

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ



**Απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων από σταυρανθή λαχανικά.
Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός με συνθετικές και
φασματοσκοπικές τεχνικές**

Παναγιώτα-Κυριακή Φ. Ρεβέλου

Τεχνολόγος Τροφίμων

MSc στην Οργανική Σύνθεση και Εφαρμογές στη Χημική Βιομηχανία

Επιβλέπουσα: Βιολέττα Κωνσταντίνου-Κόκοτου

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2018

Διδακτορική Διατριβή

**Απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων από σταυρανθή λαχανικά.
Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός με συνθετικές και
φασματοσκοπικές τεχνικές**

Παναγιώτα-Κυριακή Φ. Ρεβέλου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Β. Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μέλη: Χ. Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Β. Μαγκριώτη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Β. Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Η. Κουλαδούρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Π. Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

Χ. Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Α. Χίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΧΠ

Β. Μαγκριώτη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Σ. Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Περίληψη

Τα λαχανικά της οικογένειας των σταυρανθών (τάξη Brassicales) περιέχουν πλήθος βιοδραστικών οργανικών ενώσεων. Μεταξύ αυτών ξεχωρίζουν οι γλυκοζινολίτες οι οποίοι συναντώνται στην τάξη Brassicales. Κατά την ενζυμική υδρόλυση των γλυκοζινολιτών, απελευθερώνονται αλειφατικές ισοθειοκυανικές ενώσεις, αρωματικές ισοθειοκυανικές ενώσεις και παράγωγα του ινδολίου. Στα πλαίσια της διατριβής, συντέθηκαν, η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη, οι ινδολικές ενώσεις ινδολο-3-καρβινόλη, ινδολο-3-ακετονιτρίλιο, ινδολο-3-καρβαλδεΐδη και ασκορβιγόνο. Επίσης, συντέθηκαν τα ινδολικά παράγωγα, ινδολο-3-ακεταμίδιο και τα αμιδικά συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με 10 αμινοξέα. Όλες οι ενώσεις που συντέθηκαν, μελετήθηκαν με φασματοσκοπία NMR και FT-IR και φασματομετρία μάζας HRMS. Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος άμεσου ποσοτικού προσδιορισμού του συνόλου των ισοθειοκυανικών ενώσεων στα σταυρανθή λαχανικά, με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, αξιοποιώντας την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR FT-IR), σε συνδυασμό με τον αλγόριθμο PLS. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στις απορροφήσεις της περιοχής $2150-2120\text{ cm}^{-1}$ όπου εμφανίζεται η ασύμμετρη τάση $N=C=S$. Η νέα μέθοδος αποδείχθηκε ισοδύναμη με την αντίστοιχη μέθοδο UV-Vis της βιβλιογραφίας, βάση των στατιστικών ελέγχων F και t και της % ανάκτησης, που ήταν εντός των αποδεκτών ορίων. Στη συνέχεια της διατριβής, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης, χρησιμοποιώντας φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αναλυτή μαζών Q-TOF. Η νέα μέθοδος UPLC-HRMS/MS επικυρώθηκε και χαρακτηρίστηκε από εξαιρετική γραμμικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν με UHPLC-HRMS/MS οι ενώσεις, ινδολο-3-καρβαλδεΐδη, ινδολο-3-καρβινόλη, ινδολο-3-ακετονιτρίλιο και ασκορβιγόνο. Η συγκριμένη μέθοδος αποτελεί την πρώτη εφαρμογή του UHPLC-HRMS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης σε σταυρανθή λαχανικά. Στο τελευταίο στάδιο της διατριβής πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των φυτορμονών με UHPLC-HRMS/MS σε οχτώ σταυρανθή λαχανικά. Οι ενώσεις που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη (27 ενώσεις) ήταν οι φυτορμόνες, ινδολο-3-οξικό οξύ, 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ, ιασμονικό οξύ και σαλικυλικό οξύ. Επίσης προσδιορίστηκαν, το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο, το ινδολο-3-ακεταμίδιο και η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη. Τέλος, προσδιορίστηκαν στοχευμένα τα αμιδικά συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με τα αμινοξέα αλανίνη, γλυκίνη, θρυπτοφάνη, σερίνη, μεθειονίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, βαλίνη, ασπαρτικό οξύ και γλουταμινικό οξύ. Η νέα μέθοδος UHPLC-HRMS/MS που αναπτύχθηκε, επέτρεψε την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση νέων ενώσεων, που δεν είναι γνωστός ο ρόλος τους στα φυτά, παρέχοντας ακρίβεια και αξιοπιστία των

αποτελεσμάτων και μπορεί να εφαρμοστεί για την μελέτη των φυτορμονών και σε άλλα είδη φυτών.

Επιστημονική περιοχή: Γεωπονικές Επιστήμες, Ανάλυση Φυσικών Προϊόντων

Λέξεις κλειδιά: Γλυκοζινολίτες, Ισοθιοκυανικές Ενώσεις, Ινδολικές Ενώσεις, Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας, Σταυρανθή Λαχανικά

“Isolation of bioactive compounds from cruciferous vegetables. Identification and quantification by synthetic and spectroscopic techniques”

Abstract

Vegetables of the cruciferae family (order Brassicales) contain a number of organic compounds with biological activity. Among these are glucosinolates, which are found only in the order Brassicales. Upon enzymatic hydrolysis of glucosinolates, aliphatic isothiocyanates, aromatic isothiocyanates and indole derivatives, are released. The isothiocyanate sulforaphane and the indole derivatives, indole-3-carbinol, indole-3-acetonitrile, indole-3-carbaldehyde and ascorbigen were synthesized and used as standards for the developing of new qualitative and quantitative methods applied in cruciferous vegetables. Indole derivatives such as indole-3-acetamide and amide conjugates of indole-3-acetic acid with 10 amino acids were also synthesized. All synthesized compounds were studied by NMR and FT-IR spectroscopy and HRMS. A new method for the direct quantification of total isothiocyanate content of cruciferous vegetables by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, using the Attenuated Total Reflection (ATR) technique, in combination with the PLS algorithm, was developed. The assay was based on the absorbance of the 2150-2120 cm^{-1} region, where the asymmetric stretching of $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ appears. The new method proved equivalent to the UV-Vis literature method, based on the *F* and *t* statistical tests and the % recovery, which were within the acceptable limits. Subsequently, a new method for the simultaneous determination of sulforaphane and indole-3-carbinol was developed, using a high-resolution mass spectrometer with a Q-TOF mass analyzer. The new UPLC-HRMS/MS method was validated and characterized by excellent linearity and low detection limits. The new UPLC-HRMS/MS method is the first that utilizes high resolution mass spectrometry for the simultaneous determination of sulforaphane and indole-3-carbinol in cruciferous vegetables. Indole-3-carbaldehyde, indole-3-carbinol, indole-3-acetonitrile and ascorbigen, were determined by UHPLC-HRMS/MS. The indole derivatives were studied in extracts of 7 cruciferous vegetables (red and white cabbage, green and purple broccoli, turnip, radish, white cauliflower) through a new UHPLC-HRMS/MS method which was developed for the study. This method is the first application of UHPLC-HRMS/MS for the simultaneous determination of glucobrassicin hydrolysis products in cruciferous vegetables. In the final stage of dissertation, a determination of phytohormones in eight cruciferous vegetables was carried out. The compounds included in the study (27 compounds) were indole-3-acetic acid, 4-chloroindole-3-acetic acid, jasmonic acid and salicylic acid. Indole-3-acetonitrile and indole-3-acetamide and indole-3-carbaldehyde were also studied. Finally, the amide conjugates of indole-3-acetic acid with the amino acids alanine, glycine, tryptophan, serine, methionine, tyrosine,

phenylalanine, valine, aspartic acid and glutamic acid were studied. The new UHPLC-HRMS/MS method enabled the identification and quantification of new compounds with unknown role in plants, providing accuracy and reliability of results and can be applied for the study of phytohormones in other plant species.

Scientific discipline: Agricultural Sciences, Natural Products Analysis

Keywords: Glucosinolates, Isothiocyanates, Indoles, High Resolution Mass Spectrometry, Cruciferous Vegetables

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Abstract

| | |
|---|----------|
| Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή | 1 |
| A.1. Σταυρανθή Λαχανικά | 1 |
| A.1.1. Ιστορικά Στοιχεία | 1 |
| A.1.2. Βοτανική Προέλευση | 1 |
| A.1.3. Βοτανική Περιγραφή | 3 |
| A.1.3.1. Γενικά | 3 |
| A.1.3.2. Λάχανο | 3 |
| A.1.3.3. Μπρόκολο | 4 |
| A.1.3.4. Κουνουπίδι | 5 |
| A.1.3.5. Ρέβα | 6 |
| A.1.3.6. Ρόκα | 6 |
| A.1.3.7. Ρεπάνι | 7 |
| A.1.3.8. Νεροκάρδαμο | 7 |
| A.1.4. Θρεπτική Αξία | 8 |
| A.2. Γλυκοζινολίτες | 10 |
| A.2.1. Γενικά | 10 |
| A.2.2. Βιοσύνθεση | 13 |
| A.2.3. Ενζυμική Υδρόλυση Γλυκοζινολιτών | 15 |
| A.2.4. Προϊόντα Ενζυμικής Υδρόλυσης Γλυκοζινολιτών με Βιολογική Δράση | 17 |
| A.2.4.1. Ισοθειοκυανικές Ενώσεις | 17 |
| A.2.4.2. Παράγωγα του Ινδολίου | 20 |
| A.2.5. Αναλυτικές Μέθοδοι Προσδιορισμού των Προϊόντων της Ενζυμικής Υδρόλυσης των Γλυκοζινολιτών | 21 |
| A.2.6. Περιεκτικότητα των Προϊόντων Ενζυμικής Υδρόλυσης των Γλυκοζινολιτών στα Σταυρανθή Λαχανικά | 22 |

| | |
|--|-----------|
| A.3. Φυτικές Ορμόνες | 24 |
| A.3.1. Γενικά | 24 |
| A.3.2. Αυξίνες | 25 |
| A.3.3. Ιασμονικό Οξύ | 29 |
| A.3.4. Σαλικυλικό Οξύ | 30 |
| A.3.5. Αναλυτικές Μέθοδοι Προσδιορισμού Φυτικών Ορμονών | 32 |
| A.4. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με Μετασχηματισμό Fourier | 33 |
| A.4.1. Γενικά | 33 |
| A.4.2. Φασματοφωτόμετρο FT-IR | 34 |
| A.4.3. Μετασχηματισμός Fourier | 36 |
| A.4.4. Επεξεργασία Φασμάτων FT-IR | 37 |
| A.4.4.1. Διόρθωση Βασικής Γραμμής | 37 |
| A.4.4.2. Αυτόματη Εξομάλυνση | 39 |
| A.4.4.3. Αποσυνέλιξη | 40 |
| A.4.5. Τεχνική Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR) | 41 |
| A.4.6. Μερική Παλινδρόμηση Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS) | 42 |
| A.5. Φασματομετρία Μάζας | 43 |
| A.5.1. Γενικά | 43 |
| A.5.2. Ιστορικά Στοιχεία | 45 |
| A.5.3. Μέρη Φασματογράφου Μάζας | 45 |
| A.5.3.1. Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος | 46 |
| A.5.3.2. Πηγές Ιόντων | 47 |
| A.5.3.3. Αναλυτές Μάζας | 52 |
| A.5.3.4. Ανιχνευτές | 61 |
| A.5.3.5. Σύστημα Κενού | 62 |
| A.5.4. Θραυσματοποίηση MS/MS | 63 |
| A.5.5. Συλλογή και Επεξεργασία Αποτελεσμάτων στη Φασματομετρία Μάζας | |
| Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας | 64 |
| A.6. Βιβλιογραφία | 67 |
| Κεφάλαιο Β. Στόχοι της Διατριβής | 81 |

| | |
|--|-----------|
| Κεφάλαιο Γ. Σύνθεση των Ισοθειοκυανικών Ενώσεων και των Παραγώγων του Ινδολίου | 85 |
| Γ.1. Σύνθεση Ισοθειοκυανικών και Ινδολικών Ενώσεων | 85 |
| Γ.2. Σύνθεση των Συζευγμάτων του Ινδολο-3-οξικού Οξέος με Αμινοξέα | 86 |
| Γ.3. Βιβλιογραφία | 92 |
| Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθειοκυανικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανθή Λαχανικά | 94 |
| Δ.1. Μέθοδος Εκχύλισης των Προϊόντων Ενζυμικής Υδρόλυσης των Γλυκοζινολιτών από Σταυρανθή Λαχανικά | 94 |
| Δ.2. Ανάπτυξη Μεθόδου Προσδιορισμού των Ολικών Ισοθειοκυανικών Ενώσεων με Φασματοσκοπία Υπερύθρου. Εφαρμογή σε δείγματα μπρόκολου | 97 |
| Δ.2.1. Υλικά και Όργανα | 97 |
| Δ.2.2. Παρασκευή Εκχυλισμάτων | 98 |
| Δ.2.3. Ανάπτυξη μεθόδου με Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) | 99 |
| Δ.2.3.1. Λήψη των Φασμάτων FT-IR των Προτύπων Διαλυμάτων Σουλφοραφάνης και των Εκχυλισμάτων Μπρόκολου | 100 |
| Δ.2.3.2. Επεξεργασία των Φασμάτων FT-IR | 100 |
| Δ.2.3.3. Φασματοσκοπική Ανάλυση με FT-IR | 101 |
| Δ.2.3.4. Στατιστική Επεξεργασία των Φασμάτων FT-IR και Εφαρμογή του Αλγόριθμου PLS | 103 |
| Δ.2.4. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis) | 106 |
| Δ.2.5. Σύγκριση των μεθόδων φασματοσκοπίας UV-Vis και FT-IR | 109 |
| Δ.2.6. Συμπεράσματα | 112 |
| Δ.3. Ανάπτυξη Μεθόδου Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού Σουλφοραφάνης και Ινδολο-3-καρβινόλης με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Εφαρμογή σε Δείγματα Μπρόκολου | 113 |
| Δ.3.1. Υλικά και Όργανα | 113 |
| Δ.3.2. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων | 114 |
| Δ.3.3. Παρασκευή Εκχυλισμάτων | 114 |

| | |
|--|-----|
| Δ.3.4. Συνθήκες UPLC-HRMS/MS | 114 |
| Δ.3.5. Μελέτη με Συνδυασμό Υγρής Χρωματογραφίας και Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας | 115 |
| Δ.3.6. Επικύρωση Μεθόδου-Γραμμικότητα και Όρια Ανίχνευσης | 118 |
| Δ.3.7. Ανάλυση Εκχυλισμάτων Μπρόκολου | 120 |
| Δ.3.8. Συμπεράσματα | 124 |
| Δ.4. Ανάπτυξη Μεθόδου Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού Ινδολικών Παραγώγων με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Εφαρμογή σε Σταυρανθή Λαχανικά | 125 |
| Δ.4.1. Υλικά και Όργανα | 125 |
| Δ.4.2. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων | 126 |
| Δ.4.3. Παρασκευή Εκχυλισμάτων | 126 |
| Δ.4.4. Συνθήκες UHPLC-HRMS/MS | 127 |
| Δ.4.5. Μελέτη με Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας | 128 |
| Δ.4.6. Επικύρωση Μεθόδου-Γραμμικότητα και Όρια Ανίχνευσης | 135 |
| Δ.4.7. Ανάλυση Εκχυλισμάτων Σταυρανθών | 138 |
| Δ.4.8. Συμπεράσματα | 144 |
| Δ.5. Βιβλιογραφία | 145 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε. Προσδιορισμός των Φυτορμονών στα Σταυρανθή Λαχανικά | 148 |
| Ε.1. Υλικά και Όργανα | 148 |
| Ε.2. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων | 151 |
| Ε.3. Παρασκευή Εκχυλισμάτων | 151 |
| Ε.4. Συνθήκες UHPLC-HRMS/MS | 151 |
| Ε.5. Μελέτη με Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας | 152 |
| Ε.6. Επικύρωση Μεθόδου-Γραμμικότητα και Όρια Ανίχνευσης | 164 |
| Ε.7. Ανάλυση Εκχυλισμάτων Σταυρανθών | 166 |
| Ε.8. Συμπεράσματα | 179 |
| Ε.9. Βιβλιογραφία | 181 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ. Πειραματικές Μέθοδοι Σύνθεσης Οργανικών Ενώσεων | 184 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| ΣΤ.1. Γενικό Πειραματικό Μέρος | 184 |
| ΣΤ.2. Πειραματικές Μέθοδοι | 186 |
| ΣΤ.3. Βιβλιογραφία | 231 |
| Κατάλογος Εικόνων | 233 |
| Κατάλογος Πινάκων | 234 |
| Κατάλογος Σχημάτων | 236 |
| Συντμήσεις-Αρτικόλεξα | 243 |
| Παράρτημα | 245 |

Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

A.1. Σταυρανθή Λαχανικά

A.1.1. Ιστορικά Στοιχεία

Τα πιο γνωστά σταυρανθή λαχανικά ανήκουν στο γένος *Brassica* και περιλαμβάνουν το μπρόκολο, το λάχανο, τα λαχανάκια Βρυξελών, το κουνουπίδι, τα γογγύλια, τη μουστάρδα, τη λαχανίδα κ.α.¹ Λιγότερο γνωστά είδη είναι το κάρδαμο της Βιρτζίνια από το Μεξικό και το maca από τις Άνδεις.² Ακόμα και η ελαιοκράμβη από την οποία προέρχεται το κραμβέλαιο (λάδι κανόλα) αποτελεί μέλος της οικογένειας των σταυρανθών.³ Ο Κάρολος Λινναίος, Σουηδός βοτανολόγος του 18^{ου} αιώνα έδωσε την ονομασία σταυρανθή γιατί σε όλα τα μέλη της οικογένειας τα φύλλα έχουν σταυροειδές σχήμα. Σήμερα η οικογένεια των σταυρανθών καλείται *Brassicaceae*.¹ Παρά το γεγονός ότι τα σταυρανθή λαχανικά δεν ήταν στο βασικό διαιτολόγιο των Παλαιολιθικών προγόνων μας εν τούτοις αναγνωρίστηκαν ως φαρμακευτικά φυτά και διαδόθηκαν ευρέως κατά τον Μεσαίωνα από τους Έλληνες και τους Ρωμαίους. Διατηρημένοι σπόροι σταυρανθών σε αρχαία Κινεζικά χωριά χρονολογούνται από το 4000 και 5000 π.Χ. και στο Πακιστάν από το 2000 π.Χ. Κινεζικά και σανσκριτικά γραπτά αναφέρουν τη χρήση των σταυρανθών την πρώτη και τη δεύτερη χιλιετηρίδα π.Χ., ενώ ο Ιπποκράτης και ο Πυθαγόρας κατέγραψαν τη χρήση της μουστάρδας ως μπαχαρικό, αλλά και ως φάρμακο έναντι του δηλητηρίου του σκορπιού. Στοιχεία για την καλλιέργεια του λάχανου, του μπρόκολου και της λαχανίδας υπάρχουν σε γραπτά των πρώτων χρόνων της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, ενώ η καλλιέργεια του κουνουπιδιού αναφέρεται σε αραβικά γραπτά του 12^{ου} και 13^{ου} αιώνα.⁴ Τα σταυρανθή συνέχισαν τη διεθνή διάδοση τους στους επόμενους αιώνες. Οι πρώτοι Αμερικανοί έποικοι έφεραν είδη σταυρανθών από την Ευρώπη στο Jamestown της Βιρτζίνια. Αν και ορισμένα σταυρανθή όπως το maca των Άνδεων και το Ιαπωνικό wasabi, εξαιτίας των αυστηρών περιβαλλοντικών απαιτήσεων παρέμειναν ως τοπικές καλλιέργειες, ωστόσο τα υπόλοιπα είδη σταυρανθών έχουν διαδοθεί πλέον σε όλο τον κόσμο.

A.1.2. Βοτανική Προέλευση

Τα σταυρανθή λαχανικά ανήκουν στην τάξη *Brassicales*, στη βοτανική οικογένεια των *Brassicaceae*. Η τάξη *Brassicales* αριθμεί 16 οικογένειες (πίνακας Α.1).⁵ Η οικογένεια των *Brassicaceae* περιέχει 350 γένη (π.χ. *Brassica*, *Raphanus*, *Armoracia*, *Nasturtium*, *Wasabia*, *Alyssum*, *Arabidopsis* κ.α.), τα οποία αποτελούνται συνολικά

από 3000 είδη. Τα περισσότερα από αυτά τα είδη δεν είναι βρώσιμα όμως υπάρχουν και ορισμένοι τύποι εδώδιμων λαχανικών όπως το μπρόκολο, το λάχανο, η ρόκα, το νεροκάρδαμο, το κουνουπίδι, η ρέβα, το ρεπάνι κ.α.

Πίνακας Α.1. Οικογένειες που ανήκουν στην τάξη *Brassicales*⁵

| | | | |
|---------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <i>Akaniaceae</i> | <i>Caricaceae</i> | <i>Limnanthaceae</i> | <i>Salvadoraceae</i> |
| <i>Bataceae</i> | <i>Cleomaceae</i> | <i>Moringaceae</i> | <i>Setchellanthaceae</i> |
| <i>Brassicaceae</i> | <i>Gyrostemonaceae</i> | <i>Pentadiplandraceae</i> | <i>Tovariaceae</i> |
| <i>Capparaceae</i> | <i>Koeberliniaceae</i> | <i>Resedaceae</i> | <i>Tropealaceae</i> |

Στον πίνακα Α.2 παρουσιάζονται τα κύρια σταυρανθή εδώδιμα λαχανικά με τη βοτανολογική τους ταξινόμηση.⁶

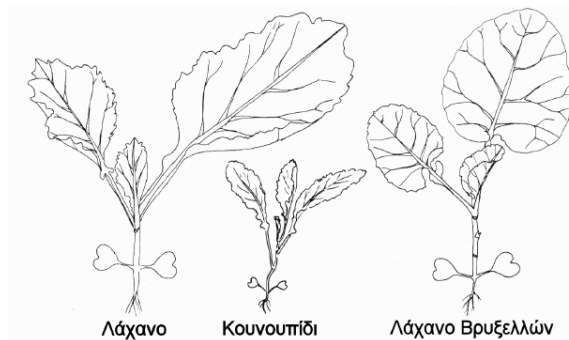
Πίνακας Α.2. Σταυρανθή λαχανικά με βοτανολογική ταξινόμηση⁶

| Γένος | Είδος & Ποικιλία | Κοινή ονομασία |
|-------------------|---|---------------------|
| <i>Brassica</i> | <i>B.oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | Κουνουπίδι |
| | <i>B.oleracea</i> var. <i>capitata</i> | Λάχανο |
| | <i>B.oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> | Λαχανάκια Βρυξελλών |
| | <i>B.oleracea</i> var. <i>italica</i> | Μπρόκολο |
| | <i>B.oleracea</i> var. <i>sabauda</i> | Λάχανο Savoy |
| | <i>B.oleracea</i> var. <i>acephala</i> | Λαχανίδα |
| | <i>B.rapa</i> var. <i>chinensis</i> | Κινέζικο Λάχανο |
| | <i>B.rapa</i> var. <i>pekinensis</i> | |
| | <i>B.rapa</i> var. <i>rapa</i> | Ρέβα |
| | <i>B.napus</i> var. <i>oleifera</i> | Κανόλα |
| | <i>B.alba</i> | Λευκή Μουστάρδα |
| | <i>B.juncea</i> | Ινδική Μουστάρδα |
| <i>Raphanus</i> | <i>R.sativus</i> | Ρεπάνι |
| <i>Armoracia</i> | <i>A.rusticana</i> | Αγριοράπανο |
| <i>Nasturtium</i> | <i>N.officinale</i> | Νεροκάρδαμο |
| <i>Lepidium</i> | <i>L.sativum</i> | Κάρδαμο |
| <i>Eruca</i> | <i>E.sativa</i> | Ρόκα |
| <i>Wasabia</i> | <i>W.japonica</i> | Wasabi |

A.1.3. Βοτανική Περιγραφή

A.1.3.1. Γενικά

Η οικογένεια *Brassicaceae* αποτελείται κυρίως από ποώδη φυτά με ετήσια, διετή ή πολυετή διάρκεια ζωής. Ωστόσο, γύρω από τη Μεσόγειο, υπάρχουν και ξυλώδη θάμνοι με 1-3 μέτρα ύψος, π.χ. στη Βόρεια Αφρική (*Zilla spinosa* και *Ptilotrichum spinosum*), στη Δαλματία (*Dendralysson* και *Cramboxylon*) και στα Κανάρια νησιά (*Dendrosinapis*, *Descurainia*, *Parolinia*, *Stanleya*). Η δομή των ανθέων είναι εξαιρετικά ομοιόμορφη σε όλη την οικογένεια. Η διάκριση των διαφόρων ειδών του γένους *Brassica* είναι δύσκολη όταν τα φυτά είναι νεαρά (εικόνα Α.1). Ο καρπός είναι συχνά ο πιο σημαντικός διαγνωστικός χαρακτήρας των φυτών αυτής της οικογένειας. Τα κυριότερα καλλιεργούμενα λαχανικά που ανήκουν στην οικογένεια *Brassicaceae* είναι το λάχανο, το μπρόκολο, το κουνουπίδι, το λάχανο Βρυξελλών, η ρόκα, η ρέβα, το ραπανάκι και το λάχανο της Κίνας.⁷



Εικόνα Α.1. Νεαρά φυτά του γένους *Brassica*

A.1.3.2. Λάχανο (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

Το λάχανο είναι φυτό γρήγορης ανάπτυξης με επιφανειακό ριζικό σύστημα (12.5-30 εκ.). Τα φύλλα είναι μεγάλα, πλατιά και μπορεί να έχουν κόκκινες αποχρώσεις, ανάλογα με την ποικιλία. Η κεφαλή είναι συνεκτική, μεγάλου μεγέθους, σφαιροειδής και σχηματίζεται από αλληλοεπικαλύψεις των φύλλων. Ο χρωματισμός ποικίλει από ανοιχτό πράσινο μέχρι κοκκινωπό. Όταν η κεφαλή παραμείνει στο έδαφος και δεν γίνει η συγκομιδή, τότε ανοίγει και από το κέντρο της εμφανίζεται το ανθικό στέλεχος και



Εικόνα Α.2. Νεαρό φυτό λάχανου

πάνω σε αυτό οι ταξιανθίες. Ο σχηματιζόμενος σπόρος κατά τη φάση της πλήρους ωρίμανσης (Αύγουστος) αποκτά σκούρο χρώμα. Οι διάφορες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο μπορεί να διαφέρουν ως προς το χρώμα των φύλλων της κεφαλής (πράσινο, ιώδες, κόκκινο, λευκό), την ανθεκτικότητα στην πρόωρη άνθηση και το σχίσσιμο της κεφαλής. Οι χρησιμοποιούμενες ποικιλίες μπορεί να είναι κατάλληλες για καλοκαιρινή (πρώιμη παραγωγή), φθινοπωρινή (μεσοπρώιμη παραγωγή) ή χειμωνιάτικη καλλιέργεια (όψιμη παραγωγή). Η καλύτερη προστασία του λάχανου εξασφαλίζεται από τα εξωτερικά του φύλλα. Όσο πιο συμπαγές είναι το λάχανο τόσο αυξάνεται η διάρκεια συντήρησής του. Σε θερμοκρασία 1 °C και σχετική υγρασία 70-80% μπορεί να συντηρηθεί για μερικές εβδομάδες.⁷



Εικόνα Α.3. Τύποι λάχανου

A.1.3.3. Μπρόκολο (*Brassica oleracea* var. *Italica*)

Το μπρόκολο αναπτύσσεται σε ύψος 45-60 εκ. ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη ποικιλία ή το υβρίδιο. Έχει σχετικά επιφανειακό ριζικό σύστημα (45 εκ.). Τα φύλλα είναι μεγάλα, πλατιά και σαρκώδη. Η βασική διαφορά από το κουνουπίδι είναι ότι το μπρόκολο εκτός από την κεντρική ανθοκεφαλή σχηματίζει και δευτερεύουσες ανθοκεφαλές στις μασχάλες των φύλλων, που είναι ακανόνιστου σχήματος. Η κεντρική ανθοκεφαλή έχει μια διάμετρο από 7.5 έως 20 εκ. Ενώ οι δευτερεύουσες είναι μικρότερης διαμέτρου. Εάν η ανθοκεφαλή παραμείνει στο έδαφος μετά τη συγκομιδή, τότε τα ανθικά στελέχη επιμηκύνονται για να δώσουν τα άνθη. Φυτά με μεγάλα πράσινα φύλλα παράγουν μικρές ανθοκεφαλές πάνω σε ψιλό ανθικό



Εικόνα Α.4.

Άνθηση στο μπρόκολο

στέλεχος. Οι *sprouting* τύποι μπρόκολου φέρουν πολλές ανθοκεφαλές σχετικά μικρές με περισσότερη ή λιγότερη ομοιομορφία. Οι τύποι μπρόκολου *calabrese* φέρουν μια μεγάλη κεντρική ανθοκεφαλή (Εικόνα Α.5).

Μπρόκολο τύπου *calabrese*Μπρόκολο τύπου *sprouting***Εικόνα Α.5.** Τύποι μπρόκολου

Η διάρκεια της καλλιέργειας του μπρόκολου από τη σπορά έως τη συγκομιδή είναι περίπου 3 έως 4.5 μήνες και εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη ποικιλία και την εποχή της σποράς. Τα φρέσκα μπρόκολα σε συνθήκες με θερμοκρασία 0 °C και σχετική υγρασία 95-98% διατηρούνται για 2 εβδομάδες περίπου, ενώ σε συνθήκες με 0-4.5 °C και σχετική υγρασία 80% το χρονικό διάστημα της συντήρησης τους μπορεί να φτάσει τον 1 μήνα.⁷

A.1.3.4. Κουνουπίδι (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)

Το κουνουπίδι αναπτύσσεται σε ύψος 45-60 εκ. (ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη ποικιλία ή υβρίδιο) και έχει σχετικά επιφανειακό ριζικό σύστημα (45 εκ). Τα φύλλα είναι μεγάλα σαρκώδη και στενότερα από το λάχανο. Η ανθοκεφαλή αποτελείται από μεγάλου μεγέθους ανθικά στελέχη, είναι συμπαγής και έχει χρώμα λευκό ή υποκίτρινο.

Εάν η ανθοκεφαλή παραμείνει στο έδαφος μετά τη συγκομιδή, τότε τα ανθικά στελέχη επιμηκύνονται για να δώσουν τα άνθη. Οι διάφορες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο μπορεί να διαφέρουν ως προς το σχήμα των φύλλων και το χρώμα της ανθοκεφαλής. Η διάρκεια της καλλιέργειας του κουνουπιδιού από τη σπορά έως τη συγκομιδή είναι περίπου 6 μήνες.⁷

**Εικόνα Α.6.** Άνθηση στο κουνουπίδι

A.1.3.5. Ρέβα (*Brassica rapa* var. *rapa*)

Η ρέβα είναι φυτό χαμηλής και σχετικά γρήγορης ανάπτυξης. Τα φύλλα φέρουν λοβούς και η γογγυλόριζα είναι σφαιρική ή πεπλατυσμένη και μικρού σχετικά μεγέθους. Το ανθικό στέλεχος εκπτύσσεται από το κέντρο της κορυφής της γογγυλόριζας και φτάνει σε ύψος 1 μ. Πάνω στις διακλαδώσεις σχηματίζονται οι ταξιανθίες που φέρουν πολλά ερμαφρόδιτα άνθη. Οι σχηματιζόμενοι σπόροι έχουν σκούρο χρώμα κατά την ωρίμανση τους. Οι χρησιμοποιούμενες ποικιλίες, διακρίνονται για το σχετικά μικρό μέγεθος γογγυλόριζας και το μικρό διάστημα καλλιέργειας τους. Η διάρκεια της καλλιέργειας, από τη σπορά έως τη συγκομιδή, κυμαίνεται από 2-3 μήνες, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη ποικιλία.

**Εικόνα Α.7.** Ρέβες

Η ρέβα μπορεί να συντηρηθεί για χρονικό διάστημα 1-2 μήνες σε θάλαμο με θερμοκρασία 0-1.5 °C και σχετική υγρασία 95%.⁷

A.1.3.6. Ρόκα (*Eruca sativa*)

Η ρόκα είναι χειμωνιάτικο φυτό και ανθίζει από το Μάρτιο έως τον Ιούνιο. Το ύψος του φυτού φτάνει τα 20-100 εκατοστά με βλαστούς που διακλαδίζονται. Τα άνθη του φυτού είναι μπεζ με διάμετρο δύο έως τέσσερα εκατοστά και σχηματίζουν ταξιανθία κόρυμβο, με την τυπική δομή του άνθους των σταυρανθών. Τα πέταλα είναι μπεζ, με μωβ πορφυρές νευρώσεις και οι στήμονες κίτρινοι. Το φυτό αποβάλλει τα σέπαλά του, αμέσως μετά την άνθιση. Τα φύλλα του είναι πτεροειδή, έλοβα με τέσσερις έως δέκα μικρούς, πλευρικούς λοβούς και ένα μεγάλο, ακραίο λοβό. Ο καρπός είναι μικρός, κωνικός, ραμφοειδής και περιέχει αρκετούς ωσειδείς σπόρους κίτρινου χρώματος. Ο βλαστός και τα φύλλα της ρόκας τρώγονται σε διάφορες σαλάτες, ενώ σε ορισμένες περιοχές μαγειρεύονται. Η ρίζα του φυτού είναι πασσαλώδης. Πολλαπλασιάζεται με σπόρο. Η σπορά γίνεται από την Άνοιξη μέχρι το Φθινόπωρο. Ευδοκίμει στα περισσότερα εδάφη με μικρή αντοχή στο pH (6-7). Καλλιεργείται για τα μικρά της φύλλα και καταναλώνεται ως σαλάτα από μόνη της, ή σε ανάμειξη με άλλες σαλάτες. Στην περίπτωση αυτή, η συγκομιδή πραγματοποιείται περίπου δεκαοχτώ

**Εικόνα Α.8.**

Ανθισμένα φυτά ρόκας

ημέρες από την σπορά. Τα ώριμα φυτά συγκομίζονται τριάντα με πενήντα ημέρες από την σπορά και πωλούνται σε ματσάκια.⁷

A.1.3.7. Ρεπάνι (*Raphanus sativus*)

Καλλιεργείται για τη σαρκώδη ρίζα του. Ο βλαστός του έχει διατομή σε σχήμα δίσκου, όπως του καρότου και των τεύτλων. Τα φύλλα του είναι τριχωτά, συνήθως ακέραια και φύονται σαν ρόδα κοντά στο δίσκο. Η σαρκώδης ρίζα του (ριζοκόνδυλος) έχει σχήμα σφαιρικό ή κωνικό και μακρύ ανάλογα με την ποικιλία. Το χρώμα της ρίζας ποικίλει από λευκό, κόκκινο, ροζ και πορφυρό. Το βάρος της είναι από μερικά γραμμάρια και φτάνει μέχρι ένα κιλό στη ποικιλία dalkon της Ιαπωνίας. Τα ρεπάνια είναι ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες. Οι διάφορες ποικιλίες διακρίνονται σε ανοιξιάτικες που δίνουν ριζοκόνδυλους για λίγο χρόνο και 30 περίπου μέρες μετά τη σπορά. Η γεύση τους είναι ήπια και καυστική. Οι καλοκαιρινές ποικιλίες δίνουν ριζοκόνδυλους για αρκετό χρονικό διάστημα και 40-50 μέρες μετά τη σπορά. Στις χειμωνιάτικες ποικιλίες οι ρίζες αναπτύσσονται αργά και έχουν πιο καυτερή γεύση. Η σπορά των ρεπανιών αρχίζει από την Άνοιξη και συνεχίζεται κάθε 10 μέρες για να υπάρχει συνεχής παραγωγή. Όταν αποκτήσουν μέγεθος κατάλληλο τότε ξεριζώνονται και στέλνονται στο εμπόριο. Μετά τη συγκομιδή τα ρεπάνια διατηρούνται για 2-3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και για 2 μήνες στους 0 °C και 90-95% σχετική υγρασία.⁷



Εικόνα Α.9. Ρεπάνια

A.1.3.8. Νεροκάρδαμο (*Nasturtium officinale*)

Το νεροκάρδαμο είναι ταχέως αναπτυσσόμενο, υδρόβιο, πολυετές φυτό της χειμερινής περιόδου. Εάν δεν γίνει συγκομιδή μπορεί να αυξηθεί σε ύψος από 50 έως 120 εκατοστά. Είναι κατάλληλο για υδροπονική καλλιέργεια σε ελαφρώς αλκαλικό νερό. Τα φύλλα του μπορούν να αποθηκευτούν φρέσκα για περιορισμένο χρονικό διάστημα. Σε ακατάλληλους χειρισμούς μετά τη συγκομιδή τα φύλλα του γίνονται κίτρινα και γλοιώδη. Είναι πολύ ευαίσθητο φυτό και χρειάζεται κατάλληλες συνθήκες ψύξης. Αποθηκεύεται στους 0 °C με υψηλή σχετική υγρασία (95-100%) για περίπου 3-4 ημέρες.⁷



Εικόνα Α.10.
Νεροκάρδαμο

A.1.4. Θρεπτική Αξία

Η θρεπτική αξία διαφόρων ειδών της οικογένειας *Brassicaceae* παρουσιάζεται στον πίνακα Α.3.⁷ Παρατηρούμε ότι αυτά τα είδη των σταυρανθών έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες, λιπαρά και υδατάνθρακες. Είναι καλή πηγή πρωτεϊνών με υψηλή βιολογική αξία και περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και ιδιαίτερα αυτά που περιέχουν θείο. Το μπρόκολο περιέχει το υψηλότερο ποσοστό πρωτεϊνών ενώ το λάχανο βρυξελλών έχει τη μεγαλύτερη ποσότητα σε διαιτητικές ίνες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα λαχανικά.

Πίνακας Α.3. Μέση σύσταση θρεπτικών συστατικών σε διάφορα είδη σταυρανθών⁷

| Είδος Λαχανικού Συστατικό ανά 100 g νωπού προϊόντος | Λάχανο | Κουνουπίδι | Μπρόκολο | Λάχανο Βρυξελλών | Ραπανάκι |
|---|--------|------------|----------|---------------------|----------|
| Νερό (g) | 90.7 | 88.4 | 88.2 | 84.3 | 95.4 |
| Ολικό Άζωτο (g) | 0.2 | 0.6 | 0.7 | 0.6 | 0.1 |
| Πρωτεΐνες (g) | 1.4 | 3.6 | 4.4 | 3.5 | 0.7 |
| Λίπη (g) | 0.2 | 0.9 | 0.9 | 1.4 | 0.2 |
| Υδατάνθρακες (g) | 5.0 | 3.0 | 1.8 | 4.1 | 1.9 |
| Ενεργειακό περιεχόμενο (KJ) | 113 | 142 | 138 | 114 | 49 |
| Άμυλο (g) | 0.1 | 0.4 | 0.1 | 0.1 | Ίχνη |
| Ολικά Σάκχαρα (g) | 4.9 | 2.5 | 1.5 | 3.8 | 1.9 |
| Διαιτητικές Ίνες (g) | 2.1 | 1.8 | 2.6 | 3.1 | 1.9 |

Τα σταυρανθή λαχανικά είναι εξαιρετική πηγή μεταλλικών στοιχείων όπως ασβέστιο, σίδηρος, μαγνήσιο, νάτριο, κάλιο και φώσφορος, τα περισσότερα από τα οποία είναι σε απορροφήσιμη μορφή. Από τον πίνακα Α.4 φαίνεται ότι η καλύτερη πηγή μετάλλων συγκριτικά με τα υπόλοιπα λαχανικά είναι το μπρόκολο καθώς περιέχει το υψηλότερο ποσοστό μαγνησίου, ασβεστίου, φώσφορου, σιδήρου και θείου.

Πίνακας Α.4. Μέση σύσταση μεταλλικών στοιχείων σε διάφορα είδη σταυρανθών⁷

| Είδος Λαχανικού Μέταλλα Ανά 100 g νωπού προϊόντος | Λάχανο | Κουνουπίδι | Μπρόκολο | Λάχανο Βρυξελλών | Ραπανάκι |
|---|--------|------------|----------|---------------------|----------|
| Νάτριο (mg) | 7 | 9 | 8 | 6 | 11 |
| Κάλιο (mg) | 240 | 380 | 370 | 450 | 240 |
| Μαγνήσιο (mg) | - | 17 | 22 | 8 | 5 |
| Ασβέστιο (mg) | 49 | 21 | 56 | 26 | 19 |
| Φώσφορος (mg) | 29 | 64 | 87 | 77 | - |
| Σίδηρος (mg) | 0.5 | 0.7 | 1.7 | 0.7 | 0.6 |
| Θείο (mg) | 54 | 55 | 130 | 93 | 38 |
| Μαγγάνιο (mg) | 0.2 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | - |
| Χλώριο (mg) | 40 | 28 | 100 | 38 | - |

Σημαντικά ποσοστά βιταμινών περιέχονται στα σταυρανθή λαχανικά (πίνακας Α.5). Το επίπεδο της βιταμίνης C ποικίλει από 17 έως 115 mg/100 g νωπού προϊόντος και του καροτενίου από 40 έως 575 mg/100 g νωπού προϊόντος. Επίσης τα λαχανικά αυτά είναι πλούσια σε φολικό οξύ (34-134 μg/100 g νωπού προϊόντος).

Πίνακας Α.5. Μέση σύσταση βιταμινών σε διάφορα είδη σταυρανθών⁷

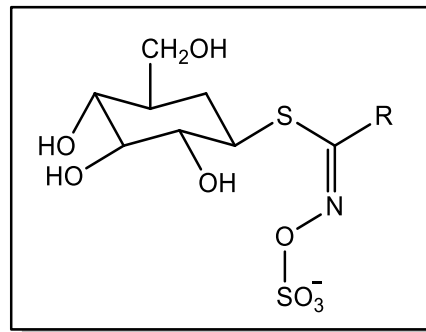
| Είδος Λαχανικού Βιταμίνες Ανά 100 g νωπού προϊόντος | Λάχανο | Κουνουπίδι | Μπρόκολο | Λάχανο Βρυξελλών | Ραπανάκι |
|---|--------|------------|----------|---------------------|----------|
| Νιασίνη (mg) | 0.3 | 0.6 | 0.9 | 0.2 | 0.4 |
| Βιταμίνη Β6 (mg) | 0.2 | 0.3 | 0.1 | 0.4 | 0.1 |
| Βιταμίνη Β12 (μg) | - | - | - | - | - |
| Φολικό Οξύ (μg) | 34 | 66 | 90 | 135 | 38 |
| Παντοθενικό Οξύ (mg) | 0.2 | 0.6 | - | 1.0 | 0.2 |
| Βιοτίνη (μg) | 0.1 | 1.5 | - | 0.4 | - |
| Καροτένιο (μg) | 40 | 50 | 575 | 215 | Ίχνη |
| Βιταμίνη Α (mg) | - | - | 0.1 | - | - |
| Βιταμίνη D (μg) | - | - | - | - | - |
| Θειαμίνη (mg) | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.03 |
| Ριβοφλαβίνη (mg) | 0.01 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | Ίχνη |
| Βιταμίνη C (mg) | 35 | 43 | 87 | 115 | 17 |

Το λάχανο Βρυξελλών είναι πλουσιότερο σε φολικό οξύ, ριβοφλαβίνη, βιταμίνη Β₆ και βιταμίνη C, ενώ το μπρόκολο περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα καροτενίου και νιασίνης. Τα σταυρανθή λαχανικά περιέχουν επίσης και μικρές ποσότητες βιταμίνης E. Το ποσοστό των ολικών τοκοφερολών και τοκοτριενολών κατά φθίνουσα σειρά είναι: μπρόκολο (0.8 mg/100 g) > λάχανο Βρυξελλών (0.4 mg/100 g) > κουνουπίδι (0.4 mg/100 g) > κινέζικο λάχανο (0.2 mg/100 g) > κόκκινο λάχανο (0.1 mg/100 g) > λευκό λάχανο (0.04 mg/100 g). Η τοκοφερόλη που υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό στα σταυρανθή λαχανικά είναι η α-τοκοφερόλη, εκτός από το κουνουπίδι όπου περιέχεται κυρίως η γ-τοκοφερόλη.⁷

A.2. Γλυκοζινολίτες

A.2.1. Γενικά

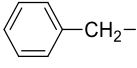
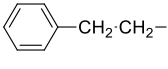




Τα σταυρανθή λαχανικά είναι εξαιρετική πηγή φυτοχημικών ενώσεων όπως καροτενοειδή, φλαβονοειδή, χλωροφύλλες, φαινολικές ενώσεις και γλυκοζινολίτες. Οι γλυκοζινολίτες (Σχήμα A.1), είναι οργανικά ανιόντα με πλευρική αλυσίδα R προερχόμενη από αμινοξύ, ένα τμήμα οξίμης συνδεδεμένο με θειογλυκόζη και ένα θειώδες ανιόν συνδεδεμένο στο άτομο του οξυγόνου.⁸



Σχήμα A.1. Δομή γλυκοζινολίτη⁸

Οι ενώσεις αυτές κατατάσσονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών και μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες με βάση την δομή του πρόδρομου αμινοξέος: 1) Αλειφατικοί γλυκοζινολίτες, που προέρχονται από μεθειονίνη, λευκίνη, βαλίνη ή ισολευκίνη, 2) Αρωματικοί γλυκοζινολίτες, που προέρχονται από φαινυλαλανίνη ή τυροσίνη, και 3) Ινδολο γλυκοζινολίτες, που προέρχονται από την θρυπτοφάνη.⁹ Στον πίνακα A.6 παρουσιάζεται η δομή και η ονομασία των κυριότερων γλυκοζινολιτών που περιέχονται στα σταυρανθή λαχανικά.⁸

Πίνακας Α.6. Κυριότεροι γλυκοζινολίτες στα σταυρανθή λαχανικά⁸

| Δομή R- ομάδας | Ημισυστηματική ονομασία R- ομάδων | Κοινή ονομασία |
|---|--|--|
| $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$ | Άλυλο (Allyl) | Σινιγκρίνη (Sinigrin) |
| $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | Βουτ-3-ένυλο (But-3-enyl) | Γλυκοναπίνη (Gluconapin) |
| $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | Πεντ-4-ένυλο (Pent-4-enyl) | Γλυκομπρασικαναπίνη (Glucobrassicinapin) |
| $\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | 3-Μεθυλθειοπρότυλο (3-Methylthiopropyl) | Γλυκοϊμπερβερίνη (Glucoibervirin) |
| $\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | 4-Μεθυλθειοβούτυλο (4-Methylthiobutyl) | Γλυκοερουκίνη (Glucoerucin) |
| $\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | 3-Μεθυλοσουλφινυλοπρότυλο (3-Methylsulphinylpropyl) | Γλυκοϊμπερίνη (Glucoiberin) |
| $\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | 4-Μεθυλοσουλφινυλοβούτυλο (4-Methylsulphinylbutyl) | Γλυκοραφανίνη (Glucoraphanin) |
| $\text{CH}_3-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | 4-Μεθυλοσουλφονυλοβούτυλο (4-Methylsulphonylbutyl) | Γλυκοερυσολίνη (Glucoerysolin) |
|  | Βένζυλο (Benzyl) | Γλυκοτροπαεολίνη (Glucotropaeolin) |
|  | Φαιναίθυλο (Phenethyl) | Γλυκοναστουρτίνη (Gluconasturtiin) |
|  | Ινδολο-3-υλομέθυλο (Indol-3-ylmethyl) | Γλυκομπρασικίνη (Glucobrassicin) |
|  | N-Μεθοξινδολο-3-υλομέθυλο (N-Methoxyindol-3-ylmethyl) | Νεογλυκομπρασικίνη (Neoglucobrassicin) |
|  | 4-Υδροξινδολο-3-υλομέθυλο (4-Hydroxyindol-3-ylmethyl) | 4-Υδροξυγλυκομπρασικίνη (4-Hydroxyglucobrassicin) |
|  | 4-Μεθοξινδολο-3-υλομέθυλο (4-Methoxyindol-3-ylmethyl) | 4-Μεθοξυγλυκομπρασικίνη (4-Methoxyglucobrassicin) |

Οι γλυκοζινολίτες, οι οποίοι συναντώνται μόνο στην τάξη *Brassicales*, έχουν εξελιχθεί από τους κυανογόνους γλυκοζίτες (cyanogenic glycosides) οι οποίοι υπάρχουν σε όλο το φυτικό βασίλειο.¹⁰ Ενώ οι κυανογόνοι γλυκοζίτες προέρχονται από ένα περιορισμένο αριθμό πρόδρομων αμινοξέων (βαλίνη, ισολευκίνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη),¹¹ οι γλυκοζινολίτες προέρχονται από πολλά περισσότερα αμινοξέα (αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, μεθειονίνη, τυροσίνη,

φαινυλαλανίνη και θρυπτοφάνη) καθώς και παράγωγα της μεθειονίνης και ομοφαινυλαλανίνης (homophenylalanine).^{12,13} Περιέργως, οι κυανογόνοι γλυκοζίτες και οι γλυκοζινολίτες δεν συνυπάρχουν στα φυτά, εκτός από ένα είδος, το *Carica Papaya*, το οποίο παράγει συγχρόνως κυανογόνους γλυκοζίτες και γλυκοζινολίτες που προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη.¹⁴ Οι πρώτες δομές γλυκοζινολιτών που διασαφηνίστηκαν ήταν η δομή της σινιγκρίνης και της σιναλμπίνης το 1956¹⁵ και ο όρος γλυκοζινολίτες εμφανίστηκε πρώτη φορά το 1961. Μέχρι το 2014 είχαν ταυτοποιηθεί 136 δομές γλυκοζινολιτών.¹⁶ Ο μεγάλος αριθμός γλυκοζινολιτών προκύπτει με τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας R (Σχήμα Α.1) π.χ. με οξείδωση του θείου, αλκενυλίωση, υδροξυλίωση καθώς και υποκαταστάσεις με άκυλο σύζευξη με βενζοϊκό οξύ.¹¹

Στον πίνακα Α.7 παρατίθεται η περιεκτικότητα γλυκοζινολιτών σε διάφορα σταυρανή λαχανικά. Ο προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS). Παρατηρούμε ότι το μπρόκολο περιέχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκοζινολιτών (66.8 μmol/100 g) με κυριότερο τη γλυκοραφανίνη (29.8 μmol/100 g) η οποία κατά την ενζυμική υδρόλυση της δίνει την ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη.¹⁷

Πίνακας Α.7. Επίπεδα γλυκοζινολιτών σε σταυρανή λαχανικά¹⁷

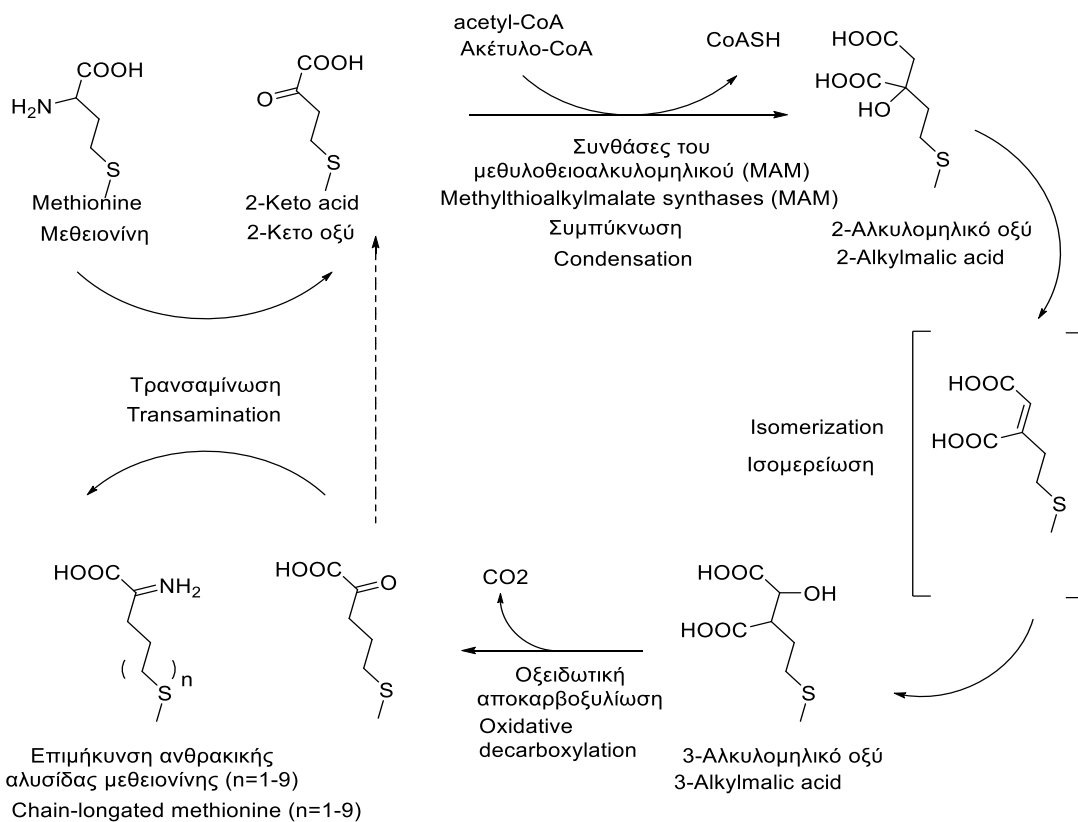
| Είδος Λαχανικού | Μπρόκολο | Λάχανο Βρυξελλών | Κουνουπίδι | Πράσινο Λάχανο |
|---|----------|---------------------|------------|-------------------|
| Γλυκοζινολίτες μmol/100 g νωπού προϊόντος | | | | |
| Σινιγκρίνη | 1.7±1.1 | 8.6±3.1 | 5.3±1.7 | 5.1±1.8 |
| Γλυκοναπίνη | 3.4±1.0 | 2.8±1.6 | 3.4±1.2 | 0.4±0.3 |
| Προγκοϊτρίνη | 3.9±1.3 | 2.4±1.0 | 0.5±0.4 | 0.6±0.4 |
| Γλυκοϊμπερίνη | 19.7±2.7 | 1.5±1.1 | 1.3±0.6 | 3.9±1.5 |
| Γλυκοραφανίνη | 29.8±2.8 | 0.6±0.5 | 0.3±0.2 | 0.4±0.3 |
| Γλυκοαλυσίνη | 3.9±1.1 | 0.3±0.3 | <LOD | <LOD |
| Γλυκοναστουρτίνη | 4.4±10 | 1.1±0.7 | 2.8±1.6 | <LOD |
| Ολικοί Γλυκοζινολίτες | 66.8 | 17.3 | 13.6 | 10.4 |

A.2.2. Βιοσύνθεση

Η βιοσύνθεση των γλυκοζινολιτών περιλαμβάνει τρεις φάσεις: (i) την επιμήκυνση της ανθρακικής αλυσίδας των αμινοξέων, με εισαγωγή επιπλέον μεθυλενομάδων στην πλευρική αλυσίδα, (ii) την μετατροπή του τμήματος του αμινοξέος στον βασικό πυρήνα του γλυκοζινολίτη και (iii) την επακόλουθη τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας.¹⁸

i. Επιμήκυνση ανθρακικής αλυσίδας αμινοξέων:

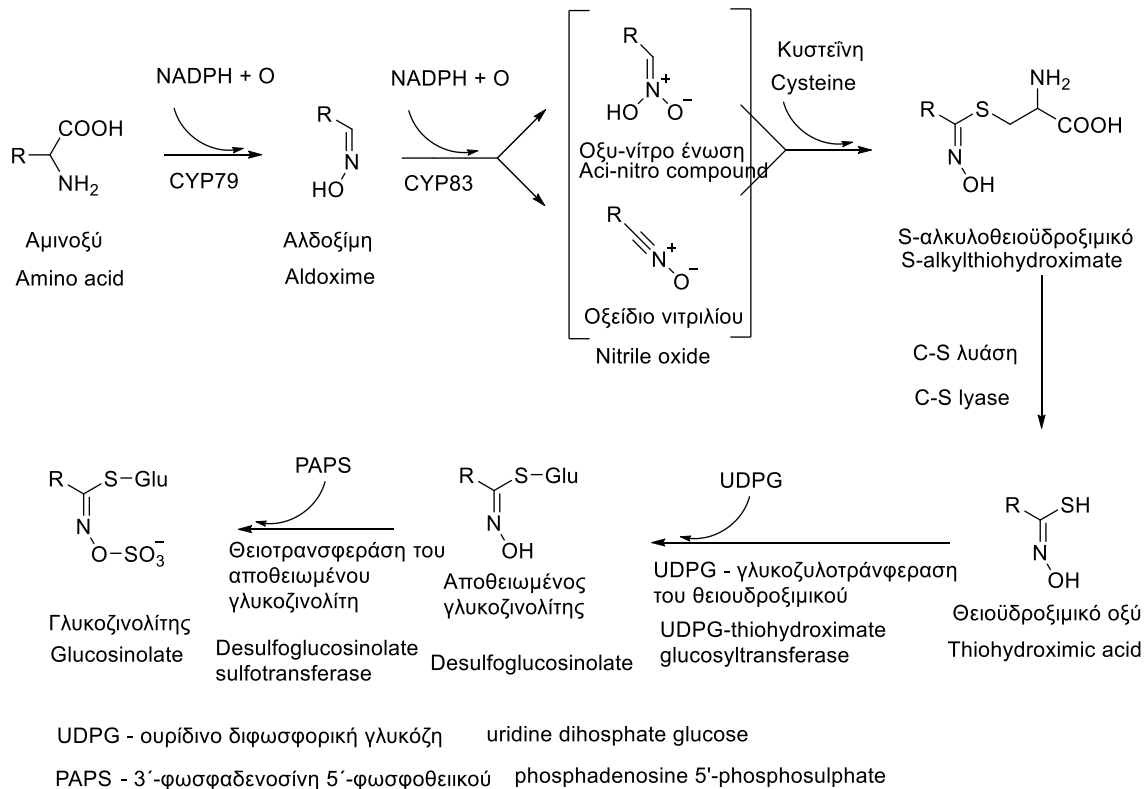
Η πλειονότητα των γλυκοζινολιτών στο *Arabidopsis Thaliana* όπως και σε πολλά άλλα είδη της οικογένειας των Brassicaceae σχηματίζονται από μεθειονίνη η οποία τροποποιείται με την προσθήκη 1-9 επιπρόσθετων μεθυλενομάδων στην πλευρική ανθρακική αλυσίδα (Σχήμα Α.2). Η πορεία αρχίζει με τρανσαμίνωση της μεθειονίνης οπότε σχηματίζεται το αντίστοιχο 2-οξο οξύ (2-oxo acid), στο οποίο προστίθεται μια μεθυλενομάδα μέσω ενός κύκλου τριών σταδίων, ο οποίος περιλαμβάνει τη συμπύκνωση με ακέτυλο-CoA, ισομερείωση και τέλος οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση. Το νεοσχηματιζόμενο 2-οξο οξύ μπορεί να μετατραπεί στο αντίστοιχο παράγωγο μεθειονίνης ή να συμμετάσχει σε επόμενους κύκλους επιμήκυνσης ανθρακικής αλυσίδας.¹⁸



Σχήμα Α.2. Πορεία επιμήκυνσης ανθρακικής αλυσίδας μεθειονίνης κατά τη βιοσύνθεση των γλυκοζινολιτών¹⁸

ii. Μετατροπή του τμήματος του αμινοξέος στο βασικό πυρήνα του γλυκοζινολίτη:

Η μετατροπή του πρόδρομου αμινοξέος στον τελικό γλυκοζινολίτη περιλαμβάνει ενδιάμεσα στάδια που είναι κοινά για όλους τους γλυκοζινολίτες (Σχήμα Α.3).



Σχήμα Α.3. Βιοσύνθεση γλυκοζινολιτών¹⁸

Τα δύο αρχικά στάδια της βιοσύνθεσης του βασικού πυρήνα ενός γλυκοζινολίτη καταλύονται από ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που ανήκουν στις οικογένειες CYP79 και CYP83, αντίστοιχα. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας CYP79 καταλύουν την μετατροπή του αμινοξέος στην αντίστοιχη αλδοξίμη. Στο δεύτερο στάδιο δημιουργείται ένα ασταθές οξυ-νίτρο ενδιάμεσο το οποίο συζευγνύεται με την σουλφυδρύλο ομάδα της κυστεΐνης μέσω του α-ανθρακοατόμου. Αυτό το στάδιο καταλύεται από ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια CYP83. Το S-αλκυλοθειούδροξιμικό (S-alkylthiohydroximate) μετατρέπεται σε θειούδροξιμικό οξύ (thiohydroxamic acid) σε μια αντίδραση που καταλύεται από μία C-S λυάση, η οποία ταυτοποιήθηκε το 2004 στο *Arabidopsis Thaliana* από τους Mikkelsen, Naur και Halkier.¹⁹ Τα ένζυμα για την γλυκοζυλίωση (glucosylation), γλυκοζυλοτρανσφεράση θειούδροξιμικού διφωσφορικού ουριδίνης

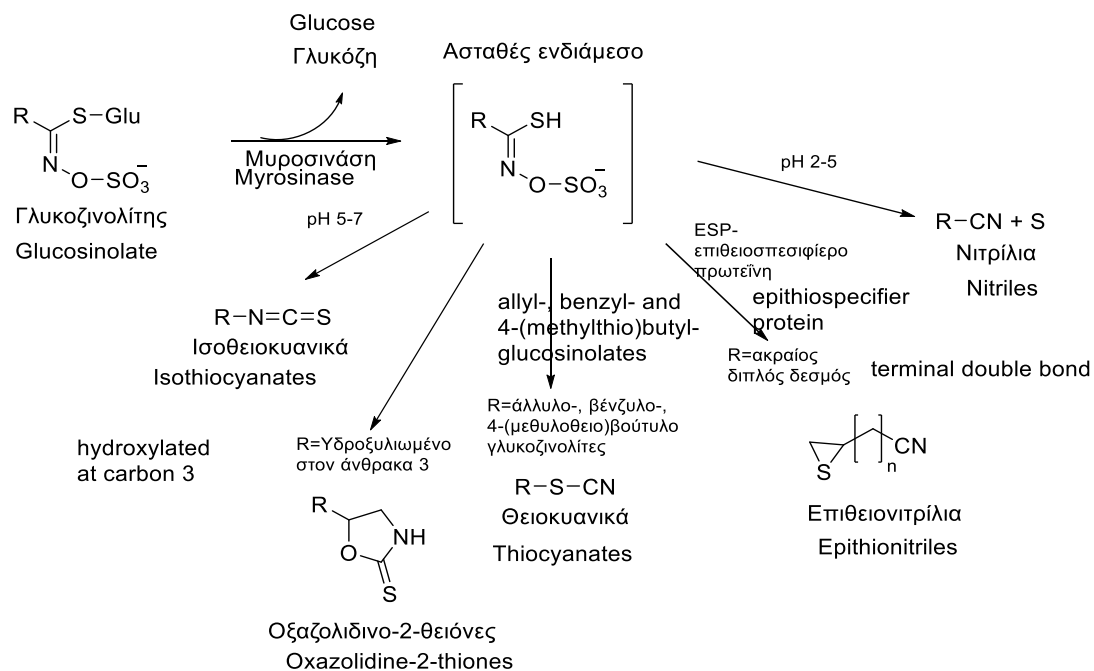
(uridine diphosphate thiohydroximate glucosyltransferase) και την θείωση (sulfation) 3'-φωσφοαδενοσίνη 5'-φωσφοθειικού: θειοτρανσφεράση του αποθειωμένου γλυκοζινολίτη (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate: desulfoglucosinolate sulfotransferase), έχουν χαρακτηριστεί και εν μέρει απομονωθεί από ορισμένα σταυρανθή.^{20,21}

iii. Τροποποίηση πλευρικής αλυσίδας:

Μετά τον σχηματισμό της βασικής δομής του γλυκοζινολίτη, μπορεί να πραγματοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα τροποποιήσεων στην πλευρική αλυσίδα καθώς επίσης και στην συνδεδεμένη γλυκόζη. Αυτές οι τροποποιήσεις περιλαμβάνουν οξείδωση, υδροξυλίωση, μεθοξυλίωση, αποκορεσμό, θείωση και γλυκοζυλίωση και λαμβάνουν χώρα ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο μοτίβο ανάπτυξης.^{22,23}

A.2.3. Ενζυμική Υδρόλυση Γλυκοζινολιτών

Τα φυτά που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν γλυκοζινολίτες περιέχουν το ένζυμο β-θειογλυκοσιδάση, γνωστό και ως μυροσινάση (EC 3.2.3.1). Κατά τη μάσηση, την κοπή ή τον τραυματισμό των σταυρανθών από έντομα και παθογόνους μικροοργανισμούς, απελευθερώνεται από τα κύτταρα η ενδογενής μυροσινάση η οποία υδρολύει τα γλυκοζινολίτες προς γλυκόζη και ένα ασταθές ενδιάμεσο (Σχήμα Α.4) το οποίο ακαριαία μετατρέπεται σε διάφορα προϊόντα υδρόλυσης (ισοθειοκυανικά, θειοκυανικά, νιτρίλια, επιθειονιτρίλια, οξαζολιδινο-2-θειόνες).

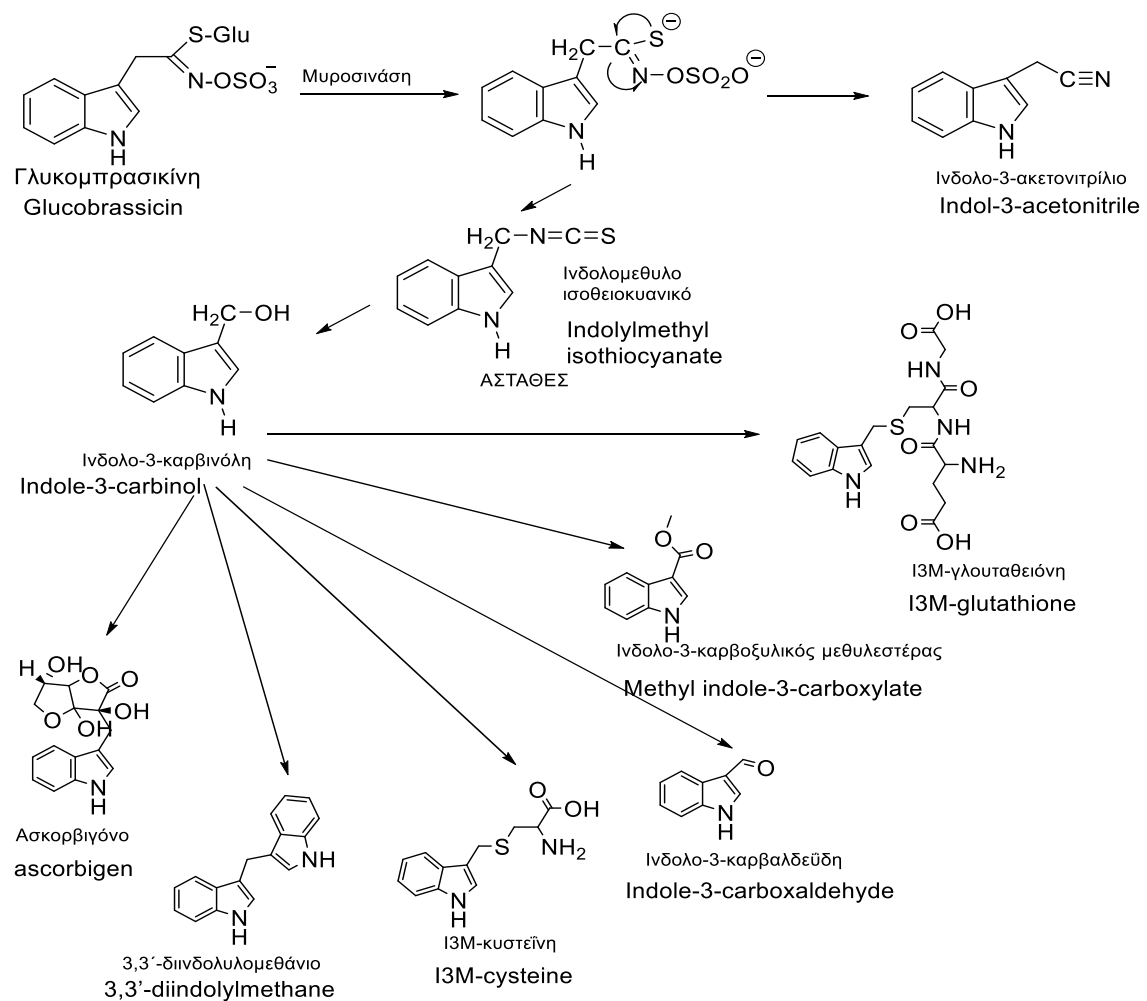


Σχήμα Α.4. Ενζυμική υδρόλυση γλυκοζινολιτών¹⁸

Η σύσταση του μίγματος των τελικών προϊόντων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, τη θερμοκρασία, την παρουσία πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη μυροσινάση και τη διαθεσιμότητα ιόντων σιδήρου.¹⁸

Η υδρόλυση σε ουδέτερες συνθήκες συνήθως έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ισοθειοκυανικών ενώσεων. Εάν στον C-2 της πλευρικής αλυσίδας του γλυκοζινολίτη υπάρχει υδροξυλομάδα τότε τα ισοθειοκυανικά που σχηματίζονται είναι ασταθή και κυκλοποιούνται προς οξαζολιδινο-2-θειόνες.

Σε όξινο pH και παρουσία ιόντων Fe^{2+} , ο σχηματισμός νιτριλίων λαμβάνει χώρα *in vitro*,²⁵ ενώ *in vivo* εξαρτάται από την παρουσία πρωτεϊνικών παραγόντων όπως την επιθειοσπεσιφιέρο πρωτεΐνη (erithiospecifier protein - ESP).²⁶ Παρουσία ESP, οι γλυκοζινολίτες με έναν ακραίο διπλό δεσμό στην πλευρική αλυσίδα τους, υδρολύονται προς επιθειονιτρίλια. Οι θειοκυανικές ενώσεις σχηματίζονται αποκλειστικά από βένζυλο-, άλλυλο- και 4-μεθυλοσουλφινυλοβούτυλο γλυκοζινολίτες.²⁷



Σχήμα Α.5. Ενζυμική υδρόλυση γλυκομπρασικίνης²⁹

Τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών με ινδολικό δακτύλιο (Σχήμα Α.5) διαφέρουν από τα υπόλοιπα εξαιτίας της αστάθειας των ισοθειοκυανικών που σχηματίζονται σε ουδέτερο pH, τα οποία τελικά μετατρέπονται σε ινδολο-μεθανόλες, προϊόντα σύζευξης με ασκορβικό οξύ και ολιγομερή μίγματα.²⁸

Κατά την υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης (Σχήμα Α.5) τα ασταθή αρχικά προϊόντα αντιδρούν γρήγορα προς το σχηματισμό ινδολο-3-ακετονιτριλίου και ινδολο-3-καρβινόλης. Η ESP πρωτεΐνη προάγει τον σχηματισμό του ινδολο-3-ακετονιτριλίου με ανάλογο τρόπο όπως και στους αλειφατικούς γλυκοζινολίτες. Η ινδολο-3-καρβινόλη είναι χημικά λιγότερο σταθερή από το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο και σχηματίζει προϊόντα όπως το 3,3'διινδολυλομεθάνιο, την ινδολο-3-καρβαλδεΐδη και τον ινδολο-3-καρβοξυλικό μεθυλεστέρα. Επίσης μπορεί να αντιδράσει με άλλους μεταβολίτες του φυτού και να παραχθούν προϊόντα όπως το ασκορβιγόνο, η Ι3Μ-κυστεΐνη και η Ι3Μ-γλουταθειόνη.²⁹

A.2.4. Προϊόντα Ενζυμικής Υδρόλυσης Γλυκοζινολιτών με Βιολογική Δράση

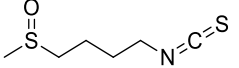
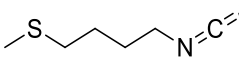
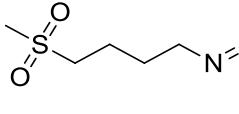
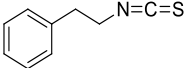
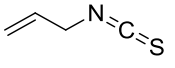
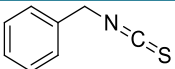
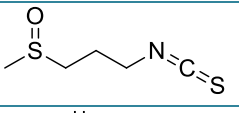
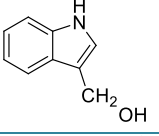
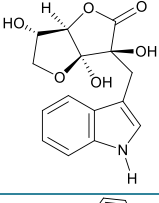
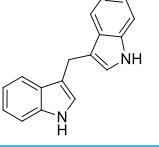
Οι γλυκοζινολίτες παρουσιάζουν αρκετά μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας της βιολογικής δράσης που αποδίδεται στα αντίστοιχα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης (Πίνακας Α.8). Παρά το γεγονός ότι τα προϊόντα αυτά όταν προστεθούν στη διατροφή διαφόρων ειδών ζώων παρουσιάζουν τοξικότητα και προκαλούν επιβράδυνση της ανάπτυξης,³⁰ εν τούτοις οι ενώσεις αυτές επιδεικνύουν αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση και μπορούν να χρησιμεύσουν σε μια πληθώρα εφαρμογών.⁸

A.2.4.1 Ισοθειοκυανικές Ενώσεις

Σουλφοραφάνη

Η σουλφοραφάνη είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοραφανίνης, η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο μπρόκολο. Άλλα λαχανικά που περιέχουν σουλφοραφάνη σε μικρότερο ποσοστό είναι το λάχανο, τα λαχανάκια βρυξελλών και το κουνουπίδι.⁶ Η σουλφοραφάνη παρεμποδίζει την ανάπτυξη και μπορεί να καταπολεμήσει πολλά στελέχη του ελικοβακτηριδίου (*Helicobacter pylori*) ακόμα και αυτά που εμφανίζουν αντίσταση στα αντιβιοτικά.³¹ Επιπλέον, μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη διαφόρων στελεχών παθογόνων μικροοργανισμών όπως *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* και

Πίνακας Α.8. Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών με βιολογική δράση

| Δομή | Ονομασία |
|---|---|
|  | 4-(Μεθυλοσουλφινυλο)βούτυλο ισοθειοκυανικό (4-(Methylsulfinyl)butyl isothiocyanate) (Σουλφοραφάνη) |
|  | 4-(Μεθυλοθειο)βούτυλο ισοθειοκυανικό (4-(Methylthio)butyl isothiocyanate-erucin) (Ερουκίνη) |
|  | 4-(Μεθανοσουλφονυλο)βούτυλο ισοθειοκυανικό (4-(Methanesulfonyl)butyl isothiocyanate-erysolin) (Ερυσολίνη) |
|  | Φαιναίθυλο ισοθειοκυανικό (Phenethyl isothiocyanate) |
|  | 2-Προπένυλο ισοθειοκυανικό (2-Propenyl isothiocyanate) |
|  | Βένζυλο ισοθειοκυανικό (Benzyl isothiocyanate) |
|  | 3-(Μεθυλοσουλφινυλο)πρόπυλο ισοθειοκυανικό (3-(Methylsulfinyl)propyl isothiocyanate-iberin) (Ιμπερίνη) |
|  | Ινδολο-3-καρβινόλη (Indole-3-carbinol) |
|  | (Ασκορβιγόνο) (Ascorbigen) |
|  | 3,3'-Δινδολυλομεθάνιο (3,3'-Diindolylmethane) |

Enterococcus faecalis σε ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (minimal inhibitory concentration - MIC) που κυμαίνεται από 1 µg/mL έως 4 µg/mL.³² Σε άλλη έρευνα αποδεικνύεται η ικανότητα της σουλφοραφάνης να παρεμποδίζει την ανάπτυξη εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη καθώς και στελεχών του *Bacillus anthracis*.³³ Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την δράση της σουλφοραφάνης έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου όπως λευχαιμία,³⁴ καρκίνο του μαστού,³⁵ καρκίνο του παχέος εντέρου,³⁶ καρκίνο του παγκρέατος,³⁷ καρκίνο του προστάτη^{38α} και καρκίνο της ουροδόχου κύστης.^{38β} Η συγκέντρωση αναστολής κατά 50% (IC₅₀) της

σουλφοραφάνης είναι $5.66 \pm 1.2 \mu\text{M}$.^{38β} Τέλος, η σουλφοραφάνη μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρές και να καταπολεμήσει φλεγμονές στα νεφρά και το καρδιαγγειακό σύστημα. Η δράση της στο καρδιαγγειακό σύστημα είναι παρόμοια με αντιοξειδωτικά φαρμακολογικά σκευάσματα μακράς χορήγησης.³⁹

Ερουκίνη

Η ερουκίνη είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοερουκίνης και είναι το κύριο ισοθιοκυανικό που απαντάται στη ρόκα.⁶ Παρουσιάζει αντιμυκητιασική δράση έναντι δύο πολύ σημαντικών φυτοπαθογόνων, του *Pythium irregulare* και του *Rhizoctonia solani*. Οι μύκητες αυτοί είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας, καθώς είναι ικανοί να επιβιώσουν σαπροφυτικά σε υπολείμματα φυτών στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για τον λόγο αυτό η παρουσία τους στο έδαφος πρέπει να ελέγχεται με συνθετικές αντιμυκητιασικές ενώσεις.⁴⁰ Η έρευνα για την αντικαρκινική δράση της ερουκίνης δείχνει ότι μπορεί να έχει δράση ενάντια στη λευχαιμία⁴¹ και στον καρκίνο των πνευμόνων.⁴²

Ερυσολίνη

Η ερυσολίνη είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοερυσολίνης και είναι το κύριο ισοθιοκυανικό στο σταυρανθές *Cardaria draba*⁴³ ενώ βρίσκεται και στη ρόκα σε μικρότερες συγκεντρώσεις.⁴⁴ Έχει ερευνηθεί για την δράση της ενάντια στη λευχαιμία και έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να λειτουργήσει συνεργιστικά με άλλες δραστικές ουσίες για την αντιμετώπιση της.⁴³

Φαιναίθυλο ισοθιοκυανικό

Το φαιναίθυλο ισοθιοκυανικό είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοναστουρτιίνης και βρίσκεται κυρίως στο νεροκάρδαμο⁴⁵ ενώ υπάρχει σε μικρότερες ποσότητες στα γογγύλια και στο ραπανάκι.⁶ Έχει ανασταλτική δράση ενάντια στους φυτοποθαγόνους μύκητες *Gaeumannomyces graminis*⁴⁶ και *Fusarium oxysporum*.⁴⁷ Επίσης, παρουσιάζει εντομοκτόνο δράση έναντι των *Drosophila melanogaster*, *Musa domestica*,⁴⁸ *Otiiorhynchus sulcatus*⁴⁹ και *Globodera rostochiensis*.⁵⁰ Η αντικαρκινική δράση του έχει ερευνηθεί και υπάρχουν ενδείξεις για την ανασταλτική του δράση έναντι της λευχαιμίας,⁵¹ του καρκίνου του προστάτη⁵² και του παχέος εντέρου.⁵³

2-Προπένυλο ισοθειοκυανικό

Το 2-προπένυλο ισοθειοκυανικό είναι προϊόν υδρόλυσης της σινγκρίνης και υπάρχει στη μουστάρδα, στο λάχανο και στα λαχανάκια βρυξελλών.⁶ Παρουσιάζει έντονη αντιμυκητιασική δράση έναντι των *Peronospora parasitica*,⁵⁴ *Fusarium sambucinum*,⁵⁵ *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana* και *Rhizoctonia solani*.⁵⁶ Επίσης, εμφανίζει ανασταλτική δράση σε πολλά στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών όπως *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* και *Vibrio parahaemolyticus*.⁵⁷ Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις για την αντικαρκινική του δράση έναντι της λευχαιμίας⁵⁸ και του καρκίνου του προστάτη.⁵⁹

Βένζυλο ισοθειοκυανικό

Το βένζυλο ισοθειοκυανικό είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοτροπαεολίνης και συναντάται στο κάρδαμο⁶ και στην παπάγια.⁶⁰ Προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων όπως οι *Alternaria tenuis*, *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium spp.* και *Rhizopus oryzae*⁶¹ ενώ υπάρχουν ενδείξεις για την αντικαρκινική του δράση έναντι του καρκίνου του παγκρέατος⁶² και του παχέος εντέρου.³⁶

Ιμπερίνη

Η ιμπερίνη είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκοϊμπερίνης και βρίσκεται στο μπρόκολο, στο λάχανο και στα λαχανάκια βρυξελλών.⁶ Εμφανίζει αντιμυκητιασικές ιδιότητες έναντι των *Pythium irregulare* και *Rhizoctonia solani*,⁴⁰ ενώ εμφανίζει αντικαρκινική δράση έναντι του νευροβλαστώματος.⁶³

A.2.4.2 Παράγωγα Ινδολίου

Ινδολο-3-καρβινόλη

Η ινδολο-3-καρβινόλη είναι προϊόν υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης και βρίσκεται κυρίως στο μπρόκολο, στα λαχανάκια βρυξελλών, στο κουνουπίδι και στη λαχανίδα.⁶ Έρευνες δείχνουν ότι η ινδολο-3-καρβινόλη μπορεί να καταστείλει το μελάνωμα που δημιουργείται από την UVB ακτινοβολία,⁶⁴ ενώ προλαμβάνει την ανάπτυξη καρκινικών όγκων που ρυθμίζονται από οιστρογόνα, όπως ο καρκίνος του μαστού, του ενδομητρίου και του τραχήλου της μήτρας⁶⁵ καθώς και ο καρκίνος του προστάτη.⁶⁶

3,3'-Δινδολυλομεθάνιο

Το 3,3'-δινδολυλομεθάνιο είναι ένα διμερές προϊόν συμπύκνωσης της ινδολο-3-καρβινόλης (Σχήμα Α.5) που παράγεται κατά την υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης.⁶⁷ Εμφανίζει παρόμοια αντικαρκινική δράση με την ινδολο-3-καρβινόλη καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι προλαμβάνει την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού,⁶⁸ του τραχήλου της μήτρας⁶⁹ και του προστάτη.⁷⁰

Ασκορβιγόνο

Το ασκορβιγόνο παράγεται από την αντίδραση της ινδολο-3-καρβινόλης και του L-ασκορβικού οξέος που βρίσκεται στα σταυρανθή λαχανικά.⁷¹ Έχει αντιοξειδωτικές⁷² και αντικαρκινικές ιδιότητες και προστατεύει το DNA από βλάβες.⁷³

A.2.5. Αναλυτικές Μέθοδοι Προσδιορισμού Προϊόντων Ενζυμικής Υδρόλυσης Γλυκοζινολιτών

Λόγω της αντικαρκινικής δράσης που παρουσιάζουν τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό τους στα σταυρανθή λαχανικά και σε άλλα υποστρώματα. Μια σύνοψη των μεθόδων αυτών παρουσιάζεται στον πίνακα Α.9.

Πίνακας Α.9. Μέθοδοι προσδιορισμού προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών

| ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ | ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ |
|-----------------------------|------------|
| HPLC | 74-85 |
| LC-MS | 86-87 |
| LC-MS/MS | 17, 88-94 |
| GC-MS | 95-99 |
| ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ UV-Vis | 100 |

Όλες οι αναλυτικές τεχνικές του πίνακα Α.9 έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εκλεκτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών. Εξαίρεση αποτελεί η φασματοφωτομετρική μέθοδος UV-Vis με την οποία προσδιορίζεται

έμμεσα το σύνολο των ισοθειοκυανικών ενώσεων και θεωρείται χρονοβόρα λόγω του προαπαιτούμενου σταδίου της παραγωγοποίησης.

Ο προσδιορισμός των ισοθειοκυανικών ενώσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί με HPLC αντίστροφης φάσης και ανιχνευτή DAD, όμως, η πλειονότητα των ισοθειοκυανικών είναι ασταθή έλαια, δυσδιάλυτα στο νερό και αρκετές φορές καθιζάνουν στη στήλη. Η ανίχνευση των ινδολικών παραγώγων γίνεται συνήθως με φθορισμομετρικό ανιχνευτή, για το λόγο αυτό ο ταυτόχρονος προσδιορισμός ισοθειοκυανικών και ινδολικών παραγώγων είναι δύσκολος. Υπάρχει μόνο μια μέθοδος στη βιβλιογραφία ταυτόχρονου προσδιορισμού με HPLC και ανιχνευτή UV, της ινδολο-3-καρβινόλης, του ινδολο-3-ακετονιτριλίου, του 2-προπένυλο ισοθειοκυανικού και του 2-φαιναίθυλο ισοθειοκυανικού.⁸⁰

Οι τεχνικές LC-MS και LC-MS/MS έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στον εκλεκτικό προσδιορισμό προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών σε διάφορα υποστρώματα, ωστόσο και εδώ μόνο μια αναφορά γίνεται στη βιβλιογραφία για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ισοθειοκυανικών και ινδολικών παραγώγων με LC-MS/MS για τον προσδιορισμό της σουλφοραφάνης, της ινδολο-3-καρβινόλης, του ινδολο-3-ακετονιτριλίου, του 3,3'-δινδολυλομεθάνιου και του ασκορβιγόνου σε ανθρώπινο πλάσμα και ούρα.⁹²

Τέλος, η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μόνο ορισμένων πτητικών ισοθειοκυανικών ενώσεων. Ωστόσο, λόγω της αστάθειας αυτών των ισοθειοκυανικών έχει παρατηρηθεί θερμική αποικοδόμηση προς άλλα προϊόντα⁹⁵ για τον λόγο αυτό εφαρμόζεται παραγοντοποίηση πριν τον προσδιορισμό.⁹⁸

A.2.6. Περιεκτικότητα Προϊόντων Ενζυμικής Υδρόλυσης Γλυκοζινολιτών στα Σταυρανθή Λαχανικά

Στον πίνακα A.10 φαίνεται η περιεκτικότητα των διαφόρων προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών σε σταυρανθή λαχανικά. Η περιεκτικότητα των ενώσεων αυτών είναι ενδεικτική καθώς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, τη γεωγραφία, την εποχή και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες π.χ. την προσβολή παθογόνων μικροοργανισμών, τη γονιμότητα του εδάφους και τους ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών.¹⁰⁷ Επιπλέον, ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που πρέπει να σημειωθεί είναι οι συνθήκες εκχύλισης. Η ενζυματική υδρόλυση των γλυκοζινολιτών πρέπει να ολοκληρωθεί πλήρως και υπό τις κατάλληλες συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή ισοθειοκυανικών έναντι των αντίστοιχων νιτριλίων. Κατά συνέπεια, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η

συγκέντρωση π.χ. της σουλφοραφάνης στο μπρόκολο ποικίλει σημαντικά στη βιβλιογραφία από 0.14 mg/100 g⁸² έως και 370.3 mg/100 g⁹⁵ φρέσκου μπρόκολου.

Πίνακας Α.10. Περιεκτικότητα προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών σε διάφορα σταυρανθή λαχανικά

| ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ | ΕΙΔΟΣ ΛΑΧΑΝΙΚΟΥ | ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ |
|---|-----------------|---|
| Σουλφοραφάνη | Μπρόκολο | 0.14 mg/100 g FW ^{α82} έως 370.3 mg/100 g FW ⁹⁵ |
| | Λευκό λάχανο | 540 μg/g FW ⁹⁶ |
| | Κόκκινο λάχανο | 48 μg/g FW ⁹⁶ |
| | Ρέβες | 60 μg/g FW ⁹⁶ |
| | Κουνουπίδι | 2-190 μmol/100 g FW ⁶ |
| | Ρόκα | 5.90 μmol/ g DW ^{β102} |
| | Ραπανάκι | 111.94 μg/g FW ⁷⁸ |
| Ιμπερίνη | Μπρόκολο | 2.40 mg/ g DW ¹⁰¹ |
| | Λευκό λάχανο | 5-280 μmol/100 g FW ⁶ |
| | Κουνουπίδι | 0-330 μmol/100 g FW ⁶ |
| | Ρόκα | 1.55 μmol/g DW ¹⁰² |
| 2-Προπένυλο ισοθειοκυανικό | Μπρόκολο | 7.54 mg/g DW ¹⁰¹ |
| | Λευκό λάχανο | 4-160 μmol/100 g FW ⁶ |
| | Ρέβες | 5 mg/100 g FW ¹⁰³ |
| | Κουνουπίδι | 1-160 μmol/100 g FW ⁶ |
| Φαιναίθυλο ισοθειοκυανικό | Μπρόκολο | 1.93 mg/g DW ¹⁰¹ |
| | Ρέβες | 8 mg/100 g FW ¹⁰³ |
| | Νεροκάρδαμο | 14-29.3 μmol/g DW ¹⁰⁴ |
| Ασκορβιγόνο | Μπρόκολο | 236 μmol/100 g DW ¹⁰⁵ |
| | Λευκό λάχανο | 0.081 μmol/100 g FW ⁸³ |
| | Κουνουπίδι | 929 μmol/100 g DW ¹⁰⁵ |
| Ινδολο-3-καρβινόλη | Μπρόκολο | 24.6 μmol/100 g DW ¹⁰⁵ |
| | Λευκό λάχανο | 0.116 μmol/100 g FW ⁸³ |
| | Κουνουπίδι | 39.5 μmol/100 g DW ¹⁰⁵ |
| Ινδολο-3-καρβαλεΐδη | Λευκό λάχανο | 1.88 mg/100 g FW ¹⁰⁶ |
| | Κουνουπίδι | 10 μg/100 g FW ¹⁰⁶ |
| Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο | Μπρόκολο | 4.9 μmol/100 g DW ¹⁰⁵ |
| | Λευκό λάχανο | 0.085 μmol/100 g FW ⁸³ |
| | Κουνουπίδι | 7.1 μmol/100 g DW ¹⁰⁵ |
| 3,3'-Δινδολυλομεθάνιο | Μπρόκολο | 3.1 μmol/100 g DW ¹⁰⁵ |
| | Λευκό λάχανο | 0.00235 μmol/100 g FW ⁸³ |
| | Κουνουπίδι | 3.1 μmol/100 g DW ¹⁰⁵ |

^αFW: Φρέσκου λαχανικού, ^βDW: Ξηρού λαχανικού.

Η περιεκτικότητα των ισοθιοκυανικών ενώσεων έχει μελετηθεί κυρίως στο μπρόκολο επειδή περιέχει το υψηλότερο ποσοστό ισοθιοκυανικών από όλα τα σταυρανθή με την αντικαρκινική ισοθιοκυανική ένωση σουλφοραφάνη να υπερισχύει.⁸² Η σουλφοραφάνη περιέχεται σε περισσότερα είδη σταυρανθών λαχανικών σε σχέση με τα υπόλοιπα ισοθιοκυανικά.

Από τα δεδομένα του πίνακα Α.10 παρατηρούμε ότι το μπρόκολο περιέχει μία ποικιλία άλλων ισοθιοκυανικών και ινδολικών παραγώγων με σημαντική βιολογική δράση όπως τα: 2-προπένυλο ισοθιοκυανικό, φαιναίθυλο ισοθιοκυανικό, ιμπερίνη, ασκορβιγόνιο, ινδολο-3-καρβινόλη και 3,3'-διινδολυλομεθάνιο. Το λευκό λάχανο και το κουνουπίδι είναι επίσης σημαντικές πηγές ισοθιοκυανικών και ινδολικών ενώσεων όπως η σουλφοραφάνη, η ιμπερίνη, το 2-προπένυλο ισοθιοκυανικό, το ασκορβιγόνιο, η ινδολο-3-καρβινόλη, η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη, το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο και το 3,3'-διινδολυλομεθάνιο. Οι ρέβες περιέχουν σουλφοραφάνη και φαιναίθυλο ισοθιοκυανικό, ενώ η ρόκα περιέχει σουλφοραφάνη και ιμπερίνη. Το φαιναίθυλο ισοθιοκυανικό περιέχεται κυρίως στο νεροκάρδαμο.

A.3. Φυτικές Ορμόνες

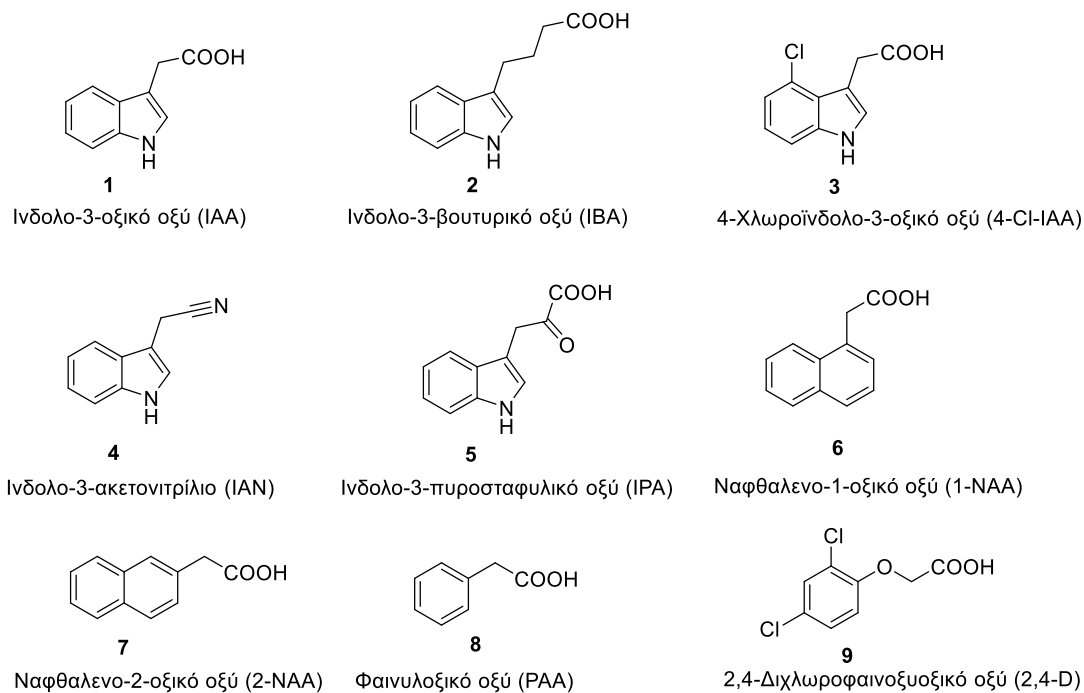
A.3.1. Γενικά

Οι φυτικές ορμόνες είναι διαφορετικής δομής μικρά μόρια τα οποία προέρχονται από διάφορες βασικές μεταβολικές οδούς. Είναι σημαντικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών και ρυθμίζουν τις αντιδράσεις τόσο στις βιοτικές όσο και στις αβιοτικές καταπονήσεις. Περιέχονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και ενεργούν είτε τοπικά, είτε στη θέση σύνθεσης τους ή σε μακρινούς ιστούς. Οι έρευνες των τελευταίων ετών έχουν αποκαλύψει διάφορες ενώσεις που κατατάσσονται στις φυτικές ορμόνες, εκ των οποίων οι βασικότερες είναι το αμπισικό οξύ (ABA), το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA ή αυξίνη), τα μπρασινοστεροειδή (BRs), οι κυτοκινίνες, το γιββερελλικό οξύ (GA), το ιασμονικό οξύ (JA), το αιθυλένιο και το σαλικυλικό οξύ. Συνολικά αυτές οι ενώσεις ρυθμίζουν κάθε πτυχή της ζωής του φυτού, από το σχηματισμό μοτίβου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του έως και τις αντιδράσεις σε βιοτικό και αβιοτικό στρες. Τα φυτά επίσης χρησιμοποιούν αρκετές πεπτιδικές ορμόνες ώστε να ρυθμίσουν διάφορες αποκρίσεις κατά την ανάπτυξη τους. Αν και η φυσιολογική λειτουργία των περισσότερων φυτικών ορμονών έχει μελετηθεί για δεκαετίες, ωστόσο τα τελευταία 10 με 15 χρόνια παρατηρείται μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της βιοσύνθεσης, μεταφοράς και απόκρισης των ορμονών. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια

για τις περισσότερες από τις ορμόνες είτε είναι καλά χαρακτηρισμένα (όπως στην περίπτωση των ABA, BRs και GA) ή αναδυόμενα (όπως για την αυξίνη και το JA). Γνωρίζουμε ότι τα επίπεδα των ορμονών είναι ρυθμιζόμενα και ανταποκρίνονται αναλόγως σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Στην περίπτωση της αυξίνης, η μεταφορά της ορμόνης σε τοπική και σε μεγάλη απόσταση έχει ουσιώδη ρόλο σε πολλές πτυχές κατά την ανάπτυξη του φυτού, ενώ η μεταφορά των πτητικών ενώσεων όπως το αιθυλένιο και το μεθυλοϊασμονικό είναι σημαντικές για την άμυνα των φυτών.¹⁰⁸

A.3.2. Αυξίνες

Οι αυξίνες ήταν οι πρώτες φυτικές ορμόνες που ανακαλύφθηκαν και έχουν ερευνηθεί εκτεταμένα για πολλές δεκαετίες. Σε πολλές μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι οι αυξίνες παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών καθώς θεωρείται ότι ρυθμίζουν ή επηρεάζουν διαφορετικές αποκρίσεις σε ολόκληρο το φυτό, όπως τροπισμούς, κυριαρχία κορυφής και έναρξη ρίζας καθώς και τις αποκρίσεις σε κυτταρικό επίπεδο, όπως η διεύρυνση, ο διαχωρισμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων.¹⁰⁹ Οι αυξίνες ανήκουν σε χημικά διαφορετικές τάξεις ενώσεων, οι περισσότερες από τις οποίες έχουν αρωματικό σύστημα όπως ινδόλιο, φαινύλιο ή ναφθαλένιο με πλευρική αλυσίδα που περιέχει συνδεδεμένη μια καρβοξυλομάδα (Σχήμα Α.6).¹¹⁰



Σχήμα Α.6. Χημικοί τύποι φυσικών και συνθετικών αυξινών¹¹⁰

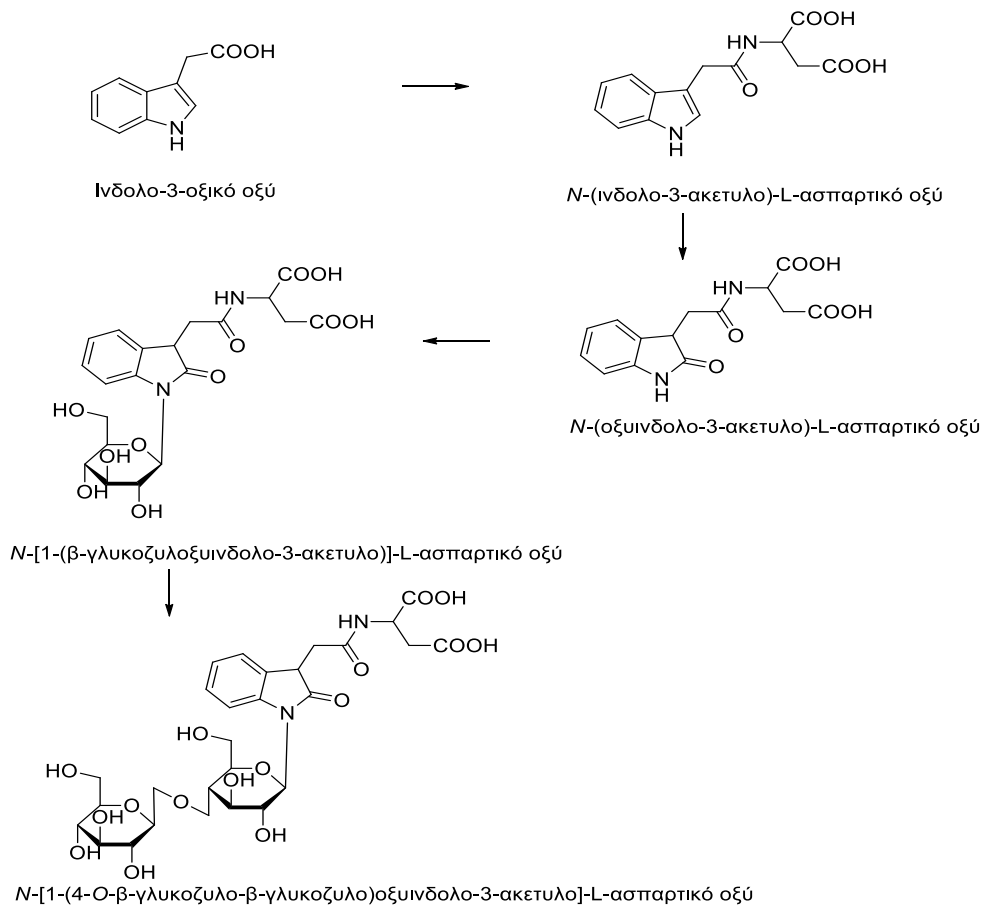
Το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) είναι συνήθως η φυσική αυξίνη που υπάρχει σε όλα τα κατώτερα φυτά. Μια χλωριωμένη μορφή του IAA με υψηλή δραστηριότητα αυξίνης είναι το 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ (4-Cl-IAA), που συναντάται σε διάφορα είδη φυτών.¹¹¹ Εκτός από τις αυξίνες με ινδολικό δακτύλιο, το φαινυλοξικό οξύ έχει ταυτοποιηθεί στα φυτά και είναι μια δραστική αυξίνη στις περισσότερες βιολογικές δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί.¹¹² Ορισμένες πρόδρομες ενώσεις του IAA, όπως το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο και το ινδολο-3-πυροσταφυλικό οξύ, παρουσιάζουν επίσης ιδιότητες διέγερσης της ανάπτυξης του φυτού πιθανώς λόγω της μετατροπής τους στον φυτικό ιστό στο βιολογικά δραστικό IAA.¹¹³ Επίσης, το ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA) παρουσιάζει παρόμοια δράση στις βιολογικές δοκιμές. Ενώ το IBA αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως συνθετική αυξίνη, τελικά αποδείχτηκε ότι είναι ενδογενής ένωση.¹¹⁴ Δύο βασικοί τύποι συνθετικών φυτικών ορμονών έχουν περιγραφεί οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλή δράση αυξίνης: το ναφθαλενο-1-οξικό οξύ (naphthalene-1-acetic acid, 1-NAA) και το 2,4-δichλωροφαινοξοξικό οξύ (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D). Το ισομερές του 1-NAA, ναφθαλενο-2-οξικό οξύ παρουσιάζει χαμηλότερη βιολογική δράση. Το 2,4-D χρησιμοποιείται συνήθως ως ζιζανιοκτόνο.¹¹⁵

Τα φυτά χρησιμοποιούν αρκετούς μηχανισμούς για τον έλεγχο των επιπέδων των ενδογενών αυξινών, ιδιαίτερα του IAA. Παρά τη ρύθμιση της σύνθεσης και αποικοδόμησης αυτών των φυτικών ορμονών, τα φυτά αποθηκεύουν αυξίνες και σε συζευγμένη μορφή. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενδογενούς IAA του φυτού δεν είναι στην ελεύθερη και βιολογικά ενεργή μορφή, αλλά βρίσκεται συζευγμένο στην καρβοξυλομάδα, μέσω εστερικών δεσμών, με μονοσακχαρίτες, πολυσακχαρίτες υψηλού μοριακού βάρους, μυοϊνσιτόλη, χολίνη και γλυκοπρωτεΐνες. Το IAA μπορεί επίσης να συζευχθεί μέσω αμιδικών δεσμών με απλά αμινοξέα, πεπτίδια ή πρωτεΐνες. Οι συζευγμένες μορφές του IAA πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην αποθήκευση και τη μεταφορά του IAA, απενεργοποίηση των ορμονικών οδών προς τον καταβολισμό των αυξινών και ως συστατικά μιας ομοιόστασης για τον έλεγχο των επιπέδων του IAA. Επίσης, αυτές οι συζευγμένες μορφές μπορούν να προστατεύσουν το IAA έναντι της υπεροξειδικής αποικοδόμησης. Η υδρόλυση του ενδογενούς συζευγμένου IAA είναι σημαντική πηγή ελεύθερου IAA.¹¹⁶ Η σύζευξη του IAA είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται τόσο στα ανώτερα όσο και στα κατώτερα φυτά και οι συζευγμένες μορφές του IAA συντίθενται ταχέως στο φυτικό ιστό, όταν η ομοιόσταση της αυξίνης διαταράσσεται. Για παράδειγμα, η έκθεση των φυτών σε υψηλό ποσοστό εξωγενούς φυσικού IAA ή συνθετικού 2,4-δichλωροφαινοξοξικού οξέος οδηγεί στη σύνθεση συζευγμένων μορφών με ασπαρτικό και γλυκόζη. Φαίνεται ότι τα φυτά χρησιμοποιούν διαφορετικές συζευγμένες μορφές για την αποτοξίνωση της περίσσειας των αυξινών, γεγονός που υποδηλώνει ότι το συζευγμένο τμήμα μπορεί να υπαγορεύει τη μοίρα της προσαρτημένης αυξίνης με στόχο την αποθήκευση, μεταφορά ή αποδόμηση της.

Αυτές οι τροποποιημένες μορφές αυξινών μπορούν περαιτέρω να οξειδωθούν π.χ. σε ΟχΙΑΑ-συζεύγματα, τα οποία αδρανοποιούν μόνιμα τις αυξίνες.¹¹⁷

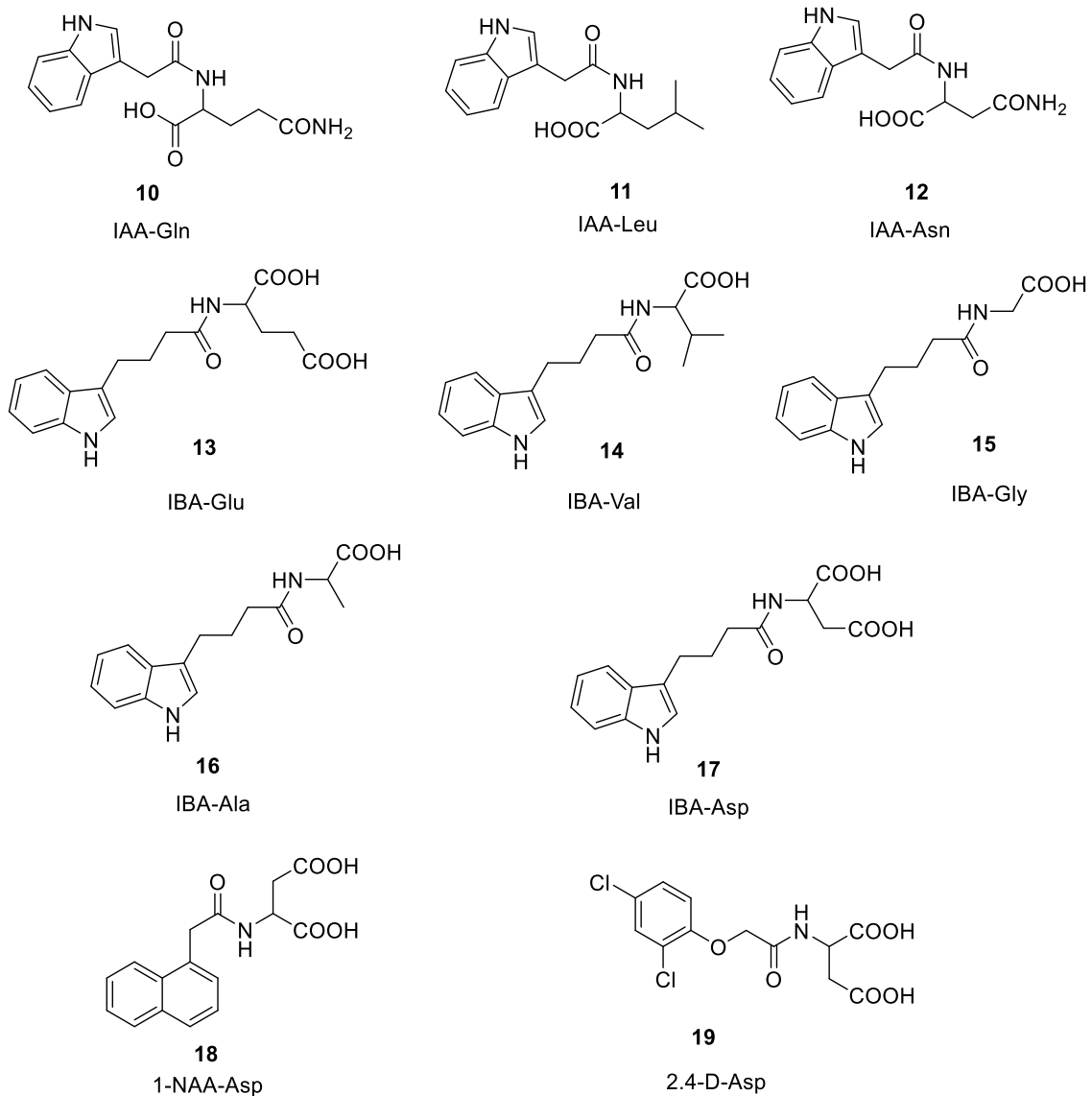
Εκτός από το ΙΑΑ, το ΙΒΑ εμφανίζεται επίσης ως ελεύθερο οξύ και σε διάφορες συζευγμένες μορφές, σε μικρότερη όμως αφθονία από το ΙΑΑ. Το ΙΒΑ συζευγνύεται με άλλες ενώσεις μέσω αμιδικών και εστερικών δεσμών. Οι συζευγμένες μορφές του ΙΒΑ υδρολύονται ευκολότερα και μεταφέρονται με αργό ρυθμό στα διάφορα μέρη του φυτού, αφήνοντας έτσι μεγαλύτερο ποσοστό ορμόνης στη βάση του φυτού συγκριτικά με το ΙΑΑ.¹¹⁸

Όλα τα είδη φυτών έχουν το δικό τους ξεχωριστό προφίλ συζευγμένων μορφών αυξίνης. Γενικά, στα μονοκοτυλήδονα φαίνεται να υπερισχύουν οι εστερικές συζευγμένες μορφές ενώ στα δικοτυλήδονα οι αμιδικές συζευγμένες μορφές αυξίνης.¹¹⁹ Πολλά πειράματα έχουν δείξει ότι η συζευγμένη μορφή του ΙΑΑ με το ασπαρτικό οξύ υπερισχύει στα περισσότερα δικοτυλήδονα φυτά. Η κύρια οδός απενεργοποίησης του ΙΑΑ στα δικοτυλήδονα μετατρέπει το ΙΑΑ σε *N*-(ινδολο-3-ακετυλο)-*L*-ασπαρτικό οξύ. Ο ινδολικός δακτύλιος του ΙΑΑ-ασπαρτικού οξέος οξειδώνεται για να σχηματίσει *N*-(οξεινδολο-3-ακετυλο)-*L*-ασπαρτικό οξύ, το οποίο υποβάλλεται σε διαδοχικές γλυκοζυλιώσεις (Σχήμα Α.7).¹²⁰



Σχήμα Α.7. Καταβολισμός και σύζευξη του ΙΑΑ με *L*-ασπαρτικό οξύ στην τομάτα¹¹⁰

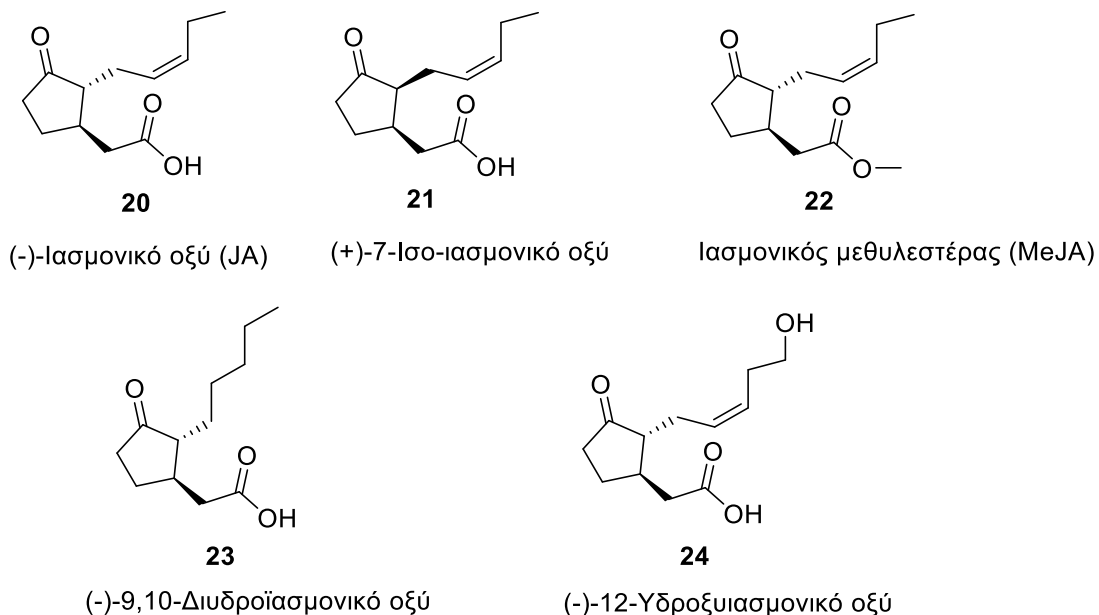
Συζεύγματα του IAA με αμινοξέα (L-ασπαρτικό οξύ, L-γλουταμινικό οξύ, L-αλανίνη, L-γλυκίνη, L-βαλίνη και L-λευκίνη) υπάρχουν σε πολλά είδη φυτών ενώ σε κάποια είδη το IAA μπορεί να συζευχθεί με άλλα αμινοξέα (Σχήμα Α.8). Τα συζεύγματα IAA-αμινοξέων που βρίσκονται σε φυτικούς ιστούς μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες: (i) με βάση τη δραστικότητα βιοπροσδιορισμού και (ii) την ευαισθησία στην υδρόλυση από συγκεκριμένα ένζυμα. Στη πρώτη ομάδα ανήκουν οι συζευγμένες μορφές του IAA με L-αλανίνη και L-λευκίνη οι οποίες παρουσιάζουν δραστικότητα γιατί μπορούν άμεσα να μετατραπούν με τη δράση της αμιδοϋδρολάσης σε ενεργό IAA, ενώ στη δεύτερη ομάδα ανήκουν τα IAA-ασπαρτικό οξύ και IAA-γλουταμινικό οξύ τα οποία δεν υδρολύονται από την αμιδοϋδρολάση αλλά δημιουργούνται κατά την διαδικασία αποτοξίνωσης όταν υπάρχει περίσσεια IAA.¹²¹



Σχήμα Α.8. Συζευγμένες δομές αυξινών με αμινοξέα¹¹⁰

A.3.3. Ιασμονικό Οξύ

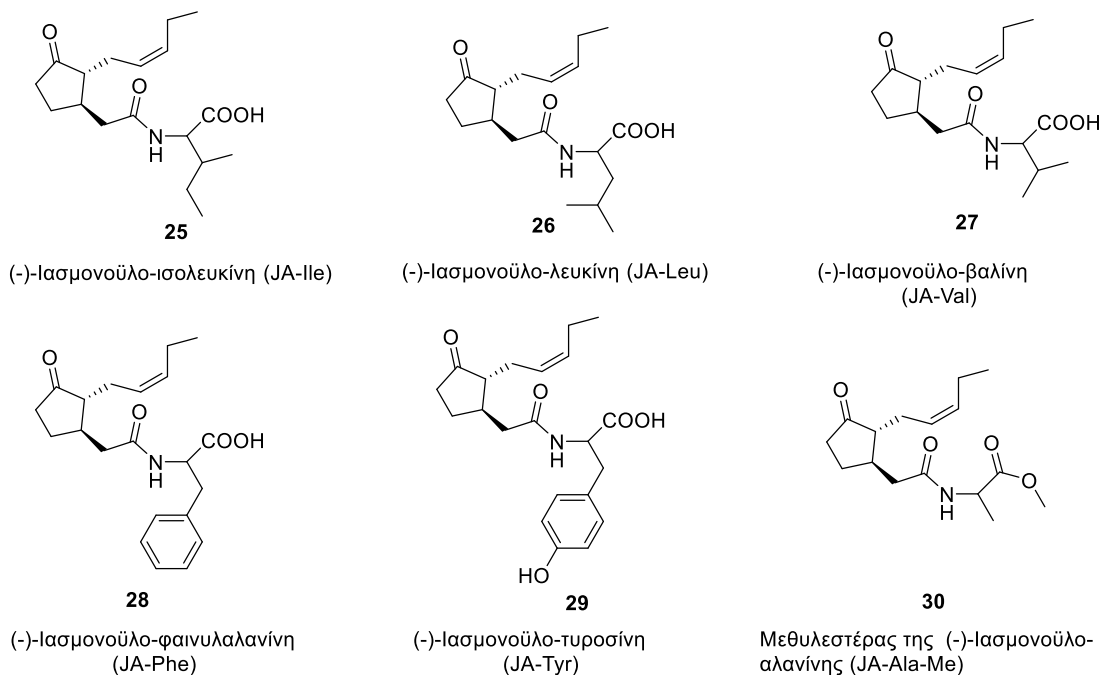
Η ομάδα των ιασμονικών, τα οποία είναι παράγωγα κυκλοπεντανόνης, είναι ευρέως διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο. Το (-)-ιασμονικό οξύ (JA), το στερεοϊσομερές του (+)-7-ισο-ιασμονικό οξύ, το (-)-9,10-διυδροϊασμονικό οξύ, το (-)-12-υδροξυιασμονικό οξύ, τα υδροξυλιωμένα παράγωγα του JA καθώς και ο μεθυλεστέρας του ιασμονικού οξέος (MeJA) είναι τα κυριότερα μέλη αυτής της οικογένειας (Σχήμα Α.9). Τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για την βιολογική δράση των ιασμονικών είναι ο δακτύλιος πεντανόνης, η πεντένυλο πλευρική αλυσίδα που εισάγεται στον άνθρακα-7, μια ακέτυλο πλευρική αλυσίδα στον άνθρακα-3 και η κετονομάδα στον άνθρακα-6.¹²³



Σχήμα Α.9. Χημικές δομές φυσικών ιασμονικών¹²²

Τα ιασμονικά είναι επαγωγείς διαφόρων φυσιολογικών διεργασιών όπως η βλάστηση των σπόρων, η ανάπτυξη γύρης, η σύνθεση αιθυλενίου, η γήρανση και ο σχηματισμός κονδύλων. Το JA θεωρείται ως η ένωση που σηματοδοτεί την ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος απόκρισης σε διάφορα είδη βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων.¹²² Αν και τα ιασμονικά υπάρχουν σε ολόκληρο το φυτό, η υψηλότερη συγκέντρωσή τους παρατηρείται σε αναπτυσσόμενους ιστούς όπως η κορυφή των βλαστών, οι άκρες των ριζών, τα ανώριμα φρούτα και τα νεαρά φύλλα. Σχηματίζουν συζευγμένες μορφές με μια ποικιλία αμινοξέων καθώς και με μεθυλομάδες, γλυκόζυλο και γεντιοβιόζυλο ομάδες. Η βιολογική δραστηριότητα των ιασμονικών έχει αποδοθεί στις ελεύθερες μορφές ιασμονικών, ωστόσο η γλυκοζυλίωση και σύζευξη με αμινοξέα είναι σημαντική για την ομοιοστάση των ορμονών. Επιπλέον, συζεύγματα του JA με αμινοξέα, όπως Ile (ισολευκίνη), Leu

(λευκίνη), Val (βαλίνη), Ala (αλανίνη), Tyr (τυροσίνη) και Phe (φαινυλαλανίνη) (Σχήμα 10) μπορεί να παίζουν έναν ουσιαστικό ρόλο στην οδό μεταγωγής σήματος απόκρισης ιασμονικών, όπως στην εκπομπή πτητικών οργανικών ενώσεων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση αμυντικών συστημάτων σε γειτονικά φυτά. Το JA-Ile είναι το κυρίαρχη μορφή συζευγμένου JA στα φυτά.¹²⁴ Συζεύγματα ιασμονικών με αμινοξέα όπως Tyr και Phe υπάρχουν σε λουλούδια από διάφορα είδη φασολιών. Το σύζευγμα JA-Phe παρουσιάζει πολύ υψηλή βιολογική δραστηριότητα στο ρύζι (*O. sativa*), και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της φυτοαλεξίνης σακουρανετίνης.¹²⁵



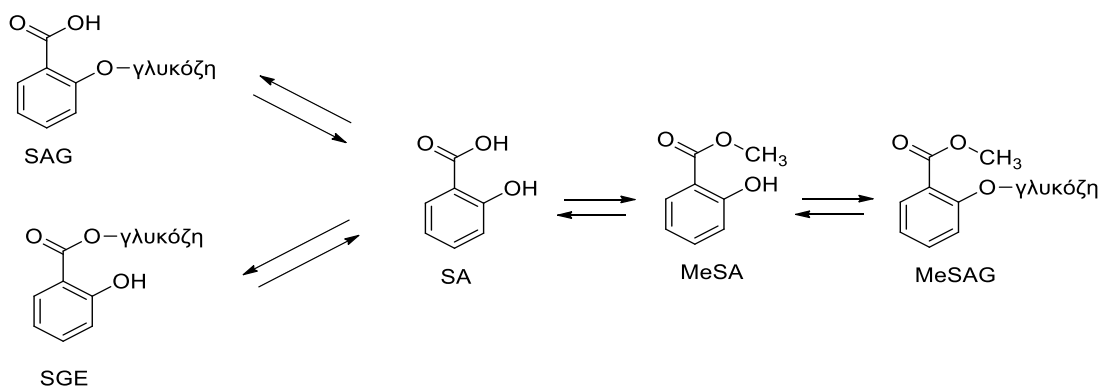
Σχήμα Α.10. Συζευγμένες δομές ιασμονικών¹²²

A.3.4. Σαλικυλικό Οξύ

Το σαλικυλικό οξύ (SA) είναι μια απλή φαινολική ένωση η οποία έχει μελετηθεί για το ρόλο της στην ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού και ιδιαίτερα της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (SAR). Στα φυτά, το SA συντίθεται μέσω δύο οδών από το χορισμικό οξύ, ένα προϊόν της σικιμικής μεταβολικής οδού. Η μια οδός είναι μέσω της ισοχορισμικής συνθάσης (ICS), η οποία πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για >90% του SA που συντίθεται κατά την ενεργοποίηση της απόκρισης σε καταπονήσεις. Η άλλη διαδρομή χρησιμοποιεί το μονοπάτι της φαινυλαλανίνης-αμμωνίας-λυάσης (PAL).¹²⁶ Το SA μπορεί να τροποποιηθεί εύκολα προς διάφορα παράγωγα (μέσω

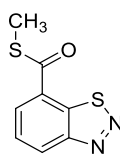
γλυκοζυλίωσης, μεθυλίωσης, σύζευξης αμινοξέων, σουλφονίωσης, υδροξυλίωσης κλπ.), τα περισσότερα εκ των οποίων είναι αδρανείς ενώσεις.

Το μεγαλύτερο μέρος του SA που παράγεται στα φυτά είναι γλυκοζυλιωμένο (SAG) (Σχήμα Α.11) και πιστεύεται ότι είναι η κύρια μορφή αποθήκευσης η οποία δίνει την δυνατότητα να μετατραπεί ξανά σε SA μέσω ενζυματικών αντιδράσεων που καταλύονται από την β-γλυκοσιδάση του SA. Το μεθυλιωμένο παράγωγο του SA (μεθυλοσαλικυλικό, MeSA) είναι επίσης αδρανές, αλλά λόγω της πτητικότητας του μπορεί εύκολα να διαχέεται διαμέσου των μεμβρανών. Η αύξηση της πτητικότητας του SA μέσω της σύνθεσης του MeSA μπορεί να βοηθήσει τα φυτά να εκκρίνουν SA έξω από το κύτταρο στο οποίο συντίθεται. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να βοηθήσει τα φυτά να μειώσουν τη συσσώρευση του SA και τα επακόλουθα τοξικά αποτελέσματά του, τα οποία προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Το SA χρησιμεύει επίσης ως σημαντικό μόριο σηματοδότης σε διάφορες φυσιολογικές αποκρίσεις όπως η ξηρασία, η θερμογένεση, η βλάστηση των σπόρων, η ανθοφορία και το όζον.¹²⁷



Σχήμα Α.11. Δομές σαλικυλικού οξέος και των παραγώγων του¹²⁷

Αρκετές συνθετικές ενώσεις που μιμούνται την αμυντική δράση του SA έναντι παθογόνων μικροοργανισμών έχουν διατεθεί στη γεωργία για την προστασία των καλλιεργειών. Κυριότερο παράδειγμα είναι το acibenzolar-*S*-methyl (Σχήμα Α.12) που διατίθεται στο εμπόριο ως μηκυτοκτόνο και δρά μέσω της ενεργοποίησης του συστήματος άμυνας των φυτών.¹²⁶



31

Σχήμα Α.12. Η δομή του μηκυτοκτόνου acibenzolar-*S*-methyl¹²⁶

A.3.5. Αναλυτικές Μέθοδοι Προσδιορισμού Φυτικών Ορμονών

Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί στη βιβλιογραφία, κυρίως με τη χρήση υγρής και αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Για την ποσοτικοποίηση των αυξινών συνήθως χρησιμοποιούνται μέθοδοι LC-MS ή LC-MS/MS ωστόσο έχουν εφαρμοστεί και μέθοδοι GC-MS.¹³⁰ Στον πίνακα A.11 φαίνονται οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των φυτικών ορμονών. Ο προσδιορισμός των φυτορμονών παρεμποδίζεται περαιτέρω από άλλες ενώσεις που βρίσκονται στα φυτικά εκχυλίσματα σε μεγαλύτερες ποσότητες. Επομένως οι κατάλληλες μέθοδοι προσδιορισμού αυτών των ενώσεων πρέπει να χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία.

Πίνακας A.11. Μέθοδοι προσδιορισμού φυτορμονών

| ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ | ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ |
|-------------------|------------|
| GC-MS | 128-130 |
| HPLC | 131 |
| LC-MS | 132-135 |
| LC-MS/MS | 136-139 |
| HRMS (Orbitrap) | 140 |
| HRMS (Q-TOF) | 141 |

Η ποσοτικοποίηση των φυτορμονών παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες καθώς η συγκέντρωσή τους στους φυτικούς ιστούς είναι σε επίπεδα ppb. Η χρήση της φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας μπορεί να βοηθήσει αρκετά σε αυτή την περίπτωση, όμως η εφαρμογή της σε αυτή την κατηγορία ενώσεων περιορίζεται μέχρι στιγμής σε μία μέθοδο με προσδιορισμό φυτορμονών στην τομάτα¹⁴⁰ με αναλυτή μαζών Orbitrap και στο *Arabidopsis thaliana* με αναλυτή μαζών Q-TOF.¹⁴¹

Πίνακας A.12. Επίπεδα φυτορμονών στο ρύζι¹³⁷

| ΦΥΤΟΡΜΟΝΕΣ | ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (ng/g) |
|----------------------------------|-----------------------|
| Ινδολο-3-οξικό οξύ | 6.23 |
| Ινδολο-3-ακετυλο-L-ασπαρτικό οξύ | 4.75 |
| Ινδολο-3-ακετυλο-L-φαιτυλαλανίνη | 0.34 |
| Ιασμονικό οξύ | 208 |
| Σαλικυλικό οξύ | 4694.7 |

Στη βιβλιογραφία, μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν στοιχεία για την περιεκτικότητα των φυτορμονών στα σταυρανθή λαχανικά. Στον πίνακα Α.12 παρουσιάζονται τα επίπεδα ορισμένων φυτορμονών στο ρύζι. Ο προσδιορισμός τους έγινε με μέθοδο LC-MS/MS.¹³⁷ Παρατηρούμε ότι το σαλικυλικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τις υπόλοιπες φυτορμόνες που μελετήθηκαν, ενώ το ιασμονικό οξύ και το ινδολο-3-οξικό οξύ ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Α.4. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με Μετασχηματισμό Fourier

Α.4.1. Γενικά

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) είναι μια ισχυρή και ευέλικτη αναλυτική τεχνική που μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα δειγμάτων. Βασίζεται στην ανάλυση της αλληλεπίδρασης του υπέρυθρου φωτός με την ύλη. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί αλλαγές στη διπολική ροπή του μορίου που μελετάται δημιουργώντας δονήσεις. Οι δονήσεις αυτές, που εμφανίζονται σε ένα φάσμα υπέρυθρου μπορούν να μας δώσουν την ταυτότητα των λειτουργικών ομάδων, που υπάρχουν στο δείγμα. Η υπέρυθρη ακτινοβολία εκφράζεται συμβατικά ως κυματάριθμος με μονάδες cm^{-1} όπως φαίνεται στην εξίσωση Α.1.¹⁴²

$$\tilde{\nu} = 1/\lambda \text{ cm}^{-1}$$

Εξίσωση Α.1

Η υπέρυθρη ακτινοβολία κυμαίνεται από 10 έως 12800 cm^{-1} και μπορεί να χωριστεί περαιτέρω σε τρεις περιοχές, εγγύς, μέσο και άπω υπέρυθρη ακτινοβολία (Πίνακας Α.13), η καθεμία με τα δικά της πλεονεκτήματα για τις φασματοσκοπικές μελέτες.¹⁴²

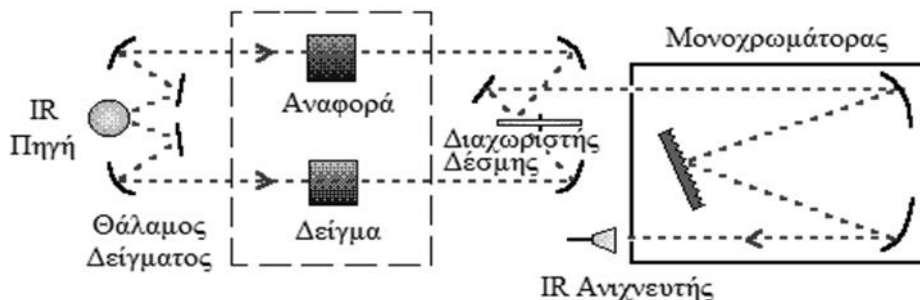
Πίνακας Α.13. Περιοχές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με σειρά αυξανόμενου μήκους κύματος¹⁴²

| Περιοχή | Μήκος κύματος (λ) (μm) | Κυματάριθμος ($\tilde{\nu}$) (cm^{-1}) |
|-----------------------|---|---|
| Άπω UV | 0.01-0.2 | 1000000-50000 |
| Εγγύς UV | 0.2-0.38 | 50000-26300 |
| Ορατό | 0.38-0.78 | 26300-12800 |
| Εγγύς υπέρυθρο | 0.78-3.0 | 12800-4000 |
| Μέσο υπέρυθρο | 3.0-50 | 4000-200 |
| Άπω υπέρυθρο | 50-1000 | 200-10 |
| Μικροκύματα | 1000-1000000 | 10-0.01 |

Η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier έγινε εφικτή με την εφεύρεση του συμβολόμετρου Michelson από τον Albert A. Michelson το 1891. Ωστόσο, από την δεκαετία του 1960 και μετά, η τεχνική χρησιμοποιήθηκε ευρύτερα λόγω της ανάπτυξης των ηλεκτρονικών υπολογιστών και της εύρεσης του αλγορίθμου Fast Fourier από τους Cooley και Tukey.¹⁴³ Οι περαιτέρω τεχνολογικές εξελίξεις σήμερα δίνουν την δυνατότητα για την συλλογή υψηλής ποιότητας φασμάτων FT-IR από ένα δείγμα μέσα σε λίγα λεπτά ή και λιγότερο. Επιπλέον, η μεγάλη ποικιλία τεχνικών δειγματοληψίας σημαίνει ότι η φασματοσκοπία FT-IR είναι μία από τις πιο ευπροσάρμοστες και χρήσιμες μεθόδους χημικής ανάλυσης που είναι διαθέσιμες στους επιστήμονες.

A.4.2. Φασματοφωτόμετρο FT-IR

Οι θεμελιώδεις αρχές του φασματοφωτομέτρου FT-IR παρέμειναν αμετάβλητες εδώ και δεκαετίες, παρά τις βελτιώσεις στον χρόνο συλλογής των δεδομένων. Η τυπική διάταξη αποτελείται από μια πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, ένα συμβολόμετρο, την περιοχή εισαγωγής δείγματος, τον ανιχνευτή και κάποια μορφή λογισμικού ανάλυσης (Σχήμα A.13).¹⁴³

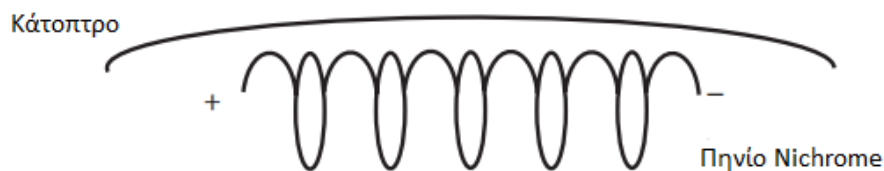


Σχήμα A.13. Βασικά μέρη ενός φασματοφωτομέτρου FT-IR¹⁴³

Πηγή

Η πιο συνηθισμένη περιοχή στη φασματοσκοπία FT-IR είναι η περιοχή μέσο υπέρυθρου, έτσι ένα φασματοφωτόμετρο πρέπει να έχει μια πηγή που εκπέμπει υπέρυθη ακτινοβολία με κυματάριθμο $400-4000 \text{ cm}^{-1}$. Η πηγή που χρησιμοποιείται σε πολλά φασματοφωτόμετρα FTIR ονομάζεται αερόψυκτη πηγή, το διάγραμμα της οποίας φαίνεται στο σχήμα A.14. Ο όρος "αερόψυκτη" υποδηλώνει ότι η θερμοκρασία της πηγής ρυθμίζεται από την εκπομπή θερμότητας στην ατμόσφαιρα. Μια αερόψυκτη πηγή αποτελείται από ένα πηνίο ή μια κορδέλα από σύρμα Ni-Cr (Nichrome). Είναι κράμα νικελίου και χρωμίου και έχει υψηλή αντίσταση στην ηλεκτρική ροή. Η πηγή αυτή θερμαίνεται και λάμπει στο μέσο

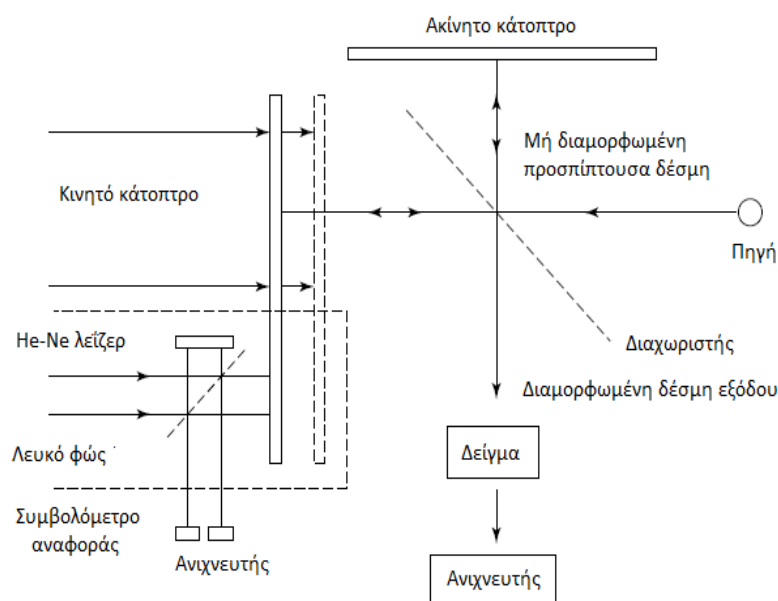
υπέρυθρο όταν τη διαπεράσει ηλεκτρική ενέργεια. Ένα άλλο πλεονέκτημα της Nichrome είναι ότι αντιστέκεται στην οξείδωση, η οποία είναι σημαντική αφού το θερμαινόμενο σύρμα εκτίθεται στην ατμόσφαιρα. Το σύρμα nichrome μπορεί να είναι σε θερμική επαφή με κεραμικό μέρος, το οποίο του επιτρέπει να λειτουργεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Οι αερόψυκτες πηγές μπορούν να επιτυγχάνουν θερμοκρασίες από 1200 °K έως 1400 °K. Στα περισσότερα φασματοφωτόμετρα FT-IR η πηγή υποστηρίζεται από ένα κάτοπτρο, όπως φαίνεται στο σχήμα Α.14, ή περιβάλλεται από ένα περίβλημα για να συλλέξει όσο το δυνατόν περισσότερο υπέρυθρο φως και να το στείλει προς το συμβολόμετρο. Οι αερόψυκτες πηγές είναι ανθεκτικές, απλές και φθηνές.¹⁴⁴ Στα πειράματα της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Thermo Nicolet 6700 FTIR το οποίο διαθέτει πηγή Nichrome.¹⁴⁵



Σχήμα Α.14. Διάγραμμα αερόψυκτης πηγής υπέρυθρου¹⁴⁴

Συμβολόμετρο

Στην καρδιά του υπέρυθρου φασματοφωτόμετρου είναι το συμβολόμετρο Michelson. Αυτή η οπτική συσκευή επιτρέπει την υπολογισμό της απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας από το δείγμα (Σχήμα Α.15).



Σχήμα Α.15. Συμβολόμετρο Michelson¹⁴³

Συνήθως αποτελείται από μια πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, ένα ακίνητο κάτοπτρο, ένα κινητό κάτοπτρο και έναν διαχωριστή δέσμης. Εάν μια ακτινοβολία μονοχρωματικής ακτινοβολίας μήκους κύματος λ (cm) διέλθει από έναν ιδανικό διαχωριστή δέσμης, το 50% της προσπίπτουσας ακτινοβολίας θα ανακλασθεί σε ένα από τα κάτοπτρα, ενώ το 50% θα μεταδοθεί στο άλλο κάτοπτρο.

Οι δύο δέσμες ανακλώνται στα κάτοπτρα, επιστρέφοντας στο διαχωριστή δέσμης οπότε προκύπτει μια δέσμη. Το 50% της δέσμης που ανακλάται από το σταθερό κάτοπτρο μεταδίδεται μέσω του διαχωριστή δέσμης ενώ το 50% ανακλάται προς την κατεύθυνση της πηγής. Η δέσμη που εξέρχεται από το συμβολόμετρο στις 90° προς τη δέσμη εισόδου ονομάζεται μεταδιδόμενη δέσμη και αυτή είναι η δέσμη που ανιχνεύεται στη φασματοσκοπία FT-IR.¹⁴³

Ανιχνευτής

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για τη μέσο υπέρυθη περιοχή είναι δύο ειδών. Ο κανονικός ανιχνευτής, για χρήση ρουτίνας, ο οποίος είναι μια πυροηλεκτρική συσκευή που ενσωματώνει δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (DTGS) σε ένα ανθεκτικό στη θερμοκρασία παράθυρο αλκαλικού αλογονιδίου ενώ για πιο ευαίσθητα πειράματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδραργυρο-καδμιο τελλουρίδιο (MCT), αλλά αυτό πρέπει να ψυχθεί σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου.¹⁴³

A.4.3. Μετασχηματισμός Fourier

Οι βασικές εξισώσεις για το μετασχηματισμό Fourier, σχετίζονται με την ένταση που προσπίπτει στον ανιχνευτή, $I(\delta)$ και με τη φασματική πυκνότητα ισχύος σε ένα συγκεκριμένο κυματάριθμο $\tilde{\nu}$, που δίνεται από το $B(\tilde{\nu})$ και έχουν ως εξής:

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\tilde{\nu} \quad \text{Εξίσωση A.2}$$

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\delta \quad \text{Εξίσωση A.3}$$

Αυτές οι δύο εξισώσεις είναι αλληλομετατρέψιμες και είναι γνωστές ως ζεύγος μετασχηματισμού Fourier. Η εξίσωση A.2 είναι η συνάρτηση καθυστέρησης και δείχνει τη μεταβολή της πυκνότητας ισχύος ως συνάρτηση της διαφοράς στο μήκος διαδρομής, ενώ η εξίσωση A.3 δείχνει την μεταβολή της έντασης ως συνάρτηση του κυματάριθμου. Καθεμία μπορεί να μετατραπεί στη άλλη μέσω της μαθηματικής μέθοδου του μετασχηματισμού Fourier. Το απαραίτητο πείραμα για την συλλογή ενός φάσματος FTIR είναι η παραγωγή ενός συμβολογράμματος με δείγμα και χωρίς δείγμα στη δέσμη, μετασχηματίζοντας τα συμβολογράμματα σε φάσματα της

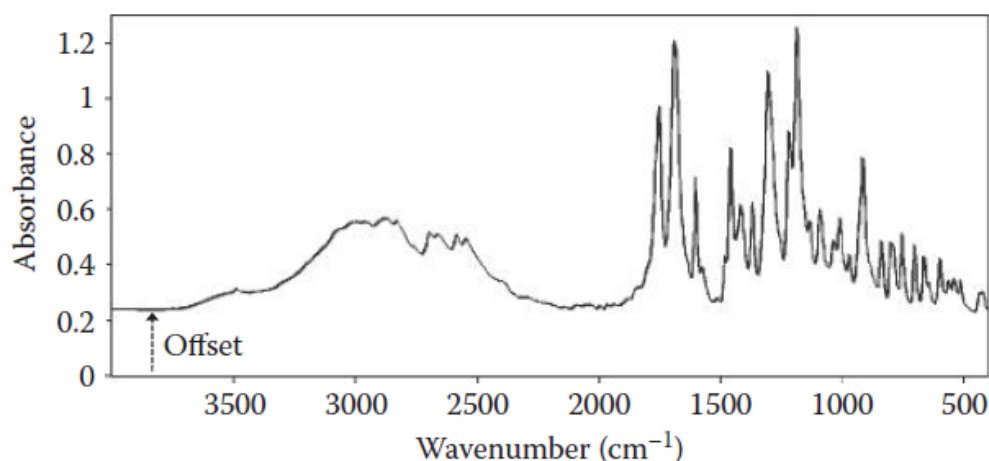
(α) πηγής με απορροφήσεις δείγματος και (β) της πηγής χωρίς απορροφήσεις δείγματος. Η αναλογία του (α) και του (β) αντιστοιχεί σε ένα φάσμα διασποράς διπλής δέσμης. Η σημαντική πρόοδος στα φασματοφωτόμετρα FTIR ήρθε με τη νέα μαθηματική μέθοδο που επινοήθηκε από τους Cooley και Tukey και ονομάστηκε γρήγορος μετασχηματισμός Fourier (FFT).¹⁴³

A.4.4. Επεξεργασία Φασμάτων FT-IR

Αφού ληφθεί το συμβολόγραμμα και μετατραπεί σε οπτικό φάσμα υπέρυθρου από το μετασχηματισμό Fourier, πρέπει να πραγματοποιηθούν από το χρήστη διαδικασίες διόρθωσης και επεξεργασίας των φασμάτων, ώστε να διευκολυνθεί η ερμηνεία τους, οι οποίες όμως δεν εκτελούνται αυτόματα από το φασματοφωτόμετρο. Πολλές από αυτές τις διαδικασίες είναι διαθέσιμες με τα πακέτα λογισμικού που χρησιμοποιούν τα φασματοφωτόμετρα FTIR.

A.4.4.1. Διόρθωση Βασικής Γραμμής

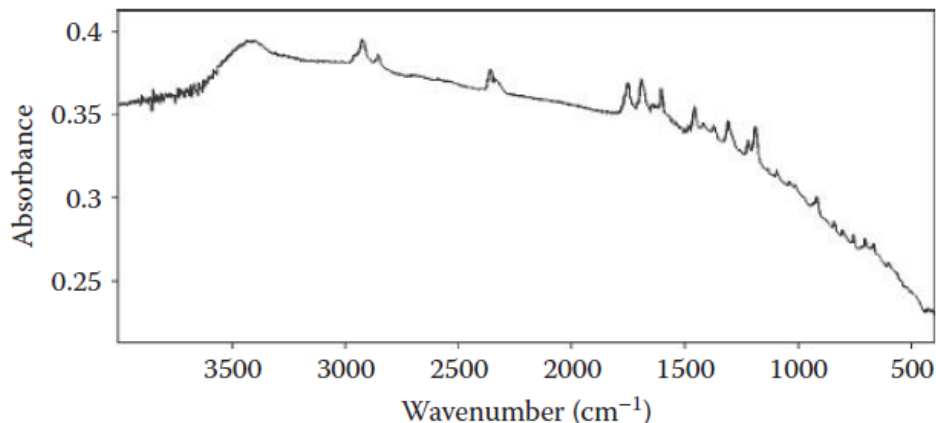
Σε ιδανική περίπτωση, ένα φάσμα υπέρυθρου θα πρέπει να έχει μια επίπεδη βασική γραμμή που αντιστοιχεί σε μηδέν απορρόφηση ή 100% διαπερατότητα. Στην πραγματικότητα όμως τις περισσότερες φορές τα φάσματα δεν έχουν ιδανική βασική γραμμή. Ολόκληρη η βασική γραμμή ενός φάσματος μπορεί να μετατοπιστεί από το μηδέν, όπως απεικονίζεται στο σχήμα A.16.



Σχήμα A.16. Ένα παράδειγμα υπέρυθρου φάσματος του οποίου η γραμμή βάσης έχει μετατοπιστεί κατά $\sim 0,2$ μονάδες απορρόφησης¹⁴⁴

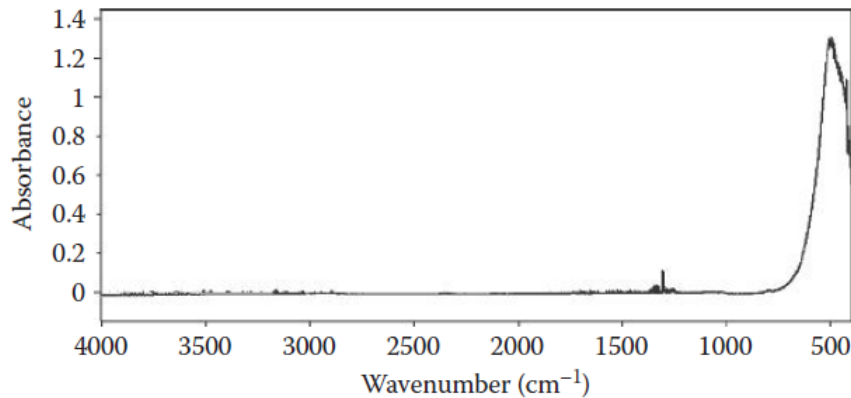
Αυτός ο τύπος μετατόπισης ισοδυναμεί με την προσθήκη μιας σταθερής τιμής σε όλες τις απορροφήσεις σε ένα φάσμα. Η μετατόπιση προκαλείται από οποιοδήποτε πρόβλημα το οποίο έχει ως επίπτωση οι τιμές του άξονα γ να είναι περίπου ίδιες σε όλους τους κυματάριθμους. Σε δισκίο με βρωμιούχο κάλιο (KBr) το φάσμα της ασπιρίνης που φαίνεται στο σχήμα Α.16 έχει μία μετατόπιση περίπου 0.2 μονάδων απορρόφησης. Το δισκίο είχε μεγάλο πάχος με αποτέλεσμα ανακλάται και απορροφά σημαντικά ποσά της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε όλους τους κυματάριθμους. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να διορθωθεί κάνοντας ένα λεπτότερο δισκίο KBr.¹⁴⁴

Ο δεύτερος τύπος προβλήματος στη βασική γραμμή είναι η κλίση, όπως απεικονίζεται στο σχήμα Α.17 το οποίο δείχνει το φάσμα ενός δισκίου με KBr όπου το δείγμα και το KBr δεν ήταν επαρκώς αλεσμένο σε μορφή σκόνης. Τα προκύπτοντα μεγάλα σωματίδια στο δείγμα διασκορπίζουν την υπέρυθρη δέσμη, η ένταση της οποίας αυξάνεται με τον κυματάριθμο, δίνοντας κεκλιμένο φάσμα (Σχήμα Α.17). Αυτό το πρόβλημα μπορεί να επιλυθεί με την παρασκευή νέου δισκίου με επαρκώς αλεσμένο δείγμα και KBr. Ένα άλλο πρόβλημα που προκαλεί κλίση στη βασική γραμμή, είναι η διακύμανση της θερμοκρασίας μέσα στο όργανο και διακυμάνσεις τάσης στην ηλεκτρική γραμμή που τροφοδοτεί το φασματοφωτόμετρο. Αυτό το πρόβλημα μπορεί μερικές φορές να διορθωθεί με την συλλογή ενός καινούργιου φάσματος υποβάθρου.¹⁴⁴



Σχήμα Α.17. Φάσμα FTIR στο οποίο υπάρχει κλίση στη βασική γραμμή¹⁴⁴

Ο τρίτος τύπος προβλήματος στη βασική γραμμή είναι η δημιουργία καμπύλης (Σχήμα Α.18). Αυτό μπορεί να προκληθεί από ένα πρόβλημα στον ανιχνευτή του οργάνου. Άλλοι λόγοι περιλαμβάνουν προβλήματα με το λέιζερ ή το συμβολόμετρο του FTIR.¹⁴⁴



Σχήμα Α.18. Φάσμα υπέρυθρου στο οποίο υπάρχει μεγάλη καμπύλη στη βασική γραμμή¹⁴⁴

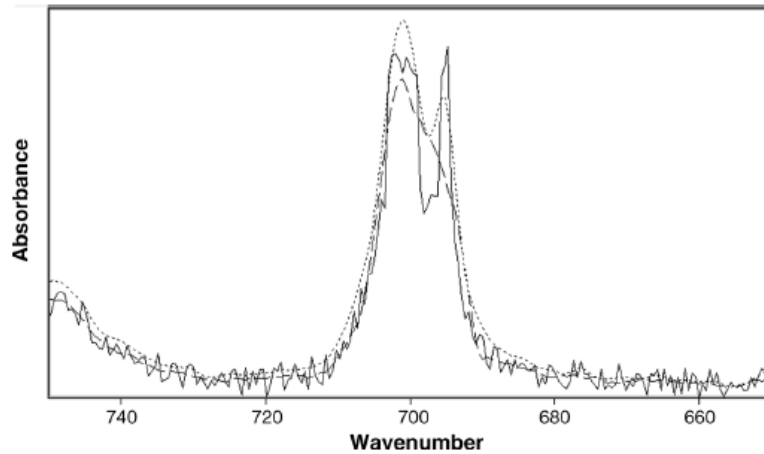
A.4.4.2. Αυτόματη Εξομάλυνση

Η αυτόματη εξομάλυνση εφαρμόζεται για τη μείωση του θορύβου στο τελικό φάσμα FTIR. Αυτό επιτυγχάνεται με την τροποποίηση των σημείων δεδομένων έτσι ώστε να μειώνονται τα υψηλότερα σημεία από τα άμεσα γειτονικά σημεία και αυτά που είναι χαμηλότερα από τα γειτονικά σημεία να αυξάνονται δίνοντας έτσι ένα "ομαλότερο" φάσμα.

Η απλούστερη μέθοδος εξομάλυνσης ενός φάσματος είναι ο κινούμενος μέσος όρος, όπου υπολογίζεται ο μέσος όρος ενός περιττού αριθμού διαδοχικών σημείων δεδομένων και η μέση τιμή αντικαθιστά το κεντρικό σημείο. Στη συνέχεια, το σύνολο των σημείων δεδομένων μετακινείται κατά ένα σημείο και η λειτουργία επαναλαμβάνεται. Για το σκοπό αυτό συνήθως χρησιμοποιείται ο αλγόριθμος εξομάλυνσης Savitzky - Golay (που προτάθηκε το 1964 από τους Abraham Savitzky και Marcel Golay), ο οποίος είναι παρόμοιος λειτουργικά με τον κινούμενο μέσο όρο, εκτός από το γεγονός ότι χρησιμοποιεί τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων προσαρμοσμένη σε ένα πολυώνυμο αντί για έναν απλό μέσο όρο.¹⁴²

Μια άλλη μέθοδος για τη μείωση του φασματικού θορύβου είναι η εξομάλυνση Fourier όπου το φάσμα ουσιαστικά μετατρέπεται σε συμβολόγραμμα στο οποίο εντοπίζονται και αφαιρούνται τα συστατικά θορύβου. Ο μεγαλύτερος φασματικός θόρυβος είναι ο λευκός θόρυβος (Σχήμα Α.19), ο οποίος από τη φύση του είναι πολύ υψηλής συχνότητας και ανεξάρτητος από το μήκος κύματος. Συνεπώς, ο λευκός θόρυβος μπορεί να αφαιρεθεί από το φάσμα με την περικοπή του συμβολογράμματος ή την αντικατάσταση των τιμών υψηλής συχνότητας με μηδενικά. Ωστόσο, επειδή οι φασματικές γραμμές υπέρυθρου είναι οξείες, περιέχουν επίσης συστατικά υψηλής συχνότητας και η αφαίρεση τους θα έχει ως

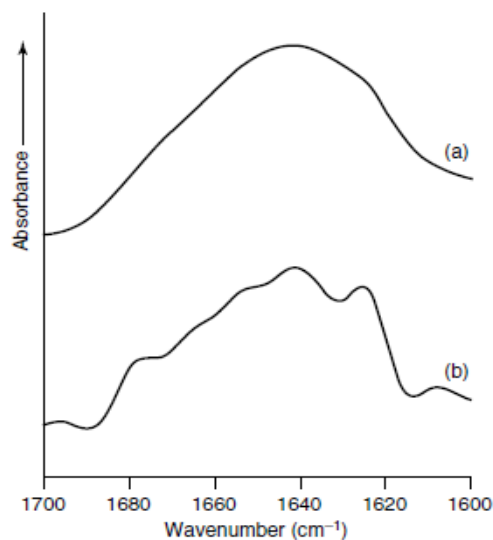
αποτέλεσμα τη διεύρυνση των φασματικών γραμμών στο προκύπτον οπτικό φάσμα.¹⁴²



Σχήμα Α.19. Φάσμα FTIR πολυστυρενίου με 10% λευκό θόρυβο (—) εξομάλυνση 21 σημείων με τον αλγόριθμο Savitzky – Golay (---) και εξομάλυνση Fourier 30 σημείων (.....)¹⁴²

A.4.4.3. Αποσυνέλιξη

Η αποσυνέλιξη γίνεται όταν καταγράφονται φάσματα στα οποία παρατηρείται αλληλεπικάλυψη κορυφών. Η διακριτική ικανότητα του φασματοφωτομέτρου δεν αυξάνεται, αλλά η δυνατότητα διαφοροποίησης των χαρακτηριστικών του φάσματος μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά. Αυτό απεικονίζεται στο σχήμα Α.20, το οποίο δείχνει μια ευρεία φασματική γραμμή πριν και μετά την αποσυνέλιξη. Οι κορυφές που είναι σε πολύ κοντινό κυματάρημο είναι τώρα εύκολα διακριτές.¹⁴³

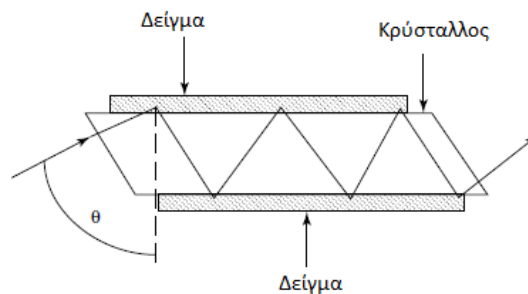


Σχήμα Α.20. Ευρεία φασματική γραμμή πριν (a) και μετά (b) την αποσυνέλιξη¹⁴³

Η τεχνική της αποσυνέλιξης περιλαμβάνει γενικά διάφορα στάδια: υπολογισμό ενός συμβολογράμματος του δείγματος με υπολογισμό του αντιστρόφου μετασχηματισμού Fourier του φάσματος, πολλαπλασιασμό του συμβολογράμματος μέσω μιας συνάρτησης εξομάλυνσης και μέσω μιας συνάρτησης αποτελούμενη από μια Gaussian-Lorentzian ζώνη φασματικών γραμμών και τέλος μετασχηματισμός Fourier του τροποποιημένου συμβολογράμματος. Κατά την αποσυνέλιξη, το σχήμα της φασματικής γραμμής ρυθμίζεται σε μια προσπάθεια να παρέχονται στενότερες φασματικές γραμμές χωρίς υπερβολική παραμόρφωση.¹⁴³

A.4.5. Τεχνική Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR)

Η φασματοσκοπία εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) χρησιμοποιεί το φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (Σχήμα A.21). Μια δέσμη ακτινοβολίας που εισέρχεται σε έναν κρύσταλλο θα υποστεί ολική εσωτερική ανάκλαση όταν η γωνία πρόσπτωσης στη διεπιφάνεια μεταξύ του δείγματος και του κρυστάλλου είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη γωνία, όπου η τελευταία είναι συνάρτηση των δεικτών διάθλασης των δύο επιφανειών. Η δέσμη διαπερνά ένα κλάσμα μήκους κύματος πέρα από την ανακλώσα επιφάνεια και όταν ένα υλικό που απορροφά επιλεκτικά την ακτινοβολία βρίσκεται σε στενή επαφή με την ανακλώσα επιφάνεια, η δέσμη χάνει ενέργεια στο μήκος κύματος όπου απορροφά το υλικό. Η προκύπτουσα εξασθενημένη ακτινοβολία μετράται και απεικονίζεται ως συνάρτηση του μήκους κύματος από το φασματοφωτόμετρο. Το βάθος διείσδυσης στην φασματοσκοπία ATR είναι συνάρτηση του μήκους κύματος, λ , του δείκτη διάθλασης του κρυστάλλου, n_2 και της γωνίας προσπίπτουσας ακτινοβολίας, θ .



Σχήμα A.21. Σχηματική παρουσίαση επιφάνειας υποδοχής στην τεχνική ATR¹⁴³

Το βάθος διείσδυσης, d_p , για ένα μη απορροφητικό μέσο δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$d_p = (\lambda/n_1) / \{2\pi[\sin^2 \theta - (n_1/n_2)^2]^{1/2}\} \quad \text{Εξίσωση A.4}$$

όπου n_1 είναι ο δείκτης διάθλασης του δείγματος.



Εικόνα Α.11. Φασματοφωτόμετρο FT-IR Thermo Nicolet 6700 και υποδοχή ATR

Οι κρύσταλλοι που χρησιμοποιούνται στις υποδοχές ATR κατασκευάζονται από υλικά που έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και έχουν πολύ υψηλό δείκτη διάθλασης. Τέτοια υλικά περιλαμβάνουν σεληνίδιο του ψευδαργύρου (ZnSe), γερμάνιο (Ge) και του ιωδιδίου του θαλλίου (KRS-5).¹⁴³

A.4.6. Μερική Παλινδρόμηση Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS)

Η μερική παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων (PLS) είναι ένα ισχυρό πολυπαραγοντικό στατιστικό εργαλείο που εφαρμόζεται με επιτυχία στις ποσοτικές αναλύσεις υπεριώδους, υπερύθρου, χρωματογραφίας κ.α. Το λογισμικό PLS συνήθως παρέχεται από τους κατασκευαστές των φασματοφωτομέτρων FTIR.¹⁴⁶ Το μοντέλο PLS μπορεί να ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα της συγχώνευσης της κύριας συνιστώσας παλινδρόμησης (PCR) και της πολυπαραγοντικής γραμμικής παλινδρόμησης (MLR). Η PCR βρίσκει παράγοντες (factors) που συλλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέγεθος διακύμανσης στη μήτρα μεταβλητών πρόβλεψης (X) (π.χ. φάσματα, μέγεθος μήτρας $J \times I$, όπου J είναι ο αριθμός των μηκών κύματος και I ο αριθμός των δειγμάτων). Το MLR επιδιώκει να βρει έναν ενιαίο παράγοντα (factor) ο οποίος να συσχετίζει καλύτερα τις μεταβλητές του προγνώστη (X) με τις προβλεπόμενες (y) μεταβλητές (π.χ. συγκεντρώσεις). Στο PLS, από την άλλη πλευρά, οι πληροφορίες που περιέχονται σε αμφότερα τα (X) και (y) χρησιμοποιούνται ενεργά για τον ορισμό του λανθάνοντος μεταβλητού χώρου, με τέτοιο τρόπο ώστε οι λανθάνοντες παράγοντες συλλαμβάνουν τη διακύμανση και επιτυγχάνουν συσχέτιση, μεγιστοποιώντας έτσι τη συνδιακύμανση μεταξύ του προγνώστη (X) και των προβλεπόμενων (y) μεταβλητών.¹⁴⁷

Το στάδιο βαθμονόμησης στο μοντέλο PLS απαιτεί ως πρώτο βήμα την εκτίμηση του βέλτιστου αριθμού λανθανουσών μεταβλητών A, η οποία συνήθως γίνεται με μια τεχνική γνωστή ως leave-one-out cross validation. Το κύριο αποτέλεσμα της βαθμονόμησης είναι ο φορέας των συντελεστών λανθάνουσας παλινδρόμησης \mathbf{V} (μέγεθος $A \times 1$) και δύο μήτρες των φορέων φόρτωσης \mathbf{P} και \mathbf{W} (και οι δύο

μεγέθους $J \times A$). Στην επόμενη φάση πρόβλεψης, αυτές οι παράμετροι χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της συγκέντρωσης αναλυόμενης ουσίας σε ένα δείγμα (\hat{y}) από το αντίστοιχο φάσμα του x :

$$\hat{t} = (W^T P)^{-1} W^T x \quad \text{Εξίσωση A.5}$$

$$\hat{y} = v^T t + \bar{y}_{cal} \quad \text{Εξίσωση A.6}$$

Όπου \hat{t} είναι ο φορέας των λεγόμενων βαθμολογιών (scores) για το δείγμα δοκιμής (μέγεθος $A \times 1$), ο δείκτης "T" υποδεικνύει τη μετατόπιση (transposition) και το \bar{y}_{cal} είναι η μέση συγκέντρωση βαθμονόμησης.

Η εξίσωση A.6 ορίζεται στο χώρο των λανθάνουσων μεταβλητών, αν και υπάρχει μια ανάλογη έκφραση στον πραγματικό μεταβλητό χώρο, όπως:

$$\hat{y} = b^T x + \bar{y}_{cal} \quad \text{Εξίσωση A.7}$$

Όπου b είναι ο φορέας συντελεστών παλινδρόμησης στον πραγματικό χώρο.¹⁴⁷

Το PLS δίνει πολύ σταθερά αποτελέσματα και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις στις οποίες υπάρχουν πολλές μεταβλητές, αλλά όχι απαραίτητα πολλά δείγματα, καθώς κάθε δείγμα μπορεί να δώσει μεγάλο αριθμό μεταβλητών. Βασικό κριτήριο για την προβλεψιμότητα των μοντέλων PLS είναι ο αριθμός των μεταβλητών που περιλαμβάνονται στα μοντέλα. Είναι σημαντικό να διατηρηθεί ο αριθμός των μεταβλητών όσο το δυνατόν χαμηλότερος. Στο PLS επιλέγονται οι παράμετροι που δίνουν τη "μέγιστη" μείωση της συνδιακύμανσης των δεδομένων. Έτσι, το PLS θα δώσει τον ελάχιστο αριθμό μεταβλητών που είναι απαραίτητες.¹⁴⁸

A.5. Φασματομετρία Μάζας

A.5.1. Γενικά

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως στην ποιοτική και ποσοτική χημική ανάλυση. Η τεχνική αυτή μετρά την αναλογία μαζών προς φορτίο (m/z) οποιουδήποτε αναλύτη, οργανικής και ανόργανης φύσης, η οποία προηγουμένως είχε ιοντισθεί. Τα σωματίδια με μηδενικό καθαρό ηλεκτρικό φορτίο (μόρια ή ρίζες) δεν ανιχνεύονται με αυτή την τεχνική. Επομένως, το φασματόμετρο μάζας δεν μετρά άμεσα τη μάζα, αλλά το m/z , όπου m είναι η σχετική μάζα ενός ιόντος στην ενοποιημένη ατομική κλίμακα διαιρούμενη με το φορτίο, z , του ιόντος. Η τιμή m/z δεν έχει μονάδες. Επειδή η μάζα των ατόμων και των μορίων είναι πολύ μικρή, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρησή του το

χιλιόγραμμο που είναι βασική μονάδα στο διεθνές σύστημα (SI). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται η μονάδα ατομικής μάζας (u).¹⁴⁹

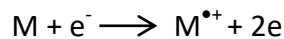
Το u που ονομάζεται Dalton (Da), ορίζεται ως το 1/12 της μάζας ενός ατόμου ¹²C στην βασική κατάσταση:

$$1 u = 1 \text{ Da} = 1.660538921 \times 10^{-27} \text{ kg}$$

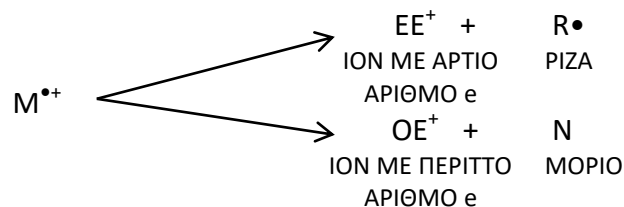
Με αυτόν τον τρόπο, η μάζα άλλων ατόμων ή μορίων εκφράζεται σε σχέση με τη μάζα του πιο σταθερού ισότοπου του άνθρακα, ¹²C που βρίσκεται σε αφθονία και αυτή η τιμή δεν έχει μονάδες. Το z ορίζεται ως η απόλυτη τιμή του φορτίου ενός ιόντος που διαιρείται με την τιμή του στοιχειώδους φορτίου του ηλεκτρονίου (e) στρογγυλεμένου στον πλησιέστερο ακέραιο αριθμό:

$$e = 1,602177 \times 10^{-19} \text{ C}$$

Το πρώτο στάδιο στη φασματομετρική ανάλυση των ενώσεων είναι η παραγωγή ιόντων της ένωσης στην αέρια φάση, π.χ. με ιοντισμό ηλεκτρονίων:



Αυτό το μοριακό ιόν υφίσταται θραυσματοποίηση. Επειδή πρόκειται για κατιόν ρίζας με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων, μπορεί να θραυσματοποιηθεί για να δώσει είτε μια νέα ρίζα και ένα ιόν με άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων, είτε ένα ουδέτερο μόριο και ένα νέο κατιόν ρίζας.



Αυτοί οι δύο τύποι ιόντων έχουν διαφορετικές χημικές ιδιότητες. Κάθε ιόν που προκύπτει από τη θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος μπορεί, με τη σειρά του, να θραυσματοποιηθεί περαιτέρω και ούτω καθεξής. Όλα αυτά τα ιόντα που προκύπτουν διαχωρίζονται στον φασματογράφο μάζας σύμφωνα με την αναλογία μάζας προς φορτίο και ανιχνεύονται ανάλογα με την αφθονία τους. Έτσι, παράγεται ένα φάσμα μάζας του μορίου το οποίο ουσιαστικά είναι μια γραφική παράσταση της αφθονίας των ιόντων έναντι της αναλογίας μάζας προς φορτίο. Η φασματομετρία μάζας έχει πάρα πολλές εφαρμογές και μπορεί να μας δώσει πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειακή σύσταση του δείγματος, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση μιγμάτων, τη δομή οργανικών, ανόργανων, οργανομεταλλικών

και βιολογικών μορίων, τη δομή και τη σύσταση επιφανειών και την αναλογία ισότοπων στοιχείων.¹⁵⁰

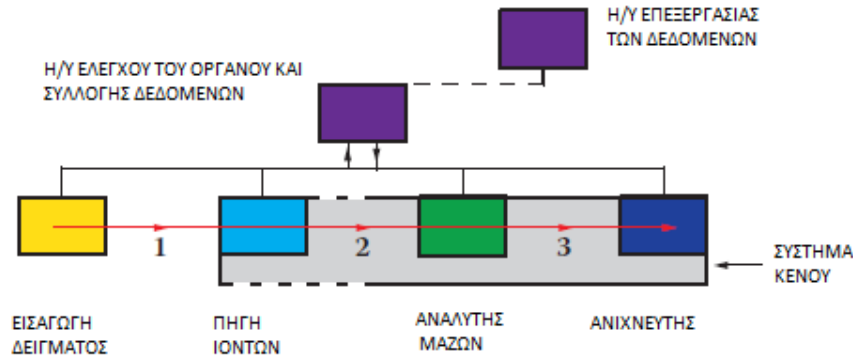
A.5.2. Ιστορικά Στοιχεία

Η ιστορία της φασματομετρίας μάζας ξεκινά το 1897 όπου ο J. J. Thompson κατάφερε να διαχωρίσει σωματίδια με διαφορετική μάζα, να προσδιορίσει την σχετική αφθονία τους και να δημιουργήσει τον πρώτο φασματογράφο μάζας. Τα επόμενα 60 χρόνια, σημειώθηκε σημαντική πρόοδος τόσο σε επίπεδο οργανολογίας όσο και σε επίπεδο εφαρμογών. Οι πρώτες βελτιώσεις έγιναν στην πηγή ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, στους μαγνήτες διπλής εστίασης και στους αναλυτές χρόνου πτήσης. Οι εφαρμογές περιελάμβαναν την επίδειξη, από τον F. W. Aston, της ύπαρξης ισοτοπικών στοιχείων σε πολλές μορφές. Η δυνατότητα διαφοροποίησης των ισότοπων οδήγησε στη συλλογή του ισότοπου ουρανίου-235 που χρησιμοποιήθηκε στην ατομική βόμβα. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 διατέθηκε στο εμπόριο ο πρώτος αέριος χρωματογράφος συνδεδεμένος με φασματόμετρο μάζας. Η σύζευξη των δύο τεχνικών επέτρεψε τον διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων έτσι ώστε τα μεμονωμένα συστατικά τους να μπορούν να εισαχθούν διαδοχικά στο φασματόμετρο μάζας.

Λόγω της ανάγκης τα δείγματα να βρίσκονται σε αέρια φάση, παρέμεινε το πρόβλημα με τις πολικές ενώσεις που αποσυντίθενται όταν θερμαίνονται, πριν από την εξάτμιση. Αυτή η κατηγορία ενώσεων περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό μορίων βιολογικού ενδιαφέροντος. Αρχικά, η χημική παραγοντοποίηση επέτρεψε την ανάλυση μερικών πολικών ενώσεων ενώ στα τέλη της δεκαετίας του 1970 αναπτύχθηκε ο ιοντισμός ροής με βομβαρδισμό ατόμων μεγάλης ταχύτητας (FAB). Τη δεκαετία του 1990, εμφανίστηκαν στο εμπόριο δυο νέες τεχνικές ιοντισμού, ο ηλεκτροψεκασμός (ESI) και ο ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI). Ο ESI διευκόλυνε τη σύζευξη υγρής χρωματογραφίας (LC) με φασματομετρία μάζας, επιτρέποντας την ανάλυση πολικών, βιοδραστικών ενώσεων όπως φάρμακα και μεταβολίτες. Επιπλέον, ο ESI και ο MALDI επέτρεψαν τη χρήση της φασματομετρίας μάζας στο πεδίο της ανάλυσης πρωτεϊνών (και άλλων βιοπολυμερών).¹⁵¹

A.5.3. Μέρη Φασματογράφου Μάζας

Τα κύρια μέρη που αποτελούν ένα φασματογράφο μάζας φαίνονται στο σχήμα A.22.



Σχήμα Α.22. Μέρη φασματογράφου μάζας¹⁵¹

Ένας φασματογράφος μάζας αποτελείται από τα εξής τμήματα:

1. Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος. Στο τμήμα αυτό εισάγεται συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος σε υγρή ή αέρια μορφή.
2. Την πηγή ιόντων. Τα μόρια του δείγματος ιοντίζονται, είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα, μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας.
3. Τον αναλυτή μαζών. Όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z που φέρουν.
4. Τον ανιχνευτή. Εδώ συλλαμβάνονται τα διαχωριζόμενα ιόντα και μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα.
5. Το σύστημα κενού. Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό που δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.
6. Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο Η/Υ χρησιμεύει τόσο στον έλεγχο του φασματογράφου όσο και στην συλλογή και την επεξεργασία των δεδομένων.¹⁵¹

Α.5.3.1. Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος

Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για εισαγωγή του στον χώρο ιοντισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση. Η εξαέρωση δειγμάτων που περιέχουν ενώσεις με περιορισμένη πτητικότητα ή στερεών δειγμάτων, διευκολύνεται με θέρμανση σε συνθήκες υψηλού κενού. Στο δοχείο δείγματος η

πίεση που επικρατεί είναι της τάξης των 10^{-2} Torr. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής το αέριο δείγμα εισάγεται σε ενδιάμεσο χώρο με ακόμη μικρότερη πίεση (τυπικά 10^{-5} Torr) από όπου, με σταθερή παροχή, εισάγεται στον χώρο ιοντισμού, όπου επικρατεί ακόμη χαμηλότερη πίεση (τυπικά 10^{-7} Torr), ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των παραγόμενων ιόντων. Στη συνδυασμένη τεχνική LC-MS, το υγρό που εκλούεται από τη χρωματογραφική στήλη οδηγείται στην πηγή ιόντων, αφού προηγουμένως απαλλαγεί από τη μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη.¹⁵¹

A.5.3.2. Πηγές Ιόντων

Τα μόρια είναι ηλεκτρικά ουδέτερα, επομένως δεν μπορούν να κινηθούν σε ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία εάν δεν υποστούν ιοντισμό. Η διαδικασία του ιοντισμού προσθέτει ενέργεια στα μόρια της αναλυόμενης ουσίας. Ο έλεγχος της ποσότητας ενέργειας επηρεάζει τα παραγόμενα ιόντα και, συνεπώς, τους τύπους των θραυσμάτων που παράγονται. Υπάρχουν πολλοί τρόποι σχηματισμού ιόντων τόσο εντός όσο και εκτός του φασματογράφου μάζας. Η μέθοδος ιοντισμού καθορίζει την ποσότητα ενέργειας που προστίθεται στον αναλύτη. Μέχρι τη δεκαετία του 1990, ο ιοντισμός γινόταν σε πηγές ιόντων που βρίσκονται μέσα στο θάλαμο κενού του φασματογράφου μάζας. Οι "παράγοντες" ιοντισμού περιελάμβαναν ηλεκτρόνια, άλλα ιόντα, ηλεκτρικά πεδία και λέιζερ. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την πραγματοποίηση ιοντισμού εκτός του θαλάμου κενού, σε ατμοσφαιρική πίεση. Αυτές οι μέθοδοι έχουν αυξήσει σημαντικά την ποικιλία και το φάσμα εφαρμογών της φασματομετρίας μάζας.¹⁵¹

Ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων

Ο ιοντισμός με ηλεκτρόνια (Electron Ionization ή EI) ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ευρέως, και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται, συχνότερα στα συστήματα GC-MS. Στον EI, οι αναλυτές στην αέρια φάση βομβαρδίζονται με ηλεκτρόνια ενέργειας 70 eV που λαμβάνονται από ένα θερμαινόμενο νήμα που βρίσκεται μέσα στο θάλαμο κενού. Η θραυσματοποίηση μπορεί να είναι τόσο εκτεταμένη ώστε να μην παρατηρείται μοριακό ιόν. Ωστόσο, η θραυσματοποίηση είναι γενικά προβλέψιμη και παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή του αναλύτη. Αυτή η προβλεψιμότητα κατέστησε δυνατή την κατασκευή βιβλιοθηκών φασμάτων που μπορούν να αναζητηθούν (μέσω υπολογιστή) για την αναγνώριση άγνωστων αναλυτών. Ένα σημαντικό μειονέκτημα του EI είναι ότι περιορίζεται σε μόρια με μοριακή μάζα <1 kDa.¹⁵¹

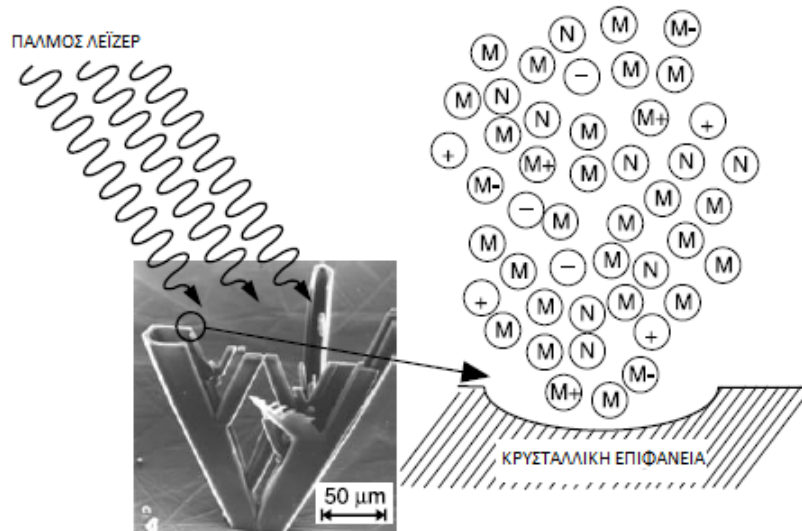
Χημικός ιοντισμός

Ο χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization ή CI) πραγματοποιείται συνήθως σε σχετικά υψηλή πίεση (0.1-100 Pa) και γι' αυτό το λόγο συνδυάζεται με σύγχρονες διατάξεις σύζευξης LC-MS ατμοσφαιρικής πίεσης. Η υψηλή πίεση έχει ως αποτέλεσμα συχνές συγκρούσεις των προσδιοριζόμενων μορίων, είτε μεταξύ τους, είτε με ιόντα που διοχετεύονται στο σύστημα και προέρχονται από αέριο αντιδραστήριο (π.χ. αμμωνία ή μεθάνιο). Το αέριο αντιδραστήριο που βρίσκεται σε περίσσεια ιοντίζεται αρχικά, είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, είτε λόγω της ροής του πάνω από φορτισμένο ηλεκτρόδιο εκκένωσης (6 kV). Στη συνέχεια τα ιόντα του αερίου αντιδραστήριου αντιδρούν με τα μόρια της προσδιοριζόμενης ένωσης ιονίζοντάς τα. Τα φάσματα που λαμβάνονται με χρήση χημικού ιοντισμού περιέχουν μικρότερο αριθμό σημάτων (είναι "καθαρότερα") σε σύγκριση με αυτά που λαμβάνονται όταν εφαρμόζεται ιοντισμός με ηλεκτρόνια. Η κύρια κορυφή δίνει πολύ δυνατότερο σήμα και ο προσδιορισμός της σχετικής μοριακής μάζας καθίσταται ευκολότερος. Ομοίως με τον EI, το ανώτερο όριο μάζας του χημικού ιοντισμού είναι ~ 1 kDa.¹⁵¹

Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας

Ο ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ή MALDI), αναπτύχθηκε από τον Karas, Hillenkamp, και συνεργάτες στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Η πηγή ιόντων MALDI συνήθως λειτουργεί υπό συνθήκες υψηλού κενού, με πίεση 1026 torr. Σε αυτό το είδος ιοντισμού το δείγμα χρειάζεται ειδική κατεργασία. Δηλαδή, τα μόρια του αναλύτη ενσωματώνονται σε μια μήτρα μορίων χαμηλού μοριακού βάρους που απορροφούν ακτινοβολία.

Τα μόρια της μήτρας διεγείρονται συντονισμένα από ένα υπεριώδες ή υπέρυθρο παλμό λέιζερ για νανοδευτερόλεπτα και η απορροφημένη ενέργεια προκαλεί εκρηκτική διάσπαση του δείγματος και ιοντισμό ενός κλάσματος των μορίων του αναλύτη. Συνεπώς, ένας όγκος της μήτρας και των παγιδευμένων αναλυόμενων μορίων αναρροφάται στην αέρια φάση. Το εκτοξευόμενο υλικό περιέχει τόσο ουδέτερα όσο και φορτισμένα είδη που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Στο σχήμα A.23 η φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απεικονίζει έναν κρύσταλλο σιναπικού οξέος-μυοσφαιρίνης. Στην περίπτωση της εκρόφησης, δημιουργούνται μόρια ουδέτερης μήτρας (M), ιόντα θετικής μήτρας (M+), αρνητικά ιόντα μήτρας (M-), ουδέτερα μόρια αναλυόμενης ουσίας (N), θετικά ιόντα αναλύτη (+) και αρνητικά ιόντα αναλύτη (-) και/ ή μεταφέρονται στην αέρια φάση.

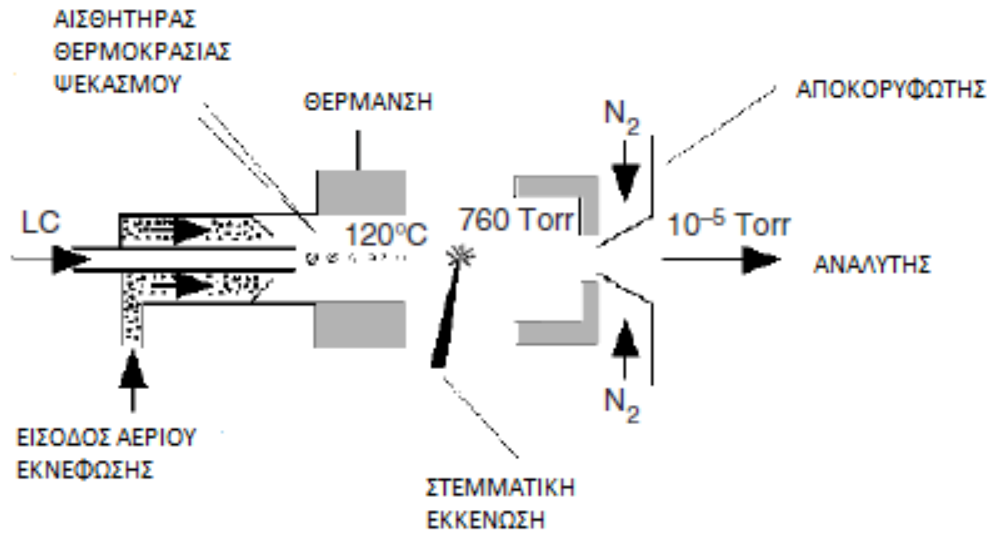


Σχήμα Α.23. Ιοντισμός MALDI¹⁵²

Το σημαντικότερο στοιχείο της μεθόδου MALDI είναι το υλικό της μήτρας. Υλικά μήτρας που απορροφούν στο υπεριώδες είναι αρωματικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους όπως τα παράγωγα κινναμωμικού οξέος, ενώ στο υπέρυθρο χρησιμοποιούνται υλικά όπως ο πάγος H_2O , η γλυκερόλη και η ουρία. Η επιλογή του υλικού μήτρας εξαρτάται από την κατηγορία του αναλύτη. Ένα χαρακτηριστικό του MALDI-MS, είναι η ικανότητα ανίχνευσης βιομορίων σε πολύπλοκα μίγματα παρουσία σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης αλάτων, ρυθμιστικών διαλυμάτων και άλλων ειδών. Λόγω αυτής της ικανότητας, το MALDI-MS έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη πρωτεϊνών και πεπτιδίων σε ορό, σωματικά υγρά και ολόκληρα κύτταρα.¹⁵²

Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση

Ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization ή APCI) είναι ισοδύναμος του χημικού ιοντισμού, με τη διαφορά ότι διεξάγεται σε ατμοσφαιρική πίεση (Σχήμα Α.24). Ο APCI εφαρμόζεται κυρίως σε πολικές και σχετικά μη πολικές ενώσεις με μέτριο μοριακό βάρος μέχρι περίπου 1500 Da.¹⁵⁰ Ο αναλύτης εισάγεται στον εκνεφωτή σε μορφή διαλύματος είτε με απευθείας ένεση είτε από το συνδεδεμένο σύστημα υγρής χρωματογραφίας και μετατρέπεται σε ένα νέφος από μία δέσμη αζώτου υψηλής ταχύτητας. Στη συνέχεια, τα σταγονίδια μετατοπίζονται από τη ροή του αερίου μέσω ενός θερμαινόμενου σωλήνα χαλαζία που ονομάζεται θάλαμος εξάτμισης. Η θερμότητα που μεταφέρεται στα σταγονίδια ψεκασμού επιτρέπει την εξάτμιση της κινητής φάσης και του δείγματος στη ροή του αερίου.

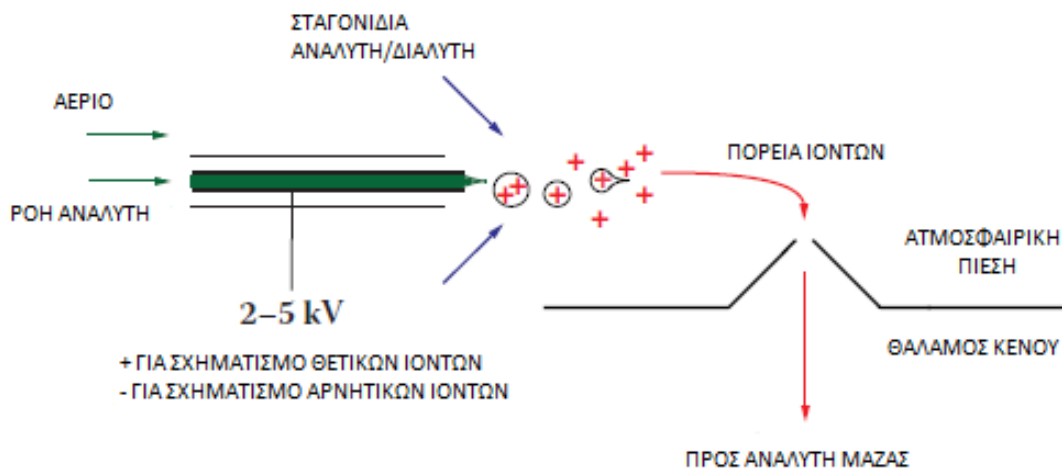


Σχήμα Α.24. Πηγή ιόντων APCI¹⁵⁰

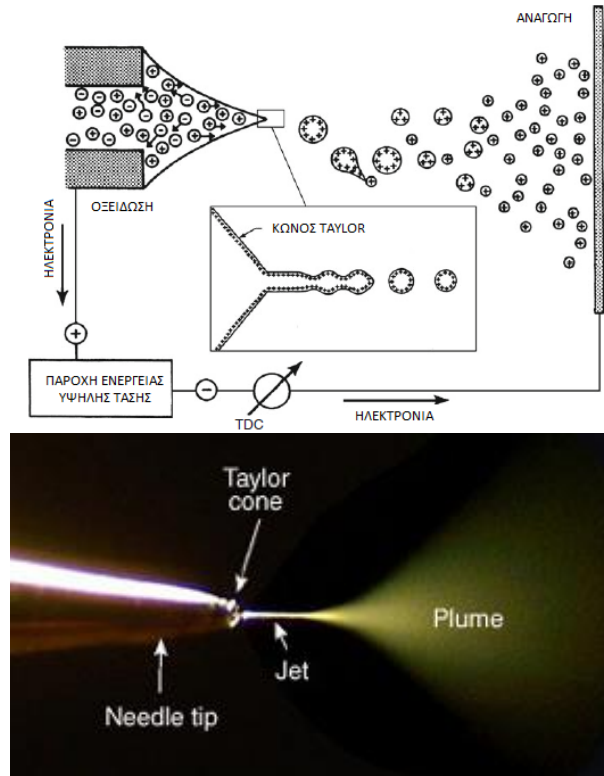
Η θερμοκρασία αυτού του θαλάμου ελέγχεται, γεγονός που καθιστά τις συνθήκες ατμοποίησης ανεξάρτητες από τη ροή και από τη φύση της κινητής φάσης. Το θερμό αέριο (120 °C) και οι ενώσεις εξέρχονται από το σωλήνα. Στη συνέχεια μεταφέρονται προς ένα ηλεκτρόδιο όπου λαμβάνει χώρα ο ιοντισμός. Η εξατμισθείσα κινητή φάση δρα ως ιοντίζον αέριο και τα ιόντα αντιδραστηρίων παράγονται από την επίδραση μιας εκκενώσεως κορώνας στον νεφελοποιημένο διαλύτη. Τυπικά, η εκκένωση κορώνας σχηματίζεται από πρωτεύοντα ιόντα ιοντισμού ηλεκτρονίων όπως το N_2^{*+} ή το O_2^{*+} . Στη συνέχεια, αυτά τα ιόντα συγκρούονται με τα εξατμισμένα μόρια διαλύτη για να σχηματίσουν τα δευτερεύοντα ιόντα αντιδρώντος αερίου. Τα ηλεκτρόνια που χρειάζονται για τον πρωταρχικό ιοντισμό δεν παράγονται από ένα θερμαινόμενο νήμα, καθώς η πίεση σε αυτό το τμήμα της διεπαφής είναι ατμοσφαιρική και το νήμα θα καεί, αλλά μάλλον χρησιμοποιώντας στεμματικές εκκενώσεις ή εκπομπή β-σωματιδίων. Αυτές οι δύο πηγές ηλεκτρονίων εμφανίζουν μεγάλη αντοχή στην παρουσία διαβρωτικών ή οξειδωτικών αερίων. Η ταχεία εξάτμιση των σταγονιδίων μειώνει σημαντικά τη θερμική αποσύνθεση του αναλύτη με αποτέλεσμα την περιοσμένη θραυσματοποίηση των ενώσεων.¹⁵⁰ Ο APCI είναι συχνά η μέθοδος επιλογής για την ποσοτικοποίηση μικρών μορίων, καθώς πρόκειται για μια διαδικασία χημικού ιοντισμού που παρέχει μια πιο ομοιόμορφη απόκριση αναλύτη σε σχέση με τον ηλεκτροψεκασμό.¹⁵¹

Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization ή ESI) είναι η συνηθέστερη μέθοδος ιοντισμού στα συστήματα υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών. Βασίζεται στην παρατήρηση κατά την οποία όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο μερικών χιλιάδων V, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες. Η διάταξη περιγράφεται στο σχήμα Α.25 και ο τρόπος λειτουργίας αναλύεται ως εξής: Η είσοδος του διαλύματος στο σύστημα γίνεται εν ροή μέσα από τριχοειδή σωλήνα. Παράλληλα με τον τριχοειδή βρίσκεται εξωτερικός σωλήνας μέσα από τον οποίο διαβιβάζεται αέριο που σκοπό έχει τη δημιουργία εκνεφώματος στην άκρη του τριχοειδούς. Ο τριχοειδής είναι γειωμένος, ενώ στο απέναντι ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται δυναμικό της τάξης των 2-5 kV. Κατά τον ψεκασμό του διαλύματος σε περιβάλλον υψηλού δυναμικού ο διαλύτης εξατμίζεται ταχύτατα ιοντίζοντας τις διάφορες ενώσεις.^{150,151} Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξάτμιση με ιοντισμό (ion evaporation) και εντάσσεται στις ήπιες τεχνικές ιοντισμού. Κατά τον ιοντισμό πολύ μικρό ποσοστό θραύσης λαμβάνει χώρα και τα φάσματα ηλεκτροψεκασμού είναι απλά, καθαρά και εύκολα στην εκτίμηση. Για τους λόγους αυτούς η τεχνική αυτή έχει διαδοθεί ιδιαίτερα και απαντάται στα περισσότερα νέα όργανα. Ένας άλλος λόγος της διάδοσής της είναι το γεγονός ότι επιτρέπει τον προσδιορισμό μεγαλομορίων (πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κλπ). Κατά τον ιοντισμό της με ηλεκτροψεκασμό μια πρωτεΐνη, δε διασπάται, αλλά φορτίζεται πολλαπλώς μειώνοντας έτσι το λόγο m/z , π.χ. ένα πολυ-πεπτίδιο με σχετική μοριακή μάζα στα 5.000 dalton, φορτιζόμενο σε 10 σημεία στο μόριο του, θα εμφανίσει κορυφή σε m/z 500.^{150,151}



Σχήμα Α.25. Πηγή ESI¹⁵¹



Σχήμα Α.26. Σχηματική παράσταση του κώνου Taylor και σχηματισμός εκνεφώματος¹⁵³

Στο σχήμα Α.26 φαίνεται η σχηματική παράσταση του κώνου Taylor και ο σχηματισμός εκνεφώματος στην τεχνική ESI. Το πολύ υψηλό ηλεκτρικό πεδίο που επιβάλλεται από την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος προκαλεί εμπλουτισμό θετικών ιόντων ηλεκτρολυτών στον μηνίσκο του διαλύματος στο μεταλλικό τριχοειδές άκρο. Αυτό το καθαρό φορτίο τραβιέται προς τα κάτω, διευρύνοντας τον μηνίσκο σε κώνο που εκπέμπει ένα λεπτό εκνέφωμα θετικά φορτισμένων σταγονιδίων. Η εξάτμιση του διαλύτη μειώνει τον όγκο των σταγονιδίων με σταθερό φορτίο, οδηγώντας στη σχάση των σταγονιδίων. Η ισορροπία φορτίου επιτυγχάνεται με ηλεκτροχημική οξείδωση στο θετικό ηλεκτρόδιο και μείωση στο αρνητικό ηλεκτρόδιο.¹⁵³

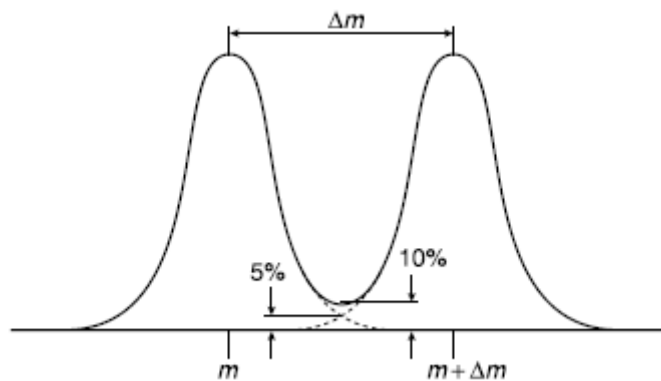
A.5.3.3. Αναλυτές Μάζας

Η βασική λειτουργία του φασματογράφου μάζας είναι να διαχωρίσει τα ιόντα, που παράγονται στην πηγή ιόντων, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων m/z . Από τον τύπο του αναλυτή μαζών εξαρτάται η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου, που είναι το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό ποιότητας ενός φασματογράφου μάζας. Η διακριτική ικανότητα (R) ορίζεται ως η παρατηρούμενη μάζα m διαιρούμενη με τη διαφορά μεταξύ δύο μαζών Δm που μπορούν να διαχωριστούν (Εξίσωση Α.8 & Σχήμα Α.27):

$$R = m/\Delta m$$

Εξίσωση Α.8

Ο ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι πετυχαίνεται, όταν δύο περίπου ισουψείς κορυφές επικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών



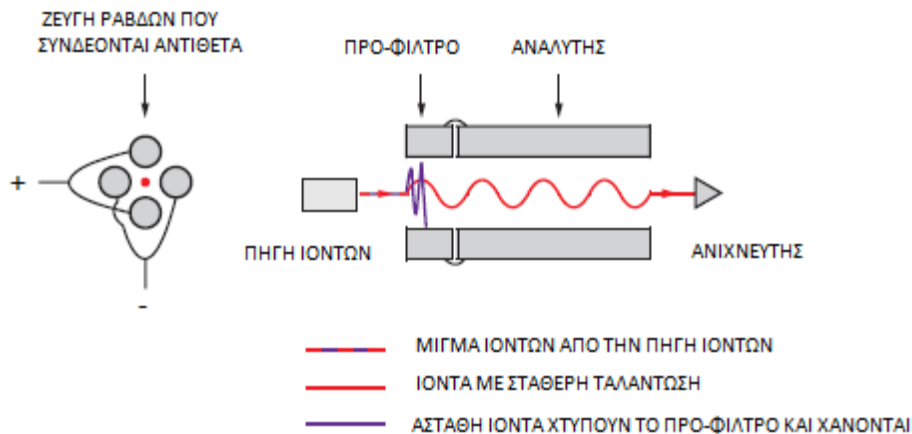
Σχήμα Α.27. Διακριτική ικανότητα στη φασματομετρία μαζών¹⁵²

Οι μετρήσεις μάζας πραγματοποιούνται σε φασματογράφους με χαμηλή (LRMS) ή υψηλή (HRMS) διακριτική ικανότητα. Οι μετρήσεις σε φασματογράφο LRMS παρέχουν πληροφορίες για την ονομαστική μάζα του αναλύτη. Η ακριβής μάζα μετράται μόνο σε φασματογράφους HRMS με ακρίβεια τεσσάρων ή εξι δεκαδικών ψηφίων. Η κύρια διαφορά μεταξύ των διαφόρων φασματογράφων μάζας οφείλεται στον αναλυτή μάζας που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ιόντων. Οι αναλυτές μάζας που χρησιμοποιούνται στους φασματογράφους HRMS και περιγράφονται παρακάτω είναι ο αναλυτής τετράπολου-χρόνου πτήσης Q-TOF, ο αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων Orbitrap και ο αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier FT-ICR.¹⁴⁹⁻¹⁵²

Τετραπολικός αναλυτής

Οι τετραπολικοί αναλυτές, όπως υπονοεί το όνομά τους, αποτελούνται από ένα σύνολο τεσσάρων ράβδων. Οι ράβδοι που είναι μεταλλικοί (μολυβδαίνιο) ή κεραμικοί με μεταλλική επίστρωση, μήκους 10-20 cm και διάμετρο μέχρι 1 cm, τοποθετούνται παράλληλα μεταξύ τους σε τετράγωνο με τα αντίθετα ζεύγη να συνδέονται ηλεκτρικά (Σχήμα Α.28). Η ευθυγράμμιση των ράβδων πρέπει να είναι

ακριβής για να δημιουργηθεί το συμμετρικό ηλεκτρικό πεδίο που είναι απαραίτητο για το διαχωρισμό ιόντων με διαφορετικές τιμές m/z . Το προφίλ των επιφανειών των ράβδων που βλέπουν στο κεντρικό σημείο του τετραγώνου πρέπει να είναι σε σχήμα υπερβολής ή κυλινδρικό για να υπάρξει το ιδανικό ηλεκτρικό πεδίο. Ο τετραπολικός αναλυτής λειτουργεί ανάλογα με τα οπτικά φίλτρα επιτρέποντας σε ιόντα μίας μόνο τιμής m/z να περάσουν και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Όλα τα άλλα ιόντα εξουδετερώνονται και απομακρύνονται. Για το λόγο αυτό ο τετραπολικός αναλυτής αποκαλείται συχνά και φίλτρο μαζών.



Σχήμα Α.28. Τετραπολικός αναλυτής¹⁵¹

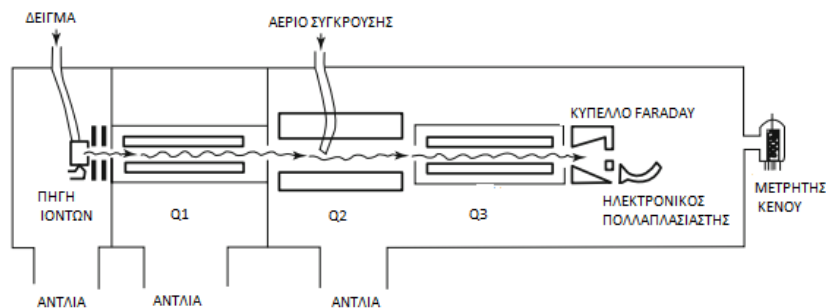
Όπως φαίνεται στο σχήμα Α.28, τέσσερις μεταλλικές κυλινδρικές ράβδοι (πόλοι) βρίσκονται φορτισμένες ανά απέναντι ζεύγη στο ίδιο συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα. Στο σύστημα εφαρμόζεται με διαφορά φάσης 180 μοίρες εναλλασσόμενο ρεύμα υψηλής συχνότητας (ραδιοσυχνότητα). Τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο μετά από επιτάχυνση σε δυναμικό 5-15 V. Τα ιόντα αρχίζουν να ταλαντεύονται κατά την είσοδο τους στο πεδίο που δημιουργείται. Μόνο ιόντα με μία συγκεκριμένη τιμή m/z έχουν σταθερή ταλαντωτική τροχιά (οριοθετημένη ταλάντωση) κατά μήκος του άξονα του τετραπόλου προς τον ανιχνευτή. Όλα τα άλλα ιόντα με διαφορετικές τιμές m/z αναπτύσσουν ασταθή μοτίβα ταλάντωσης (απεριόριστη ταλάντωση) κάθετα προς τη διαδρομή της πτήσης και χάνονται από τη σύγκρουση με τις ράβδους (ή τα προφίλτρα, εάν υπάρχουν).

Για τη σάρωση σε ένα τετραπολικό αναλυτή τα δυναμικά των δύο ρευμάτων (εναλλασσόμενου και συνεχούς) αυξάνονται από τιμή 0 έως μια μέγιστη τιμή, με το λόγο των δύο περίπου στο 6. Με τον τρόπο αυτό το δυναμικό μεταβάλλεται από 0 έως περί τα + 250 V για το συνεχές ρεύμα και από 0 έως + 1500 V για το εναλλασσόμενο. Η σάρωση αυτή των δυναμικών επηρεάζει την κίνηση των ιόντων με τρόπο που ορίζεται από περίπλοκες διαφορικές εξισώσεις. Τα ιόντα ουσιαστικά κινούνται διαγράφοντας ελικοειδείς πορείες μέσα στο τετράπολο. Η διαχωριστική

ικανότητα τέτοιων οργάνων φτάνει τις 3.000, ενώ έχουν δυνατότητα ανάλυσης ιόντων με m/z έως τις 3.000.¹⁵¹

Τριπλό τετράπολο

Ο τετραπολικός αναλυτής μπορεί να συνδυαστεί με άλλα δυο τετράπολα και να προκύψει ο φασματογράφος μάζας τριπλού τετραπόλου (Q₃Q₂Q₁). Τριπλά τετράπολα απαντώνται συχνότατα, για την εκμετάλλευση των θετικών στοιχείων του τετραπόλου (ταχεία σάρωση, δυνατότητα εφαρμογής φασματομετρίας μαζών σε σειρά/Tandem MS). Η μεγάλη χρησιμότητα του συστήματος έγκειται στη δυνατότητα της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας MS-MS (Σχήμα 29).



Σχήμα Α.29. Τριπλό τετράπολο¹⁵³

Αρχικά επιλέγεται στο πρώτο τετράπολο (Q₁) μόνο ένα ιόν. Στη συνέχεια το μητρικό ιόν οδηγείται στο δεύτερο τετράπολο (Q₂), όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (αργό ή ήλιο) και διασπάται παράγοντας θυγατρικά ιόντα. Το δεύτερο τετράπολο (Q₂) αποτελεί την κυψελίδα συγκρούσεων και λειτουργεί ως χώρος θραυσματοποίησης του μητρικού ιόντος. Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων πραγματοποιείται στο τρίτο τετράπολο (Q₃).

Η παρακολούθηση των ιόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τύπους σάρωσης:

- Την πλήρη σάρωση (Full Scan). Η πλήρης σάρωση βοηθάει στον προσδιορισμό της ταυτότητας μιας άγνωστης ουσίας (προσδιορισμό μοριακού βάρους).
- Την παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring-SIM), όπου παρακολουθείται ένα συγκεκριμένο ιόν ή ομάδα ιόντων. Είναι αποτελεσματική στην ανίχνευση μικρών ποσοτήτων (σε ίχνη) μιας γνωστής ουσίας σε πολύπλοκα μίγματα όταν το φάσμα μαζών της ουσίας είναι γνωστό.
- Την παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring-SRM ή Multiple Reaction Monitoring-MRM), όπου

παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση ή ομάδα αντιδράσεων, όπως η αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ιόντος.

- Την σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning), η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια ανάλυσης. Στο πρώτο στάδιο, ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z εισέρχονται στο τετράπολο Q1. Στη συνέχεια, τα επιλεγμένα ιόντα m/z εισέρχονται στο τετράπολο Q2, όπου υπόκεινται σε διάσπαση σχηματίζοντας θυγατρικά ιόντα. Τα θυγατρικά ιόντα μπορούν να παραχθούν με αποσύνθεση μετασταθών ιόντων ή με αλληλεπιδράσεις με αέριο αργό. Τα σχηματιζόμενα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο Q3 για το δεύτερο στάδιο ανάλυσης. Το φάσμα μαζών που προκύπτει δείχνει τα θυγατρικά ιόντα που παρήχθησαν από τη θραυσματοποίηση του επιλεγμένου μητρικού ιόντος. Ο τύπος αυτός σάρωσης παρέχει πληροφορίες για τη δομή μιας ουσίας.
- Την σάρωση μητρικού ιόντος (Precursor Ion Scanning), η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια ανάλυσης. Στο πρώτο στάδιο, τα ιόντα που παράγονται στην πηγή εισέρχονται στο τετράπολο Q1 που λειτουργεί σε σάρωση. Στη συνέχεια, τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο Q2, όπου υπόκεινται σε διάσπαση σχηματίζοντας θυγατρικά ιόντα. Το τετράπολο Q3 στο δεύτερο στάδιο ανάλυσης επιτρέπει μόνο σε θυγατρικά συγκεκριμένου λόγου m/z να εξέλθουν από τον ανιχνευτή. Το φάσμα μαζών που προκύπτει δείχνει τα μητρικά ιόντα που διασπάστηκαν για την παραγωγή του επιλεγμένου θυγατρικού ιόντος. Ο τύπος αυτός σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σχετικά με τη δομή και τη θραυσματοποίηση μιας ουσίας.^{151,153}

Αναλυτής χρόνου πτήσης

Ένας αναλυτής μάζας χρόνου-πτήσης (Time Of Flight ή TOF), διαχωρίζει τα ιόντα σύμφωνα με τη χρονική διαφορά μεταξύ ενός σήματος έναρξης και του παλμού που παράγεται όταν ένα ιόν χτυπά τον ανιχνευτή, δηλαδή, τον χρόνο πτήσης. Η αρχή του αναλυτή TOF δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά από τον Stephens το 1946. Το σημαντικό στα όργανα TOF-MS είναι η ύπαρξη ενός καλά καθορισμένου σήματος έναρξης για τη μέτρηση του χρόνου. Συνεπώς, οι αναλυτές TOF είναι κατάλληλοι για τις πηγές ιοντισμού παλμικού ιόντος, όπως ο MALDI, όπου ο παλμός λέιζερ, ο οποίος δημιουργεί ιόντα στην αέρια φάση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ξεκινήσει η μέτρηση του χρόνου (Σχήμα Α.30). Ο αναλυτής είναι σε υψηλό θετικό ή αρνητικό δυναμικό, τυπικά 5 έως 30 kV, και καθώς τα ιόντα εισέρχονται στην αέρια φάση, επιταχύνονται προς το κατώτερο δυναμικό. Όταν αφήσουν την περιοχή επιτάχυνσης, όλα τα άθικτα ιόντα με το ίδιο φορτίο θα έχουν ιδανικά την ίδια κινητική ενέργεια, αλλά διαφορετικές, εξαρτώμενες από τη

μάζα, ταχύτητες. Τα ιόντα στη συνέχεια αφήνονται να παρασυρθούν σε μία περιοχή χωρίς πεδίο προς έναν ανιχνευτή.



Σχήμα Α.30. Σχήμα ενός φασματογράφου MALDI-TOF με ανακλαστήρα¹⁵²

Η χρονική διαφορά μεταξύ του σήματος έναρξης και του παλμού που δημιουργείται όταν το ιόν χτυπάει τον ανιχνευτή είναι ο χρόνος πτήσης (t) και μπορεί να εκφραστεί ως:

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2qU}} \propto \sqrt{m/z}$$

Εξίσωση Α.9

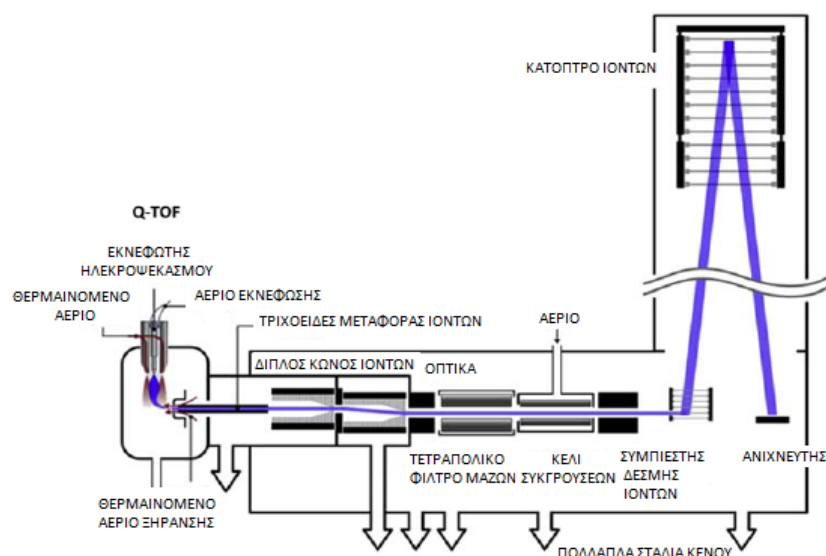
Όπου L είναι το μήκος της ελεύθερης περιοχής, v είναι η ταχύτητα ιόντων μετά την επιτάχυνση, m είναι η μάζα του ιόντος, q το φορτίο του ιόντος (charge of the ion), U η διαφορά επιτάχυνσης του ηλεκτρικού δυναμικού, και z η κατάσταση του φορτίου (charge state). Όσο γρηγορότερο ή ελαφρύτερο είναι το ιόν, τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος πτήσης. Δεν υπάρχει η ανάγκη να γνωρίζει ο χρήστης τα ακριβή δυναμικά και τις αποστάσεις του φασματογράφου καθώς η μετατροπή χρόνου/μάζας γίνεται με βαθμονόμηση με ιόντα γνωστών μαζών. Συνεχείς πηγές ιόντων, όπως η ESI, μπορούν να συνδεθούν με τους αναλυτές TOF μέσω ορθογώνιας επιτάχυνσης (oa-TOF). Στον oa-TOF, τα ιόντα που παράγονται από την πηγή εισέρχονται στον αναλυτή TOF κάθετα προς τον κύριο άξονά του. Το δυναμικό επιτάχυνσης αρχικά τίθεται στο μηδέν και ο παλμός εκκίνησης παράγεται στιγμιαία καθώς αυξάνεται το δυναμικό και τα ιόντα επιταχύνονται στον σωλήνα πτήσης. Ο συνδυασμός MALDI-TOF είναι ένα πανίσχυρο όργανο που έχει αλλάξει τα δεδομένα στην ανάλυση μεγαλομορίων. Πρωτεΐνες, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και πολυμερή, των οποίων ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους ήταν μια επίπονη διαδικασία, αναλύονται με χρήση MALDI-TOF σε μίγματα ή σε πραγματικά δείγματα και γίνεται προσδιορισμός μοριακών βαρών.¹⁵²

Αναλυτής τετράπολου-χρόνου πτήσης

Ο αναλυτής χρόνου πτήσης σε συνδυασμό με τετράπολο (Q-TOF) χρησιμοποιείται αρκετά στην μεταβολομική και ιδιαίτερα στη μη στοχευμένη ανάλυση. Η υψηλή απόδοση του αναλυτή Q-TOF σε πειράματα MS και MS/MS καθώς και η δυνατότητα χρήσης πηγών ιοντισμού, όπως ο APCI και ESI, τον κατέστησαν αρκετά δημοφιλής. Αρχικά είχε σχεδιαστεί για ανάλυση πεπτιδίων, αλλά γρήγορα χρησιμοποιήθηκε σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών που εκτείνεται από τη νάνο-ανάλυση βιολογικών δειγμάτων μέχρι και τη φαρμακευτική ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.



Εικόνα Α.12. Φασματογράφος μάζας Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC-MS σε συνδυασμό με UHPLC



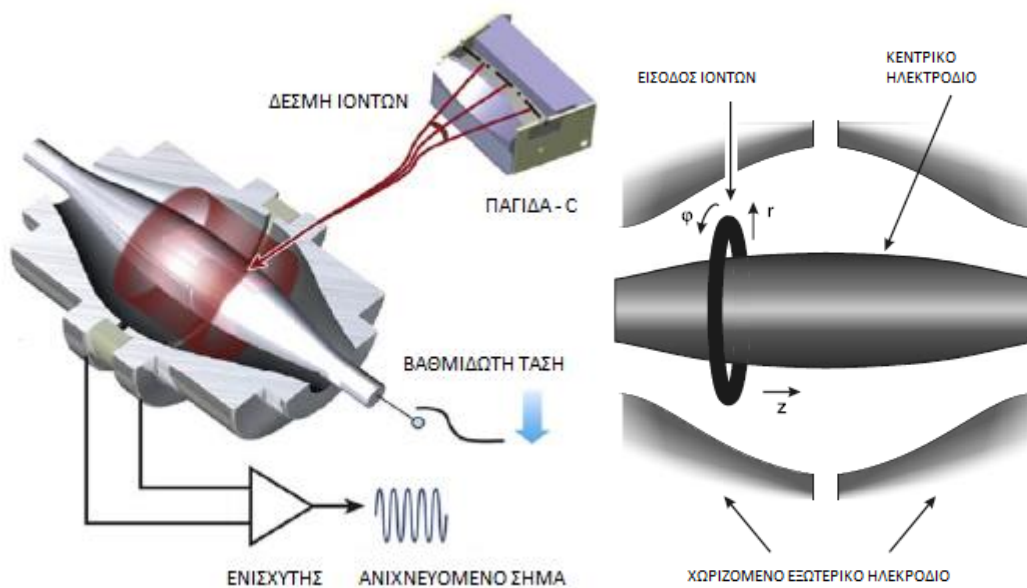
Σχήμα Α.31. Αναλυτής Q-TOF με πηγή ESI¹⁴⁹

Η υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία που παρουσιάζει σε συνδυασμό με την εύκολη λειτουργία για επιστήμονες με εμπειρία στην ενόργανη ανάλυση με αναλυτές μαζών τριπλού ή απλού τετραπόλου οδήγησαν στη γρήγορη διάδοσή του. Οργανολογικά ο αναλυτής μαζών Q-TOF μπορεί να θεωρηθεί ως η προσθήκη ενός τετραπόλου σε ένα TOF ή ως η αντικατάσταση του Q3 ενός τριπλού τετραπόλου με ένα TOF, (Σχήμα Α.31).

Σχεδιάστηκε για ποιοτικές αναλύσεις, σύντομα όμως επεκτάθηκε και σε ποσοτικούς προσδιορισμούς. Ακόμη και σήμερα που η μέγιστη ευαισθησία στην ανάλυση ενός συγκεκριμένου ιόντος επιτυγχάνεται με τριπλό τετράπολο, η αυξανόμενη ειδικότητα των υψηλής διακριτικής ικανότητας Q-TOF οργάνων, συχνά παρέχει καλύτερη αναλογία σήματος-θορύβου σε πολλές εφαρμογές.¹⁴⁹

Αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων

Ο αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap) είναι ο πιο πρόσφατος, τελευταίας τεχνολογίας αναλυτής μαζών και λειτουργεί παγιδεύοντας ιόντα σε κυκλική κίνηση. Αποτελείται από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο με σχήμα ατράκτου και ένα εξωτερικό κυλινδρικό ηλεκτρόδιο, ομοαξονικό με το κεντρικό ηλεκτρόδιο (Σχήμα Α.32).



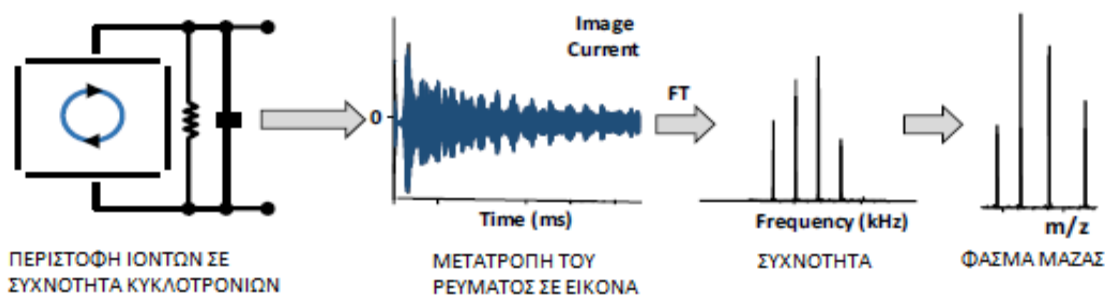
Σχήμα Α.32. Αναλυτής orbitrap^{149,152}

Τα ηλεκτρόδια κατασκευάζονται με ακρίβεια έτσι ώστε οι ηλεκτροστατικές έλξεις των ιόντων στο εσωτερικό ηλεκτρόδιο να ισορροπούνται με φυγοκεντρικές δυνάμεις, τα οποία προκαλούν την περιστροφή των ιόντων γύρω από τον άξονα. Προηγουμένως, τα ιόντα συσσωρεύονται αρχικά σε μια εξωτερική συσκευή έγχυσης (C-trap) η οποία παγιδεύει τα ιόντα σε γεμάτο με αέριο τετραπόλο και στη συνέχεια εισάγεται εφαιπτομενικά στον αναλυτή μάζας σε σύντομους παλμούς. Η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων αναγκάζει τα ιόντα σε περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και ταυτόχρονα σε ταλάντωση στον άξονα z. Μετά την ανίχνευση του ιοντικού ρεύματος εφαρμόζεται μετασχηματισμός Fourier (FT) για τη μετατροπή του σήματος σε φάσμα m/z .

Ο αναλυτής Orbitrap παρουσιάζει πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα (30.000-100.000), μεγάλη ακρίβεια μάζας (2-5 ppm) καθώς επίσης έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μεγάλου εύρους μαζών (50-4000).^{149,152}

Αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier

Ο αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance ή FT-ICR) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Marshall και τον Comisarow το 1974. Μέχρι σήμερα, είναι ο αναλυτής που παρέχει την υψηλότερη απόδοση όσον αφορά την διακριτική ικανότητα. Ο αναλυτής FT-ICR επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό του m/z των ιόντων με βάση τη συχνότητα κυκλοτρονίων των ιόντων σε σταθερό μαγνητικό πεδίο. Η διαδικασία που ακολουθείται στον αναλυτή FT-ICR φαίνεται στο σχήμα A.33.



Σχήμα A.33. Η διαδικασία που ακολουθείται στον αναλυτή FT-ICR¹⁴⁹

Τα ιόντα παγιδεύονται σε μια παγίδα Penning (ένα μαγνητικό πεδίο με ηλεκτρικές παγίδες) όπου διεγείρονται (στη συχνότητα κυκλοτρονικού συντονισμού τους) σε μεγαλύτερη κυκλοτρονιακή ακτίνα από ένα ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο ορθογώνιο στο μαγνητικό πεδίο. Αφού αφαιρεθεί το πεδίο διέγερσης, τα ιόντα περιστρέφονται στη συχνότητα κυκλοτρονίων τους σε φάση (ως «πακέτο» ιόντων). Αυτά τα ιόντα επάγουν ένα φορτίο σε ένα ζεύγος ηλεκτροδίων όταν το «πακέτο» ιόντων περνά κοντά τους. Το προκύπτον σήμα καλείται ελεύθερη αποσύνθεση επαγωγής ή συμβολόγραμμα, που συνίσταται από υπέρθεση ημιτονοειδών κυμάτων. Το σήμα ψηφιοποιείται και υποβάλλεται σε διακριτό μετασχηματισμό Fourier για να αποδώσει ένα φάσμα συχνοτήτων των κυκλοτρονικών ιόντων, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε φάσμα m/z . Σήμερα, στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμοι FT-ICR-MS μόνο από την εταιρία Bruker Daltonics με διακριτική ικανότητα έως 1.000.000.¹⁴⁹

A.5.3.4. Ανιχνευτές

Ο ρόλος του ανιχνευτή είναι να μετατρέψει την ενέργεια των εισερχόμενων σωματιδίων σε ένα σήμα ρεύματος που είναι καταχωρημένο από τις ηλεκτρονικές συσκευές και μεταφέρεται στον υπολογιστή του συστήματος του φασματογράφου μάζας. Όταν ένα εισερχόμενο σωματίδιο χτυπά στον ανιχνευτή, η ενέργεια από την κρούση προκαλεί εκπομπή δευτερογενών σωματιδίων, για παράδειγμα, ηλεκτρονίων ή φωτονίων. Ο αριθμός των δευτερογενών σωματιδίων που δημιουργούνται από μια πρόσκρουση εξαρτάται συχνότερα από την ενέργεια ή / και την ταχύτητα του εισερχόμενου ιόντος. Επομένως, εάν όλα τα ιόντα επιταχυνθούν στην ίδια κινητική ενέργεια, όπως στον αναλυτή μάζας TOF, τότε η ευαισθησία ανίχνευσης είναι χαμηλότερη για τα ιόντα μεγάλης μάζας και στη συνέχεια για ιόντα χαμηλής μάζας. Για να αυξηθεί η ευαισθησία ανίχνευσης, τα ιόντα συχνά επιταχύνονται πριν καταλήξουν στον ανιχνευτή. Ένας ανιχνευτής κατά προτίμηση θα πρέπει να έχει υψηλή απόδοση για τη μετατροπή της ενέργειας του εισερχόμενου ιόντος σε ηλεκτρόνια ή φωτόνια, γραμμική απόκριση, χαμηλό θόρυβο, σύντομο χρόνο αποκατάστασης και ελάχιστες μεταβολές στο χρόνο διέλευσης (στενό πλάτος κορυφής). Σε αυτή την ενότητα περιγράφονται ορισμένοι από τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σήμερα (ή πρόσφατα) σε φασματόμετρα μάζας. Δύο τύποι ανιχνευτών που συναντώνται περισσότερο είναι ο ανιχνευτής Faraday και ο ηλεκτρονικός πολλαπλασιαστής.¹⁵²

Κύπελο Faraday

Ο ανιχνευτής Faraday (Faraday Cup), είναι ο περισσότερο διαδεδομένος, εξαιτίας της ακρίβειας, της αξιοπιστίας και της ανθεκτικής του κατασκευής. Η απλούστερη μορφή του ανιχνευτή Faraday είναι ένα μεταλλικό (αγώγιμο) κύπελλο που συλλέγει φορτισμένα σωματίδια και είναι ηλεκτρικά συνδεδεμένο με ένα όργανο που μετρά το παραγόμενο ρεύμα. Μια σημαντική εφαρμογή για τους ανιχνευτές Faraday είναι ακριβείς μετρήσεις της αναλογίας σταθερών ισοτόπων.¹⁵²

Ηλεκτρονικοί πολλαπλασιαστές

Ένας πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων (Electron Multiplier) ενισχύει ένα ασθενές ρεύμα εισερχόμενων σωματιδίων χρησιμοποιώντας μια σειρά δευτερογενών ηλεκτροδίων εκπομπής για να παράγει ένα σημαντικά υψηλότερο ρεύμα στην άνοδο. Όταν ένα σωματίδιο προσκρούει στη δύνοδο, η ενέργεια μεταφέρεται απευθείας στα ηλεκτρόνια στο υλικό δυνόδου και εκπέμπονται πολλά δευτερεύοντα ηλεκτρόνια. Η δύνodos συχνά αποτελείται από ένα κράμα ενός μετάλλου αλκαλίων ή αλκαλικών γαιών με ένα ευγενέστερο μέταλλο. Έτσι, σχηματίζεται ένα λεπτό μονωτικό φιλμ οξειδωμένου αλκαλικού μετάλλου σε ένα αγώγιμο στήριγμα. Οι ηλεκτρονικοί πολλαπλασιαστές είναι σήμερα οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές στη φασματομετρία μάζας και διατίθενται σε διάφορα σχήματα.¹⁵²

A.5.3.5. Σύστημα Κενού

Τα συστήματα κενού που χρησιμοποιούνται σε φασματογράφους μάζας αποσκοπούν στην πρόληψη της απώλειας ιόντων λόγω σύγκρουσης με ουδέτερα μόρια, όπως ο αέρας, στους διάφορους θαλάμους του οργάνου. Μια άλλη σημαντική λειτουργία, είναι η απομάκρυνση των μορίων που δεν αντέδρασαν από την πηγή ιόντων για την πρόληψη/μείωση επιδράσεων μνήμης με ελαχιστοποίηση της διασταυρούμενης μόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων που εισάγονται, όπως από συστατικά χρωματογραφικής έκλουσης ή ηλεκτροφορητικά απόβλητα. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες είναι επιθυμητές συγκρούσεις μεταξύ ιόντων και ουδέτερων μορίων. Έτσι, είναι σημαντικό να εξεταστεί ο βαθμός κενού που απαιτείται σε διάφορα μέρη των φασματόμετρων μάζας. Η δημιουργία κενού σε ένα φασματογράφο μάζας αποτελείται από δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο επιτυγχάνεται ένα αρχικό κενό στα 10^{-2} Torr. Στο δεύτερο στάδιο το υψηλό κενό σε όλους του θαλάμους του φασματογράφου φτάνει τα 10^{-5} Torr έως τα 10^{-10} Torr. Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως οι περιστροφικές αντλίες οι οποίες

μειώνουν αρχικά την πίεση στα 10^{-2} Torr και στη συνέχεια αναλαμβάνουν αντλίες διάχυσης ελαίου. Επίσης, χρησιμοποιούνται και οι στροβιλομοριακές αντλίες, που λειτουργούν χωρίς υγρά.¹⁵¹

A.5.4. Θραυσματοποίηση MS/MS

Όταν υπάρχουν περισσότεροι του ενός αναλυτές σε ένα φασματογράφο μάζας, οι παράμετροι των μεμονωμένων αναλυτών μπορούν να ποικίλουν, χωριστά ή σε συνδυασμό, για τη λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης ή για την παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων. Η στρατηγική χρήσης δύο αναλυτών σε συνδυασμό ονομάζεται φασματομετρία μάζας/φασματομετρία μάζας (MS/MS). Υπάρχουν αρκετοί συνδυασμοί οργάνων MS/MS, συμπεριλαμβανομένων των QqQ, TOF/TOF, Q-TOF κ.α.

Η διαδικασία της φασματομετρίας MS/MS είναι ότι ένα συγκεκριμένο πρόδρομο ιόν θραυσματοποιείται προς ένα μικρότερο ιόν συνοδευόμενο από την απώλεια ενός ουδέτερου θραύσματος. Το πρόδρομο ιόν επιλέγεται συνήθως στον πρώτο αναλυτή, και στη συνέχεια στο κελί συγκρούσεων (collision cell) παράγονται ιόντα τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται σε έναν δεύτερο αναλυτή. Το κελί συγκρούσεων είναι τοποθετημένο μεταξύ των δυο αναλυτών. Σε αυτό το κελί τα ιόντα του αναλυτή, στα οποία έχει προστεθεί ενέργεια, κατά τη διάρκεια της επιτάχυνσής τους, συγκρούονται με ουδέτερα άτομα με υψηλό δυναμικό ιοντισμού (συνήθως αέριο αργόν) ή μόρια (π.χ. άζωτο) διατηρούμενα σε σχετικά υψηλή πίεση (6 mTorr , $8 \times 10^{-3} \text{ mbar}$). Κατά τη διάρκεια αυτών των συγκρούσεων, ένα μέρος της κινητικής ενέργειας των ιόντων μετατρέπεται σε πλεονάζουσα ηλεκτρονική ενέργεια. Η διαδικασία ονομάζεται ενεργοποίηση μέσω σύγκρουσης (collisional activation). Εάν η περίσσεια ενέργειας που αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια των συγκρούσεων είναι επαρκής για να σπάσει τους χημικούς δεσμούς, τότε αυτά τα ιόντα λέγεται ότι έχουν υποβληθεί σε διάσπαση που προκαλείται από σύγκρουση (collision-induced dissociation-CID), που ονομάζεται επίσης διάσπαση/αποσύνθεση (collisionally activated dissociation/decomposition-CAD) που ενεργοποιείται με σύγκρουση.

Η διαδικασία CID είναι σωρευτική. Τα ιόντα εισέρχονται στο κελί CID με κινητική ενέργεια που αποκτάται κατά την επιτάχυνση τους (10 έως 100 V) από τον πρώτο αναλυτή. Μόλις φτάσουν στο κελί, τα ιόντα συσσωρεύουν πρόσθετη ενέργεια διαδοχικά μέσω πολλαπλών συγκρούσεων με τα ουδέτερα άτομα αερίου μέχρι να θραυσματοποιηθούν σε μια (περιορισμένη) ποικιλία ιόντων. Η θραυσματοποίηση κανονικά περιλαμβάνει τη θραύση του δεσμού μεταξύ ενός άνθρακα και ενός γειτονικού ετεροατόμου, π.χ. N, O, S και Si. Η φύση και ο βαθμός

θραυσματοποίησης εξαρτώνται έντονα από την αρχική τάση επιτάχυνσης και, σε μικρότερο βαθμό, από τον τύπο και την πίεση του αερίου σύγκρουσης. Η επιλογή της ποσότητας κινητικής ενέργειας που προστίθεται στα ιόντα εξαρτάται τόσο από την αναλυόμενη ουσία όσο και από τον τύπο των δεδομένων που αναζητούνται. Για να ληφθούν πληροφορίες δομής, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια σειρά ενεργειών έτσι ώστε τα φάσματα να δείχνουν προοδευτική, ενεργειακά εξαρτημένη θραυσματοποίηση.

Όταν τα πρόδρομα ιόντα επιταχυνθούν με 1-20 kV, η τεχνική αναφέρεται ως CID υψηλής ενέργειας. Οι συγκρούσεις που προκύπτουν (συχνά με ήλιο παρά με αργό) διεγείρουν την ηλεκτρονική κατάσταση του αναλύτη και παράγουν μια ευρεία κατανομή της εσωτερικής ενέργειας. Η εκτεταμένη θραυσματοποίηση παρέχει πολλές πληροφορίες για τη δομή μιας ένωσης. Π.χ., η CID υψηλής ενέργειας μπορεί ακόμη να διακρίνει την λευκίνη από υπολείμματα ισολευκίνης σε πεπτίδια. Οι συγκρούσεις υψηλής ενέργειας μπορούν να πραγματοποιηθούν μόνο σε όργανα που έχουν τροποποιηθεί (ή έχουν κατασκευαστεί) για τέτοιου είδους πειράματα.¹⁵¹

A.5.5. Συλλογή και Επεξεργασία Δεδομένων στη Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας

Οι φασματογράφοι μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά συστήματα QqQ. Το βασικό πλεονέκτημα τους είναι ότι δίνουν την δυνατότητα ακριβούς ταυτοποίησης, βασισμένη κυρίως στις μετρήσεις της ακριβούς μάζας (exact mass). Επιπλέον, παρουσιάζουν αυξημένη εκλεκτικότητα, η οποία είναι ίσως το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό όταν πρέπει να προσδιοριστούν ίχνη εκατοντάδων αναλυτών σε πολύ πολύπλοκα δείγματα, όπως τρόφιμα, τα οποία περιέχουν χιλιάδες συστατικά και υπάρχουν συχνά σε υψηλές συγκεντρώσεις. Τέλος, η λειτουργία πλήρους σάρωσης στα συστήματα HRMS επιτρέπει την ανίχνευση απεριόριστου αριθμού ενώσεων με ελάχιστη προσπάθεια βελτιστοποίησης των αναλυτικών παραμέτρων και προσφέρει τη δυνατότητα αναδρομικής ανάλυσης δεδομένων, η οποία δεν είναι δυνατή με QqQ.

Η ακριβής μάζα ενός ιόντος είναι πολύτιμη πληροφορία για την ταυτοποίηση του. Η οδηγία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής SANTE/11945/2015¹⁵⁴ αναγνωρίζει ανοχή στην ακρίβεια μάζας 5 ppm ως επαρκές κριτήριο ταυτοποίησης. Ωστόσο, η ακρίβεια μάζας μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως η παρουσία ισοβαρών ενώσεων, η οποία μπορεί να δώσει ψευδή αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, η ακριβής μάζα και ο χρόνος έκλουσης μιας ένωσης δεν επαρκούν για την ταυτοποίηση της. Σε αυτή την περίπτωση είναι πολύ χρήσιμες οι πληροφορίες που

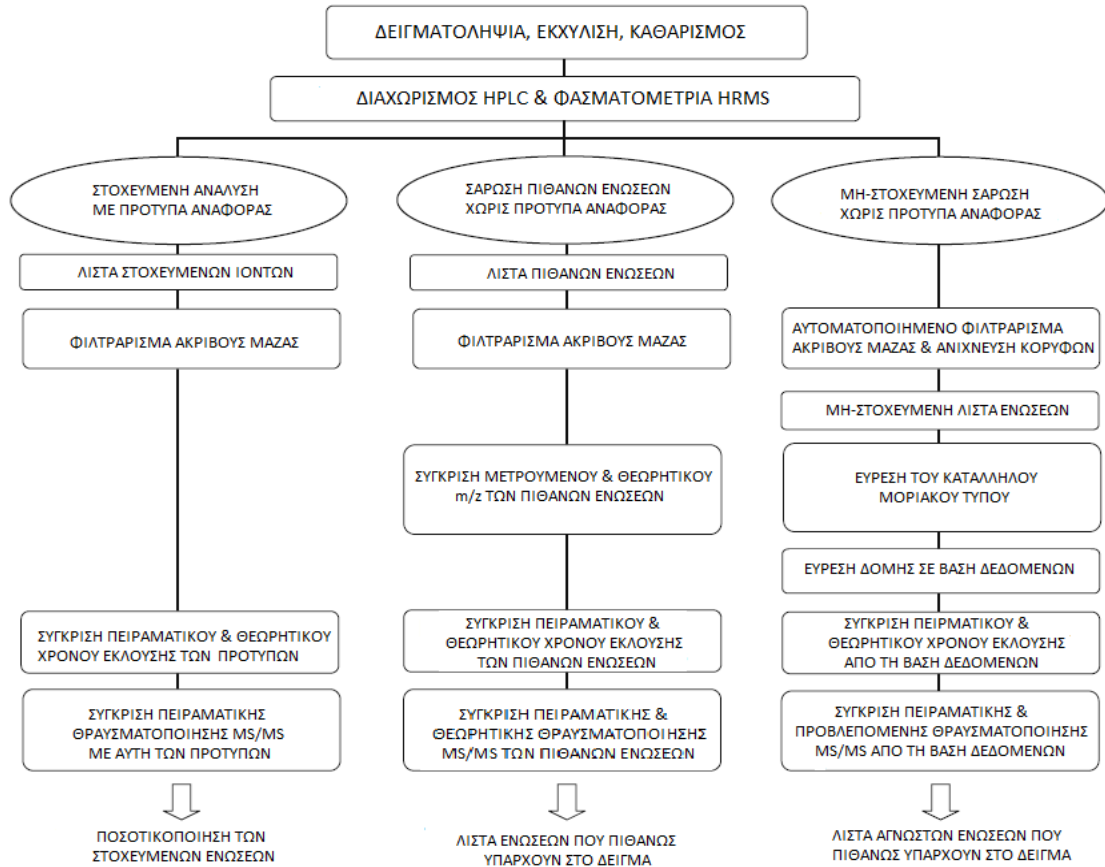
παρέχονται από τη θραυσματοποίηση του μητρικού ιόντος στα φάσματα MS/MS. Τα ιόντα προσθήκης συνήθως δεν αποτελούν καλή επιλογή λόγω της περιορισμένης συχνότητας εμφάνισης και της μεγάλης μεταβλητότητάς τους.

Οι απαιτήσεις ταυτοποίησης της οδηγίας SANTE/11945/2015 για τα όργανα HRMS καταδεικνύουν ότι πρέπει να καταγράφονται τουλάχιστον δύο ιόντα: ένα μοριακό ιόν και ένα πρωτονιωμένο ή αποπρωτονιωμένο μόριο ή ιόν προσθήκης, με ακρίβεια μάζας 5 ppm, συν ένα θυγατρικό ιόν από το φάσμα MS/MS. Επιπλέον, ο λόγος του εμβαδού της κορυφής των δύο μαζών πρέπει να είναι $\pm 30\%$ της μέσης αναλογίας του μετρούμενου προτύπου της ένωσης στο ίδιο πείραμα.¹⁴⁹

Τα χρωματογραφήματα πλήρους σάρωσης MS και MS/MS περιέχουν χιλιάδες ιόντα που προέρχονται από τους αναλύτες που υπάρχουν στα δείγματα αλλά και από διάφορες παρεμβολές. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές επεξεργασίας δεδομένων που ακολουθούνται στη φασματομετρία HRMS όπως οι εξής:

1. Η στοχευμένη ανάλυση (target analysis), όπου η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των ενώσεων γίνονται με βάση τα αντίστοιχα πρότυπα αναφοράς τα οποία είναι διαθέσιμα.
2. Η σάρωση πιθανών ενώσεων (suspects screening), όπου δεν υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα αναφοράς αλλά η ταυτοποίηση των ενώσεων γίνεται με πληροφορίες από βάσεις δεδομένων και τη βιβλιογραφία. Αυτές οι πληροφορίες περιλαμβάνουν το χρόνο έκλουσης, το ακριβές m/z του ιόντος, τα θυγατρικά ιόντα από τη θραυσματοποίηση του μητρικού ιόντος καθώς και τα ιόντα προσθήκης.
3. Η μη στοχευμένη σάρωση (non-target screening), όπου δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες ή πρότυπα αναφοράς για την ταυτοποίηση των ενώσεων.¹⁵⁵

Στο σχήμα A.34 περιγράφεται η σύγκριση των μεθόδων. Είναι σαφές ότι η στοχευμένη ανάλυση αναφέρεται στην ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση ενός συνόλου αναλυτών που έχουν προεπιλεχθεί. Σε αυτή την περίπτωση, η στοχευμένη ανάλυση αγνοεί οποιαδήποτε άλλη ένωση υπάρχει στο δείγμα. Το ίδιο συμβαίνει και στη σάρωση πιθανων ενώσεων, όπου θέλουμε να ερευνήσουμε την πιθανότητα ύπαρξης συγκεκριμένων ενώσεων στο δείγμα.



Σχήμα Α.34. Σύγκριση των μεθόδων ανάλυσης δεδομένων στη φασματομετρία HRMS¹⁵⁵

Αντίθετα, η μη στοχευμένη σάρωση, σημαίνει σάρωση σε μια μεγάλη βάση δεδομένων, χωρίς να είναι γνωστό το τι θα βρεθεί. Στη μη στοχευμένη σάρωση ακολουθούνται τα εξής βήματα: (i) αυτοματοποιημένη ανίχνευση της κορυφής του ιόντος με φιλτράρισμα για την εύρεση της ακριβούς μάζας από το χρωματογράφημα (ii) αντιστοίχιση της ακριβούς μάζας με έναν μοριακό τύπο (iii) αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων για πιθανές δομές που αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο μοριακό τύπο. Και οι τρεις μέθοδοι χρησιμοποιούνται αρκετά στην φασματομετρία HRMS. Ιδιαίτερα, η μη στοχευμένη σάρωση είναι αρκετά διαδεδομένη στην εύρεση της παρουσίας φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα.^{149,155}

Α.6. Βιβλιογραφία

1. Higdon, J. V., Delage, B., William, D. E., Dashwood, R. H. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiological evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, 55(3), 224-236.
2. Hanelt, P. (1998). Lesser known or forgotten cruciferous vegetables and their history. *Acta Horticulturae*, 459, 39-45.
3. Griffiths, D. W., Birch, A. N. E., Hillman, J. R. (1998). Antinutritional compounds in the Brassica Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73(1), 1-18.
4. Fenwick, G. R., Heaney, R. K., Mullin, W. J. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18(2), 123-201.
5. Haston, E., Richardson, J. E., Stevens, P. F., Chase, M. W., Harris, D. J. (2007). A linear sequence of angiosperm phylogeny group II families, *Taxonomy*, 56(1), 7-12.
6. World Health Organization/International Agency for Research on Cancer (2004). Cruciferous vegetables, isothiocyanates and indoles, IARC handbooks on cancer prevention, (Vol. 9), (pp. 13-23). Lyon: IARC press.
7. Salunkhe, D. K., Kadam, S. S. (1998). Handbook of vegetable science and technology: production, composition, storage, and processing, (1st ed.), (pp. 299-372). CRC Press.
8. Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., Arora, S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates - A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1561-1572.
9. Ettlinger, M., Kjaer, A. (1968). Sulfur compounds in plants in: Marby, T. J., Alston, R. E., Runeckle, V. C. eds., Recent Advances in Phytochemistry, (Vol. 1), (pp. 59-144). New York: Appleton-Century-Crofts.
10. Johnson, S. D., Griffiths, M. E., Peter, C. I., Lawes, M. J. (2009). Pollinators, "mustard oil" volatiles, and fruit production in flowers of the dioecious tree *Drypetes natalensis* (Putranjivaceae). *American Journal of Botany*, 96(11), 2080-2086.
11. Møller, B. L. (2010). Functional diversifications of cyanogenic glucosides. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), 337-346.
12. Agerbirk, N., Olsen, C. E. (2012). Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*, 77, 16-45.
13. Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5-51.

14. Bennett, R. N., Kiddle, G., Wallsgrave, R. M. (1997). Biosynthesis of benzylglucosinolate, cyanogenic glucosides and phenylpropanoids in *Carica papaya*. *Phytochemistry*, 45(1), 59-66
15. Ettlinger, M. G., Lundeen, A. J. (1956). The structures of sinigrin and sinalbin; an enzymatic rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*, 78(16), 4172-4173.
16. Agerbirk, N., Olsen, C. E. (2015). Glucosinolate hydrolysis products in the crucifer *Barbarea vulgaris* include a thiazolidine-2-one from a specific phenolic isomer as well as oxazolidine-2-thiones. *Phytochemistry*, 115(1), 143-151.
17. Song, L., Morrison, J. J., Botting, N. P., Thornalley, P. J. (2005). Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amines. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 234-243.
18. Redovniković, I. R., Glivetić, T., Delonga, K., Furač, J. V. (2008). Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum Biologorum*, 110(4), 297-309.
19. Mikkelsen, M. D., Naur, P., Halkier, B. A. (2004). *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *The Plant Journal*, 37(5), 770-777.
20. Halkier, B. A., Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 303-333.
21. Grubb, C. D., Zipp, B. J., Ludwig -Muller J., Masuno, M. N., Molinski, T. F., Abel, S. (2004). *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *The Plant Journal*, 40(6), 893-908.
22. Petersen B. L., Chen, S. X., Hansen C. H., Olsen, C. E., Halkier, B. A. (2002). Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 214(4), 562-571.
23. Brown, P. D., Tokuhisa, J. G., Reichelt, M., Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62(3), 471-481.
24. Giamoustaris, A., Mithen, R. (1996). Genetics of aliphatic glucosinolates 4 Side-chain modification in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(5-6), 1006-1010.
25. Uda, Y., Kurata, T., Arakawa N. (1986). Effects of pH and ferrous ion on the degradation of glucosinolates by myrosinase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(11), 2735-2740.
26. Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D. J., Gershenzon, J. (2001). The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes

- the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *The Plant Cell*, 13(12), 2793-2807.
27. Hasapis, X., Macleod, A. J. (1982). Benzylglucosinolate degradation in heat-treated *Lepidium sativum* seeds and detection of a thiocyanate-forming factor. *Phytochemistry*, 21(5), 1009-1013
 28. Agerbirk, N., Olsen, C. E., Sørensen, H. (1998). Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1563-1571.
 29. Kim, J. H., Lee B. W., Schroeder, F. C., Jander, G. (2008). Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *The Plant Journal*, 54(6), 1015-1026.
 30. Tripathi, M. K., Mishra A. S. (2007). Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 132(1-2), 1-27.
 31. Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., Lozniewski, A. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7610-7615.
 32. Johansson, N. L., Pavia, C. S., Chiao, J. W. (2008). Growth inhibition of a spectrum of bacterial and fungal pathogens by sulforaphane, an isothiocyanate product found in broccoli and other cruciferous vegetables. *Planta Medica*, 74(7), 747-750.
 33. Choi, W. J., Kim, S. K., Park, H. K., Sohn, U. D., Kim, W. (2014). Anti-inflammatory and anti-superbacterial properties of sulforaphane from shepherd's purse. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 18(1), 33-39.
 34. Fimognari, C., Nusse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2002). Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis*, 23(4), 581-586.
 35. Rosea, P., Huangb, Q., Ongb, C. N., Whiteman, M. (2005). Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209(2), 105-113.
 36. Bonnesen, C., Eggleston, I. M., Hayes, J. D. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Research*, 61(16), 6120-6130.

37. Wang, L., Liu, D., Ahmed, T., Chung, F. L., Conaway, C., Chiao, J. W. (2004). Targeting cell cycle machinery as a molecular mechanism of sulforaphane in prostate cancer prevention. *International Journal of Oncology*, 24(1), 187-192.
38. α. Singh, A. V., Xiao, D., Lew, K. L., Dhir, R., Singh, S. V. (2004). Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis*, 25(1), 83-90.
β. Abbaoui, B., Riedl, K. M., Ralston, R. A., Thomas-Ahner, J. M., Schwartz, S. J., Clinton, S. K., Mortazavi, A. (2012). Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: characterization, metabolism, and interconversion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(11), 1675-1687.
39. Wu, L., Ashraf, M. H. N., Facci, M., Wang, R., Paterson, P. G., Ferrie, A., Juurlink, B. H. J. (2004). Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7094-7099.
40. Manici, L. M., Lazzeri, L., Baruzzi, G., Leoni, O., Galletti, S., Palmieri, S. (2000). Suppressive activity of some glucosinolate enzyme degradation products on *Pythium irregulare* and *Rhizoctonia solani* in sterile soil. *Pest Management Science*, 56(10), 921-926.
41. Fimognari, C., Nüsse, M., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2004). The new isothiocyanate 4-(methylthio)butyl isothiocyanate selectively affects cell-cycle progression and apoptosis induction of human leukemia cells. *Investigational New Drugs*, 22(2), 119-129.
42. Azarenko, O., Jordan, M. A., Wilson, L. (2014). Erucin, the major isothiocyanate in arugula (*Eruca sativa*), inhibits proliferation of MCF7 tumor cells by suppressing microtubule dynamics. *PLoS ONE* 9(6): e100599.
43. Prashar, A., Siddiqui, F., Singh, A. K. (2012). Synthetic and green vegetable isothiocyanates target red blood leukemia cancers. *Fitoterapia*, 83(2), 255-265.
44. Lamy, E., Schröder, J., Paulus, S., Brenk, P., Stahl, T., Mersch-Sundermann, V. (2008). Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erucic acid in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2415-2421.
45. Giallourou, N., Oruna-Concha, M. J., Harbourne, N. (2016). Effects of domestic processing methods on the phytochemical content of watercress (*Nasturtium officinale*). *Food Chemistry*, 212, 411-419.

46. Angus, J. F. (1994). Biofumigation: isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit the growth of the take-all fungus. *Plant and Soil*, 162(1), 107-112.
47. Smolinska, U., Morra, M. J., Knudsen, G. R., James, R. L. (2003). Isothiocyanates produced by *Brassicaceae* species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease*, 87(4), 407-412
48. Lichtenstein, E. P., Morgan, D. G., Mueller, C. H. (1964). Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(2), 158-161.
49. Borek, V., Elberson, L. R., McCaffrey, J. P., Morra, M. J. (1995). Toxicity of aliphatic and aromatic isothiocyanates to eggs of the black vine weevil (*Coleoptera: Curculionidae*). *Journal of Economic Entomology*, 88(5), 1192-1196.
50. Serra, B., Rosa, E., Iori, R., Barillari, J., Cardoso, A., Abreu, C., et al. (2002). In vitro activity of 2-phenylethyl glucosinolate, and its hydrolysis derivatives on the root-knot nematode *Globodera rostochiensis* (Woll.). *Scientia Horticulturae*, 92(1), 75-81.
51. Johnson, C. R., Chun, J., Bittman, R., Jarvis, W. D. (2004). Intrinsic cytotoxicity and chemomodulatory actions of novel phenethylisothiocyanate sphingoid base derivatives in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(2), 452-461.
52. Chiao, J. W., Chung, F., Krzeminski, J., Amin, S., Arshad, R., Ahmed, T., et al. (2000). Modulation of growth of human prostate cancer cells by the N-acetylcysteine conjugate of phenethyl isothiocyanate. *International Journal of Oncology*, 16(6), 1215-1219.
53. Jeong, W. S., Kim, I. W., Hu, R., Kong, A. N. (2004). Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway. *Pharmaceutical Research*, 21(4), 661-670.
54. Greenhalgh, J. R., Mitchell, N. D. (1976). The involvement of flavour volatiles in the resistance to downy mildew of wild and cultivated forms of *Brassica oleracea*. *The New Phytologist*, 77(2), 391-398.
55. Mayton, H. S., Oliver, C., Vaughn, S. F., Loria, R. (1996). Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology*, 86(3), 267-271.
56. Sarwar, M., Kirkegaard, J. A., Wong, P. T. W., Desmarchelier, J. M. (1998). Biofumigation potential of brassicas. III In-vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant and Soil*, 201(1), 103-112.
57. Isshiki, K., Tokuoka, K., Mori, R., Chiba, S. (1992). Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(9), 1476-1477.

58. Xu, K., Thornalley, P. J. (2000). Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 60(2), 221-231.
59. Srivastava, S. K., Xiao, D., Lew, K. L., Hershberger, P., Kokkinakis, D. M. Johnson, C. S., Trump, D. L., Singh, S. V. (2003). Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits growth of PC-3 human prostate cancer xenografts in vivo, *Carcinogenesis*, 24(10), 1665-1670.
60. Nakamura, Y., Morimitsu, Y., Uzu, T., Ohigashi, H., Murakami, A., Naito, Y., Nakagawa, Y., Osawa, T., Uchida, K. (2000). A glutathione S-transferase inducer from papaya: rapid screening, identification and structure-activity relationship of isothiocyanates. *Cancer Letters*, 157(2), 193-200.
61. Drobnica, L., Zemanova, M., Nemeč, P., Antos, K., Kristian, P., Stullerova, A., et al. (1967). Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds. I. Naturally occurring isothiocyanates and their analogues. *Applied Microbiology*, 15(4), 701-709.
62. Srivastava, S. K., Singh, S. V. (2004). Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, 25(9), 1701-1709.
63. Jadhav, U., Ezhilarasan, R., Vaughn, S. F., Berhow, M. A. Mohanam, S. (2007). Iberin induces cell cycle arrest and apoptosis in human neuroblastoma cell. *International Journal of Molecular Medicine*, 19(3), 353-361.
64. Kim, D. S., Jeong, Y. M., Moon, S. I., Kim, S. Y., Kwon, S. B., Park, E. S., Youn, S. W., Park, K. C. (2006). Indole-3-carbinol enhances ultraviolet B-induced apoptosis by sensitizing human melanoma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(22), 2661-2668.
65. Auburn, K. J., Fan, S., Rosen, E. M., Goodwin, L., Chandraskaren, A., Williams, D. E., Chen, D., Carter, T.H. (2003). Indole-3-Carbinol Is a Negative Regulator of Estrogen. *The Journal of Nutrition*, 133(7 Suppl), 2470S-2475S.
66. Zhang, J., Hsu, J. C., Kinseth, M. A., Bjeldanes, L. F., Firestone, G. L. (2003). Indole-3-carbinol induces a G1 cell cycle arrest and inhibits prostate-specific antigen production in human LNCaP prostate carcinoma cells. *Cancer*, 98(11), 2511-2520.
67. De Kruif, C. A., Marsman, J. W., Venekamp, J. C., Falke, H. E., Noordhoek, J., Blaauboer, B. J., Wortelboer, H. M. (1991). Structure elucidation of acid reaction products of indole-3-carbinol: detection in vivo and enzyme induction in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 80(3), 303-315.
68. Chang, X., Tou, J. C., Hong, C., Kim, H. A., Riby, J. E., Firestone, G. L., Bjeldanes, L. F. (2005). 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and

- the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis*, 26(4), 771-778.
69. Chen, D. Z., Qi, M., Auburn, K. J., Carter, T. H. (2001). Indole-3-carbinol and diindolylmethane induce apoptosis of human cervical cancer cells and in murine HPV16-transgenic preneoplastic cervical epithelium. *The Journal of Nutrition*, 131(12), 3294-3302.
 70. Nachshon-Kedmi, M., Yannai, S., Haj, A., Fares, F. A. (2003). Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 745-752.
 71. Wagner, A. E., Rimbach, G. (2009). Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 217-224.
 72. Tai, A., Fukunaga, K., Ohno, A., Ito, H. (2014). Antioxidative properties of ascorbigen in using multiple antioxidant assays. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry*, 78(10), 1723-1730.
 73. Bonnesen, C., Eggleston, I. M., Hayes, J. D. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Research*, 61(16), 6120-6130.
 74. Campas-Baypoli, O. N., Sánchez-Machado, D. I., Bueno-Solano, C., Ramírez-Wong, B., López-Cervantes, J. (2010). HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products. *Biomedical Chromatography*, 24(4), 387-392.
 75. Ares, A. M., Bernal, J., Martin, M. T., Bernal, J. L., Nozal, M. J. (2014a). Optimized formation, extraction and determination of sulforaphane in broccoli by liquid chromatography with diode array detection. *Food Analytical Methods*, 7(3), 730-740.
 76. Pilipczuk, T., Dawidowska, N., Kusznierevicz, B., Namieśnik, J., Bartoszek, A. (2015). Simultaneous determination of indolic compounds in plant extracts by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV and fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 8(9), 2169-2177.
 77. Ciska, E., Verkerk, R., Honke, J. (2009). Effect of boiling on the content of ascorbigen, indole-3-carbinol, indole-3-acetonitrile, and 3,3'-diindolylmethane in fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2334-2338.
 78. Sangthong, S., Weerapreeyakul, N. (2016). Simultaneous quantification of sulforaphane and sulforaphane by reverse phase HPLC and their content in *Raphanus sativus* L. var. *caudatus* Alef extracts. *Food Chemistry*, 201, 139-144.
 79. Wilson, E. A., Ennahar, S., Marchioni, E., Bergaentzlé, M., Bindler, F. (2012). Improvement in determination of isothiocyanates using high-

- temperature reversed-phase HPLC. *Journal of Separation Science*, 35(16), 2026-2031.
80. Matthäus, B., Fiebig, H. J. (1996). Simultaneous determination of isothiocyanates, indoles, and oxazolidinethiones in myrosinase digests of rapeseeds and rapeseed meal by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3894-3899.
81. Moussata, J., Wang, Z., Wang, J. (2014). Development and validation of an HPLC method for the simultaneous quantification of indole-3-carbinol acetate, indole-3-carbinol, and 3,3-diindolylmethane in mouse plasma, liver, and kidney tissues. *Journal of Chromatography B*, 958, 1-9.
82. Liang, H., Yuan, Q. P., Dong, H. R., Liu Y. M. (2006). Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), 473-476.
83. Ciska, E., Drabińska, N., Narwojsz, A., Honke, J. (2016). Stability of glucosinolates and glucosinolate degradation products during storage of boiled white cabbage. *Food Chemistry*, 203, 340-347.
84. Bradfield, C. A., Bjeldanes, L. F. (1987). High-performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(1), 46-49.
85. Ciska, E., Pathak D. R. (2004). Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7938-7943.
86. Ji, Y., Morris, M. E. (2003). Determination of phenethyl isothiocyanate in human plasma and urine by ammonia derivatization and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 323(1), 39-47.
87. Al Janobi, A. A., Mithen, R. F., Gasper, A.V., Shaw, P. N., Middleton, R. J., Ortori, C. A., Barrett, D. A. (2006). Quantitative measurement of sulforaphane, iberin and their mercapturic acid pathway metabolites in human plasma and urine using liquid chromatography–tandem electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 844(2), 223–234.
88. Zheng L., Zheng F. (2015). Development and validation of an LC-APCI-MS/MS method for the determination of phenethyl isothiocyanate in human plasma. *Biomedical Chromatography*, 29(4), 619-625.
89. Rodríguez-Hernández, M. C., Medina, S., Gil-Izquierdo, A., Martínez-Ballesta, M. C., Diego A. Moreno, D.A. (2013) Broccoli isothiocyanate content and in vitro availability according to variety and origin. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 32(2), 251-264.

90. Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., Bernal, J. (2015). Development and validation of a LC-MS/MS method to determine sulforaphane in honey. *Food Chemistry*, 181, 263-269.
91. Song, L., Iori, R., Thornalley, P. J. (2006). Purification of major glucosinolates from Brassicaceae seeds and preparation of isothiocyanate and amine metabolites. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(8), 1271-1280.
92. Hauder, J., Winkler, S., Bub, A., Rüfer, C. E., Pignitter, M., Somoza, V. (2011). LC-MS/MS quantification of sulforaphane and indole-3-carbinol metabolites in human plasma and urine after dietary intake of selenium-fortified broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8047-8057.
93. Fujioka, N., Ainslie-Waldman, C. E., Upadhyaya, P., Carmella, S. G., Fritz, V. A., Rohwer, C., Fan, Y., Rauch, D., Le, C., Hatsukami, D. K., Hecht, S. S. (2014). Urinary 3,3'-diindolylmethane: a biomarker of glucobrassicin exposure and indole-3-carbinol uptake in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention*, 23(2), 282-287.
94. Dominguez-Perles, R., Medina, S., Moreno, D. Á., García-Viguera, C., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, Á. (2014). A new ultra-rapid UHPLC/MS/MS method for assessing glucoraphanin and sulforaphane bioavailability in human urine. *Food Chemistry*, 143, 132-138.
95. Chiang, W. C. K., Pusateri, D. J., Leitz, R. E. A. (1998). Gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of sulforaphane and sulforaphane nitrile in broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1018-1021.
96. Farag, M. A. & Abdel Motaal, A. A. (2010). Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 65-70.
97. Slater, G. P., Manville, J. F. (1993). Analysis of thiocyanates and isothiocyanates by ammonia chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, 648(2), 433-443
98. Fischer, J. (1992). Sulphur- and nitrogen-containing volatile components of kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 194, 259-262.
99. Pocasap, P., Weerapreeyakul, N. (2016). Sulforaphane and sulforaphane in commonly consumed cruciferous plants contributed to antiproliferation in HCT116 colon cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2), 119-124.

100. Zhang, Y., Cho, C. G., Posner, G. H., Talalay, P. (1992). Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Analytical Biochemistry*, 205, 100-107.
101. Wang, N., Shen, L., Qiu, S., Wang, X., Wang, K., Hao, J., Xu, M. (2010). Analysis of the isothiocyanates present in three Chinese Brassica vegetable seeds and their potential anticancer bioactivities. *European Food Research and Technology*, 231(6), 951-958.
102. Villatoro-Pulido, M., Priego-Capote, F., Álvarez-Sánchez, B., Saha, S., Philo, M., Obregón-Cano, S., De Haro-Bailón, A., Font, R., Del Río-Celestino, M. (2013). An approach to the phytochemical profiling of rocket [*Eruca sativa* (Mill.) Thell]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3809-3819.
103. Vieites-Outes, C., López-Hernández, J., Lage-Yusty, M. A. (2016). Modification of glucosinolates in turnip greens (*Brassica rapa* subsp. *rapa* L.) subjected to culinary heat processes. *Cyta – Journal of Food*, 14(4), 536-540.
104. Rodrigues, L., Silva, I., Poejo, J., Serra, A. T., Matias, A. A., Simplício, A. L., Bronze, M. R., Duarte, C. M. M. (2016). Recovery of antioxidant and antiproliferative compounds from watercress using pressurized fluid extraction. *RSC Advances*, 6(37), 30905-30918.
105. Sosinska, E., Obiedzinski, M. W. (2011). Effect of processing on the content of glucobrassicin and its degradation products in broccoli and cauliflower. *Food control*, 22(8), 1348-1356.
106. Devys, M., Barbier, M. (1991). Indole-3-carboxaldehyde in the cabbage *Brassica oleracea*: A systematic determination. *Phytochemistry*, 30(2), 389-391.
107. Vallejo, F., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F. A. (2003). Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3776-3782.
108. Santner, A., Calderon-Villalobos, L., Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 301-307.
109. Hagen, G., Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, 49(3-4), 373-385.
110. Bajguz, A., Piotrowska, A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70(8), 957-969.
111. Slovin, J. P., Bandurski, R. S., Cohen, J. D. (1999). Auxin. in: Hooykaas, P. J. J., Hall, M. A., Libbenga, K. R. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*, (pp. 115-140). London: Elsevier Science.

112. Ludwig-Müller, J., Cohen, J. D. (2002). Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*, 115(2), 320-329.
113. Cohen, J. D., Slovin, J. P., Hendrickson, A.M. (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 8(5), 197-199.
114. Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M., Zolman, B. K. (2001). Inputs to the active indole-3- acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. *Journal of Plant Growth Regulators*, 20, 198-216.
115. Kelley, K. B., Riechers, D. E. (2007). Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(1), 1-11.
116. Cohen, J. D., Bandurski, R. S. (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 403-430.
117. Östin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R. P., Sandberg, G. (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 118(1), 285-296.
118. Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M., Zolman, B. K. (2001). Inputs to the active indole-3- acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. *Journal of Plant Growth Regulators*, 20(3), 198-216.
119. Cooke, T. J., Poli, D. B., Szein, A. E., Cohen, J. D. (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Molecular Biology*, 49(3-4), 319-338.
120. Iyer, M., Cohen, J. D., Slovin, J. P. (1997). Molecular manipulation of IAA metabolism in tomato. *Plant Physiology*, 114(Sup. 3), 158.
121. Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D., Sandberg, G., 2002. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 49(3-4), 249-272.
122. Piotrowska, A., Bajguz, A. (2011). Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry*, 72(17), 2097-2112.
123. Creelman, R. A., Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 355-381.
124. Tamogami, S., Rakwal, R., Agrawal, G. K. (2008). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(4), 723-727.
125. Tamogami, S., Rakwal, R., Kodama, O. (1997). Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of naringenin-7-

- O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Letters*, 401(2-3), 239-242.
126. Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, 228, 127-134.
127. Rivas-San Vicente, M., Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321-3338.
128. Müller, A., Düchting, P., Weiler, E. W. (2002). A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216(1), 44-56.
129. Schmelz, E. A., Engelberth, J., Alborn, H. T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H., Tumlinson, J. H. (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10552-10557.
130. Schneider, E. A., Kazakoff, C. W., Wightman, F. (1985). Gas chromatography-mass spectrometry evidence for several endogenous auxins in pea seedling organs. *Planta*, 165(2), 232-241.
131. Górka, B., Wiczorek, P. P. (2017). Simultaneous determination of nine phytohormones in seaweed and algae extracts by HPLC-PDA. *Journal of Chromatography B*, 1057, 32-39.
132. Lu, Q., Zhang, L., Chen, T., Lu, M., Ping, T., Chen, G. (2008). Identification and quantitation of auxins in plants by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(16), 2565-2572.
133. Yu, P., Hegeman, A. D., Cohen, J. D. (2014). A facile means for the identification of indolic compounds from plant tissues. *The Plant Journal*, 79(6), 1065-1075.
134. Östin, A., Moritz, T., Sandberg, G. (1992). Liquid chromatography/mass spectrometry of conjugates and oxidative metabolites of indole-3-acetic acid. *Biological Mass Spectrometry*, 21(6), 292-298.
135. Liu, H., Li, X., Xiao, J., Wang, S. (2012). A convenient method for simultaneous quantification of multiple phytohormones and metabolites: application in study of rice-bacterium interaction. *Plant Methods*, 8(1):2.
136. Pěňčík, A., Rolčík, J., Novák, O., Magnus, V., Barták, P., Buchtík, R., Salopek-Sondi, B., Strnada, M. (2009). Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta*, 80(2), 651-655.
137. Cao, Z. Y., Sun, L. H., Mou, R. X., Zhang, L. P., Lin, X. Y., Zhu, Z. W., Chen, M. X. (2016). Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-

- triplequadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1451, 67–74.
138. Eyer, L., Vain, T., Pařízková, B., Oklestkova, J., Barbez, E., Kozubíková, H., Pospíšil T., Wierzbicka, R., Kleine-Vehn, J., Fránek, M., Strnad, M., Robert, S., Novak, O. (2016). 2,4-D and IAA amino acid conjugates show distinct metabolism in Arabidopsis, *PLoS One*, 11(7), e0159269.
139. Li, Y. H., Wei, F., Dong, X. Y., Peng, J. H., Liu, S. Y., Chen, H. (2011). Simultaneous analysis of multiple endogenous plant hormones in leaf tissue of oilseed rape by solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 22(5), 442-449.
140. Van Meulebroek, L., Bussche, J. V., Steppe, K., Vanhaecke. L. (2012). Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry for metabolomic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant. *Journal of Chromatography A*, 1260, 67-80.
141. Liang, Y., Zhu, X., Wu, T., Zhao, M., Liu, H. (2012). Rapid and sensitive detection of auxins and flavonoids in plant samples by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 35(19), 2559-2566.
142. Kaufmann, E. N. (2012). Characterization of materials (2nd ed), (pp.1104-1135). John Wiley & Sons, Inc.
143. Stuart, B. (2004). Infrared spectroscopy: fundamentals and applications, (pp.15-70). John Wiley & Sons, Ltd.
144. Smith, B. C. (2011). Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy, (pp.19-85). Taylor & Francis Group, LLC.
145. Venetsanou, A., Anastasaki, E., Gardeli, C., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S. (2017). Estimation of antioxidant activity of different mixed herbal infusions using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(2), 149-155.
146. Haaland, D. M., Thomas, E. V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Analytical Chemistry*, 60(11), 1193-1202.
147. Allegrini, F., Olivieri, A. C. (2014). IUPAC-Consistent approach to the limit of detection in partial least- squares calibration. *Analytical Chemistry*, 86(15), 7858-7866.
148. Höskuldsson, A. (1988). PLS regression methods. *Journal of Chemometrics*, 2, 211-228.

149. Romero-González, R., Frenich, A. G. (2017). Applications in high resolution mass spectrometry food safety and pesticide residue analysis, (pp. 1-78). Elsevier Inc.
150. De Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007). Mass spectrometry principles and applications (3rd ed.), (pp. 15-200). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
151. Greaves, J., Roboz, J. (2014). Mass spectrometry for the novice, (pp.1-107). Taylor & Francis Group, LLC.
152. Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., Kraj, A. (2009). Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications, (pp. 15-70). John Wiley & Sons, Inc.
153. Gross, J. H. (2017). Mass spectrometry: a textbook (3rd ed.), (pp. 720-743). Springer International Publishing AG.
154. SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf
155. Krauss, M., Singer, H., Hollender, J. (2010). LC-high resolution MS in environmental analysis: From target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 943-951.

Κεφάλαιο Β. Στόχοι της Διατριβής

Τα σταυρανθή λαχανικά περιέχουν πλήθος φυτοχημικών ενώσεων. Από αυτές, τα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών (ισοθειακουανικές ενώσεις, παράγωγα του ινδολίου), έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών στην προσπάθειά τους για την πρόληψη και την καταπολέμηση διαφόρων ειδών καρκίνου.

Μια άλλη μεγάλη και σημαντική ομάδα φυτοχημικών ενώσεων αποτελούν οι φυτικές ορμόνες. Από αυτή την ομάδα στα σταυρανθή λαχανικά ξεχωρίζουν οι αυξίνες με χημική δομή, η οποία ομοιάζει με αυτή των ινδολίων που παράγονται από την ενζυμική υδρόλυση των γλυκοζινολιτών, καθώς και το ιασμονικό και το σαλικυλικό οξύ που επιτελούν σημαντικές λειτουργίες συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού, αντίστοιχα. Οι αυξίνες απαντώνται τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και ως αμιδικά συζεύγματα με αμινοξέα. Τα συζεύγματα επιτελούν διάφορες λειτουργίες όπως η ρύθμιση των επιπέδων των αυξινών στο φυτικό ιστό, ή αναστολή της δράσης των αυξινών ή είναι προϊόντα μεταβολισμού. Στη βιβλιογραφία επισημαίνεται ότι πιθανώς υπάρχουν και άλλα συζεύγματα των αυξινών τα οποία δεν έχουν ταυτοποιηθεί και επομένως δεν γνωρίζουμε τον ρόλο τους στα φυτά. Αυτή η ομάδα ενώσεων δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα στα σταυρανθή λαχανικά, ιδιαίτερα επειδή περιέχονται στα φυτά σε πολύ μικρές ποσότητες.

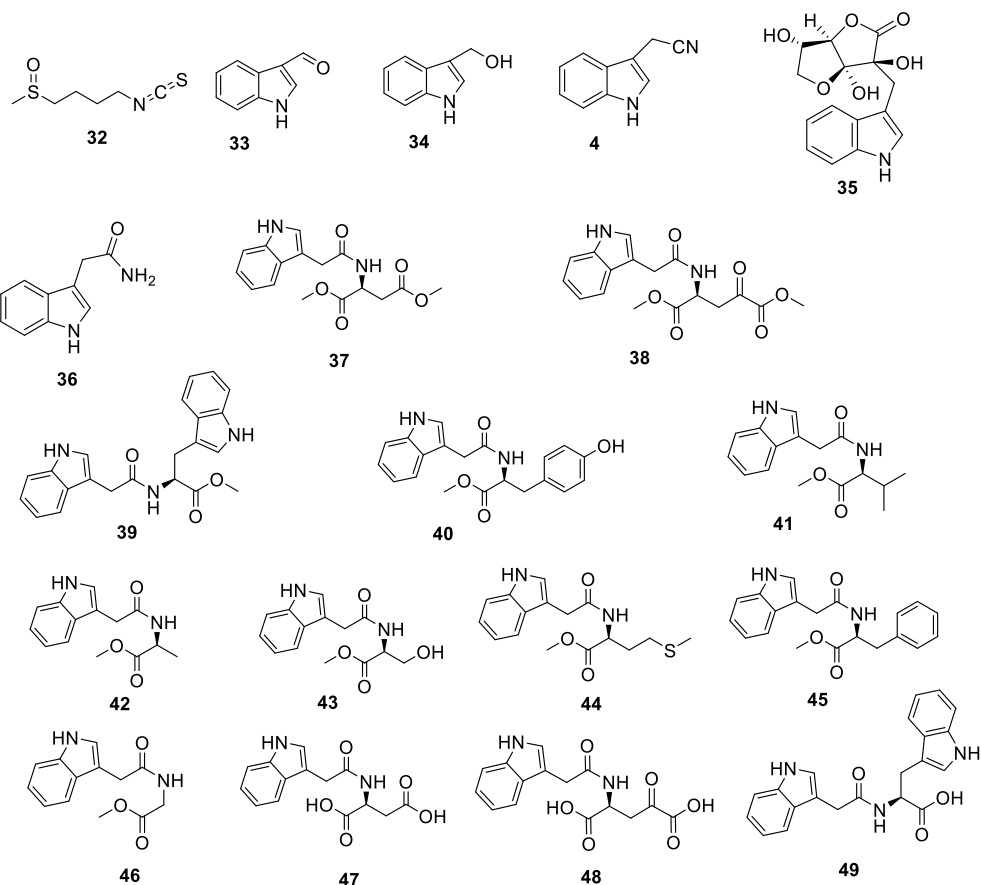
Επομένως, η ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων εκχύλισης και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των ενώσεων αλλά και η ταυτοποίηση ενώσεων που δεν έχουν περιγραφεί προηγουμένως είναι σημαντική. Τεχνικές όπως η φασματοσκοπία υπεράυθρου με μετασχηματισμό Fourier, η οποία αποτελεί μια γρήγορη, αξιόπιστη, μη καταστρεπτική τεχνική, καθώς και η φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS), η οποία με ένα μόνο πείραμα δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών ενώσεων, παρέχοντας αποτελέσματα εξαιρετικά μεγάλης ακρίβειας, μπορούν να αξιοποιηθούν για την μελέτη των παραπάνω ενώσεων.

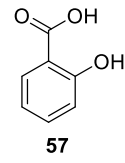
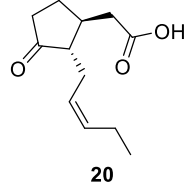
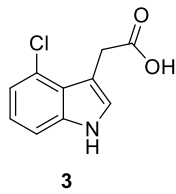
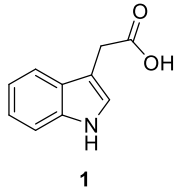
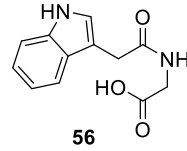
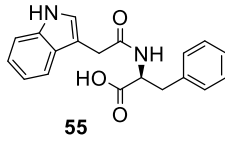
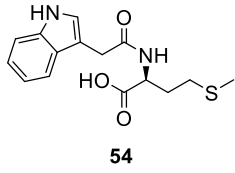
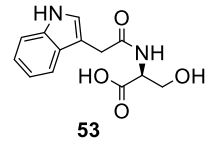
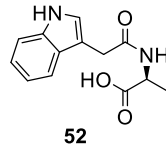
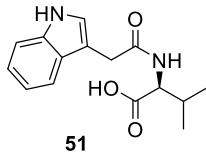
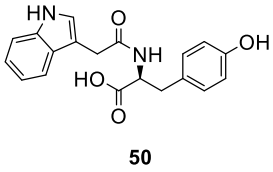
Στα πλαίσια αυτά, οι στόχοι της παρούσας διατριβής είναι:

- Η απομόνωση των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών (ισοθειακουανικές ενώσεις, ινδολικά παράγωγα) από σταυρανθή λαχανικά με μία γρήγορη και μειωμένου κόστους μέθοδο εκχύλισης που δεν απαιτεί προκατεργασία του δείγματος, ώστε να μην έχουμε αποικοδόμηση των ευαίσθητων ενώσεων.

- Η εκμετάλλευση των πλεονεκτημάτων της φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR για την ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των ολικών ισοθειοκυανικών σε μπρόκολο, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο αναφοράς τη σουλφοραφάνη. Η υπάρχουσα αναλυτική μέθοδος στη βιβλιογραφία είναι έμμεση που βασίζεται στην παραγωγοποίηση των ισοθειακυανικών και μέτρηση της απορρόφησης του παραγόμενου προϊόντος με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού, επομένως, είναι χρονοβόρα και αυξημένου κόστους.
- Η ανάπτυξη μεθόδου ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης σε μπρόκολο, με φασματομετρία μάζας HRMS. Η σουλφοραφάνη **(32)** και η ινδολο-3-καρβινόλη **(34)**, προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών γλυκοραφανίνη και γλυκομπρασικίνη αντίστοιχα, παρουσιάζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση. Μέχρι τώρα, τα προϊόντα υδρόλυσης γλυκοζινολιτών από εκχυλίσματα σταυρανθών δεν έχουν μελετηθεί με φασματομετρία μάζας HRMS.
- Ο ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός του ινδολο-3-ακετονιτριλίου **(4)**, της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης **(33)**, της ινδολο-3-καρβινόλης **(34)**, και του ασκορβιγόνου **(35)**, σε σταυρανθή λαχανικά όπως στη ρέβα, στο ραπανάκι, στο λευκό και στο κόκκινο λάχανο, στο πράσινο και στο μωβ μπρόκολο και στο κουνουπίδι, με φασματομετρία μάζας HRMS. Ο προσδιορισμός τους είναι σημαντικός καθώς παρουσιάζουν πολλαπλή βιολογική δράση και δεν έχουν μελετηθεί στη ρέβα και στο ραπανάκι, μέχρι στιγμής.
- Ο ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός των φυτορμονών στα σταυρανθή λαχανικά μέσω της ανάπτυξης μιας νέας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού με τη χρήση της φασματομετρίας μάζας HRMS. Οι ενώσεις θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν το ινδολο-3-οξικό οξύ **(1)**, το 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ **(3)**, το ινδολο-3-ακεταμίδιο **(36)**, η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη **(33)**, το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο **(4)**, το ιασμονικό οξύ **(20)**, το σαλικυλικό οξύ **(58)** και τα συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με αμινοξέα όπως το: L-ασπαρτικό οξύ **(37 και 47)**, L-γλουταμινικό οξύ **(38 και 48)**, L-τρυπτοφάνη **(39 και 49)**, L-τυροσίνη **(40 και 50)**, L-βαλίνη **(41 και 51)**, L-αλανίνη **(42 και 52)**, L-σερίνη **(43 και 53)**, L-μεθειονίνη **(44 και 54)**, L-φαινυλαλανίνη **(45 και 55)** και γλυκίνη **(46 και 56)**. Μέχρι στιγμής, οι ενώσεις αυτές δεν έχουν προσδιοριστεί στα σταυρανθή λαχανικά.

- Η σύνθεση των ενώσεων που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση της γλυκοραφάνινης και της γλυκομπρασικίνης καθώς και η σύνθεση των αυξινών και των συζευγμένων με αμινοξέα αυξινών, χρησιμοποιώντας μεθόδους συνθετικής οργανικής χημείας και εν συνεχεία η ταυτοποίηση και μελέτη τους με φασματοσκοπικές μεθόδους. Αυτές οι ενώσεις θα χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα αναφοράς για την επίτευξη των προηγούμενων στόχων της διατριβής και είναι: η σουλφοραφάνη (**32**), η οποία αποτελεί το κυριότερο προϊόν ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκοραφάνινης, η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη (**33**), η ινδολο-3-καρβινόλη (**34**), το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (**4**), το ασκορβιγόνο (**35**), το ινδολο-3-ακεταμίδιο (**36**) και τα συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με τα αμινοξέα: L-ασπαρτικό οξύ (**37** και **47**), L-γλουταμινικό οξύ (**38** και **48**), L-τρυπτοφάνη (**39** και **49**), L-τυροσίνη (**40** και **50**), L-βαλίνη (**41** και **51**), L-αλανίνη (**42** και **52**), L-σερίνη (**43** και **53**), L-μεθειονίνη (**44** και **54**), L-φαινυλαλανίνη (**45** και **55**) και γλυκίνη (**46** και **56**).



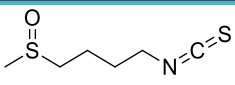
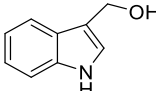
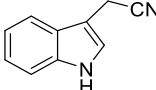
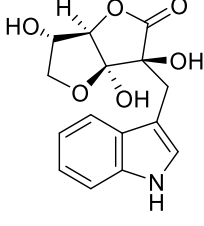
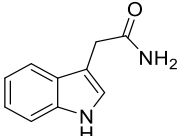


Κεφάλαιο Γ. Σύνθεση Ισοθειοκυανικών Ενώσεων και Παραγώγων του Ινδολίου

Γ.1. Σύνθεση Ισοθειοκυανικών και Ινδολικών Ενώσεων

Η σύνθεση της σουλφοραφάνης (**32**), της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ασκορβιγόνου (**35**) και του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μεθόδους της βιβλιογραφίας (Πίνακας Γ1 & Παράρτημα). Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR καθώς και με φασματομετρία μάζας (HRMS). Αναλυτικά στοιχεία χαρακτηρισμού δίνονται στο κεφάλαιο ΣΤ.

Πίνακας Γ.1. Βιβλιογραφικές παραπομπές για την σύνθεση των ισοθειοκυανικών και ινδολικών ενώσεων

| ΕΝΩΣΗ | ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ |
|--|-----------|
|  (32) | 1 |
|  (34) | 2,3 |
|  (4) | 4 |
|  (35) | 5,6 |
|  (36) | 7 |

Γ.2. Σύνθεση των Συζευγμάτων του Ινδολο-3-οξικού οξέος με Αμινοξέα

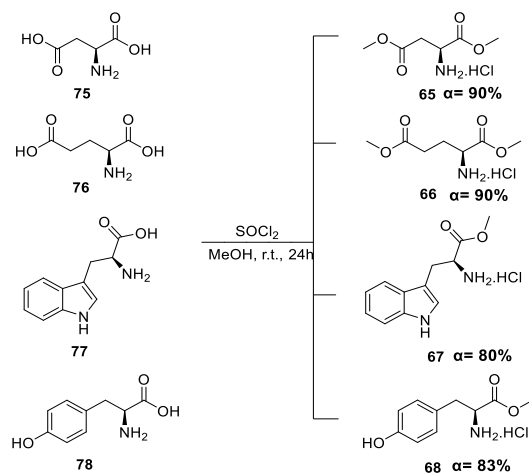
Τα συζεύγματα των αυξινών με τα αμινοξέα επιτελούν σημαντικές λειτουργίες στους φυτικούς ιστούς. Οι έρευνες σχετικά με την λειτουργία των συζευγμάτων στα φυτά είναι σε εξέλιξη, καθώς το έργο τους είναι πολύπλευρο (§ Α.3.2). Η πλειονότητα των συζευγμάτων δεν είναι διαθέσιμη στο εμπόριο, έτσι η εφαρμογή απλών και αποτελεσματικών μεθόδων σύνθεσης τους είναι σημαντική.

Οι συνθετικές μέθοδοι που έχουν προταθεί για την σύνθεση των συζευγμάτων των αυξινών με τα αμινοξέα περιλαμβάνουν την εφαρμογή γνωστών μεθόδων σύζευξης που εφαρμόζονται στην πεπτιδική σύνθεση όπως η μέθοδος των ενεργοποιημένων εστέρων,⁸ η μέθοδος των μικτών ανυδριτών,⁹ η μέθοδος των άκυλο χλωριδίων¹⁰ και η σύζευξη με ένα παράγωγο του ινδολο-3-οξικού οξέος με βενζοτριαζόλιο [1-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-2-(1*H*-indol-3-yl)ethanone].¹¹ Επίσης, η σύζευξη με χρήση του *N,N'*-δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου (DCC), παρουσία *N*-υδροξυβενζοτριαζολίου (HOBt) έχει χρησιμοποιηθεί.¹²⁻¹⁵ Η τελευταία μέθοδος περιλαμβάνει μια απλή αντίδραση που πραγματοποιείται σε ένα συνθετικό στάδιο, παρουσιάζει όμως το μειονέκτημα της παραγωγής ενός ανεπιθύμητου παραπροϊόντος, της *N,N'*-δικυκλοεξυλουρίας. Έτσι, το τελικό προϊόν χρειάζεται επιπλέον κατεργασία για την απομάκρυνση της.

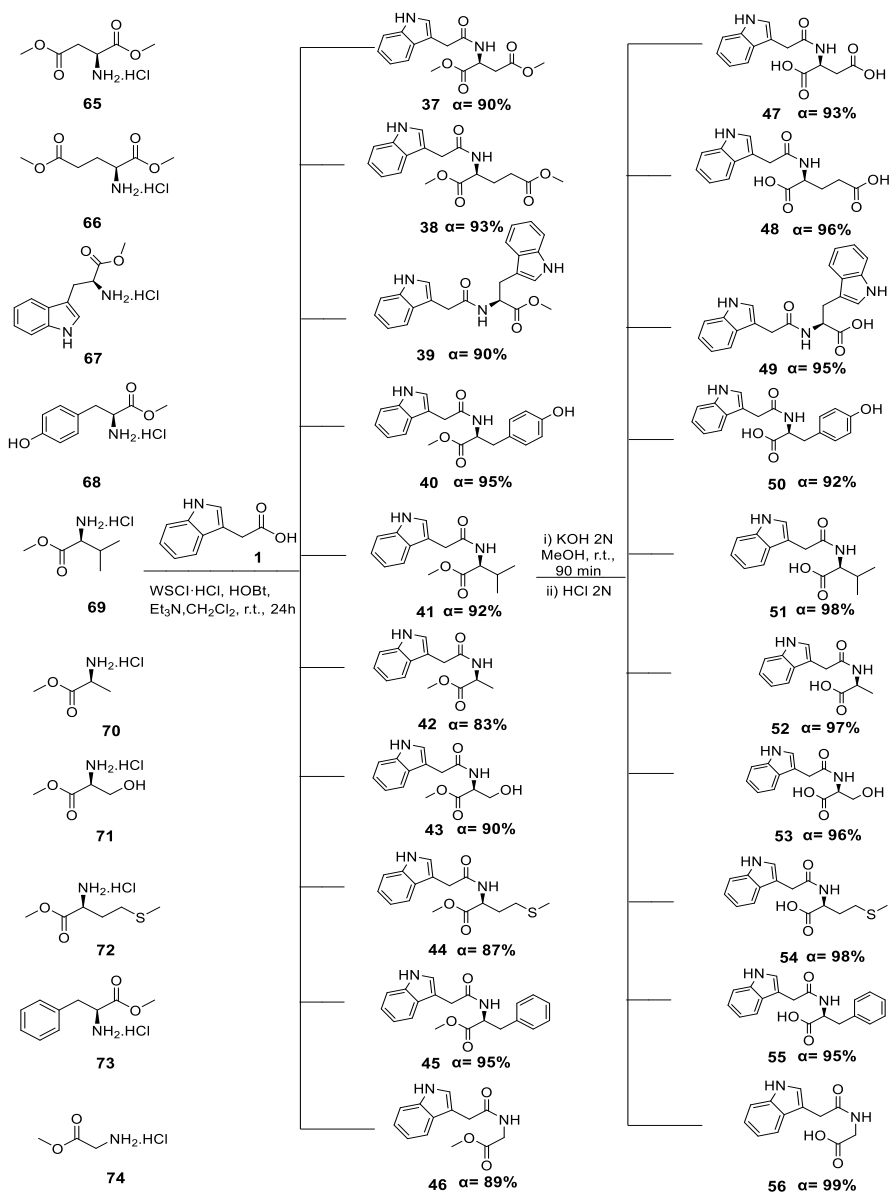
Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η χρήση του υδροχλωρικού άλατος του 1-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλο]-3-αιθυλοκαρβοδιμιδίου (1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, WSCI.HCl), για την σύζευξη προστατευμένων αμινοξέων με σκοπό τη σύνθεση πεπτιδίων,¹⁶ για την σύζευξη προστατευμένων αμινοξέων και αμινών¹⁷ και προστατευμένων διπεπτιδίων και οξέων¹⁸ αποτελεί μία εναλλακτική λύση, γιατί το αντιδραστήριο σύζευξης είναι υδατοδιαλυτό και έτσι απομακρύνεται εύκολα κατά την διαδικασία των εκχυλίσεων.

Έτσι, η μέθοδος που επιλέχθηκε για την σύζευξη του ινδολο-3-οξικού οξέος με τα αμινοξέα ήταν ο συνδιασμός WSCI.HCl και HOBt, παρουσία Et₃N σε CH₂Cl₂. Στη σύνθεση χρησιμοποιήθηκαν οι διμεθυλεστέρες των αμινοξέων L-ασπαρτικού οξέος (**65**), L-γλουταμινικού οξέος (**66**) και οι μεθυλεστέρες των αμινοξέων L-θρυπτοφάνης (**67**), L-τυροσίνης (**68**), L-βαλίνης (**69**), L-αλανίνης (**70**), L-σερίνης (**71**), L-μεθειονίνης (**72**), L-φαινυλαλανίνης (**73**) και γλυκίνης (**74**), υπό τη μορφή του υδροχλωρικού τους άλατος.

Το υδροχλωρικό άλας του διμεθυλεστέρα των αμινοξέων L-ασπαρτικού οξέος (**65**) και L-γλουταμινικού οξέος (**66**) και το υδροχλωρικό άλας του μεθυλεστέρα των αμινοξέων L-θρυπτοφάνης (**67**) και L-τυροσίνης (**68**) δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμα και παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία¹⁹ από τα αντιστοιχα L-αμινοξέα με θειονυλοχλωρίδιο (SOCl₂) σε διαλύτη MeOH κατά το ακόλουθο σχήμα Γ.1.



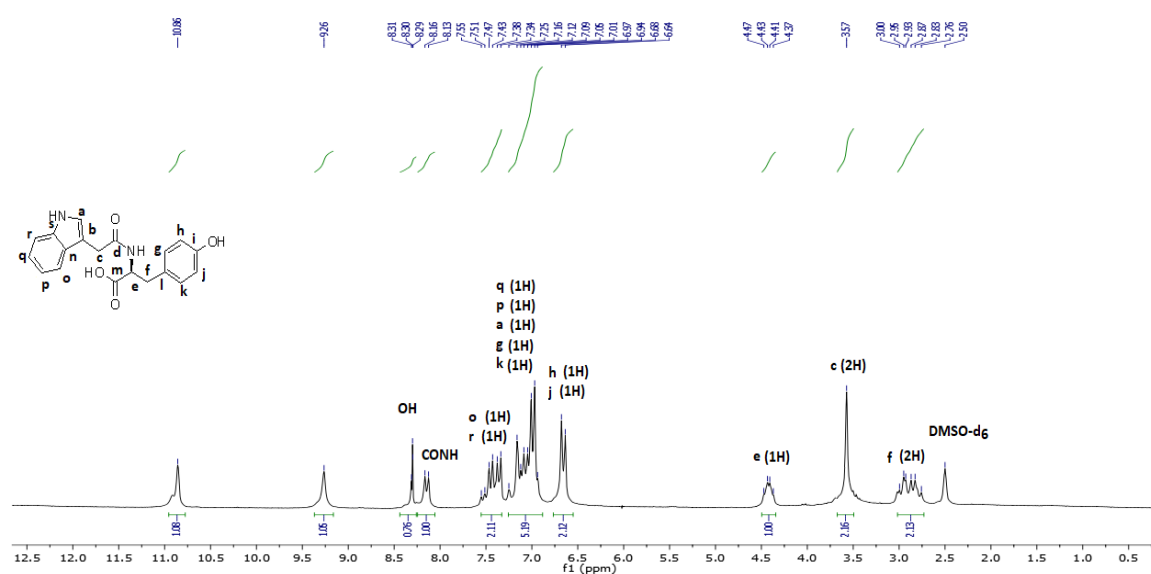
Σχήμα Γ.1. Σύνθεση των ενώσεων (65), (66), (67) και (68)



Σχήμα Γ.2. Σύνθεση συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με αμινοξέα

Η σύνθεση των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος απεικονίζεται στο σχήμα Γ.2. Τα προϊόντα σύζευξης **(37)** - **(46)** παρασκευάστηκαν σε αποδόσεις από 83% έως και 95% και στη συνέχεια σαπωνοποιήθηκαν παρουσία KOH 2N σε MeOH, για την υδρόλυση των εστερικών ομάδων. Για την απελευθέρωση της καρβοξυλικής ομάδας ακολούθησε οξίνιση με HCl 2N και τα συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος **(47)** έως και **(56)** απομονώθηκαν σε αποδόσεις από 92% έως και 99%.

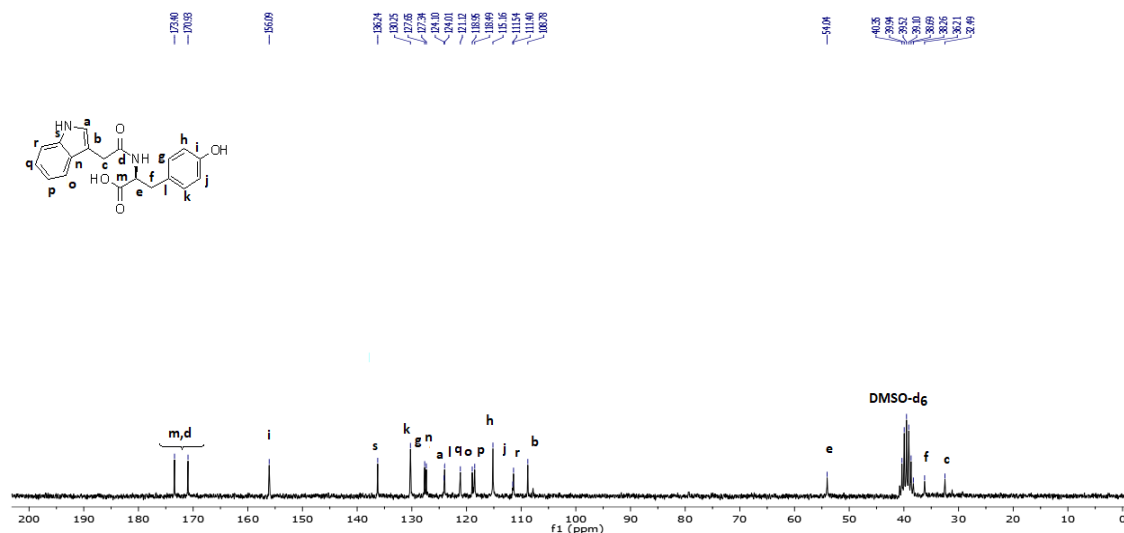
Στο σχήμα Γ.3 παρατίθεται το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **(50)** σε DMSO- d_6 . Η απλή κορυφή στα 3.57 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθυλενομάδας **c**, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις στα 2.76-3.00 ppm αποδίδονται στα διαστερεοτοπικά πρωτόνια της μεθυλενομάδας **f**. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 4.37-4.47 ppm αποδίδονται στο μεθινικό πρωτόνιο **e**, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις από τα 6.64 έως 7.55 ppm αποδίδονται στα πρωτόνια **h**, **j**, **q**, **p**, **a**, **g**, **k**, **o** και **r** των αρωματικών δακτυλίων. Η διπλή κορυφή στα 8.13-8.16 ppm, αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αμιδικής ομάδας CONH ενώ η κορυφή στα 8.30 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της φαινολικής ομάδας. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 9.26 ppm και στα 10.86 ppm αποδίδονται στα πρωτόνια της NH ομάδας και της καρβοξυλομάδας.



Σχήμα Γ.3. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **(50)** σε DMSO- d_6

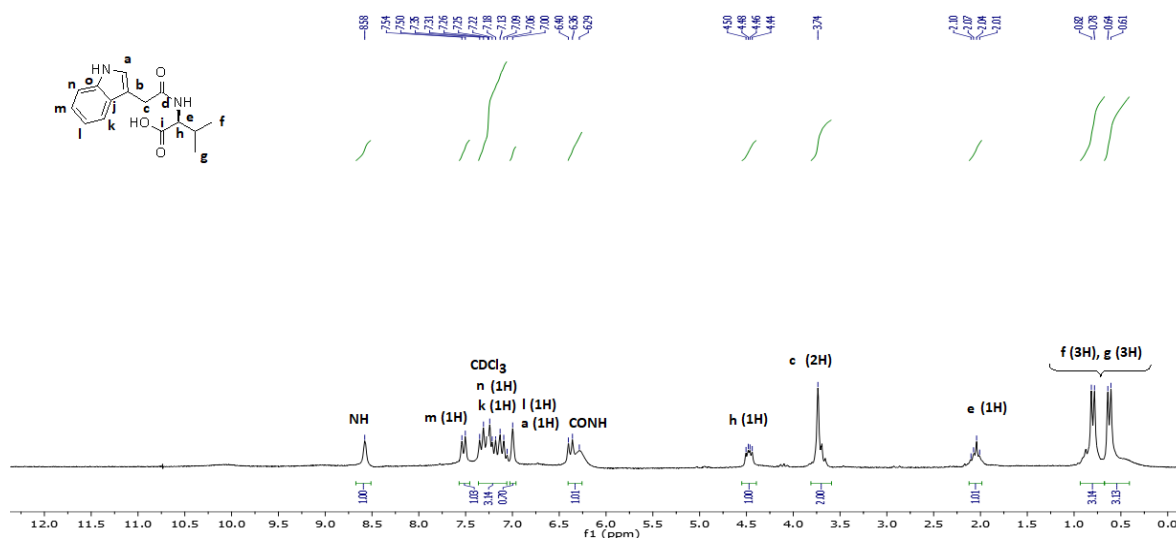
Στο σχήμα Γ.4 παρατίθεται το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **(50)** σε DMSO- d_6 . Η χημική μετατόπιση στα 32.5 ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα της μεθυλενομάδας **c**, ενώ η χημική μετατόπιση στα 36.2 ppm στον άνθρακα της μεθυλενομάδας **f**. Η χημική μετατόπιση στα 54.0 ppm αντιστοιχεί στον μεθινικό άνθρακα **e**. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 170.9 και 173.4 αντιστοιχούν στους άνθρακες των καρβονυλίων **d** και **m**. Οι υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις στα 108.8, 111.4, 111.5, 115.2, 118.5,

119.0, 121.1, 124.0, 127.3, 127.6, 130.2, 136.2 και 156.1 ppm αποδίδονται στους άνθρακες **b**, **r**, **j**, **h**, **p**, **o**, **q**, **a**, **n**, **g**, **k**, **s** και **i** του αρωματικού συστήματος.



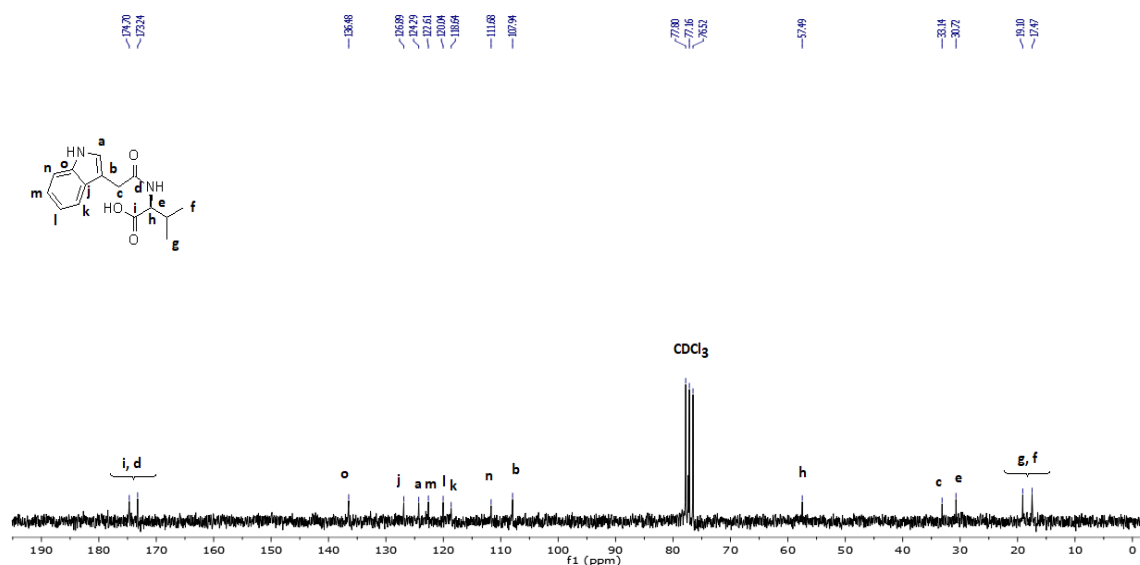
Σχήμα Γ.4. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**50**) σε DMSO-d_6

Στο σχήμα Γ.5 παρατίθεται το φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**51**) σε CDCl_3 . Οι δύο διπλές κορυφές στα 0.61-0.64 και 0.78-0.72 ppm ανήκουν στις μεθυλομάδες **g** και **f**. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 2.01-2.10 ppm αποδίδονται στο μεθινικό πρωτόνιο **e**. Η απλή κορυφή στα 3.74 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθυλενομάδας **c**, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις από τα 4.44 έως 4.50 ppm αποδίδονται στο μεθινικό πρωτόνιο **h**. Η χημική μετατόπιση στα 6.29-6.40 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αμιδικής ομάδας CONH ενώ οι χημικές μετατοπίσεις από 7.00 έως και 7.54 ppm ανήκουν στα πρωτόνια **a**, **l**, **k**, **n** και **m** των αρωματικών δακτυλίων. Η απλή κορυφή στα 8.58 ppm ανήκει στο πρωτόνιο της NH ομάδας.



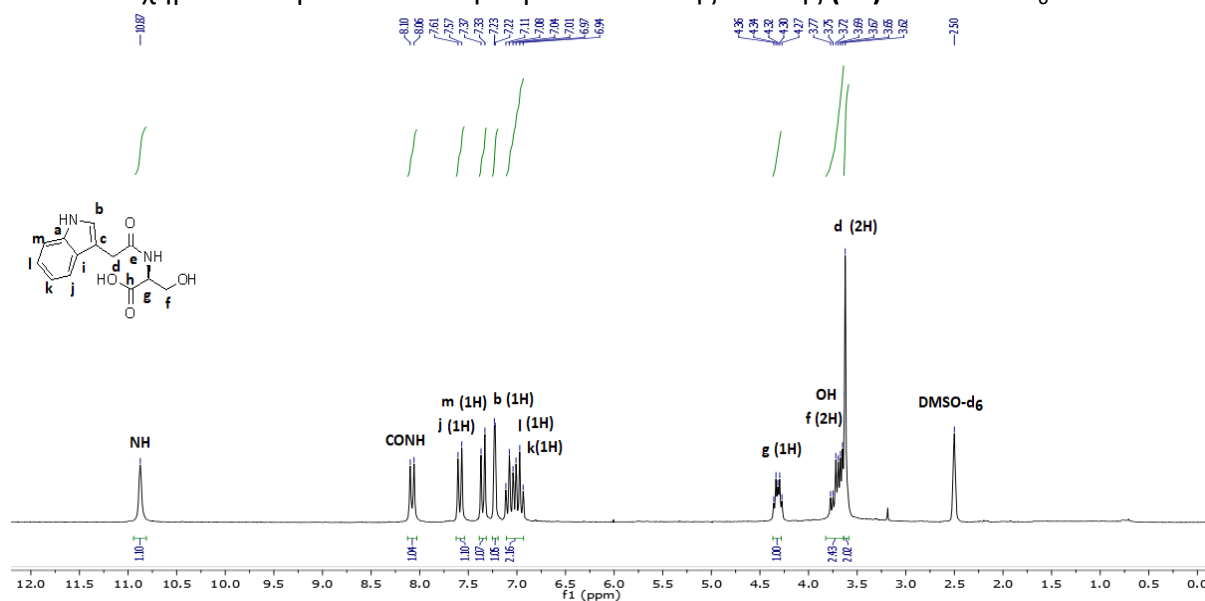
Σχήμα Γ.5. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**51**) σε CDCl_3

Στο σχήμα Γ.6 παρατίθεται το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**51**) σε CDCl_3 . Οι χημικές μετατοπίσεις στα 17.5 και 19.1 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες των μεθυλομάδων **f** και **g**. Η χημική μετατόπιση στα 30.7 ppm αποδίδεται στον μεθινικό άνθρακα **e**. Η χημική μετατόπιση στα 33.1 ppm αποδίδεται στον άνθρακα της μεθυλενομάδας **c**. Η χημική μετατόπιση στα 57.5 ppm αντιστοιχεί στον μεθινικό άνθρακα **h**. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 173.2 και 174.7 αντιστοιχούν στους άνθρακες των καρβονυλίων **d** και **i**. Οι υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις στα 107.9, 111.7, 118.6, 120.0, 122.6, 124.3, 126.9 και 136.5 ppm ανήκουν στους άνθρακες **b**, **n**, **k**, **l**, **m**, **a**, **j** και **o** του αρωματικού συστήματος.



Σχήμα Γ.6. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**51**) σε CDCl_3

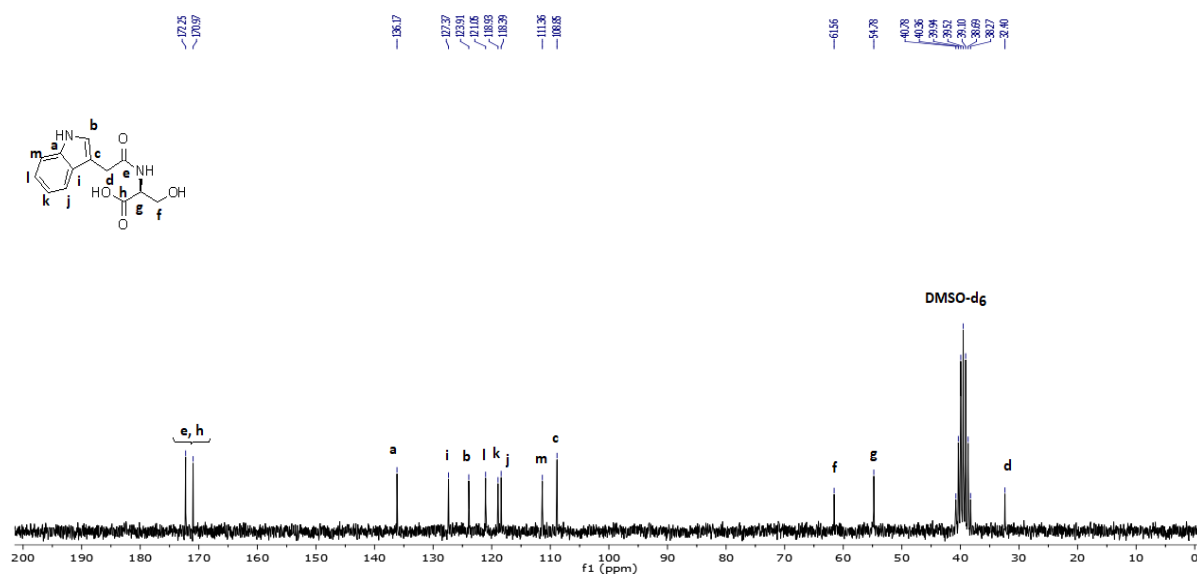
Στο σχήμα Γ.7 παρατίθεται το φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**53**) σε DMSO-d_6 .



Σχήμα Γ.7. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**53**) DMSO-d_6

Η απλή κορυφή στα 3.62 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθυλενομάδας **d**. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 3.66-3.77 ppm αποδίδονται στο πρωτόνιο της υδροξυλομάδας και στα πρωτόνια της μεθυλενομάδας **f**. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 4.27-4.36 ppm αποδίδονται στο μεθινικό πρωτόνιο **g**. Οι χημικές μετατοπίσεις από τα 6.94 έως και τα 7.61 ppm αποδίδονται στα πρωτόνια **k, l, b, m** και **j** του αρωματικού συστήματος. Η διπλή κορυφή στα 8.06-8.10 ppm, ανήκει στην CONH ομάδα, ενώ η απλή κορυφή στα 10.87 ανήκει στην NH ομάδα.

Στο σχήμα Γ.8 παρατίθεται το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**53**) σε DMSO- d_6 . Η χημική μετατόπιση στα 32.4 ppm ανήκει στον άνθρακα της μεθυλενομάδας **d**. Η χημική μετατόπιση στα 54.8 ppm αντιστοιχεί στον μεθινικό άνθρακα, **g** ενώ η χημική μετατόπιση στα 61.6 ppm ανήκει στον άνθρακα της μεθυλενομάδας **f** που φέρει την υδροξυλομάδα. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 171.0 και 172.3 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες των καρβονυλίων **h** και **e**. Οι υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις στα 108.9, 111.4, 118.4, 118.9, 121.1, 123.9, 127.4 και 136.2 ppm ανήκουν στους άνθρακες **c, m, j, k, l, b, i** και **a** του αρωματικού συστήματος.



Σχήμα Γ.8. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**53**) DMSO- d_6

Γ.3. Βιβλιογραφία

1. D'Souza, C. A., Amin, S., Desai, D. (2003). A facile and efficient synthesis of ¹⁴C-labelled sulforaphane. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 46(9), 851-859.
2. Dashwood, R. H., Uyetake, L., Fong, A. T., Hendricks, J. D., Bailey, G. S. (1989). The synthesis of [³H] - indole-3-carbinol, a natural anti-carcinogen from cruciferous vegetables. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 27(8), 901-907.
3. Mikhaleva, A. I., Ivanov, A. V., Skital'tseva, E. V., Ushakov, I. A., Vasil'tsov, A. M., Trofimov, B. A. (2009). An efficient route to 1-vinylpyrrole-2-carbaldehydes. *Synthesis*, 4, 587-590.
4. Yamada, F., Hashizume, T., Somei, M. (1998). Simple one step syntheses of indole-3-acetonitriles from indole-3-carboxaldehydes. *Heterocycles*, 47(1), 509-516.
5. Kiss, G., Neukom, H. (1966). Über die struktur des ascorbigens. *Helvetica Chimica Acta*, 49(2), 989-992.
6. Opietnik, M., Jaafar, S. N. B. S., Becker, M., Böhmendorfer, S., Hofinger, A. Rosenau, T. (2012). Ascorbigen - occurrence, synthesis, and analytics. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 9(4), 411-417.
7. Reid, A. E., Kim, S. W., Seiner, B., Fowler, F. W., Hooker, J., Ferrieri, R., Babst, B., Fowler, J. S. (2011). Radiosynthesis of C-11 labeled auxin (3-indolyl[1-¹¹C]acetic acid) and its derivatives from gramine. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 54(8), 433-437.
8. Mollan, R. C., Donnelly, D. M. X., Harmey, M. A. (1972). Synthesis of indole-3-acetylaspartic acid. *Phytochemistry*, 11(4), 1485-1488.
9. Tomašić, A., Bertoša, B., Tomić, S., Šoškić, M., Magnus, V. (2007). Binding behavior of amino acid conjugates of indole-3-acetic acid to immobilized human serum albumin. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 240-249.
10. Weller, L. E., Sell. H. M. (1958). Synthesis of 3-indoleacetamides. *Journal of Organic Chemistry*, 23(11), 1776-1777.
11. Katritzky, A. R., Khelashvili, L., Munawar, M. A. (2008). Syntheses of IAA- and IPA-amino acid conjugates. *Journal of Organic Chemistry*, 73(22), 9171-9173.
12. Good, N. E. (1956). The synthesis of indole-3-acetyl-D-L-aspartic acid and related compounds. *Canadian Journal of Chemistry*, 34, 1356-1358.
13. Napoli, L. D., Evidente, A., Piccialli, G., Santacroce, C., Iacobellis, N. S., Sisto, A. (1993). Synthesis of N-ε-(indole-3-acetyl)-l-lysine. *Phytochemistry*, 33(1), 13-16.

14. LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. R. T., Bartel, B. (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal Biological Chemistry*, 277(23), 20446-20452.
15. Ilic, N., Magnus, V., Ostin, A., Sandberg, G. (1997). Stable-isotope labeled metabolites of the phytohormone, indole-3-acetic acid. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 39(5), 433-440.
16. Smyrniotou, A., Kokotou, M. G., Mouchlis, V. D., Barbayianni, E., Kokotos, G., Dennis, E. A., Constantinou-Kokotou, V. (2017). 2-Oxoamides based on dipeptides as selective calcium-independent phospholipase A2 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(3), 926-940.
17. Fotaras, S., Kokotos, C. G., Tsandi, E., Kokotos, G. (2011). Prolinamides bearing thiourea groups as gatalysts for asymmetric aldol reactions. *European Journal Organic Chemistry*, 2011(7), 1310-1317.
18. Vasilakaki, S., Pastukhov, O., Mavromoustakos, T., Huwiler, A., Kokotos, G. (2018). Small peptides able to suppress prostaglandin E₂ generation in renal mesangial cells. *Molecules*, 23(1), 158.
19. Adams, H., Bawa, R. A., Jones, S. (2006). N-Alkyl oxazolidines as stereocontrol elements in asymmetric Diels-Alder cycloadditions of 9-substituted anthracene derivatives. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4(22), 4206-4213.

Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθεικουανικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανθή Λαχανικά

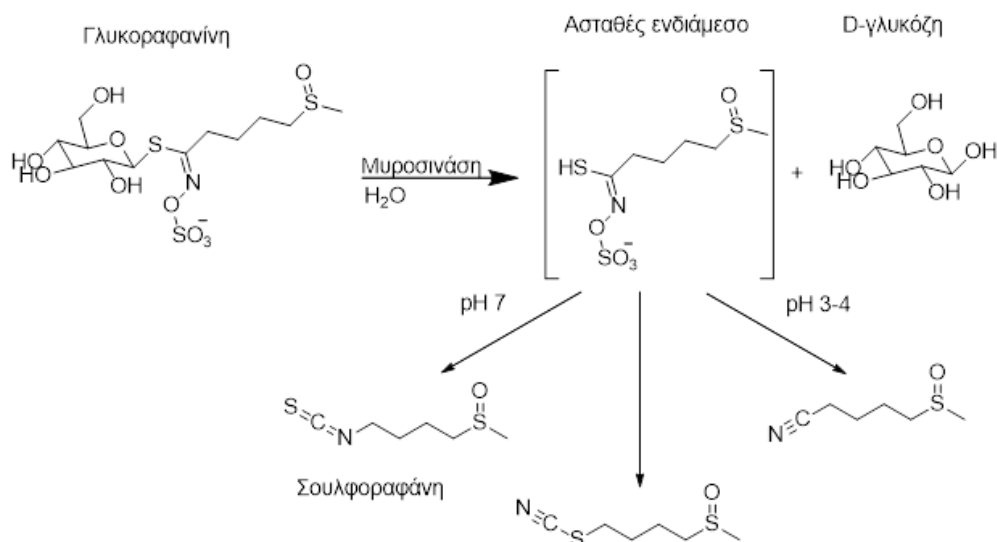
Δ.1. Μέθοδος Εκχύλισης Προϊόντων Υδρόλυσης Γλυκοζινολιτών από Σταυρανθή Λαχανικά

Η μέθοδος εκχύλισης των ισοθεικουανικών ενώσεων και των ινδολικών παραγώγων είναι πολύ σημαντική, καθώς όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα Α.2.3. αποτελούν προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών. Τα στάδια της διαδικασίας εκχύλισης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία¹⁻⁵ είναι:

- Ζύγιση και πολτοποίηση ή λειοτρίβηση φρέσκου ή λυοφιλιωμένου λαχανικού.
- Υδρόλυση γλυκοζινολιτών με ή χωρίς προσθήκη νερού.
- Θέρμανση για να ολοκληρωθεί η ενζυμική υδρόλυση.
- Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη.
- Καθαρισμός του εκχυλίσματος.

Η υδρόλυση των γλυκοζινολιτών στα φρέσκα ή λυοφιλιωμένα σταυρανθή λαχανικά επιτυγχάνεται με τη δράση της ενδογενούς μυροσινάσης, ένα ένζυμο που απελευθερώνεται κατά την κοπή ή την μάσηση των λαχανικών. Μετά την πολτοποίηση των λαχανικών προστίθεται μια ποσότητα νερού η οποία βοηθά να επιτευχθεί η ενζυμική υδρόλυση.⁴⁻⁶ Το pH του προστιθέμενου νερού είναι πολύ σημαντικός παράγοντας, καθώς το όξινο pH οδηγεί την ενζυμική υδρόλυση στην παραγωγή νιτριλίων⁴⁻⁶ τα οποία είναι τοξικά. Αντιθέτως, το ουδέτερο pH ευνοεί τον σχηματισμό των επιθυμητών ισοθεικουανικών ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντική βιολογική δράση.²⁻⁵ Για παράδειγμα κατά την ενζυμική υδρόλυση της γλυκοραφανίνης (Σχήμα Δ.1), σε pH 7 λαμβάνεται η αντικαρκινική ένωση σουλφοραφάνη, ενώ σε pH 3 έως 4 λαμβάνεται το αντίστοιχο νιτρίλιο.¹⁻⁵

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ενζυμική υδρόλυση των γλυκοζινολιτών είναι η θερμοκρασία. Η θέρμανση άνω των 70 °C απενεργοποιεί την ενδογενή μυροσινάση,⁵ με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται η ενζυμική υδρόλυση, ενώ η βέλτιστη δράση της μυροσινάσης παρατηρείται στους 37-45 °C για 4 ώρες.^{6,7}



Σχήμα Δ.1. Ενζυμική υδρόλυση της γλυκοραφανίνης¹⁻⁵

Η συγκέντρωση των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών εξαρτάται επίσης και από άλλους παράγοντες όπως:

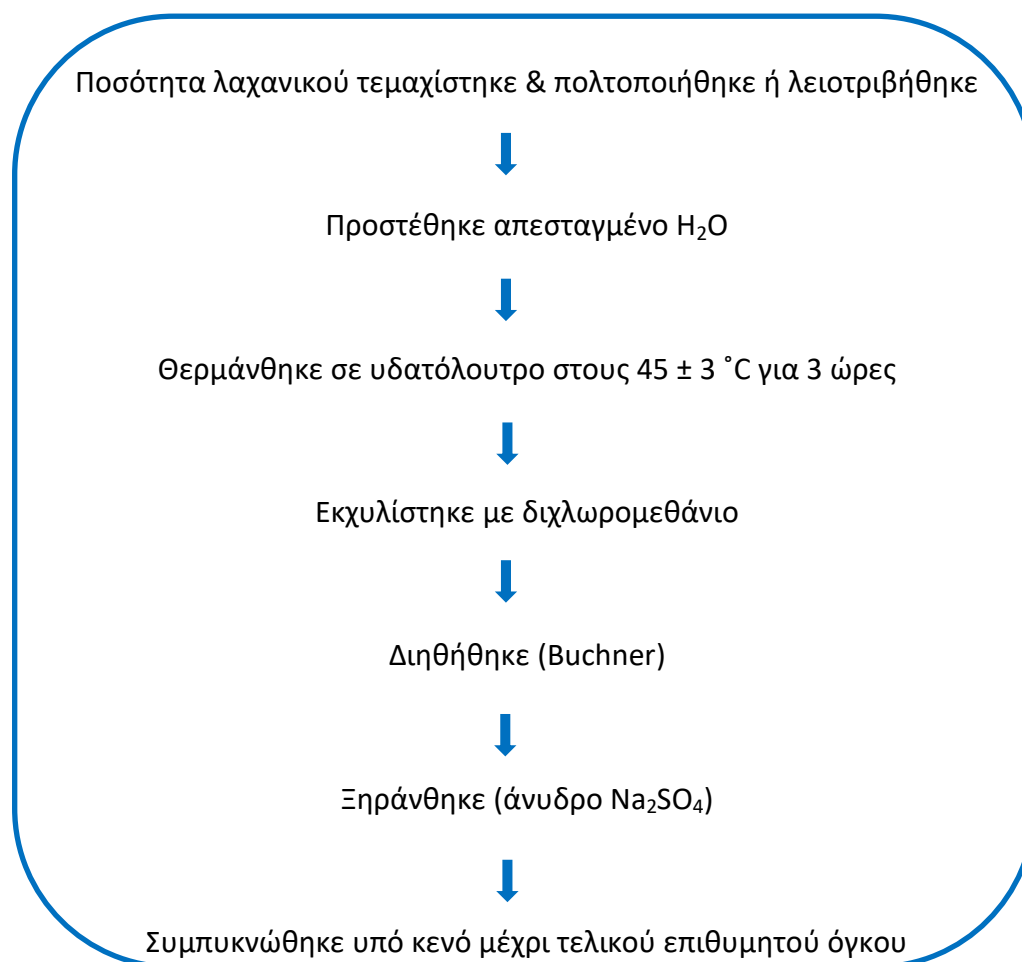
- Τις διαφορές ανάμεσα στις ποικιλίες των λαχανικών
- Την περιοχή που καλλιεργούνται
- Την εποχή που καλλιεργούνται
- Τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (γονιμότητα εδάφους, παθογόνους μικροοργανισμούς, προσβολή από έντομα, λίπασμα)⁸

Ο οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται συνήθως κατά την εκχύλιση είναι το διχλωρομεθάνιο,^{1,5,9} ωστόσο, λιγότερο συχνά, έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο¹⁰ και ο μεθυλο tert-βουτυλαιθέρας.¹¹

Για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος συχνά εφαρμόζεται η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).^{1,9,12} Από τη μελέτη τριών ειδών SPE με διαφορετική στατική φάση, (C18, άμινο-SPE, silica-SPE) προέκυψε ότι η silica-SPE δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα για την ανάκτηση των ισοθειουκωανικών. Για το στάδιο καθαρισμού και έκλουσης του εκχυλίσματος από την SPE έχουν μελετηθεί διάφοροι διαλύτες όπως νερό, ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, οξικό οξύ 0.1 M, εξάνιο και οξικός αιθυλεστέρας. Από τις μελέτες αποδεικνύεται ότι ο καταλληλότερος διαλύτης καθαρισμού είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, ενώ το διχλωρομεθάνιο είναι ο

καταλληλότερος διαλύτης έκλυσης.⁹ Τέλος, ένας εναλλακτικός τρόπος καθαρισμού του εκχυλίσματος είναι και η χρήση φίλτρου 0.45 μm.¹³

Λαμβάνοντας υπόψιν τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, επιλέξαμε φρέσκο ή λυοφιλωμένο φυτικό υλικό, με προσθήκη απεσταγμένου νερού pH 7.0 ώστε να ευνοηθεί η υδρόλυση προς την παραγωγή ισοθειακουανικών ενώσεων έναντι των αντίστοιχων νιτριλίων. Η θερμοκρασία υδρόλυσης που επιλέχθηκε ήταν 45 °C για 3 ώρες, ενώ ο οργανικός διαλύτης εκχύλισης ήταν το διχλωρομεθάνιο. Ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος από τα στερεά συστατικά πραγματοποιήθηκε με διηθητικό χαρτί Whatman τύπου 1. Η τεχνική της SPE δεν επιλέχθηκε, αφενός γιατί αυξάνει το κόστος της μεθόδου και αφετέρου θέλαμε να αναπτύξουμε μια μέθοδο με μικρό χρόνο κατεργασίας, καθόσον οι ενώσεις που θέλαμε να προσδιορίσουμε είναι ως επί το πλείστον ευοξειδωτες και ασταθείς και η εφαρμογή της τεχνικής SPE θα προκαλούσε ανεπιθύμητες απώλειες.



Σχήμα Δ.2. Συνοπτική παρουσίαση της διαδικασίας εκχύλισης των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών από σταυρανθή λαχανικά

Η διαδικασία εκχύλισης των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών που εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται συνοπτικά στο σχήμα Δ.2 και περιγράφεται ως εξής: Ζυγίστηκε ορισμένη ποσότητα από το φρέσκο ή λυοφιλωμένο λαχανικό που στη συνέχεια πολτοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός ηλεκτρικού μπλέντερ ή ιγδίου, αντίστοιχα. Το πολτοποιημένο δείγμα μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως, προστέθηκε απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 45 ± 3 °C για 3 ώρες. Στη συνέχεια, το ποτήρι ζέσεως αποσύρθηκε από το υδατόλουτρο και αφέθηκε 30 λεπτά, ώστε να αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τότε προστέθηκε διχλωρομεθάνιο και το μίγμα αναδεύθηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα για 15 λεπτά και κατόπιν διηθήθηκε με τη βοήθεια Buchner και διηθητικού χαρτιού Whatman τύπου 1. Το στερεό υπόλειμμα τοποθετήθηκε εκ νέου στο ποτήρι ζέσεως και η διαδικασία εκχύλισης με το διχλωρομεθάνιο επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Τα διηθήματα συγκεντρώθηκαν σε εκχυλιστική χοάνη και διαχωρίστηκαν οι δύο υγρές στοιβάδες. Μετά την απομάκρυνση της υδατικής στοιβάδας, παραλήφθηκε η οργανική στοιβάδα, η οποία ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και συμπυκνώθηκε υπό κενό στους 30 °C μέχρι του τελικού επιθυμητού όγκου.

Δ.2. Ανάπτυξη Μεθόδου Προσδιορισμού των Ολικών Ισοθεικουανικών Ενώσεων με Φασματοσκοπία Υπερύθρου. Εφαρμογή σε δείγματα μπρόκολου

Δ.2.1. Υλικά και Όργανα

Φυτικό υλικό

Η προμήθεια των δειγμάτων μπρόκολου (*Brassica oleracea* L.var. *italica*, cv. *Calabrese*) πραγματοποιήθηκε από τοπικούς παραγωγούς του Ν. Αργολίδας ($37^{\circ}37'54.3''\text{N}$ $22^{\circ}47'30.3''\text{E}$), του Ν. Εύβοιας ($38^{\circ}28'02.5''\text{N}$ $23^{\circ}38'13.4''\text{E}$) και του Ν. Αχαΐας ($38^{\circ}08'14.0''\text{N}$ $21^{\circ}30'56.4''\text{E}$), ενώ η συγκομιδή των μπρόκολων έγινε τον Μάρτιο του έτους 2016.

| Αριθμός δείγματος | Προέλευση |
|--------------------------|------------------|
| 1 | Ν. Αργολίδας |
| 2 | Ν. Αργολίδας |
| 3 | Ν. Εύβοιας |
| 4 | Ν. Εύβοιας |

| | |
|----|------------|
| 5 | N. Εύβοιας |
| 6 | N. Αχαΐας |
| 7 | N. Αχαΐας |
| 8 | N. Αχαΐας |
| 9 | N. Αχαΐας |
| 10 | N. Αχαΐας |

Συσκευές & Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο FT-IR της εταιρίας Thermo Fisher Scientific (μοντέλο Nicolet 6700), με πηγή Nichrome, ανιχνευτή δευτεριωμένη θεική τριγλυκίνη και κατάλληλη υποδοχή για εξάρτημα ATR με πλάκα ZnSe.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο FT-IR με το λογισμικό OMNIC 7.3, για την λήψη και την επεξεργασία των φασμάτων.
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, διπλής δέσμης, της εταιρίας Agilent Technologies (μοντέλο Cary 60), με λάμπα Xenon (80Hz), μονοχρωμάτορα Czerny-Turner και ανιχνευτή διπλής διόδου πυριτίου.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο UV-Vis με το λογισμικό Cary WinUV, για την λήψη και την επεξεργασία των φασμάτων.

Δ.2.2. Παρασκευή Εκχυλισμάτων

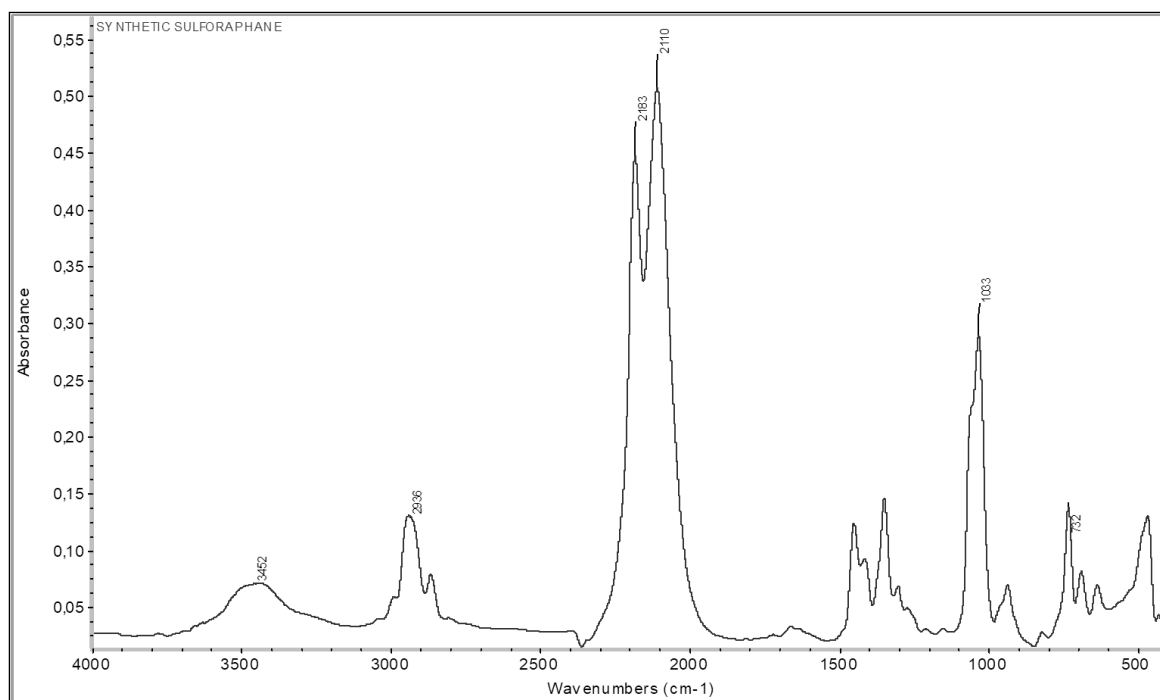
Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε στη ενότητα Δ.1. και εν συντομία έχει ως εξής: 200 g ανθυλίων φρέσκου μπρόκολου τεμαχίστηκαν και πολτοποιήθηκαν. Προστέθηκαν 100 mL δις απεσταγμένου νερού και ο πολτός θερμάνθηκε στους 45 °C για 3 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 mL διχλωρομεθανίου και ο πολτός αναδεύθηκε για 15 λεπτά, ακολούθησε διήθηση από χαρτί Whatman τύπου 1, με τη βοήθεια χωνιού Buchner. Η εκχύλιση των στερεών συστατικών επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με 2x50 mL διχλωρομεθανίου. Τα διηθήματα συγκεντρώθηκαν σε εκχυλιστική χοάνη και απομακρύνθηκε η υδατική στοιβάδα. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό στους 35 °C μέχρι τελικού όγκου 10 mL.

Δ.2.3. Ανάπτυξη Μεθόδου με Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Αρχικά, μελετήθηκε το φάσμα FT-IR της πρότυπης σουλφοραφάνης, που είχε συντεθεί προηγουμένως, ώστε να εντοπίσουμε την φασματική περιοχή που είναι κατάλληλη για την ποσοτικοποίηση των ολικών ισοθειουκτανικών ενώσεων. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το διχλωρομεθάνιο. Το φάσμα της πρότυπης ένωσης (Σχήμα Δ.3) καταγράφηκε χρησιμοποιώντας το δισκίο ZnSe ως εξής:

2-3 σταγόνες διαλύματος σουλφοραφάνης 1000 mg/100 mL τοποθετήθηκαν στο δισκίο, ο διαλύτης εξατμίστηκε σε συνθήκες δωματίου (σχεδόν αμέσως) και απέμεινε η πρότυπη ένωση της οποίας καταγράφηκε το φάσμα (Σχήμα Δ.3).

Στο φάσμα FT-IR της σουλφοραφάνης παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης στα 3452 cm^{-1} (τάση του H-C-S λόγω $\text{H}_3\text{C-S}$), στα 2936 cm^{-1} (ασύμμετρη τάση C-H λόγω $-\text{CH}_2-$), στα $2183\text{-}2110\text{ cm}^{-1}$ (ασύμμετρες τάσεις N=C=S), στα 1033 cm^{-1} (συμμετρική τάση S=O λόγω $\text{H}_3\text{C-S=O}$) και στα 732 cm^{-1} (τάση C-S λόγω $\text{H}_3\text{C-S=O}$)¹⁴ (Πίνακας Δ.1). Από τις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης του φάσματος, φαίνεται ότι η φασματική περιοχή $2183\text{-}2110\text{ cm}^{-1}$, όπου εμφανίζεται η ασύμμετρη τάση N=C=S , μπορεί να αξιοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των ολικών ισοθειουκτανικών ενώσεων.



Σχήμα Δ.3. FT-IR φάσμα της πρότυπης σουλφοραφάνης

Πίνακας Δ.1. Οι απορροφήσεις στο IR της πρότυπης σουλφοραφάνης και η ερμηνεία τους

| Απορρόφηση (cm ⁻¹) | Ερμηνεία |
|--------------------------------|---|
| 3452 | Τάση C-H του H ₃ C-S |
| 2936 | Τάση C-H των CH ₂ |
| 2183-2110 | Διπλή κορυφή, ασύμμετρες τάσεις των N=C=S |
| 1033 | Τάση S=O του H ₃ C-S=O |
| 732 | Τάση C-S του H ₃ C-S=O |

Δ.2.3.1. Λήψη των Φασμάτων FT-IR των Προτύπων Διαλυμάτων Σουλφοραφάνης και των Εκχυλισμάτων Μπρόκολου

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σουλφοραφάνης συγκεντρώσεων 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 και 400 mg/100 mL σε διχλωρομεθάνιο. Χρησιμοποιήθηκαν 500 μL πρότυπου διαλύματος σουλφοραφάνης ή εκχυλίσματος μπρόκολου. Καταγράφηκαν τρεις φορές τα FT-IR φάσματα (4000 - 650 cm⁻¹) κάθε προτύπου (συνολικά 3x9 πρότυπα διαλύματα= 27 φάσματα) και των εκχυλισμάτων των διαφορετικών δειγμάτων μπρόκολου (συνολικά 3x10 εκχυλίσματα μπρόκολου= 30 φάσματα) με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance spectroscopy, ATR), σε κρύσταλλο ZnSe και γωνία πρόσπτωσης 45° με υπόβαθρο (background) κρύσταλλο ZnSe, 100 σαρώσεις (scans) και διαχωριστική ικανότητα (resolution) 4 cm⁻¹.

Δ.2.3.2. Επεξεργασία των Φασμάτων FT-IR

Η επεξεργασία των φασμάτων ATR FT-IR των προτύπων διαλυμάτων και των εκχυλισμάτων μπρόκολου που λήφθηκαν, πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια:

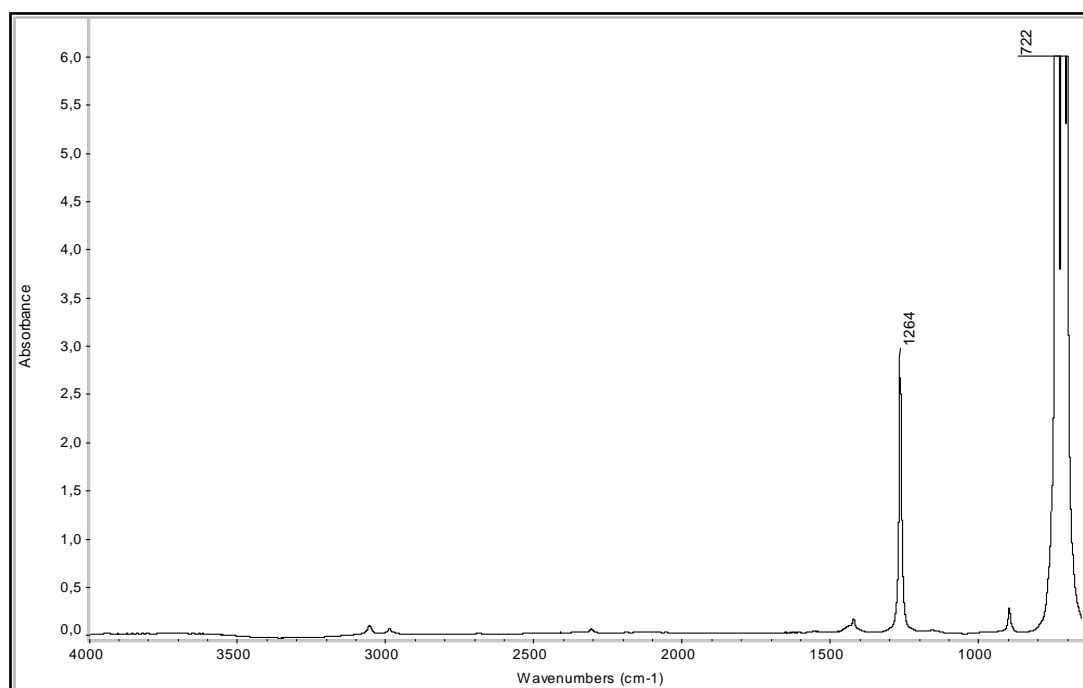
1. Έγινε αυτόματη εξομάλυνση (smoothing) των φασμάτων μέσω του λογισμικού του οργάνου. Η λειτουργία πραγματοποιήθηκε με χρήση του

αλγόριθμου Savitsky-Golay με πολυωνυμικό μοντέλο δευτέρου βαθμού και πέντε επιλεγμένα σημεία.

2. Έγινε αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής των φασμάτων μέσω του λογισμικού του οργάνου. Η λειτουργία πραγματοποιήθηκε με χρήση πολυωνυμικού μοντέλου δευτέρου βαθμού και 20 επαναλήψεις.
3. Έγινε αποθήκευση των επεξεργασμένων φασμάτων.

Δ.2.3.3. Φασματοσκοπική Ανάλυση με FT-IR

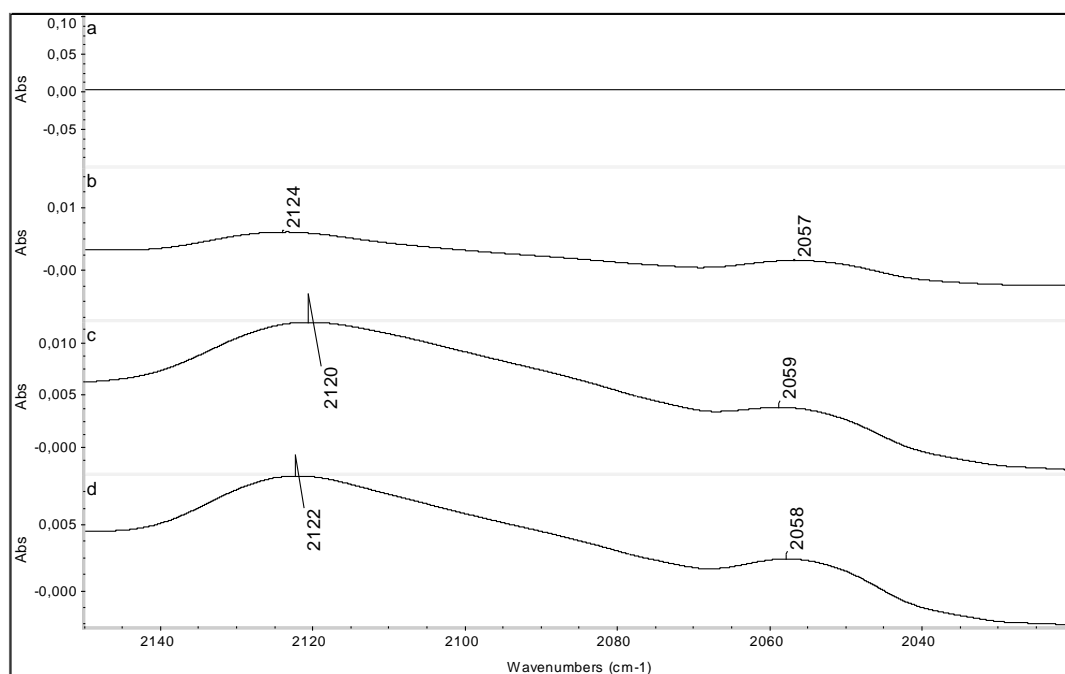
Στο φάσμα του πυκνότερου πρότυπου διαλύματος σουλφοραφάνης (Σχήμα Δ.4), συγκέντρωσης 400 mg/100 mL, παρατηρήθηκε απορρόφηση στα 1264 cm^{-1} που συνδέεται με τη δόνηση παραμόρφωσης $>\text{CHCl}_2$ του διχλωρομεθανίου και μία απορρόφηση στα 722 cm^{-1} που συνδέεται με τη δόνηση τάσης C-Cl του διχλωρομεθανίου.¹⁴



Σχήμα Δ.4. FT-IR φάσμα πρότυπου διαλύματος της σουλφοραφάνης συγκέντρωσης 400 mg/100mL σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο

Οι απορροφήσεις της σουλφοραφάνης δεν ήταν ορατές λόγω της μεγάλης έντασης των δύο αυτών κορυφών του διαλύτη. Μπορούν όμως οι απορροφήσεις της σουλφοραφάνης να καταστούν ορατές, ιδιαίτερα αυτές της περιοχής $2150-2120\text{ cm}^{-1}$ όπου εμφανίζεται η ασύμμετρη τάση $\text{N}=\text{C}=\text{S}$,¹⁴ εάν γίνει επικέντρωση στην περιοχή αυτή του φάσματος. Τότε στη φασματική περιοχή $2150-2020\text{ cm}^{-1}$, παρατηρήθηκε ότι η ένταση της απορρόφησης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης (Σχήμα Δ.5 α, b, c, d). Η διπλή κορυφή (~ 2120 και $\sim 2058\text{ cm}^{-1}$) της παραπάνω φασματικής περιοχής σχετίζεται με τις ασύμμετρες τάσεις της $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ομάδας.¹⁴

Οι απορροφήσεις του προτύπου διαλύματος που δεν περιείχε τη σουλφοραφάνη ήταν μηδενικές σε αυτή τη φασματική περιοχή (Σχήμα Δ.5.α). Τα εκχυλίσματα από μπρόκολα παρουσίαζαν επίσης την διπλή κορυφή στην παραπάνω φασματική περιοχή (Σχήμα Δ.5.d). Έτσι, για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού των ολικών ισοθειοκυανικών ενώσεων επιλέχθηκε η φασματική περιοχή $2150-2020\text{ cm}^{-1}$. Η μικρή ένταση των κορυφών και ο κίνδυνος λήψης λανθασμένων αποτελεσμάτων λόγω αλληλεπικάλυψης κορυφών, μας οδήγησε στην εφαρμογή του αλγόριθμου της παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Με τη χρήση του αλγόριθμου PLS, αναπτύχθηκε ένα αξιόπιστο μοντέλο βαθμονόμησης μέσω του οποίου υπολογίστηκε με ακρίβεια η συγκέντρωση των ολικών ισοθειοκυανικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των δειγμάτων μπρόκολου.



Σχήμα Δ.5. Η φασματική περιοχή $2150-2020\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR των: a) πρότυπο διάλυμα με $0\text{ mg}/100\text{ mL}$ σουλφοραφάνης; b) πρότυπο διάλυμα με 200

mg/100 mL σουλφοραφάνης; c) πρότυπο διάλυμα με 400 mg/100 mL σουλφοραφάνης; d) εκχύλισμα μπρόκολου (αριθμός δείγματος 10)

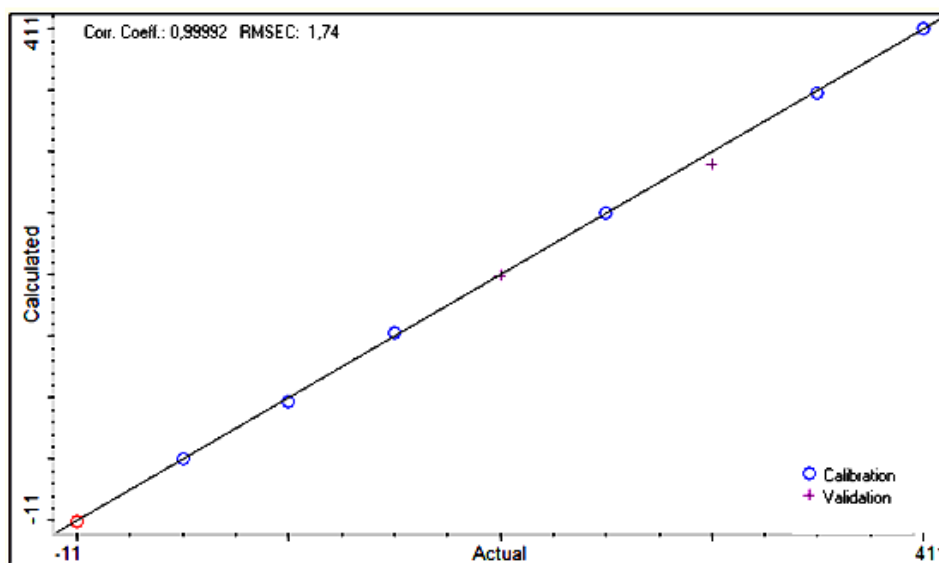
Δ.2.3.4. Στατιστική Επεξεργασία των Φασμάτων FT-IR και Εφαρμογή του Αλγόριθμου PLS

Για τη στατιστική επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο TQ Analyst, το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο λογισμικό που συνοδεύει το όργανο IR και ο αλγόριθμος PLS. Η στατιστική ακρίβεια του μοντέλου βαθμονόμησης σχετίζεται από το συντελεστή γραμμικότητας r , σε συνδυασμό με την τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της βαθμονόμησης (root-mean-square error of calibration, RMSEC), την τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της διασταυρωμένης επικύρωσης (root-mean-square error of cross validation, RMSECV) και την τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της πρόβλεψης (root-mean-square error of prediction, RMSEP).

Το λογισμικό TQ Analyst χρησιμοποιήθηκε ως εξής:

1. Τα φάσματα με τις αντίστοιχες πραγματικές (actual) συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων σουλφοραφάνης εισήχθησαν στο λογισμικό.
2. Επιλέχθηκε η φασματική περιοχή $2150-2020\text{ cm}^{-1}$, για την εφαρμογή του PLS.
3. Επιλέχθηκε η εντολή βαθμονόμηση (calibration) και στη συνέχεια, επιλέχθηκε η εντολή επικύρωση (validation). Για την εκτίμηση του βέλτιστου μοντέλου βαθμονόμησης, το λογισμικό χώρισε τυχαία τα πρότυπα διαλύματα σουλφοραφάνης (0-400 mg/100 mL) σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα είχε 7 πρότυπα, που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση και η άλλη ομάδα είχε 2 πρότυπα, που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση.
4. Στη συνέχεια, το ίδιο το μοντέλο υπολόγισε ξανά τις πραγματικές (actual) συγκεντρώσεις και τις εμφάνισε ως υπολογισμένες (calculated). Δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι, η δοκιμή Chauvenet μαζί με τα διαγνωστικά μοχλότητας (leverage diagnostics) χρησιμοποιήθηκαν από το λογισμικό για την ανίχνευση των ακραίων τιμών με βάση τη φασματική διαφορά ή την διαφορά στις συγκεντρώσεις της σουλφοραφάνης.¹⁵ Δεν βρέθηκαν ακραίες τιμές. Το εύρος συγκεντρώσεων καλύφθηκε πολύ καλά από το μοντέλο, δεδομένου ότι το εύρος τιμών ήταν 100%, το οποίο είναι μεγαλύτερο από 95%. Άρα, ο αριθμός των προτύπων της σουλφοραφάνης ήταν επαρκής.

5. Κατασκευάστηκε η καμπύλη γραμμικής συσχέτισης (Σχήμα Δ.6) μεταξύ των “actual” και “calculated” τιμών από το λογισμικό και υπολογίστηκε ο συντελεστής γραμμικότητας (correlation coefficient) της καμπύλης και η RMSECV. Ο γραμμικός συνδυασμός των φασματοσκοπικών μεταβλητών, που ονομάζονται παράγοντες (factors) χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή της μεταβολής στο μοντέλο PLS. Στο συγκεκριμένο μοντέλο βαθμονόμησης, ως παράγοντας ορίστηκε το σύνολο στοιχείων που περιέχουν τις φασματοσκοπικές και τις πραγματικές τιμές πληροφοριών σουλφοραφάνης. Το λογισμικό υπολόγισε την τιμή του RMSECV στα 4.81 και στη συνέχεια υπολόγισε το βέλτιστο αριθμό παραγόντων με βάση την τιμή του RMSECV. Ο προτεινόμενος αριθμός παραγόντων από το λογισμικό ήταν 4. Έτσι, ο παράγοντας 4 περιέγραψε το 99.7% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων και το 99.9% της διακύμανσης της συγκέντρωσης της σουλφοραφάνης.



Corr. Coeff: Συντελεστής γραμμικότητας, RMSEC: Ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της βαθμονόμησης.

Σχήμα Δ.6. Γραμμική συσχέτιση μεταξύ των “actual” και “calculated” τιμών των συγκεντρώσεων των προτύπων σουλφοραφάνης

Με αυτό τον τρόπο αναπτύχθηκε ένα χημειομετρικό μοντέλο συσχέτισης των συγκεντρώσεων των προτύπων με τα δεδομένα των φασματικών περιοχών (βαθμονόμηση). Οι αντίστοιχες τιμές ($r = 0.99992$, $RMSEC = 1.74$, $RMSEP = 2.17$) της προτεινόμενης μεθόδου FT-IR έδειξαν γραμμική συσχέτιση μεταξύ των “calculated” και των “actual” συγκεντρώσεων της σουλφοραφάνης (Σχήμα Δ.6). Όσο πιο κοντινές είναι οι τιμές των RMSEC και RMSEP, τόσο πιο αξιόπιστο είναι το μοντέλο. Η υψηλή

τιμή του r ήταν σύμφωνη με μια ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μεταξύ των "calculated" και των "actual" συγκεντρώσεων των προτύπων της σουλφοραφάνης. Η μικρή διακύμανση που παρατηρήθηκε μεταξύ των τιμών RMSEC και RMSEP σε σύγκριση με τις τιμές της σουλφοραφάνης, έδειξε την αξιοπιστία του μοντέλου.¹⁵

Στη συνέχεια ελήφθησαν τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων και με βάση το μοντέλο PLS που αναπτύχθηκε, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε ισοδύναμα σουλφοραφάνης των δέκα εκχυλισμάτων μπρόκολου, με τρεις επαναλήψεις.

Στον πίνακα Δ.2 δίνονται οι συγκεντρώσεις των ολικών ισοθεικουανικών εκφρασμένες σε mg σουλφοραφάνης ανά 100 g φρέσκου φυτικού υλικού όπως υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη νέα μέθοδο ATR FT-IR που αναπτύχθηκε με την εφαρμογή του αλγόριθμου PLS. Η συγκέντρωση των ισοθεικουανικών με βάση τη νέα μέθοδο ATR FT-IR κυμάνθηκε από 89 ± 4 έως 285 ± 2 mg/100 g φρέσκου μπρόκολου.

Πίνακας Δ.2. Περιεκτικότητα σε ολικά ισοθεικουανικά εκφρασμένη σε ισοδύναμα σουλφοραφάνης ανά 100 g φρέσκου μπρόκολου \pm τυπική απόκλιση δέκα δειγμάτων μπρόκολου με τρεις επαναλήψεις όπως προσδιορίστηκε από την μέθοδο ATR FT-IR.

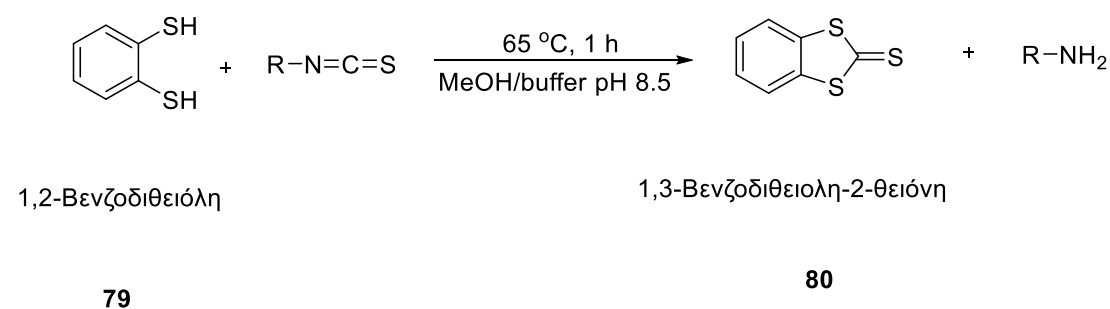
| Δείγμα | ATR FT-IR^α μέθοδος (mg SFN^β/100 g FW^γ \pm SD^δ, n^ε=3) |
|---------------|---|
| Μπρόκολο 1 | 218 \pm 5 |
| Μπρόκολο 2 | 249 \pm 4 |
| Μπρόκολο 3 | 227 \pm 5 |
| Μπρόκολο 4 | 179 \pm 3 |
| Μπρόκολο 5 | 248 \pm 5 |
| Μπρόκολο 6 | 89 \pm 4 |
| Μπρόκολο 7 | 107 \pm 2 |
| Μπρόκολο 8 | 175 \pm 3 |
| Μπρόκολο 9 | 276 \pm 4 |
| Μπρόκολο 10 | 285 \pm 2 |

^αΦασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
εξασθενημένης ολικής ανάκλασης, ^βΣουλφοραφάνη, ^γΦρέσκου βάρους,
^δΤυπική απόκλιση, ^εΑριθμός επαναλήψεων

Δ.2.4. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

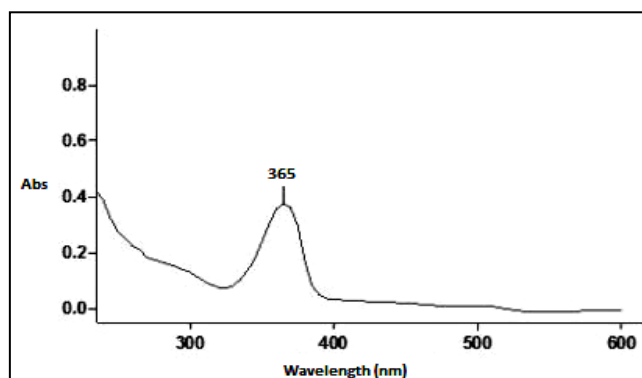
Για να μπορέσουμε να ελέγξουμε τη μέθοδο που αναπτύχθηκε με χρήση του FT-IR, έπρεπε να μετρηθεί η συγκέντρωση των ολικών ισοθειοκυανικών ενώσεων των δειγμάτων σύμφωνα με μια επικυρωμένη μέθοδο της βιβλιογραφίας και να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων.¹⁶

Επιλέξαμε τη μέθοδο με τη χρήση φασματοφωτομετρίας UV-Vis και μετρήθηκε η συνολική περιεκτικότητα σε ισοθειοκυανικές ενώσεις από τα δέκα εκχυλίσματα μπρόκολου, με τρεις επαναλήψεις. Η μέθοδος αυτή είναι έμμεση και περιλαμβάνει αρχικά την αντίδραση παραγωγοποίησης των ισοθειακυανικών ενώσεων με την 1,2-βενζοδιθειόλη (**79**) και τη μέτρηση της απορρόφησης του προϊόντος της αντίδρασης, 1,3-βενζοδιθειόλη-2-θειόνη (**80**), στα 365 nm (Σχήμα Δ.7).¹⁶



Σχήμα Δ.7. Γενική αντίδραση παραγωγοποίησης ισοθειοκυανικών ενώσεων με 1,2-βενζοδιθειόλη

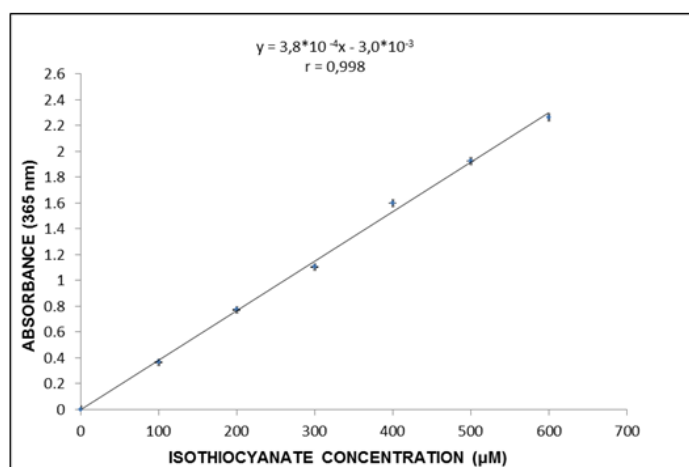
Στο σχήμα Δ.8 φαίνεται το φάσμα UV του διαλύματος της 1,3-βενζοδιθειόλης-2-θειόνης (**80**) συγκέντρωσης 100 μ M και το μέγιστο της απορρόφησης της στα 365 nm.



Σχήμα Δ.8. Φάσμα UV 1,3-βενζοδιθειόλης-2-θειόνης 100 μ M, σε διάλυμα 1.1 mL μεθανόλης και 0.9 mL ρυθμιστικού διαλύματος (pH 8.5)

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σουλφοραφάνης 0, 100, 200, 300, 400, 500 και 600 μM . Στη συνέχεια, σε γυάλινο φιαλίδιο με πώμα προστέθηκαν 900 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 100 mM, pH 8.5, 900 μL μεθανόλη, 100 μL πρότυπου διαλύματος σουλφοραφάνης (0-600 μM) σε MeOH και 100 μL διαλύματος 1,2-βενζοδιθειόλης 80 mM, σε μεθανόλη. Ο τελικός όγκος του συστήματος της αντίδρασης ήταν 2.0 mL. Η 1,2-βενζοδιθειόλη προστέθηκε τελευταία, για την έναρξη της αντίδρασης παραγωγοποίησης. Η αντίδραση θερμάνθηκε υπό ανάδευση, στους 65 °C για 1 ώρα. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα τυφλό δείγμα που περιείχε όλα τα στοιχεία του συστήματος της αντίδρασης εκτός της σουλφοραφάνης. Στη συνέχεια, μετά το μηδενισμό με το τυφλό δείγμα, μετρήθηκε η απορρόφηση των προτύπων διαλυμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV. Οι μετρήσεις απορρόφησης, στα 365 nm, πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε πρότυπο.

Η καμπύλη βαθμονόμησης, που κατασκευάστηκε στο Microsoft Excel βάση των προτύπων διαλυμάτων, είχε συντελεστή γραμμικότητας $r = 0.998$ και δίνεται στο σχήμα Δ.9.



Σχήμα Δ.9. Καμπύλη βαθμονόμησης μεταξύ της συγκέντρωσης (μM) ισοθειακουκτανικών ενώσεων και της αντίστοιχης απορρόφησης τους στα 365 nm

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των ισοθειουκτανικών στα εκχυλίσματα μπρόκολου, εφαρμόστηκε μια αραιώση 1:1000 με μεθανόλη, προκειμένου οι συγκεντρώσεις να παραμείνουν εντός της καμπύλης βαθμονόμησης. Σε γυάλινο φιαλίδιο με πώμα προστέθηκαν 999 μL μεθανόλη, 1 μL του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος, 900 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 100 mM, pH 8.5 και 100 μL διαλύματος 1,2-βενζοδιθειόλης 80 mM. Ο τελικός όγκος του συστήματος

της αντίδρασης ήταν 2.0 mL. Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε στους 65 °C για 1 ώρα. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα τυφλό δείγμα που περιείχε 999 μ L μεθανόλη, 1 μ L διχλωρομεθάνιο, 900 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 100 mM, pH 8.5 και 100 μ L διαλύματος 1,2-βενζοδιθειόλης 80 mM. Οι μετρήσεις απορρόφησης, στα 365 nm, πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε δείγμα.

Τα αποτελέσματα (Πίνακας Δ.3) που ελήφθησαν από την καμπύλη βαθμονόμησης σε μ M μετατράπηκαν σε mg ισοδυνάμων σουλφοραφάνης ανά 100 g φρέσκου μπρόκολου ως εξής: από την καμπύλη βαθμονόμησης υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε ολικά ισοθειουκωνικά σε μ M (nmol/mL), χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση TREND του Microsoft Excel. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση πολλαπλασιάστηκε με τον συντελεστή αραιώσης.

Πίνακας Δ.3. Περιεκτικότητα σε ολικά ισοθειουκωνικά εκφρασμένη σε mg ισοδυνάμων σουλφοραφάνης ανά 100 g φρέσκου μπρόκολου \pm τυπική απόκλιση δέκα δειγμάτων μπρόκολου, όπως προσδιορίστηκε με τη χρήση της φασματοφωτομετρίας UV.

| Δείγμα | UV-Vis ^α μέθοδος (mg SFN ^β /100 g FW ^γ \pm SD ^δ , n ^ε =3) |
|-------------|---|
| Μπρόκολο 1 | 219 \pm 7 |
| Μπρόκολο 2 | 248 \pm 5 |
| Μπρόκολο 3 | 232 \pm 4 |
| Μπρόκολο 4 | 179 \pm 4 |
| Μπρόκολο 5 | 248 \pm 5 |
| Μπρόκολο 6 | 97 \pm 5 |
| Μπρόκολο 7 | 107 \pm 6 |
| Μπρόκολο 8 | 191 \pm 4 |
| Μπρόκολο 9 | 300 \pm 10 |
| Μπρόκολο 10 | 292 \pm 9 |

^αΥπεριώδες-Ορατό, ^βΣουλφοραφάνη, ^γΦρέσκου βάρους, ^δΤυπική απόκλιση, ^εΑριθμός επαναλήψεων.

Τα nmol μετατράπηκαν σε mg ισοδυνάμων σουλφοραφάνης, πολλαπλασιάζοντας με το μοριακό βάρος της σουλφοραφάνης (MB: 177.29) και τελικά ανάχθηκαν στα 100 g φρέσκου μπρόκολου. Οι συγκεντρώσεις των ολικών ισοθειουκωνικών κυμάνθηκαν μεταξύ 97 \pm 5 και 300 \pm 10 mg/100 g φρέσκου μπρόκολου (πίνακας Δ.3).

Δ.2.5. Σύγκριση των μεθόδων φασματοσκοπίας UV-Vis και FT-IR

Για να ελέγξουμε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της νέας μεθόδου ATR FT-IR, υπολογίστηκε η % ανάκτηση της σουλφοραφάνης και εφαρμόστηκε ο στατιστικός έλεγχος F και t , αντίστοιχα, για διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η φασματοφωτομετρική μέθοδος UV-Vis χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς για τον υπολογισμό της % ανάκτησης της σουλφοραφάνης σε εκχυλίσματα μπρόκολου. Η % ανάκτηση υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση Δ.1:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\text{Συγκέντρωση ισοθειοκυανικών με τη μέθοδο FT - IR}}{\text{Συγκέντρωση ισοθειοκυανικών με τη μέθοδο UV - Vis}} \times 100 \quad \text{Εξίσωση Δ.1}$$

Τα αποδεκτά όρια ανάκτησης για συγκεντρώσεις άνω των 100 μg/Kg, σύμφωνα με την οδηγία της Ένωσης Επισήμων Αναλυτικών Χημικών (AOAC), κυμαίνονται από 80 έως και 110%.¹⁷ Η % ανάκτηση της σουλφοραφάνης που υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης Δ.1 ήταν εντός των αποδεκτών ορίων, αφού κυμάνθηκε από 91.6 έως 100% (Πίνακας Δ.4).

Η μέθοδος ATR FT-IR εξετάστηκε επίσης από την άποψη της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας, χρησιμοποιώντας τον στατιστικό έλεγχο F και t , αντίστοιχα, για διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η στάθμη εμπιστοσύνης σχετίζεται με το πόσο στατιστικά βέβαιο είναι ότι η νέα μέθοδος συγκρινόμενη με άλλες μεθόδους δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την επαναληψιμότητα ή την ακρίβεια.¹⁸

Για την εφαρμογή του στατιστικού ελέγχου F υπολογίστηκε ο λόγος:

$$F_{\text{πειρ}} = \frac{s_A^2}{s_B^2}, \quad (\text{όπου } s_A \text{ και } s_B, \text{ οι τυπικές αποκλίσεις δύο σειρών δεδομένων}) \quad \text{Εξίσωση Δ.2}$$

έτσι ώστε στον αριθμητή να βρίσκεται η μεγαλύτερη τυπική απόκλιση.¹⁸

Αν ο $F_{\text{πειρ}}$ είναι μικρότερος του αντίστοιχου θεωρητικού $F_{p, (v_A, v_B)}$ (F_{critical}), που υπάρχει σε στατιστικούς πίνακες, για βαθμούς ελευθερίας $v_A = \eta_A - 1$ και $v_B = \eta_B - 1$ (όπου η_A και η_B ο αριθμός των μετρήσεων) και για ορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης, τότε οι δύο μέθοδοι δεν διαφέρουν ως προς την επαναληψιμότητα.¹⁸

Από τους στατιστικούς πίνακες, η τιμή του F_{critical} , για στάθμη εμπιστοσύνης 95% και δύο βαθμούς ελευθερίας, ήταν $F_{\text{critical}} = 19.0$. Όλες οι τιμές του F που υπολογίστηκαν

($F_{\text{πειρ}}$) σύμφωνα με τη εξίσωση Δ.2, ήταν μικρότερες του F_{critical} εκτός από αυτή του 10^{ου} δείγματος. Οι πειραματικές τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 1.00 και 20.3 (Πίνακας Δ.4). Ως εκ τούτου, οι δύο μέθοδοι αποδείχτηκαν ισοδύναμες όσον αφορά την επαναληψιμότητα (εκτός από το δέκατο δείγμα μπρόκολου).

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ο στατιστικός έλεγχος t για να διαπιστωθεί εάν οι δύο μέθοδοι διαφέρουν ως προς την ακρίβεια.

Πίνακας Δ.4. Τα αποτελέσματα στατιστικών ελέγχων F και t και η ανάκτηση (%)

| Δείγμα | Έλεγχος F^{α} | Έλεγχος t^{α} | Ανάκτηση % |
|-------------|----------------------|----------------------|------------|
| Μπρόκολο 1 | 1.96 | 0.16 | 99.5 |
| Μπρόκολο 2 | 1.56 | 0.22 | 100 |
| Μπρόκολο 3 | 1.56 | 1.11 | 97.8 |
| Μπρόκολο 4 | 1.33 | 0.00 | 100 |
| Μπρόκολο 5 | 1.00 | 0.00 | 100 |
| Μπρόκολο 6 | 1.56 | 1.77 | 91.8 |
| Μπρόκολο 7 | 9.00 | 0.00 | 100 |
| Μπρόκολο 8 | 1.78 | 4.53 | 91.6 |
| Μπρόκολο 9 | 6.25 | 2.63 | 92 |
| Μπρόκολο 10 | 20.3 | 1.07 | 97.6 |

^αΕπίπεδο εμπιστοσύνης: 95 %

Όταν ο αριθμός των μετρήσεων κάθε μεθόδου είναι διαφορετικός, η πειραματική τιμή του t δίνεται από την εξίσωση Δ.3:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\sqrt{\frac{(n_A - 1)s_A^2 + (n_B - 1)s_B^2}{n_A + n_B - 2}}} \sqrt{\frac{n_A n_B}{n_A + n_B}} \quad \text{Εξίσωση Δ.3}$$

όπου \bar{x}_A , \bar{x}_B οι μέσοι όροι, n_A , n_B οι αριθμοί των μετρήσεων και s_A και s_B οι τυπικές αποκλίσεις των δύο μεθόδων.¹⁸

Εάν ο αριθμός μετρήσεων είναι ο ίδιος ($n_A=n_B$), η πειραματική τιμή του t , που προκύπτει από την εξίσωση Δ.4, δίνεται από την εξίσωση Δ.4:

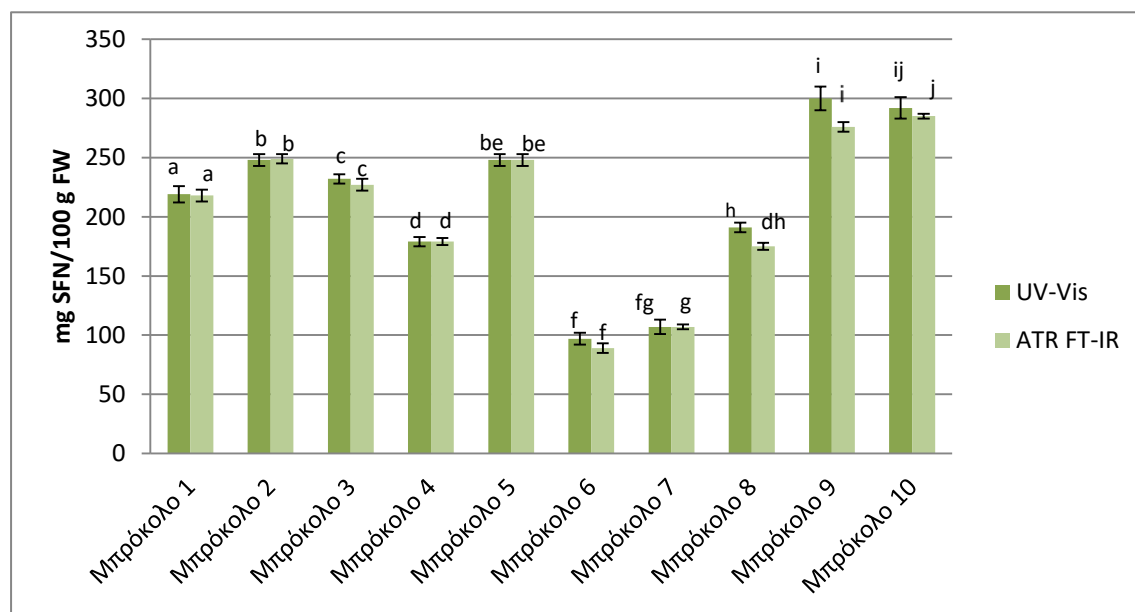
$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\sqrt{\frac{s_A^2 + s_B^2}{n-1}}}$$

Εξίσωση Δ.4

όπου \bar{x}_A και \bar{x}_B οι δύο μέσοι όροι, s_A και s_B οι τυπικές αποκλίσεις και n ο αριθμός των μετρήσεων. Αν η πειραματική τιμή του t είναι μικρότερη της αντίστοιχης θεωρητικής για $2n-2$ βαθμούς ελευθερίας και για ορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης,

τότε η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική και οι μέθοδοι δεν διαφέρουν ως προς την ακρίβεια.¹⁸

Από τους στατιστικούς πίνακες, η τιμή του $t_{critical}$ για στάθμη εμπιστοσύνης 95% και τέσσερις βαθμούς ελευθερίας ήταν $t_{critical} = 2.776$. Όλες οι τιμές του t που υπολογίστηκαν ($t_{πειρ}$) με την εξίσωση Δ.4, ήταν μικρότερες του $t_{critical}$ εκτός από αυτή του 8^{ου} δείγματος. Οι πειραματικές τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 0 και 4.53 (Πίνακας Δ.4). Έτσι, οι δύο μέθοδοι (UV-Vis και ATR FT-IR) αποδείχτηκαν ισοδύναμες όσον αφορά την ακρίβεια (εκτός από το όγδοο δείγμα μπρόκολου).



Σχήμα Δ.10. Περιεκτικότητα των ολικών ισοθειοκυανικών ενώσεων σε 10 δείγματα μπρόκολου όπως προσδιορίστηκε από την νέα μέθοδο ATR FT-IR και τη μέθοδο UV-Vis της βιβλιογραφίας. Σύγκριση του μέσου όρου των δειγμάτων (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)

Στο ραβδόγραμμα του σχήματος Δ.10 παρουσιάζεται συνοπτικά η περιεκτικότητα του συνόλου των ισοθειοκυανικών ενώσεων (εκφρασμένη σε mg ισοδυνάμων σουλφοραφάνης/100 g FW) σε 10 δείγματα μπρόκολου από τους νομούς Αργολίδας (μπρόκολο 1 & 2), Εύβοιας (μπρόκολο 3-5) και Αχαΐας (μπρόκολο 6-10), όπως προσδιορίστηκε από τη νέα μέθοδο ATR FT-IR και τη μέθοδο UV-Vis της βιβλιογραφίας. Από το σχήμα Δ.10 παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις που έχουν υπολογιστεί μέσω των δύο μεθόδων. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ισοθειοκυανικών παρατηρήθηκαν στα δείγματα μπρόκολου 9 και 10 με προέλευση από το Ν. Αχαΐας.

Δ.2.6. Συμπεράσματα

Ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC), σε ειδική έκδοση του, εξαίρει τις αντικαρκινικές ιδιότητες των ισοθειοκυανικών ενώσεων και τονίζει την αναγκαιότητα ανάπτυξης νέων μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού των ενώσεων αυτών στα σταυρανθή λαχανικά.¹⁹ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προτεινόμενη μεθοδολογία με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμού Fourier και την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR FT-IR) σε συνδυασμό με τον αλγόριθμο PLS, αποτελεί μια εξαιρετική εναλλακτική μέθοδο για τον άμεσο προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας του συνόλου των ισοθειακυανικών σε μπρόκολο καθώς και σε άλλα σταυρανθή λαχανικά. Η σύγκριση των ληφθέντων αποτελεσμάτων, με μια καθιερωμένη έμμεση φασματοφωτομετρική μέθοδο UV-Vis, δείχνει ότι και οι δύο μέθοδοι είναι ισοδύναμες όσον αφορά την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια.

Σημαντικό πλεονέκτημα της νέας μεθόδου ATR FT-IR, αποτελεί ο γρήγορος και άμεσος προσδιορισμός των ισοθειοκυανικών ενώσεων σε σχέση με την καθιερωμένη μέθοδο UV-Vis της βιβλιογραφίας κατά την οποία εφαρμόζεται παραγοντοποίηση των ισοθειοκυανικών ενώσεων. Επιπλέον, οι μέθοδοι που βασίζονται στη φασματοσκοπία IR παρουσιάζουν περαιτέρω πλεονεκτήματα όπως, το μειωμένο κόστος και η διευκόλυνση των αναλύσεων ρουτίνας καθώς, δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα. Επίσης, για την εφαρμογή των μεθόδων φασματοσκοπίας IR δεν απαιτείται υψηλά εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό.

Η νέα μέθοδος ATR FT-IR που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής είναι η πρώτη μέθοδος που προτείνεται για τον άμεσο προσδιορισμό των συνολικών ισοθειακυανικών ενώσεων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελλοντικές εφαρμογές σε άλλα σταυρανθή λαχανικά.

Δ.3. Ανάπτυξη Μεθόδου Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού Σουλφοραφάνης και Ινδολο-3-καρβινόλης με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Εφαρμογή σε Δείγματα Μπρόκολου

Δ.3.1. Υλικά και Όργανα

Φυτικό Υλικό

Η προμήθεια των δειγμάτων μπρόκολου (*Brassica oleracea* L.var. *italica*, cv. *Calabrese*) πραγματοποιήθηκε από τοπικούς παραγωγούς του Ν. Αργολίδας (37°37'54.3"N 22°47'30.3"E), του Ν. Εύβοιας (38°28'02.5"N 23°38'13.4"E) και του Ν. Αχαΐας (38°08'14.0"N 21°30'56.4"E). Η συγκομιδή των μπρόκολων έγινε τον Απρίλιο του έτους 2016.

| Αριθμός δείγματος | Προέλευση |
|-------------------|--------------|
| 1 | Ν. Αργολίδας |
| 2 | Ν. Αργολίδας |
| 3 | Ν. Αργολίδας |
| 4 | Ν. Εύβοιας |
| 5 | Ν. Εύβοιας |
| 6 | Ν. Εύβοιας |
| 7 | Ν. Αχαΐας |
| 8 | Ν. Αχαΐας |
| 9 | Ν. Αχαΐας |
| 10 | Ν. Αχαΐας |

Συσκευές & Όργανα

- Φασματογράφος μάζας UPLC-HRMS/MS της εταιρίας Bruker (μοντέλο Bruker Maxis Impact) εξοπλισμένος με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), αναλυτή τετραπόλου-χρόνου πτήσης (Q-TOF), χρωματογραφικό σύστημα UPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 και αυτόματο δειγματολήπτη.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, συνδεδεμένος με το φασματογράφο μάζας με το λογισμικό Bruker Data Analysis 4.1, για την λήψη και την επεξεργασία των φασμάτων.

Δ.3.2. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σουλφοραφάνης και ινδολο-3-καρβινόλης συγκέντρωσης 1000 µg/mL σε μεθανόλη και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C. Από αυτά παρασκευάστηκαν με αραιώση σε μεθανόλη τα πρότυπα διαλύματα εργασίας. Ένα διάλυμα 10 µg/mL σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα πλήρους σάρωσης και MS/MS, ενώ για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1, 2, 3, 5, 8 και 10 µg/mL σε μεθανόλη.

Δ.3.3. Παρασκευή Εκχυλισμάτων

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε στη ενότητα Γ.1. και εν συντομία έχει ως εξής: Τα ανθύλλια αφαιρέθηκαν αμέσως από το φρέσκο μπρόκολο, χωρίστηκαν σε 3 μερίδες των 100 g, τεμαχίστηκαν και πολτοποιήθηκαν. Προστέθηκαν 50 mL δις απεσταγμένου νερού και ο πολτός θερμάνθηκε στους 45 °C για 3 ώρες. Προστέθηκαν 50 mL διχλωρομεθανίου και ο πολτός αναδεύθηκε για 15 λεπτά, ακολούθησε διήθηση με Buchner και η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με 2x30 mL διχλωρομεθανίου. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του νερού σε διαχωριστική χοάνη, η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρι τελικού όγκου 10 mL.

Δ.3.4. Συνθήκες UPLC-HRMS/MS

Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε το άζωτο, ενώ τα πειράματα διεξήχθησαν στον αρνητικό και στον θετικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (negative & positive ESI).

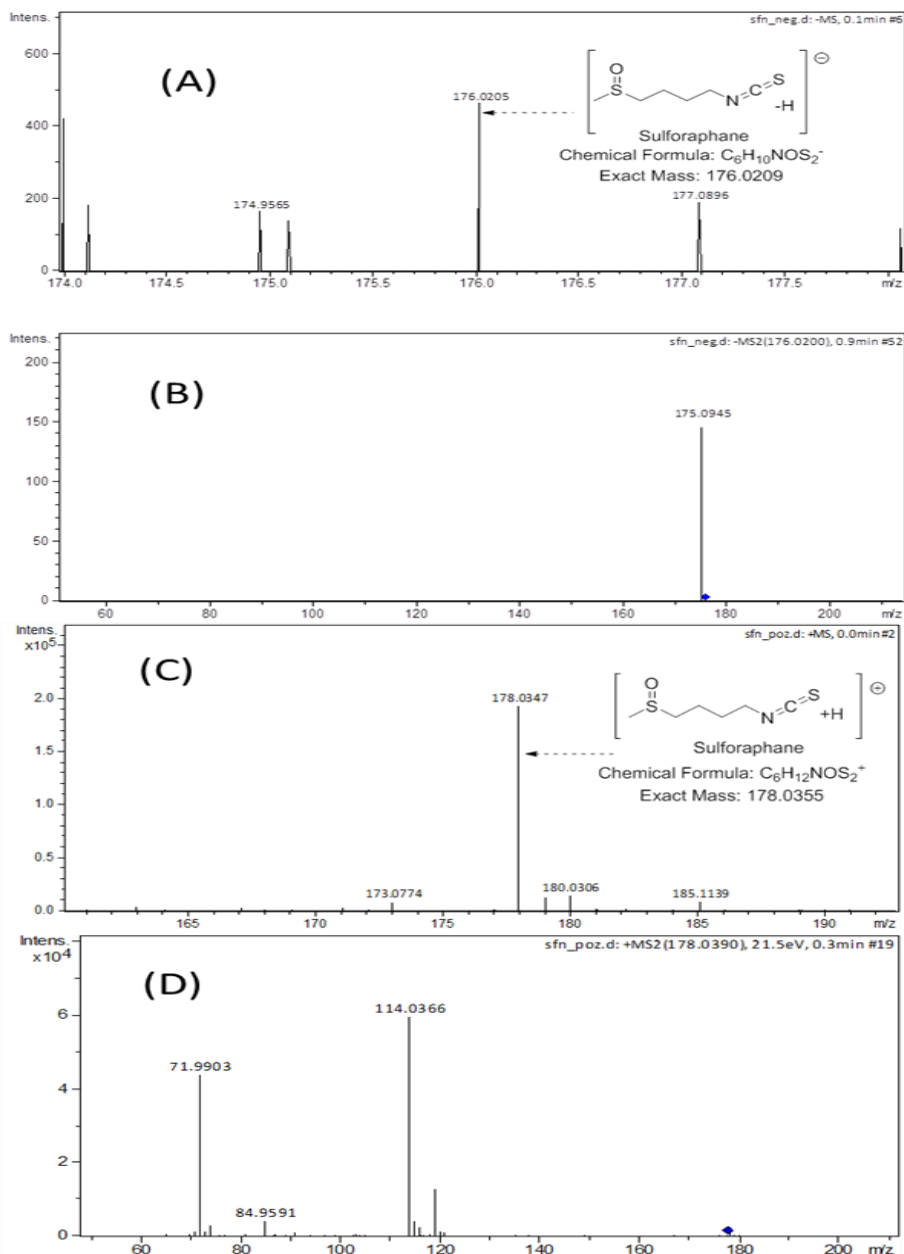
Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν auto-MS και auto-MS/MS με τις εξής παραμέτρους:

- Θερμοκρασία πηγής 180 °C.
- Δυναμικό τριχοειδούς 4500 V.
- Πίεση εκνεφωτή 0.4 Bar.
- Ροή αερίου αποδιαλύτωσης 4.0 l/min.
- Ενέργεια σύγκρουσης 10 eV.

Για τη χρωματογραφικό προσδιορισμό της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης της

εταιρίας Merck (Chromolith RP, 100 x 4.6 mm). Η κινητή φάση ήταν μίγμα MeOH/H₂O (80/20, v/v) σε ροή 0.3 mL/min. Ο συνολικός χρόνος χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν 20 λεπτά.

Δ.3.5. Μελέτη με Συνδυασμό Υγρής Χρωματογραφίας και Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας



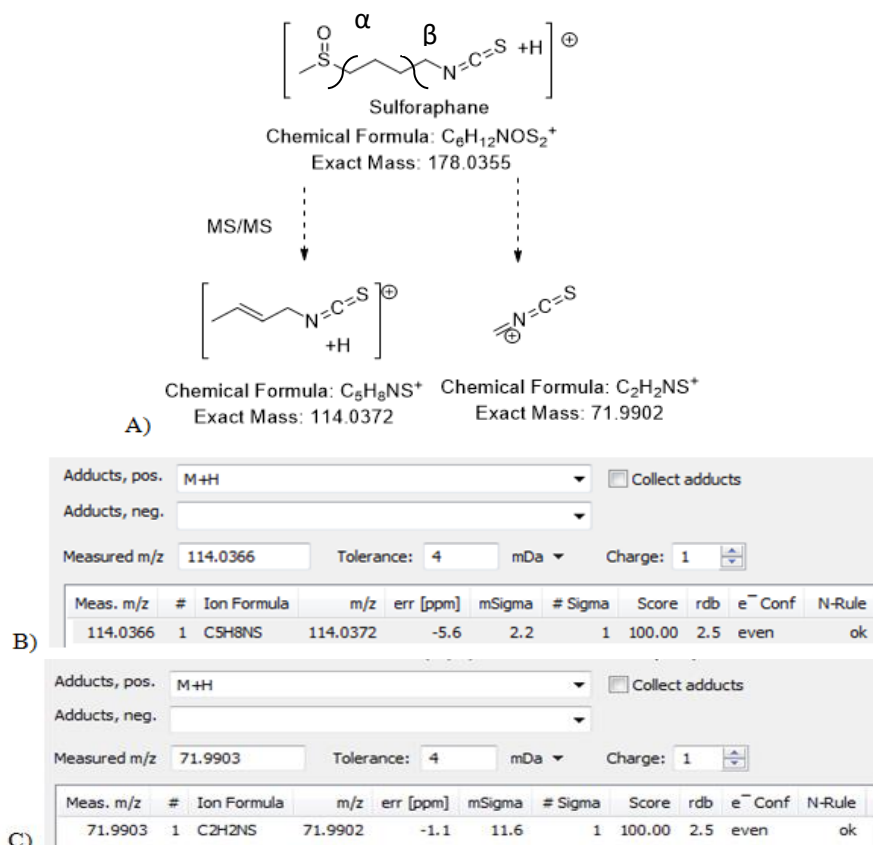
Σχήμα Δ.11. Φάσμα πλήρους σάρωσης (A) και MS/MS (B) της σουλφοραφάνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (C) και MS/MS (D) της σουλφοραφάνης στον θετικό ιοντισμό ESI

Για τον προσδιορισμό της σουλφοραφάνης (SFN) και της ινδολο-3-καρβινόλης (I3C), μελετήσαμε αρχικά τα φάσματα πλήρους σάρωσης και τα φάσματα MS/MS που λήφθηκαν με την τεχνική της ανάλυσης με έγχυση του δείγματος υπό συνεχή ροή (Flow Injection Analysis-FIA) τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό (ESI).

Συγκρίνοντας τα φάσματα της σουλφοραφάνης στον θετικό και στον αρνητικό ιοντισμό, παρατηρήθηκε ότι το πιο ισχυρό σήμα ήταν στον θετικό ιοντισμό (ESI) (Σχήμα Δ.11) και αυτός επιλέχθηκε για τη ποσοτικοποίηση των ενώσεων στα εκχυλίσματα.

Η μελέτη των φασμάτων μάζας υψηλής διακριτικής ισχύος της σουλφοραφάνης έδειξε ότι ακολουθείται συγκεκριμένο μοτίβο θραυσματοποίησης.

Στον αρνητικό ιοντισμό, το μοριακό ιόν $[M-H]^-$ της σουλφοραφάνης ανιχνεύθηκε σε m/z 176.0205 (Δ 2.3 ppm) (Σχήμα Δ.11.A), ενώ στο φάσμα MS/MS του μητρικού ιόντος $[M-H]^-$, ανιχνεύθηκε το θυγατρικό ιόν σε m/z 175.0945 (Σχήμα Δ.9.B).



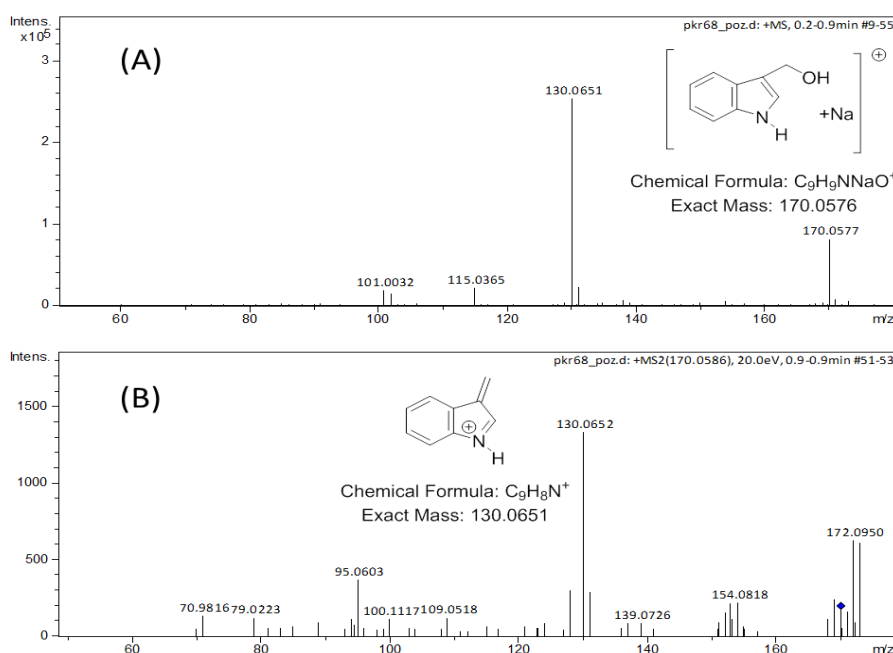
Σχήμα Δ.12. Προτεινόμενο μοτίβο θραυσματοποίησης της σουλφοραφάνης στον θετικό ιοντισμό ESI (A) και οι προτεινόμενοι από το λογισμικό Data Analysis χημικοί τύποι των θραυσμάτων (B) και (C)

Το φάσμα πλήρους σάρωσης της σουλφοραφάνης στον θετικό ιοντισμό, έδειξε το ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 178.0347 (Δ 4.5 ppm) (Σχήμα Δ.11.C). Στο φάσμα MS/MS του μητρικού ιόντος $[M+H]^+$, ανιχνεύθηκαν τα θυγατρικά ιόντα σε m/z 114.0366 και 71.9902 (Σχήμα Δ.11.D). Το ιόν σε m/z 114.0366 μπορεί να προκύψει από το

μητρικό ιόν, με α θραύση του δεσμού S-C, $[H_3C-S(=O)]$ και το ιόν με m/z 71.9902 μπορεί να προκύψει από το μητρικό ιόν, με β θραύση, ως προς την ισοθεικουανική ομάδα, του δεσμού C-C, $[N=C=S]$ στο μόριο της σουλφοραφάνης (Σχήμα Δ.12.A).

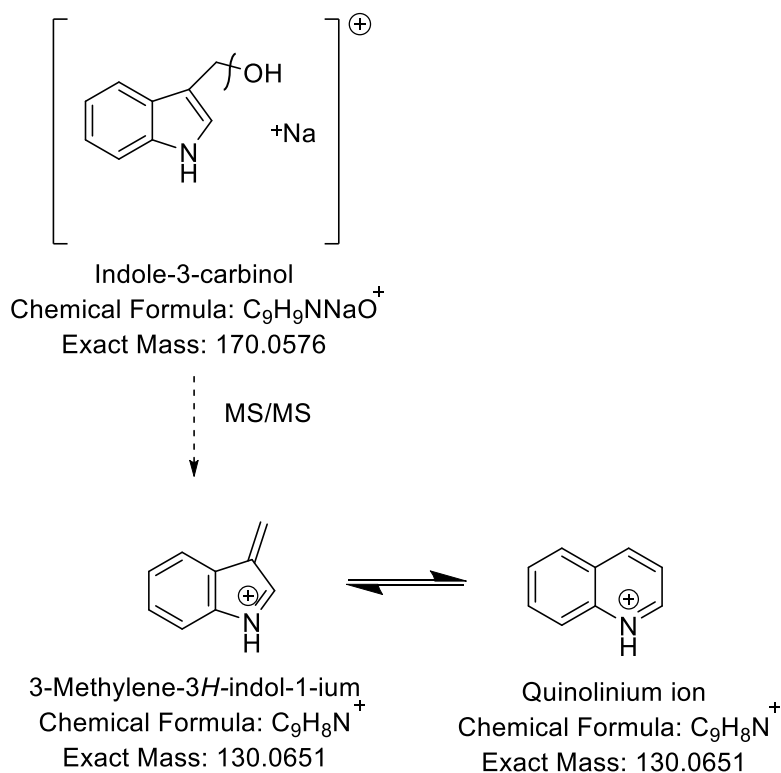
Για να επιβεβαιωθεί ο προτεινόμενος τύπος των θυγατρικών ιόντων, χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή Smart Formula από το λογισμικό Data Analysis (Σχήμα Δ.12) που μπορεί να προτείνει τους μοριακούς τύπους των θραυσμάτων, αφού λήφθηκε υπόψη ο κανόνας του αζώτου και το σφάλμα μάζας να είναι μικρότερο από 5 ppm. Το ιόν σε m/z 114.0366 (Δ 5.3 ppm) αντιστοιχεί σε χημικό τύπο $C_5H_8NS^+$ (Σχήμα Δ.12.B), ενώ το ιόν με m/z 71.9902 (Δ 1.4 ppm) στον μοριακό τύπο $C_2H_2NS^+$ (Σχήμα Δ.12.C), που βρίσκονται σε συμφωνία με το προτεινόμενο μοτίβο θραυσματοποίησης.

Τα φάσματα πλήρους σάρωσης και MS/MS για την ινδολο-3-καρβινόλη καταγράφηκαν στον θετικό ιοντισμό ESI. Στο φάσμα πλήρους σάρωσης παρατηρήθηκε το ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 170.0577 (Δ 0.6 ppm), ενώ το ιόν $[M+H]^+$ δεν παρατηρήθηκε (Σχήμα Δ.13.A), επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες σε ινδολικές ενώσεις.²⁰



Σχήμα Δ.13. Φάσμα πλήρους σάρωσης (A) και MS/MS (B) της ινδολο-3-καρβινόλης στον θετικό ιοντισμό ESI

Το ιόν με m/z 130.0651 μπορεί να αποδοθεί στο ιόν που προκύπτει μετά την απόσπαση του H_2O από το μητρικό ιόν. Αυτό το ιόν ανιχνεύεται όταν ληφθεί το φάσμα MS/MS (Σχήμα Δ.13.B) του μητρικού ιόντος $[M+Na]^+$, σε m/z 130.0652. Αντιστοιχεί στο 3-μεθυλενο-3H-ινδόλ-1-ιο ιόν που μπορεί να αναδιαταχθεί προς τη σταθερότερη μορφή του ιόντος κινολινίου (quinolinium ion) (Σχήμα Δ.14).²¹



Σχήμα Δ.14. Απόσπαση H_2O από το μητρικό ιόν $[M+Na]^+$ της ινδολο-3-καρβινόλης και σχηματισμός του ιόντος κινολινίου, στον θετικό ιοντισμό ESI

Δ.3.6. Επικύρωση Μεθόδου – Γραμμικότητα και Όρια Ανίχνευσης

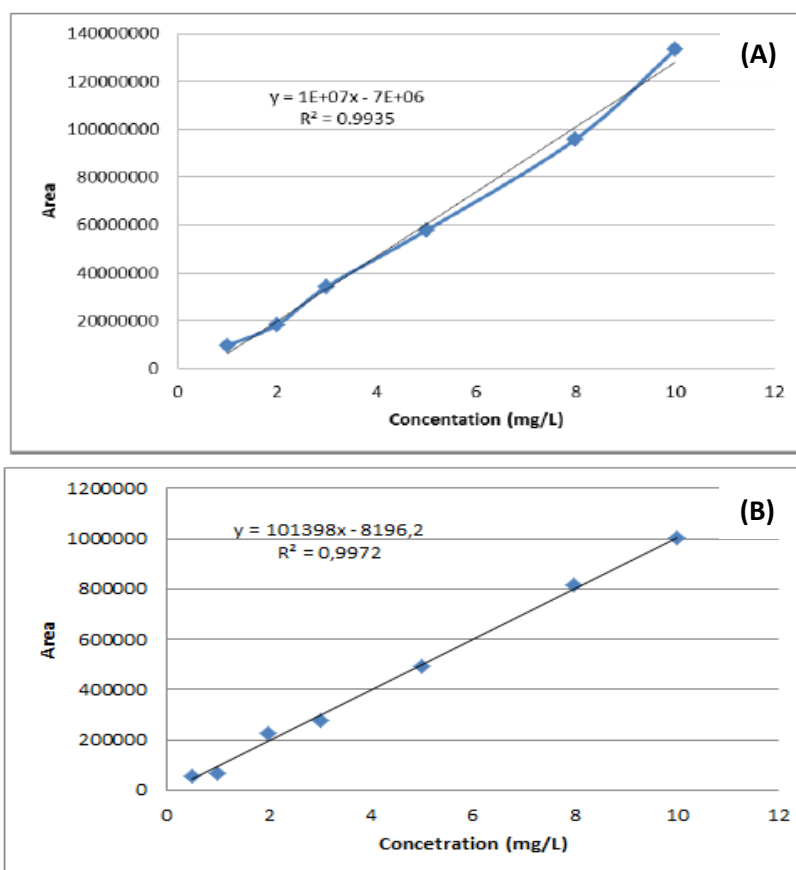
Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης στον θετικό ιοντισμό με την τεχνική ESI, βασίστηκε στο χρόνο έκλουσης με τη χρήση προτύπων ενώσεων, την ακριβή μάζα των ιόντων $[M+H]^+$ (για την σουλφοραφάνη) και $[M+Na]^+$ (για την ινδολο-3-καρβινόλη) και τα φάσματα MS/MS τους. Για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το εμβαδό της κορυφής του χρωματογραφήματος του εξαγόμενου ιόντος. Τα χαρακτηριστικά ιόντα, το σφάλμα μάζας και η ένταση της κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό φαίνονται στον πίνακα Δ.5.

Πίνακας Δ.5. Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό

| Ενώσεις | Θεωρητική μάζα (m/z) [M+H] ⁺ | Παρατηρούμενη μάζα (m/z) [M+H] ⁺ | Σφάλμα μάζας (ppm) | Ένταση κορυφής [M+H] ⁺ | Κύρια θραύσματα (m/z) |
|------------------|--|--|--------------------|--|-----------------------|
| SFN ^α | 178.0355 | 178.0347 | 4.5 | 2.0x10 ⁵ | 114.0372 71.9902 |
| I3C ^β | [M+Na] ⁺ 170.0576 | [M+Na] ⁺ 170.0577 | 0.6 | [M+Na] ⁺ 0.8x10 ⁵ | 130.0652 |

^αSFN: Σουλφοραφάνη, ^βI3C: Ινδολο-3-καρβινόλη

Η γραμμικότητα της νέας μεθόδου προσδιορίστηκε από την καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τις δύο πρότυπες ενώσεις σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Σχήμα Δ.15).



Σχήμα Δ.15. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη σουλφοραφάνη (A) και την ινδολο-3-καρβινόλη (B) στον θετικό ESI ιοντισμό

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) (Πίνακας Δ.6) υπολογίστηκαν με βάση τις εξισώσεις:

$$\text{LOD} = 3.3 * S_a / b$$

Εξίσωση Δ.5

$$\text{LOQ} = 10 * S_a / b$$

Εξίσωση Δ.6

όπου S_a είναι η τυπική απόκλιση και b είναι η κλίση.

Πίνακας Δ.6 Αναλυτικές παράμετροι για τον προσδιορισμό της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης

| Ένώσεις | Συντελεστής γραμμικότητας r | LOD ^α (μg/mL) | LOQ ^β (μg/mL) | Γραμμική περιοχή (μg/mL) | Χρόνος κατακράτησης (min) |
|------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| SFN ^α | 0.993 | 0.77 | 2.35 | 1-10 | 5.11 |
| I3C ^β | 0.997 | 0.42 | 1.29 | 1-10 | 5.01 |

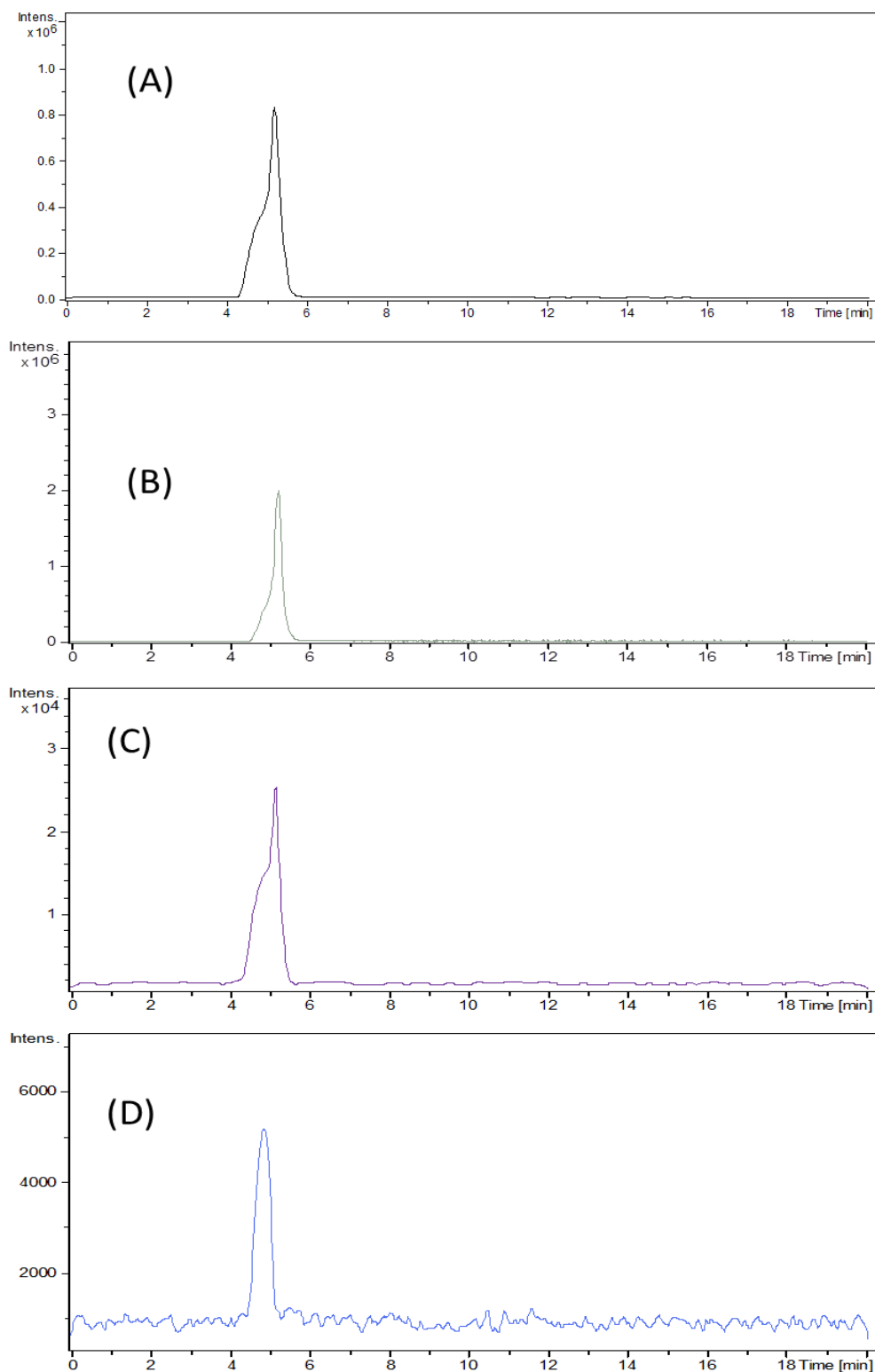
^αLOD: Όριο ανίχνευσης, ^βLOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

Δ.3.7. Ανάλυση Εκχυλισμάτων Μπρόκολου

Στο σχήμα Δ.15, παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων προτύπου διαλύματος σουλφοραφάνης (2 μg/mL) σε m/z 178.0355 και ενός προτύπου διαλύματος ινδολο-3-καρβινόλης (10 μg/mL) σε m/z 170.0577, μαζί με τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων από δείγματα μπρόκολου.

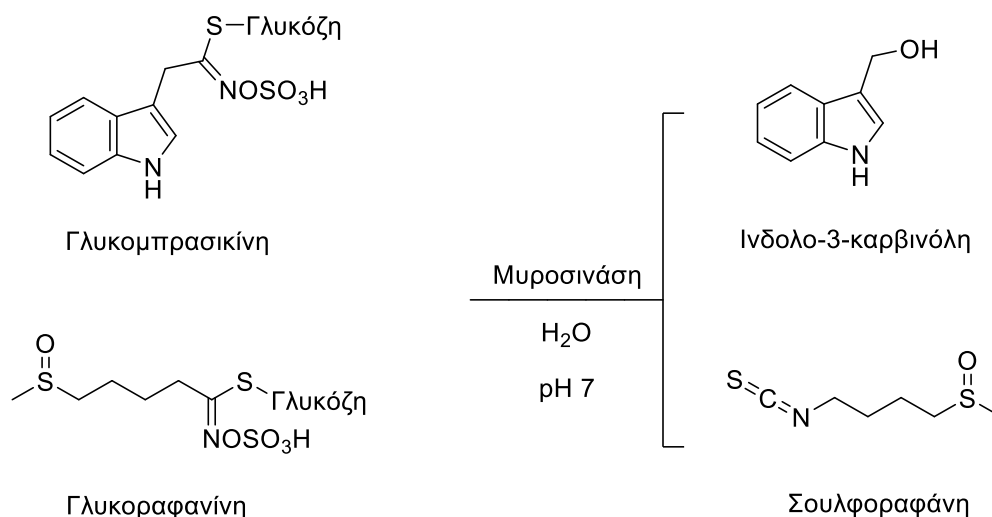
Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με στήλη Chromolith (100 x 4.6 mm) με την οποία επιτυγχάνεται γρήγορος διαχωρισμός και μειωμένος χρόνος ανάλυσης. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης της μεθόδου UPLC HRMS/MS ήταν 20 λεπτά.

Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθεικουανικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανθή Λαχανικά



Σχήμα Δ.16. Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων πρότυπου διαλύματος σουλφοραφάνης (2 µg/mL) σε m/z 178.0355 (A) και δείγματος μπρόκολου (B) και χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων πρότυπου διαλύματος ινδολο-3-καρβινόλης (10 µg/mL) σε m/z 170.0576 (C) και εκχυλίσματος μπρόκολου (D)

Η σουλφοραφάνη και η ινδολο-3-καρβινόλη αποτελούν προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκοραφάνης και της γλυκομπρασικίνης, αντίστοιχα, σε pH 7.



Σχήμα Δ.17. Ενζυμική υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης και γλυκοραφάνης και παραγωγή ινδολο-3-καρβινόλης και σουλφοραφάνης^{2,4}

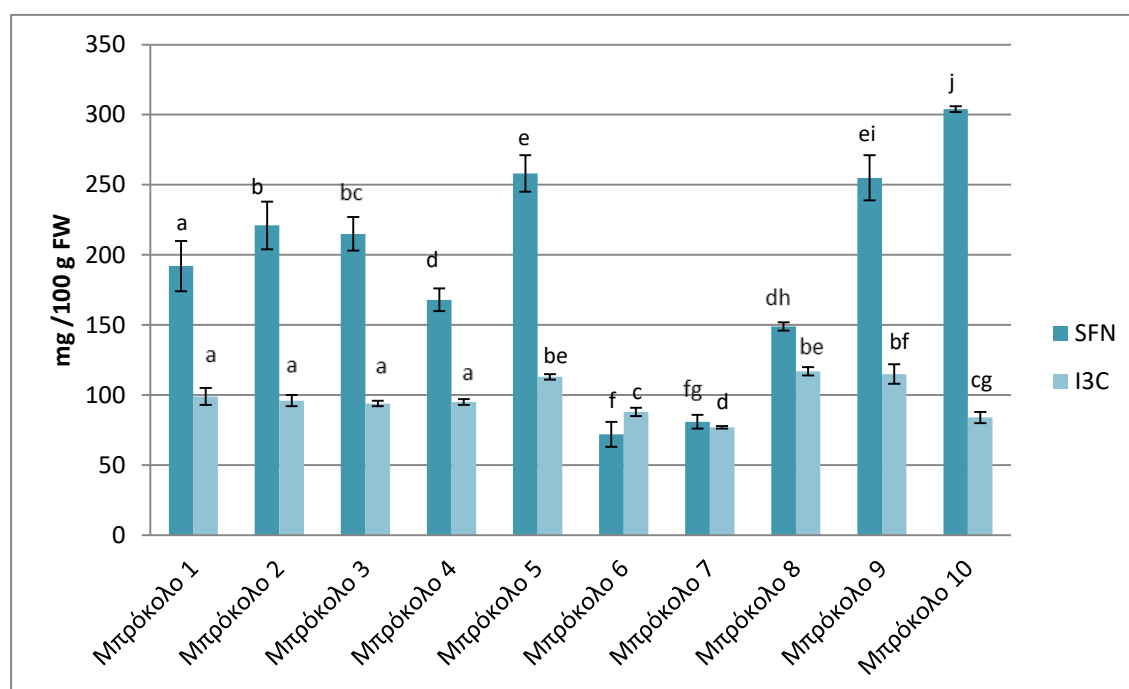
Πίνακας Δ.7. Περιεκτικότητα της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης σε 10 δείγματα μπρόκολου

| Δείγμα | mg SFN ^α /100 g FW ^β ± SD ^γ , n ^δ =3 | mg I3C ^ε /100 g FW ^β ± SD ^γ , n ^δ =3 |
|-------------|---|---|
| Μπρόκολο 1 | 192±18 | 99±6 |
| Μπρόκολο 2 | 221±17 | 96±4 |
| Μπρόκολο 3 | 215±12 | 94±2 |
| Μπρόκολο 4 | 168±8 | 95±2 |
| Μπρόκολο 5 | 258±13 | 113±2 |
| Μπρόκολο 6 | 72±9 | 88±3 |
| Μπρόκολο 7 | 81±5 | 77±1 |
| Μπρόκολο 8 | 149±3 | 117±3 |
| Μπρόκολο 9 | 255±16 | 115±7 |
| Μπρόκολο 10 | 304±2 | 84±4 |

^αΣουλφοραφάνη, ^βΦρέσκου βάρους, ^γΤυπική απόκλιση, ^δΑριθμός επαναλήψεων, ^εινδολο-3-καρβινόλη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η περιεκτικότητα της γλυκοραφάνινης (7.1 $\mu\text{mol/g}$ ξηρού βάρους) στο μπρόκολο είναι μεγαλύτερη της γλυκομπρασικίνης (1.1 $\mu\text{mol/g}$ ξηρού βάρους), άρα κατ'αντιστοιχία η συγκέντρωση της σουλφοραφάνης θα είναι αυξημένη σε σχέση με την συγκέντρωση της ινδολο-3-καρβινόλης.²² Το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε και στα δείγματα μπρόκολου της παρούσας μελέτης καθώς οι συγκεντρώσεις της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης στα δείγματα μπρόκολου που υπολογίστηκαν με την νέα μέθοδο κυμάνθηκαν από 72 ± 9 έως 304 ± 2 $\text{mg}/100$ g φρέσκου μπρόκολου, για την σουλφοραφάνη και από 77 ± 1 έως 117 ± 3 $\text{mg}/100$ g φρέσκου μπρόκολου, για την ινδολο-3-καρβινόλη (Πίνακας Δ.7).

Στο ραβδόγραμμα του σχήματος Δ.18 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης σε 10 δείγματα μπρόκολου από τους νομούς Αργολίδας (μπρόκολο 1-3), Εύβοιας (μπρόκολο 4-6) και Αχαΐας (μπρόκολο 7-10), όπως προσδιορίστηκε από την νέα μέθοδο UPLC HRMS/MS. Από το σχήμα Δ.18 παρατηρούμε ότι σχεδόν σε όλα τα δείγματα μπρόκολου η συγκέντρωση της σουλφοραφάνης είναι υψηλότερη σε σχέση με τη συγκέντρωση της ινδολο-3-καρβινόλης. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σουλφοραφάνη και ινδολο-3-καρβινόλη βρέθηκαν στα δείγματα με προέλευση από το Ν. Αχαΐας.



Σχήμα Δ.18. Περιεκτικότητα της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης σε 10 δείγματα μπρόκολου όπως μετρήθηκε από την μέθοδο UPLC HRMS/MS. Σύγκριση του μέσου όρου των δειγμάτων (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)

Δ.3.8. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC), η σουλφοραφάνη και η ινδολο-3-καρβινόλη, που αποτελούν προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών γλυκοραφανίνης και γλυκομπρασικίνης, αντίστοιχα, παρουσιάζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση.¹⁹ Επομένως, ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ενώσεων αυτών με αναλυτικές μεθόδους υψηλής αξιοπιστίας και ακρίβειας καθίσταται αναγκαίος.

Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης, χρησιμοποιώντας φασματογραφία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αναλυτή μαζών Q-TOF. Ο αναλυτής μαζών Q-TOF παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα της υψηλής ακρίβειας και διαχωριστικής ισχύος και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία αλλά και εκλεκτικότητα. Επιπρόσθετο πλεονέκτημα της μέθοδου που αναπτύχθηκε, ήταν η εφαρμογή της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (UPLC), που είχε ως αποτέλεσμα τον μειωμένο χρόνο κατακράτησης και τον γρήγορο διαχωρισμό των ενώσεων. Η νέα μέθοδος UPLC-HRMS/MS επικυρώθηκε και χαρακτηρίστηκε από εξαιρετική γραμμικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι η μοναδική στη βιβλιογραφία που χρησιμοποιεί φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης σε μπρόκολο και η εφαρμογή της δύναται να επεκταθεί και στα υπόλοιπα είδη σταυρανθών λαχανικών.

Δ.4. Ανάπτυξη Μεθόδου Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού Ινδολικών Παραγώγων με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Εφαρμογή σε Σταυρανθή Λαχανικά

Δ.4.1. Υλικά και Όργανα

Φυτικό υλικό

Η προμήθεια των σταυρανθών λαχανικών πραγματοποιήθηκε από τοπικούς παραγωγούς του Ν. Εύβοιας (38°28'02.5"N 23°38'13.4"E), ενώ η συγκομιδή των λαχανικών έγινε τον Φεβρουάριο του έτους 2017.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής σταυρανθή λαχανικά:

1. Κόκκινο λάχανο (*Brassica oleracea* L. var. *rubra* L. cv. *Romanov*)
2. Ρέβα (*Brassica rapa* L. subsp. *rapifera* Metzg. cv. *Snowball*)
3. Λευκό λάχανο (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. cv. *Cabbice*)
4. Μωβ μπρόκολο (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck cv. *Violletto*)
5. Λευκό κουνουπίδι (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. cv. *Zarka*)
6. Πράσινο μπρόκολο (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck cv. *Calabrese*)
7. Ραπανάκι (*Raphanus raphanistrum* L. subsp. *sativus* (L.) Domin cv. *Belcanto*)

Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν φύλλα απο το λευκό λάχανο, ανθύλλια απο το μπρόκολο και το κουνουπίδι και οι βολβοί απο το ραπανάκι και τη ρέβα. Τα δείγματα λυοφιλιώθηκαν άμεσα, λειοτριβήθηκαν και κονιορτοποιήθηκαν σε ιγδίο. Το ποσοστό υγρασίας των δειγμάτων ήταν:

| Δείγμα | Ποσοστό Υγρασίας % |
|------------------|--------------------|
| Πράσινο μπρόκολο | 91 |
| Μωβ μπρόκολο | 91 |
| Λευκό κουνουπίδι | 92 |
| Κόκκινο λάχανο | 93 |
| Λευκό λάχανο | 92 |
| Ρέβα | 90 |
| Ραπανάκι | 90 |

Συσκευές & Όργανα

- Φασματογράφος μάζας UHPLC-HRMS/MS της εταιρίας Agilent (μοντέλο Agilent 6530) εξοπλισμένος με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), αναλυτή Q-TOF, χρωματογραφικό σύστημα UHPLC Agilent 1290 Infinity και αυτόματο δειγματολήπτη.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, συνδεδεμένος με το φασματογράφο μάζας με το λογισμικό Agilent MassHunter Data Acquisition (version B.06.00) και Agilent MassHunter Qualitative Analysis (version B.07.00), για την λήψη και την επεξεργασία των φασμάτων, αντίστοιχα.

Δ.4.2. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα ινδολο-3-καρβαλδεΐδης, ινδολο-3-ακετονιτριλίου, ασκορβιγόνου και ινδολο-3-καρβινόλης, συγκέντρωσης 1000 µg/mL σε MeOH και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C. Από αυτά παρασκευάστηκαν με αραιώση σε MeOH τα πρότυπα διαλύματα εργασίας. Ένα διάλυμα 10 µg/mL σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα πλήρους σάρωσης και MS/MS, ενώ για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, 8 και 10 µg/mL σε MeOH.

Δ.4.3. Παρασκευή Εκχυλισμάτων

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε στη ενότητα Γ.1. και εν συντομία έχει ως εξής: Σε 1 g λυοφιλωμένου φυτικού υλικού προστέθηκαν 25 mL δις απεσταγμένου νερού και ο πολτός θερμάνθηκε στους 45 °C για 3 ώρες. Προστέθηκαν 30 mL διχλωρομεθανίου και ο πολτός αναδεύθηκε για 15 λεπτά, ακολούθησε διήθηση με Buchner και η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με 2x20 mL διχλωρομεθανίου. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του νερού με διαχωριστική χοάνη, η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄, συμπυκνώθηκε υπό κενό στους 35 °C μέχρι ξηρού και διαλύθηκε σε 1 mL MeOH. Για την ανάλυση στο LC-MS, 50 µL από το εκχύλισμα αραιώθηκαν με 50 µL MeOH.

Δ.4.4. Συνθήκες UHPLC-HRMS/MS

Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε άζωτο, ενώ τα πειράματα διεξήχθησαν στον αρνητικό και στον θετικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε είχε τις εξής παραμέτρους:

- Θερμοκρασία αερίου αποδιαλύτωσης, 300 °C.
- Ροή αερίου αποδιαλύτωσης, 12 l/min.
- Δυναμικό τριχοειδούς, 4000 V.
- Πίεση αερίου εκνεφωτή, 45 psi.
- Δυναμικό θραυσματοποίησης, 150 V.
- Δυναμικό αποκορυφωτή / διαχωριστή ιόντων, 65 V.
- Ταχύτητα σάρωσης, 1 scan/sec.
- Εύρος ανιχνευόμενων μαζών, 50-1500 *m/z*.

Για τα πειράματα MS/MS αναπτύχθηκε μέθοδος auto MS/MS με τις εξής παραμέτρους:

- Δυναμικό ενέργειας σύγκρουσης, 5 V.
- Δυναμικό αντιστάθμισης, 2.5 V.
- Προτιμώμενη κατάσταση φορτίου, 2, 1, unknown.
- Ταχύτητα σάρωσης, 1 scan/sec.
- Εύρος ανιχνευόμενων μαζών, 50-1500 *m/z*.

Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων επιλέχθηκε η δυνατότητα συνεχούς διόρθωσης της βαθμονόμησης του συστήματος με διοχέτευση κατάλληλου διαλύματος που περιείχε γνωστές τιμές ιόντων αναφοράς. Στη λειτουργία του θετικού ιοντισμού τα ιόντα αναφοράς είχαν τιμές *m/z* 121.0509 και 922.0098, ενώ στη λειτουργία του αρνητικού ιοντισμού οι αντίστοιχες τιμές *m/z* ήταν 112.9856 και 1033.9881.

Για τη χρωματογραφική μελέτη χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης της εταιρίας Agilent (Zorbax C18, 50 x 2.1 mm, 1.8 μm). Η κινητή φάση ήταν H₂O (A) και MeOH (B) με την ακόλουθη βαθμιδωτή σύσταση: 0 min: 5% B; 1 min: 5% B; 8.5 min: 95% B; 9.5 min: 95% B; 11.5 min: 8% B; 20.5 min: 5% B. Ο όγκος του ενέσιμου εκχυλίσματος ήταν 2 μL, η ροή ήταν 0.4 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 27 °C.

Δ.4.5. Μελέτη με Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας

Όλες οι ενώσεις μελετήθηκαν στον αρνητικό και θετικό ιοντισμό με την τεχνική της FIA για τη λήψη των φασμάτων πλήρους σάρωσης και MS/MS.

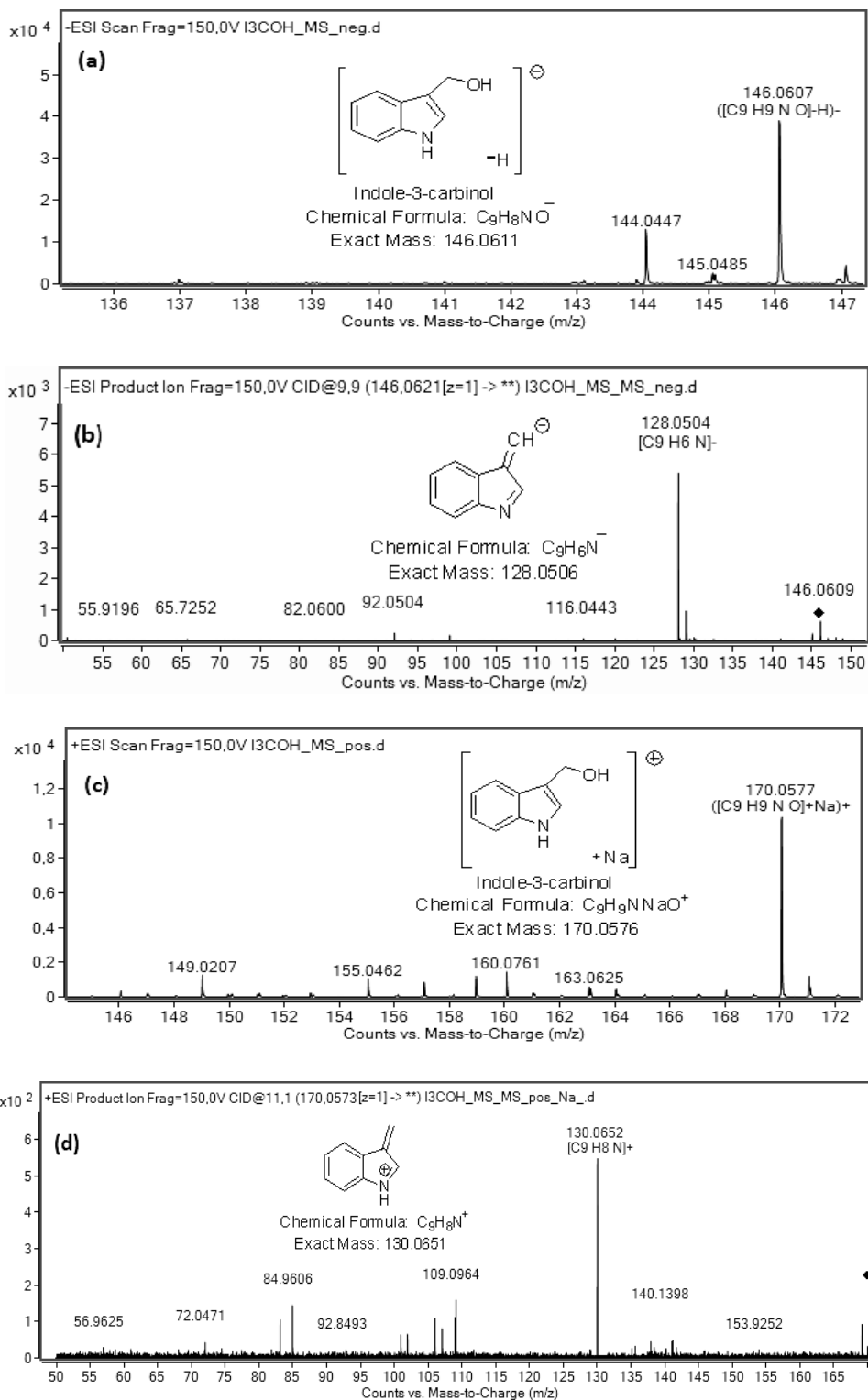
Η ινδολο-3-καρβινόλη, το κύριο προϊόν της ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης, σε ουδέτερο pH, στον αρνητικό ESI ιοντισμό έδειξε το ιόν $[M-H]^-$ σε m/z 146.0607 (Δ 2.7 ppm) (Σχήμα Δ.19 a). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος από το $[M-H]^-$ ανιχνεύθηκε ένα ιόν σε m/z 128.0504 (Σχήμα Δ.19 b). Ο μοριακός τύπος που προτάθηκε από το λογισμικό Agilent MassHunter για το θραύσμα με m/z 128.0504 (Δ 1.6 ppm) είναι $C_9H_6N^-$ που αντιστοιχεί στο (3H-ινδολ-3-υλιδενο)μεθανίδιο.

Στον θετικό ESI ιοντισμό, το φάσμα πλήρους σάρωσης της ινδολο-3-καρβινόλης έδειξε το ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 170.0577 (Δ 0.6 ppm), ενώ το ιόν $[M+H]^+$ δεν ανιχνεύθηκε (Σχήμα Δ.19 c). Όπως ακριβώς στην προηγούμενη μέθοδο (§ Δ.3.5), στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M+Na]^+$, ανιχνεύθηκε ένα ιόν σε m/z 130.0652 (Σχήμα Δ.19 d) που αντιστοιχεί στο 3-μεθυλενο-3H-ινδολ-1-ίο, το οποίο μετατρέπεται σε σταθερό ιόν κινολινίου.^{20,21}

Το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο παράγεται από την ενζυμική υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης κυρίως σε όξινο pH και το φάσμα πλήρους σάρωσης στον αρνητικό ESI ιοντισμό, έδειξε το ιόν $[M-H]^-$ σε m/z 155.0609 (Δ 3.9 ppm) (Σχήμα Δ.20 a). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M-H]^-$ το μεγαλύτερο σήμα ήταν σε m/z 128.0503 (Σχήμα Δ.20 b). Ο προτεινόμενος από το λογισμικό μοριακός τύπος για το ιόν σε m/z 128.0503 (Δ 2.3 ppm) ήταν $C_9H_6N^-$ που αντιστοιχεί στο (3H-ινδολ-3-υλιδενο)μεθανίδιο, προϊόν παραγόμενο μετά την απόσπαση HCN από το μητρικό ιόν.

Στον θετικό ESI ιοντισμό, το φάσμα πλήρους σάρωσης του ινδολο-3-ακετονιτρίλιου έδειξε το ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 157.0765 (Δ 3.2 ppm) μαζί με το $[M+Na]^+$ σε m/z 179.0583 (Δ 2.2 ppm) (Σχήμα Δ.20 c). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού $[M+H]^+$, ανιχνεύθηκε ένα ιόν σε m/z 130.0655 (Δ 3.1 ppm) (Σχήμα Δ.20 d), με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_9H_8N^+$, το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν κινολινίου που είχε παρατηρηθεί προηγουμένως στο φάσμα MS/MS της ινδολο-3-καρβινόλης (Σχήμα Δ.19 d).

Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθεικουανικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανή Λαχανικά



Σχήμα Δ.19. Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-καρβινόλης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-καρβινόλης στον θετικό ιοντισμό ESI

Τα φάσματα MS/MS του ινδολο-3-ακετονιτριλίου και της ινδολο-3-καρβινόλης που λήφθηκαν στον θετικό ιοντισμό είναι σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία καθώς σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με LC/(+) ES-MS/MS, το κύριο ιόν που ανιχνεύθηκε ήταν το ιόν κινολινίου.^{20,23}

Το ασκορβιγόνιο παράγεται κατά την αντίδραση της ινδολο-3-καρβινόλης και του ασκορβικού οξέος που υπάρχει στους φυτικούς ιστούς. Στη μελέτη του ασκορβιγόνου στον αρνητικό ESI ιοντισμό, το φάσμα πλήρους σάρωσης έδειξε το ιόν $[M-H]^-$ σε m/z 304.0820 (Δ 2.3 ppm) (Σχήμα Δ.21 a). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού $[M-H]^-$, το μεγαλύτερο σήμα ήταν σε m/z 116.0498 (Σχήμα Δ.21 b). Ο προτεινόμενος από το λογισμικό μοριακός τύπος για το θραύσμα με m/z 116.0498 (Δ 6.9 ppm) ήταν $C_8H_6N^-$ που αντιστοιχεί στο ινδολ-1-ίδιο ιόν.

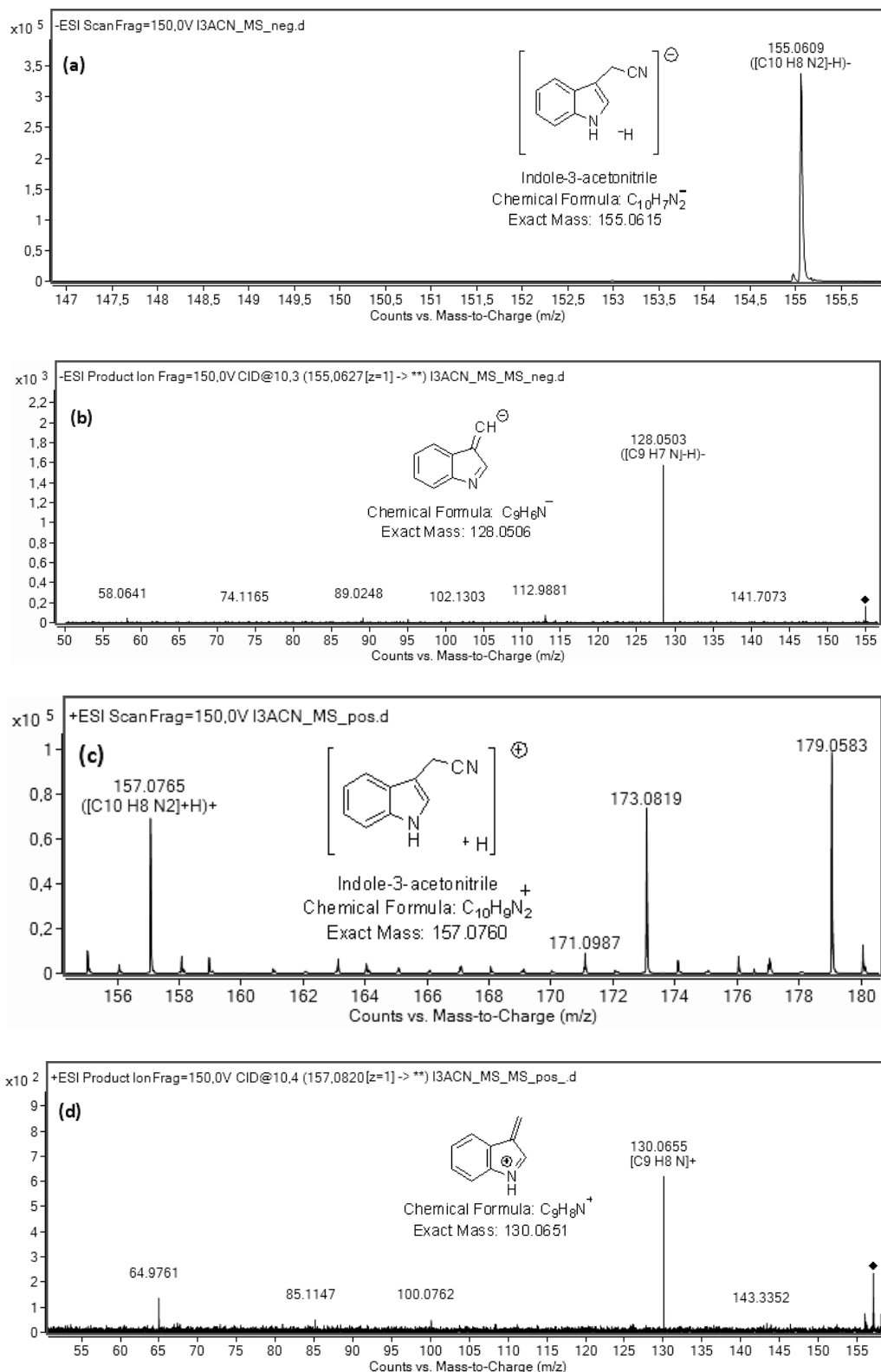
Στον θετικό ESI ιοντισμό, το φάσμα πλήρους σάρωσης του ασκορβιγόνου έδειξε το ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 306.0978 (Δ 2.0 ppm) μαζί με το $[M+Na]^+$ σε m/z 328.0792 (Δ 0 ppm) (Fig. Δ.21 c).

Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού $[M+H]^+$ (Σχήμα Δ.21 d), ανιχνεύθηκε ένα ιόν σε m/z 130.0649 (Δ 1.5 ppm) με μοριακό τύπο $C_9H_8N^+$, το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν κινολινίου που είχε παρατηρηθεί προηγουμένως στα φάσματα MS/MS της ινδολο-3-καρβινόλης και του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (Σχήμα Δ.19 d & Σχήμα Δ.20 d). Η παρουσία του ιόντος κινολινίου στο φάσμα MS/MS του ασκορβιγόνου έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές.²³

Στο φάσμα πλήρους σάρωσης της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης, που αποτελεί προϊόν οξείδωσης της ινδολο-3-καρβινόλης, στον αρνητικό ESI ιοντισμό έδειξε το ιόν $[M-H]^-$ σε m/z 144.0459 (Δ 2.8 ppm) (Σχήμα Δ.22 a). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M-H]^-$ (Σχήμα Δ.22 b), ανιχνεύθηκε ένα ιόν με m/z 116.0507 (Δ 0.9 ppm) με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_8H_6N^-$ που αντιστοιχεί στο ινδολ-1-ίδιο ιόν.

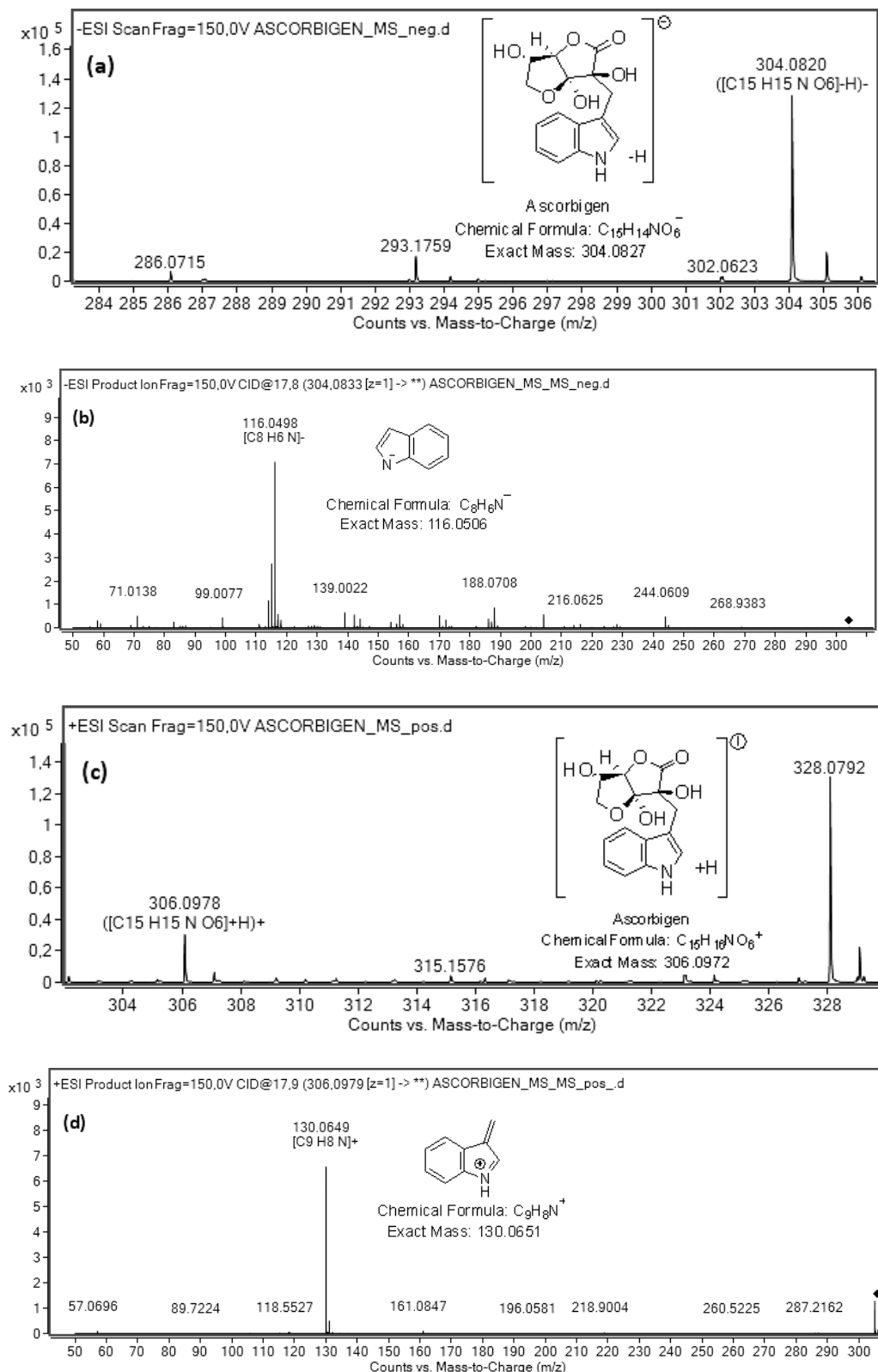
Το φάσμα πλήρους σάρωσης της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στον θετικό ESI ιοντισμό έδειξε το ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 146.0598 (Δ 1.4 ppm) μαζί με το $[M+Na]^+$ σε m/z 168.0419 (Δ 0.6 ppm) (Σχήμα Δ.22 c). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M+H]^+$, ανιχνεύθηκε ένα ιόν σε m/z 118.0646 (Fig. Δ.22 d). Το ιόν σε m/z 118.0646 (Δ 4.2 ppm) έχει μοριακό τύπο $C_8H_8N^+$ που αντιστοιχεί στο 1*H*-ινδόλ-1-ιο ιόν, η παρουσία του οποίου έχει επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές.²⁰

Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθεικουανικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανή Λαχανικά



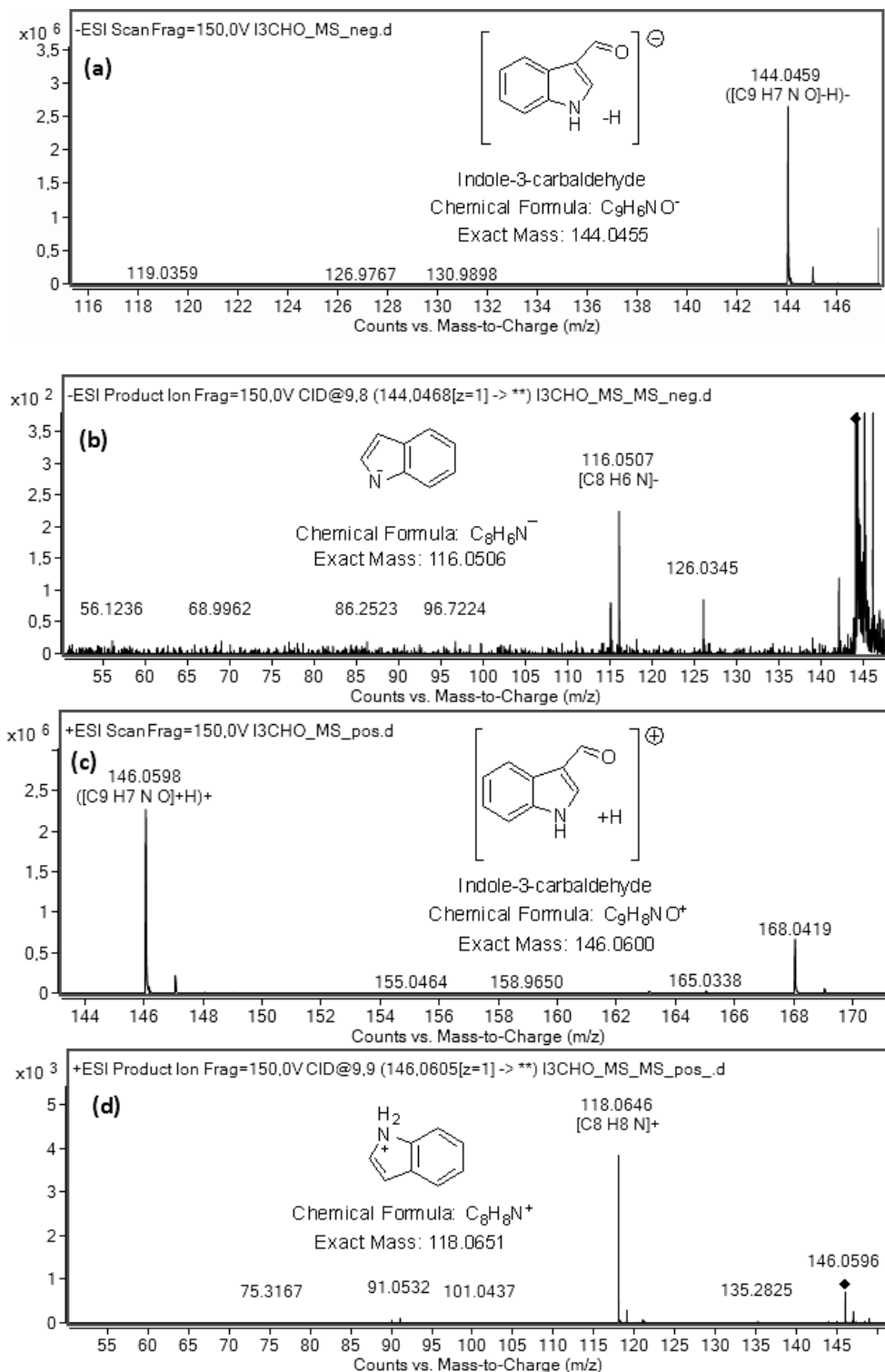
Σχήμα Δ.20. Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ινδολο-3-ακετονιτριλίου στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ινδολο-3-ακετονιτριλίου στον θετικό ιοντισμό ESI

Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθεικουανικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανή Λαχανικά



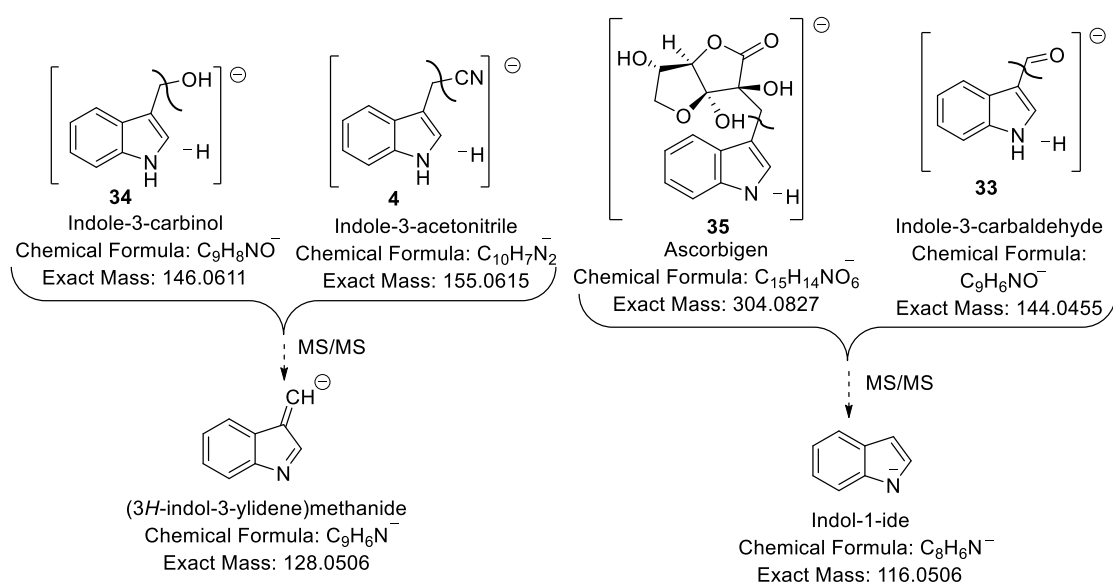
Σχήμα Δ.21. Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ασκορβιγόνου στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ασκορβιγόνου στον θετικό ιοντισμό ESI

Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθεικωνικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανή Λαχανικά



Σχήμα Δ.22. Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στον θετικό ιοντισμό ESI

Στο σχήμα Δ.23 συνοψίζονται τα κύρια θραύσματα μάζας από τα φάσματα MS/MS των ιόντων $[M-H]^-$ της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ασκορβιγόνου (**35**) και της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI.

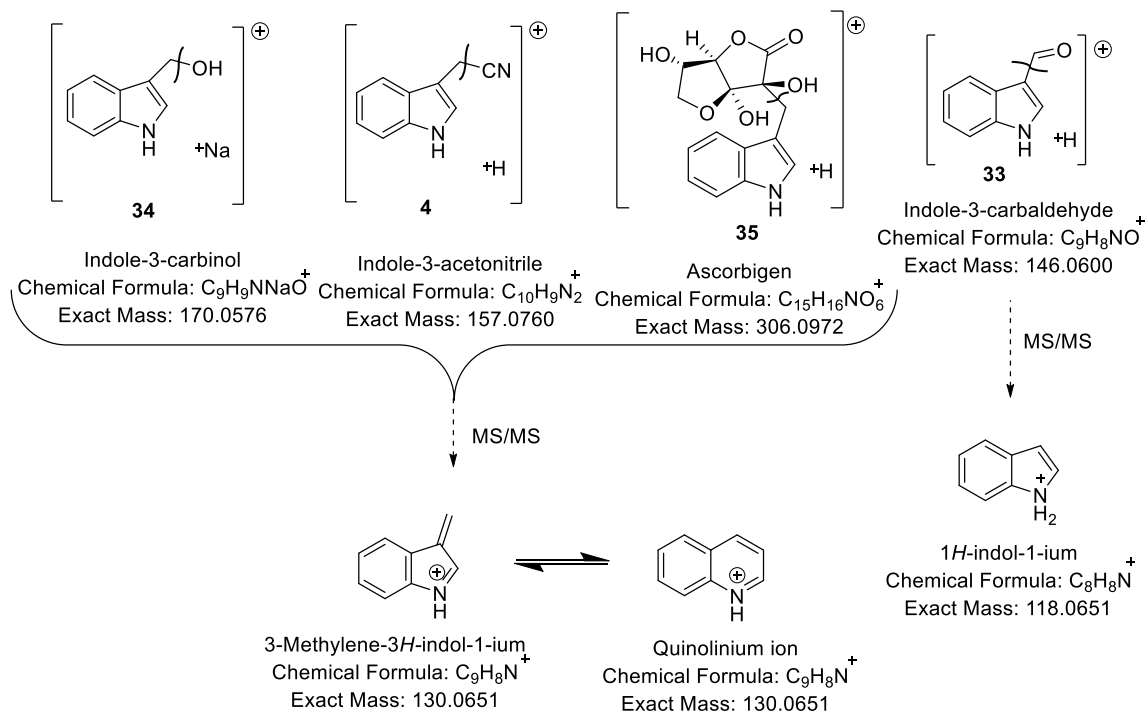


Σχήμα Δ.23. Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων $[M-H]^-$ της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ασκορβιγόνου (**35**) και της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI

Το ιόν με m/z 128.0506 που αντιστοιχεί στο (3H-ινδολ-3-υλιδενο)μεθανίδιο παρατηρείται από κοινού στο φάσμα MS/MS των ιόντων $[M-H]^-$ της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**) και του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**) μετά την απόσπαση H_2O ή HCN αντίστοιχα. Στο φάσμα MS/MS των ιόντων $[M-H]^-$ του ασκορβιγόνου (**35**) και της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**) παρατηρείται το θραύσμα με m/z 116.0507 που αντιστοιχεί στο ινδολ-1-ίδιο ιόν και προκύπτει μετά από θραύση C-C μεταξύ του C-3 σε α θέση ως προς τον ινδολικό δακτύλιο.

Μέχρι στιγμής οι συγκεκριμένες ινδολικές ενώσεις έχουν μελετηθεί μόνο στο θετικό ιοντισμό ESI, έτσι δεν υπάρχουν διαθέσιμες βιβλιογραφικές αναφορές των φασμάτων MS/MS προς σύγκριση στον αρνητικό ESI ιοντισμό.

Στο σχήμα Δ.24 συνοψίζονται τα κύρια θραύσματα μάζας από τα φάσματα MS/MS, στον θετικό ιοντισμό ESI, των θυγατρικών ιόντων της ινδολο-3-καρβινόλης (A), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (B), του ασκορβιγόνου (C) και της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (D).



Σχήμα Δ.24. Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ασκορβιγόνου (**35**) και της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**), στον θετικό ιοντισμό ESI

Παρατηρούμε ότι το ιόν κινολινίου με m/z 130.0651 ανιχνεύθηκε στο φάσμα MS/MS των ιόντων $[M+Na]^+$ της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**), $[M+H]^+$ του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**) και $[M+H]^+$ του ασκορβιγόνου (**35**). Στο φάσμα MS/MS της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**) παρατηρήθηκε το θραύσμα με m/z 118.0651 που αντιστοιχεί στο 1H-ινδόλ-1-ιο ιόν. Τα ευρήματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες.^{20,23}

Δ.4.6. Επικύρωση Μεθόδου - Γραμμικότητα και Όρια Ανίχνευσης

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των παραγώγων του ινδολίου πραγματοποιήθηκε στον αρνητικό ESI ιοντισμό καθώς διαπιστώθηκε από την μελέτη με FIA ότι υπήρχε δυνατότερο σήμα σε σχέση με τον θετικό ιοντισμό. Η ταυτοποίηση βασίστηκε στο

χρόνο έκλουσης με βάση τις πρότυπες ενώσεις, την ακριβή μάζα των ιόντων [M-H]⁻ και το φάσμα MS/MS. Για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το εμβαδό της κορυφής του χρωματογραφήματος του εξαγόμενου ιόντος. Τα χαρακτηριστικά ιόντα, το σφάλμα μάζας και η ένταση της κορυφής στον αρνητικό και θετικό ESI ιοντισμό φαίνονται στους πίνακες Δ.8 και Δ.9, αντίστοιχα.

Πίνακας Δ.8. Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον αρνητικό ESI ιοντισμό

| Ενώσεις | Θεωρητική μάζα (m/z) [M-H] ⁻ | Παρατηρούμενη μάζα (m/z) [M-H] ⁻ | Σφάλμα μάζας (ppm) | Ένταση κορυφής [M-H] ⁻ | Κύρια θραύσματα (m/z) |
|--------------------|---|---|--------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| I3CHO ^α | 144.0455 | 144.0459 | 2.8 | 2.8x10 ⁶ | 116.0507 |
| IAN ^β | 155.0615 | 155.0609 | 3.9 | 3.5x10 ⁵ | 128.0503 |
| I3C ^γ | 146.0611 | 146.0607 | 2.7 | 4.0x10 ⁴ | 128.0504 |
| ABG ^δ | 304.0827 | 304.0820 | 2.3 | 1.3x10 ⁵ | 116.0498 |

^αI3CHO: Ινδολο-3-καρβαλδεΐδη, ^βIAN: Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο, ^γI3C: Ινδολο-3-καρβινόλη, ^δABG: Ασκορβιγόνο

Πίνακας Δ.9. Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό

| Ενώσεις | Θεωρητική μάζα (m/z) [M+H] ⁺ | Παρατηρούμενη μάζα (m/z) [M+H] ⁺ | Σφάλμα μάζας (ppm) | Ένταση κορυφής [M+H] ⁺ | Κύρια θραύσματα (m/z) |
|--------------------|---|---|--------------------|--|-----------------------|
| I3CHO ^α | 146.0600 | 146.0598 | 1.4 | 2.3x10 ⁶ | 118.0646 |
| IAN ^β | 157.0760 | 157.0765 | 3.2 | 0.7x10 ⁵ | 130.0655 |
| ABG ^γ | 306.0972 | 306.0978 | 2.0 | 0.3x10 ⁵ | 130.0649 |
| I3C ^δ | [M+Na] ⁺ 170.0576 | [M+Na] ⁺ 170.0577 | 0.6 | [M+Na] ⁺ 1.1x10 ⁴ | 130.0652 |

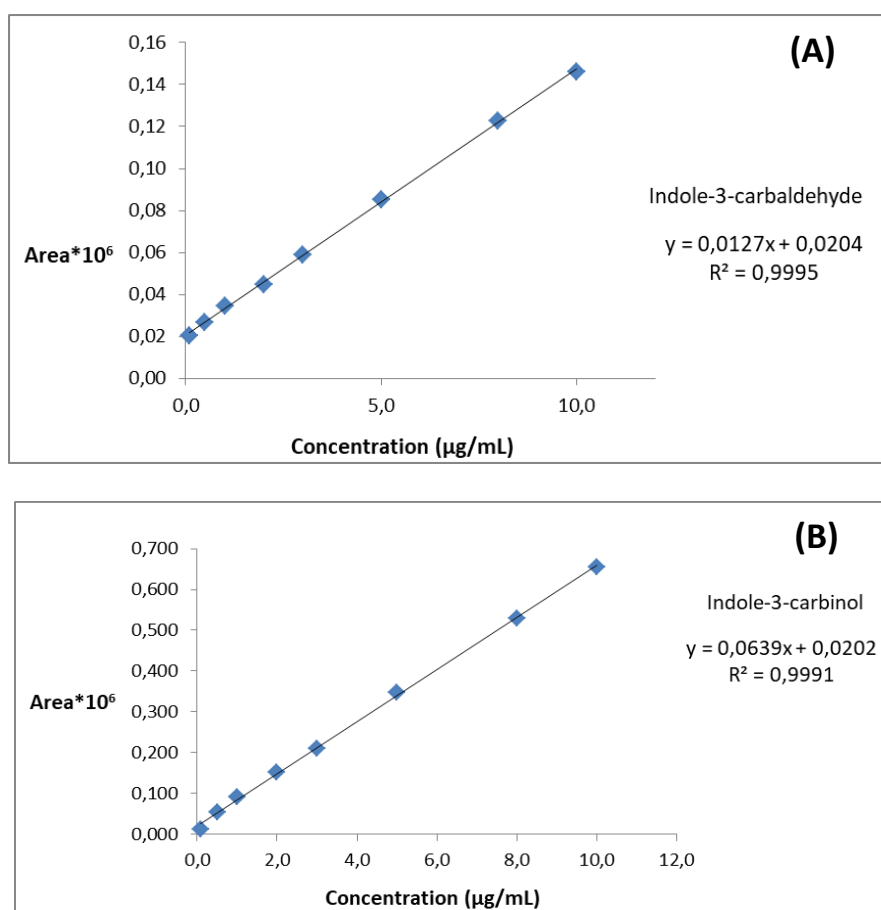
^αI3CHO: Ινδολο-3-καρβαλδεΐδη, ^βIAN: Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο, ^γABG: Ασκορβιγόνο, ^δI3C: Ινδολο-3-καρβινόλη

Η γραμμικότητα της νέας μεθόδου (Πίνακας Δ.10) προσδιορίστηκε από την καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις των προτύπων ενώσεων, ενώ τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) σύμφωνα με τις εξισώσεις Δ.5 και Δ.6 (§ Δ.3.6). Οι καμπύλες βαθμονόμησης παρουσιάζονται στα σχήματα Δ.25 και Δ.26.

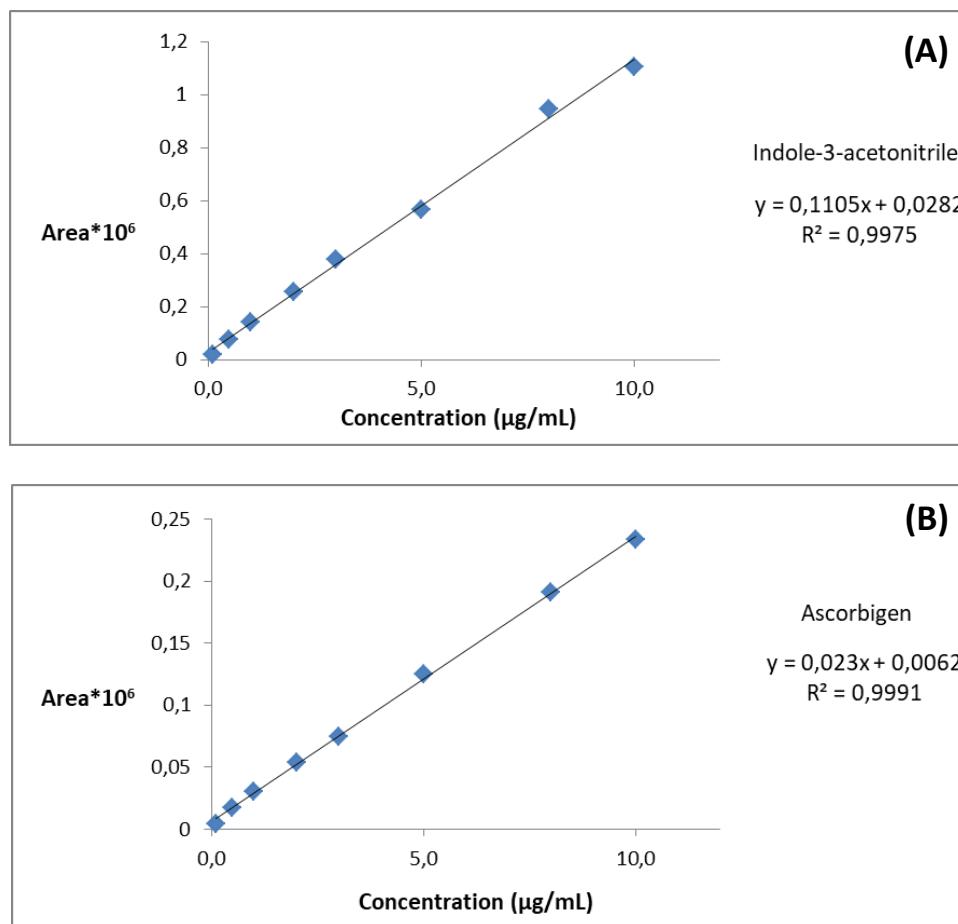
Πίνακας Δ.10. Αναλυτικές παράμετροι για τον προσδιορισμό των παραγώγων του ινδολίου

| Ένωση | Συντελεστής γραμμικότητας r | LOD ^α (μg/mL) | LOQ ^β (μg/mL) | Γραμμική περιοχή (μg/mL) | Χρόνος κατακράτησης (min) |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| I3CHO ^γ | 0.9995 | 0.44 | 1.34 | 0.1-10 | 9.34 |
| IAN ^δ | 0.9975 | 0.97 | 2.94 | 0.1-10 | 10.0 |
| I3C ^ε | 0.9991 | 0.57 | 1.72 | 0.1-10 | 8.33 |
| ABG ^{στ} | 0.9991 | 0.58 | 1.76 | 0.1-10 | 7.94 |

^αLOD: Όριο ανίχνευσης, ^βLOQ: Όριο ποσοτικοποίησης, ^γI3CHO: Ινδολο-3-καρβαλδεΐδη, ^δIAN: Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο, ^εI3C: Ινδολο-3-καρβινόλη, ^{στ}ABG: Ασκορβιγόνο



Σχήμα Δ.25. Καμπύλη βαθμονόμησης για την ινδολο-3-καρβαλδεΐδη (A) και την ινδολο-3-καρβινόλη (B) στον αρνητικό ESI ιοντισμό



Σχήμα Δ.26. Καμπύλη βαθμονόμησης για το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (A) και το ασκορβιγόνο (B) στον αρνητικό ESI ιοντισμό

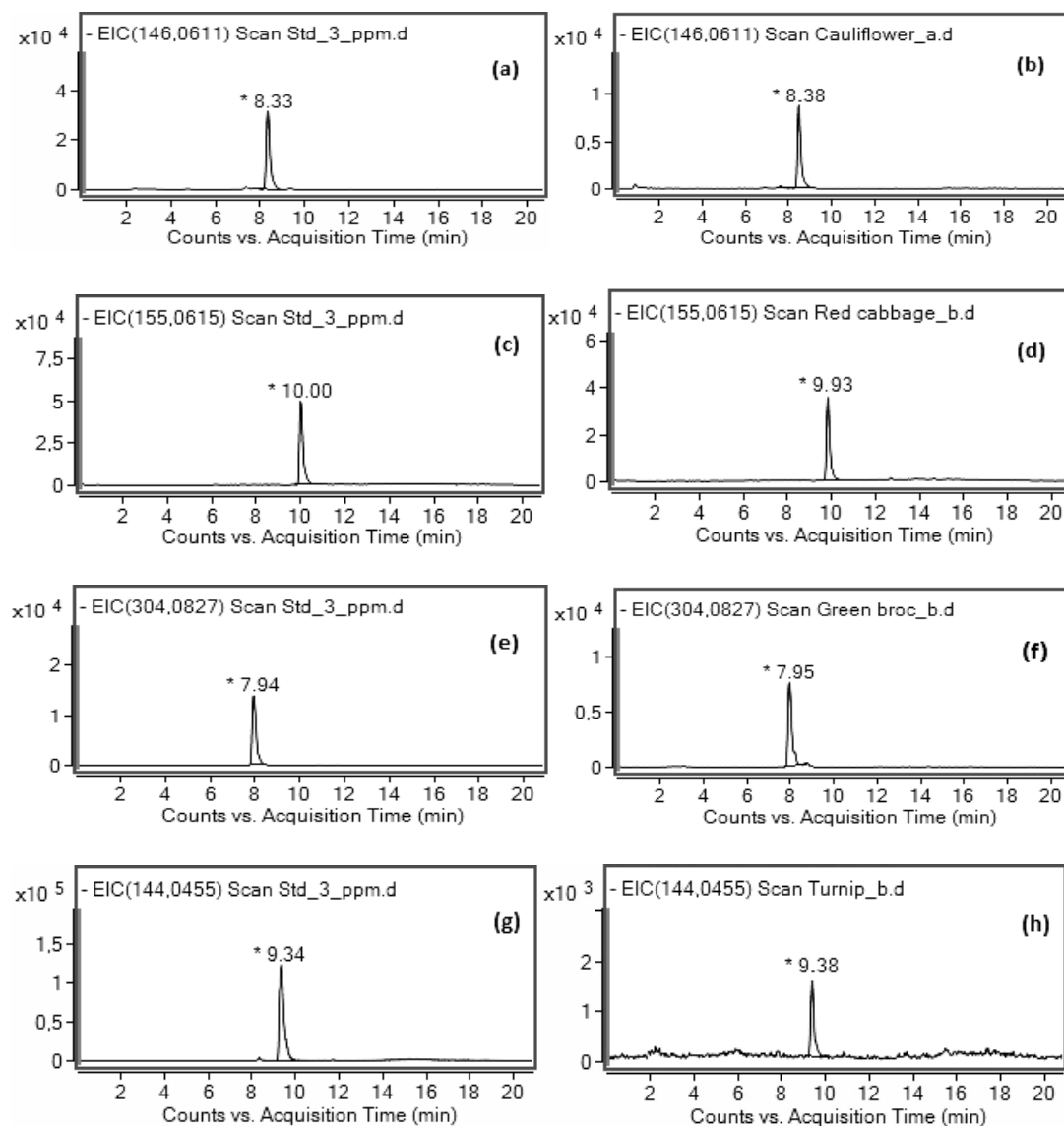
Δ.4.7. Ανάλυση Εκχυλισμάτων Σταυρανθών

Μελετήθηκαν εκχυλίσματα από λευκό κουνουπίδι, κόκκινο λάχανο, λευκό λάχανο, πράσινο μπρόκολο, μωβ μπρόκολο, ραπανάκι και ρέβα.

Τα χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 3 μg/mL και εκχυλισμάτων σταυρανθών, για τις τέσσερις ινδολικές ενώσεις, παρουσιάζονται στο σχήμα Δ.27.

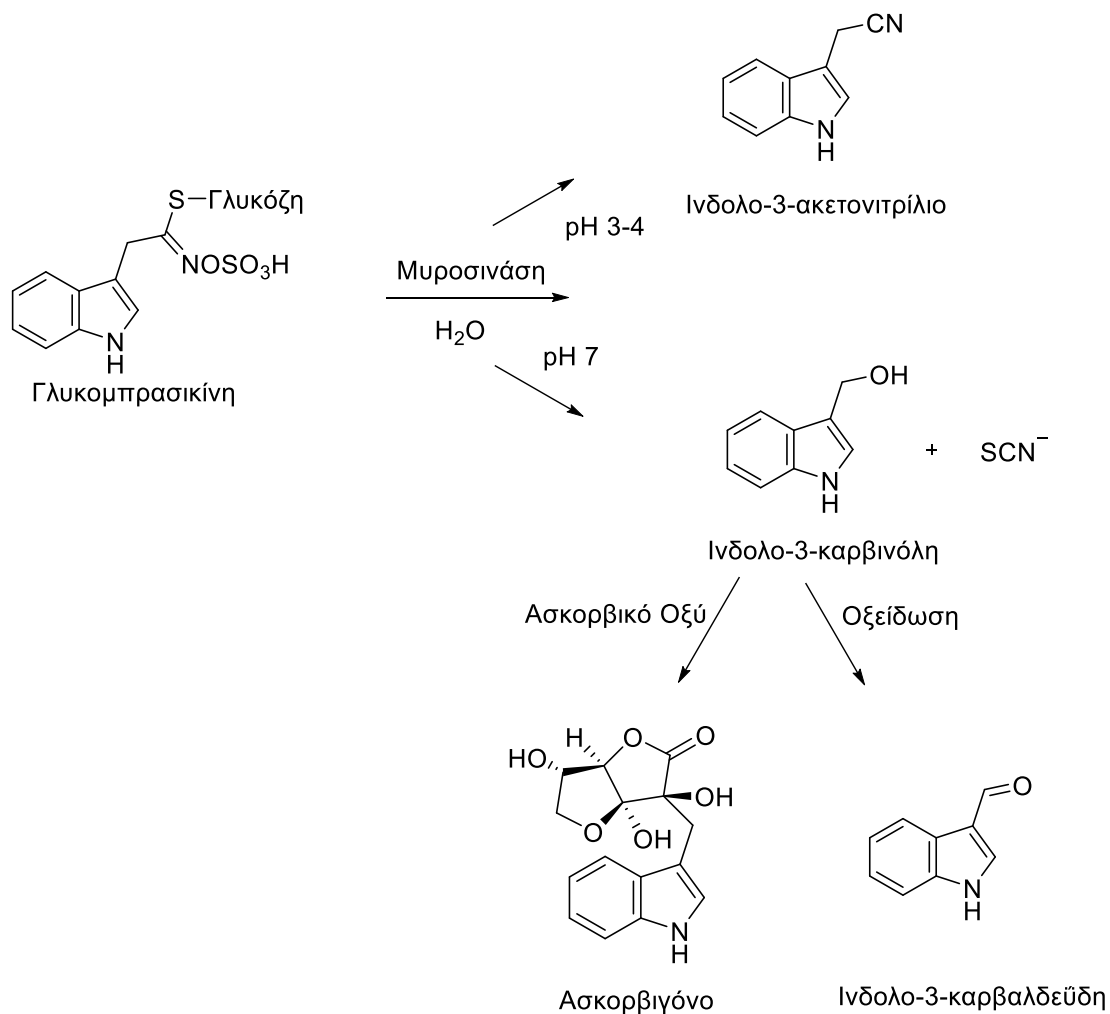
Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων επιτεύχθηκε με στήλη Agilent (Zorbax C18, 50 x 2.1 mm, 1.8 μm) κατάλληλη για γρήγορο διαχωρισμό. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης μαζί με την εξισορρόπηση της στήλης ήταν 20.5 λεπτά, αρκετά χαμηλότερος από άλλες χρωματογραφικές μεθόδους της βιβλιογραφίας.^{24,25}

Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθεικουανικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανή Λαχανικά



Σχήμα Δ.27. Χρωματογράφημα του εξαγόμενου ιόντος προτύπου διαλύματος (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ινδολο-3-καρβινόλης (a) και εκχυλίσματος κουνουπιδιού (b) σε m/z 146.0611, προτύπου διαλύματος ινδολο-3-ακετονιτριλίου (c) και εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου σε m/z 155.0615, προτύπου διαλύματος ασκορβιγόνου (e) και εκχυλίσματος πράσινου μπρόκολου (f) σε m/z 304.0827, προτύπου διαλύματος ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (g) και εκχυλίσματος ρέβας (h) σε m/z 144.0455 στον αρνητικό ESI ιοντισμό

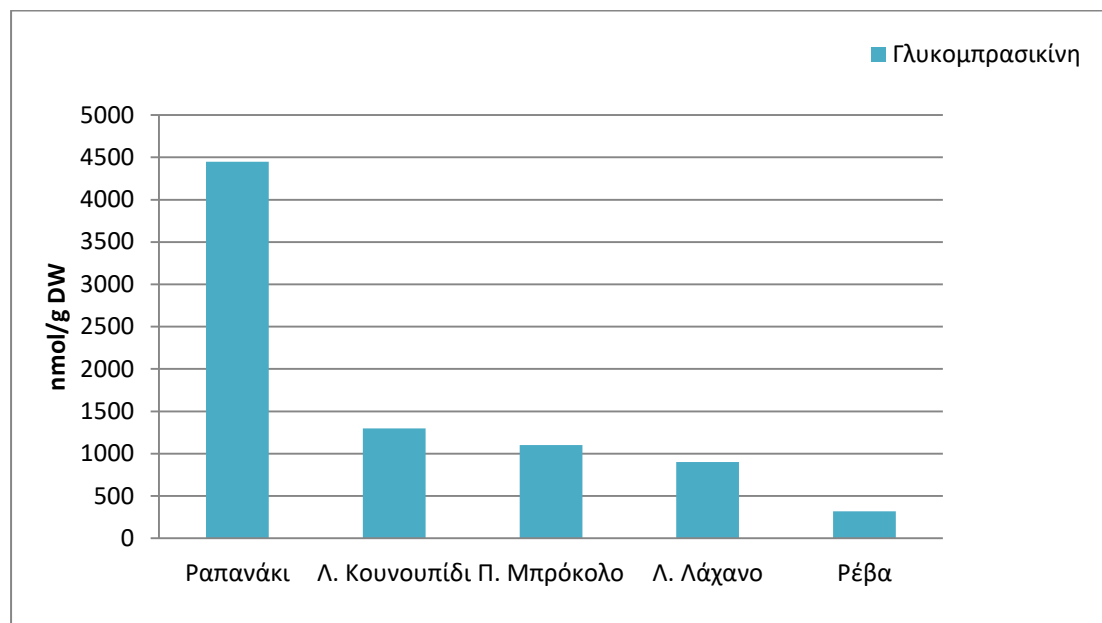
Η ινδολο-3-καρβινόλη και το ινδολο-3-ακετονιτριλίο είναι τα δύο άμεσα προϊόντα που παράγονται κατά την ενζυμική υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης. Η ινδολο-3-καρβινόλη μπορεί, μεταξύ άλλων, να οξειδωθεί προς το σχηματισμό της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης ή να αντιδράσει με το ασκορβικό οξύ που υπάρχει στους φυτικούς ιστούς και να παραχθεί ασκορβιγόνο (Σχήμα Δ.28).²⁴



Σχήμα Δ.28. Ενζυμική υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης και παραγωγή ινδολο-3-ακετονιτρίλιου και ινδολο-3-καρβινόλης και των προϊόντων μεταβολισμού της ινδολο-3-καρβινόλης, ασκορβιγόνο και ινδολο-3-καρβαλδεΐδη²⁴

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η περιεκτικότητα της γλυκομπρασικίνης στα σταυρανθή λαχανικά κυμαίνεται από 320-4448 nmol/g ξηρού λαχανικού (Σχήμα Δ.29).^{22,26} Βέβαια, οι συγκεντρώσεις αυτές είναι ενδεικτικές, καθώς η περιεκτικότητα των γλυκοζινολιτών εξαρτάται από τις διαφορές ανάμεσα στις ποικιλίες των σταυρανθών, τη γεωγραφική προέλευση, την εποχή καλλιέργειας αλλά και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (γονιμότητα εδάφους, παθογόνους μικροοργανισμούς, προσβολή από έντομα, λίπασμα).¹⁷

Κεφάλαιο Δ. Προσδιορισμός των Ισοθεικουανικών και των Ινδολικών Ενώσεων στα Σταυρανή Λαχανικά



Σχήμα Δ.29. Περιεκτικότητα γλυκομπρασικίνης στα σταυρανή λαχανικά σύμφωνα με τη βιβλιογραφία^{22,26}

Οι συγκεντρώσεις των ινδολίων στα εκχυλίσματα σταυρανή λαχανικών που μελετήθηκαν, με τρεις επαναλήψεις, συνοψίζονται στον πίνακα Δ.11. Η περιεκτικότητα τους εκφράστηκε σε nmol/g ξηρού βάρους (DW).

Πίνακας Δ.11. Περιεκτικότητα ινδολικών παραγώγων σε σταυρανή λαχανικά

| Ενώσεις | Περιεκτικότητα (nmol/g DW ^α ±SD ^β , n ^γ =3) | | | | | | |
|--------------------|--|--------------|----------------|--------------|------------------|----------|-------------------|
| | Λευκό Κουνουπίδι | Λευκό Λάχανο | Κόκκινο Λάχανο | Μωβ Μπρόκολο | Πράσινο Μπρόκολο | Ρέβα | Ραπανάκι |
| I3CHO ^δ | 176.5±1.0 | 245.9±0.3 | 151.1±0.7 | 211.0 ±1.0 | 173.9±0.2 | 14.3±0.2 | 27.2±0.9 |
| IAN ^ε | 15.5±1.8 | 12.0±0.1 | 34.5±1.0 | ND | 15.0±0.7 | 0.4±0.2 | ND ^η |
| I3C ^σ | 31.4±0.2 | 4.1±0.1 | 4.8±0.4 | 18.3±0.6 | 4.6±0.1 | 15.9±2.1 | <LOD ^θ |
| ABG ^ζ | 1.0±0.2 | 14.9±0.2 | 22.5±0.2 | 2.1±0.1 | 25.1±0.3 | 1.7±0.1 | <LOD |

^αDW: Ξηρού βάρους, ^βSD: Τυπική απόκλιση, ^γΑριθμός επαναλήψεων ^δI3CHO: Ινδολο-3-καρβαλδεΐδη, ^εIAN: Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο, ^σI3C: Ινδολο-3-καρβινόλη ^ζABG: Ασκορβιγόνο, ^ηND: Δεν ανιχνεύθηκε, ^θLOD: Όριο ανίχνευσης

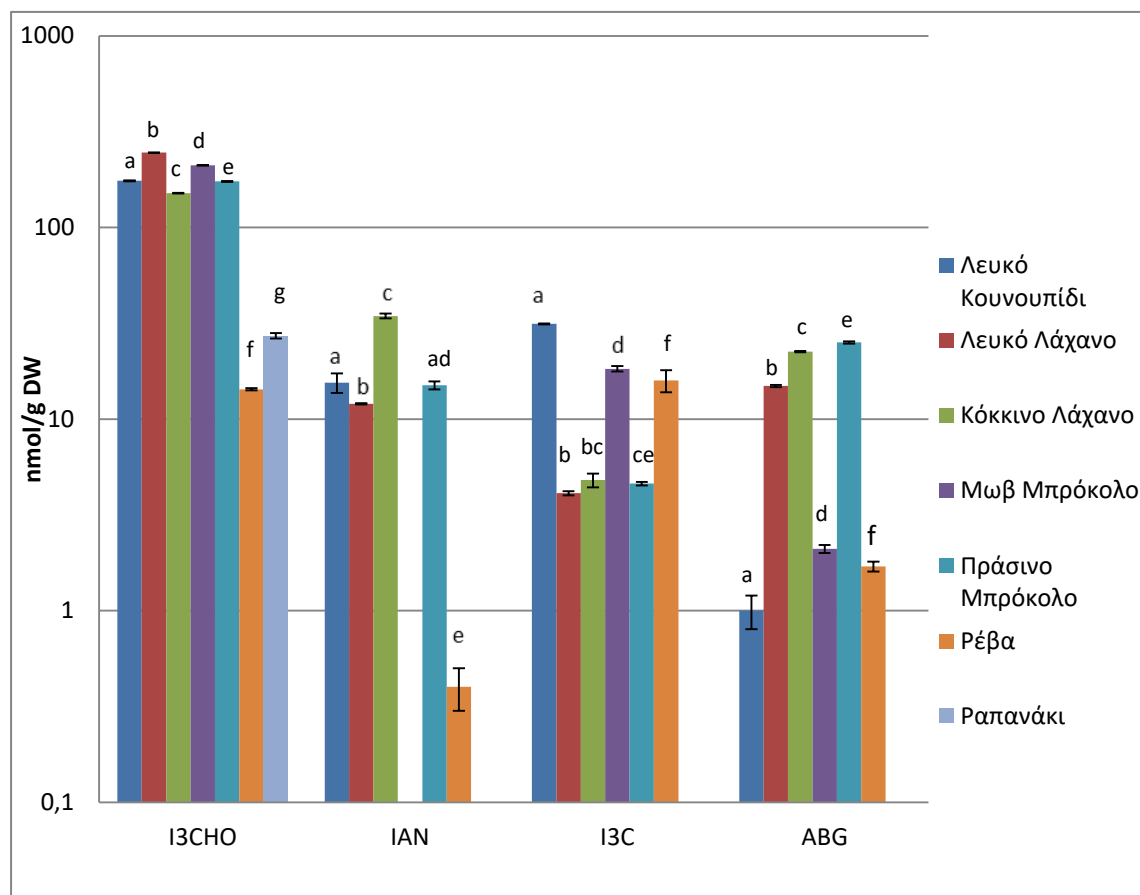
Η ινδολο-3-καρβινόλη και το ασκορβιγόνο ανιχνεύθηκαν σε όλα τα εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις από 4.1±0.1 nmol/g DW έως 31.4±0.2 nmol/g DW και 1.0±0.2 nmol/g DW έως 25.1±0.3 nmol/g DW, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα της ινδολο-3-

καρβινόλης και του ασκορβιγόνου στο ραπανάκι ήταν χαμηλότερη του ορίου ανίχνευσης.

Το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο ανιχνεύθηκε σε όλα τα σταυρανή, εκτός από το μωβ μπρόκολο και το ραπανάκι. Η χαμηλότερη συγκέντρωση του ινδολο-3-ακετονιτρίλιου ανιχνεύθηκε στη ρέβα (0.4 ± 0.2 nmol/g DW) ενώ η υψηλότερη ανιχνεύθηκε στο κόκκινο λάχανο (34.5 ± 1.0 nmol/g DW).

Η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα σε συγκεντρώσεις από 14.3 ± 0.2 nmol/g DW (ρέβα) έως 245.9 ± 0.3 nmol/g DW (λευκό λάχανο).

Οι διαφορές στη συγκέντρωση που εμφανίζουν τα ινδόλια που προσδιορίστηκαν στα διάφορα είδη σταυρανή που μελετήθηκαν φαίνονται στο σχήμα Δ.30.



Σχήμα Δ.30. Περιεκτικότητα των προϊόντων υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης στα σταυρανή λαχανικά. Σύγκριση του μέσου όρου των δειγμάτων (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)

Οι βιβλιογραφικές μελέτες για την παρουσία της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στα σταυρανή λαχανικά είναι ελάχιστες και περιλαμβάνουν μόνο το λευκό λάχανο (13.1 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ φρέσκου βάρους), το λευκό κουνουπίδι (68.9 $\text{nmol}/100\text{ g}$ φρέσκου βάρους) και το πράσινο μπρόκολο (1.4 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ φρέσκου βάρους).^{27,28}

Η περιεκτικότητα του ινδολο-3-ακετονιτριλίου, της ινδολο-3-καρβινόλης και του ασκορβιγόνου έχει μελετηθεί στο μπρόκολο (4.9 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$, 24.6 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ και 236.8 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ξηρού βάρους, αντίστοιχα) και στο κουνουπίδι (7.1 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$, 39.5 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ και 929.0 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ξηρού βάρους, αντίστοιχα), ενώ η περιεκτικότητα του ινδολο-3-ακετονιτριλίου και του ασκορβιγόνου έχει μελετηθεί στο λάχανο (0.1-0.5 $\text{mg}/100\text{ g}$ και 2.4-5.5 $\text{mg}/100\text{ g}$ φρέσκου βάρους, αντίστοιχα).^{29,31}

Από το σχήμα Δ.30, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα συγκεντρώσεων ινδολο-3-καρβαλδεΐδης που μετρήθηκαν είναι αρκετά υψηλότερα σε όλα σχεδόν τα σταυρανή, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ινδόλια που προσδιορίστηκαν. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι ένα μέρος της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης παράγεται από την οξείδωση της ινδολο-3-καρβινόλης,^{24,32} ωστόσο άλλο ένα μέρος προέρχεται από τον μεταβολισμό του ινδολο-3-οξικού οξέος (αυξίνη) και από τη βιοσύνθεση παραγώνων του ινδολο-3-καρβοξυλικού οξέος.^{33,34} Το ίδιο ισχύει για το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο το οποίο, εκτός των προαναφερθέντων, συμμετέχει και στη βιοσύνθεση της φυτοαλεξίνης καμαλεξίνης.³⁴ Επάνω σε αυτό το θέμα θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στην ενότητα Ε.7.

Παρά το γεγονός ότι η περιεκτικότητα της γλυκομπρασικίνης έχει προσδιοριστεί στη ρέβα και στο ραπανάκι (Σχήμα Δ.29),^{22,26} εν τούτοις τα αντίστοιχα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης δεν έχουν μελετηθεί ακόμη.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ρέβα περιέχει όλα τα ινδολικά παράγωγα που μελετήθηκαν, ενώ στο ραπανάκι μόνο η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη ποσοτικοποιήθηκε, η περιεκτικότητά σε ινδολο-3-καρβινόλη και ασκορβιγόνο ήταν χαμηλότερη του ορίου ανίχνευσης και το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο δεν ανιχνεύθηκε.

Δ.4.8. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τέσσερις ινδολικές ενώσεις που προέκυψαν από την ενζυμική υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης, με φασματομετρία μάζας HRMS. Δύο από τις ενώσεις αυτές, η ινδολο-3-καρβινόλη και το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο είναι τα άμεσα προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης, ενώ η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη και το ασκορβιγόνο προήλθαν, αντίστοιχα, από την οξειδωση της ινδολο-3-καρβινόλης ή την αντίδραση αυτής με το φυσικώς υπάρχον ασκορβικό οξύ.

Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC), η ινδολο-3-καρβινόλη και το ασκορβιγόνο παρουσιάζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση¹⁹ και επομένως είναι σημαντική η έρευνα της περιεκτικότητας των ενώσεων αυτών στα σταυρανθή λαχανικά. Η περιεκτικότητα των ενώσεων αυτών σε διάφορα είδη σταυρανθών (λευκό λάχανο, κόκκινο λάχανο, πράσινο μπρόκολο, μωβ μπρόκολο, ρέβα, ραπανάκι και λευκό κουνουπίδι), μετρήθηκε μέσω μιας νέας μεθόδου UHPLC-HRMS/MS που αναπτύχθηκε. Οι συγκεντρώσεις των ινδολίων κυμάνθηκαν από 4.1 ± 0.1 έως 31.4 ± 0.2 nmol/g ξηρού βάρους, για την ινδολο-3-καρβινόλη, από 0.4 ± 0.2 nmol/g DW έως 34.5 ± 1.0 nmol/g ξηρού βάρους, για το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο, από 1.0 ± 0.2 nmol/g έως 25.1 ± 0.3 nmol/g ξηρού βάρους, για το ασκορβιγόνο και από 14.3 ± 0.2 έως 245.9 ± 0.3 nmol/g ξηρού βάρους, για την ινδολο-3-καρβαλδεΐδη.

Τα επίπεδα συγκεντρώσεων της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης ήταν υψηλότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα ινδόλια. Η αυξημένη συγκέντρωσή της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στα σταυρανθή μπορεί να οφείλεται και στην ύπαρξη επιπλέον ποσότητας από την συμμετοχή της στον μεταβολισμό των αυξινών καθώς και στη βιοσύνθεση παραγώγων του ινδολο-3-καρβοξυλικού οξέος.

Η παρούσα μέθοδος είναι η πρώτη στη βιβλιογραφία σχετικά με τον προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης στη ρέβα και στο ραπανάκι όπως επίσης αποτελεί και την πρώτη εφαρμογή μεθόδου UHPLC-HRMS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των συγκεκριμένων ινδολίων σε σταυρανθή λαχανικά.

Δ.5. Βιβλιογραφία

1. Campas-Baypoli, O. N., Sánchez-Machado, D. I., Bueno-Solano, C., Ramírez-Wong, B., López-Cervantes, J. (2010). HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products. *Biomedical Chromatography*, 24(4), 387-392.
2. Chiang, W. C. K., Pusateri, D. J., Leitz, R. E. A. (1998). Gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of sulforaphane and sulforaphane nitrile in broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1018-1021.
3. Farag, M. A., Abdel Motaal, A. A. (2010). Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 65-70.
4. Latxague, L., Gardrat, C., Coustille, J. L., Viaud, M. C., Rollin, P. (1991). Identification of enzymatic degradation products from synthesized glucobrassicin by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 586, 166-170.
5. Matusheski, N. V., Juvik, J. A., Jeffery, E. H. (2004). Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry*, 65(9), 1273-1281.
6. Li, X., Kushad, M. M. (2005). Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(6), 503-511.
7. Stoin, D., Pirsan, P., Radu, F., Poiana, M.-A., Alexa, E., Dogaru, D. (2009). Studies regarding the myrosinase enzymatic activity from black mustard (*Brassica nigra*) seeds. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(1), 44-47.
8. Vallejo, F., García-Viguera, C., & Tomás-Barberán, F. A. (2003). Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3776-3782.
9. Han, D. & Row, K. H. (2011). Separation and purification of sulforaphane from broccoli by solid phase extraction. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(3), 1854-1861.
10. Moon, J. K., Kim, J. R., Ahn, Y. J., & Shibamoto, T. (2010). Analysis and anti-Helicobacter activity of sulforaphane and related compounds present in broccoli (*Brassica oleracea* L.) sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6672-6677.
11. Ares, A. M., Bernal, J., Martin, M. T., Bernal, J. L., Nozal, M. J. (2014a). Optimized formation, extraction and determination of sulforaphane in

- broccoli by liquid chromatography with diode array detection. *Food Analytical Methods*, 7(3), 730-740.
12. Bertelli, D., Plessi, M., Braghiroli, D., Monzani, A. (1998). Separation by solid phase extraction and quantification by reverse phase HPLC of sulforaphane in broccoli. *Food Chemistry*, 63, 417-421.
 13. Azizi, S.N., Amiri-Besheli, B., Sharifi-Mehr, S. (2011). The isolation and determination of sulforaphane from broccoli tissues by reverse phase-high performance liquid chromatography. *Journal Chinese Chemical Society*, 58, 906-910.
 14. Socrates, G. (2001). Infrared and Raman characteristic group frequencies (3rd ed.), (pp.88-93). Chichester: John Wiley & Sons.
 15. Chen, Y., Xie, M., Zhang, H., Wang, Y., Nie, S., Li, C. (2012). Quantification of total polysaccharides and triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma atrum* by near infrared spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 135, 268-275.
 16. Zhang, Y., Cho, C. G., Posner, G. H., Talalay, P. (1992). Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Analytical Biochemistry*, 205, 100-107.
 17. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals, January 2012, AOAC International.
 18. Παππάς, Χ. (2000). Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού κενάφ (*Hibiscus cannabinus* L.). Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
 19. World Health Organization/International Agency for Research on Cancer (2004). Cruciferous vegetables, isothiocyanates and indoles, IARC handbooks on cancer prevention, (Vol. 9), (pp. 13-23). Lyon: IARC press.
 20. Prinsen, E., Van Dongen, W., Esmans, E. L., Van Onckelen, H. A. (1997). HPLC linked electrospray tandem mass spectrometry: A rapid and reliable method to analyse indole-3-acetic acid metabolism in bacteria. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(1), 12-22.
 21. Khmel'nitskii, R. A. (1974). Mass spectrometry of indole compounds (review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 10(3), 253-267.
 22. Kushad, M. M., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Juvik, J. A., Klein, B. P., Wallig, M. A., Jeffery, E. H. (1999). Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1541-1548.
 23. Hauder, J., Winkler, S., Bub, A., Rüfer, C. E., Pignitter, M., Somoza, V. (2011). LC-MS/MS quantification of sulforaphane and indole-3-carbinol metabolites in human plasma and urine after dietary intake of selenium-fortified broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8047-8057.

24. Bradfield, C. A., Bjeldanes, L. F. (1987). High-performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(1), 46-49.
25. Lee, S. Y., Chu, S. M., Lee, S. M., Kim, H. J., Cho, H. S., Yu, C. Y., Kim, J. K. (2010). Determination of indole-3-carbinol and indole-3-acetonitrile in Brassica vegetables using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(2), 249-252.
26. Park, W., Kim, K.-S., Jang, Y.-S. Lee, K., Kim, S.-J., Ahn, S.-J., Hong, S. W., Lee, Y.-H. (2017). Variation in Glucosinolate Contents of Cruciferous Plants. *Records of Natural Products*, 11(2), 185-192.
27. Devys M., Barbier M. (1991). Indole-3-carboxaldehyde in the cabbage Brassica oleracea: A systematic determination. *Phytochemistry*, 30(2), 389-391.
28. Wall, M. E., Taylor, H., Perera, P., Wani, M. C. (1988). Indoles in edible members of the Cruciferae. *Journal of Natural Products*, 51(1), 129-135.
29. Sosińska, E., Obiedziński, M. W. (2011). Effect of processing on the content of glucobrassicin and its degradation products in broccoli and cauliflower. *Food Control*, 22(8), 1348-1356.
30. Aleksandrova, L. G., Korolev, A. M., Preobrazhenskaya M. N. (1992). Study of natural ascorbigen and related compounds by HPLC. *Food Chemistry*, 45(1), 61-69.
31. Ciska, E., Pathak, D. R. (2004). Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7938-7943.
32. Fetizon, M., Gomez-Parra, F., Louis, J. (1976). Oxydation par le carbonate d'argent sur célite. XV. Alcools hétérocycliques. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 13(3), 525-528.
33. Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D., Sandberg, G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 49(3-4), 249-272.
34. Böttcher, C., Chapman, A., Fellermeier, F., Choudhary, M., Scheel, D., Glawischnig, E. (2014). The Biosynthetic Pathway of indole-3-carbaldehyde and indole-3-carboxylic acid derivatives in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(2), 841-853.

Κεφάλαιο Ε. Προσδιορισμός των Φυτορμονών στα Σταυρανθή Λαχανικά

Ε.1. Υλικά και Όργανα

Φυτικό υλικό

Η προμήθεια των σταυρανθών λαχανικών πραγματοποιήθηκε από τοπικούς παραγωγούς του Ν. Εύβοιας (38°28'02.5"N 23°38'13.4"E), ενώ η συγκομιδή των λαχανικών έγινε τον Φεβρουάριο του έτους 2017.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής σταυρανθή λαχανικά:

1. Κόκκινο λάχανο (*Brassica oleracea* L. var. *rubra* L. cv. *Romanov*)
2. Ρέβα (*Brassica rapa* L. subsp. *rapifera* Metzg. cv. *Snowball*)
3. Λευκό λάχανο (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. cv. *Cabbice*)
4. Μωβ μπρόκολο (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck cv. *Viollete*)
5. Λευκό κουνουπίδι (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. cv. *Zarka*)
6. Πράσινο μπρόκολο (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck cv. *Calabrese*)
7. Ραπανάκι (*Raphanus raphanistrum* L. subsp. *sativus* (L.) Domin cv. *Belcanto*)
8. Ρόκα (*Eruca sativa* (L.) Mill.)

Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν φύλλα απο το λάχανο και τη ρόκα, ανθύλλια απο το μπρόκολο και το κουνουπίδι και οι βολβοί απο το ραπανάκι και τη ρέβα. Τα δείγματα λυοφιλώθηκαν άμεσα, λειοτριβήθηκαν και κονιορτοποιήθηκαν σε ιγδίο. Το ποσοστό υγρασίας των δειγμάτων ήταν:

| Δείγμα | Ποσοστό Υγρασίας % |
|------------------|--------------------|
| Πράσινο μπρόκολο | 91 |
| Μωβ μπρόκολο | 91 |
| Λευκό κουνουπίδι | 92 |
| Κόκκινο λάχανο | 93 |
| Λευκό λάχανο | 92 |
| Ρέβα | 90 |
| Ραπανάκι | 90 |
| Ρόκα | 92 |

Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φυτικών ορμονών στα σταυρανή λαχανικά παρουσιάζονται στον πίνακα Ε.1. Από τις 27 ενώσεις που μελετήθηκαν, το (±)-ιασμονικό οξύ, το σαλικυλικό οξύ, το 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ και το ινδολο-3-οξικό οξύ ήταν εμπορικά διαθέσιμα από την εταιρία TCI Chemicals, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις συντέθηκαν με μεθόδους οργανικής συνθετικής χημείας (Κεφάλαιο Γ και ΣΤ).

Πίνακας Ε.1. Ενώσεις που μελετήθηκαν με φασματομετρία μαζών

| Όνομασία IUPAC | Εμπειρική Ονομασία | Συντομογραφία (Αριθμός ένωσης) |
|--|---|--------------------------------|
| 1 <i>H</i> -Ινδολο-3-καρβαλδεΐδη (1 <i>H</i> -Indole-3-carbaldehyde) | Ινδολο-3-καρβαλδεΐδη | I3CHO (33) |
| 2-(1 <i>H</i> -Ινδολ-3-υλ)ακετονιτρίλιο (2-(1 <i>H</i> -Indol-3-yl)acetonitrile) | Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο | IAN (4) |
| {{(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-3-οξο-2-[(2 <i>Z</i>)-πεντ-2-εν-1-υλ]κυκλοπεντυλ}οξικό οξύ ({(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-3-οξο-2-[(2 <i>Z</i>)-pent-2-en-1-yl]cyclopentyl}acetic acid) | (±)-ιασμονικό οξύ | JA (20) |
| 2-Υδροξυβενζοϊκό οξύ (2-Hydroxybenzoic acid) | Σαλικυλικό οξύ | SA (57) |
| (4-Χλωρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλ)οξικό οξύ ((4-Chloro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetic acid) | 4-Χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ | 4-Cl-IAA (3) |
| 2-(1 <i>H</i> -Ινδολ-3-υλ)ακεταμίδιο (2-(1 <i>H</i> -Indol-3-yl)acetamide) | Ινδολο-3-ακεταμίδιο | IAM (36) |
| 2-(1 <i>H</i> -Ινδολ-3-υλ)οξικό οξύ (2-(1 <i>H</i> -Indol-3-yl)acetic acid) | Ινδολο-3-οξικό οξύ | IAA (1) |
| (2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -Indol-3-ylacetyl)amino]propanoic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -αλανίνη | IAA1a (52) |
| (2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]-3-μεθυλοβουτανοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -Indol-3-ylacetyl)amino]-3-methylbutanoic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -βαλίνη | IAVal (51) |
| [(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]οξικό οξύ ([(1 <i>H</i> -Indol-3-ylacetyl)amino]acetic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο-γλυκίνη | IAGly (56) |
| (2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]-4-(μεθυλοσουλφονυλο)βουτανοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -Indol-3-ylacetyl)amino]-4-(methylsulfonyl)butanoic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -μεθειονίνη | IAMet (54) |
| (2 <i>S</i>)-3-(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλ)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-3-(1 <i>H</i> -Indol-3-yl)-2-[(1 <i>H</i> -indol-3-ylacetyl)amino]propanoic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -θρυπτοφάνη | IATrp (49) |
| (2 <i>S</i>)-3-(4-Υδροξυφαινυλο)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-3-(4-Hydroxyphenyl)-2-[(1 <i>H</i> -indol-3-ylacetyl)amino]propanoic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -τυροσίνη | IATyr (50) |
| (2 <i>S</i>)-3-Υδροξυ-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-3-Hydroxy-2-[(1 <i>H</i> -indol-3-ylacetyl)amino]propanoic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -σερίνη | IASer (53) |
| (2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]-3-φαινυλοπροπανοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -Indol-3-ylacetyl)amino]-3-phenylpropanoic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -φαινυλαλανίνη | IAPhe (55) |
| (2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]βουτανοδιοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -Indol-3-ylacetyl)amino]butanedioic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -ασπαρτικό οξύ | IAAsp (47) |
| (2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]πεντανοδιοϊκό οξύ ((2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -Indol-3-ylacetyl)amino]pentanedioic acid) | Ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -γλουταμινικό οξύ | IAGlu (48) |
| (2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλακετυλαμινο]προπανοϊκός μεθυλεστέρας (Methyl (2 <i>S</i>)-2-[(1 <i>H</i> -indol-3-ylacetyl)amino]propanoate) | Μεθυλεστέρας της ινδολο-3-ακετυλο- <i>L</i> -αλανίνης | IAA1a-Me (42) |

Κεφάλαιο Ε. Προσδιορισμός των Φυτορμονών στα Σταυρανή Λαχανικά

| | | |
|---|--|----------------------------|
| (2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]-3-μεθυλοβουτανοϊκός μεθυλεστέρας (Methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-3-methylbutanoate) | Μεθυλεστέρας της ινδολο-3-ακετυλο-L- βαλίνης | IAVal-Me (41) |
| (2S)-3-(1H-ινδολ-3-υλ)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο] προπανοϊκός μεθυλεστέρας (Methyl (2S)-3-(1H-indol-3-yl)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate) | Μεθυλεστέρας της ινδολο-3-ακετυλο-L- θρυπτοφάνης | IATrp-Me (39) |
| (2S)-3-(4-Υδροξυφαινυλ)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκός μεθυλεστέρας (Methyl (2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate) | Μεθυλεστέρας της ινδολο-3-ακετυλο-L- τυροσίνης | IATyr-Me (40) |
| (2S)-3-Υδροξυ-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο] προπανοϊκός μεθυλεστέρας (Methyl (2S)-3-hydroxy-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate) | Μεθυλεστέρας της ινδολο-3-ακετυλο-L- σερίνης | IASer-Me (43) |
| (2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]-3-φαινυλοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (Methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-3-phenylpropanoate) | Μεθυλεστέρας της ινδολο-3-ακετυλο-L- φαινυλαλανίνης | IAPhe-Me (45) |
| [(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]οξικός μεθυλεστέρας (Methyl [(1H-indol-3-ylacetyl)amino]acetate) | Μεθυλεστέρας της ινδολο-3-ακετυλο- γλυκίνης | IAGly-Me (46) |
| (2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]-4-(μεθυλοσουλφονυλο)βουτανοϊκός μεθυλεστέρας (Methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-4-(methylsulfonyl)butanoate) | Μεθυλεστέρας της ινδολο-3-ακετυλο-L- μεθειονίνης | IAMet-Me (44) |
| (2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]βουτανοδιοϊκός διμεθυλεστέρας (Dimethyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]butanedioate) | Διμεθυλεστέρας του ινδολο-3-ακετυλο-L- ασπαρτικού οξέος | IAAsp-Me ₂ (37) |
| (2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]πεντανιοδιοϊκός διμεθυλεστέρας (Dimethyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]pentanedioate) | Διμεθυλεστέρας του ινδολο-3-ακετυλο-L- γλουταμινικού οξέος | IAGlu-Me ₂ (38) |

Συσκευές & Όργανα

- Φασματογράφος μάζας UHPLC-HRMS/MS της εταιρίας Agilent (μοντέλο Agilent 6530) εξοπλισμένος με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), αναλυτή Q-TOF, χρωματογραφικό σύστημα UHPLC Agilent 1290 Infinity και αυτόματο δειγματολήπτη.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, συνδεδεμένος με το φασματογράφο μάζας με το λογισμικό Agilent MassHunter Data Acquisition (version B.06.00) και Agilent MassHunter Qualitative Analysis (version B.07.00), για την λήψη και την επεξεργασία των φασμάτων, αντίστοιχα.

Ε.2. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000 mg/L σε μεθανόλη όλων των ενώσεων και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C. Από αυτά παρασκευάστηκαν με αραιώση σε μεθανόλη τα πρότυπα διαλύματα εργασίας. Ένα διάλυμα 10 mg/L σε μεθανόλη από κάθε ένωση χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα πλήρους σάρωσης και MS/MS.

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης για τα IAA, I3CHO και IAN παρασκευάστηκε μίγμα πρότυπων διαλυμάτων είκοσι διαφορετικών συγκεντρώσεων (2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000, 3000, 5000, 8000 και 10000 ng/mL), δεκαοχτώ διαφορετικών συγκεντρώσεων (2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000, 3000 και 5000 ng/mL) και δεκατριών διαφορετικών συγκεντρώσεων (8, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 200, 300, 500, 800, 1000 και 2000 ng/mL) αντίστοιχα, σε MeOH. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης των SA, JA, 4-Cl-IAA, IAM και όλων των συζευγμάτων του IAA με αμινοξέα, παρασκευάστηκε μίγμα πρότυπων διαλυμάτων δώδεκα διαφορετικών συγκεντρώσεων (2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 200, 300 ng/mL).

Ε.3. Παρασκευή Εκχυλισμάτων

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της βιβλιογραφίας¹ ως εξής: 1 g λυοφιλιωμένου λαχανικού εκχυλίστηκε στους 4 °C για 24 ώρες με 20 mL MeOH 80%. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε με διήθηση σε Buchner και το υπόλειμμα εκχυλίστηκε εκ νέου με 20 mL MeOH 80% για 30 λεπτά στους 4 °C. Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, ξηράνθηκαν με 1 g άνυδρο θειικό νάτριο και διηθήθηκαν. Το εκχύλισμα συμπυκνώνεται υπό κενό στους 35 °C μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε 1 mL MeOH. Για την ανάλυση στο LC-MS, 50 µL από το εκχύλισμα αραιώθηκαν με 50 µL MeOH.

Ε.4. Συνθήκες UHPLC-HRMS/MS

Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε άζωτο, ενώ τα πειράματα διεξήχθησαν στον αρνητικό και στον θετικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε είχε τις εξής παραμέτρους:

- Θερμοκρασία αερίου αποδιαλύτωσης, 300 °C.
- Ροή αερίου αποδιαλύτωσης, 12 l/min.

- Δυναμικό τριχοειδούς, 4000 V.
- Πίεση αερίου εκνεφωτή, 45 psi.
- Δυναμικό θραυσματοποίησης, 170 V.
- Δυναμικό αποκορυφωτή / διαχωριστή ιόντων, 65 V.
- Ταχύτητα σάρωσης, 1 scan/sec.
- Εύρος ανιχνευόμενων μαζών, 50-1500 m/z .

Για τα πειράματα MS/MS αναπτύχθηκε μέθοδος auto MS/MS με τις εξής παραμέτρους:

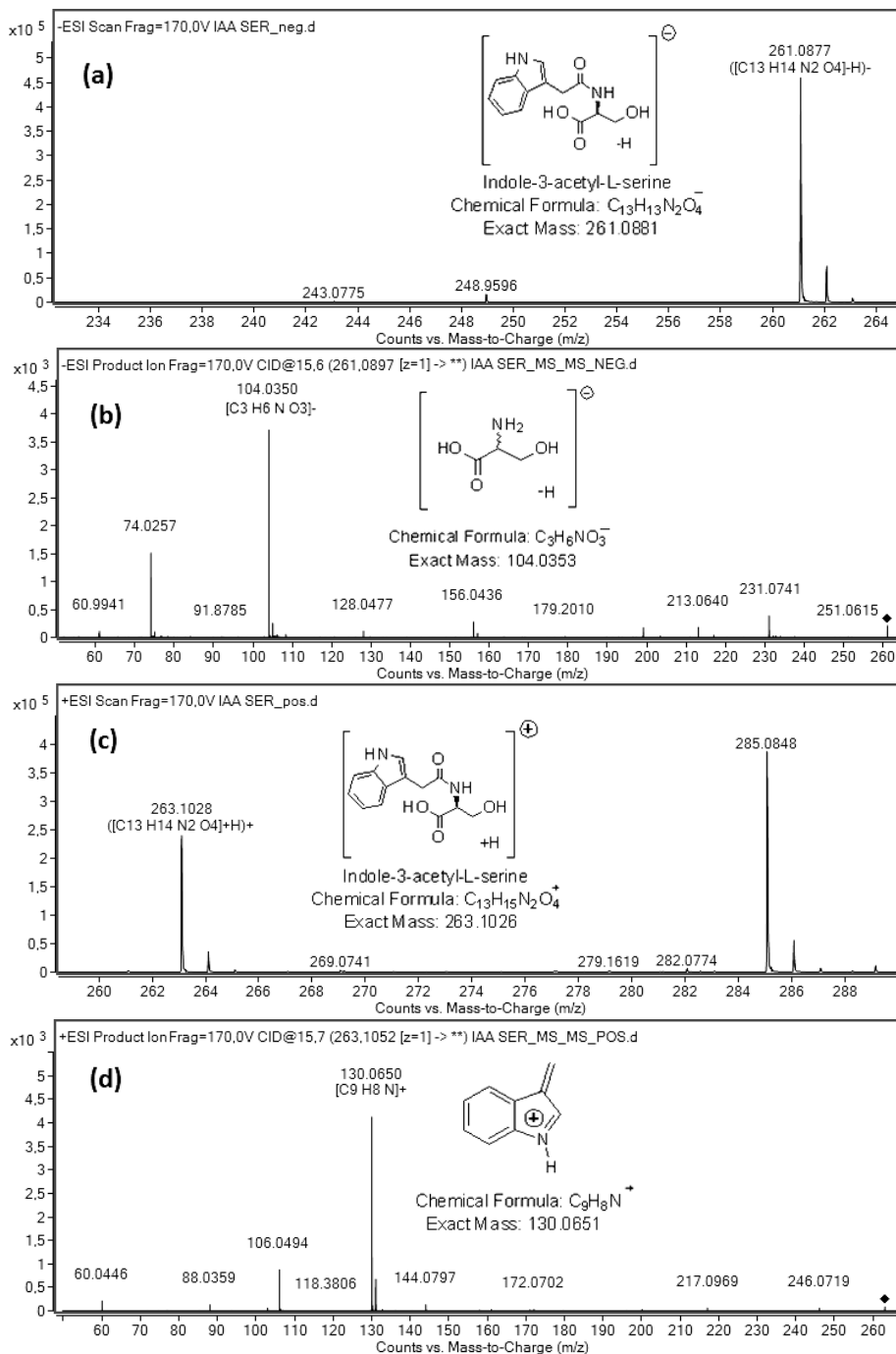
- Δυναμικό ενέργειας σύγκρουσης, 5 V.
- Δυναμικό αντιστάθμισης, 2.5 V.
- Προτιμώμενη κατάσταση φορτίου, 2, 1, unknown.
- Ταχύτητα σάρωσης, 1 scan/sec.
- Εύρος ανιχνευόμενων μαζών, 50-1500 m/z .

Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων επιλέχθηκε η δυνατότητα συνεχούς διόρθωσης της βαθμονόμησης του συστήματος με διοχέτευση κατάλληλου διαλύματος που περιείχε γνωστές τιμές ιόντων αναφοράς. Στη λειτουργία του θετικού ιοντισμού τα ιόντα αναφοράς είχαν τιμές m/z 121.0509 και 922.0098, ενώ στη λειτουργία του αρνητικού ιοντισμού οι αντίστοιχες τιμές m/z ήταν 112.9856 και 1033.9881.

Για τη χρωματογραφική μελέτη χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης της εταιρίας Agilent (Zorbax C18, 50 x 2.1 mm, 1.8 μ m). Η κινητή φάση ήταν H₂O-φορμικό οξύ 0.1% (A) και MeOH-φορμικό οξύ 0.1% (B) με την ακόλουθη βαθμιδωτή σύσταση: 0 min: 5% B; 1 min: 5% B; 8.5 min: 95% B; 9.5 min: 95% B; 11.5 min: 5% B; 28.5 min: 5% B. Ο όγκος του ενέσιμου εκχυλίσματος ήταν 2 μ L, η ροή ήταν 0.4 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 27 °C.

Ε.5. Μελέτη με Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας

Όλες οι ενώσεις (n=27) μελετήθηκαν με φασματομετρία μάζας με την τεχνική της έγχυσης συνεχούς ροής (flow injection analysis-FIA). Τα φάσματα μάζας MS και MS/MS της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης και του αντίστοιχου μεθυλεστέρα θα περιγραφούν λεπτομερώς, καθώς η παρουσία των ενώσεων αυτών στους φυτικούς ιστούς δεν έχει περιγραφεί έως τώρα. Τα φάσματα μάζας MS και MS/MS των υπόλοιπων ενώσεων δίδονται στο παράρτημα.



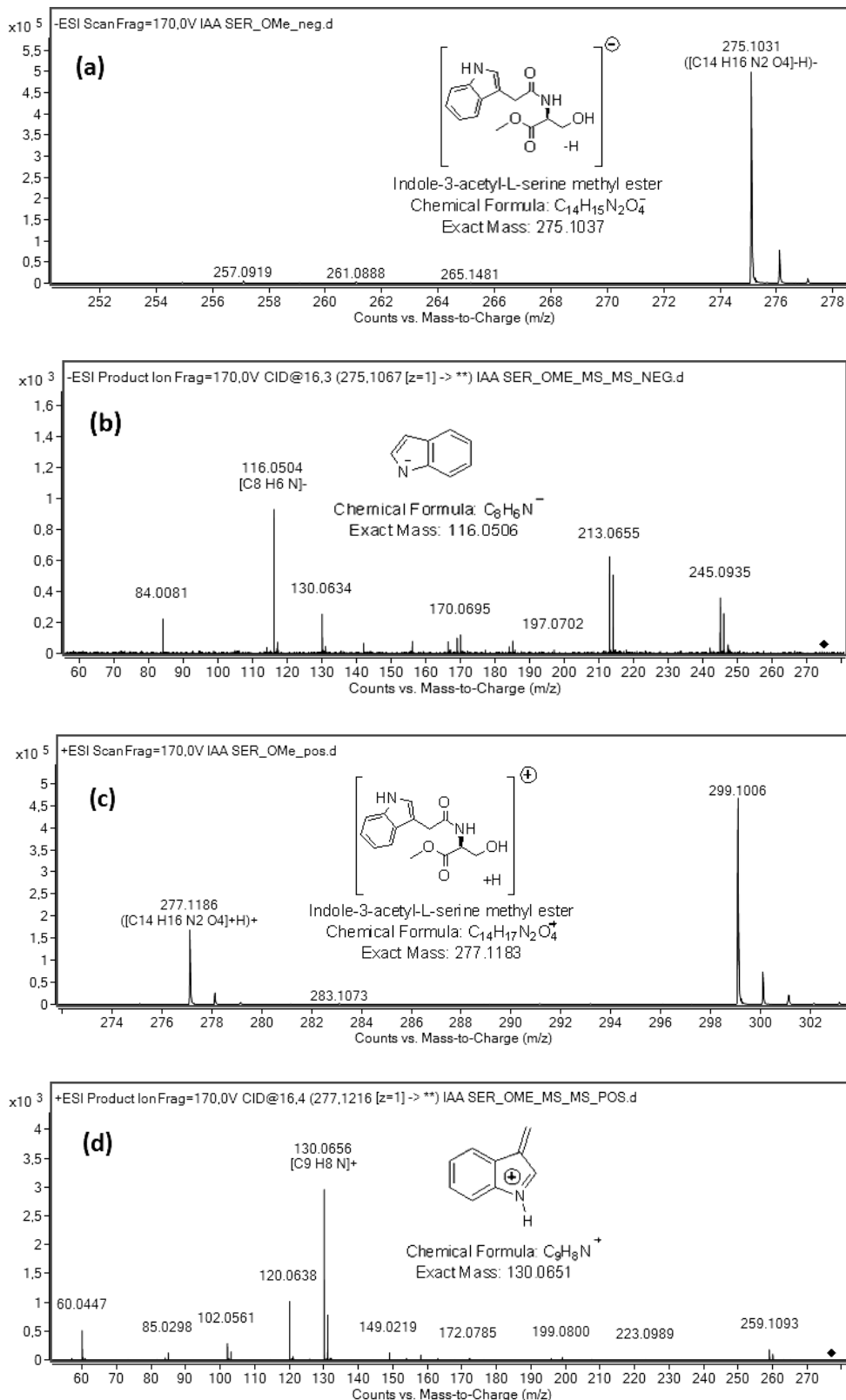
Σχήμα Ε.1. Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης στον θετικό ιοντισμό ESI

Στον αρνητικό ESI ιοντισμό, το φάσμα πλήρους σάρωσης της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης έδειξε το ιόν $[M-H]^-$ σε m/z 261.0877 (Δ 1.5 ppm) (Σχήμα E.1.a). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M-H]^-$, το ιόν με τη μεγαλύτερη αφθονία παρατηρήθηκε σε m/z 104.0350 (Σχήμα E.1.b). Ο μοριακός τύπος που αντιστοιχεί με τη βοήθεια του λογισμικού Agilent MassHunter για το θραύσμα με m/z 104.0350 (Δ 2.9 ppm) είναι $C_3H_6NO_3^-$, ο οποίος αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$ της σερίνης που λαμβάνεται μετά την διάσπαση του αμιδικού δεσμού.

Στον θετικό ESI ιοντισμό, το φάσμα πλήρους σάρωσης της ινδολο-3-ακετυλο-σερίνης έδειξε το ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 263.1028 (Δ 0.8 ppm) μαζί με το $[M+Na]^+$ σε m/z 285.0848 (Δ 0.7 ppm) (Σχήμα E.1.c), ενώ στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M+H]^+$, ανιχνεύθηκε ένα ιόν σε m/z 130.0650 (Σχήμα E.1.d). Το ιόν με m/z 130.0650 (Δ 0.8 ppm) έχει μοριακό τύπο $C_9H_8N^+$ και αντιστοιχεί στο 3-μεθυλενο-3H-ινδολ-1-ιο ιόν, το οποίο μετατρέπεται σε σταθερό ιόν κινολινίου.^{2,3} Για όλους τους προτεινόμενους μοριακούς τύπους λήφθηκαν υπόψιν ο κανόνας του αζώτου και το σφάλμα μάζας το οποίο πρέπει να είναι χαμηλότερο από 5 ppm.

Το ιόν $[M-H]^-$ του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης ανιχνεύθηκε σε m/z 275.1031 (Δ 2.2 ppm) (Σχήμα E.2.a). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M-H]^-$, το ιόν με τη μεγαλύτερη αφθονία παρατηρήθηκε σε m/z 116.0504 (Δ 0.8 ppm) με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_8H_6N^-$, το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν ινδολίου $[M-H]^-$ που λαμβάνεται μετά την διάσπαση του αμιδικού δεσμού του συζευγμένου μεθυλεστέρα της σερίνης (Σχήμα E.2.b).

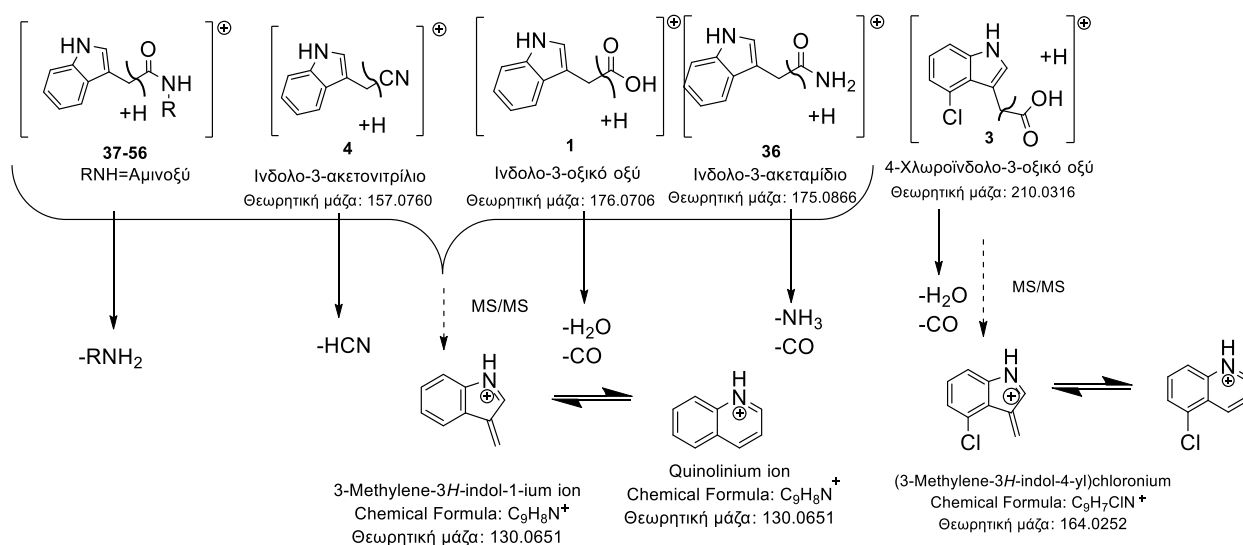
Στον θετικό ESI ιοντισμό, το φάσμα πλήρους σάρωσης του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-σερίνης έδειξε το ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 277.1186 (Δ 1.1 ppm) μαζί με το $[M+Na]^+$ σε m/z 299.1006 (Δ 1.3 ppm) (Σχήμα E.2.c). Στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M+H]^+$, ανιχνεύθηκε ένα ιόν σε m/z 130.0656 (Δ 3.8 ppm) με μοριακό τύπο $C_9H_8N^+$ (Σχήμα E.2.d), το ίδιο ιόν παρατηρήθηκε στο φάσμα MS/MS του θυγατρικού ιόντος $[M+H]^+$ της ινδολο-3-ακετυλο-σερίνης (Σχήμα E.1.d) και αντιστοιχεί στο ιόν κινολινίου.^{2,3}



Σχήμα Ε.2. Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης στον θετικό ιοντισμό ESI

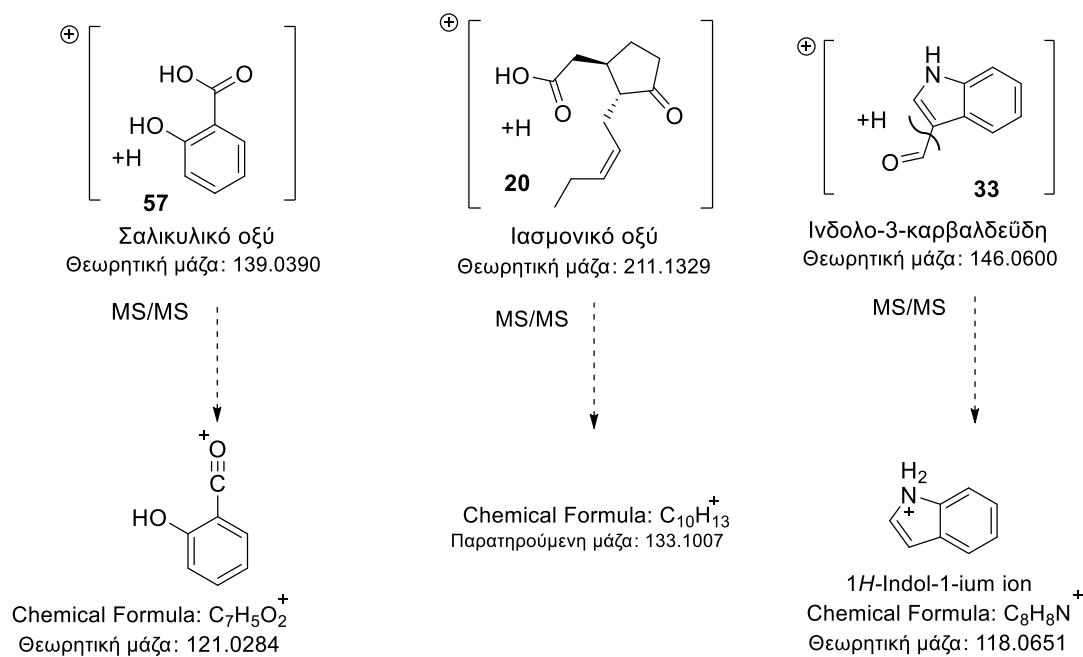
Θραυσματοποίηση των Ενώσεων στον Θετικό Ιοντισμό (ESI)

Στα φάσματα MS/MS των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με τα αμινοξέα (**37-56**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**) και του ινδολο-3-οξικού οξέος (**1**), στο θετικό ιοντισμό ESI, το κύριο θυγατρικό ιόν που ανιχνεύθηκε ήταν το 3-μεθυλενο-3*H*-ινδολ-1-ιο ιόν, το οποίο όπως προαναφέρθηκε στη ενότητα Δ.3.5, μπορεί να μετατραπεί στο σταθερό ιόν κινολινίου (Σχήμα Ε.3).^{2,3} Αυτό το ιόν προκύπτει με β-θραύση, ως προς το αρωματικό σύστημα, της ανοιχτής αλυσίδας. Έτσι, από τις ενώσεις 37-56 γίνεται απόσπασση του μορίου του αμινοξέος, από το νιτριλίου του μορίου HCN, από το ινδολο-3-οξικό οξύ (**1**) και του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος (**3**) ένα μόριο H₂O και ένα μόριο CO, και από το ινδολο-3-ακεταμίδιο (**36**) ένα μόριο NH₃ και ένα μόριο CO. Από το 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ (**3**) προκύπτει το 4-χλωροϋποκατεστημένο ιόν (3-μεθυλενο-3*H*-ινδολ-4-υλ)χλωρόνιο ή το 5-χλωροκινολινικό ιόν.



Σχήμα Ε.3. Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος (**37-56**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ινδολο-3-οξικού οξέος (**1**) του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**) και του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος (**3**), στον θετικό ιοντισμό ESI

Στο φάσμα MS/MS της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**) ανιχνεύθηκε το 1*H*-ινδόλ-1-ιο ιόν με m/z 118.0653 με απόσπαση CO (Σχήμα Ε.4). Στο φάσμα MS/MS του ιασμονικού οξέος (**20**), ανιχνεύθηκε το θυγατρικό ιόν με m/z 133.1007 και του σαλικυλικού οξέος (**57**) με m/z 121.0285 μετά από απόσπαση ενός μορίου H₂O (Σχήμα Ε.4).



Σχήμα Ε.4. Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**), του ιασμονικού οξέος (**20**) και του σαλικυλικού οξέος (**57**), στον θετικό ιοντισμό ESI

Στον πίνακα Ε.2 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα από τα φάσματα MS/MS των ενώσεων που μελετήθηκαν στον θετικό ιοντισμό, με την παρατηρούμενη και την θεωρητική μάζα των θραυσμάτων και τον προτεινόμενο μοριακό τύπο από το λογισμικό Agilent MassHunter Qualitative Analysis. Για όλους τους προτεινόμενους μοριακούς τύπους λήφθηκαν υπόψιν ο κανόνας του αζώτου και το σφάλμα μάζας το οποίο πρέπει να είναι χαμηλότερο από 5 ppm.

Πίνακας Ε.2. Χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα στον θετικό ESI ιοντισμό

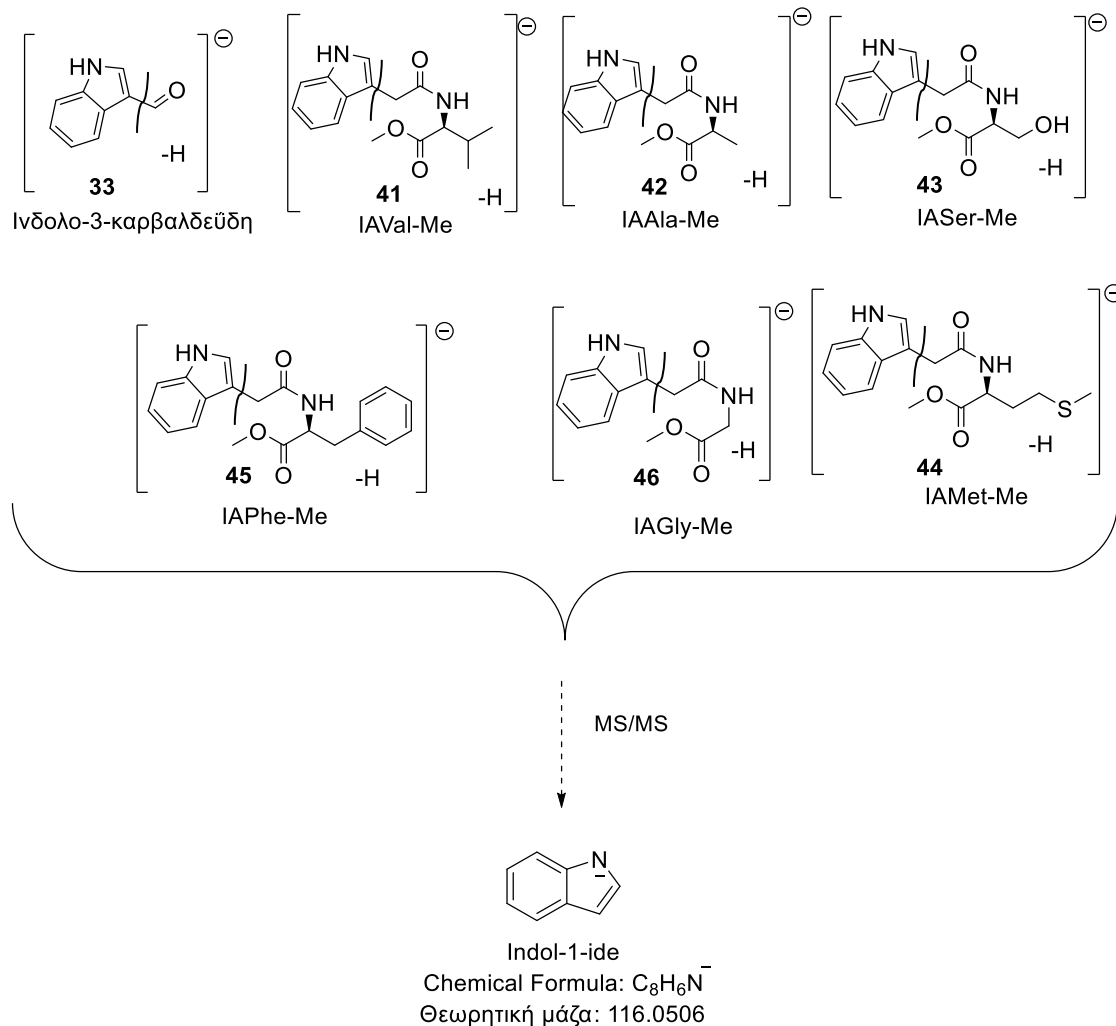
| Ενώσεις | Προτεινόμενος μοριακός τύπος θραύσματος | Θεωρητική μάζα θραύσματος (<i>m/z</i>) | Παρατηρούμενη μάζα θραύσματος (<i>m/z</i>) | Σφάλμα μάζας (ppm) |
|-----------------------|---|---|---|--------------------------|
| I3CHO | C ₈ H ₈ N ⁺ | 118.0651 | 118.0653 | 1.7 |
| JA | C ₁₀ H ₁₃ ⁺ | | 133.1007 | |
| SA | C ₇ H ₅ O ₂ ⁺ | 121.0284 | 121.0285 | 0.8 |
| 4-Cl-IAA | C ₉ H ₇ ClN ⁺ | 164.0252 | 164.0252 | 0 |
| | | 166.0223 | 166.0231 | 4.8 |
| IAN | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0655 | 3.1 |
| IAM | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0650 | 0.8 |
| IAA | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0651 | 0 |
| IAAla | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0649 | 1.5 |
| IVal | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0651 | 0 |
| IAgly | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0649 | 1.5 |
| IAMet | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0650 | 0.8 |
| IATrp | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0649 | 1.5 |
| IATyr | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0649 | 1.5 |
| IASer | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0650 | 0.8 |
| IAPhe | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0645 | 4.6 |
| IAAsp | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0652 | 0.8 |
| IAGlu | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0646 | 3.8 |
| IAAla-Me | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0648 | 2.3 |
| IVal-Me | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0649 | 1.5 |
| IATrp-Me | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0651 | 0 |
| IATyr-Me | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0647 | 3.1 |
| IASer-Me | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0656 | 3.8 |
| IAPhe-Me | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0655 | 3.1 |
| IAGly-Me | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0648 | 2.3 |
| IAMet-Me | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0648 | 2.3 |
| IAGlu-Me ₂ | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0645 | 4.6 |
| IAAsp-Me ₂ | C ₉ H ₈ N ⁺ | 130.0651 | 130.0653 | 1.5 |

Θραυσματοποίηση των Ενώσεων στον Αρνητικό Ιοντισμό (ESI)

Στον αρνητικό ιοντισμό, στα φάσματα MS/MS, δεν παρατηρήθηκε κοινό μοτίβο θραυσματοποίησης για τα συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με τα αμινοξέα. Ωστόσο στα φάσματα MS/MS ορισμένων συζευγμάτων ανιχνεύθηκαν κοινά θυγατρικά ιόντα.

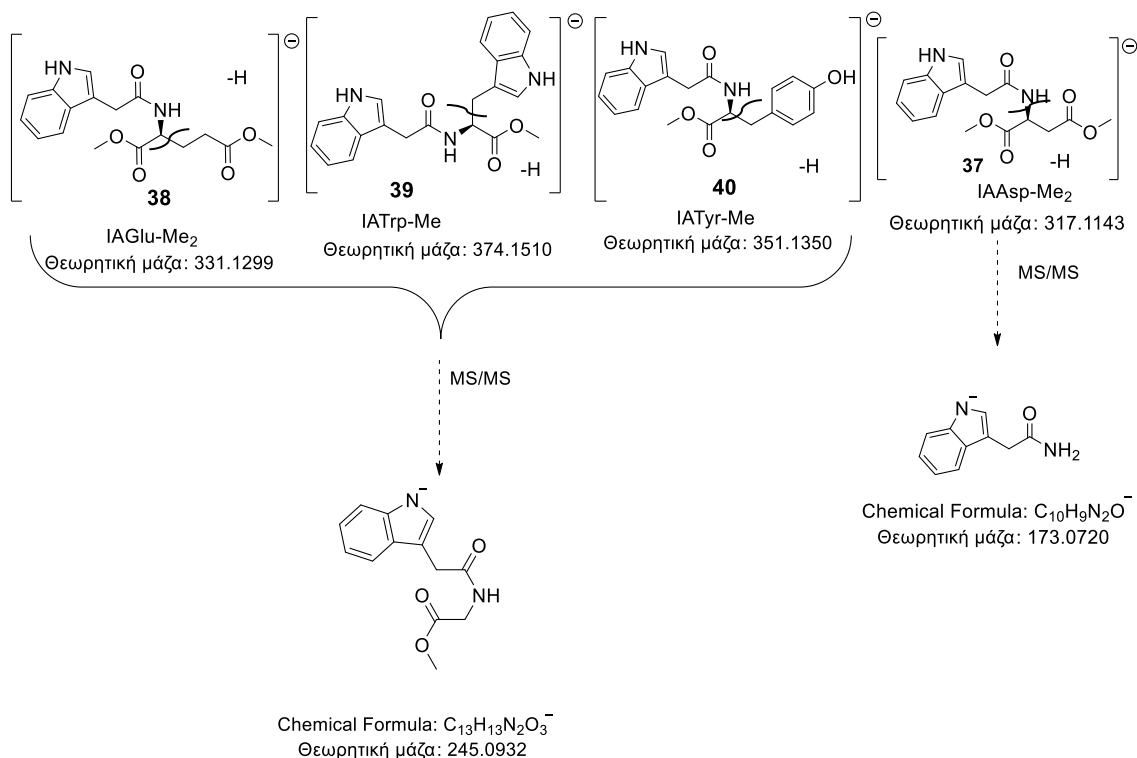
Το ινδολ-1-ίδιο με *m/z* 116.0506, ανιχνεύθηκε στα φάσματα MS/MS της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης και των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με τους μεθυλεστέρες των αμινοξέων βαλίνης (**41**), αλανίνης (**42**), σερίνης (**43**), μεθειονίνης (**44**),

φαινυλαανίνης (**45**) και γλυκίνης (**46**) (Σχήμα Ε.5). Είναι αποτέλεσμα της α-θραύσης της ανοιχτής αλυσίδας στη θέση C-3 του ινδολικού δακτυλίου.



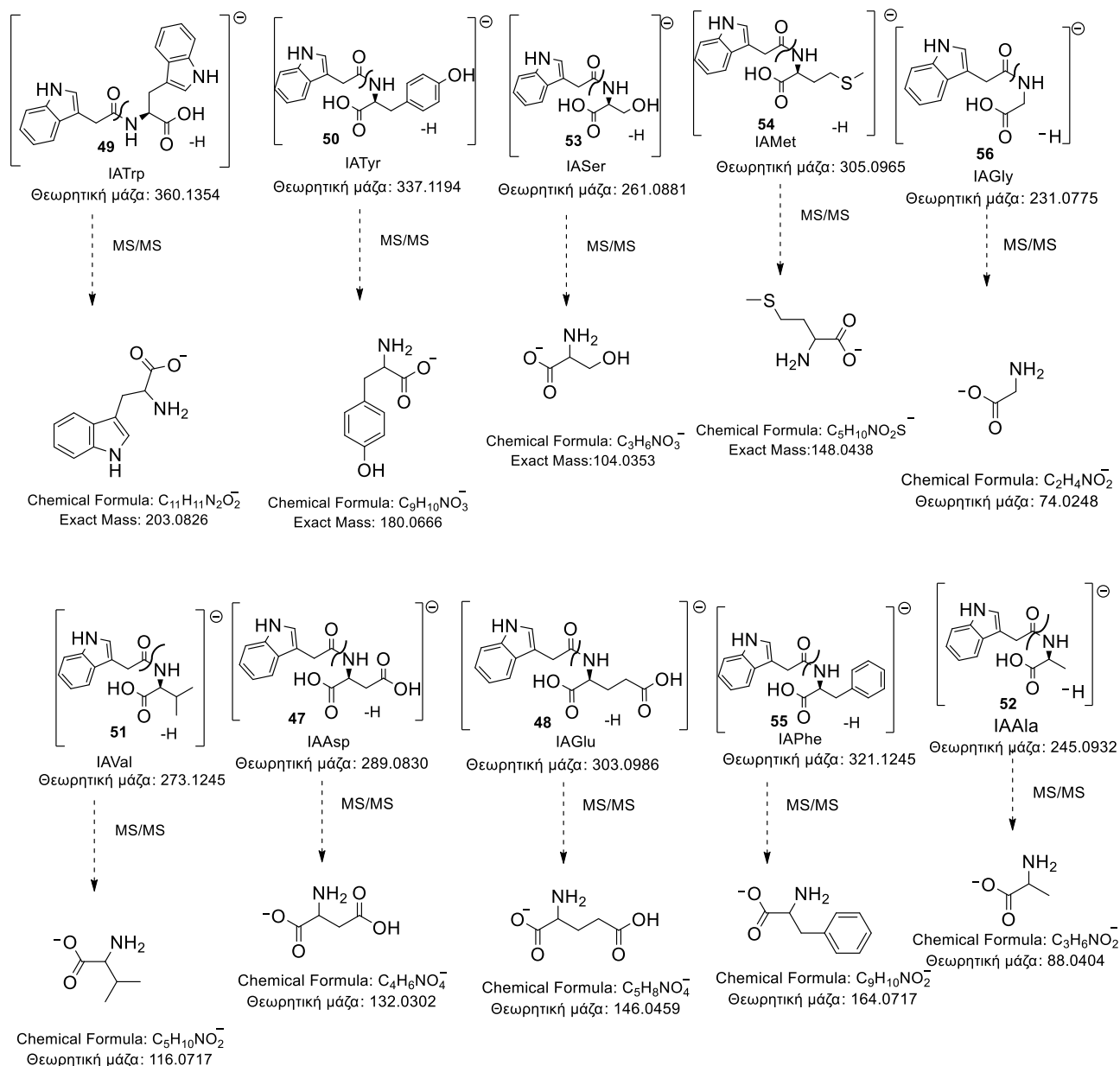
Σχήμα Ε.5. Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**) και των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος (**41-46**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI

Στο φάσμα MS/MS των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με τον διμεθυλεστέρα του γλουταμινικού οξέος (**38**), τον μεθυλεστέρα της θρυπτοφάνης (**39**) και της τυροσίνης (**40**), ανιχνεύθηκε ένα θυγατρικό ιόν που αντιστοιχεί σε m/z 245.0923, αποτέλεσμα της β-θραύσης ως προς την α-καρβοξυλομάδα των αμινοξέων. Το σύζευγμα του ινδολο-3-οξικού οξέος με τον διμεθυλεστέρα του ασπαρτικού οξέος (**37**), στο φάσμα MS/MS, έδωσε θυγατρικό ιόν με m/z 173.0714 (Σχήμα Ε.6).



Σχήμα Ε.6. Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με τον διμεθυλεστέρα του γλουταμινικού οξέος (**38**), τον μεθυλεστέρα της θρυπτοφάνης (**39**) και της τυροσίνης (**40**) και τον διμεθυλεστέρα του ασπαρτικού οξέος (**37**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI

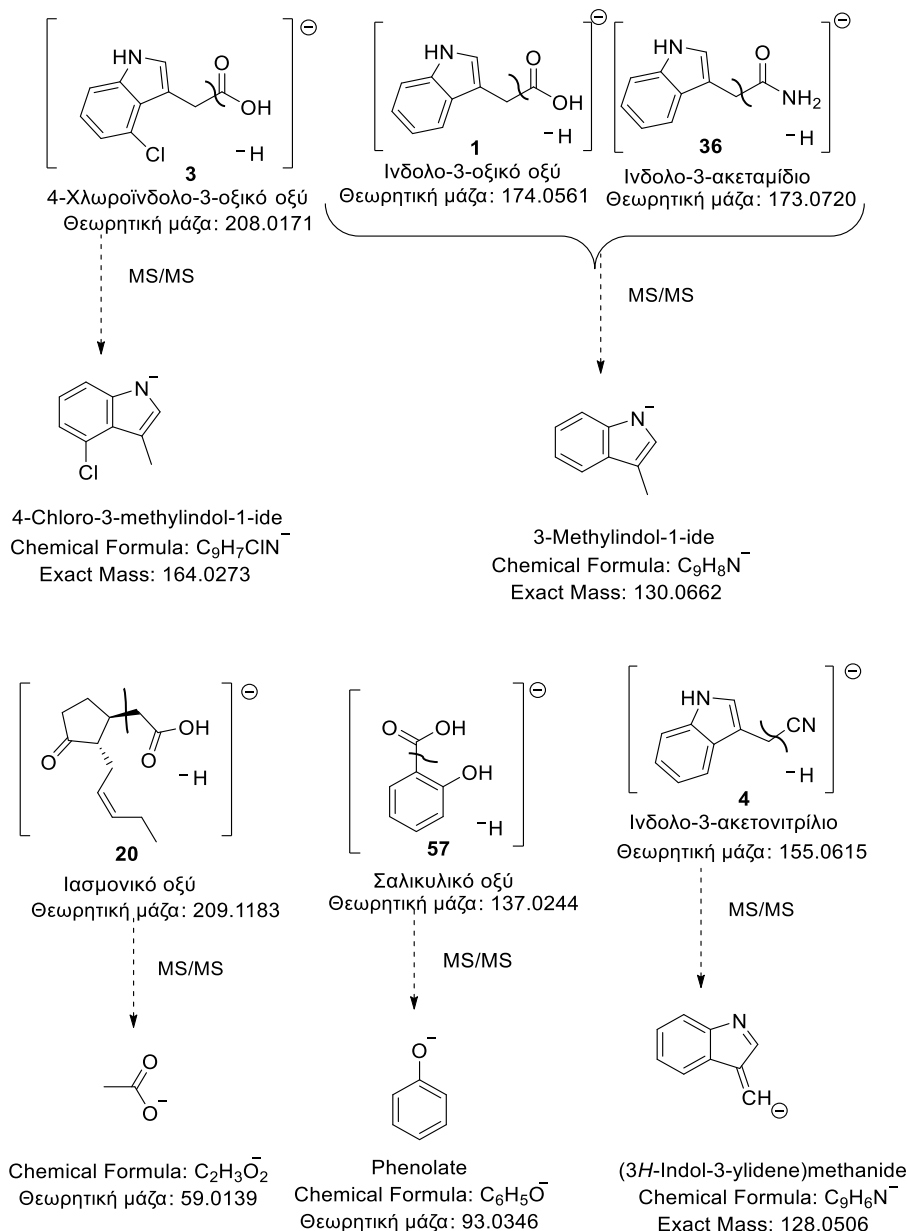
Τα συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με την θρυπτοφάνη (**49**) και τη τυροσίνη (**50**), στο φάσμα MS/MS, έδωσαν θυγατρικά ιόντα, με m/z 203.0825 και m/z 180.0657, αντίστοιχα. Στο φάσμα MS/MS των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με τη σερίνη (**53**), την μεθειονίνη (**54**) και τη βαλίνη (**51**), ανιχνεύθηκαν τα ιόντα με m/z 104.0350, m/z 148.0434 και m/z 116.0717, αντίστοιχα. Τα συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με την αλανίνη (**52**) και τη γλυκίνη (**56**), στο φάσμα MS/MS, έδωσαν ως θυγατρικά ιόντα τα m/z 88.0404 και m/z 74.0248, αντίστοιχα. Στο φάσμα MS/MS των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με το ασπαρτικό οξύ (**47**), το γλουταμινικό οξύ (**48**) και την φαινυλαλανίνη (**55**) ανιχνεύθηκαν τα ιόντα με m/z 132.0300, m/z 146.0454 και m/z 164.0709, αντίστοιχα, (Σχήμα Ε.7). Σε όλα τα αμιδικά συζεύγματα (**47**) έως και (**56**), τα θυγατρικά ιόντα προκύπτουν με θραύση του αμιδικού δεσμού και αντιστοιχούν στα ιόντα των αμινοξέων.



Σχήμα Ε.7. Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με την θρυπτοφάνη (49), την τυροσίνη (50) την σερίνη (53), την μεθειονίνη (54), τη γλυκίνη (56), την βαλίνη (51), ασπαρτικό οξύ (47), γλουταμινικό οξύ (48), φαινυλαλανίνη (55) και την αλανίνη (52), στον αρνητικό ιοντισμό ESI

Στο φάσμα MS/MS του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος (3) ανιχνεύθηκε ένα θυγατρικό ιόν που αντιστοιχεί στο 4-χλωρο-3-μεθυλοϊνδολ-1-ίδιο με m/z 164.0271, μετά από απόσπαση ενός μορίου CO_2 , ενώ στο φάσμα MS/MS του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (4) ανιχνεύθηκε ένα θυγατρικό ιόν που αντιστοιχεί στο (3H-ινδολ-υλιδενο)μεθανίδιο με m/z 128.0506 (Σχήμα Ε.8), μετά από απόσπαση ενός μορίου HCN. Στο φάσμα MS/MS

του ινδολο-3-οξικού οξέος (**1**) και του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**) ανιχνεύθηκε ένα θυγατρικό ιόν που αντιστοιχεί στο 3-μεθυλοϊνδολ-1-ίδιο με m/z 130.0662 (Σχήμα Ε.8). Στο φάσμα MS/MS του ιασμονικού οξέος (**20**) ανιχνεύθηκε ένα θυγατρικό ιόν που αντιστοιχεί στο οξικό ιόν με m/z 59.0139, ενώ στο φάσμα MS/MS του σαλικυλικού οξέος (**57**) ανιχνεύθηκε το θυγατρικό ιόν που αντιστοιχεί στο φαινολικό ιόν με m/z 93.0346 (Σχήμα Ε.8).



Σχήμα Ε.8. Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος (**3**), του ινδολο-3-οξικού οξέος (**1**), του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**), του ινδολο-3-ακετονιτρίλιου (**4**), του ιασμονικού οξέος (**20**) και του σαλικυλικού οξέος (**57**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI

Στον πίνακα Ε.3 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα από τα φάσματα MS/MS των ενώσεων που μελετήθηκαν στον αρνητικό ιοντισμό, με την παρατηρούμενη και την θεωρητική μάζα των θραυσμάτων και τον προτεινόμενο μοριακό τύπο από το λογισμικό Agilent MassHunter Qualitative Analysis. Για όλους τους προτεινόμενους μοριακούς τύπους λήφθηκαν υπόψιν ο κανόνας του αζώτου και το σφάλμα μάζας το οποίο πρέπει να είναι χαμηλότερο από 5 ppm.

Πίνακας Ε.3. Χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα στον αρνητικό ESI ιοντισμό

| Ενώσεις | Προτεινόμενος μοριακός τύπος θραύσματος | Θεωρητική μάζα θραύσματος (<i>m/z</i>) | Παρατηρούμενη μάζα θραύσματος (<i>m/z</i>) | Σφάλμα μάζας (ppm) |
|-----------------------|--|--|---|--------------------------|
| I3CHO | C ₈ H ₆ N ⁻ | 116.0506 | 116.0503 | 2.6 |
| IAAla-Me | C ₈ H ₆ N ⁻ | 116.0506 | 116.0503 | 2.6 |
| IVal-Me | C ₈ H ₆ N ⁻ | 116.0506 | 116.0501 | 4.3 |
| ISer-Me | C ₈ H ₆ N ⁻ | 116.0506 | 116.0504 | 0.8 |
| IAPhe-Me | C ₈ H ₆ N ⁻ | 116.0506 | 116.0503 | 2.6 |
| IAGly-Me | C ₈ H ₆ N ⁻ | 116.0506 | 116.0505 | 0.9 |
| AMet-Me | C ₈ H ₆ N ⁻ | 116.0506 | 116.0508 | 1.7 |
| AGlu-Me ₂ | C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ ⁻ | 245.0932 | 245.0921 | 4.5 |
| ATrp-Me | C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ ⁻ | 245.0932 | 245.0923 | 3.7 |
| ATyr-Me | C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ ⁻ | 245.0932 | 245.0923 | 3.7 |
| IAM | C ₉ H ₈ N ⁻ | 130.0652 | 130.0658 | 4.6 |
| IAA | C ₉ H ₈ N ⁻ | 130.0652 | 130.0656 | 3.1 |
| IAN | C ₉ H ₆ N ⁻ | 128.0506 | 128.0508 | 1.6 |
| JA | C ₂ H ₃ O ₂ ⁻ | 59.0139 | 59.0140 | 1.7 |
| SA | C ₆ H ₅ O ⁻ | 93.0346 | 93.0345 | 1.1 |
| 4-Cl-IAA | C ₉ H ₇ ClN ⁻ | 164.0273 | 164.0271 | 1.2 |
| | | 166.0244 | 166.0246 | 1.2 |
| IAAla | C ₃ H ₆ NO ₂ ⁻ | 88.0404 | 88.0405 | 1.1 |
| IVal | C ₅ H ₁₀ NO ₂ ⁻ | 116.0717 | 116.0717 | 0 |
| IAGly | C ₂ H ₄ NO ₂ ⁻ | 74.0248 | 74.0246 | 2.7 |
| AMet | C ₅ H ₁₀ NO ₂ S ⁻ | 148.0438 | 148.0434 | 2.7 |
| ATrp | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂ ⁻ | 203.0826 | 203.0825 | 0.5 |
| ATyr | C ₉ H ₁₀ NO ₃ ⁻ | 180.0666 | 180.0657 | 5.0 |
| ASer | C ₃ H ₆ NO ₃ ⁻ | 104.0353 | 104.0350 | 2.9 |
| IAPhe | C ₉ H ₁₀ NO ₂ ⁻ | 164.0717 | 164.0709 | 4.9 |
| IAAsp | C ₄ H ₆ NO ₄ ⁻ | 132.0302 | 132.0300 | 1.5 |
| IAGlu | C ₅ H ₈ NO ₄ ⁻ | 146.0459 | 146.0454 | 3.4 |
| IAAsp-Me ₂ | C ₁₀ H ₉ N ₂ O ⁻ | 173.0720 | 173.0714 | 3.5 |

Ε.6. Επικύρωση Μεθόδου – Γραμμικότητα και Όρια Ανίχνευσης

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των 27 ενώσεων του πίνακα Ε1 πραγματοποιήθηκε στον αρνητικό ESI ιοντισμό καθώς διαπιστώθηκε από την μελέτη με FIA ότι υπήρχε μεγαλύτερη αφθονία του μοριακού τους ιόντος σε σχέση με τον θετικό ιοντισμό. Η ταυτοποίηση βασίστηκε στο χρόνο έκλουσης με βάση τις πρότυπες ενώσεις, την ακριβή μάζα των ιόντων [M-H]⁻ και το φάσμα MS/MS. Για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το εμβαδό της κορυφής του χρωματογραφήματος του εξαγόμενου ιόντος. Τα χαρακτηριστικά ιόντα, το σφάλμα μάζας και η ένταση της κορυφής στον αρνητικό και θετικό ESI ιοντισμό φαίνονται στους πίνακες Ε.4 και Ε.5, αντίστοιχα.

Πίνακας Ε.4. Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον αρνητικό ESI ιοντισμό

| Ενώσεις | Θεωρητική μάζα (m/z) [M-H] ⁻ | Παρατηρούμενη μάζα (m/z) [M-H] ⁻ | Σφάλμα μάζας (ppm) | Ένταση κορυφής [M-H] ⁻ | Κύρια θραύσματα (m/z) |
|-----------------------|---|---|--------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| I3CHO | 144.0455 | 144.0451 | 2.8 | 5.5x10 ⁵ | 116.0503 |
| IAN | 155.0615 | 155.0615 | 0.0 | 1.5x10 ⁴ | 128.0508 |
| JA | 209.1183 | 209.1179 | 1.9 | 5.4x10 ⁵ | 59.0140 |
| SA | 137.0244 | 137.0242 | 1.5 | 5.8x10 ⁵ | 93.0345 |
| 4-Cl-IAA | 208.0171 | 208.0167 | 1.9 | 5.0x10 ⁵ | 164.0271 |
| | 210.0142 | 210.0136 | 2.9 | 1.6x10 ⁵ | 166.0246 |
| IAM | 173.0720 | 173.0716 | 2.3 | 4.4x10 ⁴ | 130.0658 |
| IAA | 174.0561 | 174.0555 | 3.4 | 4.0x10 ⁴ | 130.0656 |
| IAAla | 245.0932 | 245.0928 | 1.6 | 2.8x10 ⁵ | 88.0405 |
| IVal | 273.1245 | 273.1240 | 1.8 | 4.8x10 ⁵ | 116.0717 |
| IAGly | 231.0775 | 231.0770 | 2.2 | 3.3x10 ⁵ | 74.0246 |
| IAMet | 305.0965 | 305.0960 | 1.6 | 5.5x10 ⁵ | 148.0434 |
| IATrp | 360.1354 | 360.1351 | 0.8 | 3.5x10 ⁴ | 203.0825 |
| IATyr | 337.1194 | 337.1191 | 0.9 | 2.3x10 ⁴ | 180.0657 |
| IASer | 261.0881 | 261.0877 | 1.5 | 4.6x10 ⁵ | 104.0350 |
| IAPhe | 321.1245 | 321.1241 | 1.2 | 6.8x10 ⁴ | 164.0709 |
| IAAsp | 289.0830 | 289.0821 | 3.1 | 2.3x10 ⁶ | 132.0300 |
| IAGlu | 303.0986 | 303.0980 | 2.0 | 1.0x10 ⁶ | 146.0454 |
| IAAla-Me | 259.1088 | 259.1082 | 2.3 | 8.1x10 ⁵ | 116.0503 |
| IVal-Me | 287.1401 | 287.1396 | 1.7 | 4.8x10 ⁵ | 116.0501 |
| IATrp-Me | 374.1510 | 374.1502 | 2.1 | 5.1x10 ⁵ | 245.0923 |
| IATyr-Me | 351.1350 | 351.1344 | 1.7 | 7.1x10 ⁵ | 245.0923 |
| IASer-Me | 275.1037 | 275.1031 | 2.2 | 5.0x10 ⁵ | 116.0504 |
| IAPhe-Me | 335.1401 | 335.1395 | 1.8 | 5.0x10 ⁵ | 116.0503 |
| IAGly-Me | 245.0932 | 245.0923 | 3.7 | 1.6x10 ⁶ | 116.0505 |
| IAMet-Me | 319.1122 | 319.1117 | 1.6 | 4.9x10 ⁵ | 116.0508 |
| IAAsp-Me ₂ | 317.1143 | 317.1136 | 2.2 | 4.7x10 ⁵ | 173.0714 |
| IAGlu-Me ₂ | 331.1299 | 331.1290 | 2.7 | 0.9x10 ⁶ | 245.0921 |

Πίνακας Ε.5. Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό

| Ενώσεις | Θεωρητική μάζα (m/z) [M+H] ⁺ | Παρατηρούμενη μάζα (m/z) [M+H] ⁺ | Σφάλμα μάζας (ppm) | Ένταση κορυφής [M+H] ⁺ | Κύρια θραύσματα (m/z) |
|-----------------------|---|---|--------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| I3CHO | 146.0600 | 146.0601 | 0.7 | 4.0x10 ⁵ | 118.0653 |
| IAN | 157.0760 | 157.0770 | 6.4 | 1.4x10 ⁴ | 130.0655 |
| JA | 211.1329 | 211.1328 | 0.5 | 2.5x10 ⁴ | 133.1007 |
| SA | 139.0390 | 139.0390 | 0.0 | 6.0x10 ³ | 121.0285 |
| 4-Cl-IAA | 210.0316 | 210.0317 | 0.5 | 1.4x10 ⁵ | 164.0252 |
| | 212.0287 | 212.0290 | 1.4 | 0.5x10 ⁵ | 166.0231 |
| IAM | 175.0866 | 175.0868 | 1.1 | 4.0x10 ⁴ | 130.0650 |
| IAA | 176.0706 | 176.0704 | 1.1 | 1.8x10 ⁴ | 130.0651 |
| IAAla | 247.1077 | 247.1079 | 0.8 | 2.5x10 ⁵ | 130.0649 |
| IAVal | 275.1390 | 275.1391 | 0.4 | 4.5x10 ⁵ | 130.0651 |
| IAGly | 233.0921 | 233.0919 | 0.9 | 2.5x10 ⁵ | 130.0649 |
| IAMet | 307.1111 | 307.1113 | 0.7 | 3.0x10 ⁵ | 130.0650 |
| IATrp | 362.1499 | 362.1499 | 0.0 | 2.7x10 ⁴ | 130.0649 |
| IATyr | 339.1339 | 339.1341 | 0.6 | 2.8x10 ⁴ | 130.0649 |
| IASer | 263.1026 | 263.1028 | 0.8 | 2.4x10 ⁵ | 130.0650 |
| IAPhe | 323.1390 | 323.1392 | 0.6 | 6.0x10 ⁵ | 130.0645 |
| IAAsp | 291.0975 | 291.0979 | 1.4 | 6.0x10 ⁵ | 130.0652 |
| IAGlu | 305.1132 | 305.1139 | 2.3 | 5.0x10 ⁶ | 130.0646 |
| IAAla-Me | 261.1234 | 261.1235 | 0.4 | 8.0x10 ⁵ | 130.0648 |
| IAVal-Me | 289.1547 | 289.1550 | 1.0 | 3.0x10 ⁵ | 130.0649 |
| IATrp-Me | 376.1656 | 376.1660 | 1.1 | 3.0x10 ⁵ | 130.0651 |
| IATyr-Me | 353.1496 | 353.1497 | 0.3 | 2.3x10 ⁵ | 130.0647 |
| IASer-Me | 277.1183 | 277.1186 | 1.1 | 1.6x10 ⁵ | 130.0656 |
| IAPhe-Me | 337.1547 | 337.1547 | 0.0 | 4.5x10 ⁵ | 130.0655 |
| IAGly-Me | 247.1077 | 247.1084 | 2.8 | 3.5 x10 ⁵ | 130.0648 |
| IAMet-Me | 321.1267 | 321.1273 | 1.9 | 4.5x10 ⁵ | 130.0648 |
| IAAsp-Me ₂ | 319.1288 | 319.1288 | 0.0 | 3.0x10 ⁵ | 130.0653 |
| IAGlu-Me ₂ | 333.1445 | 333.1441 | 1.2 | 0.8x10 ⁶ | 130.0645 |

Η γραμμικότητα της νέας μεθόδου (Πίνακας Ε.6), προσδιορίστηκε από την καμπύλη βαθμονόμησης των 27 ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ενώ τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις εξισώσεις Δ.5 και Δ.6 (§ Δ.3.6). Οι καμπύλες βαθμονόμησης των ενώσεων δίδονται στο παράρτημα.

Πίνακας Ε.6. Αναλυτικές παράμετροι για τον προσδιορισμό των φυτορμονών

| Ένωση | Συντελεστής γραμμικότητας r | LOD ^α (ng/mL) | LOQ ^β (ng/mL) | Γραμμική περιοχή (ng/mL) | Χρόνος κατακράτησης (min) |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| IAA | 0.9999 | 97.8 | 296.3 | 2-10000 | 13.12 |
| I3CHO | 0.9998 | 64.2 | 194.7 | 2-5000 | 12.82 |
| IAN | 0.9999 | 30.6 | 92.7 | 8-2000 | 13.38 |
| JA | 0.9996 | 8.4 | 25.5 | 2-300 | 14.26 |
| SA | 0.9999 | 4.7 | 14.1 | 2-300 | 13.62 |
| 4-Cl-IAA | 0.9996 | 7.4 | 22.5 | 2-300 | 13.93 |
| IAM | 0.9996 | 7.9 | 23.9 | 2-300 | 12.80 |
| IAAla | 0.9998 | 6.0 | 18.1 | 2-300 | 12.64 |
| IAGly | 1 | 2.3 | 7.1 | 2-300 | 11.76 |
| IVal | 0.9997 | 7.5 | 22.8 | 2-300 | 13.86 |
| IATrp | 0.9998 | 6.0 | 18.2 | 2-300 | 14.15 |
| IATyr | 0.9998 | 5.4 | 16.4 | 2-300 | 13.51 |
| IASer | 0.9998 | 6.1 | 18.3 | 2-300 | 11.29 |
| IAPhe | 0.9997 | 6.6 | 20.0 | 2-300 | 14.35 |
| IAMet | 0.9999 | 4.6 | 14.1 | 2-300 | 13.72 |
| IAAsp | 0.9991 | 12.8 | 38.9 | 2-300 | 11.71 |
| IAGlu | 0.9995 | 9.4 | 28.5 | 2-300 | 11.99 |
| IAGly-Me | 1 | 2.2 | 6.7 | 2-300 | 12.65 |
| IAAla-Me | 1 | 2.4 | 7.3 | 2-300 | 13.22 |
| IVal-Me | 0.9999 | 3.3 | 10.1 | 2-300 | 14.24 |
| IATrp-Me | 0.9998 | 6.0 | 18.2 | 2-300 | 14.43 |
| IATyr-Me | 0.9998 | 5.2 | 15.9 | 2-300 | 13.86 |
| IASer-Me | 0.9999 | 4.8 | 14.5 | 2-300 | 12.34 |
| IAPhe-Me | 0.9999 | 3.8 | 11.5 | 2-300 | 14.56 |
| IAMet-Me | 0.9998 | 5.5 | 16.8 | 2-300 | 14.04 |
| IAAsp-Me ₂ | 0.9999 | 3.9 | 11.9 | 2-300 | 13.31 |
| IAGlu-Me ₂ | 0.9998 | 5.5 | 16.7 | 2-300 | 13.50 |

^αLOD: Όριο ανίχνευσης, ^βLOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

Ε.7. Ανάλυση Εκχυλισμάτων Σταυρανθών

Στην οικογένεια Brassicaceae, μέχρι στιγμής, ο προσδιορισμός των αυξινών και των σχετικών μεταβολιτών τους έχει πραγματοποιηθεί μόνο στο γένος Arabidopsis. Για το λόγο αυτό αποφασίσαμε να επεκτείνουμε την μελέτη των ενώσεων αυτών σε άλλα μέλη της οικογένειας Brassicaceae και συγκεκριμένα στα γένη Brassica (κόκκινο λάχανο, λευκό λάχανο, πράσινο μπρόκολο, μωβ μπρόκολο, λευκό κουνουπίδι, ρέβα), Raphanus (ραπανάκι) και Eruca (ρόκα).

Οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν:

- Το ιασμονικό οξύ (JA), ο κύριος εκπρόσωπος της ομάδας των ιασμονικών. Είναι η φυτορμόνη που σηματοδοτεί την ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος απόκρισης σε διάφορα είδη βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων.⁴
- Το σαλικυλικό οξύ (SA), το οποίο συμβάλλει στην ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού.⁵
- Το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) και το 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ (4-Cl-IAA). Οι ενώσεις αυτές αντιπροσωπεύουν την ομάδα των αυξινών και παρουσιάζουν την ισχυρότερη δράση αυξίνης. Οι αυξίνες ρυθμίζουν ή επηρεάζουν διαφορετικές αποκρίσεις σε ολόκληρο το φυτό, όπως τροπισμούς, κυριαρχία κορυφής και έναρξη ριζοβολίας καθώς και τις αποκρίσεις σε κυτταρικό επίπεδο, όπως ο διαχωρισμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων.⁶
- Το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (IAN), το ινδολο-3-ακεταμίδιο (IAM) και η ινδολο-3-καρβαδεΐδη (I3CHO). Οι συγκεκριμένες ενώσεις αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού των αυξινών.⁷
- Τα συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με τα αμινοξέα (Ala, Gly, Phe, Tyr, Met, Trp, Ser, Val, Glu, Asp) και τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες τους. Για κάποια από τα οποία, μεταξύ άλλων είναι γνωστό ότι, ρυθμίζουν τα επίπεδα του ινδολο-3-οξικού οξέος στους φυτικούς ιστούς.⁸

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων επιτεύχθηκε με στήλη Agilent (Zorbax C18, 50 x 2.1 mm, 1.8 μm) κατάλληλη για γρήγορο διαχωρισμό των ενώσεων. Έτσι ο συνολικός χρόνος ανάλυσης μαζί με την εξισορρόπηση της στήλης ήταν 28.5 λεπτά. Η συγκέντρωση των φυτορμονών στα σταυρανθή λαχανικά παρουσιάζεται στον πίνακα Ε.7. Η περιεκτικότητα εκφράστηκε σε ppm ανά 1 g ξηρού βάρους (DW).

Πίνακας Ε.7. Περιεκτικότητα φυτορμονών σε σταυρανή λαχανικά

| Ένωση | Περιεκτικότητα (pmol/g DW ^α ±SD ^β , n ^γ =3) | | | | | | | |
|----------------------|--|-------------------|----------|------------|---------------------|-----------------|-----------|-------------------|
| | Λευκό Λάχανο | Κόκκινο Λάχανο | Ρέβα | Κουνουπίδι | Πράσινο Μπρόκολο | Μωβ Μπρόκολο | Ραπανάκι | Ρόκα |
| IAA | 107014±1678 | 358±13 | 3917±98 | 24235±188 | 26737±367 | 94997±2205 | 15846±274 | 1460±39 |
| I3CHO | 72480±704 | 577±8 | 3457±96 | 24087±736 | 23821±91 | 57590±610 | 3240±59 | 62637±927 |
| IAN | 4912±92 | 1069±20 | 1446±57 | 2511±30 | 14062±47 | 1268±25 | 619±29 | n.d. ^δ |
| JA | 1604±69 | 479±4 | 681±7 | 1594±43 | 817±7 | 770±5 | 820±10 | 1189±3 |
| SA | 226±3 | 484±6 | 375±3 | 2757±96 | 984±18 | 5079±105 | 4258±57 | 702±11 |
| 4-Cl-IAA | n.d. | 103±3 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 259±9 | n.d. |
| IAM | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 2485±115 | 205±14 | n.d. |
| IAAla | 23.4±1.0 | 3.28±0.85 | 84.6±3.1 | 51.1±1.0 | 70.2±2.0 | 87.6±2.7 | 98.9±2.4 | 190±2 |
| IVal | 936±27 | n.d. | 103±3 | 305±4 | 337±7 | 337±9 | 1912±42 | n.d. |
| AGly | 112±3 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 166±5 | 242±4 |
| AMet | 65.2±2.4 | 31.3±3.7 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| ATrp | 131±3 | 20.6±0.5 | 37.2±0.9 | 85.9±3.9 | 125±5 | 222±8 | 59.7±1.9 | n.d. |
| ATyr | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 248±12 | n.d. |
| ASer | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 144±5 | 549±27 | n.d. |
| APhe | 293±4 | 30.3±0.8 | 112±5 | n.d. | 72.5±3.1 | 232±4 | 414±16 | n.d. |
| AAsp | n.d. | n.d. | 245±7 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| AGlu | n.d. | n.d. | 41.7±0.6 | n.d. | 263±8 | n.d. | 225±3 | n.d. |
| AGly-Me | 20.5±1.4 | 4.64±0.22 | 76.9±1.1 | 33.3±1.1 | 96.2±1.0 | n.d. | 115±2 | 225±2 |
| AAAla-Me | n.d. | n.d. | 189±7 | n.d. | 108±6 | n.d. | 622±4 | n.d. |
| IVal-Me | 212±6 | 2.14±0.26 | 10.1±1.9 | n.d. | 25.7±1.4 | 83.4±1.8 | 235±20 | 151±4 |
| ATrp-Me | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| ATyr-Me | 3313±45 | n.d. | 128±4 | n.d. | n.d. | 106±2 | 167±3 | 378±7 |
| ASer-Me | 802±31 | 219±4 | 367±24 | n.d. | 252±2 | 278±4 | 245±18 | 225±1 |
| APhe-Me | 49.6±1.3 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| AMet-Me | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| AAsp-Me ₂ | 119±2 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| AGlu-Me ₂ | 122±3 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

^αDW: Ξηρού βάρους, ^βSD: Τυπική απόκλιση, ^γn: Αριθμός επαναλήψεων ^δn.d.: Δεν ανιχνεύθηκε

Προσδιορισμός του ιασμονικού οξέος (JA), του σαλικυλικού οξέος (SA), του ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA) και του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος (4-Cl-IAA) στα σταυρανθή λαχανικά

Το ιασμονικό οξύ ανιχνεύθηκε σε όλα τα σταυρανθή λαχανικά, σε συγκεντρώσεις από 479 ± 4 έως 1604 ± 69 pmol/g DW. Η υψηλότερη συγκέντρωση ιασμονικού οξέος ανιχνεύθηκε στο λευκό λάχανο, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση ήταν στο κόκκινο λάχανο. Η συγκέντρωση του ιασμονικού οξέος στο Arabidopsis σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, κυμαίνεται από 33.3 έως 3447 pmol/g φρέσκου βάρους (FW).^{9,10}

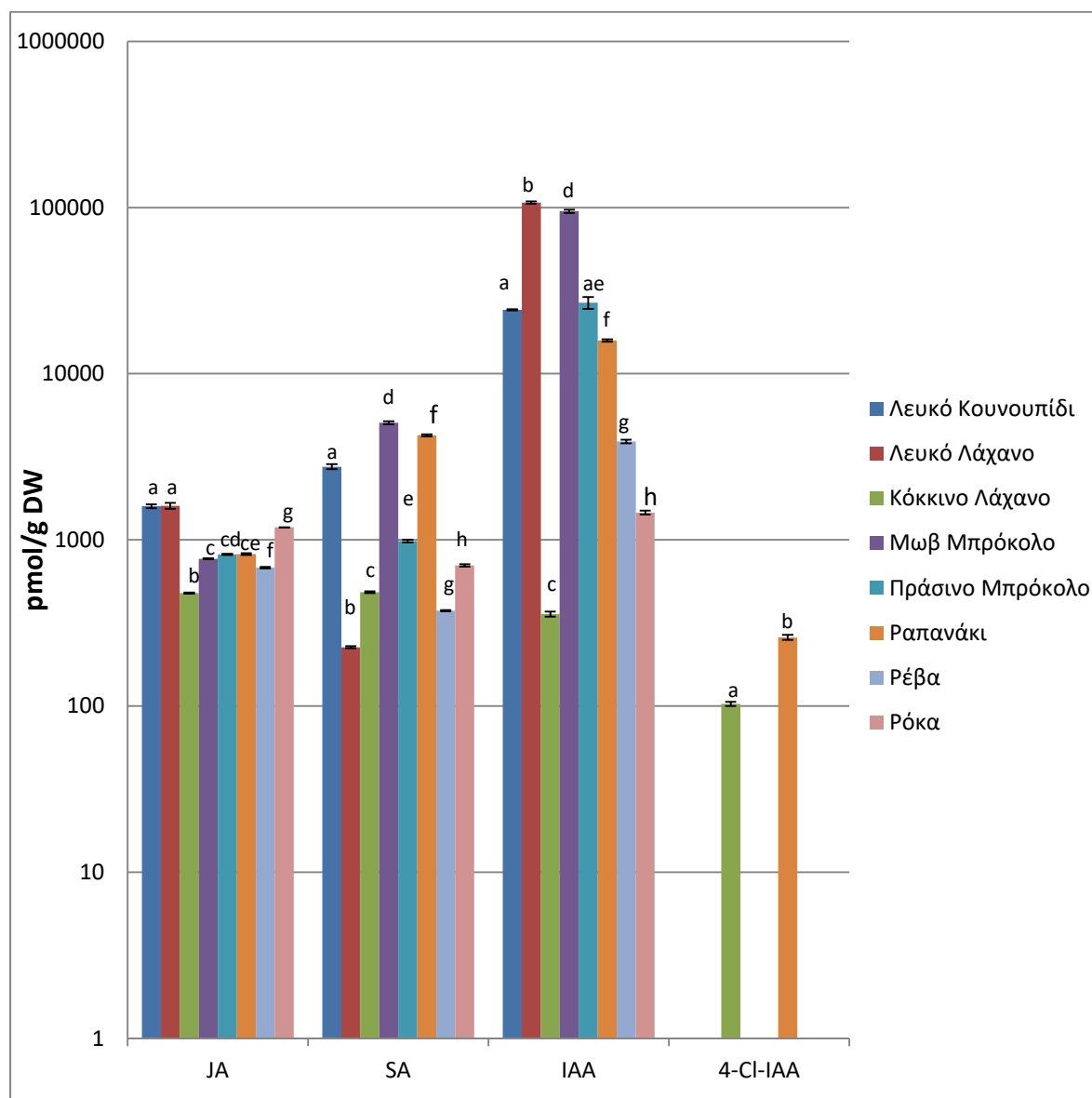
Το σαλικυλικό οξύ ανιχνεύθηκε σε όλα τα σταυρανθή λαχανικά και βρέθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το ιασμονικό οξύ (226 ± 3 έως 5079 ± 105 pmol/g DW). Η υψηλότερη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος βρέθηκε στο μωβ μπρόκολο, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στο λευκό λάχανο. Στο Arabidopsis, η περιεκτικότητα του σαλικυλικού οξέος κυμαίνεται στα 6300-594000 pmol/g FW.^{11,12}

Η περιεκτικότητα των σταυρανθών σε ινδολο-3-οξικό οξύ κυμάνθηκε από 358 ± 13 έως 107014 ± 1678 pmol/g DW, με την υψηλότερη συγκέντρωση να παρατηρείται στο λευκό λάχανο, ενώ στο Arabidopsis, η συγκέντρωση είναι αρκετά υψηλή και κυμαίνεται από 68500-289000 pmol/g FW.^{13,14}

Το 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ ανιχνεύθηκε μόνο στο κόκκινο λάχανο (103 ± 3 pmol/g DW) και στο ραπανάκι (259 ± 9 pmol/g DW). Η συγκέντρωση του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος στο Arabidopsis έχει βρεθεί στα 190-1669 pmol/g FW.^{15,16}

Από το σχήμα Ε.9 παρατηρούμε ότι από τις τέσσερις φυτορμόνες που μελετήθηκαν στα σταυρανθή λαχανικά, το ινδολο-3-οξικό οξύ ανιχνεύθηκε σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος, ήταν υψηλότερη από αυτή του ιασμονικού οξέος και του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος, το οποίο ανιχνεύθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τα αποτελέσματα αυτά ενδεικτικά καθότι η συγκέντρωση των φυτορμονών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως, το είδος του φυτού, τη θέση και την περίοδο δειγματοληψίας αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.¹⁷

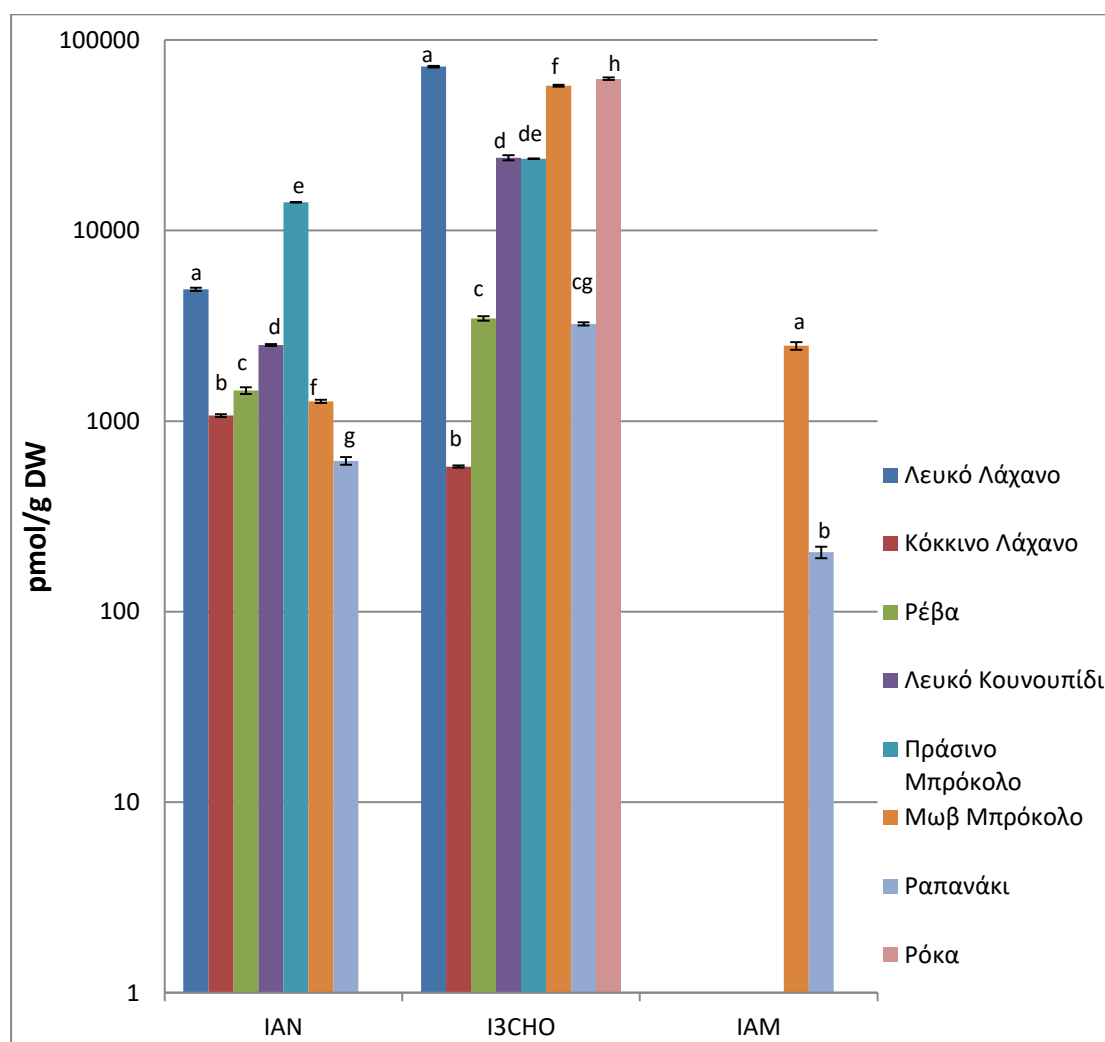


Σχήμα Ε.9. Περιεκτικότητα των σταυρανθών λαχανικών σε ιασμονικό οξύ (JA), σαλικυλικό οξύ (SA), ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) και 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ (4-Cl-IAA). Σύγκριση του μέσου όρου των δειγμάτων (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)

Προσδιορισμός του ινδολο-3-ακεταμιδίου (IAM), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (IAN) και της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (I3CHO) στα σταυρανθή λαχανικά

Το ινδολο-3-ακεταμίδιο ανιχνεύθηκε μόνο στο μωβ μπρόκολο (2485±115 pmol/g DW) και στο ραπανάκι (205±14 pmol/g DW), ενώ το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο ανιχνεύθηκε σε όλα τα σταυρανή, εκτός από τη ρόκα, σε συγκεντρώσεις από 619±29 pmol/g DW (ραπανάκι) έως 14062±47 pmol/g DW (πράσινο μπρόκολο). Η συγκέντρωση του ινδολο-3-ακεταμίδιου και του ινδολο-3-ακετονιτρίλιου στο *Arabidopsis* σύμφωνα με τη βιβλιογραφία κυμαίνεται στα 0.74-900 pmol/g FW και στα 2990-5410 pmol/g FW, αντίστοιχα.^{18,19}

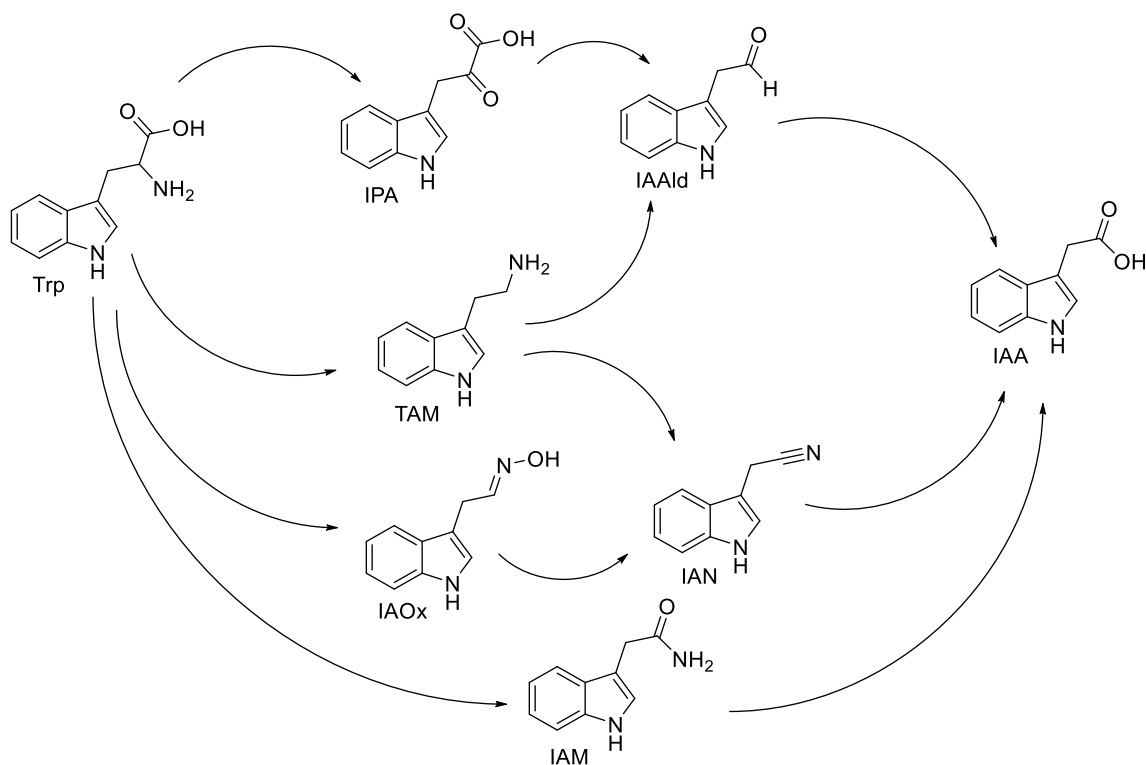
Η ινδολο-3-καρβαλεΐδη ανιχνεύθηκε σε όλα ανεξαιρέτως τα σταυρανή σε συγκεντρώσεις από 577±8 pmol/g DW (κόκκινο λάχανο) έως 72480±704 pmol/g DW (λευκό λάχανο). Η συγκέντρωση της ινδολο-3-καρβαλεΐδης στο *Arabidopsis* σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φτάνει τα 964 pmol/g FW.²⁰



Σχήμα Ε.10. Περιεκτικότητα των σταυρανή λαχανικών σε ινδολο-3-ακεταμίδιο (IAM), ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (IAN) και ινδολο-3-καρβαλεΐδη (I3CHO). Σύγκριση του μέσου όρου των δειγμάτων (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)

Από το σχήμα Ε.10 παρατηρούμε ότι συγκέντρωση της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης είναι υψηλότερη σε σχέση με την συγκέντρωση του ινδολο-3-ακετονιτρίλιου και του ινδολο-3-ακεταμιδίου. Το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο και το ινδολο-3-ακεταμίδιο συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του ινδολο-3-οξικού οξέος από την θρυπτοφάνη. Τόσο το ινδολο-3-ακεταμίδιο όσο και το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο παρουσιάζουν ιδιότητες αυξίνης.⁷

Όπως φαίνεται από το σχήμα Ε.11, τα ενδιάμεσα προϊόντα στη βιοσυνθετική πορεία του ινδολο-3-οξικού οξέος είναι το ινδολο-3-πυροσταφυλικό (IPA), η ινδολο-3-ακεταλδεΐδη (IAAld), η θρυπταμίνη (TAM), το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (IAN), η ινδολο-3-ακεταλδοξίμη (IAOx) και το ινδολο-3-ακεταμίδιο (IAM).⁷



Σχήμα Ε.11. Βιοσύνθεση του ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA) από την θρυπτοφάνη (Trp) στο *Arabidopsis*⁷

Προσδιορισμός των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος στα σταυρανθή λαχανικά

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ύπαρξη των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με τα αμινοξέα αλανίνη (IAAla), βαλίνη (IAVal), γλυκίνη (IAGly), μεθειονίνη (IAMet), θρυπτοφάνη (IATrp), τυροσίνη (IATyr), σερίνη (IASer), φαινυλαλανίνη (IAPhe), ασπαρτικό οξύ (IAAsp), γλουταμινικό οξύ (IAGlu) και των αντίστοιχων μεθυλεστέρων τους (IAAla-Me, IAVal-Me, IAGly-Me, IAMet-Me, IATrp-Me, IATyr-Me, IASer-Me, IAPhe-Me, IAAsp-Me₂, IAGlu-Me₂).

Η IAAla, ανιχνεύθηκε σε όλα τα σταυρανθή που μελετήθηκαν, σε συγκεντρώσεις από $3.28 \pm 0.85 - 190 \pm 2$ pmol/g DW, ενώ ο αντίστοιχος μεθυλεστέρας (IAAla-Me) βρέθηκε στη ρέβα, στο πράσινο μπρόκολο και στο ραπανάκι.

Οι ενώσεις IATrp, IAVal, IAPhe και IAVal-Me ανιχνεύθηκαν σχεδόν σε όλα τα εκχυλίσματα, ενώ η ένωση IATrp-Me δεν βρέθηκε σε κανένα δείγμα.

Η IAMet βρέθηκε στο κόκκινο (31.3 pmol/g DW) και το λευκό λάχανο (65.2 pmol/g DW), αλλά ο αντίστοιχος μεθυλεστέρας (IAMet-Me) δεν ανιχνεύθηκε στα εκχυλίσματα.

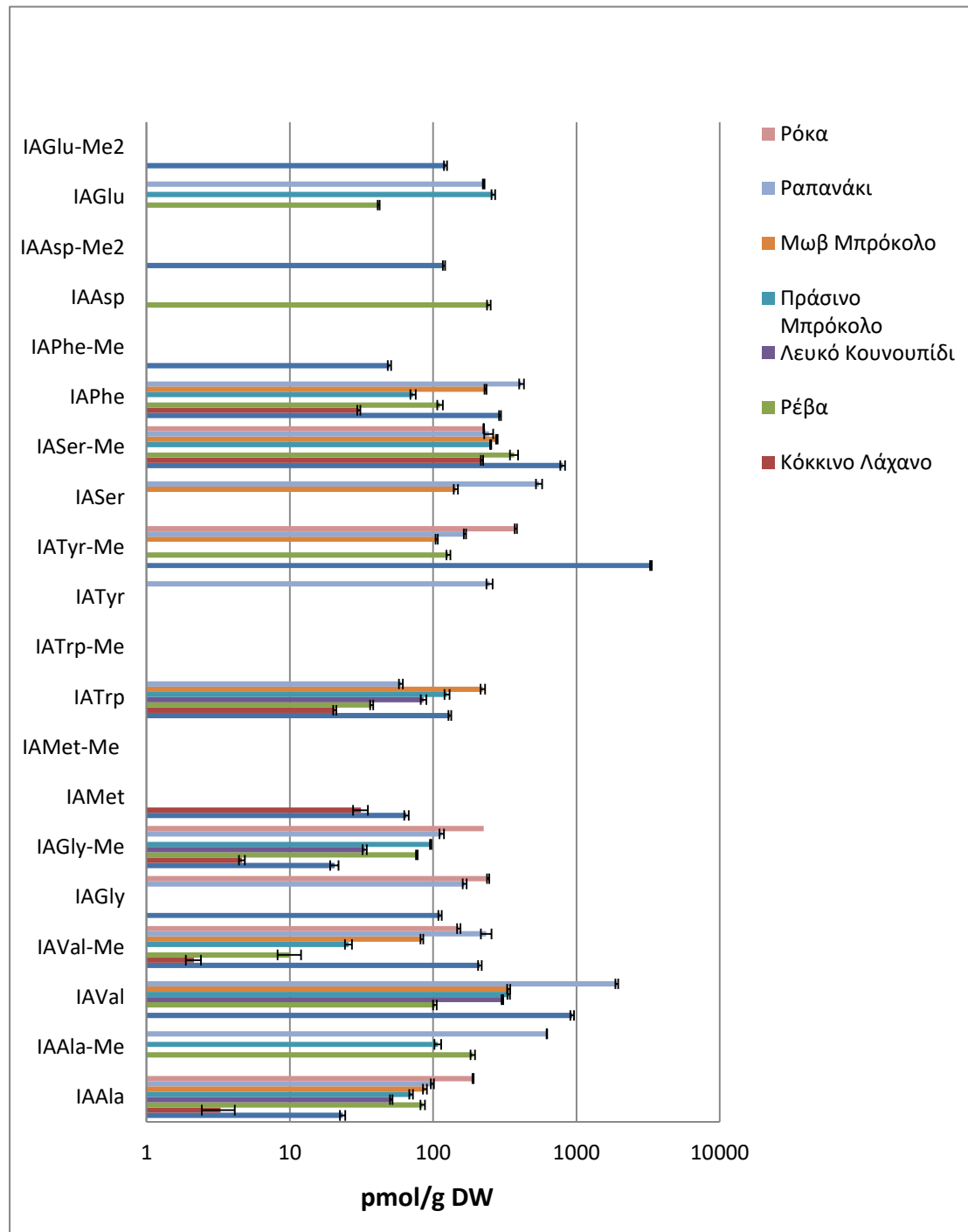
Η IAGly ανιχνεύθηκε μόνο στο λευκό λάχανο (112 ± 3 pmol/g DW), στο ραπανάκι (166 ± 5 pmol/g DW) και στη ρόκα (242 ± 4 pmol/g DW), ενώ ο IAGly-Me ανιχνεύθηκε σε όλα τα σταυρανθή, εκτός από το μωβ μπρόκολο, σε συγκεντρώσεις από 4.64 ± 0.22 έως 225 ± 2 pmol/g DW.

Το IAAsp βρέθηκε μόνο στη ρέβα (245 ± 7 pmol/g DW), ενώ το IAGlu ανιχνεύθηκε στη ρέβα (41.7 ± 0.6 pmol/g DW), στο ραπανάκι (225 ± 3 pmol/g DW) και στο πράσινο μπρόκολο (263 ± 8 pmol/g DW). Οι ενώσεις IAAsp-Me₂ και IAGlu-Me₂ ανιχνεύθηκαν μόνο στο λευκό λάχανο σε χαμηλή συγκέντρωση.

Η IATyr ανιχνεύθηκε μόνο στο ραπανάκι (248 ± 12 pmol/g DW), αλλά ο αντίστοιχος μεθυλεστέρας (IATyr-Me) ανιχνεύθηκε στο λευκό λάχανο, στη ρέβα, στο μωβ μπρόκολο, στο ραπανάκι και στη ρόκα, σε συγκεντρώσεις από 106 ± 2 έως 3313 ± 45 pmol/g DW.

Η χαμηλότερη συγκέντρωση συζεύγματος του IAA με αμινοξύ ήταν 2.14 ± 0.26 pmol/g DW (IAVal-Me) και ανιχνεύθηκε στο κόκκινο λάχανο, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε στο λευκό λάχανο και ήταν 3313 ± 45 pmol/g DW (IATyr-Me).

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται και στο ραβδόγραμμα του σχήματος Ε.13.



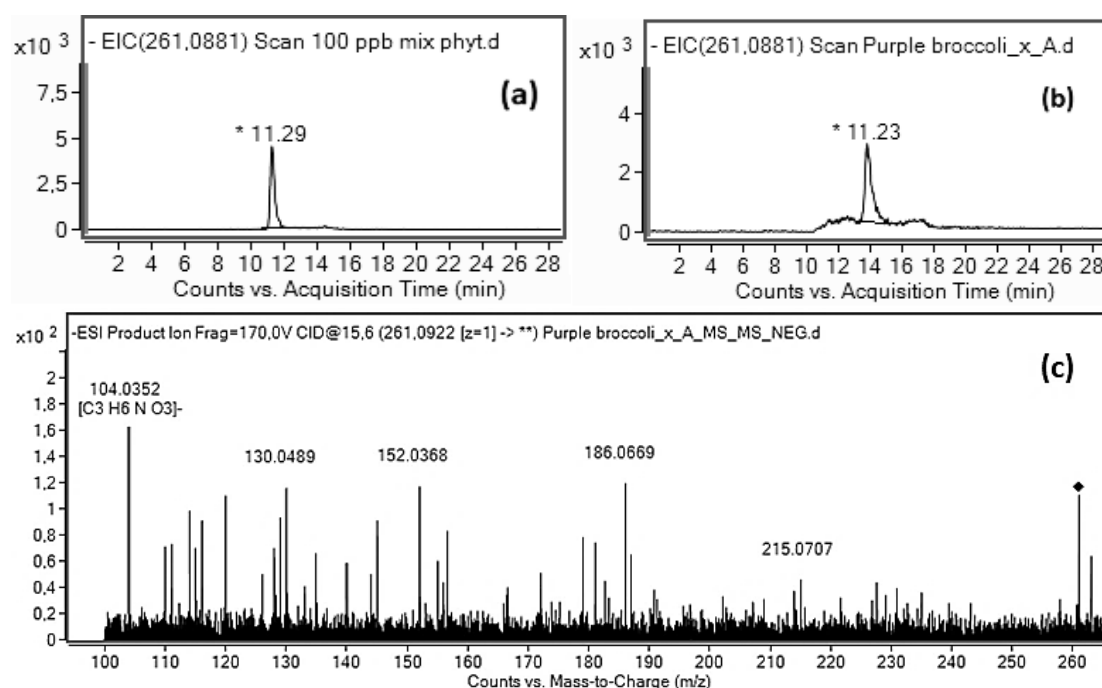
Σχήμα Ε.13. Περιεκτικότητα των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με αμινοξέα, στα σταυρανθή λαχανικά

Δύο νέα συζεύγματα του IAA με την σερίνη (IASer) και τον μεθυλεστέρα της σερίνης (IASer-Me) ταυτοποιήθηκαν στην οικογένεια Brassicaceae, για πρώτη φορά. Εξ όσων

γνωρίζουμε, αυτά τα συζεύγματα δεν έχουν περιγραφεί προηγουμένως σε κανένα είδος φυτού.

Η IASer ανιχνεύθηκε στο μωβ μπρόκολο (144 ± 5 pmol/g DW) και στο ραπανάκι (549 ± 27 pmol/g DW), ενώ το IASer-Me ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα εκτός από το κουνουπίδι και η περιεκτικότητά του κυμάνθηκε από 219 ± 4 έως 802 ± 31 pmol/g DW.

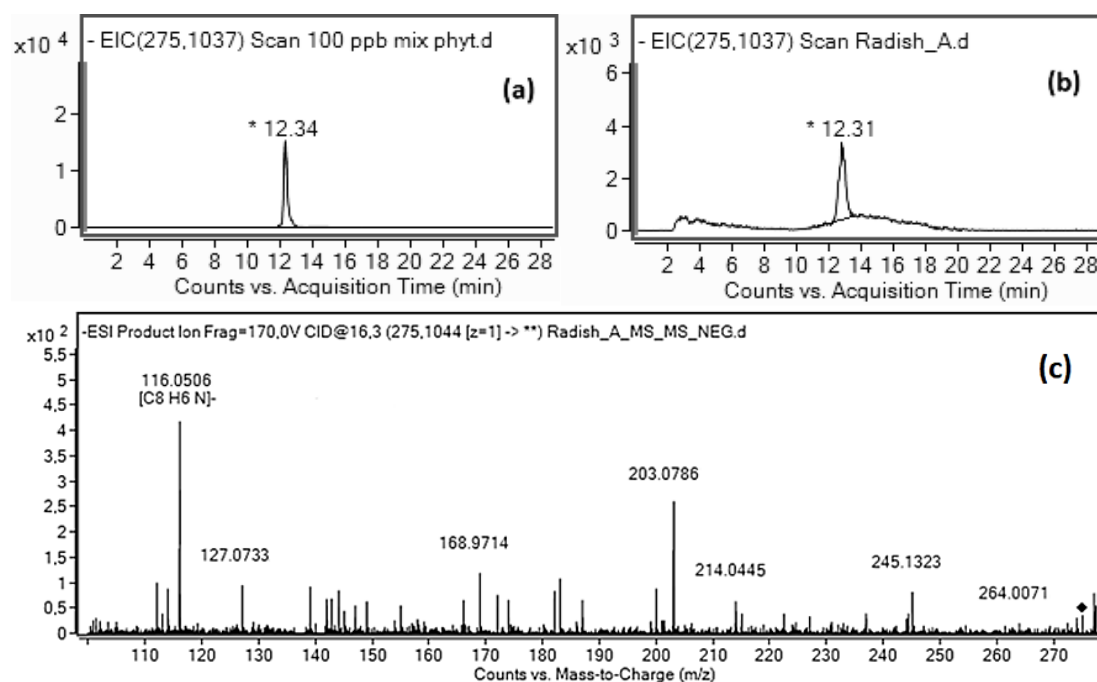
Στο σχήμα E.14 φαίνεται το χρωματογράφημα του εξαγόμενου ιόντος ενός εκχυλίσματος μωβ μπρόκολου και ενός προτύπου διαλύματος σε m/z 261.0881, που αντιστοιχεί στην IASer. Επιπλέον, στο σχήμα E.14.c παρουσιάζεται το φάσμα MS/MS ενός εκχυλίσματος μωβ μπρόκολου στο οποίο ανιχνεύθηκε το θυγατρικό ιόν με m/z 104.0352, το οποίο είχε παρατηρηθεί και στο φάσμα MS/MS της πρότυπης IASer (Σχήμα E.1.b) που είχε μελετηθεί με FIA. Τα χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων των υπόλοιπων ενώσεων δίνονται στο παράρτημα.



Σχήμα E.14. Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων προτύπου διαλύματος (100 ng/mL) IASer (a), ενός εκχυλίσματος μωβ μπρόκολου (b) και το MS/MS φάσμα ενός εκχυλίσματος μωβ μπρόκολου (c) σε m/z 261.0881 υπό αρνητικό ESI ιοντισμό

Στο σχήμα E.15 φαίνεται το χρωματογράφημα του εξαγόμενου ιόντος ενός εκχυλίσματος από ραπανάκι και ενός προτύπου διαλύματος σε m/z 275.1037, που αντιστοιχεί στον IASer-Me, ενώ στο σχήμα E.15.c παρουσιάζεται το φάσμα MS/MS ενός εκχυλίσματος από ραπανάκι στο οποίο ανιχνεύθηκε το θυγατρικό ιόν με m/z

116.0506, το οποίο είχε παρατηρηθεί και στο φάσμα MS/MS της πρότυπης IASer-Me (Σχήμα Ε.2.β) που είχε μελετηθεί με FIA.



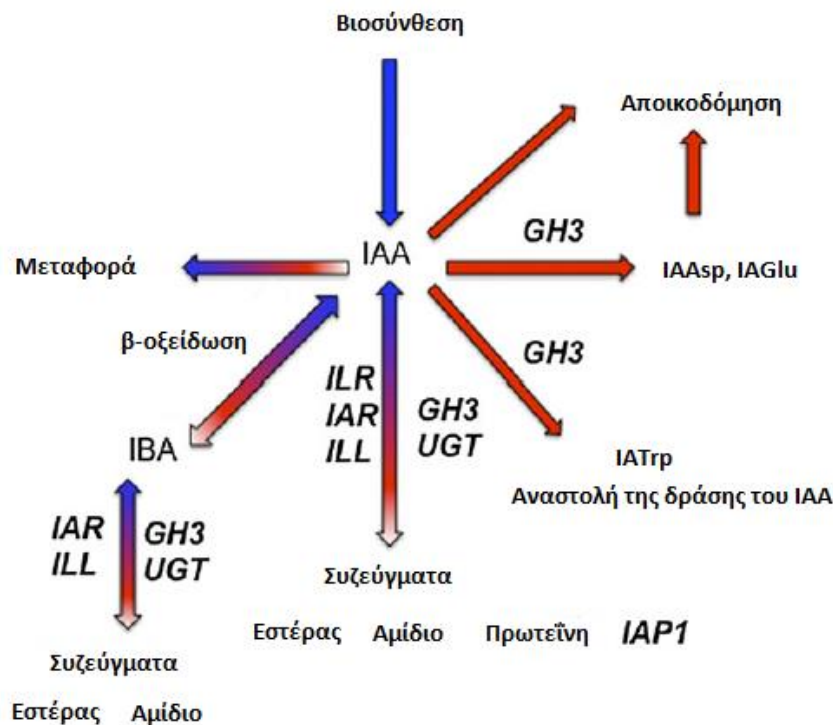
Σχήμα Ε.15. Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων ενός προτύπου διαλύματος (100 ng/mL) IASer-Me (a), ενός εκχυλίσματος από ραπανάκι (b) και το MS/MS φάσμα ενός εκχυλίσματος από ραπανάκι (c) σε m/z 275.1037 υπό αρνητικό ESI ιοντισμό

Τα αμιδικά συζεύγματα του IAA αποτελούν περίπου το 90% του συνολικού IAA στο *Arabidopsis*.²¹ Η συγκέντρωση των IAAsp και IAGlu στο *Arabidopsis* έχει βρεθεί στα 20.3-213 pmol/g FW και 3.6-2157 pmol/g FW, αντίστοιχα,^{13,14} ενώ οι περιεκτικότητες των IATrp και IAAla είναι αρκετά χαμηλές (<10 pmol/g FW).^{23,24} Συζεύγματα του IAA με τα αμινοξέα φανυλαλανίνη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη, βαλίνη και αλανίνη και τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των αμινοξέων, έχουν προσδιοριστεί σε άλλα είδη φυτών, όπως στο *Helleborus niger* (μαύρος ελλέβορος), στην τομάτα, στο ρύζι, στην καρύδα και στο γκίνγκο σε συγκεντρώσεις από 0.44-2089 pmol/g FW.^{1,25-27} Τα αποτελέσματα είναι αναμενόμενα, καθώς η συγκέντρωση των συζευγμάτων του IAA που μετρήθηκε ήταν χαμηλή, γεγονός που παρατηρείται και σε άλλα είδη φυτών.

Η σύνθεση των συζευγμάτων του IAA πραγματοποιείται από ειδικές συνθετάσες, ενώ σύζευξη του IAA μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή μη αναστρέψιμη. Η σύζευξη του IAA με αμινοξέα όπως η αλανίνη και η φανυλαλανίνη είναι αναστρέψιμη,

καθώς τα συζεύγματα αυτά υδρολύονται από συγκεκριμένες υδρολάσες και χρησιμεύουν στην αποθήκευση του IAA, ενώ όταν χρειαστεί τα συζεύγματα αυτά υδρολύονται προς την παραγωγή ελεύθερου IAA. Αντιθέτως, η σύζευξη του IAA με αμινοξέα όπως το ασπαρτικό οξύ και γλουταμινικό οξύ είναι μη αναστρέψιμη και έτσι αυτά τα συζεύγματα τελικά αποικοδομούνται.^{28,29} Ξεχωριστή περίπτωση αποτελεί η σύζευξη του IAA με την θρυπτοφάνη, καθώς το IATrp θεωρείται ότι αναστέλλει τη δράση της αυξίνης.²³

Στο σχήμα Ε.16 φαίνεται πώς συμμετέχουν τα συζεύγματα του IAA στο μεταβολισμό των αυξινών. Το IAA, εκτός από αμινοξέα, σχηματίζει συζεύγματα με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Τα μπλέ βέλη συμβολίζουν αντιδράσεις που οδηγούν στην αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου IAA, ενώ τα κόκκινα βέλη δείχνουν τη ελάττωση της συγκέντρωσης. Δίπλα σε κάθε βέλος είναι τα γονίδια που ευθύνονται για την σύζευξη του IAA και την υδρόλυση των συζευγμάτων.²⁸



Σχήμα Ε.16. Συμμετοχή των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA) στο μεταβολισμό των αυξινών²⁸

Ε.8. Συμπεράσματα

Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός 27 ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των αυξινών και των σχετικών μεταβολιτών τους, του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού οξέος, σε οχτώ είδη σταυρανθών (λευκό και κόκκινο λάχανο, ρέβα, κουνουπίδι, ραπανάκι, ρόκα, πράσινο και μωβ μπρόκολο).

Αναπτύχθηκε μια καινούρια μέθοδος με UHPLC-HRMS/MS κατά την οποία τα φάσματα μάζας των πρότυπων ενώσεων μελετήθηκαν για την εύρεση χαρακτηριστικών θυγατρικών ιόντων που αργότερα χρησιμοποιήθηκαν για τη ταυτοποίηση των ενώσεων στα εκχυλίσματα.

Το ιασμονικό οξύ (JA), το σαλικυλικό οξύ (SA) και το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) ανιχνεύθηκαν σε όλα τα σταυρανθή που μελετήθηκαν, ενώ το 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ (4-Cl-IAA) ανιχνεύθηκε μόνο σε δύο είδη σταυρανθών (κόκκινο λάχανο και ραπανάκι). Η συγκέντρωση του ινδολο-3-οξικού οξέος κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις υπόλοιπες φυτορμόνες.

Επίσης προσδιορίστηκαν, το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο και το ινδολο-3-ακεταμίδιο, που αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα κατά την πορεία βιοσύνθεσης του ινδολο-3-οξικού οξέος και η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη, που παράγεται κατά την αποκαρβοξυλίωση του ινδολο-3-οξικού οξέος. Το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα εκτός από την ρόκα, ενώ το ινδολο-3-ακεταμίδιο ανιχνεύθηκε μόνο στο μωβ μπρόκολο και στο ραπανάκι. Η συγκέντρωση της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα (577 ± 8 έως 72480 ± 704 pmol/g ξηρού βάρους) σε σχέση με την συγκέντρωση του ινδολο-3-ακετονιτρίλιου και του ινδολο-3-ακεταμιδίου.

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου δόθηκε έμφαση στην ταυτοποίηση νέων συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με αμινοξέα. Έτσι, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν δύο νέα συζεύγματα του ινδολο-3-οξικού οξέος με τη σερίνη και τον αντίστοιχο μεθυλεστέρα αυτής, τα οποία δεν έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής σε κανένα είδος φυτού και δεν είναι γνωστός ο ρόλος που διαδραματίζουν στα φυτά. Η περιεκτικότητα των συζευγμάτων του IAA με την σερίνη και τον αντίστοιχο μεθυλεστέρα της, κυμάνθηκε από 144 ± 5 έως 549 ± 27 pmol/g ξηρού βάρους και από 219 ± 4 έως 802 ± 31 pmol/g ξηρού βάρους, αντίστοιχα.

Σχεδόν όλα τα συζεύγματα που μελετήθηκαν, εκτός του IATrp-Me και του IAMet-Me, ανιχνεύθηκαν σε όλα ή ορισμένα σταυρανθή. Η χαμηλότερη συγκέντρωση συζεύγματος του ινδολο-3-οξικού οξέος με αμινοξύ που ανιχνεύθηκε ήταν 2.14 ± 0.26 pmol/g ξηρού βάρους (IAVal-Me) και ανιχνεύθηκε στο κόκκινο λάχανο,

ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε στο λευκό λάχανο και ήταν 3313 ± 45 pmol/g ξηρού βάρους (IA_{Tyr}-Me).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι λογικά, σε σύγκριση με τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα για το *Arabidopsis* και για άλλα είδη. Άλλωστε, η συγκέντρωση των φυτορμονών και των σχετικών μεταβολιτών τους εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και από το είδος του φυτού, τη θέση και την περίοδο δειγματοληψίας.¹⁷

Η νέα μέθοδος UHPLC-HRMS/MS που αναπτύχθηκε, επέτρεψε την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση νέων ενώσεων, παρέχοντας ακρίβεια και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και μπορεί να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό των φυτορμονών και σε άλλα είδη φυτών.

Ε.9. Βιβλιογραφία

1. Cao, Z. Y., Sun, L. H., Mou, R. X., Zhang, L. P., Lin, X. Y., Zhu, Z. W., Chen, M. X. (2016). Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1451, 67-74.
2. Prinsen, E., Van Dongen, W., Esmans, E. L., Van Onckelen, H. A. (1997). HPLC linked electrospray tandem mass spectrometry: A rapid and reliable method to analyse indole-3-acetic acid metabolism in bacteria. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(1), 12-22.
3. Khmel'nitskii, R. A. (1974). Mass spectrometry of indole compounds (review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 10(3), 253-267.
4. Piotrowska, A. & Bajguz, A. (2011). Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates, *Phytochemistry*, 72, 2097-2112.
5. Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, 228, 127-134.
6. Hagen, G., Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, 49, 373-385.
7. Gao Y., Zhao Y. (2014). Auxin Biosynthesis and Catabolism. In: Zažímalová E., Petrášek J., Benková E. (eds) *Auxin and Its Role in Plant Development*. Vienna: Springer
8. Bajguz, A., Piotrowska, A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70(8), 957-969.
9. Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A. L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M., Krupa, Z. (2005). The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 162(12), 1338-1346.
10. McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., Browse, J. (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5473-5477.
11. Hao, L., Wang, Y., Xu, J., Feng, S.-D., Ma, C.-Y., Liu, C., Xu, X., Li, G.-Z. Herbert, S. J. (2011). Role of endogenous salicylic acid in *Arabidopsis* response to elevated sulfur dioxide concentration. *Biologia Plantarum*, 55(2), 297-304.
12. Brodersen, P., Malinovsky, F. G., Hématy, K., Newman, M. A., Mundy, J. (2005). The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis* acd11. *Plant Physiology*, 138(2), 1037-1045.
13. Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K.,

- Kamiya, Y., Kasahara, H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), 18512-18517.
14. Tam, Y. Y., Epstein, E., Normanly, J. (2000). Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiology*, 123(2), 589-596.
 15. Tivendale, N. D., Davidson, S. E., Davies, N. W., Smith, J. A., Dalmais, M., Bendahmane, A. I., Quittenden, L. J., Sutton, L., Bala, R. K., Le Signor, C., Thompson, R., Horne, J., Reid, J. B., Ross, J. J. (2012). Biosynthesis of the halogenated auxin, 4-chloroindole-3-acetic acid. *Plant Physiology*, 159(3), 1055-1063.
 16. Ross, J. J., Tivendale, N. D., Davidson, S. E., Reid, J. B., Davies, N. W., Quittenden, L. J., Smith, J. A. (2012). A mutation affecting the synthesis of 4-chloroindole-3-acetic acid. *Plant Signaling & Behavior*, 7(12), 1533-1536.
 17. Davies, P.J. (2010). Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action. New York: Springer.
 18. Pollmann, S., Müller, A., Piotrowski, M., Weiler, E. W. (2002). Occurrence and formation of indole-3-acetamide in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 216(1), 155-161.
 19. Normanly, J., Grisafi, P., Fink, G. R., Bartel, B. (1997). Arabidopsis mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. *The Plant Cell*, 9(10), 1781-1790.
 20. Stahl, E., Bellwon, P., Huber, S., Schlaeppli, K., Bernsdorff, F., Vallat-Michel, A., Mauch, F., Zeier, J. (2016). Regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance. *Molecular Plant*, 9(5), 662-681.
 21. Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D., Sandberg, G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 49(3-4), 249-272.
 22. Böttcher, C., Chapman, A., Fellermeier, F., Choudhary, M., Scheel, D., Glawischnig, E. (2014). The biosynthetic pathway of indole-3-carbaldehyde and indole-3-carboxylic acid derivatives in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(2), 841-853.
 23. Staswick, P. E. (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiology*, 150(3), 1310-1321.
 24. Kowalczyk, M., Sandberg, G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 127(4), 1845-1853.

25. Pěňčík, A., Rolčík, J., Novák, O., Magnus, V., Barták, P., Buchtík, R., Salopek-Sondi, B., Strnada, M. (2009). Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta*, 80(2), 651-655.
26. Van Meulebroek, L., Bussche, J. V., Steppe, K., Vanhaecke, L. (2012). Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry for metabolomic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant. *Journal of Chromatography A*, 1260, 67-80.
27. Yu, P., Hegeman, A. D., Cohen, J. D. (2014). A facile means for the identification of indolic compounds from plant tissues. *The Plant Journal*, 79(6), 1065-1075.
28. Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1757-1773.
29. Rosquete, M. R., Barbez, E., Kleine-Vehn, J. (2012). Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant*, 5(4), 772-786.

Κεφάλαιο ΣΤ. Πειραματικές Μέθοδοι Σύνθεσης Οργανικών Ενώσεων

ΣΤ.1. Γενικό Πειραματικό Μέρος

Όργανα και διατάξεις

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H και ^{13}C λήφθηκαν και καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Varian τύπου Mercury 200 MHz και 50 MHz, αντίστοιχα. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων ήταν CDCl_3 , D_2O , CD_3OD , DMSO-d_6 , CD_3COCD_3 και ήταν εμπορικά διαθέσιμοι από την εταιρία Euroisotope. Οι ^1H NMR χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε ppm και τα δεδομένα παρουσιάζονται ως χημικές μετατοπίσεις (πολλαπλότητα, σταθερές σύζευξης σε Hz, αριθμός πρωτονίων, ταυτοποίηση κορυφών). Τα σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή της πολλαπλότητας των κορυφών είναι: (s) απλές, (bs) ευρείες απλές, (d) διπλές, (dd) διπλές διπλών, (t) τριπλές, (q) τετραπλές, (m) πολλαπλές.

Τα φάσματα ακριβούς μάζας κατεγράφησαν σε φασματογράφο μάζας Bruker Maxis Impact QTOF LC-MS ή Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF LC-MS και ο ιονισμός των ουσιών έγινε μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού (ESI, Electro Spray Ionization).

Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν και καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Thermo Fisher Scientific (μοντέλο Nicolet 6700).

Τα σημεία τήξεως μετρήθηκαν σε συσκευή Buchi 530 και δεν δίνονται διορθωμένα.

Οι γωνίες στροφής μετρήθηκαν σε ηλεκτρονικό πολωσίμετρο Perkin-Elmer 343, στα 589nm χρησιμοποιώντας κυψελίδα μήκους 10.00 cm και σε θερμοκρασία δωματίου.

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Οι πορείες των αντιδράσεων και η καθαρότητα των προϊόντων ελέγχθηκαν μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), χρησιμοποιώντας φύλλα αλουμινίου επιστρωμένα με silica gel 60 και φθορίζοντα δείκτη F_{254} , πάχους στοιβάδας 0.2 mm (Merk, Art. 5714). Για την ανάπτυξη των χρωματογραφιών λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν διάφορα συστήματα διαλυτών που αναφέρονται σε κάθε περίπτωση.

Η εμφάνιση των χρωματογραφημάτων έγινε με διάλυμα 10% νινυδρίνης σε αιθανόλη, με διάλυμα 7% φωσφομολυβδαινικού οξέος σε αιθανόλη, με έκθεση σε ατμούς ιωδίου και με ακτινοβολία UV ($\lambda=254$ nm). Οι τιμές R_f για κάθε ουσία που παρασκευάστηκε δίδονται κατά περίπτωση σε διάφορα συστήματα διαλυτών τα οποία αναφέρονται στους επιμέρους πίνακες των πειραματικών μεθόδων.

Χρωματογραφία στήλης

Τα προϊόντα που παρασκευάστηκαν καθαρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης. Στις χρωματογραφίες στήλης η έκλουση έγινε με τη δύναμη της βαρύτητας (απλή στήλη). Για τις χρωματογραφίες στήλης χρησιμοποιήθηκε silica gel (70-230 mesh) της Merk και η αναλογία ουσίας /silica gel κυμαινόταν ανάλογα με την περίπτωση από 1/60-1/100 κατά βάρος. Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκλούσεις αναφέρονται χωριστά κατά περίπτωση.

Αντιδραστήρια και διαλύτες

Γενικά σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν χημικώς καθαρά αντιδραστήρια.

Η προμήθεια των αντιδραστηρίων και διαλυτών έγινε από τις εταιρίες Fluka, Acros Organics, TCI Chemicals, Alfa Aesar και Sigma Aldrich.

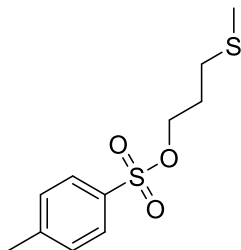
- Ξηρό THF παρασκευάστηκε με reflux κοινού THF επί τουλάχιστον δύο ώρες παρουσία μεταλλικού Na και βενζοφαινόνης. Στη συνέχεια ο διαλύτης αποστάχθηκε και φυλάχθηκε πάνω από μοριακά κόσκινα 4 Å.
- Ξηρό DMF αγοράστηκε από την εταιρία Acros Organics φυλασσόμενο πάνω από μοριακά κόσκινα.

Οι συμπυκνώσεις των διαλυτών έγιναν υπό ελαττωμένη πίεση σε θερμοκρασία 25-35 °C ανάλογα με το διαλύτη.

ΣΤ.2. Πειραματικές Μέθοδοι

3-(Methylsulfanyl)propyl-4-methylbenzenesulfonate

3-(Μεθυλοσουλφανυλο)προπυλο-4-μεθυλοβενζολοσουλφονικός εστέρας



59

Σε αναδευόμενο διάλυμα 3-μεθυλοθειοπροπανόλης **58** (1.5 mL, 14.5 mmol) και τριαιθυλαμίνης (4.5 mL, 32.0 mmol) σε CH₂Cl₂ (10 mL), το οποίο ψύχθηκε στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην παρα-τολουολοσουλφονυλοχλωρίδιο (4.2 g, 21.8 mmol) διαλυμένο σε CH₂Cl₂ (20 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Το μίγμα αραιώθηκε με H₂O (15 mL) και μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου η οργανική φάση εκπλύθηκε με HCl, NaHCO₃ και H₂O, ξηράνθηκε με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκε. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel 60 και διαλύτη έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα 40-60 °C:Et₂O 8:2. Απομονώθηκαν 3.4 g προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (Πετρ.αιθ.:Et ₂ O 7:3) |
|---------|--------|---|--|
| 90% | 260.37 | C ₁₁ H ₁₆ O ₃ S ₂ | 0.58 |

Άχρωμο έλαιο

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.70-7.76 (m, 2H, ArH), 7.28-7.33 (m, 2H, ArH), 4.09 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, OCH₂), 2.41-2.52 (m, 2H, CH₂S), 2.40 (s, 3H, PhCH₃), 1.97 (s, 3H, SCH₃), 1.80-1.96 (m, 2H, CH₂CH₂S)

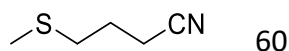
¹³C NMR (CDCl₃) δ 144.69, 132.55, 129.71, 129.40, 127.58, 127.44, 68.72, 29.53, 27.97, 21.38, 15.04

HRMS (ESI) [M+Na]⁺ *m/z*=283.0433, βρέθηκε 283.0433

IR (ZnSe, cm⁻¹) 1363, 1191, 1177, 959, 915

4-(Methylsulfanyl)butanenitrile

4-(Μεθυλοσουλφανυλο)βουτανονιτρίλιο



60

Σε αναδευόμενο διάλυμα του τοζυλεστέρα **59** (2.4 g, 9.4 mmol) σε ξηρό DMF (10 mL) προστέθηκε KCN (6.1 g, 94 mmol). Το μίγμα θερμάνθηκε με αναρροή στους 80 °C, υπό αργόν, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, αραιώθηκε με H₂O (20 mL) και μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίστηκε με πετρελαϊκό αιθέρα 40-60 °C (3x35 mL). Η υδατική φάση απομακρύνθηκε και η οργανική φάση εκπλύθηκε με H₂O, ξηράνθηκε με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκε. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel 60 και διαλύτη έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα 40-60 °C:Et₂O 8:2. Απομονώθηκαν 3.4 g προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (Πετρ.αιθ.:Et ₂ O 7:3) |
|---------|--------|----------------------------------|--|
| 70% | 115.19 | C ₅ H ₉ NS | 0.40 |

Άχρωμο έλαιο

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.44-2.63 (m, 4H, CH₂CN, SCH₂), 2.07 (s, 3H, SCH₃), 1.84-2.02 (m, 2H, CH₂)

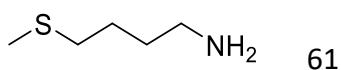
¹³C NMR (CDCl₃) δ 118.8, 31.9, 24.0, 15.3, 14.6

HRMS (ESI) [M+Na]⁺ m/z=138.0348, βρέθηκε 138.0348

IR (ZnSe, cm⁻¹) 2920, 2855, 2246, 1428, 1263, 957

4-(Methylsulfanyl)butan-1-amine

4-(Μεθυλοσουλφανυλο)βουταν-1-αμίνη



61

Σε αναδευόμενο διάλυμα του νιτριλίου **60** (590 mg, 5.1 mmol) σε ξηρό THF (50 mL) προστέθηκε στάγδην $\text{BH}_3\text{-THF}$ 1M (34 mL, 34 mmol), υπό αργόν. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Στη συνέχεια, ψύχθηκε στους 0 °C και προστέθηκε HCl 2N (60 mL). Το μίγμα συμπυκνώθηκε και το υδατικό υπόλειμμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη. Προστέθηκε NaOH 2N (90 mL) και η υδατική φάση εκχυλίστηκε με CHCl_3 (3x40 mL). Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, ξηράνθηκαν με Na_2SO_4 και συμπυκνώθηκαν. Το προϊόν χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω κατεργασία για την επόμενη αντίδραση. Απομονώθηκαν 396 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | $R_f(\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_3\text{ 5:5:0.1})$ |
|---------|--------|------------------------------------|--|
| 65% | 119.23 | $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{NS}$ | 0.20 |

Άχρωμο έλαιο

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.55 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, NCH_2), 2.35 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, SCH_2), 2.07 (s, 3H, SCH_3), 1.30-1.45 (m, 4H, CH_2CH_2)

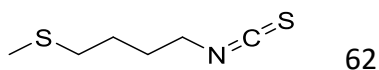
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 41.1, 33.4, 32.1, 25.8, 14.7

HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=120.0842$, βρέθηκε 120.0840

IR (ZnSe, cm^{-1}) 2917, 2858, 1569, 1486, 1321, 1157

4-Isothiocyanoatobutyl methyl sulfide

4-Ισοθειοκυανοβουτυλο μέθυλο σουλφίδιο



62

Σε αναδευόμενο διάλυμα της αμίνης **61** (203 mg, 1.7 mmol) σε CH₂Cl₂ (11 mL) προστέθηκε NaHCO₃ 5% (11 mL). Το μίγμα αναδεύθηκε έντονα για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε CSCl₂ (0.17 mL, 2.2 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη, η στοιβάδα του CH₂Cl₂ συλλέχθηκε και η υδατική φάση εκχυλίστηκε με CH₂Cl₂ (2x20 mL). Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, ξηράνθηκαν με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκαν. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel 60 και διαλύτη έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα 40-60 °C:Et₂O 9:1. Απομονώθηκαν 260 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (Πετρ.αιθ.:Et ₂ O 9:1) |
|---------|--------|--|--|
| 95% | 161.28 | C ₆ H ₁₁ NS ₂ | 0.56 |

Υποκίτρινο έλαιο

¹H NMR (CDCl₃) δ 3.56 (t, J=6.1 Hz, 2H, CH₂NCS), 2.50-2.60 (m, 2H, SCH₂), 2.11 (s, 3H, SCH₃), 1.73-1.81 (m, 4H, CH₂CH₂)

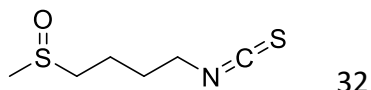
¹³C NMR (CDCl₃) δ 129.3, 44.4, 32.8, 28.5, 25.4, 15.0

HRMS (ESI) [M+H]⁺ m/z=162.0406, βρέθηκε 162.0413

IR (ZnSe, cm⁻¹) 2946, 2919, 2183, 2104, 1450, 1350

4-Isothiocyanatobutyl methyl sulfoxide

4-Ισοθειοκυανοβουτυλο μέθυλο σουλφοξείδιο



32

Σε αναδευόμενο διάλυμα της ένωσης **62** (226 mg, 1.4 mmol) σε CH₂Cl₂ (4 mL), το οποίο ψύχθηκε στους -10 °C, προστέθηκε στάγδην mCPBA 80% (290 mg, 1.4 mmol) διαλυμένο σε CH₂Cl₂ (4 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση στους 0 °C για 40 λεπτά. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική στοιβάδα εκπλύθηκε με NaHCO₃ 5% και brine, ξηράνθηκε με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκε. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel 60 και διαλύτη έκλουσης CHCl₃:MeOH 98:2. Απομονώθηκαν 223 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (CHCl ₃ -MeOH 96:4) |
|---------|--------|---|---|
| 90% | 177.29 | C ₆ H ₁₁ NOS ₂ | 0.22 |

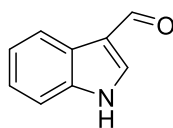
Υποκίτρινο έλαιο

¹H NMR (CDCl₃) δ 3.58 (t, *J*=6.1 Hz, 2H, CH₂NCS), 2.68-2.71 (m, 2H, CH₂SO), 2.57 (s, 3H, CH₃SO), 1.86-1.88 (m, 4H, CH₂CH₂)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 129.8, 53.1, 44.4, 38.4, 28.6, 19.8

HRMS (ESI) [M+H]⁺ *m/z*=178.0355, βρέθηκε 178.0355

IR (ZnSe, cm⁻¹) 3452, 2936, 2183, 2110, 1033, 732

1H-Indole-3-carbaldehyde**1H-ινδολο-3-καρβαλδεΐδη**

33

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη, εφοδιασμένη με σωλήνα CaCl₂, ψύχθηκε DMF (1.6 mL) στους -15 °C και προστέθηκε στάγδην (COCl)₂ σε CH₂Cl₂ 2M (3.5 mL, 7 mmol) σε διάστημα 10 λεπτών. Στη συνέχεια, προστέθηκε ινδόλιο (527 mg, 4.5 mmol) διαλυμένο σε DMF (0.6 mL), προσέχοντας ώστε η θερμοκρασία να μην ξεπεράσει τους 10 °C. Μετά την πάροδο 10 λεπτών, το μίγμα θερμάνθηκε στους 35 °C έως 40 °C για 1 ώρα. Προστέθηκε τριμμένος πάγος (1 g) και H₂O (0.5 mL) και στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην NaOH 9M (6 mL). Η αντίδραση θερμάνθηκε γρήγορα μέχρι το σημείο ζέσεως (~55 °C) και αφέθηκε να ηρεμήσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίστηκε με AcOEt (3x15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, εκπλύθηκαν με brine, ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκαν. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel 60 και διαλύτη έκλουσης AcOEt:πετρελαϊκό αιθέρα 40-60 °C 6:4. Απομονώθηκαν 522 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt-Πετρ.αιθ. 6:4) |
|---------|--------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 80% | 145.16 | C ₉ H ₇ NO | 0.45 |

Υποκίτρινο στερεό

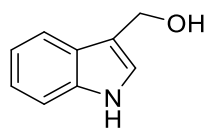
Σημείο τήξεως: 195-197 °C (σ.τ.βιβλ.¹=196-197 °C)

¹H NMR (CD₃OD) δ 9.84 (s, 1H, CHO), 8.06-8.14 (m, 2H, ArH), 7.42-7.46 (m, 1H, ArH), 7.16-7.28 (m, 2H, ArH).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 186.6 (CHO), 139.0, 124.8, 124.2, 122.8, 121.8, 121.6, 119.2, 112.3

HRMS (ESI) [M+H]⁺ m/z=144.0444, βρέθηκε 144.0452

IR (KBr, cm⁻¹) 3114, 2825, 2381, 1648, 1524

1H-Indol-3-ylmethanol**1H-ινδολο-3-υλομεθανόλη**

34

Σε αναδευόμενο διάλυμα της ένωσης **33** (290 mg, 2.0 mmol) σε MeOH (4 mL) προστέθηκε NaBH₄ (113 mg, 3.0 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Το μίγμα αραιώθηκε με H₂O (5 mL), μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίστηκε με CHCl₃ (3x15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, εκπλύθηκαν με brine, ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκαν. Απομονώθηκαν 241 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt-CHCl ₃ 5:5) |
|---------|--------|----------------------------------|--|
| 82% | 147.18 | C ₉ H ₉ NO | 0.46 |

Υποκίτρινο στερεό

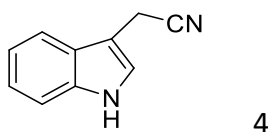
Σημείο τήξεως: 97-99 °C (σ.τ.β_{ιβλ}²=98-99 °C)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.86 (bs, 1H, NH), 7.61 (d, *J*=7.9 Hz, 1H, ArH), 7.36 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 6.96-7.12 (m, 2H, ArH), 4.65-4.75 (m, 2H, CH₂OH), 3.40 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 136.4, 126.7, 123.3, 121.0, 118.9, 118.4, 116.0, 111.3, 55.5 (CH₂OH)

HRMS (ESI) [M+Na]⁺ *m/z*=170.0578, βρέθηκε 170.0576

IR (KBr, cm⁻¹) 3405, 2864, 1659, 1457, 1098

1H-Indol-3-ylacetonitrile**1H-Ινδολο-3-υλοακετονιτρίλιο**

Σε αναδευόμενο διάλυμα της ένωσης **33** (109 mg, 0.7 mmol) σε μίγμα MeOH:NH₂CHO 1:1 (8 mL) προστέθηκε NaBH₄ (34 mg, 0.91 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια προστέθηκε KCN (228 mg, 3.5 mmol) και το μίγμα θερμάνθηκε με αναρροή στους 100 °C, υπό αργόν, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, αραιώθηκε με H₂O (15 mL) και μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίστηκε με μίγμα διαλυτών CHCl₃:MeOH 95:5 (3x25 mL). Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, εκπλύθηκαν με brine, ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκαν. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel 60 και διαλύτη έκλουσης CHCl₃:MeOH 95:5. Απομονώθηκαν 93 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (CHCl ₃ -MeOH 95:5) |
|---------|--------|---|---|
| 85% | 156.19 | C ₁₀ H ₈ N ₂ | 0.64 |

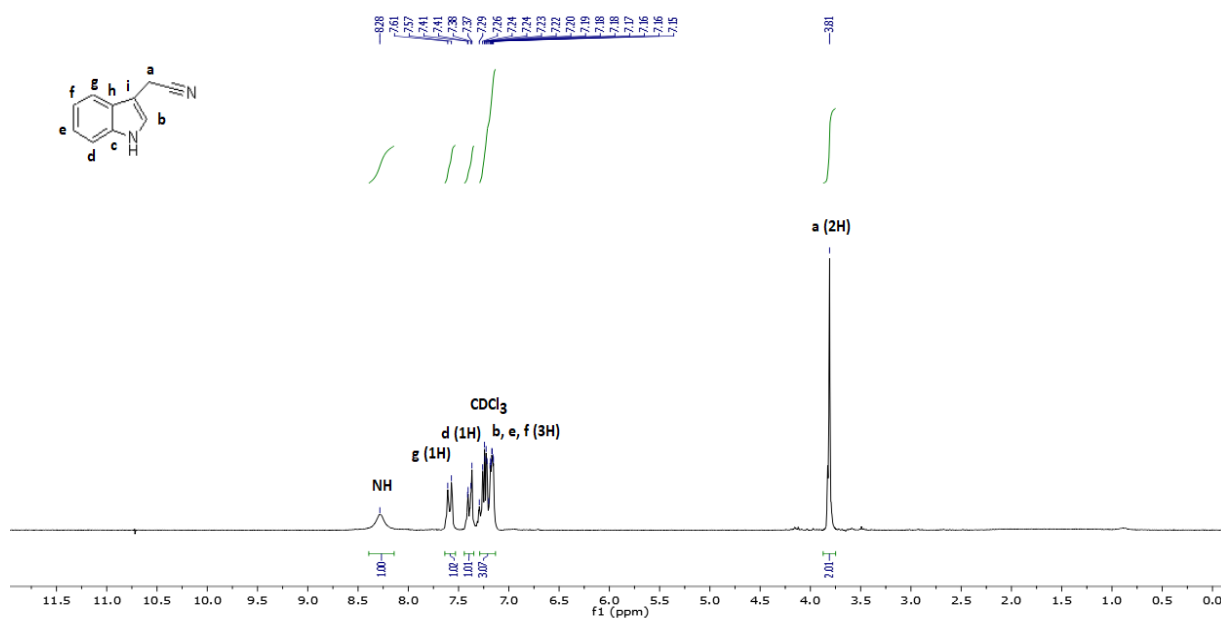
Υποκίτρινο έλαιο

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.28 (bs, 1H, NH), 7.59 (d, *J*=7.3 Hz, 1H, ArH), 7.37-7.41 (m, 1H, ArH), 7.15-7.29 (m, 3H, ArH), 3.81 (s, 2H, CH₂)

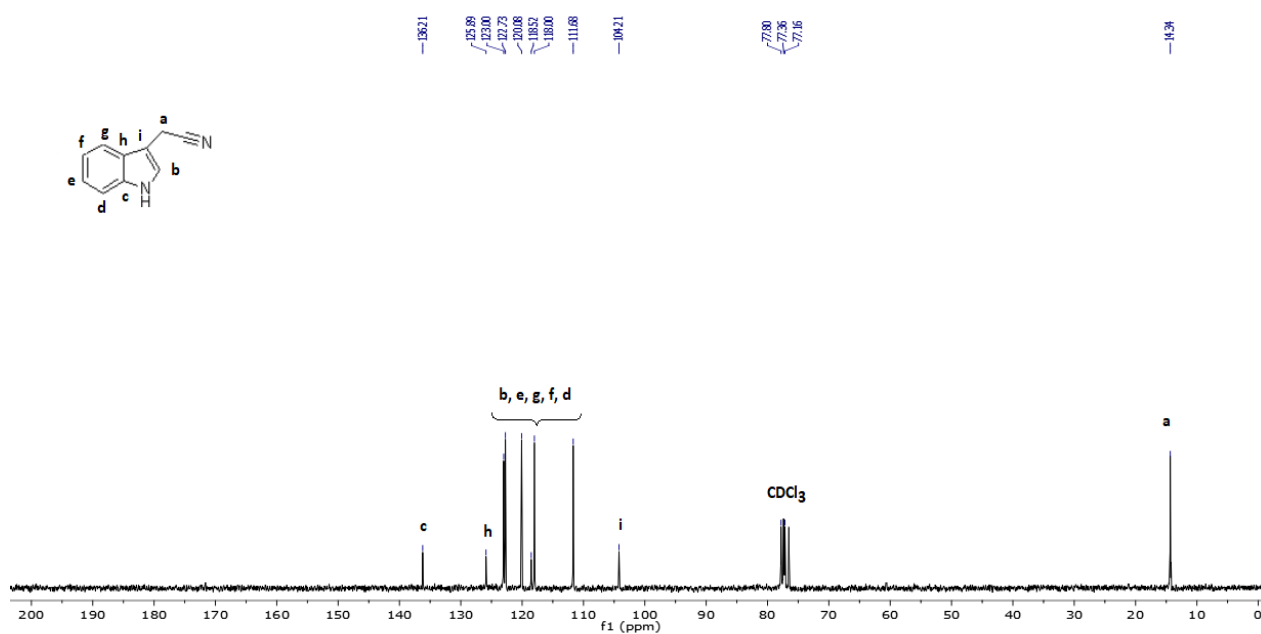
¹³C NMR (CDCl₃) δ 136.2, 125.9, 123.0, 122.7, 120.1, 118.5, 118.0, 111.7, 104.2, 14.3

HRMS (ESI) [M+H]⁺ *m/z*=157.0760, βρέθηκε 157.0765

IR (ZnSe, cm⁻¹) 3414, 2255, 1619, 1454, 1095



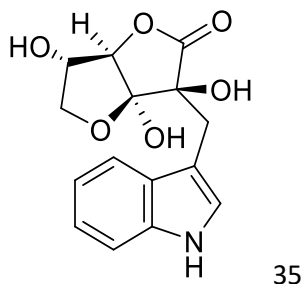
Σχήμα ΣΤ.1. Φάσμα $^1\text{H NMR}$ του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (4) σε CDCl_3



Σχήμα ΣΤ.2. Φάσμα $^{13}\text{C NMR}$ του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (4) σε CDCl_3

(3*S*,3*aS*,6*aR*)-3,3*a*,6-trihydroxy-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)tetrahydrofuro[3,2-*b*]furan-2(3*H*)-one

(3*S*,3*aS*,6*aR*)-3,3*a*,6-τριυδροξυ-3-(1*H*-ινδολο-3-υλμεθυλο)τετραυδροφουρο[3,2-*b*]φουραν-2(3*H*)-όνη



Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα McIlvaine, pH 4.0 (20 mL), με ανάμιξη διαλύματος Na₂HPO₄ 0.2M (7.7 mL) και κιτρικού οξέος 0.1M (12.3 mL). Στο διάλυμα που παρασκευάστηκε προστέθηκαν υπό ανάδευση, ινδολο-3-καρβινόλη **34** (370 mg, 2.5 mmol) και ασκορβικό οξύ **69** (440 mg, 2.5 mmol). Η αντίδραση αναδεύθηκε, υπό αργόν, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, προστατευμένη από το φως. Το μίγμα διηθήθηκε για την απομάκρυνση των στερεών και το διήθημα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη, όπου εκπλύθηκε με Et₂O (3x15 mL). Η αιθερική στοιβάδα απομακρύνθηκε και υδατική στοιβάδα εκχυλίστηκε με AcOEt (3x15 mL). Οι στοιβάδες του AcOEt συγκεντρώθηκαν, εκπλύθηκαν με brine, ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκαν. Απομονώθηκαν 343 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (iPrOH-MeOH-AcOEt-AcOH 2.5:2.5:5.0:0.5) |
|---------|--------|---|--|
| 45% | 305.29 | C ₁₅ H ₁₅ NO ₆ | 0.81 |

Λευκό στερεό

[α]_D²⁵ = +11.2° (c=2.0 σε EtOH)

[α]_D²⁵_{βιβλ}³ = +11.0° (c=2.0 σε EtOH)

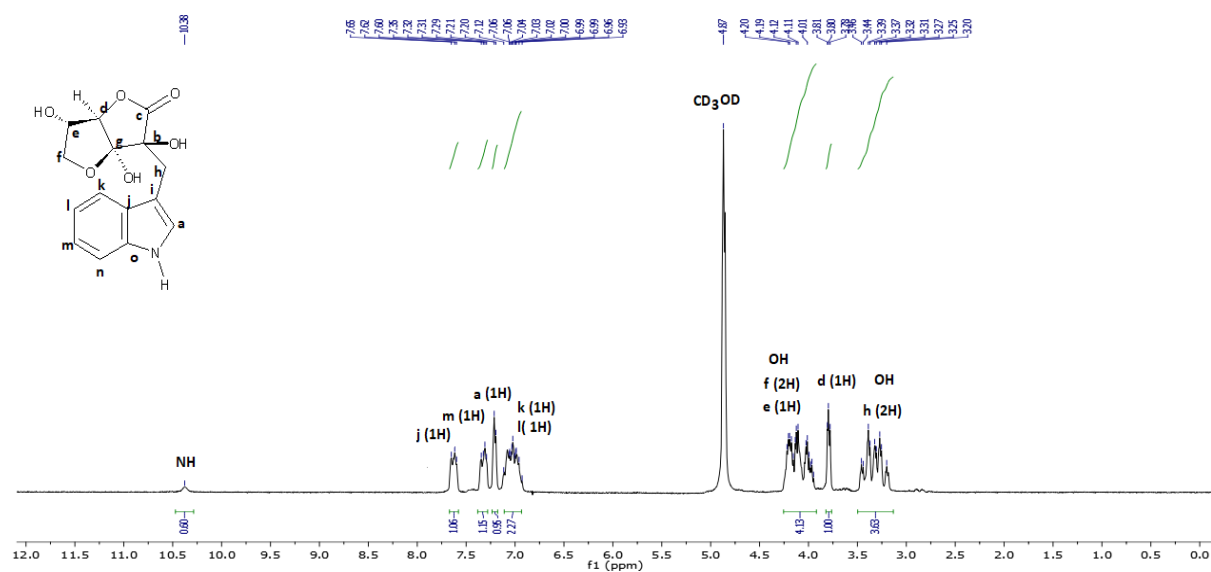
Σημείο τήξεως: 64-65 °C (σ.τ.βιβλ³ = 65 °C)

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 10.38 (bs, 1H, NH), 7.60-7.65 (m, 1H, ArH), 7.29-7.35 (m, 1H, ArH), 7.21 (s, 1H, ArH), 6.93-7.12 (m, 2H, ArH), 4.11-4.20 (m, 4H, CHOH, CH_2OH , OH), 3.78-3.81 (m, 1H, CH), 3.20-3.46 (m, 4H, CH_2 , OH, OH)

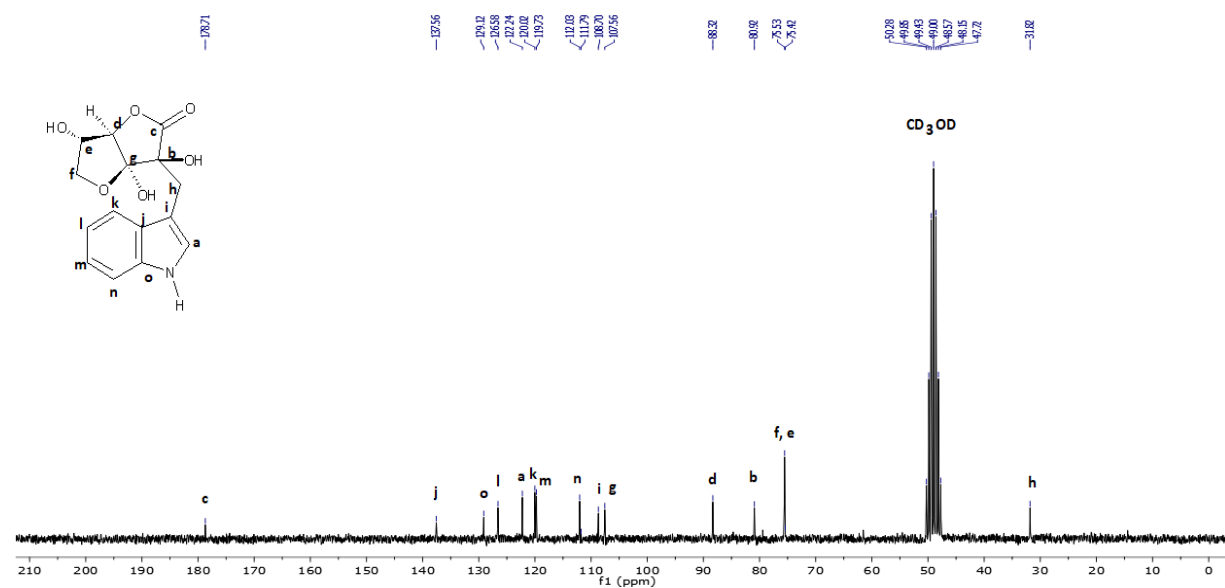
$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ 178.7, 137.6, 129.1, 126.6, 122.2, 120.0, 119.7, 112.0, 111.8, 108.7, 107.6, 88.3, 80.9, 75.5, 75.4, 31.8

HRMS (ESI) $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z=304.0827$, βρέθηκε 304.0820

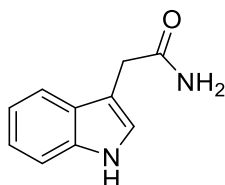
IR (KBr, cm^{-1}) 3470, 2955, 1804, 1460, 1351, 768



Σχήμα ΣΤ.3. Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης (35) σε CD_3OD



Σχήμα ΣΤ.4. Φάσμα $^{13}\text{C NMR}$ της ένωσης (35) σε CD_3OD

2-(1*H*-Indol-3-yl)acetamide2-(1*H*-ινδολο-3-υλ)ακεταμίδιο

36

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το νιτρίλιο **4** (256 mg, 1.6 mmol) προστέθηκε NaOH 1M (50 mL). Η αντίδραση θερμάνθηκε με αναρροή στους 100 °C για 25 λεπτά. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη, όπου προστέθηκε HCl 1M (50 mL) και εκχυλίστηκε με AcOEt (3x30 mL). Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, εκπλύθηκαν με brine, ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκαν. Απομονώθηκαν 237 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (CH ₂ Cl ₂ -MeOH-AcOH 5:1:0.2) |
|---------|--------|--|--|
| 85% | 174.20 | C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O | 0.79 |

Υποκίτρινο στερεό

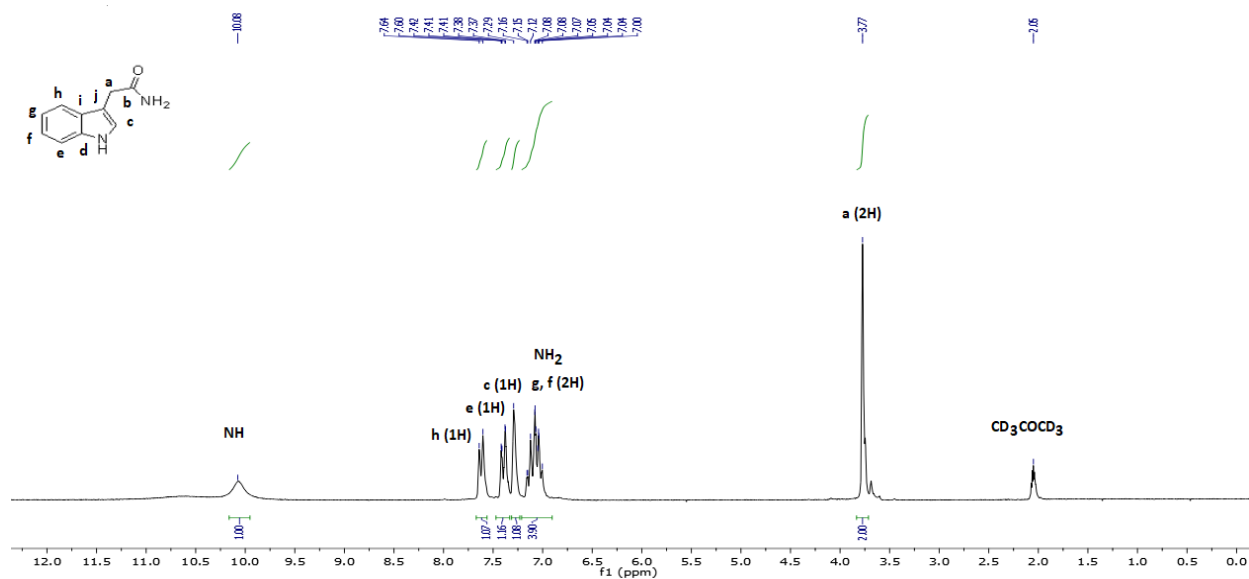
Σημείο τήξεως: 149-151 °C (σ.τ.β_{ιβλ}⁴=154 °C)

¹H NMR (CD₃COCD₃) δ 10.08 (bs, 1H, NH), 7.62 (d, *J*=7.5 Hz, 1H, ArH), 7.37-7.42 (m, 1H, ArH), 7.29 (s, 1H, ArH), 7.00-7.16 (m, 4H, ArH, NH₂), 3.77 (s, 2H, CH₂)

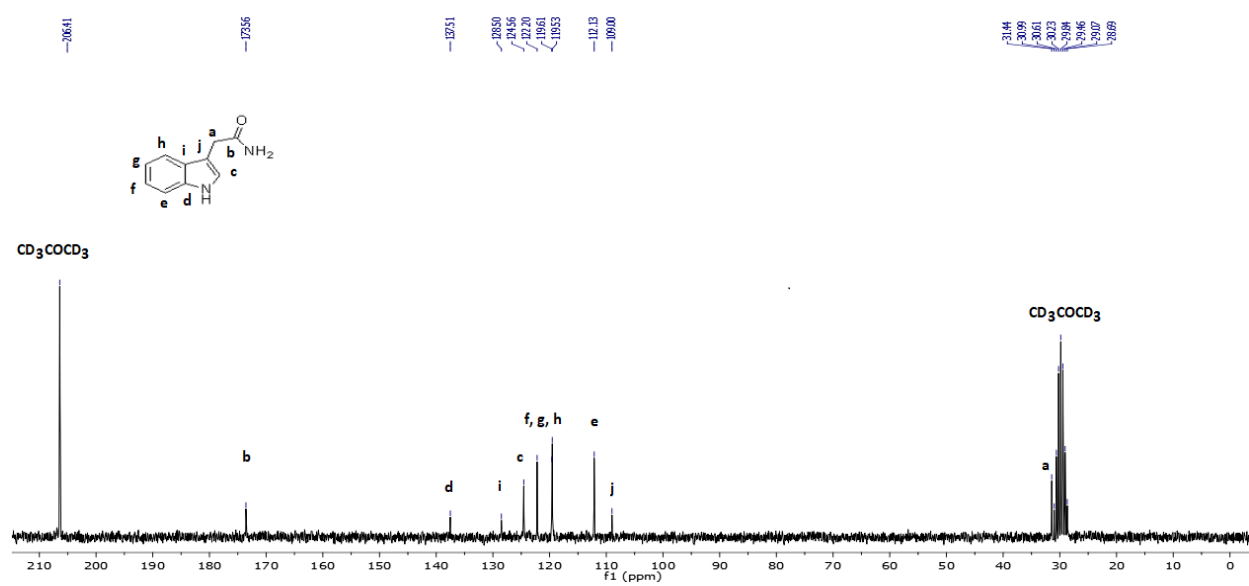
¹³C NMR (CD₃COCD₃) δ 173.6, 137.5, 128.5, 124.6, 122.2, 119.6, 112.1, 109.0, 31.4

HRMS (ESI) [M+H]⁺ *m/z*=175.0866, βρέθηκε 175.0864

IR (KBr, cm⁻¹) 3399, 3128, 1724, 1409, 1103



Σχήμα ΣΤ.5. Φάσμα ¹H NMR του ινδολο-3-ακεταμιδίου (36) σε CD₃COCD₃



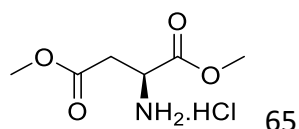
Σχήμα ΣΤ.6. Φάσμα ¹³C NMR του ινδολο-3-ακεταμιδίου (36) σε CD₃COCD₃

Γενική πορεία σύνθεσης μεθυλεστέρων αμινοξέων υπό μορφή υδροχλωρικού άλατος

Σε αναδευόμενο διάλυμα του εκάστοτε αμινοξέος (2.5 mmol, **75**, **76**, **77**, **78**) σε MeOH (7 ml), το οποίο ψύχθηκε στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην SOCl₂ (0.3 mL, 4.0 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό, το προϊόν ανακρυσταλλώθηκε από MeOH/Et₂O.

Dimethyl (2S)-2-aminobutanedioate hydrochloride

Υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινοβουτανοδιοϊκού διμεθυλεστέρα



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας ως αμινοξύ το L-ασπαρτικό οξύ **75** (333 mg, 2.5 mmol). Απομονώθηκαν 444 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (CH ₂ Cl ₂ -MeOH-NH ₃ 9:1:0.5) |
|---------|--------|--|---|
| 90% | 197.62 | C ₆ H ₁₂ ClNO ₄ | 0.70 |

Λευκό στερεό

[α]_D²⁵=+10.9° (c=1.0 σε H₂O)

[α]_D²⁰_{βιβλ}⁵=+10.3° (c=1.0 σε H₂O)

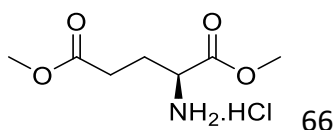
Σημείο τήξεως: 111-113 °C (σ.τ.βιβλ⁵=112-115 °C)

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 4.29-4.47 (m, 1H, CH), 3.67 (s, 3H, COOCH_3), 3.64 (s, 3H, COOCH_3), 2.97-3.13 (m, 2H, CH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O) δ 171.6, 169.3, 53.9, 53.0, 49.1, 33.6

Dimethyl (2S)-2-aminopentanedioate hydrochloride

Υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινοπεντανοδιοϊκού διμεθυλεστέρα



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας ως αμινοξύ το L-γλουταμινικό οξύ **76** (368 mg, 2.5 mmol). Απομονώθηκαν 476 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | $\text{R}_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-NH}_3$ 9:1:0.5) |
|---------|--------|--|--|
| 90% | 211.64 | $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{ClNO}_4$ | 0.53 |

Λευκό στερεό

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +25.0^\circ$ (c=5.0 σε H_2O)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}{}_{\beta\text{t}\beta\lambda}^6 = +25.4^\circ$ (c=5.05 σε H_2O)

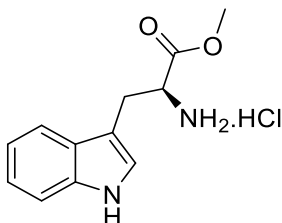
Σημείο τήξεως: 83-85 °C (σ.τ. $_{\beta\text{t}\beta\lambda}^6 = 83^\circ\text{C}$)

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 3.93-4.13 (m, 1H, CH), 3.55 (s, 3H, COOCH_3), 3.42 (s, 3H, COOCH_3), 1.90-2.59 (m, 4H, CH_2CH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O) δ 174.7, 170.1, 53.5, 52.3, 51.9, 29.2, 24.6

Methyl (2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanoate hydrochloride

Υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-3-(1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού
μεθυλεστέρα



67

Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας ως αμινοξύ την L-θρυπτοφάνη **77** (511 mg, 2.5 mmol). Απομονώθηκαν 509 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (CH ₂ Cl ₂ -MeOH-NH ₃ 9:1:0.5) |
|---------|--------|---|---|
| 80% | 254.71 | C ₁₂ H ₁₅ ClN ₂ O ₂ | 0.70 |

Λευκό στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +16.1^\circ$ (c=1.0 σε MeOH)

$[\alpha]_D^{20} \text{βιβλ}^7 = +16.8^\circ$ (c=1.0 σε MeOH)

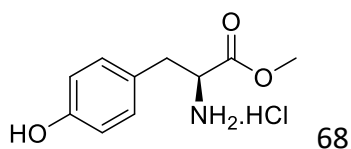
Σημείο τήξεως: 211-213 °C (σ.τ.βιβλ⁷=209-210 °C)

¹H NMR (D₂O) δ 7.34-7.44 (m, 2H, ArH), 7.02-7.18 (m, 3H, ArH), 4.23-4.31 (m, 1H, CH), 3.64 (s, 3H, COOCH₃), 3.26-3.34 (m, 2H, CH₂)

¹³C NMR (D₂O) δ 170.4, 136.2, 126.3, 125.4, 122.2, 119.6, 118.0, 112.0, 105.9, 53.5, 53.2, 25.6

Methyl (2S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate hydrochloride

Υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-3-(4-υδροξυφαινυλο) προπανοϊκού
μεθυλεστέρα



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας ως αμινοξύ την L-τυροσίνη **78** (453 mg, 2.5 mmol). Απομονώθηκαν 481 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (CH ₂ Cl ₂ -MeOH-NH ₃ 9:1:0.5) |
|---------|--------|---|---|
| 83% | 231.68 | C ₁₀ H ₁₄ ClNO ₃ | 0.47 |

Λευκό στερεό

$[\alpha]_D^{25} = -4.8^\circ$ (c=2.4 σε H₂O)

$[\alpha]_D^{20}{}_{\beta\text{ιβλ}}^8 = -5.2^\circ$ (c=2.4 σε H₂O)

Σημείο τήξεως: 191-192 °C (σ.τ._{βιβλ}⁸=189-190 °C)

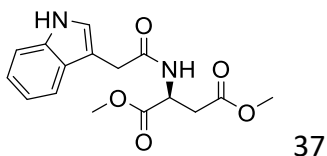
¹H NMR (D₂O) δ 6.74-7.16 (m, 4H, ArH), 4.24-4.36 (m, 1H, CH), 3.71 (s, 3H, COOCH₃), 3.02-3.22 (m, 2H, CH₂)

¹³C NMR (D₂O) δ 170.0, 155.1, 130.7, 130.6, 125.2, 115.8, 115.7, 54.1, 53.4, 34.6

Γενική πορεία σύζευξης

Σε αναδευόμενο διάλυμα του ινδολο-3-οξικού οξέος **1** (263 mg, 1.5 mmol) σε CH₂Cl₂ (12 ml), το οποίο ψύχθηκε στους 0 °C, προστέθηκε ο μεθυλεστέρας του εκάστοτε αμινοξέος υπό τη μορφή υδροχλωρικού άλατος (1.5 mmol, **65**, **66**, **67**, **68**, **69**, **70**, **71**, **72**, **73**, **74**). Στη συνέχεια προστέθηκαν διαδοχικά, Et₃N (0.5 mL, 3.3 mmol), WSCI.HCl (326 mg, 1.7 mmol) και HOBt (230 mg, 1.5 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση στους 0 °C για 1 ώρα και σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε AcOEt (20 mL), μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και εκπλύθηκε διαδοχικά με brine, κιτρικό οξύ 5%, brine, NaHCO₃ 5% και brine. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκε. Το εκάστοτε προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel 60 και διαλύτη έκλουσης AcOEt:πετρελαϊκό αιθέρα 40-60 °C 7:3.

Dimethyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]butanedioate
(2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]βουτανοδιοϊκός διμεθυλεστέρας



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινοβουτανοδιοϊκού διμεθυλεστέρα (dimethyl (2S)-2-aminobutanedioate hydrochloride) **65** (296 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 430 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt-Πετρ.αιθ. 7:3) |
|---------|--------|---|--------------------------------------|
| 90% | 318.33 | C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ | 0.41 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +34.0$ (c = 1.0 σε CHCl_3)

Σημείο τήξεως: 88-89 °C

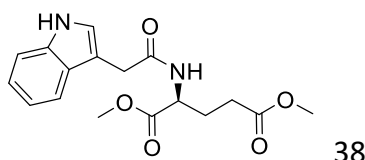
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 9.13 (s, 1H, NH), 7.49 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.30-7.25 (m, 1H, ArH), 7.18-7.02 (m, 2H, ArH), 6.93-6.86 (m, 2H, NHCO, ArH), 4.91-4.83 (m, 1H, CH), 3.73 (s, 2H, CH_2CONH), 3.60 (s, 3H, COOCH_3), 3.42 (s, 3H, COOCH_3), 2.97-2.72 (m, 2H, CHCH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 171.8, 171.7, 170.9, 136.2, 126.5, 124.0, 121.7, 119.1, 118.0, 111.3, 107.3, 52.4, 51.6, 48.2, 35.7, 32.9

HRMS (ESI) $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z=317.1143$, βρέθηκε 317.1136

IR (KBr, cm^{-1}) 3394, 3052, 2952, 1742, 1657, 1519, 1460, 1218, 1174

**Dimethyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]pentanedioate
(2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]πεντανοδιοϊκός διμεθυλεστέρας**



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινοπεντανοδιοϊκού διμεθυλεστέρα (dimethyl (2S)-2-aminopentanedioate hydrochloride) **66** (317 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 464 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | $R_f(\text{AcOEt}-\text{Πετρ.αιθ. 7:3})$ |
|---------|--------|--|--|
| 93% | 332.36 | $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ | 0.43 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = -15.3$ (c = 1.0 σε CHCl₃)

Σημείο τήξεως: 96-98 °C

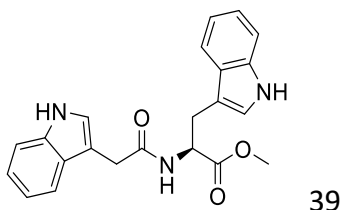
¹H NMR (CDCl₃) δ 9.24 (s, 1H, NH), 7.49 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.30-7.21 (m, 1H, ArH), 7.16-7.01 (m, 2H, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 6.65 (d, J = 7.7 Hz, 1H, NHCO), 4.59-4.55 (m, 1H, CH), 3.69 (s, 2H, CH₂CONH), 3.55 (s, 3H, COOCH₃), 3.52 (s, 3H, COOCH₃), 2.21-2.18 (m, 2H, CH₂), 2.12-1.98 (m, 1H, CHH), 1.83-1.73 (m, 1H, CHH)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.0, 172.2, 172.0, 136.4, 126.8, 124.1, 121.9, 119.4, 118.2, 111.5, 107.5, 52.2, 51.6, 51.6, 33.0, 29.7, 26.7

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=331.1299, βρέθηκε 331.1290

IR (KBr, cm⁻¹) 3276, 3058, 2952, 1736, 1651, 1530, 1442, 1259, 1165

**Methyl (2S)-3-(1H-indol-3-yl)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate
(2S)-3-(1H-ινδολ-3-υλο)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκός
μεθυλεστέρας**



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-3-(1H-ινδολ-3-υλ)προπανοϊκού μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanoate hydrochloride) **67** (382 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 507 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt-Πετρ.αιθ. 7:3) |
|---------|--------|---|--------------------------------------|
| 90% | 375.43 | C ₂₂ H ₂₁ N ₃ O ₃ | 0.41 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +8.8$ (c = 1.0 σε CHCl_3)

Σημείο τήξεως: 167-169 °C (σ.τ.β.βλ.⁹=170-172 °C)

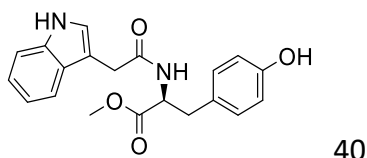
¹H NMR (CDCl_3) δ 9.03 (s, 1H, NH), 8.74 (s, 1H, NH), 7.49 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.40-7.33 (m, 2H, ArH), 7.26-7.06 (m, 6H, ArH), 6.50 (d, J = 8.7 Hz, 1H, NHCO), 6.12 (s, 1H, ArH), 4.98-4.87 (m, 1H, CH), 3.69 (s, 2H, CH_2CONH), 3.62 (s, 3H, COOCH_3), 3.31-3.09 (m, 2H, CH_2)

¹³C NMR (CDCl_3) δ 172.8, 172.6, 136.7, 136.5, 127.3, 127.2, 124.6, 123.5, 122.5, 122.2, 120.0, 119.7, 118.8, 118.4, 111.9, 111.8, 108.8, 107.8, 60.9, 52.8, 33.2, 27.7

HRMS (ESI) $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z=374.1510, βρέθηκε 374.1502

IR (KBr, cm^{-1}) 3382, 3085, 2846, 1739, 1669, 1521, 1456, 1230, 1092

Methyl (2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate
(2S)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2-[(1H-ινδολο-3-υλοακετυλο)αμινο]προπανοϊκός
μεθυλεστέρας



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπανοϊκού μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate hydrochloride) **68** (347 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 502 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt-Πετρ.αιθ. 7:3) |
|---------|--------|---|--------------------------------------|
| 95% | 352.39 | C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄ | 0.40 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +20.5$ (c = 1.0 σε CHCl_3)

Σημείο τήξεως: 103-105 °C

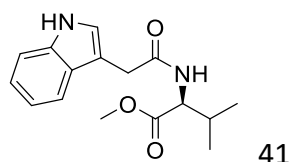
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.92 (s, 1H, NH), 7.75 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.41-7.11 (m, 4H, ArH), 6.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NHCO), 6.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH), 6.45-6.37 (m, 2H, ArH, OH), 4.84-4.80 (m, 1H, CH), 3.68 (s, 2H, CH_2CONH), 3.63 (s, 3H, COOCH_3), 2.87-2.86 (m, 2H, CH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 172.5, 172.0, 155.4, 136.2, 132.5, 129.8, 129.6, 126.5, 125.8, 124.2, 122.1, 119.6, 118.2, 115.4, 111.5, 106.9, 60.4, 52.3, 36.3, 32.8

HRMS (ESI) $[\text{M-H}]^-$ $m/z = 351.1350$, βρέθηκε 351.1344

IR (KBr, cm^{-1}) 3146, 3014, 2955, 1736, 1648, 1513, 1460, 1360, 1233, 1118

**Methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-3-methylbutanoate
(2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-3-μεθυλοβουτανοϊκός μεθυλεστέρας**



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-3-μεθυλοβουτανοϊκού μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-amino-3-methylbutanoate hydrochloride) **69** (251 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 398 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | $R_f(\text{AcOEt-Πετρ.αιθ. 7:3})$ |
|---------|--------|--|-----------------------------------|
| 92% | 288.35 | $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ | 0.51 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +15.6$ (c = 1.0 σε CHCl₃)

Σημείο τήξεως: 82-84 °C

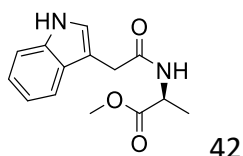
¹H NMR (CDCl₃) δ 9.24 (s, 1H, NH), 7.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.36 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.23-7.08 (m, 2H, ArH), 7.01 (s, 1H, ArH), 6.40 (d, J = 8.7 Hz, 1H, NHCO), 4.59-4.52 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 2H, CH₂CONH), 3.63 (s, 3H, COOCH₃), 2.09-1.99 (m, 1H, CH), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.67 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.2, 171.9, 136.3, 126.6, 123.9, 122.0, 119.4, 118.2, 111.4, 107.6, 57.0, 51.9, 33.1, 30.7, 18.7, 17.3

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=287.1401, βρέθηκε 287.1396

IR (KBr, cm⁻¹) 3275, 2960, 2878, 1735, 1650, 1517, 1459, 1370, 1208, 1093

Methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate
(2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκός μεθυλεστέρας



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-aminopropanoate hydrochloride) **70** (209 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 324 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt-Πετρ.αιθ. 7:3) |
|---------|--------|---|--------------------------------------|
| 83% | 260.29 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ | 0.45 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +40.1^\circ$ (c = 1.0 σε CHCl₃)

$[\alpha]_D^{25}_{\beta\text{βλ}}^{10} = +43.0^\circ$ (c=0.04 σε CHCl₃)

Σημείο τήξεως: 67-69 °C

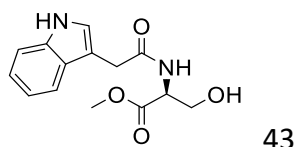
¹H NMR (CDCl₃) δ 9.18 (s, 1H, NH), 7.58 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.26-7.09 (m, 2H, ArH), 7.01 (s, 1H, ArH), 6.50 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NHCO), 4.69-4.55 (m, 1H, CH), 3.76 (s, 2H, CH₂CONH), 3.63 (s, 3H, COOCH₃), 1.30 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.3, 171.8, 136.5, 126.9, 124.2, 122.1, 119.6, 118.5, 111.6, 107.8, 52.3, 48.1, 33.2, 17.9

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=259.1088, βρέθηκε 259.1082

IR (KBr, cm⁻¹) 3394, 3061, 2955, 1748, 1651, 1521, 1460, 1218, 1168

**Methyl (2S)-3-hydroxy-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate
(2S)-3-υδροξυ-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκός μεθυλεστέρας**



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-3-υδροξυπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-amino-3-hydroxypropanoate hydrochloride) υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-3-υδροξυπροπανοϊκού μεθυλεστέρα **71** (233 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 352 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt) |
|---------|--------|---|------------------------|
| 85% | 276.29 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₄ | 0.33 |

Κίτρινο ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +13.5$ (c = 1.0 σε CHCl₃)

Σημείο τήξεως: 92-94 °C

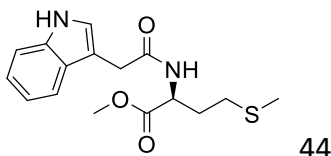
¹H NMR (CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H, NH), 7.53 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.31-7.26 (m, 1H, ArH), 7.20-7.06 (m, 2H, ArH), 6.92 (s, 1H, ArH), 6.82 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NHCO), 4.59-4.56 (m, 1H, CH), 3.85-3.73 (m, 3H, CH₂OH), 3.69 (s, 2H, CH₂CONH), 3.59 (s, 3H, COOCH₃)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.8, 171.0, 136.4, 127.0, 124.2, 122.4, 119.8, 118.5, 111.7, 108.0, 62.8, 54.8, 52.7, 33.2

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=275.1037, βρέθηκε 275.1031

IR (KBr, cm⁻¹) 3397, 3067, 2952, 1739, 1642, 1527, 1460, 1221, 1077

**Methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-4-(methylsulfanyl)butanoate
(2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-4-(μεθυλοσουλφανυλο)βουτανοϊκός
μεθυλεστέρας**



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-4-μεθυλοσουλφανυλοβουτανοϊκού μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-amino-4-methylsulfanylbutanoate hydrochloride) **72** (300 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 418 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt-Πετρ.αιθ. 7:3) |
|---------|--------|---|--------------------------------------|
| 87% | 320.41 | C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₃ S | 0.41 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +8.5$ (c = 1.0 σε CHCl₃)

Σημείο τήξεως: 83-85 °C

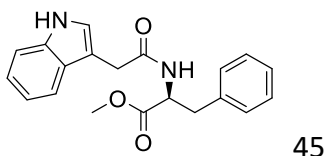
¹H NMR (CDCl₃) δ 9.14 (s, 1H, NH), 7.52 (d, J = 7.1 Hz, 1H, ArH), 7.35-7.31 (m, 1H, ArH), 7.26-7.07 (m, 2H, ArH), 7.00 (s, 1H, ArH), 6.62 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NHCO), 4.74-4.64 (m, 1H, CH), 3.73 (s, 2H, CH₂CONH), 3.60 (s, 3H, COOCH₃), 2.31-2.24 (m, 2H, CH₂), 2.02-1.96 (m, 2H, CH₂), 1.84 (s, 3H, SCH₃)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.5, 172.5, 136.7, 127.1, 124.5, 122.5, 119.9, 118.7, 111.9, 108.0, 52.7, 51.8, 33.5, 31.1, 30.1, 15.4

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=319.1122, βρέθηκε 319.1117

IR (KBr, cm⁻¹) 3391, 3052, 2946, 1739, 1651, 1521, 1456, 1221, 1177

Methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-3-phenylpropanoate
(2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-3-φαινυλοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του (2S)-2-αμινο-3-φαινυλοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-amino-3-phenylpropanoate hydrochloride) **73** (323 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 479 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (AcOEt-Πετρ.αιθ. 7:3) |
|---------|--------|---|--------------------------------------|
| 95% | 336.39 | C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃ | 0.49 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +48.3$ (c = 1.0 σε CHCl_3)

Σημείο τήξεως: 91-93 °C

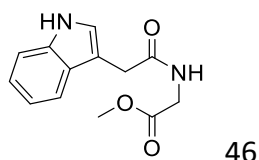
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 9.07 (s, 1H, NH), 7.51 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.40-7.36 (m, 1H, ArH), 7.26-7.06 (m, 5H, ArH), 6.84-6.85 (m, 1H, ArH), 6.74 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, ArH), 6.31 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NHCO), 4.96-4.86 (m, 1H, CH), 3.73 (s, 2H, CH_2CONH), 3.65 (s, 3H, COOCH_3), 3.06-2.89 (m, 2H, CH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 171.8, 171.7, 136.5, 135.3, 128.9, 128.4, 126.9, 126.9, 124.1, 122.2, 119.7, 118.5, 111.6, 107.7, 52.9, 52.2, 37.5, 33.2

HRMS (ESI) $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 335.1401$, βρέθηκε 335.1395

IR (KBr, cm^{-1}) 3423, 3061, 2958, 1754, 1654, 1527, 1457, 1215, 1086

Methyl [(1*H*-indol-3-ylacetyl)amino]acetate
[(1*H*-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]οξικός μεθυλεστέρας



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το υδροχλωρικό άλας του 2-αμινοοξικού μεθυλεστέρα (methyl 2-aminoacetate hydrochloride) **74** (188 mg, 1.5 mmol). Απομονώθηκαν 329 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | $R_f(\text{AcOEt}-\text{Πετρ.αιθ. } 8:2)$ |
|---------|--------|--|---|
| 89% | 246.27 | $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ | 0.37 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

Σημείο τήξεως: 63-65 °C

¹H NMR (CDCl₃) δ 9.36 (s, 1H, NH), 7.56 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, ArH), 7.33 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.26-7.10 (m, 2H, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 6.64 (bs, 1H, NHCO), 3.86 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂), 3.73 (s, 2H, CH₂CONH), 3.57 (s, 3H, COOCH₃)

¹³C NMR (CDCl₃) 172.7, 170.1, 136.3, 126.8, 124.2, 121.9, 119.4, 118.3, 111.5, 107.5, 51.9, 41.0, 32.7

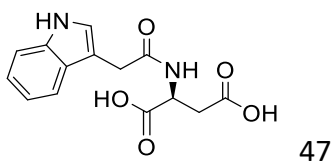
HRMS (ESI) [M-H]⁻ *m/z*=245.0932, βρέθηκε 245.0923

IR (KBr, cm⁻¹) 3390, 2949, 2849, 1751, 1645, 1545, 1459, 1221, 1106

Γενική πορεία σαπωνοποίησης

Σε αναδευόμενο διάλυμα των εκάστοτε συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος (0.4 mmol, **37**, **38**, **39**, **40**, **41**, **42**, **43**, **44**, **45**, **46**) σε MeOH (2 mL), προστέθηκε NaOH 2N (0.4 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκπλύθηκε με Et₂O. Η αιθερική στοιβάδα απομακρύνθηκε, η υδατική στοιβάδα οξινίστηκε με HCl 2N και εκχυλίστηκε με AcOEt (3x15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, εκπλύθηκαν με brine, ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και συμπυκνώθηκαν.

(2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]butanedioic acid (2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]βουτανοδιοϊκό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον (2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]βουτανοδιοϊκό διμεθυλεστέρα (dimethyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]butanedioate) **37** (127 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 108 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 93% | 290.27 | C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₅ | 0.68 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

[α]_D²⁵ = -5.4 ° (c=1.0 σε MeOH)

[α]_D²⁷_{β₁β_λ}¹¹ = -4.51° (c=1.0 σε MeOH)

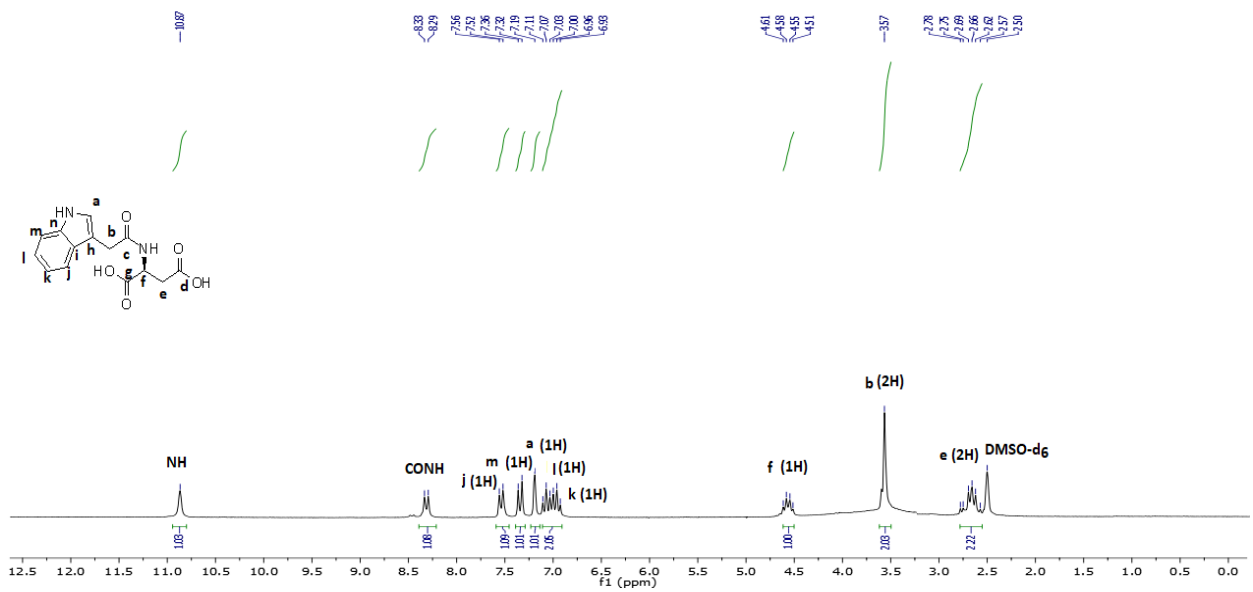
Σημείο τήξεως: 163-165 °C (σ.τ.β₁β_λ¹¹ = 164.5 °C)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.87 (s, 1H, NH), 8.31 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NHCO), 7.54 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.19 (s, 1H, ArH), 7.11-6.93 (m, 2H, ArH), 4.61-4.51 (m, 1H, CH), 3.57 (s, 2H, CH₂CONH), 2.78-2.57 (m, 2H, CH₂)

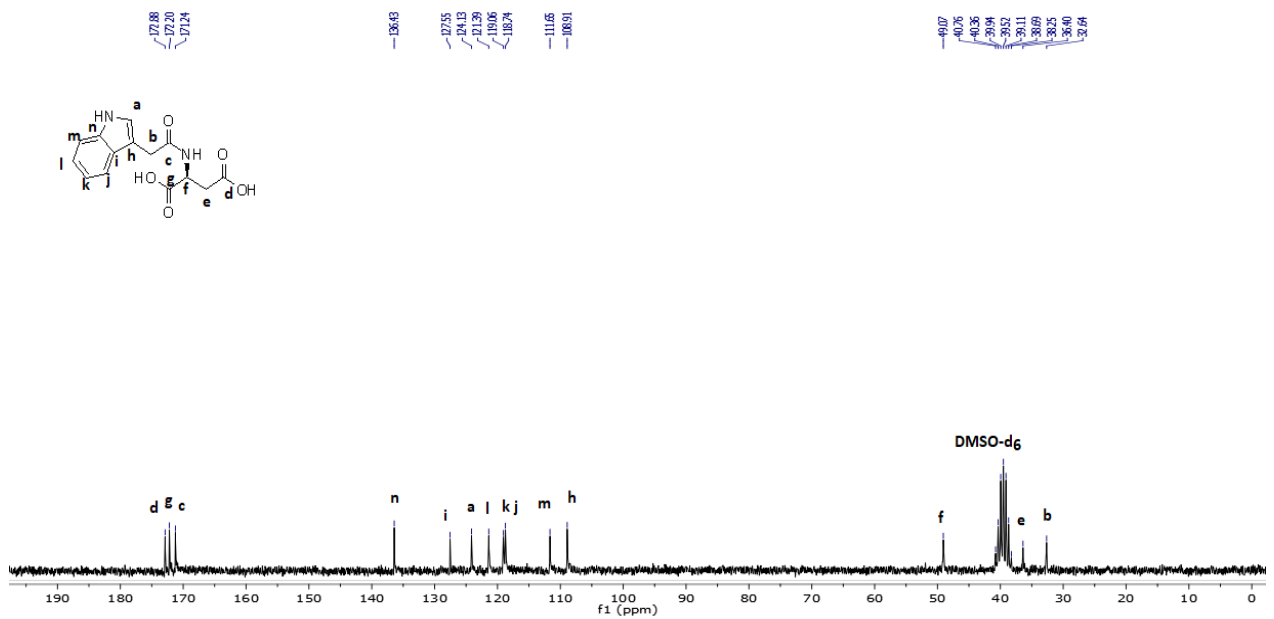
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 172.9, 172.2, 171.2, 136.4, 127.5, 124.1, 121.4, 119.1, 118.7, 111.6, 108.9, 49.1, 36.4, 32.6

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=289.0830, βρέθηκε 289.0821

IR (KBr, cm⁻¹) 3402, 3058, 2926, 2852, 1736, 1615, 1542, 1457, 1224, 1127

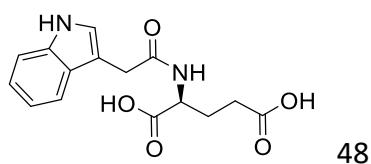


Σχήμα ΣΤ.7. Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης (47) σε DMSO-d_6



Σχήμα ΣΤ.8. Φάσμα $^{13}\text{C NMR}$ της ένωσης (47) σε DMSO-d_6

(2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]pentanedioic acid
 (2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]πεντανοδιοϊκό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον (2S)-2-[(1H-ινδολ-3-υλακετυλ)αμινο]πεντανοδιοϊκό διμεθυλεστέρα (dimethyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]pentanedioate) **38** (133 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 117 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 96% | 304.30 | C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₅ | 0.74 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = -10.0^\circ$ (c=1.0 σε MeOH)

$[\alpha]_D^{27}{}_{\beta\text{t}\beta\lambda}^{11} = -10.57^\circ$ (c=1.0 σε MeOH)

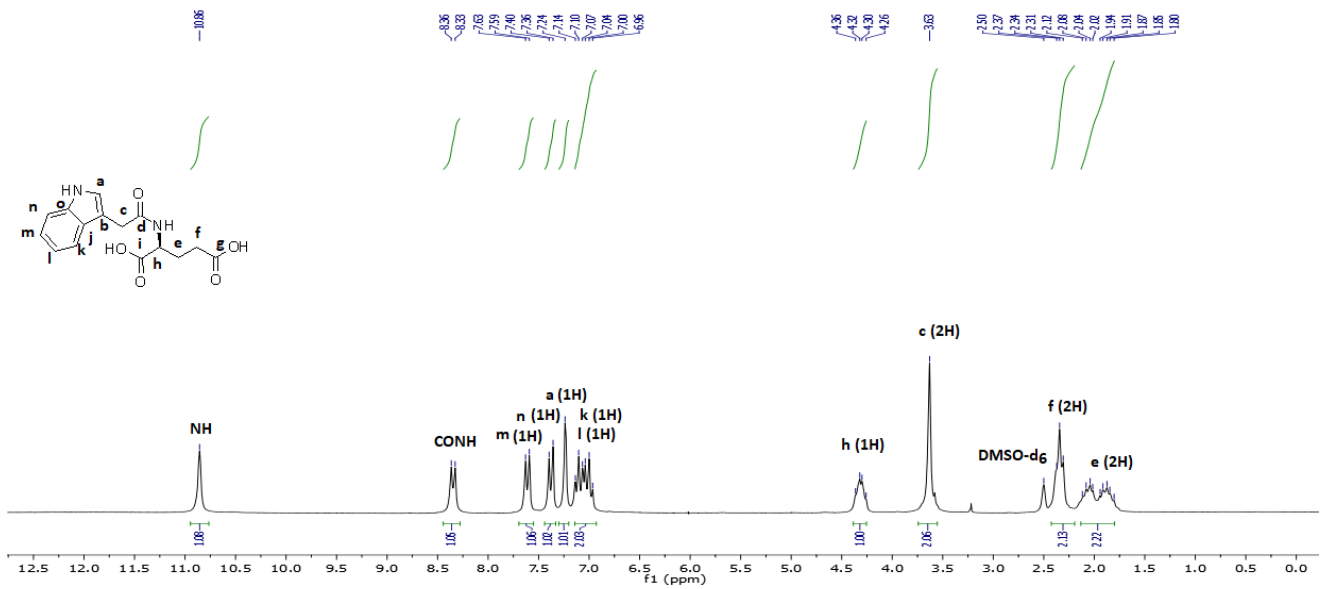
Σημείο τήξεως: 160-162 °C (σ.τ.β.βλ.¹¹=162.5 °C)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.86 (s, 1H, NH), 8.35 (d, J = 7.7 Hz, 1H, NHCO), 7.61 (d, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 7.14-6.96 (m, 2H, ArH), 4.36-4.26 (m, 1H, CH), 3.63 (s, 2H, CH₂CONH), 2.37-2.31 (m, 2H, CH₂), 2.12-1.80 (m, 2H, CH₂)

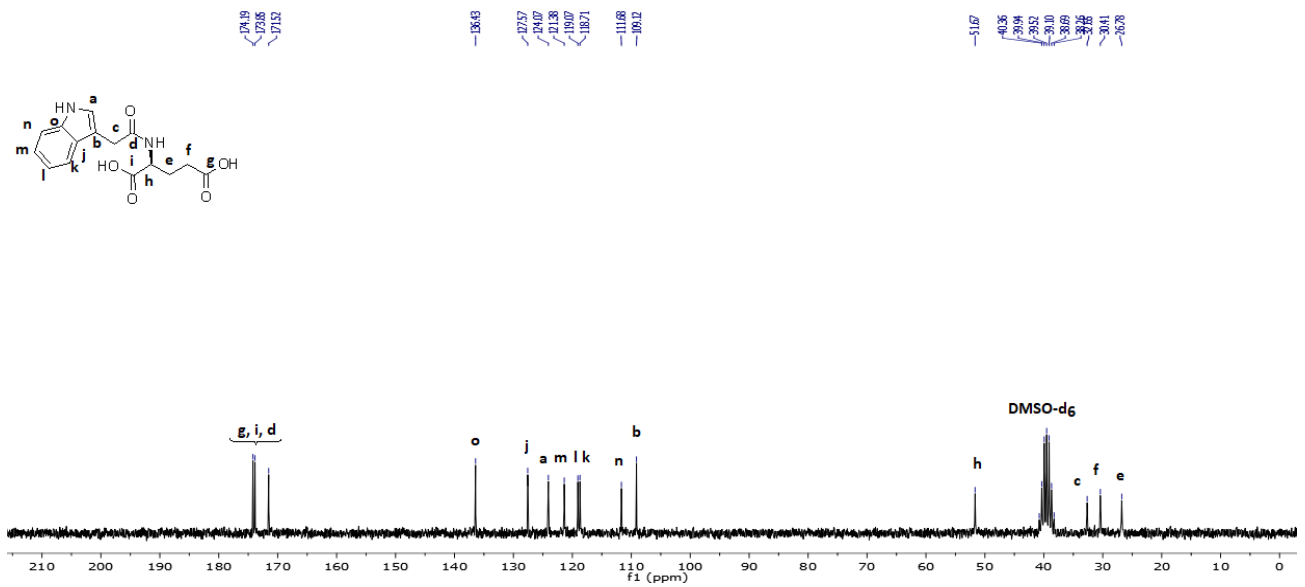
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 174.2, 173.8, 171.5, 136.4, 127.6, 124.1, 121.4, 119.1, 118.7, 111.7, 109.1, 51.7, 32.6, 30.4, 26.8

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=303.0986, βρέθηκε 303.0980

IR (KBr, cm⁻¹) 3714, 3322, 3055, 2917, 1728, 1660, 1524, 1430, 1224, 1101

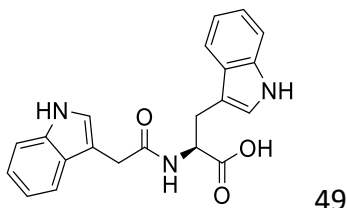


Σχήμα ΣΤ.9. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (48) σε DMSO- d_6



Σχήμα ΣΤ.10. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (48) σε DMSO- d_6

(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoic acid
(2S)-3-(1H-ινδολο-3-υλο)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον (2S)-3-(1H-ινδολ-3-υλο)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό μεθυλεστέρα (methyl (2S)-3-(1H-indol-3-yl)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate) **39** (150 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 137 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 95% | 361.40 | C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₃ | 0.87 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

[α]_D²⁵=+15.1° (c=1.0 σε MeOH)

[α]_D²⁰_{βλβλ}¹¹=+14.56° (c=1.0 σε MeOH)

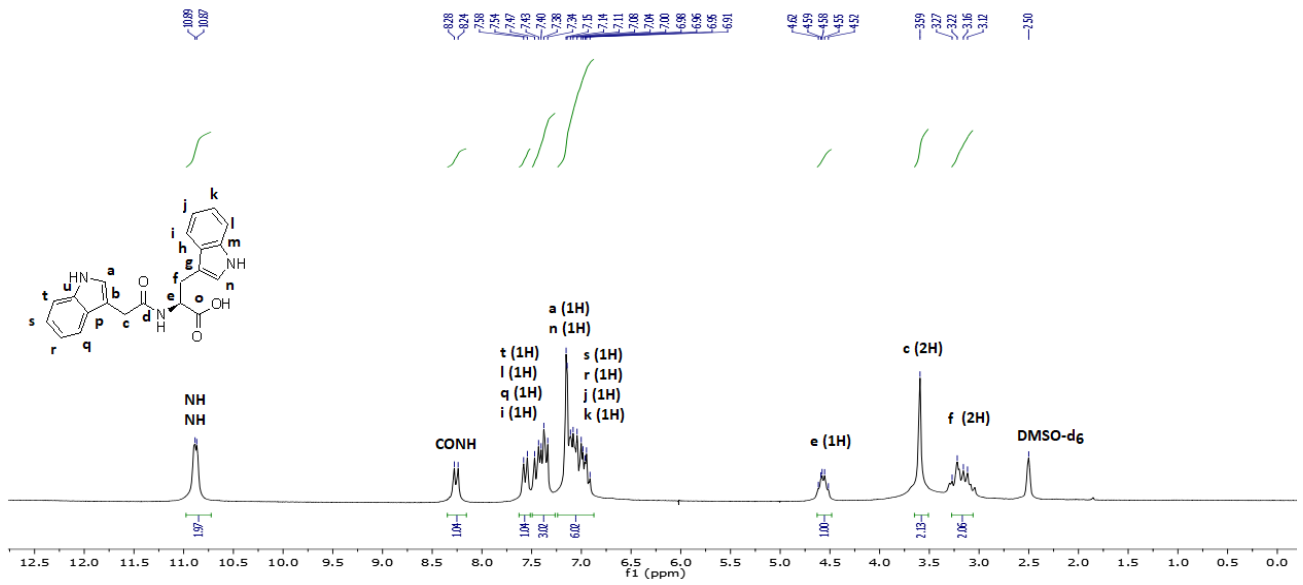
Σημείο τήξεως: 180-182 °C (σ.τ.βλβλ¹¹=181-183 °C)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.89-10.87 (m, 2H, NH, NH), 8.26 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NHCO), 7.56 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.47-7.34 (m, 3H, ArH), 7.15-6.91 (m, 6H, ArH), 4.62-4.52 (m, 1H, CH), 3.59 (s, 2H, CH₂CONH), 3.27-3.04 (m, 2H, CH₂)

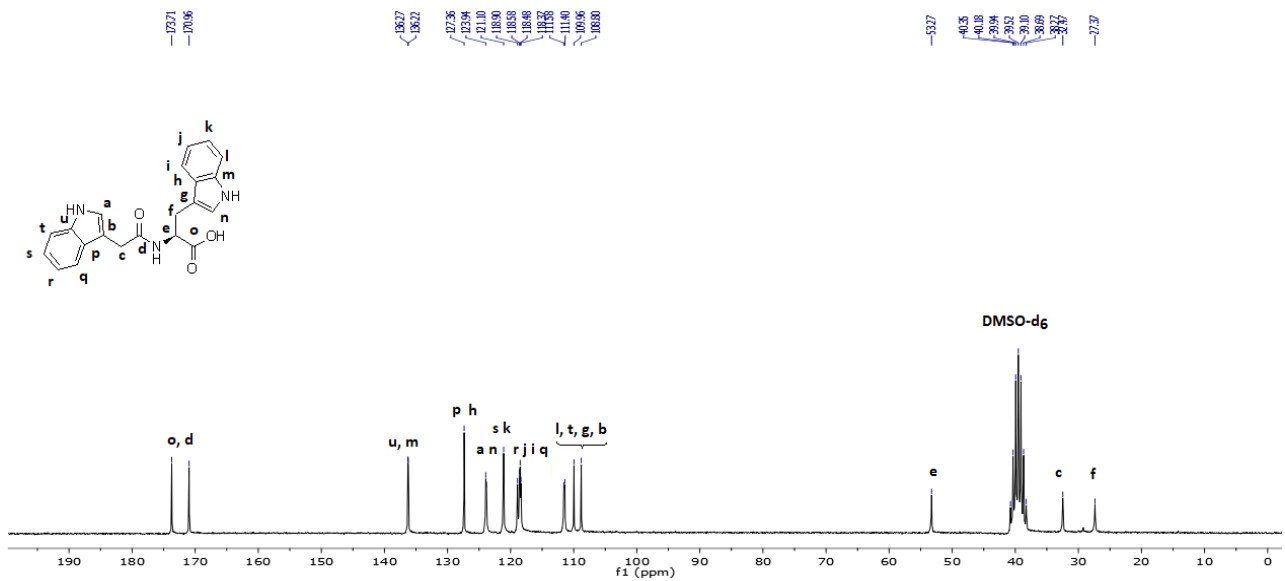
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 173.7, 171.0, 136.3, 136.2, 127.4, 123.9, 123.8, 121.1, 118.9, 118.6, 118.5, 118.4, 111.6, 111.4, 110.0, 108.8, 53.3, 32.5, 27.4

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=360.1354, βρέθηκε 360.1351

IR (KBr, cm⁻¹) 3408, 3037, 2922, 1786, 1622, 1527, 1465, 1215, 1095

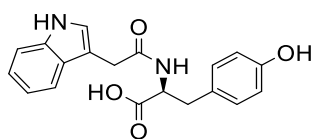


Σχήμα ΣΤ.11. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (49) σε DMSO-d_6



Σχήμα ΣΤ.12. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (49) σε DMSO-d_6

(2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoic acid
(2S)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό οξύ



50

Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον (2S)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό μεθυλεστέρα (methyl (2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate) **40** (141 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 124 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 92% | 338.36 | C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄ | 0.84 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

[α]_D²⁵=+28.9° (c=1.0 σε MeOH)

Σημείο τήξεως: 216-218 °C (σ.τ.βλ¹²=222-223 °C)

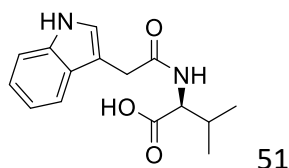
¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.86 (s, 1H, NH), 9.26 (s, 1H, COOH), 8.30 (t, J = 1.6 Hz, 1H, OH), 8.15 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NHCO), 7.55-7.34 (m, 2H, ArH), 7.25-6.94 (m, 5H, ArH), 6.66 (d, J = 8.3 Hz, 2H, ArH), 4.47-4.37 (m, 1H, CH), 3.57 (s, 2H, CH₂CONH), 3.00-2.76 (m, 2H, CH₂)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 173.4, 170.9, 156.1, 136.2, 130.2, 127.6, 127.3, 124.1, 124.0, 121.1, 118.9, 118.5, 115.2, 111.5, 111.4, 108.8, 54.0, 36.2, 32.5

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=337.1194, βρέθηκε 337.1191

IR (KBr, cm⁻¹) 3391, 3064, 2926, 2854, 1728, 1645, 1521, 1460, 1227, 1115

(2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-3-methylbutanoic acid
(2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-3-μεθυλοβουτανοϊκό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον (2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-3-μεθυλοβουτανοϊκό μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-3-methylbutanoate) **41** (115 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 107 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 98% | 274.32 | C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₃ | 0.83 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

[α]_D²⁵=+7.8° (c=1.0 σε MeOH)

[α]_D²⁵_{βιβλ}¹³=+10.3° (c=2.0 σε MeOH)

Σημείο τήξεως: 186-188 °C (σ.τ.βιβλ¹³=185-187 °C)

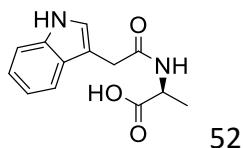
¹H NMR (CDCl₃) δ 8.58 (s, 1H, NH), 7.52 (d, J = 7.3 Hz, 1H, ArH), 7.36-7.06 (m, 3H, ArH), 7.00 (s, 1H, ArH), 6.40-6.29 (m, 1H, NHCO), 4.50-4.44 (m, 1H, CH), 3.74 (s, 2H, CH₂CONH), 2.10-2.01 (m, 1H, CH), 0.80 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.62 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 174.7, 173.2, 136.5, 126.9, 124.9, 122.6, 120.0, 118.6, 111.7, 107.9, 57.5, 33.1, 30.7, 19.1, 17.5

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=273.1245, βρέθηκε 273.1240

IR (KBr, cm⁻¹) 3293, 2963, 2869, 1701, 1621, 1545, 1430, 1262, 1109

(2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoic acid
 (2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον (2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate) **42** (104 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 96 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 97% | 246.27 | C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃ | 0.76 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = -20.3^\circ$ (c=1.0 σε MeOH)

$[\alpha]_D^{20}{}_{\beta\text{t}\beta\lambda}^{13} = -14.4^\circ$ (c=2.0 σε MeOH)

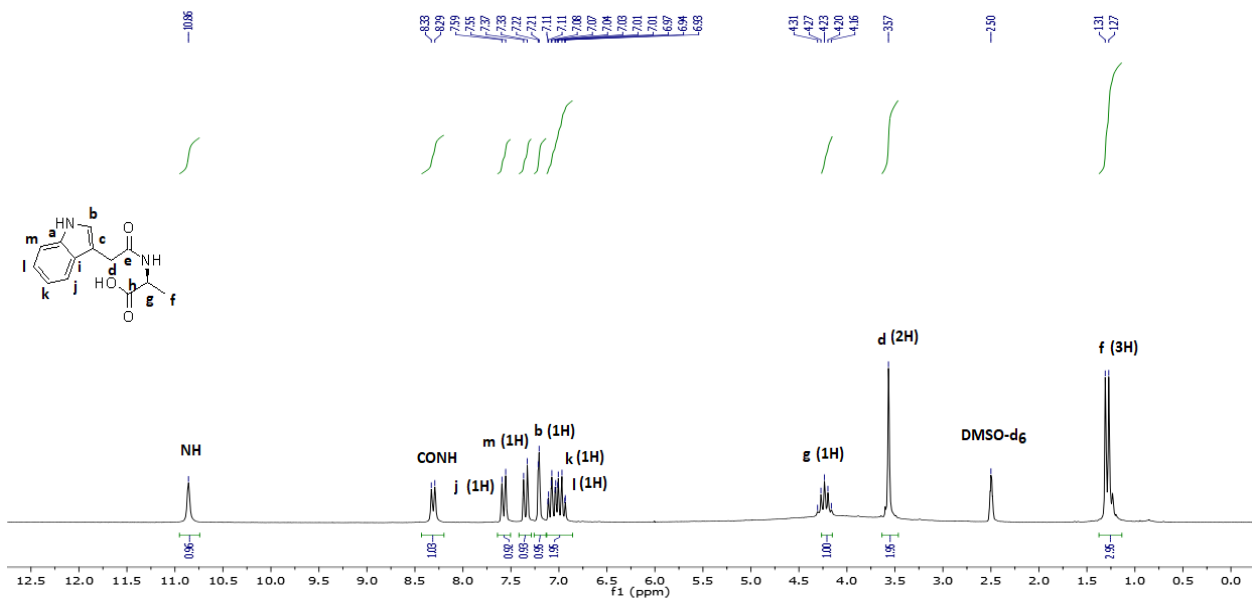
Σημείο τήξεως: 133-135 °C (σ.τ.β.βλ.¹³=134-135 °C)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.86 (s, 1H, NH), 8.31 (d, J = 7.2 Hz, 1H, NHCO), 7.57 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.21 (s, 1H, ArH), 7.11-6.93 (m, 2H, ArH), 4.31-4.16 (m, 1H, CH), 3.57 (s, 2H, CH₂CONH), 1.29 (d, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃)

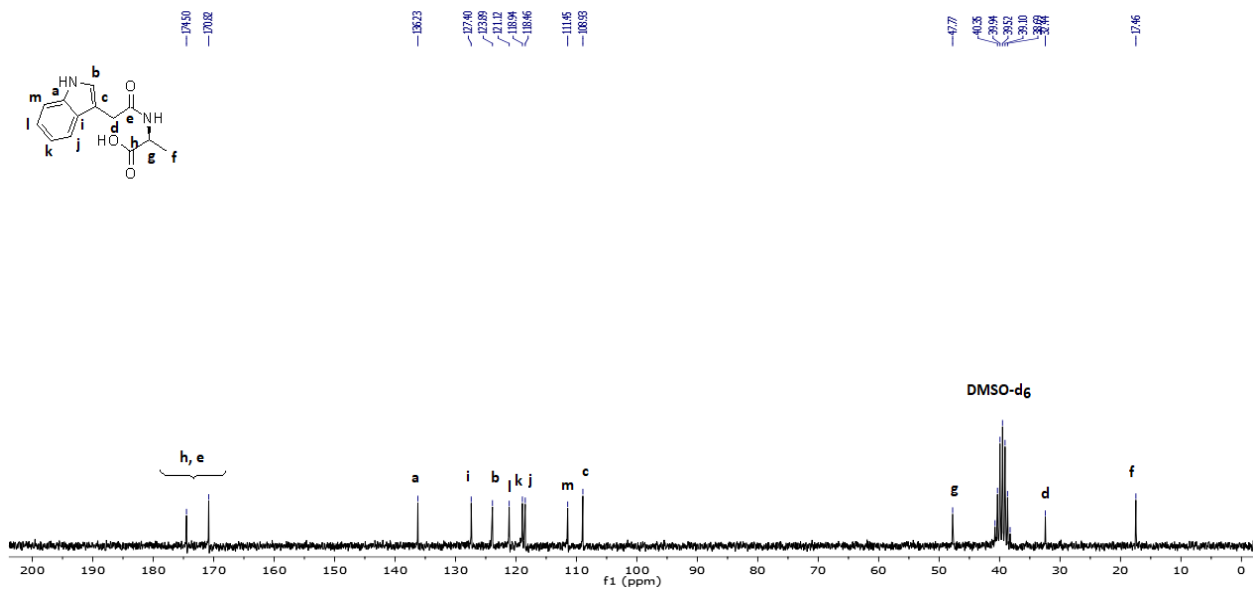
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 174.5, 170.8, 136.2, 127.4, 123.9, 121.1, 118.9, 118.5, 111.4, 108.9, 47.8, 32.4, 17.5

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=245.0932, βρέθηκε 245.0928

IR (KBr, cm⁻¹) 3368, 3061, 2973, 1722, 1642, 1536, 1462, 1262, 1168

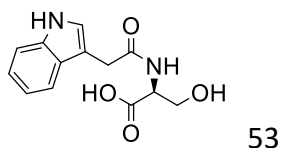


Σχήμα ΣΤ.13. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (52) DMSO-d_6



Σχήμα ΣΤ.14. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (52) DMSO-d_6

(2S)-3-hydroxy-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoic acid
(2S)-3-υδροξυ-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον (2S)-3-υδροξυ-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]προπανοϊκό μεθυλεστέρα (methyl (2S)-3-hydroxy-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]propanoate) **43** (110 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 101 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 96% | 262.26 | C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₄ | 0.67 |

Κίτρινο ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +5.5^\circ$ (c=1.0 σε MeOH)

Σημείο τήξεως: 191-193 °C (σ.τ.β_{βλ}¹²=195-200 °C)

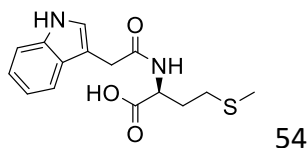
¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.87 (s, 1H, NH), 8.08 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NHCO), 7.59 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, J = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.11-6.94 (m, 2H, ArH), 4.36-4.27 (m, 1H, CH), 3.77-3.66 (m, 3H, CH₂OH), 3.62 (s, 2H, CH₂CONH)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 172.2, 171.0, 136.2, 127.4, 123.9, 121.0, 118.9, 118.4, 111.4, 108.8, 61.6, 54.8, 32.4

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=261.0881, βρέθηκε 261.0877

IR (KBr, cm⁻¹) 3661, 3381, 3143, 2958, 1739, 1645, 1545, 1433, 1251, 1101

(2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-4-(methylsulfonyl)butanoic acid
(2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-4-(μεθυλοσουλφανυλο)βουτανοϊκό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον (2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-4-(μεθυλοσουλφανυλο)βουτανοϊκό μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-4-(methylsulfonyl)butanoate) **44** (128 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 120 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 98% | 306.38 | C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₃ S | 0.80 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

[α]_D²⁵ = -13.5° (c=1.0 σε MeOH)

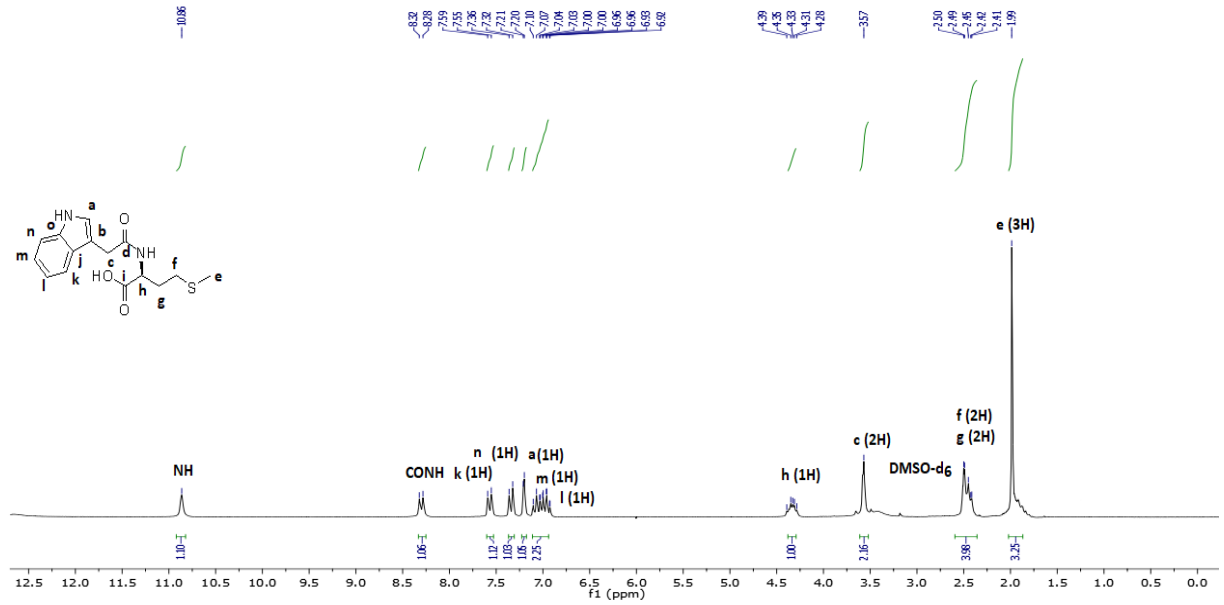
Σημείο τήξεως: 124-126 °C (σ.τ.βιβλ.¹⁴ = 123-124 °C)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.86 (s, 1H, NH), 8.30 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NHCO), 7.57 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.20 (s, 1H, ArH), 7.10-6.92 (m, 2H, ArH), 4.39-4.28 (m, 1H, CH), 3.57 (s, 2H, CH₂CONH), 2.50-2.41 (m, 4H, CH₂CH₂), 1.99 (s, 3H, SCH₃)

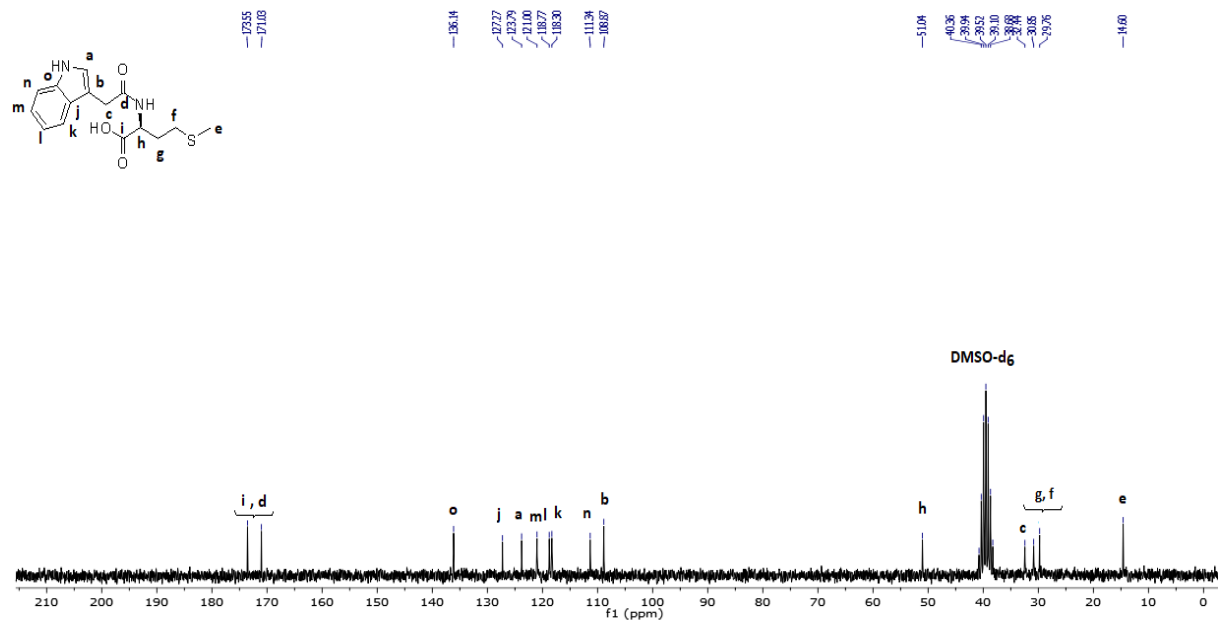
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 173.5, 171.0, 136.1, 127.3, 123.8, 121.0, 118.8, 118.3, 111.3, 108.9, 51.0, 32.4, 30.8, 29.8, 14.6

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=305.0965, βρέθηκε 305.0960

IR (KBr, cm⁻¹) 3346, 3052, 2928, 2858, 1748, 1622, 1545, 1430, 1230, 1127

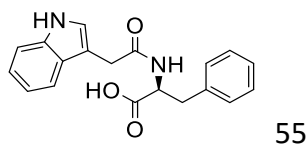


Σχήμα ΣΤ.15. Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης (54) DMSO- d_6



Σχήμα ΣΤ.16. Φάσμα $^{13}\text{C NMR}$ της ένωσης (54) DMSO- d_6

(2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-3-phenylpropanoic acid
(2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-3-φαινυλοπροπανοϊκό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας το (2S)-2-[(1H-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]-3-φαινυλοπροπανοϊκό μεθυλεστέρα (methyl (2S)-2-[(1H-indol-3-ylacetyl)amino]-3-phenylpropanoate) **45** (135 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 122 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 95% | 322.36 | C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃ | 0.81 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

$[\alpha]_D^{25} = +13.4^\circ$ (c=1.0 σε MeOH)

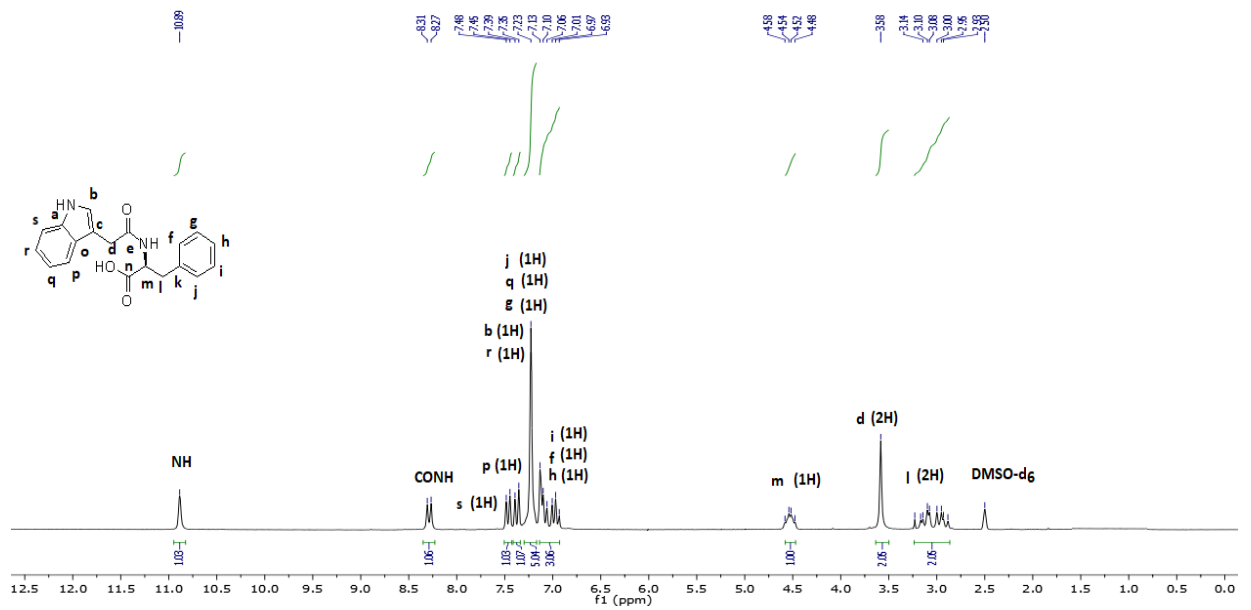
Σημείο τήξεως: 152-154 °C (σ.τ.βλ¹⁴=148-150 °C)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.89 (s, 1H, NH), 8.29 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NHCO), 7.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.23 (s, 5H, ArH), 7.13-6.93 (m, 3H, ArH), 4.58-4.48 (m, 1H, CH), 3.58 (s, 2H, CH₂CONH), 3.10-2.93 (m, 2H, CH₂)

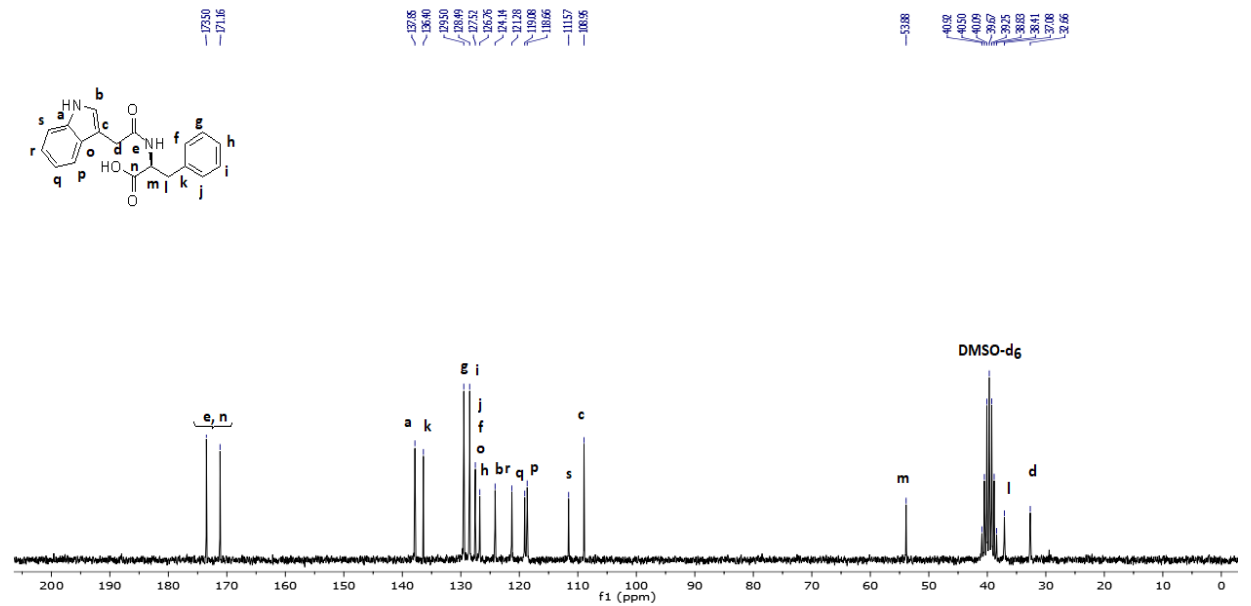
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 173.5, 171.2, 137.8, 136.4, 129.5, 128.5, 127.5, 126.8, 124.1, 121.3, 119.1, 118.7, 111.6, 108.9, 53.9, 37.1, 32.7

HRMS (ESI) [M-H]⁻ m/z=321.1245, βρέθηκε 321.1241

IR (KBr, cm⁻¹) 3426, 3061, 2928, 1775, 1616, 1530, 1454, 1206, 1171

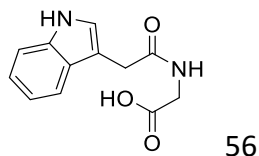


Σχήμα ΣΤ.17. Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης (55) DMSO- d_6



Σχήμα ΣΤ.18. Φάσμα $^{13}\text{C NMR}$ της ένωσης (55) DMSO- d_6

[(1*H*-indol-3-ylacetyl)amino]acetic acid
 [(1*H*-ινδολο-3-υλακετυλ)αμινο]οξικό οξύ



Το ανωτέρω προϊόν παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία παρασκευής χρησιμοποιώντας τον [(1*H*-ινδολο-3-υλοακετυλο)αμινο]οξικό μεθυλεστέρα (methyl [(1*H*-indol-3-ylacetyl)amino]acetate) **46** (98 mg, 0.4 mmol). Απομονώθηκαν 92 mg προϊόντος.

| Απόδοση | M.B. | M.T. | R _f (nBuOH-AcOH-H ₂ O 4:1:1) |
|---------|--------|---|---|
| 99% | 232.24 | C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃ | 0.74 |

Ανοιχτό ροζ στερεό

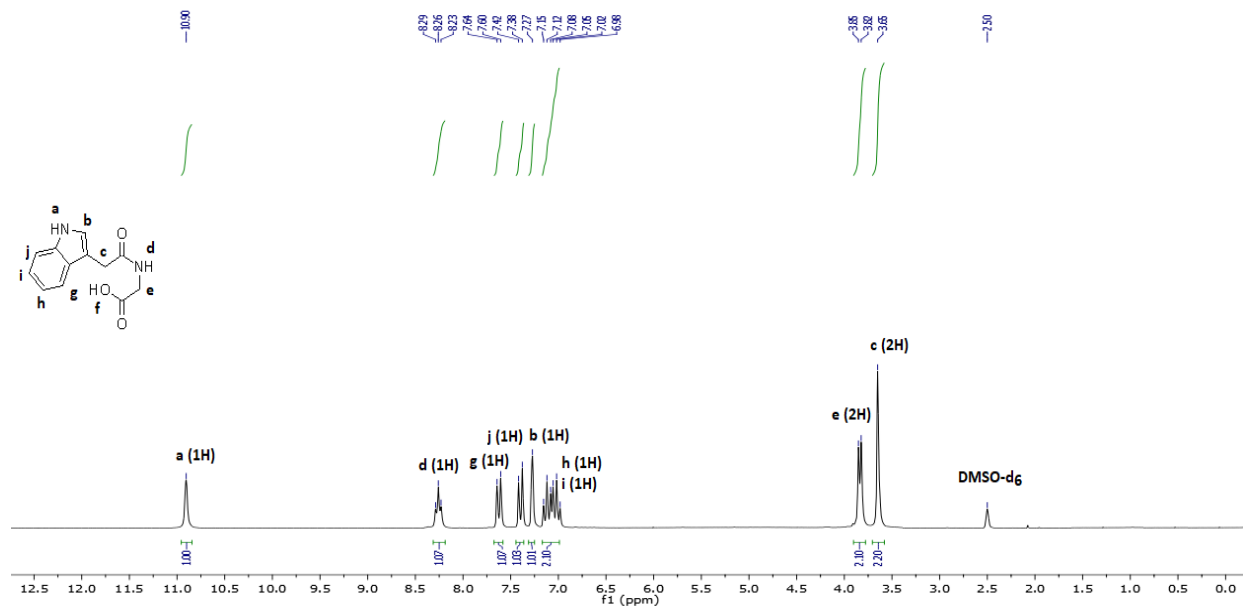
Σημείο τήξεως: 87-89 °C (σ.τ.βιβλ.¹³=86-87 °C)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.90 (s, 1H, NH), 8.26 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NHCO), 7.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.27 (s, 1H, ArH), 7.15-6.98 (m, 2H, ArH), 3.84 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 3.65 (s, 2H, CH₂CONH)

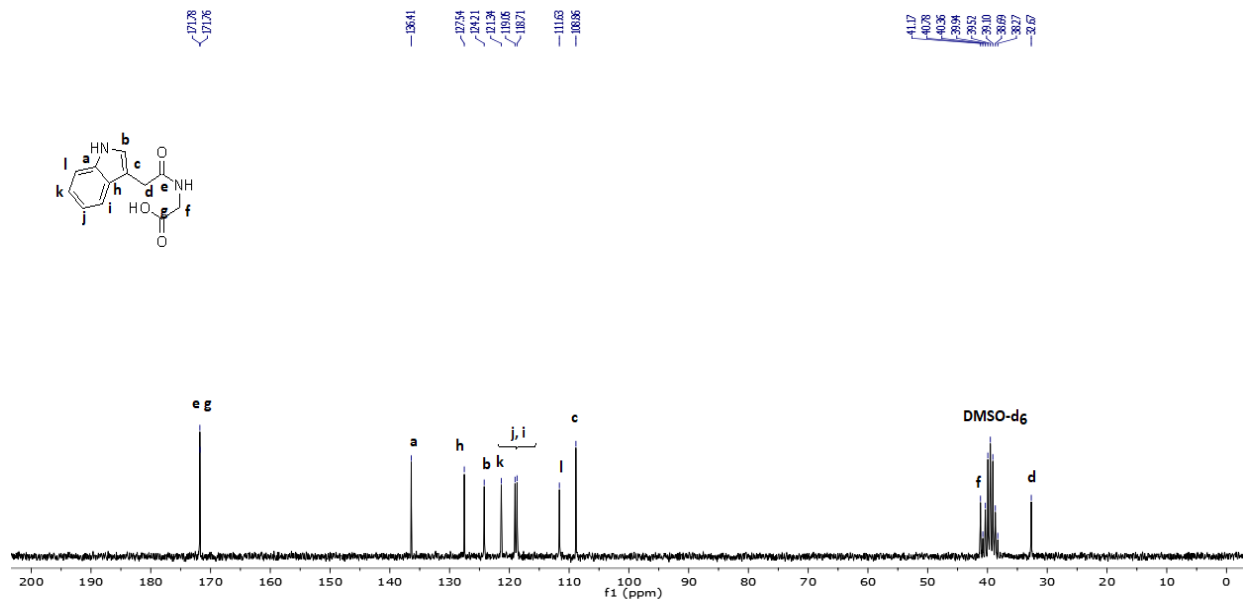
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 171.8, 171.8, 136.4, 127.5, 124.2, 121.3, 119.0, 118.7, 111.6, 108.9, 41.2, 32.7

HRMS (ESI) [M-H]⁻ *m/z*=231.0775, βρέθηκε 231.0770

IR (KBr, cm⁻¹) 3391, 3320, 2928, 1707, 1654, 1542, 1433, 1230, 1106



Σχήμα ΣΤ.19. Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης (56) DMSO- d_6



Σχήμα ΣΤ.20. Φάσμα $^{13}\text{C NMR}$ της ένωσης (56) DMSO- d_6

ΣΤ.3. Βιβλιογραφία

1. James, P. N., Snyder, H. R. (1959). Indole-3-aldehyde. *Organic Syntheses*, 39(30), 539.
2. Geissman, T. A., Armen, A. (1952). The reaction of gramine with methyl iodide. The preparation and properties of gramine methiodide. *Journal of the American Chemical Society*, 74(15), 3916-3919.
3. Kiss, G., Neukom, H. (1966). Über die struktur des ascorbigens. *Helvetica Chimica Acta*, 49(2), 989-992.
4. Shaw, K. N. F., McMillan, A., Gudmundson, A. G., Armstrong, M. D. (1958). Preparation and properties of β -3-indolyl compounds related to tryptophan metabolism. *Journal of Organic Chemistry*, 23(8), 1171-1178.
5. Korpis, K., Weber, F., Brune, S., Wünsch, B., Bednarski, P. J. (2014). Involvement of apoptosis and autophagy in the death of RPMI 8226 multiple myeloma cells by two enantiomeric sigma receptor ligands. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(1), 221-233.
6. Geiger, C., Zelenka, C., Weigl, M., Fröhlich, R., Wibbeling, B., Lehmkuhl, K., Schepmann, D., Grünert, R., Bednarski, P. J., Wünsch, B. (2007). Synthesis of bicyclic sigma receptor ligands with cytotoxic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(24), 6144-6153.
7. Lingenfelter, D. S., Helgeson, R. C., Cram, D. J. (1981). Host-guest complexation. 23. High chiral recognition of amino acid and ester guests by hosts containing one chiral element. *Journal of Organic Chemistry*, 46(2), 393-406.
8. Jung, M. E., Rohloff, J. C. (1985). Organic chemistry of L-tyrosine. 1. General synthesis of chiral piperazines from amino acids. *Journal of Organic Chemistry*, 50(24), 4909-4913.
9. Khalaf, R. A., Abdula, A. M., Mubarak, M. S., Taha, M. O. (2015). Tryptophan and thiosemicarbazide derivatives: design, synthesis, and biological evaluation as potential b-D-galactosidase and b-D-glucosidase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, 24(6), 2529-2550.
10. Vasudevan, N., Jachak, G. R., Reddy, D. S. (2015). Breaking and Making of Rings: A method for the preparation of 4-quinolone-3-carboxylic acid amides and the expensive drug Ivacaftor. *European Journal of Organic Chemistry*, 34, 7433-7437.
11. Weller, L. E., Sell, H. M. (1958). Synthesis of 3-indoleacetamides. *Journal of Organic Chemistry*, 23, 1776-1777.

12. Feung, C. S., Hamilton, R. H., Mumma, R. O. (1975). Indole-3-acetic acid. Mass spectra and chromatographic properties of amino acid conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1120-1124.
13. Magnus, V., Nigović, B., Hangarter, R. P., Good, N. E. (1992). *N*-(indol-3-ylacetyl)amino acids as sources of auxin in plant tissue culture. *Journal of Plant Growth Regulators*, 11, 19-28.
14. Katritzky, A. R., Khelashvili, L., Munawar, M. A. (2008). Syntheses of IAA- and IPA-amino acid conjugates. *Journal of Organic Chemistry*, 73, 9171-9173.

Κατάλογος Εικόνων

- Εικόνα Α.1.** Νεαρά φυτά του γένους *Brassica*
- Εικόνα Α.2.** Νεαρό φυτό λάχανου
- Εικόνα Α.3.** Τύποι λάχανου
- Εικόνα Α.4.** Άνθηση στο μπρόκολο
- Εικόνα Α.5.** Τύποι μπρόκολου
- Εικόνα Α.6.** Άνθηση στο κουνουπίδι
- Εικόνα Α.7.** Ρέβες
- Εικόνα Α.8.** Ανθισμένα φυτά ρόκας
- Εικόνα Α.9.** Ρεπάνια
- Εικόνα Α.10.** Νεροκάρδαμο
- Εικόνα Α.11.** Φασματοφωτόμετρο FT-IR Thermo Nicolet 6700 και υποδοχή ATR
- Εικόνα Α.12.** Φασματογράφος μάζας Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC-MS σε συνδιασμό με UHPLC

Κατάλογος Πινάκων

- Πίνακας Α.1.** Οικογένειες που ανήκουν στην τάξη Brassicales
- Πίνακας Α.2.** Σταυρανθή λαχανικά με βοτανολογική ταξινόμηση
- Πίνακας Α.3.** Μέση σύσταση θρεπτικών συστατικών σε διάφορα είδη σταυρανθών
- Πίνακας Α.4.** Μέση σύσταση μεταλλικών στοιχείων σε διάφορα είδη σταυρανθών
- Πίνακας Α.5.** Μέση σύσταση βιταμινών σε διάφορα είδη σταυρανθών
- Πίνακας Α.6.** Κυριότεροι γλυκοζινολίτες στα σταυρανθή λαχανικά
- Πίνακας Α.7.** Επίπεδα γλυκοζινολιτών σε σταυρανθή λαχανικά
- Πίνακας Α.8.** Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης γλυκοζινολιτών με βιολογική δράση
- Πίνακας Α.9.** Μέθοδοι προσδιορισμού προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών
- Πίνακας Α.10.** Περιεκτικότητα προϊόντων υδρόλυσης γλυκοζινολιτών σε διάφορα σταυρανθή λαχανικά
- Πίνακας Α.11.** Μέθοδοι προσδιορισμού φυτορμονών
- Πίνακας Α.12.** Επίπεδα φυτορμονών στο ρύζι
- Πίνακας Α.13.** Περιοχές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με σειρά αυξανόμενου μήκους κύματος
- Πίνακας Γ.1.** Βιβλιογραφικές παραπομπές για την σύνθεση των ισοθειακουανικών και ινδολικών ενώσεων
- Πίνακας Δ.1.** Οι απορροφήσεις στο IR της πρότυπης σουλφοραφάνης και η ερμηνεία τους
- Πίνακας Δ.2.** Περιεκτικότητα σε ολικά ισοθειακουανικά εκφρασμένη σε ισοδύναμα σουλφοραφάνης ανά 100 g φρέσκου μπρόκολου ± τυπική απόκλιση δέκα δειγμάτων μπρόκολου με τρεις επαναλήψεις όπως προσδιορίστηκε από την μέθοδο ATR FT-IR.
- Πίνακας Δ.3.** Περιεκτικότητα σε ολικά ισοθειακουανικά εκφρασμένη σε mg ισοδυνάμων σουλφοραφάνης ανά 100 g φρέσκου μπρόκολου ± τυπική απόκλιση δέκα δειγμάτων μπρόκολου, όπως προσδιορίστηκε με τη χρήση της φασματοφωτομετρίας UV.

- Πίνακας Δ.4.** Τα αποτελέσματα στατιστικών ελέγχων F και t και η ανάκτηση (%)
- Πίνακας Δ.5** Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό
- Πίνακας Δ.6.** Αναλυτικές παράμετροι για τον προσδιορισμό της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης
- Πίνακας Δ.7.** Περιεκτικότητα της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης σε 10 δείγματα μπρόκολου
- Πίνακας Δ.8.** Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον αρνητικό ESI ιοντισμό
- Πίνακας Δ.9.** Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό
- Πίνακας Δ.10.** Αναλυτικές παράμετροι για τον προσδιορισμό των παραγώγων του ινδολίου
- Πίνακας Δ.11.** Περιεκτικότητα ινδολικών παραγώγων σε σταυρανθή λαχανικά
- Πίνακας Ε.1.** Ενώσεις που μελετήθηκαν με φασματομετρία μαζών
- Πίνακας Ε.2.** Χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα στον θετικό ESI ιοντισμό
- Πίνακας Ε.3.** Χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα στον αρνητικό ESI ιοντισμό
- Πίνακας Ε.4.** Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον αρνητικό ESI ιοντισμό
- Πίνακας Ε.5.** Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό
- Πίνακας Ε.6.** Αναλυτικές παράμετροι για τον προσδιορισμό των φυτορμονών
- Πίνακας Ε.7.** Περιεκτικότητα φυτορμονών σε σταυρανθή λαχανικά

Κατάλογος Σχημάτων

- Σχήμα A.1.** Δομή γλυκοζινολίτη
- Σχήμα A.2.** Πορεία επιμήκυνσης ανθρακικής αλυσίδας μεθειονίνης κατά τη βιοσύνθεση των γλυκοζινολιτών
- Σχήμα A.3.** Βιοσύνθεση γλυκοζινολιτών
- Σχήμα A.4.** Ενζυμική υδρόλυση γλυκοζινολιτών
- Σχήμα A.5.** Ενζυμική υδρόλυση γλυκομπρασικίνης
- Σχήμα A.6.** Χημικοί τύποι φυσικών και συνθετικών αυξινών
- Σχήμα A.7.** Καταβολισμός και σύζευξη του IAA με L-ασπαρτικό οξύ στην τομάτα
- Σχήμα A.8.** Συζευγμένες δομές αυξινών με αμινοξέα
- Σχήμα A.9.** Χημικές δομές φυσικών ιασμονικών
- Σχήμα A.10.** Συζευγμένες δομές ιασμονικών
- Σχήμα A.11.** Δομές σαλικυλικού οξέος και των παραγώγων του
- Σχήμα A.12.** Η δομή του μηκητοκτόνου acibenzolar-*S*-methyl
- Σχήμα A.13.** Βασικά μέρη ενός φασματοφωτομέτρου FT-IR
- Σχήμα A.14.** Διάγραμμα αερόψυκτης πηγής υπερύθρου
- Σχήμα A.15.** Συμβολόμετρο Michelson
- Σχήμα A.16.** Ένα παράδειγμα υπέρυθρου φάσματος του οποίου η γραμμή βάσης έχει μετατοπιστεί κατά $\sim 0,2$ μονάδες απορρόφησης
- Σχήμα A.17.** Φάσμα FTIR στο οποίο υπάρχει κλίση στη βασική γραμμή
- Σχήμα A.18.** Φάσμα υπερύθρου στο οποίο υπάρχει μεγάλη καμπύλη στη βασική γραμμή
- Σχήμα A.19.** Φάσμα FTIR πολυστυρενίου με 10% λευκό θόρυβο (—) εξομάλυνση 21 σημείων με τον αλγόριθμο Savitzky – Golay (----) και εξομάλυνση Fourier 30 σημείων (.....)
- Σχήμα A.20.** Ευρεία φασματική γραμμή πριν (a) και μετά (b) την αποσυνέλιξη
- Σχήμα A.21.** Σχηματική παρουσίαση επιφάνειας υποδοχής στην τεχνική ATR
- Σχήμα A.22.** Μέρη φασματογράφου μάζας
- Σχήμα A.23.** Ιοντισμός MALDI
- Σχήμα A.24.** Πηγή ιόντων APCI

- Σχήμα Α.25.** Πηγή ESI
- Σχήμα Α.26.** Σχηματική παράσταση του κώνου Taylor και σχηματισμός εκνεφώματος
- Σχήμα Α.27.** Διακριτική ικανότητα στη φασματομετρία μαζών
- Σχήμα Α.28.** Τετραπολικός αναλυτής
- Σχήμα Α.29.** Τριπλό τετράπολο
- Σχήμα Α.30.** Σχήμα ενός φασματογράφου MALDI-TOF με ανακλαστήρα
- Σχήμα Α.31.** Αναλυτής Q-TOF με πηγή ESI
- Σχήμα Α.32.** Αναλυτής orbitrap
- Σχήμα Α.33.** Η διαδικασία που ακολουθείται στον αναλυτή FT-ICR
- Σχήμα Α.34.** Σύγκριση των μεθόδων ανάλυσης δεδομένων στη φασματομετρία HRMS
- Σχήμα Γ.1.** Σύνθεση των ενώσεων **(65)**, **(66)**, **(67)** και **(68)**
- Σχήμα Γ.2.** Σύνθεση συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με αμινοξέα
- Σχήμα Γ.3.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **(50)** σε DMSO-d_6
- Σχήμα Γ.4.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **(50)** σε DMSO-d_6
- Σχήμα Γ.5.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **(51)** σε CDCl_3
- Σχήμα Γ.6.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **(51)** σε CDCl_3
- Σχήμα Γ.7.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **(53)** DMSO-d_6
- Σχήμα Γ.8.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **(53)** DMSO-d_6
- Σχήμα Δ.1.** Ενζυμική υδρόλυση της γλυκοραφάνης
- Σχήμα Δ.2.** Συνοπτική παρουσίαση της διαδικασίας εκχύλισης των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών από σταυρανθή λαχανικά
- Σχήμα Δ.3.** FT-IR φάσμα της πρότυπης σουλφοραφάνης
- Σχήμα Δ.4.** FT-IR φάσμα πρότυπου διαλύματος της σουλφοραφάνης συγκέντρωσης 400 mg/100mL σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο
- Σχήμα Δ.5.** Η φασματική περιοχή $2150\text{-}2020\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR των: a) πρότυπο διάλυμα με 0 mg/100 mL σουλφοραφάνης; b) πρότυπο διάλυμα με 200 mg/100 mL σουλφοραφάνης; c) πρότυπο διάλυμα με 400 mg/100 mL σουλφοραφάνης; d) εκχύλισμα μπρόκολου (αριθμός δείγματος 10)

- Σχήμα Δ.6.** Γραμμική συσχέτιση μεταξύ των “actual” και “calculated” τιμών των συγκεντρώσεων των προτύπων σουλφοραφάνης
- Σχήμα Δ.7.** Γενική αντίδραση παραγωγοποίησης ισοθιοκυανικών ενώσεων με 1,2-βενζοδιθειόλη
- Σχήμα Δ.8.** Φάσμα UV 1,3-βενζοδιθειόλης-2-θειόνης 100 μM, σε διάλυμα 1.1 mL μεθανόλης και 0.9 mL ρυθμιστικού διαλύματος (pH 8.5)
- Σχήμα Δ.9.** Καμπύλη βαθμονόμησης μεταξύ της συγκέντρωσης (μM) ισοθιοκυανικών ενώσεων και της αντίστοιχης απορρόφησής τους στα 365 nm
- Σχήμα Δ.10.** Περιεκτικότητα των ολικών ισοθιοκυανικών ενώσεων σε 10 δείγματα μπρόκολου όπως προσδιορίστηκε από την νέα μέθοδο ATR FT-IR και τη μέθοδο UV-Vis της βιβλιογραφίας. Σύγκριση του μέσου όρου των δέκα δειγμάτων μπρόκολου (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)
- Σχήμα Δ.11.** Φάσμα πλήρους σάρωσης (A) και MS/MS (B) της σουλφοραφάνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (C) και MS/MS (D) της σουλφοραφάνης στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.12.** Προτεινόμενο μοτίβο θραυσματοποίησης της σουλφοραφάνης στον θετικό ιοντισμό ESI (A) και οι προτεινόμενοι από το λογισμικό Data Analysis χημικοί τύποι των θραυσμάτων (B) και (C)
- Σχήμα Δ.13.** Φάσμα πλήρους σάρωσης (A) και MS/MS (B) της ινδολο-3-καρβινόλης στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.14.** Απόσπαση H₂O από το μητρικό ιόν [M+Na]⁺ της ινδολο-3-καρβινόλης και σχηματισμός του ιόντος κινολινίου, στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.15.** Καμπύλη βαθμονόμησης για τη σουλφοραφάνη (A) και την ινδολο-3-καρβινόλη (B) στον θετικό ESI ιοντισμό
- Σχήμα Δ.16.** Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων πρότυπου διαλύματος σουλφοραφάνης (2 μg/mL) σε m/z 178.0355 (A) και δείγματος μπρόκολου (B) και χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων πρότυπου διαλύματος ινδολο-3-καρβινόλης (10 μg/mL) σε m/z 170.0576 (C) και εκκλίσηματος μπρόκολου (D)

- Σχήμα Δ.17.** Ενζυμική υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης και γλυκοραφανίνης και παραγωγή ινδολο-3-καρβινόλης και σουλφοραφάνης
- Σχήμα Δ.18.** Περιεκτικότητα της σουλφοραφάνης και της ινδολο-3-καρβινόλης σε 10 δείγματα μπρόκολου όπως μετρήθηκε από την μέθοδο UPLC HRMS/MS. Σύγκριση του μέσου όρου των δέκα δειγμάτων μπρόκολου (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)
- Σχήμα Δ.19.** Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-καρβινόλης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-καρβινόλης στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.20.** Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ινδολο-3-ακετονιτριλίου στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ινδολο-3-ακετονιτριλίου στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.21.** Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ασκορβιγόνου στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ασκορβιγόνου στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.22.** Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.23.** Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων $[M-H]^-$ της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ασκορβιγόνου (**35**) και της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.24.** Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ασκορβιγόνου (**35**) και της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**), στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Δ.25.** Καμπύλη βαθμονόμησης για την ινδολο-3-καρβαλδεΐδη (A) και την ινδολο-3-καρβινόλη (B) στον αρνητικό ESI ιοντισμό

- Σχήμα Δ.26.** Καμπύλη βαθμονόμησης για το ινδολο-3-ακετονιτριλίο (A) και το ασκορβιγόνιο (B) στον αρνητικό ESI ιοντισμό
- Σχήμα Δ.27.** Χρωματογράφημα του εξαγόμενου ιόντος προτύπου διαλύματος (3 μg/mL) ινδολο-3-καρβινόλης (a) και εκχυλίσματος κουνουπιδιού (b) σε m/z 146.0611, προτύπου διαλύματος ινδολο-3-ακετονιτριλίου (c) και εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου σε m/z 155.0615, προτύπου διαλύματος ασκορβιγόνου (e) και εκχυλίσματος πράσινου μπρόκολου (f) σε m/z 304.0827, προτύπου διαλύματος ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (g) και εκχυλίσματος ρέβας (h) σε m/z 144.0455 στον αρνητικό ESI ιοντισμό
- Σχήμα Δ.28.** Ενζυμική υδρόλυση της γλυκομπρασικίνης και παραγωγή ινδολο-3-ακετονιτριλίου και ινδολο-3-καρβινόλης και των προϊόντων μεταβολισμού της ινδολο-3-καρβινόλης, ασκορβιγόνιο και ινδολο-3-καρβαλδεΐδη
- Σχήμα Δ.29.** Περιεκτικότητα γλυκομπρασικίνης στα σταυρανθή λαχανικά σύμφωνα με τη βιβλιογραφία
- Σχήμα Δ.30.** Περιεκτικότητα των προϊόντων υδρόλυσης της γλυκομπρασικίνης στα σταυρανθή λαχανικά. Σύγκριση του μέσου όρου των δειγμάτων (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)
- Σχήμα Ε.1.** Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Ε.2.** Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-σερίνης στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα Ε.3.** Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος (**37-56**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ινδολο-3-οξικού οξέος (**1**) του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**) και του 4-

- χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος (**3**), στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα E.4.** Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**), του ιασμονικού οξέος (**20**) και του σαλικυλικού οξέος (**57**), στον θετικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα E.5.** Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**) και των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος (**41-46**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα E.6.** Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με τον διμεθυλεστέρα του γλουταμινικού οξέος (**38**), τον μεθυλεστέρα της θρυπτοφάνης (**39**) και της τυροσίνης (**40**) και τον διμεθυλεστέρα του ασπαρτικού οξέος (**37**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα E.7.** Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με την θρυπτοφάνη (**49**), την τυροσίνη (**50**) την σερίνη (**53**), την μεθειονίνη (**54**), τη γλυκίνη (**56**), την βαλίνη (**51**), ασπαρτικό οξύ (**47**), γλουταμινικό οξύ (**48**), φαινυλαλανίνη (**55**) και την αλανίνη (**52**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα E.8.** Θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος (**3**), του ινδολο-3-οξικού οξέος (**1**), του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**), του ιασμονικού οξέος (**20**) και του σαλικυλικού οξέος (**57**), στον αρνητικό ιοντισμό ESI
- Σχήμα E.9.** Περιεκτικότητα των σταυρανθών λαχανικών σε ιασμονικό οξύ (JA), σαλικυλικό οξύ (SA), ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) και 4-χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ (4-Cl-IAA). Σύγκριση του μέσου όρου των δειγμάτων (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)
- Σχήμα E.10.** Περιεκτικότητα των σταυρανθών λαχανικών σε ινδολο-3-ακεταμίδιο (IAM), ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (IAN) και ινδολο-3-καρβαλδεΐδη (I3CHO). Σύγκριση του μέσου όρου των δειγμάτων (το διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές για $p < 0.05$)

- Σχήμα Ε.11.** Βιοσύνθεση του ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA) από την θρυπτοφάνη (Trp) στο Arabidopsis
- Σχήμα Ε.12.** Βιοσύνθεση ινδολικών ενώσεων από την θρυπτοφάνη (Trp) στο Arabidopsis
- Σχήμα Ε.13.** Περιεκτικότητα των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος με αμινοξέα, στα σταυρανθή λαχανικά
- Σχήμα Ε.14.** Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων προτύπου διαλύματος (100 ng/mL) IASer (a), ενός εκχυλίσματος μωβ μπρόκολου (b) και το MS/MS φάσμα ενός εκχυλίσματος μωβ μπρόκολου (c) σε m/z 261.0881 υπό αρνητικό ESI ιοντισμό
- Σχήμα Ε.15.** Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων ενός προτύπου διαλύματος (100 ng/mL) IASer-Me (a), ενός εκχυλίσματος από ραπανάκι (b) και το MS/MS φάσμα ενός εκχυλίσματος από ραπανάκι (c) σε m/z 275.1037 υπό αρνητικό ESI ιοντισμό
- Σχήμα Ε.16.** Συμμετοχή των συζευγμάτων του ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA) στο μεταβολισμό των αυξινών
- Σχήμα ΣΤ.1.** Φάσμα ^1H NMR του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**) σε CDCl_3
- Σχήμα ΣΤ.2.** Φάσμα ^{13}C NMR του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**) σε CDCl_3
- Σχήμα ΣΤ.3.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**35**) σε CD_3OD
- Σχήμα ΣΤ.4.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**35**) σε CD_3OD
- Σχήμα ΣΤ.5.** Φάσμα ^1H NMR του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**) σε CD_3COCD_3
- Σχήμα ΣΤ.6.** Φάσμα ^{13}C NMR του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**) σε CD_3COCD_3
- Σχήμα ΣΤ.7.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**47**) σε DMSO-d_6
- Σχήμα ΣΤ.8.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**47**) σε DMSO-d_6
- Σχήμα ΣΤ.9.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**48**) σε DMSO-d_6
- Σχήμα ΣΤ.10.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**48**) σε DMSO-d_6
- Σχήμα ΣΤ.11.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**49**) σε DMSO-d_6
- Σχήμα ΣΤ.12.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**49**) σε DMSO-d_6
- Σχήμα ΣΤ.13.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**52**) DMSO-d_6
- Σχήμα ΣΤ.14.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**52**) DMSO-d_6
- Σχήμα ΣΤ.15.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**54**) DMSO-d_6

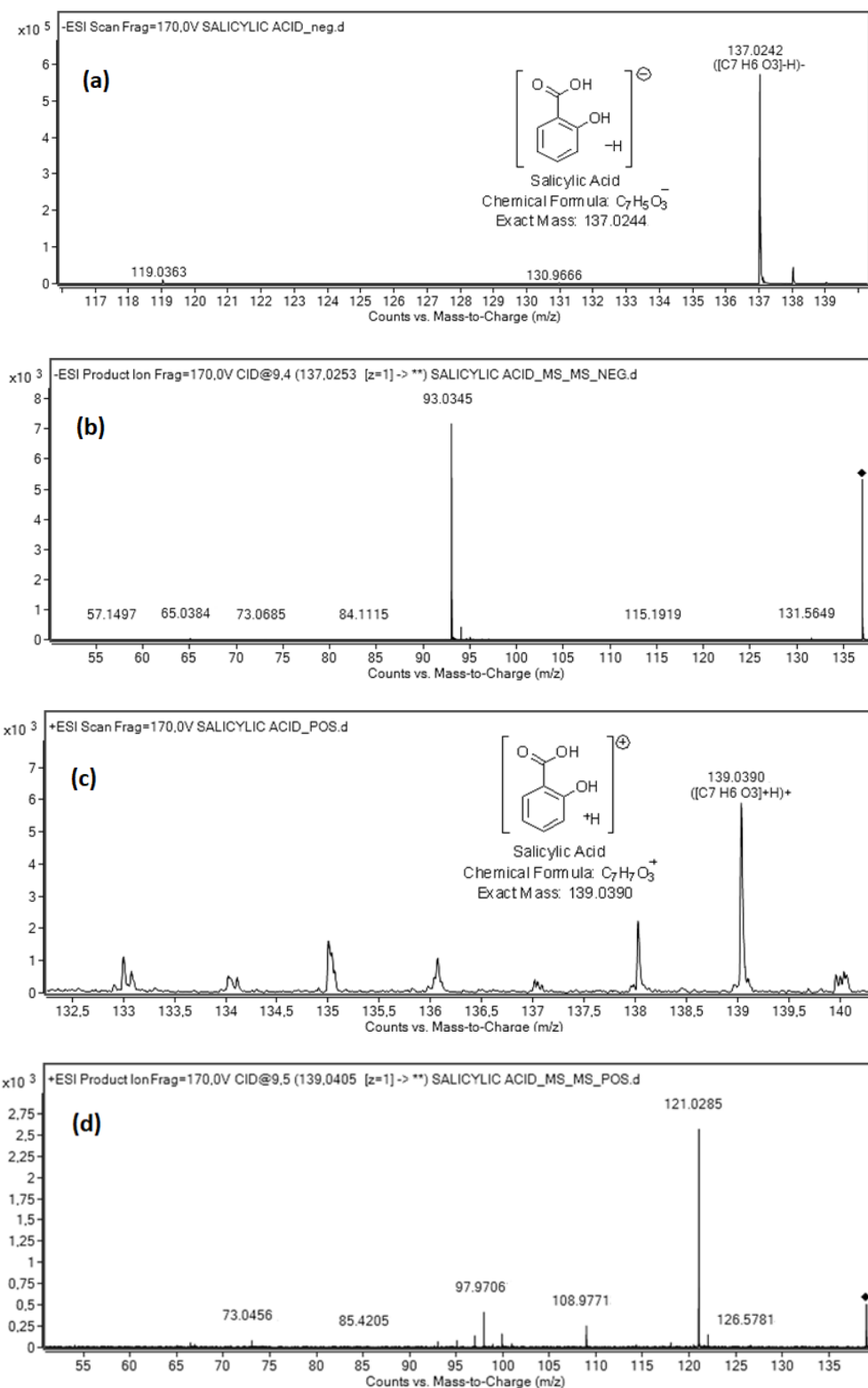
- Σχήμα ΣΤ.16.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **(54)** DMSO- d_6
- Σχήμα ΣΤ.17.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **(55)** DMSO- d_6
- Σχήμα ΣΤ.18.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **(55)** DMSO- d_6
- Σχήμα ΣΤ.19.** Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **(56)** DMSO- d_6
- Σχήμα ΣΤ.20.** Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **(56)** DMSO- d_6

Συντμήσεις-Αρτικόλεξα

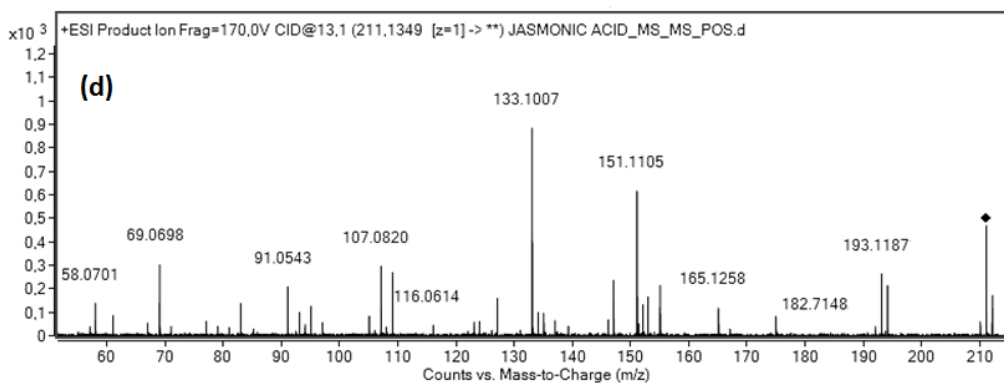
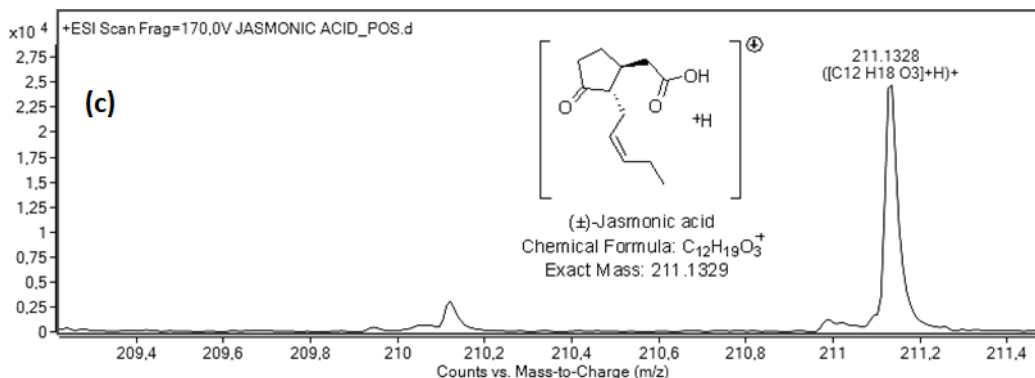
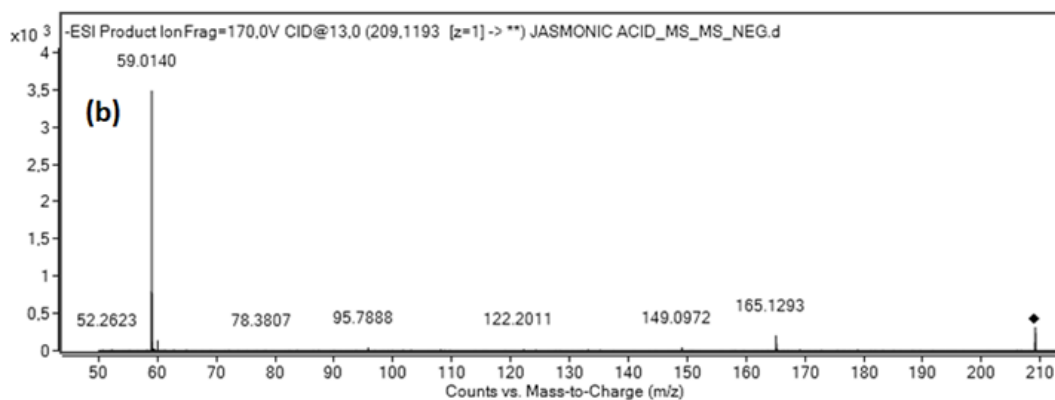
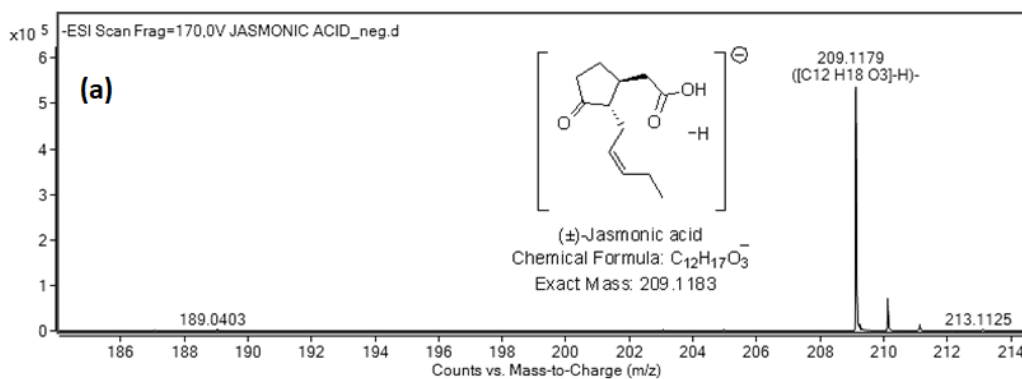
| Σύντμηση | Πλήρης Αγγλικός Όρος | Ελληνικός Όρος |
|------------------------|---|--|
| ABG | Ascorbigen | Ασκορβιγόνο |
| AcOEt | Ethyl acetate | Οξικός αιθυλεστέρας |
| AcOH | Acetic acid | Οξικό οξύ |
| Ala | Alanine | Αλανίνη |
| Asp | Aspartic acid | Ασπαρτικό οξύ |
| ATR | Attenuated total reflection | Εξασθενημένη ολική ανάκλαση |
| 4-Cl-IAA | 4-Chloroindole-3-acetic acid | 4-Χλωροϊνδολο-3-οξικό οξύ |
| DCC | <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide | <i>N,N</i> -Δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο |
| DMF | Dimethylformamide | Διμεθυλοφορμαμίδιο |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | Διμεθυλοσουλφοξειδίο |
| Et₃N | Triethylamine | Τριαιθυλαμίνη |
| ESI | Electrospray ionization | Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό |
| FIA | Flow injection analysis | Έγχυση σε συνεχή ροή |
| FT-IR | Fourier transform- infrared spectroscopy | Μετασχηματισμός Fourier- φασματοσκοπία υπερύθρου |
| Glu | Glutamic acid | Γλουταμινικό οξύ |
| Gly | Glycine | Γλυκίνη |
| HOBt | <i>N</i> -Hydroxybenzotriazole | <i>N</i> -Υδροξυβενζοτριαζόλιο |
| HPLC | High-performance liquid chromatography | Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης |
| HRMS | High resolution mass spectrometry | Φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας |
| IAA | Indole-3-acetic acid | Ινδολο-3-οξικό οξύ |
| IAM | Indole-3-acetamide | Ινδολο-3-ακεταμίδιο |
| IAN | Indole-3-acetonitrile | Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο |
| I3C | Indole-3-carbinol | Ινδολο-3-καρβινόλη |
| I3CHO | Indole-3-carbaldehyde | Ινδολο-3-καρβαλδεΐδη |
| JA | Jasmonic acid | Ιασμονικό οξύ |
| LC-MS | Liquid chromatography- mass spectrometry | Υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας |
| LOD | Limit of detection | Όριο ανίχνευσης |
| LOQ | Limit of quantification | Όριο Ποσοτικοποίησης |
| m/z | Mass to charge ratio | Λόγος μάζας προς φορτίο |
| MeOH | Methanol | Μεθανόλη |

| | | |
|-----------------|---|---|
| Met | Methionine | Μεθειονίνη |
| MS | Mass spectrometry | Φασματομετρία μάζας |
| MS/MS | Tandem mass spectrometry | Δίδυμη φασματομετρία μάζας |
| NMR | Nuclear magnetic resonance | Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός |
| Phe | Phenylalanine | Φανυλαλανίνη |
| PLS | Partial least squares regression | Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων |
| QTOF | Quadrupole time-of-flight | Τετράπολο-χρόνος πτήσης |
| r | Correlation coefficient | Συντελεστής γραμμικότητας |
| RMSEC | Root mean square error of calibration | Τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος βαθμονόμησης |
| RMSECV | Root mean square error of cross validation | Τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος διασταυρωμένης επικύρωσης |
| RMSEP | Root mean square error of prediction | Τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος πρόβλεψης |
| RT | Retention time | Χρόνος κατακράτησης |
| SA | Salicylic acid | Σαλικυλικό οξύ |
| SD | Standard deviation | Τυπική απόκλιση |
| Ser | Serine | Σερίνη |
| SFN | Sulforaphane | Σουλφοραφάνη |
| THF | Tetrahydrofuran | Τετραϋδροφουράνιο |
| TLC | Thin-layer chromatography | Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας |
| Trp | Tryptophane | Θρυπτοφάνη |
| Tyr | Tyrosine | Τυροσίνη |
| UPLC | Ultra-performance liquid chromatography | Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης |
| UV-Vis | Ultraviolet-visible | Υπεριώδες-ορατό |
| Val | Valine | Βαλίνη |
| WSCl.HCl | 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride | Υδροχλωρικό άλας του 1-[3(διμεθυλαμινο)προπυλο]-3-αιθυλοκαρβοδιιμιδίου |

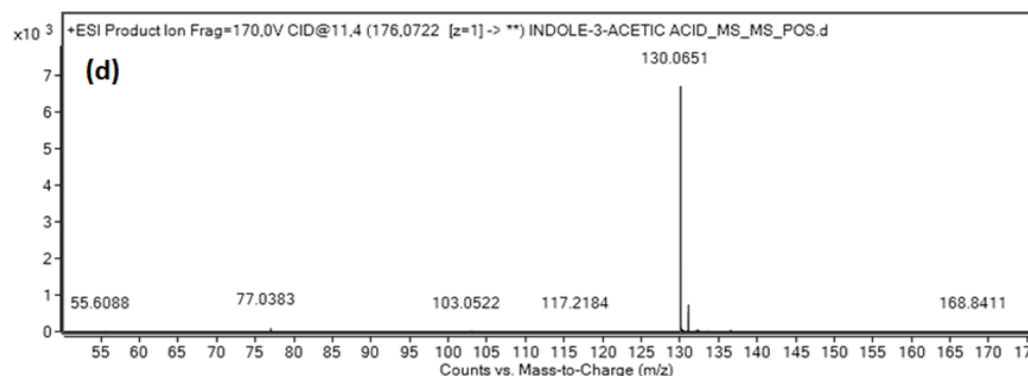
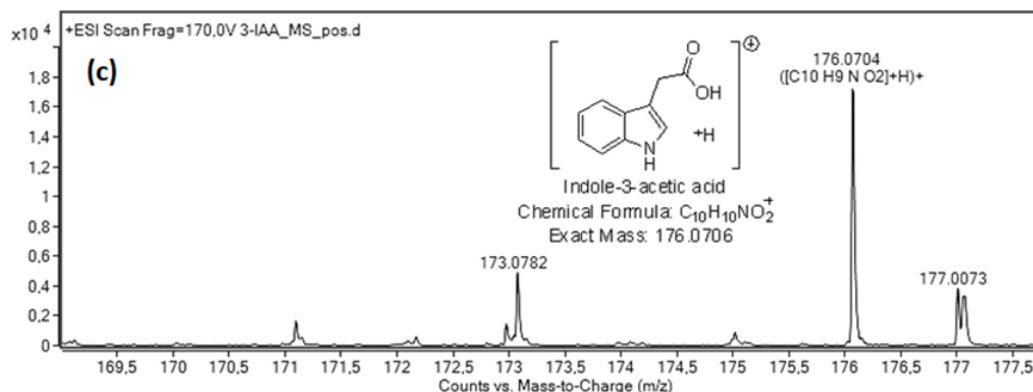
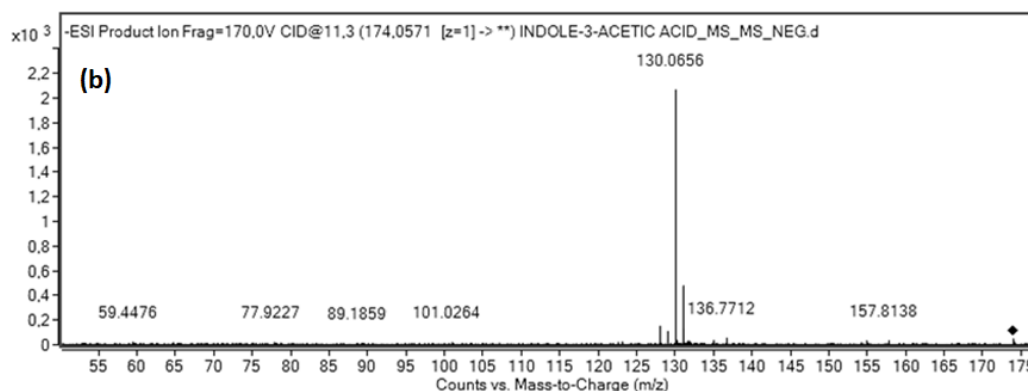
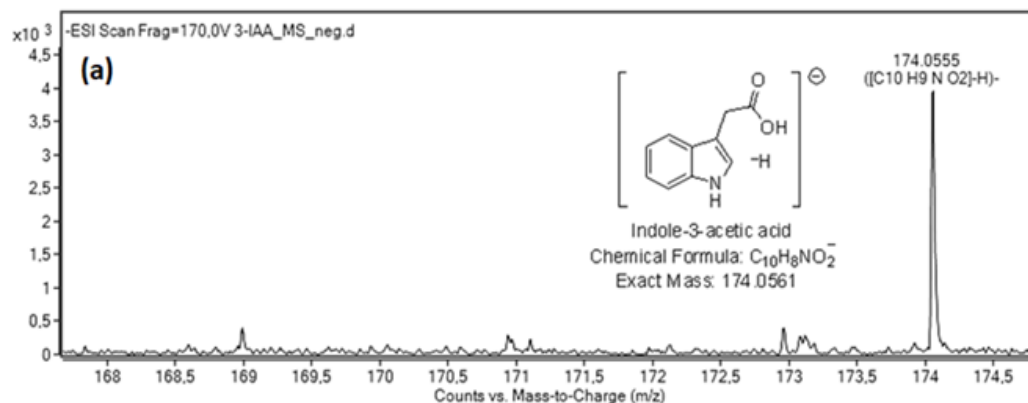
Παράρτημα Ι



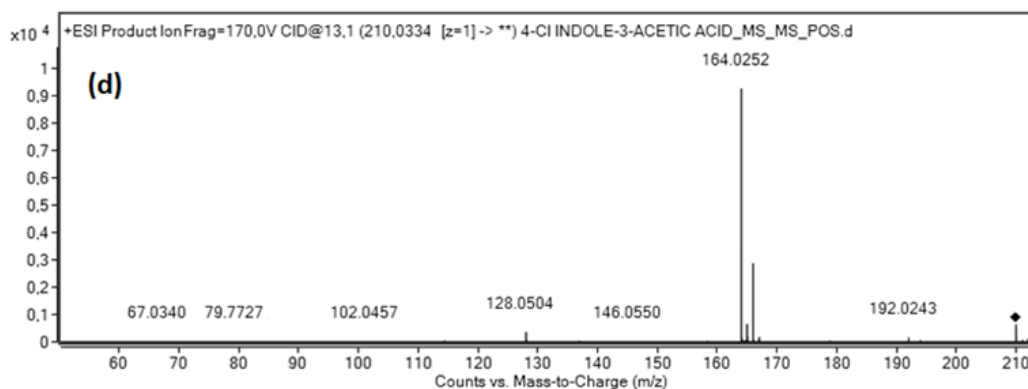
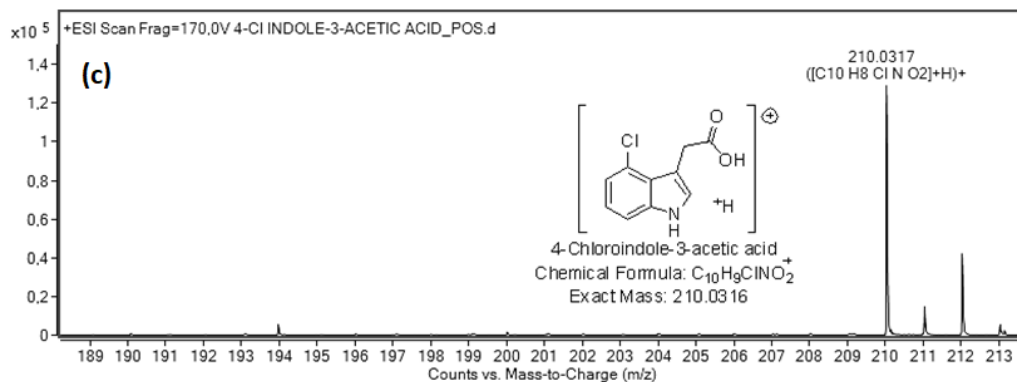
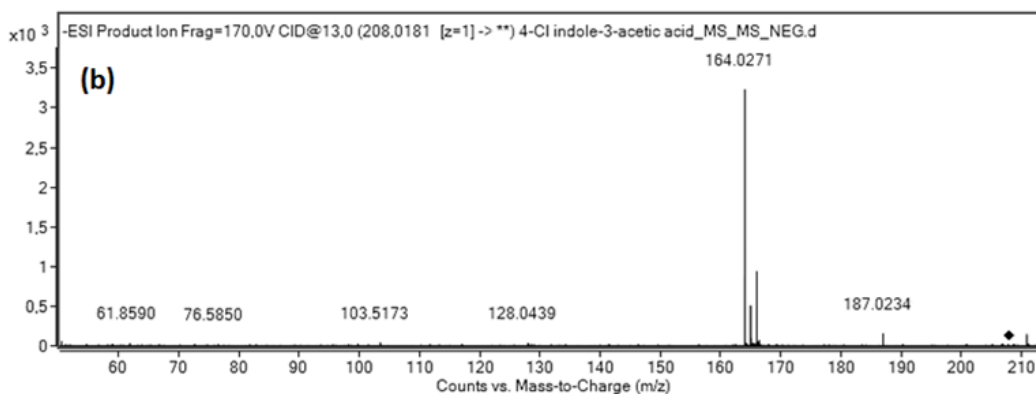
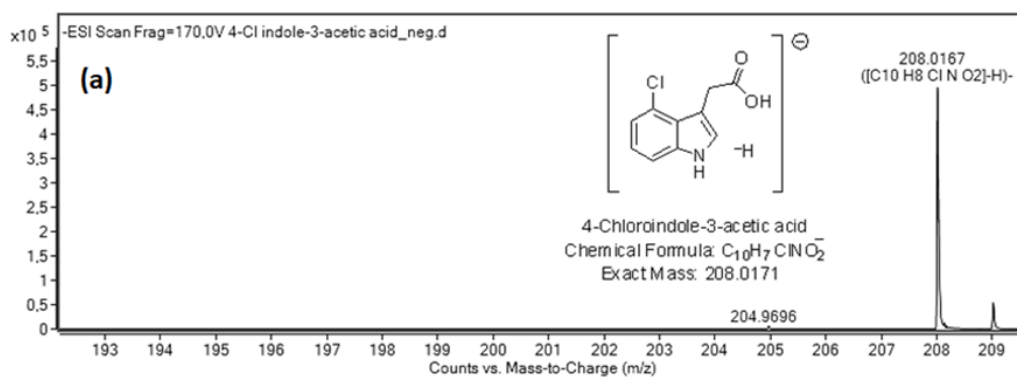
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του σαλικυλικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του σαλικυλικού οξέος στον θετικό ιοντισμό ESI



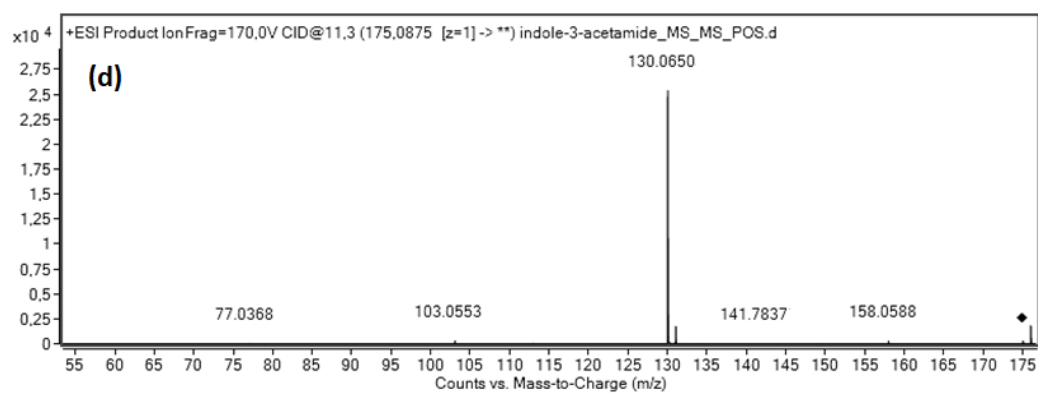
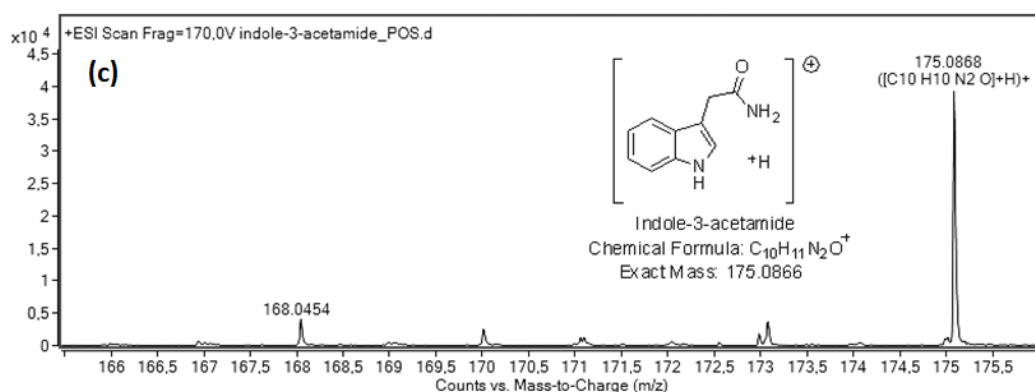
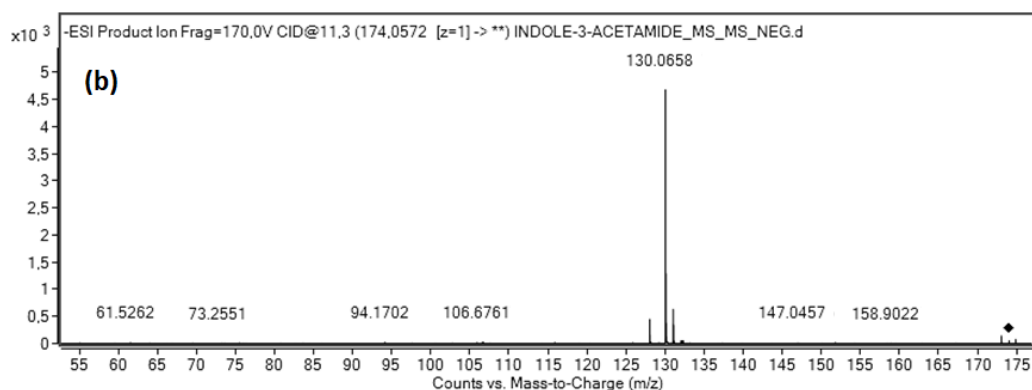
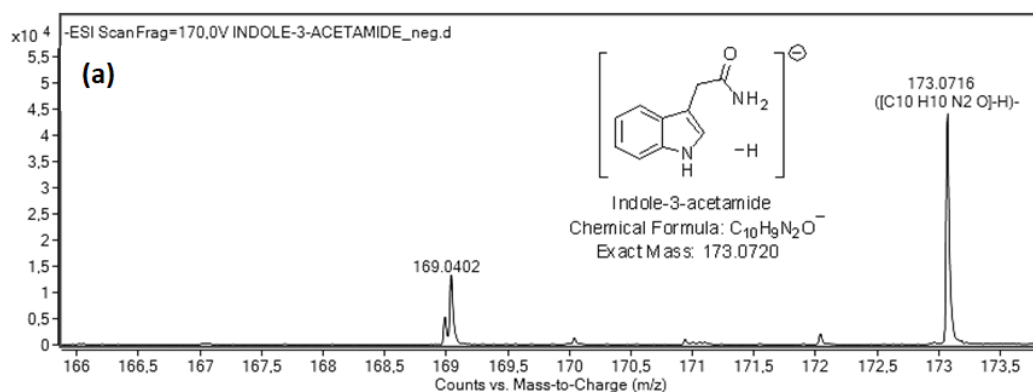
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ιασμονικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ιασμονικού οξέος στον θετικό ιοντισμό ESI



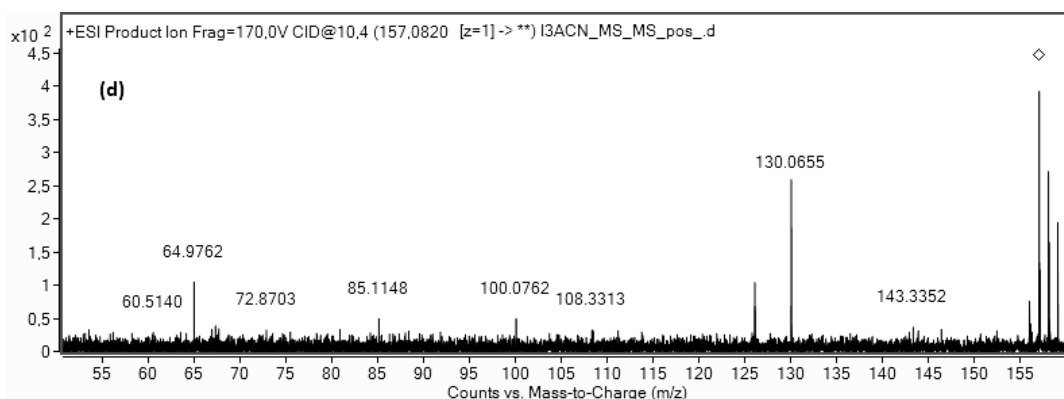
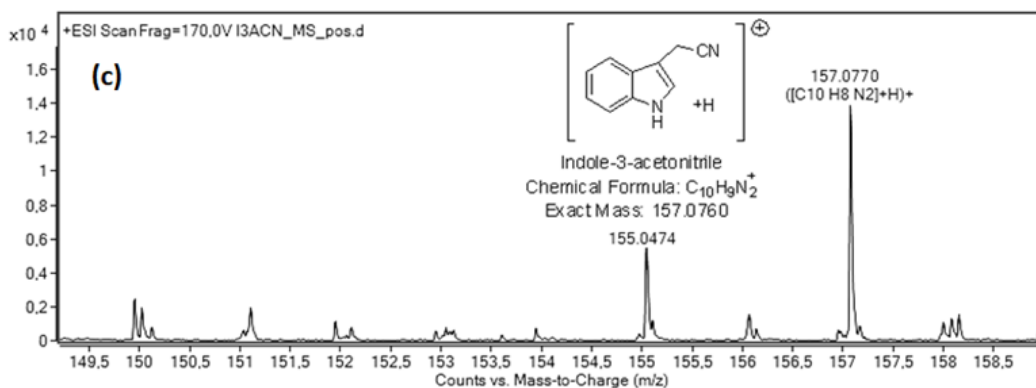
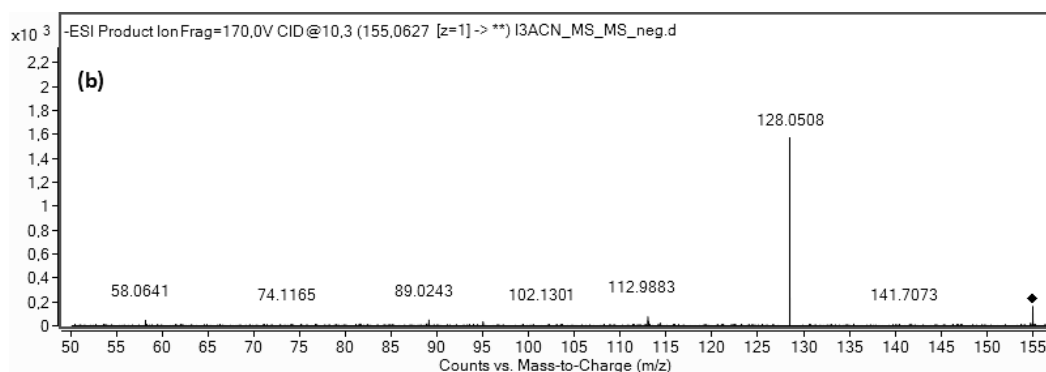
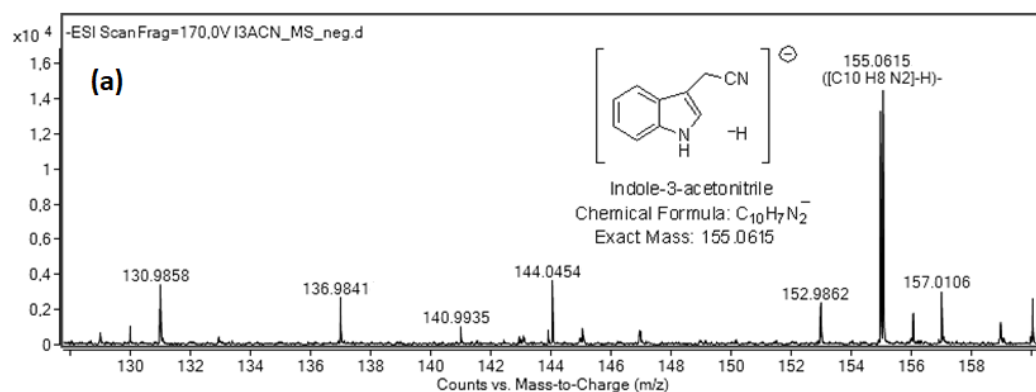
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ινδολο-3-οξικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ινδολο-3-οξικού οξέος στον θετικό ιοντισμό ESI



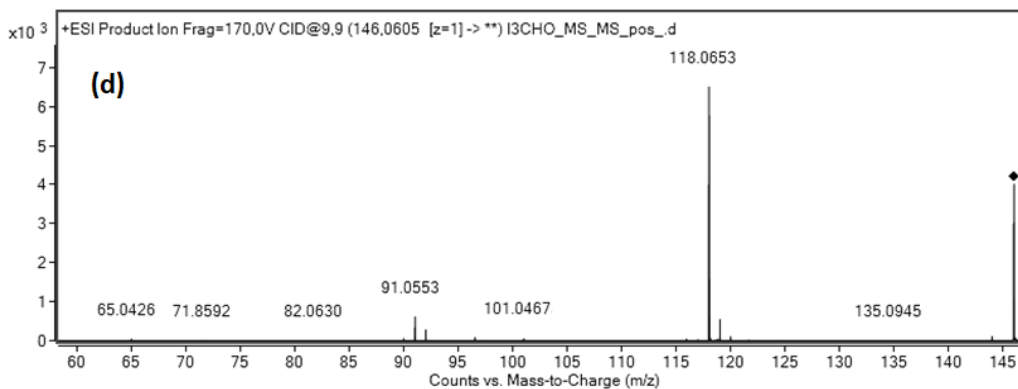
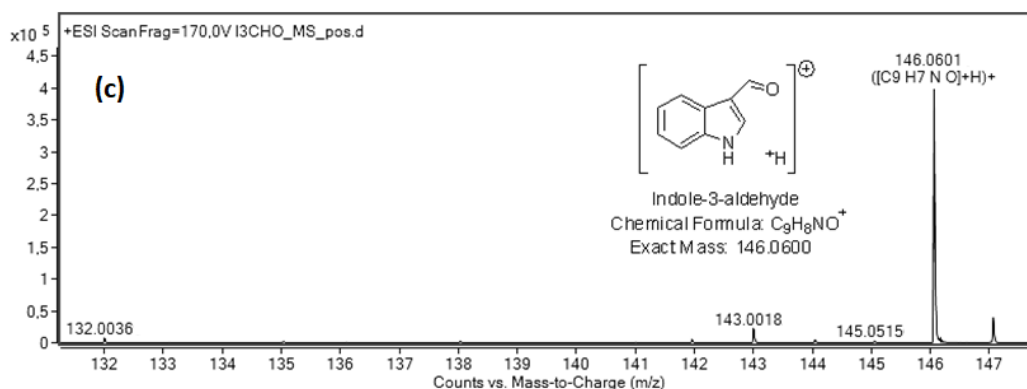
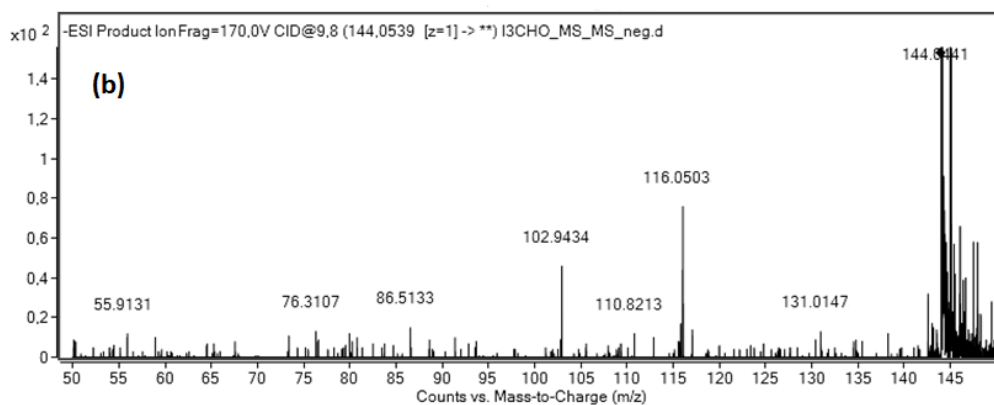
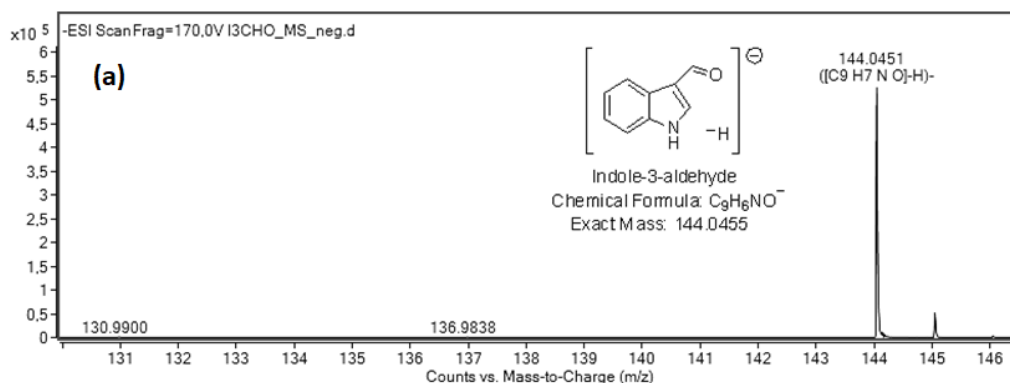
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος στον θετικό ιοντισμό ESI



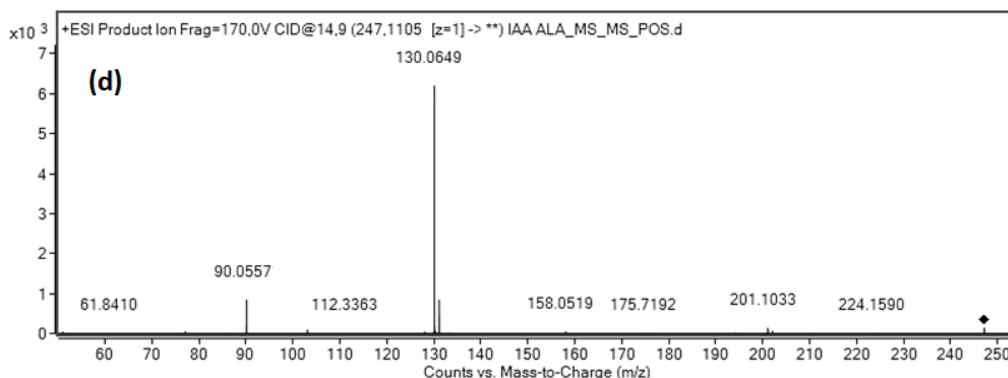
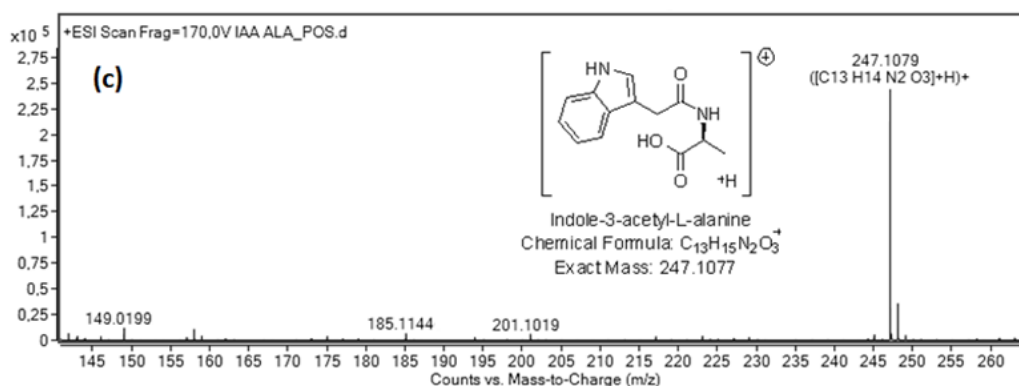
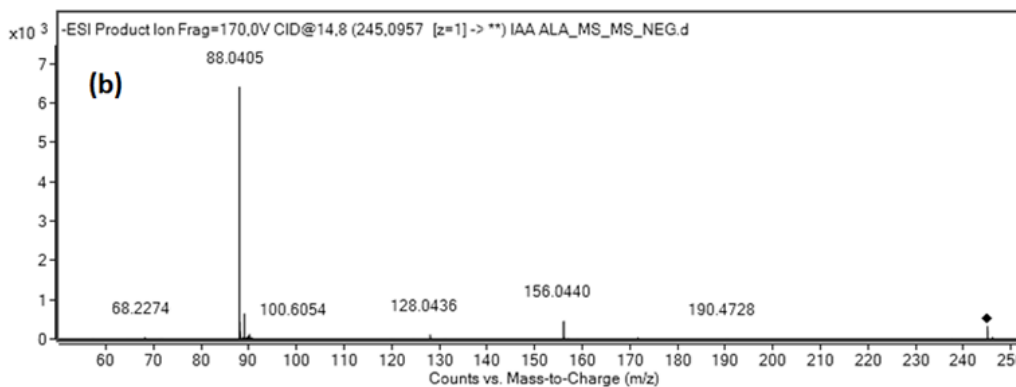
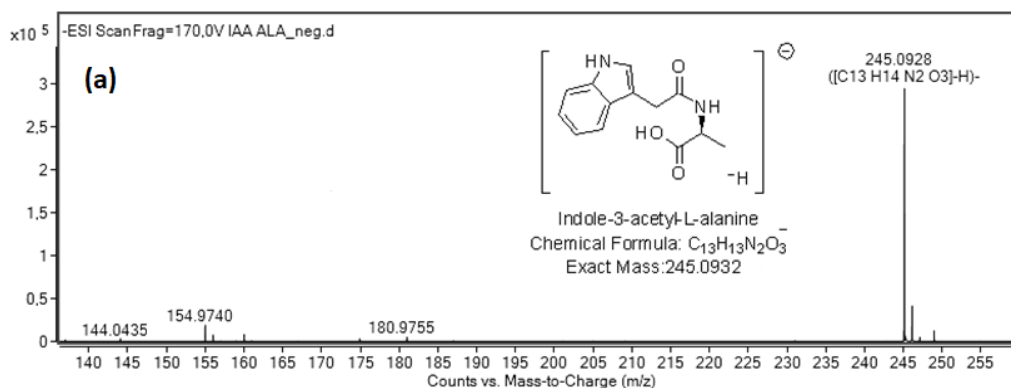
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ινδολο-3-ακεταμιδίου στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ινδολο-3-ακεταμιδίου στον θετικό ιοντισμό ESI



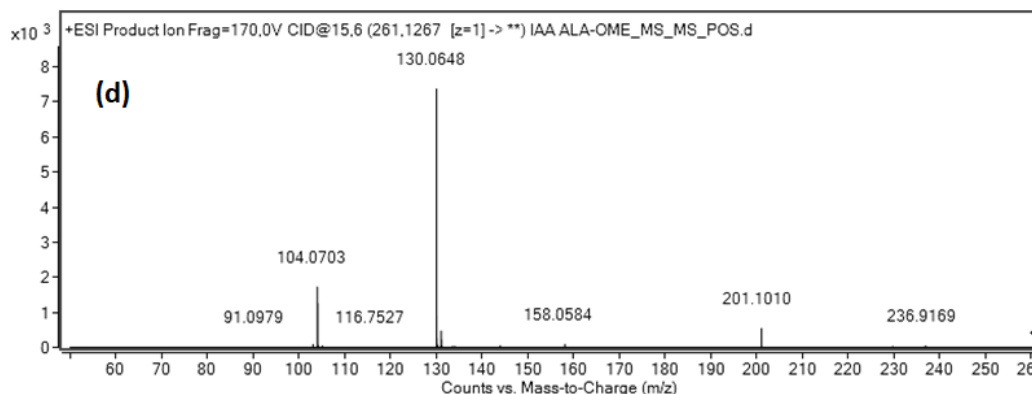
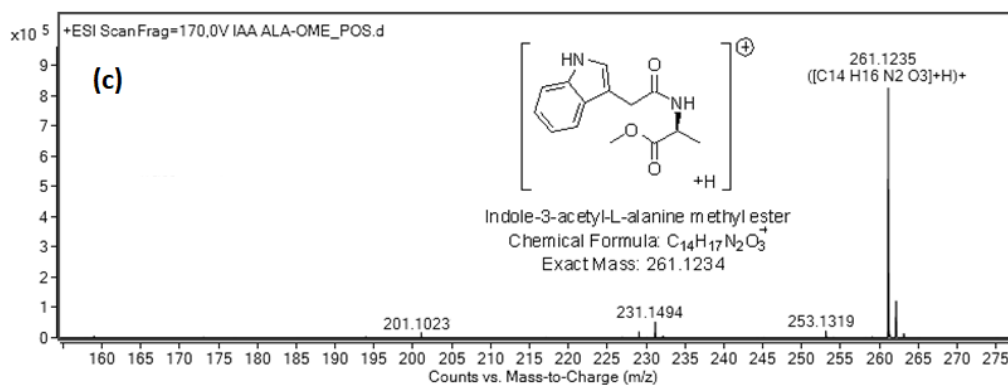
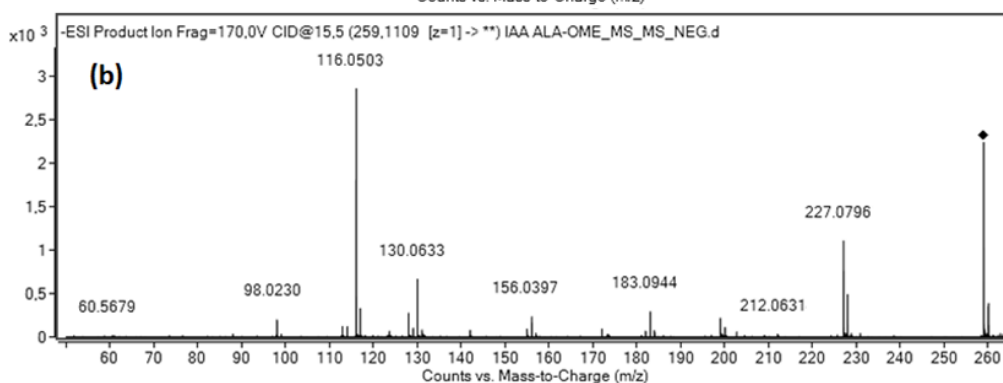
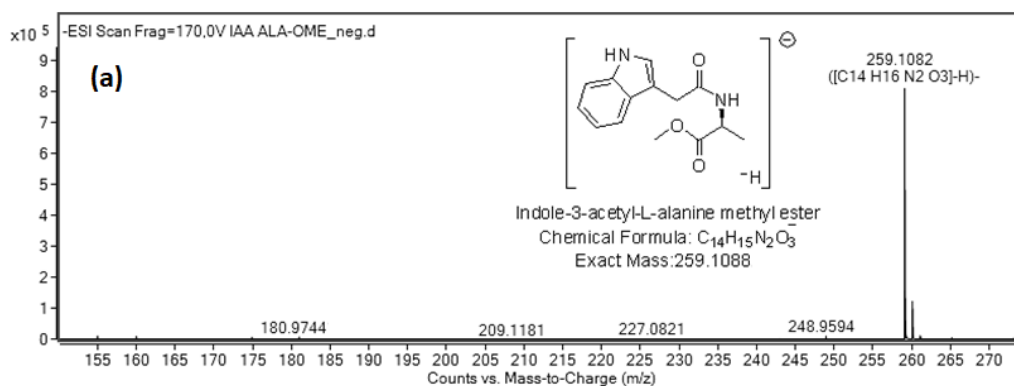
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ινδολο-3-ακετονιτριλίου στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ινδολο-3-ακετονιτριλίου στον θετικό ιοντισμό ESI



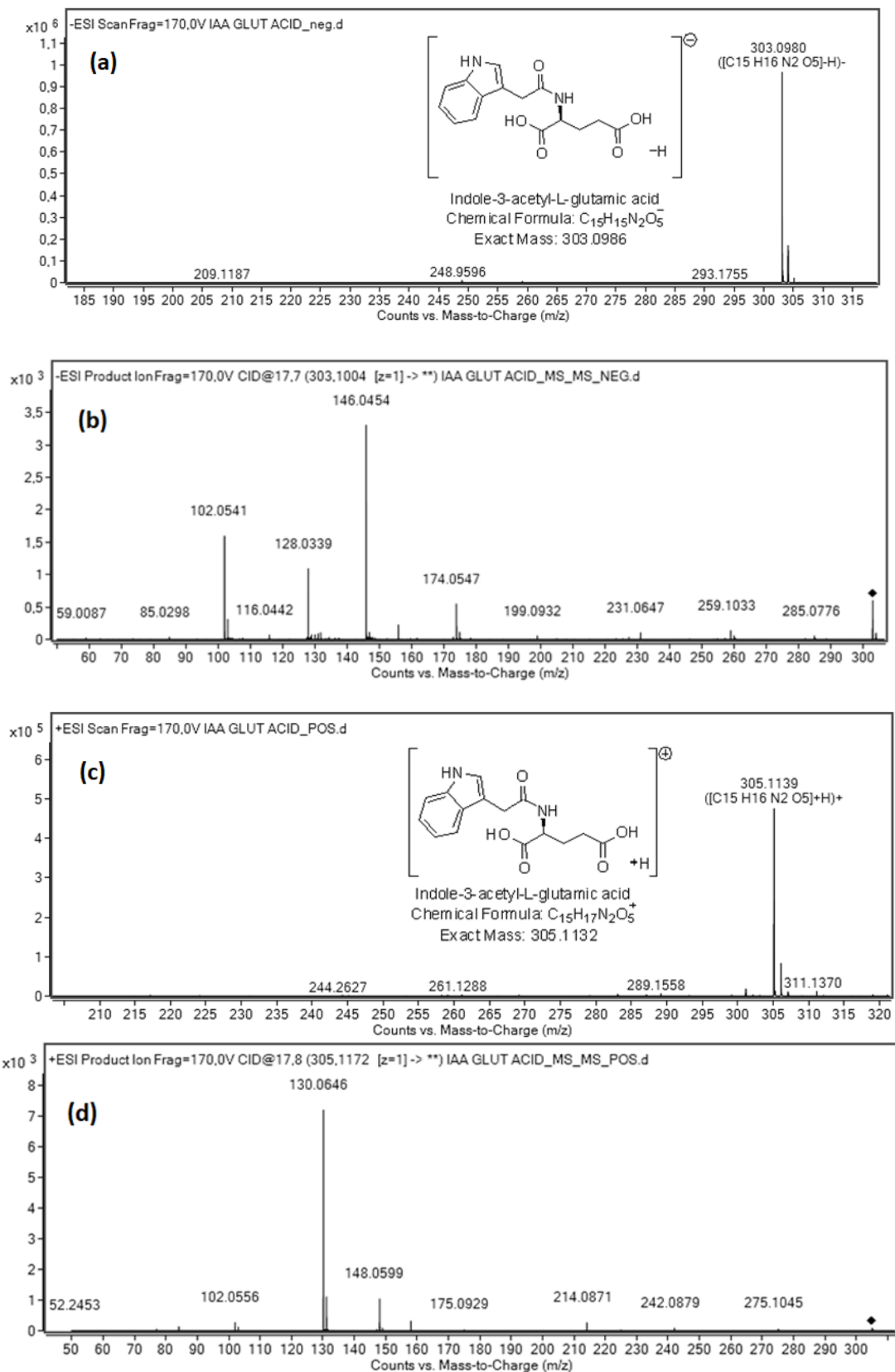
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης στον θετικό ιοντισμό ESI



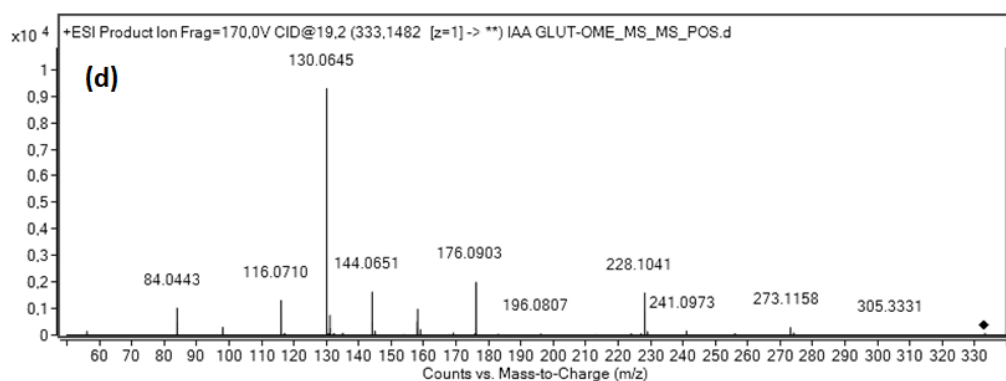
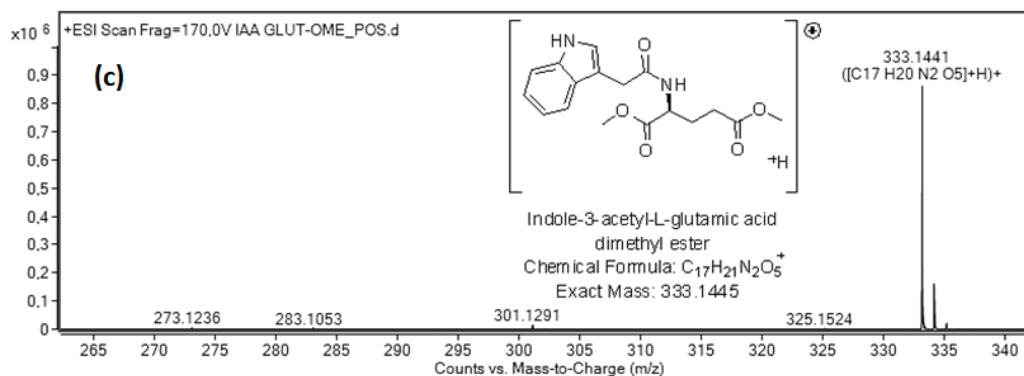
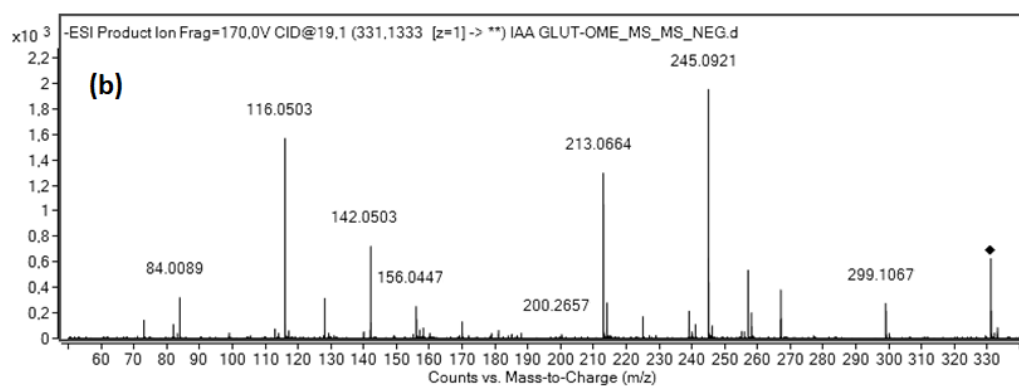
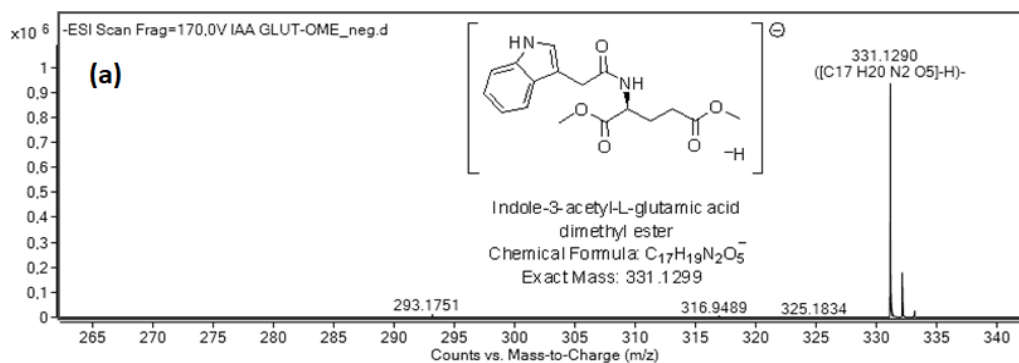
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-L-αλανίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-L-αλανίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



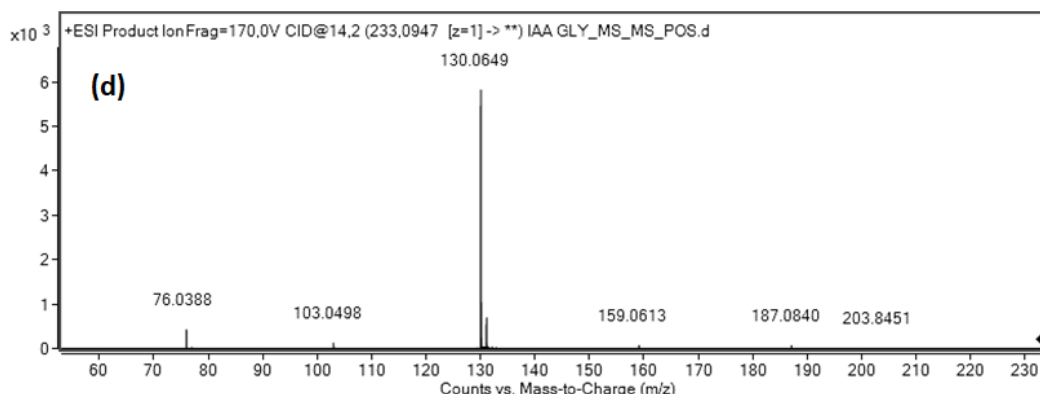
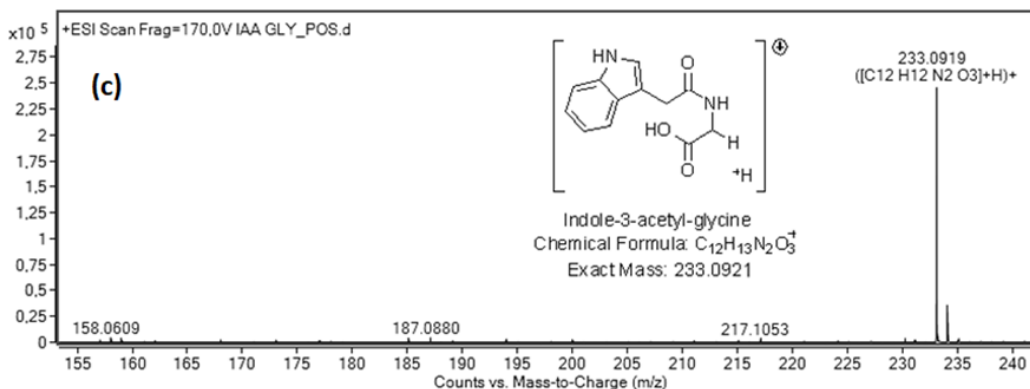
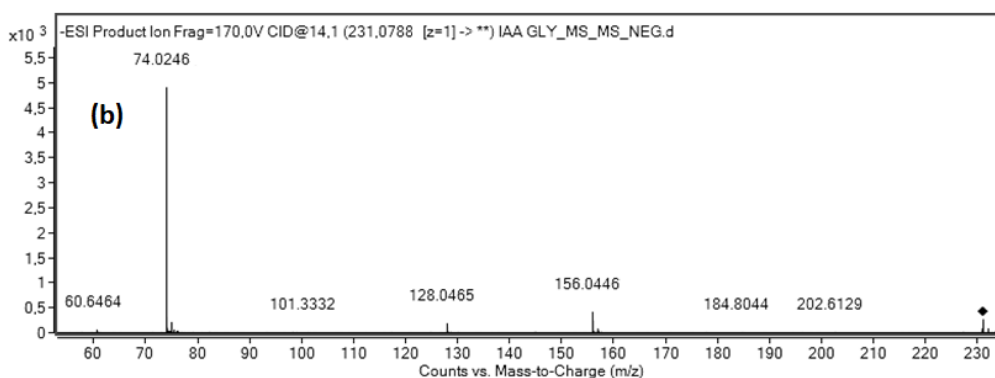
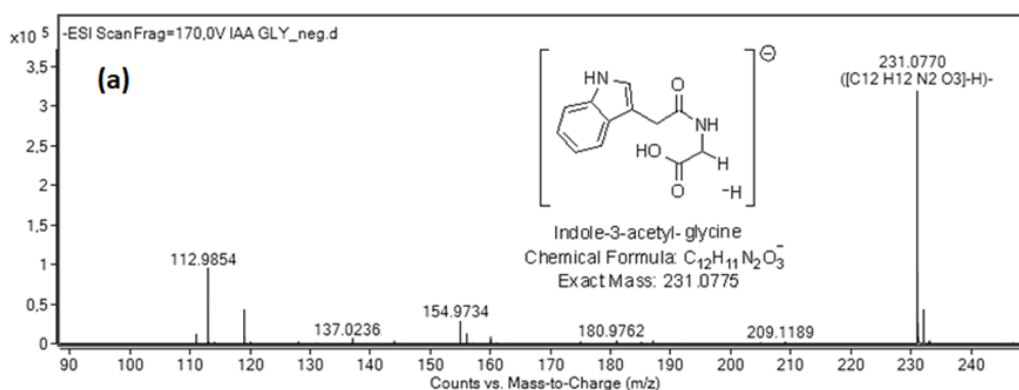
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-αλανίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-αλανίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



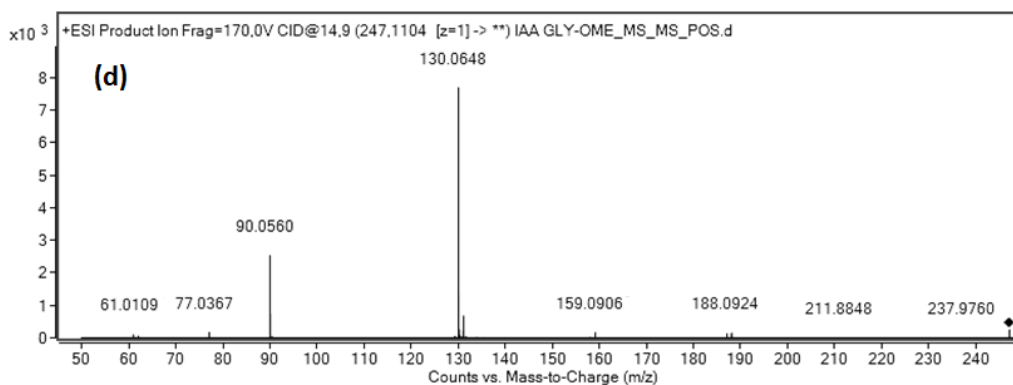
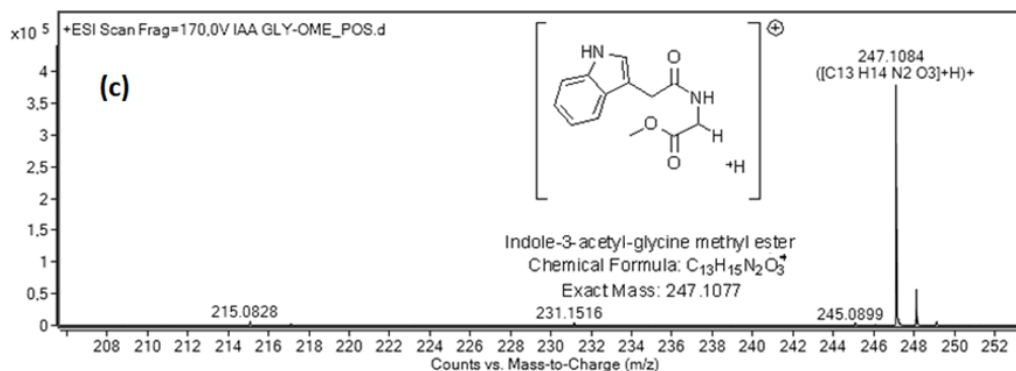
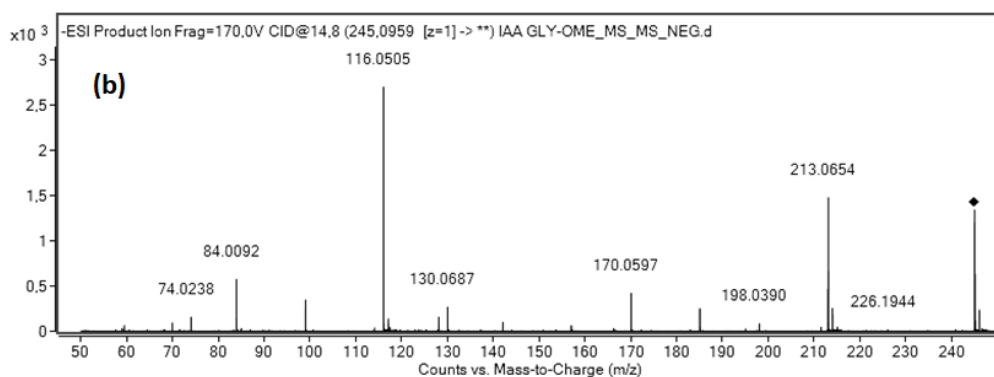
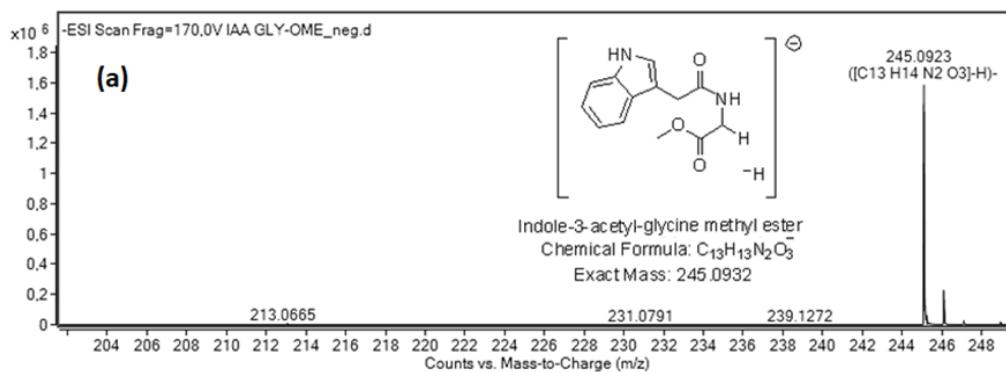
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ινδολο-3-ακετυλο-L-γλουταμινικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ινδολο-3-ακετυλο-L-γλουταμινικού οξέος στον θετικό ιοντισμό ESI



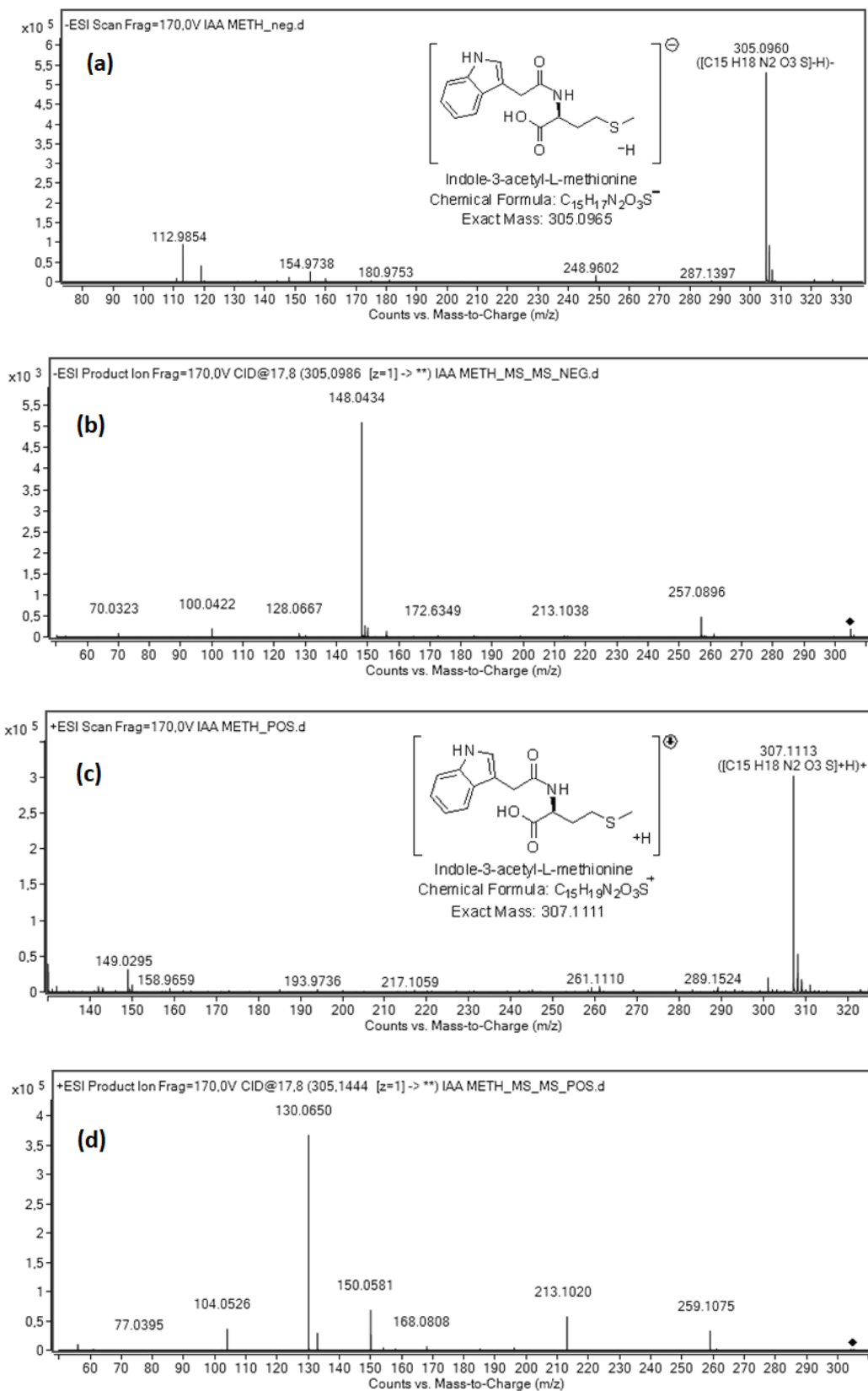
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του διμεθυλεστέρα του ινδολο-3-ακετυλο-L-γλουταμινικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του διμεθυλεστέρα του ινδολο-3-ακετυλο-L-γλουταμινικού οξέος στον θετικό ιοντισμό ESI



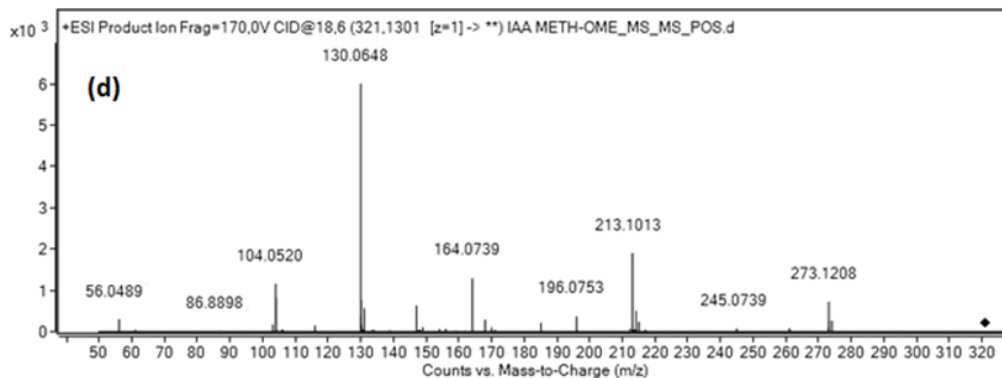
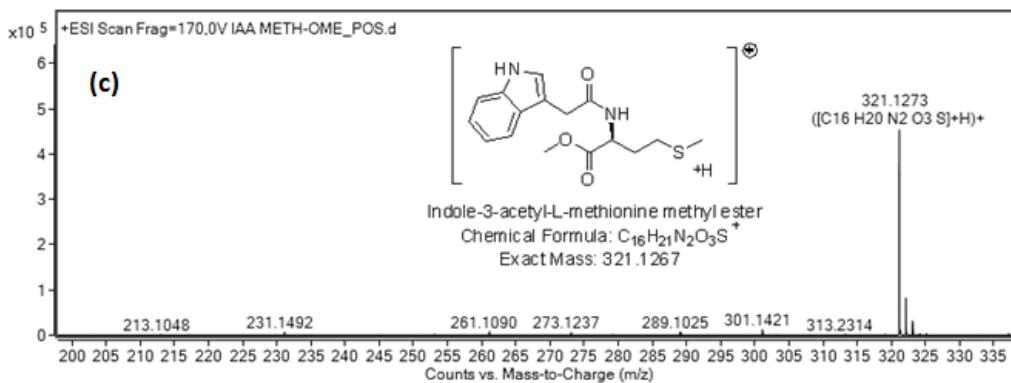
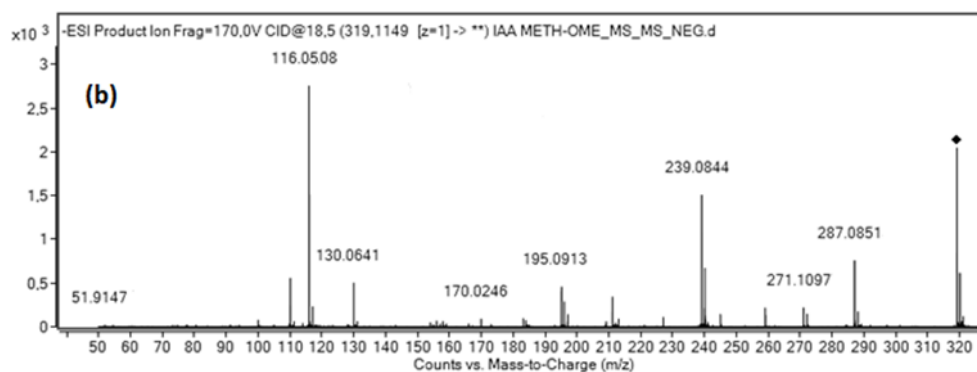
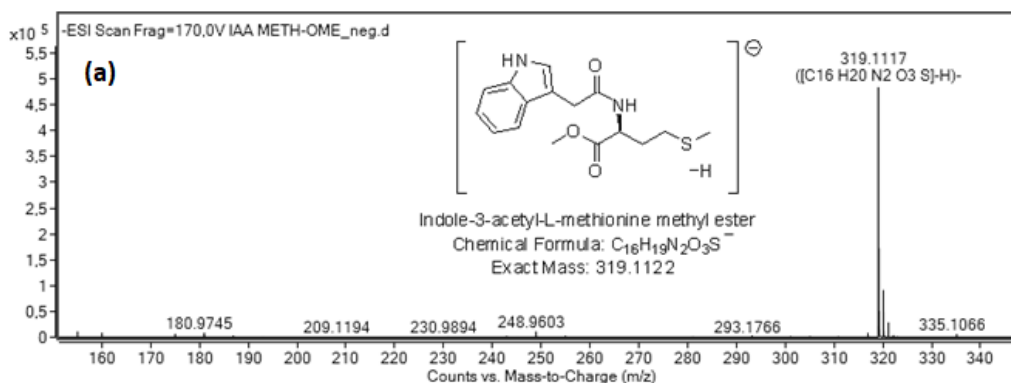
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-γλυκίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-γλυκίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



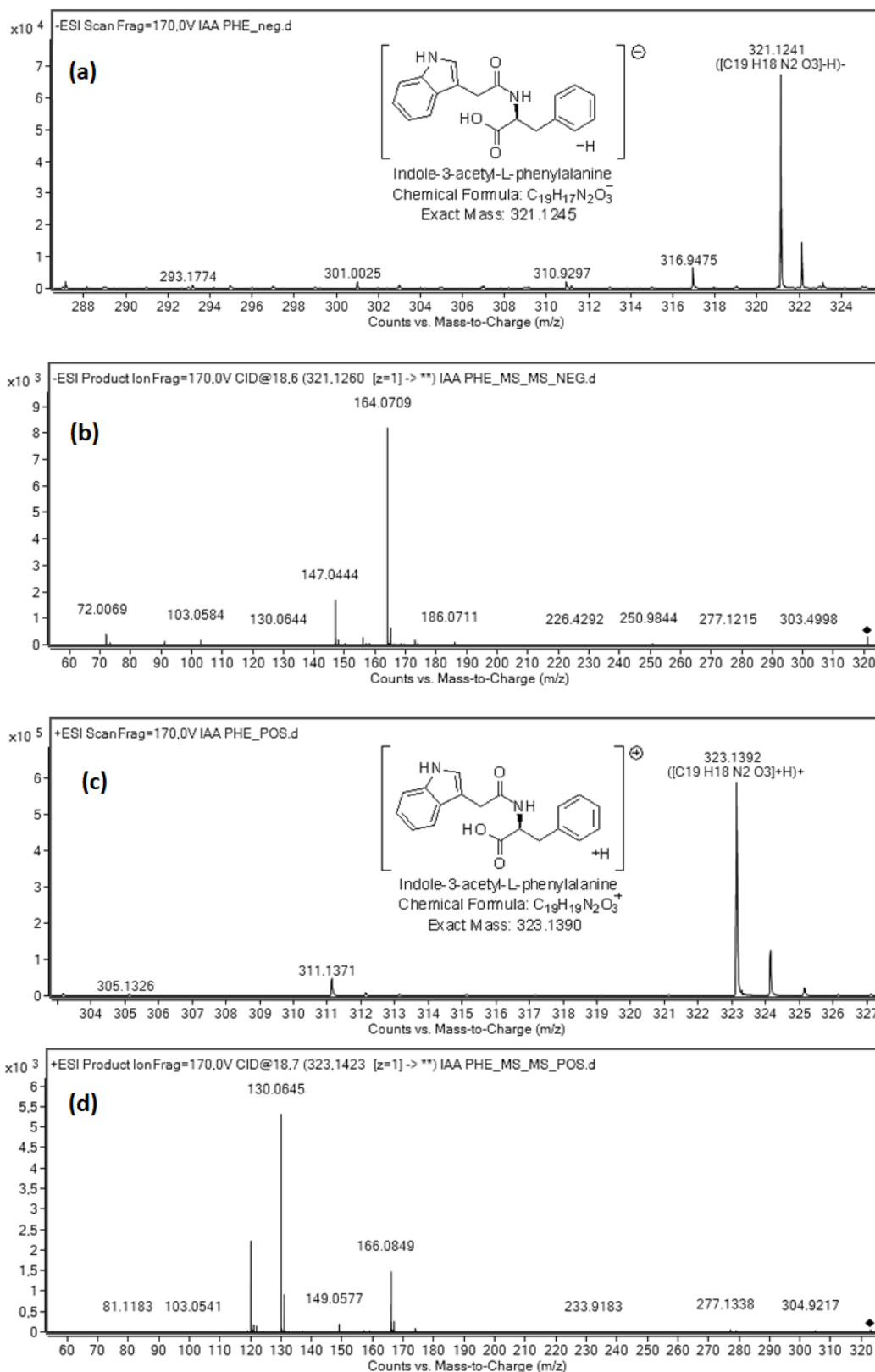
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-γλυκίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-γλυκίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



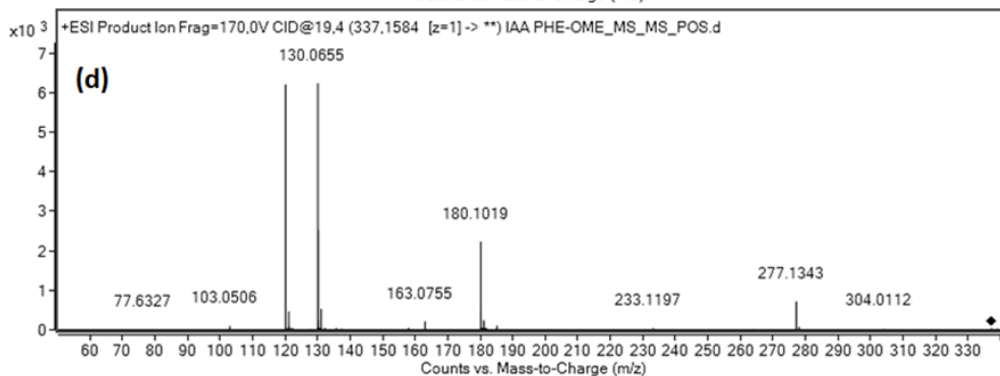
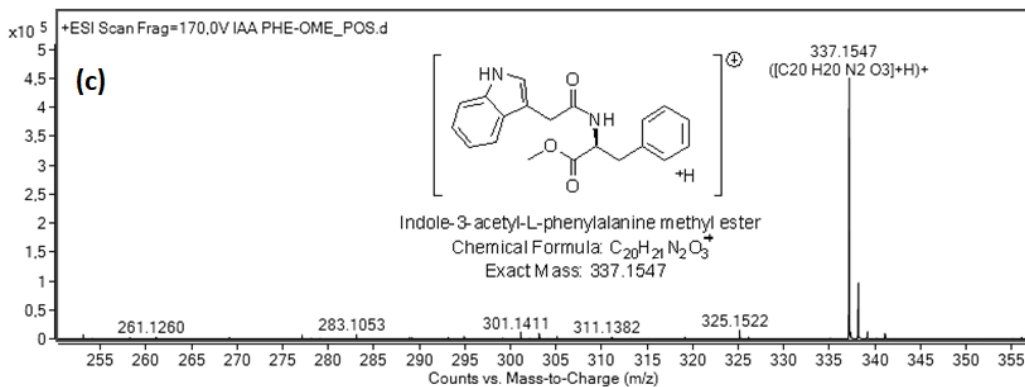
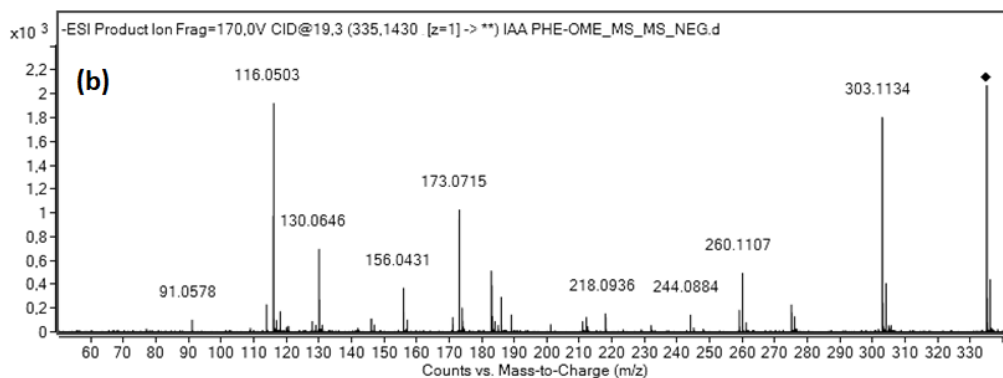
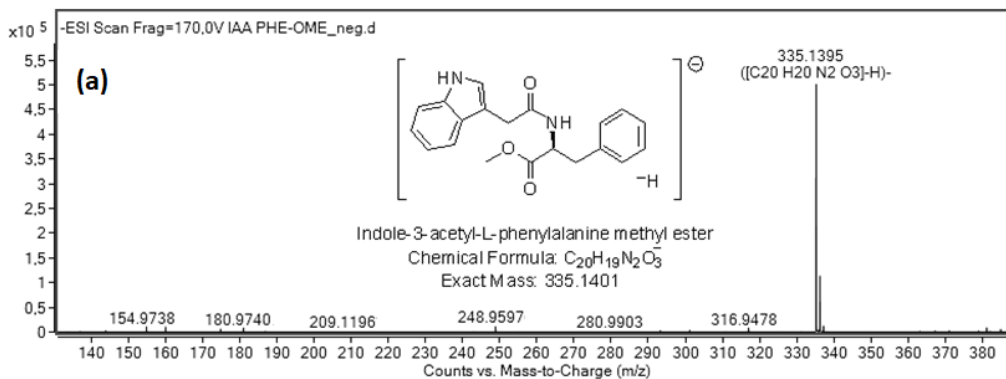
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-L-μεθειονίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-L-μεθειονίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



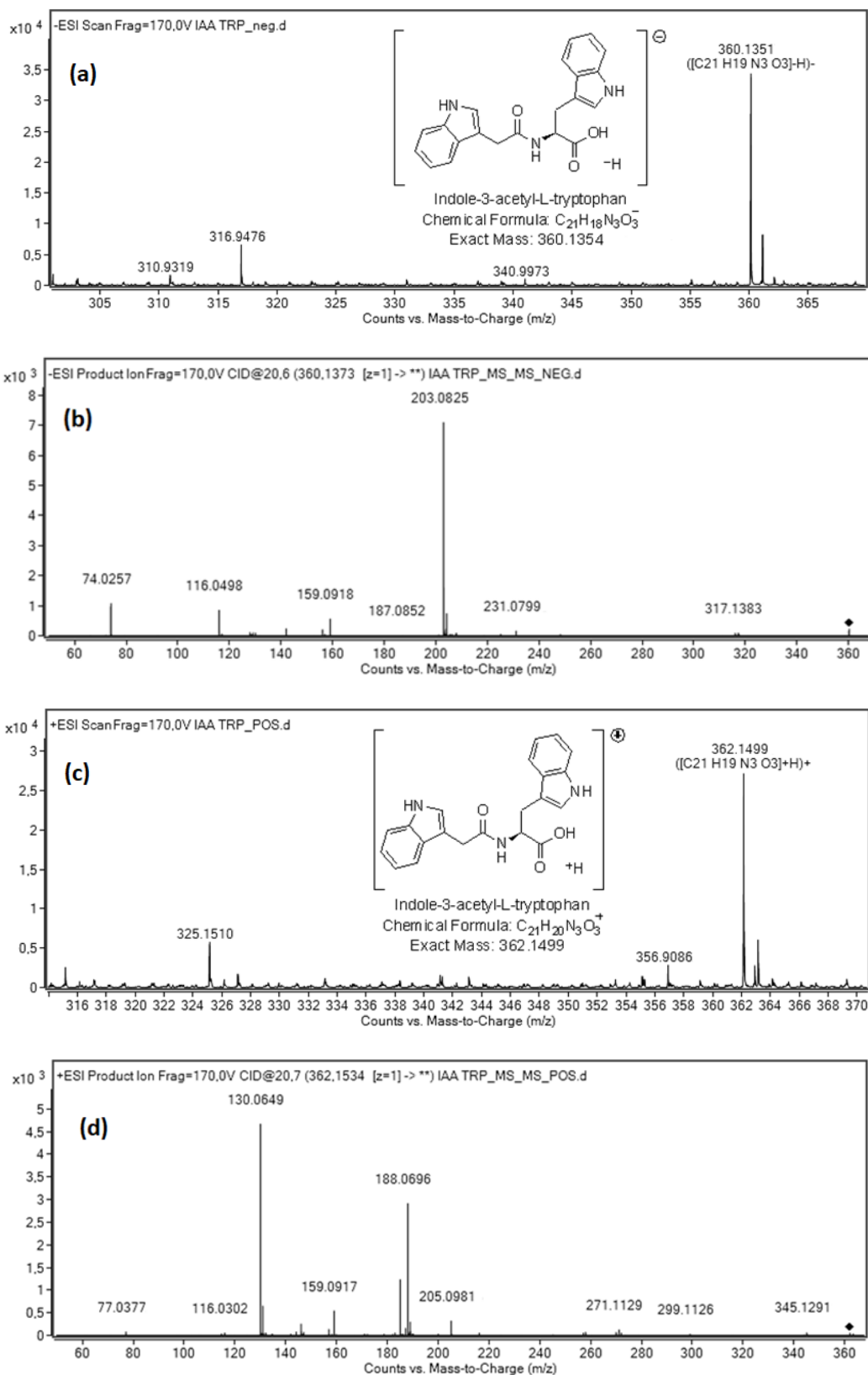
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-μεθειονίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-μεθειονίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



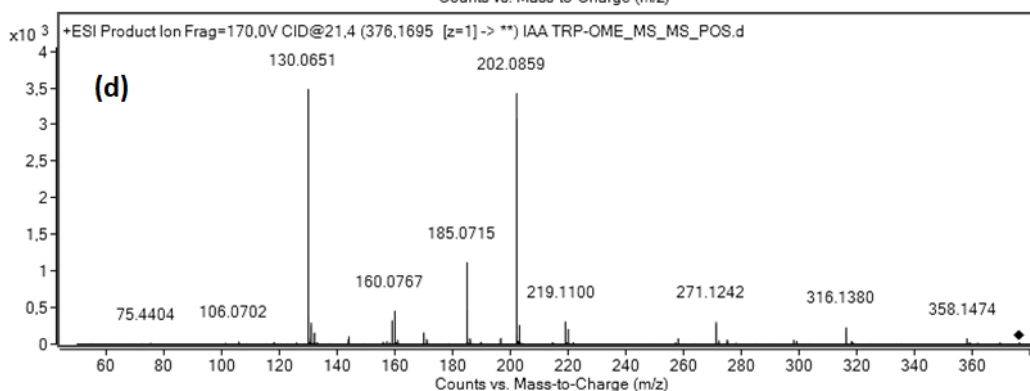
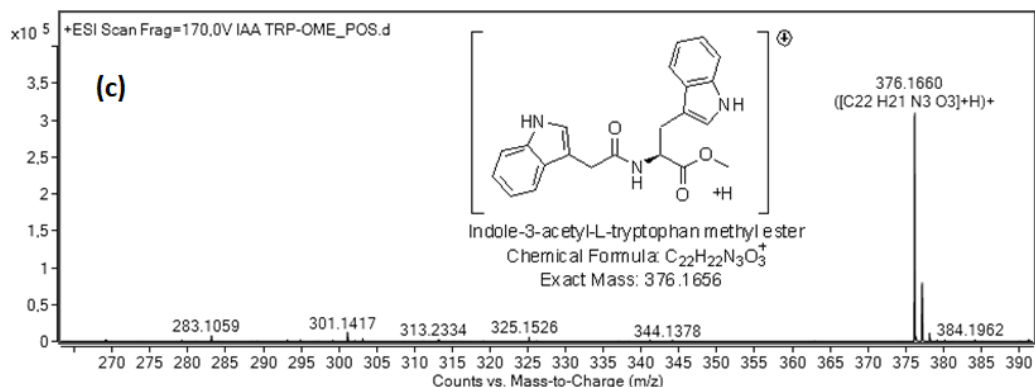
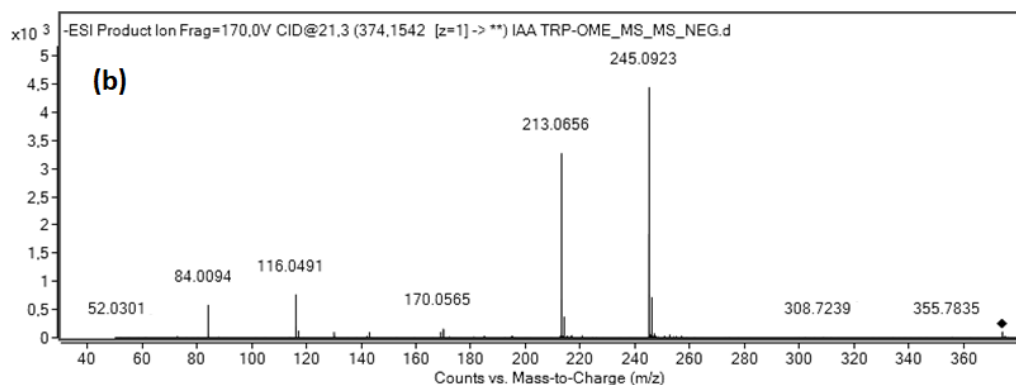
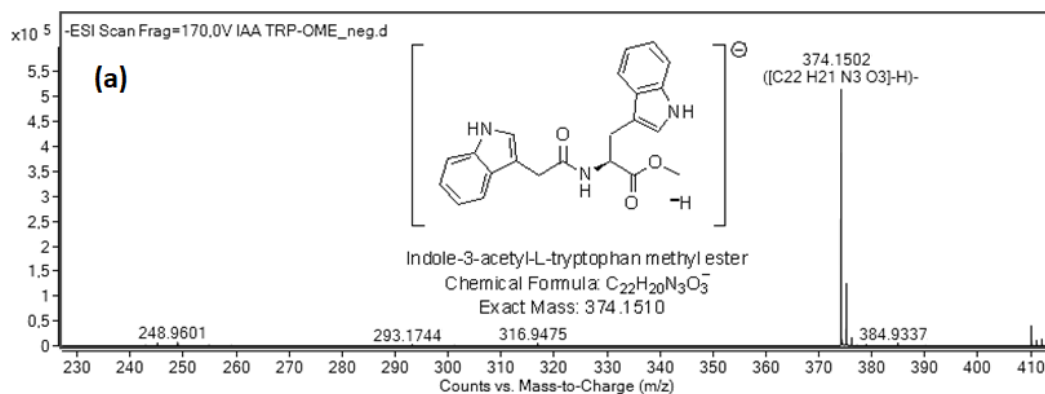
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-L-φαινυλαλανίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-L-φαινυλαλανίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



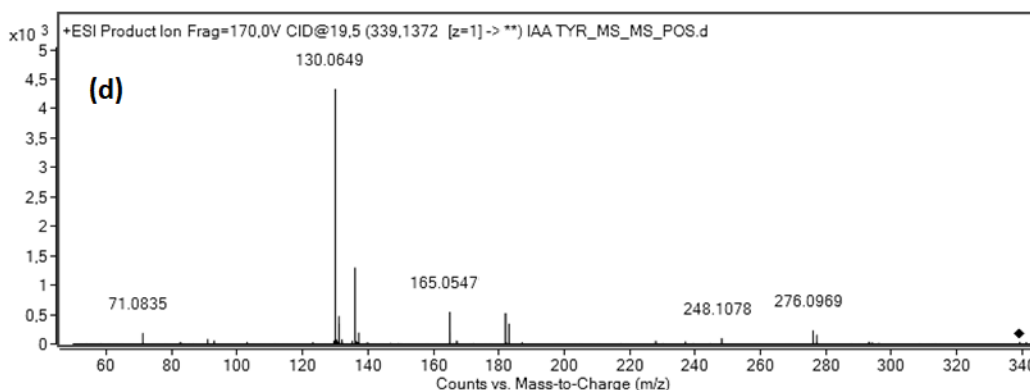
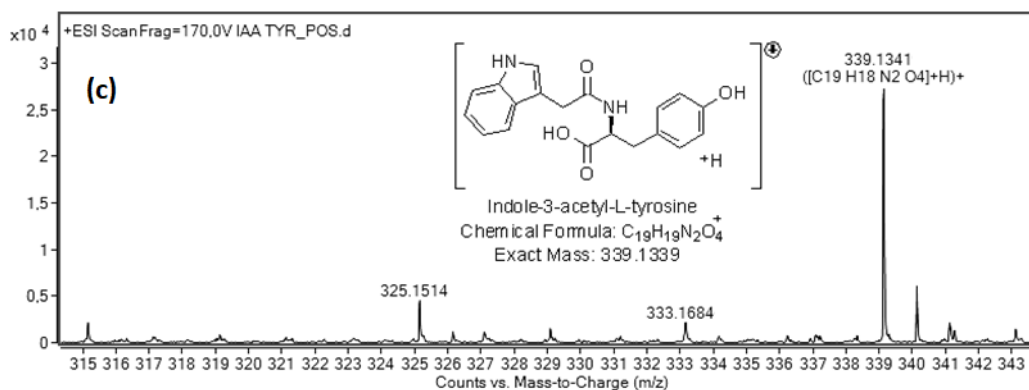
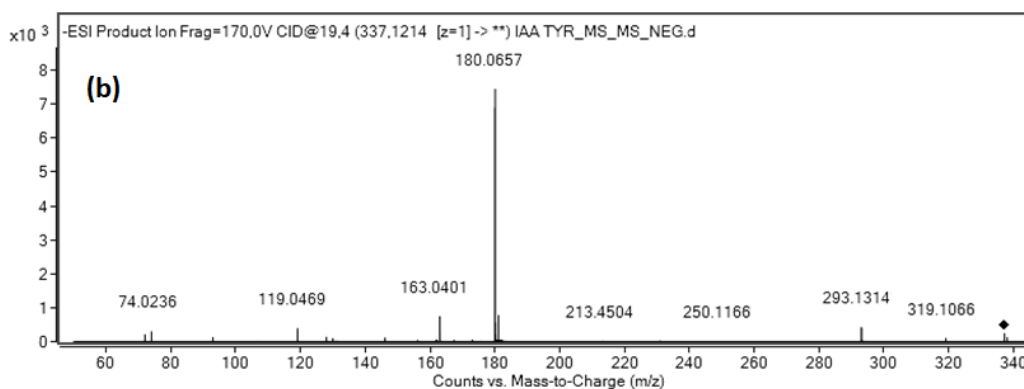
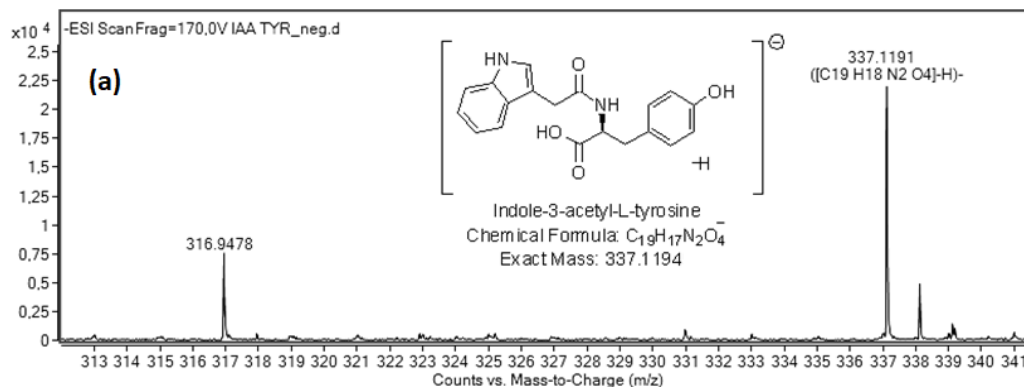
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-φαινυλαλανίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-φαινυλαλανίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



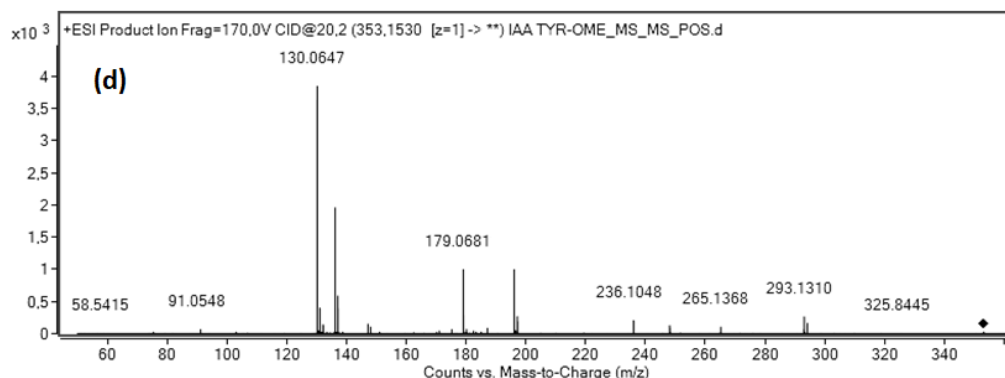
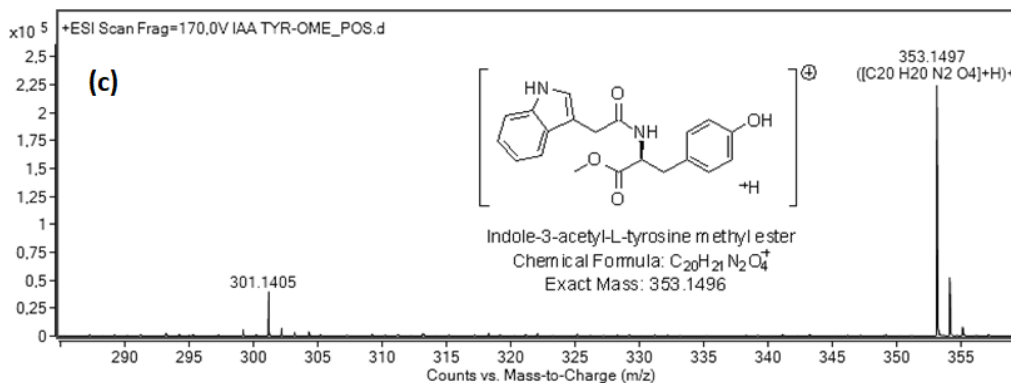
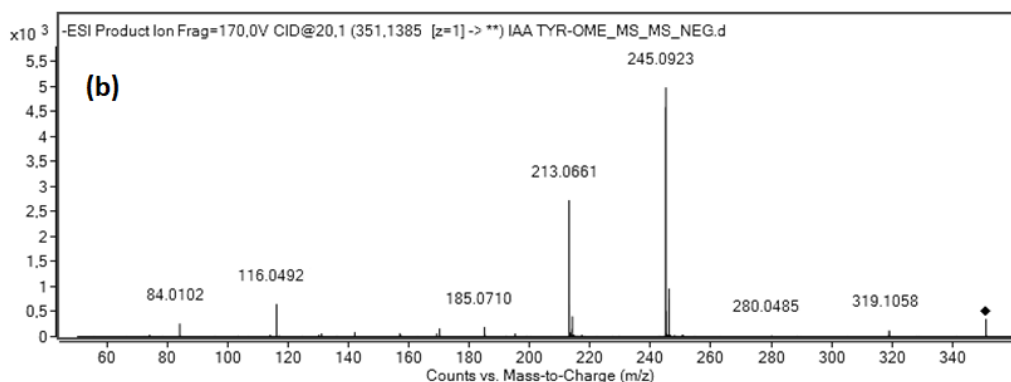
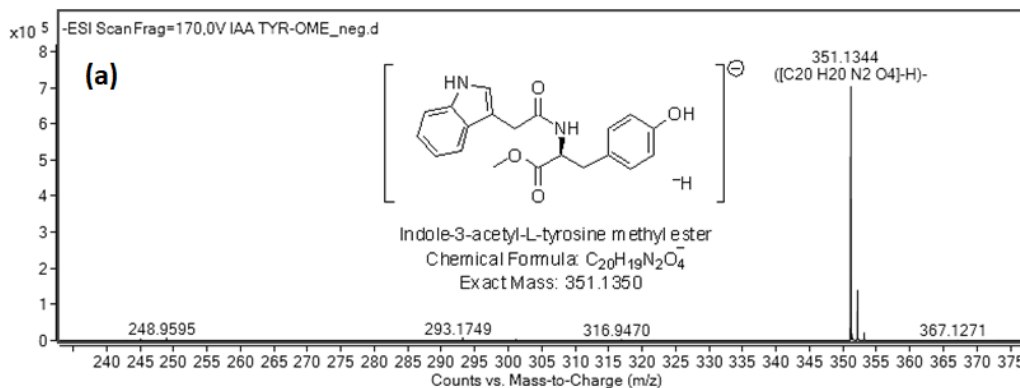
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-L-θρυπτοφάνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-L-θρυπτοφάνης στον θετικό ιοντισμό ESI



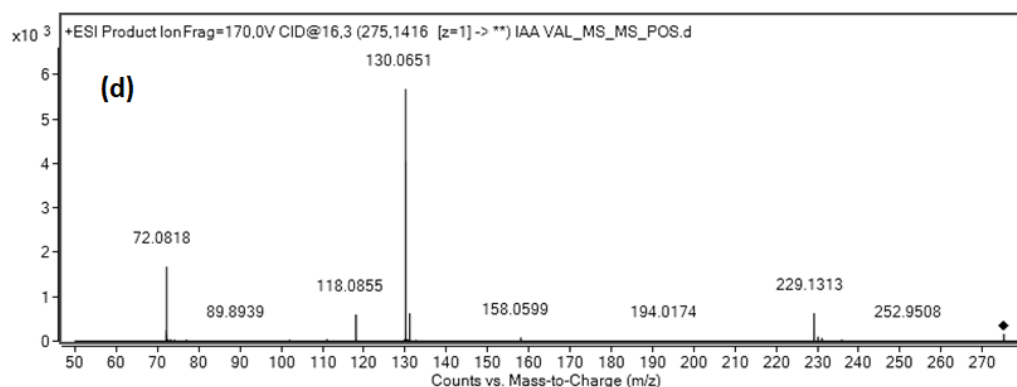
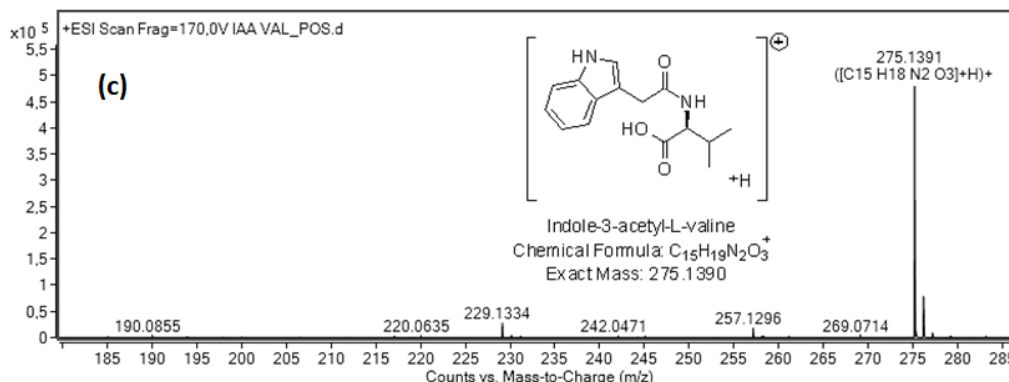
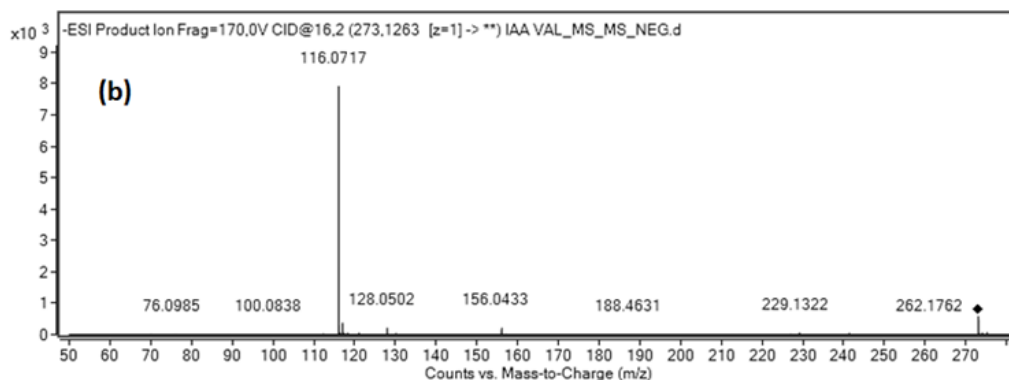
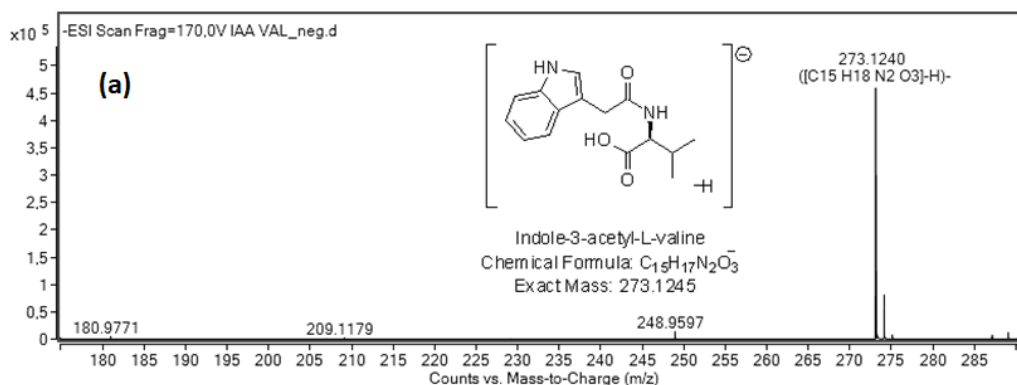
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-θρυπτοφάνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-θρυπτοφάνης στον θετικό ιοντισμό ESI



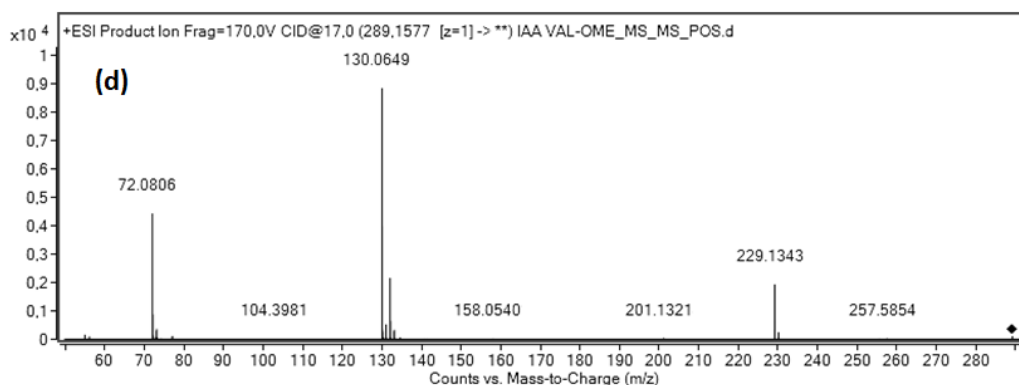
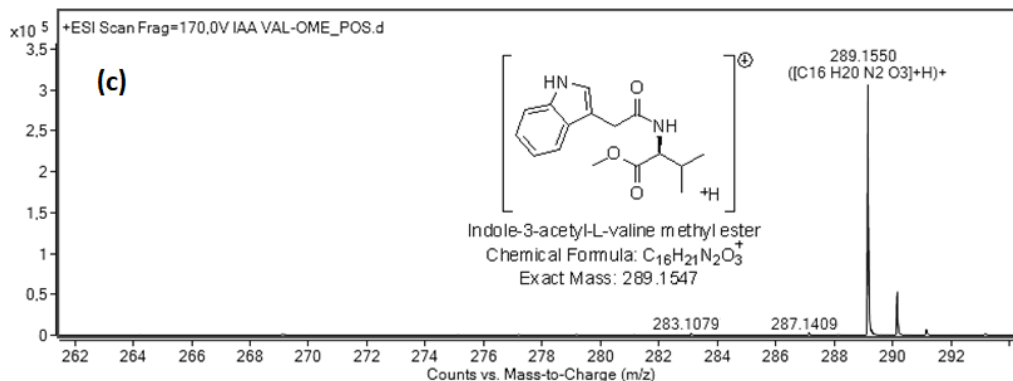
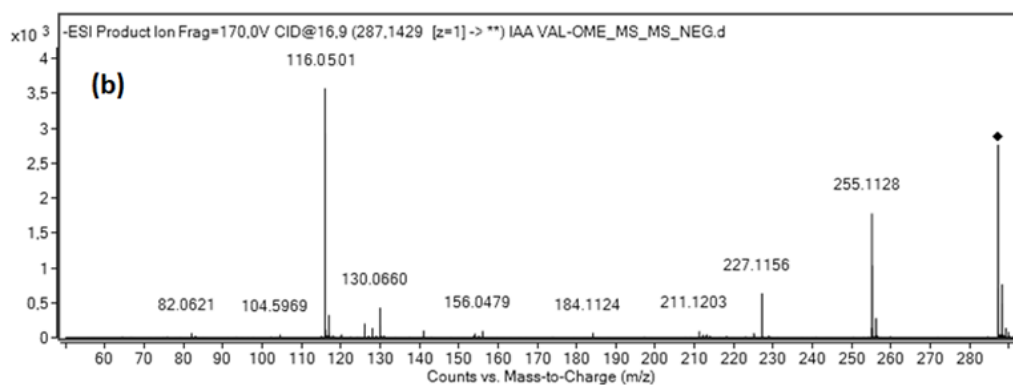
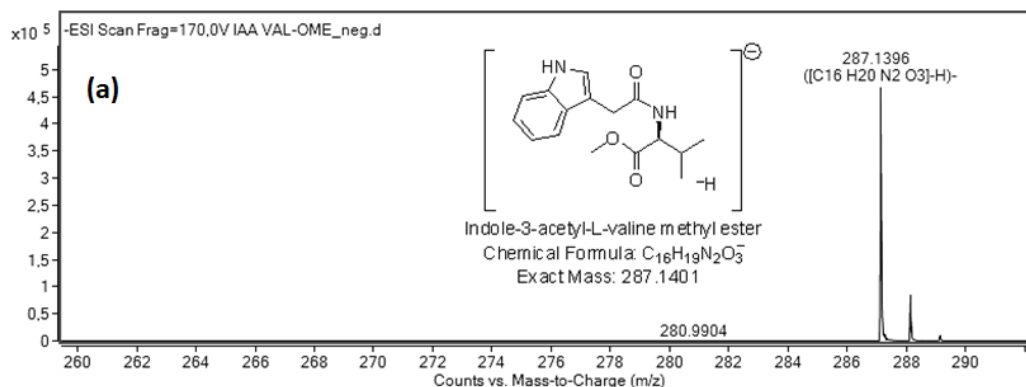
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-L-τυροσίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-L-τυροσίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



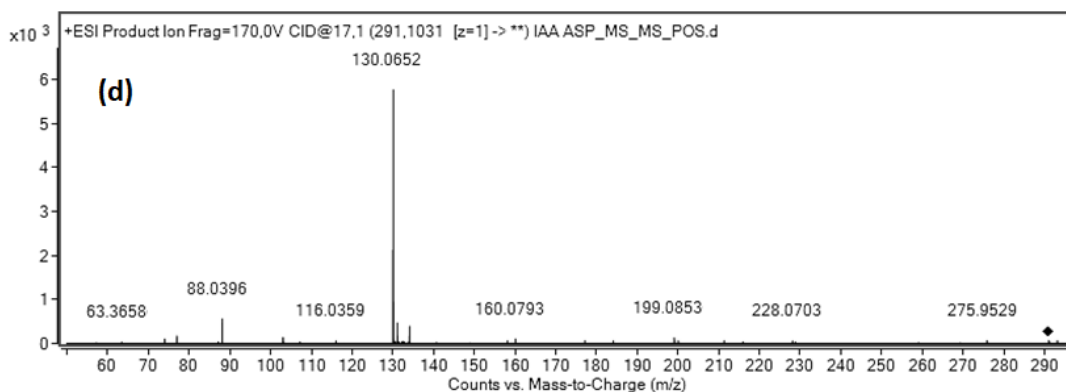
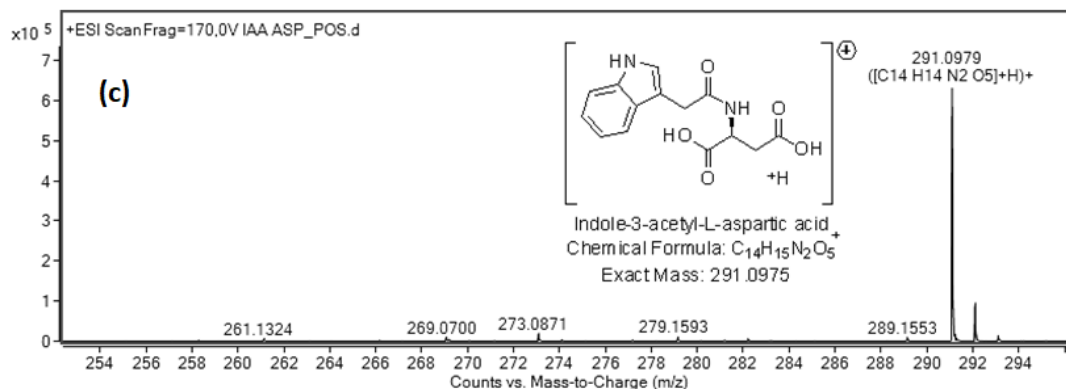
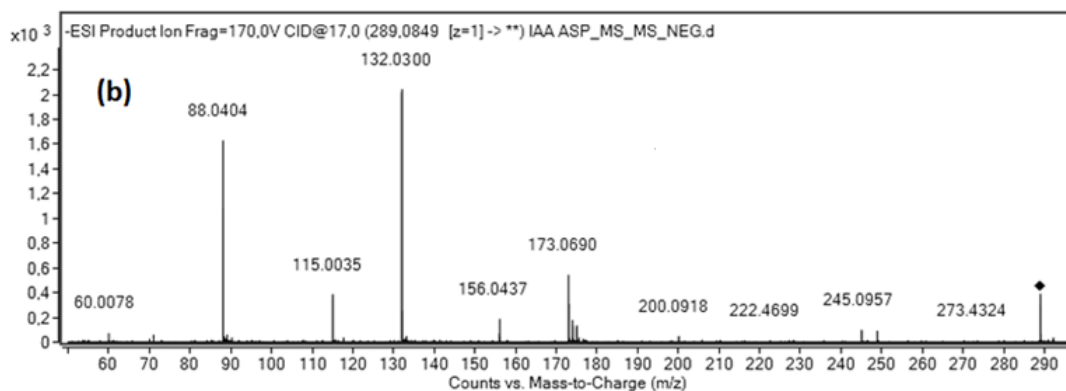
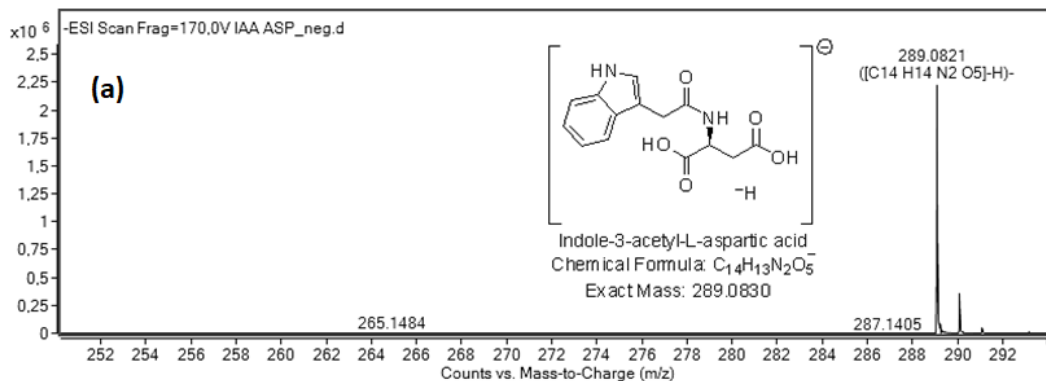
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-τυροσίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-τυροσίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



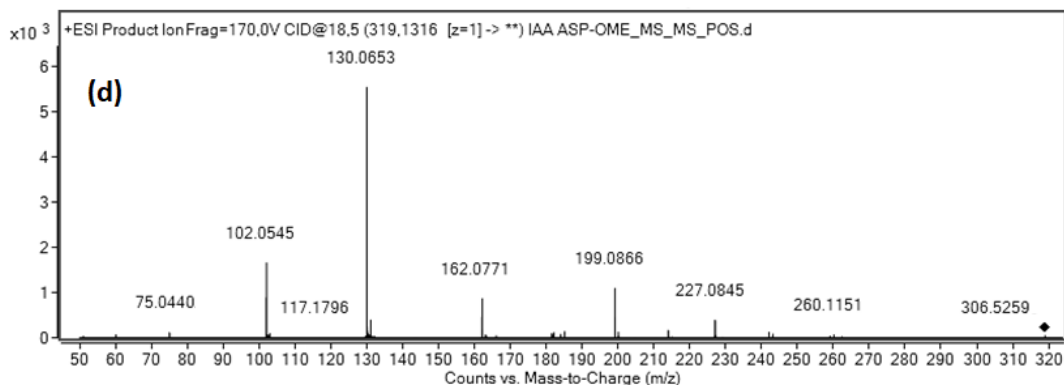
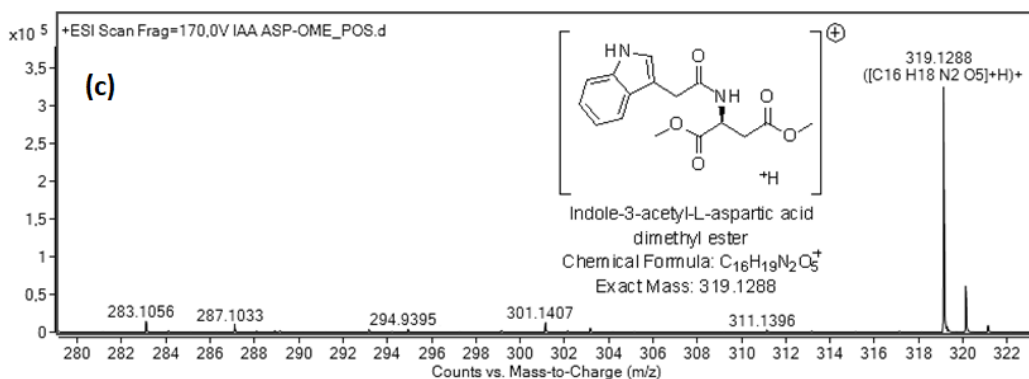
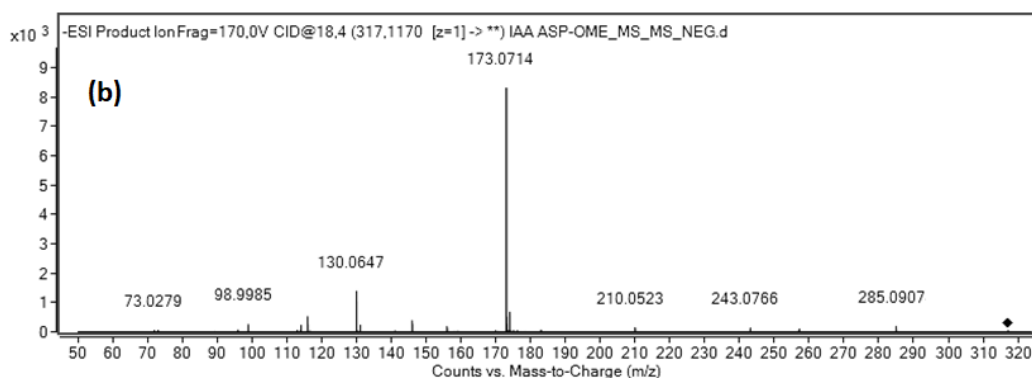
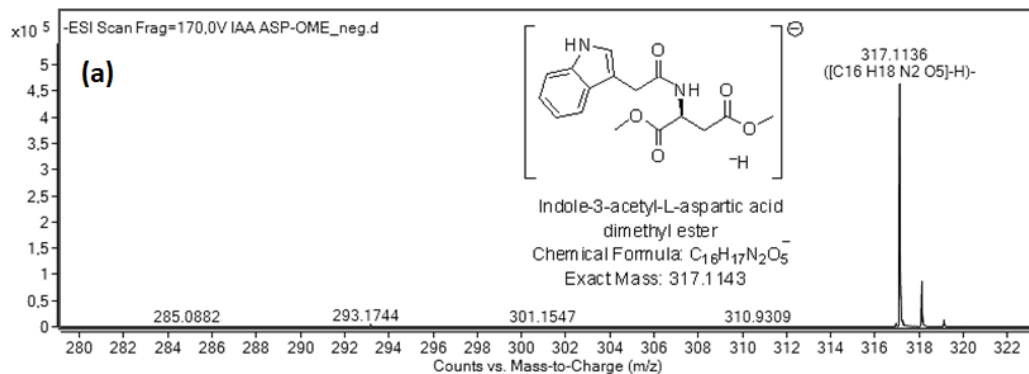
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) της ινδολο-3-ακετυλο-L-βαλίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) της ινδολο-3-ακετυλο-L-βαλίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



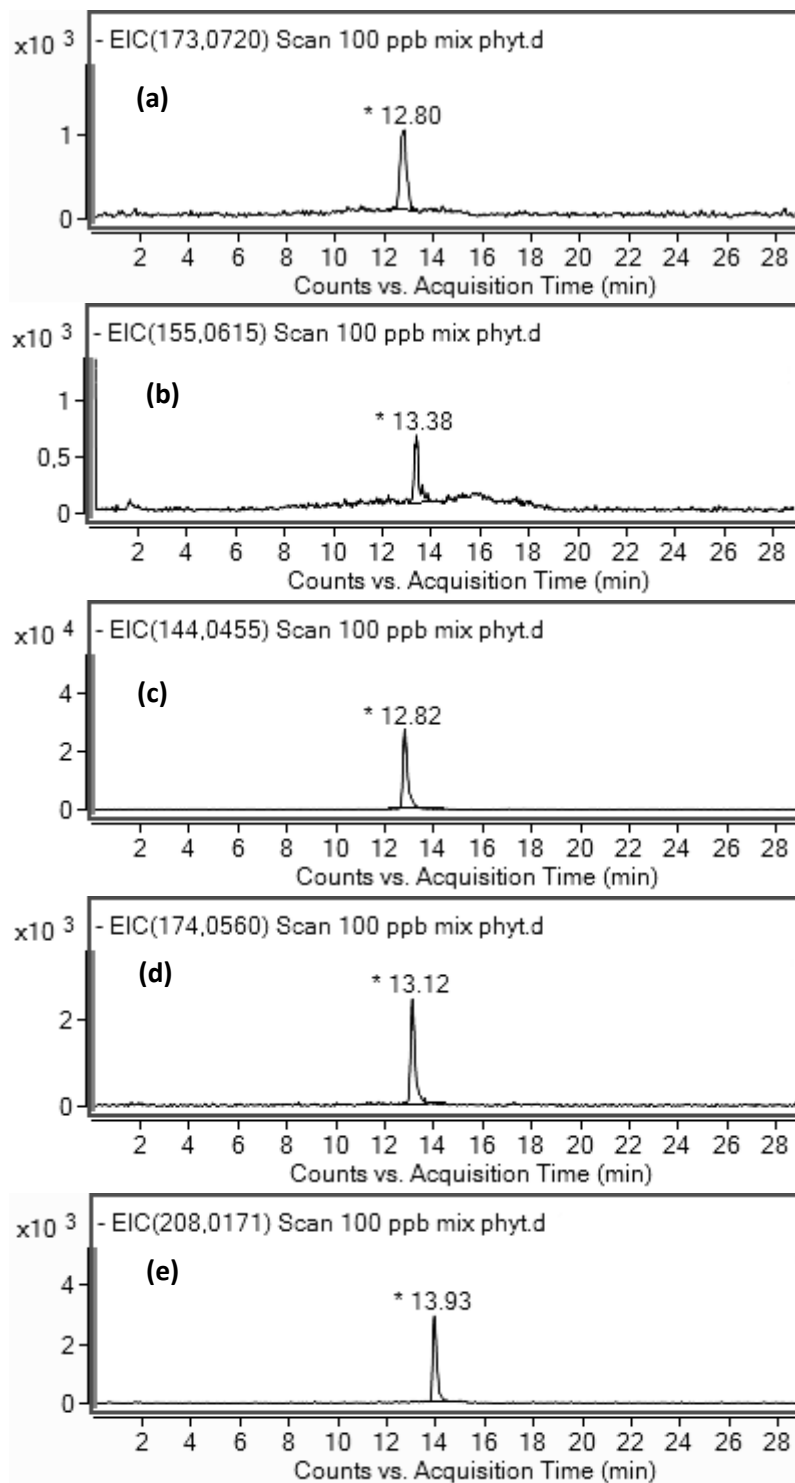
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-βαλίνης στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-βαλίνης στον θετικό ιοντισμό ESI



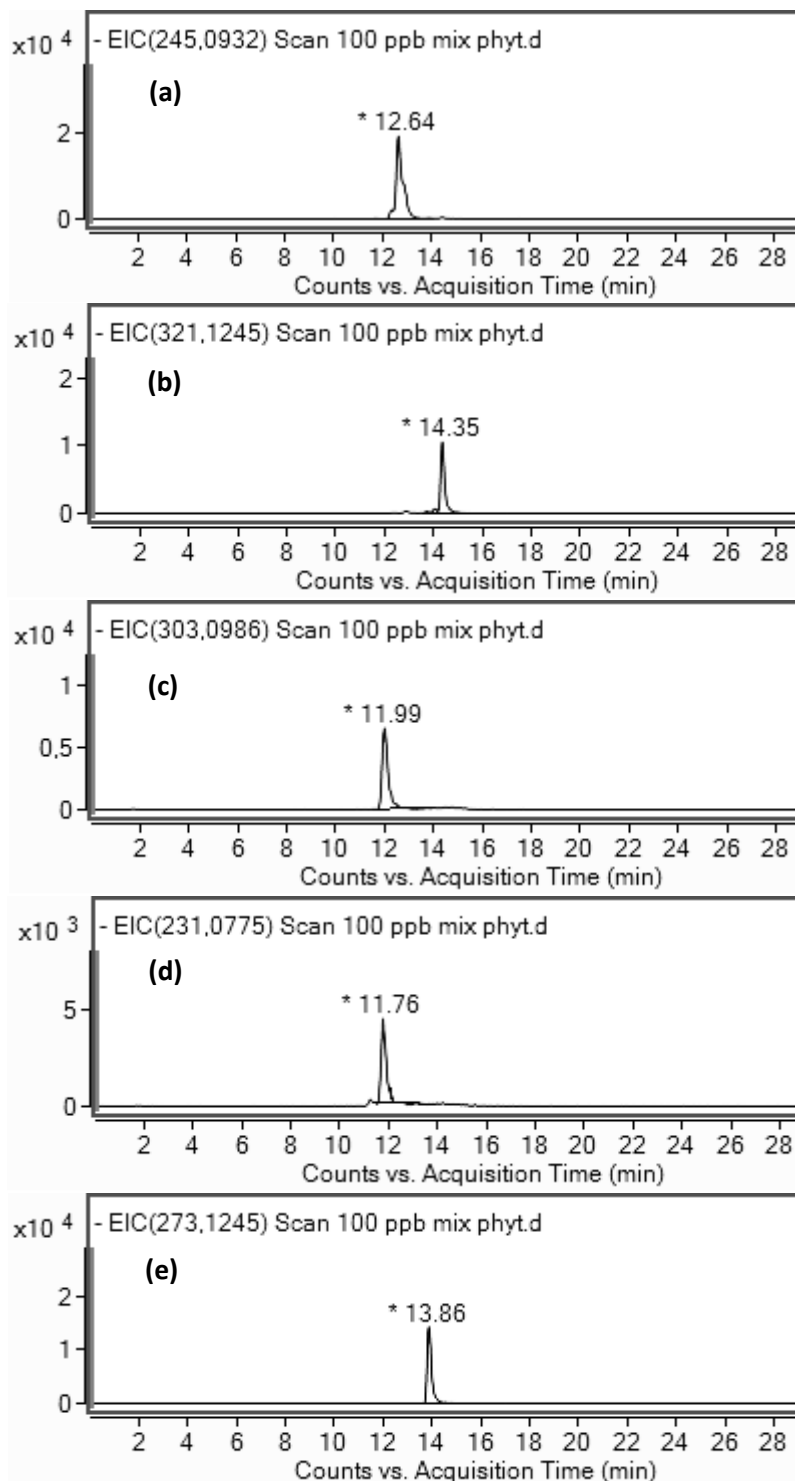
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του ινδολο-3-ακετυλο-L-ασπαρτικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του ινδολο-3-ακετυλο-L-ασπαρτικού οξέος στον θετικό ιοντισμό ESI



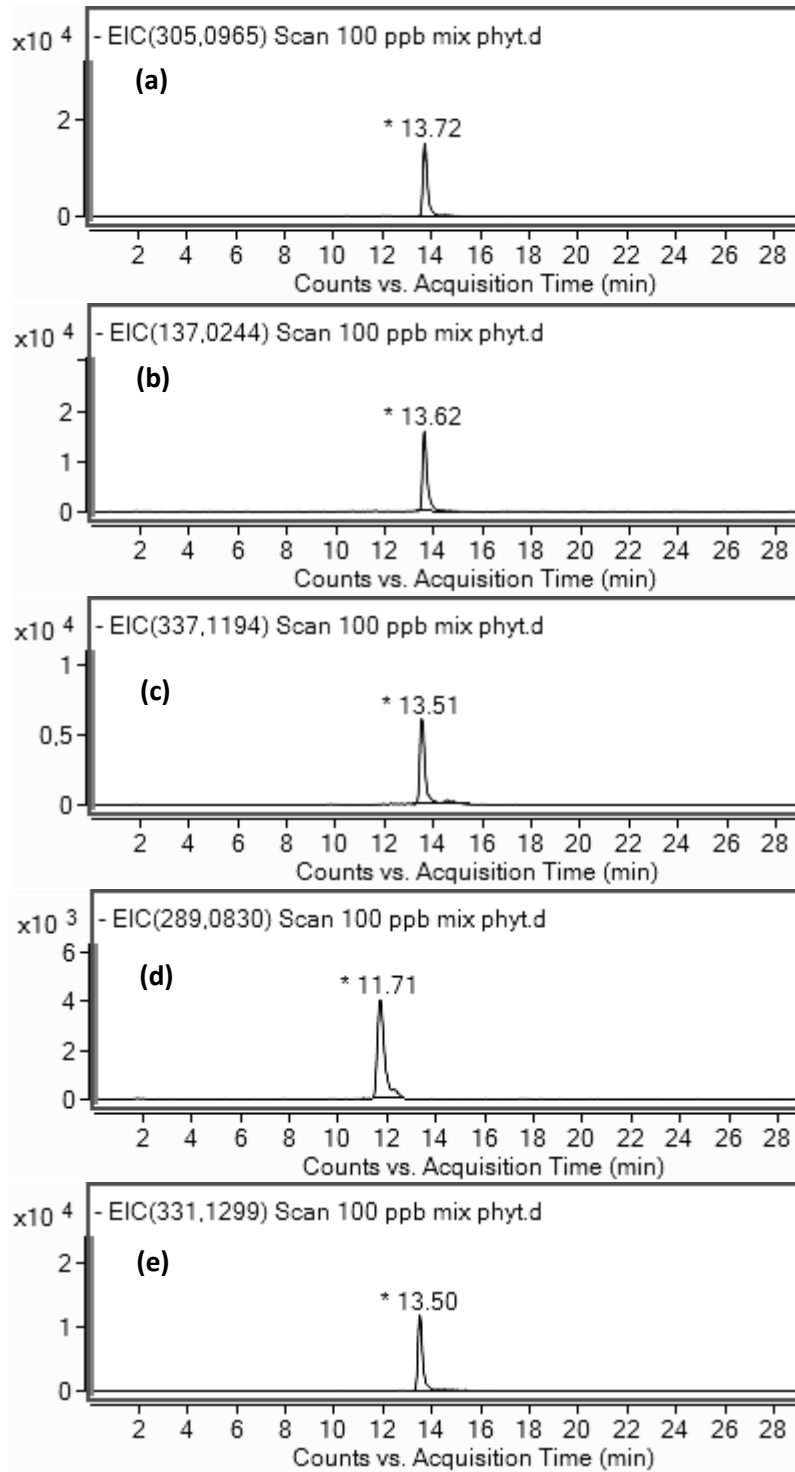
Φάσμα πλήρους σάρωσης (a) και MS/MS (b) του μεθυλεστέρα του ινδολο-3-ακετυλο-L-ασπαρτικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό ESI. Φάσμα πλήρους σάρωσης (c) και MS/MS (d) του μεθυλεστέρα του ινδολο-3-ακετυλο-L-ασπαρτικού οξέος στον θετικό ιοντισμό ESI



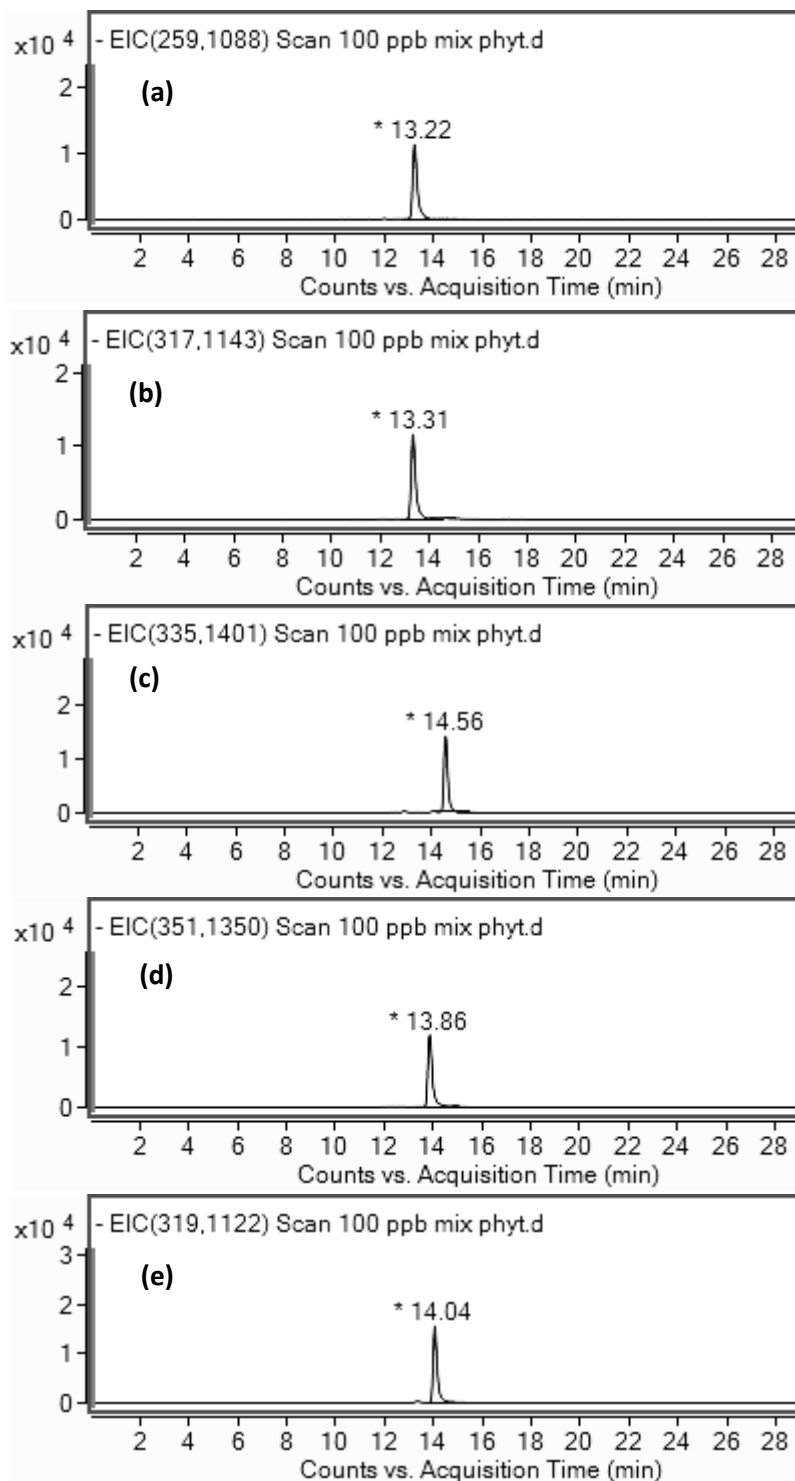
Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων ενός πρότυπου διαλύματος (100 ng/mL) του ινδολο-3-ακεταμίδιου (a), του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (b), της ινδολο-3-καρβαλδεύδης (c), του ινδολο-3-οξικού οξέος (d) και του 4-χλωροϊνδολο-3-οξικού οξέος (e)



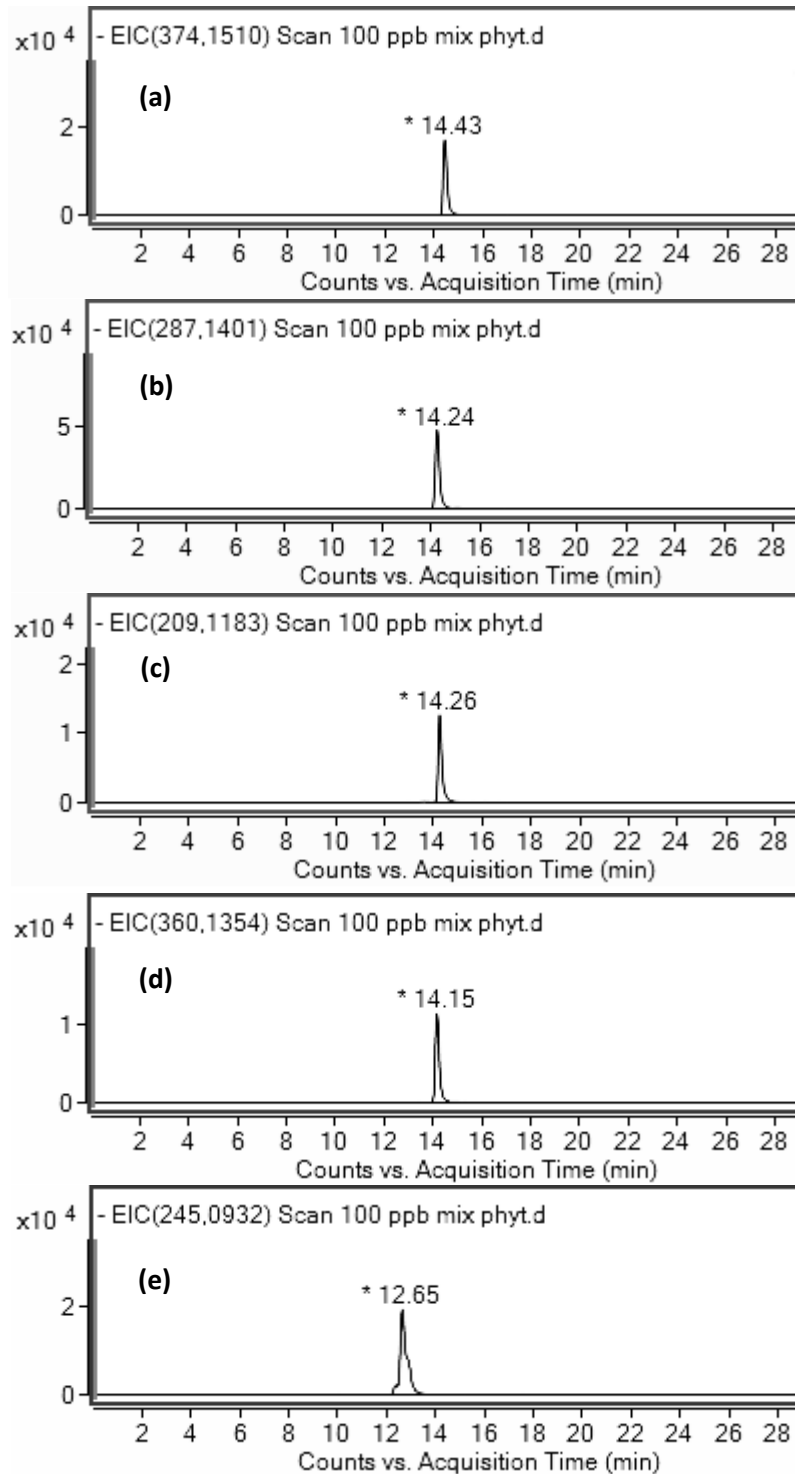
Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων ενός πρότυπου διαλύματος (100 ng/mL) της ινδολο-3-ακετυλο-L-αλανίνης (a), της ινδολο-3-ακετυλο-L-φαιτυλαλανίνης (b), του ινδολο-3-ακετυλο-L-γλουταμινικού οξέος (c), της ινδολο-3-ακετυλο-γλυκίνης (d) και της ινδολο-3-ακετυλο-L-βαλίνης (e)



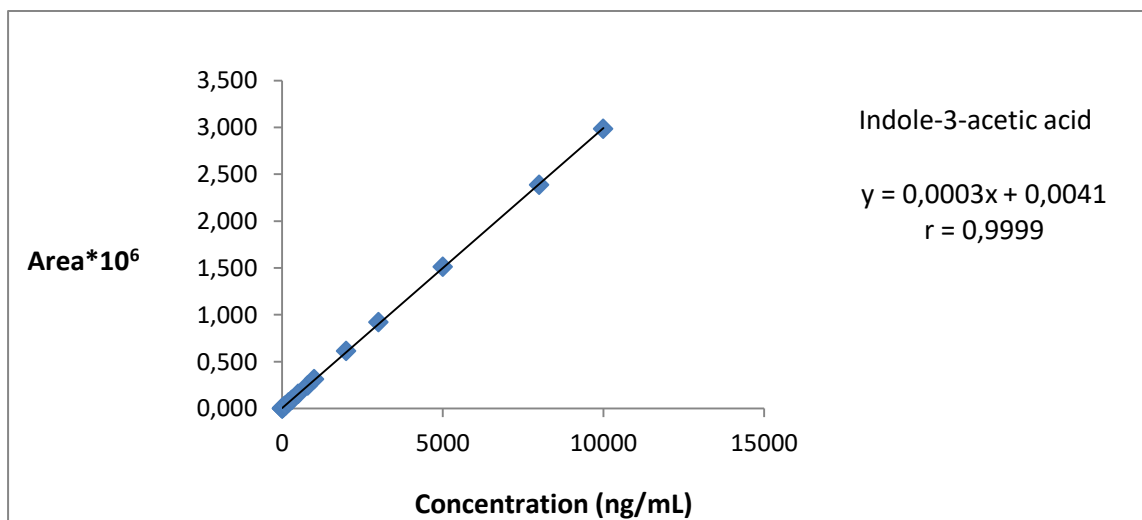
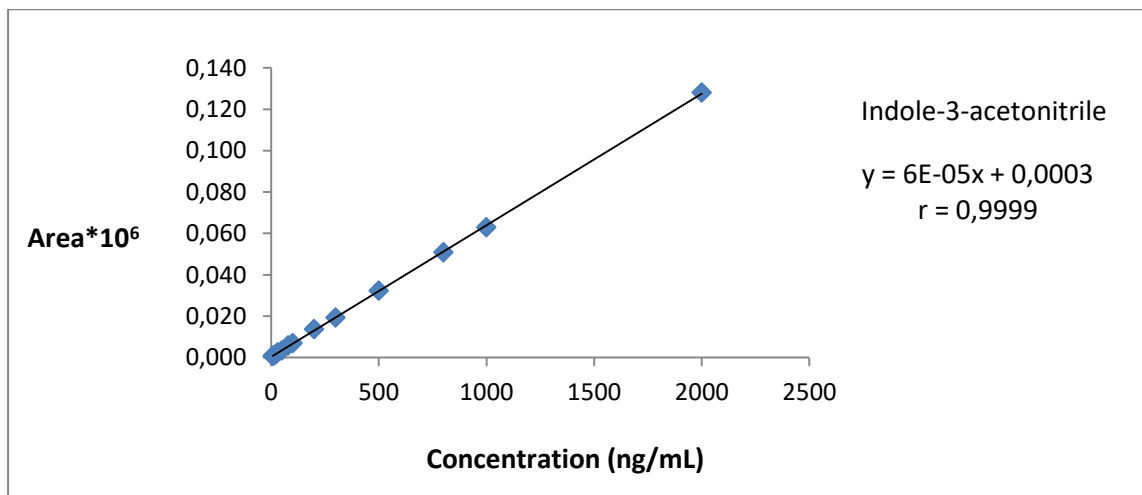
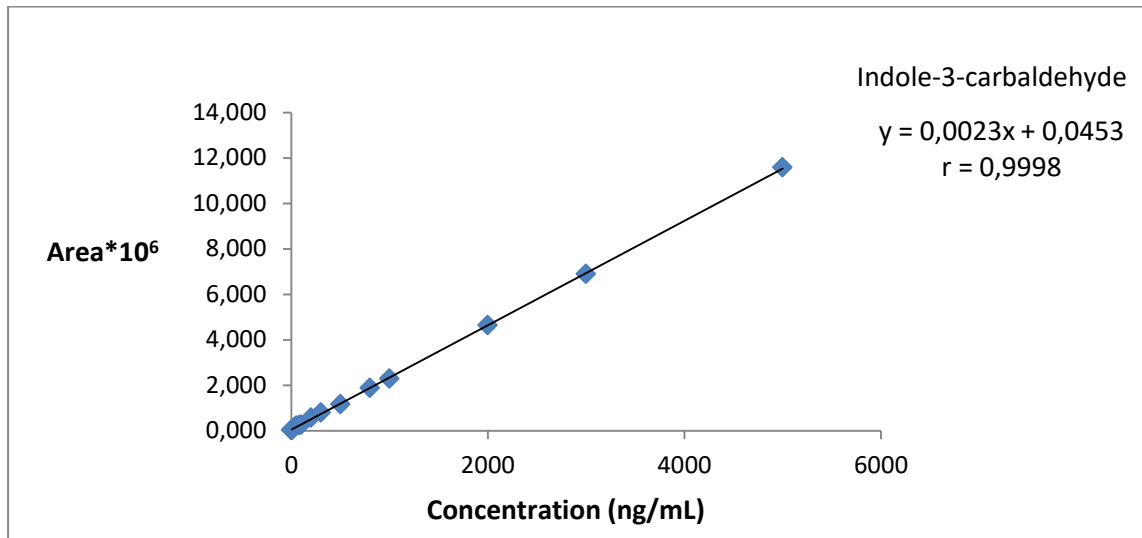
Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων ενός πρότυπου διαλύματος (100 ng/mL) της ινδολο-3-ακετυλο-μεθειονίνης (a), του σαλικυλικού οξέος (b), της ινδολο-3-ακετυλο-τυροσίνης (c), του ινδολο-3-ακετυλο-ασπαρτικού οξέος (d) και του διμεθυλεστέρα του ινδολο-3-ακετυλο-γλουταμινικού οξέος (e)

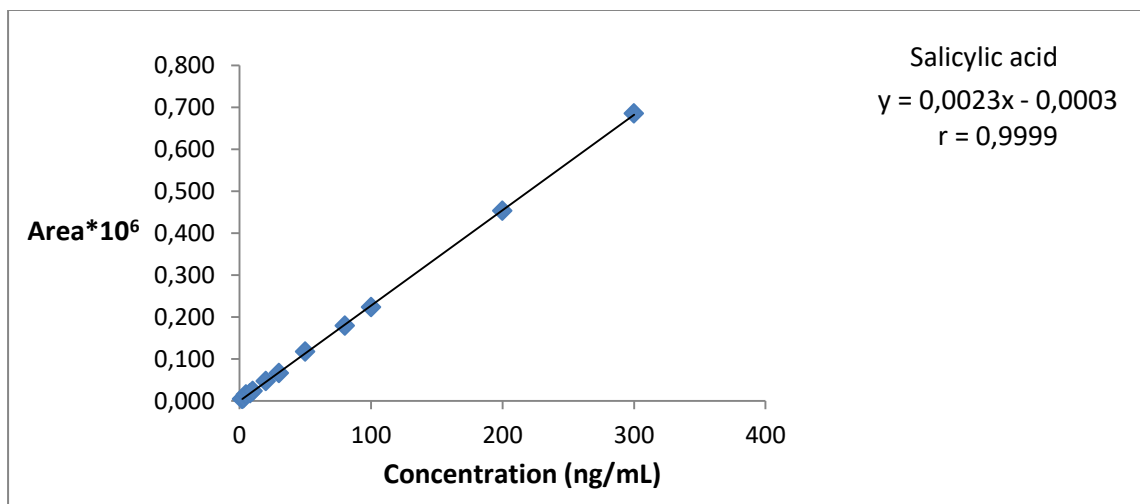
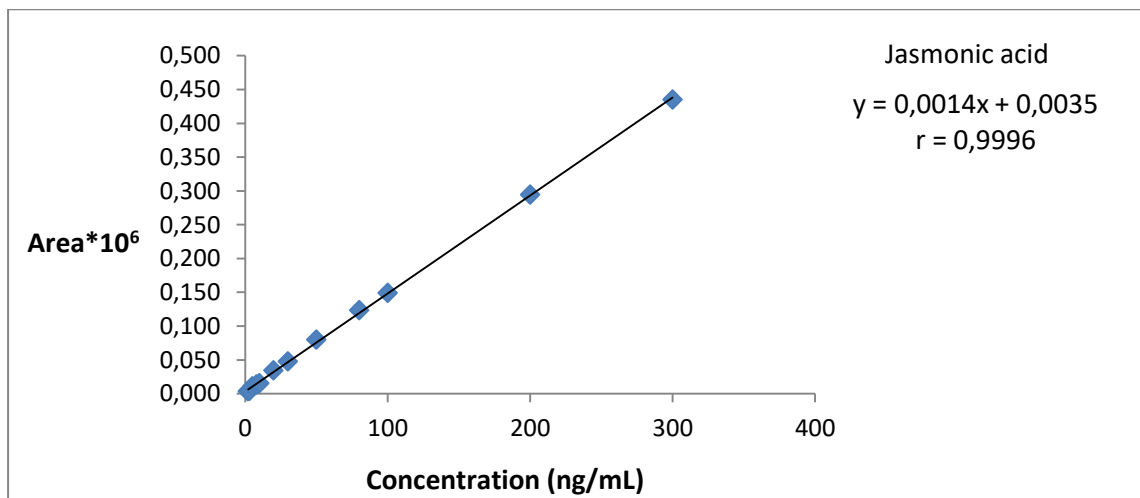
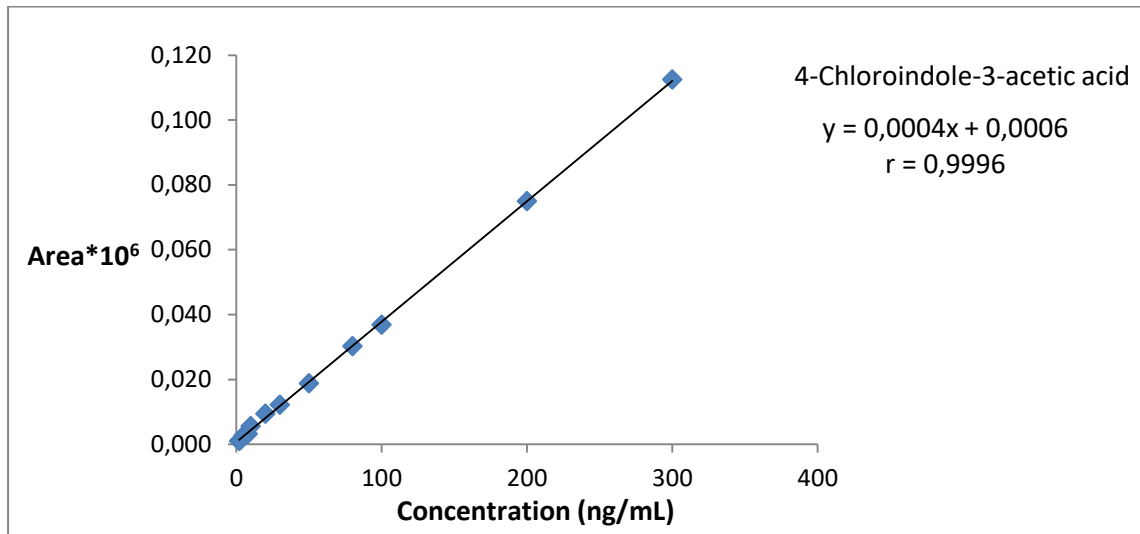


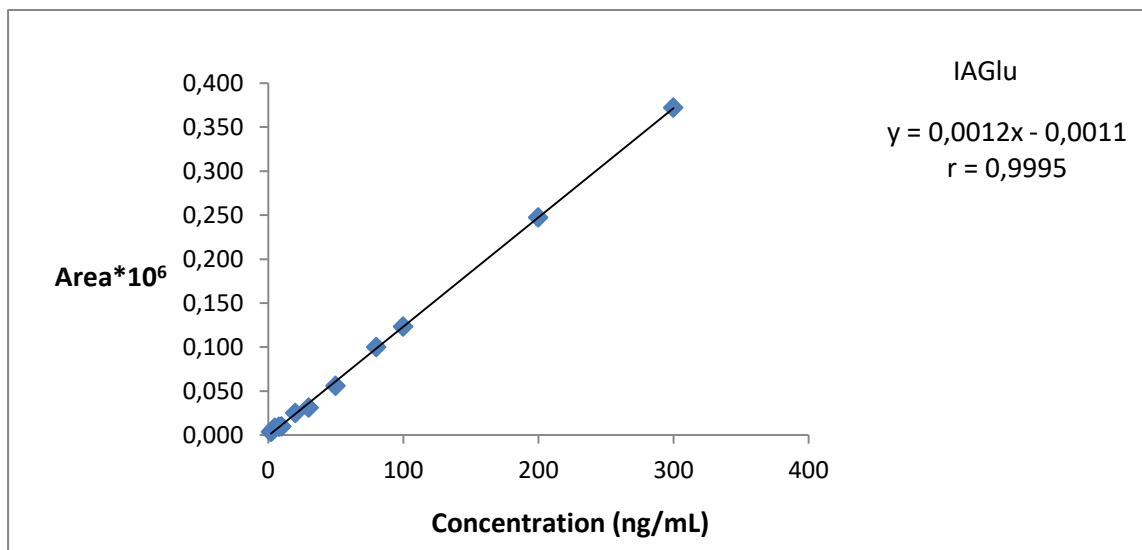
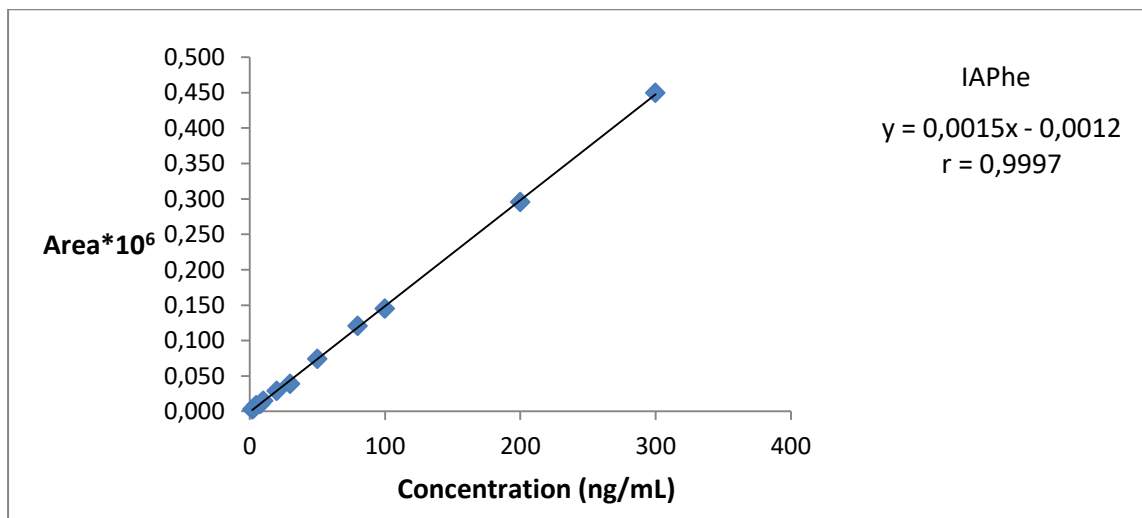
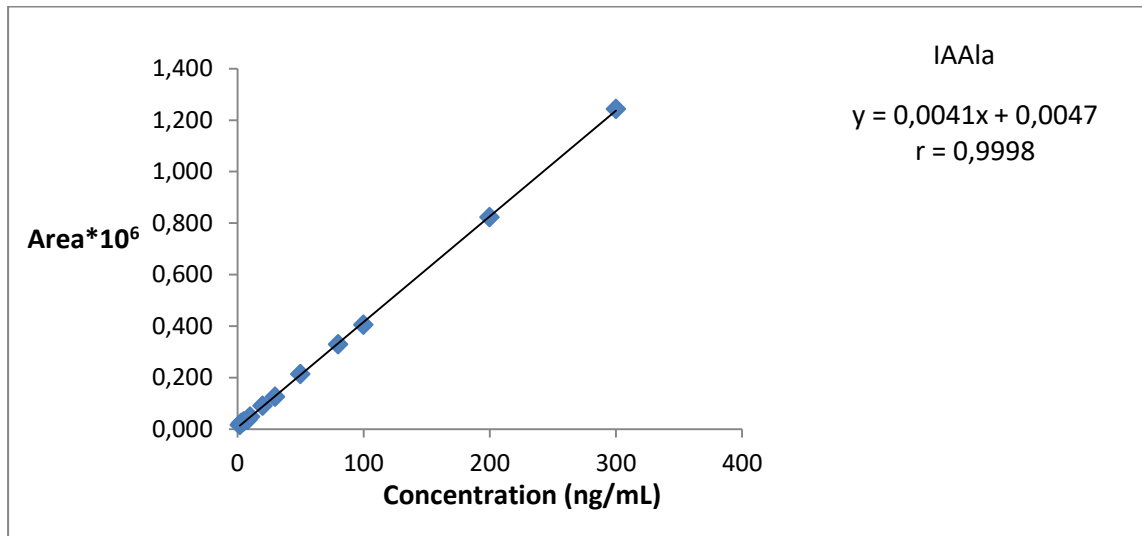
Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων ενός πρότυπου διαλύματος (100 ng/mL) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-αλανίνης (a), του διμεθυλεστέρα του ινδολο-3-ακετυλο-L-ασπαρτικού οξέος (b), του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-φαινυλαλανίνης (c), του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-τυροσίνης (d), του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-μεθειονίνης (e)

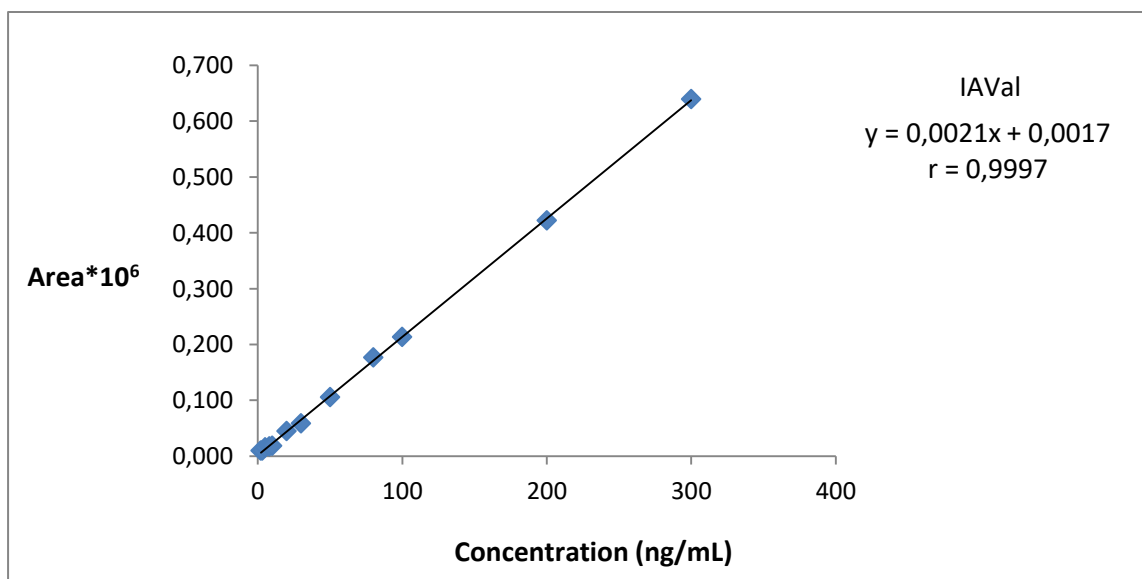
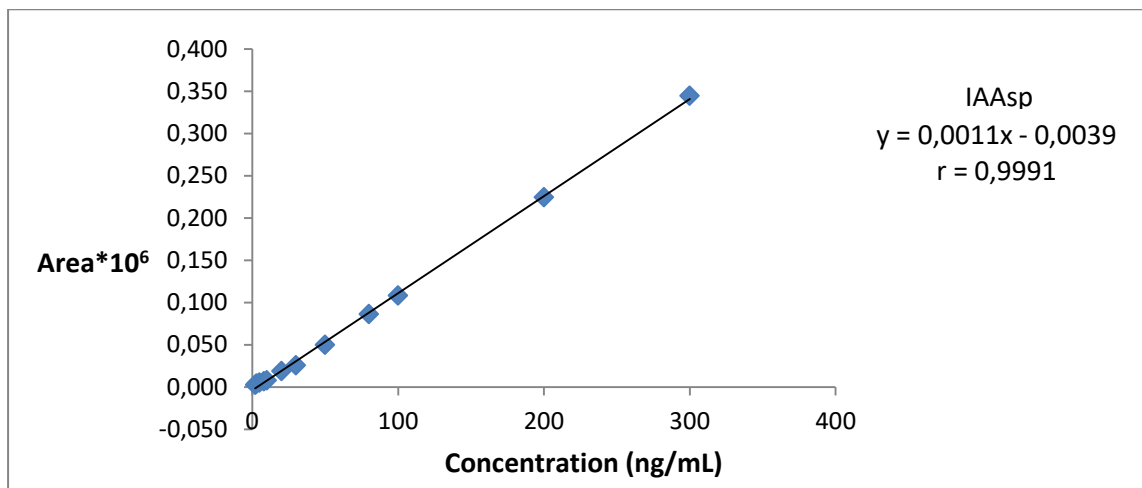
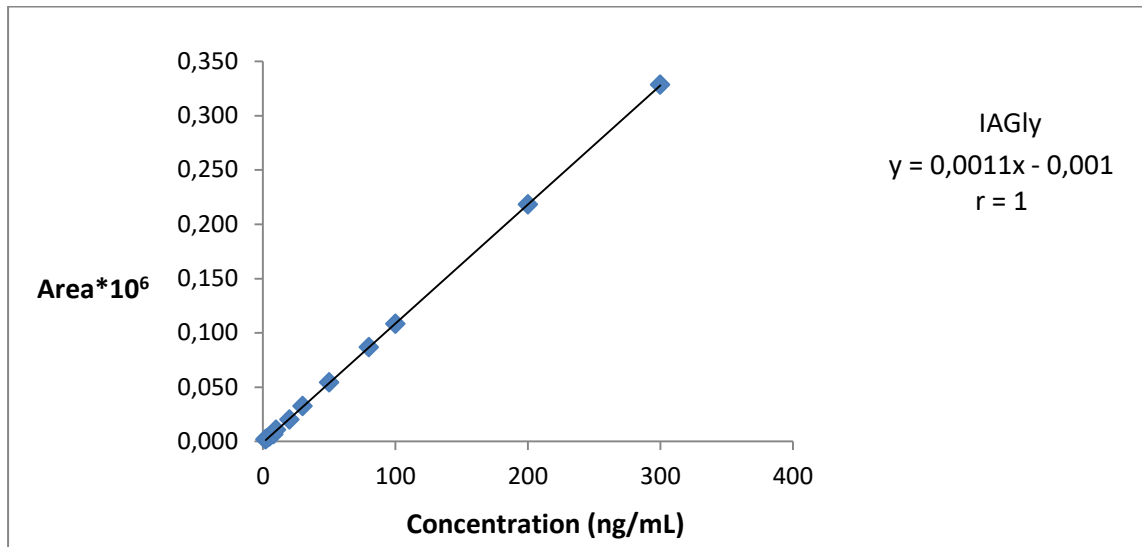


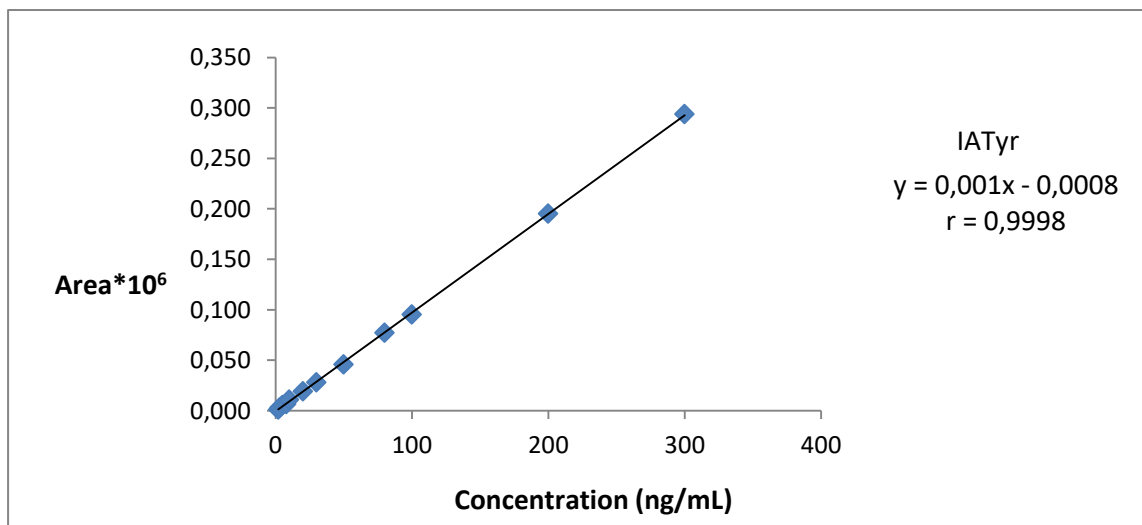
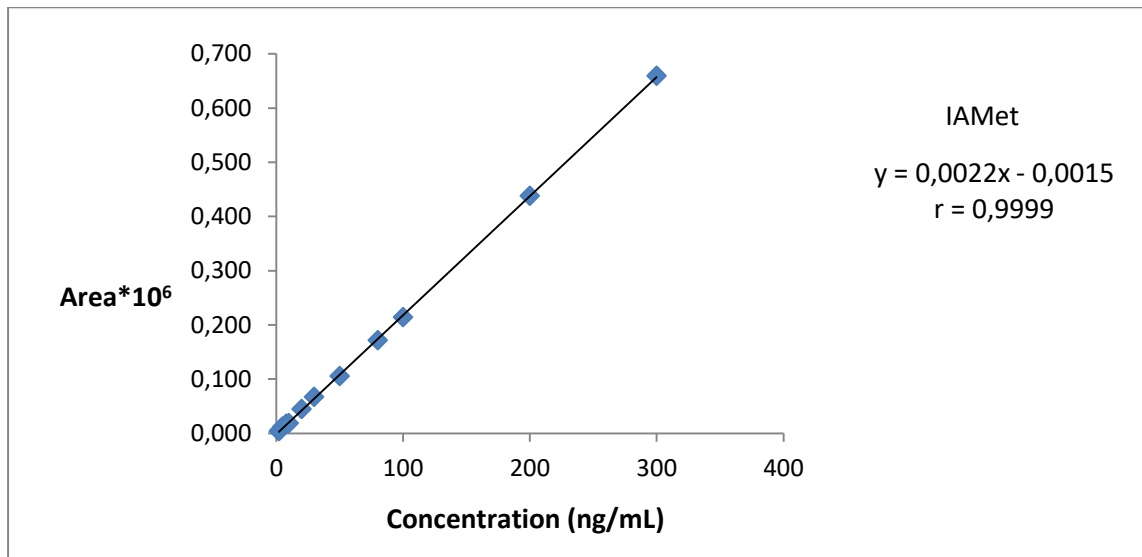
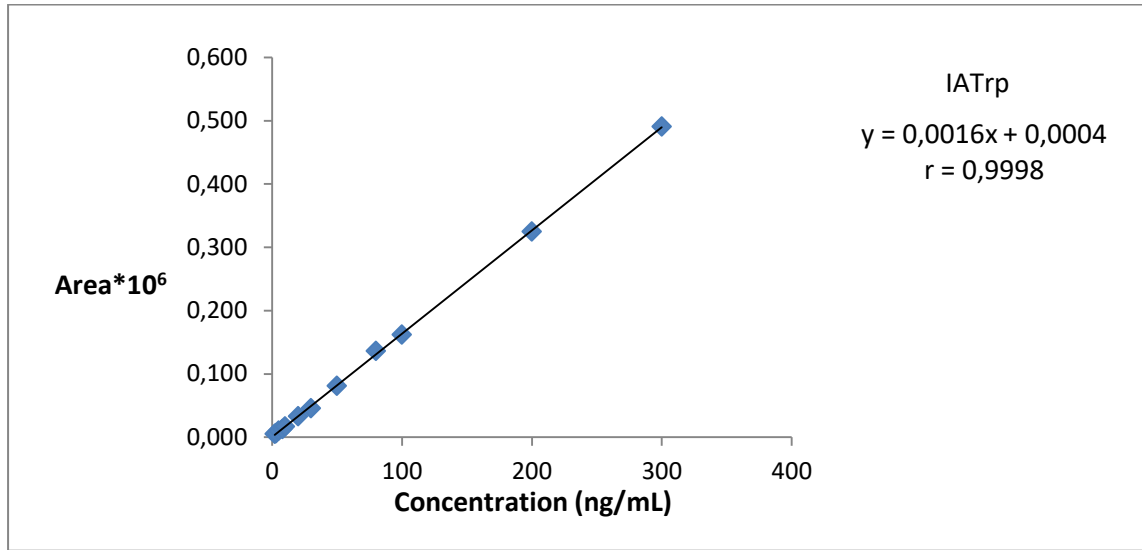
Χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων ενός πρότυπου διαλύματος (100 ng/mL) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-θρυπτοφάνης (a) του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-L-βαλίνης (b) του ιασμονικού οξέος (c) της ινδολο-3-ακετυλο-L-θρυπτοφάνης (d) και του μεθυλεστέρα της ινδολο-3-ακετυλο-γλυκίνης (e)

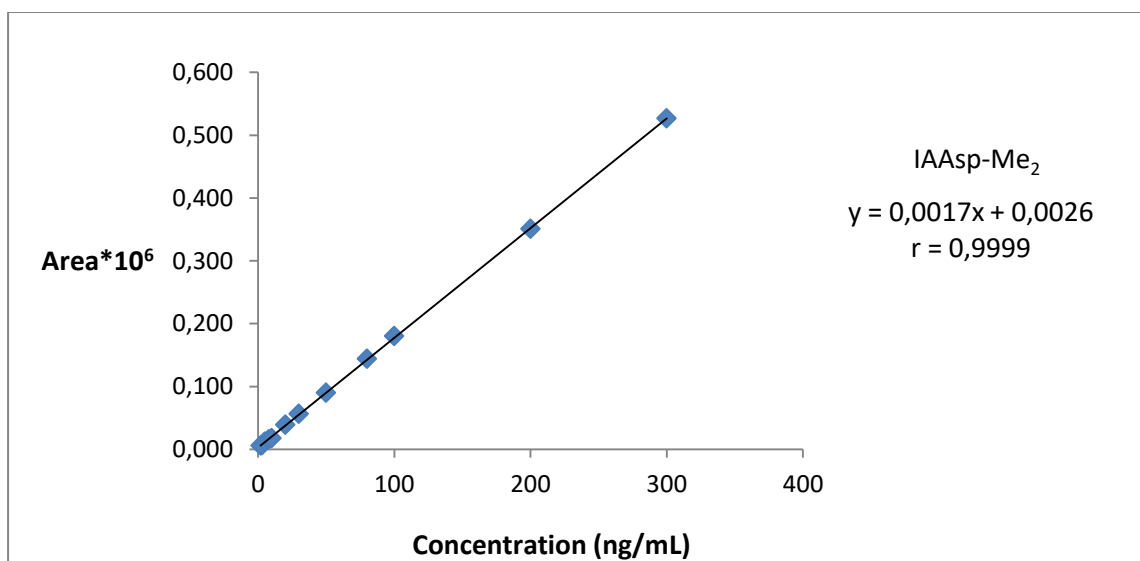
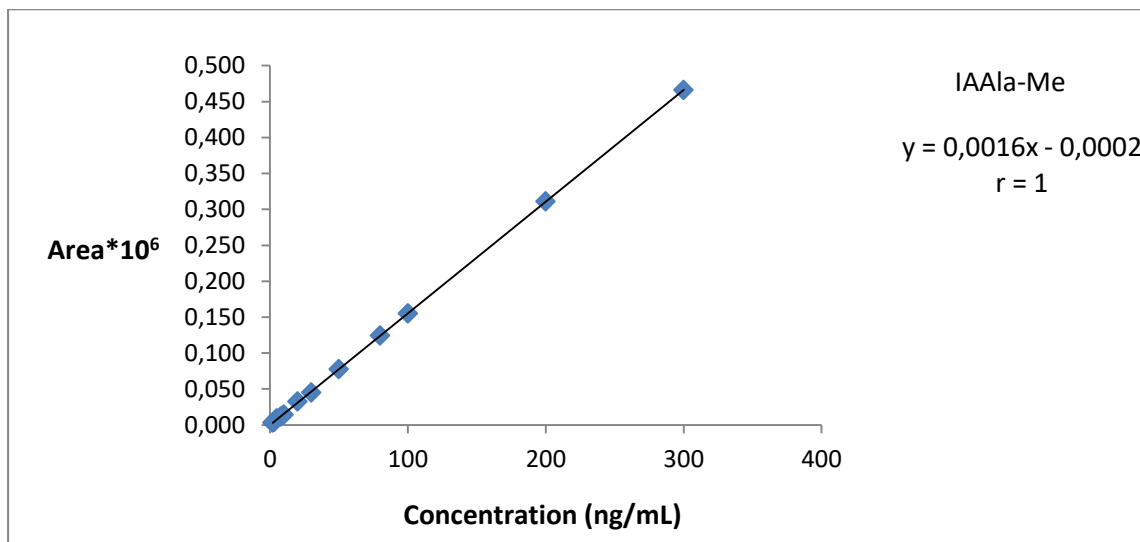
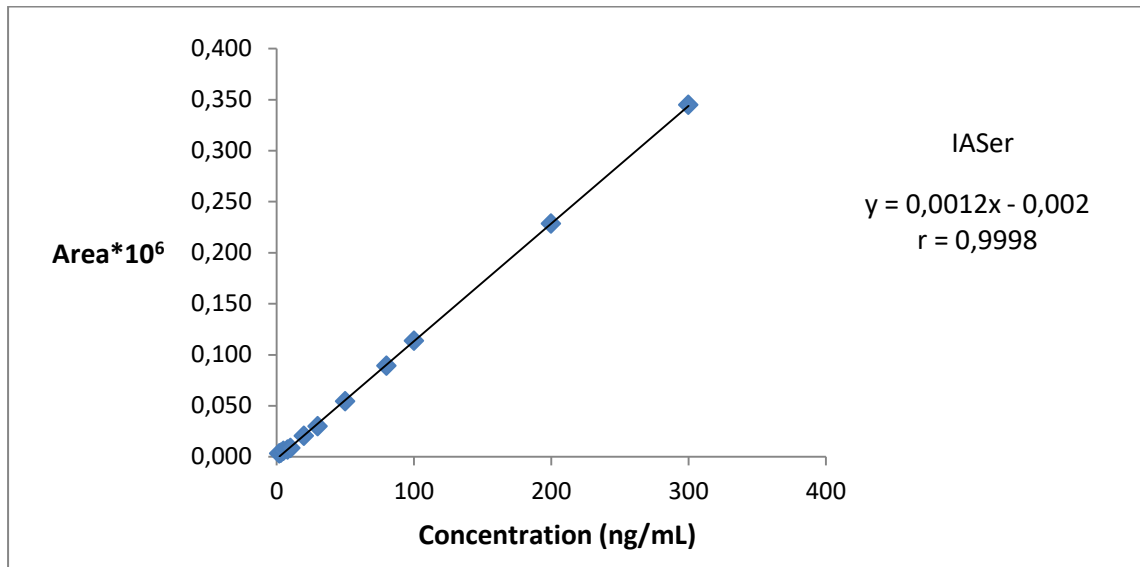


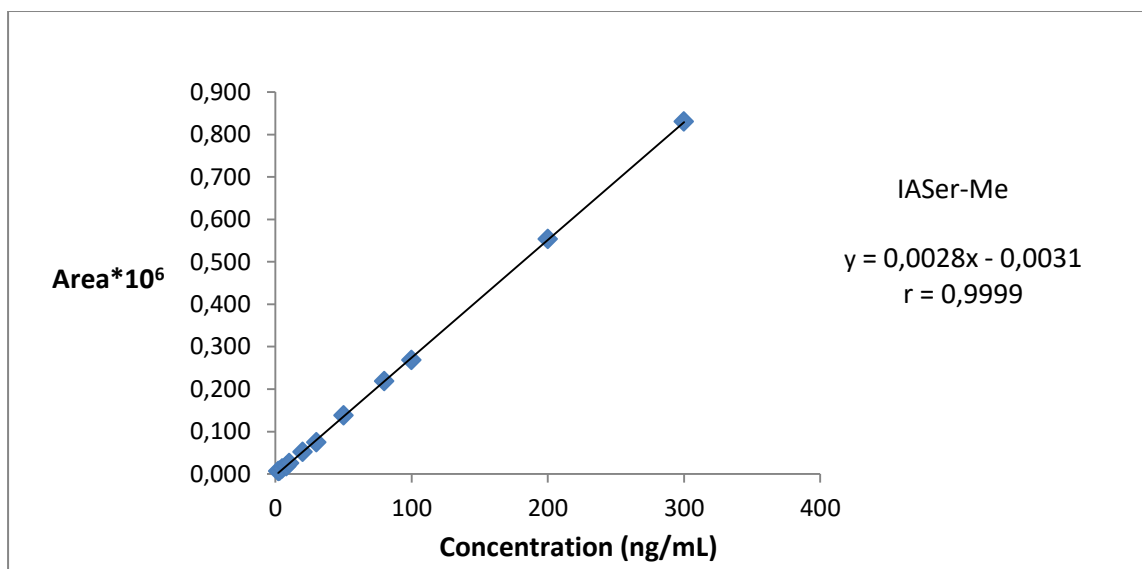
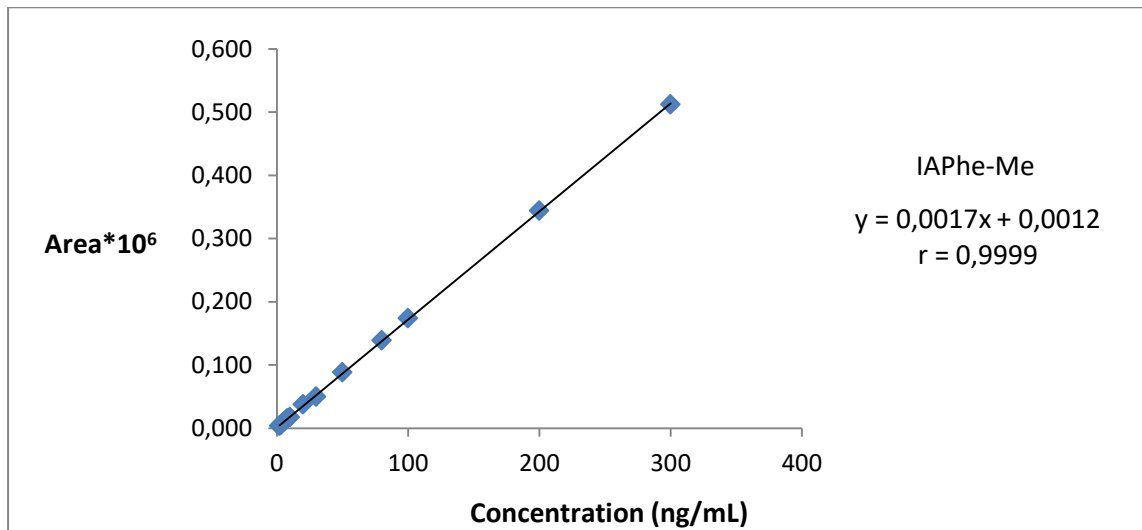
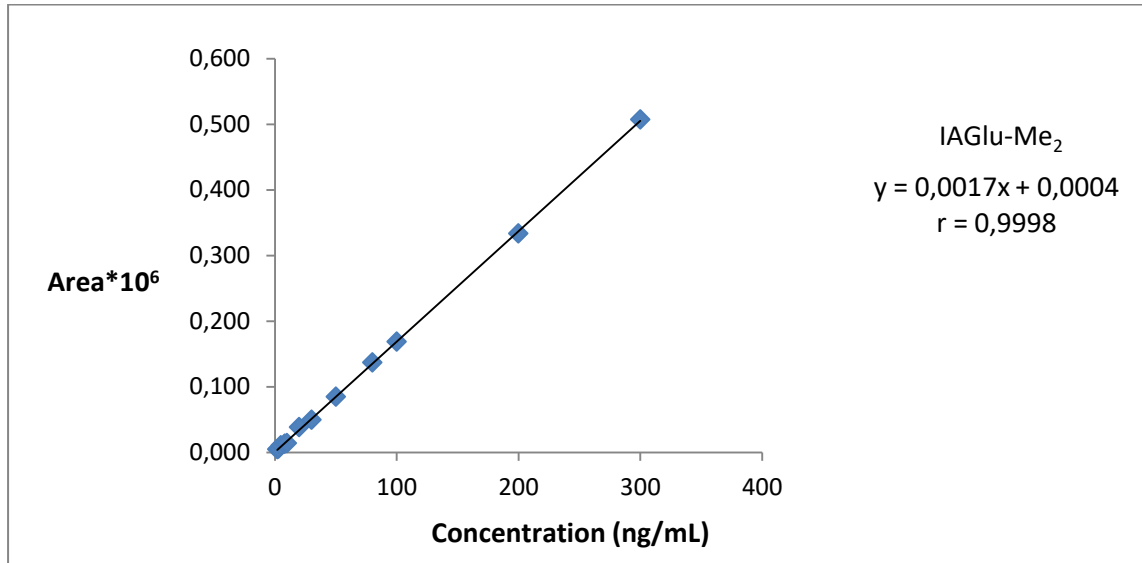


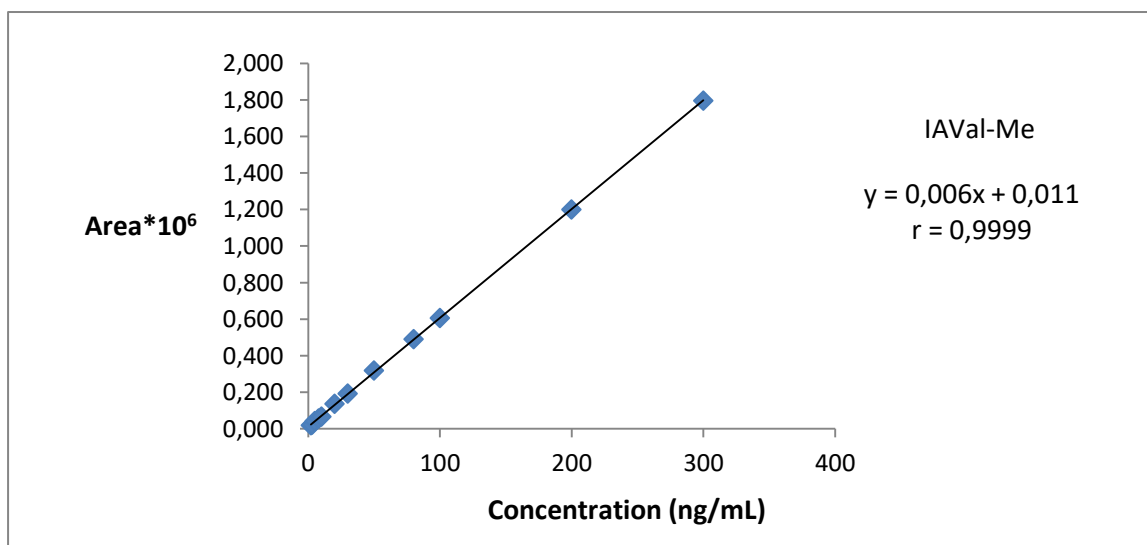
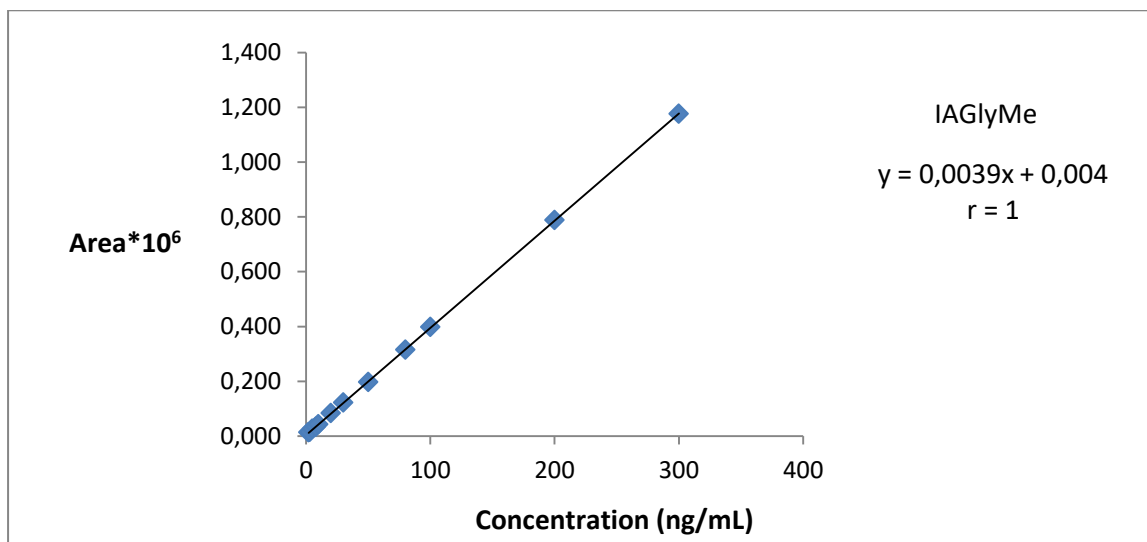
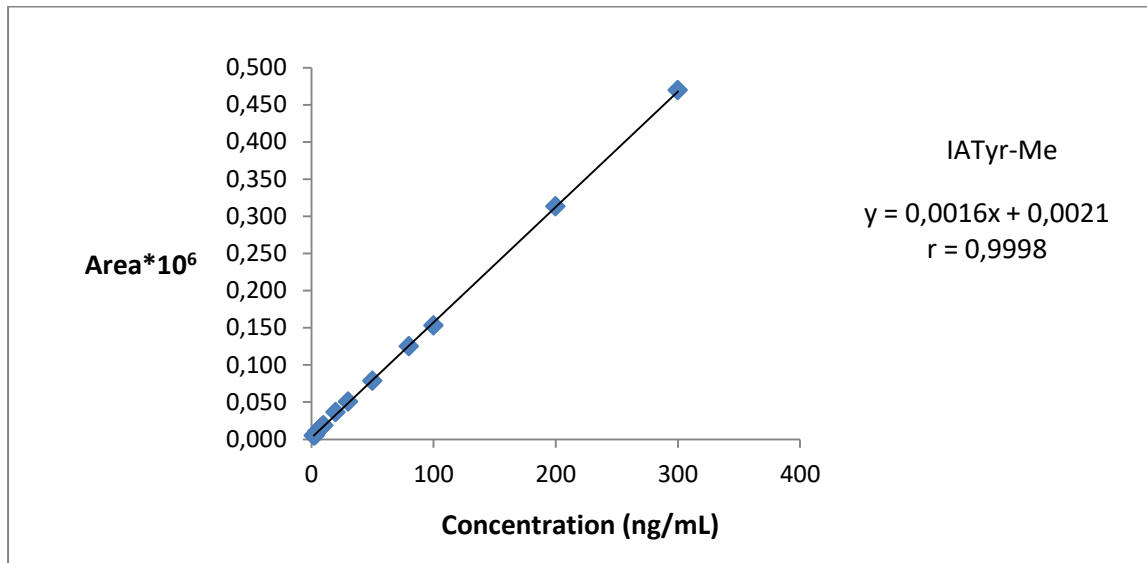


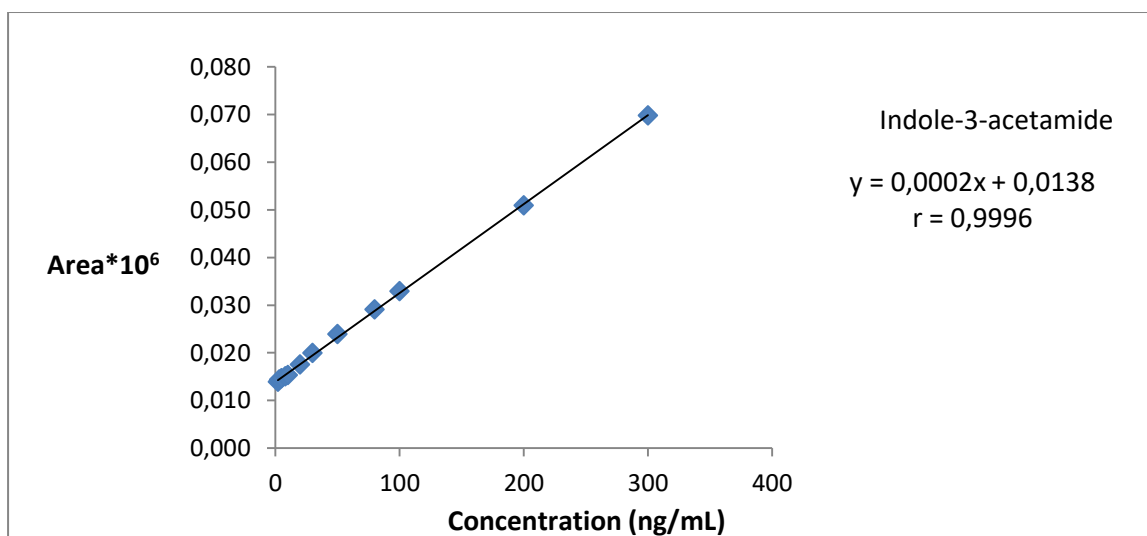
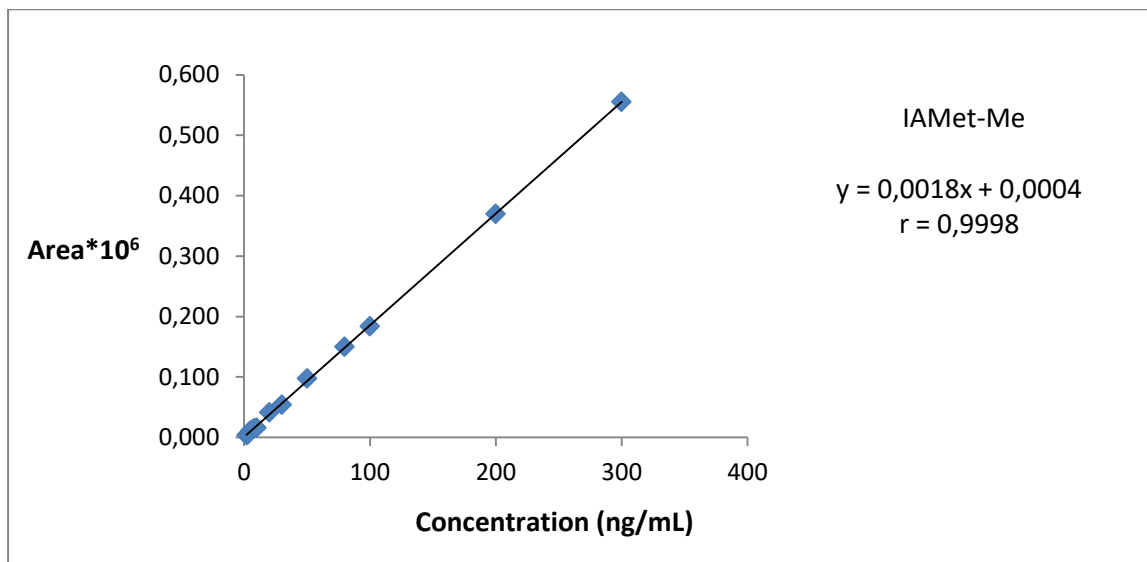
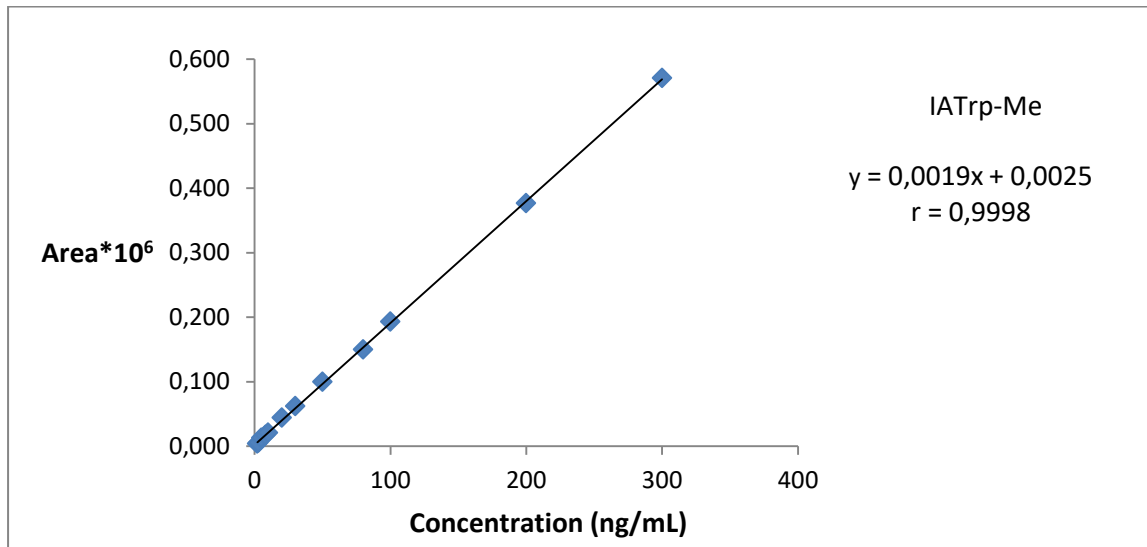








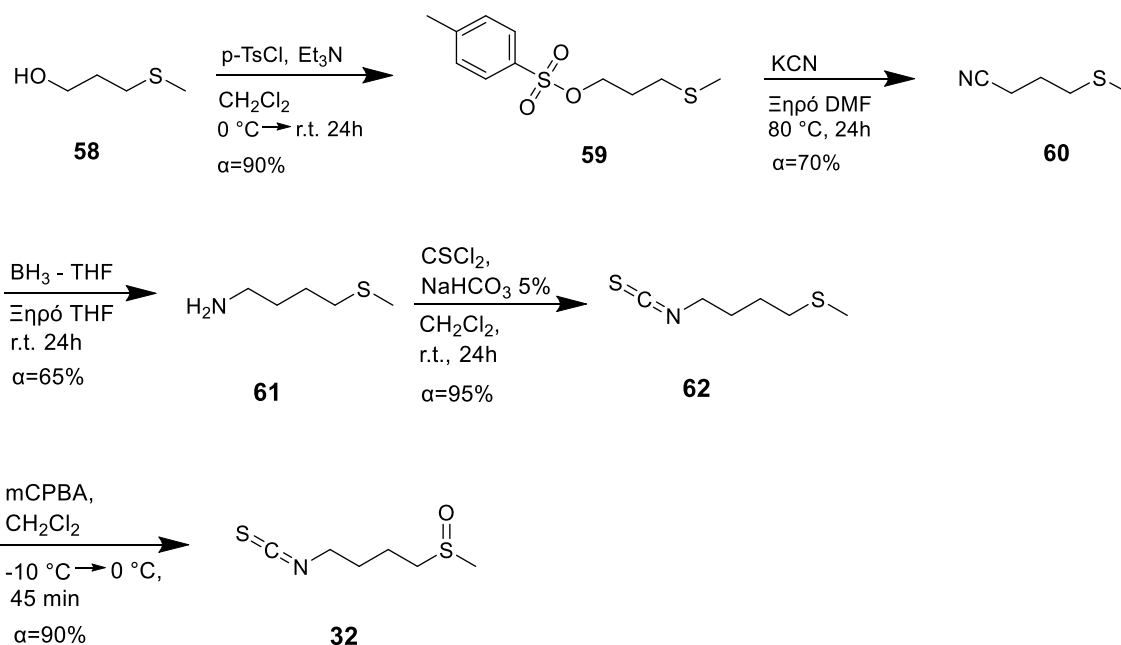




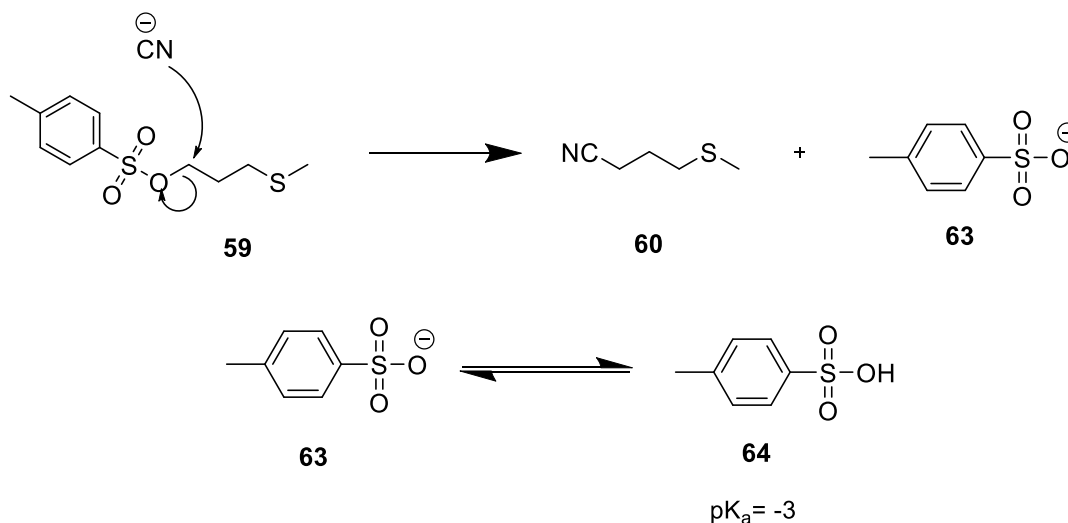
Σύνθεση της Σουλφοραφάνης

Η σύνθεση της σουλφοραφάνης (**32**) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μέθοδο της βιβλιογραφίας και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο αναφοράς για την ανάπτυξη της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του συνόλου των ισοθειακουανικών ενώσεων σε μπρόκολο, με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR.

Ως πρώτη ύλη για την σύνθεση της σουλφοραφάνης χρησιμοποιήθηκε η εμπορικώς διαθέσιμη 3-μεθυλοθειοπροπανόλη (**58**) από την οποία παρασκευάστηκε ο αντίστοιχος τοζυλεστέρας (**59**), σε απόδοση 90%, κατόπιν αντίδρασης με παρατολουολοσουλφονυλοχλωρίδιο (p-TsCl), παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N). Η παρατολουολοσουλφόνυλο ομάδα σε μία αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης, υποκαταστάθηκε από το ιόν CN⁻ (KCN) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη ξηρό DMF στους 80 °C και οδήγησε στο νιτρίλιο (**60**). Αξίζει να σημειωθεί ότι, το στάδιο μετατροπής της υδροξυλομάδας σε τοζυλεστέρα είναι απαραίτητο καθότι η υδροξυλομάδα είναι κακή αποχωρούσα ομάδα. Αντίθετα, η τοζυλο-ομάδα είναι καλή αποχωρούσα ομάδα, αφού το ανιόν που προκύπτει είναι πολύ σταθερό λόγω συντονισμού. Επιπλέον το παρα-τολουολοσουλφόνυλο οξύ έχει pK_a=-3 και η συζυγής του βάση είναι ασθενής.



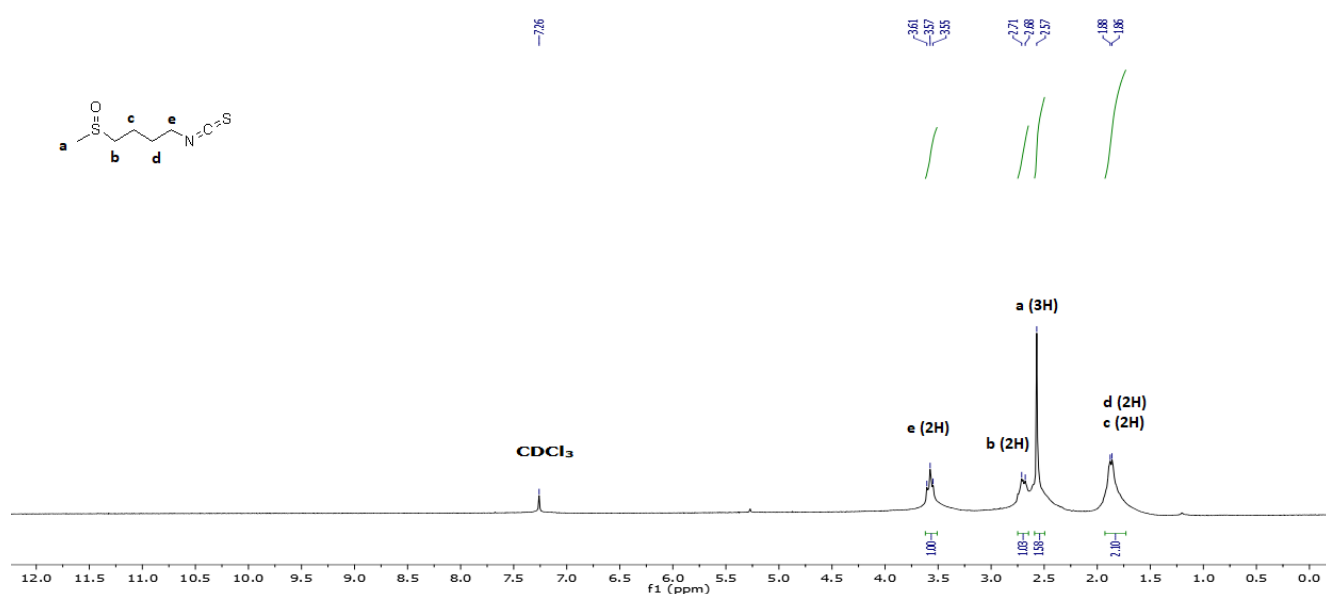
Πορεία σύνθεσης σουλφοραφάνης (**32**)



Πυρηνόφιλη υποκατάσταση της τοζυλο-ομάδας από την κυανομάδα

Το νιτρίλιο, με χρήση βορανίου (BH_3) σε τετραϋδροφουράνιο (THF), ανάχθηκε στην αμίνη (**61**). Η αμίνη στη συνέχεια οποία αντέδρασε με θειοφωσγένειο ($CSCl_2$) παρουσία $NaHCO_3$ 5% και μετετράπηκε στον ισοθειοκυανικό εστέρα (**62**) σε απόδοση 95%. Το τελικό προϊόν, η σουλφοραφάνη (**32**) παρασκευάστηκε με οξείδωση του (**62**) χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό το μετα-χλωρούπερβενζοϊκό οξύ (mCPBA), σε απόδοση 90%.

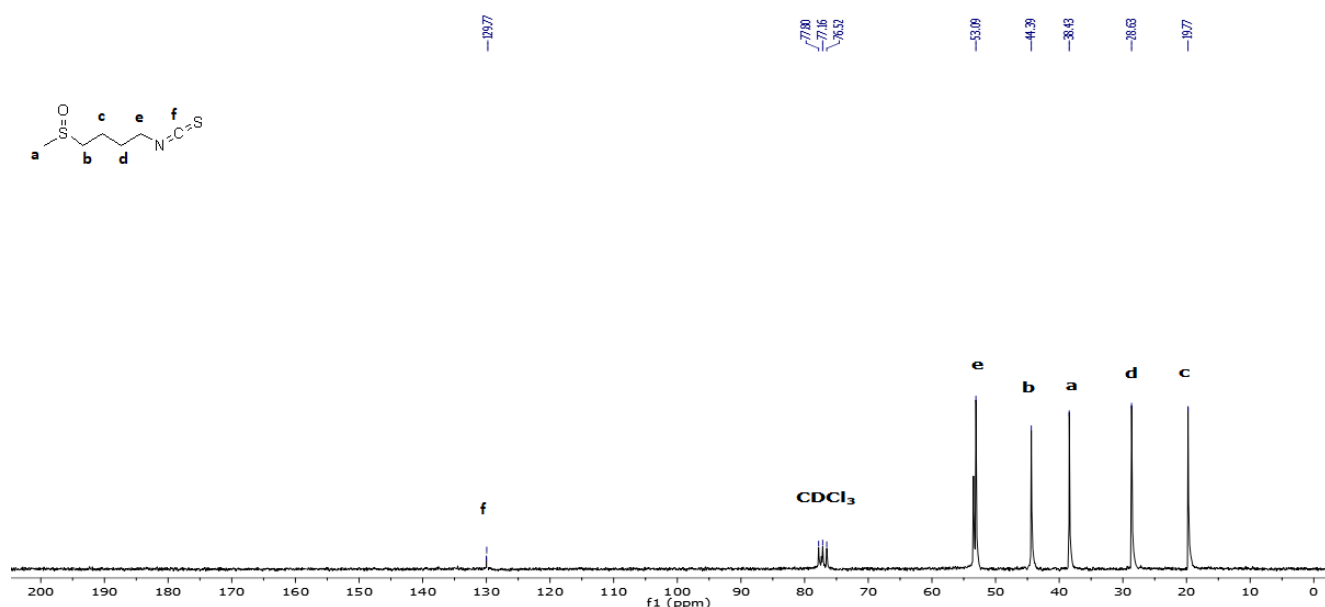
Η ένωση (**32**) ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία 1H και ^{13}C NMR καθώς και με φασματομετρία μάζας (HRMS). Αναλυτικά στοιχεία χαρακτηρισμού για όλες τις ενώσεις δίνονται στο κεφάλαιο ΣΤ. Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα 1H NMR της σουλφοραφάνης (**32**) σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$).



Φάσμα 1H NMR της σουλφοραφάνης (**32**) σε $CDCl_3$

Η απλή κορυφή στα 2.57 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθυλομάδας **a**, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις στα 3.55-3.61, 2.68-2.71 και 1.86-1.88 ppm αποδίδονται στα πρωτόνια των μεθυλενομάδων **e**, **b**, **c** και **d** αντίστοιχα.

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα ^{13}C NMR, της σουλφοραφάνης (**32**) σε CDCl_3 , με αποσύζευξη πρωτονίου. Η χημική μετατόπιση στα 129.8 ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα της ισοθειακουανικής ομάδας **f**, ενώ η χημική μετατόπιση στα 38.4 ppm στον άνθρακα του μεθυλίου **a**. Οι υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις στα 19.8, 28.6, 44.4 και 53.1 ppm ανήκουν στους άνθρακες των μεθυλενομάδων **c**, **d**, **b** και **e**, αντίστοιχα.

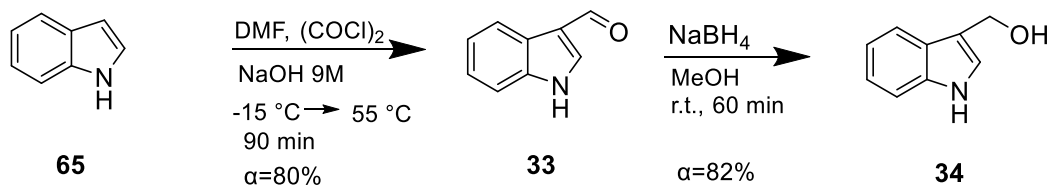


Φάσμα ^{13}C NMR της σουλφοραφάνης (**32**) σε CDCl_3

Σύνθεση της Ινδολο-3-καρβινόλης

Προχωρήσαμε στη σύνθεση της ένωσης (**34**) η οποία χρησιμοποιήθηκε μαζί με την ένωση (**32**) ως πρότυπο αναφοράς για την ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονου ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού σουλφοραφάνης και ινδολο-3-καρβινόλης, με τη βοήθεια της φασματομετρία μάζας HRMS.

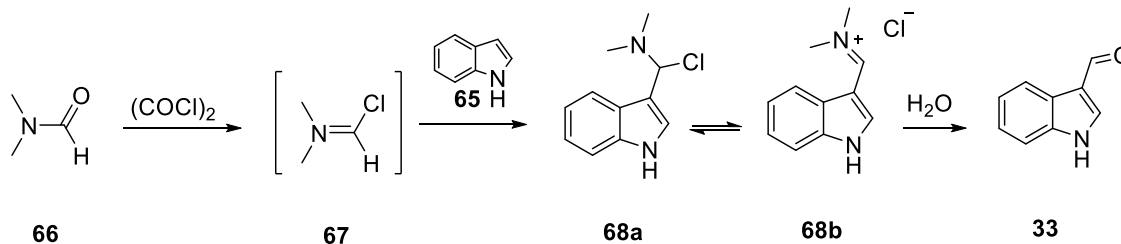
Η σύνθεση της ένωσης (**34**) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.



Πορεία σύνθεσης ινδολο-3-καρβινόλης (**34**)

Ξεκινήσαμε από το εμπορικώς διαθέσιμο ινδόλιο (**65**), από το οποίο λάβαμε την καρβαλδεΐδη του ινδολίου (**33**), σε απόδοση 80%, με οξαλυλοχλωρίδιο (COCl_2) και DMF. Η αναγωγή της καρβαλδεΐδης (**33**), με βοριοϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4), οδήγησε στην ινδολο-3-καρβινόλη (**34**) σε απόδοση 82%.

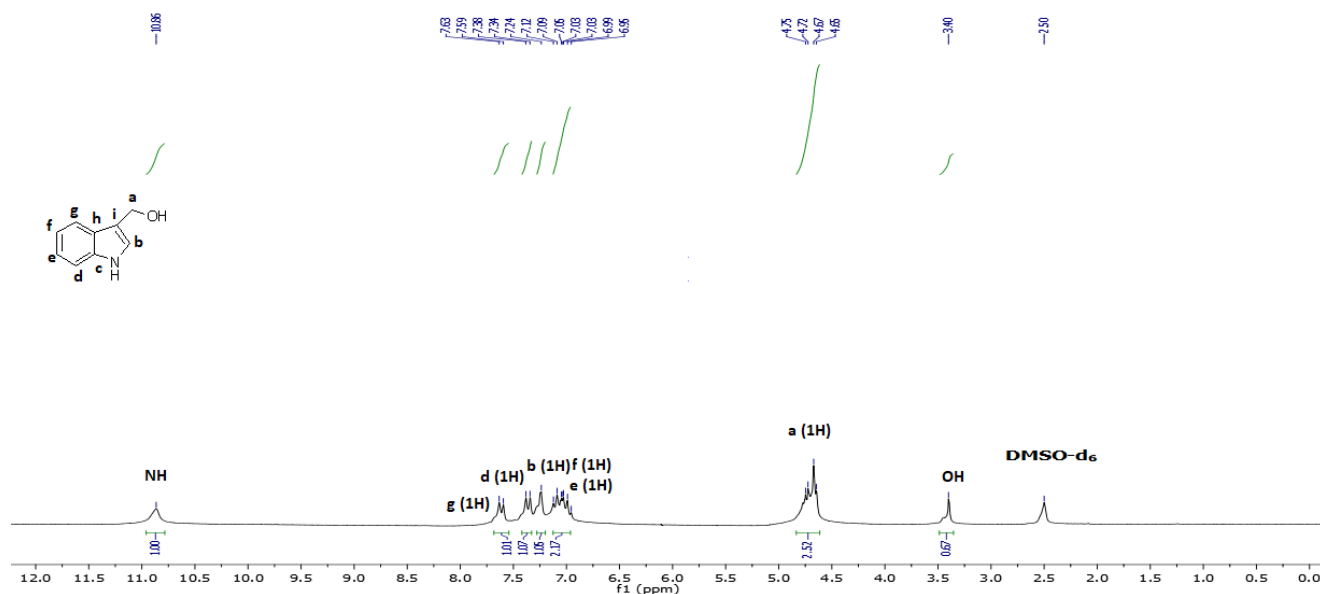
Το σημαντικότερο βήμα στη σύνθεση της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**) ήταν το στάδιο παρασκευής της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**) από το ινδόλιο (**63**), χρησιμοποιώντας μια παραλλαγή της αντίδρασης Vilsmeier-Haack με (COCl_2) (Σχήμα Γ.6). Η αντίδραση του DMF (**66**) με το (COCl_2) δίνει ένα υποκατεστημένο ιόν ιμινίου (**67**) το οποίο καλείται και αντιδραστήριο Vilsmeier. Μετά την προσθήκη του ινδολίου (**65**), σχηματίζεται το ιόν ιμινίου (**68b**), το οποίο υδρολύεται προς σχηματισμό της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης (**33**).



Σύνθεση της ινδολο-3-καρβαλδεΐδης με βάση την αντίδραση Vilsmeier-Haack

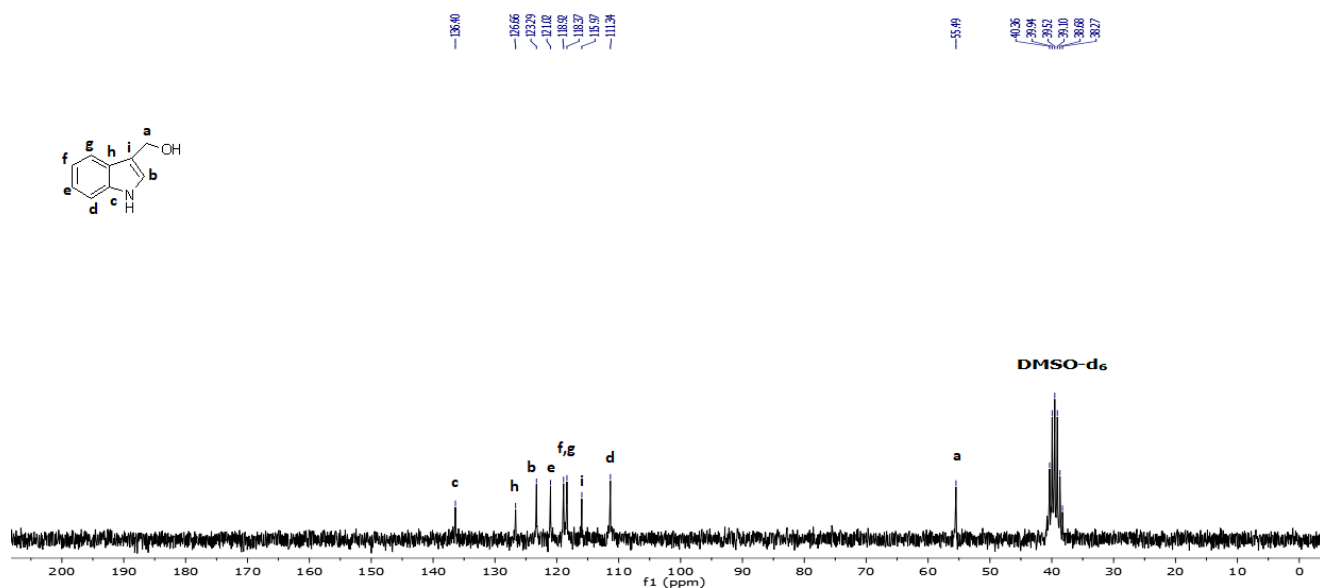
Η ένωση (**34**) ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR καθώς και με HRMS.

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα ^1H NMR της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**) σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6). Η απλή κορυφή στα 3.40 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της υδροξυλομάδας ενώ οι χημικές μετατοπίσεις στα 4.65-4.75 ppm ανήκουν στα πρωτόνια της μεθυλενομάδας **a**. Η ευρεία κορυφή στα 10.86 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της NH ομάδας, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις στα 6.95-7.63 ppm αποδίδονται στα πρωτόνια των **b**, **d**, **e**, **f** και **g**.



Φάσμα ¹H NMR της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**) σε DMSO-d₆

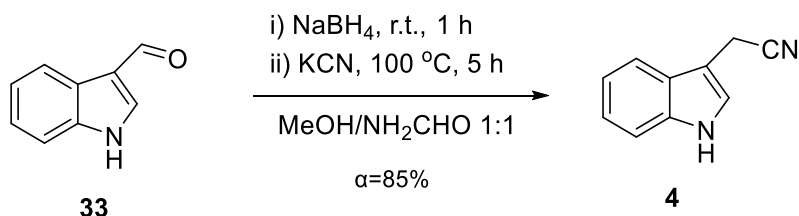
Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα ¹³C NMR της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**) σε DMSO-d₆, με αποσύζευξη πρωτονίου. Η χημική μετατόπιση στα 55.5 ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα **a** που φέρει την υδροξυλομάδα. Οι υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις στα 136.4, 126.7, 123.3, 121.0, 118.9, 116.0 και 111.3 ppm αποδίδονται στους άνθρακες **c**, **i**, **b**, **f**, **g**, **h**, **j** και **d** αντίστοιχα, του αρωματικού συστήματος.



Φάσμα ¹³C NMR της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**) σε DMSO-d₆

Σύνθεση του Ινδολο-3-ακετονιτριλίου

Για τις ανάγκες της μελέτης των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών αλλά και των αυξινών, στα σταυρανθή λαχανικά, προχωρήσαμε στη σύνθεση του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**) η οποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

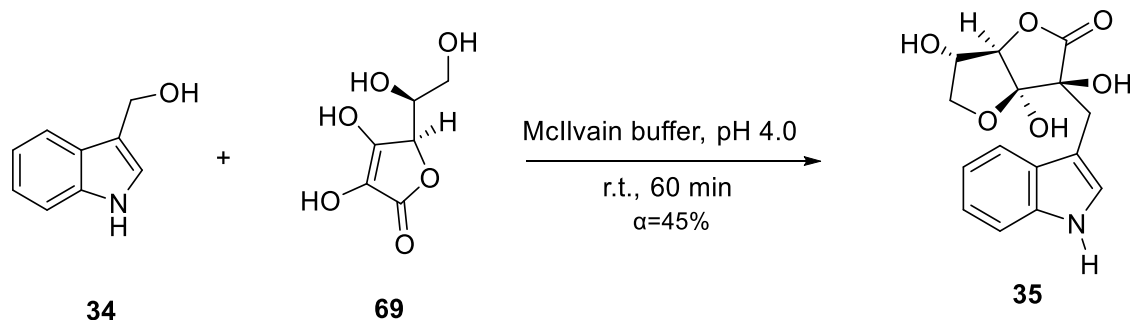


Σύνθεση ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**)

Ξεκινώντας από την καρβαλδεΐδη του ινδολίου (**33**), η οποία είχε συντεθεί προηγουμένως, πραγματοποιήθηκε αναγωγή με βοριοϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4) και πυρηνόφιλη υποκατάσταση με κυανιούχο κάλιο (KCN). Το ινδολο-3-ακετονιτριλίο (**4**) παρασκευάστηκε σε συνολική απόδοση 85%. Η ένωση (**4**) ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR καθώς και με HRMS.

Συνθεση του Ασκορβιγόνου

Η σύνθεση του ασκορβιγόνου (**35**) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μέθοδο της βιβλιογραφίας μετά από αντίδραση της ινδολο-3-καρβινόλης (**34**) με L-ασκορβικό οξύ (**69**), σε ρυθμιστικό διάλυμα McIlvaine pH 4.0. Η απόδοση ήταν 45%.



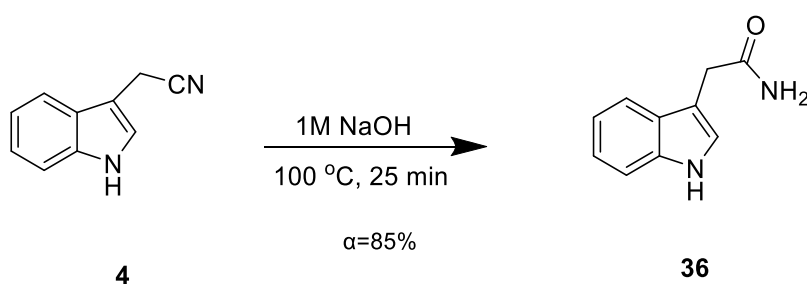
Σύνθεση ασκορβιγόνου (**35**)

Το ασκορβιγόνο (**35**), το ινδολο-3-ακετονιτριλίο (**4**), η ινδολο-3-καρβινόλη (**34**) και η ινδολο-3-καρβαλδεΐδη (**33**), θα μελετηθούν με φασματομετρία HRMS στο κεφάλαιο Δ. Η δομή του ασκορβιγόνου (**35**) έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία με φάσματα ^1H NMR και DEPT ^{13}C NMR. Επομένως, η απόδοση των χημικών

μετατοπίσεων στα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR που λάβαμε βασίστηκε στα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Σύνθεση του Ινδολο-3-ακεταμιδίου

Η σύνθεση του ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**) πραγματοποιήθηκε για τις ανάγκες της μελέτης των αυξινών στα σταυρανθή λαχανικά σύμφωνα με μέθοδο της βιβλιογραφίας. Η αλκαλική υδρόλυση του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (**4**) με θέρμανση υπό αναρροή οδηγεί στο ινδολο-3-ακεταμίδιο (**36**), σε απόδοση 85%.



Σύνθεση ινδολο-3-ακεταμιδίου (**36**)

Η ένωση (**36**) ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR καθώς και με HRMS.