



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

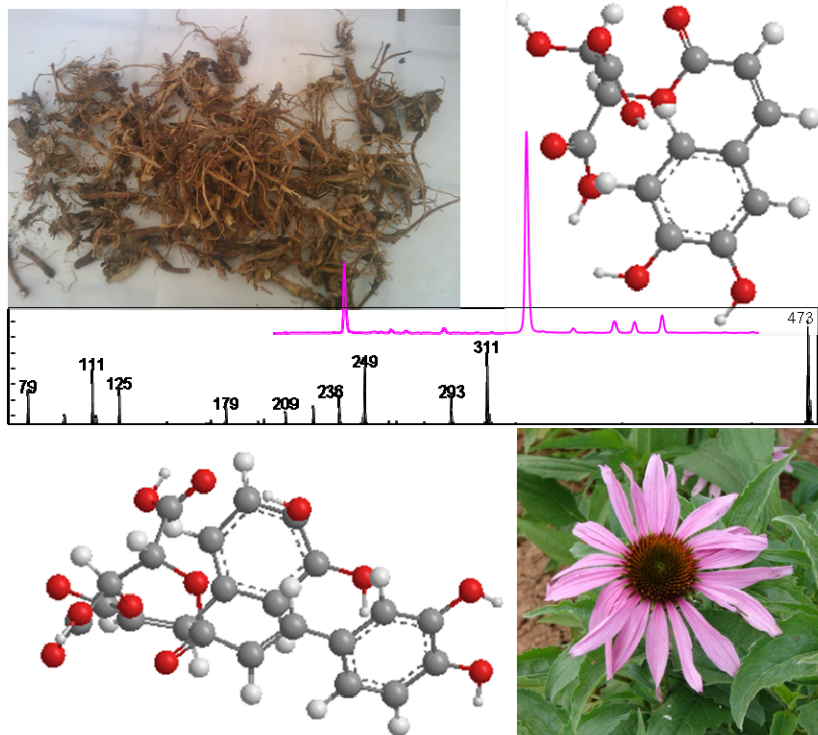
ΠΜΣ “ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ”

**ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ριζών του φυτού
Echinacea purpurea καλλιεργούμενου στην Ελλάδα**

Μεταπτυχιακή Μελέτη



**Παζιώτου Γεωργία
Χημικός**

ΑΘΗΝΑ

Φεβρουάριος 2011

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ**

**ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ριζών του φυτού

***Echinacea purpurea* καλλιεργούμενου στην Ελλάδα**

Παζιώτου Γεωργία

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Π. Ταραντίλης: Επιβλέπων Καθηγητής, Επίκουρος Καθηγητής Χημείας Γενικού Τμήματος Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Μ. Πολυσίου: Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Καθηγητής Χημείας Γενικού Τμήματος Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Β. Κωνσταντίνου: Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Καθηγήτρια Χημείας Γενικού Τμήματος Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ

Φεβρουάριος 2011

Στο Γιώργο για την υπομονή και την αγάπη του

αντί προλόγου...

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, συνεργάστηκα με ανθρώπους που ο καθένας κάτι πρόσφερε με τον τρόπο του στην ολοκλήρωση της εργασίας μου. Σε όλους οφείλω τουλάχιστον ένα ευχαριστώ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω λοιπόν πρώτα από όλους τον επιβλέποντά μου Επίκουρο Καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη, ο οποίος εκτός από την επίβλεψη της παρούσας διατριβής είχε και την ιδέα για το συγκεκριμένο θέμα. Όλο αυτό το διάστημα ήταν δίπλα μου στο εργαστήριο, προσφέροντάς μου με γενναιοδωρία από τις γνώσεις και την εμπειρία του. Στη συνέχεια τον Διευθυντή του Εργαστηρίου, Καθηγητή Μόσχο Πολυσίου ο οποίος με πολύ θέρμη παρακολουθούσε τα πειράματά μου από κοντά, δίνοντάς μου συμβουλές και νέες ιδέες. Την Καθηγήτρια Βιολέτα Κωνσταντίνου για το ενδιαφέρον της σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Τη φίλη και συνάδελφο Νάντια Ασπρακά την ευχαριστώ για τη βοήθειά της στα πειράματα της φασματομετρίας μαζών. Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή Κώστα Γεωργίου, ο οποίος πάντα έδειχνε ενδιαφέρον για το τι πειράματα έκανα, όταν με έβλεπε να πηγαίνω πέρα δώθε στους διαδρόμους με μπουκαλάκια στα χέρια και είχε διάθεση για επιστημονική κουβέντα.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Χρήστο Παπά, ο οποίος έβαζε με τον τρόπο του τις σκέψεις μου και τα πειράματά μου σε τάξη και τον Επίκουρο Καθηγητή Θανάση Κυμπάρη που ήταν πάντα στο εργαστήριο και είχε τη διάθεση να απαντήσει σε οποιαδήποτε απορία. Χαίρομαι που γνώρισα επιστήμονες-ανθρώπους οι οποίοι με εμπιστεύτηκαν, με ενθάρρυναν και με βοήθησαν.

Ευχαριστώ επίσης πολύ τη Δήμητρα και τον Χάρη, διδάκτορες του εργαστηρίου καθώς και την Ειρήνη και τον Λευτέρη υποψήφιους διδάκτορες, για τη βοήθειά τους με την εξοικίωση στο εργαστήριο και την παραχώρηση από το δικό τους ζωτικό χώρο, για την υπομονή τους και τις συμβουλές τους στις κουβέντες μας, οι οποίες δεν περιορίζονταν σε επιστημονικά θέματα. Την Άνσυ, τη Γεωργία και

την Όλγα, συμφοιτήτριες με τις οποίες εκτός από πιπέτες και φωτόμετρα μοιραστήκαμε άγχη, ανησυχίες και χαρές, χαίρομαι που τις γνώρισα.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω όλους τους διδάσκοντες του μεταπτυχιακού οι οποίοι με πολύ συνέπεια μας έκαναν να κοπιάσουμε πολύ ώστε να κερδίσουμε όσο το δυνατόν περισσότερα σε νέες γνώσεις και εμπειρίες.

Την Καθηγήτρια Γεωργικής Φαρμακολογίας Μαρία Χρυσάγη την ευχαριστώ για την ηθική της συμπαράσταση.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου για τη στήριξη, την κατανόηση και τη βοήθεια που μου πρόσφερε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Γεωργία Παζιώτου

ΤΙΤΛΟΣ: Μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ριζών του φυτού *Echinacea purpurea* καλλιεργούμενου στην Ελλάδα

Φεβρουάριος 2011

Η *Echinacea purpurea* είναι ένα φαρμακευτικό φυτό, το οποίο μόλις πρόσφατα άρχισε να καλλιεργείται στην Ελλάδα. Προκειμένου να παραληφθούν τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα από τις ρίζες της *E. purpurea* 0,5g αλεσμένης λεπτόκοκκης σκόνης ριζών εκχυλίστηκαν με 10mL διαλύματος CH₃OH:H₂O σε διάφορες αναλογίες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15min, με ή χωρίς τη χρήση υπερήχων. Η πορεία εκχύλισης των φαινολικών συστατικών παρατηρούνταν με μέτρηση της απορρόφησης των εκχυλισμάτων στα 330nm. Η κινητική της εκχύλισης μελετήθηκε και για τις δύο μεθόδους χρησιμοποιώντας το σύστημα 70:30 το οποίο είχε δώσει μέγιστη απόδοση. Διαπιστώθηκε ότι χρειάζονται τέσσερις εκχυλίσεις ως αναγκαία συνθήκη για την παραλαβή ποσού πάνω από το 95% του ολικού φαινολικού περιεχομένου των ριζών του φυτού.

Ακολούθησε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων καθώς και δύο εμπορικών σκευασμάτων *Echinacea* με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης-ανεστραμμένης φάσης (HPLC-RP) και υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μαζών (LC/MS). Καφεϊκό, καφταρικό και κιχορικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα.

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο της εκχύλισης καφταρικό και κιχορικό οξύ ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά σε συγκεντρώσεις από 16,66-18,00 mg/g ξηρής ρίζας, ποσό το οποίο δεν ελαττώθηκε σημαντικά όταν τα εκχυλίσματα αποθηκεύθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα (15d) στους -20°C. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση στο LC-MS υποδεικνύουν την ύπαρξη γλωρογενικού οξέος, και κυναρίνης. Στα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα μετρήθηκε καφταρικό και κιχορικό οξύ από 8,09 έως 9,03mg/g ξηρού φυτικού υλικού, το οποίο ήταν χαμηλότερο από το ποσό το οποίο μετρήθηκε στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα. Εχινακοζίτης και κυναρίνη ανιχνεύτηκαν και στα δύο εμπορικά σκευάσματα με ανάλυση LC-MS, ενώ γλωρογενικό οξύ βρέθηκε μόνο στο ένα από αυτά.

Επιπλέον, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο όλων των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η αντιοξειδωτική ικανότητα) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH. Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο Folin έδειξαν ότι η κλασσική μέθοδος είναι ισοδύναμη με τη μέθοδο την υποβοηθούμενη από υπερήχους ($29,05 \pm 2,18 \text{mg/g}$ ξηρής ρίζας). Τα εμπορικά σκευάσματα είχαν φαινολικά συστατικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ($8,66 \pm 0,28 \text{mg/g}$).

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογίστηκαν τα EC_{50} των εκχυλισμάτων και συγκρίθηκαν με εκείνα γνωστών αντιοξειδωτικών. Οι τιμές τους κυμαίνονταν από 2,87 έως 4,2ppm εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και δείχνουν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά είχε το εκχύλισμα από την κλασσική μέθοδο.

Ακόμα, καταγράφηκε το φάσμα FT-IR των μη επεξεργασμένων ριζών σε σκόνη με την τεχνική διάχυτης ανάκλασης (DRIFT) καθώς και εκείνα και των υγρών εκχυλισμάτων με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR). Φαίνεται ότι υπάρχει άμεσος συσχετισμός της πορείας της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών με το φάσμα FT-IR και ειδικότερα με την κορυφή στα $1510\text{-}1520\text{cm}^{-1}$, οπότε και θα μπορεί να δημιουργηθεί μια μέθοδος ακόμη και ποσοτικού προσδιορισμού των ολικών φαινολικών με μέτρηση του εμβαδού της κορυφής στα $1510\text{-}1520\text{cm}^{-1}$.

Συνοψίζοντας, η μελέτη των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* που καλλιεργήθηκε στην Ελλάδα, δείχνουν ότι είναι πλούσιες σε φαινολικά συστατικά με αντιοξειδωτική δράση και κυρίως σε κιχορικό οξύ, μόριο με πολλές βιολογικές δράσεις.

ABSTRACT

Georgia Paziotou

TITLE: Study of hydroalcoholic extracts of *Echinacea purpurea* roots cultivated in Greece

February 2011

Echinacea purpurea is a medicinal plant the cultivation of which was recently practiced in Greece. In order to study the hydroalcoholic extracts from the roots of *E. purpurea* 0,5g of fine ground roots were extracted with 10mL CH₃OH:H₂O system at various concentrations with stirring at room temperature for 15 min with or without the use of ultrasounds. The extraction progress was monitored by measuring the absorbance of the extracts at 330nm. The kinetic of the extraction was studied for both methods using the 70:30 solvent system which had given optimal yields. It was concluded that four extractions are required to receive yields above 95% of the total phenolic content of the plant roots.

Qualitative and quantitative analysis of the total phenolic content of root extracts and of two commercial preparations was performed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (LC-MS). Caffeic acid, caftaric acid and chicoric acid were used as standards.

Independently from the extraction method used, caftaric and chicoric acid were identified in all root extracts at concentrations from 16,66 to 18,00mg/g dry root amount which did not significantly decrease after a short period of extract storage at -20°C. Results from LC-MS analysis indicated also the presence of chlorogenic acid and cynarin. The commercially available preparations analysed had a content of caftaric and chicoric acid varying from 8,09 to 9,03 mg/g dry plant tissue, which was much lower than the amount detected in the hydroalcoholic extracts. Echinacoside and cynarin were both identified in commercial preparations with LC-MS analysis while chlorogenic acid was identified only in one of them.

In addition, total phenolic content of all samples analysed was estimated with the Folin-Ciocalteu assay. Scavenger activity was estimated by studying the sample quenching capacity towards the stable radical DPPH. All results were expressed in terms of gallic acid equivalents. The results of the Folin assay showed

that the classic method was equally efficient with the ultrasound assisted method ($29,05 \pm 2,18$ mg of total phenolics/g dry root). It was also shown that commercial preparations had a phenolic content at lower concentrations ($8,66 \pm 0,28$ mg/g). For the antioxidant capacity estimation EC_{50} values were compared to those of known antioxidants. EC_{50} values fluctuated between 2,87 and 4,2 ppm of gallic acid equivalents, indicating substantial antioxidant capacity. The above data indicate that the highest antioxidant capacity and the highest phenolic content was observed in the classic method extract.

Finally the FT-IR spectra of ground *E. purpurea* roots was recorded in Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) spectroscopy mode and those of the extracts in Attenuated Total Reflectance (ATR) spectroscopy mode. The peak at $1510-1520\text{cm}^{-1}$ which is directly associated with the phenolic content of a sample was of high intensity in all samples. It seems that there is a direct correlation between the course of extraction of total phenolic content and the intensity of the $1510-1520\text{cm}^{-1}$ peak. Such observation could be exploited for the development of a new quantitative method with applicability to the determination of total phenolics.

As a conclusion, the present study showed that *E. purpurea* root extracts, are rich in phenolic acids and especially in chicoric, compound with high antioxidant potential.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

αντί προλόγου.....	i
Περίληψη.....	iii
Abstract.....	iv
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	xi
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Γενικά.....	1
1.2. Βιολογικές ιδιότητες και χρήσεις της <i>Echinacea sp.</i>	3
1.3. <i>Echinacea purpurea</i>	5
1.3.1. Εισαγωγή	5
1.4. Το φυτοχημικό προφίλ της <i>Echinacea purpurea</i>	6
1.4.1. Παράγοντες που επηρεάζουν το φυτοχημικό προφίλ	6
1.4.2. Γλυκοπρωτεΐνες	7
1.4.3. Πολυσακχαρίτες.....	7
1.4.4. Αλκαλοειδή.....	7
1.4.5. Κετοαλκένια και Κετοαλκίνια	8
1.4.6. Φλαβονοειδή.....	8
1.4.7. Συστατικά αιθερίου ελαίου.....	8
1.4.8. Αλκυλαμίδια	9
1.4.9. Φαινυλοπροπανοειδή-παράγωγα του καφεϊκού οξέος	11
1.5. Ο ρόλος των φαινυλοπροπανοειδών και η βιοσύνθεσή τους.....	13
1.6. Βιολογικές ιδιότητες της <i>Echinacea purpurea</i>	14
1.7. Η χημεία των αντιοξειδωτικών συστατικών της <i>Echinacea</i>	15
1.8. Αναλυτικό προφίλ της <i>Echinacea purpurea</i>	17
1.8.1. Μέθοδοι εκχύλισης.....	17
1.8.2. Μέθοδοι ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού των εκχυλισμάτων.....	19
ΣΚΟΠΟΣ.....	21
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1. Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια	24
2.2. Βιολογικό Υλικό. Συλλογή και προετοιμασία.....	24
2.3. Εκχύλιση σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση.....	25
2.4. Εκχύλιση με υπερήχους.....	25
2.5. Ποσοτικοί προσδιορισμοί.....	26
2.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	26
2.5.2. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH.....	27
2.5.3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) Ανεστραμμένης Φάσης (HPLC-RP).....	28
2.6. Χρωματογραφία HPLC συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS).....	29
2.7. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....	30
2.8. Φασματοσκοπία Υπερύθρου	30
2.8.1. Λήψη φάσματος FT-IR με την τεχνική της Εξασθενημένης Ολικής ανάκλασης (ATR).....	32
2.8.2. Φασματοσκοπία υπερύθρου ανακλαστικότητας με σκέδαση με μετασχηματισμό Fourier (DRIFT).....	32

2.9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
3.1. Μελέτη της παραλαβής ολικών φαινολικών συστατικών από τις ρίζες της <i>Echinacea purpurea</i>	33
3.1.1. Μελέτη της επίδρασης του διαλύτη στην παραλαβή των ολικών φαινολικών	33
3.2. Κινητική της εκχύλισης και σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης	35
3.2.1. Κινητική της εκχύλισης	36
3.3. Διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών από τις ρίζες του φυτού <i>Echinacea purpurea</i> με χρωματογραφία HPLC ανεστραμμένης φάσης (HPLC - RP)	38
3.3.1. HPLC προτύπων καφταρικού και κιχορικού οξέος	40
3.3.2. HPLC των εκχυλισμάτων της <i>Echinacea purpurea</i>	40
3.3.3. Εμπορικά δείγματα	43
3.4. Χρωματογραφία HPLC συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS) για την ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών	47
3.4.1. LC-MS των προτύπων, καφταρικού, κιχορικού και καφεϊκού οξέος	48
3.4.2. LC-MS εκχυλισμάτων από δείγματα ρίζας <i>Echinacea purpurea</i>	52
3.4.3. LC-MS των Εμπορικών Σκευασμάτων	56
3.5. Ποσοτικοί προσδιορισμοί	60
3.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με τη μεθοδο Folin-Ciocalteu	60
3.5.1.1. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με γαλλικό οξύ	60
3.5.1.2. Προσδιορισμός φαινολικών στα εκχυλίσματα ριζών. Σύγκριση των δύο μεθόδων εκχύλισης	61
3.5.1.3. Ποσοτική σύγκριση των εργαστηριακών εκχυλισμάτων με τα εμπορικά σκευάσματα ως προς το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	62
3.5.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH	66
3.5.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών με χρωματογραφία HPLC	70
3.5.3.1. Κατασκευή πρότυπων καμπυλών καφταρικού και κιχορικού οξέος	70
3.5.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών με χρωματογραφία RP-HPLC	71
3.5.3.3. Σύγκριση της κλασσικής μεθόδου και της μεθόδου με χρήση υπερήχων με χρήση της χρωματογραφίας HPLC	75
3.6. Φασματοσκοπία Υπερύθρου	79
3.6.1. Φάσματα FT-IR κιχορικού και καφεϊκού οξέος με την τεχνική ATR	79
3.6.2. Φάσματα FT-IR μη επεξεργασμένων ριζών της <i>Echinacea purpurea</i> με την τεχνική DRIFT	81
3.6.3. FT-IR φάσματα των εκχυλισμάτων των ριζών με την τεχνική ATR	83
3.6.3.1. Παρακολούθηση της πορείας της εκχύλισης με τα ATR φάσματα των εκχυλισμάτων	85
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	88
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	100
I. HPLC χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων ριζών <i>E. purpurea</i>	101
II. Ολικό ρεύμα Ιόντων (TIC), όπως προκύπτει από την ανάλυση με LC-MS, εκχυλισμάτων ριζών <i>E. purpurea</i>	111

III.	FT-IR φάσματα, εκχυλισμάτων ριζών <i>E. purpurea</i> με την τεχνική ATR	113
------	---	-----

Συντμήσεις

ATR	Attenuated Total Reflectance Spectroscopy	Φασματοσκοπία Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης
ΑΣΚΑΦΕΦΑ	Rural Cooperative of Aetoloakarnania's Cultivators of Aromatic Rharmaceutical and Energy Plants	Αγροτικός Συνεταιρισμός Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και Ενεργειακών Φυτών Αιτωλοακαρνανίας
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	2,2'-αζινο-bis(3-αιθυλβενζθεαζολιν-6-σουλφονικό οξύ)
BHT	Butylated hydroxytoluene	Βουτυλ υδροξύ τολουόλιο
Γαλλικό οξύ	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ	
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2 διφαινυλο-1- πικρυλοϋδραζίλιο
DRIFT	Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier με την τεχνική της Διάχυτης Ανάκλασης
ESI	Electron Spray Ionization	Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό
Εχινakoζίτης	[(2R,3R,4R,5R,6R)-6-[2-(3,4-διυδροξυφαινυλ) αιθοξύ]-5-υδροξύ-2-[[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-τριυδροξύ-6-(υδροξύ) οξαν-2-υλ] οξύμεθυλ]-4-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-τριυδροξύ-6-μεθυλοξαν-2-υλ] οξύοξαν-3-υλ] (E)-3-(3,4-διυδροξυφαινύλο) προπ-2-ενοϊκό	
FT-IR	Fourier Transformd Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
HPLC	High Performance Liquid Chromatography-Reverse Phase	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης- Ανεστραμμένης Φάσης
Καφεϊκό Οξύ	3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)- 2-προπenoϊκό οξύ ή 3,4-διυδροξύ-κινamμικό οξύ	

Καφταρικό Οξύ	(2R,3R)-2-[(E)-3-(3,4-διδροξυφαινυλο)προπ-2-ενοϋλ]οξύ-3-υδροξυ βουτανοδικό οξύ	
Κιχορικό Οξύ	(2R,3R)-2,3-bis{[(E)-3-(3,4διδροξυφαινυλο)προπ-2-ενοϋλ]οξύ} βουτανοδικό οξύ	
Κουναρίνη	1R,3R,4S,5R)-1,3-bis{[(E)-3-(3,4-διδροξυφαινυλ)προπ-2-ενοϋλ]οξύ}-4,5- διδροξυκυκλοεξαν-1-καρβοξυλικό οξύ	
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Πολυτετραφθοροαιθυλένιο
PPO	Poly Phenol Oxidase	Οξειδάση των πολυφαινολών
Χλωρογενικό Οξύ	(1S,3R,4R,5R)-3- {[(2Z)-3-(3,4-διδροξυφαινυλ)προπ-2-ενοϋλ]οξύ }-1,4,5- τριδροξυκυκλοεξακαρβοξυλικό οξύ	
TFA	Trifluoroacetic acid	Τριφθοροξικό οξύ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά.

Η *Echinacea* είναι από τα πιο διαδεδομένα φαρμακευτικά φυτά. Προϊόντα της κυκλοφορούν σε όλο τον κόσμο και οι πωλήσεις των σκευασμάτων που την περιέχουν κατέχουν τις 10 πρώτες θέσεις παγκοσμίως. Τον 18ο αιώνα ο Γερμανός βοτανολόγος Conrad Moench, ονόμασε το γένος *Echinacea*, όνομα το οποίο προέρχεται από από την Ελληνική λέξη “εχίνος”, που σημαίνει σκαντζόχοιρος, αναφερόμενος στην ακανθωτή, στρογγυλή καπελλοφόρο θήκη του καρπού, η οποία προσομοίαζε με σκαντζόχοιρο ή αχινό (Σχ.1).



Σχήμα 1: Φωτογραφία της ακανθωτής καπελλοφόρου θήκης του καρπού της Echinacea.

Η *Echinacea* είναι ιθαγενές φυτό από των μεσοδυτικών πολιτειών των ΗΠΑ και του Καναδά και καλλιεργείται κυρίως στις ΗΠΑ και την Ευρώπη. Ανήκει στην οικογένεια Asteracea ή Compositae της τάξης των Asterales. Το γένος *Echinacea* περιλαμβάνει εννέα είδη τα οποία έχουν τα εξής βοτανικά χαρακτηριστικά:

Είναι πολυετείς αδρότριχες πόες που φτάνουν σε ύψος κοντά στο 1 μέτρο. Τα φύλλα τους είναι ωοειδή-λογχοειδή ή γραμμωτά με τρίχες και από τις δύο πλευρές. Η ρίζα (κεντρική χονδρή γραμμή) εκπτύσσει πολλές λεπτές ρίζες μεγάλου μήκους. Τα άνθη είναι λίγα σε κάθε βλαστό, κωνικά, κίτρινα, ροζ, έως έντονα μωβ. Η ανθοφορία διαρκεί ένα τρίμηνο, έως το τέλος του καλοκαιριού. Οι σπόροι είναι ορθογώνιοι, χρώματος γκρι-άσπρου και διαμέτρου 4-5mm.

Τα πιο γνωστά είδη τα οποία αξιοποιούνται εμπορικά λόγω των ουσιών με φαρμακευτή δράση που περιέχουν είναι τα εξής :

- *Echinacea angustifolia* (D.C.) ή γνωστή ως στενόφυλλη. Το ύψος των ανθοφόρων βλαστών της φτάνει τα 60cm. Είναι ιθαγενές φυτό των δυτικών πολιτειών των ΗΠΑ και του νότιου Καναδά και φύεται σε ασβεστώδη εδάφη πεδιάδων, λόφων και βουνών.
- *Eichinacea pallida* Nutt., ιθαγενής των πεδιάδων των κεντρικών πολιτειών των ΗΠΑ. Έχει ανοικτά μωβ άνθη και ύψος ανθοφόρων βλαστών μέχρι 1,20m.
- *Echinacea purpurea* (L.) Monch. Είναι η ευρύτερα καλλιεργούμενη *Echinacea* η οποία σχεδόν δεν απαντάται πια ως αυτοφυής. Τα άνθη της έχουν χρώμα έντονο μωβ και οι βλαστοί ύψος από 0,90-1,20m. Έχει μεγαλύτερη απαίτηση σε υγρασία από τα άλλα είδη.
- Δύο άλλα λιγότερο σημαντικά είδη είναι η *E. atrubens* και η *E. paradoxa*.

Η *Echinacea* πολλαπλασιάζεται με σπόρους και η καλλιέργεια της εγκαθίσταται την άνοιξη. Στην Ευρώπη το 65% των καλλιεργειών είναι *Echinacea purpurea*, το 25% *E. pallida* (κυρίως στην Ιταλία), ενώ το υπόλοιπο 10% είναι *E. angustifolia* (κυρίως στη Γαλλία).

Η *E. angustifolia* μπορεί να καλλιεργηθεί σε χώρες με εύκρατο και ηπειρωτικό κλίμα, ενώ η *E. purpurea* μόνο σε χώρες με εύκρατο κλίμα. Όλα τα είδη της προτιμούν ηλιόλουστες περιοχές με εδάφη καλώς στραγγιζόμενα, με ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο pH (5,5-7,2), εκτός της *E. angustifolia* η οποία αναπτύσσεται καλύτερα σε ελαφρώς αλκαλικό έδαφος (pH 8) (Foster, 1991). Έχουν μέτριες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και για βέλτιστη ανάπτυξη χρειάζονται έντονη ηλιοφάνεια. Η *Echinacea* είναι ανθεκτική σε συνθήκες ξηρασίας που επικρατούν κατά την ανάπτυξη της σε πολλές περιοχές της Ευρώπης

Η *E. purpurea* μιας και φύεται κοντά στα δάση δεν προτιμά άμεσο ηλιακό φως και αντέχει μέχρι σε 50% σκιά. Για τον ίδιο λόγο είναι πιο απαιτητική σε υγρασία με πλατιά φύλλα που συγκρατούν νερό και μορφολογία ριζών ώστε επίσης να συκρατούν νερό. Μπορεί να καλλιεργείται και σε ελαφρώς όξινο έδαφος, ενώ το αμμώδες έδαφος που κάνει ευκολότερη την συγκομιδή των ριζών, προτιμάται.

Από το φυτό συγκομίζονται τα φύλλα ή οι ρίζες. Τα φύλλα είναι δυνατόν να συγκομίζονται από το πρώτο έτος, ενώ η συγκομιδή των ριζών γίνεται σε καλλιέργειες των τριών ετών. Σε πειραματικές καλλιέργειες δεν παρατηρήθηκαν

προβλήματα από ασθένειες και προσβολές εντόμων, ενώ παρατηρήθηκε ευαισθησία των φυτών σε ζιζάνια.

1.2. Βιολογικές ιδιότητες και χρήσεις της *Echinacea* sp.

Η *Echinacea* sp. χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Ανασκαφές σε χωριά των φυλών Lakota Sioux έχουν δώσει ενδείξεις για ύπαρξη του φυτού τουλάχιστον από το 1600. Το φυτό χρησιμοποιήθηκε στη μοντέρνα ιατρική στα τέλη του 1800 από τον H.C.F. Meyer και περιλαμβάνεται στο εθνικό συνταγολόγιο των ΗΠΑ από το 1916. Κατείχε εξέχουσα θέση στη μοντέρνα Ιατρική των ΗΠΑ στις αρχές του 20ου αιώνα, όταν ανακαλύφθηκε από τους Ευρωπαίους οι οποίοι τη χρησιμοποίησαν εξαντλητικά έως το 1930. Σήμερα εκατομμύρια Ευρωπαίων χρησιμοποιούν *Echinacea* ως κύρια θεραπεία για το κρύωμα, τη γρίπη, μολύνσεις και γενικότερα για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι περισσότερες χρήσεις της *Echinacea* είναι γνωστές από τις διάφορες φυλές Ινδιάνων οι οποίοι τη χρησιμοποιούσαν για πόνο στο λαιμό, βήχα, λοιμώξεις του αναπνευστικού, ενάντια στον πυρετό, σε πρησμένους λεμφαδένες και πονόδοντο. Επίσης τη χρησιμοποιούσαν σε δήγματα φιδιών και εντόμων και για την επούλωση πληγών, στα αφροδίσια νοσήματα, στις ρευματικές παθήσεις, στο στομαχόπονο. Συνήθως χρησιμοποιούσαν τη ρίζα ως είχε, ή σε αφέψημα μαζί με φύλλα.

Την *Echinacea* έφεραν στο προσκήνιο της ιατρικής, οι Εκλεκτικοί, ομάδα ιατρών από το 1830 έως το 1930, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν βότανα στην ιατρική πράξη. Την προέβαλαν ως καθαριστικό του αίματος για τα αφροδίσια νοσήματα, ως παράγοντα για τη θεραπεία των ημικρανιών, των ρευματισμών, όγκων, της ελονοσίας και των αιμορροΐδων. Με την εξάπλωση των αντιβιοτικών το 1930 η χρήση της περιορίστηκε, ενώ τα τελευταία 15 χρόνια είναι παγκοσμίως γνωστή για τις αντικές, αντιμυκητιασικές και αντιβακτηριακές της ιδιότητες και εκατοντάδες σκευάσματα της κυκλοφορούν στο εμπόριο.

Εδώ και αιώνες είναι γνωστό ότι η *Echinacea* αυξάνει την ανθεκτικότητα σε λοιμώξεις. Έρευνες έχουν δείξει ότι αυξάνει τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία πολεμούν τις λοιμώξεις. Η Sandoz, η πρώτη φαρμακευτική εταιρεία που ασχολήθηκε με το φυτό βρήκε ότι στις ρίζες υπάρχουν συστατικά με αντιβιοτική δράση ενάντια στον *Streptococcus* και τον *Staphylococcus aureus*.

Λόγω ο της πληθώρας των βιολογικών ιδιοτήτων της *Echinacea* όλο και αυξάνεται ο αριθμός των σκευασμάτων της που κυκλοφορούν στο εμπόριο. Τα κύρια σκευάσματα είναι αιθανολικά ή μη εκχυλίσματα αποξηραμένων ριζών ή/και υπέργειων τμημάτων, κάψουλες, αναβράζοντα δισκία και πρόσφατα σε αυτά έχουν προστεθεί στιγμιαία ροφήματα, μίγματα για αφεψήματα, σιρόπια και καραμέλες για το λαιμό καθώς και προϊόντα ατομικής υγιεινής όπως οδοντόκρεμες σαπούνια και σαμπουάν. Πρόσφατα χρησιμοποιείται σε κάποια λειτουργικά τρόφιμα, όπως έτοιμες σούπες και χυμοί. Οι πωλήσεις από αυτά τα σκευάσματα ανέρχονται ετησίως στις ΗΠΑ σε 150 εκατομμύρια δολάρια (*Tilburt et al., 2008*) και παγκοσμίως σε 300 περίπου εκατομμύρια δολάρια.

1.3. *Echinacea purpurea*

1.3.1. Εισαγωγή

Η *E. purpurea* αποτελεί το 65% της καλλιεργούμενης *Echinacea* στην Ευρώπη (σε σύνολο 2500-3000 στρέμματα) (Becker, 2000). Καλλιεργείται ως καλλωπιστικό φυτό αλλά και ως φαρμακευτικό φυτό. Τουλάχιστον 10 ποικιλίες *E. purpurea* καλλιεργούνταν ως καλλωπιστικά φυτά στην Ευρώπη έως το 1960 (Bauer and Wagner, 1990). Κατά τον Aiello (2002) το πιο εμπορικό προϊόν αποτελούν οι ρίζες του φυτού.

Αποτελεί το κύριο είδος στις καλλιέργειες της Πολωνίας, της Ουγγαρίας, της Ολλανδίας, της Σουηδίας, και της Φινλανδίας και το κυρίαρχο στη Γερμανία, την Ισπανία και την Ελβετία. Στην Ελλάδα δεν υπήρχε έως τώρα συστηματική καλλιέργεια *Echinacea*. Πρώτη φορά καλλιεργείται *E. purpurea* από τον συνεταιρισμό ΑΣΚΑΦΕΦΑ στο Αγρίνιο, με σπόρο προερχόμενο από καλλιέργεια της Ελβετίας (Σχ.2). Η πρώτη συλλογή ριζών έγινε την άνοιξη του 2010 μετά από τρία χρόνια καλλιέργειας και αποτελεί το βιολογικό υλικό της παρούσας μελέτης.



Σχήμα 2: Φωτογραφία από την πρώτη καλλιέργεια της *E. purpurea* στην Ελλάδα (Αγρίνιο Ιούλιος 2010).

1.4. Το φυτοχημικό προφίλ της *Echinacea purpurea*

Μελέτες αναφέρουν διαφορετικό φυτοχημικό προφίλ για κάθε είδος της *Echinacea*, καθώς και διαφορετική σύσταση ανάλογα με τον ιστό που εξετάζεται (ρίζες ή υπέργεια τμήματα), αλλά και από τη γεωγραφική προέλευση και τις αγρονομικές τακτικές. Εκτενείς μελέτες της χημικής σύστασης όλων των ειδών έχουν δείξει ότι αποτελείται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, αλκαλοειδή, κεταλκένια και κετοαλκίνια, φλαβονοειδή, αλκυλαμίδια και φαινυλοπροπανοειδή, κατηγορίες ενώσεων που όλες συνεισφέρουν στις βιολογικές ιδιότητες του φυτού.

1.4.1. Παράγοντες που επηρεάζουν το φυτοχημικό προφίλ

Υπάρχουν αρκετές μελέτες των επιδράσεων των περιβαλλοντικών παραγόντων (συμπεριλαμβανομένων και των αγρονομικών) στις ενώσεις που καθορίζουν την ποιότητα της *Echinacea*.

Η δομή και η περιοχή της καλλιέργειας καθώς και η εποχή της συλλογής μπορεί να ασκούν σημαντική επίδραση στο περιεχόμενο των ολικών φαινολικών συστατικών και των αλκυλαμιδίων της *Echinacea*. Έχει παρατηρηθεί διακύμανση στο περιεχόμενο κιχορικό οξύ, τόσο στις ρίζες της *E. purpurea*, όσο και στα άνθη της ανάλογα με την περιοχή (Wills and Stuart, 2000, Perry et.al., 2002).

Έχει μελετηθεί επίσης, πώς ποσότητα των δραστικών συστατικών μπορεί να επηρεάζεται από τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς και την επεξεργασία των φυτών. Οι Wills and Stuart (2000) έδειξαν ότι ξήρανση της *E. purpurea* σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 ημέρες έως 10% τελική υγρασία δεν επηρεάζει το περιεχόμενο σε φαινολικά οξέα και αλκυλαμίδια. Κατά την αποθήκευση σε σκοτεινό μέρος η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της απώλειας σε αλκυλαμίδια από 2% στους 5 °C σε 80% στους 30°C. Για τα φαινολικά οξέα ισχύει το αντίθετο, με τη μικρότερη απώλεια να παρατηρείται κατά την αποθήκευση στο 30 °C (<1%) ενώ αυξάνεται στο 40% στους 5°C, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην απορρόφηση υγρασίας σε χαμηλές θερμοκρασίες, η οποία ενισχύει την ενζυμική αποικοδόμηση (5% στους 20°C).

Οι Livesey et.al. (1999) έδειξαν ότι η φύλαξη αλκοολικών εκχυλισμάτων (50-100%) *E. purpurea* στους -20°C, δεν επηρεάζει το ποσό των φαινολικών, το οποίο όμως ελαττώνεται κατά 20%, όταν η αποθήκευση πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασίες

20°C και 40°C. Στα αλκυλαμίδια δεν παρατηρείται ελάττωση. Όταν τα εκχυλίσματα φυλάχθηκαν σε ξηρή μορφή το ποσό του κιχωρικού οξέος έμεινε αμετάβλητο.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών συμφωνούν με τις μεγάλες διακυμάνσεις που παρατηρούνται στα δραστικά συστατικά της *E. purpurea* αλλά και των άλλων ειδών της, στα παρασκευάσματα που κυκλοφορούν στο εμπόριο.

Οι καλλιεργητές πρέπει να λαμβάνουν υπόψη αυτούς τους παράγοντες ώστε να βελτιστοποιούν τις καλλιέργειές τους, ως προς τον επιθυμητό χημειότυπο προκειμένου να διαθέτουν καλής ποιότητας πρώτη ύλη και κατά συνέπεια να έχουν και το μέγιστο οικονομικό όφελος.

1.4.2. Γλυκοπρωτεΐνες

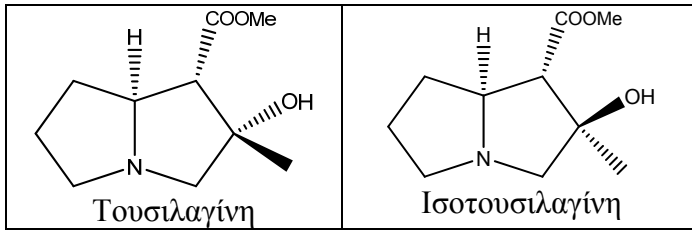
Από τις ρίζες της έχουν απομονωθεί τρεις γλυκοπρωτεΐνες μοριακού βάρους 17, 21 και 30 kDa με περιεκτικότητα 3% σε πρωτεΐνη (Beuscher *et.al.*, 1995) και με κύρια σάκχαρα την αραβινόζη (64-84%), τη γαλακτόζη (1,9-5,3%) και τις γλυκοζαμίνες (6%) (Egert and Beuscher, 1992).

1.4.3. Πολυσακχαρίτες

Δύο πολυσακχαρίτες με ανοσοενισχυτική δράση έχουν απομονωθεί από τα υπέργεια τμήματα της *E. purpurea*, ο PSI (4-O-μεθυλ-γλυκουρονοααραβινοξυλάνη), και ο PSII (ααραβινορααμνογαλακτάνη) (Proksch and Wagner, 1987). Παρόμοιας σύστασης κλάσμα πολυσακχαριτών έχει απομονωθεί και από τις ρίζες. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες έχει δειχθεί ότι ενισχύουν την *in-vitro* αλλά και την *in vivo* δράση των T-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων (Wagner *et.al.*, 1988).

1.4.4. Αλκαλοειδή

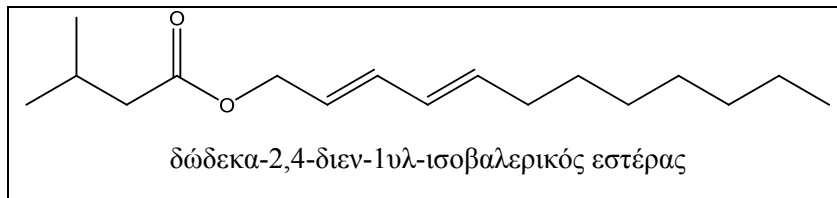
Τα πρώτα αλκαλοειδή τα οποία απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από εκχύλιμα ολόκληρου του φυτού είναι δύο αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης, η τουσιλαγίνη και η ισοτουσιλαγίνη (Σχ.3) (Röder *et.al.*, 1984). Αυτή είναι η μόνη αναφορά ύπαρξης τέτοιων αλκαλοειδών στη φυλή των *Helianthea* της οικογένειας *Astraceae*, όπου συνήθως απαντώνται απλές βάσεις πυριδίνης.



Σχήμα 3: Τα δύο κύρια αλκαλοειδή από τις ρίζες του φυτού *E. purpurea*.

1.4.5. Κετοαλκένια και Κετοαλκίνια

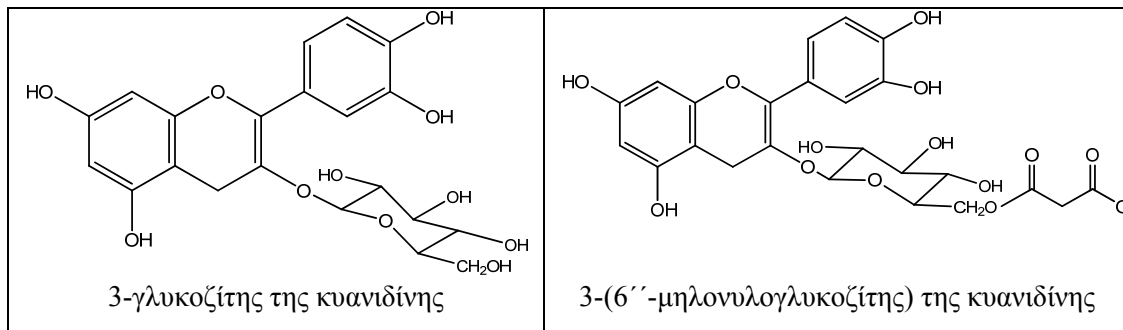
Η ύπαρξη κετοαλκενίων και κετοαλκινίων είναι χαρακτηριστική των ριζών της *E. pallida*. Το μόνο κετοαλκένιο που αναφέρεται έως τώρα να περιέχεται στις ρίζες της *E. purpurea* (αλλά και της *E. angustifolia*) είναι ένας εστέρας, ο δώδεκα-2,4-διεν-1υλ-ισοβαλερικός εστέρας (Heinzer *et.al.*, 1988) (Σχ.4). Η απουσία άλλων κετοαλκενίων και κετοαλκινίων, ξεχωρίζει τις ρίζες αυτών των δύο ειδών από τις ρίζες της *Echinacea pallida*.



Σχήμα 4: Το μοναδικό κετοαλκένιο στις ρίζες του φυτού *E. purpurea*.

1.4.6. Φλαβονοειδή

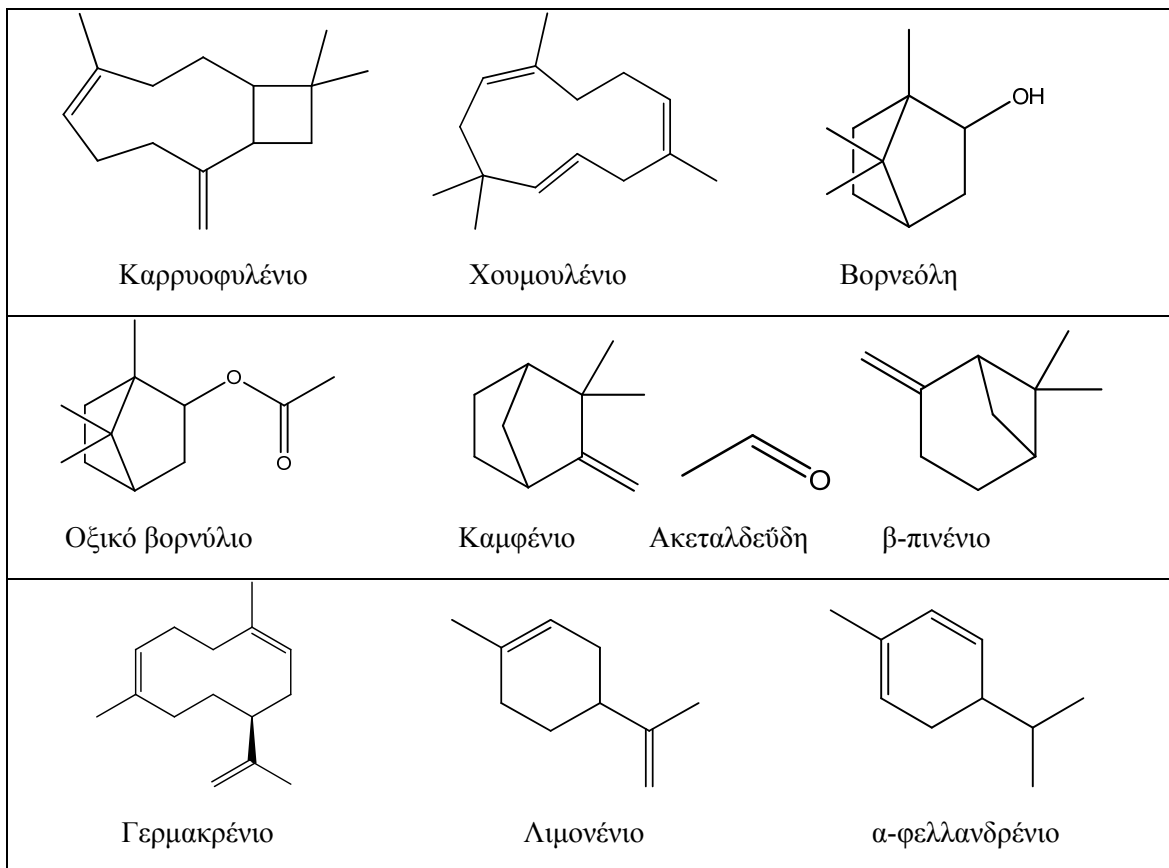
Μία μόνο μελέτη υπάρχει (Cheminat *et.al.*, 1989) στην οποία αναφέρεται η ύπαρξη φλαβονοειδών στα άνθη της *E. purpurea* και *pallida*. Ταυτοποιήθηκαν δύο χρωστικές ανθοκυανίνες, ο 3-γλυκοζίτης της κυανιδίνης και ο 3-(6''-μηλονικός γλυκοζίτης) της κυανιδίνης (Σχ. 5)



Σχήμα 5: Οι δύο ανθοκυανίνες των λουλουδιών της *E. Purpurea*

1.4.7. Συστατικά αιθερίου ελαίου

Οι ρίζες της *E. purpurea* περιέχουν έως 0,2% αιθέριο έλαιο (Bauer, 1999), με κύρια συστατικά, το καρνοφυλένιο, το χουμουλένιο και το εποξειδίο του καρνοφυλλενίου, ενώ τα άνθη και τα υπέργεια τμήματα λιγότερο από 0,1%, με κύρια συστατικά τη βορνεόλη, το οξικό βορνύλιο, το γερμακρένιο, το καρνοφυλλένιο και το εποξειδίό του. Τα κύρια πτητικά συστατικά όλων των τμημάτων του φυτού που απομονώθηκαν με εκχύλιση πάνω απο το χώρο του φυτού (Head Space) και αναλύθηκαν με GC-MS ήταν πάνω από 70, με κύρια συστατικά το καμφένιο, το β-πινένιο, το λιμονένιο, την ακεταλδεΰδη και το α-φελλανδρένιο (Σχ 6).



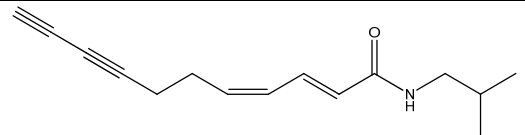
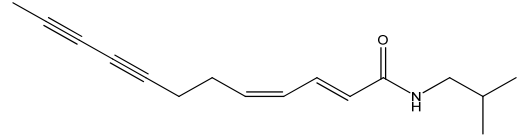
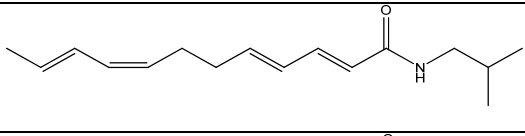
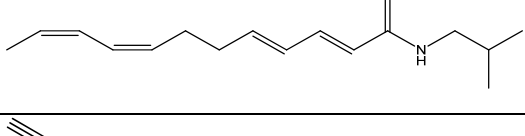
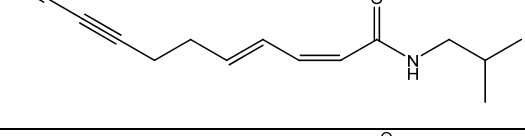
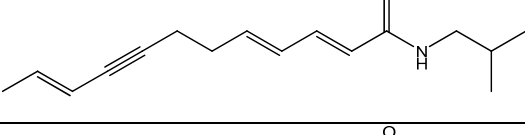
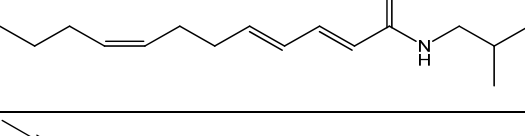
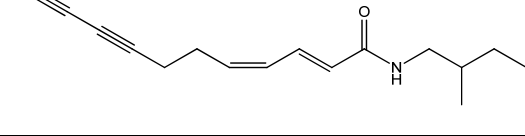
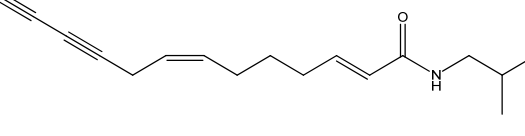
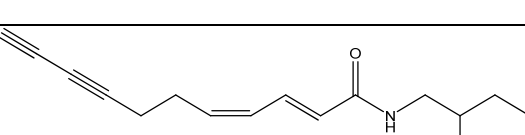
Σχήμα 6: Τα συστατικά του αιθερίου ελαίου από τις ρίζες και τα υπέργεια τμήματα της *E. purpurea*

1.4.8. Αλκυλαμίδια

Τα αλκυλαμίδια είναι αμίδια ακόρεστων αλειφατικών λιπαρών οξέων με έναν τουλάχιστον διπλό δεσμό και εμφανίζονται κυρίως στις οικογένειες Asteraceae, Piperaceae και Rutaceae. Έχουν απομονωθεί μόνο από την *E. angustifolia* και *E. purpurea*. Δέκα αλκυλαμίδια ακετυλενικού τύπου έχουν απομονωθεί από τις ρίζες της *E. purpurea* από τα οποία ένα μόνο είναι του τύπου 2,7 διεν- ενώ τα υπόλοιπα είναι του τύπου 2,4 διέν- (Πίνακας 1). Τα κύρια αλκυλαμίδια είναι το 4 και το 5. Τα ίδιο

ισχύει και στα υπέργεια τμήματα του φυτού με τα αλκυλαμίδια 1,3,6,7 και 9 να βρίσκονται σε ελάχιστες ποσότητες.

Πίνακας 1: Τα δέκα κύρια αλκυλαμίδια τα οποία περιέχονται στις ρίζες και τα υπέργεια τμήματα της *Echinacea purpurea*.

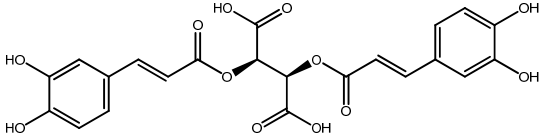
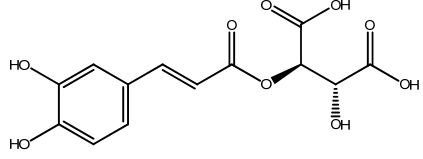
α/α	Αλκυλαμίδιο	Όνομα
1		(2E,4Z)-N-ισοβουτυλεντεκα-2,4-διεν-8,10-διυναμίδιο
2		(2E,4Z)-N-ισοβουτυλδωδεκα-2,4-διεν-8,10-διυναμίδιο
3		(2E,4E,8Z,10E)-N-ισοβουτυλδωδεκα-2,4,8,10-τετραεναμίδιο
4		(2E,4E,8Z,10Z)-N-ισοβουτυλδωδεκα-2,4,8,10-τετραεναμίδιο
5		(2Z,4E)-N-ισοβουτυλεντεκα-2,4-διεν-8,10-διυναμίδιο
6		(2E,4E,10E)-N-ισοβουτυλδωδεκα-2,4,10-τριεν-8-υναμίδιο
7		(2E,4E,8Z)-N-ισοβουτυλδωδεκα-2,4,8-τριεναμίδιο
8		(2E,4Z)-N-(2-μεθυλβουτυλ)δωδεκα-2,4-διεν-8,10-διυναμίδιο
9		(2E,7Z)-N-ισοβουτυλδεκατρια-2,7-διεν-10,12-διυναμίδιο
10		(2E,4Z)-N-(2-μεθυλβουτυλ)εντεκα-2,4-διεν-8,10-διυναμίδιο

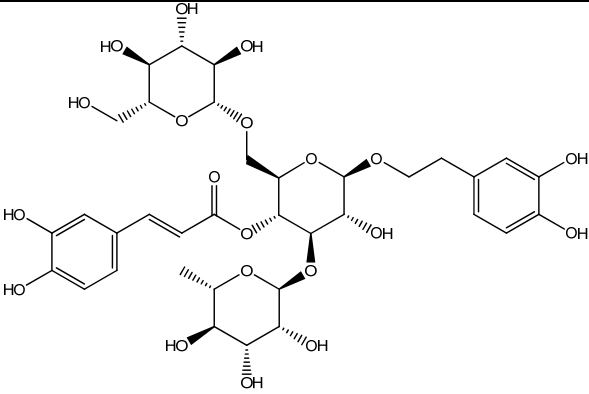
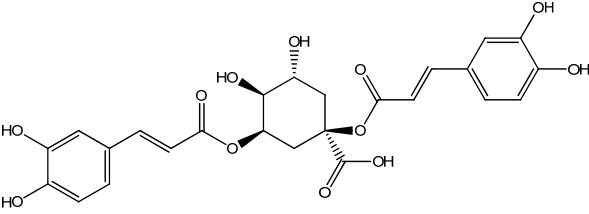
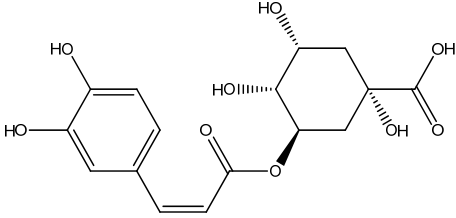
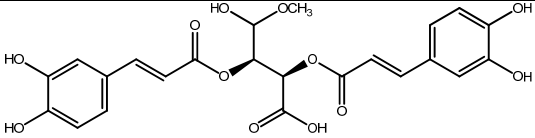
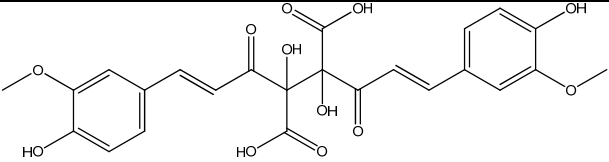
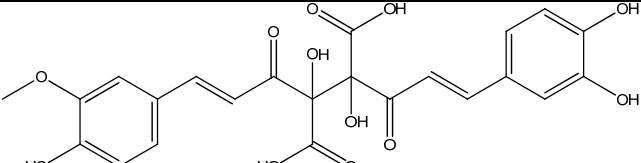
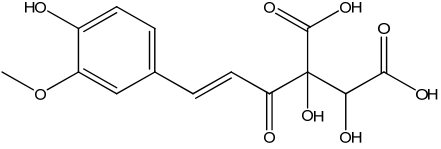
1.4.9. Φαινυλοπροπανοειδή-παράγωγα του καφεϊκού οξέος

Τα κύρια φαινολικά συστατικά της *E. purpurea* ανήκουν στην κατηγορία των φαινυλοπροπανοειδών, ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από έναν φαινολικό δακτύλιο με μία πλάγια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Κοινά παραδείγματα αποτελούν τα υδροξυκιναμμικά οξέα και οι κουμαρίνες. Υδροξυκιναμμικά οξέα όπως είναι το φερουλικό, το σιναπικό και το π-κουμαρικό βρίσκονται στη φύση με τη μορφή εστέρων επιδρώντας στην ομαλή αύξηση των φυτών καθώς και στην αύξηση της ανθεκτικότητας έναντι διαφόρων ασθενειών. Γνωστή χημική ένωση που ανήκει σε αυτή την κατηγορία είναι το καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυ κιναμμικό οξύ).

Στην *Echinacea* τα φαινολικά-αντιοξειδωτικά συστατικά είναι παράγωγα του καφεϊκού οξέος και συγκεκριμένα εστέρες του με τρυγικό ή κινικό οξύ (Πίνακας 2). Το κύριο παράγωγο του καφεϊκού οξέος σε όλα τα μέρη του φυτού (Cheminat *et.al.*, 1998) είναι το κιχορικό οξύ, ενώ το καφταρικό οξύ βρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες και το χλωρογενικό σε ίχνη. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές (Bauer *et.al.*, 1988b,) το κιχορικό βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες στα άνθη, συγκριτικά με τα φύλλα και τους μίσχους. Στα φύλλα έχουν βρεθεί επιπλέον ο μεθυλεστέρας του κιχορικού οξέος καθώς και κάποιοι εστέρες του φερουλικού οξέος.

Πίνακας 2: Τα κύρια φαινολικά συστατικά, παράγωγα του καφεϊκού οξέος στα διάφορα είδη της *Echinacea*.

Ένωση/m (g/mol)	Δομή/Όνομασία κατά IUPAC
Κιχορικό Οξύ 474,38	 (2R,3R)-2,3-bis{[(E)-3-(3,4διυδροξυφαινυλ)προπ-2-ενοϋλ]οξύ} βουτανοδικό οξύ
Καφταρικό Οξύ 312,22	 (2R,3R)-2-[(E)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλ)προπ-2-ενοϋλ]οξύ-3-υδροξυ βουτανοδικό οξύ

<p>Εχινakoζίτης Mr:786,73</p>	
<p>Κυναρίνη 516,45</p>	
<p>Χλωρογενικό Οξύ 354,31</p>	
<p>Μεθυλεστέρας του κιχορικού οξέος</p>	
<p>2,3 δι φερουλοϋλτρυγικό οξύ</p>	
<p>2-καφεοϋλ-3- φερουλοϋλ- τρυγικό οξύ</p>	
<p>2-φερουλοϋλ τρυγικό οξύ</p>	

Τα τρία είδη της *Echinacea* παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους στη σύσταση των φαινολοπροπανοειδών. Στις ρίζες της *E. pallida* τα κύρια συστατικά είναι ο εχινakoζίτης και το κιχορικό οξύ, ενώ περιέχει επίσης καφταρικό και

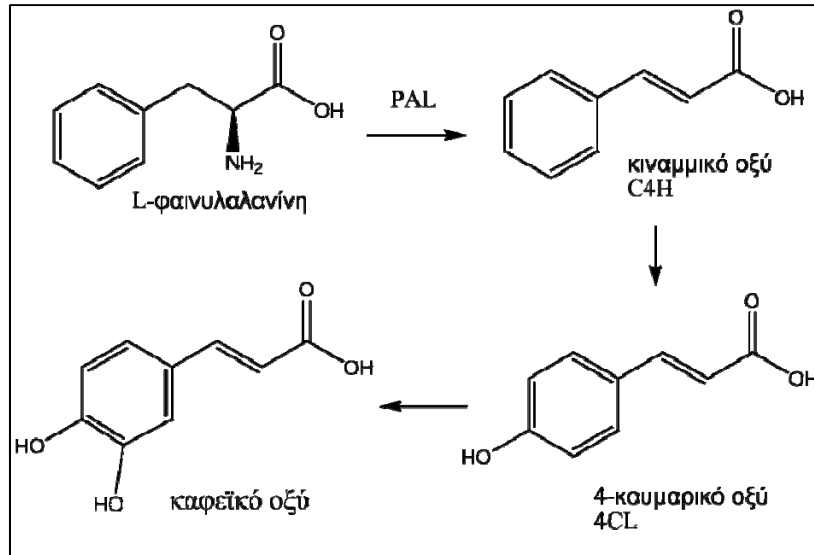
χλωρογενικό οξύ, ενώ στις ρίζες της *E. angustifolia* κύρια συστατικά είναι ο εχινακοζίτης και η κυναρίνη, ενώ απουσιάζει το κιχορικό οξύ. Η έλειψη του εχινακοζίτη είναι ένα κριτήριο διαχωρισμού της *E. purpurea* από τα δύο άλλα είδη.

Στις φαινολικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας έχουν αποδοθεί πολλές από τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες της *Echinacea*.

1.5. Ο ρόλος των φαινυλοπροπανοειδών και η βιοσύνθεσή τους

Τα φαινυλοπροπανοειδή όπως τα ισοπρενοειδή και τα αλκαλοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά. Λειτουργούν ως γραμμή άμυνας ενάντια σε παθογόνα (βακτήρια, μύκητες, ιούς), σαρκοβόρους εχθρούς (έντομα και θηλαστικά), παράγοντες stress (UV ακτινοβολία και όζον). Ελκύουν επικονιαστές και μπορεί να έχουν δράση ορμονών. Έχουν μεγάλη σημασία στην προσαρμοστικότητα των φυτών στις διαρκείς αλλαγές των περιβάλλοντικών συνθηκών (θερμοκρασία, ξηρασία, CO₂, σύσταση εδάφους). Για παράδειγμα, το κιχορικό οξύ αυξάνει σε νεαρά φυτά του *Lattuca sativa* ως αντίδραση του φυτού σε αυξημένες θερμοκρασίες (Ahuja *et.al.*, 2010). Επίσης, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καλίου αυξάνεται κατά 16% το ποσό του εχινακοζίτη που ανιχνεύεται στις ρίζες της *E. angustifolia* (Berti *et.al.*, 2002).

Η βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανοειδών πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και ακολουθεί την οδό του σικιμικού οξέος, (από το μεταβολισμό των υδατανθράκων), από το οποίο συντίθεται το αμινοξύ φαινυλαλανίνη. Από την φαινυλαλανίνη και με ένζυμο κλειδί την PAL (αμμωνιακή λύαση της φαινυλαλανίνης) (Camm and Towers 1973), με αντίδραση απαμίνωσης συντίθεται το κινναμμικό οξύ, από το οποίο με αντιδράσεις υδροξυλίωσης, συντίθεται το p-κουμαρικό οξύ και στη συνέχεια το καφεϊκό οξύ. Τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος τα οποία βρίσκονται στην *Echinacea* παράγονται στη συνέχεια με αντιδράσεις εστεροποίησης ή/και γλυκοζυλίωσης, οι οποίες ρυθμίζονται ενζυμικά (Σχ. 7).



Σχήμα 7: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης του καφεϊκού οξέος και των παραγώγων του από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη.

Η δραστηριότητα της PAL αλλά και η βιοσύνθεσή της εξαρτάται από παράγοντες περιβαλλοντικούς, ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Σε καλλιέργειες ριζών της *E. purpurea* βρέθηκε ότι η επίδραση του φωτός αυξάνει τη δραστηριότητα της PAL με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής κιχορικού, καφταρικού, χλωρογενικού και καφεϊκού οξέος (Abbasi *et.al.*, 2007). Η αύξηση αυτή εμφανίζεται στις ρίζες και όχι σε νεαρούς βλαστούς και φαίνεται ότι είναι οργανοειδική. Επίσης παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται με την επίδραση των παραγόντων ανάπτυξης, γιββερλικού οξέος και τριαζολών με παρατηρούμενη αύξηση της παραγωγής κιχορικού και καφταρικού οξέος (Maxwell *et.al.*, 2009).

1.6. Βιολογικές ιδιότητες της *Echinacea purpurea*

Είναι γνωστό ότι παρασκευάσματα των ριζών αλλά και των υπέργειων τμημάτων και των τριών ειδών της *Echinacea* χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση κρυωμάτων, γρίπης και χρόνιων αναπνευστικών λοιμώξεων. Σε αυτά τα παρασκευάσματα περιέχεται ποικιλία ενώσεων οι οποίες ενισχύουν μη ειδικά το ανοσοποιητικό σύστημα και εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Οι δράσεις αυτές έχουν αποδοθεί στα πολικά παράγωγα του καφεϊκού οξέος, τους πολυσακχαρίτες και τα λιπόφιλα αλκυλαμίδια και πολυακετυλένια, με τα αλκυλαμίδια και τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος να έχουν τη σημαντικότερη συνεισφορά. Τα αλκυλαμίδια ενισχύουν την φαγοκυτταρική δράση των κοκκιοκυττάρων και φαίνεται να έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, αναστέλλοντας τη σύνθεση των προσταγλανδινών και των

λευκοτριενίων. Η αντιφλεγμονώδης δράση τους φαίνεται να ενισχύεται από την παρουσία φαινολικών συστατικών (Goel *et.al.*, 2002, Clifford *et.al.*, 2002).

Από τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος περισσότερες βιολογικές ιδιότητες φαίνεται να έχει το κιχορικό οξύ το οποίο ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα με την ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση (Dalby-Brown *et al.*, 2005). Αναστέλλει τη δράση του ενζύμου υαλουρονιδάση, το οποίο εμπλέκεται στις βακτηριακές μολύνσεις (Bauer and Wagner 1991). Προστατεύει το κολλαγόνο από τη δράση της UV ακτινοβολίας, οπότε μπορεί να έχει αντι-φωτογηραντική δράση (Facino *et.al.*, 1995) και έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ιντεγκράση του HIV-1, εμποδίζοντας έτσι τον ιό να αντιγραφεί (Reinke *et. al.*, 2002). Πολλές μελέτες τελευταία εστιάζονται στη σύνθεση αναλόγων του κιχορικού οξέος, τα οποία θα έχουν δράση αναστολέα ιντεγκράσης. Επίσης το κιχορικό ενισχύει την παραγωγή ινσουλίνης και την πρόσληψη γλυκόζης (Tousch *et al.*, 2008). Ισχυρή αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει και ο εχινακοζίτης, ενώ μικρότερη το χλωρογενικό, η κυναρίνη και το καφταρικό οξύ.

1.7. Η χημεία των αντιοξειδωτικών συστατικών της Echinacea

Οι ζωντανοί οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο της ατμόσφαιρας σε αντιδράσεις οξείδωσης για την παραγωγή ενέργειας. Σε φυσιολογικές συνθήκες 2% του οξυγόνου ανάγεται ατελώς στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών οξυγόνου, ποσοστό που για κάποιους λόγους μπορεί να αυξηθεί και να οδηγήσει σε αντιδράσεις υπεροξειδωσης των νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων, πρωτεϊνών και υδατανθράκων. Εκτός όμως από τα ενδογενή Ενεργά Είδη Οξυγόνου (ΕΕΟ ή ROS) οι οργανισμοί εκτίθενται σε (ΕΕΟ) από εξωγενείς πηγές, όπως το κάπνισμα, η υπεριώδης ακτινοβολία, η ρύπανση. Τα παραπάνω βέβαια ισχύουν και για τις ρίζες αζώτου.

Οι ελεύθερες ρίζες φέρουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και αναζητούν ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις ώστε να γίνουν μόρια ουδέτερα. Παρόλο που η πρόσληψη ηλεκτρονίων κάνει τη ρίζα ουδέτερη, μπορεί να σχηματίζεται μία δεύτερη ελεύθερη ρίζα με την ανάλογη διαδικασία, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο μία αλυσιδωτή αντίδραση. Μέχρι οι διαδοχικές ρίζες να γίνουν ανενεργές, έχουν προκύψει εκατοντάδες ρίζες μέσα σε δευτερόλεπτα από την αρχική αντίδραση. Ο οργανισμός έχει ρυθμιστικούς μηχανισμούς (ένζυμα και αντιοξειδωτικές ουσίες) για να εμποδίσει την καταστροφή βιομορίων από ελεύθερες ρίζες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει

στην παθογένεια χρόνιων ασθενειών όπως ισχαιμικά επεισόδια, εγκεφαλική δυσλειτουργία, φωτογήρανση, καταρράκτης (Lefer, D.J. and Granger, D.N., 2000).

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν ή να απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες πριν προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα και είναι αναμφίβολα σημαντικά για τη διατήρηση της υγείας του οργανισμού (Percival, 1998). Έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση της δομής με την αντιοξειδωτική δράση, η οποία ενισχύεται όταν ο δακτύλιος είναι υποκατεστημένος στην *o*- ή *p*- θέση γιατί μέσω των δομών συντονισμού επιτυγχάνεται σταθεροποίηση της σχηματιζόμενης ρίζας.

Ως αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται είτε συνθετικά μόρια (BHT, γαλλικό οξύ, Trolox), είτε μόρια προερχόμενα από φυσικές πηγές (βιταμίνη C), ή από φυτά (δενδρολίβανο, φασκόμηλο, τσαϊ) τα οποία περιέχουν φαινολικά συστατικά με σημαντική αντιοξειδωτική δράση (ροσμαρινικό οξύ, καρνοσικό οξύ, κατεχίνες).

Η *Echinacea* είναι ένα τέτοιο παράδειγμα φυτού, το οποίο περιέχει ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα φαινολικά της συστατικά, από τα οποία, ισχυρότερα αντιοξειδωτικά φαίνεται ότι είναι το κιχορικό οξύ και ο εχίνακοζίτης. Μεθανολικά εκχυλίσματα ριζών της *Echinacea* δοκιμάστηκαν στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα ακόμη και από το μάρτυρα (Niki, 1990). Ο εχίνακοζίτης εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα από όλα τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος, ακόμη και από το κιχορικό οξύ, στην προστασία του κολλαγόνου τύπου III από τις ελεύθερες ρίζες (Sloley et.al., 2001), ενώ πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν το κιχορικό ως ισχυρότερο αντιοξειδωτικό (Thygesen et.al., 2007, Pellati et.al., 2005).

Τα εκχυλίσματα των ριζών *E. purpurea* δίνουν καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα αντίστοιχα των υπέργειων τμημάτων όταν μελετήθηκαν ως προς την παρεμπόδιση στη δημιουργία της ρίζας DPPH (Sloley et.al., 2001). Καθαρό κιχορικό οξύ που απομονώθηκε από τις ρίζες της *E. purpurea* έχει δειχθεί ότι έχει μεγαλύτερη κατά τρεις φορές αντιοξειδωτική ικανότητα από το ασκορβικό οξύ (η σύγκριση πάντα γίνεται σε μοριακή βάση) (Tepe et.al., 2004), ενώ όταν συγκρίνεται με το ροσμαρινικό οξύ (γνωστό αντιοξειδωτικό της οικογένειας Lamiaceae), φαίνεται να έχει καλύτερη ή την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα (Dalby-Brown et.al., 2005).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα και των υπόλοιπων φαινολικών οξέων (καφταρικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κυναρίνη) έχει ελεγχθεί με τη ρίζα ABTS και έχει βρεθεί ότι έχουν 1,24-1,26 φορές μεγαλύτερη από το Trolox (Bauer and Wagner

1991). Στην αντιοξειδωτική ικανότητα συνεισφέρουν και τα φλαβονοειδή, τα οποία όμως στην *Echinacea* βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωση και σε ακόμη μικρότερη στη ρίζα.

Η οξειδάση των πολυφαινόλων (PPO) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει και την υδοξυλίωση των μονοφαινόλων σε ο-διφαινόλες, αλλά και την οξείδωση των τελευταίων σε ο-κινόνες. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν στη δημιουργία καφέ χρώματος (ενζυμική αμαύρωση). Αυτή η αλλαγή στο χρώμα παρατηρείται στα φυτά, τα φρούτα και τα λαχανικά κατά τη διάρκεια μετασυλλεκτικών χειρισμών παρουσία υγρασίας, με αποτέλεσμα την απώλεια της ποιότητας και την ακόλουθη πιθανή απόρριψη από τον καταναλωτή. Ο *Wolfgang et.al. (2000)* απομόνωσε PPO από *E. purpurea* η οποία έχει υψηλή συγγένεια για το καφεϊκό, το κιχορικό, το ροσμαρινικό, της οποίας αποτελούν υποστρώματα. Ο *Nüsslein et.al. (2000)* βρήκε PPO από εκχύλισμα *E. purpurea* η οποία κατέλυε την διάσπαση του κιχορικού οξέος. Οπότε στη βιομηχανία τροφίμων μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κιχορικό οξύ για να αποφεύγεται η ενζυμική αμαύρωση.

Το γεγονός βέβαια ότι το κιχορικό είναι καλό υπόστρωμα για τις PPOs υποδεικνύει την ανάγκη χαμηλού ποσοστού υγρασίας κατά την αποθήκευση του και υψηλών συγκεντρώσεων αλκοόλης σε διεργασίες παραλαβής του στο εκχυλιστικό μέσο, προκειμένου να απενεργοποιείται το ένζυμο και να μην χάνεται η απόδοση σε κιχορικό οξύ.

1.8. Αναλυτικό προφίλ της *Echinacea purpurea*

1.8.1. Μέθοδοι εκχύλισης

Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί σε δείγματα από το φυτό *Echinacea* ποικίλουν ανάλογα με το είδος του φυτού και εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι ο τρόπος παραλαβής των επιθυμητών συστατικών. Στη μελέτη αυτή ενδιαφέρον έχουν τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα, οπότε ακολουθεί μια βιβλιογραφική αναδρομή στους τρόπους παραλαβής αυτών των εκχυλισμάτων καθώς και οι κυριότερες μέθοδοι ανάλυσής τους.

Τα φαινολικά οξέα έχουν αρκετές υδροξυλομάδες στα μόρια τους, γεγονός που τα καθιστά πολικά μόρια και για την εκχύλισή τους χρειάζονται μίγματα αλκοόλης:νερού. Η ομάδα του καφεϊκού που περιέχουν όλα αυτά τα μόρια δίνει

χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο UV-Vis που βοηθά στην παρακολούθηση της πορείας της εκχύλισης.

Οι κυριότερες μέθοδοι εκχύλισης οι οποίες χρησιμοποιούνται είναι είτε η εκχύλιση με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (κλασσική μέθοδος), είτε η εκχύλιση με υπέρηχους σε θερμοκρασία δωματίου. Αρκετές διαφοροποιήσεις έχουν αναπτυχθεί σε αυτές τις μεθόδους οι οποίες αφορούν, στο χρόνο, τη θερμοκρασία της εκχύλισης καθώς και τον αριθμό των εκχυλίσεων.

Στις μεθόδους που είναι υποβοηθούμενες από υπέρηχους, οι πιο συνηθισμένοι χρόνοι εκχύλισης είναι 10min και μία μόνο εκχύλιση (*Stuart and Wills, 2000a*), 5min και τρεις εκχυλίσεις (*Bergeron et.al., 2000*) ενώ άλλες μέθοδοι προτείνουν 30min (*Liu et.al., 2006, Luo et.al., 2003*) ή 40min (*Stanisavljevic et.al., 2009*), πάντα σε θερμοκρασία δωματίου.

Στις αναφορές που χρησιμοποιείται η κλασσική μέθοδος συνήθως οι εκχυλίσεις διαρκούν 15 min, με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και γίνονται δύο συνήθως εκχυλίσεις (*Brown et.al., 2010, Pellati et.al., 2005, Perry et.al., 2001*), αλλά αναφέρονται και εκχυλίσεις για 1h στους 50°C (*Schieffer et.al., 2000*) και υπάρχει μόνο μία αναφορά για εκχύλιση 8 h με νερό σε θερμοκρασία βρασμού (*Iranshahi and Amanzadeh, 2008*).

Σε όλες τις παραπάνω μεθόδους, τα συστήματα εκχύλισης ήταν υδροαλκοολικά και η αναλογία σε αιθανόλη ήταν σίγουρα πάνω από 50%, για να μην ευνοούνται οι ενζυμικές διασπάσεις. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα είναι αιθανόλη:νερό ή μεθανόλη:νερό 70:30. Οι Stuart and Wills (2000b) βρήκαν διακυμάνσεις στο εκχυλιζόμενο ποσό κιχωρικού οξέος και αλκυλαμιδίων που παραλαμβάνονται ανάλογα με το σύστημα των διαλυτών. Σε ποσοστά αιθανόλης από 90% -100% εκχυλίζονται καλύτερα τα αλκυλαμιδία, ενώ για το κιχωρικό οξύ μέγιστη εκχυλιστική ικανότητα παρατηρήθηκε με 60% αιθανόλη. Με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 °C στους 60°C παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης σε κιχωρικό οξύ και μείωση των αλκυλαμιδίων.

Σε κάθε μελέτη πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά ποια μόρια είναι επιθυμητά να αναλυθούν, ώστε να χρησιμοποιηθούν οι βέλτιστες συνθήκες στο πείραμα ώστε το αποτέλεσμα να αντικατοπτρίζει το πραγματικό περιεχόμενο της υπό ανάλυσης ένωσης στο δείγμα.

1.8.2. Μέθοδοι ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού των εκχυλισμάτων

Οι ρίζες και τα υπέργεια τμήματα της *E. purpurea* χαρακτηρίζονται από την παρουσία κιχορικού, καφταρικού οξέος και αλκυλαμιδίων

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το ποσό του κιχορικού οξέος κυμαίνεται από 0,6 έως 2,1% σε φρέσκο φυτικό υλικό, ποσό το οποίο ελαττώνεται με τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς. Το κιχορικό οξύ βρίσκεται στα ίδια επίσης επίπεδα και στα άνθη του φυτού, ενώ σε πολύ χαμηλότερα ποσά στα φύλλα και τους μίσχους.

Κύρια μέθοδος για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα είναι η χρωματογραφία HPLC ανεστραμμένης φάσης. Σε όλες τις αναφορές χρησιμοποιούνται στήλες C18 και η ανίχνευση πραγματοποιείται με παρακολούθηση του φάσματος UV-Vis των εκλουόμενων συστατικών. Τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος έχουν όλα χαρακτηριστικά φάσματα και γίνεται ευκολότερη η ταυτοποίησή τους. Η κινητή φάση είναι σύστημα νερό-μεθανόλη ή νερό-ακετονιτρίλιο και οξινίζεται ώστε να αποφεύγεται το φαινόμενο tailing και να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των κορυφών οπότε και μεγαλύτερη ακρίβεια κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό. Τα οξέα που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οξικό, φωσφορικό, μυρμικικό και τριφθοροξικό με τελικό pH 2-2,5.

Μέθοδος HPLC για την ανάλυση των κύριων φαινολικών συστατικών της *Echinacea* σε μεθανολικά εκχυλίσματα αναπτύχθηκε πρώτη φορά από τον Bauer et.al.(1988). Πολλές ομάδες ακολούθησαν παρόμοιες συνθήκες, όπως η μέθοδος του INA (Institute of Neutraceutical Advancement) και του Bergeron et.al. (2000). Στις περιπτώσεις που χρειάζεται γρήγορος ποιοτικός προσδιορισμός χρησιμοποιείται στήλη 125mm και μεγάλη ροή κινητής φάσης 1-1,5mL/min, ενώ συνήθως στις περιπτώσεις που ακολουθεί και ποσοτικός προσδιορισμός η στήλη είναι 250mm.

Το LC-MS έχει αποδειχθεί ισχυρό αναλυτικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση φυτοχημικών σε πολύπλοκα μίγματα. Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί τέτοιες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε εκχυλίσματα από *Echinacea*. Χρησιμοποιείται ήπια μέθοδος ιοντισμού, ο ηλεκτροψεκασμός (ESI) σε λειτουργία αρνητικού ιόντος οπότε και καταγράφονται τα $[M-H]^-$ ιόντα (Castro et.al., 2010, Li et.al., 2004). Στη λειτουργία θετικού ιόντος

εκτός των $[M-H]^+$ και $[M-Na]^+$ δεν σχηματίζονται άλλα ιόντα τα οποία να δίνουν επιπλέον δομικές πληροφορίες.

ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία εικοσιπέντε χρόνια υπάρχει πραγματική έκρηξη στη χρήση φαρμακευτικών φυτών παγκοσμίως και κυρίως της *Echinacea* λόγω των πολλών φαρμακευτικών της ιδιοτήτων, καθιστώντας την ένα από τα φυτά τα σκευάσματα του οποίου κατέχουν τις πρώτες θέσεις σε πωλήσεις σε ολόκληρο τον κόσμο

Τα τρία κυριότερα είδη της που καλλιεργούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς είναι η *Echinacea purpurea*, *angustifolia* και *pallida*. Οι δράσεις τους συνδέονται με καταστάσεις προσβολής από ιούς, βακτήρια και παράσιτα, καθώς και με φλεγμονώδεις καταστάσεις παρόμοιας αιτιολογίας. Η αποτελεσματικότητα των σκευασμάτων της *Echinacea* εξαρτάται όχι μόνο από το είδος της, αλλά και από το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται, την ηλικία του, τη γεωγραφική του προέλευση, καθώς και από τη μέθοδο εκχύλισης των δραστικών συστατικών του.

Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια ολοένα και αυξάνονται τα σκευάσματα της *Echinacea* που διατίθενται στο εμπόριο, μόνο που η πρώτη ύλη εισάγεται καθώς έως τώρα δεν υπήρχε εγχώρια συστηματική καλλιέργειά της. Η πρώτη φορά που καλλιεργείται *Echinacea* στην Ελλάδα είναι από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και Ενεργειακών Φυτών Αιτωλοακαρνανίας (ΑΣΚΑΦΕΦΑ) στο Αγρίνιο και συγκεκριμένα η *Echinacea purpurea*.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ποιοτική και ποσοτική μελέτη των συστατικών των ριζών της *E. purpurea*, που καλλιεργείται στην Ελλάδα και εκχυλίζονται σε σύστημα αλκοόλης:νερού καθώς και η σύγκριση τους με τη βιβλιογραφία και εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα. Συγκεκριμένα αντικείμενο της μελέτης είναι το προσδιορισμός φαινολικών οξέων παραγώγων του καφεϊκού οξέος που περιέχονται στις ρίζες του φυτού, κατηγορία ενώσεων που εμφανίζουν βιολογικές δράσεις και έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Με την καταγραφή του χημικού και του αναλυτικού προφίλ του φυτού θα διερευνηθεί αν η *Echinacea purpurea* μπορεί να αποτελέσει μία νέα συστηματική καλλιέργεια στην Ελλάδα, η οποία θα προσφέρει στην Ελληνική και όχι μόνο αγορά, προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

Γαλλικό οξύ 98% από την Alfa Aesar

Καφταρικό οξύ 97% από τη Sigma

Καφεϊκό οξύ 99% HPLC standard από τη Sigma

Κιχορικό οξύ, HPLC standard από τη Synthese.

Αντιδραστήριο Folin από τη Merck.

DPPH από τη Sigma.

Άνυδρο Na₂CO₃ από τη Merck.

Τριφθοροξικό οξύ από τη Merck.

Μεθανόλη HPLC και MS βαθμού καθαρότητας από τη Lab Scan.

2.2. Βιολογικό Υλικό. Συλλογή και προετοιμασία

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ρίζες του φυτού *Ecinaeca purpurea* η οποία καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Η καλλιέργεια έγινε από τον Συνεταιρισμό ΑΣΚΑΦΕΦΑ, στο Αγρίνιο. Τα φυτά εκριζώθηκαν μετά από τρία χρόνια καλλιέργειας, οι ρίζες συλλέχθηκαν, ξηράθηκαν υπό σκιά ώστε το τελικό ποσό υγρασίας να είναι περί το 10% και ακολούθησε φύλαξή τους στους -20°C προστατευμένες από φως και υγρασία. Τα δείγματα των ριζών πριν την ανάλυση, καθαρίστηκαν προσεκτικά από τυχόν υπολείμματα χώματος και κόπηκαν σε πολύ μικρά τεμάχια με κλαδευτήρι. Στη συνέχεια τεμαχίστηκαν περαιτέρω και αλέστηκαν με οικιακό μύλο, ώστε να συλλεχθεί μια αρκετά λεπτόκοκκη σκόνη.

Επίσης στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά σκευάσματα τα οποία περιέχουν το μεν πρώτο σε αναλογία 1:1, υπέργεια τμήματα *Echinacea purpurea* και ρίζες *Echinacea angustifolia* σε 50% αιθανόλη (δείγμα R), ενώ το δεύτερο είναι εκχύλισμα από ρίζες *Echinacea pallida* σε 50% αιθανόλη (δείγμα S).

2.3. Εκχύλιση σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση

Ποσότητα 0,5g αλεσμένων και αποξηραμένων ριζών (Σχ.8) εκχυλίζονταν με 10mL συστήματος MeOH:νερού σε ποτήρι ζέσης, για 15 min υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα, σε θερμοκρασία δωματίου (Pellati *et.al.*, 2005). Το εκχύλισμα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 10min στις 7.000rpm και το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό σε ογκομετρική φιάλη. Ο όγκος του εκχυλίσματος συμπληρώθηκε έως τα 10mL με το σύστημα εκχύλισης. Το στερεό υπόλειμμα εκχυλιζόταν ξανά με τον ίδιο τρόπο. Το εκχύλισμα διηθήθηκε με φίλτρο PTFE 0,45μm και ήταν έτοιμο για ανάλυση. Η διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για κάθε δείγμα και ο συνολικός όγκος του δείγματος ήταν 40mL. Η παραπάνω μέθοδος είναι γνωστή και ως “Κλασσική μέθοδος”.



Σχήμα 8: Ρίζες του φυτού *Echinacea purpurea*.

2.4. Εκχύλιση με υπερήχους

Μέθοδοι υποβοηθούμενες με υπερήχους έχουν βρει εφαρμογή γιατί μπορεί να είναι πιο γρήγορες και να έχουν καλύτερη εκχυλιστική ικανότητα. Για την *E. purpurea* τέτοιες μέθοδοι χρησιμοποιούνται την τελευταία δεκαετία (Thygesen *et.al.*, 2007; Luo *et.al.*, 2003; Perry *et.al.*, 2001). Στο εργαστήριο η πορεία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε σε λουτρό υπερήχων συχνότητας 35KHz (Sonorex Bandelin Super PK255) για 15min και η θερμοκρασία ελέγχονταν ώστε να μην ξεπερνάει τους 30°C για να αποφευχθεί η διάσπαση ή οξείδωση των υδατοδιαλυτών συστατικών που εκχυλίζονται. Τα υπόλοιπα βήματα ήταν ακριβώς τα ίδια με εκείνα της κλασσικής μεθόδου.

2.5. Ποσοτικοί προσδιορισμοί

2.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη η χρωματομετρική μέθοδος των Folin-Ciocalteu η οποία αρχικά είχε προταθεί για την ανάλυση πρωτεϊνών (Folin & Ciocalteu, 1927), και με την οποία ανιχνεύεται το σύνολο των υδροξυ-φαινυλομάδων ενός δείγματος χωρίς το διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών ((Singleton & Rossi, 1965), (Waterman & Mole, 1994)). Η μέθοδος αυτή φαίνεται ότι τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται συχνότερα λόγω της απλότητάς της, της επαναληψιμότητάς της και του γεγονότος ότι επηρεάζεται λιγότερο από ουσίες παρεμπόδισης, οι οποίες μεταβάλλουν το αποτέλεσμα.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι τα ολικά φαινολικά συστατικά ενός δείγματος σε αλκαλικό περιβάλλον, δίνουν ένα έντονο μπλέ χρώμα ανάγοντας τα ετεροπολυμερή ιόντα του φωσφομολυβδενικού οξέος και του φωσφοβολφραμικού οξέος που περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, και από την απορρόφησή τους στα 765nm προκύπτει η τιμή της συγκέντρωσής τους στο δείγμα.

Τα στάδια της ανάλυσης έχουν ως εξής:

- Ο όγκος του υπό ανάλυση δείγματος συμπληρώνεται έως το 1,1 mL με νερό.
- Ακολουθεί προσθήκη 100μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,1N) και ανάδευση.
- Προσθήκη 800μL διαλύματος ανθρακικού νατρίου (7,5%) μετά από χρονικό διάστημα 30s και πριν από 6min και ανάδευση, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 3%.
- Παραμονή των δειγμάτων για 1½ h σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων με φωτόμετρο Hach DR/210 στα 765nm.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών γίνεται με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τη χρήση γαλλικού οξέος, με αποτέλεσμα η τιμή της συγκέντρωσης κάθε δείγματος να εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

2.5.2. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH

Η ρίζα DPPH (2,2 διφαινυλ-πικρυλ-υδραζίλιο) χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της ικανότητας των πολυφαινολών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, καθώς επιτρέπει το χειρισμό πολλών δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα και την ανίχνευση αντιοξειδωτικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις (*Brand-Williams et al., 1995*). Στην ικανότητα αυτή των πολυφαινολών αποδίδεται η αντιοξειδωτική τους δράση, με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολών ενός δείγματος (*Parejo, et al., 2000*).

Στη μορφή της ρίζας το DPPH απορροφά στα 517nm και η τιμή της απορρόφησης ελαττώνεται όταν το μόριο ανάγεται με μεταφορά ηλεκτρονίου από κάποιο αντιοξειδωτικό. Οπτικά, αυτό παρατηρείται με αλλαγή του αρχικά ιώδους χρώματος του διαλύματος της ρίζας, σε κίτρινο (Σχ.9).



Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης αντιοξειδωτικών συστατικών στο DPPH.

Η έκφραση των αποτελεσμάτων αποδίδεται ως % ελάττωση της απορρόφησης ανά ισοδύναμα γαλλικού οξέος, η οποία υπολογίζεται κάθε φορά από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Αναστολή} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100, \text{ όπου } A_c \text{ η απορρόφηση του DPPH και } A_s$$

η απορρόφηση του δείγματος.

Η καμπύλη που κατασκευάζεται χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του EC_{50} , της συγκέντρωσης στην οποία παρατηρείται 50% μείωση στη δράση του DPPH. Τα βήματα της μεθόδου έχουν ως εξής:

- Δείγματα αυξανόμενου όγκου κάθε εκχυλίσματος αναμιγνύονται με 300μL μεθανολικού διαλύματος 1mM DPPH, μέχρις τελικού όγκου 3mL σε μεθανόλη.

- Μετά από 30 λεπτά επώαση στο σκοτάδι μετράται η απορρόφηση στα 517nm σε φωτόμετρο Hach DR/210.

Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη. Το δείγμα αναφοράς (300μL 1mM DPPH και 2,7mL μεθανόλη) παρασκευάζονταν καθημερινά. Όλα τα δείγματα αναλύονταν εις τριπλούν και κάθε πείραμα πραγματοποιούνταν δύο φορές. Στην περίπτωση πρότυπων ουσιών (γαλλικό οξύ, καφταρικό οξύ, κιχορικό οξύ), τα αποτελέσματα εκφράζονταν σε μg ανά αντίδραση με δυνατότητα υπολογισμού του EC_{50} σε μM.

2.5.3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) Ανεστραμμένης Φάσης (HPLC-RP)

Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος με αυτή τη χρωματογραφική μέθοδο γίνεται με βάση την πολικότητα των μορίων. Τα λιγότερο πολικά μόρια δεν συγκρατούνται ισχυρά στη μεγάλη υδρόφοβη αλυσίδα της στατικής φάσης, οπότε είναι και αυτά που εκλούνται πιο γρήγορα από τη στήλη, ενώ τα πιο υδρόφοβα μόρια συγκρατούνται ισχυρότερα οπότε και εκλούνται αργότερα από τη στήλη. Η στατική υδρόφοβη φάση είναι σφαιρίδια πυριτίου (τροποποιημένη silica) τα οποία στην επιφάνειά τους φέρουν κορεσμένη αλυσίδα υδρογονάνθρακα με 18 άτομα άνθρακα στη σειρά. Η μεγάλη αυτή υδρόφοβη αλυσίδα κάνει πιο ισχυρές τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της στατικής φάσης και των συστατικών του δείγματος.

Η μέθοδος της χρωματογραφίας HPLC χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων ριζών *Echinacea purpurea* καθώς και των εμπορικών σκευασμάτων συγκρίνοντας πάντα τη χρωματογραφική τους συμπεριφορά με εκείνη αναλυτικών προτύπων.

Τα δείγματα μετά από εκχύλιση διηθούνταν με PTFE φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,45μm και αναλύονταν χρωματογραφικά σε όργανο της εταιρίας Agilent (Series 1100) εφοδιασμένο με ανιχνευτή διάταξης διόδων. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Discovery HS-C18 της Supelco, με μέγεθος σωματιδίων 5μm και διαστάσεις 250x4,6mm. Η κινητή φάση ήταν MeOH:νερό-0,1%TFA. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0.9 mL/min και η στήλη ήταν εξισορροπημένη σε 25% MeOH. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν από 25% MeOH σε 75% σε χρόνο 40min (Castro et.al., 2010).

Τα δείγματα εισάγονταν στο σύστημα με βαλβίδα υψηλής πίεσης Rheodyne τύπου 7125 και ο όγκος του δείγματος ήταν 20μL. Η καταγραφή των εκλουόμενων συστατικών γίνονταν συνεχώς με καταγραφή του φάσματος απορρόφησης από τον ανιχνευτή διάταξης διόδων καθώς και σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Η παρακολούθηση για τα φαινορικά συστατικά της *Echinacea purpurea* γίνονταν σε μήκος κύματος 330nm.

Τα πρότυπα διαλύματα του καφταρικού, του καφεϊκού και του κιχορικού οξέος τα οποία δημιουργήθηκαν για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών των δειγμάτων της *Echinacea* ετοιμάστηκαν με μεθανόλη και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20°C μέχρι τη χρήση τους. Τα διαλύματα τα οποία τελικά εισήχθησαν στον χρωματογράφο αραιώθηκαν με την κινητή φάση.

Πολλές μέθοδοι χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε εκχυλίσματα *E. purpurea*. Σε όσες από αυτές ενδιαφέρει ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με χρήση αναλυτικών προτύπων συνήθως χρησιμοποιούνται στήλες C18 RP μικρού μήκους (125mm), με εσωτερική διάμετρο 4,6mm και μέγεθος σωματιδίων 5μm. Η κινητή φάση είναι μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο και νερό με κάποιο οξύ. Η ροή είναι συνήθως της τάξης του 1,5 mL/min και ο χρόνος της ανάλυσης είναι έως 18min Στην περίπτωση που χρειάζεται τα δείγματα να περάσουν και από ανιχνευτή μαζών χρησιμοποιούνται αντίστοιχες στήλες μεγαλύτερου μήκους (250mm) με ανάλογους διαλύτες και ροή της τάξης του 1mL/min

2.6. Χρωματογραφία HPLC συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Η λήψη των φασμάτων μάζας έγινε σε σύστημα Shimadzu LC/MS-2010A εξοπλισμένο με δυαδική αντλία LC-10ADvp, απαερωτή DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp ρυθμισμένο σε όγκο έγχυσης δείγματος 10μL, ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) SPD-M10Avp και εκλεκτικό τετραπολικό ανιχνευτή μαζών (MSD) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI).

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες της HPLC-RP όπως περιγράφηκαν στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι” με την διαφορά ότι αντί του TFA χρησιμοποιήθηκε 0,1% μυρμηκικό οξύ, προκειμένου να υπάρξει καλός σχηματισμός σπρέυ λόγω μικρότερης επιφανειακής τάσης από το TFA,

καλύτερος ιοντισμός του δείγματος, οπότε και καλύτερο σήμα στο MS (Wang and Cole, 1996) και η θερμοκρασία της στήλης διατηρούνταν σταθερή στους 25°C.

Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης παρέμεινε στα 0,9mL/min και δε μειώθηκε όπως συνηθίζεται όταν στη φασματομετρία μαζών έχουμε μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό, προκειμένου να διατηρηθεί ο καλός διαχωρισμός στις κορυφές και η πίεση δεν ξεπέρασε τα 140-160bar.

Οι συνθήκες του ανιχνευτή MS στη λειτουργία αρνητικού ιόντος προκειμένου να ευνοείται ο σχηματισμός $[M-H]^-$ ήταν οι εξής:

Θερμοκρασία πηγής ιοντισμού CDL 300 °C, ροή αερίου εκνέφωσης (N_2) 1,5L min^{-1} , πίεση αερίου ξήρανσης (N_2) 0,1MPa (ροή 10 L min^{-1}), θερμοκρασία heat block 300°C, δυναμικό περιοχής εκνέφωσης (interface), -3,5kV, τάση CDL (Curved Dissolvation Line) -20V, και τάση ανιχνευτή -1,48kV.

Στα χρωματογραφήματα LC-MS πλήρους σάρωσης (scan mode) καταγράφηκε η περιοχή από 50 έως 800 amu (λόγος μάζας προς φορτίο, m/z) με χρόνο σάρωσης 2000amu/s. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού LC-MS Solution Workstation Ver. 3.0.

Η αντιστοίχιση των κορυφών των δειγμάτων μεταξύ HPLC και LC έγινε βάσει του χρόνου συγκράτησης και των φασμάτων απορρόφησης στο UV-Vis, σε σύγκριση με εκείνα των αναλυτικών προτύπων (κιχορικό, καφταρικό), ενώ όπου δεν υπήρχαν πρότυπα, βάση των βιβλιογραφικών δεδομένων. Η ταυτοποίηση στη συνέχεια επιβεβαιωνόταν κατά τον ίδιο τρόπο με την ESI-MS ανάλυση.

2.7. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Τα φάσματα UV-Vis των εκχυλισμάτων της *E. purpurea* ελήφθησαν στην περιοχή 200-700nm, στο υπό εξέταση σύστημα MeOH:νερού κάθε φορά, σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης V-550 Jasco Corporation, USA. Η συγκριτική μελέτη των φασμάτων χρησιμοποιείται για να αξιολογηθεί η εκχυλιστική ικανότητα του κάθε συστήματος διαλυτών και η ποσοτική απόδοση σε ολικά φαινολικά συστατικά ανά εκχύλιση.

2.8. Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου, είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται πολύ συχνά γιατί απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, δίνει γρήγορα αποτελέσματα

καθώς και λόγω της ευκολίας σύγκρισης των φασμάτων που λαμβάνονται με άλλα γνωστά. Χρησιμοποιείται κυρίως στην οργανική και στη φαρμακευτική χημεία καθώς μέσω τέτοιων φασμάτων δίνεται η δυνατότητα διερεύνησης της μοριακής σύνταξης και της ταυτοποίησης άγνωστων ουσιών.

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού και του τμήματος των ραδιοκυμάτων. Το πιο χρήσιμο κομμάτι της υπέρυθρης περιοχής για τη φασματοσκοπία είναι μεταξύ $4000-600\text{ cm}^{-1}$ γιατί όλες σχεδόν οι ανόργανες και οργανικές ενώσεις απορροφούν ακτινοβολία σε αυτή την περιοχή (Skoog *et.al.*, 1998).

Τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) παρέχουν φάσματα με λόγο σήματος προς θόρυβο μεγαλύτερο από τα καλής ποιότητας φασματομέτρα διασποράς. Ο μετασχηματισμός Fourier είναι η ανάλυση μιας πειραματικά λαμβανομένης καμπύλης με τη μορφή μιας τριγωνομετρικής σειράς. Χρησιμοποιείται ως μέθοδος προσδιορισμού των συστατικών ενός πολύπλοκου περιοδικού κύματος.



Σχήμα 10: Το φασματοφωτόμετρο FT-IR 6700 της Nicolet του Εργαστηρίου Χημείας.

Τα φάσματα FT-IR ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700 (Thermo Scientific) εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειϊκής τριγλυκίνης (DTGS), πηγή Nichrome και διαχωριστή δέσμης από KBr στην περιοχή $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (Σχ.10). Τα φάσματα καταγράφηκαν και επεξεργάστηκαν με χρήση του λογισμικού FT-IR Omnic 7.3 με διακριτικό όριο 4 cm^{-1} και 100 σαρώσεις ανά δείγμα.

2.8.1. Λήψη φάσματος FT-IR με την τεχνική της Εξασθηνιμένης Ολικής ανάκλασης (ATR)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη συλλογή φασμάτων από ρευστά υλικά ή για δείγματα σε μορφή φιλμ. Χρησιμοποιείται το εξάρτημα ATR το οποίο φέρει υποδοχέα δείγματος από ZnSe και επιτρέπει τη λήψη φασμάτων σε υδατικά δείγματα μειώνοντας την απορρόφηση του διαλύτη. Με τη μέθοδο ATR εξετάζεται η επιφάνεια του δείγματος. Σε όλα τα φάσματα έγινε εξομάλυνση του σήματος και διόρθωση της βασικής γραμμής.

2.8.2. Φασματοσκοπία υπερύθρου ανακλαστικότητας με σκέδαση με μετασχηματισμό Fourier (DRIFT)

Σε αυτή την τεχνική λήψης φασμάτων τα δείγματα βρίσκονται σε στερεή κατάσταση, συνήθως σε μορφή σκόνης. Είναι απλή και γρήγορη τεχνική η οποία δεν απαιτεί πρότερη επεξεργασία του δείγματος. Για την εισαγωγή του δείγματος χρησιμοποιήθηκε μικροϋποδοχέας DRIFTS (Spectra Tech) με έξι κάτοπτρα, σε υποδοχέα 3x2mm και το φάσμα υποβάθρου ελήφθη με καθαρή ξηρή σκόνη KBr. Με αυτή την τεχνική ελήφθησαν τα φάσματα των ριζών της *E. purpurea* και τα φάσματα των κλασμάτων από τις εκχυλίσσεις μετά από συμπύκνωσή τους έως ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (Boeco).

2.9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος στατιστικής Microcal Origin 7,5. Η σύγκριση μέσων τιμών έγινε σε επίπεδο σημαντικότητας 95% με το student's t-test.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

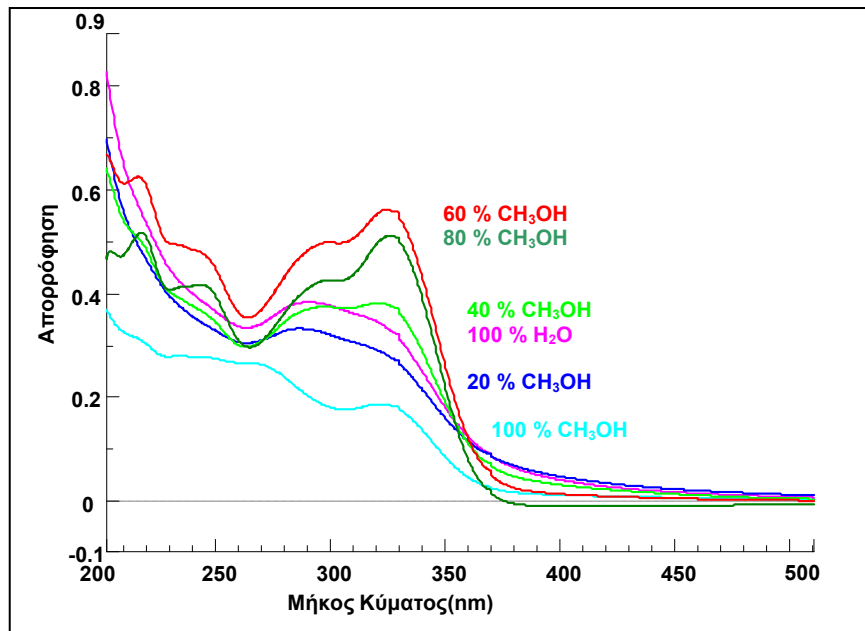
3.1. Μελέτη της παραλαβής ολικών φαινολικών συστατικών από τις ρίζες της *Echinacea purpurea*

3.1.1. Μελέτη της επίδρασης του διαλύτη στην παραλαβή των ολικών φαινολικών

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα καταλληλότερα συστήματα εκχύλισης των φαινολικών συστατικών είναι μεθανόλη/νερό, ή αιθανόλη/νερό αν το προϊόν πρόκειται να χορηγηθεί για βρώση, με τη μεθανόλη να δίνει καλύτερες αποδόσεις.

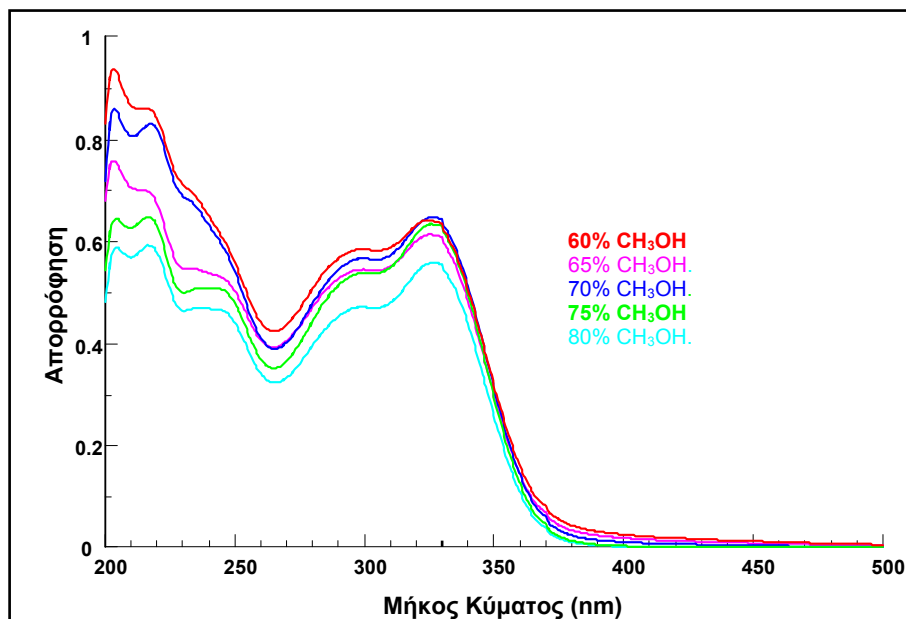
Στη μελέτη αυτή ελέγχθηκαν συστήματα μεθανόλης/νερού από 0 έως 100% σε μεθανόλη. Η μέθοδος εκχύλισης που επιλέχθηκε ήταν η εκχύλιση με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έξι δείγματα ρίζας *E. purpurea* (0,5g) εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι” χρησιμοποιώντας αντίστοιχα συστήματα μεθανόλης/νερού 0, 20, 40, 60, 80 και 100% σε μεθανόλη. Πραγματοποιήθηκε μία μόνο εκχύλιση, το εκχύλισμα συλλέχθηκε, ο όγκος του συμπληρώθηκε έως τα 10mL και λήφθηκε το φάσμα του. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Η μορφή των φασμάτων είναι αυτή που φαίνεται στο *Σχήμα 11*. Όπως φαίνεται όλα τα συστήματα εμφανίζουν μέγιστο στην περιοχή των 330nm, που όπως είναι γνωστό απορροφούν τα φαινολικά συστατικά, με μεγαλύτερη απορρόφηση να εμφανίζουν τα συστήματα των 60 και 80% σε μεθανόλη.

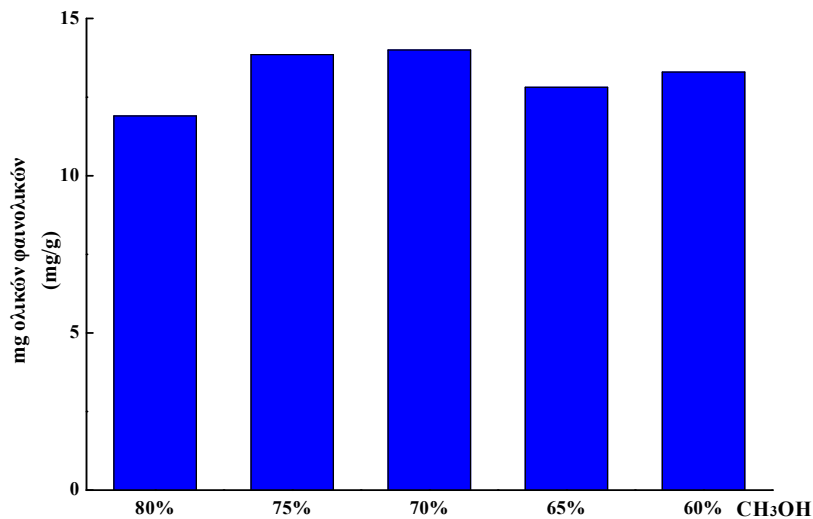


Σχήμα 11: Φάσμα UV των εκχυλισμάτων της *Echinacea purpurea* σε συστήματα MeOH:νερό, από 0 έως 100% σε μεθανόλη.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε ότι καλύτερα συστήματα εκχύλισης είναι το 60 και 80% σε μεθανόλη. Για την επιλογή του βέλτιστου συστήματος στη συνέχεια, έγιναν εκχυλίσεις όπως προηγουμένως με συστήματα 60, 65, 70, 75 και 80% σε μεθανόλη. Τα φάσματα UV-Vis των δειγμάτων φαίνονται στο Σχήμα 12. Στα εκχυλίσματα έγινε και ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 13.



Σχήμα 12: Φάσματα UV των εκχυλισμάτων της *Echinacea purpurea* σε συστήματα MeOH:νερό, 60, 65, 70, 75 και 80 % σε μεθανόλη.



Σχήμα 13: Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινόλικών των εκχυλισμάτων της *E. purpurea* σε συστήματα μεθανόλης/νερού, 60, 65, 70, 75 και 80 % σε μεθανόλη με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Σχ. 13) φάνηκε ότι όταν το ποσοστό της μεθανόλης ή του νερού ήταν 100%, η εκχυλιστική ικανότητα είναι χαμηλή. Σε συγκεντρώσεις μεθανόλης από 60% έως 80% η εκχυλιστική ικανότητα είναι υψηλή και δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, ενώ σε συγκεντρώσεις κάτω του 60% σε μεθανόλη, η εκχυλιστική ικανότητα ελαττώνεται. Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας (Pellati *et.al.*, 2004, Pomponio *et.al.*, 2002).

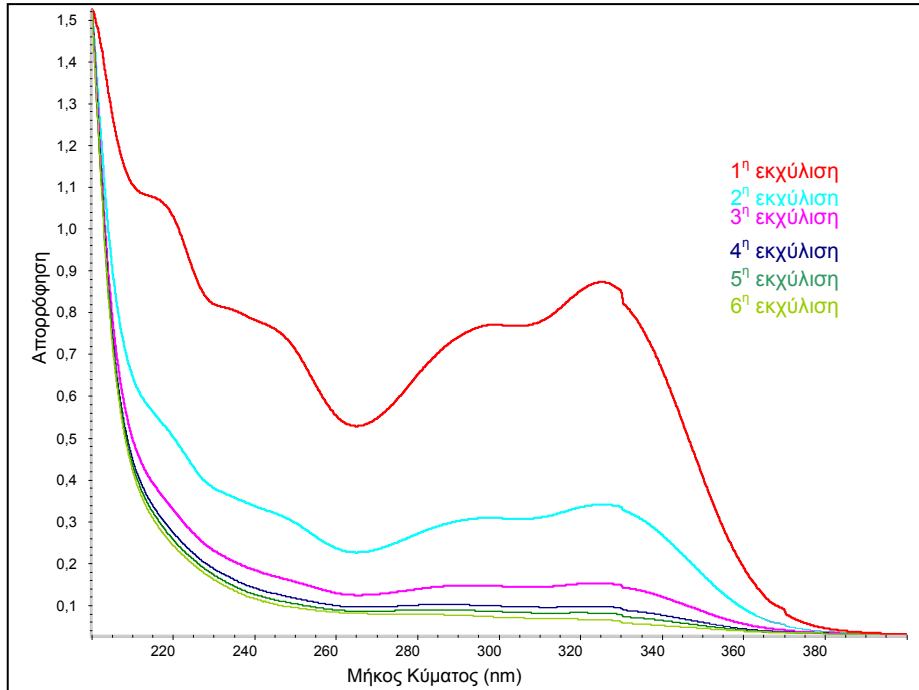
Συμπερασματικά την καλύτερη εκχυλιστική ικανότητα για τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος φαινολικά συστατικά τα οποία περιέχονται στις ρίζες του φυτού *E. purpurea*, εμφανίζει το σύστημα που περιέχει 70% μεθανόλη. Όλες οι επόμενες εκχυλίσεις έγιναν με αυτό το σύστημα.

3.2. Κινητική της εκχύλισης και σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης

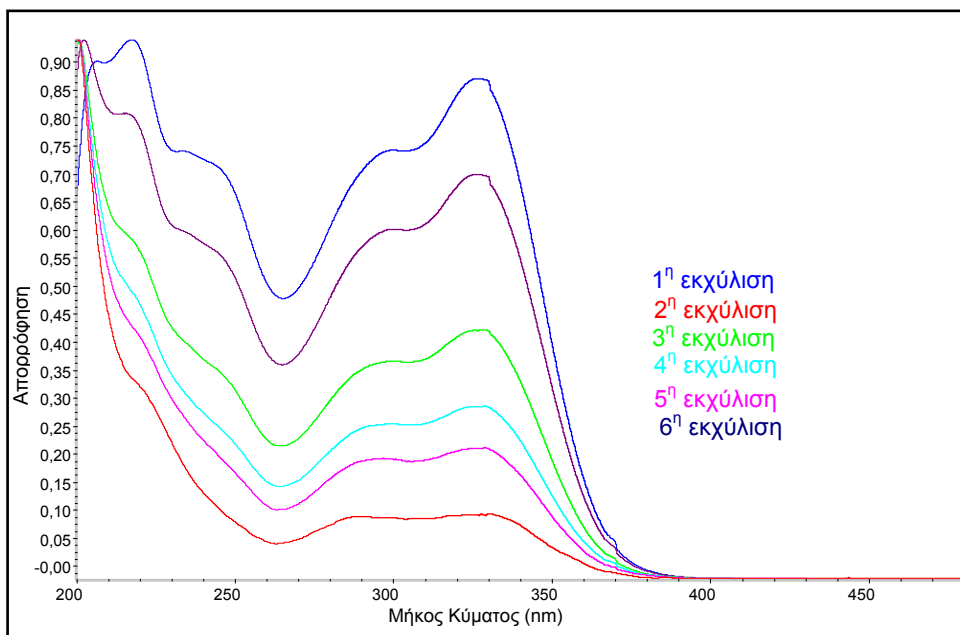
Εστη συνέχεια της μελέτης έγινε η σύγκριση των δύο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων της βιβλιογραφίας, ως προς την απόδοση σε φαινολικά συστατικά και η επιλογή του αριθμού των εκχυλίσεων ώστε να παραλαμβάνονται πάνω από το 95% των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών του δείγματος.

3.2.1. Κινητική της εκχύλισης

Και για τις δύο μεθόδους που εξετάστηκαν ζυγίστηκαν δείγματα φυτικού ιστού 0,5g (n=2) και εκχυλίστηκαν δέκα φορές το καθένα. Στα εκχυλίσματα λήφθηκε το φάσμα υπεριώδους ορατού (UV-Vis) (Σχήματα 14,15) για να παρατηρηθεί η πορεία ελάττωσης των φαινολικών συστατικών.



Σχήμα 14: Φάσματα UV-Vis των εκχυλισμάτων της *Echinacea purpurea* σε σύστημα μεθανόλης:νερού 70:30 με τη μέθοδο ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου.

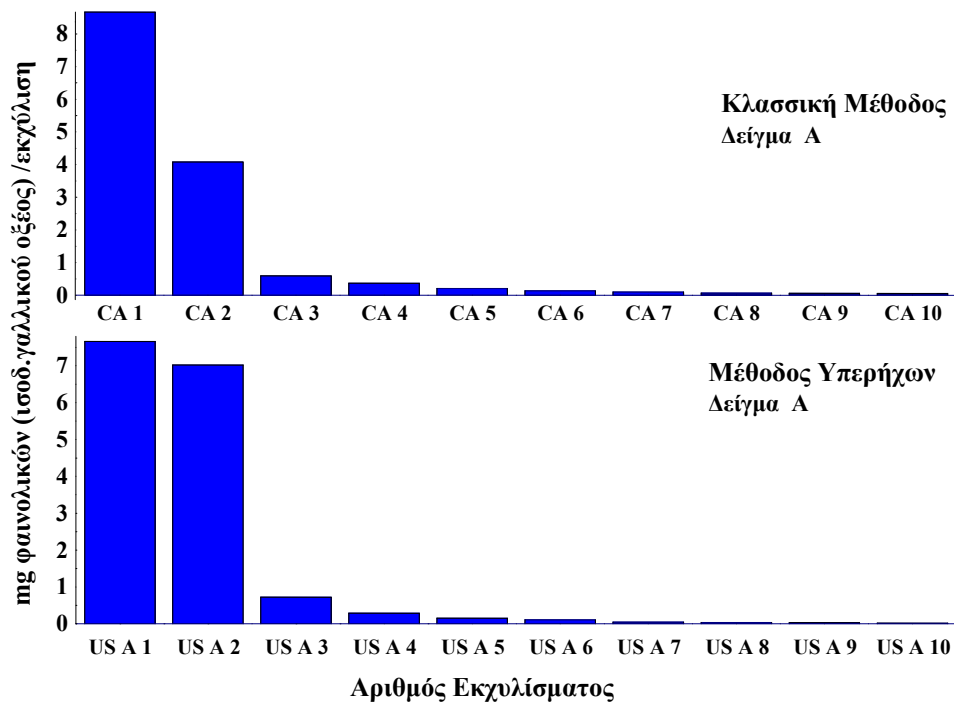


Σχήμα 15: Φάσματα UV-Vis των εκχυλισμάτων της *Echinacea purpurea* σε σύστημα μεθανόλης:νερού 70:30 στα εκχυλίσματα της μεθόδου με χρήση υπερήχων

Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών σε κάθε εκχύλιση με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον Πίνακα 3 και η σχηματική αναπαράστασή τους στο Σχήμα 16.

Πίνακας 3: Το ποσό των φαινολικών συστατικών ανά εκχύλιση, εκφρασμένο σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και για τις δύο μεθόδους που εξετάστηκαν.

Αριθμός εκχυλίσεων	Κλασσική Μέθοδος mg/g φυτικού ιστού	Μέθοδος με Υπέρηχους mg/g φυτικού ιστού
1	17,34	15,32
2	4,20	14,04
3	1,18	14,40
4	0,73	0,58
5	0,40	0,30
6	0,27	0,22
7	0,20	0,88
8	0,14	0,66
9	0,11	0,57
10	0,10	0,27
Σύνολο	28,64	32,13



Σχήμα 16: Σχηματική αναπαράσταση της κινητικής των εκχυλίσεων για τις δύο υπό εξέταση μεθόδους.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι στην απλή μέθοδο με ανάδευση χρειάζονται τέσσερις εκχυλίσεις για την παραλαβή 95,7% των ολικών φαινολικών ενώ στη μέθοδο με τους υπερήχους τρεις εκχυλίσεις. Επειδή κατά την εκχύλιση δειγμάτων με τη μέθοδο των υπερήχων τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλήψιμα (3 ή 4 εκχυλίσεις) επιλέχθηκαν οι τέσσερις εκχυλίσεις και για τις 2 μεθόδους.

3.3. Διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών από τις ρίζες του φυτού

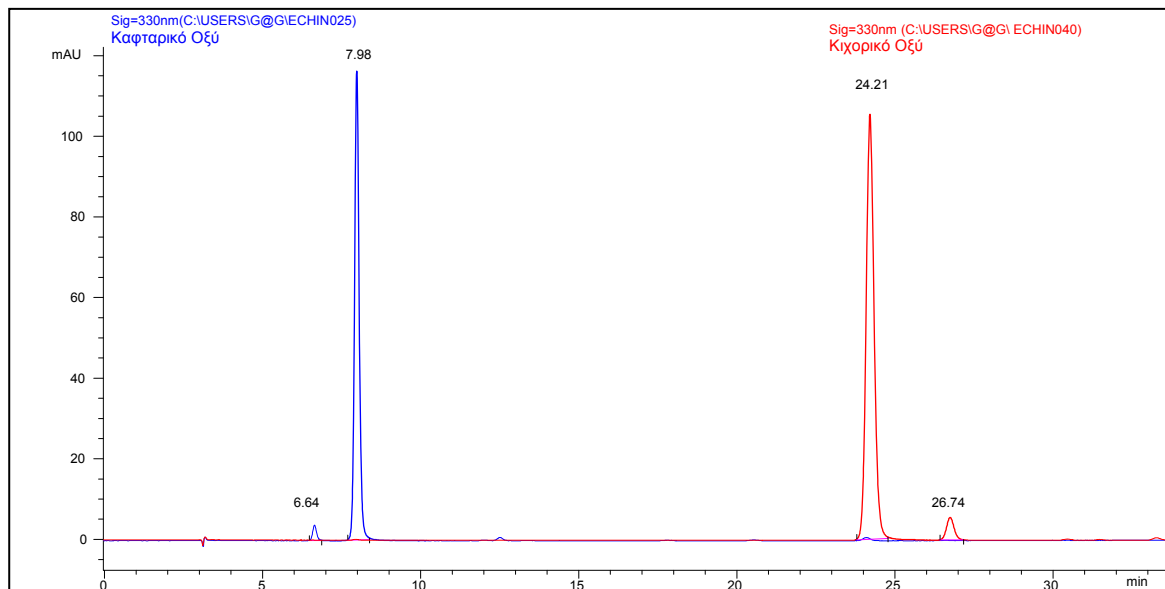
Echinacea purpurea με χρωματογραφία HPLC ανεστραμμένης φάσης (HPLC -RP)

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι σε όλα τα μέρη του φυτού της *E. purpurea* τα κύρια φαινολικά συστατικά είναι το κιχορικό και το καφαρικό οξύ (Binns et.al., 2002, Perry et.al., 2001, Bergeron et.al., 2000, Cheminat et.al, 1988). Για την κυναρίνη αναφέρεται η ανίχνευσή της και ο ποσοτικός της προσδιορισμός, αν και σε πολύ χαμηλότερες ποσότητες απ' ό τι στις ρίζες της *E. angustifolia* (Li et.al., 2004; Perry et.al., 2001. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι υπάρχει χλωρογενικό οξύ και εχινakoζίτης αλλά σε ποσότητες κάτω από τα όρια ποσοτικοποίησης της μεθόδου, ενώ η ύπαρξη καφεϊκού οξέος είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης με HPLC (Pellati et.al., 2005). Οι Bergeron et.al., (2000) και οι Bauer et.al., (1988) αναφέρουν ότι δεν

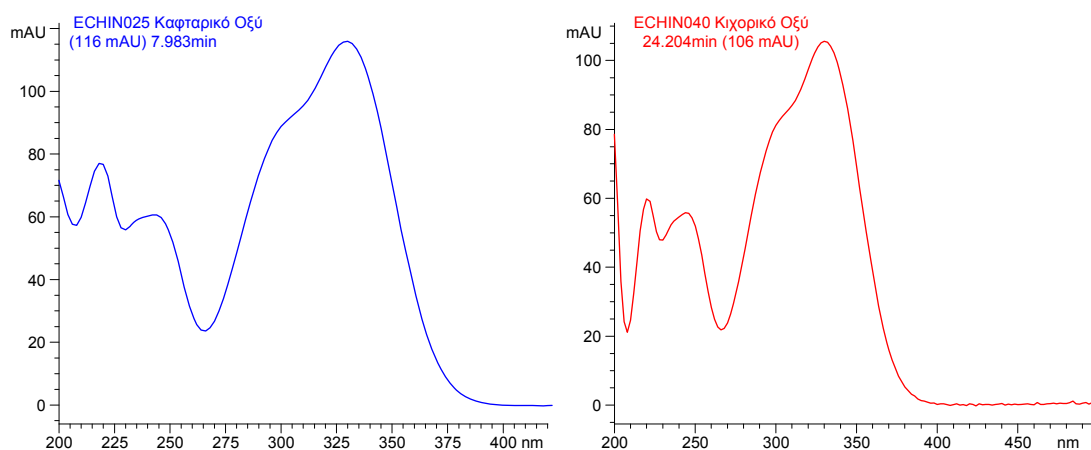
ανιχνεύθηκε εχινakoζίτης. Στην παρούσα εργασία έγινε διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών από τις ρίζες του φυτού *E. purpurea* με χρωματογραφία HPLC και προσπάθεια ταυτοποίησής τους με χρήση αναλυτικών προτύπων και αναδρομή στη βιβλιογραφία.

3.3.1. HPLC προτύπων καφταρικού και κιχορικού οξέος

Διαλύματα προτύπων κιχορικού και καφταρικού οξέος υποβλήθηκαν σε HPLC με τον ίδιο τρόπο που αναφέρεται στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι”. Τα χρωματογραφήματά τους και τα φάσματα UV-Vis φαίνονται στο Σχήματα 17 και 18 αντίστοιχα.



Σχήμα 17: Χρωματογράφημα HPLC καφταρικού οξέος 97% καθαρότητας (μπλε γραμμή) και κιχορικού οξέος HPLC βαθμού καθαρότητας (κόκκινη γραμμή) σε στήλη C-18 (250 x 4,6mm) που είχε εξισορροπηθεί με 25:75 MeOH:νερό- 0,1% σε TFA και εκλούστηκε με βαθμίδωση συγκέντρωσης MeOH 25-45% σε 40min. Φαίνονται οι χρόνοι συγκράτησής τους.

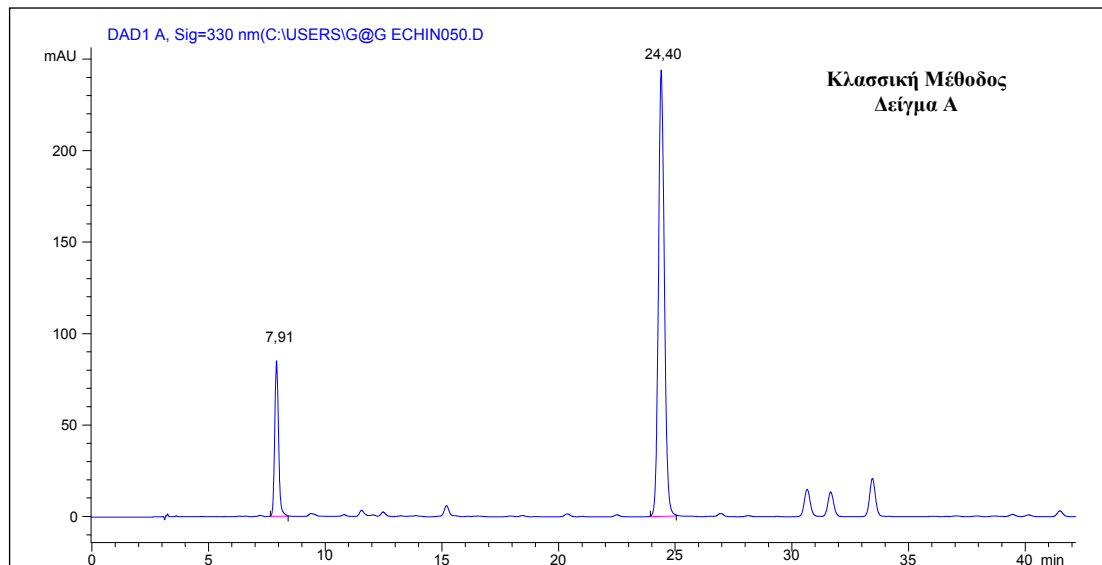


Σχήμα 18: Τα φάσματα UV-Vis πρότυπου καφταρικού (αριστερά) και κιχορικού οξέος (δεξιά) όπως προκύπτουν από τα χρωματογραφήματά τους στο Σχήμα 17.

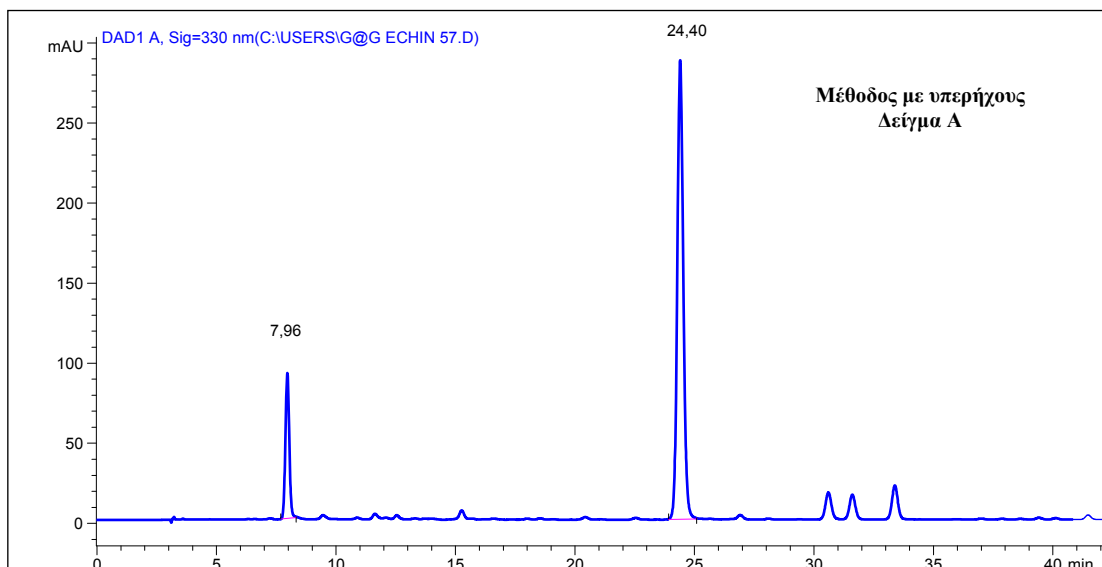
3.3.2. HPLC των εκχυλισμάτων της *Echinacea purpurea*

Δείγματα ριζών *E. purpurea* (n=3), παραλήφθηκαν εκχυλίστηκαν και με τις δύο μεθόδους, όπως έχουν ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι” και

διηθήθηκαν από φίλτρο PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μ m. Ο τελικός όγκος του εκχυλίσματος για 0,5g ριζών μετά από τέσσερις εκχυλίσεις ήταν 40mL σε σύστημα 70:30 MeOH:νερό. Δείγμα όγκου 1 έως 5 μ L των εκχυλισμάτων υποβλήθηκαν σε RP-HPLC σε στήλη C-18 (250 x 4,6mm) η οποία είχε εξισορροπηθεί με σύστημα 25:75 MeOH-νερό-0,1% TFA και εκλούστηκε με βαθμίδωση συγκέντρωσης MeOH από 25 σε 45% σε 40min. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 19 και 20 δύο κύριες κορυφές εμφανίζονται στα δείγματα με χρόνους συγκράτησης στα 7,84-8,0 min και στα 24-24,4 min.

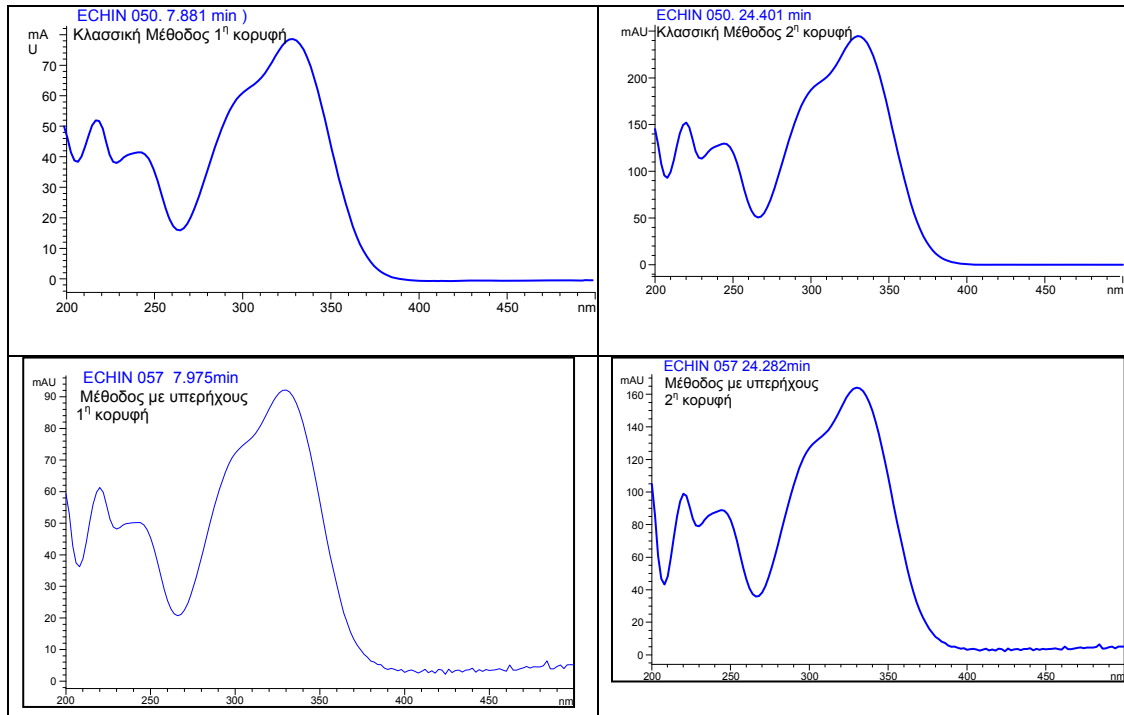


Σχήμα 19: Χρωματογράφημα HPLC δείγματος ριζών *E. purpurea* μετά από εκχύλιση με την κλασσική μέθοδο, σε στήλη C-18 (250 x 4,6mm). Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος.



Σχήμα 20: Χρωματογράφημα HPLC δείγματος ριζών *E. purpurea* μετά από εκχύλιση με μέθοδο υποβοηθούμενη από υπερήχους. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος.

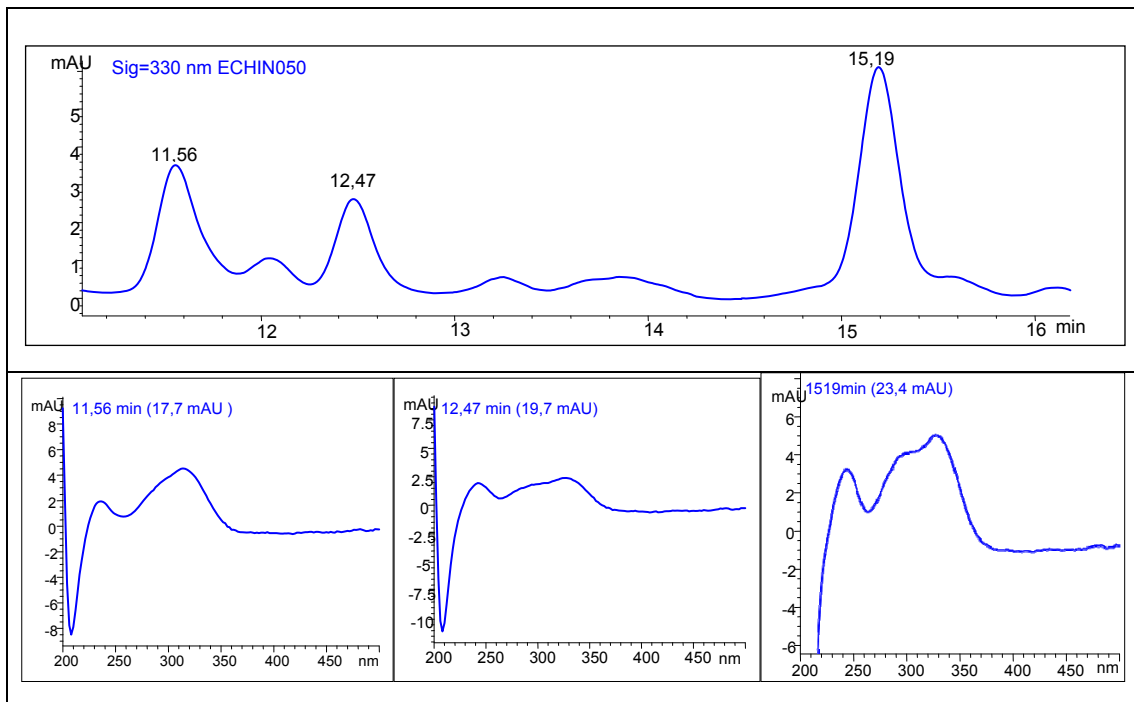
Για τα δείγματα επίσης καταγράφηκαν και τα φάσματα UV-Vis της κάθε κορυφής όπως φαίνεται στο Σχ. 21 προκειμένου να συγκριθούν στην πορεία με εκείνα αναλυτικών προτύπων και να μπορέσει να γίνει ταυτοποίηση των κορυφών του δείγματος. Η κορυφή στα 32min φαίνεται να έχει φάσμα ίδιο με αυτό του κιχορικού οξέος κάτι που έχει παρατηρηθεί ξανά στη βιβλιογραφία (Li *et.al.* 2004).



Σχήμα 21: Τα φάσματα UV-Vis των κύριων κορυφών των δειγμάτων HPLC ριζών *E. purpurea* που υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία RP-HPLC όπως φαίνονται στο Σχήμα 19 και 20.

Συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης των συστατικών των εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* με εκείνους των προτύπων (Σχ. 17), προκύπτει ότι στα εκχυλίσματα υπάρχουν ενώσεις ίδιας πολικότητας με το καφταρικό και το κιχορικό οξύ. Συγκρίνοντας κατόπιν τα φάσματα UV-Vis των εκχυλισμάτων με εκείνα των προτύπων που έχουν τον ίδιο χρόνο συγκράτησης (Σχ. 18,21), προκύπτει ότι αυτά ταυτίζονται.

Με μια πιο προσεκτική μεγέθυνση των χρωματογραφημάτων εμφανίζονται και στα δύο, τρεις κορυφές στα 11,5 τα 12,47 και τα 15,19 min Η περιοχή αυτή του χρωματογραφήματος καθώς και τα φάσματα UV των κορυφών αυτών φαίνονται στο Σχ.22.



Σχήμα 22: Μεγέθυνση της περιοχής 11-16min των χρωματογραφημάτων 19 και 20 ριζών *E. purpurea* και τα UV φάσματα των τριών κορυφών που ανιχνεύονται σε αυτή.

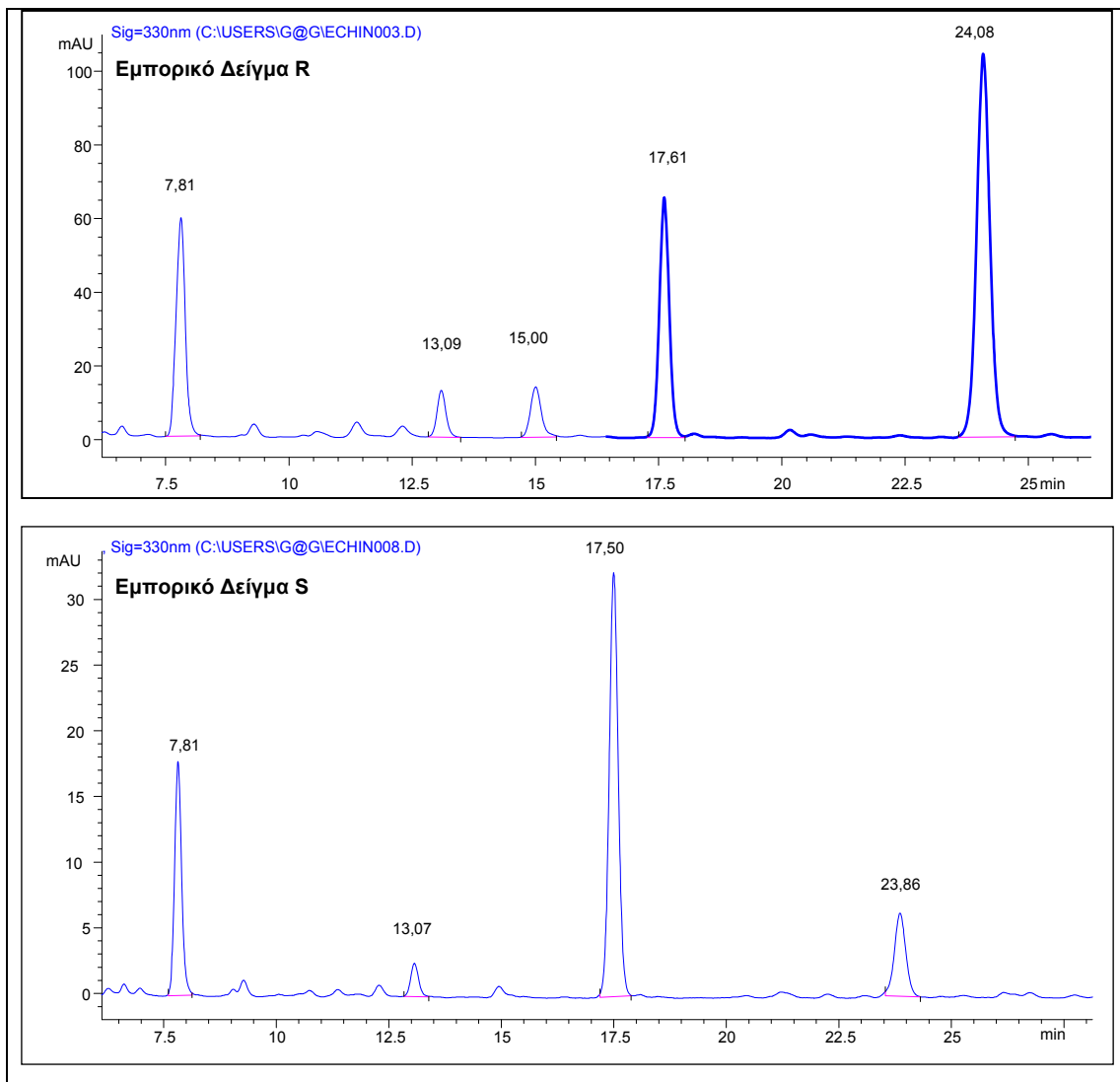
Όπως αναφέρθηκε, στη βιβλιογραφία έχει καταγραφεί η ύπαρξη χλωρογενικού οξέος, καφεϊκού οξέος και κυναρίνης, τα οποία βάση της πολικότητάς τους εκκλύονται με αυτή τη σειρά μετά το καφταρικό οξύ και πριν το κιχορικό οξύ. Οπότε μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στις παραπάνω ενώσεις. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από το φάσμα UV-Vis της τρίτης κορυφής, το οποίο φαίνεται να ταυτίζεται με αυτό της κυναρίνης. Για τις άλλες δύο κορυφές τα φάσματα UV-Vis ενώ έχουν τη μορφή φαινολικών οξέων δεν δίνουν περισσότερες πληροφορίες για την ταυτοποίησή τους.

Καταλήγοντας μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι τα δείγματα των ριζών της *E. purpurea* έχουν ως κύρια συστατικά το καφταρικό οξύ και το κιχορικό οξύ, φαίνεται ότι έχουν επιπλέον κυναρίνη ενώ η ύπαρξη χλωρογενικού οξέος και καφεϊκού οξέος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.3.3. Εμπορικά δείγματα

Στο εργαστήριο υπήρχαν και δύο εμπορικά σκευάσματα, το **R** και το **S**, τα οποία αναλύθηκαν χρωματογραφικά ως έχουν, με αραιώση στο σύστημα του διαλύτη της HPLC, με την ίδια μέθοδο που αναλύθηκαν και τα δείγματα των ριζών. Τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν είχαν τη μορφή που φαίνεται στο Σχ.23. Για

κάθε κύρια κορυφή των χρωματογραφημάτων καταγράφηκαν και τα φάσματα UV-Vis τα οποία και παρατίθενται στα Σχ. 24 και 25.

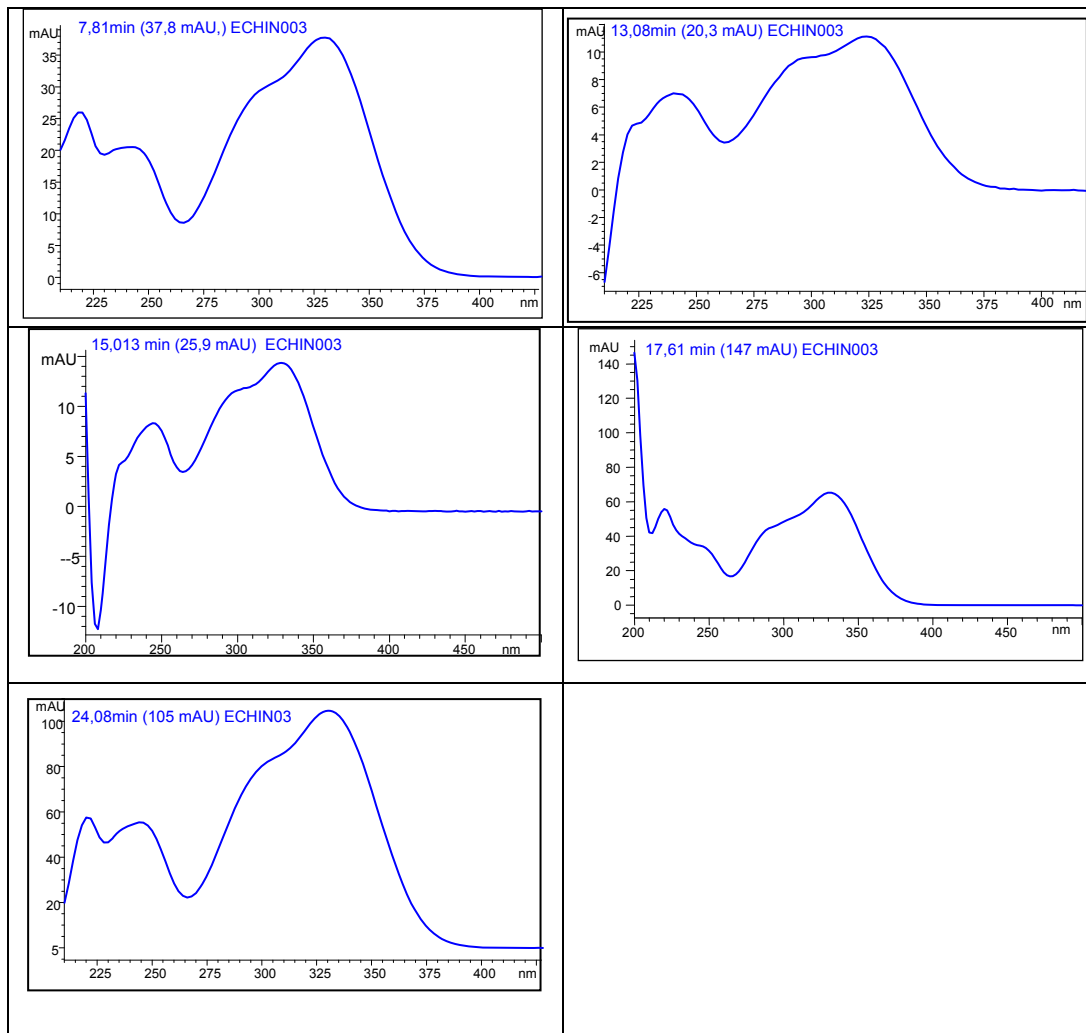


Σχήμα 23: Χρωματογράφημα HPLC εμπορικού δείγματος R και S σε στήλη C-18 (250 x 4,6mm) που είχε εξισορροπηθεί με 25:75 MeOH:νερό σε TFA και εκλούστηκε με βαθμίδωση συγκέντρωσης MeOH 25-45% σε 40min. Φαίνονται οι χρόνοι συγκράτησης των κύριων συστατικών τους.

Στο δείγμα R το οποίο προέρχεται από ίσες ποσότητες ρίζες της *E. angustifolia* και υπέργεια τμήματα της *E. purpurea* αναμενόταν να ανιχνευθούν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα εξής φαινολικά οξέα, παράγωγα του καφεϊκού οξέος: α) καφταρικό οξύ β) χλωρογενικό οξύ γ) κυναρίνη δ) εχινακοζίτης και ε) κιχορικό οξύ. Στο δείγμα S το οποίο προέρχεται από ρίζες της *E. pallida* αναμενόταν η ανίχνευση καφταρικού οξέος, εχινακοζίτη και κιχορικού οξέος. Η ταυτοποίηση του καφταρικού και του κιχορικού οξέος είναι εύκολη γιατί μπορεί να γίνει σύγκριση με το χρόνο συγκράτησης των προτύπων, όπως στην προηγούμενη ενότητα. Στο δείγμα

Σ η κορυφή που υπολείπεται για ανίχνευση είναι εκείνη του εχινakoζίτη για τον οποίο γίνεται η υπόθεση ότι είναι η κορυφή στα 17,5min για τον οποίο ο χρόνος συγκράτησης δικαιολογείται (έκλυση πριν το κιχορικό) και για τον οποίο το φάσμα UV-Vis (Σχ 25) ταιριάζει με αυτόν του πρότυπου εχινakoζίτη (Pellati *et.al.*, 2005). Τα ίδια ισχύουν για τις κορυφές των 7,8, 17,6 και 24min στο δείγμα R. Σε αυτό το δείγμα επίσης αναμενόταν η ύπαρξη κυναρίνης και χλωρογενικού οξέος. Η κυναρίνη έχει λίγο μικρότερο χρόνο συγκράτησης από τον εχινakoζίτη (Pellati, 2005) οπότε θα μπορούσε να είναι η κορυφή στα 15min. Κάτι τέτοιο μπορεί να ισχύει μιας και το φάσμα UV-Vis (Σχ 24) της συγκεκριμένης κορυφής μοιάζει με εκείνο της κυναρίνης. Επιπλέον αναμένεται να ανιχνευθεί χλωρογενικό οξύ σε αυτό το δείγμα.

Βλέποντας το Σχ.23 παρατηρούνται 3 μικρές κορυφές μετά το καφαρικό οξύ, όπου αναμένεται να εκλούεται το χλωρογενικό οξύ. Αυτές οι κορυφές είναι πολύ μικρές σε ένταση και από τα φάσματα UV-Vis τους δεν προκύπτει αν κάποια από αυτές είναι όντως χλωρογενικό οξύ. Η κορυφή στα 13min έχει φάσμα UV-Vis που μοιάζει πιο πολύ με της κυναρίνης παρά με εκείνο του χλωρογενικού οξέος. Επιπρόσθετα, δε θεωρείται πολύ πιθανό να είναι χλωρογενικό οξύ η κορυφή στα 13min γιατί εμφανίζεται και στο χρωματογράφημα του δείγματος S, το οποίο όμως επειδή είναι δείγμα ριζών *Echinacea pallida* δεν αναμένεται να περιέχεται στο δείγμα. Είναι γνωστό ότι ελεύθερο καφεϊκό οξύ θα περιέχονταν στα υπό εξέταση δείγματα, μόνο εάν είχαν υποστεί ενζυμική διάσπαση (Nüsslein, *et.al.*, 2000), γεγονός που θεωρείται πιθανό αφού το εμπορικό σκεύασμα S είναι πολύ παλιό και γενικότερα η φύλαξη των εκχυλισμάτων σε υδατικά διαλύματα ευνοεί τις διασπάσεις.

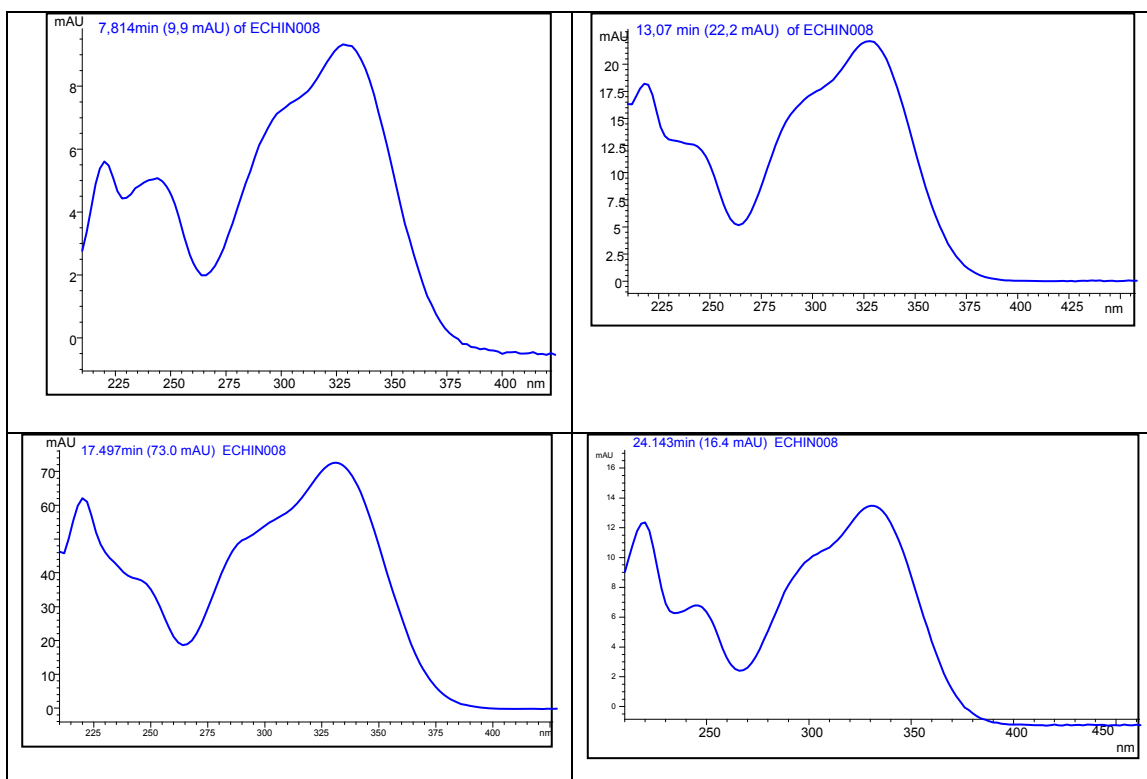


Σχήμα 24: Τα φάσματα UV-Vis των κύριων συστατικών του δείγματος R με τη σειρά που εκλύονται από τη στήλη (βλ. Σχ. 23).

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι στο δείγμα R, το οποίο αντιστοιχεί σε εμπορικό σκεύασμα μίγματος *E. angustifolia* και *E. purpurea* ανιχνεύτηκαν καφταρικό και κιχορικό οξύ, ενώ υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι περιέχει εχινακοζίτη και κυναρίνη. Στο δείγμα S το οποίο αντιστοιχεί σε σκεύασμα *E. pallida* ανιχνεύτηκαν καφταρικό και κιχορικό οξύ, ενώ υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι περιέχει εχινακοζίτη. Στα εργαστηριακά δείγματα των ριζών της *E. purpurea* ανιχνεύτηκαν καφταρικό και κιχορικό οξύ, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι περιέχουν κυναρίνη ενώ δεν ανιχνεύθηκε εχινακοζίτης.

Η πιθανή ύπαρξη καφεϊκού οξέος το δείγμα S καθώς και χλωρογενικού ή/και καφεϊκού οξέος στα εργαστηριακά δείγματα και το δείγμα R, χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση. Η επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων καθώς και η διερεύνηση

των υποθέσεων έγινε με τη χρήση της φασματομετρίας μαζών όπως περιγράφεται παρακάτω.



Σχήμα 25: Τα φάσματα UV-Vis των κύριων συστατικών του δείγματος *S* με τη σειρά που εκλούνται από τη στήλη (βλ. Σχ. 23).

3.4. Χρωματογραφία HPLC συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS) για την ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών

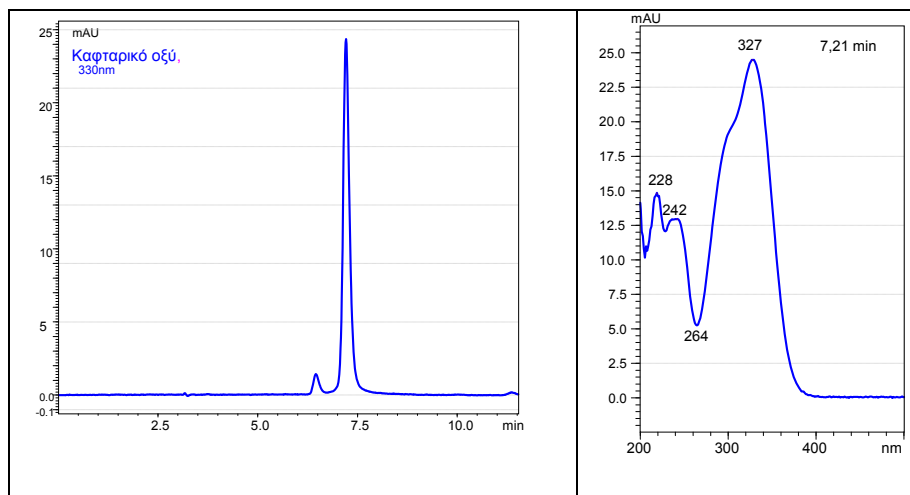
Με τη χρήση της μεθόδου LC-MS στόχος της εργασίας ήταν να ταυτοποιηθούν οι κορυφές που είχαν βρεθεί με το HPLC μέσω των μοριακών ιόντων και πιθανών χαρακτηριστικών θραυσμάτων για την κάθε υπό εξέταση ένωση. Αρχικά αναλύθηκαν τα πρότυπα και στην συνέχεια τα δείγματα (εκχυλίσματα ριζών και εμπορικά σκευάσματα). Τα πιο συνηθισμένα φαινολικά οξέα, παράγωγα του καφεϊκού οξέος τα οποία περιέχονται στις ρίζες των διαφόρων ειδών της *Echinacea*, τα μοριακά τους ιόντα $[M-H]^-$ και τα κυριότερά τους θραύσματα φαίνονται στον Πίνακα 4 (Wang et.al., 2009, Cech et.al., 2006, Li et.al., 2004).

Πίνακας 4: Τα κυριότερα φαινολικά οξέα των ριζών *Echinacea*, τα μοριακά τους ιόντα και τα θραύσματά τους σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

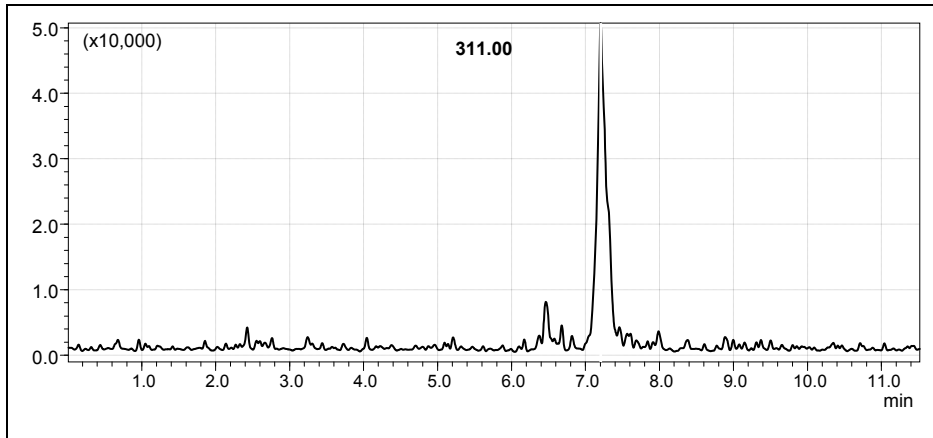
Ένωση	Μοριακό Ιόν [M-H] ⁻	Θραύσματα (m/z)
Καφταρικό Οξύ	311	149, 179, 135
Κιχορικό Οξύ	473	311, 149, 179, 293, 113
Εχινakoζίτης	785	623, 477, 315, 461, 311, 179,135,161, 153,
Κυναρίνη	515	353, 191, 179, 335, 155
Χλωρογενικό οξύ	353	191, 179
Καφεϊκό οξύ	179	135

3.4.1. LC-MS των προτύπων, καφταρικού, κιχορικού και καφεϊκού οξέος

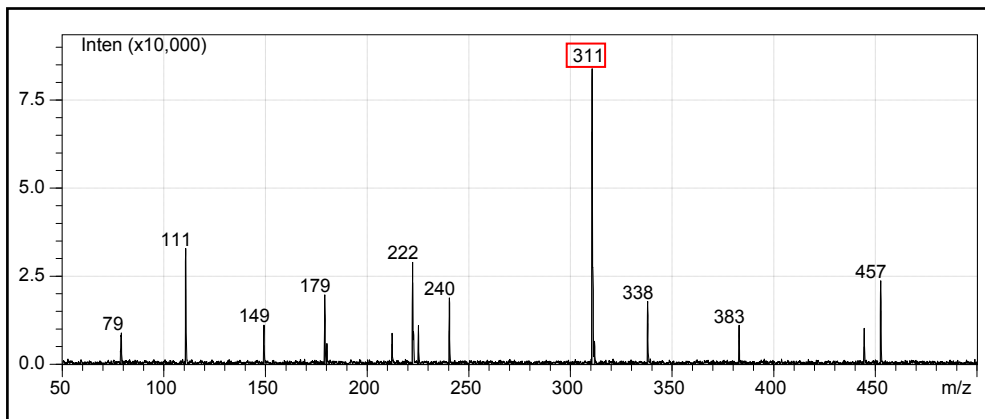
Στη συνέχεια έγιναν με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω, οι αναλύσεις των προτύπων του καφταρικού, του κιχορικού και του καφεϊκού οξέος. Στα Σχήματα 26, 29 και 32, φαίνονται τα χρωματογραφήματά τους όπως αυτά καταγράφηκαν από το HPLC της Shimadzu και τα αντίστοιχα φάσματα τους UV-Vis, ενώ ακολουθούν τα φάσματα μάζας τους (ολικό ρεύμα ιόντων ή αναζήτηση συγκεκριμένου ιόντος, και τα κύρια θραύσματα που ανιχνεύονται. (Σχ. 27,28, 30, 31 και 33,34).



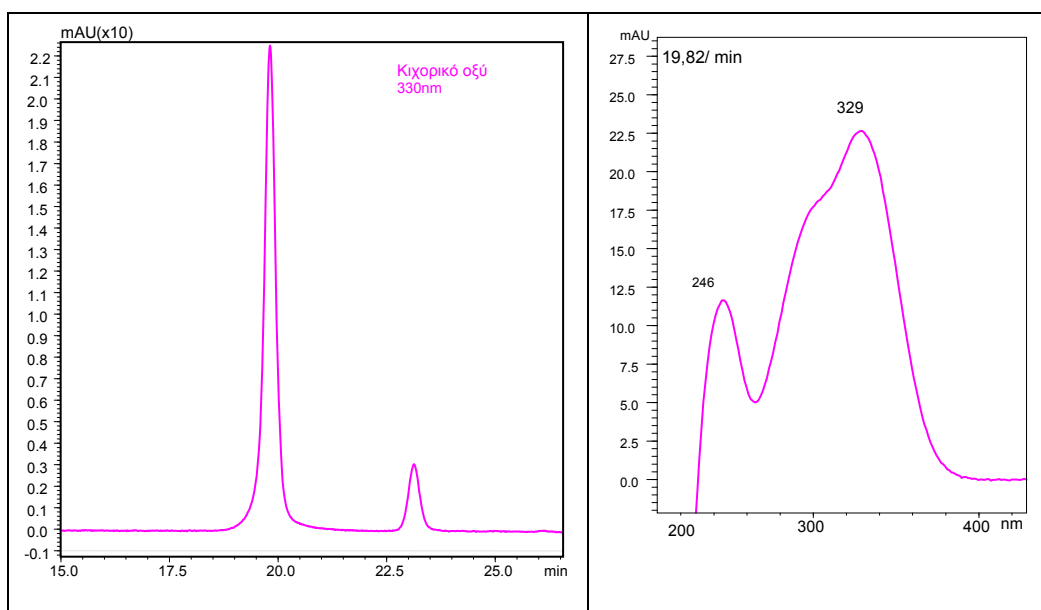
Σχήμα 26: Το HPLC χρωματογράφημα και το φάσμα UV-Vis του καφταρικού οξέος, όπως προκύπτουν από την ανάλυσή τους στο LC-MS.



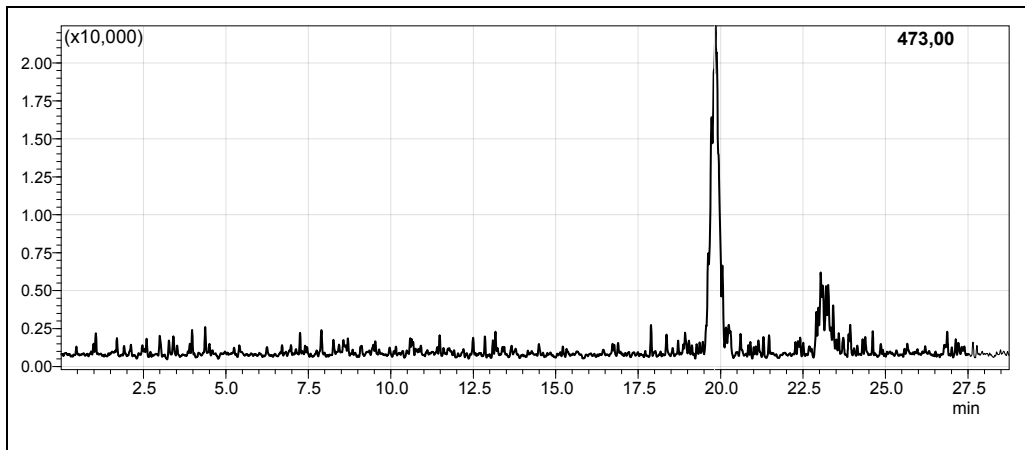
Σχήμα 27: Τα αποτελέσματα από το MS κατά τη σάρωση στην περιοχή 50-800 amu για $m/z=311$ για το καφταρικό οξύ.



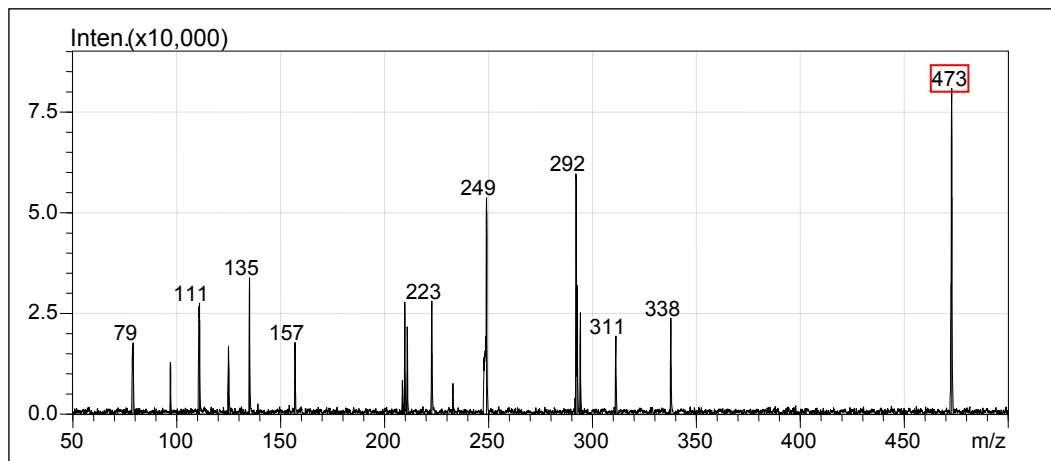
Σχήμα 28: Τα κυριότερα θραύσματα μάζας της κορυφής του καφταρικού οξέος με $[M-H]^- = 311$.



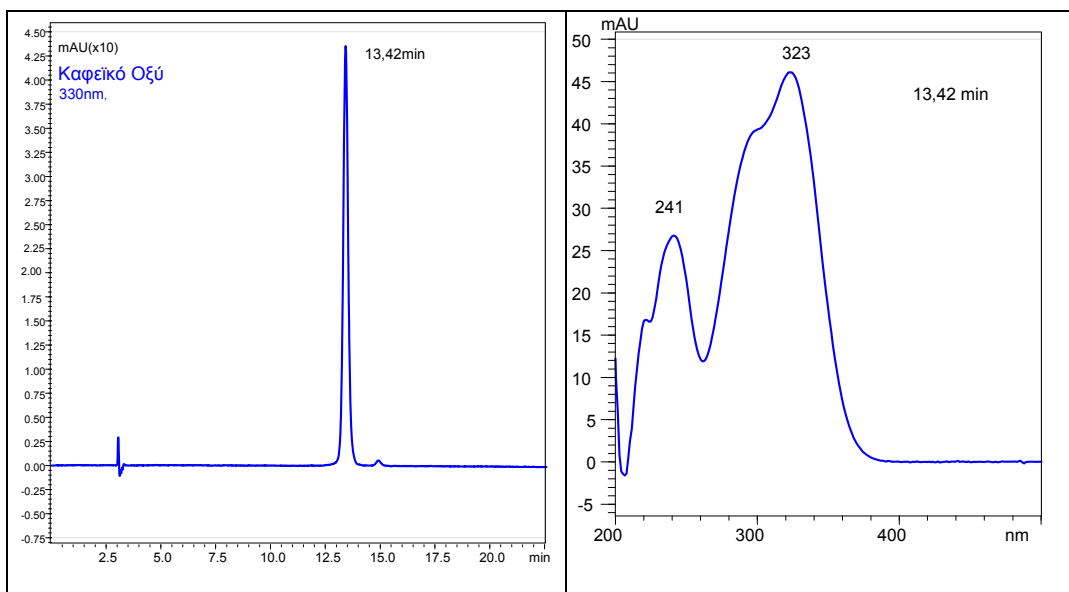
Σχήμα 29: Το HPLC χρωματογράφημα και το φάσμα UV-Vis του κιχορικού οξέος, όπως προκύπτουν από την ανάλυσή του στο LC-MS.



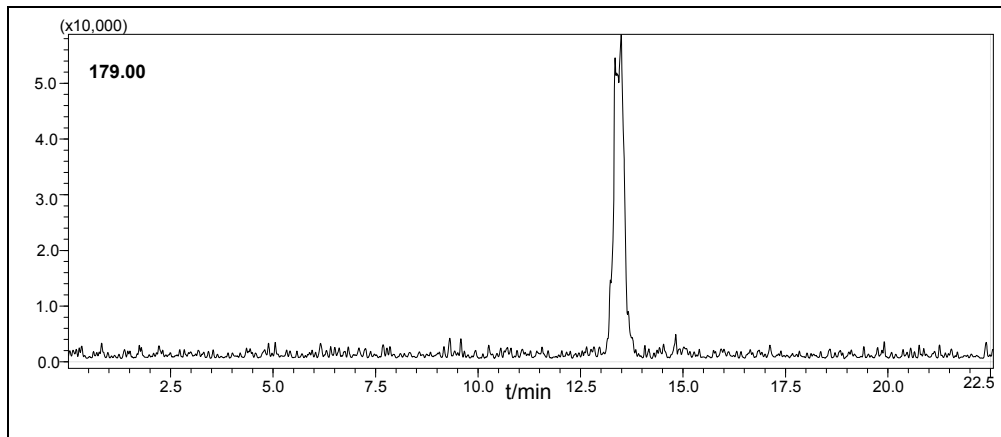
Σχήμα 30: Τα αποτελέσματα από το MS κατά τη σάρωση στην περιοχή 50-800 amu για $m/z=473$ για το κιχωρικό οξύ.



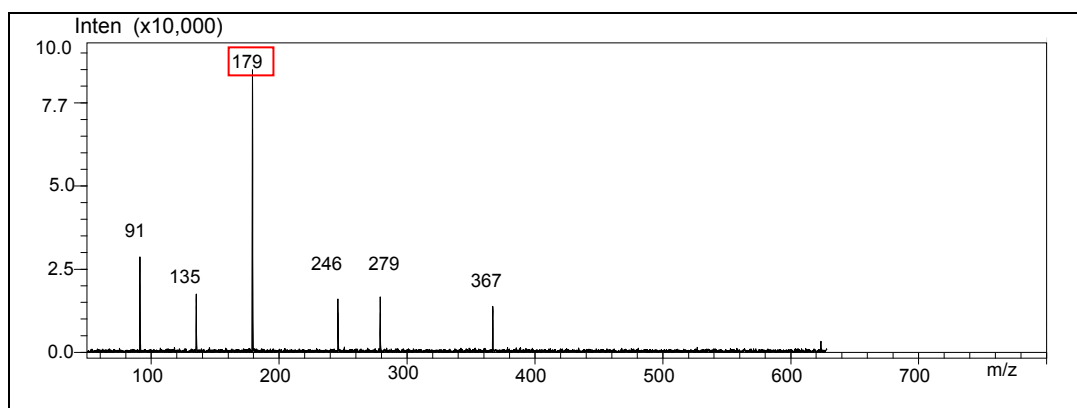
Σχήμα 31: Τα κυριότερα θραύσματα μάζας της κορυφής του κιχωρικού οξέος με $[M-H]^- = 473$.



Σχήμα 32: Το HPLC χρωματογράφημα και το φάσμα UV-Vis του καφεϊκού οξέος, όπως προκύπτουν από την ανάλυσή του στο LC-MS.



Σχήμα 33: Τα αποτελέσματα από το MS κατά τη σάρωση στην περιοχή 50-800 amu για $m/z=179$ για το καφεϊκό οξύ.

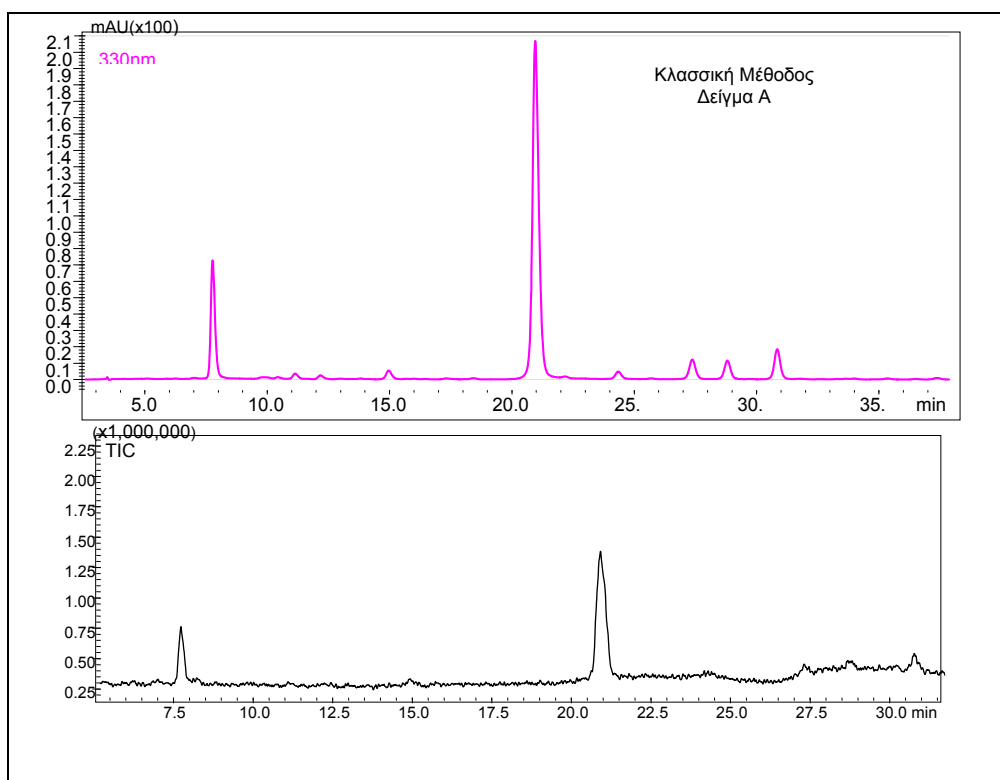


Σχήμα 34: Τα κυριότερα θραύσματα μάζας της κορυφής του καφεϊκού οξέος με $[M-H]^- = 179$.

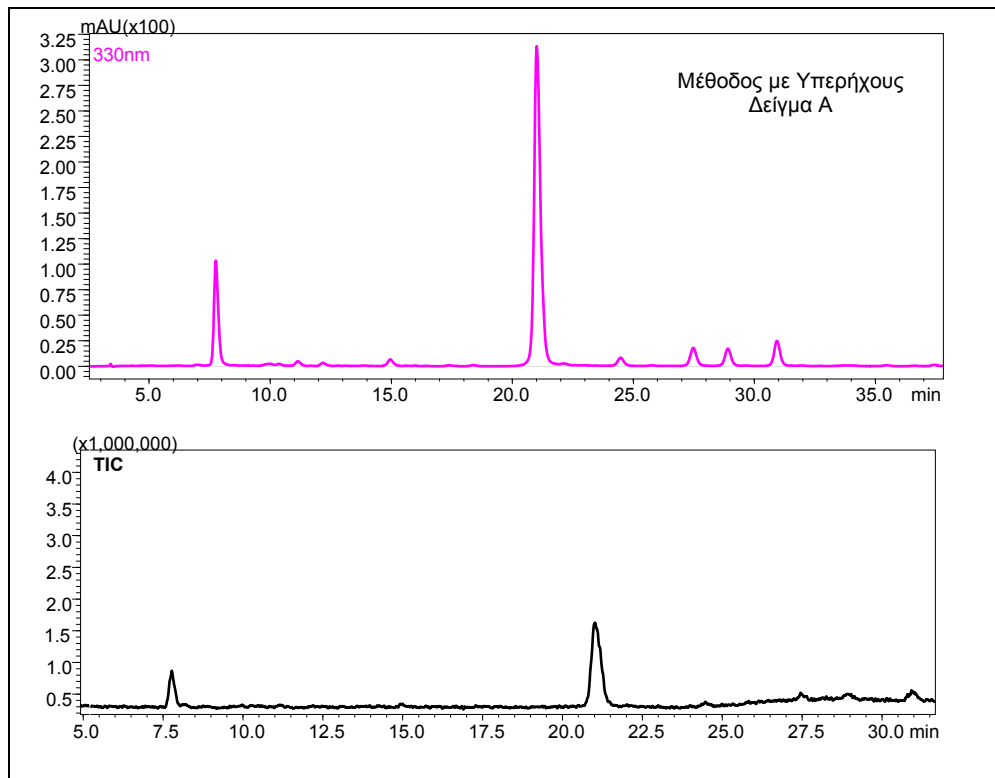
Συνοπτικά φαίνεται ότι η κορυφή του καφεϊκού οξέος με χρόνο συγκράτησης 13,42min αντιστοιχεί σε ιόν $m/z = 179$ όπως αναμένονταν για το μοριακό ιόν του καφεϊκού οξέος. Για το κιχωρικό οξύ στη συνέχεια η κορυφή του με χρόνο συγκράτησης 19,82min αντιστοιχεί σε ιόν $m/z = 473$, όπως αναμένονταν για το μοριακό του ιόν, ενώ τέλος για το καφεϊκό οξύ με χρόνο συγκράτησης 7,21min αντιστοιχεί σε ιόν $m/z = 311$ όπως αναμένονταν για το μοριακό ιόν του καφεϊκού οξέος. Επίσης τα φάσματα μάζας δίνουν και τα επιμέρους θραύσματα της κάθε πρότυπης ουσίας. Με όλες τις παραπάνω πληροφορίες αλλά και τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τις υπόλοιπες υπό διερεύνηση ουσίες (χλωρογενικό οξύ, κυναρίνη, εχινακοζίτη), έγινε προσπάθεια να ταυτοποιηθούν τα κύρια συστατικά των δειγμάτων που προέρχονται από ρίζες *Echinacea purpurea* καθώς και των δύο εμπορικών σκευασμάτων τα οποία αναλύθηκαν.

3.4.2. LC-MS εκχυλισμάτων από δείγματα ρίζας *Echinacea purpurea*

Μετά από τα πρότυπα αναλύθηκαν τα εκχυλίσματα των ριζών τα οποία προέρχονται από εκχύλιση είτε με την κλασσική μέθοδο, είτε με τη μέθοδο με υπερήχους. Ακολουθούν χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας, ενός δείγματος από κάθε μέθοδο (Σχ.35-36) καθώς και τα χαρακτηριστικά θραύσματα της κάθε κορυφής (Σχ.37,38).



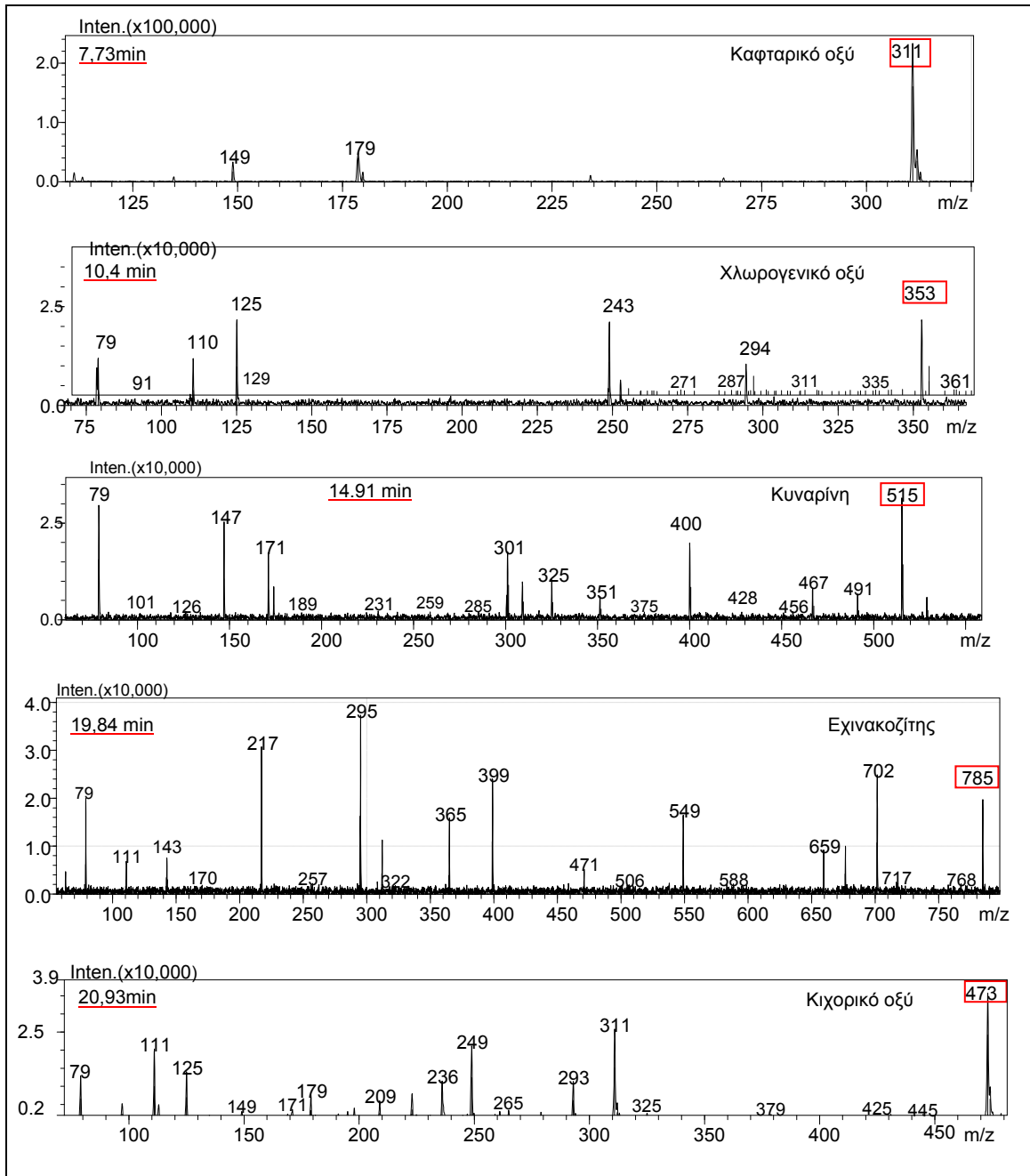
Σχήμα 35: Το HPLC χρωματογράφημα δείγματος ριζών *E. purpurea* το οποίο εκχυλίστηκε με την κλασσική μέθοδο και το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC), όπως προκύπτει από την ανάλυσή του στο LC-MS.



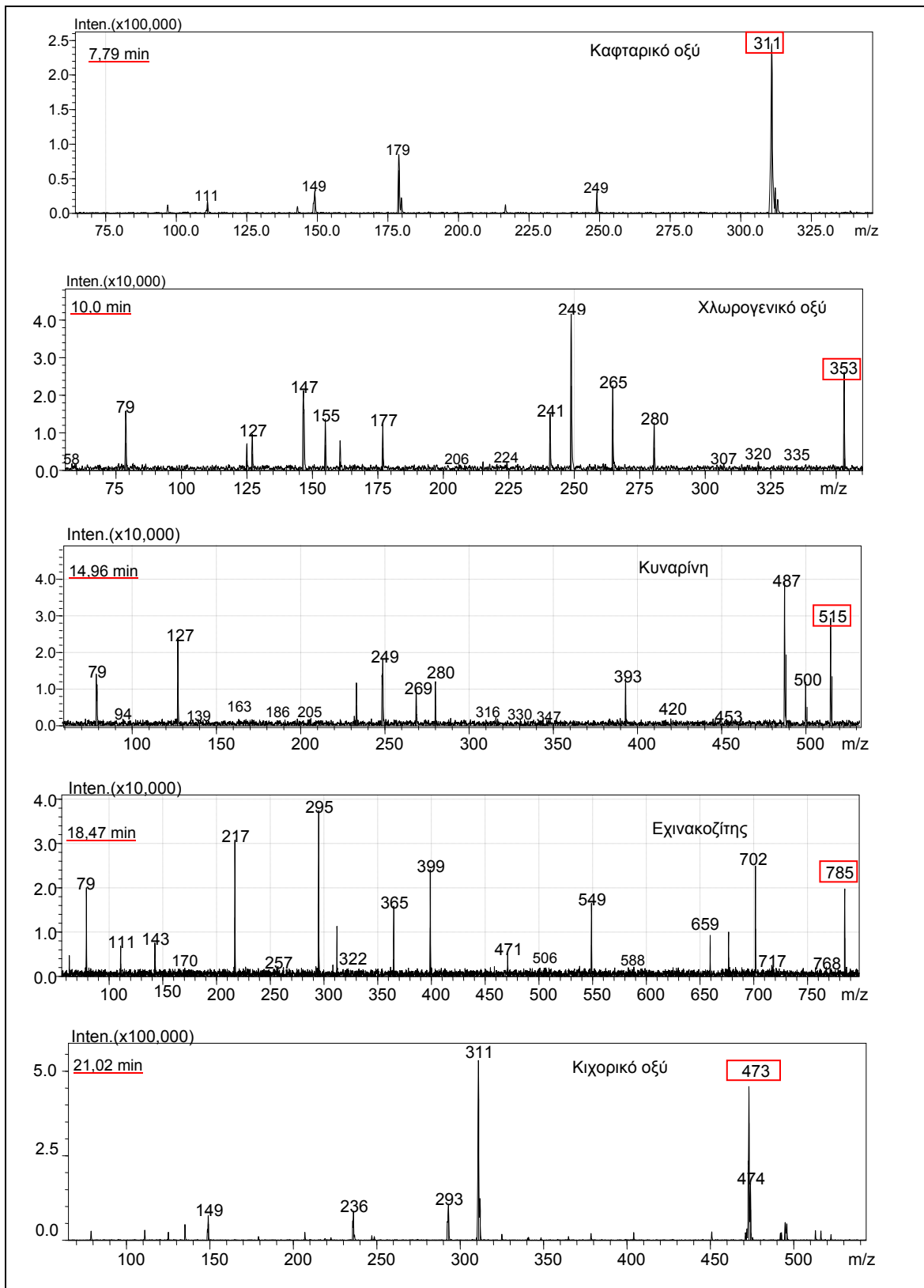
Σχήμα 36: Το HPLC χρωματογράφημα δείγματος ριζών *Echinacea purpurea* το οποίο εκχλιόστηκε με τη μέθοδο με υπερήχους και το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC), όπως προκύπτει από την ανάλυσή του στο LC-MS.

Τα χρωματογραφήματα των σχημάτων 35 και 36 έχουν την ίδια μορφή και εμφανίζουν τις ίδιες κορυφές με εκείνα των σχημάτων 19 και 20 όπως αναμενόταν. Το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC) όπως προκύπτει από την ανάλυση των δειγμάτων στο LC-MS δείχνει δύο κύριες κορυφές στα 7,70 και στα 21min και για τα δύο δείγματα, οι οποίες αντιστοιχούν στο καφταρικό οξύ και το κιχορικό οξύ (Luo *et.al.*, 2003, Pellati *et.al.*, 2005). Αυτό επιβεβαιώνεται και από την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $[M-H]^-$, τα οποία βρέθηκαν να είναι 311 για την κορυφή στα 7,70 min και 473 για την κορυφή στα 21min, ίδια με εκείνα των αναλυτικών προτύπων του καφταρικού και του κιχορικού οξέος (Σχ. 27, 30). Εκτός από τις δύο κύριες κορυφές των χρωματογραφημάτων, από τα φάσματα μάζας των δειγμάτων των ριζών ανιχνεύεται στα 10,4min μοριακό ιόν ίσο με 353, στα 14,9 min μοριακό ιόν ίσο με 515 και στα 19,8 min μοριακό ιόν ίσο με 785 (Σχ. 37), τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε δείγματα *Echinacea* αντιστοιχούν σε χλωρογενικό οξύ, κυναρίνη και εχινακοζίτη αντίστοιχα (Wang *et.al.*, 2009, Li *et.al.*, 2004, Facino *et.al.*, 1995). Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα με εκείνα του HPLC, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη καφταρικού οξέος, χλωρογενικού οξέος, κυναρίνης και κιχορικού οξέος, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καθόλου το μοριακό ιόν 179 που αντιστοιχεί στο καφεϊκό οξύ.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανίχνευση μοριακού ιόντος 785 που αντιστοιχεί στον εχινakoζίτη (Wang *et.al.*, 2009), μόριο για το οποίο το HPLC δεν είχε δώσει καμία ένδειξη ανίχνευσής του. Και στη βιβλιογραφία εξάλλου, άλλοι ερευνητές αναφέρουν την ανίχνευση του εχινakoζίτη σε πολύ χαμηλά επίπεδα στις ρίζες της *E. purpurea* (Binns *et.al.*, 2002, Perry *et.al.*, 2001), ενώ άλλοι ότι δεν ανιχνεύεται (Bergeron *et.al.*, 2000, Bauer *et.al.* 1988).



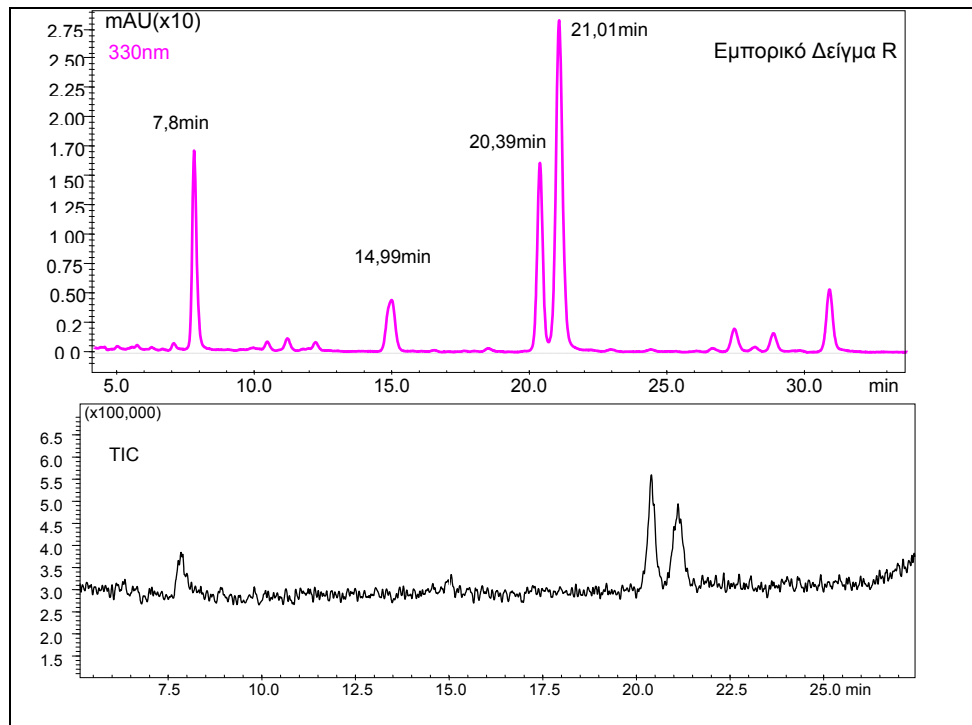
Σχήμα 37: Τα κυριότερα θραύσματα μάζας των κορυφών του εκχυλίσματος από την κλασσική μέθοδο εκχύλισης του σχήματος 35, με τη σειρά που εκλούνται από τη στήλη.



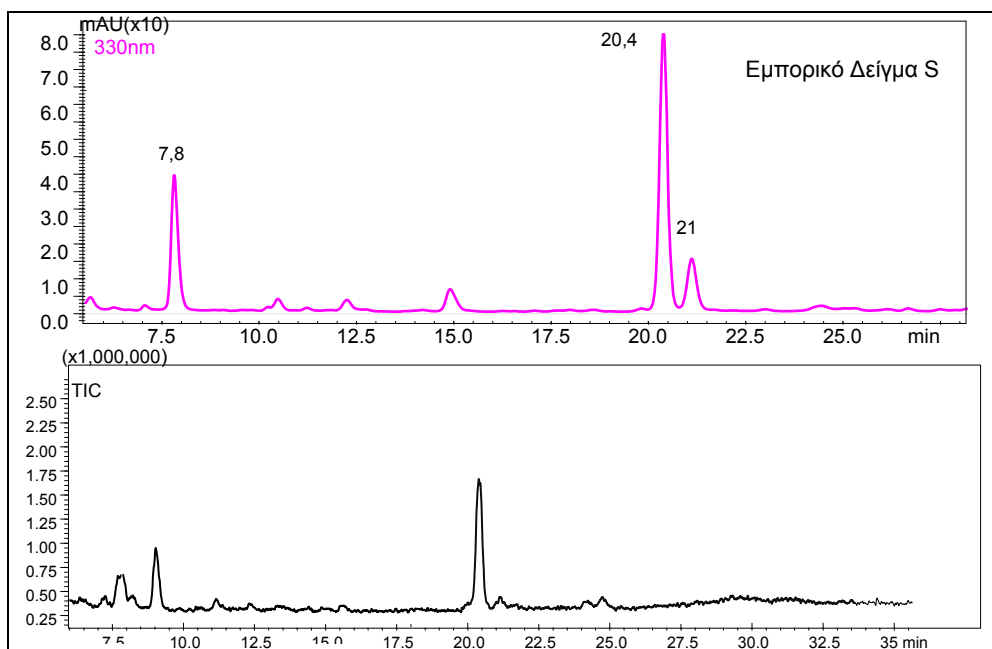
Σχήμα 38: Τα κυριότερα θραύσματα μάζας των κορυφών του εκχυλίσματος από τη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους του σχήματος 36, με τη σειρά που εκλοούνται από τη στήλη.

3.4.3. LC-MS των Εμπορικών Σκευασμάτων

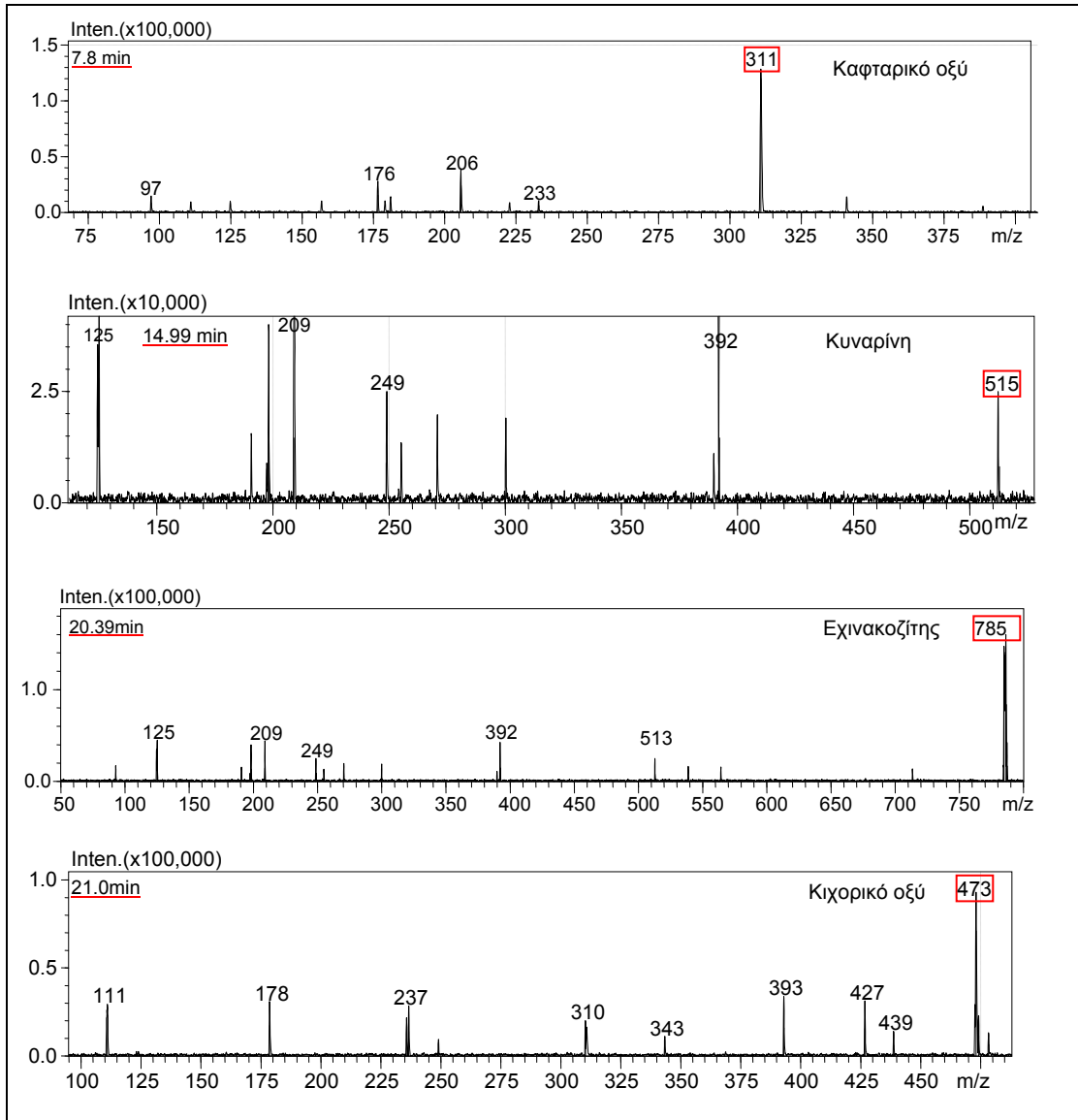
Στη συνέχεια και με τον ίδιο τρόπο, αναλύθηκαν δείγματα από τα δύο εμπορικά σκευάσματα R και S. Τα χρωματογραφήματά τους και τα φάσματα μάζας τους ακολουθούν στα Σχ.39-42.



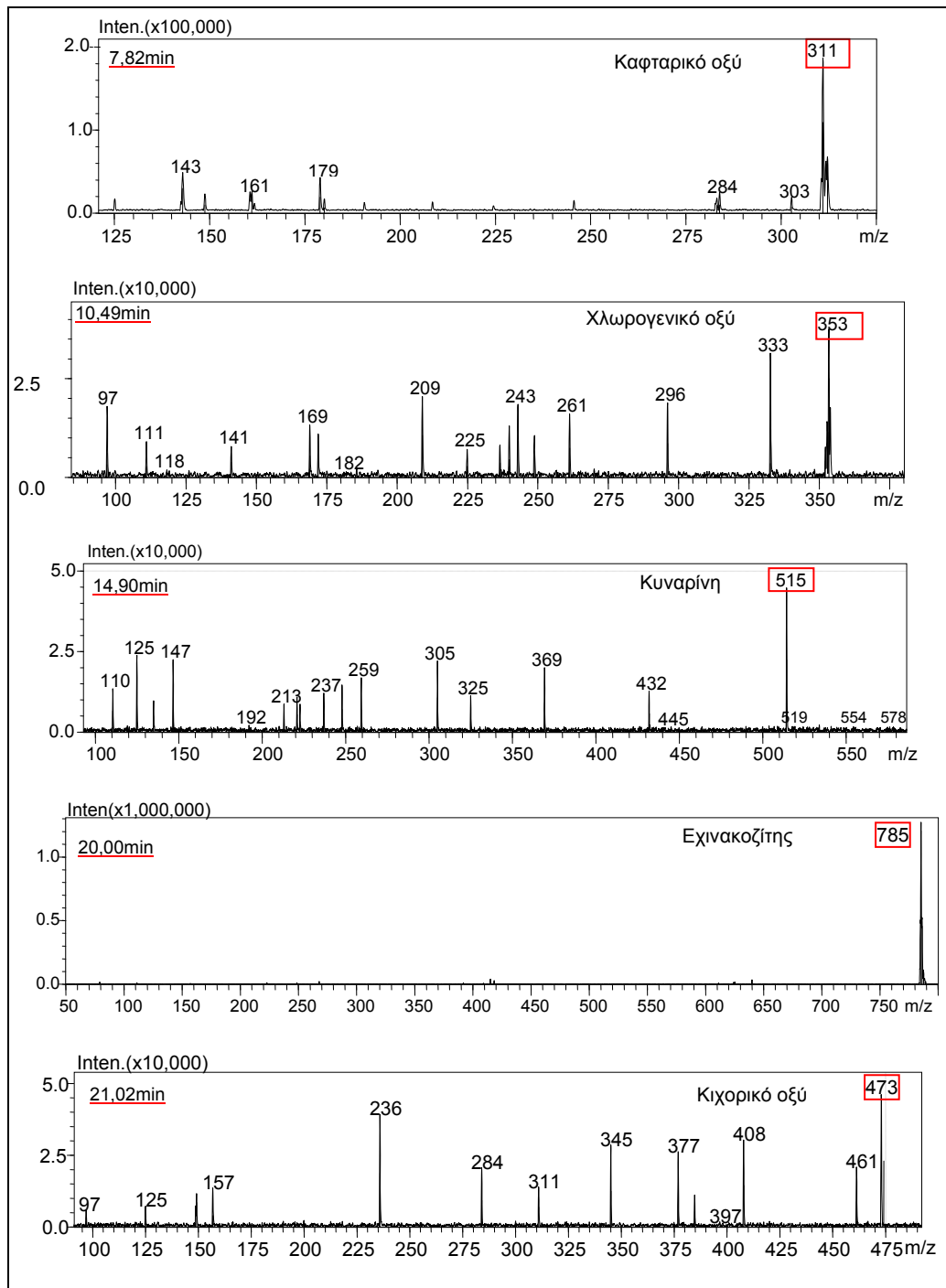
Σχήμα 39: Το HPLC χρωματογράφημα εμπορικού δείγματος R το οποίο εκχυλίστηκε με την κλασική μέθοδο και το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC), όπως προκύπτει από την ανάλυσή του στο LC-MS.



Σχήμα 40: Το HPLC χρωματογράφημα εμπορικού δείγματος S το οποίο εκχυλίστηκε με την κλασική μέθοδο και το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC), όπως προκύπτει από την ανάλυσή του στο LC-MS.



Σχήμα 41: Τα κυριότερα θραύσματα μάζας των κορυφών του εμπορικού δείγματος R του Σχήματος 39 με τη σειρά που εκλύονται από τη στήλη.



Σχήμα 42: Τα κυριότερα θραύσματα μάζας των κορυφών του εμπορικού δείγματος S του σχήματος 40 με τη σειρά που εκλούνται από τη στήλη.

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα των Σχημάτων 39 και 40 από το LC-MS με τα αντίστοιχα του Σχ. 23 από το HPLC, παρατηρείται μετατόπιση των κορυφών γεγονός που αποδίδεται στην αλλαγή του οξέος από TFA σε HCOOH. Το αποτέλεσμα είναι οι κορυφές στα 13 και 15min του Σχ. 23 για το δείγμα R να εμφανίζονται ως μία, στα 15 min στο Σχ. 39 και οι κορυφές που αποδόνται στον εχινakoζίτη και το κιχορικό οξύ να εκλούνται πολύ κοντά στα Σήματα 39 και 40.

Στα φάσματα με το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC) του Σχ. 39 ανιχνεύονται τρεις κύριες κορυφές στα 7,8 , 20,39 και 21min και μία μικρότερη στα 15min οι οποίες αντιστοιχούν σε m/z 311, 785, 473 και 515 (Σχ.41) και ταυτοποιούνται ως καφταρικό οξύ, εχινakoζίτης, κιχορικό οξύ και κυναρίνη.

Στα φάσματα με το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC) του Σχ. 40 ανιχνεύονται τέσσερις κύριες κορυφές στα 7,8 , 9, 20 και 21 min Η κορυφή στα 9 min δεν εμφανίζεται στο χρωματογράφημα του Σχ. 40 (μήκος κύματος 330nm) και το φάσμα της UV-Vis δε μοιάζει σε κάποιο από τα φαινολικά οξέα παράγωγα του καφεϊκού οξέος τα οποία περιέχονται σε δείγματα *E. purpurea* και είναι πιθανό να είναι κάποιο αλκυλαμίδιο.

Οι υπόλοιπες κορυφές αντιστοιχούν σε m/z 311, 785 και 473.(Σχ.42) και ταυτοποιούνται ως καφταρικό οξύ, εχινakoζίτης και κιχορικό οξύ. Επίσης στα 10,9min και στα 14,90min εμφανίζονται ιόντα με m/z 353 και 515 τα οποία αντιστοιχούν σε χλωρογενικό οξύ και κυναρίνη αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι στο χρωματογράφημα του Σχήματος. 40 αυτές οι κορυφές εμφανίζουν πολύ χαμηλό σήμα και τα φάσματα UV-Vis έχουν πολύ θόρυβο.

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι στο δείγμα R, το οποίο αντιστοιχεί σε εμπορικό σκεύασμα μίγματος *E. angustifolia* και *E. purpurea* ανιχνεύτηκαν καφταρικό και κιχορικό οξύ, εχινakoζίτης και κυναρίνη, ενώ δεν ανιχνεύθηκε χλωρογενικό οξύ. Στο δείγμα S το οποίο αντιστοιχεί σε σκεύασμα *E. pallida* ανιχνεύτηκαν καφταρικό, κιχορικό οξύ και εχινakoζίτης, ενώ υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι περιέχει χλωρογενικό οξύ και κυναρίνη. Σε κανένα από τα δύο δείγματα δεν ανιχνεύθηκε καφεϊκό οξύ.

3.5. Ποσοτικοί προσδιορισμοί

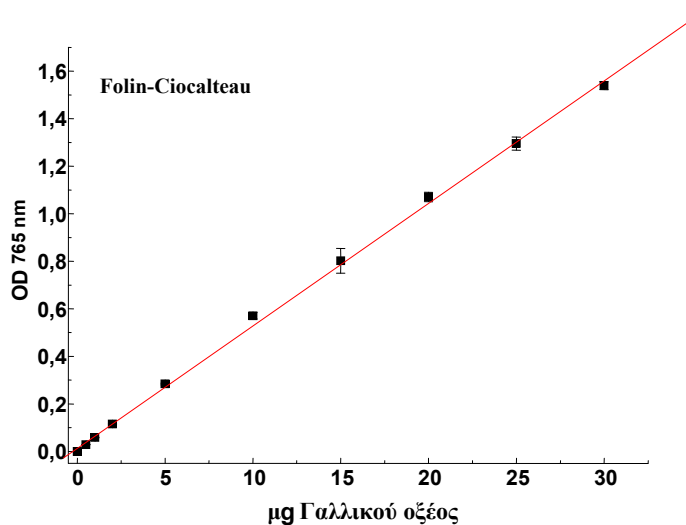
3.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

3.5.1.1. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με γαλλικό οξύ

Τα ολικά φαινολικά συστατικά των υπό ανάλυση δειγμάτων έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu. Για την εφαρμογή της κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με χρήση γαλλικού οξέος ως πρότυπο. Η καμπύλη κατασκευάστηκε με τη χρήση εννέα (9) πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος, με εύρος συγκεντρώσεων από 0,25μg/mL έως 30μg/mL. Η εξίσωση της καμπύλης είναι : $Απορρόφηση = 0,01671 + 0,049 \times Ποσότητα \text{ (}\mu\text{g)}$, με $R^2=0,99$. Η σχηματική της αναπαράσταση ακολουθεί στο Σήμα. 43.

Πίνακας 5: Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με χρήση γαλλικού οξέος και τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

μg	OD1	OD2	OD3	meanOD	SD error
0	0	0	0	0	0
0,5	0,028	0,029	0,028	0,02833	5,7735E-4
1	0,058	0,058	0,061	0,059	0,00173
2	0,114	0,116	0,116	0,11533	0,00115
5	0,28	0,285	0,287	0,284	0,00361
10	0,564	0,587	0,562	0,571	0,01389
15	0,743	0,839	0,825	0,80233	0,05186
20	1,048	1,085	1,079	1,07067	0,01986
25	1,269	1,325	1,292	1,29533	0,02815
30	1,525	1,558	1,535	1,53933	0,01692



Σχήμα 43: Πρότυπη καμπύλη με γαλλικό οξύ για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών οξέων στα δείγματα της *Echinacea purpurea* με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

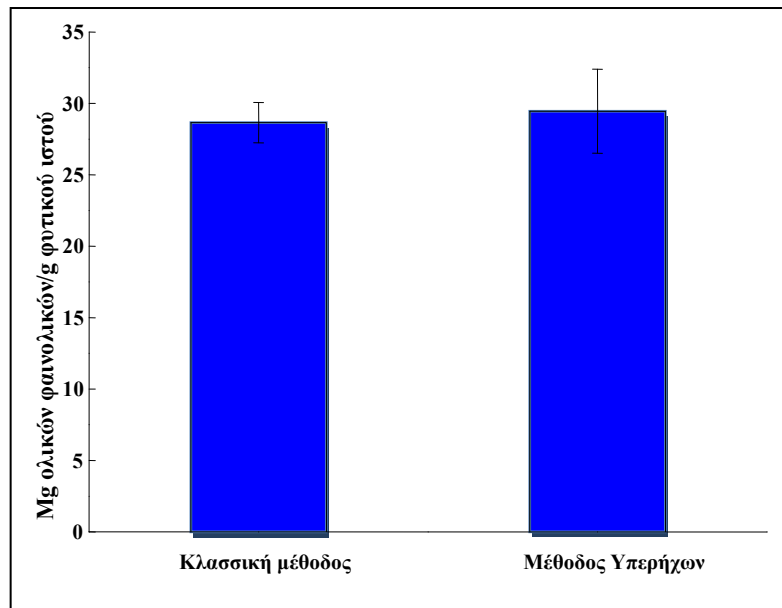
3.5.1.2. Προσδιορισμός φαινολικών στα εκχυλίσματα ριζών. Σύγκριση των δύο μεθόδων εκχύλισης

Στη συνέχεια συγκρίθηκαν οι δύο μέθοδοι εκχύλισης ως προς την απόδοσή τους σε φαινολικά συστατικά. Ζυγίστηκαν 0.5 g φυτικού υλικού (n=3) και εκχυλίστηκαν και με τις δύο μεθόδους. Έγιναν τέσσερις εκχυλίσεις σε κάθε δείγμα όπως επιλέχθηκε παραπάνω. Τα εκχυλίσματα συλλέχθηκαν, συμπληρώθηκαν έως τα 40mL με MeOH:νερό 70:30 και ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών σε δείγματα ρίζας *E. purpurea* με την κλασσική μέθοδο εκχύλισης και με τη μέθοδο με χρήση υπερήχων εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Δείγμα	Κλασσική μέθοδος (mg/g φυτικού ιστού)	Μέθοδος με υπερήχους (mg/g φυτικού ιστού)
1	29.91	32.62
2	28.84	28.88
3	27.13	26.86
Σύνολο	28.65 ± 1.42	29.45±2.94

Οι δύο μέθοδοι κρίνονται ισοδύναμες σε απόδοση γιατί συγκρίνοντας τις μέσες τιμές των δειγμάτων ανά μέθοδο (student t-test), προκύπτει ότι αυτές στατιστικά δε διαφέρουν σε επίπεδο σημαντικότητας 95% (Σχ.44).



Σχήμα 44: Σύγκριση της μέσης τιμής για τα φαινολικά συστατικά που παραλαμβάνονται με την κλασσική μέθοδο εκχύλισης και με τη μέθοδο με χρήση υπερήχων.

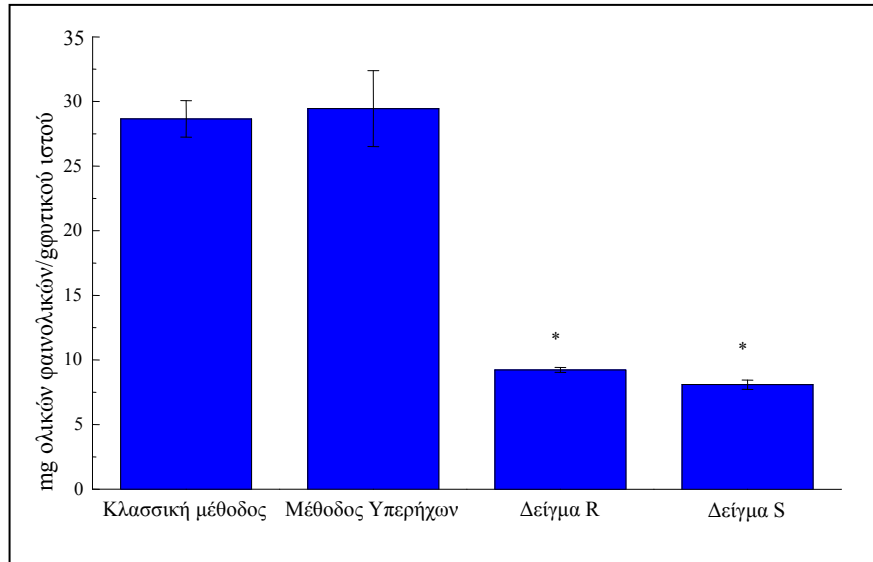
3.5.1.3. Ποσοτική σύγκριση των εργαστηριακών εκχυλισμάτων με τα εμπορικά σκευάσματα ως προς το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Προκειμένου να συγκριθούν ποσοτικά ως προς το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά οξέα τα εργαστηριακά εκχυλίσματα με τα εμπορικά σκευάσματα τα οποία ως γνωστόν είναι εκχυλίσματα σε 50% αιθανόλη, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός και στα δείγματα R και S, λαμβάνοντας υπόψη τις οδηγίες των κατασκευαστών για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς. Τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν με την κλασσική μέθοδο εκχύλισης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα εμπορικά δείγματα R και S με την κλασσική μέθοδο εκχύλισης εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Δείγμα	R (mg/g φυτικού ιστού)	S (mg/g φυτικού ιστού)
1	9,10	8,03
2	9,50	8,48
3	9,104	7,76
MT±SD	9,23 ± 0,195	8,09±0,36

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 6 και του Πίνακα 7 φαίνεται ότι τα εμπορικά δείγματα περιέχουν ανά g αποξηραμένου φυτικού ιστού πολύ μικρότερη ποσότητα ολικών φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα εργαστηριακά εκχυλίσματα (Σχ. 45).



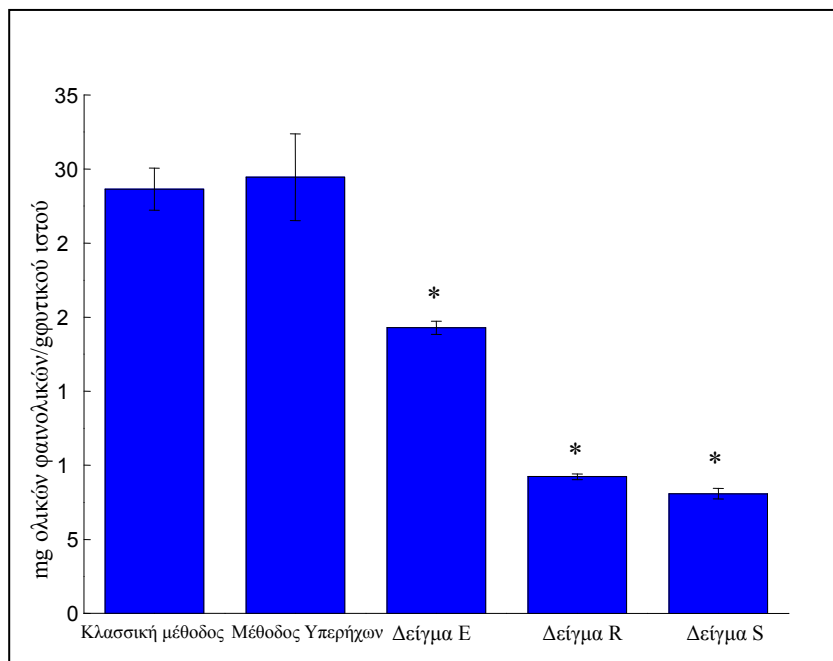
Σχήμα 45: Ποσοτική σύγκριση των φαινολικών συστατικών που παραλαμβάνονται στα εργαστηριακά εκχυλίσματα και στα εμπορικά δείγματα.

Η μικρή ποσότητα ολικών φαινολικών μπορεί να οφείλεται είτε στο ότι τα εμπορικά σκευάσματα είναι αιθανολικά εκχυλίσματα και ίσως η εκχύλιση σε αιθανολικά διαλύματα να μην έχει τόσο καλή απόδοση σε φαινολικά σε σχέση με τη μεθανόλη, είτε σε κάποιο άλλο παράγοντα όπως η μακρόχρονη αποθήκευση που μπορεί να έχει οδηγήσει σε πιθανή οξείδωση των συστατικών των δειγμάτων (Nüsslein et al., 2000).

Προκειμένου να εξεταστεί κατά πόσο το μέσο εκχύλισης παίζει ρόλο στην εκχυλιστική ικανότητα σε ολικά φαινολικά, 0.5g ριζών *E. purpurea* (n=2) εκχυλίστηκαν με την κλασική μέθοδο (4 εκχυλίσεις) με σύστημα αιθανόλη:νερό 50:50. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8 και συνολική συγκριτική εικόνα δίνεται στο Σχήμα 46.

Πίνακας 8: Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών σε δείγμα ριζών *Echinacea purpurea* με την κλασική μέθοδο εκχύλισης και εκχυλιστικό μέσο αιθανόλη:νερό50:50 (δείγμα E), εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Δείγμα	E (mg/g φυτικού ιστού)
1	19,6
2	18,96
MT±SD	19,28 ± 0,45



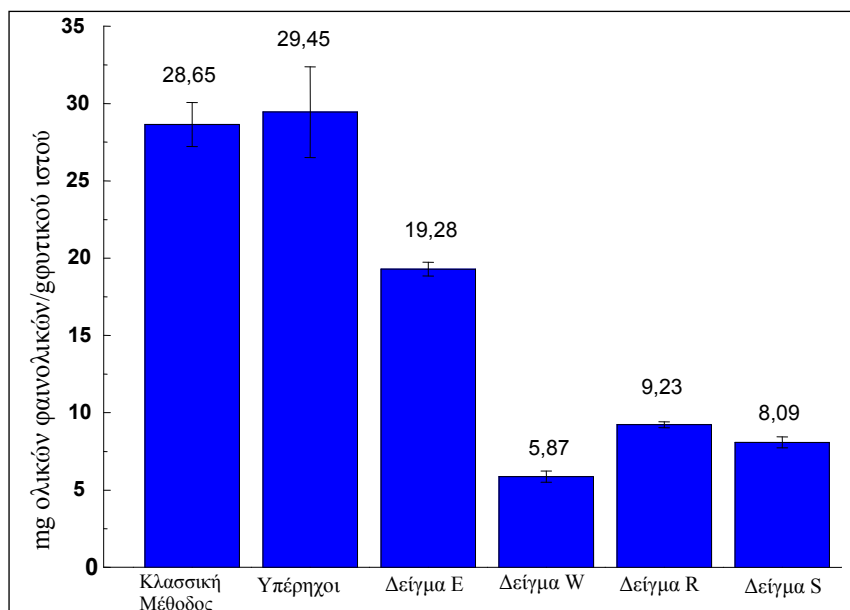
Σχήμα 46: Ποσοτική σύγκριση των ολικών φαινολικών συστατικών στα διάφορα δείγματα που εξετάστηκαν, εκφρασμένα ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος/mg φυτικού ιστού.

Είναι ξεκάθαρο ότι η αιθανόλη σαν εκχυλιστικό σύστημα μπορεί να μην έχει τόσο καλή απόδοση όσο το σύστημα MeOH:νερό, αλλά δεν είναι ο παράγοντας στον οποίο οφείλεται το χαμηλό ποσό συνολικών ολικών συστατικών στα εμπορικά δείγματα, μιας και εμφανίζεται χαμηλότερο και από αυτό που αναμένεται βάση της σύστασής τους από τη βιβλιογραφία. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στον τρόπο με τον οποίο οι βιομηχανίες παρασκευάζουν τα εκχυλίσματά τους. Συνήθως οι εκχυλίσεις γίνονται σε μεγάλες δεξαμενές με ζεστό νερό που αφενός συνεπάγεται απενεργοποίηση των PPOs, αφετέρου όμως δεν επιτυγχάνεται μέγιστη εκχυλιστική απόδοση. Στη συνέχεια στα εκχυλίσματα προστίθεται αιθανόλη έως τελικού όγκου 17-22% ώστε να συντηρηθούν από την ανάπτυξη μικροοργανισμών

και να διαυγασθούν από μικροσωματίδια και πολυσακχαρίτες. Εξαρχής τα εμπορικά σκευάσματα δεν αντικατοπτρίζουν την πραγματική σύσταση σε φαινολικά συστατικά του φυτού από το οποίο προέρχονται. Για να διερευνηθεί αυτή τη υπόθεση, δείγμα ριζών το οποίο είχε πλυθεί με νερό για 10 περίπου min, ξηράθηκε εκ νέου, αλέστηκε σε οικιακό μύλο και εκχυλίστηκε όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο “Μέθοδοι και Υλικά”, με την κλασική μέθοδο. Στο εκχύλισμα που προέκυψε (**W**), έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Πίνακας 9) αλλά και ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC, και τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται στο παράρτημα. Παρατηρείται όντως πολύ μεγάλη ελάττωση στην ποσότητα των ολικών φαινολικών όταν τα δείγματα έχουν ξεπλυθεί με νερό. Τα συνολικά αποτελέσματα με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu φαίνονται στο Σχ. 47.

Πίνακας 9: Ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών σε δείγμα ριζών *E. Purpurea* το με την κλασική μέθοδο εκχύλισης οποίο είχε προηγούμενα ξεπλυθεί με νερό (δείγμα W), εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Δείγμα	W (mg/g φυτικού ιστού)
1	6,13
2	5,6
MT±SD	5,87 ± 0,37



Σχήμα 47: Ποσοτική σύγκριση των ολικών φαινολικών συστατικών όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν, εκφρασμένα ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος/mgφυτικού ιστού.

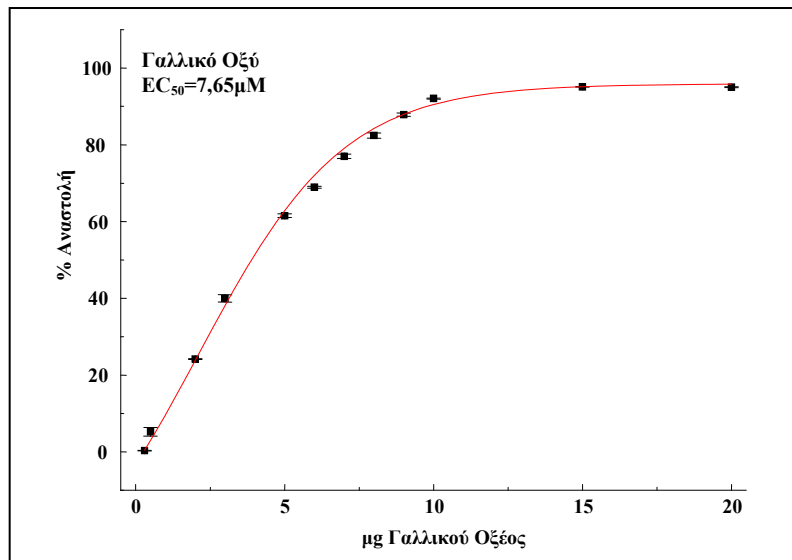
Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι η κλασσική μέθοδος εκχύλισης είναι ισοδύναμη με τη μέθοδο εκχύλισης με χρήση υπερήχων ως προς την απόδοση σε ολικά φαινολικά συστατικά, ενώ η εκχύλιση με 50% αιθανόλη έχει σημαντικά χαμηλότερη απόδοση (30%). Ρίζες που πλένονται με νερό χάνουν κατά 80% τα φαινολικά συστατικά τους. Επίσης τα εμπορικά δείγματα έχουν πολύ μικρότερο περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά σε σύγκριση με τα εργαστηριακά εκχυλίσματα.

3.5.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH

Αρχικά κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με μέτρηση της απορρόφησης διαλύματος DPPH με διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος (Σχ. 48). Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν από 0,3 έως 20 μg γαλλικού οξέος/3mL (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη ρίζα DPPH, του γαλλικού οξέος.

μg Γαλλικού	% Αναστολή	SD
0,3	0,31	0,076
0,5	5,21	1,16
2	24,18	0,10
3	39,97	0,95
5	61,53	0,49
6	68,93	0,23
7	77	0,57
8	82,42	0,70
9	87,85	0,42
10	92,05	0,11
15	95,1	0,058
20	95	0,11



Σχήμα 48: Πρότυπη καμπύλη DPPH με γαλλικό οξύ για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων της *Echinacea purpurea*.

Από την παραπάνω καμπύλη υπολογίζεται το EC₅₀ του γαλλικού οξέος ίσο με 3,89μg ή 7,65μM.

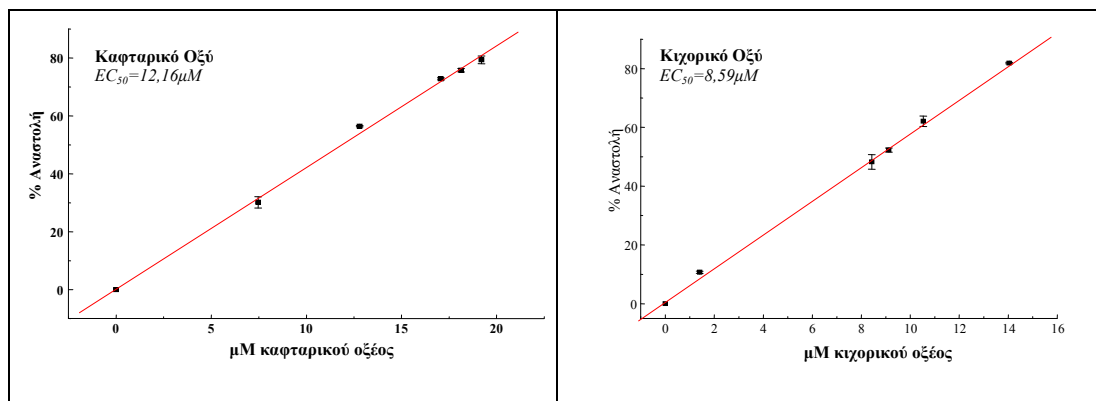
Ακολούθησε στη συνέχεια προσδιορισμός του EC₅₀ για το πρότυπο καφταρικό και κιχορικό οξύ, για τα εργαστηριακά εκχυλίσματα που προκύπτουν από εκχύλιση με την κλασική μέθοδο, τη μέθοδο με υπερήχους και για εκχύλιση με 50% αιθανόλη, καθώς και για τα εμπορικά σκευάσματα. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε τρία δείγματα και κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 11 και στη συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικές καμπύλες αναστολής (Σχ.49-52).

Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος, όπως προκύπτουν από τις μετρήσεις που είχαν ήδη γίνει με τη μέθοδο *Folin-Ciocalteu*, θεωρώντας ότι ο συντελεστής συσχέτισης ανάμεσα στη μέθοδο στη *Folin-Ciocalteu* και του DPPH είναι περίπου ίσος με τη μονάδα.

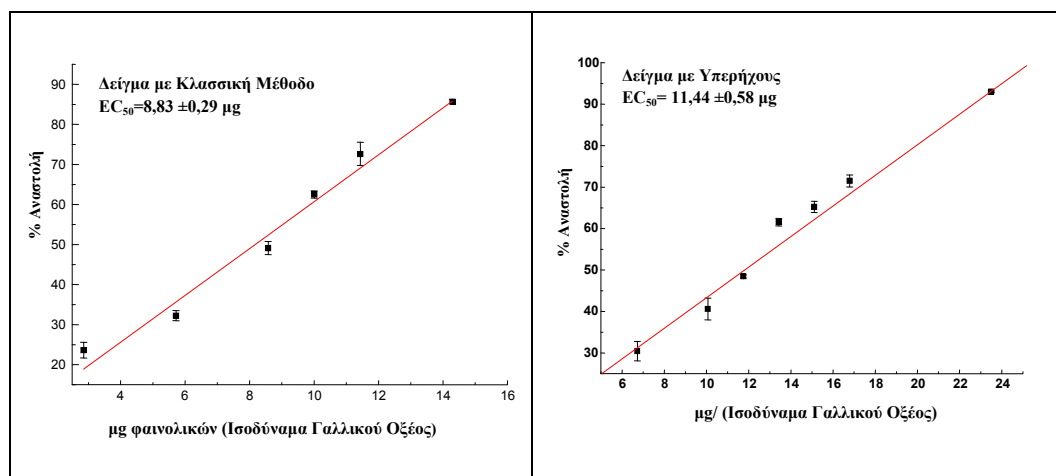
Πίνακας 11: Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, όπως προκύπτουν από τη μέθοδο *Folin-Ciocalteu* για τα εκχυλίσματα.

Δείγμα	Εξισώσεις	EC ₅₀
Γαλλικό Οξύ		7,65μM ή 3,89μg ή 1,3ppm
Καφταρικό Οξύ	$y = 4,2038x + 0,0983$ $R^2 = 0,998$	12,16 μM (11,39μg/3mL) ή 3,8 ppm

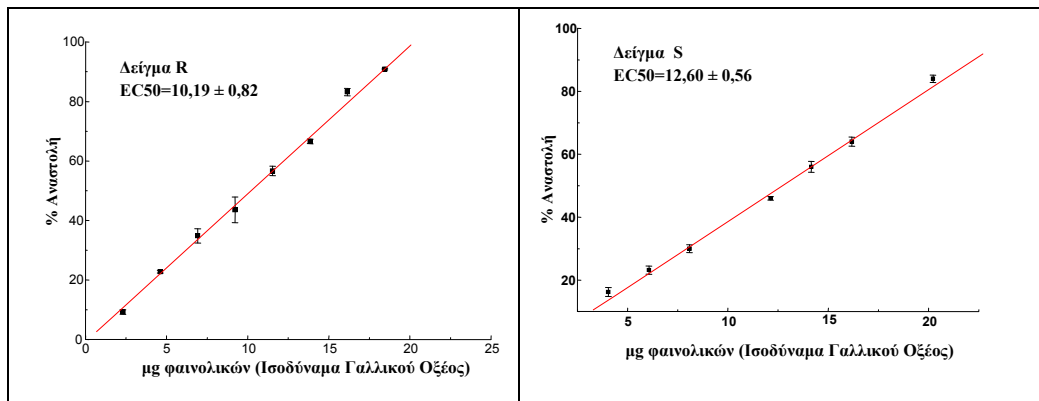
Κιχορικό	$y = 5,7285x + 0,9743$ $R^2 = 0,999$	8,59 μM (12,22 $\mu\text{g}/3\text{mL}$) ή 4,073ppm
Δείγμα C	$y = 2,5841x - 5,8839$ $R^2 = 0,998$	$8,61 \pm 0,74\mu\text{g}$ (33,83 μL) 2,87 \pm 0,25 ppm
Δείγμα US	$y = 4,744x - 2,11$ $R^2 = 0,997$	$11,436 \pm 0,58\mu\text{g}$ (31,10 μL) 3,81 \pm 0,19ppm
Δείγμα E	$y = 1,2467x + 1,4808$ $R^2 = 0,997$	$10,98 \pm 0,87\mu\text{g}$ (43,36 μL) 3,66 \pm 0,29ppm
Δείγμα R	$y = 5,068x - 1,6532$ $R^2 = 0,998$	$10,19 \pm 0,82\mu\text{g}$ (22,08 μL) 3,40 \pm 0,41 ppm
Δείγμα S	$y = 4,1686x - 2,543$ $R^2 = 0,9964$	$12,60 \pm 0,56\mu\text{g}$ (31,15 L) 4,20 \pm 0,19 ppm



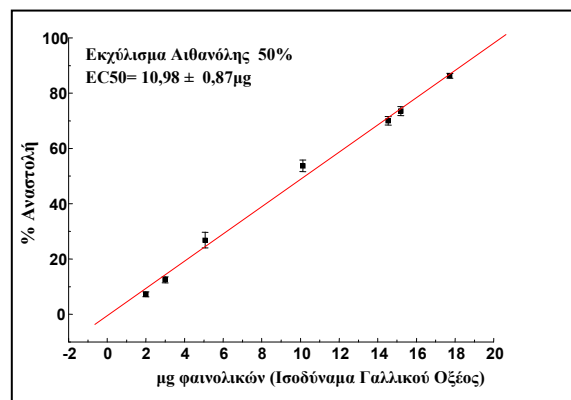
Σχήμα 49: Πρότυπη καμπύλη DPPH με κιχορικό και καφταρικό οξύ για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων της *E. purpurea*



Σχήμα 50: Καμπύλη αναστολής DPPH του εκχυλίσματος των ριζών της *E. purpurea* με την Κλασσική Μέθοδο και με τη Μέθοδο με τους Υπερήχους.



Σχήμα 51: Καμπύλη αναστολής DPPH με τα εμπορικά δείγματα *Echinacea purpurea* R και S.



Σχήμα 52: Καμπύλη αναστολής DPPH του εκχυλίσματος των ριζών της *E. purpurea* με 50% αιθανόλη.

Όλα τα δείγματα φαίνονται να έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα συγκρινόμενα με τα πρότυπα που αναλύθηκαν αλλά και με άλλα συνθετικά ή φυσικά που αναφέρονται συνήθως στη βιβλιογραφία, όπως το BHT, το ασκορβικό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ (Tepe *et.al.*, 2004, Sökmén *et.al.*, 2004).

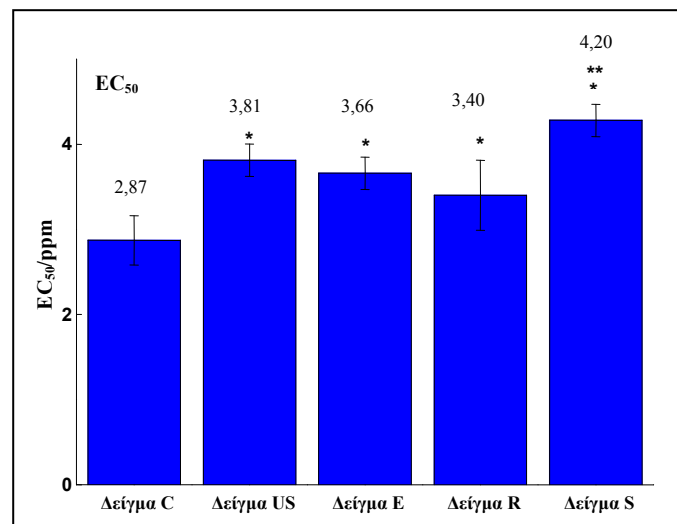
Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 11 φαίνεται ότι δείγματα που εκχυλίστηκαν με υπέρηχους εμφανίζουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από εκείνα που εκχυλίστηκαν με την κλασσική μέθοδο. Παρόλο που οι μέσες τιμές τους δε διαφέρουν στατιστικά (επίπεδο 0,95), στον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, τα αποτελέσματα για την αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν αντίστροφα (Πίνακας 3).

Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζει το δείγμα που εκχυλίστηκε με την κλασσική μέθοδο ενώ μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζει το εμπορικό σκεύασμα S. Όλα τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (συμβολισμός με *) ως προς το εκχύλισμα από την

κλασσική μέθοδο. Το δείγμα S διαφέρει σημαντικά ως προς την αντιοξειδωτική του ικανότητα ακόμη και σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα (**).

Το δείγμα που εκχυλίστηκε με αιθανόλη 50% ενώ είχε στατιστικά σημαντικά λιγότερα ολικά φαινολικά συστατικά από το δείγμα που εκχυλίστηκε με υπέρηχους σε μεθανόλη 70% (Σχ. 52), φαίνεται να έχει ίδιας τάξης αντιοξειδωτική ικανότητα με αυτό. Το ίδιο ισχύει και για το εμπορικό σκεύασμα R. Φαίνεται από τα παραπάνω ότι τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας δε συμπίπτουν με αυτά του Folin-Ciocalteu. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη αναγωγικών σακχάρων στα δείγματα τα οποία δίνουν θετική αντίδραση με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

Τα παραπάνω συμπεράσματα αποτυπώνονται γραφικά στο Σχ.52.



Σχήμα 53:Γραφική απεικόνιση των τιμών EC₅₀ για τα δείγματα που αναλύθηκαν όπως αναφέρονται στον Πίνακα 10.

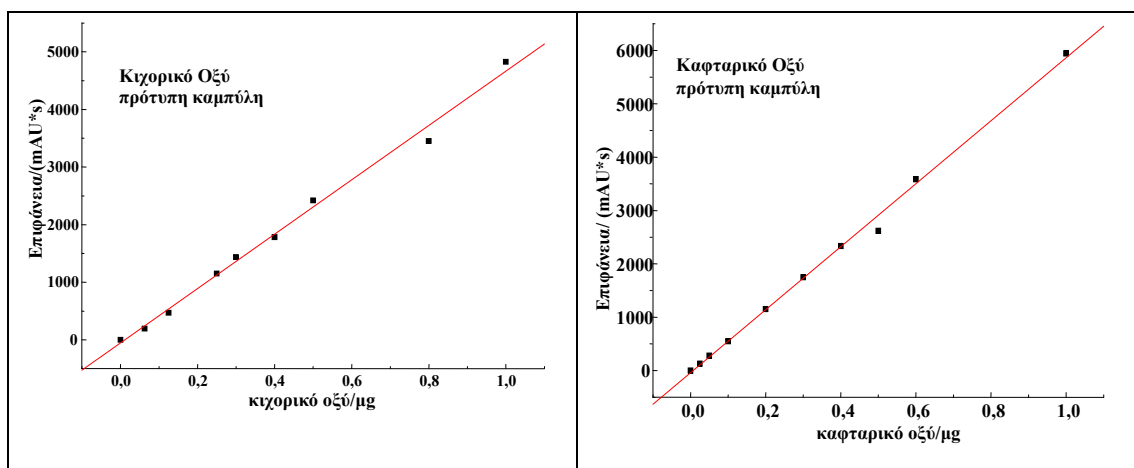
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τον υπολογισμό των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συγκρίθηκαν και με τα αποτελέσματα από τον ποσοτικό προσδιορισμό με το HPLC για το καφταρικό και το κιχορικό οξύ, όπως αναφέρεται παρακάτω.

3.5.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών με χρωματογραφία HPLC

3.5.3.1. Κατασκευή πρότυπων καμπυλών καφταρικού και κιχορικού οξέος

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του καφταρικού και του κιχορικού οξέος οξέος πραγματοποιήθηκαν ενέσεις πρότυπων διαλυμάτων σε συγκεντρώσεις 1,25 έως

και 50 ppm. Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων, δημιουργούνται πρότυπες καμπύλες αναφοράς (Σχ. 54) στη οποία παρουσιάζονται οι ποσότητες σε μg των πρότυπων διαλυμάτων του καφταρικού και του κιχορικού οξέος και της επιφάνειας των κορυφών των χρωματογραφημάτων τους ($\text{mAU}\cdot\text{s}$). Από τις εξισώσεις που προκύπτουν υπολογίζονται οι ποσότητες του καφταρικού και του κιχορικού οξέος σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.



Σχήμα 54: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για το κιχορικό και το καφταρικό οξύ.

Οι εξισώσεις των ευθειών που προκύπτουν είναι για το μεν

$$\text{καφταρικό: } y = 5971,8x - 28,774$$

$$\text{με } SD = 156,73 \text{ και } R^2 = 0,999,$$

ενώ για το

$$\text{κιχορικό: } y = 4896,5x - 78,821$$

$$\text{με } SD = 1444,23 \text{ και } R^2 = 0,9985.$$

3.5.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών με χρωματογραφία RP-HPLC

Για τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με την κλασική μέθοδο (CA, CB και CF), όπου αντιπροσωπευτικό τους χρωματογράφημα φαίνεται στο Σχ.19 προκύπτουν από τις ολοκληρώσεις των κορυφών τα παρακάτω αποτελέσματα που φαίνονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Τα αποτελέσματα της ολοκλήρωσης από το HPLC των κορυφών του καφταρικού και του κιχορικού οξέος στα δείγματα από εκχύλιση με την κλασσική μέθοδο και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός από τις πρότυπες καμπύλες.

Κλασσική Μέθοδος Εκχύλισης				
	Επιφάνεια/mAU*s		μg/4μL	mg / g αποξ. ρίζας
Δείγμα Α	καφταρικό	979	0,169	3,38
	κιχορικό	4236	0,88	17,6
Δείγμα Β	καφταρικό	648	0,113	2,23
	κιχορικό	3245,7	0,68	13,60
Δείγμα Γ	καφταρικό	653	0,114	2,28
	κιχορικό	2692,6	0,57	11,4
M.T ±SD	καφταρικό	0,132 ± 0,033		2,64± 0,66
	κιχορικό	0,701 ± 0,171		14,02± 3,42

Με τον ίδιο τρόπο γίνονται οι υπολογισμοί για τα δείγματα τα οποία εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο των υπερήχων, με 50% αιθανόλη και τα εμπορικά δείγματα (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού από το HPLC σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ουσίας/g ξηρού φυτικού υλικού.

mg/g ρίζας	Κλασσική Μέθοδος	Μέθοδος με υπερήχους	Εκχύλιση με 50% αιθανόλη	Δείγμα R	Δείγμα S
Καφταρικό	2,64±0,66	2,75±0,43	1,57±0,3	1,36±0,15	0,47±0,025
Κιχορικό	14,02±3,42	15,28±2,29	6,34±0,41	4,158±0,32	0,52±0,04
Σύνολο	16,66± 4,08	18,03±2,72	7.91±0,71	5,518±0,47	1,027±0,07

Στα εργαστηριακά εκχυλίσματα οι τιμές που υπολογίζονται για τα δύο από τα συνολικά φαινολικά συστατικά που περιέχουν είναι στα πλαίσια που ορίζονται από τη βιβλιογραφία και στα πλαίσια που ορίζουν τα πρότυπα ποιότητας (1,5% για το κιχορικό οξύ) από την Αμερικάνικη Φαρμακοποιεία (*U.S Pharmacopeia, 2000*).

Το δείγμα R αποτελείται σε αναλογία 1:1 από υπέργεια τμήματα του φυτού *E. angustifolia* και υπέργεια τμήματα της *E. purpurea*.

Βάση της βιβλιογραφίας αναμενόταν να περιέχει 16,86mg ολικών φαινολικών/g φυτικού υλικού. Είναι αναμενόμενο από το HPLC να υπολογίζεται χαμηλότερο ποσό από εκείνο της βιβλιογραφίας γιατί το δείγμα R περιέχει επίσης κυναρίνη και εχινakoζίτη, μόρια για τα οποία δεν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός.

Παρόλα αυτά και με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu υπολογίστηκαν $9,23 \pm 0,195 \text{mg}$ ολικών φαινολικών/g φυτικού ιστού, ποσότητα δηλαδή σημαντικά χαμηλότερη από την αναμενόμενη. Από τα δύο είδη *Echinacea* του δείγματος R, καφταρικό και κιχορικό οξύ περιέχει μόνο η *Echinacea purpurea*, οπότε κάνοντας τις αναγωγές υπολογίζεται το μεν καφταρικό σε $2,72 \text{mg/g}$, το δε κιχορικό $8,32 \text{mg/g}$ ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται $3,97 \pm 0,14 \text{mg/g}$ για το καφταρικό και 20 περίπου mg/g για το κιχορικό.

Από τη βιβλιογραφία για το δείγμα S το οποίο προέρχεται από ρίζες *E. pallida* αναμενόταν να περιέχει $0,78 \text{mg/g}$ καφταρικό οξύ και $0,41 \text{mg/g}$ κιχορικό οξύ, σύνολο δηλαδή $1,19 \pm 0,1 \text{mg}$, ενώ υπολογίστηκαν $0,99 \pm 0,015 \text{mg/g}$. Επίσης συνολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu στο εργαστήριό μας υπολογίστηκαν $8,09 \pm 0,36 \text{mg/g}$, τιμή που είναι κοντά σε αυτά που υπολογίστηκαν από τους *Li and Wardle (2001)* (9.10mg/g), και τους *Pellati et al., 2005* ($13,92$) και ανάμεσα στις τιμές που υπολογίστηκαν από τους *Hu and Kitts (2000)* (25.00mg/g) και *Perry et al. (2001)* (3.40mg/g) ενώ από τη βιβλιογραφία (υπολογισμένα πάντα από HPLC) αναμενόταν $13,92 \pm 0,31 \text{mg/g}$ φυτού.

Και στα δύο αυτά δείγματα οι αποκλίσεις είναι πολύ μεγάλες (της τάξης του 35-40%) και πιθανά να οφείλονται στο ότι κατά την αποθήκευση τα φαινολικά οξέα υφίστανται οξείδωση από την οξειδάση των πολυφαινολών (*Nuslein et al., 2000*). Βέβαια θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι εξαρχής τα δείγματα αυτά ήταν αραιωμένα και δεν περιείχαν τα αναμενόμενα ποσά φαινολικών οξέων .

Προκειμένου να εξεταστεί αν η αποθήκευση παίζει ρόλο στην ελάττωση του συνολικού ποσού των μετρούμενων φαινολικών οξέων, τα εργαστηριακά δείγματα τα οποία είχαν αναλυθεί με το HPLC, αναλύθηκαν εκ νέου μετά από 15 ημέρες και έγινε σε αυτά ποσοτικός προσδιορισμός από τις πρότυπες καμπύλες όπως και προηγούμενα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Τα αποτελέσματα της ολοκλήρωσης από το HPLC των κορυφών του καφταρικού και του κιχορικού οξέος μετά από 15 ημέρες, στα δείγματα από εκχύλιση με την κλασσική μέθοδο και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός από τις πρότυπες καμπύλες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg πρότυπης ουσίας/g φυτικού ιστού.

Ανάλυση μετά από 15 ημέρες							
Κλασσική Μέθοδος				Μέθοδος με υπερήχους			
	Επιφάνεια/mAU.s	$\mu\text{g}/4\mu\text{L}$	mg/g	Επιφάνεια/mAU.s	$\mu\text{g}/5\mu\text{L}$	mg/g	
Δείγμα Α	καφταρικό	691,6	0,121	2,42	1169,3	0,18	2,88
	κιχορικό	2987,1	0,626	12,52	5371,4	1,053	16,85
Δείγμα Β	καφταρικό	714,64	0,124	2,50	986,9	0,15	2,50
	κιχορικό	3378,3	0,706	14,12	4426,2	0,91	14,51
Δείγμα Γ	καφταρικό	780,2	0,136	2,70	637,3	0,146	2,34
	κιχορικό	3532	0,737	14,75	4000	0,884	14,15
ΣΥΝΟΛΟ	καφταρικό	$0,1275 \pm 0,0066$	$2,55 \pm 0,132$	$0,172 \pm 0,027$		$2,59 \pm 0,26$	
	κιχορικό	$0,690 \pm 0,062$	$13,79 \pm 1,16$	$0,955 \pm 0,14$		$15,17 \pm 1,47$	
ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ	M.T \pmSD/ mg / g αποξ. ρίζας			M.T \pmSD/ mg / g αποξ. ρίζας			
	$16,34 \pm 1,29$			$17,76 \pm 1,72$			

Τα συνολικά αποτελέσματα των δύο ομάδων αναλύσεων προκειμένου να συγκριθούν παρατίθενται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15: Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού από το HPLC αμέσως μετά την εκχύλιση και μετά από 15 ημέρες σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις των δειγμάτων και εκφράζονται σε mg ουσίας/g ξηρού φυτικού υλικού (ρίζας).

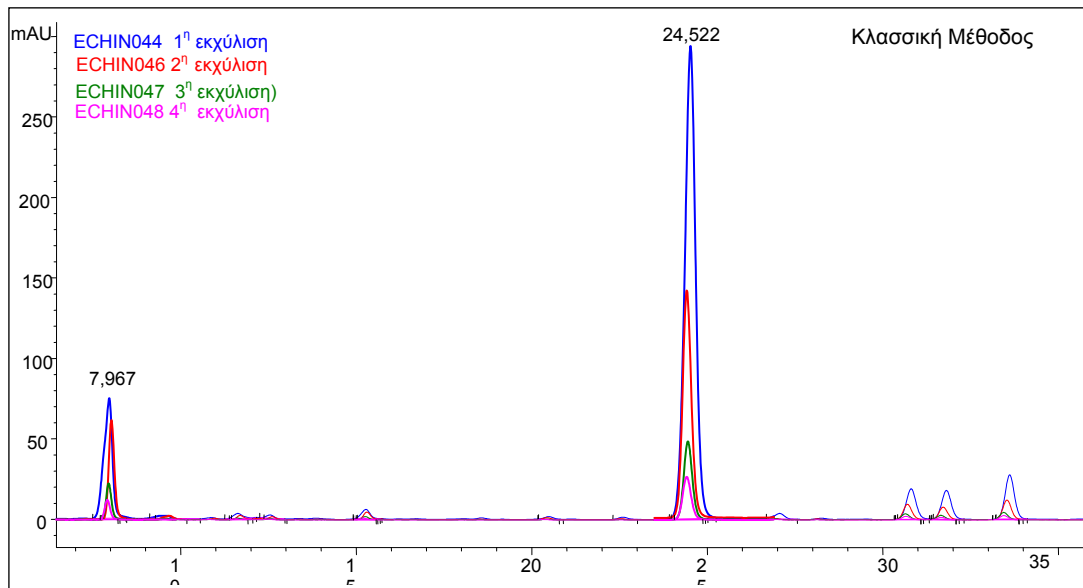
Αμέσως μετά την εκχύλιση			Μετά από 15 ημέρες	
mg/g ρίζας	Κλασσική Μέθοδος	Μέθοδος με υπερήχους	Κλασσική Μέθοδος	Μέθοδος με υπερήχους
Καφταρικό	$2,64 \pm 0,66$	$2,75 \pm 0,43$	$2,55 \pm 0,132$	$2,59 \pm 0,26$
Κιχορικό	$14,02 \pm 3,42$	$15,28 \pm 2,29$	$13,79 \pm 1,16$	$15,17 \pm 1,47$
Σύνολο	$16,66 \pm 4,08$	$18,03 \pm 2,72$	$16,34 \pm 1,29$	$17,76 \pm 1,72$

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η βραχύχρονη τουλάχιστον αποθήκευση δεν επηρεάζει ποσοτικά τα ολικά φαινολικά οξέα μιας και στις παραπάνω μετρήσεις δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις μετά από 15 ημέρες.

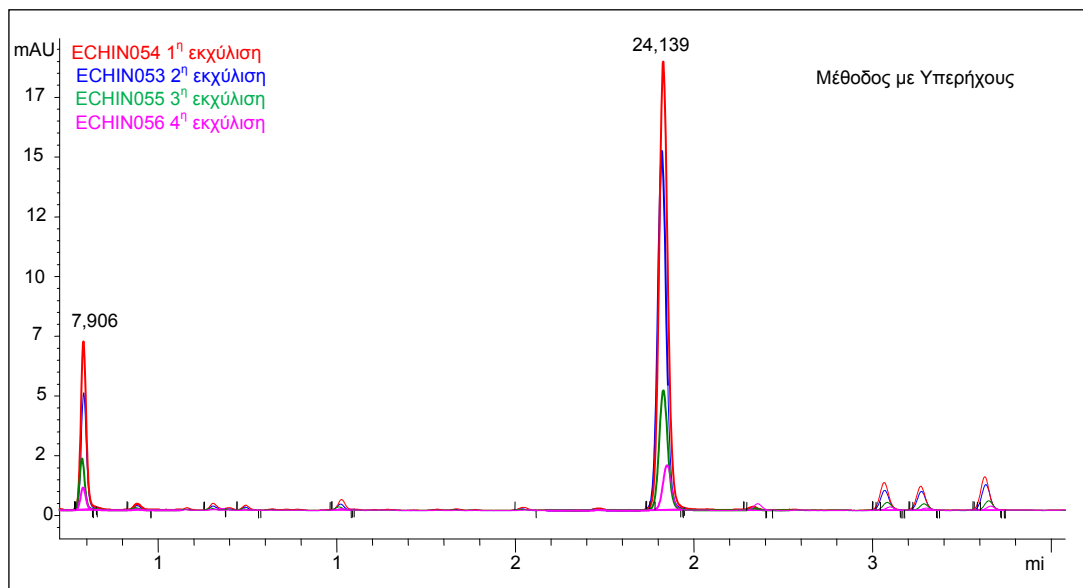
3.5.3.3. Σύγκριση της κλασσικής μεθόδου και της μεθόδου με χρήση υπερήχων με χρήση της χρωματογραφίας HPLC

Από την ενότητα 4.2, όπου έγινε η κινητική των δύο μεθόδων εκχύλισης, επιλέχθηκαν οι 4 εκχυλίσεις για την παραλαβή ποσοστού μεγαλύτερου του 95% των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων ριζών της *E. purpurea*. Στο Σχήμα 15 φαίνεται ότι ενώ στην κλασσική μέθοδο εκχύλισης το μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών εκχυλίζεται με την πρώτη εκχύλιση, στη μέθοδο με τους υπερήχους το μεγαλύτερο ποσοστό φαίνεται να εκχυλίζεται σχεδόν ισόποσα στις δύο πρώτες εκχυλίσεις.

Προκειμένου να διερευνηθεί και ποσοτικά η παραπάνω διαπίστωση, δύο δείγματα 0,5g ριζών εκχυλίστηκαν με τις δύο μεθόδους όπως έχει αναφερθεί προηγούμενα, αλλά τα 4 εκχυλίσματα συλλέχθηκαν ξεχωριστά έως όγκου 10mL το καθένα σε MeOH:νερό 70:30 και αναλύθηκαν με την ίδια μέθοδο HPLC. Από τα αποτελέσματα της ολοκλήρωσης των κορυφών του καφταρικού και του κιχορικού οξέος (Σχ.54) προκύπτουν τα αποτελέσματα του Πίνακα 16.



Σχήμα 55: Τα χρωματογραφήματα των τεσσάρων εκχυλισμάτων του δείγματος από εκχύλιση με την κλασική μέθοδο σε στήλη C-18 (250 x 4,6mm) που είχε εξισορροπηθεί με 25:75 MeOH:νερό- 0,1% σε TFA και εκλούστηκε με βαθμίδωση συγκέντρωσης MeOH 25-45% σε 40min.



Σχήμα 56: Τα χρωματογραφήματα των τεσσάρων εκχυλισμάτων του δείγματος από εκχύλιση με τη μέθοδο με υπέρηχους σε στήλη C-18 (250 x 4,6mm) που είχε εξισορροπηθεί με 25:75 MeOH:νερό- 0,1% σε TFA και εκλούστηκε με βαθμίδωση συγκέντρωσης MeOH 25-45% σε 40min.

Πίνακας 16: Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού από το HPLC των εκχυλισμάτων 1 έως 4 δειγμάτων ριζών *E. purpurea* που εκχυλίστηκαν με την κλασική μέθοδο και με τη μέθοδο με χρήση υπερήχων. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις των δειγμάτων και εκφράζονται σε mg συνολικών φαινολικών/g ξηρού φυτικού υλικού (ρίζας).

Κλασική Μέθοδος			Μέθοδος με Υπερήχους	
Αρ. Εκχυλίσματος	Σύνολο Φαινολικών mg/g	% του συνόλου	Σύνολο Φαινολικών mg/g	% του συνόλου
1	15,347	78,93	12,22	56,90
2	2,604	13,39	7,9929	36,92
3	0,938	4,82	0,919	4,28
4	0,555	2,86	0,407	1,90
Σύνολο	19,44	100	21,47	100

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις κατά τη μελέτη της κινητικής της εκχύλισης όπου κατά τη μέθοδο με χρήση υπερήχων η εκχύλιση του μεγαλύτερου μέρους των φαινολικών δεν παρατηρείται στο πρώτο εκχύλιμα αλλά στο πρώτο και το δεύτερο. Με τα παραπάνω δεδομένα του HPLC μπορεί να ελεγχθεί σε τι ποσοστό εκχυλίζεται το κάθε συστατικό των δειγμάτων σε κάθε εκχύλιμα. (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού από το HPLC των εκχυλισμάτων 1 έως 4 δειγμάτων ριζών *E. purpurea* που εκχυλίστηκαν με την κλασική μέθοδο και με τη μέθοδο με χρήση υπερήχων. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις των δειγμάτων και εκφράζονται σε mg ουσίας/g ξηρού φυτικού υλικού (ρίζας).

Κλασική Μέθοδος					Μέθοδος με υπερήχους			
Αρ. Εκχυλ	καφταρικό mg/g	%	κιχορικό mg/g	%	καφταρικό mg/g	%	κιχορικό mg/g	%
1	2,19	73,41	13,157	79,92	1,76	53,44	10,46	57,53
2	0,496	16,63	2,108	12,81	1,28	38,87	6,649	36,57
3	0,1856	6,22	0,752	4,57	0,1676	5,09	0,752	4,13
4	0,1115	3,74	0,444	2,70	0,0856	2,60	0,322	1,77
Σύνολο	2,9831	100	16,461	100	3,29	100	18,183	100

Από τον Πίνακα 17 φαίνεται ότι το ίδιο μοντέλο εκχύλισης που ακολουθούν τα ολικά φαινολικά ακολουθούν και τα επιμέρους συστατικά των δειγμάτων, δηλαδή το κιχορικό και το καφταρικό οξύ.

Φαίνεται δηλαδή ότι και τα δύο αυτά συστατικά εκχυλίζονται σε ποσοστό από 73-80% στην πρώτη εκχύλιση στην κλασσική μέθοδο, ενώ στη μέθοδο με τους υπερήχους σε ποσοστό μικρότερο στην πρώτη εκχύλιση (53-58%). Δεν παρατηρήθηκε διαφορετική σειρά εκχύλισης των δύο συστατικών μεταξύ των μεθόδων, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει αυτή τη διαφορά στο ποσοτικό κομμάτι της εκχύλισης.

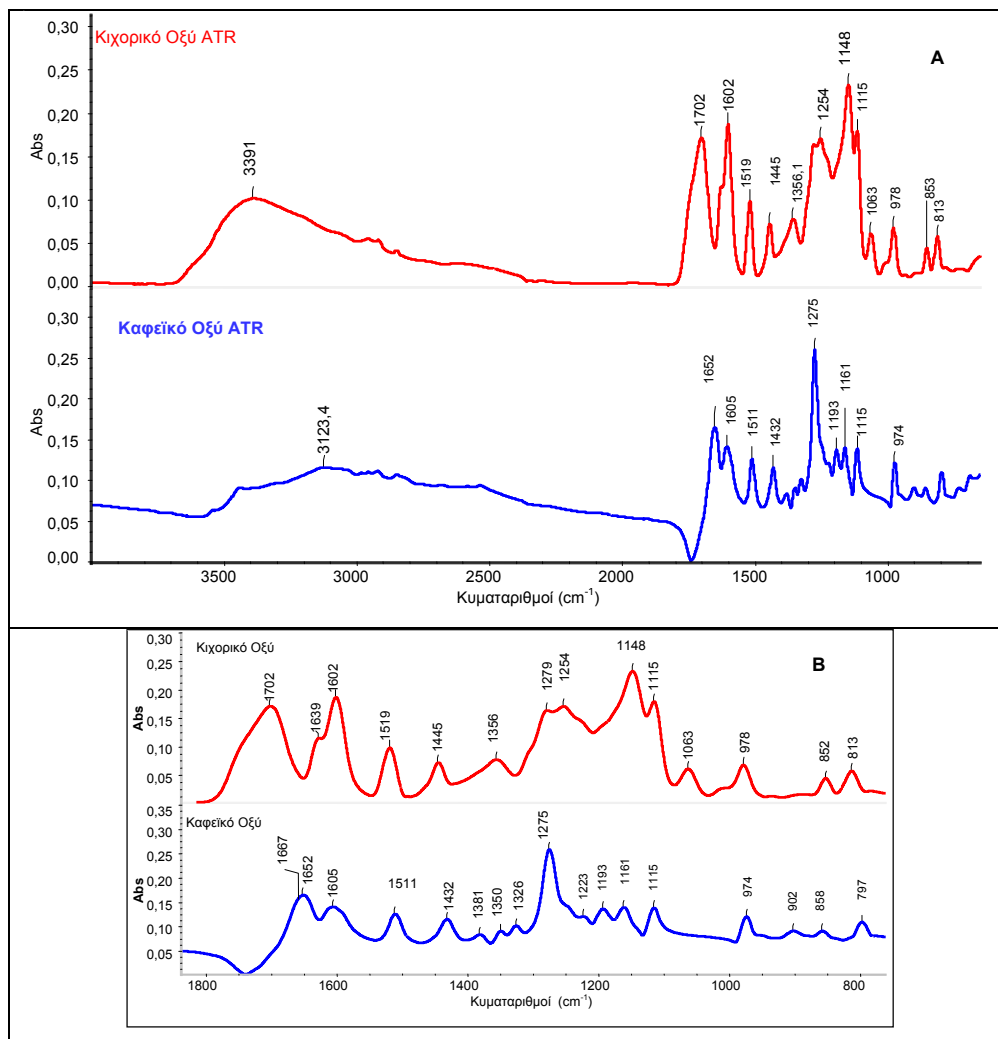
Επιπλέον πληροφορίες για το είδος των μορίων που εκχυλίζονται σε κάθε στάδιο της εκχύλισης, πιθανά να μπορέσουν να ληφθούν με χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου.

3.6. Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Από τη χρωματογραφική μελέτη των μεθανολικών εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* τα οποία παραλήφθηκαν μετά από εκχύλιση με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά και με υπέρηχους προσδιορίστηκαν ποιοτικά και ποσοτικά με HPLC και LC-MS τα φαινολικά συστατικά παράγωγα του καφεϊκού οξέος καφταρικό και κιχορικό οξύ. Στόχος της μελέτης των φασμάτων IR ήταν η επιβεβαίωση της πορείας της εκχύλισης με στόχο την εφαρμογή μιας νέας πιο απλής και γρήγορης μεθόδου για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων.

3.6.1. Φάσματα FT-IR κιχορικού και καφεϊκού οξέος με την τεχνική ATR

Ελήφθησαν τα φάσματα του κιχορικού και του καφεϊκού οξέος με την τεχνική ATR (Σχ. 57 και Πίνακας 18).



Σχήμα 57: Η περιοχή 4000- 600 cm^{-1} του FT-IR φάσματος προτύπων κιχορικού και καφεϊκού οξέος (A) και μεγέθυνση της περιοχής 1800-1000 cm^{-1} (B), με την τεχνική ATR.

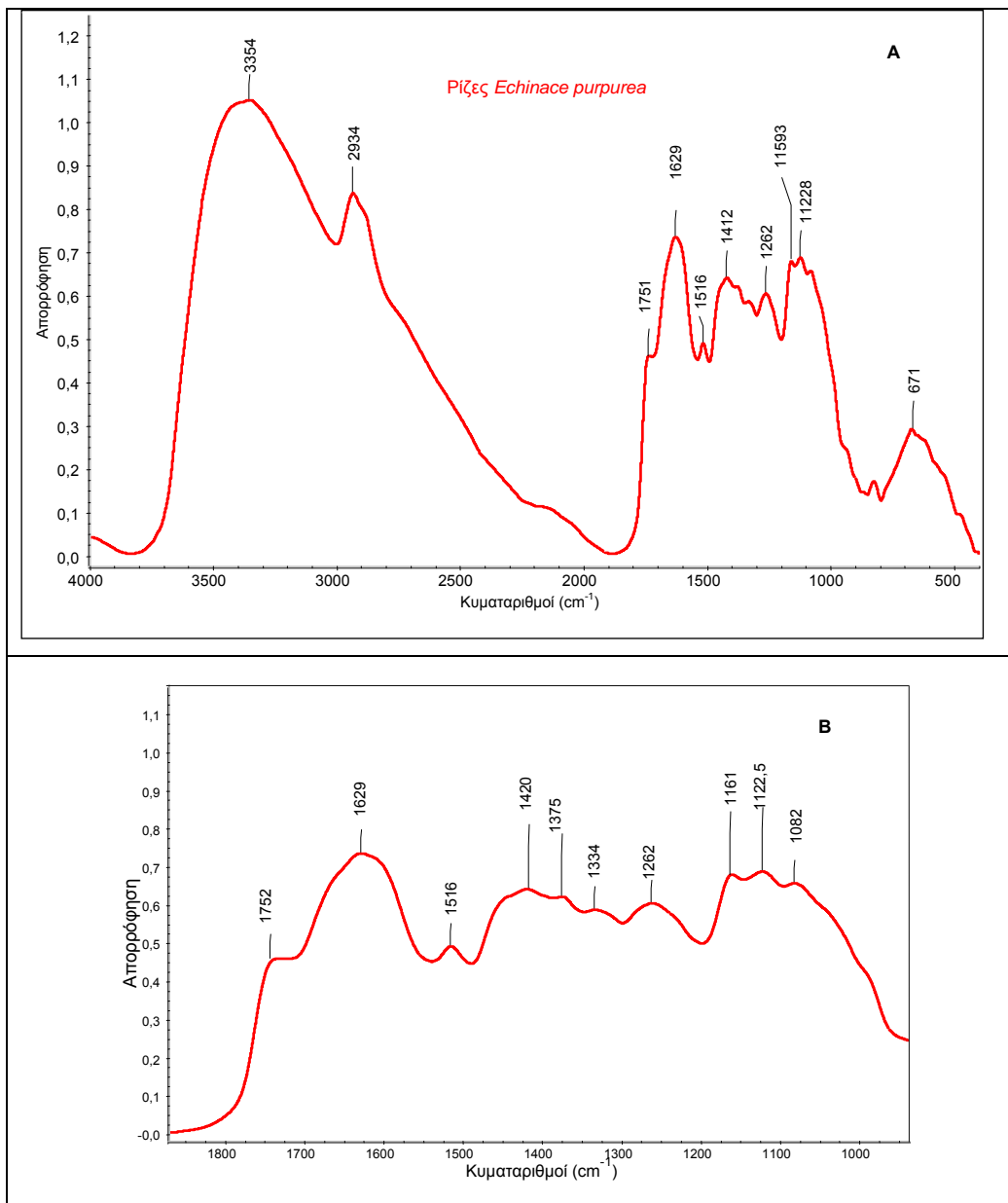
Η φαρδιά ταινία στα 3391 και τα 3123cm⁻¹ του FT-IR φάσματος του κιχορικού και του καφεϊκού οξέος αντίστοιχα οφείλονται στις δονήσεις τάσης των υδροξυλίων και τις δονήσεις τάσης C-H του αρωματικού δακτυλίου. Το φάσμα του κιχορικού οξέος παρουσιάζει μία πλατειά ταινία απορρόφησης επικεντρωμένη στα 1702cm⁻¹, η οποία οφείλεται στο καρβονύλιο της εστερομάδας ενώ η δόνηση τάσης του καρβονυλίου της καρβοξυλομάδας στο φάσμα του καφεϊκού εμφανίζεται στα 1652cm⁻¹. Η κορυφή στα 1519 και στα 1511cm⁻¹ στα δύο φάσματα αποδίδεται στους C-H συζυγιακούς δεσμούς των αρωματικών δακτυλίων και χαρακτηρίζει τα φαινορικά συστατικά ενός δείγματος (Socrates, 1994). Η κορυφή στα 1445 και 1432cm⁻¹ αποδίδεται στον αρωματικό δακτύλιο σε συνδυασμό της δόνησης τάσης του C-O και της παραμόρφωσης του O-H.

Πίνακας 18: Οι κυματαριθμοί από τις κορυφές των προτύπων και οι χαρακτηριστικές ομάδες στις οποίες αντιστοιχούν.

Κιχορικό Κυματαριθμοί (cm ⁻¹)	Καφεϊκό Κυματαριθμοί (cm ⁻¹)	Χαρακτηριστική Ομάδα
3391	3123	Δόνηση τάσης του -OH
1702	1667	Δόνηση Τάσης -C=O εστερομάδας και καρβοξυλομάδας
1639	1650	Δόνηση τάσης διπλού δεσμού C
1602	1605	Καρβοξυλικά ανιόντα
1519	1511	Δόνηση τάσης C-H Αρωματικού δακτυλίου
1445	1432	Αρωματικός δακτύλιος σε συνδυασμό με δόνηση τάσης του C- O και της παραμόρφωσης του O-H
1254	1275 1193	Δόνηση Τάσης C-O εστερομάδας και O-H καρβοξυλικών οξέων
1148	1161	Δόνηση τάσης του C-O εστέρων
1115	1115	παραμόρφωση των αρωματικών C- H
813		Δόνηση κάμψης εκτός επιπέδου των αρωματικών C-H

3.6.2. Φάσματα FT-IR μη επεξεργασμένων ριζών της *Echinacea purpurea* με την τεχνική DRIFT

Για την παραλαβή των φασμάτων IR με την τεχνική DRIFT χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα σκόνη των ριζών της *E. purpurea*. Το φάσμα τους φαίνεται στο Σχ.58, ενώ οι απορροφήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων φαίνονται στον Πίνακα 19.



Σχήμα 58: Το FT-IR φάσμα των ακατέργαστων ριζών της *E. purpurea* (περιοχή 4000-600cm⁻¹) (A) και μεγέθυνση της περιοχής 1800-1000 cm⁻¹ (B), με την τεχνική DRIFT.

Στο φάσμα των ριζών της *E. purpurea* παρατηρήθηκαν στην περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων 4000-1500cm⁻¹ πέντε ταινίες απορροφήσεων.

Η πρώτη είναι μια φαρδιά ταινία από τα $3650-2800\text{cm}^{-1}$, που επικεντρώνεται στα 3354cm^{-1} . Οι απορροφήσεις σε αυτή την περιοχή οφείλονται στις δονήσεις τάσης των υδροξυλίων, τις δονήσεις τάσης C-H του αρωματικού δακτυλίου και των δονήσεων τάσης του δεσμού N-H των αμιδίων.

Η δεύτερη ταινία παρουσιάζει κορυφή στα 2935cm^{-1} . Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή οφείλεται σε δονήσεις τάσης αλειφατικών C-H, και κορεσμένου C-C (2938cm^{-1} και 2710cm^{-1} αντίστοιχα όπως προκύπτει από τη δεύτερη παράγωγο).

Οι απορροφήσεις στην περιοχή από τα $1800-1500\text{cm}^{-1}$ αποδίδονται σε δονήσεις τάσης του καρβονυλίου, των αμιδίων και των αρωματικών δακτυλίων. Συγκεκριμένα (αποτελέσματα από δεύτερη παράγωγο) στα 1737cm^{-1} εμφανίζεται η δόνηση τάσης του καρβονυλίου εστερομάδας, στα 1723cm^{-1} της καρβοξυλομάδας ενώ στη φαρδιά ταινία απορρόφησης γύρω στα 1600cm^{-1} αλληλεπικαλύπτονται οι απορροφήσεις του καρβονυλίου των αμιδίων στα 1679cm^{-1} , οι απορροφήσεις των καρβοξυλικών ανιόντων στα 1610cm^{-1} , το δεσμευμένο νερό στα 1630cm^{-1} και η δόνηση τάσης των διπλών δεσμών των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου στα $1581,5\text{cm}^{-1}$ αντίστοιχα.

Η κορυφή στα 1518cm^{-1} αποδίδεται στις εκτός επιπέδου δονήσεις C-H αρωματικών δακτυλίων σε συνδυασμό με τη δόνηση τάσης του C-O και της παραμόρφωσης του O-H. Η κορυφή στα 1420cm^{-1} αποδίδεται στις εκτός επιπέδου δονήσεις C-H αλειφατικών ομάδων

Οι κορυφές στα 1122 και 1082cm^{-1} αντιστοιχούν σε δόνηση τάσης του C-O των εστέρων και στις σκελετικές δονήσεις των C-OH και C-O-C των δακτυλίων της πυρανόζης των σακχάρων (Socrates, 1994, Schulz et al., 2007).

Η περιοχή, που εκτείνεται από τα 1400 έως τα 600cm^{-1} είναι η περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων.

Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με την αναμενόμενη σύσταση για τις ρίζες της *E. purpurea*, όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος. Δεν ανιχνεύθηκε κορυφή στα 2150cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί στον τριπλό δεσμό και που αναμενόταν μιας και από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι στις ρίζες της *E. purpurea* υπάρχουν αλκυλαμίδια με τριπλούς δεσμούς (Bauer et al., 1998). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το όργανο εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία σε αυτή την περιοχή.

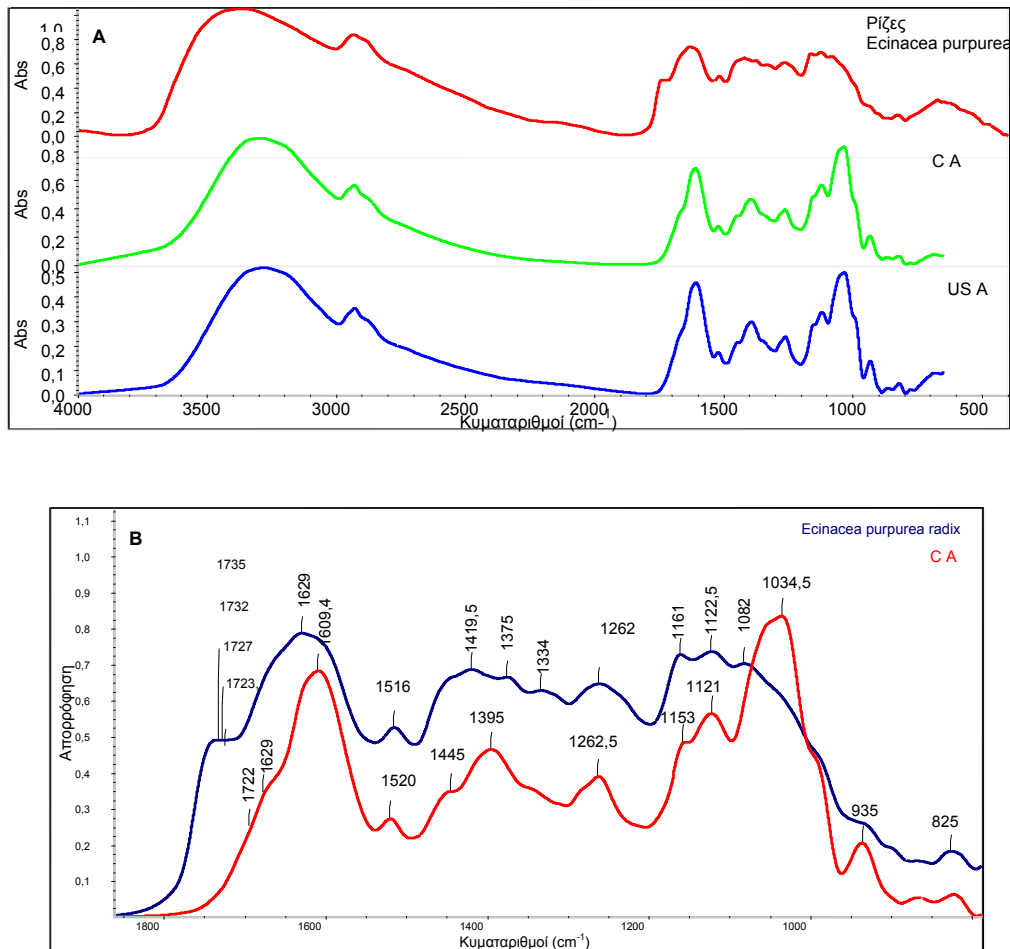
Το σημαντικότερο όμως στην παρούσα μελέτη είναι ότι το δείγμα των ριζών εμφανίζει χαρακτηριστική κορυφή στα 1518cm^{-1} , ένδειξη ύπαρξης φαινολικών συστατικών παρά το γεγονός ότι είναι μίγμα πολλών συστατικών. Η κορυφή αυτή στην πορεία συγκρίθηκε με εκείνες των εκχυλισμάτων και των προτύπων.

Πίνακας 19: Οι κυματαριθμοί από τις κορυφές του φάσματος των μη επεξεργασμένων ριζών της *E. purpurea* και οι χαρακτηριστικές ομάδες στις οποίες αντιστοιχούν.

Κυματαριθμοί/ cm^{-1}	Χαρακτηριστική Ομάδα
3650-2800	Δόνηση τάσης O-H Δόνηση τάσης C-H του αρωματικού δακτυλίου Δόνηση τάσης του δεσμού N-H
2938	Δόνηση τάσης αλειφατικών C-H
2710	Δόνηση τάσης αλειφατικών και C-C
1737	Δόνηση τάσης του καρβονυλίου εστερομάδας
1723	Δόνηση τάσης καρβονυλίου καρβοξυλομάδας
1679	Καρβονύλιο αμιδίων
1630	Δεσμευμένο νερό ή/και διπλός δεσμός C
1610	Καρβοξυλικά ανιόντα
1582	Δόνηση τάσης των διπλών δεσμών των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου
1518	Δονήσεις εκτός επιπέδου C-H αρωματικών δακτυλίων στον αρωματικό δακτύλιο σε συνδυασμό με τη δόνηση τάσης του C-O και της παραμόρφωσης του O-H
1420	δόνηση εκτός επιπέδου C-H αλειφατικών ομάδων
1122	δόνηση τάσης του C-O των εστέρων
1080	σκελετικές δονήσεις των C-OH και C-O-C των δακτυλίων της πυρανόζης των σακχάρων

3.6.3. FT-IR φάσματα των εκχυλισμάτων των ριζών με την τεχνική ATR

Αρχικά τα εκχυλίσματα και από τις δύο μεθόδους συμπυκνώθηκαν υπό κενό έως ξηρού και ελήφθησαν τα φάσματά τους με την τεχνική DRIFT. Όμως τα φάσματα δεν ήταν καλά και δε χρησιμοποιήθηκαν (παράρτημα). Για να μπορεί να γίνει σύγκριση με το φάσμα των ριζών ελήφθησαν τα φάσματά τους με την τεχνική ATR (Σχ. 59).



Σχήμα 59: Το FT-IR φάσμα των εκχυλισμάτων και των ακατέργαστων ριζών της *E. purpurea* (περιοχή 4000-600cm⁻¹) (A) και μεγέθυνση της περιοχής 1800-1000cm⁻¹(B), με την τεχνική ATR.

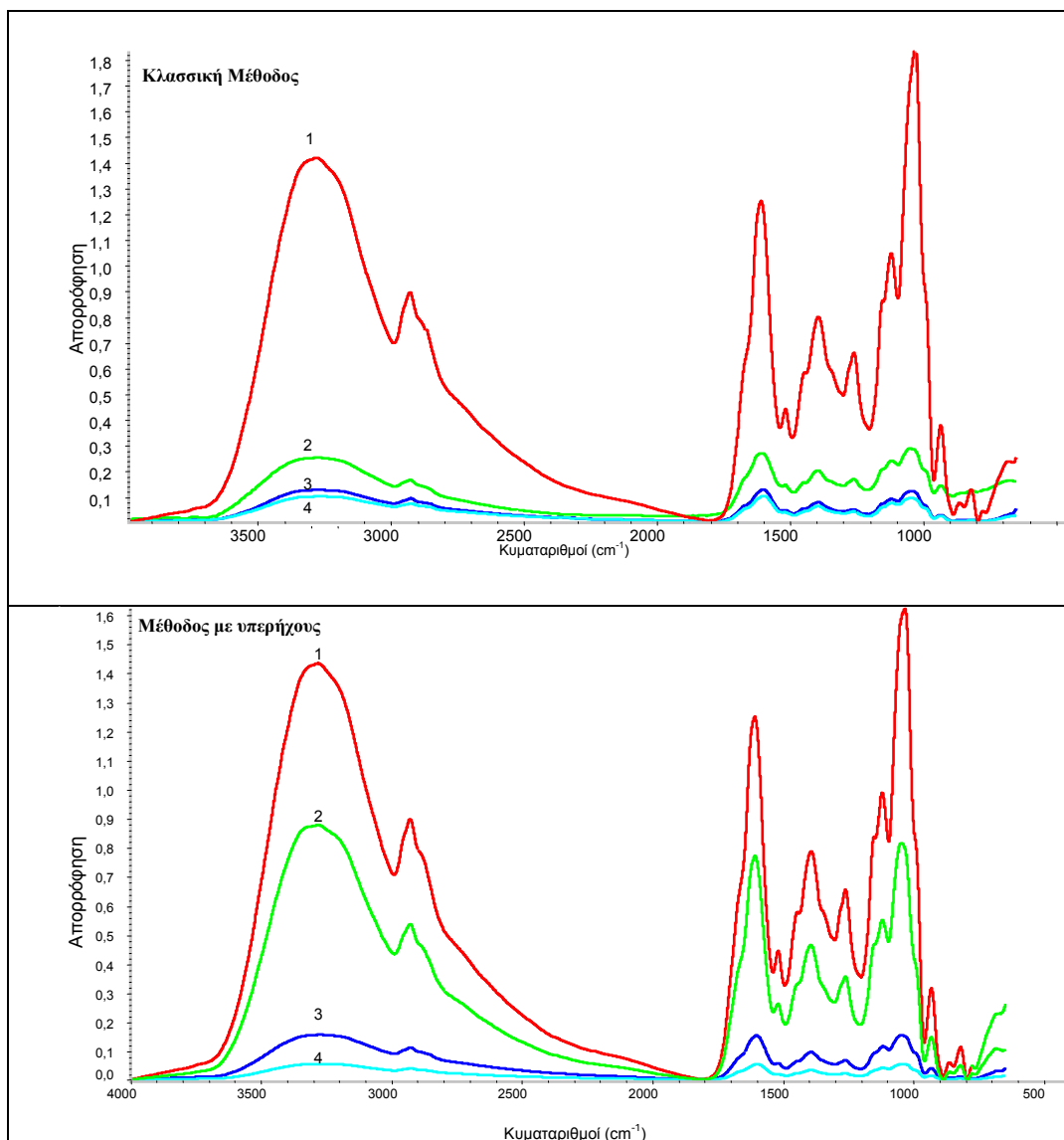
Τα φάσματα των εκχυλισμάτων μεταξύ τους είναι σχεδόν ταυτόσημα. Με τη βοήθεια του λογισμικού του οργάνου και δημιουργώντας βιβλιοθήκες βρέθηκε ότι τα φάσματα των εκχυλισμάτων των δύο μεθόδων εμφανίζουν ομοιότητα μεταξύ τους 98,26%, ενώ με εκείνα των ριζών σε μορφή σκόνης, ομοιότητα 60%.

Στα φάσματα των εκχυλισμάτων έχει περιοριστεί η κορυφή στην περιοχή των 1700cm⁻¹ στα 1680cm⁻¹ και στα 1080cm⁻¹, γεγονός που δείχνει ότι με την εκχύλιση έχουν απομακρυνθεί κάποια μόρια με εστερομάδες, αμίδια ή ακόρεστες ενώσεις με διπλούς δεσμούς (πιθανότατα αλκυλαμίδια) καθώς και σάκχαρα. Στην περιοχή 1300 με 1450cm⁻¹ παρουσιάζεται, μια φαρδιά ταινία απορρόφησης η οποία ενδεχομένως επικαλύπτει κορυφές που προέρχονται από δονήσεις του σκελετού διαφορετικών ουσιών. Η κορυφή στα 1500cm⁻¹ που δείχνει τα φαινολικά συστατικά είναι χαρακτηριστική και χωρίς αλληλεπικαλύψεις.

Συνολικά μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι η εκχύλιση είναι πετυχημένη ανεξάρτητα της μεθόδου γιατί και απομακρύνει μη επιθυμητά συστατικά, αλλά ταυτόχρονα είναι ήπια και δεν αλλάζει το προφίλ των περιεχόμενων μορίων.

3.6.3.1. Παρακολούθηση της πορείας της εκχύλισης με τα ATR φάσματα των εκχυλισμάτων

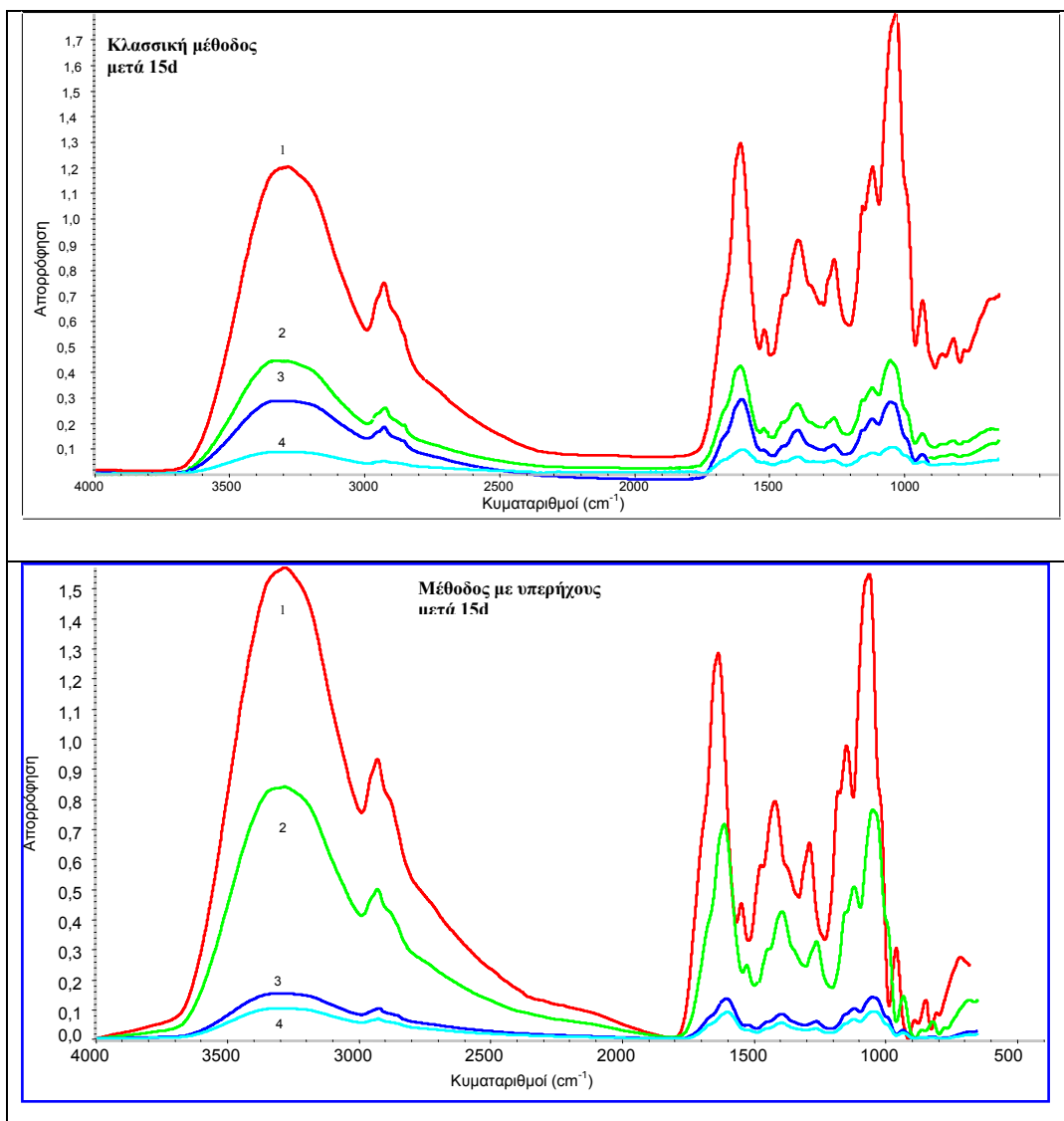
Στη συνέχεια παρατίθενται τα FT-IR φάσματα των τεσσάρων επιμέρους εκχυλισμάτων και από τις δύο μεθόδους εκχύλισης (Σχ.60), από τη συνένωση των οποίων προκύπτει το τελικό εκχύλισμα (Σχ.59).



Σχήμα 60: Το FT-IR φάσμα των επιμέρους εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* με την τεχνική ATR.

Βρέθηκε ότι τα φάσματα έχουν ποσοστό ομοιότητας 99,87, τα δύο πρώτα της κάθε μεθόδου εκχύλισης, αλλά και μεταξύ των δύο μεθόδων. Αυτή η ομοιότητα ελαττώνεται προς το τέταρτο εκχύλισμα, όπου η ομοιότητα είναι 98,6%. Ποιοτικά παρατηρείται ελάττωση στην κορυφή των $1500-1520\text{cm}^{-1}$ με τα στάδια της εκχύλισης, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στην κινητική των εκχυλίσεων (Σχ.16) και με τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών (Πίνακας 3 και Σχ.13). Η κορυφή σχεδόν εξαφανίζεται στην τελευταία εκχύλιση.

Στη συνέχεια ελήφθησαν τα φάσματα των ίδιων εκχυλισμάτων μετά από 15 ημέρες τα οποία παρατίθενται στο Σχ. 61.



Σχήμα 61: Το FT-IR φάσμα των επιμέρους εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* μετά από 15 ημέρες, με την τεχνική ATR.

Και στα φάσματα των κλασμάτων μετά από 15 ημέρες παρατηρήθηκαν ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα. Μεταξύ των δύο πρώτων φασμάτων της κάθε μεθόδου αλλά και μεταξύ των μεθόδων εμφανίζεται ποσοστό ομοιότητας 99,8%, ενώ η ομοιότητα αυτή ελαττώνεται στο 98,6% στο τέταρτο εκχύλισμα. Επίσης ποιοτικά παρατηρείται ελάττωση στην κορυφή των $1500-1520\text{cm}^{-1}$ με τα στάδια της εκχύλισης, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στην κινητική των εκχυλίσεων αλλά και με τον ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η κορυφή σχεδόν εξαφανίζεται στην τελευταία εκχύλιση.

Συνοψίζοντας μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι και οι δύο μέθοδοι της εκχύλισης είναι ήπιες, δηλαδή, ενώ εμπλουτίζουν το δείγμα σε φαινολικά συστατικά μιας και απομακρύνουν κάποια μακρομόρια (πολυσακχαρίτες και εστέρες πηκτινών), δεν φαίνεται να προκαλούν μη αντιστρεπτές μεταβολές (οξειδώσεις).

Επίσης με το FT-IR φαίνεται ότι μπορεί να αναπτυχθεί μια μέθοδος για γρήγορη ποσοτική εκτίμηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου απευθείας σε δείγματα ρίζας, χωρίς καμιά άλλη χημική επεξεργασία. Επιπρόσθετα τα FT-IR φάσματα φαίνεται ότι προσφέρονται για τη γρήγορη παρακολούθηση της πορείας της εκχύλισης ποσοτικά εφόσον αναπτυχθεί κατάλληλη μέθοδος, αλλά σίγουρα ποιοτικά. Να επισημανθεί εδώ η μεγάλη αναλογία που παρατηρείται ανάμεσα στο φάσμα UV-Vis (καταγράφει τα χρωμοφώρα του εκχυλίσματος) και το φάσμα FT-IR το οποίο οφείλεται σε όλα τα συστατικά του δείγματος.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η *Echinacea purpurea* είναι ένα φυτό με φαρμακευτικές ιδιότητες το οποίο καλλιεργείται παγκοσμίως και οι πωλήσεις από τα σκευάσματά του κατέχουν τις πρώτες θέσεις στην Αμερική αλλά και παγκόσμια. Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να πληθαίνουν τα διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα και να αυξάνεται συνεχώς η ζήτησή τους. Πολλές από τις βιολογικές ιδιότητες της *Echinacea* οφείλονται στα υδατοδιαλυτά φαινολικά συστατικά της, οπότε κρίθηκε σκόπιμο σε αυτή τη μελέτη να μελετηθούν αυτά τα συστατικά, ποιοτικά και ποσοτικά ως προς τη σύστασή τους, σε ρίζες *Echinacea purpurea* η οποία καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα.

Για την παραλαβή των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ριζών συγκρίθηκαν δύο μέθοδοι εκχύλισης, η κλασσική μέθοδος με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και η μέθοδος υποβοηθούμενη από υπέρηχους.

Αρχικά διερευνήθηκε η σύσταση του αποτελεσματικότερου εκχυλιστικού μέσου για τα φαινολικά συστατικά και βρέθηκε ότι όταν στα συστήματα της εκχύλισης το ποσοστό της μεθανόλης ή του νερού ήταν 100%, παρουσίαζαν χαμηλή εκχυλιστική ικανότητα. Σε συγκεντρώσεις μεθανόλης από 60% έως 80% η εκχυλιστική ικανότητα ήταν υψηλή και δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές, ενώ σε συγκεντρώσεις κάτω του 60% σε μεθανόλη, η εκχυλιστική ικανότητα ελαττωνόταν. Τελικά ως βέλτιστο εκχυλιστικό σύστημα επιλέχθηκε εκείνο που περιέχει 70% μεθανόλη. Το σύστημα 50% σε αιθανόλη εκχυλίζει σημαντικά λιγότερα φαινολικά συστατικά.

Μελέτη της κινητικής της εκχύλισης έδειξε ότι χρειάζονται τέσσερις εκχυλίσεις για την παραλαβή πάνω από 95% των ολικών φαινολικών και στις δύο μεθόδους εκχύλισης.

Με χρήση της χρωματογραφίας HPLC-RP ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα καφταρικό και το κιχορικό οξύ. Η επιβεβαίωση έγινε συγκρίνοντας τα φάσματα UV-Vis και τους χρόνους συγκράτησης των συστατικών των δειγμάτων με εκείνα πρότυπου κιχορικού και καφταρικού οξέος.

Στα εκχυλίσματα των ριζών της *E. purpurea* υπήρχαν ενδείξεις για την ύπαρξη κυναρίνης, γλωρογενικού οξέος και καφεϊκού οξέος οι οποίες διερευνήθηκαν

περαιτέρω, ενώ δεν ανιχνεύθηκε εχινakoζίτης. Στο εμπορικό δείγμα R, το οποίο αντιστοιχεί σε σκεύασμα μίγματος *E. angustifolia* και *E. purpurea* υπήρχαν σημαντικές ενδείξεις ότι περιέχει εχινakoζίτη και κυναρίνη, ενώ το εμπορικό δείγμα S το οποίο αντιστοιχεί σε σκεύασμα *E. pallida* υπήρχαν σοβαρές ενδείξεις ότι περιέχει εχινakoζίτη. Με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών (LC-MS) επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα του HPLC για το καφαρικό και το κιχορικό οξύ με ταυτοποίηση των μοριακών τους ιόντων.

Στα εκχυλίσματα των ριζών καταγράφησαν επίσης και μοριακά ιόντα που αντιστοιχούν σε γλωρογενικό οξύ, κυναρίνη και εχινakoζίτη. Στο δείγμα R, ανιχνεύθηκαν επίσης εχινakoζίτης και κυναρίνη, ενώ στο δείγμα S ανιχνεύθηκε και εχινakoζίτης. Σε κανένα από τα δύο δείγματα δεν ανιχνεύθηκε καφεϊκό οξύ.

Στη συνέχεια έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων. Οι δύο μέθοδοι εκχύλισης κρίθηκαν ισοδύναμες γιατί οι μέσες τιμές των φαινολικών συστατικών δε διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 95% (student t-test) ($28.65 \pm 1.42\text{mg/g}$ για την κλασσική μέθοδο και $29.45 \pm 2.94\text{mg/g}$ για την μέθοδο με τους υπέρηχους).

Τα εμπορικά δείγματα όμως περιέχουν ανά g αποξηραμένου φυτικού ιστού πολύ μικρότερη ποσότητα ολικών φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα εργαστηριακά εκχυλίσματα ($9,23 \pm 0,19\text{ mg/g}$ το R και $8,09 \pm 0,36\text{mg/g}$ το S).

Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στον τρόπο με τον οποίο οι βιομηχανίες παρασκευάζουν τα εκχυλίσματά τους. Συνήθως οι εκχυλίσεις γίνονται σε μεγάλες δεξαμενές με ζεστό νερό που αφενός επιτυγχάνει απενεργοποίηση των PPOs, αφετέρου όμως δεν επιτυγχάνεται μέγιστη εκχυλιστική απόδοση. Στη συνέχεια στα εκχυλίσματα προστίθεται αιθανόλη έως τελικού όγκου 17-22% ώστε να συντηρηθούν από την ανάπτυξη μικροοργανισμών και να διαυγασθούν από μικροσωματίδια και πολυσακχαρίτες. Εξαρχής τα εμπορικά σκευάσματα δεν αντικατοπτρίζουν την πραγματική σύσταση σε φαινολικά συστατικά του φυτού από το οποίο προέρχονται. Γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τη μέτρηση των φαινολικών συστατικών σε δείγμα ριζών οι οποίες αρχικά είχαν ξεπλυθεί με νερό.

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η ρίζα DPPH. Οι τιμές των EC_{50} που μετρήθηκαν συγκρίθηκαν με εκείνες γνωστών αντιοξειδωτικών ουσιών. Όλα τα δείγματα φαίνονται να έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα συγκρινόμενα με εκείνα που αναλύθηκαν στο

εργαστήριο (γαλλικό, κιχορικό, καφταρικό) αλλά και με άλλα συνθετικά ή φυσικά που αναφέρονται συνήθως στη βιβλιογραφία, (BHT, το ασκορβικό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ). Είναι σημαντικό το ότι το κιχορικό οξύ είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό –τρεις φορές ισχυρότερο από τη βιταμίνη C– και έχει συγκρίσιμη αντιοξειδωτική ικανότητα με το ροσμαρινικό οξύ. Η ιδιότητά του αυτή έχει ήδη αξιολογηθεί από τις βιομηχανίες τροφίμων οι οποίες αναζητούν φυτικές πηγές πλούσιες σε κιχορικό οξύ. Ένα άλλο πλεονέκτημα του κιχορικού οξέος είναι ότι μπορεί να εμποδίζει ή να καθυστερεί την ενζυμική αμαύρωση των τροφίμων από τη δράση των PPOs, μιας και το ίδιο αποτελεί υπόστρωμα για αυτές.

Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα δείγματα εμφανίζει εκείνο που εκχυλίστηκε με την κλασσική μέθοδο ($2,87 \pm 0,25\text{ppm}$) και μικρότερη το εμπορικό σκεύασμα S ($4,20 \pm 0,19\text{ppm}$). Όλα τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα συγκρινόμενα με το εκχύλισμα από την κλασσική μέθοδο.

Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός του κιχορικού και του καφταρικού οξέος σε όλα τα δείγματα με HPLC. Στο δείγμα από την κλασσική μέθοδο βρέθηκαν $2,64 \pm 0,66\text{mg/g}$ καφταρικό οξύ και $14,02 \pm 3,42\text{mg/g}$ κιχορικό οξύ., ενώ οι αντίστοιχες τιμές από τη μέθοδο με υπερήχους δε διαφέρουν σημαντικά. Στα εργαστηριακά εκχυλίσματα οι τιμές που υπολογίζονται για το περιεχόμενο κιχορικό οξύ είναι στα πλαίσια που ορίζουν τα πρότυπα ποιότητας (1,5% για το κιχορικό οξύ).

Στο δείγμα R υπολογίστηκε $11,02 \pm 0,94\text{mg/g}$ άθροισμα κιχορικού-καφταρικού, κατά 35% δηλαδή μειωμένο από το αναμενόμενο, ενώ στο δείγμα S. $0,99 \pm 0,07\text{mg/g}$, μειωμένο κατά 37%. Οι πολύ μεγάλες αυτές διαφορές πιθανά να οφείλονται στο ότι κατά την αποθήκευση παρουσία υγρασίας, ή ακόμη και κατά την πορεία της εκχύλισης τα φαινολικά οξέα υφίστανται οξείδωση από την οξειδάση των πολυφαινολών Αυτό θα μπορούσε να έχει συμβεί στα δείγματα εάν η εκχύλισή τους έχει γίνει μόνο με νερό όπως συνηθίζεται στη βιομηχανία και η προθήκη αιθανόλης είχε ακολουθήσει ως συντηρητικό και διαυγαστικό από τους πολυσακχαρίτες μέσο.

Όλα τα δείγματα τα οποία είχαν αναλυθεί με HPLC, αναλύθηκαν εκ νέου μετά από 15 ημέρες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός δεν έδειξε καμία σημαντική διαφορά, στη σύσταση γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βραχυπρόθεσμη αποθήκευση δεν επηρεάζει ποσοτικά τα ολικά φαινολικά οξέα στα εκχυλίσματα.

Σημαντικά ήταν τα αποτελέσματα της HPLC προέκυψαν μετά από τους ποσοτικούς προσδιορισμούς σε καθένα από τα τέσσερα κλάσματα της εκχύλισης και για τις δύο μεθόδους. Βρέθηκε ότι με την εκχύλιση με την κλασσική μέθοδο το μεγαλύτερο ποσοστό καφταρικού και κιχορικού οξέος εκχυλίζεται στην πρώτη εκχύλιση (78,9%) και ακολουθεί η δεύτερη με 13,4%, ενώ στη μέθοδο με τους υπέρηχους αρκετά μεγάλο ποσοστό εκχυλίζεται και στη δεύτερη εκχύλιση (56,9 και 36,92% αντίστοιχα). Τα ποσοστά αυτά συμπίπτουν για το κάθε συστατικό ξεχωριστά αλλά και για το σύνολο. Αυτή η παρατήρηση δεν μπορεί να εξηγηθεί γιατί ενώ φαίνεται ότι η εκχύλιση είναι εύκολη, δεν αναμένεται με τους υπέρηχους να είναι πιο αργή. Μπορεί να υποθέσει κανείς ότι το αποτέλεσμα αυτό είναι χαρακτηριστικό της ρίζας. Η παρατήρηση αυτή είχε γίνει και ποιοτικά από τη μελέτη των φασμάτων UV-Vis.

Με τη μελέτη των φασμάτων FT-IR δεν παρουσιάζονται διαφορές στα φάσματα των εκχυλισμάτων που προέρχονται από τις δύο μεθόδους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η έντονη κορυφή στα 1518cm^{-1} , τόσο στο φάσμα των ακατέργαστων ριζών όσο και των εκχυλισμάτων, ένδειξη ύπαρξης πολλών φαινολικών συστατικών.

Συνοψίζοντας μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι και οι δύο μέθοδοι της εκχύλισης είναι ήπιες, δηλαδή, ενώ εμπλουτίζουν το δείγμα σε φαινολικά συστατικά απομακρύνοντας κάποια μακρομόρια (πολυσακχαρίτες και εστέρες πηκτινών), δεν φαίνεται να προκαλούν μη αντιστρεπτές μεταβολές (οξειδώσεις) στα υπόλοιπα συστατικά.

Επίσης με τη χρήση της φασματοσκοπίας IR, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορεί να αναπτυχθεί μια μέθοδος για γρήγορη ποσοτική εκτίμηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου απευθείας σε ρίζες. Επιπρόσθετα, τα FT-IR φάσματα φαίνεται ότι προσφέρονται για τη γρήγορη παρακολούθηση της πορείας της εκχύλισης ποσοτικά εφόσον αναπτυχθεί κατάλληλη μέθοδος, αλλά σίγουρα ποιοτικά.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα των ριζών της *E. purpurea* ελληνικής καλλιέργειας είναι εφάμιλλα της βιβλιογραφίας, με υψηλό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά υψηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας, με κύριο το κιχορικό οξύ, μόριο μεγάλης βιολογικής αξίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbasi, B.H.**, Tian C-L., Murch S.J., Saxena P.K., Liu C-Z., (2007). Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy rootcultures of *Echinacea purpurea* *Plant Cell Rep* 26:1367–1372.
- Ahuja, I.**, de Vos R.C.H., Bones A.M. and Hall RD. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, Vol. 15, No. 12
- Aiello, N.**, (2002). Growing purple coneflower for medicinal use, *ISAFSA Comunicazioni di Ricerca*, 1: 5–13.
- Becker, P.**, (2000). *Business Guide, Medicinal and Spice Plants, Europe 2001*, Agrimedia Bergen/Dumme, Germany.
- Bauer, R.**, (1999). Chemistry, analysis and immunological investigations of *Echinacea* phytopharmaceuticals, in Wagner, H., Ed., *Immunomodulatory Agents from Plants*, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 41–88.
- Bauer, R.** and Wagner, H., (1991). *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs, in Wagner, H. and Farnsworth, N.R., Eds., *Economic and Medicinal Plant Research*, vol. 5, Academic Press, New York, pp. 253–321.
- Bauer, R.**, Khan, I.A., and Wagner, H., (1988). TLC and HPLC analysis of *Echinacea pallida* and *E. angustifolia* roots, *Planta Medica*, 54: 426–430.
- Bauer, R.**, Remiger, P. and Wagner, H., (1988b), *Echinacea* Vergleichende DC und HPLC: Analyse der Herba–Drogen von *Echinacea purpurea*, *E. pallida* und *E. angustifolia*, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 128, 174–180.
- Beuscher, N.**, Bodinet, C., Willigmann, I. and Egert, D., (1995), Immunmodulierende Eigenschaften von Wurzelextrakten verschiedener *Echinacea*-Arten, *Z. Phytother.*, 16, 157–166.
- Binns, S.E.**, J.F. Livesey, J.T. Arnason and B.R. Baum, (2002), Phytochemical variation in *Echinacea* Moench (Heliantheae: Asteraceae) from roots and flowerheads of wild and cultivated populations, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3673–3687.
- Bergeron, C.**, Livesey, J.F., Awang, D.V.C., Arnason, J.T., Rana, J., Baum, B.R. and Lechtamo, W., (2000). A quantitative HPLC method for the quality assurance of *Echinacea* products on the North American market, *Phytochem. Anal.*, 11: 207–215.
- Berti, M.**, Wilckens, R., Fischer, S. and Hevia, F., 2002, Effect of harvest season, nitrogen, phosphorus and potassium on root yield, echinacoside and alkamides in *Echinacea angustifolia* L. in Chile, *Acta Hort.*, 576: 303–310.

- Brand-Williams W.**, Cuvelier M.E, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebens Wiss Technol* , 28(1), 25–30.
- Brown P.N.**, Chan M., Betz J.M. (2010). Optimization and single laboratory validation study of a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of phenolic *Echinacea* constituents. *Anal Bioanal Chem* 397:1883–1892.
- Camm, E. L.**, Towers, G. H. N. (1973). Phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry*, 12, 961-973. Review article.
- Castro J.**, Balarama Krishna M. V., Choiniere J.R., Marcus R.K. (2010). Analysis of caffeic acid derivatives in echinacea extracts by liquid chromatography particle beam mass spectrometry (LC–PB/MS) employing electron impact and glow discharge ionization sources. *Anal Bioanal Chem*, 397:1259–1271.
- Cech N.B.**, Eleazer M. S., Shoffner L.T., Crosswhite M. R., Davis A.C., Mortenson A.M., (2006). High performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous analysis of alkamides and caffeic acid derivatives from *Echinacea purpurea* extracts. *J. of Chrom. A*, 1103, 219–228.
- Cheminat, A.**, Brouillard, R., Guerne, P., Bergmann, P. and Rether, B., (1989), Cyanidin 3-malonylglucoside in *Echinacea species*, *Phytochemistry*, 28, 3246–3247.
- Cheminat, A.**, Zawatzky, R., Becker, H. and Brouillard, R., 1988, Caffeoyl conjugates from *Echinacea species*: structures and biological activity, *Phytochemistry*, 27, 2787–2794.
- Clifford, L.J.** Nair, M.G., Rana, J. and Dewitt, D.L., 2002, Bioactivity of alkamides isolated from *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Phytomedicine*, 9: 249–253.
- Dalby-Brown, L.**, Barsett, H., Landbo, A. R., Meyer, A. S., & Molgaard, P. (2005). Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9413–9423.
- Egert, D.** and Beuscher, N., (1992), Studies on antigen specificity of immunoreactive arabinogalactan proteins extracted from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea purpurea*, *Planta Med.*, 58, 163–165.
- Facino, R.M.**, Carini, M., Aldini, G., Saibene, L., Pietta, P. and Mauri, P., (1995), Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced

degradation: a potential use of Echinacea extracts in the prevention of skin photodamage, *Planta Med.*, 61: 510–514.

Folin O. & Ciocalteu V., (1927). On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 27, 239-343.

Foster, S., (1991). Echinacea: Nature's Immune Enhancer, Healing Arts Press, Rochester, VT.

Goel, V., Chang, C., Sloma, J.V., Barton, R., Bauer, R., Gahler, R. and Basu, T.K., (2002), Alkylamides of Echinacea purpurea stimulate alveolar macrophage function in normal rats, *Int. J. Immunopharmacol.*, 2: 381–387.

Heinzer, F., Chavanne, M., Meusy, J.-P., Maitre, H.-P., Giger, E. and Baumann, T.W., (1988), Ein Beitrag zur Klassifizierung der therapeutisch verwendeten Arten der Gattung *Echinacea*, *Pharm. Acta. Helv.*, 63, 132–136.

Hu C, Kitts DD. (2000). Studies on the antioxidant activity of Echinacea root extracts. *J Agric Food Chem* 48: 1466–1472.

Lefter, D.J. and Granger, D.N., (2000), Oxidative stress and cardiac disease, *Am. J. Med.*, 109: 315–323.

Li W., Sun Y., van Breemen R.B.; Fitzloff J.F. (2004). Evaluation of Major Caffeic Acid Derivatives in Echinacea purpurea Dietary Supplements by HPLC with Photodiode Array Detection and Electrospray Mass Spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 27: 16, 2507-2529.

Li TSC, Wardle DA. (2001). Effects of root drying temperature and moisture content on the levels of active ingredients in Echinacea roots. *J Herbs, Spices Med Plants* 8: 15–21.

Liu C-Z., Abbasi H., GaoM., Murch S.J., Saxeva P.K., (2006). Caffeic Acid Derivatives Production by Hairy Root Cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Agric. Food Chem*, 54, 8456-8460.

Livesey, J., Awang, D.V.C., Arnason, J.T., Letchamo, W., Barrett, M. and Pennyroyal, G., (1999). Effect of temperature on stability of marker constituents in Echinacea purpurea root formulations, *Phytomedicine*, 6: 347–349.

Luo, X.B., Chen, B., Yao, S.Z., Zeng, J.G., (2003). Simultaneous analysis of caffeic acid derivatives and alkamides in roots and extracts of Echinacea purpurea by high-performance liquid chromatography- photodiode array detection-electrospray mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, 986, 73-81.

- Maxwell A.**, Jones P., Saxena P.K., Murch S.J., (2009). Elicitation of secondary metabolism in *Echinacea purpurea* L. by gibberellic acid and triazoles *Eng. Life Sci.*, 9, No. 3, 205–210.
- Niki, E.**, (1990), Free radical initiator as sources of water or lipid-soluble peroxy radicals, *Methods Enzymol.*, 186: 100–108.
- Nüsslein, B.**, Kurzmann, M., Bauer, R. and Kreis, W., (2000). Enzymatic degradation of cichoric acid in *Echinacea purpurea* preparation, *J. Nat. Prod.*, 63: 1615–1618.
- Parejo, I.**, Codina, C., Petrakis, C., & Kefalas, P. (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co (II)/EDTA- induced luminal chemiluminescence and DPPH free radical assay. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44, 507-512.
- Pellati F.**, Benvenuti S., Magro L., Melegari M., Lasseigne T. (2005). Variability in the Composition of Anti-oxidant Compounds in *Echinacea* Species by HPLC. *Phytochem. Anal.* 16, 77–85.
- Pellati F.**, Benvenuti S., Magro L., Melegari M., Soragni F. (2004). Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. *J Pharm Biomed Anal.* 35, 289-301.
- Percival, M.** Antioxidants. (1996). Clinical nutrition insights. NUT031 1/96 Rev. 10/98. Advanced Nutrition Publications, Inc., Revised 1998.
- Perry, N.B.**, Anderson, R., Burgess, E.J., Follett, J.M., Martin, D. and Smallfield, B.M., (2002). *Echinacea purpurea*: Variation in Yield and Quality between Plant Parts, Harvest Dates and Sites, Crop & Food Research, New Zealand.
- Perry, N.B.**; Burgess, E.J.; Glennie, V.I. (2001). *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1702–1706.
- Pomponio, R.** Gotti, M. Hudaib, V. Cavrini (2002). Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to *Echinacea purpurea* plant extracts. *J. Chromatogr. A* , 945,(1-2), 239–247.
- Proksch, A.** and Wagner, H., (1987). Structural analysis of a 4-O methylglucuronarabinoxylan with immunostimulating activity from *Echinacea purpurea*, *Phytochemistry*, 26, 1989–1993.
- Reinke RA**, Lee DJ, McDougall BR, King PJ, Victoria J, Mao Y, Lei X, Reinecke MG, Robinson WE jr (2004). L-chicoric acid inhibits human immunodeficiency virus

type 1 integration in vivo and is a noncompetitive but reversible inhibitor of HIV-1 integrase in vitro. *Virology*. Sep 1;326(2).

Röder, E., Wiedenfeld, H., Hille, T. and Britz-Kirstgen, R., (1984), Pyrrolizidine in *Echinacea angustifolia* DC. and *Echinacea purpurea* Moench — Isolierung und Analytik, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 124, 2316–2318.

Schieffer, G.W., (2000). Validated HPLC method for caffeic-acid derivatives and alkamides in Echinacea solid dosage forms using a single extraction procedure, *J. Am. Nutraceutical Assoc.*, 3: 67–81.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 29: 152-178.

Singleton V.L., Rossi Jr., J.A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic–phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* , 16, 144–158.

Skoog D.A., Holler, F.J and Nieman, T.A. (eds.). 1998. Principles of Instrumental Analysis. 5th Ed. Harcourt Brace College Publishers, USA. pp. 380-403.

Socrates, G. (1994). Infrared characteristic group frequencies, tables and charts, 2nd edition, John Wiley & sons, Chichester

Sloley, B.D., Urichuk, L.J., Tywin, C., Coutts, R.T., Pang, P.K. and Shan, J.J., (2001). Comparison of chemical components and antioxidant capacity of different Echinacea species, *J. Pharm. Pharmacol.*, 53:849–857.

Sökmen M., Serkedjieva J., Daferera D., Gulluce M., Polissiou M., Tepe B., Akpulat H.A., Sahin F., Sokmen A. (2004). In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, and Antiviral Activities of the Essential Oil and Various Extracts from Herbal Parts and Callus Cultures of *Origanum acutidens* *J. Agric. Food Chem.* 52, 3309-3312.

Stanisavljevic, I., Stojicevic, S., Velickovic, D, Veljkovic, V., Lazic, M., (2009). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction. Biotechnology and Bioengineering, *Chin. J. Chem. Engin.* 17(3) 478-483.

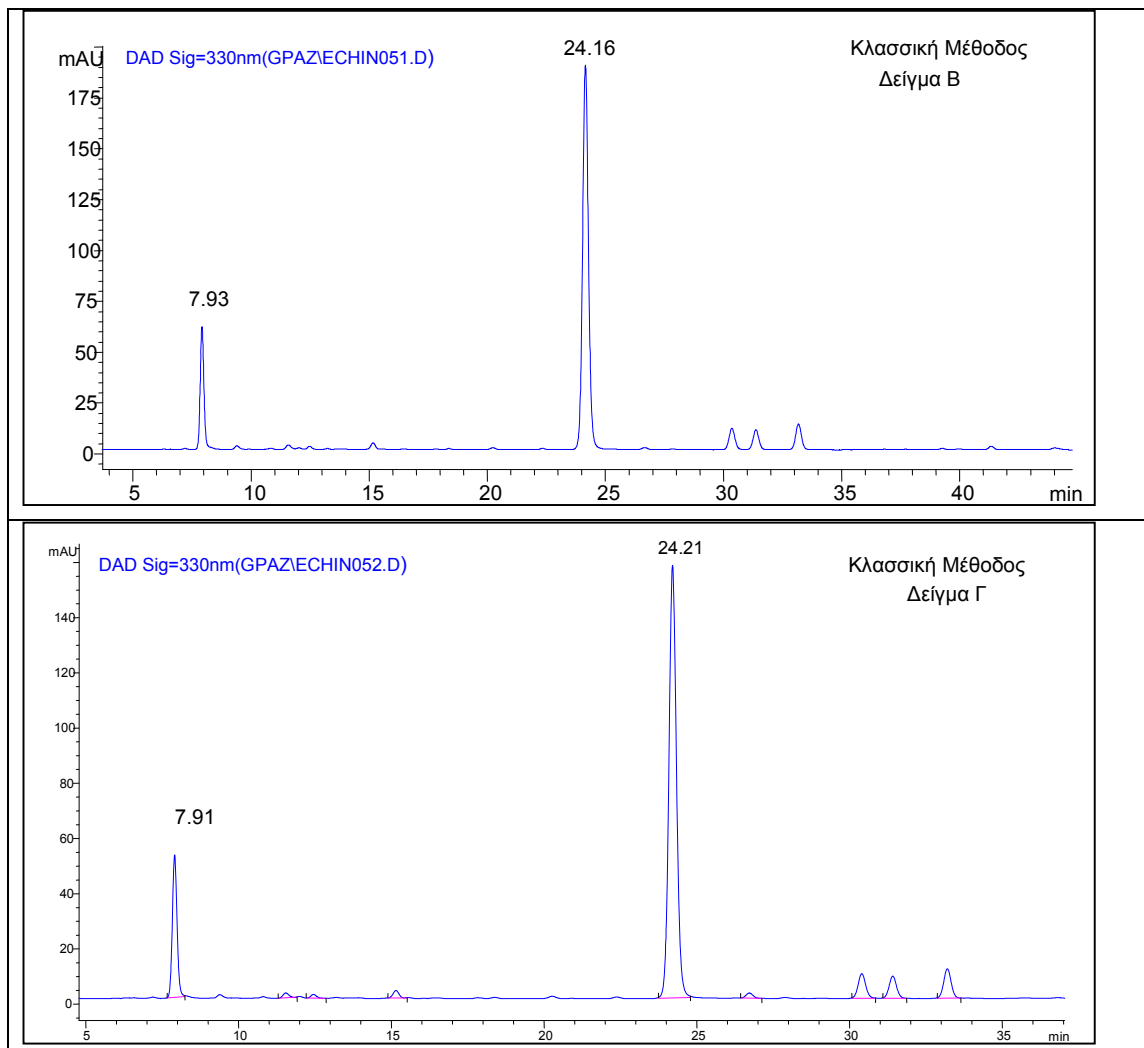
Stuart, D.L. and Wills, R.B.H., (2000a). Alkylamide and cichoric acid levels in *Echinacea purpurea* tissues during plant growth, *J. Herbs Spices Med. Plants*, 7: 91–101.

- Stuart, D.L.** and Wills, R.B.H., (2000b). Factors affecting the extraction of alkamides and cichoric acid during ethanolic processing of *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Aust. J. Exp. Agric.*, 40: 873–877.
- Tepe B.,** Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlub G., Polissiou M., Okmena A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry* 84, 519–525.
- Thygesen, L.,** Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L.H., Molgaard, P. (2007). Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea* alone and in combination, *Food Chem.*, 101, 74-81.
- Tousch, D.,** Lajoix, A., Hosy, E., Azay-Milhau, J., Ferrare, K., Jahannault, C., Cros, G., & Petit, P. (2008). Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucoseuptake. *Bioch. and Bioph. Res. Com.*, 377, 131–135.
- Tilburt, J. C.,** Emanuel, E. J., & Miller, F. G. (2008). Does the evidence make a difference in consumer behavior? Sales of supplements before and after publication of negative research results. *J. of Gen. Int. Med.*, 23, 1495–1498.
- U.S. Pharmacopeia,** (2000), *Echinacea angustifolia*, U.S. Pharmacopeia Monograph, Pharmacopeial Forum, 26: 609–614.
- Wagner, H.,** Stuppner, H., Schäfer, W. and Zenk, M., (1988). Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures, *Phytochemistry*, 27, 119–126.
- Wang, G;** Cole, R. B. (1996). Effects of Solvent and Counterion on Ion Pairing and Observed Charge States of Diquaternary Ammonium Salts in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 7(10), 1050-1058.
- Waterman P.G.,** Mole S., (1994) Analysis of Phenolic Plant Metabolites; *Blackwell Scientific*: Oxford, U.K., pp 83-91.
- Wills, R.B.H.** and Stuart, D.L., (2000), Effect of handling and storage on alkamides and cichoric acid in *Echinacea purpurea*, *J. Sci. Food Agric.*, 80: 1402–1406.
- Wolfgang, K.,** Ursula, S. and Birgit, N., (2000), Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the herbal drug *Echinacea purpurea* herb (purple coneflower herb). *J. Appl. Bot.*, 74: 106–112.

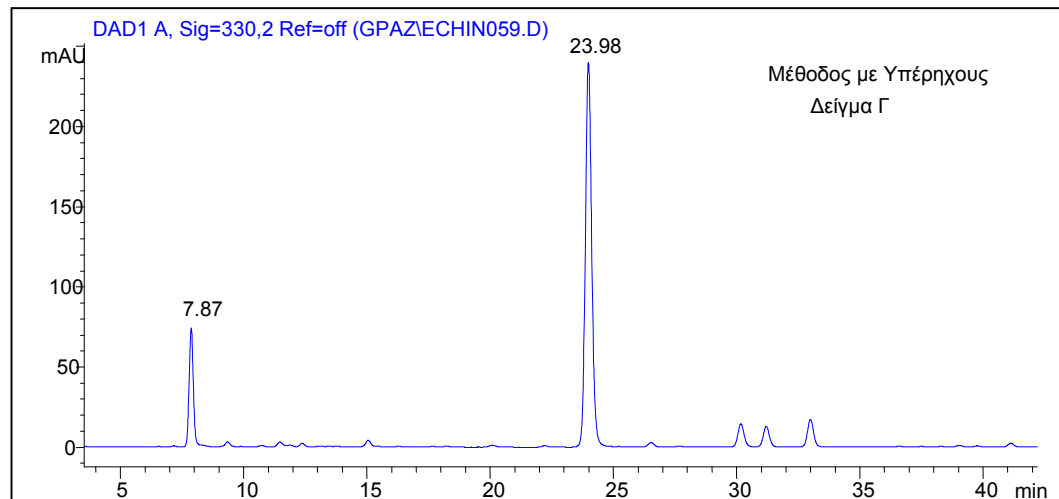
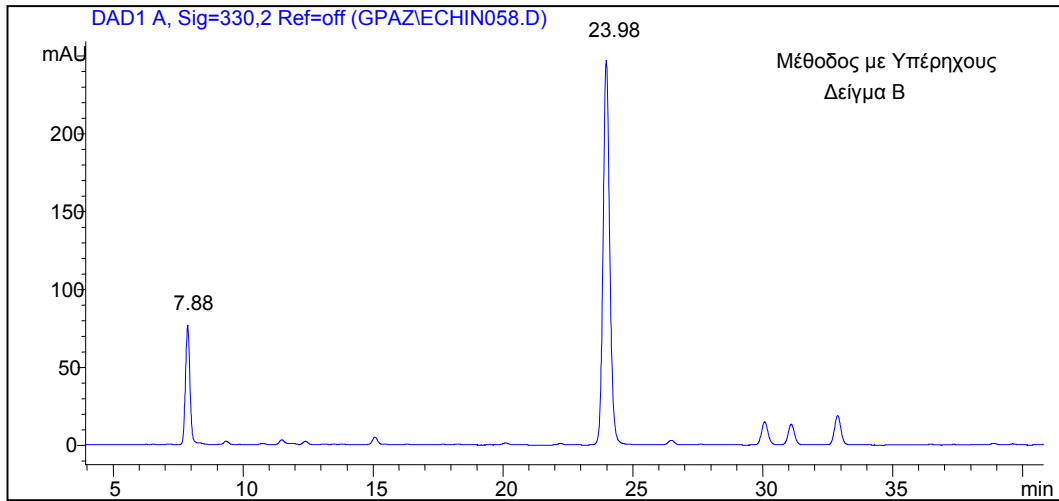
Wolkart K, Gangemi JD, Turner RB, Bauer R (2004). Enzymatic Degradation of Echinacoside and Cynarine in *Echinacea angustifolia* Root Preparations *Pharm Biol* 42:443–448.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

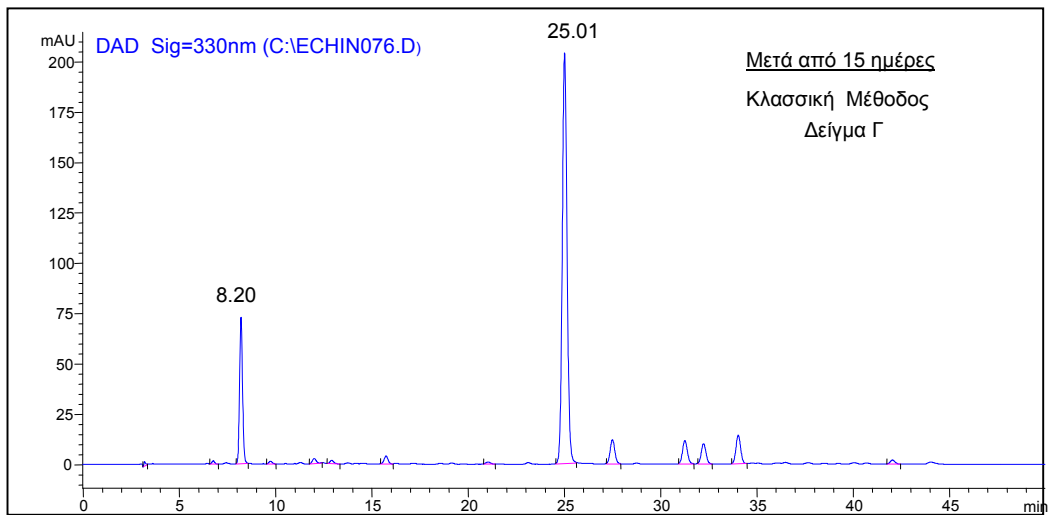
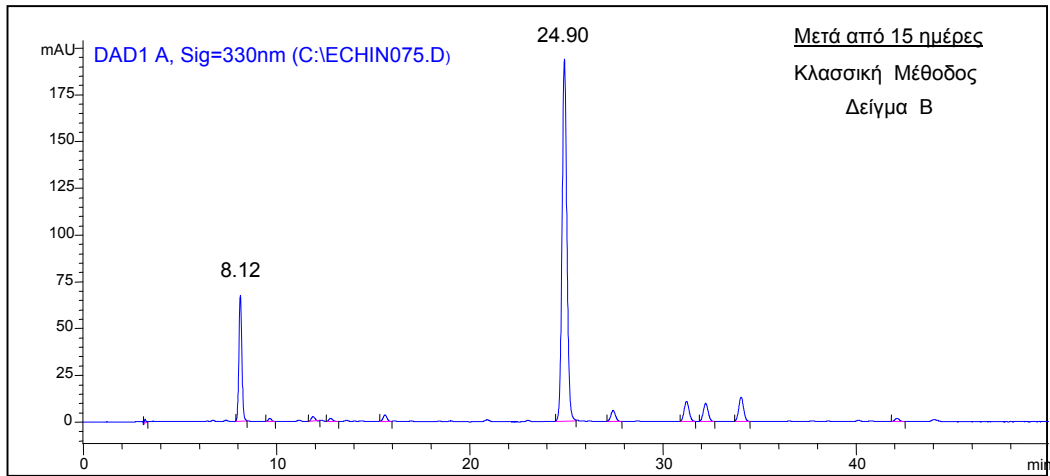
I. HPLC χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων ριζών *E. purpurea*



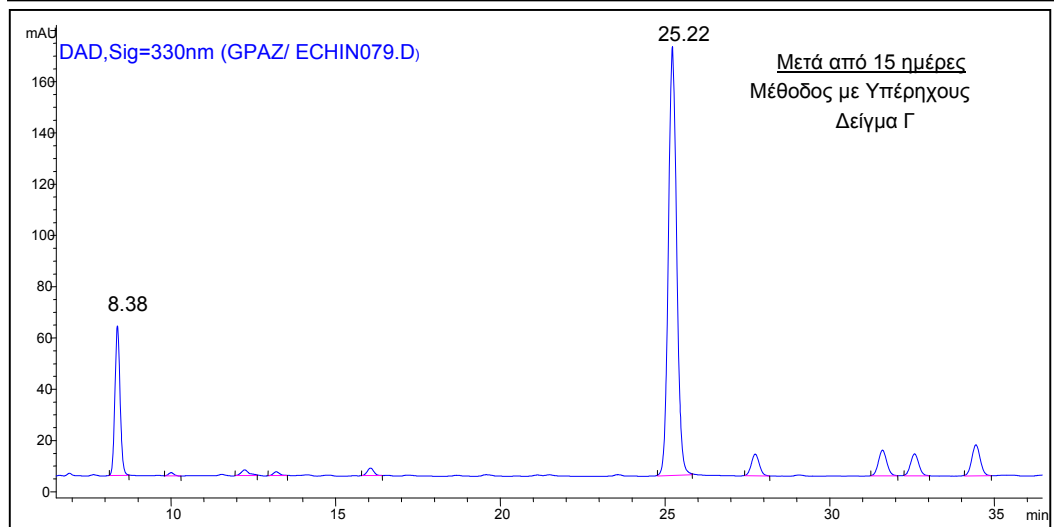
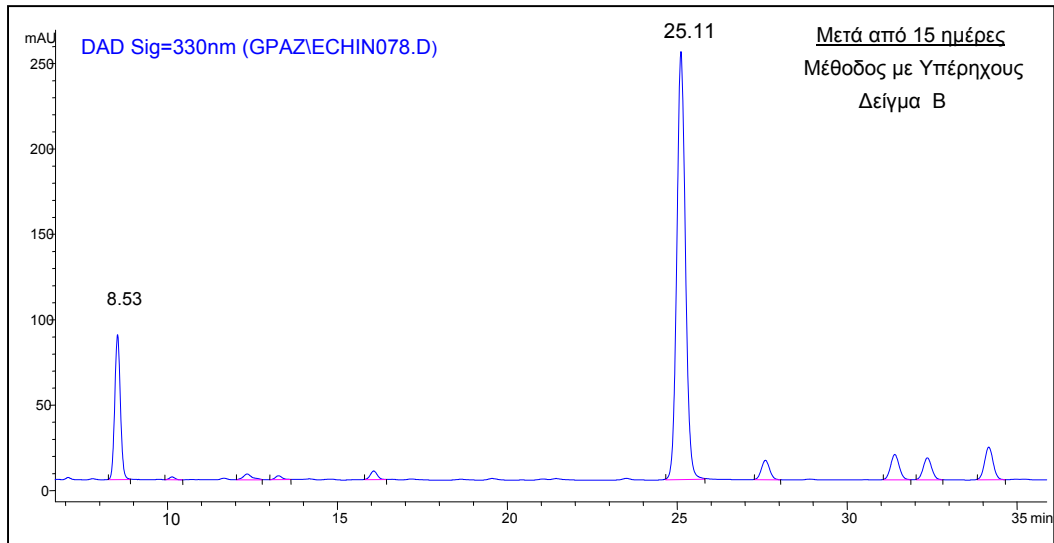
Σχήμα 1: Χρωματογραφήματα HPLC δειγμάτων ριζών *E. purpurea* μετά από εκχύλιση με την Κλασσική Μέθοδο. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος.



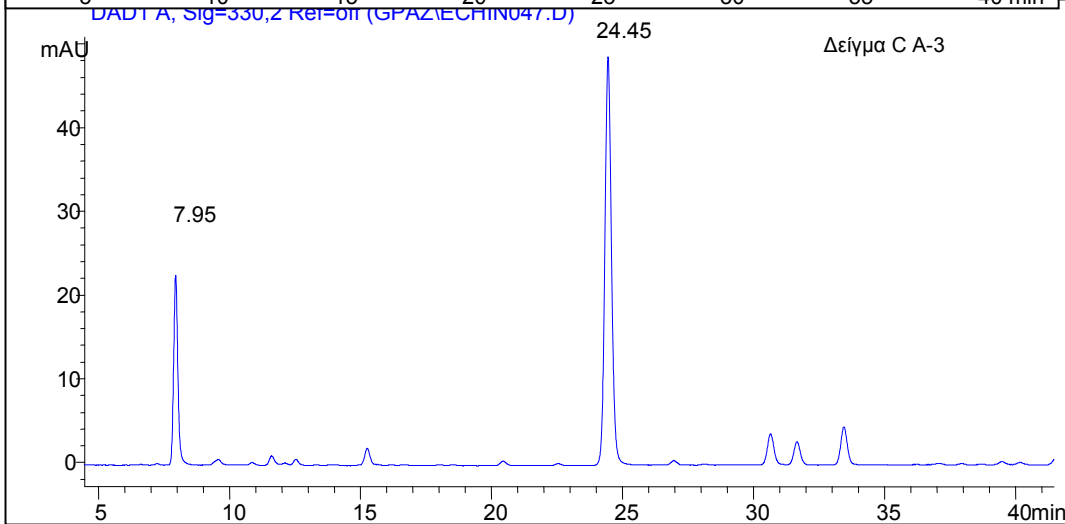
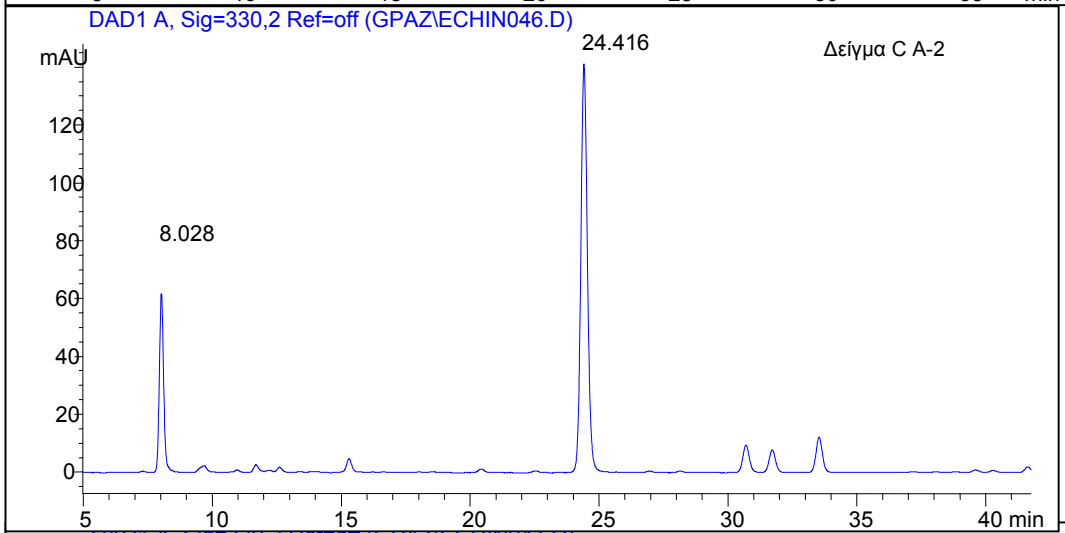
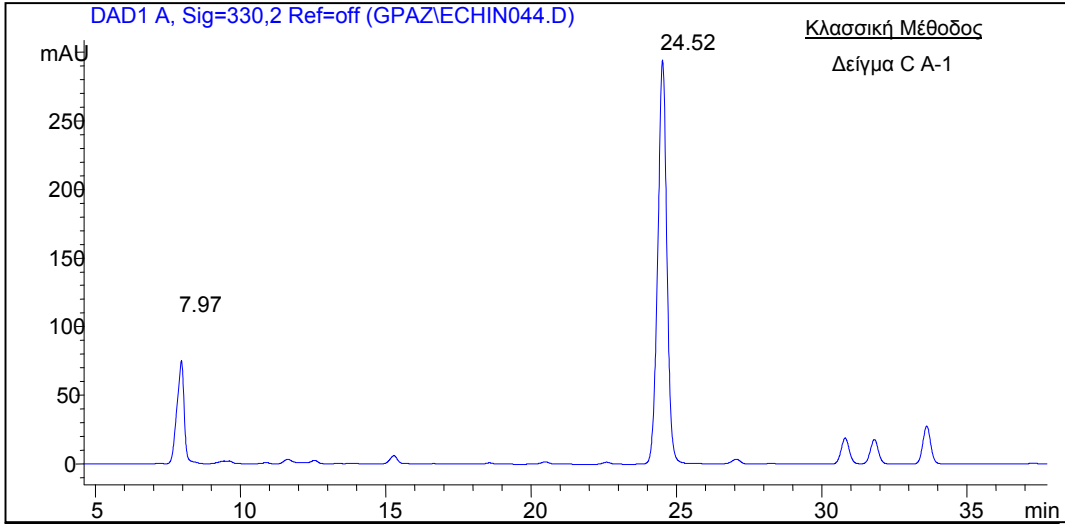
Σχήμα 2: Χρωματογραφήματα HPLC δειγμάτων ριζών *E. purpurea* μετά από εκχύλιση με Μέθοδο υποβοηθούμενη από Υπέρηχους. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος.

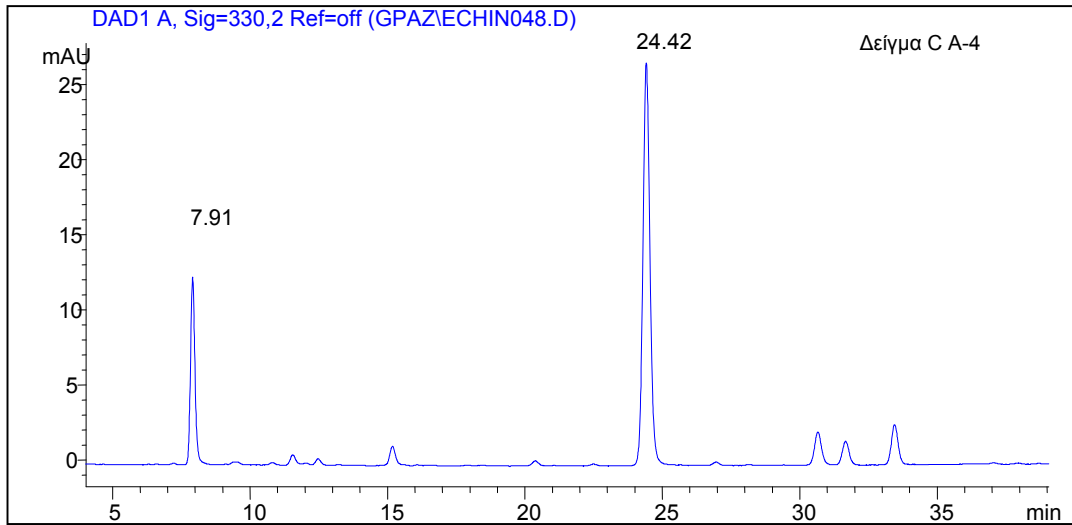


Σχήμα 3: Χρωματογραφήματα HPLC δειγμάτων ριζών *E. purpurea* μετά από δεκαπέντε ημέρες από την εκχύλιση με την Κλασσική Μέθοδο. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος.

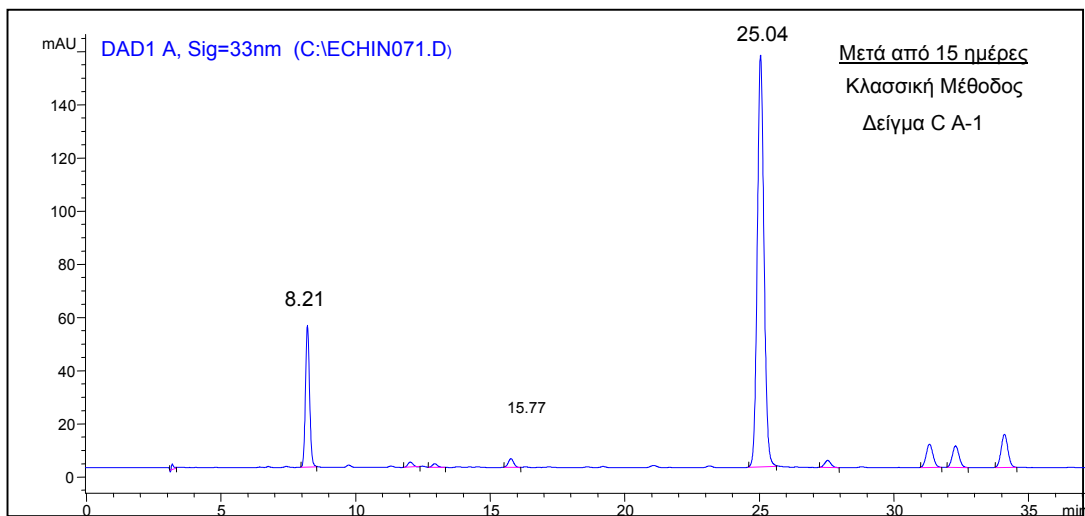


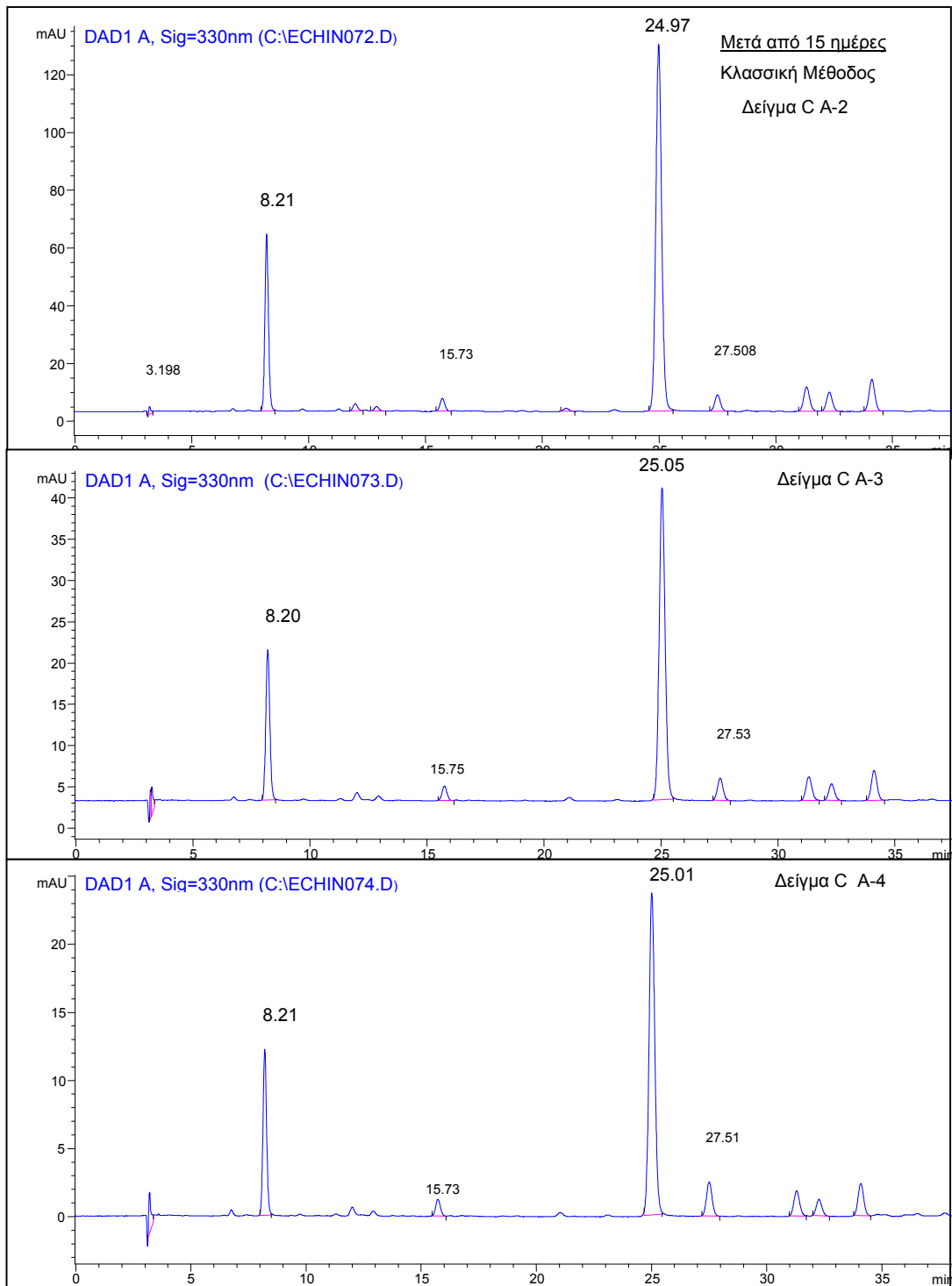
Σχήμα 4: Χρωματογραφήματα HPLC δειγμάτων ριζών *E. purpurea* μετά από δεκαπέντε ημέρες από την εκχύλιση με Μέθοδο υποβοηθούμενη από Υπέρηχους. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος.



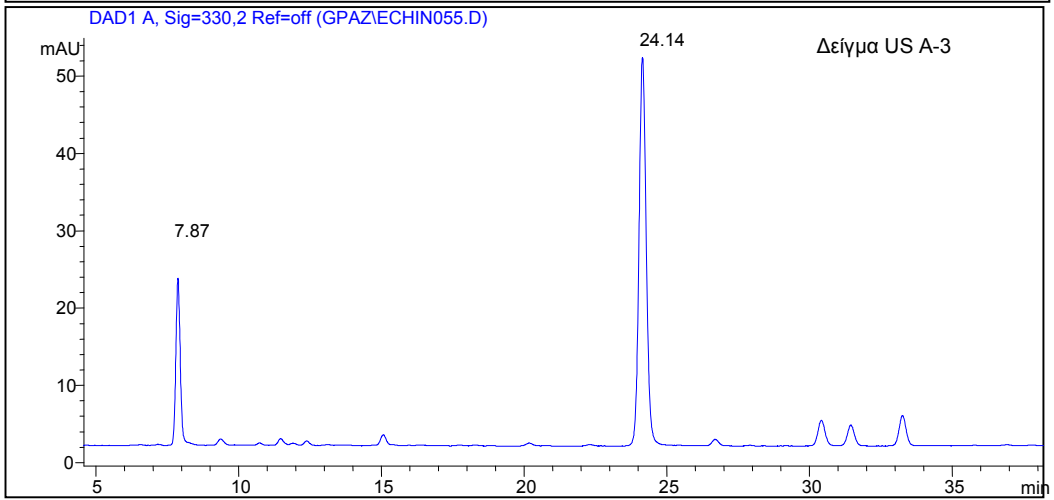
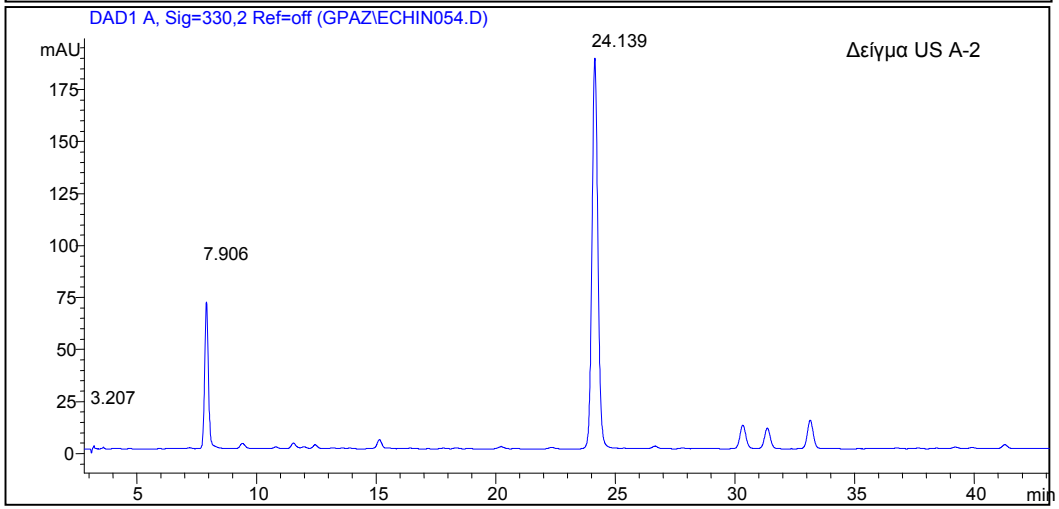
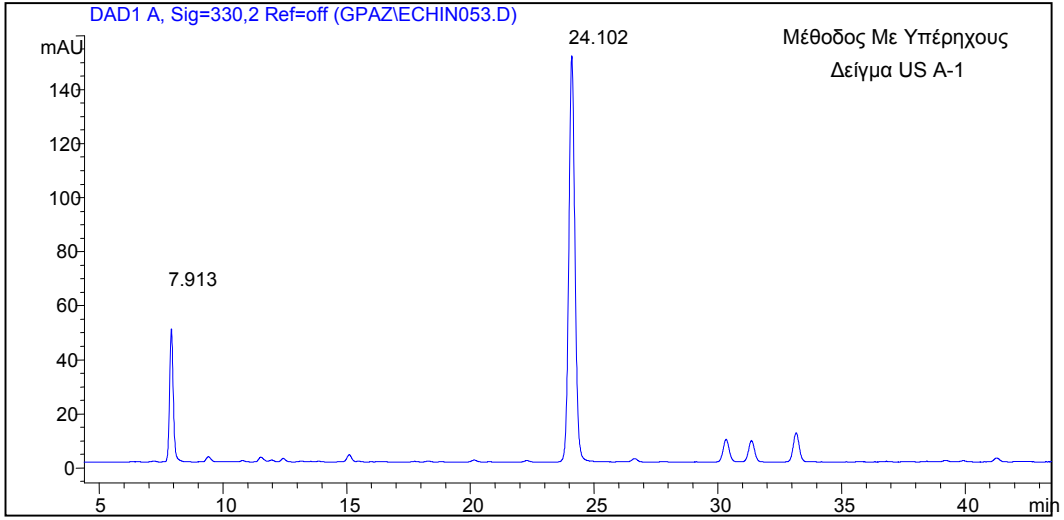


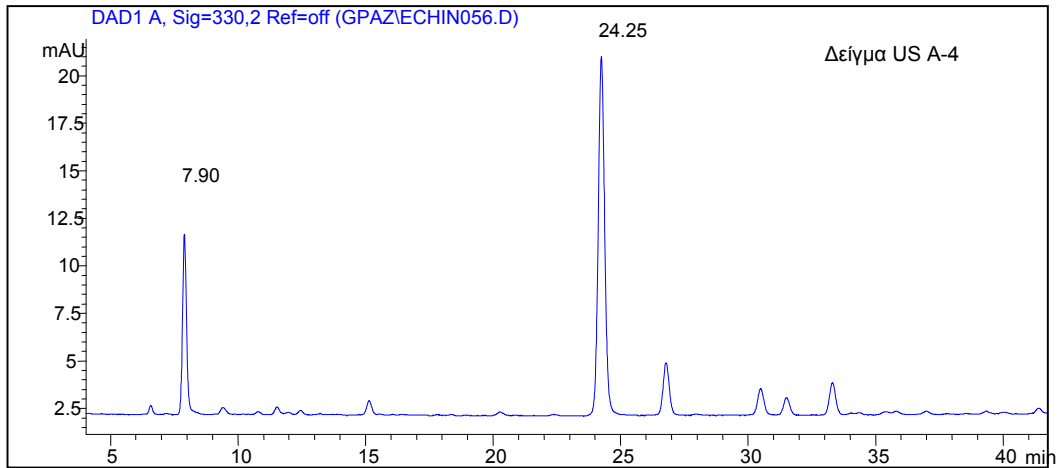
Σχήμα 5: Χρωματογραφήματα HPLC των κλασμάτων 1-4 δειγμάτων ριζών *E. purpurea* μετά από εκχύλιση με την Κλασσική Μέθοδο. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος.



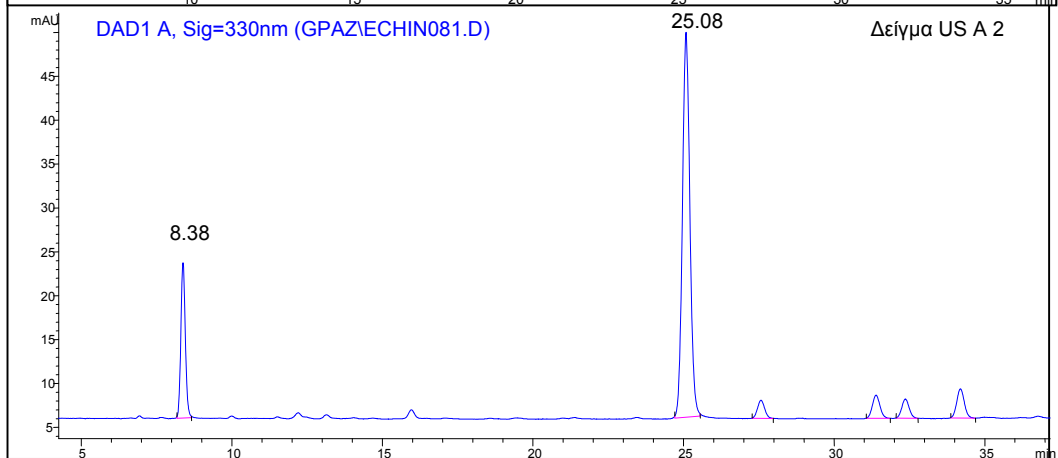
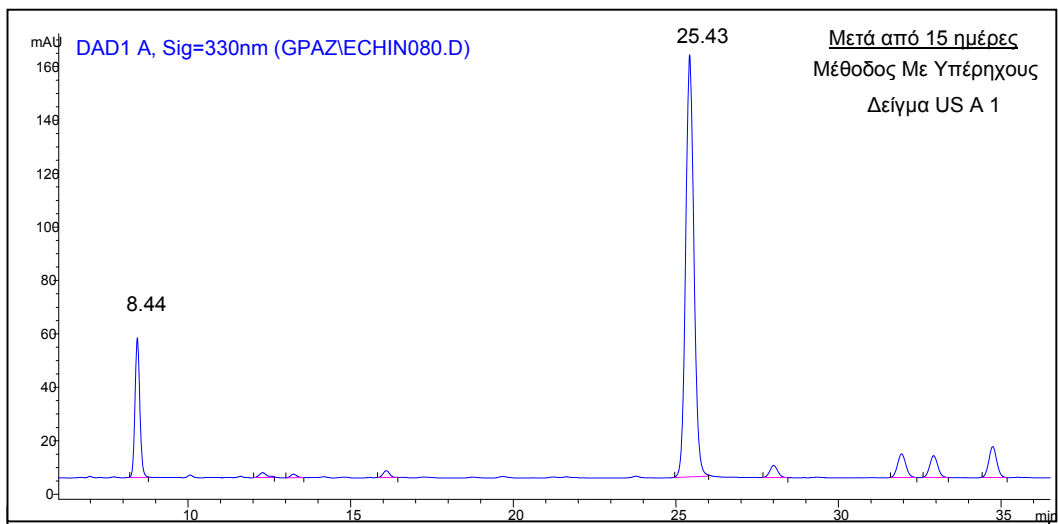


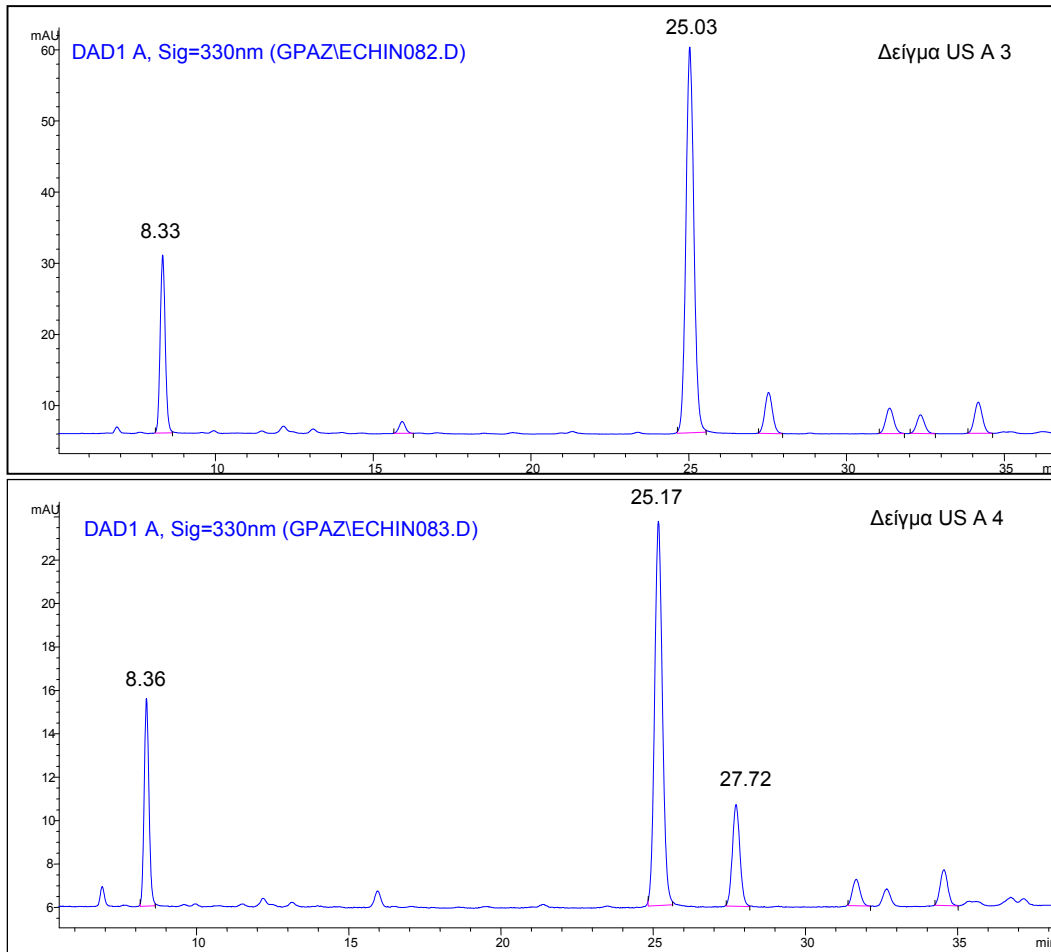
Σχήμα 6: Χρωματογραφήματα HPLC μετά από δεκαπέντε ημέρες, των κλασμάτων 1-4 δειγμάτων ριζών *E. purpurea* μετά από εκχύλιση με την Κλασσική Μέθοδο. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος





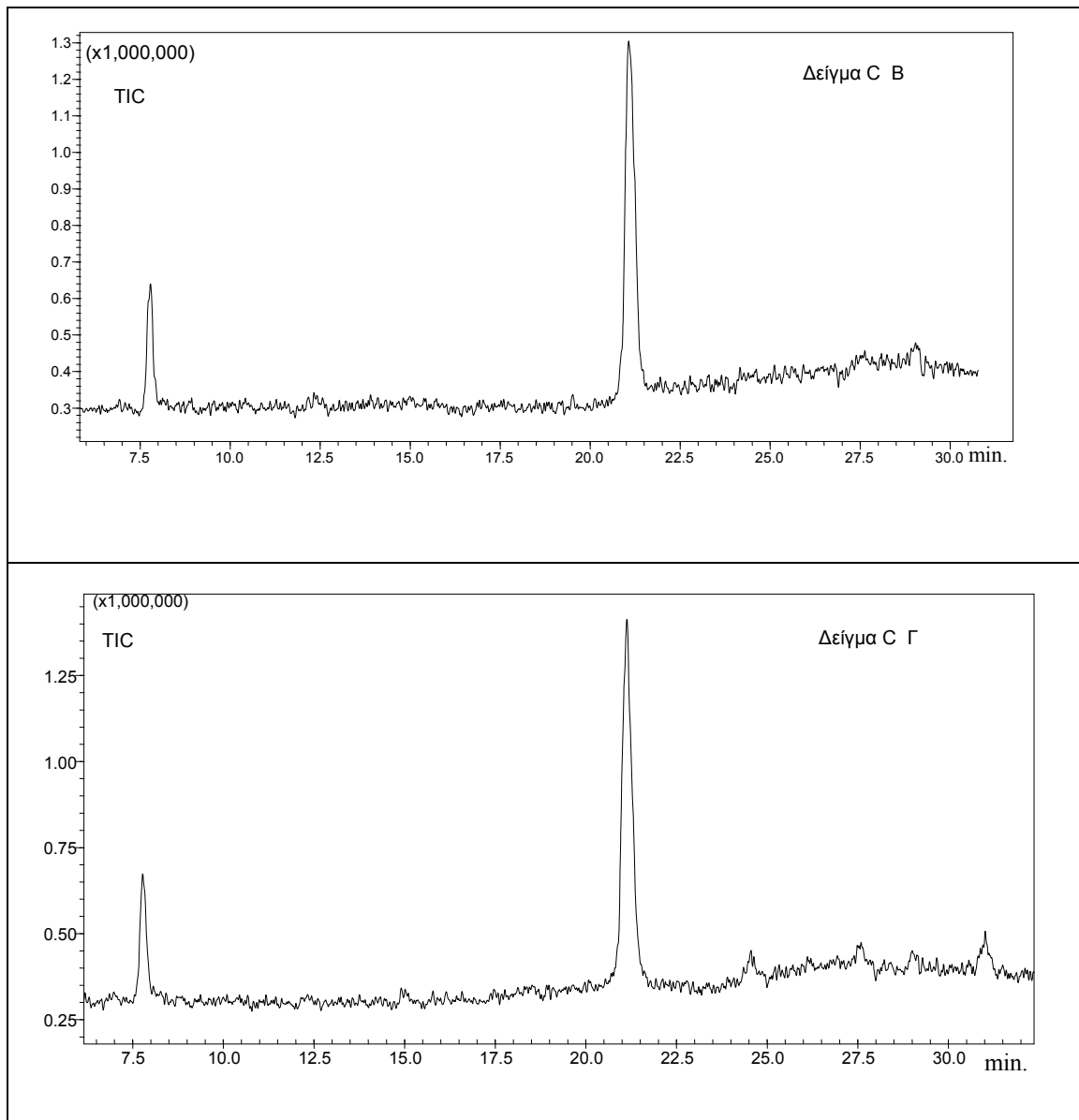
Σχήμα 7: Χρωματογραφήματα HPLC των κλασμάτων 1-4 δειγμάτων ριζών *E. purpurea* μετά από εκχύλιση με Μέθοδο υποβοηθούμενη από Υπερήχους. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος



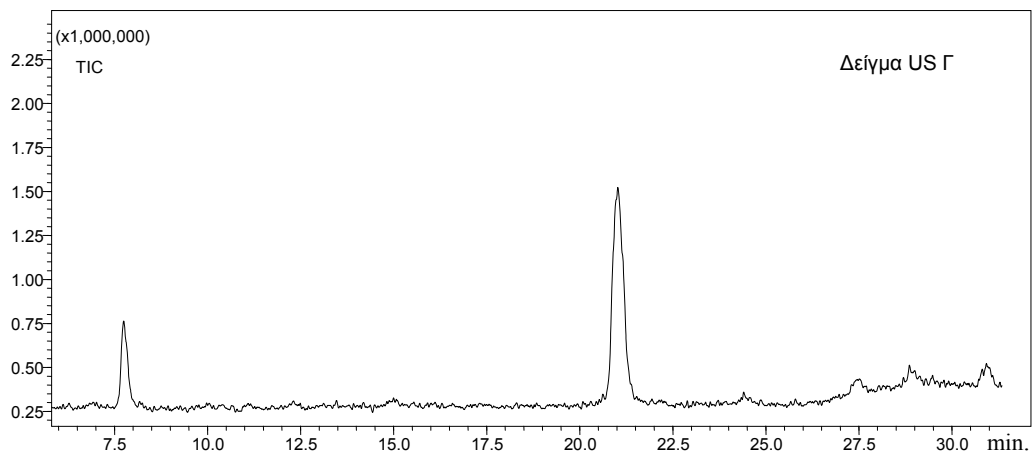
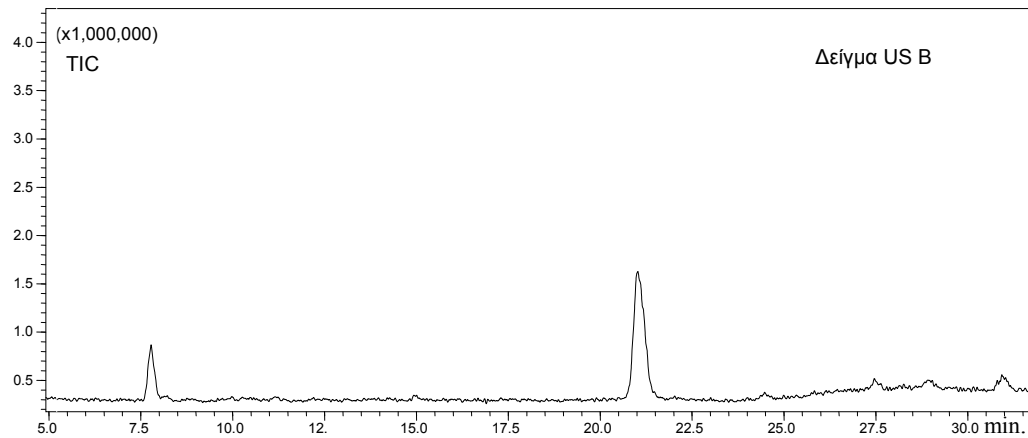


Σχήμα 8: Χρωματογραφήματα HPLC μετά από δεκαπέντε ημέρες των κλασμάτων 1-4, δειγμάτων ριζών *E. purpurea* μετά από εκχύλιση με Μέθοδο υποβοηθούμενη από Υπερήχους. Φαίνεται ο χρόνος συγκράτησης των δύο κύριων συστατικών του δείγματος.

Π.Ολικό Ρεύμα Ιόντων (TIC), όπως προκύπτει από ανάλυση με LC-MS εκχυλισμάτων ριζών *E. purpurea*

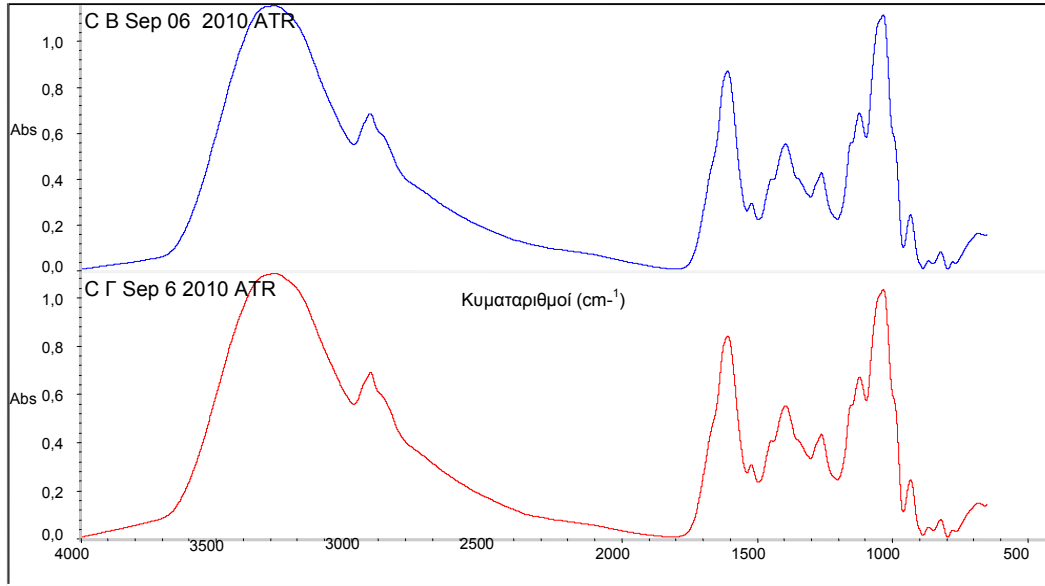


Σχήμα 9: Το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC), όπως προκύπτει από την ανάλυσή τους στο LC-MS, δειγμάτων ριζών *Echinacea purpurea* τα οποία εκχυλίστηκαν με την Κλασική Μέθοδο.

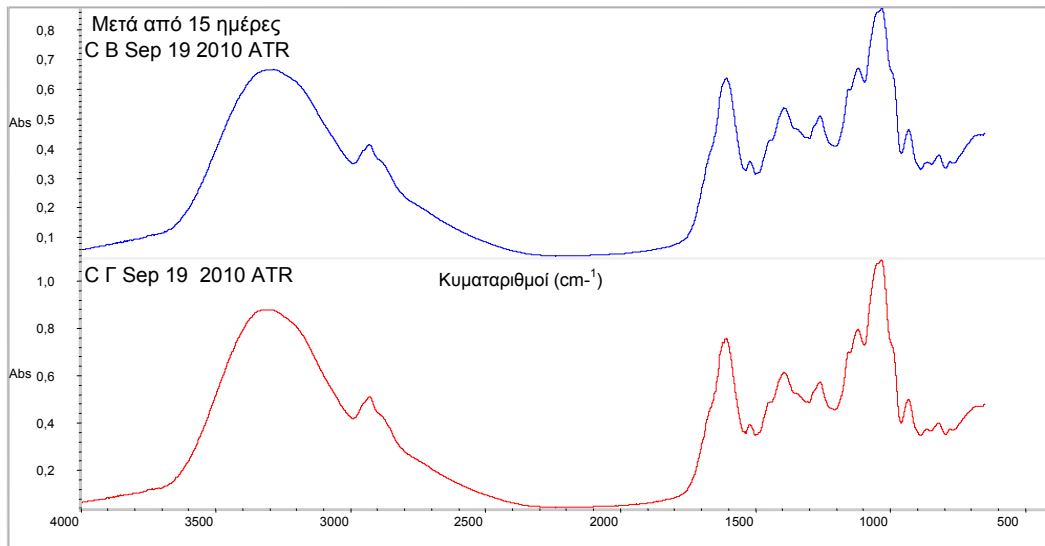


Σχήμα 10: Το ολικό ρεύμα ιόντων (TIC), όπως προκύπτει από την ανάλυσή τους στο LC-MS, δειγμάτων ριζών *Echinacea purpurea* τα οποία εκχυλίστηκαν με τη Μέθοδο με Υπέρηχους.

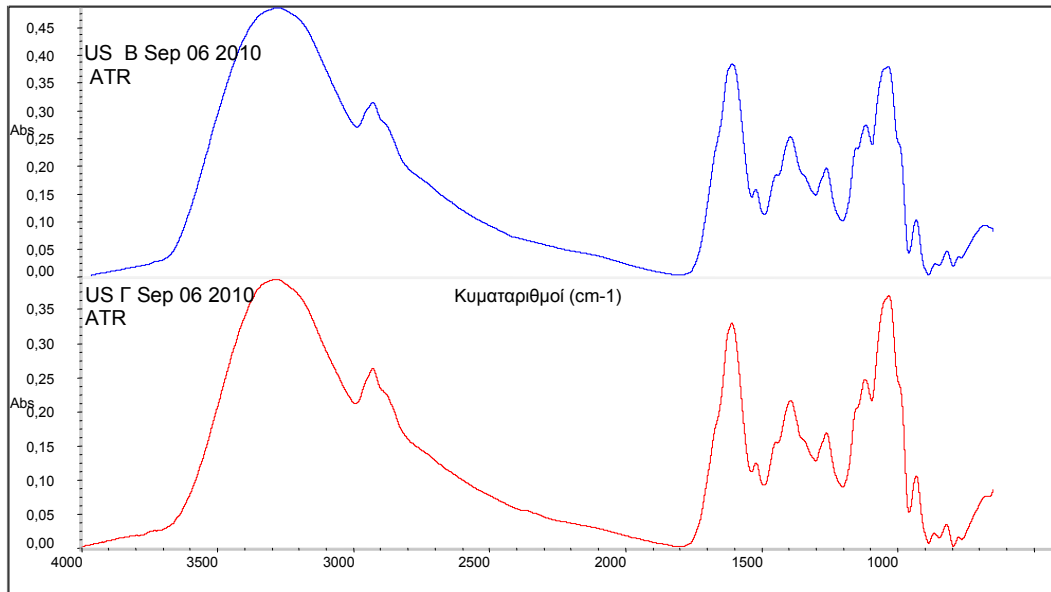
III. FT-IR φάσματα εκχυλισμάτων ριζών της *E. purpurea* με την τεχνική ATR



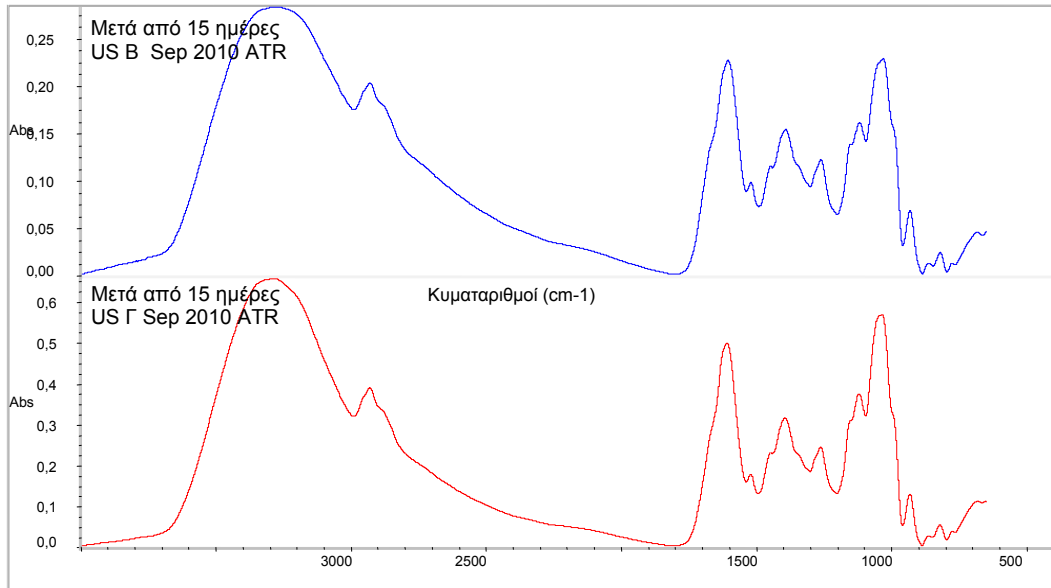
Σχήμα 11: FT-IR φάσματα των εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* που εκχυλίστηκαν με την Κλασσική Μέθοδο, με την τεχνική ATR.



Σχήμα 12: FT-IR φάσματα μετά από δεκαπέντε ημέρες των εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* που εκχυλίστηκαν με την Κλασσική Μέθοδο, με την τεχνική ATR.



Σχήμα 13: FT-IR φάσματα των εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* που εκχυλίστηκαν με Μέθοδο υποβοηθούμενη από Υπέρηχους, με την τεχνική ATR.



Σχήμα 14: FT-IR φάσματα μετά από δεκαπέντε ημέρες, των εκχυλισμάτων των ριζών της *E. purpurea* που εκχυλίστηκαν με Μέθοδο υποβοηθούμενη από Υπέρηχους, με την τεχνική ATR.