



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ
ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ
ΠΙΕΣΗΣ»

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΤΣΑΓΙΑΝΝΙΔΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ
ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ
ΠΙΕΣΗΣ»**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΤΣΑΓΙΑΝΝΙΔΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Αναπλ.Καθ. Β.Φ.ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Ι. ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΗΣ, Καθηγητής
2. Β. ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ, Αναπλ. Καθηγήτρια
3. Α. ΚΟΒΑΤΣΗ, Επίκ. Καθηγήτρια

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει ως σκοπό την ανάπτυξη μιας μεθόδου για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό 15 φαινολικών αντιοξειδωτικών: φλαβον-3-όλης, (-)-επιγαλλοκατεχίνης, (+)-κατεχίνης, γαλλικού εστέρα (-)-επιγαλλοκατεχίνης, (-)-επικατεχίνης, γαλλικού εστέρα (-)-επικατεχίνης, (-) γαλλοκατεχίνης, ενός φαινολικού οξέος (γαλλικό οξύ), ενός υδροκινναμωμικού οξέος (χλωρογενικό οξύ), φλαβονών (απιγενίνη), φλαβονολών (καμφερόλη, κερκετίνη, και μυρικετίνη), και αλκαλοειδών πουρινών (καφεΐνη, θεοφυλλίνη, θεοβρωμίνη) και την εφαρμογή της σε διαφορετικά εκχυλίσματα βοτάνων, τσάι και ποικιλίες καφέ.

Η εργασία περιλαμβάνει δύο ενότητες, το θεωρητικό μέρος, στο οποίο αναπτύσσονται οι βασικές αρχές της Υγρής Χρωματογραφίας και δίνονται γενικές πληροφορίες για τις ενώσεις που πρόκειται να προσδιοριστούν, και το πειραματικό μέρος, όπου περιγράφονται αναλυτικά, τα στάδια της ανάπτυξης της μεθόδου.

Για την επικύρωση της μεθόδου έγινε έλεγχος της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου, κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας, αλλά και σε διαφορετικές ημέρες, ενώ μελετήθηκε και η σταθερότητα των ενώσεων. Η μέθοδος εφαρμόστηκε τόσο σε έτοιμα δείγματα του εμπορίου, όσο και σε φυσικά εκχυλίσματα βοτάνων που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο.

Η ερευνητική εργασία για την απόκτηση διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Διαπανεπιστημιακού– Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο: «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας». Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Β.Φ. Σαμανίδου για την υπόδειξη του θέματος και τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ σε ερευνητικό επίπεδο με την εφαρμογή της Υγρής χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης, καθώς επίσης και για την ουσιαστική συμβολή και την πολύτιμη καθοδήγησή της, σε όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Ε. Τολίκα, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Ε. Καραγιώργου για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την άψογη συνεργασία τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη που μου έδειξε, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	Error! Bookmark not defined.
1. Εισαγωγή	Error! Bookmark not defined.
1.1. Υπόβαθρο Μελέτης	3
1.2 Πολυφαινόλες	Error! Bookmark not defined.
1.3 Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών	5
1.4 Αλκαλοειδή	Error! Bookmark not defined.
1.5 Βότανα, Τσάι και καφές ως πηγή πολυφαινολών και αλκαλοειδών	6
2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης-HPLC	7
2.1 Ανιχνευτής ορατού- υπεριώδους παράταξης φωτοδιόδων- Diode Array Detector DAD	9
3. Προκατεργασία δείγματος	12
4. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	13
4.1 Τρόποι εκχύλισης πολυφαινολών	13
4.2 Αναλυτικές μέθοδοι για την ανάλυση εκχυλισμάτων πολυφαινολών και αλκαλοειδών από βότανα, τσάι και καφέ	17
4.3 Σχολιασμός βιβλιογραφικής ανασκόπησης	22
5. Σκοπός της εργασίας	24
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
6. Όργανα, συσκευές και αντιδραστήρια	28
6.1 Οργανολογία	28
6.2 Συσκευές	28
6.3 Αντιδραστήρια	29
7. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου	31
7.1 Επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης	31
7.2 Επιλογή αναλυτικής στήλης και εκλουστικού συστήματος	32
7.3 Επιλογή εσωτερικού προτύπου	33

8. επικύρωση της μεθόδου σε πρότυπα διαλύματα.....	36
8.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων	36
8.2 Καμπύλες αναφοράς προτύπων διαλυμάτων.....	36
8.3 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης.....	38
8.4 Ακρίβεια και πιστότητα της μεθόδου	39
8.5 Ακρίβεια, επαναληψιμότητα (intra day repeatability) και πιστότητα σε διαφορετικές μέρες (inter- day precision).....	40
9. Εφαρμογή της μεθόδου στον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε εκχυλίσματα τσαγιού	
45	
9.1 Επιλογή πρωτοκόλλου για την εκχύλιση δειγμάτων από τσάι	45
9.2 Επιλογή πρωτοκόλλου για την υδρόλυση του εκχυλίσματος.....	46
10. Μελέτη σταθερότητας πρότυπων δειγμάτων και φυτικών εκχυλισμάτων	52
11. Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα του εμπορίου	53
11.1 Βότανα ελληνικών βουνών	53
11.2 Πράσινο τσάι.....	57
11.3 Μαύρο τσάι.....	64
11.4 Καφές.....	64
1. 12 Συμπεράσματα	68
13. Περίληψη	69
14 Summary	70
15 Βιβλιογραφία	71

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο Ιπποκράτης και αργότερα ο Θεόφραστος και ο Διοσκουρίδης, εστίασαν και κατέγραψαν με σχολαστική επιμέλεια τη θεραπευτική δράση εκατοντάδων βοτάνων, αιώνες πριν. Η γνώση αυτή μεταδόθηκε από γενιά σε γενιά, εμπλουτισμένη κάθε φορά με καινούργια στοιχεία και παρατηρήσεις. Σήμερα δεκάδες τεκμηριωμένες μελέτες, έρχονται να επιβεβαιώσουν τα οφέλη υγείας πολλών βοτάνων, ενώ το τσάι και ο καφές αποτελούν τα πλέον διαδεδομένα αφεψήματα που καταναλώνονται καθημερινά από εκατομμύρια ανθρώπους σε ολόκληρο τον κόσμο. (Ξένος, 2011)

Τόσο ο καφές, όσο και το τσάι έχουν κοινό συστατικό την καφεΐνη και θεωρούνται αντιοξειδωτικά, τονωτικά και ωφέλιμα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Οι πολυφαινόλες, οι οποίες βρίσκονται σε αυτά τα ροφήματα, μπορούν και προστατεύουν τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες, καθώς και από το οξειδωτικό στρες, στο οποίο υπόκεινται καθημερινά. Ταυτόχρονα η αντιοξειδωτική τους δράση επεκτείνεται στην προστασία από το διαβήτη τύπου 2, την αρθρίτιδα, τα καρδιακά νοσήματα, καθώς και τις διάφορες μορφές καρκίνου. (He, et al. 2010)

Μελέτες έχουν δείξει πως η καφεΐνη που περιέχεται στο τσάι και τον καφέ μπορεί να καταπολεμήσει την κούραση και να αυξήσει την πνευματική συγκέντρωση, διεγείροντας τον εγκέφαλο και αυξάνοντας τα επίπεδα της ενδογενούς ντοπαμίνης. Σε φυσιολογικά και επιτρεπτά όρια, ο καφές έχει την ικανότητα να επιδράσει θετικά στο νευρικό σύστημα βελτιώνοντας τις πνευματικές ικανότητες. (He, et al. 2010)

Λαμβάνοντας υπόψη την ευεργετική δράση των πολυφαινολών, αλλά και των αλκαλοειδών (πουρίνες) για τον ανθρώπινο οργανισμό, μία μέθοδος για τον προσδιορισμό τους (ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση) σε εκχυλίσματα ελληνικών βοτάνων, τσάι και καφέ έχει μεγάλη σημασία, τόσο για τη διασφάλιση της ανθρώπινης υγείας, όσο και για την προώθηση εγχώριων προϊόντων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο

προσδιορισμός πολυφαινολών και αλκαλοειδών σε εκχυλίσματα ελληνικών βοτάνων διαφορετικού γένους (*Sideritis Raiserii*, *Sideritis Scardiga*, *Origanum Vulgare*), καφέ εμπορίου (ελληνικό, φίλτρου, NesCafe) και τσάι εμπορίου (μαύρο, πράσινο).

1.1. Υπόβαθρο μελέτης

Πριν την παροχή περισσοτέρων λεπτομερειών σχετικές με τη συγκεκριμένη μελέτη, είναι σημαντικό να αναφερθούν οι χημικές ιδιότητες και η δράση των πολυφαινολών και αλκαλοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς επίσης και η σχέση μεταξύ των ενώσεων αυτών και των βοτάνων, τσαγιού και καφέ. Επιπροσθέτως παρέχονται πληροφορίες σχετικές με το είδος των δειγμάτων που αναλύθηκαν, καθώς επίσης και το όργανο, με το οποίο μελετήθηκε ο διαχωρισμός και προσδιορισμός των ενώσεων.

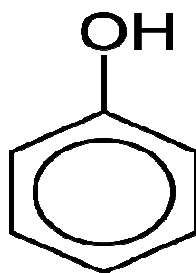
1.2 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι αντιοξειδωτικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά και τα προστατεύουν από το στρες, την υπερϊώδη ακτινοβολία και τις μολύνσεις. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για μόρια με παρόμοιες χημικές δομές που ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των φυτοχημικών ενώσεων, ενώσεων που βρίσκονται στα φυτικά τρόφιμα και περιέχουν στο μόριό τους τη χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης (*Σχήμα 1.1*). Οι φαινολικές ενώσεις είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και βρίσκονται σε αυτά ελεύθερα ή ενωμένα με μόρια γλυκόζης ή άλλα σάκχαρα. (Rijke, et al., 2006)

Η ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων γίνεται με βάση τον αριθμό και τη διάταξη των ατόμων άνθρακα που ενώνονται με το δακτύλιο της φαινόλης και συνήθως απαντώνται υπό συζευγμένη μορφή με σάκχαρα και οργανικά οξέα. Έτσι προκύπτουν δύο μεγάλες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων στα φυτά: τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. (Rijke, et al., 2006)

- Φλαβονοειδή: Βασικός τύπος C6-C3-C6, με κύριους εκπροσώπους τις ανθοκυανίνες και τις ταννίνες.
- Μη φλαβονοειδή: Περιλαμβάνει τα φαινολικά οξέα, υδροξυκινναμωμικά οξέα

και στιλβένια.



Σχήμα 1.1 - Χημική δομή φαινόλης

Σημαντική ομάδα των φλαβονοειδών, είναι οι φλαβονόλες, στις οποίες ανήκουν και οι κατεχίνες. Οι κατεχίνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τις ελεύθερες και τις εστεροποιημένες. Στις ελεύθερες κατεχίνες ανήκουν η γαλλοκατεχίνη, η επικατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη, ενώ στις εστεροποιημένες, οι γαλλικοί εστέρες της επιγαλλοκατεχίνης, της επικατεχίνης, της γαλλοκατεχίνης και της κατεχίνης. Σε αντίθεση με την εστεροποιημένη κατεχίνη, η ελεύθερη κατεχίνη είναι λιγότερο στυφή και έχει μια ήπια γλυκιά γεύση. (Vuong, 2010)

Τα φλαβονοειδή που περιέχουν μια ή περισσότερες ομάδες σακχάρων, αναφέρονται ως γλυκοσίτες (ή γλυκοζίτες στην περίπτωση που η ομάδα αυτή είναι της γλυκόζης). Όταν η ομάδα αυτή του σακχάρου είναι απύσα, τότε απαντούν με τη μορφή του αγλύκου. Ένα ιδιαίτερα σημαντικό θέμα στον προσδιορισμό των φλαβονοειδών σχετίζεται με το αν αυτοί είναι στη συζευγμένη τους μορφή ή στη μορφή του αγλύκου. Το στάδιο της υδρόλυσης θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό και έχει χρησιμοποιηθεί ως μέσο για την εύρεση της χημικής δομής και το χαρακτηρισμό των γλυκοσιτών και της άγλυκης μορφής των φλαβονοειδών, αλλά και για την απλοποίηση των χρωματογραφικών αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που οι πρότυπες ενώσεις δεν είναι διαθέσιμες στο εμπόριο. Η υδρόλυση μπορεί να είναι ενζυμική, όξινη ή αλκαλική. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως κάτω από τις συνθήκες υδρόλυσης μπορούν να συμβούν αλλαγές και αλλοιώσεις, όπως αλλαγές στους γλυκοσιτικούς δεσμούς και έτσι να παράγονται ισομερή με τις προς προσδιορισμό ενώσεις. Το πλεονέκτημα της υδρόλυσης έγκειται κυρίως στην απλοποίηση των αποτελεσμάτων της χρωματογραφίας, αφού η υδρόλυση απλοποιεί

σημαντικά το φαινολικό προφίλ των δειγμάτων. Η όξινη υδρόλυση είναι αυτή που εφαρμόζεται κυρίως σε φλαβονοειδή που απαντούν με τη μορφή του αγλύκου. (Tura & Robards, 2002)

Στην περίπτωση που ενδιαφέρει ο προσδιορισμός της άγλυκης μορφής των φλαβονοειδών, τότε η χημική υδρόλυση είναι απαραίτητη πριν την ανάλυση των δειγμάτων. Η υδρόλυση μπορεί να εφαρμοστεί με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος ή μυρμηκικού οξέος σε υψηλές θερμοκρασίες (80- 100 °C), ή με επαναρροή με ένα οξύ υπό την παρουσία αιθανόλης, ενώ ενζυμική υδρόλυση έχει πραγματοποιηθεί με β-γλουκουρονιδάση ή β-γλυκοσιδάση. Στα τρόφιμα οι περισσότερες πολυφαινόλες απαντούν με τη μορφή γλυκοσιτών, εκτός από τις φλαβον-3-όλες, οι οποίες είναι παρούσες με την ελεύθερη μορφή τους ή ως γαλλικοί εστέρες. Όσον αφορά στη σταθερότητα των ενώσεων κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης, οι κατεχίνες είναι ιδιαίτερα σταθερές σε όξινο περιβάλλον, (pH<4). (Rijke,et al., 2006)

1.3 Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων αποδίδεται στην ικανότητά τους να συμπλοκοποιούν τα ελεύθερα μέταλλα, ώστε αυτά να μη συμμετέχουν ως υπόστρωμα υπεροξειδασών, ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις εξουδετέρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και στη δράση τους ως δεσμευτές των ιόντων οξυγόνου υψηλής δραστηριότητας (ROS) και των ελεύθερων ριζών. (Boskou, 2006)

Η ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες αναφέρεται ως ο κυριότερος τρόπος δράσης τους, ενώ η ικανότητα αυτή εξαρτάται από την ευκολία απόδοσης ατόμου υδρογόνου ή μονήρους ηλεκτρονίου στις ελεύθερες ρίζες και από τη σταθερότητα της παραγόμενης ρίζας.

Όσον αφορά στη συσχέτιση της δομής τους με την αντιοξειδωτική τους δράση, οι έρευνες κατέληξαν σε ορισμένα κριτήρια που πρέπει να πληροί ένα φλαβονοειδές, ώστε να είναι αποτελεσματικός εκκαθαριστής ελεύθερων ριζών, με σημαντικότερο τον αριθμό και την διάταξη των ομάδων υδροξυλίου.

Στην αντιοξειδωτική ικανότητα συνεισφέρουν, τόσο οι φλαβονοειδείς, όσο και οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις με τα διμερή προκυανιδινών να έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική

ικανότητα και να ακολουθούν κατά φθίνουσα σειρά οι φλαβανόλες, φλαβονόλες, τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και τα απλά φαινολικά οξέα. (Atoui, et al., 2005)

1.4 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή αποτελούν ιδιαίτερη κατηγορία οργανικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων. Τα αλκαλοειδή ταξινομούνται με βάση το συντακτικό τους τύπο και με βάση τη φύση και τον αριθμό των πυρήνων τους, καθώς και με τους υποκαταστάτες που συνδέουν αυτούς σε πυριδίνες, πυρρολιδίνες, τροπάνια, πουρίνες κ.α.

Όπως και στις πολυφαινόλες υπάρχουν ενώσεις που ανήκουν στα αλκαλοειδή και διαθέτουν αντιοξειδωτικές και διεγερτικές ιδιότητες, όπως η καφεΐνη η θεοβρωμίνη και η θεοφυλλίνη.

1.5 Βότανα, Τσάι και καφές ως πηγή πολυφαινολών και αλκαλοειδών

Πολλές μελέτες μέχρι σήμερα έχουν επιβεβαιώσει τη σχέση που υπάρχει μεταξύ της κατανάλωσης καφέ ή/και τσαγιού και της δυνατότητας που έχουν τα ροφήματα αυτά να δρουν ευεργετικά για τον ανθρώπινο οργανισμό, με την πρόληψη κυρίως σημαντικών ασθενειών, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες. Οι παραπάνω ιδιότητες των συγκεκριμένων αφεψημάτων, καθώς και το ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη χρήση φυσικών προϊόντων, ιδιαίτερα στον τομέα των φαρμάκων, οδήγησαν το ενδιαφέρον στο φυτό *Sideritis* (τσάι του βουνού), το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως ως αρωματικό και θερμαντικό ρόφημα, λόγω της αντιφλεγμονώδους ιδιότητας και αντιοξειδωτικής ικανότητάς του, η οποία θεωρείται πως οφείλεται στην επίσης υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει περισσότερα από 140 είδη και υποείδη, ενώ η Ελλάδα είναι πλούσια σε ενδημικά είδη του φυτού και μάλιστα ποικίλλοντα κατά διαμερίσματα από τη Μακεδονία μέχρι την Κρήτη, σε υψόμετρο που κυμαίνεται από 500-2000 μέτρα. (Konstadinova, et al., 2010) (Γαβριέλη)

Στην περίπτωση των αλκαλοειδών είναι απαραίτητο να αναφερθεί πως, τόσο ο καφές, όσο και το τσάι, είναι πλούσια σε ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία με πιο διαδεδομένη την καφεΐνη και έπειτα τη θεοβρωμίνη και τη θεοφυλλίνη.

Τα флаβονοειδή και κυρίως οι флаβονόλες (π.χ. κατεχίνη) και τα φαινολικά οξέα είναι οι κύριες πολυφαινόλες που βρίσκονται στον καφέ και στο τσάι. Παράλληλα, το τσάι είναι σημαντική πηγή γαλλικού οξέος, ενώ το καφεϊκό οξύ και το παράγωγό του, χλωρογενικό οξύ αποτελούν τις βασικές πολυφαινόλες του καφέ. Οι флаβονόλες συμβάλλουν στην πικρή και στυφή γεύση του πράσινου τσαγιού. Η σειρά με την οποία οι κατεχίνες απαντούν στο τσάι ποσοτικά είναι ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης, η επιγαλλοκατεχίνη, η γαλλικού εστέρα επικατεχίνης και η επικατεχίνη. (Hu, et al., 2009)

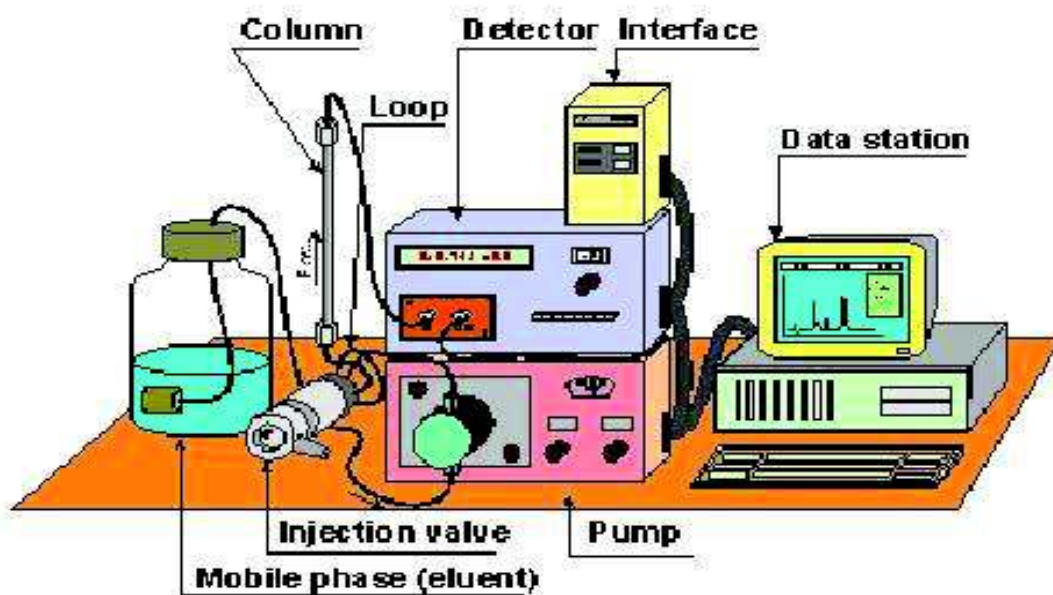
2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ-HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, με ετήσιες πωλήσεις σε όργανα που φτάνουν τα δισεκατομμύρια ευρώ. Η τεχνική αυτή έχει γίνει πλήρως αποδεκτή εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας της, καθώς και την εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς. Είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και εφαρμόζεται ευρέως για τον προσδιορισμό ενώσεων πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, τα αναλυτικά εργαστήρια και πολλά επιστημονικά πεδία.

Συγκριτικά με την κλασική χρωματογραφία, η HPLC διαφέρει, καθώς χρησιμοποιεί μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης της στήλης και μεγάλη πίεση. Ο διαχωρισμός των ενώσεων με την HPLC, όπως και με τις περισσότερες χρωματογραφικές τεχνικές, επιτυγχάνεται εξαιτίας της διαφορετικής κατανομής τους μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Είναι απαραίτητο να αναφερθεί πως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης υπερέχει σε σχέση με τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνικές, εξαιτίας της ακρίβειας και της επαναληψιμότητάς της, ενώ δεν υπολείπεται ως τεχνική στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό, με ιδιαίτερα χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Η βασική διάταξη ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (Σχήμα 2.1) περιλαμβάνει τα τμήματα:

- Φιάλη(ες) αποθήκευσης διαλυτών
- Αντλία (σταθερής ροής ή πίεσης)
- Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα, αυτόματος δειγματολήπτης)
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτής
- Σύστημα καταγραφής αποτελεσμάτων (χρήση κατάλληλου λογισμικού)



Σχήμα 2.1 . Τοπική Διάταξη HPLC

Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη (στατική φάση) με τη βοήθεια ειδικής βαλβίδας. Μέσω της κινητής φάσης, η οποία είναι συνήθως μίγμα διαφόρων αναλογιών κατ' όγκον ενός ή περισσοτέρων οργανικών διαλυτών και νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος στην κατάλληλη τιμή pH, μεταφέρονται στη στήλη, όπου και διαχωρίζονται ανάλογα με το βαθμό αντίδρασής τους με τη στατική φάση.

Στη χρωματογραφία προσρόφησης ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση, ενώ βρίσκει εφαρμογή στο

διαχωρισμό ενώσεων παρόμοιας δομής και διαφορετικής πολικότητας. Διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης:

- Χρωματογραφία κανονικής φάσης, η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή (στήλη SiO_2 ή Al_2O_3)
- Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή (στήλη από διοξείδιο του πυριτίου συζευγμένα με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια κτλ.)

Σχετικά με την κινητή φάση είναι απαραίτητο να αναφερθεί πως οι διαλύτες που επιλέγονται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, χαμηλής τοξικότητας, δραστικοί σε χαμηλές συγκεντρώσεις, να μην είναι πτητικοί, να έχουν χαμηλή πίεση επαναφοράς και μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού.

Η επιλογή της κινητής φάσης είναι πολύ σημαντική κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου. Η εύρεση της καταλληλότερης κινητής φάσης εξαρτάται από ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες των διαλυτών και έχει κριτήριο τον επιτυχή διαχωρισμό των ενώσεων ενός δείγματος. Οι ιδιότητες αυτές είναι οι εξής:

- Πολικότητα, όσο πιο πολικός είναι ο διαλύτης, τόσο πιο γρήγορα εκκλούνται οι πολικές ενώσεις
- Ελουοτροπική ισχύς, καθορίζεται από τη στατική φάση, η οποία χρησιμοποιείται
- Βασικότητα, δυνατότητα διπολικών αλληλεπιδράσεων, που υπεισέρχονται στην εκλεκτικότητα του κάθε διαλύτη
- Τοξικότητα, τοξικοί διαλύτες αποφεύγονται
- Συμβατότητα με τον ανιχνευτή, π.χ. για τον UV- Vis πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα κατώτερα όρια απορρόφησης των διαφόρων διαλυτών στο υπεριώδες.
- Κόστος και pH

Η έκλυση των προσδιοριζόμενων συστατικών μπορεί να είναι ισοκρατική ή βαθμωτή.

- Ισοκρατική έκλυση: Η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή σε όλη την διάρκεια της ανάλυσης

- Βαθμωτή έκλυση: μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης με το χρόνο για το διαχωρισμό μιγμάτων ενώσεων με παρόμοια δομή και ιδιότητα.

(Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001)

2.1 Ανιχνευτής ορατού υπεριώδους παράταξης φωτοδιόδων- Diode Array Detector DAD

Ο ανιχνευτής στην HPLC θεωρείται ένα σημαντικό και ιδιαίτερα κρίσιμο στοιχείο του συστήματος, αφού κάνει ορατό το διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη και επιτρέπει την αξιοποίησή του στην ανάλυση.

Τα ιδανικά χαρακτηριστικά ενός ανιχνευτή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης είναι τα παρακάτω:

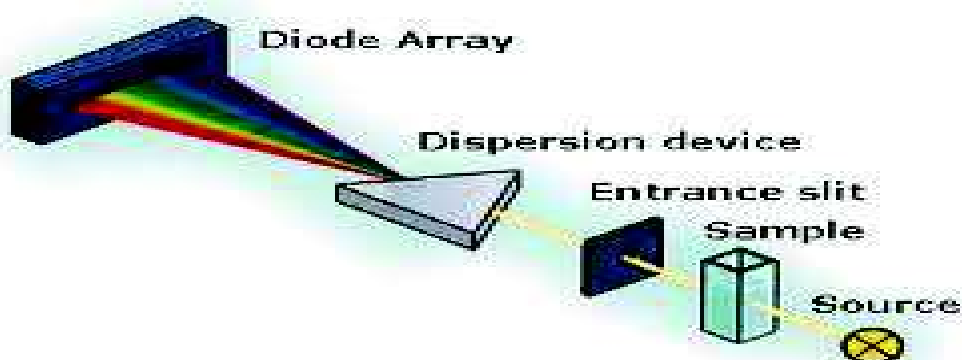
- Να ανταποκρίνεται στα υπό εξέταση συστατικά του μίγματος
- Να επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης της τάξης των ng-μg
- Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση
- Να μην επηρεάζεται από μεταβολές της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης
- Να παρέχει γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων των διαχωριζόμενων συστατικών, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ποσοτική ανάλυση.

Τα είδη των ανιχνευτών στην HPLC μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες:

1. Σε αυτούς που ανταποκρίνονται στις φυσικές και χημικές ιδιότητες των συστατικών του μίγματος (ανιχνευτής υπεριώδους- ορατού και ανιχνευτές φθορισμού)

2. Σε αυτούς που ανταποκρίνονται σε αλλαγές των ιδιοτήτων που υφίσταται η κινητή φάση (διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης)

Ο ανιχνευτής που έχει επικρατήσει σήμερα είναι κυρίως ο φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και αυτός με σύστημα παράταξης φωτοδιόδων (photodiode array detector, PDAD). Με το παραπάνω σύστημα παράταξης επιτρέπεται η ταυτόχρονη συλλογή και ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών σε πολλά μήκη κύματος, χαρακτηριστικό σημαντικό, αφού τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν μέγιστα απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος.



Σχήμα 2.2 . Ανιχνευτής DAD

Η ουσιαστική διαφορά με τον κλασικό ανιχνευτή UV-Vis είναι η παρουσία του ολογραφικού φράγματος στη θέση του μονοχρωμάτορα. Το προς ανάλυση δείγμα δέχεται την ακτινοβολία ολόκληρου του φάσματος και η ακτινοβολία που εξέρχεται, αφού αναλυθεί στο ολογραφικό φράγμα προσπίπτει σε παράταξη φωτοδιόδων. Κάθε δίοδος δέχεται ακτινοβολία ενός και μόνο μήκους κύματος και το σήμα, αφού ενισχυθεί μετατρέπεται σε ψηφιακό και αποθηκεύεται στον υπολογιστή.

Η ευαισθησία αυτού του ανιχνευτή εξαρτάται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης των διαφόρων συστατικών, ενώ δεν επηρεάζεται από τις μεταβολές της θερμοκρασίας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συγκεντρώσεις της τάξης του 0.01 $\mu\text{g/mL}$.

3. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η διαδικασία προκατεργασίας δείγματος αποτελεί μια κρίσιμη διαδικασία κατά τον προσδιορισμό και διαχωρισμό ενώσεων και για το λόγο αυτόν πρέπει να είναι μια ακριβής και επαναλήψιμη διαδικασία. Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληροί μια τέτοια αναλυτική διαδικασία είναι ο χρόνος, το κόστος, η εκλεκτικότητα, η αποτελεσματικότητα, καθώς επίσης και ο βαθμός δυσκολίας και η δυνατότητα αυτοματοποίησής της.

Για το σχεδιασμό της καταλληλότερης μεθόδου προκατεργασίας ενός δείγματος θεωρείται απαραίτητο να ληφθούν υπόψη, τόσο οι φυσικοχημικές ιδιότητες του, όσο και η χημική σύστασή του. Άλλες παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη πριν το σχεδιασμό της μεθόδου προκατεργασίας περιλαμβάνουν τη σταθερότητα του δείγματος, την ανάκτηση της εξεταζόμενης ένωσης με το πέρας της προκατεργασίας, καθώς επίσης και οι τυχόν παρεμποδίσεις που μπορεί να οφείλονται στο είδος του υποστρώματος.

Η διαδικασία της προκατεργασίας του δείγματος μπορεί να είναι ιδιαίτερα απλή και να πραγματοποιείται με την προσθήκη ενός μόνο διαλύτη εκχύλισης στο δείγμα. Παρόλα ταύτα οι περισσότερες τεχνικές εφαρμόζουν τη φυσική κατανομή, η οποία κατανέμεται σε υγρό- αέριο, υγρό- υγρό, υγρό- στερεό, στερεό- στερεό κατά ένα σταθερό λόγο και έτσι αν η σταθερά της ισορροπίας ενός συστατικού διαφέρει από αυτή ενός άλλου ανεπιθύμητου, τότε το προσδιοριζόμενο συστατικό μπορεί να απομονωθεί. (Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2004)

Πριν την ανάλυση και τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών από διαφορετικά δείγματα βοτάνων, τσαγιού και καφέ, είναι απαραίτητη η εκχύλιση των δειγμάτων. Σε μια τυπική εκχύλιση, οι διαλύτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται είναι κυρίως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη (υπερκάθαρα ή σε συνδυασμό με νερό ή οξικό αιθυλεστέρα). Οι συνθήκες για τη βέλτιστη εκχύλιση εξαρτώνται απόλυτα από την προς προσδιορισμό ένωση, αλλά και από το είδος του δείγματος το οποίο μελετάται. Τυπικά η εκχύλιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 80- 100 °C ή με την παραμονή της ένωσης στο

διαλύτη εκχύλισης για αρκετές ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. (Engelhardt, et al., 2010) (Biesaga, 2011) (Vuong, et al., 2011)

Στην περίπτωση των πολυφαινολών θα πρέπει να αποφευχθούν οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, καθώς και η μακρόχρονη παραμονή του δείγματος στο διαλύτη εκχύλισης. (Vuong, et. al, 2011)

Τα φαινολικά οξέα εμφανίζονται στη φύση ως εστέρες και πιο σπάνια ως γλυκοζίτες ή σε ελεύθερη μορφή. Τα φλαβονοειδή επίσης, όπως και έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν στα φυτά δεσμευμένα με σάκχαρα ως γλυκοζίτες. Γι' αυτόν το λόγο χρησιμοποιείται η όξινη υδρόλυση με HCl για να απελευθερωθούν οι αγλυκόνες από τα σάκχαρα και να ανιχνευθούν στη συνέχεια με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα σχετικά με το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιοξειδωτικών ενώσεων από διάφορα βότανα, τσάι και διάφορα είδη καφέ. Διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης και προκατεργασίας δείγματος έχουν εξεταστεί και οι σημαντικότερες από αυτές θα παρουσιαστούν στη συνέχεια. Θεωρείται σημαντικό να αναφερθεί πως από τις εργασίες αυτές σημαντικά και ενδιαφέροντα στοιχεία μελετήθηκαν, αξιολογήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ενώ πολλά απορρίφθηκαν για λόγους, όπως κόστος, χρόνος και πολυπλοκότητα στην ανάλυση.

4.1 Τρόποι εκχύλισης πολυφαινολών

Ξεκινώντας με την απομόνωση των πολυφαινολών και αλκαλοειδών από τα προς ανάλυση δείγματα, πολλές μελέτες έχουν γίνει για την ανάδειξη της περισσότερο αποτελεσματικής και ακριβέστερης μεθόδου.

Σε μια μελέτη των Naczk και Shahidi το 2006, γίνεται αναφορά σε διάφορες μεθόδους εκχύλισης των φαινολικών συστατικών από φρούτα, λαχανικά και δημητριακά. Επισημαίνεται πόσο σημαντικός παράγοντας είναι η διαλυτότητα των φαινολών, αφού αυτές πολλές φορές αντιδρούν με άλλα συστατικά των φυτών, όπως υδρογονάνθρακες και πρωτεΐνες, και δημιουργούν αδιάλυτα σύμπλοκα. Διαλύτες όπως η μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη ακετόνη και οι συνδυασμοί τους έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές φορές για την εκχύλιση των φαινολών, συχνά σε διαφορετικές αναλογίες με νερό. Ακολουθείται αλκαλική υδρόλυση, καθώς και μια σειρά ενζυματικών διεργασιών για την αποτελεσματική απελευθέρωση των δεσμευμένων φαινολών. Η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών μετά την εκχύλιση επηρεάζεται από τον χρόνο εκχύλισης και άλλους σχετικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία. Ο χρόνος εκχύλισης μπορεί να ποικίλει από 1 λεπτό έως 24 ώρες. Μεγάλης διάρκειας εκχυλίσεις αυξάνουν τις πιθανότητες οξείδωσης των φαινολικών συστατικών. Στη συγκεκριμένη εργασία αναφέρεται επίσης πως η εκχύλιση των πολυφαινολών μπορεί να επηρεαστεί από την αναλογία διαλύτη- δείγματος. Στην περίπτωση των ανθοκυανίνων, αυτές όπως αναφέρεται απομονώνονται από τα φυτά με τη χρήση όξινου οργανικού διαλύτη, κυρίως μεθανόλης. (Naczk & Shahidi, 2006)

Σε άρθρο των Moraes de Souza το 2008, σχετικά με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα και την σύσταση σε φαινόλες των φυτικών εκχυλισμάτων που καταναλώνονται στη Βραζιλία αναφέρεται λεπτομερώς η διαδικασία της υδρόλυσης πριν τον προσδιορισμό των υπό μελέτη ενώσεων. Πριν τον προσδιορισμό του χημικού προφίλ των δειγμάτων με τη χρήση της HPLC, οι γλυκοσίτες των φλαβονοειδών, μετατρέπονται στη μορφή του αγλύκου μέσω της υδρόλυσης. Καθορισμένη ποσότητα εκχυλίσματος (20 mL) προσυγκεντρώνεται με τη χρήση περιστροφικής εξάτμισης υπό πίεση και προστίθεται 1 mL νερού και 1 mL μεθανόλης. Ένα mL της ποσότητας του παρασκευασμένου διαλύματος μεταφέρεται σε φιαλίδιο, όπου και προστίθεται 0.25 mL HCL 6M. Τα φιαλίδια θερμαίνονται στους 90 °C για 30 λεπτά και έπειτα ψύχονται σε πάγο. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου με τα υδρολυόμενα φλαβονοειδή αραιώνεται έως τα 10 mL με απιονισμένο νερό και εφαρμόζονται δύο εκχυλίσεις με 40 mL και 30 mL οξικού αιθυλεστέρα. Τα εκχυλίσματα αναμιγνύονται μεταξύ τους και ξηραίνονται με άνυδρο Na_2SO_4 και προσυγκεντρώνονται υπο πίεση με περιστρεφόμενη εξάτμιση. Ακολουθεί επαναδιάλυση με 600 μL μεθανόλης και εισαγωγή στην HPLC. (Souza, et al., 2008)

Οι Rijke et al. σε άρθρο τους το 2006 αναφέρουν, σε βιβλιογραφική μελέτη, τις περισσότερες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού και ανίχνευσης των φλαβονοειδών. Στη συγκεκριμένη εργασία η τεχνική της εκχύλισης υγρού- στερεού θεωρείται ως η πιο διαδεδομένη για τις συγκεκριμένες ενώσεις και με ευρεία εφαρμογή, όσον αφορά στο είδος του δείγματος (σε στερεό πρώτα γίνεται ομογενοποίηση). Η εκχύλιση Soxhlet αναφέρεται πως χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά για την απομόνωση φλαβονοειδών από στερεά δείγματα, ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο. Τα υγρά δείγματα αρχικά διηθούνται και/ ή φυγοκεντρούνται, ενώ ακολουθεί η άμεση εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα διαχωρισμού ή έπεται της εκχύλισης υγρού- υγρού (LLE) ή στερεού- υγρού (SPE). Στην περίπτωση εκχύλισης LLE, ο διαλύτης εκχύλισης είναι συνήθως οξικός αιθυλεστέρας ή διαιθυλ-αιθέρας με μικρή ποσότητα οξέος. Για την υδρόλυση (όπου αυτή απαιτείται, αγλυκόνες) χρησιμοποιείται υδροχλωρικό οξύ ή μυρμηκικό οξύ σε υψηλές θερμοκρασίες (80-100°C). Υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπου η υδρόλυση δεν πρέπει να πραγματοποιείται σε τόσο έντονες συνθήκες. Στον Πίνακα 4.1 παρατίθενται παραδείγματα δειγμάτων και αντίστοιχων μεθόδων εκχύλισης. (Rijke, et al., 2006)

Πίνακας 4.1 . Διαδικασίες εκχυλίσεων για φλαβονοειδή

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΕΣ	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ
<p>Soxhlet</p> <p>Various flavonoids</p> <p>Daidzein, genistein</p> <p>Flavonoid/glycosides</p>	<p>MeOH</p> <p>MeOH-H₂O (9:1)</p> <p>EtOH-H₂O</p>	<p><i>M. spicata,</i> <i>T. europea,</i> <i>U dioica, H. prforatum</i> <i>Soybean milk,</i> <i>farina meat</i> <i>Ginkgo biloba leaves</i></p>	<p>Εκχύλιση για 12ώρες με μεθανόλη και έπειτα συμπύκνωση με εξάτμιση υπό κενό. Αραιώση σε διάλυμα φωσφορώδους οξέος / μεθανόλης 80:20 (v/v) και θέρμανση για μία ώρα στους 130°C</p>	<p>GC/MS</p> <p>LC- ED</p> <p>LC- UV</p>
<p>LLE</p> <p>(-)Epicatechin gallate, epigallocatechin gallate</p> <p>Epicatechin</p> <p>Suretallerin</p> <p>Quercitin</p>	<p>EtOH-H₂O (1:1)</p> <p>Et₂O 1M HCl (pH2)</p> <p>Et₂O, 3% 1M Phosphori</p>	<p><i>Green Tea</i></p> <p><i>Olive Oil</i></p> <p><i>Rat plasma</i></p>	<p>Το σύστημα EtAc-H₂O για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ως μίγμα.</p>	<p>HSCC</p> <p>LC- UV & FLU</p> <p>LC-UV</p>

	c acid Et ₂ O 1M HCl (pH2)	<i>Red wine</i>	Διάλυση του εκχυλίσματος σε σύστημα MeOH:H ₂ O (1:1) για αποτελεσματικό διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ενώσεων.	LC- UV
SE Epicatechin, Catechin, rutin, apigenin, luteolin, quercetin	MeOH	<i>Ginkgo biloba leaves</i>	Τοποθέτηση αποξηραμένων φύλλων σε υπερήχους με 5 mL MeOH για 30 λεπτά	CE- ED
Isoflavone and flavonol- glycoside- (di)malonates	MeOH- H ₂ O (1:1)	<i>T. pratense, T. dubium, T. repens, L. corniculates leaves</i>	Αποξηραμένα φύλλα εδάφους με MeOH: H ₂ O διηθείται και εκχυλίζεται μία ακόμη φορά	LC-UV-MS & FLU
Daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein	MeCN- H ₂ O (1:1)	<i>Soy food</i>	Η υδρόλυση δεν κατάφερε να διαχωρίσει τα μαλονικά και οξικά άλατα.	LC- MS
Catechin, epicatechin,	Me ₂ O: H ₂ O (7:3)	<i>Apple</i>		LC-UV-MS

procyanidin, flavonols, anthocyanins, dihydrochalcones				
---	--	--	--	--

Στην περίπτωση εκχύλισης στερεού- υγρού για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών ανφέρεται στο ίδιο άρθρο πως το υλικό πλήρωσης, το οποίο κυρίως χρησιμοποιείται είναι αυτό με ομάδες C18 δεσμευμένες στην πηκτική διοξειδίου του πυριτίου, ενώ τόσο το δείγμα, όσο και οι διαλύτες έχουν υποστεί οξίνιση για πρόληψη του ιονισμού των φλαβονοειδών. Για την εκχύλιση φλαβονοειδών από διάφορα άλλα είδη δειγμάτων πραγματοποιήθηκε διπλή εκχύλιση στερεού- υγρού, το μεθανολικό εκχύλισμα υπέστη εκχύλιση στερεού υγρού, ενώ οι επιθυμητές ενώσεις συλλέγονται και μεταφέρονται σε δεύτερη στήλη SPE για να περάσουν από την ίδια διαδικασία.

Ως σχετικά νέα μέθοδος εκχύλισης στερεού- υγρού των φλαβονοειδών είναι αυτή που χρησιμοποιεί ως προσροφητές, πολυμερή μοριακά αποτυπώματα (SPE-MIPS), τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα και θερμική και μηχανική σταθερότητα. Σε αντίθεση με την SPE- MIP, η μικροεκχύλιση στερεού- υγρού (SPME) έδωσε προϊόντα με υψηλότερη ανάκτηση. (Rijke, et al., 2006)

Οι Qiang He et al. το 2010, παρουσίασαν σε ερευνητική τους μελέτη, την ανάπτυξη μεθόδου για τον άμεσο προσδιορισμό της καφεΐνης και κατεχίνης από εκχυλίσματα τσαγιού με την HPLC. Στην συγκεκριμένη εργασία 10 mg εκχυλίσματος τσαγιού και 7.5 mg δείγματος κατεχίνης διαλυτοποιήθηκαν σε 10 mL μίγματος αιθανόλης:νερού 1:1 (v/v) με τη βοήθεια της χρήσης υπερήχων. Όσον αφορά στην καφεΐνη, η διαλυτοποίησή της πραγματοποιήθηκε σε μίγμα ακετόνης:νερού 1:1 (v/v). Πριν την ανάλυση των δειγμάτων με την HPLC, ήταν απαραίτητη η διήθηση των δειγμάτων μέσω μεμβράνης των 0.45 μm. (He, et al., 2010)

Στην εργασία των Rostagno et al. το 2011, η διαδικασία εκχύλισης των στερεών δειγμάτων ήταν παρόμοια με την προαναφερθείσα, με μόνη διαφορά την εκχύλιση σε υψηλότερη θερμοκρασία και για μεγαλύτερη διάρκεια. Τα υγρά δείγματα του εμπορίου

που εξετάστηκαν για πολυφαινόλες απαερώθηκαν μέσω υπερήχων για 10 λεπτά και έπειτα διηθήθηκαν μέσω φίλτρου 0.2 μm. (M.A., et al., 2011).

Οι Friedman et al. το 2006, σε εργασία τους μελέτησαν μεταξύ άλλων τις κατάλληλες συνθήκες και το ποσοστό μίγματος αιθανόλης- νερού για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό κατεχινών και φλαβονοειδών σε δείγματα μαύρου και πράσινου τσαγιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερης του 80% δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα του εκχυλίσματος, ενώ το μίγμα νερού-αιθανόλης (80%) εξατμίζεται γρηγορότερα σε σύγκριση με το αντίστοιχο μίγμα 20%. Οι συνθήκες εκχύλισης που επιλέχθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν 60°C για 15 λεπτά. (Friedman, et al., 2006)

Ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται η αναφορά στη μελέτη της Biesaga το 2011, σχετικά με τη σταθερότητα των φλαβονοειδών μετά από διάφορες μεθόδους εκχύλισης (θέρμανση, χρήση υπερήχων, διαβροχή και με μικροκύματα). Στη συγκεκριμένη έρευνα 11 διαφορετικά φλαβονοειδή μελετήθηκαν, ενώ η μελέτη έδειξε πως η μικρότερη αποδόμησή τους παρατηρήθηκε μετά από θέρμανση σε υδρόλουτρο στους 30°C για 30 λεπτά και έπειτα από την εκχύλιση με μικροκύματα για 1 λεπτό στα 160 W. Παρ'όλα αυτά πρέπει να επισημανθεί πως αντίστοιχα η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης εξαρτάται τόσο από το είδος του δείγματος, όσο και από τις προς προσδιορισμό ενώσεις. (Biesaga, 2011)

4.2 Αναλυτικές μέθοδοι για την ανάλυση εκχυλισμάτων πολυφαινόλων και αλκαλοειδών από βότανα, τσάι και καφέ

Στην περίπτωση του γένους *Sideritis*, το γνωστό ως τσάι του βουνού, πολλές μελέτες έχουν γίνει όχι μόνο για τον τρόπο ανάλυσης του εκχυλίσματος, αλλά και για τα αντιοξειδωτικά συστατικά του συγκεκριμένου φυτού.

Ξεκινώντας με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση του συγκεκριμένου φυτού, αξίζει η αναφορά στην εργασία των Pljevljakusic et al. το 2011, όπου μελετήθηκαν οι ιδιότητες του γένους *Sideritis raeseri* σε τέσσερα διαφορετικά στάδια της ανθοφορίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μέγιστη απόδοση του ελαιώδους εκχυλίσματος παρατηρήθηκε στη φάση της πλήρους ανθοφορίας. Όλα τα προς ανάλυση εκχυλίσματα περιείχαν φαινολικά συστατικά με την ποσότητά τους να ποικίλει από 15.3-34.1 mg/g. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογραφο

μάζας με ηλεκτροψεκασμό επέτρεψε την ταυτοποίηση 22 φαινολικών συστατικών, ενώ κάποια флаβονοειδή ταυτοποιήθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή DAD. Στην περίπτωση των флаβονοειδών η ανάλυση ήταν αντίστροφης φάσης, ενώ η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν 250 mm × 4 mm, 5 μm, RP-18 Lichrospher. Η κινητή φάση στην παρούσα μελέτη αποτελείται από (Α) νερό με 1% 0.1 N φωσφορικό οξύ και (Β) ακετονιτρίλιο. Η έκλυση ορίστηκε ως εξής: 90- 80% Α 20-30 λεπτά, 80% Α 30- 35 λεπτά, 80- 70% Α 10- 20 λεπτά, 70- 30% Α 20-30 λεπτά, 30- 0% Α 30-35 λεπτά με ανίχνευση στα 280 και 330 nm. (Pljevljakusic, et al., 2011)

Στην περίπτωση του γένους *Sideritis* που καλλιεργείται στην περιοχή της Μακεδονίας, οι Patreska et al. το 2011, σε δημοσιευμένη εργασία αναφέρουν πως 24 φαινολικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν (αέρια τμήματα) με υγρή χρωματογραφία- ορατού υπεριώδους με παράταξη φωτοδιόδων συζευγμένη με φασματογράφο μάζας ιονισμού ηλεκτροψεκασμού. Με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε τρία νέα φαινολικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στο φυτό γένους *Sideritis*. Ενδεικτικά στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται κάποια флаβονοειδή που ταυτοποιήθηκαν στο γένος *Sideritis*. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη 250 mm × 4 mm, 5 μm RP-18 LiChroCART, ενώ η κινητή φάση αποτελούνταν από δύο διαλύτες: νερό- μυρμηκικό οξύ 1% (Α) και μεθανόλη (Β). Βαθμωτή έκλυση με 20% Β μέχρι το 50% σε 25 λεπτά και 95% Β σε 60 λεπτά. Η ροή ήταν ρυθμισμένη στα 0.7 mL/min και η ποσότητα δείγματος εισαγωγής 80 μL. (Patreska, et al., 2011)

Τα συστατικά του ελαιώδους εκχυλίσματος του γένους *Sideritis raeseri* και *Sideritis scardiga* έχουν ταυτοποιηθεί με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (GC/MS), από τους Kostadinova et al. Τα συστατικά που βρέθηκαν ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των μονοτερπένιων, διτερπένιων, υδρογονανθράκων, καθώς επίσης και άλλα συστατικά (Konstadinova, et al., 2010).

Τα κυριότερα διτερπένια του γένους *Sideritis* είχαν ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί από τους Seranillos et al. το 1997 με HPLC αντίστροφης φάσης. (Serranillos, et al., 1997)

Πίνακας 4.2 . Ταυτοποιημένα φλαβονοειδή με LC-DAD-MS ESI.

Compounds	t_R(min)	UV (nm)	
Flavonoid-7-o-diglycosides			
9 Isoscutellarein 7-O-allosyl-glucoside	23.7	254, 270, 348	
	24.8	254, 276, 302, 344	
10 Hypolactin 7-O-allosyl-glucoside	27.2	256, 350	
11 Luteolin 7-O-allosyl-glucoside	29.5	254, 272, 298, 342	
12 3-O-Methylhypolactin 7-O-allosyl-glucoside	34.4	280, 306, 330	
13 4-O-Methylisoscuteallarein 7-O-allosyl-glucoside			
Compounds	t_R(min)	UV (nm)	(M- H) m/z
Flavonoid acetylglycosides			
14 Hypolaetin 7-O-(6''-O-acetyl)-allosylglucoside	29.03	256sh,276,304sh,342	667
	30.05	268, 332	635
15 Apigenin 7-O-(6''-O-acetyl)-allosyl-glucoside	32.2	276, 306, 328sh	651
16 Isocuteallarein 7-O-(6''-O-acetyl)-allosylglucoside	32.9	280, 306, 330sh	681
17 3'-O-Methylhypocaeletin 7-O-(6'''-O-acetyl)-allosyl-glucoside			

18 Isoscutellarein 7-O-(2''',6'''-di-O-acetyl)-allosyl-glucoside	34.6	280, 306, 328sh	693
19 3'-O-Methylhypolaetin 7-O-(6'''-O-acetyl)- allosyl glucoside	35.9	254, 278, 302sh, 338	681
20 Hypolaetin 7-O-(2''',6'''-di-O-acetyl)allosylglucoside	36.6	256sh, 274, 302sh, 342	709
21 4'-O-Methylhysoscutellarein 7-O-(6'''-O-acetyl)allosylglucoside	37.6	274, 310, 328sh	665
22 Isoscutallerein 7-O-(6'''-O-acetyl)allosyl(6''-O-acetyl)glucoside	38.3	268, 300, 318	693
23 3'-O-Methylhypolaetin 7-O-(2''',6'''-di-O-acetyl)-allosylglucoside	39.1	254, 278, 302sh, 342	723
24 4'-O-Methylisoscutellarein 7-O-(6'''-O-acetyl)allosyl-(6''-O-acetyl)glucoside	42.5	278, 308, 328sh	707

Όπως έχει αναφερθεί μέχρι τώρα, το τσάι είναι πηγή πλούσια σε πολυφαινόλες και ιδιαίτερα σε κατεχίνες. Οι Zeeb et al. σε έρευνά τους το 2000 δημοσίευσαν μέθοδο σχετική με το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση δώδεκα κατεχινών από μαύρο και πράσινο τσάι με Υγρή χρωματογραφία/ ατμοσφαιρική πίεσης- χημικού ιονισμού συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (LC- APCI/MS). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα μαύρου και πράσινου τσαγιού του εμπορίου, ενώ η ταυτοποίηση των οκτώ κύριων κατεχινών και της καφεΐνης έγινε με τη χρήση του χρόνου συγκράτησης μετά την ανάλυση μιγμάτων προτύπων ενώσεων και με τη συνεχή καταγραφή του φάσματος

μάζας. Οι οκτώ κύριες κατεχίνες των οποίων το πλήρες όνομα φαίνεται στον πίνακα 4.3 (C, EC, GC, EGC, CG, ECG, GCG, EGCG) υπήρχαν στα πέντε από τα έξι δείγματα που εξετάστηκαν.(Zeeb, et al., 2000)

Πίνακας 4.3 . Συντομογραφίες των προς ανάλυση ενώσεων

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙ	ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑ
A	
Ap	Απιγενίνη
C	Κατεχίνη
ClGn	Χλωρογενικό οξύ
EC	Επικατεχίνη
ECG	Γαλλικός εστέρας Επικατεχίνης
EGC	Επιγαλλοκατεχίνη
EGCG	Γαλλικός εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης
GA	Γαλλικό οξύ
GC	Γαλλοκατεχίνη
Kf	Καμφερόλη
My	Μυρικετίνη
Que	Κερκετίνη
TF	Θεοφυλίνη
TB	Θεοβρωμίνη

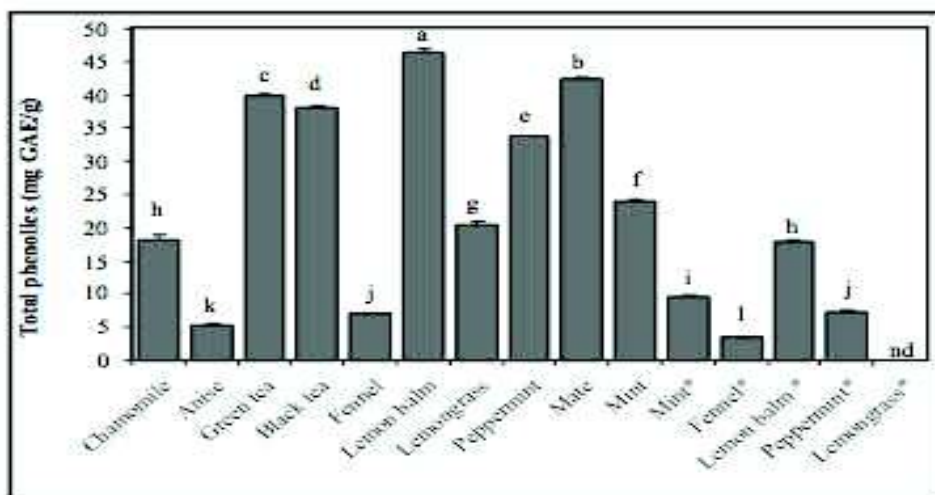
--	--

Στην κατηγορία της ποσοτικής ανάλυσης των κατεχινών ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δημοσιευμένη εφαρμογή των Jiang et al. όπου η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης και απόδοσης με ανιχνευτή UV (UHPLC-UV). Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν είναι υψηλής απόδοσης, τόσο για το διαγνωστικό έλεγχο, όσο και για την ποσοτικοποίηση των κατεχινών και άλλων φαινολικών συστατικών (Jiang & Zhang, 2010)

Αρκετές παράμετροι της μεθόδου, όπως η σύσταση της κινητής φάσης, η ροή και το μήκος της στήλης εξετάστηκαν, ώστε να βελτιστοποιηθεί η ταχύτητα διαχωρισμού και έκλουσης των συστατικών για τη χρήση της μεθόδου σε εφαρμογές υψηλής απόδοσης. Σημαντικού ενδιαφέροντος ήταν επίσης και οι διαφορές που βρέθηκαν με τη χρήση αυτής της εφαρμογής, στο περιεχόμενο δειγμάτων πράσινου και μαύρου τσαγιού, σε κατεχίνες και άλλα φαινολικά συστατικά. Τέλος αναφέρεται πως αν και η εφαρμογή είναι ελεγχμένη για την ποσοτικοποίηση των κατεχινών σε τσάι, μπορεί να εφαρμοστεί και για τον προσδιορισμό κατεχινών και φαινολών και σε άλλα είδη τροφίμων, καθώς επίσης και για τη μελέτη της επίδρασης των κατεχινών στον ανθρώπινο οργανισμό.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αναφορά στο άρθρο των Hu et al. το 2009, το οποίο σχετίζεται ιδιαίτερα με την παρούσα εργασία, και αφορά στην ανάπτυξη μεθόδου για την απομόνωση μεθυλιωμένων κατεχινών από το πράσινο τσάι και τον αποτελεσματικό προσδιορισμό δέκα κατεχινών, τριών αλκαλοειδών πουρινών και γαλλικού οξέος σε τσάι με HPLC- DAD. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό είναι η TSKgel ODS-100Z (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), η θερμοκρασία του φούρνου προγραμματίστηκε στους 40 °C, ενώ η κινητή φάση περιείχε μυρμηκικό οξύ (pH 2.5, A) και μεθανόλη (B). Το πρόγραμμα έκλουσης (γραμμική βαθμωτή) ήταν το ακόλουθο: 0-15 λεπτά, A από 82% στο 40%, B από 18% στο 60%. Η ροή του συστήματος ρυθμίστηκε στα 1.0 mL/min και ο όγκος εισαγωγής δείγματος 20 μL. Το εύρος πίεσης του συστήματος ήταν 80-105 bar και το μήκος κύματος του DAD προγραμματίστηκε σε εύρος 200-600nm. (Hu, et al., 2009)

Σε άρθρο των Souza et al. σχετικό με τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και της περιεκτικότητας σε φαινόλες με HPLC-UV, σε φυτικά εκχυλίσματα που καταναλώνονται στη Βραζιλία, βρέθηκε πως το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες ποικίλλει ανάλογα με το είδος των βοτάνων.



Σχήμα 4.1. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε ποικιλία φυτικών εκχυλισμάτων που καταναλώνονται στη Βραζιλία

Το μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο που προσδιορίστηκε ήταν 46.46 mg/g, ενώ σε κάποια βότανα τα ολικά φαινολικά συστατικά ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Στο Σχήμα 4.1 απεικονίζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των φυτικών εκχυλισμάτων, που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία. (Souza, et al., 2008)

Τέλος ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Dalluge et al. το 1997 σχετικά με την επιλογή της καταλληλότερης στήλης και βαθμωτής έκλουσης σε συστήματα HPLC για την ταυτοποίηση, το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κατεχινών πράσινου τσαγιού. Η σύγκριση έξι στηλών αντίστροφης φάσης έδειξε πως οι ανενεργές στατικές φάσεις που χρησιμοποιούν υπερκάθαρη σίλικα και αυξάνουν την κάλυψη της σίλικας παρέχουν καλύτερο διαχωρισμό και χρωματογραφική αποδοτικότητα για τον προσδιορισμό των κατεχινών, σε σχέση με τις συμβατικές στήλες C₁₈. Η αξιολόγηση των συνθηκών έκλουσης της κινητής φάσης που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό έδειξε πως η παρουσία οξέος στην κινητή φάση είναι σημαντική, τόσο για τον προσδιορισμό

των κατεχινών, όσο και για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος.(Dalluge, et al., 1998)

4.3 Σχολιασμός βιβλιογραφικής ανασκόπησης

Από τη βιβλιογραφική επισκόπηση εξάγεται το συμπέρασμα ότι από τις διαχωριστικές αναλυτικές τεχνικές που υπάρχουν, η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πολυφαινολών και αλκαλοειδών πουρινών από εκχυλίσματα βοτάνων, τσαγιού και καφέ. Οι συνηθέστεροι τρόποι ανίχνευσης είναι η φασματοφωτομετρία UV/ DAD και MS, και οι δύο αυτές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για το διαχωρισμό των πολυφαινολών, ενώ ιδιαίτερες διαφορές παρατηρούνται στα όρια ανίχνευσης των μεθόδων.

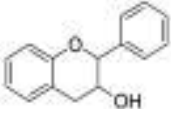
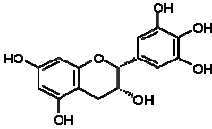
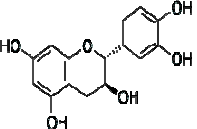
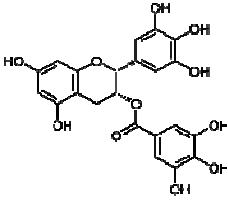
Στην περίπτωση των εκχυλίσεων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υψηλά ποσοστά ανάκτησης στην περίπτωση εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων. Αυτό που ποικίλλει περισσότερο στην περίπτωση αυτή είναι οι συνθήκες εκχύλισης (χρόνος, θερμοκρασία και σύσταση διαλύτη) για το καλύτερο και περισσότερο αξιόλογο αποτέλεσμα, αφού πολλές φορές έχει παρατηρηθεί η αλλοίωση των προσδιοριζόμενων συστατικών, εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών και του μεγάλου χρόνου εκχύλισης.

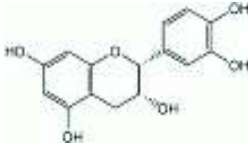
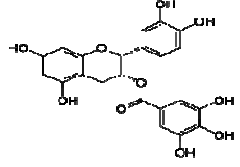
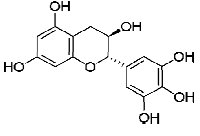
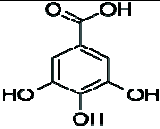
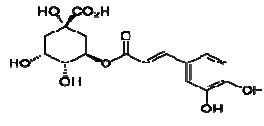
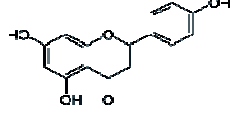
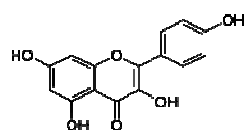
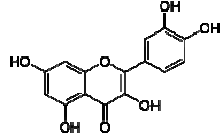
5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

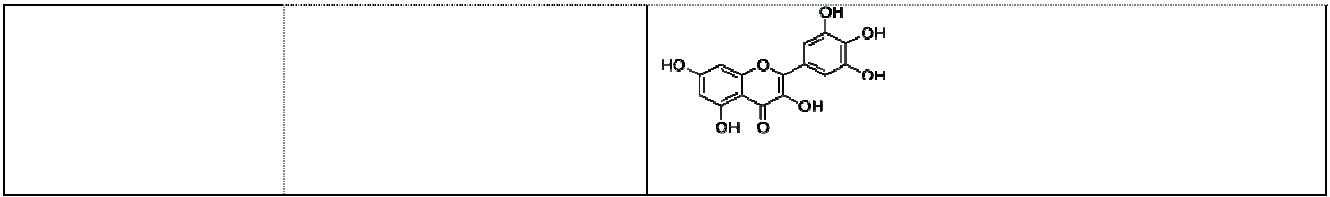
Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας μεθόδου HPLC/DAD για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ποσοτικό διαχωρισμό 15 πολυφαινολών και τριών αλκαλοειδών πουρινών (Πίνακας 5.1) σε διαφορετικά εκχυλίσματα βοτάνων, τσαγιού και καφέ. Η μέθοδος που αναπτύσσεται στην εργασία αυτή εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου, ώστε να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του βοτάνου γένους *Sideritis* (τσάι του βουνού).

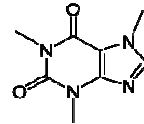
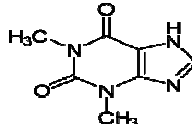
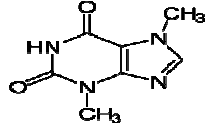
Στην παρούσα εργασία γίνεται για πρώτη φορά ανάπτυξη μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων κατεχινών και άλλων πολυφαινολών στο Ελληνικό “τσάι του βουνού”, ενώ εφαρμόστηκε με επιτυχία για την ανάλυση όλων των προσδιοριζόμενων συστατικών σε δείγματα τσάι καφέ και βοτάνων του εμπορίου.

Πίνακας 5.1 . Προσδιοριζόμενα συστατικά και η χημική τους δομή

Συστατικό	Χημική Δομή
flavan-3-ols	
(-)-epigallocatechin	
(+)-catechin	
(-)-epigallocatechin gallate	

<p>(-)-epicatechin</p>		
<p>(-)-epicatechin gallate</p>		
<p>(-)-gallocatechin</p>		
<p>gallic acid</p>		
<p>hydroxycinnamic acid (chlorogenic acid)</p>		
<p>flavones (apigenin)</p>		
<p>Flavonols</p>	<p>Kaempferol</p>	
	<p>quercetin</p>	
	<p>myricetin</p>	



Συστατικό		Χημική Δομή
Purine alkaloids	caffeine	
	theophylline	
	theobromine	

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



6. ΟΡΓΑΝΑ, ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

6.1 Οργανολογία

Τα επιμέρους τμήματα που αποτελούν τη χρωματογραφική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας της παρούσας μελέτης είναι τα εξής:

- Σύστημα βαθμωτής έκλουσης της Εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Japan) με αντλία LC-10AD (Shimadzu) και σύστημα μίξης διαλυτών FCV- 9AL (Shimadzu)
- Αυτόματο σύστημα εισαγωγής δείγματος SIL- 9A (Shimadzu)
- Ανιχνευτής φωτοδιόδων SPD- M6A (Shimadzu)
- Λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων Class- M10A (Shimadzu)
- Αναλυτική στήλη PerfectSil Target ODS-3 HD 5- μm (250 mm \times 4.6 mm id), MZ-Analysentechnik (Mainz, Germany)
- Σύστημα απαέρωσης των διαλυτών DGU- 2A (Shimadzu)
- Υάλινες φιάλες αποθήκευσης διαλυτών

6.2 Συσκευές

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον προσδιορισμό των πολυφαινολών και αλκαλοειδών πουρίνων είναι τα ακόλουθα:

- Γυάλινη συσκευή διήθησης διαλυτών Alltech Associates (Deerfield, IL, USA), και διηθητικοί ηθμοί Whatman κυτταρίνης-νιτρικών 0.2 μm (Whatman Laboratory Division, Maidstone, England)
- Συσκευή ανάδευσης Glasscol vortexer (Terre Haute, IN, USA)
- Συσκευή υπερήχων Transonic 460/H (Elma, Germany)

- Περιστροφικός εξατμιστήρας BUCHI, Αντλία συμπύκνωσης V- 700, ROTAVAPOR R-300 (Switzerland), και συσκευή συμπύκνωσης ReactiVap 9-port 18780, Pierce (Rockford, IL, USA)

6.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται παρακάτω:

Πρότυπες ενώσεις (όπου δεν αναφέρεται η καθαρότητα, δεν έχει διευκρινιστεί από τον προμηθευτή, Sigma Aldrich, St. Louis MO USA)

- GA
- (-)-EGC
- (+)-C hydrate
- CAF
- (-)- ECG
- (-)GC ($\geq 98\%$)
- theophylline anhydrous (TF, $\geq 99\%$)
- TB ($\geq 99\%$)
- Chlorogenic acid hemihydrate (ClGn, $\geq 98\%$)
- Kf (≥ 90)
- Ap ($\geq 95\%$)
- Myricetin (My $\geq 96\%$)

- Quercetin hydrate (Que $\geq 95\%$)
- 1,7 dimethylxanthine ($>98\%$)

Διαλύτες έκλουσης (κινητή φάση), από την εταιρεία Chem Lab (Baker Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA)

- Μεθανόλη (MeOH), κατάλληλης καθαρότητας για χρωματογραφία
- Ακετονιτρίλιο (ACN), κατάλληλης καθαρότητας για χρωματογραφία Οξικός
- αιθυλεστέρας (EtAc), κατάλληλης καθαρότητας για χρωματογραφία

Λοιπά αντιδραστήρια

- Υδροχλωρικό οξύ (HCl), αναλυτικώς καθαρό, του οίκου Chem Lab
- Κιτρικό οξύ, του οίκου Riedel-de-Haen (Seelze, Germany)
- Υπερκάθαρο νερό Milli-Q1 (Millipore, Bedford, MA, USA)

7. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

7.1 Επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης

Ο ανιχνευτής που επιλέχθηκε για τη διάταξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης ήταν ο UV- DAD. Η επιλογή αυτή καθορίστηκε εξαιτίας της φύσης των ενώσεων που προσδιορίζονται, καθώς και εξαιτίας της επιλογής υδρόλυσης των δειγμάτων κατά την προκατεργασία τους.

Για την επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος ανίχνευσης παρασκευάστηκε μίγμα διαλύματος πρότυπων ενώσεων σε μεθανόλη:νερό (30:70 v/v), και ελήφθησαν τα φάσματα UV-DAD. Στον Πίνακα 7.1 συνοψίζονται τα μέγιστα απορρόφησης των 15 πολυφαινολών, καθώς και ο χρόνος έκλουσής τους, ενώ στο σχήμα 5.1 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα που απεικονίζει τις απορροφήσεις των 15 πολυφαινολών στα διάφορα μήκη κύματος.

Πίνακας 7.1 Μέγιστα απορρόφησης και χρόνοι έκλουσης πολυφαινολών με τις χρωματογραφικές συνθήκες της αναπτυσσόμενης μεθόδου.

Ένωση	Μέγιστο απορρόφησης (nm)	Χρόνος έκλουσης
GA	270	7.682
GC	240	9.860
TB	270	12.404
TF	270	18.232
ClGn	330	21.985
CAF	270	24.580

EGC	240	19.516
C	270	20.236
EC	270	26.961
EGCG	240	29.754
ECG	270	33.474
MY	370	40.891
Kf	370	52.364
Ap	330	53.473
Que	270	45.916

7.2 Επιλογή αναλυτικής στήλης και εκλουστικού συστήματος

Η αναλυτική στήλη είναι από τα σημαντικότερα στοιχεία της χρωματογραφίας, αφού σε αυτήν βασίζεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος. Η επιλογή της στατικής φάσης στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε βάσει της βιβλιογραφίας.

Για την εύρεση του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος έγιναν πολλές δοκιμές. Δοκιμάστηκαν συνολικά 26 εκλουστικά προγράμματα, κάποιες δοκιμές είχαν ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό των συστατικών, αλλά όχι σε ικανοποιητικό βαθμό, ενώ άλλες απορρίφθηκαν εξαιτίας της αδυναμίας τους να διαχωρίσουν τα προσδιοριζόμενα συστατικά. Βασικό πρόβλημα στο πρόγραμμα έκλουσης ήταν ο διαχωρισμός των EGC και C.

Οι προς ανάλυση ενώσεις διαχωρίστηκαν με εφαρμογή βαθμωτής έκλουσης και με κινητή φάση μεθανόλη- ακετονιτρίλιο (95:5% v/v) (A) και οξικό οξύ (μετά από διήθηση) 0.01% (B). Το πρόγραμμα έκλουσης των φαινολικών συστατικών παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2 . Σύστημα έκλουσης φαινολικών συστατικών

Χρόνος (min)	MeOH- ACN (A)	Acetic Acid (B)
0	3%	97%
0-5	8%	92%
5-20	27%	73%
20-30	50%	50%
30-35	45%	55%
35-50	40%	60%

Σχετικά με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η θερμοκρασία που εφαρμόστηκε ήταν θερμοκρασία δωματίου (25°C), η ροή ήταν 0.8 mL/min, η πίεση κυμαινόταν από 215- 300 kg/cm² και η ποσότητα εισαγωγής δείγματος 50 µL. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7.1 για το διαχωρισμό των πολυφαινολών έπρεπε να επιλεχθούν τέσσερα διαφορετικά μήκη κύματος 240, 270, 330 και 370 nm.

7.3 Επιλογή εσωτερικού προτύπου

Εσωτερικό πρότυπο σε μια αναλυτική μέθοδο ονομάζεται η ένωση εκείνη, η οποία συμπεριφέρεται παρόμοια με την προς προσδιορισμό ουσία και προστίθεται σε σταθερή ποσότητα, ώστε να βρίσκεται και σε σταθερή συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα πρότυπα, λευκά (blank) και πραγματικά.

Το εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της επαναληψιμότητας της μεθόδου, αλλά και για την αντιμετώπιση και πρόληψη από τυχαία και συστηματικά σφάλματα.

Είναι πολύ σημαντικό η ένωση που θα επιλεχθεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο σε μια μέθοδο εκτός από το να έχει παρόμοιες ιδιότητες με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις να πληροί και τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- Να μην αποτελεί συστατικό του δείγματος

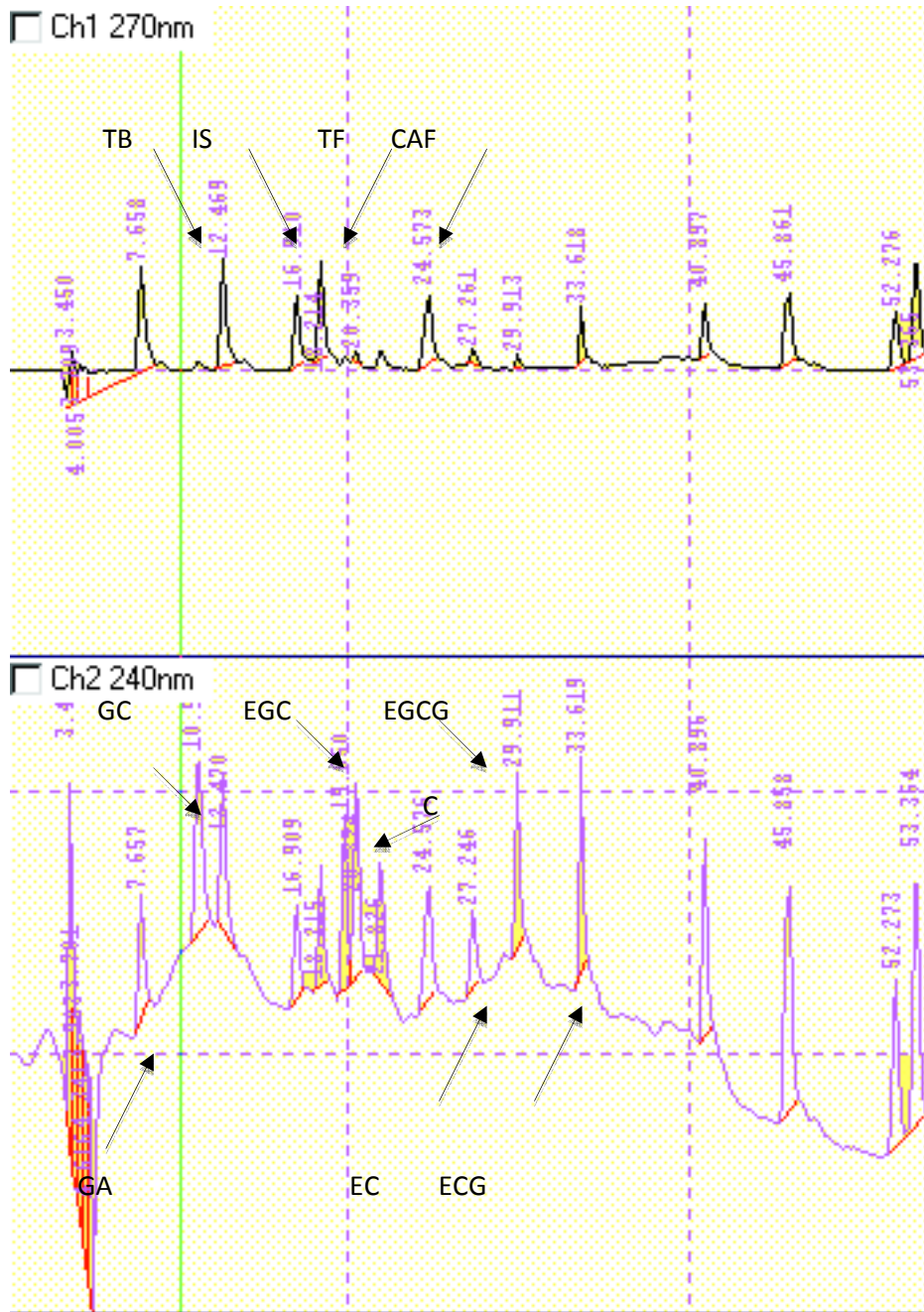
- Να μην αντιδρά με κάποιο από τα συστατικά του δείγματος
- Να δίνει μια και μοναδική κορυφή
- Ο χρόνος συγκράτησης του να είναι κοντά σε αυτούς που εξετάζουμε

Από τα έως τώρα δεδομένα είναι φανερό πως το εσωτερικό πρότυπο στη συγκεκριμένη μελέτη θα πρέπει να απορροφά σε ένα από τα τέσσερα μήκη κύματος που αναφέρθηκαν παραπάνω, αλλά και να εκλούεται στις παραπάνω συνθήκες και σε χρόνο από 7 έως 53 λεπτά.

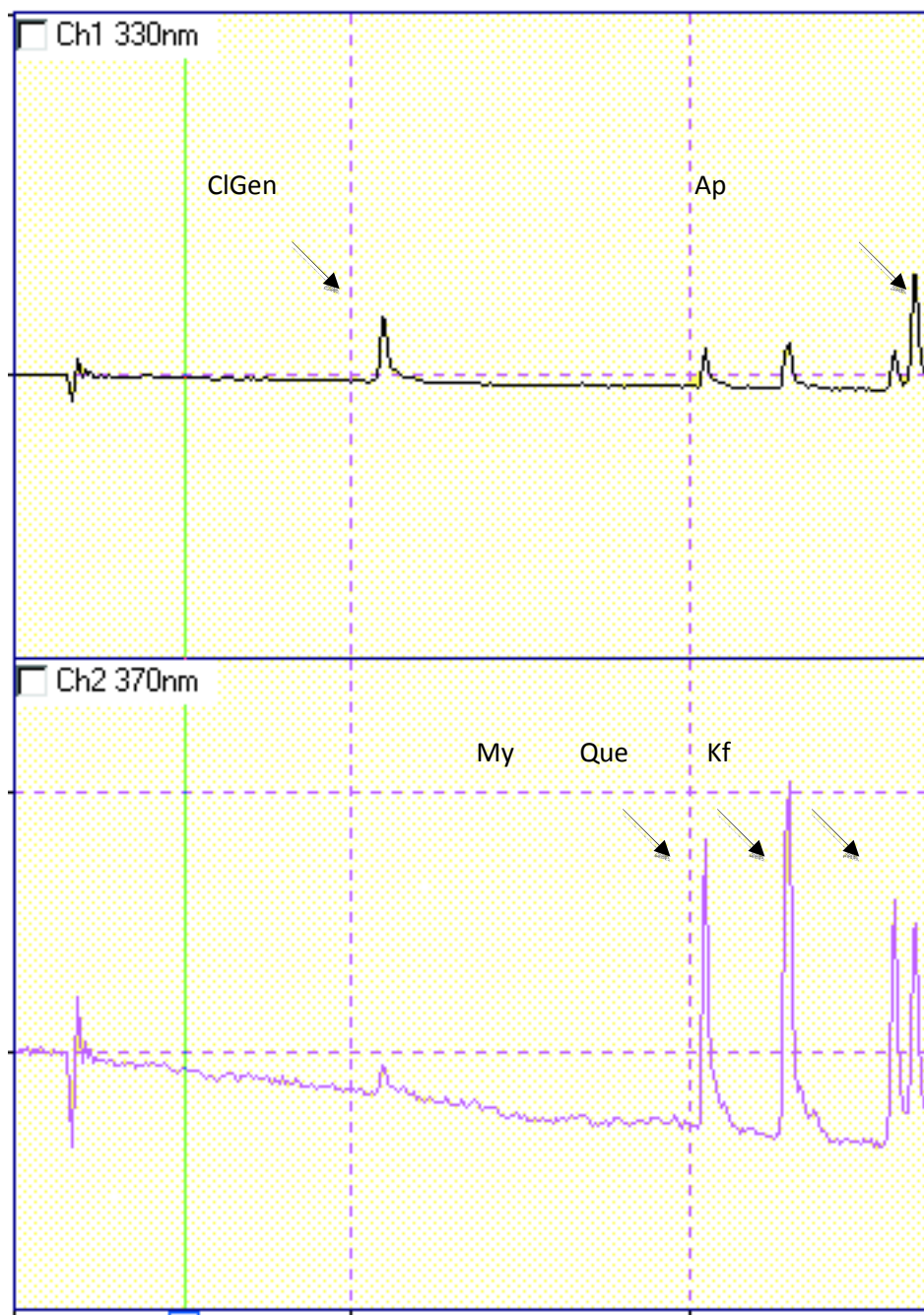
Οι ενώσεις οι οποίες μελετήθηκαν ως εσωτερικό πρότυπο για τη συγκεκριμένη ανάλυση είναι οι εξής:

- 1,7-διμεθυλο - ξανθίνη
- Ισοκαφεΐνη
- Παρακεταμόλη
- Κολχικίνη

Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού ενώσεων που προσδιορίζονται ήταν δύσκολο να βρεθεί ένα εσωτερικό πρότυπο, του οποίου η κορυφή δεν συνέπιπτε με μία από τις κορυφές των προσδιοριζόμενων συστατικών. Από τις τέσσερις παραπάνω ενώσεις η Παραξανθίνη ήταν αυτή που πληρούσε όλες τις προϋποθέσεις ενός εσωτερικού προτύπου και επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ο χρόνος έκλουσης της ξανθίνης είναι στα 16,500 λεπτά πριν την TF και συγκέντρωση που επιλέχθηκε 5 ppm. Στο Σχήμα 7.1 και 7.2 απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα μίγματος προτύπων που ελήφθησαν με τη χρήση του παραπάνω εκλουστικού συστήματος και με την παρουσία εσωτερικού προτύπου.



Σχήμα 7.1 . Μίγμα προτύπων σε μέγιστο απορρόφησης 270 και 240 nm



Σχήμα 7.2. Μίγμα προτύπων σε μέγιστο απορρόφησης 330 και 370 nm

8. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

8.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα συγκέντρωσης 100 ng/μL, σε MeOH:H₂O (30:70 v/v) για τις ενώσεις: GA, TB, TF, ClGn, CAF, EGCG, EC και σε MeOH για GC, C, EGC, ECG, My, Que, Kf, Ap και 1,7 διμεθυλοξανθίνη μετά τη διαλυτοποίηση της κατάλληλης ποσότητας πρότυπης ένωσης στον αντίστοιχο διαλύτη.

Τα πρότυπα διαλύματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο (4°C) και από τη μελέτη της σταθερότητάς τους βρέθηκε πως ήταν σταθερά για το διάστημα του ενός μηνός. Από τα πυκνά πρότυπα διαλύματα, με κατάλληλη διαλυτοποίηση, παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα αραιά για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς με εύρος συγκέντρωσης από 2-10 ng/μL. Όλα τα πρότυπα διαλύματα περιέχουν το προεπιλεγμένο εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 5 ng/μL.

Η προτεινόμενη μέθοδος στα πρότυπα διαλύματα επικυρώθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την ευαισθησία, τη σταθερότητα, την εκλεκτικότητα, την ακρίβεια, την πιστότητα και την καταλληλότητα του συστήματος.

8.2 Καμπύλες αναφοράς προτύπων διαλυμάτων

Σημαντικό στοιχείο επικύρωσης μιας μεθόδου και ειδικότερα για την περίπτωση χρήσης της για τον ποσοτικό προσδιορισμό είναι η γραμμικότητά της. Ο έλεγχος της γραμμικότητας μιας μεθόδου εξετάζεται με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς για κάθε ένα από τα προσδιοριζόμενα συστατικά.

Για το σκοπό αυτό όπως αναφέρθηκε και παραπάνω μετά από κατάλληλες αραιώσεις των πυκνών προτύπων διαλυμάτων, τα αντίστοιχα αραιά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Τα επίπεδα συγκεντρώσεων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις καμπύλες είναι τα εξής: 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, και 10.0 ng/μL, ενώ για το εμβαδόν υπολογίστηκε ο μέσος όρος των εμβαδών κάθε ένωσης μετά από

τρεις εγχύσεις δείγματος. Στα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της γραμμικότητας είχε προστεθεί εσωτερικό πρότυπο σε σταθερή συγκέντρωση 5 ng/μL.

Σε όλα τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, η κορυφή κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης ολοκληρώθηκε και χρησιμοποιήθηκε ο λόγος του εμβαδού κάθε προσδιοριζόμενου συστατικού με το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Από την καμπύλη που κατασκευάστηκε (x: συγκέντρωση, y: λόγος εμβαδών) υπολογίστηκε η εξίσωση παλινδρόμησης και μαζί της η κλίση της ευθείας, το τυπικό σφάλμα και ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά τη στατιστική επεξεργασία της καμπύλης αναφοράς συνοψίζονται στον Πίνακα 8.1.

Πίνακας 8.1 . Καμπύλες αναφοράς φαινολικών συστατικών σε πρότυπα διαλύματα, παρουσία εσωτερικού προτύπου

Συστατικό	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής Γραμμικής Συσχέτισης
GA	$y=(-0,01\pm 0,04)+(0,20\pm 0,01)x$	0,9969
GC	$y=(0,53\pm 0,02)+(0,33\pm 0,00)x$	1
TB	$y=(-0,02\pm 0,02)+(0,22\pm 0,00)x$	0,9988
TF	$y=(0,02\pm 0,05)+(0,21\pm 0,01)x$	0,9954
EGC	$y=(0,00\pm 0,10)+(0,314\pm 0,02)x$	0,9947
C	$y=(-0,08\pm 0,05)\pm(0,35\pm 0,01)x$	0,9984
ClGn	$y=(-0,08\pm 0,01)\pm+0,16\pm 0,00)x$	0,9998
CAF	$y=(-0,07\pm 0,02)+(0,21\pm 0,01)x$	0,9984
EGCG	$y=(-0,05\pm 0,01)+(0,05\pm 0,00)x$	0,9977
EC	$y=(-0,11\pm 0,12)+(0,28\pm 0,02)x$	0,9975
ECG	$y=(-0,21\pm 0,05)+(0,28\pm 0,01)x$	0,9976

My	$y=(-0,17\pm 0,05)+(0,16\pm 0,01)x$	0,9968
Que	$y=(-0,24\pm 0,03)+(0,23\pm 0,01)x$	0,9988
Kf	$y=(-0,27\pm 0,05)+(0,22\pm 0,01)x$	0,9969
Ap	$y=(-0,28\pm 0,15)+(0,33\pm 0,02)x$	0,9921

όπου:

y = ο λόγος του εμβαδού της κορυφής της προς ανάλυσης ένωσης προς το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (1,7-διμεθυλο – ξανθίνη)

X =συγκέντρωση της ένωσης που προσδιορίζεται

8.3 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης

Όριο ανίχνευσης (Limit of detection, LOD): Η ελάχιστη ποσότητα του προσδιοριζόμενου συστατικού που μπορεί να ανιχνευθεί με κάποια μέθοδο και με βεβαιότητα 95 ή 99%.

Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantitation, LOQ): Η ελάχιστη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης που μπορεί να ανιχνευθεί με κάποια μέθοδο και με βεβαιότητα 95 ή 99%.

Στην περίπτωση του ορίου ανίχνευσης αυτό εκφράζει τη συγκέντρωση της ένωσης που δίνει τιμή μέτρησης x_L ίση με τη μέση τιμή των μετρήσεων μιας σειράς λευκών προσδιορισμών αυξημένη κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης s_b των μετρήσεων αυτών. Έτσι προκύπτει ότι:

$$LOD = 3.3\sigma/s$$

Όπου σ : Τυπική απόκλιση τεταγμένης επί την αρχή

s : Κλίση ευθείας

$$LOQ = 3LOD$$

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της παρούσας μελέτης για κάθε ένα από τα προσδιοριζόμενα συστατικά συγκεντρώνονται στον Πίνακα 8.2.

Πίνακας 8.2 . *LOD και LOQ της μεθόδου για τα προσδιοριζόμενα συστατικά*

Συστατικό	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
GA	1.0	0.3
GC	2.0	0.7
TB	1.0	0.3
TF	1.0	0.3
EGC	2.0	0.7
C	1.5	0.5
ClGn	0.8	0.3
CAF	1.0	0.3
EGCG	3.0	1.0
EC	2.0	0.7
ECG	1.9	0.6
My	2.0	0.7
Que	1.3	0.4
Kf	2.0	0.7
Ap	2.0	0.7

8.4 Ακρίβεια και πιστότητα της μεθόδου

Με τον όρο ακρίβεια της μεθόδου εννοείται ο βαθμός συμφωνίας των αποτελεσμάτων που παράγονται από τη μέθοδο με την πραγματική τιμή ή μια παραδεκτή ως πραγματική

τιμή. Ποσοτικά η ακρίβεια εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό από το σχετικό σφάλμα και μπορεί να εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας ένα πιστοποιημένο υλικό αναφοράς και συγκρίνοντας την ευρεθείσα τιμή με την πιστοποιημένη τιμή που συνοδεύει το υλικό αναφοράς. Η σχέση από την οποία ορίζεται η τυπική απόκλιση δίνεται παρακάτω.

$$\text{Σχετικό σφάλμα (\%)} = \frac{(\text{μέση ευρεθείσα τιμή} - \text{θεωρητική τιμή})}{\text{θεωρητική τιμή}} \times 100$$

Αντίστοιχα η ανάκτηση υπολογίζεται από την εξής σχέση:

$$\text{Ανάκτηση (\%)} = \frac{\text{μέση ευρεθείσα τιμή}}{\text{Θεωρητική τιμή}} \times 100$$

Η πιστότητα μιας αναλυτικής μεθόδου αναφέρεται στην εγγύτητα μιας σειράς μετρήσεων κάτω από διαφορετικές συνθήκες σε πολλαπλά δείγματα και μπορεί να εκφραστεί με διαφορετικούς όρους.

- Επαναληψιμότητα: αναφέρεται στις διακυμάνσεις που παρουσιάζονται σε πολλαπλές αναλύσεις και οι οποίες πραγματοποιούνται εντός της ίδιας ημέρας, κάτω από τις ίδιες συνθήκες
- Ενδιάμεση πιστότητα: Η διακύμανση των αποτελεσμάτων μετρήσεων που λήφθηκαν μακροπρόθεσμα και προσδιορίζεται συγκρίνοντας αποτελέσματα μιας ανάλυσης σε ένα εργαστήριο με την πάροδο του χρόνου
- Αναπαραγωγιμότητα: Αναφέρεται στην πιστότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των εργαστηρίων με σκοπό την επιβεβαίωση της καταλληλότητας της μεθόδου

Η έκφραση των παραπάνω όρων γίνεται με την τυπική και τη σχετική τυπική απόκλιση.

Τυπική απόκλιση: s ή SD

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Σχετική τυπική απόκλιση: $\text{RSD (CV\%)} = 100 \text{ SD} / X$

Όπου x : η μέση ευρεθείσα τιμή μιας σειράς μετρήσεων

n: ο αριθμός των μετρήσεων

8.5 Ακρίβεια, επαναληψιμότητα (intra day repeatability) και πιστότητα σε διαφορετικές μέρες (inter- day precision)

Ένας τρόπος έκφρασης της πιστότητας είναι η επαναληψιμότητα (intra-day) και εκφράζεται με την εγγύτητα των αποτελεσμάτων πολλαπλών μετρήσεων εντός μιας ημέρας, κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Παρόμοια η ενδιάμεση πιστότητα μπορεί να εκφραστεί και ως «inter- day precision» και είναι ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων, όταν η διαδικασία εφαρμόζεται κατ' επανάληψη σε πολλαπλά δείγματα και υπολογίζεται σε μια περίοδο διαδοχικών ημερών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη για την επαναληψιμότητα τρία πρότυπα δείγματα συγκέντρωσης 3, 6 και 10 ng/μL μετρήθηκαν πέντε φορές μέσα στην ίδια μέρα και κάτω από ίδιες συνθήκες.

Παρόμοια προσδιορίστηκε και η πιστότητα με τρεις μετρήσεις για πέντε συνεχόμενες ημέρες σε πρότυπα διαλύματα συγκεντώσεων (3, 6 και 10 ng/μL). Τα αποτελέσματα των παρουσιάζονται στους Πίνακες 8.3 και 8.4.

Πίνακας 8.3 . Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Συστατικό	Θεωρητική Συγκέντρωση (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ±SD (μg/mL)	RSD %	Ανάκτηση %
GA	3	3,6±1,12	31,2	120
	6	5,6±0,17	3,1	93
	10	9,8±0,16	1,6	98
GC	3	2,9±0,08	2,8	97
	6	6,3±0,18	2,9	105

	10	9,6±0,74	7,8	96
TB	3	2,9±0,05	1,7	97
	6	5,6±0,41	7,3	93
	10	9,1±0,035	3,8	91
TF	3	2,8±0,18	6,4	93
	6	6,3±0,18	2,9	105
	10	10,5±0,44	4,2	105
EGC	3	2,9±0,14	4,6	97
	6	5,9±0,15	2,6	98
	10	10,1±0,92	9,1	101
C	3	2,7±0,06	2,3	90
	6	5,4±0,22	4	90
	10	9,8±0,3	3,1	98
CIGen	3	3,1±0,1	3,3	103
	6	5,8±0,19	3,2	97
	10	10,2±2,2	21,6	102
CAF	3	2,7±0,1	3,7	93
	6	5,5±0,14	2,6	92
	10	9,7±0,6	6,2	97
EGCG	3	2,9±0,55	18,9	97
	6	5,6±0,33	5,9	93

	10	9,6±0,74	7,7	96
EC	3	2,8±0,03	1,1	93
	6	5,6±0,28	5	93
	10	9,8±0,51	5,2	98
ECG	3	2,9±0,01	0,3	97
	6	5,4±0,16	2,9	90
	10	9,5±0,29	3	95
My	3	2,7±0,04	1,6	90
	6	6,3±0,09	1,4	105
	10	10,2±0,42	4,1	102
Que	3	2,8 ±0,02	0,76	93
	6	5,9±0,08	1,4	98
	10	10,1±0,25	2,5	101
Kf	3	2,7±0,01	0,4	90
	6	5,7±0,56	9,8	95
	10	9,7±0,5	5,2	97
Ap	3	2,8±0,83	29,6	93
	6	5,7±0,11	2	95
	10	9,6±0,78	8,1	96

Πίνακας 8.4 . Ακρίβεια και πιστότητα της μεθόδου σε 5 ημέρες

Συστατικό	Θεωρητική Συγκέντρωση (μg/mL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ±SD (μg/mL)	RSD %	Ανάκτηση %
GA	3	2,8±0,48	17,9	93
	6	5,9±0,71	12,83	98
	10	10,1±1,05	10,7	101
GC	3	2,7±0,45	15,5	90
	6	5,8±0,56	9,6	97
	10	9,2±0,22	8	92
TB	3	2,8±0,04	0,7	93
	6	5,7±0,03	0,3	95
	10	9,3±0,04	1,6	93
TF	3	2,9±0,36	6,2	97
	6	6,1±1,03	11,2	101
	10	10,2±0,06	2	102
EGC	3	3,1±0,03	0,5	103
	6	5,6±0,24	2,6	93
	10	9,9±0,12	4,1	99
C	3	2,8±0,06	1	93
	6	5,8±0,23	2,26	97

	10	9,1±0,03	1,2	91
ClGen	3	2,7±0,10	1,9	90
	6	5,9±1,1	11,16	98
	10	9,3±0,29	10,2	93
CAF	3	2,9±0,09	1,6	97
	6	5,5±0,78	8,6	92
	10	9,1±0,28	10,5	91
EGCG	3	2,7±0,5	18,7	90
	6	5,5±0,1	1,8	92
	10	9,8±0,42	4,3	98
EC	3	2,9±0,21	7,5	97
	6	5,8±0,2	3,4	97
	10	9,3±0,88	9,5	93
ECG	3	2,9±0,1	0,5	97
	6	5,9±0,15	2,6	98
	10	9,9±0,4	4,1	99
My	3	3,1±0,14	4,4	103
	6	5,8±0,3	5,1	97
	10	9,7±0,48	4,9	97
Que	3	2,9±0,08	2,6	98
	6	5,9±0,26	4,4	98

	10	9,3±0,62	6,7	93
Kf	3	2,9±0,11	3,8	97
	6	5,6±0,31	5,6	93
	10	9,2±0,63	6,8	92
Ap	3	2,7±0,05	1,7	90
	6	5,5±0,34	6,1	92
	10	9,5±0,77	8,1	95

9. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΣΑΓΙΟΥ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης, όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών από εκχυλίσματα τσαγιού (γένους *Sideritis*, ‘τσάι του βουνού’) και η μετέπειτα εφαρμογή της σε άλλα δείγματα (αφεινήματα) του εμπορίου (καφέ, τσάι, βότανα).

Απαραίτητη λοιπόν προϋπόθεση για τη μέτρηση φαινολικών συστατικών σε δείγματα από τσάι και καφέ είναι και η εύρεση της κατάλληλης μεθόδου προκατεργασίας δείγματος, καθώς και η βελτιστοποίησή της.

9.1 Επιλογή πρωτοκόλλου για την εκχύλιση δειγμάτων τσαγιού

Η προμήθεια εναέριων τμημάτων από τσάι του βουνού *S. raeseri*, έγινε από την τοπική αγορά.

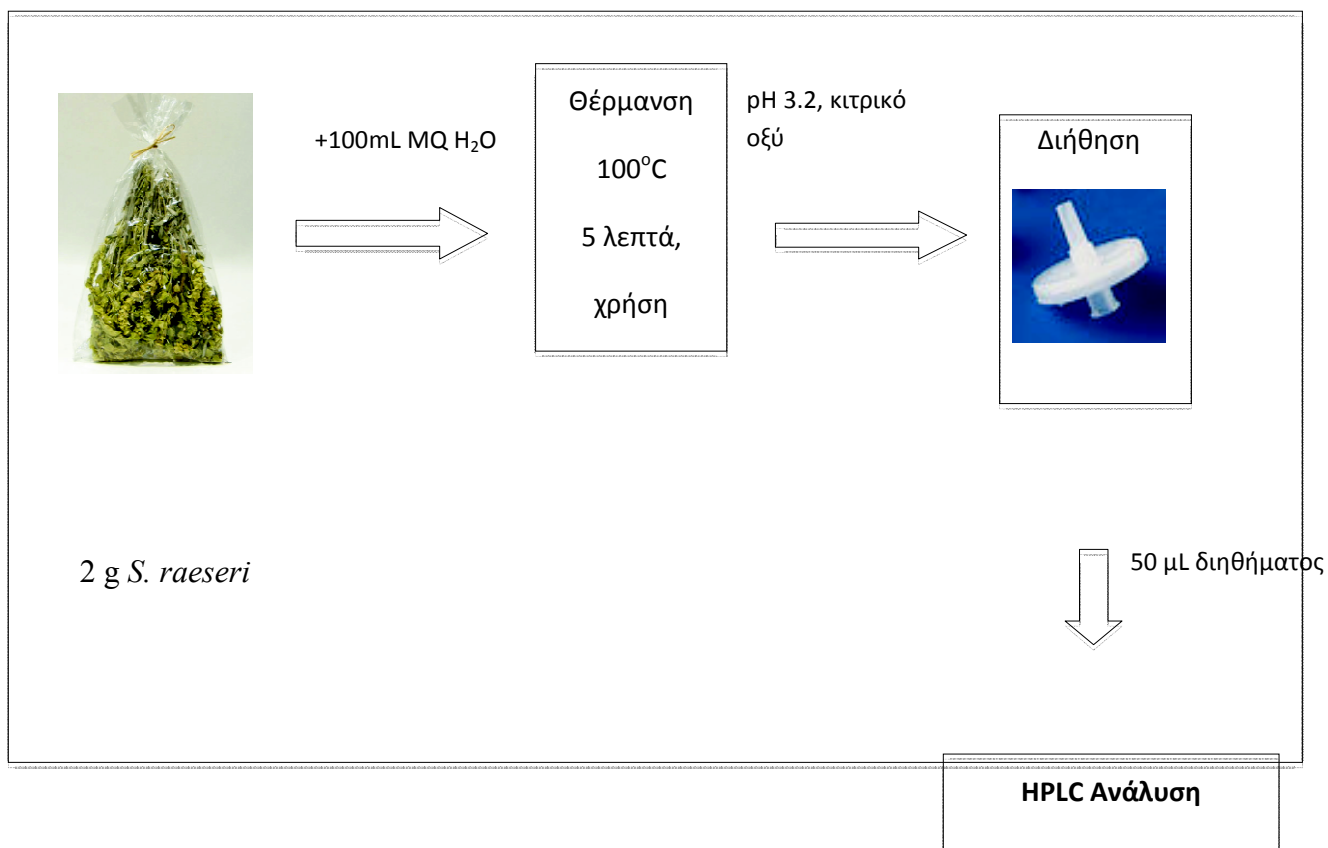
Για την εκχύλιση της, όσο το δυνατόν περισσότερης ποσότητας κάθε συστατικού από το δείγμα, ήταν απαραίτητο αρχικά να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες εκχύλισης. Οι αρχικές συνθήκες εκχύλισης περιλάμβαναν την εκχύλιση 1 g ξηρού δείγματος με την προσθήκη 100 mL απεσταγμένου νερού και με θέρμανση στους 80 °C για 5 λεπτά (25). Διαφορετικές ποσότητες δείγματος επίσης ελέγχθηκαν για το βέλτιστο αποτέλεσμα όπως 2 και 3 g. Από τις διάφορες μελέτες βρέθηκε πως η ποσότητα των 2 g ήταν αρκετή, ώστε να παραληφθούν μετρήσιμες ποσότητες των προσδιοριζόμενων συστατικών. Το εύρος της θερμοκρασίας που εφαρμόστηκε στην ποσότητα αυτή του ξηρού δείγματος κυμάνθηκε από 80 έως 100 °C, ενώ η καλύτερη ανάκτηση επιτεύχθηκε στους 100 °C. Ταυτόχρονα αξιολογήθηκαν και διαφορετικοί διαλύτες εκχύλισης συμπεριλαμβανομένου του οξικού αιθυλεστέρα και της μεθανόλης, χωρίς όμως να λαμβάνονται τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα από τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1.

Πίνακας 9.1 . Αποτελέσματα βελτιστοποίησης μεθόδου εκχύλισης δείγματος *S. raeseri*

Συνθήκες εκχύλισης	Ανιχνεύσιμα συστατικά	Συγκέντρωση (μg/g)
MQ H ₂ O, θέρμανση 80°C, 5 λεπτά	C ClGn	1.9 6.1
MQ H ₂ O, θέρμανση 100°C, 5 λεπτά	C ClGn	2.1 10.1
MeOH, ανάδευση με υπερήχους, 15 λεπτά	-	-
EtAc, ανάδευση με υπερήχους, 15 λεπτά	-	-

Η εκχύλιση η οποία επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει την προκατεργασία 2 g ξηρού δείγματος με θέρμανση μέχρι βρασμού (100 °C) σε 100 mL απιονισμένο νερό για 5 λεπτά. Η εκχύλιση επιταχύνθηκε μέσω ανάδευσης με τη χρήση υπερήχων για 5 λεπτά. Επιπροσθέτως το pH προσαρμόστηκε στα 3.2 με την προσθήκη κιτρικού οξέος. Το εκχυλισμένο δείγμα διηθήθηκε αρχικά μέσω διηθητικού ηθμού και έπειτα μέσω νάιλον ηθμού (13 mm × 0.2 μm). Από το προϊόν της διήθησης 50 μL εισήχθησαν στην HPLC για χρωματογραφική ανάλυση.

Σχετικά με την επιλογή της διαδικασίας εκχύλισης αυτή επιλέχθηκε με τέτοιο τρόπο, ώστε να μιμείται τη διαδικασία παρασκευής σπιτικού τσαγιού ή άλλων αφεψημάτων του εμπορίου.



Σχήμα 9.1 . Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης δείγματος *S. Raeseri*

9.2 Επιλογή πρωτοκόλλου για την υδρόλυση του εκχυλίσματος

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου υδρόλυσης έγινε σε εκχυλισμένο δείγμα φυτού *S. raeseri*. Μελετήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί θερμοκρασίας και συγκέντρωσης οξέος, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης υδρόλυση των γλυκοσιδικών φλαβονοειδών.

Στη δεύτερη πειραματική προσπάθεια υδρόλυσης των φλαβονοειδών εφαρμόστηκε θέρμανση στους 90°C μαζί με υδροχλωρικό οξύ 9 mol/L. Ενώ κατά την τρίτη προσπάθεια υδρόλυσης η θέρμανση δεν ξεπέρασε τους 60°C και η συγκέντρωση του υδροχλωρικού οξέος ήταν 6 mol/L.

Τα αποτελέσματα των τεχνικών υδρόλυσης που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία συνοψίζονται στον Πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.2- Αποτελέσματα βελτιστοποίησης μεθόδου υδρόλυσης σε δείγματα *S. raeseri*

Πειραματική προσπάθεια	Συνθήκες υδρόλυσης	Ενώσεις που ανιχνεύτηκαν	Συγκέντρωση (μg/g)
1	6 mol/L HCl, 90°C	ClGn My Ap	3.8 1.4 1.3
2	9 mol/L HCl, 90°C	ClGn	5.6
3	6 mol/L HCl, 60°C	ClGn My	3.3 0.8

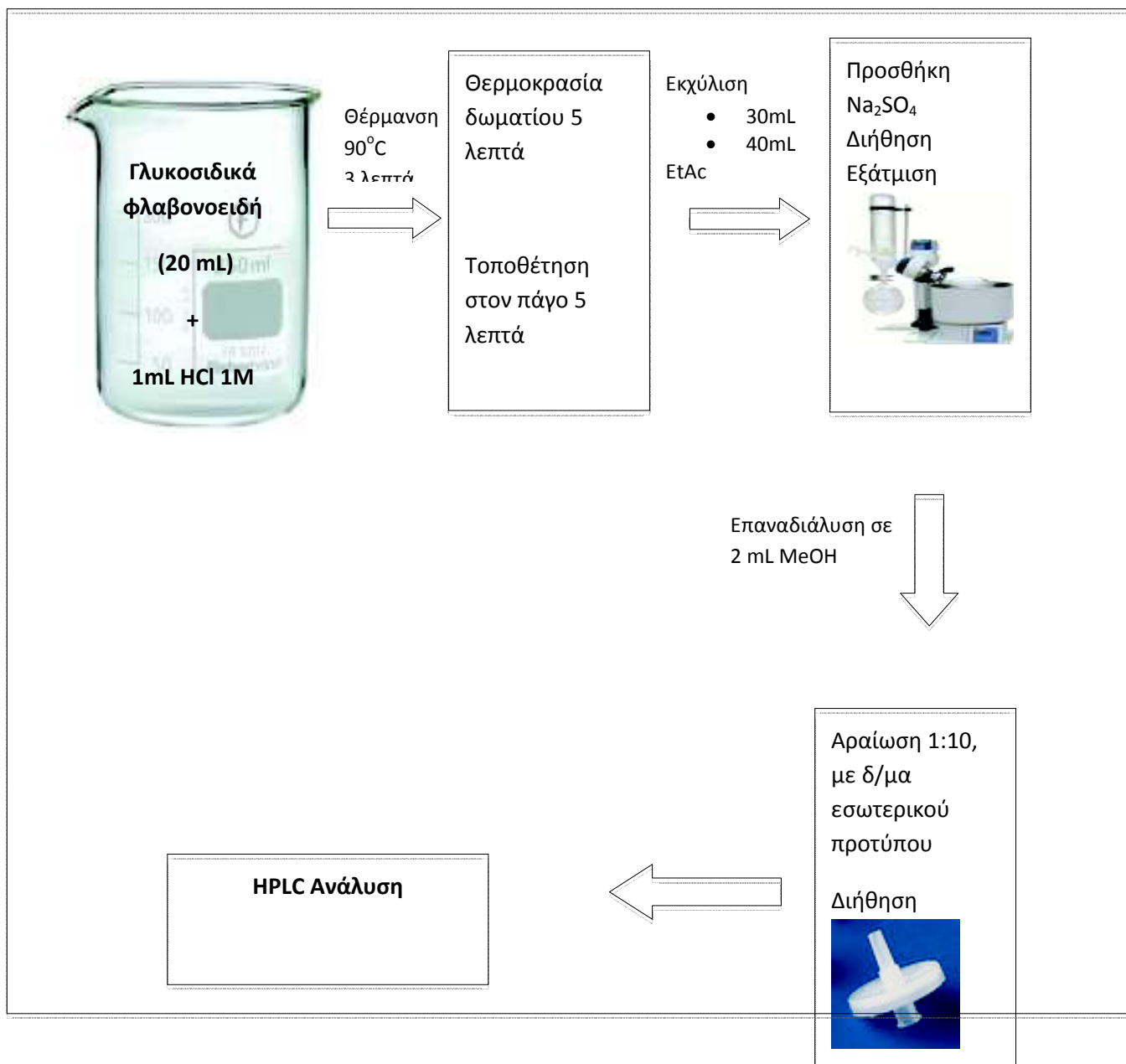
Από τα αποτελέσματα του πίνακα 9.2, φαίνεται πως οι 60 °C δεν ήταν αρκετοί για την επίτευξη της ολικής υδρόλυσης του δείγματος. Η υδρόλυση ήταν επιτυχημένη, όταν χρησιμοποιήθηκε υψηλή συγκέντρωση HCl (9 mol/L), και αυτό απεικονίζεται στην πρώτη πειραματική προσπάθεια, όπου, τόσο η συγκέντρωση του οξέος, όσο και η θερμοκρασία φαίνεται να είναι οι βέλτιστες για τη συγκεκριμένη υδρόλυση.

Παρακάτω παρουσιάζεται λεπτομερώς η διαδικασία υδρόλυσης που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη για τον προσδιορισμό των φαινολών στα προς ανάλυση δείγματα.

Πριν την ανάλυση των δειγμάτων με την HPLC, τα γλυκοσιδικά φλαβονοειδή, αρχικά υδρολύθηκαν στην άγλυκη μορφή τους με την προσθήκη 1 mL υδροχλωρικού οξέος 1 M σε 20 mL εκχύλισματος και με θέρμανση στους 90°C για 30 λεπτά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και έπειτα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο για άλλα 5 λεπτά. Ακολούθησε διπλή εκχύλιση με την προσθήκη 30 και 40 mL οξικού αιθυλεστέρα. Το εκχύλισμα συλλέχθηκε και σε αυτό προστέθηκαν Na₂SO₄, και το διάλυμα διηθήθηκε με τη χρήση απλού διηθητικού ηθμού. Μετά την ξήρανση του δείγματος σε μειωμένης πίεσης περιστροφικό εξατμιστήρα, πραγματοποιήθηκε

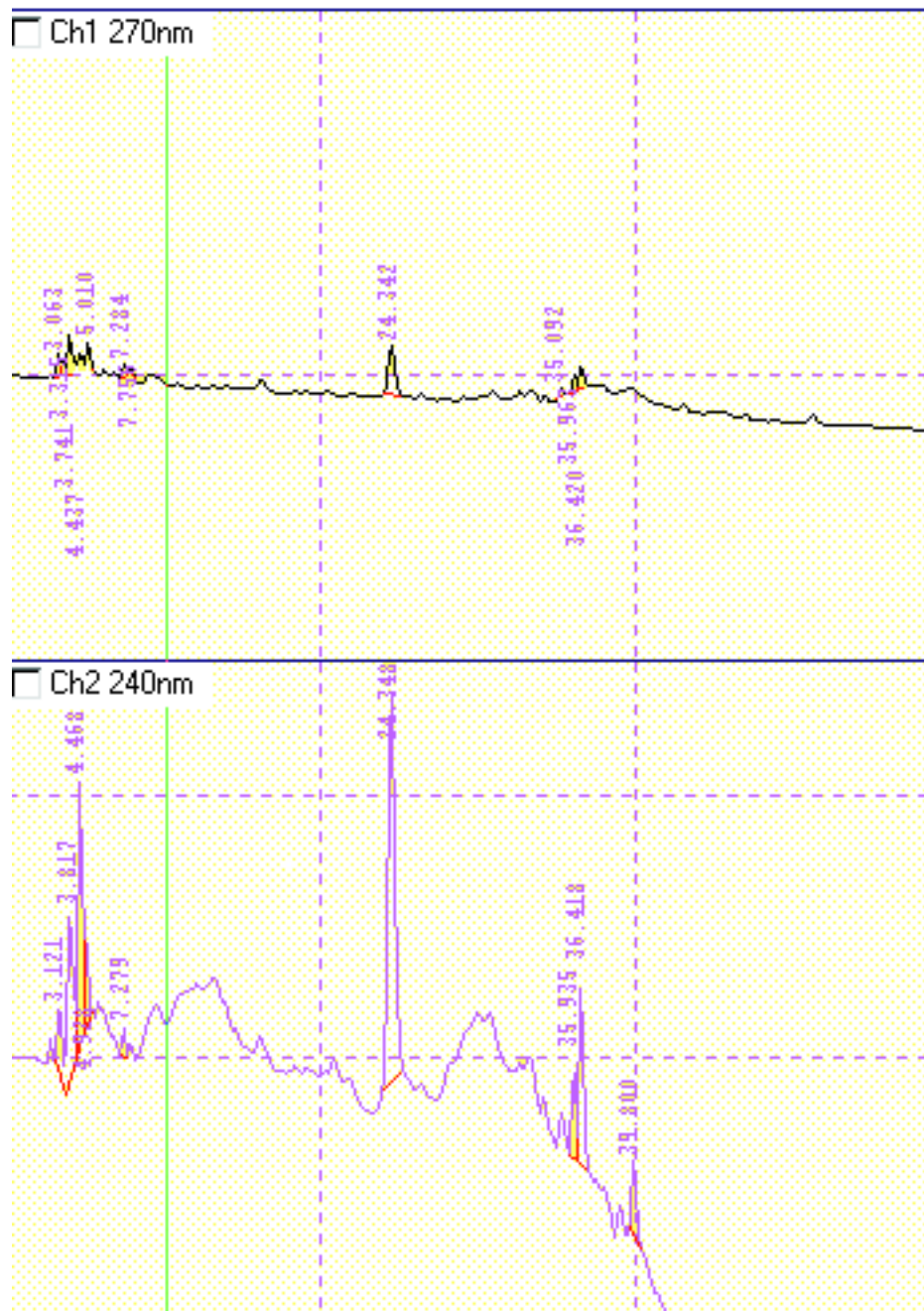
επαναδιάλυσή του σε 2 mL μεθανόλης. Ποσότητα 1 mL του δείγματος αραιώθηκε κατά δέκα φορές με διάλυμα εσωτερικού προτύπου, ακολούθησε διήθηση, μέσω νάιλον ηθμού (13 mm × 0.2 μm) και το υδρολυμένο εκχύλισμα αναλύθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.

Η σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλου υδρόλυσης σε δείγμα *S. raeseri*, παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.2.

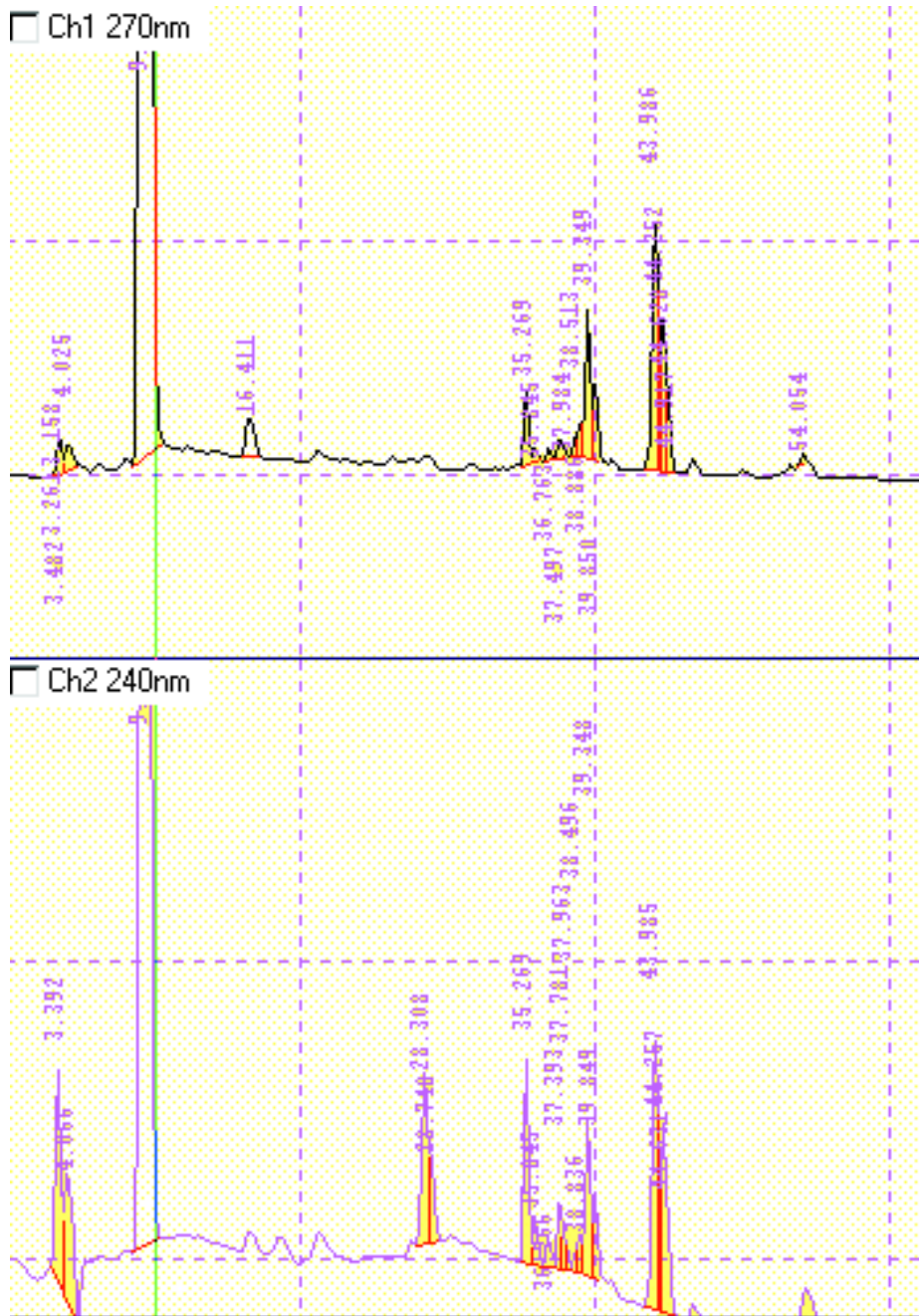


Σχήμα 9.2. Σχηματική απεικόνιση υδρόλυσης σε εκχύλισμα *S. raeseri*

Στα σχήματα 9.3 και 9.4 παρουσιάζονται τα χρωματογράφημα που παρελήφθησαν στα δύο διαφορετικά μήκη κύματος από τη χρωματογραφική ανάλυση δείγματος *S. Raeseri* πριν και μετά την υδρόλυση αντίστοιχα.



Σχήμα 9.3. HPLC- DAD χρωματογράφημα δείγματος *S. raeseri* πριν την υδρόλυση



Σχήμα 9.4. HPLC- DAD χρωματογράφημα δείγματος *S. raeseri* μετά την υδρόλυση

10. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Ο έλεγχος σταθερότητας τόσο των δειγμάτων, όσο και των πρότυπων διαλυμάτων είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς πολλά δείγματα αλλοιώνονται εύκολα πριν τη χρωματογραφική ανάλυση. Η αλλοίωση αυτή μπορεί να προκύψει τόσο κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του διαλύματος, όσο και κατά την προκατεργασία του δείγματος. Επίσης δεν είναι λίγες οι φορές που ένα δείγμα μπορεί να αλλοιωθεί εξαιτίας των συνθηκών αποθήκευσής του. Σημαντικό λοιπόν θεωρείται μία μέθοδος να εξετάζεται ως προς τη σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο δείγμα.

Είναι αρκετά σύνηθες τα πρότυπα δείγματα να μη χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την παρασκευή τους, αλλά και να επαναχρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια μιας μελέτης αφού πρώτα αποθηκευτούν στις κατάλληλες συνθήκες. Η επίδραση της θερμοκρασίας στα προσδιοριζόμενα συστατικά μπορεί να μελετηθεί αναλύοντας ένα εμβολιασμένο δείγμα γνωστής συγκέντρωσης αμέσως μετά την παρασκευή του και διαδοχικά μέσα στην προβλεπόμενη περίοδο αποθήκευσης.

Η σταθερότητα των πρότυπων δειγμάτων στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 και 48 ώρες. Όλα τα προσδιοριζόμενα συστατικά βρέθηκε πως δε μεταβάλλονται σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα από 48 ώρες.

Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων, αυτά αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο (4°C) και η σταθερότητα τους ελέγχθηκε για την περίοδο της μίας εβδομάδας. Τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας σε εκχυλισμένα δείγματα έδειξε πως τα προσδιοριζόμενα συστατικά είναι σταθερά για τρεις ημέρες, ενώ υπήρξαν απώλειες της αρχικής τους ποσότητας (50%) στο τέλος της εβδομάδας.

11. Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα του εμπορίου

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε για την ανάλυση διαφόρων δειγμάτων του εμπορίου που ήδη χαρακτηρίζονται ως πηγές πλούσιες σε φαινολικά συστατικά, αλλά και σε δείγματα των οποίων η φαινολική σύσταση δεν είναι ακόμη γνωστή. Τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- Βότανα ελληνικών βουνών
- Δείγματα καφέ του ελληνικού εμπορίου
- Αποξηραμένα δείγματα πράσινου και μαύρου τσαγιού του ελληνικού εμπορίου (σε φακελάκι)
- Δείγματα πράσινου κρύου τσαγιού (στιγμαία ροφήματα)

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν πριν και μετά την υδρόλυση σύμφωνα με τις προαναφερθείσες διαδικασίες.

11.1 Βότανα ελληνικών βουνών

Τα βότανα των ελληνικών βουνών, τα οποία και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν του γένους *Sideritis* (*raeseri* και *scardiga*) καθώς και το φυτό γένους *O. vulgare*. Όλα τα δείγματα βρέθηκε να έχουν παρόμοια σύσταση. Τόσο στα υδρολυμένα, όσο και στα μη υδρολυμένα εκχυλίσματα του φυτού *O. Vulgare* βρέθηκε My και C. ClGn και C ταυτοποιήθηκε σε δείγματα του φυτού *S. raeseri*, ενώ τα συστατικά My και Ap βρέθηκαν στο υδρολυμένο εκχύλισμα του ίδιου βοτάνου. Στο υδρολυμένο και μη υδρολυμένο εκχύλισμα του φυτού γένους *S. scardiga* ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις ECG, GlGn, My και Ap. Όπως ήταν αναμενόμενο περισσότερα συστατικά ή υψηλότερη συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων βρέθηκε στα εκχυλίσματα που υποβλήθηκαν σε υδρόλυση. Κάποια συστατικά όπως My, Que, Kf και Ap δεν ήταν ανιχνεύσιμα στα μη υδρολυμένα εκχυλίσματα των δειγμάτων ή ανιχνεύτηκαν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η υδρόλυση ήταν αυτή που κατέστησε εφικτή την ανίχνευση όλων των προσδιοριζόμενων ενώσεων στα δείγματα βοτάνων.

Στον Πίνακα 11.1 συνοψίζονται τα ευρήματα της ανάλυσης δειγμάτων βοτάνου από ελληνικά βουνά, ενώ στα σχήματα 11.1 και 11.2 απεικονίζονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα.

Πίνακας 11.1 . Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων βοτάνων πριν και μετά την υδρόλυση

Δείγμα	Μη- υδρολυμένο εκχύλισμα		Υδρολυμένο εκχύλισμα	
	Ένωση	Συγκέντρωση (μg/g)	Ένωση	Συγκέντρωση (μg/g)
<i>S. raeseri</i>	ClGn	2,5	ClGn	3,6
	C	<LOQ	My	1,8
			Ap	1,2
<i>S. scardiga</i>	EGC	2,4	ECG	2,4
	ClGn	2,3	ClGn	3,6
	My	0,8	My	1,8
			Ap	1,2
<i>O. vulgare</i>	My	1,3	My	3
	C	<LOQ	C	0,9

Ενδεικτικά παρακάτω παρατίθενται ορισμένα από τα χρωματογραφήματα μη υδρολυμένων εκχυλισμάτων των βοτάνων.



Σχήμα 11.1 HPLC- DAD χρωματογράφημα μη-υδρολυμένου εκχυλίσματος *S. scardiga*



Σχήμα 11.2. HPLC- DAD μη υδρολυμένου εκχυλίσματος *O. vulgare*

11.2 Πράσινο τσάι

Μελετήθηκαν πέντε δείγματα πράσινου τσαγιού του εμπορίου στην παρούσα εργασία. Τα προσδιοριζόμενα συστατικά ανιχνεύτηκαν, τόσο σε στιγμιαία ροφήματα κρύου τσαγιού, όσο και σε δείγματα αποξηραμένου τσαγιού σε φακελάκι. Τα δείγματα αυτά είχαν παρόμοια σύσταση.

Στην πλειοψηφία των δειγμάτων αυτών βρέθηκε GA, Kf και Que σε χαμηλή συγκέντρωση. Σε κάποια από τα δείγματα αυτά του εμπορίου ανιχνεύτηκε ιδιαίτερα υψηλή ποσότητα του συστατικού EGCG, ενώ γενικότερα το πράσινο τσάι βρέθηκε να περιέχει περισσότερη C και σε υψηλότερη συγκέντρωσης από τα υπόλοιπα δείγματα.

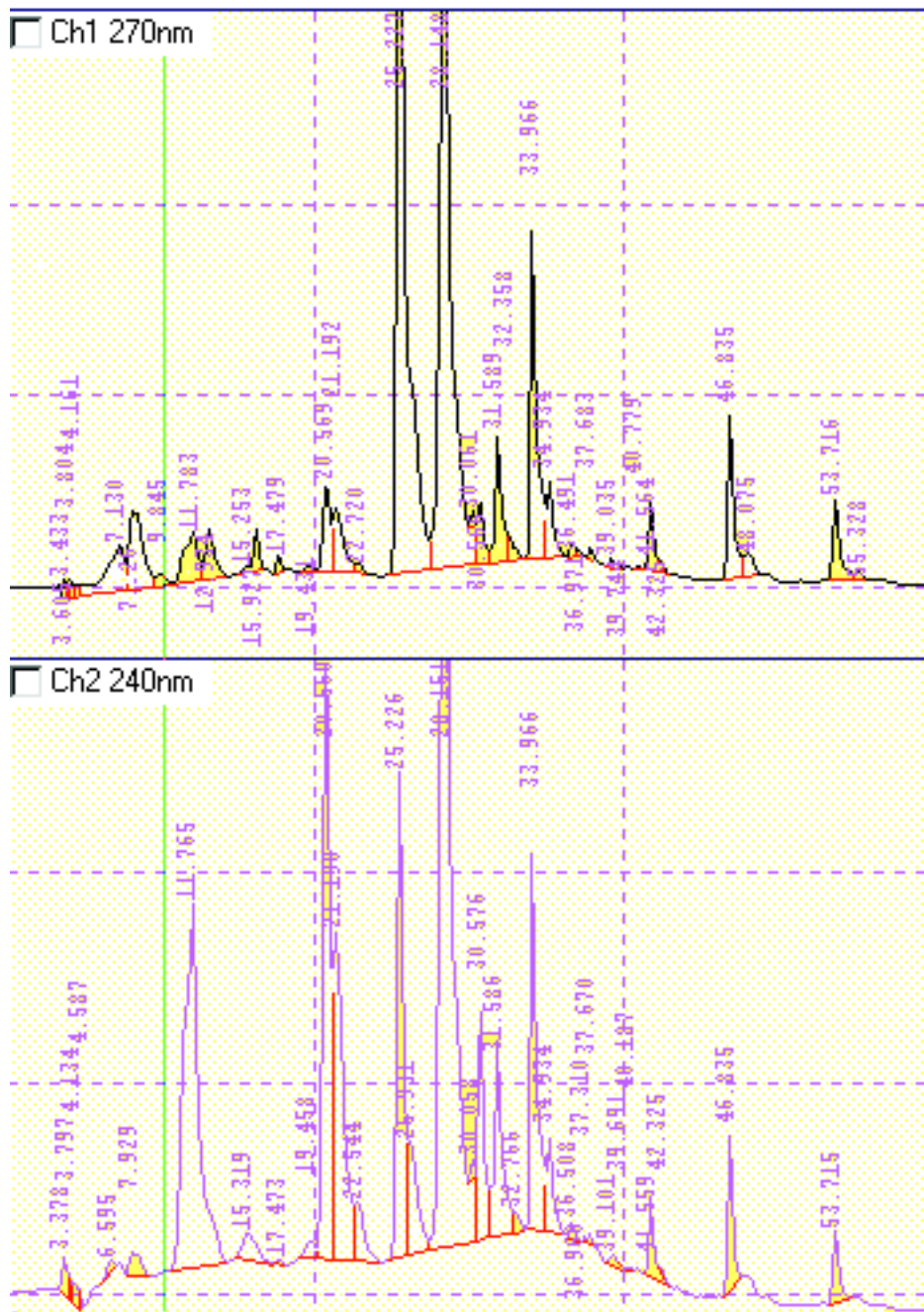
Στον πίνακα 11.2 περιέχονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης δειγμάτων πράσινου τσαγιού, τόσο πριν, όσο και μετά την υδρόλυσή τους, ενώ στα σχήματα 11.3 έως 11.6 απεικονίζονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα της συγκεκριμένης ανάλυσης. Ιδιαίτερα σημαντική σε αυτό το στάδιο θεωρείται η αναφορά στην προετοιμασία των στιγμιαίων ροφημάτων, αφού η αρχική εκχύλιση δεν ήταν απαραίτητη. Τα στιγμιαία ροφήματα υδρολύθηκαν απευθείας.

Πίνακας 11.2 . Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων πράσινου τσαγιού

Δείγμα	Μη- υδρολυμένο εκχύλισμα		Υδρολυμένο εκχύλισμα	
	Ένωση	Συγκέντρωση (µg/g)	Ένωση	Συγκέντρωση (µg/g)
Πράσινο τσάι εμπορίου 1 (mg/L)	GC	5,8	ECCG	1,8
	TB	2	Que	5
	EGC	7,6		
	Chlorogenic acid	0,6		

	EC	7,3		
Πράσινο τσάι εμπορίου 2 (mg/L)	GA	0,9	Que	11,8
	GC	5		
	C	4,6		
	ClGn	1,3		
	EC	9		
	EGCG	45		
Πράσινο τσάι εμπορίου 3 (mg/L)	EC	1	Kf	6,1
	ECG	2,3	Que	5,2
	My	2		
	EGCG	70		
Πράσινο τσάι εμπορίου 4	My	5,35	Kf	2,5
	CAF	171	Que	4,7
	EGCG	1,685	My	1,7
	EGC	370,4	EGCG	58,7
	GA	15	EGC	58,7
	TB	8,4	GA	3
	GC	28,2	TB	2,2
			EC	4,1
Πράσινο τσάι εμπορίου 5	GA	3,3	GA	2,8
	TB	3,6	TB	1,9
	CAF	105	Kf	2,5

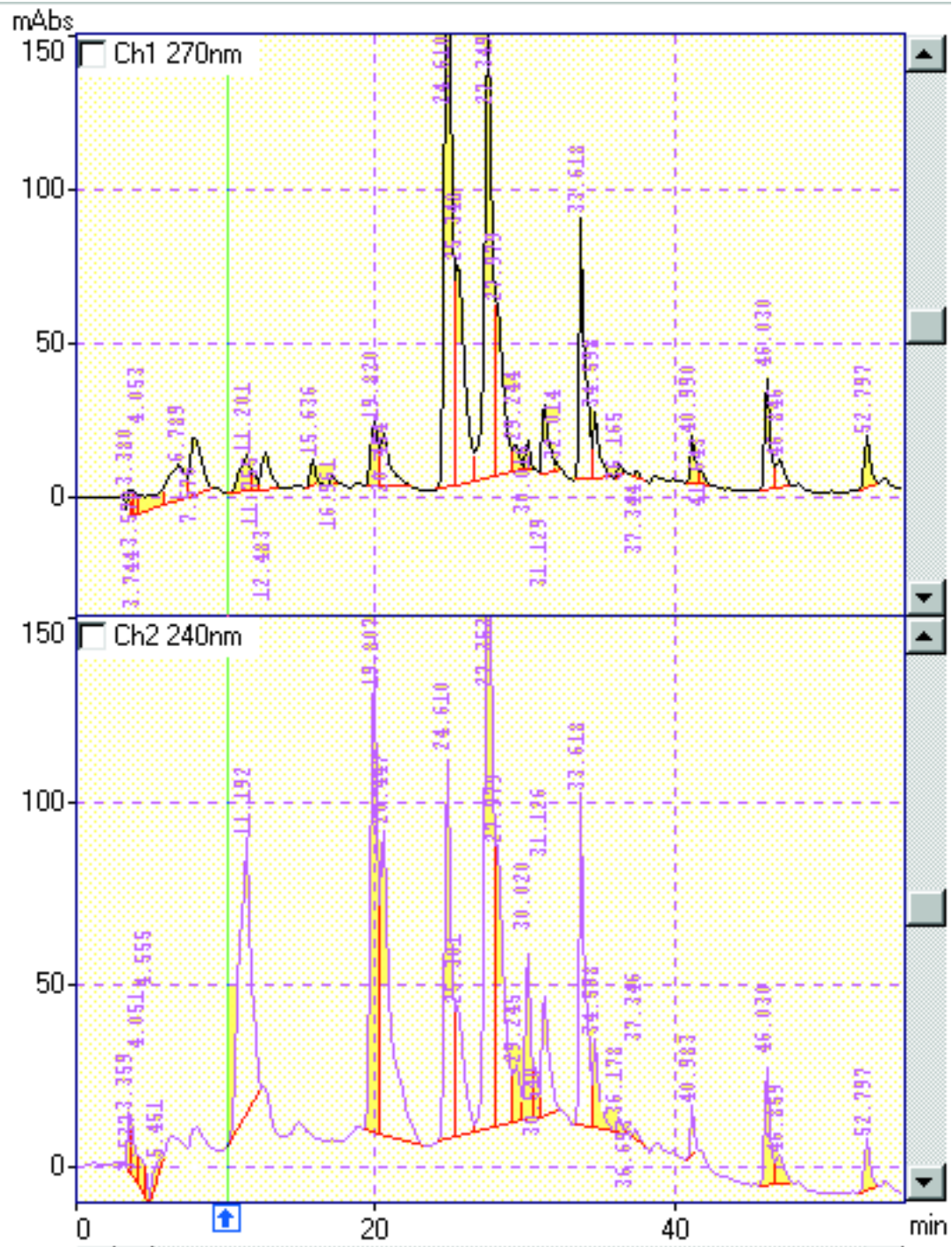
			Que	5,4
			My	1,8
			EC	4,8
			EGCG	686,3
			CAF	116,7



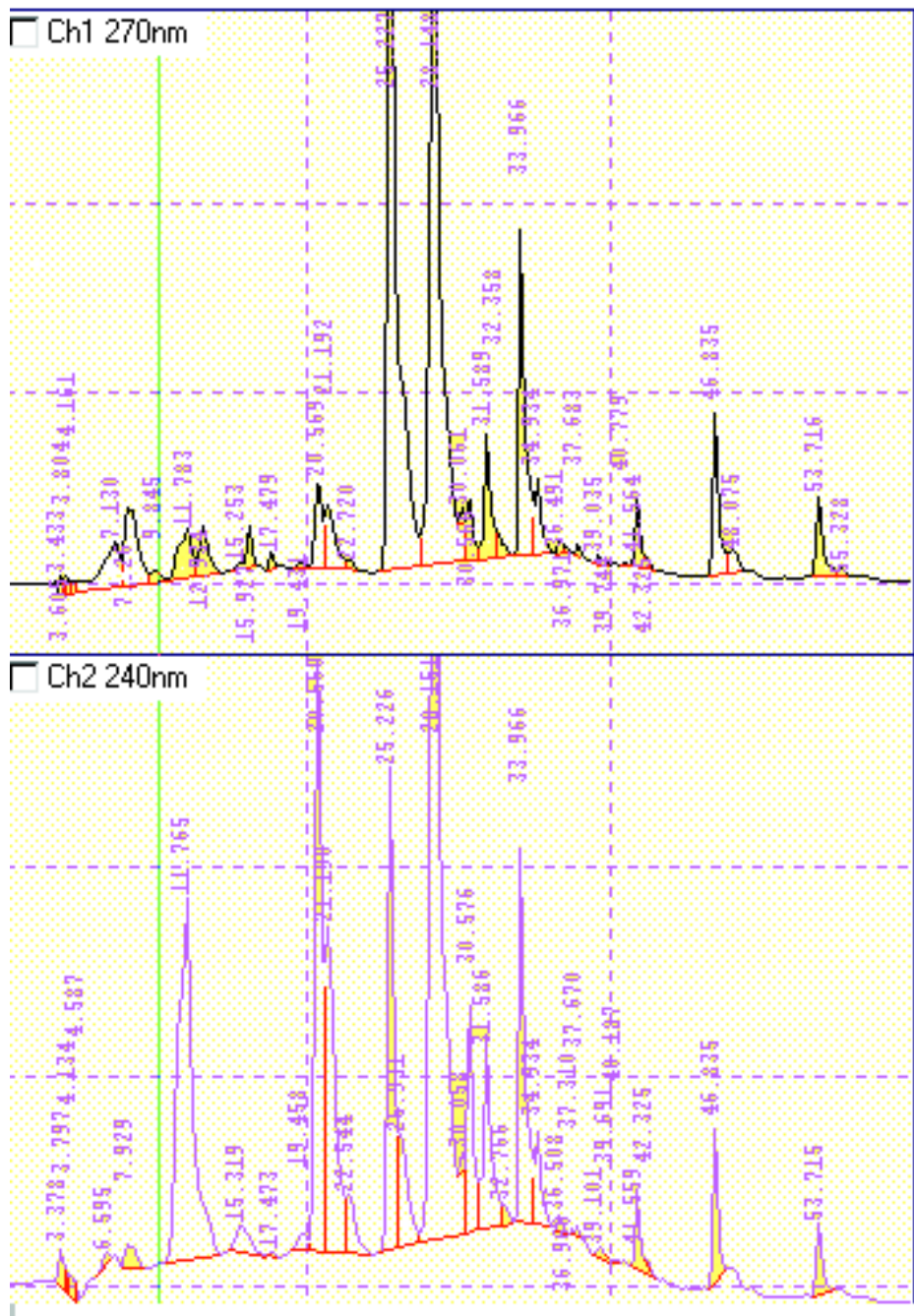
Σχήμα 11.3 . HPLC- DAD Χρωματογράφημα από πράσινο τσάι εμπορίου 1



Σχήμα 11.4- HPLC- DAD χρωματογράφημα από πράσινο τσάι εμπορίου 2



Σχήμα 11.5 . HPLC- DAD χρωματογράφημα πράσινου τσαγιού σε φακελάκι



Σχήμα 11.6. HPLC- DAD χρωματογράφημα στιγμιαίου ροφήματος πράσινου τσαγιού σε φιάλη

11.3 Μαύρο τσάι

Τα δείγματα μαύρου τσαγιού που αναλύθηκαν με την παρούσα μέθοδο ήταν σε στερεή μορφή. Στα εκχυλίσματά τους ανιχνεύθηκαν TB, ClGn, CAF και GA. Μετά την υδρόλυση, περισσότερες ενώσεις ήταν ανιχνεύσιμες συμπεριλαμβανομένων των TF, EC, ECG, Que, και Kf.

Η καφεΐνη που βρέθηκε στα δείγματα μαύρου τσαγιού ήταν σε αρκετά υψηλά επίπεδα, ενώ το συστατικό ClGn προσδιορίστηκε να έχει χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με τα βότανα *S. raeseri*, *S. scardiga* και *O. vulgare*.

Τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης των δειγμάτων μαύρου τσαγιού συνοψίζονται στον Πίνακα 11.3.

Πίνακας 11.3 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων μαύρου τσαγιού πριν και μετά την υδρόλυσή τους.

Δείγμα	Μη- υδρολυμένο εκχύλισμα		Υδρολυμένο εκχύλισμα	
	Ένωση	Συγκέντρωση (µg/g)	Ένωση	Συγκέντρωση (µg/g)
Δείγμα μαύρου τσαγιού εμπορίου	TB	1,8	GA	5,6
	Chlorogenic acid	0,6	TF	1,7
	CAF	108,4	ClGn	0,5
	GA	5,4	CAF	112,2
			EC	1
			ECG	1,5
			Que	2,9
		Kf	3,1	

11.4 Καφές

Τρία διαφορετικά είδη καφέ αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό πολυφαινολών με την παρούσα μέθοδο.

- Καφές φίλτρου
- Ελληνικός καφές
- Στιγμιαίος καφές

Πρέπει να αναφερθεί πως στην περίπτωση του στιγμιαίου καφέ υπήρχε η ένδειξη στην συσκευασία της υψηλής συγκέντρωσης σε φαινολικά συστατικά.

Στα δείγμα του καφέ φίλτρου ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν τα συστατικά ClGn, CAF και TB, ενώ οι GA και CAF ανιχνεύτηκαν μετά την υδρόλυση. Σε δείγμα ελληνικού καφέ βρέθηκαν ClGn και CAF, τόσο στα υδρολυμένα, όσο και μη στα υδρολυμένα εκχυλίσματα. Τέλος και όσον αφορά στον στιγμιαίο καφέ βρέθηκαν μόνο η CAF και το ClGn. Το συστατικό ClGn βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις σε όλα τα δείγματα καφέ.

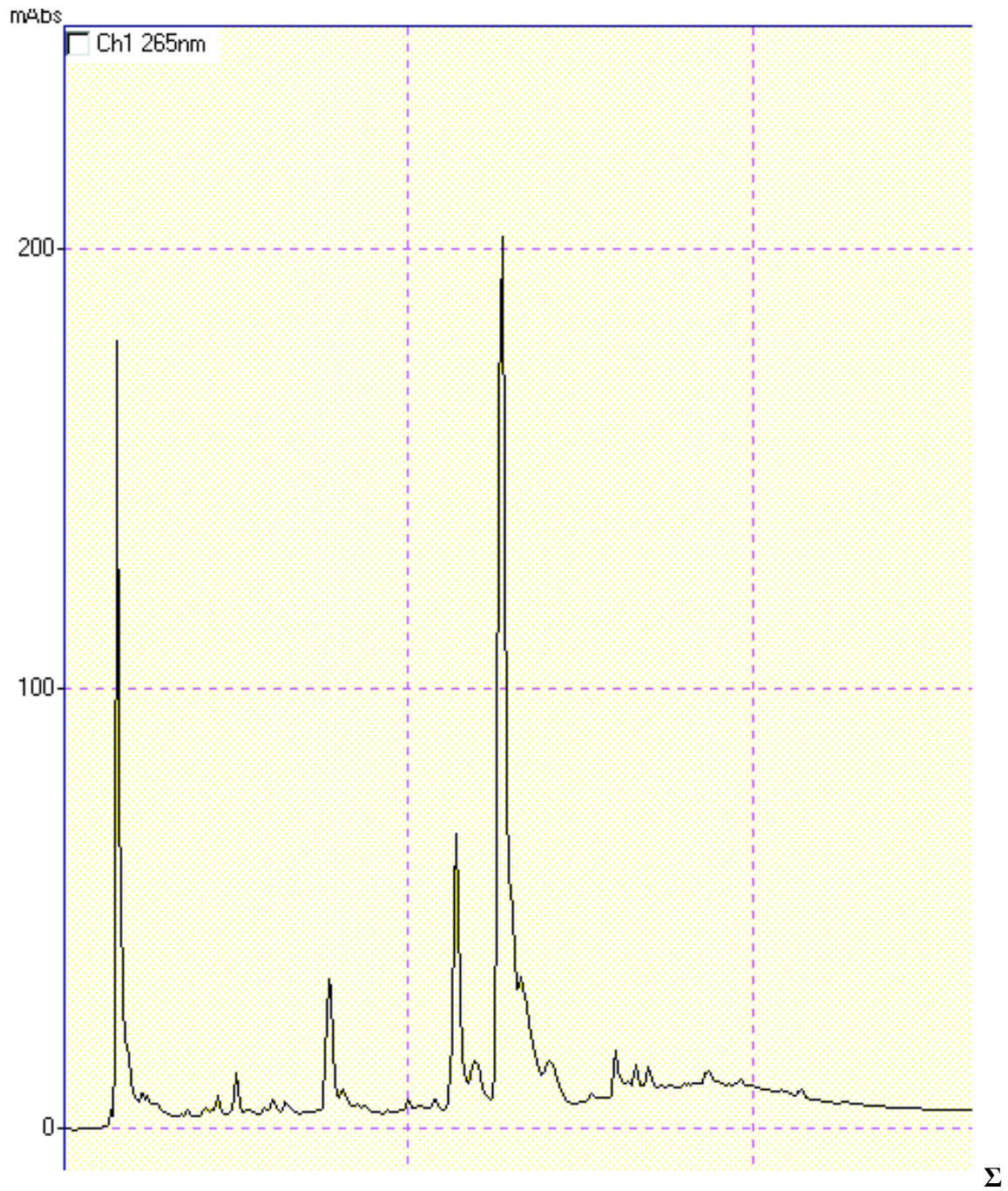
Τα αποτελέσματα της HPLC- DAD ανάλυσης των δειγμάτων καφέ συνοψίζονται στον Πίνακα 11.4.

Πίνακας 11.4. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων καφέ σε υδρολυμένα και μη εκχυλίσματα

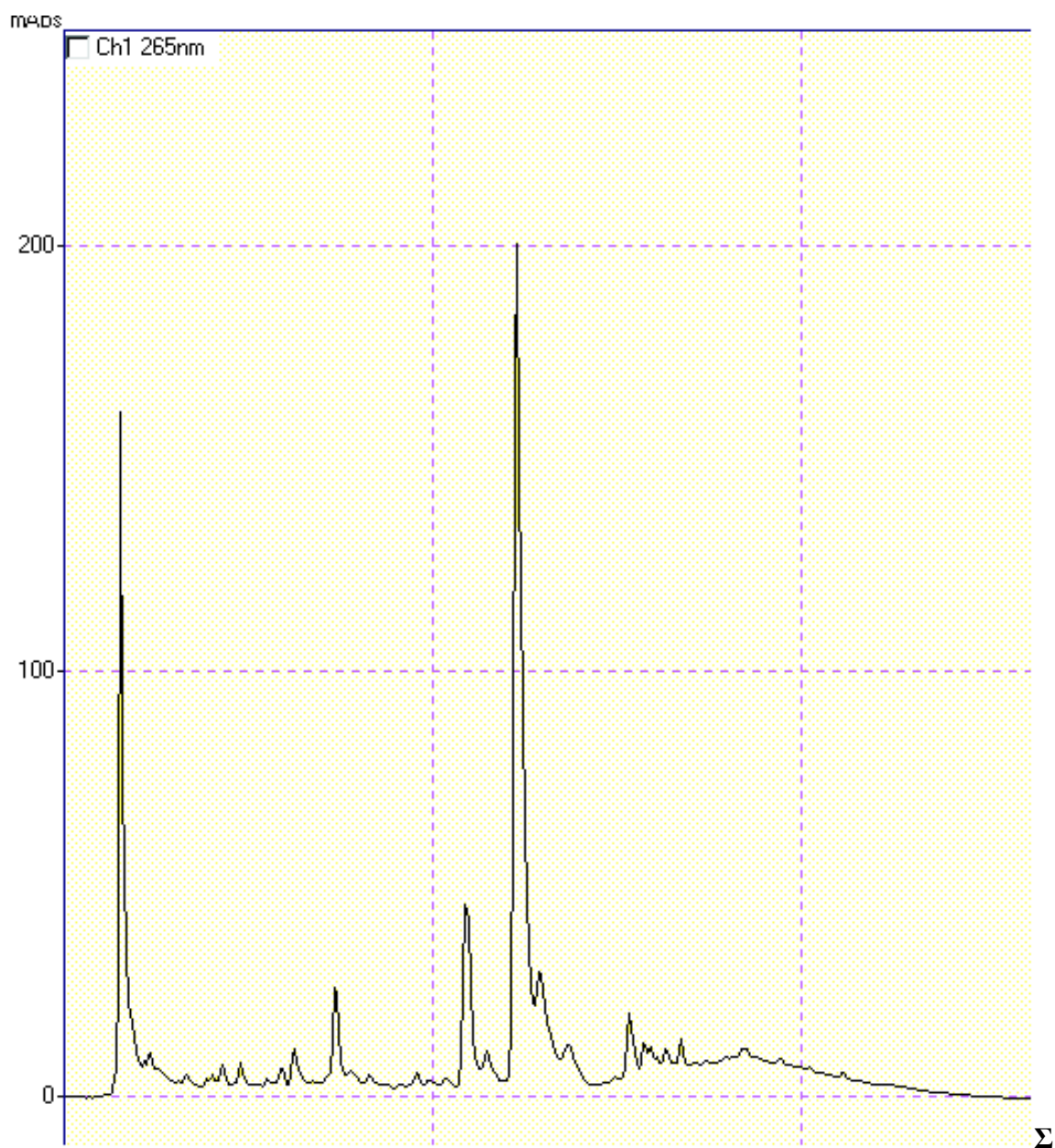
Δείγμα	Μη- υδρολυμένο εκχύλισμα		Υδρολυμένο εκχύλισμα	
	Ένωση	Συγκέντρωση (µg/g)	Ένωση	Συγκέντρωση (µg/g)
Ελληνικός καφές	ClGn	58,8	ClGn	53,35
	CAF	106,1	CAF	131,2

	EGCG	48,7		
Καφές φίλτρου	ClGn	38,3	GA	5,8
	CAF	101,4	CAF	149,64
	TB	2,6		
Στιγμαίος καφές	TB	1,6	GA	3,4
	ClGn	151,7	CAF	321
	CAF	285,2	EGCG	250,4
			ClGn	164,6

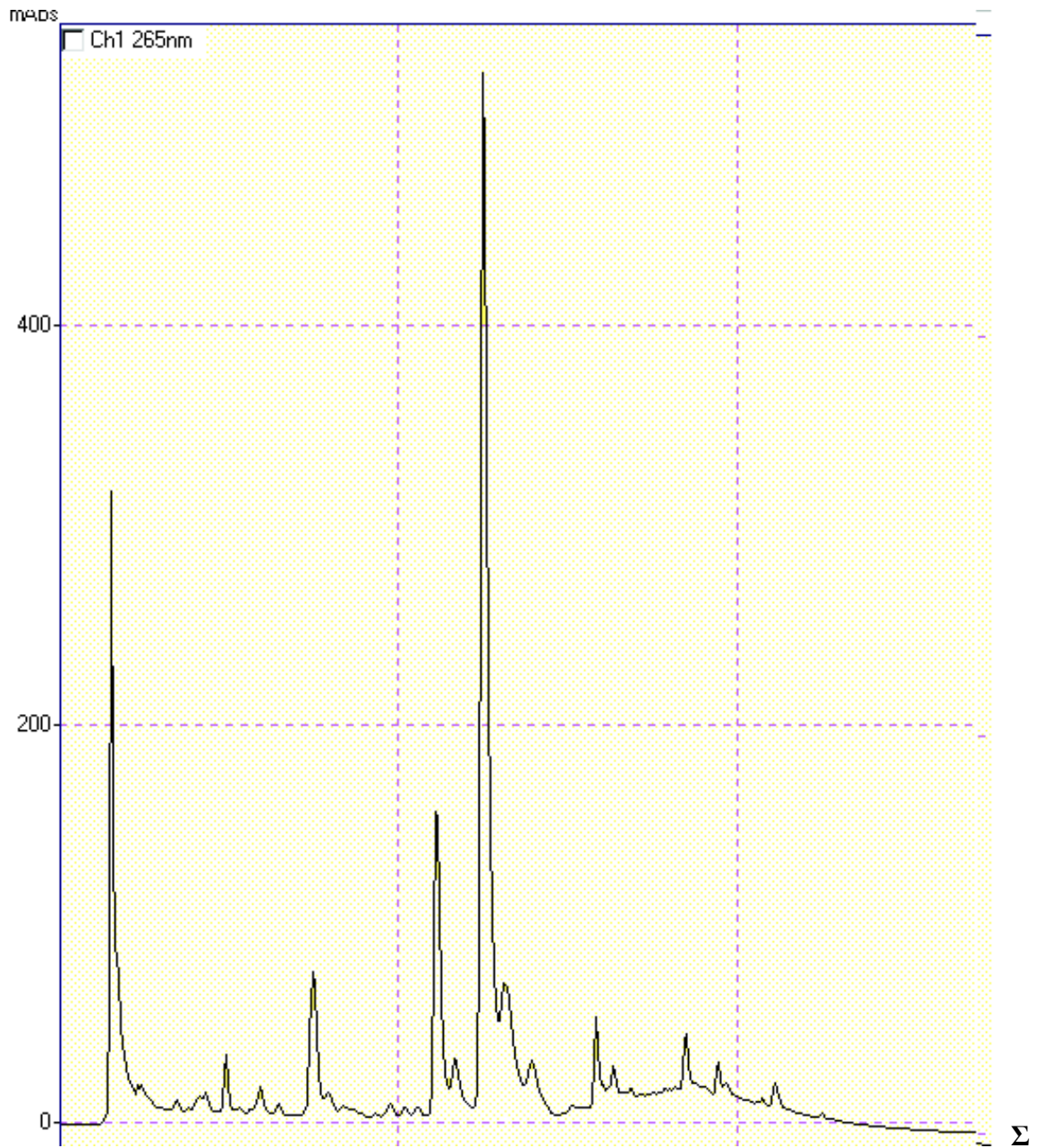
Στα σχήματα 11.7, 11.8, 11.9 παρατίθενται τα χρωματογραφήματα ελληνικού, γαλλικού και στιγμαίου καφέ αντίστοιχα από HPLC- DAD.



χήμα 11.7 . HPLC- DAD χρωματογράφημα δείγματος ελληνικού καφέ



χήμα 11.8. HPLC- DAD χρωματογράφημα δείγματος καφέ φίλτρου



χήμα 11.9 . HPLC- DAD χρωματογράφημα δείγματος στιγμιαίου καφέ

12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη μελέτη για πρώτη φορά μελετάται ο προσδιορισμός (ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση) των φαινολικών συστατικών στο ελληνικό τσάι του βουνού.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη μπορεί να χαρακτηριστεί ιδιαίτερα ευαίσθητη και ακριβής σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, ενώ ιδιαίτερα σημαντικό πλεονέκτημά της είναι η εφαρμογή της σε διαφορετικά δείγματα τσαγιού και βοτάνων διαφορετικού γένους, όσο και σε διαφορετικές ποικιλίες καφέ. Ταυτόχρονα, μέσω αυτής της μελέτης και μεθόδου, παραλήφθησαν χρωματογραφήματα με χρήση HPLC- DAD και 15 συστατικά (δείκτες) μπορούν να προσδιοριστούν κάτω από τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

Ιδιαίτερα σημαντική για την ανάλυση των προσδιοριζόμενων συστατικών συστατικών, θεωρείται η διαδικασία της υδρόλυσης παρουσία HCl, μετά την εφαρμογή της οποίας παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα υψηλές μεταβολές στις συγκεντρώσεις ορισμένων μόνο συστατικών .

Ο διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών επιτεύχθηκε με τη χρήση αναλυτικής στήλης PerfectSil Target ODS-3 HD 5- μ m (250 mm \times 4.6 mm id), ενώ η έκλουση έγινε βαθμωτά με κινητή φάση το ακόλουθο μίγμα MeOH: ACN (95:5% v/v) και CH₃COOH 0,01%. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 50 λεπτά, ενώ μετά από δοκιμές το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε είναι η παραξανθίνη. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή UV- DAD σε τέσσερα διαφορετικά μήκη κύματος 270, 240, 330 και 370 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προς ανάλυση ενώσεων έγινε με την τεχνική του εσωτερικού προτύπου.

Αρχικά η μέθοδος αναπτύχθηκε σε πρότυπα διαλύματα ενώσεων και επικυρώθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την ευαισθησία, την ακρίβεια και την πιστότητά της. Όσον αφορά στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, αυτά είναι ιδιαίτερα χαμηλά.

Ανακεφαλαιώνοντας λοιπόν, η μέθοδος που αναπτύχθηκε μπορεί να χαρακτηριστεί ως:

- Απλή
- Γρήγορη

- Ευαίσθητη
- Εκλεκτική
- Οικονομική
- Επιλήψιμη
- Εφαρμόσιμη σε μεγάλο εύρος δειγμάτων

Η εργασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές μελέτες για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων που μελετήθηκαν, καθώς και άλλων βοτάνων που καλλιεργούνται στην ελληνική γη.

13. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ταυτόχρονος προσδιορισμός πολυφαινολών και κύριων αλκαλοειδών πουρινών στο ελληνικό φυτό γένους *Sideritis*, σε ελαιώδη εκχυλίσματα, πρασινο τσάι, μαύρο τσάι και καφέ με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης- παράταξης φωτοδιόδων

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε και μελετήθηκε μια μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 15 φαινολικών αντιοξειδωτικών: φλαβον-3-όλης, (-)-επιγαλλοκατεχίνης, (+)-κατεχίνης, γαλλικού εστέρα (-)-επιγαλλοκατεχίνης, (-)-επικατεχίνης, γαλλικού εστέρα (-)-επικατεχίνης, (-) γαλλοκατεχίνης, ενός φαινολικού οξέος (γαλλικό οξύ), ενός υδροκινναμωμικού οξέος (χλωρογενικό οξύ), φλαβονών (απιγενίνη), φλαβονολών (καμφερόλη, κερκετίνη, και μυρικετίνη), και αλκαλοειδών πουρινών (καφεΐνη, θεοφυλλίνη, θεοβρωμίνη) σε διαφορετικά εκχυλίσματα βοτάνων, τσάι και ποικιλίες καφέ. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε επικυρώθηκε και εφαρμόστηκε με επιτυχία στον προσδιορισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του φυτού γένους *Sideritis*, γνωστό και ως ελληνικό τσάι του βουνού. Σύμφωνα με τα όσα είναι γνωστά έως σήμερα, αυτή είναι η πρώτη μελέτη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κατεχινών και άλλων πολυφαινολών στο ελληνικό τσάι του βουνού. Η όξινη υδρόλυση ήταν απαραίτητη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των άγλυκων προσδιοριζόμενων συστατικών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το χλωρογενικό οξύ, η μυρικετίνη, η απιγενίνη, η κατεχίνη και η επικατεχίνη γαλλικού εστέρα βρέθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν σε δείγματα του φυτού γένους *Sideritis*.

14 SUMMARY

Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek Sideritis species, herbal extracts, green tea, black tea and coffee by high-performance liquid chromatography- diode array detection

Herein, a high performance liquid chromatography- diode array detection method for the simultaneous determination of 15 phenolic antioxidants: flavan-3-ols, (-)-epigallocatechin, (+)-catechin, (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)gallocatechin, a phenolic acid (gallic acid), a hydrocyanic acid (chlorogenic acid), flavones (apigenin), flavonols (kaempferol, quercetin, and myricetin), and purine alkaloids (caffeine, theophylline, theobromine) in different herb extracts, tea, and coffee varieties. The developed method was validated and successfully applied in order to determine the polyphenolic content to estimate the antioxidant activity of the Sideritis species commonly known as Greek mountain tea. To the best of our knowledge this is the first report on the quantitative determination of catechins and other polyphenols in Greek mountain tea. Acidic hydrolysis was necessary for the simultaneous determination of the aglycones of the target analytes. According to our results, chlorogenic acid, myricetin, apigenin, catechin and epicatechin gallate are found in the Sideritis species.

15 Βιβλιογραφία

Ξένος, Κ. (2011, 02 09). *iatronet.gr 1999-2013*. Retrieved 01 15, 2013, from [iatronet.gr: www.iatronet.gr/article.asp?art_id=13980](http://www.iatronet.gr/article.asp?art_id=13980)

Γαβριέλη, Χ. *Φυσικοχημική και φαρμακολογική μελέτη του φυτού Sideritis raeseri*. Α.Π.Θ. Τμήμα Φαρμακευτικής, Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας. Α.Π.Θ.

http://www.iama.gr/ethno/sideritis/tsai_tou_vounou_files/Tsai_tou_vounou_Gavrieli_Xrisi.pdf

Σαμανίδου, Β., & Παπαδογιάννης, Ι. (2001). Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης. In Π. Ι.Ν., *Ενοργανη Χημική Ανάλυση* (pp. 263- 287). Θεσσαλονίκη: Πήγασος.

Παπαδογιάννης, Ι., & Σαμανίδου, Β. (2004). Σύγχρονες διαχωριστικές τεχνικές στην ενόργανη χημική ανάλυση. In Παπαδογιάννης, *Ενόργανη χημική ανάλυση*. Θεσσαλονίκη: Πήγασος.

Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* , 27- 36.

Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A* , 2505- 2512.

Boskou, D. (2006). Sources of natural phenolic antioxidant. *Trends in Food Science and Technology* , 505- 512.

Dalluge, J. J., Nelson, B. C., Brown Thomas, J., & Sander, L. C. (1998). Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* , 265- 274.

Engelhardt, U., Mander, L., & Lui, H. (2010). Authenticity of Caffeine Containing Beverages. *Natural products II Chemistry and Biology* , 999- 1032.

Friedman, M., Levin, C. E., Choi, S.-H., Kozukue, E., & Kozukue, N. (2006). HPLC Analysis of catechins teaflavins and alkaloids in commercial teas and green tea dietary supplements: Comparison of water and 80% ethanol water extracts. *Food Chemistry and Toxicology* , 328- 337.

- He, Q., Yuanping, L., Zhou, L., & Shi, B. (2010). Simultaneous determination of caffeine and catechins in tea extracts by HPLC. *Liquid Chromatography and Related Technologies* , 491-498.
- Hu, B., Wang, L., Zhou, B., Zhang, X., Sun, Y., Ye, H., et al. (2009). Efficient procedure for isolation methylated catechins from green tea and effective analysis of ten catechins three purine alkaloids and gallic acid in tea by high- performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A* , 3223- 3231.
- Jiang, G., & Zhang, T. (2010). *Quantitative Analysis of Catechins in Tea by HPLC/UV*. USA: Thermo Fisher Scientific.
- Konstadinova, E., Nikolova, D., Alipieva, K., Stefova, M., Stefkov, G., Evastieva, L., et al. (2010). Chemical constituents of the essential oils of *Sideritis scardica* Griseb and *Sideritis raeseri* From Bulgaria and Macedonia. *Natural Product Research* , 819-823.
- M.A., R., Manchon, N., D'Arrigo, M., Guillamon, E., Villares, A., Garcia, et al. (2011). Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high performance liquid chromatography used a fused- core column. *Analytica Chimica Acta* , 204- 211.
- Naczka, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits, and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 1523-1542.
- Patreska, J., Stefova, M., Ferreres, F., Moreno, D., Tomas- Barberan, F., Stefkov, G., et al. (2011). Potential bioactive phenolics of Macedonia *Sideritis* species used for medicinal "Mountain Tea". *Food Chemistry* , 13- 20.
- Pljevljakusic, D., Savikin, K., Jnkovic, T., Zdunic, G., Ristic, M., Godjevak, D., et al. (2011). Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. Heldr. subsp. *raeseri*. *Food Chemistry* , 226- 233.
- Rijke, E. d., Out, P., Wilfried, N. M., Freek, A., Cees, G., & Udo, B. A. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* , 31-63.

Serranillos, P. G., Palomino, O., Villarubia, A., Cases, M., Carretero, E., & Villar, A. (1997). Analysis of diterpenoids from *Sideritis* species by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* , 421- 425.

Souza, M.-d., Alencar, S., Regitano-d'Arce, M., & Oldoni, T. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Cienc. Tecnol. Aliment.* , 1135- 8122.

Tura, D., & Robards, K. (2002). Sample handling strategies for the determination of biphenols in food and plants. *Journal of Chromatography A* , 71-93.

Vuong, Q. V. (2010). Extraction and isolation of catechins from tea. *J. Sep. Sci.* , 3415-3428.

Vuong, Q. V., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2011). Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *Separation Science* , 3099- 3106.

Zeeb, D. J., Nelson, B. C., Albert, K., & Dalluge, J. J. (2000). Separation and Identification of twelve catechins in Tea using Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionization- Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* , 5020- 5026.



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης