



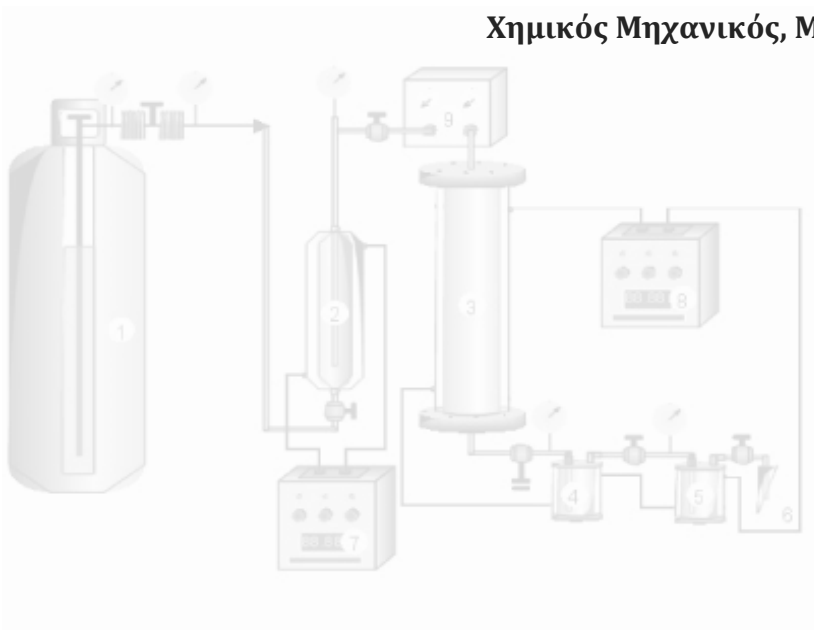
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*“Βελτιστοποίηση φιλικών προς το περιβάλλον  
διαδικασιών εκχύλισης για την παραλαβή  
βιοδραστικών προϊόντων”*

**Παπαευσταθίου Γεώργιος**

**Χημικός Μηχανικός, M.Sc.**



**ΑΘΗΝΑ 2017**



### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: **ΑΛΕΞΙΟΣ ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ** (Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
- **ΜΗΤΑΚΟΥ ΣΟΦΙΑ** (Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
- **ΑΛΗΓΙΑΝΝΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ** (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

### ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **ΑΛΕΞΙΟΣ ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ** (Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
- **ΜΗΤΑΚΟΥ ΣΟΦΙΑ** (Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
- **ΑΛΗΓΙΑΝΝΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ** (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
- **ΜΑΓΟΥΛΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ** (Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.)
- **ΒΟΥΤΣΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ** (Αναπληρωτής Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.)
- **ΓΚΙΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ** (Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
- **ΑΣΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΔΡΕΑΝΑ** (Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ.)

# Ευχαριστίες

---

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την Καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μαγουλά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Επαμεινώνδα Βουτσά, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ανδρεάνα Ασημοπούλου που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.
- Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την Καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για την διαρκή παρακολούθηση και τις χρήσιμες συμβουλές τους.
- Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη και επιβλέπων της παρούσας διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγησή του και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.
- Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για την επιλογή του θέματος, τις συμβουλές του και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αλλά κυρίως τον ευχαριστώ για την υπομονή και τη στήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας.
- Τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μαγουλά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Βουτσά για τη φιλοξενία τους στο εργαστήριο του Τομέα Ανάλυσης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων του Ε.Μ.Π. για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, τη συνεχή επίβλεψή και βοήθειά τους σε θέματα υπερκρίσιμης εκχύλισης, καθώς και για την άψογη συνεργασία μας όλο αυτό το διάστημα.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα για όλη τη βοήθεια του σε θέματα των στατιστικών αναλύσεων.
- Την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ανδρεάνα Ασημοπούλου που δέχθηκε να κρίνει την παρούσα διδακτορική διατριβή
- Τη διδάκτορα κ. Χάιτα Ελίζα και τη διδάκτορα Μακροπούλου Μαρία για την βοήθειά τους και τις συμβουλές τους σε θέματα βιολογικών ελέγχων.
- Τη φαρμακοποιό Αποστολία Μπλέτσα για την πολύτιμη παρουσία της στο εργαστήριο και τη βοήθειά της στη μελέτη του φυτού της γλυκύρριζας.
- Το διδάκτορα Νικόλαο Ξυνό για τη φιλία του, τη συνεργασία του και για όλες τις ώρες που περάσαμε επάνω στις συσκευές της υπερκρίσιμης εκχύλισης.
- Τη διδάκτορα και ερευνήτρια Σταθοπούλου Γεωργία για την ανιδιοτελή βοήθειά της όλα αυτά τα χρόνια.



- Το διδάκτορα και ερευνητή Διονύση Αμπάτη για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές συζητήσεις που είχαμε όλο αυτό το διάστημα στο εργαστήριο.
- Το διδάκτορα και ερευνητή Αποστόλη Αγγελή για τις συμβουλές του σχετικά με τη χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση.
- Το διδάκτορα κ. Καλπουτζάκη Ελευθέριο για τη συλλογή και ταυτοποίηση των φυτικών δρογών καθώς επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του σε θέματα συστηματικής βοτανικής.
- Τη διδάκτορα και ΕΔΙΠ κ. Λούλη Βίκη του Τομέα Ανάλυσης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων του Ε.Μ.Π για τις συμβουλές της και την πολύτιμη βοήθειά της σε θέματα υπερκρίσιμης εκχύλισης.
- Τη Βάνα, την Αργυρώ, την Εύα, τη Σαπφώ, το Νίκο, την Ειρήνη, την Ελίζα, τον Vincent, τη Νικητία, τον Άκη και όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα, τη συνεργασία και το ενδιαφέρον τους όλα αυτά τα χρόνια.
- Και τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου που με στήριξαν και με στηρίζουν σε όλες τις στιγμές της ζωής μου.



# Περιεχόμενα

---

<b>1</b>	<b><i>Βασικές αρχές υπερκρίσιμης εκχύλισης.....</i></b>	<b>4</b>
1.1	<b>Κρίσιμο σημείο και υπερκρίσιμα ρευστά .....</b>	<b>4</b>
1.1.1	Ιδιότητες υπερκρίσιμων ρευστών.....	5
1.1.2	Το διοξείδιο του άνθρακα ως διαλύτης.....	5
1.2	<b>Ιστορική αναδρομή .....</b>	<b>6</b>
1.3	<b>Καθιέρωση Υ.Ε. ως μια σύγχρονη &amp; πράσινη τεχνική εκχύλισης.....</b>	<b>7</b>
1.4	<b>Αρχή λειτουργίας .....</b>	<b>8</b>
1.5	<b>Εκλεκτικότητα – Χρήση συνδιαλυτών .....</b>	<b>10</b>
1.6	<b>Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της υπερκρίσιμης εκχύλισης με CO<sub>2</sub> .....</b>	<b>13</b>
1.7	<b>Εφαρμογές υπερκρίσιμης εκχύλισης.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b><i>Επιταχυνόμενη εκχύλιση .....</i></b>	<b>20</b>
2.1	<b>Γενικά στοιχεία.....</b>	<b>20</b>
2.2	<b>Περιγραφή της εκχυλιστικής διαδικασίας .....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Εφαρμογές .....	21
2.2.2	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της επιταχυνόμενης εκχύλισης .....	22
2.2.3	Εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό.....	23
<b>3</b>	<b><i>Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης.....</i></b>	<b>26</b>
3.1	<b>Εφαρμογές της τεχνικής SPME .....</b>	<b>28</b>
3.2	<b>Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα SPME.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b><i>Πειραματικός σχεδιασμός - Design of Experiments (DOE) .....</i></b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b><i>Μοντελοποίηση .....</i></b>	<b>32</b>
5.1	<b>Γενικά .....</b>	<b>32</b>
5.2	<b>Μοντέλα ισοζυγίων μάζας.....</b>	<b>32</b>
5.2.1	Γενικά .....	32
5.2.2	Μοντέλο Sononά.....	33
<b>6</b>	<b><i>In vitro δοκιμές .....</i></b>	<b>36</b>
6.1	<b>Τυροσινάση.....</b>	<b>36</b>
6.1.1	Μηχανισμός τυροσινάσης σε κυτταρικό επίπεδο .....	36
6.1.2	Αναστολείς τυροσινάσης .....	41
6.1.3	Προβλήματα – παθήσεις.....	42
6.2	<b>Ελεύθερες ρίζες.....</b>	<b>42</b>
6.2.1	Ιστορικά στοιχεία .....	42
6.2.2	Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτική δράση.....	43
6.2.3	Παθολογικές καταστάσεις του οξειδωτικού στρες.....	45

6.2.4	Άμυνα του οργανισμού .....	45
<b>7</b>	<b>Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>47</b>
	<b><u>Sideritis raeseri ssp.attica</u></b>	
<b>8</b>	<b>Εισαγωγικό μέρος .....</b>	<b>68</b>
8.1	Γενικά στοιχεία του γένους <i>Sideritis</i> .....	68
8.2	Χρήσεις στη λαϊκή θεραπευτική.....	71
8.3	Το γένος <i>Sideritis</i> και αντιοξειδωτική δράση .....	73
8.4	Το είδος <i>Sideritis raeseri</i> .....	74
8.5	Το υποείδος <i>Sideritis raeseri ssp. attica</i> .....	75
8.5.1	Συστηματική ταξινόμηση .....	75
8.5.2	Βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους <i>S. raeseri ssp. attica</i> .....	76
8.5.3	Γεωγραφική εξάπλωση .....	76
8.5.4	Βιότοπος.....	77
8.5.5	Δρογοχημεία .....	77
	<b><u>Sideritis raeseri ssp.attica Πειραματικό μέρος</u></b>	
<b>9</b>	<b><i>Sideritis raeseri ssp. attica</i> .....</b>	<b>86</b>
9.1	Λόγοι επιλογής του είδους <i>Sideritis raeseri ssp. attica</i> .....	86
9.2	Σχεδιασμός εκχυλιστικής διαδικασίας .....	86
9.3	Υλικά και μέθοδοι .....	90
9.4	Παραλαβή εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της επιταχυνόμενης εκχύλισης .....	90
9.5	Παραλαβή εκχυλισμάτων από το αρχικό υλικό με τη μέθοδο της υπερκρίσιμης εκχύλισης .....	93
9.6	Εκχύλιση υπολείμματος της Υ.Ε. με την τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης .....	97
9.6.1	Συγκριτική μελέτη του χημικού φορτίου και της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόμενων εκχυλισμάτων.....	101
9.7	Συμπεράσματα αξιολόγησης των εκχυλιστικών διαδικασιών .....	106
9.8	Φυτοχημική μελέτη του κλάσματος Υρ. Su.E. ....	108
9.8.1	Κλασμάτωση με χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (FCPC) .....	108
9.8.2	Έλεγχος των εκχυλισμάτων με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	111
9.8.3	Φυτοχημική μελέτη κλασμάτων του FCPC .....	115
9.9	Συμπεράσματα.....	135
	<b><u>Cistus creticus ssp.creticus</u></b>	
<b>10</b>	<b>Εισαγωγή.....</b>	<b>140</b>
10.1	Δρογοιστορία.....	141
10.2	Δρογοφαρμακολογία .....	143
10.3	Δρογοβοτανική .....	143

<b>10.4</b>	<b>Δρογοετυμολογία.....</b>	<b>145</b>
<b>10.5</b>	<b>Δρογοχημεία .....</b>	<b>146</b>
10.5.1	Τερπένια.....	146
10.5.2	Φλαβονοειδή και λοιποί μεταβολίτες .....	148
<b>10.6</b>	<b>Λόγοι επιλογής του είδους <i>Cistus creticus</i> ssp. <i>creticus</i> .....</b>	<b>149</b>
<b><u>Cistus creticus</u> ssp. <i>creticus</i> Πειραματικό μέρος</b>		
<b>10.7</b>	<b>Σκοπός .....</b>	<b>150</b>
<b>10.8</b>	<b>Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>150</b>
<b>10.9</b>	<b>Μελέτη του χημικού περιεχομένου της ρητίνης ‘λάδανο’ .....</b>	<b>151</b>
10.9.1	Παραλαβή των πτητικών συστατικών της ρητίνης με την τεχνική της Υ.Ε. ....	151
10.9.2	Εκχύλιση υπολείμματος της υπερκρίσιμης εκχύλισης για την παραλαβή των πολικών συστατικών .....	153
10.9.3	Χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων υπερκρίσιμης εκχύλισης με TLC.....	154
10.9.4	Παραλαβή αιθέριου ελαίου ρητίνης με υδραπόσταξη .....	155
10.9.5	Εκχύλιση της ρητίνης με τη χρήση υπερήχων .....	156
<b>10.10</b>	<b>Ανάλυση αιθέριων ελαίων και μη πολικών εκχυλισμάτων ρητίνης με GC-MS... 157</b>	
10.10.1	Σύγκριση σύστασης πτητικού κλάσματος υπερκρίσιμης εκχύλισης και αιθερίου ελαίου .....	157
10.10.2	Ανάλυση πτητικών συστατικών εκχυλισμάτων UAE.....	161
<b>10.11</b>	<b>Μελέτη χημικού περιεχομένου των υπέργειων τμημάτων του φυτού <i>C. creticus</i> ssp. <i>creticus</i> .....</b>	<b>163</b>
10.11.1	Παραλαβή των πτητικών συστατικών με τη χρήση υπερκρίσιμης εκχύλισης.....	163
10.11.2	Παραλαβή αιθερίου ελαίου με την τεχνική της υδραπόσταξης .....	164
10.11.3	Ανάλυση του πτητικού κλάσματος της υπερκρίσιμης εκχύλισης και του αιθερίου ελαίου της .....	164
<b>10.12</b>	<b>Ανάλυση πτητικών συστατικών της ρητίνης με την τεχνική SPME.....</b>	<b>167</b>
<b>10.13</b>	<b>Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών .....</b>	<b>170</b>
10.13.1	Φυτοχημική μελέτη του κλάσματος C.c.R.SFE.1.....	170
10.13.2	Φυτοχημική μελέτη του κλάσματος C.c.R.SFE.5.....	182
<b>10.14</b>	<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>190</b>
<b><u>Glycyrrhiza glabra</u></b>		
<b>11</b>	<b>Ιστορικά στοιχεία .....</b>	<b>192</b>
<b>11.1</b>	<b>Η οικογένεια Leguminosae και το γένος <i>Glycyrrhiza</i> .....</b>	<b>193</b>
<b>11.2</b>	<b>Το είδος <i>Glycyrrhiza glabra</i> .....</b>	<b>196</b>
11.2.1	Βοτανικά χαρακτηριστικά .....	196
11.2.2	Καλλιέργεια - εξάπλωση .....	197
11.2.3	Χρήσεις-φαρμακευτικές δράσεις.....	198
<b>11.3</b>	<b>Δρογοχημεία .....</b>	<b>200</b>
11.3.1	Σαπωνίνες .....	201
11.3.2	Φλαβονοειδή .....	202
11.3.3	Κουμαρίνες .....	203
11.3.4	Βιομηχανικές εφαρμογές .....	204

11.3.5	Αντενδείξεις .....	204
<b><u>Glycyrrhiza glabra Πειραματικό μέρος</u></b>		
11.4	Σκοπος και κριτήρια επιλογής του είδους .....	206
11.5	Συλλογή του φυτικού υλικού και ξήρανση .....	207
11.6	Υλικά και μέθοδοι .....	207
11.7	Μέτρηση κοκκομετρίας .....	208
11.8	Αρχική εκχύλιση των ριζών της <i>G. glabra</i> με τη χρήση υπερκρίσιμου CO <sub>2</sub> .....	209
11.8.1	Έλεγχος βιολογικών ιδιοτήτων .....	210
11.8.2	Χρωματογραφικός έλεγχος HPLC και TLC .....	211
11.9	Βελτιστοποίηση υπερκρίσιμης εκχύλισης με τη χρήση του Design of Experiments (DOE) .....	213
11.9.1	Εκτέλεση διαγνωστικών πειραμάτων (Screening design) υπερκρίσιμης εκχύλισης .....	213
11.9.2	Μελέτη βελτιστοποίησης της διεργασίας Υ.Ε.....	220
11.9.3	Συσχέτιση της δράσης στην τυροσινάση με τους περιεχόμεους μεταβολίτες των εκχυλισμάτων με τη χρήση βιοαυτογραφικής μεθόδου .....	234
11.9.4	Ανάλυση εκχυλισμάτων με PLS-R .....	237
11.9.5	Ποσοτικοποίηση γκλαμπριντίνης με την τεχνική HPTLC .....	242
11.9.6	Βελτιστοποίηση της διεργασίας Υ.Ε.....	246
11.9.7	Αριθμητική βελτιστοποίηση (numerical optimization) Υ.Ε. ....	248
11.10	Εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων (UAE) και σύγκριση με την Υ.Ε.....	250
11.10.1	Σύγκριση τεχνικών Υ.Ε. και UAE .....	251
11.11	Μοντελοποίηση της Υ.Ε. με τη χρήση του μοντέλου Sononά .....	253
11.12	Συμπεράσματα.....	256
<b><u>Glycyrrhiza glabra μελέτη υπολείμματος Υ.Ε.</u></b>		
11.13	Σκοπός .....	258
11.14	Υλικά και μέθοδοι .....	259
11.15	Παρασκευή εκχυλισμάτων με την τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης .....	259
11.15.1	Έλεγχος ως προς την αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο DPPH .....	264
11.15.2	Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου (TPC) .....	267
11.15.3	Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικών φλαβονοειδών (TFC).....	271
11.15.4	Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο ABTS.....	274
11.16	Υπολογισμός βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης με τη χρήση του Design Of Experiments (DOE) .....	277
11.17	Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι.....	280
	Παράρτημα.....	302

## Περίληψη

Από τον προηγούμενο αιώνα μέχρι και σήμερα έχει σημειωθεί μία αλματώδης ανάπτυξη στον τομέα των θετικών επιστημών. Οι νέες και καινοτόμες τεχνολογίες που ήρθαν στο προσκήνιο, οδήγησαν στη σημαντική βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής αλλά και στην αύξηση του προσδόκιμου της. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα επιτεύγματα δεν ήρθαν χωρίς κάποιο αντίτιμο. Η παραγωγή, η χρήση και η διάθεση των χημικών παραπροϊόντων της βιομηχανίας, είχε σε πολλές περιπτώσεις αρνητικές συνέπειες τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στο φυσικό περιβάλλον. Σε αυτό λοιπόν το πλαίσιο αναπτύχθηκε μια έντονη ερευνητική δραστηριότητα με σκοπό την αντικατάσταση των χρησιμοποιούμενων τοξικών διαλυτών με καινούργιους, φιλικούς προς το περιβάλλον. Το αποτέλεσμα αυτής της προσπάθειας οδήγησε στην εύρεση των 'πράσινων' και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών εκχύλισης όπως τα υπερκρίσιμα ρευστά, η επιταχυνόμενη εκχύλιση, το υποκρίσιμο νερό και η εκχύλιση με μικροκύματα πολλές από τις οποίες έχουν ήδη βρει το δρόμο της βιομηχανικής εφαρμογής.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η εφαρμογή, η μελέτη και η βελτιστοποίηση φιλικών προς το περιβάλλον διεργασιών εκχύλισης, για την παραγωγή δραστικών εκχυλισμάτων από φυτά με φαρμακολογική δράση, μέσα από τη χρήση σύγχρονων και καινοτόμων τεχνικών εκχύλισης όπως: η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, η επιταχυνόμενη εκχύλιση και η εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυτά της Ελλάδας, γνωστά για τη φαρμακευτική τους δράση όπως ο *Sideritis raeseri ssp. attica*, η ρητίνη του φυτού *Cistus creticus ssp. creticus* και τα υπέργεια τμήματά του, καθώς και οι ρίζες του φυτού *Glycyrrhiza glabra*. Στόχος, ήταν η εφαρμογή των παραπάνω τεχνικών εκχύλισης για την παραγωγή δραστικών εκχυλισμάτων με υψηλές αποδόσεις, αυξημένο φορτίο σε φαινόλες και φλαβονοειδή και υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Για την παραλαβή ολόκληρου του φάσματος των δευτερογενών μεταβολιτών μιας δρόγης απαιτείται η χρήση διαλυτών διαφορετικής πολικότητας. Συγκεκριμένα, μία συνήθης εφαρμογή διαλυτών κλιμακούμενης πολικότητας, η οποία είναι ικανή να παραλάβει ολόκληρο το φάσμα των βιοδραστικών συστατικών, περιλαμβάνει

αρχικά τη χρήση διχλωρομεθανίου για την παραλαβή των άπολων συστατικών του φυτού, στη συνέχεια χρήση μεθανόλης, για τα μέσης πολικότητας συστατικά και τέλος χρήση νερού.

Τα πρώτο φυτό που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν το είδος *S. raeseri* ssp. *attica* στο οποίο έγινε η μελέτη ενός πρωτοκόλλου εκχύλισης, με σκοπό την αντικατάσταση των προαναφερθέντων, οργανικών διαλυτών (διχλωρομεθανίου και μεθανόλης), με διαλύτες φιλικούς προς το περιβάλλον (υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> και αιθανόλη) για την παραλαβή εκχυλισμάτων με υψηλές αποδόσεις και υψηλή βιολογική δράση. Συγκεκριμένα, θεσπίσθηκε ένα πρωτόκολλο εκχύλισης το οποίο περιλάμβανε αρχικά, την χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα (με προσθήκη συνδιαλύτη) σε διάφορες συνθήκες (για την εκχύλιση των μη πολικών συστατικών του φυτού) και στην συνέχεια εισαγωγή του υπολείμματος στην συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE) και εκχύλιση με αιθανόλη και νερό για την παραλαβή των πιο πολικών συστατικών. Τα εκχυλίσματα τα οποία προέκυψαν από τη διεργασία δεν ήταν μόνο απαλλαγμένα από οργανικούς διαλύτες, αλλά αποδείχτηκαν δραστικότερα, συγκρινόμενα με αυτά της συμβατικής μεθόδου, διαθέτοντας υψηλότερο φορτίο σε φαινόλες και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Τέλος, το εκχύλισμα που παρουσίασε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση και το υψηλότερο φορτίο σε φαινολικά συστατικά, υποβλήθηκε σε φυτοχημική μελέτη για την απομόνωση των κύριων μεταβολιτών του. Ταυτοποιήθηκαν έξι μεταβολίτες: ο λαβαντουλιφολιοσίδης, ο ακτεοσίδης, ο 7-O-6'''-O-ακετυλο-β - D - αλλοπυρανοσυλο - (1→2) -β - D -γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης, ο λεονοσίδης A, ο 7-O-6'''-O-ακετυλο- β-D- αλλοπυρανοσυλο -(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελαρεΐνης και ο 7-O-6'''-O-ακετυλο- β-D- αλλοπυρανοσυλο -(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της 4'-O-μεθυλοϋπολετίνης, εκ των οποίων ο λεονοσίδης A απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Sideritis*.

Όσον αφορά το είδος *Cistus creticus*, έγινε μελέτη της διεργασίας της υπερκρίσιμης εκχύλισης για την παραλαβή των μη πολικών συστατικών της ρητίνης του φυτού (λάδανο) και των υπέργειων τμημάτων του, καθώς και η σύγκριση αυτών με κλασικές τεχνικές εκχύλισης, όπως η υδροαπόσταξη και η εκχύλιση με



υπερήχους. Από τη μελέτη των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων που παρασκευάστηκαν, παρατηρήθηκαν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές, οι οποίες σχετίζονται με την διαδικασία εκχύλισης. Σημαντικότερη εξ αυτών αποτέλεσε η διαφορά στη συγκέντρωση του μεταβολίτη οξειδίου της μαννόλης, όπου για το αιθέριο έλαιο της υδραπόσταξης υπολογίσθηκε στα 14.4% ενώ για την υπερκρίσιμη εκχύλιση στο 2.57%. Φαίνεται ότι οι υψηλές θερμοκρασίες και οι εκτεταμένοι χρόνοι εκχύλισης εντός της συσκευής Clevenger οδηγούν στη θερμική αλλοίωση/μετατροπή ορισμένων συστατικών τα οποία με τη σειρά τους οδήγησαν στην υψηλή συγκέντρωση του μεταβολίτη, αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι οι ηπιότερες συνθήκες της υπερκρίσιμης εκχύλισης αποτρέπουν τον θερμικό καταβολισμό, οδηγώντας στην παραλαβή ποιοτικά ανώτερων εκχυλισμάτων με αναλλοίωτα συστατικά.

Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο το οποίο παρασκευάσθηκε από τη διεργασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης διαθέτει πιο φυσικό άρωμα το οποίο θυμίζει περισσότερο του φρέσκου φυτού, διότι μέσα από την εφαρμογή μιας headspace ανάλυσης, αποδείχθηκε ότι το αιθέριο έλαιο αυτής περιέχει συστατικά, τα ποσοστά των οποίων παρουσιάζουν περισσότερα κοινά στοιχεία με αυτά της πηγής προέλευσης. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο της διεργασίας είναι και ποιοτικά ανώτερο διότι, λόγω των πολύ καλών εκχυλιστικών ιδιοτήτων της μεθόδου, συνεκχυλίζονται και άλλα, πιο βαριά δραστικά συστατικά τα οποία διαθέτουν σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες (*εντ-3β-υδροξυ-13-επι-οξείδιο της μαννόλης* και ο οξικός εστέρας της ριμπενόλης), προσδίδοντας στο λαμβανόμενο αιθέριο έλαιο βιολογική μεγαλύτερη αξία.

Τέλος, σε επιλεγμένα εκχυλίσματα της υπερκρίσιμης εκχύλισης, τα οποία ήταν πλούσια σε βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, πραγματοποιήθηκε φυτοχημική μελέτη για την απομόνωση των κυριότερων μεταβολιτών τους από όπου ταυτοποιήθηκαν: το 4,5-δι-έπι αριστολοχένιο, το *εντ-οξείδιο της μαννόλης*, το *εντ-13-επι-οξείδιο της μαννόλης*, το *εντ-3β-ακετοξυ-13-επι-οξείδιο της μαννόλης* (οξικός εστέρα της ριμπενόλης), το *εντ-3β-υδροξυ-13-επι-οξείδιο της μαννόλης* (ριμπενόλη), ο 4'-μεθυλαιθέρας της απιγενίνης (ακακετίνη), ο 3,3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης, ο 3,4'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης, ο 3-μεθυλαιθέρας της καιμπφερόλης, η απιγενίνη και ο 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης.

Το τελευταίο φυτό το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν οι ρίζες του φυτού *G. glabra*. Σκοπός της μελέτης αποτέλεσε η εφαρμογή και η βελτιστοποίηση της διεργασίας της υπερκρίσιμης εκχύλισης για την παραγωγή εκχυλισμάτων με σημαντικές αντιοξειδωτικές δράσεις, φορτίο σε φαινόλες και φλαβονοειδή, υψηλή συγκέντρωση γκλαμπριντίνης και ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου της τυροσινάσης. Για την επίτευξη του στόχου αυτού έγινε η εφαρμογή της Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology), όπου αρχικά έγινε η χρήση ενός Factorial σχεδιασμού 2 επιπέδων (2-level Factorial design), για την εύρεση των σημαντικών παραμέτρων της διεργασίας και στη συνέχεια ενός Central Composite σχεδιασμού για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της εκχύλισης. Στη συνέχεια, εφαρμόζοντας έναν αλγόριθμο αριθμητικής βελτιστοποίησης, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες παραλαβής εκχυλισμάτων από όπου και παρασκευάστηκαν δύο εκχυλίσματα: ενός με υψηλή αντιοξειδωτική δράση στο ABTS (όμοια με αυτή του Trolox:  $IC_{50} \approx 8 \mu\text{g/mL}$ ), καθώς και ενός με ισχυρή λευκαντική δράση, η οποία είναι 4.5 φορές πιο ισχυρή από αυτή του πρότυπου αναστολέα (Kojic acid:  $IC_{50} \approx 1.34 \mu\text{g/mL}$ ).

Η παραπάνω μελέτη δε θα μπορούσε να θεωρηθεί ολοκληρωμένη αν δεν γινόταν και μια θεωρητική μελέτη αυτής μέσα από την εφαρμογή ενός μοντέλου πρόρρησης. Η περιγραφή έγινε με τη χρήση ενός μοντέλου εμβολικής ροής που προτάθηκε από τους των Sononá *et al.* (1994), το οποίο κατάφερε να περιγράψει πολύ καλά τα πειραματικά δεδομένα, ενώ ταυτόχρονα βοήθησε και στον υπολογισμό των συντελεστών μεταφοράς μάζας.

Τέλος, έλαβε χώρα και η μελέτη του υπολείμματος της υπερκρίσιμης εκχύλισης. Ένα υλικό το οποίο, αν και απαλλαγμένο από τα μη πολικά συστατικά, εξακολουθεί να είναι πλούσιο σε πολικούς μεταβολίτες, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή εκχυλισμάτων με αξιόλογες βιολογικές δράσεις. Γι' αυτό το λόγο, έγινε μία προσπάθεια αξιοποίησής του για την παρασκευή εκχυλισμάτων τα οποία θα χαρακτηρίζονται από καλή αντιοξειδωτική δράση και υψηλό φορτίο σε φαινόλες και φλαβονοειδή στη συσκευή της επιταχυνόμενης εκχύλισης. Και σε αυτή την περίπτωση επιλέχθηκε να γίνει μια μελέτη βελτιστοποίησης της εκχυλιστικής διεργασίας. Λόγω των πολύ καλών

αποτελεσμάτων της Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης, έγινε η εφαρμογή ενός Central Composite σχεδιασμού, για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας, κάνοντας χρήση διαλυτών, φιλικών προς το περιβάλλον όπως αιθανόλης/νερού και υποκρίσιμου νερού, από όπου και προέκυψαν εκχυλίσματα με αξιόλογες βιολογικές δράσεις και ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις οι οποίες αγγίζουν το 32% του ξηρού βάρους της δρόγης.

## Abstract

Since the beginning of the 20<sup>th</sup> century, there has been a significant interest in the field of applied sciences. New and innovative technologies have been invented, leading to the significant improvement of the human life. But unfortunately, these achievements came with a cost. The chemical wastes, the toxic solvents, the byproducts and the production of greenhouse gasses had a significant impact on the environment the results of which are still visible till the present day. For this reason, the last century has been a systematic study for the replacement of the toxic solvents with new ones, environmentally friendly and less harmful such as supercritical fluid extraction, subcritical water extraction, accelerated solvent extraction, microwave assisted extraction and others, many of which have already found the way to the industrial applications.

The subject of the present doctorat thesis was the study of optimization and the implementation of environmentally friendly extraction processes for the production of bioactive extracts from plants with significant pharmacological characteristics, using modern and innovative extraction technologies, such as supercritical CO<sub>2</sub>, accelerated solvent extraction and subcritical water extraction.

For that, three different plant species were collected from different regions of Greece and were studied: *Sideritis raeseri ssp. attica*, *Cistus creticus ssp. creticus* and the roots of *Glycyrrhiza glabra*. The aim of this work was the application of the aforementioned techniques for the production of extracts that will exhibit: high yields, high antioxidant activity and significant phenolic and flavonoid content.

The first plant was the aerial parts of *Sideritis raeseri* ssp. *attica*, a plant well known in Greece for its pharmacological activities, especially for its use in the treatment of colds and coughs.

In order to extract the majority of the active metabolites, a sequential use of solvents is needed, such as: dichloromethane, methanol and water. The aim of this study was the substitution of these solvents with environmentally friendly ones like supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water, without the decrease of the extract's activity. This substitution led to extracts that exhibit higher yields, increased antioxidant activity and higher phenolic and flavonoid content only through the use of environmentally friendly procedures.

Subsequently, the extract with the highest activity was subjected to further phytochemical analysis in order to isolate and characterize its major metabolites. The isolation led to the identification of *lavandulofolioside*, *acteoside*, *hypolaetin 7-O-6'''-O-acetyl-β - D - allopyranosyl - (1→2) -β - D-glucopyranoside*, *leonoside A*, *isoscutellarein 7-O-6'''-O-acetyl- β-D- allopyranosyl-(1→2)-β-D- glucopyranoside* and *4'-O-methylhypolaetin 7-O-6'''-O-acetyl- β-D- allopyranosyl-(1→2)-β-D- glucopyranoside*, from whom *leonoside A* was isolated for the first time from the *Sideritis* genus.

The second plant studied in this dissertation was *Cistus creticus* ssp. *creticus*, an endemic species grown in Crete, well known for its unique aroma, pharmacological attributes and its ability to produce a resin called 'ladano'. In this study, a comparison between supercritical fluid extraction and classic extractions (hydrodistillation and ultrasound assisted extraction both in plant and resin) took place.

During this study, significant qualitative and quantitative differences were detected between the obtained extracts, the most important of which was the amount of manool oxide detected in the essential oils of hydrodistillation and supercritical extraction (14.4% and 2.57% respectively). As it turned out, these differences were directly related to the extraction procedures. The high temperatures and the elongated extraction times inside the Clevenger apparatus led to the production of the aforementioned terpenic metabolite through a thermal transformation-degradation of a relative compound, proving that the milder

extracting conditions of the supercritical extraction provided higher quality extract, free of chemical alterations. In addition, the use of supercritical fluids led to the extraction of more active compounds such as 3 $\beta$ -hydroxy-13-*epi*-manoyl oxide and ribenol ethyl acetate that exhibit significant antimicrobial and antifungal activities enhancing even more the biological attributes of the engiven extract.

Subsequently, a phytochemical analysis of the plant took place and the major bioactive metabolites contained in the most active extract were identified. The isolation concluded to the structural elucidation of 11 compounds: 4,5-di-*epi*-aristolochene, manool oxide, *ent*-13-*epi*-manoyl oxide, *ent*-3 $\beta$ -acetoxy-13-*epi* -manool oxide, *ent*-3 $\beta$ -hydroxy-13-*epi*-manool oxide (ribenol), apigenin 4'-methyl ether, quercetin 3,3'-dimethyl ether, quercetin 3,4'-dimethyl ether, kaempferol 3-methyl ether, apigenin and quercetin 3-methyl ether.

The last plant studied in this dissertation was the roots of ***Glycyrrhiza glabra***, a plant with significant biological activities with a long history in folk medicine. The aim of this study was the optimization of supercritical fluid extraction in order to produce extracts with high yields, significant antioxidant activity, phenolic and flavonoid content, strong inhibitory activity against tyrosinase and high content of glabridin. For that purpose, Response Surface Methodology was applied. Initially, a series of screening experiments took place (via a 2 Level Factorial design) in order to find the significant parameters that affect the procedure and subsequently though a Central Composite Design to optimize them. The optimum conditions were finally identified by the use of numerical optimization which resulted in the production of two extracts: one with significant antioxidant activity (ABTS test) and one strong inhibitory activity in the tyrosinase enzyme (4.5 stronger than Kojic acid).

Moreover, a theoretical approach was also studied thought the application of a mass balance model introduced by Sovová *et al.* (1994). As it was shown, the experimental data were satisfactorily correlated with the model, which in turn can be used to describe the procedure accurately.

Finally, the residue of supercritical extraction was subjected to the Accelerated Solvent Extraction, in order to obtain the more polar compounds and produce extracts that exhibit high yields, significant antioxidant activity, high phenolic and flavonoid content. For that purpose, a case study was made by the use

of Response Surface Methodology, which led to the production of extracts that show high extraction yields (32% on dry base) and high antioxidant potentials (ABTS  $IC_{50}$  = 27.50 and DPPH  $IC_{50}$  = 71.23).



## Συνομογραφίες

Υ.Ε.	Υπερκρίσιμη εκχύλιση	DCM	Διχλωρομεθάνιο
Υ.Ρ.	Υπερκρίσιμα ρευστά	CDCl <sub>3</sub>	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
SFE	Υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO <sub>2</sub>	F.A.	Φορμικό οξύ
ASE	Επιταχυνόμενη εκχύλιση (Accelerated Solvent Extraction)	A.A.	Οξικό οξύ
UAE	Εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων	CPC	Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (Centrifugal Partition Chromatography)
SCW	Εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό	P.B.	Ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer
HPTLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης	DOE	Πειραματικός σχεδιασμός 'Design of Experiments'
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	CCD	Central Composite Design
GC-MS	Αέρια χρωματογραφία μάζας	RSM	Μέθοδος Επιφάνειας Απόκρισης (Resonance Surface Methodology)
NMR	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	PLS-R	Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων
d	Διπλή	df	Βαθμοί ελευθερίας
dd	Διπλή διπλή	TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
ddd	Διπλή διπλή διπλή	δ.ο.	Διαλυμένη ουσία
m	Πολλαπλή	τ.ε.δ.ο.	Τροφοδοσία ελεύθερης διαλυμένης ουσίας
<sup>1</sup> H	Πρωτόνιο	DHI	5,6 διυδροξυκινόνη
<sup>13</sup> C	Άνθρακας	IQ	Ινδολοκινόνη
δ	Χημική μετατόπιση	G.A.	Γαλλικό οξύ
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	VLC	Ανοιχτής στήλης χαμηλής πίεσης
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence	DHICA	5,6 διυδροξυινδόλο – 2- καρβοξυλικό C.c.R.SFE.Κλάσματα ρητίνης υπερκρίσιμης εκχύλιση
COSY	Correlation Spectrometry	Ccred	Αιθέριο έλαιο ρητίνης από υδροαπόσταξη
COSY-LR	Long Range Correlation Spectrometry	EsOilHD	Αιθέριο έλαιο φυτού από υδροαπόσταξη
DPPH	2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλική ρίζα	C.c.P.SFE.1~4	Αιθέριο έλαιο από υπερκρίσιμη εκχύλιση
TPC	Μέτρηση ολικού φαινολικού φορτίου	C.c.R.UAE.C-Hex	Εκχύλισμα υπερήχων με κυκλοεξάνιο
TFC	Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών	C.c.R.UAE.DCM	Εκχύλισμα υπερήχων με διχλωρομεθάνιο
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulphonic acid)	SFE1~20	Κλάσματα υπερκρίσιμης εκχύλισης του είδους <i>Sideritis raeseri ssp attica</i>
Tyr.	Μέτρηση λευκαντικής δράσης	A.DCM.Meth.	Εκχύλισμα ASE του <i>S. raeseri ssp attica</i> με διχλωρομεθάνιο
HD	Υδροαπόσταξη	A.Meth.	Εκχύλισμα ASE του <i>S. raeseri ssp attica</i> με μεθανόλη
ΔMO	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	A.W.Meth.	Εκχύλισμα ASE του <i>S. raeseri ssp attica</i> με νερό
ROS	Reactive Oxygen Species		
T <sub>c</sub>	Κρίσιμη θερμοκρασία		
P <sub>c</sub>	Κρίσιμη πίεση		
CP	Κρίσιμο σημείο		
ANOVA	Ανάλυση διακύμανσης		
MeOH	Μεθανόλη		
EtOH	Αιθανόλη		
ACN	Ακετονιτρίλιο		
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας		
MeOD	Δευτεριωμένη μεθανόλη		
C-Hex	Κυκλοεξάνιο		



A.DCM.E/W Εκχύλισμα ASE του *S. raeseri* ssp  
*attica* με νερό/αιθανόλη  
A.E/W Εκχύλισμα ASE του *S. raeseri* ssp  
*attica* με νερό/αιθανόλη  
A.DCM. Εκχύλισμα ASE του *S. raeseri* ssp  
*attica* με διχλωρομεθάνιο  
A.Eth. Εκχύλισμα ASE του *S. raeseri* ssp  
*attica* με μεθανόλη  
A.W.Eth. Εκχύλισμα ASE του *S. raeseri* ssp  
*attica* με νερό  
Υρ.Su.E/W Εκχύλισμα του υπολείμματος της  
Υ.Ε. στο ASE με αιθανόλη/νερό 50/50

Υρ.Su.E Εκχύλισμα του υπολείμματος της  
υπερκρίσιμης εκχύλισης στο ASE με  
αιθανόλη  
Υρ.Su.W Εκχύλισμα του υπολείμματος της  
υπερκρίσιμης εκχύλισης στο ASE με  
νερό  
G.g.Run1~13 Opt Εκχυλίσματα Υ.Ε. του φυτού  
G. *Glabra* για τη μελέτη  
βελτιστοποίησης  
G.g.res.Run.1~40 Εκχυλίσματα υπολείμματος  
Υ.Ε. του φυτού G. *Glabra* στη μελέτη  
βελτιστοποίησης



## Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο ενισχύεται η επιτακτική ανάγκη για τον επαναπροσδιορισμό της Χημείας, ώστε αυτή να συνδράμει στη δημιουργία διεργασιών φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Οι κλασικές τεχνικές εκχύλισης, που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα (εκχύλιση συνεχούς ροής (percolation), εκχύλιση με συνεχή ανάδευση (maceration), εκχύλιση Soxhlet, υδροαπόσταξη κ.α.) απαιτούν εκτεταμένους χρόνους εκχύλισης, υψηλά ποσοστά ενέργειας και υψηλές ποσότητες οργανικών διαλυτών, ενώ δεν ενδείκνυνται για την παραλαβή συστατικών ευαίσθητων στη θερμοκρασία, μιας και στην πλειοψηφία τους, απαιτούν τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων. Έτσι λοιπόν θεωρήθηκε αναγκαία η αντικατάσταση αυτών των τεχνικών με στόχο την εύρεση εναλλακτικών διεργασιών οι οποίες θα μπορούσαν να εξαλείψουν τα προβλήματα των προαναφερθέντων, δίνοντας μία νέα ώθηση στους τομείς παραγωγής εκχυλισμάτων.

Γι αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε ιδιαίτερα έντονα η έννοια της 'Πράσινης Χημείας' η οποία έχει σα στόχο την ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεων από την παραγωγή, χρήση και διάθεση των επιβλαβών χημικών προϊόντων, ενώ ταυτόχρονα ενθαρρύνει την παραγωγή και την ανάπτυξη νέων και αποδοτικών διεργασιών, φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο, μέσα από την αντικατάσταση των συμβατικών διεργασιών και των βλαβερών οργανικών διαλυτών.

Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, με αυτό το σκεπτικό, είναι αρκετές, οι περισσότερες εξ αυτών βασίζονται στις αρχές της μειωμένης κατανάλωσης διαλυτών και ενέργειας καθώς και στην μικρότερη εμπλοκή του χρήστη στα διάφορα στάδια της διεργασίας. Μερικές από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι:

- Η Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (Supercritical Fluid Extraction - SFE)
- Η Εκχύλιση με Χρήση Υπέρηχων (UltraSonic Extraction - UAE)
- Η Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υψηλές Πιέσεις (Pressure Assisted Extraction - PAE)
- Η Εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό (Subcritical water – SCW)

## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη και η βελτιστοποίηση φιλικών προς το περιβάλλον διεργασιών εκχύλισης, για την παραγωγή δραστικών εκχυλισμάτων από φυτά της Ελλάδας, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική φαρμακολογική δράση. Οι τεχνικές οι οποίες επιλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη ήταν αυτές της εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (Υ.Ε.), της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE), της εκχύλισης με τη χρήση υποκρίσιμου νερού (SCW) και της εκχύλισης με τη χρήση υπερήχων (UAE) λόγω των δυνατοτήτων που παρουσιάζουν.

Η μελέτη των τεχνικών αυτών πραγματοποιήθηκε σε φυτά γνωστά για την φαρμακευτική τους δράση, όπως ο *Sideritis raeseri* ssp. *attica* (τσάι του βουνού), η *Glycyrrhiza glabra*, το φυτό *Cistus creticus* ssp. *creticus* καθώς και η ρητίνη του 'λάδανο', τα οποία διαθέτουν μεγάλη ιστορία στη λαϊκή θεραπευτική και χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων.

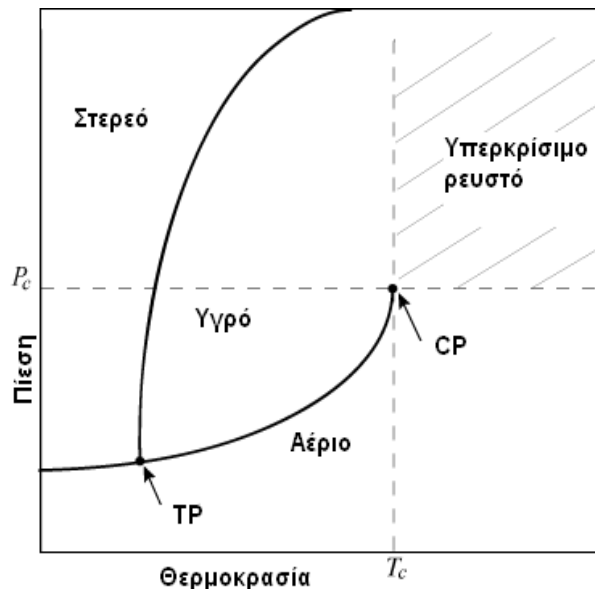
Στόχος, ήταν η παραγωγή δραστικών εκχυλισμάτων, με υψηλές αποδόσεις, με τη χρήση φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών εκχύλισης, τα οποία θα διαθέτουν υψηλό φορτίο σε φαινόλες και φλαβονοειδή και υψηλή αντιοξειδωτική δράση.



# 1 Βασικές αρχές υπερκρίσιμης εκχύλισης

## 1.1 Κρίσιμο σημείο και υπερκρίσιμα ρευστά

Με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της διεργασίας της υπερκρίσιμης εκχύλισης (Υ.Ε.), κρίνεται σκόπιμη η αναφορά στις κρίσιμες συνθήκες (κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση) ενός διαλυτικού μέσου. Ως κρίσιμη θερμοκρασία ( $T_c$ ) ενός διαλύτη ορίζεται η θερμοκρασία πάνω από την οποία ο διαλύτης δεν μπορεί να υγροποιηθεί όσο και αν συμπιεστεί, ενώ κρίσιμη πίεση, ( $P_c$ ) είναι η πίεση πάνω από την οποία δεν μπορεί να αεριοποιηθεί όσο και αν θερμανθεί. Η κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση αποτελούν χαρακτηριστικές ιδιότητες για κάθε διαλύτη και ο συνδυασμός αυτών ορίζει ένα σημείο πάνω στο διάγραμμα φάσεων που ονομάζεται κρίσιμο σημείο (CP) (Εικόνα 1) [1]–[4]. Όταν ένας διαλύτης βρίσκεται σε θερμοκρασία και πίεση πάνω από τις κρίσιμες τιμές (CP) καλείται υπερκρίσιμο ρευστό και παρουσιάζει χαρακτηριστικές ιδιότητες που δε μπορούν να το χαρακτηρίσουν ούτε ως υγρό, αλλά ούτε ως αέριο.



Εικόνα 1. Διάγραμμα φάσεων ενός καθαρού διαλύτη

### 1.1.1 Ιδιότητες υπερκρίσιμων ρευστών

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της χρήσης ενός διαλυτικού μέσου σε υπερκρίσιμες συνθήκες σχετίζεται με τις ιδιότητες που αποκτά, γεγονός το οποίο γίνεται εύκολα αντιληπτό από τα στοιχεία του παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) στον οποίο αναφέρονται οι τιμές μερικών φυσικοχημικών παραμέτρων (η πυκνότητα, ο συντελεστής διάχυσης και το ιξώδες) ενός ρευστού σε υπερκρίσιμες συνθήκες, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές του υγρού και του αερίου.

Πίνακας 1. Σύγκριση φυσικοχημικών ιδιοτήτων αέριας, υπερκρίσιμης και υγρής φάσης

Φάση	Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> )	Συντελεστής διάχυσης (cm <sup>2</sup> /s)	Ιξώδες (cps)
Αέριο	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
Υπερκρίσιμο ρευστό	0,3 – 0,8	10 <sup>-3</sup> - 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>-1</sup>
Υγρό	1	<10 <sup>-5</sup>	1

Οι χαμηλές τιμές που λαμβάνουν οι τιμές του συντελεστή διάχυσης, του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης, τους προσδίδει πολύ καλές ρεολογικές ιδιότητες. Ενώ, το γεγονός ότι εμφανίζουν πυκνότητα συγκρίσιμη με αυτή των υγρών, προσδίδει σε αυτούς αυξημένη διαλυτική ικανότητα συγκρίσιμη με αυτή της υγρής φάσης. Από τα προαναφερθέντα αντιλαμβάνεται κανείς ότι ο συνδυασμός των χαρακτηριστικών καθιστά τα Υ.Ρ. ιδανικούς διαλύτες για μία διεργασία εκχύλισης.

### 1.1.2 Το διοξείδιο του άνθρακα ως διαλύτης

Ο αριθμός των διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια διαδικασία Υ.Ε. είναι μεγάλος, μάλιστα οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, μαζί με τις αντίστοιχες κρίσιμες τιμές τους, παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί [2],[5].

Πίνακας 2. Διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες υπερκρίσιμης εκχύλισης

Διαλύτης	Κρίσιμη θερμοκρασία (CO <sub>2</sub> )	Κρίσιμη πίεση (bar)	Κρίσιμη πυκνότητα (g/mL)
Διοξείδιο του άνθρακα (CO <sub>2</sub> )	31.10	73.9	0.469
Νερό (H <sub>2</sub> O)	373.94	220.64	0.322
Μεθάνιο (CH <sub>4</sub> )	-82.75	46.0	0.162
Εθάνιο (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> )	32.15	48.7	0.203
Προπάνιο (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> )	96.65	42.5	0.217
Αιθυλένιο (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	9.25	50.4	0.215
Προπυλένιο (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> )	91.75	46.0	0.232
Μεθανόλη (CH <sub>3</sub> OH)	239.45	80.9	0.272
Αιθανόλη (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	240.75	61.4	0.276
Ακετόνη (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	234.95	47.0	0.278

Ο πιο διαδεδομένος διαλύτης μέχρι και σήμερα, σε διεργασίες υπερκρίσιμης εκχύλισης, είναι το CO<sub>2</sub> και αυτό λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζει:

- ✓ Είναι πτητικός (αέριο) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και επομένως διαχωρίζεται εύκολα από τις εκχυλιζόμενες ουσίες
- ✓ Έχει χαμηλή τιμή κρίσιμης θερμοκρασίας (31.1 °C)
- ✓ Είναι μη τοξικός
- ✓ Είναι μη αναφλέξιμος
- ✓ Λόγω τετραπολικής ροπής μπορεί και διαλύει ως ένα βαθμό συστατικά μέσης πολικότητας
- ✓ Επιτρέπεται από τον FDA η χρήση του σε τρόφιμα και φάρμακα
- ✓ Έχει χαμηλό κόστος
- ✓ Είναι εύκολα διαθέσιμος
- ✓ Είναι φιλικός προς το περιβάλλον

## 1.2 Ιστορική αναδρομή

Η μελέτη των υπερκρίσιμων ρευστών ξεκινάει από τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα, όταν προσδιορίστηκε για πρώτη φορά από τον Baron Gagniard de la Tour το κρίσιμο σημείο [6]. Στη συνέχεια το 1854, οι μελέτες του Francis σχετικά με τη διαλυτική



ικανότητα του υγρού CO<sub>2</sub> σε διάφορες συνθήκες αποτέλεσαν σταθμό για τον προσδιορισμό των αντίστοιχων ιδιοτήτων του στην υπερκρίσιμη κατάσταση [7] και μερικά χρόνια αργότερα, ο Andrews (1869) προσδιόρισε με μεγάλη ακρίβεια το κρίσιμο σημείο του CO<sub>2</sub> (30.92°C και 74.48 bar) [8].

Η εκτενέστερη μελέτη γύρω από τις υπερκρίσιμες συνθήκες ήρθε από τους Hanney και Hogarth το 1879, οι οποίοι μελέτησαν τη διαλυτότητα ανόργανων αλάτων σε υπερκρίσιμη αιθανόλη ( $T_c = 234\text{ }^\circ\text{C}$ ). Αυτό που παρατήρησαν ήταν ότι η αιθανόλη σε αυτή την κατάσταση παρουσίαζε αυξημένη διαλυτική ικανότητα, αλλά ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι με τη μείωση της πίεσης προκαλείτο καταβύθιση των αλάτων. Αυτό ήταν το σημείο που έγινε η πρώτη σύνδεση μεταξύ της διαλυτικής ικανότητας και της πίεσης. Οι παρατηρήσεις τους αυτές αρχικά δέχτηκαν ισχυρή κριτική, μέχρι που τελικά η επιστημονική κοινότητα δέχτηκε ότι πρόκειται για ένα νέο φαινόμενο και όχι απλώς για αύξηση της διαλυτότητας εξαιτίας της αυξημένης θερμοκρασίας.

Οι έρευνες για τα φαινόμενα αυτά συνεχίστηκαν σε όλη τη διάρκεια του 19<sup>ου</sup> μέχρι και τα μέσα του 20<sup>ου</sup>. Το πέρασμα όμως από το ερευνητικό επίπεδο στην βιομηχανική αξιοποίηση των Υ.Ρ. έγινε με πολύ αργούς ρυθμούς λόγω των υψηλών πιέσεων λειτουργίας, γεγονός που αντικατοπτρίζεται από το υψηλό πάγιο κόστος, το οποίο καθιστούσε οικονομικά απαγορευτική τη χρήση τους. Έπρεπε να περάσουν περίπου 150 χρόνια από την ανακάλυψη των κρίσιμων ιδιοτήτων έως ότου γίνει η πρώτη εφαρμογή βιομηχανικής κλίμακας (1978) για την απομάκρυνση της καφεΐνης από τον καφέ [9]. Έκτοτε η διαδικασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης έχει αρχίσει να βρίσκει ολοένα και περισσότερες εφαρμογές στους τομείς έρευνας και βιομηχανίας [2].

### **1.3 Καθιέρωση Υ.Ε. ως μια σύγχρονη & πράσινη τεχνική εκχύλισης**

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού που χρησιμοποιεί τις ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών για την παραγωγή εκχυλισμάτων. Έχει εφαρμοστεί κυρίως σε τομείς τροφίμων, φαρμάκων και

καλλυντικών και τα τελευταία χρόνια βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο.

Οι λόγοι ανάπτυξης της τεχνικής οφείλονται σε πολλούς παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι η συνεχής ανάγκη για ανάπτυξη νέων - σύγχρονων τεχνικών εκχύλισης οι οποίες θα οδηγήσουν σε ευκολότερες, ταχύτερες και πιο οικονομικές διεργασίες παραγωγής. Επιπλέον, η αύξηση του κόστους ενέργειας (ιδίως της ηλεκτρικής ενέργειας) τα τελευταία χρόνια, έχει καταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους (π.χ. κλασματική απόσταξη) οικονομικά ασύμφορες.

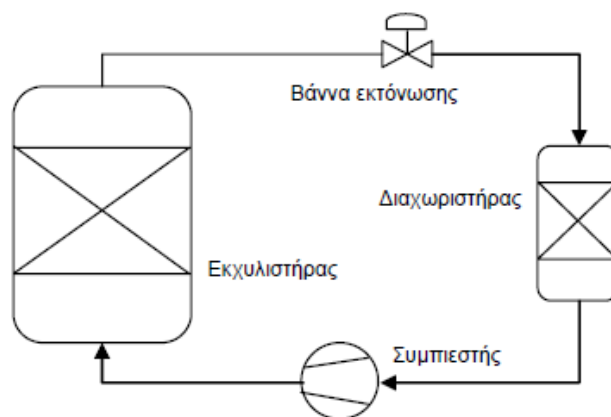
Σε αυτό συνετέλεσαν και οι νέοι υγειονομικοί κανονισμοί που υποβλήθηκαν για τη χρήση αρκετών βιομηχανικών διαλυτών (π.χ. χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες κλπ) [10], καθώς και οι νέοι αυστηρότεροι περιβαλλοντικοί κανονισμοί που έθεσαν αυστηρότερα κριτήρια για την επεξεργασία και διάθεση των βιομηχανικών αποβλήτων [11].

## **1.4 Αρχή λειτουργίας**

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση διακρίνεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη φύση του εκχυλιζόμενου προϊόντος. Η πρώτη κατηγορία (στην οποία ανήκει η πλειονότητα των εφαρμογών) αφορά τις περιπτώσεις όπου η προς εκχύλιση ουσία βρίσκεται εγκλωβισμένη μέσα σε ένα στερεό υπόστρωμα (π.χ. εκχύλιση από φυτικές πρώτες ύλες), ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι περιπτώσεις όπου η προς εκχύλιση ουσία αποτελεί συστατικό υγρού μείγματος (π.χ. παραλαβή πτητικών συστατικών από οινοπνευματώδη ποτά). Και στις δύο περιπτώσεις η αρχή λειτουργίας είναι η ίδια. Το CO<sub>2</sub> σε υπερκρίσιμες συνθήκες εισέρχεται στον εκχυλιστήρα, όπου έχει τοποθετηθεί η πρώτη ύλη ώστε να λάβει χώρα η εκχύλιση. Στη συνέχεια, το μίγμα εκχύλισης από την έξοδο του εκχυλιστήρα οδηγείται στον διαχωριστήρα, όπου με μια απλή εκτόνωση του συστήματος το CO<sub>2</sub> μεταπίπτει στην αέρια κατάσταση. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαλυτικής ικανότητας του CO<sub>2</sub> και την εναπόθεση των διαλυθέντων συστατικών στο εσωτερικό του διαχωριστήρα. Τέλος, ο διαλύτης απαλλαγμένος πλέον από προσμίξεις

ανακυκλοφορεί στο σύστημα και η προαναφερόμενη διεργασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκχύλισης.

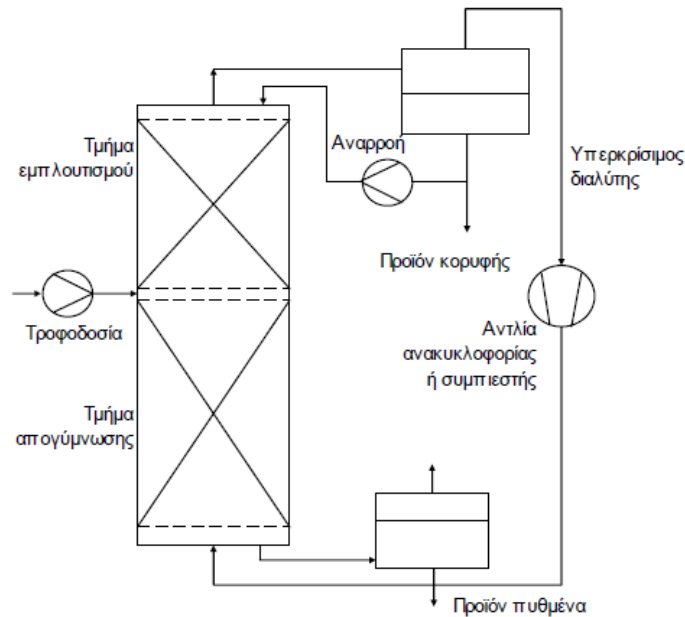
Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 2) γίνεται η διαγραμματική απεικόνιση της υπερκρίσιμης διεργασίας.



Εικόνα 2. Διάγραμμα ροής υπερκρίσιμης εκχύλισης για στερεά υποστρώματα

Όσο αφορά τον διαχωρισμό υγρών μειγμάτων (δεύτερη κατηγορία), η διεργασία μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε ημισυνεχή λειτουργία, όπως στην περίπτωση της εκχύλισης σε στερεό υπόστρωμα, με το προς διαχωρίσιμο υγρό να τοποθετείται εντός του δοχείου εκχύλισης και το υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> να περνάει μέσα από την μάζα του, είτε σε μία στήλη διαχωρισμού φέρνοντας σε συνεχή επαφή το υγρό μείγμα με τον υπερκρίσιμο διαλύτη κατά αντirroή. Στην Εικόνα 3 απεικονίζεται ένα διάγραμμα ροής μιας διεργασίας υπερκρίσιμης εκχύλισης κατά αντirroή σε στήλη διαχωρισμού.

Το εκχύλισμα παραλαμβάνεται από την κορυφή της στήλης (τμήμα εμπλουτισμού) ενώ στον πυθμένα συλλέγεται το υπόλειμμα (τμήμα απογύμνωσης). Πολλές φορές, για την καλύτερη ανάκτηση συστατικών, ένα μέρος του εκχυλίσματος ανατροφοδοτείται στη στήλη [4],[5].



Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής Υπερκρίσιμης εκχύλισης με στήλη για διαχωρισμό υγρών μειγμάτων

Παρ' όλο όμως το γεγονός ότι η κλασμάτωση υγρών μειγμάτων με χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου μπορεί να οδηγήσει σε μικρότερα λειτουργικά κόστη, σε σχέση με την εκχύλιση στερεών υποστρωμάτων, δεν έχει τύχει μεγάλης προσοχής και προς το παρόν έχει βρει εφαρμογή στην εκχύλιση ασφάλτου από πετρελαϊκά κλάσματα (διεργασία ROSE) [3], στην ανακύκλωση λιπαντικών ελαίων, στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων π.χ. απομόνωση σκουαλενίου [12] και στην απομάκρυνση αιθανόλης από αλκοολούχα ποτά όπως κρασί και μύρα [13].

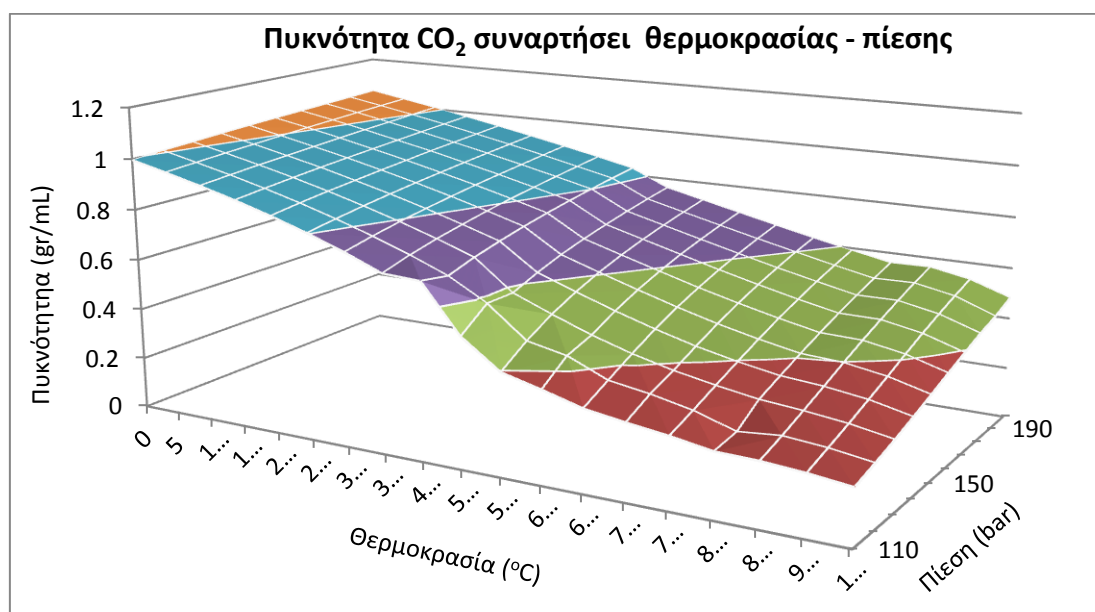
## 1.5 Εκλεκτικότητα – Χρήση συνδιαλυτών

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της Υ.Ε. είναι η εκλεκτικότητα που παρουσιάζει, δηλαδή η διαφορετική διαλυτική ικανότητά του σε συνάρτηση με τις συνθήκες εκχύλισης, τις αλληλεπιδράσεις του με τις προς εκχύλιση ουσίες καθώς και τη χημική δομή των τελευταίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η απομάκρυνση π-υδροβενζοϊκού οξέος από μίγμα με βενζοϊκό οξύ. Η παραλαβή του π-υδροβενζοϊκού οξέος ευνοείται σε συγκεκριμένες συνθήκες λόγω της παρουσίας φαινολικής υδροξυλομάδας στο μόριό του.

Ο σημαντικότερος παράγοντας ο οποίος συμβάλλει στην εκλεκτικότητα του CO<sub>2</sub> είναι η ικανότητα του να μεταβάλλει την πυκνότητά του σε σχέση με την πίεση και τη θερμοκρασία, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3, Εικόνα 4).

Πίνακας 3. Μεταβολή της πυκνότητας του CO<sub>2</sub> συναρτήσει θερμοκρασίας και πίεσης

T, °C/P, bar	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
0	0.997	1.005	1.012	1.020	1.027	1.033	1.039	1.045	1.051	1.057
5	0.964	0.973	0.982	0.990	0.998	1.006	1.013	1.020	1.026	1.032
10	0.929	0.940	0.950	0.959	0.968	0.977	0.985	0.992	1.000	1.007
15	0.891	0.904	0.916	0.927	0.937	0.946	0.955	0.964	0.972	0.980
20	0.849	0.865	0.879	0.891	0.903	0.914	0.925	0.934	0.943	0.952
25	0.803	0.822	0.839	0.854	0.868	0.880	0.892	0.903	0.913	0.923
30	0.751	0.775	0.796	0.814	0.830	0.845	0.858	0.870	0.882	0.893
35	0.692	0.723	0.749	0.770	0.790	0.807	0.822	0.836	0.849	0.862
40	0.685	0.665	0.698	0.724	0.747	0.767	0.785	0.801	0.816	0.829
50	0.504	0.584	0.583	0.622	0.655	0.682	0.705	0.726	0.745	0.762
55	0.397	0.467	0.524	0.569	0.606	0.637	0.664	0.687	0.708	0.727
60	0.359	0.436	0.469	0.518	0.559	0.593	0.623	0.648	0.671	0.692
65	0.317	0.371	0.423	0.472	0.514	0.550	0.582	0.610	0.635	0.657
70	0.294	0.347	0.386	0.431	0.473	0.511	0.544	0.573	0.600	0.623
75	0.274	0.314	0.357	0.398	0.438	0.475	0.508	0.539	0.566	0.591
80	0.248	0.265	0.332	0.371	0.408	0.443	0.476	0.506	0.534	0.560
85	0.244	0.279	0.318	0.358	0.399	0.438	0.474	0.507	0.537	0.563
90	0.232	0.265	0.299	0.336	0.373	0.410	0.445	0.477	0.507	0.534
100	0.214	0.242	0.271	0.301	0.333	0.365	0.396	0.426	0.455	0.482



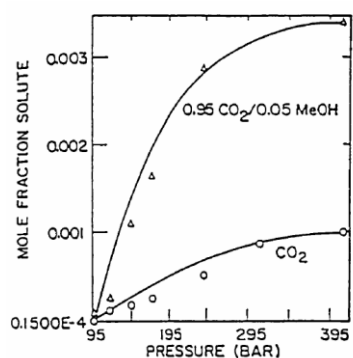
Εικόνα 4. Μεταβολή της πυκνότητας CO<sub>2</sub> συναρτήσει θερμοκρασίας και πίεσης

Έτσι, γνωρίζοντας τη διαλυτική ικανότητα ορισμένων ουσιών σε συγκεκριμένες τιμές πυκνότητας CO<sub>2</sub> μπορούμε να επιτύχουμε επιλεκτική εκχύλιση συστατικών καθώς και κλασμάτωση του εκχυλίσματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εκχύλιση για την παραλαβή αιθερίων ελαίων, όπου με την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών στους διαχωριστήρες είναι δυνατή η συλλογή στον ένα διαχωριστήρα των μη πτητικών συστατικών (λιπαρά και κηροί) ενώ στον άλλο του καθαρού αιθέριου ελαίου [14],[15].

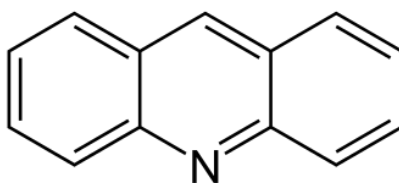
Ωστόσο, επειδή το CO<sub>2</sub> είναι άπολος διαλύτης με πολικότητα παρόμοια αυτής του κυκλοεξανίου, η εκχυλιστική του ικανότητα περιορίζεται στα μη πολικά μόρια (π.χ. λιπαρά οξέα, τερπένια, απλές φαινόλες κ.α.). Αύξηση της πολικότητάς του και συνεπώς της διαλυτικής του ικανότητας είναι δυνατό να επιτευχθεί με τη χρήση συνδιαλυτών. Οι συνδιαλύτες είναι ουσίες μικρού μοριακού βάρους που προστίθενται στο υπερκρίσιμο ρευστό σε μικρές ποσότητες και συντελούν στη σημαντική αύξηση της διαλυτικής του ικανότητας.

Η επίδρασή τους στη διαδικασία εκχύλισης βασίζεται στην έντονη αλληλεπίδραση που εμφανίζουν με τα μόρια της διαλυμένης ουσίας (*ηλεκτροστατικές δυνάμεις διασποράς, διπόλου-διπόλου και διπόλου-επαγόμενου διπόλου, δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις οξέων-βάσεων κατά Lewis*) και το αποτέλεσμα της χρήσης τους είναι η αύξηση της απόδοσης, οι μικρότερες απαιτήσεις σε κατανάλωση διαλυτών και η χρήση λιγότερης ενέργειας.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5) φαίνεται η αύξηση στη διαλυτότητα της ακριδίνης (Εικόνα 6) τόσο με την αύξηση της πίεσης αλλά κυρίως με τη χρήση μεθανόλης ως συνδιαλύτη. Παρατηρούμε χαρακτηριστικά ότι η προσθήκη 5% μεθανόλης στο υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> αυξάνει τη διαλυτότητα της σχεδόν 4 φορές.



Εικόνα 5 Διαλυτότητα της ακριδίνης σε υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> στους 50 °C με και δίχως χρήση μεθανόλης ως συνδιαλύτη



Εικόνα 6. Χημικός τύπος ακριδίνης

## 1.6 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα υπερκρίσιμης εκχύλισης με CO<sub>2</sub>

Το βασικότερο ίσως πλεονέκτημα της Υ.Ε. έναντι άλλων μεθόδων με οργανικούς διαλύτες (υδροαπόσταξη, κλασική εκχύλιση, εκχύλιση Soxhlet κ.α.), είναι οι ηπιότερες συνθήκες λειτουργίας, που λόγω του ότι είναι πιο κοντά στις θερμοκρασίες περιβάλλοντος γίνεται πλέον δυνατή η παραλαβή θερμοευαίσθητων συστατικών (π.χ. αιθέριων ελαίων, βιταμινών, ενζύμων, αντιοξειδωτικών κ.α.) όπου με τις παραδοσιακές μεθόδους θα ήτο δύσκολη ή ακόμη και αδύνατη. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης (CO<sub>2</sub>) είναι πτητικός και με μία απλή πτώση του συστήματος, απομακρύνεται ως αέριο από τη διεργασία αφήνοντας ένα καθαρό τελικό προϊόν το οποίο δεν υφίσταται καμία επιπλέον θερμική καταπόνηση για την απομάκρυνση του διαλύτη. Έτσι λοιπόν, από τα παραπάνω αντιλαμβάνεται κανείς ότι ο συνδυασμός των δύο προηγούμενων πλεονεκτημάτων οδηγεί σε χαμηλότερες καταναλώσεις ενέργειας, οι οποίες μπορούν να φτάσουν και το 50% για τις περιπτώσεις εκχύλισης αιθερίων ελαίων με υδραπόσταξη [4].

Επίσης, στα θετικά της τεχνικής συγκαταλέγεται και το γεγονός ότι έχει μειωμένο μικροβιακό φορτίο και ότι το υλικό που παραμένει μετά το πέρας της εκχύλισης παραμένει αναλλοίωτο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω εκχυλίσεις και μελέτες με άλλες τεχνικές.

Ωστόσο, ορισμένα χαρακτηριστικά της Υ.Ε. αποτελούν ταυτόχρονα και μειονεκτήματά της, τα οποία εμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή της. Το βασικότερο εξ' αυτών αποτελεί η υψηλή πίεση λειτουργίας που συχνά ξεπερνά τα 300 bar, η οποία συνεπάγεται υψηλό πάγιο κόστος και ασυνεχή λειτουργία, ειδικά στις περιπτώσεις εκχύλισης στερεών υποστρωμάτων.

Τέλος, σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι η επιλογή των συνθηκών εκχύλισης γίνεται τις περισσότερες φορές εμπειρικό με τρόπο, αφού δεν υπάρχουν αξιόπιστα θερμοδυναμικά μοντέλα προσομοίωσης τα οποία να επιτρέπουν την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας χωρίς την ανάγκη χρονοβόρων πειραμάτων [1].

Πίνακας 4. Πλεονεκτήματα - μειονεκτήματα υπερκρίσιμης εκχύλισης

<i>Πλεονεκτήματα</i>	<i>Μειονεκτήματα</i>
Εύκολος διαχωρισμός ουσιών	Υψηλό πάγιο κόστος
Χαμηλές θερμοκρασίες	Υψηλές πιέσεις
Μη τοξικοί διαλύτες	Εμπειρική επιλογή συνδιαλυτών
Εκλεκτικότητα	Ασυνεχής λειτουργία
Μη εύφλεκτοι διαλύτες	Έλλειψη μαθηματικού μοντέλου πρόρρησης

## 1.7 Εφαρμογές υπερκρίσιμης εκχύλισης

Από την πρώτη εφαρμογή της Υ.Ε. μέχρι και σήμερα, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη θεμελίωση της ως μία βιώσιμη και προσοδοφόρα μέθοδο και λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει, είναι αρκετοί οι τομείς στους οποίους έχει βρει το δρόμο προς τη βιομηχανική παραγωγή, μερικοί από τους οποίους παρουσιάζονται στη συνέχεια.

### ❖ Παραλαβή αιθέριων ελαίων

Η Υ.Ε. με CO<sub>2</sub>, λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του διαλύτη, αποτελεί ιδανική διεργασία για την παραλαβή αιθέριων ελαίων. Το έλαιο το οποίο λαμβάνεται από μια τέτοια διεργασία, είναι ποιοτικά ανώτερο συγκρινόμενο με αυτό των συμβατικών τεχνικών, λόγω των ηπιότερων συνθηκών εκχύλισης (συνθήκες οι οποίες δεν ξεπερνούν τους 50 °C και τα 100bar). Οι συνθήκες αυτές δεν ευνοούν την καταστροφή των θερμοευαίσθητων συστατικών, με αποτέλεσμα το άρωμα του τελικού προϊόντος να είναι πιο κοντά και να θυμίζει περισσότερο αυτό του φρέσκου φυτού. Επιπλέον, επειδή η Υ.Ε. αποτελεί διεργασία εκχύλισης και όχι απόσταξης, εκχυλίζονται ταυτόχρονα και άλλα, πιο δραστικά συστατικά με



σημαντικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα το έλαιο που παραλαμβάνεται να είναι και πιο δραστικό.

Μερικά από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα εκχύλισης αιθερίων ελαίων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα [2],[16],[17].

Πίνακας 5. Παραδείγματα βιομηχανικής εφαρμογής αιθερίων ελαίων

Εκχύλισμα	Φυτό	Εφαρμογή
Ginger oil	<i>Zingiber officinalis</i>	Στη μαγειρική και στην παρασκευή αναψυκτικών
Pimento berry oil	<i>Pimenta officinalis</i>	Σε προϊόντα μαγειρικής και σε προϊόντα στοματικής υγιεινής
Clove bud oil and oleoresin	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Σε τρόφιμα και προϊόντα στοματικής υγιεινής
Nutmeg oil	<i>Myristica fragrans</i>	Σε προϊόντα μαγειρικής και χυμούς λαχανικών
Juniper berry oil	<i>Juniperus officinalis</i>	Σε αλκοολούχα ποτά
Celery seed oil	<i>Apium graveolens</i>	Σε προϊόντα μαγειρικής και χυμούς λαχανικών (χυμός τομάτας)
Vanilla absolute	<i>Vanilla fragrans</i>	Σε λικέρ και σε γαλακτοκομικά προϊόντα
Cardamom oil	<i>Elletaria cardamomum</i>	Σε μείγματα μπαχαρικών
Aniseed oil	<i>Illicium verum</i>	Σε λικέρ και σε προϊόντα στοματικής υγιεινής
Coriander oil	<i>Coriander sativum</i>	Στο curry, στη σοκολάτα και σε γεύσεις φρούτων
Pepper oleoresin and oil	<i>Piper nigrum</i>	Σε μπαχαρικά, σε τρόφιμα και σε προϊόντα μαγειρικής
Cinnamon bark oil	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Σε προϊόντα αρτοποιίας
Cumin oil	<i>Cuminum cyminum</i>	Σε φαρμακευτικά προϊόντα
Marjoram oil	<i>Majorana hortensis</i>	Σε προϊόντα μαγειρικής
Savory oil	<i>Satureja hortensis</i>	Σε προϊόντα μαγειρικής
Rosemary oil	<i>Rosemary officinalis</i>	Ως αντιοξειδωτικά
Sage oil	<i>Salvia officinalis</i>	Σε τρόφιμα και σε προϊόντα μαγειρικής
Thyme oil	<i>Thymus vulgaris</i>	Σε τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα
Paprika color (oleoresin)	<i>Capsicum annum</i>	Σε προϊόντα μαγειρικής και σε προϊόντα αρτοποιίας

#### ❖ Παρασκευή ελαίων με θερμοευαίσθητα συστατικά

Η χρήση του λυκίσκου στη ζυθοποιία είναι γνωστή από αρχαιοτάτων χρόνων. Χρησιμοποιείται για να δώσει άρωμα και γεύση στην μύρα εξισορροπώντας την γλυκιά γεύση της βύνης με την πικράδα του.

Το πρόβλημα με το φυτό βρίσκεται στα στάδια αποθήκευσης και επεξεργασίας του. Ορισμένα συστατικά του είναι πολύ ευαίσθητα στη θερμοκρασία και η μη προσεκτική συντήρησή του μπορεί να οδηγήσει στη σημαντική απώλεια πτητικών συστατικών, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη γεύση του τελικού προϊόντος. Αυτό σημαίνει ότι οι κλασικές τεχνικές εκχύλισης (υδροαπόσταξη, εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες κ.α.), λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που εφαρμόζουν, ενέχουν υψηλό κίνδυνο ποιοτικής υποβάθμισης του παραγόμενου ελαίου.

Η τεχνική της Υ.Ε. αποτέλεσε μια καλή εναλλακτική μέθοδο σε αυτόν τον τομέα καθώς οι ήπιες συνθήκες λειτουργίας της είναι ιδανικές για την παραγωγή ενός υψηλής ποιότητας ελαίου.

Η εμπορική επιτυχία της μεθόδου φαίνεται από το γεγονός ότι στις Η.Π.Α. χρησιμοποιείται από τη δεκαετία του '80 και έχει ουσιαστικά αντικαταστήσει την παραδοσιακή εκχύλιση του λυκίσκου με οργανικούς διαλύτες [18],[19].

#### ❖ Παρασκευή βιοδραστικών εκχυλισμάτων από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά

Τα φαρμακευτικά φυτά, ολόκληρα ή τμήματά τους (άνθη, φύλλα, καρποί, ρίζες κ.ά.), διαθέτουν αξιοσημείωτες βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις οι οποίες βοηθούν στην παρεμπόδιση της εκδήλωσης ή/και στην αντιμετώπιση ασθενειών, θωρακίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, δικαιολογημένα τις τελευταίες δεκαετίες η φυτοθεραπεία βρίσκει ολοένα και μεγαλύτερη αποδοχή από το καταναλωτικό κοινό, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται ένα αυξημένο ενδιαφέρον και από τον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων φυτικής προέλευσης.

Με βάση τα προαναφερόμενα γίνεται εύκολα αντιληπτό το γεγονός ότι η Υ.Ε. με CO<sub>2</sub> έχει βρει πολλές εφαρμογές στην ανάκτηση μεγάλου αριθμού βιολογικά δραστικών εκχυλισμάτων και απομονωμένων ουσιών από μία μεγάλη ποικιλία φαρμακευτικών φυτών, μερικές από τις οποίες φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Δράσεις και δραστικά συστατικά φυτικών εκχυλισμάτων

Φυτό	Ιδιότητες
<i>Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis, Matricaria chamomilla, Apium petroselinum, Salvia officinalis, Oreganum virens, Eucalyptus globulus</i> κ.α.	Αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση
<i>Calendula officinalis, Chrysanthemum parthenium, Cnicus benedictus</i> κ.α.	Αντιφλεγμονώδης δράση (λόγω σεσκιτερπενικών-γ-λακτονών)
<i>Crotalaria Spectabilis, Maytenus senegalensis, Danggui Longhui Wan</i>	Αλκαλοειδή με αντικαρκινική δράση
<i>Geranium maculatum, Filipendula ulmaria, Rubus idaeus, Ribes rubrum</i>	Πολυφαινόλες με δράση κατά της καρκινογένεσης (πχ. γαλλικό οξύ)
<i>Camellia assamica, Camellia sinensis</i>	Φλαβονοειδή, κατεχίνες
<i>Oenothera blennies, Oenothera lamariciana</i>	γ-λινολειακό οξύ
<i>Humulus lupulus</i>	Χουμουλόνες, λουπουλόνες (humulones, lupulones), φλαβονοειδή και αιθέριο έλαιο
<i>Coffea Arabica, Camellia sinensis</i>	Απομάκρυνση καφεΐνης
<i>Calendula officinalis, Matricaria chamomilla, Piper nigrum, Zingiber officinale</i>	Ελαιορητίνες (Oleo-resin)
<i>Echinacea purpurea</i>	Πολυφαινόλες
<i>Eucalyptus spp. Mentha spp, Origanum spp, Levisticum officinale, Salvia desoleana</i>	Αιθέρια έλαια
<i>Ginkgo biloba</i>	Γλυκοσίδες φλαβονόλων και τερπένια
<i>Hypericum perforatum</i>	Ναφθοδιανθόνες, υπερικίνη και ψευδοπερικίνη
<i>Piper methysticum</i>	Καβαλακτόνες
<i>Solanum lycopersicum</i> (καρποί και φλούδες)	Καροτενοειδή, τοκοφερόλες, λυκοπένιο και σιτοστερόλη
<i>Taxus brevifolia</i>	Ταξόλη
<i>Taxus cuspidate</i>	Paclitaxel and baccatin III
<i>Vitis vinifera</i>	Προκυανιδίνες
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	Καροτενοειδή
<i>Bixa Orellana</i>	Μπιξίνη

\* [20],[21],[22],[23]

❖ **Απομάκρυνση ανεπιθύμητων ή επιβλαβών ουσιών από προϊόντα ευρείας κατανάλωσης**

- **Απομάκρυνση νικοτίνης από τον καπνό**

Οι αρνητικές επιπτώσεις της νικοτίνης στην ανθρώπινη υγεία είναι γνωστές και κατά καιρούς έχουν γίνει πολλές προσπάθειες απομάκρυνσής της από τα προϊόντα του

καπνού. Η συνηθέστερα εφαρμοζόμενη τεχνική μέχρι σήμερα, ήταν η απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation), η οποία αν και οδηγεί σε καλά αποτελέσματα όσον αφορά την απομάκρυνση της νικοτίνης, αλλοιώνει τη γεύση του καπνού, με αποτέλεσμα την ποιοτική υποτίμηση του προϊόντος. Η απομάκρυνση της έγινε δυνατή με τη χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub>, το οποίο λόγω της εκλεκτικής διαλυτικής του ικανότητας μπορεί να απομακρύνει έως και το 98% της νικοτίνης αφήνοντας αναλλοίωτη τη γεύση του καπνού.

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της διαδικασίας είναι ότι λειτουργεί σε ένα πλήρως κλειστό κύκλωμα (ισοβαρής διεργασία), με τη συλλογή της νικοτίνης να μην γίνεται μέσω κάποιας εκτόνωσης στο σύστημα, αλλά μέσω της προσρόφησης της σε ένα μέσο παγίδευσης, το οποίο μπορεί να είναι είτε κάποιο διαλυτικό μέσο (π.χ. νερό, αλκοόλη), είτε ενεργός άνθρακας. Αυτή η διαδικασία προσφέρει επίσης και το πλεονέκτημα της μειωμένης κατανάλωσης CO<sub>2</sub> [24],[25].

- **Απομάκρυνση καφεΐνης από καφέ και τσάι**

Μία πολύ σημαντική εφαρμογή της Υ.Ε. σε βιομηχανικό επίπεδο είναι η απομάκρυνση της καφεΐνης από τον καφέ και το τσάι. Με κατάλληλες συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας και συνδιαλύτη είναι δυνατή η ποσοτική απομάκρυνση της καφεΐνης από τους κόκκους του καφέ ή το τσάι και η ποσοτική συλλογή της στους διαχωριστήρες.

Η διαδικασία αυτή έχει διπλό όφελος διότι εκτός από το υπόλειμμα της εκχύλισης το οποίο αποτελεί ένα προϊόν με μεγάλη εμπορική αξία, παραλαμβάνεται και το εκχύλισμα της διαδικασίας καφεΐνη, η οποία είναι ένα προϊόν με υψηλή ζήτηση τόσο στη φαρμακοβιομηχανία όσο και στη βιομηχανία συμπληρωμάτων διατροφής [26],[27],[28]. Η εμπορική αξία μιας τέτοια διεργασίας είναι τόσο μεγάλη, ώστε δικαιολογείται το γεγονός να έχουν γίνει σήμερα μεγάλες επενδύσεις σε εκχυλιστήρες εκατοντάδων ή και χιλιάδων λίτρων, με τον μεγαλύτερο να φθάνει τα 40000 lt.

### ❖ Κατεργασία αποβλήτων και απομάκρυνση τοξικών ουσιών

Τα υδατικά απόβλητα και τα εδάφη που είναι μολυσμένα με τοξικές ουσίες αποτελούν ιδιαίτερο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την αντιμετώπιση του προβλήματος είναι: ταφή, αποτέφρωση, θερμική εκρόφηση, κατεργασία με οργανικούς διαλύτες, χημική οξειδωση, η *in-situ* και *ex-situ* κατεργασία, ακόμα και ο αποκλεισμός ολόκληρης της περιοχής.

Η εφαρμογή των κλασικών μεθόδων είναι ακόμα περιορισμένη λόγω πολλών λειτουργικών προβλημάτων. Παραδείγματος χάριν, η ταφή είναι απλή και φτηνή διεργασία, αλλά λόγω των νέων αυστηρότερων κανονισμών και του κινδύνου μόλυνσης των υπογείων νερών, τείνει να εγκαταλειφθεί και να αντικατασταθεί από άλλες περιβαλλοντικά ορθότερες διεργασίες. Η αποτέφρωση είναι μία αποτελεσματική μέθοδος, παρουσιάζει ωστόσο προβλήματα εξαιτίας της μεγάλης ενεργειακής κατανάλωσης, αλλά και της δυσκολίας διαθέσεως των στερεών υπολειμμάτων και των παραγόμενων αερίων. Η απόσταξη αποτελεί μια ιδιαίτερα ενεργοβόρα διεργασία, ειδικά για αραιά διαλύματα, ενώ η εκχύλιση με υγρούς διαλύτες είναι μία ήπια τεχνική που έχει περιορισμένη εφαρμογή, γιατί ένα μέρος του διαλύτη παραμένει στο επεξεργασμένο νερό [29],[30].

Η τεχνική της Υ.Ε. αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματική σε αυτόν τον τομέα. Με τη χρήση διαλυτών σε υπερκρίσιμες συνθήκες (με παρουσία συνδιαλύτη ή μη) είναι δυνατή η απομάκρυνση των τοξικών ουσιών με υψηλά ποσοστά ανάκτησης.

### ❖ Άλλες εφαρμογές υπερκρίσιμης εκχύλισης

Άλλες διεργασίες στις οποίες έχει βρει εφαρμογή η Υ.Ε. είναι: η παρασκευή εκχυλισμάτων από φρούτα, η παραγωγή φυσικών χρωστικών, η παραγωγή βιοντίζελ [31],[32], η χρήση σε χρωματογραφικές αναλύσεις [33],[34], η επαιξεργασία πολυμερών [35] κ.α.. Επίσης, μεταξύ των πιο σύγχρονων εφαρμογών της Υ.Ε. περιλαμβάνονται διαδικασίες αποστείρωσης επιδερμικού υλικού, καθαρισμός επιφανειών και εργαλείων, ανακρυστάλλωση και μορφοποίηση τελικών προϊόντων [36],[37] καθώς και εφαρμογές σε χημικές αντιδράσεις [2],[16].

## **2 Επιταχυνόμενη εκχύλιση**

### **2.1 Γενικά στοιχεία**

Η επιταχυνόμενη εκχύλιση (Accelerated Solvent Extraction - ASE) αποτελεί μία ημιαυτοματοποιημένη διαδικασία παραλαβής εκχυλισμάτων από στερεά και ημιστερεά δείγματα, η οποία κάνει χρήση υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων με σκοπό την ταχύτερη παραλαβή των επιθυμητών συστατικών.

Οι πιέσεις που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται από 500 έως και τα 3000 p.s.i., ενώ οι θερμοκρασίες από 50 °C έως και 200 °C. Οι υψηλές τιμές των παραμέτρων αυτών έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση του συντελεστή διάχυσης του διαλύτη, τη διάλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων του φυτού και κατ' επέκταση την αύξηση της απόδοσης της εκχυλιστικής διαδικασίας. Επιπλέον, προσφέρει σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης αλλά και στην κατανάλωση διαλυτών [38].

Επίσης, λόγω των υψηλών πιέσεων προκαλείται ανύψωση του σημείου ζέσης του διαλύτη και καθίστανται δυνατές οι εκχυλίσεις σε θερμοκρασίες υψηλότερες του σημείου βρασμού, με άμεση συνέπεια την ακόμα μεγαλύτερη ανάκτηση εκχυλιζόμενων συστατικών.

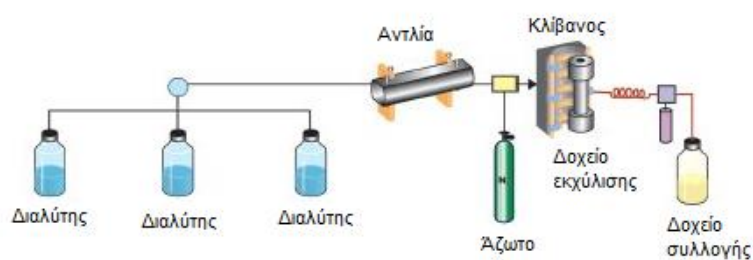
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία εφαρμογή της επιταχυνόμενης εκχύλισης η οποία είναι γνωστή ως εκχύλιση με υποκρίσιμο ή υπέρθερμο νερό (SCW). Η εφαρμογή αυτή παρουσιάζει ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζει (διεξοδική αναφορά στο Κεφάλαιο 2.2.3).

### **2.2 Περιγραφή της εκχυλιστικής διαδικασίας**

Το προς εκχύλιση δείγμα εισάγεται σε ειδικά δοχεία εκχύλισης, τα οποία με τη σειρά τους τοποθετούνται εντός της συσκευής. Στη συνέχεια, επιλέγονται οι συνθήκες (διαλύτης, θερμοκρασία και χρόνος εκχύλισης) και το δείγμα φέρεται εντός του κλιβάνου όπου και θερμαίνεται, ενώ ταυτόχρονα πληρώνεται με το διαλύτη έως ότου η πίεση στο δοχείο εκχύλισης φτάσει τα 1500 p.s.i.. Στη συνέχεια ακολουθεί η φάση της στατικής εκχύλισης, μετά το πέρας της οποίας, το εκχύλισμα

απελευθερώνεται από το κάτω μέρος του δοχείου, από όπου και φιλτράρεται αυτόματα και εν συνεχεία συλλέγεται στα αντίστοιχα δοχεία συλλογής. Το στάδιο αυτό μπορεί να επαναληφθεί όσες φορές είναι επιθυμητό, μέχρι εξάντλησης των επιθυμητών συστατικών. Στη συνέχεια, ακολουθεί το στάδιο έκπλυσης ή *flushing*, όπου διοχετεύεται νέα ποσότητα διαλύτη, με συνεχή ροή εντός του δοχείου εκχύλισης για το ξέπλυμα αυτού αλλά και των σωληνώσεων. Αφότου ολοκληρωθεί το στάδιο αυτό, διοχετεύεται ποσότητα αζώτου υπό πίεση για 60 sec (στάδιο εξώθησης διαλύτη ή *purging*) με σκοπό την απομάκρυνση ολόκληρης της ποσότητας του διαλύτη που πιθανόν να βρίσκεται εγκλωβισμένη μέσα στους πόρους του δείγματος.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η διαγραμματική απεικόνιση της διεργασίας εκχύλισης (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχεδιάγραμμα επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE)

### 2.2.1 Εφαρμογές

Η διεργασία της επιταχυνόμενης εκχύλισης έχει πολυάριθμες εφαρμογές σε ερευνητικό και εργαστηριακό επίπεδο. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή της σε βιομηχανικό επίπεδο είναι αρκετά περιορισμένη, τουλάχιστον με τη μορφή που έχει περιγραφεί παραπάνω.

Μερικές από τις πιο γνωστές εφαρμογές της τεχνικής στα τμήματα ελέγχου και ανάπτυξης των βιοτεχνιών και βιομηχανιών σχετίζονται με:

- Τη βιομηχανία τροφίμων: στην απομάκρυνση λιπαρών από κρέας, στην εκχύλιση των υπολειμματικών σακχάρων από φυτικά υλικά, στον προσδιορισμό λιπιδίων ύστερα από όξινη υδρόλυση, σε γαλακτοκομικά προϊόντα και διάφορα snacks, στον προσδιορισμό προσθήκης λιπαρών ή άλλων πρόσθετων σε προϊόντα

και στην ταυτοποίηση αρωματικών και προσθετικών γεύσης που υπάρχουν σε προϊόντα διατροφής [39].

- Τη φαρμακοβιομηχανία: για τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των δρογών, καθώς και την παρακολούθηση των επιπέδων των δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά σκευάσματα με σκοπό τον έλεγχο σταθερότητάς τους.

- Τις χημικές - πετροχημικές βιομηχανίες: στη βιομηχανία παραγωγής πολυμερών για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση της δομής των πολυμερών μέσω της εκχύλισης των πλαστικοποιητών που περιέχονται στο PVC [39], στην απομάκρυνση πολυπροπυλενίου και πολυαιθυλενίου που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σταθεροποιητών UV και αντιοξειδωτικών παραγόντων καθώς και στην εκχύλιση ελαίων και οργανικών οξέων από τα πολυμερή στυρενίου – βουταδιενίου.

- Τον τομέα παραγωγής εκχυλισμάτων: για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής [39].

### **2.2.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της επιταχυνόμενης εκχύλισης**

Η επιταχυνόμενη εκχύλιση παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών τεχνικών εκχύλισης, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω:

- Έχει σημαντικά μειωμένη κατανάλωση διαλυτών σε ποσοστά που φτάνουν μέχρι και το 50% σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές.
- Παρέχει σταθερή ποιοτική και ποσοτική σύσταση των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων λόγω των καθορισμένων συνθηκών εκχύλισης.
- Παρουσιάζει υψηλές αποδόσεις και πολύ καλή ανάκτηση δραστικών συστατικών.
- Παρέχει τη δυνατότητα χρήσης διαφορετικών διαλυτών και ανάμειξής τους σε οποιαδήποτε αναλογία.
- Υπάρχει η δυνατότητα εναλλαγής διαλυτών ανάμεσα στις εκχυλίσεις με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ταχεία και διαδοχική εκχύλιση ενός ή περισσότερων δειγμάτων με διαφορετικούς διαλύτες.
- Είναι ιδιαίτερα γρήγορη διαδικασία με μειωμένους χρόνους εκχύλισης.
- Υπάρχει η δυνατότητα εκχύλισης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα.
- Επικρατούν αδρανείς και μη οξειδωτικές συνθήκες λόγω χρήσης αδρανούς αερίου (π.χ. N<sub>2</sub> ή Arg).



- Λόγω εφαρμογής υψηλών πιέσεων είναι δυνατή η χρήση θερμοκρασιών υψηλότερων του σημείου ζέσης του διαλύτη από αυτό σε ατμοσφαιρικές συνθήκες.
- Αποτελεί μια ημιαυτοματοποιημένη διαδικασία με εύκολο προγραμματισμό.
- Και τέλος, εξ αιτίας του γεγονότος ότι το σύστημα είναι κλειστό παρέχει μεγάλη ευελιξία στην επιλογή διαλυτών όπου με τις συμβατικές τεχνικές η χρήση τους θα ήταν επικίνδυνη [40].

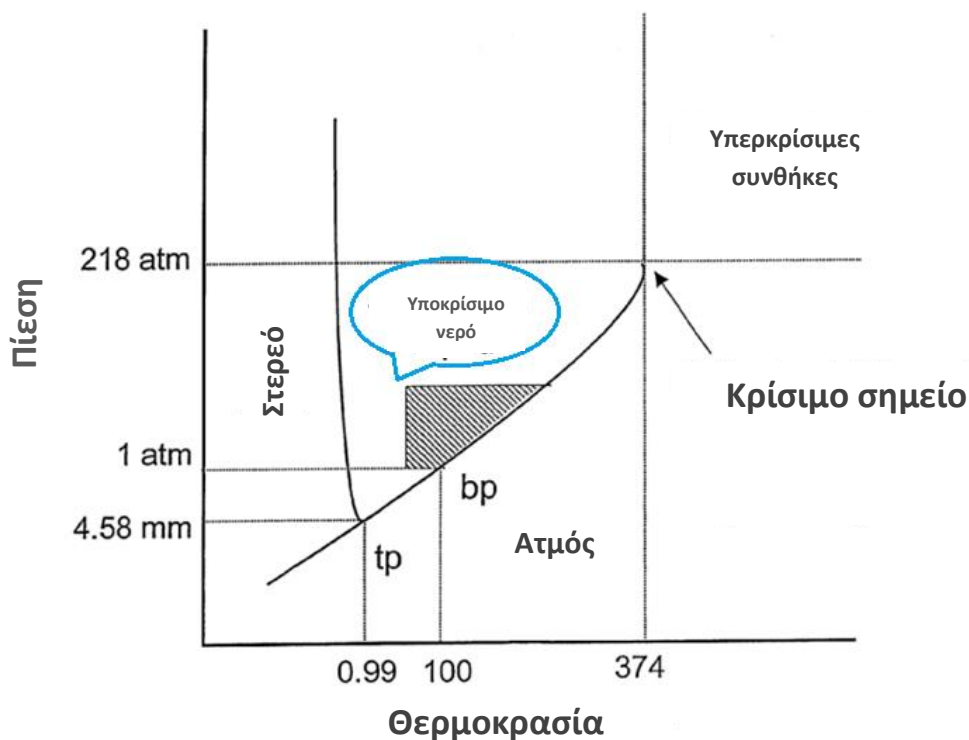
Η τεχνική αυτή αποτελεί μια εύκολη, γρήγορη και αποδοτική μέθοδο με πολλά πλεονεκτήματά, τα οποία την έχουν καθιερώσει ως μια αναντικατάστατη τεχνική στο χώρο παραγωγής εκχυλισμάτων. Τα μόνα σημεία στα οποία μειονεκτεί η τεχνική, σε σύγκριση με τις κλασικές τεχνικές εκχύλισης, είναι το αυξημένο κόστος της συσκευής, ο κίνδυνος αλλοίωσης των συστατικών τα οποία είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία [41], αλλά και το γεγονός ότι απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο συμπύκνωσης για την παραλαβή του τελικού εκχυλίσματος και αφορά την απομάκρυνση του χρησιμοποιούμενου διαλύτη (μειονέκτημα σε σύγκριση με την υπερκρίσιμη εκχύλιση). Τέλος είναι απαγορευτική για τη διεργασία η χρήση διαλυτών με χαμηλά σημεία αυτανάφλεξης (π.χ. αιθέρων) λόγω του αυξημένου κινδύνου που υπάρχει, εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων που επικρατούν εντός της συσκευής.

### 2.2.3 Εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό

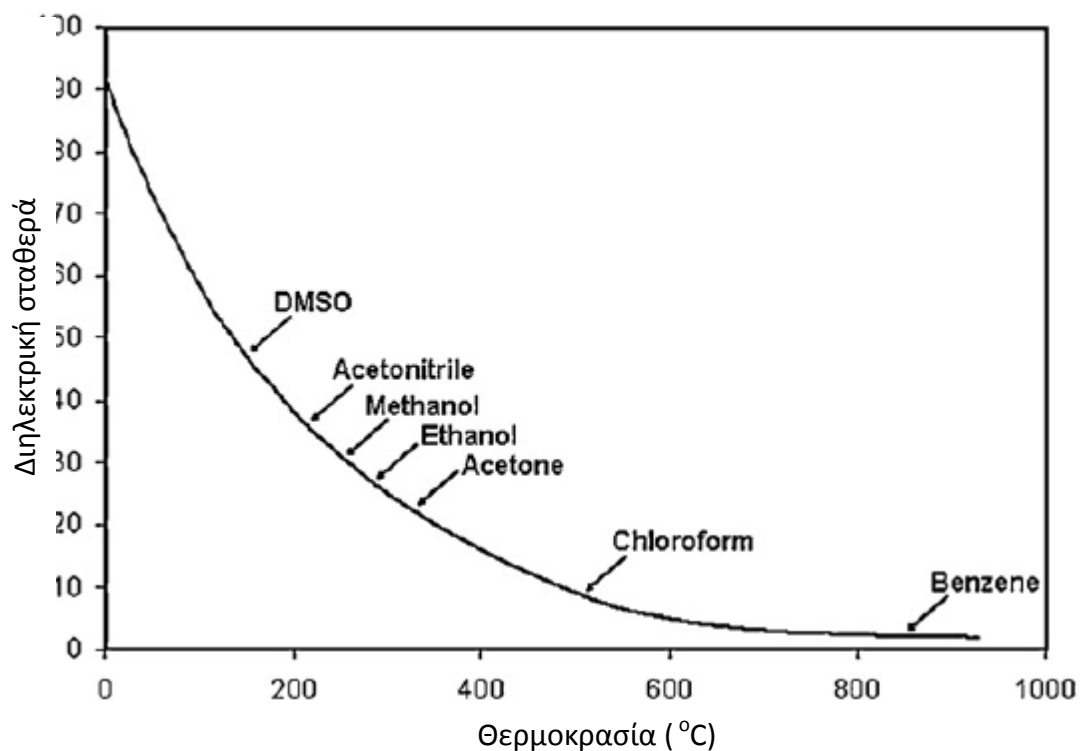
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (Κεφάλαιο 2.1), μία σημαντική εφαρμογή της επιταχυνόμενης εκχύλισης είναι η χρήση της για την εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό (SCW). Μια διεργασία η οποία βασίζεται στην εκχύλιση με νερό σε υψηλές θερμοκρασίας και πιέσεις, η οποία κερδίζει όλο και περισσότερο επιστημονικό και πρακτικό ενδιαφέρον.

Συγκεκριμένα, ως υποκρίσιμο νερό (subcritical water – SCW) ορίζεται το νερό που βρίσκεται υπό πίεση σε θερμοκρασίες μεταξύ 100 °C και 374 °C [42] (Εικόνα 8) και είναι γνωστό και ως «σχεδόν κρίσιμο νερό» (near critical), «υπέρθερμο νερό» (superheated water) και «ζεστό νερό υπό πίεση» (pressurized hot water). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του να βρεθεί ο διαλύτης (νερό) σε αυτή την κατάσταση είναι οι μεταβολές που παρατηρούνται στις ιδιότητές του.

Αναλυτικότερα λόγω της αυξημένης κινητικότητας των μορίων του νερού, παρατηρείται μείωση στην ισχύ των δεσμών υδρογόνου γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια τη σημαντική μείωση της πολικότητάς του. Η τιμή αυτή σχετίζεται άμεσα από τις συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας [43],[44]. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνει η θερμοκρασία τόσο μειώνεται η διηλεκτρική σταθερά του και κατ' επέκταση η πολικότητά του [45] (Εικόνα 9). Ως παράδειγματα, αναφέρουμε ότι η πολικότητα του νερού στους 100 °C γίνεται όμοια με αυτή του DMSO, στους 220 °C όμοια με αυτή της μεθανόλης, ενώ σε πιο ακραίες συνθήκες (πάνω από 800 °C) γίνεται όμοια με αυτή του βενζολίου [45].



Εικόνα 8. Διάγραμμα φάσεων νερού



Εικόνα 9. Μεταβολή διηλεκτρικής σταθεράς του νερού ως συνάρτηση της θερμοκρασίας

Εκμεταλλεούμενοι λοιπόν αυτήν την ιδιότητα, μπορούμε να επιτύχουμε την εκχύλιση μεγαλύτερου εύρους πολικότητας συστατικών έχοντας ως διαλύτη το νερό, των οποίων η εκχύλιση σε κανονικές συνθήκες δε θα ήτο εφικτή [46],[47].

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι ίδια με αυτή της επιταχυνόμενης εκχύλισης με την μόνη διαφορά να βρίσκεται στο γεγονός ότι το διαλυτικό μέσο που χρησιμοποιείται είναι το νερό και ότι οι θερμοκρασίες που εφαρμόζονται είναι υψηλότερες των 100 °C. Η πίεση που εφαρμόζεται από το σύστημα (1500 p.s.i) είναι υπεραρκετή ώστε να διατηρηθεί το νερό σε υποκρίσιμες συνθήκες, (η ελάχιστη πίεση που απαιτείται για να βρεθεί το νερό σε υποκρίσιμη κατάσταση στους 200 °C είναι 232 p.s.i).

Η χρήση της τεχνικής ήδη έχει βρει πληθώρα εργαστηριακών εφαρμογών ενώ τα τελευταία χρόνια αρχίζει να κερδίζει μεγαλύτερο έδαφος και σε βιομηχανικό επίπεδο, με πολλές εταιρίες να επενδύουν στην τεχνική, με τις περισσότερες εφαρμογές να προστατεύονται με αυστηρά σύμφωνα εχεμύθειας και πατέντες.

Η χρήση του της τεχνικής σε διεργασίες εκχύλισης παρουσιάζει ορισμένα πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα:

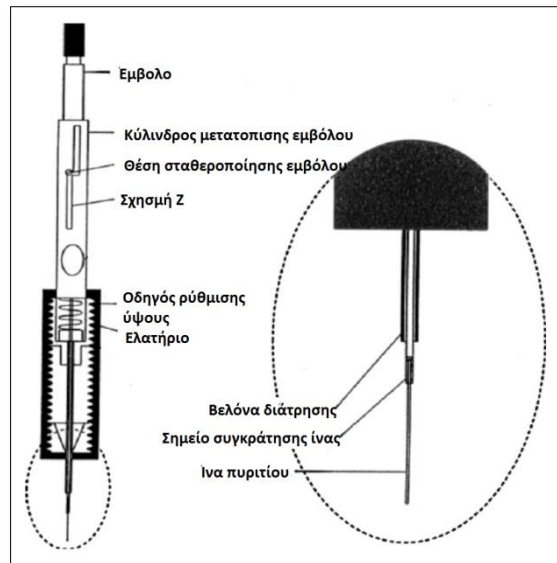
- Επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις
- Απαιτείται μειωμένος χρόνος εκχύλισης
- Χαρακτηρίζεται από μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και χαμηλά λειτουργικά κόστη [48]
- Μειώνεται η χρήση οργανικών διαλυτών
- Και τέλος, όλη η διαδικασία είναι φιλική προς το περιβάλλον

Μολονότι η τεχνική χαρακτηρίζεται από πολλά πλεονεκτήματα, θεωρείται πλήρως ακατάλληλη για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων συστατικών, ενώ μετά το πέρας της εκχύλισης, το υπόλειμμα έχει αλλοιωθεί σε βαθμό που να θεωρείται ακατάλληλο για περαιτέρω επεξεργασία.

Μερικά παραδείγματα αξιόλογων εφαρμογών της εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό είναι στην παραλαβή φαινολών, ανθρακινονών, ταννινών, φλαβονοειδών, λακτονών, καθώς και για την παραλαβή αιθέριων ελαίων από φυτά. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση της χρωστικής ίντιγκο από το φυτό *Isatis tinctora*, στη βιομηχανία των πολυμερών για την απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων και υπολειμματικών μονομερών, αλλά και στην βιομηχανία ελαστικών για τον αποβουλκανισμό.

### 3 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid phase microextraction - SPME) αποτελεί μια νέα μέθοδο μελέτης πτητικών συστατικών η οποία αναπτύχθηκε από τους Arthur & Pawliszyn το 1990. Στηρίζεται στην προσρόφηση των πτητικών συστατικών επάνω σε ένα προσροφητικό υλικό που βρίσκεται στην άκρη μιας διάταξης η οποία μοιάζει με μικροσύρριγα. [49], το ενεργό κομμάτι της οποίας βρίσκεται στο άκρο της και είναι μια λεπτή ίνα κατασκευασμένη από ένα φιλμ πυριτίου (fused silica fiber) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Συσκευή SPME

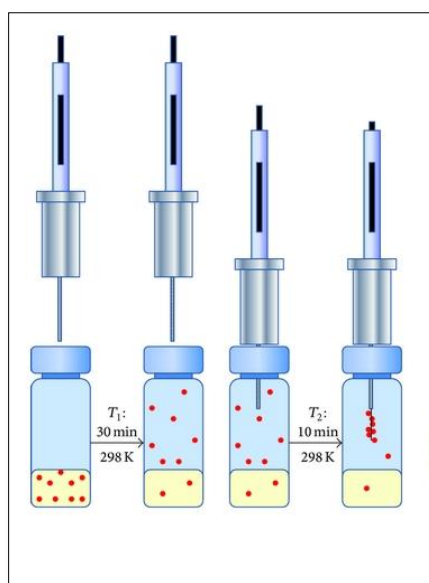
Η ίνα είναι προστατευμένη στην εξωτερική της επιφάνεια από μια βελόνα διάτρησης, η οποία είναι συνδεδεμένη σε ένα ασάλινο έμβολο επάνω σε μία συσκευή συγκράτησης (holder).

Η διαδικασία της δειγματοληψίας είναι ιδιαίτερα απλή και γρήγορη. Το δείγμα τοποθετείται εντός φιαλιδίου με διάτρητο πώμα, το οποίο σφραγίζεται με ένα διάφραγμα (septum). Πριν την ανάλυση, η ίνα πρέπει να καθαριστεί για την απομάκρυνση των προσμείξεων που προκαλούν θόρυβο στο χρωματογράφημα. Η εισαγωγή της ίνας στο δείγμα γίνεται τρυπώντας το διάφραγμα του δοχείου και πιέζοντας το έμβολο προς τα κάτω όπου και εκτίθεται η ίνα στον υπερκείμενο χώρο. Η ίνα παραμένει σε αυτήν την κατάσταση έως ότου επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ των πτητικών συστατικών και της στατικής προσροφητικής φάσης και εν συνεχεία αφαιρείται. Κατόπιν, τοποθετείται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου όπου λόγω της υψηλής θερμοκρασίας στο στόμιο εισόδου πτητικές οι ουσίες εκροφούνται και εισέρχονται στη χρωματογραφική στήλη από όπου και ακολουθεί η χρωματογραφική τους ανάλυση.

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία μελέτης των πτητικών συστατικών είναι:

- Ο τύπος της στατικής φάσης της ίνας
- Η εφαρμοζόμενη στο δείγμα θερμοκρασία
- Η ταυτόχρονη ανάδευση του δείγματος
- Ο όγκος του δείγματος

- Οι συνθήκες εκφόρτωσης του δείγματος
- Η ιοντική ισχύς και το pH



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση συσκευής μικροεκχύλισης

Η διαδικασία της δειγματοληψίας μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

- α) με εμβάπτιση της ίνας σε υγρά δείγματα (direct immersion DI-SPME)
- β) με προσρόφηση από τον υπερκείμενο αέριο χώρο πάνω από το δείγμα (headspace HS-SPME)

Η επιλογή του τρόπου γίνεται ανάλογα με το είδος του δείγματος, την πτητικότητα της αναλυόμενης ουσίας και τη συγγένεια της με το υπόστρωμα. Αναλυτικότερα, η τεχνική HS-SPME χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση πτητικών συστατικών, ενώ για λιγότερο πτητικές ή μη πτητικές εφαρμόζεται η τεχνική της άμεση εμβάπτισης. Συνήθως, η DI-SPME χρησιμοποιείται σε καθαρά διαλύματα, ενώ για πιο πολύπλοκα βιολογικά υλικά (π.χ. ούρα, πλάσμα, σίελος κ.α.) προτιμάται η εκχύλιση από τον υπερκείμενο χώρο.

### 3.1 Εφαρμογές της τεχνικής SPME

Η πρώτη εφαρμογή της τεχνικής ήταν επάνω στην ανάλυση ρύπων από υγρά απόβλητα, αλλά η ευελιξία και η ευκολία της χρήση της, γρήγορα συνέβαλαν στο να βρει εφαρμογές σε διάφορους άλλους τομείς, όπως η βιομηχανία τροφίμων και

ποτών, η φαρμακοβιομηχανία και η βιομηχανία παραγωγής αρωμάτων και αιθέριων ελαίων.

Μερικές από τις χαρακτηριστικές εφαρμογές της τεχνικής αποτελούν η ταυτοποίηση οργανικών θειούχων ενώσεων από την άσπρη και τη μαύρη τρούφα, ο εντοπισμός θειούχων ενώσεων στην παραγωγή της μπύρας, στην ανάλυση κρασιών και αλκοολούχων ποτών, στην τυροκομεία, στα τρόφιμα για την μέτρηση και το έλεγχο του αρώματός τους, στα λαχανικά για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων και στη βιομηχανία αρωμάτων για τον έλεγχο διαφόρων σταδίων της παραγωγής [50].

Ακόμα έχει βρει εφαρμογή και σε περιβαλλοντικές αναλύσεις όπως η ανίχνευση φυτοφαρμάκων, φθαλικών παραγώγων και αρσενικού σε υδατικά δείγματα καθώς και διαφόρων οργανικών και ανόργανων ρύπων σε μολυσμένα εδάφη (π.χ. χλώρο- και νιτροανυλίνες, νιτροβενζόλιο, υδράργυρο κ.α.) [51].

Από τις πιο πρόσφατες εφαρμογές είναι και η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Ενώ οι πρώτες αναλύσεις στον τομέα περιορίζονταν στον εντοπισμό αιθανόλης στα ούρα, ο τομέας έχει αναπτυχθεί τόσο πολύ και σήμερα υπάρχει μία μεγάλη βάση δεδομένων για την ταυτοποίηση και άλλων ουσιών όπως αμφεταμίνες, αντισταμινικά φάρμακα, αντικαταθλιπτικά και κορτικοστεροειδή [51].

Σήμερα, η ευαισθησία και η εκλεκτικότητα της μεθόδου την έχουν καταστήσει ιδανική για την ανάλυση μεγάλου εύρους συστατικών και οι εφαρμογές της τα τελευταία χρόνια αυξάνονται συνεχώς [52],[53].

### **3.2 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα SPME**

Η τεχνική SPME παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων κατεργασίας δειγμάτων [54]. Συγκεκριμένα:

- Είναι απλή και γρήγορη
- Είναι εύκολη
- Μπορεί να γίνει παρουσία οργανικών διαλυτών
- Δεν απαιτείται προηγούμενη επεξεργασία του δείγματος
- Είναι συμβατική με αρκετές αναλυτικές μεθόδους
- Έχει μεγάλη ποικιλία ινών για τον προσδιορισμό διαφορετικών συστατικών
- Απαιτεί μικρούς όγκους δείγματος
- Έχει μεγάλη εκλεκτικότητα

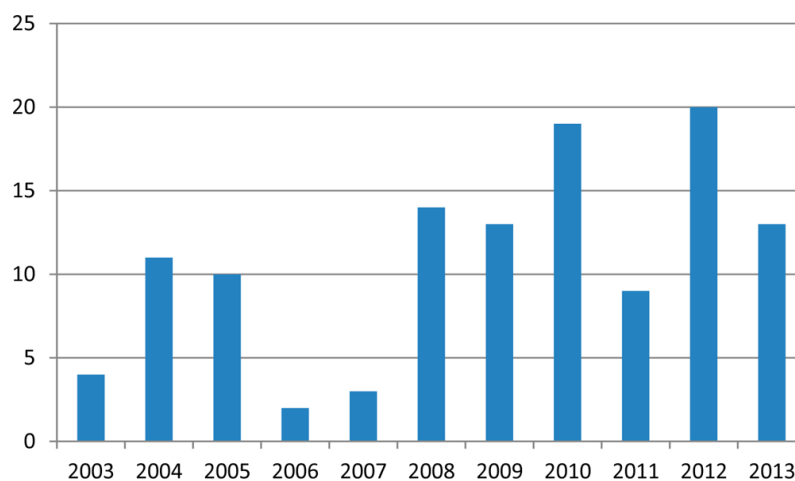
- Προσφέρει τη δυνατότητα αυτοματοποίησης

Ωστόσο, η μέθοδος εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα όπως:

- Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο χρόνος προετοιμασίας του δείγματος για ανάλυση μπορεί να είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους
- Η χρήση της ίνας μπορεί να προκαλέσει φαινόμενα μεταφοράς (carry – over) και να μειώσει την αποτελεσματικότητά της
- Η κάθε ίνα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για συγκεκριμένο αριθμό αναλύσεων (50 με 100 δοκιμές) με αποτέλεσμα να αυξάνεται το κόστος της μεθόδου

## 4 Πειραματικός σχεδιασμός - Design of Experiments (DOE)

Ο στατιστικός σχεδιασμός πειραμάτων αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη, κατανόηση και βελτιστοποίηση μιας διεργασίας. Η ευκολία εφαρμογής της και η αποτελεσματικότητά της, έχουν οδηγήσει τα τελευταία χρόνια, σε μία σημαντική αύξηση του συνολικού αριθμού των δημοσιεύσεων που σχετίζονται με τον πειραματικό σχεδιασμό (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Δημοσιεύσεις σχετικές με το DOE

Ο παραδοσιακός σχεδιασμός βελτιστοποίησης, κατά τον οποίο μεταβάλλεται ένας παράγοντας τη φορά, αν και είναι απλός και εύκολα κατανοητός παρουσιάζει ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα. Πρώτον, ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται είναι πάρα πολύ μεγάλος, με αποτέλεσμα ο σχεδιασμός να είναι



χρονοβόρος και ασύμφορος [55] και δεύτερον δε λαμβάνονται υπόψη αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων [56]. Έτσι, για τη μελέτη μιας διεργασίας, η οποία ελέγχεται από 6 παραμέτρους (factors), που καθε μία μεταβάλλεται σε δύο επίπεδα (level), απαιτούνται συνολικά  $2^6=64$  πειράματα. Αυτός είναι ένας μεγάλος και ασύμφορος αριθμός πειραμάτων τόσο για εργαστηριακούς όσο και για βιομηχανικούς σκοπούς.

Αυτές οι δυσκολίες δύνανται να ξεπεραστούν χάρη στον πειραματικό σχεδιασμό 'Design of Experiments' (DOE), ο οποίος παρέχει την δυνατότητα προσδιορισμού αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων μιας διεργασίας (factors) για μία ή περισσότερες αποκρίσεις (responses), μειώνοντας ταυτόχρονα τον αριθμό των απαιτούμενων πειραμάτων [57],[58].

Επειδή οι παράμετροι που διέπουν μια διεργασία είναι αρκετοί στις περισσότερες περιπτώσεις, αρχικά λαμβάνει χώρα ένας διαγνωστικός σχεδιασμός (screening design), ο οποίος έχει σαν στόχο τον καθορισμό των παραμέτρων που επηρεάζουν σημαντικά τη διεργασία [59]. Με βάση το παραπάνω παράδειγμα, αν ο αριθμός των παραμέτρων μειωθεί στο μισό, τότε ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων μειώνεται σε  $2^3=8$  πειράματα. Και εν συνεχεία, αφού ανιχνευθούν οι κύριες παράμετροι, εφαρμόζεται η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology-RSM) προκειμένου να δημιουργηθεί ένα μοντέλο που θα περιγράφει τη διεργασία σε σχέση με τις αποκρίσεις [55],[60].

Αναλυτικότερα, ένας RSM σχεδιασμός περιλαμβάνει τρία στάδια πειραματικών υπολογισμών:

1. Το βασικό σχεδιασμό, που αποτελείται από ένα σύνολο πειραμάτων σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να λαμβάνονται υπόψιν όλες οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων παραμέτρων και μια σειρά από αξονικά σημεία, όπου οι παράμετροι εκτελούνται σε alpha τιμές (τιμή =  $\alpha \cdot \text{παραμέτρο}$ ) έτσι ώστε να διατηρηθεί η περιστροφικότητα του σχεδιασμού [60].
2. Για λόγους επαναληψιμότητας, το πρόγραμμα προτείνει μια σειρά πειραμάτων σε σταθερές συνθήκες (center points) για την επαλήθευση της διαδικασίας. Αυτά τα σημεία αναπαράγονται με σκοπό την βελτίωση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων και την πρόβλεψη της καμπυλότητας.

3. Και τέλος η μελέτη και η στατιστική επεξεργασία των αποκρίσεων για την εξαγωγή συμπερασμάτων καθώς και τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας.

## **5 Μοντελοποίηση**

### **5.1 Γενικά**

Η μοντελοποίηση μιας διεργασίας αποτελεί σημαντικό κομμάτι για το σχεδιασμό της, τον έλεγχό της και την κατανόησή της. Παρέχει δυνατότητες όπως η γενίκευση των πειραματικών δεδομένων της, η βαθύτερη γνώση των φαινομένων της, η κλιμάκωση μεγέθους της και η βελτιστοποίησή της. Γι' αυτό το λόγο η περιγραφή μέσω ενός μοντέλου θεωρείται σημαντική, πόσο μάλλον για μια διεργασία όπως της Υ.Ε. η οποία ελέγχεται από πολλούς παράγοντες.

Για την Υ.Ε. έχουν καταστρωθεί κατά καιρούς διάφορα μοντέλα, τα οποία βασίζονται σε διαφορετικές προσεγγίσεις. Τα μοντέλα αυτά μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις γενικές κατηγορίες:

- i. Στα εμπειρικά μοντέλα
- ii. Στα μοντέλα που βασίζονται στην αναλογία μεταφοράς θερμότητας
- iii. Και στα μοντέλα που βασίζονται στα ισοζύγια μάζας

Στην παρούσα εργασία θα αναφερθούμε και θα αναπτύξουμε ένα μοντέλο της τελευταίας κατηγορίας για τους εξής λόγους:

- Μπορούν και περιγράφουν με μεγάλη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα
- Παρέχουν πληροφορίες για τους συντελεστές μεταφοράς μάζας
- Βοηθούν στην μελέτη κλιμάκωση μεγέθους της διεργασίας

### **5.2 Μοντέλα ισοζυγίων μάζας**

#### **5.2.1 Γενικά**

Τα ισοζύγια μάζας αποτελούν τη λογιστική απεικόνιση μίας διεργασίας ή μίας ενότητας διεργασιών. Με την κατάστρωσή τους αποκτούμε μία πρώτη εικόνα για τις μεταβολές των διαφόρων υλικών χωρίς να είναι απαραίτητη η γνώση των λεπτομερειών κάθε διεργασίας. Γενικά, αποτελούν ένα ικανό εργαλείο για την περιγραφή μιας διεργασίας και των φαινομένων της [61].

Τα μοντέλα αυτά προκύπτουν μέσα από την επίλυση των ισοζυγίων μάζας. Σημαντικό στάδιο για την επίλυση αυτών (ιδίως για διεργασίες όπως η Υ.Ε.) αποτελεί η επιλογή των παραδοχών που θα γίνουν, ώστε τα ισοζύγια να μπορούν να επιλυθούν.

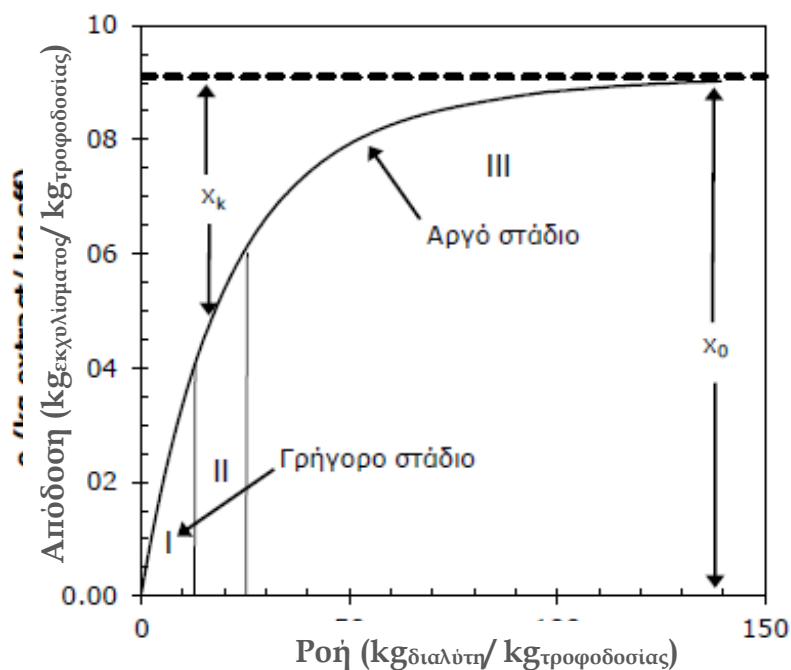
Οι βασικές παραδοχές πάνω στις οποίες καταστρώνονται τα περισσότερα από αυτά είναι: (α) οι ουσίες που περιέχονται στο εκχύλισμα αντιμετωπίζονται στο σύνολο τους σαν μία ουσία (ψευδοσυστατικό), (β) η στερεή κλίνη είναι ομοιογενής όσον αφορά το μέγεθος των στερεών σωματιδίων και την κατανομή της εκχυλίσιμης ουσίας, (γ) στην είσοδο του εκχυλιστήρα ο διαλύτης είναι καθαρός, (δ) η θερμοκρασία, η πίεση και ο ρυθμός ροής του διαλύτη λαμβάνονται ως σταθερά σε κάθε σημείο του εκχυλιστήρα, (ε) ο διαλύτης κυκλοφορεί με εμβολική ροή και (στ) η αξονική διασπορά θεωρείται αμελητέα [5],[62].

Ένα πρόβλημα που εμφανίζεται συχνά σε αυτά τα μοντέλα και χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή είναι το γεγονός ότι οι παραδοχές αυτές δεν ισχύουν για διαφορετικά συστήματα. Έτσι, η άμεση μεταφορά σε άλλες διεργασίες (π.χ. κλιμάκωση μεγέθους) δεν είναι πάντα εφικτή και να είναι απαραίτητη η διεξαγωγή πειραμάτων για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

### **5.2.2 Μοντέλο Sonová**

Ένα μοντέλο με πολύ καλά αποτελέσματα [63],[64],[65] προτάθηκε από την Helena Sonová το 1993, το οποίο βασίστηκε στην θεωρία των κυτταρικών δομών. Δηλαδή, στο ότι το φυτικό υλικό αποτελείται από κυτταρικές δομές (cells) μέσα στις οποίες είναι εγκλωβισμένοι οι διάφοροι μεταβολίτες. Με την άλεση, ένα μέρος αυτών των κυτταρικών δομών καταστρέφεται απελευθερώνοντας τα προς εκχύλιση συστατικά, ενώ τα υπόλοιπα περικλείονται από κυτταρικά τοιχώματα. Έτσι λοιπόν, για μια διεργασία προκύπτουν 3 στάδια εκχύλισης: ένα γρήγορο στάδιο, το οποίο αφορά την παραλαβή των συστατικών που έχουν απελευθερωθεί κατά το σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων, ένα ενδιάμεσο μεταβατικό στάδιο, όπου εκχυλίζεται το εύκολο/αποδεσμευμένο τμήμα του εκχυλίσματος, ενώ έχει ξεκινήσει και η εκχύλιση του εγκλωβισμένου, και τέλος ένα τρίτο στάδιο, το οποίο αφορά την

εκχύλιση των δεσμευμένων συστατικών [62]. Τα στάδια της εκχύλισης φαίνονται αναλυτικότερα στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13. Τα τρία στάδια εκχύλισης του μοντέλου

Έτσι λοιπόν με βάση τις παραπάνω παραδοχές καταλήγουμε στην κατάστρωση των ακόλουθων ισοζυγίων μάζας για την υπερκρίσιμη φάση και τη φάση του στερεού:

$$\text{Φάση του ρευστού:} \quad \rho_f \varepsilon \left( \frac{\partial y}{\partial t} + u \frac{\partial y}{\partial h} \right) = J \quad (I)$$

$$\text{Φάση του στερεού:} \quad -\rho_s (1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J \quad (II)$$

Όπου  $\rho_f$  η πυκνότητα του διαλύτη ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $\varepsilon$  το πορώδες της κλίνης, *τ.ε.δ.ο.* η τροφοδοσία ελεύθερης διαλυμένης ουσίας,  $y$  η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (δ.ο.) στη φάση του ρευστού ( $\text{kg}_{\delta.ο.} / \text{kg}_{\text{διαλύτη}}$ ),  $x$  η συγκέντρωση της δ.ο. στη φάση του στερεού (πρώτη ύλη) ( $\text{kg}_{\delta.ο.} / \text{kg}_{\tau.ε.δ.ο.}$ ),  $u$  η ταχύτητα του διαλύτη ανηγμένη ως προς το πορώδες της κλίνης,  $\rho_s$  η πυκνότητα του στερεού ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $h$  η αξονική συντεταγμένη, και  $J$  ο ρυθμός μεταφοράς της δ.ο. μεταξύ των φάσεων.

Για τον ρυθμό μεταφοράς μάζας  $J$  έχουμε[66]:

Για το γρήγορο στάδιο:

$$J(x, y) = k_f \alpha_0 \rho_f (y_r - y) \quad x > x_k \quad (III)$$

Ενώ για το αργό στάδιο:

$$J(x, y) = k_f \alpha_0 \rho_s x(1 - y/y_r) \quad x \leq x_k \quad (IV)$$

Όπου  $y_r$  η διαλυτότητα στο ρευστό ( $kg_{\delta.o}/kg_{\delta.ιαλύτη}$ ) και  $x_k$  η αρχική συγκέντρωση του δεσμευμένου εκχυλίσματος στο στερεό ( $kg_{\delta.o}/kg_{\tau.ε.δ.ο.}$ ).

Με βάση τα παραπάνω και υποθέτοντας  $\partial y/\partial t = 0$ , το σύστημα των διαφορικών εξισώσεων έχει την ακόλουθη αναλυτική λύση:

$$e = \begin{cases} q y_r [1 - \exp(-Z)] & q < q_m \\ y_r [q - q_m \exp(z_w - Z)] & q_m \leq q < q_n \\ x_0 - \frac{y_r}{W} \ln \{1 + [\exp(W x_0 / y_r) - 1] \exp[W (q_m - q)] x_k / x_0\} & q \geq q_n \end{cases} \quad (V)$$

με

$$q_m = (x_0 - x_k) / y_r Z$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \left[ \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(W x_0 / y_r)}{x_0} \right] \quad (VI)$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{y_r}{W x_0} \ln \left\{ \frac{x_0 \exp[W (q - q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \right\} \quad (VII)$$

$$Z = \frac{k_f \alpha_0 \rho_f}{\dot{q} (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (VIII)$$

$$W = \frac{k_s \alpha_0}{\dot{q} (1 - \varepsilon)} \quad (IX)$$

Όπου:  $e$  η ανηγμένη ποσότητα εκχυλιζόμενης ουσίας ( $kg_{\delta.o}/kg_{\tau.ε.δ.ο.}$ ),  $q$  η ανηγμένη ποσότητα διαλύτη που έχει καταναλωθεί ( $kg_{\delta.o}/kg_{\tau.ε.δ.ο.}$ ),  $q_n$  η τιμή του  $q$  στη φάση που τα συστατικά έχουν πλήρως εκχυλιστεί ( $kg_{\delta.o}/kg_{\tau.ε.δ.ο.}$ ),  $q_m$  η τιμή του  $q$  κατά την έναρξη εκχύλισης στο εσωτερικό του στερεού ( $kg_{\delta.o}/kg_{\tau.ε.δ.ο.}$ ),  $Z$  ο αδιάστατος συντελεστής μεταφοράς μάζας (φάση ρευστού),  $W$  ο αδιάστατος συντελεστής μεταφοράς μάζας (φάση στερεού),  $\dot{q}$  ο ειδικός ρυθμός ροής του

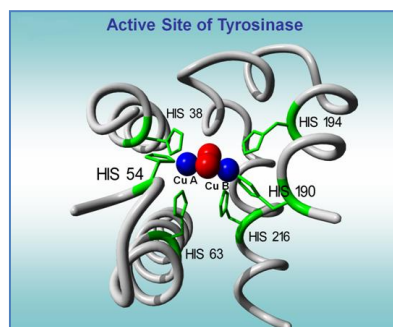
διαλύτη [ $kg_{δ.δ}/s/kg_{τ.ε.δ.δ}$ ],  $k_f$  (m/s) ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην υπερκρίσιμη φάση,  $k_s$  (m/s) ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στο στερεό και  $Z_W$  η αδιάστατη αξονική συντεταγμένη μεταξύ του γρήγορου και του αργού σταδίου εκχύλισης.

Από τις παραπάνω εξισώσεις του μοντέλου, οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι οι:  $\gamma_r$ ,  $x_0$ ,  $x_k$ ,  $Z$  και  $W$ . Η τιμή του  $\gamma_r$  προκύπτει από την κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης εκχύλισης (στο γρήγορο στάδιο εκχύλισης) και το  $x_0$  υπολογίζεται πειραματικά. Συνεπώς οι προσαρμόσιμες παράμετροι του μοντέλου καταλήγουν να είναι τρεις ( $x_k$ ,  $Z$  και  $W$ ).

## 6 *In vitro* δοκιμές

### 6.1 Τυροσινάση

Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο που ανήκει στην κατηγορία των μονοοξυγενασών και περιέχει χαλκό στο ενεργό της κέντρο. Είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση διότι είναι το ένζυμο-κλειδί που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση μελανίνης, η οποία καθορίζει το χρώμα του δέρματος, των μαλλιών των θηλαστικών και τα προστατεύει από την υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της νευρομελανίνης στον ανθρώπινο εγκέφαλο και τον νευροεκφυλισμό που σχετίζεται με τη νόσο Parkinson. Επιπλέον, αυτό το ένζυμο είναι υπεύθυνο για την ανεπιθύμητη ενζυμική αμαύρωση των φρούτων και λαχανικών. Ως αποτέλεσμα, η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο-στόχος από την σκοπιά των επιστημών, για τη δράση των φαρμάκων, των καλλυντικών και των τροφίμων [67],[68].



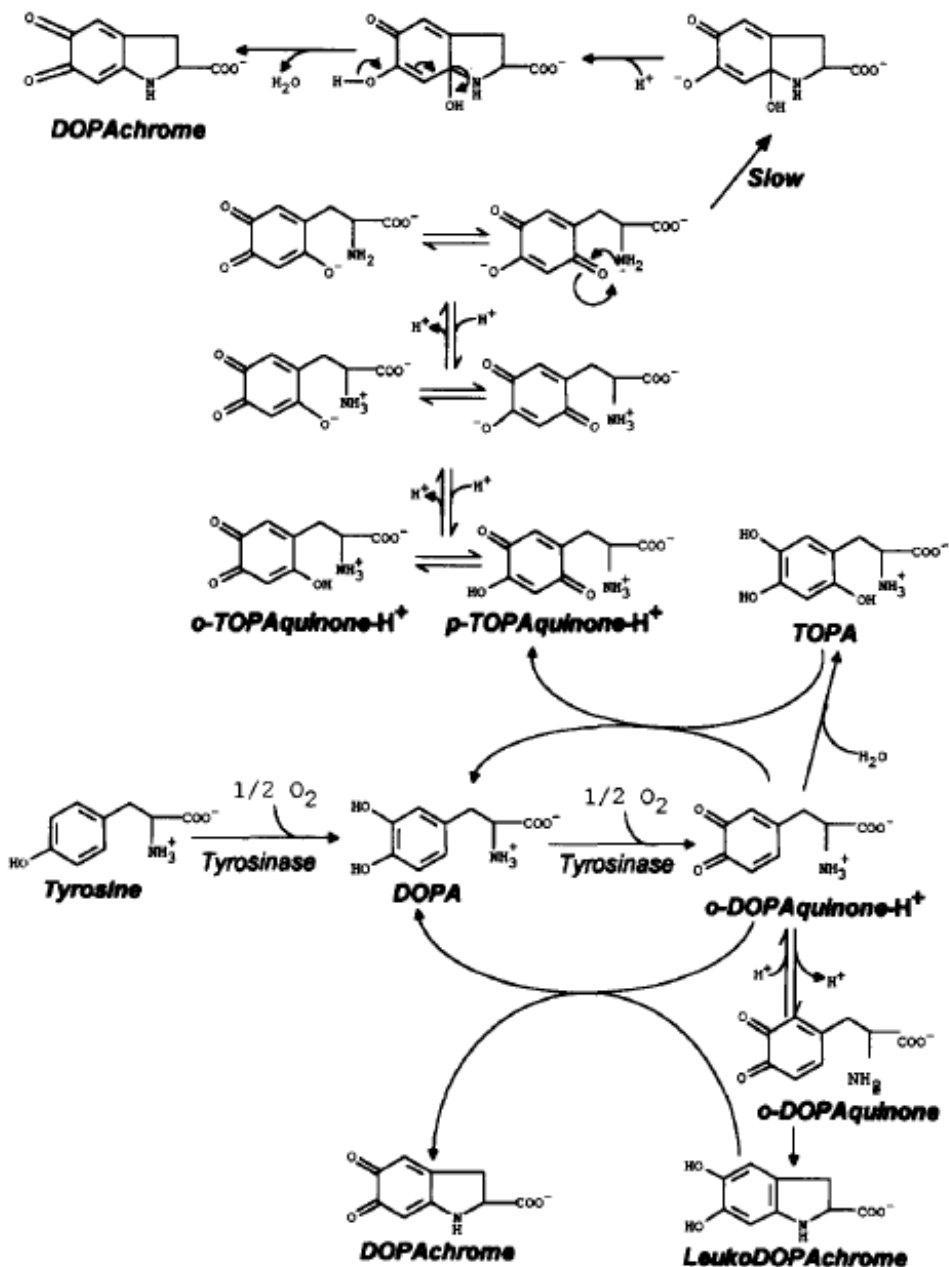
#### 6.1.1 Μηχανισμός τυροσινάσης σε κυτταρικό επίπεδο

Το μεταβολικό μονοπάτι της μελανογένεσης περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Raper το 1926 και βελτιώθηκε από τον Mason το 1948. Η συμβολή τους στον επιστημονικό χώρο ήταν τόσο μεγάλη που το μοντέλο που πρότειναν

παρέμεινε γνωστό μέχρι και σήμερα ως “μονοπάτι Raper-Mason” [69]. Οι δεκαετίες που ακολούθησαν ήταν εξίσου σημαντικές για την εξέλιξη του μοντέλου διότι, 2 χρόνια αργότερα, από τις μελέτες των Lerner και Fitzpatrick το 1950 [70] έγινε η σύνδεση της τυροσινάσης στη μελανογένεση, ενώ στα χρόνια που ακολούθησαν αποσαφηνίστηκε πλήρως ο ρόλος της καθώς και οι ασθένειες που οφείλονταν από τη δυσλειτουργία της [71],[72].

Στα θηλαστικά υπάρχουν δύο βασικοί τύποι μελανίνης: η ευμελανίνη και η φαίομελανίνη, με την πρώτη να έχει μαύρο χρώμα ενώ η δεύτερη, κίτρινο/καφέ. Μέσα σε ένα κύτταρο σχηματίζονται και τα δύο αυτά παράγωγα με τη διαφορά τους να σχετίζεται με το μεταβολικό μονοπάτι που θα ακολουθηθεί κατά τη διαδικασία της βιοσύνθεσης.

Το μεταβολικό μονοπάτι της μελανογένεσης χωρίζεται σε δύο φάσεις: το εγγύς (proximal) και το άπω (distal). Το εγγύς ξεκινάει με την ενζυμική οξείδωση του υποστρώματος της τυροσίνης σε L-DOPA και στη συνέχεια μετατροπή της (πάλι με τη χρήση της τυροσινάσης) σε μία ο-κινόνη την ο-DOPAquinone. Το μόριο αυτό στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει δύο πορείες χημικών αντιδράσεων: είτε ενδομοριακή 1,4- προσθήκη στο βενζολικό δακτύλιο, είτε προσθήκη νερού. Στην πρώτη περίπτωση, η αμινομάδα της ο-DOPAquinone μέσω της 1,4- προσθήκης στο βενζολικό δακτύλιο, σχηματίζει το leukoDOPAchrome, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται για να μας δώσει το DOPAchrome [70], ενώ στη δεύτερη περίπτωση συμβαίνει μία προσθήκη νερού στον βενζολικό δακτύλιο που οδηγεί στο σχηματισμό της ένωσης TOPA, η οποία οξειδώνεται σε p-toraquinone και μέσω μιας σειράς βραδέων αντιδράσεων λαμβάνεται το DOPAchrome [73] (Εικόνα 14). Όπως είναι κατανοητό από τα παραπάνω και οι δύο μορφές καταλήγουν στο σχηματισμού του ίδιου τελικού προϊόντος.

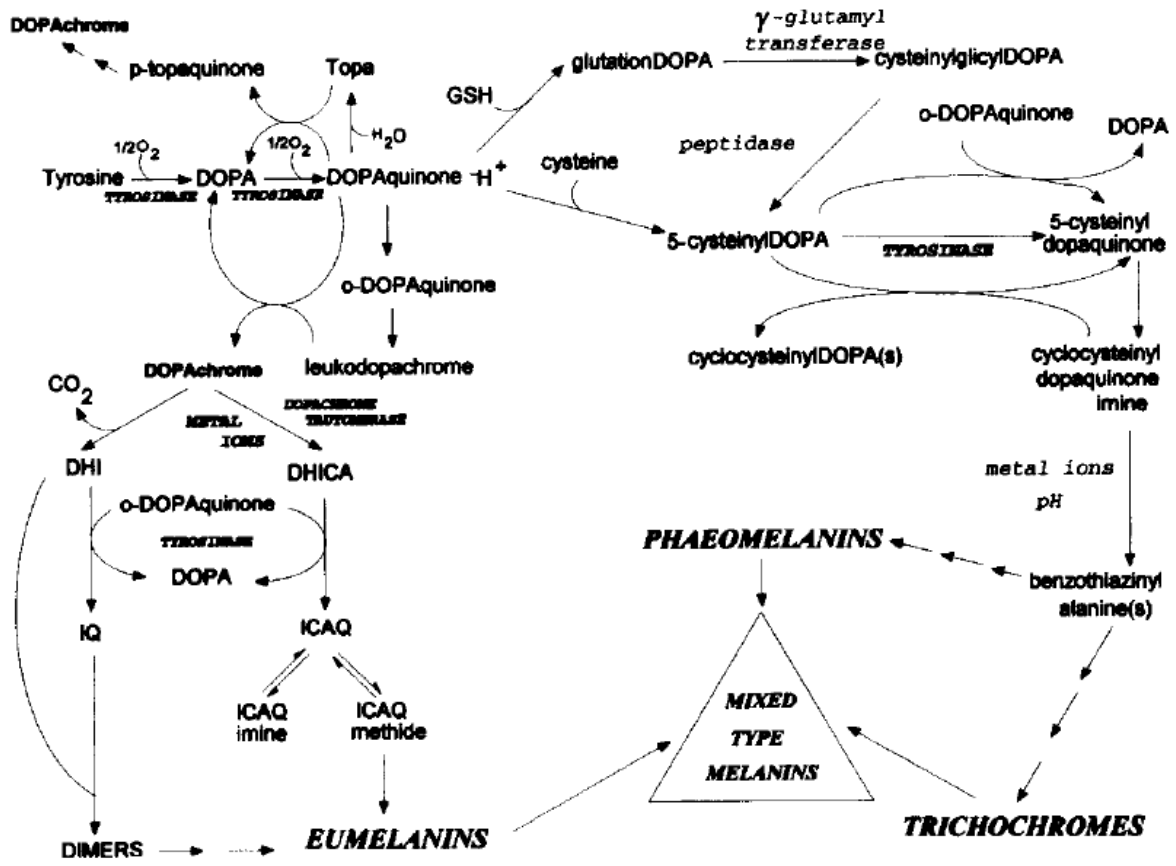


Εικόνα 14. Βιοσυνθετικό μονοπάτι για τη παραγωγή του DOPAchrome

Κατά τη διαδικασία της άπω φάσης (distal phase), λαμβάνουν χώρα οι τελικές χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις για το μετασχηματισμό του DOPAchrome σε ευμελανίνη. Και σε αυτή την περίπτωση οι δρόμοι που μπορούν να ακολουθηθούν είναι δύο. Είτε μέσα από μια αντίδραση αποκαρβοξύλωσης του DOPAchrome σε 5,6-διϋδροξυκινόνη (DHI) και στη συνέχεια οξείδωσή του σε 5,6-ινδολοκινόνη (IQ) [74] και εν τέλει στο σχηματισμό της ευμελανίνης, είτε μέσω της τυροσινάσης όπου το DOPAchrome μετατρέπεται σε 5,6-διϋδροξυϊνδολο – 2-

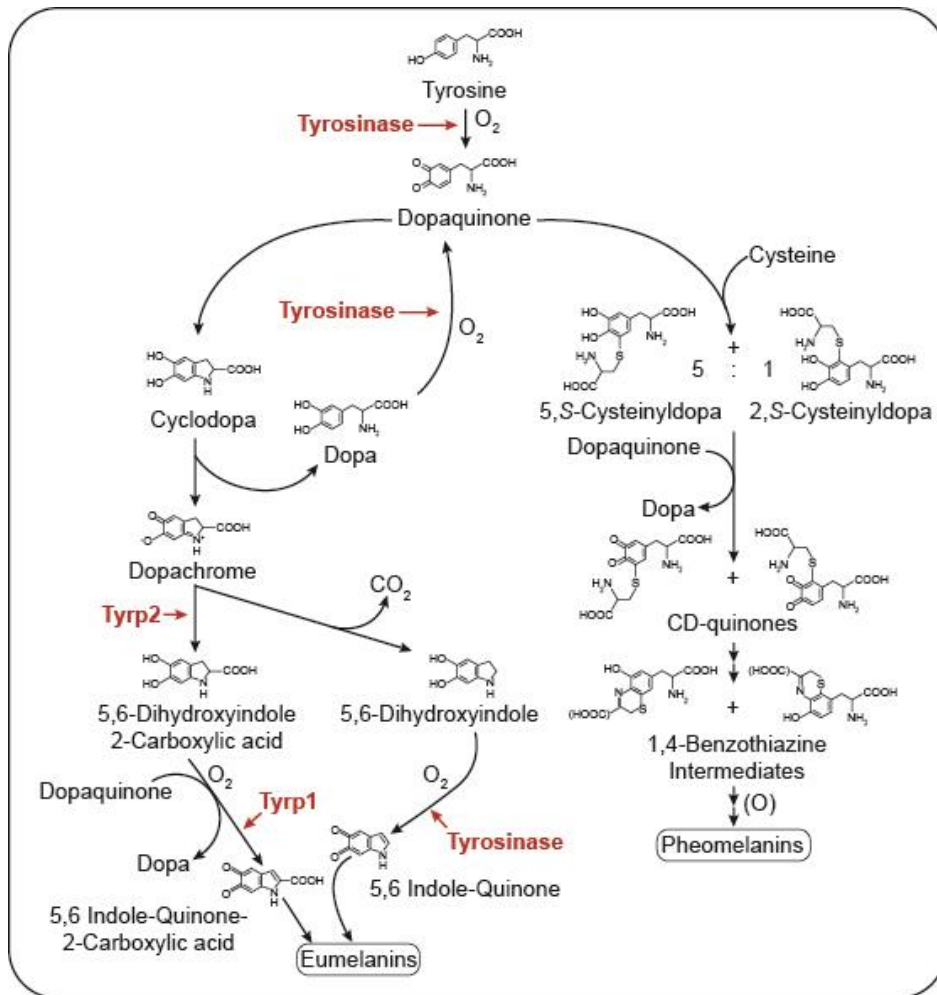


καβροξυλικό οξύ (DHICA) και στη συνέχεια σε ευμελανίνη [75]. Ο λόγος για τον οποίο η βιοσύνθεση μπορεί να επιλέξει κάποιο από τα δύο βιοσυνθετικά μονοπάτια δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Διάγραμμα μελανογένεσης εγγύς και άπω φάσης

Αν στη βιοσυνθετική πορεία της ευμελανίνης και συγκεκριμένα το στάδιο μετά την παραγωγή της DOPAquinone, υπάρχει η παρουσία κυστεΐνης, τότε το βιοσυνθετικό μονοπάτι μπορεί να οδηγηθεί και προς τη σύνθεση φαίομελανίνης (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Σύνθεση φαιομελανίνης και ευμελανίνης από την τυροσίνη

Σε αυτήν την περίπτωση έχουμε το σχηματισμό διαφορετικού ενδιάμεσου, του cysteinylDOPA, το οποίο μετατρέπεται σε 5 - cysteinylDOPA και μέσω της ενζυμικής οξείδωσης με τυροσινάση, μετατρέπεται σε 5 - cysteinylDOPAquinone. Στη συνέχεια, μέσω μιας ενδομοριακής κυκλοποίησης και παρουσίας μεταλλοϊόντων, σχηματίζεται η 2H - 1,4 βενζοθειαζίνη και τελικώς η φαιμελανίνη [76].

Όπως γίνεται κατανοητό από όλα τα παραπάνω η παρουσία της τυροσινάσης στη διαδικασία της μελανογένεσης αποτελεί σημείο κλειδί, διότι εμπλέκεται σε πολλά στάδια της διεργασίας για την τελική παραγωγή των προϊόντων της μελανίνης.

Σε αντίθεση με την πολύπλοκη βιοσυνθετική πορεία που ακολουθείται μέσα σε ένα μελανοκύτταρο, το πρωτόκολλο το οποίο εφαρμόστηκε στη παρούσα διατριβή για τη μελέτη της λευκαντικής δράσης των δειγμάτων, είναι σαφώς πιο

απλοποιημένο και ακολουθεί τη βιοσυνθετική πορεία της τυροσινάσης με υπόστρωμα την L-DOPA λόγω, της ευκολίας χρήσης του πρωτοκόλλου και της γρήγορης ταχύτητας των αποτελεσμάτων.

### 6.1.2 Αναστολείς τυροσινάσης

Ο πρότυπος αναστολέας της τυροσινάσης θεωρείται το kojic acid. Είναι ένας ανταγωνιστικός αναστολέας, ο οποίος αποτελεί τη βάση επάνω στην οποία συγκρίνονται όλα τα εκχυλίσματα που παράγονται στη κοσμετολογία και στη βιομηχανία τροφίμων. Μερικοί ακόμη αναστολείς που συναντάμε πολύ συχνά στη βιβλιογραφία είναι η τροπολόνη [77] και το υπόστρωμα L- μιμοζίνη [78] τα οποία παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση.

Εκτός από τους κλασσικούς αναστολείς, μεγάλη έρευνα έχει γίνει για την εύρεση νέων φυσικών αναστολέων από φυτικές πρώτες ύλες. Η μελέτη έχει φέρει στο φως μεγάλο αριθμό φυσικών προϊόντων από τους οποίους οι δραστικότεροι ανήκουν στις κατηγορίες των πολυφαινόλων (φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, στυλβένια, κουμαρίνες κ.α.), στις βενζαλδεΐδες, στα λιπίδια μακράς αλυσίδας, στα στεροειδή, στις ανθρακινόνες και άλλα συνθετικά ή ημισυνθετικά παράγωγα [67]. Μερικά πολύ γνωστά παραδείγματα αυτών αποτελούν: η οξυρεσβερατρόλη από το είδος *Morus alba*, η ταξιφολίνη από το *Polygonum hydriper*, οι φλαβανόλες κερσετίνη, μυρισετίνη και η κεμφερόλη, η γλαμπριντίνη, το γκλαμπρένιο και η λικοχαλκόνη A από το είδος της γλυκύρριζας καθώς και μερικά συνθετικά/ημισυνθετικά παράγωγα όπως η N- φαινυλοθειουρία [79] και η N-υποκατεστημένες-N-νιτροζοϋδροξυλαμίνες [80].

Σε αυτό το σημείο καλό θα ήταν να αναφερθεί ότι ο ορισμός "αναστολείς τυροσινάσης" είναι μερικές φορές ασαφής διότι, στις περισσότερες αναφορές χρησιμοποιείται η εν λόγω ορολογία για την αναστολή της μελανογενέσεως, η οποία επικεντρώνεται κυρίως στην μείωση του σχηματισμού της μελανίνης, ανεξάρτητα από οποιαδήποτε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του αναστολέα και του ενζύμου και με τους περισσότερους αναστολείς να μελετώνται με βάση τη δράση

τους στην τυροσινάση, έχοντας ως υπόστρωμα την L-DOPA και μετρώντας το σχηματισμό του DOPACHrome [67].

### 6.1.3 Προβλήματα – παθήσεις

Η διαταραχή στη λειτουργία της τυροσινάσης μπορεί να οδηγήσει σε δερματικές παθήσεις που έχουν να κάνουν είτε με υπερλειτουργία, είτε με υπολειτουργία της. Μερικές από τις πιο κοινές ανωμαλίες που προκύπτουν είναι οι πανάδες (μελάσματα), η μεταφλεγμονώδης υπερμελάγχρωση, η ασθένεια Peutz – Jegher, οι φακίδες, κλπ [81].

Στην παρούσα εργασία θα γίνει μία εκτενής μελέτη για τη βελτιστοποίηση της υπερκρίσιμης εκχύλισης στη διαδικασία παραγωγής εκχυλισμάτων, πλούσιων σε μεταβολίτες με ισχυρή δράση στην τυροσινάση από το είδος της *Glycyrrhiza glabra*.

## 6.2 Ελεύθερες ρίζες

### 6.2.1 Ιστορικά στοιχεία

Οι ελεύθερες ρίζες άρχισαν να εμφανίζονται στο προσκήνιο στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όταν ο χημικός Gomberg στις Η.Π.Α, ανακάλυψε εντελώς τυχαία τη ρίζα του τριφαινυλομεθυλίου, χωρίς να γνωρίζει ότι ο τρισθενής του άνθρακας ήταν η πρώτη μορφή ελεύθερης ρίζας. Πολύ αργότερα το 1954 ο Daniel Gilbert και η Rebecca Gersman σε δημοσίευση τους, πρότειναν ότι οι ρίζες είναι απαραίτητες για τη ζωή των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων, ενώ από την άλλη έχουν και τοξική υπόσταση. Δύο χρόνια αργότερα, το 1956 ο Herman Denham, πρότεινε ότι οι ελεύθερες ρίζες ίσως διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης. Η υπόθεση του Herman Denham, η θεωρία δηλαδή περί των ελευθέρων ριζών για τη γήρανση, ενέπνευσε αναρίθμητες μελέτες και έρευνες γύρω από αυτή και ειδικότερα για τις ρίζες του οξυγόνου καθώς και για δραστικές του μορφές που δεν είναι ρίζες [82].

Οι ελεύθερες ρίζες είναι φυσικά προϊόντα του ανθρώπινου μεταβολισμού. Απελευθερώνονται φυσιολογικά στον οργανισμό από τα μιτοχόνδρια, στα οποία λαμβάνει χώρα η οξείδωση των τροφών (δηλαδή η μετατροπή της τροφής σε ενέργεια) [83].

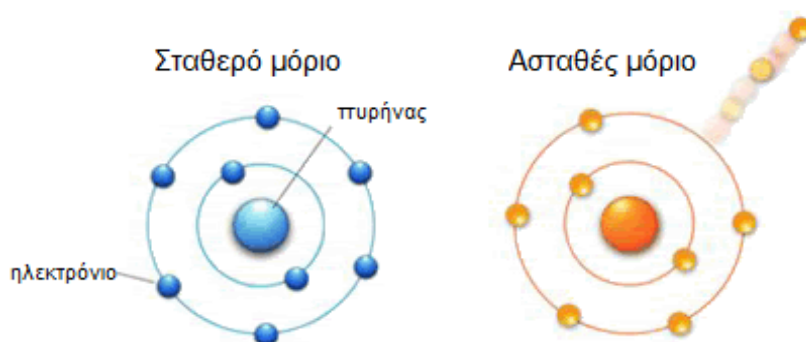
Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η υπέρταση, βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), ο διαβήτης και ως εκ τούτου παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης, στη διαδικασία της γήρανσης, στην καρκινογένεση, καθώς και στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου [84],[85].

### 6.2.2 Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτική δράση

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται άτομα ή ομάδες ατόμων τα οποία φέρουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο μόριό τους και παράγονται κατά την διάρκεια χρησιμοποίησης του οξυγόνου για την παραγωγή ενέργειας. Είναι μόρια που χαρακτηρίζονται από υψηλή ενεργειακή στάθμη.

Για να εξισορροπήσουν τη δομή τους, αποσπούν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια μετατρέποντας τα μόρια αυτά σε ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να ξεκινούν ξεκινώντας μια καταστρεπτική αλυσίδα, προκαλώντας βλάβες σε μεγάλης σημασίας κυτταρικές δομές όπως στις πρωτεΐνες, στις κυτταρικές μεμβράνες και στο DNA [83].

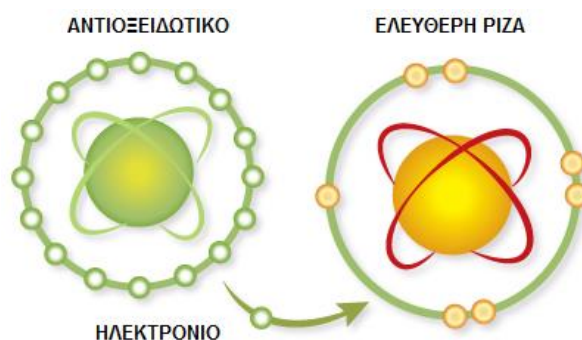
Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών μπορεί να γίνει είτε ενδογενώς, λόγω της πληθώρας των μεταβολικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στον ανθρώπινο οργανισμό, είτε εξωγενώς από την επίδραση κάποιου περιβαλλοντικού παράγοντα.



Εικόνα 17. Σχηματισμός των ελευθέρων ριζών

Στο εσωτερικό των κυττάρων παράγονται συνεχώς ουσίες που ονομάζονται «Δραστικές Μορφές Οξυγόνου» ή ΔΜΟ (Reactive Oxygen Species ή ROS). Ο όρος ΔΜΟ περιλαμβάνει τις ελεύθερες ρίζες στις οποίες το μονήρες ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε άτομο οξυγόνου, όπως για παράδειγμα το υπεροξειδίο ( $O_2$ ) ή η υδροξυλική ρίζα ( $HO^\cdot$ ), καθώς και κάποια παράγωγα του οξυγόνου τα οποία μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς στον ανθρώπινο οργανισμό ως προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, συνήθως από αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (ενζυμικές και μη ενζυμικές) [86].

Οι βλαβερές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό είναι γνωστές ως οξειδωτικό stress, ένας όρος ο οποίος χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει τις καταστάσεις στις οποίες παρατηρείται υπέρμετρη αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου και των ελευθέρων ριζών έναντι ουσιών, οι οποίες αναστέλλουν την οξείδωση και είναι γνωστές ως αντιοξειδωτικά. Με τον όρο αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ουσίες που συμμετέχουν στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και μπορούν να καθυστερήσουν την οξείδωση των μορίων.



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της εξουδετέρωσης μιας ελεύθερης ρίζας από μια αντιοξειδωτική ουσία

Μερικές από τις παθήσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress είναι οι εξής: η γήρανση [87], ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος, η νόσος Alzheimer [88],[89] καθώς και διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και φλεγμονές [90].

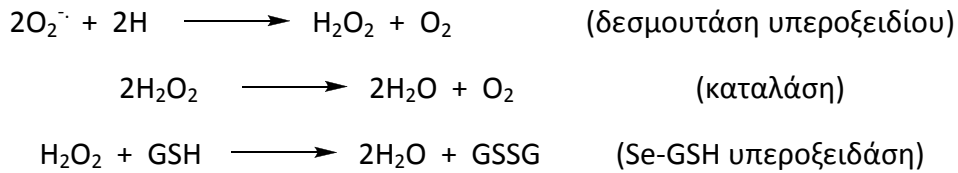
### 6.2.3 Παθολογικές καταστάσεις του οξειδωτικού στρες

Εάν το κυτταρικό αμυντικό σύστημα εναντίων των ελευθέρων ριζών εξαντληθεί, η ενεργοποίηση του οξυγόνου προκαλεί άμεσα κυτταροτοξικότητα και κυτταρική εκφύλιση διαφόρων οργάνων του ανθρωπίνου σώματος όπως του ήπατος, του μυοκαρδίου, των νεφρών, του μυελού των οστών και του εγκεφάλου. Ορισμένες παθήσεις που μπορούν να προκληθούν από την προσβολή των παραπάνω οργάνων μπορεί να είναι οι εξής[91]:

- i.* Αρτηριοσκλήρυνση
- ii.* Έμφραγμα μυοκαρδίου
- iii.* Νευρολογικές παθήσεις (οξείες και χρόνιες)
- iv.* Φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η παγκρεατίτιδαΚαρκίνος
- vi.* Επιπλοκές διαβήτη

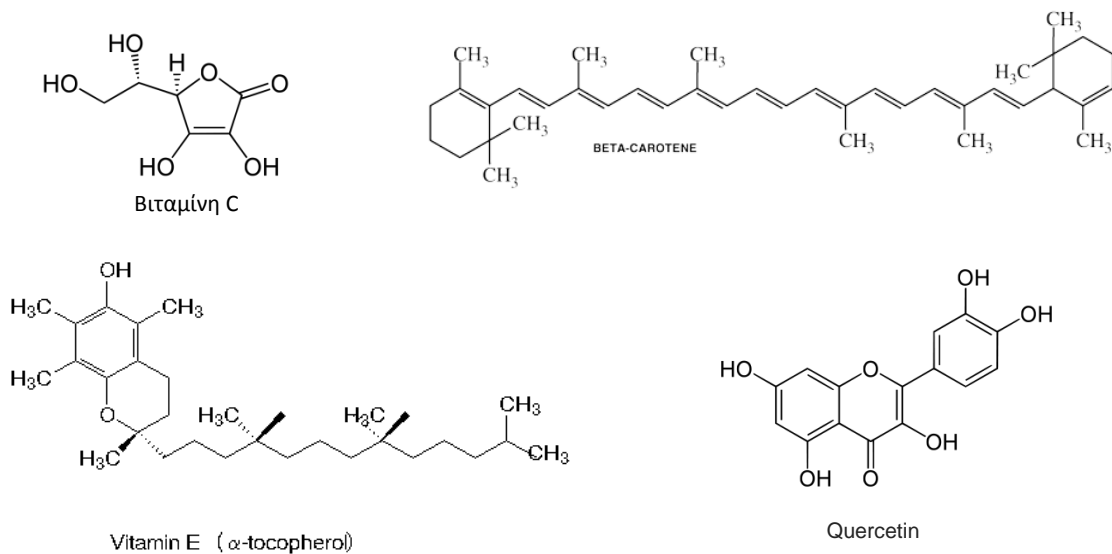
### 6.2.4 Άμυνα του οργανισμού

Το κύτταρο για να υπερκεράσει την οξειδωτική πίεση που δέχεται από την παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης ελευθέρων ριζών διαθέτει αμυντικούς μηχανισμούς [92]. Η πρωταρχική άμυνα του οργανισμού έναντι της ρίζας του υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και των μορφών που προέρχονται από αυτή, παρέχεται από μεταλλοένζυμα. Μια μεγάλη κατηγορία μεταλλοενζύμων είναι οι δεσμουτάσες του υπεροξειδίου (superoxide dismutase ή SOD) που ειδικά και επαρκώς καταλύουν τη μετατροπή του  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ . Επίσης, υπάρχουν κι' άλλες δύο κατηγορίες μεταλλοενζύμων που αναστέλλουν τη συσσώρευση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και είναι οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες. Οι καταλάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την μετατροπή του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ), ενώ οι υπεροξειδάσες ανάγουν το  $H_2O_2$  σε  $H_2O$ .



Σχήμα 1: Ένζυμα που εξουδετερώνουν τα δραστικά ενδιάμεσα του οξυγόνου.

Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η οξειδωτική πίεση που δέχεται το κύτταρο μπορεί να υπερκεράσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του, τότε είναι απαραίτητη η εξωγενής χορήγηση αντιοξειδωτικών προκειμένου να αναχαιτιστεί η δράση των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό [93]. Σημαντικό ρόλο σε αυτό το σημείο παίζουν τα φυσικά αντιοξειδωτικά, που λαμβάνουμε διατροφικά, όπως είναι: το γαλλικό οξύ, η τοκοφερόλη (βιταμίνη E), το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η ουμπικινόνη, τα φλαβονοειδή, οι κατεχόλες, η βιταμίνη A, τα καροτενοειδή και πολλά άλλα συστατικά [94].



Εικόνα 19 Μεταβολίτες με αντιοξειδωτική τους δράση

Συμπερασματικά, καταλήγουμε στο ότι η ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών με φυσικά ή συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι δυνατό να οδηγήσει στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης και επομένως στην πρόληψη και τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, όπου εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες. Επομένως, η εξωγενής χορήγησή αντιοξειδωτικών είναι μείζονος σημασίας μιας και βοηθάει στην καλύτερη και πιο ομαλή λειτουργία του οργανισμού.



## 7 Υλικά και μέθοδοι

- **Συσκευές υπερκρίσιμης εκχύλισης**

Τα πειράματα της υπερκρίσιμης εκχύλισης έλαβαν χώρα σε δύο συσκευές, μία εργαστηριακής κλίμακας (SFE - 500) δυναμικότητας 500mL και μία ημιπilotικής κλίμακας (SFE-1-2) με δυναμικότητα 3000mL. Η αναλυτική τους περιγραφή γίνεται παρακάτω.

- **Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης (SFE - 500)**

Τα πειράματα βελτιστοποίησης για το φυτό *Glycyrrhiza glabra*, πραγματοποιήθηκαν στην εργαστηριακή συσκευή SFE-500 (SEPARX CHIMIE FINE, France) (Εικόνα 20) η οποία αποτελείται από ένα εκχυλιστήρα χωρητικότητας 500ml, εντός του οποίου τοποθετείται κυλινδρικό δοχείο εκχύλισης, το οποίο και φέρει την πρώτη ύλη.

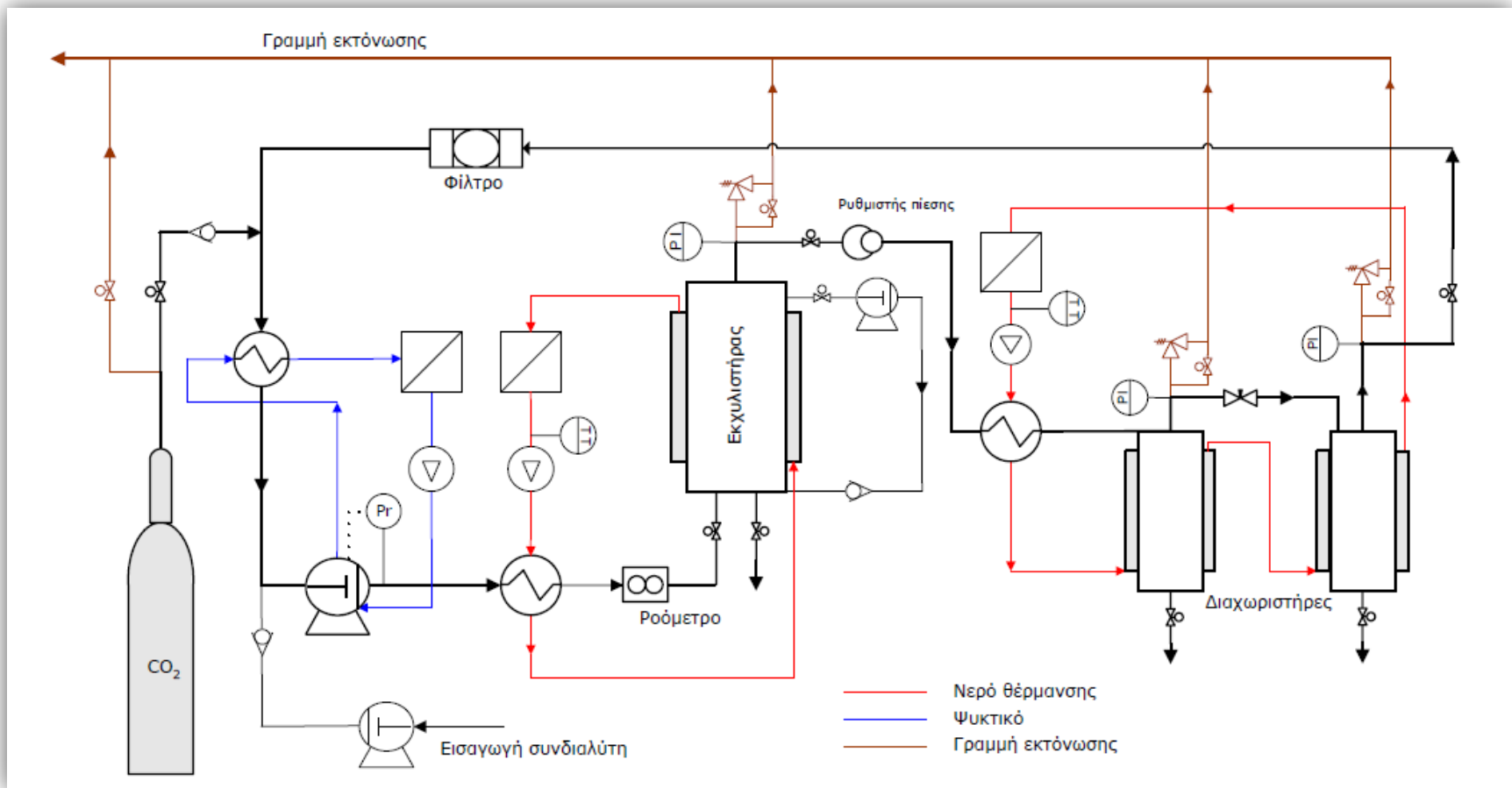
Ο σχεδιασμός της συσκευής είναι τέτοιος που επιτρέπει την ταχεία φόρτωση και εκφόρτωση της προς εκχύλιση ουσίας καθώς και με δυνατότητα προσθήκης συνδιαλύτη στο σύστημα.

Η συλλογή του εκχυλίσματος πραγματοποιείται σε δύο δοχεία διαχωρισμού (διαχωριστήρες) οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι εν σειρά. Έχουν χωρητικότητα 18 ml ο καθένας και μπορούν να λειτουργούν σε διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας. Κατά αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η κλασμάτωση του εκχυλίσματος και η παραλαβή προϊόντων διαφορετικής σύστασης. Εσωτερικά είναι σχεδιασμένα σαν κυκλώνες, ώστε το ρευστό να εισέρχεται εφαιπτομενικά ως προς τα τοιχώματα του θαλάμου και να επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση του εκχυλίσματος με τη μικρότερη δυνατή παράσυρση.

Τα χαρακτηριστικά μεγέθη και οι συνθήκες λειτουργίας της συσκευής παρατίθενται στον Πίνακα 7.



Εικόνα 20. Η εργαστηριακή συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης, SFE-500.

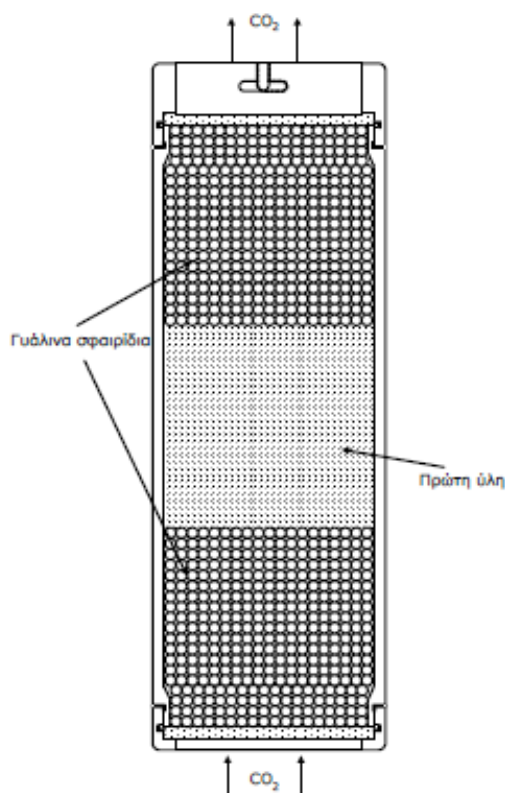


Εικόνα 21. Διάγραμμα ροής υπερκρίσιμης εκχύλισης, SFE-500

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά μεγέθη και προδιαγραφές υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE-500

Μέγιστη πίεση λειτουργίας	300 bar
Μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας	70 °C
Θερμοκρασιακό εύρος λειτουργίας του ψυκτικού	-25 °C έως 40 °C
Ροή διαλύτη	0.5-5 kg/h
Όγκος δοχείου εκχύλισης	400 ml
Όγκος κάθε δοχείου διαχωρισμού	18 ml
Υλικό κατασκευής	316L ανοξείδωτος χάλυβας, PTFE

Εντός του δοχείου εκχύλισης το φυτικό υλικό, περικλείεται από ποσότητα γυάλινων σφαιρών. Ο λόγος είναι ώστε να εξασφαλίζεται ομοιόμορφη ροή CO<sub>2</sub> στην μάζα της πρώτης ύλης (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Δοχείο εκχύλισης με φυτικό υλικό και γυάλινες σφαίρες

- **Ημιπλοτική συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης (SFE 1-2)**

Η ημιπλοτική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής εργασίας (*Sideritis raeseri* ssp. *attica* και *C creticus* ssp. *creticus*) ήταν η SFE-1-2 No 4218 (SEPAREX F 54250 CHAMPIGNEULLES). Είναι εξοπλισμένη με δύο εκχυλιστήρες χωρητικότητας 1 και 2 λίτρων, δυνατότητα προσθήκης συνδιαλύτη και τρεις διαχωριστήρες χωρητικότητας 200mL, με δυνατότητα κλασμάτωσης του εκχυλίσματος.

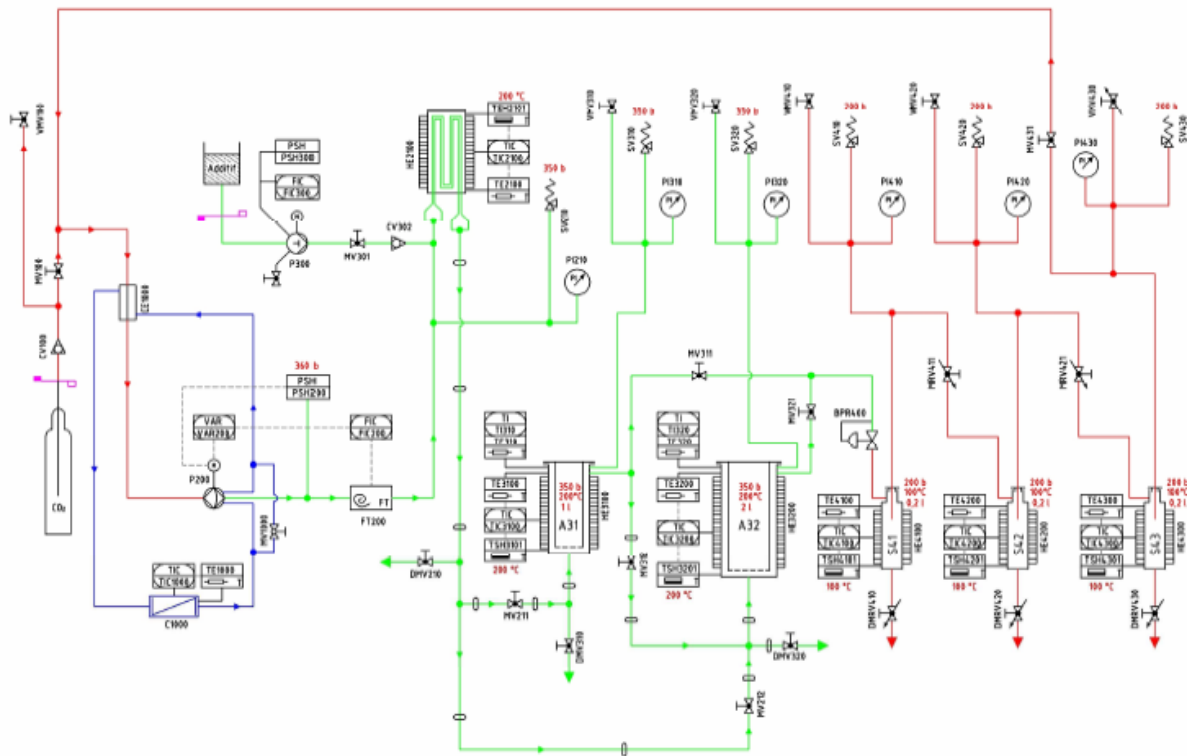


Εικόνα 23. Συσκευή Υπερκρίσιμης Εκχύλισης SFE-1-2

Τα χαρακτηριστικά μεγέθη και οι συνθήκες λειτουργίας της συσκευής παρατίθενται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά μεγέθη και προδιαγραφές συσκευής SFE-1-2

Μέγιστη πίεση λειτουργίας	350 bar
Θερμοκρασιακό εύρος	30 – 200 °C
Ροή διοξειδίου	2.5 – 10 kg/h
Ροή συνδιαλύτη	0 - 100 mL/min
Θερμοκρασιακό εύρος ψύξης	-25 έως 40 °C
Υλικά κατασκευής	316 L ανοξείδωτος χάλυβας PTFE



Εικόνα 24. Διάγραμμα ροής ημιπilotικής συσκευής υπερκρίσιμης εκχύλισης εργαστηρίου

Η λειτουργία της συσκευής είναι όμοια με αυτή της SFE - 500 με τη μόνη διαφορά να είναι η δυναμικότητά τους.

Η συσκευή αυτή χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας εκχυλισμάτων τόσο στα πειράματα της γλυκύριζας όσο και στα πειράματα στο τσάι του βουνού (*Sideritis raeseri* ssp. *attica*) και του *Cistus creticus* ssp. *creticus* (Πειραματικό Μέρος).

- **Συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE)**

Τα πειράματα της παρούσας διατριβής έγιναν σε συσκευή εργαστηριακής κλίμακας (Dionex ASE 300) η οποία διαθέτει: 12 θέσεις δοχείων εκχύλισης (με πολλαπλή δυνατότητα εκχύλισης σε κάθε δοχείο), 12 θέσεις δοχείων συλλογής, ένα δοχείο συλλογής αποβλήτων, κλίβανο για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας, μία αντλία παροχής διαλύτη, έναν αισθητήρα αυτόματης εκτόνωσης, μία οβίδα παροχής αερίου (αέρα ή αζώτου), 4 δοχεία διαλυτών με ικανότητα ανάμειξής τους σε

οποιαδήποτε αναλογία και δύο αισθητήρες ασφαλείας (έναν για έλεγχο διαρροής διαλυτών από το σύστημα και έναν αισθητήρα για έλεγχο πλήρωσης των δοχείων συλλογής).



Εικόνα 25. Συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης (DIONEX ASE 300)

Τα χαρακτηριστικά μεγέθη και οι συνθήκες λειτουργίας της συσκευής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9. Συνθήκες λειτουργίας επιταχυνόμενης εκχύλισης DIONEX ASE 300

Θερμοκρασιακό εύρος	40 °C έως 200 °C
Πίεση λειτουργίας	1500 p.s.i. (100 bar)
Κύκλοι εκχύλισης (cycles)	1 έως 5
Χρόνος στατικής εκχύλισης (static time)	0 έως 99 min
Χρόνος προθέρμανσης (pre-heat)	0 έως 9 min
Όγκος έκπλυσης (flushing)	0% έως 150%
χρόνος εξώθησης του διαλύτη (purging):	60 to 900 sec

- **Πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments - DOE)**

Για τον πειραματικό σχεδιασμό των βελτιστοποιήσεων έγινε με τη χρήση της δοκιμαστικής έκδοση (free trial version) του στατιστικού προγράμματος Design Expert 7 (StatEase, Inc., Minneapolis, MN).

- **SIMCA (PLS-R)**

Η συσχέτιση των εκχυλισμάτων με τη δράση στην τυροσινάση έγινε με τη χρήση του προγράμματος SIMCA-P/P+ 11.5.0 Umetrics

- **Μέτρηση υγρασίας**

Η μέτρηση της υγρασίας έγιναν σε θερμοζυγό με λάμπα αλογόνου Mettler Toledo HB43-S halogen.

- **Συμπύκνωση και ξήρανση δειγμάτων**

Όλα τα δείγματα συμπυκνώθηκαν σε συσκευή ανάδευσης υπό κενού (Rota Vapor) μέχρις ξηρού με το λουτρό ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 45 °C και το κενό στα 50 mbar.

Τα υδατικά εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν σε συσκευή λυοφιλοποίησης CHRIST ALPHA 1/5 η οποία συνίσταται από τα ακόλουθα τμήματα:

- i. Θάλαμο δειγμάτων, χωρητικότητας 50L
- ii. Θάλαμο συμπύκνωσης υδρατμών
- iii. αντλία υψηλού κενού
- iv. σύστημα ταχείας απόψυξης και απομάκρυνσης του νερού

- **Μέτρηση κοκκομετρίας**

Η μέτρηση της κοκκομετρίας του φυτικού υλικού έγινε στη συσκευή CISA Cedaceria Industrial BA 200 N και χρησιμοποιήθηκαν κόσκινα μεγέθους 1000  $\mu\text{m}$ , 630  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 315  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  και 100  $\mu\text{m}$ .

- **Αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GC-MS)**

Η χημική ανάλυση των αιθέριων ελαίων έγινε με αέρια χρωματογραφία, συνδεδεμένη με φασματομετρία μάζας. Ο ανιχνευτής μάζας Hewlett-Packard (HP) 5973 χρησιμοποιεί πηγή ιοντισμού δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (EI) (70 eV), συνδεδεμένος με αέριο χρωματογράφο HP 6890 και εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη HP-5 MS (30m  $\times$  0.25mm; πάχους 0.25 $\mu\text{m}$ ). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που εφαρμόστηκε ήταν: στους 60 °C για 5min, στη συνέχεια αύξηση με ρυθμό 3 °C/min έως τους 280 °C το οποίο ακολουθούσε μια στατική φάση για 15min. Η θερμοκρασία έγχυσης του δείγματος ήταν 220 °C, η παροχή του φέροντος αερίου (ήλιο) ήταν 0.8 mL/min και ο όγκος ένεσης του δείγματος ήταν 1 $\mu\text{L}$ . Η ταυτοποίηση



των ουσιών έγινε με τη χρήση των βιβλιοθηκών Wiley275 και Adams. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν σε συγκεντρώσεις 2.5 mg/mL διαλυμένα σε κυκλοεξάνιο, αφού πρώτα είχε γίνει αφαίρεση της περιεχόμενης υγρασίας με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Για τα υδατικά δείγματα (υδροσόλες), έγινε αρχικά εκχύλιση με πεντάνιο σε αναλογία 5/1, διαχωρισμός των φάσεων και στη συνέχεια αφαίρεση της υγρασίας με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

- **Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase microextraction - SPME)**

Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων ήταν η DVB/CAR/PDMS Stableflex 24Ga Supelco.

Για τα δείγματα με SPME η ανάλυση των ουσιών έγινε στη συσκευή GC-MS Thermo Trace DSQ GC-MS, με πηγή ιοντισμού, δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (EI) (70 eV). Περιλαμβάνει αέριο χρωματογράφο Finnigan trace GC ultra, ανιχνευτή μάζας Finnigan trace DSQ και τριχοειδή στήλη TR-5MS (30m × 0.25mm; πάχους 0.25mm). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν: θέρμανση στους 36 °C για 3 min, στη συνέχεια αύξηση με ρυθμό 3 °C/min έως τους 290 °C το οποίο ακολουθούσε μια στατική φάση για 10 min. Η θερμοκρασία έγχυσης του δείγματος ήταν στους 250 °C και η παροχή του φέροντος αερίου (ήλιο) ήταν 1 mL/min. Η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε με τη χρήση της βιβλιοθήκης Wiley275, NIST και Xcalibur.



Εικόνα 26. Συσκευή αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας για τη μελέτη των δειγμάτων με SPME

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων ήταν το ακόλουθο: τα δείγματα τοποθετήθηκαν εντός γυάλινων φιαλιδίων 20mL, σφραγίστηκαν με διάφραγμα (septum) και τοποθετήθηκαν εντός λουτρού για επώαση στους 40 °C για 30 min. Στη συνέχεια έγινε ενεργοποίηση της ίνας για 10 min στους 270 °C και ακολούθησε δειγματοληψία από τον υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων για 20 min. Μετά το πέρας του χρόνου, η ίνα τοποθετήθηκε εντός του αέριου χρωματογράφου σε λειτουργία splitless, για 5 min, στους 270 °C για την αποδέσμευση των συστατικών και ακολούθησε ανάλυση με βάση το προαναφερθέν θερμοκρασιακό πρόγραμμα.

Όσο αφορά τα στερεά δείγματα χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 2 g, ενώ για τα αιθέρια έλαια ποσότητα 2.5mg.

- **Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC - prepHPLC)**

Ο ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων έγινε με τη χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι της Thermo Finnigan η οποία αποτελείται από τα ακόλουθα τμήματα:

- Αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία
- Αυτόματος δειγματολήπτης SpectraSystem AS3000
- Ένας ανιχνευτής φωτοδιόδων (PDA) SpectraSystem UV8000 degasser
- Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων ήταν μια Fortis Technologies Ltd. UniverSil HS C18 διαστάσεων 250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm. Ενώ, για την απομόνωση των ουσιών έγινε η χρήση ημιπαρασκευαστικής στήλης Supelcosil LC – 18 διαστάσεων 250 x 10 mm i.d., 5.0 μm.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων ήταν υψηλής καθαρότητας HPLC grade (Merck KGaA) και η καταγραφή των χρωματογραφήμάτων έγινε σε τρία μήκη κύματος 220, 280 και 366 nm.

- **Χρωματογραφία λεπτής στειβάδας (TLC)**

Για τον γρήγορο ποιοτικό έλεγχο των ολικών εκχυλισμάτων και των διαφόρων κλασμάτων έγινε η χρήση χρωματογραφίας λεπτής στειβάδας (TLC). Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- α) Αλουμινένιες πλάκες επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου (Silica gel 60 F<sub>254</sub>- Merck) διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική χρωματογραφία)
- β) Αλουμινένιες πλάκες επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου αντίστροφης φάσης (RP-18 F<sub>254</sub>S) διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική χρωματογραφία)
- γ) Γυάλινες πλάκες επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου (Silica gel 60 F<sub>254</sub>- Merck) διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική και παρασκευαστική χρωματογραφία)
- δ) Γυάλινες πλάκες επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου αντίστροφης φάσης (RP-18 F<sub>254</sub>S) διαστάσεων 5 x 10 cm (αναλυτική χρωματογραφία και παρασκευαστική χρωματογραφία)

Ο έλεγχος των χρωματογραφημάτων έγινε με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (με μήκη κύματος 254 nm και 365 nm), ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό.

- **Χρωματογραφία λεπτή στειβάδα υψηλής απόδοσης (HPTLC)**

Για την ανάλυση των δειγμάτων με χρωματογραφία λεπτή στειβάδα χρησιμοποιήθηκε η αυτοματοποιημένη συσκευή της CAMAG η οποία περιλαμβάνει:

- Αυτόματο δειγματολήπτη CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4) για την τοποθέτηση του δείγματος
- Θάλαμο ανάπτυξης CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2) για την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος
- CAMAG TLC Scanner 3 για την πυκνομετρική αξιολόγηση του χρωματογραφήματος και την λήψη φασμάτων απορρόφησης
- CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254nm, 366nm και στο ορατό
- CAMAG Chromatogram Immersion Device για την εμβάπτιση της πλάκας σε χρωματογραφικά αντιδραστήρια

### **Χρωματογραφικά αντιδραστήρια**

Για την εμφάνισή τους χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης:

- Διάλυμα A: βανιλίνη 5% σε μεθανόλη
- Διάλυμα B: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% σε μεθανόλη [95]

Πριν από τον ψεκασμό της πλάκας, αναμειγνύονται ίσοι όγκοι από τα δύο διαλύματα και ακολουθεί θέρμανση για 3 min στους 105 °C.

### **Αντιδραστήρια βιοαυτογραφικής μεθόδου (bioautography) για τον εντοπισμό μεταβολιτών με δράση στην τυροσινάση**

#### **1. Διάλυμα Phosphate buffer (PB) 0.02M, pH=6.8**

- *Διάλυμα Α:* διαλύονται 0.34836 g  $K_2HPO_4$  σε 100 mL απιονισμένου νερού
- *Διάλυμα Β:* διαλύονται 0.27598 g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  σε 100 mL απιονισμένου νερού
- Γίνεται ανάμιξη τους σε αναλογία 4/6 (v/v). Η τιμή του pH πρέπει να είναι στο 6,8 (τυχόν αποκλίσεις διορθώνονται με κατάλληλη προσθήκη από τα δύο διαλύματα)

#### **2. Διάλυμα τυροσινάσης**

Παρασκευάζεται stock διάλυμα τυροσινάσης, ενεργότητας 12'000 U/mL διαλύοντας την απαιτούμενη ποσότητα ενζύμου σε Phosphate buffer. Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό αραιώνεται και παρασκευάζονται aliquots των 100  $\mu$ L τα οποία τοποθετούνται σε κατάψυξη στους -20 °C. Λίγο πριν από τον ψεκασμό της πλάκας, γίνεται αραιώση ενός aliquot σε ενεργότητα 400 U/mL ώστε το αντιδραστήριο να είναι έτοιμο προς χρήση.

#### **3. Παρασκευή υποστρώματος**

Για την παρασκευή της L-DOPA (12 mmol/L) διαλύουμε 0.0473 g L-DOPA σε 20 mL Phosphate buffer. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex για 2min και λουτρό υπερήχων για 20min.

- **Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (prepTLC)**

Έγινε σε γυάλινες πλάκες με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck). Για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν μίγματα οργανικών διαλυτών σε συγκεκριμένες αναλογίες.

- **Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)**

Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$ , όπως και φασμάτων δύο διαστάσεων COSY - LR (Correlation Spectroscopy - Long Range), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) έγινε σε φασματογράφο Bruker Avance III 600. Οι χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ ) είναι εκφρασμένες σε ppm (εσωτερικό πρότυπο TMS), ενώ οι σταθερές σύζευξης ( $J$ ) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως *s* (απλή), *brs* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή) και *multiplet* (πολλαπλή), ενώ ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη φασμάτων ήταν η δευτεριωμένη μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO) και δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ).

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη των φασμάτων ήταν αγορασμένοι από τη Merck KGaA Darmstadt, Germany.

- **Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (FCPC)**

Η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση (Fast Centrifugal Partition Chromatography, FCPC) αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην ύπαρξη δύο μη αναμίξιμων υγρών φάσεων, εκ των οποίων η μια είναι η κινητή και η άλλη η στατική. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα εντός ειδικά κατασκευασμένης στήλης, η οποία και πληρώνεται με την στατική φάση (σε αυτή είναι διαλυμένο το προς ανάλυση δείγμα), ενώ η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στατικής παρασύροντας τα διάφορα συστατικά.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη απομόνωση των μεταβολιτών είναι υδροστατικού τύπου της Kromaton (Angers, France) FCPC®.



Εικόνα 27.Συσκευή κατανομής με φυγοκέντριση Kromaton FCPC

- **Εκχύλιση με υπερήχους (UAE)**

Για τις εκχυλίσεις με τη χρήση υπερήχων χρησιμοποιήθηκε συσκευή Branson 2510.

- **Φωτόμετρο UV/Vis Reader**

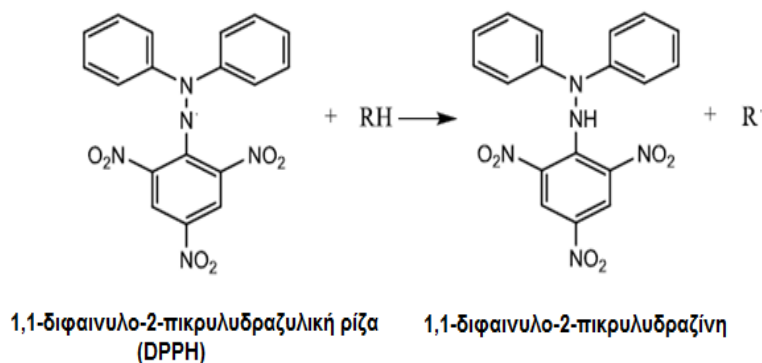
Όλες οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, ολικού φαινολικού φορτίου, ολικών φλαβονοειδών και αναστολής της τυροσινάσης έγιναν στη συσκευή Infinite m200 pro TECAN reader.

- **Αντιοξειδωτική δράση (DPPH)**

Ο έλεγχος των εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση έγινε με το αντιδραστήριο DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) όπως προτάθηκε από τους Lee S.K. *et al.* (1998) [96].

Το DPPH αποτελεί μία ρίζα η οποία διαθέτει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στο μόριό του. Λόγω του ηλεκτρονίου αυτού, το DPPH παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στα 517 nm (Εικόνα 28). Μόλις αυτό το ηλεκτρόνιο σχηματίσει ζεύγος, παρουσία ενός συλλέκτη ελευθέρων ριζών, το διάλυμα αποχρωματίζεται και η μείωση της απορρόφησης είναι ανάλογη του αριθμού των ηλεκτρονίων που προσλαμβάνονται [96].

Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεγάλου αριθμού δειγμάτων, καθώς είναι σύντομη, απλή και έχει χαμηλό κόστος.



Εικόνα 28. Αναγωγή της ρίζας 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl προς 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine

## ➤ Το πρωτόκολλο της μεθόδου DPPH

Ζυγίζονται με ακρίβεια 12.4 mg αντιδραστηρίου DPPH και προστίθενται 100mL αιθυλική αλκοόλη και το διάλυμα αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης.

Για κάθε εκχύλισμα παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/mL σε DMSO (διμεθυλο σουλφοξείδιο) και σε κάθε 96τρυπη πλάκα τοποθετούνται 10 µL δείγματος και 190 µL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Ακολούθησε επώαση για 30 min στο σκοτάδι και μετρήθηκε η απορρόφησή των δειγμάτων 517 nm (τελική συγκέντρωση: 0,5 mg/mL). Στη συνέχεια για κάθε ένα από αυτά τα δείγματα γίνονται διαδοχικές αραιώσεις κατά 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60 και 70 φορές. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ ( $IC_{50} \approx 4,5 \mu\text{g/mL}$ ).

Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης, υπολογίστηκε με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A - B - (C - D)}{(A - B)} \times 100$$

Όπου:

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

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

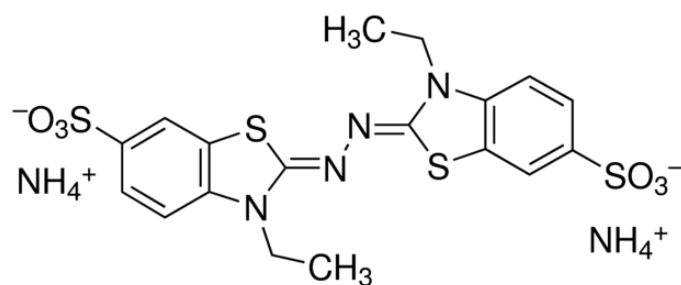
C: η απορρόφηση του δείγματος (10 µL δείγματος+190 µL DPPH)

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

### • Αντιοξειδωτική δράση (ABTS)

Ο έλεγχος των εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση έγινε επίσης και με τη μέθοδο του ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) όπως προτάθηκε από τους Yang *et al.* (2011) [97].

Το πρωτόκολλο αυτό είναι παρόμοιο με αυτό του DPPH. Χρησιμοποιείται και αυτό για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού εκχυλισμάτων, είναι εύκολο, γρήγορο και με χαμηλό κόστος, με τη διαφορά να βρίσκεται στην ευαισθησία του αντιδραστηρίου σε σχέση με το DPPH μιας και απαιτεί σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων.



Εικόνα 29. Ρίζα ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))

### ➤ Το πρωτόκολλο της μεθόδου ABTS

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα ABTS συγκέντρωσης 7 mM (15 mL) το οποίο αναμειγνύεται με διάλυμα potassium persulphate συγκέντρωσης 140 mM (264 µL) και αφήνεται στο σκοτάδι για 12 με 16 h για να ενεργοποιηθεί. Πριν από τη μέτρηση των δειγμάτων, το ενεργοποιημένο πλέον ABTS\* αραιώνεται με αιθανόλη μέχρις η απορρόφηση να είναι  $0,70 \pm 0,02$  στα 734 nm [97].

Στη συνέχεια, για τη μέτρηση στην 96τρυπη πλάκα, σε κάθε πηγάδι προστίθενται 50µL δείγματος (σε DMSO), 100 µL ενεργοποιημένου ABTS\* και ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 10 min. Μετά το πέρας της επώασης, έγινε μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 734 nm (ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε το Trolox με  $IC_{50} \approx 8$  µg/mL). Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης, υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\% inhibition = \frac{A - B - (C - D)}{(A - B)} \times 100$$

Όπου:

A: η απορρόφηση του 'control' (50 µL DMSO+100 µL ABTS)

B: το τυφλό (blank) του 'control' (50 µL DMSO+100 µL EtOH)

C: η απορρόφηση του δείγματος (50 µL δείγματος+100 µL ABTS)

D: το τυφλό (blank) του δείγματος (50 µL δείγματος+100 µL EtOH)



Επειδή η ικανότητα των δειγμάτων να αναστέλλουν τη ρίζα ήταν ποικίλα, οι αραιώσεις των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν κατάλληλες ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός των αντίστοιχων  $IC_{50}$ .

- **Υπολογισμός ολικών φαινολικών (TPC)**

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικά παράγωγα υπολογίστηκε με την μέθοδο Folin – Ciocalteu (Hoff *et al.* 1997, Miliauskas *et al.* 2004) σε 96τρυπη πλάκα [98].

Όσο αφορά τα αντιδραστήρια, παρασκευάστηκαν διαλύματα Folin – Ciocalteu 10% (v/v) και ένα υδατικό διάλυμα  $Na_2CO_3$  7,5 % (w/v). Τα αντιδραστήρια αυτά παρασκευάστηκαν λίγο πριν την μέτρηση ώστε να είναι φρέσκα.

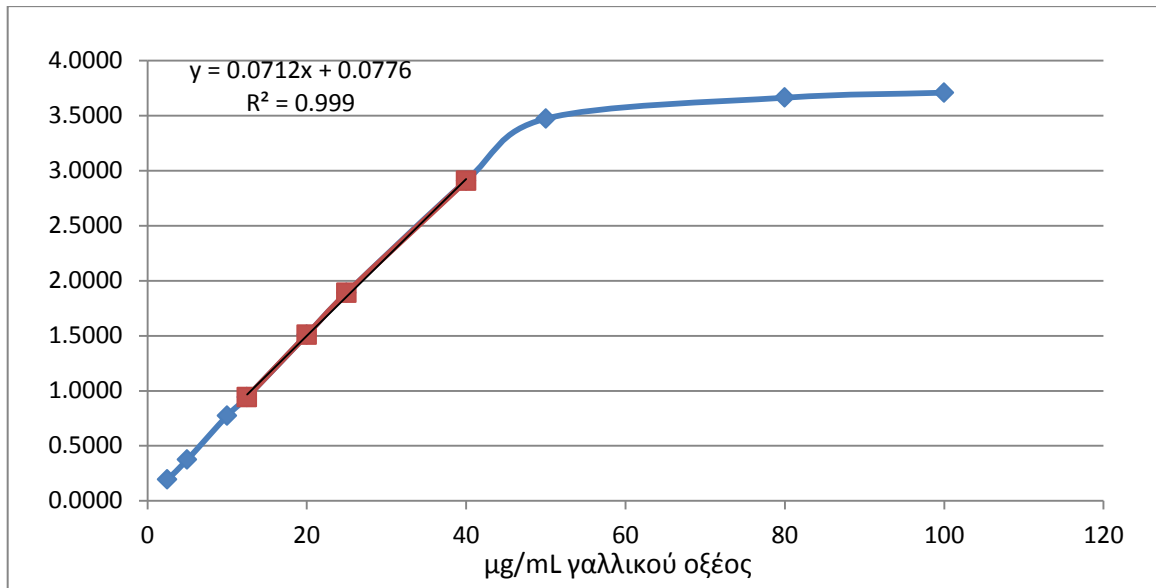
Από κάθε εκχύλισμα παρασκευάστηκαν και μετρήθηκαν δυο συγκεντρώσεις διαλυμάτων 5 και 10 mg/mL (τελικές μετρούμενες συγκεντρώσεις 0.5 και 1 mg/mL αντίστοιχα).

- **Το πρωτόκολλο της μεθόδου TPC**

Το πρωτόκολλο για τον υπολογισμό των ολικών φαινολικών, σε 96τρυπη πλάκα, περιλαμβάνει την προσθήκη 25  $\mu$ L δείγματος, 125  $\mu$ L αραιωμένου διαλύματος Folin – Ciocalteu και 100  $\mu$ L διαλύματος  $Na_2CO_3$ . Ακολουθεί επώαση για 30 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μέτρηση στα 765 nm [99],[98].

#### Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Πριν από την μέτρηση των δειγμάτων κατασκευάστηκε καμπύλη γαλλικού οξέος (GA) με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (100  $\mu$ g/mL, 80  $\mu$ g/mL, 60  $\mu$ g/mL, 40  $\mu$ g/mL, 20  $\mu$ g/mL, 15  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL και 1  $\mu$ g/mL). Η καμπύλη που προέκυψε παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί:



Εικόνα 30. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση απορρόφησης – συγκέντρωσης γαλλικού οξέος είναι:

$$y = 0.0712 * x + 0.0776$$

Στη συνέχεια, από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης (με όρια  $0.900 < A < 2.950$ ) και με την εφαρμογή της εξίσωσης, υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση γαλλικού οξέος και εν συνεχεία η ισοδύναμη συγκέντρωση σε µg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος.

- **Υπολογισμός ολικών φλαβονοειδών (TFC)**

Ο υπολογισμός των εκχυλισμάτων ως προς την περιεκτικότητά τους σε ολικά φλαβονοειδή έγινε με βάση τη μέθοδο που προτάθηκε από τους Chatatikun και Chiabchalard (2013) [100].

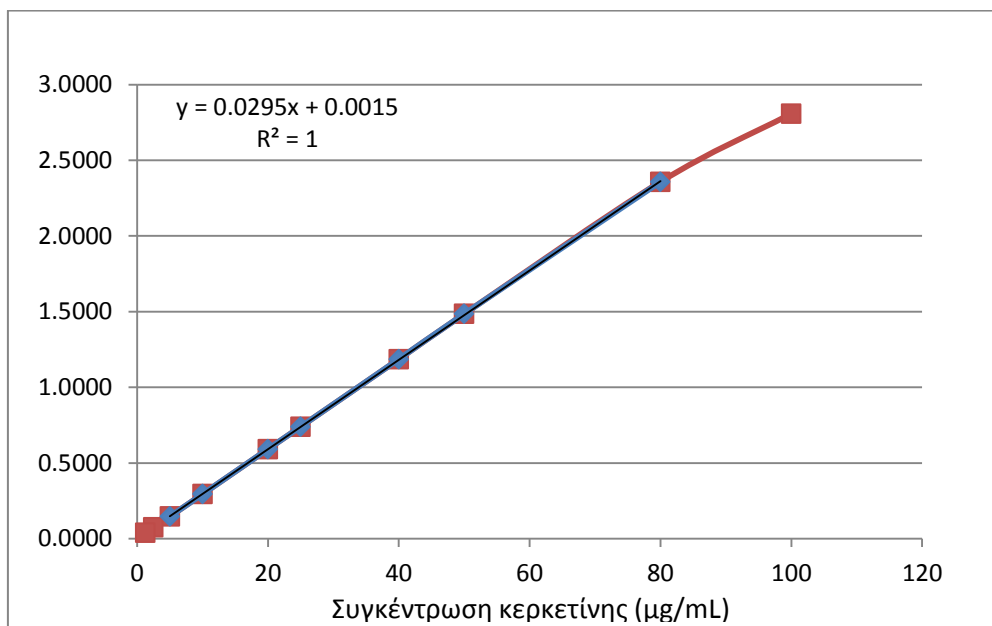
Όσον αφορά τα αντιδραστήρια, παρασκευάστηκαν διαλύματα 10%  $AlCl_3$  και 1 M sodium acetate ( $C_2H_3NaO_2$ ) λίγο πριν την μέτρηση ώστε να είναι φρέσκα. Για τα προς μέτρηση δείγματα, παρασκευάστηκαν 'stock' διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης 10 mg/mL σε DMSO (μετρούμενη συγκέντρωση 2 mg/mL) .

➤ **Το πρωτόκολλο της μεθόδου TFC**

Το πρωτόκολλο για τον υπολογισμό των ολικών φαλαινοειδών περιλαμβάνει αρχικά την προσθήκη 50 μL δείγματος στην 96τρυπη πλάκα, 20 μl αραιωμένου  $AlCl_3$ , 160 μL αιθανόλης και 20 μL  $C_2H_3NaO_2$ . Το μείγμα αφήνεται για 40 min στο σκοτάδι και εν συνεχεία μετράται η απορρόφηση του στα 415 nm [100].

Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης

Όμοια με τον υπολογισμό της ποσότητας του φαινολικού φορτίου έτσι και σε αυτή την περίπτωση κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς κερκετίνης (Quercetin) προκειμένου να υπολογιστεί η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φλαβονοειδή. Επομένως, μετρήθηκε η απορρόφηση των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης κερκετίνης (100 μg/mL, 80 μg/mL, 50 μg/mL, 40 μg/mL, 25 μg/mL, 20 μg/mL, 10 μg/mL, 5 μg/mL, 2.5 μg/mL και 1.25 μg/mL) από όπου και κατασκευάστηκε η ακόλουθη καμπύλη αναφοράς.



Εικόνα 31. Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης

Η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση απορρόφησης – συγκέντρωσης κερκετίνης είναι:

$$y = 0.0295 * x + 0.0015$$

Στη συνέχεια, από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης (με όρια  $0.20 < A < 2.400$ ) και με τη βοήθεια της εξίσωσης, υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση κερκετίνης και εν συνεχεία η ισοδύναμη συγκέντρωση σε  $\mu\text{g}$  κερκετίνης/g εκχυλίσματος.

- **Ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης**

Η αξιολόγηση των εκχυλισμάτων ως προς την ανασταλτική τους δράσης έναντι του ενζύμου τυροσινάση πραγματοποιήθηκε με βάση την μέθοδο των Masuda *et al.* (2008) [101].

- **Το πρωτόκολλο της μεθόδου για την αναστολή της τυροσινάσης**

Σε πλάκα 96 πηγαδιών, τα πηγάδια χωρίστηκαν σε 4 ομάδες: A (3 πηγάδια), B (1 πηγάδι), C (3 πηγάδια), D (1 πηγάδι) στα οποία τοποθετήθηκαν: A: 120  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος phosphate buffer 1/15 M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) και 40  $\mu\text{l}$  τυροσινάσης (92 units/ml) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, B: 160  $\mu\text{l}$  ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, C: 80  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος, 40  $\mu\text{l}$  δείγματος διαλυμένα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και 40  $\mu\text{l}$  τυροσινάσης, D: 120  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος και 40  $\mu\text{l}$  δείγματος διαλυμένα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στους 23 °C για 10 min και ακολούθησε προσθήκη 40  $\mu\text{l}$  L-DOPA 2.5mM διαλυμένης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, σε όλα τα πηγάδια. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 23 °C και μετρήθηκε η απορρόφηση όλων των δειγμάτων στα 475 nm [101] (ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε το Kojic acid  $\text{IC}_{50} \approx 1.34$ ). Το % ποσοστό της αναστολής υπολογίστηκε με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100$$

Όπου:

A: απορρόφηση 'control' (120  $\mu\text{L}$  phosphate buffer + 40  $\mu\text{L}$  τυροσινάσης + 40  $\mu\text{l}$  L-DOPA)

B: το τυφλό (blank) του 'control' (160  $\mu\text{L}$  phosphate buffer + 40  $\mu\text{l}$  L-DOPA)

C: απορρόφηση δείγματος (80  $\mu$ L phosphate buffer + 40  $\mu$ L δείγματος + 40  $\mu$ L τυροσινάσης + 40  $\mu$ L L-DOPA)

D: το τυφλό (blank) του δείγματος (120  $\mu$ L phosphate buffer + 40  $\mu$ L δείγματος + 40  $\mu$ L L-DOPA)

- **Διαλύτες - αντιδραστήρια**

Το υγρό CO<sub>2</sub> (99.5%) προμηθεύτηκε από την εταιρία AIR LIQUIDE HELLAS. Οι διαλύτες αιθανόλη 96% v/v, διχλωρομεθάνιο, οξικός εθυλεστέρας, κυκλοεξάνιο αγοράστηκαν από την Merck KGaA, Darmstadt, ενώ τα αντιδραστήρια 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), Folin-Ciocalteu, AlCl<sub>3</sub> και οξικό νάτριο (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (USA). Η απόλυτη αιθανόλη (για τα βιολογικά test) προμηθεύτηκε από την εταιρία Carlo Erba Reagents. Για τις αναλυτικές συσκευές έγινε χρήση HPLC grade διαλυτών με το ακετονιτρίλιο να έχει αγοραστεί από την Merck KGaA, Darmstadt, το οξικό οξύ (100% glacial) από την εταιρία Riedel-de Haën και το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποσταγμένο και φιλτραρισμένο μέσω της συσκευής Labconco Water Pro PS polishing station (Labconco Corporation, Kansas City, MSU).

# *Sideritis raeseri* ssp. *attica*

---

## 8 Εισαγωγικό μέρος

### 8.1 Γενικά στοιχεία του γένους *Sideritis*

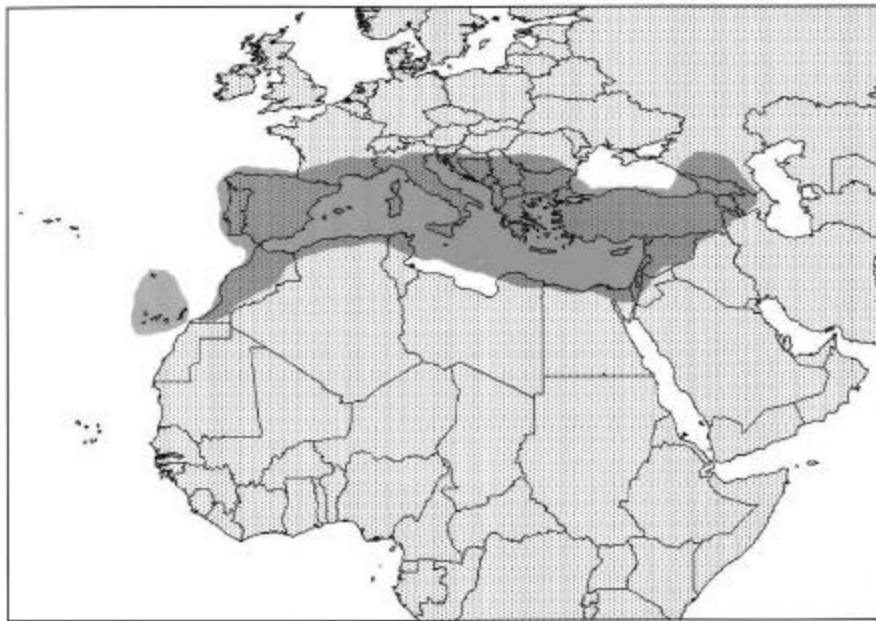


Ο *Sideritis* (Σιδηρίτιδα ή Σιδερίτης) γνωστό ως τσάι του βουνού ή ελληνικό τσάι και είναι ένα ευρέως διαδεδομένο ρόφημα το οποίο δεν λείπει από καμία ελληνική οικογένεια. Είναι γνωστό από τα αρχαία χρόνια για τις θεραπευτικές του ιδιότητες, ενώ λέγεται ότι πήρε το όνομά του από την ελληνική λέξη «σίδηρος», λόγω της ικανότητάς του να θεραπεύει πληγές από σιδερένια αντικείμενα. Μια άλλη εκδοχή αναφέρει ότι ονομάστηκε έτσι λόγω του σχήματος που έχει ο κάλυκας του άνθους του, ο οποίος μοιάζει με αιχμή λόγχης, ενώ μια τρίτη εκδοχή αναφέρεται ότι ο Διοσκουρίδης έδωσε το όνομα αυτό λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του εγχύματος σε σίδηρο. Στην Κρήτη είναι γνωστό με το όνομα «μαλοτήρας», ονομασία που προέρχεται από τις ιταλικές λέξεις «male» (αρρώστια) και «tirare» (σύρω), επειδή στην ενετοκρατούμενη Κρήτη το θεωρούσαν πανάκεια για το κρυολόγημα και τις παθήσεις του αναπνευστικού [102].

Τις πρώτες περιγραφές για το γένος τις έχουμε από τον Θεόφραστο το 300 π.Χ. και αργότερα από τον Διοσκουρίδη, ο οποίος στο έργο του *Περί Ιατρικής Ύλης* (De Materia Medica) αναφέρει ότι η 'σιδηρίτιδα' αποτελεί μια πόα, με φύλλα πιο επιμήκη από το 'ελελίσφακον' (φασκόμηλο) και μικρότερα της μέντας, με γεύση ευχάριστη και καθόλου στυφή ενώ υπάρχουν σπόνδυλοι περιφερειακά στους βλαστούς και μέσα σ' αυτούς μαύρα σπέρματα [103].

Την πρώτη αναλυτική περιγραφή του γένους την έχουμε από τον Λινναίο το έτος 1737. Στη συνέχεια οι Webb και Berthelot (1836) στη μελέτη τους υποστήριξαν

ότι ο 'σιδερίτης' αποτελούσε ξεχωριστό γένος το οποίο ονομάστηκε '*Leucorhae*' [104]. Μερικά χρόνια αργότερα ο Bentham (1848) θεώρησε ότι τα είδη του προαναφερόμενου γένους αποτελούσαν μια υποομάδα (Section) του γένους *Sideritis* και το ονόμασε *Marrubiastrum* [105]. Είκοσι χρόνια αργότερα, ο Bolle (1863) επανέφερε την κατά Λινναίο κατάταξη και τέλος οι Mendoza-Hener το 1977 πρότειναν ότι οι σιδερίτες μπορούν να διακριθούν σε δύο υπογένη, τα *Sideritis* και *Marrubiastrum* στα οποία μπορούν να καταταχθούν τα διάφορα είδη που απαντώνται στις παραμεσόγειες περιοχές και στα Κανάρια νησιά, αντίστοιχα [106].



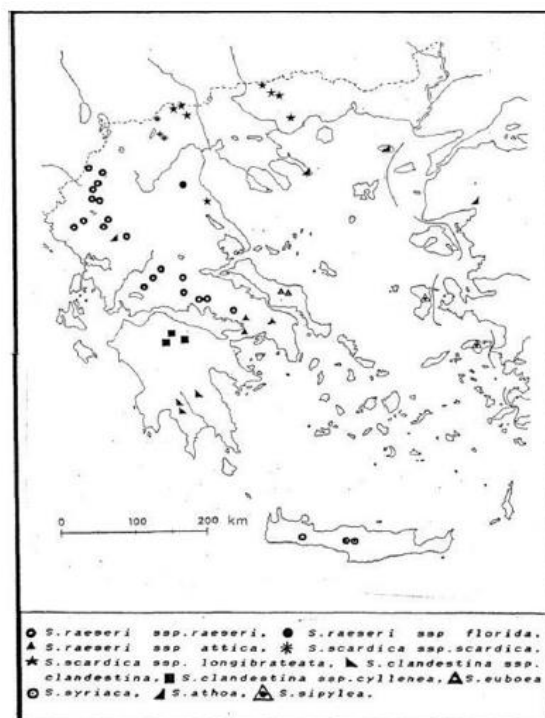
Εικόνα 32. Γεωγραφική εξάπλωση του γένους *Sideritis*

Σήμερα, το γένος *Sideritis* αποτελείται από 80 διαφορετικά είδη, τα οποία εξαπλώνονται κυρίως στο χώρο της Μεσόγειου και σε χώρες όπως η Ισπανία, η Γαλλία, η Ιταλία, τα Βαλκάνια, η Κύπρος, τα Κανάρια νησιά, η Μικρά Ασία, στον Καύκασο, στα παράλια της βορείου Αφρικής και σε περιοχές της Τουρκίας. Στον Ελλαδικό χώρο φύονται 14 είδη τα οποία είναι [106],[107],[108]:

- *Sideritis euboica* Heldr. (συνώνυμο *Sideritis syriaca* L. var. *condensata* Boiss. & Heldr.) ή τσάι της Εύβοιας
- *Sideritis clandestina* (Bory & Chaub.) Hayek ssp. *clandestina* (συνώνυμο *Sideritis theezans* Boiss. & Heldr., *Phlomis clandestina* Bory & Chaub.) ή τσάι του Ταΰγετου και του Μαλεβού (Πάρνωνα)
- *Sideritis clandestina* (Bory & Chaub.) Hayek ssp. *peloponnesiaca* (Boiss. & Heldr.) Baden (συνώνυμο *Sideritis peloponnesiaca* Boiss. & Heldr.) ή τσάι

- της Πελοποννήσου
- *Sideritis perfoliata* L. ssp. *perfoliata* (συνώνυμα *Sideritis glandulifera* Post)
  - *Sideritis perfoliata* L. ssp. *athoa* (Papanic. & Kokkini) Baden (συνώνυμα *Sideritis athoa* Papanic. & Kokkini, *Sideritis perfoliata* L. var. *lanata* Turrill) ή τσάι του Αγίου Όρους και των νησιών του Αιγαίου (Σαμοθράκη)
  - *Sideritis scardica* Griseb. (συνώνυμο *S. florida* Boiss. & Heldr.), γνωστό και ως Σιδερίτης ο πολυανθής
  - *Sideritis sipylea* Boiss.
  - *Sideritis syriaca* L. ssp. *syriaca* (συνώνυμο *Sideritis cretica* Boiss.) ή τσάι της Κρήτης (μαλοτήρα ή μαλοθήρα).
  - *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. ssp. *attica* (Heldr.) Papanic & Kokkini (συνώνυμο *Sideritis attica*)
  - *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. ssp. *raeseri* ή τσάι του Βελουχίου και του Παρνασσού
  - *Sideritis montana* L. *remota* (D' Urv.) Heywood
  - *Sideritis montana* L. *montana*
  - *Sideritis romana* L. subsp. *romana*
  - *Sideritis romana* L. subsp. *purpurea* (Talbot ex Benth), γνωστό και ως Σιδερίτης η πορφυρά

Όλα τα παραπάνω είδη ανήκουν ταξινομικά στην ομάδα sect. *Empedoflia* (Rafin). Bentham [107].



Εικόνα 33. Γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του Σιδερίτη στην Ελλάδα



Η χρήση του Σιδερίτη ως παραδοσιακό αφέψημα στις περιοχές της ανατολικής Μεσογείου και της Ισπανίας, έχει αυξήσει σημαντικά τις ανάγκες για καλλιέργειά του γένους, καθώς η συλλογή των αυτοφυών φυτών δεν αρκεί για να καλύψει τις αυξανόμενες ανάγκες της αγοράς [109]. Οι Pljevljakušić *et al.* (2011) αναφέρουν πως οι σημαντικές θεραπευτικές ιδιότητες του *S. raeseri* έχουν καταστήσει απαραίτητη την καλλιέργειά του σε περιοχές όπως η Σερβία, όπου μέχρι και σήμερα γίνονται εισαγωγές από την Αλβανία και την ΠΓΔΜ (Πρώην Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της Μακεδονίας). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την καλλιέργεια του είδους *S. scardica* και του υβριδίου *S. scardica* x *S. syriaca* [110].

Αντιθέτως, στην Ελλάδα ο Σιδερίτης είναι αυτοφυής, μεμονωμένα ή σε πληθυσμούς κυρίως σε ορεινές περιοχές με υψόμετρο πολλές φορές πάνω από 1.000 m. Συνήθως ευδοκμεί σε βραχώδη και ασβεστολιθικά εδάφη, αλλά μπορεί να προσαρμοστεί σε πολλούς τύπους εδαφών, με ένα εύρος pH 6 ως 8. Παρουσιάζει ιδιαίτερη αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες, με την ανάπτυξή του να αρχίζει πολύ νωρίς την άνοιξη. Η εγκατάσταση της καλλιέργειας μπορεί να γίνει σε χωράφια που έχουν καταστραφεί από μακροχρόνια χρήση ή ακόμα και σε βραχώδεις χορτολιβαδικές εκτάσεις. Η καλλιέργεια είναι ξερική και εύκολη, αλλά για να διατηρήσει το προϊόν την ποιότητά του, θα πρέπει οι συνθήκες να μοιάζουν στο μέγιστο δυνατό με εκείνες στους φυσικούς βιότοπους του είδους. Η καλλιεργητική φροντίδα αλλά και όλοι οι χειρισμοί μετά τη συγκομιδή έχουν ιδιαίτερη σημασία ώστε τα προϊόντα να χαρακτηρίζονται από υψηλή ποιότητα και σταθερότητα στην παράδοση [111].

## **8.2 Χρήσεις στη λαϊκή θεραπευτική**

Στη λαϊκή θεραπευτική το αφέψημα από τα υπέργεια τμήματα του φυτού χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση πολλών παθήσεων, όπως αυτού του κοινού κρυολογήματος και σε παθήσεις του ανώτερου αναπνευστικού. Έχει ευχάριστο άρωμα με υπόπικρη γεύση και σε συνδυασμό με μέλι και κανέλλα καταπραΰνει τον έντονο βήχα. Έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της δυσπεψίας, ως τονωτικό, εφιδρωτικό και διουρητικό. Είναι καταπραΰντικό κι επειδή δεν διεγείρει

το νευρικό σύστημα (σε σύγκριση με το τσάι), δρα ως κατευναστικό και δεν προκαλεί αϋπνία. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί στην πλύση πληγών και στην αντιμετώπιση στοματικών ελκών.



Εικόνα 34. *Sideritis raeseri* ssp. *attica*

Στην Ελλάδα, αλλά και σε αρκετές περιοχές της Τουρκίας, εγχύματα του φυτού έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανακούφιση των πόνων από εντερικές παθήσεις, ως αντισπασμωδικά και κατά των παθήσεων της καρδιάς [112],[113],[114]. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι μοναχοί του Αγίου Όρους το θεωρούσαν πανάκεια και το χρησιμοποιούσαν για την αντιμετώπιση κάθε νόσου, ακόμη και για παθήσεις του αιμοποιητικού συστήματος [115],[116].

Πρόσφατες μελέτες που δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό 'Journal of Alzheimer's disease' (2016) έδειξαν ότι το ελληνικό τσάι του βουνού ενισχύει τη μνήμη, τονώνει τις γνωστικές ικανότητες και βοηθά στην καταπολέμηση της νόσου Alzheimer. Η χορήγηση εκχυλίσματος *S. scardica* που έγινε σε ποντίκια για 25 μέρες, έδειξε τη μείωση του εγκεφαλικού οιδήματος κατά 80% [117],[118], ενώ η ίδια ερευνητική ομάδα πρότεινε ότι η καθημερινή κατανάλωση τσαγιού συμβάλλει στην υποχώρηση των συμπτωμάτων της νόσου και κατόπιν στην σταθεροποίηση της κατάστασης του ασθενούς.

Μια επιπλέον χρήση των ειδών του γένους (ιδίως του *S. euboaea*) είναι ως ενισχυτικό γεύσης και συντηρητικό του ελαιόλαδου. Λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων τους σε φλαβονοειδή, τα διάφορα είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και συντηρητικών σε τρόφιμα [119].

Πληροφορίες για διάφορες χρήσεις του στη λαϊκή θεραπευτική έχουμε και από άλλες χώρες όπως η Ισπανία, όπου διάφορα είδη χρησιμοποιούνται για τη μακροχρόνια θεραπεία φλεγμονωδών καταστάσεων, ενώ ευρέως διαδεδομένη είναι η χρήση του είδους *S. angustifolia* ως φάρμακο για την επούλωση πληγών στα ζώα [120].

### 8.3 Το γένος *Sideritis* και αντιοξειδωτική δράση

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία τροφίμων, έχει δείξει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες. Ο λόγος είναι η αναγνώριση του πιθανού ρόλου των φυσικών αντιοξειδωτικών στην παρεμπόδιση πολλών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και στις ευεργετικές επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία [121].

Μέχρι πρότινος, τα πιο συνήθη αντιοξειδωτικά τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών είναι τα επονομαζόμενα 'Ε' (π.χ. το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (E321) και ο προπυλεστέρα του γαλλικού οξέος (E310) που χρησιμοποιούνται ως αντιοξειδωτικά σε τρόφιμα και καλλυντικά αντίστοιχα), για τα οποία μπορεί μεν να επιτρέπεται η χρήση τους, αλλά σε αυξημένες συγκεντρώσεις υπάρχει κίνδυνος για την εμφάνιση παρενεργειών [122]. Από την άλλη μεριά, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε φυσικά αντιοξειδωτικά έχει ιδιαίτερα ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία του ανθρώπου [123]. Έτσι, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μια μεγάλη στροφή προς τα φυσικά προϊόντα και τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών [124].

Το γένος '*Sideritis*' αποτελεί μια πηγή πλούσια σε πολυφαινόλες και φυσικά αντιοξειδωτικά με ιδιαίτερα ευεργετικές δράσεις για τον άνθρωπο. Αυτό πιστοποιείται εύκολα μέσα από την πληθώρα βιβλιογραφικών μελετών. Συγκεκριμένα, οι Tunalier *et al.* (2004) [125] στη μελέτη τους ασχολήθηκαν με την διερεύνηση του χημικού προφίλ 27 ειδών του γένους, τα οποία συνέλλεξαν από διάφορες περιοχές της Τουρκίας, καταλήγοντας ότι τα περισσότερα από αυτά τα είδη αποτελούν πλούσια πηγή σε φλαβονοειδή και φαινολικά παράγωγα. Στη συνέχεια, αξιολόγησαν όλα τα εκχυλίσματά ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση (αναστολή της ρίζας DPPH και της λιπιδικής υπεροξειδωσης) και παρουσίασαν πολύ καλά αποτελέσματα. Μέσα από αυτόν τον έλεγχο φάνηκε και η συσχέτιση μεταξύ του φαινολικού φορτίου και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων [124],[125],[126].

## 8.4 Το είδος *Sideritis raeseri*

Το είδος του *Sideritis raeseri* Boiss.& Heldr. αποτελείται από δύο υποείδη: τον *Sideritis raeseri* ssp. *raeseri* Boiss.& Heldr. και *Sideritis raeseri* ssp. *attica* (Heldr) Papanic. & Kokkini [107].



Εικόνα 35. Το είδος *Sideritis raeseri*

Το είδος διαθέτει απλά στελέχη μήκους 10-50 cm, γκριζωπά και μαλλιαρά. Τα φύλλα της βάσης είναι σπατουλοειδή με μίσχο 5-20 mm, έλασμα 12-60 x 5-8 mm (επιμηκυμένο έως αντιωοειδές), λευκοπά μαλλιαρά, σχεδόν ακέραια, αμβλύμορφα, επιμηκούμενα στη βάση. Τα φύλλα του στελέχους έχουν διαστάσεις 10-50 x 5-8 mm, σχεδόν επιφυή, στενά ελλειπτικά έως επιμηκυμένα οξύληκτα. Οι σπόνδυλοι της ταξιανθίας κυμαίνονται από 3-15, είναι απομακρυσμένοι και σε σπάνιες περιπτώσεις οι πάνω είναι συνωστισμένοι. Τα μέσα βράκτια έχουν διαστάσεις 5-20 x 8-19 mm, είναι κοντύτερα ή μακρύτερα από τα άνθη και έχουν σχήμα ωοειδές έως κυκλικό ή νεφροειδές με αδενώδεις τρίχες και με αιχμή 0.5-4 mm. Ο κάλυκας έχει ύψος από 6-13 mm με πιεσμένο βελούδινο τρίχωμα, αραιές αδενώδεις τρίχες και οδόντες 2-4 mm. Η στεφάνη έχει μήκος 8-15mm, είναι ελαφρά κίτρινη χωρίς καφέ λωρίδες [107].

## 8.5 Το υποείδος *Sideritis raeseri* ssp. *attica*

### 8.5.1 Συστηματική ταξινόμηση

Το φυτό *Sideritis raeseri* ssp. *attica* (συνώνυμο του *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. var. *attica*), το οποίο αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας, είναι δικοτυλήδονο φυτό που ανήκει στην τάξη των *Lamiales* και την οικογένεια *Labiatae* (*Lamiaceae*). Αρχικά περιγράφηκε ως ανεξάρτητο είδος με το όνομα *Sideritis raeseri* Heldr., στη συνέχεια χαρακτηρίστηκε ως ποικιλία του *S. raeseri*, όπου τελικά από την ταξινομική



Εικόνα 36. *Sideritis raeseri* ssp. *attica*

αναθεώρηση που έκαναν οι Papanikolaou & Kikini το 1982 καθιερώθηκε ως ξεχωριστό υποείδος [127]. Η συστηματική ταξινόμηση του υποείδους, σύμφωνα με τις αρχές του USDA (United States Department of Agriculture) είναι η ακόλουθη [128],[129]:

Πίνακας 10. Συστηματική ταξινόμηση του είδους *S. raeseri* ssp. *attica*

Βασίλειο ( <i>Regnum</i> )	<i>Plantae</i> (Plants)
Υποβασίλειο ( <i>Subregnum</i> )	<i>Tracheobionta</i> (Vascular plants)
Υπεράθροισμα ( <i>Superdivisio</i> )	<i>Spermatophyta</i> (Seed plants)
Άθροισμα ( <i>Divisio</i> )	<i>Magnoliophyta</i> (Flowering plants)
Υποάθροισμα ( <i>Subdivisio</i> )	<i>Magnoliophytina</i>
Κλάση ( <i>Classis</i> )	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotyledons)
Υποκλάση ( <i>Subclassis</i> )	<i>Asteridae</i>
Υπερτάξη ( <i>Superordo</i> )	<i>Lamianae</i>
Τάξη ( <i>Order</i> )	<i>Lamiales</i>
Οικογένεια ( <i>Familia</i> )	<i>Labiatae</i> ( <i>Lamiaceae</i> )
Γένος ( <i>Genus</i> )	<i>Sideritis</i>
Είδος ( <i>Species</i> )	<i>Sideritis raeseri</i>
Υποείδος ( <i>Subspecies</i> )	<i>Sideritis raeseri</i> subsp. <i>attica</i>

### 8.5.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους *S. raeseri* ssp. *attica*

Ο *Sideritis raeseri* ssp. *attica* είναι μία πολυετής πόα διαμέτρου έως 80 cm, με λευκόφαιο πυκνό εριώδες τρίχωμα. Έχει στελέχη αρκετά έως πολυάριθμα (έως 50) με ξυλώδη παραμένουσα βάση, όρθια ή ανερχόμενα, ύψους 10-30 (-50) cm, χωρίς διακλαδώσεις. Τα φύλλα της βάσης είναι σπατουλοειδή έως επιμήκη σπατουλοειδή, εριώδη, ακέραια ή οδοντωτά, αμβλεία έως σχεδόν αμβλεία, που στενεύουν σταδιακά για να σχηματίσουν το μίσχο με διαστάσεις 12-60 x 4-10 mm. Τα ανώτερα φύλλα του βλαστού είναι σχεδόν άμισχα, αποστρογγυλωμένα ή με σταδιακή στένωση στη βάση τους, οξύληκτα, διαστάσεων 10-50 x 5-8 mm. Η ταξιανθία έχει μήκος 3-25 cm, με 3 έως 15 αραιά σπονδυλώματα. Τα βράκτια φύλλα είναι νεφροειδή, βραχύτερα των ανθέων, με αδενώδες και μη αδενώδες τρίχωμα εξωτερικά, διαστάσεων 6-12 x 9-12 mm, απολήγοντα σε ακίδα μικρότερη του 1mm. Ο κάλυκας είναι στενός κωδωνοειδής με μήκος 7-13 mm, με πιεσμένο μη αδενώδες τρίχωμα καθώς και οδόντες 2-4mm. Στεφάνη ομοιόμορφα υποκίτρινη έως κίτρινη με μήκος 8-15 mm [130].

### 8.5.3 Γεωγραφική εξάπλωση

Το υποείδος *S. raeseri* ssp. *attica* είναι ενδημικό της Ελλάδας και φύεται στα όρη Πάρνηθα, Πατέρας και Κιθαιρώνας των νομών Αττικής και Βοιωτίας. Φυτρώνει σε σχισμές βράχων και πετρώδεις τοποθεσίες σε υψόμετρο πάνω από 1.000m και ανθίζει τους καλοκαιρινούς μήνες. Οι πληθυσμοί όμως του είδους στην Πάρνηθα έχουν συρρικνωθεί σημαντικά εξαιτίας της μεγάλης υπερσυλλογής και πλέον θεωρείται είδος υπό εξαφάνιση [130]. Πλέον βρίσκεται σε περιορισμένες θέσεις στο όρος, οι οποίες σύμφωνα με δημοσιευμένες πληροφορίες είναι οι κορυφές και οι τοποθεσίες 'Καραβόλα', 'Όρνιο', 'Ναυτικό', 'Ξεροβούνι' και 'Κυρά'. Στα όρη Πατέρας και Κιθαιρώνας είναι ακόμη πιο σπάνιο και έχει περιοριστεί στις κορυφές 'Μικρή Κολοσούρα' και 'Προφήτης Ηλίας', αντίστοιχα [131].



Εικόνα 37. Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Sideritis raeseri ssp. attica*

#### 8.5.4 Βιότοπος

Το υποείδος *S. raeseri ssp. attica* φύεται σε πετρώδεις ή βραχώδεις περιοχές με χαμηλούς αραιούς θάμνους, σε ανοίγματα δάσους ελάτων (*Abies cephalonica*) ή μικτού δάσους ελάτων-κωνοφόρων δέντρων (*Abies cephalonica*-*Pinus halepensis ssp. halepensis*), σε φωτεινές και ηλιόλουστες θέσεις. Συχνά οι πληθυσμοί εμφανίζονται πάνω από το όριο της δενδρώδους βλάστησης, σε ασβεστολιθικό υπόστρωμα. Πολύ σπάνια έχει παρατηρηθεί σε πυκνό δάσος. Οι βιότοποί του περιλαμβάνουν πλαγιές με μικρή κλίση ή πετρώδεις κορυφογραμμές, σε υψόμετρο 900-1.400 m. Ο πληθυσμός με το μεγαλύτερο υψόμετρο εντοπίζεται στην υψηλότερη κορυφή Καραβόλα της Πάρνηθας [130].

#### 8.5.5 Δρογοχημεία

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξημένο ενδιαφέρον για τη μελέτη της θεραπευτικών ιδιοτήτων των ειδών του γένους, με αποτέλεσμα σήμερα να υπάρχουν στην παγκόσμια βιβλιογραφία αρκετές αναφορές σχετικά με τα δραστικά συστατικά του γένους. Οι κυριότερες κατηγορίες αυτών είναι: τα τερπενοειδή



(μονοτερπένια, διτερπένια τύπου καουρανίου, ιριδοειδή κ.α.) και τα φαινολικά παράγωγα (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, φαινυλαιθανοειδικοί γλυκοσίδες κ.α.) [119],[132],[133].

### 8.5.5.1 Τερπένια

Τα τερπένια αποτελούν μη πολικά μόρια τα οποία απαντώνται κυρίως ως συστατικά των αιθέριων ελαίων. Στην πλειοψηφία τους είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό άρωμα των φυτών, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν αξιόλογες βιολογικές δράσεις.



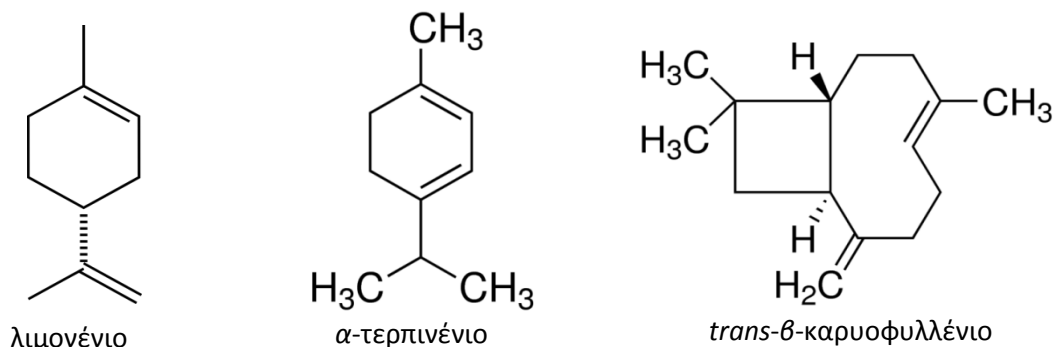
Ταξινομικά ανήκουν σε μια μεγάλη κατηγορία χημικών ενώσεων, η οποία τα διαφοροποιεί ανάλογα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα που έχουν στο μόριό τους. Έτσι, διακρίνονται σε μονοτερπένια (10C), σεσκιτερπένια (15C), διτερπένια (20C), σεστερτερπένια (25C), τριτερπένια (30C) και καρτενοειδή (40C).

Μολονότι η οικογένεια *Lamiaceae* αποτελείται από φυτά πλούσια σε αιθέρα έλαια, τα φυτά του γένους *Sideritis* χαρακτηρίζονται από μικρή περιεκτικότητα [134], με αποδόσεις που σπάνια ξεπερνούν το 1% [135],[136]. Επιπλέον, χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι τα τερπένια του γένους ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των μονοτερπενίων και των διτερπενίων [137],[138]. Στο γένος σπάνια απαντώνται μεταβολίτες σεσκιτερπενικής και τριτερπενικής δομής [109].

- Μονοτερπένια

Τα μονοτερπένια αποτελούν μικρά, μη πολικά μόρια, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός κυκλοπεντανο-(c)-πυρανικού δακτυλίου στο μόριό τους. Απαντώνται συχνά σε διάφορα γένη της οικογένειας *Lamiaceae* και αποτελούν χημειοταξινομικούς δείκτες [139]. Όσον αφορά το είδος *S. raeseri* ssp. *attica*, χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις  $\alpha$ - και  $\beta$ -πινενίου (42,84%), καθώς και από  $\beta$ -φελλανθρένιο/λιμονένιο,  $\alpha$ -τερπινένιο,  $\delta$ -3-καρένιο,  $\alpha$ -φελλανθρένιο, *trans*- $\beta$ -καρυοφυλλένιο, δικυκλογερμακρένιο κ.α. [111],[136].



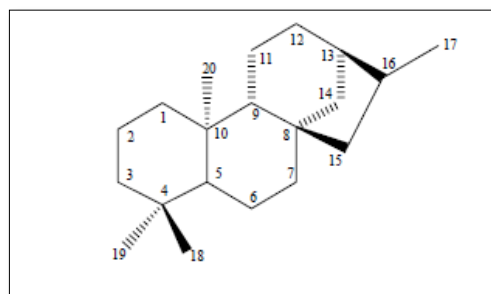


Εικόνα 38. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μονοτερπενικών μορίων

Οι βιολογικές δράσεις των μονοτερπενίων έχουν μελετηθεί εκτενώς ώστε να γνωρίζουμε σήμερα ότι είναι μόρια με αξιόλογες δράσεις όπως: αντιαρθριτική, αναλγητική, αντιφλεγμονώδη, αντιαρρυθμική, κατευναστική, αντιυπερτασική, αντιοξειδωτική, διουρητική, αντιβιοτική, καθαρτική, ενώ έχουν δείξει κυτταροτοξική-αντιλευχαιμική δράση στην ανθεκτική καρκινική σειρά P<sub>388</sub> [112],[140],[141],[142].

- Διτερπένια

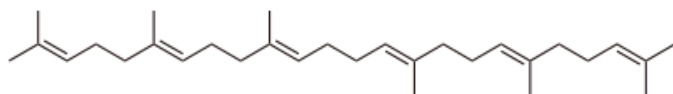
Τα διτερπένια αποτελούν μια πολυπληθή ομάδα χημικών ενώσεων, η οποία συναντάται ευρέως στο φυτικό βασίλειο. Αποτελούνται από 20 άτομα άνθρακα και αποτελούν μια ομάδα η οποία παρουσιάζει μεγάλες δομικές



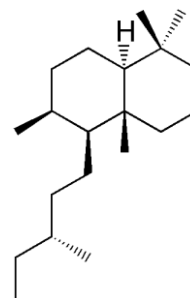
Εικόνα 39. Δομικός σκελετός διτερπενίων

διαφοροποιήσεις, με τις συνηθέστερες μορφές τους είναι τα οξυγονωμένα παράγωγα με κέτο- ή υδρόξυ- ομάδες στο μόριό τους [143]. Οι Fraga *et al.* (2012) [144] στη φυτοχημική - ταξινομική μελέτη που έκαναν, κατέταξαν τα μεσογειακά είδη του γένους *Sideritis* σε τέσσερις κατηγορίες βάσει του χημειότυπού τους. Η ταξινόμηση έγινε ως εξής: i) είδη που συνθέτουν τριτερπένια, αλλά όχι διτερπένια, ii) είδη που συνθέτουν δικυκλικά διτερπένια τύπου λαβδανίου και όχι άλλα διτερπένια, iii) είδη που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τετρακυκλικών

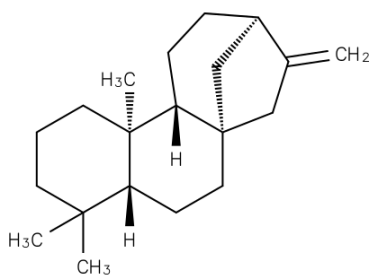
διτερπενίων τύπου *ent*-καουρενίου και iv) είδη που συνθέτουν τετρακυκλικά διτερπένια τύπου *ent*-μπεγιε-15-ενίου ή/και του *ent*-ατισ-13-ενίου. Με βάση τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών παρατηρήθηκε ότι τα είδη της ανατολικής και κεντρικής Μεσογείου (Τουρκία, Ιταλία, Ελλάδα) ανήκουν στην τρίτη κατηγορία συνθέτοντας κυρίως διτερπένια τύπου *ent*-καουρενίου [111],[144].



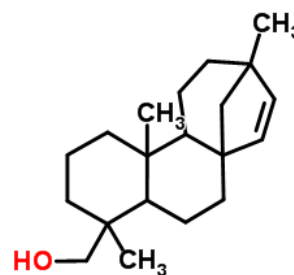
i) Σκουαλένιο: μόριο τριτερπενικού τύπου



ii) διτερπένιο λαβδανικού τύπου



iii) τετρακυκλικό διτερπένιο τύπου *ent*-καουρενίου



iv) *ent*-μπεγιε-15-εν-19-ολ: τετρακυκλικό διτερπένιο τύπου *ent*-μπεγιε-15-ενίου

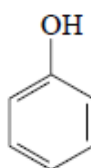
Εικόνα 40. Χαρακτηριστικά παραδείγματα διτερπενίων του γένους *Sideritis*

Τα διτερπένια αυτού του τύπου (Εικόνα 40) παρουσιάζουν αυξημένο ενδιαφέρον με δράσεις όπως: αντιτροφική, εντομοκτόνο, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή, αντιική, δράση κατά των ρευματικών παθήσεων καθώς και κυτταροτοξική, ενώ έχει βρεθεί ότι είναι καλοί αναστολείς του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ που σχετίζεται με τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού σε καταστάσεις λοιμώξεων [112].

Ορισμένα, από τα πιο χαρακτηριστικά καουρένια που έχουν απομονωθεί από το είδος *S. raeseri* είναι η σιδερόλη, η σιδεριδιόλη, η σιδεροξόλη, η εποξυσιδερόλη και η εποξυϊσολινεαρόλη [106],[145].

### 8.5.5.2 Φαινολικά παράγωγα

Τα φαινολικά παράγωγα αποτελούν και αυτά μία ευρεία κατηγορία φυσικών προϊόντων με κοινό χαρακτηριστικό την ύπαρξη ενός βενζολικού δακτυλίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στο μόριό τους (ελεύθερα ή συνδεδεμένα) (Εικόνα 41). Βιοσυνθετικά προέρχονται από την οδό του σικιμικού και του οξικού οξέος [146].



Εικόνα 41 . Φαινολικός δακτύλιος

Στους μεταβολίτες της κατηγορίας αυτής έχει αποδοθεί ένας μεγάλος αριθμός φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Η πιο γνωστή όμως εξ αυτών, η οποία και τα χαρακτηρίζει, είναι η αντιοξειδωτική τους δράση, η οποία σχετίζεται με την καταπολέμηση του οξειδωτικού stress που θεωρείται υπεύθυνο για την εκδήλωση πολλών παθήσεων. Παράλληλα, στις φαινόλες έχουν αποδοθεί και άλλες δράσεις, όπως αντιμικροβιακή, αντινεοπλασματική, αντική και προστατευτική δράση σε καρδιαγγειακές παθήσεις.

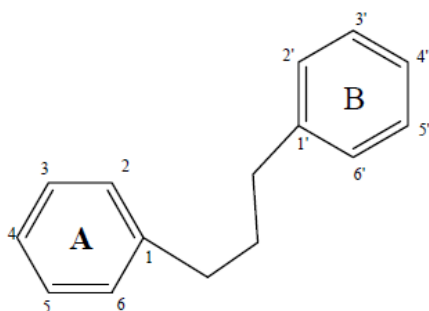
Δεδομένου ότι τα περισσότερα ελληνικά είδη χρησιμοποιούνται ευρέως με τη μορφή ροφημάτων, από τα προαναφερόμενα γίνεται εύκολα αντιληπτό το μεγάλο ενδιαφέρον που υπάρχει για την ενσωμάτωσή τους σε διατροφικά προϊόντα [147],[148],[149].

- Φλαβονοειδή

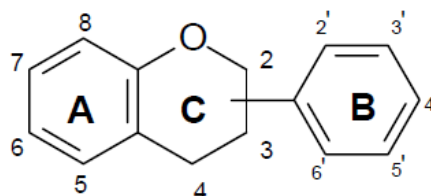
Το γένος *Sideritis* αποτελεί μια πλούσια πηγή πολυφαινολικών ενώσεων, κυρίως φλαβονοειδών, των οποίων η απομόνωση έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών τα τελευταία χρόνια. Αποτελούν καλούς ταξινομικούς δείκτες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των ειδών μεταξύ τους. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι το γένος *Sideritis* παρουσιάζει μεγάλη δυσκολία

στην ταξινόμησή του λόγω της μεγάλης υβριδοποίησης που παρατηρείται. Όπως είναι γνωστό, τα υβρίδια διακρίνονται δύσκολα με βάση μόνο τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, γι' αυτό και έχει γίνει μία στροφή προς τη διερεύνηση των δευτερογενών μεταβολιτών με σκοπό την εύρεση χημειοταξινομικών δεικτών [150].

Από χημικής άποψης, τα φλαβονοειδή είναι φαινολικά παράγωγα τα οποία αποτελούνται από 15 τουλάχιστον άτομα άνθρακα (2 βενζολικούς πυρήνες ενωμένους με μία αλυσίδα 3 ατόμων άνθρακα), με δομή που αναφέρεται ως C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Θεωρούνται παράγωγα του φαινυλοπροπανίου και συντίθενται μέσω των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού και του οξικού οξέος.



Εικόνα 42. Σύστημα C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>



Εικόνα 43. Βασικός σκελετός των φλαβονοειδών

Αρκετοί μεταβολίτες της κατηγορίας έχουν απομονωθεί από το είδος *S. raeseri*, όπως είναι οι ακόλουθοι: ο 7-γλυκοσίδης της απιγενίνης [132], η απιγενίνη [151], η υπολετίνη, η 3'-O-μεθυλοϋπολετίνη, η ισοσκουτελλαρεΐνη και η 4'-O-μεθυλοϊσοσκουτελλαρεΐνη [152]. Οι Gabrieli *et al.* (2005) [133] απομόνωσαν 7-O-(β-D-αλλοπυρανοσυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανόσυλο παράγωγα 5,8-διυδροξυφλαβονών (ενώσεις ιδιαίτερα πολικές), ενώ οι Pljevljakušić *et al.* (2011) από το υποείδος *S. raeseri* ssp. *raeseri* εντόπισαν τους γλυκοσίδες των φλαβονών 4'-O-μεθυλοϋπολετίνη και 4'-O-μεθυλοϊσοσκουτελλαρεΐνη με τη χρήση φασματομετρίας μάζας [153]. Επίσης, από το υποείδος αυτό έχουν απομονωθεί ο 7-O-β-D-αλλοπυρανοσυλο-β-D γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελλαρεΐνης και δύο 7-γλυκοσίδες της απιγενίνης [112].

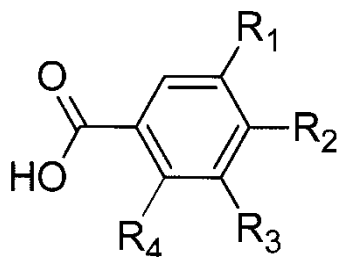
Τα φλαβονοειδή και οι δράσεις τους αποτελούν ακόμη και σήμερα ένα μεγάλο αντικείμενο έρευνας για πολλούς ερευνητές και ο λόγος είναι οι αξιόλογες φαρμακολογικές τους ιδιότητες. Πέραν της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης, οι οποίες έχουν ήδη αναφερθεί, ορισμένα φλαβονοειδή έχουν δείξει καλή

αντιβακτηριδιακή και αντιμυκητιασική δράση έναντι μικροοργανισμών όπως ο *Staphylococcus aureus* και η *Escherichia coli* [154]. Παρουσιάζουν επίσης αντιελκωτική, ηπατοπροστατευτική και προστατευτική δράση κατά της οστεοπόρωσης [109],[155]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση φλαβονοειδών αυξάνει την αντίσταση των αιμοφόρων αγγείων και οδηγεί σε ελάττωση της διαπερατότητάς τους. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση της κυκλοφορικής ανεπάρκειας των φλεβών και του εγκεφάλου, των κυρσών, σε οφθαλμορραγίες, σε αιμορραγίες διαβητικών και υπερτασικών, σε μητρορραγίες κ.ά. [156].

Επίσης, τη θετική συμβολή τους σε περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από κατάθλιψη, χρόνιο άγχος, Parkinson και την εκφυλιστική ασθένεια Alzheimer, έφερε στο φως η μελέτη των Turkmenoglu *et al.* (2015), όταν παρατήρησαν την ικανή ανασταλτική δράση τεσσάρων φλαβονοειδών του είδους στο ένζυμο hMAO [157]. Η μελέτη έδειξε ότι τα τέσσερα φλαβονοειδή προσδένονται επιλεκτικά στο ένζυμο αναστέλλοντάς το και έτσι θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για τη σύνθεση νέων ημισυνθετικών αναστολέων [157].

- Φαινολοξέα

Τα φαινολοξέα αποτελούν μία ομάδα οργανικών οξέων που εμπεριέχουν το λιγότερο μία καρβοξυλομάδα και ένα φαινολικό υδροξύλιο στο μόριό τους. Ο όρος χρησιμοποιείται κυρίως για παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος, τα οποία είναι πολύ διαδεδομένα στα φυτά και βρίσκονται είτε ελεύθερα είτε με τη μορφή εστέρων και γλυκοσιδών. Βιοσυνθετικά προέρχονται και αυτά από την οδό του σικιμικού οξέος.

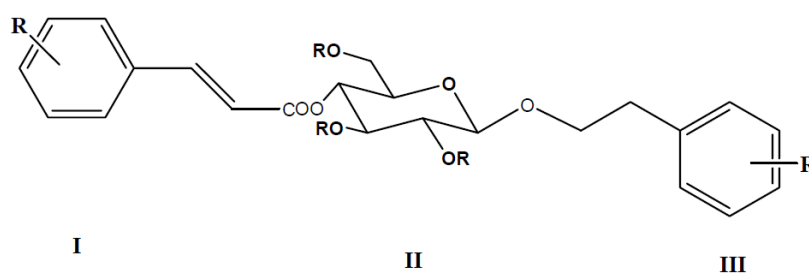


Εικόνα 44. Δομή φαινολικών οξέων

Από βιολογικής άποψης, τα φαινολοξέα παρουσιάζουν μια ποικιλία βιολογικών δράσεων όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική, αντιϊκή, κυτταροτοξική, ηπατοτοξική κ.α. [156].

- Φαινυλαιθανοϊδικοί γλυκοσίδες

Οι φαινυλαιθανοϊδικοί γλυκοσίδες είναι μία ομάδα υδατοδιαλυτών προϊόντων, ευρέως διαδεδομένων στο φυτικό βασίλειο, των οποίων η μελέτη έχει αρχίσει σχετικά πρόσφατα. Είναι γνωστοί και ως βερμπασκοσίδες ή φαινυλοπροπανοϊδικοί γλυκοσίδες. Το μόριό τους χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο αρωματικών ομάδων (μιας φαινυλαιθανολικής ομάδας και μιας ομάδας τύπου κινναμωμικού οξέος). Οι δύο αυτές αρωματικές ενότητες, οι οποίες μπορούν να είναι υποκατεστημένες κατά διάφορους τρόπους, συνδέονται συνήθως με μία β-D-γλυκοπυρανόση μέσω γλυκοσιδικού και εστερικού δεσμού, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φαινυλαιθανολική ομάδα συνδέεται στην ανωμερική θέση της γλυκόζης, ενώ στον εστερικό δεσμό με τη μονάδα του κινναμωμικού οξέος συμμετέχει συνήθως η υδροξυλομάδα της θέσεως 4 του σακχάρου.



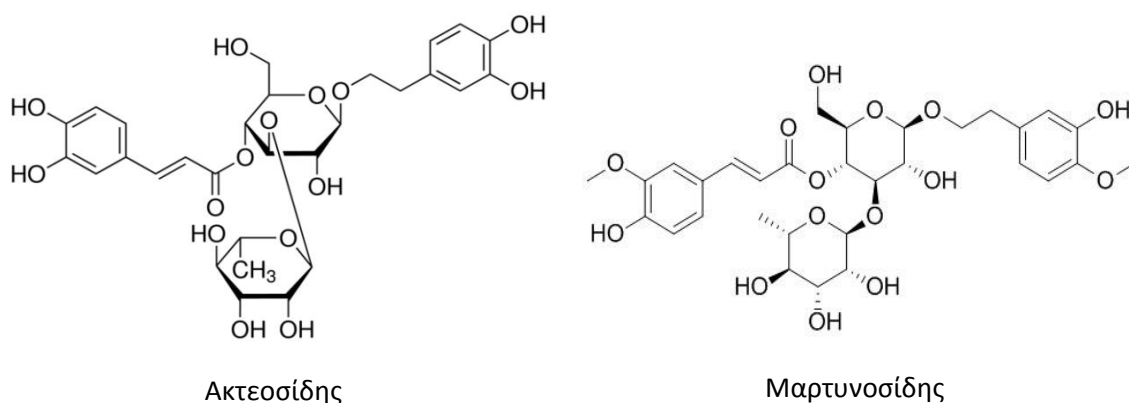
Εικόνα 45. Δομικός σκελετός φαινυλαιθανοϊδικών γλυκοσίδων

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 45) φαίνονται τα χαρακτηριστικά τμήματα του μορίου τα οποία είναι: (I) Κινναμωμική ομάδα, (II) Ομάδα β-D-γλυκοπυρανόσης και (III) Φαινυλαιθανολική ομάδα.

Βιοσυνθετικά η φαινυλαιθανολική ομάδα προέρχεται από την τυροσίνη, η οποία διαδοχικά μετατρέπεται σε τυραμίνη και τυροσόλη. Αντίθετα, η δεύτερη αρωματική ομάδα προκύπτει βιοσυνθετικά από την οδό: φαινυλαλανίνη -

κινναμωμικό οξύ - π-κουμαρικό οξύ. Αρχικά, γίνεται γλυκοσυλίωση της φαινυλαιθανολικής ομάδας και στη συνέχεια ακολουθεί η εστεροποίηση του οξειδικού τμήματος.

Οι φαινυλαιθανοϊδικοί γλυκοσίδες ταξινομούνται με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά στις εξής κατηγορίες: μονοσακχαριδικά παράγωγα, δισακχαριδικά παράγωγα, τρισακχαριδικά παράγωγα, γλυκοσίδες που δεν έχουν τη β-D-γλυκοκυρανόση ως κεντρικό σάκχαρο και στα σύνθετα παράγωγα με ιριδοειδή.



Εικόνα 46. Χημικοί τύποι χαρακτηριστικών βερμπασκοσίδων του υποείδους *S. raeseri ssp. raeseri*

Οι περισσότεροι βερμπασκοσίδες έχουν απομονωθεί από φυτά γνωστά για τη δράση τους στη λαϊκή θεραπευτική και θεωρούνται δραστικά μόρια. Μελέτες που έχουν γίνει έδειξαν κυρίως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιιική, κυτταροτοξική, ανοσοκατασταλτική, αντιυπερτασική, αντιηπατοτοξική, αντιτροφική, νευροκαταπραϋντική - αντιεπιληπτική, και αντιηπατοτοξική δράση [112]. Τρεις από τους πιο χαρακτηριστικούς βερμπασκοσίδες που έχουν απομονωθεί από είδος *S. raeseri ssp. raeseri* είναι ο ακτεοσίδης, ο λαβαντουλιφολιοσίδης (Κεφάλαιο 9.8.3) και ο μαρτυνοσίδης [158].

# *S. raeseri ssp. attica* Πειραματικό μέρος

---

## 9 *Sideritis raeseri ssp. attica*

### 9.1 Λόγοι επιλογής του είδους *Sideritis raeseri ssp. attica*

Όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω τα είδη του γένους *Sideritis* χρησιμοποιούνταν επί σειρά ετών στη λαϊκή θεραπευτική για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων, όπως αυτές του κοινού κρυολογήματος καθώς και για παθήσεις του ανώτερου αναπνευστικού. Επιπλέον, μελέτες που έχουν γίνει έχουν δείξει σημαντική δράση έναντι της νόσου Alzheimer, ενώ ταυτόχρονα έχουν δείξει τη σημαντική ενίσχυση της μνήμης και της τόνωσης των γνωστικών ικανοτήτων. Επιπλέον, η μονογραφία ειδών του γένους *Sideritis* καταρτίστηκε και καταχωρήθηκε επίσημα το 2015 από τον EMA και αφορά την χρήση του αποξηραμένου, υπέργειου τμήματος του φυτού με τη μορφή αφεψήματος για την αντιμετώπιση του κοινού κρυολογήματος καθώς και των γαστρεντερικών διαταραχών [159]. Τα προαναφερόμενα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το συγκεκριμένο είδος είναι ενδημικό της χώρας μας, αλλά και η ελλιπής βιβλιογραφία για μελέτες σχετικά με το χημικό του φορτίο, είναι οι λόγοι που μας οδήγησαν στην επιλογή του για περαιτέρω μελέτη.

Συγκεκριμένα, σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών εκχύλισης προκειμένου να παραχθούν εκχυλίσματα τα οποία θα χαρακτηρίζονται από καλή αντιοξειδωτική δράση και υψηλό φαινολικό φορτίο. Τέλος, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, έλαβε χώρα η φυτοχημική μελέτη του δραστικότερου εκχυλίσματος με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των κυριότερων μεταβολιτών του.

### 9.2 Σχεδιασμός εκχυλιστικής διαδικασίας

Η ερευνητική μας ομάδα, η οποία ανήκει Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, έχει αναπτύξει μία γενική διαδικασία εκχύλισης των φυτικών δρογών με σκοπό την παραλαβή του συνόλου των περιεχόμενων



μεταβολιτών και την αξιολόγηση του χημικού περιεχομένου τους. Πιο συγκεκριμένα, η δρόγη εκχυλίζεται με την τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE) και γίνεται με τη χρήση διαδοχικών διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Αναλυτικότερα: αρχικά γίνεται χρήση διχλωρομεθανίου (DCM) για την παραλαβή των άπολων μεταβολιτών, στη συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση με MeOH για την παραλαβή των συστατικών μέσης πολικότητας και τέλος γίνεται εκχύλιση με H<sub>2</sub>O για την παραλαβή των πιο πολικών μεταβολιτών.

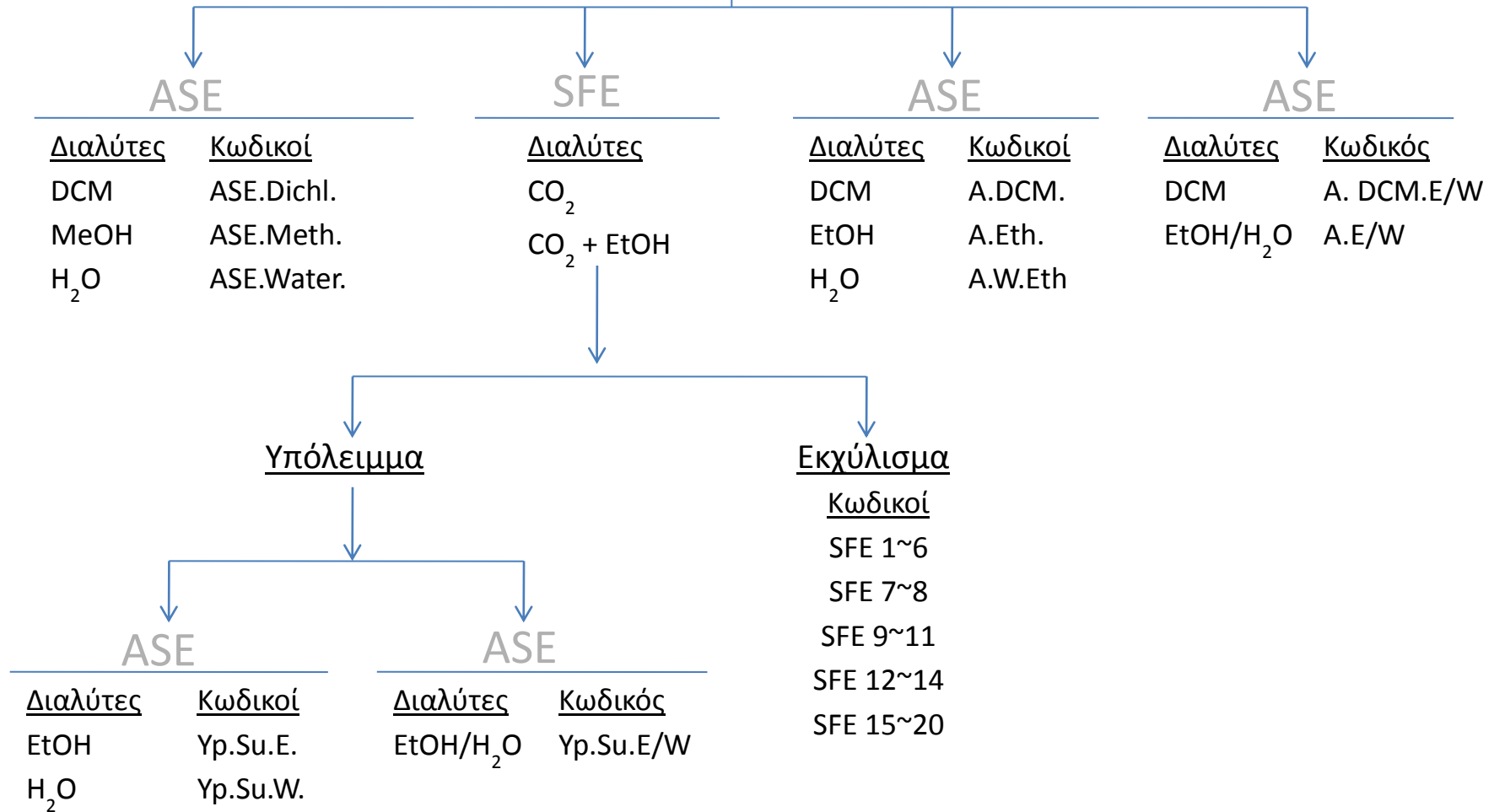
Ωστόσο, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, στόχος ήταν η διερεύνηση για την αντικατάσταση των τοξικών διαλυτών DCM και MeOH με διαλύτες φιλικούς προς το περιβάλλον, χωρίς να μειώνεται το φαινολικό φορτίο των εκχυλισμάτων και κατ' επέκταση η αντιοξειδωτική δράση τους. Πιο συγκεκριμένα, έγινε μία προσπάθεια αντικατάστασης του DCM με Υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> (παρουσία συνδιαλύτη) και η αντικατάσταση της MeOH από EtOH.

Στο επόμενο διάγραμμα παρουσιάζεται σχηματικά η πορεία εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκε, με τις αντίστοιχες τεχνικές και τους κωδικούς των παραχθέντων εκχυλισμάτων. Συνοπτικά, ο σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- I. Παρασκευή εκχυλισμάτων με την πάγια μέθοδο εκχύλισης, με την τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE) και διαλύτες DCM (**ASE.Dichl.**), MeOH (**ASE.Meth.**) και H<sub>2</sub>O (**ASE.Water**).
- II. Παρασκευή διαδοχικών εκχυλισμάτων με διαλύτες DCM (**A.DCM.EtOH**), EtOH (**A.EtOH.**) και H<sub>2</sub>O (**A.W.EtOH.**),
- III. Παρασκευή διαδοχικών εκχυλισμάτων με διαλύτες DCM (**A.DCM.E/W**) και EtOH/H<sub>2</sub>O (**A.E/W**).
- IV. Παρασκευή εκχυλισμάτων για την αντικατάσταση του DCM με διαλύτες μη τοξικούς - φιλικούς προς το περιβάλλον και συγκεκριμένα με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> παρουσία συνδιαλύτη EtOH (**SFE 1~6**, **SFE 7~8**, **SFE 9~11**, **SFE 12~14** και **SFE 15~20**).
- V. Εκχύλιση του υπολείμματος της προαναφερόμενης διαδικασίας στο ASE με διαλύτες EtOH (**Υp.Su.E.**) και H<sub>2</sub>O (**Υp.Su.W.**) διαδοχικά, ή απευθείας με διαλύτη EtOH/H<sub>2</sub>O (**Υp.Su.E/W**).

- VI. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης και του ολικού φαινολικού φορτίου των όλων των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων και σύγκριση των αποτελεσμάτων τους
- VII. Βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου εκχύλισης με σκοπό τη μείωση της κατανάλωσης διαλυτών και του χρόνου εκχύλισης
- VIII. Και τέλος απομόνωση και ταυτοποίηση των κύριων μεταβολιτών του δραστικότερου εκχυλίσματος

## *S. raeseri ssp. attica*



Εικόνα 47. Πορεία εκχυλίσεων του φυτού *S. raeseri ssp. attica*

### 9.3 Υλικά και μέθοδοι

Η συλλογή του φυτικού υλικού έγινε στην Πάρνηθα το 2006, ενώ η ξήρασή του έγινε με φυσικό τρόπο σε σκοτεινό και καλά αεριζόμενο χώρο για 20 ημέρες.

Οι τεχνικές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της ενότητας είναι τα εξής:

- Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE-1-2 (SEPALEX)
- Συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE 300 (DIONEX)
- Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) κανονικής και αντίστροφης φάσης
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)
- Ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Semiprep HPLC)
- Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (FCPC)
- Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητισμού (NMR) Bruker Avance III 600 MHz.
- Φωτόμετρο τύπου 'reader Infinite m200 pro' (TECAN) για μετρήσεις απορρόφησης στα πλαίσια των βιολογικών δοκιμών

### 9.4 Παραλαβή εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της επιταχυνόμενης εκχύλισης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η πάγια μέθοδος εκχύλισης του εργαστηρίου μας, για την παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών μιας δρόγης, περιλαμβάνει τη χρήση της τεχνικής ASE. Η μέθοδος συνοπτικά αποτελείται από τα εξής στάδια: αρχικά χρήση DCM για την παραλαβή των μη πολικών συστατικών, στη συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση με MeOH για την παραλαβή των ουσιών ενδιάμεσης πολικότητας και τέλος πραγματοποιείται εκχύλιση με H<sub>2</sub>O για τους πιο πολικούς μεταβολίτες. Οι συνθήκες εκχύλισης για το καθένα από τα τρία στάδια παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 11. Συνθήκες πάγιας μεθόδου εκχύλισης στο ASE

Παράμετροι	DCM	MeOH	H <sub>2</sub> O
Θερμοκρασία (°C)	70	70	50
Πίεση (p.s.i)	1500	1500	1500
Χρόνος προθέρμανσης (min)	0	0	0
Χρόνος στατικής φάσης (min)	20	20	20
Όγκος <i>flushing</i>	60%	60%	60%
Χρόνος <i>purging</i> (sec)	100	100	100
Κύκλοι εκχύλισης	3	3	3

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τον προσδιορισμό και τη βελτιστοποίηση των παραπάνω συνθηκών πραγματοποιήθηκαν μελέτες στο εργαστήριό μας, έτσι ώστε να επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις στο μικρότερο δυνατό χρόνο, με τη μικρότερη ποσότητα διαλυτών.

Έτσι, ποσότητα (21 g) αποξηραμένων υπέργειων τμημάτων του *S. raeseri ssp. attica* εισήχθησαν στο ASE για τη διαδοχική εκχύλιση στις προαναφερόμενες συνθήκες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Βάρος δρόγης:** 21 g

**Διαλύτες:** DCM, MeOH και H<sub>2</sub>O

Πίνακας 12. Βάρη και αποδόσεις εκχύλισης με ASE με διαλύτες DCM, MeOH και H<sub>2</sub>O.

Διαλύτες	Κωδικός	Βάρος (g)	Συνολικό βάρος (g)	Απόδοση (%)	Συνολική απόδοση (%)
1) DCM	ASE.Dichl.1	0.8101	0.9859 g	3.85	4.68%
2) DCM	ASE.Dichl.2	0.1256		0.59	
3) DCM	ASE.Dichl.3	0.0503		0.23	
1) MeOH	ASE.Meth.1	2.9852	4.4522 g	14.21	21.18%
2) MeOH	ASE.Meth.2	1.0687		5.1	
3) MeOH	ASE.Meth.3	0.3983		1.89	
1) H <sub>2</sub> O	ASE.Water.1	1.2418	1.8857 g	5.91	8.97%
2) H <sub>2</sub> O	ASE.Water.2	0.4498		2.14	
3) H <sub>2</sub> O	ASE.Water.3	0.1941		0.92	

Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) για τον αρχικό, ποιοτικό τους έλεγχο.



Εικόνα 50. TLC κανονικής φάσης διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος *S.raeseri ssp. attica*. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 97/3



Εικόνα 49. TLC κανονικής φάσης μεθανολικού εκχυλίσματος *S.raeseri ssp. attica*. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 70/30



Εικόνα 48. TLC αντιστρόφου φάσης υδατικού εκχυλίσματος *S.raeseri ssp. attica*. Σύστημα ανάπτυξης H<sub>2</sub>O/MeOH 60/40

Από την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων TLC, τόσο με τη χρήση λάμπας UV όσο και με την παρατήρηση με γυμνό οφθαλμό, πριν και μετά την εμφάνιση με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης, διαπιστώθηκε ότι: το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα (**ASE.Dichl.**) είναι πλούσιο σε τερπενικούς μεταβολίτες (μωβ κηλίδες) (Εικόνα 50) ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα (**ASE.Meth.**) είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή και φαινολικά παράγωγα (κηλίδες που παρουσιάζουν απορρόφηση και εμφανίζονται κίτρινες μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο) (Εικόνα 49). Τέλος, στο υδατικό εκχύλισμα (**ASE.Water.**) είναι έντονη η παρουσία σακχάρων (κηλίδες καφέ χρώματος) (Εικόνα 48). Επιπλέον, από τις αποδόσεις του Πίνακα 13 προκύπτει ότι το υποείδος είναι πλούσιο σε μεταβολίτες μέσης πολικότητας, καθώς το μεγαλύτερο μέρος των μεταβολιτών του φυτού λαμβάνεται με τη χρήση MeOH και το ποσοστό αυτών να αγγίζει το 21.18% του βάρους της δρόγης.

Σημαντικό επίσης είναι και το ποσοστό των πολικών συστατικών που περιέχεται στο είδος του *S. raeseri ssp. attica* καθώς το ποσοστό του υδατικού εκχυλίσματος (**ASE.Water.**) φτάνει το 8.97%.

Τα εκχυλίσματα αυτά θα αποτελέσουν τη βάση για τη σύγκριση όλων των υπόλοιπων εκχυλισμάτων που θα προκύψουν στη συνέχεια, όσον αφορά την απόδοση, την αντιοξειδωτική δράση και το φαινολικό φορτίο.

## 9.5 Παραλαβή εκχυλισμάτων από το αρχικό υλικό με τη μέθοδο της υπερκρίσιμης εκχύλισης

Μία ποσότητα αποξηραμένων και κονιοποιημένων υπέργειων τμημάτων του *S. raeseri ssp. attica* εισήχθη στη συσκευή της SFE-1-2 για εκχύλιση στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 13. Ο σχεδιασμός του πειράματος και η επιλογή των συνθηκών λειτουργίας, έγιναν εμπειρικά λόγω της ελλιπούς βιβλιογραφίας στις διεργασίες Υ.Ε. για τα είδη του γένους *Sideritis* και έγιναν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η παραλαβή μεγάλου εύρους μη πολικών συστατικών.

Ποσότητα προς εκχύλιση: 50 g

Διάρκεια εκχύλισης: 5 h

Πίνακας 13. Συνθήκες υπερκρίσιμης εκχύλισης του φυτού *S. raeseri ssp. attica*

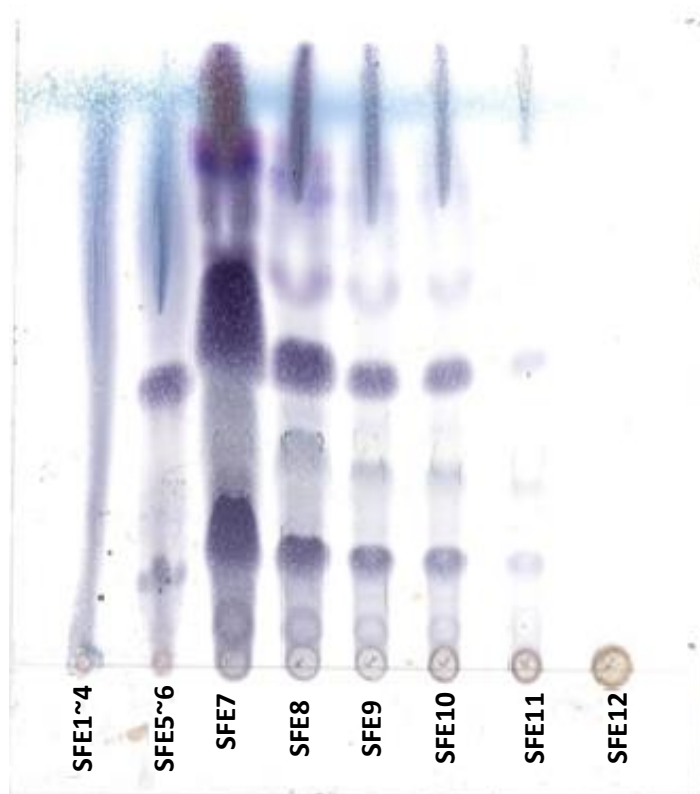
Δείγμα	Θερμοκρασία εκχυλιστήρα (°C)	Πίεση εκχυλιστήρα (bar)	Χρόνος (min)	Ροή (Kg/h)	Αιθανόλη (%)	Θερμοκρασία διαχωριστήρων (°C)	Πίεση διαχωριστήρων (bar)
SFE1	50	90	15	2.5	0	40	65
SFE2	50	90	15	2.5	0	40	65
SFE3	50	90	15	2.5	0	40	65
SFE4	50	90	15	2.5	0	40	65
SFE5	50	150	15	2.5	0	40	65
SFE6	50	150	15	2.5	0	40	65
SFE7	50	150	15	2.5	5	40	65
SFE8	50	150	15	2.5	5	40	65
SFE9	50	150	15	2.5	10	40	65
SFE10	50	150	15	2.5	10	40	65
SFE11	50	150	15	2.5	10	40	65
SFE12	50	150	15	2.5	20	40	65
SFE13	50	250	15	2.5	20	40	65
SFE14	50	250	15	2.5	20	40	65
SFE15	50	250	15	2.5	20	40	65
SFE16	50	250	15	2.5	20	40	65
SFE17	50	250	15	2.5	20	40	65
SFE18	50	250	15	2.5	20	40	65
SFE19	50	250	15	2.5	20	40	65
SFE20	50	250	15	2.5	20	40	65

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιλάμβανε: αρχικά την εκχύλιση του φυτού με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>, χωρίς την προσθήκη συνδιαλύτη, σε ήπιες συνθήκες (πίεση 90 και 150 bar) και εν συνεχεία αύξηση της πίεσης (250 bar) με προσθήκη αιθανόλης (σε διάφορες περιεκτικότητες) για την παραλαβή των πιο πολικών

συστατικών. Αναλυτικότερα, στα αρχικά στάδια (**SFE1** έως **SFE6**) έγινε μια προσπάθεια παραλαβής των πτητικών και άπολων συστατικών του φυτού, λόγω όμως της μειωμένης απόδοσης των ειδών σε αιθέριο έλαιο, η συλλογή του δεν κατέστη δυνατή (η περιεκτικότητα του είδους σε πτητικά συστατικά κυμαίνεται από 0,1% έως 0,4% [136],[138]). Παρόλα αυτά όμως το άρωμα το οποίο έβγαινε από τη συσκευή, κατά τη διαδικασία της εκχύλισης ήταν πολύ ευχάριστο θυμίζοντας αυτό του φρέσκου φυτού.

Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη συνδιαλύτη αιθανόλης σε ποσοστά 5% (κλάσματα **SFE7** έως **SFE8**) και 10% (κλάσματα **SFE9** έως **SFE11**) στα 150 bar και ολοκληρώθηκε με 20% αιθανόλη στα 250 bar (κλάσματα **SFE11** έως **SFE20**).

Στη συνέχεια όλα τα κλάσματα της Υ.Ε. ελέχθησαν ως προς χημικό τους φορτίο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Ο έλεγχος έδειξε ότι τα πρώτα κλάσματα της διεργασίας (**SFE1** έως **SFE8**) είναι πλούσια σε λιπαρά συστατικά και τερπενικούς μεταβολίτες (Εικόνα 51), ενώ τα πιο πολικά εκχυλίσματα λόγω της αύξησης της πίεσης και του συνδιαλύτη (**SFE9** έως **SFE20**) έχουν εμπλουτιστεί με πιο πολικά συστατικά όπως φαινολικά παράγωγα, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα (Εικόνα 52 και 53).



Εικόνα 51. Κλάσματα της Υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE 1~12. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 98/2



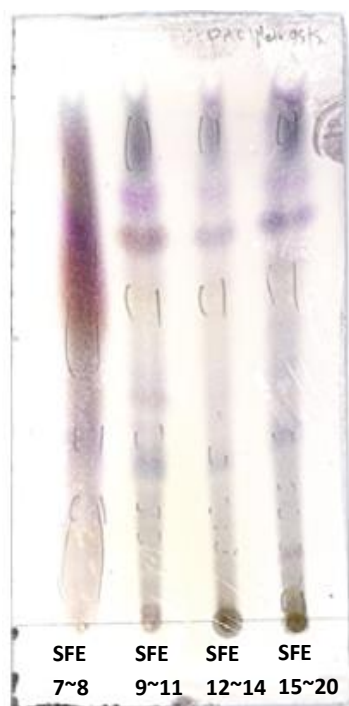
Λόγω του παρόμοιου χημικού προφίλ που παρουσιάζουν μερικά από τα εκχυλίσματα της Υ.Ε., αποφασίστηκε η συνένωσή τους και έτσι προέκυψαν πέντε τελικά εκχυλίσματα: **SFE1~6**, **SFE7~8**, **SFE9~11**, **SFE12~14** και **SFE15~20**. Οι αποδόσεις και τα βάρη των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 14. Βάρη και αποδόσεις κλασμάτων υπερκρίσιμης εκχύλισης του φυτού *S. raeseri ssp. attica*

Δείγμα	Βάρος (g)	Απόδοση (%)	Συνολική απόδοση
SFE1~6	0.002	0%	6.09 %
SFE7~8	0.614	1.23	
SFE9~11	1.9949	3.99	
SFE12~14	0.2447	0.49	
SFE15~20	0.1914	0.38	

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα, προκύπτει ότι η μέγιστη απόδοση λαμβάνεται με τη χρήση συνδιαλύτη 10%.

Στη συνέχεια παρατίθεται η ανάλυση των συνενωμένων κλασμάτων με TLC.



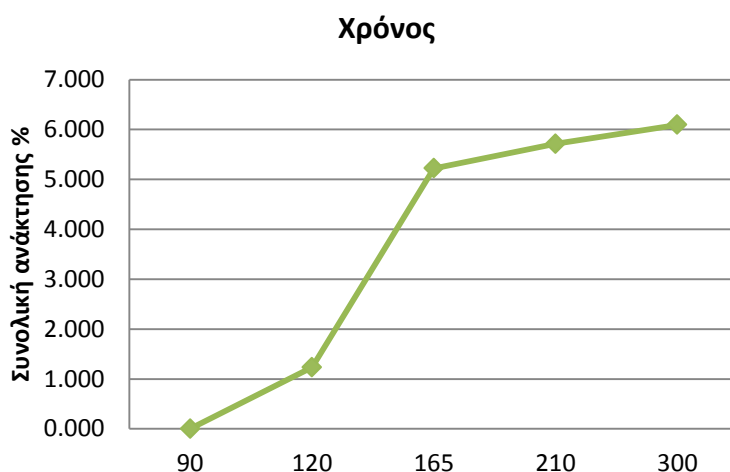
Εικόνα 53. Συνενωμένα κλάσματα υπερκρίσιμης εκχύλισης. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 95/5



Εικόνα 52. Συνενωμένα κλάσματα υπερκρίσιμης εκχύλισης. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 90/10

Από τη σύγκριση των αποδόσεων των εκχυλίσεων που αναφέρονται στους Πίνακες 12 και 14, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η συνολική απόδοση της Υ.Ε. είναι υψηλότερη από αυτή του εκχυλίσματος **ASE.Dichl.** (6.09% έναντι 4.68%). Η διαφορά οφείλεται στις ιδιότητες του υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> το οποίο μπορεί και παραλαμβάνει αποδοτικότερα τα λιπόφιλα συστατικά του φυτού σε σχέση με το DCM. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε και από τις αναλύσεις με TLC, μιας και τα δείγματα της Υ.Ε. παρουσιάζονται πλουσιότερα σε δευτερογενείς μεταβολίτες.

Το γεγονός ότι ο απαιτούμενος χρόνος για την ολοκλήρωση της Υ.Ε. είναι μεγαλύτερος (5 h), σε σύγκριση με το αντίστοιχο εκχύλισμα του ASE (60 min), οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι η ποσότητα δρόγης που εισάγαμε στο SFE ήταν μεγαλύτερη (50 g για το SFE, ενώ 21 g για στο ASE). Με μια πιο προσεκτική παρατήρηση των αποτελεσμάτων, παρατηρείται ότι ο χρόνος εκχύλισης θα μπορούσε να μειωθεί σημαντικά, εάν από τη διαδικασία Υ.Ε. παραλείπαμε τα στάδια παραλαβής των κλασμάτων **SFE1** έως **SFE6** και **SFE15** έως **SFE20**, για τα οποία οι αποδόσεις είναι ιδιαίτερα χαμηλές και δεν συνεισφέρουν ουσιαστικά στην τελική απόδοση του εκχυλίσματος. Με αυτόν τον τρόπο ο χρόνος εκχύλισης θα μειωνόταν σημαντικά (στις 2 h), ενώ η απόδοση του θα κυμαίνονταν στο 5.71%, τιμή υψηλότερη από αυτή του ASE (Εικόνα 54).



Εικόνα 54. Συνολική απόδοση υπερκρίσιμης εκχύλισης ως προς το χρόνο (min)

Επιπλέον, παρατηρείται ότι με την αύξηση του ποσοστού του συνδιαλύτη αυξάνεται η απόδοση της Υ.Ε., γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαδικασία

επηρεάζεται από τη διάχυση των συστατικών στον κύριο όγκο του διαλύτη (διαλυτική ικανότητα του μέσου). Η επίδραση είναι τόσο ισχυρή που ο διπλασιασμός του ποσοστού του συνδιαλύτη οδηγεί στον τριπλασιασμό της απόδοσης.

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η αντικατάσταση του DCM με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> είναι δυνατή μιας και η διεργασία της Υ.Ε. μπορεί και παραλαμβάνει ποσοτικά τα μη πολικά συστατικά της δρόγης, ενώ ταυτόχρονα παράγει ποιοτικώς ανώτερα εκχυλίσματα, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με περισσότερους δραστικούς μεταβολίτες.

## 9.6 Εκχύλιση υπολείμματος της Υ.Ε. με την τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης

Όπως προαναφέρθηκε, ένα από τα μειονεκτήματα της Υ.Ε. είναι η αδυναμία να παραλαμβάνει πολικούς μεταβολίτες. Το υπόλειμμα λοιπόν της διεργασίας, απαλλαγμένο πλέον από μη πολικά συστατικά και δυνητικά πλούσιο σε πολικούς μεταβολίτες, εισήχθη στο ASE για περαιτέρω εκχύλιση με διάφορους μη τοξικούς διαλύτες όπως EtOH και H<sub>2</sub>O με σκοπό την παραλαβή ενός εκχυλίσματος το οποίο διαθέτει πλούσιο φαινολικό φορτίο και υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Έτσι, το υπόλειμμα της Υ.Ε. χωρίστηκε σε 2 μέρη, το ένα εκχυλίστηκε διαδοχικά με διαλύτες EtOH και H<sub>2</sub>O, ενώ το άλλο με μίγμα EtOH/H<sub>2</sub>O σε αναλογία 50:50 με τις λοιπές συνθήκες εκχύλισης να είναι ίδιες με αυτές της κλασικής μεθόδου, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα (Πίνακας 15 και 17).

**Βάρος Υπολείμματος S.F.E.:** 23.5 g

**Διαλύτες:** EtOH και H<sub>2</sub>O

Πίνακας 15. Συνθήκες εκχύλισης υπολείμματος της Υ.Ε. στο ASE με EtOH και H<sub>2</sub>O

Παράμετροι	EtOH	H <sub>2</sub> O
Θερμοκρασία (°C)	70	50
Πίεση (p.s.i)	1500	1500
Χρόνος προθέρμανσης (min)	0	0
Χρόνος στατικής φάσης (min)	20	20
Όγκος <i>flushing</i>	60%	60%
Χρόνος <i>purging</i> (sec)	100	100
Κύκλοι	3	3

Πίνακας 16. Βάρη και αποδόσεις διαδοχικής εκχύλισης υπολείμματος της Υ.Ε. με ASE με EtOH και H<sub>2</sub>O

Διαλύτες	Κωδικός	Βάρος (g)	Απόδοση (%)	Συνολική Απόδοση
1) EtOH	Υρ.Су.Е.1	2.8058	11.93	16.75%
2) EtOH	Υρ.Су.Е.2	1.1010	4.68	
3) EtOH	Υρ.Су.Е.3	0.03	0.13	
1) H <sub>2</sub> O	Υρ.Су.У.1	0.9889	4.21	5.77%
2) H <sub>2</sub> O	Υρ.Су.У.2	0.3090	1.31	
3) H <sub>2</sub> O	Υρ.Су.У.3	0.0602	0.25	

**Βάρος Υπολείμματος S.F.E.:** 23.5 g

**Διαλύτες:** EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50

Πίνακας 17. Συνθήκες εκχύλισης υπολείμματος SFE στο ASE με EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50.

Παράμετροι	EtOH/H <sub>2</sub> O
Θερμοκρασία (°C)	70
Πίεση (p.s.i)	1500
Χρόνος προθέρμανσης (min)	0
Χρόνος στατικής φάσης (min)	20
Όγκος <i>flushing</i>	60%
Χρόνος <i>purging</i> (sec)	100
Κύκλοι	3

Πίνακας 18. Βάρη και αποδόσεις υπολείμματος SFE στο ASE με EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50.

Διαλύτες	Κωδικός	Βάρος (g)	Απόδοση (%)	Συνολική Απόδοση
1) EtOH/H <sub>2</sub> O	Υρ.Су.Е/У.1	4.3592	18.54	22.92%
2) EtOH/H <sub>2</sub> O	Υρ.Су.Е/У.2	0.7473	3.18	
3) EtOH/H <sub>2</sub> O	Υρ.Су.Е/У.3	0.2811	1.19	

Για την εξαγωγή όμως ασφαλών συμπερασμάτων κρίθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθούν αντίστοιχες εκχυλίσεις στο αρχικό υλικό με αντικατάσταση της Υ.Ε. με επιταχυνόμενη εκχύλιση, ώστε να είναι δυνατή η πλήρης σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ τους και να μπορούν να δικαιολογηθούν τυχόν διαφορές που μπορεί να προκύψουν ανάμεσα στα εκχυλίσματα. Πιο συγκεκριμένα, στο αρχικό φυτικό υλικό, έλαβε χώρα μια διαδοχική εκχύλιση με τη χρήση διαλυτών DCM, EtOH και H<sub>2</sub>O καθώς και μία με DCM και EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50.

Γ' αυτό το λόγο νέες ποσότητες από τον *S. raeseri ssp. attica* ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν στο ASE για εκχύλιση στις συνθήκες που παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες.

**Βάρος:** 23 g

**Διαλύτες:** DCM, EtOH και H<sub>2</sub>O

**Πίνακας 19. Συνθήκες διαδοχικής εκχύλισης στο ASE με DCM, EtOH και H<sub>2</sub>O**

Παράμετροι	DCM	EtOH	H <sub>2</sub> O
Θερμοκρασία (°C)	70	70	50
Πίεση (p.s.i)	1500	1500	1500
Χρόνος προθέρμανσης (min)	0	0	0
Χρόνος στατικής φάσης (min)	20	20	20
Όγκος <i>flushing</i>	60%	60%	60%
Χρόνος <i>purging</i> (sec)	100	100	100
Κύκλοι	3	3	3

**Πίνακας 20. Αποδόσεις και βάρη διαδοχικής εκχύλισης στο ASE με DCM, EtOH και H<sub>2</sub>O**

Διαλύτες	Κωδικός	Βάρος (g)	Απόδοση (%)	Συνολική απόδοση
1) DCM	A.DCM.1	1.875	8.150	8.46%
2) DCM	A.DCM.2	0.073	0.317	
3) DCM	A.DCM.3	0.02	0.08	
1) EtOH	A.Eth.1	1.329	5.780	9.53%
2) EtOH	A.Eth.2	0.428	1.861	
3) EtOH	A.Eth.3	0.434	1.889	
1) H <sub>2</sub> O	A.W.Eth.1	3.391	14.744	19.45%
2) H <sub>2</sub> O	A.W.Eth.2	0.771	3.351	
3) H <sub>2</sub> O	A.W.Eth.2	0.312	1.356	

**Βάρος:** 20 g

**Διαλύτες:** EtOH/H<sub>2</sub>O (50:50)

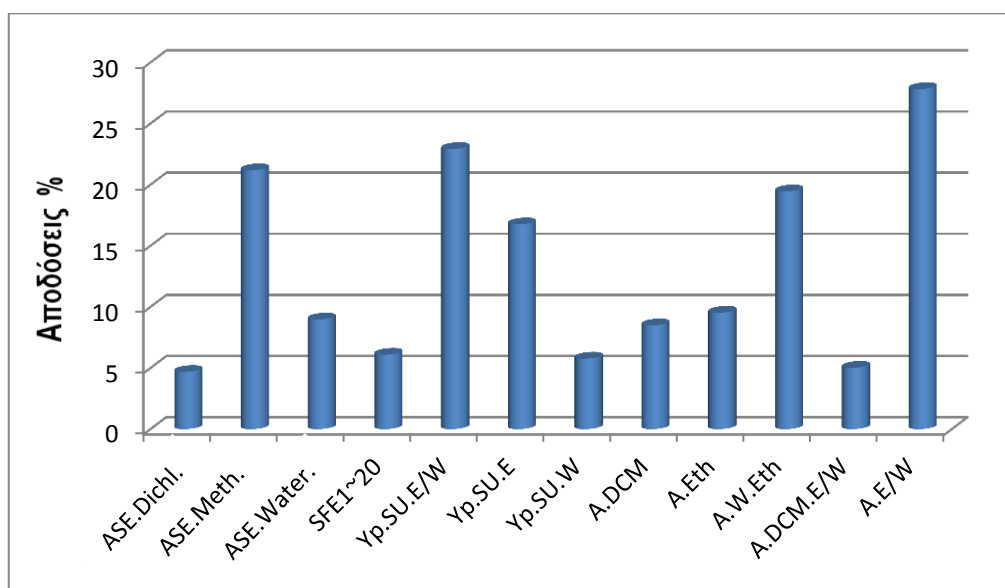
**Πίνακας 21. Συνθήκες διαδοχικής εκχύλισης στο ASE με DCM και EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50**

Παράμετροι	DCM	EtOH/H <sub>2</sub> O
Θερμοκρασία (°C)	70	70
Πίεση (p.s.i)	1500	1500
Χρόνος προθέρμανσης (min)	0	0
Χρόνος στατικής φάσης (min)	20	20
Όγκος <i>flushing</i>	60%	60%
Χρόνος <i>purging</i> (sec)	100	100
Κύκλοι	3	3

**Πίνακας 22. Βάρη και αποδόσεις εκχύλισης στο ASE με DCM και EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50.**

Διαλύτες	Κωδικός	Βάρος (g)	Απόδοση (%)	Συνολική απόδοση
1) DCM	A.DCM.E/W1	0.837	4.185	5.02%
2) DCM	A.DCM.E/W2	0.102	0.51	
3) DCM	A.DCM.E/W3	0.065	0.325	
1) EtOH/H <sub>2</sub> O	A.E/W.1	4.7691	23.845	27.82%
2) EtOH/H <sub>2</sub> O	A.E/W.2	1.2429	6.214	
3) EtOH/H <sub>2</sub> O	A.E/W.3	0.3614	1.807	

Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα εκχυλίσματα με τις αποδόσεις τους.



Εικόνα 55. Συγκεντρωτικές αποδόσεις επιταχυνόμενης και υπερκρίσιμης εκχύλισης

Πίνακας 23. Συγκεντρωτικές αποδόσεις εκχυλισμάτων επιταχυνόμενης και υπερκρίσιμης εκχύλισης

Κωδικός εκχυλίσματος	Διαλύτης εκχύλισης	Αποδόσεις (%)
ASE.Dichl.	DCM	4.68
ASE.Meth.	MeOH	21.18
ASE.Water.	H <sub>2</sub> O	8.97
A.DCM	DCM	8.46
A.Eth.	EtOH	9.53
A.Ψ.Eth.	H <sub>2</sub> O	19.45
A.DCM.Ε/Ψ	EtOH/H <sub>2</sub> O	5.02
A.Ε/Ψ.	EtOH/H <sub>2</sub> O	<b>27.82</b>
Υπ.Συ.Ε/Ψ.	EtOH/H <sub>2</sub> O	<b>22.92</b>
Υπ.Συ.Ε.	EtOH	16.75
Υπ.Συ.Ψ.	H <sub>2</sub> O	5.77
SFE 7~8	CO <sub>2</sub> +5 % EtOH	1.23
SFE 9~11	CO <sub>2</sub> +10 % EtOH	3.99
SFE 12~14	CO <sub>2</sub> +20 % EtOH	0.49
SFE 15~20	CO <sub>2</sub> +20 % EtOH	0.38

Με βάση τις παραπάνω αποδόσεις, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η μεγαλύτερη ποσότητα των μεταβολιτών παραλαμβάνεται με τη χρήση μίγματος EtOH/H<sub>2</sub>O. Τα αποδοτικότερα εκχυλίσματα της διεργασίας είναι τα: **A.Ε/Ψ.** ακολουθούμενο από το **Υπ.Συ.Ε/Ψ.** Η αυξημένη απόδοσή τους πιθανότατα να οφείλεται στο η πολικότητα του μίγματος είναι ιδανική για την ποσοστική

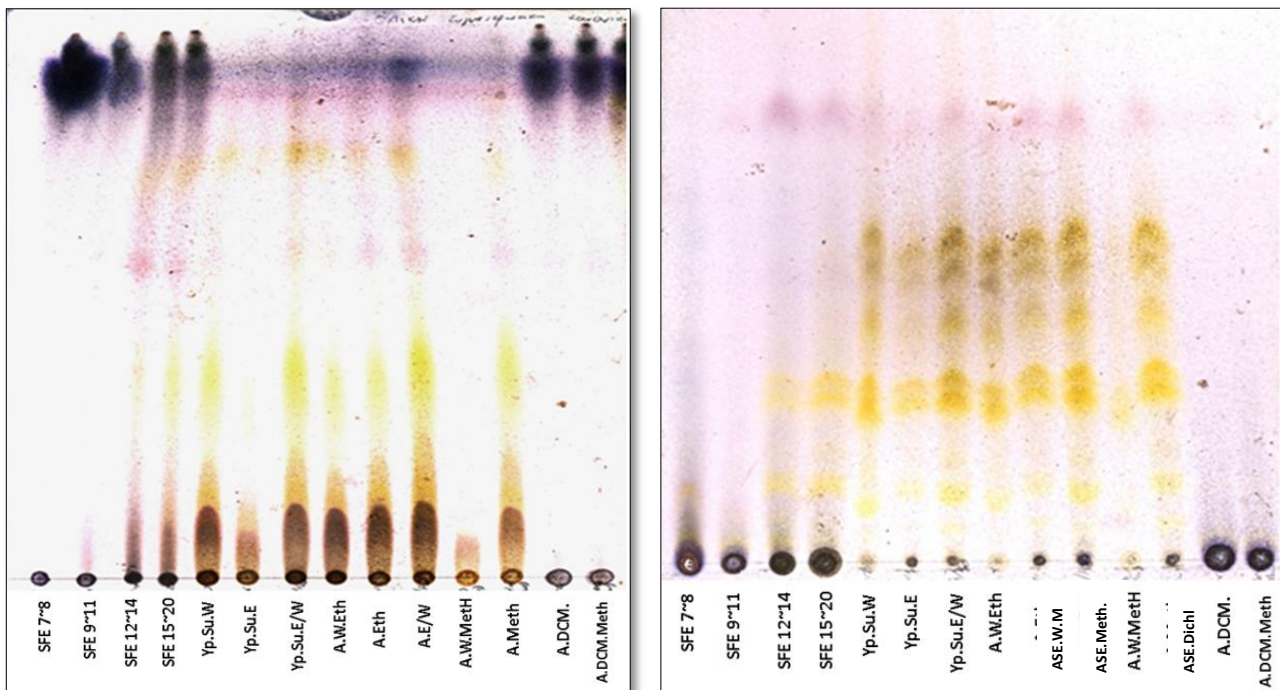
παραλαβή των μεταβολιτών καθώς και επειδή από τα προηγούμενα εκχύλισης έχουν προηγούμενα απομακρυνθεί οι κηροί και τα άπολα συστατικά, γεγονός που διευκολύνει την παραλαβή των λοιπών πιο πολικών μεταβολιτών (γλυκοσίδες φλαβονοειδών και κυρίως σάκχαρα) από πολικούς διαλύτες όπως το νερό και τα μίγματά του με την αιθανόλη.

### **9.6.1 Συγκριτική μελέτη του χημικού φορτίου και της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόμενων εκχυλισμάτων**

Αρχικά, τα παραγόμενα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) για τον έλεγχο του χημικού τους φορτίου. Η ανάλυση έδειξε ότι στα εκχυλίσματα υπήρχε έντονη η παρουσία μεταβολιτών όπως φλαβονοειδών, σακχάρων, ιριδοειδών και φαινυλαιθανοειδικών γλυκοσιδών (Εικόνα 56). Από τη σύγκριση μεταξύ τους, προκύπτει ότι οι διαφορές μεταξύ των υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων, τα οποία έχουν προκύψει με τη χρήση των μη πολικών διαλυτών διχλωρομεθάνιο και υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>, είναι κυρίως ποσοτικές και όχι ποιοτικές.

Στα υδατικά εκχυλίσματα παρατηρείται έντονα η παρουσία σακχάρων (ιδίως στα εκχυλίσματα **A.W.Eth** και **ASE.Water.**), ενώ σε όλα τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες EtOH και MeOH παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών και φαινολικών παραγώγων.

Όσο αφορά τα κλάσματα **SFE7~8**, **SFE9~11**, **SFE12~14**, **SFE15~20**, αυτά είναι ιδιαίτερα πλούσια σε μη πολικά συστατικά όπως λιπαρά και τερπένια, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται η παρουσία ορισμένων φλαβονοειδών ιδίως στα πιο πολικά κλάσματα (κίτρινες κηλίδες) (Εικόνα 56).



Εικόνα 56. Συγκεντρωτικές πλάκες TLC εκχυλισμάτων *S. raeseri ssp attica* κανονικής και αντιστρόφου φάσης. Συστήματα ανάπτυξης DCM/MeOH 70:30 και H<sub>2</sub>O/AcN 70:30 αντίστοιχα

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα αποδοτικότερα εκχυλίσματα είναι τα **A.E/W** (28.82%), **Yp.Su.E/W** (22.92%), **ASE.Meth.** (21.18%) και **A.W.Eth** (19.45%). Η χρήση μίγματος EtOH/H<sub>2</sub>O αποτελεί έναν καλό συνδυασμό για την παραγωγή εκχυλισμάτων με υψηλές αποδόσεις. Όπως όμως προέκυψε από την ανάλυση με TLC, οι υψηλές αποδόσεις δεν οφείλονται μόνο στην εκχύλιση δευτερογενών μεταβολιτών αλλά και στη συνεκχύλιση μεγάλης ποσότητας σακχάρων (Εικόνα 56).

Στο πρωτόκολλο εκχύλισης με DCM, EtOH και H<sub>2</sub>O η απόδοση του αιθανολικού εκχυλίσματος (**A.Eth.** = 9.53%) είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με αυτήν του αντίστοιχου μεθανολικού (**ASE.Meth.** 21.18%). Η EtOH, ως πιο άπολος διαλύτης από τη MeOH, φαίνεται πως δεν ήταν σε θέση να παραλάβει ποσοτικά τα πιο πολικά συστατικά του εκχυλίσματος, τα οποία εκχυλίστηκαν στη συνέχεια με τη χρήση H<sub>2</sub>O (**A.W.Eth.** = 19.45%).

Από την συνεκτίμηση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι η συνολική απόδοση της διαδοχικής εκχύλισης του υπολείμματος της Υ.Ε. με EtOH και H<sub>2</sub>O (**Yp.Su.E.** 16.75% και **Yp.Su.W.** 5.78%) είναι ίδια με αυτή της EtOH/H<sub>2</sub>O (**Yp.Su.E/W.** =



22.96%). Συνεπώς, η πρώτη θα μπορούσε εύκολα να αντικατασταθεί από τη δεύτερη, μειώνοντας σημαντικά τον όγκο διαλυτών αλλά και το χρόνο εκχύλισης. Επιπλέον, η διαδικασία θα μπορούσε να βελτιωθεί ακόμα περισσότερο εάν, οι τρεις κύκλοι εκχύλισης του **Υρ.Su.E/W.**, μειώνονταν σε δύο. Η απόδοση της διαδικασίας θα κυμαινόταν σε αντίστοιχα υψηλές τιμές (21.73%) (Πίνακας 24), ενώ θα είχαμε ακόμα μικρότερη κατανάλωση διαλυτών. Αντίστοιχα φαινόμενα παρατηρούνται και για τη διαδικασία εκχύλισης με DCM, EtOH και H<sub>2</sub>O (Πίνακας 24)

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της Υ.Ε. με αυτά της κλασικής εκχύλισης με DCM, προκύπτει ότι η πρώτη κατάφερε να παρέχει ένα πλουσιότερο εκχύλισμα με περισσότερα συστατικά. Αυτό επιβεβαιώνεται τόσο από την υψηλότερη απόδοση του εκχυλίσματος (**SFE1~20** = 6.09% έναντι **ASE.Dichl.** = 4.68%), όσο και από τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC (Εικόνα 56).

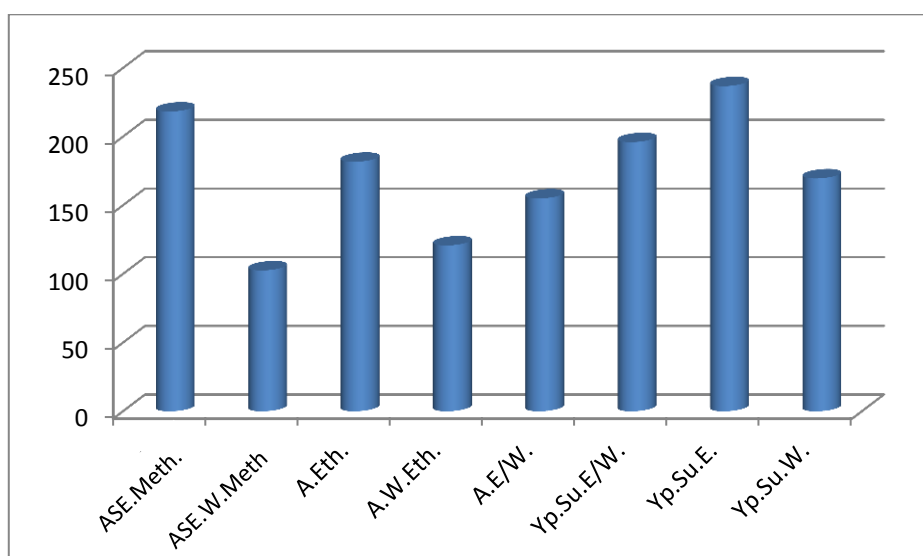
Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα του είδους *S. raeseri* ssp. *attica* (εκτός των διχλωρομεθανικών εκχυλισμάτων και του πιο άπολου κλάσματος '**SFE1~6**' της Υ.Ε.) υποβλήθηκαν σε ελέγχους αξιολόγησης αντιοξειδωτικής δράσης και ολικού φαινολικού φορτίου. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε, περιγράφεται στο κεφάλαιο της Οργανολογίας και τα αποτελέσματα αναλύσεων παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 24. Υπολογισμός φαινολικού φορτίου και αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του είδους *S. raeseri* ssp. *attica*

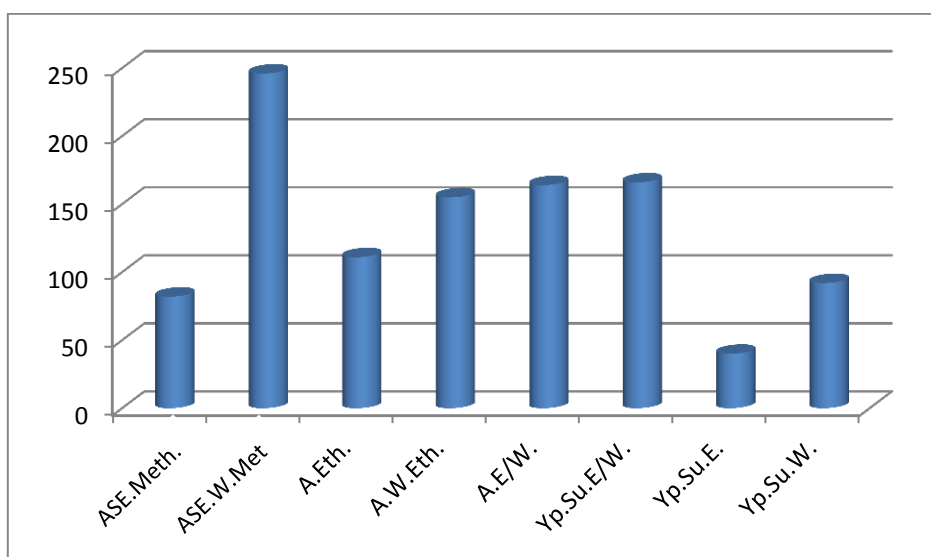
Κωδικός εκχυλίσματος	Διαλύτης εκχύλισης	Αποδόσεις (%)	Ολικό φαινολικό φορτίο (mg GAE / g εκχυλίσματος)	DPPH IC <sub>50</sub> (μg/ml)
A.DCM.Meth	DCM	4.68	-----	-----
ASE.Meth.	MeOH	21.18	218.3	82
ASE.Water.	H <sub>2</sub> O	8.97	102.6	246
A.DCM	DCM	8.46	-----	-----
A.Eth.	EtOH	9.53	181.7	111
A.W.Eth.	H <sub>2</sub> O	19.45	120.8	155
A.DCM.E/W	EtOH/H <sub>2</sub> O	5.02	-----	-----
A.E/W.	EtOH/H <sub>2</sub> O	27.82	155.0	164
Υρ.Su.E/W.	EtOH/H <sub>2</sub> O	22.92	196.0	166
Υρ.Su.E.	EtOH	16.75	<b>236.8</b>	<b>40</b>
Υρ.Su.W.	H <sub>2</sub> O	5.77	169.6	92
SFE 9~11	CO <sub>2</sub> +10 % EtOH	3.99	26.66	-----
SFE 12~14	CO <sub>2</sub> +20 % EtOH	0.49	80.60	-----
SFE 15~20	CO <sub>2</sub> +20 % EtOH	0.38	170.86	-----

Τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με τη χρήση μη πολικών διαλυτών δεν αξιολογήθηκαν ως προς τη δράση τους, λόγω της μικρής διαλυτότητάς τους στα διαλυτικά μέσα που χρησιμοποιούνται στα αντίστοιχα πρωτόκολλα. Η προσθήκη λιπόφιλων συστατικών στα αντιδραστήρια μέτρησης, είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία θολερότητας και το σχηματισμό ιζήματος, καθιστώντας τη μέτρηση αδύνατη. Έτσι, ο υπολογισμός και η σύγκριση των αποτελεσμάτων επικεντρώθηκε στη μέτρηση των πιο πολικών εκχυλισμάτων, των οποίων ο χρωματογραφικός έλεγχος έδειξε υψηλή περιεκτικότητα σε δραστικά παράγωγα.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παραπάνω ελέγχων.



Εικόνα 57. Τιμές ολικού φαινολικού φορτίου εκχυλισμάτων *S. raeseri ssp. attica* (mg GAE/g)



Εικόνα 58. Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων *S. raeseri ssp. attica* (IC<sub>50</sub>, µg/ml)

Στο σύνολό τους, τα εκχυλίσματα του *S. raeseri* ssp. *attica* παρουσίασαν καλή αντιοξειδωτική δράση και υψηλές τιμές ολικού φαινολικού φορτίου με δραστικότερο εξ αυτών να είναι το εκχύλισμα που προήλθε από το υπόλειμμα της Υ.Ε. με τη μέθοδο ASE και με διαλύτη αιθανόλη (**Υπ.Су.Е.**).

Συγκρίνοντας τις τιμές του εκχυλίσματος **Υπ.Су.Е.** με αυτές του μεθανολικού εκχυλίσματος της κλασικής μεθόδου (**ASE.Meth.**), το **Υπ.Су.Е.** είναι πλουσιότερο σε φαινολικό φορτίο με τιμές υψηλότερες κατά 8.9% (236.8 mg GAE/g εκχυλίσματος **Υπ.Су.Е.**, έναντι 218.13 mg GAE/g εκχυλίσματος **ASE.Meth.**) ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει δύο φορές ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση ( $IC_{50} = 40 \mu\text{g/ml}$ , έναντι  $IC_{50} = 82 \mu\text{g/ml}$ ).

Επιπλέον, ακόμα μεγαλύτερη είναι η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των εκχυλισμάτων **Υπ.Су.Е.** και **Α.Еth.** Οι διαφορές των τιμών είναι της τάξης του 31% για το ολικό φαινολικό φορτίο, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα του πρώτου είναι τρεις φορές μεγαλύτερη. Για τα εκχυλίσματα αυτά, τόσο έντονες διαφορές δεν ήταν αναμενόμενες μιας και ο μοναδικός παράγοντας που μεταβλήθηκε στη διαδικασία ήταν η αντικατάσταση του DCM με υπερκρίσιμο  $CO_2$ .

Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγούμαστε, παρατηρώντας τη δράση των αντίστοιχων υδατικών εκχυλισμάτων. Το εκχύλισμα **Υπ.Су.В.** παρουσίασε 60% υψηλότερο ολικό φαινολικό φορτίο σε σχέση με το αντίστοιχο **ASE.Water.** (196.0 mg GAE/g εκχυλίσματος, έναντι 120.8 mg GAE/g εκχυλίσματος) και σχεδόν διπλάσια τιμή αντιοξειδωτικής δράσης ( $IC_{50} = 92 \mu\text{g/ml}$ , έναντι  $IC_{50} = 155 \mu\text{g/ml}$ ).

Συνεπώς, από τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι διαφορές στη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων σχετίζονται άμεσα με την μέθοδο και τους διαλύτες παρασκευής τους.

Μία ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι ότι τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τις εκχυλίσεις με EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50 (**Α.Е/W.** και **Υπ.Су.Е/W.**), ενώ είχαν τις υψηλότερες αποδόσεις έδειξαν μέτρια αντιοξειδωτική δράση και φαινολικό φορτίο. Ο λόγος της μειωμένης δράσης τους οφείλεται στη συνεκχύλιση μεγάλης ποσότητας σακχάρων (Εικόνα 56) τα οποία, ενώ συνεισφέρουν στην απόδοση του εκχυλίσματος δε συμβάλουν καθόλου στη συνολική δράση του εκχυλίσματος. Συνεπώς, η χρήση μίγματος EtOH/H<sub>2</sub>O για την αντικατάσταση της

μεθανόλης δε θεωρείται ικανοποιητική, αν ο στόχος μας είναι η παρασκευή εκχυλίσματος με αντιοξειδωτική δράση.

Επίσης, από τις τιμές του Πίνακα 24 επιβεβαιώνεται η αρχική παρατήρηση σχετικά με τα κλάσματα της Υ.Ε., ότι η αύξηση του ποσοστού του συνδιαλύτη οδηγεί στη εκχύλιση περισσότερων δραστικών συστατικών. Ο διπλασιασμός και μόνο του ποσοστού της από 10% σε 20% έχει σαν αποτέλεσμα το τετραπλασιασμό της τιμής του TPC. Αποτέλεσμα αναμενόμενο, μιας και η αύξηση του ποσοστού του συνδιαλύτη αυξάνει την πολικότητα της κινητής φάσης και συνεπώς τη διαλυτική ικανότητα του CO<sub>2</sub> και κατ' επέκταση την εκχύλιση περισσότερων δραστικών συστατικών.

## **9.7 Συμπεράσματα αξιολόγησης των εκχυλιστικών διαδικασιών**

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων, προκύπτουν ορισμένα σημαντικά συμπεράσματα για τις δύο διεργασίες εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE) αποτελεί μια ιδιαίτερα γρήγορη τεχνική με πολύ υψηλές αποδόσεις, η οποία παρέχει τη δυνατότητα παραλαβής ολόκληρου του φάσματος των μεταβολιτών μιας δρόγης, σε μικρό χρονικό διάστημα, με μικρή κατανάλωση διαλυτών. Επιπλέον, η μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα χρήσης μεγάλου εύρους διαλυτών γιαυτό και θεωρείται ιδανική για την παρασκευή μεγάλης ποικιλίας εκχυλισμάτων από στερεά και ημιστερεά υποστρώματα. Αναλυτικότερα, η κατανάλωση διαλυτών της κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 120 έως και 140 ml για μια εκχύλιση, επειδή κατά κύριο λόγο απαιτούνται τουλάχιστον 2 με 3 επαναλαμβανόμενες εκχυλίσεις για την πλήρη παραλαβή των περιεχόμενων συστατικών, ένας μέσος όγκος κατανάλωσης είναι περίπου στα 240 – 360 ml (ποσότητα αρκετά ικανοποιητική).

Ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα της διεργασίας αποτελεί το γεγονός ότι η διαδικασία είναι ημιαυτοματοποιημένη, γεγονός το οποίο συμβάλει ακόμα περισσότερο στην χρήση της και στην εξοικονόμηση χρόνου.

Αρνητικά στοιχεία της διαδικασίας αποτελούν: η αδυναμία εκχύλισης συνεχούς ροής και το γεγονός ότι η επιλογή των συνθηκών εκχύλισης βασίζεται στην εμπειρία του χειριστή.

Στον αντίποδα, η διαδικασία της Υ.Ε. αποτελεί και αυτή μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο, η οποία χαρακτηρίζεται υψηλές αποδόσεις, χαμηλή κατανάλωση διαλυτών και μειωμένους χρόνους εκχύλισης. Επιπλέον, είναι φιλική προς το περιβάλλον, κάνει χρήση μη τοξικών διαλυτών, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για στερεές, όσο και για ημιστερεές - ρευστές πρώτες ύλες (υγρά διαλύματα).

Αρνητικά στοιχεία της διαδικασίας: η αδυναμία εκχύλισης πολικών συστατικών, οι υψηλές πιέσεις, η ασυνεχής λειτουργία αλλά και η έλλειψη μοντέλων πρόρρησης για την επιλογή των συνθηκών εκχύλισης.

Συνοψίζοντας επομένως τα παραπάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η συνδυαστική χρήση των δυο μεθόδων αποτελεί ένα ιδανικό εργαλείο για την παραγωγή εκχυλισμάτων με υψηλές αποδόσεις και αξιόλογη δράση (εκχυλίσματα **Υρ.Su.E.** και **Υρ.Su.E/W**) μιας και τα πλεονεκτήματα της μίας καλύπτουν τα μειονεκτήματα της άλλης.

Πιο συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα που προήλθαν με τη συνδυαστική χρήση της Υ.Ε. και του ASE, παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλές τιμές DPPH και TPC, μίας και η αρχική χρήση Υ.Ε. συνετέλεσε στην απομάκρυνση συστατικών της δρόγης, που δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και εκχύλισε συστατικά που δεν περιέχουν φαινολικό φορτίο. Στη συνέχεια, το υπόλειμμα της Υ.Ε., πλουσιότερο πλεόν σε δραστικά συστατικά, χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την παραγωγή δραστικών εκχυλισμάτων με την τεχνική του ASE. Η παρατήρηση αυτή ιδιαίτερα σημαντική αναλογιστούμε το όφελος που μπορεί να προκύψει μέσα από μια διεργασία διαδοχικών εκχυλίσεων, οι οποίες καθιστούν εφικτή την παραγωγή ποιοτικά ανώτερων και δραστικά εμπλουτισμένων εκχυλισμάτων.

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαμε να αποφανθούμε ότι επιτεύχθηκε ο αρχικός στόχος για την παραγωγή εκχυλισμάτων, με τη χρήση πράσινων και φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών, τα οποία έχουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση και υψηλό φαινολικό φορτίο. Η συνδυαστική χρήση του υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> και της EtOH, οι οποίοι αντικατέστησαν τους τοξικούς διαλύτες DCM και MeOH, συνετέλεσαν στη

παραγωγή εκχυλισμάτων με μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και πλούσιο χημικό φορτίο.

Το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα στα οποία έγινε η αντικατάσταση του DCM με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> παρουσιάζουν υψηλότερες δράσεις, οφείλεται στις ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών. Οι ηπιότερες συνθήκες εκχύλισης, οι ταχύτεροι ρυθμοί ανάκτησης, ο μικρότερος χρόνος παραμονής των δραστικών ουσιών σε επαφή με το διαλύτη αλλά και ο μειωμένος χρόνος επεξεργασίας του εκχυλίσματος, συντελούν στα παραπάνω αποτελέσματα, οδηγώντας στην παραγωγή ενός δραστικότερου εκχυλίσματος (**Υρ.Su.E.**) το οποίο δεν μειονεκτεί σε τίποτα συγκρινόμενο με αυτό της κλασικής μεθόδου (**A.Eth.**).

## 9.8 Φυτοχημική μελέτη του κλάσματος Υρ.Su.E.

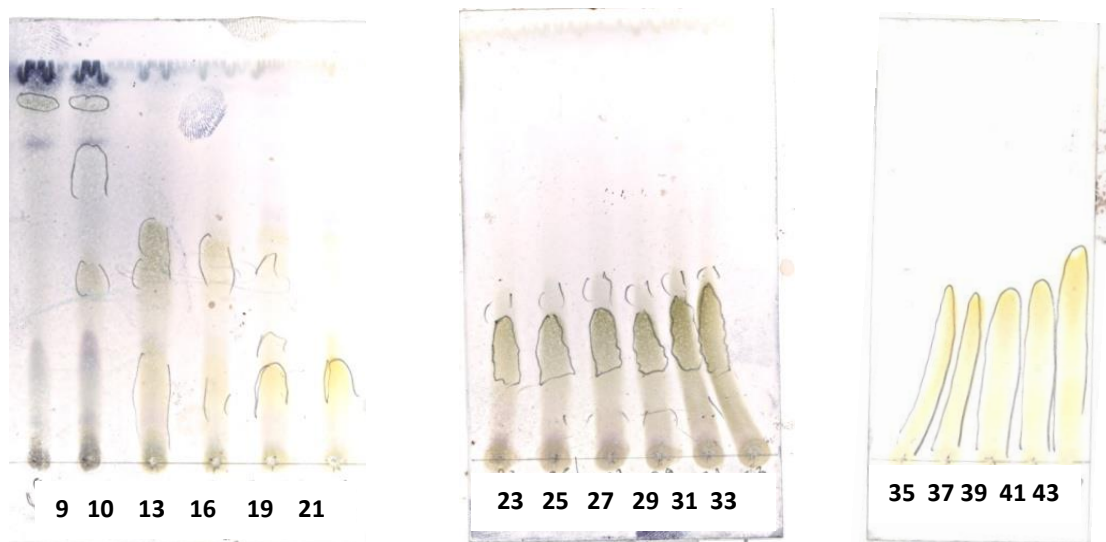
### 9.8.1 Κλασμάτωση με χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (FCPC)

Το εκχύλισμα **Υρ.Su.E.**, το οποίο παρουσίασε την καλύτερη δράση στους ελέγχους DPPH και TPC, επιλέχθηκε για περαιτέρω κλασμάτωση με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των κυριότερων μεταβολιτών του. Γι' αυτό, ποσότητα (1 g) ξηρού εκχυλίσματος εισήχθη στο FCPC για περαιτέρω διαχωρισμό και απομόνωση. Οι συνθήκες εκτέλεσης του χρωματογραφικού διαχωρισμού φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

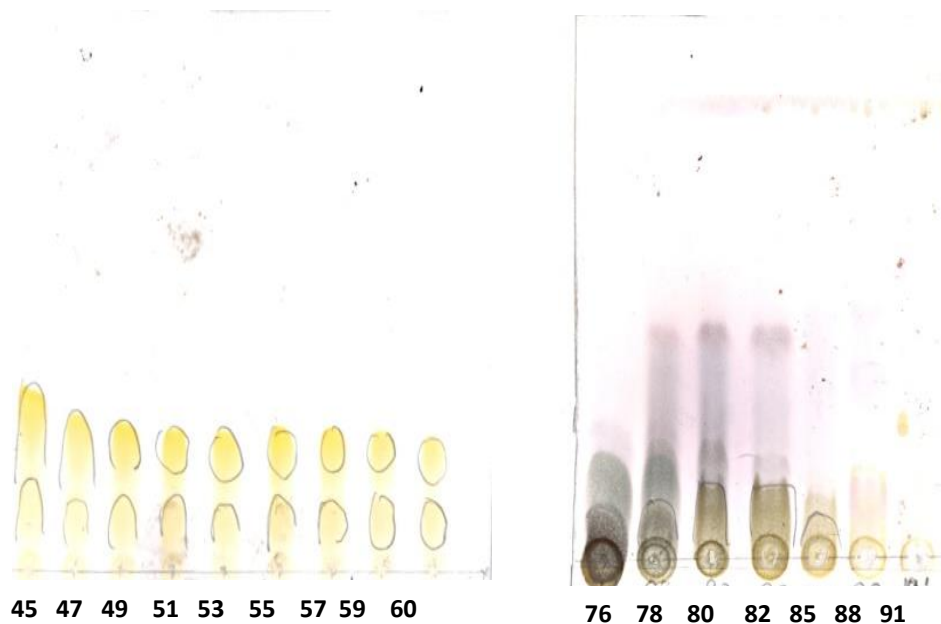
Πίνακας 25. Συνθήκες κλασμάτωσης εκχυλίσματος Υρ.Su.E. με την τεχνική FCPC

<b>Βάρος</b>	1 g
<b>Διαλύτες</b>	EtOAc/EtOH/H <sub>2</sub> O (10:1:10)
<b>Στροφές</b>	700 rpm/min
<b>Ροή</b>	8 ml/min
<b>Κινητή φάση</b>	πάνω φάση (οργανική)
<b>Στατική φάση</b>	κάτω φάση (υδατική)
<b>Αλλαγή φάσεων</b>	κλάσμα 77

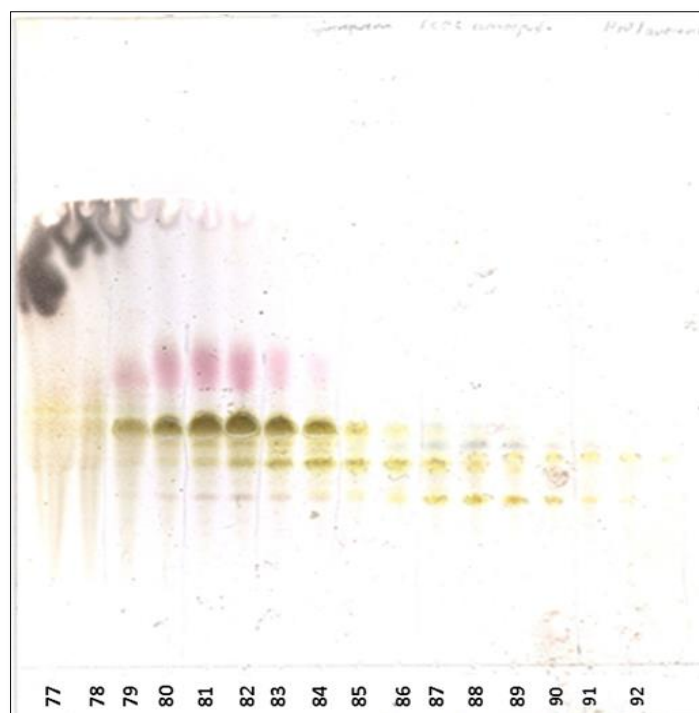
Από τη διαδικασία συλλέχθηκαν συνολικά 112 κλάσματα. Στη συνέχεια τα κλάσματα ελέγχθηκαν για το χημικό τους φορτίο με TLC και η εικόνα τους μετά από τον ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης ήτο η ακόλουθη:



Εικόνα 59. Χρωματογραφικό έλεγχος TLC στα κλάσματα του FCPC του εκχυλίσματος Υρ.Συ.Ε. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 80/20



Εικόνα 60. Χρωματογραφικό έλεγχος TLC στα κλάσματα του FCPC του εκχυλίσματος Υρ.Συ.Ε. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 80/20



Εικόνα 61. Χρωματογραφικό έλεγχο αντίστροφης TLC στα κλάσματα του FCPC μετά την αλλαγή φάσης για το εκχύλισμα Υρ.Су.Е.. Σύστημα ανάπτυξης H<sub>2</sub>O/MeOH 70:30

Από τον παραπάνω χρωματογραφικό έλεγχο, παρατηρείται ότι στα κλάσματα 19 έως 21 και 35 έως 60 υπάρχει έντονη η παρουσία φλαβονοειδών (κίτρινες κηλίδες), ενώ στα κλάσματα 23 έως 33 αναγνωρίζεται η παρουσία φαινυλαιθανοειδικών γλυκοσίδων (σκούρες καφέ κηλίδες). Αντιθέτως, στα κλάσματα 77 έως 92, υπάρχει έντονη η παρουσία σακχάρων, φλαβονοειδών και ιριδοειδών (κηλίδες ροζ χρώματος) (Εικόνα 59, 60 και 61).

Λόγω του παρόμοιου χημικού προφίλ των κλασμάτων, καταλήξαμε σε 18 συνενωθέντα κλάσματα τα οποία συμπυκνωθήκαν μέχρις ξηρού, τα βάρη των οποίων φαίνονται στο ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 26. Συνενώσεις κλάσματα του FCPC του εκχυλίσματος Υρ.Су.Е.

Κλάσματα	Κωδικός	Κινητή φάση	Ρύθμιση συσκευής	Βάρος (g)
1~7	FCPC 1~7	Πάνω φάση	Ascending	0
8~10	FCPC 8~10	Πάνω φάση	Ascending	0.0577
11~16	FCPC 11~16	Πάνω φάση	Ascending	0.0519
17~18	FCPC 17~18	Πάνω φάση	Ascending	0.0041
19~26	FCPC 19~26	Πάνω φάση	Ascending	0.0359
27~36	FCPC 27~36	Πάνω φάση	Ascending	0.0529
37~43	FCPC 37~43	Πάνω φάση	Ascending	0.0427
44~52	FCPC 44~52	Πάνω φάση	Ascending	0.0466

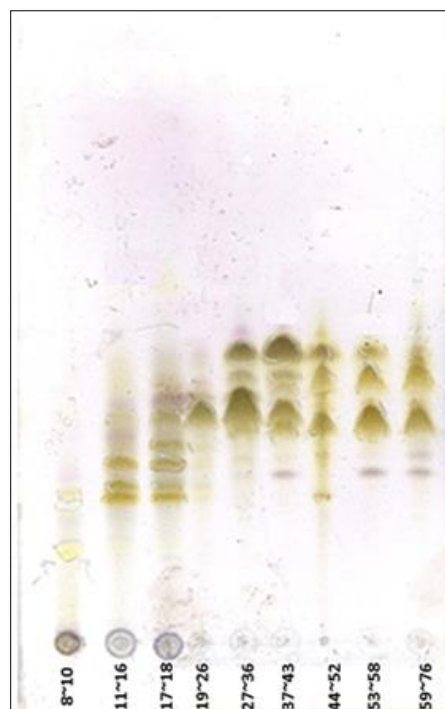


53~58	FCPC 53~58	Πάνω φάση	Ascending	0.0314
59~76	FCPC 59~76	Πάνω φάση	Ascending	0.0256
77~78	FCPC 77~78	Κάτω φάση	Descending	0.2649
79~80	FCPC 79~80	Κάτω φάση	Descending	0.0696
81~82	FCPC 81~82	Κάτω φάση	Descending	0.072
83~84	FCPC 83~84	Κάτω φάση	Descending	0.0527
85~86	FCPC 85~86	Κάτω φάση	Descending	0.0444
87~90	FCPC 87~90	Κάτω φάση	Descending	0.0128
91~93	FCPC 91~93	Κάτω φάση	Descending	0.0003
94~112	FCPC 94~112	Κάτω φάση	Descending	0.0015

Στα συνενωμένα κλάσματα έγινε έλεγχος με TLC κανονικής και αντιστρόφου φάσης.



Εικόνα 63. Χρωματογραφικός έλεγχος TLC στα συνενωμένα κλάσματα του FCPC. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 70:30



Εικόνα 62. Χρωματογραφικός έλεγχος αντιστροφής TLC στα συνενωθέντα κλάσματα του FCPC. Σύστημα ανάπτυξης H<sub>2</sub>O/MeOH 70:30

### 9.8.2 Έλεγχος των εκχυλισμάτων με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για τον ποιοτικό έλεγχο των κλασμάτων του FCPC χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Για την εύρεση κατάλληλου συστήματος διαλυτών εξετάστηκαν συνολικά 18 διαφορετικά συστήματα βαθμιδωτής έκλυσης με διαλύτες MeOH, AcN και H<sub>2</sub>O, με ή χωρίς την προσθήκη οξέος. Από το σύνολο

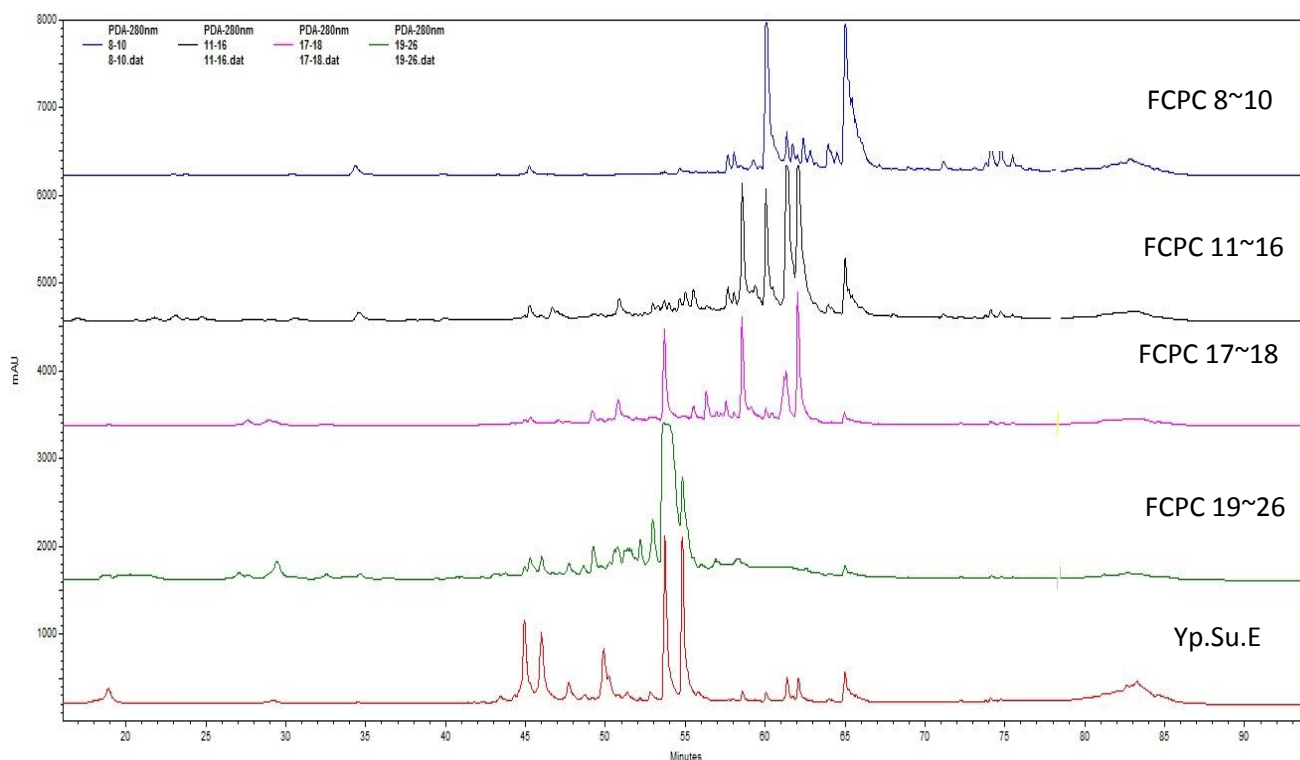
των συστημάτων επιλέχθηκε το σύστημα του Πίνακα 27, λόγω του καλύτερου διαχωρισμού των περιεχόμενων συστατικών.

**Πίνακας 27. Σύστημα διαλυτών HPLC για τα κλάσματα του FCPC του εκχυλίσματος Υρ.Συ.Ε.**

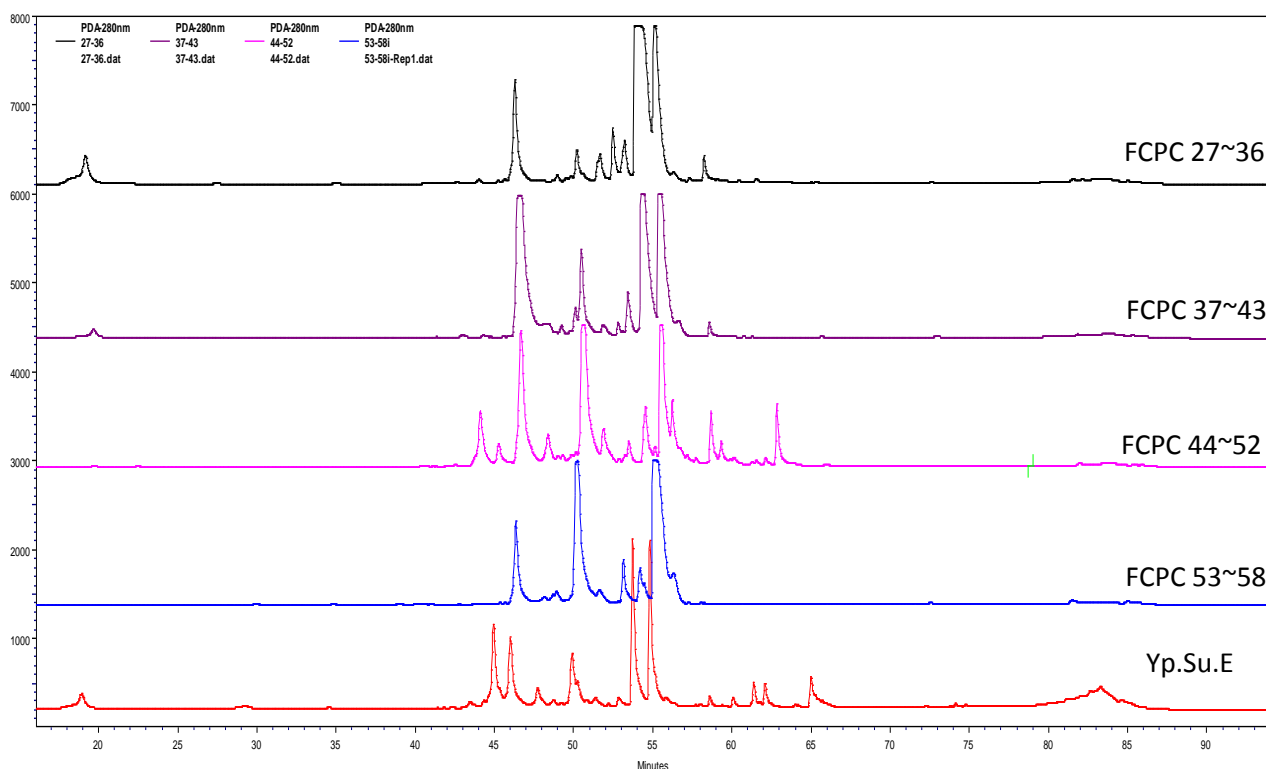
Χρόνος (min)	H <sub>2</sub> O + 2% A.A.	AcN + 2% A.A.	Ροή (ml/min)
0	96	4	1
30	88	12	1
45	80	20	1
75	50	50	1
80	30	70	1
85	96	4	1
95	96	4	1
100	96	4	1

Για την ανίχνευση των ουσιών που εκλούνται από τη στήλη επιλέχθηκαν τα μήκη κύματος 220 nm, 280 nm και 365 nm.

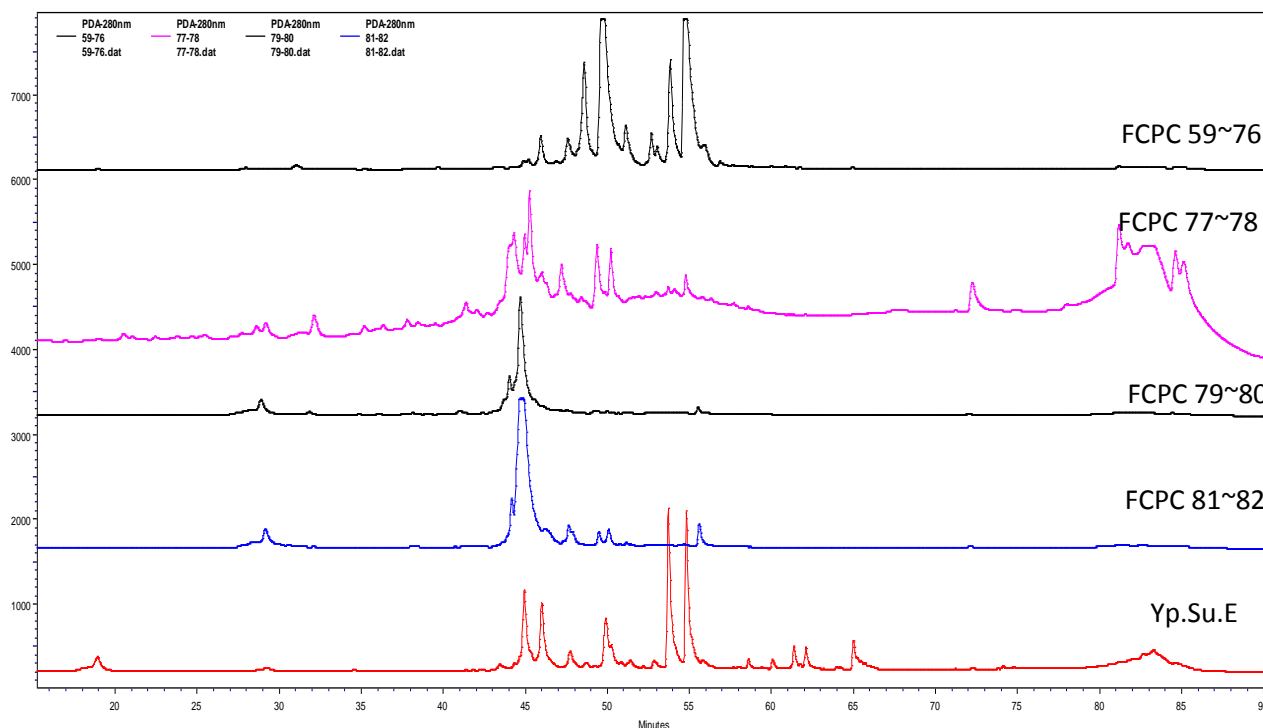
Για όλα τα κλάσματα του FCPC παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 5 mg/mL (H<sub>2</sub>O/AcN 50:50) και στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν στα 280 nm.



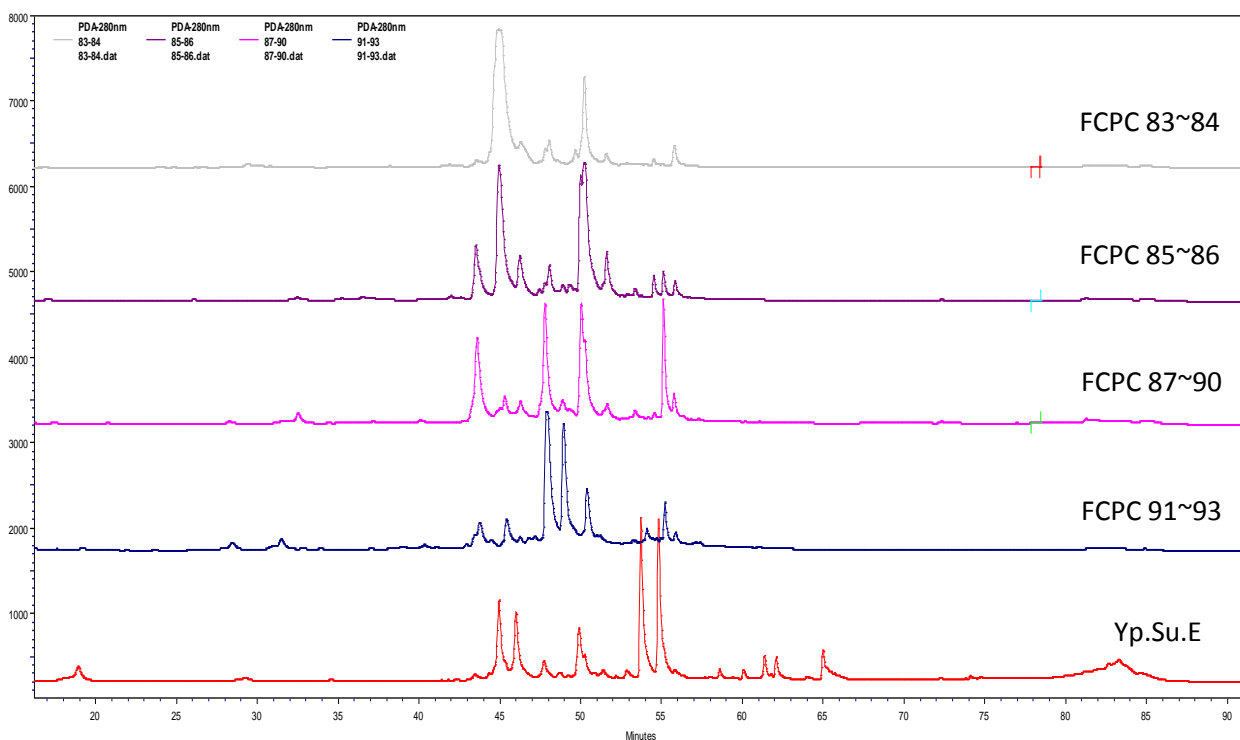
**Εικόνα 64. Χρωματογραφήματα κλασμάτων FCPC8~10, FCPC11~16, FCPC17~18, FCPC19~26 και αρχικού εκχυλίσματος Υρ.Συ.Ε.**



Εικόνα 65. Χρωματογράφημα κλασμάτων FCPC27~36, FCPC37~43, FCPC44~52, FCPC53~58 και αρχικού εκχυλίσματος Yp.Su.E.



Εικόνα 66. Χρωματογράφημα κλασμάτων FCPC59~76, FCPC77~78, FCPC79~80, FCPC81~82 και αρχικού εκχυλίσματος Yp.Su.E.



Εικόνα 67. Χρωματογράφημα κλασμάτων FCPC83~84, FCPC85~86, FCPC87~90, FCPC91~93 και αρχικού εκχυλίσματος Υρ.Συ.Ε.

Από τη χρωματογραφική ανάλυση φαίνεται ότι το διφασικό σύστημα που εφαρμόστηκε στο FCPC έδωσε μία ικανοποιητική κλασμάτωση, οδηγώντας στη συλλογή εμπλουτισμένων κλασμάτων. Δύο από αυτά ήταν αρκετά καθαρά (FCPC19-26 και FCPC81-82) ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίηση των περιεχόμενων ουσιών τους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Από την παραπάνω κλασμάτωση παρατηρείται η σταδιακή έκλυση συστατικών, από τις πιο άπολες στις πιο πολικές, μιας και η κινητή φάση που επιλέχθηκε ήταν η οργανική, ενώ στη συνέχεια (μετά την αντιστροφή του συστήματος) γίνεται ανάκτηση των πιο πολικών συστατικών του εκχυλίσματος (κλάσματα FCPC 77 έως FCPC 93).

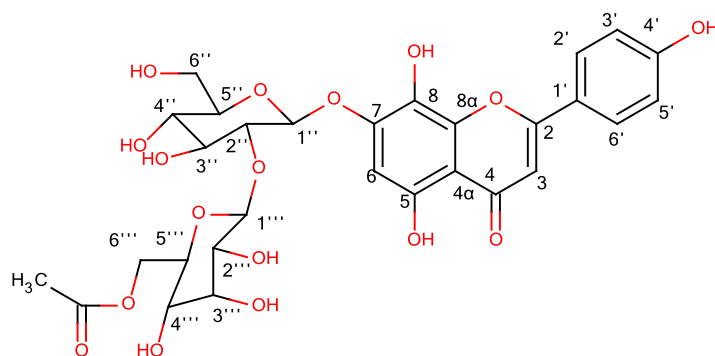
Από τη χρωματογραφική ανάλυση παρατηρείται η επανέκλυση ορισμένων συστατικών μέσης πολικότητας, μετά την αντιστροφή του συστήματος (FCPC91-93), συμβαίνει διότι οι ουσίες αυτές είχαν παραμείνει σε κάποιο ποσοστό στη στήλη και εκλύονται εκ νέου κατά την αλλαγή φάσης.

### 9.8.3 Φυτοχημική μελέτη κλασμάτων του FCPC

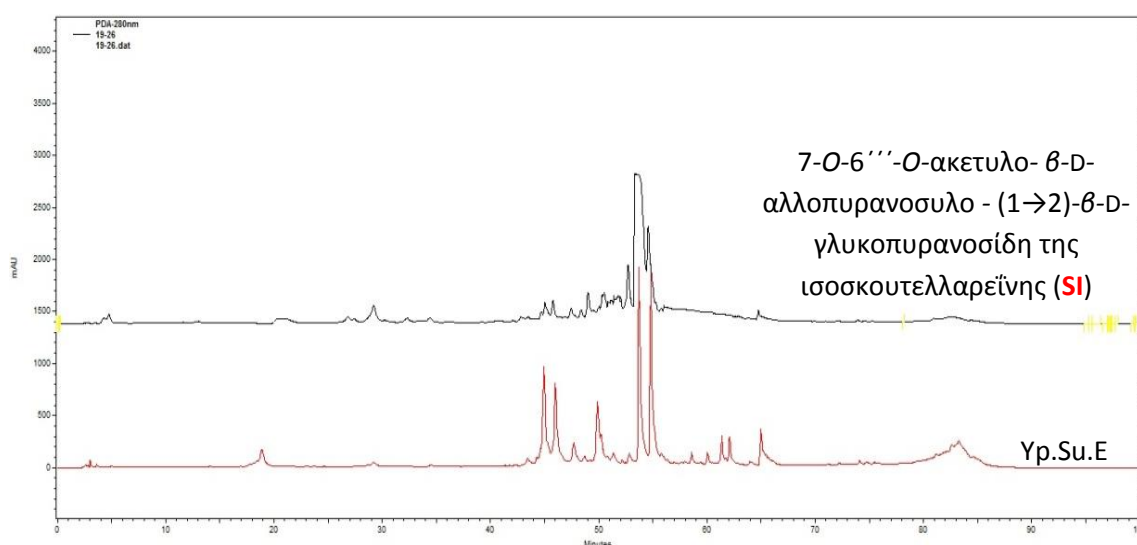
- Κλάσμα FCPC 19-26 / Μεταβολίτης **SI**

Από τα κλάσματα που λάβαμε από το FCPC, σε δύο (FCPC19-26 και FCPC81~82) ήταν σχετικά καθαρές οι περιεχόμενες ουσίες, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η άμεση ταυτοποίησή τους με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Το κλάσμα FCPC19-26 ταυτοποιήθηκε ως ο 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελαρεΐνης (**SI**). Ο μεταβολίτης ανήκει στα κατηγορία των φλαβονοειδών και η δομή του είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 68. Δομή του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο- β-D- αλλοπυρανοσυλο - (1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελαρεΐνης (**SI**)



Εικόνα 69. Συγχρωματογράφιση του Υρ.Су.Е μαζί με τον 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο- β-D- αλλοπυρανοσυλο - (1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελαρεΐνης (**SI**)

Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη **SI**, πραγματοποιήθηκε με βάση τα δεδομένα NMR, βασίστηκε στις παρακάτω παρατηρήσεις:

- Στην περιοχή  $\delta$  8.50-6.50 του φάσματος πρωτονίου είναι ευδιάκριτο το υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα των πρωτονίων H-3', H-5' και H-2', H-6' ως διπλές κορυφές στα 6.93 ppm και 7.93 ppm αντίστοιχα, με σταθερά σύζευξης  $J = 8.2$  Hz. Επιπλέον χαρακτηριστικές είναι και οι κορυφές των πρωτονίων H-3 και H-6 ως απλές στα 6.65 ppm και 6.79 ppm, αντίστοιχα
- Στην οξυγονωμένη περιοχή χαρακτηριστικές είναι οι τιμές των ανωμερικών πρωτονίων της γλυκόσης και της αλλόσης που συντονίζονται στα 4.94 ppm (σαν διπλή κορυφή με  $J = 7.8$  Hz) και στα 5.07 ppm (ως διπλή με  $J = 8.1$  Hz), αντίστοιχα
- Το πρωτόνιο της γλυκόσης H-2'' συντονίζεται στα 3.73 ppm ως dd με  $J = 9.2/7.8$  Hz και της θέσης H-4'' στα 3.49 ppm ως t με  $J = 10.7$  Hz. Από την ανάλυση του φάσματος προέκυψε ότι τα μεθυλενικά - μη ισοδύναμα πρωτόνια της θέσης H-6'' συντονίζονται στα 3.96 και 3.76 Hz ως dd κορυφές με σταθερές σύζευξης  $J = 12.0/1.4$  Hz και  $J = 12.0/5.2$  Hz, αντίστοιχα. Ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 60.9 ppm
- Για τα πρωτόνια της αλλόσης έχουμε ότι: το H-2''' συντονίζεται στα 3.47 ppm ως dd με  $J = 8.1, 2.8$  Hz, το H-3''' στα 4.11 ppm ως t με  $J = 2.8$  Hz και το H-4''' στα 3.63 ppm ως dd με  $J = 9.8, 2.8$  Hz. Τα πρωτόνια της θέσης H-6''', που είναι χαρακτηριστικά των εξοσών, συντονίζονται στα 4.33 και 4.24 ppm ως dd με  $J = 12.0, 2.0$  Hz και  $12.0, 5.2$  Hz, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι τα πρωτόνια αυτά συντονίζονται σε υψηλές τιμές ppm υποδηλώνει τη σύνδεση του ακετυλίου στην συγκεκριμένη θέση. Επιπλέον, χαρακτηριστικό για το σάκχαρο αποτελεί το πρωτόνιο στη θέση H-5''' το οποίο, λόγω της "axial-axial" συσχέτισης με το πρωτόνιο H-4''' αλλά και των συσχετίσεων με τα μη ισοδύναμα πρωτόνια της θέσης H-6''', δίνει σήμα με μορφή ddd με  $J = 2.0, 5.2, 10.0$  Hz, στα 4.04 ppm
- Η θέση πρόσδεσης της γλυκόσης στη θέση C-7 της γενίνης δικαιολογείται από την αποθωράκιση που παρατηρείται στους C-6 και C-8
- Ο τρόπος σύνδεσης των δύο σακχάρων μεταξύ τους δικαιολογείται από την αποθωράκιση που παρατηρείται στον άνθρακα C-2'' της γλυκόσης

Οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης κορυφών του μεταβολίτη **SI** επαληθεύθηκαν με αυτές της βιβλιογραφίας [133],[160],[161] και παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Περισσότερα φασματοσκοπικά δεδομένα για το μεταβολίτη παρατίθενται στο Παράρτημα.

Πίνακας 28. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερών σύζευξης του 7-O-6'''-Ο-ακετυλο- β-D- αλλοπυρανοσουλίου - (1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελλαρείνης (**SI**) σε CD<sub>3</sub>OD

Θέση	<sup>1</sup> H (δ) (ppm)	Σταθερά σύζευξης J (Hz)	<sup>13</sup> C(δ) (ppm)
1	-----	-----	
2	-----	-----	164.9
3	6.65	1H, s	103.1
4	-----	-----	183.3
4α	-----	-----	105.8
5	-----	-----	152.8
6	6.79	1H, s	101.2
7	-----	-----	149.9
8	-----	-----	128.7
8α	-----	-----	145.2
1'	-----	-----	121.8
2'	7.93	1H, d J = 8.2 Hz	129.4
3'	6.93	1H, d J = 8.2 Hz	116.2
4'	-----	-----	161.2
5'	6.93	1H, d J = 8.2 Hz	116.2
6'	7.93	1H, d J = 8.2 Hz	129.4
<b>Γλυκόση</b>			
1''	4.94	1H, d J = 7.8 Hz	102.2
2''	3.73	1H, dd J = 9.2/7.8 Hz	83.4
3''	3.54~3.51	*	66.5
4''	3.49	1H, t J = 10.7 Hz	76.9
5''	3.54~3.51	*	76.9
6''a	3.96	1H, dd J = 12.0/1.4 Hz	60.9
6''b	3.76	1H, dd J = 12.0/5.2 Hz	
<b>Αλλόση</b>			
1'''	5.07	1H, d J = 8.1 Hz	103.1
2'''	3.47	1H, dd J = 8.1/2.8 Hz	70.3
3'''	4.11	1H, t, J = 2.8 Hz	71.2
4'''	3.63	1H, dd J = 9.8/2.8 Hz	67.5
5'''	4.04	1H, ddd J = 10.0/5.2/2.0 Hz	72.2
6'''a	4.33	1H, dd J = 12.0/2.0 Hz	62.8
6'''b	4.24	1H, dd J = 12.0/5.2 Hz	
CH <sub>3</sub> CO-	2.00	3H, s	21.5
CH <sub>3</sub> CO-	-----	-----	173.0

\* Αλληλοεπικάλυψη πρωτονίων.

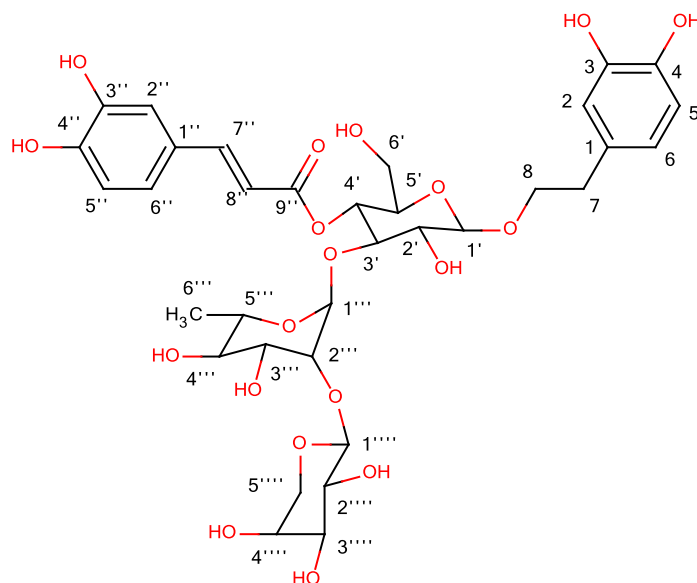
Ο μεταβολίτης **SI** είναι ευρέως διαδεδομένος στο γένος. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Stachys recta* [162], ενώ έχει ήδη απομονωθεί από τα είδη *Sideritis raeseri* ssp. *raeseri* [133], *S. syriaca*, *S. hyssopifolia* [163], *S. hyssopifolia* var. *pyrenaica* [164], *S. parfoliata* ssp. *perfoliata* [165], *S. stricta* [160], *S. mugronensis*, *S. funkiana*, *S. bourgeana*, *S. murgetana*, *S. leucantha*, *S. albicaulis*, *S. littoralis*, *S. leucantha* ssp. *incana* [166], *S. javalambrensis* [167], *S. scardica* [168], *S. infernalis*, *S. kuegleriana*, *S. pumila*, *S. nervosa*, *S. discolor*, *S. dendrochahorra*, *S. dasygnaphala*, *S.*

*cystosiphon*, *S. soluta*, *S. canariensis*, *S. oroteneriffke*, *S. oroteneriffae arayae* και *S. lotsyi* [169].

Ο 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D- αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελλαρεΐνης παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση [167].

- Κλάσμα FCPC81-82 / Μεταβολίτης **SII**

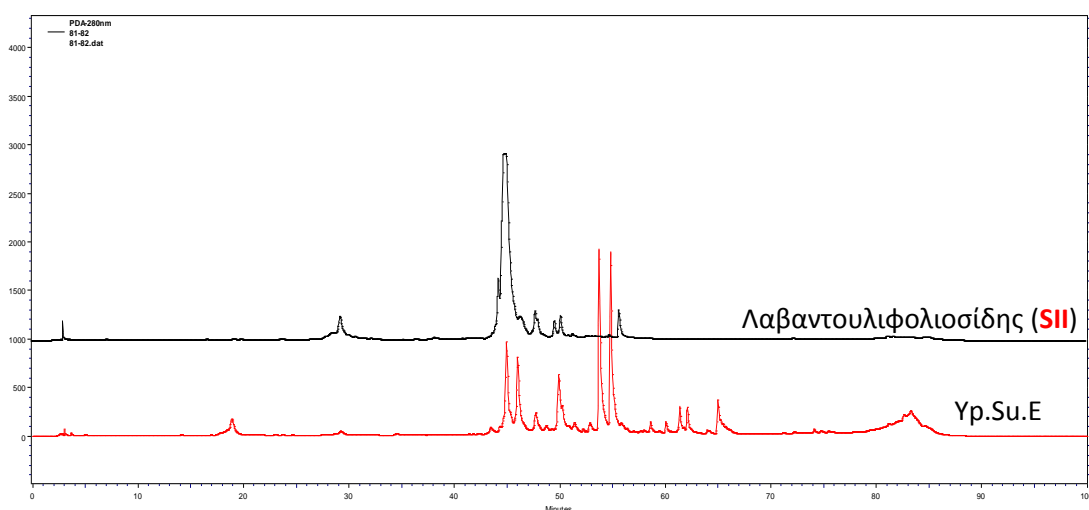
Το κλάσμα FCPC81-82 περιείχε κυρίως μία ουσία, η οποία με τη λήψη και επεξεργασία φασμάτων NMR ταυτοποιήθηκε ως β-D-αραβινοπυρανοσυλο-(1→2)-α-L-ραμνοπυρανοσυλο-(1→3)-4-Ο-καφεουλο-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο) αιθανόλης ή λαβαντουλιφολιοσίδης (**SII**). Η δομή του μορίου είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 70. Δομή λαβαντουλιφολιοσίδης (**SII**)

Στη συνέχεια παρουσιάζονται το χρωματογράφημα της ουσίας μαζί με αυτό του ολικού εκχυλίσματος.





Εικόνα 71. Χρωματογράφημα Υρ.Су.Е μαζί με τον λαβαντουλιφολιοσίδη (SII)

Το φάσμα του μεταβολίτη είναι αρκετά πολύπλοκο λόγω της ύπαρξης τριών σακχαριδικών μονάδων στη δομή του.

- Στην περιοχή του φάσματος από 7.70 ppm έως και 6.20 ppm παρατηρούνται δύο ABX συστήματα των οποίων τα πρωτόνια (H-2/H-5/H-6 και H-2''/H-5''/H-6'') δίνουν σήματα σε  $\delta$  6.72 (d,  $J = 1.7$  Hz), 6.69 (d,  $J = 7.9$  Hz), 6.58 (dd,  $J = 7.9/1.7$  Hz) και  $\delta$  7.06 (d,  $J = 2.0$  Hz), 6.78 (d,  $J = 8.2$  Hz), 6.94 (dd,  $J = 8.2/2.0$  Hz), αντίστοιχα
- Τα δύο πρωτόνια H-7 συντονίζονται στα 2.77 ppm ως πολλαπλή κορυφή, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 35.5 ppm.
- Τα μη ισοδύναμα πρωτόνια της θέσης H-8 συντονίζονται στα 4.07 και 3.74 ppm ως δύο τετραπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 7.6 Hz και ο αντίστοιχος άνθρακας εμφανίζεται αποθωρακισμένος στα 70,6 ppm. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη σύνδεση του φαινυλαιθανολικού δακτυλίου στο σάκχαρο. Η σύνδεση αυτή είναι ορατή και από το φάσμα HMBC, στο οποίο φαίνεται η σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου H-1' με τον άνθρακα C-8 (τα φάσματα 2D παρατίθενται στο Παράρτημα)
- Τα πρωτόνια του διπλού δεσμού (H-7'' και H-8'') παρουσιάζουν χαρακτηριστική σύζευξη  $J = 15.0$  Hz και συντονίζονται στα 7.61 και 6.29 ppm ως διπλές κορυφές.
- Στην οξυγονωμένη περιοχή εμφανίζονται τρεις διπλές κορυφές στα 4.37 ppm ( $J = 7.5$  Hz), στα 5.48 ppm ( $J = 1.2$  Hz) και 4.32 ppm ( $J = 7.3$  Hz), οι οποίες αντιστοιχούν στα ανωμερικά πρωτόνια της γλυκόσης, της ραμνόσης και της αραβινόσης, αντίστοιχα
- Σχετικά με τα πρωτόνια της γλυκόσης παρατηρείται ότι το πρωτόνιο H-2' συντονίζεται στα 3.39 ppm ως dd ( $J = 7.5$  και 9.3 Hz), ενώ το πρωτόνιο H-3' παρουσιάζεται ως t με  $J = 9.3$  Hz στα 3.77 ppm. Το πρωτόνιο H-4' απαντάται στα

- 4.91 ppm ως t με  $J = 9.3$  Hz, ενώ το πρωτόνιο H-6' b δίνει ένα χαρακτηριστικό σήματα (dd,  $J = 12.3, 5.0$  Hz) στα 3.66 ppm.
- Ο τρόπος σύνδεσης της καφεϊκής ομάδας στο σάκχαρο φαίνεται από την αποθωράκιση του πρωτονίου H-4' (4.91 ppm), ενώ επαληθεύεται από το φάσμα HMBC και συγκεκριμένα τη σύζευξη του H-4' με τον άνθρακα C-9'' της καφεϊκής ομάδας (τα φάσματα 2D παρατίθενται στο Παράρτημα)
  - Τα πρωτόνια της ραμνόσης H-2''' και H-3''' συντονίζονται στα 3.96 ppm (dd,  $J = 3.2/ 1.4$  Hz) και 3.68 ppm (dd,  $J = 9.6/3.2$  Hz), αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H-4''' εμφανίζεται στα 3.30 ppm ως τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 9.6 Hz. Τα μεθυλικά πρωτόνια συντονίζονται στα 1.07 ppm ως μια διπλή κορυφή ( $J = 6.1$  Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 18.5 ppm.
  - Όσον αφορά την αραβινόση, τα πρωτόνια H-2'''' και H-3'''' δίνουν κορυφές στα 3.63 ppm (dd,  $J = 9.3/7.3$  Hz) και 3.52 ppm (dd,  $J=9.9/3.5$  Hz). Τα πρωτόνια του μεθυλενικού άνθρακα της θέσης C-5'''' είναι χαρακτηριστικά του σακχάρου και όντας μη ισοδύναμα εμφανίζονται χωριστά στα 3.86 ppm (dd,  $J =12.9/2.3$  Hz) και την περιοχή 3.59-3.53 ppm
  - Ο τρόπος σύνδεσης των σακχάρων μεταξύ τους διαπιστώθηκε με το φάσμα HMBC, όπου είναι ορατή η σύζευξη των πρωτονίων H-3' και H-2''' με τους άνθρακες C-1''' και C-1''''', αντίστοιχα. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι άνθρακες C-3' και C-2''' εμφανίζονται αποθωρακισμένοι δικαιολογεί τον προαναφερόμενο τρόπο σύνδεσης (Παράρτημα).

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του λαβαντουλιφολιοσίδη, τα οποία επιβεβαιώθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας [128-129, 132-134], παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 29. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερών σύζευξης λαβαντουλιφολιοσίδη (SIH) σε CD<sub>3</sub>OD

Θέση	<sup>1</sup> H (δ) (ppm)	Πολλαπλότητα - Σταθερά σύζευξης J	<sup>13</sup> C(δ) (ppm)
1	-----	-----	131.8
2	6.72	1H, d, J = 1.7 Hz	114.7
3	-----	-----	144.3
4	-----	-----	144.9
5	6.69	1H, d, J = 7.9 Hz	114.7
6	6.58	1H, dd, J = 7.9/1.7 Hz	119.4
7	2.77	2H, m	35.5
8	4.07	1H, ~q, J = 7.6 Hz	70.6
	3.74	~q, J = 7.6 Hz	
1''	-----	-----	126.5
2''	7.06	1H, d, J = 2.0 Hz	113.3
3''	-----	-----	145.2
4''	-----	-----	148.0
5''	6.78	1H, d, J = 8.2 Hz	114.7
6''	6.94	3H, dd, J = 8.2/2.0 Hz	121.7

7''	7.61	1d, $J = 15.0$ Hz	146.6
8''	6.29	1d, $J = 15.0$ Hz	112.8
9''	-----	-----	166.8
<b>Γλυκόση</b>			
1'	4.37	1H, d, $J = 7.5$ Hz	102.5
2'	3.39	1H, dd, $J = 9.3/7.5$ Hz	74.3
3'	3.77	1H, t, $J = 9.3$ Hz	82.4
4'	4.91	1H, t, $J = 9.3$ Hz	70.4
5'	3.59~3.53	*	76.1
6'a	3.59~3.53	*	
6'b	3.66	3H, dd, $J = 12.3/5.0$ Hz	62.8
<b>Ραμνόση</b>			
1'''	5.48	1H, d, $J = 1.2$ Hz	102.0
2'''	3.96	1H, dd, $J = 3.2/1.4$ Hz	80.9
3'''	3.68	1H, dd, $J = 9.6/3.2$ Hz	72.3
4'''	3.30	1H, t, $J = 9.6$ Hz	73.4
5'''	3.59~3.53	1H, m	70.6
6'''	1.07	3H, d, $J = 6.1$ Hz	18.5
<b>Αραβινόση</b>			
1''''	4.32	1H, d, $J = 7.3$ Hz	105.3
2''''	3.63	1H, dd, $J = 9.3/7.3$ Hz	70.6
3''''	3.52	1H, dd, $J = 9.9/3.5$ Hz	74.4
4''''	3.59~3.53	*	73.0
5'''' a	3.86	2H, dd, $J = 12.9/2.3$ Hz	
5'''' b	3.59~3.53	*	64.9

\* Αλληλοεπικάλυψη πρωτονίων.

Ο λαβαντουλιφολιοσίδης ανήκει την κατηγορία των τρισακχαριδικών φαινυλαιθανοειδικών γλυκοσδών και απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Stachys lavandulifolia* [170]. Η ουσία απομονώθηκε το 1990 από τον κόνδυλο και τα φύλλα του φυτού *Stachys sieboldii* (Lamiaceae) και είχε ονομαστεί σταχυσοσίδης Α [171]. Επίσης, έχει απομονωθεί από τα φυτά του είδους *Sideritis lycia* Boiss. & Heldr [173] και *Sideritis perfoliata* ssp. *perfoliata* [165].

Παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση [173], προκαλεί αύξηση στην στεφανιαία εκροή και έχει υποτασική δράση ελαφρώς ασθενέστερη σε σχέση με τον βερμπασκοσίδη, ενώ σε υψηλότερες δόσεις προκαλεί ελάττωση στη συστολική και στη διαστολική αρτηριακή πίεση [174].

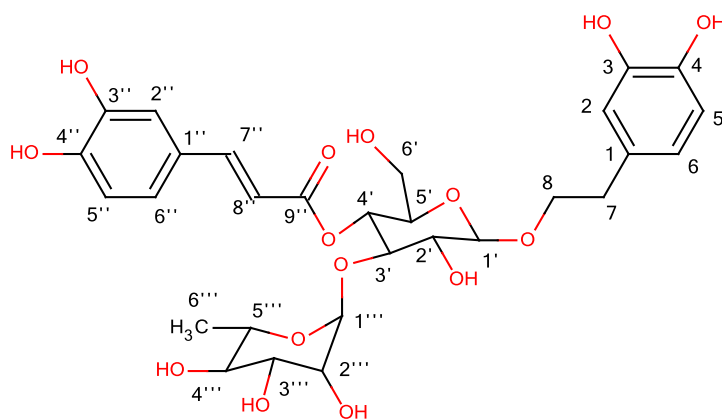
- Κλάσμα FCPC37-43 / Μεταβολίτες **SIII** και **SIV**

Το χρωματογράφημα HPLC του κλάσματος FCPC37-43 περιλαμβάνει τρεις κύριες κορυφές, εκ των οποίων η μία με χρόνο έκλουσης 53.75 min (Εικόνα 65) έχει

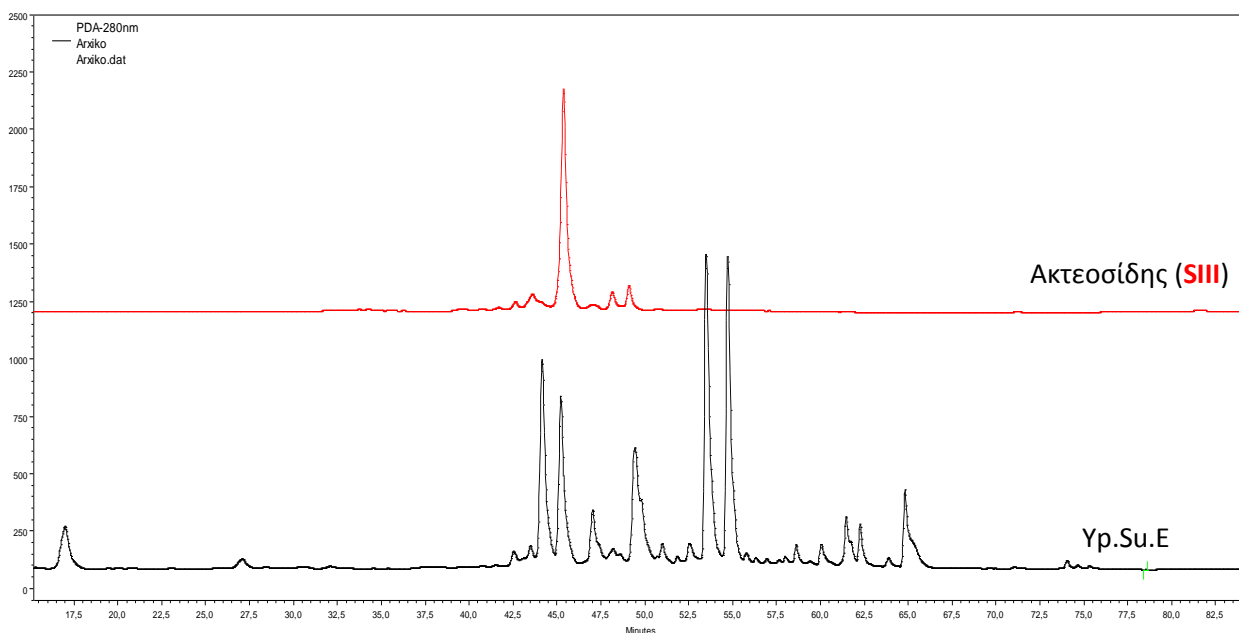
ταυτοποιηθεί ως ο 7-O-6'''-O-ακετυλο- β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελλαρεΐνης (**SI**).

Με σκοπό την απομόνωση της κορυφής με χρόνο έκλουσης 45.98 min εφαρμόστηκε η τεχνική της παρασκευαστικής TLC (PrepTLC) με σύστημα ανάπτυξης, DCM/MeOH 80:20 και προσθήκη οξικού οξέος σε ποσοστό 1%.

Ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως ο ακτεοσίδης (**SIII**) με τη δομή του να είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 72. Δομή ακτεοσίδης (**SIII**)



Εικόνα 73. Συγχρωματογράφηση του Yp.Su.E μαζί με τον ακτεοσίδη (**SIII**)

Το φάσμα του ακτεοσίδη είναι παρόμοιο με του λαβαντουλιφολιοσίδη με τις μόνες διαφορές να εστιάζονται στην περιοχή των σακχάρων.

- Στην περιοχή από 7.70 ppm έως και 6.17 ppm παρατηρούνται τα πρωτόνια αρωματικών δακτυλίων H-2 (d,  $J = 2.0$  Hz), H-5 (d,  $J = 8.0$  Hz), H-6 (dd,  $J = 8.0, 2.0$ Hz), H-2'' (d,  $J = 1.6$  Hz), H-5'' (d,  $J = 8.5$  Hz) και H-6'' (dd,  $J = 8.5, 1.6$  Hz)
- Τα πρωτόνια H-7 και H-8 του φαινυλοαιθανολικού δακτυλίου συντονίζονται στα 2.81 ppm ως πολλαπλή κορυφή και σε  $\delta$  4.07 / 3.74 ppm ως δύο πολλαπλές κορυφές
- Τα πρωτόνια του διπλού δεσμού H-7'' και H-8'' παρουσιάζουν χαρακτηριστική σύζευξη  $J = 15.0$  Hz και συντονίζονται στα 7.61 και 6.29 ppm ως διπλές κορυφές
- Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος είναι διακριτά τα δύο ανωμερικά πρωτόνια της γλυκόσης και της ραμνόσης στα 4.39 ppm (d,  $J = 8.0$  Hz) και 5.20 ppm (d,  $J = 0.8$  Hz)
- Τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόσης συντονίζονται στα 1.11 ppm ως μια διπλή κορυφή με  $J = 6.4$  Hz
- Χαρακτηριστική είναι η χημική μετατόπιση του C-2''' της ραμνόσης, ο οποίος σε αντίθεση με τον λαβαντουλιφολιοσίδη συντονίζεται στα 72.4 ppm, γεγονός που εξηγείται από την απουσία γλυκοσιδικού δεσμού στο υδροξύλιο της θέσης  
Ο τρόπος σύνδεσης των σακχάρων μεταξύ τους φαίνεται μέσα από το φάσμα HMBC (Παράρτημα).

Οι χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης κορυφών του ακτεοσίδη ταυτοποιήθηκαν με αυτές της βιβλιογραφίας και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα [112],[175],[176],[161]:

Πίνακας 30. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερών σύζευξης του ακτεοσίδη (SIII) σε CD<sub>3</sub>OD

Θέση	<sup>1</sup> H (δ) (ppm)	Σταθερά σύζευξης J (Hz)	<sup>13</sup> C(δ) (ppm)
1	-----	-----	131.9
2	6.71	1H, d, J = 2.0 Hz	117.0
3	-----	-----	144.9
4	-----	-----	146.3
5	6.69	1H, d, J = 8.0 Hz	117.0
6	6.58	1H, dd, J = 8.0/2.0 Hz	121.5
7	2.81	2H, m	36.7
8	4.07	1H, m	
	3.74	1H, m	72.4
1''	-----	-----	128.0
2''	7.07	1H, d, J = 1.6 Hz	115.6
3''	-----	-----	150.0
4''	-----	-----	147.0
5''	6.79	1H, d, J = 8.5 Hz	116.8
6''	6.97	1H, dd, J = 8.5/1.6 Hz	123.7
7''	7.61	1H, d, J = 15.7 Hz	148.3
8''	6.29	1H, d, J = 15.7 Hz	115.0
9''	-----	-----	168.5
<b>Γλυκόση</b>			
1'	4.39	1H, d, J = 8.0 Hz	104.5

2'	3.44	1H, dd, J = 9.2/8.0 Hz	76.1
3'	3.83	1t, J = 9.2 Hz	85.5
4'	4.89	*	70.8
5'	3.67~3.51	**	76.4
6'	3.67~3.51	**	62.7
<b>Ραμνóση</b>			
1'''	5.20	1H, d, J = 0.8 Hz	103.2
2'''	3.93	1H, m	72.4
3'''	3.67~3.51	**	72.4
4'''	3.67~3.51	**	74.1
5'''	3.67~3.51	**	70.8
6'''	1.11	3H, d, J = 6.4 Hz	18.9

\* Αλληλοεπικάλυψη με την κορυφή του νερού

\*\* Αλληλοεπικάλυψη πρωτονίων

Ο ακτεοσίδης ανήκει στους δισακχαριδικούς φαινυλαιθανοειδικούς γλυκοσίδες και απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Verbascum sinuatum* (Scrophulariaceae) [177] αλλά η ακριβής απόδοση της δομής του έγινε κατά την δεύτερη απομόνωσή του από το φυτό *Syringa vulgaris*. Επίσης, έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του ίδιου γένους *Sideritis*, όπως τα *S. lycia* Boiss. Et Heldr. [173], *S. perfoliata*, *S. ozturkii* Aytac & Aksoy και *S. stricta* [112].

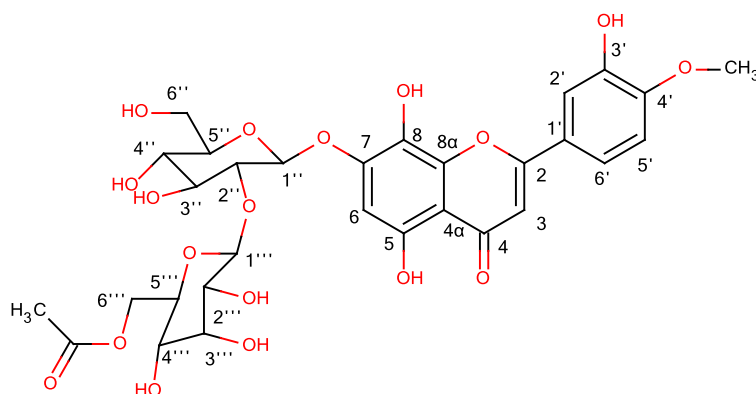
Για τον ακτεοσίδη έχουν αναφερθεί διάφορες δράσεις, οι κυριότερες εξ αυτών να είναι αντιμικροβιακή, κυτταροτοξική, αντιηπατοτοξική, αντιμυκητιασική, αντιβακτηριδιακή, αντιϋπερτασική, ανοσοκατασταλτική, αντιοξειδωτική, καρδιαγγειακή, αντιϋπερτασική, αναλγητική, αντιφλεγμονώδη κ.ά. [112].

Τέλος το κλάσμα FCPC37-43, εκτός από τον ακτεοσίδη (**SIII**) και τον 7-O-6'''-O-ακετυλο - β-D- αλλοπυρανοσυλο - (1→2) -β-D- γλυκοπυρανοσίδη της ισοσκοτελλαρεΐνης (**SI**), περιέχει μία ακόμα ουσία με χρόνο έκλουσης 55.01 min (Εικόνα 65). Για την απομόνωση του μεταβολίτη αυτού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ημιπαρασκευαστικής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (Semiprep - HPLC).

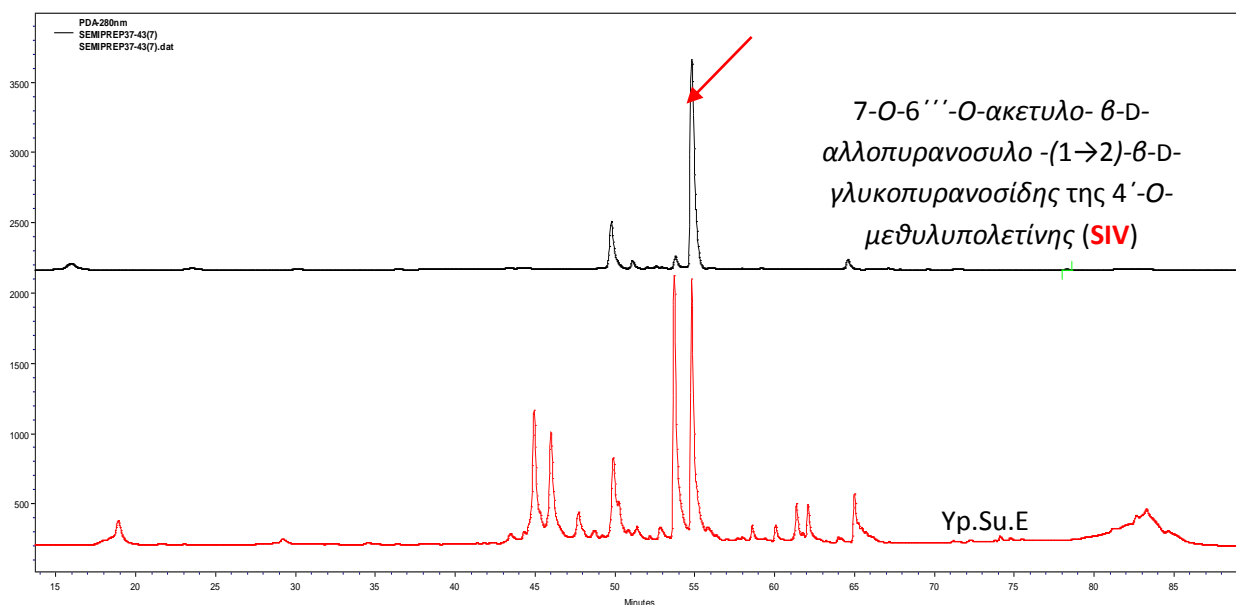
Πίνακας 31. Συνθήκες αναλυτικής και ημιπαρασκευαστικής HPLC

	Αναλυτική μέθοδος	Ημιπαρασκευαστική μέθοδος
Χρωματογραφική στήλη	Discovery HS RP-18 C18 (25 cm x 4.6 mm, 5.0 μm)	Supelcosil LC 18 (25 cm x 10 mm, 5 μm)
Συγκέντρωση δείγματος	5 mg/ml	έως 5 mg/ml
Μέθοδος	H <sub>2</sub> O +2%AA /AcN +2% AA	H <sub>2</sub> O +2%AA /AcN +2% AA
Ροή διαλύτη	1 ml/min	3 ml/min
Όγκος δείγματος	20 μl	1 ml

Ποσότητα 0.0239 g του κλάσματος FCPC37-43, διαλύθηκε σε 6 ml κινητής φάσης (αναλογία AcN/H<sub>2</sub>O 50:50) και προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 3.9 mg/ml. Μετά από την πραγματοποίηση έξι συνολικά ενέσεων απομονώθηκε ο 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο- (1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης (**SIV**).



Εικόνα 74. Η δομή του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο- β-D- αλλοπυρανοσυλο -(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης (**SIV**)



Εικόνα 75. Συγχρωματογράφηση Yr.Su.E μαζί τον 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο- β-D- αλλοπυρανοσυλο -(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης (**SIV**)

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο- β-D- αλλοπυρανοσυλο -(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης παρατηρούνται ομοιότητες με το αντίστοιχο φάσμα της 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-

γλυκοπυρανοσίδη της ισοσκοτελλαρεΐνης (**SI**). Οι σημαντικότερες διαφορές εντοπίζονται στην ύπαρξη ενός μεθυλίου και ενός παραπάνω -OH στον αρωματικό δακτύλιο Β. Πιο συγκεκριμένα:

- Είναι εμφανής η ύπαρξη ενός ABX συστήματος που αποτελείται από τα σήματα των πρωτονίων H-2', H-5' και H-6', τα οποία συντονίζονται στα 7.50 ppm (d,  $J = 1.6$  Hz), 7.12 ppm (d,  $J = 8.4$  Hz) και 7.61 ppm (dd,  $J = 8.4, 1.6$  Hz), αντίστοιχα. Ακόμα, είναι ευδιάκριτες και οι χαρακτηριστικές απλές κορυφές των πρωτονίων H-3 και H-6 στα 6.65 ppm και 6.79 ppm
- Στην οξυγονωμένη περιοχή έχουμε δύο σήματα τα οποία εμφανίζονται στα 4.96 ppm (d με  $J = 8.0$  Hz) και 5.09 ppm (d με  $J = 8.0$  Hz) και ανήκουν στα ανωμερικά πρωτόνια της γλυκόσης και της ραμνόσης, αντίστοιχα
- Τα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας εμφανίζονται στα 3.98 ppm και ως απλή κορυφή, ενώ η θέση πρόσδεσης τους στο O στην θέση 4' του δακτυλίου Β καθορίστηκε με βάση το φάσμα δύο διαστάσεων COSY-LR (Παράρτημα)

Οι χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης κορυφών του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσουλίου -(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας [163],[175],[176],[112]:

Πίνακας 32. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερών σύζευξης του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσουλίου -(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης (**SIV**) σε CD<sub>3</sub>OD

Θέση	<sup>1</sup> H (δ) (ppm)	Σταθερά σύζευξης J (Hz)	<sup>13</sup> C(δ) (ppm)
2	-----	-----	167.0
3	6.66	1H, s	104.6
4	-----	-----	184.8
4α	-----	-----	145.6
5	-----	-----	152.2
6	6.81	1H, s	102.0
7	-----	-----	154.3
8	-----	-----	130.1
8α	-----	-----	108.1
1'	-----	-----	123.8
2'	7.50	1H, d, J = 1.6 Hz	117.0
3'	-----	-----	144.9
4'	-----	-----	146.3
5'	7.12	1H, d, J = 8.4 Hz	117.0
6'	7.61	1H, dd, J = 8.4/1.6 Hz	121.5
CH <sub>3</sub> -O-4'	3.98	3H, s	55.0
<b>Γλυκόση</b>			
1''	4.96	1H, d, J = 8.0 Hz	102.1
2''	3.73	1H, dd, J = 9.2/8.0 Hz	84.3
3''	3.72~3.65	*	77.9



4''	3.54~3.50	*	71.2
5''	3.54~3.50	*	78.8
6''a	3.97	2H, brd, J = 12.1 Hz	
6''b	3.79	2H, dd, J = 12.1/4.0 Hz	62.7
<b>Αλλόση</b>			
1'''	5.09	1H, d, J = 8.0 Hz	104.1
2'''	3.47	1H, dd, J = 8.0/2.8 Hz	73.4
3'''	4,14	1H, t, J = 2.8 Hz	73.0
4'''	3.72~3.65	*	68.8
5'''	4.05	1H, m	73.7
6'''a	4.32	2H, dd, J = 12.1/1.6 Hz	65.4
6'''b	4.24	2H, dd, J = 12.1/5.2 Hz	
CH <sub>3</sub> CO-	2.00	3H, s	20.8
CH <sub>3</sub> CO-	-----	-----	173.0

\* Αλληλοεπικάλυψη πρωτονίων.

Ο 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης ανήκει στους γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Η πρώτη του απομόνωσή έγινε από το φυτό *Stachys recta* (Labiatae) [162], ενώ παράλληλα έχει απομονωθεί και από διάφορα είδη του γένους *Sideritis* όπως *S. syriaca* [178], *S. euboica* [112] *S. raeseri* ssp. *raeseri* [133], *Sideritis perfoliata* ssp. *perfoliata* [165], *Sideritis javalambrensis* [167], *S. lycia* [179],[173] και *S. scardica* [152].

Χαρακτηριστικές βιολογικές δράσεις του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης είναι η αντιοξειδωτική και η αντιφλεγμονώδης, ενώ έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει και αντιελκωτική δράση [112].

- Μελέτη του κλάσματος FCPC59-76 / Μεταβολίτης (SV)

Το κλάσμα του FCPC59-76, όπως φάνηκε από την HPLC (

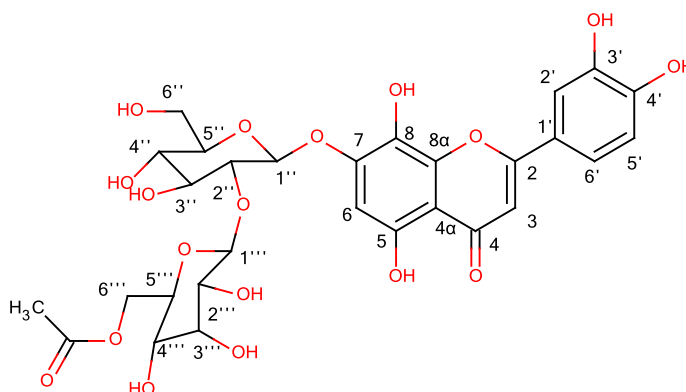
Εικόνα 66) περιέχει δύο κύριες κορυφές με χρόνους έκλουσης 49.71 min και 54.74 min. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στον 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης - **SIV**), όπως επαληθεύτηκε από τον χρόνο ανάρτησης και από το φάσμα UV. Όσον αφορά τη δεύτερη ουσία, χρησιμοποιήθηκε η ημιπαρασκευαστική Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Semiprep HPLC) για την απομόνωσή της. Η μέθοδος, η στήλη και το σύστημα διαλυτών παρέμειναν ίδια με την περίπτωση της απομόνωσης της 7-Ο-

6'''-O-ακετυλο- β-D- αλοπυρανοσυλο -(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της 4'-O-μεθυλοϋπολετίνης (**SIV**).

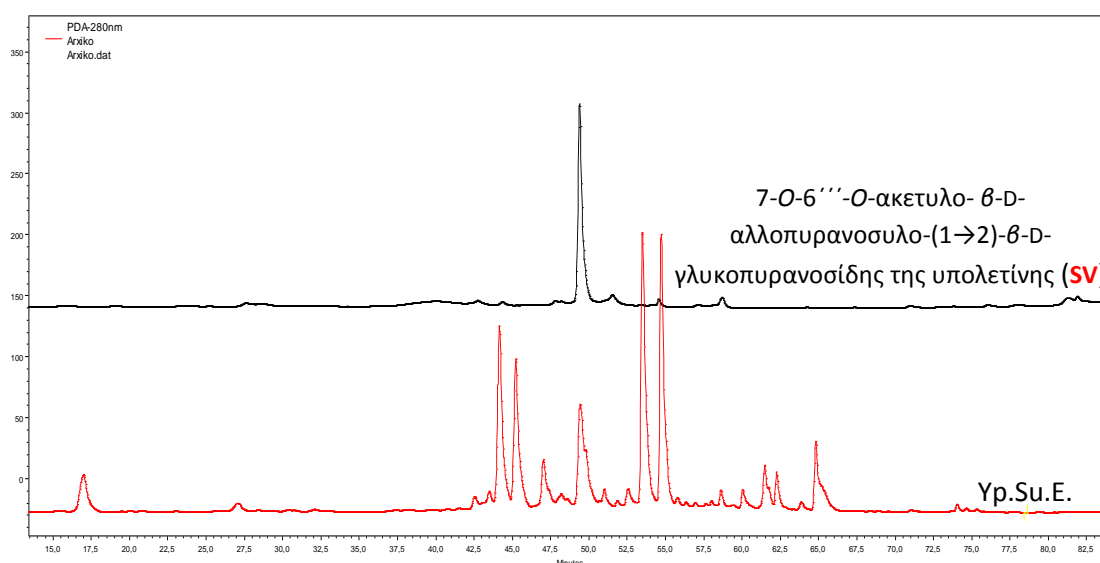
Πίνακας 33. Συνθήκες ημιπαρασκευαστικής HPLC

	Ημιπαρασκευαστική μέθοδος
Χρωματογραφική στήλη	Supelcosil LC 18 (25 cm x 10 mm, 5 μm)
Συγκέντρωση δείγματος	έως 5 mg/ml
Μέθοδος	H <sub>2</sub> O +2%AA /AcN +2% AA (Δοκιμή 2)
Ροή διαλύτη	3 ml/min
Όγκος δείγματος	1 ml

Από το κλάσμα FCPC59-76 παρασκευάστηκε 'stock' διάλυμα συγκέντρωσης 2.3 mg/mL και έγινε ένεση στην Semiprep HPLC. Από τη διαδικασία απόμονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ο 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης (**SV**). Η δομή του μεταβολίτη είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 76. 7-O-6'''-O-ακετυλο- β-D-αλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης (**SV**)



Εικόνα 77. Συγχρωματογράφιση Yp.Su.E με τον 7-O-6'''-O-ακετυλο- β-D-αλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη της υπολετίνης (**SIV**)

Η δομή του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσουλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης, είναι όμοια με αυτή του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσουλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης (SIV) με τη μόνη διαφορά στην απουσία του μεθυλίου στη θέση C-4'. Πιο συγκεκριμένα:

- Είναι εμφανής η ύπαρξη ενός ABX συστήματος το οποίο αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2' (7.47 ppm, d με  $J = 2.3$  Hz), H-5' (6.92 ppm, d με  $J = 8.2$  Hz) και H-6' (7.47 ppm, dd με  $J = 8.2/2.3$  Hz). Ακόμα, είναι ευδιάκριτες και οι χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H-3 και H-6 στα 6.69 ppm και 6.79 ppm
- Τα ανωμερικά πρωτόνια των σακχάρων συντονίζονται στα 4.94 ppm (d,  $J = 7.6$  Hz) για τη γλυκόση και στα 5.07 ppm (d,  $J = 8.2$  Hz) για τη ραμνόση
- Η απουσία του CH<sub>3</sub> στην θέση C-4' συνάδει με την έλλειψη της κορυφής στο φάσμα του πρωτονίου σε δ 3.98 ppm, αλλά και από το γεγονός ότι τα πρωτόνια των θέσεων H-5' και H-6' παρουσιάζονται πιο θωρακισμένα (Πίνακας 34)

Οι χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης κορυφών του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσουλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί [163]:

Πίνακας 34. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερών σύζευξης του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσουλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης (SIV) σε CD<sub>3</sub>OD

Θέση	<sup>1</sup> H (δ) (ppm)	Σταθερά σύζευξης J (Hz)	<sup>13</sup> C(δ) (ppm)
2	-----	-----	167.0
3	6.59	1H, s	104.6
4	-----	-----	184.8
4α	-----	-----	108.1
5	-----	-----	152.2
6	6.79	1H, s	102.0
7	-----	-----	154.3
8	-----	-----	130.1
8α	-----	-----	145.6
1'	-----	-----	123.8
2'	7.47	1H, s	114.7
3'	-----	-----	147.3
4'	-----	-----	151.7
5'	6.92	1H, d, J = 8.2 Hz	117.2
6'	7.47	1H, dd, J = 8.2/2.3 Hz	121.1
<b>Γλυκόση</b>			
1''	4.94	1H, d, J = 7.6 Hz	102.1
2''	3.72	1H, dd, J = 9.4/7.6 Hz	84.3
3''	3.67	1H, t, J = 9.4 Hz	77.9
4''	3.52~3.48	*	71.2
5''	3.52~3.48	*	78.8
6''a	3.95	1H, dd, J = 12.0/1.0 Hz	
6''b	3.77	1H, dd, J = 12.0/5.0 Hz	62.7

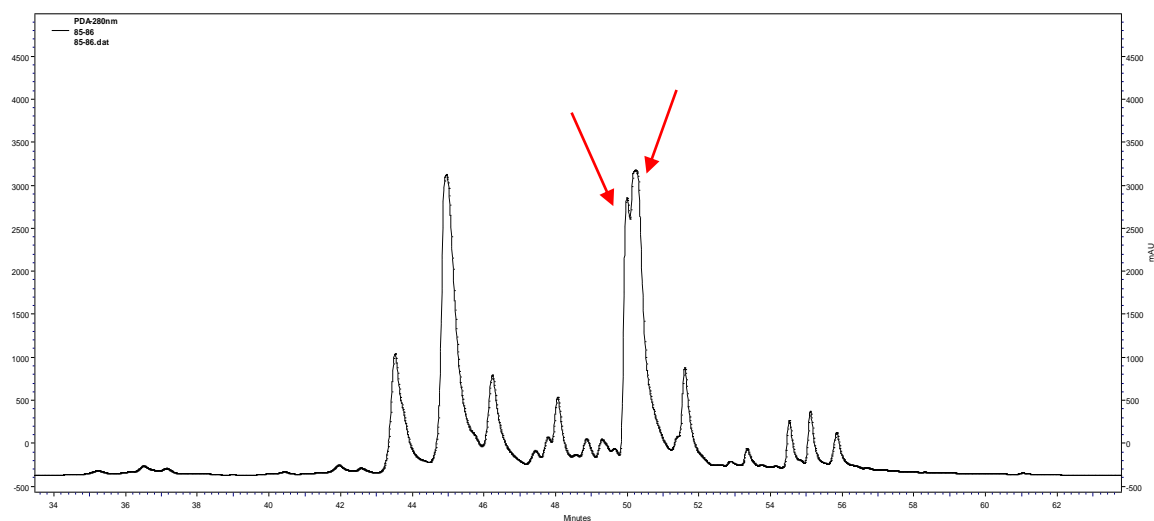
Αλλόση			
1'''	5.07	1H, d, J = 8.2 Hz	104.1
2'''	3.45	1H, dd, J = 8.2/2.9 Hz	73.4
3'''	4.11	1H, t, J = 2.9 Hz	73.0
4'''	3.64	1H, dd, J = 9.9/2.9 Hz	68.8
5'''	4.03	1H, ddd, J = 9.9/5.2/2.0 Hz	73.7
6''a	4.34	2H, dd, J = 12.0/2.2 Hz	
6''b	4.24	2H, dd, J = 12.0/5.0 Hz	65.4
CH <sub>3</sub> CO-	2.00	3H, s	20.8
CH <sub>3</sub> CO-	2.00	3H, s	173.9

\* Αλληλοεπικάλυψη πρωτονίων

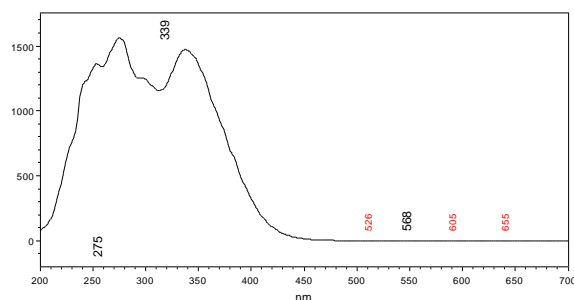
Ο 7-O-6'''-Ο-ακετυλο- β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης ανήκει και αυτός στους γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Η πρώτη του απομόνωση έγινε από φυτό *Stachys anisochila* [162], ενώ έχει απομονωθεί και από τα είδη του γένους *Sideritis* όπως *S. hyssopifolia* [163], *S. mugronensis*, *S. tragoriganum*, *S. funkiana*, *S. murgetana*, *S. leucantha*, *S. bourgeana*, *S. pauciflora*, *S. leucantha* ssp. *incana*, *S. albicaulis* και *S. littoralis* [166]. Έχει παρουσιάσει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

- Μελέτη του κλάσματος FCPC85-86 / Μεταβολίτης (SVI)

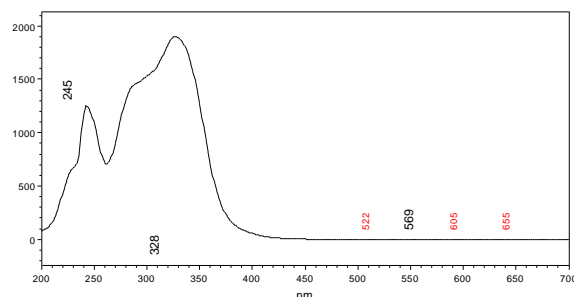
Η προσεκτική μελέτη των χρωματογραφημάτων του κλάσματος FCPC85-86 οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η κορυφή που εκλούεται στα 50.23 min αποτελεί μείγμα δυο ουσιών, καθώς παρατηρούνται δύο διαφορετικά φάσματα UV στην αρχή και το τέλος της κορυφής. Στη συνέχεια παρατίθενται τα αντίστοιχα φάσματα UV για σύγκριση.



Εικόνα 78. Χρωματογράφημα κλάσματος FCPC85~86 όπου παρατηρείται μικρή σχάση της κορυφής.



Εικόνα 79. Φάσμα UV της κορυφής στα 50.23 min στην αρχή της έκλουσης της



Εικόνα 80. Φάσμα UV της κορυφής στα 50.23 min στο τέλος της έκλουσής της

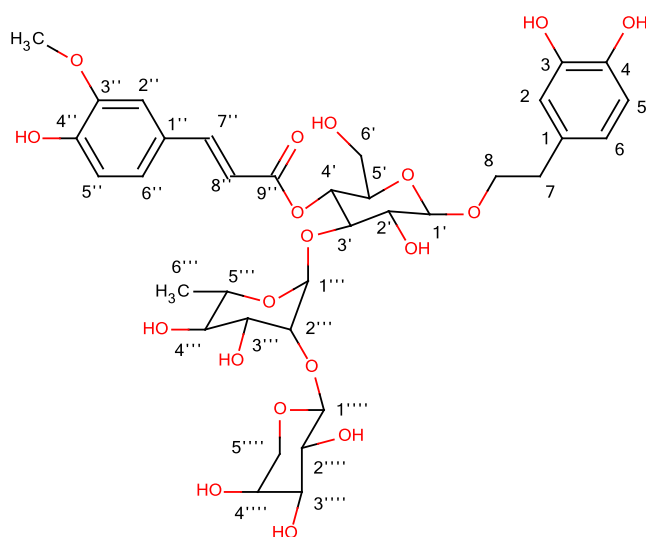
Το φάσμα UV που λαμβάνουμε στην αρχή της κορυφής ανήκει στην 7-*O*-6'''-*O*-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη της υπολετίνης, η οποία περιγράφεται παραπάνω (**SV**). Έτσι, η προσοχή μας επικεντρώθηκε στην απομόνωση της δεύτερης κορυφής. Λόγω όμως της παρόμοιας πολικότητας των δύο μεταβολιτών, αποφασίστηκε να βρεθεί ένα κατάλληλο σύστημα στην HPLC ικανό να διαχωρίσει τις παραπάνω ουσίες και στη συνέχεια με τη μέθοδο της ημιπαρασκευαστική Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης να επιτευχθεί ο διαχωρισμός τους. Έτσι, από το κλάσμα FCPC85-86 παρασκευάστηκε 'stock' διάλυμα (5 mg/mL) και δοκιμάστηκαν πέντε συστήματα HPLC, εκ των οποίων το ένα αποδείχτηκε αποτελεσματικό για την απομόνωση της ουσίας στόχου (Πίνακας 35).

Πίνακας 35. Σύστημα διαχωρισμού κλάσματος FCPC85~86 στη Semiprep - HPLC

Χρόνος (min)	H <sub>2</sub> O + 2% A.A.	AcN +2% A.A.	Ροή (mL/min)
0	88,0	12,0	1.00
15,0	80,0	20,0	1.00
30,0	65,0	35,0	1.00
35,0	60,0	40,0	1.00
36,0	88,0	12,0	1.00
46,0	88,0	12,0	1.00

Έτσι λοιπόν από το κλάσμα FCPC85-86 παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 2.5 mg/mL και από το διαχωρισμό με την τεχνική της Semiprep - HPLC προέκυψαν δύο ουσίες (0.0008 g και 0.0009 g αντίστοιχα), οι οποίες με τη λήψη φασμάτων NMR ταυτοποιήθηκαν ως ο 7-*O*-6'''-*O*-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης (**SV**) και α-L-αραβινοσυλο -(1→2) -α-L-ραμνοπυρανόσυλο -(1→3)- 4-*O*-φερουλοϋλο-β-D-

γλυκοπυρανοσίδης της 3,4-διυδροξυφαινουλαιθανόλης ή αλλιώς λεονοσίδης A (**SVI**) [172]. Η δομή του είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 81. Λεονοσίδης A (**SVI**)

Το φάσμα του λεονοσίδης A είναι παρόμοιο με αυτό του λαβαντουλιφολιοσίδης (**SII**). Η μόνη δομική διαφορά εστιάζεται στην παρουσία φερουλικής ομάδας στην περίπτωση του λεονοσίδης A αντί για την καφεϊκή ομάδα που υπάρχει στο λαβαντουλιφολιοσίδη. Πιο συγκεκριμένα:

- Στην περιοχή του φάσματος από 7.80 ppm έως και 6.30 ppm παρατηρούνται τα αρωματικά πρωτόνια H-2, H-5, H-6, H-2'', H-5'' και H-6'' τα οποία συντονίζονται στα 6.70 ppm (d με  $J = 2.0$  Hz), στα 6.67 ppm (d με  $J = 8.0$  Hz), στα 6.56 ppm (dd με  $J = 8.0, 2.0$  Hz), καθώς και 7.20 ppm (d με  $J = 2.0$  Hz), 6.81 ppm (d με  $J = 8.0$  Hz) και 7.08 ppm (dd με  $J = 8.0, 2.0$  Hz), αντίστοιχα
- Τα πρωτόνια H-7 της αλειφατικής αλυσίδας συντονίζονται στα 2.79 ppm (πολλαπλή που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια), ενώ τα μη ισοδύναμα πρωτόνια H-8 συντονίζονται στα 4.04 και 3.72 ppm ως δύο πολλαπλές κορυφές
- Τα πρωτόνια του διπλού δεσμού (H-7'' και H-8'') παρουσιάζουν χαρακτηριστική σύζευξη  $J = 15.0$  Hz και εμφανίζονται στα 7.66 και 6.37 ppm ως διπλές κορυφές
- Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος είναι ορατά τα ανωμερικά πρωτόνια των σακχάρων της γλυκόσης, της ραμνόσης και της αραβινόσης, τα οποία συντονίζονται στα 4.38 ppm (d με  $J = 8.0$  Hz), 5.49 ppm (s) και 4.31 ppm (d με  $J = 7.2$  Hz), αντίστοιχα
- Η απλή κορυφή που υπάρχει στα 3.91 ppm υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μεθυλίου στην ένωση, ενώ η σύνδεση του μεθοξυλίου στη θέση τον C-3'' επιβεβαιώθηκε με τη λήψη φάσματος HMBC.

Οι χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης του μεταβολίτη είναι:

Πίνακας 36. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερών σύζευξης του λεονοσίδη (SVI) Α σε CD<sub>3</sub>OD.

Θέση	<sup>1</sup> H (δ) (ppm)	Σταθερά σύζευξης J (Hz)	<sup>13</sup> C(δ) (ppm) [127]
1	-----	-----	131.6
2	6.70	1H, d, J = 2.0 Hz	117.2
3	-----	-----	146.1
4	-----	-----	144.7
5	6.67	1H, d, J = 8.0 Hz	116.4
6	6.56	1H, dd, J = 8.0/2.4 Hz	121.3
7	2.79	2H, m	36.6
8a	4.04	1H, m	
8b	3,72	1H, m	72.3
1''	-----	-----	127.7
2''	7.20	1H, d, J = 2.0 Hz	111.9
3''	-----	-----	149.4
4''	-----	-----	150.8
5''	6.81	1H, d, J = 8.0 Hz	116.6
6''	7.08	1H, dd, J = 8.0/1.2 Hz	124.4
7''	7.66	1d, J = 15.0 Hz	115.1
8''	6.37	1d, J = 15.0 Hz	147.9
9''	-----	-----	168.3
CH <sub>3</sub> -O-3''	3.91	3H, s	56.5
<b>Γλυκόση</b>			
1'	4.38	1H, d, J = 8.0 Hz	104.2
2'	3.38	1H, dd, J = 9.3/8.0 Hz	76.1
3'	3.77	1H, t, J = 9.3 Hz	81.9
4'	4.88	*	70.6
5'	3.58~3.50	**	76.0
6'	3.66	1H, dd, J = 12.0/6.0 Hz	62.3
<b>Ραμνόση</b>			
1'''	5.49	1H, s	101.8
2'''	3.94	1H, brd	80.4
3'''	3.63	1H, dd, J = 9.9/3.2 Hz	72.0
4'''	3.30	1H, t, J = 9.9 Hz	74.1
5'''	3.58~3.50	**	70.4
6'''	1.08	3H, d J = 6.4 Hz	18.5
<b>Αραβινόση</b>			
1''''	4.31	1d J = 7.2 Hz	104.2
2''''	3.64	1H, dd, J = 9.3/7.2 Hz	71.2
3''''	3.49	1H, dd J = 9.2/3.6 Hz	72.6
4''''	3.77	1H, brd	68.9
5''''a	3.85	1dd J = 12.8/2.4	
5''''b	3.58~3.50	**	64.9

\* Αλληλοεπικάλυψη με την κορυφή του νερού

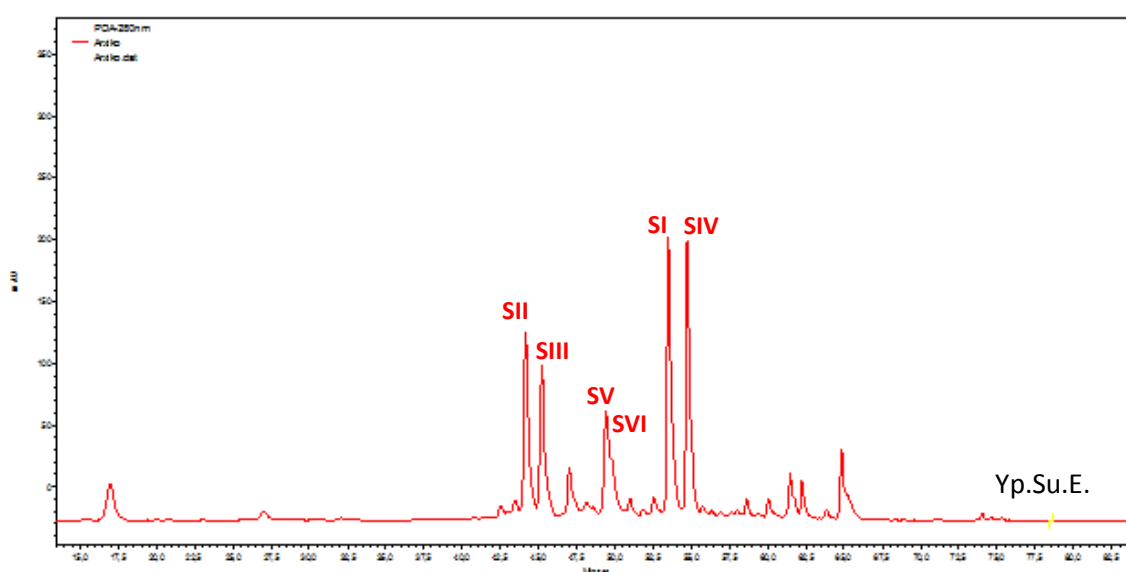
\*\* Αλληλοεπικάλυψη πρωτονίων

Ο μεταβολίτης ανήκει στην κατηγορία των τρισακχαριδικών φαινυλαιθανοειδικών γλυκοσιδών. Πρώτη φορά αναφέρθηκε ως μεταβολίτης του φυτού *Stachys sieboldii* [180], ενώ απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος του

*Sideritis*. Επίσης, είναι γνωστός και ως σταχιοσίδης Β και σταχιοσίδης C [171] αλλά στη βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με την πιο πρόσφατη ονομασία του ως λεονοσίδης Α.

Ο μεταβολίτης (**SVI**) διαθέτει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση [171].

Στη συνέχεια παρατίθεται ένα χρωματογράφημα του εκχυλίσματος Υρ.Су.Е με τους ταυτοποιημένους μεταβολίτες, οι οποίοι αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του ολικού εκχυλίσματος.



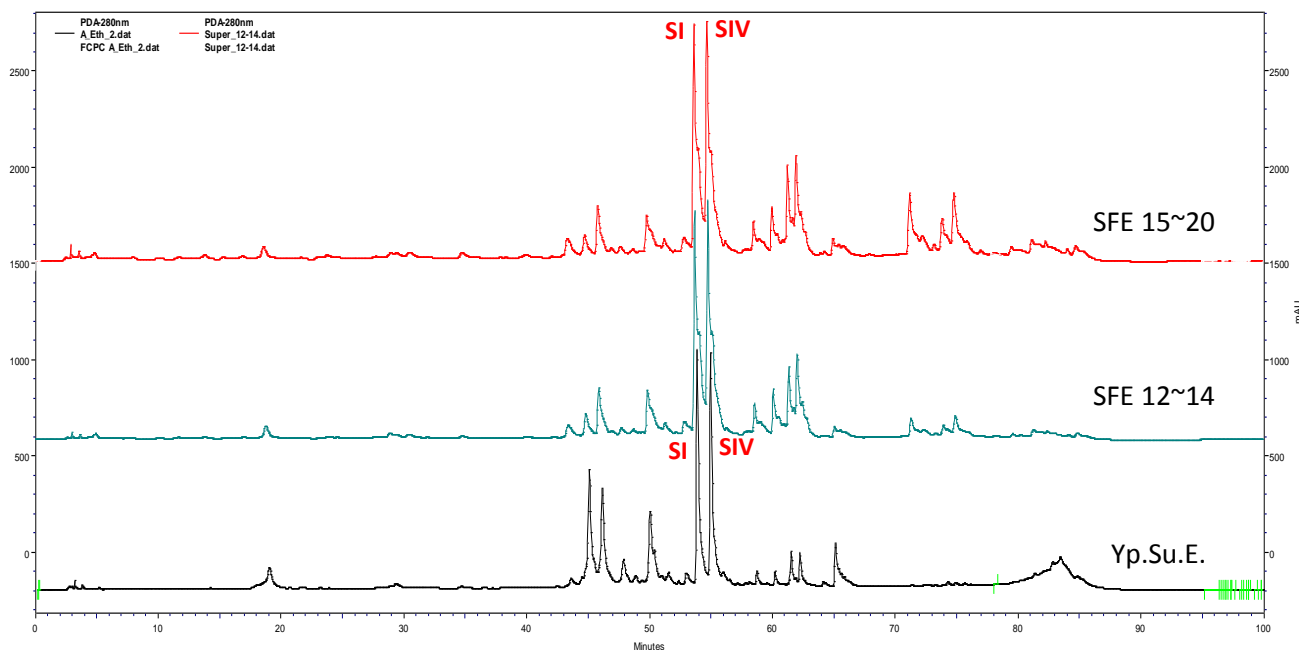
Εικόνα 82. Χρωματογράφημα HPLC του εκχυλίσματος Υρ.Су.Е. με τους ταυτοποιημένους μεταβολίτες

### 9.8.3.1 Ταυτοποίηση φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα της Υ.Ε.

Ο πρωταρχικός χρωματογραφικός έλεγχος των εκχυλισμάτων της υπερκρίσιμης εκχύλισης φανέρωσε την παρουσία φλαβονοειδών, τα οποία χαρακτηρίζονται από αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση και προσδίδουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες στα εκχυλίσματα. Συνεπώς, έχοντας απομονώσει τους κύριους μεταβολίτες του είδους, επιδιώχθηκε η ταυτοποίησή τους στα πιο πολικά κλάσματα **SFE12-14** και **SFE15-20** της Υ.Ε. Έτσι λοιπόν συγχρωματογραφώντας τις πρότυπες ουσίες με τα προαναφερόμενα κλάσματα επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο -β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδη της



ισοσκοτελλαρεΐνης (**SI**) και του 7-*O*-6'''-*O*-ακετυλο-β-D- αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδη της 4'-*O*-μεθυλοουπόλετινης (**SIV**).



Εικόνα 83. Συγχρωματογράφιση εκχυλισμάτων SFE12~14 και SFE15~20 με το εκχύλισμα Υρ.Су.Е.

Παρατηρούμε ότι η εκχύλιση φλαβονοειδών και δραστικών, πολικών συστατικών είναι δυνατή με τη χρήση της Υ.Ε και επειδή οι ουσίες αυτές αποτελούν συστατικά με αντιοξειδωτική δράση, αυξάνουν την βιολογική αξία του εκχυλίσματος. Για την ποσοτική παραλαβή τους όμως είναι απαραίτητη η αύξηση του ποσοστού του συνδιαλύτη. Μολονότι, η χρήση συνδιαλύτη σε ποσοστό 30% θα επιτρέψει την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων και θα ενισχύσει την αντιοξειδωτική ικανότητα των παραγόμενων εκχυλισμάτων, θα πρέπει να ληφθεί πολύ σοβαρά υπόψιν η αύξηση του συνολικού κόστους στην περίπτωση βιομηχανικής εφαρμογής της διαδικασίας στην εκχύλιση ειδών του γένους *Sideritis*.

## 9.9 Συμπεράσματα

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας παρασκευάσθηκαν άπολα και πολικά εκχυλίσματα από το φυτό *Sideritis raeseri* ssp. *attica* με τη χρήση φιλικών προς το περιβάλλον διαλυτών και τεχνικών εκχύλισης. Στόχος ήταν η αντικατάσταση

των συμβατικών διαδικασιών, κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται τοξικοί οργανικοί διαλύτες όπως είναι το διχλωρομεθάνιο (DCM) και η μεθανόλη (MeOH), με φιλικούς προς το περιβάλλον, χωρίς να μειώνεται η απόδοση της εκχύλισης και η βιολογική αξία των παραγόμενων εκχυλισμάτων.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού εφαρμόστηκαν οι τεχνικές της υπερκρίσιμης εκχύλισης (Υ.Ε.) και επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE), είτε μεμονωμένα είτε και συνδυαστικά. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα ελέγχθησαν τόσο ως προς την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις όσο και ως προς την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, ενώ το πιο αξιόλογο από αυτά μελετήθηκε φυτοχημικά για την απομόνωση των κύριων μεταβολιτών του.

Από την προαναφερόμενη διαδικασία εξήχθησαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η διεργασία της Υ.Ε. με CO<sub>2</sub>, ιδίως με τη χρήση αιθανόλης σα συνδιαλύτη, είναι ικανή να ανακτήσει όλο το φάσμα των μη πολικών και μέσης πολικότητας συστατικών του φυτού
- Μέσω της σωστής επιλογής συνθηκών εκχύλισης είναι δυνατή η εκχύλιση δραστικών μεταβολιτών, όπως τα φλαβονοειδή 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκοτελλαρεΐνης (**SI**) και ο 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-O-μεθυλοϋπολεΐνης (**SIV**)
- Το φυτικό υλικό που προέκυψε μετά την ολοκλήρωση της Υ.Ε., αν και είναι απαλαγμένο από τα μη πολικά συστατικά, είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε μεταβολίτες μέσης και μεγάλης πολικότητας, οι οποίοι μπορούν εύκολα να παραληφθούν με μία εκχύλιση στο ASE με EtOH. Μάλιστα το εκχύλισμα **Υρ.Su.E** είναι δραστικότερο σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα που προκύπτουν με τις συμβατικές μεθόδους και παρουσιάζει διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα και σχεδόν διπλάσιο φαινολικό φορτίο
- Από τη μελέτη των εκχυλισμάτων φάνηκε ότι η αντικατάσταση των τοξικών διαλυτών είναι δυνατή, δίχως να επηρεάζεται η απόδοση των εκχυλισμάτων και μάλιστα στο σύνολό τους τα εκχυλίσματα που προκύπτουν παρουσιάζουν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση και φαινολικό φορτίο (Πίνακας 24).

- Οι διαδοχικές εκχυλίσεις στο ASE με αιθανόλη (x3) και νερό (x3), οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραλαβή των φαινολικών ουσιών μέσης και μεγάλης πολικότητας, είναι δυνατό να αντικατασταθούν από μία εκχύλιση με EtOH/H<sub>2</sub>O (50:50) με πολύ καλή απόδοση και σημαντική μείωση στην κατανάλωση διαλυτών
- Το δραστικότερο εκχύλισμα που προέκυψε από τη συνδυαστική χρήση της Υ.Ε. και του ASE (**Υρ.Su.E.**) μελετήθηκε περαιτέρω για την απομόνωση και ταυτοποίηση των κύριων μεταβολιτών του. Έτσι, απομονώθηκαν τα φλαβονοειδή: (7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D- αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης (**SV**), 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελλαρεΐνης (**SI**) και 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D- γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοϋπολετίνης (**SIV**), καθώς και οι φανυλοαιθανοειδικοί γλυκοσίδες λαβαντουλιφολιοσίδης (**SII**), ακτεοσίδης (**SIII**) και λεονοσίδης Α (**SVI**). Μάλιστα ο λεονοσίδης Α απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Sideritis*

Ολοκληρώνοντας, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, καταστρίστηκε ένα πρωτόκολλο εκχύλισης (υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>, EtOH και H<sub>2</sub>O) από την εφαρμογή του οποίου προέκυψαν εκχυλίσματα με υψηλές αποδόσεις, χωρίς τη χρήση τοξικών διαλυτών, με πλούσιο φαινολικό φορτίο με πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση και δραστικότερα από τα αντίστοιχα της πάγιας μεθόδου. Έτσι λοιπόν, οι δύο τεχνικές μπορούν να συνδυαστούν πολύ καλά μεταξύ τους και μέσα από την κατάλληλη επιλογή των συνθηκών εκχύλισης να οδηγήσουν στην παραγωγή εκχυλισμάτων με βελτιωμένη δράση και αξιόλογο χημικό φορτίο. Παρατήρηση ιδιαίτερα σημαντική αν αναλογιστεί κανείς το όφελος που μπορεί να προκύψει μέσα από την παραγωγή ποιοτικά ανώτερων εκχυλισμάτων.

Συνεπώς, έγινε δυνατή η αντικατάσταση των τοξικών διαλυτών DCM και MeOH με διαλύτες φιλικούς προς το περιβάλλον και η θέσπιση ενός νέου πρωτοκόλλου εκχύλισης το οποίο παρέχει αποδοτικά-δραστικά εκχυλίσματα.

# Comparative study of accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction of total phenolics and flavonoids from *Sideritis raeseri* subsp. *attica* and study of antioxidant activity

G Papaefstathiou <sup>1</sup>, P Polychronopoulos <sup>1</sup>, N Aligiannis <sup>1</sup>, AL Skaltsounis <sup>1</sup>, S Mitaku <sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Athens, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Zografou Campus, 15771, Athens, Greece

The genus *Sideritis* (Lamiaceae) comprises 8 species and 7 subspecies according to Flora of Greece [1, 2]. *Sideritis* species are often used in Mediterranean countries as herbal tea, and the common Greek name of these plants is „mountain tea“. Moreover, these plants are used in Mediterranean traditional medicine for their antiinflammatory, antirheumatic, and antimicrobial activities [3, 4]. Over the years, the phytochemistry of the genus *Sideritis* (Lamiaceae) has been studied and several flavonoid aglycones and glycosides have been identified. It is well known that these natural compounds possess a good antioxidant activity [5].

In continuation of our investigation on the composition of *Sideritis* species from Greece [6], the total phenolic content and free radical scavenging activity (DPPH) of extracts from *Sideritis raeseri* subsp. *attica* were evaluated. These extracts were obtained using A.S.E. (Accelerated Solvent Extraction) and S.F.E. (Supercritical Fluid Extraction) techniques, in several conditions. S.F.E. extraction conditions were determined by varying pressure, ethanol concentration, and extraction time (Pressure was varied from 90 to 300bar and ethanol from 0–20%). In addition, the flavonoid content of the above mentioned extracts was compared with conventional extraction method. HPLC analysis of the acquired extracts showed that the use of A.S.E. gave the best results for flavonoid glycosides, whereas S.F.E. gave higher yields of flavonoid aglycones.

## References:

1. Tutin, T. G. *et al.* (1972) Flora Europea. Cambridge University Press, Cambridge.
2. Strid, A. Tan, Kit. (1991) Mountain Flora of Greece. Edinburg University Press, Edinburg.
3. Villar, A. *et al.* (1986) Plant Med. Phytother 10:31–36.
4. Diaz, R. M. *et al.* (1988) Planta Med. 54:301–304.
5. Gabrieli C. N. *et al.* (2005) J. Ethnopharmacol. 96:423–428
6. Aligiannis, N. *et al.* (2001) J. Agric. Food Chem. 49:811–815.

# Metabolic profiling and antioxidant activity of *Sideritis* species growing in southeast europe

G Papaefstathiou <sup>1</sup>, N Aligiannis <sup>1</sup>, N Fokialakis <sup>1</sup>, L Skaltsounis <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacognosy & Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimioupolis, 15771, Greece

The genus *Sideritis* L. (Lamiaceae) comprises more than 150 species occurring mainly in the Mediterranean area and the Balkan Peninsula [1 – 2]. The plants in many locations of Greece are known as “mountain tea” and are used traditionally as herbal teas for treating cold, cough, fever, as well as digestive, diuretic or respiratory problems. Due to the high content of polyphenolic compounds the species have been also associated with potential antioxidant activity [3]. In a continuation of our studies on *Sideritis* genus [4], six of the most popular Balkan species (*S. clandestina* subsp. *clandestina*, *S. euboea*, *S. perfoliata* subsp. *perfoliata*, *S. raeseri* subsp. *raeseri*, *S. scardica* and *S. syriaca*) have been compared for their phenolic content, their antioxidant activity and their metabolic profiling. In more details, several extracts were prepared by maceration, using H<sub>2</sub>O or H<sub>2</sub>O/EtOH in different portions with various ratios of solvent to plant material. These extracts were evaluated for their Total Phenolic Content and found values ranging from 70 to 200 mg GAE/g extract, as well as for their Free Radical Scavenging activity and showed that possess significant antioxidant potential. In addition, phytochemical investigation lead to the isolation of the major components that were identified as acteoside, martynoside and glycosides of apigenin, hypolaetin, isoscutelarein, 4'-*O*-methylisoscutellarein and 4'-*O*-methyl-hypolaetin. Then, High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) and Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) were used for the chemical profiling of the extracts. The results showed that the metabolite profiling and antioxidant activity of all water extracts were identical while the extracts produced by H<sub>2</sub>O/EtOH proportion had mainly quantitative differences in their chemical contents.

**Keywords:** mountain tea, *Sideritis*, antioxidant activity, secondary metabolites

## References:

- [1] Heywood V.H. Flora Europaea, Vol 3. Cambridge: Cambridge University Press; 1972: 138 – 143.
- [2] Baden C. Mountain Flora of Greece, Vol 3. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1991: 84 – 91.
- [3] Charami M, Lazari D, Karioti A, Skaltsa H, Hadjipavlou-Litina D, Souleles Ch. Antioxidant and Antiinflammatory Activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae), *Phytother Res* 2008; 4: 450 – 454.
- [4] Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou I.B, Mitakou S. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece, *J Agric Food Chem* 2001; 49: 811 – 815.

# *Cistus creticus* ssp. *creticus*

---

## 10 Εισαγωγή



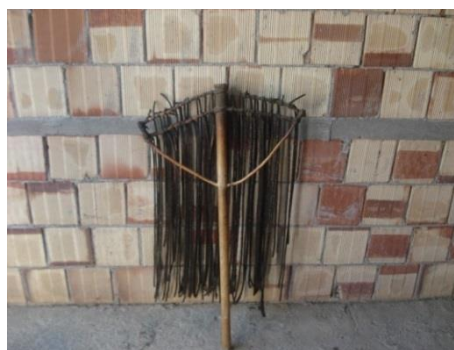
Τα διάφορα είδη του γένους *Cistus* L. είναι γνωστά από τα αρχαία χρόνια μέσω αναφορών που έχουν γίνει στα κείμενα της αρχαίας Ελληνικής γραμματείας για τη χρήση τους στη λαϊκή θεραπευτική. Τα είδη αυτά είναι γνωστά τόσο για το χαρακτηριστικό και έντονο άρωμά τους, όσο και για τις φαρμακολογικές δράσεις που επιδεικνύουν για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων.

Ένα από τα είδη του γένους, το οποίο θα μας απασχολήσει στην παρούσα διατριβή, είναι το *Cistus creticus* ssp. *creticus*. Είναι ένα είδος που φύεται στην Ελλάδα και κυρίως της Κρήτης, το οποίο αν και στις μέρες μας χρησιμοποιείται ως καλλωπιστικό φυτό, λόγω του όμορφου άνθους του, είναι γνωστό και για την ιδιότητα του να παράγει μια ρητίνη που ονομάζεται 'λάδανο'. Η ρητίνη αυτή εκκρίνεται από τις αδενώσεις τρίχες στην επιφάνεια των υπέργειων τμημάτων του φυτού και είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια τόσο για το χαρακτηριστικό της άρωμα όσο και τις θεραπευτικές της ιδιότητες.



Η χρήση του φυτού ήταν και είναι διαδεδομένη σε πολλές μεσογειακές χώρες όπως η Ισπανία, η Πορτογαλία, το Μαρόκο, η Ελλάδα, η Κύπρος καθώς και σε πολλές αραβικές χώρες όπου χρησιμοποιούταν για θυμιάματα [181]. Τόσο το φυτό όσο και η ρητίνη χρησιμοποιούνται στη λαϊκή θεραπευτική για την αντιμετώπιση πολλών παθήσεων, όπως το κοινό κρυολόγημα, ο βήχας, προβλήματα δυσπεψίας, έλκη και εγκαύματα [103]. Επιπλέον, το φυτό αποτελεί ένα από τα συστατικά παρασκευής του Άγιου μύρου, ενώ το εκχύλισμά του χρησιμοποιείται σε διάφορα σαμπουάν για την ενίσχυση του τριχωτού της κεφαλής (δράση περιεγραμμένη από τους Διοσκουρίδη και Γαληνό).

Η εμπορική εκμετάλλευση της ρητίνης αποτελούσε στο παρελθόν σημαντική πηγή εισοδήματος για πολλές οικογένειες και μάλιστα σε μερικά μέρη της Κρήτης η συλλογή της συνεχίζεται μέχρι και σήμερα (κοινότητα Σισσών Μυλοποτάμου).



Εικόνα 84. Το αργαστήρι του αλαδανιάρη

Η συλλογή της αποτελεί μια επίπονη διαδικασία η οποία ξεκινάει από τα τέλη Μαΐου μέχρι τις αρχές του καλοκαιριού, την περίοδο ανθοφορίας του φυτού όπου η ρητίνη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Η συλλογή γίνεται με ένα ειδικό εργαλείο που ονομάζεται 'το αργαστήρι του αλαδανιάρη', (ένα είδος τσουγκράνας που αντί για δόντια έχει μακριές δερμάτινες λουρίδες). Αυτό το πατροπαράδοτο εργαλείο χρησιμοποιείται περνώντας το ανάμεσα από τα φυτά, χαϊδεύοντάς τα, χωρίς να πληγωθούν ή να καταστραφούν, με τη ρητίνη να συγκρατείται επάνω του. Όλη η διαδικασία συλλογής αποτελεί μια ιδιαίτερα επίπονη διεργασία, διότι πραγματοποιείται σε ώρες έντονης ηλιοφάνειας ώστε να ρευστοποιείται η ρητίνη και να είναι ευκολότερη η συλλογή της, με την ημερήσια απόδοση να κυμαίνεται από 0,5 έως 1kg. Το ποσοστό της ρητίνης το οποίο παράγεται από τα φύλλα, εκτός από την εποχιακή του διακύμανση, μπορεί να ποικίλει από περιοχή σε περιοχή, λόγω περιβαλλοντικών ή και γενετικών παραγόντων και κυμαίνεται από 1.5-15% ξηρού βάρους φύλλων. Οι ποσότητες της ρητίνης που συλλέγονται, συσκευάζονται και εξάγονται κυρίως στις Αραβικές κυρίως χώρες όπου χρησιμοποιούνται ως θυμίαμα.

## 10.1 Δρογοιστορία

Οι αναφορές που υπάρχουν για τις χρήσεις και τις δράσεις του *Cistus* ξεκινούν από την εποχή του Ηρόδοτου (5<sup>ος</sup>/4<sup>ος</sup> αιώνας π.Χ.), ο οποίος αναφέρει για πρώτη φορά στο λάβδανο ως "λήδανον το καλέουσι, Αράβιοι λάδανον", ενώ γίνεται λόγος τόσο για τη χρήση του στην παρασκευή μύρου καθώς και για τη συλλογή του από το τρίχωμα των αιγών και των τράγων. Επίσης, ο Θεόφραστος, έκανε μια διάκριση ανάμεσα σε δύο γένη του *Cistus* βάσει του χρώματος του άνθους τους, τα

οποία τα παρομοίαζε με άγρια ρόδα και κάνοντας σαφή αναφορά στη “λιπαρότητα” του “επιπορφυρίζοντος” (ρητίνη).

Ο Διοσκουρίδης (1<sup>ος</sup> αιώνας μ.Χ.) στο έργο του αναφέρεται στο *Cistus* δίνοντας μια λεπτομερή περιγραφή του τρόπου συλλογής του λάβδανου, ενώ κάνει αναφορά στη χρήση του για γαστρεντερικές διαταραχές, αιμοπτύσεις και στον έλεγχο της εμμήνου ρύσης [103],[182].

Ο Ρωμαίος ιατρός Celsus (25π.Χ. - 25μ.Χ.), αναφέρθηκε στη χρήση της ρητίνης με τη μορφή εμπλάστρου σε κακοήθη σαρκώματα. Επίσης, ο Ορειβάσιος (Βυζαντινός ιατρός που έζησε τον 4<sup>ο</sup> αιώνα), παρασκεύαζε αλοιφή με λάδανο για την αντιμετώπιση της τριχόπτωσης. Ο Πέρσης ιατρός Αβικέννας (980-1037 μ.Χ.), ο οποίος ασχολήθηκε εκτεταμένα με την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, αναφέρει τη χρήση του λάβδανου για την αποσκλήρυνση του στομάχου και του εντέρου καθώς και με τη μορφή αλοιφής για τη θεραπεία του σπλήνα. Περιηγητές και βοτανολόγοι, όπως οι Pierre Belon και Joseph Pitton de Tournefort (1517-1564 μ.Χ.), αναφέρθηκαν αναλυτικά στις ιδιότητες, τα χαρακτηριστικά του και τον τρόπο συλλογής του φυτού, πληροφορίες που συνέλλεξαν κατά την παραμονή τους στην Κρήτη [183].

Αναφορές έχουμε και από το Γαληνό ο οποίος περιέγραψε τις στυπτικές ιδιότητες του φυτού και την ικανότητά του για την αντιμετώπιση δυσεντεριών και “σηπεδονωδών” ελκών με μορφή καταπλάσματος. Επίσης, έκανε χρήση του φυτού σε επιθέματα για στομαχικές και ηπατικές διαταραχές αλλά και σαν αντίδοτο εχιδνών. Επιπλέον, έκανε διάκριση μεταξύ του φυτού και της ρητίνης, για την οποία αναφέρει ότι είναι κατάλληλη για θεραπείες κατά της τριχόπτωσης.

Επιπροσθέτως, την πρώτη σαφή αναφορά για τη χρήση του είδους ως αντισηπτικό την έχουμε από τον Ιπποκράτη, ο οποίος αναφέρει τον καθαρισμό με χλιαρό νερό μετά από μητρορραγία στο οποίο είχε βράσει *Cistus* και φασκόμηλο [184].

Γύρω στον 18<sup>ο</sup> αιώνα άρχισε να χρησιμοποιείται εκτεταμένα και ως συστατικό αλοιφών για την αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων καθώς και κατά της πανώλης. Επιπλέον, πιο σύγχρονες αναφορές μιλούν για τη χρήση του σε σκληρούς όγκους της μήτρας, όγκους του πρωκτού, ρινικούς πολύποδες και



καρκινογόνα έλκη καθώς και για την υποχώρηση καλοήθους μορφής αποστημάτων, χελωνίων και καλογήρων [185].

## 10.2 Δρογοφαρμακολογία

Το *C. creticus* τα τελευταία χρόνια έχει τύχει μεγάλης προσοχής και επιστημονικού ενδιαφέροντος, λόγω του ότι αποτελεί μια πλούσια πηγή δραστικών συστατικών (πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, τερπένια λαβδανικού τύπου κ.α. [186]). Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν δείξει σημαντικές δράσεις όπως: αντιοξειδωτική, αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητιασική (*mycosis, candida albicans* κ.α.) [187], αντικαρκινική [187],[188] αντιική [189], αντιφλεγμονώδη, επουλωτική, κυτοτοξική [190], καθώς και ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων κυτταρικών σειρών όπως: KB, P388, NSCLC-N6, RAI, MOLT3 και H9 [186],[191],[192],[193],[194],[195],[196]. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί η χρήση του στη θεραπεία του όγκου της μήτρας, του όγκου του πρωκτού, σε ρινικούς πολύποδες και καρκινογόνα έλκη [185].

Χαρακτηριστική επίσης είναι και η αντιοξειδωτική του ικανότητα, ενώ χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι με την κατανάλωση ενός και μόνο αφεψήματος την μέρα καλύπτονται οι ημερήσιες ανάγκες του οργανισμού σε βιταμίνη C [197]. Στη διπλανή εικόνα παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση ενός αφεψήματος *Cistus* σε σχέση με διάφορα γνωστά ροφήματα και ποτά.



Επιπλέον, το αιθέριο έλαιό του είναι εγκεκριμένο από τον FDA και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο τροφίμων, αρωματικός παράγοντας και ως συμπλήρωμα διατροφής, ενώ συσκευασμένα αφεψήματα του φυτού κυκλοφορούν ήδη στην αγορά.

## 10.3 Δρογοβοτανική

Η **οικογένεια** Cistaceae αποτελείται από 8 γένη και 180 είδη, εκ των οποίων τα γένη *Cistus*, *Fumara*, *Halimium*, *Helianthemum*, and *Tuberaria* εντοπίζονται στη

Μεσόγειο[181]. Περιλαμβάνει θάμνους ή πόες με απλά φύλλα συνήθως αντίθετα και τρίχες κυρίως αστεροειδείς. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, υπόγυνα, μονήρη ή σε ταξιανθίες. Φέρουν 5 ή 3 σέπαλα, ενώ τα πέταλα είναι συνήθως 5 και σπανίως απουσιάζουν. Οι στήμονες είναι πολλοί, η ωθήκη μονόχωρη ή διαχωρισμένη με τρεις ή πέντε πλακούντες (σπάνια 10), με ωάρια ορθότροπα, σπάνια ανάτροπα. Ο στύλος είναι απλός ή δεν υπάρχει. Ο καρπός είναι διαρηγνυόμενη κάψα με πολλά σπέρματα [198].

Το **γένος** *Cistus* L. αποτελείται από 20 περίπου είδη, τα οποία απαντώνται κυρίως στη λεκάνη της Μεσογείου [160]. Πιο συγκεκριμένα, πολλά είδη ευδοκιμούν στην Ισπανία, το Μαρόκο, την Ιταλία, την Πορτογαλία, την Αλγερία και τη Γαλλία. Αντίθετα, στην Ανατολική Μεσόγειο τα είδη είναι πολύ λιγότερα με τα πιο συχνά απαντώμενα να είναι τα *C. creticus*, *C. Palviflorus* και *C. salvifolius*. Το γένος περιλαμβάνει θάμνους με άνθη μεγαλύτερα από 2 cm σε διάμετρο, λευκά έως μωβ-κόκκινα. Η ωθήκη είναι 5-χωρη και σπάνια 10-χωρη με αξονικούς πλακούντες και ωάρια ορθότροπα. Έχουν αναφερθεί υβρίδια, ανάμεσα σε είδη του γένους *Cistus* και είδη του γένους *Halimium*. Όλα τα είδη είναι φυτά στεγνών θαμνοτόπων ή ανοικτών ορεινών περιοχών [199]. Τα είδη του γένους είναι πυρόφυτα, τα οποία εξαπλώνονται σε βιοτόπους μετά από πυρκαγιές [200].

Το **είδος** *Cistus creticus* ssp. *creticus* είναι πολυετής θάμνος με στελέχη μέχρι 1 m όρθια ή απλωτά. Τα φύλλα είναι ωοειδή, αντρωοειδή ή ελλειπτικά με διαστάσεις (10-)20-50(70) x 8-30 mm, συχνά είναι κυματιστά, με διακλαδισμένα νεύρα, πράσινα ή γκριζοπράσινα, τριχωτά ή μαλλιαρά με αστεροειδείς τρίχες, με τα νεύρα πιεσμένα από πάνω και προεξέχοντα από κάτω. Τα φυτά έχει ακραίες ταξιανθίες με 1-7 άνθη, λίγο πολύ συμμετρικά. Φέρει 5 σέπαλα ωοειδή-επιμήκη αιχμηρά με αστεροειδείς και μακριές απλές τρίχες. Τα άνθη είναι διαμέτρου 4- 6 cm χρώματος ιώδους-ρόδιου.

Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του γένους *Cistus* αναφέρεται στον ακόλουθο ισότοπο: [Γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του \*Cistus\*](#).

Όσον αφορά τα υποείδη του *C. creticus* ssp. *creticus*, αυτά εξαπλώνονται κυρίως στην κεντρική και δυτική Μεσόγειο, την Κορσική, τη Σαρδηνία και την Ελλάδα [201]. Σημαντικό στοιχείο που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι από τα έξι *taxa* του γένους που φύονται στην Ελλάδα, τα πέντε εξαπλώνονται στη γεωγραφική

περιοχή της Κρήτης: *Cistus creticus* L. ssp. *creticus*, *Cistus creticus* L. ssp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter & Burdet, *Cistus monspeliensis* L., *Cistus parviflorus* Lam. και *Cistus salviifolius* L.[202].

Η συστηματική ταξινόμηση του γένους, σύμφωνα με το σύστημα που έχει υιοθετήσει το USDA, είναι η ακόλουθη:

Πίνακας 37. Συστηματική ταξινόμηση του είδους *C. creticus*

Βασίλειο (Kingdom)	<i>Plantae</i>
Υποβασίλειο (Subkingdom)	<i>Tracheobionta</i>
Υπεράθροισμα (Superdivision)	<i>Spermatophyta</i>
Άθροισμα (Division)	<i>Magnoliophyta</i>
Κλάση (Class)	<i>Magnoliopsida</i>
Υποκλάση (Subclass)	<i>Dilleniidae</i>
Τάξη (Order)	<i>Violales</i>
Οικογένεια (Family)	<i>Cistaceae</i> (Rock-rose family)
Γένος (Genus)	<i>Cistus</i> L. (rockrose)
Είδος (Species)	<i>creticus</i>
Υποείδος (Subspecies)	<i>creticus</i>

## 10.4 Δρογοετυμολογία

Ετυμολογικά η λέξη ‘*Cistus*’, ‘κίστος-κίσθος’ ή ‘κίσθαρος’ αποδίδεται στην ελληνική λέξη «κίστη» που σημαίνει πανέρι, κουτί. Άλλα ονόματα με τα οποία είναι γνωστά τα φυτά του γένους είναι: κίσσαρος, κιστάρια, κίστα, αλαδανιά, αλάδανος, ατίσαρα, αλίσσαροι, αλιταριές, ξισταριά και κουνούκλα.

Άλλες ονομασίες με τις οποίες είναι γνωστό το φυτό σε διάφορες γλώσσες είναι οι ακόλουθες:

- **Λατινικά:** lapdanum, labdanum [203]
- **Γαλλία:** Ciste de crete
- **Ιταλικά:** ladano
- **Τούρκικα:** laden
- **Ισπανικά:** jara de Ladano [191].

Όσον αφορά την ονομασία 'λάβδανο' θεωρείται ότι είναι ακκαδικής προέλευσης. Οι Ακκάδιοι ήταν αρχαίος λαός της Μεσοποταμίας, οι οποίοι κατοικούσαν βόρεια των Σουμέριων και ήκμασαν την 3<sup>η</sup> χιλιετία π.Χ. Στα Ακκαδικά προφέρονταν λάντινου ή λάντουνου (ladunu). Η ελληνική λέξη που αφορά τη ρητίνη είναι λήδανον ή λάδανον (Ηρόδοτος, 500 π.Χ.), η οποία εξελίχθηκε αργότερα σε λάβδανο. Στα λατινικά εμφανίζεται ως Ladanum, labdanum και lapdanum [204]. Η ονομασία του λάβδανου σε άλλες γλώσσες φαίνεται ακολούθως:

- **Ασσυριακά:** Ladanu.
- **Αραβικά :** Ladhan.
- **Αγγλικά:** Ladanum.
- **Γερμανικά:** Labdanum, Ladenharz, Ladan, Gummi or Resina Labdanum.
- **Γαλλικά :** Ladanum.
- **Ισπανικά:** Ládano.
- **Τουρκικά :** Ladaen.

## 10.5 Δρογοχημεία

Από τα είδη του *Cistus* έχουν απομονωθεί περισσότεροι από 700 μεταβολίτες, εκ των οποίων 400 ανήκουν στην κατηγορία των τερπενίων, ενώ περισσότεροι από 160 στην κατηγορία των флаβονοειδών και των φαινυλοπροπανοειδών. Συγκεκριμένα, από το είδος *C. creticus* ssp. *creticus* έχουν απομονωθεί περίπου 90 τερπενικές ενώσεις (μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και διτερπένια) και περισσότερα από δέκα φαινυλοπροπανοειδή – флаβονοειδή [181].

Στη συνέχεια αναφέρονται τα γενικά χαρακτηριστικά των βασικών χημικών κατηγοριών, στις οποίες ανήκουν οι μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από το είδος.

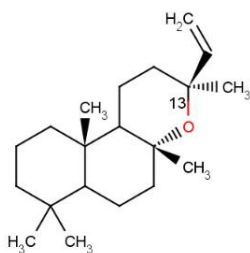
### 10.5.1 Τερπένια

Τα τερπένια αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ενώσεων οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του είδους και είναι υπεύθυνα για πολλές από τις βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις του. Βιοσυνθετικά

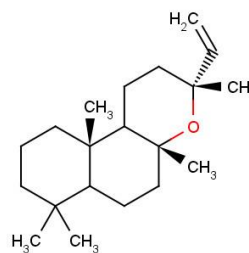
προέρχονται από το μεβαλονικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται αρχικά από ακετοακέτυλο-CoA και ακέτυλο-CoA, με ενδιάμεσο προϊόν το β-υδρόξυ-3-αιθυλογλουταρικό-CoA. Στη συνέχεια, το μεβαλονικό οξύ μετατρέπεται σταδιακά σε πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο, το οποίο αποτελεί και την *in vivo* πρόδρομη ουσία των τερπενοειδών. Αυτό σχηματίζει στη συνέχεια το πυροφωσφορικό γερανύλιο (C10), από όπου προέρχονται τα μονοτερπένια, και το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (C15), από το οποίο παράγονται όλα τα υπόλοιπα τερπένια [205].

Η περιεκτικότητά τους σε ένα είδος ποικίλει καθώς επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, η περιοχή, η θερμοκρασία, οι μικροοργανισμοί κ.ά. [206]. Τέτοιου τύπου διαφοροποιήσεις έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες μελέτες αιθέριων ελαίων που έχουν γίνει κατά καιρούς. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξε και η μελέτη των Demetzos *et al.* (2002), στην οποία πραγματοποιήθηκε μια διαπληθυσμιακή μελέτη του χημικού περιεχομένου στο είδος *C. creticus* ssp. *creticus* με δείγματα συλλεγμένα από διάφορα μέρη της Κρήτης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα συστατικά των αιθέριων ελαίων τους και διαπιστώθηκε ότι η σύστασή τους εξαρτάται άμεσα από την περιοχή συλλογής, τις κλιματολογικές συνθήκες και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες [206].

Δύο από τους κυριότερους τερπενικούς μεταβολίτες που παράγει το φυτό είναι το εντ-οξείδιο της μανούλης και το εντ-13-επι-οξείδιο της μανούλης. Η παρουσία τους στο είδος είναι μεγάλη, με το ποσοστό τους σε ορισμένα φυτά να φτάνει το 20% και 36% του βάρους το αιθερίου ελαίου αντίστοιχα [206],[207]. Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν δείξει σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων κυτταρικών σειρών (P388, KB, NSCLC-N6) [187] καθώς και αντιβακτηριδιακή δράση έναντι πολλών βακτηρίων και ιδιαίτερα έναντι του *Staphylococcus aureus* [187],[208],[209].



Εικόνα 86. εντ-13-επι-οξείδιο της μανούλης (III)

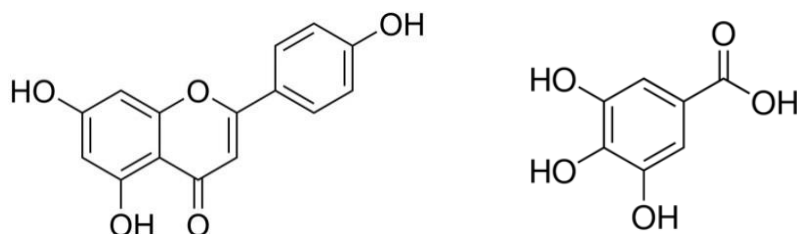


Εικόνα 85. εντ-οξείδιο της μανούλης (III)

Επίσης, από το γένος έχουν ταυτοποιηθεί και πολλά τερπενικά μόρια λαβδανικού τύπου όπως: 8,13-εποξυ-15,16-ντινορλαβδ-12-ένιο, 3β-υδροξυ-13-επι-οξείδιο της μανούλης, λαβδα-7,13-διεν-15-όλη, οξικός εστέρας του λαβδα-7,13-διεν-15-υλίου, 3β-ακετυλο-13-επι-οξείδιο της μανούλης, λαβδα-13-εν-8α,15-διόλη, και ο οξικός εστέρας του λαβδα-13-εν-8α-ολ-15-υλίου.

### 10.5.2 Φλαβονοειδή και λοιποί μεταβολίτες

Οι δύο βασικότεροι παράγοντες για τη διαίωνιση ενός είδους αποτελούν η διαδικασία αναπαραγωγής του και η ικανότητά του για προστασία από εξωτερικούς παράγοντες. Και στις δύο περιπτώσεις σημαντικό ρόλο παίζουν τα φλαβονοειδή. Η ιδιότητα τους να απορροφούν την ηλιακή ακτινοβολία έχει σαν αποτέλεσμα να προσδίδουν στο φυτό έντονους χρωματισμούς συμβάλλοντας ουσιαστικά στη διαδικασία της επικονίασης, ενώ ταυτόχρονα προσφέρουν προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, την ξηρασία και τους παθογόνους μικροοργανισμούς [210].



Εικόνα 87. Δομή απιγενίνης και γαλικού οξέος

Είναι ενώσεις πολύ διαδεδομένες στις οικογένειες των ανώτερων φυτών και το όνομά τους προέρχεται από τη λατινική λέξη 'flavus' που σημαίνει κίτρινο, λόγω του κίτρινου χρώματός τους που ευθύνεται για τον χρωματισμό των καρπών και των άνθων [211]. Αποτελούν παράγωγα της βενζο-γ-πυρόνης και βιοσυνθετικά παράγονται από τις οδούς του σικιμικού και του οξικού οξέος.

Τα περισσότερα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από το είδος του *C. creticus* ssp. *creticus* αποτελούν παράγωγα της κερσετίνης, της καιμπφερόλης και της μυρικετίνης.

Λοιποί μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από τα διάφορα είδη του γένους είναι: ορισμένα φαινολικά οξέα όπως είναι το γαλλικό οξύ, η ελεμισίνη, η εξαϋδροξυδιφαινοϋλογλυκόζη και τα παράγωγα τους, καθώς και οι ταννίνες στις οποίες οφείλεται η στυπτική δράση των φυτών. Ως παράδειγμα αναφέρουμε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών οξέων έχει βρεθεί στο είδος *C. albidus*, ενώ η πολύ μεγάλη ποσότητα ταννινών παράγεται από το είδος *C. laurifolius* ιδίως στα νεαρά φύλλα [212].

## 10.6 Λόγοι επιλογής του είδους *Cistus creticus ssp. creticus*

Όπως προαναφέρθηκε το *C. creticus ssp. creticus* είναι ενδημικό της Ελλάδας, αποτελεί μια πηγή πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες και χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παραγωγή εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων [213]. Επιπλέον, όλες οι μελέτες που αφορούν το είδος, έχουν γίνει με τη χρήση κλασσικών μεθόδων και διαλυτών εκχύλισης, όπως η υδραπόσταξη για την παραλαβή των πτητικών συστατικών, η εκχύλιση με διαβροχή και τη χρήση υδατοαλκοολικών μιγμάτων για την παρασκευή βαμμάτων [214], εκχυλίσαις υποβοηθούμενες με υπερήχους καθώς και οι εκχυλίσαις με τη χρήση οργανικών διαλυτών όπως εξάνιο [194],[196], ο οξικός αιθυλεστέρας [215] και το διχλωρομεθάνιο [199]. Έτσι λοιπόν, εκτεταμένη χρήση του στη λαϊκή θεραπευτική, η περιεκτικότητά του σε πολυάριθμους, δραστικούς μεταβολίτες με αξιόλογες βιολογικές δράσεις, καθώς και η απουσία εφαρμογής σύγχρονων τεχνικών εκχύλισης, ήταν οι λόγοι που μας οδήγησαν στην επιλογή και μελέτη του συγκεκριμένου είδους.

## *C. creticus ssp. creticus* Πειραματικό μέρος

---

### 10.7 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η εφαρμογή της υπερκρίσιμης εκχύλισης για την παραλαβή άπολων και μέσης πολικότητας δραστικών μεταβολιτών από τη ρητίνη και τα υπέργεια τμήματα του φυτού *C. creticus ssp. creticus*, καθώς και η σύγκριση των αποτελεσμάτων της εναλλακτικής αυτής μεθόδου εκχύλισης με τα ληφθέντα από συμβατικές τεχνικές, όπως η υδροαπόσταξη (HD) και η εκχύλιση με τη χρήση λουτρού υπερήχων (UAE).

Τέλος, σε επιλεγμένα εκχυλίσματα, τα οποία ήταν πλούσια σε βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, πραγματοποιήθηκε φυτοχημική μελέτη για την απομόνωση και ταυτοποίηση των κυριότερων συστατικών τους.

### 10.8 Υλικά και μέθοδοι

Η συλλογή του φυτικού υλικού έγινε τον Ιούλιο του 2013 σε περιοχή κοντά στην κοινότητα Σισσών Μυλοποτάμου του νομού Ρεθύμνης, στην Κρήτη, ενώ η ρητίνη αγοράστηκε από το συναιτερισμό της περιοχής το 2014.

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

- Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης (SFE-1-2)
- Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους (Branson 2510- UAE)
- Συσκευή απόσταξης αιθέριων ελαίων (HD)
- Αέρια χρωματογραφία μάζας (GC-MS)
- Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME)
- Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητισμού (NMR) Bruker Avance III 600 MHz.
- Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) κανονικής και αντίστροφης φάσης



## 10.9 Μελέτη του χημικού περιεχομένου της ρητίνης 'λάδανο'

### 10.9.1 Παραλαβή των πτητικών συστατικών της ρητίνης με την τεχνική της Υ.Ε.

Η εκχύλιση της ρητίνης έλαβε χώρα στη συσκευή ημιπilotικής κλίμακας (SFE-1-2) ώστε η παραλειφθήσα ποσότητα εκχυλίσματος να είναι επαρκής για την περαιτέρω μελέτη του. Έτσι, ποσότητα 52.63 g ρητίνης αναμείχθηκε με 18 g αδρανής άμμου και 7 g κελουλόζης και τοποθετήθηκαν εντός του δοχείου εκχύλισης. Η ανάμειξη με τα αδρανή υλικά έγινε με σκοπό την ευκολότερη διέλευση του CO<sub>2</sub> μέσα από όλη τη μάζα της και να αποτραπεί ο κίνδυνος απόφραξης των σωληνώσεων λόγω της κολλώδους υφής της, διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ομαλότερη λειτουργία της συσκευής και την επιτυχή ολοκλήρωση της εκχυλιστικής διαδικασίας.

Εκτός από την ποσοτική παραλαβή των άπολων συστατικών της ρητίνης, μέσα στους στόχους της παρούσης μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας της Υ.Ε. για κλασμάτωση του εκχυλίσματος, όχι με την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών εντός των διαχωριστήρων [213], αλλά με την αλλαγή της πολικότητας της κινητής φάσης. Αλλάζοντας σταδιακά την πίεση και το ποσοστό του συνδιαλύτη, εκχυλίζονται συστατικά διαφορετικής πολικότητας, επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο την παραλαβή συστατικών με αρκετά μεγαλύτερο εύρος πολικότητας. Για την εκπλήρωση αυτού του στόχου, σχεδιάστηκε ένα πρωτόκολλο εκχύλισης το οποίο περιελάμβανε τα εξής στάδια: αρχικά τη χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> σε χαμηλές πιέσεις για την παραλαβή των πτητικών συστατικών της ρητίνης, στη συνέχεια αύξηση της πίεσης για την παραλαβή των άπολων μη πτητικών συστατικών και τέλος προσθήκη συνδιαλύτη (σε διάφορες συγκεντρώσεις) για την παραλαβή των πιο πολικών μεταβολιτών (Πίνακας 38). Με αυτόν τον τρόπο έγινε δυνατή η παραλαβή εκχυλισμάτων με διαφορετικό φυτοχημικό φορτίο, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνθηκε η μετέπειτα διαδικασία της απομόνωσης των μεταβολιτών.

Επειδή η ρητίνη είναι ένα ιδιαίτερα κολλώδες ημιστερεό υλικό, η θερμοκρασία στον εκχυλιστήρα και στους διαχωριστήρες ρυθμίστηκε στους 50 °C (θερμοκρασία σχετικά υψηλή για πτητικά συστατικά), συνθήκη η οποία κρίθηκε

απαραίτητη για την ρευστοποίηση της και την πιο αποδοτική και πιο αποτελεσματική εκχύλισή της.

Πίνακας 38. Συνθήκες Υ.Ε. εκχύλισης της ρητίνης και οι αποδόσεις

Δείγμα*	Ροή (kg/h)	Εκχυλιστήρας (1L)		Διαχωριστήρες		Συνδιαλύτης (%)	Βάρος (g)	Απόδοση (%)
		Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)			
<b>C.c.R.SFE.1</b>	3.5	100	50	55	50	-	3.34	6.34
<b>C.c.R.SFE.2</b>	3.5	200	50	55	50	-	4.98	9.46
<b>C.c.R.SFE.3</b>	3.5	200	50	55	50	2.5	5.77	10.96
<b>C.c.R.SFE.4</b>	3.5	300	50	55	50	5	1.91	3.63
<b>C.c.R.SFE.5</b>	35	300	50	55	50	10	1.55	2.94

\*Το κάθε στάδιο εκχύλισης γινόταν μέχρι εξάντλησης.

Παρατηρώντας τις αποδόσεις του Πίνακα 38 προκύπτει ότι το σύνολο των μη πολικών συστατικών της ρητίνης ανέρχεται περίπου στο 33.33% της μάζας της ρητίνης, με τη μέγιστη απόδοση να λαμβάνεται σε συνθήκες πίεσης 200 bar και συνδιαλύτη 2.5%.

Τα πρώτα κλάσματα που εκχυλιστήκαν με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> (**C.c.R.SFE.1** και **C.c.R.SFE.2**) είχαν υπόλευκο χρώμα και παχύρρευστη υφή η οποία δε θύμιζε καθόλου αυτή ενός συνηθισμένου αιθέριου ελαίου. Παρόλα αυτά τα δείγματα είχαν πολύ έντονο άρωμα που θύμιζε πολύ αυτό του φρέσκου φυτικού υλικού. Αυτή η διαφορετική υφή των πτητικών κλασμάτων εκχυλισμάτων, σε σύγκριση με το αιθέριο έλαιο το οποίο παραλαμβάνεται με την υδραπόσταξη, οφείλεται στο γεγονός ότι με την Υ.Ε. εκτός από τα πτητικά συστατικά συνεκχυλίζονται και άλλα μη πτητικά άπολα συστατικά (π.χ. λιπαρά, τερπένια και φαινολικά παράγωγα) [216],[217], η εκχύλιση των οποίων έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορετική υφή του τελικού προϊόντος.

Τα πιο πολικά δείγματα που παρελήφθησαν με τη χρήση συνδιαλύτη (**C.c.R.SFE.3**, **C.c.R.SFE.4** και **C.c.R.SFE.5**), είχαν σχετικά μικρές αποδόσεις, κίτρινο χρώμα (υποψία παρουσίας φλαβονοειδών) και έντονα κολλώδη υφή, ενώ χαρακτηρίζονταν από την παντελή έλλειψη αρώματος. Το γεγονός αυτό ήταν

αναμενόμενο καθώς στα προηγούμενα στάδια εκχύλισης απομακρύνθηκαν εξαντλητικά τα πτητικά συστατικά. Η χαμηλή περιεκτικότητα των κλασμάτων αυτών σε πτητικά συστατικά επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (Παράρτημα).

### 10.9.2 Εκχύλιση υπολείμματος της υπερκρίσιμης εκχύλισης για την παραλαβή των πολικών συστατικών

Με σκοπό να ελεγχθεί το εναπομείναν φορτίο του υπολείμματος της Υ.Ε. σε μεταβολίτες, μια ποσότητα (10 g) εκχυλίστηκε με την τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE), χρησιμοποιώντας διαδοχικά διαλυτικά μέσα όπως: οξικός αιθελεστέρας (EtOAc), αιθανόλη (EtOH) και αιθανόλη/νερό 50:50 και στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 39. Συνθήκες εκχύλισης υπολείμματος Υ.Ε. στο ASE

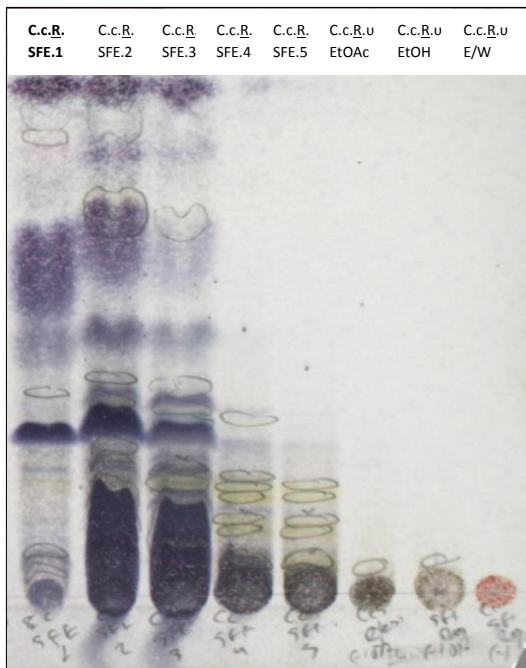
Δείγμα	Διαλύτης	Θερμοκρασία (°C)	Κύκλοι	Χρ. εκχύλισης (min)	Βάρος (g)	Απόδοση (%)
<b>C.c.R.u.EtOAc</b>	EtOAc	70	2	5	0.033	0.33
<b>C.c.R.u.EtOH</b>	EtOH	70	2	5	0.63	6.3
<b>C.c.R.u.E/W</b>	EtOH /H <sub>2</sub> O 50:50	70	2	5	1.25	12.5

Από τις τιμές των αποδόσεων παρατηρείται ότι το υπόλειμμα της Υ.Ε. είναι πλούσιο σε πολικούς μεταβολίτες, για την εκχύλιση των οποίων είναι απαραίτητη η χρήση μίγματος αιθανόλης νερού.

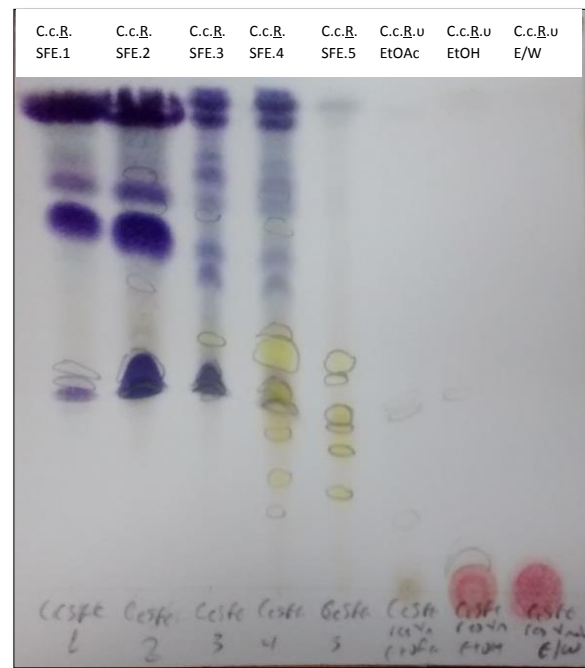
Η χαμηλή απόδοση του εκχυλίσματος **C.c.R.u.EtOAc** καταδεικνύει την αποτελεσματικότητα της διεργασίας της Υ.Ε.. Το συγκεκριμένο κλάσμα της επιταχυνόμενης εκχύλισης ήταν πλήρως απαλλαγμένο από πτητικά, στοιχείο το οποίο γινόταν άμεσα αντιληπτό από την πλήρη έλλειψη αρώματος, ενώ επιβεβαιώθηκε και πειραματικά με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας μάζας (Παράρτημα).

### 10.9.3 Χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων υπερκρίσιμης εκχύλισης με TLC

Όπως προέκυψε από τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC (Εικόνα 88 και Εικόνα 89), με το εκχυλιστικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε πραγματοποιήθηκε ένας ιδιαίτερα αποτελεσματικός διαχωρισμός των ουσιών με βάση την πολικότητα και την πολικότητά τους, οδηγώντας στην παραγωγή συνολικά πέντε κλασμάτων: δύο πλούσιων σε τερπενικούς μεταβολίτες (**C.c.R.SFE.1** και **C.c.R.SFE.2**), δύο πλούσιων σε φλαβονοειδή (**C.c.R.SFE.4** και **C.c.R.SFE.5**) και έναν που περιέχει μείγμα αυτών (**C.c.R.SFE.3**) (Εικόνα 89). Έτσι, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι μεταβάλλοντας κατάλληλα την πολικότητα της κινητής φάσης γίνεται εφικτή η αποτελεσματική εκχύλιση διαφορετικών συστατικών της ρητίνης και κατ' επέκταση η παραλαβή κλασμάτων με διαφορετικό φυτοχημικό φορτίο. Η δυνατότητα αυτή μπορεί να καταστεί ιδιαίτερα αποτελεσματική ιδίως σε περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητή η παραλαβή εκχυλισμάτων με διαφορετικές βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες.



Εικόνα 88. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας στα κλάσματα της Υ.Ε. της ρητίνης. Σύστημα ανάπτυξης DCM/Meth 99/1

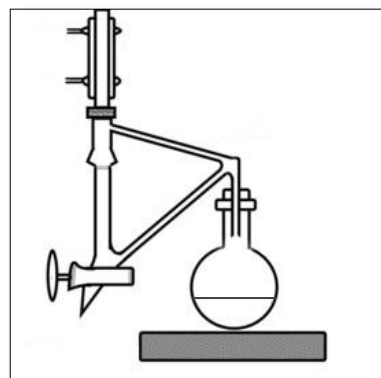


Εικόνα 89. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας στα κλάσματα της Υ.Ε. της ρητίνης. Σύστημα ανάπτυξης DCM/Meth 95/5 +0.1% F.A.

Επίσης, από την παρατήρηση των χρωματογραφικών πλακών TLC προέκυψε ότι τα κλάσματα του υπολείμματος **C.c.R.u.EtOH** και **C.c.R.u.E/W** είναι πλούσια σε τανίνες (κόκκινο χρώμα στη γραμμή βάσης της TLC). Η ανίχνευση αυτών των μεταβολιτών στο εκχύλισμα ήταν αναμενόμενη, μιας και το φυτό είναι γνωστό για τη στυπτική του δράση [181].

#### 10.9.4 Παραλαβή αιθέριου ελαίου ρητίνης με υδραπόσταξη

Η υδραπόσταξη (HD) αποτελεί τη βασική τεχνική με την οποία συγκρίνονται όλες οι σύγχρονες μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων. Είναι μια καλά καθιερωμένη τεχνική στο χώρο της αρωματοποιίας και χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα για την παραγωγή των περισσότερων αρωμάτων που κυκλοφορούν στην αγορά. Γι' αυτό το λόγο, στην παρούσα εργασία η τεχνική θα χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου της ρητίνης, του οποίου η ποιοτική και την ποσοτική σύσταση θα συγκριθεί με τη σύσταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών της υπερκρίσιμης εκχύλισης.



Ποσότητα 72 g ρητίνης αναμείχθηκε με 43 g αδρανής άμμου και 7.5 g κελουλόζης και εισήχθη στη συσκευή Clevenger για απόσταξη. Μετά το πέρας 3 ωρών, συλλέχθηκαν 0.7 mL αιθέριου ελαίου (**Ccred**), με την απόδοση του να υπολογίζεται στο 0.98%. Η απόδοση αυτή είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με αυτή της Υ.Ε. (6.34%) και αυτό οφείλεται στις εκχυλιστικές δυνατότητες του υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> το οποίο, εκτός από τα πτητικά συστατικά παραλαμβάνει και άλλα μη πτητικά άπολα συστατικά τα οποία συμβάλουν στην αύξηση της μάζας του εκχυλίσματος.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ουσιών που συνεκχυλίζονται μαζί με το αιθέριο έλαιο της υπερκρίσιμης εκχύλισης αποτελούν συστατικά με σημαντικές βιολογικές δράσεις, οι οποίες προσδίδουν στο έλαιο ιδιότητες όπως: αντιοξειδωτική (εκχύλιση ασκορβικού οξέος και καροτενοειδών), αντιική και αντιβακτηριδιακή (λινολεϊκό και α-λινολενικό οξύ),

ενώ αρκετά χαρακτηρίζονται από υψηλό βιολογικό ενδιαφέρον (π.χ. ωμέγα 3 λιπαρά, λουτεολίνη κ.α.) [2],[218],[219]. Όπως αποδείχτηκε από την μελέτη της ποιοτικής σύστασης το μεγαλύτερο ποσοστό των συνεκχυλιζόμενων συστατικών αποτελούν ενώσεις με σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Κεφάλαιο 10.10.1).

### 10.9.5 Εκχύλιση της ρητίνης με τη χρήση υπερήχων

Μια ακόμα τεχνική, φιλική προς το περιβάλλον, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή εκχυλισμάτων είναι η διαβροχή με τη χρήση υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction UAE). Η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και γρήγορη, με υψηλές αποδόσεις και μειωμένους χρόνους εκχύλισης.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της *σπηλαιώσης*, που συμβαίνει στη μάζα του διαλύτη κατά την επιβολή των διαφόρων συχνοτήτων. Κατά το φαινόμενο αυτό, ο διαλύτης απορροφάει την μικροκυματική ακτινοβολία δημιουργώντας μικρές φυσαλίδες στη μάζα του, οι οποίες μέσω συνεχόμενων κύκλων συμπύκνωσης – αραίωσης οδηγούν στο σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων, την απελευθέρωση των δραστικών συστατικών και εν τέλει στην αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Ωστόσο μετά το πέρας της εκχύλισης είναι απαραίτητη η συμπύκνωση του δείγματος για την απομάκρυνση του διαλύτη.

Θέλοντας να συγκρίνουμε τις αποδόσεις της Υ.Ε. με αυτές της UAE, πραγματοποιήθηκαν δύο επιπλέον εκχυλίσεις της ρητίνης με τη χρήση οργανικών διαλυτών: κυκλοεξανίου (C-Hex) και διχλωρομεθανίου (DCM), στις συνθήκες του παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 40. Εκχύλιση ρητίνης με τη χρήση υπερήχων

Δείγμα	Βάρος (g)	Διαλύτης	Αναλογία (δρόγη/διαλύτη)	Διάρκεια (h)	Απόδοση (%)
<b>C.c.R.UAE.C-Hex</b>	7,89	C-Hex	1/7	2	32.62
<b>C.c.R.UAE.DCM</b>	7,98	DCM	1/7	2	40.79

Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν σε συσκευή θέρμανσης υπό κενό (Rota Vapor) για την απομάκρυνση του διαλύτη. Η εικόνα των τελικών εκχυλισμάτων έμοιαζε πολύ με αυτή του κλάσματος **C.c.R.SFE.3** της Υ.Ε.. Τα δείγματα παρουσίαζαν έντονα

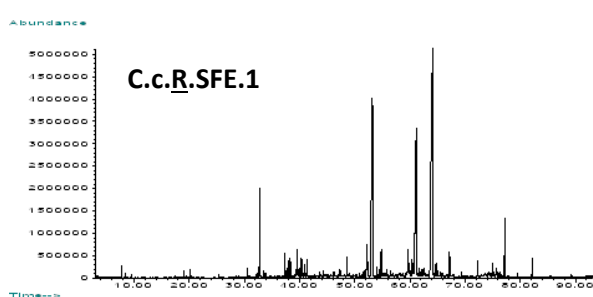
κολλώδη υφή, κίτρινο χρώμα, ενώ ήταν επίσης χαρακτηριστική η έλλειψη αρώματος και πτητικών συστατικών (Πίνακας 41).

Από την σύγκριση των αποδόσεων της Υ.Ε. με την UAE προκύπτει ότι και οι δύο διεργασίες παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά ανάκτησης μεταβολιτών με παρόμοια αποτελέσματα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι και οι δύο τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή εκχυλισμάτων με υψηλές αποδόσεις, με την Υ.Ε. να παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι στην ίδια διαδικασία παράγονται και εκχυλίσματα με πλούσιο φορτίο σε πτητικά συστατικά.

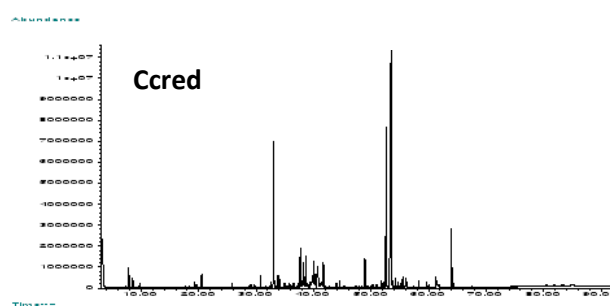
## 10.10 Ανάλυση αιθέριων ελαίων και μη πολικών εκχυλισμάτων ρητίνης με GC-MS

### 10.10.1 Σύγκριση σύστασης πτητικού κλάσματος υπερκρίσιμης εκχύλισης και αιθερίου ελαίου

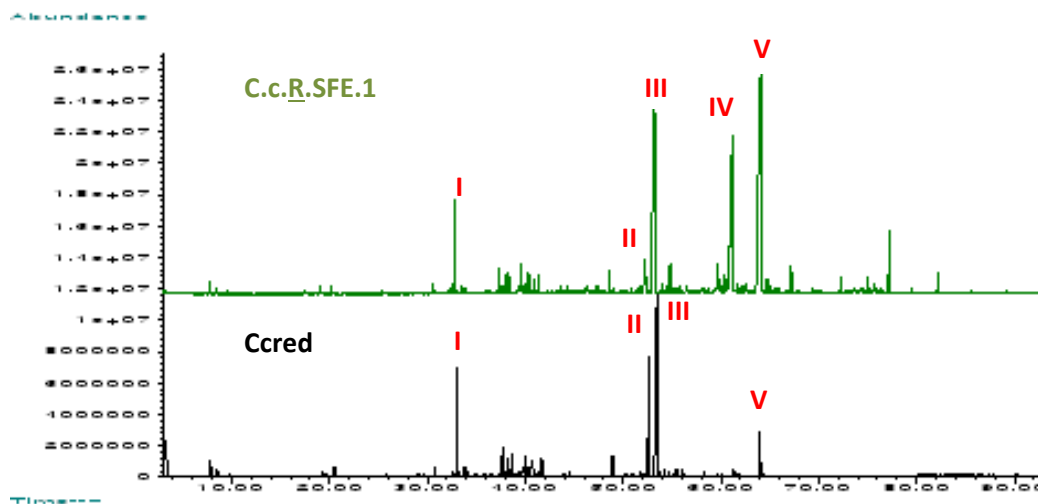
Τα κλάσματα **C.c.R.SFE.1** και **Ccred** αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία μάζας (GC-MS) για την ταυτοποίηση των συστατικών τους. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 'Υλικά και μέθοδοι' και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 41.



Εικόνα 91. Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου ρητίνης από Υ.Ε. (C.c.R.SFE.1)



Εικόνα 90. Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου ρητίνης από υδροαπόσταξη (Ccred)



Εικόνα 92. Χρωματογραφήματα αιθέριου ελαίου ρητίνης από Υ.Ε. και υδροαπόσταξη αντίστοιχα

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα μεταξύ τους παρατηρούνται τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές διαφορές. Το πτητικό κλάσμα της Υ.Ε. είναι πλουσιότερο σε μεταβολίτες, ιδίως μετά το πεντηκοστό λεπτό του χρωματογραφήματος, με τις σημαντικότερες διαφορές να εντοπίζονται στην περιεκτικότητα των μεταβολιτών **II**, **IV** και **V**.

Η περαιτέρω ανάλυση των φασμάτων μάζας έδειξε ότι οι μεταβολίτες **II** και **III** αποτελούν το εντ-οξείδιο της μανούλης και το εντ-13-επι-οξείδιο της μανούλης αντίστοιχα (Κεφάλαιο 10.13). Συγκεκριμένα, τα δύο αυτά επιμερή αποτελούν βασικά συστατικά της ρητίνης, το ποσοστό των οποίων μπορεί να φτάσει το 20% και 36% των πτητικών συστατικών αντίστοιχα [206], ενώ συνήθως απαντώνται με τη μορφή μείγματος [124]. Στην παρούσα μελέτη, η αναλογία τους στα αιθέρια έλαια της υδροαπόσταξης και της Υ.Ε. είναι 2/3 και 1/11 αντίστοιχα (Πίνακας 41). Αυτή η διαφορά στην αναλογία των δύο επιμερών πιθανώς σχετίζεται με την μέθοδο εκχύλισής τους. Οι υψηλές θερμοκρασίες και οι μεγάλοι χρόνοι επεξεργασίας εντός της συσκευής Clevenger, πιθανότατα να οδηγούν στην καταστροφή ορισμένων θερμοευαίσθητων ουσιών, τα παράγωγα των οποίων να οδηγούν στο σχηματισμό του συγκεκριμένου παραγώγου (**III**). Αντιθέτως, η διαδικασία της Υ.Ε. λαμβάνοντας χώρα σε πιο ήπιες συνθήκες αποτρέπει την αλλοίωση των ευαίσθητων συστατικών, λαμβάνοντας πτητικά κλάσματα ανώτερης ποιότητας χωρίς θερμικές μεταβολές. [220],[217],[221],[222]. Ένα ακόμα στοιχείο το οποίο συνεργεί στο προαναφερόμενο συμπέρασμα, είναι ότι το εντ-οξείδιο της μανούλης δεν



ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα κλάσματα της Υ.Ε., αλλά ούτε και στο υπόλειμμα αυτής (Παράρτημα). Αν υπήρχε το ενδεχόμενο της μη εκχύλισής του συγκεκριμένου μεταβολίτη στα κλάσματα **C.c.R.SFE.1** και **C.c.R.SFE.2** (λόγω μειωμένης διαλυτότητας στο CO<sub>2</sub>) θα έπρεπε να είχε ανιχνευθεί η παρουσία του στα κλάσματα **C.c.R.SFE.3**, **C.c.R.SFE.4** και **C.c.R.SFE.5**, ή στο εκχύλισμα του υπολείμματος (**C.c.R.u.EtOAc**) (Παράρτημα).

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι από μελέτες που έχουν γίνει για τη δράση των δύο επιμερών έχουν δείξει ότι το εντ-13-επι-οξειδίο της μανούλης (**III**) αποτελεί το δραστικότερο παράγωγο [124], καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι η Υ.Ε. όχι μόνο παραλαμβάνει πτητικούς μεταβολίτες με υψηλές αποδόσεις και ανώτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αλλά οδηγεί και στην παραγωγή δραστικότερου τελικού προϊόντος, καλύτερης ποιότητας και ανεπηρέαστο από θερμικές μεταβολές και αλλοιώσεις.

Όσον αφορά τους μεταβολίτες **IV** και **V** η ταυτοποίηση μέσω GC-MS δε στάθηκε δυνατή, γι' αυτό και προβήκαμε στην απομόνωση τους μέσω χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης χαμηλής πίεσης (VLC), ενώ με τη φασματοσκοπική μελέτη με NMR επιτεύχθηκε ο καθορισμός της χημικής τους δομής και η ταυτοποίησή τους ως ριμπενόλη (εντ-3β-υδροξυ-13-επι-οξειδίο της μανούλης - **IV**) και οξικός εστέρας της ριμπενόλης (**V**) (Κεφάλαια 10.13.1.2 και 10.13.1.3).

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η χημική ανάλυση των συστατικών των αιθέριων ελαίων της Υ.Ε. και της HD.

Πίνακας 41. Ανάλυση αιθέριων ελαίων ρητίνης υδροαπόσταξης και υπερκρίσιμης εκχύλισης

Ταυτοποίηση πτητικών συστατικών ρητίνης							
A/A	Συστατικά	Ri (Adams)	Ccred (%)	CcRsfe1 (%)	CcRsfe2 (%)	CcRsfe3 (%)	Βιβλιογραφία
1	Tricyclene	921	0.1	-	-	-	[223]
2	$\alpha$ -Pinene	932	1.48	0.28	-	-	[223]
3	Camphene	946	0.71	0.14	-	-	[223]
4	$\beta$ -Pinene	974	0.31	0.07	-	-	[223]
5	Limonene	1024	0.1	-	-	-	[223]
6	<i>trans</i> -Pinocarveol	1135	0.16	0.06	-	-	[224]
7	Camphene hydrate	1145	0.07	-	-	-	*
8	Borneol	1167	0.43	0.2	-	-	[224]
9	Terpineol-4	1174	0.25	-	-	-	[224]

10	$\alpha$ -Terpineol	1186	0.93	0.35	-	-	[224]
11	Carvacrol	1298	0.45	-	-	-	[224]
12	$\alpha$ -Copaene	1374	0.14	-	-	-	[224]
13	$\beta$ -Bourbonene	1387	0.3	-	-	-	[223]
14	E-Caryophyllene	1417	0.64	0.35	-	-	[223]
15	$\alpha$ -Humulene	1452	0.07	-	-	-	[224]
16	<i>allo</i> -Aromadendrene	1458	0.37	0.14	-	-	[224]
18	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolochene	1471	11.55	4.4	trs**	-	!
17	$\alpha$ -Amorphene	1485	0.26	-	-	-	[224]
19	$\beta$ -Selinene	1489	1.33	0.41	-	-	[223],[224]
20	$\alpha$ -Selinene	1498	-	0.24	-	-	[223],[224]
21	$\delta$ -Cadinene	1522	0.24	-	-	-	[224]
22	<i>cis</i> -Calamenene	1527	0.13	-	-	-	[224]
24	$\alpha$ -Calacorene	1544	0.12	-	-	-	[224]
23	$\beta$ -Germacrene	1559	-	-	-	-	[224]
27	Spathulenol	1577	0.14	-	-	-	[224]
25	Caryophyllene oxide	1582	2.32	0.84	-	-	[224]
26	Viridiflorol	1592	1.85	0.63	-	-	[224]
27	Ledol	1602	1.79	0.67	-	-	[224]
29	Humulene epoxide II	1608	0.25	-	-	-	[223]
28	<i>allo</i> -Aromadendrene epoxide	1639	-	0.2	-	-	*
30	Muurola-4.10(14)-dien-1-beta-ol	1630	0.43	-	-	-	*
31	Caryophylla-3,8(13)-dien-5b-ol	1641	-	0.35	-	-	[224]
33	Caryophylla-4(14),8(15)-dien-5a-ol	1641	2.3	-	-	-	[223]
32	$\alpha$ -Eudesmol	1652	1.9	1.15	-	-	[223]
34	neo-Intermedeol	1658	-	-	-	-	*
35	14-Hydroxy-(Z)-caryophyllene	1666	-	-	-	-	[224]
37	$\beta$ -Eudesmol	1649	-	-	-	-	[223]
38	$\alpha$ -Selin-11-en-4-ol	1658	1.22	0.6	-	-	[223]
36	7,14-Anhydroamorpho-4,9-diene	1755	-	-	-	-	[224]
39	Cyclocolorenone	1759	-	0.6	-	-	*
40	Ambroxide	1756	0.33	0.23	-	-	[225],[215]
41	Drimenone	1792	-	-	-	-	[223]
42	8,13-epoxy-15,16-Dinorlabd-12-ene	1826	1.74	0.89	-	-	[225]
43	15,16-Dinorlabd-8(20)-en-13-one	1961	-	0.18	-	-	*
44	Manoyl oxide	1996	14.4	2.57	1.89	6.15	[223]
45	13- <i>epi</i> -Manoyl oxide	2017	30.02	17	5.85	5.74	[223]
46	Kaurene	2042	0.52	0.35	-	-	[223]
47	Sclareolide	2065	0.38	1.41	0.68	-	*
48	13(16),14-Labdadien-8-ol	2120	-	-	0.84	3.01	*
49	Abienol	2149	0.4	-	-	0.9	[225]
50	Sclareol	2222	0.47	0.32	-	0.6	[223]
51	(12R)-8,12-epoxide-13(16),14-	----	0.26	0.98	-	-	*

	labdadiene						
52	Ribenol	2268	1.18	13.66	16.48	5.26	IV
53	Labd-7,13-dien-15-ol	2280	-	-	-	12.21	*
54	Tricosane	2300	0.13	0.29	6.51	-	[223]
55	Ethyl ester Ribenol		3.56	30.09	15.17	4.79	V
56	Labd-7,13,dien-15-ol, acetate	2392	0.23	0.3	31.67	21.07	*
57	Labd-13E-8,15 diol	2422	-	0.82	11.39	26.24	*
58	Pentacosane	2500	-	1.23	-	-	*
59	Heptacosane	2700	-	0.09	-	-	[224]
60	Nonacosane	2900	-	2.63	-	-	[224]
61	Triacontane	3000	-	0.8	0.73	0.68	[224]
	Total		85.96	85.52	91.21	86.65	

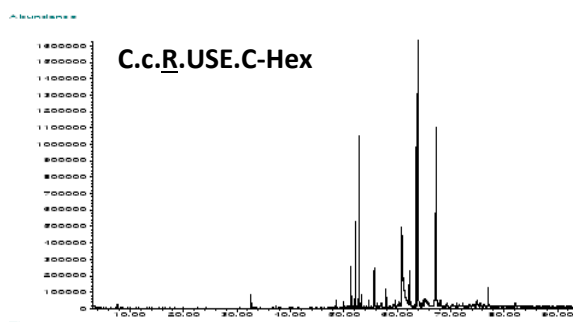
\* Adams και Wiley275

\*\*tr. ανιχνεύτηκε σε ίχνη

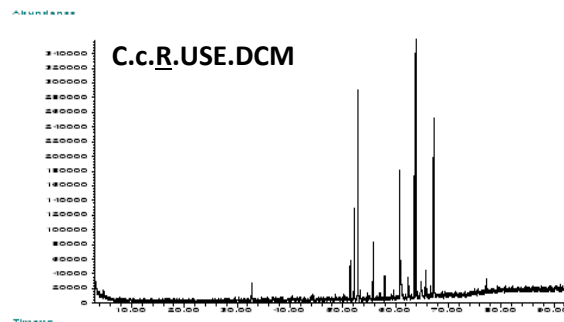
### 10.10.2 Ανάλυση πτητικών συστατικών εκχυλισμάτων UAE

Η ανάλυση των κλασμάτων **C.c.R.UAE.C-Hex** και **C.c.R.UAE.DCM** με τη χρήση GC-MS έδειξε ότι τα εκχυλίσματα είναι ιδιαίτερα φτωχά σε πτητικά συστατικά, ιδίως στα πρώτα λεπτά του φάσματος (Εικόνα 93 και Εικόνα 94), ενώ το μεγαλύτερο φορτίο τους εντοπίζεται μετά το πενήκοστο λεπτό όπου γίνεται η ανίχνευση των πιο 'βαριών' συστατικών.

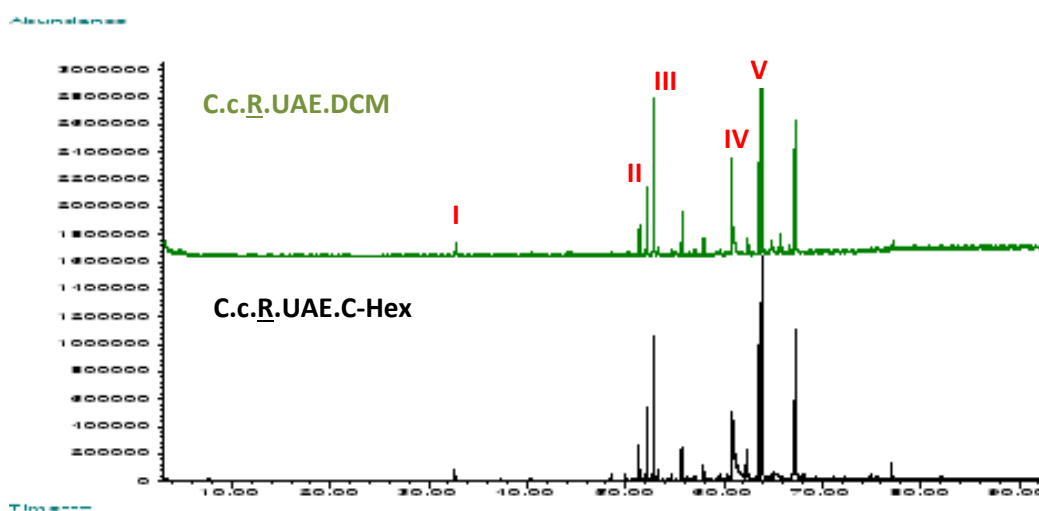
Η σημαντική απώλεια των πτητικών συστατικών, πιθανώς να σχετίζεται με τη διαδικασία συμπύκνωσης κατά το στάδιο της απομάκρυνση του διαλύτη. Αν και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ήπιες συνθήκες, παρόλα αυτά φαίνεται ότι αυτό δεν ήταν αρκετό για να διατηρήσουν ανέπαφα τα πτητικά συστατικά. Επιπλέον, είναι εμφανής και σε αυτή την περίπτωση η αυξημένη αναλογία του εντ-οξειδίου της μανούλης (II) σε σχέση με το εντ-13-επι- επιμερές της (III) η αναλογία των οποίων κοιμάνεται σε ποσοστό 1/2 (Πίνακας 42).



Εικόνα 93. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος υπερήχων της ρητίνης με κυκλοεξάνιο (C.c.R.UAE.C-Hex)



Εικόνα 94. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος υπερήχων της ρητίνης με διχλωρομεθάνιο (C.c.R.UAE.DCM)



Εικόνα 95.Χρωματογραφήματα αιθέριου ελαίου ρητίνης από UAE με DCM και C-Hex αντίστοιχα

Επιπλέον, από τα χρωματογραφήματα προκύπτει ότι τα κλάσματα **C.c.R.UAE.C-Hex** και **C.c.R.UAE.DCM**, (Εικόνα 95) διαθέτουν παρόμοιο χημικό φορτίο. Το σύνολο και τα ποσοστά των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν είναι παρόμοιος, συνεπώς η επιλογή οποιουδήποτε εκ των δύο διαλυτών, αποτελεί μία καλή επιλογή για την παραγωγή ενός εκχυλίσματος με υψηλές αποδόσεις.

Συμπερασματικά, καταλήγουμε ότι η εκχύλιση με υπερήχους αποτελεί μια αποδοτική, γρήγορη και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική εκχύλισης, με υψηλά ποσοστά ανάκτησης. Στη συγκεκριμένη όμως περίπτωση, το επιπλέον στάδιο που απαιτείται για την απομάκρυνση του διαλύτη είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών πτητικών συστατικών, εν αντιθέσει με την Υ.Ε. η οποία είχε υψηλές αποδόσεις και διατήρησε αναλλοίωτη την οσμή του δείγματος.

Πίνακας 42. Ανάλυση εκχυλισμάτων ρητίνης με υπερήχους -UAE

Εκχυλίσματα ρητίνης με UAE					
A/A	Συστατικά	Ri (Adams)	C.c.R.UAE.C-Hex (%)	C.c.R.UAE.DCM (%)	Βιβλιογραφία
1	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolochene	1471	0.85	trs**	I
2	Manoyl oxide	1996	5.32	6.86	[223]
3	13- <i>epi</i> -Manoyl oxide	2017	11.85	15.42	[223]
4	13(16).14-Labdien-8-ol	2120	3.17	4.44	*
5	Abienol	2149	1.54	1.83	[225]
6	Ribenol	2268	8.19	10	IV
7	Ethyl ester Ribenol		16.58	17.17	V

8	Labd-7,13,dien-15-ol, acetate	2392	22.71	19.34	*
9	Labd-13E-8,15 diol	2422	17.48	15.26	*
10	Triacontane	3000	1.29		[224]
	Total		88.98	90.32	

\* Adams και Wiley275

\*\*tsr. ανιχνεύτηκε σε ίχνη

## 10.11 Μελέτη χημικού περιεχομένου των υπέργειων τμημάτων του φυτού *C. creticus ssp. creticus*

### 10.11.1 Παραλαβή των πτητικών συστατικών με τη χρήση υπερκρίσιμης εκχύλισης

Με βάση το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση των πτητικών κλασμάτων που παρελήφθησαν από τη ρητίνη με Υ.Ε. και υδραπόσταξη, κρίθηκε σκόπιμη η συγκριτική μελέτη των αντίστοιχων παρασκευασμάτων από τα υπέργεια τμήματα του φυτού. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η ίδια πορεία εκχυλίσεων έχοντας ως πρώτη ύλη αυτή τη φορά, τα φρέσκα υπέργεια τμήματα του φυτού. Συγκεκριμένα 572 g φυτικού υλικού τοποθετήθηκαν στην ημιπλωτική συσκευή SFE-1-2 για εκχύλιση, με την επιλογή των συνθηκών να γίνεται με βάση αυτές που προτάθηκαν από τη βιβλιογραφία [213].

Συγκεκριμένα, στη παραπάνω μελέτη οι ερευνητές μελέτησαν τη βελτιστοποίηση της διεργασίας της Υ.Ε. για την παραλαβή πτητικών συστατικών από το φυτό *Cistus ladanifer* L., προτείνοντας ως βέλτιστες συνθήκες αυτές των 90 bar και 40 °C. Εκτός αυτού, εξέτασαν και την επίδραση των διαφορετικών συνθηκών πίεσης και θερμοκρασίας στους διαχωριστήρες, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι μέσω της κατάλληλης επιλογής συνθηκών, είναι δυνατή η κατακράτηση των δυσδιάλυτων συστατικών στον πρώτο διαχωριστήρα (όπως κηρών και υγρασίας) και η παραλαβή του υπόλοιπου πτητικού κλάσματος στο δεύτερο (-10 °C / 70 bar και -10 °C / 20 bar αντίστοιχα) [213]. Στην παρούσα διατριβή ένας τέτοιος διαχωρισμός δεν κατέστη δυνατός λόγω αδυναμίας της συσκευής να λειτουργήσει σε τόσο χαμηλές συνθήκες και επειδή (σε αντίθεση με τους Rincón *et al.*) ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε το νωπό φυτό και αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη συλλογή μεγάλης ποσότητας νερού στους διαχωριστήρες. Γι' αυτό και αποφασίστηκε η εκχύλιση να

γίνει ρυθμίζοντας και τους τρεις διαχωριστήρες στις μικρότερες δυνατές συνθήκες λειτουργίας (Πίνακας 43).

Πίνακας 43. Συνθήκες Υ.Ε. για την εκχύλιση του φυτού *C. creticus ssp. creticus*

Δείγμα	Ροή (kg/h)	Εκχυλιστήρας (1L)		Διαχωριστήρες		Συνδιαλύτης (%)	Διάρκεια (h)
		Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)		
C.c.P.SFE.1~4	5	90	40	65	30	-	2

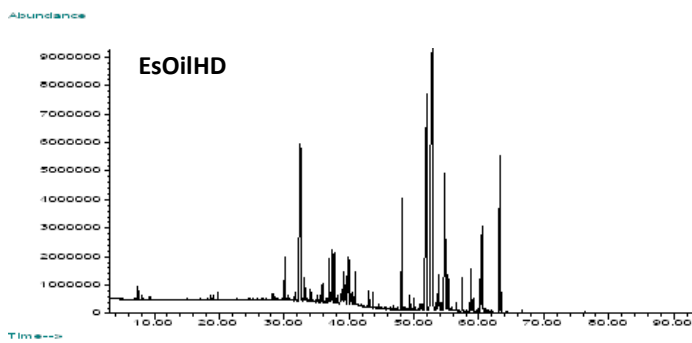
Από τη διεργασία συλλέχθηκαν συνολικά 150 mL αρωματισμένου ύδατος. Το νερό που συλλέχθηκε ήταν διαυγές και άχρωμο, δίχως να είναι εμφανής η παρουσία ελαιώδους φάσης. Επειδή όμως η οσμή του εκχυλίσματος ήταν έντονη ακολούθησε η ανάλυσή του με τη χρήση GC-MS και μετά από προηγούμενη εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Η ανάλυση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο της Οργανολογίας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 44.

### 10.11.2 Παραλαβή αιθερίου ελαίου με την τεχνική της υδροαπόσταξης

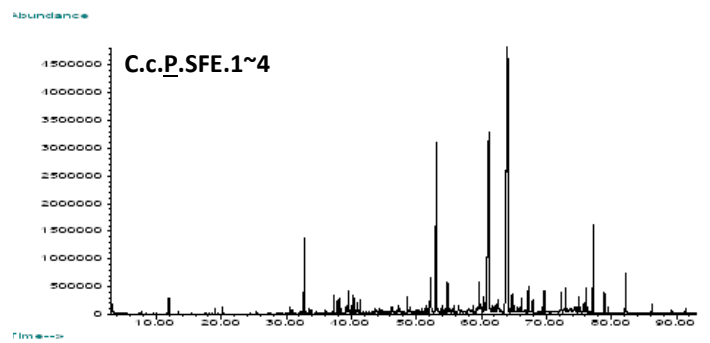
Μέτρο σύγκρισης για τη διεργασία αποτέλεσε και σε αυτή την περίπτωση η τεχνική της υδροαπόσταξης (**EsOilHD**). Ποσότητα 120 g φυτού τοποθετήθηκε εντός της συσκευής Clevenger και μετά από 3 ώρες συλλέχθηκαν 0.3 mL αιθερίου ελαίου (απόδοση: 0.25%). Στη συνέχεια, τα δύο αιθέρια έλαια (**C.c.P.SFE.1~4** και **EsOilHD**) αναλύθηκαν με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας μάζας (GC-MS) με σκοπό την ταυτοποίηση των συστατικών τους.

### 10.11.3 Ανάλυση του πτητικού κλάσματος της υπερκρίσιμης εκχύλισης και του αιθερίου ελαίου της

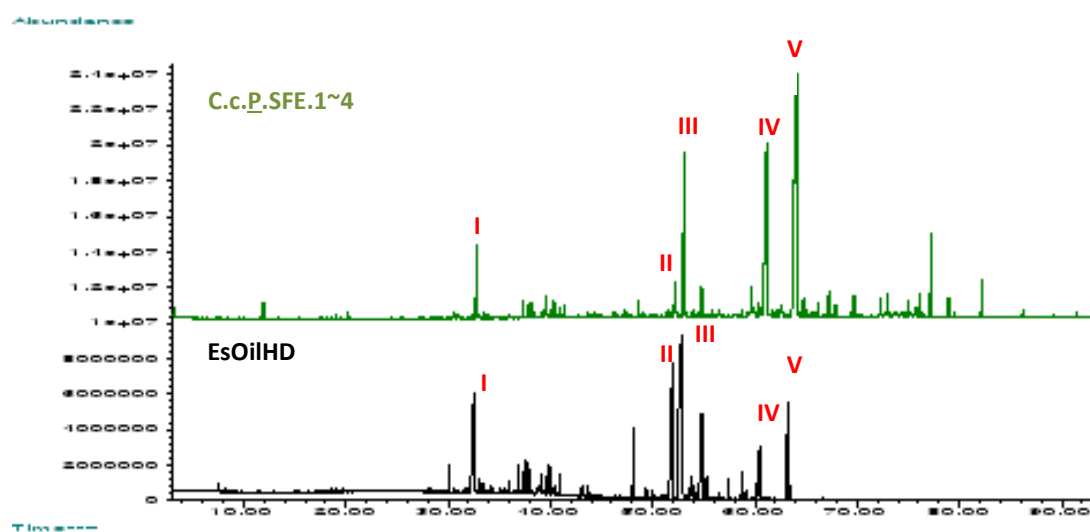
Η ανάλυση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο της Οργανολογίας με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον Πίνακα 44.



Εικόνα 97. Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου φυτού *C. creticus* ssp. *creticus* από υδροαπόσταξη



Εικόνα 96. Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου φυτού *C. creticus* ssp. *creticus* από Υ.Ε.



Εικόνα 98. Συγχρωματογράφιση αιθέριων ελαίων υδροαπόσταξης και Υ.Ε. του φυτού *C. creticus* ssp. *creticus*

Από την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων (Εικόνα 98) διαπιστώνεται ότι αντίστοιχες διαφορές υπάρχουν και στο φρέσκο φυτό. Και σε αυτή την περίπτωση η αναλογία των μεταβολιτών **II** και **III** είναι 1/9 για την Υ.Ε. και 1/2 για την HD, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την υποψία ότι τα υψηλά ποσοστά του εντ-οξειδίου της μανούλης (**II**) σχετίζονται με τη μέθοδο εκχύλισης του. Οι υψηλές θερμοκρασίες και ο έντονος βρασμός εντός της συσκευής Clevenger έχουν σαν αποτέλεσμα στο σχηματισμό του συγκεκριμένου επιμερούς, πιθανότατα μέσω της καταστροφής/μετασχηματισμού κάποιου συγγενικού παραγώγου.

Όσον αφορά τους μεταβολίτες **IV** (ριμπενόλη) και **V** (οξικό εστέρα της ριμπενόλης), μειωμένα ποσοστά ανάκτησης παρατηρούνται και στο αιθέριο έλαιο του φυτού (**EsOilHD**). Οι μειωμένες συγκεντρώσεις στα αιθέρια έλαια της

υδροαπόσταξης (**Ccred** και **EsOilHD**) οφείλονται στο γεγονός ότι οι μεταβολίτες έχουν χαμηλή τάση ατμών, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανάκτησή τους με την συγκεκριμένη τεχνική.

Στη συνέχεια παρατίθεται ένας πίνακας με τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης των δύο αιθέριων ελαίων. Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των βιβλιοθηκών Wiley275 και Adams και επιβεβαιώθηκαν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Πίνακας 44. Ανάλυση αιθέριων ελαίων φυτικού υλικού με υπερκρίσιμη εκχύλιση και υδροαπόσταξη

Φυτό <i>C. creticus</i> ssp. <i>creticus</i>					
A/A	Συστατικά	Ri (Adams)	EsOILHD (%)	C.c.P.SFE.1~4 (%)	Βιβλιογραφία
1	$\alpha$ -Pinene	932	0.3	-	[223]
2	Camphene	946	0.11	-	[223]
3	$\beta$ -Pinene	974	0.09	-	[223]
4	Limonene	1024	-	0.42	[223]
5	Borneol	1167	0.1	0.16	[224]
6	$\alpha$ -Terpineol	1186	0.15	0.26	[224]
7	Carvacrol	1298	-	trs**	[224]
8	$\alpha$ -Copaene	1374	0.13	-	[224]
9	<i>E</i> -Caryophyllene	1417	0.93	0.25	[223]
10	$\alpha$ -Humulene	1452	0.12	-	[224]
11	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolochene	1471	9.08	2.67	I
12	$\beta$ -Selinene	1489	0.86	0.25	[223],[224]
13	$\alpha$ -Selinene	1498	0.39	0.18	[223],[224]
14	$\delta$ -Cadinene	1522	0.19	-	[224]
15	$\beta$ -Germacrene	1559	0.43	-	[224]
16	Caryophyllene oxide	1582	1.14	0.6	[224]
17	Viridiflorol	1592	1.75	0.5	[224]
18	Ledol	1602	1.37	0.48	[224]
19	allo-Aromadendrene epoxide	1639	0.59	0.29	*
20	Caryophylla-3,8(13)-dien-5b-ol	1641		0.9	[224]
21	$\alpha$ -Eudesmol	1652	2.04	1.48	[223]
22	neo-Intermedeol	1658	1.07	1.48	*
23	14-Hydroxy-(Z)-caryophyllene	1666	0.43	-	[224]
24	Amorpha-4,9-diene<7,14-anhydro->	1755	0.48	0.47	[224]
25	Cyclocolorenone	1759	0.98	0.48	*
26	Ambroxide	1756	0.38	-	[225],[215]
27	Drimenone	1792	0.13	-	[223]
28	8,13-Epoxy-15,16-dinorlabd-12-ene	1826	3.66	0.66	[225]
29	15,16-Dinorlabd-8(20)-en-13-one	1961	-	0.22	Wiley275



30	Manoyl oxide	1996	14.91	1.29	[223]
31	13- <i>epi</i> -Manoyl oxide	2017	22.03	11.73	[223]
32	Kaurene	2042	0.18	0.29	[223]
33	Sclareolide	2065	0.22	1.39	*
34	Abienol	2149	0.35	-	[225]
35	Sclareol	2222	1.67	0.42	[223]
36	(12R)-8,12-epoxide-13(16),14-labdadiene	----	2.27	0.88	*
37	Ribenol	2268	3.12	16.42	<b>IV</b>
38	Tricosane	2300	0.09	0.23	[223]
39	Ethyl ester Ribenol		5.91	28.91	<b>V</b>
40	Labd-7,13,dien-15-ol, acetate	2392	0.47	1	*
41	Labd-13E-8,15 diol	2422	-	1.04	*
42	Pentacosane	2500	0.07	1.49	*
43	Heptacosane	2700	-	0.79	[224]
44	Nonacosane	2900	-	3.79	[224]
45	Triacontane	3000	-	1.79	[224]
	Total		78.19	83.21	

\* Adams και Wiley275

\*\**tsr.* ανιχνεύτηκε σε ίχνη

## 10.12 Ανάλυση πτητικών συστατικών της ρητίνης με την τεχνική SPME

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές εργασίες οι οποίες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η χρήση της Υ.Ε. συμβάλει στην παραγωγή αιθέριων ελαίων τα οποία χαρακτηρίζονται από φυσικό άρωμα που θυμίζει αυτό της πηγής προέλευσης [2],[220],[217],[226]. Επομένως, θέλοντας να διαπιστώσουμε αν στην περίπτωση της ρητίνης του φυτού *C. creticus ssp. creticus* έχει ανάλογα αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των πτητικών συστατικών της ρητίνης και των παρασκευασμάτων της. Η τεχνική που επιλέχθηκε ήταν αυτή της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME), λόγω της ευελιξίας που προσφέρει και της ικανότητας για δειγματοληψία σε μεγάλο εύρος συνθηκών.

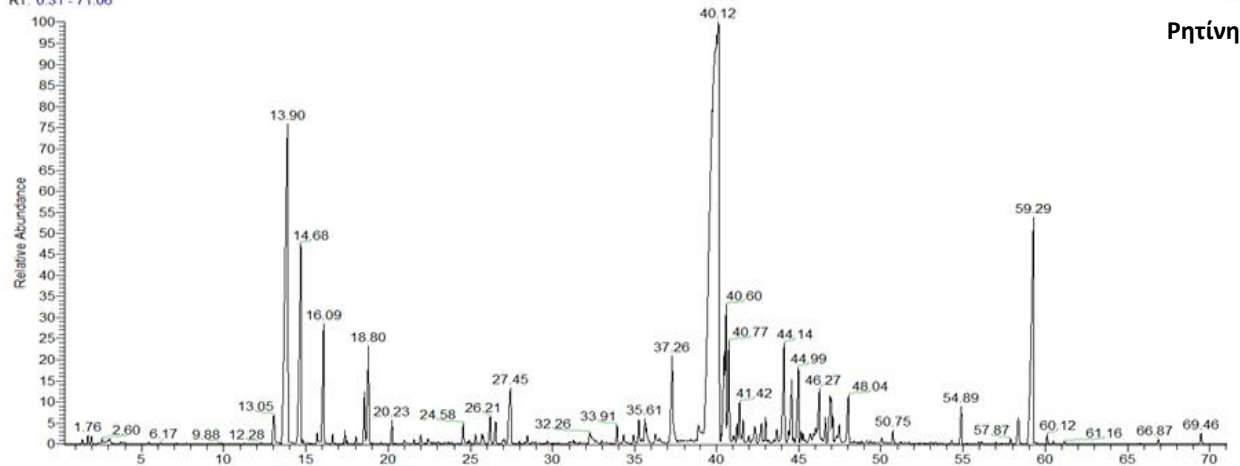
Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα 2 g ρητίνης τοποθετήθηκε εντός γυάλινου δοχείου 20 mL και επεξεργάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο της Οργανολογίας. Επίσης, με την ίδια μέθοδο μελετήθηκαν και τα

πητικά συστατικών των **C.c.R.SFE.1** και **Ccred**. Τα χρωματογραφήματα από το GC-MS που ελήφθησαν παρατίθενται για σύγκριση στην Εικόνα 99.

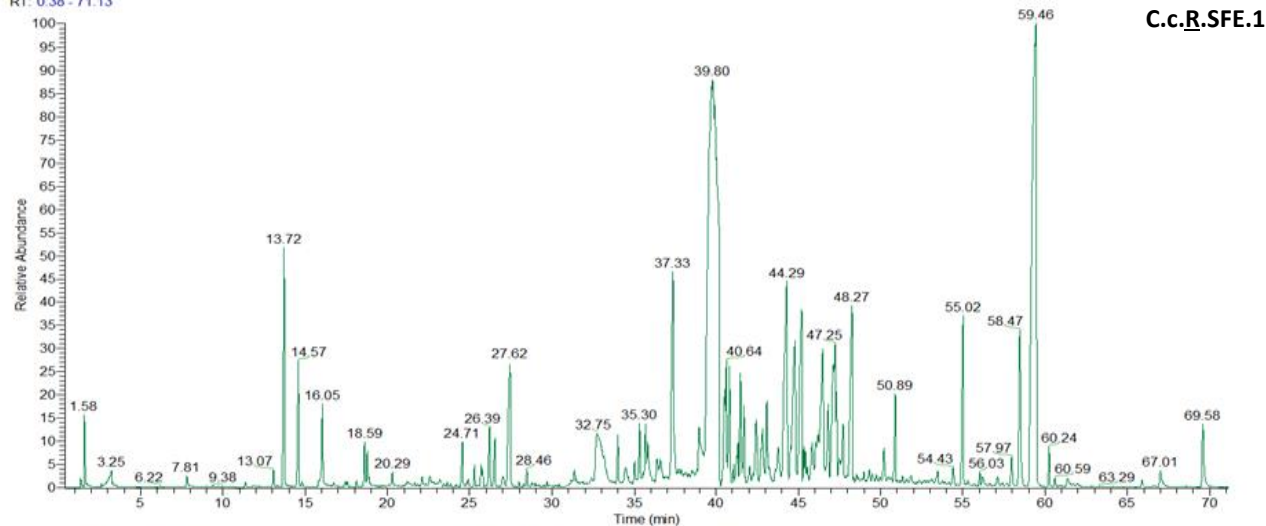
C:\Users\... \SPME Data\Labdanum02  
Labdanum

22/3/2016 16:13:49

RT: 0.31 - 71.06



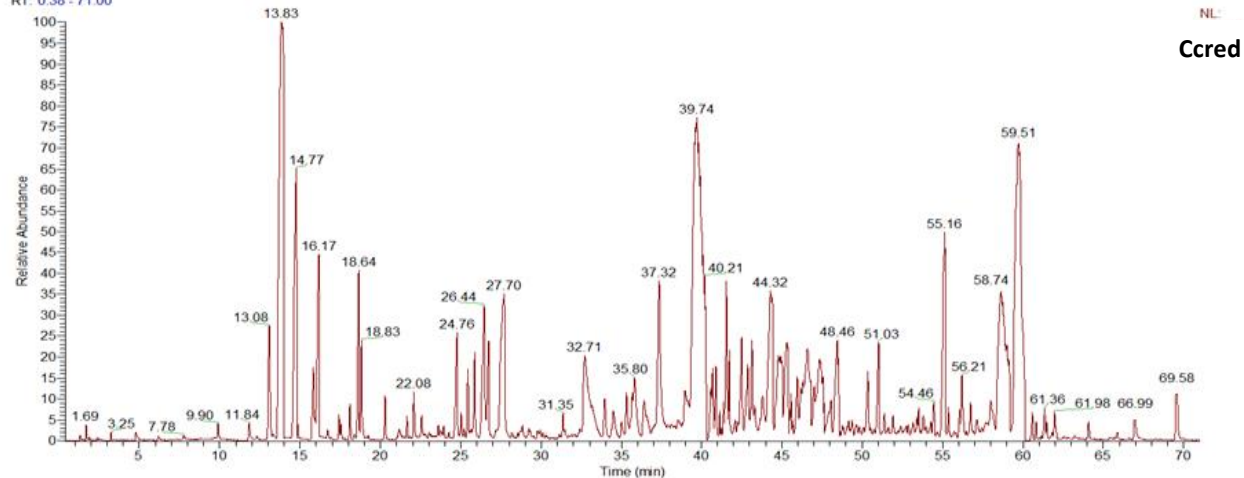
RT: 0.38 - 71.13



C:\Users\... \spme data\ccred(90)  
CcRed

16/5/2016 16:23:12

RT: 0.38 - 71.00



Εικόνα 99. Χρωματογραφήματα ρητίνης και αιθέριων ελαίων υδροαπόσταξης και Υ.Ε με SPME.

Από τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων προέκυψε ότι τα πτητικά συστατικά της Υ.Ε. παρουσιάζουν περισσότερα κοινά στοιχεία με αυτά της πρώτης ύλης, με την εικόνα των δύο δειγμάτων να μοιάζει αρκετά ιδίως μετά το εικοστό λεπτό του φάσματος (Εικόνα 99). Η ίδια εικόνα αποτυπώνεται και στα ποσοστά των ταυτοποιημένων μεταβολιτών, όπως για τον μεταβολίτη 4,5-δι-επι-αριστολοχένιο (I) αλλά και στην αναλυσία των δύο επιμερών: εντ-οξειδίου της μανσόλης (II) και εντ-13-έπι οξειδίου της μανσόλης (III) (Πίνακας 45), αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι η Υ.Ε. παράγει εκχυλίσματα με άρωμα πιο κοντά σε αυτό της φυσικής πυγής προέλευσης.

Πίνακας 45. Χημική ανάλυση ρητίνης και αιθέριων ελαίων C.c.R.SFE.1 και Ccred με SPME

SPME						
A/A	Συστατικά	Ri (Adams)	Ρητίνη (%)	C.c.R.SFE.1 (%)	Ccred (%)	Βιβλιογραφία
1	Tricyclene	921	0.63	0.15	1.63	[223]
2	$\alpha$ -Pinene	932	11.59	2.54	11.5	[223]
3	Camphene	946	4.16	1.17	5.13	[223]
4	$\beta$ -Pinene	974	2.02	1	2.48	[223]
5	$\alpha$ -Terpinene	1018			0.26	[227]
6	<i>p</i> -Cymene	1023	0.8	0.43	1.66	[227]
7	Limonene	1024	1.6	0.35	1	[223]
8	<i>trans</i> -Pinocarveol	1135	0.3	0.94	1.38	[224]
9	Camphor	1146	tr	0.16	0.2	[228]
10	Borneol	1167	0.44	1.93	2.55	[224]
11	Terpineol-4	1174	0.35	0.81	1.28	[224]
12	$\alpha$ -Terpineol	1186	1.5	4	4.52	[224]
13	<i>trans</i> Carveol	1219	0.1	0.24		*
14	Carvacrol	1298	0.32			[224]
15	$\alpha$ -Copaene	1374	0.35	0.53	0.7	[224]
16	$\beta$ -Bourbonene	1387	0.63	0.72		[181]
17	dihydro- $\gamma$ -Ionone	1417			0.49	*
18	Caryophyllene <E>	1417	2.01	2.99	3.16	[223]
19	allo-Aromadendrene	1458	0.4	1.09	0.83	[224]
20	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolochene	1471	45.05	20.31	15.13	I
21	$\beta$ -Selinene	1489	1	0.9	0.32	[223],[224]
22	$\alpha$ -Selinene	1498	2.82	1.41	0.75	[223],[224]
23	$\delta$ -Cadinene	1522	0.81	0.73	1.6	[224]
24	<i>cis</i> -Calamenene	1527	0.31	0.61	0.7	[224]
25	$\alpha$ -Calacorene	1544		0.85	1.06	[224]
26	Caryophyllene oxide	1582	2.03	3.99	0.85	[224]

27	Viridiflorol	1592	1.22	2.61	0.8	[224]
28	Ledol	1602	1.22	2.73	0.7	[224]
29	Tetracyclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol, 4,4-dimethyl-	1636	0.96	3.29		*
30	$\alpha$ -Eudesmol	1652	1.19	2.02		[223]
31	Ambroxide	1756	0.18	0.86	1.01	[225],[215]
32	Sclareoloxide	1906	0.56	2.08	3.76	[215]
33	Manoyl oxide	1996	0.57	2.48	4.9	[223]
34	13- <i>epi</i> -Manoyl oxide	2017	6.92	17.9	10.35	[223]
35	Kaurene	2042	0.19	0.32	trs**	[223]
36	Sclareolide	2065	trs**	0.18		*
37	Sclareol	2222			0.42	[223]
38	Ribenol	2268	trs**	0.34	0.22	<b>IV</b>
39	Ethyl ester Ribenol		0.14	1.02	0.6	<b>V</b>
	Total		92.37	83.68	82.91	

\* Adams, Wiley275 και Excalibur

\*\**tsr*. ανιχνεύτηκε σε ίχνη

Επιπλέον, αντίστοιχα φαινόμενα παρατηρούνται και στην αναλογία των μεταβολιτών του εντ-οξειδίου της μανούλης (II) και του εντ-13-επι-οξειδίου της μανούλης (III) (για τη ρητίνη = 1/12, για την Υ.Ε. = 1/9 και για την HD = 1/2), επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο το φαινόμενο της θερμικής αλλοίωσης.

## 10.13 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

### 10.13.1 Φυτοχημική μελέτη του κλάσματος C.c.R.SFE.1

Πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των κυριότερων μεταβολιτών του κλάσματος C.c.R.SFE.1, το οποίο με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης με τις τεχνικές GC-MS και HPTLC παρουσίασε το πλουσιότερο χημικό περιεχόμενο. Η απομόνωση των κύριων μεταβολιτών έγινε με χρωματογραφία ανοιχτής στήλης χαμηλής πίεσης (VLC) από όπου απομονώθηκαν οι εξής μεταβολίτες: 4,5-δι-επι-αριστολοχένιο (I), εντ-οξύδιο της μανούλης (II), εντ-13-επι-οξύδιο της μανούλης (III), ριμπενόλη (IV) και οξικός εστέρας της ριμπενόλης (V). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα κλάσματα της στήλης με τα αντίστοιχα βάρη τους (Πίνακας 46).

- Δείγμα: C.c.R.SFE.1
- Βάρος δείγματος: 1,4 g
- Silica: 45 g
- Διάμετρος στήλης: 2,7 g
- Αρχική πολικότητα: C-Hex

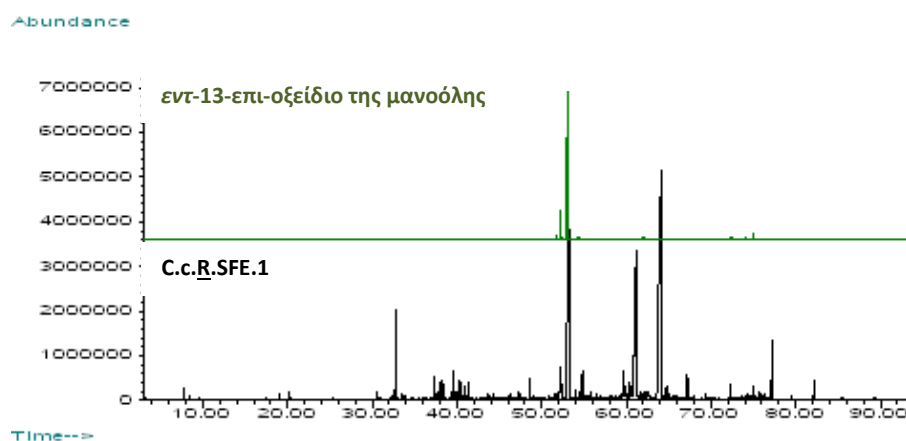
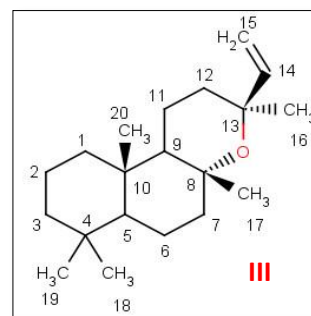
Πίνακας 46. Αποτελέσματα χρωματογραφικού διαχωρισμού του δείγματος C.c.R.SFE.1

Κλάσμα	Κωδικός	Κινητή φάση	Βάρος (g)	Μεταβολίτης
1-7	C.c.SFE.1.OC.1-7	C-Hex	0.0848	Μεταβολίτης I: 4,5-δι-έπι αριστολοχένιο
8-12	C.c.SFE.1.OC.8-12	C-Hex	0.0026	Μεταβολίτης II: εντ-οξειδιο της μανόλης
13-28	C.c.SFE.1.OC.13-28	C-Hex/EtOAc 98/2	0.0724	Μεταβολίτης III: εντ-13-επι-οξειδιο της μανόλης
29-53	C.c.SFE.1.OC.29-53	C-Hex/EtOAc 98/2	0.0543	
54-67	C.c.SFE.1.OC.54-67	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0026	
68-73	C.c.SFE.1.OC.68-73	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0639	
74,00	C.c.SFE.1.OC.74	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0075	
75-80	C.c.SFE.1.OC.75-80	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0287	
81-92	C.c.SFE.1.OC.81-92	C-Hex/EtOAc 97/3	0.2212	Μεταβολίτης V: Οξικός εστέρα της ριμπενόλης
93-104	C.c.SFE.1.OC.93-104	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0325	
105-114	C.c.SFE.1.OC.105-114	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0159	
115-128	C.c.SFE.1.OC.115-128	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0126	
129-132	C.c.SFE.1.OC.129-132	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0148	
133-151	C.c.SFE.1.OC.133-151	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0276	
152-170	C.c.SFE.1.OC.152-170	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0073	
171-194	C.c.SFE.1.OC.171-194	C-Hex/EtOAc 97/3	0.0066	
195-202	C.c.SFE.1.OC.195-202	C-Hex/EtOAc 93/7	0.0112	
203-212	C.c.SFE.1.OC.203-212	C-Hex/EtOAc 93/7	0.06	Μεταβολίτης IV: Ριμπενόλη
213-222	C.c.SFE.1.OC.213-222	C-Hex/EtOAc 93/7	0.018	
223-233	C.c.SFE.1.OC.223-233	C-Hex/EtOAc 93/7	0.0124	
234-254	C.c.SFE.1.OC.234-254	C-Hex/EtOAc 93/7	0.0093	
clean	C.c.SFE.1.OC.clean		0.1643	

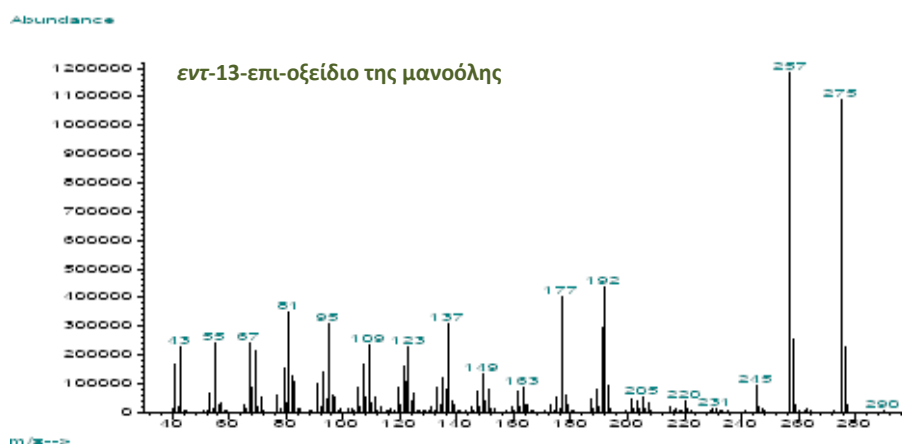
### 10.13.1.1 Εντ-13-επι-οξείδιο της μανούλης (III)

Ο μεταβολίτης III αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της ρητίνης. Παραλήφθηκε μαζί με το αντίστοιχο επιμερές του σε αναλογία 1/12 ως ένα υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν με μοριακό βάρος 290 g/mol.

Αποτελεί ένα πολύ διαδεδομένο προϊόν στο φυτικό βασίλειο. Έχει απομονωθεί από διάφορα είδη της οικογένειας, ενώ έχει αναφερθεί η παρουσία του και σε αιθέρια έλαια των φυτών της οικογένειας όπως *Salvia aethiopsis* [229], *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* [136], *Stachys menthifolia* [230], αλλά και σε είδη άλλων οικογενειών όπως είναι τα φυτά *Excoecaria agallocha* [231] και *Croton insularis* (οικ. Euphorbiaceae) [232]). Επίσης, έχει αναφερθεί η παρουσία του και σε είδη της οικογένειας Cistaceae [124],[192],[193],[233].



Εικόνα 100. Χρωματογράφημα εντ-13-επι-οξείδιου της μανούλης



Εικόνα 101. Φάσμα μάζας εντ-13-επι-οξείδιου της μανούλης

Όσον αφορά τις δράσεις του, το μίγμα μαζί με το αντίστοιχο επιμερές του έχουν δείξει κυτταροτοξική δράση έναντι των σειρών P388, KB, NSCLC-N6 και αντιβακτηριδιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* [187],[199],[208].

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα επαληθεύτηκαν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας [186].

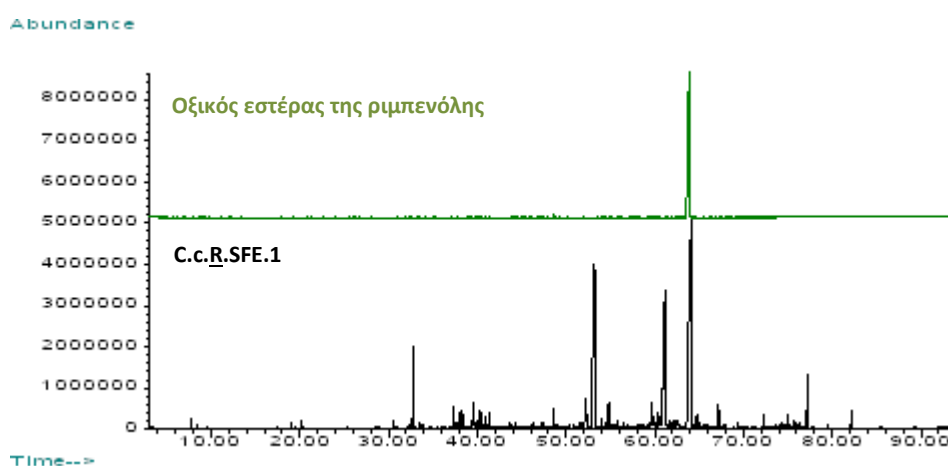
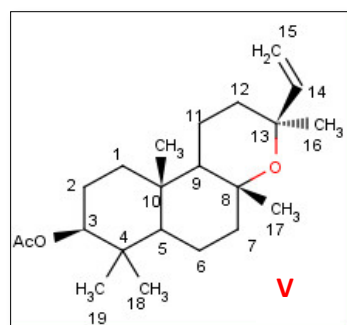
Πίνακας 47. Φασματοσκοπικά δεδομένα του εντ-13-επι-οξειδίου της μανούλης σε CDCl<sub>3</sub>

	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
<b>1ax</b>	0.95 (1H, dd, <i>J</i> =12.3/2.52 Hz)	39.3
<b>1eq</b>	1.70-1.40 ***	
<b>2ax</b>	1.70-1.40 ***	19.9
<b>2eq</b>	1.70-1.40 ***	
<b>3ax</b>	1.20-1.08 *	42.2
<b>3eq</b>	1.40-1.30 **	
<b>4</b>	-	33.2
<b>5</b>	0.86 (1H, br d, <i>J</i> = 11.5 Hz)	56.4
<b>6ax</b>	1.40-1.30 **	18.6
<b>6eq</b>	1.70-1.40 ***	
<b>7ax</b>	1.44 (1H, br t, <i>J</i> = 9.14 Hz)	43.1
<b>7eq</b>	1.77 (1H, dt, <i>J</i> = 11.8 / 3.04 HZ)	
<b>8</b>	-	76.0
<b>9</b>	1.20-1.08 *	58.5
<b>10</b>	-	36.8
<b>11ax</b>	1.40-1.30 **	15.9
<b>11eq</b>	1.40-1.30 **	
<b>12ax</b>	1.40-1.30 **	34.8
<b>12eq</b>	2.20 (1H, m)	
<b>13</b>	-	73.2
<b>14</b>	6.01 (1H, dd, <i>J</i> = 18.02 / 11.2 Hz)	147.7
<b>15a</b>	4.88 (1H, dd, <i>J</i> = 11.2/0.9 Hz)	109.5
<b>15b</b>	4.97 (1H, dd, <i>J</i> = 18.02/0.9 Hz)	
<b>16</b>	1.20-1.08 *	32.7
<b>17</b>	1.22 (3H, s)	23.9
<b>18</b>	0.85 (3H, s)	33.3
<b>19</b>	0.78 (3H, s)	21.3
<b>20</b>	0.72 (3H, s)	15.9

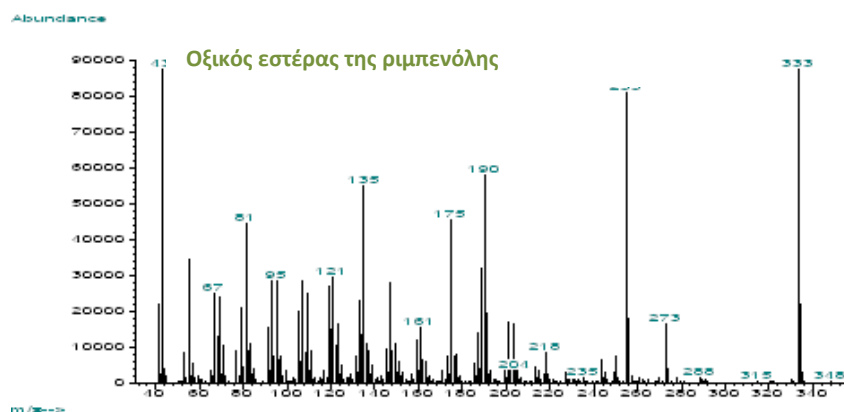
\*, \*\*, \*\*\* = υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των σημάτων αυτών

### 10.13.1.2 Οξικός εστέρας της ριμπενόλης (εντ-3β-ακετοξυ-13-επι-οξειδίου της μαννόλης) (V)

Ο μεταβολίτης απομονώθηκε ως άμορφη, λευκή σκόνη με μοριακό βάρος 348 g/mol. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με αυτά του εντ-13-επι-οξειδίου της μαννόλης, το οποίο αποτελεί το 3-ακετυλο- παράγωγό της. Το προϊόν αυτό είναι αρκετά διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο, ενώ έχει είδη απομονωθεί από τη ρητίνη του *C. creticus* ssp. *creticus* [124]. Ως παράδειγμα αναφέρεται η απομόνωσή του από τα είδη *C. monspeliensis* [233] και *Sideritis canariensis* [234].



Εικόνα 102. Χρωματογράφημα οξικού εστέρα της ριμπενόλης



Εικόνα 103. Φάσμα μάζας οξικού εστέρα της ριμπενόλης



Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

Πίνακας 48. φασματοσκοπικά δεδομένα οξικού εστέρα της ριμπενόλης σε CDCl<sub>3</sub>

	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
<b>1ax</b>	1.00 (1H, dd, <i>J</i> = 11.8 / 2.6 Hz)	37.5
<b>1eq</b>	1.70-1.55 ***	
<b>2ax</b>	1.70-1.55 ***	27.2
<b>2eq</b>	1.70-1.55 ***	
<b>3</b>	4.47 (1H, dd, <i>J</i> = 11.6 / 4.39 Hz)	79.6
<b>4</b>	-	38.7
<b>5</b>	0.86 (1H, br d, <i>J</i> = 11.5 Hz)	55.1
<b>6ax</b>	1.50-1.40 **	19.4
<b>6eq</b>	1.70-1.55 ***	
<b>7ax</b>	1.36 (1H, br t, <i>J</i> = 11.5 Hz)	42.9
<b>7eq</b>	1.75 (1H, brd dt, <i>J</i> = 11.5 / 3.0 HZ)	
<b>8</b>	-	75.8
<b>9</b>	1.12-1.08 *	58.2
<b>10</b>	-	36.4
<b>11ax</b>	1.50-1.40 **	15.9
<b>11eq</b>	1.50-1.40 **	
<b>12ax</b>	1.50-1.40 **	34.6
<b>12eq</b>	2.21 (1H, m)	
<b>13</b>	-	73.4
<b>14</b>	6.00 (1H, dd, <i>J</i> = 17.8 / 11.2 Hz)	147.4
<b>15a</b>	4.91 (1H, d, <i>J</i> = 11.2 Hz)	109.5
<b>15b</b>	4.96 (1H, d, <i>J</i> = 17.8 Hz)	
<b>16</b>	1.12-1.08 *	32.6
<b>17</b>	1.21 (3H, s)	23.7
<b>18</b>	0.85 (3H, s)	27.9
<b>19</b>	0.82 (3H, s)	15.1
<b>20</b>	0.75 (3H, s)	15.8
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>	2.04 (3H, s)	21.1
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>		169.1

\*, \*\*, \*\*\* = υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των σημάτων αυτών

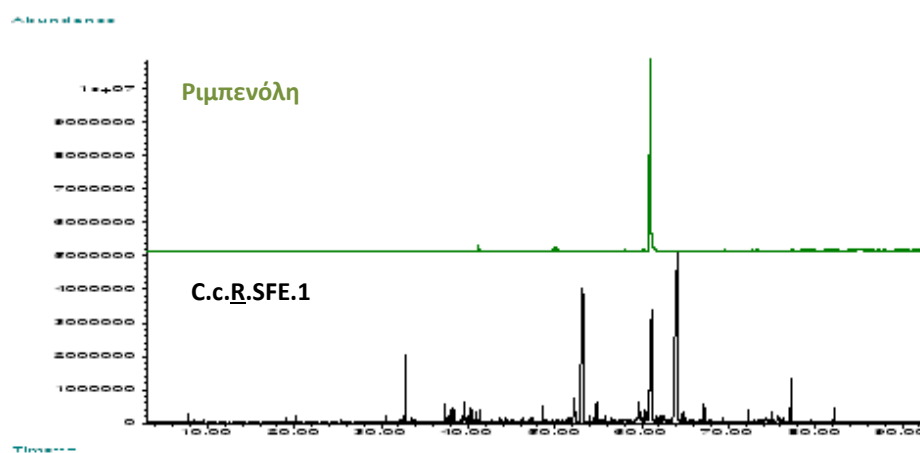
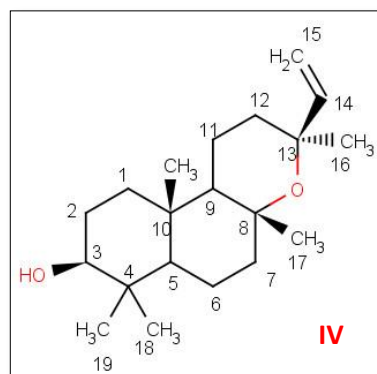
Αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά της ρητίνης, η περιεκτικότητά του οποίου εκτιμάται στο 3% του βάρους του εμπορικού της δείγματος [208]. Επίσης για το προϊόν έχει αναφερθεί κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών [201],[195], καθώς και αντιμικροβιακή δράση έναντι μυκήτων του γένους *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* και *C. tropicalis*) [199].

### 10.13.1.3 Ριμπενόλη (εντ-3β-υδροξυ-13-επι-οξείδιο της μανούλης) (IV)

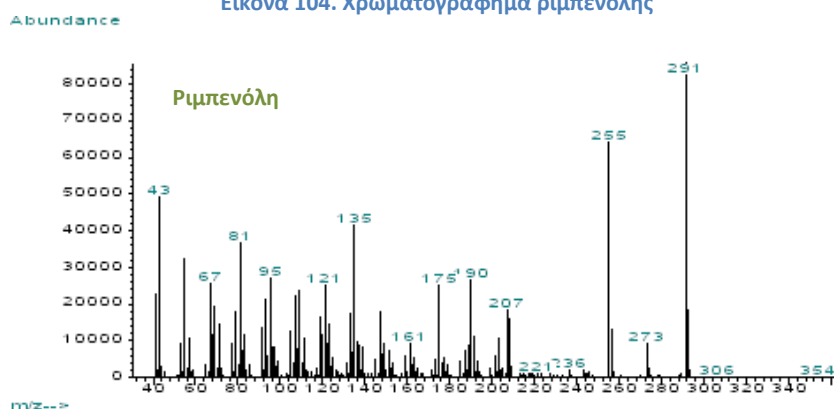
Ο μεταβολίτης **IV** αποτελεί έναν από τους τρία βασικά συστατικά της ρητίνης. Απομονώθηκε ως ένα λευκό, κρυσταλλικό προϊόν, το μοριακό βάρος του οποίου ταυτοποιήθηκε μέσω φασματομετρίας μάζας στα 306 g/mol.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου **IV** συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας και παρατηρήθηκε ότι αντιστοιχούν στη δομή της ριμπενόλης (εντ-3β-υδροξυ-13-επι-οξειδίου της μανούλης) [124],[231].

Είναι ένα διαδεδομένο προϊόν στο φυτικό βασίλειο και απομονώθηκε για πρώτη φορά από το είδος *Sideritis canariensis* [235]. Έχει είδη απομονωθεί από το είδος *C. creticus* ssp. *creticus* [201],[124] την *Excoecaria agallocha* [231], το *Stachys mucronata* [236] και τα είδη *Abies balsamea* και *A. alba* [237].



Εικόνα 104. Χρωματογράφημα ριμπενόλης



Εικόνα 105. Φάσμα μάζας ριμπενόλης

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο τα οποία επιβεβαιώθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας [124].

Πίνακας 49. Φασματοσκοπικά δεδομένα ριμπενόλης σε CDCl<sub>3</sub>

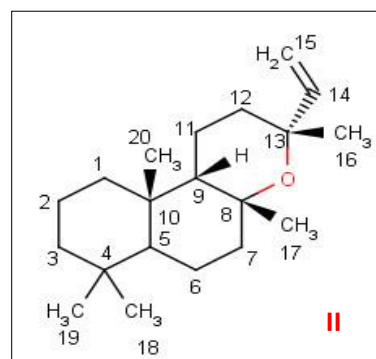
	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
<b>1ax</b>	1.01 (1H, m)	37.5
<b>1eq</b>	1.70-1.52 ***	
<b>2ax</b>	1.70-1.52 ***	27.2
<b>2eq</b>	1.70-1.52 ***	
<b>3</b>	3.21 (1H, dd, <i>J</i> = 11.4 / 4.7 Hz)	78.7
<b>4</b>	-	38.7
<b>5</b>	0.91 (1H, dd, <i>J</i> = 12.5 / 2.5 Hz)	55.1
<b>6ax</b>	1.50-1.40 **	19.4
<b>6eq</b>	1.70-1.52 ***	
<b>7ax</b>	1.35 (1H, br t, <i>J</i> = 13.0 Hz)	42.9
<b>7eq</b>	1.78 (1H, dt, <i>J</i> = 11.7 / 3.2 Hz)	
<b>8</b>	-	75.8
<b>9</b>	1.16 (1H, dd, <i>J</i> = 11.0 / 3.9 Hz)	58.2
<b>10</b>	-	36.4
<b>11ax</b>	1.50-1.40 **	15.9
<b>11eq</b>	1.50-1.40 **	
<b>12ax</b>	1.50-1.40 **	34.6
<b>12eq</b>	2.20 (1H, m)	
<b>13</b>	-	73.4
<b>14</b>	6.00 (1H, dd, <i>J</i> = 18.0 / 11.3 Hz)	147.4
<b>15a</b>	4.91 (1H, d, <i>J</i> = 11.3 Hz)	109.5
<b>15b</b>	4.96 (1H, d, <i>J</i> = 18.0 Hz)	
<b>16</b>	1.13-1.07 *	32.6
<b>17</b>	1.21 (3H, s)	23.7
<b>18</b>	0.97 (3H, s)	27.9
<b>19</b>	0.74 (3H, s)	15.1
<b>20</b>	0.73 (3H, s)	15.8

\*, \*\*, \*\*\* = υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των σημάτων αυτών

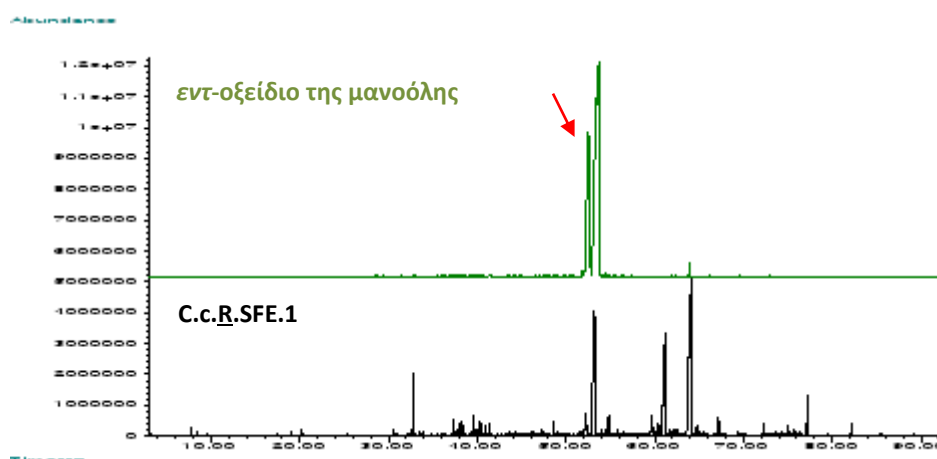
Για τον μεταβολίτη έχουν αναφερθεί διάφορες δράσεις όπως κυτταροτοξική έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών [161],[154] αντιβακτηριδιακή δράση έναντι των *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter anitratus* [167] και δράση κατά της προμαστιγωτής και της αμαστιγωτής μορφής του πρωτόζωου *Leshmania donovani* (σπλαχνική λεισμανίαση) [192].

### 10.13.1.4 Εντ-οξείδιο της μανούλης (II)

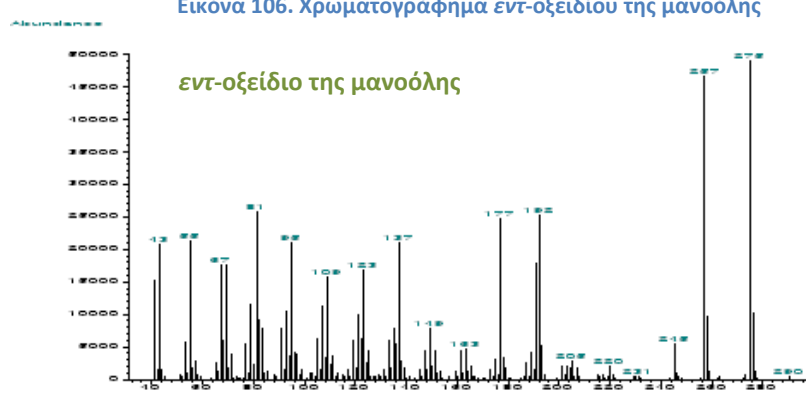
Η ταυτοποίηση του εντ-οξειδίου της μανούλης έγινε δυνατή με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR από το δεύτερο κλάσμα της στήλης (C.c.SFE.1.OC.8-12), όπου η αναλογία του μαζί με αντίστοιχο επιμερές του ήταν 1/2. Το μοριακό του βάρος του οποίου, όπως διαπιστώθηκε μέσω φασματομετρίας μάζας είναι 290 g/mol.



Είναι και αυτό ένα προϊόν διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο. Έχει είδη απομονωθεί από το είδος *C. creticus* ssp. *creticus* [192],[194] ενώ έχει αναφερθεί η παρουσία του σε αιθέρια έλαια διαφόρων φυτών όπως τη *Salvia aethiopsis* [229], τη *Araucaria araucana* και *A. heterophylla* [238] το *Coleus forskohlii* [239] και στους καρπούς του *Vitex agnus castus* [240]. Συνήθως απαντάται ως μίγμα με το αντίστοιχο επιμερές του, από το οποίο μάλιστα είναι και λιγότερο δραστικό [124].



Εικόνα 106. Χρωματογράφημα εντ-οξειδίου της μανούλης



Εικόνα 107. Φάσμα μάζας εντ-οξειδίου της μανούλης

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο τα οποία επαληθευτήκαν με αυτά της βιβλιογραφίας [229].

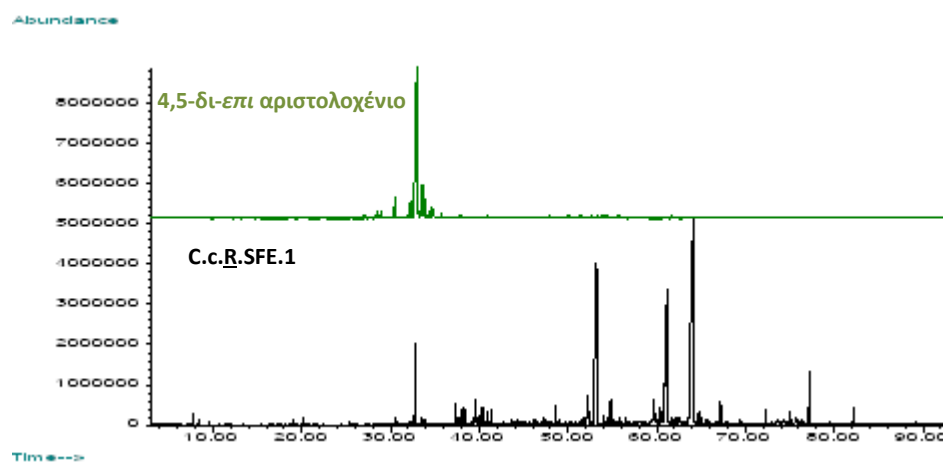
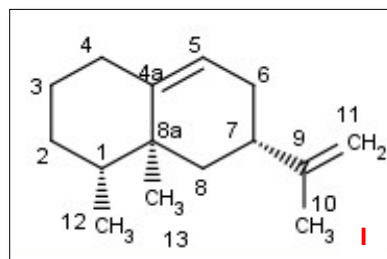
Πίνακας 50. Φασματοσκοπικά δεδομένα εντ-οξειδίου της μανόλης σε  $\text{CDCl}_3$

	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
<b>1ax</b>	0.99 (1H, m)	39.0
<b>1eq</b>	1.70-1.50 ***	
<b>2ax</b>	1.70-1.50 ***	19.1
<b>2eq</b>	1.70-1.50 ***	
<b>3ax</b>	1.16-1.08 *	42.1
<b>3eq</b>	1.49-1.30 **	
<b>4</b>	-	33.2
<b>5</b>	0.86 (1H, br d, $J = 11.5$ Hz)	56.4
<b>6ax</b>	1.49-1.30 **	18.6
<b>6eq</b>	1.70-1.50 ***	
<b>7ax</b>	1.32 (1H, br t, $J = 9.5$ Hz)	43.2
<b>7eq</b>	1.81 (1H, dt, $J = 12.6 / 3.0$ Hz)	
<b>8</b>	-	76.0
<b>9</b>	1.16-1.08 *	58.5
<b>10</b>	-	36.8
<b>11ax</b>	1.49-1.30 **	15.4
<b>11eq</b>	1.49-1.30 **	
<b>12ax</b>	1.49-1.30 **	35.8
<b>12eq</b>	2.19 (1H, m)	
<b>13</b>	-	73.0
<b>14</b>	5.86 (1H, dd, $J = 17.3 / 11.0$ Hz)	147.7
<b>15a</b>	4.90 (1H, d, $J = 10.6 / 1.44$ Hz)	110.1
<b>15b</b>	5.13 (1H, dd, $J = 17.3 / 1.3$ Hz)	
<b>16</b>	1.19	28.5
<b>17</b>	1.22 (3H, s)	25.5
<b>18</b>	0.85 (3H, s)	33.4
<b>19</b>	0.78 (3H, s)	21.3
<b>20</b>	0.72 (3H, s)	15.3

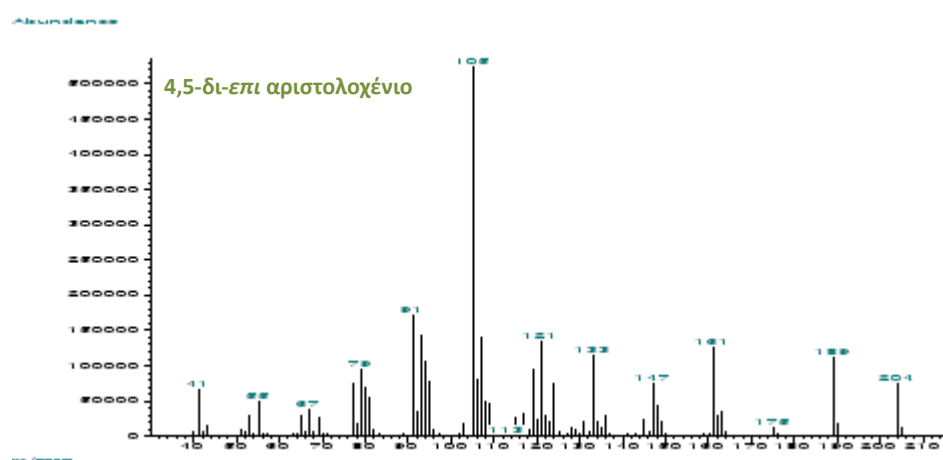
*\*, \*\*, \*\*\* = υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των σημάτων αυτών*

### 10.13.1.5 4,5-δι-επι αριστολογένιο (ισομερές ερεμοφιλίνης) (I)

Το πρώτο κλάσμα που παραλάβαμε από τη στήλη περιείχε σε μεγάλη ποσότητα τον μεταβολίτη **I**, ο οποίος ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR ως το 4,5-δι-επι-αριστολογένιο. Πρόκειται για ένα άμορφο, λευκό, κρυσταλλικό προϊόν με μοριακό βάρος 204 g/mol. Αποτελεί ένα ισομερές του ερεμοφιλενίου, η ορθή απόδοση στην δομή του οποίου έγινε από τους Hatzellis *et al.* το 2004. Έχει απομονωθεί από διάφορα φυτά όπως το αιθέριο έλαιο του είδους *St. alopecuross* [230] και τους καρπούς του *Mangifera indica* L [241].



Εικόνα 108. Χρωματογράφημα του 4,5-δι-επι αριστολογενίου



Εικόνα 109. Φάσμα μάζας του 4,5-δι-επι αριστολογενίου

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο τα οποία επιβεβαιώθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία [242].

Πίνακας 51. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4,5-δι-επι αριστολογενίου σε CDCl<sub>3</sub>

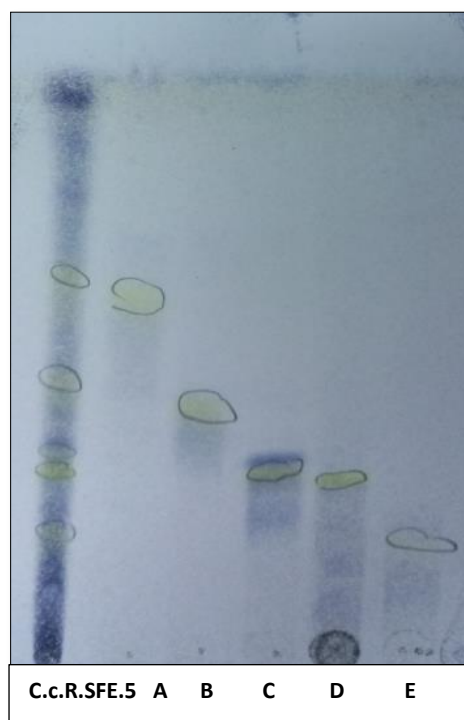
	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
<b>1</b>	1.65 (1H, m)	38.71
<b>2ax</b>	1.39 (1H, m)	31.40
<b>2eq</b>	1.50 (1H, m)	29.26
<b>3ax</b>	1.28 (1H, m)	
<b>3eq</b>	1.77 (1H, m)	32.30
<b>4ax</b>	1.86 (1H, m)	
<b>4eq</b>	2.19 (1H, m)	
<b>4a</b>	-	146.39
<b>5</b>	5.34 (1H, d, J=6.5Hz)	117.90
<b>6ax</b>	1.84 (1H, m)	31.50
<b>6eq</b>	1.96 (1H, m)	37.71
<b>7</b>	2.13 (1H, brd, J=11.79Hz)	
<b>8ax</b>	1.09 (1H, dd, J=13.19Hz)	39.65
<b>8eq</b>	1.91 (2H, brd, J=13.11Hz)	
<b>8a</b>	-	39.43
<b>9</b>	-	150.29
<b>10</b>	1.73 (3H, s)	21.09
<b>11ax</b>	4.69 (1H, brd, d, J=0.8 Hz )	108.26
<b>11eq</b>	4.70 (1H, brd, d, J=0.8 Hz)	
<b>12</b>	0.79(3H, d, J=6.69 Hz)	20.77
<b>13</b>	0.92 (3H, s)	15.76

Μελέτες για τη δράση του έχουν δείξει χαμηλή ανασταλτική δράση ενάντια σε καρκινικές σειρές MCF7 (καρκίνος του μαστού) και H460 (καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα) μετά από 48 h επώασης. Ακόμα, έχει παρουσιάσει χαμηλά επίπεδα τοξικότητας σε κύτταρα SF268 (κύτταρα που σχετίζονται με το κεντρικό νευρικό σύστημα) και PBMCs (μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος) [242].

### 10.13.2 Φυτοχημική μελέτη του κλάσματος C.c.R.SFE.5

Το κλάσμα **C.c.R.SFE.5** της Υ.Ε. είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε φλαβονοειδή, όπως προέκυψε από την ανάλυση με TLC, γι' αυτό και αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη του με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των κυριότερων μεταβολιτών του. Η τεχνική που επιλέχθηκε για το σκοπό αυτό ήταν η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (prepTLC).

Ποσότητά εκχυλίσματος (20 mg) τοποθετήθηκε σε γυάλινη πλάκα prepTLC και ακολούθησε ανάπτυξη με σύστημα διαλυτών DCM/MeOH 95:5, από όπου και απομονώθηκαν οι εξής έξι μεταβολίτες: ο 4'-μεθυλαιθέρας της απιγενίνης (ακακετίνη) (**VI**), ο 3,3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης (**VII**), ο 3,4'-διμεθυλεθέρας της κερκετίνης (**VIII**), ο 3-μεθυλεθέρας της καιμπφερόλης (**IX**), η απιγενίνη (**X**) και ο 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης (**XI**).

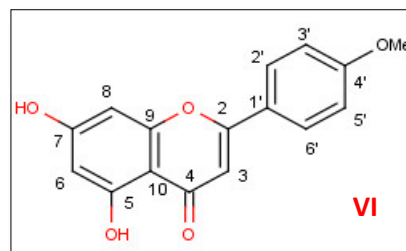


Εικόνα 110. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κλασμάτων prepTLC. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 95/5



### 10.13.2.1 4'-μεθυλαιθέρας της απιγενίνης (ακακετίνη) (VI)

Ο μεταβολίτης **VI** ταυτοποιήθηκε ως ο 4'-μεθυλαιθέρας της απιγενίνης. Πρόκειται για μια άμορφη σκόνη με υποκίτρινο χρώμα με μοριακό βάρος 284 g/mol και αποτελεί το πιο άπολο φλαβονοειδές που απομονώθηκε από το εκχύλισμα. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του επιβεβαιώθηκαν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας [243].



Έχει είδη ταυτοποιηθεί η ύπαρξή του στο λάβδανο [124], ενώ έχει απομονωθεί και από πολλά είδη όπως η *Ammisia pygmaea* [244], το *Ziziphora clinorodioides* [245] και την *Calea urticifolia* [246].

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη:

Πίνακας 52. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4'-μεθυλαιθέρα της απιγενίνης σε CD<sub>3</sub>OD

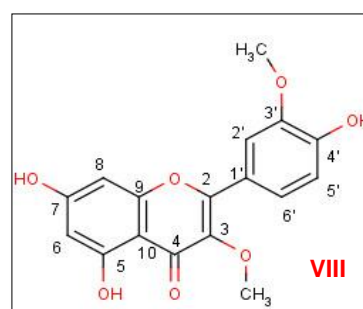
	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
<b>2</b>	-	165.9
<b>3</b>	6.65 (1H, s)	105.2
<b>4</b>	-	184.2
<b>5</b>	-	163.7
<b>6</b>	6.22 (1H, d, J = 2.2 Hz)	100.2
<b>7</b>	-	165.7
<b>8</b>	6.47 (1H, d, J = 2.2 Hz)	95.2
<b>9</b>	-	159.7
<b>10</b>	-	105.3
<b>1'</b>	-	124.7
<b>2' / 6'</b>	7.96 (2H, d, J = 9.0 Hz)	129.2
<b>3' / 5'</b>	7.11 (2H, d, J = 9.0 Hz)	116.3
<b>4'</b>	-	164.4
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3.91 (3H, s)	56.3

Το προϊόν είναι ευρέως διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο. Έχει μελετηθεί για την ικανότητά του να αναστέλλει το 'τρέμουλο' που δημιουργείται κατά τη φάση σχηματισμού φλεγμονής (έλεγχος φορμαλίνης) [247], ενώ έχει βρεθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από βλάβες που προκαλούνται σε περιπτώσεις στρες υποξίας/επανοξυγόνωσης μέσω της μείωσης της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής δράσης [245]. Επιπλέον,

παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι του νευροεκφυλισμού των οφθαλμών, ο οποίος παρατηρείται σε μεγάλες ηλικίες [243]. Επιπλέον, οι Chaurasiya *et al.* (2015) εξέτασαν τη δράση της ως ένα πιθανό αναστολέα των MAO-A και -B, επειδή παρουσιάζει σημαντική συγγένεια με τους υποδοχείς της σεροτονίνης. Στη μελέτη τους παρατήρησαν την αντιστρεπτή ικανότητα σύνδεσής της με τα ένζυμα και ιδιαίτερα με την MAO-B [246].

### 10.13.2.2 3,3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης (VII)

Ο μεταβολίτης αυτός ταυτοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας NMR ως ο 3,3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης. Απομονώθηκε ως μείγμα με τον 3,4'-διμεθυλαιθέρα της κερκετίνης (VIII) και η επιβεβαίωση της δομής έγινε με χρήση φάσματος COSY-LR. Το μοριακό βάρος του μεταβολίτη υπολογίστηκε στα 330 g/mol.



Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα άνθη του φυτού *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) [248]. Είναι ευρέως διαδεδομένο στο Φυτικό Βασίλειο, και έχει βρεθεί σε είδη των οικογενειών Asteraceae, Betulaceae, Cistaceae (*C. creticus* και *C. monspeliensis*), Fouquieriaceae, Hippocastanaceae, Leguminosae, Rutaceae, Salicaceae, Solanaceae, Zygophyllaceae κ.α. [124],[249],[250],[251],[252].

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,3'-διμεθυλαιθέρα της κερκετίνης σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Πίνακας 53. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,3'-διμεθυλαιθέρα της κερκετίνης σε CD<sub>3</sub>OD

	<sup>1</sup> H-NMR
<b>2</b>	-
<b>3</b>	-
<b>4</b>	-
<b>5</b>	-
<b>6</b>	6.23 (1H, d, J = 2.0 Hz)
<b>7</b>	-
<b>8</b>	6.44 (1H, d, J = 2.0 Hz)
<b>9</b>	-
<b>10</b>	-
<b>1'</b>	-
<b>2'</b>	7,74 (1H, d, J = 2,1 Hz)

3'	-
4'	-
5'	7.11 (H, d, $J = 8.6$ Hz)
6'	7.68 (1H, dd, $J = 8.6 / 2,1$ Hz)
3'-O-CH <sub>3</sub>	3.97 (3H, s)
3-O-CH <sub>3</sub>	3.82 (3H, s)

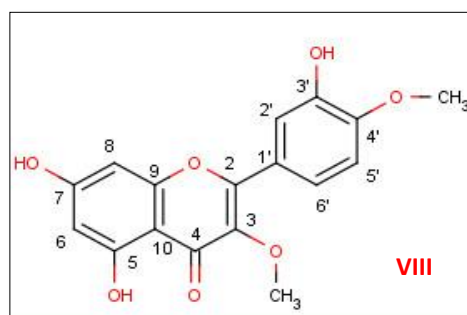
Η ταυτοποίηση της ουσίας έγινε συγκρίνοντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα με αυτά της υφιστάμενης βιβλιογραφίας σε διαλύτη DMSO [124]. Στο ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα βιβλιογραφικά δεδομένα για σύγκριση.

Πίνακας 54. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,3'-διμεθυλαιθέρα της κερκετίνης σε DMSO

	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
2	-	155.4
3	-	137.7
4	-	178.8
5	-	161.2
6	6.16 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	98.5
7	-	164.1
8	6.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	93.8
9	-	156.3
10	-	104.1
1'	-	120.7
2'	7.60 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	111.9
3'	-	147.4
4'	-	149.7
5'	6.92 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	115.6
6'	7.53 (1H, dd, $J = 8.0 / 2.0$ Hz)	122.1
3-OCH <sub>3</sub>	3.83 (3H, s)	59.6
3'-OCH <sub>3</sub>	3.84 (3H, s)	55.6

### 10.13.2.3 3,4'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης (VIII)

Ο μεταβολίτης VIII ταυτοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας NMR από το μείγμα με τον 3,3'-διμεθυλαιθέρα της κερκετίνης (VII), το μοριακό βάρος του οποίου είναι 330 g/mol. Μερικά από τα φυτά που έχει απομονωθεί είναι ο φλοιός του *Punica granatum* (Punicaceae) [253], το περικάρπιο του *Zanthoxylum bungeanum*



(Rutaceae) [254] και από τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Combretum quadrangular*, ενώ ταυτοποιείται για πρώτη φορά στο είδος *C. creticus* ssp. *creticus*.

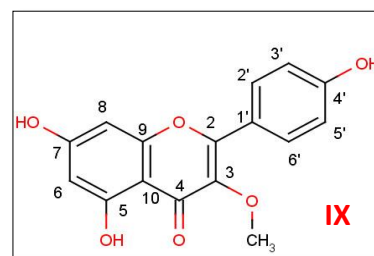
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,4'-διμεθυλαιθέρα της κερκετίνης σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Πίνακας 55. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,4'-διμεθυλαιθέρα της κερκετίνης σε CD<sub>3</sub>OD

	<sup>1</sup> H-NMR
<b>2</b>	-
<b>3</b>	-
<b>4</b>	-
<b>5</b>	-
<b>6</b>	6.23 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)
<b>7</b>	-
<b>8</b>	6.43 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)
<b>9</b>	-
<b>10</b>	-
<b>1'</b>	-
<b>2'</b>	7.63 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
<b>3'</b>	-
<b>4'</b>	-
<b>5'</b>	6.97 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz)
<b>6'</b>	7.66 (1H, dd, <i>J</i> = 8.6 / 2.1 Hz)
<b>4'-O-CH<sub>3</sub></b>	3.97 (3H, s)
<b>3-O-CH<sub>3</sub></b>	3.82 (3H, s)

#### 10.13.2.4 3-μεθυλαιθέρας της καιμπερόλης (IX)

Το προϊόν **IX** απομονώθηκε ως μια κίτρινη σκόνη, με μοριακό βάρος 302 g/mol. Η ταυτοποίηση της δομής της έγινε με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και τα δεδομένα να επαληθεύτηκαν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας [255],[256],[257].



Έχει απομονωθεί από αρκετά είδη, μερικά εκ των οποίων είναι: *Opuntia ficus-indica* [255], *Inula viscosa* [258], *Hieracium pilosella* L.[256], *Zingiber aromaticum* [259], *Dodonaea viscosa* (L.) [260]. Επίσης έχει απομονωθεί και από

είδη του γένους *Cistus* (*C. ladanifer*, *C. monspeliensis* και *C. creticus* ssp. *creticus*) [192],[261],[262].

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-μεθυλαιθέρα της καμπφερόλης σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

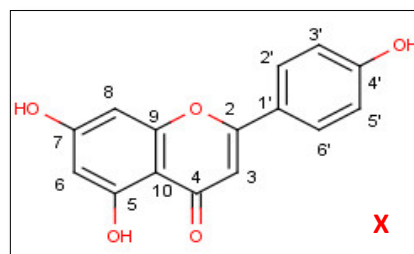
Πίνακας 56. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-μεθυλαιθέρα της καμπφερόλης σε CD<sub>3</sub>OD

	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
<b>2</b>	-	158.5
<b>3</b>	-	139.9
<b>4</b>	-	180.4
<b>5</b>	-	163.5
<b>6</b>	6.22 (1H, d, J = 2.1 Hz)	100.2
<b>7</b>	-	166.5
<b>8</b>	6.43 (1H, d, J = 2.1 Hz)	95.2
<b>9</b>	-	158.9
<b>10</b>	-	106.3
<b>1'</b>	-	123.0
<b>2' / 6'</b>	8.01 (2H, d, J = 8.5 Hz)	131.8
<b>3' / 5'</b>	6.95 (2H, d, J = 8.5 Hz)	117.0
<b>4'</b>	-	162.1
<b>3-CH<sub>3</sub></b>	3.80 (3H, s)	60.9

Μερικές δράσεις για τις οποίες έχει μελετηθεί είναι οι χαλαρωτικές του ιδιότητες στους εντερικούς και αγγειακούς λείους μύες καθώς και η χρήση του ως σπασμολυτικό [262].

### 10.13.2.5 Απιγενίνη (X)

Το προϊόν αυτό αποτελεί μια κίτρινη σκόνη με μοριακό βάρος 270 g/mol. Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR του είναι τυπικό ενός σκελετού флаβόνης και δεδομένα του επαληθεύτηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας [263]. Αποτελεί ένα από τα πλέον διαδεδομένα φυσικά προϊόντα και έχει απομονωθεί από πολλά φυτικά είδη.



Στη συνέχεια παρατίθενται τα φασματοσκοπικά δεδομένα της απιγενίνης σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

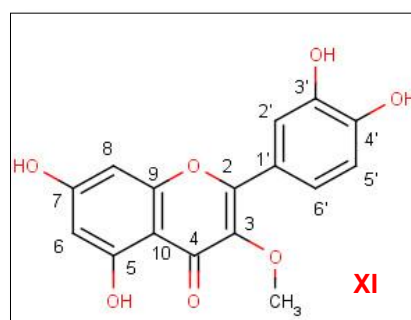
Πίνακας 57. Φασματοσκοπικά δεδομένα της απιγενίνης σε CD<sub>3</sub>OD

	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
<b>2</b>	-	164.4
<b>3</b>	6.62 (1H, s)	106.6
<b>4</b>	-	180.5
<b>5</b>	-	164.9
<b>6</b>	6.24 (1H, d, J = 2.1 Hz)	104.8
<b>7</b>	-	160.2
<b>8</b>	6.49 (1H, d, J = 2.1 Hz)	99.3
<b>9</b>	-	160.7
<b>10</b>	-	109.4
<b>1'</b>	-	123.1
<b>2' / 6'</b>	7.88 (1H, d, J = 8.8 Hz)	129.3
<b>3' / 5'</b>	6.96 (1H, d, J = 8.8 Hz)	117.1
<b>4'</b>	-	162.6

Για τον μεταβολίτη έχουν αναφερθεί διάφορες δράσεις, μερικές εκ των οποίων μερικές είναι: αντιαλλεργική [264], αντιφλεγμονώδη, οιστρογονική, αντικαρκινική [265], νευροπροστατευτική [266], δράση κατά της αγγειογένεσης [267], ενώ έχει παρατηρηθεί ότι παρεμποδίζει την παραγωγή κορτιζόλης από τα κύτταρα των επινεφριδίων H295R [268].

#### 10.13.2.6 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης (XI)

Ο μεταβολίτης **XI** ταυτοποιήθηκε ως ο 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης. Απομονώθηκε ως μια κίτρινη, άμορφη σκόνη με μοριακό βάρος 318 g/mol. Συναντάται συχνά στο φυτικό βασίλειο, ενώ έχει απομονωθεί από διάφορα είδη όπως τα φύλλα του *Cistus laurifolius* [269], την *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* [270], το *Polygonum amphibium*, το *Allagorarpus viscosissimus*, τη *Lychnorhora staavioides* και από διάφορα είδη του γένους *Rhamnus* [271].



Στη συνέχεια παρατίθενται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης σε δευτεριωμένη μεθανόλη, τα οποία επαληθεύτηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας [272].

Πίνακας 58. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης σε CD<sub>3</sub>OD

<sup>1</sup> H-NMR	
<b>2</b>	-
<b>3</b>	-
<b>4</b>	-
<b>5</b>	-
<b>6</b>	6.18 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
<b>7</b>	-
<b>8</b>	6.37 (1H, brd d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
<b>9</b>	-
<b>10</b>	-
<b>1'</b>	-
<b>2'</b>	7.64 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
<b>3'</b>	-
<b>4'</b>	-
<b>5'</b>	6.92 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz)
<b>6'</b>	7.55 (1H, dd, <i>J</i> = 8.60 / 2.1 Hz)
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	3.80 (1H, s)

Ο μεταβολίτης έχει μελετηθεί για διάφορες δράσεις και έχει δείξει ικανή αντιική, αντιοξειδωτική και νευροπροστατευτική δράση [255]. Επίσης, έχει δείξει σημαντική αντιβακτηριδιακή δράση έναντι του ελικοβακτηρίου του *pylori* (*Helicobacter pylori*), ενώ αποτελεί και έναν ικανό αναστολέα των φωσφατασών cAMP and cGMP [269].

## 10.14 Συμπεράσματα

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη της ρητίνης και των άπολων μεταβολιτών των υπεργείων τμημάτων του φυτού *C. creticus* ssp. *creticus* εξάγονται ορισμένα συμπεράσματα για τα πλεονεκτήματα της Υ.Ε. έναντι των συμβατικών τεχνικών:

- Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εφαρμόσθηκε ένα πρωτόκολλο εκχύλισης με στόχο την ποσοτική παραλαβή των μη πολικών συστατικών της ρητίνης του φυτού *C. creticus* ssp. *creticus*. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, μεταβάλλοντας κατάλληλα την πολικότητα της κινητής φάσης είναι δυνατή η αποτελεσματική κλασμάτωση του εκχυλίσματος και η παραλαβή εκχυλισμάτων διαφορετικής χημικής σύστασης.
- Η ποιοτική ανάλυση των αιθέριων ελαίων που παρασκευάσθηκαν με τη διεργασία της HD έδειξαν ότι οι υψηλές θερμοκρασίες και οι εκτεταμένοι χρόνοι παραμονής εντός της συσκευής Clevenger, οδήγησαν στη θερμική μεταβολή πτητικών συστατικών με αποτέλεσμα την ποιοτική αλλοίωση του τελικού προϊόντος. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια που παρασκευάσθηκαν με την τεχνική HD περιείχαν υψηλά ποσοστά από το μεταβολίτη **II** (οξειδίο της μανούλης), η παρουσία του οποίου δεν ανιχνεύτηκε σε υψηλά ποσοστά στα δείγματα της Υ.Ε., αλλά ούτε και στα δείγματα του φυτού και της ρητίνης τα οποία μελετήθηκαν με την τεχνική SPME. Παρατήρηση η οποία μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η μεγάλη περιεκτικότητα του οξειδίου της μανούλης ως ένα βαθμό οφείλεται στο θερμικό μετασχηματισμό άλλων παραγώγων.
- Το πτητικό κλάσμα που προέκυψε από τη διεργασία της Υ.Ε. παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με την HD (6.34% έναντι 0.98%), με τη διαφορά αυτή να οφείλεται στη συνεχύλιση και άλλων άπολων μη πτητικών συστατικών, τα οποία όπως αποδείχθηκε, αποτελούν μεταβολίτες με σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες (μεταβολίτες **IV** και **V**). Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι το λαμβανόμενο με την Υ.Ε. πτητικό κλάσμα είναι εμπλουτισμένο με δραστικά συστατικά τα οποία προσδίδουν σημαντική βιολογική αξία στο εκχύλισμα.
- Ποσότητα από τη ρητίνη εκχυλίστηκε με την τεχνική της UAE κάνοντας χρήση διαλυτών DCM και EtOAc. Αν και η διεργασία απέδωσε εκχυλίσματα με υψηλές αποδόσεις (αντίστοιχες με αυτές της Υ.Ε.), το επιπλέον στάδιο που απαιτείται για την απομάκρυνση του διαλύτη έχει ως συνέπεια την απώλεια μεγάλου μέρους των πτητικών συστατικών τους.
- Τέλος, από τα εκχυλίσματα της Υ.Ε. **C.c.R.SFE.1** και **C.c.R.SFE.5** απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 11 συνολικά μεταβολίτες εκ των οποίων ένας απομονώθηκε για πρώτη φορά από το είδος (3,3'-διμεθυλαιθέρα της κερκετίνης (**VII**)).



Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι οι ηπιότερες συνθήκες της Υ.Ε. και οι μετέπειτα μειωμένοι χρόνοι επεξεργασίας του εκχυλίσματος οδηγούν στην παραγωγή δραστικότερων πτητικών παρασκευασμάτων ανώτερης ποιότητας, με υψηλότερες αποδόσεις και άρωμα το οποίο μοιάζει περισσότερο με αυτό της πηγής προέλευσης. Συνεπώς γίνεται αντιληπτό πως η διεργασία της Υ.Ε. μπορεί να αποτελέσει μια πολύ καλή εναλλακτική τεχνική για την παράγωγη δραστικών εκχυλισμάτων από το φυτό *C. creticus* ssp. *creticus* και από άλλα αρωματικά φυτά.

# *Glycyrrhiza glabra*

---

## 11 Ιστορικά στοιχεία



Οι Κινέζοι από το 2500 π.Χ, οι Αιγύπτιοι από το 1700 π.Χ., οι Έλληνες με τον Ιπποκράτη, τον Διοσκουρίδη, τον Θεόφραστο τον Γαληνό αλλά και όλοι οι λαοί ανεξάρτητα από τον πολιτισμό που ανέπτυξαν, βρήκαν στο «φαρμακείο» της φύσης, την ίαση της ψυχής και του σώματός μελετώντας τη θεραπευτική δράση των βοτάνων. Οι γνώσεις τους μεταδόθηκαν από γενιά σε γενιά και σήμερα έρχονται δεκάδες μελέτες για να τεκμηριώσουν τα οφέλη των βοτάνων στον άνθρωπο.

Η γλυκύρριζα συγκαταλέγεται μεταξύ των βοτάνων τα οποία έχουν μελετηθεί ενδελεχώς και δεκάδες μελέτες έχουν λάβει χώρα για τη διερεύνηση των βιολογικών και φαρμακολογικών της ιδιοτήτων. Στις θεραπευτικές ιδιότητες της γλυκύρριζας έχουν αναφερθεί ο Θεόφραστος και ο Διοσκουρίδης στα έργα τους, στα οποία την αναφέρουν ως ένα πολύτιμο φυτό το οποίο χρησιμοποιούσαν για την αντιμετώπιση πολλών παθήσεων.

Η δρόγη πήρε το όνομά της από τις λέξεις «γλυκός + ρίζα» οι οποίες σημαίνουν «γλυκιά ρίζα». Σύμφωνα με τον Θεόφραστο (3<sup>ος</sup>-4<sup>ος</sup> αιώνας π.Χ.) οι Έλληνες πιθανώς να γνώρισαν την γλυκύρριζα από την Σκυθική φυλή (μια εθνολογική ομάδα ατόμων που έζησαν στην περιοχή της Ουκρανίας, μεταξύ της Μαύρης και της Κασπίας Θάλασσας) με αποτέλεσμα αρχικά να ονομαστεί το φυτό «Σκυθική ρίζα» [273]. Η ονομασία της ως 'γλυκύρριζα' ήρθε αργότερα από τον Διοσκουρίδη όταν τη συμπεριέλαβε στο έργο του 'De Materia Medica' [103].



Εικόνα 111. Ρίζες γλυκύρριζας



σχεδόν ισομήκη δόντια και στεφάνη που αποτελείται από πέντε πέταλα τριών διαφορετικών τύπων. Το μεγαλύτερο είναι ο πέτασος, δύο όμοια μεταξύ τους, ελεύθερα το ένα από το άλλο που ονομάζονται πτέρυγες και δύο ενωμένα μεταξύ τους πέταλα που αποτελούν την τρόπιδα. Στο εσωτερικό της τρόπιδας βρίσκονται δέκα στήμονες των οποίων τα νήματα μπορεί να είναι είτε ενωμένα μεταξύ τους, σχηματίζοντας ένα σωλήνα που περιβάλλει τον ύπερο, είτε ο ένας να είναι ελεύθερος και οι εννέα ενωμένοι. Τα φύλλα είναι συνήθως σύνθετα, αποτελούμενα από τρία ή περισσότερα φυλλάρια. Στη βάση κάθε φύλλου συνήθως απαντάται ένα ζεύγος παράφυλλων, το μέγεθος και το σχήμα των οποίων ποικίλει στα διάφορα φυτά. Σε μερικά είδη το ακραίο φυλλάριο μπορεί να αντικαθίσταται από μια απλή ή διακλαδιζόμενη έλικα. Η ρίζα τους είναι ένα ισχυρό πασσαλώδες σύστημα το οποίο έχει την ικανότητα να διεισδύει βαθιά μέσα στο έδαφος [278],[279].

Στην οικογένεια αυτή υπάγονται μερικά από τα γνωστότερα εδώδιμα είδη, όπως είναι τα φασόλια, οι φακές, τα μπιζέλια, τα ρεβίθια και τα κουκιά. Η σπουδαιότητα των ψυχανθών είναι πάρα πολύ μεγάλη, όχι μόνο για τις διατροφικές συνήθειες των ανθρώπων αλλά και για ολόκληρο το οικοσύστημα, αφού έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το βιολογικά αδρανές ατμοσφαιρικό άζωτο σε νιτρικά άλατα, μορφή με την οποία τα φυτά μπορούν εύκολα να το απορροφήσουν. Η αζωτοδέσμευση επιτυγχάνεται μέσω μίας συμβιωτικής σχέσης μεταξύ του φυτού και των αζωτοβακτηρίων του εδάφους [280]. Καθώς είναι λίγα τα φυτά των άλλων οικογενειών που έχουν αυτή την ικανότητα, η οικογένεια Leguminosae είναι υπεύθυνη για τον κύριο όγκο της βιολογικής αυτής ανακύκλωσης. Ο παράγοντας αυτός σε συνδυασμό με την υψηλή θρεπτική αξία των εδώδιμων φυτών της, αποτελεί το κύριο αίτιο καλλιέργειας των ειδών της οικογένειας σε συστήματα αμειψισποράς [279].

Χαρακτηριστικός είναι ο καρπός της, ο οποίος ονομάζεται χέδρωπας ή λοβός (legume), απ' όπου προέρχονται και οι ονομασίες 'Χέδρωπα' και 'Λεγκουμινώδη' για τα είδη της οικογένειας. Ο καρπός προέρχεται από επιφυή μονόχωρη ωθήκη σχηματισμένη από ένα μόνο καρπόφυλλο και μπορεί να είναι διαρρηκτός ή αδιάρρηκτος.



Ένας από τους πιο ασυνήθιστους καρπούς αυτής της κατηγορίας, στο φυτικό

βασίλειο, είναι αυτός του αράπικου φιστικιού, ο οποίος ωριμάζει υπόγεια. Επιπρόσθετα, ενδεικτική είναι και η μορφολογία των ανθέων της οικογένειας, η οποία θυμίζει πεταλούδα (ψυχή) και γι' αυτό τα άνθη χαρακτηρίζονται ως ψυχόμορφα, ενώ η οικογένεια είναι γνωστή και με τις ονομασίες Ψυχανθή ή Παπυλιονίδες. Είναι ισχυρά ζυγόμορφα και αποτελούνται από πενταμερή συστέπαλο κάλυκα και πενταμερή στεφάνη με ανόμοια πέταλα [281].

Το γένος της γλυκύρριζας περιλαμβάνει συνολικά 15 είδη με πολλά από αυτά καλλιεργούνται για την εκμετάλλευση του ριζώματός τους. Ο πίνακας που ακολουθεί περιλαμβάνει τα είδη του γένους, τις ποικιλίες, τα υποείδη και συνώνυμα αυτών.

Πίνακας 59. Είδη του γένους *Glycyrrhiza*

Είδος	Συνώνυμα	Υποείδη Ποικιλίες	Γεωγραφική κατανομή
<i>G. acantocarapa</i> (Lindley J. Back)	native licorice native Lucerne		<b>Αυστραλία</b>
<i>G. aspera</i> Pallas			<b>Ασία:</b> Αφγανιστάν Κίνα Ιράν, CIS Ασία <b>Ευρώπη</b> CIS <b>Μέση Ανατολή:</b> Λίβανο, Συρία, Τουρκία
<i>G. astragalina</i> Hook & Arn	<i>Culensillo,</i> <i>Locancia,</i> <i>Orozuz, Orozuz,</i> <i>Regaliz</i> <i>Silvestre, Triaca</i>		<b>Νότια Αμερική:</b> Αργεντινή, Χιλή
<i>G. echinata</i> L	<i>Gl. macedonica</i> <i>Boiss &amp; Orph</i> <i>Gl. foetidissima</i> Tausch		<b>Ασία:</b> Ιράν, CIS Ασία <b>Ευρώπη:</b> Βουλγαρία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιταλία, Κρήτη, Ρουμανία, Τουρκία,
<i>G. eurycarpa</i> P.C. Li			<b>Ασία:</b> Κίνα
<i>G. foetida</i> Desf			<b>Αφρική:</b> Αλγερία, Μαρόκο, Τυνησία <b>Ευρώπη:</b> Ισπανία
<i>G. glabra</i> L.	<i>Common Licorice,</i> <i>Common Liquorice,</i> <i>Licorice,</i> <i>Spanish licorice</i>	var <i>violacea</i> var <i>gladulifera</i> (Ρωσία) var. <i>Typical</i> (Ιταλία, Ισπανία)	<b>Αφρική:</b> Αλγερία, Αίγυπτος, Λιβύη <b>Ασία:</b> Αφγανιστάν, Κίνα, Ινδία, Ιράν, Ιράκ, Πακιστάν, CIS Ασία <b>Αυστραλία</b> <b>Ευρώπη:</b> Αλβανία, Αυστρία, Βουλγαρία, Τσεχία, Σλοβακία, Γαλλία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιταλία, Κρήτη, Πορτογαλία, Ρουμανία, Σαρδηνία, Ισπανία, Ελβετία, Ευρωπαϊκή Τουρκία, Πρώην Γιουγκοσλαβία, CIS Ευρώπη <b>Μέση Ανατολή:</b> Ελλάδα, Κύπρος, Ισραήλ, Ιορδανία, Λίβανο, Συρία, Τουρκία <b>Βόρεια Αμερική:</b> Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής

<i>G. inflata</i> Batalin			<b>Ασία:</b> Κίνα
<i>G. korshinskyi</i> Grigo			<b>Ασία:</b> Κίνα, CIS Ασία <b>Ευρώπη</b> CIS
<i>G. lepiota</i> Pursh	<i>American Licorice, Nuttall's Licorice, Wild Licorice</i>		<b>Κεντρική Αμερική:</b> Μεξικό (Βόρειο-Κεντρικό) <b>Βόρεια Αμερική:</b> Καναδά, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
<i>G. pallidiflora</i> Maxim			<b>Ασία:</b> Κίνα, CIS Ασία
<i>G. triphylla</i> Fischer &c. Meyer			<b>Ασία:</b> Αφγανιστάν, Ιράν, Πακιστάν, Κίνα, CIS Ασία
<i>G. uralensis</i> Fischer			<b>Ασία:</b> Αφγανιστάν, Κίνα Μογγολία, Πακιστάν, CIS Ασία
<i>G. yunnanensis</i> P. C. Li			<b>Ασία,</b> Κίνα

**CIS Ευρώπη:** η γεωγραφική περιοχή από τις χώρες Βέλγιο, Ευρωπαϊκή Τουρκία, Μολδαβία, Ουκρανία

**CIS Ασία:** η γεωγραφική περιοχή από τις χώρες Αρμενία, Αζερμπαϊτζάν, Γεωργία, Καζακστάν, Κιργιστάν, Ρωσία (Σιβηρία) Τατζικιστάν, Τουρκμενιστάν, Ουζμπεκιστάν.

## 11.2 Το είδος *Glycyrrhiza glabra*

### 11.2.1 Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το είδος *G. glabra* είναι ένα πολυετές φυτό, όρθιο, ύψους 50-100 cm. Οι ρίζες του είναι κυλινδρικές, διακλαδισμένες και σαρκώδεις, οι οποίες φτάνουν τα 1-



Εικόνα 112.Υπέργειο τμήμα *G. glabra* L.

2 μέτρα, και φέρουν καταβολάδες. Έχει σύνθετα φύλλα που αποτελούνται από 9 - 17 κατ' εναλλαγή, πτεροειδή φυλλάρια, οξέα ή αμβλέα, επιμήκη, ελλειπτικά - λογχοειδή με βοτρυώδεις ταξιανθίες πιο κοντές από τα φύλλα ή λίγο πιο μεγάλες. Οι βλαστοί του φυτού είναι όρθιοι, ραβδωτοί, ισχυροί και χνουδωτοί. Τα άνθη έχουν συνήθως χρώμα κυανό και εμφανίζονται στις αρχές του καλοκαιριού, έχουν ύψος 1 cm, με επίπεδα περικάρπια, επιμήκη έως γραμμικά, μήκους 1 – 3 cm και πάχους 6 mm με λίγους ή πολλούς

πυκνούς ακανθώδεις αδένες, έχοντας πολλούς ή ελάχιστους (2 - 3) σπόρους [282].

Το είδος *G. glabra* L. περιλαμβάνει πολλές ποικιλίες, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους σε συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι 2 εμπορικότερες εξ αυτών είναι: η *Glycyrrhiza glabra* var. *typica* Regel&Herd, γνωστή ως ‘Spanish liquorice’ και η *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* (Wald et Kit) Regel & Herd, γνωστή ως ‘Russian liquorice’. Η πρώτη διαθέτει ρίζες και ριζώματα που φτάνουν το 1 m, κυλινδρικού σχήματος με διάμετρο 5 – 20 mm, ενώ η δεύτερη που διαθέτει μόνο ρίζες κυλινδρικές, είτε διακλαδισμένες είτε συγκλίνουσες, μήκους 15 – 40 cm και διαμέτρου 1 – 5 cm.

Η συστηματική ταξινόμηση του φυτού παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 60. Συστηματική ταξινόμηση της *Glycyrrhiza glabra* L

Συστηματική ταξινόμηση της <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	
Βασίλειο	(Φυτά) Plants
Άθροισμα (Διαίρεση)	(Αγείοσπερμα) Spermatophyta
Κλάση	(Δικοτυλήδονα) Magnoliopsida – Dicotyledons
Τάξη	Fabales
Οικογένεια	Fabaceae (Leguminosae)
Υποοικογένεια	Faboideae/Papilionoideae
Γένος	<i>Glycyrrhiza</i> L. – Licorice
Είδος	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. – cultivated Licorice

Taxonomy for Plants, [www.arsgrin.gov](http://www.arsgrin.gov)

### 11.2.2 Καλλιέργεια - εξάπλωση

Το είδος *G. glabra* φύτεται σε χώρες της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία και Ισπανία), την Μικρά Ασία, την Ινδία, την Κίνα, το Αφγανιστάν, το Ιράν, το Πακιστάν, την Τουρκία και τη Ρωσία, ενώ καλλιεργείται εκτεταμένα στις χώρες της Αφρικής και της Κίνας (με την τελευταία να κατέχει το 90% της παγκόσμιας παραγωγής[283],[284]). Αναπτύσσεται σε αποικίες και χρειάζεται χαμηλό υψόμετρο, χέρσα και υγρά εδάφη για να αναπτυχθεί. Η συλλογή της



πραγματοποιείται τους φθινοπωρινούς μήνες και παραλαμβάνονται τόσο η κύρια ρίζα όσο και οι δευτερεύουσες διακλαδιζόμενες ρίζες του.

Ένα φυτό για να θεωρηθεί κατάλληλο για συγκομιδή πρέπει να έχει φτάσει το 3-4 έτος της ηλικίας του, με τη συλλογή του να είναι ιδιαίτερα δύσκολη μιας και απαιτείται η ξερίζωσή του φυτού[284].

### 11.2.3 Χρήσεις-φαρμακευτικές δράσεις



Η γλυκύρριζα έχει χαρακτηριστική γλυκιά γεύση που οφείλεται στην παρουσία της γλυκυρριζίνης. Η ουσία αυτή έχει 60 φορές πιο γλυκιά γεύση από αυτή της ζάχαρης [285] και για τον λόγο αυτό εκχυλίσματα του φυτού χρησιμοποιούνται

στη βιομηχανία για την παραγωγή ζαχαρωτών, τα οποία είναι εξαιρετικά δημοφιλή τόσο στην Κεντρική και Δυτική Ευρώπη όσο και στις Σκανδιναβικές χώρες [286]. Στη Συρία, την καταναλώνουν ως ποτό, ενώ στην Ισπανία και τη Γαλλία την παίρνουν απευθείας από το έδαφος και την μασούν για καθαρή αναπνοή [284]. Η γλυκύρριζα χρησιμοποιείται και στην βιομηχανία καπνού. Η προσθήκη εκχυλίσματος στον καπνό (σε συγκέντρωση <5%), κάνει πιο έντονη τη γεύση και το άρωμά του, χωρίς να επηρεάζει την τοξικότητα του [287]. Η χρήση του σε τέτοιου τύπου προϊόντα είναι πάρα πολύ μεγάλη. Μάλιστα, στην Αμερική το 63% του συνολικού όγκου της παραγόμενης γλυκύρριζας καταναλώνεται σε προϊόντα της καπνοβιομηχανίας [284].

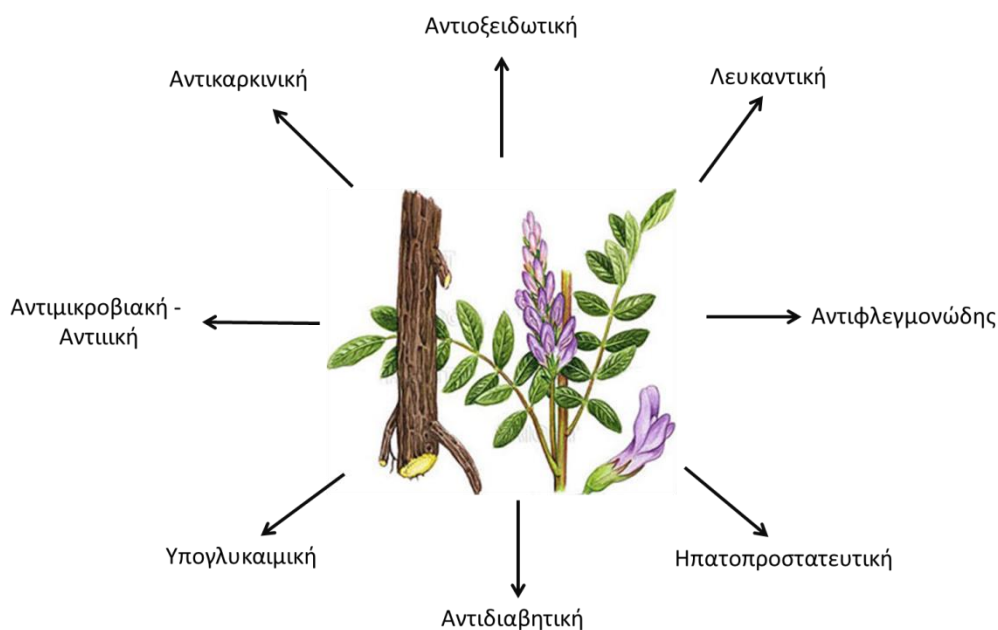
Η γλυκύρριζα έχει μια πλούσια ιστορία ως φαρμακευτικό φυτό και είναι καλά ριζωμένη στην ινδική, κινεζική, ελληνική και αιγυπτιακή παράδοση. Οι πρώτες αναφορές για την δράση προέρχονται από τον Θεόφραστο, ο οποίος την έδινε στους ασθενείς σαν θεραπεία για το άσθμα [288]. Αναφορές έχουμε και για τους πρώτους έμπορους της αρχαιότητας οι οποίοι πουλούσαν γλυκύρριζα σε συνδυασμό με μέλι, δημιουργώντας έτσι τα πρώτα ζαχαρωτά. Τον 13<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ. εκχυλίσματα του φυτού χρησιμοποιήθηκαν ως φάρμακο για τον πονόλαιμο, το βήχα



και τη συμφόρηση. Την ίδια εποχή και συγκεκριμένα το 1305, ο Βασιλιάς Εδουάρδος Ι της Αγγλίας φορολογούσε την εισαγόμενη γλυκύριζα, προκειμένου να συγκεντρωθούν φορολογικά έσοδα για τη δημιουργία της γέφυρας του Λονδίνου. Αργότερα, τον 18<sup>ο</sup> αιώνα, ο Ναπολέων Βοναπάρτης μασούσε τη γλυκύριζα ως φάρμακο για τα προβλήματα δυσπεψίας που αντιμετώπιζε [289]. Ακόμα έχει την ικανότητα να ελαττώνει τα όξινα επίπεδα του στομάχου, ανακουφίζοντας έτσι από την καούρα. Ακόμα διαθέτει μια αξιοσημείωτη ικανότητα επούλωσης των στομαχικών ελκών, επειδή δημιουργεί ένα προστατευτικό στρώμα πάνω στα τοιχώματα του στομάχου, ενώ ταυτόχρονα μειώνει τους σπασμούς του παχέος εντέρου. Ακόμα, θεωρείται ως ένα βότανο ωφέλιμο σε προβλήματα του σπλήνα, γαστρίτιδας, κολικούς και στην πρωτοπαθή αδρενοκορτικοειδική ανεπάρκεια [290]. Επίσης, παρουσιάζει ισχυρή δράση σε διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως, ο σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*) [291], ο στρεπτόκοκκος (*Streptococcus mutans*) [292], ο βάκιλος (*Bacillus subtilis*), ο εντερόκοκκος (*Enterococcus faecalis*), η ψευδομανάδα (*Pseudomonas aeruginosa*) [288] και το μυκοβακτηρίδιο (*Mycobacterium smegmatis*) [293]. Έχει θετική δράση σε βρογχική καταρροή, τη βρογχίτιδα, την πνευμονία και το βήχα. Επενεργεί θετικά σε προβλήματα στρες, έχει διουρητική, αντιοξειδωτική και οιστρογόνο δράση και συστήνεται κατά του διαβήτη και της χοληστερίνης [294].

Η δρόγη έχει αξιοσημείωτη δράση στο ενδοκρινικό σύστημα. Οι περιεχόμενοι γλυκοσίδες έχουν παρόμοια δομή με τα φυσικά στεροειδή που υπάρχουν στον οργανισμό και έτσι εξηγείται η ευεργετική δράση της γλυκύριζας σε ορμονολογικά προβλήματα όπως αυτό των επινεφριδίων (νόσο του Addison)[295]. Επίσης, οι γλυκοσίδες αναστέλλουν την παραγωγή κορτιζόλης, της ορμόνης που εκκρίνεται στο αίμα σε περιόδους έντονου άγχους. Με τον τρόπο αυτό το φυτό λειτουργεί κατευναστικά σε προβλήματα στρες [276].

Σύγχρονες μελέτες πάνω στα εκχυλίσματα της *G. glabra* έχουν φέρει στο φως δράσεις όπως: αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική, υπογλυκαιμική, υπατοπροστατευτική, ανοσορρυθμιστική, ενάντια στους ιούς Influenza – (H1N1, FFM-1 και FFM-2 και SARS), ακόμα και αντικαρκινική δράση στη κυτταρική σειρά PC-SPES (καρκίνος του προστάτη)[294],[296].



Εικόνα 113. Σχηματική αναπαράσταση των βιολογικών δράσεων της *Glycyrrhiza glabra*.

Σημαντική είναι και η λευκαντική δράση που παρουσιάζει στο δέρμα (ιδιότητα η οποία θα μας απασχολήσει και στην παρούσα διατριβή). Πολλές αναφορές της διεθνούς βιβλιογραφίας δείχνουν την ισχυρή ανασταλτική δράση της γλυκύρριζας στο ένζυμο της τυροσινάσης, το οποίο εμπλέκεται στη σύνθεση της μελανίνης του δέρματος [297],[298],[299].

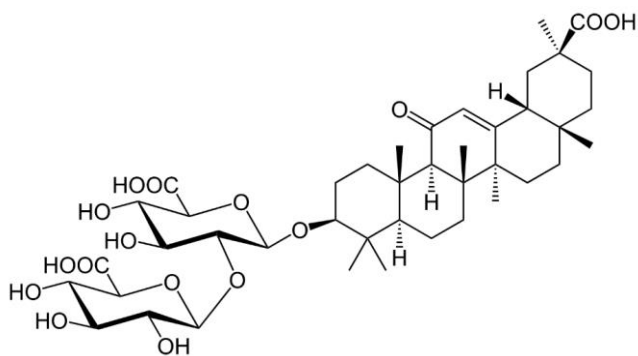
### 11.3 Δρογοχημεία

Από τη γλυκύρριζα έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός δευτερογενών μεταβολιτών, με τους περισσότερους από αυτούς να εντοπίζονται στη ρίζα του φυτού. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ριζώματός της αποτελεί το γεγονός ότι το 40-50% των συστατικών της ξηρής δρόγης είναι υδατοδιαλυτές βιοδραστικές ενώσεις, ενώ επίσης περιέρχονται σάκχαρα (3 – 16%), άμυλο (30%) και τέφρα (6%). Μεταξύ των δευτερογενών μεταβολιτών περιλαμβάνονται τριτερπενικές σαπωνίνες, φλαβονοειδή, πτητικά τερπενικά συστατικά, τανίνες, στερόλες, κουμαρίνες καθώς και φαινολικές ενώσεις με οιστρογόνο δράση [282],[300].

### 11.3.1 Σαπωνίνες

Ο κυριότερος μεταβολίτης που παράγεται από το φυτό είναι η γλυκυρριζίνη ή αλλιώς γλυκυρριζικό οξύ. Είναι μία τριτερπενική σαπωνίνη με γλυκιά γεύση, η οποία αποτελείται από ένα μόριο γλυκυρρετικού οξέος συζευγμένο με 2 μόρια γλυκουρονικού οξέος) [285]. Απαντάται σε υψηλά ποσοστά στη ρίζα και μάλιστα η περιεκτικότητά της κατά μέσο όρο κυμαίνεται στο 15% αυτής, ενώ στα υδατικά εκχυλίσματα είναι δυνατό να φτάσει το 20 -25% [300].

Αυτό το υψηλό ποσοστό την έχει καταστήσει ως ένα ιδανικό δείκτη για τον έλεγχο της καταλληλότητας της πρώτης ύλης για τη χρήση της στη βιομηχανία καθώς και για τον έλεγχο των τελικών προϊόντων της [301].



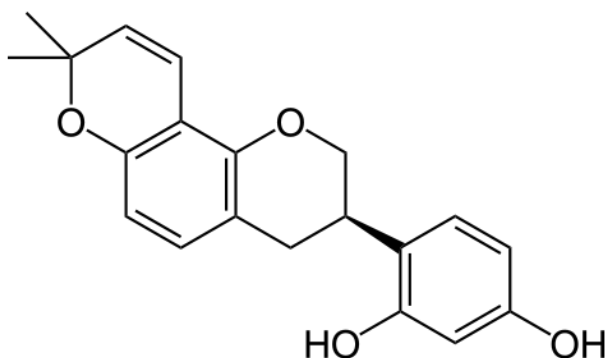
Εικόνα 114.Χημικός τύπος γλυκυρριζίνης

Εκτός από τη γλυκιά της γεύση, η γλυκυρριζίνη έχει μελετηθεί για τις βιολογικές της ιδιότητες σε διάφορους *in vitro* και *in vivo* ελέγχους. Αξιόλογη είναι η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης και η ηπατοπροστατευτική της δράση, ενώ σημαντική είναι η δράση κατά του διαβήτη, έναντι του έλκους και η ευεργετική της επίδραση στο προεμμηνορροϊκό σύνδρομο. Διαθέτει επίσης αντιμικροβιακές και αντιϊκές ιδιότητες με πολύ καλή δράση στους ιούς του κοινού κρυολογήματος, στην ιογενή ηπατίτιδα, στον ιό του απλού έρπητα, στον ιό ανεμοβλογιάς, στον ιό SARS καθώς και στον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS-HIV) [302],[303].

Μερικές ακόμα σαπωνίνες που έχουν απομονωθεί κατό το είδος είναι η γλυκυρρετόλη, το γκλαμπρολίδιο, το ισογκλαμπρολίδιο και το γλυκυρρετικό οξύ [304].

### 11.3.2 Φλαβονοειδή

Κατά καιρούς πολλά μόρια που έχουν απομονωθεί από το φυτό ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και είναι υπεύθυνα για τον κίτρινο χρωματισμό της ρίζας. Είναι ενώσεις γνωστές για τη δράση τους (αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης κ.α.) [282], από τις οποίες ξεχωρίζουν η λικουϊρτίνη, η ισολικουϊρτίνη, λικουϊριτιγενίνη, η ραμνολικουϊριλίνη, η γλυκολικουϊριτίνη, η πρενυλολικοφλαβόνη Α, η 1-μεθοξυφασεολίνη [300], η φορμονονετίνη, η νεολικουϊρετίνη, το γκλαμπρένιο και η γκλαμπριντίνη [305] (Εικόνα 115).



Εικόνα 115. Χημικός τύπος γκλαμπριντίνης

Η τελευταία αποτελεί και τον κυριότερο μεταβολίτη που απαντάται στα μη πολικά εκχυλίσματα του φυτού [297]. Είναι μία κίτρινη ουσία με ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση. Έχει την ικανότητα να αναστέλλει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης, η οποία με τη σειρά της συντελεί στη μείωση του ρυθμού της αθηροσκλήρωσης [306]. Για το λόγο προτάθηκε από τους Somjen *et al.* (2004) για την προστασία από καρδιακά προβλήματα σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση [307].

Επίσης, έχει ισχυρή οιστρογονική δράση λόγω της ικανότητας να συνδέεται με τον οιστρογονικό υποδοχέα ER [308], ενώ έχει παρατηρηθεί, σε δοκιμές που έγιναν σε κυτταρικές σειρές MC3T3-E1, ότι αυξάνει την παραγωγή των

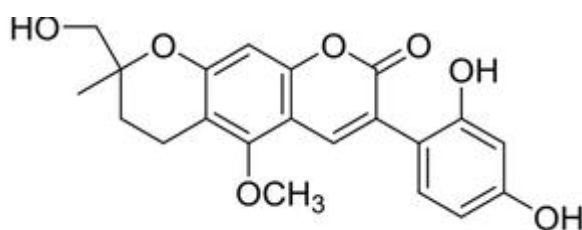
οστεοβλαστών (κύτταρα που εμπλέκονται στην ανάπλαση του ιστού των οστών) [309].

Ακόμα, η συνεργιστική δράση των φλαβονοειδών της γλυκύρριζας είναι εμφανής στον ανταγωνισμό έναντι της ακετυλοχολίνης και της ισταμίνης, με αποτέλεσμα το εκχύλισμά τους να παρουσιάζει αντισπασμωδική δράση [310].

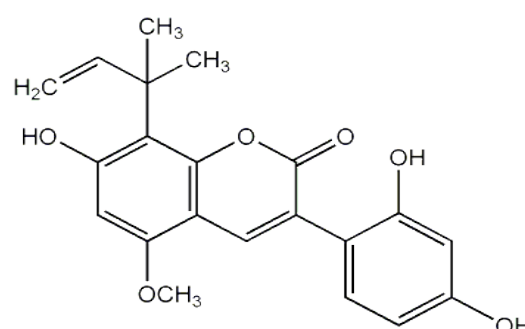
Εκτός των άλλων, μία ακόμα ισχυρή δράση που παρουσιάζει, είναι στην ικανότητά της να αναστέλλει τη δράση της τυροσινάσης. Η τυροσινάση είναι το ένζυμο που σχετίζεται με τη διαδικασία της μελανογένεσης. Μέσω της αναστολής του ενζύμου, βοηθάει στη λεύκανση του δέρματος και στην αντιμετώπιση δερματικών δυσλειτουργιών όπως τα μελανώματα, τα μαύρα στίγματα και οι φακίδες [297],[298],[299]. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας της, έχει βρει εφαρμογή και στην αναστολή του ενζυμικού μαυρίσματος των φρούτων[311].

### 11.3.3 Κουμαρίνες

Μεταξύ των δευτερογενών μεταβολιτών που βιοσυντίθενται από το φυτό περιλαμβάνονται και οι κουμοαρίνες. Πρόκειται για ουσίες με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιπηκτική δράση, ενώ ενεργούν και ως διεγερτικά του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επίσης, παράγωγα κουμαρινών έχουν εμφανίσει κυτταροτοξική δράση, σε καρκινικές σειρές καθώς και στην ανασταλτική δράση έναντι του ιού HIV [312].



Εικόνα 116. Δομή λικοκυρανοκουμαρίνης



Εικόνα 117. Δομή λικοαρυλοκουμαρίνη

Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι οι ακόλουθοι: η λικοκυρανοκουμαρίνη, η λικοαρυλοκουμαρίνη, η κουμαρίνη GU-12,

η λικοκουμαρίνη C, η 6 - ακετυλο- 4 – μεθυλο-5-υδροξυκουμαρίνη, η ερνιαρίνη και η ουμπελιφερόνη [305]

#### **11.3.4 Βιομηχανικές εφαρμογές**

Από όλα τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η γλυκύρριζα αποτελεί σήμερα ένας μεγάλης οικονομικής σημασίας φυτό με πολυάριθμες εφαρμογές στη βιομηχανία. Εκτιμάται ότι η ετήσια παραγωγή της ανέρχεται στα 10 εκατομμύρια τόννους ετησίως [283]. Συνεπώς η μελέτη ενός τέτοιου φυτικού υλικού έχει ιδιαίτερη σημασία τόσο από επιστημονικής όσο και από οικονομικής άποψης. Μερικές από τις σημαντικότερες εφαρμογές της παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

- Στα τρόφιμα ως γλυκαντική ύλη σε καραμέλες, τσίχλες, γλυκά, ποτά και αφεψήματα
- Στα φρούτα για την αποτροπή του ενζυμικού μαυρίσματός τους
- Στη βιομηχανία καλλυντικών για την παραγωγή κρεμών, σαμπουάν και λευκαντικών κρεμών
- Στη φαρμακοβιομηχανία σε σιρόπια για το βήχα, σε καραμέλες, παστίλιες για το λαιμό και για τη βελτίωση της γεύσης ορισμένων φαρμάκων
- Και στη βιομηχανία καπνού για τη βελτίωση της γεύσης του τσιγάρου

#### **11.3.5 Αντενδείξεις**

Παρά τις ευεργετικές επιπτώσεις της στην ανθρώπινη υγεία, η γλυκύρριζα δε πρέπει να χρησιμοποιείται αψήφιστα, αφού η χρήση της εγκυμονεί κινδύνους. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρατεταμένη χρήση της μπορεί να προκαλέσει προβλήματα υγείας κυρίως λόγω της παρουσίας της γλυκυρριζίνης. Η ουσία αυτή, λόγω της δομής της, έχει την ικανότητα να μιμείται τη δράση της αλδοστερόνης, μιας ορμόνης που είναι υπεύθυνη για την ισορροπία καλίου/νατρίου στον οργανισμό. Η αύξηση της γλυκυρριζίνης στο αίμα, έχει σαν αποτέλεσμα τη

διαταραχή αυτής της ισορροπίας. Ο οργανισμός με τη σειρά του, με σκοπό να διατηρήσει την ομοιόστασή του, αναγκάζεται να μειώσει τα επίπεδα καλίου στο αίμα και αυτό σε περιπτώσεις μακροχρόνιας χρήσης μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα υγείας όπως αυξημένη αρτηριακή πίεση και κίνδυνος εκδήλωσης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Γι' αυτό η γερμανική επιτροπή 'Commission E έχει συστήσει σαν μέγιστη δόση γλυκύριζας τα 3 g ημερησίως, με διάρκεια λήψης όχι μεγαλύτερη από 6 βδομάδες [313]. Συνεπώς, η χρήση της θα πρέπει να αποφεύγεται σε περιπτώσεις υπέρτασης, κίρρωση του ήπατος, σε άτομα με νεφρική ανεπάρκεια, χολοηπατικές δυσλειτουργίες και υπέρταση. Επίσης, μπορεί να προκαλέσει αύξηση της προλακτίνης και των οιστρογόνων και αντίστοιχα μείωση της τεστοστερόνης, ενώ απαγορεύεται η λήψη της στους μήνες της κυοφορίας [276],[314],[315].

# *Glycyrrhiza glabra* Πειραματικό μέρος

---

## 11.4 Σκοπος και κριτήρια επιλογής του είδους

Όπως αναφέρθηκε στο εισαγωγικό κεφάλαιο, η *Glycyrrhiza glabra* αποτελεί ένα φυτό με μεγάλη ιστορία στη λαϊκή θεραπευτική [316], ενώ στις μέρες μας βρίσκει ποικίλες εφαρμογές λόγω των αξιόλογων βιολογικών ιδιοτήτων της. Τα υδατοαλκοολικά εκχυλίσματα του φυτού χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών για την παραγωγή βιοδραστικών φυσικών προϊόντων, ενώ η ετήσια παραγωγή γλυκύρριζας εκτιμάται στους 10 εκατομμύρια τόννους παγκοσμίως [283]. Συνεπώς, γίνεται άμεσα κατανοητό ότι η εφαρμογή νέων τεχνικών για την παραγωγή δραστικών εκχυλισμάτων μπορεί να αποτελέσει στοιχείο μείζονος σημασίας και οικονομικού οφέλους.

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στα εκχυλίσματα του φυτού έχουν δείξει πολλές διαφορετικές και αξιόλογες δράσεις όπως: αντιβηχικές, αποχρεμπτικές, αντιπηκτικές, αντιμικροβιακές, αντιιικές, οιστρογονικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, δράσεις κατά του έλκους και του διαβήτη, ηπατοπροστατευτικές και αντικαρκινικές [294]. Ακόμα, μελέτες στα άπολα και μέσης πολικότητας εκχυλίσματα του φυτού, έχουν δείξει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου της τυροσινάσης [317],[318], ένα ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της μελανίνης [311]. Βασικό όμως ανασταλτικό στοιχείο για την παραλαβή αυτών των μεταβολιτών με τη χρήση κλασικών τεχνικών εκχύλισης αποτελεί: α) η χρήση οργανικών διαλυτών (διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, κυκλοεξάνιο κ.α.) και β) το γεγονός ότι αρκετά από τα δραστικά συστατικά του φυτού είναι θερμοευαίσθητα και με μικρή άνοδο της θερμοκρασίας είναι πιθανός ο καταβολισμός τους με αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση του παραγόμενου εκχυλίσματος [319].

Έτσι, με σκοπό την υπερκέρση των προαναφερόμενων μειονεκτημάτων, αποφασίστηκε η εφαρμογή της τεχνικής της εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξειδίου του άνθρακα και της χρήσης αιθανόλης ως συνδιαλύτη. Στόχος, είναι η



μεγιστοποίηση της δράσης και της απόδοσης του εκχυλίσματος μέσω της χρήσης του Στατιστικού Σχεδιασμού Πειραμάτων (Design of Experiments - DOE).

Επίσης, για την καλύτερη κατανόηση της διεργασίας της Υ.Ε. πραγματοποιήθηκε η περιγραφή αυτής μέσω της χρήσης ενός μαθηματικού μοντέλου μεταφοράς μάζας (Sononá et al., (1994)) [62],[66], προκειμένου να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας που διέπουν τη διεργασία, τα οποία είναι απαραίτητα για τις μελέτες σχεδιασμού και κλιμάκωσης μεγέθους.

Τέλος, το υπόλειμμα της Υ.Ε., επεξεργάσθηκε με την τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (ASE), με σκοπό την παραλαβή των πιο πολικών συστατικών του φυτού, για την παραγωγή εκχυλισμάτων με υψηλό φορτίο σε φαινολικά παράγωγα καθώς και καλή αντιοξειδωτική δράση.

## **11.5 Συλλογή του φυτικού υλικού και ξήρανση**

Οι ρίζες του φυτικού υλικού συλλέχθηκαν στην Κεφαλονιά το 2009 και υποβλήθηκαν σε φυσική ξήρανση σε σκιερό και καλά αεριζόμενο χώρο.

## **11.6 Υλικά και μέθοδοι**

Τα όργανα, οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι:

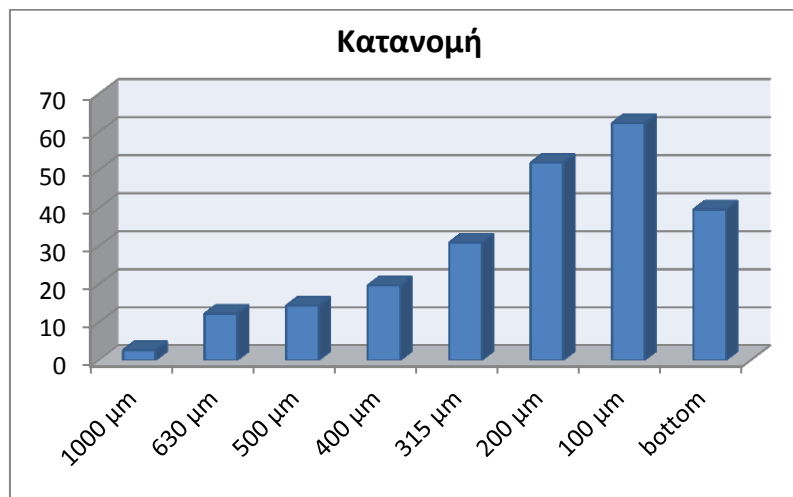
- Συσκευές υπερκρίσιμης εκχύλισης (SFE-500)
- Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) κανονικής και αντίστροφης φάσης
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)
- Θερμοζυγός με λάμπα αλογόνου
- Συσκευή κοσκίνισης
- Συσκευή συμπύκνωσης υπό κενό (Rota vapor)
- Συσκευή λυοφιλοποίησης
- Το λογισμικό Design Expert 7 (StatEase, Inc., Minneapolis, MN).
- Το λογισμικό SIMCA-P/P+ 11.5.0 Umetrics
- Φωτόμετρο (TECAN reader Infinite m200 pro)

## 11.7 Μέτρηση κοκκομετρίας

Πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων, η πρώτη ύλη τεμαχίστηκε και κοσκινίστηκε για τον προσδιορισμό της μέσης διαμέτρου της. Η κατανομή βάρους της παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 61. Κατανομή βάρους κοσκίνων για την ρίζα του φυτού *G. glabra*

Κοκκομετρία				
Μέγεθος κοσκίνων	Βάρος κοσκίνων (g)	Μεικτό βάρος (g)	Καθαρό βάρος (g)	% Ποσοστό επί του συνολικού βάρους
1000 $\mu\text{m}$	331.7	369.22	37.52	1.15
630 $\mu\text{m}$	443.51	615.15	171.64	5.24
500 $\mu\text{m}$	439.08	640.12	201.04	6.14
400 $\mu\text{m}$	420.32	695.84	275.52	8.41
315 $\mu\text{m}$	411.96	845.4	433.44	13.23
200 $\mu\text{m}$	396.32	1123.34	727.02	22.20
100 $\mu\text{m}$	399.82	1272.44	872.62	26.65
Βάση	219.07	774.03	554.96	16,95
		<b>Σύνολο</b>	<b>3273.76</b>	



Εικόνα 118. Κατανομή βάρους για την αλεσμένη ρίζα του φυτού *G. glabra*

Το μεγαλύτερο μέρος των τεμαχίων της κονιοποιημένης δρόγης είχαν μέγεθος από 100 έως 200  $\mu\text{m}$ . Η μέτρηση της κοκκομετρίας έγινε διότι στη συνέχεια της παρούσας εργασίας γίνει η μελέτη της επίδρασή της στη διεργασία της Υ.Ε (Κεφάλαιο 11.12.1).

## 11.8 Αρχική εκχύλιση των ριζών της *G. glabra* με τη χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub>

Η παραλαβή των μη πολικών συστατικών της ρίζας του φυτού *G. glabra*, τα οποία ανήκουν στην πλειονότητά τους στην κατηγορία των φλαβονοειδών και διαθέτουν αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες, είναι εφικτή με τη χρήση διαφόρων εκχυλιστικών διαδικασιών. Τεχνικές όπως η επιταχυνόμενη εκχύλιση (ASE) [319], η εκχύλιση με τη συσκευή Soxhlet [320],[321] καθώς και οι κλασσικές τεχνικές εκχύλισης: διαβροχή (maceration) και εμβροχή (percolation) [322],[323], αποτελούν μερικές χαρακτηριστικές διεργασίες που μπορούν να εφαρμοσθούν για το σκοπό αυτό. Όμως, σύμφωνα με μελέτες που έχουν λάβει χώρα στο εργαστήριο μας, οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης και η επιταχυνόμενη εκχύλιση (ASE) χαρακτηρίζονται από την πιθανή αλλοίωση θερμοευαίσθητων και ευοξειδωτων συστατικών, οδηγώντας στην καταστροφή τους και στη δημιουργία μιας σειράς ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Από την άλλη μεριά, οι ηπιότερες συνθήκες της Υ.Ε. συντελούν στη μείωση του κινδύνου θερμικής υποβάθμισης των ευαίσθητων συστατικών, και στην παρασκευή εκχυλισμάτων ανώτερης ποιότητας [276].

Θέλοντας λοιπόν, να μελετήσουμε την αντιοξειδωτική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών της γλυκύρριζας και την ικανότητά τους στην αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης, επιλέχθηκε η εφαρμογή της τεχνικής των υπερκρίσιμων ρευστών με τη χρήση CO<sub>2</sub>. Γι' αυτό το λόγο, προβήκαμε σε μία δοκιμαστική εκχύλιση των ριζών του φυτού (90.45 g) στην ημιπilotική συσκευή SFE500 στις ακόλουθες συνθήκες: θερμοκρασία 50 °C, πίεση 250 bar και ροή CO<sub>2</sub> 1.2 kg/h στον εκχυλιστήρα και 40 °C και 30 bar στους διαχωριστήρες. Η μοναδική παράμετρος που μεταβαλλόταν με την πάροδο του χρόνου ήταν το ποσοστό του συνδιαλύτη (αιθανόλη), το οποίο κυμάνθηκε σε ποσοστά 0%, 5% και 10% w/w. Στόχος, αυτής της μεταβολής ήταν η μερική κλασμάτωση του εκχυλίσματος και η παραλαβή κλασμάτων με μεταβολίτες διαφορετικής πολικότητας.

Οι αποδόσεις και τα κλάσματα που προέκυψαν από την παραπάνω εκχύλιση παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 62.

Πίνακας 62. Αποδόσεις υπερκρίσιμης εκχύλισης του φυτού *G. glabra* στη συσκευή SFE500

α/α	Συνδιαλύτης (w/w)	Βάρος (g)	Απόδοση (%)	Συνολική Απόδοση (%)	Ποσότητα CO <sub>2</sub> (kg CO <sub>2</sub> / kg τροφ.)
G.g.1.p	-	0.048	0.053	0.243	27
G.g.2.p	-	0.176	0.19		
G.g.3.p	EtOH 5%	0.357	0.39	1.3	146
G.g.4.p	EtOH 5%	0.399	0.44		
G.g.5.p	EtOH 5%	0.083	0.09		
G.g.6.p	EtOH 5%	0.235	0.25		
G.g.7.p	EtOH 5%	0.030	0.03		
G.g.8.p	EtOH 5%	0.094	0.10		
G.g.9.p	EtOH 10%	0.223	0.24	0.45	40
G.g.10.p	EtOH 10%	0.196	0.21		

### 11.8.1 Έλεγχος βιολογικών ιδιοτήτων

Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα ελέχθησαν ως προς την ικανότητά τους να ανάγουν την ελεύθερη ρίζα DPPH (σε συγκέντρωσεις 200μg/mL) καθώς και για την ικανότητα τους να αναστέλουν τη δράση του ενζύμου της τυροσινάσης (IC<sub>50</sub>). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 63).

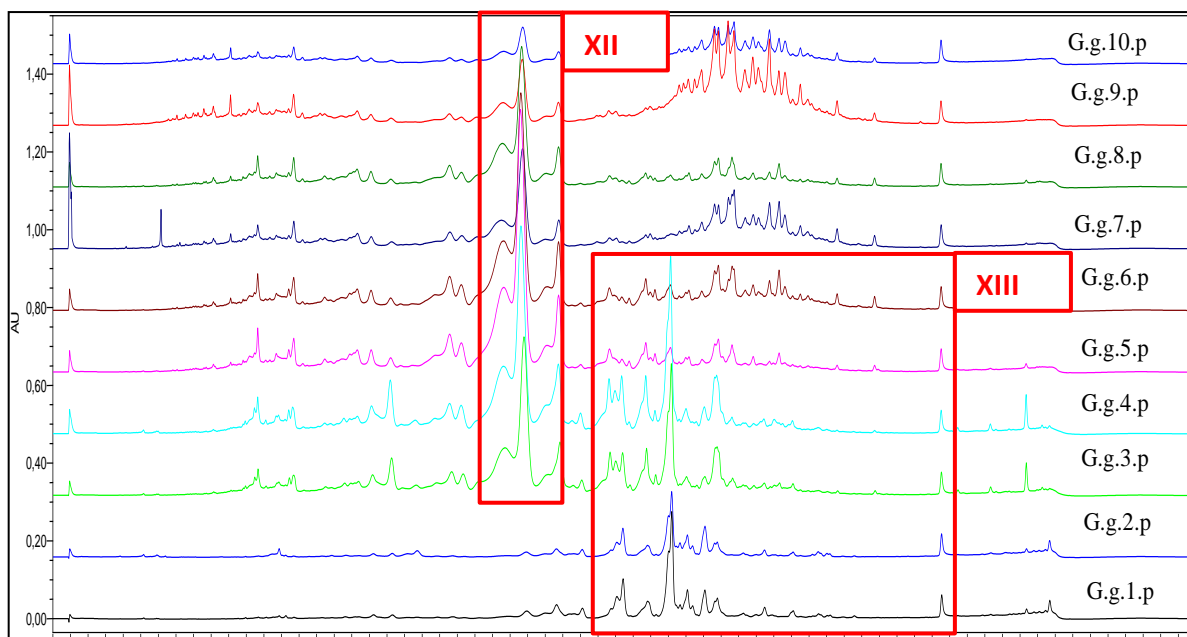
Πίνακας 63. Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης και αναστολής της τυροσινάσης των αρχικών εκχυλισμάτων της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Βιολογικά τεστ εκχυλισμάτων Υ.Ε.(SFE500)		
	DPPH (%) (C=200μg/mL)	Αναστολή τυροσινάσης (IC <sub>50</sub> )
G.g.1.p	19.29	30.68
G.g.2.p	18.09	83.10
G.g.3.p	67.89	1.77
G.g.4.p	65.27	1.91
G.g.5.p	70.74	0.98
G.g.6.p	80.56	1.45
G.g.7.p	67.82	2.08
G.g.8.p	68.20	1.01
G.g.9.p	88.03	2.71
G.g.10.p	85.64	3.21
Πρότυποι αναστολείς	Γαλλικό οξύ (σστα 200 μg/mL 100% αναστολή)	Kojic acid IC <sub>50</sub> ≈1.34 μg/mL

Ο αρχικός έλεγχος των εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική δράση, έδειξε δείγματα με καλή ικανότητα αναστολής της ρίζας, ιδίως αυτά που παραλήφθησαν με 5% και 10% αιθανόλη (**G.g.5p** έως **G.g.10p**). Η προσθήκη συνδιαλύτη, φαίνεται ότι αυξάνει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση γεγονός που οφείλεται στην αύξηση της διαλυτικής ικανότητας της κινητής φάσης και στην εκχύλιση πιο πολικών, δραστικών συστατικών. Αντίστοιχα, ο έλεγχος των εκχυλισμάτων για τη δράση τους έναντι της τυροσινάσης, έδειξε δείγματα ιδιαίτερα δραστικά στο ένζυμο. Συγκεκριμένα, τα κλάσματα που παραλήφθησαν με 5% συνδιαλύτη παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου και μάλιστα τόσο ισχυρή όσο αυτή του πρότυπου αναστολέα. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερης σημασίας αν αναλογισθεί κανείς ότι αφορά ολικό εκχύλισμα και όχι κάποιον απομονωμένο μεταβολίτη. Όμως σε αντίθεση με την αντιοξειδωτική ικανότητα, η δράση έναντι της τυροσινάσης φαίνεται να μειώνεται με την αύξηση του συνδιαλύτη. Η χρήση 10% αιθανόλης προκαλεί μία ελαφριά μείωση στη δράση του εκχυλίσματος που όπως θα αποδειχθεί παρακάτω (Εικόνα 119), οφείλεται στην προγενέστερη εξαντλητική παραλαβή της δραστικής ουσίας και στην εκχύλιση άλλων, λιγότερων δραστικών μεταβολιτών.

### **11.8.2 Χρωματογραφικός έλεγχος HPLC και TLC**

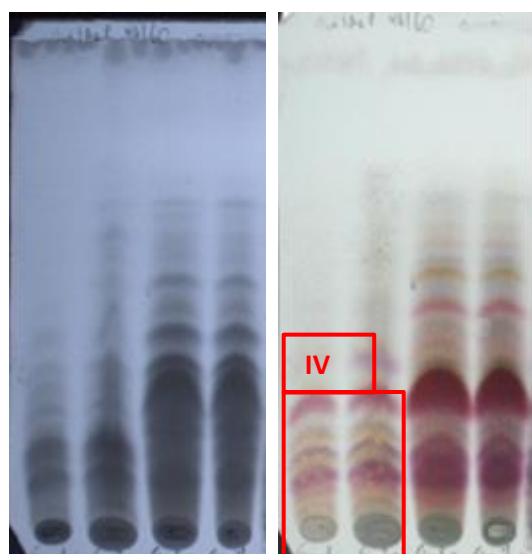
Στη συνέχεια ακολούθησε ο ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με τη χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν δείγματα γνωστής συγκέντρωσης (5 mg/mL) και αναλύθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση του φυτοχημικού προφίλ τους. Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 119).



Εικόνα 119. Χρωματογραφήματα κλασμάτων υπερκρίσιμης εκχύλισης στα 280 nm.

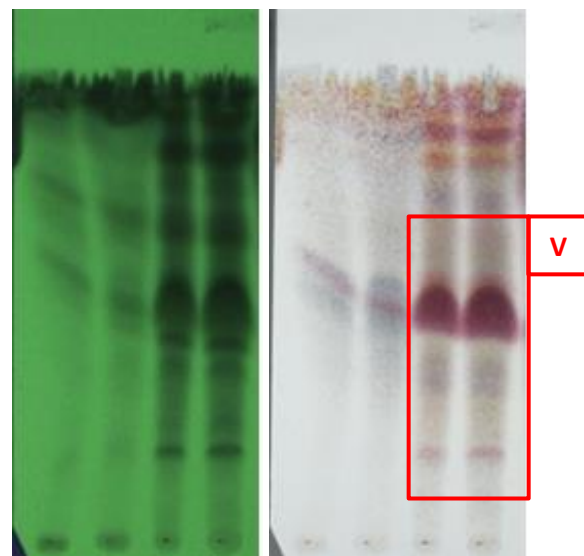
Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση βαθμιδωτής μεταβολής με ανάμιξη δύο διαλυτών: A (H<sub>2</sub>O + 1% οξικό οξύ) και B (ακετονιτρίλιο + 1% οξικό οξύ) και στήλη αντιστρόφου φάσης HS C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm) Fortis Technologies Ltd. UniverSil. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1 mL/min, ενώ το σύστημα έκλουσης ήταν το ακόλουθο: 0-10 min βαθμιδωτό μέχρι 37.0% B; 10-30 min ισοκρατικό και από 30-60 min βαθμιδωτό έως 100% B.

Επιπροσθέτως, τα δείγματα αναλύθηκαν και με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Εικόνα 120 και Εικόνα 121).



G.g.1p G.g.3p G.g.5p G.g.7p G.g.1p G.g.3p G.g.5p G.g.7p

Εικόνα 121. Σύστημα ανάπτυξης H<sub>2</sub>O/AcN 40/60 - TLC αντιστρόφου φάσεως



G.g.1p G.g.3p G.g.5p G.g.7p G.g.1p G.g.3p G.g.5p

Εικόνα 120. Σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 95/5 - TLC κανονικής φάσεως

Από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων προκύπτει ότι με τη χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> (χωρίς προσθήκη συνδιαλύτη) γίνεται η παραλαβή των μη-πολικών συστατικών των ριζών της γλυκύρριζας (Εικόνα 119), ενώ με τη σταδιακή αύξηση του ποσοστού της αιθανόλης αυξάνεται η διαλυτική ικανότητα του μίγματος και εκχυλίζονται περισσότερα συστατικά (Εικόνα 119 και 120 με επισημάνσεις **XIII** και **V**). Ταυτοχρόνως, η δράση των εκχυλισμάτων στη τυροσινάση φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση του μεταβολίτη XII στην Εικόνα 119, που όπως αποδείχτηκε στη συνέχεια πρόκειται για τη γκλαμπριντίνη, μόριο γνωστό για τη δράση του στο ένζυμο [297],[298],[285].

## **11.9 Βελτιστοποίηση υπερκρίσιμης εκχύλισης με τη χρήση του Design of Experiments (DOE)**

### **11.9.1 Εκτέλεση διαγνωστικών πειραμάτων (Screening design) υπερκρίσιμης εκχύλισης**

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι τα εκχυλίσματα της Υ.Ε. παρουσιάζουν αξιόλογη δράση έναντι του ενζύμου της τυροσινάσης. Έτσι λοιπόν, προβήκαμε στη μελέτη βελτιστοποίησης της διεργασίας με σκοπό την παραγωγή εκχυλισμάτων με ισχυρή δράση στο ένζυμο, υψηλό φορτίο σε φλαβονοειδή και καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επειδή όμως η διεργασία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, αρχικά έλαβε χώρα μία μελέτη εύρεσης των στατιστικά σημαντικών παραμέτρων, ώστε να γίνει ο καθορισμός εκείνων οι οποίες πραγματικά επηρεάζουν τη διεργασία, μεταξύ αυτών που έχουν μικρή επίπτωση σε αυτή. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνεται σημαντικά ο αριθμός των μεταβλητών βελτιστοποίησης και κατ' επέκταση ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού εφαρμόστηκε ένας παραγοντικός σχεδιασμός 2 επιπέδων (2-Level Factorial) [56],[324], για την αξιολόγηση των παραμέτρων της θερμοκρασίας, της πίεσης, της ροής του διαλύτη, της κοκκομετρίας, του ποσοστού της υγρασίας και του ποσοστού του συνδιαλύτη.

Σε γενικές γραμμές ο σχεδιασμός περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- i. Τον ορισμό των βασικών παραμέτρων

- ii. Την επιλογή του αριθμού των προς εκτέλεση πειραμάτων, καθώς στα πλαίσια ενός πλήρη σχεδιασμού απαιτούνται συνολικά  $2^n$  πειράματα ( $n$  ο αριθμός των παραμέτρων). Στο συγκεκριμένο σχεδιασμό επιλέχθηκε να γίνει μείωση του αριθμού των πειραμάτων στο  $\frac{1}{4}$  του πλήρους σχεδιασμού ( $2^{n-2}$ ), όριο το οποίο θεωρείται ασφαλές για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων χωρίς την ύπαρξη μεγάλου σφάλματος
- iii. Την εκτέλεση των προτεινόμενων πειραμάτων και καταγραφή των αντίστοιχων αποκρίσεων
- iv. Και τέλος τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την εξαγωγή συμπερασμάτων και την αξιολόγηση της βαρύτητας των επιλεγμένων παραμέτρων

Συνολικά, μελετήθηκαν 6 αριθμητικοί παράμετροι (numerical factors), τα όρια των οποίων ορίστηκαν ως εξής:

- Θερμοκρασία: 40 έως 65 °C [325]
- Πίεση: 100 έως 300 bar
- Ροή CO<sub>2</sub>: 1 έως 3 kg/h
- Ποσοστό συνδιαλύτη: 0 έως 10%
- Υγρασία πρώτης ύλης: 7 έως 21% [326]
- Μέγεθος των σωματιδίων: 0~200, 315~500 και 630~1000 μm

Ως αποκρίσεις του διαγνωστικού σχεδιασμού ορίστηκαν:

- η απόδοση (%)
- η αντιοξειδωτική δράση έναντι της ελεύθερης ρίζας DPPH (τελική συγκέντρωση 500 μg/mL)
- η αντιοξειδωτική δράση έναντι της ελεύθερης ρίζας ABTS (IC<sub>50</sub>)
- το φορτίο σε φλαβονοειδή (mg κερκετίνης/g εκχυλίσματος) και
- η ανασταλτική δράση στην τυροσινάση (τελική συγκέντρωση 100 μg/mL)

Εισάγοντας τα δεδομένα στο υπολογιστικό πρόγραμμα, προτάθηκαν από το σχεδιασμό 20 συνολικά πειράματα, εκ των οποίων τα 16 επιλέχτηκαν σε τυχαίες συνθήκες (randomized) και τα 4 ήταν κεντρικά σημεία (center points). Το σύνολο των πειραμάτων μαζί με τα αποτελέσματα των αντίστοιχων αποκρίσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.



Πίνακας 64. Πειραματικός σχεδιασμός 2-Level Factorial της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

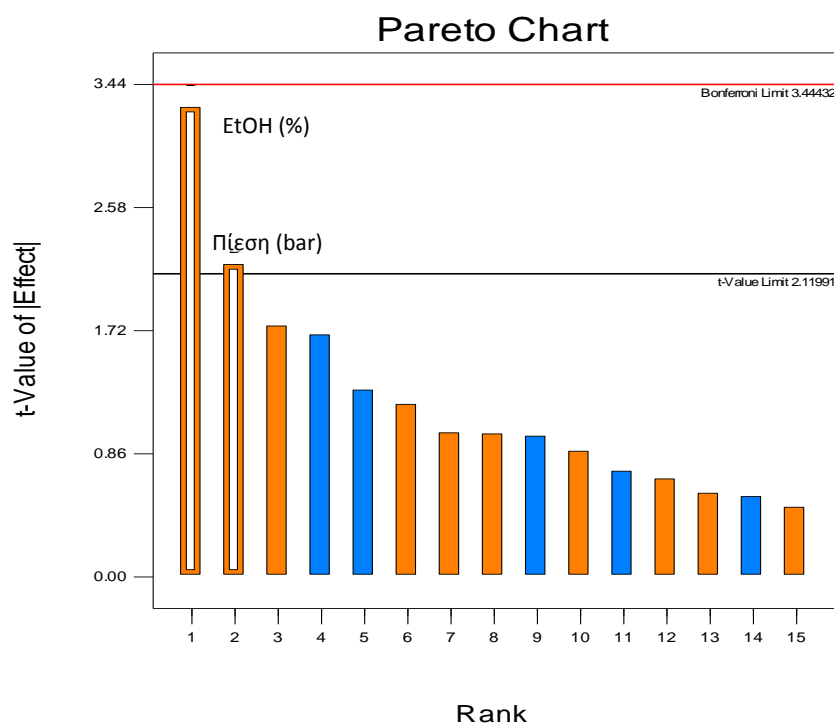
Παράμετροι							Αποκρίσεις				
Δείγμα	Θερμ/σία (°C)	Πίεση (bar)	Ροή (kg/h)	Συν/της (%)	Κοκ/τρία (μm)	Υγρασία (%)	Απόδοση (%)	DPPH (%)*	TFE (mg Κερ/g εκχ)	ABTS (IC <sub>50</sub> )**	Τυρ/ση (%)***
G.g.Run 4	40	100	1	10	0~200	21	1.69	83.39	41.88	12.90	94.14
G.g.Run 5	40	300	3	10	0~200	21	3.51	75.46	35.99	18.46	86.66
G.g.Run 6	40	300	1	10	630~1000	7	1.52	90.48	45.99	12.80	85.26
G.g.Run 11	40	300	3	0	0~200	7	0.36	31.85	21.22	48.10	55.81
G.g.Run 13	40	300	1	0	630~1000	21	0.32	71.24	27.74	31.59	87.99
G.g.Run 17	40	100	3	0	630~1000	21	0.28	30.56	15.50	60.61	49.65
G.g.Run 19	40	100	1	0	0~200	7	0.22	10.46	18.11	453.22	15.07
G.g.Run 20	40	100	3	10	630~1000	7	2.89	91.96	43.76	11.43	87.69
G.g.Run 2	52.5	200	2	5	315~500	14	1.91	83.90	35.99	8.37	91.30
G.g.Run 8	52.5	200	2	5	315~500	14	1.90	90.02	45.70	8.05	87.00
G.g.Run 10	52.5	200	2	5	315~500	14	3.58	91.02	46.16	7.74	83.57
G.g.Run 12	52.5	200	2	5	315~500	14	0.99	92.16	51.96	9.57	88.18
G.g.Run 1	65	300	3	10	630~1000	21	3.08	91.82	43.12	9.89	93.19
G.g.Run 3	65	100	3	10	0~200	7	0.29	25.86	13.80	97.44	54.57
G.g.Run 7	65	100	1	0	630~1000	7	0.66	8.68	17.03	1214.60	0.26
G.g.Run 9	65	300	3	0	630~1000	7	0.78	42.57	27.40	38.29	79.80
G.g.Run 14	65	300	1	0	0~200	21	0.38	22.30	16.56	42.40	55.65
G.g.Run 15	65	300	1	10	0~200	7	1.42	71.42	27.12	15.01	89.60
G.g.Run 16	65	100	1	10	630~1000	21	0.15	25.36	15.31	125.85	43.11
G.g.Run 18	65	100	3	0	0~200	21	0.07	3.92	12.97	490.35	13.57

Πρότυποι αναστολείς: \*Γαλλικό οξύ: 100% inh σε C=200 μg/mL, \*\*Trolox = IC<sub>50</sub>≈8 μg/mL, \*\*\*Kojic acid = IC<sub>50</sub>≈1.34 μg/mL

Όλες οι παραπάνω αναλύσεις έγιναν με βάση τις μεθόδους και τα πρωτόκολλα που παρουσιάζονται στην παράγραφο 'Υλικά και Μέθοδοι'. Στη συνέχεια, τα δεδομένα επεξεργαστήκαν κατάλληλα με τη μέθοδο ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και προέκυψε ότι από το σύνολο των 6 παραμέτρων που μελετήθηκαν, τρεις ήταν οι στατιστικά σημαντικοί, οι οποίοι επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη διεργασία της Υ.Ε. (% ποσοστό του συνδιαλύτη, η πίεση και η θερμοκρασία).

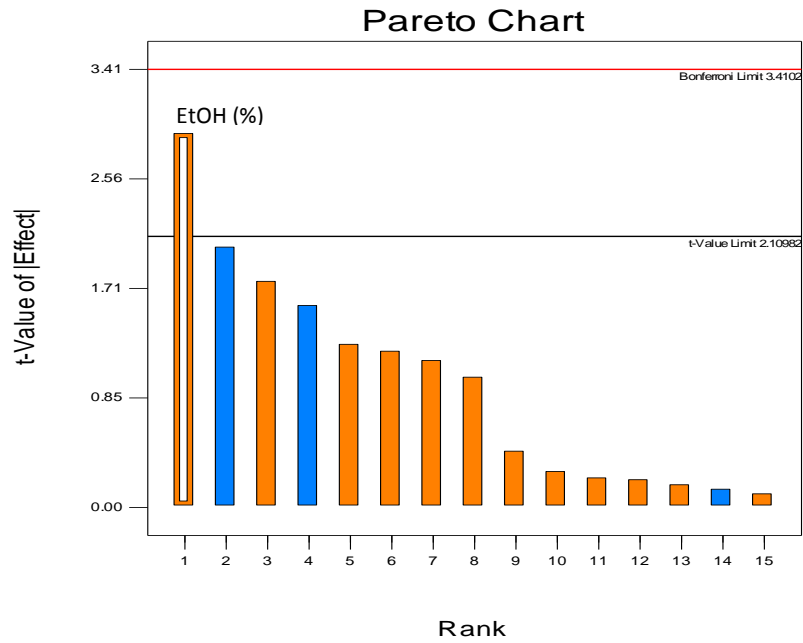
Συγκεκριμένα, η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι οι παράμετροι που επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τις μεταβολές της απόδοσης ήταν: το ποσοστό του συνδιαλύτη και η πίεση (διάγραμμα Pareto), καθώς είναι οι μοναδικές παράμετροι οι οποίες ξεπερνούν το όριο t-value = 2.11 (Εικόνα 122). Τα όρια Bonferroni και t-value παρέχουν μία εκτίμηση για το αν το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό με πιθανότητα του σφάλματος να είναι μικρότερη του 5%

[327]. Επιπλέον, οι προαναφερόμενοι παράμετροι είχαν θετική επίδραση στη συγκεκριμένη απόκριση, καθώς η αύξησή τους έχει σαν συνέπεια την αύξηση της απόδοσης (πορτοκαλί χρώμα στο διάγραμμα).



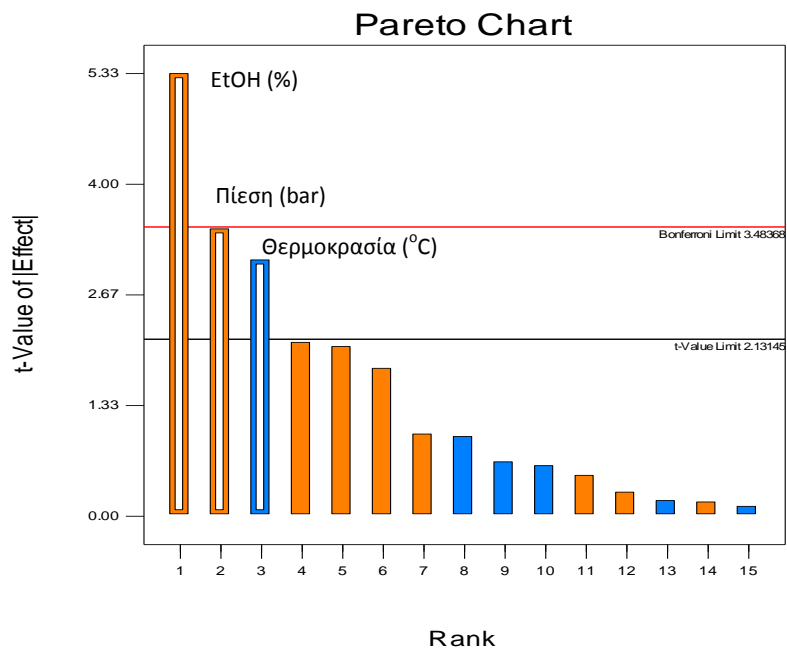
Εικόνα 122. Διάγραμμα Pareto για την απόδοση της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Ανάλογα συμπεράσματα προκύπτουν και για την ανάλυση των τιμών του φορτίου σε ολικά φλαβονοειδή (TFC). Το διάγραμμα Pareto έδειξε την σημαντική επίδραση του συνδιαλύτη στις τιμές της απόκρισης (με ακρίβεια  $p\text{-value} < 0.05$ ), καθώς είναι η μοναδική παράμετρος που περνάει το όριο  $t\text{-value} = 2.11$  (Εικόνα 123), με το ποσοστό του συνδιαλύτη να έχει θετική επίδραση στην απόκριση (πορτοκαλί χρώμα).



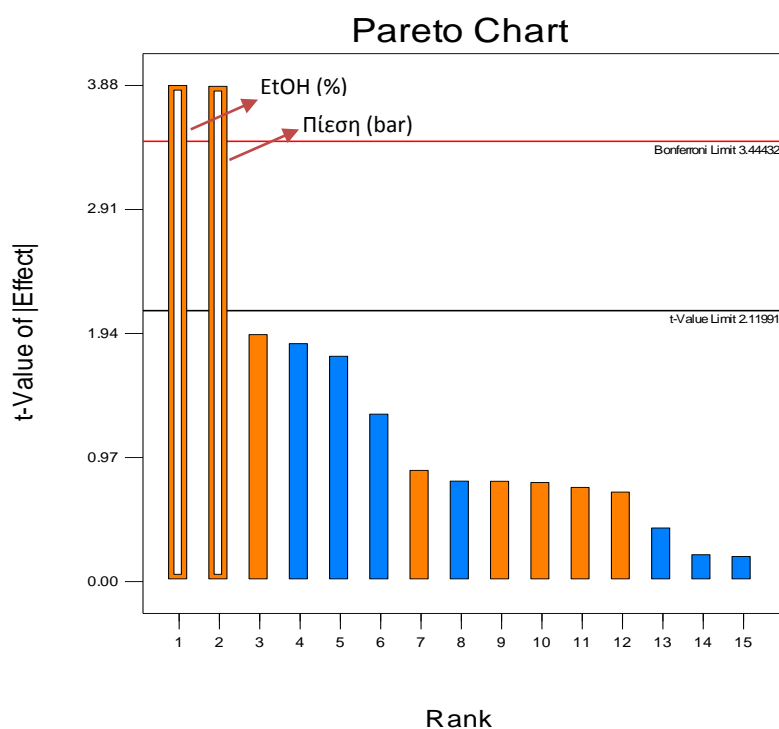
Εικόνα 123. Διάγραμμα Pareto για τα ολικά φλαβονοειδή της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Το διάγραμμα Pareto για την αντιοξειδωτική δράση έναντι του DPPH έδειξε ότι η απόκριση επηρεάζεται από τρεις παράγοντες ( $p$ -value<0.05), το ποσοστό του συνδιαλύτη, την πίεση και τη θερμοκρασία, με τους δύο πρώτους να έχουν θετική επίδραση στην απόκριση (πορτοκαλί χρώμα), ενώ ο τρίτος να έχει αρνητική (μπλε χρώμα) (Εικόνα 124).



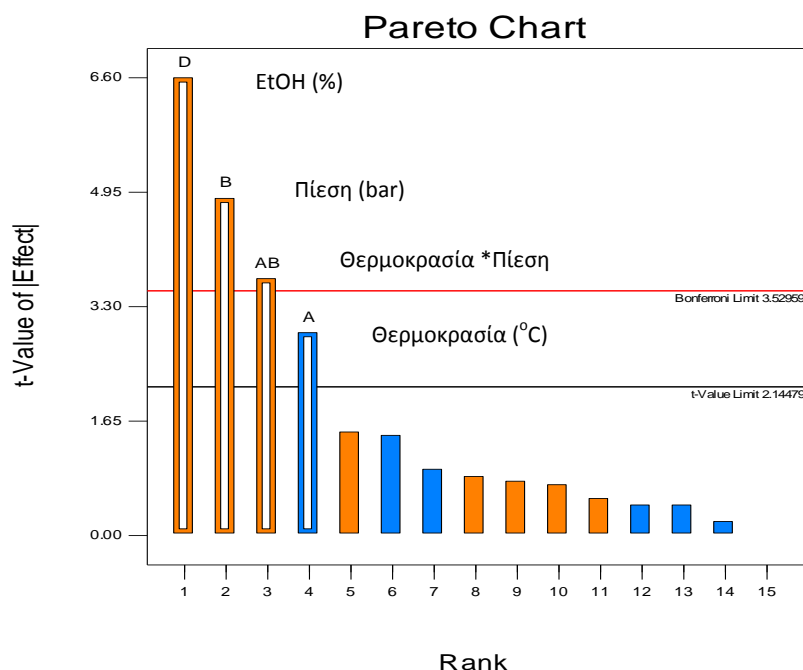
Εικόνα 124. Διάγραμμα Pareto για την αντιοξειδωτική δράση (DPPH) της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Όσον αφορά, την αναστολή στην τυροσινάση, το διάγραμμα Pareto έδειξε ότι η απόκριση επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την πίεση και το ποσοστό του συνδιαλύτη ( $p$ -value<0.05), με τις δύο παραμέτρους να έχουν θετική επίδραση στην απόκριση. (Εικόνα 125). Μάλιστα, οι δύο παράμετροι έχουν τόσο ισχυρή επίδραση που ξεπερνούν το πιο αυστηρό όριο Bonferroni = 3.44.



Εικόνα 125. Διάγραμμα Pareto για την ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Για την αντιοξειδωτική δράση έναντι του ABTS, το διάγραμμα Pareto έδειξε ότι η απόκριση επηρεάζεται από τέσσερις παραμέτρους ( $p$ -value<0.05), το ποσοστό του συνδιαλύτη, την πίεση, τη θερμοκρασία και το γινόμενο πίεσης - θερμοκρασίας. Και οι τέσσερις παράμετροι δίνουν τιμές πάνω από το όριο t-value, με τις περισσότερες εξ αυτών να έχουν θετική επίδραση εξαιρώντας τη θερμοκρασία που έχει αρνητική (μπλε χρώμα) (Εικόνα 126).



Εικόνα 126. Λιάγραμμα Pareto για την αντιοξειδωτική δράση (ABTS) της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Για όλες τις παραπάνω αποκρίσεις, η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι οι τιμές των F-Values είναι αρκετά μεγάλες, ώστε οι επιδράσεις των παραμέτρων του μοντέλου να θεωρούνται σημαντικές και τα αποτελέσματα αξιόπιστα. Επίσης, οι τιμές του 'adequate precession', για όλες τις αποκρίσεις ήταν μεγαλύτερες του προτεινόμενου ορίου 4, το οποίο υποδηλώνει ότι η αναλογία σήματος - θορύβου είναι μικρότερη από το πραγματικό μέγεθος της επίδρασης και ότι τα αποτελέσματα δεν επηρεάζονται από το θόρυβο (Πίνακας 65).

Επίσης, τα αποτελέσματα των αποκρίσεων ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία έκτροπων τιμών (outliers). Ο έλεγχος έγινε μέσω των normal probability tests, απ' όπου προέκυψε η απουσία άστοχων πειραμάτων (outliers).

Πίνακας 65. Πίνακας χαρακτηριστικών μεγεθών ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τις παραμέτρους διαγνωστικού σχεδιασμού (Screening design)

	Απόδοση	TFE	DPPH	Τυροσινάση	ABTS
<b>F-Value</b>	7.78	8.47	16.64	15.04	16.90
<b>Adequate precession</b>	6.11	6.91	11.87	8.67	15.40
<b>Έκτροπες τιμές (Outliers)</b>	x	x	x	x	x

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, προκύπτει ότι οι παράμετροι που ελέγχουν σε σημαντικό βαθμό τη διαδικασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης είναι το ποσοστό του συνδιαλύτη, η πίεση και η θερμοκρασία, με τις δύο πρώτες παραμέτρους να έχουν θετική επίδραση στις αποκρίσεις, ενώ η θερμοκρασία να έχει αρνητική στις τιμές του DPPH και του ABTS. Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά οι επιδράσεις όλων των παραμέτρων.

**Πίνακας 66. Επίδραση παραμέτρων στις αντίστοιχες αποκρίσεις για τα Screening πειράματα της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra***

	Ποσ. συνδιαλύτη (%)	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Ροή (kg/h)	Υγρασία (%)	Κοκκομετρία (μm)
Απόδοση	↑	↑	x	x	x	x
DPPH	↑	↑	↓	x	x	x
TFC	↑	x	x	x	x	x
ABTS	↑	↑	↓	x	x	x
Τυροσινάση	↑	↑	x	x	x	x

### 11.9.2 Μελέτη βελτιστοποίησης της διεργασίας Υ.Ε.

Μετά τον προσδιορισμό των σημαντικών παραμέτρων (Πίνακας 66) ακολούθησε η βελτιστοποίηση της διεργασίας της Υ.Ε με στόχο την παραγωγή εκχυλισμάτων με υψηλές αποδόσεις, πλούσιο φορτίο σε φλαβονοειδή και ισχυρή δράση στους ελέγχους έναντι του DPPH, του ABTS και του ενζύμου της τυροσινάσης. Από την παρατήρηση του Πίνακα 66 προέκυψε ότι η μοναδική παράμετρος με αρνητική επίδραση στις αποκρίσεις είναι η θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, η αύξησή της έδειξε να έχει αρνητική επίπτωση επάνω στις τιμές των αποκρίσεων έναντι του DPPH και του ABTS, γεγονός μη επιθυμητό, μιας και ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι η αριστοποίηση της διεργασίας της Υ.Ε. για τη μεγιστοποίηση της δράσης του εκχυλίσματος. Έτσι λοιπόν, αποφασίστηκε η παράμετρος της θερμοκρασίας να οριστεί στη μικρότερη μελετώμενη τιμή (40°C), ώστε να διασφαλισθεί η βέλτιστη τιμή των αποκρίσεων.

Για το συγκεκριμένο σκοπό επιλέχθηκε ο 'Central Composite' σχεδιασμός (CCD) της Μεθόδου Επιφάνειας Απόκρισης (RSM), λόγω της ικανότητας του να παρέχει αξιόλογα αποτελέσματα [328],[58]. Συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός αυτός χρησιμοποιεί το πολυώνυμο [i] για να περιγράψει τις μεταβολές των αποκρίσεων συναρτήσει των παραμέτρων, εκτελώντας  $2^k + 2k + n_0$  πειράματα, όπου k ο αριθμός των παραμέτρων και  $n_0$  ο αριθμός των κεντρικών σημείων (center points) [329].

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j>1}^3 \beta_{ij} \chi_i \chi_j \quad [i]$$

Όπου: Y η απόκριση,  $\chi_i$  και  $\chi_j$  οι ανεξάρτητες μεταβλητές,  $\beta_0$  το σημείο τομής του οριζόντιου άξονα και  $\beta_i, \beta_j, \beta_{ii}$  και  $\beta_{ij}$ , οι συντελεστές παλινδρόμησης (regression coefficients) [330],[325].

Αναλυτικότερα, ο CCD σχεδιασμός περιλαμβάνει:

1. Ένα σύνολο πειραμάτων σχεδιασμένων με τέτοιο τρόπο ώστε να λαμβάνονται υπόψη όλες οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων παραμέτρων [60]
2. Ένα σύνολο πειραμάτων σε σταθερές συνθήκες για τη μελέτη της επαναληψιμότητας (κεντρικά σημεία-center points)
3. Τη στατιστική επεξεργασία των αποκρίσεων για την εξαγωγή συμπερασμάτων
4. Και τέλος τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας μέσα από την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης

Ως αποκρίσεις του σχεδιασμού ορίσθηκαν οι εξής μεταβλητές:

- η απόδοση (%)
- η αντιοξειδωτική δράση έναντι του DPPH (σε συγκέντρωση 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
- η αντιοξειδωτική δράση έναντι του ABTS ( $\text{IC}_{50}$ )
- το φορτίο σε φλαβονοειδή (mg κερκετίνης/g εκχυλίσματος)
- και η αναστολή έναντι της τυροσινάσης ( $\text{IC}_{50}$ )

Για τις παραμέτρους οι οποίες δεν επηρεάζουν τη διεργασία, οι συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές: ροή 1 kg/h, ποσοστό υγρασίας 7.77% και κοκκομετρία από 0~200  $\mu\text{m}$  [325]. Εισάγοντας τα δεδομένα στο πρόγραμμα, προτάθηκαν συνολικά 13 πειράματα, 9 σε τυχαίες συνθήκες και 4 κεντρικά σημεία (center points), τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 67. Πίνακας παραμέτρων και αποκρίσεων του Central composite σχεδιασμού της διεργασίας της Υ.Ε.

Δείγμα	EtOH (%)	Πίεση (bar)	Απόδοση (%)	Τυροσινάση (IC <sub>50</sub> )*	DPPH (250 μg/mL)**	ABTS (IC <sub>50</sub> ***)	TFE (mg κερ/g εκχ)
<b>G.g.Run.1 Opt</b>	5	200	1.80	0.41	60.03	13.48	22.12
<b>G.g.Run.2 Opt</b>	5	200	1.76	0.45	61.56	15.15	23.27
<b>G.g.Run.3 Opt</b>	0.00	200	0.57	5.59	17.76	50.71	13.35
<b>G.g.Run.4 Opt</b>	5	200	1.99	0.36	64.69	11.18	24.48
<b>G.g.Run.5 Opt</b>	8.54	270	1.85	0.42	69.28	13.97	29.2
<b>G.g.Run.6 Opt</b>	5	200	2.65	0.25	79.52	10.34	35.94
<b>G.g.Run.7 Opt</b>	10	200	2.68	0.26	73.62	9.14	37
<b>G.g.Run.8 Opt</b>	1.46	129	0.89	0.50	33.31	27.15	11.6
<b>G.g.Run.9 Opt</b>	5	100	0.89	0.47	41.59	22.98	14.18
<b>G.g.Run.10 Opt</b>	5	300	1.95	0.27	68.12	11.74	28.01
<b>G.g.Run.11 Opt</b>	8.54	129	1.27	0.25	56.79	16.16	21.1
<b>G.g.Run.12 Opt</b>	5	200	1.54	0.47	53.86	16.99	20.33
<b>G.g.Run.13 Opt</b>	1.46	270	1.22	0.32	57.86	13.57	18.89

Πρότυποι αναστολείς: \* Γαλλικό οξύ: 100% inh με C=200 μg/mL, \*\*Trolox = IC<sub>50</sub>≈8μg/mL, \*\*\*Kojic acid = IC<sub>50</sub>≈1.34μg/mL

Όλες οι παραπάνω αναλύσεις έγιναν με βάση τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στο κεφάλαιο 'Υλικά και μέθοδοι'. Από την διερεύνηση των αποτελεσμάτων του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 67) παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του δείγματος **G.g.Run.6 Opt** δε συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα των υπόλοιπων κεντρικών πειραμάτων (center points), γι' αυτό το λόγο θεωρήθηκαν 'έκτροπες' και δε συμπεριλήφθηκαν στους ακόλουθους υπολογισμούς. Ακόμη, από την παρατήρηση των τιμών προκύπτουν μερικά σημαντικά συμπεράσματα, ιδιαίτερα όσον αφορά τη δράση έναντι της τυροσινάσης. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν πολύ ισχυρή δράση στο ένζυμο και ιδίως τα εκχυλίσματα **G.g.Run.7 Opt**, **G.g.Run.10 opt** και **G.g.Run.11 Opt**, των οποίων η ανασταλτική δράση είναι έως και 5 φορές πιο ισχυρή από αυτή του πρότυπου αναστολέα. Επιπλέον, τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν καλές τιμές αντιοξειδωτικής δράσης και υψηλό φορτίο σε φλαβονοειδή, με δραστικότερα εξ αυτών να είναι τα δείγματα στα οποία γίνεται χρήση υψηλών πιέσεων και ποσοστού συνδιαλύτη (**G.g.Run.5 Opt**, **G.g.Run.7 Opt** και **G.g.Run. 10 opt**).

Για την εξαγωγή όμως περισσότερων συμπερασμάτων, τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν κατάλληλα με τη βοήθεια του προγράμματος (DOE) από όπου και προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

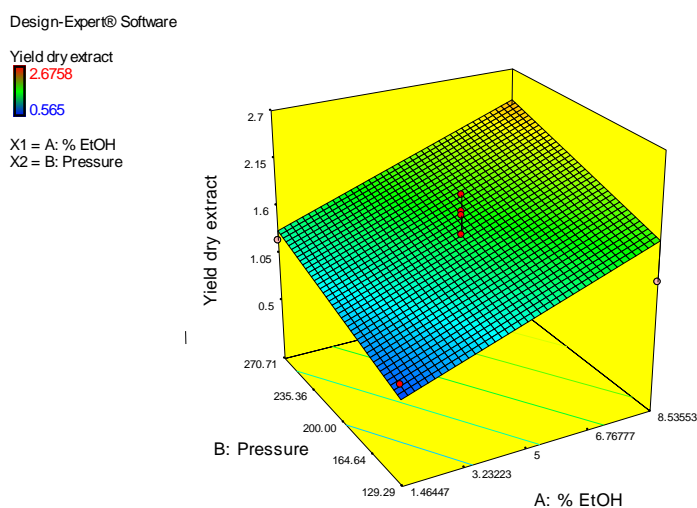


- Απόδοση

Όσον αφορά την απόδοση, προτάθηκε από το πρόγραμμα το γραμμικό μοντέλο για να περιγράψει τις μεταβολές τις απόκρισης συναρτήσει των παραμέτρων, με την εξίσωση να έχει την ακόλουθη μορφή:

$$\text{Απόδοση (\%)} = -0.022811 + (0.14143 * \text{EtOH}) + (4.24931\text{E-}003 * \text{Πίεση}) \quad [\text{ii}]$$

Στη συνέχεια παρατίθεται η διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης απόδοσης - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη (Εικόνα 127).

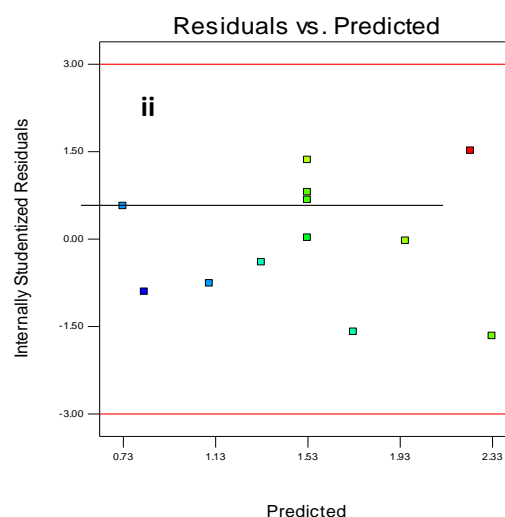
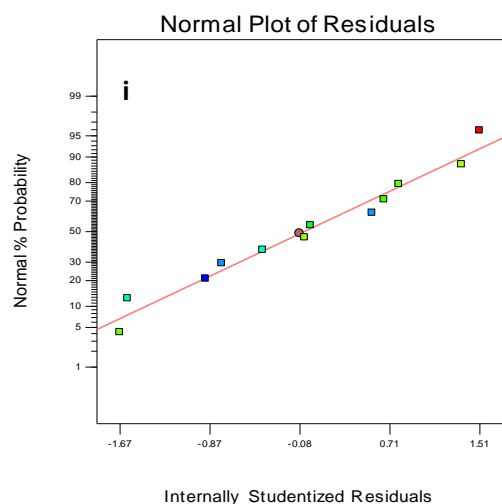


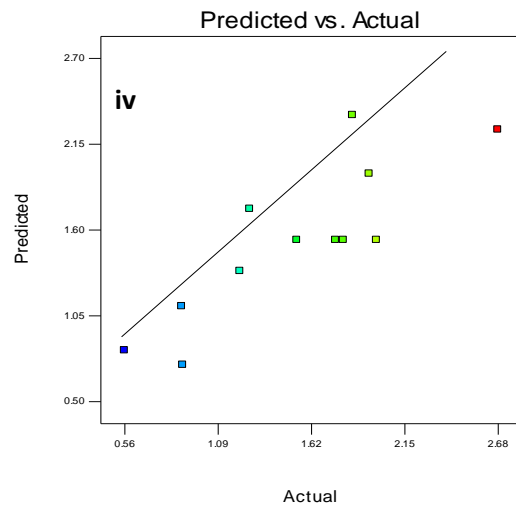
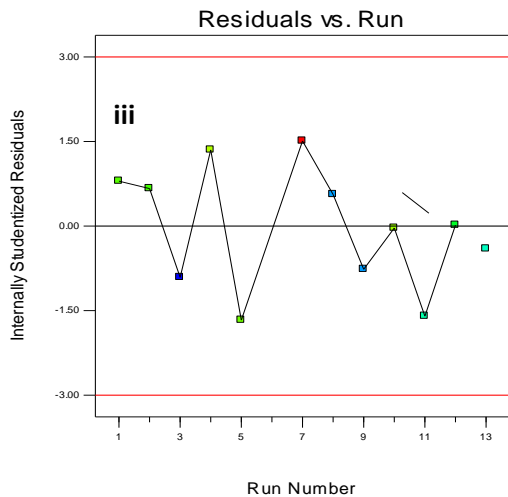
Εικόνα 127. Διάγραμμα απόδοσης - πίεσης και ποσοστού συνδιαλύτη για την Υ.Ε. των ριζών του φυτού *G. glabra*

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές της απόδοσης ως συνάρτηση των παραμέτρων με F-Value=10.95 και p-value=0.0039. Επιπλέον, υπολογίσθηκαν και οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης  $R^2=0.7088$ , adjusted  $R^2=0.6441$  και predicted  $R^2=0.4359$ , ενώ από το 'μοντέλο κανονικής κατανομής' (normal probability test) επιβεβαιώθηκε η καταλληλότητα προσαρμογής του μοντέλου και η απουσία έκτροπων τιμών (outliers) (Εικόνα 127). Για τους συντελεστές διακύμανσης adjusted  $R^2$  και predicted  $R^2$  διαφορές μεγαλύτερες του 0.2 θεωρούνται στατιστικά υψηλές γι' αυτό και προτείνεται από το πρόγραμμα το μοντέλο να εξετασθεί με προσοχή στο στάδιο της αριθμητικής βελτιστοποίησης, διότι υπάρχει ο κίνδυνος εσφαλμένης πρόρρησης

αποκρίσεων. Ακόμα, η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε στο 9.082, που είναι μεγαλύτερη του προτεινόμενου ορίου 4, το οποίο υποδηλώνει ότι η αναλογία σήματος / θορύβου είναι μικρότερη από το πραγματικό μέγεθος της επίδρασης και ότι τα αποτελέσματά δεν επηρεάζονται από το θόρυβο.

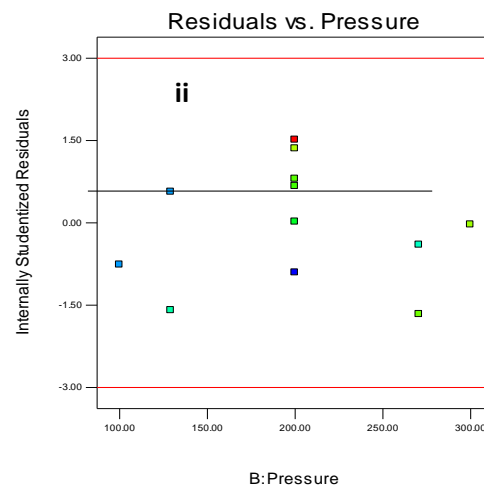
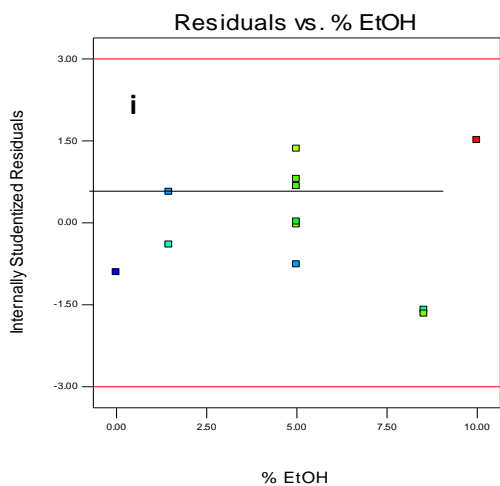
Στη συνέχεια, παρατίθενται τα διαγράμματα του διαγνωστικού ελέγχου για το μοντέλο από όπου φαίνεται ότι οι τιμές των υπολειμμάτων (residuals) έναντι των προβλεπόμενων τιμών είναι ομοιόμορφα κατανομημένες εκατέρωθεν της κεντρικής γραμμής χωρίς να παρουσιάζουν κάποια τάση και είναι ομοιόμορφα κατανομημένες εκατέρωθεν της γραμμής, χωρίς κάποια τιμή να βρίσκεται εκτός των προτεινόμενων ορίων (Εικόνα 128). Θετικό είναι το γεγονός ότι η σειρά εκτέλεσης των πειραμάτων, δεν παρουσίασε κάποια επίδραση στην απόκριση της απόδοσης, με τις τιμές των υπολειμμάτων (residuals) να βρίσκονται και αυτές εντός των επιθυμητών ορίων (Εικόνα 128). Το διάγραμμα προβλεπόμενων (Predicted) έναντι πειραματικών τιμών (Actual) ακολουθεί ευθεία γραμμή, γεγονός που υποδεικνύει καλή ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου.

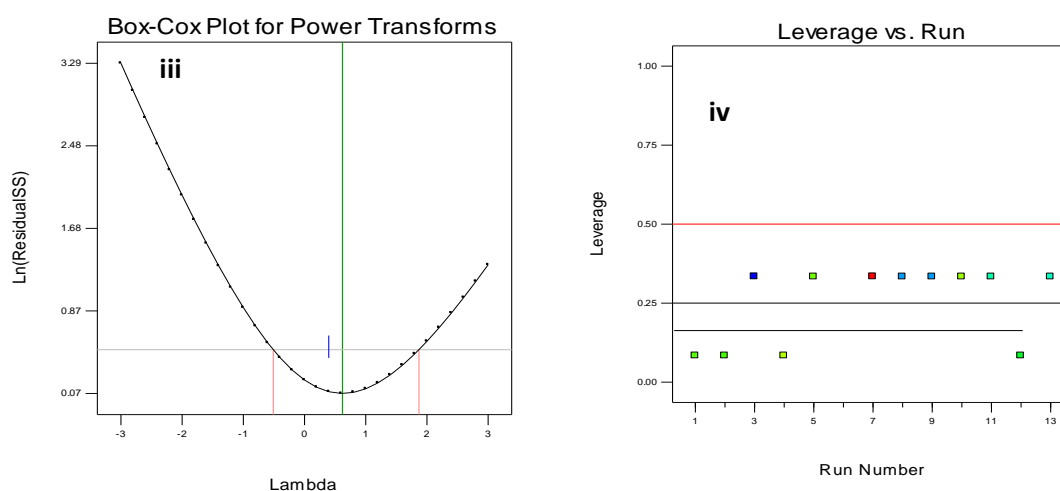




**Εικόνα 128. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση της απόδοσης**

Το διάγραμμα Box Cox έδειξε ότι δεν υπήρξε ανάγκη μετασχηματισμού των τιμών της απόκρισης (Εικόνα 129), ενώ από τις τιμές των υπολειμμάτων έναντι των παραμέτρων, φάνηκε η απουσία ετεροσκεδαστικότητας (Εικόνα 129). Τέλος, από την τιμή του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων (Run), προέκυψε ότι δεν υπάρχουν πειράματα που να έχουν στατιστικά μεγαλύτερη σημασία σε σχέση με τα υπόλοιπα (Εικόνα 129).





Εικόνα 129. i) και ii) Διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους EtOH και πίεσης αντίστοιχα iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόγλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση της απόδοσης

Πίνακας 68. Πίνακας τιμών ANOVA για την απόδοση της Υ.Ε. του φυτού *G.glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	2.27	2	1.36	10.95	0.0039
<b>A-% EtOH</b>	2.00	1	2.00	16.09	0.0031
<b>B-Πίεση</b>	0.72	1	0.72	5.81	0.0392
<b>Lack of Fit</b>	1.02	6	0.17	4.95	0.1086

Από τους παραπάνω ελέγχους βεβαιώνεται η αξιοπιστία του μοντέλου και η ικανότητα του να μπορεί περιγράψει και να προβλέψει τις τιμές της απόδοσης.

Τέλος, από τις τιμές του πίνακα καθώς και από την εξίσωση [ii] παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό του συνδιαλύτη είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόκριση.

- Αντιοξειδωτική δράση έναντι του DPPH

Για την καλύτερη συσχέτιση των αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής δράσης ήταν απαραίτητος ένας μετασχηματισμός των τιμών της απόκρισης.

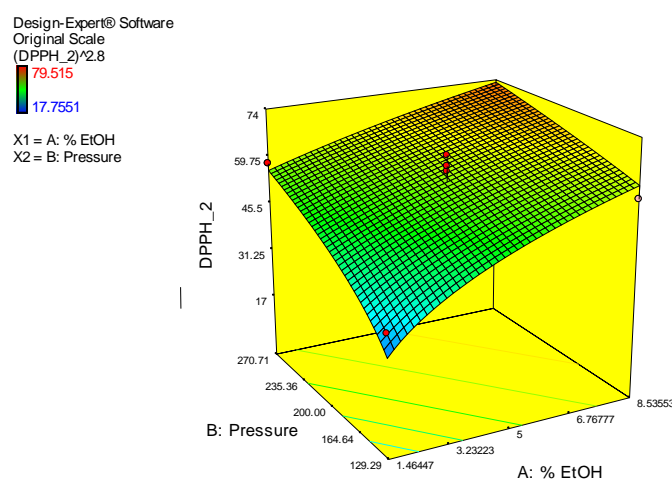
$$DPPH' = DPPH^{2.8}$$

Στη συνέχεια, τα δεδομένα επεξεργάστηκαν κατάλληλα και από το πρόγραμμα προτάθηκε το γραμμικό μοντέλο για να περιγράψει τις μεταβολές της

απόκρισης ( $p$ -value<0.0001), με τη μαθηματική εξίσωση να έχει την ακόλουθη μορφή:

$$DPPH' = -70902.30147 + (12521.55186 * \text{EtOH}) + (481.55142 * \text{Πίεση}) \quad [\text{iii}]$$

Η διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης αναστολή του DPPH - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 130).



Εικόνα 130. Διάγραμμα αντιοξειδωτικής δράσης DPPH - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη για την Υ.Ε. των ριζών του φυτού *G. glabra*

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές της αντιοξειδωτικής δράσης στο DPPH ως συνάρτηση των παραμέτρων ( $F$ -Value = 30.08 και  $p$ -value<0.0001). Επιπλέον, υπολογίσθηκαν οι τιμές των συντελεστών διακύμανσης  $R^2=0.8834$ , adjusted  $R^2=0.8575$  και predicted  $R^2=0.7917$ , ενώ από το 'normal probability test' αποδείχτηκε η καταλληλότητα της προσαρμογής του μοντέλου. Ακόμα, η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε στα 16.4, που είναι αρκετά μεγαλύτερη του προτεινόμενου ορίου 4, το οποίο υποδηλώνει ότι η αναλογία σήματος / θορύβου είναι μικρότερη από το πραγματικό μέγεθος της επίδρασης και συνεπώς τα αποτελέσματα είναι ανεξάρτητα του θορύβου.

Από τα διαγράμματα του διαγνωστικού ελέγχου (Παράρτημα ) προέκυψε ότι οι τιμές των υπολειμμάτων (residuals) έναντι των προβλεπόμενων τιμών δεν παρουσιάζουν κάποια τάση και είναι ομοιόμορφα κατανομημένες εκατέρωθεν της

γραμμής, χωρίς κάποια τιμή να βρίσκεται εκτός των προτεινόμενων ορίων. Επιπλέον, η σειρά εκτέλεσης των πειραμάτων δεν επηρέασε τα αποτελέσματα της απόκρισης, ενώ από το διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών (Predicted vs Actual) επιβεβαιώθηκε η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου (Παράρτημα)

Το διάγραμμα Box Cox έδειξε την καταλληλότητα του μετασχηματισμού (Παράρτημα), ενώ από τις τιμές των υπολειμμάτων έναντι των παραμέτρων φάνηκε η απουσία ετεροσκεδαστικότητας (Παράρτημα). Τέλος, από την τιμή του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων, προέκυψε ότι δεν υπάρχουν πειράματα που να έχουν στατιστικά μεγαλύτερη σημασία σε σχέση με τα υπόλοιπα (Παράρτημα).

Πίνακας 69. Πίνακας τιμών ANOVA για την αντιοξειδωτική δράση στο DPPH της Υ.Ε. του φυτού *G.glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	2.495E+010	2	1.248E+010	34.08	< 0.0001
<b>A-% EtOH</b>	1.568E+010	1	1.568E+010	42.83	0.0001
<b>B-Πίεση</b>	9.276E+009	1	9.276E+009	25.34	0.0007
<b>Lack of Fit</b>	2.134E+009	6	3.556E+008	0.92	0.5768

Από τους παραπάνω ελέγχους επιβεβαιώνεται η αξιοπιστία του μοντέλου και η ικανότητα περιγραφής και πρόβλεψης της αντιοξειδωτικής δράσης έναντι του DPPH.

Ολοκληρώνοντας, προκύπτει ότι η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι το ποσοστό της αιθανόλης είναι η παράμετρος με τη μεγαλύτερη επίδραση στη διεργασία της Υ.Ε. και ότι οι υψηλές τιμές της ευνοούν την παραλαβή εκχυλισμάτων με καλή αντιοξειδωτική δράση.

- Αντιοξειδωτική δράση έναντι του ABTS

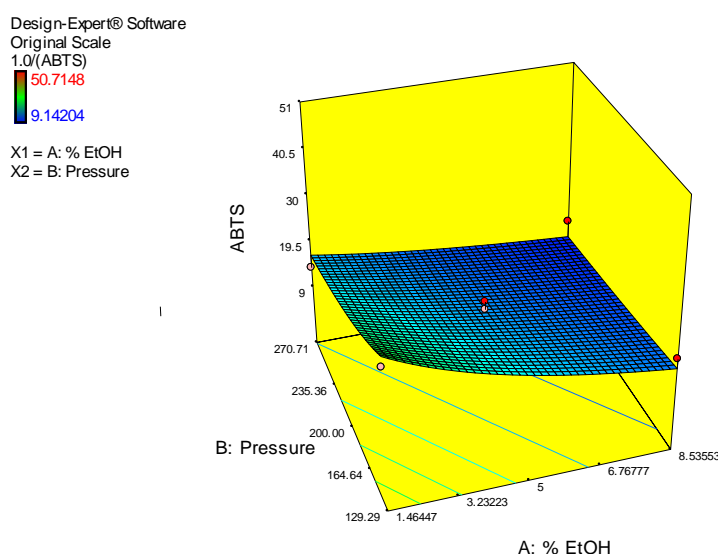
Και σε αυτή την περίπτωση μετασχηματισμός των τιμών της απόκρισης ήταν απαραίτητος για την καλύτερη συσχέτιση των αποτελεσμάτων. Ο μετασχηματισμός που εφαρμόστηκε είχε την ακόλουθη μορφή:

$$ABTS' = \frac{1}{ABTS}$$

Στη συνέχεια, τα δεδομένα επεξεργάστηκαν κατάλληλα και προτάθηκε το γραμμικό μοντέλο ( $p$ -value=0.097) για να περιγράψει τις μεταβολές της απόκρισης, με τη μαθηματική εξίσωση να είναι η ακόλουθη:

$$ABTS' = 2.08996E-003+(5.29412E-003 * EtOH)+(1.86489E-004* Πίεση) \quad [iv]$$

Η διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης αναστολή του ABTS - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 131).



Εικόνα 131. Διάγραμμα αντιοξειδωτικής δράσης ABTS - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη για την Υ.Ε. των ριζών του φυτού *G. glabra*

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές της αντιοξειδωτικής δράσης έναντι του ABTS ως συνάρτηση των παραμέτρων ( $F$ -Value = 8.10 και  $p$ -value=0.0097). Επιπλέον, υπολογίσθηκαν και οι τιμές των συντελεστών διακύμανσης  $R^2=0.6428$ , adjusted  $R^2=0.5634$  και predicted  $R^2=0.3061$ , ενώ από το 'normal probability test' φάνηκε η καταλληλότητα της προσαρμογής του μοντέλου. Για τους συντελεστές διακύμανσης adjusted  $R^2$  και predicted  $R^2$  διαφορές της τάξης του 0.2 θεωρούνται στατιστικά υψηλές γι' αυτό και προτείνεται από το πρόγραμμα το μοντέλο να εξετασθεί με προσοχή κατά το στάδιο της αριθμητικής βελτιστοποίησης, διότι υπάρχει ο κίνδυνος εσφαλμένης πρόρρησης αποκρίσεων. Ακόμα, η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε στα 7.931, που είναι ελαφρός υψηλότερη του προτεινόμενου ορίου 4, το οποίο υποδηλώνει ότι η αναλογία σήματος / θορύβου είναι μικρότερη από το

πραγματικό μέγεθος της επίδρασης και συνεπώς τα αποτελέσματά είναι ανεξάρτητα του θορύβου.

Από τα διαγράμματα του διαγνωστικού ελέγχου προέκυψε ότι οι τιμές των υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών δεν παρουσιάζουν κάποια τάση και είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες, χωρίς κάποια τιμή να βρίσκεται εκτός των προτεινόμενων ορίων. Επιπλέον, η σειρά εκτέλεσης των πειραμάτων δεν επηρέασε τα αποτελέσματα της απόκρισης, ενώ από το διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών επιβεβαιώθηκε η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου (Παράρτημα).

Το διάγραμμα Box Cox έδειξε την καταλληλότητα του μετασχηματισμού (Παράρτημα), ενώ από τις τιμές των υπολειμμάτων έναντι των παραμέτρων φάνηκε η απουσία ετεροσκεδαστικότητας (Παράρτημα). Τέλος, από την τιμή του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων, προέκυψε ότι δεν υπάρχουν πειράματα που να έχουν στατιστικά μεγαλύτερη σημασία σε σχέση με τα υπόλοιπα (Παράρτημα).

Συνοψίζοντας, από τους παραπάνω ελέγχους επιβεβαιώνεται η αξιοπιστία του μοντέλου καθώς και η ικανότητα του για την περιγραφή και την πρόβλεψη των αποκρίσεων έναντι του ABTS.

Πίνακας 70. Πίνακας τιμών ANOVA για την αντιοξειδωτική δράση στο ABTS της Υ.Ε. του φυτού *G.glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	4.194E-003	2	2.097E-003	8.10	0.0097
<b>A-% EtOH</b>	2.803E-003	1	2.803E-003	10.82	0.0094
<b>B-Πίεση</b>	1.391E-003	1	1.391E-003	5.37	0.0456
<b>Lack of Fit</b>	812E-003	6	3.020E-004	1.75	0.3465

Τέλος από τις τιμές του πίνακα καθώς και από την εξίσωση [iv] παρατηρείται ότι το ποσοστό του συνδιαλύτη είναι αυτό που έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόκριση και μάλιστα διπλάσια από αυτή της πίεσης.

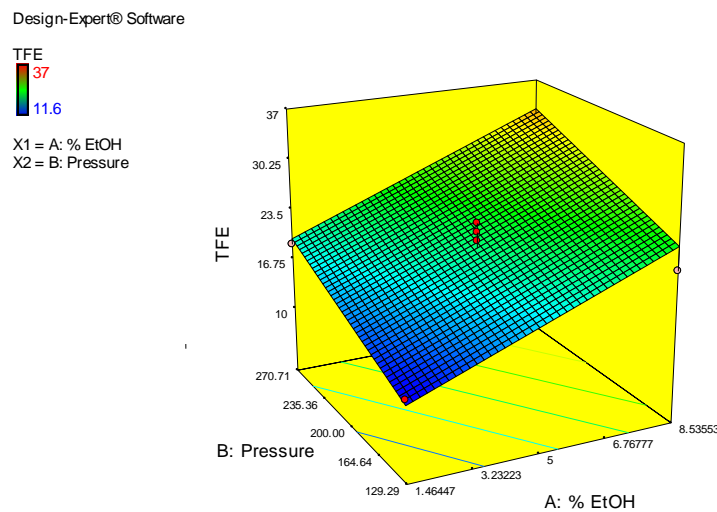


- Φορτίο σε φλαβονοειδή TFC

Όσον αφορά το φορτίο σε φλαβονοειδή, προτάθηκε από το πρόγραμμα το γραμμικό μοντέλο ( $p\text{-value} < 0.0001$ ) ώστε να περιγράψει τις μεταβολές της απόκρισης, με την εξίσωση να έχει την ακόλουθη μορφή:

$$\text{TFC} = 0.19020 + (1.88289 * \text{EtOH}) + (0.061781 * \text{Πίεση}) \quad [v]$$

Η διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης TFC - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη φαίνεται παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 132. Διάγραμμα ολικό φορτίο σε φλαβονοειδή TFC - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη για την Υ.Ε. των ριζών του φυτού *G. glabra***

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές της απόκρισης του TFC ως συνάρτηση των παραμέτρων ( $F\text{-Value} = 32.18$  και  $p\text{-value} = 0.0001$ ). Επιπλέον, υπολογίσθηκαν και οι τιμές των συντελεστών διακύμανσης  $R^2 = 0.8773$ ,  $\text{adjusted } R^2 = 0.8501$  και  $\text{predicted } R^2 = 0.7437$ , ενώ από το 'normal probability test' αποδείχτηκε η καταλληλότητα της προσαρμογής του μοντέλου. Ακόμα, η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε στα 15.7 που είναι αρκετά μεγαλύτερη του προτεινόμενου ορίου 4, το οποίο υποδηλώνει ότι η αναλογία σήματος / θορύβου είναι μικρότερη από το πραγματικό μέγεθος της επίδρασης και συνεπώς τα αποτελέσματά είναι ανεξάρτητα του θορύβου.

Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών ελέγχων επιβεβαίωσαν την αξιοπιστία του μοντέλου καθώς και την ικανότητα του για περιγραφή και πρόβλεψη των αποκρίσεων του TFC. Τα σχετικά διαγράμματα παρατίθενται στο Παράρτημα.

Πίνακας 71. Πίνακας τιμών ANOVA για ολικό φορτίο σε φλαβονοειδή (TFC) της Υ.Ε. του φυτού *G.glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	507.20	2	253.60	32.18	< 0.0001
<b>A-% EtOH</b>	354.53	1	354.53	44.99	< 0.0001
<b>B-Πίεση</b>	152.68	1	152.68	19.37	0.0017
<b>Lack of Fit</b>	61.57	6	10.26	3.29	0.1780

Από τις τιμές του πίνακα καθώς και από την εξίσωση [v] παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση ότι το ποσοστό του συνδιαλύτη είναι αυτό που έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόκριση και μάλιστα διπλάσια από αυτή της πίεσης.

- Τυροσινάση

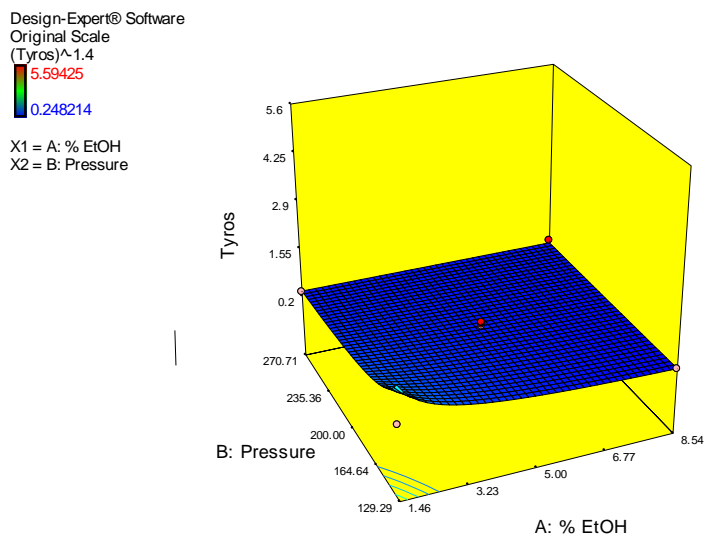
Και στην περίπτωση της τυροσινάσης ένας μετασχηματισμός των τιμών της απόκρισης ήταν απαραίτητος. Ο μετασχηματισμός που εφαρμόστηκε είχε την ακόλουθη μορφή:

$$Tyros' = Tyros^{-1.4}$$

Η σχέση η οποία μπορεί να περιγράψει καλύτερα τις μεταβολές της απόκρισης ως συνάρτηση των παραμέτρων, περιλαμβάνει το γραμμικό μοντέλο με αλληλεπιδράσεις δύο παραμέτρων, η μορφή του οποίου είναι η ακόλουθη:

$$Tyros' = -5.33154 + (1.6157 * EtOH) + (0.035774 Πίεση) - (5.94471E-003 * EtOH * Πίεση) \quad [vi]$$

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης αναστολής της τυροσινάσης - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη (Εικόνα 133).



Εικόνα 133. Λιάγραμμα τυροσινάσης - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη για την Υ.Ε. των ριζών του φυτού *G. glabra*

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές της τυροσινάσης ως συνάρτηση των παραμέτρων (F-Value = 5.28 και p-value=0.0267), ενώ η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε στα 7.731, υποδηλώνοντας ότι τα αποτελέσματά είναι ανεξάρτητα του θορύβου. Επίσης, υπολογίσθηκαν και οι τιμές των συντελεστών διακύμανσης  $R^2=0.6643$ , adjusted  $R^2=0.5385$  και predicted  $R^2=-0.1907$ . Η αρνητική τιμή της παραμέτρου predicted  $R^2$  υποδηλώνει ότι το μοντέλο παρουσιάζει αδυναμία στην πρόρρηση των αποτελεσμάτων και ο μέσος όρος των τιμών της απόκρισης αποτελεί καλύτερο δείκτη πρόβλεψης. Επιπλέον, από την ανάλυση διακύμανσης υπολογίστηκε ότι η τιμή F-Value' του 'Lack of Fit' είναι 7.14, η οποία θεωρείται αρκετά υψηλή και υποδηλώνει ότι υπάρχει σημαντική πιθανότητα (6.38%) το 'Lack of Fit F-Value' να οφείλεται στο θόρυβο (τιμές <10% θεωρούνται στατιστικά προβληματικές)..

Από τα παραπάνω καταλήγουμε στο ότι υπάρχει σημαντικός βαθμός αβεβαιότητας στην ικανότητα περιγραφής και πρόρρησης του μοντέλου, γεγονός το οποίο μας εμπόδισε στο να δεχθούμε την αξιοπιστία του.

Πίνακας 72. Πίνακας τιμών ANOVA για την ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης των εκχυλισμάτων της Υ.Ε. του φυτού *G.glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	28.51	3	9.50	5.28	0.0267
<b>A-% EtOH</b>	18.21	1	18.21	10.11	0.0130
<b>B-Πίεση</b>	1.46	1	1.46	0.81	0.3935
<b>A*B</b>	8.83	1	8.83	4.91	0.0576
<b>Lack of Fit</b>	13.29	5	2.66	7.14	0.0683

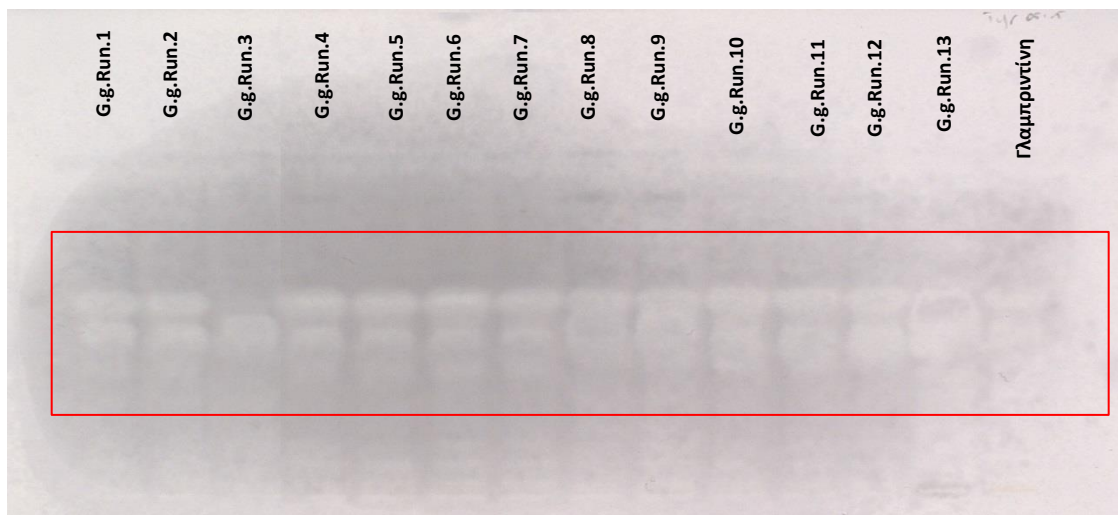
Εξαιτίας λοιπόν των παραπάνω ασαφών συμπερασμάτων σχετικά με τη δράση έναντι της τυροσινάσης, αποφασίστηκε να γίνει περαιτέρω μελέτη των εκχυλισμάτων με στόχο τη διερεύνηση και δικαιολόγηση του φαινομένου.

### 11.9.3 Συσχέτιση της δράσης στην τυροσινάση με τους περιεχόμεους μεταβολίτες των εκχυλισμάτων με τη χρήση βιοαυτογραφικής μεθόδου

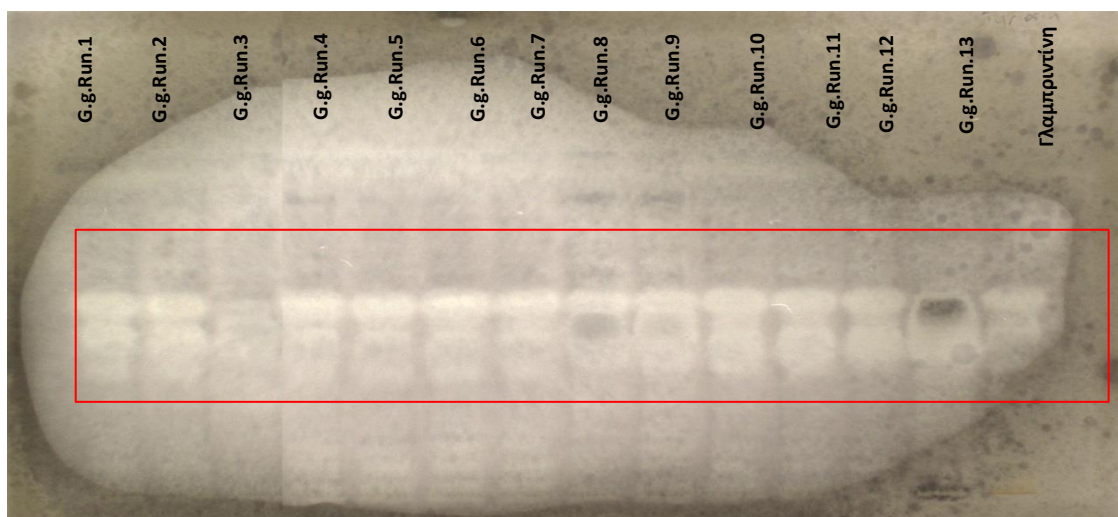
Οι χαμηλές τιμές των συντελεστών προσδιορισμού  $R^2$  και predicted  $R^2$  που υπολογίστηκαν παραπάνω, δείχνουν τη μεγάλη διασπορά που παρουσιάζουν οι τιμές των αποκρίσεων της τυροσινάσης σε σχέση με τις παραμέτρους (πίεση και ποσοστό συνδιαλύτη). Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι ακόμα και το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα της διεργασίας (**G.g.Run 3 Opt**) παρουσιάζει δράση ( $IC_{50} = 5.59 \mu\text{g/mL}$ ) ανάλογη με τον πρότυπο αναστολέα (Kojic acid= $1.34 \mu\text{g/mL}$ ). Η παρατήρηση αυτή μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι κατά τις διαφορετικές συνθήκες της εκχύλισης παραλαμβάνονται διαφορετικοί μεταβολίτες με σημαντική δράση έναντι του ενζύμου, και συνεπώς είναι πιθανή η ύπαρξη φαινομένων αρθροιστικής δράσης ή/και συνέργειας [331],[332],[333],[299].

Για την επιβεβαίωση του παραπάνω συμπεράσματος, προβήκαμε στην ανάλυση των εκχυλισμάτων με τη βιοαυτογραφική μέθοδο (bioautography). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη γρήγορη και αποτελεσματική ανίχνευση μεταβολιτών με δράση έναντι της τυροσινάσης μέσω της απλής ανάπτυξης δειγμάτων σε μία χρωματογραφική πλάκα TLC. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 'Υλικά και Μέθοδοι' και τα αποτελέσματα, μετά τον

ψεκασμό των πλακών τόσο με θειϊκή βανιλίνη όσο και με το ένζυμο, φαίνονται ακολούθως:

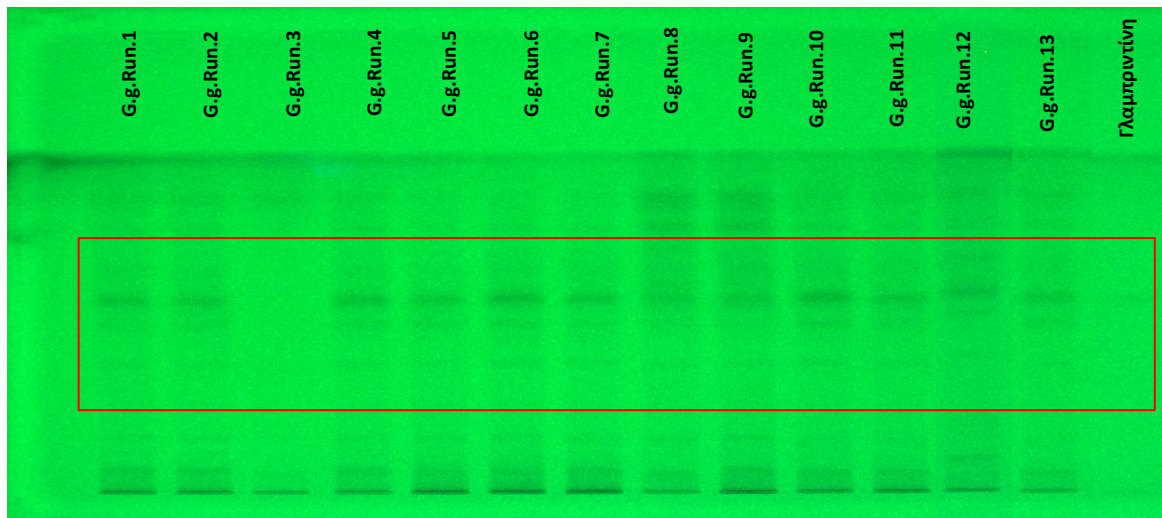


Εικόνα 134. Πλάκα HPTLC για τα δείγματα της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra* μετά τον ψεκασμό με τα αντιδραστήρια της τυροσινάσης, με φωτισμό από επάνω. Σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο/οξικός αιθυλεστέρας /διχλωρομεθάνιο 1/1/1

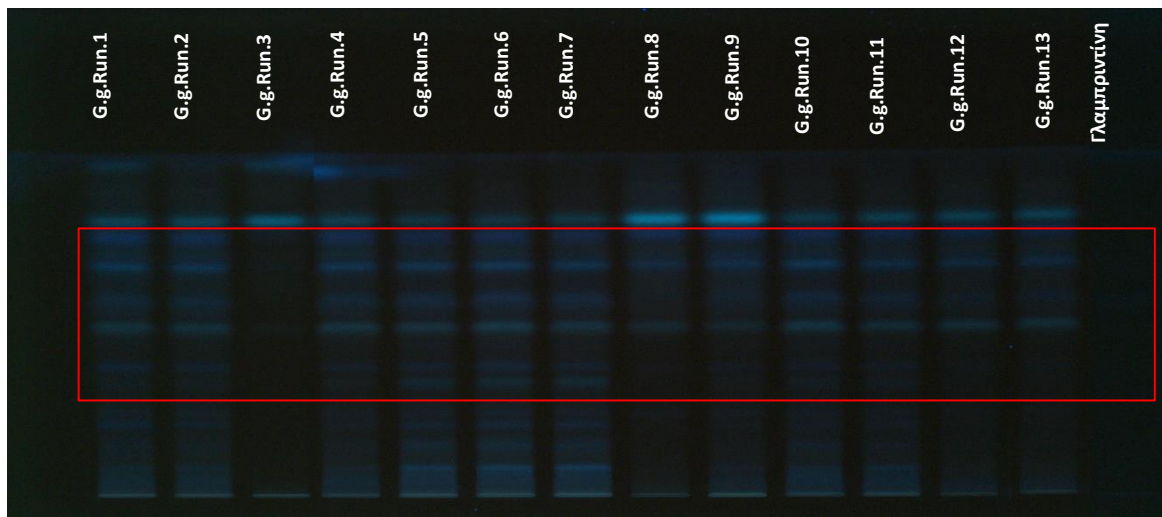


Εικόνα 135. Πλάκα HPTLC για τα δείγματα της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra* μετά τον ψεκασμό με τα αντιδραστήρια της τυροσινάσης, με φωτισμό από κάτω. Σύστημα ανάπτυξης Τολουόλιο/οξικός αιθυλεστέρας /διχλωρομεθάνιο 1/1/1

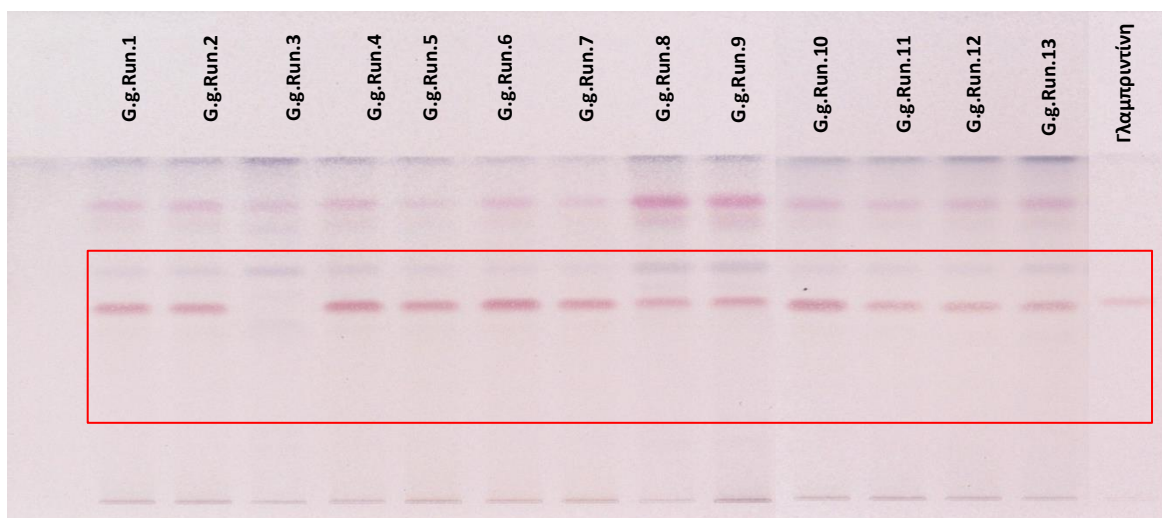




Εικόνα 136 Πλάκα HPTLC για τα δείγματα της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra* στα 254 nm . Σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο/οξικός αιθυλεστέρας /διχλωρομεθάνιο 1/1/1



Εικόνα 137 Πλάκα HPTLC για τα δείγματα της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra* στα 366 nm . Σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο/οξικός αιθυλεστέρας /διχλωρομεθάνιο 1/1/1



Εικόνα 138 Πλάκα HPTLC για τα δείγματα της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra* στο ορατό. Σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο/οξικός αιθυλεστέρας /διχλωρομεθάνιο 1/1/1

Στις ζώνες όπου έχει γίνει αναστολή του ενζύμου, υπάρχει έντονος λευκός χρωματισμός, ενώ στις περιοχές όπου οι μεταβολίτες δεν έχουν αναστείλει την παραγωγή μελανίνης, παρατηρείται έντονη μαύρη χρώση. Αναλυτικότερα, στις Εικόνα 134 και Εικόνα 135 παρατηρούνται ευρείες ζώνες λευκού χρώματος, ιδίως στο μέσο της TLC, με το φαινόμενο αυτό να παρατηρείται σε όλο το εύρος των εκχυλισμάτων της Υ.Ε. (από τα πιο αδρανή (**G.g.Run 3 Opt**) μέχρι και τα πιο δραστικά εκχυλίσματα (**G.g.Run 7 Opt**), επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την υποψία ότι η δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται στη δράση πολλών μεταβολιτών.

#### 11.9.4 Ανάλυση εκχυλισμάτων με PLS-R

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, θελήσαμε να αποσαφηνίσουμε ποιοι από τους κύριους μεταβολίτες του φυτού ευθύνονται για τη δράση των εκχυλισμάτων, καθώς και ποιο είναι το μέγεθος της επίδρασής τους. Έτσι λοιπόν, προβήκαμε στην εφαρμογή της Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial least squares regression - PLS-R), συγκρίνοντας τη συγκέντρωση των κύριων μεταβολιτών του φυτού, με την δράση τους έναντι της τυροσινάσης.

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία παρέχει τη δυνατότητα μελέτης περιπτώσεων όπου είναι επιθυμητή η συσχέτιση δύο συνιστωσών για τις οποίες οι μεταβλητές είναι περισσότερες από τις αποκρίσεις [334]. Συνοπτικά, το PLS-R αποτελεί μια μεθοδολογία η οποία προσπαθεί να βρει τις πολυδιάστατες συνιστώσες μιας μήτρας δεδομένων  $X$ , οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να προβλέπουν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τις πολυδιάστατες μεταβολές της μήτρας  $Y$ . Βασική προϋπόθεση, είναι οι συγκεκριμένες συνιστώσες να ερμηνεύουν τη μέγιστη δυνατή διασπορά των  $X$  και  $Y$ . Συνεπώς, ο στόχος του PLS-R είναι να εξάγει τις λανθάνουσες μεταβλητές, οι οποίες ερμηνεύουν τη μέγιστη τιμή της διασποράς στην απόκριση, ενώ ταυτόχρονα παρέχει και μια μοντελοποίηση των αποκρίσεων [335],[336].

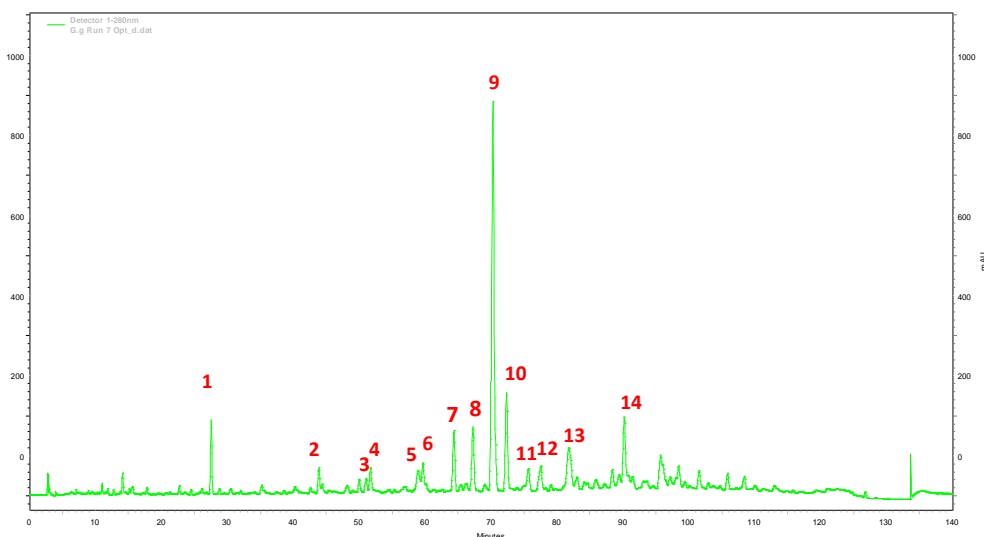
Στη συνέχεια, όλα τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με HPLC για τον εντοπισμό των κύριων μεταβολιτών τους. Παρασκευάσθηκαν δείγματα γνωστής συγκέντρωσης 4 mg/mL σε μείγμα MeOH/AcN 50:50 και αναλύθηκαν με το βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης που παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 73). Η στήλη που

χρησιμοποιήθηκε ήταν HS C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm) Fortis Technologies Ltd. UniverSil, ενώ για την καταγραφή των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν τρία μήκη κύματος: 220, 280 και 360 nm. Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν στα χρωματογραφήματα που λάβαμε στα 280 nm λόγω καλύτερης ευκρίνειας.

**Πίνακας 73. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης των εκχυλισμάτων της Υ.Ε. για την ανάλυση με PLS-R**

Χρόνος	AcN	H <sub>2</sub> O + 1% A.A	Ροή (mL/min)
0.0	2.0	98.0	1.00
5.0	19.0	81.0	1.00
115.0	80.0	20.0	1.00
120.0	100.0	0	1.00
130.0	100.0	0	1.00
131.0	2.0	98.0	1.00
140.0	2.0	98.0	1.00

Μετά από παρατήρηση των χρωματογραφήματων εντοπίστηκαν 14 κύριοι μεταβολίτες (Εικόνα 139) από τους οποίους καταγράφηκαν τα εμβαδά των κορυφών τους (Παράρτημα). Στη συνέχεια, τα δεδομένα εισήχθησαν στο υπολογιστικό πρόγραμμα SIMCA-P+11.5 και μετά από κατάλληλη επεξεργασία προέκυψαν τα διαγράμματα των Εικόνων 140, 141 και 143.

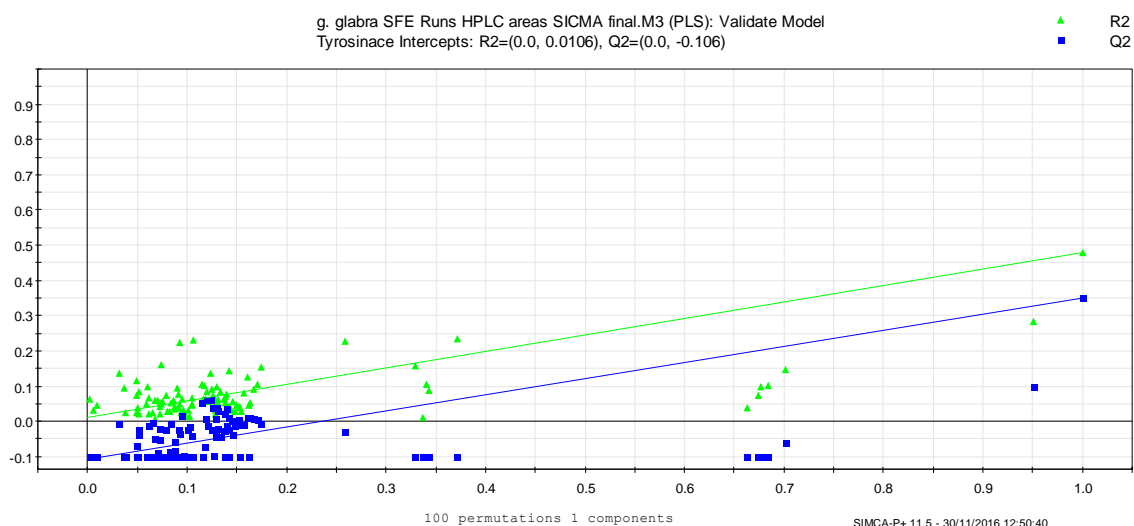


**Εικόνα 139. Χρωματογράφημα HPLC του εκχυλίσματος G.g.Run.7 της Υ.Ε. για την ανάλυση με PLS-R στα 280 nm.**



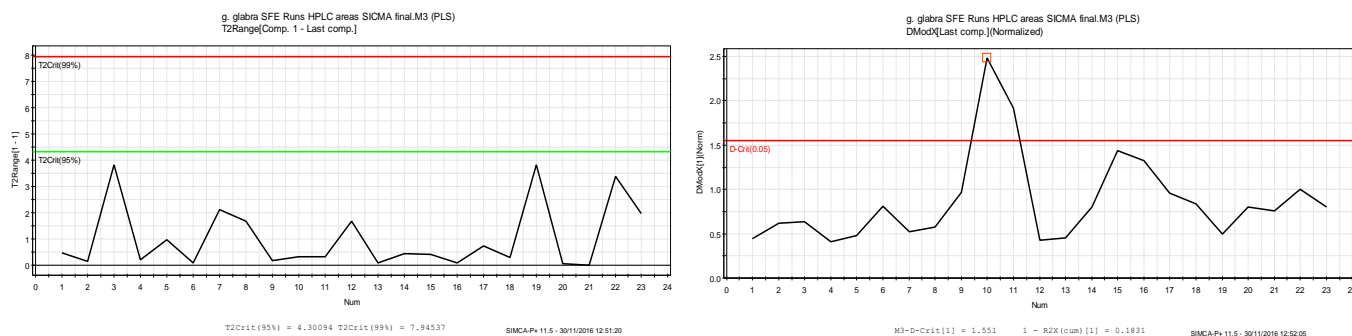
Από το πρόγραμμα, υπολογίστηκαν και οι τιμές των δεικτών προσαρμογής (fitting capacity) και πρόβλεψης (predictive ability) του μοντέλου  $R^2 = 0.817$  και  $Q^2 = 0.351$ , αντίστοιχα. Για τους συντελεστές αυτούς, τιμές πάνω από 0.5 είναι επιθυμητές, ώστε να θεωρείται το μοντέλο αξιόπιστο και ικανό να παρέχει ασφαλή αποτελέσματα. Επειδή για το σχεδιασμό, μας ενδιέφερε η αιτιολόγηση των φαινομένων και όχι η ικανότητα πρόβλεψης, θεωρήσαμε τα αποτελέσματα ικανοποιητικά.

Η διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, επιβεβαιώθηκε και με την εφαρμογή του ελέγχου μετάθεσης (permutation test), ο οποίος έδειξε ότι το μοντέλο είναι αξιόπιστο και ότι τα αποτελέσματα δεν οφείλονται σε τυχαίο γεγονός (Εικόνα 140).



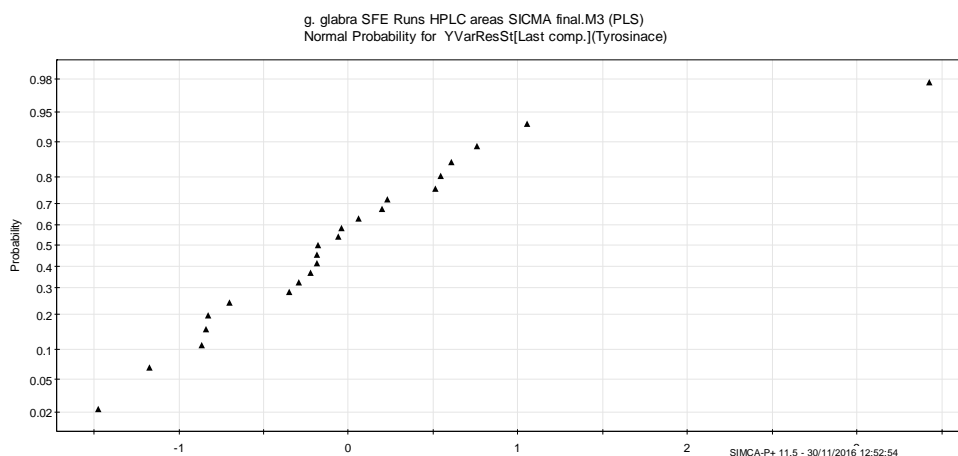
**Εικόνα 140. Αποτελέσματα του τεστ μετάθεσης (permutation test) για το μοντέλο του PLS-R σχετικά με τα εκχυλίσματα της Υ.Ε.**

Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 141) παρουσιάζεται το Hotelling  $T^2$ -τεστ το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο έκτροπων τιμών (outliers). Θέτοντας ως όρια εμπιστοσύνης τα 95% και 99%, φαίνεται ότι κανένα από τα αποτελέσματα δεν ξεπερνά τα όρια (Εικόνα 141) επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την απουσία έκτροπων τιμών. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε και με τον αυστηρότερο έλεγχο 'DModX', στο οποίο παρατηρείται η ύπαρξη μίας μόνο έκτροπης τιμής.



**Εικόνα 141. Αποτελέσματα Hotelling  $T^2$  και DModX τεστ για τα εκχυλίσματα της *G. glabra***

Η κατανομή των residuals (σφαλμάτων - κατάλοιπων) φαίνεται στην Εικόνα 142. Το γεγονός ότι παρατηρείται μια σιγμοειδής καμπύλη, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα residuals είναι τυχαία κατανομημένα και ότι το μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο.



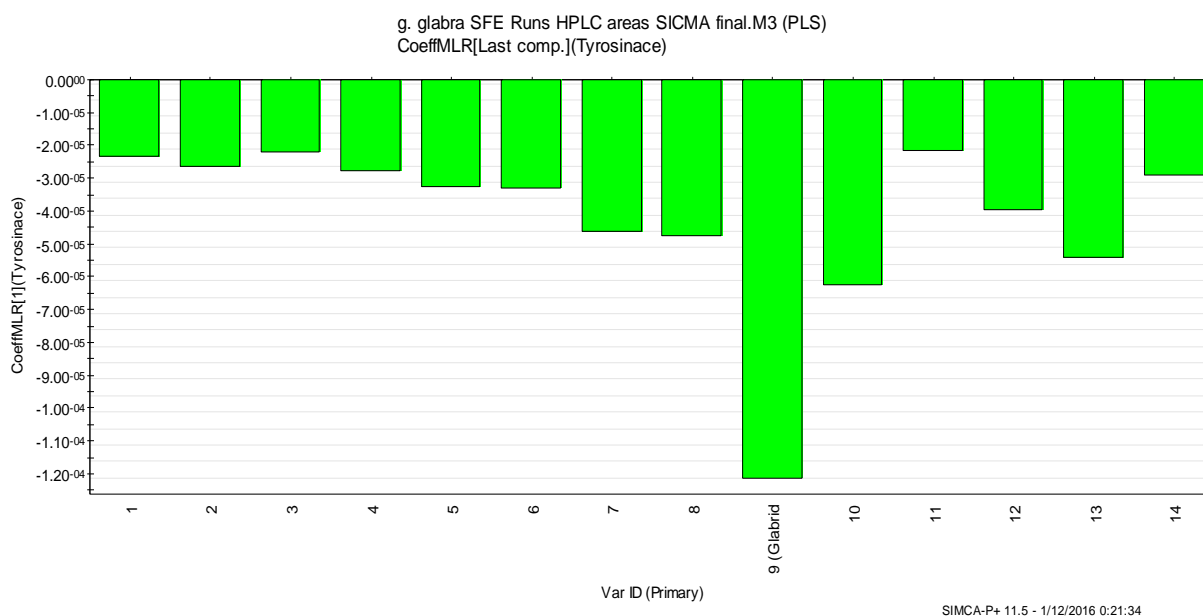
**Εικόνα 142. Διάγραμμα κατανομής residuals (κατάλοιπων)**

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των παραπάνω ελέγχων, επιβεβαιώθηκε η αξιοπιστία του μοντέλου και η ικανότητά του στο να παρέχει ακριβή αποτελέσματα.

Η συσχέτιση της δράσης των μεταβολιτών με την τυροσινάση έγινε μέσω του διαγράμματος 'coefficients plot' (Εικόνα 143). Στο διάγραμμα οι μπάρες αντιστοιχούν στους επιλεγμένους μεταβολίτες (1 έως 14), ενώ το ύψος σχετίζεται με το μέγεθος της επίδρασής τους στη δράση ( $IC_{50}$ ). Το γεγονός ότι οι μπάρες έχουν αρνητικές τιμές οφείλεται στην αρνητική συσχέτιση των τιμών  $IC_{50}$ , με τη

δραστικότητα (δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή  $IC_{50}$  τόσο μικρότερη είναι δράση).

Η εικόνα του διαγράμματος 'coefficients plot' φανερώνει ότι αρκετοί μεταβολίτες του φυτού παρουσιάζουν κάποιας μορφής ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την παρατήρηση ότι η δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται στην αρθροιστική ή συνεργιστική δράση των περιεχόμενων μεταβολιτών. Επιπλέον, από τους συντελεστές παρατηρείται ότι η ουσία με τη μεγαλύτερη δράση στο ένζυμο είναι ο μεταβολίτης 9, ο οποίος αποτελεί και τον κύριο μεταβολίτη των εκχυλισμάτων.

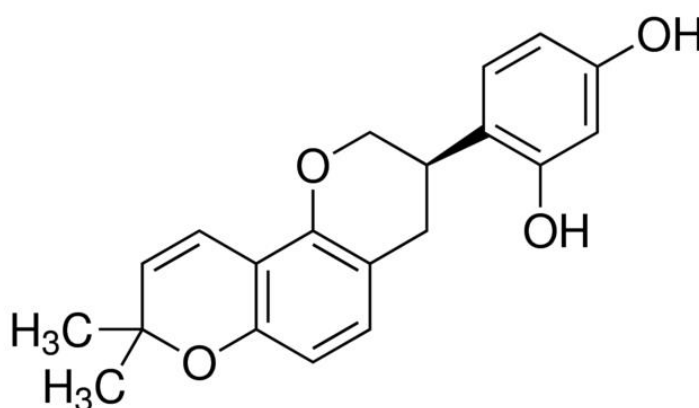


Εικόνα 143. Διάγραμμα coefficients plot για τη δράση στην τυροσινάση των κύριων μεταβολιτών του φυτού της *G. glabra*

Με βάση τα προαναφερόμενα γίνεται πλέον σαφές ότι αναφερόμαστε στη συνολική δράση του εκχυλίσματος της *G. glabra* μιας και η δράση της έναντι της τυροσινάσης επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από τον αριθμό των εκχυλιζόμενων μεταβολιτών, δικαιολογώντας με αυτόν τον τρόπο την αδυναμία της Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης στη συσχέτιση των αποτελεσμάτων.

### 11.9.5 Ποσοτικοποίηση γκλαμπριντίνης με την τεχνική HPTLC

Λόγω της ισχυρής επίδρασης του μεταβολίτη 9 στη δράση του εκχυλίσματος, αποφασίσθηκε η ταυτοποίησή του. Συγκεκριμένα, από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας [297],[298],[67], καθώς και από την προγενέστερη εργαστηριακή εμπειρία σχετικά με τους μεταβολίτες του φυτού, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο μεταβολίτης 9 αποτελεί τη 'γκλαμπριντίνη'. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε πειραματικά με τη χρήση πρότυπης ουσίας μέσα από την συχρωματογράφιση στην HPLC (Παράρτημα).



Εικόνα 144. Δομή γκλαμπριντίνης

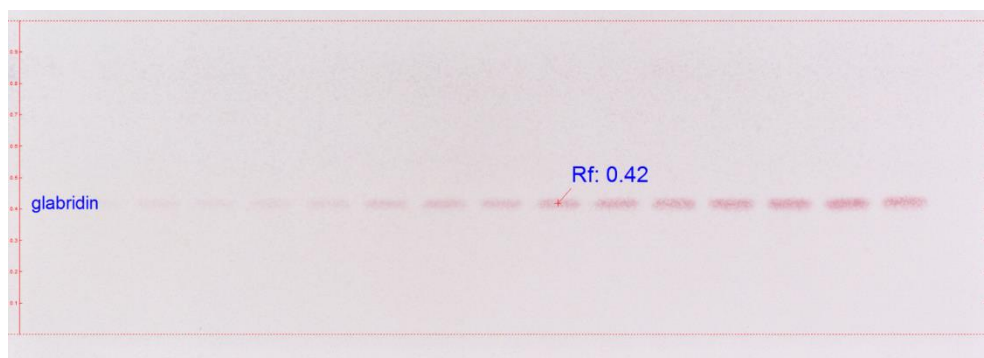
Έχοντας γνώση των φαινομένων συνεργιστικής δράσης που διέπουν τα εκχυλίσματα και έχοντας εντοπίσει το μεταβολίτη που είναι υπεύθυνος για τη δράση έναντι στη τυροσινάσης, αποφασίσθηκε να γίνει η προσθήκη της γκλαμπριντίνης ως μίας ακόμη απόκρισης, στη βελτιστοποίηση της διεργασίας με σκοπό να έχουμε μία καλύτερη συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων και των αποκρίσεων.

Η ποσοτικοποίηση της γκλαμπριντίνης στα εκχύλιμα της Υ.Ε. έγινε με την τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC). Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπύλης αναφοράς, για την κατασκευή της οποίας χρησιμοποιήθηκε γκλαμπριντίνη καθαρότητας 99,9% [337]. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκαν πλάκες HPTLC κανονικής φάσης 20x10 cm και ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών τολουόλιο/διχλωρομεθάνιο/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 1/1/1 (v/v/v). Αρχικά παρασκευάστηκε stock διάλυμα γκλαμπριντίνης σε μεθανόλη

(συγκέντρωσης 5 mg/ml) και στη συνέχεια παρασκευάστηκαν έξι διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης, οι ποσότητες των οποίων φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 74) Με τη χρήση της HPTLC τοποθετήθηκαν στην πλάκα 15 ζώνες (πλάτους 8mm) διαφορετικής περιεκτικότητας και στη συνέχεια η πλάκα αναπτύχθηκε σε αυτόματο θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενη υγρασία και θερμοκρασία. Όταν το μέτωπο του διαλύτη έφτασε στα 70 mm, η πλάκα αφαιρέθηκε και παρατηρήθηκε κάτω από το φως λάμπας UV στα 254 και 366 nm, ενώ φωτογραφήθηκε μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης (Εικόνα 145).

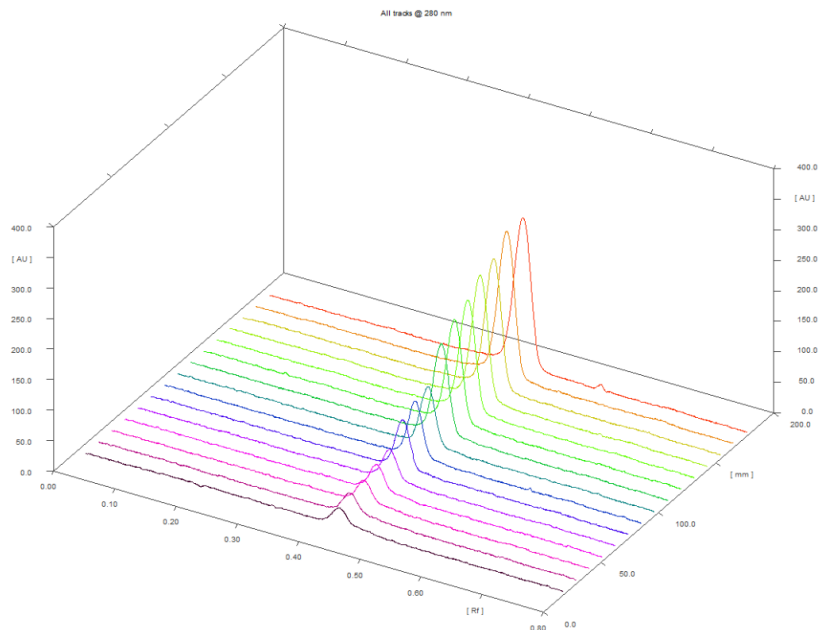
Πίνακας 74. Καμπύλη αναφοράς Γλαμπριντίνης

Πρότυπα	Περιεκτικότητα προτύπου σε γλαμπριντίνη (μg/ml)	Ποσότητα διαλύματος στην πλάκα (mL)	Ποότητα γλαμπριντίνης στην πλάκα (μg)
1	2.50	20	0.05
2	3.75	20	0.075
3	7.50	20	0.15
4	15.0	20	0.30
5	20.00	20	0.40
6	25.00	20	0.50



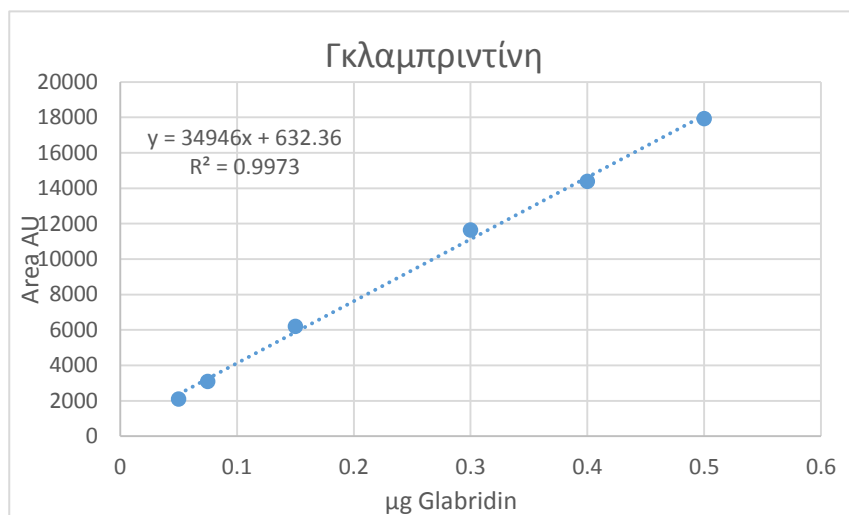
Εικόνα 145. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλαμπριντίνης μετά από ψεκασμό

Η λήψη των φασμάτων UV έγινε με τη χρήση του Scanner στα 280 nm, ενώ τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στην Εικόνα 146.



Εικόνα 146. Χρωματογραφήματα πρότυπων γλαμπριντίνης

Από τις συγκεντρώσεις των προτύπων και από τα εμβαδά των κορυφών του χρωματογραφήματος κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς (Εικόνα 147), με γραμμική εξίσωση,  $y = 34946x + 632.36$ , με  $R^2 = 0.9973$ .



Εικόνα 147. Καμπύλη αναφοράς γλαμπριντίνης

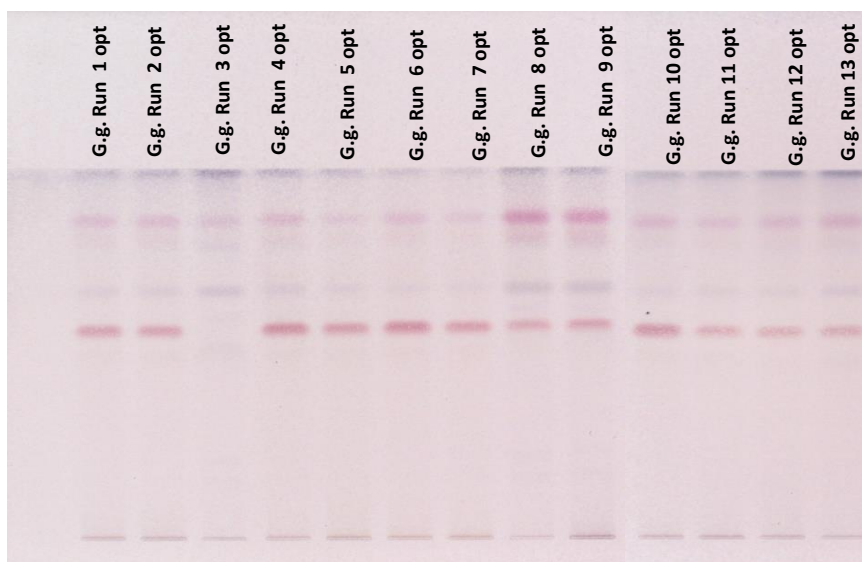
### 11.9.5.1 Προσδιορισμός περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε γλαμπριντίνη

Για τον προσδιορισμό της γλαμπριντίνης στα δείγματα της Υ.Ε. παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 4 mg/ml σε μίγμα

μεθανόλη/διχλωρομεθανίου 50:50. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλάκες HPTLC στις ποσότητες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 75 και ακολούθησε ο προσδιορισμός της περιεκτικότητάς τους.

Πίνακας 75. Ποσοτικοποίηση γκλαμπριντίνης στα δείγματα της Υ.Ε.

Δείγμα	Ποσότητα στη σύριγγα (μL)	Ποσότητα στην πλάκα (μg)	Περιεκτικότητα γκλαμπριντίνης (%)
G.g. Run 1 Opt	2.5	10	4.91
G.g. Run 2 Opt	2.5	10	4.30
G.g. Run 3 Opt	10	40	0
G.g. Run 4 Opt	2.5	10	5.38
G.g. Run 5 Opt	2.5	10	5.05
G.g. Run 6 Opt	2.5	10	6.50
G.g. Run 7 Opt	2.5	10	5.33
G.g. Run 8 Opt	5	20	1.40
G.g. Run 9 Opt	5	20	1.66
G.g. Run 10 Opt	2.5	10	6.50
G.g. Run 11 Opt	2.5	10	4.27
G.g. Run 12 Opt	2.5	10	5.11
G.g. Run 13 Opt	2.5	10	4.64



Εικόνα 148. Ανεπτυγμένη πλάκα TLC δειγμάτων Υ.Ε. μετά τον ψεκασμό

### 11.9.6 Βελτιστοποίηση της διεργασίας Υ.Ε.

Στη συνέχεια, προσθέτοντας ως απόκριση την περιεκτικότητα της γκλαμπριντίνης στο υπολογιστικό πρόγραμμα 'DOE' προέκυψε ο ακόλουθος σχεδιασμός. Στο σημείο αυτό θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί ότι η μετέπειτα προσθήκη αποκρίσεων δεν επηρεάζει την ανάλυση του σχεδιασμού και τα ήδη εξαχθέντα συμπεράσματα.

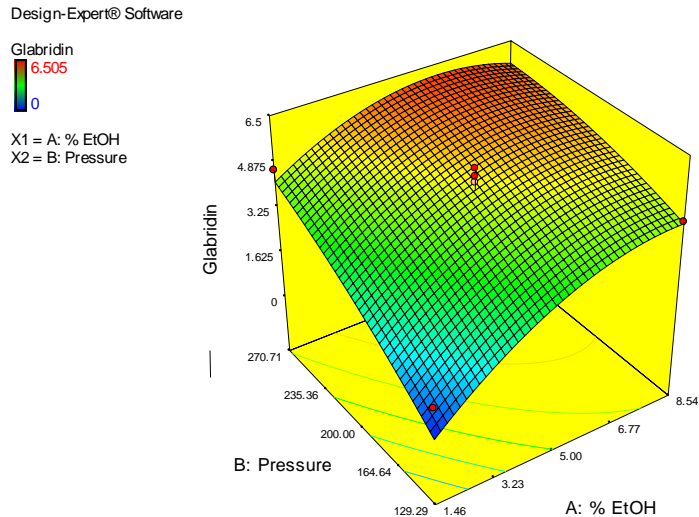
Πίνακας 76. Τιμές παραμέτρων και αποκρίσεων Central composite σχεδιασμού της Υ.Ε. μετά την προσθήκη της γκλαμπριντίνης

Δείγμα	EtOH (%)	Πίεση (bar)	Απόδοση (%)	Τυροσινάση (IC <sub>50</sub> )*	DPPH (250 μg/mL)**	ABTS (IC <sub>50</sub> )***	TFE (mg κερ/g εκχ)	Γκλαμπριντίνη (%)
G.g.Run.1 Opt	5	200	1.80	0.41	60.03	13.48	22.12	4.91
G.g.Run.2 Opt	5	200	1.76	0.45	61.56	15.15	23.27	4.30
G.g.Run.3 Opt	0.00	200	0.57	5.59	17.76	50.71	13.35	0.00
G.g.Run.4 Opt	5	200	1.99	0.36	64.69	11.18	24.48	5.39
G.g.Run.5 Opt	8.54	270	1.85	0.42	69.28	13.97	29.2	5.05
<del>G.g.Run.6 Opt</del>	<del>5</del>	<del>200</del>	<del>2.65</del>	<del>0.25</del>	<del>79.52</del>	<del>10.34</del>	<del>35.94</del>	<del>6.51</del>
G.g.Run.7 Opt	10	200	2.68	0.26	73.62	9.14	37	5.33
G.g.Run.8 Opt	1.46	129	0.89	0.50	33.31	27.15	11.6	1.40
G.g.Run.9 Opt	5	100	0.89	0.47	41.59	22.98	14.18	1.66
G.g.Run.10 Opt	5	300	1.95	0.27	68.12	11.74	28.01	6.50
G.g.Run.11 Opt	8.54	129	1.27	0.25	56.79	16.16	21.1	4.27
G.g.Run.12 Opt	5	200	1.54	0.47	53.86	16.99	20.33	5.11
G.g.Run.13 Opt	1.46	270	1.22	0.32	57.86	13.57	18.89	4.64

Ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προτάθηκε από το σχεδιασμό ένα μοντέλο δευτέρου βαθμού (p-value=0.0615) για να περιγράψει τις μεταβολές της απόκρισης της περιεκτικότητας σε γκλαμπριντίνη συναρτήσει των παραμέτρων και η εξίσωση είχε την ακόλουθη μορφή:

$$\text{Γκλαμπριντίνη (\%)} = -7.76486 + (1.68547 * \text{EtOH}) + (0.056006 * \text{Πίεση}) - (2.46000\text{E}-003 * \text{EtOH} * \text{Πίεση}) - (0.081100 * \text{EtOH}^2) - (6.12500\text{E}-005 * \text{Πίεση}^2) \quad [\text{vii}]$$





Εικόνα 149. Διάγραμμα ποσοστού γκλαμπριντίνης - πίεσης - ποσοστού συνδιαλύτη για την Υ.Ε. των ριζών της *G. glabra*

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές της απόκρισης ( $F\text{-Value} = 10.39$ ), ενώ υπολογίσθηκαν οι τιμές των  $R^2=0.8964$ ,  $\text{adjusted } R^2=0.8101$  και  $\text{predicted } R^2=0.7447$  που δείχνουν πολύ καλά επίπεδα συσχέτισης. Από την παρατήρηση του 'normal probability test' επιβεβαιώθηκε η απουσία έκτροπων τιμών (outliers), ενώ η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε στα 9.903 που είναι υψηλότερη του προτεινόμενου ορίου 4, υποδηλώνοντας ότι τα αποτελέσματα δεν επηρεάζονται από το θόρυβο.

Από τα διαγράμματα του διαγνωστικού ελέγχου προέκυψε ότι οι τιμές των υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών δεν παρουσιάζουν κάποια τάση και είναι ομοιόμορφα κατανομημένες, χωρίς κάποια τιμή να βρίσκεται εκτός των προτεινόμενων ορίων. Επιπλέον, η σειρά εκτέλεσης των πειραμάτων δεν επηρέασε τα αποτελέσματα της απόκρισης, ενώ από το διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών επιβεβαιώθηκε η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου (Παράρτημα).

Το διάγραμμα Box\_Cox έδειξε ότι δεν υπήρξε η ανάγκη μετασχηματισμού των αποτελεσμάτων (Παράρτημα), ενώ από τις τιμές των υπολειμμάτων έναντι των παραμέτρων φάνηκε η απουσία ετεροσκεδαστικότητας (Παράρτημα). Τέλος, από την τιμή του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των

πειραμάτων, προέκυψε ότι δεν υπάρχουν πειράματα που να έχουν στατιστικά μεγαλύτερη σημασία σε σχέση με τα υπόλοιπα (Παράρτημα).

Πίνακας 77. Πίνακας τιμών ANOVA για το ποσοστό της γκλαμπριντίνης των εκχυλισμάτων της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	37.54	5	7.51	10.39	0.0065
<b>A-% EtOH</b>	14.63	1	14.63	20.24	0.0041
<b>B-Πίεση</b>	14.76	1	14.76	20.41	0.0040
<b>A*B</b>	1.51	1	1.51	2.09	0.1981
<b>A<sup>2</sup></b>	6.58	1	6.58	9.10	0.0235
<b>B<sup>2</sup></b>	0.60	1	0.60	0.83	0.3973
<b>Lack of Fit</b>	3.70	3	1.23	5.81	0.0912

Συνοψίζοντας τους παραπάνω ελέγχους, επιβεβαιώνεται η αξιοπιστία του μοντέλου και η ικανότητα περιγραφής και πρόβλεψης των αποκρίσεων για την περιεκτικότητα της γκλαμπριντίνης.

### 11.9.7 Αριθμητική βελτιστοποίηση (numerical optimization) Υ.Ε.

Με βάση τις εξισώσεις που καταστρώθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους [i έως vii] προβήκαμε στον υπολογισμό των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης για την παραγωγή εκχυλισμάτων με:

- a) υψηλή απόδοση, υψηλό φορτίο σε φλαβονοειδή και υψηλή αντιοξειδωτική δράση έναντι του DPPH και του ABTS (**G.g.Run Opt Yield**)
- b) μέγιστη ανασταλτική δράση έναντι της τυροσικινάσης και υψηλή συγκέντρωση σε γκλαμπριντίνη (**G.g. Run Opt T.G.**)

Εφαρμόζοντας έναν αλγόριθμο αριθμητικής βελτιστοποίησης, προτάθηκαν από το πρόγραμμα οι βέλτιστες συνθήκες για τα δύο εκχυλίσματα, ενώ ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε μια θεωρητική προσέγγιση των πειραματικών τιμών των αποκρίσεων (Πίνακας 78).

Πίνακας 78. Βέλτιστες τιμές συνθηκών Υ.Ε. τις ρίζες φυτού *G. glabra* και οι θεωρητικές τιμές των αποκρίσεων

Δείγμα	EtOH (%)	Πίεση (bar)	Απόδοση (%)	DPPH (250μg/mL)*	ABTS (IC <sub>50</sub> )**	TFC (mg Κερ/g εκχ)	Τυροσ. (IC <sub>50</sub> )***	Γκλαμπ. (%)
G.g Run Opt Yield	10	300	2.66	78.03	9.01	37.55	0.39	4.88
G.g Run Opt T.G.	4.45	300	1.88	66.93	12.25	27.11	0.33	6.13

Λοιπές συνθήκες: θερμοκρασία 40 °C, ροή 1 kg/h, ποσοστό υγρασίας 7.77% και κοκκομετρία 0~200 μm

Συνεπώς, νέες ποσότητες του φυτού εκχυλίστηκαν βάσει των προτεινόμενων συνθηκών στη συσκευή SFE500 και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι τιμές των αντίστοιχων αποκρίσεων. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρατίθενται στο πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 79. Πίνακας θεωρητικών και πειραματικών βέλτιστων τιμών για τις αποκρίσεις της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Σύγκριση θεωρητικών – πειραματικών αποκρίσεων												
Δείγμα	Απόδοση (%)		DPPH* (250μg/mL)		ABTS** (IC <sub>50</sub> )		TFC (mg Κερ/g εκχ)		Τυροσινάση*** (IC <sub>50</sub> )		Γκλαμπριντίνη (%)	
	Θεωρ/κή	Πειρ/κή	Θεωρ/κή	Πειρ/κή	Θεωρ/κή	Πειρ/κή	Θεωρ/κή	Πειρ/κή	Θεωρ/κή	Πειρ/κή	Θεωρ/κή	Πειρ/κή
G.g Run Opt Yield	2.66	3.1	78.03	72.32	9.01	9.19	37.55	34.88	0.39	0.37	4.88	5.11
G.g Run Opt T.G.	1.88	2.7	66.93	68.02	12.25	11.98	27.11	27.86	0.33	0.3	6.13	5.86

Πρότυποι αναστολείς: \* Γαλλικό οξύ: 100% inh σε C=200 μg/mL, \*\*Trolox: IC<sub>50</sub>≈8μg/mL, \*\*\*Kojic acid: IC<sub>50</sub>≈1.34μg/mL

Συμπερασματικά, καταλήγουμε στο ότι ο CCD σχεδιασμός έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα. Οι θεωρητικές τιμές πλησίασαν τις αντίστοιχες πειραματικές με μικρές αποκλίσεις, γεγονός που δείχνει ότι η χρήση του προγράμματος για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας Υ.Ε. αλλά και την παρασκευή εκχυλισμάτων με επιθυμητές ιδιότητες είναι δυνατή με πολύ καλά αποτελέσματα. Επιπλέον οδηγηθήκαμε στην παρασκευή εκχυλισμάτων με:

- α) υψηλή απόδοση, αντιοξειδωτική δράση και φορτίο σε φλαβονοειδή (**G.g Run Opt Yield**) και
- β) μέγιστη λευκαντική δράση και περιεκτικότητα σε γκλαμπριντίνη (**G.g Run Opt T.G.**)

Συνοψίζοντας λοιπόν από τα παραπάνω, καταλήγουμε στο ότι η αθροιστική - συνεργιστική δράση των μεταβολιτών της δρόγης, σε συνδυασμό με τις ηπιότερες συνθήκες της Υ.Ε. οδήγησαν στην παραγωγή ποιοτικά ανώτερων εκχυλισμάτων με

αξιόλογες δράσεις (αντιοξειδωτική δράση **G.g Run Opt Yield** όμοια με αυτή του πτώτυπου αντιοξειδωτικού στο ABTS: Trolox =  $IC_{50} \approx 8 \mu\text{g/mL}$ ) καθώς και στην παρασκευή ενός εκχυλίσματος (**G.g Run Opt T.G.**) με **4.5** φορές πιο ισχυρή λευκαντική δράση από τον πρότυπο αναστολέα. Ένα αποτέλεσμα ιδιαίτερα σημαντικό αν αναλογισθεί κανείς ότι το αποτέλεσμα αφορά ολικό εκχύλισμα και όχι κάποιον απομονωμένο μεταβολίτη.

### 11.10 Εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων (UAE) και σύγκριση με την Υ.Ε.

Ποσότητα από το φυτικό υλικό εισήχθη στη συσκευή υπερήχων και εκχυλίστηκε με διάφορους διαλύτες, σε συγκεκριμένες συνθήκες που φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί. Στόχος, ήταν η παρασκευή εκχυλισμάτων, τα οποία θα αποτελούσαν το μέτρο σύγκρισης για την αποτελεσματικότητα της διεργασίας της Υ.Ε..

Πίνακας 80. Συνθήκες εκχύλισης με υπερήχους για τις ρίζες του φυτού *G. glabra*

Κωδικός	Βάρος φυτού (g)	Διαλύτης	Διάρκεια (min)
<b>G.g.UAE.C-Hex</b>	10.10	C-Hex	3x30
<b>G.g.UAE.DCM</b>	10.09	DCM	3x30
<b>G.g.UAE.MeOH</b>	10.09	MeOH	3x30
<b>G.g.UAE.EtOH</b>	10.10	EtOH	3x30
<b>G.g.UAE.EtOAc</b>	10.10	EtOAc	3x30

Στη συνέχεια, τα παραγόμενα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH και ABTS, το φορτίο τους σε φλαβονοειδή, τη δράση τους έναντι της τυροσινάσης καθώς και την περιεκτικότητά τους σε γκλαμπριντίνη (Πίνακας 81). Όλες οι μετρήσεις έγιναν με βάση τα πρωτόκολλα που παρουσιάζονται στην παράγραφο 'Υλικά και μέθοδοι', ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα.

Πίνακας 81. Αποτελέσματα βιολογικών δράσεων για τα εκχυλίσματα της UAE για το φυτό *G. glabra*

Κωδικός	Απόδοση (%)	DPPH (250µg/mL)*	ABTS (IC <sub>50</sub> )**	TFC (mg κερ/g εκχ)	Τυροσινάση (IC <sub>50</sub> )***	Γκλαμπριντίνη (%)
G.g.UAE.C-Hex	1.09	29.77	64.51	16.72	3.41	0.17
G.g.UAE.DCM	2.97	<b>89.43</b>	<b>10.54</b>	38.59	<b>0.47</b>	<b>5.01</b>
G.g.UAE.MeOH	<b>18.66</b>	47.66	26.68	26.24	1.58	0.88
G.g.UAE.EtOH	11.35	65.71	19.94	30.28	0.63	2.13
G.g.UAE.EtOAc	3.76	92.34	15.12	<b>50.27</b>	0.59	4.48

Πρότυποι αναστολείς: \* Γαλλικό οξύ: 100% inh σε C=200 µg/mL, \*\*Trolox: IC<sub>50</sub>≈8 µg/mL, \*\*\*Kojic acid: IC<sub>50</sub>≈1.34 µg/mL

Παρατηρώντας τις τιμές των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι η MeOH είναι ο διαλύτης με τη καλύτερη δυνατότητα ανάκτησης μεταβολιτών. Η απόδοση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος (**G.g.UAE.MeOH**) είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα της UAE, φανερώνοντας ταυτόχρονα την υψηλή περιεκτικότητα της δρόγης σε μεταβολίτες μέση πολικότητας.

Αναφορικά με τη δράση των εκχυλισμάτων έναντι της τυροσινάσης, πιο δραστικά παρουσιάζονται τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με διαλύτες DCM και EtOAc (**G.g.UAE.DCM** και **G.g.UAE.EtOAc**). Τα εκχυλίσματα αυτά διαθέτουν 2.8 και 2.2 φορές πιο ισχυρή δράση από τον πρότυπο αναστολέα, ενώ παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά γκλαμπριντίνης καθώς και τις υψηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής δράσης. Τέλος, το εκχύλισμα που παρασκευάστηκε με την χρήση EtOAc (**G.g.UAE.EtOAc**) παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση φλαβονοειδών. Η πολικότητα του EtOAc είναι ιδανική για την παραγωγή εκχυλισμάτων με υψηλά ποσοστά TFC καθώς μπορεί και παραλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος των μη πολικών φλαβονοειδών.

### 11.10.1 Σύγκριση τεχνικών Υ.Ε. και UAE

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο τεχνικών, εξάγονται ορισμένα σημαντικά συμπεράσματα για την εκχύλιση των ριζών της γλυκύρριζας και την παραλαβή βιοδραστικών εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, για τις περιπτώσεις όπου η δράση του εκχυλίσματος είναι ο απώτερος σκοπός της διεργασίας, η Υ.Ε.

αποτελεί την επιθυμητή τεχνική. Τα εκχυλίσματα που παρασκευάζονται με τη χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> παρουσία συνδιαλύτη (**G.g.Run Opt T.G.** και **G.g.Run Opt Yield**) διαθέτουν 2 φορές πιο ισχυρή ανασταλτική δράση σε σχέση με αυτά της UAE (**G.g.UAE.DCM** και **G.g.UAE.EtOAc**) και εξίσου αξιόλογη τιμές αντιοξειδωτική δράση. Από την άλλη μεριά, τα εκχυλίσματα της UAE παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλές τιμές απόδοσης, ιδίως στις περιπτώσεις χρήσης πολικών διαλυτών (**G.g.UAE.MeOH** και **G.g.UAE.EtOH**), οι τιμές των οποίων αγγίζουν το 18.66% και 11.35% του ξηρού βάρους της δρόγης.

Πίνακας 82. Σύγκριση αποτελεσμάτων Υ.Ε. και UAE για τις ρίζες του φυτού *G. glabra*

Κωδικός	Απόδοση (%)	DPPH (250μg/mL)*	ABTS (IC <sub>50</sub> )**	TFC (mg κερ/g εκχ)	Τυροσινάση (IC <sub>50</sub> )***	Γκλαμπριντίνη (%)
<b>G.g Run Opt Yield</b>	3.1	72.32	9.19	34.88	0.37	5.11
<b>G.g Run Opt T.G.</b>	2.7	68.02	11.98	27.86	0.3	5.36
<b>G.g.UAE.C-Hex</b>	1.09	29.77	64.51	16.72	3.41	0.17
<b>G.g.UAE.DCM</b>	2.97	89.43	10.54	38.59	0.47	5.01
<b>G.g.UAE.MeOH</b>	18.66	47.66	26.68	26.24	1.58	0.88
<b>G.g.UAE.EtOH</b>	11.35	65.71	19.94	30.28	0.63	2.13
<b>G.g.UAE.EtOAc</b>	3.76	92.34	15.12	50.27	0.59	4.48

Πρότυποι αναστολείς: \* Γαλλικό οξύ: 100% inh σε C=200 μg/mL, \*\*Trolox: IC<sub>50</sub>≈8 μg/mL, \*\*\*Kojic acid: IC<sub>50</sub>≈1.34 μg/mL

Σημαντική διαφοροποίηση παρατηρείται και στις τιμές του ολικού φλαβονοειδικού φορτίου (TFC). Η εκχύλιση στους υπερήχους με EtOAc φαίνεται ότι ευνοεί την παραλαβή μεγάλου εύρους μη πολικών φλαβονοειδών του φυτού με την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος **G.g.UAE.EtOAc** να είναι 1.4 φορές υψηλότερη σε σχέση με τα λοιπά δείγματα.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, οι δύο τεχνικές παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα **G.g Run Opt Yield** και **G.g.UAE.DCM** παρουσιάζουν υψηλή δράση στο τεστ του ABTS και μάλιστα παρόμοια με αυτή του πρότυπου αναστολέα (Trolox IC<sub>50</sub>≈8 μg/mL).

## 11.11 Μοντελοποίηση της Υ.Ε. με τη χρήση του μοντέλου Sononά

Για τη μοντελοποίηση της διεργασίας και για τη μελέτη των φαινομένων μεταφοράς μάζας, επιλέχθηκε να γίνει η εφαρμογή του μοντέλου των Sononά et al., (1994), διότι παρέχει πολύ καλά και αξιόλογα αποτελέσματα [63],[64],[65] χωρίς να απαιτεί ιδιαίτερα πολύπλοκους μαθηματικούς υπολογισμούς.

Έχοντας γνώση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης (300 bar και 5 με 10 % συνδιαλύτη), αποφασίστηκε η προσαρμογή του μοντέλου να γίνει στα πειράματα των οποίων οι συνθήκες ήταν παραπλήσιες των βέλτιστων (**G.g.Run 7 Opt**, **G.g.Run 9 Opt**, **G.g.Run 10 Opt** και **G.g.Run 12 Opt**).

Αφού καταστρώθηκαν οι εξισώσεις του μοντέλου στο υπολογιστικό πρόγραμμα Excel (Εξισώσεις I έως IX), εφαρμόστηκε ο μη γραμμικός GRG αλγόριθμος του Solver από όπου και υπολογίστηκαν οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου. Τα αποτελέσματα των ανεξάρτητων παραμέτρων καθώς και τα μέσα απόλυτα % σφάλματα (AAD%) παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 83. Αποτελέσματα ανεξαρτήτων παραμέτρων της Υ.Ε. του μοντέλου Sononά

Δείγμα	$\gamma r$	$x_o$	$x_k$	$Z^* \dot{q} * 10^2$ (1/s)	$W^* \dot{q} * 10^5$ (1/s)	AAD (%)
<b>G.g.Run 7 Opt</b>	0.0010	0.027	0.016	3.10	11.55	1.17%
<b>G.g.Run 9 Opt</b>	0.00031	0.009	0.005	3.10	8.01	2.85%
<b>G.g.Run 10 Opt</b>	0.00065	0.020	0.012	3.10	11.86	0.96%
<b>G.g.Run 12 Opt</b>	0.00052	0.016	0.0096	3.10	15.00	0.75%

Ο υπολογισμός των σφαλμάτων έγινε από την σχέση:

$$AAD (\%) = \{1/NP \times \sum [(e_{exp} - e_{calc}) / e_{exp}]\} * 100$$

όπου NP ο αριθμός των πειραματικών σημείων.

Τόσο από τα σφάλματα όσο και από την εικόνα των διαγραμμάτων (Εικόνα 152) γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το μοντέλο των Sononά et al. (1994) περιγράφει πολύ καλά τα πειραματικά δεδομένα.

Όσο αφορά τις παραμέτρους του μοντέλου, η διαλυτότητα των ουσιών στην κινητή φάση ( $\gamma r$ ) υπολογίζεται από την κλίση του ευθυγράμμου τμήματος της

καμπύλης εκχύλισης. Για τον υπολογισμό της τιμής της διαλυτότητας, θεωρήσαμε ότι η ροή είναι αρκετά χαμηλή (1 kg/h) και ο χρόνος επαφής του διαλύτη με τα συστατικά να είναι αρκετά μεγάλος, ώστε η τιμή να μπορεί να θεωρηθεί κοντά σε αυτή της ισορροπίας. Από τις τιμές του  $y_r$  παρατηρείται ότι με την αύξηση της πίεσης και του ποσοστού του συνδιαλύτη, αυξάνεται και η διαλυτότητα των ουσιών, παρατήρηση η οποία έρχεται σε συμφωνία με τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του CCD.

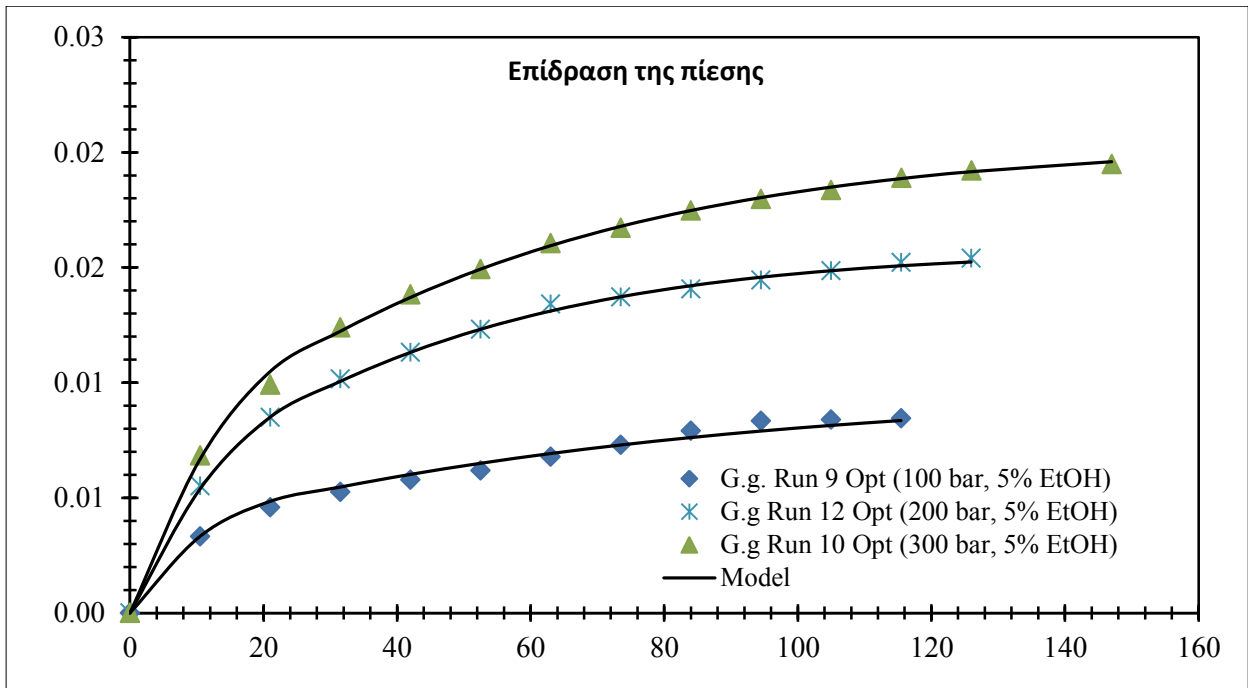
Επίσης, το  $x_o$  εκφράζει τη μέγιστη δυνατή ποσότητα ουσιών που μπορούν να εκχυλιστούν στις δεδομένες συνθήκες του κάθε πειράματος και υπολογίζεται πειραματικά μέσα από την εξαντλητική εκχύλιση της πρώτης ύλης, ενώ το  $x_k$  εκφράζει την παγιδευμένη ποσότητα μεταβολιτών στο δείγμα. Κατά τον υπολογισμό των τιμών, παρατηρήθηκε ότι ο λόγος  $x_k / x_o$  ήταν σταθερός για όλα τα πειράματα ( $\approx 0.6$ ), οπότε αποφασίσθηκε να διατηρηθεί μια κοινή τιμή για όλα τα πειράματα και να μειωθεί κατά έναν παράγοντα ο αριθμός των προσαρμόσιμων παραμέτρων.

Στη συνέχεια, υπολογίσθηκαν και οι τιμές των  $qm$  και  $qn$  οι οποίες βοηθούν στον προσδιορισμό των σταδίων της διεργασίας, με τις τιμές τους να δείχνουν ότι το 1<sup>ο</sup> στάδιο της γρήγορης εκχύλισης ολοκληρώνεται μέσα στα 2.5 πρώτα λεπτά, το ενδιάμεσο στάδιο έχει διάρκεια μεταξύ 2 και 15 λεπτών και τέλος το 3<sup>ο</sup> στάδιο περιγράφει μόνο την αργή φάση εκχύλισης και αφορά χρόνους από τα 15 λεπτά και μετά.

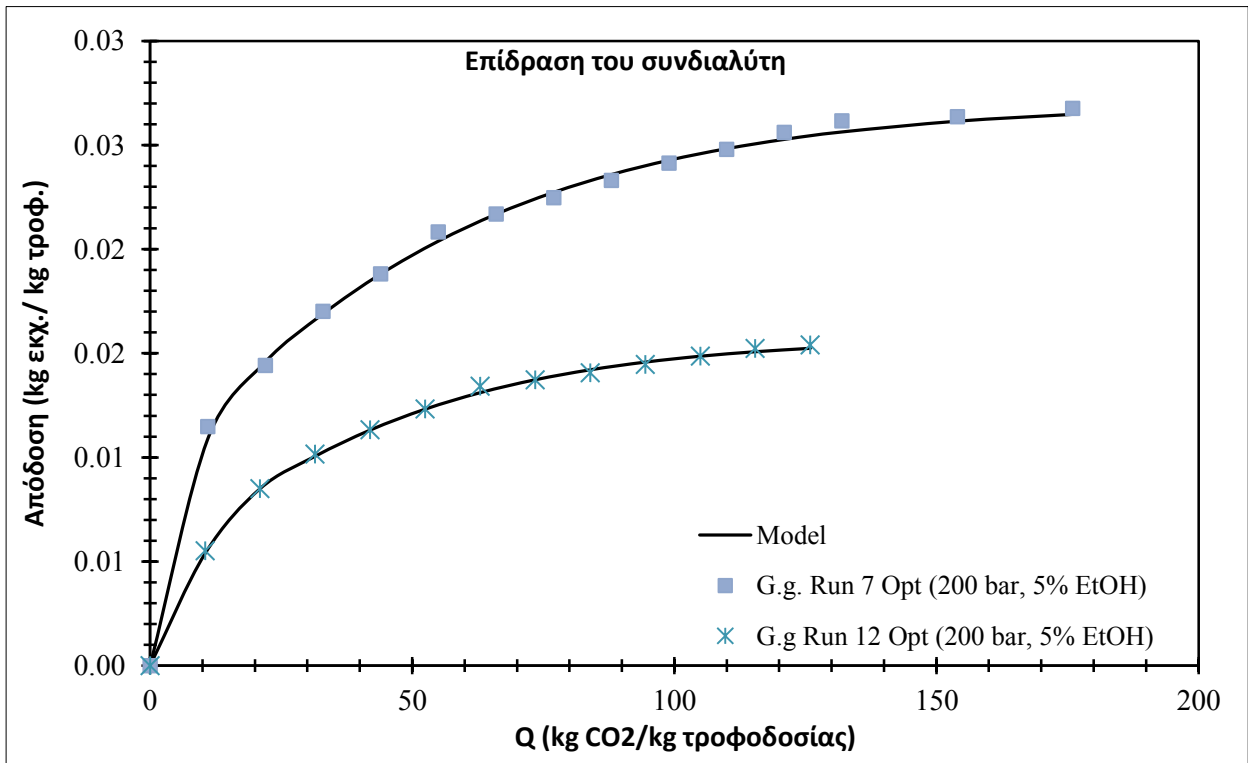
Παρατηρώντας την τιμή του  $qm$  διαπιστώνεται ότι το πρώτο κομμάτι της εκχύλισης είναι ιδιαίτερα σύντομο, γι' αυτό και θεωρήθηκε ότι οι τιμές του  $Z \times \dot{q}$  δεν επηρεάζουν την περιγραφή της διεργασίας, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια κοινή τιμή για όλα τα πειράματα ( $Z \times \dot{q} = 3.10$ ). Επομένως, το μεγαλύτερο κομμάτι της εκχύλισης ελέγχεται από τη μεταφορά μάζας στη φάση του στερεού ( $W \times \dot{q}$ ).

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του μοντέλου μαζί με τα πειράματα (Εικόνες 150, 151 και 152), από όπου φαίνεται ότι το η καμπύλη του μοντέλου βρίσκεται σε καλή συμφωνία πειραματικά δεδομένα.

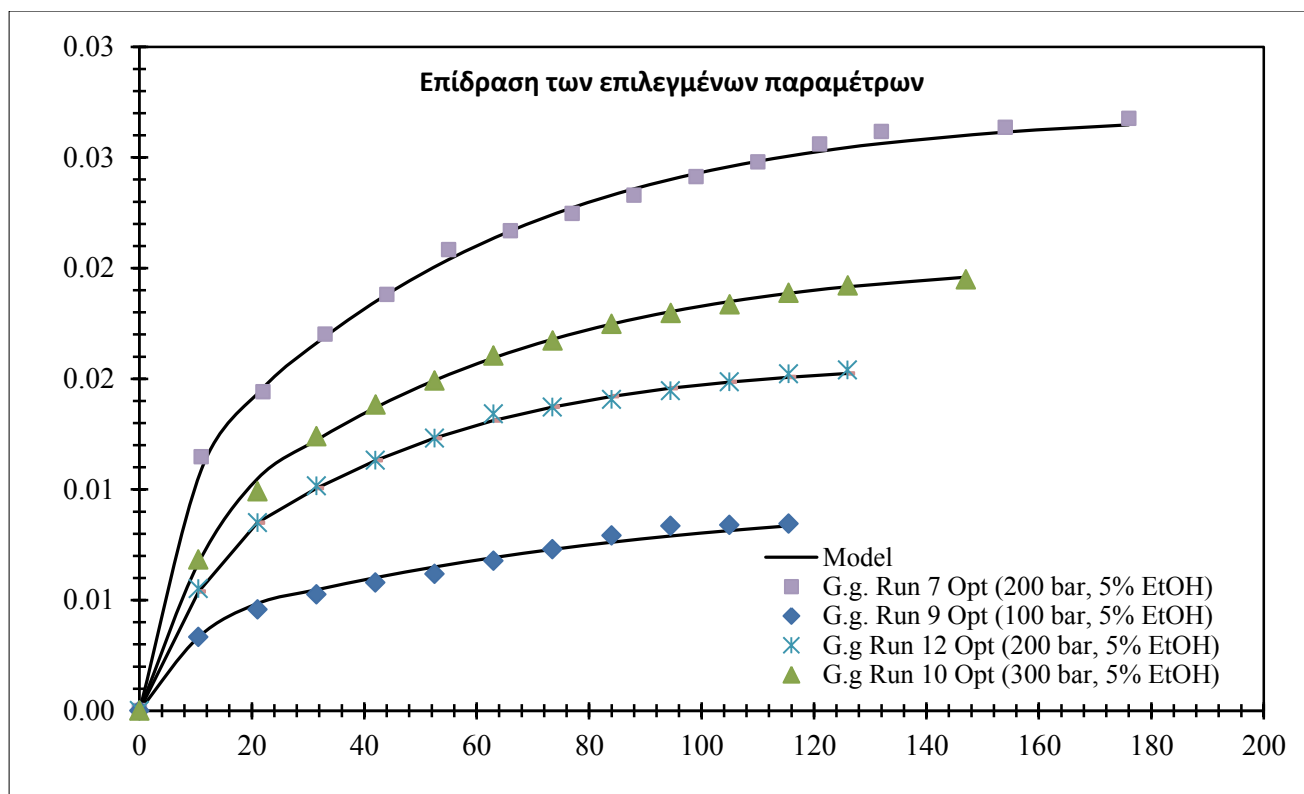




Εικόνα 150. Επίδραση της πίεσης στην απόδοση της ΥΕ και η προσαρμογή των αποτελεσμάτων του μοντέλου της Σοννά



Εικόνα 151. Επίδραση του ποσοστού συνδιαλύτη στην απόδοση της ΥΕ και η προσαρμογή των αποτελεσμάτων του μοντέλου της Σοννά



Εικόνα 152. Απόδοση της Υ.Ε. για το φυτό της *G. glabra* συναρτήσει του χρόνου για τις διάφορες συνθήκες εκχύλισης.

## 11.12 Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης εφαρμόστηκε η Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών της Υ.Ε. των ριζών της γλυκύρριζας, με σκοπό την παρασκευή εκχυλισμάτων με υψηλές τιμές απόδοσης, ισχυρή δράση έναντι της τυροσινάσης, αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση και υψηλό φορτίο σε φλαβονοειδή. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, εφαρμόστηκε αρχικά ένας διαγνωστικός σχεδιασμός (Screening design) για τον εντοπισμό των σημαντικών παραμέτρων της διεργασίας και στη συνέχεια, ακολούθησε η μελέτη βελτιστοποίησης αυτών με την εφαρμογή ενός 'Central Composite' σχεδιασμού 13 πειραμάτων. Ο σχεδιασμός κατέληξε στη δημιουργία ενός συνόλου εξισώσεων συσχέτισης παραμέτρων – αποκρίσεων (Εξισώσεις i έως vii) η επίλυση των οποίων έγινε με σκοπό την παραγωγή εκχυλισμάτων με: α) υψηλή απόδοση, υψηλό φορτίο σε φλαβονοειδή και σημαντική αντιοξειδωτική δράση (**G.g.Run Opt Yield**) και β) υψηλή συγκέντρωση γκλαμπριντίνης και μέγιστη λευκαντική δράση (**G.g.Run Opt T.G.**). Βάση του σχεδιασμού αυτού

πραγματοποιήθηκαν τα προτεινόμενα πειράματα και προσδιορίστηκαν οι αντίστοιχες αποκρίσεις, οι τιμές των οποίων ήταν σε πολύ καλή συμφωνία με τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές. Το γεγονός αυτό έδειξε ότι η Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης παρέχει πολύ καλά αποτελέσματα για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας καθώς και για την παρασκευή εκχυλισμάτων με επιθυμητές ιδιότητες.

Επιπρόσθετα, τα εκχύλισματά της Υ.Ε. συγκρίθηκαν με αυτά της εκχύλισης με υπερήχους, με τα πρώτα να πλεονεκτούν ως προς δράση έναντι της τυροσινάσης, ενώ έδειξαν εξίσου υψηλές τιμές απόδοσης και αντιοξειδωτικής δράσης. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα **G.g.Run Opt T.G.** παρουσίασε 2 φορές πιο ισχυρή δράση από αυτά της UAE και **4.5** φορές πιο ισχυρή δράση από τον πρότυπο αναστολέα (Kojic acid:  $IC_{50} \approx 1.34 \mu\text{g/mL}$ ).

Επιπλέον, το εκχύλισμα **G.g.Run Opt Yield** παρουσίασε παρόμοιες τιμές απόδοσης και αντιοξειδωτικής δράσης με αυτά της UAE (**G.g.UAE.DCM** και **G.g.UAE.EtOAc**) και δύο φορές πιο ισχυρή ανασταλτική δράση στο ένζυμο τυροσινάση. Το γεγονός δείχνει ότι η Υ.Ε. θα μπορούσε να αποτελέσει μια άριστη εναλλακτική τεχνική για την παραγωγή μη πολικών, δραστικών εκχυλισμάτων από τις ρίζες του φυτού της *G. glabra*.

Στον αντίποδα, το πλεονέκτημα της UAE να μην έχει περιορισμούς στη χρήση πολικών διαλυτών, οδήγησε στην παραγωγή εκχυλισμάτων με πολύ υψηλές αποδόσεις (**G.g.UAE.MeOH**) και υψηλό φορτίο σε φλαβονοειδή (**G.g.UAE.EtOAc**), οι τιμές των οποίων έφθασαν 18.66% και 50.27 (mg κερ/g εκχ), αντίστοιχα.

Τέλος, έγινε η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μαθηματικό μοντέλο των Sonová *et al.* (1994). Το μοντέλο αυτό κατάφερε να περιγράψει τα δεδομένα σε ικανοποιητικό βαθμό, με την προσομοίωση να μπορεί να αξιοποιηθεί μελλοντικά για τη μελέτη φαινομένων μεταφοράς μάζας και στην κλιμάκωση μεγέθους της διεργασίας.

# *Glycyrrhiza glabra* μελέτη υπολείμματος Υ.Ε.

## 11.13 Σκοπός

Το υπόλειμμα της Υ.Ε., μολλονότι είναι απαλλαγμένο από τα μη πολικά συστατικά, τα οποία διαθέτουν αξιόλογη λευκαντική δράση, εξακολουθεί να είναι πλούσιο σε πολικούς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή εκχυλισμάτων με αξιόλογες βιολογικές δράσεις.

Αντικείμενο λοιπόν της παρούσας μελέτης, αποτέλεσε η αξιοποίηση του υπολείμματος για την παρασκευή δραστικών εκχυλισμάτων, τα οποία θα χαρακτηρίζονται από καλή αντιοξειδωτική δράση και υψηλό φορτίο σε φαινόλες και φλαβονοειδή. Και σε αυτή την περίπτωση η τεχνική που επιλέχθηκε για την παρασκευή των εκχυλισμάτων ήταν αυτή της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE), ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν EtOH, H<sub>2</sub>O και μίγματα αυτών.

Λόγω των πολύ καλών αποτελεσμάτων που παρείχε η Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (RSM) για την περίπτωση της Υ.Ε., αποφασίσθηκε να γίνει η εφαρμογή της και στη μελέτη του υπολείμματος. Έτσι, εφαρμόσθηκε ένας 'Central Composite' σχεδιασμός με τρεις αριθμητικές παραμέτρους (θερμοκρασία, χρόνος στατικής εκχύλισης και ποσοστό συνδιαλύτη) και έναν 'categoric' (κύκλοι εκχύλισης), από τον οποίο προέκυψε το σύνολο των πειραμάτων που παρουσιάζεται στον Πίνακα 84.

Σε αντίθεση με τη διεργασία της Υ.Ε., σε αυτό το σχεδιασμό αποφασίσθηκε να μην λάβουν χώρα Screening design πειράματα, για τον εντοπισμό των σημαντικών παραμέτρων, λόγω του γεγονότος ότι προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας στη συσκευή ASE έχουν δείξει ότι οι κύριοι παράμετροι που επηρεάζουν τη διεργασία είναι: η θερμοκρασία, ο διαλύτης, οι κύκλοι και ο χρόνος εκχύλισης [58]. Έτσι λοιπόν, η μελέτη επικεντρώθηκε στην βελτιστοποίηση της διεργασίας της Υ.Ε, θέτοντας τις τέσσερις παραπάνω μεταβλητές ως παραμέτρους και τα όρια τιμών τους ορίσθηκαν ως εξής:

- Θερμοκρασία: 50 έως 190 °C
- Χρόνος στατικής εκχύλισης: 5 έως 15 min

- Ποσοστό αιθανόλης στο μείγμα του διαλύτη: 0 έως 100%
- Και κύκλοι εκχύλισης: 1 έως 3

Επιπλέον, προτάθηκε η πραγματοποίηση 6 κεντρικών πειραμάτων (center points) σε σταθερές συνθήκες: 120 °C, 10 min και 50% EtOH για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας της διαδικασίας.

Επίσης, στο σχεδιασμό έγινε και η εφαρμογή της εκχύλισης με υποκρίσιμο νερό (SCW), καθώς το υπόλειμμα της Υ.Ε. (απαλλαγμένο πλέον από τα θερμοευαίσθητα συστατικά) αποτελεί ιδανική πρώτη ύλη για την μελέτη της τεχνικής.

#### **11.14 Υλικά και μέθοδοι**

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

- Συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE 300)
- Φωτόμετρο (TECAN reader Infinite m200 pro)
- Συσκευή συμπύκνωσης υπό κενό (Rota vapor)
- Συσκευή λυοφιλοποίησης
- Design Expert 7 (StatEase, Inc., Minneapolis, MN)

#### **11.15 Παρασκευή εκχυλισμάτων με την τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης**

Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται οι συνθήκες των παραμέτρων που προτάθηκαν από το σχεδιασμό, καθώς και οι αντίστοιχες τιμές των αποδόσεων.

Για τη διαδικασία παρασκευής των εκχυλισμάτων ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια: αρχικά ζύγιση 6 g φυτικού υλικού εντός των ειδικών δοχείων εκχύλισης, ρύθμιση των παραμέτρων και τέλος παραλαβή των τελικών εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια, συμπυκνώνθηκαν τα δείγματα σε συσκευή συμπύκνωσης υπό κενό (Rota Vapor), με την τελική απομάκρυνση του διαλύτη να γίνεται σε συσκευή λυοφιλοποίησης.

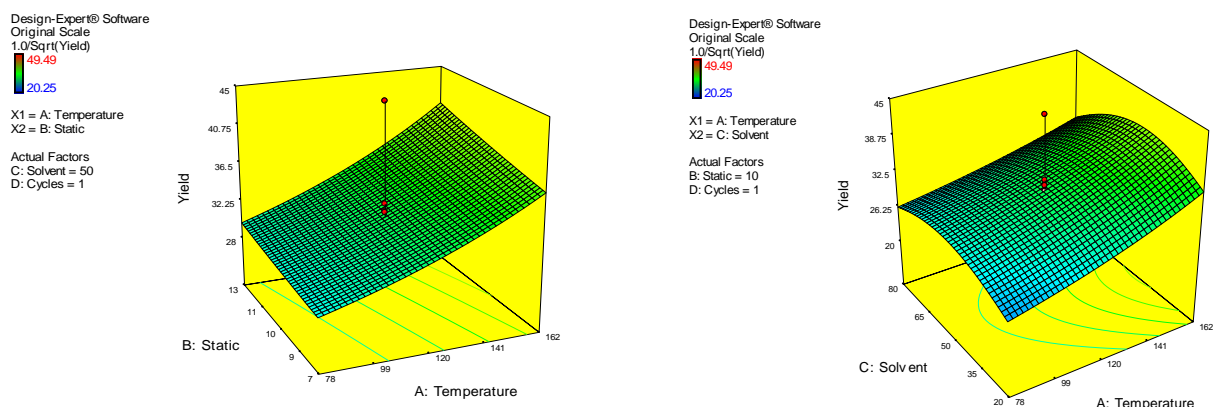
Πίνακας 84. Πίνακας συνθηκών εκχύλισης του υπολείμματος της Υ.Ε. για το φυτό *G. glabra* για τον CCD σχεδιασμό μαζί με τις αποδόσεις

Δείγμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Διαλύτης (%)	Κύκλοι εκχύλισης	Απόδοση (%)
G.g res.Run 1	162	13	20	1	33.61
G.g res.Run 2	120	10	50	1	34.03
G.g res.Run 3	120	10	50	1	32.19
G.g res.Run 4	120	15	50	1	36.95
G.g res.Run 5	78	13	80	1	26.48
G.g res.Run 6	120	10	50	3	36.70
G.g res.Run 7	162	7	20	1	34.46
G.g res.Run 8	190	10	50	1	43.28
G.g res.Run 9	78	13	20	3	32.03
G.g res.Run 10	120	10	50	1	33.09
G.g res.Run 11	162	13	80	3	34.83
G.g res.Run 12	120	10	100	1	20.25
G.g res.Run 13	120	10	50	3	35.00
G.g res.Run 14	120	5	50	3	33.05
G.g res.Run 15	50	10	50	3	32.54
G.g res.Run 16	162	13	20	3	49.49
G.g res.Run 17	162	13	80	1	33.22
G.g res.Run 18	120	10	50	1	44.94
G.g res.Run 19	162	7	80	3	29.55
G.g res.Run 20	78	7	20	3	35.32
G.g res.Run 21	120	10	50	3	29.55
G.g res.Run 22	120	15	50	3	31.89
G.g res.Run 23	78	7	80	1	26.24
G.g res.Run 24	162	7	20	3	45.80
G.g res.Run 25	78	7	20	1	20.39
G.g res.Run 26	120	10	50	3	35.67
G.g res.Run 27	120	10	50	1	32.08
G.g res.Run 28	120	10	0	1	23.22
G.g res.Run 29	120	10	0	3	28.79
G.g res.Run 30	78	13	20	1	26.45
G.g res.Run 31	120	5	50	1	32.93
G.g res.Run 32	120	10	50	3	32.46
G.g res.Run 33	120	10	100	3	23.87
G.g res.Run 34	120	10	50	1	33.24
G.g res.Run 35	120	10	50	3	34.84

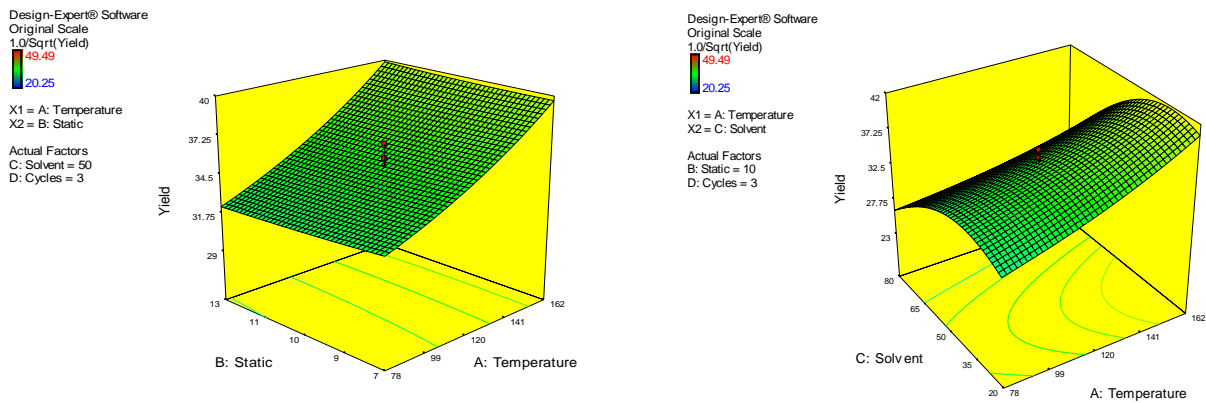
<b>G.g res.Run 36</b>	78	13	80	3	23.98
<b>G.g res.Run 37</b>	78	7	80	3	26.96
<b>G.g res.Run 38</b>	190	10	50	3	36.06
<b>G.g res.Run 39</b>	50	10	50	1	28.51
<b>G.g res.Run 40</b>	162	7	80	1	33.69

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 84 διαπιστώνεται ότι η επιταχυνόμενη εκχύλιση παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά ανάκτησης συστατικών, με τις τιμές των αποδόσεων να φτάνουν έως και το 49% της ξηρής μάζας του φυτού (**G.g res.Run 16**). Μάλιστα, οι υψηλότερες τιμές απόδοσης παρατηρούνται κατά τη χρήση θερμοκρασιών υψηλότερων του σημείου ζέσης του διαλύτη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η χρήση υποκρίσιμου νερού συμβάλει σημαντικά στην αύξηση της απόδοσης των εκχυλισμάτων. Φαίνεται πως οι μεταβολές στην πολικότητα του νερού έχουν σαν αποτέλεσμα την εκχύλιση μεγαλύτερου εύρους συστατικών, διαφορετικής πολικότητας, οδηγώντας εν τέλει στην εκχύλιση ακόμα περισσότερων δραστικών συστατικών και επομένως στην σημαντική αύξηση του ξηρού βάρους του εκχυλίσματος.

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα των αποδόσεων, επεξεργάστηκαν κατάλληλα και προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα:



**Εικόνα 153.** Διαγράμματα αποδόσεων ως συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 1 κύκλο εκχύλισης



Εικόνα 154. Διαγράμματα αποδόσεων ως συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 3 κύκλους εκχύλισης

Για την καλύτερη συσχέτιση των αποτελεσμάτων, ήταν απαραίτητος ένας μετασχηματισμός των τιμών της απόδοσης:

$$\text{Απόδοση}' = \frac{1}{\text{Απόδοση}^2}$$

Στη συνέχεια, προτάθηκε από το πρόγραμμα, το μοντέλο δευτέρου βαθμού ( $p\text{-value} < 0.0001$ ) για να περιγράψει τις μεταβολές της απόκρισης, με τις εξισώσεις της διεργασίας, για 1 και 3 κύκλους εκχύλισης να είναι οι ακόλουθες:

Για 1 κύκλο εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$\begin{aligned} \text{Απόδοση}' = & 0.25744 - (2.36938\text{E-}004 * \text{Θερμοκρασία}) - (7.48379\text{E-}004 * \text{Χρ.εκχύλισης}) \\ & - (1.67226\text{E-}003 * \text{Διαλύτης}) - (4.50499\text{E-}006 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}) \\ & + (2.06787\text{E-}006 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) + (1.37812\text{E-}005 * \\ & \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) - (5.47082\text{E-}007 * \text{Θερμοκρασία}^2) - (2.04331\text{E-}005 * \\ & \text{Χρ.εκχύλισης}^2) + (1.28954\text{E-}005 * \text{Διαλύτης}^2) \end{aligned}$$

Για 3 κύκλους εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$\begin{aligned} \text{Απόδοση}' = & 0.20879 - (1.26198\text{E-}004 * \text{Θερμοκρασία}) + (3.87987\text{E-}004 * \text{Χρ.εκχύλισης}) - \\ & (1.31560\text{E-}003 * \text{Διαλύτης}) - (4.50499\text{E-}006 * \text{Θερμοκρασία} * \\ & \text{Χρ.εκχύλισης}) + (2.06787\text{E-}006 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) + (1.37812\text{E-}005 * \\ & \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) - (5.47082\text{E-}007 * \text{Θερμοκρασία}^2) - (2.04331\text{E-}005 * \\ & \text{Χρ.εκχύλισης}^2) + (1.28954\text{E-}005 * \text{Διαλύτης}^2) \end{aligned}$$

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές της απόδοσης ( $F\text{-Value} = 6.28$  και  $p\text{-value} < 0.0001$ ), ενώ το 'normal probability test' έδειξε την απουσία έκτροπων τιμών



(outliers). Επίσης, υπολογίσθηκαν και οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού  $R^2=0.7586$ , adjusted  $R^2=0.6380$  και predicted  $R^2=0.3558$ . Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των παραμέτρων adjusted  $R^2$  και predicted  $R^2$  (μεγαλύτερη του 0.2) θεωρείται στατιστικά σημαντική, γι' αυτό και προτάθηκε από το σχεδιασμό το μοντέλο να εξετασθεί με προσοχή κατά το στάδιο αριθμητικής βελτιστοποίησης, διότι υπάρχει ο κίνδυνος εσφαλμένης πρόρρησης αποκρίσεων.

Επιπλέον, η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε στο 10.8, που είναι αρκετά μεγαλύτερη του προτεινόμενου ορίου 4 και υποδηλώνει ότι η αναλογία σήματος προς το θόρυβο είναι μικρότερη από το πραγματικό μέγεθος της επίδρασης.

Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών ελέγχων επιβεβαίωσαν την αξιοπιστία του μοντέλου καθώς και την ικανότητά του για την περιγραφή και πρόβλεψη των αποκρίσεων της απόδοσης του υπολείμματος. Τα σχετικά διαγράμματα παρατίθενται στο Παράρτημα.

**Πίνακας 85. Πίνακας τιμών ANOVA για την απόδοση του υπολείμματος της Υ.Ε. του φυτού *G.glabra***

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	0.009	13	0.0007	6.28	< 0.0001
<b>A-Θερμοκρασία</b>	0.003	1	0.0030	26.88	< 0.0001
<b>B-Χρ. εκχύλισης</b>	4.68E-05	1	4.68E-05	0.41	0.5273
<b>C-Διαλύτης</b>	0.0007	1	0.0007	6.97	0.0138
<b>D-Κύκλοι</b>	0.0003	1	0.0003	3.32	0.0797
<b>A*B</b>	4.97E-06	1	4.97E-06	0.043	0.8362
<b>A*C</b>	0.0001	1	0.0001	0.91	0.3466
<b>A*D</b>	0.0001	1	0.0001	1.27	0.2696
<b>B*C</b>	2.37E-05	1	2.37E-05	0.21	0.6520
<b>B*D</b>	7.79E-05	1	7.79E-05	0.68	0.4159
<b>C*D</b>	0.0007	1	0.0007	6.73	0.0154
<b>A<sup>2</sup></b>	2.59E-05	1	2.59E-05	0.22	0.6377
<b>B<sup>2</sup></b>	9.4E-07	1	9.4E-07	0.0082	0.9283
<b>C<sup>2</sup></b>	0.003	1	0.003	32.83	< 0.0001
<b>Lack of Fit</b>	2.181E-003	16	1.363E-004	1.74	0.1888

Από την παρατήρηση των προαναφερόμενων εξισώσεων και των αντίστοιχων διαγραμμάτων παρατηρείται ότι για την παραλαβή εκχυλισμάτων με

υψηλές αποδόσεις είναι απαραίτητη η χρήση υψηλών θερμοκρασιών, πολλών κύκλων εκχύλισης και μίγματος διαλυτών EtOH/H<sub>2</sub>O [338].

### 11.15.1 Έλεγχος ως προς την αντιοξειδωτική δράση με την μέθοδο DPPH

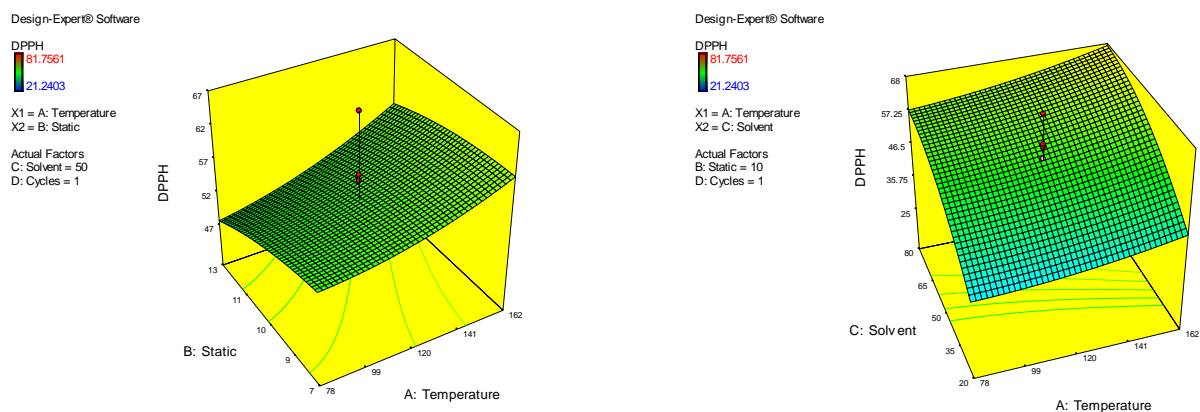
Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, όλα τα δείγματα μετρήθηκαν σε συγκεντρώσεις 500 µg/mL, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 86. Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH) για το υπόλειμμα της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

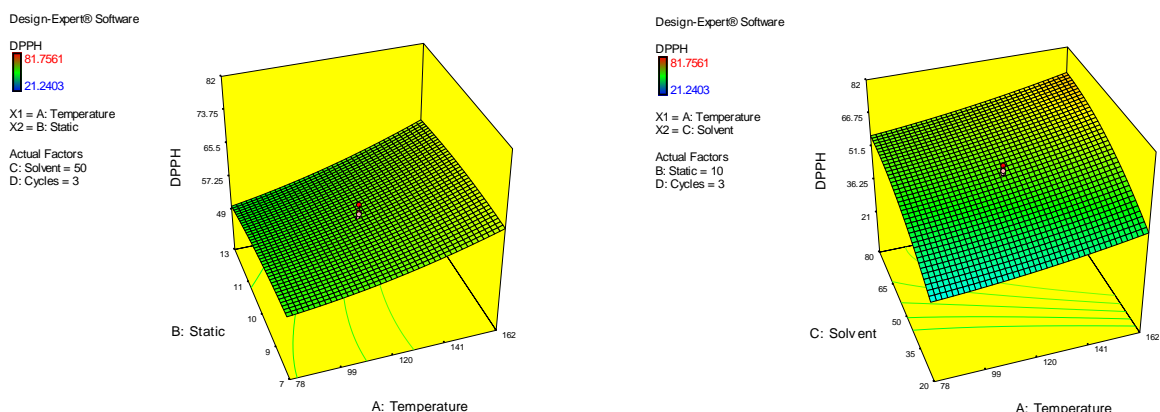
Δείγματα	% Inhibition, (C <sub>well</sub> =500µg/mL)	Δείγματα	% Inhibition, (C <sub>well</sub> =500µg/mL)
G.g res.Run 1	32.80	G.g res.Run 21	57.29
G.g res.Run 2	49.64	G.g res.Run 22	61.05
G.g res.Run 3	50.59	G.g res.Run 23	56.12
G.g res.Run 4	48.30	G.g res.Run 24	47.49
G.g res.Run 5	50.92	G.g res.Run 25	34.23
G.g res.Run 6	49.81	G.g res.Run 26	54.51
G.g res.Run 7	43.80	G.g res.Run 27	56.98
G.g res.Run 8	63.83	G.g res.Run 28	25.63
G.g res.Run 9	29.49	G.g res.Run 29	21.24
G.g res.Run 10	57.85	G.g res.Run 30	31.75
G.g res.Run 11	63.61	G.g res.Run 31	59.00
G.g res.Run 12	65.03	G.g res.Run 32	57.66
G.g res.Run 13	56.34	G.g res.Run 33	62.40
G.g res.Run 14	54.32	G.g res.Run 34	53.45
G.g res.Run 15	50.46	G.g res.Run 35	59.66
G.g res.Run 16	43.52	G.g res.Run 36	56.68
G.g res.Run 17	65.53	G.g res.Run 37	58.91
G.g res.Run 18	66.93	G.g res.Run 38	81.76
G.g res.Run 19	65.81	G.g res.Run 39	51.51
G.g res.Run 20	49.27	G.g res.Run 40	64.33

Τα εκχυλίσματα της επιταχυνόμενης εκχύλισης παρουσίασαν μια έντονη διακύμανση στις τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης. Συγκεκριμένα, οι τιμές κυμάνθηκαν από 21% ως και 81%, με πιο δραστικά να είναι τα εκχυλίσματα στα οποία έγινε χρήση υψηλών θερμοκρασιών, πολλών κύκλων εκχύλισης και μίγματος EtOH/H<sub>2</sub>O (**G.g res.Run 38**). Η διακύμανση των τιμών πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης των δειγμάτων, οι οποίες είχαν σα συνέπεια την παραλαβή μεταβολιτών διαφορετικής δραστηριότητας.

Στη συνέχεια τα δεδομένα εισήχθησαν στο πρόγραμμα και μετά από κατάλληλη επεξεργασία προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα:



**Εικόνα 155. Διαγράμματα αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH) ως συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 1 κύκλο εκχύλισης**



**Εικόνα 156. Διαγράμματα αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH) ως συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 3 κύκλους εκχύλισης**

Από το πρόγραμμα προτάθηκε ένα μοντέλο δευτέρου βαθμού (p-value=0.0002) για να περιγράψει τις μεταβολές της αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH), ενώ οι εξισώσεις για 1 και 3 κύκλους εκχύλισης είχαν την ακόλουθη μορφή:

Για 1 κύκλο εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$DPPH = 40.65007 - (0.18747 * \text{Θερμοκρασία}) - (0.66389 * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (0.69502 * \text{Solvent}) + (6.92602E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (6.96123E-004 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) + (0.020365 * \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) + (7.44471E-004 * \text{Θερμοκρασία}^2) - (0.10297 * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) - (5.86704E-003 * \text{Διαλύτης}^2)$$

Για 3 κύκλους εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$DPPH = 35.51134 - (0.14424 * \text{Θερμοκρασία}) - (0.20501 * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (0.65532 * \text{Διαλύτης}) + (6.92602E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (6.96123E-004 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) + (0.020365 * \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) + (7.44471E-004 * \text{Θερμοκρασία}^2) - (0.10297 * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) - (5.86704E-003 * \text{Διαλύτης}^2)$$

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές του DPPH (F-Value = 12.90 και p-value < 0.0001). Επίσης, υπολογίσθηκαν και οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού  $R^2=0.8658$ , adjusted  $R^2=0.7986$  και predicted  $R^2=0.6505$ , ενώ από το 'normal probability test' φάνηκε ότι δεν υπάρχουν outliers. Ακόμα, τα αποτελέσματα ήταν ανεξάρτητα του θορύβου και αυτό επιβεβαιώθηκε από την τιμή 'adequate precision value' η οποία υπολογίστηκε 15.42.

Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών ελέγχων επιβεβαίωσαν την αξιοπιστία του μοντέλου καθώς και την ικανότητά του περιγράφει και να προβλέπει τις τιμές των αποκρίσεων της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος έναντι του DPPH. Τα σχετικά διαγράμματα παρατίθενται στο Παράρτημα.

Πίνακας 87. Πίνακας τιμών ANOVA για την αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του υπολείμματος της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
<b>Model</b>	5222.84	13	401.76	12.90	< 0.0001
<b>A-Θερμοκρασία</b>	646.47	1	646.47	20.76	0.0001
<b>B-Χρ. εκχύλισης</b>	100.26	1	100.26	3.22	0.0844
<b>C-Διαλύτης</b>	3406.90	1	3406.90	109.38	< 0.0001
<b>D-Κύκλοι</b>	70.36	1	70.36	2.26	0.1449
<b>A*B</b>	11.75	1	11.75	0.38	0.5444
<b>A*C</b>	11.87	1	11.87	0.38	0.5423
<b>A*D</b>	22.10	1	22.10	0.71	0.4072
<b>B*C</b>	51.84	1	51.84	1.66	0.2084
<b>B*D</b>	12.71	1	12.71	0.41	0.5286
<b>C*D</b>	9.51	1	9.51	0.31	0.5853
<b>A<sup>2</sup></b>	47.94	1	47.94	1.54	0.2258
<b>B<sup>2</sup></b>	23.87	1	23.87	0.77	0.3893
<b>C<sup>2</sup></b>	775.10	1	775.10	24.89	< 0.0001
<b>Lack of Fit</b>	2.181E-003	16	1.363E-004	1.74	0.1888

Από την παρατήρηση των διαγραμμάτων (Εικόνες 155 και 156) προκύπτει ότι για υψηλές τιμές ανασταλτικής δράσης έναντι του DPPH απαιτείται η χρήση υψηλών θερμοκρασιών και η χρήση μίγματος διαλυτών με υψηλά ποσοστά EtOH. Αντίθετα, παρατηρείται ότι οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης δεν ευνοούν την καλύτερη δράση. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς να οφείλεται στην αλλίωση ορισμένων δραστικών μεταβολιτών, λόγω της παρατεταμένης παραμονής τους σε υψηλές θερμοκρασίες.

### 11.15.2 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου (TPC)

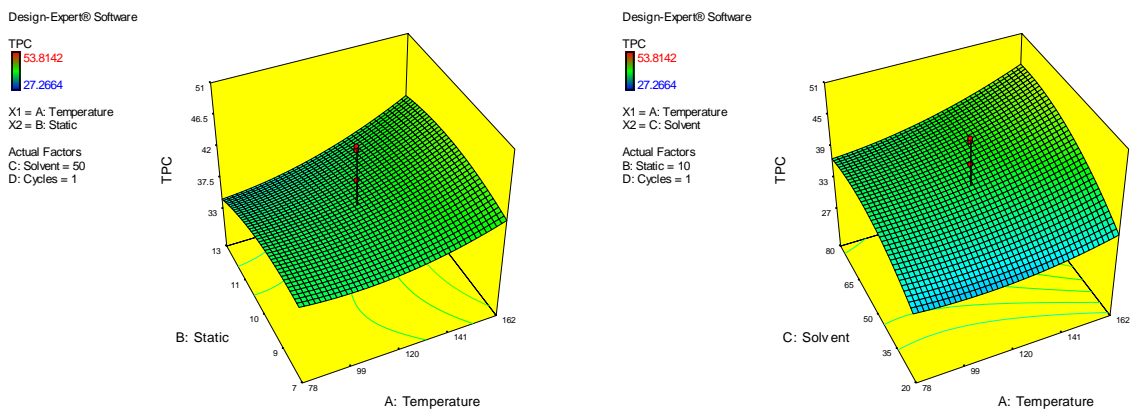
Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τον υπολογισμό του TPC περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 'Υλικά και μέθοδοι' με τα αποτελέσματα της ανάλυσης να παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 88. Πίνακας αποτελεσμάτων ολικού φαινολικού φορτίου (TPC) τα δείγματα του υπολείμματος της Υ.Ε. για το φυτό *G. glabra*

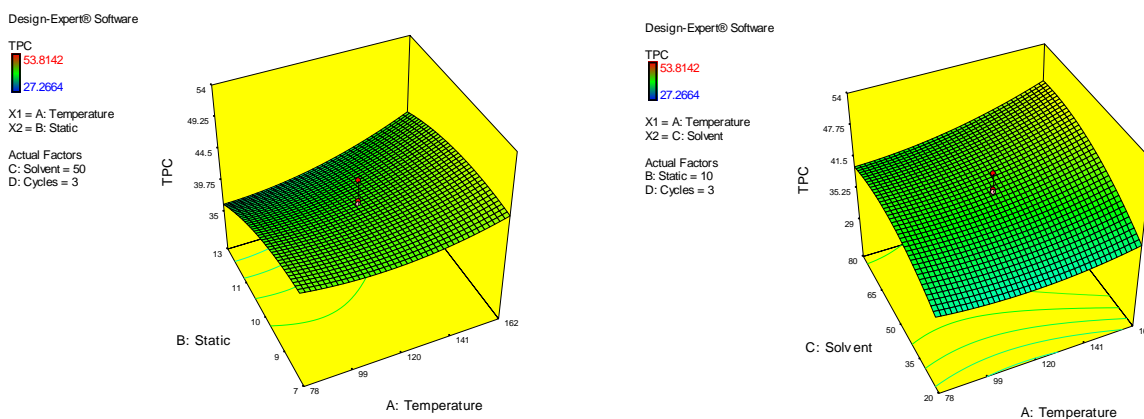
Δείγματα	TPC (mg GA/g εκχ)	Δείγματα	TPC (mg GA/g εκχ)
<b>G.g res.Run 1</b>	32.77	<b>G.g res.Run 21</b>	41.34

G.g res.Run 2	42.05	G.g res.Run 22	35.01
G.g res.Run 3	36.69	G.g res.Run 23	39.35
G.g res.Run 4	34.34	G.g res.Run 24	34.28
G.g res.Run 5	31.01	G.g res.Run 25	27.27
G.g res.Run 6	35.98	G.g res.Run 26	40.01
G.g res.Run 7	32.62	G.g res.Run 27	39.47
G.g res.Run 8	50.04	G.g res.Run 28	27.71
G.g res.Run 9	24.92	G.g res.Run 29	29.19
G.g res.Run 10	33.85	G.g res.Run 30	31.90
G.g res.Run 11	45.47	G.g res.Run 31	36.41
G.g res.Run 12	38.10	G.g res.Run 32	44.96
G.g res.Run 13	41.35	G.g res.Run 33	39.40
G.g res.Run 14	44.81	G.g res.Run 34	33.53
G.g res.Run 15	40.39	G.g res.Run 35	41.81
G.g res.Run 16	33.65	G.g res.Run 36	32.77
G.g res.Run 17	39.91	G.g res.Run 37	42.05
G.g res.Run 18	46.18	G.g res.Run 38	36.69
G.g res.Run 19	43.23	G.g res.Run 39	34.34
G.g res.Run 20	41.98	G.g res.Run 40	31.01

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν κατάλληλα και προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα:



Εικόνα 157. Διαγράμματα φαινολικού φορτίου (TPC) ως συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 1 κύκλο εκχύλισης



**Εικόνα 158. Διαγράμματα φαινολικού φορτίου (TPC) ως συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 3 κύκλους εκχύλισης**

Από το πρόγραμμα προτάθηκε το μοντέλο δευτέρου βαθμού ( $p$ -value=0.0004) για να περιγράψει τις μεταβολές του φαινολικού φορτίου (TPC), με τις παραμέτρους της θερμοκρασίας και το ποσοστό του συνδιαλύτη να έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση.

Οι εξισώσεις που προέκυψαν για 1 και 3 κύκλους εκχύλισης είναι οι ακόλουθες:

Για 1 κύκλο εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$TPC = 31.16749 - (0.30605 * \text{Θερμοκρασία}) + (2.27023 * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (0.38322 * \text{Διαλύτης}) + (9.92939E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (1.21565E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) - (8.69514E-003 * \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) + (8.75612E-004 * \text{Θερμοκρασία}^2) - (0.16475 * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) - (3.26529E-003 * \text{Διαλύτης}^2)$$

Για 3 κύκλους εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$TPC = 41.78224 - (0.32214 * \text{Θερμοκρασία}) + (1.72801 * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (0.37041 * \text{Διαλύτης}) + (9.92939E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) + (1.21565E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) - (8.69514E-003 * \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) + (8.75612E-004 * \text{Θερμοκρασία}^2) - (0.16475 * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) - (3.26529E-003 * \text{Διαλύτης}^2)$$

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με ANOVA, έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό με περιγράψει τις μεταβολές του φαινολικού φορτίου (F-Value = 5.46 και  $p$ -value = 0.0001). Επιπλέον, υπολογίσθηκαν και οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού  $R^2=0.7320$ , adjusted  $R^2=0.5980$  και predicted  $R^2=0.4273$ , ενώ το 'normal probability test' έδειξε ότι δεν υπάρχουν outliers. Ακόμα, η τιμή 'adequate

precision value' υπολογίστηκε στο 10.62 που είναι μεγαλύτερη του προτεινόμενου ορίου, υποδηλώνοντας ότι τα αποτελέσματα είναι ανεξάρτητα από το θόρυβο.

Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών ελέγχων επιβεβαίωσαν την αξιοπιστία του μοντέλου καθώς και την ικανότητά του για περιγραφή και πρόβλεψη των αποκρίσεων του ολικού φαινολικού φορτίου του υπολείμματος (TPC). Τα σχετικά διαγράμματα παρατίθενται στο Παράρτημα.

**Πίνακας 89. Πίνακας τιμών ANOVA για το ολικό φαινολικό φορτίο (TPC) του υπολείμματος της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra***

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	1054.42	13	81.10	5.46	0.0001
<b>A-Θερμοκρασία</b>	149.08	1	149.08	10.04	0.0039
<b>B-Χρ. εκχύλισης</b>	70.17	1	70.17	4.72	0.0390
<b>C-Διαλύτης</b>	287.95	1	287.95	19.39	0.0002
<b>D-Κύκλοι</b>	68.71	1	68.71	4.62	0.0409
<b>AB</b>	24.15	1	24.15	1.62	0.2134
<b>AC</b>	36.20	1	36.20	2.43	0.1305
<b>AD</b>	3.06	1	3.06	0.20	0.6534
<b>BC</b>	9.45	1	9.45	0.63	0.4322
<b>BD</b>	17.74	1	17.74	1.19	0.2843
<b>CD</b>	0.98	1	0.98	0.066	0.7983
<b>A<sup>2</sup></b>	66.32	1	66.32	4.46	0.0443
<b>B<sup>2</sup></b>	61.11	1	61.11	4.11	0.0528
<b>C<sup>2</sup></b>	240.08	1	240.08	16.17	0.0004
<b>Lack of Fit</b>	165.18	16	10.32	0.47	0.9155

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του πίνακα των παραπάνω εξισώσεων, αλλά και των διαγραμμάτων (Εικόνες 157 και 158) προκύπτει ότι για την παραλαβή εκχυλισμάτων με υψηλό φαινολικό φορτίο είναι απαραίτητη η χρήση υψηλών θερμοκρασιών και μίγματος διαλυτών με υψηλά ποσοστά EtOH [338]. Σε αντίθεση με τους Ju-Young Baek *et al*, (2008), παρατηρήσαμε ότι οι μικροί χρόνοι εκχύλισης ευνοούν την παραλαβή υψηλότερου φαινολικού φορτίου, το οποίο πιθανώς να σχετίζεται (όπως και στην αντιοξειδωτική δράση) με την καταστροφή ορισμένων φαινολών λόγω της παρατεταμένης παραμονής τους σε υψηλές θερμοκρασίες.



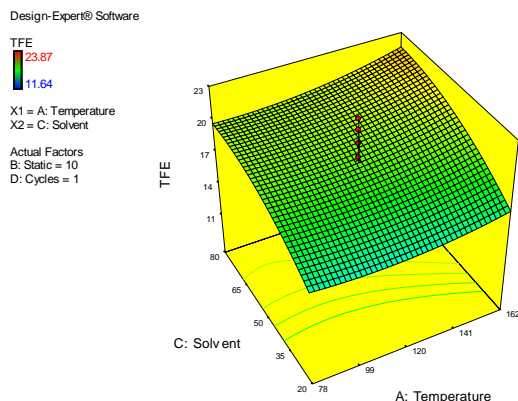
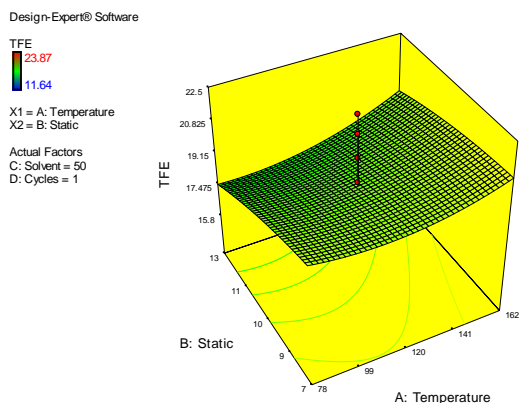
### 11.15.3 Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικών φλαβονοειδών (TFC)

Για τον υπολογισμό του ολικού φορτίου σε φλαβονοειδή, τα δείγματα μετρήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 2 mg/mL σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 'Υλικά και μέθοδοι'. Τα αποτελέσματα του ελέγχου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

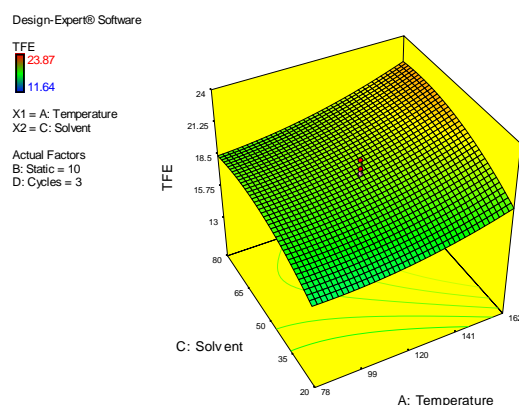
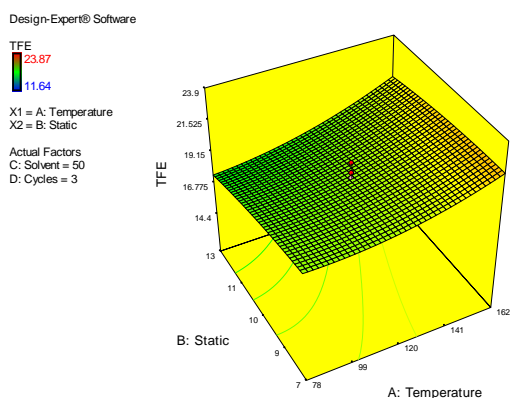
Πίνακας 90. Πίνακας αποτελεσμάτων ολικών φλαβονοειδών (TFC) τα δείγματα του υπολείμματος της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Δείγμα	TFC (mg κερκ/g εκχ)	Δείγμα	TFC (mg κερκ/g εκχ)
G.g res.Run 1	16.58	G.g res.Run 21	19.64
G.g res.Run 2	19.05	G.g res.Run 22	18.52
G.g res.Run 3	20.30	G.g res.Run 23	18.17
G.g res.Run 4	15.88	G.g res.Run 24	18.23
G.g res.Run 5	17.47	G.g res.Run 25	14.35
G.g res.Run 6	14.49	G.g res.Run 26	18.06
G.g res.Run 7	18.72	G.g res.Run 27	18.25
G.g res.Run 8	19.56	G.g res.Run 28	11.64
G.g res.Run 9	15.04	G.g res.Run 29	13.84
G.g res.Run 10	21.48	G.g res.Run 30	13.62
G.g res.Run 11	22.20	G.g res.Run 31	20.17
G.g res.Run 12	20.91	G.g res.Run 32	19.11
G.g res.Run 13	20.38	G.g res.Run 33	19.64
G.g res.Run 14	21.74	G.g res.Run 34	18.52
G.g res.Run 15	20.65	G.g res.Run 35	19.26
G.g res.Run 16	19.48	G.g res.Run 36	16.39
G.g res.Run 17	20.04	G.g res.Run 37	18.26
G.g res.Run 18	22.44	G.g res.Run 38	23.87
G.g res.Run 19	22.01	G.g res.Run 39	21.88
G.g res.Run 20	19.11	G.g res.Run 40	21.68

Τα διαγράμματα που προέκυψαν, μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι τα ακόλουθα:



Εικόνα 159. Διαγράμματα ολικών φλαβονοειδών (TFC) ως συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 1 κύκλο εκχύλισης



Εικόνα 160. Διαγράμματα ολικών φλαβονοειδών (TFC) ως συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 3 κύκλους εκχύλισης

Από το πρόγραμμα προτάθηκε ένα μοντέλο δευτέρου βαθμού ( $r$ -value=0.0083) για να περιγράψει τις μεταβολές του TPC ως συνάρτηση των παραμέτρων, ενώ οι εξισώσεις για 1 και 3 κύκλους εκχύλισης είχαν την ακόλουθη μορφή:

Για 1 κύκλο εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$TFC = 20.88344 - (0.10702 * \text{Θερμοκρασία}) - (0.15027 * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (0.16128 * \text{Διαλύτης}) + (2.54053E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (2.39911E-004 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) + (1.18087E-003 * \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) + (3.59782E-004 * \text{Θερμοκρασία}^2) - (0.025983 * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) - (1.28783E-003 * \text{Διαλύτης}^2)$$

Για 3 κύκλους εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$TFC = 20.41193 - (0.091141 * \text{Θερμοκρασία}) - (0.088463 * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (0.12945 * \text{Διαλύτης}) + (2.54053E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}) + (2.39911E-004 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) + (1.18087E-003 * \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) + (3.59782E-004 * \text{Θερμοκρασία}^2) - (0.025983 * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) - (1.28783E-003 * \text{Διαλύτης}^2)$$

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει το φορτίο σε φλαβονοειδή (F-Value = 4.02 και p-value=0.0012). Επίσης, από το πρόγραμμα υπολογίσθηκαν οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού  $R^2=0.6678$ , adjusted  $R^2=0.5017$  και predicted  $R^2=0.2335$ . Οι τιμές του adjusted  $R^2$  και του predicted  $R^2$  θα έπρεπε να συγκλίνουν. Διαφορές άνω του 0.20 θεωρούνται στατιστικά υψηλές για το μοντέλο και πιθανώς οφείλονται στην ύπαρξη κάποιας ισχυρή επίδρασης. Γι' αυτό και προτάθηκε από τον CCD σχεδιασμό, να εξετασθεί το μοντέλο με προσοχή κατά τα στάδια αριθμητικής βελτιστοποίησης. Επιπλέον, η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε 9.96 που είναι μεγαλύτερη του κατώτερου προτεινόμενου ορίου 4 με τα αποτελέσματα είναι ανεξάρτητα του θορύβου.

Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών ελέγχων επιβεβαίωσαν την αξιοπιστία του μοντέλου καθώς και την ικανότητα του για περιγραφή και πρόβλεψη των αποκρίσεων του φορτίου σε φλαβονοειδή (TFC). Τα σχετικά διαγράμματα παρατίθενται στο Παράρτημα.

Πίνακας 91. Πίνακας τιμών ANOVA για το ολικό φορτίο σε φλαβονοειδή (TFC) του υπολείμματος της Υ.Ε. του φυτού *G.glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	194.73	13	14.97	4.02	0.0012
<b>A-Θερμοκρασία</b>	28.793	1	28.79	7.72	0.0100
<b>B-Χρ. εκχύλισης</b>	18.27	1	18.27	4.90	0.0358
<b>C-Διαλύτης</b>	78.94	1	78.9	21.18	< 0.0001
<b>D-Κύκλοι</b>	2.120	1	2.12	0.56	0.4574
<b>A*B</b>	1.58	1	1.58	0.42	0.5205
<b>A*C</b>	1.41	1	1.41	0.37	0.5438
<b>A*D</b>	2.98	1	2.98	0.80	0.3791
<b>B*C</b>	0.17	1	0.174	0.04	0.8304
<b>B*D</b>	0.23	1	0.23	0.06	0.8055
<b>C*D</b>	6.11	1	6.11	1.64	0.2114
<b>A<sup>2</sup></b>	11.19	1	11.19	3.00	0.0948

<b>B<sup>2</sup></b>	1.52	1	1.520	0.40	0.5286
<b>C<sup>2</sup></b>	37.34	1	37.34	10.02	0.0039
<b>Lack of Fit</b>	60.42	16	3.78	1.04	0.4933

Από την παρατήρηση των εξισώσεων και των διαγραμμάτων (Εικόνες 159 και 160) προέκυψε ότι για την παραλαβή εκχυλισμάτων με υψηλό φορτίο σε φλαβονοειδή, απαιτείται η χρήση υψηλών θερμοκρασιών, μειωμένου χρόνου εκχύλισης και χρήση μίγματος διαλυτών με υψηλά ποσοστά EtOH.

#### 11.15.4 Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο ABTS

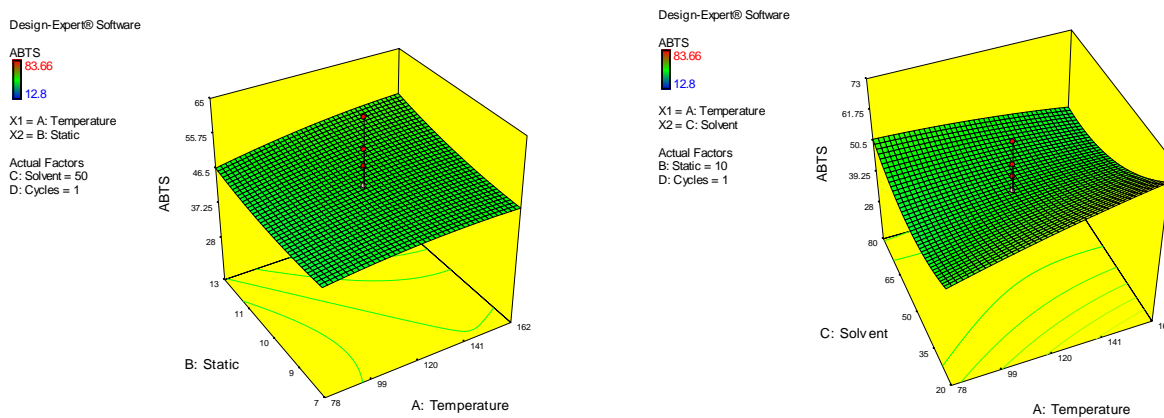
Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης στο ABTS, για όλα τα δείγματα υπολογίστηκαν οι τιμές IC<sub>50</sub> και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 92. Πίνακας αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικής δράσης σε ABTS για τα δείγματα του υπολείμματος της Υ.Ε. για το φυτό *G. glabra*

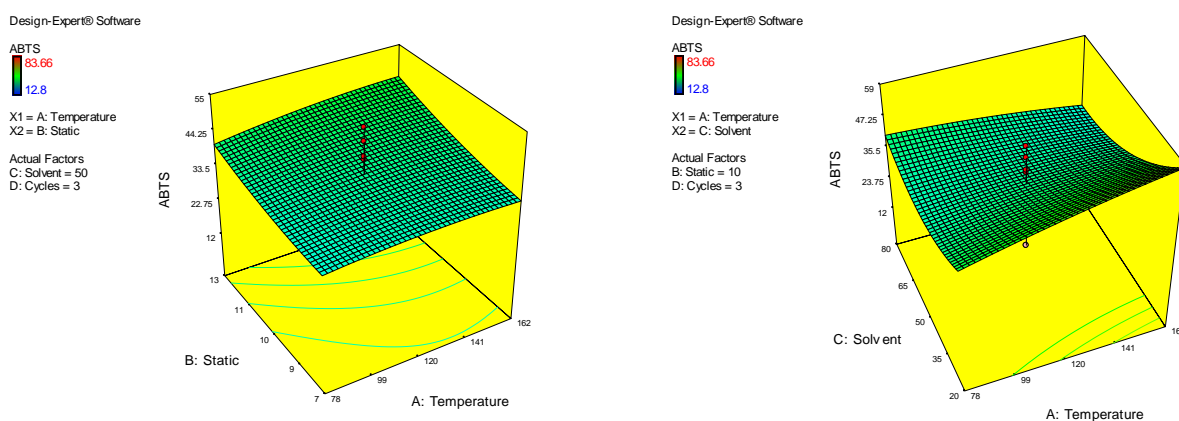
<b>Δείγματα</b>	<b>ABTS IC<sub>50</sub> (μg/ml)</b>	<b>Δείγματα</b>	<b>ABTS IC<sub>50</sub> (μg/ml)</b>
<b>G.g res.Run 1</b>	61.02	<b>G.g res.Run 21</b>	46.68
<b>G.g res.Run 2</b>	52.60	<b>G.g res.Run 22</b>	54.52
<b>G.g res.Run 3</b>	64.74	<b>G.g res.Run 23</b>	51.82
<b>G.g res.Run 4</b>	64.81	<b>G.g res.Run 24</b>	50.77
<b>G.g res.Run 5</b>	56.92	<b>G.g res.Run 25</b>	47.64
<b>G.g res.Run 6</b>	12.80	<b>G.g res.Run 26</b>	50.75
<b>G.g res.Run 7</b>	83.66	<b>G.g res.Run 27</b>	41.20
<b>G.g res.Run 8</b>	38.74	<b>G.g res.Run 28</b>	72.60
<b>G.g res.Run 9</b>	38.29	<b>G.g res.Run 29</b>	57.67
<b>G.g res.Run 10</b>	56.81	<b>G.g res.Run 30</b>	50.88
<b>G.g res.Run 11</b>	36.75	<b>G.g res.Run 31</b>	34.70
<b>G.g res.Run 12</b>	57.03	<b>G.g res.Run 32</b>	41.36
<b>G.g res.Run 13</b>	31.59	<b>G.g res.Run 33</b>	57.18
<b>G.g res.Run 14</b>	29.09	<b>G.g res.Run 34</b>	28.38
<b>G.g res.Run 15</b>	38.26	<b>G.g res.Run 35</b>	42.21

G.g res.Run 16	76.23	G.g res.Run 36	36.81
G.g res.Run 17	44.37	G.g res.Run 37	30.69
G.g res.Run 18	47.49	G.g res.Run 38	37.65
G.g res.Run 19	28.65	G.g res.Run 39	42.53
G.g res.Run 20	64.18	G.g res.Run 40	52.43

Τα διαγράμματα που προέκυψαν μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι τα ακόλουθα:



Εικόνα 161. Διαγράμματα αντιοξειδωτικής δράση (ABTS) σε συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 1 κύκλο εκχύλισης



Εικόνα 162. Διαγράμματα αντιοξειδωτικής δράση (ABTS) σε συνάρτηση του χρ. εκχύλισης - θερμοκρασίας και διαλύτη - θερμοκρασίας για 3 κύκλους εκχύλισης

Και για την περίπτωση του ABTS, προτάθηκε από το σχεδιασμό ένα μοντέλο δευτέρου βαθμού ( $p$ -value=0.0440) για να περιγράψει τις μεταβολές της

αντιοξειδωτικής δράσης, ως συνάρτηση των παραμέτρων. Αντιστοίχως, οι εξισώσεις που περιγράφουν τις μεταβολές της απόκρισης για 1 και 3 κύκλους εκχύλισης να είναι οι ακόλουθες:

Για 1 κύκλο εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$ABTS = 62.31501 + (0.32744 * \text{Θερμοκρασία}) - (4.22478 * \text{Χρ.εκχύλισης}) - (0.62494 * \text{Διαλύτης}) + (7.21754E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}) - (4.27951E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) + (0.021984 * \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) - (5.69396E-004 * \text{Θερμοκρασία}^2) + (0.14780 * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) + (7.61398E-003 * \text{Διαλύτης}^2)$$

Για 3 κύκλους εκχύλισης η εξίσωση είναι:

$$ABTS = 51.42937 + (0.31611 * \text{Θερμοκρασία}) - (3.52829 * \text{Χρ.εκχύλισης}) - (0.70757 * \text{Διαλύτης}) + (7.21754E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Χρ.εκχύλισης}) - (4.27951E-003 * \text{Θερμοκρασία} * \text{Διαλύτης}) + (0.021984 * \text{Χρ.εκχύλισης} * \text{Διαλύτης}) - (5.69396E-004 * \text{Θερμοκρασία}^2) + (0.14780 * \text{Χρ.εκχύλισης}^2) + (7.61398E-003 * \text{Διαλύτης}^2)$$

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), έδειξε ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ικανό να περιγράψει τις μεταβολές της απόκρισης (F-Value=2.13 και p-value=0.00483). Επίσης, υπολογίσθηκαν οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού  $R^2=0.5164$ , adjusted  $R^2=0.2745$  και predicted  $R^2=-0.1798$ . Η αρνητική τιμή της παραμέτρου 'predicted  $R^2$ ' υποδηλώνει ότι το μοντέλο παρουσιάζει αδυναμία στην ικανότητα πρόβλεψης αποτελεσμάτων, με τον μέσο όρο των τιμών της απόκρισης να αποτελεί καλύτερο δείκτη πρόβλεψης. Επιπλέον, η τιμή 'adequate precision value' υπολογίστηκε 6.48 που είναι οριακά υψηλότερη του προτεινόμενου ορίου 4.

Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών ελέγχων επιβεβαίωσαν την αξιοπιστία του μοντέλου καθώς και την ικανότητά του για περιγραφή και πρόβλεψη των αποκρίσεων του φορτίου σε φλαβονοειδή (TFC). Τα σχετικά διαγράμματα παρατίθενται στο Παράρτημα.

Πίνακας 93. Πίνακας τιμών ANOVA για την αντιοξειδωτική δράση (ABTS) του υπολείμματος της Υ.Ε. για το φυτό *G. glabra*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F
<b>Μοντέλο</b>	4187.19	13	322.09	2.13	0.0483
<b>A-Θερμοκρασία</b>	88.80	1	88.80	0.58	0.4498
<b>B-Χρ. εκχύλισης</b>	263.50	1	263.50	1.74	0.1978
<b>C-Διαλύτης</b>	951.83	1	951.83	6.31	0.0185
<b>D-Κύκλοι</b>	885.85	1	885.85	5.87	0.0226
<b>A*B</b>	12.76	1	12.76	0.084	0.7735
<b>A*C</b>	448.69	1	448.69	2.97	0.0964
<b>A*D</b>	1.51	1	1.51	0.010	0.9208
<b>B*C</b>	60.41	1	60.41	0.40	0.5324
<b>B*D</b>	29.27	1	29.27	0.19	0.6632
<b>C*D</b>	41.20	1	41.20	0.27	0.6056
<b>A<sup>2</sup></b>	28.04	1	28.04	0.18	0.6699
<b>B<sup>2</sup></b>	49.18	1	49.18	0.32	0.5729
<b>C<sup>2</sup></b>	1305.41	1	1305.41	8.65	0.0068
<b>Lack of Fit</b>	2171.23	16	135.70	0.78	0.6866

Από τις εξισώσεις του μοντέλου και τα αντίστοιχα διαγράμματα (Εικόνα 161 και 162

Εικόνα 162) προκύπτει ότι για να έχουμε υψηλές τιμές αντιοξειδωτικής δράσης (ABTS) είναι απαραίτητη η χρήση μίγματος διαλυτών EtOH / H<sub>2</sub>O, λίγων κύκλων και μειωμένων χρόνων εκχύλισης.

### 11.16 Υπολογισμός βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης με τη χρήση του Design Of Experiments (DOE)

Μετά την ολοκλήρωση των ελέγχων και την κατάρτιση των εξισώσεων που περιγράφουν τη σχέση παραμέτρων – αποκρίσεων, εφαρμόστηκε ένας αλγόριθμος αριθμητικής βελτιστοποίησης (numerical optimization), με σκοπό την εύρεση των συνθηκών εκχύλισης για την παραλαβή εκχυλισμάτων με:

- i. υψηλή αντιοξειδωτική δράση έναντι τις ρίζας DPPH (**Run 44**)
- ii. υψηλό φορτίο σε φαινόλες και ολικά φλαβονοειδή (**Run 42**)
- iii. και βέλτιστη δράση έναντι της ρίζας του ABTS (**Run 45**)

Επιπλέον, έλαβε χώρα ένα ακόμα πείραμα σε τυχαίες συνθήκες εκχύλισης (**Run 43**), για να εξετασθεί περαιτέρω η αξιοπιστία του μοντέλου σχετικά με την

ικανότητα πρόβλεψης των αποκρίσεων στις οποίες υπολογίσθηκαν χαμηλές τιμές συντελεστών προσδιορισμού predicted R<sup>2</sup> (απόδοσης, TFC και ABTS).

Στον επόμενο πίνακα παρατίθενται οι τιμές των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης, μαζί με τις θεωρητικές τιμές των αποκρίσεων καθώς και τους αντίστοιχους παράγοντες ακρίβειας (desirability).

**Πίνακας 94. Βέλτιστες τιμές συνθηκών εκχύλισης για το υπόλειμμα της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra***

Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης					Θεωρητικές τιμές αποκρίσεων					
Δείγματα	Θερμοκρασία (°C)	Χρ. εκχύλισης (min)	Αιθανόλη (%)	Κύκλοι	Απόδοση (%)	DPPH	TFC	TPC	ABTS	Desirability
Run 42	162	8	75	3	32.59	69.12	22.1 0	47.61	29.65	0.81
Run 43	88	11	35	1	28.43	43.22	17.0 7	35.31	47.85	1.00
Run 44	162	12	80	3	29.40	71.23	21.4 7	44.46	39.59	0.83
Run 45	162	7	80	3	30.03	68.31	21.9 4	47.44	27.50	0.79

Από τον υπολογισμό των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης για τα δείγματα **Run 42**, **Run 44** και **Run 45** παρατηρείται πως από το σχεδιασμό προτάθηκαν παρόμοιες συνθήκες εκχύλισης, οι οποίες κυμαίνονται από 8 έως 12 min, στους 162 °C, 75 με 80% αιθανόλη και 3 κύκλους εκχύλισης. Αυτό συμβαίνει επειδή οι αποκρίσεις επηρεάζονται με παρόμοιο τρόπο από τις παραμέτρους και μεγιστοποιούνται σε παρόμοιες περιοχές συνθηκών εκχύλισης.

Στη συνέχεια, νέες ποσότητες του υπολείμματος ζυγίστηκαν και εκχυλίστηκαν βάσει των προτεινόμενων συνθηκών με την τεχνική ASE και προσδιορίστηκαν οι τιμές των αποκρίσεων. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι θεωρητικές και οι πειραματικές τιμές με τα αντίστοιχα % σφάλματα για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.



Πίνακας 95. Συγκεντρωτικός πίνακας θεωρητικών και πειραματικών αποκρίσεων του υπολείμματος της Υ.Ε. του φυτού *G. glabra*

Σύγκριση θεωρητικών – πειραματικών αποκρίσεων										
Δείγμα	Απόδοση (%)		DPPH*		TFC*		TPC*		ABTS*	
	Θεωρητική	Πειραματική	Θεωρητική	Πειραματική	Θεωρητική	Πειραματική	Θεωρητική	Πειραματική	Θεωρητική	Πειραματική
Run 42	32.59± 0.26	30.51 ±1.24	69.12± 0.55	63.49± 2.51	22.10± 0.17	22.93± 1.28	47.61± 0.38	43.30± 1.35	29.65± 0.24	32.87± 2.16
Run 43	28.43± 0.56	29.73± 1.23	43.22± 0.42	45.10± 1.96	17.07± 0.17	12.95± 2.02	35.31± 0.35	35.99± 1.36	47.85± 0.30	40.05± 2.84
Run 44	29.40± 0.24	35.72± 1.28	71.23± 0.59	71.35± 1.56	21.47± 0.17	24.40± 2.20	44.46± 0.36	45.59± 0.79	39.59± 0.32	32.82± 2.35
Run 45	30.03± 0.23	28.62± 1.86	68.31± 0.53	74.55± 2.69	21.94± 0.17	20.92± 1.67	47.44± 0.37	41.16± 2.96	27.50± 0.21	23.89± 2.87

\*Όλοι οι έλεγχοι έγιναν με βάση τις μεθόδους που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο της Οργανολογίας

Από τη σύγκριση θεωρητικών - πειραματικών τιμών προέκυψε ότι ο σχεδιασμός CCD παρείχε πολύ καλά αποτελέσματα, με πολύ υψηλά επίπεδα ακρίβειας. Οι προβλεπόμενες τιμές πλησίασαν τις αντίστοιχες πειραματικές, γεγονός που επιβεβαίωσε για ακόμα μια φορά ότι η χρήση του προγράμματος για τη βελτιστοποίηση μιας διεργασίας, την πρόβλεψη των αποκρίσεων και την παρασκευή εκχυλισμάτων με επιθυμητά χαρακτηριστικά είναι δυνατή με πολύ καλά αποτελέσματα. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η αξιοπιστία του μοντέλου για τις αποκρίσεις όπου οι συντελεστές προσδιορισμού (predicted R<sup>2</sup>) παρουσίασαν χαμηλές τιμές.

Καταληκτικά, συμπεραίνουμε ότι η εφαρμογή του Στατιστικού Πειραματικού Σχεδιασμού αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη διεργασιών, καθώς παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα δίχως τη χρήση μεγάλου αριθμού πειραμάτων, ενώ ταυτόχρονα βοηθάει στην καλύτερη και πιο βαθιά κατανόηση μιας διεργασίας καθώς και των παραμέτρων που την επηρεάζουν.

### 11.17 Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης εφαρμόστηκε η Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE) στις επεξεργασμένες από την Υ.Ε. ρίζες του φυτού της *G. glabra*, με στόχο την παραγωγή εκχυλισμάτων με υψηλή αντιοξειδωτική δράση και αξιόλογο φορτίο σε φαινόλες και φλαβονοειδή.

Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε ένας 'Central Composite' σχεδιασμός ο οποίος μέσω της εκτέλεσης 40 πειραμάτων (34 τυχαίων και 6 κεντρικών) οδήγησε στη δημιουργία ενός μοντέλου συσχέτισης παραμέτρων και αποκρίσεων (Εξισώσεις ii έως vii). Η αριθμητική επίλυση του μοντέλου αυτού έδωσε εκχυλίσματα με μέγιστη δράση στο DPPH και το ABTS (**Run 44** και **Run 45**) και υψηλό φορτίο σε φαινόλες και φλαβονοειδή (**Run 42**). Τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ελέγχους αξιολόγησης της βιολογικής τους δράσης και του χημικού τους φορτίου και τα αποτελέσματα αυτών βρέθηκαν σε πολύ καλή συμφωνία με τις θεωρητικές τιμές, αποδεικνύοντας για μια ακόμα φορά ότι η εφαρμογή του RSM παρέχει πολύ καλά και ακριβή αποτελέσματα.

Σε αυτό το σημείο θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί πως το μοντέλο των εξισώσεων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και να εφαρμοστεί μελλοντικά για την παρασκευή εκχυλισμάτων με επιθυμητές ιδιότητες στο συγκεκριμένο φυτικό υλικό.

Επιπλέον, στο CCD σχεδιασμό έγινε η χρήση της εκχύλισης με υποκρίσιμο νερό (SCW), με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της μεθοδολογίας στις αποδόσεις, στο χημικό φορτίο και στις βιολογικές ιδιότητες των παραγόμενων εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι η SCW παρείχε εντυπωσιακά αποτελέσματα όσον αφορά τις αποδόσεις των εκχυλισμάτων της γλυκύρριζας, με τα εκχυλίσματά της να παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά ανάκτησης (έως και 49% **G.g res.Run 16**), ενώ ταυτόχρονα επέδειξε και θετική επίδραση στις τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης και στην περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή [338], με τις τιμές αυτών των αποκρίσεων να αυξάνονται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Μεταξύ των μελλοντικών στόχων της έρευνάς μας περιλαμβάνονται:

- η εφαρμογή της μεθοδολογίας 'Επιφάνειας Απόκρισης' για την πρόβλεψη βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των ριζών ώστε να προκύψουν εκχυλίσματα εμπλουτισμένα σε συγκεκριμένους μεταβολίτες με διαφορετικές δράσεις
- περαιτέρω βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης για την παρασκευή εκχυλισμάτων αξιόλογη δράση έναντι άλλων βιολογικών στόχων π.χ. οιστρογονική δράση
- η φυτοχημική μελέτη του δραστικότερου εκχυλίσματος για την απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του
- και τέλος η μελέτη της γλυκαντικής γεύσης των εκχυλισμάτων και η ενσωμάτωση επιλεγμένων εκχυλισμάτων σε βιολειτουργικά τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής

# Βιβλιογραφία

---

- [1] E. Βουτσάς and K. Μαγουλάς, *Ειδικά Κεφάλαια Θερμοδυναμικής*. Ε.Μ.Π., 2003.
- [2] M. Mukhopadhyay, *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press, 2000.
- [3] McHugh Mark and Krukoni Val, "Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice - Mark McHugh, Val Krukoni - Βιβλία Google," *Butterworth - Heinemann*, 1994. .
- [4] Χ. Περάκης, "Διερεύνηση της επίδρασης των δεσμών υδρογόνου στη διαλυτότητα οργανικών ουσιών σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα παρουσία συνδιαλυτών," *Διδακτορική Διατριβή*, vol. Εθνικό Μετ, no. Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2007.
- [5] Β. Λούλη, "Ανάπτυξη της τεχνικής της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης και εφαρμογές της στην ανάκτηση φυσικών προϊόντων," vol. Διδακτορικ, no. Εθνικό Μετσοβιο Πολυτεχνείο, p. Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2004.
- [6] B. Berche, M. Henkel, and R. Kenna, "Critical phenomena: 150 years since Cagniard de la Tour," May 2009.
- [7] A. W. Francis, "Ternary Systems of Liquid Carbon Dioxide," *J. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 12, pp. 1099–1114, Dec. 1954.
- [8] T. Andrews, "The Bakerian Lecture: On the Continuity of the Gaseous and Liquid States of Matter," *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 159, no. 164–170, pp. 575–590, Jan. 1869.
- [9] E. Lack and H. Seidlitz, "Commercial scale decaffeination of coffee and tea using supercritical CO<sub>2</sub>," in *Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1993, pp. 101–139.
- [10] "ΦΕΚ 1450B/13," 2013. [Online]. Available: [http://www.elinyae.gr/el/lib\\_file\\_upload/1450b\\_13.1372149117000.pdf](http://www.elinyae.gr/el/lib_file_upload/1450b_13.1372149117000.pdf).
- [11] "Περιβαλλοντικός κανονισμός Βιομηχανικών περιοχών," 2011. [Online]. Available: [https://www.etvavipe.gr/~media/Images/Vipe/ETBA\\_Environmental\\_Regulation.pdf](https://www.etvavipe.gr/~media/Images/Vipe/ETBA_Environmental_Regulation.pdf).
- [12] N. A. Akgün, "Separation of squalene from olive oil deodorizer distillate using supercritical fluids," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 113, no. 12, pp. 1558–1565, Dec. 2011.
- [13] A. K.a., a. Mohamed, a. S. Abdulmir, and H. a. Abas, "A Review on Supercritical Fluid Extraction as New Analytical Method," *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 4, no. 4, pp. 345–353, 2008.
- [14] E. Reverchon and G. Della Porta, "Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Fractionation of Lavender Essential Oil and Waxes," *J. Agric. Food Chem.*, no. 1994, pp. 1654–1658, 1995.
- [15] A. Bampouli, K. Kyriakopoulou, G. Papaefstathiou, V. Louli, N. Aligiannis, K. Magoulas, and M. Krokida, "Evaluation of total antioxidant potential of Pistacia lentiscus var. chia leaves extracts using UHPLC-HRMS," *J. Food Eng.*, vol. 167, pp. 25–31, 2015.
- [16] J. Williams and A. Clifford, *Supercritical Fluid, Methods and Protocols*. .
- [17] O. Bensebia, D. Barth, and A. Dahmani, "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Rosemary Comparison With Steam Distillation and Hydrodistillation," 2005.
- [18] C. R. Langezaal, A. Chandra, S. T. Katsiotis, J. J. C. Scheffert, and A. B. De Haan, "Analysis of Supercritical Carbon Dioxide Extracts from Cones and Leaves of a Hurnulus lupulus L Cultivar," 1990.
- [19] Z. Zeković, I. Pfač-Šovljanski, and O. Grujić, "Supercritical fluid extraction of hops," *J. Serbian Chem. Soc.*, vol. 72, no. 1, pp. 81–87, 2007.
- [20] F. Sahena, I. S. M. Zaidul, S. Jinap, A. A. Karim, K. A. Abbas, N. A. N. Norulaini, and A.

- K. M. Omar, "Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review," *J. Food Eng.*, vol. 95, no. 2, pp. 240–253, 2009.
- [21] K. K. Chandrakant, D. J. Pravin, H. S. Bharat, K. Sachin, and K. P. Amol, "OVERVIEW O SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTIO FOR HERBAL DRUGS &quot;," *Pharmacologyonline*, vol. 2, pp. 575–596, 2011.
- [22] M. Herrero, J. A. Mendiola, A. Cifuentes, and E. Ibáñez, "Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 16, pp. 2495–2511, 2010.
- [23] K. M. Sharif, M. M. Rahman, J. Azmir, A. Mohamed, M. H. A. Jahurul, F. Sahena, and I. S. M. Zaidul, "Experimental design of supercritical fluid extraction – A review," *J. Food Eng.*, vol. 124, pp. 105–116, 2014.
- [24] M. Fischer and T. M. Jefferies, "Optimization of nicotine extraction from tobacco using supercritical fluid technology with dynamic extraction modeling," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 44, pp. 1258–1264, 1996.
- [25] C. Wu, W. F. Siems, H. H. Hill, Jr, and R. M. Hannan, "Analytical determination of nicotine in tobacco by supercritical fluid chromatography–ion mobility detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 811, no. 1, pp. 157–161, 1998.
- [26] O. Vitzthum and P. Hubert, "Method for the Manufacture of Caffeine Free Black Tea," 1979.
- [27] K. Zosel, "Process for recovering caffeine," 1974.
- [28] K. Zosel, "Process for the decaffeination of coffee," *US Patent 4,260,639*. 1981.
- [29] M. D. A. Saldaña, V. Nagpal, and S. E. Guigard, "Remediation of Contaminated Soils using Supercritical Fluid Extraction: A Review (1994-2004)," *Environ. Technol.*, vol. 26, no. 9, pp. 1013–1032, Sep. 2005.
- [30] S. B. Hawthorne and D. J. Miller, "Extraction and Recovery of Organic Pollutants from Environmental Solids and Tenax-GC Using Supercritical CO<sub>2</sub>," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 24, no. 6, pp. 258–264, Jun. 1986.
- [31] C. Vera and S. D'Ippolito, "Production of biodiesel by a two-step supercritical reaction process with adsorption refining," ... *Congr. Process ...*, pp. 1–10, 2005.
- [32] S. Glisic and D. Skala, "The problems in design and detailed analyses of energy consumption for biodiesel synthesis at supercritical conditions," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 49, no. 2, pp. 293–301, 2009.
- [33] D. Berger, "Supercritical Fluid Chromatography (SFC): A Review of Technical Developments."
- [34] L. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, and D. Guillaume, "Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2µm particles: A tutorial," *Anal. Chim. Acta*, vol. 824, pp. 18–35, 2014.
- [35] Ž. Knez, E. Markočič, M. Leitgeb, M. Primožič, M. Knez Hrnčič, and M. Škerget, "Industrial applications of supercritical fluids: A review," *Energy*, vol. 77, pp. 235–243, 2014.
- [36] Z. Knez and E. Weidner, "Particles formation and particle design using supercritical fluids," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 7, no. 4–5, pp. 353–361, 2003.
- [37] M. Türk, *Particle formation with supercritical fluids challenges and limitations*. .
- [38] B. E. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzell, N. L. Porter, N. Avdalovic, and C. Pohl, "Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation," *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 6, pp. 1033–1039, Jan. 1996.
- [39] "ASE® 300 Accelerated Solvent Extractor systems.," ©Dionex Corp. Brochure, LPN 2012-03, 2009.
- [40] X. Lou, H.-G. Janssen, and C. a. Cramers, "Parameters Affecting the Accelerated Solvent Extraction of Polymeric Samples," *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 8, pp. 1598–1603,

- 1997.
- [41] L. Wang and C. L. Weller, "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 17, no. 6, pp. 300–312, 2006.
- [42] "Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 47, no. 3, pp. 373–381, 2009.
- [43] R. M. Smith, "Extractions with superheated water," *J. Chromatogr. A*, vol. 975, no. 1, pp. 31–46, 2002.
- [44] A. Mustafa and C. Turner, "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 703, no. 1, pp. 8–18, 2011.
- [45] A. G. Carr, R. Mammucari, and N. R. Foster, "A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds," *Chem. Eng. J.*, vol. 172, no. 1, pp. 1–17, 2011.
- [46] E. Ibañez, A. Kubátová, F. J. Señoráns, S. Cavero, U. Reglero, and S. B. Hawthorne, "Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 2, pp. 375–382, 2003.
- [47] I. Rodríguez-Meizoso, F. R. Marin, M. Herrero, F. J. Señorans, G. Reglero, and E. Ibañez, "Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 41, no. 5, pp. 1560–1565, 2006.
- [48] "Change of Water Properties with Temperature." [Online]. Available: [http://www.criticalprocesses.com/Use of enthalpies to calculate energy needed.htm](http://www.criticalprocesses.com/Use%20of%20enthalpies%20to%20calculate%20energy%20needed.htm).
- [49] C. L. Arthur and J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers," *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 19, pp. 2145–2148, Oct. 1990.
- [50] "<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Bulletin/8652.pdf>."
- [51] G. Vas and K. Vekey, "Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis," *J. Mass Spectrometry*, no. 39, pp. 233–254, 2004.
- [52] C. W. Huie, "A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 373, no. 1–2, pp. 23–30, May 2002.
- [53] "SPME Applications. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=21943026>."
- [54] Χ. Γαρδέλη, *Μελέτη της Χημικής Σύστασης Αιθέριων Ελαίων ορισμένων Αρωματικών Φυτών της Ελληνικής Χλωρίδας. Διδακτορική διατριβή*. Αθήνα, 2009.
- [55] S. Weissman, "Design of Experiments (DoE) and Process Optimization. A Review of Recent Publications.," *Org. Process Res. Dev.*, no. August 2014, p. 140627143639007, 2014.
- [56] Δ. Π. Κομίλης, "Πειραματικός Σχεδιασμός και Στατιστική Ανάλυση," *Δημοκράτειο Πανεπιστήμιο Θράκης*, vol. Τμήμα Μηχα, 2006.
- [57] E. M. Silva, H. Rogez, and Y. Larondelle, "Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 55, no. 3, pp. 381–387, 2007.
- [58] N. Xynos, G. Papaefstathiou, E. Gikas, A. Argyropoulou, N. Aligiannis, and A. L. Skaltsounis, "Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 122, pp. 323–330, 2014.
- [59] "Two Level Factorial Experiments." [Online]. Available: [http://reliawiki.org/index.php/Two\\_Level\\_Factorial\\_Experiments](http://reliawiki.org/index.php/Two_Level_Factorial_Experiments).

- [60] L. S. Kassama, J. Shi, and G. S. Mittal, "Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 60, no. 3, pp. 278–284, 2008.
- [61] D. M. Himmelblau and J. B. Riggs, *Βασικές Αρχές και Υπολογισμοί στη Χημική Μηχανική*. Εκδόσεις Τζιόλας, 2004.
- [62] H. Sovoná, "Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> - I. Modeling of extraction curves," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 49, no. 3, pp. 409–414, 1994.
- [63] I. Papamichail, V. Louli, and K. Magoulas, "Supercritical fluid extraction of celery seed oil," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 18, no. 3, pp. 213–226, 2000.
- [64] V. Louli, G. Folas, E. Voutsas, and K. Magoulas, "Extraction of parsley seed oil by supercritical CO<sub>2</sub>," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 30, no. 2, pp. 163–174, 2004.
- [65] C. Perakis, V. Louli, and K. Magoulas, "Supercritical fluid extraction of black pepper oil," *J. Food Eng.*, vol. 71, no. 4, pp. 386–393, 2005.
- [66] H. Sovoná, J. Kučera, and J. Jež, "Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>—II. Extraction of grape oil," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 49, no. 3, pp. 415–420, 1994.
- [67] T.-S. Chang, "An updated review of tyrosinase inhibitors," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 6, pp. 2440–75, Jun. 2009.
- [68] Α. Ο. Χατζηβασιλείου, Μ. Ρουσσάκη, Α. Δέτση, Ε. Κρίτση, Π. Ζουμπουλάκης, Β. Petrushevski, and Η. Κεφαλάς, "Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός δομής νέων χαλκονών και ωρόνων ως αναστολέων του ενζύμου τυροσινάση," in *9ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής*, 2013.
- [69] V. J. Hearing, "Determination of Melanin Synthetic Pathways," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 131, pp. E8–E11, 2011.
- [70] T. B. Fitzpatrick, S. W. Becker, A. B. Lerner, and H. Montgomery, "Tyrosinase in human skin: demonstration of its presence and of its role in human melanin formation.," *Science*, vol. 112, no. 2904, pp. 223–5, Aug. 1950.
- [71] G. SZABÓ, A. B. GERALD, M. A. PATHAK, and T. B. FITZPATRICK, "Racial Differences in the Fate of Melanosomes in Human Epidermis," *Nature*, vol. 222, no. 5198, pp. 1081–1082, Jun. 1969.
- [72] J. L. Rees, "The genetics of human pigmentary disorders.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 131, no. E1, pp. E12–3, 2011.
- [73] Á. Sánchez-Ferrer, J. Neptuno Rodríguez-López, F. García-Cánovas, and F. García-Carmona, "Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism," Elsevier, 1995.
- [74] H. S. Mason, "Oxidases," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 34, no. 1, pp. 595–634, Jun. 1965.
- [75] J. M. Pawelek, "After dopachrome?," *Pigment Cell Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 53–62, Mar. 1991.
- [76] G. Prota, "Progress in the chemistry of melanins and related metabolites.," *Med. Res. Rev.*, vol. 8, no. 4, pp. 525–56.
- [77] J. C. Espín and H. J. Wichers, "Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 7, pp. 2638–44, Jul. 1999.
- [78] J. Cabanes, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, J. A. Lozano, and F. García-Carmona, "L-mimosine a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase," *Phytochemistry*, vol. 26, no. 4, pp. 917–919, 1987.
- [79] M. Criton and V. Le Mellay-Hamon, "Analogues of N-hydroxy-N'-phenylthiourea and N-hydroxy-N'-phenylurea as inhibitors of tyrosinase and melanin formation.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 12, pp. 3607–10, Jun. 2008.
- [80] L. P. Xie, Q. X. Chen, H. Huang, X. D. Liu, H. T. Chen, and R. Q. Zhang, "Inhibitory effects of cupferron on the monophenolase and diphenolase activity of mushroom tyrosinase.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, no. 12, pp. 1658–66, Dec. 2003.
- [81] S. Momtaz, "Tyrosinase inhibitors isolated from *Ceratonia siliqua* ( L . ) and

- Sideroxylon inerme ( L.),” *Sci. York*, no. April, pp. 37–40, 2007.
- [82] R. Kohen and A. Nyska, “Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 30, no. 6, pp. 620–50.
- [83] “Τι είναι οι ελεύθερες ρίζες και γιατί απειλούν την υγεία μας; | Your Life | click@Life.” [Online]. Available: <http://www.clickatlife.gr/your-life/story/4842>.
- [84] J. L. Cadet, “Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview.,” *Int. J. Neurosci.*, vol. 40, no. 1–2, pp. 13–8, May 1988.
- [85] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, “Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health.,” *Pharmacogn. Rev.*, vol. 4, no. 8, pp. 118–26, Jul. 2010.
- [86] M. Lateef, L. Iqbal, N. Fatima, K. Siddiqui, N. Afza, M. Zia-ul-Haq, and M. Ahmad, “Evaluation of antioxidant and urease inhibition activities of roots of *Glycyrrhiza glabra*.,” *Pak. J. Pharm. Sci.*, vol. 25, no. 1, pp. 99–102, Jan. 2012.
- [87] J. Burns, P. T. Gardner, D. Matthews, G. G. Duthie, M. E. Lean, and A. Crozier, “Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification.,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 12, pp. 5797–808, Dec. 2001.
- [88] K. F. Gey, “The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms,” *Biochem Soc Trans*, vol. 18, no. 6, pp. 1041–1045, Dec. 1990.
- [89] M. A. Smith, G. Perry, P. L. Richey, L. M. Sayre, V. E. Anderson, M. F. Beal, and N. Kowall, “Oxidative damage in Alzheimer’s.,” *Nature*, vol. 382, no. 6587, pp. 120–1, Jul. 1996.
- [90] O. I. A. PhD, “Free radicals, antioxidants and international nutrition\*,” *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, vol. 8, no. 1, pp. 53–63, Mar. 1999.
- [91] S. Cuzzocrea, D. P. Riley, A. P. Caputi, and D. Salvemini, “Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury.,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 53, no. 1, pp. 135–59, Mar. 2001.
- [92] M. Percival, *Antioxidants*. Advanced Nutrition Publications, Inc, 1998.
- [93] M. Κουφάκη, *Ειδικές Μορφωτικές Εκδηλώσεις ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΟΙΝΩΝΙΑ*”. 2002.
- [94] M. Mushtaq, A. S. Sheikh, S. A. Jafari, S. Ahmad, and A. Mushtaq, “Reactive oxygen species,” *Pakistan J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 38, pp. 1–7, 2005.
- [95] E. Stahl, *Thin-layer chromatography. A laboratory handbook*. Berlin ;Heidelberg ;New York: Springer, 1969.
- [96] S. K. Lee, Z. H. Mbwambo, H. Chung, L. Luyengi, E. J. Gamez, R. G. Mehta, A. D. Kinghorn, and J. M. Pezzuto, “Evaluation of the antioxidant potential of natural products.,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 1, no. 1, pp. 35–46, Apr. 1998.
- [97] H. Yang, Y. Dong, H. Du, H. Shi, Y. Peng, and X. Li, “Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China,” *Molecules*, vol. 16, no. 4, pp. 3444–3455, 2011.
- [98] G. Miliauskas, P. R. Venskutonis, and T. A. van Beek, “Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts,” *Food Chem.*, vol. 85, no. 2, pp. 231–237, 2004.
- [99] J. E. HOFF and K. I. SINGLETON, “A method for determination of tannins in foods by means of immobilized protein,” *J. Food Sci.*, vol. 42, no. 6, pp. 1566–1569, Nov. 1977.
- [100] M. Chatatikun and A. Chiabchalard, “Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts,” *J. Chem. Pharm. Res.*, vol. 5, no. 4, pp. 97–102, 2013.
- [101] T. Masuda, Y. Odaka, N. Ogawa, K. Nakamoto, and H. Kuninaga, “Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*),” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 2, pp. 597–601, 2008.
- [102] “<http://www.vita.gr/mindandbody/alternative/article/23586/sto-enallaktiko-mikroskopio-to-tsai-toy-boynoy/>” .



- [103] P. Dioscorides, *Anazarbei De materia medica libri quinque. Weidmannos, Berolini III, 5 II*. 1958.
- [104] B. P. Webb and S. Berthelot, *Histoire naturelle des Iles Canaries III, (Phytographia Canariensis)*. 1836.
- [105] G. Bentham, *Labiatae. Prodromus systematis naturalis regni vegetalis (de Candolle)*. 1848.
- [106] N. Γεωργιάδης, *Φυτοχημική μελέτη του αιθερικού εκχυλίσματος του φυτού Sideritis syriaca L., LC – DAD – MS (ESI+) ανάλυση και αντιοξειδωτική ικανότητα*. Θεσσαλονίκη: Α.Π.Θ., 2006.
- [107] A. Strid and K. Tan, *Mountain flora of Greece*. 1992.
- [108] "<http://www.ipni.org/index.html>." .
- [109] E. González-Burgos, M. E. Carretero, and M. P. Gómez-Serranillos, "Sideritis spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities - A review," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 135, no. 2, pp. 209–225, 2011.
- [110] E. Kostadinova, K. Alipieva, M. Stefova, D. Antonova, L. Evstatieva, G. Stefkov, I. Tsvetkova, H. Naydenski, and V. Bankova, "Influence of cultivation on the chemical composition and antimicrobial activity of Sideritis spp," vol. 4, no. 14, pp. 102–106, 2008.
- [111] E. Πατέλου, *“Εκτίμηση της Γενετικής Ποικιλότητας Αυτοφυών Πληθυσμών Τσάι του Βουνού (Sideritis raeseri) με τη Χρήση Μοριακών Δεικτών.”* Θεσσαλονίκη: Α.Π.Θ., Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2014.
- [112] Ά. Παληογιάννη, *Μελέτη Πτητικών Συστατικών Ελληνικών Οίνων & Αποσταγμάτων - Παραγωγή Βιολειτουργικών Οίνων με Βάση Φυτά του Γένους Sideritis. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο. Αθήνα, 2007.*
- [113] G. Torcu, A. C. Gören, T. Kiliç, Y. K. Yildiz, and G. Tümen, "Diterpenes from Sideritis argyrea," *Fitoterapia*, vol. 72, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2001.
- [114] B. Dulger, A. Gonuz, and V. Aysel, "Inhibition of clotrimazole-resistant Candida albicans by some endemic Sideritis species from Turkey," 2006.
- [115] Α. Κ. Χατζοπούλου, *Ανατομική μελέτη ειδών του γένους Sideritis*. Διδακτορική Διατριβή, 1962.
- [116] E. Hanlidou, R. Karousou, V. Kleftoyanni, and S. Kokkini, "The herbal market of Thessaloniki (N Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 91, no. 2–3, pp. 281–99, Apr. 2004.
- [117] J. Hofrichter, M. Krohn, T. Schumacher, C. Lange, B. Feistel, B. Walbroel, and J. Pahnke, "Sideritis spp. Extracts Enhance Memory and Learning in Alzheimer’s  $\beta$ -Amyloidosis Mouse Models and Aged C57Bl/6 Mice," *J. Alzheimer’s Dis.*, vol. 53, no. 3, pp. 967–980, May 2016.
- [118] B. Feistel, B. Walbroel, and J. Pahnke, "Extract preparation from Sideritis scardica enhances memorizing skills of mice in Morris water maze," *Planta Med.*, vol. 79, no. 13, p. PB9, Aug. 2013.
- [119] J. Tsaknis and S. Lalas, "Extraction and identification of natural antioxidant from Sideritis euboea (mountain tea).," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 16, pp. 6375–81, Aug. 2005.
- [120] J. C. Barber, J. Francisco-Ortega, A. Santos-Guerra, K. G. Turner, and R. K. Jansen, "Origin of Macaronesian Sideritis L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets.," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 23, no. 3, pp. 293–306, Jun. 2002.
- [121] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584, 2002.
- [122] "<http://www.food-info.net/gr/index.htm>." .

- [123] Raquel Pulido, \* and Laura Bravo, and F. Saura-Calixto, "Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay," 2000.
- [124] Ε. Καλπουτζάκης, *Φαρμακογνωστική μελέτη φυτών της Κρήτικής χλωρίδας. Διδακτορική διατριβή*. Αθήνα: Εθνικό και Καποδυστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2007.
- [125] Z. Tunalier, M. Kosar, N. Ozturk, K. H. C. Baser, H. Duman, and N. Kirimer, "Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Sideritis* Species," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 40, no. 3, pp. 206–210, May 2004.
- [126] Ζ. Λιναδράκη, *Μελέτη βιοχημικών παραμέτρων σε εγκεφαλικές περιοχές μυών μετά από την πόση υδατικού αφεψήματος του *Sideritis clandestina* subsp. *Cyllenea*. Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης*. Πανεπιστήμιο Πατρών, 2007.
- [127] K. Papanikolaou and S. Kokkini, "A Taxonomic Revision of *Sideritis* L. Section *Empedoclia* (Rafin.) Bentham (Labiatae) in Greece," in *Aromatic Plants*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1982, pp. 101–128.
- [128] "<http://plants.usda.gov/classification.html>."
- [129] "<http://ww2.bgbm.org/herbarium/default.cfm>."
- [130] Δ. Φοίτος, Θ. Κωνσταντινίδης, and Γ. Καμάρη, *Βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων των σπάνιων & απειλούμενων φυτών της Ελλάδας*. Πάτρα: Τόμος 2 (E-Z), Ελληνική Βοτανική Εταιρεία, 2009.
- [131] Θ. Κωνσταντινίδης, *Η χλωρίδα και η βλάστηση των ορέων Γεράνεια, Πατέρας και Κιθαιρών*, Διδακτορ. Αθήνα, 1997.
- [132] C. Gabrieli and E. Kokkalou, "A new glycosylated acylflavone from *Sideritis raeseri*," *Phytochemistry*, vol. 29, no. 2, pp. 681–683, 1990.
- [133] C. N. Gabrieli, P. G. Kefalas, and E. L. Kokkalou, "Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis raeseri*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 96, no. 3, pp. 423–428, Jan. 2005.
- [134] N. Kirimer, N. Tabanca, B. Demirci, K. H. C. Baser, H. Duman, and Z. Aytac, "The Essential Oil of a New *Sideritis* Species: *Sideritis ozturkii* Aytac and Aksoy," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 37, no. 3, pp. 234–237, 2001.
- [135] A. Koutsaviti, I. Bazos, M. Milenković, M. Pavlović-Drobac, and O. Tzakou, "Antimicrobial Activity and Essential Oil Composition of Five *Sideritis* taxa of *Empedoclia* and *Hesiodia* Sect. from Greece," *Rec. Nat. Prod.*, vol. 7, no. 1, pp. 6–14, 2013.
- [136] N. Aligiannis, E. Kalpoutzakis, I. B. Chinou, S. Mitakou, E. Gikas, and A. Tsarbopoulos, "Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 2, pp. 811–815, 2001.
- [137] N. Tabanca, Kirimer N., and K. H. C. Baser, "The Composition of Essential Oils From Two Varieties of *Sideritis erythrantha* var. *erythrantha* and var. *cedretorum*," *Turk J Chem*, vol. 25, no. 2, pp. 201–208, 2001.
- [138] O. Tzakou, "The Essential Oil of *Sideritis raeseri* Boiss. et Heldr. ssp. *attica* (Heldr.) Pap. et Kok.," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 14, no. 5, pp. 376–377, Sep. 2002.
- [139] R. Taskova, M. Mitova, L. Evstatieva, M. Anchem, D. Peev, N. Handjieva, V. Bankova, and S. Popov, "Iridoids, flavonoids and terpenoids as taxonomic markers in Lamiaceae, Scrophulariaceae and Rubiaceae," *Bocconeae.*, vol. 5, pp. 631–636, 1997.
- [140] B. Dinda, S. Debnath, and Y. Harigaya, "Naturally occurring iridoids. A review, part 1," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 55, no. 2, pp. 159–222, 2007.
- [141] S. M. Kupchan, A. L. Dessertine, B. T. Blaylock, and R. F. Bryan, "Isolation and structural elucidation of allamandin, an antileukemic iridoid lactone from *Allamanda cathartica*," *J. Org. Chem.*, vol. 39, no. 17, pp. 2477–82, Aug. 1974.
- [142] R. Turner, N. Etienne, M. G. Alonso, S. de Pascual-Teresa, A. M. Miniñane, P. D. Weinberg, and G. Rimbach, "Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil

- phenolics.," *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. J. Int. Vitaminol. Nutr.*, vol. 75, no. 1, pp. 61–70, Jan. 2005.
- [143] V. Lanzotti, "Diterpenes for Therapeutic Use," in *Natural Products*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 3173–3191.
- [144] B. M. Fraga, "Phytochemistry and chemotaxonomy of *Sideritis* species from the Mediterranean region," *Phytochemistry*, vol. 76, pp. 7–24, 2012.
- [145] P. Venturella and A. Bellino, "Diterpenes from some Greek *Sideritis* species," *Fitoterapia*, vol. 48, pp. 3–4, 1977.
- [146] Ι. Χήνου, *Χημεία Φυσικών Προϊόντων ΙΙΙ. Φαινολικά παράγωγα*. Αθήνα, 2002.
- [147] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2, no. 5, pp. 270–8, 2009.
- [148] R. Randhir, Y.-T. Lin, and K. Shetty, "Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors," *Process Biochem.*, vol. 39, no. 5, pp. 637–646, 2004.
- [149] A. Saleem, M. Husheem, P. Härkönen, and K. Pihlaja, "Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 81, no. 3, pp. 327–336, 2002.
- [150] Α. Καραχασάνη, *Γεωγραφική και βοτανική ταξινόμηση ειδών Σιδερίτη (*Sideritis spp*) αυτοφυόμενων στην Ελλάδα, με χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας συνδυασμένης με χημειομετρικές μεθόδους. Μεταπτυχιακή διατριβή*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.
- [151] B. Janeska, M. Stefova, and K. Alipieva, "Assay of flavonoid aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD.," *Acta Pharm.*, vol. 57, no. 3, pp. 371–7, Sep. 2007.
- [152] I. I. Koleva, J. P. Linssen, T. A. van Beek, L. N. Evstatieva, V. Kortenska, and N. Handjieva, "Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 83, no. 8, pp. 809–819, Jun. 2003.
- [153] D. Pljevljakušić, K. Šavikin, T. Janković, G. Zdunić, M. Ristić, D. Godjevac, and A. Konić-Ristić, "Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*," *Food Chem.*, vol. 124, no. 1, pp. 226–233, 2011.
- [154] M. De Los A. Alvarez, N. B. Debattista, and N. B. Pappano, "Synergism of flavonoids with bacteriostatic action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 and *Escherichia coli* ATCC 25 922," *Biocell*, vol. 30, no. 1, pp. 39–42, Apr. 2006.
- [155] † Eva Kassi, † Zoi Papoutsis, ‡ Nikolaos Fokialakis, § Ioanna Messari, ‡ and Sophia Mitakou, and † Paraskevi Moutsatsou\*, "Greek Plant Extracts Exhibit Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM)-like Properties," 2004.
- [156] Ε. Βερυκοκίδου and Ε. Βερυκοκίδου - Βιτσαροπούλου, *Σημειώσεις Φαρμακογνωσίας Ι*. Αθήνα, 1993.
- [157] F. Turkmenoglu, İ. Baysal, S. Ciftci-Yabanoglu, K. Yelekci, H. Temel, S. Paşa, N. Ezer, İ. Çaliş, and G. Ucar, "Flavonoids from *Sideritis* Species: Human Monoamine Oxidase (hMAO) Inhibitory Activities, Molecular Docking Studies and Crystal Structure of Xanthomicrol," *Molecules*, vol. 20, no. 5, pp. 7454–7473, Apr. 2015.
- [158] N. Menković, D. Gođevac, K. Šavikin, G. Zdunić, S. Milosavljević, A. Bojadži, and O. Avramoski, "Bioactive Compounds of Endemic Species *Sideritis raeseri* subsp. *raeseri* Grown in National Park Galičica," *Rec. Nat. Prod.*, vol. 7, no. 3, pp. 161–168, 2013.
- [159] E. M. Agency, "List of references supporting the assessment of *Sideritis scardica* Griseb . ; *Sideritis clandestina* ( Bory & Chaub .) Hayek ; *Sideritis raeseri* Boiss . & Heldr . ; *Sideritis syriaca*," vol. 14, no. July, pp. 495–498, 2015.
- [160] F. P. ŞAHİN, N. EZER, and İ. ÇALIŞ, "Terpenic and Phenolic Compounds from *Sideritis stricta*," *Turkish J. Chem.*, vol. 30, no. 4, pp. 495–504, 2006.
- [161] N. M. Munkombwe, "Acetylated phenolic glycosides from *Harpagophytum*

- procumbens," *Phytochemistry*, vol. 62, no. 8, pp. 1231–1234, 2003.
- [162] A. Lenherr, M. F. Lahloub, and O. Sticher, "Three flavonoid glycosides containing acetylated allose from *Stachys recta*," *Phytochemistry*, vol. 23, no. 10, pp. 2343–2345, 1984.
- [163] M. L. Rodriguez-Lyon, A. M. Diaz-Lanza, M. Bernabé, and L. Villaescusa-castillo, "Flavone glycosides containing acetylated sugars from *Sideritis hyssopifolia*," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 38, no. 8, pp. 684–687, Aug. 2000.
- [164] T. Adzet, S. Cañigüeral, I. Monasterio, R. Vila, and C. Ibáñez, "The Essential Oil and Polyphenols of *Sideritis hyssopifolia* var *pyrenaica*," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 151–153, May 1990.
- [165] M.-T. Charami, D. Lazari, A. Karioti, H. Skaltsa, D. Hadjipavlou-Litina, and C. Souleles, "Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae)," *Phyther. Res.*, vol. 22, no. 4, pp. 450–454, Apr. 2008.
- [166] F. A. Tomás-Barberán, M. I. Gil, F. Ferreres, D. Rivera, C. Obón, and F. Tomás-Lorente, "Distribution of 8-Hydroxyflavone glycosides and flavonoid aglycones in some Spanish *Sideritis* species," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 21, no. 4, pp. 487–497, 1993.
- [167] J. L. Rios, S. Mañez, M. Paya, and M. J. Alcaraz, "Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*," *Phytochemistry*, vol. 31, no. 6, pp. 1947–1950, Jun. 1992.
- [168] A. Abdel Sattar, V. Bankova, and S. Popov, "Acylated flavonoid glycosides from *Sideritis scardica*," *Fitoterapia*, vol. 66, no. 2, p. 190, 1995.
- [169] M. I. Gil, F. Ferreres, A. Marrero, F. Tomás-Lorente, and F. A. Tomás-Barberán, "Distribution of flavonoid aglycones and glycosides in *Sideritis* species from the canary islands and madeira," *Phytochemistry*, vol. 34, no. 1, pp. 227–232, 1993.
- [170] A. A. Başaran, İ. Çaliş, C. Anklin, S. Nishibe, and O. Sticher, "Lavandulifolioside: A New Phenylpropanoid Glycoside from *Stachys lavandulifolia*," *Helv. Chim. Acta*, vol. 71, no. 6, pp. 1483–1490, Sep. 1988.
- [171] H. Nishimura, H. Sasaki, N. Inagaki, M. Chin, and H. Mitsuhashi, "Nine phenethyl alcohol glycosides from *Stachys sieboldii*," *Phytochemistry*, vol. 30, no. 3, pp. 965–9, 1991.
- [172] I. Caliş, T. Ersöz, D. Taşdemir, and P. Rüedi, "Two phenylpropanoid glycosides from *Leonurus glaucescens*," *Phytochemistry*, vol. 31, no. 1, pp. 357–9, Jan. 1992.
- [173] Y. Akcos, N. Ezer, I. Çaliş, R. Demirdamar, and B. C. Tel, "Polyphenolic Compounds of *Sideritis lycia* and Their Anti-Inflammatory Activity," *Pharm. Biol.*, vol. 37, no. 2, pp. 118–122, Jan. 1999.
- [174] K. Miłkowska-Leyck, B. Filipek, and H. Strzelecka, "Pharmacological effects of lavandulifolioside from *Leonurus cardiaca*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 80, no. 1, pp. 85–90, Apr. 2002.
- [175] T. ERSÖZ, Ü. Ş. HARPUT, and İ. ÇALIŞ, "Iridoid, Phenylethanoid and Monoterpene Glycosides from *Phlomis sieheana*," *Turkish J. Chem.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–8, 2002.
- [176] L. Li, C. M. Liu, Z. J. Chen, J. Wang, D. F. Shi, and Z. Q. Liu, "Isolation and Purification of Plantamajoside and Acteoside from Plant Extract of *Plantago asiatica* L. by High Performance Centrifugal Partition Chromatography," *Chem. Res. Chinese Univ.*, vol. 25, no. 30873364, pp. 817–821, 2009.
- [177] E. Schunk, "No Title," *Anal. Chem.*, no. 66, pp. 174–243, 1848.
- [178] P. Venturella, A. Bellino, and M. L. Marino, "Three acylated flavone glycosides from *Sideritis syriaca*," *Phytochemistry*, vol. 38, no. 2, pp. 527–30, Jan. 1995.
- [179] N. Ezer and Y. Akcos, "Flavonoids from *Sideritis lycia*," *J. Fac. Pharm. Hacettepe Univ.*, no. 15, pp. 81–87, 1995.
- [180] J. Yamahara, T. Kitani, H. Kobayashi, and Y. Kawahara, "[Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Anti-anoxia action and the active constituents]," *Yakugaku Zasshi*, vol. 110,

- no. 12, pp. 932–5, Dec. 1990.
- [181] D. Papaefthimiou, A. Papanikolaou, V. Falara, S. Givanoudi, S. Kostas, A. K. Kanellis, M. Skorić, S. Todorović, N. Gligorijević, R. Janković, S. Živković, M. Ristić, and S. Radulović, “Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes’ biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 38, no. June, pp. 153–159, 2014.
- [182] T. R. Gunther, *The Greek Herbal of Dioscorides*. The University of Chicago Press, 1934.
- [183] Σ. Δ. Καββάδα, *Αποθήκευση Αποτελέσματος Εικονογραφημένον βοτανικόν, φυτολογικόν λεξικόν*. Πελεκάνος, 1964.
- [184] Ιπποκράτης, *Τα δραστικά έναντι των γυναικείων*, Version 1. Musaios T.L.G.
- [185] Κ. Οικονομάκης, *Οι αλαδανάρηδες του Μυλοπόταμου Κρητικό πανόραμα*. 2007.
- [186] C. Demetzos, S. Mitaku, M. Couladis, C. Harvala, and D. Kokkinopoulos, “Natural metabolites of ent-13-epi-manoyl oxide and other cytotoxic diterpenes from the resin ‘LADANO’ of *Cistus creticus*,” *Planta Med.*, vol. 60, no. 6, pp. 590–591, Dec. 1994.
- [187] I. Chinou, C. Demetzos, C. Harvala, C. Roussakis, and J. F. Verbist, “Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*,” *Planta Med.*, vol. 60, no. 1, pp. 34–6, Feb. 1994.
- [188] L. Barros, M. Dueñas, C. T. Alves, S. Silva, M. Henriques, C. Santos-Buelga, and I. C. F. R. Ferreira, “Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 41, pp. 41–45, 2013.
- [189] K. Droebner, C. Ehrhardt, A. Poetter, S. Ludwig, and O. Planz, “CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice,” *Antiviral Res.*, vol. 76, no. 1, pp. 1–10, Oct. 2007.
- [190] E. Barrajón-Catalán, S. Fernández-Arroyo, C. Roldán, E. Guillén, D. Saura, A. Segura-Carretero, and V. Micol, “A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship,” *Phytochem. Anal.*, vol. 22, no. 4, pp. 303–12.
- [191] Κ. Δεμέτζος, “Η χημική σύσταση και φαρμακολογική δράση της ρητίνης λάδανο,” *Διδακτορική Διατριβή*, 1990.
- [192] C. Demetzos, C. Harvala, S. M. Philianos, and A. L. Skaltsounis, “A New Labdane-Type Diterpene and Other Compounds from the Leaves of *Cistus incanus* ssp. *creticus*,” *J. Nat. Prod.*, vol. 53, no. 5, pp. 1365–1368, Sep. 1990.
- [193] C. Demetzos, S. Mitaku, A. E. Loukis, C. Harvala, and A. Gally, “A new drimane sesquiterpene, isomers of manoyl oxide and other volatile constituents from the resin ‘ladano’ of *Cistus incanus* ssp. *creticus* (L.) Heywood,” *J. Essent. Oil Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 37–41, Jan. 1994.
- [194] C. Demetzos, S. Mitaku, A. L. Skaltsounis, M. C. Catherine Harvala, and F. Libot, “Diterpene esters of malonic acid from the resin ‘Ladano’ of *Cistus creticus*,” *Phytochemistry*, vol. 35, no. 4, pp. 979–981, 1994.
- [195] K. Dimas, C. Demetzos, M. Marsellos, R. Sotiriadou, M. Malamas, and D. Kokkinopoulos, “Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro,” *Planta Med.*, vol. 64, no. 3, pp. 208–211, Apr. 1998.
- [196] C. Demetzos, K. Dimas, S. Hatziantoniou, T. Anastasaki, and D. Angelopoulou, “Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis-clerodane type diterpenes,” *Planta Med.*, vol. 67, no. 7, pp. 614–8, Oct. 2001.
- [197] “Λαδανιά (λάδανο, αλάδανος).” [Online]. Available: <http://pegasus-bio.gr/el/kaliergies-pegasusbio-superfoods-herbs/herbs2-pegasusbio-votana/cistus-organicherbs-pegasusbio-votana-ladania>.
- [198] V. H. Heywood, N. A. Burges, D. H. Valentine, S. M. Walters, and D. A. Webb, *Flora Europaea (2)*. Cambridge University Press, 1968.

- [199] E. Kalpoutzakis, N. Aligiannis, S. Mitaku, L. Chinou, C. Charvala, and a L. Skaltsounis, "New hemisynthetic manoyl oxide derivatives with antimicrobial activity.," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 49, no. 7, pp. 814–817, 2001.
- [200] L. TRABAUD and L., "Modalités de germination des cistes et des pins méditerranéens et colonisation des sites perturbés," *Rev. d'écologie [ISSN 0249-7395]*, 1995, vol. 50, N°1, pp. 3-14, 1995.
- [201] C. Demetzos, A. Loukis, V. Spiliotis, N. Zoakis, N. Stratigakis, and H. E. Katerinopoulos, "Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil of *Cistus creticus* L.," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 7, no. 4, pp. 407–410, Jul. 1995.
- [202] N. J. Turland, L. Chilton, and J. R. Press, *Flora of the Cretan area : annotated checklist & atlas*. London: H.M.S.O., 1995.
- [203] "Λάβδανο: Το Μύρο της Βίβλου." [Online]. Available: <http://ladano.blogspot.gr/>.
- [204] "<http://aladanos.blogspot.gr/2013/02/etimologia-labdanum.html>." .
- [205] Α. Λουκής, *Χημεία Φυσικών προϊόντων Ι-Βιοσύνθεση*. Αθήνα, 2003.
- [206] C. Demetzos, T. Anastasaki, and D. Perdetzoglou, "A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. Growing in Crete (Greece)," *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 57, no. 1–2, pp. 89–94, 2002.
- [207] T. Anastasaki, C. Demetzos, D. Perdetzoglou, M. Gazouli, A. Loukis, and C. Harvala, "Analysis of labdane-type diterpenes from *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS," *Planta Med.*, vol. 65, no. 8, pp. 735–739, Dec. 1999.
- [208] E. Kalpoutzakis, I. Chinou, S. Mitaku, A.-L. Skaltsounis, and C. Harvala, "Antibacterial Labdane-type Diterpenes from the Resin 'Ladano' of *Cistus creticus* Subsp. *creticus*," *Nat. Prod. Lett.*, vol. 11, no. 3, pp. 173–179, Mar. 1998.
- [209] E. Kalpoutzakis, N. Aligiannis, S. Mitaku, I. Chinou, C. Harvala, and A. L. Skaltsounis, "New semisynthetic antimicrobial labdane-type diterpenoids derived from the resin 'ladano' of *Cistus creticus*," *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 56, no. 1–2, pp. 49–52, 2001.
- [210] M. Stephanou and Y. Manetas, "The effects of seasons, exposure, enhanced UV-B radiation, and water stress on leaf epicuticular and internal UV-B absorbing capacity of *Cistus creticus* : a Mediterranean field study," *J. Exp. Bot.*, vol. 48, no. 11, pp. 1977–1985, 1997.
- [211] Ε. Βερυκοκίδου, *Σημειώσεις φαρμακογνωσίας Ι*. Αθήνα, 1997.
- [212] H. Ammar, S. López, J. S. González, and M. J. Ranilla, "Tannin levels in the foliage of some Spanish shrub species at different stages of development," *Nutr. Feed. Strateg. sheep goats under harsh Clim.*, vol. 59, pp. 159–163, 2004.
- [213] J. Rincón, a. De Lucas, and I. Gracia, "Isolation of Rock Rose Essential Oil Using Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction," *Sep. Sci. Technol.*, vol. 35, no. 16, pp. 2745–2763, 2000.
- [214] L. Tomás-Menor, A. Morales-Soto, E. Barrajón-Catalán, C. Roldán-Segura, A. Segura-Carretero, and V. Micol, "Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 55, pp. 313–322, 2013.
- [215] A. Hutschenreuther, C. Birkemeyer, K. Grötzinger, and R. K. Straubinger, "Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. in vitro," *Pharmazie*, vol. 65, no. 4, pp. 290–295, Apr. 2010.
- [216] V. Illés, H. G. Daood, S. Perneczki, L. Szokonya, and M. Then, "Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super- and subcritical conditions," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 17, no. 2, pp. 177–186, 2000.
- [217] W. Guan, S. Li, R. Yan, S. Tang, and C. Quan, "Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods," *Food Chem.*, vol. 101, no. 4, pp. 1558–1564, 2007.

- [218] L. Ferreira de França, G. Reber, M. A. A. Meireles, N. T. Machado, and G. Brunner, "Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 14, no. 3, pp. 247–256, 1999.
- [219] B. Homayooni, M. A. Sahari, and And Barzegar, "Concentrations of omega-3 fatty acids from rainbow sardine fish oil by various methods," *Int. Food Res. J.*, vol. 21, no. 2, pp. 743–748, 2014.
- [220] N. Herzi, J. Bouajila, S. Camy, S. Cazaux, M. Romdhane, and J. S. Condoret, "Comparison between Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Hydrodistillation for Two Species of *Eucalyptus*: Yield, Chemical Composition, and Antioxidant Activity," *J. Food Sci.*, vol. 78, no. 5, 2013.
- [221] P. Barton, E. Hughes, M. T. Company, I. D. Drive, and M. Hussein, "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Peppermint and Spearmint," pp. 157–162, 1992.
- [222] E. Reverchon, "Supercritical fluid extraction and fractionation related products," vol. 10, 1997.
- [223] J. Paolini, A. Falchi, Y. Quilichini, J. M. Desjobert, M. C. D. Cian, L. Varesi, and J. Costa, "Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*)," *Phytochemistry*, vol. 70, no. 9, pp. 1146–1160, 2009.
- [224] M. R. Loizzo, M. Ben Jemia, F. Senatore, M. Bruno, F. Menichini, and R. Tundis, "Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 59, pp. 586–594, 2013.
- [225] D. Angelopoulou, C. Demetzos, and D. Perdetzoglou, "Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 30, no. 3, pp. 189–203, 2002.
- [226] E. Reverchon and F. Senatore, "Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction," *Flavour Fragr. J.*, vol. 7, no. 4, pp. 227–230, 1992.
- [227] O. Chouitah, B. Meddah, A. Aoues, and P. Sonnet, "Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from *Glycyrrhiza glabra* Leaves," *J. Essent. Oil Bear. Plants*, vol. 14, no. 3, pp. 284–288, Jan. 2011.
- [228] C. Demetzos, D. Angelopoulou, and D. Perdetzoglou, "A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece)," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 30, no. 7, pp. 651–665, 2002.
- [229] M. S. Gonzalez, J. M. San Segundo, M. C. Grande, M. Medarde, and I. S. Bellido, "Sesterterpene lactones from *Salvia aethiopsis*. *Salviaethiopsisolide* and 13-*epi-salviaethiopsisolide*," *Tetrahedron*, vol. 45, no. 11, pp. 3575–3582, 1989.
- [230] H. D. Skaltsa, C. Demetzos, D. Lazari, and M. Sokovic, "Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece," *Phytochemistry*, vol. 64, no. 3, pp. 743–752, Oct. 2003.
- [231] T. Konishi, M. Azuma, R. Itoga, S. Kiyosawa, Y. Fujiwara, and Y. Shimada, "Three new labdane-type diterpenes from wood, *Excoecaria agallocha*," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 44, no. 1, pp. 229–231, 1996.
- [232] K. Graikou, N. Aligiannis, A.-L. Skaltsounis, I. Chinou, S. Michel, F. Tillequin, and M. Litaudon, "New diterpenes from *Croton insularis*," *J. Nat. Prod.*, vol. 67, no. 4, pp. 685–8, Apr. 2004.
- [233] D. Angelopoulou, C. Demetzos, C. Dimas, D. Perdetzoglou, and A. Loukis, "Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of ent-13-*epi-manoyl oxide* and its isomers," *Planta Med.*, vol. 67, no. 2, pp. 168–71, Mar. 2001.
- [234] B. M. Fraga, R. Guillermo, M. G. Hernández, T. Mestres, and J. M. Arteaga, "Diterpenes from *Sideritis canariensis*," *Phytochemistry*, vol. 30, no. 10, pp. 3361–

- 3364, 1991.
- [235] A. G. González, B. M. Fraga, M. G. Hernández, and J. G. Luis, "New diterpenes from *Sideritis canariensis*," *Phytochemistry*, vol. 12, no. 5, pp. 1113–1116, 1973.
- [236] F. Piozzi and M. Bruno, "Diterpenoids from Roots and Aerial Parts of the Genus *Stachys*," vol. 51, pp. 1–11, 2011.
- [237] N. Sekine, S. Shibutani, and M. Yatagai, "Chemical composition of the terpenoids in wood and knots of *Abies* species," *Eur. J. Wood Wood Prod.*, vol. 71, no. 5, pp. 679–682, Sep. 2013.
- [238] M. Pietsch and W. A. König, "Enantiomers of sesquiterpene and diterpene hydrocarbons in *Araucaria* species," *Phytochem. Anal.*, vol. 11, no. 2, pp. 99–105, 2000.
- [239] I. Pateraki, J. Andersen-Ranberg, B. Hamberger, A. M. Heskes, H. J. Martens, P. Zerbe, S. S. Bach, B. L. Møller, J. Bohlmann, and B. Hamberger, "Manoyl oxide (13R), the biosynthetic precursor of forskolin, is synthesized in specialized root cork cells in *Coleus forskohlii*," *Plant Physiol.*, vol. 164, no. 3, pp. 1222–36, Mar. 2014.
- [240] D. Stojković, M. Soković, J. Glamočlija, A. Džamić, A. Ćirić, M. Ristić, and D. Grubišić, "Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils," *Food Chem.*, vol. 128, no. 4, pp. 1017–1022, 2011.
- [241] \*, † Jorge A. Pino, † Judith Mesa, † Yamilie Muñoz, ‡ and M. Pilar Martí, and R. Marbot§, "Volatile Components from Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars," 2005.
- [242] K. Hatzellis, G. Pagona, A. Spyros, C. Demetzos, and H. E. Katerinopoulos, "Correction of the structure of a new sesquiterpene from *Cistus creticus* ssp. *creticus*," *J. Nat. Prod.*, vol. 67, no. 12, pp. 1996–2001, Dec. 2004.
- [243] X. Wang, H. Perumalsamy, H. W. Kwon, Y.-E. Na, and Y.-J. Ahn, "Effects and possible mechanisms of action of acacetin on the behavior and eye morphology of *Drosophila* models of Alzheimer's disease," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. April, p. 16127, 2015.
- [244] E. Rodríguez, N. J. Carman, G. Vander Velde, J. H. McReynolds, T. J. Mabry, M. A. Irwin, and T. A. Geissman, "Methoxylated flavonoids from *Artemisia*," *Phytochemistry*, vol. 11, no. 12, pp. 3509–3514, 1972.
- [245] W.-J. Yang, C. Liu, Z.-Y. Gu, X.-Y. Zhang, B. Cheng, Y. Mao, and G.-P. Xue, "Protective effects of acacetin isolated from *Ziziphora clinopodioides* Lam. (*Xintahua*) on neonatal rat cardiomyocytes," *Chin. Med.*, vol. 9, no. 1, p. 28, 2014.
- [246] N. Chaurasiya, V. Gogineni, F. Leon, M. Nuñez, S. Cutler, L. Walker, and B. Tekwani, "Isolation of acacetin from *Calea urticifolia* as a potent inhibitor of human monoamine oxidase-A and B," *Planta Med.*, vol. 81, no. 11, p. PV4, Jun. 2015.
- [247] A. I. Carballo-Villalobos, M. E. González-Trujano, and F. J. López-Muñoz, "Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin," *Eur. J. Pain (United Kingdom)*, vol. 18, no. 3, pp. 396–405, Mar. 2014.
- [248] C. Yang, H. Braymer, E. Murphy, W. Chorney, N. Scully, and S. Wender, "Notes-Methyl Ethers of Quercetin in Tobacco Flowers," *J. Org. Chem.*, vol. 25, no. 11, pp. 2063–2064, Nov. 1960.
- [249] E. Wollenweber and V. H. Dietz, "Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants," *Phytochemistry*, vol. 20, no. 5, pp. 869–932, 1981.
- [250] E. Wollenweber, M. Dörr, H. Fritz, S. Papendieck, G. Yatskievych, and J. N. Roitman, "Exudate Flavonoids in Asteraceae from Arizona, California and Mexico," *Zeitschrift für Naturforsch. C*, vol. 52, no. 5–6, pp. 301–307, 1997.
- [251] J. B. (Jeffrey B. . Harborne and H. Baxter, *The handbook of natural flavonoids*. Wiley, 1999.
- [252] E. W. Ollenw Eber, K. Arin, and M. Ann, "Flavonoid Aglycones in the Leaf Resin of Some *Cistus* Species," *Z. Naturforsch.*, no. 39c, pp. 303–306, 1983.
- [253] C. A. Williams and R. J. Grayer, "Anthocyanins and other flavonoids," *Previous Rev.*



- Nat. Prod. Rep.*, vol. 18, 2001.
- [254] J. B. Harborne, C. A. Williams, and R. J. Grayer, "Anthocyanins and other flavonoids," *Previous Rev. Nat. Prod. Rep.*, vol. 18, 2001.
- [255] E. H. Lee, H. J. Kim, Y. S. Song, C. Jin, K.-T. Lee, J. Cho, and Y. S. Lee, "Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten.*," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 26, no. 12, pp. 1018–23, Dec. 2003.
- [256] M. Gawronska-Grzywacz and T. Krzaczek, "Flavonoids and coumarins from *Hieracium pilosella* L. (asteraceae)," *Acta Soc. Bot. Pol.*, vol. 78, no. 3, pp. 189–195, 2009.
- [257] N. Nakatani, A. Jitoe, T. Masuda, and S. Yonemori, "Flavonoid Constituents of *Zingiber zerumbet* Smith," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 55, no. 2, pp. 445–460, Feb. 1991.
- [258] E. Wollenweber, K. Mayer, and J. N. Roitman, "Exudate flavonoids of *Inula viscosa*," Pergamon, 1991.
- [259] T. Usia, H. Iwata, A. Hiratsuka, T. Watabe, S. Kadota, and Y. Tezuka, "Sesquiterpenes and Flavonol Glycosides from *Zingiber aromaticum* and Their CYP3A4 and CYP2D6 Inhibitory Activities."
- [260] N. M. M. Shalaby, H. I. Abd-Alla, M. A. Hamed, S. N. Al-Ghamdi, and S. M. S. Jambi, "Flavones composition and therapeutic potential of *Dodonaea viscosa* against liver fibrosis," *Int. J. Phytomedicine*, vol. 4, pp. 27–39, 2012.
- [261] N. Chaves, J. C. Escudero, and C. Gutiérrez-Merino, "Quantitative variation of flavonoids among individuals of a *Cistus ladanifer* population," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 25, no. 5, pp. 429–435, 1997.
- [262] G. Attaguile, G. Perticone, G. Mania, F. Savoca, G. Pennisi, and S. Salomone, "*Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 92, no. 2, pp. 245–250, 2004.
- [263] R. W. Owen, R. Haubner, W. Mier, A. Giacosa, W. E. Hull, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch, "Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, no. 5, pp. 703–17, May 2003.
- [264] H. Matsuda, T. Morikawa, S. Ando, I. Toguchida, and M. Yoshikawa, "Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 11, no. 9, pp. 1995–2000, May 2003.
- [265] P. Mak, Y.-K. Leung, W.-Y. Tang, C. Harwood, and S.-M. Ho, "Apigenin suppresses cancer cell growth through ERbeta," *Neoplasia*, vol. 8, no. 11, pp. 896–904, Nov. 2006.
- [266] S. P. Patil, P. D. Jain, J. S. Sancheti, P. J. Ghumatkar, R. Tambe, and S. Sathaye, "Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice," *Neuropharmacology*, vol. 86, pp. 192–202, Nov. 2014.
- [267] E.-J. Seo, V. Kuete, O. Kadioglu, B. Krusche, S. Schröder, H. J. Greten, J. Arend, I.-S. Lee, and T. Efferth, "Antiangiogenic activity and pharmacogenomics of medicinal plants from traditional korean medicine," *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2013, p. 131306, 2013.
- [268] S. Ohno, S. Shinoda, S. Toyoshima, H. Nakazawa, T. Makino, and S. Nakajin, "Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 80, no. 3, pp. 355–363, 2002.
- [269] O. Ustün, B. Özçelik, Y. Akyön, U. Abbasoglu, and E. Yesilada, "Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 108, no. 3, pp. 457–461, Dec. 2006.
- [270] H. Yoo, S.-H. Kim, J.-Y. Lee, H.-J. Kim, S.-H. Seo, B.-Y. Chung, C.-B. Jin, and Y.-S. Lee, "Synthesis and Antioxidant Activity of 3-Methoxyflavones," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 26, no. 12, pp. 2057–2060, Dec. 2005.

- [271] J. Li, M. Mottamal, H. Li, K. Liu, F. Zhu, Y. Y. Cho, C. P. Sosa, K. Zhou, G. T. Bowden, A. M. Bode, and Z. Dong, "Quercetin-3-methyl ether suppresses proliferation of mouse epidermal JB6 p+ cells by targeting ERKs," *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 2, pp. 459–465, 2012.
- [272] H. D. Smolarz, A. Surdacka, and J. Roliński, "Influence of ethyl acetate extract and quercetin-3-methyl ether from *Polygonum amphibium* on activation lymphocytes from peripheral blood of healthy donor in vitro," *Phyther. Res.*, vol. 17, no. 7, pp. 744–747, 2003.
- [273] A. Hort, *Enquiry into Plants and Minor Works on Odours and Weather Signs*. Harvard University Press, 1961.
- [274] <http://filonoi.gr/2013/01/01/mr-glykoriza-katapolema-kai-ioys-anthektikoys-sta-antibiotika/>, "licorise 2." [Online]. Available: <http://filonoi.gr/2013/01/01/mr-glykoriza-katapolema-kai-ioys-anthektikoys-sta-antibiotika/>.
- [275] K. C. (Kee C. Huang and W. M. (Walter M. Williams, *The pharmacology of Chinese herbs*. CRC Press, 1999.
- [276] Φ. Τσιρίπιδου, *Απομόνωση φυσικών παραγώγων με δράση ανασταλτική των κυκλινσεξαρτώμενων κινασών (CDK's), σύνθεση αναλόγων τους και μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων τους. Διαδακτορική διατριβή*. Αθήνα: Εθνικό και Καποδυστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010.
- [277] "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III," *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 161, no. 2, pp. 105–121, Oct. 2009.
- [278] "<http://eol.org/pages/4277/overview>." .
- [279] Α. Αγγελής, *Φαρμακογνωστική μελέτη φυτών της οικογένειας Fabaceae (Vicia faba, Lotus edulis, Lotus longisiliquosus, Tetragonolobus purpureus, Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus) και του είδους Oryza sativa (Gramineae). Διαδακτορική διατριβή*. Εθνικό και Καποδυστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.
- [280] "<https://en.wikipedia.org/wiki/Rhizobium>." .
- [281] Μ. Βαρδαβάκης, *Συστηματική Βοτανική: Κρυπτόγαμα - Σπερματοφύτα*, 3η. Θεσσαλονίκη: Σαλονικίδης, 1993.
- [282] World Health Organization, *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 1*. Geneva, 1999.
- [283] R. Wei, F. Qiu, W. Kong, J. Wei, M. Yang, Z. Luo, J. Qin, and X. Ma, "Co-occurrence of aflatoxin B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in *Glycyrrhiza uralensis* analyzed by HPLC-MS/MS," *Food Control*, vol. 32, no. 1, pp. 216–221, 2013.
- [284] "[en.wikipedia.org/wiki/Liquorice](http://en.wikipedia.org/wiki/Liquorice)." .
- [285] R. Kaur, H. Kaur, and A. S. Dhindsa, "Glycyrrhiza glabra: a phytopharmacological review," *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 4, no. 7, pp. 2470–2477, 2013.
- [286] "<http://www.ekriti.gr/>," . .
- [287] E. L. Carmines, R. Lemus, and C. L. Gaworski, "Toxicologic evaluation of licorice extract as a cigarette ingredient," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 43, no. 9, pp. 1303–1322, 2005.
- [288] <http://medlabgr.blogspot.com/2015/12/glycyrrhiza-glabra.html>, "<http://medlabgr.blogspot.com/2015/12/glycyrrhiza-glabra.html>." .
- [289] <https://fytro.wordpress.com>, "<https://fytro.wordpress.com>." .
- [290] [http://masticyou.blogspot.gr/2015/12/blog-post\\_13.html](http://masticyou.blogspot.gr/2015/12/blog-post_13.html), "αδρενοκορτικοειδική." .
- [291] M. Irani, M. Sarmadi, F. Bernard, G. H. Ebrahimi Pour, and H. Shaker Bazarnov, "Leaves Antimicrobial Activity of *Glycyrrhiza glabra* L.," *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, vol. 9, no. 4, pp. 425–8, 2010.
- [292] S. L. Ajagannanavar, H. Battur, S. Shamarao, V. Sivakumar, P. U. Patil, and P. Shanavas, "Effect of aqueous and alcoholic licorice (*glycyrrhiza glabra*) root extract

- against streptococcus mutans and lactobacillus acidophilus in comparison to chlorhexidine: an in vitro study.," *J. Int. oral Heal. JIOH*, vol. 6, no. 4, pp. 29–34, Jul. 2014.
- [293] R. P. Chandran, "Antimycobacterial activity of Glycyrrhiza glabra Linn. Root extract against mycobacterium smegmatis," vol. 7, no. 3, pp. 458–463, 2015.
- [294] R. K. Harwansh, K. C. Patra, S. K. Pareta, J. Singh, and R. Biswas, "Pharmacological studies of Glycyrrhiza glabra- a review," vol. 2, no. August, 2013.
- [295] H. Cooper, B. Bhattacharya, V. Verma, a J. McCulloch, W. S. a Smellie, and a H. Heald, "Licorice and soy sauce, a life-saving concoction in a patient with Addison's disease.," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 44, no. Pt 4, pp. 397–399, Jul. 2007.
- [296] M. Sabouri Ghannad, A. Mohammadi, S. Safiallahy, J. Faradmal, M. Azizi, and Z. Ahmadvand, "The Effect of Aqueous Extract of Glycyrrhiza glabra on Herpes Simplex Virus 1.," *Jundishapur J. Microbiol.*, vol. 7, no. 7, p. e11616, Jul. 2014.
- [297] T. Yokota, H. Nishio, Y. Kubota, and M. Mizoguchi, "The Inhibitory Effect of Glabridin from Licorice Extracts on Melanogenesis and Inflammation," *Pigment Cell Res.*, vol. 11, no. 6, pp. 355–361, 1998.
- [298] J. Chen, X. Yu, and Y. Huang, "Inhibitory mechanisms of glabridin on tyrosinase," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 168, pp. 111–117, 2016.
- [299] O. Nerya, J. Vaya, R. Musa, S. Izrael, R. Ben-Arie, and S. Tamir, "Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 5, pp. 1201–1207, 2003.
- [300] M. Damle, "Glycyrrhiza glabra (Licorice) - a potent medicinal herb," *Int. J. Herb. Med.*, vol. 2, no. 2, pp. 132–136, 2014.
- [301] G. R. Fenwick, J. Lutomski, and C. Nieman, "Licorice, Glycyrrhiza glabra L.- Composition, uses and analysis," *Food Chem.*, vol. 38, no. 2, pp. 119–143, 1990.
- [302] L. A. Baltina, "Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp. 155–71, Jan. 2003.
- [303] L. J. Ming and A. C. Y. Yin, "Therapeutic effects of glycyrrhizic acid.," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 8, no. 3, pp. 415–8, Mar. 2013.
- [304] M. Parvaiz, K. Hussain, S. Khalid, N. Hussnain, N. Iram, Z. Hussain, and M. Azhar Ali, "A Review: Medicinal Importance of Glycyrrhiza glabra L. (Fabaceae Family)," *Glob. J. Pharmacol.*, vol. 8, no. 1, pp. 08–13, 2014.
- [305] X. Wang, H. Zhang, L. Chen, L. Shan, G. Fan, and X. Gao, "Licorice, a unique &quot;guide drug&quot; of traditional Chinese medicine: a review of its role in drug interactions.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 150, no. 3, pp. 781–90, Dec. 2013.
- [306] L. Parker, C. Nam Ong, and B. Halliwell, *Herbal and Traditional Medicine, Molecular Aspects of Health*, 1st ed. Marcel Dekker, 2004.
- [307] D. Somjen, S. Katzburg, J. Vaya, A. M. Kaye, D. Hendel, G. H. Posner, and S. Tamir, "Estrogenic activity of glabridin and glabrene from licorice roots on human osteoblasts and prepubertal rat skeletal tissues," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 91, no. 4, pp. 241–246, 2004.
- [308] S. Tamir, M. Eizenberg, D. Somjen, N. Stern, R. Shelach, A. Kaye, and J. Vaya, "Estrogenic and Antiproliferative Properties of Glabridin from Licorice in Human Breast Cancer Cells," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 20, 2000.
- [309] A. Vontzalidou, A. Meligova, M. Makropoulou, V. Ritsos, D. Mitsiou, A. Angelis, N. Aliogiannis, M. Alexis, and S. Mitakou, "Discovery of natural agents potentially effective in preventing post-menopausal osteoporosis based on Greek flora," *Planta Med.*, vol. 80, no. 16, p. P1128, Oct. 2014.
- [310] J. B. Zadeh, Z. M. Kor, and M. K. Goftar, "Licorice (Glycyrrhiza glabra Linn) As a Valuable Medicinal Plant," *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, vol. 1, no. 10, pp. 1281–1288, 2013.

- [311] L. Qiu, Q.-H. Chen, J.-X. Zhuang, X. Zhong, J.-J. Zhou, Y.-J. Guo, and Q.-X. Chen, "Inhibitory effects of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase," *Food Chem.*, vol. 112, no. 3, pp. 609–613, 2009.
- [312] M. A. Musa, J. S. Cooperwood, and M. O. F. Khan, *A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer.*, vol. 15, no. 26. NIH Public Access, 2008.
- [313] *German Federal of Justice, German Commission E for human medicine monography, no 9, dated 15-05-1985, no 50 dated 13-03-1990, no 74 dated 19-04-1991, no 178 dated 21-09-1991*. .
- [314] D. Armanini, G. Bonanni, and M. Palermo, "Reduction of Serum Testosterone in Men by Licorice," *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, no. 15, pp. 1158–1158, Oct. 1999.
- [315] P. and practice The American Botanical Council. The ABC clinical guide to herbs, Mark Blumenthal 273-283 and 465-475) of Phytotherapy, modern Herbal Medicine, Simon Mills, Kelly Bone, *The American Botanical Council. The ABC clinical guide to herbs, Mark Blumenthal 273-283, Principles and practice of Phytotherapy, modern Herbal Medicine, Simon Mills, Kelly Bone, 465-475*). .
- [316] C. Fiore, M. Eisenhut, E. Ragazzi, G. Zanchin, and D. Armanini, "A history of the therapeutic use of liquorice in Europe," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 99, no. 3, pp. 317–324, Jul. 2005.
- [317] K. T. Firoza Khanom, Hiroshi Kayahara, "Tyrosinase Inhibitory Activity of Bangladeshi indigenous Medicinal plants," *Isba*, vol. 64, no. 9. pp. 1967–1969, 2000.
- [318] B. Fu, H. Li, X. Wang, F. S. C. Lee, and S. Cui, "Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 19, pp. 7408–7414, 2005.
- [319] P. Tsiripillou, E. Haita, N. Aligiannis, S. Mitaku, and A. Skaltsounis, "Recovery of bioactive compounds from roots of *Glycyrrhiza glabra* by novel techniques of extraction," *Planta Med.*, vol. 74, no. 9, p. PC146, Jul. 2008.
- [320] P. K. P. Gaitry Chopra, B. D. Saraf, F. Inam, and S. S. Deo, "Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extract roots of *Glycyrrhiza glabra* and HPLC analysis."
- [321] S. S. Nair, R. R. Pharande, A. S. Bannaliker, and A. P. Mukne, "In vitro antimycobacterial activity of acetone extract of *Glycyrrhiza glabra*," *J. Pharm. Pharmacogn. Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 80–86, 2015.
- [322] S. Sultana, A. Haque, K. Hamid, K. Urmi, and S. Roy, "Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra*," *Agric. Biol. J. North Am.*, vol. 1, no. 5, pp. 957–960, 2010.
- [323] S. B. Denisova, V. T. Danilov, S. G. Yunusova, V. A. Davydova, Y. I. Murinov, and F. S. Zarudii, "Isolation and biological activity of lipids from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots," *Pharm. Chem. J.*, vol. 41, no. 9, pp. 489–491, Sep. 2007.
- [324] A. Donelian, L. H. C. Carlson, T. J. Lopes, and R. A. F. Machado, "Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO<sub>2</sub> and by steam distillation," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 48, no. 1, pp. 15–20, 2009.
- [325] A. Kemzuraite, P. R. Venskutonis, R. Baranauskienė, and D. Navikiene, "Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of different anatomical parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) using response surface methodology and evaluation of extracts composition," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 87, pp. 93–103, 2014.
- [326] B. Nagy and B. Simándi, "Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 46, no. 3, pp. 293–298, 2008.
- [327] "Minitab | Minitab." [Online]. Available: <http://blog.minitab.com/>. [Accessed: 04-Jul-2017].
- [328] J. Zolgharnein, A. Shahmoradi, and J. B. Ghasemi, "Comparative study of Box-

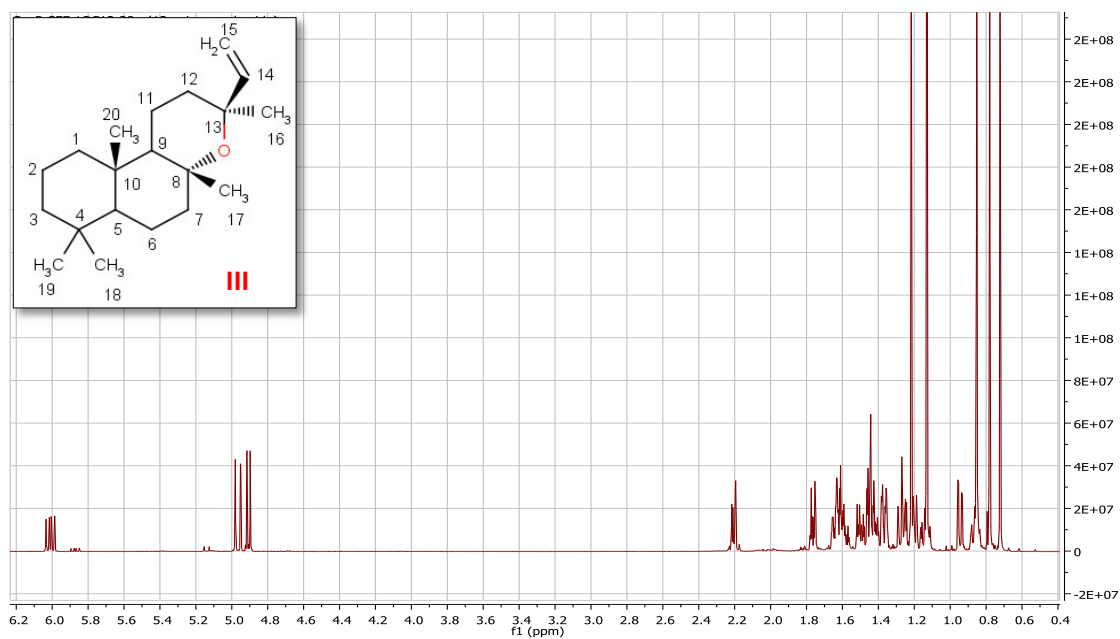
- Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves," *J. Chemom.*, vol. 27, no. 1–2, pp. 12–20, 2013.
- [329] E. A. Diler and R. Ipek, "An experimental and statistical study of interaction effects of matrix particle size, reinforcement particle size and volume fraction on the flexural strength of Al–SiCp composites by P/M using central composite design," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 548, pp. 43–55, 2012.
- [330] E. Ghasemi, F. Raofie, and N. M. Najafi, "Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves," *Food Chem.*, vol. 126, no. 3, pp. 1449–1453, 2011.
- [331] P. Burger, A. Landreau, S. Azoulay, T. Michel, and X. Fernandez, "Skin Whitening Cosmetics: Feedback and Challenges in the Development of Natural Skin Lighteners," *Cosmetics*, vol. 3, no. 4, p. 36, 2016.
- [332] C. Liang, J.-H. Lim, S.-H. Kim, and D.-S. Kim, "Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*," 2012.
- [333] Y. H. Jin, S. J. Lee, M. H. Chung, J. H. Park, Y. I. Park, T. H. Cho, and S. K. Lee, "Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 22, no. 3, pp. 232–6, Jun. 1999.
- [334] Σ.-Κ. Μ. Σταυρινίδης, *Παλινδρόμηση μερικών ελάχιστων τετραγώνων. Διπλωματική εργασία*. 2011.
- [335] S. Wold, M. Sjöström, and L. Eriksson, "PLS-regression: a basic tool of chemometrics," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 58, no. 2, pp. 109–130, 2001.
- [336] P. Geladi and B. R. Kowalski, "Partial least-squares regression: a tutorial," *Anal. Chim. Acta*, vol. 185, pp. 1–17, 1986.
- [337] M. Singh, Y. Kamal, E. Tamboli, R. Parveen, S. Ansari, and S. Ahmad, "Glabridin, a stable flavonoid of *Glycyrrhiza glabra*: HPTLC analysis of the traditional formulation," *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC*, vol. 26, no. 3, pp. 267–273, Jun. 2013.
- [338] J. Y. Baek, J. M. Lee, and S. C. Lee, "Extraction of nutraceutical compounds from licorice roots with subcritical water," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 63, no. 3, pp. 661–664, 2008.

# Παράρτημα

Στο παράρτημα αναφέρονται πληροφορίες σχετικά με τις διαδικασίες που έλαβαν χώρα οι οποίες δεν αναφέρονται στο κυρίως κείμενο.

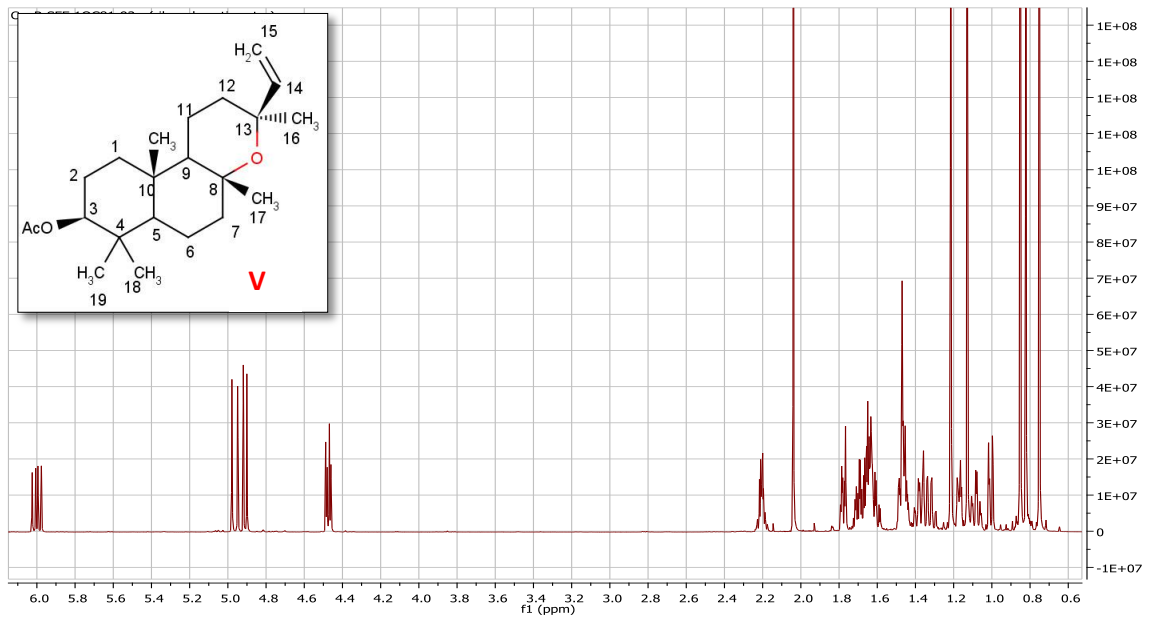
## *Cistus creticus* 'λάδανο'

- εντ-13-επι-οξείδιο της μανούλης (III) (διαλύτης  $\text{CDCl}_3$ )



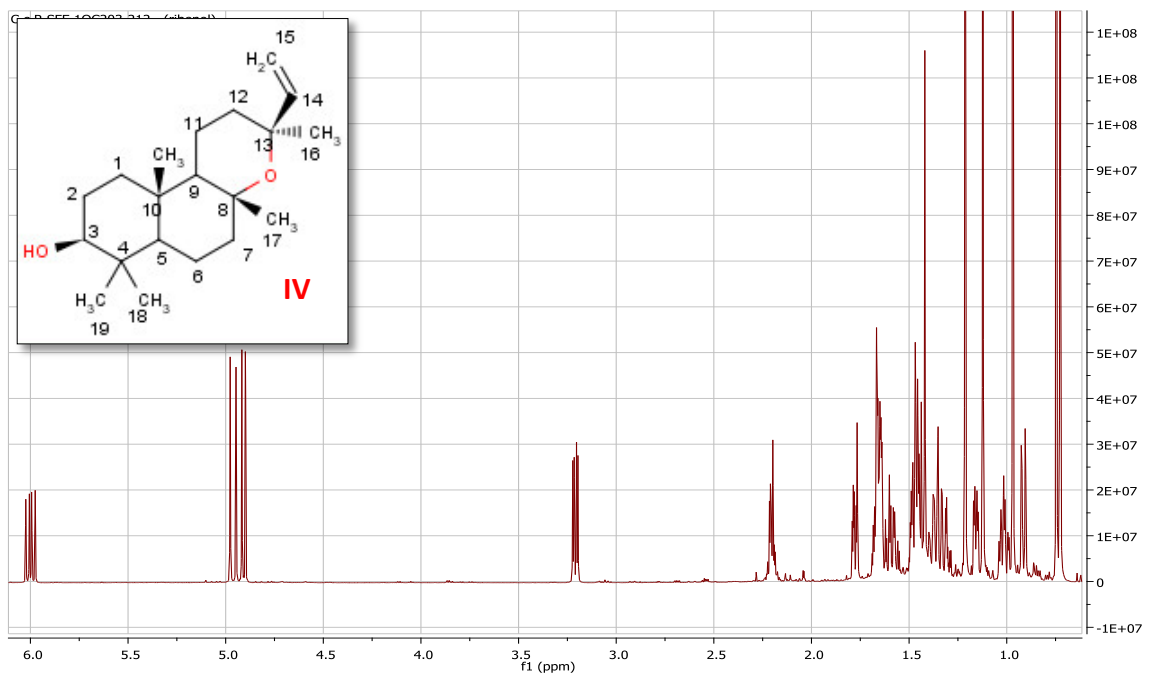
Εικόνα 163. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεταβολίτη εντ-13-επι-οξείδιο της μανούλης

- Οξικός εστέρα της ριμπενόλης ή εντ-3β-ακετοξυ-13-επι-οξείδιο της μανοόλης (διαλύτης CDCl<sub>3</sub>) (**V**)



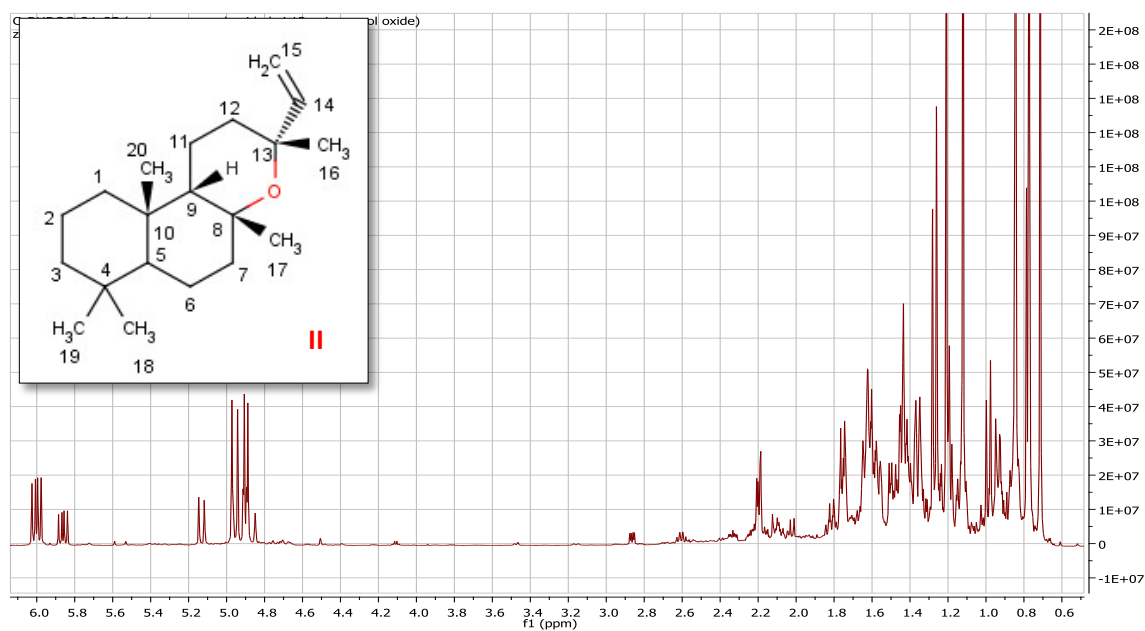
Εικόνα 164. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του οξικού εστέρα της ριμπενόλης

- Ριμπενόλη ή εντ-3β-υδροξυ-13-επι-οξείδιο της μανοόλης (διαλύτης CDCl<sub>3</sub>) (**IV**)



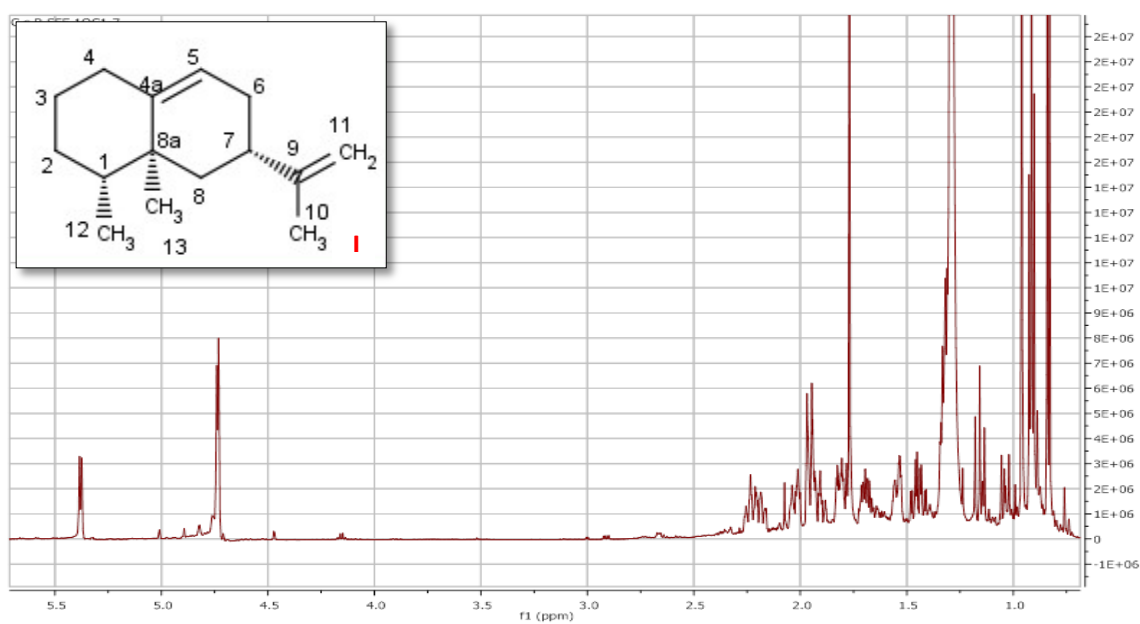
Εικόνα 165. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ριμπενόλης

- Εντ-οξείδιο της μανούλης (διαλύτης  $\text{CDCl}_3$ ) (II)



Εικόνα 166. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεταβολίτη εντ-οξείδιο της μανούλης

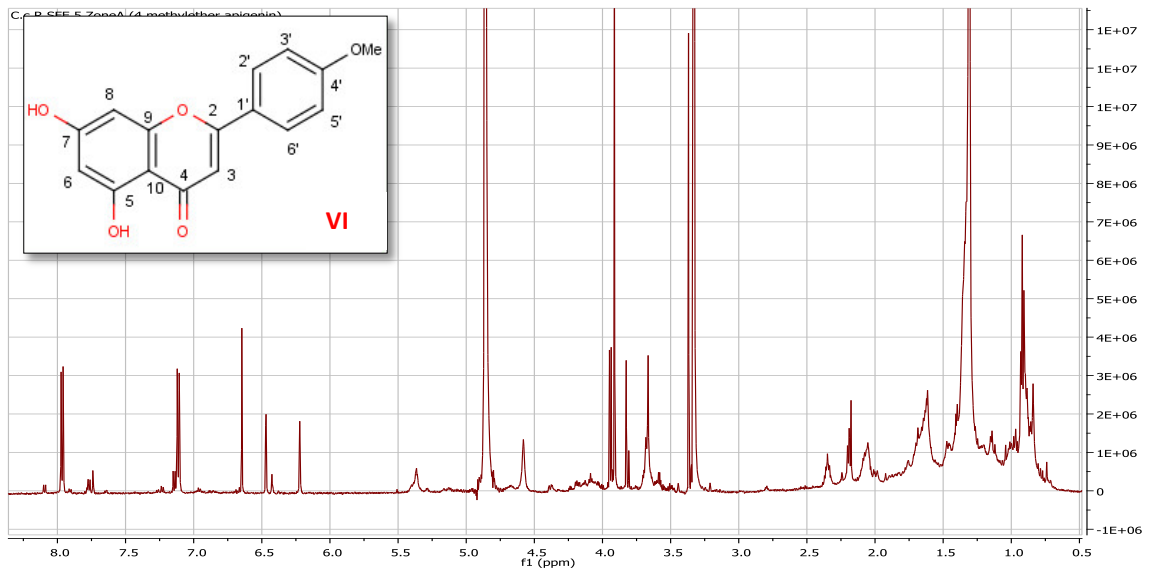
- 4,5-δι-επι αριστολοχένιο (διαλύτης  $\text{CDCl}_3$ ) (I)



Εικόνα 167. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεταβολίτη 4,5-δι-επι αριστολοχένιο

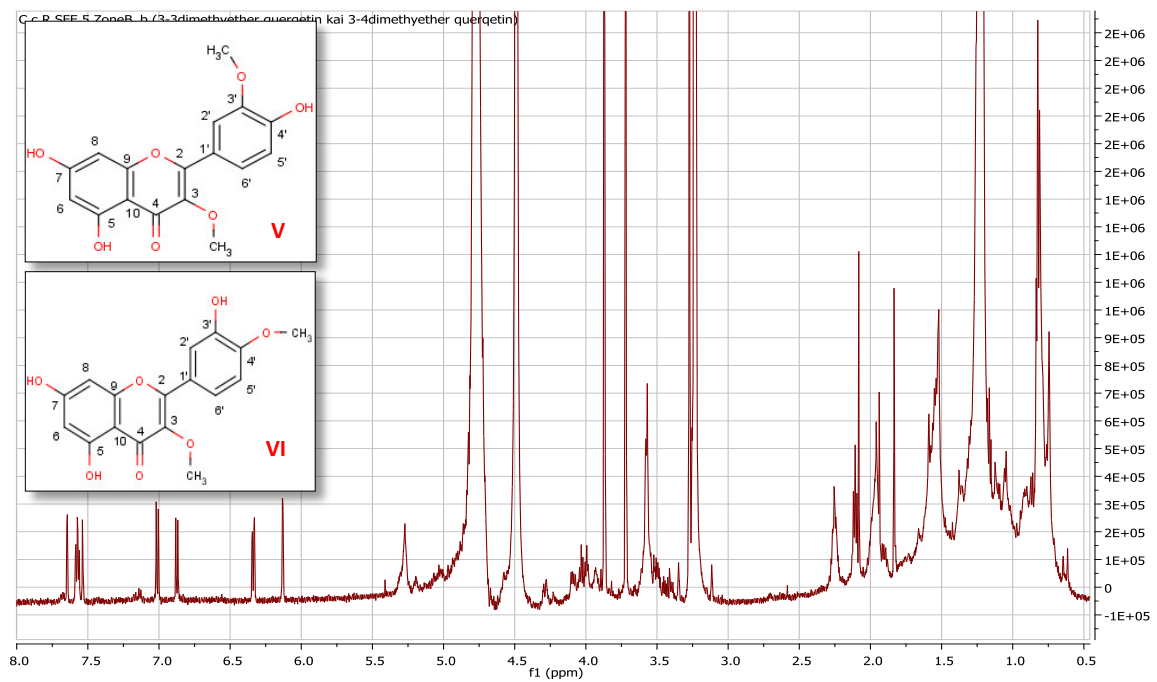


- 4'-μεθυλαιθέρας της απιγενίνης (ακακετίνη) (**VI**)

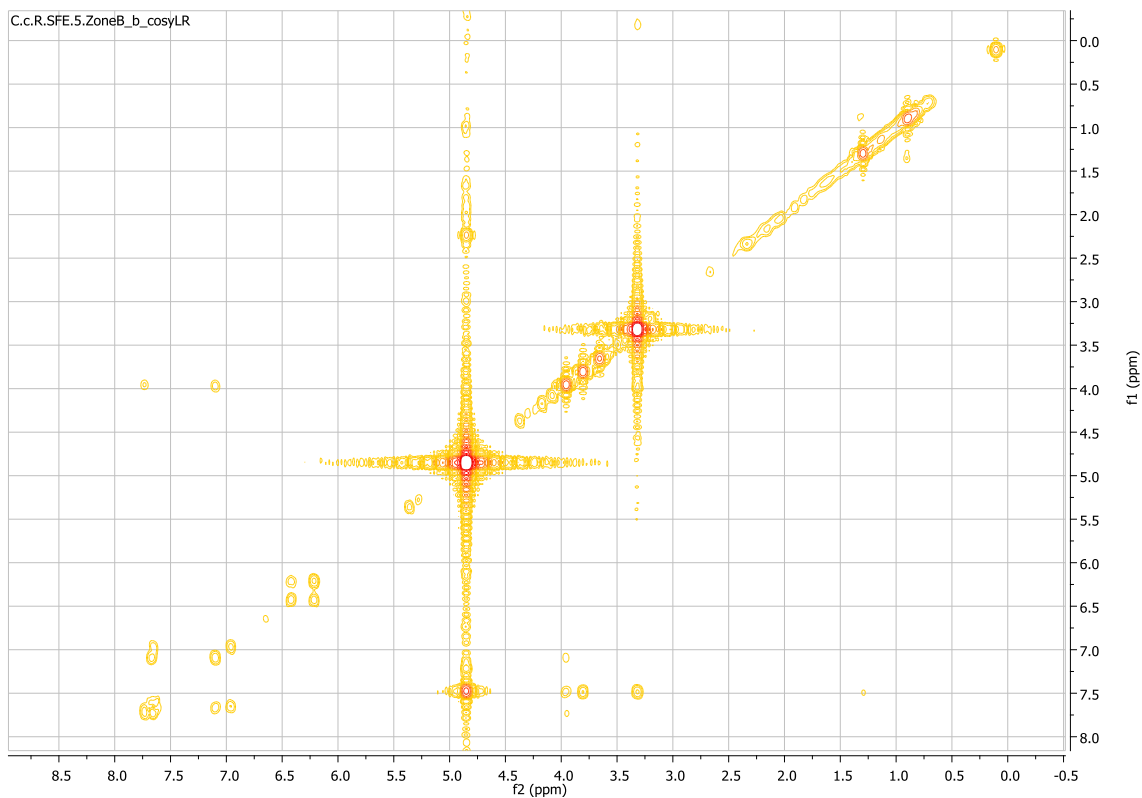


Εικόνα 168. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεταβολίτη 4'-μεθυλαιθέρας της απιγενίνης

- 3,3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης (**VII**) και 3,4'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης (**VIII**) (διαλύτης  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

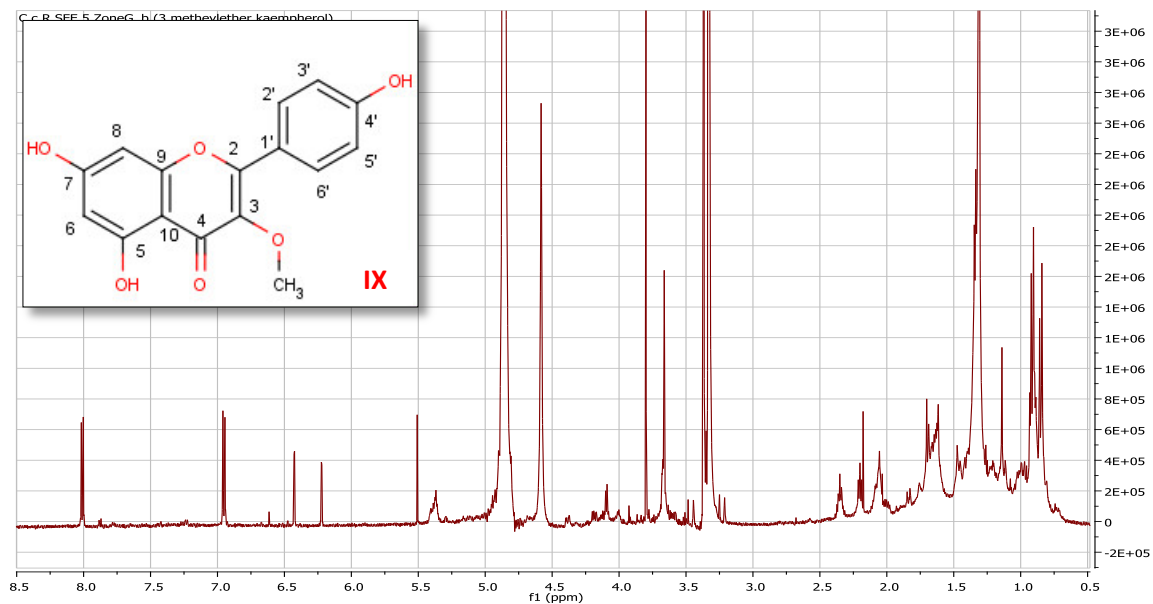


Εικόνα 169. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  των μεταβολιτών 3,3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης και 3,4'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης

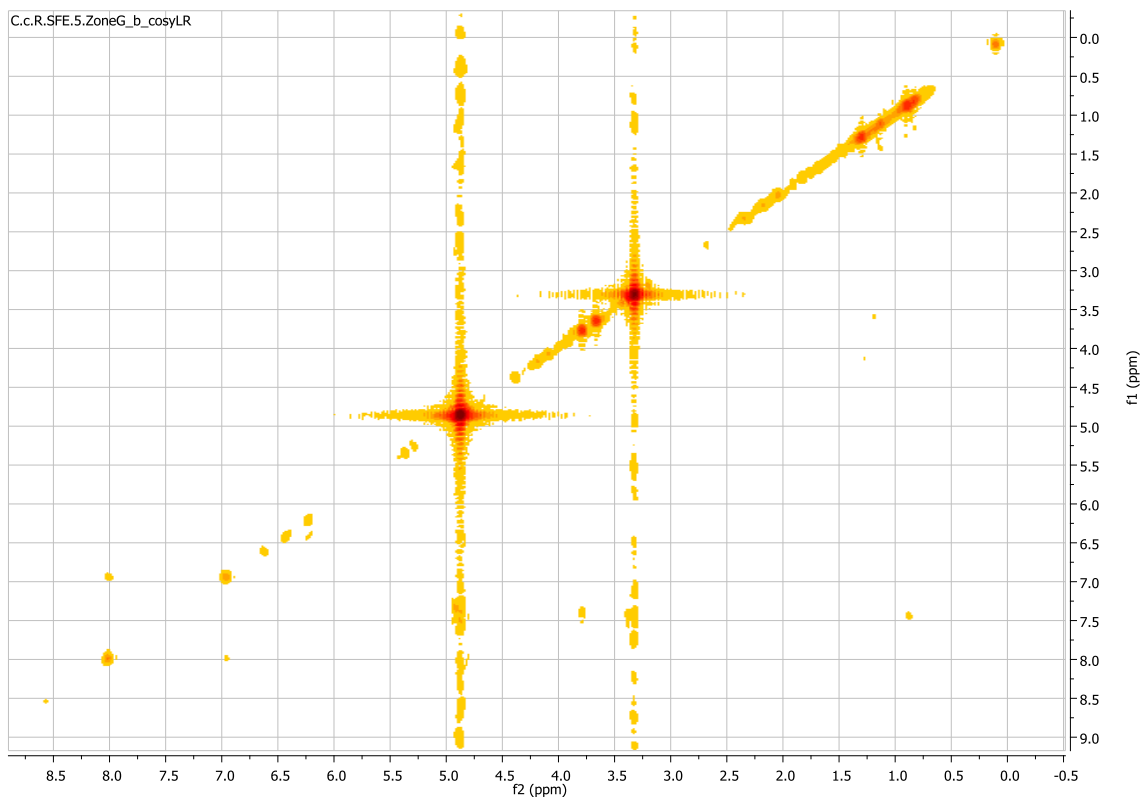


Εικόνα 170. Φάσμα COSY-LR των μεταβολιτών 3,3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης και 3,4'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης

- 3-μεθυλαιθέρας της καϊμφερόλης (διαλύτης CD<sub>3</sub>OD) (IX)

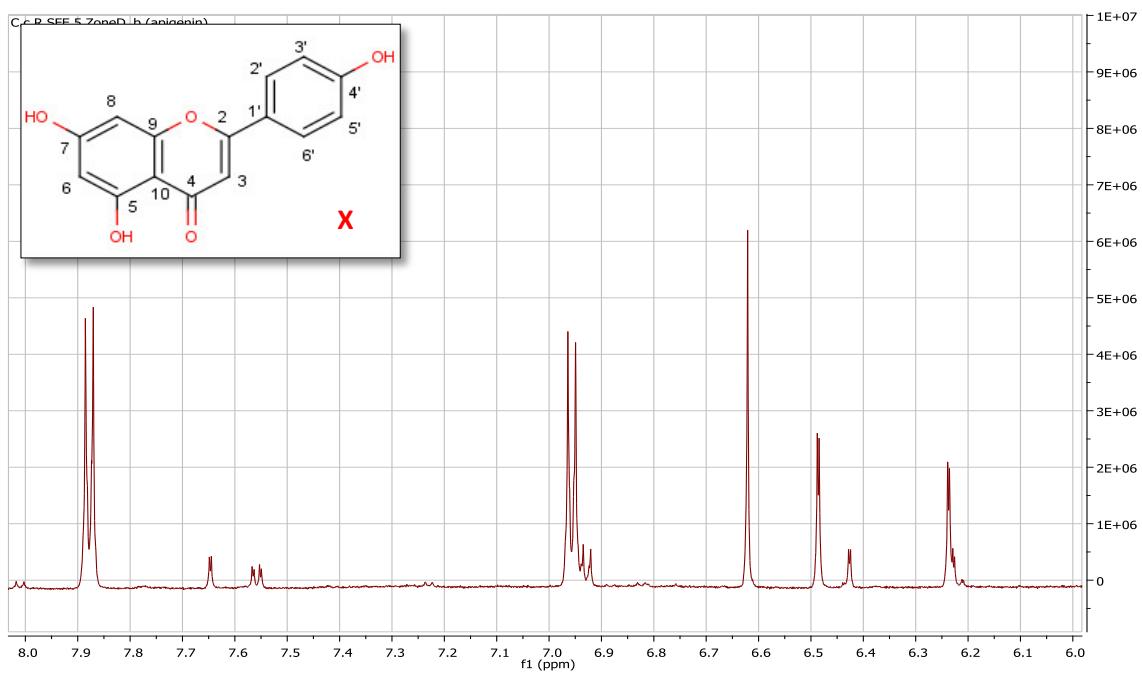


Εικόνα 171. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του μεταβολίτη 3-μεθυλαιθέρας της καϊμφερόλης

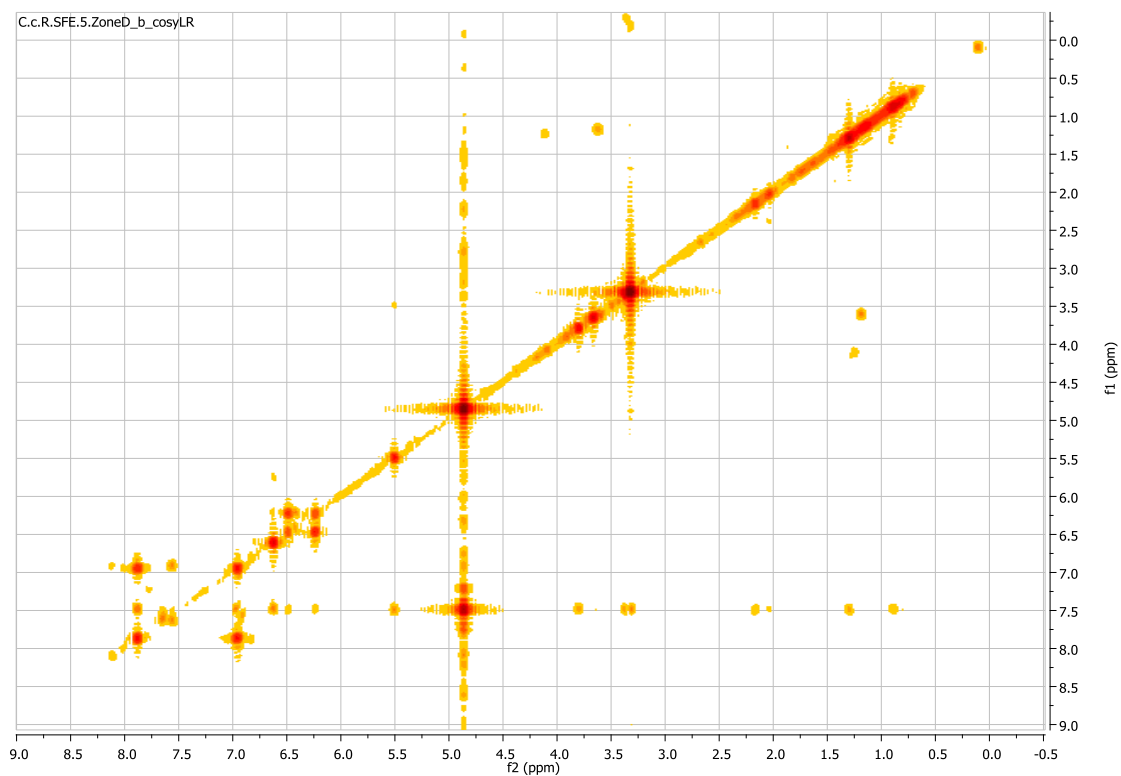


Εικόνα 172. . Φάσμα COSY-LR του μεταβολίτη 3-μεθυλαιθέρας της καμπφερόλης

- Απιγενίνη (X) (διαλύτης CD<sub>3</sub>OD)

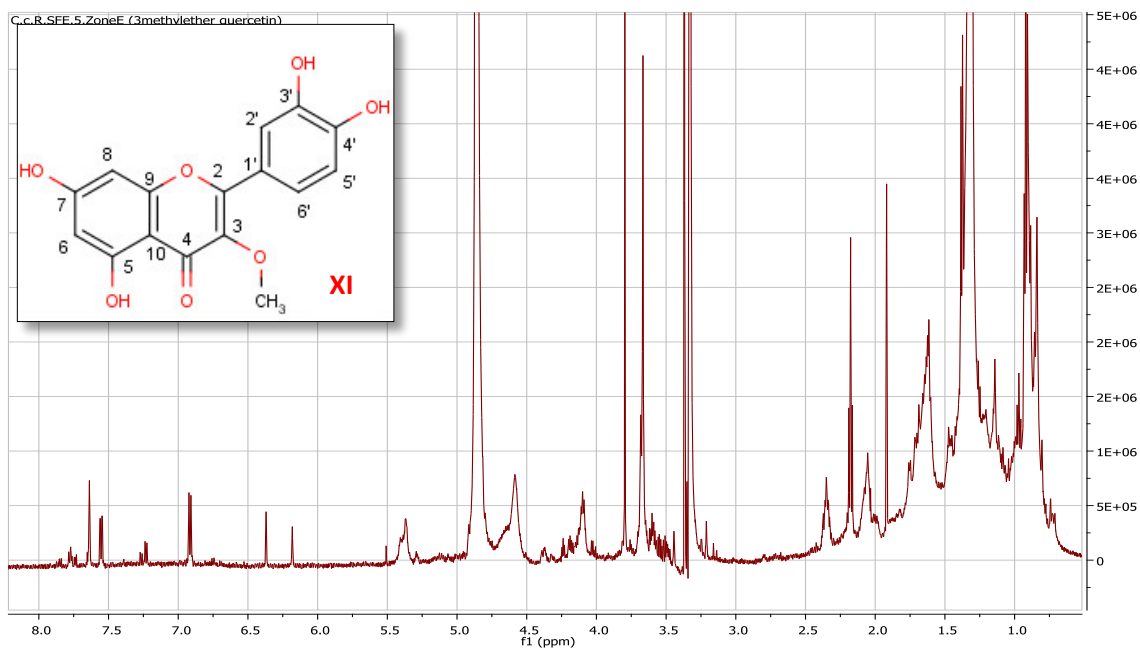


Εικόνα 173. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της απιγενίνης

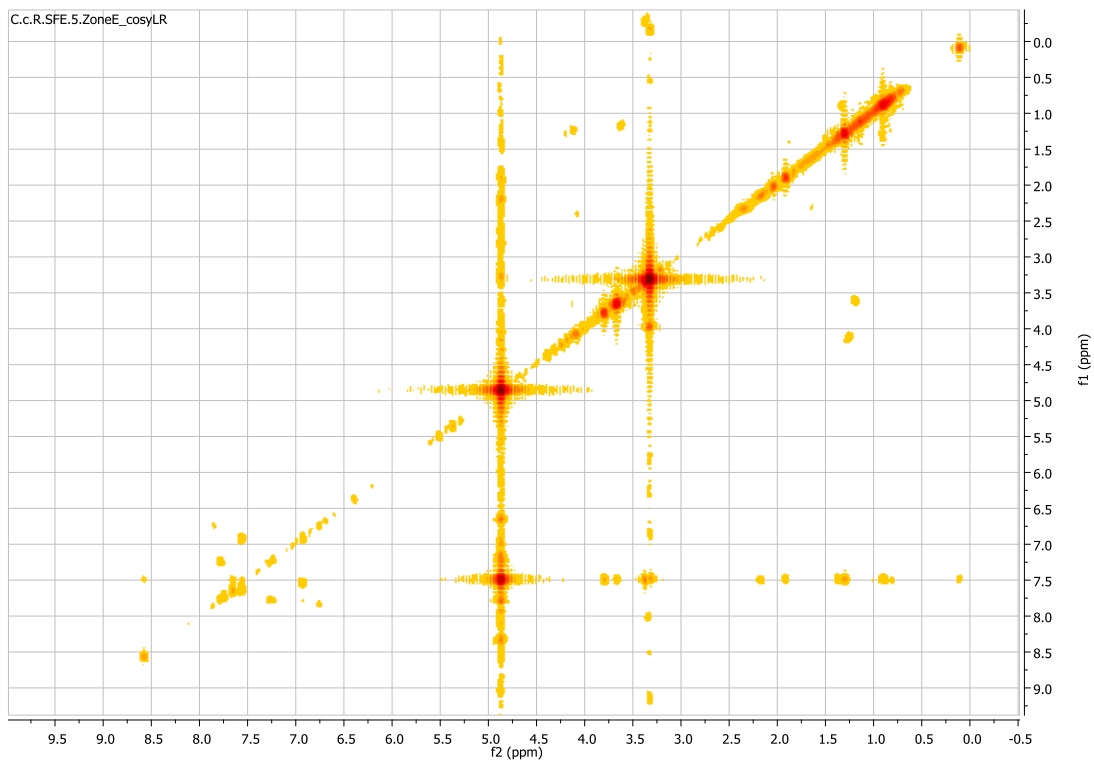


Εικόνα 174. Φάσμα COSY-LR της απιγενίνης

- 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης (ισοραμετίνη) (διαλύτης  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (XI)

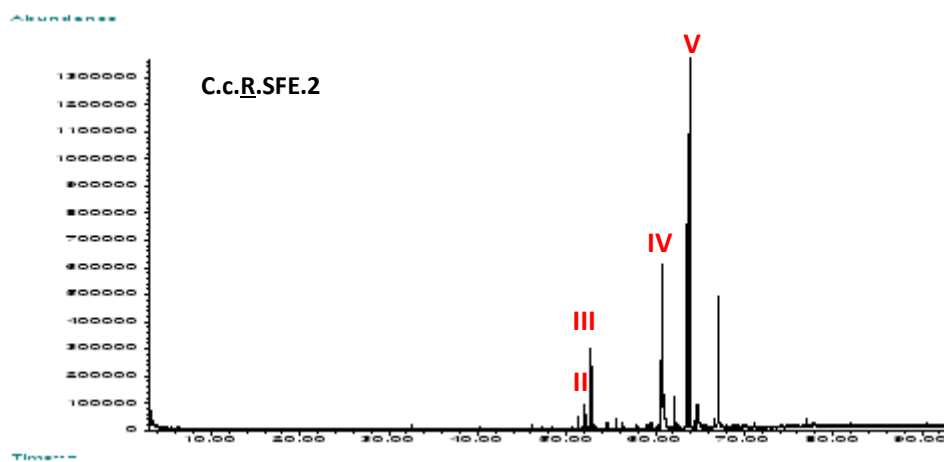


Εικόνα 175. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεταβολίτη 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης

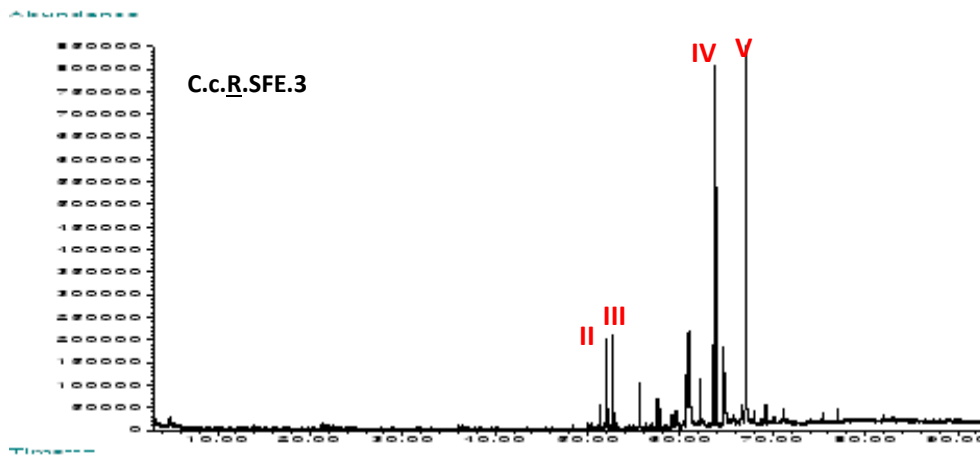


Εικόνα 176. Φάσμα COSY-LR του μεταβολίτη 3-μεθυλαιθέρας της κερκετίνης

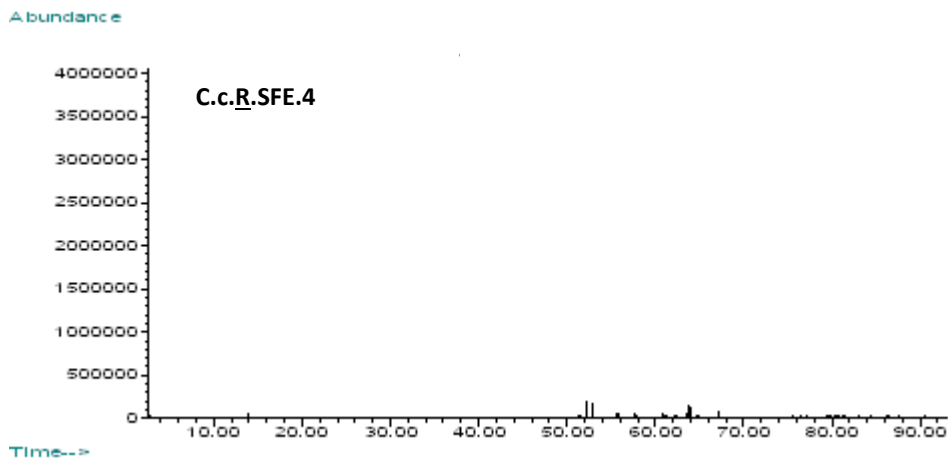
## Φάσματα αέριας χρωματογραφίας (GC-MS)



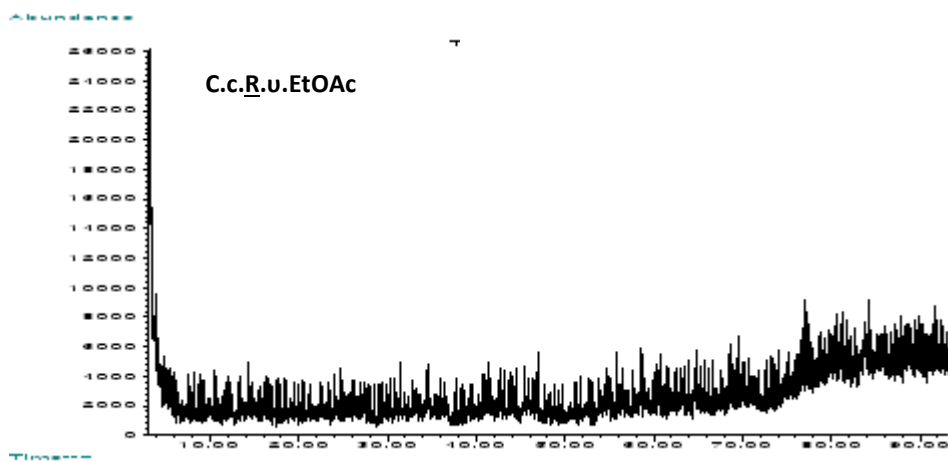
Εικόνα 177. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Υ.Ε. του κλάσματος C.c.R.SFE.2



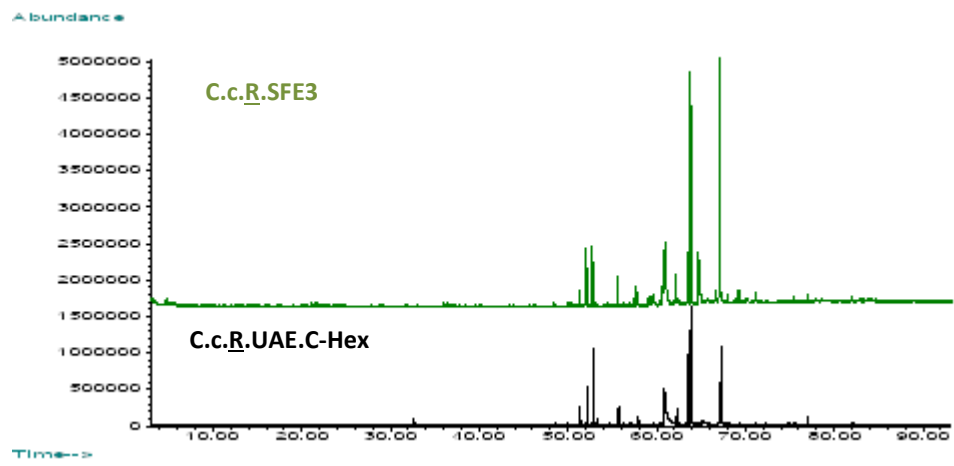
Εικόνα 178. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Υ.Ε. με 2,5% συνδιαλύτη του κλάσματος C.c.R.SFE.3



Εικόνα 179. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Υ.Ε. με 5% συνδιαλύτη του κλάσματος C.c.R.SFE.4



Εικόνα 180. Χρωματογράφημα υπολείμματος Υ.Ε. που εκχυλίστηκε με EtOAc



Εικόνα 181. Συγχρωματογράφιση του κλάσματος C.c.R.SFE3 και του υπολείμματος C.c.R.UAE.C-Hex

Πίνακας 96. Συγκεντρωτικός πίνακας ανάλυσης αιθέριων ελαίων και εκχυλισμάτων με GC-MS και SPME για το φυτό *C. creticus ssp. creticus* και τη ρητίνη 'λάδανο'

A/A	Συστατικά**	Ri (Adams)	Ρητίνη						Φυτό		SPME		
			Ccred (%)	C.c.R.SFE.1 (%)	C.c.R.SFE.2 (%)	C.c.R.S FE.3 (%)	C.c.R.UA E.C-Hex (%)	C.c.R.UA E.DCM (%)	EsOILH D	C.c.P.SFE. 1~4 (%)	Ρητίνη (%)	C.c.R.SFE.1 (%)	Ccred (%)
1	Tricyclene	921	0.1								0.63	0.15	1.63
2	$\alpha$ -Pinene	932	1.48	0.28					0.3		11.59	2.54	11.5
3	Camphene	946	0.71	0.14					0.11		4.16	1.17	5.13
4	$\beta$ -Pinene	974	0.31	0.07					0.09		2.02	1	2.48
5	$\alpha$ -Terpinene	1018											0.26
6	<i>p</i> -Cymene	1023									0.8	0.43	1.66
7	Limonene	1024	0.1							0.42	1.6	0.35	1
8	<i>trans</i> -Pinocarveol	1135	0.16	0.06							0.3	0.94	1.38
9	Camphene hydrate	1145	0.07										
10	Camphor	1146									tr	0.16	0.2
11	Borneol	1167	0.43	0.2					0.1	0.16	0.44	1.93	2.55
12	Terpineol-4	1174	0.25								0.35	0.81	1.28
13	$\alpha$ -Terpineol	1186	0.93	0.35					0.15	0.26	1.5	4	4.52
14	<i>trans</i> Carveol	1219									0.1	0.24	
15	Carvacrol	1298	0.45							tr	0.32		
16	$\alpha$ -Copaene	1374	0.14						0.13		0.35	0.53	0.7
17	$\beta$ -Bourbonene	1387	0.3								0.63	0.72	
18	dihydro- $\gamma$ -Ionone	1417											0.49
19	E-Caryophyllene	1417	0.64	0.35					0.93	0.25	2.01	2.99	3.16
20	$\alpha$ -Humulene	1452	0.07						0.12				
21	<i>allo</i> -Aromadendrene	1458	0.37	0.14							0.4	1.09	0.83



22	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolochene	1471	11.55	4.4	tr		0.85	tr	9.08	2.67	45.05	20.31	15.13
23	$\alpha$ -Amorphene	1485	0.26										
24	$\beta$ -Selinene	1489	1.33	0.41					0.86	0.25			
25	$\alpha$ -Selinene	1498		0.24					0.39	0.18	2.82	1.41	0.75
26	$\delta$ -Cadinene	1522	0.24						0.19		0.81	0.73	1.6
27	<i>cis</i> -Calamenene	1527	0.13								0.31	0.61	0.7
28	$\alpha$ -Calacorene	1544	0.12									0.85	1.06
29	$\beta$ -Germacrene	1559							0.43				
30	Spathulenol	1577	0.14										
31	Caryophyllene oxide	1582	2.32	0.84					1.14	0.6	2.03	3.99	0.85
32	Viridiflorol	1592	1.85	0.63					1.75	0.5	1.22	2.61	0.8
33	Ledol	1602	1.79	0.67					1.37	0.48	1.22	2.73	0.7
34	Humulene epoxide II	1608	0.25										
35	<i>allo</i> -Aromadendrene epoxide	1639		0.2					0.59	0.29			
36	Muurola-4.10(14)-dien-1-beta-ol	1630	0.43										
37	Tetracyclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol, 4,4-dimethyl-	1636									0.96	3.29	
38	Caryophylla-3,8(13)-dien-5b-ol	1641		0.35						0.9			
39	Caryophylla-4(14),8(15)-dien-5a-ol	1641	2.3										

40	$\alpha$ -Eudesmol	1652	1.9	1.15					2.04	1.48	1.19	2.02	
41	neo- Intermedeol	1658							1.07	1.48			
42	Caryophyllene<14-hydroxy-(Z)->	1666							0.43				
43	$\beta$ -Eudesmol	1649											
44	$\alpha$ -Selin-11-en-4-ol	1658	1.22	0.6									
45	Amorpha-4,9-diene<7,14-anhydro->	1755							0.48	0.47			
46	Cyclocolorenone	1759		0.6					0.98	0.48			
47	Ambroxide	1756	0.33	0.23					0.38		0.18	0.86	1.01
48	Drimenone	1792							0.13				
49	15,16-Dinorlabd-12-ene,8,13-epoxy	1826	1.74	0.89					3.66	0.66			
50	Sclareoloxide	1906											
51	15,16-Dinorlabd-8(20)-en-13-one	1961		0.18						0.22	0.56	2.08	3.76
52	Manoyl oxide	1996	14.4	2.57	1.89	6.15	5.32	7	14.91	1.29	0.57	2.48	4.9
53	13- <i>epi</i> -Manoyl oxide	2017	30.02	17	5.85	5.74	11.85	15	22.03	11.73	6.92	17.9	10.35
54	Kaurene	2042	0.52	0.35					0.18	0.29	0.19	0.32	trs
55	Sclareolide	2065	0.38	1.41	0.68				0.22	1.39	tr	0.18	
56	13(16).14-Labdien-8-ol	2120			0.84	3.01	3.17	4					
57	Abienol	2149	0.4			0.9	1.54	2	0.35				
58	Sclareol	2222	0.47	0.32		0.6			1.67	0.42			0.42

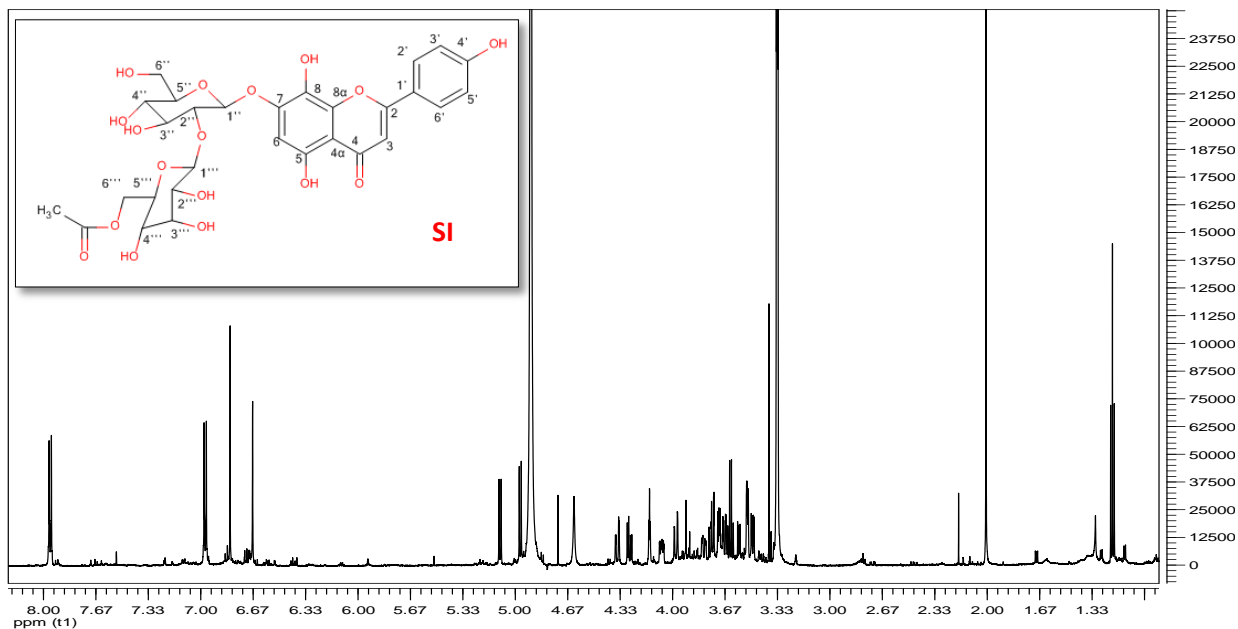
59	(12R)-13(16),14-labdadien-8,12-epoxide	----	0.26	0.98					2.27	0.88			
60	Ribenol	2268	1.18	13.7	16.48	5.26	8.19	10	3.12	16.42	tr	0.34	0.54
61	Labd-7,13,dien-15-ol	2280				12.21							
62	Tricosane	2300	0.13	0.29	6.51				0.09	0.23			
63	Ethyl ester Ribenol		3.56	30.1	15.17	4.79	16.58	17	5.91	28.91	0.14	1.02	1.25
64	Labd-7,13,dien-15-ol, acetate	2392	0.23	0.3	31.67	21.07	22.71	19	0.47	1			
65	Labd-13E-8,15 diol	2422		0.82	11.39	26.24	17.48	15		1.04			
66	Pentacosane	2500		1.23					0.07	1.49			
67	Heptacosane	2700		0.09						0.79			
68	Nonacosane	2900		2.63						3.79			
69	Triacontane	3000		0.8	0.73	0.68	1.29			1.79			
	Total		85.96	85.5	91.21	86.65	88.98	90	78.19	83.21	92.37	83.68	82.91

\*tr. ανιχνεύτηκε σε ίχνη

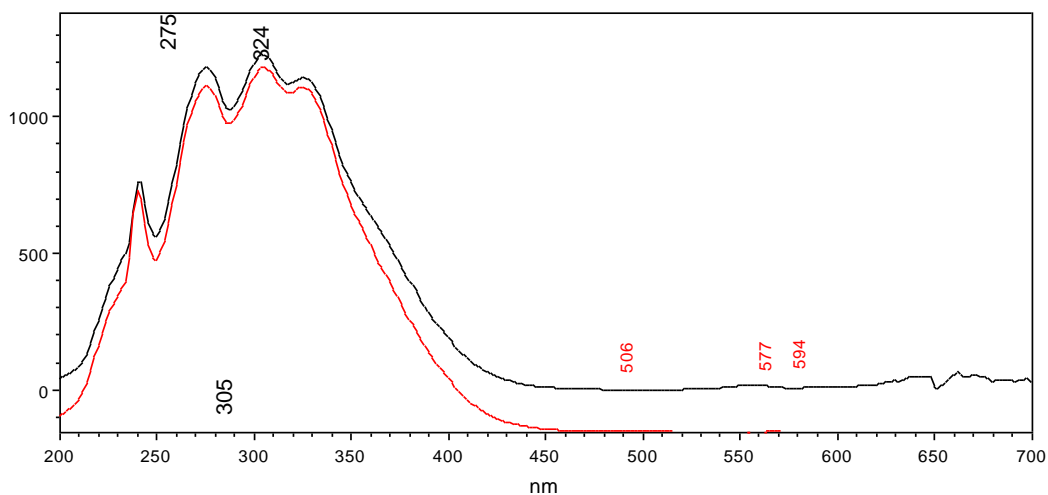
\*\* Adams, Wiley275 και Excalibur

## *Sidertis raeseri* ssp. *attica*

- 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελλαρεΐνης (διαλύτης CD<sub>3</sub>OD) (SI)

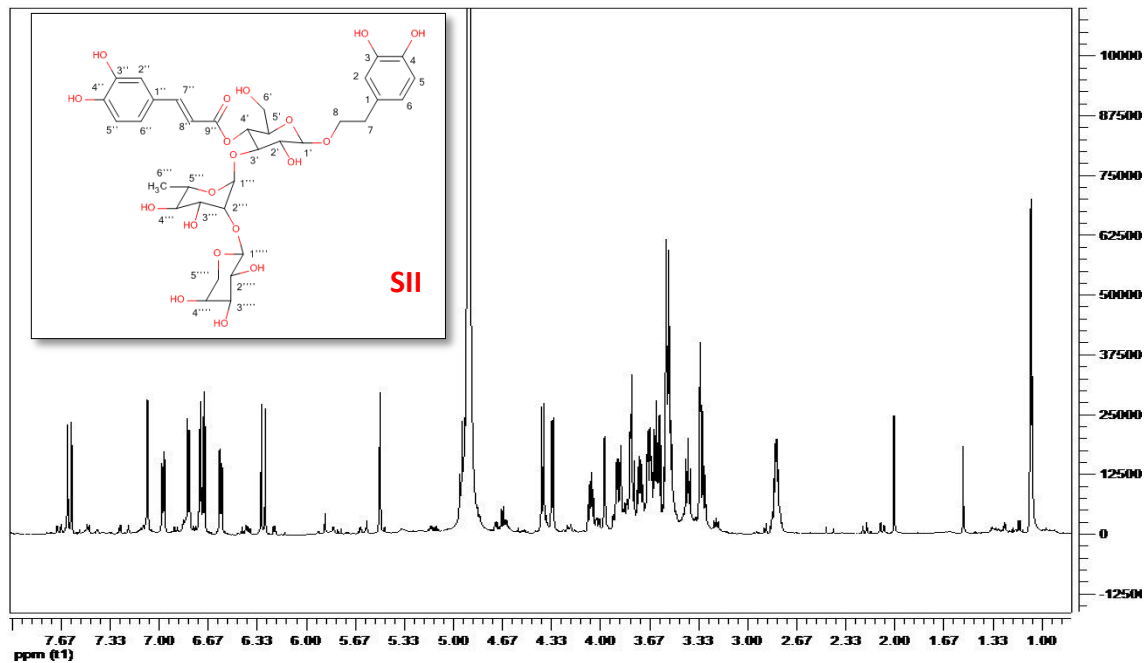


Εικόνα 182. Φάσμα 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελλαρεΐνης

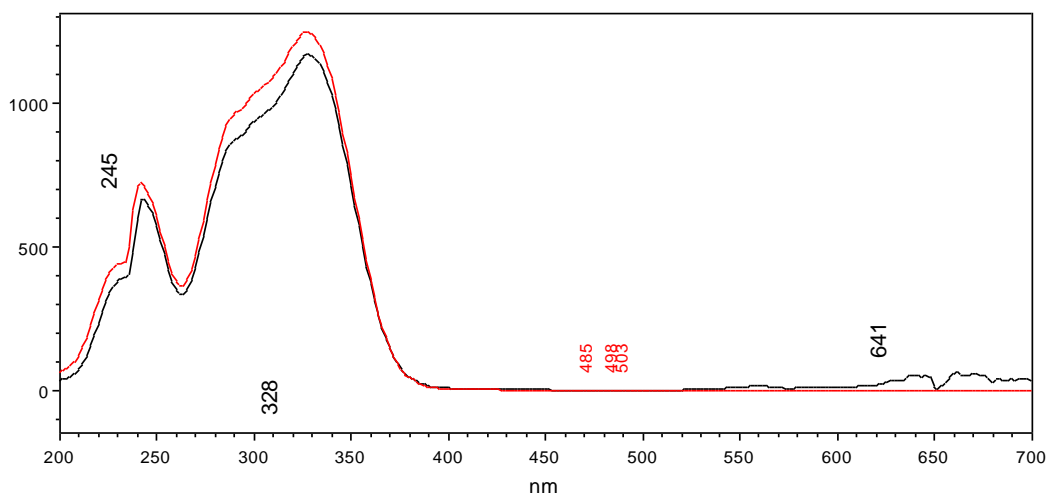


Εικόνα 183. Σύγκριση φάσματος UV του κλάσματος 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της ισοσκουτελλαρεΐνης (κόκκινου χρώματος), με το φάσμα του ολικού εκχυλίσματος (μαύρου χρώμα)

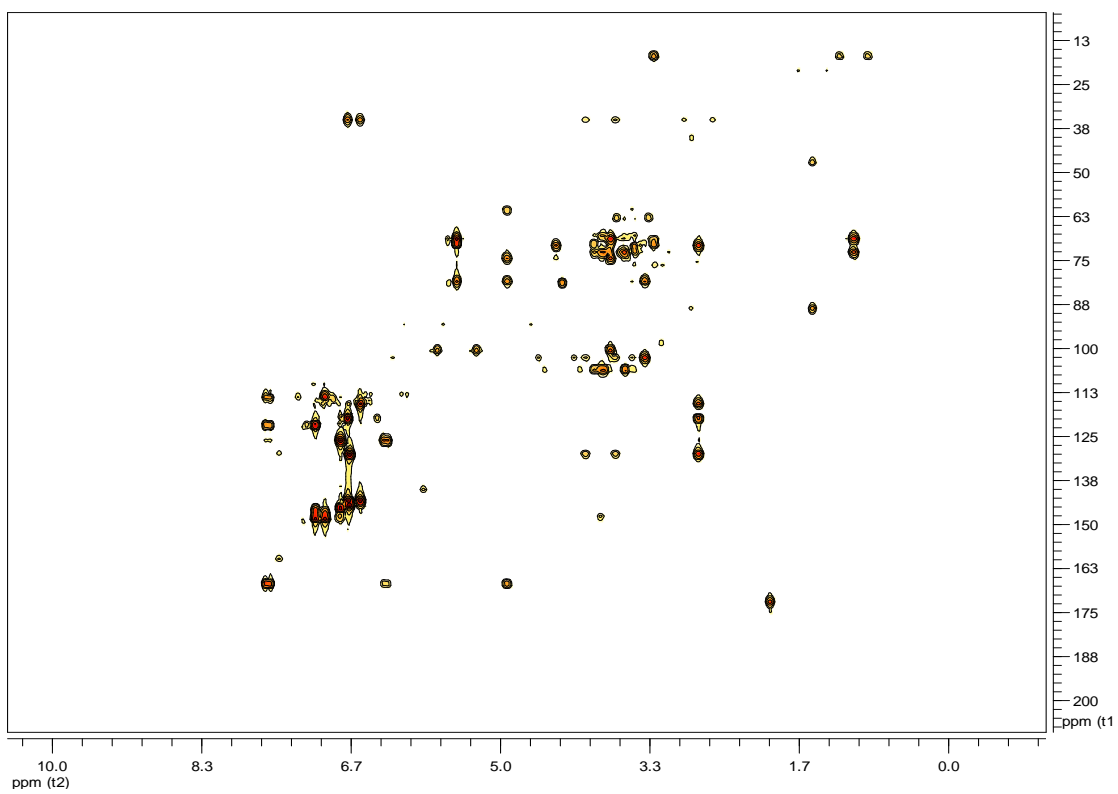
- $\alpha$ -L-αραβινοσυλο-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ραμνοπυρανόσυλο-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-καφεύλο- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης της 2-(3 $\rightarrow$ 4)-διυδρόξυ-(φαίνυλ) αιθανόλης ή αλλιώς λαβαντουλιφολιοσίδης (**SII**)



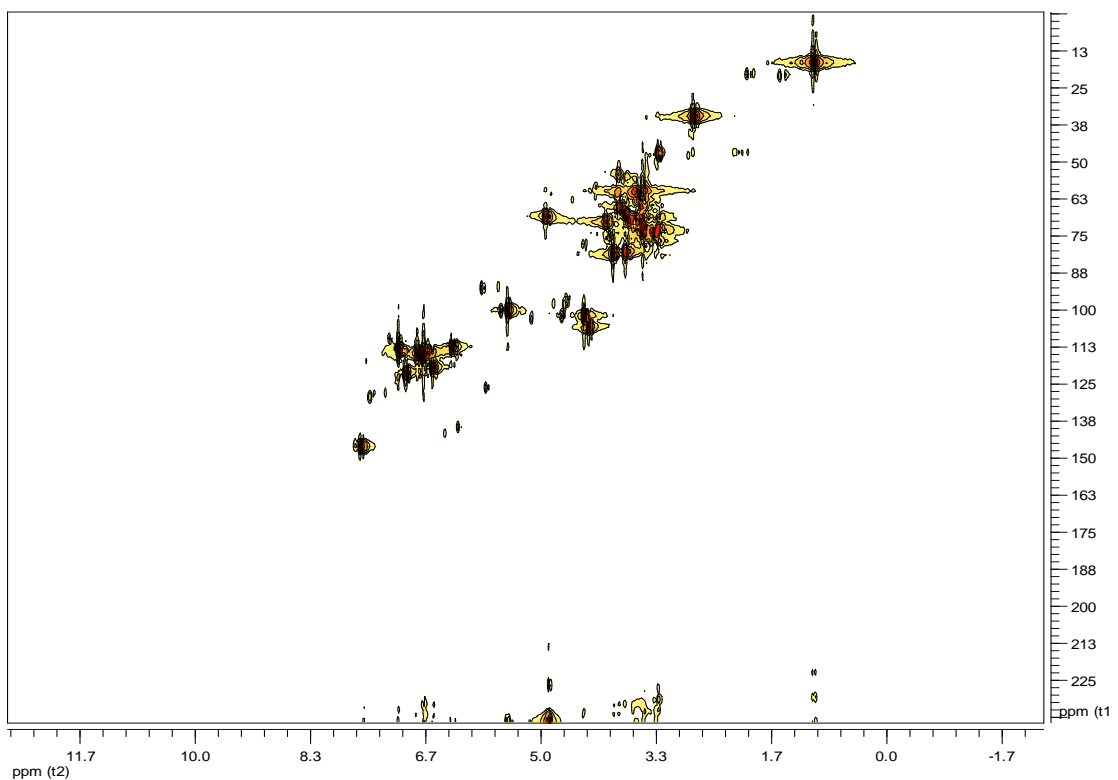
Εικόνα 184. Φάσμα NMR λαβαντουλιφολιοσίδη σε  $CD_3OD$



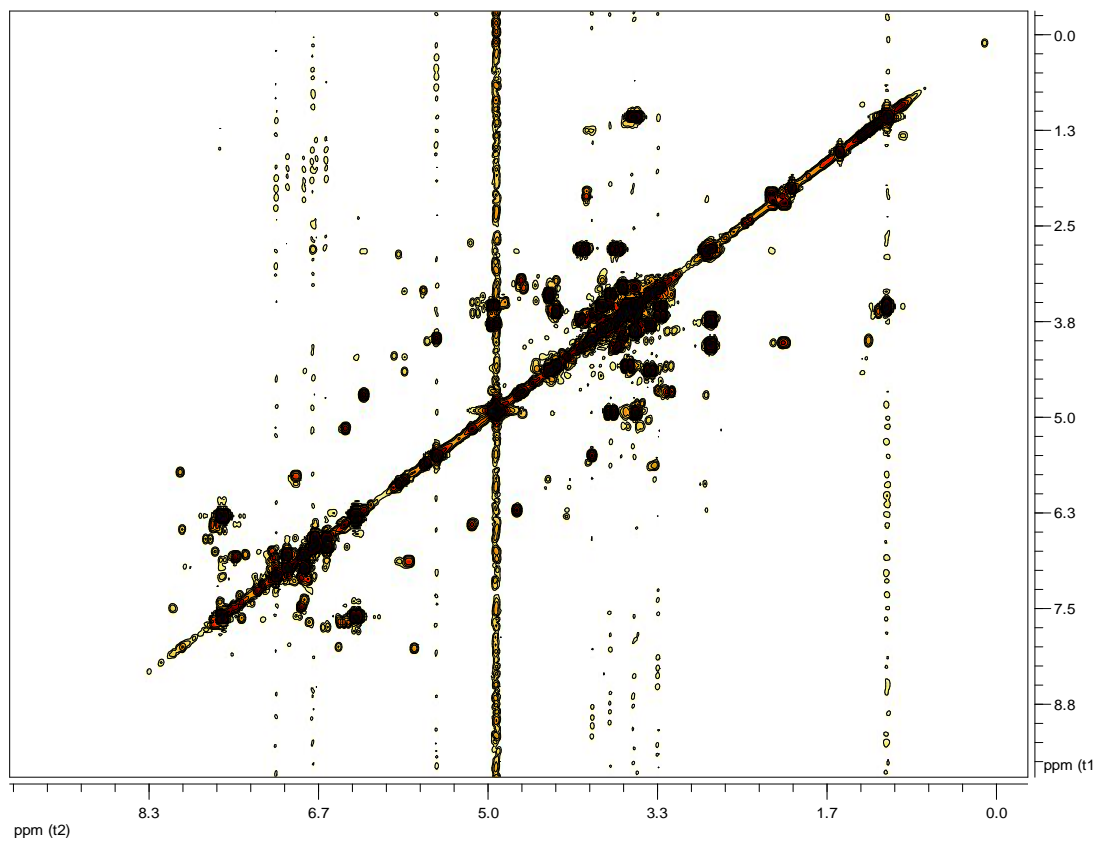
Εικόνα 185. Σύγκριση φάσματος UV του λαβαντουλιφολιοσίδης (κόκκινου χρώματος), με το αντίστοιχο φάσμα του ολικού εκχυλίσματος (μαύρου χρώματος)



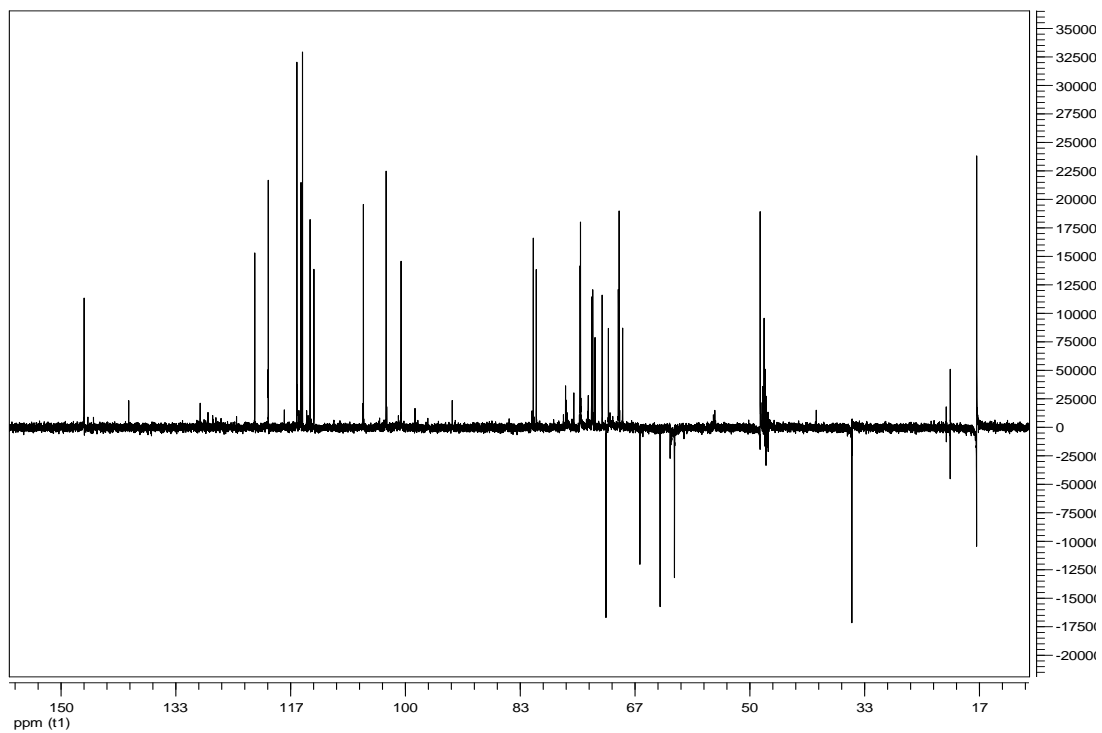
Εικόνα 186. Φάσμα ΗΜΒΣC λαβαντουλιφολιισίδη σε CD<sub>3</sub>OD



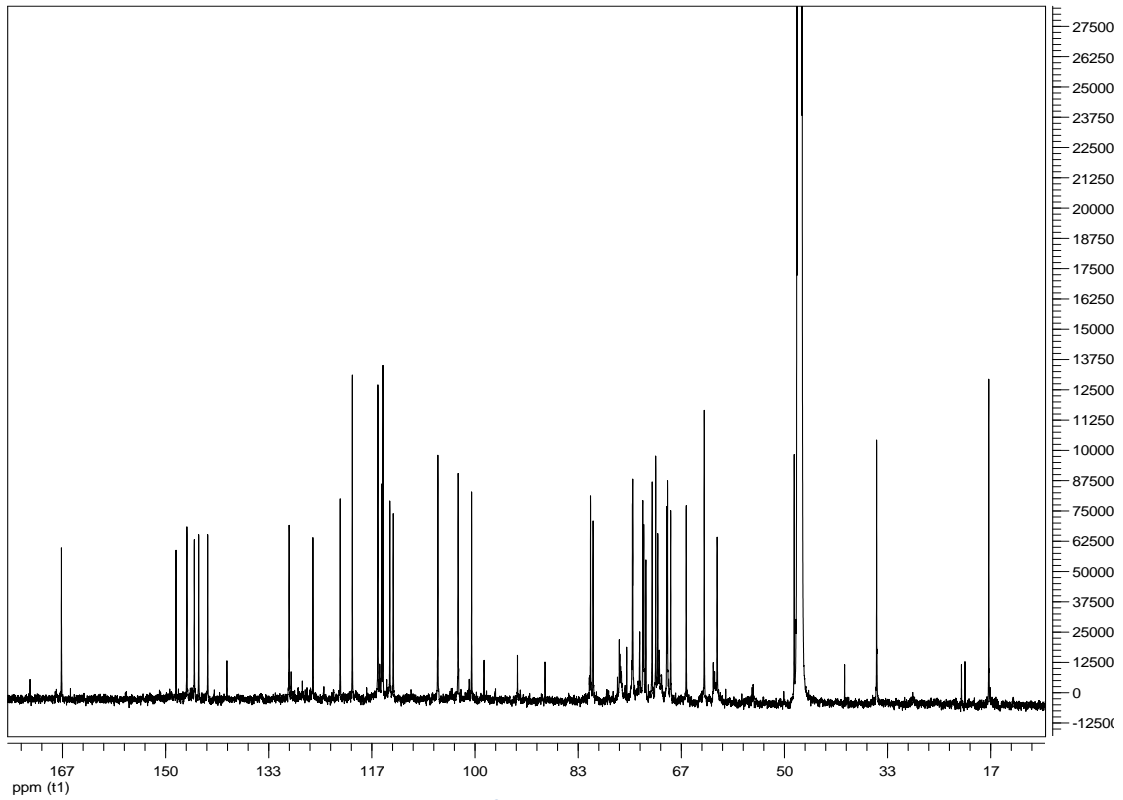
Εικόνα 187. Φάσμα ΗΜQC λαβαντουλιφολιισίδη σε CD<sub>3</sub>OD



Εικόνα 188. Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY λαβαντουλιφολιοσίδη σε  $\text{CD}_3\text{OD}$

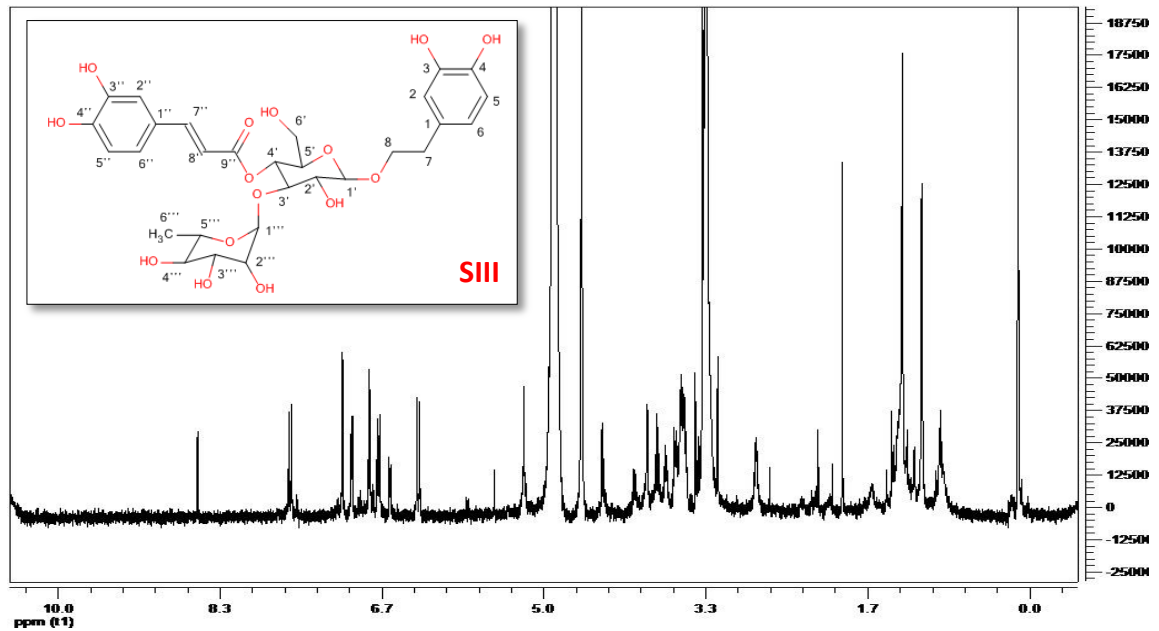


Εικόνα 189. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  λαβαντουλιφολιοσίδη σε  $\text{CD}_3\text{OD}$



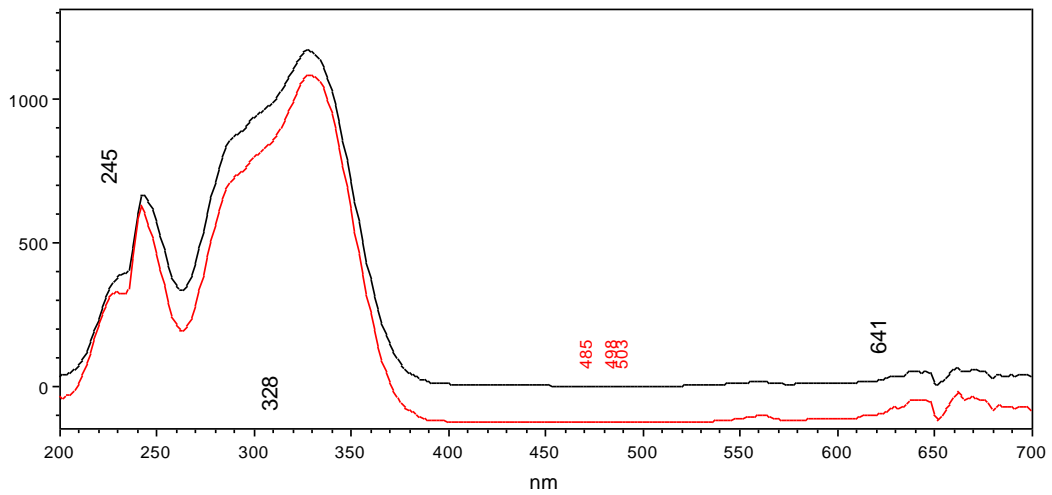
Εικόνα 190. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  λαβαντουλιφολιοσίδη σε  $\text{CD}_3\text{OD}$

- Ακτεοσίδης (SIII)

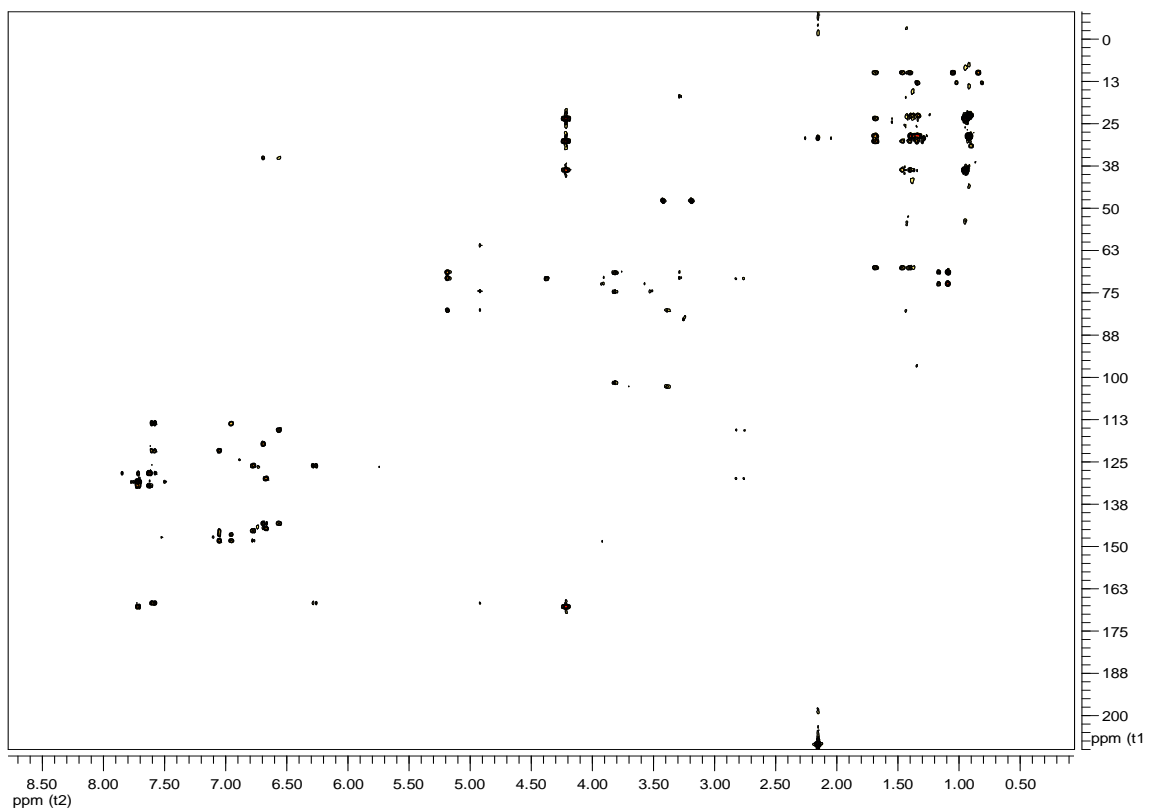


Εικόνα 191. Φάσμα NMR ακτεοσίδη σε  $\text{CD}_3\text{OD}$



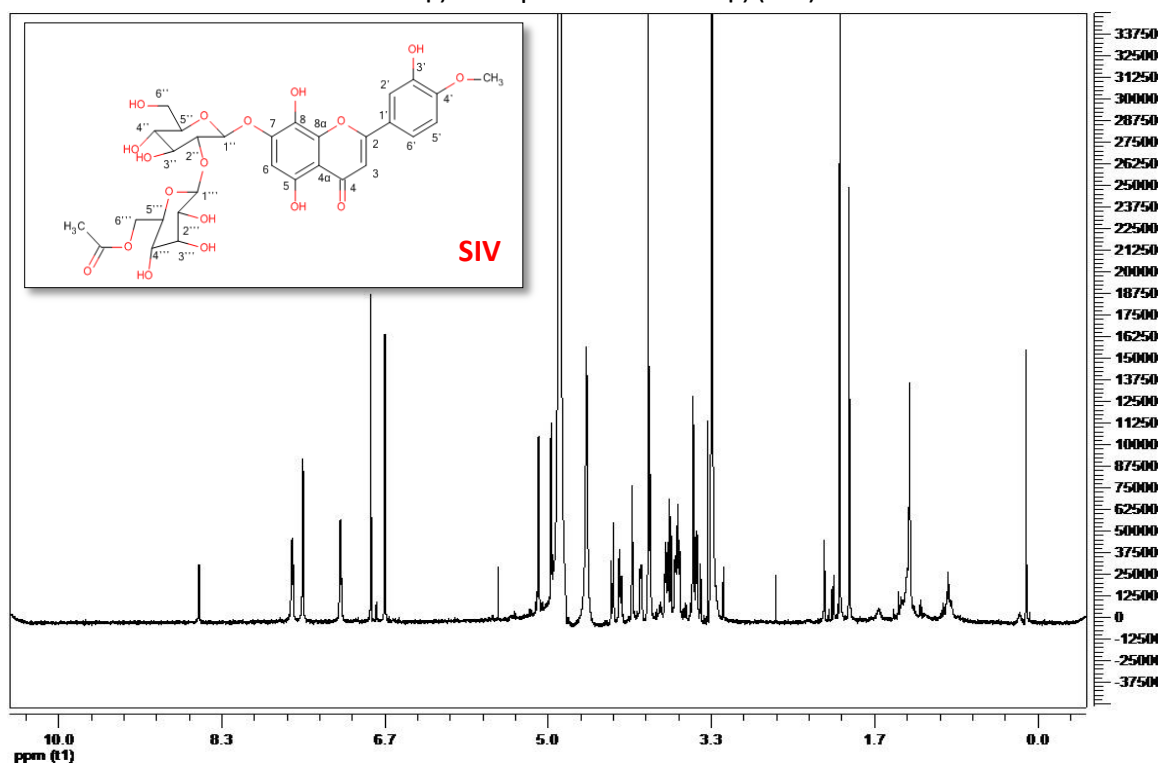


Εικόνα 192. Σύγκριση φάσματος UV του ακτεοσίδη (κόκκινο χρώμα) με το φάσμα του ολικού εκχυλίσματος (μαύρο χρώμα)

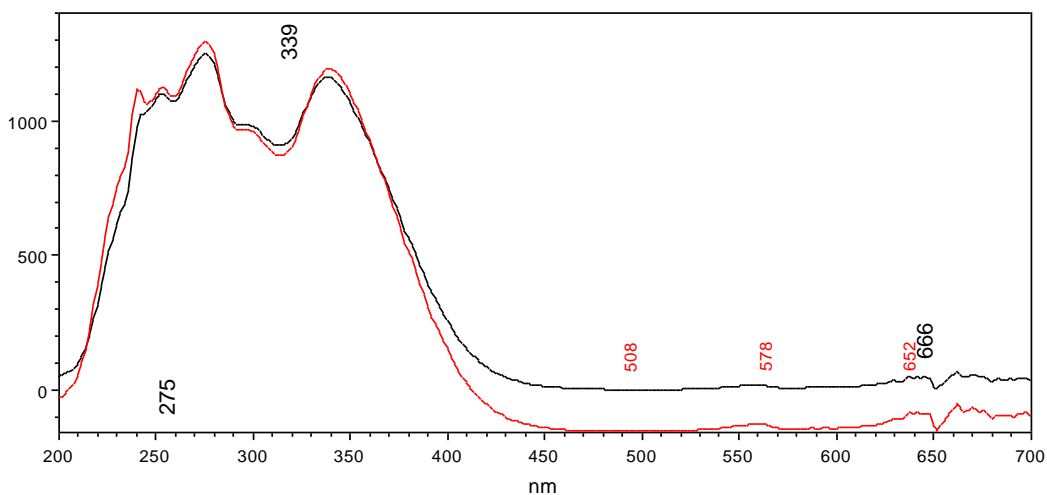


Εικόνα 193. Φάσμα HMBC ακτεοσίδη σε  $CD_3OD$

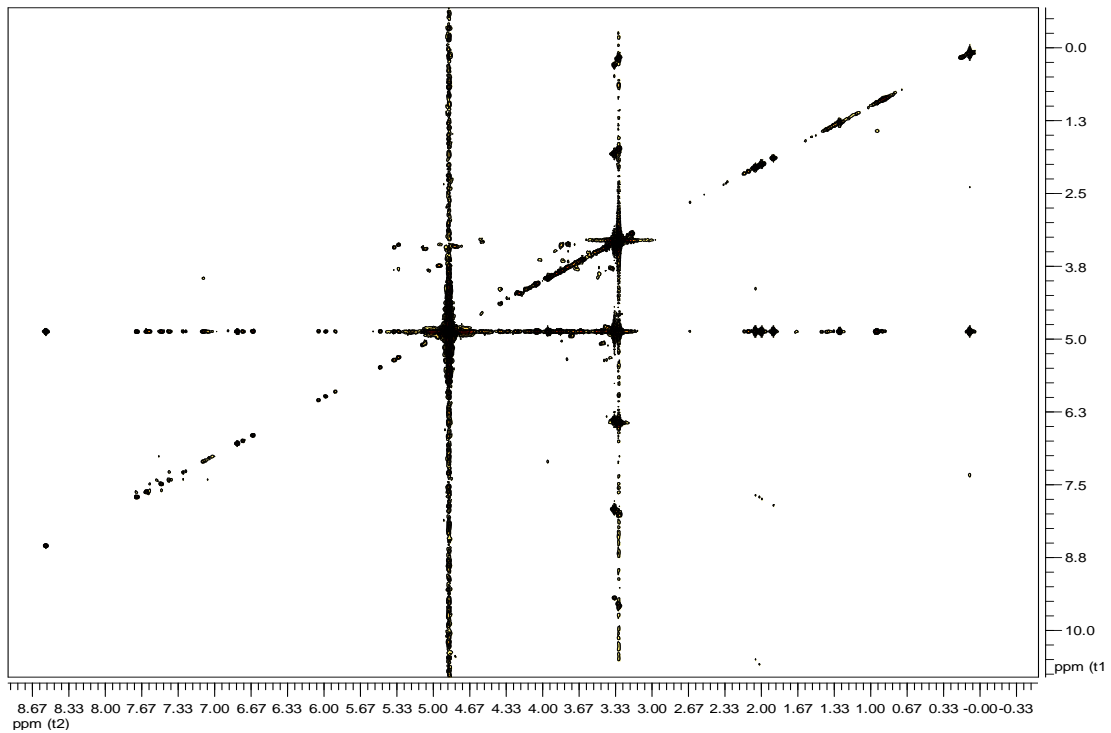
- 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-O-μεθυλοπολετίνης (SIV)



Εικόνα 194. Φάσμα NMR της 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-O-μεθυλοϋπολετίνης σε CD<sub>3</sub>OD

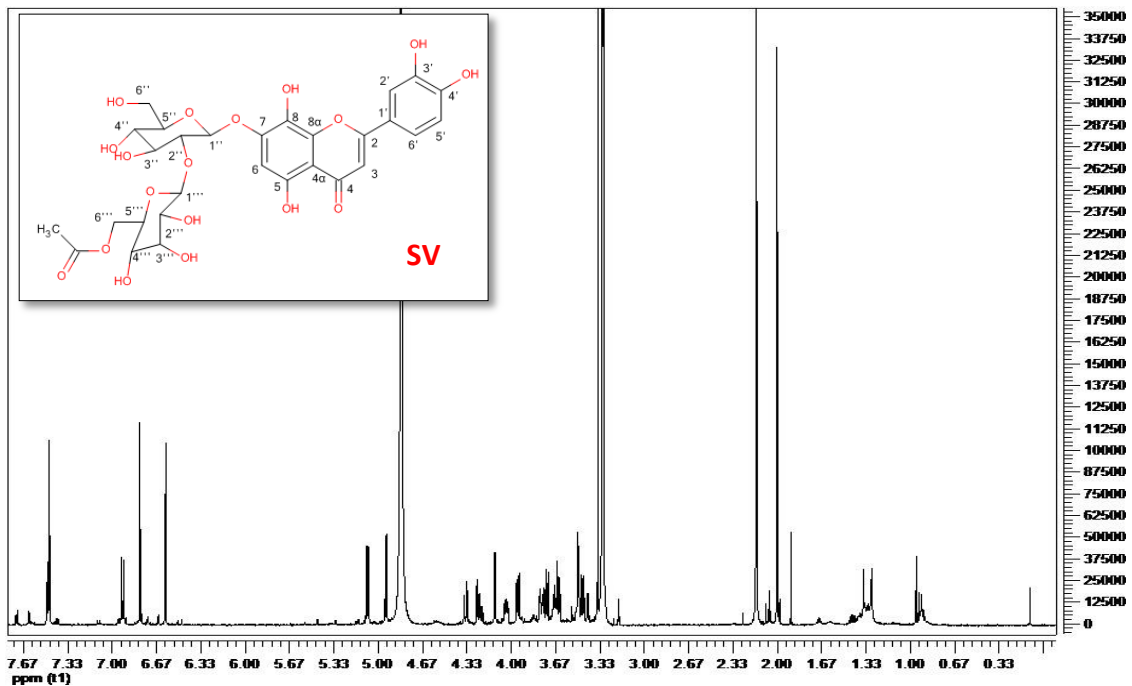


Εικόνα 195. Σύγκριση φάσματος UV της 7-O-6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-O-μεθυλοϋπολετίνης (κόκκινου χρώματος) με το αντίστοιχο φάσμα του ολικού εκχυλίσματος (μαύρο χρώμα)

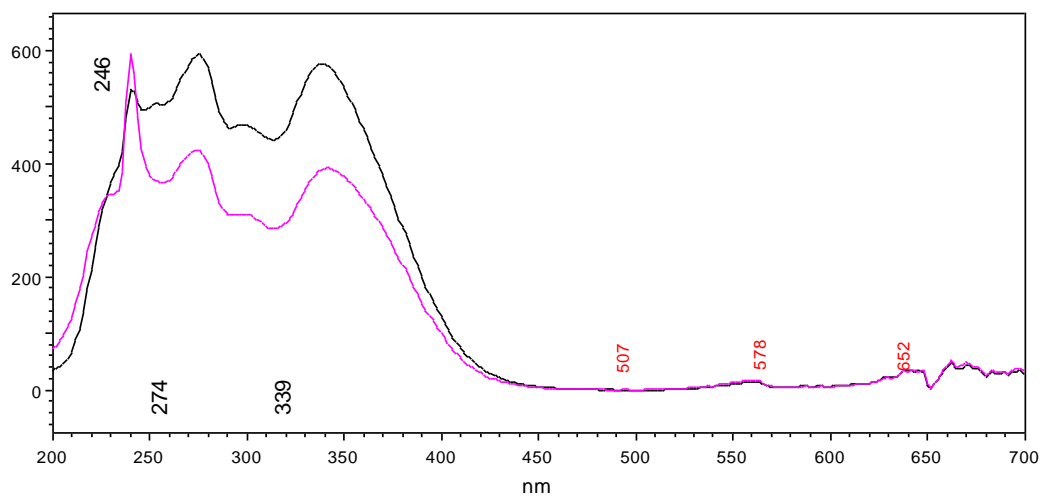


Εικόνα 196. Φάσμα COSY-LR της 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο- β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 4'-Ο-μεθυλοκατεχίνης σε CD<sub>3</sub>OD

- 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο- β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης (SV)

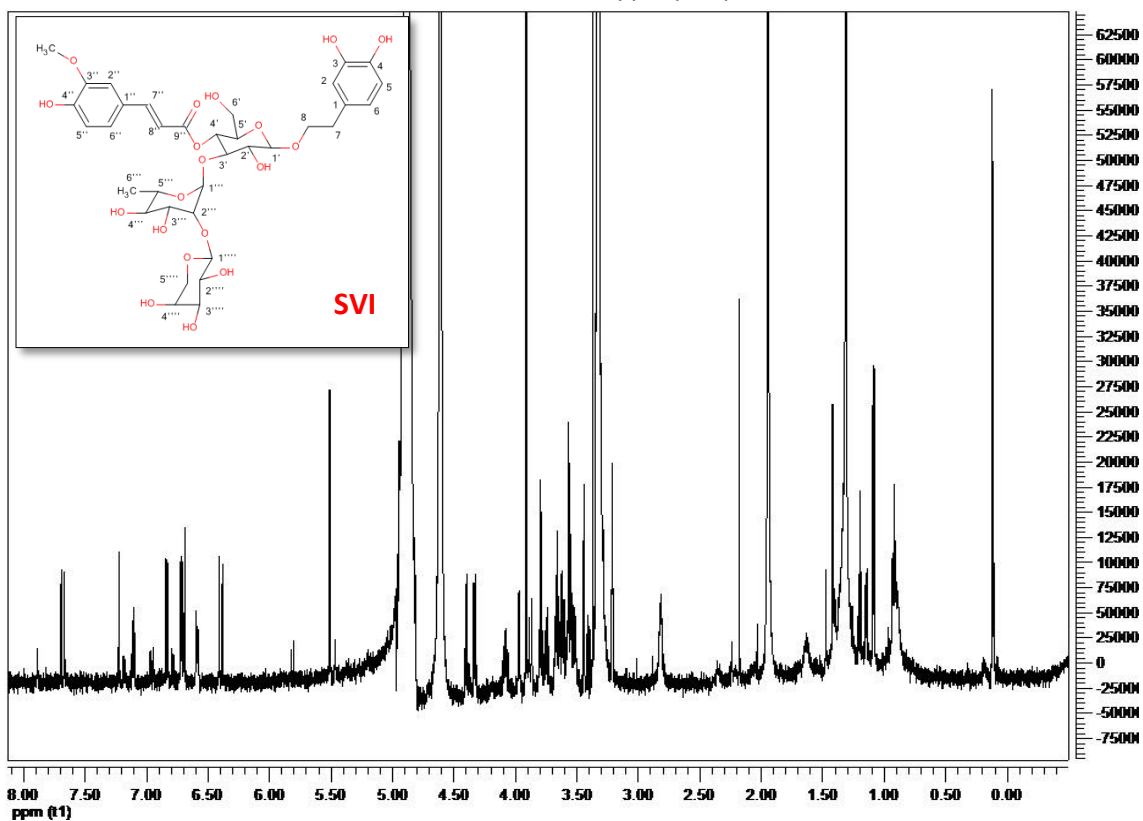


Εικόνα 197. Φάσμα NMR 7-Ο-6'''-Ο-ακετυλο- β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης

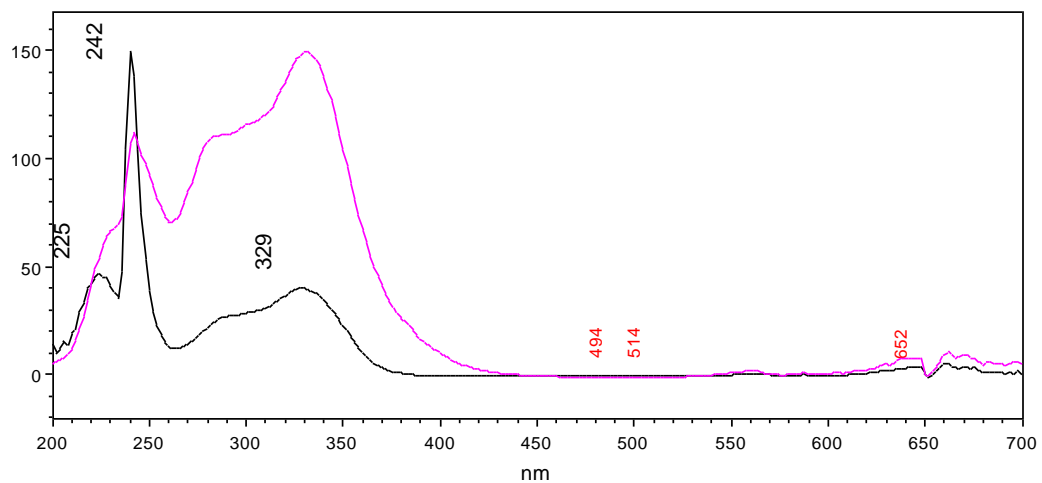


Εικόνα 198. Σύγκριση φάσματος UV της καθαρής 7-*O*-6'''-*O*-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της υπολετίνης (μωβ χρώματος), με το αντίστοιχο φάσμα του ολικού εκχυλίσματος (μαύρο χρώμα)

- Λεονοσίδης A (SVI)



Εικόνα 199. Φάσμα λεονοσίδης A σε CD<sub>3</sub>OD



Εικόνα 200. Σύγκριση φάσματος UV του λεονοσίδη Α (μαύρου χρώματος) με το αντίστοιχο φάσμα του ολικού εκχυλίσματος (μωβ χρώματος)

## *Glycyrrhiza glabra* (υπερκρίσιμη εκχύλιση)

- Ανάλυση εκχυλισμάτων *G. glabra* με HPLC και η καταγραφή των κύριων μεταβολιτών του για την επαιξεργασία με PLS-R

A/A	1	2	3	4	5	6	7	8	9 (Glabridin)	10	11	12	13	14	Τυροσινάση
G.g Run 1 Opt	850724	1415933	865990	1646222	1962822	2079071	4595461	4488722	26822345	7134784	1738451	3165213	7489102	6821480	0.41
G.g Run 2 Opt	981696	1235440	803396	1534255	1308816	1739994	4323891	3809297	22694008	6388913	2260737	3022340	7350121	6866284	0.45
G.g Run 3 Opt	0	57701	0	125461	0	94325	432553	306099	770246	440253	810135	181884	1095391	5166211	5.59
G.g Run 4 Opt	1348960	1255880	854297	1588818	1518434	1688388	3742873	4169808	25994305	6546607	1983252	2512274	6346275	5496394	0.26
G.g Run 4 Opt_2	840269	1311580	954865	1650179	1626427	2032249	4778656	5005123	31906685	7713073	1922129	3233039	7869783	6952551	0.45
G.g Run 5 Opt	2000016	1183855	740442	1460807	1994928	1795013	3428938	3988261	25032899	5988908	1239078	1958865	5236238	4630674	0.42
G.g Run 6 Opt	1732513	1417157	1099571	2007531	2692709	2758589	4866828	5774492	36457299	9887083	2493523	3244081	7595573	7110002	0.28
G.g Run 6 Opt_2	1713207	1376290	1104763	1935133	2483940	2639228	4768716	5720725	35141581	9170657	1838904	3103722	7281848	6677267	0.22
G.g Run 7 Opt	2962406	1332412	820443	1593100	1872773	1904175	3589130	4115078	25775477	6094759	1315114	2388821	5369545	5260214	0.26
G.g Run 8 Opt	21523	337089	326554	587385	655199	1035658	2926977	1987587	8335479	4551532	3689656	2370921	8438045	10156986	0.50
G.g Run 9 Opt	620464	871611	361210	1040567	588177	924202	3698026	1599661	9433266	3789462	2333416	2827335	7071641	9348218	0.47
G.g Run 10 Opt	1017611	1337230	1113487	1885576	2527520	2541410	5101089	5534839	35034692	8783878	1965999	3365128	7896586	7097162	0.27
G.g Run 11 Opt	1772515	1323345	698126	1333581	1334364	1560070	3910918	3403059	22997266	5943671	1681453	2651805	6900532	6482327	0.25
G.g Run 12 Opt	623957	1071488	817626	1433884	1770342	1606341	3920183	4282230	27081688	6925456	3158143	2894064	8212814	7387210	0.47
G.g Run 13 Opt	205559	773640	715110	1138683	1527985	1494737	4794413	4128619	25099131	7521997	3519705	2798472	8931660	9221752	0.32
G.g Opt Yield	3699102	1139463	480541	818316	1681214	1446642	2491075	3060832	17911010	4865584	1038823	1692561	3800036	4426487	0.40
G.g Opt Yield_2	2491011	740591	368228	594955	1087195	985203	1734576	2066843	13563904	3384484	657189	1014915	2527653	3559122	0.44
G.g Opt Yield T.G.	2987408	1355905	850843	1275548	1867744	2015386	4102228	4128540	26663890	6163137	1543712	2521795	6146087	6018125	0.31
G.g C-Hex b	46223	0	0	0	0	48670	852619	335371	1544915	592252	412448	0	1824528	2583103	3.41

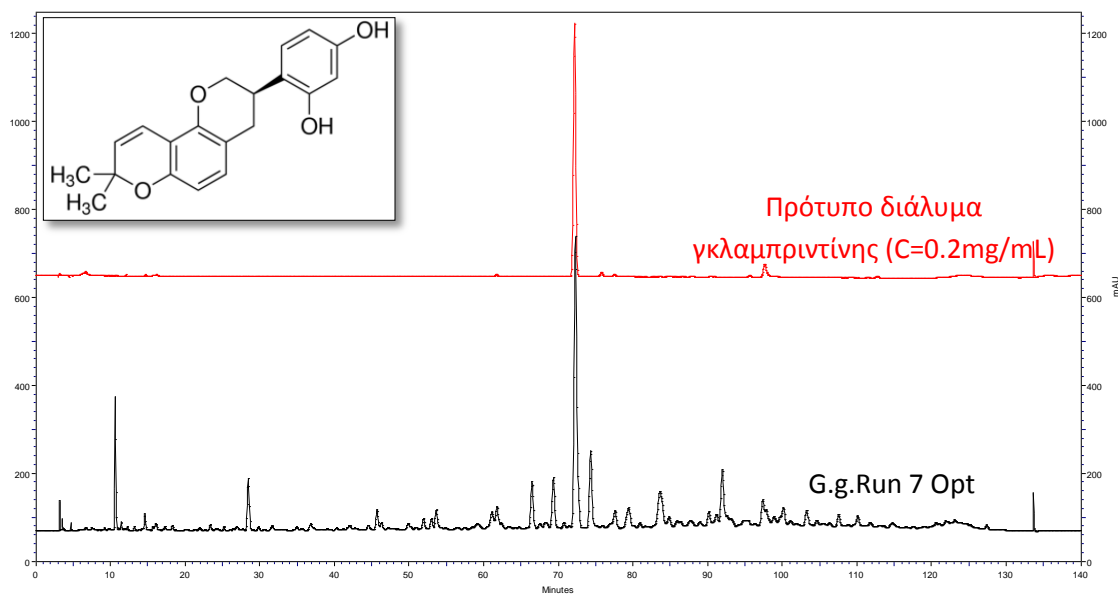
G.g DCM	567893	756881	646052	968003	1806170	1810764	3560646	3786834	25164299	5949811	1168118	1781648	4537972	6826058	0.47
G.g EtOAc	450386	633891	635053	928071	1496851	1627236	3045796	3386948	22343724	5520963	993835	1741320	4000608	6389160	0.59
G.g MeOH	1039100	202690	82502	176821	178014	234804	513801	603951	4339168	967659	147661	231757	621358	919558	1.58
G.g EtOH	923442	328806	203572	329367	547789	573947	1124911	1257466	8801459	2091591	357367	562539	1340635	2403015	0.63

## Ταυτοποίηση γκλαμπριντίνης

Η ταυτοποίηση της γκλαμπριντίνης έγινε με HPLC. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν: Fortis Technologies Ltd. UniverSil HS C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm) και συγκέντρωση πρότυπης: 0,2mg/mL σε MeOH.

Πίνακας 97. Σύστημα ανάλυσης HPLC

Χρόνος	AcN	H <sub>2</sub> O + 1% A.A	Ροή (mL/min)
0.0	2.0	98.0	1.00
5.0	19.0	81.0	1.00
115.0	80.0	20.0	1.00
120.0	100.0	0	1.00
130.0	100.0	0	1.00
131.0	2.0	98.0	1.00
140.0	2.0	98.0	1.00

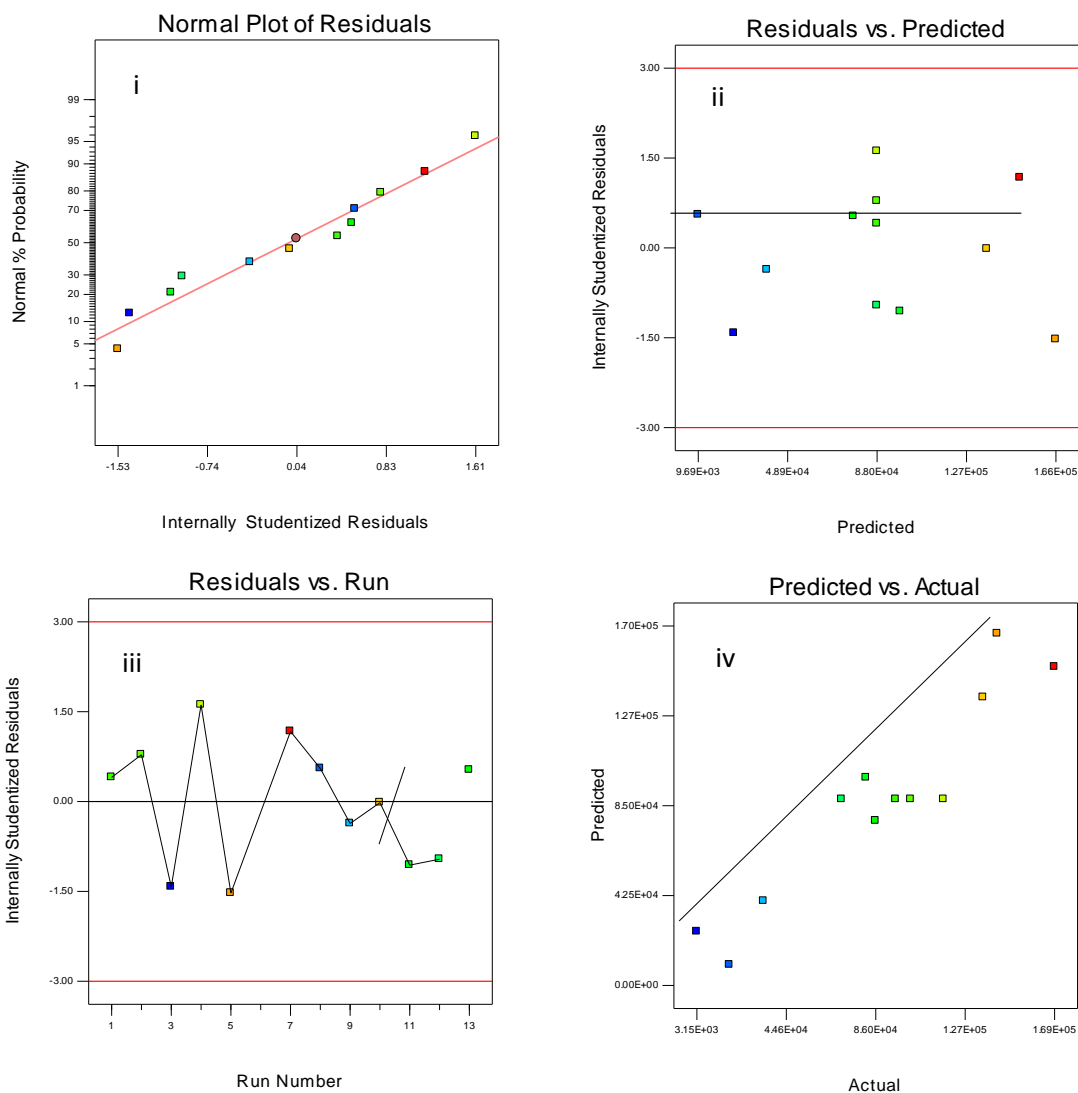


Εικόνα 201. Συγχρωματογράφιση πρότυπης γκλαμπριντίνης με το εκχύλισμα της Υ.Ε. των ριζών του φυτού *G. glabra* (280 nm)

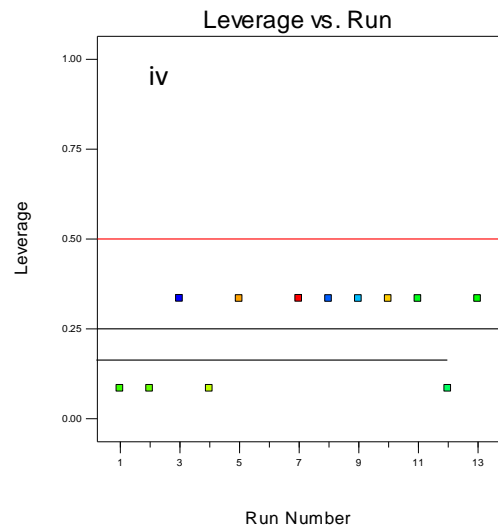
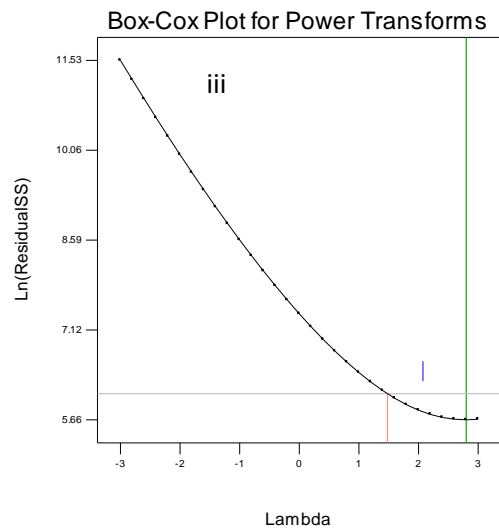
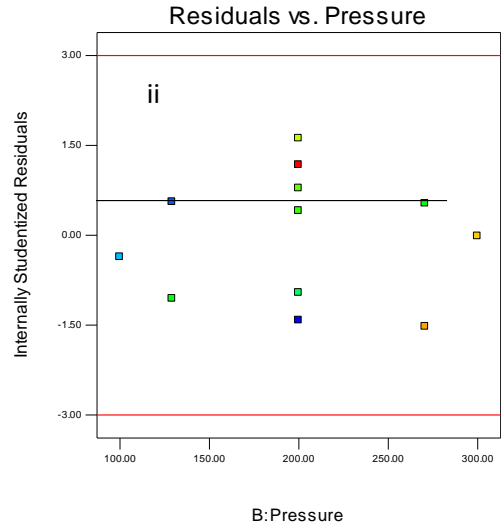
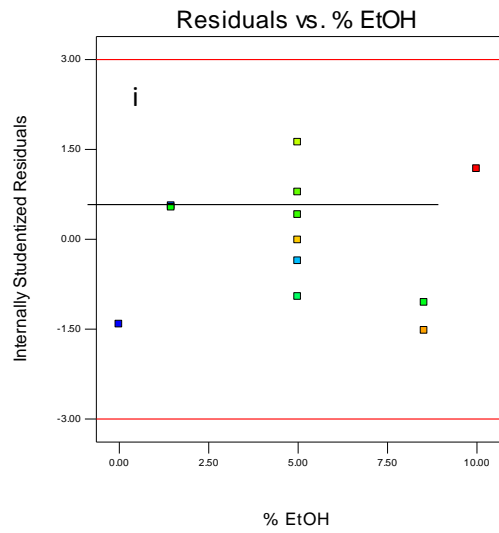


## Διαγράμματα ανάλυσης διακύμανσης για τη μεγιστοποίηση της Υ.Ε.

- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για την αντιοξειδωτική δράση στο DPPH των εκχυλισμάτων της Υ.Ε.

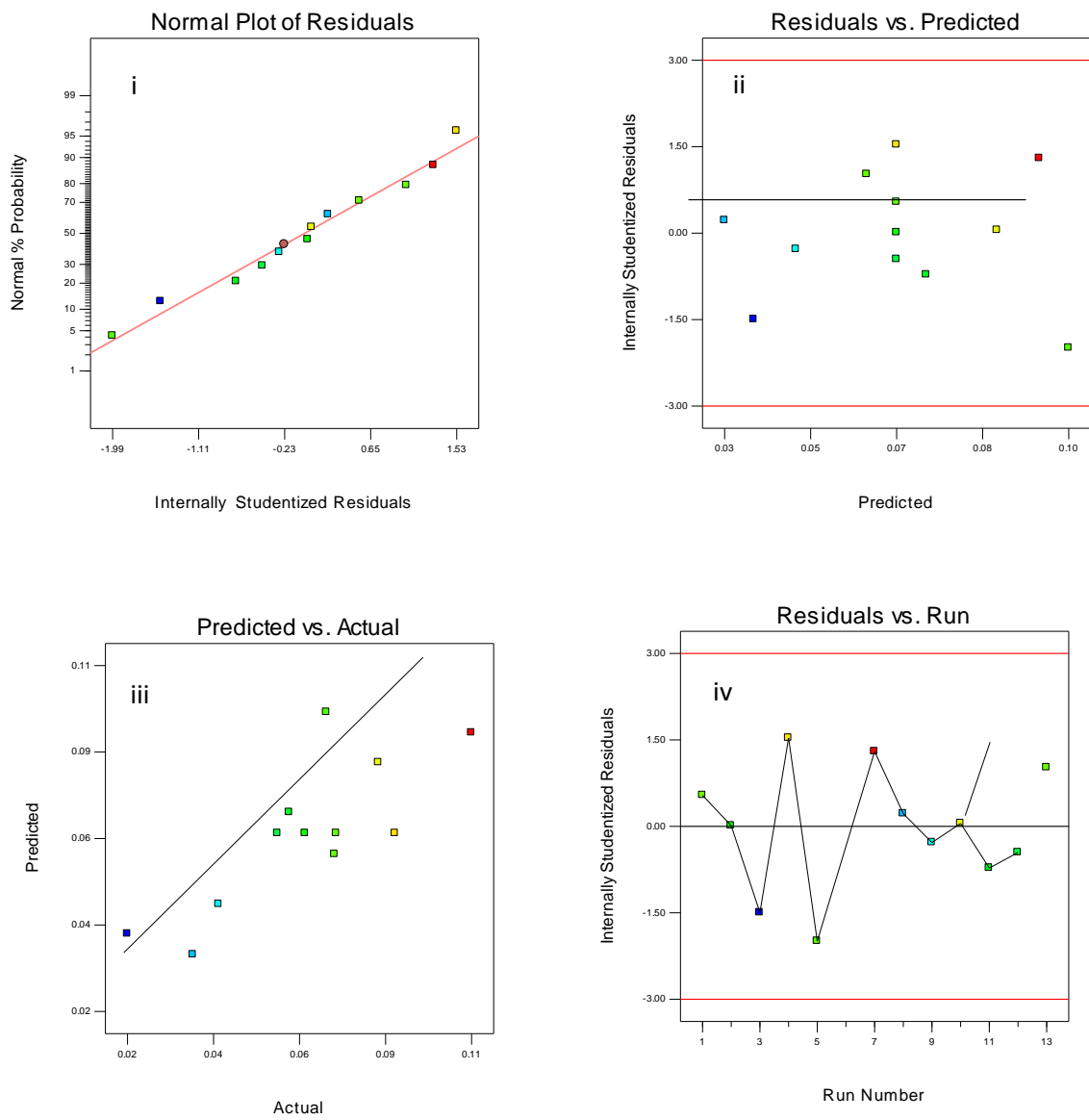


Εικόνα 202. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης στο DPPH

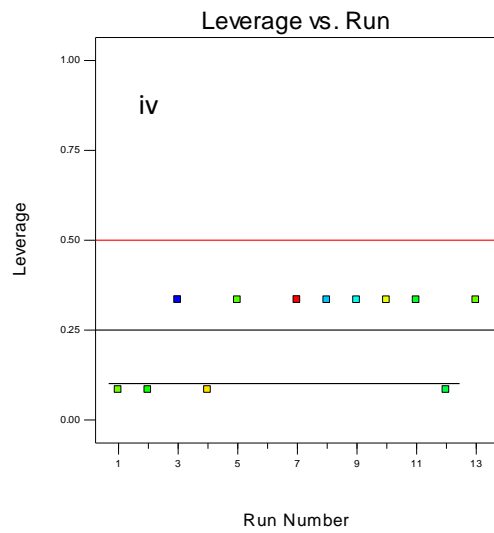
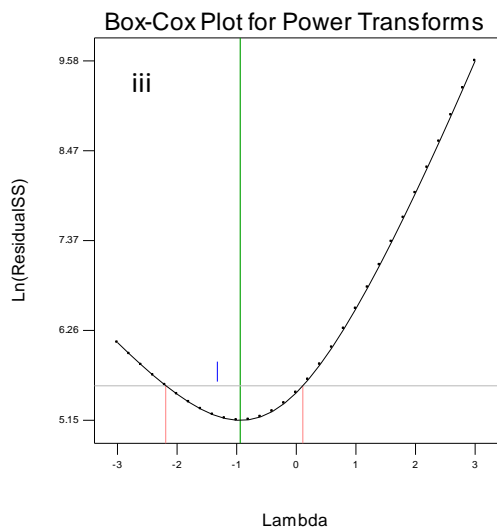
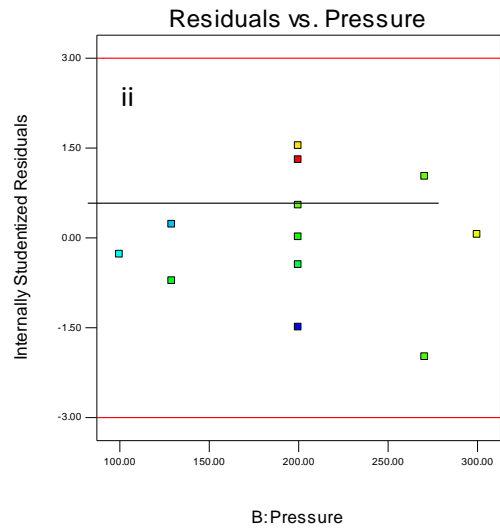
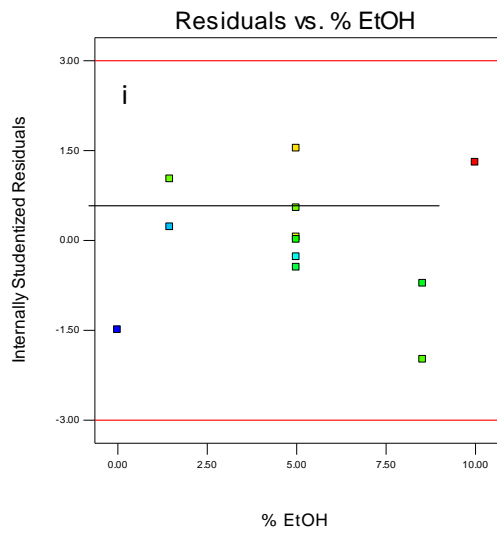


Εικόνα 203. i) και ii) Διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους EtOH και πίεσης αντίστοιχα  
 iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης στο DPPH

- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για την αντιοξειδωτική δράση στο ABTS των εκχυλισμάτων της Υ.Ε.

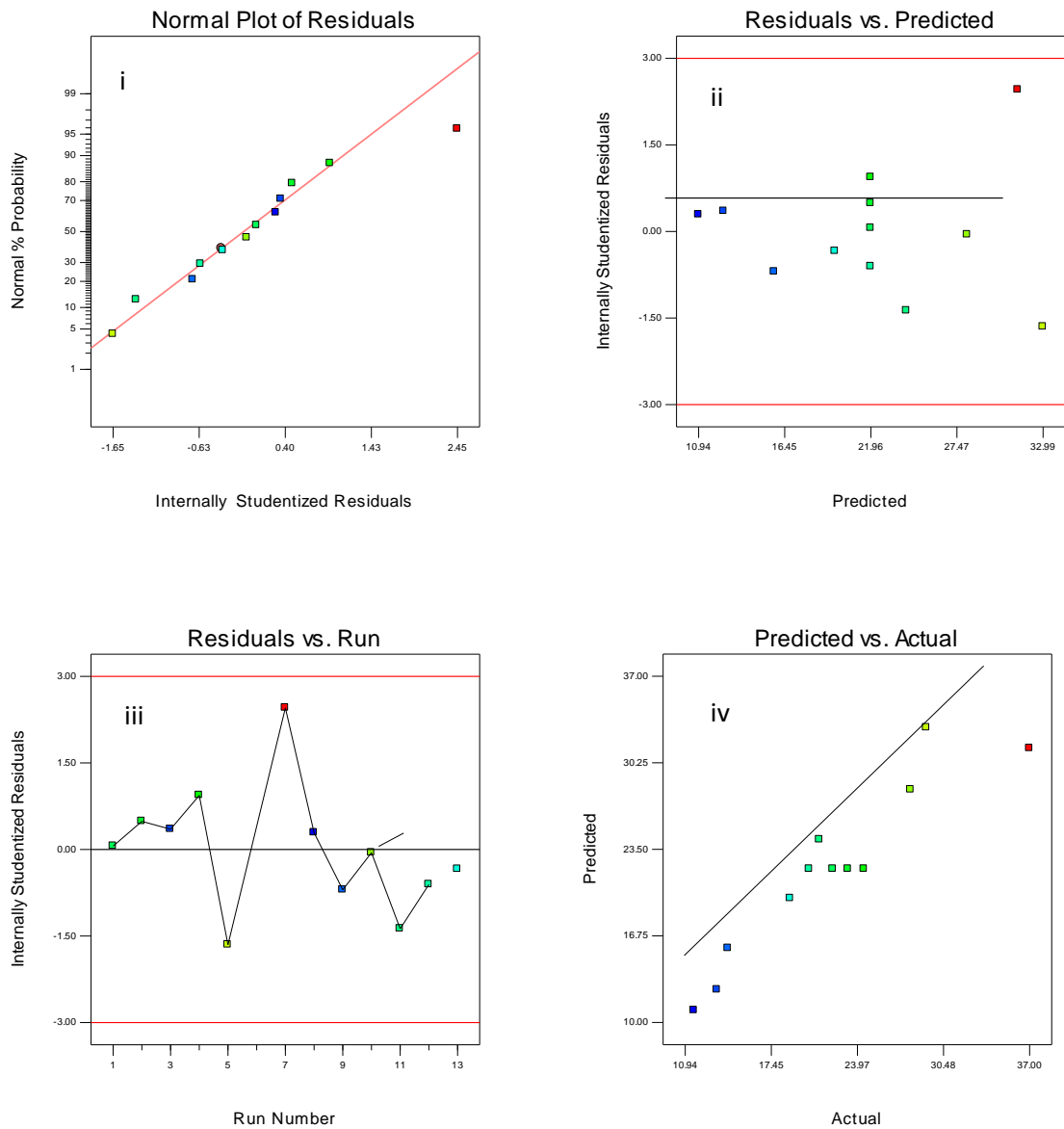


Εικόνα 204. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης στο ABTS

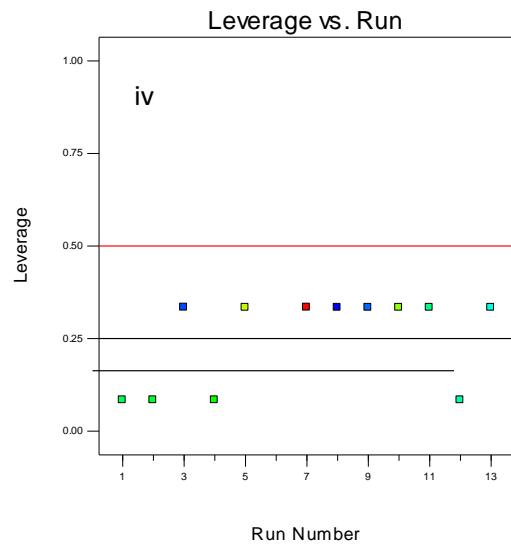
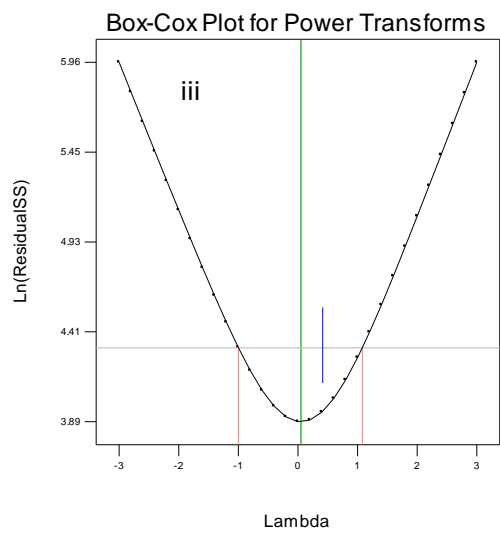
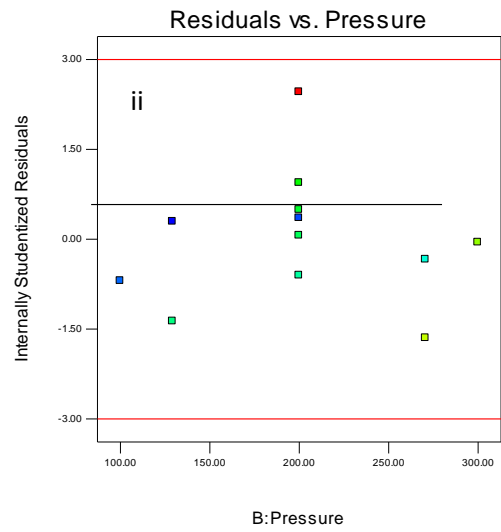
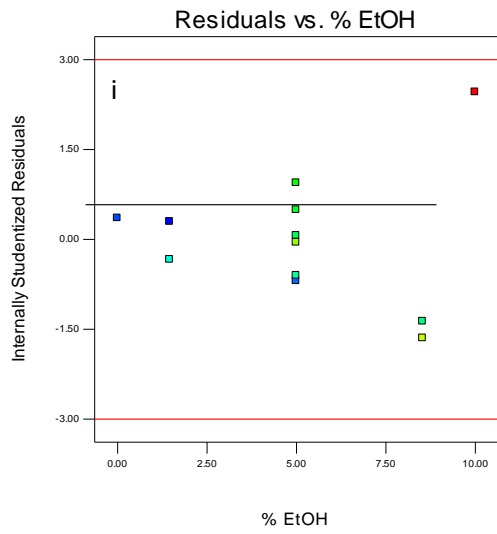


Εικόνα 205. i) και ii) Διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους EtOH και πίεσης αντίστοιχα  
 iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης στο ABTS

- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για το φορτίο σε ολικά φλαβονοειδή TFC των εκχυλισμάτων της Υ.Ε.

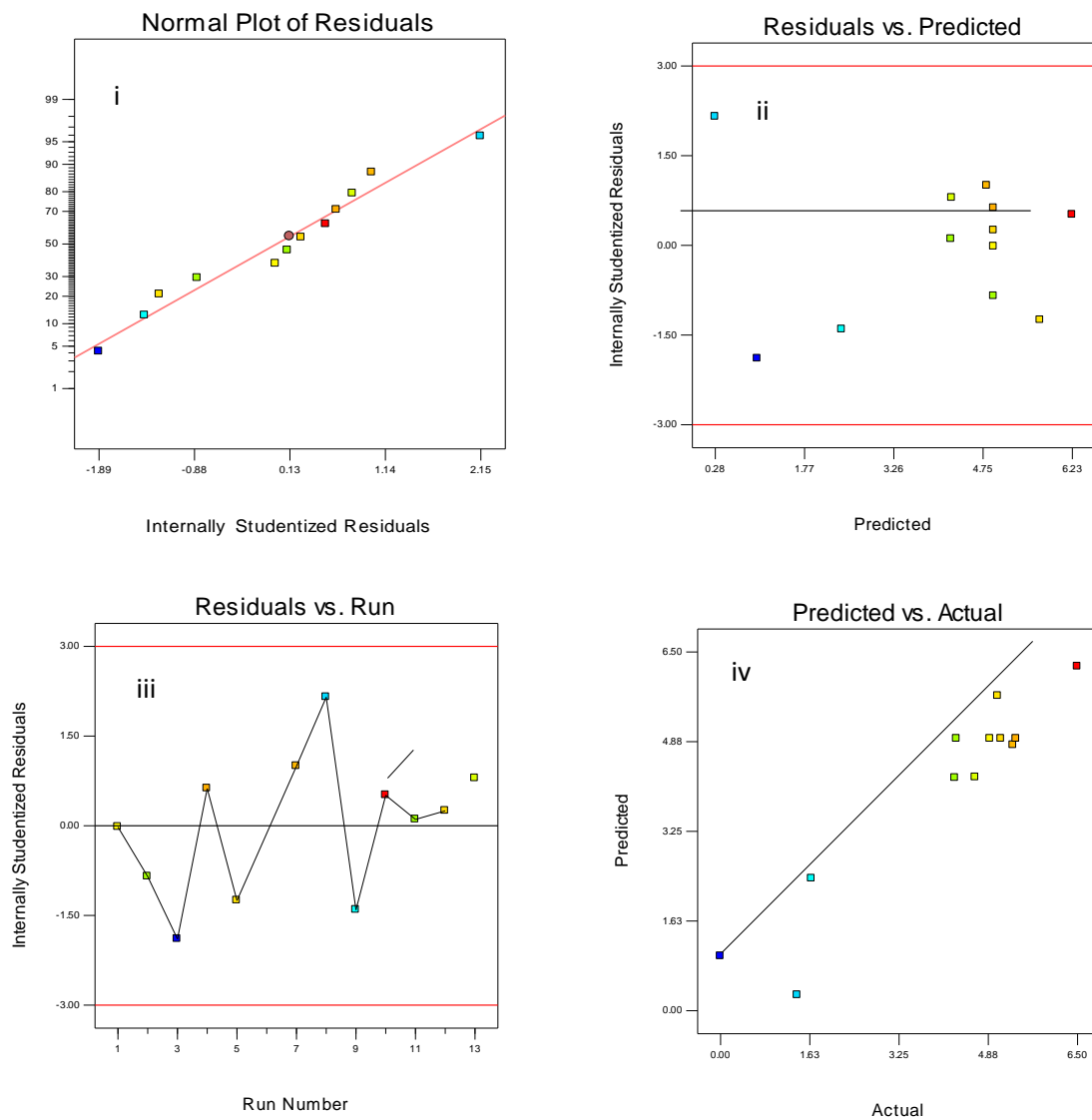


Εικόνα 206. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση του φορτίου σε φλαβονοειδή TFC

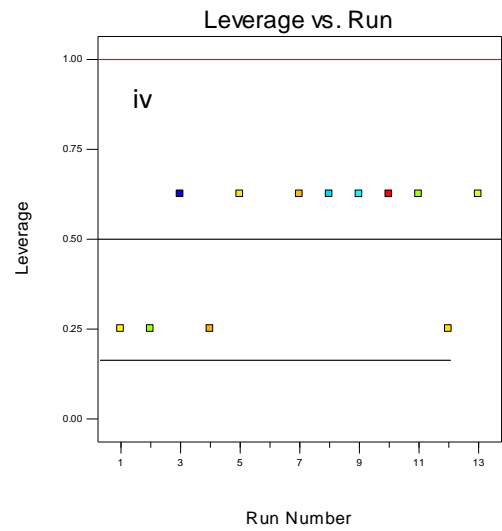
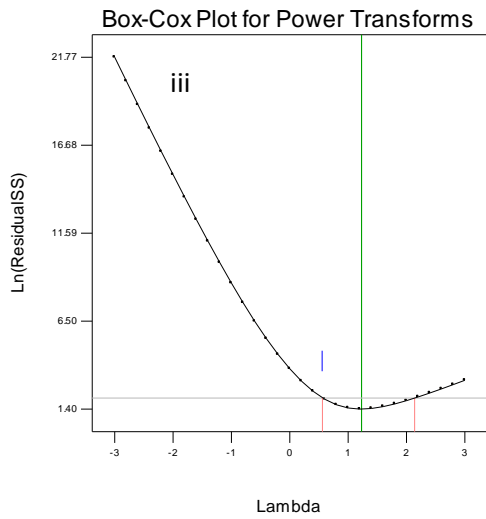
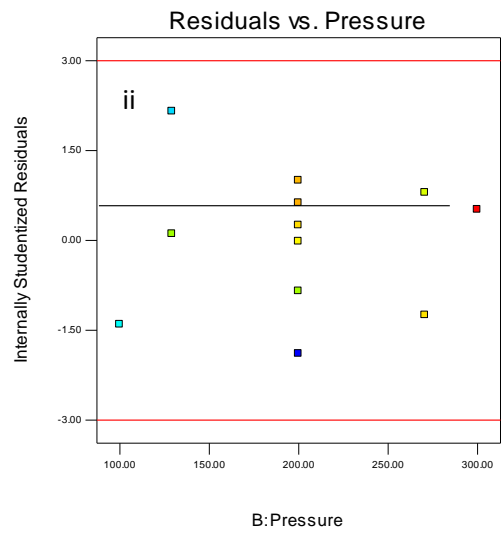
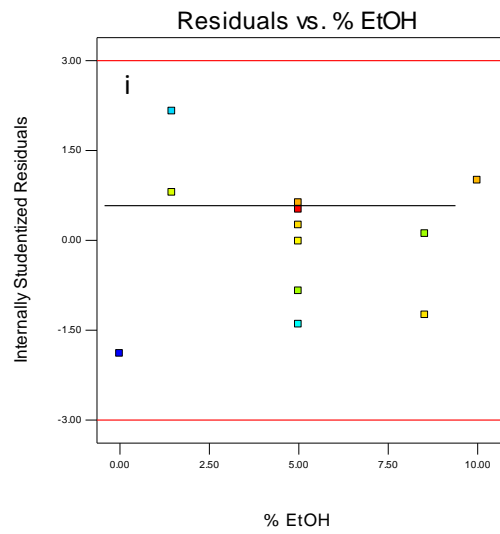


Εικόνα 207. i) και ii) Διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους EtOH και πίεσης αντίστοιχα  
 iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόγλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση του φορτίου σε φλαβονοειδή TFC

- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για την περιεκτικότητα της γκλαμπριντίνης των εκχυλισμάτων της Υ.Ε.



Εικόνα 208. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση της περιεκτικότητας της γκλαμπριντίνης



Εικόνα 209. i) και ii) Διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους EtOH και πίεσης αντίστοιχα  
 iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση της περιεκτικότητας της γκλαμπριντίνης



## *Glycyrrhiza glabra* (υπόλειμμα υπερκρίσιμης εκχύλισης)

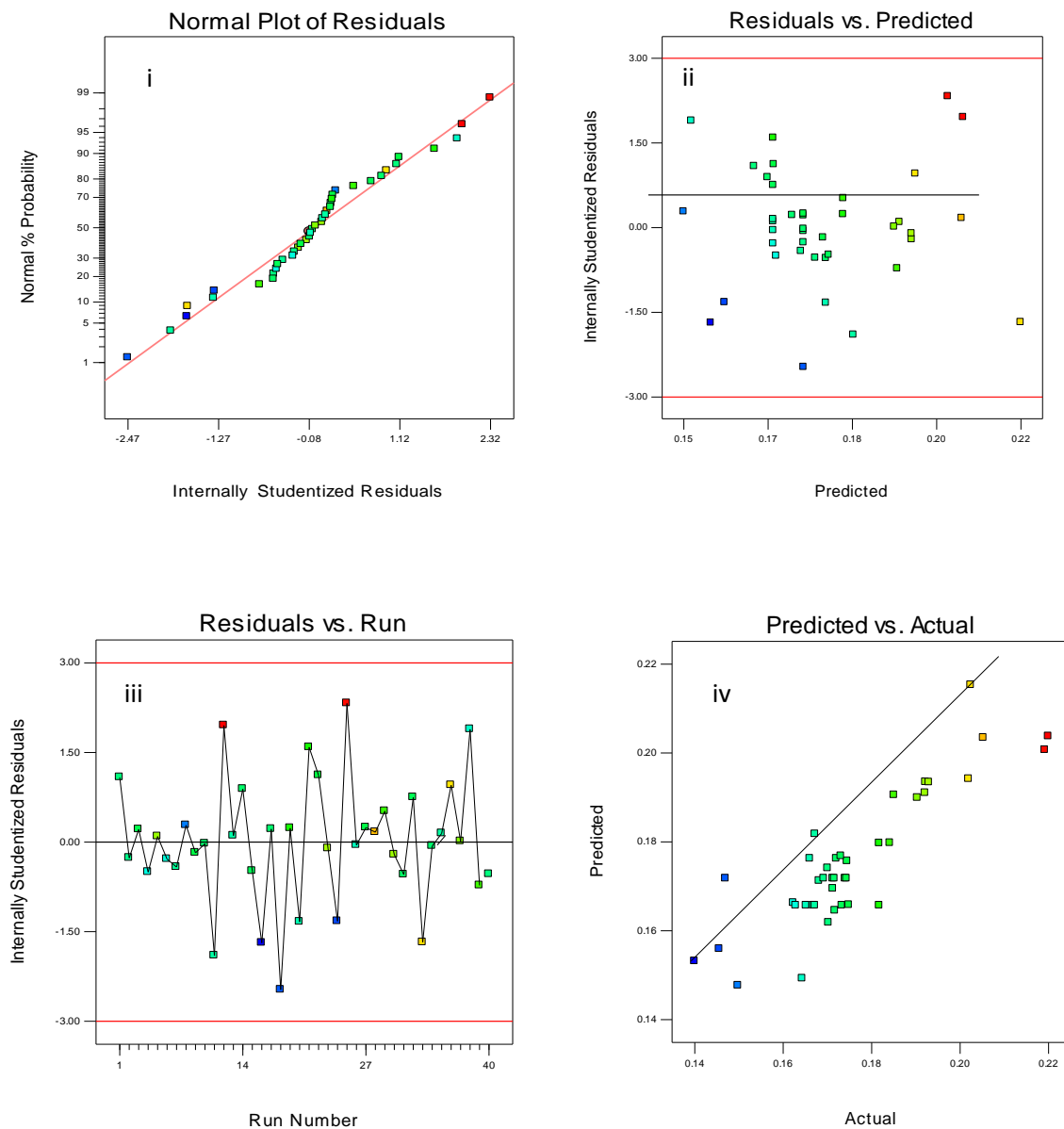
Πίνακας 98. Συγκεντρωτικός πίνακας συνθηκών εκχύλισης και αποτελεσμάτων του CCD σχεδιασμού για το υπόλειμμα της Υ.Ε. του φυτού *G.glabra*

Δείγματα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Διαλύτης (%)	Κύκλοι εκχύλισης	Ξηρό βάρος (g)	Απόδοση (%)	TFC	TPC	DPPH	ABTS
							(mg κερκετίνης/g εκχυλίσματος), C <sub>well</sub> =2mg/mL	(mg GA/g extract)	% Inhibition, (C <sub>well</sub> =500μg/mL)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
G.g res.Run 1	162	13	20	1	2.0164	33.61	16.58	32.77	32.8	61.02
G.g res.Run 2	120	10	50	1	2.042	34.03	19.05	42.05	49.64	52.6
G.g res.Run 3	120	10	50	1	1.9313	32.19	20.3	36.69	50.59	64.74
G.g res.Run 4	120	15	50	1	2.217	36.95	15.88	34.34	48.3	64.81
G.g res.Run 5	78	13	80	1	1.5889	26.48	17.47	31.01	50.92	56.92
G.g res.Run 6	120	10	50	3	2.2017	36.7	14.49	35.98	49.81	12.8
G.g res.Run 7	162	7	20	1	2.0676	34.46	18.72	32.62	43.8	83.66
G.g res.Run 8	190	10	50	1	2.5967	43.28	19.56	50.04	63.83	38.74
G.g res.Run 9	78	13	20	3	1.9216	32.03	15.04	24.92	29.49	38.29
G.g res.Run 10	120	10	50	1	1.9855	33.09	21.48	33.85	57.85	56.81
G.g res.Run 11	162	13	80	3	2.0898	34.83	22.2	45.47	63.61	36.75
G.g res.Run 12	120	10	100	1	1.2149	20.25	20.91	38.1	65.03	57.03
G.g res.Run 13	120	10	50	3	2.1001	35	20.38	41.35	56.34	31.59
G.g res.Run 14	120	5	50	3	1.9828	33.05	21.74	44.81	54.32	29.09
G.g res.Run 15	50	10	50	3	1.9522	32.54	20.65	40.39	50.46	38.26
G.g res.Run 16	162	13	20	3	2.9691	49.49	19.48	33.65	43.52	76.23
G.g res.Run 17	162	13	80	1	1.9932	33.22	20.04	39.91	65.53	44.37
G.g res.Run 18	120	10	50	1	2.6963	44.94	22.44	46.18	66.93	47.49

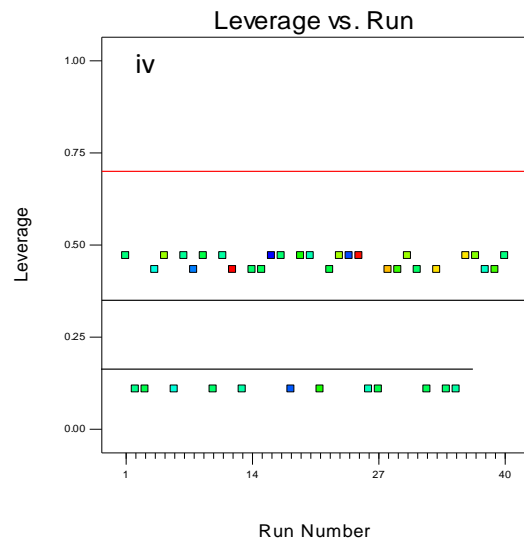
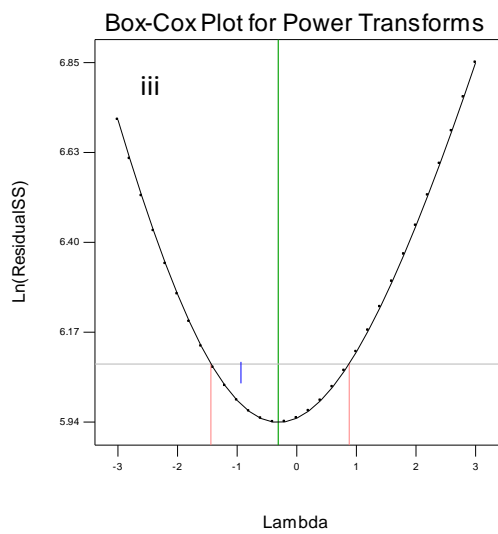
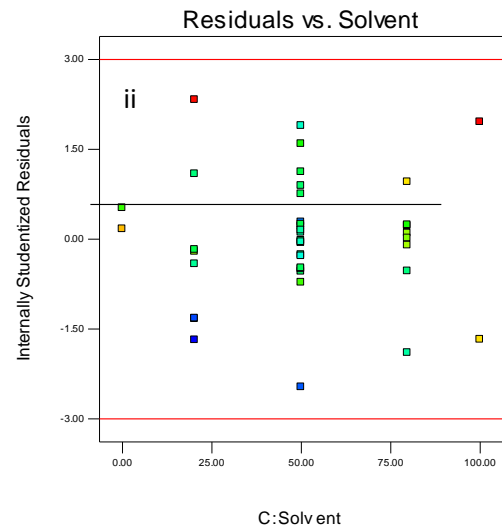
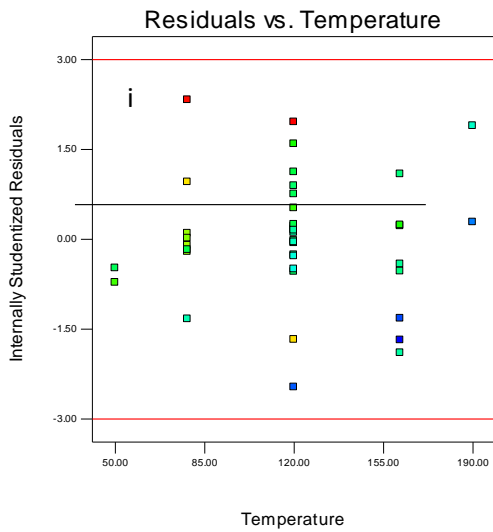
G.g res.Run 19	162	7	80	3	2.1784	29.55	22.01	43.23	65.81	28.65
G.g res.Run 20	78	7	20	3	2.1192	35.32	19.11	41.98	49.27	64.18
G.g res.Run 21	120	10	50	3	1.7731	29.55	19.64	41.34	57.29	46.68
G.g res.Run 22	120	15	50	3	1.9133	31.89	18.52	35.01	61.05	54.52
G.g res.Run 23	78	7	80	1	1.5743	26.24	18.17	39.35	56.12	51.82
G.g res.Run 24	162	7	20	3	2.7477	45.8	18.23	34.28	47.49	50.77
G.g res.Run 25	78	7	20	1	1.2232	20.39	14.35	27.27	34.23	47.64
G.g res.Run 26	120	10	50	3	2.14004	35.67	18.06	40.01	54.51	50.75
G.g res.Run 27	120	10	50	1	1.9245	32.08	18.25	39.47	56.98	41.2
G.g res.Run 28	120	10	0	1	1.3933	23.22	11.64	27.71	25.63	72.6
G.g res.Run 29	120	10	0	3	1.7274	28.79	13.84	29.19	21.24	57.67
G.g res.Run 30	78	13	20	1	1.5871	26.45	13.62	31.9	31.75	50.88
G.g res.Run 31	120	5	50	1	1.9755	32.93	20.17	36.41	59	34.7
G.g res.Run 32	120	10	50	3	1.9474	32.46	19.11	44.96	57.66	41.36
G.g res.Run 33	120	10	100	3	1.4319	23.87	19.64	39.4	62.4	57.18
G.g res.Run 34	120	10	50	1	1.9944	33.24	18.52	33.53	53.45	28.38
G.g res.Run 35	120	10	50	3	2.0902	34.84	19.26	41.81	59.66	42.21
G.g res.Run 36	78	13	80	3	1.439	23.98	16.39	32.77	56.68	36.81
G.g res.Run 37	78	7	80	3	1.6174	26.96	18.26	42.05	58.91	30.69
G.g res.Run 38	190	10	50	3	2.1634	36.06	23.87	36.69	81.76	37.65
G.g res.Run 39	50	10	50	1	1.7104	28.51	21.88	34.34	51.51	42.53
G.g res.Run 40	162	7	80	1	2.0214	33.69	21.68	31.01	64.33	52.43

## Διαγράμματα ανάλυσης διακύμανσης για τη μεγιστοποίηση του υπολείμματος της Υ.Ε.

- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για τις τιμές απόδοσης του υπολείμματος

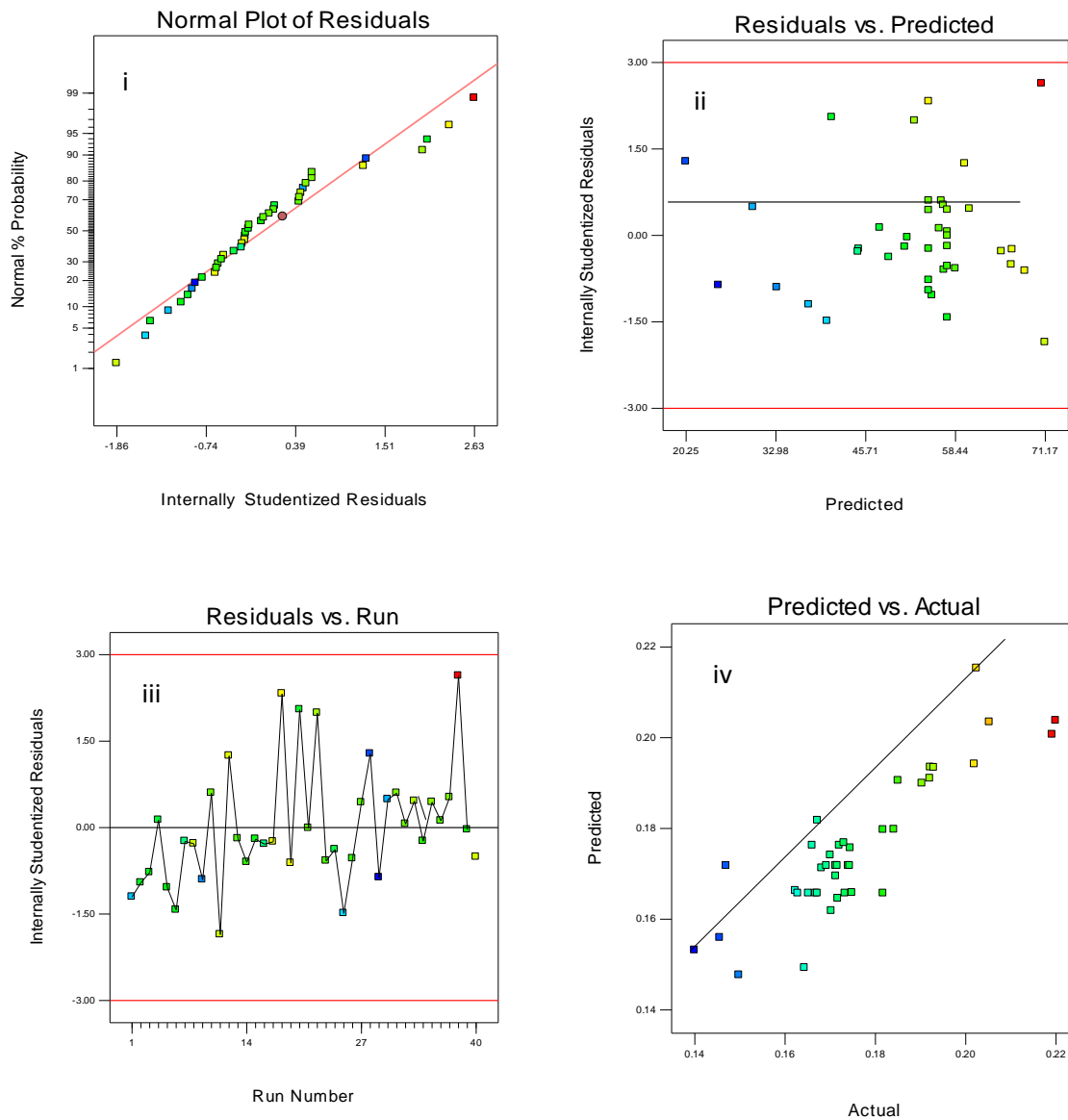


Εικόνα 210. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση της απόδοσης του υπολείμματος

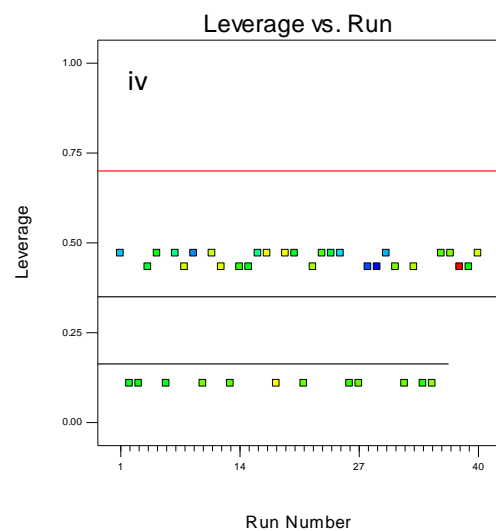
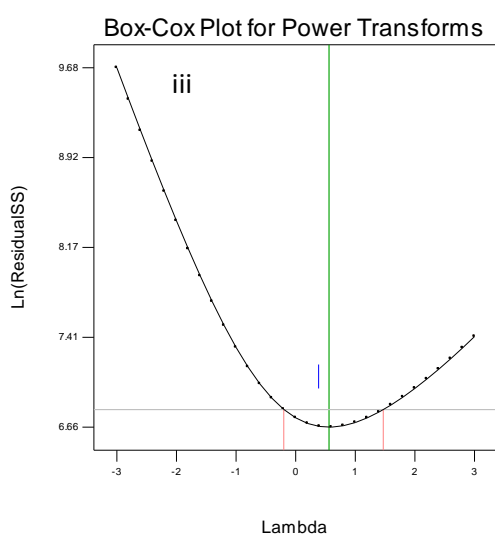
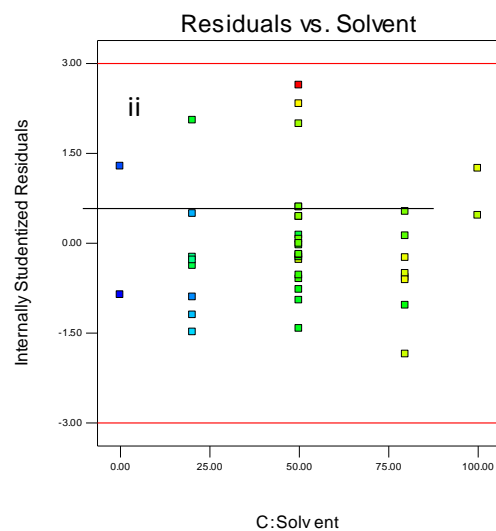
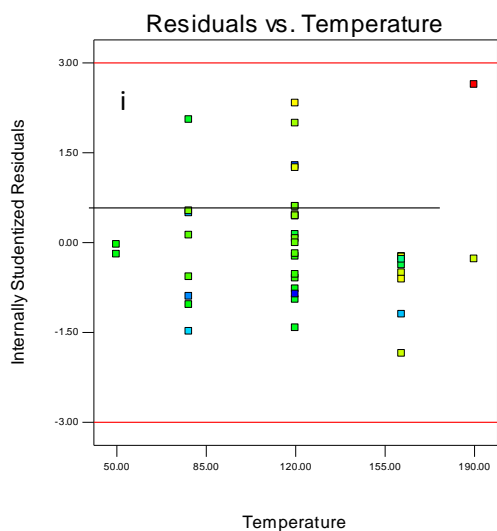


Εικόνα 211. i) και ii) Ενδεικτικά διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους θερμοκρασίας και ποσοστού EtOH αντίστοιχα iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση της απόδοσης του υπολείμματος

- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για την αντιοξειδωτική δράση του υπολείμματος στο DPPH

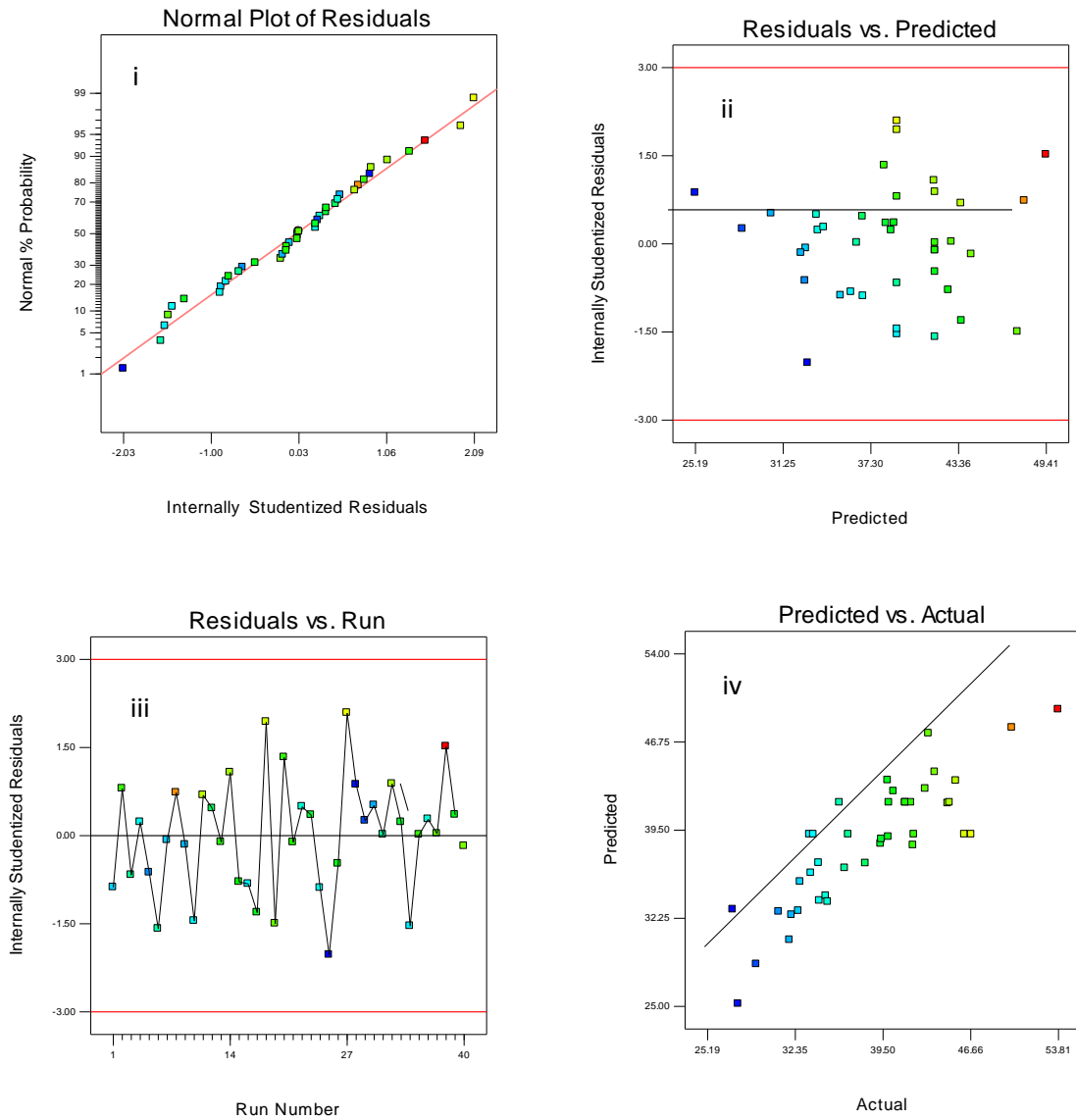


Εικόνα 212. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης του υπολείμματος στο DPPH

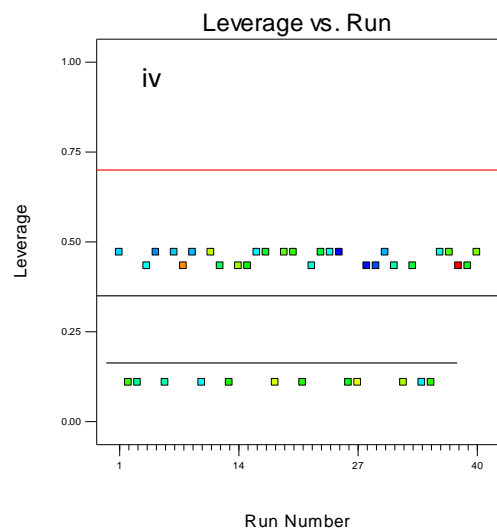
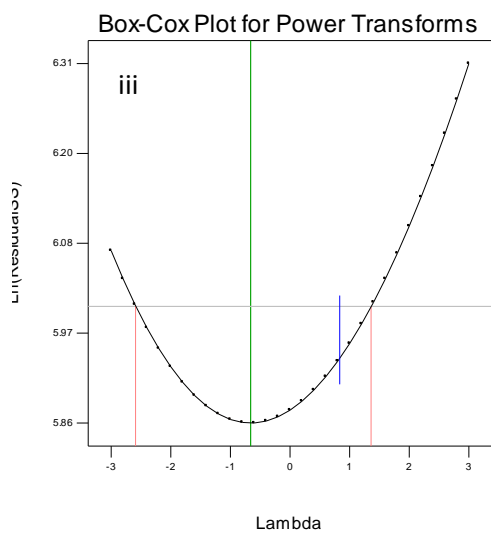
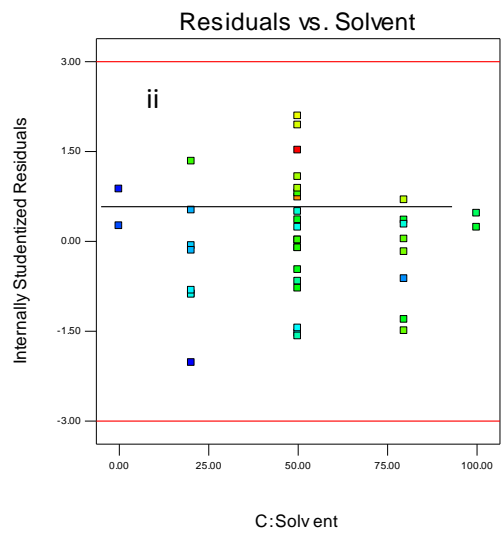
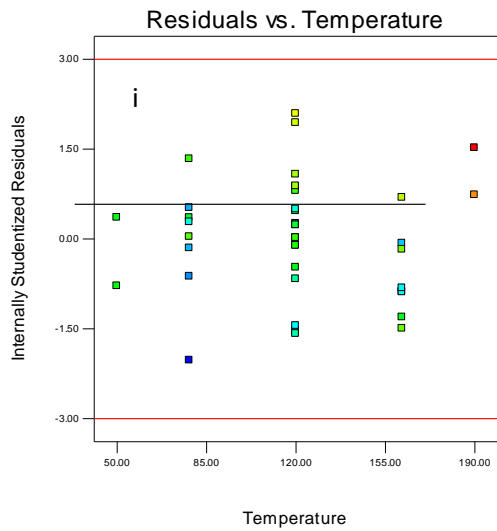


Εικόνα 213. i) και ii) Ενδεικτικά διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους θερμοκρασίας και ποσοστού EtOH αντίστοιχα iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης του υπολείμματος στο DPPH

- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για το ολικό φαινολικό φορτίο (TPC)



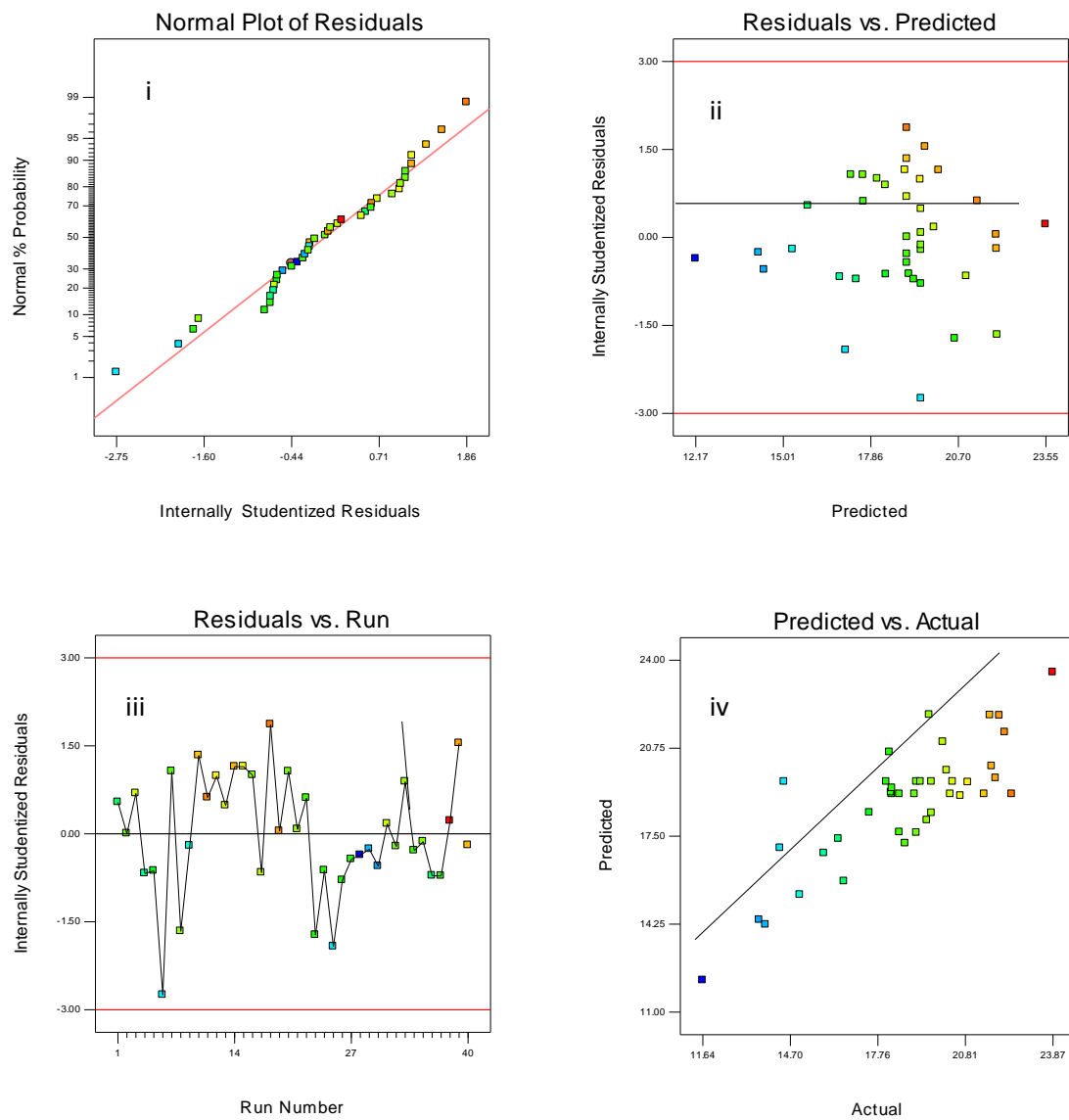
Εικόνα 214. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση του ολικού φαινολικού φορτίου (TPC)



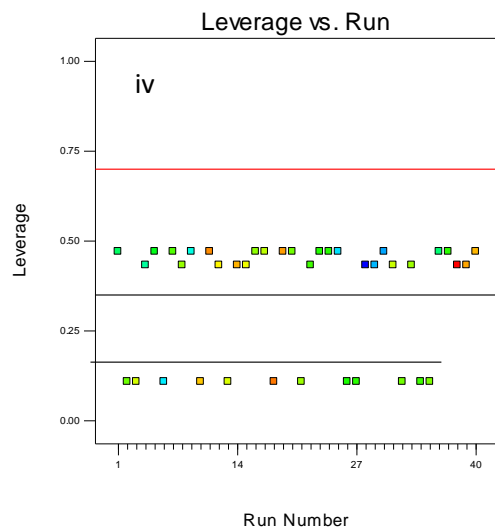
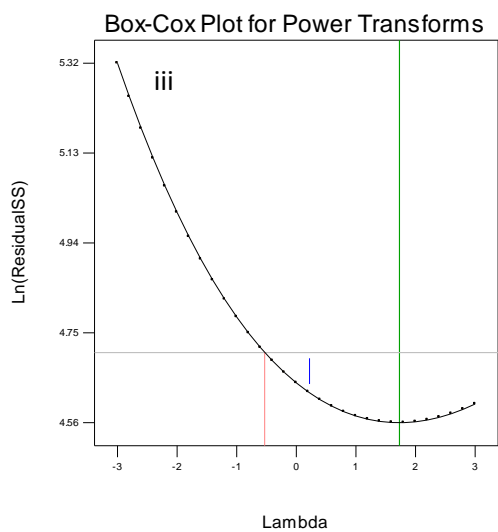
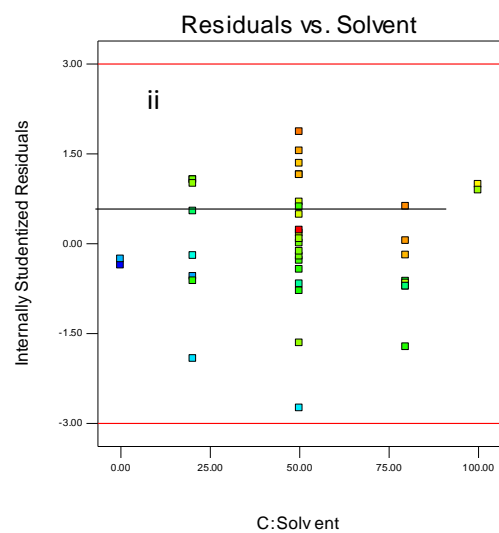
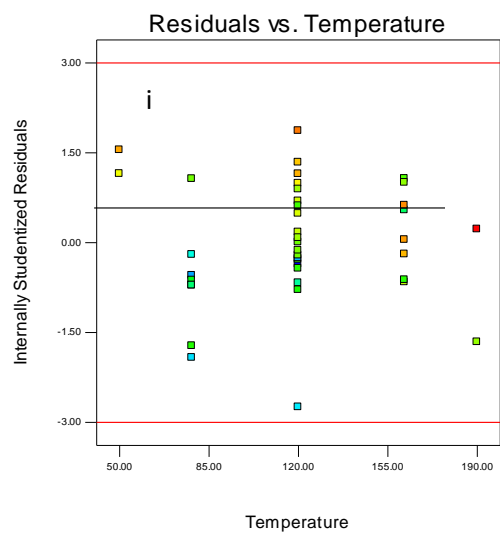
Εικόνα 215. i) και ii) Ενδεικτικά διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους θερμοκρασίας και ποσοστού EtOH αντίστοιχα iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση του ολικού φαινολικού φορτίου (TPC)



- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για το φορτίο σε φλαβονοειδή (TFC)

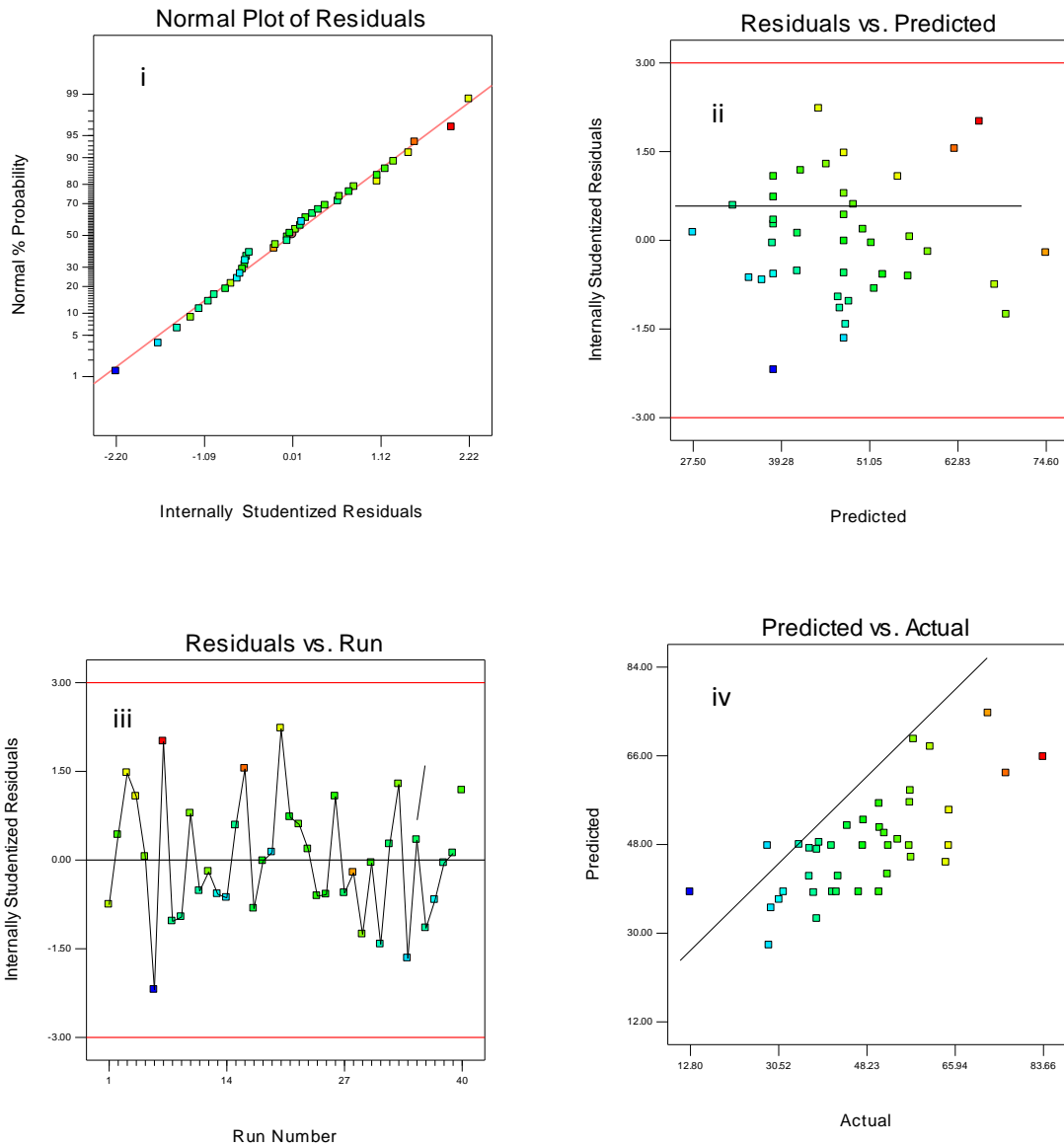


Εικόνα 216. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση του φορτίου σε φλαβονοειδή (TFC)

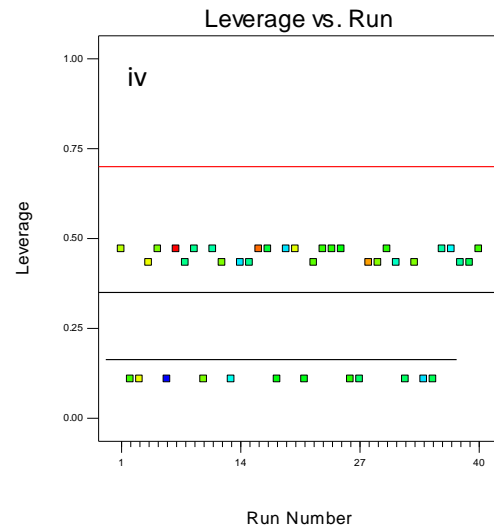
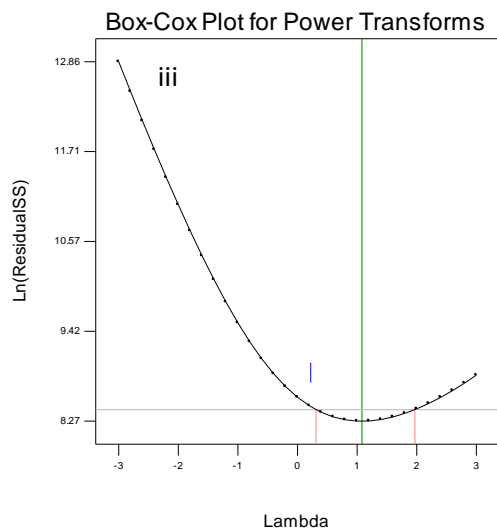
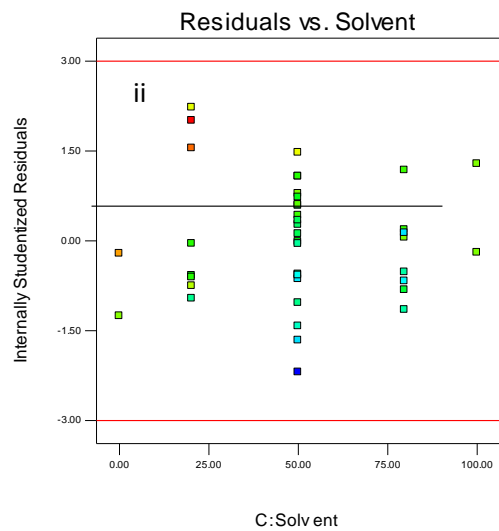
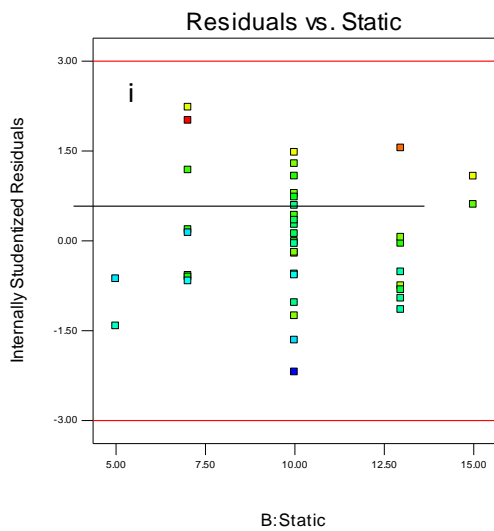


Εικόνα 217. i) και ii) Ενδεικτικά διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους θερμοκρασίας και ποσοστού EtOH αντίστοιχα iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση του φορτίου σε φλαβονοειδή (TFC)

- Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης για την αντιοξειδωτική δράση στο ABTS



Εικόνα 218. i) Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολειμμάτων ii) Διάγραμμα υπολειμμάτων έναντι των προβλεπόμενων τιμών iii) Διάγραμμα σειράς εκτέλεσης πειραμάτων έναντι υπολειμμάτων iv) Διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι πειραματικών τιμών για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης στο ABTS



Εικόνα 219. i) και ii) Ενδεικτικά διαγράμματα υπολειμμάτων σε σχέση με τις παραμέτρους χρόνου εκχύλισης και ποσοστού EtOH αντίστοιχα iii) Διάγραμμα Box Cox και iv) Διάγραμμα του παράγοντα μόχλευσης (leverage) έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης στο ABTS