



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Συγκριτική Μελέτη Αφεψημάτων και Εγχυμάτων Ελληνικών
Ποικιλιών Βοτάνων με Αναλυτικές Προσεγγίσεις**

**ΤΣΙΓΚΡΙΜΑΝΗ ΔΙΑΜΑΝΤΙΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Συγκριτική Μελέτη Αφεισημάτων και Εγχυμάτων Ελληνικών Ποικιλιών Βοτάνων με
Αναλυτικές Προσεγγίσεις

ΤΣΙΓΚΡΙΜΑΝΗ ΔΙΑΜΑΝΤΙΝΑ

A.M.: 51302

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Προεστός Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΡΚΑΚΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Τμήμα Χημείας

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

.....

ΠΡΟΕΣΤΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΗΣ

Τμήμα Χημείας

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

.....

ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Γ'

Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

.....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 21/10/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί συγκριτική μελέτη του τρόπου και του χρόνου επεξεργασίας βοτάνων για την πρόσληψη μεγαλύτερης ποσότητας φαινολικών συστατικών και πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθήνας (Ε.Κ.Π.Α.), του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε.) και του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος (Τ.Ε.Ι.) Αθήνας. Για τη μελέτη αυτή αναλύθηκαν δέκα βότανα ελληνικής καλλιέργειας *Matricaria chamomilla* (χαμομήλι), *Echinacea purpurea* (εχινάκεια), *Lippia citriodora* (λουΐζα), *Menta pulegium* (φλισκούνι), *Mentha spicata* (δύσμος), *Origanum majorana* (μαντζουράνα), *Origanum vulgare* (ρίγανη), *Thymus capitatus* (θυμάρι), *Hypericum perforatum* (σπαθόχορτο) και *Hippophae rhamnoides* (ιπποφαές). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με χρήση φασματοφωτομετρικών αναλύσεων, μεταβολομικής με εφαρμογή φασματοσκοπίας NMR και τέλος, υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (HPLC-ESI-MSⁿ). Ο πρωταρχικός στόχος ήταν να προσδιοριστεί η βέλτιστη διαδικασία επεξεργασίας όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις που παραλαμβάνονται. Παράλληλα στόχος ήταν η ανάδειξη των πλουσιότερων ποικιλιών βοτάνων σε φαινολικές ενώσεις.. η Η αντιριζική και η αντιοξειδωτική ικανότητα των σκευασμάτων εκτιμήθηκαν με τις αναλύσεις DPPH, ABTS και FRAP, ενώ με την μέθοδο Folin-Ciocalteu προσδιορίστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των παρασκευασμάτων. Η μεταβολομική με εφαρμογή φασματοσκοπίας NMR, επισήμανε τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων για κάθε παρασκεύασμα. Επιπρόσθετα, με την ανάπτυξη μεθόδου HPLC-MSⁿ πρότυπων ενώσεων πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων. Τόσο το φαινολικό προφίλ, όπως εκφράζεται και από τις αναλυτικές μεθόδους, καθώς και η αντιριζική ικανότητα, πιστοποιούνται με τις υψηλότερες τιμές στα εγχύματα συγκριτικά με τα αφεψήματα. Τέλος εξετάστηκε ο χρόνος παραμονής αναδεικνύοντας ότι τα αφεψήματα των 15 λεπτών ήταν πιο πλούσια σε φαινολικές ενώσεις κάτι που θα μπορούσε να αποδοθεί σε περαιτέρω απελευθέρωση άγλυκων δομών λόγω της παρατεταμένης θερμικής επεξεργασίας.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Χημεία Τροφίμων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Βότανα, Αντιοξειδωτικά, Φαινολικό Περιεχόμενο, NMR Μεταβολομική, HPLC-MS, Αφέψημα, Έγχυμα

ABSTRACT

This is a comparative study and conducted in cooperation of the National University of Athens (UOA), the National Hellenic Research Foundation and the Food Technology Department of the Technological Educational Institute of Athens in order to put under the scope infusions and decoctions of 10 Greek herbal species, namely *Matricaria chamomilla*, *Echinacea purpurea*, *Lippia citriodora*, *Menta pulegium*, *Mentha spicata*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Thymus capitatus*, *Hypericum perforatum* and *Hippophae rhamnoides*. This study implements NMR metabolomics, HPLC/MS analysis and spectrophotometric studies. The primary objective was to determine whether the metabolic profile of each preparation is capable to characterize it and what exactly indicate. Moreover, the antioxidant and antiradical profiles of the preparations were assessed with the DPPH, FRAP and the ABTS assays, while the Folin-Ciocalteu assay evaluated the total phenolic content of the different preparations. PCA-class and OPLS-DA models highlighted the differences among the samples and pinpointed specific classes of compounds for each preparation. Both the phenolic profile, as expressed by the three analytical methods and the antiradical capacity, evidenced by higher values in infusions compared to beverages. The time factor was examined for the preparation of decoctions and the 15 min preparation was generally found rich in phenols of higher antioxidant capacity which could be attributed to further release of the aglycon structures due to extended heat treatment.

SUBJECT AREA: Food Chemistry

KEYWORDS: Herbs, Antioxidant, Antiradical, Phenolic content, NMR metabolomics, HPLC-MS, Infusions; Decoctions

*Στους γονείς μου, Γιάννη και Γιωργία,
στην αδέρφή μου Μαρκέλα*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., στα εργαστήρια του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και στο Εργαστήριο Ενόργανης Χημείας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Αθηνών.

Επιβλέπων της εν λόγω ερευνητικής εργασίας ήταν ο κ. Χαράλαμπος Προεστός, Επίκουρος Καθηγητής του Ε.Κ.Π.Α., τον οποίον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκτέλεσης της εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Γ στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, για την άριστη συνεργασία, καθοδήγηση και επίβλεψη κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης. Επιπλέον, ευχαριστώ την κα Βασιλεία Σινάνογλου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τ.Ε.Ι. Αθηνών, για την άμεση βοήθεια και τη σημαντική συμβολή της στην εκπόνηση της εν λόγω εργασίας καθώς και την κα Στρατή Ειρήνη, Εργαστηριακή Συνεργάτη, για τη βοήθεια της. Ακόμη, ευχαριστώ την κα Παναγιώτα Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Ε.Κ.Π.Α., ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Σιάπη Ελένη, Ειδική Τεχνική Επιστήμονα, τον διδάκτορα κ. Χαράλαμφο Φωτάκη και τις υποψηφίους διδάκτορες κα. Θάλεια Τσιάκα και κα Δήμητρα Λαντζουράκη καθώς και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κωνσταντίνο Μακρή και Δήμητρα Ταγκούλη για το άψογο κλίμα συνεργασίας και τη συνεισφορά τους στις πειραματικές εργασίες και μαζί με τα υπόλοιπα μέλη του εργαστήρια του Ε.Ι.Ε, Μαρία Ζερβού, Κωνσταντίνο Ποταμίτη, Αικατερίνη Κόκκοτου, Ευτυχία Κρίση, Παράσχο Χριστοδούλου και Χαρίλαο Αλκενάρη για το ενδιαφέρον και τη βοήθεια τους.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ελένη Ντουμπάκη, τον Αναστάσιο Καρτελιά, τη Μαρία Σφέτσα και Εμμανουήλ Τσιάμη για την αμέριστη συμπαράσταση και ενθάρρυνσή τους σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου προγράμματος. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Γιάννη και Γιωργία και την αδερφή μου Μαρκέλα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	19
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	20
2.1 Η επίδραση της γεωφυσικής θέσης της Ελλάδας στη χλωρίδα	20
2.2 Τι είναι βότανα.....	20
2.3 Ιστορία	20
2.4 Ο ρόλος των βοτάνων στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων	21
2.5 Οικονομική αξιοποίηση και ο ρόλος των βοτάνων στην ανάπτυξη.....	22
2.6 Βιοδραστικές ενώσεις από βότανα και η δράση τους.....	24
2.7 Παρασκευάσματα από βότανα	26
2.8 Δέκα βότανα της Ελληνικής χλωρίδας	28
2.8.1 Χαμομήλι	28
2.8.2 Εχινάκεια	29
2.8.3 Λουΐζα.....	30
2.8.4 Φλισκούρι.....	31
2.8.5 Δυόσμος	32
2.8.6 Μαντζουράνα.....	33
2.8.7 Ρίγανη.....	35
2.8.8 Θυμάρι.....	36
2.8.9 Σπαθόχορτο.....	37
2.8.10 Ιπποφαές.....	39
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ — ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	41
3.1 Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις	41
3.1.1 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης / ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH• (2,2 diphenyl-1-picryl-hydrazyl)	41

3.1.2	Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS●+ [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]	42
3.1.3	Ανάλυση με τη μέθοδο αναγωγικής δύναμης του σιδήρου (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP).....	43
3.1.4	Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu.....	43
3.2	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός(NMR)	44
3.2.1	Εισαγωγή.....	44
3.2.2	Βασικές αρχές φασματοσκοπίας NMR.....	45
3.2.3	Χημική Μετατόπιση.....	47
3.2.4	Σταθερά Σύζευξης.....	48
3.2.5	Κύρια μέρη ενός συστήματος για τη λήψη φασμάτων NMR	49
3.2.6	Φασματοσκοπία πρωτονίου μίας διάστασης (1H-NMR).....	50
3.2.7	Παλμική Ακολουθία NOESYPRESAT	50
3.3	Μεταβολομική μελέτη	51
3.3.1	Χημειομετρία.....	52
3.3.2	SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy)	53
3.4	Ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS).....	54
3.4.1	Εισαγωγή.....	54
3.4.2	Μηχανισμός διαχωρισμού.....	55
3.4.3	Χρωματογραφικές παράμετροι.....	56
3.4.4	Φασματομετρία μάζας και προσδιορισμός μοριακών μαζών	59
3.4.5	Σύζευξη Υγρής χρωματογραφίας με Φασματομετρία μάζας.....	61
3.4.6	Φασματομετρία μαζών σε σειρά (TandemMS).....	61
3.4.7	Ταυτοποίηση και μελέτη δομής	62

3.4.8	Τμήματα οργάνου LC/Ms	62
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	70
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	71
5.1	Πειραματική Πορεία	71
5.2	Αναλώσιμα, διαλύτες και πρότυπες ουσίες	71
5.3	Συσκευές και όργανα ανάλυσης	74
5.4	Επεξεργασία δειγμάτων	75
5.5	Φασματοφωτομετρικές τεχνικές ανάλυσης	77
5.5.1	Μέθοδος εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH [•] (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)	78
5.5.2	Μέθοδος εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας ABTS ^{•+} [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]	79
5.5.3	Ανάλυση με τη μέθοδο αναγωγικής δύναμης του σιδήρου (ferric reducing antioxidant power, FRAP)	80
5.5.4	Μέθοδος Folin-Ciocalteu για υπολογισμό του συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC)	80
5.6	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)	81
5.6.1	Προετοιμασία δείγματος	81
5.6.2	¹ H NMR παράμετροι	82
5.6.3	Φασματοσκοπία πρωτονίου μίας διάστασης (¹ H NMR)	82
5.6.4	Παλμική Ακολουθία NOESYPRESAT	83
5.7	Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχικές θραυσματοποιήσεις (MS ⁿ) (HPLC–ESI–MS ⁿ) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών	83
5.7.1	Προετοιμασία πρότυπων ενώσεων και δειγμάτων για ανάλυση	83
5.7.2	Επιλογή συνθηκών HPLC-ESI-MS	84

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	91
6.1 Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις δειγμάτων	91
6.1.1 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH• (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)	91
6.1.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS•+ [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]	93
6.1.3 Εκτίμηση αναγωγικής δύναμης του σιδήρου (ferric reducing antioxidant power, FRAP)	96
6.1.4 Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu.....	98
6.1.5 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων φασματοφωτομετρικών μεθόδων.....	101
6.2 Παράθεση αποτελεσμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	102
6.3 Ανάλυση με Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχικές θραυσματοποιήσεις (MS ⁿ) (HPLC–ESI–MS ⁿ) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων	109
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	117
8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	119

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1	ΕΚΤΑΡΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ ΓΙΑ ΤΑ ΕΤΗ 2007-2014 ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ Υ.Π.Α.Π.ΕΝ. .	23
ΣΧΗΜΑ 2	ΕΙΣΠΡΑΞΕΙΣ ΕΞΑΓΩΓΩΝ (€) ΕΝΤΟΣ ΚΑΙ ΕΚΤΟΣ Ε.Ε. ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ EUROSTAT	24
ΣΧΗΜΑ 3	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	92
ΣΧΗΜΑ 4	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΝΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΡΙΖΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ DPPH.....	93
ΣΧΗΜΑ 5	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΡΟΛΟΧ	94
ΣΧΗΜΑ 6	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΝΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ABTS	95
ΣΧΗΜΑ 7	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΡΤΖ	97
ΣΧΗΜΑ 8	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ	98
ΣΧΗΜΑ 9	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	99
ΣΧΗΜΑ 10	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΟΛΙΚΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ.....	100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1 <i>MATRICARIA CHAMOMILLA</i>	28
ΕΙΚΟΝΑ 2 <i>ECHINACEA PURPUREA</i>	29
ΕΙΚΟΝΑ 3 <i>LIPPIA CITRIODORA</i>	30
ΕΙΚΟΝΑ 4 <i>MENTHA PULEGIUM</i>	31
ΕΙΚΟΝΑ 5 <i>MENTHA SPICATA</i>	32
ΕΙΚΟΝΑ 6 <i>ORIGANUM MAJORANA</i>	33
ΕΙΚΟΝΑ 7 <i>ORIGANUM VULGARE</i>	35
ΕΙΚΟΝΑ 8 <i>THYMUS CAPITATUS</i>	36
ΕΙΚΟΝΑ 9 <i>HYPERICUM PERFORATUM</i>	37
ΕΙΚΟΝΑ 10 <i>HIPPOPHAE RHAMNOIDES</i>	39
ΕΙΚΟΝΑ 11 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ DRPH● ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΟΦΑ ΣΤΑ 516 ΝΜ	41
ΕΙΚΟΝΑ 12 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΑΒΤS●+ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΟΦΑ ΣΤΑ 734 ΝΜ	42
ΕΙΚΟΝΑ 13 ΑΝΑΓΩΓΗ ΣΙΔΗΡΟΥ	43
ΕΙΚΟΝΑ 14 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ F–C ΜΕΣΩ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΕΝΟΣ E ⁻²¹	44
ΕΙΚΟΝΑ 15 ΑΥΤΕΣ ΟΙ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΡΟΠΗΣ, ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΣΧΗΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΝΟΣ ΠΥΡΗΝΑ ΜΕ SPIN ½	46
ΕΙΚΟΝΑ 16 ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (3E) ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ SPIN ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΜΕΝΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ	46
ΕΙΚΟΝΑ 17 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ	49
ΕΙΚΟΝΑ 18 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΟΙΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	52
ΕΙΚΟΝΑ 19 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΣΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	55
ΕΙΚΟΝΑ 20 ΧΡΟΝΟΙ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ	56
ΕΙΚΟΝΑ 21 ΕΥΡΟΣ ΚΟΡΥΦΗΣ	57
ΕΙΚΟΝΑ 22 LCQ FLEET ION TRAP MS ^N , THERMO FISHER SCIENTIFIC (UK).....	63
ΕΙΚΟΝΑ 23 ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΨΕΚΑΣΜΟΥ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ	65
ΕΙΚΟΝΑ 24 ΠΑΓΙΔΑ ΙΟΝΤΩΝ	66
ΕΙΚΟΝΑ 25 (Α) ΣΧΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ, (Β) ΣΧΗΜΑ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΗ ΤΡΟΜΠΕΤΑΣ	68
ΕΙΚΟΝΑ 26 ΛΗΨΗ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ¹ H NMR	82
ΕΙΚΟΝΑ 27 Η ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ NOESYPRESAT	83
ΕΙΚΟΝΑ 28 HPLC ΦΑΣΜΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ 40 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΝΕΡΟ-ΜΕΘΑΝΟΛΗ.....	85
ΕΙΚΟΝΑ 29 HPLC ΦΑΣΜΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ 40 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΝΕΡΟ-ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ.....	85
ΕΙΚΟΝΑ 30 HPLC ΦΑΣΜΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ 40 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ-ΝΕΡΟ ΠΑΡΟΥΣΙΑ 0,1% ΚΑΙ 0,2% ΜΥΡΜΗΚΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ	86

ΕΙΚΟΝΑ 31 HPLC ΦΑΣΜΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ 40 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ-ΝΕΡΟ ΠΑΡΟΥΣΙΑ 0,1% ΚΑΙ 0,2% ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ	86
ΕΙΚΟΝΑ 32 HPLC ΦΑΣΜΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ 40 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ ΜΕ 0,1% ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΝΕΡΟ 0,2% ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	87
ΕΙΚΟΝΑ 33 ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ ΣΤΑ 1-7 ΛΕΠΤΑ HPLC ΦΑΣΜΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ 40 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ ΜΕ 0,1% ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΝΕΡΟ 0,2% ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	88
ΕΙΚΟΝΑ 34 ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ ΣΤΑ 11-14 ΛΕΠΤΑ HPLC ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ 40 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ ΜΕ 0,1% ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΝΕΡΟ 0,2% ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	88
ΕΙΚΟΝΑ 35 HPLC ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ 40 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΕ ΜΑΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ ΝΕΡΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ ΜΕ 0,1% ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΝΕΡΟ 0,2% ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	89
ΕΙΚΟΝΑ 36 ΥΠΕΡΟΞΗΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ 1H NMR ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΙΣ ΤΡΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΠΟ ΤΗ <i>MENTA SPICATA</i>	103
ΕΙΚΟΝΑ 37 NMR ΦΑΣΜΑΤΑ 3-6 PPM ΑΦΕΨΗΜΑΤΩΝ 2 ΚΑΙ 15 ΛΕΠΤΩΝ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ <i>HIPPOPHAE RHAMNOIDES</i>	104
ΕΙΚΟΝΑ 38 NMR ΦΑΣΜΑΤΑ 6-8 PPM ΕΓΧΥΜΑΤΩΝ 15 ΛΕΠΤΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ <i>MENTHA SPICATA</i> ΚΑΙ <i>MATRICARIA CHAMOMILLA</i>	104
ΕΙΚΟΝΑ 39 PCA ΜΟΝΤΕΛΟ, A=2, N=59, $R^2X(CUM)=0,43$, $Q^2(CUM)=0,32$. ΆΔΕΙΟΣ ΚΥΚΛΟΣ: ΑΦΕΨΗΜΑ 2 ΛΕΠΤΩΝ. ΓΕΜΑΤΟΣ ΚΥΚΛΟΣ: ΑΦΕΨΗΜΑ 15 ΛΕΠΤΩΝ. ΤΡΙΓΩΝΟ: ΕΓΧΥΜΑ 15 ΛΕΠΤΩΝ. 1= <i>MATRICARIA CHAMOMILLA</i> , 2= <i>ECHINACEA PURPUREA</i> , 3= <i>LIPPIA CITRIODORA</i> , 4= <i>MENTA PULEGIUM</i> , 5= <i>MENTHA SPICATA</i> , 6= <i>ORIGANUM MAJORANA</i> , 7= <i>ORIGANUM VULGARE</i> , 8= <i>THYMUS CAPITATUS</i> , 9= <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> , 10= <i>HIPPOPHAE RHAMNOIDES</i>	105
ΕΙΚΟΝΑ 40 PCA-CLASS MODELS, PAR SCALED, A= 2, N=6. (A) <i>MATRICARIA CHAMOMILLA</i> , $R^2X(CUM)= 0.95$, $Q^2(CUM)= 0.91$; (B) <i>ECHINACEA PURPUREA</i> , $R^2X(CUM)= 0.85$, $Q^2(CUM)= 0.58$; (C) <i>MENTA PULEGIUM</i> , $R^2X(CUM)= 0.77$, $Q^2(CUM)= 0.42$; (D) <i>MENTHA SPICATA</i> , $R^2X(CUM)= 0.85$, $Q^2(CUM)= 0.669$; (E) <i>ORIGANUM MAJORANA</i> , $R^2X(CUM)= 0.81$, $Q^2(CUM)= 0.54$; (F) <i>ORIGANUM VULGARE</i> , $R^2X(CUM)= 0.72$, $Q^2(CUM)= 0.51$; (G) <i>THYMUS CAPITATUS</i> , $R^2X(CUM)= 0.69$, $Q^2(CUM)= 0.37$; (H) <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> , $R^2X(CUM)= 0.86$, $Q^2(CUM)= 0.67$	107
ΕΙΚΟΝΑ 41 PCA-CLASS ΜΟΝΤΕΛΑ, PAR SCALED, A=2, N=6. (A) <i>LIPPIA CITRIODORA</i> $R^2X(CUM)= 0.95$, $Q^2(CUM)= 0.91$, (B) <i>HIPPOPHAE RHAMNOIDES</i> $R^2X(CUM)= 0.72$, $Q^2(CUM)= 0.42$	108
ΕΙΚΟΝΑ 42 HPLC ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΑ MS-MS/MS ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΕΧΙΝΗΣ	110
ΕΙΚΟΝΑ 43 HPLC ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΦΕΨΗΜΑΤΩΝ 15 ΛΕΠΤΩΝ ΤΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ <i>MATRICARIA CHAMOMILLA</i> , <i>ECHINACEA PURPUREA</i> , <i>LIPPIA CITRIODORA</i> , <i>MENTA PULEGIUM</i> ΚΑΙ <i>MENTA SPICATA</i> ΣΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ 4000PPM.....	113
ΕΙΚΟΝΑ 44 HPLC ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΦΕΨΗΜΑΤΩΝ 15 ΛΕΠΤΩΝ ΤΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ <i>ORIGANUM MAJORANA</i> , <i>ORIGANUM VULGARE</i> , <i>THYMUS CAPITATUS</i> , <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> ΚΑΙ <i>HIPPOPHAE RHAMNOIDES</i> ΣΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ 4000PPM	113

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΠΙΝΑΚΑΣ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	76
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ HPLC ΚΑΙ Η ΡΟΗ ΤΟΥΣ	89
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΟΡΙΣΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΡΝΗΤΙΚΟ (ESI ⁻) ΙΟΝΤΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	90
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ	91
ΠΙΝΑΚΑΣ 5 ΑΝΤΙΡΙΖΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ ΕΚΦΡΑΣΜΕΝΑ ΣΕ ΜG ΙΣΟΔΥΝΑΜΩΝ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΝΑ 100ML ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	92
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 ΤΙΜΕΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΡΟΛΟΧ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ.....	94
ΠΙΝΑΚΑΣ 7 ΑΝΤΙΡΙΖΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ ΕΚΦΡΑΣΜΕΝΑ ΣΕ ΜG ΙΣΟΔΥΝΑΜΩΝ ΤΡΟΛΟΧ ΑΝΑ 100ML ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	95
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 ΤΙΜΕΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΡΤΖ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ.....	96
ΠΙΝΑΚΑΣ 9 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ Fe(III).....	97
ΠΙΝΑΚΑΣ 10 ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	99
ΠΙΝΑΚΑΣ 11 ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ	100
ΠΙΝΑΚΑΣ 12 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	111
ΠΙΝΑΚΑΣ 13 ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΗΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΣΤΑ ΑΦΕΨΗΜΑΤΑ ΤΩΝ 15 ΛΕΠΤΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ Η ΑΠΟ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	115
ΠΙΝΑΚΑΣ 14 ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΗΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΣΤΑ ΑΦΕΨΗΜΑΤΑ ΤΩΝ 15 ΛΕΠΤΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ Η ΑΠΟ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	116

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα βότανα έχουν μια μεγάλη ιστορία σε όλο τον κόσμο. Τα φαρμακευτικά φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική και σήμερα μελετώνται όλο και περισσότερο και χρησιμοποιούνται είτε ως φάρμακα είτε στα τρόφιμα. Συνήθως παρασκευάζονται ως έγχυση ή αφέψημα. Έγχυση αποτελεί τη διαδικασία της εξαγωγής χημικών ενώσεων από το φυτικό υλικό με χρήση βραστού νερού που περιχύνεται στο βότανο και αφήνεται για μερικά λεπτά. Το υδατικό εκχύλισμα ονομάζεται έγχυμα. Αντίθετα, στην περίπτωση του αφεψήματος το βότανο βράζει μαζί με το νερό για μερικά λεπτά επιτρέποντας την εξαγωγή περισσότερων ουσιών, αλλά επίσης επιτρέπει να διαφύγουν στον αέρα περισσότερα αρώματα.

Στα βότανα έχει αναγνωριστεί πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων πέρα από τη φαρμακευτική δράση όπως η αντιοξειδωτική, αντι-φλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αναλγητική, νευροπροστατευτικές και αντικαρκινική. Οι ιδιότητες έχουν συσχετιστεί με ένα πλήθος πολυφαινολικών συστατικών. Οι πολυφαινόλες είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες, η παρουσία των οποίων επηρεάζεται από έναν αριθμό παραγόντων, όπως η φυτική ποικιλία, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, οι εποχιακές συνθήκες, τη γεωγραφική περιοχή ανάπτυξης και τη μεταποίηση. Υπό το πρίσμα αυτό, ένα ευρύ πολυφαινολικό αποτύπωμα αποτελεί χαρακτηριστικό του κάθε φυτού και προφανώς της αντιοξειδωτικής του δράσης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 10 διαφορετικά βότανα ελληνικής καλλιέργειας από πέντε διαφορετικές οικογένειες *Matricaria chamomilla* (χαμομήλι), *Echinacea purpurea* (εχινάκεια), *Lippia citriodora* (λουΐζα), *Menta pulegium* (φλισκούνη), *Mentha spicata* (δυσόσμος), *Origanum majorana* (μαντζουράνα), *Origanum vulgare* (ρίγανη), *Thymus capitatus* (θυμάρι), *Hypericum perforatum* (σπαθόχορτο) και *Hipporhamnus rhamnoides* (ιπποφαές). Ο γενικός στόχος αυτής της μελέτης ήταν να προταθεί μια βέλτιστη προετοιμασία για κάθε βότανο ή οικογένεια βοτάνων σύμφωνα με την εικόνα του μεταβολικού τους αποτυπώματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Η επίδραση της γεωφυσικής θέσης της Ελλάδας στη χλωρίδα

Η Ελλάδα είναι μία Μεσογειακή χώρα που διαθέτει μια βιοκλιματική και γεωλογική ποικιλία που επιτρέπουν την ύπαρξη και ανάπτυξη οικοσυστημάτων με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Οι μεταβολές του κλίματος μέσα στους αιώνες σε συνδυασμό με το πολυσχιδές έδαφος επέτρεψε την μετανάστευση φυτών και τη δημιουργία υβριδίων εμπλουτίζοντας έτσι την χλωρίδα της Ελλάδας. Σύμφωνα με τα στοιχεία από τη βάση δεδομένων της Flora Hellenica, η Ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει 5.700 είδη και υποείδη φυτών, με τα 1150 να είναι ενδημικά και τα 730 να θεωρούνται σπάνια και απειλούμενα [1], [2].

2.2 Τι είναι βότανα

Τα βότανα αποτελούν ένα μεγάλο μέρος του φυτικού βασιλείου. Αναπτύσσονται σε διάφορες άγονες ή καλλιεργημένες περιοχές. Χρησιμοποιούνται ως τροφή, για εμπλουτισμό της γεύσης, φάρμακα ή ως αρώματα. Τα βότανα με φαρμακευτική δράση διαθέτουν δραστικές ουσίες, που κατά τη λήψη τους από τον οργανισμό παρουσιάζουν επιθυμητές ιδιότητες. Όλα τα μέρη του φυτού μπορούν να αξιοποιηθούν για φαρμακευτική χρήση είτε πρόκειται για άνθη, φύλλα και καρπούς είτε πρόκειται για τον φλοιό και τις ρίζες του [3], [4].

2.3 Ιστορία

Σύμφωνα με εκτιμήσεις τα βότανα εμφανίζονται για πρώτη φορά κατά την Κρητιδική περίοδο πριν από 135 εκατομμύρια χρόνια ενώ έχει βρεθεί ότι κατά τη Νεολιθική εποχή, το 5700 π.Χ., στη λίμνη Bracciano της βορειοδυτικής Ρώμης, καλλιεργούσαν μεγάλη ποικιλία βοτάνων ενώ παράλληλα συνέλεγαν και άλλα από τα δάση [5]. Το πρώτο βιβλίο βοτανολογίας γράφτηκε στην Κίνα το 2700 π.Χ. και το δεύτερο από τους Σουμέριους το 2200 π.Χ. ενώ και κατά

στην παραδοσιακή Ινδική ιατρική γίνεται χρήση φαρμακευτικών βοτάνων, γνωστή ως Αγιουρβέδα [6].

Στη Ελληνική μυθολογία γίνεται συχνά αναφορά σε βότανα. Στα Ομηρικά έπη αναφέρονται αρκετά φυτά, με ατελείς περιγραφές, ίσως επειδή ο Όμηρος ήταν τυφλός. Την επιστήμη της βοτανολογίας ξεκίνησε ο Ασκληπιός ενώ αργότερα ήρθε ο Ιπποκράτης (460-370 π.Χ.) που αναγνωρίστηκε ως ο «πατέρας της Ιατρικής». Κατέγραψε περίπου 400 είδη βοτάνων που η χρήση τους ήταν γνωστή κατά τον 5ο αιώνα π.Χ. Σε μια σειρά βιβλίων του αναφέρθηκε στις θεραπευτικές τους ιδιότητες όπου καταγράφει 236 φυτικά φάρμακα, απαλλάσσοντας την ιατρική από την δεισιδαιμονία και την μαγεία. Επίσης ταξινόμησε σε κατηγορίες όλες τις τροφές και τα βότανα ανάλογα με την θεμελιώδη τους ιδιότητα (θερμό, ψυχρό, ξηρό και υγρό) και θεωρούσε ότι η καλή υγεία διατηρείται όταν οι ιδιότητες αυτές είναι σε ισορροπία. Την ίδια εποχή με τον Ιπποκράτη έζησε ο Αριστοτέλης (384-322 π.Χ.) και ο Θεόφραστος ο Ερέσιος (372–287 π.Χ.). Ο Αριστοτέλης θεωρείται ο θεμελιωτής των θετικών επιστημών και μεταξύ άλλων, έγραψε και δύο βιβλία «Περί Φυτών». Ο Θεόφραστος ο Ερέσιος θεωρείται ο πατέρας της Βοτανικής και πρόδρομος της φαρμακογνωσίας όμως μετά το θάνατο του η βοτανολογία για πολλά χρόνια παρέμεινε στάσιμη.

Το 60 μ.Χ Ο Διοσκουρίδης, γιατρός του Καίσαρα και της Κλεοπάτρας, έγραψε το κλασικό κείμενο *De Materia Medica* όπου περιελάμβανε πάνω από 600 θεραπευτικά φυτά, και παρέμεινε σαν ένα πρότυπο εγχειρίδιο για 1500 χρόνια.

Συνεχίζοντας μέσα στους αιώνες πλήθος βοτάνων καταγράφηκαν για τις ιδιότητες τους και την δράση τους περνώντας σιγά σιγά στην εποχή όπου τα σύγχρονα φάρμακα απομονώθηκαν από τα φυτά. Πρώτος ο Friedrich Sertuner το 1803 ανακάλυψε τη μορφίνη και τη βασική ύλη της ασπιρίνης από τον φλοιό της ιτιάς [3], [5].

2.4 Ο ρόλος των βοτάνων στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων

Τα βότανα θεωρούνται πιθανές πηγές για νέα φάρμακα, αντιβιοτικά, ζιζανιοκτόνα και παρασιτοκτόνα. Πολλά από αυτά, χρησιμοποιούνται και

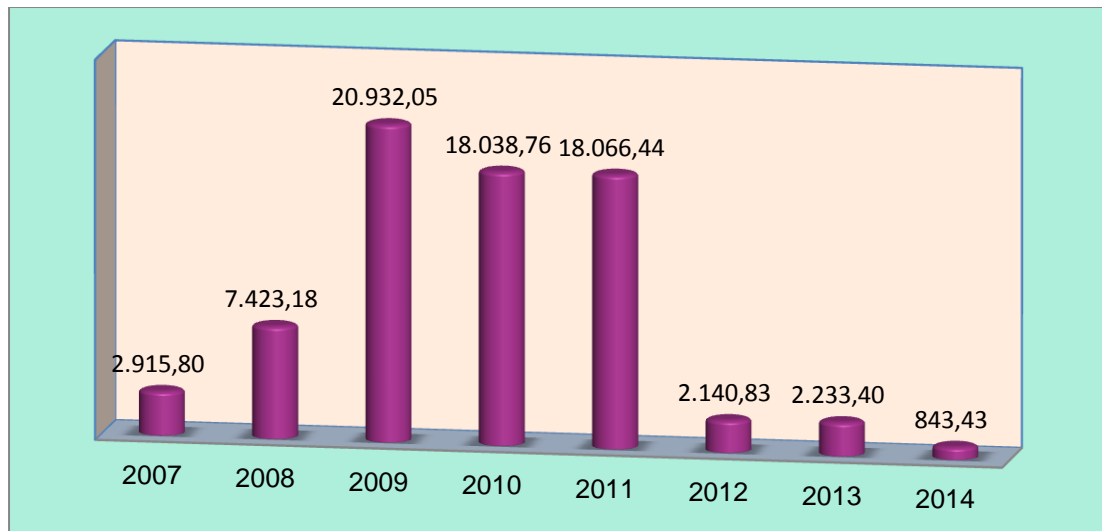
σήμερα, καθώς δεν έχουν βρεθεί κατάλληλα συνθετικά υποκατάστατα με αντίστοιχη δράση και εξειδίκευση [7].

Γνωστά φάρμακα προέρχονται απευθείας από το φυτικό βασίλειο, όπως η καφεΐνη, η κάνναβη και η νικοτίνη. Επίσης η κωδεΐνη και η μορφίνη είναι οπιούχα αναλγητικά. Το όπιο, κοινώς αφιόνι προέρχεται από ένα είδος παπαρούνας που ονομάζεται μύκων η υπνοφόρος (*Papaverum somniferum*). Ένα από τα πιο γνωστά σκευάσματα, η ασπιρίνη, δημιουργήθηκε από το φλοιό του δέντρου της ιτιάς. Επιπλέον από το φλοιό των δένδρων Κιγχόνη η ερυθρόχυμος (*Cinchona succirubra*), το οποίο έγινε πρώτα γνωστό από τη Νότια Αμερική, λαμβάνονται πολλά αλκαλοειδή, εκ των οποίων το σημαντικότερο είναι η κινίνη, που επί πολλά χρόνια ήταν το μοναδικό φάρμακο για την ελονοσία.

2.5 Οικονομική αξιοποίηση και ο ρόλος των βοτάνων στην ανάπτυξη

Υπάρχει μια πληθώρα χρήσεων για τα βότανα και γενικότερα τα φαρμακευτικά φυτά. Χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα, ποτά, συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικά, φαρμακευτικά προϊόντα, ζωοτροφές και κτηνιατρικά προϊόντα, προϊόντα για τη βιομηχανία, βυρσοδεψία και βαφής, για γεωργικά προϊόντα και για το σπίτι. Σήμερα διαφαίνεται μια μεγαλύτερη προσήλωση σε αυτά τόσο από επιχειρήσεις όσο και από δημόσιους φορείς. Το καταναλωτικό ενδιαφέρον έχει μεγεθυνθεί δίνοντας ώθηση στην αγορά συμπληρωμάτων, τροφίμων που περιέχουν πρόσθετα, καλλυντικά και φυτικά προϊόντα [8].

Στην Ελλάδα εμφανίζεται ένα σχετικά υψηλό ενδιαφέρον για την καλλιέργεια αρωματικών φυτών το οποίο όμως φαίνεται να έχει επηρεαστεί από την οικονομική κρίση όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1 με δεδομένα από το Υπουργείο Παραγωγικής Ανασυγκρότησης, Περιβάλλοντος και Ενέργειας Αγροτικής Ανάπτυξης για τα έτη 2007 - 2014.

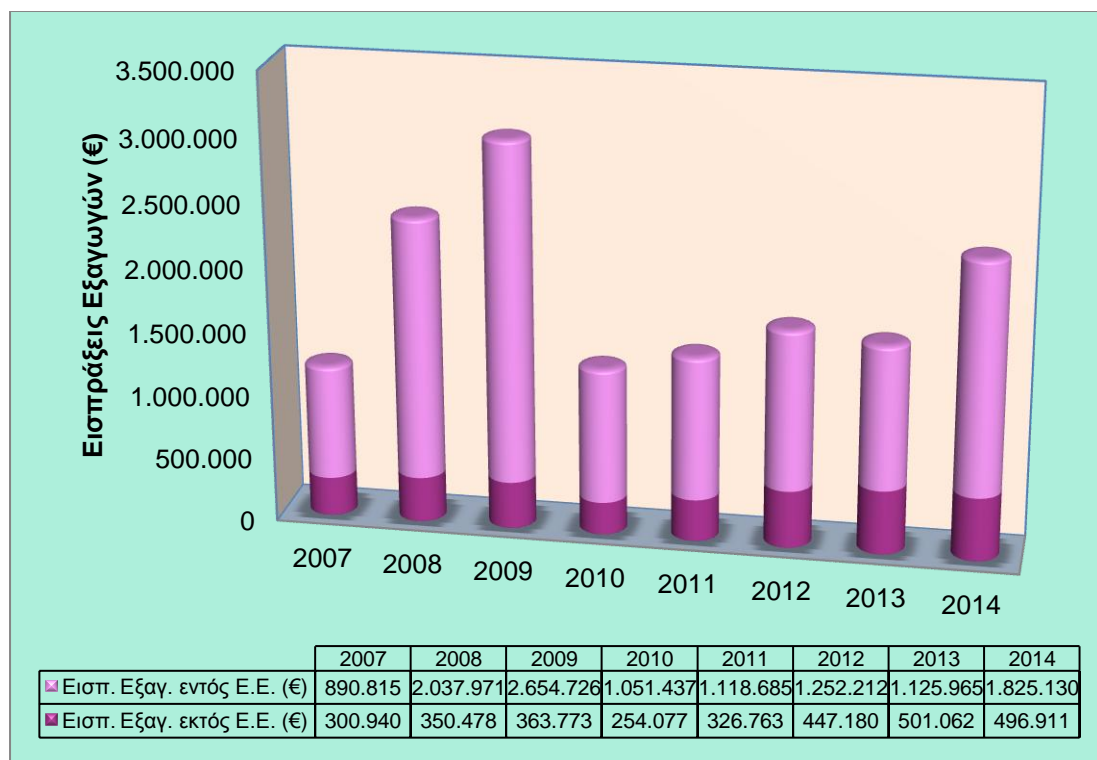


Σχήμα 1 Εκτάρια καλλιέργειας αρωματικών φυτών στον Ελλαδικό χώρο για τα έτη 2007-2014 σύμφωνα με το Υ.Π.Α.Π.ΕΝ.

Σύμφωνα και με το Σχήμα 1 από το 2007 είχε ξεκινήσει η αύξηση καλλιέργειας αρωματικών φυτών και βοτάνων, περίπου 3.000 εκτάρια (1εκτάριο = 10 στρεμ.) με αποκορύφωμα το 2009 να επταπλασιάζεται με 21.000 περίπου εκτάρια. Με την αρχή της οικονομικής κρίσης παρουσιάστηκε μια μικρή πτώση με το 2014 να φτάνει στα χαμηλότερα επίπεδα, στα 843 εκτάρια.

Κύρια φυτά εμπορικού ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία θεωρούνται: σκόρδο, λαδανιά, θυμάρι, κρόκος, μάραθος, γλυκόριζα, λυκίσκος, βαλσαμόχορτο, ύσσωπος, δάφνη, λεβάντα, χαμομήλι, μελισσόχορτο, μέντα, φλισκούνη, δυόσμος, βασιλικός, σαλέπι, δίκταμο, μαντζουράνα, ρίγανη, γλυκάνισο, μαστίχα, δενδρολίβανο, φασκόμηλο, θρούμπι, τσάι του βουνού, τίλιο ενώ έχουν εμφανιστεί και καλλιεργούμενες εκτάσεις με αρώνια, κραταιγό, γκότζι μπέρι και ιπποφαές [9].

Αρκετές είναι και οι εξαγωγές που γίνονται, με κύριους προορισμούς Κύπρο, Αλβανία, Βουλγαρία, Ισπανία, Ιταλία, Φιλιππίνες, ΗΠΑ και Γερμανία. Οι περισσότερες εξαγωγές πραγματοποιούνται εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, κάτι που διαφαίνεται και από τα στοιχεία που δημοσιοποιούνται μέσα από τη Eurostat για τα έτη 2007–2014 σχετικά με τις εξαγωγές της Ελλάδας στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2 Εισπράξεις εξαγωγών (€) εντός και εκτός Ε.Ε. σύμφωνα με στοιχεία της Eurostat

Οι εφαρμογές των βοτάνων στη βιομηχανία ποικίλουν. Χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων, γλυκαντικά και υποκατάστατα, χρωστικές ουσίες, αντιμικροβιακοί παράγοντες και αιθέρια έλαια, αντιοξειδωτικά, σταθεροποίηση λιπών, λαδιών για τηγάνισμα και τηγανισμένων προϊόντων, παράγοντες αντι-αμαύρωσης τρόφιμα εμπλουτισμένα με πολυφαινόλες και βιοφυτοφάρμακα [10]

2.6 Βιοδραστικές ενώσεις από βότανα και η δράση τους

Τα φυτά συνθέτουν μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων που διαχωρίζονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Στους πρωτογενείς μεταβολίτες ανήκουν σάκχαρα, αμινοξέα, πρωτεΐνες κ.ά και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη φωτοσύνθεση, την αναπνοή, την ανάπτυξη και την εξέλιξη [7], [11], [12], [13]. Στους δευτερογενείς μεταβολίτες ανήκουν τα εναπομείναντα χημικά στοιχεία των φυτών, δηλαδή τα αλκαλοειδή, τα τερπένια και τα φαινολικά (που προέρχονται από τους υδατάνθρακες) [11]. Επιτελούν διάφορες λειτουργίες, όπως προστασία από φυτοφάγα,

προσέλκυση επικονιαστών και ζώων, έντομα και παθογενείς μολύνσεις, λειτουργούν ως αλληλοπαθητικοί παράγοντες, και προφυλάσσουν από την υπεριώδη ακτινοβολία και την άμυνα έναντι άλλων φυτών που διεκδικούν τροφή και φως. Αξίζει να σημειωθεί πως τα φυτά ελέγχουν τη σύνθεση και αποθήκευση των φυτοχημικών ουσιών. Υπάρχουν όμως και γεωργικές πρακτικές που επηρεάζουν τη φυτοχημική σύνθεση. Εντούτοις, παράγοντες όπως η επιλογή της ποικιλίας, η αγωγή με λιπάσματα και η μεταχείριση μετά τη συγκομιδή μπορούν εύκολα να αναπροσαρμοστούν στις υπάρχουσες πρακτικές παραγωγής για να αποδώσουν σοδειές με βελτιστοποιημένη φυτοχημική σύσταση [10], [14].

Τα φαινολικά μόρια έχουν τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο με μια ή περισσότερες συνδεδεμένες υδροξυλικές ομάδες, και η δομή τους ποικίλει από χαμηλού μοριακού βάρους με μονό αρωματικό δακτύλιο έως τις μεγάλες και σύνθετες τανίνες και τις πολυφαινόλες [7], [12]. Μερικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων και τα δομικά στοιχεία τους. Διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες φαινολικών ενώσεων, τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Η ομάδα των φλαβονοειδών περιλαμβάνει ενώσεις με τη δομή δακτυλίων C₆-C₃-C₆: φλαβανόνες, φλαβόνες, ανθοκυανιδίνες κ.ά. Οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις ταξινομούνται βάσει του αριθμού των ατόμων άνθρακα: σε απλές φαινόλες, βενζοϊκά οξέα, κινναμμωμικά οξέα, σεκοϊριδοειδή κ.ά. [10], [13]. Φαινολικά μόρια μη συνδεδεμένα με μόριο σακχάρου αναφέρονται ως οι άγλυκες μορφές, ενώ φαινολικά μόρια σε μορφή σύζευξης με ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρου ονομάζονται γλυκοζίτες. Οι περισσότερες φαινόλες βρίσκονται στη φύση συνδεδεμένες με μονο- ή πολυ-σακχαρίτες, ή άλλα παράγωγα, όπως οι εστέρες ή μεθυλεστέρες, που μπορούν να υποστούν γλυκοζυλίωση ή ακυλίωση [7], [12].

Οι περισσότερες φυτικές τροφές περιέχουν φαινολικές ενώσεις, συνήθως σε 0,5–5,0% του ξηρού βάρους [7]. Μερικές οικογένειες φαινολικών είναι ευρέως διαδεδομένες στην ανθρώπινη διατροφή κυρίως για την αντιοξειδωτική τους δράση [11]. Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες που σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με ένα οξειδωσιμο υπόστρωμα, επιβραδύνουν

σημαντικά ή εμποδίζουν την οξειδωση της ουσίας [11]. Στην επιστήμη των τροφίμων, αντιοξειδωτικά θεωρούνται τα συστατικά που εμποδίζουν την τάγγιση των λιπών στα τρόφιμα, καθώς και οι διαιτητικές ουσίες που μειώνουν τις ανεπιθύμητες συνέπειες των δραστικών ειδών, όπως των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου, στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού [15].

Έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας επειδή οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί παράγοντες, δεν παρέχουν επαρκή προστασία ενάντια στη πρόκληση των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species). Η δημιουργία ελεύθερων ριζών ή δραστικών ειδών οξυγόνου, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού, πέρα από την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός βιολογικού συστήματος προκαλεί το οξειδωτικό στρες. Τα φυτοχημικά ως αντιοξειδωτικά, δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, και μπορούν να εμποδίσουν τον κυτταρικό θάνατο ή την απόπτωση, Το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται για μια σειρά από διαταραχές που περιλαμβάνουν την καρδιαγγειακή δυσλειτουργία, το σακχαρώδη διαβήτη, την ελονοσία, την αθηροσκλήρωση, το AIDS, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τον καταρράκτη, ρευματισμό, καρκίνους και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα εκτός από το γήρας [16].

2.7 Παρασκευάσματα από βότανα

Αφέψημα: Το φυτό βράζεται σε νερό για μερικά λεπτά και μετά σουρώνεται. Το αφέψημα πίνεται σε δόσεις μέσα στις επόμενες 12 ώρες.

Έγχυμα: Μόλις αρχίσει να βράζει το νερό περιχύνεται στο βότανο. Σκεπάζεται, αφήνεται για μερικά λεπτά και φιλτράρεται. Καταναλώνεται άμεσα για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών

Αλοιφή: Χρησιμοποιείται μόνο για εξωτερική χρήση. Γίνεται με πρώτη ύλη το έγχυμα, το αφέψημα, ή τη σκόνη του βοτάνου που δουλεύεται με κηρί, βούτυρο ή αλεύρι μέχρι να γίνουν ένα ομοιογενές μείγμα και διατηρείται σε βάζο.

Βάμμα: Η φυτική ύλη αφήνεται σε καθαρό οινόπνευμα 70° να μουσκέψει, χωρίς θέρμανση ή βρασμό, σε γυάλινο δοχείο για αρκετές ημέρες και

αναδεύεται ανά διαστήματα. Μετά το πέρας των ημερών σουρώνεται και διατηρείται καλά κλεισμένο σε δροσερό και σκιερό μέρος για αρκετό διάστημα.

Εκχύλισμα: Συμπυκνωμένο έγχυμα ή αφέψημα που φυλάσσεται για μεγάλο χρονικό διάστημα και καταναλώνεται σε μικρές δόσεις μετά από αραιώση.

Έμβρεγμα: Είναι το διάλυμα που παραλαμβάνεται μουσκεύοντας ένα φυτό σε νερό έως 12 ώρες (για να μην αναπτυχτούν βακτήρια) ή σε οινόπνευμα για έως 15 μέρες.

Κατάπλασμα: Χρησιμοποιείται κατευθείαν πάνω στο δέρμα, δεμένο με ένα ύφασμα για μερικά λεπτά. Αν το βότανο έχει ερεθιστική δράση δένεται ελαφρά για να ελαττωθεί τη δράση του. Σημαντικό είναι να ξέρουμε και τι θερμοκρασία που πρέπει να έχει το κατάπλασμα, για να μην χάνονται οι αντιφλογιστικές και σπασμολυτικές ιδιότητες των φυτών.

Κομπρέσες: είναι για εξωτερική χρήση. Ένα κομμάτι ύφασμα ή βαμβάκι εμβαπτίζεται σε έγχυμα, αφέψημα ή βάμμα και τοποθετείται απευθείας για 5-15 λεπτά ανάλογα με τη σοβαρότητα του προβλήματος.

Λουτρό: Παρασκευάζεται αφέψημα, έγχυμα ή αφήνεται το βότανο για αρκετές ώρες στο νερό. Στραγγίζεται και προστίθεται στο νερό του μπάνιου. Έτσι επιτρέπουν στις θεραπευτικές ιδιότητες των βοτάνων να έχουν άμεση επαφή με το πονεμένο μέρος.

Σιρόπι: Εκχύλισμα βοτάνου σε λιωμένη ζάχαρη σε νερό.

Σκόνη: Το βότανο ξηραίνεται στη σκιά και μετά γίνεται σκόνη. Φυλάσσεται σε γυάλινο δοχείο σκούρου χρώματος, καλά κλεισμένο και όταν χρησιμοποιείται σε αφέψημα ή έγχυμα δεν χρειάζεται φιλτράρισμα.

Λάδι: Γυάλινο δοχείο γεμίζεται αραιά με βότανο κ σε αυτό προστίθεται λάδι. Αφήνεται στον ήλιο ή σε θερμαντικό σώμα 15 μέρες περίπου κ μετά φιλτράρεται.

Αιθέριο έλαιο: Παρασκευάζεται με απόσταξη του βοτάνου

2.8 Δέκα βότανα της Ελληνικής χλωρίδας

2.8.1 Χαμομήλι



Κοινή ονομασία	Χαμομήλι
Είδος	<i>Matricaria chamomilla</i>
Τάξη:	Asterales
Οικογένεια:	Αστερίδες

Εικόνα 1 *Matricaria chamomilla*

Το όνομα του σημαίνει μήλο που είναι κάτω στο έδαφος (χάμω - μήλο). Είναι μονοετές ποώδες φυτό, με όρθια ανάπτυξη, με λείο και πολυδιακλαδισμένο βλαστό και με φωτεινό πράσινο χρώμα. Δεν ξεπερνάει σε ύψος τα 30 cm με φύλλα πτεροσχιδή, με λεπτή και μικρή κατασκευή. Τα άνθη μοιάζουν με ανθίδια λευκά γλωσσοειδή, σχηματισμένα γύρω από το κεντρικό κίτρινο στέλεχος του άνθους, με πεπλατυσμένο δίσκο [17]. Για να αναπτυχθεί καλά απαιτεί δροσερές, εύκρατες συνθήκες και θερμοκρασίες από 7-26°C. Επιβιώνει και σε θερμοκρασίες -12°C. Χρειάζεται ζεστές και μεγάλες σε μήκος ημέρες παράγοντας έτσι άφθονα άνθη. Αν και ανθεκτικό στην ξηρασία, κατά το στάδιο της έκπτυξης των σπόρων αλλά και για την ανάπτυξη των νεαρών φυταρίων χρειάζεται ικανοποιητική ποσότητα νερού [18]. Προτιμά εδάφη αποστραγγιζόμενα, αμμώδη, με pH 4,8-8,3. Απορροφούν μεγάλες ποσότητες νατρίου βοηθώντας στην μείωση της επιφανειακής του συγκέντρωσης του.

Η συγκομιδή γίνεται στο στάδιο της πλήρους άνθησης σε θερμοκρασίες από 22 έως 25°C και εκτείνεται σε μια περίοδο 3-6 εβδομάδων Απρίλιο – Μάιο. Απλώνονται και ξεραίνονται σε σκιερό μέρος ή με θερμό αέρα που η θερμοκρασία δεν πρέπει να ξεπερνά τους 35°C [19].

Είναι γνωστό για τις ηρεμιστικές και αντισηπτικές του ιδιότητες. Χρησιμοποιείται για παθήσεις νευρικής φύσεως όπως νευραλγίες, αϋπνίες

νευρική, ζαλάδα, κρίσεις άσθματος, ημικρανίες. Επίσης χρησιμοποιείται ως καταπραϋντικό, παυσίπονο, αντισηπτικό, στο βήχα, στο κρυολόγημα, τους ρευματικούς πόνους, πόνους οδοντοφυΐας, διαταραχές εμμηνόπαυσης, δυσμηνόρροια, τονωτικό της κυκλοφορίας, για πληγές στο δέρμα ή στο στόμα με γαργάρες. Το έγχυμα του είναι ορεκτικό χωνευτικό, αντιεμετικό, αντιφυσηκτικό, αντίδιάρροικό, ανθελμινθικό, εφυδροδοτικό, αντιπυρετικό, χολαγωγικό, εμμηναγωγό και εξωτερικά αντιαλλεργικό. Είναι επίσης κατάλληλο για τον κοιλόπονο και τον στομαχόπονο των μωρών [20]. Το έγχυμα με χαμομήλι ξανθαίνει τα μαλλιά. Ενώ εισπνοές ατμού χαμομηλιού ωφελούν στη γρίπη και το βήχα [21], [22].

2.8.2 Εχινάκεια



Κοινή ονομασία	Εχινάκεια
Είδος	<i>Echinacea purpurea</i>
Τάξη:	Asterales
Οικογένεια:	Αστερίδες

Εικόνα 2 *Echinacea purpurea*

Είναι πορφυρή, πολυετής πόα και αναπτύσσει όρθια στελέχη φτάνοντας τα 50-60cm, σπάνια διακλαδισμένα και φύλλα κατά εναλλαγή, μακρόστενα, τραχιά με αδρό τρίχωμα, με έλασμα και μίσχο που μικραίνει σταδιακά στα ανώτερα φύλλα. Προσομοιάζει πολύ στη μαργαρίτα. Τα άνθη είναι εντυπωσιακά κεφάλια που φυτρώνουν στην άκρη μακριού ανθοφόρου άξονα. Τα γλωσσοειδή περιφερειακά ανθίδια είναι ανοιχτά ροζ ή σκουρότερα πορφυρά. Τα σωληνοειδή ανθίδια είναι κίτρινα ή πράσινα και στις άκρες καφεκόκκινα και δημιουργούν ένα σφαιρικό ή κωνικό σχήμα στο κέντρο του κεφαλιού. Λέγεται ότι πήρε το όνομά του από την ελληνική λέξη «εχίνος», επειδή ο κώνος των ροζ-μοβ ανθών του είναι ακανθωτός και θυμίζει αχινό [23], [24].

Η εχινάκεια κατάγεται από τη Νότια Αφρική. Αντέχουν τη ζέστη και δεν απαιτούν ιδιαίτερες γεωλογικές συνθήκες για να ευδοκιμήσουν. Προτιμά τα εύφορα, αμμώδη, αλκαλικά εδάφη και τα ηλιόλουστα μέρη. Μπορεί να αντέξει την ξηρασία μόλις μεγαλώσει αρκετά.. Τα λουλούδια συλλέγονται στην πλήρη ανθοφορία τους και οι ρίζες των φυτών που είναι τεσσάρων χρονών, το Φθινόπωρο [25], [26].

Ενισχύει το ανοσοποιητικό και βοηθάει κυρίως στην πρόληψη αλλά και στην ανάρρωση από κρυολογήματα. Λειτουργεί ως φυσικό αντιβιοτικό και καταπολεμά τα βακτήρια του στρεπτόκοκκου και του σταφυλόκοκκου. Εξαιρετικά συμβάλλει στην αναγέννηση των ιστών και ωφελεί σε δοθιήνες, ακμή και έρπη ζωστήρα. Χορηγείται σε περιπτώσεις τοξιναιμίας, δηλητηριάσεις, σηψαιμίας, σηπτικές καταστάσεις και για την αντιμετώπιση της αρθρίτιδας. Κυκλοφορούν στο εμπόριο έτοιμα σκευάσματα εχινάκειας κυρίως ταμπλέτες, σακχαροπηκτικά και σταγόνες. Τέλος χρησιμοποιείται ως καλλωπιστικό φυτό σε κήπους καθώς δημιουργεί όμορφες συστάδες [27], [28].

2.8.3 Λουίζα



Κοινή ονομασία	Λουίζα
Είδος	<i>Lippia citriodora</i>
Τάξη:	Λαμιώδη
Οικογένεια:	Βερβενίδες

Εικόνα 3 *Lippia citriodora*

Η Λουίζα είναι μικρός θάμνος, ύψους 1-1,5 μέτρο. Τα φύλλα της είναι μακρόστενα λογχοειδή, ελαφρά οδοντωτά και με το τρίψιμο αναδίδουν μυρωδιά λεμονιού. Τα άνθη είναι μικρά λευκά ως ωχροπράσινα σε λεπτούς σύνθετους στάχεις [29]. Ευδοκιμεί σε περιοχές θερμές ηλιόλουστες, ενώ σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες πεθαίνει. Χρήσιμα μέρη είναι τα φύλλα και οι ανθισμένες κορυφές [30]. Στον τόπο μας καλλιεργείται μόνο ως ανθοκομικό

φυτό. Στην Αμερική, Τύνη, Αλγερία, Γαλλία καλλιεργείται αποκλειστικά για το αιθέριο έλαιο των λουλουδιών και των φύλλων του. Σε Γερμανία και Νορβηγία, καλλιεργείται μέσα σε θερμοκήπια για τον ίδιο σκοπό. Μια καλή φυτεία λουΐζας είναι δυνατόν να διαρκέσει πολλά χρόνια. Για να ευδοκιμήσει θέλει χώματα γερά και κοπρισμένα του κήπου, γόνιμα και δροσερά. Θέλει μέρος ηλιόλουστο, ώστε να δώσει 2-3 συγκομιδές από άνθη και φύλλα [31].

Το αιθέριο έλαιο της λουΐζας χρησιμοποιείται ως αρωματικό σε καλλυντικά και σαπουνία. Αναφέρεται ότι έχει χρησιμοποιηθεί κατά του πόνου του ματιού και ως έγχυμα σε πλύσεις προσώπου. Χρησιμοποιείται κυρίως ως αρωματικό σε ροφήματα, ποτά και φαγητά και συντηρητικά. Ως ρόφημα με ζάχαρη ή μέλι είναι ευχάριστο χωνευτικό και συνίσταται κατά της ναυτίας και της νεύρωσης στομάχου. Τονώνει τη λειτουργία του στομαχιού, ανακουφίζει από το μετεωρισμό, έχει ιδιότητες καταπραυντικές και αντισπασμωδικές. Η λουΐζα επίσης χρησιμοποιείται για αδυνάτισμα και αποτοξίνωση και κυτταρίτιδα [32].

2.8.4 Φλισκούνη



Εικόνα 4 *Mentha pulegium*

Κοινή ονομασία	Φλισκούνη
Είδος	<i>Mentha pulegium</i>
Τάξη:	Λαμιώδη
Οικογένεια:	Χειλανθή

Πρόκειται για ένα πολυετές φυτό με ποικιλία μορφών. Το στέλεχος είναι όρθιο ή πλάγιο, πρασινωπό ή κοκκινωπό, χνουδωτό, με έμμισχα φύλλα, ωοειδή ή μακρουλά, ακέραια μικρά οδοντωτά και επιμήκη, χνουδωτά και στις δύο επιφάνειες. Τα άνθη είναι μικρά, με χρώμα από κοκκινωπό μέχρι ιώδες και βγαίνουν πολλά μαζί σε τούφες. Την ονομασία του είδους “pulegium” την έδωσε ο Πλίνιος λόγω της ιδιότητας της να απομακρύνει τους ψήλους (pures στα λατινικά).

Ευδοκιμεί στο βόρειο ημισφαίριο και δείχνει την ύπαρξη νερού, γιατί φυτρώνει κατά μήκος των ποταμών και σε υγρούς τόπους [33]. Παραδοσιακά, φυτεύεται ανάμεσα σε στρωμένες πέτρες για να αποτρέψει τα μυρμήγκια, τους ψύλλους και τα ποντίκια. Πολλαπλασιάζεται με παραφυάδες το φθινόπωρο ενώ θέλει χώμα βαθύ, υγρό και μέτρια σκιαζόμενο. Μπορεί να συγκομιστεί από τέλη Ιουνίου μέχρι τον Οκτώβριο. Χρησιμοποιούμενα μέρη είναι τα φύλλα και οι ανθισμένες κορυφές.

Είναι πιο αρωματικό από άλλα είδη μέντας, με πυκνό και πιο πικάντικο άρωμα και γεύση, αλλά λιγότερο ευχάριστο από τη μέντα την πιπερώδη.

Το φλισκούνι είναι αντιφυσητικό, χολαγωγό, αντιδιαρροϊκό και σπασμολυτικό. Συστήνεται ως αποχρεμπτικό, κατά των βρογχικών καταρροών και κατά του άσθματος σε μεγάλες κυρίως ηλικίες. Το συνιστούσαν οι παλιοί γιατροί κατά του κοκίτη και γενικότερα για τη θεραπεία των παθήσεων του αναπνευστικού, ως σπουδαίο αντιαρθρικό ενώ μερικοί βρήκανε πως το φυτό έχει εξαιρετικές εμμηναγωγικές ιδιότητες [34]. Επίσης έχει αντιεμετικές ιδιότητες [35]. Τέλος το φλισκούνι φέρεται να τονώνει το νευρικό σύστημα και την καρδιά. Το φλισκούνι χρησιμοποιείται ως αρωματικό στη μαγειρική, οινοποιία και φαρμακοποιία [36], [37], [38].

2.8.5 Δυόσμος



Εικόνα 5 *Mentha spicata*

Κοινή ονομασία	Δυόσμος
Είδος	<i>Mentha spicata</i>
Τάξη:	Λαμιώδη
Οικογένεια:	Χειλανθή

Το φυτό φτάνει σε ύψος λιγότερο από 80 cm, έχει τον τυπικό τετράγωνο βλαστό που χαρακτηρίζει την πλειοψηφία των φυτών της οικογένειας, τα

φύλλα του είναι λογχοειδή και εκπτύσσονται απευθείας από το βλαστό, έχουν ανοιχτό πράσινο χρώμα. Τα άνθη σχηματίζονται πολλά μαζί στις μασχάλες των φύλλων. το χρώμα τους είναι συνήθως μεταξύ λιλά και ροζ [39], [40].

Τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή των δραστικών ουσιών είναι τα φύλλα και ανθισμένες κορυφές. Η συλλογή τους πρέπει να γίνει πριν από την πλήρη άνθηση. Η αποξήρανση γίνεται με τη βοήθεια ζεστής αέριας μάζας θερμοκρασίας περίπου 40°C σε σκιερό περιβάλλον.

Είναι τονωτικό με διεγερτικές ιδιότητες και κατά της δυσπεψίας, των πόνων της χολής και του στομαχιού, των νευρικών διαταραχών, των ιλίγγων και της ταχυκαρδίας. Είναι ευεργετικός στα έλκη, στη χολή και στη αναπνοή, κατά του λόξιγκα ενώ είναι και σπασμολυτικός, διουρητικός, εφιδρωτικός, κατά της πέτρας της ουροδόχου κύστης, της κατακράτησης ούρων, των φλεγμονών των νεφρών και της κύστης και του εμετού της εγκυμοσύνης [41]. Είναι φυτό ευεργετικό κατά των παθήσεων του δέρματος. Τα αφέψημα ή έγχυμα του με μέλι και λίγο γλυκάνισο, πίνεται κατά των δυνατών κολικών, είναι αντιεμετικό, κατά των νευρικών σπασμών και ενάντια της κόπωσης. Καταπραΰνει τους πόνους από αρθρίτιδα και ρευματισμούς με εντριβές. Τέλος κοπανισμένος δυόσμος και τοποθετημένος σε καταπλάσματα στο στήθος, χρησιμοποιείται κατά του πρηξίματος από γάλα [42], [43].

2.8.6 Μαντζουράνα



Εικόνα 6 *Origanum majorana*

Κοινή ονομασία	Μαντζουράνα
Είδος	<i>Origanum majorana</i>
Τάξη:	Λαμιώδη
Οικογένεια:	Χειλανθή

Η Μαντζουράνα είναι πολυετής θάμνος, ύψους 20-40cm με πολλές διακλαδώσεις. Έχει σφαιρικό σχήμα και ο χρωματισμός του φυτού είναι

γκρίζος υποπράσινος. Η ρίζα του διακλαδίζεται κατά οξεία γωνία σχεδόν από την επιφάνεια του εδάφους. Ο φλοιός, καστανού χρώματος, είναι αρκετά ανεπτυγμένος και αποκολλάται εύκολα από το ξύλο. Ο βλαστός του φυτού είναι τριγωνικής τομής, λεπτός και αρκετά σκληρός, ενώ έχει αραιά τριχίδια ώστε να φαίνεται σχεδόν λείος. Τα φύλλα του φυτού έχουν έντονη οσμή. Είναι μικρά ωοειδή [44] αντιθέτως διατεταγμένα επί του βλαστού, με πολύ λίγο ανεπτυγμένο το μίσχο. Τα άνθη της μαντζουράνας εκφύονται στις μασχάλες των φύλλων καθ' όλο το μήκος, καθώς και στο άκρο του βλαστού αποτελούμενα από φοβόμορφους σφαιρικούς σωρούς και είναι μικρά και πρασινολευκά [45].

Ευδοκίμει σε περιοχές με ήπιο σχετικά κλίμα. Έτσι προτιμώνται περιοχές παραθαλάσσιες και νησιωτικές. Ως προς τα εδάφη, κατάλληλα θεωρούνται τα πλούσια, που αποστραγγίζονται καλά. Η αντοχή της μαντζουράνας στην ξηρασία είναι αξιόλογη. Σε εδάφη δροσερά, διαπερατά και γενικώς γόνιμα μπορεί να αναπτυχθεί και χωρίς ποτίσματα. Γενικά πρέπει να προτιμώνται δροσερές περιοχές ή όπου υπάρχει νερό να ποτίζεται 2-3 φορές το καλοκαίρι [45], [46].

Η εποχή της συλλογής εξαρτάται από το σκοπό για τον οποίο καλλιεργείται και γίνεται μια φορά στο στάδιο της πλήρους άνθησης με την κοπή όλου του υπέργειου τμήματος σε ύψος 8-10cm όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου ενώ όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για δρόγη συγκομίζεται δύο φορές το χρόνο, πριν την έναρξη της άνθησης. Μετά τη συλλογή, γίνεται ξήρανση και ακολουθεί τρίψιμο και κοσκίνισμα [46], [47], [48].

Η μαντζουράνα είναι γνωστή για τις στομαχικές της ιδιότητες ως χωνευτικό και καταπραυντικό για τους στομαχόπονους. Είναι όμως και ηρεμιστικό και σε μεγάλες δόσεις ναρκωτικό, για τις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος είναι χωνευτικό, σπασμολυτικό, αντιεμετικό, ανακουφίζει από το μετεωρισμό και τη δυσπεψία, διεγείρει το συκώτι και τη σπλήνα. Είναι ακόμη διουρητικό, αγγειοδιασταλτικό, υποτασικό, αντιδιαβητικό, αλλά και ευεργετικό σε νευρικής φύσεως παθήσεις, υπερευαισθησία, νευρασθένεια, ψυχασθένεια, άγχος,

αϋπνίες, ημικρανίες, ίλιγγο, επιληψία, απώλεια μνήμης. Σε εξωτερική χρήση είναι επουλωτικό και παυσίπονο σε ρευματισμούς και πονόδοντο.

Αφέψημα μαντζουράνας με μέλι έπιναν οι τραγουδιστές ως ευεργετικό για το λάρυγγα, ενώ ανακουφίζει από βήχα και κοκίτη. Μερικές σταγόνες αιθέριου ελαίου μαντζουράνας επιτόπου ανακουφίζουν από πονόδοντο. Οι σπόροι της μαντζουράνας χρησιμοποιούνται στη μαγειρική, στα κρεατικά και αλλαντικά, στα ποτά, τις σάλτσες και ως αρωματικό. Με τα φύλλα της αρωματίζονται ντουλάπες και άλλοι χώροι του σπιτιού [49], [50].

2.8.7 Ρίγανη



Κοινή ονομασία	Ρίγανη
Είδος	<i>Origanum vulgare</i>
Τάξη:	Λαμιώδη
Οικογένεια:	Χειλανθή

Εικόνα 7 *Origanum vulgare*

Ξυλώδης, ριζωματώδης, πολυετής. Διαθέτει βλαστούς έως 90 cm, συνήθως διακλαδισμένοι επάνω, χνουδωτοί, τριχωτοί ή με βελούδινη υφή, σπάνια λείοι. Φύλλα 4-25 mm, ωοειδή, ακέραια ή ελαφρώς πριονωτά οδοντωτά, λεία ή τριχωτά, αδενώδη-στικτά, έμμισχα. Σταχύδια 5-30 mm, ωοειδή, επιμήκη, ή πρισματικά, σχηματίζοντας ένα κόρυμβο ή φόβη. Βράκτια 4-5 mm, σχεδόν δύο φορές όσο ο κάλυκας, ωοειδή, όχι ακιδοειδή, τριχωτά ή λεία, αδενώδη ή ελάχιστα αδενώδη-στικτά, ποώδη, βιολετί-μωβ ή πρασινωπά. Κάλυκας κίτρινος-αδενώδης-στικτός, τριχωτός ή λείος. Στεφάνη άνθους 4-7 mm, άσπρου ή μωβ-κόκκινου χρώματος [41], [51].

Η ρίγανη ευδοκίμει τόσο στα χωράφια όσο και σε κήπους σπιτιών, πράγμα που υποδηλώνει την ευκολία της καλλιέργειάς της. Η σημαντικότερη απαίτηση που έχει είναι το πολύ καλά στραγγισμένο χώμα, ιδιαίτερα κατά το χειμώνα. Η συγκομιδή πρέπει να γίνεται όταν αρχίσουν να εμφανίζονται κίτρινα φύλλα

στη βάση του φυτού. Πολλαπλές συγκομιδές κατά την καλλιεργητική περίοδο είναι δυνατές, ανάλογα βέβαια με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Το φυτό προσβάλλεται από ασθένειες της ρίζας συνήθως που μπορεί να το οδηγήσουν ακόμα και σε θάνατο. Η απόδοση σε αιθέριο έλαιο μεγιστοποιείται στις ζεστές συνθήκες του καλοκαιριού [52], [53].

Η ρίγανη έχει τονωτικές, ορεκτικές, χωνευτικές, σπασμολυτικές στυπτικές, αντισηπτικές, διουρητικές και εμμηναγωγικές ιδιότητες. Το αφέψημα της ρίγανης σταματάει την ευκοιλιότητα, ανακουφίζει στο μετεωρισμό και τον τυμπανισμό. Το αφέψημα ανακουφίζει από τους ρευματικούς πόνους, πόνους κεφαλιού και δοντιού. Ως αντισηπτικό βοηθάει στις φλεγμονές του στόματος και του λαιμού. Εντριβή με ριγανέλαιο ανακουφίζει από μυϊκούς και ρευματικούς πόνους και σε πονοκεφάλους που οφείλονται σε ένταση, ενώ η επάλειψη βοηθάει και στην επούλωση τραυμάτων. Το έγχυμα της ρίγανης είναι αποχρεμπτικό και χρησιμοποιείται για το βήχα και τον κοκίτη [54], [55].

2.8.8 Θυμάρι



Κοινή ονομασία	Θυμάρι
Είδος	<i>Thymus capitatus</i>
Τάξη:	Λαμιώδη
Οικογένεια:	Χειλανθή

Εικόνα 8 *Thymus capitatus*

Το θυμάρι είναι πολύ μικρός αρωματικός θάμνος που το ύψος του κυμαίνεται από 20-50cm. Είναι πολυετές φυτό με διάρκεια ζωής γύρω στα 7 έτη. Έχει φύλλα στενά και μικρά (8-12mm) άμισχα, αντίθετα ωοειδή, χρώματος πράσινου έως γκριζου. Τα άνθη του είναι μικρά ρόδινα ή ερυθροϊώδη ή λευκά, σε πυκνές κεφαλοειδείς ταξιανθίες. Το όνομα για πρώτη φορά δόθηκε από τους αρχαίους Έλληνες και προέρχεται από το αρχαίο ελληνικό ρήμα "θύω" που σημαίνει θυσιάζω για αυτό άλλωστε και το χρησιμοποιούσαν ως θυμίαμα

στους ναούς. Άλλη εκδοχή αναφέρει ότι προέρχεται από την λέξη "Θύμων" που σημαίνει θαρραλέος. Χώρες που παράγουν θυμάρι είναι κυρίως η Ισπανία, η Γαλλία, η Ελβετία, η Ιταλία, η Βουλγαρία, η Πορτογαλία και η Ελλάδα [44].

Τα σπορόφυτα μεταφυτεύονται στο χωράφι το φθινόπωρο ή την άνοιξη. Αυξάνεται καλά σε εύκρατα κλίματα, σε ζεστές, ξηρές και ηλιόλουστες περιοχές. Είναι απαιτητικό σε φως ενώ δεν προτιμά την υπερβολική υγρασία. Προτιμά ελαφρά, καλά στραγγιζόμενα εδάφη με pH 5,0-8,0. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε ποικιλία εδαφών, ειδικά σε ασβεστούχα ηλιαζόμενα και ξηρά.

Από θεραπευτική άποψη είναι στυπτικό, τονωτικό και γενικότερα δυναμωτικό. Χρησιμοποιείται κατά της ατονίας του πεπτικού συστήματος, στη χρόνια καταρροή και κατά της λευκόρροιας και εμμηνόρροιας. Είναι ακόμα αντισπασμωδικό [56]. Έγχυμα θυμαριού ως λοσιόν είναι κατά της ψώρας και του έλκους. Είναι φυτό κατά της δυσπεψίας, αντισηπτικό, απολυμαντικό, κατευναστικό στη βρογχίτιδα, τον κοκίτη και γενικότερα κατά του επίπνου βήχα, και των πονόδοντων. Επιπλέον είναι κατά της υδρωπικίας και με γαργάρες είναι ευεργετικό στο λάρυγγα [57], [58], [59].

2.8.9 Σπαθόχορτο



Κοινή ονομασία	Σπαθόχορτο
Είδος	<i>Hypericum perforatum</i>
Τάξη:	Malpighiales
Οικογένεια:	Υπερικήδες

Εικόνα 9 *Hypericum perforatum*

Βλαστοί 10-100 εκ, κάθετοι από κατακείμενη ριζοβολούσα βάση, σε 2 γραμμές. Φύλλα 8-30 χιλ., ωοειδή προς επιμήκη, άμισχα ή υπο-άμισχα, με συγκαλυμμένη δικτυωτή νεύρωση και με πολλές μεγάλες διαφανείς κηλίδες. Σέπαλα λογχοειδή ή επιμήκη προς γραμμοειδή, οξεία έως οξυτενή ή

καταλήγουν σε μικρό αγκάθι, συνήθως ακέραια, χωρίς ή με λίγα επιφανειακά μαύρα στίγματα. Πέταλα με λίγες περιθωριακές μαύρες κουκίδες, ενίοτε και με επιφανειακές μαύρες κουκίδες ή ραβδώσεις. Κάψα με ραχιαίες νευρώσεις, και πλάγια αμβλείες νευρώσεις η κυστίδια [60], [61].

Η ονομασία «St. John' worth» λέγεται ότι οφείλεται στο γεγονός ότι το φυτό βρίσκεται σε πλήρη ανθοφορία στις 24 Ιουνίου, την ημέρα μνήμης του Ιωάννη του Προδρόμου. Οι γιατροί της κλασικής Ελλάδας και της Ρώμης χρησιμοποιούσαν το βάλαμο για την επούλωση των τραυμάτων. Ο Παρέκελσος γράφει ενθουσιασμένος: «Δεν είναι δυνατό να βρεθεί καλύτερο φάρμακο για τις πληγές σε όλες τις χώρες». Στον Μεσαίωνα έχαιρε μεγάλης εκτίμησης καθώς πίστευαν ότι έχει τη δύναμη να διώχνει τους δαίμονες. Μόλις τον 18^ο αιώνα ανακαλύφθηκε επίσης η δράση ενίσχυσης των νεύρων, που σήμερα βρίσκεται στο επίκεντρο της ιατρικής χρήσης [62].

Οι εδαφικές και κλιματικές συνθήκες της χώρα μας είναι ευνοϊκές για τη συστηματική καλλιέργεια του βάλαμου το οποίο δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις. Έτσι μπορούν να αξιοποιηθούν χέρσες και ξερικές εκτάσεις με την καλλιέργεια του [63].

Αναπαράγεται κυρίως με σπόρους, αλλά και με παραφυάδες από τις ρίζες. Οι σπόροι και τα καψίδια διασπείρονται και μεταφέρονται με το νερό, προσκολλώνται σε μηχανήματα, ρόδες αυτοκινήτων, παπούτσια, ρουχισμό, στα πόδια, τη γούνα και τα φτερά των ζώων. Οι σπόροι είναι τόσο ανθεκτικοί που ακόμα και αν καταναλωθούν από ζώα παραμένουν άθικτοι στα κόπρανά τους. Η βλάστηση του φυτού γίνεται κατά την άνοιξη ενώ το pH του χώματος πρέπει να είναι ελαφρώς όξινο ή ουδέτερο. Αντίθετα, τα ιόντα ασβεστίου στο νερό φαίνεται να αναστέλλουν τη βλάστηση σε ορισμένα είδη [64], [65], [66], [67]. Η εποχή της άνθησης είναι Ιούνιος - Σεπτέμβριος, της συλλογής Ιούλιος - Αύγουστος και χρησιμοποιούμενα μέρη ολόκληρο το φυτό. Σημειώνεται ότι τα άνθη πρέπει να χρησιμοποιούνται φρέσκα ή αποξηραμένα, αλλά όχι ύστερα από μακροχρόνια φύλαξη. Όταν μείνουν πολύ καιρό, τα φύλλα κιτρινίζουν, τα άνθη αποχρωματίζονται, όλο το φυτό παίρνει ένα καστανό χρώμα και μειώνονται οι θεραπευτικές τους ιδιότητες.

Το βάλαμο είναι πολύ γνωστό ως φάρμακο που γιατρεύει τις πληγές. Θεωρείται φάρμακο για τις νευραλγίες και την κατάθλιψη, ιδίως κατά την εμμηνόπαυση. Είναι ακόμα διουρητικό και αιμοστατικό, κατά των θρομβώσεων και κατά των ελωδών πυρετών, καθώς και αποχρεμπτικό. Επιπλέον θεωρείται χρήσιμο κατά της χρόνιας καταρροής, της οδυνηρής πέψης, της ξινίλας, της γαστρίτιδας, της βρογχίτιδας, του άσθματος, των νόσων της χοληδόχου κύστης, της ουρικής αρθρίτιδας, της νυχτερινής ενούρησης και των ρευματισμών [68], [69].

2.8.10 Ιπποφαές



Κοινή ονομασία	Ιπποφαές
Είδος	<i>Hippophae rhamnoides</i>
Τάξη:	Ροδώδη
Οικογένεια:	Ελαιαγνοειδή

Εικόνα 10 *Hippophae rhamnoides*

Είναι ένας ξυλώδης αγκαθωτός, φυλλοβόλος θάμνος ή δέντρο, μερικές φορές φτάνοντας μέχρι και τα 18m, ακανόνιστου σχήματος με αγκαθωτά, γκρι κλαδιά. Φύλλα γραμμοειδή-λογχοειδή, εναλλασσόμενα, μήκους 2-6 cm, που καλύπτονται στις δύο πλευρές με ασημί-λευκά λέπια, ενώ από την κάτω πλευρά φέρουν καφέ στίγματα. Άνθη δυσδιάκριτα, κίτρινα, μονογενή εμφανίζονται πριν από τα φύλλα. Καρποί μονόσπερμη δρύπη, κοκκινωποί πορτοκαλί, που ποικίλλουν σε μήκος από 5-12 mm [70].

Το όνομά του το οφείλει στα στρατεύματα του Μεγάλου Αλεξάνδρου, που παρατήρησαν ότι τα άρρωστα και τραυματισμένα άλογα που έτρωγαν τα φύλλα και τους καρπούς του φυτού ανάρρωναν γρηγορότερα, αποκτούσαν περισσότερη δύναμη, ενώ το τρίχωμά τους δυνάμωνε και γινόταν πιο λαμπερό. Το ονόμασαν ιπποφαές, που στα νέα ελληνικά σημαίνει φωτεινό, λαμπερό άλογο (ίππος: άλογο, φάος: φως, λάμψη) [71].

Είναι αυτοφυές σε όλη την Ευρώπη, από τη Νορβηγία, νότια και ανατολικά στην Ισπανία, την Ασία την Ιαπωνία και τα Ιμαλάια. Το Ιπποφαές συνήθως φυτεύεται (σπορόφυτα) ή σπείρεται την άνοιξη. Τα καταφέρνει στα περισσότερα εδάφη, συμπεριλαμβανομένων των φτωχών, εφ' όσον δεν είναι πάρα πολύ ξηρά. Απαιτούν μια ηλιόλουστη θέση, με τα σπορόφυτα να αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν σε σκιερές θέσεις και τους ώριμους θάμνους να πεθαίνουν γρήγορα, αν επισκιάζονται από πιο ψηλά φυτά. Είναι πολύ ανεκτικό όταν εκτίθεται στη θάλασσα. Τα φυτά είναι αρκετά βραδείας ανάπτυξης. Όταν μεγαλώσει στην ενδοχώρα ευδοκimei καλά και είναι ανθεκτικό στους περίπου -25°C . Το είδος αυτό έχει συμβιωτικές σχέση με ορισμένα βακτήρια του εδάφους, τα οποία σχηματίζουν οζίδια στις ρίζες του και συμβάλλουν στην καθήλωση του ατμοσφαιρικού αζώτου. Κάποιο από το άζωτο που δεσμεύουν χρησιμοποιείται από το αναπτυσσόμενο φυτό, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και από άλλα φυτά τα οποία αναπτύσσονται σε κοντινή απόσταση. Τα φυτά παράγουν άφθονες παραφυάδες, ειδικά όταν καλλιεργούνται σε αμμώδη εδάφη [72].

Το ιπποφαές χρειάζεται επαρκές επίπεδο θρεπτικών ουσιών ώστε να έχει καλή απόδοση παραγωγής και καρπούς καλής ποιότητας. Ανταποκρίνεται καλά στο φωσφόρο. Η απόδοσή του εξαρτάται από την έκθεση στο φως, καθώς στο ιπποφαές δεν αρέσει η σκιά [73].

Με τα φύλλα του ιπποφαούς γίνονται θεραπευτικά ροφήματα. Τα φύλλα του χρησιμοποιούνται νωπά ή αποξηραμένα. Οι χρήσεις του είναι εναντίον του βήχα, ως αποχρεμπτικό αλλά και σε νοσήματα του αναπνευστικού, για τη βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος και της λειτουργίας του πεπτικού συστήματος. Χρησιμοποιείται για τη μείωση της πίεσης και της χοληστερόλης και αύξηση της γονιμότητας, ενδυνάμωση οστών, ενδυνάμωση μυών, ανακούφιση πόνου, και αναζωογόνηση δέρματος [74]. Κομπρέσα από Ιπποφαές εφαρμόζεται σε εγκαύματα από τον ήλιο, για να μειώσει πιθανά πρηξίματα, ερεθισμούς και για να επιταχύνει την επούλωση.

Τα αποξηραμένα φύλλα του ιπποφαούς όταν γίνονται ρόφημα ταιριάζουν με το τίλιο, το φασκόμηλο, το τσάι του βουνού, τη μέντα και το τζίντζερ [75], [76]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

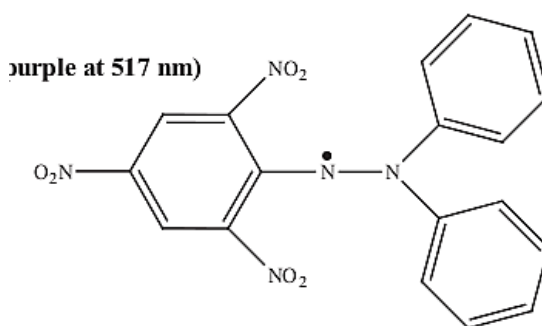
ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ — ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

3.1 Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις

Το φαινολικό περιεχόμενο πολλών τροφίμων έχει συσχετισθεί με τη δραστικότητα των συστατικών τους έναντι ελεύθερων ριζών [77], [78]. Η αντιριζική δράση χαρακτηρίζει την ικανότητα των ενώσεων να αντιδράσουν με συγκεκριμένη ρίζα. Η αντιοξειδωτική δράση είναι ουσιαστικά η ικανότητα αναστολής της διαδικασίας της οξειδωσης μέσα σε ένα σύστημα. Κατά συνέπεια, σε πολλές περιπτώσεις, η αντιριζική ικανότητα μιας ουσίας ή μείγματος ουσιών, που υπολογίζεται μέσω δοκιμών που χρησιμοποιούν κάποιο είδος ελεύθερης ρίζας, δεν ανταποκρίνεται στην αντιοξειδωτική δράση που έχει η ουσία ή το μείγμα σε κάποιο τρόφιμο ή σε οργανισμό. Είναι λογικό, όμως, να υποθέτουμε ότι εφόσον το υπό εξέταση δείγμα έχει αυξημένη ικανότητα σάρωσης μιας ελεύθερης ρίζας *in vitro*, τότε ενδέχεται να είναι δραστικό αντιοξειδωτικό [78], [79]

3.1.1 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης / ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH• (2,2 diphenyl-1-picryl-hydrazyl)

Ο προσδιορισμός της αντιριζικής ικανότητας γίνεται με τη χρήση της ρίζας DPPH• (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο). Η ρίζα αυτή παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 515–517 nm, έχει δηλαδή χρώμα μωβ. Η DPPH• δεν διμερίζεται σε αντίθεση με άλλες ελεύθερες ρίζες,



Εικόνα 11 Δομή της ρίζας DPPH• που απορροφά στα 516 nm

αλλά παραμένει στη μονομερή της μορφή σε διαλύματα, παρουσιάζει σταθερή τιμή απορρόφησης σε μεγάλο εύρος pH και δεν οξειδώνεται εύκολα. Η δοκιμή DPPH• είναι διαδεδομένη για το χαρακτηρισμό των φαινολικών ενώσεων από τους επιστήμονες τροφίμων [80]. Παρουσία ενός σαρωτή ελευθέρων ριζών, η

ρίζα DPPH• δέχεται ένα ηλεκτρόνιο ή ένα υδρογόνο, γίνεται διαμαγνητικό μόριο και το μωβ χρώμα της χάνεται σταδιακά, κάτι που συνάδει στοιχειομετρικά με τον αριθμό των ηλεκτρονίων ή υδρογόνων που έλαβαν μέρος στην αντίδραση [81].

Οι αντιδράσεις που μπορούν να λάβουν χώρα είναι οι εξής:



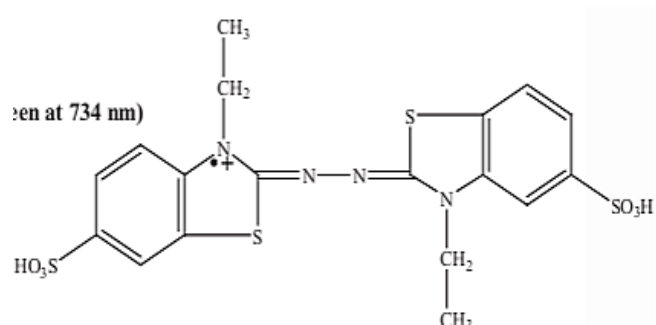
Όπου AH= αντιριζική ένωση [82], [83].

Η ρίζα (A•) που δημιουργείται μπορεί να διμερισθεί ή να αντιδράσει με μια ρίζα DPPH• με αποτέλεσμα το σχηματισμό των σταθερών μορίων, A-A ή DPPH-A [79].

Ο χρόνος που απαιτείται για κάθε ένωση ή μείγμα ενώσεων (π.χ. τρόφιμα) να φθάσουν σε μια κατάσταση ισορροπίας στην παραπάνω αντίδραση ποικίλει από μερικά λεπτά έως πολλές ώρες.

3.1.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS•+ [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)]

Είναι μια σχετικά πρόσφατα αναπτυγμένη δοκιμή στην οποία χρησιμοποιείται η ρίζα ABTS•+ [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] και εφαρμόζεται εξίσου σε λιπόφιλα και υδρόφιλα

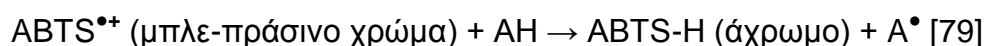
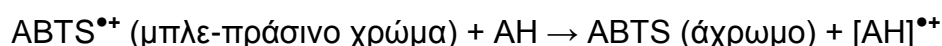


Εικόνα 12 Δομή της ρίζας ABTS•+ που απορροφά στα 734 nm

αντιοξειδωτικά [84], [85]. Η μεθοδολογία που ακολουθείται για την εκτίμηση της αντιριζικής ισχύος διάφορων ουσιών, μεταξύ αυτών και των φαινολικών, βασίζεται σε μια αντίδραση αποχρωματισμού, όπως και η δοκιμή με τη ρίζα DPPH•. Η μονοκατιοντική ρίζα ABTS•+ χρώματος μπλε-πράσινου (μέγιστο

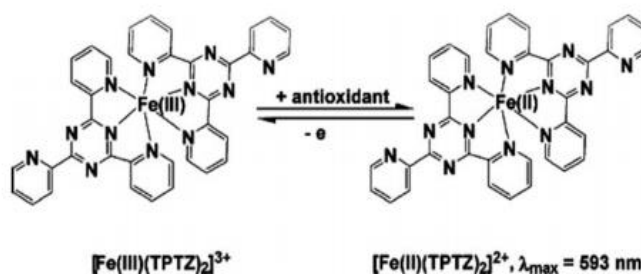
απορρόφησης στα 734 nm) σχηματίζεται άμεσα από την οξειδωση του μη ριζικού μορίου ABTS με υπερθειικό κάλιο. Παρουσία μορίων που είναι δότες υδρογόνου, η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ μειώνεται ποσοτικά ανάλογα με τη δραστηριότητα του δότη υδρογόνου, τη συγκέντρωσή του και τη διάρκεια της αντίδρασης [85].

Η σάρωση της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ πραγματοποιείται είτε με τη μεταφορά ενός υδρογόνου είτε με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από μια αντιριζική ένωση (AH).



3.1.3 Ανάλυση με τη μέθοδο αναγωγικής δύναμης του σιδήρου (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)

Η δοκιμή FRAP είναι μία γρήγορη και άμεση μέθοδος για υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δύναμης συνολικά (αναγωγικής ικανότητας) ενός τροφίμου και στηρίζεται στην αναγωγή, κάτω από όξινες συνθήκες (pH



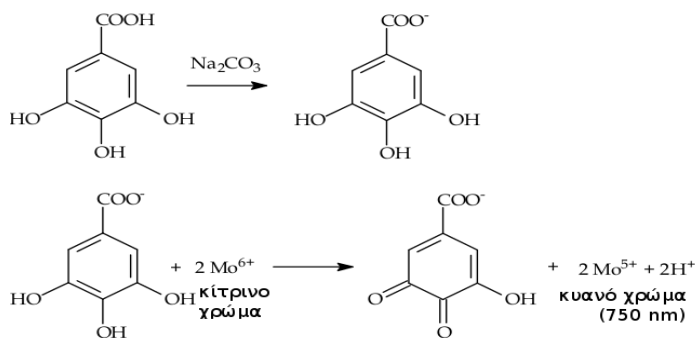
Εικόνα 13 Αναγωγή σιδήρου

3.6), του κίτρινου συμπλόκου Fe(III)–τριπυριδυλο-τριαζίνη (Fe(III)–TPTZ) σε δισθενή μορφή, που αποκτά έντονο μπλε χρώμα και απορροφά στα 593 nm.

3.1.4 Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο υπολογίζεται με τη χρήση του αντιδραστήριου Folin–Ciocalteu (F–C). Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά το 1972 από τους Folin και Ciocalteu για τη μέτρηση της τυροσίνης, αργότερα, το 1965, προσαρμόστηκε από τους Singleton and

Joseph για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ουσιών σε κρασί [86].



Εικόνα 14 Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F–C μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e⁻²¹

Το αντιδραστήριο F–C αποτελείται από άλατα του μολυβδαινίου (Mo) και

του βολφραμίου (W). Σε αλκαλικό περιβάλλον, η φαινολική ένωση οξειδώνεται, και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξειδία που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου [79]. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου, η συγκέντρωση του οποίου εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου προτύπου [86].

3.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός(NMR)

3.2.1 Εισαγωγή

Το NMR είναι μια ευέλικτη σύγχρονη αναλυτική τεχνική με εξέχουσα θέση στο χαρακτηρισμό και στην ποιοτική ανάλυση τροφίμων. Εκτενής βιβλιογραφία αναφέρει τη χρήση του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υψηλής Διαχωριστικής Ικανότητας (High Resolution (HR) – NMR) στην ταυτοποίηση μεταβολιτών σε τρόφιμα, φυτά και ποτά [87], [88], [89].

Πλεονεκτήματα της χρήσης NMR στην ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων όπως τα τρόφιμα, είναι:

1. Αποτελεί μια μη καταστροφική τεχνική, διότι το δείγμα μπορεί να ανακτηθεί μετά την ανάλυση.
2. Η παρασκευή των δειγμάτων είναι εύκολη δεδομένου ότι δεν απαιτείται κάποιος διαχωρισμός και οι χρόνοι λήψης είναι σύντομοι (συνολικά της τάξης των λεπτών) τουλάχιστον σε ότι αφορά τα απλά πειράματα μίας διάστασης.

3. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό πολλών οργανικών συστατικών ακόμα και χαμηλής συγκέντρωσης.
4. Η ταυτοποίηση ενώσεων μπορεί να υποστηριχθεί από μια σειρά ενημερωμένων λογισμικών και βάσεων δεδομένων
5. Χρήση δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR, όπως πειράματα COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο χαρακτηρισμό νέων μεταβολιτών.

Ενώ στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η χαμηλότερη ευαισθησία της σε σχέση με τις τεχνικές Φασματοσκοπίας μάζας και το υψηλό κόστος του επιστημονικού εξοπλισμού

3.2.2 Βασικές αρχές φασματοσκοπίας NMR

Η φασματοσκοπία NMR σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της πυρηνικής μαγνητικής διπολικής ροπής σε εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Η πυρηνική μαγνητική διπολική ροπή προκαλείται από την ιδιοπεριστροφή, spin, του πυρήνα. Το spin αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα της ύλης, όπως και το ηλεκτρικό φορτίο και η μάζα. Το spin των πρωτονίων και των νετρονίων λαμβάνει τιμές $\pm 1/2$. Τα spin των ομοειδών νουκλεονίων συζευγνύονται και αλληλοαναιρούνται ανά ζεύγη μηδενίζοντας έτσι το συνολικό πυρηνικό spin. Η παρουσία μονήρους υποατομικού σωματιδίου προκαλεί την εμφάνιση πυρηνικού spin I και πυρηνικής μαγνητικής ροπής μ .

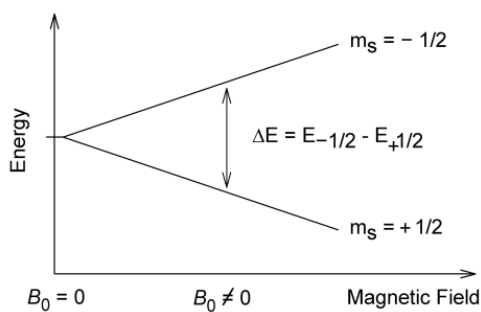
$$\mu = \gamma I \frac{h}{2\pi} \quad (1)$$

Ο συντελεστής αναλογίας γ ονομάζεται γυρομαγνητικός λόγος και σχετίζεται με την κατανομή της μάζας και του φορτίου στον πυρήνα, άρα η τιμή του εξαρτάται από το είδος του πυρήνα.

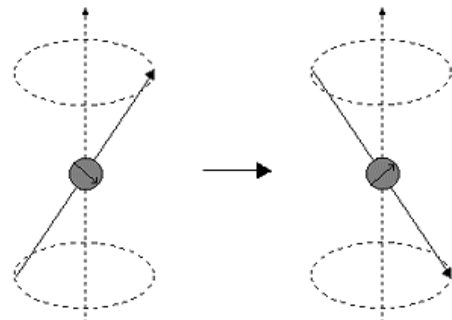
Ένας πυρήνας με πυρηνικό μαγνητικό spin I μπορεί να λάβει $(2I+1)$ προσανατολισμούς ίσης ενέργειας. Εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου αναιρεί τον ενεργειακό αυτό εκφυλισμό και διαχωρίζει τις ενεργειακές στάθμες (διάσχιση Zeeman). Οι πυρήνες που συνήθως παρατηρούνται με φασματοσκοπία NMR είναι του πρωτονίου ^1H και του άνθρακα ^{13}C με

πυρηνικό spin $I=1/2$. Με εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 η πυρηνική μαγνητική ροπή μπορεί να λάβει δύο προσανατολισμούς, παράλληλα ή αντιπαράλληλα, προς τη φορά του πεδίου, και εξαναγκάζεται σε μεταπτωτική κίνηση γύρω από το άνωσμα του μαγνητικού πεδίου με συχνότητα ιδιοπεριστροφής που χαρακτηρίζει τον κάθε πυρήνα (συχνότητα Larmor).

$$\omega = \gamma \cdot B_0 \text{ (2)}$$



Εικόνα 16 Ενεργειακή διαφορά (3E) μεταξύ των καταστάσεων πυρηνικού spin συναρτήσει της έντασης του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου



Εικόνα 15 Αυτές οι δύο διαφορετικές καταστάσεις προσανατολισμού της μαγνητικής ροπής, απεικονίζονται στο παραπάνω σχήμα για την περίπτωση ενός πυρήνα με spin $1/2$

Οι δύο αυτοί προσανατολισμοί αντιστοιχούν σε δύο ενεργειακές στάθμες, τη βασική και τη διεγερμένη και η διαφορά τους είναι ανάλογη του μαγνητικού πεδίου

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} = h\nu \text{ (3)}$$

Η κατανομή του πληθυσμού στις στάθμες, ακολουθεί την κατανομή Boltzmann:

$$\frac{n_2}{n_1} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \text{ (4)}$$

όπου n_1 ο πληθυσμός της βασικής στάθμης και n_2 αυτός της διεγερμένης, με την χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη να περιέχει ελάχιστα περισσότερους πυρήνες [86] [90].

Ο πληθυσμός των δύο σταθμών δύναται να εξισωθεί με απορρόφηση ενέργειας ίσης προς την ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών ΔE . Την ενέργεια αυτή παρέχει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συχνότητας ίση με τη συχνότητα Larmor του πυρήνα (έτσι αιτιολογείται ο χρησιμοποιούμενος όρος “συντονισμός”).

$$\nu = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad (5)$$

Η ένταση του μαγνητικού πεδίου μπορεί να κυμαίνεται από 7 – 24 Tesla και οι ιδιοσυχνότητες Larmor των πυρήνων εντός τέτοιων πεδίων είναι στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (~ MHz).

Με την παύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, οι πυρήνες αποδιεγείρονται ενώ ταυτόχρονα εκπέμπεται η ενέργεια που έχουν απορροφήσει και ανιχνεύεται μέσω της τάσης που επάγεται σε συγκεκριμένα πηνία. Η ευαισθησία της φασματοσκοπίας NMR εξαρτάται από την πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ των δύο σταθμών, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος του ενεργειακού χάσματος μεταξύ των σταθμών.

3.2.3 Χημική Μετατόπιση

Εντός ενός μαγνητικού πεδίου έντασης B_0 , όλοι οι πυρήνες πρωτονίου (ή γενικά οι μαγνητικά ενεργοί πυρήνες ενός είδους) ενός μορίου θα έπρεπε να συντονίζονται στην ίδια συχνότητα. Στην πραγματικότητα όμως αυτό δε συμβαίνει διότι κάθε πυρήνας επηρεάζεται διαφορετικά από την ένταση του μαγνητικού πεδίου λόγω του διαφορετικού χημικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται. Πιο συγκεκριμένα, λόγω της κίνησης των ηλεκτρονίων σθένους που περιβάλλουν τον πυρήνα επάγεται ένα πολύ μικρότερου μεγέθους μαγνητικό πεδίο B' , το οποίο αντιτίθεται στο εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο B_0 . Η πραγματική ένταση του μαγνητικού πεδίου που αισθάνεται κάθε ενεργός πυρήνας δίνεται από τη σχέση

$$B_{\text{eff}} = B_0 - B' = B_0(1 - \sigma) \quad (4)$$

όπου σ , η σταθερά προάσπισης, η οποία είναι συνάρτηση του ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος του πυρήνα.

Με αντικατάσταση της εξίσωσης (6) στη σχέση (2) προκύπτει η πραγματική συχνότητα συντονισμού του κάθε πυρήνα, που ονομάζεται χημική μετατόπιση

$$\omega = \gamma B_0(1 - \sigma) \quad (5)$$

Προκειμένου η χημική μετατόπιση των φασματικών κορυφών μίας ένωσης να είναι ανεξάρτητη της έντασης του πεδίου του χρησιμοποιούμενου φασματογράφου, εκφράζεται με βάση την σχέση (8)

$$\delta = \frac{\omega_1 - \omega_{\text{REF}}}{\gamma_1 \cdot B_0} \cdot 10^6 \quad (6)$$

Η χημική μετατόπιση είναι αδιάστατο μέγεθος και εκφράζεται σε ppm (parts per million) [88].

3.2.4 Σταθερά Σύζευξης

Η spin-spin σύζευξη περιγράφει την αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών πυρηνικών spin που απέχουν 1,2 ή και 3 δεσμούς μέσω των δεσμικών ηλεκτρονίων. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε διάσχιση της φασματικής κορυφής ενός πυρήνα A ανάλογα με τον αριθμό των δυνατών προσανατολισμών της μαγνητικής ροπής του γειτονικού πυρήνα X. Η σταθερά σύζευξης J, εκφράζεται από την απόσταση μεταξύ των χημικών μετατοπίσεων της διασχισμένης κορυφής και μετράται σε μονάδες συχνότητας Hz ενώ το μέγεθος της εξαρτάται από τον αριθμό των δεσμών οι οποίοι μεσολαβούν μεταξύ των αλληλεπιδρώντων πυρήνων.

Η διάσχιση μιας κορυφής συντονισμού δίνει επιπλέον πληροφορίες για τη δομή του οργανικού μορίου. Για παράδειγμα, από την πολλαπλότητα μιας απορρόφησης πρωτονίου ή ομάδας πρωτονίων, είναι δυνατό να διαπιστωθεί το πλήθος των υδρογόνων που συνδέονται στο γειτονικό ή στα γειτονικά άτομα άνθρακα [90].

3.2.5 Κύρια μέρη ενός συστήματος για τη λήψη φασμάτων NMR

Μαγνήτης: Η κύρια μονάδα ενός φασματογράφου είναι ο κρυομαγνήτης. Πρόκειται για ένα μαγνήτη με τη μορφή σωληνοειδούς κατασκευασμένου από υπεραγώγιμο υλικό.

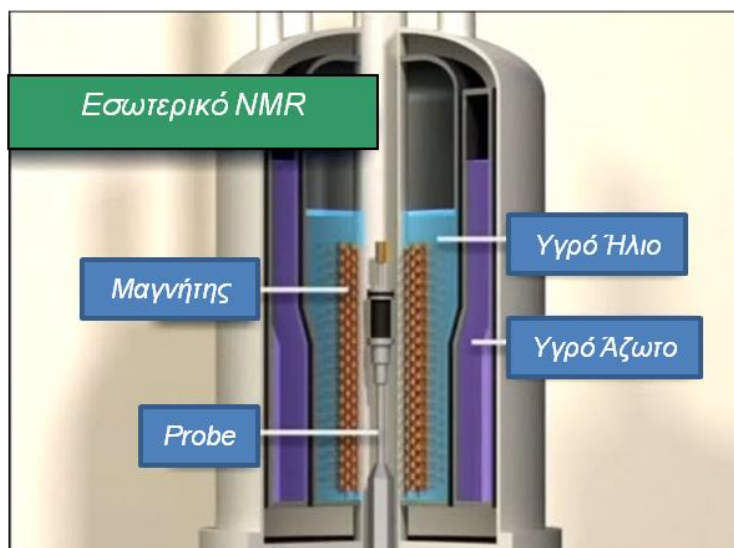
Το σωληνοειδές αφού φορτιστεί διαρρέεται συνεχώς από ρεύμα για πάντα παράγοντας μαγνητικό πεδίο το οποίο δε χρειάζεται επιπρόσθετη

ηλεκτρική ισχύ για να συντηρηθεί. Ως υπεραγώγιμα υλικά χρησιμοποιούνται

κυρίως τα κράματα

NbTi και Nb₃Sn τα οποία αποκτούν υπεραγωγιμότητα σε θερμοκρασία μικρότερη των 20K. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτή η θερμοκρασία το σωληνοειδές βυθίζεται σε λουτρό υγρού ηλίου στους 4,2K (-269°C). Η θερμική μόνωση με το περιβάλλον επιτυγχάνεται με την εμβάπτιση του συστήματος σε δεύτερο ισοθερμικό δοχείο πληρωμένο με υγρό άζωτο (78K ή -195°C). Το σωληνοειδές περιβάλλεται από πηνία «ομογενοποίησης» τα οποία μέσω εκπομπής αντισταθμιστικών ρευμάτων στοχεύουν στη διατήρηση της ομοιογένειας του πεδίου.

Αισθητήρας (probe): Στο κέντρο του μαγνήτη τοποθετείται ο αισθητήρας. Αυτός περιλαμβάνει συντονιζόμενα κυκλώματα για την εκπομπή υψηλών συχνοτήτων παλμών προς το δείγμα ώστε να διεγερθούν οι παρατηρούμενοι πυρήνες και να ληφθεί η κυματομορφή από την αποδιέγερση. Η αποδιέγερση των πυρήνων επάγει ρεύμα, το οποίο ενισχύεται και καταλήγει στο δέκτη όπου ψηφιοποιείται. Το ψηφιοποιημένο σήμα ματασχηματίζεται κατά Fourier



Εικόνα 17 Εσωτερικό Φασματογράφου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

ώστε να ληφθεί στο πεδίο συχνοτήτων το σύνολο των κορυφών συντονισμού, του υπό διερεύνηση μορίου.

Τμήμα προετοιμασίας, λήψης και επεξεργασίας σήματος (console, κονσόλα): περιλαμβάνει μονάδες σύνθεσης ραδιοσυχνοτήτων, εκπομπής ραδιοπαλμών, λήψης αναλογικών σημάτων, ψηφιοποίησης και επεξεργασίας των λαμβανόμενων σημάτων.

Η/Υ: Στον Ηλεκτρονικό Υπολογιστή είναι εγκατεστημένο το λογισμικό του φασματογράφου το οποίο ελέγχει όλες τις διεργασίες για τη λήψη και την επεξεργασία των φασμάτων.

3.2.6 Φασματοσκοπία πρωτονίου μίας διάστασης ($^1\text{H-NMR}$)

Το δείγμα ακτινοβολείται με παλμό ($p1$) διάρκειας κάποιων μικροδευτερολέπτων (μs), ο οποίος εκτρέπει τη μαγνήτιση των πυρήνων υδρογόνου από τη θέση ισορροπίας. Η FID (Free Induction Decay) που λαμβάνεται κατά την αποδιέγερση των πυρήνων μετασχηματίζεται κατά Fourier αποδίδοντας μία Lorentzian καμπύλη αποδιέγερσης σε συχνότητα χαρακτηριστική για το μελετούμενο πυρήνα και το περιβάλλον του [87].

3.2.7 Παλμική Ακολουθία NOESYPRESAT

Η ακολουθία 1D-NOESYpresat χρησιμοποιείται συνήθως στις μελέτες μεταβολικού αποτυπώματος για τη λήψη του φάσματος ^1H χρησιμοποιείται μια ακολουθία που περιλαμβάνει δύο χρονικά διαστήματα κατά τα οποία η κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του νερού ακτινοβολείται εκλεκτικά. Η παρατεταμένη ακτινοβολήση του νερού εμποδίζει την αποδιέγερση της μαγνήτισης των πρωτονίων του, αυξάνοντας έτσι το δυναμικό εύρος στη λήψη του σήματος FID και αναδεικνύοντας κορυφές χαμηλού σήματος που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες μικρής περιεκτικότητας. Με τη χρήση του μεγάλου χρόνου ακτινοβολήσης επιτυγχάνεται η εξασθένιση του σήματος του νερού [91].

3.3 Μεταβολομική μελέτη

Με τον όρο μεταβολομική μελέτη εννοούμε, τη συστηματική μελέτη, των μοναδικών χημικών αποτυπωμάτων, που αφήνουν πίσω τους οι κυτταρικές λειτουργίες. Ενώ η μεταβολομική αντανακλά αλλαγές σε κυτταρικό επίπεδο [92], [93].

Σε ότι αφορά το φυτικό βασίλειο εκτιμάται ότι το σύνολο των μεταβολιτών σε αυτό ξεπερνά τις 200.000 ενώ επιπλέον, πολλοί από αυτούς λειτουργούν ευεργετικά για τον άνθρωπο [94]. Στον τομέα των τροφίμων, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός ενός μεγάλου αριθμού χημικών συστατικών (μεταβολιτών) βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση της χημικής σύστασης των τροφίμων, στην ανίχνευση ποιότητας και αυθεντικότητας των τροφίμων και στον γεωγραφικό προσδιορισμό [95].

Οι μεταβολομικές μελέτες προϋποθέτουν το συνδυασμό αναλυτικών τεχνικών υψηλής απόδοσης (high-throughput). Τέτοιες τεχνικές προηγμένης τεχνολογίας που επιτρέπουν την πρόσβαση στο ενιαίο μεταβολικό προφίλ είναι ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) και η φασματοσκοπία μάζας (LCMS, GC-MS, CE-TOF-MS, UPLC-TOF-MS).

Μια μεταβολομική μελέτη συνεπάγεται την εξαγωγή μεγάλου όγκου δεδομένων. Η διαχείριση τους απαιτεί καταρχάς την περιστολή τους (Data Reduction) με μεθόδους όπως η τμηματοποίηση του φάσματος σε φασματικές περιοχές (spectral binning). , Η χρήση μαθηματικών αλγορίθμων για την προεπεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων ώστε να αντισταθμιστούν οι μετατοπίσεις των κορυφών συντονισμού συνήθως λόγω διακύμανσης του pH (Peak Alignment). Τέλος ο νέος πίνακας δεδομένων εισάγεται σε προγράμματα πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης.

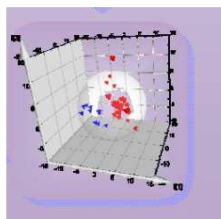
Προετοιμασία Δείγματος



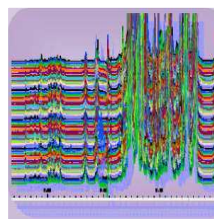
Λήψη Φάσματος NMR



Πολυμεταβλητή Ανάλυση Δεδομένων



Μαθηματική Προετοιμασία Δεδομένων



Εικόνα 18 Διάγραμμα ροής μεταβολομικής μελέτης οίνων με χρήση φασματοσκοπίας NMR και πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης

Οι μεταβολομικές μελέτες βάσει της επεξεργασίας και της διαχείρισης των μεταβολομικών δεδομένων χωρίζονται στη «μη στοχευμένη ανάλυση» (untargeted) και στη «στοχευμένη» ανάλυση (ποσοτική ανάλυση μεταβολομικών) (targeted). Η μεταβολομική μελέτη μπορεί να γίνεται με σκοπό την Ανάλυση (Informative analysis), την Ταξινόμηση και διάκριση (Discriminative analysis) ή την Ανάλυση πρόβλεψης (Predictive analysis) [90].

3.3.1 Χημειομετρία

Η χημειομετρική ανάλυση είναι απαραίτητη για την εξαγωγή της χημικής πληροφορίας από πολύπλοκα σύνολα δεδομένων, που δημιουργούνται, στο πεδίο των μεταβολομικών μελετών. Στη Χημεία συχνά χρησιμοποιείται ο όρος «αναγνώριση προτύπων» (pattern recognition) ως συνώνυμο της πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων προκειμένου να καταδειχθεί πώς η πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων βρίσκει το χαρακτηριστικό μοτίβο (πρότυπο) και κατατάσσει τα δεδομένα σε ομάδες (classes). Στις μεταβολομικές μελέτες, μέθοδοι όπως η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) και των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square Regression, PLS) εφαρμόζονται

προκειμένου να επιτευχθεί α) μια σφαιρική θεώρηση των δεδομένων, β) η ταξινόμηση και η διάκριση των δειγμάτων και γ) η εξαγωγή μοντέλου παλινδρόμησης. Η βασική χρησιμότητα της PCA είναι η προβολή ενός πίνακα δεδομένων πολλών μεταβλητών σε ένα διανυσματικό χώρο λίγων διαστάσεων (2 έως 5) ώστε να είναι δυνατή η επισκόπηση των δεδομένων και να αναδειχτούν πιθανές ομαδοποιήσεις των παρατηρήσεων, τάσεις καθώς και έκτροπες παρατηρήσεις (outliers) [91].

3.3.2 SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy)

Η επιβλεπόμενη μέθοδος SIMCA βασίζεται στην μέθοδο ταξινόμησης PCA. Δημιουργούνται PCA μοντέλα για κάθε γνωστή "ομάδα" παρατηρήσεων. Το κάθε μοντέλο PCA χρησιμοποιείται κατόπιν για να ελέγξει σε κάθε ομάδα τις παρατηρήσεις που έχουν αρχικά οριστεί και να προβλέψει αν ανήκουν πράγματι σε αυτές σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Ουσιαστικά δηλαδή ελέγχει την ομοιογένεια των παρατηρήσεων που έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με το PCA σε μια ομάδα. Οι παρατηρήσεις που δεν προβλέπονται ορθά από τα μοντέλα PCA, έχουν μεγάλα υπόλοιπα (residuals), ταξινομούνται εκτός του μοντέλου PCA και τελικά τίθενται εκτός της ομάδας.

Χημειομετρική ανάλυση

Η ανάγνωση των φασμάτων έγινε μέσω του προγράμματος Chemomix Suite 7.0

Η μήτρα δεδομένων των επεξεργασμένων φασματικών συνόλων εισάγονται στο λογισμικό για στατιστική ανάλυση SIMCA-P 14,0 (Umetrics, Umeå, Σουηδία). Η διερευνητική ανάλυση σε κύριες συνιστώσες χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αποκτηθεί μια γενική εικόνα και να απεικονίσει οποιαδήποτε σχέση (τάσεις, ακραίες τιμές) μεταξύ των παρατηρήσεων (δείγματα). Ένα μοντέλο PCA υπολογίζει τη συστηματική διακύμανση σε μια μήτρα δεδομένων από ένα χαμηλό διαστάσεων μοντέλο. Τα φασματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με Pareto κλιμάκωση (Par) και το μοντέλο PCA εξήχθη σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Στη συνέχεια ακολούθησε περαιτέρω υποβολή των δεδομένων στην τεχνική OPLS-DA. Αυτή η μέθοδος είναι μια επέκταση της μεθόδου παλινδρόμησης PLS που καταφέρνει να αυξήσει την ποιότητα

του μοντέλου ταξινόμησης διαχωρίζοντας τη συστηματική διακύμανση X σε δύο μέρη, το ένα που σχετίζεται γραμμικά με Y (προγνωστική πληροφορία) και άλλο που είναι ανεξάρτητο με το Y (ορθογώνια πληροφορία). Στα εξαγόμενα μοντέλα OPLS-DA σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% εφαρμόστηκε Pareto κλιμάκωση (Par). Συγκεκριμένα, η εφαρμογή της επιτρέπει και σε μεταβολίτες χαμηλής έντασης να επηρεάσουν την ανάλυση εφόσον η μεταβολή τους συνιστά συστηματική διακύμανση. Τα εξαγόμενα αποτελέσματα αναδεικνύουν τις μεταβλητές που διαφέρουν σημαντικά. Επίσης, η χρήση σχεδιαγράμματος S-line αναδεικνύει τους σημαντικότερους μεταβολίτες που ορίζουν κυρίως την ιδιότητα του "μέλους" σε μία κατηγορία. Αυτή η απεικόνιση εκφράζεται μέσω χρωματικής κλίμακας.

Τα διαγράμματα σημαντικότητας (VIP) χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή μεταβλητών που εμφανίζουν τη συνολική σημασία της κάθε μεταβλητής (x) επί όλων των απαντήσεων (Y) συσσωρευτικά σε όλες τις συνιστώσες. Όροι με VIP μεγαλύτερο από 1, είναι οι πιο κατάλληλοι για την ερμηνεία των τιμών Y .

Η ποιότητα του προκύπτοντος μοντέλου περιγράφεται από τις τιμές $R^2X(\text{cum})$ ($0 \leq R^2 \leq 1$) και $Q^2(\text{cum})$. Η τιμή R^2 ορίζεται ως το ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων που εξηγείται από το μοντέλο και υποδεικνύει την επιτυχία του (goodness of fit). Η τιμή Q^2 ορίζεται ως το ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων που προβλέπεται από το μοντέλο και εκφράζει την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου (goodness of prediction).

Τα μοντέλα παλινδρόμησης επικυρώθηκαν με τη χρήση της διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης διακύμανσης (CV-ANOVA). Ιδιαίτερα, η τιμή $p < 0,05$ δείχνει την αξιοπιστία ενός μοντέλου και την ευαισθησία του στον αποκλεισμό ενός δείγματος ή και μίας παραμέτρου [90].

3.4 Ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)

3.4.1 Εισαγωγή

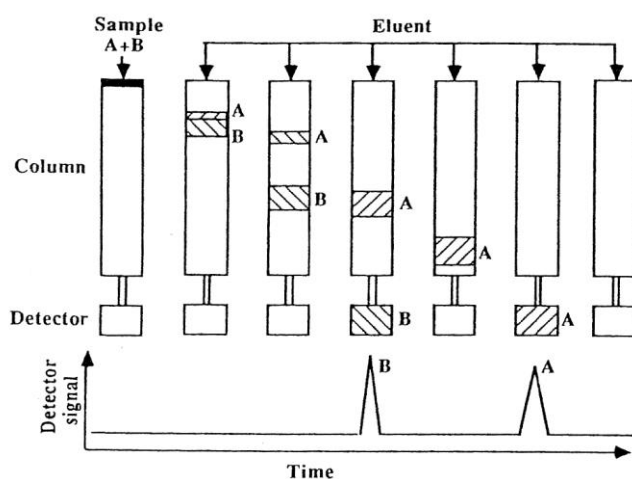
Η χρωματογραφική ανάλυση ανήκει σε μια σειρά αναλυτικών τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και προσδιορισμού συστατικών μείγματος οργανικών

και ανόργανων ουσιών. Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται με κατανομή (διασπορά, distribution) των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μίας κινητής, που βρίσκονται στη χρωματογραφική στήλη.

Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των συστατικών του μείγματος ως προς κάποιες ιδιότητες τους όπως το σημείο ζέσης, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία και άλλες. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης [104].

3.4.2 Μηχανισμός διαχωρισμού

Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στατική φάση προκαλώντας διαφορετική μετατόπιση επάνω σε αυτή των συστατικών του μείγματος. Με αυτό τον τρόπο τα συστατικά διαχωρίζονται μεταξύ τους και εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές όπως φαίνεται και στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19 Απεικόνιση της διαδικασίας διαχωρισμού στη χρωματογραφία

Το ηλεκτρικό σήμα που συνδέεται με το διαχωρισμό και φτάνει στον ανιχνευτή καταγράφοντάς το ως συνάρτηση του χρόνου ονομάζεται χρωματογράφημα και οι κορυφές που περιέχει είναι οι διαχωρισμένες ουσίες που εκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους [104].

3.4.3 Χρωματογραφικές παράμετροι

i. Σταθερά κατανομής

Η χρωματογραφία είναι μια θερμοδυναμική μέθοδος διαχωρισμού όπου κάθε συστατικό του δείγματος κατανέμεται ανάμεσα στην κινητή και τη στατική φάση. Για την ουσία A έχουμε: $A_{\text{κινητή}} \leftrightarrow A_{\text{στατική}}$

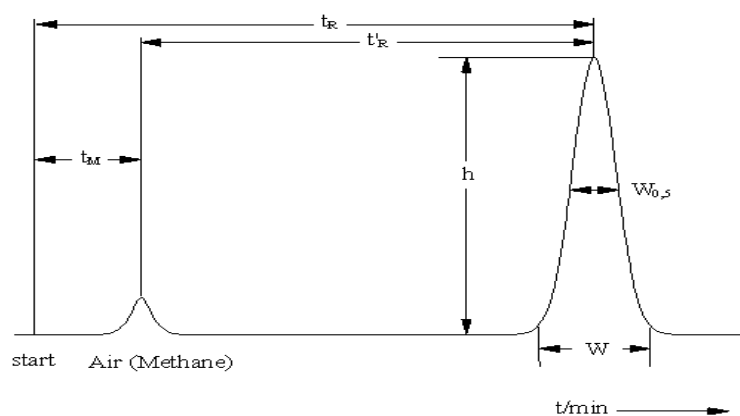
Η "αντίδραση" αυτή περιγράφεται από την σταθερά ισορροπίας K, η οποία ονομάζεται σταθερά κατανομής και ορίζεται ως:

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (1)$$

όπου C_S είναι η γραμμομοριακή συγκέντρωση της ουσίας A στην στατική φάση και C_M είναι η γραμμομοριακή συγκέντρωση της ουσίας A στην κινητή φάση [104], [105].

ii. Χρόνος κατακράτησης

Ο χρόνος που διαρκεί η έκλυση μίας μη κατακρατούμενης ένωσης ονομάζεται νεκρός χρόνος (t_M), ενώ ο χρόνος ανάμεσα στην έγχυση του δείγματος και στο μέγιστο της κορυφής ονομάζεται χρόνος κατακράτησης ή χρόνος ανάσχεσης (t_R). Ο νεκρός χρόνος μπορεί να εκφραστεί και ως μέρος του χρόνου κατακράτησης, αφού είναι ο χρόνος που ο αναλύτης μένει στην κινητή φάση, ενώ η διαφορά τους εκφράζει το χρόνο που μένει στη στατική φάση και ονομάζεται ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης ($t'_R = t_R - t_M$) [106]



Εικόνα 20 Χρόνοι ανάσχεσης

iii. Όγκος ανάσχεσης

Όγκος ανάσχεσης (V_R) είναι ο όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται για να εκλουστεί ο αναλύτης σε συγκεκριμένη ταχύτητα ροής, ενώ νεκρός όγκος (V_M) είναι ο όγκος της κινητής φάσης που περιέχεται στη στήλη. Αντίστοιχα και εδώ υπάρχει ο ανηγμένος όγκος ανάσχεση και εκφράζονται όλοι με τις σχέσεις 2-4 που ακολουθούν :

$$V_R = t_R F \quad (2)$$

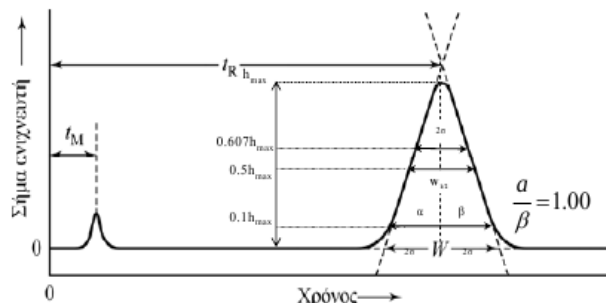
$$V_M = t_M F \quad (3)$$

$$V'_R = t'_R F \quad (4)$$

όπου F είναι η ταχύτητα της ροής της κινητής φάσης (σε mL/min) [96], [97]

iv. Εύρος και ημιεύρος κορυφής

Το εύρος της κορυφής μετριέται στη βάση της και συμβολίζεται με W , το οποίο για τις κορυφές Gauss είναι περίπου ίσο με 4 φορές την τυπική απόκλιση (σ) και αποτελεί το 95% της επιφάνειας της κορυφής. Το ημιεύρος της κορυφής μετριέται στο μέσο του ύψους της κορυφής και συμβολίζεται με $W_{1/2}$ και συνήθως χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της αποδοτικότητας της στήλης [96].



Εικόνα 21 Εύρος κορυφής

v. Ταχύτητα μετανάστευσης

Η μέση γραμμική ταχύτητα μετανάστευσης της ουσίας και η μέση γραμμική ταχύτητα u κίνησης των μορίων της κινητής φάσης είναι αντίστοιχα

$$\vec{v} = \frac{L}{t_R} \quad (5)$$

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (6)$$

όπου L είναι το μήκος της στήλης [97].

Για να συσχετίσουμε τον χρόνο κατακράτησης μιας ουσίας με τη σταθερά κατανομής της, εκφράζουμε την ταχύτητα μετανάστευσης ως κλάσμα της ταχύτητας της κινητής φάσης:

$$v = u \times \text{κλάσμα χρόνου παραμονής της ουσίας στην κινητή φάση [98]}$$

το οποίο είναι ισοδυναμεί με

$$\bar{v} = u \times \frac{\text{γραμμομόρια ουσίας στην κινητή φάση}}{\text{ολικά γραμμομόρια της ουσίας}} \quad (7)$$

Τα γραμμομόρια μιας ουσίας στην κινητή φάση δίνονται από το γινόμενο της μοριακής συγκέντρωσης C_M της ουσίας στη φάση αυτή και του όγκου της κινητής φάσης V_M . Αντίστοιχα και τα γραμμομόρια μιας ουσίας στη στατική φάση είναι το γινόμενο της συγκέντρωσης C_S της ουσίας στη φάση αυτή και του όγκου της στατικής φάσης V_S [97]. Έτσι ο παραπάνω τύπος γράφεται:

$$\bar{v} = u \times \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + K V_S / V_M} \quad (8)$$

vi. Παράγοντας κατακράτησης

Ένας βασικός όρος που εκφράζει τον βαθμό κατακράτησης των συστατικών του δείγματος στη στήλη είναι ο παράγοντας κατακράτησης k' και μετράει το πόσες φορές ο αναλυτής κατακρατείται σε σχέση με μια μη συγκρατούμενη ουσία.

$$k' = K \frac{V_S}{V_M} \quad (9)$$

Αντικαθιστώντας την παραπάνω σχέση στη σχέση (8) λαμβάνεται:

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + k'} \quad (10)$$

όπου σύμφωνα με τις εξισώσεις των γραμμικών ταχυτήτων προκύπτει ότι:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (11)$$

και αντικαθιστώντας τη σχέση (10) δίνεται η σχέση:

$$t_R = t_M \left(1 + K \frac{V_S}{V_M} \right) \quad (12)$$

Ιδανικά ο παράγοντας κατακράτησης παίρνει τιμές μεταξύ του 1 και του 20 έτσι ώστε οι διαλύτες να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη στατική φάση και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός. Αν $k'=0$ τότε σημαίνει ότι η ουσία δεν κατακρατείται καθόλου, ενώ αν $k'>20$ η ουσία κατακρατείται ισχυρά και υπάρχει μεγάλη διεύρυνση ζώνης [96], [107].

vii. Παράγοντας εκλεκτικότητας

Ο παράγοντας εκλεκτικότητας α εκφράζει το διαχωρισμό ανάμεσα σε δυο κορυφές σε ένα χρωματογράφημα και ορίζεται ως:

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} \quad (13)$$

όπου K_A και K_B οι σταθερές κατανομής της ουσίας A και B αντίστοιχα και ισχύει ότι $K_A > K_B$

Η σχέση (14) λόγω των σχέσεων (10) και (12) ισούται με:

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} = \frac{t'_{R(A)}}{t'_{R(B)}} \quad (14)$$

Ο παράγοντας εκλεκτικότητας εξαρτάται από τη φύση της στατικής και κινητής φάσης, τη θερμοκρασία της στήλης, τις ιδιότητες των διαλυμένων ουσιών και είναι πάντα μεγαλύτερος της μονάδας [105], [104].

3.4.4 Φασματομετρία μάζας και προσδιορισμός μοριακών μαζών

Κατά την πρόσκρουση ηλεκτρονίων σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, σε μόρια μιας ένωσης τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα προς ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παράγουν τα ιόντα με

διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα, που δείχνει τη σχετική ένταση του μετρούμενου ρεύματος, ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται φάσμα μαζών (mass spectrum) της ένωσης. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος. Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της, ονομάζεται φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS). Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της [98].

Το φάσμα μαζών είναι το γράφημα της (σχετικής) έντασης ως προς το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Η κορυφή του φάσματος που έχει τη μεγαλύτερη ένταση καλείται κύρια κορυφή (base peak). Συνήθως τα φάσματα εστιάζονται και ρυθμίζονται με βάση την κύρια κορυφή, οπότε το γράφημα έχει στο 100 την κύρια κορυφή και οι εντάσεις και τα ύψη των υπολοίπων κορυφών είναι σε σχέση με την κύρια κορυφή. Μια άλλη σημαντική κορυφή σε ένα φάσμα μαζών είναι η μητρική ή μοριακή κορυφή (parent peak ή molecular peak). Πέρα από αυτές τις κορυφές άλλοι τύποι κορυφών που συχνά διακρίνονται είναι: θυγατρικές κορυφές, κορυφές ισοτόπων, κορυφές του υποστρώματος-θορύβου. Οι θυγατρικές κορυφές είναι οι κορυφές που αντιστοιχούν σε θυγατρικά ιόντα που προέρχονται από τη θραύση των μοριακών ιόντων. Πολύ συχνά οι θυγατρικές κορυφές είναι οι κύριες κορυφές [98].

Η πρώτη πληροφορία που συνήθως αποζητούμε είναι η σχετική μοριακή μάζα της ένωσης που προσδιορίζουμε. Ανάλογα με την τάξη της ένωσης, έχουμε και διαφορετική ένταση σήματος στον ανιχνευτή. Για τον ιοντισμό με βομβαρδισμό ηλεκτρονίων υπάρχει διαβάθμιση της έντασης του σήματος στη σειρά:

Αρωματικές > συζυγή αλκένια > κυκλικές ενώσεις > αλκάνια

καθώς επίσης και στη σειρά:

Κετόνες > αμίνες > εστέρες > αιθέρες > καρβοξυλικά οξέα, αλδεΐδες, αμίδια

Συχνά δε λαμβάνονται μοριακά ιόντα για αλειφατικές αλκοόλες, νιτρίλια και διακλαδισμένες ενώσεις. Άλλα ιόντα που απαντώνται συχνά και επιβεβαιώνουν το μοριακό ιόν είναι: M-2 (απώλεια H₂), M-15 (απώλεια CH₃), M-18 (απώλεια H₂O), M+17 (προσθήκη NH₄), M+22 (προσθήκη Na), M+38 (προσθήκη K) και M+39 (προσθήκη Ca). Ο χαρακτηρισμός ενός ιόντος ως μοριακή κορυφή είναι ένα δύσκολο έργο, ιδιαίτερα κατά την ανάλυση άγνωστων δειγμάτων από άτομα με μικρή πείρα στη φασματομετρία μαζών. Πέραν των λογισμικών που χρησιμοποιούνται, μεγάλο ρόλο παίζουν η γνώση για το δείγμα, οι πιθανές ταυτότητες των προσδιοριζόμενων ενώσεων, καθώς και η πείρα του χειριστή του οργάνου. Σε κάποιες περιπτώσεις επιβάλλεται και η ανάλυση του ίδιου δείγματος με δύο ή και περισσότερες τεχνικές ιοντισμού [99].

3.4.5 Σύζευξη Υγρής χρωματογραφίας με Φασματομετρία μάζας

Η σύζευξη της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών έχει ως αποτέλεσμα ένα πολύ ισχυρό συνδυασμό με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Από την πλειάδα των διατάξεων σύζευξης που έχουν αναπτυχθεί, τα πιο σημαντικά επιτεύγματα θεωρούνται αυτά που επιτυγχάνουν ιοντισμό σε ήπιες συνθήκες και υπό ατμοσφαιρική πίεση. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο interface είναι ο ψεκασμός σε δυναμικό (electrospray). Η χρήση αυτού έχει κάνει δυνατή την ανάλυση μεγάλου αριθμού οργανικών ενώσεων με μοριακό βάρος έως 200.000 dalton, σε βιολογικά δείγματα, τρόφιμα και άλλα περίπλοκα δείγματα [100].

3.4.6 Φασματομετρία μαζών σε σειρά (TandemMS)

Για την ταυτοποίηση της δομής μιας ένωσης πολύ συχνά απαιτούνται από τη Φασματομετρία Μαζών περισσότερες πληροφορίες από τη μάζα του μοριακού ιόντος (δηλαδή το μοριακό βάρος της ένωσης). Για το λόγο αυτό είναι μεγάλης σημασίας η διάσπαση της ένωσης σε χαρακτηριστικά θραύσματα. Η αναγνώριση της ταυτότητας αυτών των θραυσμάτων μας επιτρέπει στη συνέχεια να έχουμε μια ασφαλέστερη αναγνώριση της δομής της αρχικής ένωσης. Η διάσπαση της μητρικής ένωσης γίνεται λόγω του περιβάλλοντος υψηλής ενέργειας μέσα στο οποίο κινούνται τα μόρια της

προσδιοριζόμενης ένωσης. Στον ιοντισμό με ηλεκτρόνια έχει ήδη περιγραφεί ότι η σύγκρουση των ηλεκτρονίων, τα οποία έχουν μεγάλη ενέργεια, έχει ως αποτέλεσμα τον ιοντισμό, αλλά και την άμεση διάσπαση της ένωσης σε θραύσματα. Στις "ήπιες" μεθόδους ιοντισμού που χαρακτηρίζονται από μικρό ποσοστό θραύσης, θα μπορούσε να επιτευχθεί υψηλό ποσοστό θραύσης, εάν εφαρμοζόταν στην πηγή ιόντων υψηλότερη ενέργεια. Όμως αυτό δεν είναι το ζητούμενο. Το επιθυμητό είναι η διατήρηση του μοριακού ιόντος, η ανάλυσή του και ο προσδιορισμός της μάζας του και στη συνέχεια η διάσπασή του σε θραύσματα και ο προσδιορισμός της μάζας αυτών [100]. Για τους λόγους αυτούς έχουν αναπτυχθεί τεχνικές και όργανα στα οποία πραγματοποιούνται με την ακόλουθη σειρά οι εξής λειτουργίες:

- ο διαχωρισμός των μαζών των προσδιοριζόμενων ενώσεων
- η απομόνωση της μάζας της ένωσης που μας ενδιαφέρει
- η διάσπασή της σε θραύσματα
- η σάρωση της μάζας των θραυσμάτων
- ο προσδιορισμός των μαζών των θραυσμάτων

3.4.7 Ταυτοποίηση και μελέτη δομής

Από τις κυριότερες εφαρμογές της φασματομετρίας μαζών είναι η ταυτοποίηση και η διερεύνηση του τύπου οργανικών (κυρίως) ενώσεων. Το φάσμα μαζών μιας ένωσης αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμά της, γιατί το μόριο κάθε ένωσης ιονίζεται και διασπάται στο φασματόμετρο μαζών με τέτοιο τρόπο, ώστε να παρέχει πληροφορίες για τη δομή της ένωσης. Η εξαιρετικά μικρή ποσότητα δείγματος (10⁻⁶-10⁻⁹ g), που απαιτείται για ταυτοποίηση, αλλά και για ποσοτική ανάλυση σε ορισμένες περιπτώσεις, με τη φασματομετρία μαζών, καθιστά την τεχνική ιδιαίτερα πολύτιμη σε μελέτες, που διεξάγονται σε απειροελάχιστες ποσότητες ουσιών βιοχημικής προέλευσης [101], [102]

3.4.8 Τμήματα οργάνου LC/MS

Ένα τυπικό φασματόμετρο μαζών αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα [101]:

- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών (κινητή φάση)
- Αντλία (σταθερής ροής ,σταθερής πίεσης)
- Αυτόματο δειγματολήπτη (Autosampler)
- Χρωματογραφική στήλη
- Την πηγή ιόντων. Εδώ τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα, είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα, μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων. Το προϊόν του ενιαίου αυτού τμήματος είναι ένα ρεύμα ιόντων (συνήθως θετικά φορτισμένων) τα οποία στη συνέχεια επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.
- Τον αναλυτή μαζών. Εδώ γίνεται διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z που φέρουν. Είναι η πραγματική "καρδιά" του συστήματος. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αναλυτών μαζών, των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε διαφορετικές αρχές.
- Τον ανιχνευτή. Σκοπός της διάταξης αυτής είναι να συλλάβει τα διαχωριζόμενα ιόντα και να τα μετατρέψει σε ηλεκτρικό σήμα. Στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία του σήματος με ειδικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.
- Το σύστημα κενού. Ολόκληρο το φασματομέτρο (πέραν του συστήματος επεξεργασίας δεδομένων) βρίσκεται υπό κενό που δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.
- Γεννήτρια αζώτου



Εικόνα22 LCQ Fleet Ion Trap MSⁿ, Thermo Fisher Scientific (UK)

- Σύστημα καταγραφής δεδομένων (DataSystem)

i. **Επιλογή Κινητής Φάσης**

Είναι γνωστό από τη χρωματογραφική θεωρία ότι η διαχωριστική ικανότητα R_s εξαρτάται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών N , τον παράγοντα συγκράτησης k' και τον παράγοντα διαχωρισμού. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων k' και α γίνεται κυρίως με αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης. Έτσι, μετά την επιλογή της στατικής φάσης (βελτιστοποίηση του N), η οποία πρέπει να έχει παρόμοια πολικότητα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, επιλέγεται η κινητή φάση έτσι ώστε $k'(1,10)$ [99].

ii. **Επιλογή Στατικής Φάσης**

Η επιλογή της στατικής φάσης και της κατάλληλης αναλυτικής στήλης είναι σημαντικά για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου και καθορίζεται από τις επιμέρους παραμέτρους [102], [103]:

- Το μέγεθος των μορίων του υλικού πληρώσεως και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης
- Η φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, η οποία καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης
- Η διάμετρος των πόρων του υλικού πληρώσεως
- Ο τύπος του υποστρώματος το οποίο πρέπει να είναι χημικά αδρανές.
- Η περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους, τόσο πιο πολική (όξινη) είναι η στήλη και τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων.

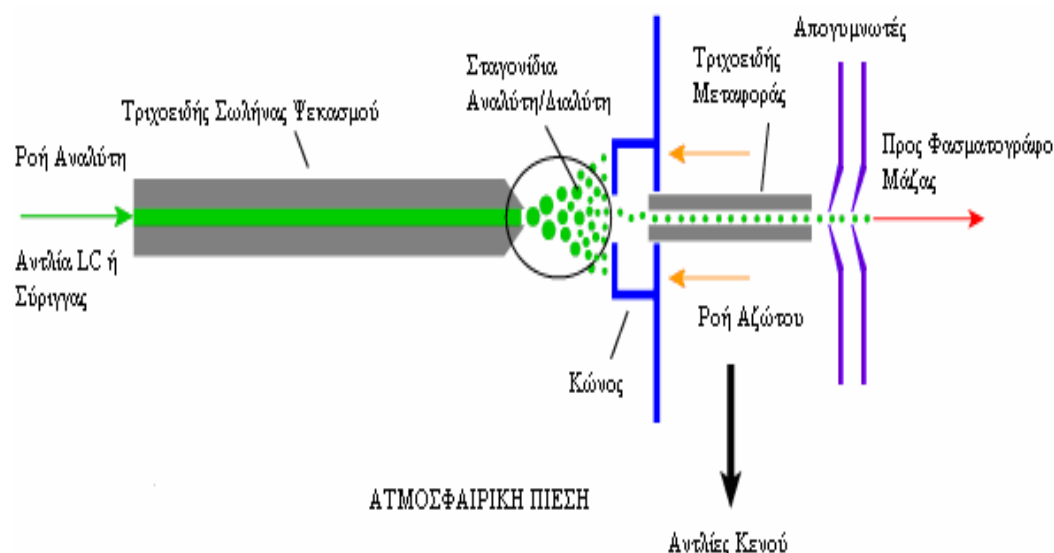
iii. **Πηγή Ιόντων**

Κάθε διακριτό τμήμα του φασματομέτρου μαζών παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και απόδοση του συνόλου. Έτσι η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού που θα εφαρμοσθεί είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Κύριες τεχνικές ιοντισμού είναι: Ιοντισμός ηλεκτρονίων, Χημικός

Ιοντισμός, Βομβαρδισμός με άτομα, Thermospray, MALDI και Electrospray [101].

Ψεκασμός σε ηλεκτρικό δυναμικό (Electrospray)

Η τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο χρησιμοποιείται ως η κυριότερη μέθοδος σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών. Βασίζεται στην παρατήρηση κατά την οποία όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω



Εικόνα 23 Σχηματική διάταξη ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο

ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο μερικών χιλιάδων V, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες.

Ο τρόπος λειτουργίας αναλύεται ως εξής: Η είσοδος του διαλύματος στο σύστημα γίνεται εν ροή μέσα από τριχοειδή σωλήνα. Παράλληλα με τον τριχοειδή βρίσκεται εξωτερικός σωλήνας μέσα από τον οποίο διαβιβάζεται αέριο που σκοπό έχει τη δημιουργία εκνεφώματος στην άκρη του τριχοειδούς. Ο τριχοειδής είναι γειωμένος, ενώ στο απέναντι ηλεκτρόδιο (counterelectrode) εφαρμόζεται δυναμικό της τάξης των 3.5-5 KV. Κατά τον ψεκασμό του διαλύματος σε περιβάλλον υψηλού δυναμικού ο διαλύτης εξατμίζεται ταχύτατα ιονίζοντας τις διάφορες ενώσεις. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξάτμιση με

ιοντισμό (ionevaporation) και εντάσσεται στις μαλακές / ήπιες τεχνικές ιοντισμού. Κατά τον ιοντισμό πολύ μικρό ποσοστό θραύσης λαμβάνει χώρα και τα electrospray φάσματα είναι απλά, καθαρά και εύκολα για εκτίμηση. Για τους λόγους αυτούς η τεχνική αυτή έχει διαδοθεί ιδιαίτερα και απαντάται στα περισσότερα νέα όργανα.

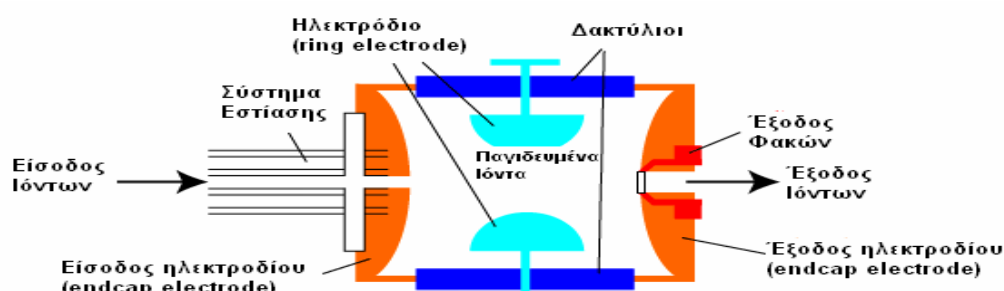
Το electrospray είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών (LC-MSinterface) [101]

iv. Αναλυτής μαζών

Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι ο αναλυτής μαζών χρησιμεύει σε κάποιες περιπτώσεις όπως ο μονοχρωμάτορας στα φασματοφωτόμετρα οπτικών τεχνικών. Η βασική λειτουργία του φασματομέτρου μαζών είναι να διαχωρίσει τα ιόντα, που παράγονται στην πηγή ιόντων, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων m/z . Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος, έτσι ώστε το μετρούμενο ιοντικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί τον αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z . Η κύρια διαφορά μεταξύ των διαφόρων φασματομέτρων μαζών έγκειται στους αναλυτές που χρησιμοποιούν για το διαχωρισμό των ιόντων. Συνηθέστεροι τύπο αναλυτών μαζών είναι: Αναλυτής απλής εστίασης, Αναλυτής διπλής εστίασης, Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole), Παγίδα ιόντων (IonTrap), Αναλυτής χρόνου πτήσης (TimeofFlight, TOF), Υβριδικός αναλυτής Orbitrap [101], [113]

Αναλυτής παγίδας ιόντων

Η παγίδα ιόντων λειτουργεί με τη δημιουργία τρισδιάστατου πεδίου στο οποίο παγιδεύονται τα προσδιοριζόμενα ιόντα και εστιάζονται σε ένα επίπεδο.



Εικόνα 24 Παγίδα ιόντων

Τα ιόντα ουσιαστικά περιορίζονται από ηλεκτρομαγνητικό πεδίο τεσσάρων πόλων, δύο ημικυλινδρικά ηλεκτρόδια (ringelectrode) και δύο ελάσματα (endcap). Τα εισερχόμενα ιόντα κυκλοφορούν στον τρισδιάστατο χώρο που ορίζεται από τα τέσσερα ηλεκτρόδια και εστιάζονται στο επίπεδο που ορίζεται από τον ανιχνευτή και το πλέγμα ιοντισμού. Στη συνέχεια εφαρμόζεται δυναμικό ραδιοσυχνότητας που αυξάνει γραμμικά προσφέροντας αυξανόμενη κινητική ενέργεια στα ιόντα. Όλα τα ιόντα του ίδιου φορτίου λαμβάνουν την ίδια ενέργεια, αλλά ιόντα μικρού m/z επιταχύνονται περισσότερο σε σχέση με τα βαρύτερα ιόντα. Ως αποτέλεσμα τα μικρότερα ιόντα αρχίζουν να ξεφεύγουν από την παγίδα και να οδηγούνται στον ανιχνευτή και ακολουθούν τα μεγαλύτερα ιόντα ανάλογα με τη μάζα τους,

Οι παγίδες ιόντων είναι μικρά συμπαγή όργανα που μπορούν να εφαρμοσθούν άμεσα και να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα για αναλύσεις μαζών έως 1.000 dalton. Η διαχωριστική τους ικανότητα περιορίζεται κάτω της τιμής των 10.000, είναι όμως οικονομικά και αξιόπιστα όργανα που λειτουργούν πολύ ικανοποιητικά ως ανιχνευτές αέριας και υγρής χρωματογραφίας. Η παγίδα ιόντων προσφέρει πολύ μεγάλες δυνατότητες λειτουργίας MS/MS και γι' αυτό το λόγο βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στη βιοανάλυση πεπτιδίων-νουκλεοτιδίων [101], [104]

v. Ανιχνευτής

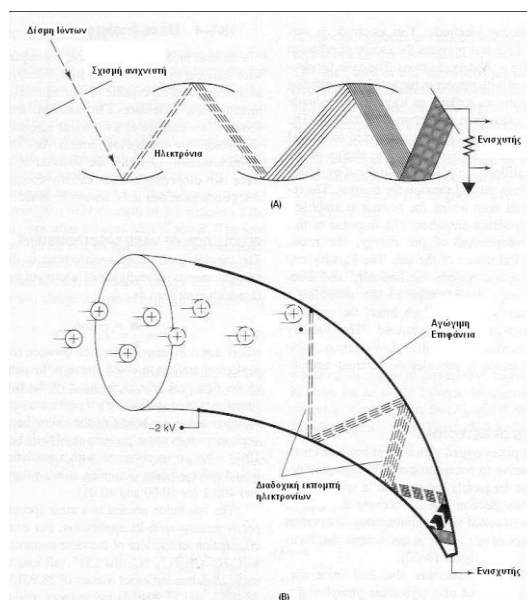
Ο ανιχνευτής παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών είναι το Φαρανταϊκό κύπελλο (Faradaycup) και ο Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electronmultiplier) [101]

Ανιχνευτής Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron multiplier).

Είναι η πιο συχνά απαντώμενη διάταξη ανίχνευσης στο φασματόμετρο μαζών. Η κατασκευή ουσιαστικά αποτελείται από γυάλινο ή μεταλλικό σωλήνα με μεταλλική επίστρωση που παρουσιάζει χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Διαφορά δυναμικού εφαρμόζεται στα δύο άκρα με τρόπο, ώστε να εμφανίζει γραμμική μεταβολή του δυναμικού κατά μήκος του σωλήνα. Ανάλογα με το σχεδιασμό του ανιχνευτή μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση σήματος έως και 10^7 . Ακολουθώντας την αρχική σύγκρουση των ιόντων, η δέσμη των ηλεκτρονίων που έχει διαφύγει, προσπίπτει στο απέναντι εσωτερικό πλευρό του σωλήνα και εκπέμπει περισσότερα ηλεκτρόνια με κάθε κρούση. Τέτοιες διατάξεις επιτυγχάνουν πολλαπλασιασμό της δέσμης (άρα και της έντασης του σήματος) κατά 10^5 - 10^8 [101].

vi. ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΕΝΟΥ

Η λειτουργία των φασματόμετρων μαζών προϋποθέτει τη συνεχή λειτουργία συστήματος παραγωγής υψηλού κενού στην περιοχή 10^{-5} - 10^{-8} Torr, οπότε δημιουργείται επαρκής ποσότητα ατμών για τη λήψη του φάσματος. Η παραμικρή διαρροή ατμοσφαιρικού αέρα π.χ. στην πηγή ιόντων, θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής ιόντων της εξεταζόμενης ένωσης και την εμφάνιση σημάτων που αντιστοιχούν στον ιοντισμό των συστατικών της ατμόσφαιρας [98].



Εικόνα 25 (Α) Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων, (Β) Σχήμα διάταξης πολλαπλασιαστή τρομπέτας

vii. Επεξεργασία φασμάτων με χρήση Η/Υ

Η ερμηνεία των φασμάτων διευκολύνεται σημαντικά με τη χρησιμοποίηση Η/Υ, ο οποίος εκτός από σύστημα καταχώρησης και παρουσίασης δεδομένων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τα εξής:

- Ταχύτατη βαθμονόμηση του φασματομέτρου, ως προς τις ακριβείς τιμές.
- Ταυτοποίηση των ιονικών θραυσμάτων από την ακριβή τιμή m/z ή από τις σχετικές τιμές των ισοτοπικών κορυφών.
- Με εφαρμογή κατάλληλου λογισμικού, ο υπολογιστής μπορεί, από τα φασματικά δεδομένα, να κάνει προκαταρκτικές υποδείξεις στο χρήστη για την ταυτότητα της εξεταζόμενης ένωσης.
- Ο χρήστης μπορεί να τροφοδοτήσει τον υπολογιστή με πολλά φάσματα μαζών μιας κατηγορίας ενώσεων, η οποία τον απασχολεί αναλυτικά. Ο υπολογιστής μπορεί να συγκρίνει το φάσμα μαζών με το αποθηκευμένο στη μνήμη του αρχείο φασμάτων και να αποφανθεί ως προς το αν το εξεταζόμενο φάσμα μπορεί να αποδοθεί σε μια ένωση ή σε μίγμα ενώσεων και ποιών.
- Με τη βοήθεια του υπολογιστή μπορούν να επιλυθούν ταχύτατα συστήματα πολλών εξισώσεων με πολλούς αγνώστους, που η επίλυσή τους απαιτείται για την ποσοτική ανάλυση μιγμάτων ενώσεων με τη φασματομετρία μαζών [98]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν 10 βότανα ελληνικής παραγωγής προς μελέτη. Ο λόγος που επιλέχθηκαν αυτά τα βότανα προς μελέτη είναι το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών για επιστροφή στη μεσογειακή διατροφή, με όλες τις ευεργετικές ιδιότητες που προσφέρει σύμφωνα και με τους γιατρούς της αρχαιότητας, αλλά και της επιστημονικής κοινότητας για το πώς αυτά μπορούν να απομονωθούν βιοδραστικά συστατικά τους. Τα βότανα που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν ανήκουν στα παραδοσιακά της ελληνικής χλωρίδας όπως η ρίγανη, το θυμάρι, άλλα είναι γνωστά για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες όπως το χαμομήλι και το σπαθόχορτο και άλλα έγιναν τα τελευταία χρόνια γνωστά για τη δράση τους, όπως τα φύλλα ιπποφαούς.

Σκοπός της μελέτης είναι η εκχύλιση των βοτάνων ως αφεψήματα και εγχύματα σε διαφορετικούς χρόνους ώστε να προσδιοριστούν οι συνθήκες με τις οποίες μπορούμε να τα καταναλώσουμε για να παραλάβουμε σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα τα βιοδραστικά συστατικά τους. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με τη βοήθεια φασματοφωτομετρικών μεθόδων αλλά και του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός τους σε οικογένειες σύμφωνα με το παρόμοιο μεταβολομικό τους αποτύπωμα με τη βοήθεια PCA μοντέλων. Τέλος έγινε ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας με σκοπό την ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των βοτάνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Πειραματική Πορεία

Δείγματα 200 – 250 g και για τα 10 δείγματα παραχωρήθηκαν από το βιολογικό αγρόκτημα Μενεκός με την ονομασία «Bioagroktima-Menekos» που βρίσκεται στη Χαλκιδική της Μακεδονίας. Όλα τα προς εξέταση δείγματα παρελήφθησαν αποξηραμένα και συσκευασμένα ενώ είχαν ήδη ταυτοποιηθεί από το Ινστιτούτο BIO Hellas.

Τα δείγματα παραχωρήθηκαν στο Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Η προετοιμασία και επεξεργασία των δειγμάτων, καθώς και η υλοποίηση των αναλυτικών τεχνικών HPLC-ESI-MSⁿ, NMR στο πλαίσιο της μεταβολομικής μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε.). Οι φασματοφωτομετρικές αναλύσεις των δειγμάτων εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενόργανης Χημείας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Αθηνών.

5.2 Αναλώσιμα, διαλύτες και πρότυπες ουσίες

- Επεξεργασία δειγμάτων

Απιονισμένο νερό

- Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις

Απεσταγμένο νερό (H₂O)

Μεθανόλη (MeOH): Methanol ≥99,8% (GC), CH₄O, MW=32,04 g/mol, CAS: 67-56-1, Sigma-Aldrich, France

Αιθανόλη (EtOH): Ethanol absolute for analysis, C₂H₅OH, MW=46,07 g/mol, Index-No: 603-002-00-5, Merck KGaA, Germany

Ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃): Sodium Carbonate anhydrous, Assay 99,5–100,5%, MW=105,99 g/mol, CAS: 497-19-8, Carlo Erba Reagents, Italy

Αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu: Folin–Ciocalteu's phenol reagent,
 $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 14\text{WO}_3\cdot 4\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ & $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 13\text{WO}_3\cdot 5\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$,
Merck KGaA, Germany

Γαλλικό οξύ (GA): 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid anhydrous 99%, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$,
MW=170,12 g/mol, CAS: 149-91-7, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

DPPH ρίζα: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (free radical) 95% powder,
 $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, MW=394,32 g/mol, CAS: 1898-66-4, Alfa Aesar GmbH&Co
KG, Germany

Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C): L-Ascorbic acid, Analytical reagent grade,
 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, MW=176,12 g/mol, CAS: 50-81-7, Fischer Chemical, UK

Υπερθειικό κάλιο ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$): Potassium persulfate $\geq 99,0\%$ (RT), MW=270,32
g/mol, CAS: 7727-21-1, Sigma-Aldrich, Germany

ABTS: ABTS 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium
salt)(Spectrophotometric reagent for free chlorine and use as
chromogenic substrate in enzyme-immunoassay) $>98,0\%$,
 $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$, MW=548,58 g/mol, CAS: 30931-67-0, TCI Tokyo Chemical
Industry Co. LTD, Japan

Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 97%,
 $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, MW=250,29 g/mol, CAS: 53188-07-01, Sigma-Aldrich,
Germany

Καυστικό νάτριο (NaOH): Sodium hydroxide pellets for analysis ISO, Assay
 $>99\%$, MW=40,00 g/mol, Merck KGaA, Germany

Υδροχλωρικό οξύ (HCl): Hydrochloric acid 35% A.G., MW=36,46 g/mol, Index
No 017-002-01X, Penta, Czech Republic

TPTZ: 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine $\geq 98\%$, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$, MW=312,33 g/mol,
CAS:3682-35-7, Sigma-Aldrich, France

Οξικό οξύ (CH_3COOH): Acetic acid $\geq 99\%$, MW=60,65 g/mol, CAS: 64-19-7,
Sigma-Aldrich, France

Τριχλωριούχος σίδηρος (FeCl₃): Iron(III) chloride 97%, MW=162,20 g/mol,
CAS: 7705-08-0, Sigma-Aldrich, France

- Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας (HPLC/Ms)

Νερό (H₂O): Water LC–MS Grade, MW=18,02 g/mol, CAS: 7732-18-5,
Fischer Scientific, UK

Ακετονιτρίλιο (ACN): Acetonitrile hypergrade for LC–MS, LiChrosolv, CH₃CN,
MW=41,05 g/mol, CAS: 75-05-8, Merck KGaA, Germany

Μεθανόλη (CH₃OH): Methanol 99,95+%, MW=32,04 g/mol, CAS: 67-56-1,
Chem-Lab

Οξικό οξύ (CH₃COOH): Acetic acid >99,5%, MW=60,05 g/mol, LGC
Promochem

(+)_Catechin hydrate (C₁₅H₁₄O₆ · xH₂O) ≥98% (HPLC) MW=290,27 g/mol
CAS Number 225937-10-0 Sigma-Aldrich Co. LOT:13011414, 10mg,
(Chembiotin Extrasynthese)

Rutin , (C₂₇H₃₀O₁₆·3H₂O) 97+% MW= 664,58 g/mol CAS Number 153-18-4
Fisher Scientific (Acros Organics)

Quercetin (C₁₅H₁₀O₇) MW=302,236 g/mol CAS Number 117-39-5

Kaempferol (C₁₅H₁₀O₆), ≥99% CAS Number 520-18-3 MW=286,25g/mol,
extrasynthese LOT NO:5291H, 10mg (Chembiotin)

Luteolin (C₁₅H₁₀O₆) ≥99% CAS Number 491-70-3 MW.= 286,25g/mol
LOT:13011418, 10mg, (Chembiotin_Extrasynthese)

Eriodictyol (C₁₅H₁₂O₆) ≥99% CAS Number 4049-38-1 MW= 288,27g/mol
LOT:13011415, 10mg, (Chembiotin_ Extrasynthese)

Tyrosol (C₈H₁₀O₂) ≥95% CAS Number 501-94-0 MW= 138,17g/mol
LOT:130114041, 100mg, (Extrasynthese)

Hesperidin (C₂₈H₃₄O₁₅) 98+%, MW=610,56g/mol CAS Number 520-26-3,
LOT:J04Y012, 25g, (Alfa Aesar)

Cinnamic acid (C₉H₈O₂) MW= 148,16g/mol, CAS Number 140-10-3

Myricetin (C₁₅H₁₀O₈) 95%, CAS Number 529-44-2 MW=318,23g/mol
LOT:A0008268, 25 mg, (Acros Organics)

Naringin (C₂₇H₃₂O₁₄ * H₂O) 98%, CAS Number 233-566-4 MW= 580,53
g/mol LOT:10153008, 10g, (Chembiotin, Alfa Aesar)

Gallic acid (C₇H₆O₅) MW= 170,12 g/mol, CAS Number 149-91-7

Caffeic acid (C₉H₈O₄) MW= 180,16 g/mol, CAS Number 331-39-5

p-coumaric acid ≥98,0% (C₉H₈O₃) MW= 164,16g/mol, CAS Number 501-98-
4 SIGMA

Chlorogenic acid (C₁₆H₁₈O₉) ≥95% MW= 354,31 g/mol, CAS Number 327-
97-9 SIGMA

Vanillic acid (HOC₆H₃(OCH₃)CO₂H) MW= 168,15 g/mol, CAS Number 121-
34-6 SIGMA

- Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

KH₂PO₄: potassium phosphate monobasic ≥99%, MW=136,09 g/mol, CAS:
7778-77-0, Sigma-Aldrich, Germany

D₂O: 0,75mL, ≥99,98%, Deutero GmbH

TSP: 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt 98%D,
MW=172,27, CAS: 24493-21-8, Sigma-Aldrich, France

CD₃OD: (methanol-d₄) 99,8%, MW=36,07, CAS: 811-98-3

5.3 Συσκευές και όργανα ανάλυσης

- Επεξεργασία δειγμάτων

Ζυγός ηλεκτρονικός ακρίβειας στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο του γραμμαρίου,
Mettler AT261, DeltaRange

Διυθητικά φύλλα Whatman 18,5cm

Περιστροφικός εξατμιστήρας με κενό (Rotary evaporator) Rotavapor Buchi461

Λυοφιλοποιητής: CentriVap Cold Trap , Labconco

- Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις

Φασματοφωτόμετρο UV–Vis: Novaspek III visible spectrophotometer, Product code: 80-2118-00, Amersham Biosciences, USA

Κυψελίδες πλαστικές για μέτρηση στο ορατό φάσμα χωρητικότητας 4 mL, l=0,1 dm, Kartell, Italy

- Υγρη χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας (HPLC/Ms)

Φίλτρα Mini-UniPrep 0,45 μm, Nylon Filter Media with Polypropylene, GE Healthcare Companies

Στήλη διαχωρισμού υγροχρωματογραφίας: Kromasil C18Hypersil Gold C18 (μήκος: 100,0 mm, διάμετρος: 2,1 mm, μέγεθος σωματιδίων: 3,5 μm)

Αυτόματος δειγματολήπτης για LC: Finnigan Surveyor Autosampler Plus Lite, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

Μηχάνημα υγροχρωματογραφίας: Finnigan Surveyor LC Pump Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

Φασματογράφος μάζας: LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

- Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

NMR Varian-600 MHz, με χρήση αισθητήρα ^1H { ^{15}N - ^{31}P } 5 mm PFG AUTOX ID.

5.4 Επεξεργασία δειγμάτων

Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους, ως αφεψήματα σε δύο διαφορετικούς χρόνους, 2 και 15 λεπτών και ως εγχύματα στα 15 λεπτά. Μετά την επεξεργασία, τα δείγματα έφτασαν τα 30 στον αριθμό οπότε κρίθηκα απαραίτητη η κωδικοποίηση τους. Η κωδικοποίηση που ακολουθήθηκε έγινε όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί και θα χρησιμοποιηθεί για χάριν ευκολίας και στη συνέχεια της εργασίας.

Πίνακας 1 Πίνακας κωδικοποίησης δειγμάτων

Είδος δείγματος	Οικογένεια	Τρόπος εκχύλισης			
		Αφέψημα 2 λεπτών	Αφέψημα 15 λεπτών	Έγχυμα 15 λεπτών	
1	<i>Matricaria chamomilla</i>	Αστερίδες	M.ch/1-02	M.ch/1-15	M.ch/2-15
2	<i>Echinacea purpurea</i>	Αστερίδες	Ech.p/1-02	Ech.p/1-15	Ech.p/2-15
3	<i>Lippia citriodora</i>	Βερβενίδες	L.c/1-02	L.c/1-15	L.c/2-15
4	<i>Menta pulegium</i>	Χειλανθή	M.pul/1-02	M.pul/1-15	M.pul/2-15
5	<i>Menta spicata</i>	Χειλανθή	M.sp/1-02	M.sp/1-15	M.sp/2-15
6	<i>Origanum majorana</i>	Χειλανθή	O.maj/1-02	O.maj/1-15	O.maj/2-15
7	<i>Origanum vulgare</i>	Χειλανθή	O.vul/1-02	O.vul/1-15	O.vul/2-15
8	<i>Thymus capitatus</i>	Χειλανθή	T.cap/1-02	T.cap/1-15	T.cap/2-15
9	<i>Hypericum perforatum</i>	Υπερικήδες	Hyp.p/1-02	Hyp.p/1-15	Hyp.p/2-15
10	<i>Hippophae rhamnoides</i>	Ελαιαγνοειδή	Hip.rh/1-02	Hip.rh/1-15	Hip.rh/2-15

Προετοιμασία αφεψημάτων

Ποσότητα των δειγμάτων κονιοροτοποιήθηκε και από το κάθε βότανο ζυγίστηκαν 2 g. Η ποσότητα μεταφέρθηκε με 60 mL απεσταγμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL. Το ποτήρι αφήνεται σε προθερμασμένη θερμαντική πλάκα μέχρι να ξεκινήσει ο βρασμός και ακολουθεί χρονομέτρηση για τους δύο διαφορετικούς χρόνους των αφεψημάτων, για τα 2 και 15 λεπτά. Το ποτήρι απομακρύνεται από την πλάκα και το ζέον δείγμα διηθείται άμεσα με πτυχωτό ηθμό σε ογκομετρικό κύλινδρο όπου και ογκομετρείται αφού ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Από το υδατικό εκχύλισμα συλλέγονται 5 mL για αποθήκευση για επαναλήψεις και το υπόλοιπο μεταφέρεται σε

προζυγισμένη σφαιρική φιάλη για να ακολουθήσει περιστροφική εξάτμιση υπό κενό στους 40°C μέχρι ξηρού. Η σφαιρική φιάλη επαναζυγίζεται και υπολογίζεται το στερεό υπόλειμμα. Γίνεται επαναδιαλυτοποίηση και ανάκτηση του στερεού υπολείμματος με 9 mL απιονισμένο νερό και μοιράζεται ισόποσα σε γυάλινα vials όπου φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

Προετοιμασία εγχυμάτων

Κατά την προετοιμασία των εγχυμάτων αφέθηκαν να βράσουν 60 mL απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL και αφού απομακρύνθηκε το ποτήρι από τη θερμαντική πλάκα προστέθηκαν 2 g κονιοροτοποιημένου δείγματος. Το δείγμα αφέθηκε στο νερό για 15 λεπτά και μετά διηθήθηκε με πτυχωτό ηθμό σε ογκομετρικό κύλινδρο όπου αφού το υδατικό διάλυμα φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου ογκομετρείται. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτή των αφεψημάτων όπως περιγράφεται και παραπάνω μέχρι την ανάκτηση και τη φύλαξη των δειγμάτων σε βαθιά κατάψυξη.

5.5 Φασματοφωτομετρικές τεχνικές ανάλυσης

Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες των δειγμάτων προσδιορίσθηκε μέσω της χρωματομετρικής τεχνικής φασματοφωτομετρίας Folin-Ciocalteu. Η ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών από τις περιεχόμενες στα δείγματα ουσίες μελετήθηκε με τρεις διαφορετικές μεθόδους (DPPH[•], ABTS^{•+} και FRAP) και σε σύγκριση με πρότυπες αντιοξειδωτικές ενώσεις, ώστε να γίνει μια αρχική εκτίμηση της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις δημοσιεύσεις Lantzouraki et al 2015 [105].

Όλες οι φωτομετρικές δοκιμασίες διεξήχθησαν εις τριπλούν στα διαφορετικά δείγματα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές με \pm τυπική απόκλιση (SD). Τα δεδομένα αναλύθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με One-Way ANOVA ανάλυση και πραγματοποιήθηκαν κατά ζεύγη πολλαπλές συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν με στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του λογισμικού SPSS (IBM SPSS Statistics. Έκδοση 19.0. Σικάγο. ΗΛ. ΗΠΑ).

5.5.1 Μέθοδος εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)

Η πειραματική διαδικασία και ο τρόπος εξαγωγής των αποτελεσμάτων βασίστηκε στη μελέτη των Brand-Williams, Cuvelier και Berset (1995), αλλά και στις προτάσεις των Νενάδη και Τσιμίδου (2002), με κάποιες παραλλαγές που εξαρτήθηκαν από τη φύση των δειγμάτων [80], [82].

Η ριζική μορφή της ουσίας DPPH, που βρίσκεται σε στερεά μορφή, διαλύεται σε μεθανόλη, για να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0,001 M (stock διάλυμα). Από αυτό, παρασκευάζεται μεθανολικό διάλυμα 100 μM που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή των δειγμάτων. Τα διαλύματα της ρίζας (stock και αραιώσεις) παρασκευάζονται καθημερινά και φυλάσσονται στο σκοτάδι συνεχώς. Σε πλαστική κυψελίδα, για κάθε δείγμα, τοποθετούνται 15 μL από τα αραιωμένα δείγματα μαζί με 3000,0 μL από το διάλυμα DPPH[•] 100 μM, έτσι ώστε η αντίδραση αποχρωματισμού της ρίζας να μελετηθεί για ένα μεγάλο εύρος αναλογίας «νωπό ή ξηρό δείγμα/DPPH[•]» κατά βάρος. Γίνεται ανακίνηση στο σκοτάδι για 1 λεπτό, και η ένταση του χρώματος της ρίζας που δεν έχει ουδετεροποιηθεί από τις αντιριζικές ενώσεις προσδιορίζεται από την απορρόφηση στα 517 nm (A_{517nm}). Η παρακολούθηση της αντίδρασης μεταξύ της DPPH[•] και κάθε δείγματος γίνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να σταθεροποιηθεί η A_{517nm} σε μια ελάχιστη τιμή, δηλαδή να φθάσει το λεγόμενο plateau χρόνου [106], [107], [108].

Ο χρόνος για να φθάσει η αντίδραση το σημείο αυτό, που συμβολίζεται ως $T_{plateau}$, εξαρτάται από το είδος του δείγματος, τη συγκέντρωσή του, τις συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία και φως) και προφανώς τη συγκέντρωση του DPPH. Παράλληλα, σε κάθε χρονική στιγμή, μετράται η $A_{517nm DPPH^{\bullet}}$ για το καθαρό διάλυμα της ρίζας ώστε να γίνει ο υπολογισμός του ποσοστού ανόσχεσής της. Επίσης, μετρώνται οι τιμές της απορρόφησης για τα δύο “τυφλά” δείγματα που θα χρειαστούν για τη διόρθωση του αρνητικού σφάλματος που προκαλεί ο όγκος του διαλύτη του κάθε δείγματος.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης επιλέχθηκε το L-ασκορβικό οξύ (L-ascorbic acid, AA), επειδή αντιδρά πλήρως με το DPPH[•] ταχύτατα και

χρειάζεται μόνο μια καταγραφή της τιμής της $A_{517\text{nm}}$. Το stock διάλυμα συγκέντρωσης 1,00 mg/mL παρασκευάζεται από τη διάλυση 0,100 g ασκορβικού οξέος σε 100,00 mL απεσταγμένου H_2O . Με τις κατάλληλες αραιώσεις προκύπτουν διαλύματα του προτύπου συγκεντρώσεων από 30 έως 1020 $\mu\text{g AA/mL}$. Τα διαλύματα του AA πρέπει να είναι παρασκευασμένα την ημέρα της διεξαγωγής του πειράματος. Σε πλαστικές κυψελίδες τοποθετούνται 15,0 μL διαλύματος AA για κάθε συγκέντρωση και 3000,0 μL DPPH[•] 100 μM , αναδεύονται στο σκοτάδι για 1 λεπτό και μετράται η $A_{516\text{nm}}$. Παρασκευάζεται, τέλος, το “τυφλό” δείγμα για τη διόρθωση των τιμών της απορρόφησης από το αρνητικό σφάλμα που προκαλεί ο όγκος του H_2O ως διαλύτης [109], [110].

Η θερμοκρασία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων με την ελεύθερη ρίζα DPPH[•] ήταν $\sim 18^\circ\text{C}$.

5.5.2 Μέθοδος εκτίμησης της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]

Πρώτο στάδιο αποτελεί η δημιουργία της ρίζας ABTS^{•+}. Παρασκευάζεται, λοιπόν, υδατικό διάλυμα που περιέχει εν διαλύσει την ουσία ABTS συγκέντρωσης 7,00 mM και υπερθειικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) σε συγκέντρωση 2,45 mM. Το μείγμα αφήνεται 16h στο σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου. Η οξειδωση της ABTS από τα υπερθειικά ιόντα ξεκινά κατευθείαν, αλλά η στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι 1,0:0,5, οπότε η οξειδωση θα είναι ατελής. Η ρίζα υπό τη μορφή του μονού κατιόντος είναι σταθερή για πάνω από 2 ημέρες αποθηκευμένη σε σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου.

Στην αρχή κάθε σειράς πειραμάτων, το διάλυμα της ρίζας αραιώνεται κατάλληλα με αιθανόλη ώστε να δίνει τιμή απορρόφησης $A_{734\text{nm}}=0,70\pm 0,02$. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιείται η Trolox, της οποίας παρασκευάζεται το stock αιθανολικό διάλυμα 0,006 M, και από αυτό διαλύματα συγκεντρώσεων από 0,20 έως 1,50 mM. Τα διαλύματα της πρότυπης ουσίας πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένα. Τα δείγματα τοποθετούνται σε πλαστικές κυψελίδες 15,0 μL αραιωμένου δείγματος ή προτύπου με 3000,0 μL

αραιωμένου διαλύματος ABTS^{•+} και αναδεύονται στο σκοτάδι για 1 λεπτό. Η απορρόφηση A_{734nm} μετράται μετά την πάροδο 5min. Υπολογίζεται, τέλος, μέσω “τυφλών” δειγμάτων το αρνητικό σφάλμα που προκαλείται στις τιμές της απορρόφησης από τον όγκο των διαλυτών των δειγμάτων και των πρότυπων διαλυμάτων [105], [110].

5.5.3 Ανάλυση με τη μέθοδο αναγωγικής δύναμης του σιδήρου (ferric reducing antioxidant power, FRAP)

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αναγωγικής ισχύος και είναι βασισμένη στην αύξηση της απορρόφησης στα 593nm λόγω του σχηματισμού των συμπλόκων της τρις-πυριδυλο-s-τριαζίνης (tripyridyl-s-triazine) με το σίδηρο (II) (TPTZ–Fe(II)) παρουσία ενός αναγωγικού μέσου.

Το δραστικό μείγμα προετοιμάστηκε με 500μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (0.3M, pH=3.6), 900μL FeCl₃ (20mM) και 1950μL νερού. 50μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος προστέθηκε στο παραπάνω δραστικού μείγματος και αφέθηκαν στους 37°C για 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδυνάμων TPTZ ανά 100mL αφεψήματος ή εγχύματος [105], [110].

5.5.4 Μέθοδος Folin-Ciocalteu για υπολογισμό του συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC)

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη, με ελάχιστες τροποποιήσεις, είναι μια μικρομέθοδος με το δυνατόν ελάχιστη χρήση αντιδραστηρίων και διαλυτών, που εφαρμόζεται ως ανάλυση ρουτίνας σε δείγματα τροφίμων και ποτών [111].

Αρχικά, παρασκευάζεται το κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na₂CO₃ ως εξής:

Σε 800,0 mL απεσταγμένου H₂O διαλύονται 200,00 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) με τη βοήθεια του βρασμού. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται ~80 g κρυστάλλων Na₂CO₃, και το διάλυμα αφήνεται για 24 h. Τέλος, φιλτράρεται και αραιώνεται μέχρι τα 1,00 L

απεσταγμένου H₂O. Το διάλυμα αυτό μένει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ως πρότυπη φαινολική ουσία για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ (gallic acid, GA). Παρασκευάστηκε stock διάλυμα αυτής, συγκέντρωσης 5 g GA/L ως εξής:

0,500 g GA διαλύονται πλήρως σε 10,0 mL αιθανόλης, και αραιώνονται με απεσταγμένο H₂O μέχρι τα 100,00 mL. Διατηρείται στο ψυγείο μέχρι 2 εβδομάδες. Από το stock διάλυμα παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα συγκεντρώσεων από 25 μέχρι 500 mg GA/L, κάθε διαφορετική ημέρα σειράς πειραμάτων.

Ακολουθεί η ανάλυση των δειγμάτων και των πρότυπων διαλυμάτων. Σε πλαστικές κυψελίδες των 2,5 mL, με τη χρήση ηλεκτρονικών πιπετών τοποθετούνται 40,0 μL προτύπου ή αραιωμένου δείγματος, 2500,0 μL απεσταγμένου H₂O και 200,0 μL αντιδραστηρίου F-C. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και μετά από αναμονή 8min, προστίθενται 500,0 μL κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃, και το μείγμα αναδεύεται ξανά. Έπειτα, οι κυψελίδες τοποθετούνται για 30 λεπτά σε υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 40°C, σε συνθήκες σκότους. Αφού αναπτυχθεί το επιθυμητό μπλε χρώμα και το περιεχόμενο των κυψελίδων αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, τότε μετράται σε φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση στα 750 nm (A_{750nm}) για κάθε δείγμα ή πρότυπο. Η διόρθωση στο σφάλμα της τιμής της απορρόφησης εξαιτίας του διαλύτη των δειγμάτων και των προτύπων γίνεται με “τυφλό” δείγμα [105], [110].

5.6 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Τα χρωματογραφήματα έχουν ληφθεί σε φασματογράφο NMR Varian-600 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με χρήση αισθητήρα ¹H {¹⁵N - ³¹P} 5 mm PFG AUTOX ID.

5.6.1 Προετοιμασία δείγματος

Από το στερεό υπόλειμμα των 3mL μετά τη λυοφιλίωση μεταφέρονται 20mg δείγματος από κάθε βότανο διαλύονται σε 375μL ρυθμιστικού διαλύματος με

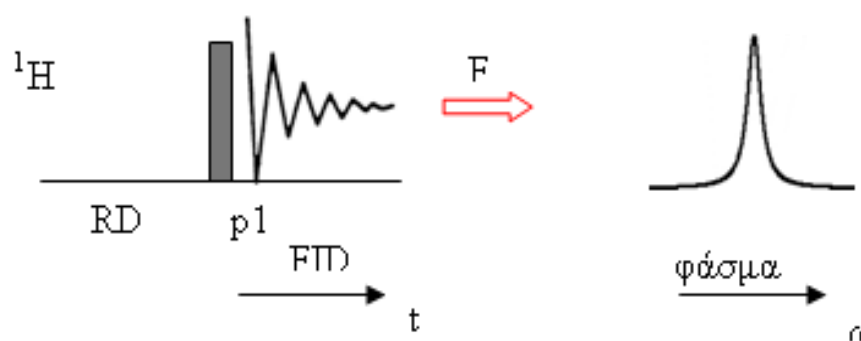
D₂O που περιέχει 0,1% TSP και 375μL CH₃OH-*d*₄ και αναδεύονται με παλμικό κυκλοαναδευτήρα για 60 δευτερόλεπτα. Μεταφέρθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά και πάλι σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρίθηκαν για 5 λεπτά με 17000g. Το υπερκείμενο διάλυμα των 600μL μεταφέρθηκε σε σωληνίσκο NMR διαμέτρου 5 mm. Το D₂O χρησιμοποιείται για το "κλείδωμα" (lock) στη συχνότητα του δευτερίου και τη σταθεροποίηση του μαγνητικού πεδίου και το TSP αποτέλεσε το πρότυπο αναφοράς για τη χημική μετατόπιση [112].

5.6.2 ¹H NMR παράμετροι

Η 1D PRESAT ακολουθία εφαρμόστηκε με τις εξής πειραματικές παραμέτρους: 128 σαρώσεις με δειγματοληψία αναλογικού σήματος με 64K σημεία. Το πειραματικό εύρος ήταν 0,3 Hz ενώ χρησιμοποιήθηκε παλμός διέγερσης 90⁰ των πυρήνων ¹H, χρόνος εφησυχασμού 1,5s [112].

5.6.3 Φασματοσκοπία πρωτονίου μίας διάστασης (¹H NMR)

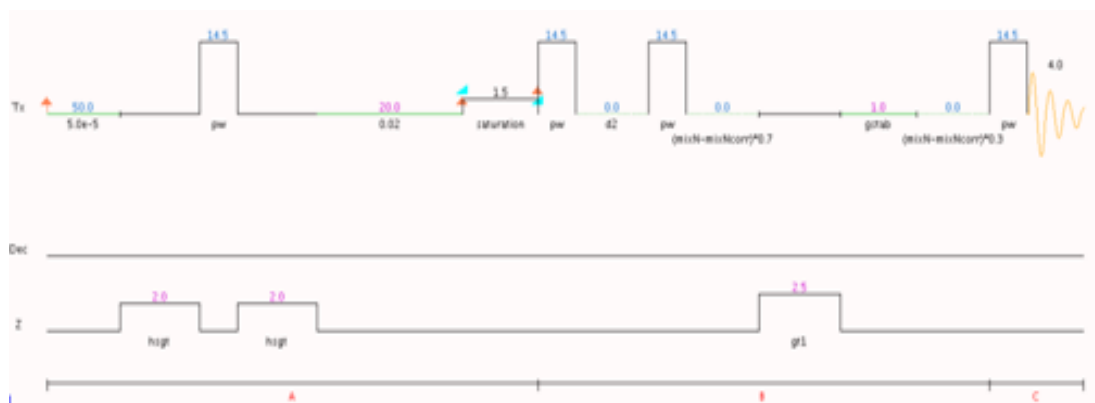
Το δείγμα ακτινοβολείται με παλμό (p1) διάρκειας κάποιων μικροδευτερολέπτων (μs), ο οποίος εκτρέπει τη μαγνήτιση των πυρήνων υδρογόνου από τη θέση ισορροπίας. Η FID (Free Induction Decay) που λαμβάνεται κατά την αποδιέγερση των πυρήνων μετασχηματίζεται κατά Fourier αποδίδοντας μία Lorentzian καμπύλη αποδιέγερσης σε συχνότητα χαρακτηριστική για το μελετούμενο πυρήνα και το περιβάλλον του. Επειδή η φασματοσκοπία πρωτονίου είναι ποσοτική, είναι δυνατός ο υπολογισμός του αριθμού των πρωτονίων σε ένα μόριο μέσω της ολοκλήρωσης των φασματικών κορυφών (Εικόνα 26) [90].



Εικόνα 26 Λήψη του φάσματος ¹H NMR

5.6.4 Παλμική Ακολουθία NOESYPRESAT

Η ακολουθία 1D-NOESYpresat (Εικόνα 27) χρησιμοποιείται συνήθως στις μελέτες μεταβολικού προφίλ προκειμένου για τη λήψη του φάσματος ^1H NMR. Η ακολουθία περιλαμβάνει δύο χρονικά διαστήματα κατά τα οποία ακτινοβολείται εκλεκτικά η κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του νερού. Η παρατεταμένη ακτινοβολία του νερού εμποδίζει την αποδιέγερση της μαγνήτισης των πρωτονίων του, αυξάνοντας έτσι το δυναμικό εύρος στη λήψη του σήματος FID που πρακτικά σημαίνει ότι αναδεικνύονται κορυφές χαμηλού σήματος που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες μικρής περιεκτικότητας. Με τη χρήση του μεγάλου χρόνου ακτινοβολίας επιτυγχάνεται η εξασθένιση του σήματος του νερού κατά έναν παράγοντα 10^5 που είναι πολύ σημαντικός όταν μελετώνται δείγματα βιολογικών υγρών και ποτών [90].



Εικόνα 27 Η ακολουθία NOESYPRESAT

5.7 Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχικές θραυσματοποιήσεις (MS^n) (HPLC–ESI– MS^n) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών

5.7.1 Προετοιμασία πρότυπων ενώσεων και δειγμάτων για ανάλυση

- Πρότυπες ενώσεις

Συγγεντρώθηκαν συνολικά 40 πρότυπες φαινολικές ενώσεις υψηλής καθαρότητας. Για την προετοιμασία διαλυμάτων πρότυπων ενώσεων ζυγίστηκε 1mg στερεού από το κάθε πρότυπο και διαλυτοποιήθηκε

πλήρως σε 1000μL μεθανόλης υψηλής καθαρότητας. Έτσι ετοιμάστηκαν διαλύματα πρότυπων ενώσεων γνωστού όγκου και συγκέντρωσης 1000ppm.

Δείγματα

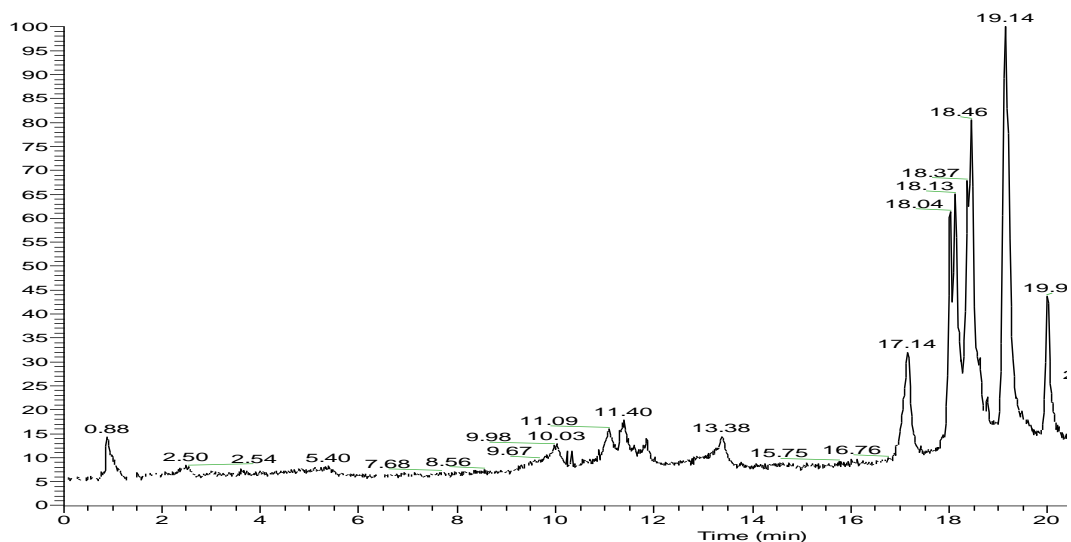
Από τα λειοφυλιόμενα δείγματα ζυγίστηκαν 4mg από το καθένα τα οποία διαλυτοποιήθηκαν πρώτα σε 1000μL μεθανόλης καθαρότητας κατάλληλης για HPLC/Ms ανάλυση. Μετά από ανάδευση και αφού βεβαιωθούμε ότι το στερεό διαλυτοποιήθηκε πλήρως, το διάλυμα φιλτράρεται σε φιαλίδια από μικροπορώδες υλικό και φυλάσσεται σε βαθιά κατάψυξη [90].

5.7.2 Επιλογή συνθηκών HPLC-ESI-Ms

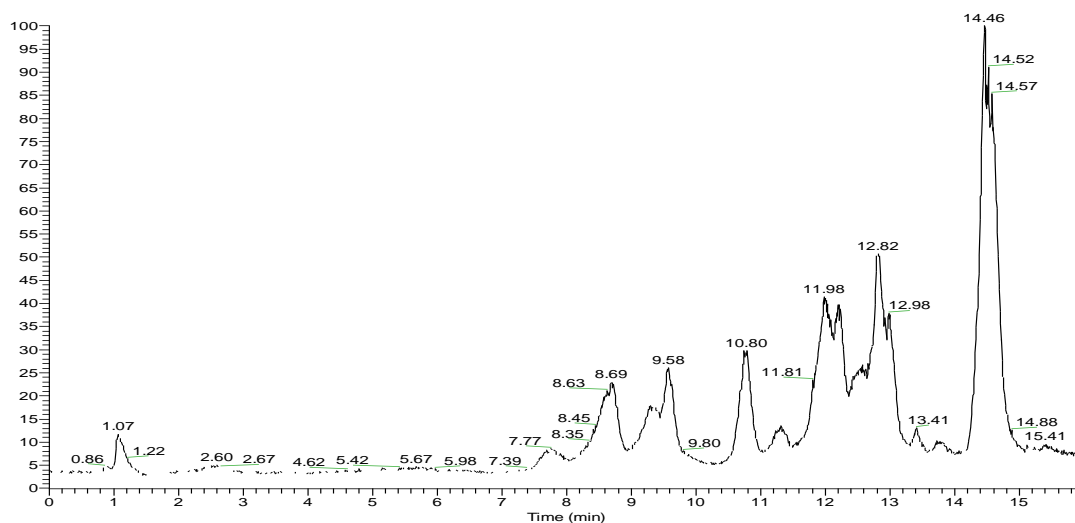
Πραγματοποιήθηκα ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας για την ταυτοποίηση ενώσεων στα δείγματα βάση των προτύπων.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για τις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με αναμεμειγμένα και τα 40 πρότυπα σε συγκέντρωση 10ppm το καθένα διαλυτοποιημένα σε μεθανόλη υψηλής καθαρότητας [113].

Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρειάζεται να γίνει πρώτα η επιλογή της κινητής φάσης. Η επιλογή δύο διαλυτών από έναν θα φέρει καλύτερο διαχωρισμό των ουσιών με τη διαφοροποίηση της πολικότητας. Για να επιτευχθεί η διαφοροποίηση αυτή επιλέχθηκε ως πολικός διαλύτης το νερό ενώ χρειάστηκε να γίνει επιλογή ανάμεσα σε μεθανόλη και ακετονιτρίλιο για την επιλογή του άπολου διαλύτη. Παραλάβαμε χρωματογραφήματα με κινητή φάση νερό-μεθανόλη και νερό-ακετονιτρίλιο με σταθερή ροή 0,3 mL/min και σταθερά μεταβαλλόμενη αναλογία της κινητής φάσης από 90% νερό και 10% του δεύτερου διαλύτη σε 0% νερό και 100% του δεύτερου διαλύτη εντός εικοσαλέπτου. Η ανάλυση ξεκινάει με το μεγαλύτερο ποσοστό του πολικού διαλύτη εξαιτίας της στήλης ανάλυσης που χρησιμοποιείται. Η στήλη είναι άπολη επομένως ευνοείται να εκλουστούν πρώτα οι πιο πολικές ενώσεις και για αυτό ενισχύεται το φαινόμενο με την παρουσία του νερού.



Εικόνα 28 HPLC φάσμα μίγματος 40 πρότυπων ενώσεων με χρήση κινητής φάσης νερό-μεθανόλη

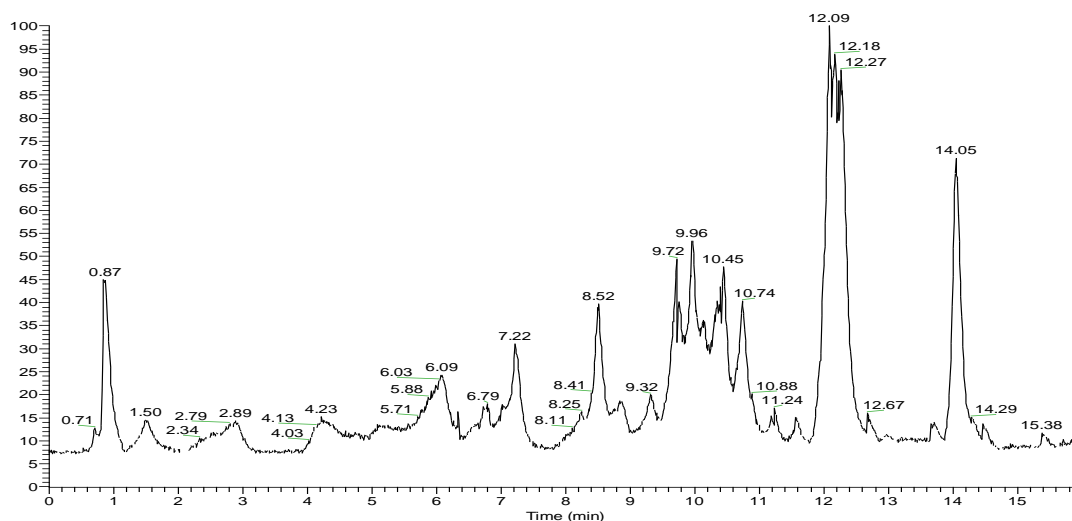


Εικόνα 29 HPLC φάσμα μίγματος 40 πρότυπων ενώσεων με χρήση κινητής φάσης νερό-ακετονιτρίλιο

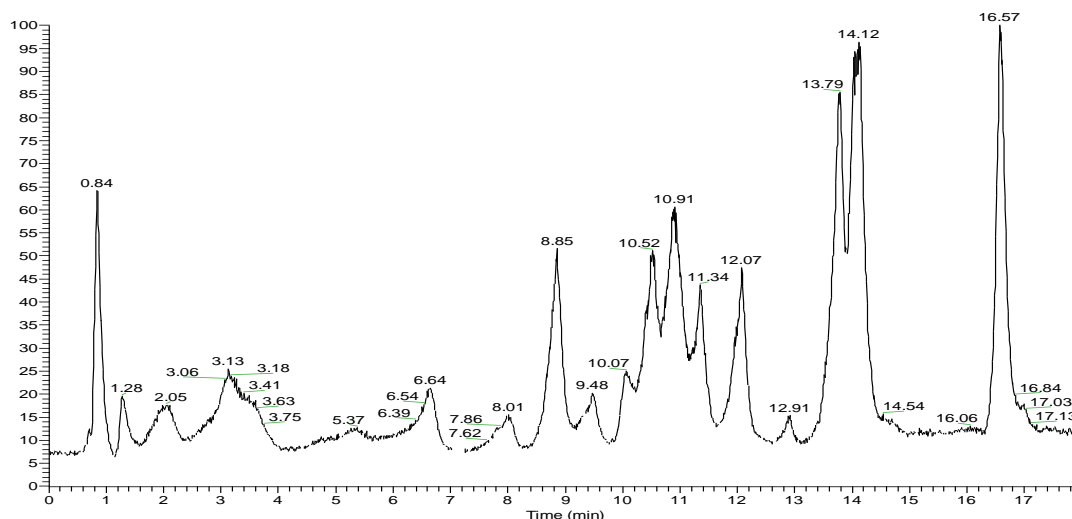
Όπως διακρίνεται και από τα χρωματογραφήματα, οι ενώσεις εκλούνται και διαχωρίζονται καλύτερα όταν στην κινητή φάση υπερτερεί σε ποσοστό ο πιο άπολος διαλύτης και μάλιστα στο χρωματογράφημα με το ακετονιτρίλιο (Εικόνα 29) η ανάλυση ολοκληρώνεται και πολύ νωρίτερα συγκριτικά με την ανάλυση με μεθανόλη (Εικόνα 28).

Για τον καλύτερο ιονισμό των ενώσεων που συνεπάγεται ενίσχυση της έντασης του σήματος, αλλά και για τον σχηματισμό πιο ομαλών κορυφών γκαουσιανής μορφής απαραίτητη είναι η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος.

Για την επιλογή καταλληλότερου ρυθμιστικού διαλύματος ανάμεσα στο μυρμηκικό οξύ και το οξικό οξύ παραλήφθησαν τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα με προσθήκη 0,1% στο ακετονιτρίλιο και 0,2% στο νερό, με το μεγαλύτερο ποσοστό στο νερό για ενίσχυση του ιονισμού.



Εικόνα 30 HPLC φάσμα μίγματος 40 πρότυπων ενώσεων με χρήση κινητής φάσης ακετονιτρίλιο-νερό παρουσία 0,1% και 0,2% μυρμηκικού οξέος αντίστοιχα

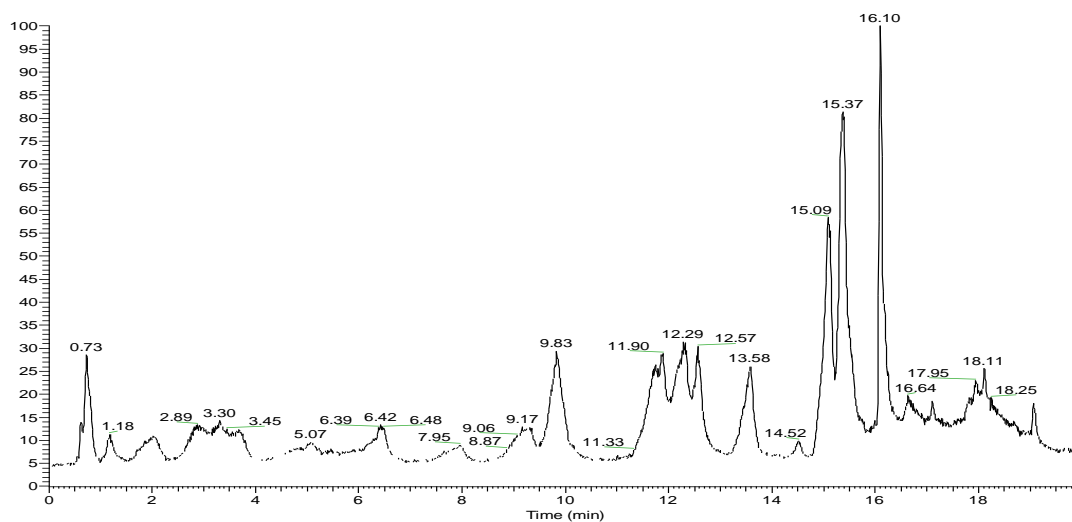


Εικόνα 31 HPLC φάσμα μίγματος 40 πρότυπων ενώσεων με χρήση κινητής φάσης ακετονιτρίλιο-νερό παρουσία 0,1% και 0,2% οξικού οξέος αντίστοιχα

Η παρουσία του μυρμηκικού οξέος φαίνεται να προκαλεί και τον ιονισμό ουσιών του περιβάλλοντος του μίγματος, πέραν των 40 προτύπων, σχηματίζοντας «ψευδοκορυφές» όπως στα 12,67 και 15,38. Επιπλέον το χρωματογράφημα φαίνεται πιο «θορυβώδες» σε αντίθεση με το

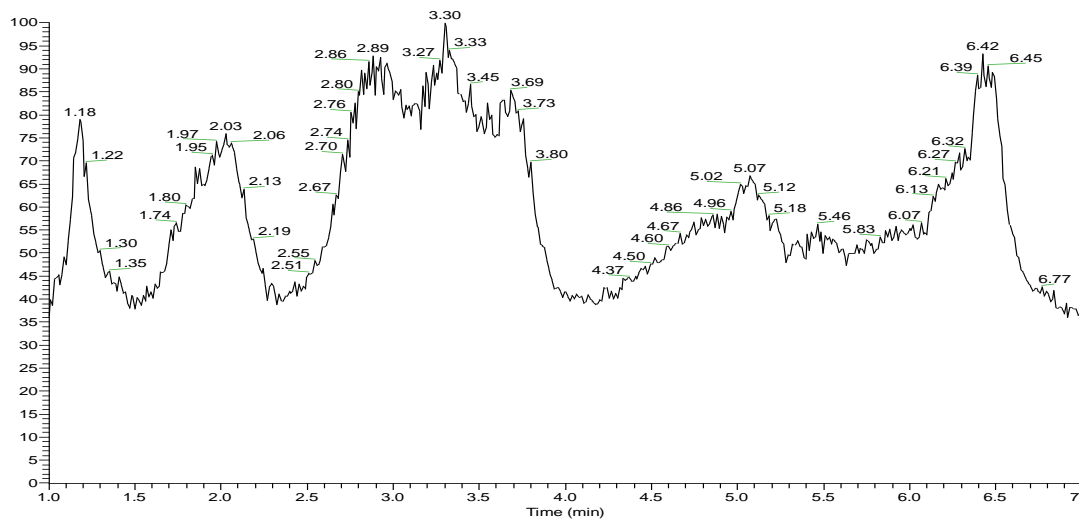
χρωματογράφημα που προκύπτει παρουσία του οξικού οξέος όπου ο ιονισμός είναι μόνο ως προς τα συστατικά του μίγματος και οι κορυφές πιο ομαλές.

Έχοντας καταλήξει στη σύσταση της κινητής φάσης και μετά από βελτιστοποιήσεις στην αναλογία της και τη ροή της κατά τη διάρκεια της ανάλυσης προέκυψε το χρωματογράφημα στην Εικόνα 32

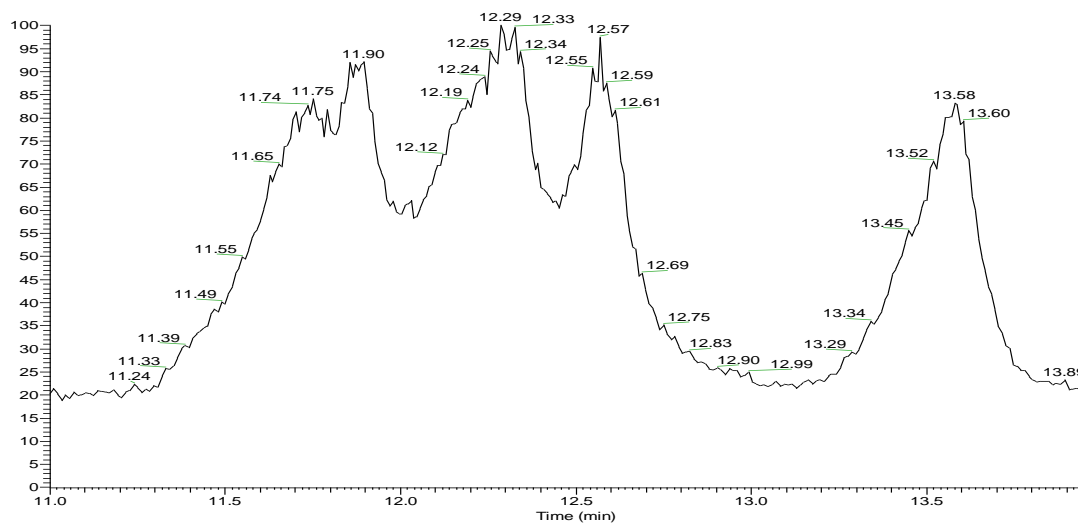


Εικόνα 32 HPLC φάσμα μίγματος 40 πρότυπων ενώσεων με χρήση κινητής φάσης ακετονιτρίλιο με 0,1% οξικό οξύ και νερό 0,2% οξικού οξέος με βελτιστοποιημένο διαχωρισμό των προτύπων

Ωστόσο στα χρονικά διαστήματα 1-7 λεπτά (Εικόνα 33) και 11-14 λεπτά (Εικόνα 34) υπάρχει έντονη αλληλοεπικάλυψη των κορυφών και διεύρυνση άλλων ενώ επιπλέον η ένταση του σήματος είναι ανθενής. Από το παραπάνω συμπεραίνουμε ότι πρέπει να ενισχυθεί ο ιονισμός των ενώσεων μέσα από την πολικότητα του μίγματος.

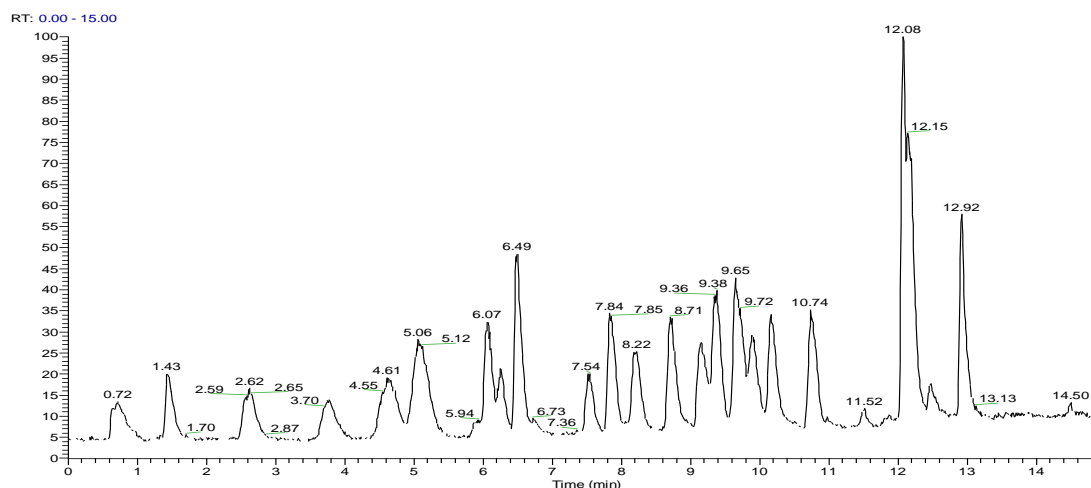


Εικόνα 33 Μεγέθυνση χρωματογραφήματος στα 1-7 λεπτά HPLC φάσμα μίγματος 40 πρότυπων ενώσεων με χρήση κινητής φάσης ακετονιτρίλιο με 0,1% οξικό οξύ και νερό 0,2% οξικού οξέος



Εικόνα 34 Μεγέθυνση χρωματογραφήματος στα 11-14 λεπτά HPLC χρωματογράφημα μίγματος 40 πρότυπων ενώσεων με χρήση κινητής φάσης ακετονιτρίλιο με 0,1% οξικό οξύ και νερό 0,2% οξικού οξέος

Για την επίλυση του παραπάνω προβλήματος έγινε αλλαγή στο διαλύτη του μίγματος από μεθανόλη σε μεθανόλη και νερό με αναλογία 30/70 ενισχύοντας έτσι τον ιονισμό του μίγματος. Παράλληλα με μεταβολές του χρόνου ανάλυσης, της αναλογίας και της ροής της κινητής φάσης προέκυψε ο διαχωρισμός όπως φαίνεται στην Εικόνα 35



Εικόνα 35 HPLC χρωματογράφημα μίγματος 40 πρότυπων ενώσεων διαλυτοποιημένων σε μεθανόλη και νερό με χρήση κινητής φάσης ακετονιτρίλιο με 0,1% οξικό οξύ και νερό 0,2% οξικού οξέος

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω λοιπόν, καταλήξαμε σε διαλύτη δείγματος μεθανόλη-νερό σε αναλογία 30/70 και κινητή φάση με ακετονιτρίλιο με 0,1% οξικού οξέος και νερό με 0,2% οξικού οξέος σε αναλογία και ένταση ροής όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2 Πρόγραμμα διαλυτών για τη βαθμιδωτή έκλυση των φαινολικών ουσιών μέσω της HPLC και η ροή τους

Χρόνος	Ροή	Ακετονιτρίλιο		Νερό	
		0,1% Οξικό οξύ		0,2% Οξικό οξύ	
0,00	0,30	10		90	
1,00	0,30	20		80	
8,00	0,30	30		70	
8,10	0,35	50		50	
9,00	0,35	50		50	
10,20	0,35	65		35	
14,00	0,35	100		0	
15,00	0,35	100		0	

Οι ενώσεις αφού διαχωριστούν και εκλουστούν από τη στήλη εισέρχονται στο φασματογράφο μάζας όπου είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός παραμέτρων για τον ιονισμό των ενώσεων. Για τον προσδιορισμό τους, μικροποσότητα από το διάλυμα (μεθανόλη-νερό 30/70) του μίγματος των 40 πρότυπων ενώσεων εγχύθηκε απευθείας στο φασματογράφο μάζας που με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος προσδιόρισε τις βέλτιστες συνθήκες για τον αρνητικό ιονισμό και των 40 πρότυπων ενώσεων οι οποίες φαίνονται στον Πίνακας 3

Πίνακας 3 Συνθήκες που ορίστηκαν για τον αρνητικό (ESI⁻) ιονισμό των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων

Ρυθμίσεις MS	Αρνητικός ιονισμός (ESI⁻)
Τάση πηγής (kV)	3.94
Τάση τριχοειδούς σωλήνα (V)	-48,49
Θερμοκρασία τριχοειδούς σωλήνα (°C)	300
Ροή αερίου περιβλήματος	4
Ροή αερίου σαρώσεως	20
Εύρος m/z	80,00-700,00

Η επεξεργασία των εξαγόμενων χρωματογραφημάτων και φασμάτων μάζας έγινε με το λογισμικό Xcalibur Version 2.1 της Thermo Scientific [113].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις δειγμάτων

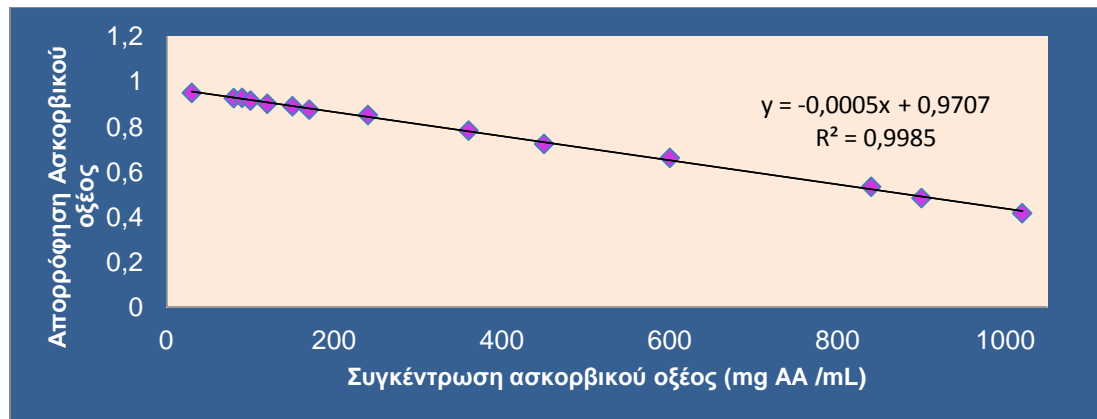
6.1.1 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH• (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)

Η ικανότητα σάρωσης της ρίζας (Radical Scavenging Activity, %RSA) επί τοις εκατό υπολογίζεται από τον τύπο: $\%RSA = (A_{516nm \text{ DPPH}^\bullet} - A_{516nm \text{ Tplateau}} \times 100\%) / A_{516nm \text{ DPPH}^\bullet}$ όπου $A_{516nm \text{ Tplateau}}$ είναι η τιμή της απορρόφησης του εναπομείνοντος DPPH• αφού έχει ολοκληρωθεί (σε χρόνο $t = T_{\text{plateau}}$) η αντίδραση μεταξύ της ρίζας και των ουσιών με αντιριζική δράση του δείγματος, ενώ $A_{516nm \text{ DPPH}^\bullet}$ είναι η τιμή της απορρόφησης του καθαρού διαλύματος DPPH• 100 μΜ.

Για τον υπολογισμό της αντιριζικής ικανότητας των δειγμάτων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με τη χρήση γνωστών συγκεντρώσεων 30-1020μg L-ασκορβικού οξέος με τα αποτελέσματα και την καμπύλη να παρατηθούν στον Πίνακα 4 και στο Σχήμα 3 που ακολουθούν

Πίνακας 4 Απορρόφησης ασκορβικού οξέος για τον σχηματισμό πρότυπης καμπύλης

C (μg / 100mL)	Απορρόφηση Ασκορβικού οξέος
30	0,949
80	0,927
100	0,916
150	0,891
170	0,876
240	0,851
360	0,782
450	0,723
600	0,661
840	0,533
900	0,483
1020	0,416



Σχήμα 3 Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τη συγκέντρωση Ασκορβικού οξέος

Από την πρότυπη καμπύλη του ασκορβικού οξέος, υπολογίσθηκε σε ισοδύναμα του ασκορβικού οξέος (Ascorbic Acid Equivalent, AAE) η αντιριζική ικανότητα για κάθε δείγμα.

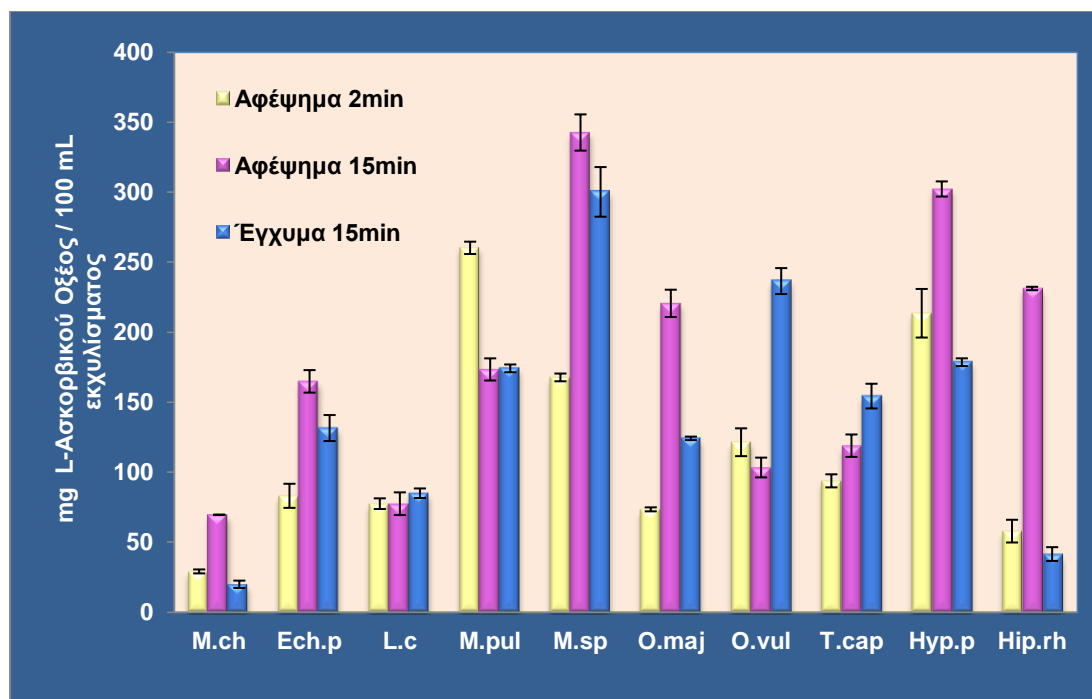
Πίνακας 5 Αντιριζική ικανότητα των βοτάνων εκφρασμένα σε mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος ανά 100mL εκχυλίσματος ^{1 2 3}

Βότανο	Αφέψημα 2min	Αφέψημα 15min	Έγχυμα 15min
<i>M.ch</i>	43.20±0.73 aA	38.45±2.26 bA	54.69±5.61 cA
<i>Ech.p</i>	84.69±6.38 aBE	101.74±2.80 bB	138.15±2.50 cB
<i>L.c</i>	73.92±5.53 aB	72.17±0.60 aC	86.09±5.54 bC
<i>M.pul</i>	135.89±7.63 aC	133.00±1.76 aD	159.20±4.13 bDF
<i>M.sp</i>	169.62±1.25 aD	192.33±4.71 bE	256.95±4.40 cE
<i>O.maj</i>	91.26±1.77 aE	105.47±2.98 bBG	160.37±3.98 cF
<i>O.vul</i>	117.23±5.54 aF	151.93±1.03 bF	215.24±7.92 cG
<i>T.cap</i>	89.24±0.71 aE	116.45±1.10 bG	146.60±0.59 cBD
<i>Hyp.p</i>	155.71±6.21 aG	174.96±4.85 bH	154.38±0.23 aDF
<i>Hip.rh</i>	73.35±1.10 aB	133.52±1.16 bD	61.05±4.70 cA

¹ Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με ±τυπική απόκλιση (n=8)

² Ο συμβολισμός βάση γραμμάτων ανά σειρά αναφέρεται στην αντίστοιχη στήλη ($p < 0,05$)

³ Ο συμβολισμός βάση γραμμάτων ανά στείλη αναφέρεται στην αντίστοιχη γραμμή ($p < 0,05$)



Σχήμα 4 Συγκριτική αποϊκόνηση αποτελεσμάτων αντιριζικής ικανότητας στη DPPH

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 5 οι τιμές κυμαίνονται στα 38,45-256,95 mg AAE. Οι υψηλότερες τιμές φαίνονται στα αφεψήματα των 15 λεπτών με εξαιρέσεις που εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη *Mentha pulegium* με υψηλότερη αντιριζική ικανότητα στο αφέψημα των 2 λεπτών και στο *Oreganum vulgare* στο έγχυμα των 15 λεπτών. Τις χαμηλότερες τιμές αντιριζικής ικανότητας παρουσιάζει η *Matricaria chamomilla* ανεξάρτητα από την διαδικασία εκχύλισης ενώ τη μεγαλύτερη αντιριζική ισχύ παρουσιάζει η *Mentha spicata* ως έγχυμα 15 λεπτών

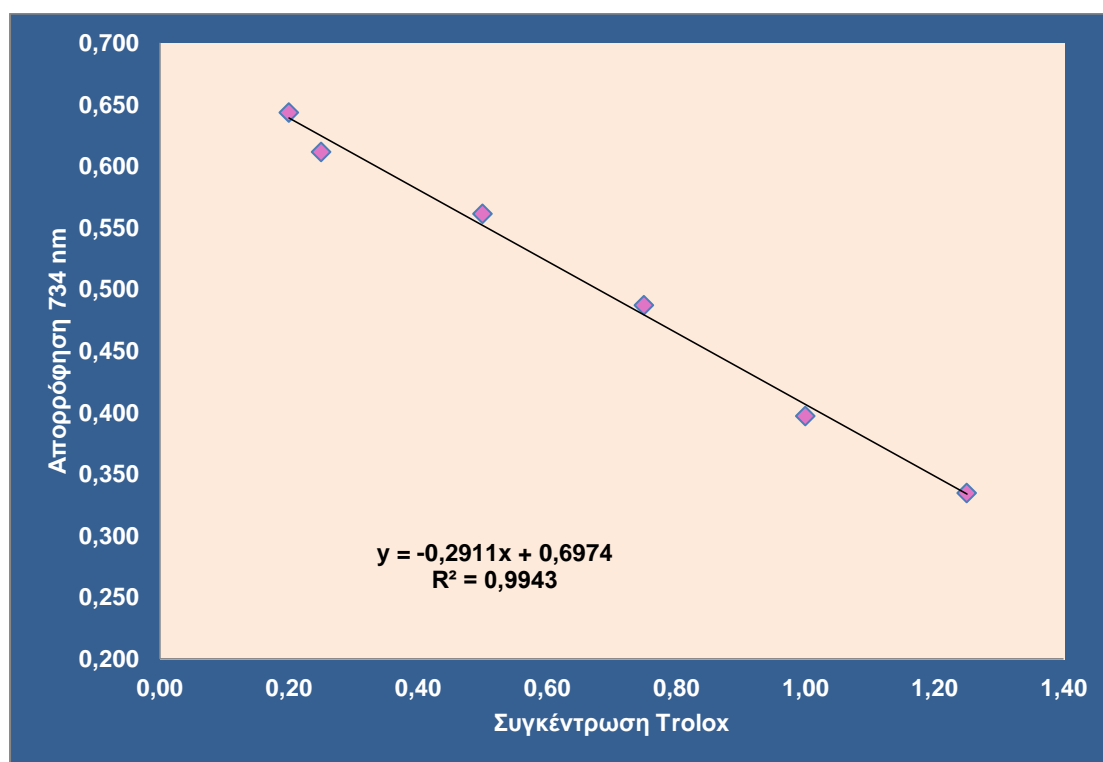
6.1.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]

Η μέθοδος της ABTS^{•+} παρέχει μια εκτίμηση για τη δραστικότητα των δειγμάτων απέναντι στη συγκεκριμένη ρίζα, η οποία εκφράζεται ως συγκέντρωση σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox (Trolox Equivalents, TE) μέσω καμπύλης συσχέτισης.

Για τον υπολογισμό της αντιριζικής ικανότητας των δειγμάτων είναι απαραίτητη πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

Πίνακας 6 Τιμές απορρόφησης Trolox σε διάφορες συγκεντρώσεις για τον σχηματισμό πρότυπης καμπύλης

C (μg /100mL)	0,2	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5
Απορρόφηση Trolox	0,644	0,612	0,561	0,487	0,397	0,335	0,278

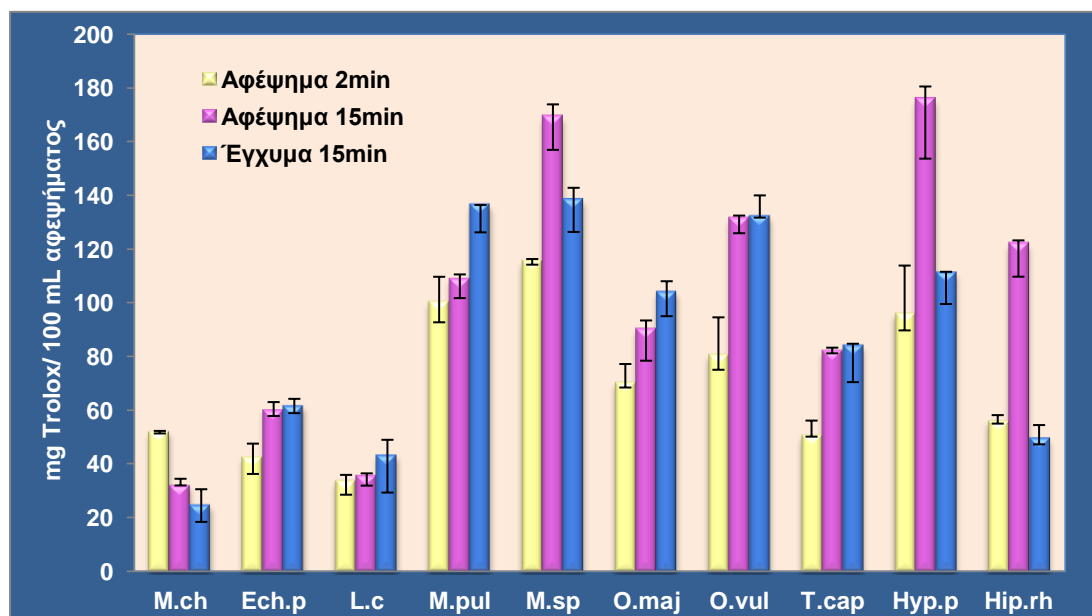


Σχήμα 5 Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τη συγκέντρωση Trolox

Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη εξήχθησαν και τα αποτελέσματα για τα δείγματα

Πίνακας 7 Αντιριζική ικανότητα των βοτάνων εκφρασμένα σε mg ισοδυνάμων Trolox ανά 100mL εκχυλίσματος ^{4 5 6}

Βότανο	Αφέψημα 2min	Αφέψημα 15min	Έγχυμα 15min
<i>M.ch</i>	52.13±0.22 aA	32.26±0.25 bA	25.01±6.57 cA
<i>Ech.p</i>	42.70±4.91 aB	60.29±2.40 bB	61.79±2.82 bB
<i>L.c</i>	34.11±1.86 aC	35.93±3.98 aA	43.49±14.12 bAF
<i>M.pul</i>	100.43±9.33 aD	108.89±7.08 aC	136.51±10.20 bC
<i>M.sp</i>	115.52±0.87 aE	169.28±12.24 bD	138.50±12.04 cC
<i>O.maj</i>	70.28±6.99 aF	90.51±12.01 bCG	104.12±9.04 bDE
<i>O.vul</i>	80.66±13.99 aF	131.53±5.55 bE	132.16±0.36 bC
<i>T.cap</i>	50.91±5.28 aA	82.26±1.02 bG	84.23±13.71 bD
<i>Hyp.p</i>	95.99±17.95 aF	175.80±22.04 bD	111.39±11.77 aE
<i>Hip.rh</i>	56.16±2.07 aA	122.16±12.37 bC	49.83±2.50 cF



Σχήμα 6 Συγκριτική αποικόνιση αποτελεσμάτων ABTS

⁴ Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με \pm τυπική απόκλιση (n=8)

⁵ Ο συμβολισμός βάση γραμμάτων ανά σειρά αναφέρεται στην αντίστοιχη στήλη ($p < 0,05$)

⁶ Ο συμβολισμός βάση γραμμάτων ανά στήλη αναφέρεται στην αντίστοιχη γραμμή ($p < 0,05$)

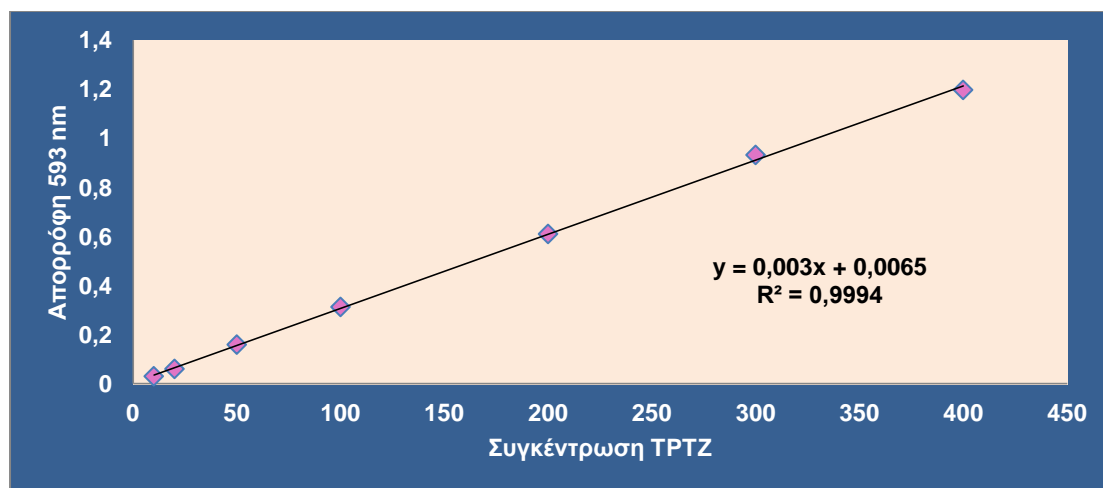
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 7 οι τιμές κυμαίνονται στα 32,26-175,82 mg TE. Οι υψηλότερες τιμές εμφανίζονται κυρίως στα αφεψήματα των 15 λεπτών με τα εγχύματα των 15 λεπτών να ακολουθούν στην πλειονότητα των δειγμάτων. Εξαιρέση αποτελούν η *Matricaria chamomilla* με υψηλότερα αποτελέσματα στο αφέψημα των 2 λεπτών και στη *Mentha pulegium* με υψηλότερη αντιριζική ικανότητα στο έγχυμα των 15 λεπτών. Τη χαμηλότερη τιμή αντιριζικής ικανότητας παρουσιάζει η *Matricaria chamomile* στο αφέψημα των 15 λεπτών ενώ τη μεγαλύτερη αντιριζική ισχύ παρουσιάζει το *Hypericum perforatum* και η *Mentha spicata* ως αφεψήματα των 15 λεπτών

6.1.3 Εκτίμηση αναγωγικής δύναμης του σιδήρου (ferric reducing antioxidant power, FRAP)

Η αναγωγική ικανότητα των δειγμάτων με τη μέθοδο αυτή βασίζεται στην αύξηση της απορρόφησης στα 593 nm λόγω του σχηματισμού των συμπλόκων της τρις-πυριδυλο-s-τριαζίνης (tripyridyl-s-triazine) με το σίδηρο (II) (TPTZ–Fe(II)) παρουσία του αναγωγικού μέσου. Χρειάστηκε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης σύμφωνα με πρότυπο TPTZ.

Πίνακας 8 Τιμές απορρόφησης TPTZ σε διάφορες συγκεντρώσεις για τον σχηματισμό πρότυπης καμπύλης

C (μg / 100mL)	10	20	50	100	200	300	400
Απορρόφηση TPTZ	0,031	0,061	0,16	0,313	0,611	0,933	1,198



Σχήμα 7 Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τη συγκέντρωση TPTZ

Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς προέκυψαν τα αποτελέσματα των δειγμάτων

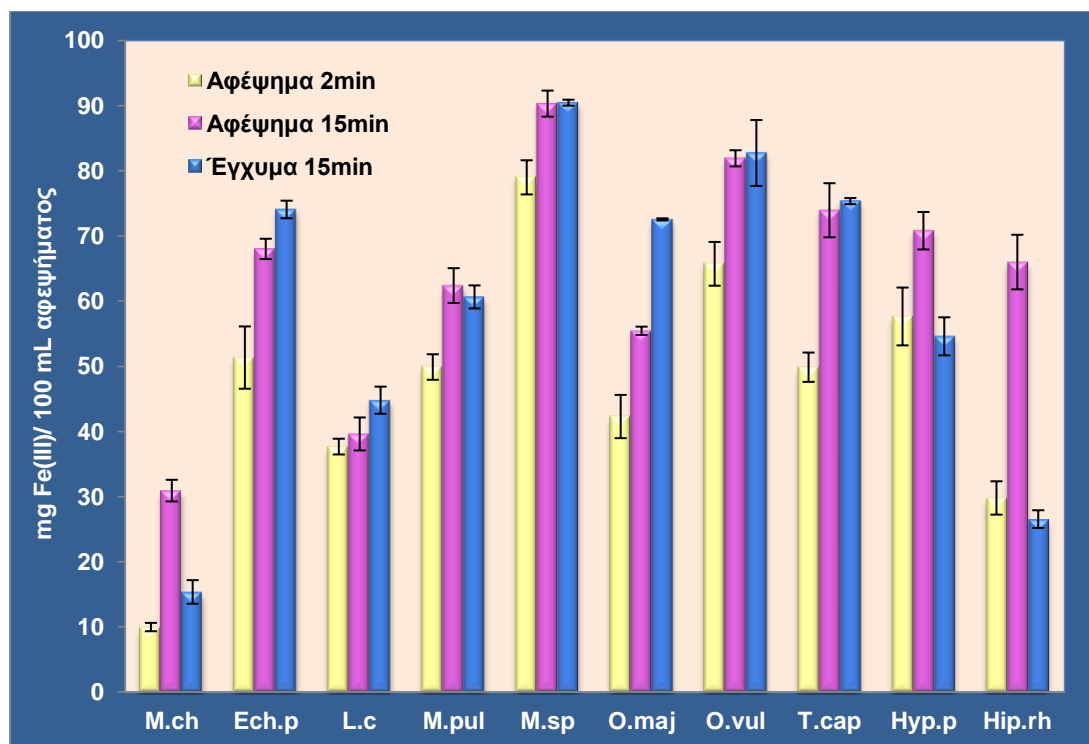
Πίνακας 9 Συγκεντρωτικός Πίνακας δεδομένων Fe(III)^{7 8 9}

Βότανο	Αφέψημα 2min	Αφέψημα 15min	Έγχυμα 15min
<i>M.ch</i>	9.98±0.64 aA	30.92±1.66 bA	15.37±1.81 cA
<i>Ech.p</i>	51.34±4.78 aBG	68.02±1.56 bB	74.07±1.35 cBG
<i>L.c</i>	37.68±1.21 aC	39.62±2.53 aC	44.80±2.08 bC
<i>M.pul</i>	49.89±1.96 aB	62.39±2.67 bD	60.65±1.77 bD
<i>M.sp</i>	79.00±2.62 aD	90.32±2.00 bE	90.46±0.46 bE
<i>O.maj</i>	42.29±3.32 aE	55.45±0.64 bF	72.55±0.16 cB
<i>O.vul</i>	65.73±3.36 aF	81.92±1.24 bG	82.74±5.06 bF
<i>T.cap</i>	49.86±2.58 aB	73.95±4.15 bB	75.35±0.47 bG
<i>Hyp.p</i>	57.65±4.44 aG	70.81±2.88 bB	54.60±2.92 aH
<i>Hip.rh</i>	29.79±2.56 aH	66.00±4.19 bB	26.55±1.36 aI

⁷ Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με ±Τυπική απόκλιση (n=8)

⁸ Ο συμβολισμός βάση γραμμάτων ανά σειρά αναφέρεται στην αντίστοιχη στήλη ($p < 0,05$)

⁹ Ο συμβολισμός βάση γραμμάτων ανά στήλη αναφέρεται στην αντίστοιχη γραμμή ($p < 0,05$)



Σχήμα 8 Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων αναγωγικής ισχύος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 9 οι τιμές κυμαίνονται στα 9,98-90,46mg Trolox. Τα δείγματα εμφανίζουν τα υψηλότερα αποτελέσματα στα εγχύματα και τα αφεψήματα των 15 λεπτών χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και με τα αφεψήματα των 2 λεπτών να έχουν τη χαμηλότερη απορρόφηση και στα 10 δείγματα που αναλύθηκαν. Στατιστικά σημαντική διαφορά εμφάνισαν τα δείγματα *Matricaria chamomile*, *Hypericum perforatum* και *Hipporphae rhamnoides* με τα υψηλότερα αποτελέσματα στα αφεψήματα των 15 λεπτών. Τη χαμηλότερη τιμή αναγωγικής ισχύος παρουσιάζει η *Matricaria chamomile* στο αφέψημα των 2 λεπτών ενώ τη μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ παρουσιάζει η *Menta spicata* ως έγχυμα 15 λεπτών.

6.1.4 Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu

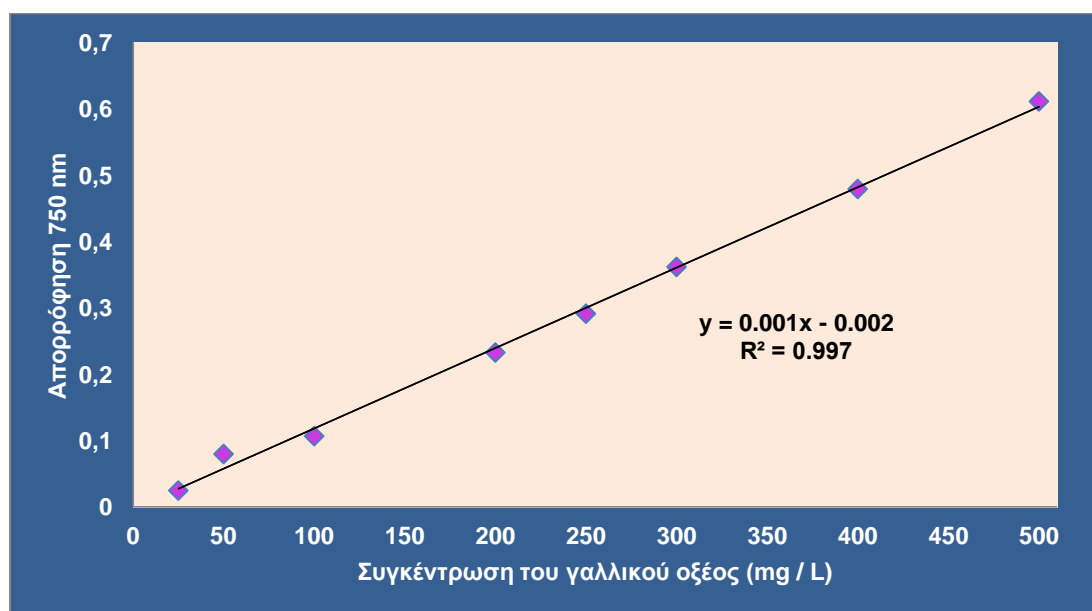
Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων κατασκευάζεται γραφικά η πρότυπη καμπύλη μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση των φαινολικών

συστατικών των δειγμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE).

Μια αντιπροσωπευτική καμπύλη συσχέτισης της πρότυπης ένωσης του γαλλικού οξέος παρατίθεται στο Σχήμα 9 με τις τιμές να φαίνονται στον Πίνακα 10. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R) κάθε καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ικανοποιητική ($R > 0,99$).

Πίνακας 10 Πίνακας συγκεντώσεων για το σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος

C (μg /100mL)	25	50	100	200	250	300	400
Απορρόφηση Γαλλικού οξέος	0,025	0,08	0,107	0,233	0,291	0,362	0,479

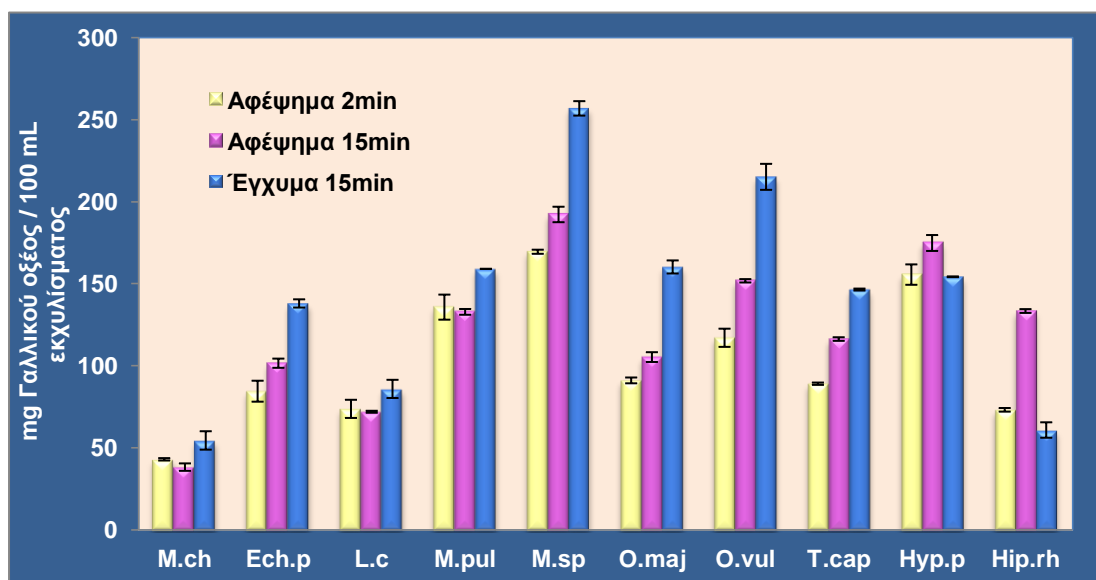


Σχήμα 9 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων εκφράστηκαν σε mg γαλλικού οξέος (GA) ανά 100mL αφεψήματος ή εγχύματος χρησιμοποιώντας την καμπύλη βαθμονόμησης

Πίνακας 11 Πίνακας δεδομένων ολικού φαινολικού περιεχομένου^{10 11 12}

Βότανο	Αφέψημα 2min	Αφέψημα 15min	Έγχυμα 15min
<i>M.ch</i>	43.20±0.73 aA	38.45±2.26 bA	54.69±5.61 cA
<i>Ech.p</i>	84.69±6.38 aBE	101.74±2.80 bB	138.15±2.50 cB
<i>L.c</i>	73.92±5.53 aB	72.17±0.60 aC	86.09±5.54 bC
<i>M.pul</i>	135.89±7.63 aC	133.00±1.76 aD	159.20±4.13 bDF
<i>M.sp</i>	169.62±1.25 aD	192.33±4.71 bE	256.95±4.40cE
<i>O.maj</i>	91.26±1.77aE	105.47±2.98bBG	160.37±3.98 cF
<i>O.vul</i>	117.23±5.54 aF	151.93±1.03 bF	215.24±7.92 cG
<i>T.cap</i>	89.24±0.71 aE	116.45±1.10 bG	146.60±0.59 cBD
<i>Hyp.p</i>	155.71±6.21 aG	174.96±4.85 bH	154.38±0.23 aDF
<i>Hip.rh</i>	73.35±1.10 aB	133.52±1.16 bD	61.05±4.70 cA



Σχήμα 10 Σχηματική αναπαράσταση σύγκρισης δεδομένων σχετικά με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο

¹⁰ Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με ±Τυπική απόκλιση (n=8)

¹¹ Ο συμβολισμός βάση γραμμάτων ανά σειρά αναφέρεται στην αντίστοιχη στήλη ($p < 0,05$)

¹² Ο συμβολισμός βάση γραμμάτων ανά στείλη αναφέρεται στην αντίστοιχη γραμμή ($p < 0,05$)

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 11 το εύρος τιμών είναι 38,45-256,95 mg γαλλικού οξέος /100mL εκχυλίσματος. Στο σύνολο των δειγμάτων τις υψηλότερες τιμές παρουσιάζουν τα εγχύματα των 15 λεπτών με εξαίρεση το *Hypericum perforatum* και το *Hipporhae rhamnoides* να εμφανίζουν το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο στα αφεψήματα των 15 λεπτών. Το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο παρουσίασε η *Menta spicata* ενώ το χαμηλότερο *Matricaria chamomile* ανεξάρτητα από την διαδικασία εκχύλισης.

6.1.5 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων φασματοφωτομετρικών μεθόδων

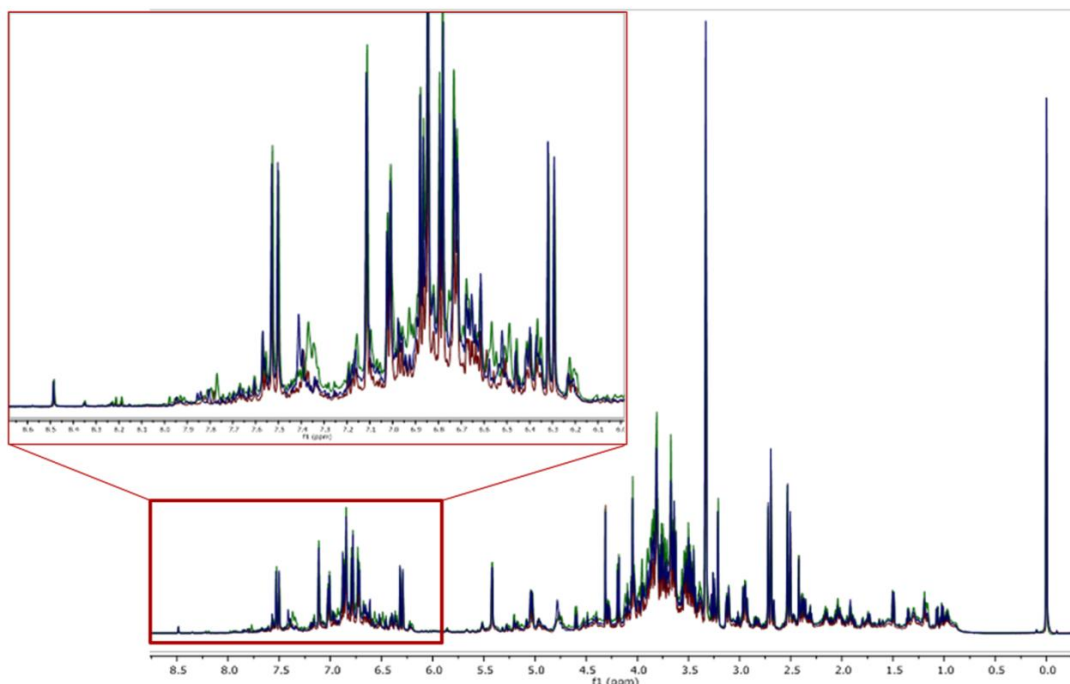
Συγκρεντρώνοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα τα 15 λεπτά αφεψήματος του είδους *Hypericum perforatum* και *Hipporhae rhamnoides* έδειξαν το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο ($p<0,05$) αλλά και την υψηλότερη αναγωγική ισχύ συγκριτικά με τα εγχύματα και τα αφεψήματα των 15 λεπτών στο σύνολο των αναλύσεων. Αντίθετα, τα εγχύματα των βοτάνων *Lippia citriodora*, *Origanum vulgare* και *Thymus capitatus* έδειξαν το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο ($p<0,05$) και ισχυρότερη αντιριζική ικανότητα συγκριτικά με όλα τα αφεψήματα. Όσον αφορά τα εγχύματα των *Matricaria chamomilla*, *Echinacea purpurea*, *Mentha spicata* και *Origanum majorana* εμφάνισαν υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο ($p<0,05$) αλλά χαμηλότερη αντιριζική ικανότητα από τα αφεψήματα των 15 λεπτών, μετρούμενα με DPPH. Αντίστοιχα το έγχυμα, *Mentha pulegium* εμφάνισε σημαντικά υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιριζική δράση όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της ABTS έναντι των αφεψημάτων. Η μέθοδος DPPH ανέδειξε τα αφεψήματα των 2 λεπτών ως αυτά με την υψηλότερη αντιριζική ικανότητα ενώ με τη μέθοδο της FRAP τα αφεψήματα των 15 λεπτών ως αυτά με την υψηλότερη αντιριζική ικανότητα.

Αποτιμώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα αφεψημάτων των 2 και 15 λεπτών τα κύρια συμπεράσματα είναι ότι τα αφεψήματα των 15 λεπτών της *Echinacea purpurea*, *Mentha spicata*, *Origanum majorana*, *Thymus capitatus*, *Hypericum perforatum* και *Hipporhae rhamnoides* έδειξαν το περισσότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα από τα αφεψήματα των 2 λεπτών. Όσον αφορά τα αφεψήματα από

τη *Lippia citriodora*, ο χρόνος προετοιμασίας δεν είχε καμία επίδραση επί του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, της αντιριζικής και αναγωγικής ικανότητας ανεξάρτητα από τη διαδικασία επεξεργασίας φτάνοντας σε T_{plateau} μόλις από τα 2 λεπτά. Το αφέψημα των 15 λεπτών του *Oreganum vulgare* παρουσίασε υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο καθώς και αντιριζική ικανότητα σύμφωνα με τις μετρήσεις της ABTS συγκριτικά με το αφέψημα των 2 λεπτών ενώ σύμφωνα με την μέθοδο της DPPH δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη αντιριζική ικανότητα. Τα αφεψήματα των 2 και 15 λεπτών του *Matricaria chamomilla* έδωσαν αποτελέσματα που τα δείχνουν να διαχωρίζονται ως μέθοδοι με τα αφεψήματα των 2 λεπτών να έχουν υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιριζική ικανότητα σύμφωνα με την ABTS αλλά μικρότερη σύμφωνα με την DPPH. Τέλος η *Mentha pulegium* στο αφέψημα των 2 λεπτών έδειξε μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα ενάντια στη ρίζα DPPH αλλά χαμηλή αναγωγική ισχύ και αντιοξειδωτική δράση από το αφέψημα των 15 λεπτών, ενώ δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διαφορές στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο αλλά και στη δράση ενάντια στη ρίζα της ABTS

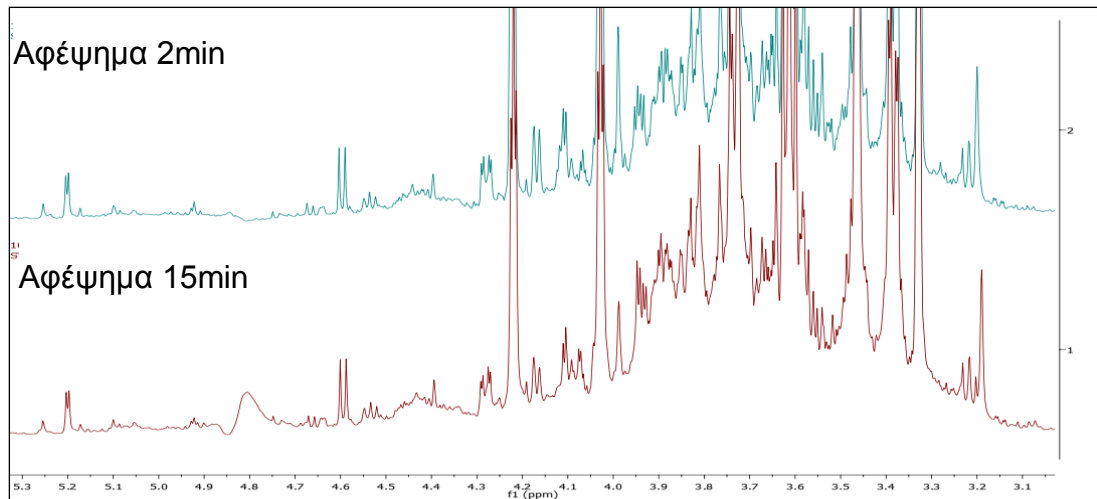
6.2 Παράθεση αποτελεσμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Σύμφωνα με τις φασματοφωτομετρικές αναλύσεις το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο εμφανίζεται στη *Mentha spicata* και μάλιστα στα εγχύματα των 15 λεπτών. Στην Εικόνα 36 απεικονίζεται η υπέρθεση των φασμάτων NMR της *Mentha spicata* ως αφεψήμα 2 (κόκκινο φάσμα) και 15 λεπτών (πράσινο φάσμα) και ως έγχυμα 15 λεπτών (μπλε φάσμα) επιβεβαιώνοντας από την ένταση των σημάτων ότι τα εγχύματα του συγκεκριμένου δείγματος είναι πιο πλούσια σε φαινολικό περιεχόμενο ως εγχύματα. Επιπλέον επικεντρώνοντας στην περιοχή των αρωματικών ενώσεων αναδεικνύεται πόσο πλούσιο είναι το δείγμα σε ενώσεις με αρωματικούς δακτυλίους.



Εικόνα 36 Υπέρθυση φασμάτων ^1H NMR και για τις τρεις διαφορετικές μεθόδους από τη *Mentha spicata*

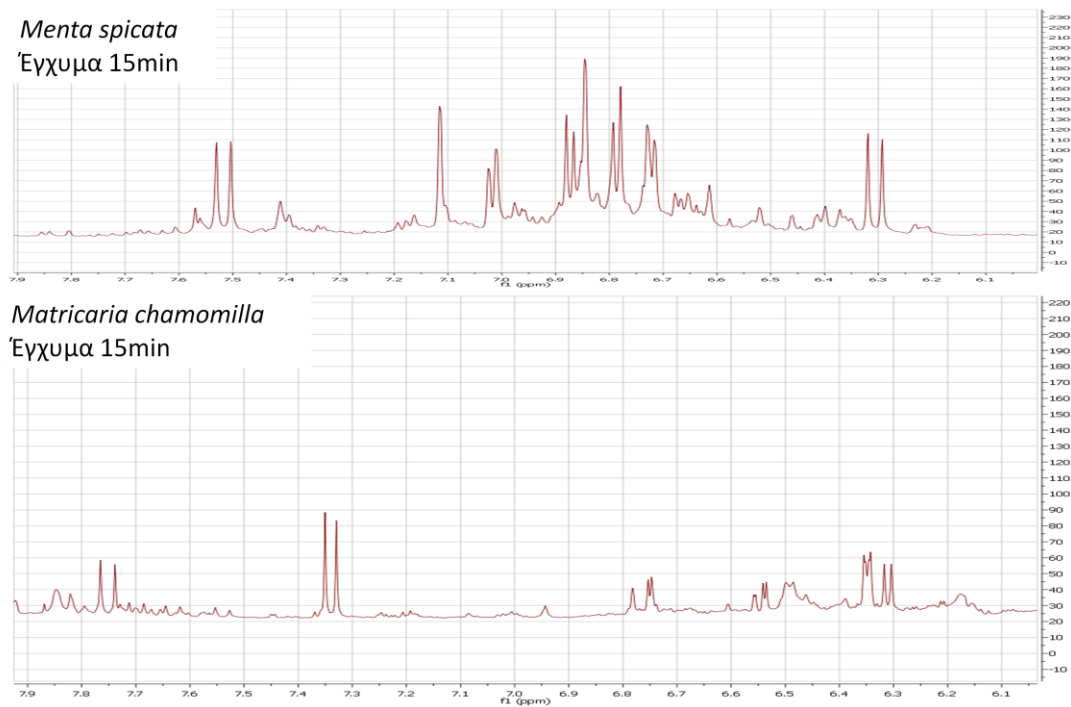
Και στις τέσσερις φασματοφωτομετρικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν το δείγμα *Hierrophae rhamnoides* είχε την υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση με στατιστικά σημαντική διαφορά ως αφέψημα των 15 λεπτών. Συγκρίνοντας τα φάσματα NMR του δείγματος αυτό επιβεβαιώνεται. Όπως φαίνεται και από τα φάσματα της Εικόνα 37 έχοντας επικεντρωθεί στα 3-6 ppm, στα αφεψήματα των 15 λεπτών όχι μόνο εμφανίζονται πιο έντονες οι κορυφές αλλά εμφανίζονται και παραπάνω κορυφές κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη παραπάνω ενώσεων συγκριτικά με το αφέψημα των 2 λεπτών όπως χαρακτηριστικά φαίνεται και από τα 4-4,2 ppm.



Εικόνα 37 NMR φάσματα 3-6 ppm αφεψημάτων 2 και 15 λεπτών του δείγματος *Hippophae rhamnoides*

Στο σύνολο των φασματοφωτο

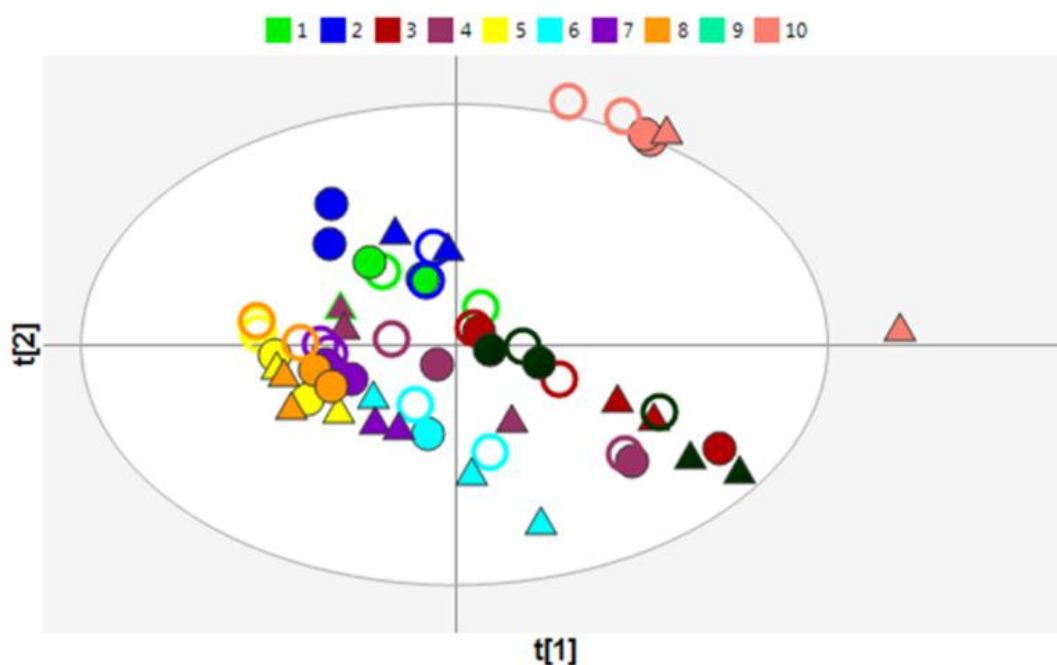
μετρικών αναλύσεων η *Mentha spicata* είχε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ η *Matricaria chamomilla* εμφάνισε τα χαμηλότερα σε καθένα όμως από αυτά το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσίασαν τα έγχυμα των 15 λεπτών.



Εικόνα 38 NMR φάσματα 6-8 ppm εγχυμάτων 15 λεπτών των δειγμάτων *Mentha spicata* και *Matricaria chamomilla*

Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα NMR των δύο δειγμάτων στη περιοχή των αρωματικών ενώσεων είναι προφανές πόσο πιο πλούσιο και ως προς συγκεντρωση αλλά και τη σύσταση είναι το έγχυμα της *Mentha spicata*.

Επειδή το σύνολο της πληροφορίας που εξήχθει από τα φάσματα NMR είναι μεγάλο, τα δεδομένα μεταφέρονται σε λογισμικό πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης. Εφαρμόστηκε η Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για να παρέχει μια επισκόπηση των παραγόντων που θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν αυτά τα δείγματα. Τα PCA μοντέλα Εικόνα 39 έδειξαν ότι τόσο η οικογένεια όσο και τα είδη των φυτών είναι οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην ομαδοποίηση των δειγμάτων αλλά όχι ο τρόπος και ο χρόνος επεξεργασίας τους. Συνεπώς, ο γενότυπος αποτελεί τον κύριο παράγοντα διαφοροποίησης των δειγμάτων κατά την ταξινόμηση τους.



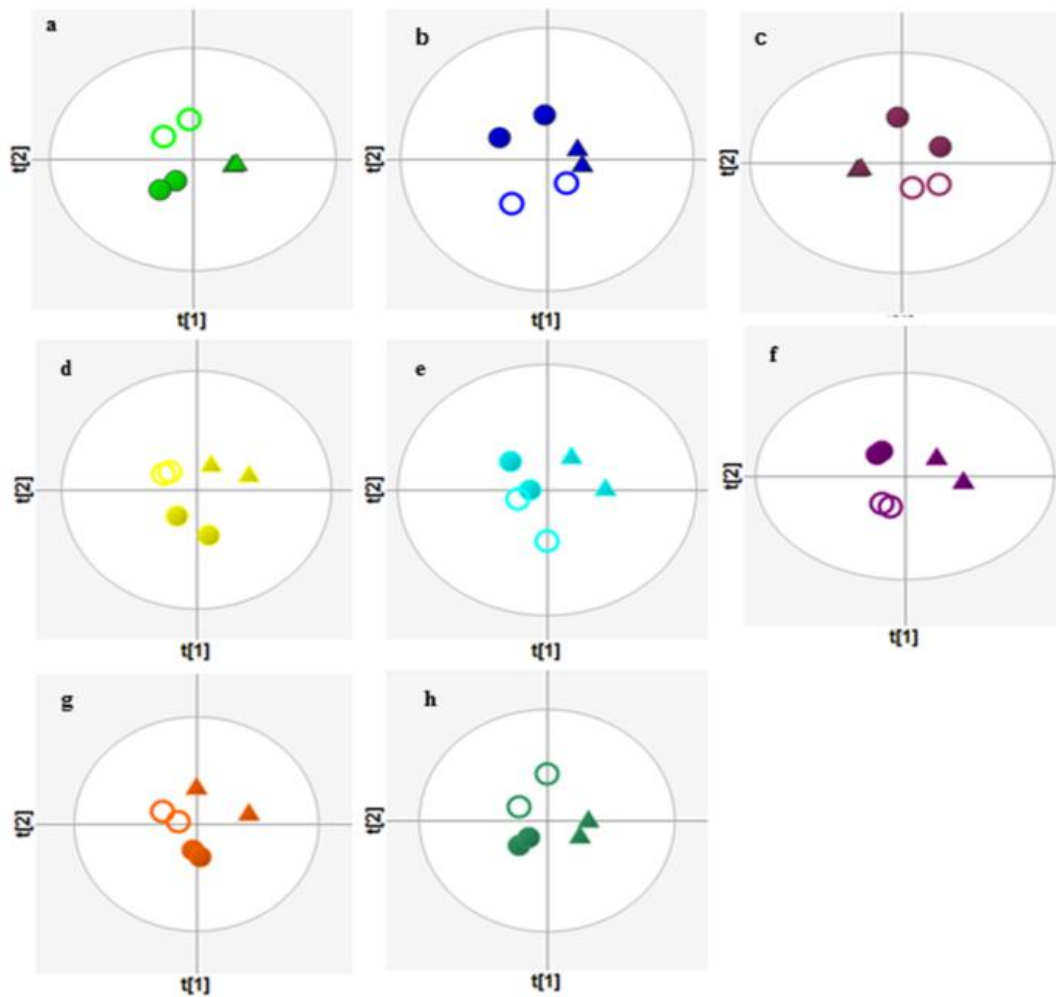
Εικόνα 39 PCA μοντέλο, A=2, N=59, $R^2X(\text{cum})=0,43$, $Q^2(\text{cum})=0,32$. Άδειος κύκλος: αφέψημα 2 λεπτών. Γεμάτος κύκλος: αφέψημα 15 λεπτών. Τρίγωνο: έγχυμα 15 λεπτών. 1=*Matricaria chamomilla*, 2=*Echinacea purpurea*, 3=*Lippia citriodora*, 4=*Mentha pulegium*, 5=*Mentha spicata*, 6=*Origanum majorana*, 7=*Origanum vulgare*, 8=*Thymus capitatus*, 9=*Hypericum perforatum*, 10=*Hippophae rhamnoides*

Από το μοντέλο αυτό είναι σαφής ο διαχωρισμός του δείγματος *Hippophae rhamnoides* που ανήκει στην οικογένεια των Ελαιογονοειδών και βρίσκεται στο

δεξί άκρο του πρώτου τεταρτημορίου. Τα δείγματα *Matricaria chamomilla* και *Echinacea purpurea* που ανήκουν στην οικογένεια των Αστερίδων διαχωρίζονται στο δεύτερο τεταρτημόριο ενώ τα δείγματα *Mentha pulegium*, *Mentha spicata*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare* και *Thymus capitatus* που ανήκουν στην οικογένεια των Χειλανθών επικεντρώνονται στο τρίτο τεταρτημόριο.

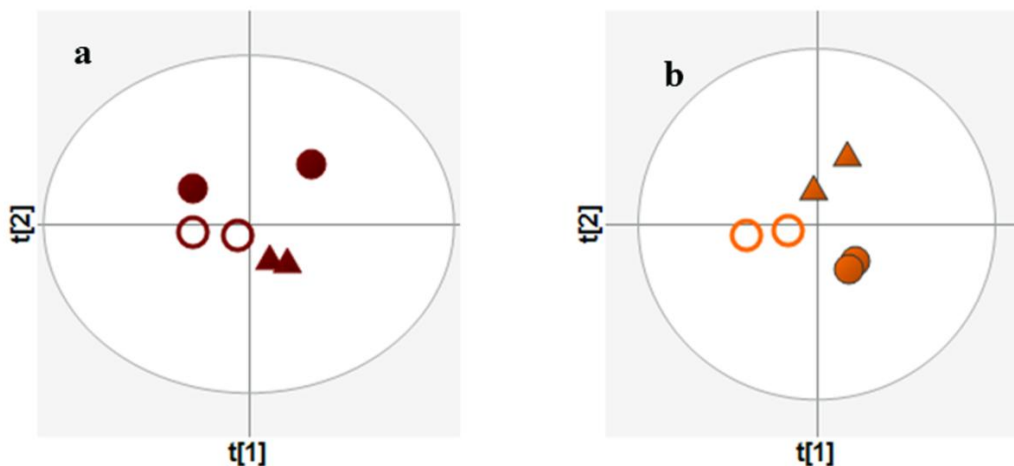
Σε μια περαιτέρω προσπάθεια ερμηνείας της επιδρασης της μεθόδου παρασκευής στο μεταβολικό αποτύπωμα του κάθε βοτάνου εφαρμόστηκε η μέθοδος PCA-class. Η μέθοδος αυτή ενσωματώνει στα μοντέλα PCA τις πληροφορίες που αφορούν στην κατηγορία των δειγμάτων.

Αρχικά, το σύνολο των δειγμάτων χωρίστηκε σε ομάδες ανάλογα με το φυτικό είδος, ορίζοντας έτσι 10 κατηγορίες. Κατά συνέπεια, 10 PCA μοντέλα, που το καθένα από αυτά ορίστηκε σύμφωνα με τον τρόπο εκχύλισης αλλά και τον χρόνο παραμονής του βοτάνου κατά τη διαδικασία εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, τα μοντέλα PCA-class αναφέρονται *Matricaria chamomilla* (Εικόνα 40a), *Echinacea purpurea* (Εικόνα 40b), *Mentha pulegium* (Εικόνα 40c), *Mentha spicata* (Εικόνα 40d), *Origanum majorana* (Εικόνα 40e), *Origanum vulgare* (Εικόνα 40f), *Thymus capitatus* (Εικόνα 40g) και *Hypericum perforatum* (Εικόνα 40h). Όπως διαφαίνεται και στα μοντέλα ο χαρακτηριστικός παράγοντας διαφοροποίησης είναι η διαδικασία παρασκευής αφού τα εγχύματα διαχωρίζονται από τα αφεψήματα κατά μήκος της πρώτης κύριας συνιστώσας (PC1).



Εικόνα 40 PCA-class models, Par scaled, $A=2$, $N=6$. (a) *Matricaria chamomilla*, $R^2X(\text{cum})=0.95$, $Q^2(\text{cum})=0.91$; (b) *Echinacea purpurea*, $R^2X(\text{cum})=0.85$, $Q^2(\text{cum})=0.58$; (c) *Menta pulegium*, $R^2X(\text{cum})=0.77$, $Q^2(\text{cum})=0.42$; (d) *Mentha spicata*, $R^2X(\text{cum})=0.85$, $Q^2(\text{cum})=0.669$; (e) *Origanum majorana*, $R^2X(\text{cum})=0.81$, $Q^2(\text{cum})=0.54$; (f) *Origanum vulgare*, $R^2X(\text{cum})=0.72$, $Q^2(\text{cum})=0.51$; (g) *Thymus capitatus*, $R^2X(\text{cum})=0.69$, $Q^2(\text{cum})=0.37$; (h) *Hypericum perforatum*, $R^2X(\text{cum})=0.86$, $Q^2(\text{cum})=0.67$.

Εξαιρέση στα παραπάνω αποτελούν η *Lippia citriodora* και το *Hippophae rhamnoides* στα οποία η διαφοροποίηση γίνεται κατά τη δεύτερη συνιστώσα (PC2).



Εικόνα 41 PCA-class μοντέλα, Par scaled, A=2, N=6. (a) *Lippia citriodora* $R^2X(\text{cum})=0.95$, $Q^2(\text{cum})=0.91$, (b) *Hippophae amnoides* $R^2X(\text{cum})=0.72$, $Q^2(\text{cum})=0.42$

Επιπλέον, σε αυτά τα μοντέλα παρατηρήθηκε και ένας επιπλέον διαχωρισμός κατά τη δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2), η οποία διαχώρισε τα αφεψήματα των 2 λεπτών από αυτά των 15 λεπτών.

Σε ένα περαιτέρω βήμα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για να εντοπίσει τους μεταβολίτες που βοηθούν στη διάκριση ανάμεσα σε αφεψήματα και εγχύματα, καθώς και τα 15 λεπτά από τα 2 λεπτά των αφεψημάτων. Όλα τα μοντέλα OPLS-DA αναδεικνύουν τη διακύμανση μεταξύ των εγχυμάτων και των αφεψημάτων. Η διακύμανση εντός των δειγμάτων αποδόθηκε στις διαφορές ανάμεσα στα αφεψήματα 15 και 2 λεπτών. Ιδιαίτερα εμφανές στον *Echinacea purpurea*, *Lippia citriodora*, *Mentha spicata*, *Origanum majorana* και *Hypericum perforatum*. Ειδικότερα, σύμφωνα με την ορθογώνια συνιστώσα του διαγράμματος διασποράς, τα αφεψήματα στα 15 λεπτά χαρακτηρίζονται από γλυκοζιλιωμένες φλαβονόλες σε σύγκριση με τα αφεψήματα των 2 λεπτών. Τα αποτελέσματά βρέθηκαν να είναι σύμφωνα με μια προηγούμενη μελέτη σε αφεψήματα και εγχύματα του *Achillea millefolium* L. (Yarrow), η οποία έδειξε ότι το μεταβολομικό αποτύπωμα των αντίστοιχων παρασκευασμάτων είχε παρόμοια μεταβολή μόνο ως προς τις ποσότητες.

Σε δεύτερο επίπεδο η μελέτη κατευθύνθηκε προς τη σύγκριση της περιοχής των φαινολικών ενώσεων με σκοπό τη διαφοροποίηση τους ως προς το είδος. Προς το σκοπό αυτό, το ολοκλήρωμα της φασματικής περιοχής στα 5,5

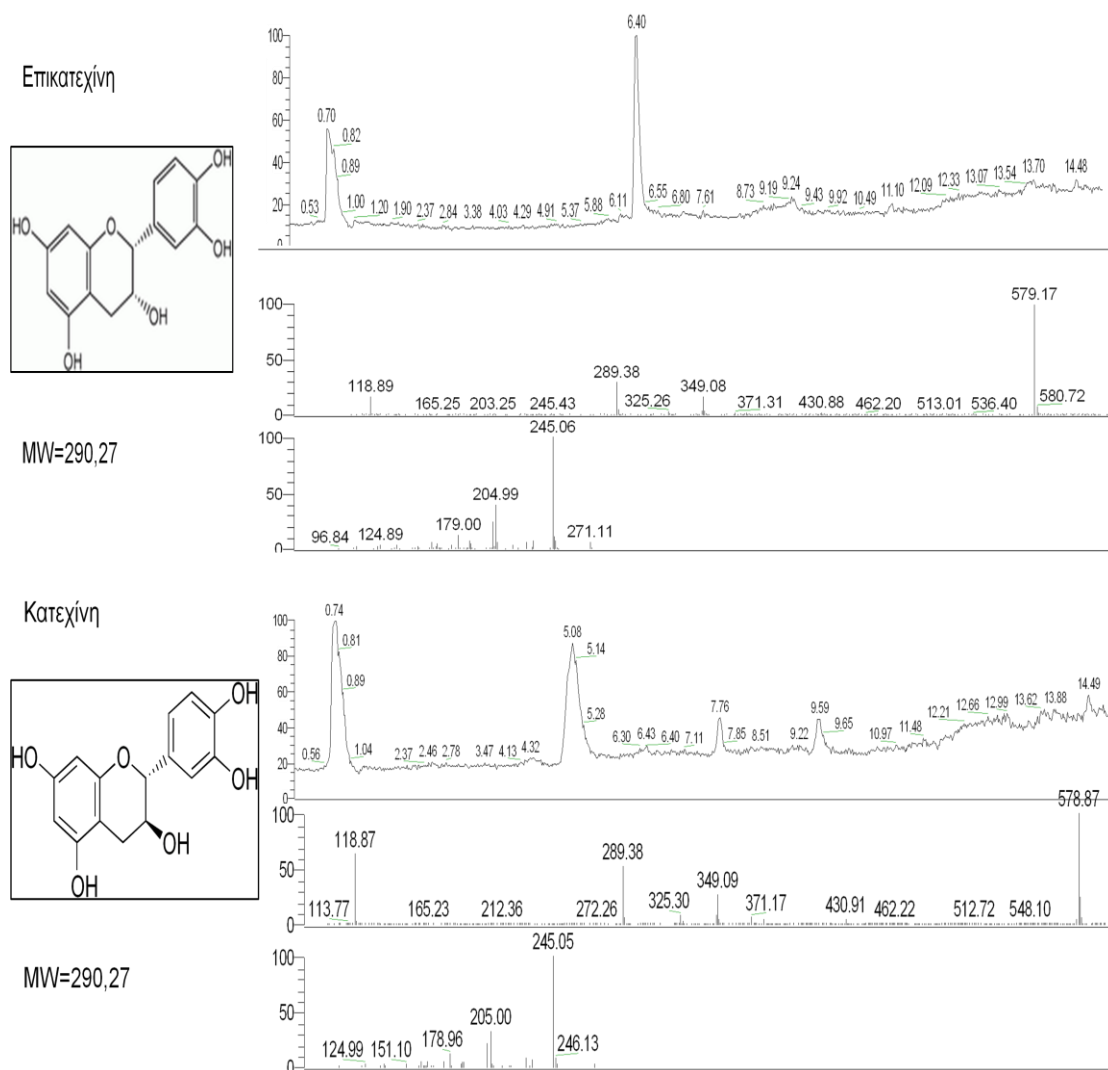
-9,5 ppm του κάθε δείγματος υπολογίστηκε και πιστοποιείται με την υψηλότερη απόδοση για φαινολικές εγχύσεις, ενώ τα αφεψήματα στα 15 λεπτά είχαν συγκριτικά με τα αφεψήματα στα 2 λεπτά υψηλότερες τιμές σε αυτήν την περιοχή. Είναι ενδιαφέρον ότι σε όλες τις προετοιμασίες στα *Mentha spicata*, *Origanum majorana* και *Origanum vulgare* υπολογίστηκαν οι υψηλότερες τιμές, αντίθετα στα *Matricaria chamomilla*, *Hypericum perforatum* και *Hipporhae rhamnoides* υπολογίστηκαν οι χαμηλότερες τιμές ανεξάρτητα με την προετοιμασία. Αυτή η συνεπής τάση από τα παραπάνω φυτικά είδη, ανεξάρτητα από τη μέθοδο παρασκευής αποδίδεται στο ιδιαίτερο φαινολικό αποτύπωμα τους.

6.3 Ανάλυση με Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχικές θραυσματοποιήσεις (MS^n) (HPLC–ESI– MS^n) για τον προσδιορισμό της ποιότητας των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων

Σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε και αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 5.7.2 αναλύθηκε μίγμα 40 πρότυπων ενώσεων συγκέντρωσης 10ppm διαλυτοποιημένα σε διαλύτη μεθανόλης-νερού σε αναλογία 30/70.

Ενώ ο διαχωρισμός των ενώσεων μέσα στη στήλη αλλά και ο χρόνος έκλουσης εξαρτώνται από τις συνθήκες ανάλυσης, το φάσμα της μάζας αποτελεί «ταυτότητα» για την κάθε ένωση. Αφού ιονιστεί μια ένωση οι κορυφές που θα εμποτισθούν στο φάσμα της εκτός από την απώλεια ενός ατόμου υδρογόνου μπορεί να είναι και η διπλάσια μάζα ($2x[M-H]$) ή ακόμα και η προσθήκη κάποιου στοιχείου ή ένωσης στην ήδη ιονισμένη ένωση. Ο τρόπος που θα συμπεριφερθεί η κάθε ένωση μετά τον ιονισμό μαζ δίνει το χαρακτηριστικό της φάσμα. Έτσι μπορεί να εμφανιστούν ισομερείς ενώσεις σε διαφορετικούς χρόνους έκλουσης αλλά και με διαφορετικά φάσματα MS και MS/MS. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μόρια της κατεχίνης και επικατεχίνης τα οποία αναλύθηκαν στο μίγμα των 40 προτυπων φαινολικών ενώσεων. Αρχικά παρόλο που είναι ισομερείς ενώσεις ίδιας πολικότητας λόγω

διαφορετικής στερεοχημείας διαφοροποιούνται ως προς τον χρόνο έκλουσης κατά 1,5 λεπτό. Επιπλέον τα φάσματα MS ένω παρουσιάζουν τα ίδια θραύσματα 289 [M-H], 349 ([M-H]+60) και 579 (2x[M-H]) ωστόσο συγκρίνοντας την ένταση της κορυφής στα 579 φαίνεται ότι στην περίπτωση της επικατεχίνης ευνοείται πολύ περισσότερο ο σχηματισμό της συγκριτικά με την κατεχίνη (Εικόνα 42)



Εικόνα 42 HPLC χρωματογραφήματα και φάσματα MS-MS/MS των πρότυπων φαινολικών ενώσεων επικατεχίνης και κατεχίνης

Ο χρόνος έκλουσης της κάθε ένωσης, η αρνητικά ιονισμένη μάζα του κατά ένα πρωτόνιο (M-H) αλλά και η δεύτερη θραυσματοποίηση (Ms/Ms) της κάθε φαινολικής ένωσης φαίνονται στον Πίνακα 12 που ακολουθεί.

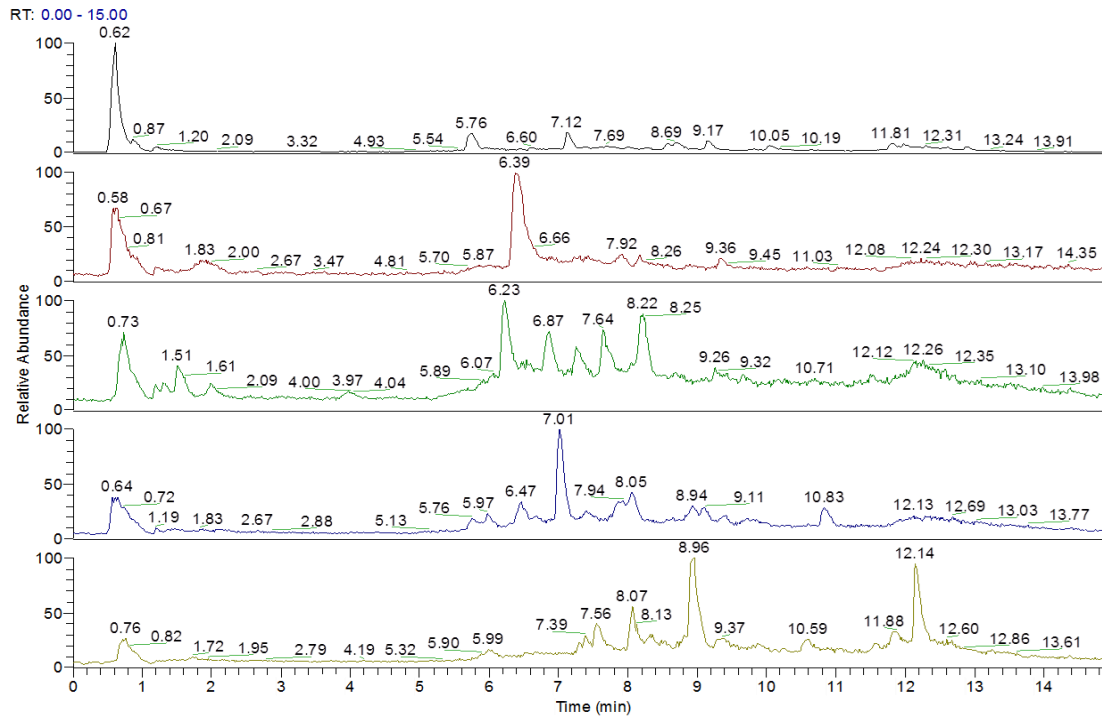
Πίνακας 12 Προτυπες φαινολικές ενώσεις

Πρότυπες ενώσεις	Χρόνος Έκλουσης	[M-H]	MS/MS
Γαλλικό οξύ	1,51	169,33	124
Πρωτοκατεχικό οξύ	2,66	153,11	108,79
Υδρόξυ-τυροσόλη	2,67	153,17	122,84
Γεντισικό οξύ	3,65	153,02	108,84
4 – Υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	4,75	136,94	92,87
Χλωρογενικό οξύ	4,91	353,03	191,02
(+) Κατεχίνη	5,08	289,38	245,05
2-4-δι-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	3,16	153,01	108,88
Βανιλικό οξύ	5,81	166,99	151,96
Καφεϊκό οξύ	6,16	179,21	134,86
Συρινγκικό οξύ	6,28	197,02	181,94
(-) Κατεχίνη	6,40	289,38	245,06
4 – υδρόξυ-βενζαλδεΐδη	6,63	120,84	58,78
Βανιλίνη	7,28	151,00	135,87
Συρινγκαλδεΐδη	7,45	181,07	165,94
π – Κουμαρικό οξύ	7,52	163,00	118,84
Φερουλικό οξύ	7,73	193,06	148,86
Ρουτίνη	7,84	609,37	301,03
Ελαγικό οξύ	8,12	301,31	257,10
Ταξιφολίνη	8,12	303,38	285,04
Συναπνικό οξύ	8,14	223,10	207,88
Trans – μ – υδρόξυ-σιναμικό οξύ	8,27	163,18	118,90
3 – υδρόξυ-σιναμικό οξύ	8,29	163,23	118,85
Ακέτο-συρινγκόνη	8,70	195,14	179,98
Σαλικυλικό οξύ	9,09	136,91	92,89
Βενζοϊκό οξύ	9,17	121,03	58,78
Ναρινγίν	9,35	579,41	459,09
Εσπεριδίνη	9,66	609,27	301,02
Ροσμαρινικό οξύ	9,68	359,09	160,88
ο – Κουμαρικό οξύ	9,82	163,10	118,87
Ολευρωπαΐνη	10,70	539,37	376,82
Λασιρεσινόλη	11,36	418,91	329,12
Εριοδικτιόλη	11,80	287,70	150,86
Λουτεολίνη	12,16	285,30	174,97
Κερσετίνη	12,18	301,23	178,86
Ρεσβερατρόλη	12,22	227,40	184,95
Κιναμικό οξύ	12,34	147,05	102,84
Ναρινγενίνη	12,87	271,29	150,88
Καμφερόλη	12,94	285,28	285,04
Ισορχαμνετίνη	13,22	315,75	300,08

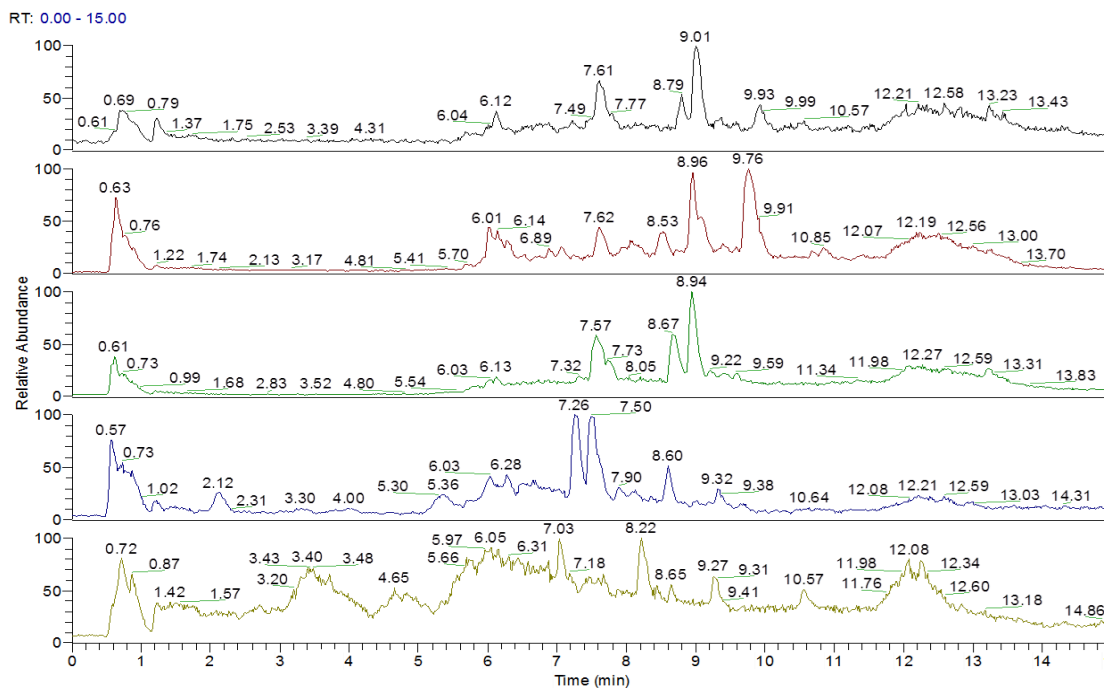
Η σειρά έκλουσης των ουσιών εξαρτάται τόσο από τη μέθοδο όσο και από τη φύση της ουσίας. Στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε στήλη C¹⁸, που σημαίνει ότι ευνοείται να εκλουστούν πρώτα οι πιο πολικές ενώσεις, που δεν συγκρατούνται εύκολα. Αυτό ενισχύεται και από την αναλογία της κινητής φάσης, που ξεκινάει στη μέθοδο με τον πιο πολικό διαλύτη να είναι στο μεγαλύτερο ποσοστό, αλλά και από τον διαλύτη του μίγματος που έχει στο μεγαλύτερο ποσοστό του και πάλι τον πιο πολικό διαλύτη, δηλαδή το νερό. Η σειρά εκλουσης όμως επειδή επιρεάζεται και από τη φύση του δείγματος, θα εμφανιστούν πρώτα οι ενώσεις με το μικρότερο μοριακό βάρος, με αυτή την τάση να διαφαίνεται και στον Πίνακας 12 και οι πιο πολικές για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Τα δείγματα, που επεξεργάστηκαν σύμφωνα με το κεφάλαιο 5.7.1 ανήκουν στα αφεψήματα των 15 λεπτών και αναλύθηκαν με την ίδια μέθοδο με τις πρότυπες ενώσεις ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα ως προς τους χρόνους έκλουσης αλλά και τα θράυσματα με τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις, σε συγκέντρωση 4000ppm.

Τα φάσματα που προέκυψαν από την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης φαίνονται στις Εικόνα 43 και Εικόνα 44



Εικόνα 43 HPLC χρωματογραφήματα των αφεψημάτων 15 λεπτών των βοτάνων *Matricaria chamomilla*, *Echinacea purpurea*, *Lippia citriodora*, *Menta pulegium* και *Menta spicata* σε συγκέντρωση 4000ppm



Εικόνα 44 HPLC χρωματογραφήματα των αφεψημάτων 15 λεπτών των βοτάνων *Origanum majorana*, *Origannym vulgare*, *Thymus capitatus*, *Hypericum perforatum* και *Hippophae rhamnoides* σε συγκέντρωση 4000ppm

Σε κάθε μια από τις αναλύσεις η πρώτη κορυφή που εμφανίζεται ανήκει στον διαλύτη του δείγματος. Όπως φαίνεται και στις εικόνες, παρόλο που τα δείγματα αναλύθηκαν στην ίδια συγκέντρωση, πιο πλούσια σε φαινολικά συστατικά είναι η *Menta spicata* και το *Hypericum perforatum* ενώ το λιγότερο πλούσια σε φαινολικές ενώσεις βότανο η *Matricaria chamomilla* κάτι που παρατηρήθηκε και από τις άλλες δύο μεθόδους με τις οποίες αναλύσαμε τα δείγματα.

Ακολούθησε ταυτοποίηση ενώσεων από τις πρότυπες που αναλύθηκαν προηγουμένως με διασταύρωση των δεδομένων από τους χρόνους έκλουσης της κάθε ουσίας αλλά και των θραυσμάτων των MS και MS/MS. Επιπλέον ταυτοποιήθηκαν και ενώσεις στα δείγματα έπειτα από βιβλιογραφική έρευνα σε παλαιότερες μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί στα παρόντα υποστρώματα.

Πίνακας 13 Ενώσεις που ανιχνεύτηκαν στα αφεψηματα των 15 λεπτών και ταυτοποιήθηκαν μέσα από βιβλιογραφία ή από πρότυπες ενώσεις¹³

Ενώσεις που ανιχνεύτηκαν	<i>M.ch</i>	<i>Ech.p</i>	<i>L.c</i>	<i>M.pul</i>	<i>M.sp</i>	<i>O.maj</i>	<i>O.vul</i>	<i>T.cap</i>	<i>Hyp.p</i>	<i>Hip.rh</i>
(-) Catechin (π)									+	
(+) Catechin (π)									+	
4-Hydroxycinnamic acid (π)			+							
Apigenin					+ [114]					
Apigenin-c-hexoside-c-hexoside							+ [115]			
Apigenin-7-o-glucoside	+ [116]									
Caffeic acid (π)		+		+	+					
Caftaric acid		+ [117]								
Catechin dimer									+ [118]	
Chlorogenic acid (π)				+						
Cichoric acid		+ [117]								
Citric acid								+ [119]		
Dihydrocaffeic acid			+ [120]							
Ellagic acid (π)									+	+
Ellagic acid (p-coumaryl) hexoside										+ [121]
Ellagic acid hexoside										+ [121]
Ellagic acid pentoside						+ [119]				+ [121]
Eriodictyol-7-o-glucuronide								+ [119]		
Ferullic acid (π)		+		+						

¹³ Δίπλα στην κάθε σημείωση φαίνεται και η αντίστοιχη βιβλιογραφία ενώ οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν μέσω των προτύπων είναι σημειωμένες με (π)

Πίνακας 14 Ενώσεις που ανιχνεύτηκαν στα αφεψηματα των 15 λεπτών και ταυτοποιήθηκαν μέσα από βιβλιογραφία ή από πρότυπες ενώσεις¹⁴

Ενώσεις που ανιχνεύτηκαν	<i>M.ch</i>	<i>Ech.p</i>	<i>L.c</i>	<i>M.pul</i>	<i>M.sp</i>	<i>O.maj</i>	<i>O.vul</i>	<i>T.cap</i>	<i>Hyp.p</i>	<i>Hip.rh</i>
Ferulic acid glucoside	+ [116]									
Ferulic acid hexoside dimer	+ [116]									
Gallocatechin								+ [119]		
Gentisic acid (π)						+				
Isoquerutrin									+ [118]	
Kaempferol-3-o-rutinoside		+ [117]				+ [119]		+ [119]	+ [118]	
Laricitrin-3-o-glucoside	+ [116]									
Luteolin-7-o-glucoside	+		+ [120]		+ [114]			+ [119]		
Medioresinol							+ [115]			
Naringenin (π)								+		
p-Coumaric acid (π)					+					
Quercetin (π)						+				
Quercetin rutinoside						+ [119]				
Quercetin-3o-glucoside								+ [119]		
Quercetin-3o-glucoside									+ [118]	
Resveratrol (π)									+	
Rosmarinic acid-o-hexosid								+ [119]		
Rosmarinic acid (π)					+		+	+		
Rutin (π)				+					+	

¹⁴ Δίπλα στην κάθε σημείωση φαίνεται και η αντίστοιχη βιβλιογραφία ενώ οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν μέσω των προτύπων είναι σημειωμένες με (π)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, επισημάνθηκαν οι διαφορές μεταξύ των αφεψημάτων και εγχυμάτων συγκεκριμένων ποικιλιών βοτάνων όσον αφορά το φαινολικό προφίλ, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική και αντιριζική τους ικανότητα. Τόσο το φαινολικό περιεχόμενο, όπως αυτό εκφράζεται από τα αποτελέσματα της Folin αλλά και από τις ολοκληρώσεις των κορυφών NMR της φαινολικής περιοχής, όσο και η αντιοξειδωτική ικανότητα πιστοποιείται με τις υψηλότερες τιμές των εγχυμάτων σε σχέση με των αφεψημάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα εγχύματα των ειδών *Lippia citriodora*, *Origanum vulgare*, *Thymus capitatus*, *Matricaria chamomilla*, *Echinacea purpurea*, *Menta spicata* και *Origanum majorana* έδειξαν το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο και παρουσίασε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα αφεψήματα. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί ότι το αφέψημα δεν είναι το ίδιο πλούσιο με το έγχυμα ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Επιπλέον εξετάστηκε ο χρόνος παρασκευής. Η προετοιμασία των 15 λεπτών κρίθηκε γενικώς ότι μπορεί να επιδράσει θετικά για τα είδη *Echinacea purpurea*, *Menta spicata*, *Origanum majorana*, *Thymus capitatus*, *Hypericum perforatum* και *Hipporphae rhamnoides* η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί σε περαιτέρω απελευθέρωση των άγλυκων δομών λόγω παρατεταμένης θερμικής επεξεργασίας.

Μέσα από την εφαρμογή μεταβολομικής στο σύνολο των δειγμάτων με φασματοσκοπίας NMR, έγινε εμφανής ο διαχωρισμός των δειγμάτων σύμφωνα με τον γενότυπο τους με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα το *Hipporphae rhamnoides*. Από τα PCA μοντέλα κάθε ένα από τα δείγματα παρατηρήθηκε ο διαχωρισμός τους σύμφωνα με την πορεία επεξεργασίας όσον αφορά τη μέθοδο (αφέψημα ή έγχυμα) αλλά και τον χρόνο.

Στα πλαίσια της εργασίας πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων με εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (HPLC-MS). Για την ταυτοποίηση, αναπτύχθηκε νέα μέθοδος, σύντομη και κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας ενώ παράλληλα

δημιουργήθηκε βάση δεδομένων πρότυπων φαινολικών ενώσεων για την περαιτέρω ταυτοποίηση.

Συνολικά στα δείγματα που αναλύθηκαν ταυτοποιήθηκαν 38 ενώσεις τόσο με χρήση της βιβλιοθήκης όσο και από βιβλιογραφική έρευνα. Οι περισσότερες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν 9 σε αριθμό στα δείγματα *Thymus capitatus* και *Hypericum perforatum* ενώ οι λιγότερες ήταν 3 στα δείγματα *Lippia citriodora* και *Origanum vulgare*. Οι πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις ήταν το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ καθώς και οι γλυκοζιλιωμένες μορφές της καμφερόλης και της λουτεολίνης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα και των τριών αναλυτικών τεχνικών συνέπιπταν στην πλειονότητά τους, αναδεικνύοντας ως πιο πλούσιο σε φαινολικά συστατικά τη *Mentha spicata* και λιγότερο πλούσιο την *Matricaria chamomilla* ενώ πιο κατάλληλη μέθοδο επεξεργασίας των συγκεκριμένων βοτάνων για την παραλαβή των φαινολικών συστατικών το έγχυμα των 15 λεπτών.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] R. Crawford, *Studies in plant survival.*, Blackwell., 1989.
- [2] M. Crawley, *Plant ecology.*, Blackwell Scientific., 1997.
- [3] Θεοφραστος, Άπαντα 11, Κάκτος, 1998.
- [4] Cambridge Advanced Learners' Dictionary & Thesaurus., Cambridge University Press.
- [5] Μ. Πολίτης, «Τα βότανα της Μεσογείου.» *Valentine floral creations*, 2015.
- [6] E. L. Greene., «Landmarks of Botanical History: A Study of Certain Epochs in the Development of the Science of Botany, Part 1.,» *Smithsonian institution.*, 1909.
- [7] J. Bueno, F. Ramos-Escudero, P. Sàez-Plaza, A. Munõz, M. Josè Navas και A. Asuero, «Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments.,» *Critical Reviews in Analytical Chemistry.*, αρ. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids., pp. 102-125, 2012.
- [8] J. Woodward, *The Physical Geography of the Mediterranean.*, Oxford University Press., 2009.
- [9] A. M. Harold, T. K. A. Mary, J. B. William, C. Josep, J. H. Richard, L. Sandra και P. N. Ronald, «Mediterranean-Climate Ecosystems.,» σε *Global Biodiversity in a Changing Environment: Scenarios for the 21st Century.*, 2001.
- [10] B. Tiwari, N. Brunton και C. Brennan, «Handbook of Plant Food

- Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction.,» *Wiley-Blackwell*, 2013.
- [11] D. Krishnaiah, R. Sarbatly και A. Bono, «Phytochemical antioxidants for health and medicine-A move towards nature.,» *Biotechnology and Molecular Biology Review.*, pp. 97-104, 2007.
- [12] A. Crozier, M. Clifford και H. Ashihara, «Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.,» *Wiley-Blackwell.*, 2007.
- [13] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. Spencer, M. Tognolini, G. Borges και A. Crozier, «Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases.,» *Antioxidants and Redox Signaling.*, pp. 1818-92, 2013.
- [14] T. Acamovic και J. Brooker, «Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals.,» *Proceedings of the Nutrition Society.*, pp. 403-412, 2007.
- [15] D. Huang, B. Ou και R. Prior, «The chemistry behind antioxidant capacity assays.,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1841-56, 2005.
- [16] J. Pokorny, «Are natural antioxidants better-and safer- than synthetic antioxidants?,» *European Journal of Lipid Science and Technology.*, pp. 629-642, 2007.
- [17] ., O. Sighn, Z. Khanam, N. Misra και M. Srivastava, «Chamomile (*Matricaria chamomile* L.): An overview.,» *Phcog. Rev.*, pp. 82-95, 2011.
- [18] V. Jakovlev, O. Isaac, K. Thiemer και R. Kunde, «Pharmacological investigations with compounds of chamomile II. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)-à-bisabolol and bisabolol oxides.,»

PlantaMED, pp. 125-40, 1979.

- [19] R. Guimarães, L. Barros, M. Dueñas, R. C. Calhelha, A. M. Caryalho, C. Santos-Buelga, M. J. R.P. Queiroz. και I. C. Ferreira., «Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds.,» *Food Chemistry*, pp. 947-954, 2013.
- [20] S. Ompal, K. Zakia, M. Neelam και S. Manoj Kumara, «Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview.,» *Pharmacogn. Rev.*, pp. 82-95, 2011.
- [21] J. Amsterdam, Y. Li, I. Soeller, K. Rockwell, J. Mao και J. Shults, «A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral *Matricaria recutita* (chamomile) extract therapy for generalized anxiety disorder.,» *Journal of Clinical Pharmacology.*, pp. 378-82, 29 08 2009.
- [22] R. Franke και H. Schilcher, «Chamomile: industrial profiles.,» σε *Storage of dry drug.*, Boca Raton: CRC Press., 2005, pp. 211-3.
- [23] G. Wolfram και M. Hans-Helge, «A randomized controlled trial of the effect of fluid extract of *Echinacea purpurea* on the incidence and severity of colds and respiratory infections.,» *The American Journal of Medicine.*, pp. 138-143, 1999.
- [24] W. Hildebert, S. Hermann, S. Wolfram και Z. Meinhardt, «Immunological active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures.,» *Phytochemistry*, pp. 119-126, 1988.
- [25] B. Barrett, «Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review.,» *Phytomedicine*, pp. 66-86, 2003.
- [26] M. B. Jenna, J. P. Amanda, R. Ava, A. W. Cynthia, K. Vamsikrishna, B. C. Nadja και M. S. David, «*Echinacea purpurea* extracts modulate

- murine dendritic cell fate and function.,» *Food and Chemical Toxicology.*, pp. 1170-1177, 2010.
- [27] W. Limei, W. Birgit, P.-W. Eva-Maria, B. Martina, L. Xin, M. Clemens, B. Tina, S. Stefan, M. R. Judith, H. H. Elke, S. Daniela, K. Brigitte και B. Rudolf, «Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review,» *Biochemical Pharmacology.*, pp. 73-89, 2014.
- [28] F. Michel, J. Jansen, P. de Tullio, M. Tits, V. Demoulin και L. Angenot, «Metabolomic Analysis of Echinacea spp. by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry and Multivariate Data analysis.,» *Technique Phytochem. Anal.*, pp. 61-65, 2009.
- [29] J. Armada και A. Barra, «On Aloysia Palau (Verbenaceae),» *Taxon*, pp. 88-90, 1992.
- [30] A. Carnat, A. Carnat, D. Fraisse και J. Lamaison, «The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea.,» *Fitoteerapia.*, pp. 44-49, 1999.
- [31] J. d. L. Singulani., P. Silva, N. Barbosa Raposo, E. de Siqueira, C. Zani, T. Almeida Alves και L. Facio Viccini, «Chemical composition and antioxidant activity of Lippia species.,» *Journal of Medicinal Plants Research.*, pp. 4416-4422.
- [32] S. Reza, N. Hosseini και M. Ghorbanpour, «Study of Essential Oil Content and Composition of Different Parts of Lemon verbena (Lippia citriodora) Grow in Iran.,» *TEOP*, pp. 120-125, 2014.
- [33] P. Gunby, «Medical News: Plant Known for Centuries Still Causes Problems Today.,» *Journal of the American Medical Association.*, pp. 2246-2247, 1979.

- [34] C. Kowalchik και H. H. William, «Rodale's Illustrated Encyclopedia of Herbs.,» *Rodale Press*, pp. 412-414, 1998.
- [35] J. Ritchason, *The Little Herb Encyclopedia: The Handbook of Natures Remedies for a Healthier Life.*, 3rd επιμ., P. Grove, Επιμ., Utah: Woodland Health Books, 1995.
- [36] K. Abolfazl, J. J. Ashkan, A. Farzad και K. Mohammad, «The antioxidative effect of Iranian Mentha pulegium extracts and essential oil in sunflower oil.,» *Food and Chemical Toxicology.*, pp. 1796-1800, 2010.
- [37] A. Nasrin, Y. Yadollah, H. Abbas και M. P. Seied, «Supercritical carbon dioxide extraction of Mentha pulegium L. essential oil,» *Talanta*, pp. 407-411, 2004.
- [38] A. Stoyanova, E. Georgiev, J. Kula και T. Majda, «Chemical Composition of the Essential Oil of Mentha pulegium L. from Bulgaria.,» *Journal of Essential Oil Research.*, pp. 475-476, 2005.
- [39] W. Turner, «Herbal,» σε *Oxford English Dictionary*, 1568.
- [40] A. Huxley, *New RHS Dictionary of Gardening.*, Macmillan επιμ., 1992.
- [41] K. Adam, A. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras και M. Arsenakis, «Antifungal Activities of Origanum vulgare subsp. hirtum, Menta spicata, Lavandula angustifolia, and Salvia fruticosa Essential Oils against Human Pathogenic Fungi.,» *J. Agric. Food Chem.*, pp. 1739-1745, 1998.
- [42] M. Maurice, *Τα Βότανα και η υγεία μας.*, Αθήνα, 1983.
- [43] S. Gunnar, *Φαρμακευτικά Προϊόντα Φυσικής Προελεύσεως.*, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης., 1996.
- [44] B. Ηλιόπουλος, *Μελέτη της επίδρασης του ερυθρού οίνου και του*

αιθέριου ελαίου του θυμαριού στην μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης., Αθήνα, 2010.

- [45] Α. Πιερρακέας, Πολύτιμα βιομηχανικά αρωματικά φυτά., Αθήνα: Αγροτικός οίκος, 1971, pp. 46-51, 57-85.
- [46] Β. Σκρουμπής, Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια., Θεσσαλονίκη: Offset Γιαχούδη-Γιαπούλη Ο.Ε., 1985, pp. 130-132.
- [47] Θ. Κουτσός, Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά: βοτανική, ταξινόμηση, οικολογία, καλλιεργητικές οδηγίες, σρήσεις., Θεσσαλονίκη: Ζήτη, 2006.
- [48] Γ. Σαρλής, Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 1991, pp. 73-74.
- [49] B. Pimple, A. Patel, P. Kadam και M. Patil, «Microscopic evaluation and physicochemical analysis of *Origanum majorana* Linn leaves.,» *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2, pp. 897-903, 2012.
- [50] M. Kains, «Culinary Herbs: Their Cultivation Harvesting Curing and Uses.,» *American Agriculturist*, 1912.
- [51] K. Koutsoumanis, K. Lampropoulou, P. Taoukis και G. Nychas, «Modelling the effect of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil on the death/survival of salmonella enteritidis in homemade taramasalad.,» *ISHS Acta Horticulturae*, 1998.
- [52] S. Kalidas, F. C. Otis, E. L. Robert, W. Ruth και A. Woraluk, «Prevention of Vitrification Associated with in vitro Shoot Culture of Oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp.,» *Journal of Plant Physiology*, pp. 447-451, 1995.
- [53] G. Cervato, M. Carabelli, S. Gervasio, A. Cittera, R. Cazzola και B. Cestaro, «Antioxidant properties of Oregano (*Origanum vulgare*) leaf

extracts.,» *Journal of Food Biochemistry.*, pp. 453-465, 2000.

- [54] C. Sung-Sook, A. V. Dhiraj, L. Yuan-Tong και S. Kalidas, «Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*,» *Elsevier*, pp. 809-816, 2005.
- [55] .. Milos, J. Mastelic και I. Jerkovic, «Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*),» *Food Chemistry*, pp. 79-83, 2000.
- [56] C. Robinson-Bax και R. Fox, Root rots of herbaceous plants caused by *Armillaria mellea.*, *Mycologist*, 2002.
- [57] K. Peter, Handbook of herbs and spices..
- [58] C. Rey, «Selection of thyme for extreme areas (of Switzerland),» *Acta Horticultural*, pp. 66-70, 1992.
- [59] G. De Rougemont, «A field guide to the crops of Britain and Europe,» London, Collins, 1989.
- [60] A. S. Bruno, F. Federico, O. M. João και C. D. Alberto, «Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts.,» *Food Chemistry*, pp. 157-167, 2005.
- [61] G. F. Paul, T. A. John και R. F. Gary, «The spectral properties of *Hypericum perforatum* leaves: the implications for its photoactivated defences.,» *Canadian Journal of Botany*, pp. 1166-1170, 1990.
- [62] A. E.-S. Doaa, E. K. Amanj, S. A. Amina και E.-D. S. E. Ezz, «*Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine.,» *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, pp. 525-533,

2003.

- [63] Z. Yanping, L. Yanhua και W. Dongzhi, «Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro.,» *J. Agric. Food Chem.*, pp. 5032-5039, 2004.
- [64] B. Juana, A. Rocio, R. Carmen, M.-A. Sagrario και M. V. Angel, «Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells.,» *Life Sciences*, pp. 1263-1276, 2004.
- [65] K. Hostanska, J. Reichljang, S. Bommer, M. Weber και R. Saller, «Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, pp. 121-132, 2003.
- [66] M. S. Christoph, P. Klaus, W. Annette, S. Erwin και C. S. Jan, «2. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria,» *The Lancet*, p. 2129, 1999.
- [67] C. Ahmet, K. Saban, K. Hamdullah και K. Ercan, «Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse,» *Biochemical Systematics and Ecology*, pp. 245-256, 2005.
- [68] M. G. Jeffrey, S. Britt και A. M. Daniel, «St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature,» *Psychopharmacology*, pp. 402-414, 2001.
- [69] L. Henderson, Q. Yue, C. Bergquist, B. Gerden και P. Arlett, «St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes,» *British Journal of Clinical Pharmacology*, pp. 349-356, 2002.

- [70] P. Negi, A. Chauhan, G. Sadia, Y. Rohinishree και R. Ramteke, «Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts,» *Food Chemistry*, pp. 119-124, 2005.
- [71] S. Geetha, M. Sai Ram, V. Singh, G. Ilavazhagan και R. Sawhney, «Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*)—an in vitro study,» *Journal of Ethnopharmacology*, pp. 373-378, 2002.
- [72] X. Gao, M. Ohlander, N. Jeppsson, L. Björk και V. Trajkovski, «Changes in Antioxidant Effects and Their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during Maturation,» *J. Agric. Food Chem.*, pp. 1485-1490, 2000.
- [73] H. Goel, J. Prasad, S. Singh, R. Sagar, I. Prem Kumar και A. Sinha, «Radioprotection by a herbal preparation of *Hippophae rhamnoides*, RH-3, against whole body lethal irradiation in mice,» *Phytomedicine*, pp. 15-25, 2002.
- [74] H. Süleyman, L. Demirezer, M. Büyükokuroglu, M. Akcay, A. Gepdiremen, Z. Banoglu και F. Göcer, «Antiulcerogenic effect of *Hippophae rhamnoides* L.,» *Phytotherapy Research*, pp. 625-627, 2001.
- [75] S. Thomas, «Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A Multipurpose Plant,» σε *HortTechnology*, 1996.
- [76] B. Yang, R. M. Karlsson, P. H. Oksman και H. P. Kallio, «Phytosterols in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Berries: Identification and Effects of Different Origins and Harvesting Times,» *J. Agric. Food Chem.*, pp. 5620-5629, 2001.
- [77] J. Michiels, C. Kevers, J. Pincemail, J. O. Defraigne και J. Dommes, «Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays

in plant food matrices.,» *Food Chemistry*, pp. 986-993, 2012.

- [78] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, E. Sendra, E. Sayas-Barberà και J. Pérez-Álvarez, «Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction.,» *Food Research International*, pp. 1217-1223, 2011.
- [79] B. Craft, A. Kerrihard, R. Amarowicz και R. Pegg, «Phenol-based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment.,» *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp. 148-173, 2012.
- [80] N. Nenadis και M. Tsimidou, «Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) tests.,» *Journal of the American Oil Chemists' Society*, pp. 1191-1195, 2002.
- [81] S. Middha, T. Usha και V. Pande, «HPLC Evaluation of Phenolic Profile, Nutritive Content, and Antioxidant Capacity of Extracts Obtained from *Punica granatum* Fruit Peel.,» *Advances in pharmacological sciences.*, 2013.
- [82] W. Brand-Williams, M. Cuvelier και C. Berset, «Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.,» *LWT-Food Science and Technology* , pp. 25-30, 1995.
- [83] P. Molyneux, «The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity,» *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, pp. 211-219.
- [84] N. Miller, C. Rice-Evans, M. Davies, V. Gopinathan και A. Milner, «A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.,» *Clinical*

science, pp. 407-12, 1993.

- [85] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang και C. Rice-Evans, «Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.,» *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 1231-1237, 1999.
- [86] C. Haminiuk, G. Maciel, M. Plata-Oviedo και R. Paralta, «Phenolic compounds in fruits- an overview.,» *International Journal of Food Science and Technology*, pp. 2023-2044, 2012.
- [87] M. Cuny, E. Vigneau, G. Le Gall, I. Colquhoun, M. Lees και D. Rutledge, *Bional Chem.*, pp. 419-427, 2008.
- [88] G. M. Ana και L. F. Duarte, «Modern Magnetic Resonance, Springer, Madrid,» 2008.
- [89] M. Brescia, V. Caldarola, A. De Giglio, D. Benedetti και F. Fanizzi, «Sacco a. analytica,» *Chemica Acta*, pp. 177-186, 2002.
- [90] Φ. Χαράλαμπος, *Μεταβολομική μελέτη και σύγκριση αποσταγμάτων με φυσικοχημίες και ανλυτικές μεθόδους*, Αθήνα, 2013.
- [91] J. Nicholson, P. Foxall, M. Spraul, R. Farrant και J. Lindon, *Anal Chem*, pp. 793-811, 1995.
- [92] K. Skogerson, R. Runnebaum, G. Wohlgemuth, J. de Ropp, H. Heymann και O. Fiehn, *J. Ag. Food Chem.*, pp. 6899-6907, 2009.
- [93] M. Gibney, M. Walsh, L. Brennan, H. Roche, B. German και B. Ommen, *American Journal of Clinical Nutrition*, pp. 497-503, 2005.
- [94] K. Saito, R. Dixon και L. Willmitzer, «57 Plant Metabolomics in Biotechnology in Agriculture and Forestry,» *Springer*, 2006.

- [95] D. Wishart, «Trends in Food Science & Technology,» pp. 482-493, 2008.
- [96] M. W. Dong, *Modern For Practicing Scientists*, Wiley-Interscience, 2006.
- [97] F. H. T. N. D.A. Skoog, *Principles of instrumental Analysis*, 2002.
- [98] Θ. Χατζηιωάννου και Μ. Κουππάρης, *Ενόργανη Ανάλυση*, 1990.
- [99] V. D. Serban Moldoveanu, *Essentials in Modern HPLC Separations*, Elsevier, 2012.
- [100] M. W. D. Satinder Ahuja, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, Elsevier, 2005.
- [101] Γ. Ζ. Β. Σ. Γ. Θ. Ι. Στρατής, σε *Ειδικές Μέθοδο Διαχωρισμού και Χημικές Αναλύσεις / Φασματομετρία μαζών*, 2003.
- [102] Β. Σ. Ν. Παπαδόγιαννης, σε *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, 2001.
- [103] Α. Β. Ι. Ζ. Ι.Α. Στρατής, *Ποσοτική Χημική Ανάλυση*, 1999.
- [104] *Polaris Q Mass Spectrometer Hardware Manual, Revision B*, Thermo Electron Corporations, San Jose-California, 2001.
- [105] D. Z. Lantzouraki, V. Sinanoglou, P. Zoumpoulakis, J. Glamoclija, A. Ciric, M. Sokovic, G. Heropoulow και C. Proestow, «Antiradical-antimicrobial activity and phenolic profile of poemegranate (*Punicagranatum* L.) juicew from different cultivars: A comparative study,» *RSC*, 2015.
- [106] T. M. Nenadis N., «Observarions on the estimation scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) tests,» *Journal of the American oil Chemists' Society*, 2002.

- [107] W. C. M. a. B. C. Brand-Williams, «Food Science and Technology,» *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT -* , 1995.
- [108] M. H. Y. a. D. G. Çam, «Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods.,» *Food Chemistry*, 2009.
- [109] V. Cheynier, «Phenolic compounds: from plants to foods.,» *Phytochemistry Reviews.*, pp. 153-177, 2012.
- [110] C. El Kar, A. Ferchichi, F. Attia και J. Bouajila, «Pomegranate (*Punica granatum*) juices: chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity.,» *Journal of food science*, pp. 795-800, 2011.
- [111] J. M. S. a. V. L. Pijac, «A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines,» *Food Technology and Biotechnology*, 2005.
- [112] Y. C. & R. V. Hye Kyong Kim, «NMR-based metabolomic analysis of plants,» *Nature Publishing Group*, 25 February 2010.
- [113] B. A. Bidlingmeyer, *Practical HPLC Methodology and Applications*, Wiley Interscience, 1993.
- [114] H. J. D. D. K. H. C. B. R. H. Muberra Kosar, «Screening of free radical scavenging compounds an water extracts of Mentha Samples using a postcolumn derivazation method,» *Agricultural and Food Chemistry*, pp. 5004-5010, 2004.
- [115] M. P. G. B. E. A. M. H. T.L. Miron, «Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian plants,» *Journal of Chromatography A*, pp. 4918-4927, 29 July 2011.
- [116] A. O. T. P. C. V. B. M. E. A. Ain Raal, «Content of essential oil,

terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries,» *Food Chemistry*, pp. 632-638, 2012.

[117] G. O. S. B. Federica Pellati, «Simultaneous metabolite fingerprinting of hydrophilic and lipophilic compounds in *Echinacea pallida* by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection,» *Journal of chromatograph*, 2012.

[118] k. K. A. V. E. L. J. B. M. F.-F. Numo Rainha, «HPLC-UV-ESI-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants,» *Phytochemistry*, 2013.

[119] S. T. Izabela Fecka, «Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques,» *Food chemistry*, pp. 1039-1053, June 2008.

[120] J. R. M. M. P. C. D. C. D. D. C. Elena E. Stashenko, «Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants,» *Journal of Separation Science*, pp. 192-202, 2013.

[121] X.-M. X. Y. C. M.-Y. Y. F.-Y. W. H. Z. Chu Chen, «Identification, quantification and antioxidant activity of acylated flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*),» *Food Chemistry*, 2012.