

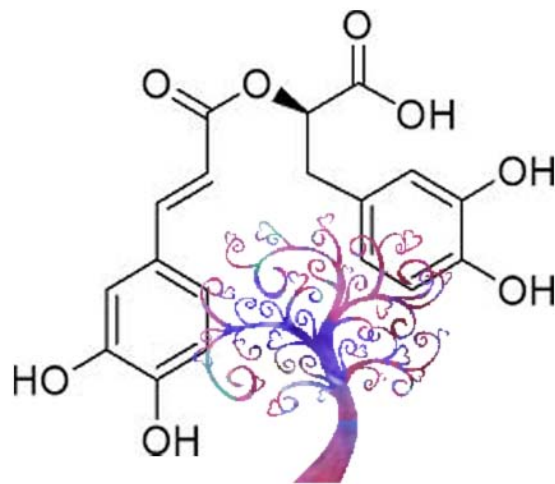


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑ  
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δημήτριος Κ. Σάλτας

« Προσδιορισμός του Ροσμαρινικού Οξέος σε Βότανα με την  
Εφαρμογή της Υγρής Χρωματογραφίας, της Φασματοσκοπίας  
Υπερύθρου και της Χημειομετρίας »



Επιβλέπων Καθηγητής :

Ταραντίλης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2012

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**  
**ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑ**  
**ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Δημήτριος Κ. Σάλτας**

Χημικός

**« Προσδιορισμός του Ροσμαρινικού Οξέος σε Βότανα με την  
Εφαρμογή της Υγρής Χρωματογραφίας, της Φασματοσκοπίας  
Υπερύθρου και της Χημειομετρίας »**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ταραντίλης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

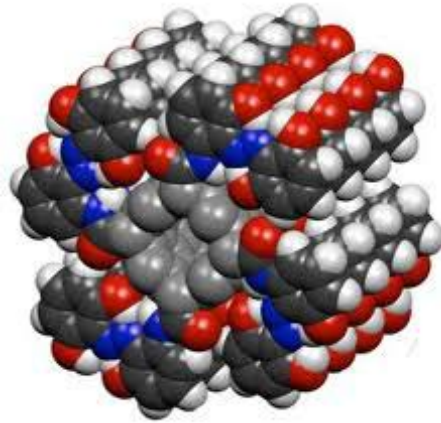
Πολυσίου Μόσχος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Παππάς Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2012**

*« Κάθε επιστήμη αρχίζει σαν φιλοσοφία  
και τελειώνει σαν τέχνη! »*



*Will Durant, Αμερικανός φιλόσοφος.*

## *ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ*

Θα ήθελα καταρχάς, να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη, εισηγητή του θέματος και επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής για την άψογη συνεργασία, τις συμβουλές, την ενθάρρυνση και την **εμπιστοσύνη** που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών.

Επίσης, να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας του Γενικού Τμήματος Καθηγητή Μόσχο Πολυσιού, για τη διάθεση του εργαστηριακού εξοπλισμού και ήταν **τιμή** μου να μαθητεύσω κάτω από τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του.

Να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή Χρήστο Παππά, για την πολύτιμη βοήθεια του στο κομμάτι της φασματοσκοπίας υπερύθρου, τα **επικοδομητικά** του σχόλια και την άριστη καθοδήγηση του.

Ένα **τεράστιο** ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Δήμητρα Διαφερέρα, που με στήριξε επιστημονικά και ψυχολογικά καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και ειδικά στην υγρή χρωματογραφία. Επίσης, στους φίλους Χάρη, Λευτέρη, Ειρήνη και Νάντια, την «ομάδα» του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια τους, όποτε τους είχα ανάγκη. Τέλος, να ευχαριστήσω και όλους τους Καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του Κλάδου ΙΙΙ, ο καθένας με τις δικές του γνώσεις συνέβαλε σ' αυτό το πλούσιο και ενδιαφέρον, επιστημονικό μου ταξίδι.

Την παρούσα εργασία, να την αφιερώσω στην φίλη μου Μυρτώ και στην Βιολέττα, οι οποίες στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε αγωνία, δυσκολία, αλλά και χαρά σ' όλη μου αυτήν την προσπάθεια, καθώς και στην οικογένεια μου.

*Δημήτριος Σάλτας*

*Αθήνα, Ιούνιος 2012*

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	I
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ .....	II
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	III
ABSTRACT .....	IV

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αρωματικά φαρμακευτικά φυτά .....	1
1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες .....	1
1.3 Φαινολικές ενώσεις.....	2
1.4 Φαινολικά οξέα .....	2
1.5 Χημεία αντιοξειδωτικών ( κατάταξη ) .....	3
1.5.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά .....	4
1.5.2 Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων.....	4
1.6 Το ροσμαρινικό οξύ .....	5
1.6.1 Βιολογικές δράσεις του ροσμαρινικού οξέος ( χρήσεις και έρευνα ) .....	6
1.6.2 Βιοσύνθεση του ροσμαρινικού οξέος .....	7

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

2.1 Η οικογένεια φυτών <i>Lamiaceae</i> ( <i>Labiatae</i> ) .....	9
2.2 Περιγραφή του φυτικού υλικού ( βοτανική ταξινόμηση ) .....	9

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

3.1 Τεχνικές εκχύλισης για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων.....	15
3.2 Υπέρηχοι και δράση αυτών κατά την εκχύλιση.....	16
3.3 Διαλύτες εκχύλισης φαινολικών οξέων .....	18
3.4 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης .....	19
3.4.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης .....	19
3.4.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC.....	22
3.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου .....	24
3.5.2 Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης.....	25
3.5.3 Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR .....	27

3.5.4 Εφαρμογές ποσοτικών προσδιορισμών με τη χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας .....	28
3.5.5 Χημειομετρία και μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων .....	28
3.6 Σκοπός.....	30

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> : ΥΛΙΚΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ- ΜΕΘΟΔΟΙ**

4.1 Φυτικό υλικό .....	32
4.2 Όργανα - αντιδραστήρια - γυάλινα σκεύη και υλικά .....	33
4.3 Προετοιμασία του διαλύτη εκχύλισης.....	34
4.4 Παραλαβή των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με υπερήχους.....	34
4.5 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων ροσμαρινικού οξέος.....	35
4.6 Ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του φυτικού υλικού με HPLC .....	35
4.7 Ανάλυση του φυτικού δείγματος με φασματοσκοπία υπέρυθρου IR.....	37

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup> : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

5.1 Αποτελέσματα της ανάλυσης των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με ( HPLC-DAD ) .....	39
5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του RA στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα .....	47
5.3 Αποτελέσματα της ανάλυσης του φυτικού υλικού με IR.....	52

<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	61
---------------------------	----

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	63
---------------------------	----

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	68
------------------------	----

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
3.1.1	Τεχνικές παραλαβής που έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του ροσμαρινικού οξέος, σε διάφορα είδη της οικογένειας <i>Lamiaceae</i> .	16
3.4.1.1	Ανάλυση εκχυλισμάτων της οικογένειας <i>Lamiaceae</i> με HPLC (βιβλιογραφία).	21
3.5.1	Οι σπουδαιότερες εφαρμογές της φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR).	24
4.1.1	Κωδικοποίηση των φυτικών δειγμάτων, περιοχή, έτος συλλογής και ποσότητα.	32
4.2.1	Οργανολογία της πειραματικής διαδικασίας.	33
4.6.1	Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε.	35
4.7.1	Συγκεντρωτικός πίνακας αριθμού εκχυλισμάτων, χρωματογραφημάτων και φασμάτων.	38
5.1.1	Πειραματικά αποτελέσματα της HPLC στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα.	40
5.2.1	Αποτελέσματα της ανάλυσης των προτύπων RA με HPLC.	47
5.2.2	Αποτελέσματα της περιεκτικότητας του RA στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα.	48
5.2.3	Μέση τιμή περιεκτικότητας του RA στα φυτά της οικογένειας <i>Lamiaceae</i> .	49
5.3.1	Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις (Mid IR) του ροσμαρινικού οξέος.	52
5.3.2	Αποτελέσματα της PLS σε «άγνωστα» φυτικά δείγματα στην περιοχή 1350 με 905 cm <sup>-1</sup> .	60
-	(Παράρτημα) Πίνακας αποτελεσμάτων της ανάλυσης των προτύπων του RA με HPLC.	96

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
<b>RA</b>	Rosmarinic acid	Ροσμαρινικό οξύ
<b>USE</b>	Ultra Sound-assisted Extraction	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Υπερήχους
<b>MAE</b>	Microwave-assisted Extraction	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Μικροκύματα
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction	Εκχύλιση Στερεάς Φάσης
<b>SFE-CO<sub>2</sub></b>	Supercritical Fluid Extraction-CO <sub>2</sub>	Υπερκρίσιμη Εκχύλιση με CO <sub>2</sub>
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
<b>DAD</b>	Diode Array Detector	Ανιχνευτής Διάταξης Διόδων
<b>t<sub>R</sub></b>	Retention time	Χρόνος συγκράτησης
<b>IR</b>	Infra Red Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου
<b>UV-vis</b>	Ultra Violet-Visible	Υπεριώδους-Ορατού (Φασματοφωτομετρία)
<b>RSN</b>	Signal to Noise Ratio	Λόγος Σήματος προς Θόρυβο
<b>FT-IR</b>	Fourier Transform Infra Red Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier
<b>DRIFTS</b>	Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Διάχυτης Ανάκλασης με Μετασχηματισμό κατά Fourier
<b>PLS</b>	Partial Least Squares	(Μέθοδος) Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων
<b>SD</b>	Standard Deviation	Τυπική Απόκλιση



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα από τα πιο διαδεδομένα και υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικά οξέα που απαντώνται στο φυτικό βασίλειο και ειδικά σε φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, είναι το ροσμαρινικό οξύ. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του, ποσοτικός και ποιοτικός σε φύλλα και άνθη, από 8 (οκτώ) είδη της παραπάνω οικογένειας, καλλιεργημένα στον Ελλαδικό χώρο και συγκεκριμένα στον νομό Αιτωλοακαρνανίας.

Το θεωρητικό κομμάτι της μελέτης, περιλαμβάνει μια εκτενή αναφορά στα φαινολικά οξέα, στα φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά και δικαιολογείται η υψηλή αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζει το ροσμαρινικό οξύ, σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Ακολουθεί μια περιγραφή του φυτικού υλικού (βοτανική ταξινόμηση) και στη συνέχεια περιγράφεται η τεχνική εκχύλισης (Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους), η χρωματογραφική (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) και η φασματοσκοπική (Φασματοσκοπία Υπερύθρου με την Τεχνική της Διάχυτης Ανάκλασης) που συνέβαλαν στον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό του ροσμαρινικού οξέος.

Στο πειραματικό κομμάτι, παρατίθεται η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του φυτικού υλικού, τα οποία παραλήφθηκαν με την τεχνική της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους και η φασματοσκοπική ανάλυση (απευθείας πάνω στο αποξηραμένο φυτικό υλικό), με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης.

Τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα έδειξαν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ στο μελισσόχορτο (86 mg ανά g ξηρού φυτικού υλικού) και την χαμηλότερη στον ύσσωπο (12 mg ανά g ξηρού φυτικού υλικού). Τα φυτικά δείγματα ταξινομήθηκαν σε τέσσερις ομάδες, έχοντας ως βάση την περιεκτικότητα τους σε ροσμαρινικό οξύ. Στην συνέχεια, με τη βοήθεια της χημειομετρίας (Μέθοδος Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων) και έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα της υγρής χρωματογραφίας, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο ποσοτικού προσδιορισμού του ροσμαρινικού οξέος στα καταγεγραμμένα φάσματα FT-IR, του ξηρού φυτικού υλικού. Το μοντέλο λειτούργησε ικανοποιητικά σε μια φασματική περιοχή από τα 1350 έως τα 905  $\text{cm}^{-1}$  και οι αποκλίσεις που έδωσε σε σχέση με τις τιμές περιεκτικότητας σε ροσμαρινικό οξύ βάση των αποτελεσμάτων της υγρής χρωματογραφίας, ήταν της τάξης των 2 έως 8 mg ανά g ξηρού φυτικού υλικού.

Εργαστήριο Χημείας του Γ.Π.Α.

Ιούνιος 2012



---

**Λέξεις κλειδιά :** Φαινολικά οξέα • Αντιοξειδωτική δράση • Ροσμαρινικό οξύ • Οικογένεια *Lamiaceae* • Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης • Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier

---

## ABSTRACT

One of the most widespread with high antioxidant activity polyphenolic acids in the plant kingdom and especially in plants of *Lamiaceae* family, is rosmarinic acid. The aim of this study was the quantitative and qualitative determination of rosmarinic acid, in leaves and flowers of 8 (eight) species from the above family, cultivated in Greek area, specifically in the prefecture of Etoloakarnania.

In the theoretical part of this study is included an extensive report for phenolic acids, for natural and synthetic antioxidants and is explained the high antioxidant activity of rosmarinic acid, according to the literature. Below is a description of the plant material (botanical classification) and then described the extraction technique (Ultra Sound-assisted Extraction), the chromatographic technique (High Performance Liquid Chromatography) and the spectroscopic technique (Diffuse Reflectance Infra Red Spectroscopy), which were contributed in quantitative and qualitative determination of rosmarinic acid.

In the experimental part, cited the analysis with High Performance Liquid Chromatography of the hydroalcoholic extracts of the plant material, which have been received with the technique of Ultra Sound-assisted Extraction and the spectroscopic analysis (directly on the dry plant material), with the technique of diffuse reflectance.

The hydroalcoholic extracts have shown the highest concentration of rosmarinic acid in *Melissa officinalis* (86 mg/g of dry plant material) and the lowest in *Hyssopus officinalis* (12 mg/g of dry plant material). The plant specimens were classified in four groups, having as basis their concentration in rosmarinic acid. Furthermore, with the help of chemometrics (Partial Least Squares) and having as reference the results of Liquid Chromatography, it has been developed a model of quantitative determination of rosmarinic acid in recorded spectra FT-IR of dry plant material. The model functioned satisfactorily in a spectral region from 1350 to 905  $\text{cm}^{-1}$  and its deviations concerning the concentrations of rosmarinic acid based on the results from Liquid Chromatography were from 2 to 8 mg/g of dry plant material.

Chemistry Lab of A.U.A.

June 2012



---

**Keywords :** Phenolic acids • Antioxidant activity • Rosmarinic acid • *Lamiaceae* family • High Performance Liquid Chromatography • Fourier Transform Infra Red Spectroscopy

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> : ( ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ) - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

### 1.1 Αρωματικά φαρμακευτικά φυτά

Κατά την πορεία της εξέλιξης, πολλά μέλη του φυτικού βασιλείου ανέπτυξαν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν ευώδη πτητικά συστατικά σε διάφορα όργανα, μέσω των οποίων προσελκύουν ωφέλιμα έντομα για την επικονίαση και άλλα ζώα ή πτηνά που είναι απαραίτητα για τη διάδοση των σπόρων, να απωθούν άλλα τα οποία είναι βλαβερά, ή να αυτοπροστατεύονται από τα φυτοφάγα ζώα. Αυτά τα φυτά ο άνθρωπος τα εκμεταλλεύτηκε για την αξία τους στη μαγειρική, την αρωματοποιία, την ιατρική και σε άλλες εφαρμογές από αρχαιοτάτους χρόνους.

Οι κύριες χρήσεις των αρωματικών φαρμακευτικών φυτών και των αιθέριων ελαίων ή άλλων βιοδραστικών συστατικών που παραλαμβάνονται από αυτά είναι (Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2010) :

- Απευθείας μαγειρική χρήση σαν φρέσκα ή αποξηραμένα αρτύματα, βότανα, καρυκεύματα και μπαχαρικά.
- Στην αρωματοποιία, σε καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής υγιεινής ή για την φροντίδα του νοικοκυριού, είτε απ' ευθείας σαν κύρια και βασικά συστατικά είτε σαν πρώτες ύλες για την εκχύλιση και τη σύνθεση ειδικών αρωματικών χημικών ουσιών.
- Στην ζαχαροπλαστική, τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών σαν αρωματικά και βελτιωτικά.
- Στην ιατρική και την κτηνιατρική σαν συστατικά σκευασμάτων.
- Στην γεωργία σαν φυσικά φυτοπροστατευτικά μέσα.
- Στην φαρμακευτική, σε διάφορα σκευάσματα, λόγω της βιολογικής τους δραστηριότητας, ή σαν βελτιωτικά οσμής και γεύσης.

Η χλωρίδα του Ελλαδικού χώρου, απαριθμεί περίπου 6000 είδη ανώτερων φυτών. Απ' αυτά τα 500 έως 600 χαρακτηρίζονται ως αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, γεγονός που μαρτυρεί ότι η Ελλάδα πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες, σε συνθήκες παραγωγής αρωματικών φυτών. Εξάλλου, οι εδαφοκλιματικές της συνθήκες είναι ιδανικές.

### 1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Πρόκειται για ενώσεις που ανήκουν σε εξαιρετικά διαφοροποιημένες χημικές ομάδες, όπως οργανικά οξέα, αρωματικές ενώσεις, τερπένια, στεροειδή, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή κ.α. Η δράση τους στα φυτά συνήθως σχετίζεται με την ρύθμιση του μεταβολισμού και/ή της αύξησης,

την απόδοση του αρώματος και του χρωματισμού των τμημάτων του φυτού και την προστασία έναντι παθογόνων οργανισμών. Δεδομένου ότι τα φυτά δεν έχουν την ικανότητα κίνησης ώστε να μπορέσουν να αποφύγουν τις αντίξοες βιοτικές επιδράσεις, αναγκάστηκαν μέσω της εξέλιξης να εφοδιαστούν εκτός από την κατάλληλη δομή και μ' ένα τεράστιο βιοχημικό οπλοστάσιο δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι θωρακίζουν τα κύτταρα έναντι των επίδοξων εχθρών (Καραμπουρνιώτης, 2003). Αν και ο δευτερογενής μεταβολισμός αποτελεί γενικά μόλις το 10 % του συνολικού μεταβολισμού στα φυτά, εντούτοις τα προϊόντα του αποτελούν τα κύρια συστατικά με **φαρμακολογική δράση**.

### 1.3 Φαινολικές ενώσεις

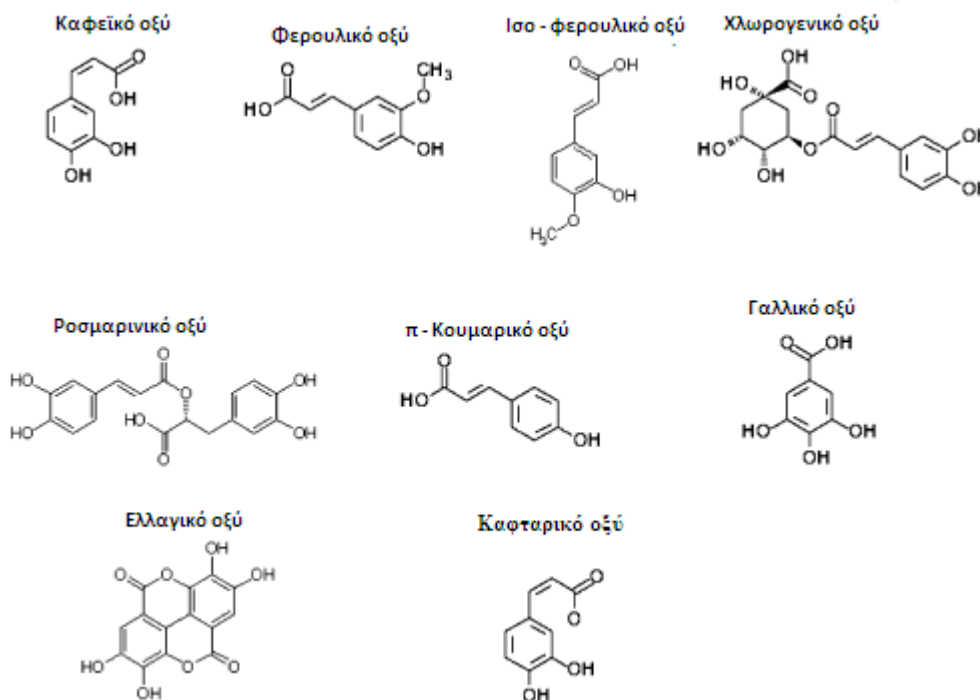
Ο όρος φυσικές φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό κυρίως φυτικών ουσιών, που έχουν στο μόριο τους ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο, υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολικών ενώσεων που απαντούν στα φυτά είναι (Ραγκούση, 2009) :

- i. **Απλές μονοκυκλικές φαινόλες και φαινολικά οξέα.**
- ii. **Φαινυλοπροπανοειδή.**
- iii. **Φαινολικές κινόνες.**
- iv. **Φλαβονοειδή**, ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους το σκελετό της **φλαβόνης** ή του **χλωριούχου φλαβυλίου** και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των φυσικών φαινολικών ενώσεων.
- v. **Πολυμερείς φαινολικές ενώσεις**, όπως οι **λιγνίνες**, οι **μελανίνες** και οι **ταννίνες**.

Φαινολικές μονάδες εμφανίζονται μερικές φορές και σε μόρια τερπενίων, στεροειδών και αλκαλοειδών.

### 1.4 Φαινολικά οξέα

Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα σπάνια απαντώνται ελεύθερα στα φυτά. Συνήθως βρίσκονται ενωμένα υπό μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών, στους οποίους αποτελούν το άγλυκο τμήμα της ένωσης. **Όξινη υδρόλυση** των φυτικών ιστών ελευθερώνει **φαινολικά οξέα**, από τους εστέρες και τα άλατα τους και επίσης διασπά τους γλυκοζίτες. Αλκαλική υδρόλυση ή αλκαλική σύντηξη διασπά ενώσεις της κατηγορίας των φλαβονοειδών προς απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα. Τα δεύτερα προκύπτουν βιογενετικά από αποικοδόμηση των φαινυλοπροπανοειδών (Ραγκούση, 2009). Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα φαινολικών οξέων που απαντώνται στα φυτά, δίνονται στο σχήμα (1.4.1) που ακολουθεί.



**Σχήμα 1.4.** : Χημικές δομές αντιπροσωπευτικών φαινολικών οξέων στα φυτά  
(Lafay & Gil-Izquierdo, 2008).

### 1.5 Χημεία αντιοξειδωτικών ( κατάταξη )

Ως **αντιοξειδωτικά** χαρακτηρίζονται οι ουσίες εκείνες που εμποδίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από την επιβλαβή δράση των τελευταίων. Ως ελεύθερη ρίζα, ορίζεται κάθε είδους ατόμου ή χημικής ένωσης που έχει την ικανότητα ανεξάρτητης «ελεύθερης» ύπαρξης και μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες, είναι ασταθείς ενώσεις, οι οποίες οξειδώνουν ένα συγκεκριμένο μόριο στόχο, κυρίως μακρομόριο. Εμπλέκονται σε πάνω από 100 αρρώστιες, όπως η καρδιακή προσβολή, ο διαβήτης, ο καρκίνος κ.α.

Μια συνήθης μέθοδος που χρησιμοποιείται για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπών που περιέχονται στα λιπαρά τρόφιμα, είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών. Χρησιμοποιούνται κυρίως για τη συντήρηση των τροφίμων, προστατεύοντας τα από τη φθορά, την τάγγιση ή τον αποχρωματισμό που μπορεί να λάβει μέρος κατά την οξείδωση. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τα **πρωτοταγή** και τα **δευτεροταγή** αντιοξειδωτικά. Τα πρώτα διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελευθέρων ριζών, παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες, ενώ τα δεύτερα μπορεί να δράσουν ως δεσμευτές οξυγόνου ελαπτώνοντας έτσι τη συγκέντρωσή του, σ' ένα κλειστό σύστημα. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται φαινολικές ενώσεις όπως, το καφεϊκό οξύ, το **ροσμαρινικό οξύ**, οι τοκοφερόλες, ο προπυλικός εστέρας του

γαλλικού οξέος, η καρνοσόλη κ.α. Ενώ, στη δεύτερη εντάσσονται το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του, το θειώδης οξύ με τα άλατα του, αλλά και καροτενοειδή.

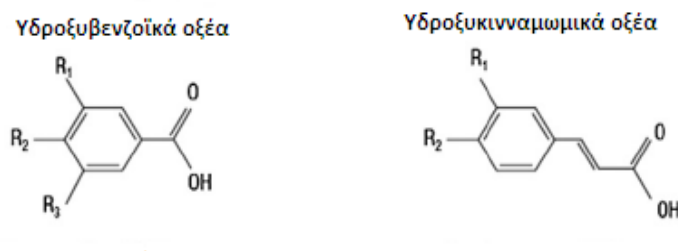
### 1.5.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει τεράστιο ενδιαφέρον στην χημεία τροφίμων και όχι μόνο, για τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών όπως οι τοκοφερόλες, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, και διαφόρων εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, με σκοπό την αποφυγή τοξικών προβλημάτων που μπορεί να προκύψουν από την χρήση συνθετικών αντιοξειδωτικών, όπως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (Butylated hydroxyanisole, **BHA**), το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (Butylated hydroxytoluene, **BHT**) και ο προπυλικός εστέρας του γαλλικού οξέος (Propyl gallate, **PG**). Τέτοιου είδους προβλήματα, μπορεί να είναι η ζημιά στο συκώτι ή διάφορες καρκινογενέσεις. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά, κατηγοριοποιούνται είτε σαν **υδατοδιαλυτά**, είτε σαν **λιποδιαλυτά** και αυτό εξαρτάται από την πρωταρχική τους δράση στην υδατική φάση ή στην λιπόφυλη περιοχή των κυτταρικών μεμβρανών (Kosar, Doman, Baser & Hiltunen, 2004). Παρουσιάζουν πολλαπλές βιολογικές δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική, εξαιτίας της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Μερικές από τις πιο γνωστές μεθόδους προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ενώσεων που απαντώνται στα φυτά, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία είναι η μέθοδος του **DPPH** (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο υδραζύλιο, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) και του **ABTS** [ 2,2'-αζινο-δις(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικού οξέος), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ], (Krishnaiah, Sarbatly & Nithyanandam, 2010).

### 1.5.2 Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων

Τα φαινολικά οξέα αποτελούνται από δύο υποομάδες, τα **υδροξυβενζοϊκά** και τα **υδροξυκινναμωμικά** οξέα. Στα υδροξυβενζοϊκά οξέα ανήκουν το γαλλικό, το π-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό, το βανιλλικό και το συριγγικό. Από την άλλη, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι αρωματικές ενώσεις με μια πλευρική αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα (-CH=CH-COOH) και σ' αυτά ανήκουν το καφεϊκό, το π-κουμαρικό, το φερουλικό και το σιναπικό (Ignat, Volf & Popa, 2011).

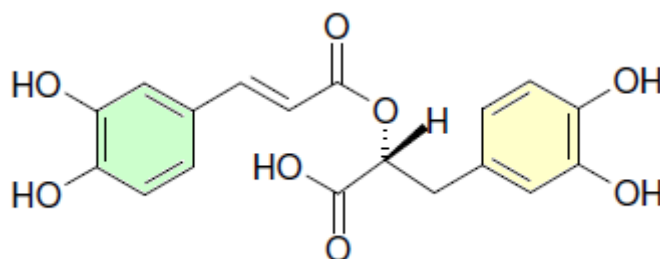


Σχήμα 1.5.2.1 : Γενική χημική δομή των φαινολικών οξέων, με  $R_1, R_2, R_3 = H, OH$  ή  $OCH_3$ .

Σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων, αυτή εξαρτάται κυρίως από τον **αριθμό** και τη **θέση** των υδροξυλικών ομάδων (-OH) και των μεθόξυ (-OCH<sub>3</sub>) υποκαταστατών στον αρωματικό τους δακτύλιο (Cai, Sun, Xing, Luo & Corke, 2006). Αν εξαιρέσουμε το γαλλικό οξύ που εμφανίζει μεγάλη αντιοξειδωτική δράση έχοντας στο μόριο του τρεις ομάδες υδροξυλίων (δότες πρωτονίων - H<sup>+</sup>), τα υδροξυκινναμωμικά οξέα δείχνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υδροξυβενζοϊκά με τον ίδιο αριθμό υδροξυλίων και μεθόξυ υποκαταστατών. Σ' αυτό το γεγονός, συμβάλει σε μεγάλο βαθμό και η παρουσία της ομάδας -CH=CH-COOH στα υδροξυκινναμωμικά, **σταθεροποιώντας** τα φαινολικά ανιόντα (Ar-O<sup>-</sup>) που προκύπτουν με την αποβολή πρωτονίων από τα υδροξύλια ή κατιόντων μεθυλίου (<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>) από τις μεθόξυ ομάδες του αρωματικού δακτυλίου, μέσω του φαινομένου του **συντονισμού** (Cai et al., 2006).

### 1.6 Το ροσμαρινικό οξύ ( Rosmarinic acid, RA : C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub> )

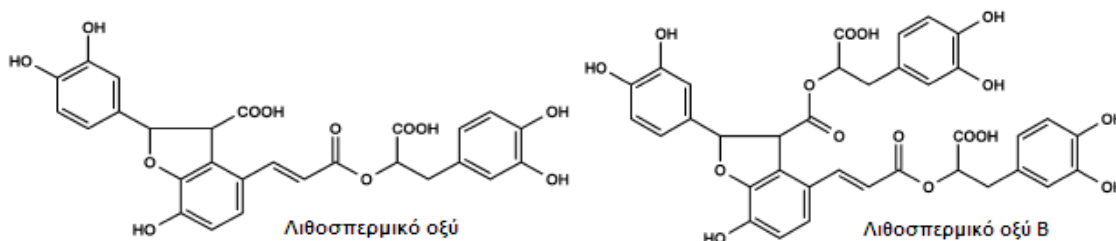
Το ροσμαρινικό οξύ προέρχεται από εστεροποίηση του **καφεϊκού οξέος** και του **3,4-διϋδροξυ φαινυλο γαλακτικού οξέος**. Την ονομασία του την πήρε από το φυτό από το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1958 το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), από δύο Ιταλούς χημικούς τον Scarpati και τον Oriente (Petersen & Simmonds, 2003).



Σχήμα 1.6.1 : Χημική δομή του ροσμαρινικού οξέος.

Στο φυτικό βασίλειο απαντάται κυρίως σε είδη της οικογένειας *Boraginaceae* και στην

υποοικογένεια *Nepetoideae* της οικογένειας *Lamiaceae*. Η μορφή με την οποία απαντάται είναι αυτή του **trans** ισομερές, όπως άλλωστε συμβαίνει με όλα τα φαινολικά οξέα στη φύση (Razborsek, 2011). Από τα πιο γνωστά χημικά του παράγωγα σαν φυσικά προϊόντα, είναι το λιθοσπερμικό οξύ και το λιθοσπερμικό οξύ Β, αποτελούμενα από ένα ή δύο μόρια ροσμαρινικού οξέος αντίστοιχα.

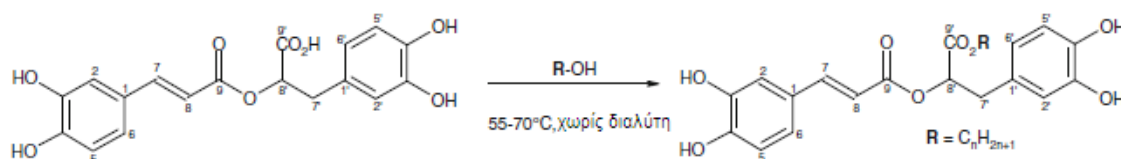


Σχήμα 1.6.2 : Χημικές δομές από παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος.

### 1.6.1 Βιολογικές δράσεις του ροσμαρινικού οξέος ( χρήσεις και έρευνα )

Το ροσμαρινικό οξύ εμφανίζει πολλαπλές βιολογικές δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή. Η αντιοξειδωτική του δράση είναι μεγαλύτερη και από εκείνη της βιταμίνης Ε. Κατά ένα μεγάλο ποσοστό, αυτό οφείλεται στην ύπαρξη των **τεσσάρων υδροξυλίων** στο μόριο του (-OH), (Cai et al., 2006). Έτσι, βοηθά στο να προλαμβάνει την καταστροφή των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ή αθηροσκλήρωσης (Park, Uddin, Xu, Kim & Lee, 2008). Η *Perilla frutescens* πλούσια σε ροσμαρινικό οξύ, χρησιμοποιείται ως αντιαλλεργικό. Στην Ιαπωνία, τα εκχυλίσματα αυτού του φυτού χρησιμοποιούνται για να βελτιώσουν και να παρατείνουν την «φρεσκάδα» της θαλασσινης τροφής.

Οι ανάγκες της εποχής μας για χρήση όλο και περισσότερων φυσικών αντιοξειδωτικών στην χημεία τροφίμων κυρίως, έχει οδηγήσει την έρευνα ακόμη και στην σύνθεση αλκυλοεστέρων του ροσμαρινικού οξέος, με ικανοποιητικές αντιοξειδωτικές δράσεις (Lecomte, Giraldo, Laguerre, Barea & Villeneuve, 2010). Η αντίδραση παρασκευής τους (εστεροποίηση), όπως φαίνεται και στο σχήμα (1.6.1.1) που ακολουθεί, είναι αρκετά απλή.



Σχήμα 1.6.1.1 : Αντίδραση παρασκευής αλκυλοεστέρων του ροσμαρινικού οξέος.



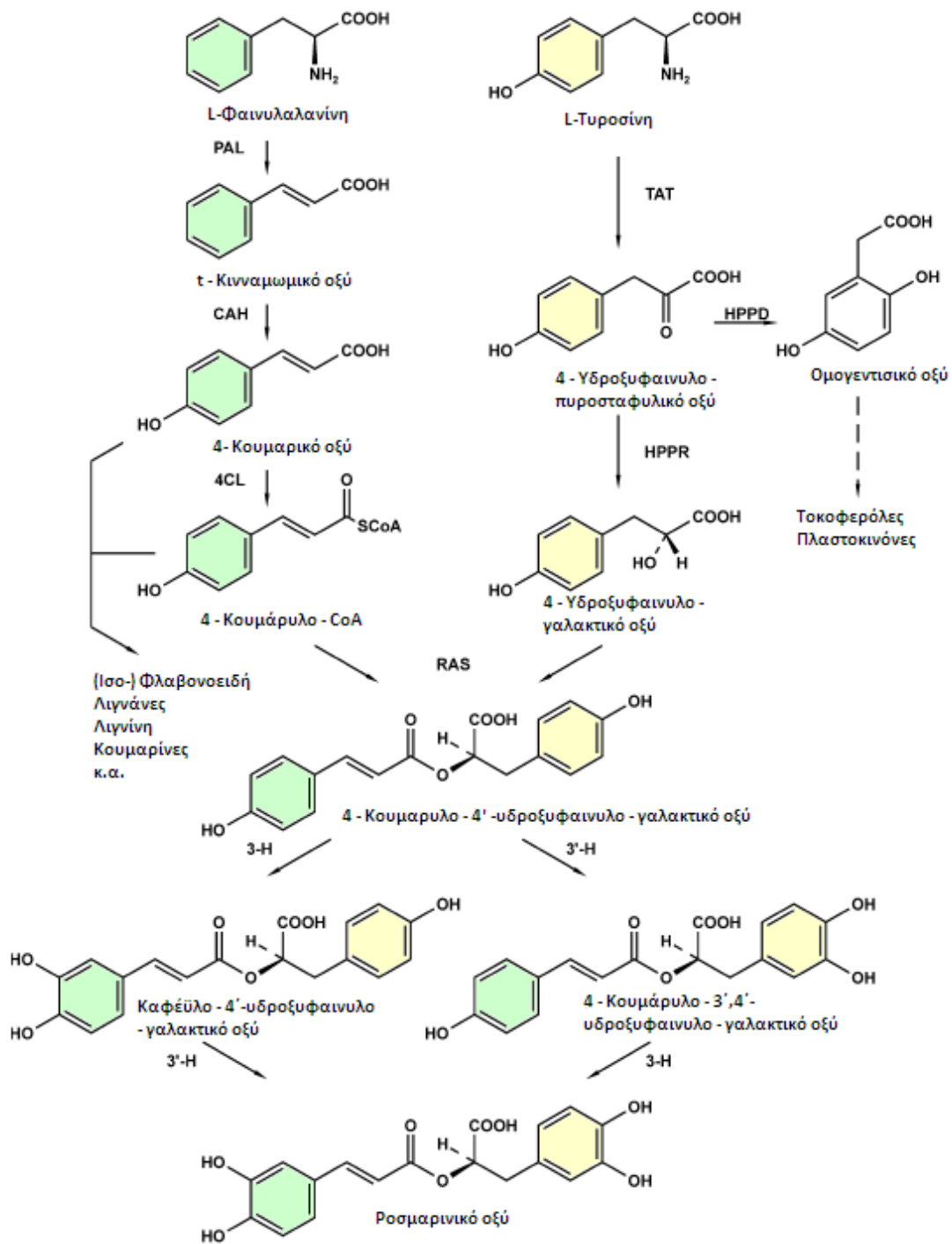
Σε μια άλλη έρευνα, αποδείχθηκε ότι το ροσμαρινικό οξύ μπορεί να δράσει σαν **φωτοπροστατευτικός** παράγοντας απέναντι στην υπεριώδη και σε άλλες ιονίζουσες ακτινοβολίες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα από φύλλα δεντρολίβανου (Sanchez-Campillo et al., 2009). Η χορήγηση του σε πειραματόζωα κατάφερε να βελτιώσει την μνήμη τους, δρώντας σαν αναστολέας της δράσης των νιτρώδη υπεροξειδίων ( $\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$ ) τα οποία είναι υπεύθυνα σε μεγάλο ποσοστό για τη νόσο του Αλτσχάϊμερ (Alkam, Nitta, Mizoguchi, Iton & Nabeshima, 2007).

### 1.6.2 Βιοσύνθεση του ροσμαρινικού οξέος

Στην βιοσύνθεση του ροσμαρινικού οξέος, πρόδρομες ενώσεις είναι τα αμινοξέα **L-φαινυλαλανίνη** και η **L-τυροσίνη**, με τη συμμετοχή 8 (οκτώ) ακόμη ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά είναι τα ακόλουθα :

- Αμμωνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης (phenylalanine ammonia-lyase, **PAL**).
- 4-υδροξυλάση του κινναμωμικού οξέος (cinnamic acid 4-hydroxylase, **CAH**).
- Υδροξυκινναμωμικός εστέρας της λιγάσης του συνενζύμου A (hydroxycinnamate: coenzyme A ligase, **4CL**).
- Αμινοτρανσφεράση της τυροσίνης (tyrosine aminotransferase, **TAT**).
- Αναγωγή του υδροξυφαινυλο-πυροσταφυλικού εστέρα (hydroxyphenylpyruvate reductase, **HPPR**).
- Υδροξυκινναμώυλο-συνένζυμο A : υδροξυφαινυλο-γαλακτικός εστέρας της υδροξυκινναμώυλο-τρανσφεράσης (hydroxycinnamoyl-CoA : hydroxyphenyllactate hydroxycinnamoyl transferase, **RAS**).
- Υδροξυκινναμώυλο-υδροξυφαινυλο-γαλακτικός εστέρας της 3- και της 3'-υδροξυλάσης αντίστοιχα (hydroxycinnamoyl-hydroxyphenyllactate 3- and 3'-hydroxylases, **3-H, 3'-H**).

Το ένζυμο υδροξυφαινυλο-πυροσταφυλικός εστέρας της διοξυγενάσης (hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase, **HPPD**) δεν μετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι (σχήμα 1.6.2.1). Το τμήμα του καφεϊκού οξέος στο ροσμαρινικό οξύ προέρχεται από την L-φαινυλαλανίνη, αφού αυτή μετατραπεί πρώτα σ' ένα **υδροξυκινναμωμικό οξύ** και το τμήμα του γαλακτικού οξέος από την L-τυροσίνη.



**Σχήμα 1.6.2.1** : Βιοσυνθετικό μονοπάτι για το ροσμαρινικό οξύ, όπως προτάθηκε από την καλλιέργεια κυττάρων σε αιώρηση, του *Coleus Blumei* (Κολεός ο βλούμιος), (Petersen et al., 2003).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> : ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

### 2.1 Η οικογένεια φυτών *Lamiaceae* (*Labiatae*)

Η οικογένεια χειλανθή ή χειλοστέφανα *Lamiaceae* (*Labiatae*) περιλαμβάνει ποώδη φυτά μονοετή ή πολυετή, με τετράγωνο βλαστό, θαμνώδη ή ημιθαμνώδη με αρωματικά φύλλα, σπανίως δένδρα ή αναρριχώμενα. Η οικογένεια των χειλανθών είναι γνωστή από την Ολιγόκαινο περίοδο. Περιλαμβάνει φυτά αρωματικά, μελισσοκομικά, αρτυματικά, πλούσια σε αιθέρια έλαια αλκοολικής, φαινολικής, τερπενικής, κετονικής ή αλδεϋδικής σύστασης, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται ως στομαχικά, αντισπασμωδικά, αντισπασμωδικά, διουρητικά ή καθαρτικά. Στην οικογένεια *Lamiaceae* ταξινομούνται 200 γένη με 3200 περίπου είδη, με επίκεντρο εξάπλωσης την περιοχή της Μεσογείου.

### 2.2 Περιγραφή του φυτικού υλικού ( βοτανική ταξινόμηση )

#### Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* - *Lamiaceae*)



Πρόκειται για πολυετές φυτό που ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*. Έχει στελέχη όρθια, τετραγωνικά, πολύ διακλαδωμένα και εκπέμπει ένα ευχάριστο, διαπεραστικό άρωμα λεμονιού. Φτάνει σε ύψος που ποικίλει από 60 έως 80 cm. Τα φύλλα του είναι με μίσχο, αντικριστά, οβάλ, οδοντωτά, με νεύρα δικτυωτά, αδρή επιφάνεια, πλούσια σε εκκριματοφόρα τριχίδια και έντονο πράσινο χρώμα, που φτάνουν σε μήκος τα 4 έως 7 cm. Τα άνθη, υπόλευκου χρώματος, βρίσκονται σε δακτύλιο στις μασχάλες των φύλλων και βγαίνουν στην αρχή του καλοκαιριού. Το λατινικό όνομα του είδους «*melissa*» αποτελεί περικοπή του αρχαίου ελληνικού «μελισσόφυλον».

Εικόνα 2.2.1 : Μελισσόχορτο

Το φυτό αυτό είναι πλούσιο σε νέκταρ και συνήθως καλλιεργείται για να τροφοδοτεί τις μέλισσες. Διακρίνονται δύο υποείδη, που έχουν και εμπορικό ενδιαφέρον : *melissa officinalis* ssp. *Officinalis*, με αιθέριο έλαιο πλούσιο σε κίτρονελλάλη και α - και β - κινράλη και *Melissa officinalis* ssp. *Altissima*, με αιθέριο έλαιο πλούσιο σε β-καρνοφυλλένιο, D-γερμακρένιο και β-

κουμπεμπένιο. Στη Γερμανία, στο ινστιτούτο Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur, έχει αναπτυχθεί σειρά υβριδίων που παράγουν υψηλές αποδόσεις, είτε σε χαρτομάζα με εξαιρετικό φύλλωμα για την εμπορία του ως φύλλα, είτε ποικιλίες για βελτιωμένες αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο. Το μελισσόχορτο παράγει ένα άχρωμο έως ελαφρά κιτρινωπό αιθέριο έλαιο, με χαρακτηριστική μυρωδιά λεμονιού. Εκτός από το αιθέριο έλαιο, τα φύλλα περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις (καφεϊκό οξύ και τα παράγωγα του, όπως ροσμαρινικό οξύ), τριτερπενικά παράγωγα, ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ, φλαβονοειδή (λουτεολιν-7-Ο γλυκοζίτη), τανίνες, ρητίνες και κηρούς.

Πρόσφατα, η Ευρωπαϊκή φαρμακοποιία για πρώτη φορά, εισήγαγε την απαίτηση περιεκτικότητας σε **ροσμαρινικό οξύ** τουλάχιστον **4 %** στα φύλλα (Κατσιώτης κ.α., 2010).

### Φασκόμηλο (*Salvia officinalis* - *Lamiaceae*)



Το φασκόμηλο είναι αυτοφυές των Μεσογειακών χωρών και απαντάται σχεδόν σε όλες τις βουνοπλαγιές και ακτές της νότιας Ευρώπης. Η χρήση του ως άρτυμα και στην φαρμακευτική έχει συντελέσει στη διάδοση του σε πολλές χώρες, σε όλο τον κόσμο. Το λατινικό όνομα *salvia* προέρχεται εκ του **salvere** : να σώζει, να θεραπεύει. Στη μόνη γλώσσα που έχει ανεξάρτητο όνομα είναι στα ελληνικά, ως αλισφακιά. Είναι μικρός ορθόκλαδος θάμνος, έντονα αρωματικός, με ύψος 40 έως 80 cm και πλάτος 45 έως 65 cm.

Εικόνα 2.2.2 : Φασκόμηλο

Ο βλαστός είναι ξυλώδης, έντονα διακλαδωμένος στη βάση και στελέχη λίγο πολύ άσπρα. Τα άνθη είναι ιώδη-μπλε, ροζ ή άσπρα, μέχρι 3 cm, μικρά, λογχοειδή, εκφυόμενα 3 έως 6 κατά σπονδύλους αραιούς. Τα φύλλα είναι στενόμακρα, μήκους 2.5 έως 6 cm, πράσινα μέχρι γκριζωπά – οφειλόμενο στα πολλά τριχίδια, με χαρακτηριστική μυρωδιά. Ανθίζει από Απρίλιο μέχρι Ιούνιο. Το αιθέριο έλαιο του είναι άχρωμο έως κίτρινο, χαρακτηριστικής μυρωδιάς καμφοράς και η δε περιεκτικότητά του στην ξηρή δρόγη να ανέρχεται από 1.5 – 3.5 %. Το φασκόμηλο διαθέτει πολλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς είναι πλούσιο σε παράγωγα του καφεϊκού οξέος, όπως το ροσμαρινικό και χλωρογενικό οξύ και με **160** πολυφαινόλες να έχουν ταυτοποιηθεί σ' αυτό (Lu & Foo, 2002).

Παγκοσμίως, αναφέρονται πάνω από 700 είδη του γένους *salvia* (φασκόμηλου) με αρκετά από αυτά να παρουσιάζουν εμπορικό ή καλλωπιστικό ενδιαφέρον. Οι πλέον γνωστές ποικιλίες της *S. officinalis* προέρχονται από την Δαλματία και εκτιμώνται ιδιαίτερα, καθώς παράγουν και τις υψηλότερες αποδόσεις αιθέριου ελαίου (Κατσιώτης κ.α., 2010).

### Ρίγανη ( *Origanum vulgare ssp. hirtum* – *Lamiaceae* )



Είναι φυτό ιθαγενές της Μεσογείου, με ευρεία εξάπλωση στις χώρες γύρω από αυτήν. Το 75 % περίπου των ειδών απαντώνται σε περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου, ενώ λίγα σχετικά είδη ανευρίσκονται στη Δυτική Μεσόγειο. Η ονομασία της προέρχεται από την αρχαία «ορίγανον», που προέρχεται από τα «όρος» και «γανούσθαι» (αγαπώ, απολαμβάνω), καθώς η ρίγανη προτιμά τα μεγαλύτερα υψόμετρα στα μεσογειακά κλίματα.

Εικόνα 2.2.3 : **Ρίγανη**

Είναι φυτό αρωματικό, ποώδες, πολυετές, με βλαστό όρθιο, τετραγωνικό, πολύκλαδο, τριχωτό, ύψους 30 έως 40 cm. Έχει φύλλα σχετικά μικρά 1 έως 2 cm, αντίθετα, έμμισχα, ωοειδή ή προμήκη, πολύ πριονωτά. Τα άνθη διατάσσονται σε σύνθετη ταξιανθία από μικρούς σπονδυλωτούς στάχεις που περιβάλλουν τα ανθοφόρα στελέχη. Είναι μικρά με δίχειλη, συμπέταλη λευκή στεφάνη. Διεθνώς στο εμπόριο διακρίνονται δύο κατηγορίες ρίγανης : **α)** η Ευρωπαϊκή και **β)** η προερχόμενη από το Μεξικό, με την ελληνική ρίγανη να θεωρείται η καλύτερη στον κόσμο. Το αιθέριο έλαιο της (ριγανέλαιο) παραλαμβάνεται με απόσταξη, με κύριο χαρακτηριστικό του την παρουσία δύο φαινολικών τερπενίων, της **καρβακρόλης** και της **θυμόλης**, στα οποία κυρίως οφείλεται η αντιμικροβιακή του δράση (Κατσιώτης κ.α., 2010).

### Δενδρολίβανο ( *Rosmarinus officinalis* – *Lamiaceae* )

Η ονομασία του στη λατινική γλώσσα ήταν *rosmarinus* και αρκετοί θεωρούν ότι προέρχεται από το *ros* (δρόσος, υγραίνω) και το *marinus* (ανήκει στη θάλασσα, από το λατινικό *mare*). Στην Ελλάδα η κοινή ονομασία δενδρολίβανο είναι χαρακτηριστική λόγω των δύο συνδετικών της «λιβάνι» και «δένδρο». Πρόκειται για έναν αειθαλή, πράσινο θάμνο που μπορεί να φτάσει τα 1.5 έως 2 m σε ύψος, με κορμό ξυλώδη, συνήθως στρεβλωμένο, με γκριζό φλοιό.



Εικόνα 2.2.4 : Δενδρολίβανο

Τα φύλλα είναι άκαμπτα, ευθύγραμμα, αντικριστά, χαρακτηριστικά ενός φυτού ξηρών, άγονων και θερμών περιοχών : βελονοειδή, ευθεία πράσινα-σκούρα, γυαλιστερά στην επάνω πλευρά και άσπρα χνουδωτά στην κάτω. Η ταξιανθία του είναι σταχυοειδής με μικρά άνθη χρώματος θαλασσοϊώδους και σπανίως ροζ-άσπρο, με την άνθηση να διαρκεί όλο το καλοκαίρι. Το φυτό αυτό,

βρίσκεται σ' όλη την Ελλάδα, καλλιεργούμενο σε κήπους και πάρκα. Η απόδοση του (φύλλα και άνθη) σε αιθέριο έλαιο, κυμαίνεται από 1.3 – 3.1 %, με κύρια συστατικά του το **λεμονένιο** και την **1,8 κινεόλη** (Parageorgiou, Gardeli, Mallouchos, Papanoannou & Komaitis, 2008). Οι πλέον ενδιαφέρον **χημειότυποι** του δενδρολίβανου είναι τρεις : Ο χημειότυπος της 1,8 κινεόλης (με υψηλή ποσοστιαία περιεκτικότητα σε 1,8 κινεόλη), της καμφοράς (με ποσοστιαία περιεκτικότητα > 20 % σε καμφορά ) και της βερμπενόνης (με ποσοστιαία περιεκτικότητα > 15 % σε βερμπενόνη), (Κατσιώτης κ.α., 2010).

#### Βασιλικός (*Basilicum ocimum* – *Lamiaceae* )



Εικόνα 2.2.5 : Βασιλικός

λεία ή σχεδόν λεία. Τα φύλλα του είναι ωοειδή έως ελλειπτικά ωοειδή, μήκους 4 έως 7 cm και πλάτους 2 έως 4 cm, συνήθως σφηνοειδή και μίσχους 1 έως 2 cm. Η ταξιανθία του είναι βοτρυοειδής, σταχυοειδής ή κορυμβοειδής. Το φυτό ανθίζει από Ιούνιο έως Ιούλιο ανάλογα με

την περιοχή και την ποικιλία, σχηματίζοντας μακρύ στάχυ αρωματικών ανθέων, συγκρατούμενα σε δακτυλίους των 5 ή 6.

Ο βασιλικός είναι έντονα αρωματικός με πικάντικη γεύση. Το αιθέριο έλαιο του είναι άχρωμο έως απαλό κίτρινο, ποικίλλουσας σύνθεσης, με χαρακτηριστική ουσία την **εστραγκόλη** που συνοδεύεται από την λιναλοόλη, την ευγενόλη και την 1,8 κινεόλη (Κατσιώτης κ.α., 2010).

### Θυμάρι ( *Thymus vulgaris* – *Lamiaceae* )



Το όνομα του θυμαριού προέρχεται από το αρχαίο ελληνικό **θύμον** και σχετίζεται με τη λέξη **θυμός** «πνεύμα» που αρχικά σήμαινε «κάπνισμα» από το λατινικό *fumus* (καπνός), πιθανώς λόγω της ισχυρής, καπνώδους μυρωδιάς του. Το κοινό θυμάρι (*T. vulgaris*), είναι αειθαλής θάμνος 15 έως 30 cm, με μακριά στελέχη και ελλειπτικά φύλλα μήκους 5 έως 16 mm. Παράγει πολλά άνθη με στεφάνη υπόλευκη έως ιώδη 5 mm, που μπορεί να

Εικόνα 2.2.6 : **Θυμάρι**

είναι είτε ερμαφρόδιτα, είτε στείρα αρσενικά ή θηλυκά. Τα φύλλα είναι άμισχα, λογχοειδή, μικρά, γυριστά στις άκρες, σκληρά, πρασινωπά, αλλά και με όλες τις αποχρώσεις ανάλογα την ποικιλία. Η περίοδος ανθοφορίας διαρκεί από Μάιο έως Οκτώβριο.

Το θυμάρι έχει μια ισχυρή, πολύ ευχάριστη αρωματική μυρωδιά, αφήνοντας πικρή και καυτή αρωματική γεύση, ανάλογα με τους χημειότυπους απ' όπου προέρχεται. Καλλιεργείται κυρίως στην Ανατολική και Νότια Ευρώπη, με κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου του τη **θυμόλη** και την **καρβακρόλη** (Κατσιώτης κ.α., 2010).

### Ύσσωπος ( *Hyssopus officinalis* – *Lamiaceae* )

Ο ύσσωπος είναι πολυετής πόα, που στην πλήρη ανάπτυξη είναι πολύκλαδος θάμνος, ενώ το ύψος του μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 70 cm. Οι βλαστοί του είναι τετραγωνικής διατομής και παραμένουν πράσινοι και λείοι ακόμη και όταν ξυλοποιηθούν. Τα φύλλα του είναι άμισχα, αντίθετα, επιμήκη, μήκους 3 έως 4 cm, με την ίδια πράσινη απόχρωση και στις δύο επιφάνειες. Τα άνθη είναι κυανά, ροζ ή λευκά και εκφύονται κατά σπονδύλους στα επάνω γόνατα των

βλαστών. Ο κάλυκας είναι κωδωνοειδής, με οδοντωτά χείλη και η στεφάνη δίχειλη. Σε μερικές ποικιλίες ύσσωπου παρατηρείται το φαινόμενο στο ίδιο φυτό, άλλοι βλαστοί να φέρουν άνθη μπλε και άλλοι ροζ.



Εικόνα 2.2.7 : Ύσσωπος

Η άνθηση σε ολόκληρο το φυτό γίνεται στο τέλος Μαΐου με αρχές Ιουνίου, ενώ οι μεμονωμένοι βλαστοί ανθίζουν σχεδόν όλο το χρόνο. Ο Διοσκουρίδης το αναφέρει ως φυτό φαρμακευτικό, ενώ οι Εβραίοι το θεωρούν φυτό ιερό. Καλλιεργείται σε χώρες της Ευρώπης, της Ασίας, της Αμερικής και στην Ελλάδα στην περιοχή του Αγρινίου (Κουτσός, 2006). Το αιθέριο έλαιο του είναι άχρωμο ή κιτρινοπράσινο, που ανέρχεται σε 0.15 % επί της χλωρής και 0.8 % επί της ξηρής δρόγης.

#### Θρούμπι - το θερινό (*Satureja hortensis* – *Lamiaceae*)



Εικόνα 2.2.8 : Θρούμπι το θερινό

Είναι φυτό ημιξυλώδες με θυσανώδη μορφή και μικρά επιμήκη φύλλα, με βραχύ τρίχωμα και έντονη οσμή. Το ύψος του μπορεί να φτάσει από 20 έως 30 cm. Δημιουργεί συστάδες που ανήκουν στα φρύγανα και είναι αυτοφυές σε άγονες ξηρές περιοχές. Φυτρώνει σε βράχους και πλαγιές σε υψόμετρο μέχρι τα 1600 m. Τα άνθη του 2 έως 4 στάχεις είναι ροδόχρωμα στους τελευταίους σπονδύλους των βλαστών.

Περιέχουν και αυτά σημαντικές ποσότητες αιθέριου ελαίου, όπως και τα φύλλα. Το αιθέριο έλαιο του χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά **θυμόλης** και πολύ μικρά ποσοστά **καρβακρόλης**. Η δε περιεκτικότητα του σ' αυτές τις φαινόλες είναι χαμηλότερη τους μήνες πριν την άνθηση και υψηλότερη τους θερινούς, κατά την καρποφορία (Γαρδέλη, 2009). Ο Θεόφραστος το αναφέρει ως θύμβρα ή θύμβρον και κατά τον Διοσκουρίδη χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή του «θρυμβίτου οίνου».



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> : ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

---

### 3.1 Τεχνικές εκχύλισης για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων

Η εκχύλιση είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές διαχωρισμού φαινολικών ενώσεων. Βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων που πρακτικά δεν αναμειγνύονται ή αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Η πιο διαδεδομένη τεχνική εκχύλισης, είναι η εκχύλιση υγρού ή στερεού σώματος διαλυμένου σε υγρό, από άλλο υγρό (Liquid-Liquid Extraction, **LLE**). Πρόκειται για μια ανέξοδη τεχνική από τη στιγμή που περιλαμβάνει τη χρήση οργανικών διαλυτών, αλλά απαιτεί μεγάλους χρόνους εκχύλισης, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα «υποβάθμισης» του εκχυλίσματος. Μια άλλη τεχνική ιδανική για υγρά δείγματα, είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, **SPE**), ενώ για στερεά είναι η εκχύλιση με συσκευή soxhlet.

Οι σύγχρονες – εναλλακτικές τεχνικές εκχύλισης, έχουν καταφέρει να αντικαταστήσουν σε μεγάλο βαθμό τις ήδη συμβατικές, επιτυγχάνοντας μια μείωση στη χρήση διαλυτών και επίσης, να επιταχύνουν την όλη διαδικασία της εκχύλισης (Garsia-Salas, Morales-Soto, Segura-Carretero & Fernandez-Gutierrez, 2010). Τέτοιες είναι :

- Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultra Sound-assisted Extraction, **USE**).
- Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave-assisted Extraction, **MAE**).
- Η υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO<sub>2</sub> (Supercritical Fluid Extraction, **SFE**).
- Η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, **PLE**).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, η τεχνική που επιλέχθηκε για την απομόνωση – παραλαβή του ροσμαρινικού οξέος από το φυτικό υλικό, ήταν η **εκχύλιση με υπερήχους** (Caniova & Brandsteterova, 2001). Η ίδια τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν από τους (Kan, Gokbulut, Kartal, Konuklugil & Yilmaz, 2007) και (Fecka, Turek & 2008). Ανατρέχοντας κάποιος στην διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν σχετικές έρευνες για την απομόνωση του ροσμαρινικού από φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* και με άλλες τεχνικές όπως αυτής της υπερκρίσιμης εκχύλισης με CO<sub>2</sub> (Peev, Peshev & Angelov, 2011) και της εκχύλισης με μικροκύματα (Liu et al., 2011) και (Rodriguez-Rojo, Visentin, Maestri & Cocero, 2012). Ακολουθεί ο πίνακας (3.1.1), με τεχνικές παραλαβής του ροσμαρινικού οξέος σε διάφορα είδη της οικογένειας *Lamiaceae* που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν, όπου φαίνεται να ξεχωρίζει η τεχνική εκχύλισης με υπερήχους.

**Πίνακας 3.1.1 :** Τεχνικές παραλαβής που έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του ροσμαρινικού οξέος, σε διάφορα είδη της οικογένειας *Lamiaceae*.

Φυτικό υλικό	Τεχνική παραλαβής	Αναφορά
Δενδρολίβανο	USE, MAE	Rojo et al., 2012.
Δενδρολίβανο	MAE	Liu et al., 2011.
Δενδρολίβανο	SPE, Soxhlet	Ozturk, Tuncel, Uysal, Oncu-Kaya & Koyumcu, 2011.
Δενδρολίβανο	Ηλεκτροδιάλυση	Zelic, Hadolin, Bauman & Vasic-Racki, 2005.
Μελισσόχορτο	SPE	Ondrejovic, Maliar, Benkovicova & Kubincova, 2012.
Μελισσόχορτο	CO <sub>2</sub> - SFE	Peev et al., 2011.
Μελισσόχορτο	Υδατόλουτρο	Kim et al., 2010.
Μελισσόχορτο	USE	Wang, Provan & Helliwell, 2004.
Μελισσόχορτο	USE	Caniova et al., 2001.
Θυμάρι	USE	Boros et al., 2010.
Θυμάρι	USE	Fecka et al., 2008.
Φασκόμηλο	USE	Gokbulut, Kartal, Konuklugil & Firat, 2010.
Φασκόμηλο	USE	Kan et al., 2007.
Φασκόμηλο	Soxhlet	Tepe, Eminagaoglu, Akpulat & Aydin, 2007.
Ρίγανη	USE	Kivilompolo, Oburka & Hyotylainen, 2007.
Θρούμπι	Soxhlet	Plander et al., 2012.

### 3.2 Υπέρηχοι και δράση αυτών κατά την εκχύλιση

Υπέρηχοι είναι τα ακουστικά κύματα τα οποία διαδίνονται με συχνότητα πάνω από 16 kHz και δεν προκαλούν το αίσθημα της ακοής στο ανθρώπινο αυτί. Η διάδοση τους γίνεται με διαδοχικά πυκνώματα και αραιώματα. Η ταχύτητα διάδοσης είναι της τάξεως των 500 m/s όταν διαδίδονται μέσα σε αέρια και των 5000 m/s, όταν η διάδοση τους γίνεται μέσα σε στερεά και υγρά.

Η χρήση των υπερήχων στην εκχύλιση στηρίζεται στο φαινόμενο της ταλάντωσης που προκαλεί η πηγή των υπερήχων, στα μόρια του υλικού με το οποίο έρχεται σε επαφή. Λόγω της ταλάντωσης, παρατηρείται μεταβολή της πίεσης του υλικού που συνήθως είναι υγρός διαλύτης, η οποία οδηγεί στη δημιουργία και κατάρρευση φυσαλίδων. Συνέπεια της αναταραχής αυτής στο υγρό, είναι η διάβρωση σε μεγάλο βαθμό του στερεού φυτικού ιστού που βρίσκεται μέσα σ' αυτό, με αποτέλεσμα μια καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στον ιστό και αποικοδόμηση των πολυμερών που αυτός περιέχει.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την δράση των υπερήχων κατά την διάρκεια της εκχύλισης, είναι η συχνότητα τους, οι ιδιότητες του υγρού (διαλύτης), η θερμοκρασία του υγρού και η περιεκτικότητα αυτού σε αέρια. Ειδικά, στην περίπτωση **λουτρού υπερήχων** για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών από δείγμα δενδρολίβανου, ιδανική συχνότητα είναι αυτή των 40 KHz (Aguirre-Bermudez, Mobbs & Canovas-Barbosa, 2011).

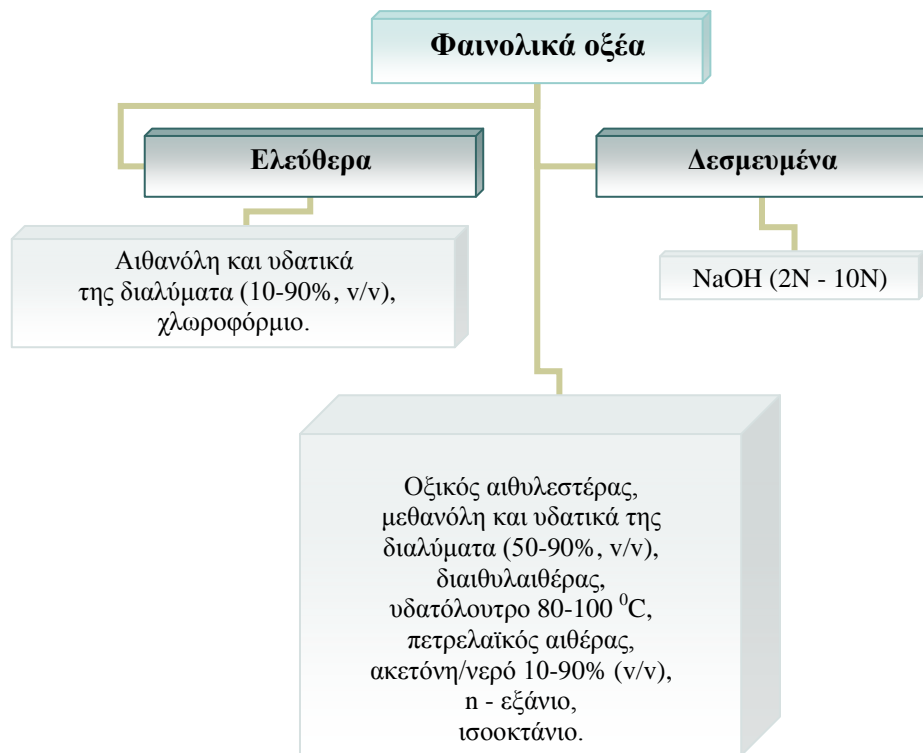


**Εικόνα 3.2.1** : Λουτρό υπερήχων.

Ανακεφαλαιώνοντας, οι υπέρηχοι είναι μια τεχνική εκχύλισης για φαινολικές ενώσεις απλή και εύκολη στον χειρισμό της για ένα εργαστήριο χημείας (λουτρό υπερήχων), επιτυγχάνοντας βελτιώσεις στην απόδοση ενός εκχυλίσματος που κυμαίνονται από **6** έως **35 %** (Garcia-Salas et al., 2010) και μειώνοντας κατά πολύ τους χρόνους εκχύλισης. Γενικά, οι ιδανικές συνθήκες για ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και μη πτητικές όπως στην περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος είναι με τη χρήση υπερήχων, η θερμοκρασία δωματίου, η χαμηλή συχνότητα και οι διαλύτες χαμηλού ιξώδους. Έχει παρατηρηθεί άλλωστε, πως μερικά φαινολικά οξέα σε θερμοκρασίες πάνω από 50 °C είναι ασταθή και διασπώνται (το ροσμαρινικό οξύ υδρολύεται προς καφεϊκό οξύ), με απώλειες της τάξης από 28.2 έως 56.4 % (Caniova et al., 2001). Σε υψηλές θερμοκρασίες, στην έκθεση στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο και στην υπερϊώδη ακτινοβολία, τα φαινολικά οξέα είναι ευαίσθητα και ασταθή (Razborsek, 2011).

### 3.3 Διαλύτες εκχύλισης φαινολικών οξέων

Στην βιβλιογραφία, από τους πιο αποτελεσματικούς διαλύτες εκχύλισης για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων και ειδικά των φαινολικών οξέων από φυτικά εκχυλίσματα, είναι η **μεθανόλη** και η **αιθανόλη** (Ignat et al., 2011). Μεταξύ αυτών των δύο διαλυτών, την μεγαλύτερη απόδοση των εκχυλισμάτων σε ροσμαρινικό οξύ από φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, την ανέδειξε οξιτισμένο υδατικό διάλυμα (pH = 2.5) μεθανόλης (Caniona et al., 2001). Οργανικοί διαλύτες όπως πετρελαϊκός αιθέρας ή χλωροφόρμιο, απέτυχαν στο παρελθόν την παραλαβή του ροσμαρινικού ή ακόμη και καφεϊκού οξέος από εκχυλίσματα φυτών της ίδιας οικογένειας (Canadanovic-Brunet et al., 2008) και (Velickovic, Nikolova, Ivancheva, Stojanovic & B.Veljkovic, 2007) αντίστοιχα.



**Οργανόγραμμα 3.3.1 :** Οργανικοί και ανόργανοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση φαινολικών οξέων (Ignat et al., 2011).

Ειδικά στην περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος, λόγω της παρουσίας εστερομάδας, η χρήση οργανικού διαλύτη για την παραλαβή του από το φυτικό εκχύλισμα είναι επιτακτική, καθώς ένας ανόργανος διαλύτης θα οδηγούσε σε όξινη ή αλκαλική υδρόλυση του, με αποτέλεσμα την παραλαβή των οξέων από τα οποία προέρχεται.

Άλλωστε, σαν **πολική** ένωση που είναι, εμφανίζει υψηλότερη διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη) εξαιτίας της αλληλεπίδρασης των υδροξυλικών μεταξύ τους ομάδων (αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου), παρά σε λιγότερο πολικούς όπως το χλωροφόρμιο (Hernandez, Ponce-Alquicira, Jaramillo-Flores & Legarreta, 2009). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι, όταν το ροσμαρινικό οξύ διαλύεται στους παραπάνω διαλύτες και σε χαμηλή θερμοκρασία, δεν προκαλείται ισομερείωση του (από **trans** μορφή να μετατραπεί σε **cis**). Σε πρόσφατη μελέτη, ένα μείγμα από οργανικούς διαλύτες με τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofuran, **THF**), αιθανόλη και πυριδίνη, αποδείχθηκε αποτελεσματικός διαλύτης εκχύλισης για την παραλαβή του trans-RA (με απόδοση πάνω από 94 %-τριπλή εκχύλιση), από εκχυλίσματα της οικογένειας *Lamiaceae* (Razborsek, 2011).

### 3.4 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης

Η χρωματογραφική ανάλυση είναι μια τεχνική φυσικού διαχωρισμού συστατικών ενός μείγματος. Ο διαχωρισμός γίνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής (φέρουσας) που βρίσκονται μέσα στην χρωματογραφική στήλη. Η αρχή της χρωματογραφίας είναι παρόμοια με αυτή της εκχύλισης και της κλασματικής απόσταξης. Ουσίες που κατανέμονται περισσότερο στην κινητή φάση, διαχωρίζονται διαδοχικά από άλλες που κατανέμονται στην στατική φάση.

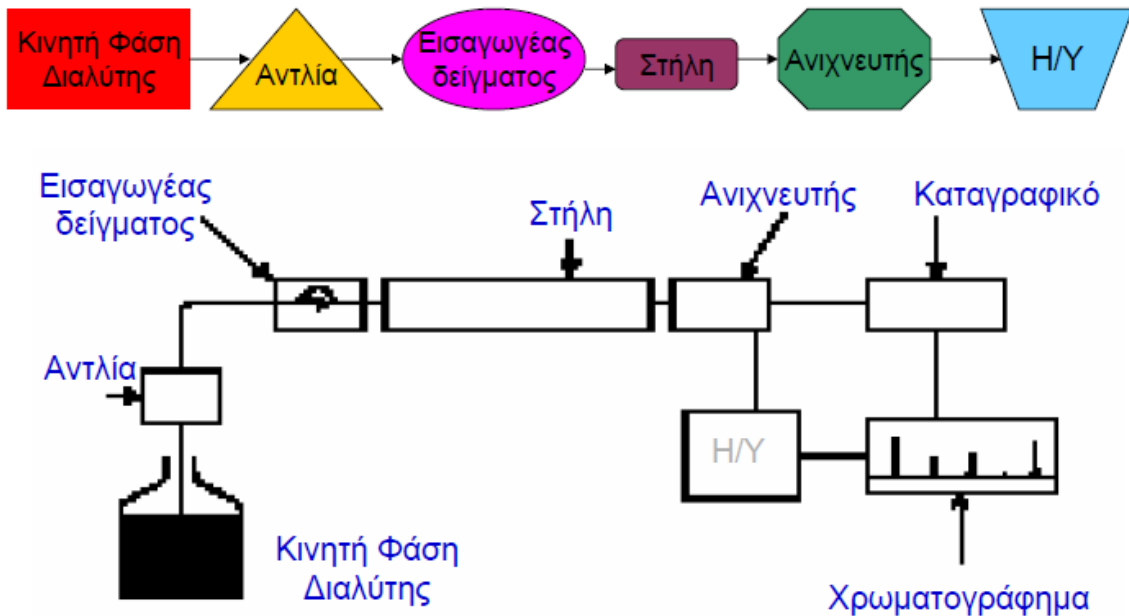
Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συστατικών ενός μείγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, και το μέγεθος των μορίων. Η κινητή φάση, καθώς διέρχεται μέσα από την χρωματογραφική στήλη προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μείγματος επάνω στην στατική φάση, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των συστατικών του μείγματος και την έξοδο τους από την στήλη σε διαφορετικούς χρόνους.

#### 3.4.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, **HPLC**) είναι η πιο διαδεδομένη χρωματογραφική τεχνική ανάλυσης και χρησιμοποιείται τόσο για τον ποιοτικό, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων. Ενδείκνυται για την ανάλυση μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ουσιών. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης γίνεται με τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης και η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντιστάσεως, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (Ταραντίλης, 2004).

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη : **α)** Το δοχείο κινητής φάσης – διαλυτών, **β)** την αντλία, **γ)** το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, **δ)** την στήλη, **ε)** τον

ανιχνευτή και **στ**) τον καταγραφέα ή ηλεκτρονικό υπολογιστή, τα οποία συνδέονται με τρόπο όπως δείχνει το παρακάτω σχήμα (3.4.1.1) :



Σχήμα 3.4.1.1 : Αναπαράσταση μιας τυπικής διάταξης της HPLC.

Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνεται σε **α)** **κανονικής φάσης** (normal phase), κατά την οποία η υγρή στατική φάση είναι πολική (όπως silica gel -  $\text{SiO}_2$  ή  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) και η κινητή φάση σχετικά μη πολική (όπως n-εξάνιο) και χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πολικών ουσιών οι οποίες εκλούνται τελευταίες από τη στήλη και **β)** **ανεστραμμένης φάσης** (reversed phase, **RP**), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική (υδρόφοβη,  $\text{SiO}_2$  συζευγμένο με αλκύλια) και η κινητή φάση πολική (όπως μείγματα διαλυτών μεθανόλης ή ακετονιτριλίου με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό) και χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία ανεστραμμένης φάσης και εφαρμόστηκε η τεχνική της **βαθμιδωτής έκλουσης** (gradient elution), όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία με το χρόνο και συνεπώς η πολικότητα του διαλύτη, με σκοπό να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών των εκχυλισμάτων από το φυτικό υλικό. Ακολουθεί σχετικός πίνακας (3.4.1.) αναλύσεων με HPLC, σε εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* για τον προσδιορισμό του ροσμαρινικού οξέος.

Πίνακας 3.4.1.1 : Ανάλυση εκχυλισμάτων της οικογένειας *Lamiaceae* με HPLC (βιβλιογραφία).

Φυτικό υλικό	Στήλη	Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (κινητή φάση - mobile phase)	Αναφορά
Μελισσόχορτο	Hypersil ODS C18 (5μm, 4.6 x 100 mm), ροή στήλης 1 mL/min και θερμοκρασία = 25 <sup>0</sup> C.	( A ) 100% (v/v) μεθανόλη και ( B ) 0.5% (v/v) οξικό οξύ σε νερό. ( A ) : 0-10 min, 5% 10-40 min, 5-75%	Kim et al., 2010.
Λενδρολίβανο	Kromasil C18 (5μm, 4.6 x 250 mm), ροή στήλης 1 mL/min και θερμοκρασία = 25 <sup>0</sup> C.	( A ) ακετονιτρίλιο και ( B ) 2% μυρμηγκικό οξύ σε νερό. ( A ) : 0-10 min, 30% 10-15 min, 30-70% 15-25 min, 70% 25-30 min, 70-30%	Liu et al., 2011.
Λενδρολίβανο	ODS C18 (3μm, 4.6 x 100 mm), ροή στήλης 1 mL/min.	( A ) μεθανόλη / νερό / μυρμηγκικό οξύ 10 / 88 / 2, ( v / v / v ) και ( B ) μεθανόλη / νερό / μυρμηγκικό οξύ 90 / 8 / 2, ( v / v / v ). ( A ) : 0-15 min, 100% 15-20 min, 85% 20-30 min, 50% 30-35 min, 0% 35-42 min, 100%	Ozturk et al., 2011.
Ρίγανη Θρούμπι	Nucleosil 100-5 C18 (5 μm, 4 x 125 mm), ροή στήλης 1 mL/min.	( A ) 1% v/v μυρμηγκικό οξύ σε νερό και ( B ) ακετονιτρίλιο. ( B ) : 0-10 min, 10-13% 10-25 min, 13-70% 25-29 min, 70% 29-30 min, 70-10% 30-40 min, 10%	Exarchou, Nenadis,Tsimidou, Gerothanassis, Troganis & Boskou, 2002.
Μελισσόχορτο Θυμάρι Λενδρολίβανο Φασκόμηλο	Kingsorb C18 (5 μm, 4.6 x 150 mm), ροή στήλης 1 mL/min και θερμοκρασία = 30 <sup>0</sup> C.	( A ) 0.1% v/v ορθοφωσφορικό οξύ σε νερό και ( B ) 0.1% v/v ορθοφωσφορικό οξύ σε μεθανόλη. ( B ) : 0-10 min, 40-50% 10-15 min, 50-60% 15-25 min, 60%	Wang et al., 2004.

<b>Θυμάρι</b>	Beta Basic C18 (5 $\mu\text{m}$ , 4.6 x 250 mm), ροή στήλης 0.9 mL/min και θερμοκρασία = 20 $^{\circ}\text{C}$ .	( A ) 5% v/v μυρμηγκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο και ( B ) 5% v/v μυρμηγκικό οξύ σε νερό. ( A ) : 0-25 min, 10-40% 25-55 min, 70%	Fecka, Raj & Baranowska, 2007.
<b>Βασιλικός</b>	Waters C18 (5 $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm), ροή στήλης 1mL/min.	( A ) 2.5% v/v μυρμηγκικό οξύ σε νερό και ( B ) ακετονιτρίλιο. ( A ) : 0 min, 85% 15 min, 75% 20 min, 70% 24 min, 45% 28 min, 10% 30 min, 0% 35-40 min, 85%	Kwee & Niemeyer, 2011.

Όπως δείχνει ο πίνακας και αναφέρεται στην βιβλιογραφία (Ignat et al., 2011), κατάλληλη χρωματογραφική στήλη για τον διαχωρισμό φαινολικών ενώσεων είναι η **C18** (όπου η προσαρτημένη ομάδα στο υλικό πληρώσεως της στήλης είναι το **δεκαοκτώλιο**). Σ' όλες τις παραπάνω αναλύσεις χαρακτηριστική είναι η μικρή διάμετρος των σωματιδίων του υλικού πληρώσεως που κυμαίνεται από 3-5  $\mu\text{m}$  (μεγαλύτερος αριθμός θεωρητικών πλακών), για καλύτερο και πιο γρήγορο διαχωρισμό. Ένα άλλο χαρακτηριστικό σημείο, είναι και το χαμηλό pH του διαλύτη της κινητής φάσης με την προσθήκη οξέων όπως το μυρμηγκικό ή το οξικό οξύ, με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών των εκχυλισμάτων. Οι (Sanli, Fonrodona, Barbosa, Ozkan & Beltran, 2005) μελέτησαν την επίδραση του pH της κινητής φάσης στο διαχωρισμό πολυφαινολικών οξέων (στα πειράματα τους η κινητή φάση ήταν ακετονιτρίλιο με μυρμηγκικό οξύ 0.1 % v/v) και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ακόμη και μια μικρή αύξηση του pH από 4 σε 4.5, είναι ικανή να οδηγήσει σε χαμηλούς χρόνους συγκράτησης (retention times,  $t_R$ ) και επομένως σε χαμηλή ανάλυση των χρωματογραφημάτων (χαμηλή διαχωριστική ικανότητα, low resolution). Ιδανικός τελικά διαχωρισμός των πολυφαινολικών οξέων, επιτυγχάνεται με όσο το δυνατόν χαμηλό pH της κινητής φάσης, στο σημείο που επιτρέπουν οι **προδιαγραφές** της χρωματογραφικής στήλης που κάθε φορά χρησιμοποιείται.

### 3.4.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με την HPLC

Η ένωση που εκλούεται από την χρωματογραφική στήλη, διοχετεύεται σε έναν ανιχνευτή φασματοφωτομέτρου και καταγράφεται το αντίστοιχο φάσμα. Έπειτα, συγκρίνεται το φάσμα



αυτό με άλλα γνωστά φάσματα από βιβλιοθήκες φασμάτων και έτσι ταυτοποιείται το άγνωστο συστατικό. Μία ακόμη παράμετρος που λαμβάνεται υπόψη είναι και η σύγκριση του χρόνου συγκράτησης (retention time,  $t_R$ ) της άγνωστης ουσίας, με αυτόν μιας πρότυπης ουσίας στις ίδιες συνθήκες ανάλυσης. Ως **χρόνος συγκράτησης**, ορίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή που γίνεται η ένεση με το δείγμα, μέχρι την εμφάνιση μεγίστου κορυφής στο χρωματογράφημα. Οι χρόνοι συγκράτησης πρέπει να συμφωνούν με μια απόκλιση  $\pm 1-2$  δευτερολέπτων. Έτσι, επιτυγχάνεται ο **ποιοτικός** προσδιορισμός των συστατικών ενός εξεταζόμενου δείγματος με την βοήθεια της HPLC.

Για τον **ποσοτικό** προσδιορισμό της άγνωστης ένωσης, χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι του εξωτερικού (external standard) ή εσωτερικού προτύπου (internal standard). Οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται στο γεγονός ότι η περιοχή που περικλείεται από την κορυφή του χρωματογραφήματος και τη βασική γραμμή, αντιστοιχεί στο εμβαδόν της κορυφής το οποίο σχετίζεται με την ποσότητα του αντίστοιχου συστατικού μέσα στο δείγμα. Όσο μεγαλύτερη ποσότητα περιέχει το εξεταζόμενο δείγμα, παρατηρούμε και μεγαλύτερο εμβαδόν κορυφής για το συγκεκριμένο συστατικό.

Στην παρούσα μελέτη, ο ποσοτικός προσδιορισμός του ροσμαρινικού οξέος επετεύχθη με τη χρήση καμπύλης αναφοράς. Πρότυπα διαλύματα του ροσμαρινικού οξέος προετοιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και αναλύθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με αυτά των εκχυλισμάτων του φυτικού υλικού. Με την βοήθεια μιας καμπύλης αναφοράς που σχεδιάστηκε από τα πρότυπα, υπολογίστηκε η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος στα φυτικά δείγματα.

### 3.5 Φασματοσκοπία υπέρυθρου

Η σύγχρονη φασματοσκοπία υπέρυθρου (Infra Red Spectroscopy, **IR**) αποτελεί ένα αποτελεσματικότερο και εύχρηστο εργαλείο, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας. Οι εφαρμογές της ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, με βάση τις τρεις περιοχές του υπέρυθρου φάσματος. Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή και με μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή (Mid IR), η οποία εκτείνεται περίπου από τα **4000** έως **600**  $\text{cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή λαμβάνονται φάσματα απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης, τόσο για ποιοτικούς όσο και για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Ακολουθεί σχετικός πίνακας με τις σπουδαιότερες εφαρμογές της φασματοσκοπίας υπέρυθρου :

**Πίνακας 3.5.1** : Οι σπουδαιότερες εφαρμογές της IR (Skoog, Hollen & Nieman, 2005).

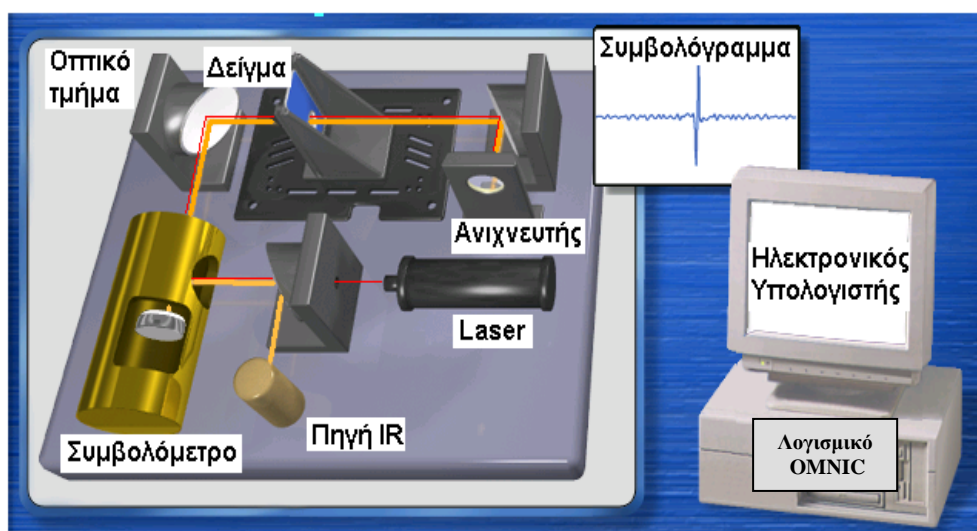
Φασματική περιοχή	Είδος μέτρησης	Είδος προσδιορισμού	Είδος δείγματος
Εγγύς υπέρυθρη (Near IR) (14000 έως 4000 $\text{cm}^{-1}$ )	Διάχυτη ανάκλαση	Ποσοτικός	Στερεά ή υγρά εμπορικά υλικά.
	Απορρόφηση	Ποσοτικός	Μείγματα αερίων.
Μέση υπέρυθρη (Mid IR) (4000 έως 600 $\text{cm}^{-1}$ )	Απορρόφηση	Ποιοτικός	Καθαρές στερεές, υγρές ή αέριες ενώσεις.
		Ποσοτικός	Πολύπλοκα στερεά, υγρά ή αέρια μείγματα.
		Χρωματογραφικός	Πολύπλοκα στερεά, υγρά ή αέρια μείγματα.
	Ανάκλαση	Ποιοτικός	Καθαρές στερεές ή υγρές ενώσεις.
	Εκπομπή	Ποσοτικός	Ατμοσφαιρικά δείγματα.
Άπω υπέρυθρη (Far IR) (600 έως 10 $\text{cm}^{-1}$ )	Απορρόφηση	Ποιοτικός	Καθαρές ανόργανες ή οργανομεταλλικές ενώσεις.

#### 3.5.1 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red Spectroscopy, **FT-IR**), είναι μία από τις πιο σημαντικές σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές. Τα φάσματα λαμβάνονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, είτε ολόκληρα είτε ορισμένες ταινίες απορρόφησης τους με άλλα γνωστά. Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, η ταυτοποίηση άγνωστων οργανικών ουσιών, αλλά και η πιστοποίηση της καθαρότητας τους. Εδώ, θα πρέπει να

αναφερθεί ότι σ' ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας, διακρίνουμε δύο κυρίως περιοχές. Την περιοχή των **χαρακτηριστικών ομάδων** που εκτείνεται από τα 4000 έως τα 1400  $\text{cm}^{-1}$  (οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις των ομάδων) και αυτή των **δακτυλικών αποτυπωμάτων** που εκτείνεται από τα 1400 έως τα 600  $\text{cm}^{-1}$  (οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολοκλήρου του μορίου).

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο FT-IR, αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα : **α)** Την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, **β)** την πηγή λέιζερ, **γ)** το συμβολόμετρο Michelson και **δ)** τον ανιχνευτή.



Εικόνα 3.5.1.1 : Οργανολογία ενός φασματοφωτόμετρου FT-IR.

Το συμβολόγραμμα που λαμβάνεται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (στην παρούσα μελέτη με το OMNIC 7.3 της εταιρίας Nicolet, 750 Magna series), υφίσταται μετασχηματισμό κατά Fourier και τελικά εμφανίζεται σαν τυπικό φάσμα FT-IR.

Η καταγραφή φασμάτων με μετασχηματισμό κατά Fourier παρουσιάζει, εκτός από την υψηλή ταχύτητα καταγραφής, τα πλεονεκτήματα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και του χαμηλού «θορύβου». Ως «θόρυβος» ορίζονται εκείνα τα σήματα, τα οποία δεν αντιστοιχούν σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος και ο οποίος καθορίζει την ποιότητα και κατ' επέκταση την αξιολόγηση ενός φάσματος. Για την αξιολόγηση των σημάτων, χρησιμοποιείται ο όρος «λόγος σήματος προς θόρυβο, Signal to Noise Ratio, **RSN**».

### 3.5.2 Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης

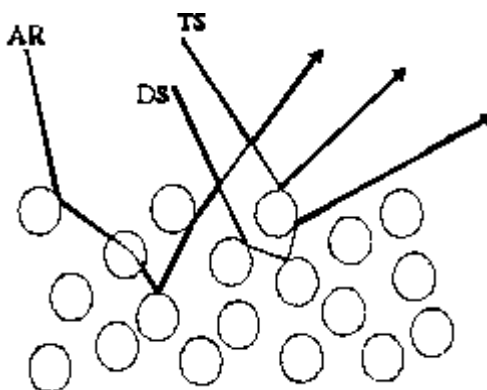
Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης με μετασχηματισμό κατά Fourier (Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform Spectroscopy, **DRIFTS**), είναι μία από τις τεχνικές

λήψης φασμάτων FT-IR από δείγματα σε στερεά κατάσταση, συνήθως υπό τη μορφή σκόνης και χωρίς την προσθήκη άλλου υλικού. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος (εικόνα 3.5.2.1).



**Εικόνα 3.5.2.1** : Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος και καψίδια για τη λήψη φασμάτων με τεχνική DRIFTS.

Όταν η υπέρυθη ακτινοβολία προσπέσει στην επιφάνεια του υλικού, ένα τμήμα της ανακλάται (ή διαχέεται), ένα τμήμα διαθλάται και ένα τμήμα περιθλάται. Ουσιαστικά, η **ανάκλαση** είναι το φαινόμενο στο οποίο στηρίζεται η τεχνική DRIFTS. Όμως, η υπέρυθη ακτινοβολία υπόκειται σε τριών ειδών ανακλάσεις (σχήμα 3.5.2.1), την απορροφητική, την διαχυτική και την αληθινή ανάκλαση. Από τα τρία αυτά είδη ανάκλασης, μόνο η απορροφητική περιέχει πληροφορίες για το δείγμα.



**Σχήμα 3.5.2.1** : Τα τρία είδη ανάκλασης υπέρυθρης ακτινοβολίας σε στερεό δείγμα υπό τη μορφή σκόνης (**AR** : Απορροφητικά ανακλώμενη, **DS** : Διαχυτικά ανακλώμενη, **TS** : Αληθινά ανακλώμενη).

Το μέρος της ακτινοβολίας που θα απορροφηθεί και στη συνέχεια θα ανακλαστεί, δηλαδή η απορροφητική ανάκλαση, εξαρτάται από :  $\alpha$ ) το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος,  $\beta$ ) τη μετωπική επιφάνεια και την πυκνότητα πακεταρίσματος του δείγματος στον υποδοχέα,  $\gamma$ ) το

δείκτη διάθλασης του δείγματος και  $\delta$ ) από τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας πάνω στο δείγμα.

Η τεχνική DRIFTS χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια γιατί είναι απλή, πάρα πολύ γρήγορη και ουσιαστικά δεν απαιτεί προηγούμενη κατεργασία του δείγματος. Όταν εξετάζονται μείγματα, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην **ομογενοποίηση** τους. Η λήψη των φασμάτων γίνεται είτε με το δείγμα ως έχει, είτε με ανάμειξη σε αναλογία 1:100 με βρωμιούχο ή χλωριούχο κάλιο (Παππάς, 2000), καθώς αυτές οι δύο ενώσεις απορροφούν στα 320 και 400  $\text{cm}^{-1}$  αντίστοιχα, εκτός δηλαδή της μέσης υπέρυθρης περιοχής.

### 3.5.3 Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR

Οι συνθέστερες επεξεργασίες που γίνονται στα φάσματα FT-IR είναι η εξομάλυνση του σήματος, η διόρθωση της βασικής γραμμής και η αποσυνέλιξη. Στοχεύουν στη βελτίωση του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς.

**Αυτόματη εξομάλυνση** (Automatic Smooth) : Με την εξομάλυνση δεν εξαλείφεται ο θόρυβος, αλλά μειώνεται σε μεγάλο βαθμό με τη βοήθεια μιας μαθηματικής επεξεργασίας, χωρίς να αλλοιώνεται η εικόνα του φάσματος, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται ο λόγος RSN. Με τη χρήση ενός αλγόριθμου, ο οποίος χρησιμοποιεί ένα πολυωνυμικό μοντέλο, τις πληροφορίες για το RSN κάποιων επιλεγμένων σημείων και με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, προσαρμόζει την καμπύλη του φάσματος. Η λειτουργία «αυτόματη εξομάλυνση» του λογισμικού OMNIC 7.3 εταιρίας Nicolet, εκτελεί αυτόματα την παραπάνω διαδικασία.

**Αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής** (Automatic baseline correct) : Η βασική γραμμή των φασμάτων FT-IR συνήθως αποτελείται και από σημεία των οποίων η ένταση δεν είναι μηδέν, γι' αυτό είναι απαραίτητο να γίνει διόρθωση της. Η διόρθωση της βασικής γραμμής δεν γίνεται μόνο για λόγους εμφάνισης των φασμάτων, αλλά είναι αναγκαία όταν πρόκειται να συγκριθούν δύο φάσματα ή να χρησιμοποιηθούν για ποσοτική ανάλυση. Η διόρθωση της βασικής γραμμής γίνεται με αυτόματη διαδικασία, από το λογισμικό OMNIC 7.3.

**Αποσυνέλιξη** (Deconvolution) : Όταν καταγράφονται φάσματα μειγμάτων ή φυσικών προϊόντων, τις περισσότερες φορές υπάρχει αλληλοεπικάλυψη κορυφών με αποτέλεσμα να εμφανίζονται σαν μία κορυφή. Για να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα αυτό, οι κορυφές αποσυνελίσσονται χρησιμοποιώντας μαθηματικές τεχνικές. Ανεξάρτητα από την τεχνική λήψης φάσματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά, υπάρχει ένα βασικό ερώτημα. Πόσες είναι οι αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές που βρίσκονται να είναι συνελιγμένες σε μία; Το ερώτημα δεν είναι εύκολο να απαντηθεί κάθε φορά. Μια καλή τεχνική, είναι αυτή της **δευτέρως παραγώγου**. Υπολογίζοντας τη δεύτερη παράγωγο της συνάρτησης της καμπύλης απορρόφησης (γίνεται αυτόματα μέσω του λογισμικού OMNIC 7.3), προκύπτει καμπύλη της

οποίας τα ελάχιστα είναι πιθανόν να αντιστοιχούν στα μέγιστα των αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών. Έπειτα, πραγματοποιείται αποσυνέλιξη της αρχικής κορυφής στις πιθανές κορυφές που την αποτελούν, είτε με τη διαδικασία της αποσυνέλιξης κατά Fourier, είτε με αυτή της εξομοίωσης της καμπύλης.

Η εξομοίωση της καμπύλης, είναι ιδιαίτερα σύνθετη και για να γίνει απαιτείται η χρήση αλγόριθμων αναπαραγωγής μοντέλων προσαρμογής ιδεατών κορυφών, σε πολύπλοκα συστήματα αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών, όπως στα φάσματα. Η προσαρμογή των καμπυλών γίνεται όχι μόνο με τη συνάρτηση Lorentzian, αλλά και με άλλες συναρτήσεις όπως Gaussian, Log normal, Gaussian / Lorentzian και Voight.

### 3.5.4 Εφαρμογές ποσοτικών προσδιορισμών με τη χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας

Ανατρέχοντας στην βιβλιογραφία, λίγες είναι οι έρευνες για ποσοτικούς προσδιορισμούς με τη χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας σε φυτικό υλικό. Για το ροσμαρινικό οξύ, ενδεικτικά μπορεί να αναφερθεί αυτή των (Stehfest, Boese, Kerns, Piry & Wilhelm, 2004), οι οποίοι με τη βοήθεια της χημειομετρίας (μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων) και έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα της HPLC, ανέπτυξαν μια μέθοδο προσδιορισμού των συγκεντρώσεων του ροσμαρινικού οξέος από τα ληφθέντα φάσματα της FT-IR, με μια μέση απόκλιση  $\pm 4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  ξηρού βάρους. Τα δείγματα προήρθαν από την καλλιέργεια κυττάρων σε αιώρηση της λεβάντας (*Lavandula Officinalis*) και η προεργασία τους για την λήψη των φασμάτων, έγινε σε πλακίδια σεληνιούχου ψευδαργύρου (ZnSe).

Σε μια άλλη μελέτη, επιτεύχθηκε με επιτυχία ο ποσοτικός προσδιορισμός της λιγνίτης σε κενάφ (*Hibiscus cannabinus L.*) με τη χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (Pappas, Tarantilis & Polissiou, 1998). Η λήψη δε των φασμάτων έγινε με την τεχνική DRIFTS, χωρίς να υποστούν κάποια χημική προεργασία τα αρχικά δείγματα. Την ίδια επιτυχία είχε και η προσπάθεια των (Petraakis, Kimbaris, Pappas, Tarantilis & Polissiou, 2009), οι οποίοι κατάφεραν έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC) και σε συνδυασμό με τα φάσματα FT-IR και τη χημειομετρία, να υπολογίσουν ποσοτικά το μονοτερπένιο πουλεγόνη (pulegone) στο φλισκούνη (*Mentha pulegium*) της οικογένειας *Lamiaceae*.

### 3.5.5 Χημειομετρία και μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στον τομέα της αναλυτικής χημείας έχει αλλάξει ουσιαστικά με την εισαγωγή χημειομετρικών μεθόδων ανάλυσης. Η αλλαγή αυτή οφείλεται στη δυνατότητα ψηφιακής καταγραφής και επεξεργασίας ευρύτατων συνόλων δεδομένων από κάθε παρατηρούμενο αντικείμενο και για μεγάλο αριθμό αντικειμένων. Η χημειομετρία είναι η

μαθηματική μεθοδολογία (εφαρμογή στατιστικής και γραμμικής άλγεβρας) που επιτρέπει τον εντοπισμό εκείνου του υποσυνόλου των δεδομένων, που σχετίζεται με την ιδιότητα του αντικειμένου που μας ενδιαφέρει και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του αντικειμένου ή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ιδιότητας αυτής. Σχετίζεται με τον κλάδο της αναλυτικής χημείας που χρησιμοποιεί στατιστικές μεθόδους ανάλυσης, με τη βοήθεια πολλών μεταβλητών (multivariate calibration methods), (Σιδερούδη, 2006).

Η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, **PLS**) είναι ένα νέο στατιστικό εργαλείο με πολλές παραλλαγές, το οποίο έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε διάφορες ποσοτικές αναλύσεις όπως χρωματογραφικές, υπερύθρου, υπεριώδους και ηλεκτροχημικών δεδομένων. Το λογισμικό PLS έχει γίνει διαθέσιμο από αρκετούς κατασκευαστές οργάνων FT-IR για ποσοτικές φασματικές αναλύσεις. Στην παρούσα μελέτη ήταν ενσωματωμένο στο λογισμικό TQ Analyst Professional Edition (7.2.0.161 Release, Thermo Electron Corp.).

### 3.6 Σκοπός

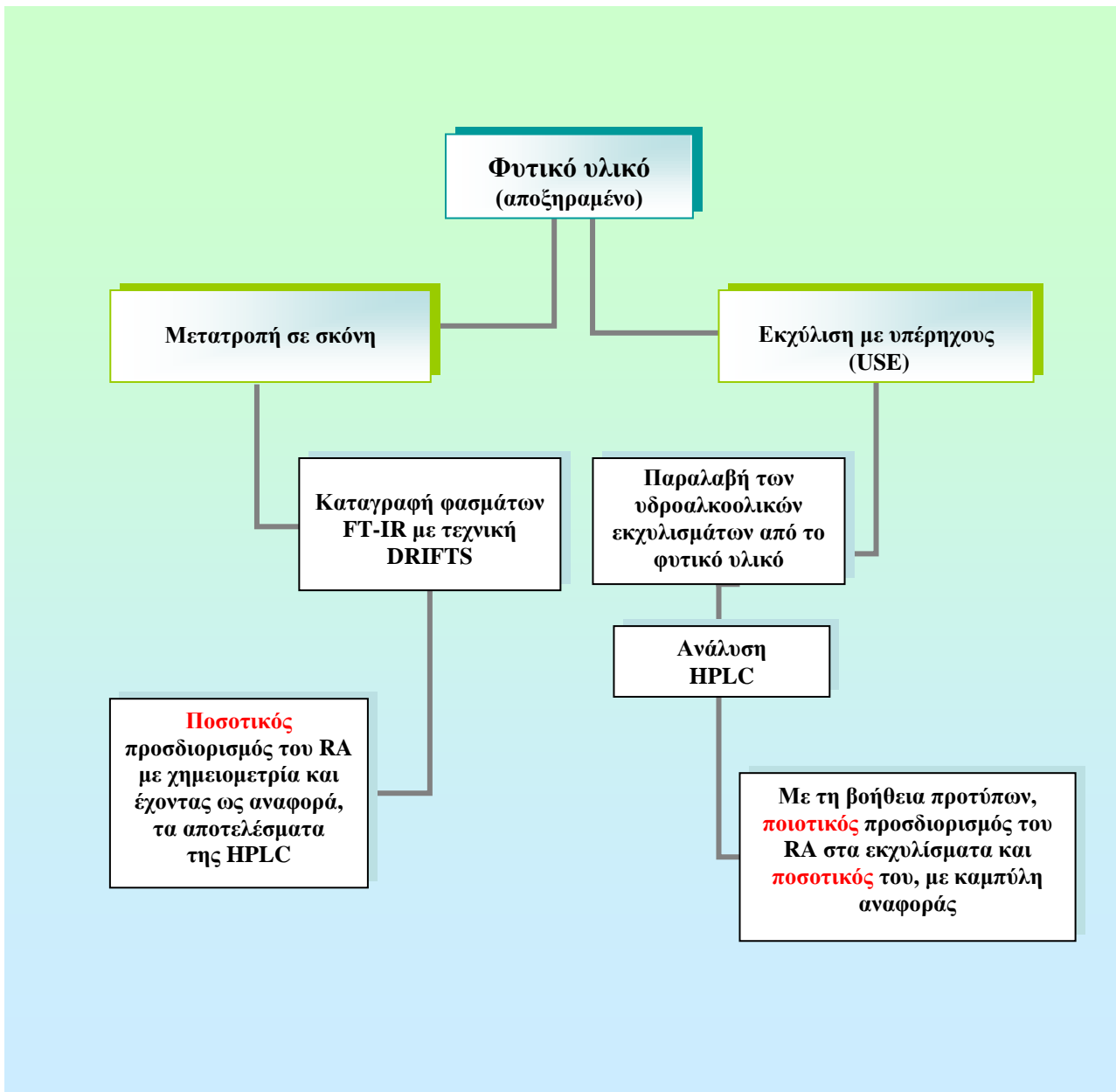
Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν **α)** ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του ροσμαρινικού οξέος, στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* καλλιεργημένα στον Ελλαδικό χώρο, με τη βοήθεια της HPLC και **β)** ο ποσοτικός προσδιορισμός του στα αποξηραμένα φυτικά δείγματα με τη βοήθεια της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (Mid IR), με ανάπτυξη μεθόδου PLS που θα συνδυάζει τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού της HPLC και αυτά της υπέρυθρης φασματοσκοπίας.

Πέρα από την προσπάθεια ανάδειξης της βιολογικής αξίας των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που χρησιμοποιήθηκαν, όσο αφορά την περιεκτικότητά τους σε ροσμαρινικό οξύ με την HPLC και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες στα ίδια φυτά, ο απώτερος σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν να επιχειρηθεί η εφαρμογή της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με την τεχνική DRIFTS στον ποσοτικό προσδιορισμό του, καθώς είναι μια πολύ πιο γρήγορη και οικονομική μέθοδος από τις ήδη υπάρχουσες και πιο συγκεκριμένα την HPLC. Τα στάδια της μελέτης ήταν τα ακόλουθα :

- Παραλαβή υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων από το αποξηραμένο φυτικό υλικό μέσω εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους (USE).
- Ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με HPLC και ποσοτικός προσδιορισμός του ροσμαρινικού οξέος με τη μέθοδο εξωτερικού προτύπου.
- Καταγραφή φασμάτων FT-IR απευθείας στο αποξηραμένο φυτικό υλικό με την τεχνική DRIFTS.
- Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR και ποσοτικός προσδιορισμός του ροσμαρινικού οξέος με τη βοήθεια της χημειομετρίας.
- Σύγκριση των δύο μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού του ροσμαρινικού οξέος.

Ακολουθεί σχετικό οργανόγραμμα (3.6.1), όπου αποδίδονται σχηματικά τα στάδια της μελέτης, η πειραματική διαδικασία δηλαδή που εφαρμόστηκε :





Οργανόγραμμα 3.6.1 : Στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ( ΥΛΙΚΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ - ΜΕΘΟΔΟΙ )

### 4.1 Φυτικό υλικό

Εναέρια μέρη φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* συλλέχθηκαν από διάφορα μέρη της Ελλάδας (πίνακας 4.1.1). Αποξηραμένα φύλλα και άνθη από τα φυτικά δείγματα λειοτριβήθηκαν στο χέρι σε πορσελάνινο γουδί, έως μετατροπή αυτών σε σκόνη η οποία και χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη την πειραματική διαδικασία (εικόνα 4.1.1).

Πίνακας 4.1.1 : Κωδικοποίηση των φυτικών δειγμάτων, περιοχή, έτος συλλογής και ποσότητα.

Λατινική ονομασία	Ελληνική ονομασία	Αριθμός δείγματος	Φυτικό μέρος	Περιοχή και έτος συλλογής	Ποσότητα σε g
<i>Salvia officinalis</i>	Φασκόμηλο	15	Φύλλα	Λουτράκι Αμφιλοχίας, 2007	6.0
<i>Salvia officinalis</i>	Φασκόμηλο	22	Φύλλα	Λουτράκι Αμφιλοχίας, 2008	6.0
<i>Basilicum ocimum</i>	Βασιλικός	43	Φύλλα	Αιτωλοακαρνανία, 2010	4.1
<i>Hyssopus officinalis</i>	Ύσσωπος	29	Φύλλα και άνθη	Πανατολικό, 2009	2.8
<i>Origanum vulgare</i>	Ρίγανη	36	Φύλλα	Αιτωλοακαρνανία, 2010	5.0
<i>Origanum vulgare</i>	Ρίγανη	58	Φύλλα και άνθη	Αιτωλοακαρνανία, 2011	2.1
<i>Thymus vulgaris</i>	Θυμάρι	37	Φύλλα	Αιτωλοακαρνανία, 2010	3.8
<i>R. officinalis</i>	Δενδρολίβανο	26	Φύλλα	Αγρίνιο, 2009	6.5
<i>M. officinalis</i>	Μελισσόχορτο	38	Φύλλα	Αιτωλοακαρνανία, 2010	4.2
<i>M. officinalis</i>	Μελισσόχορτο	39	Φύλλα	Αιτωλοακαρνανία, 2010	4.2
<i>S. hortensis</i>	Θρούμπι	40	Φύλλα	Αιτωλοακαρνανία, 2010	4.1



Εικόνα 4.1.1 : Φυτικό υλικό υπό τη μορφή σκόνης.

#### 4.2 Όργανα – αντιδραστήρια - γυάλινα σκεύη και υλικά

Ο πίνακας (4.2.1), περιέχει αναλυτικά τα όργανα, τα αντιδραστήρια, τα γυάλινα σκεύη και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας :

Πίνακας 4.2.1 : Οργανολογία της πειραματικής διαδικασίας.

Στάδια	Συσκευές - Όργανα	Αντιδραστήρια - Διαλύτες	Γυάλινα σκεύη - Υλικά
Διαλύτης εκχύλισης	Πεχάμετρο (Hach Sension 3) Θερμόμετρο Μαγνητικός αναδευτήρας	Ρυθμιστικά διαλύματα (pH = 4, 7 και 10) Μυρμηγκικό οξύ Μεθανόλη για HPLC (99.9 % καθαρότητας) Δις απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό για HPLC	Ποτήρια ζέσεως Ογκομετρικές φιάλες Σιφώνια πλήρωσεως
Υδροαλκοολικά εκχυλίσματα	Ζυγός ακριβείας Λουτρό υπερήχων (Bandelin Sonorex Super RK 255H) Αντλία κενού Συσκευή διήθησης Buchner Πλαστική σύριγγα των 20 ml	Διαλύτης εκχύλισης	Κωνικές φιάλες Βιδωτά φιαλίδια Παραφίλμ Αλουμινοχαρτο Διηθητικό χαρτί Φίλτρα σύριγγας (Teknokroma)
Πρότυπα διαλύματα για HPLC	Αυτόματες πιπέτες	RA (purum $\geq$ 96 %, Sigma Aldrich)	Παραφίλμ Βιδωτά φιαλίδια Αλουμινοχαρτο
Ανάλυση HPLC	1100 Agilent HPLC Chemstation. Στήλη Supelco (Discovery® HS C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 250 mm). Φούρνος στήλης (Column heater-Model 7971, Jones Chromatography).	Διαλύτης A, μεθανόλη (99.9 % καθαρότητας) Διαλύτης B, νερό για HPLC σε (pH = 2.5)	-
Ανάλυση IR	Thermo Nicolet 7600. Υποδοχέας δείγματος για τεχνική DRIFTS. Καψίδιο	KBr και SiO <sub>2</sub>	Βιδωτά φιαλίδια Ξηραντήρας

### 4.3 Προετοιμασία του διαλύτη εκχύλισης

Αρχικά ρυθμίστηκε το pH (κοντά στο 2.5) νερού δισαπεσταγμένου και διηθημένου για HPLC, με την προσθήκη σταγόνων μυρμηγκικού οξέος. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πεχαμέτρου και μαγνητικού αναδευτήρα, έχοντας προηγηθεί κάθε φορά βαθμονόμηση του πεχαμέτρου με την βοήθεια κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων (buffers).

Έπειτα, 40 mL του παραπάνω διαλύματος γινόταν προσθήκη σε 60 mL διαλύματος μεθανόλης (CH<sub>3</sub>OH, 99.9 % καθαρότητας) σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και έτσι προέκυπτε ο **διαλύτης εκχύλισης** (60 : 40 v/v, CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O-οξιτισμένο, αντίστοιχα).

### 4.4 Παραλαβή των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με υπερήχους ( USE )

Σε κωνική φιάλη μεταφέρθηκαν 100 mg φυτικού υλικού (υπό τη μορφή σκόνης) και προστέθηκαν 10 mL από τον διαλύτη εκχύλισης. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων (στα 35 KHz) για 10 min, με ελεγχόμενη θερμοκρασία του λουτρού στους 25 °C. Το εκχύλισμα που προέκυψε, διηθήθηκε υπό κενό σε χωνί Buchner. Το στερεό υπόλειμμα του φυτικού υλικού που παρέμεινε πάνω στο διηθητικό χαρτί, συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε ξανά στην κωνική φιάλη με την προσθήκη ακόμη 10 mL του διαλύτη εκχύλισης. Συνολικά η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές, για το ίδιο στερεό υπόλειμμα της πρώτης εκχύλισης. Στο τελικό εκχύλισμα που προέκυψε (από την ανάμειξη των τριών εκχυλισμάτων), έγινε διήθηση με τη βοήθεια πλαστικής σύριγγας και φίλτρου TeknoKroma (PTFE 0.45 μm) σε βιδωτά φιαλίδια (σε δύο συγκεκριμένα για τις ανάγκες της HPLC), τα οποία τυλίχθηκαν με παραφίλμ, σκεπάστηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -20 °C, για περαιτέρω αναλύσεις. Η παραπάνω μέθοδος που περιγράφηκε, πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε φυτικό δείγμα ξεχωριστά, λαμβάνοντας εκχυλίσματα διανυγής, απαλού κίτρινου χρώματος (εικόνα 4.4.1).



**Εικόνα 4.4.1 :** Εκχυλίσματα από τυχαία δείγματα του φυτικού υλικού.

#### 4.5 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων ροσμαρινικού οξέος

Ζυγίστηκαν 5 mg καθαρού ροσμαρινικού οξέος (1 mg/mL, Sigma Aldrich) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL, στην οποία έγινε προσθήκη 5 mL του διαλύτη εκχύλισης. Έτσι, προέκυψε πυκνό μητρικό διάλυμα (**stock solution**) του ροσμαρινικού οξέος συγκέντρωσης (1 mg/mL ή 1000 ppm), το οποίο αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -20 °C.

Με αυτόματες πιπέτες έγιναν αραιώσεις του μητρικού διαλύματος, με προσθήκη κάθε φορά του διαλύτη εκχύλισης, ώστε να προκύψουν πρότυπα διαλύματα ροσμαρινικού οξέος συγκεντρώσεων **30, 60, 100, 150, 210, 270** και **330** ppm αντίστοιχα. Τα πρότυπα αναλύθηκαν με την ίδια μέθοδο και κάτω από τις ίδιες συνθήκες στην HPLC, όπως και τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα του φυτικού υλικού, συμβάλλοντας στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του ροσμαρινικού οξέος σ' αυτά. Εδώ, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η προετοιμασία των προτύπων και η ανάλυση αυτών, διενεργήθη μετά την παραλαβή και ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του φυτικού υλικού στην HPLC και η επιλογή του εύρους συγκέντρωσης τους (από 30 έως 330 ppm), έγινε βάση των εμβαδών κορυφής του RA στα χρωματογραφήματα των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων.

#### 4.6 Ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του φυτικού υλικού με HPLC

Η ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του φυτικού υλικού, έγινε με σύστημα Agilent Model 1100 HPLC, εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου κύματος UV-Vis (Diode Array Detector, **DAD**), εικόνα (4.6.1).



Εικόνα 4.6.1 : Σύστημα της HPLC που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.

Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP Chemstation, για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Η στήλη ήταν Supelco (Discovery® HS C18) ανεστραμμένης φάσης, μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης 5  $\mu\text{m}$ . Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών. Ο διαλύτης **A** ήταν δισαπεσταγμένο και διηθημένο νερό, ρυθμισμένο σε  $\text{pH} = 2.5$  με προσθήκη φορμικού οξέος και ο διαλύτης **B** ήταν μεθανόλη υψηλής καθαρότητας (99.9 %). Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος στην σταθερή τιμή των 0.400 mL/min, με την πίεση της στήλης να κυμαίνεται από **60** έως **68** bar από τη στιγμή της ένεσης, μέχρι την έκλυση της ουσίας (RA). Επίσης, η στήλη ήταν θερμοστατούμενη σε ειδικό φούρνο για HPLC (Column heater - Model 7971, Jones Chromatography) διατηρώντας μια μέση τιμή θερμοκρασίας γύρω στους 25  $^{\circ}\text{C}$ , σε όλη την πειραματική διαδικασία.

Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλυσης (gradient elution), κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία. Αυτό επετεύχθη με κατάλληλο προγραμματισμό του οργάνου, ώστε να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Το δείγμα εισάγονταν στο σύστημα με ειδική σύριγγα, σε βαλβίδα υψηλής πίεσης Rheodyne τύπου 7125 και ο όγκος εισαγωγής του ήταν 20  $\mu\text{L}$  (**injection volume**). Ο χρόνος καταγραφής των χρωματογραφημάτων ρυθμίστηκε στα 40 min και το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης που εφαρμόστηκε, φαίνεται στον πίνακα (4.6.1) που ακολουθεί :

**Πίνακας 4.6.1** : Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης που εφαρμόστηκε.

Χρόνος * (min)	Διαλύτης B : μεθανόλη (%)	Διαλύτης A : νερό σε $\text{pH} = 2.5$ (%)
0	25	75
2	25	75
40	90	10

\* Οι χρόνοι πλυσίματος και εξισορρόπησης της στήλης, δεν αναγράφονται.

Η καταγραφή των εκλούμενων συστατικών, γίνονταν συνεχώς με καταγραφή του φάσματος απορρόφησης από τον ανιχνευτή διάταξης διόδων (**DAD**) και σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Αυτά ήταν στα **260**, **280** και **330** nm, μήκη κύματος στα οποία τα φαινολικά οξέα εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση.

Με το ίδιο πρόγραμμα έκλυσης και στις ίδιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, ελήφθησαν και τα χρωματογραφήματα των προτύπων. Συγκεκριμένα, ελήφθησαν 3 (τρία) χρωματογραφήματα για κάθε φυτικό δείγμα και 3 (τρία) για κάθε πρότυπο RA, με τυχαία σειρά ανάλυσης των προτύπων στην HPLC (και με όλα τα χρωματογραφήματα τους να λαμβάνονται

την ίδια ημέρα), με σκοπό να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα (precision) και η ακρίβεια της μεθόδου (μέθοδος εξωτερικού προτύπου).

#### 4.7 Ανάλυση του φυτικού δείγματος με φασματοσκοπία υπερέυθρου IR

Τα φάσματα FT-IR ελήφθησαν με φασματόμετρο υπερέυθρου Thermo Nicolet 7600. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό OMNIC 7.3 για την επεξεργασία τους (εικόνα 4.7.1). Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική DRIFTS, όπου το φυτικό υλικό υπό μορφή σκόνης, αρχικά τοποθετούταν σε κατάλληλο καμπίδιο και έπειτα μεταφερόταν σε ειδικό υποδοχέα για τη λήψη του φάσματος (εικόνα 4.7.2). Οι ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας οδήγησαν τελικά αυτό να γίνει με δύο τρόπους :

α) Απευθείας μεταφορά του φυτικού υλικού στον υποδοχέα μέσω καμινιδίου, χωρίς να έχει υποστεί την οποιαδήποτε χημική προεργασία και λήψη του φάσματος.

β) Αραιώσεις του φυτικού υλικού με βρωμιούχο κάλιο (KBr), δημιουργώντας μια σειρά προτύπων γνωστών συγκεντρώσεων για κάθε φυτικό δείγμα και στη συνέχεια λήψη των φασμάτων τους (για την αποφυγή απορρόφησης υγρασίας, η φύλαξη τους γινόταν σε ξηραντήρα με άνυδρο SiO<sub>2</sub>, ως αφυδραντικό).



Εικόνα 4.7.1 : Σύστημα της IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.

Στον χώρο του υποδοχέα, κατά την διάρκεια λήψης των φασμάτων, είχε τοποθετηθεί ποτήρι ζέσεως με SiO<sub>2</sub> για τη δέσμευση της υγρασίας. Για κάθε δείγμα (αραιωμένο ή μη) ελήφθησαν συνολικά 3 (τρία) φάσματα και ανά τρία φάσματα κάθε φορά, λαμβανόταν το υπόβαθρο (background) με KBr ως φάσμα αναφοράς. Ακόμη, σε κάθε δείγμα γινόταν 100 «σαρώσεις», η

διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν  $4 \text{ cm}^{-1}$ , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν  $0.3165 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ .



Εικόνα 4.7.2 : Υποδοχέας δείγματος που φέρει καγίδιο με φυτικό υλικό.

Όλα τα φάσματα FT-IR που ελήφθησαν, εξομαλύνθηκαν και έγινε διόρθωση της βασικής τους γραμμής. Η επεξεργασία των φασμάτων, έγινε με την επιλογή των αντίστοιχων λειτουργιών από το λογισμικό OMNIC 7.3. Ακολουθεί ο πίνακας (4.7.1), με το συνολικό αριθμό εκχυλισμάτων, χρωματογραφήματων και φασμάτων που ελήφθησαν κατά την πειραματική διαδικασία :

Πίνακας 4.7.1 : Συγκεντρωτικός πίνακας αριθμού εκχυλισμάτων, χρωματογραφήματων και φασμάτων.

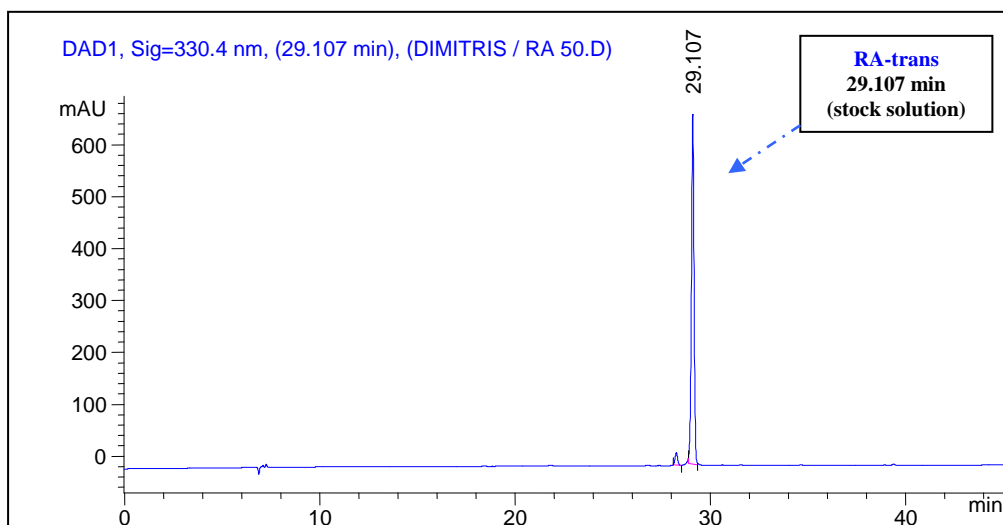
<b>Δείγμα ανάλυσης</b>	<b>Εκχυλίσματα*</b>	<b>Χρωματογραφήματα</b>	<b>Φάσματα FT-IR</b>
<b>Φυτικό υλικό</b>	33	33	33
<b>Πρότυπα RA</b>	-	21	-
<b>Φυτικό υλικό με KBr</b>	-	-	150

\* Ο μέσος όρος όγκου όλων των εκχυλισμάτων ήταν 27.3 mL.

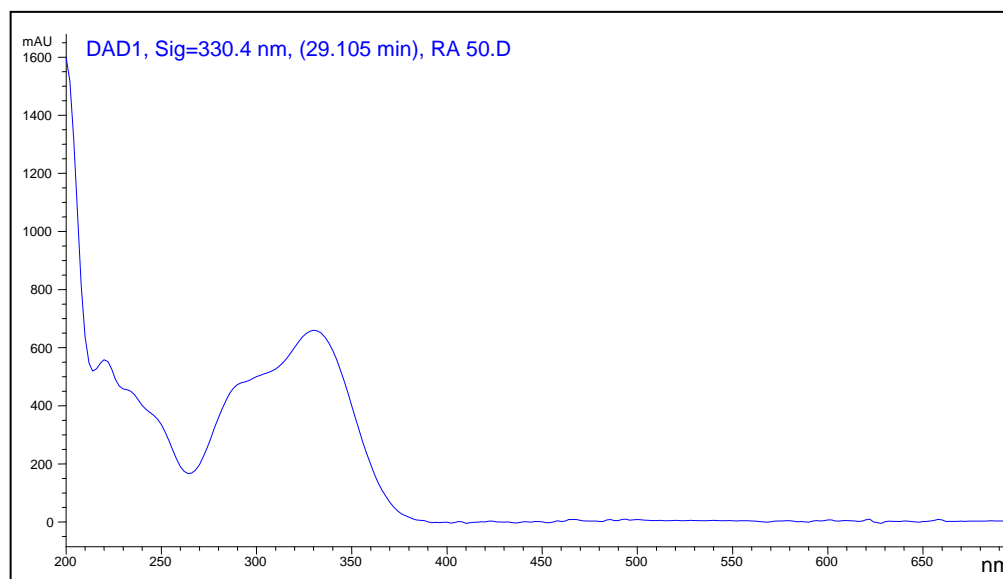


**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup> : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ****5.1 Αποτελέσματα της ανάλυσης των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με ( HPLC-DAD )**

Πριν την ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων και των προτύπων RA στην HPLC, προηγήθηκε η λήψη χρωματογραφήματος καθαρού RA (stock solution), καταγράφοντας έτσι τον χρόνο στον οποίο εκλύεται (29.107 min) και το φάσμα UV-vis αυτού, με απώτερο σκοπό την ποιοτική του ταυτοποίηση στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα, που στη συνέχεια ακολούθησαν προς ανάλυση (σχήματα 5.1.1 και 5.1.2, αντίστοιχα). Η ποιοτική ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε από την σύγκριση του χρόνου συγκράτησης και του φάσματος UV-vis του καθαρού RA, με τους αντίστοιχους χρόνους και φάσματα των εκχυλισμάτων.



Σχήμα 5.1.1 : Χρωματογράφημα καθαρού RA (stock solution) στον διαλύτη εκχύλισης.



Σχήμα 5.1.2 : Φάσμα UV-vis στα 330 nm, καθαρού RA (stock solution) στον διαλύτη εκχύλισης.

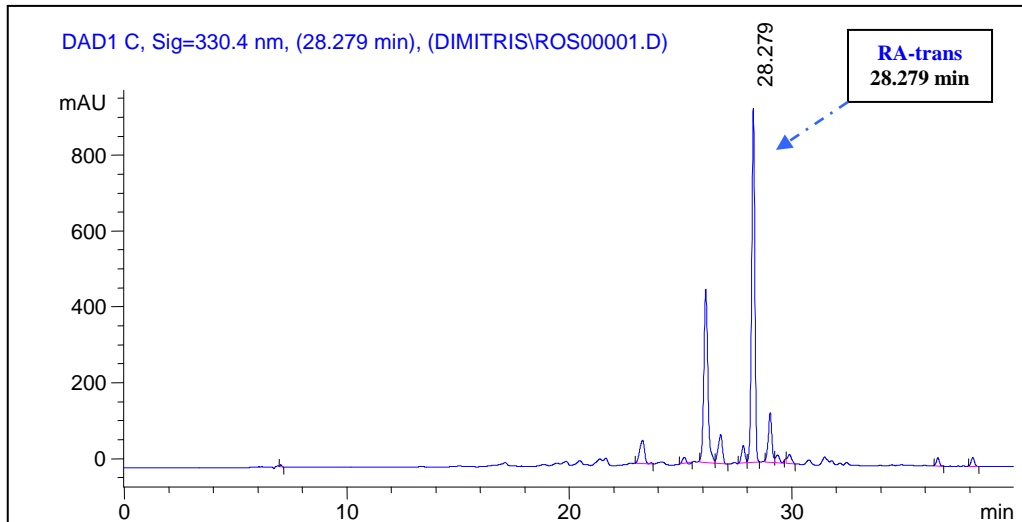
Ο πίνακας 5.1.1 περιλαμβάνει τα πειραματικά αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων, όπως τους χρόνους συγκράτησης και τα εμβαδά του RA που προέκυψαν στα εκχυλίσματα, από την ανάλυση τους με την HPLC :

Πίνακας 5.1.1 : Πειραματικά αποτελέσματα της HPLC στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα.

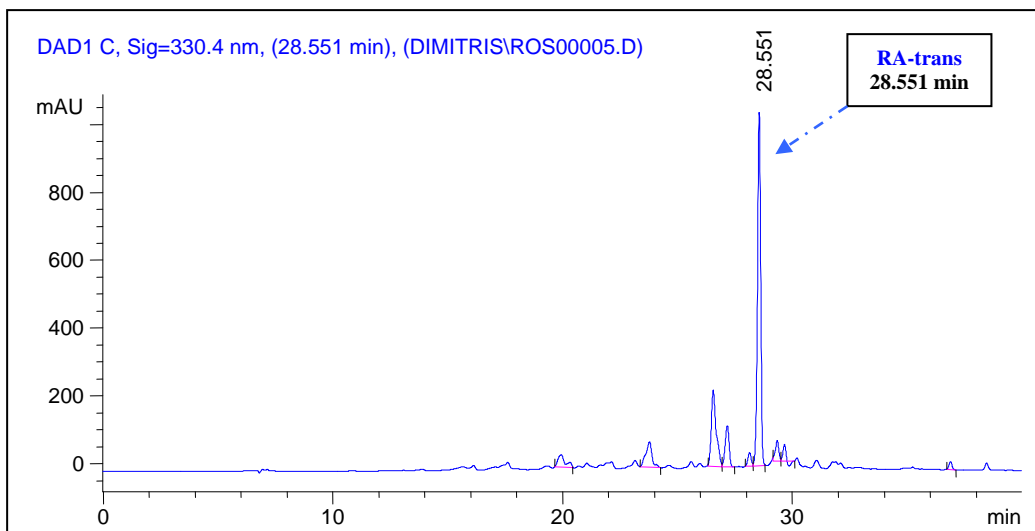
Φυτικό υλικό	Αρχείο χρωματογραφήματος	Χρόνος συγκράτησης $t_R$ (min)	Εμβαδόν κορυφής (mAU*s)
<b>Φασκόμηλο-15</b> (φύλλα)	ROS00031	28.464	9268.0
	ROS00001	28.279	9530.8
	ROS00002	28.251	9764.6
<b>Φασκόμηλο-22</b> (φύλλα)	ROS00003	28.386	10400.8
	ROS00004	28.389	10879.5
	ROS00005	28.551	10583.3
<b>Βασιλικός-43</b> (φύλλα)	ROS00006	28.488	5948.3
	ROS00007	28.437	5740.0
	ROS00008	28.494	5931.1
<b>Ύσσωπος-29</b> (φύλλα και άνθη)	ROS00009	28.452	3632.0
	ROS00010	28.463	3478.0
	ROS00011	28.301	3818.8
<b>Ρίγανη-36</b> (φύλλα)	ROS00012	28.302	4396.1
	ROS00013	28.531	4237.9
	ROS00014	28.417	4554.5
<b>Ρίγανη-58</b> (φύλλα και άνθη)	ROS00033	28.538	17136.9
	ROS00034	28.414	16042.5
	ROS00035	28.493	16398.5
<b>Θυμάρι-37</b> (φύλλα)	ROS00015	28.506	9566.0
	ROS00016	28.334	8454.2
	ROS00017	28.427	9382.7
<b>Δενδρολίβανο-26</b> (φύλλα)	ROS00018	28.550	13553.9
	ROS00019	28.538	13917.2
	ROS00020	28.575	13809.1
<b>Μελισσόχορτο-38</b> (φύλλα)	ROS00021	28.628	19574.7
	ROS00022	28.681	20390.1
	ROS00023	28.646	19559.4
<b>Μελισσόχορτο-39</b> (φύλλα)	ROS00024	28.662	23546.4
	ROS00030	28.555	22712.1
	ROS00026	28.481	23280.2
<b>Θρούμπι-40</b> (φύλλα)	ROS00032	28.600	15314.5
	ROS00028	28.587	15722.8
	ROS00029	28.879	14945.6

Όπως δείχνει ο παραπάνω πίνακας, το μεγαλύτερο εμβαδόν κορυφής σε RA κατέχει το μελισσόχορτο και το μικρότερο ο ύσσωπος από το φυτικό υλικό. Η μέση τιμή του χρόνου συγκράτησης του RA στα εκχυλίσματα ήταν **28.494** min. Ακολουθούν τα χρωματογραφήματα για κάθε δείγμα του φυτικού υλικού (από ένα παράδειγμα για κάθε φυτό) - (τα φάσματα UV-vis

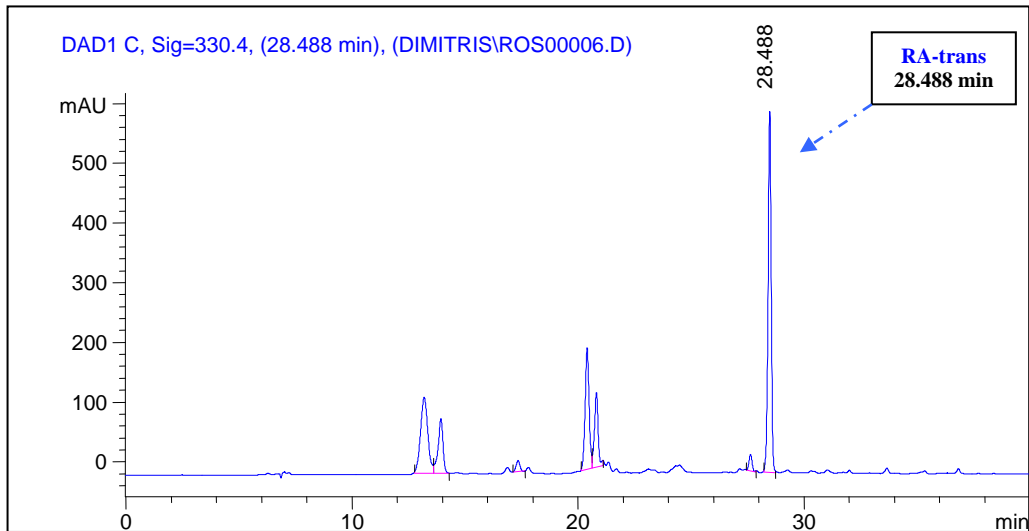
παρατίθενται όλα στο παράρτημα), όπου μπορούμε να παρατηρήσουμε ως **κυρίαρχη κορυφή** αυτή του RA σε όλα τα δείγματα.



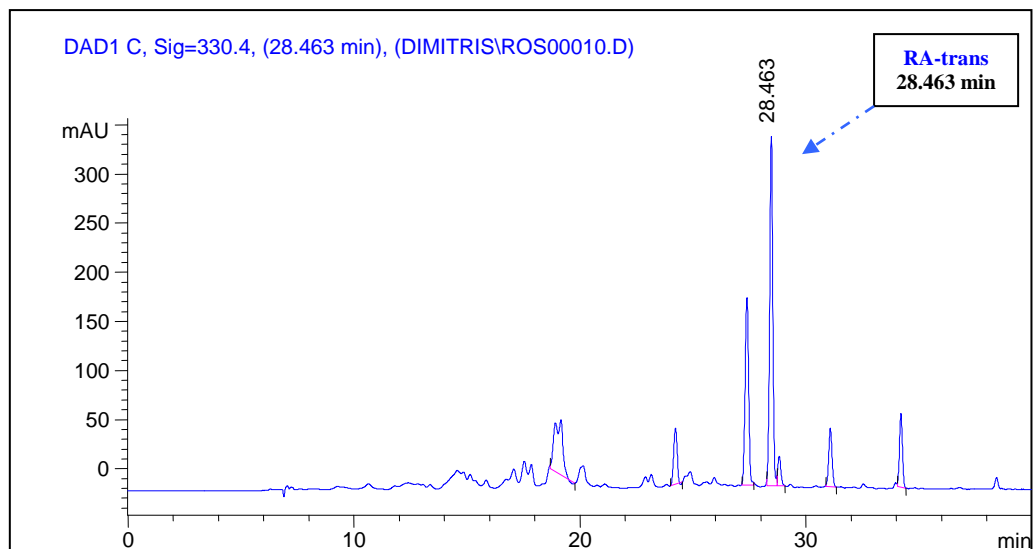
**Σχήμα 5.1.3 :** Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από **φασκόμηλο-15**.



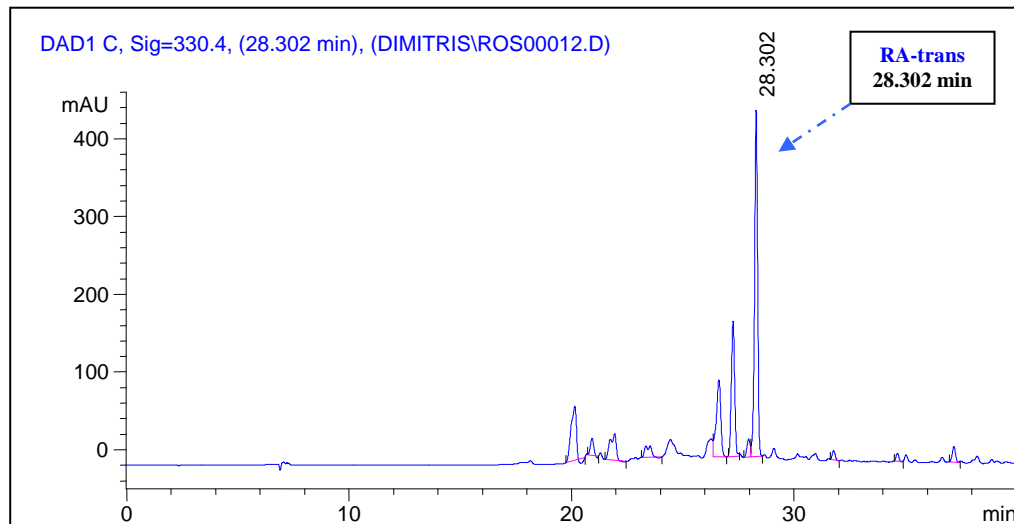
**Σχήμα 5.1.4 :** Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από **φασκόμηλο-22**.



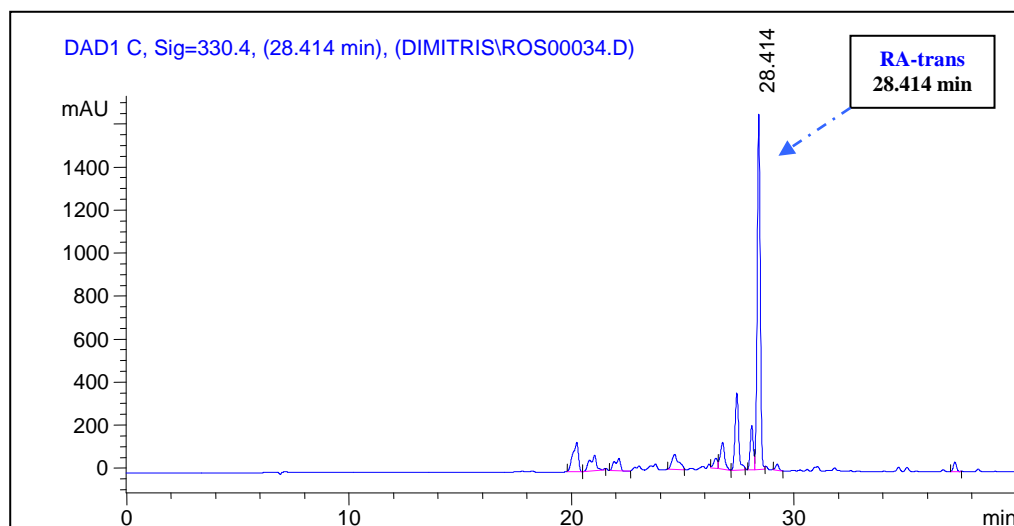
Σχήμα 5.1.5 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από βασιλικό-43.



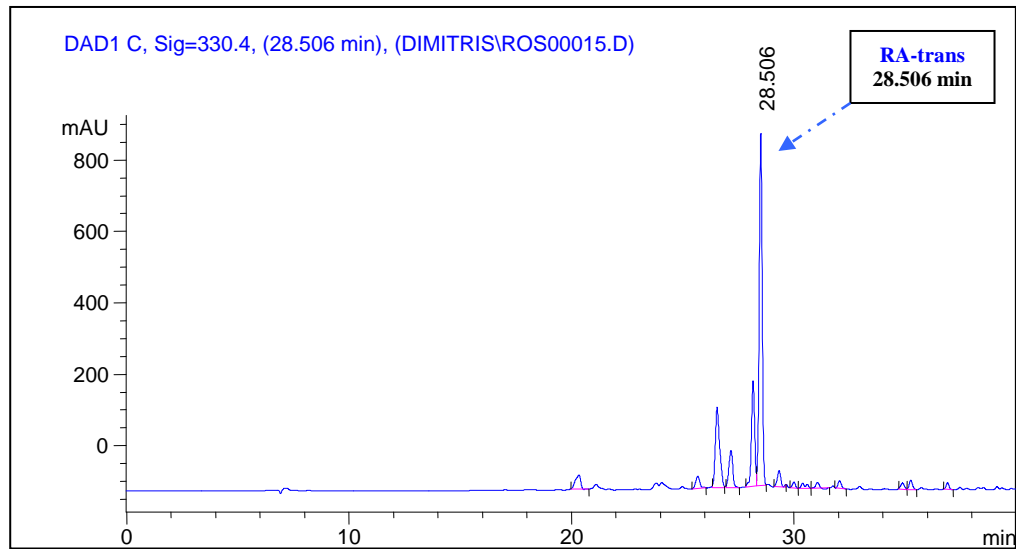
Σχήμα 5.1.6 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από ύσσωπο-29.



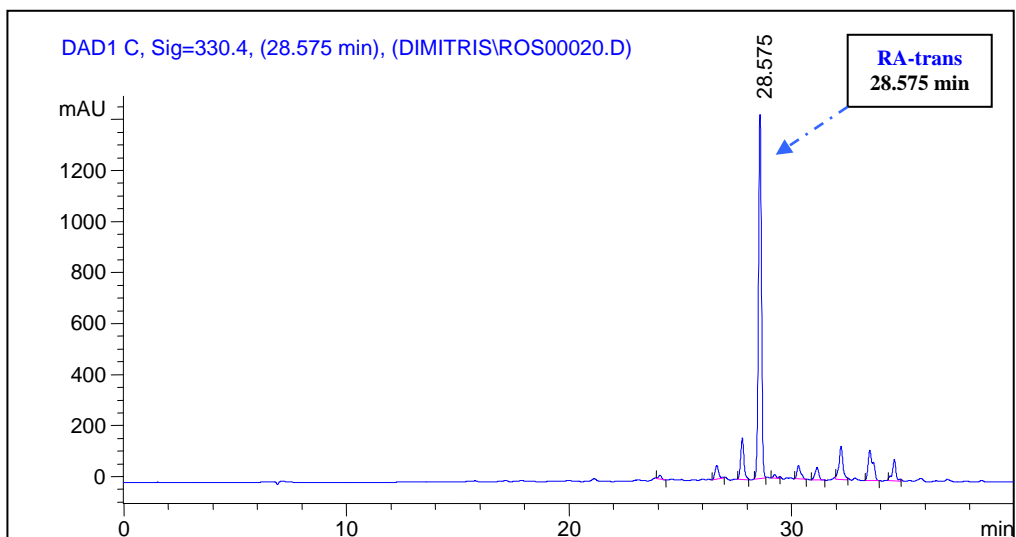
Σχήμα 5.1.7 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από **ρίγανη-36**.



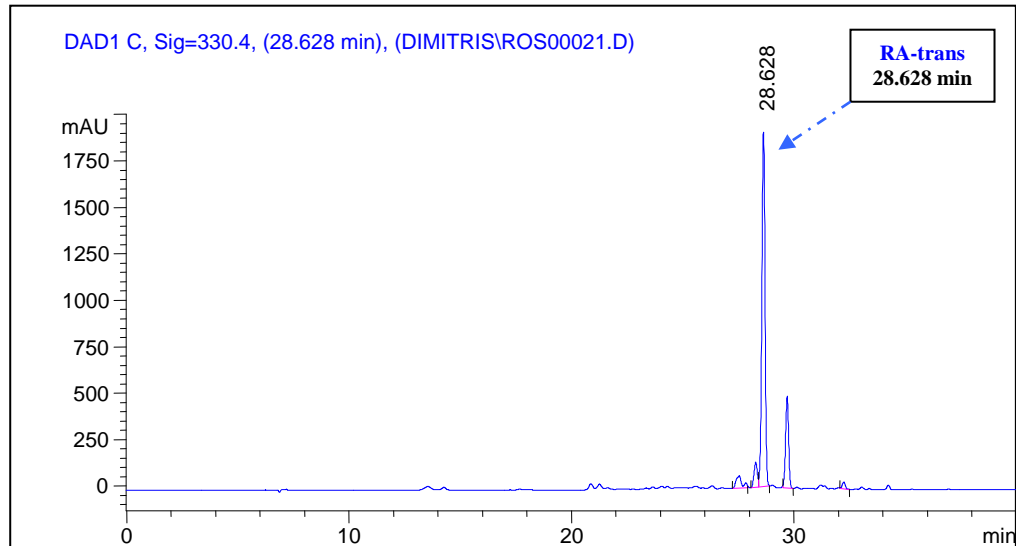
Σχήμα 5.1.8 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από **ρίγανη-58**.



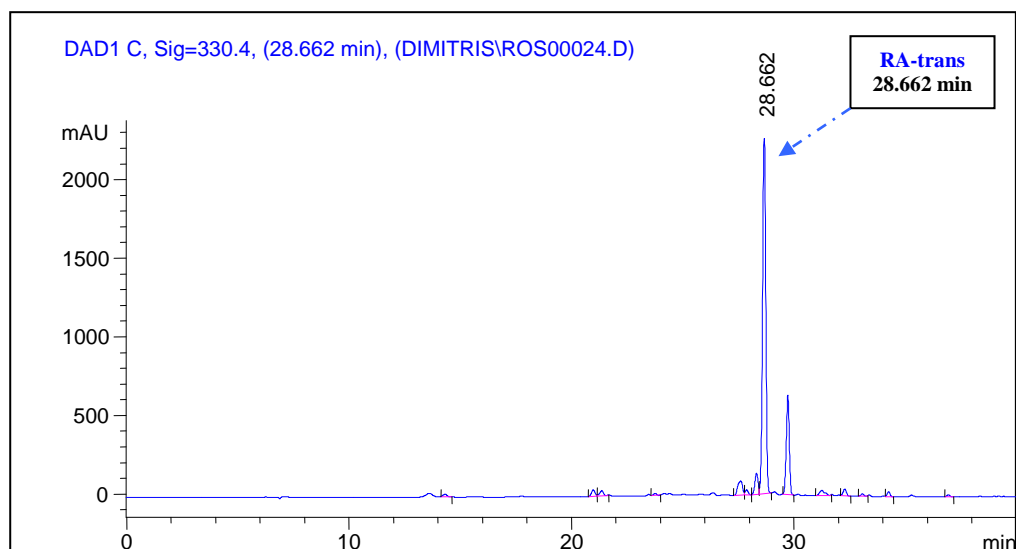
Σχήμα 5.1.9 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από **θυμάρι-37**.



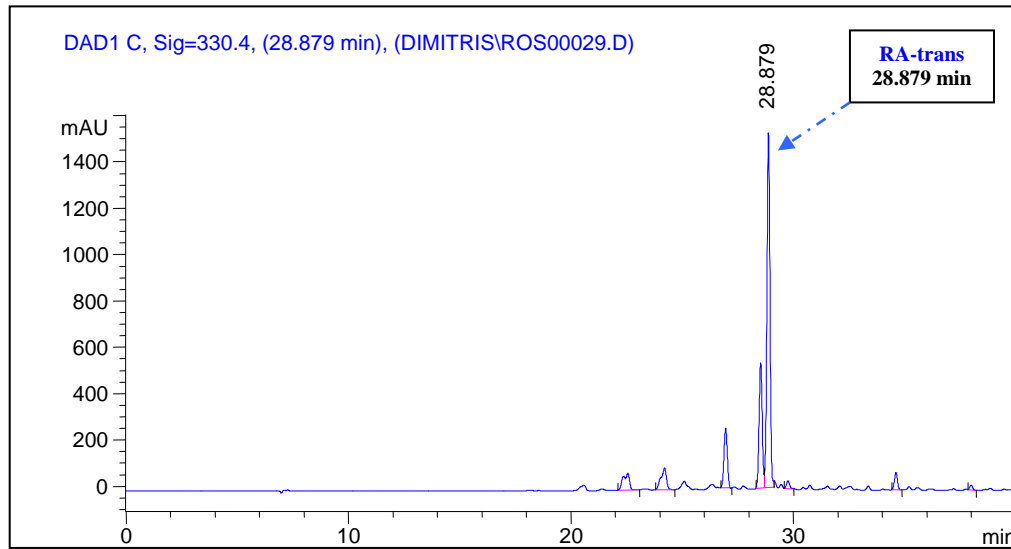
Σχήμα 5.1.10 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από **δενδρολίβανο-26**.



Σχήμα 5.1.11 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από μελισσόχορτο-38.



Σχήμα 5.1.12 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από μελισσόχορτο-39.



Σχήμα 5.1.13 : Χρωματογράφημα στα 330 nm, εκχυλίσματος από **θρούμπι-40**.

Από την σύγκριση των χρωματογραφημάτων μπορούμε επίσης να παρατηρήσουμε, ότι στην περιοχή εύρους από 13 έως 29 min περίπου (πριν δηλαδή τη χρονική στιγμή που εκλύεται το RA), σε όλα τα φυτικά δείγματα **εκτός του μελισσόχορτου**, εμφανίζονται και άλλες κορυφές φαινολικών συστατικών.

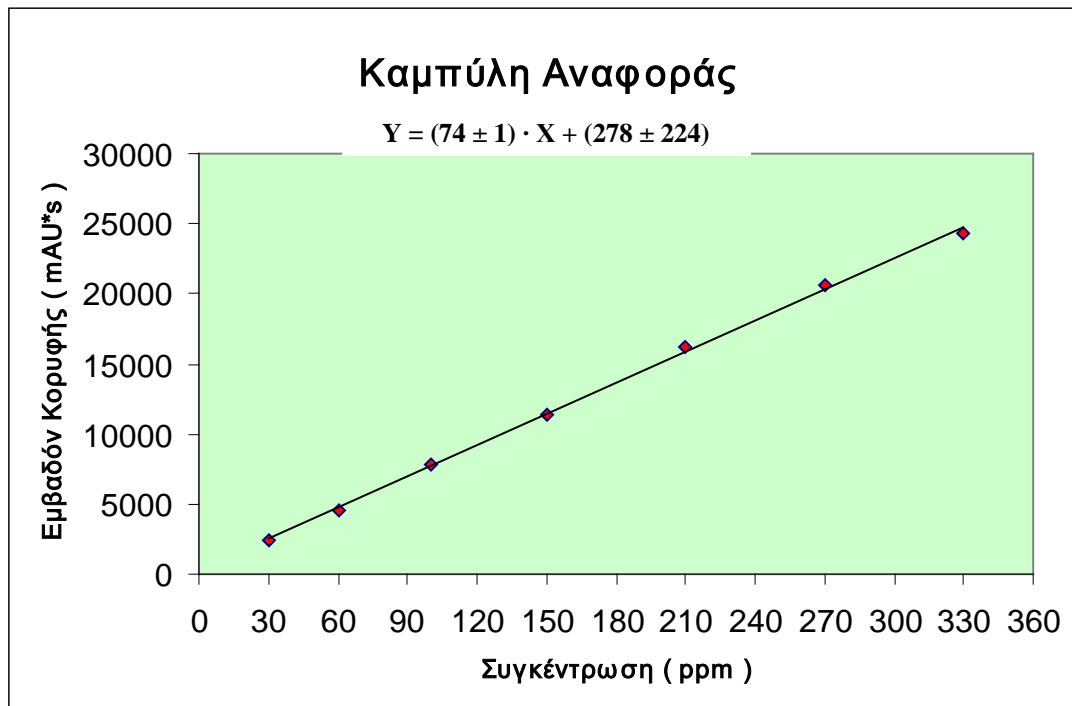


## 5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του RA στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα

Από την ανάλυση των προτύπων του RA με HPLC (πίνακας 5.2.1), δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς (σχήμα 5.2.1) και από την εξίσωση της ευθείας που προέκυψε και από τα εμβαδά των κορυφών του στα εκχυλίσματα (πίνακας 5.1.1) υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του RA στο φυτικό υλικό σε mg/g (πίνακας 5.2.2).

Πίνακας 5.2.1 : Αποτελέσματα της ανάλυσης των προτύπων RA με HPLC.

Περιεκτικότητα (ppm)	Μέση τιμή εμβαδού κορυφής (mAU*s) ± τυπική απόκλιση Αριθμός επαναλήψεων = 3
30	2352.3 ± 260.8
60	4558.8 ± 295.0
100	7849.7 ± 201.6
150	11375.0 ± 231.5
210	16192.2 ± 274.4
270	20601.9 ± 113.8
330	24289.7 ± 262.2



Σχήμα 5.2.1 : Καμπύλη αναφοράς των προτύπων RA.

Η εξίσωση ευθείας ελαχίστων τετραγώνων που προέκυψε από την ανάλυση των προτύπων, ήταν η  $Y = (74 \pm 1) \cdot X + (278 \pm 224)$ , με συντελεστή συσχέτισης  $r$  ή πολλαπλό  $R = 0.9994$  και με SD κλίσης ή τυπικό σφάλμα = 1.157. Η μέση τιμή του χρόνου συγκράτησης του RA στα

πρότυπα ήταν **28.613** min (όλα τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα UV-vis των προτύπων, παρατίθενται στο παράρτημα).

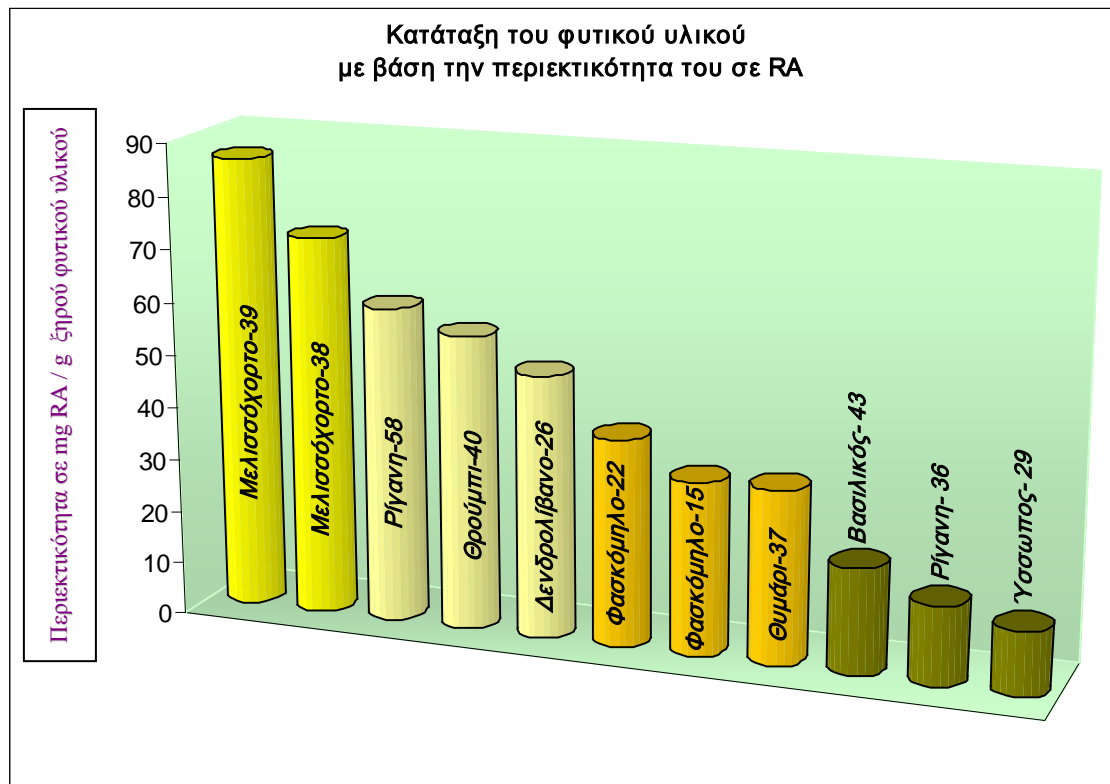
**Πίνακας 5.2.2 :** Αποτελέσματα της περιεκτικότητας του RA στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα.

Φυτικό υλικό	Αρχείο χρωματογραφήματος	Περιεκτικότητα εκχυλίσματος σε RA (ppm)	Περιεκτικότητα εκχυλίσματος σε mg RA / g (ξηρ.φωτ.υλικού)
<b>Φασκόμηλο-15</b> (φύλλα)	ROS00031	121.24	33.01
	ROS00001	124.78	32.12
	ROS00002	127.94	35.11
<b>Φασκόμηλο-22</b> (φύλλα)	ROS00003	136.52	38.87
	ROS00004	142.97	39.89
	ROS00005	138.98	39.74
<b>Βασιλικός-43</b> (φύλλα)	ROS00006	76.47	19.88
	ROS00007	73.66	20.90
	ROS00008	76.23	19.82
<b>Ύσσωπος-29</b> (φύλλα και άνθη)	ROS00009	45.23	11.76
	ROS00010	43.15	11.39
	ROS00011	47.75	12.84
<b>Ρίγανη-36</b> (φύλλα)	ROS00012	55.53	14.88
	ROS00013	53.40	14.47
	ROS00014	57.67	15.46
<b>Ρίγανη-58</b> (φύλλα και άνθη)	ROS00033	227.36	62.30
	ROS00034	212.60	58.04
	ROS00035	217.40	60.16
<b>Θυμάρι-37</b> (φύλλα)	ROS00015	125.26	34.07
	ROS00016	110.26	30.87
	ROS00017	122.78	34.87
<b>Δενδρολίβανο-26</b> (φύλλα)	ROS00018	179.04	49.24
	ROS00019	183.94	51.50
	ROS00020	182.48	49.27
<b>Μελισσόχορτο-38</b> (φύλλα)	ROS00021	260.24	70.26
	ROS00022	271.24	73.23
	ROS00023	260.03	72.03
<b>Μελισσόχορτο-39</b> (φύλλα)	ROS00024	313.80	86.30
	ROS00030	302.55	84.71
	ROS00026	310.21	87.79
<b>Θρούμπι-40</b> (φύλλα)	ROS00032	202.78	55.77
	ROS00028	208.29	57.49
	ROS00029	197.81	54.40

Ο πίνακας (5.2.3) που ακολουθεί, περιέχει τη μέση τιμή περιεκτικότητας και την τυπική απόκλιση (Standard Deviation, **SD**) του RA στο φυτικό υλικό, όπως προέκυψε από την ανάλυση της HPLC. Έχει γίνει κατάταξη από την υψηλότερη προς την χαμηλότερη περιεκτικότητα του RA στο φυτικό υλικό. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και με ραβδόγραμμα (σχήμα 5.2.3).

**Πίνακας 5.2.3 :** Μέση τιμή περιεκτικότητας του RA στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*.

<b>Φυτικό υλικό</b>	<b>Μέση τιμή περιεκτικότητας του φυτικού υλικού σε RA <math>\pm</math> SD (mg RA / g ξηρ.φυτ.υλικού)</b> Αριθμός επαναλήψεων = 3	<b>Περιεκτικότητα του φυτικού υλικού σε RA (mg RA / g ξηρ.φυτ.υλικού)</b> <b>Ελάχιστη – Μέγιστη</b>
<b>Μελισσόχορτο-39</b> (φύλλα)	<b>86 <math>\pm</math> 1</b>	<b>85 – 87</b>
<b>Μελισσόχορτο-38</b> (φύλλα)	<b>72 <math>\pm</math> 1</b>	<b>71 – 73</b>
<b>Ρίγανη-58</b> (φύλλα και άνθη)	<b>60 <math>\pm</math> 2</b>	<b>58 – 62</b>
<b>Θρούμπι-40</b> (φύλλα)	<b>56 <math>\pm</math> 2</b>	<b>54 – 58</b>
<b>Δενδρολίβανο-26</b> (φύλλα)	<b>50 <math>\pm</math> 1</b>	<b>49 – 51</b>
<b>Φασκόμηλο-22</b> (φύλλα)	<b>39.5 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>38.9 – 40.1</b>
<b>Φασκόμηλο-15</b> (φύλλα)	<b>33 <math>\pm</math> 1</b>	<b>32 – 34</b>
<b>Θυμάρι-37</b> (φύλλα)	<b>33 <math>\pm</math> 2</b>	<b>31 – 35</b>
<b>Βασιλικός-43</b> (φύλλα)	<b>20.2 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>19.6 – 20.8</b>
<b>Ρίγανη-36</b> (φύλλα)	<b>14.9 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>14.4 – 15.4</b>
<b>Ύσσωπος-29</b> (φύλλα και άνθη)	<b>12 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>11.2 – 12.8</b>



**Σχήμα 5.2.3 :** Ραβδόγραμμα κατάταξης του φυτικού υλικού με βάση την περιεκτικότητα του σε RA.

Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της HPLC (πίνακες 5.2.2 και 5.2.3), την υψηλότερη περιεκτικότητα σε RA την κατέχει το μελισσόχορτο και την χαμηλότερη ο ύσσωπος, στα 8 (οκτώ) είδη της οικογένειας *Lamiaceae* που μελετήθηκαν. Επιχειρώντας μια αξιολόγηση ως προς την βιολογική αξία των φυτών (όσο αφορά την περιεκτικότητα τους σε ροσμαρινικό οξύ και χρησιμοποιώντας το ως **χημειοταξινομικό δείκτη**), θα λέγαμε πως αυτά ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει το μελισσόχορτο, η δεύτερη τη ρίγανη (φύλλα και άνθη), το θρούμπι και το δενδρολίβανο, η τρίτη το φασκόμηλο και το θυμάρι και η τέταρτη ομάδα τον βασιλικό, τη ρίγανη (φύλλα) και τον ύσσωπο.

Οι όποιες διαφορές στην περιεκτικότητα σε RA μεταξύ φυτών του ίδιου είδους, όπως στο μελισσόχορτο και στο φασκόμηλο, πιθανόν οφείλονται στη δειγματοληψία (από την περιοχή καλλιέργειας και συγκομιδής των δειγμάτων, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες που επικρατούσαν και την εποχή συγκομιδής - κοπής τους). Για τα δύο είδη ρίγανης, προκύπτει το συμπέρασμα της ύπαρξης του RA στα άνθη του φυτού, με αποτέλεσμα την αυξημένη περιεκτικότητα του στο δείγμα 58 από ότι στο δείγμα 36.

Σε αντίστοιχη μελέτη (Trifa, 2009), που έγινε με τις ίδιες τεχνικές και μεθόδους ανάλυσης σε είδη της οικογένειας *Lamiaceae*, το μελισσόχορτο κατείχε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε

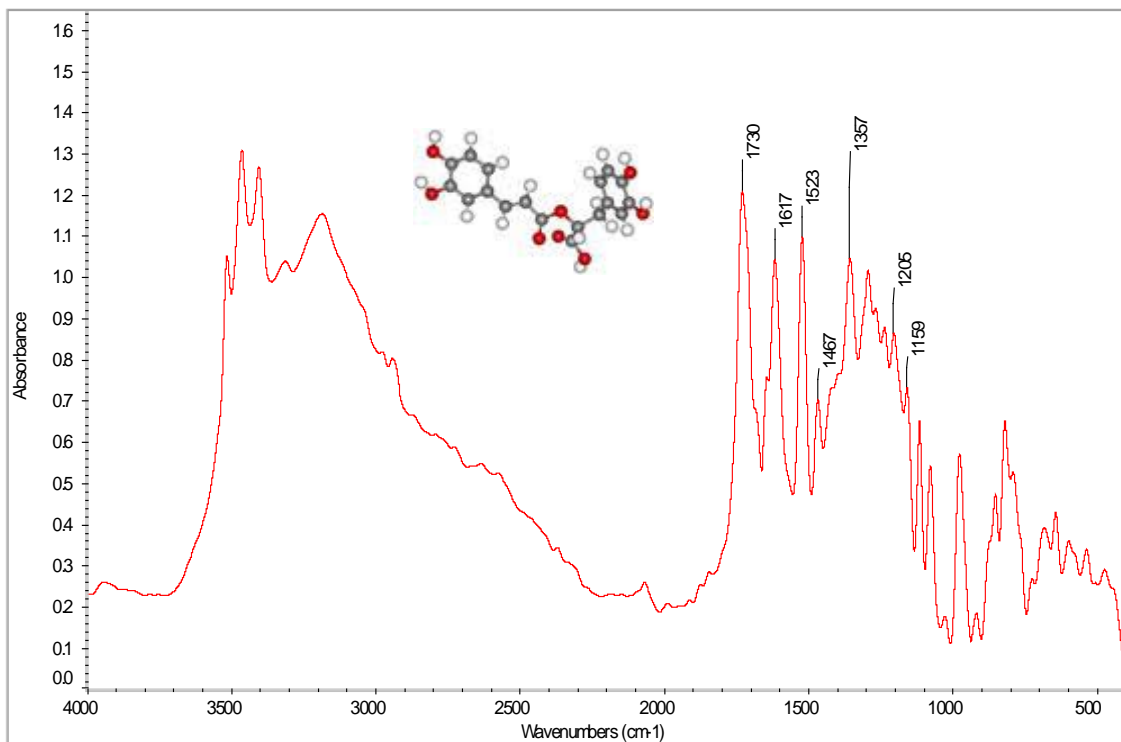
RA (62.5 – 74 mg/g) και ο ύσσωπος την χαμηλότερη (12.2 – 13.3 mg/g). Το δενδρολίβανο με (32.7 – 38.5 mg/g), το φασκόμηλο με (27.6 – 33.9 mg/g) και η ρίγανη (30.4 – 42.9 mg/g) αντίστοιχα, περιεκτικότητες σε RA χαμηλότερες από την παρούσα μελέτη, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετικές συνθήκες δειγματοληψίας (κλιματικές, εδαφικές και εποχικές). Αν και το δενδρολίβανο θεωρείται ο κύριος αντιπρόσωπος του RA, τουλάχιστον στο Ελλαδικό χώρο αυτό δείχνει να μην ισχύει, με το μελισσόχορτο να κατέχει την πρώτη θέση. Σε μια άλλη μελέτη (Κανέλλου, 2011) εξάγεται το ίδιο συμπέρασμα για το μελισσόχορτο.

Στην διεθνή βιβλιογραφία και ειδικά σε χώρες της Μεσογείου, υπάρχουν αρκετές μελέτες για την παρουσία και ποσοτικού προσδιορισμού του RA σε φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*. Οι Πολωνοί (Zgórka & Glowniak, 2001) κατέληξαν στην ίδια ταξινόμηση (σε σχέση με την περιεκτικότητα του RA στα φύλλα) σε φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, με το μελισσόχορτο > δενδρολίβανο > φασκόμηλο. Οι περιεκτικότητες σε RA ήταν σαφώς μικρότερες (~ 12 mg/g για το μελισσόχορτο, ~ 10 mg/g για το δενδρολίβανο και ~ 5 mg/g για το φασκόμηλο αντίστοιχα), γεγονός που δικαιολογείται από τις διαφορετικές συνθήκες ανάλυσης όπως η τεχνική εκχύλισης, η χρωματογραφική στήλη, οι διαλύτες, αλλά και από τις υπάρχουσες εδαφοκλιματικές συνθήκες. Οι Σλοβάκες (Caniova & Brandsteterova, 2001), μελέτησαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης (αλλά με διαφορετικές στήλες) με την παρούσα εργασία, την περιεκτικότητα του RA στα φύλλα μελισσόχορτου, με επίσης χαμηλές τιμές από 15.3 – 17.2 mg/g. Τέλος, σε μια ακόμη μελέτη οι (Wang et al., 2004) κατέληξαν και αυτοί στην ίδια σειρά ταξινόμησης, με το μελισσόχορτο > δενδρολίβανο > φασκόμηλο > θυμάρι.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής ανάλυσης με HPLC, κρίθηκε σκόπιμο να επαναληφθεί η ανάλυση ενός υδροαλκοολικού εκχυλίσματος, συγκεκριμένα ενός φασκόμηλου-15, επειδή κατά τη διάρκεια λήψης του χρωματογραφήματος, παρατηρήθηκε πτώση της πίεσης της στήλης περίπου στα 5 bar (όταν εκλούσαν το RA), με αποτέλεσμα να εμφανιστούν αυξημένα το εμβαδόν της κορυφής και ο χρόνος συγκράτησης του σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μετά ακριβώς από ένα μήνα, με τη στήλη να λειτουργεί στις επιθυμητές συνθήκες πίεσης και το εμβαδόν της κορυφής του RA που προέκυψε, να συμβαδίζει με τα εμβαδά των υπολοίπων δύο δειγμάτων. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την **σταθερότητα** του RA στα **εκχυλίσματα** για μεγάλο χρονικό διάστημα, όσο φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τέλος, η μέση τιμή του χρόνου συγκράτησης του RA ήταν για τα πρότυπα **28.613** min και για το φυτικό υλικό **28.494** min, αποδεικνύοντας μια πολύ καλή επαναληψιμότητα της μεθόδου.

### 5.3 Αποτελέσματα της ανάλυσης του φυτικού υλικού με IR

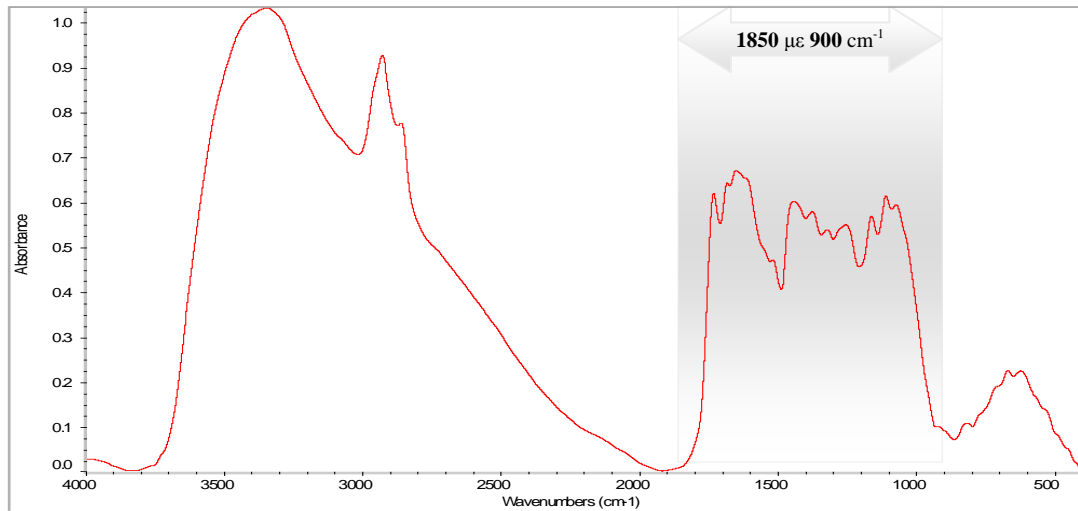
Τα φάσματα FT-IR του φυτικού υλικού και του καθαρού ροσμαρινικού οξέος, ελήφθησαν όλα με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (στα 4000 έως 400  $\text{cm}^{-1}$ ), εξομαλύνθηκαν και έγινε διόρθωση της βασικής τους γραμμής με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού. Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων με την φασματοσκοπία υπερύθρου, κρίνεται σκόπιμο στο σημείο αυτό, να παρατεθούν ορισμένα φασματοσκοπικά δεδομένα (πίνακας 5.3.1), καθώς και το φάσμα FT-IR καθαρού ροσμαρινικού οξέος (σχήμα 5.3.1), έπειτα ακολουθούν τα φάσματα των δειγμάτων (από ένα παράδειγμα).



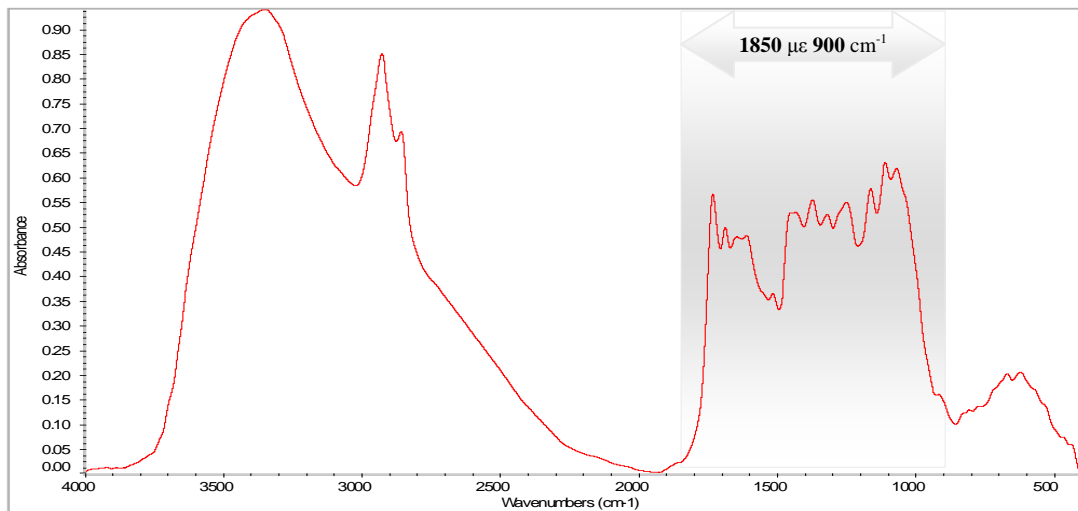
Σχήμα 5.3.1 : Φάσμα FT-IR καθαρού ροσμαρινικού οξέος.

Πίνακας 5.3.1 : Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις (Mid IR) του ροσμαρινικού οξέος.

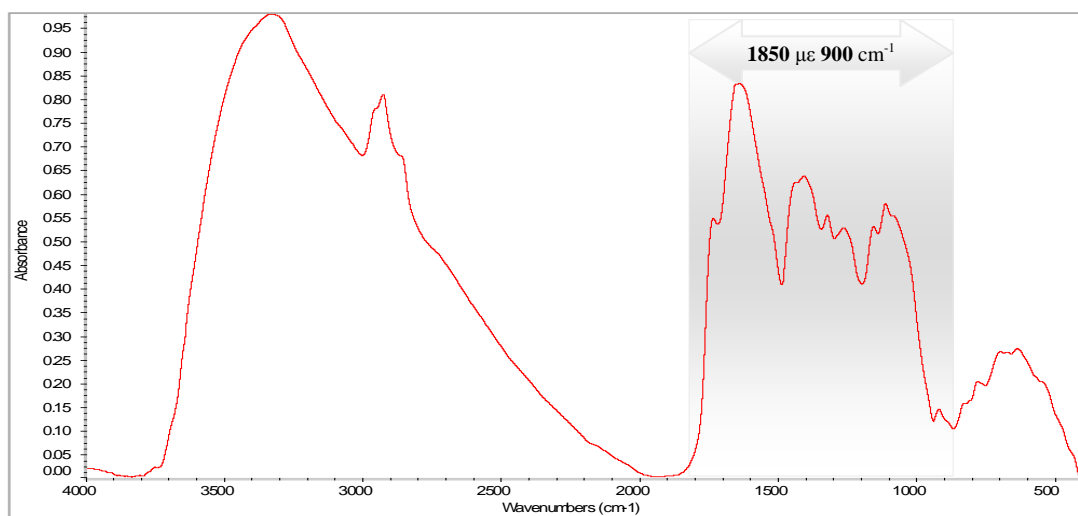
Κυματάριθος ( $\text{cm}^{-1}$ )	Λειτουργική ομάδα και είδος απορρόφησης
1730	- C=O εστερικό (δόνηση τάσης)
1617, 1523, 1467	Αρωματικός δακτύλιος (δόνηση τάσης)
1357, 1159	Φαινολικές ομάδες, C-O και O-H (δόνηση τάσης)
1205	-C-O (δόνηση τάσης)



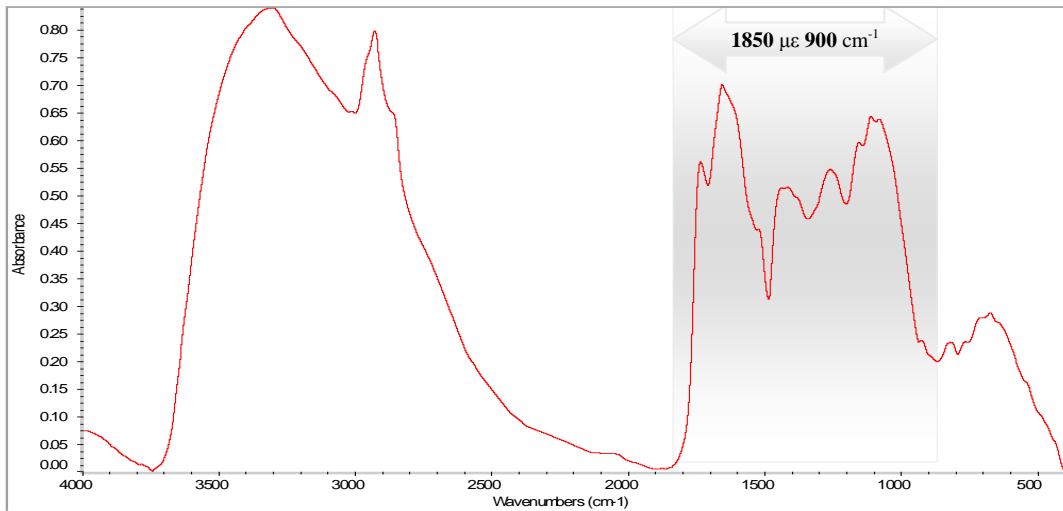
Σχήμα 5.3.1 : Φάσμα FT-IR από φασκόμελο-15.



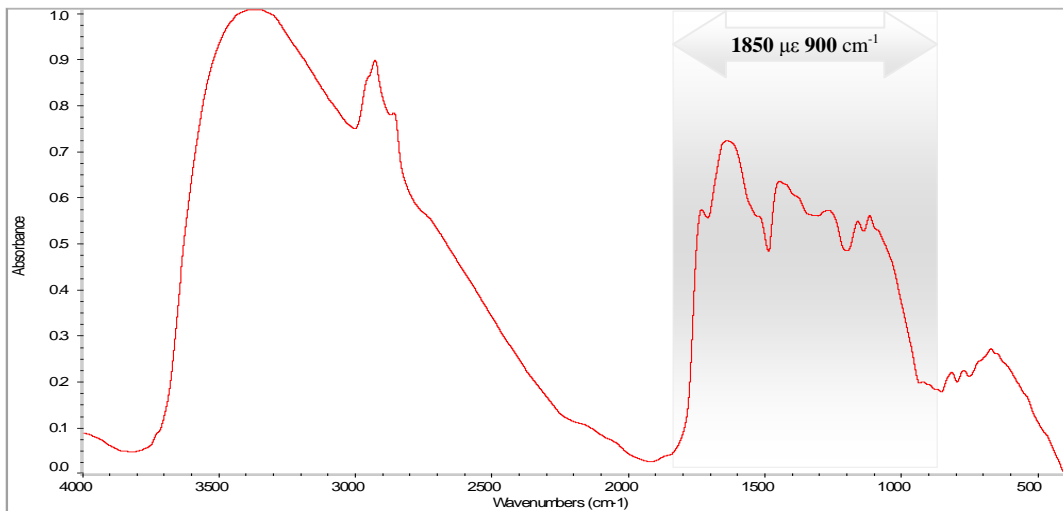
Σχήμα 5.3.2 : Φάσμα FT-IR από φασκόμελο-22.



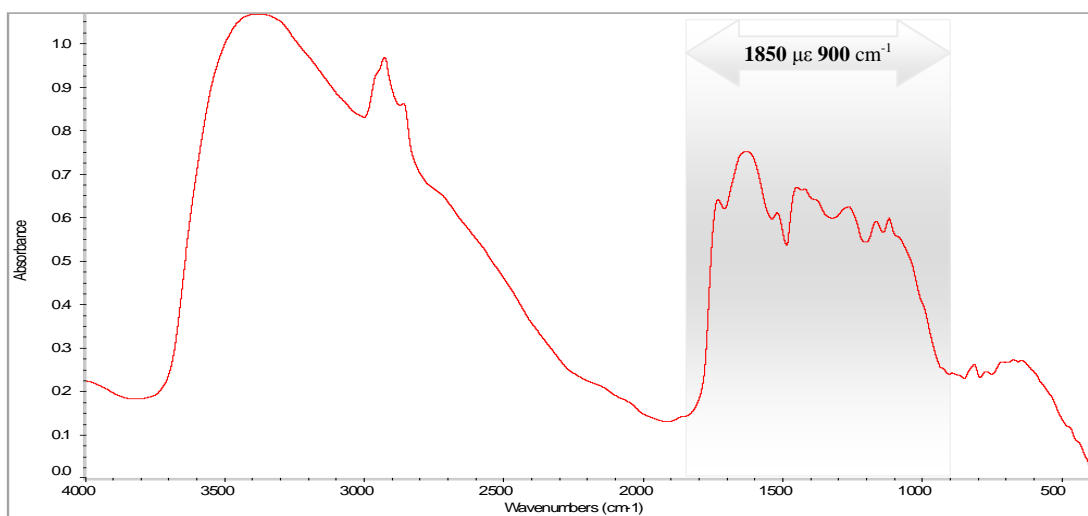
Σχήμα 5.3.3 : Φάσμα FT-IR από βασιλικό-43.



Σχήμα 5.3.4 : Φάσμα FT-IR από ύσσωπο-29.

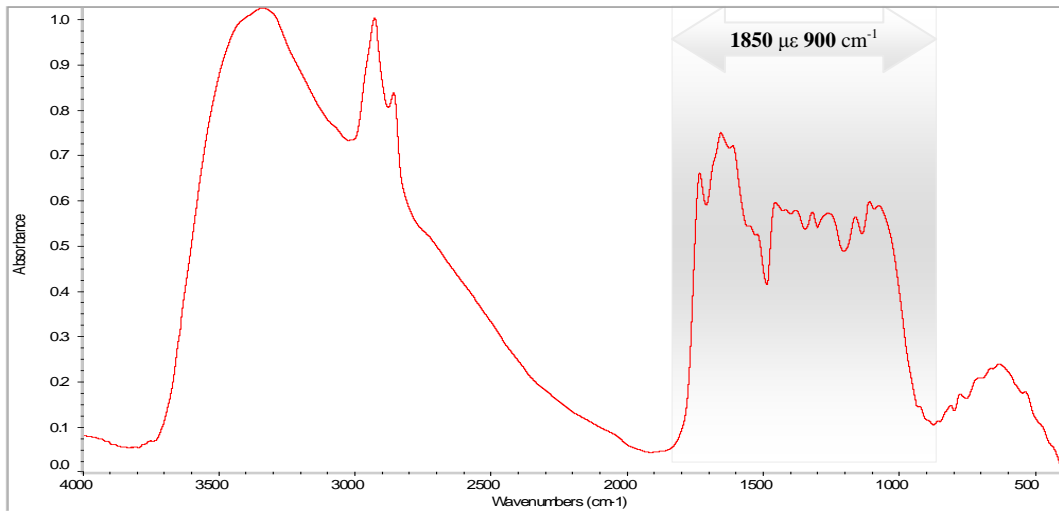


Σχήμα 5.3.5 : Φάσμα FT-IR από ρίγανη-36.

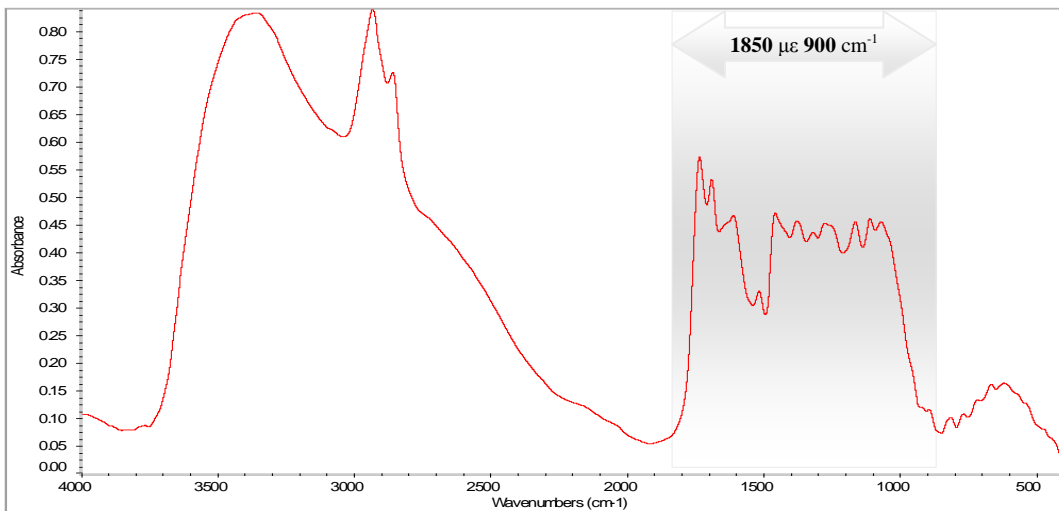


Σχήμα 5.3.6 : Φάσμα FT-IR από ρίγανη-58.

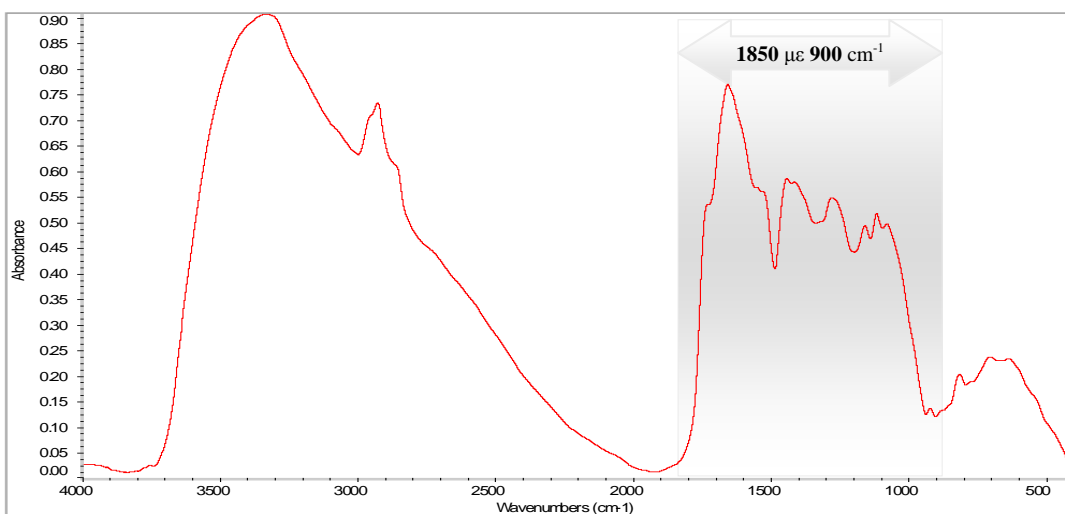




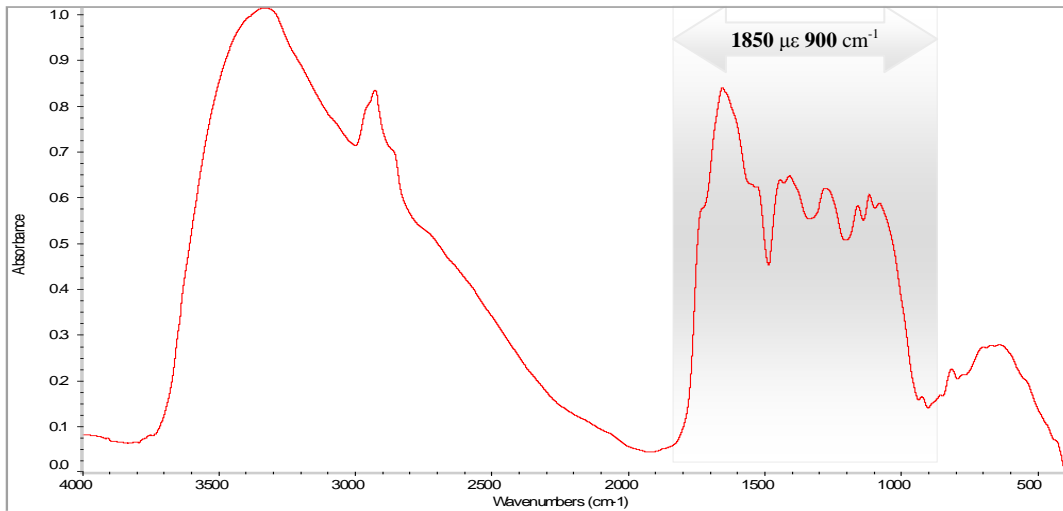
Σχήμα 5.3.7 : Φάσμα FT-IR από θυμάρι-37.



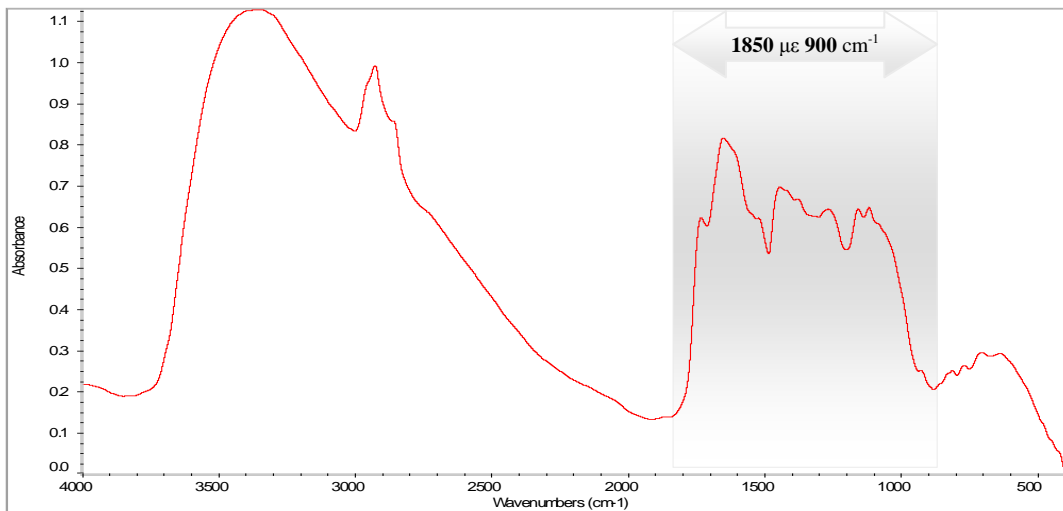
Σχήμα 5.3.8 : Φάσμα FT-IR από δενδρολίβανο-26.



Σχήμα 5.3.9 : Φάσμα FT-IR από μελισσόγορτο-38.



Σχήμα 5.3.10 : Φάσμα FT-IR από μελισσόχορτο-39.

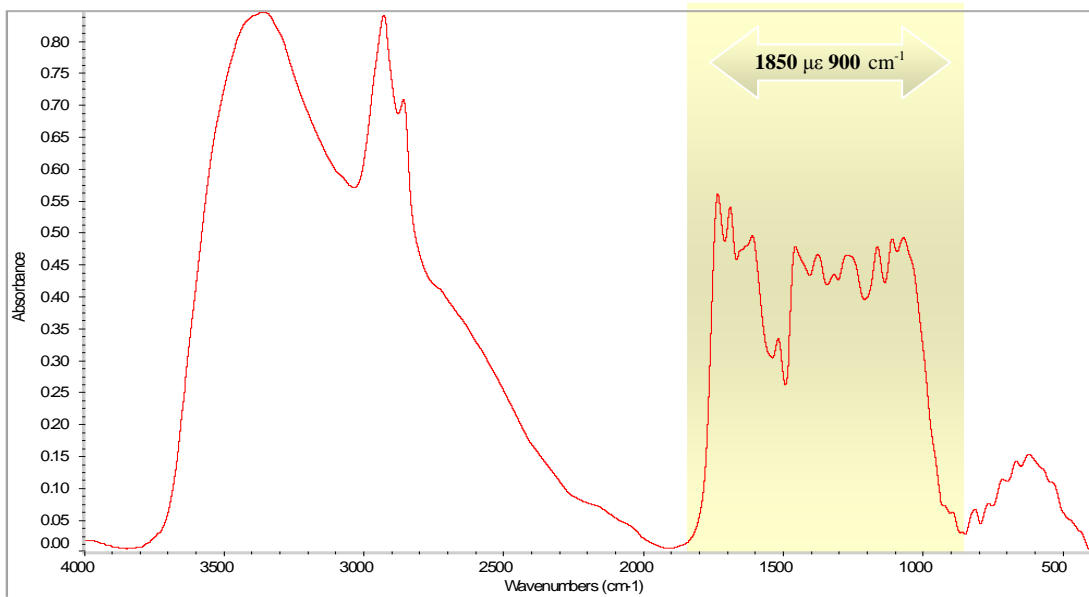


Σχήμα 5.3.11 : Φάσμα FT-IR από θρούμπι-40.

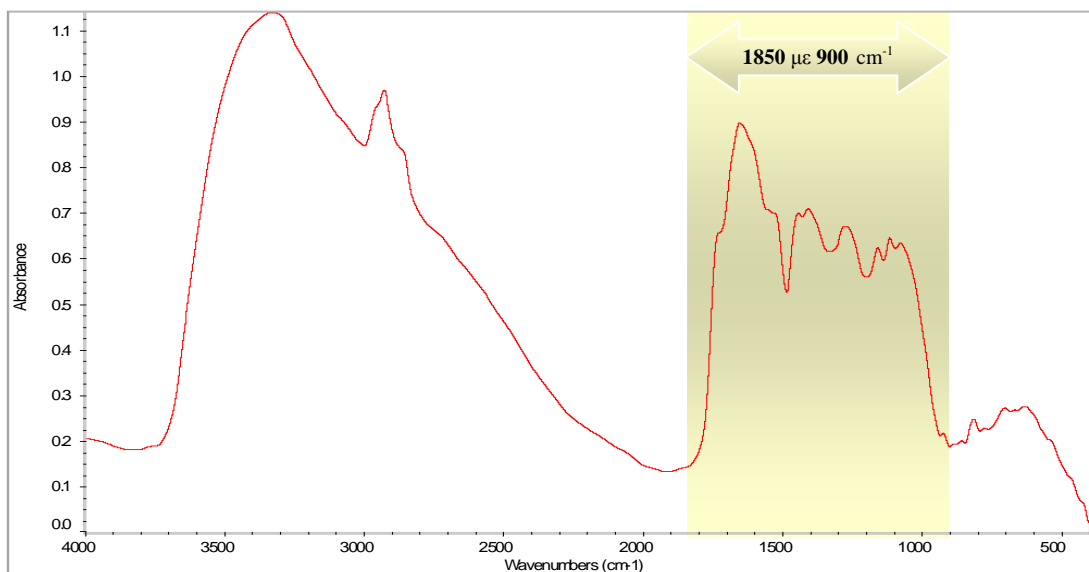
Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα φάσματα FT-IR του φυτικού υλικού, η κύρια διαφορά τους εντοπίζεται σε μια φασματική περιοχή απορροφήσεων εύρους από τα **1850** έως τα **900**  $\text{cm}^{-1}$ . Περιοχή, όπου υπάρχουν έντονα οι απορροφήσεις λειτουργικών ομάδων στο φάσμα FT-IR του RA (σχήμα 5.3.1). Το επόμενο βήμα, ήταν να προετοιμαστεί μια σειρά προτύπων με αραιώσεις με KBr του φυτικού υλικού, γνωστών συγκεντρώσεων RA (σε  $\text{mg/g}$ ) και έχοντας ως αναφορά τις περιεκτικότητες του οι οποίες προέκυψαν από την ανάλυση της HPLC.

Συνολικά προετοιμάστηκαν 45 πρότυπα, με τις συγκεντρώσεις τους να κυμαίνονται μεταξύ 11.2 και 87  $\text{mg/g}$  RA, δηλαδή μεταξύ της ελάχιστης και της υψηλότερης περιεκτικότητας του στο φυτικό υλικό. Η επιλογή τους ήταν τυχαία και ο αριθμός τους από κάθε φυτικό δείγμα, όχι σταθερός. Η λήψη των φασμάτων (τρία για κάθε πρότυπο), έγινε με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης και με τον ίδιο τρόπο όπως αυτά του φυτικού υλικού, εξομαλύνθηκαν και έγινε

διόρθωση της βασικής τους γραμμής από το λογισμικό. Παρατίθενται δύο παραδείγματα φασμάτων των προτύπων, με τα σχήματα (5.3.12 και 5.3.13) που ακολουθούν.



**Σχήμα 5.3.12 :** Φάσμα FT-IR προτύπου από **δενδρολίβανο-26**  
(αραιωμένο με KBr και συγκέντρωσης **25.84 mg/g** σε RA).

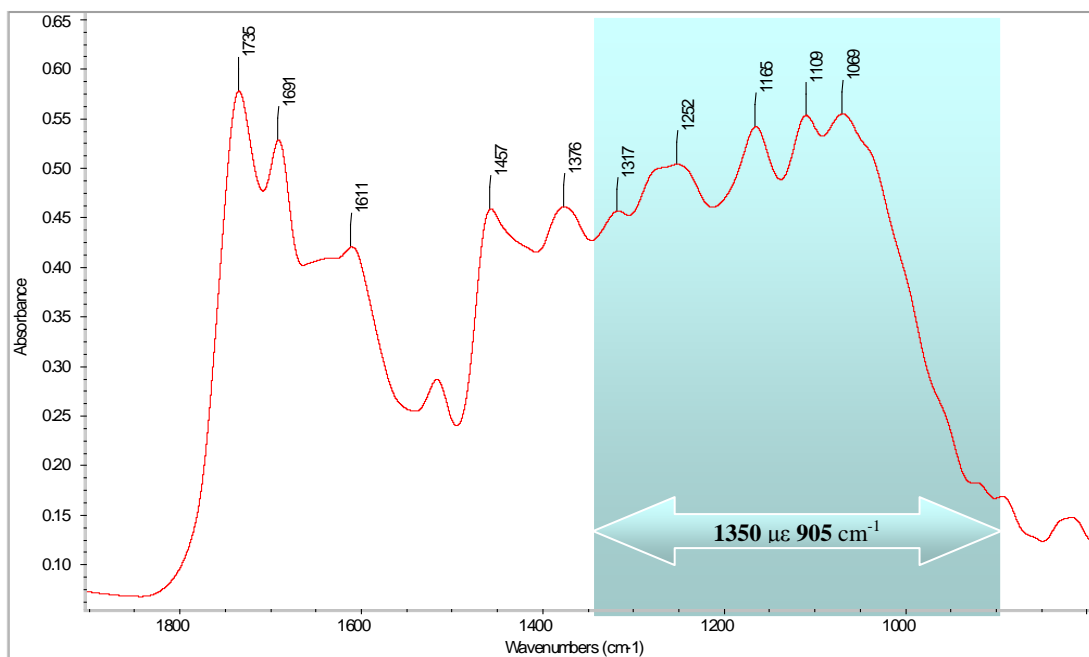


**Σχήμα 5.3.13 :** Φάσμα FT-IR προτύπου από **μελισσόγορτο-39**  
(αραιωμένο με KBr και συγκέντρωσης **43.80 mg/g** σε RA).

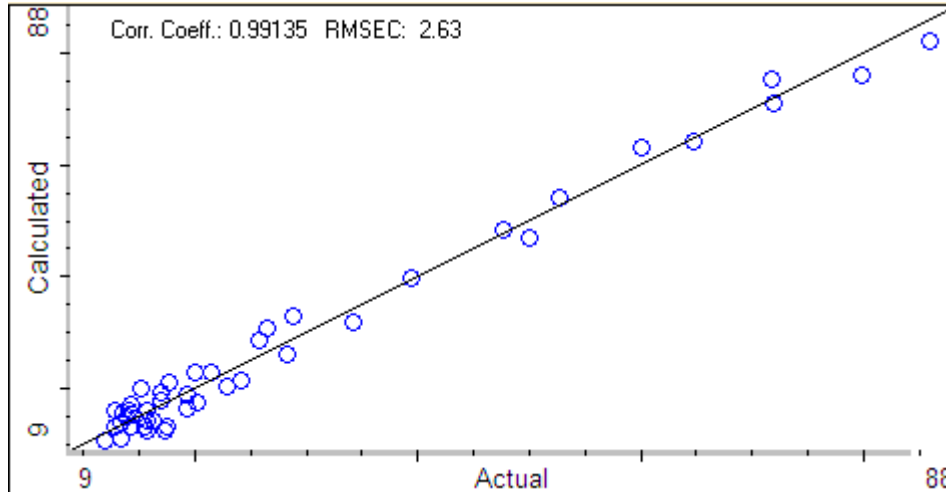
Όπως μπορούμε τουλάχιστον οπτικά να παρατηρήσουμε, τα φάσματα των φυτικών δειγμάτων (αραιωμένων και μη) δεν παρουσιάζουν διαφορές στη φασματική τους γραμμή. Η κατάστρωση των χημειομετρικών αλγορίθμων PLS ποσοτικής ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε

χρησιμοποιώντας «ειδικά» εργαλεία του λογισμικού TQ Analyst Professional Edition (7.2.0.161 Release, Thermo Electron Corp.).

Τα επεξεργασμένα φάσματα των προτύπων και 6 (έξι) αρχικά (μη αραιωμένα με KBr) του φυτικού υλικού εισήχθησαν στο λογισμικό (συγκεκριμένα ο μέσος όρος των φασματικών γραμμών των τριών φασμάτων για κάθε πρότυπο και για κάθε αρχικό) και αναζητήθηκε εκείνη η φασματική περιοχή από τα 1850 έως τα 900  $\text{cm}^{-1}$ , η οποία έδινε το χαμηλότερο σφάλμα (μέση τετραγωνική ρίζα των σφαλμάτων βαθμονόμησης, Root Mean Square Error of Calibration, **RMSEC**). Έγιναν δοκιμές σε διάφορες φασματικές περιοχές με την περιοχή στα **1350** με **905**  $\text{cm}^{-1}$  (σχήμα 5.3.14) να δίνει το βέλτιστο αποτέλεσμα (**RMSEC** = 2.63 και συντελεστή συσχέτισης **R** = 0.99), χρησιμοποιώντας τη 2<sup>η</sup> παράγωγο των φασμάτων και αφήνοντας εκτός του μοντέλου συνολικά από τα 51 (δείγματα βαθμονόμησης, **n** = **51**), τα 5 (πέντε). Η περιοχή από τα 1850 με 1490  $\text{cm}^{-1}$  αγνοήθηκε, καθώς σ' αυτήν απορροφά το δεσμευμένο νερό στους φυτικούς ιστούς (περίπου στα 1630  $\text{cm}^{-1}$ ). Στο σχήμα (5.3.1) φαίνονται τα αποτελέσματα του μοντέλου βαθμονόμησης PLS που αναπτύχθηκε.

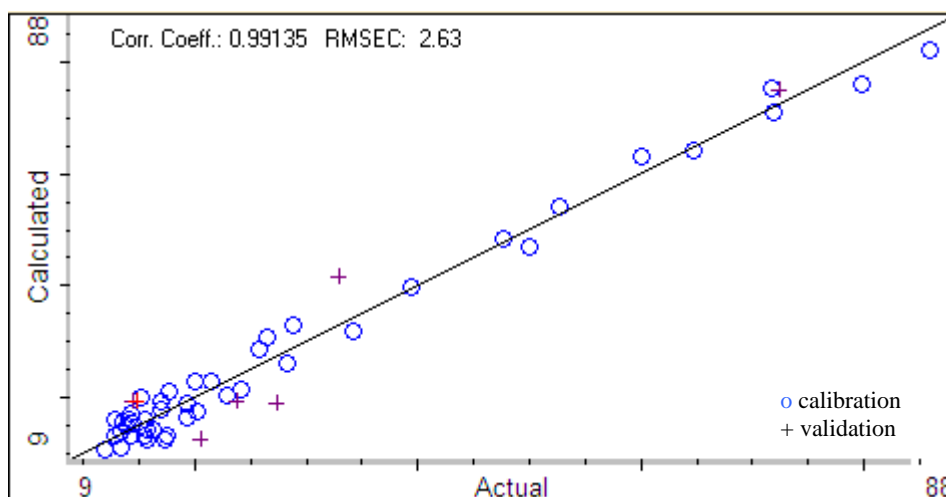


**Σχήμα 5.3.14** : Η φασματική περιοχή (**1350 με 905  $\text{cm}^{-1}$** ) που επιλέχθηκε σε ένα φάσμα FT-IR από δενδρολίβανο-26, για εφαρμογή του μοντέλου PLS.



**Σχήμα 5.3.1 :** Καμπύλη συσχέτισης προβλεπόμενης συγκέντρωσης RA (mg/g) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση (βάση των αποτελεσμάτων της HPLC) στα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης, με PLS.

Στη συνέχεια, για να διαπιστωθεί η ακρίβεια της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του RA με το μοντέλο PLS, προετοιμάστηκαν 5 (πέντε) πρότυπα από τυχαία φυτικά δείγματα (γνωστής συγκέντρωσης σε RA) και μαζί με 2 (δύο) από τα αρχικά, αποτέλεσαν τα δείγματα επικύρωσης,  $n = 7$ . Τα ληφθέντα - επεξεργασμένα φάσματα τους FT-IR εισήχθησαν στο μοντέλο (σχήμα 5.3.2). Με (o) συμβολίζονται τα σημεία βαθμονόμησης και με (+) τα σημεία επικύρωσης μέσα στα σχήματα. Όσο πιο κοντά είναι στην καμπύλη οι μετρήσεις των δειγμάτων επικύρωσης (+), τόσο πιο ισότιμες είναι σε σχέση με αυτές από τη μέθοδο αναφοράς (HPLC). Ο πίνακας (5.3.2) περιλαμβάνει τα αποτελέσματα :



**Σχήμα 5.3.2 :** Καμπύλη συσχέτισης προβλεπόμενης συγκέντρωσης RA (mg/g) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση (βάση των αποτελεσμάτων της HPLC) στα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης και επικύρωσης, με PLS.

Πίνακας 5.3.2 : Αποτελέσματα της PLS σε «άγνωστα» φυτικά δείγματα στην περιοχή 1350 με 905 cm<sup>-1</sup>.

Φυτικό δείγμα	Συγκέντρωση RA σε (mg/g)	Προβλεπόμενη συγκέντρωση RA σε (mg/g) με PLS
Μελισσόχορτο-39	72.53	74.86
Δενδρολίβανο-26	27.39	19.11
Βασιλικός-43	14.46	19.32
Φασκόμηλο-22	20.60	12.46
Φασκόμηλο-15 (αρχικό)	33.00	41.63
Θυμάρι-37	23.71	19.40
Ρίγανη-36 (αρχικό)	14.90	19.48

Όπως δείχνει ο παραπάνω πίνακας, οι τιμές των προβλεπόμενων συγκεντρώσεων RA αποκλίνουν από εκείνες που έχουν προσδιοριστεί έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα της HPLC (με τη μικρότερη απόκλιση στο μελισσόχορτο-39), όχι όμως σε τέτοιο βαθμό που να καθίσταται αμφίβολος ένας αξιόπιστος υπολογισμός της συγκέντρωσης του RA σε ένα τυχαίο φυτικό δείγμα.

Εν τέλει, φαίνεται να λειτουργεί ικανοποιητικά για την φασματική περιοχή (1350 με 905 cm<sup>-1</sup>, περιοχή απορρόφησης φαινολικών ομάδων - δονήσεις τάσης των δεσμών C-O και O-H) και μέσα στα πλαίσια της ταξινόμησης του φυτικού υλικού, όπως αυτή εκφράστηκε βάση των αποτελεσμάτων της HPLC. Μπορεί επομένως, να υπάρξει μια συνολική εκτίμηση της περιεκτικότητας σε RA (υψηλή ή χαμηλή, με μια απόκλιση να κυμαίνεται περίπου από 2 έως 8 mg-τουλάχιστον για τα παρόντα πειράματα), ενός αγνώστου φυτικού δείγματος της οικογένειας *Lamiaceae* και να καταταγεί έτσι ανάλογα σε μία από τις τέσσερις ομάδες (βάση της περιεκτικότητας σε RA), όπως αυτές προέκυψαν με την HPLC.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Οι ανάγκες της εποχής, έχουν οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα να στραφεί στην μελέτη ή ακόμη και στην σύνθεση φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών, ικανών να αντικαταστήσουν σε μεγάλο βαθμό, τις υπάρχουσες συνθετικές. Μια τέτοια ουσία μελετήθηκε και στην παρούσα εργασία, το ροσμαρινικό οξύ, σε διάφορα είδη φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* τα οποία καλλιεργούνται στον Ελλαδικό χώρο και πιο συγκεκριμένα στον νομό Αιτωλοακαρνανίας.

Η παραλαβή και απομόνωση του από το φυτικό υλικό πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, χρησιμοποιώντας μία από τις σύγχρονες και εναλλακτικές τεχνικές εκχύλισης, της υποβοηθούμενης με υπερήχους (USE). Το ροσμαρινικό οξύ ανιχνεύτηκε και στα 8 (οκτώ) είδη φυτών που επιλέχθηκαν. Ο διαλύτης εκχύλισης (μεθανόλη και νερό σε χαμηλό pH) αποδείχθηκε αποτελεσματικός για ακόμη μια φορά, όπως άλλωστε αναφέρει και η βιβλιογραφία. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD), τεχνική ανάλυσης χρονοβόρα αλλά αξιόπιστη κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Σ' όλα τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, η κυρίαρχη κορυφή ήταν αυτή του ροσμαρινικού οξέος. Η παραμονή των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων στην κατάψυξη και για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον ενός μήνα όπως αποδείχθηκε και πειραματικά στην παρούσα εργασία), δεν έδειξε να επηρεάζει την περιεκτικότητα τους σε ροσμαρινικό οξύ.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με HPLC ανέδειξαν το μελισσόχορτο, ως το φυτό που έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ (η οποία κυμάνθηκε από 71 έως 73 και 85 έως 87 mg/g ξηρού φυτικού υλικού, αντίστοιχα για τα δύο φυτικά του δείγματα στην παρούσα εργασία), γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλους ερευνητές τουλάχιστον στον Ελλαδικό χώρο. Χρησιμοποιώντας ως χημειοταξινομικό δείκτη το ροσμαρινικό οξύ, το φυτικό υλικό κατετάγη σε τέσσερις ομάδες σε σχέση με την περιεκτικότητά του σε ροσμαρινικό οξύ. Κατά ελαττωμένη σειρά αυτές είναι, η ομάδα του μελισσόχορτου (με 71 έως 87 mg RA/g ή αλλιώς πάνω από **7 %** RA επί του ξηρού φυτικού υλικού), η ομάδα της ρίγανης (φύλλα και άνθη), του θρούμπι και του δενδρολίβανου (με 49 έως 62 mg RA/g ή από **5** έως **6 %** περίπου, RA επί του ξηρού φυτικού υλικού), η ομάδα του φασκόμηλου και του θυμαριού (με 31 έως 39.5 mg RA/g ή από **3** έως **4 %** περίπου, RA επί του ξηρού φυτικού υλικού) και τέλος η ομάδα του βασιλικού, της ρίγανης (φύλλα) και του ύσσωπου (με 11 έως 21 mg RA/g ή από **1** έως **2 %** περίπου, RA επί του ξηρού φυτικού υλικού). Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων, τα καλλιεργημένα στον Ελλαδικό χώρο είδη της οικογένειας *Lamiaceae*, δείχνουν πως είναι πολύ πιο «πλούσια» σε RA απ' ότι τα αντίστοιχα είδη (κυρίως το μελισσόχορτο), καλλιεργημένα σε διάφορες χώρες της

Μεσογείου και σύμφωνα με σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές (Caniova & Brandsteterova, 2001 και Zgórkka & Glowniak, 2001).

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με την τεχνική DRIFTS και τη βοήθεια της χημειομετρίας, αν και στο παρελθόν εφαρμόστηκε με επιτυχία σε ποσοτικούς προσδιορισμούς ουσιών σε διάφορα φυτικά δείγματα, στην παρούσα εργασία υπήρξαν κάποια «εμπόδια» που έπρεπε να ξεπεραστούν. Πέρα από την έλλειψη σχετικών βιβλιογραφικών αναφορών, το πρόβλημα κυρίως εντοπίστηκε στην συμπεριφορά του φυτικού υλικού όπως αυτή «αποτυπώθηκε» στα φάσματα FT-IR που ελήφθησαν. Δεν υπήρχαν ευδιάκριτες (αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές) στα φάσματα, ώστε εύκολα να αποδοθούν στην απορρόφηση κάποιας χαρακτηριστικής ομάδας της ουσίας που μας ενδιέφερε, δηλαδή του ροσμαρινικού οξέος. Οι όποιες προσπάθειες αποσυνέλιξης αυτών των κορυφών δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Ωστόσο, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο PLS το οποίο λειτουργώντας σε μια φασματική περιοχή από τα 1350 έως τα 905  $\text{cm}^{-1}$  καταφέρνει ικανοποιητικά να δώσει μια εκτίμηση της περιεκτικότητας ενός άγνωστου φυτικού δείγματος (της οικογένειας *Lamiaceae*) με μια απόκλιση κοντά στα 2 έως 8 mg, σε ροσμαρινικό οξύ. Το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «εργαλείο» για την ανάδειξη της βιολογικής αξίας ενός φυτού όσο αφορά την περιεκτικότητα του σε ροσμαρινικό οξύ, επιτρέποντας την ταξινόμηση του σε κάποια από τις παραπάνω ομάδες όπως αυτές προέκυψαν βάση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με HPLC και να προσδιορίσει έτσι ταυτόχρονα, αν ξεπερνά ή όχι το κατώτατο όριο του **4 %** περιεκτικότητας σε RA στα φύλλα (και πιο συγκεκριμένα για το μελισσόχορτο), όπως απαιτήσε η Ευρωπαϊκή φαρμακοποιία.

Ανακεφαλαιώνοντας, θα λέγαμε πως η φασματοσκοπία υπερύθρου με την τεχνική DRIFTS σε ποσοτικούς προσδιορισμούς φυτικών δειγμάτων είναι πολλά υποσχόμενη, οικονομική και γρήγορη μέθοδος ανάλυσης και ίσως να χρήζει περισσότερο την προσοχή της έρευνας για την εξαγωγή καλύτερων αποτελεσμάτων. Η δημιουργία μιας βιβλιοθήκης φασμάτων IR φυτικού υλικού με την τεχνική αυτή, θα ενίσχυε σε μεγάλο βαθμό την αντιμετώπιση αρκετών προβλημάτων.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Διεθνής βιβλιογραφία

## A

**Aguirre-Bermudez**, D., Mobbs, T. & Canovas-Barbosa, V.G. (2011). Ultrasound Applications in Food Processing. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, chapter 3 (pp. 65-105).

**Alkam**, T., Atsumi, N., Mizoguchi, H., Itoh, A. & Nabeshima T. (2007). A natural scavenger of peroxy nitrates, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A $\beta$ <sub>25-35</sub>. *Behavioural Brain Research*, **180**: 139-145.

## B

**Boros**, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhar, Z., Kilar, F. & Felinger A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, **1217**: 7972-7980.

## C

**Cai**, Y.Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q. & Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, **78**: 2872-2888.

**Canadanovic-Brunet**, J., Cetkovic, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanovic, G., Mandic, A., Markov, S., Cvetkovic, D. & Canadanovic, V. (2008). Radical scavenging, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of *Melissa officinalis* L. Extracts. *Journal of Medicinal Food*, **11** (1): 133-143.

**Caniova**, A. & Brandsteterova, E. (2001). HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **24** (17): 2647-2659.

## E

**Exarchou**, V., Nevadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. & Boskou, D. (2002). Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 5294-5299.

## F

**Fecka**, I., Raj, D. & Krauze-Baranowska, M. (2007). Quantitative Determination of Four Water-Soluble Compounds in Herbal Drugs from *Lamiaceae* Using Different Chromatographic Techniques. *Chromatographia*, **66**: 87-93.

**Fecka**, I. & Turek, S. (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, **108**: 1039-1053.

## G

**Garcia-Salas**, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. & Fernandez-Gutierrez, A. (2010). Review: Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, **15**: 8813-8826.

**Gokbulut**, A., Kartal, M., Konuklugil, B. & Firat, M. (2010). Simultaneous determination of selected phenolic acids in Turkish *Salvia* species by HPLC-DAD. *Chemistry of Natural Compounds*, **46** (5): 805-806.

## H

**Hernandez-Hernandez**, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M.E. & Guerrero Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science* **81**: 410-417.

## I

**Ignat**, I., Volf, I. & Popa I.V. (2011). Review: A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821-1835.

## K

**Kan**, Y., Gokbulut, A., Kartal, M., Konuklugil, B. & Yilmaz G. (2007). Development and Validation of a LC Method for the Analysis of Phenolic Acids in Turkish *Salvia* Species. *Chromatographia*, **66**: 147-152.

**Kim**, S., Yun, E.J., Bak, S.J., Lee, H., Lee, S.J., Kim, C.T., Lee, J.H. & Kim, K.H. (2010). Response surface optimized extraction and chromatographic purification of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* leaves. *Food Chemistry*, **121**: 521-526.

**Kivilompolo**, M., Oburka, V. & Hyotylainen, T. (2007). Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Anal Bioanal Chem*, **388**: 881-887.

**Kosar**, M., Dorman, D., Baser, K. & Hiltunen, R. (2004). An Improved HPLC Post-Column Methodology for the Identification of Free Radical Scavenging Phytochemicals in Complex Mixtures. *Chromatographia*, **60**: 635-638.

**Krishnaiah**, D., Sarbatly, R. & Nithyanandam, R. (2011). Review: A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, **89**: 217-233.

**Kwee**, E.M. & Niemeyer, E.D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, **128**: 1044-1050.

## L

**Lafay**, S. & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*, **7**: 301-311.

**Lecomte**, J., Lopez-Giraldo, L.J., Laguerre, M., Barea, B. & Villeneuve, P. (2010). Synthesis, Characterization and Free Radical Scavenging Properties of Rosmarinic acid Fatty Esters. *J Am Oil Chem Soc*, **87**: 615-620.

**Liu**, T., Sui, X., Zhang, R., Yang, L., Zu, Y., Zhang, L., Zhang, Y. & Zhang, Z. (2011). Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Chromatography A*, **1218**: 8480-8489.

**Lu**, Y. & Yeap Foo, L. (2002). Review: Polyphenolics of *Salvia*-a review. *Phytochemistry*, **59**: 117-140.

## O

**Ondrejovic**, M., Maliar, T., Benkovicova, H. & Kubincova, J. (2012). Solid-phase extraction for photometric determination of rosmarinic acid in lemon balm (*Melissa officinalis*) extracts. *Nova Biotechnologica et Chimica*, **11** (1): 63-71.

**Ozturk**, N., Tuncel, M., Uysal, U.D., Oncu-Kaya, E.M. & Koyuncu, O. (2011). Determination of Rosmarinic Acid by High-Performance Liquid Chromatography and Its Application to Certain *Salvia* Species and Rosemary. *Food Anal. Methods*, **4**: 300-306.

## P

**Papageorgiou**, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou & Komaitis, M. (2008). Variation of the Chemical Profile and Antioxidant Behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller Grown in Greece. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **56** (16): 7254-7264.

**Pappas**, C., Tarantilis, P.A. & Polissiou, M. (1998). Determination of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Lignin in Crude Plant Material Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. *Society for Applied Spectroscopy*, **52** (11): 1399-1402.

**Park**, S.U., Uddin, Md.R., Xu, H., Kim, Y.K. & Lee, S.Y. (2008). Review: Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *African Journal of Biotechnology*, **7** (25): 4959-4965.

**Peev**, G., Penchev, P., Penchev, D. & Angelov, G. (2011). Solvent extraction of rosmarinic acid from lemon balm and concentration of extracts by nanofiltration: Effect of plant pre-treatment by supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Research and Design*, **89**: 2236-2243.

**Petrakis**, E.A., Kimbaris, A.C., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A. & Polissiou, M.G. (2009). Quantitative Determination of Pulegone in Pennyroyal Oil by FT-IR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 10044-10048.

**Petersen**, M. & Simmonds, M. S.J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, **62**: 121-125.

**R**

**Razborssek, M.I.** (2011). Stability studies on trans-rosmarinic acid and GC-MS analysis of its degradation product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55**: 1010-1016.

**Rodriguez-Rojo, S.,** Visentin, A., Maestri, D. & Cocero, M.J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, **109**: 98-103.

**S**

**Sanchez-Campillo, M.,** Gabaldon, J.A., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Del Bano, M.J., Alcaraz, M., Vicente, V., Alvarez, N. & Lozano J.A. (2009). Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food and Chemical Toxicology*, **47**: 386-392.

**Sanli, N.,** Fonrodona, G., Barbosa, J., Ozkan, G.A. & Beltran, J.L. (2005). Modeling retention in liquid chromatography of polyphenolic acids Prediction of solvent composition and pH of the mobile phase. *Analytica Chimica Acta*, **537**: 53-61.

**Stehfest, K.,** Boese, M., Kerns, G., Piry, A. & Wilhelm, C. (2004). Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. *Journal of Plant Physiology*, **161**: 151-156.

**T**

**Tepe, B.,** Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A. & Aydin E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *Verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *Amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, **100**: 985-989.

**V**

**Velickovic, D.T.,** Nikolova, M.T., Ivancheva, S.V., Stojanovic, J.B. & Veljkovic, V.B. (2007). Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration. *J. Serb. Chem. Soc.*, **72** (1): 73-80.

**W**

**Wang, H.,** Provan, G.J. & Helliwell, K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, **87**: 307-311.

**Z**

**Zelic, B.,** Hadolin, M., Bauman, D. & Vasic-Racki, D. (2005). Recovery and Purification of Rosmarinic Acid from Rosemary Using Electrodialysis. *Acta Chim. Slov.*, **52**: 126-130.

**Zgorka, G. &** Glowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **26**: 79-87.

**Ελληνική βιβλιογραφία**

**Skoog, Hollen & Nieman** (2005). Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης. Εκδόσεις Κωσταράκης, έκδοση Ε, Αθήνα, σελ.474-475.

**Trifa Ghasimi** (2009). Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός του Ροσμαρινικού Οξέος σε Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά της Οικογένειας *Lamiaceae*. Πτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Γαρδέλη Χρυσανγή** (2009). Μελέτη της Χημικής Σύστασης Αιθέριων Ελαίων Ορισμένων Αρωματικών Φυτών της Ελληνικής Χλωρίδας. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Κανέλλου Γεωργία** (2011). Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων από αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας. Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Καραμπουρνιώτης Γ.Α.** (2003). Η άμυνα των φυτών έναντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Σε: Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών, οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες. Έμβρυο σελ.169-228.

**Κατσιώτης Θ.** Σταύρος και Χατζοπούλου Σ. Πασχαλίνα (2010). Αρωματικά φαρμακευτικά φυτά και αιθέρια έλαια. Εκδόσεις Αδερφών Κυριακίδη, Αθήνα.

**Κουτσός Θ. Β.** (2006). Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Εκδόσεις Ζήτη, Αθήνα.

**Παππάς Χρήστος** (2000). Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού κενάφ (*Hibiscus cannabinus* L.). Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Ραγκούση-Ιγνατιάδου Βαλεντίνα** (2009). Χημεία φυσικών προϊόντων. Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα.

**Σιδερούδη Θεοχαρία** (2006). Φασματοσκοπική Μελέτη Οφθαλμικών Παθήσεων και Ανίχνευση Μορίων Φαρμάκων. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.

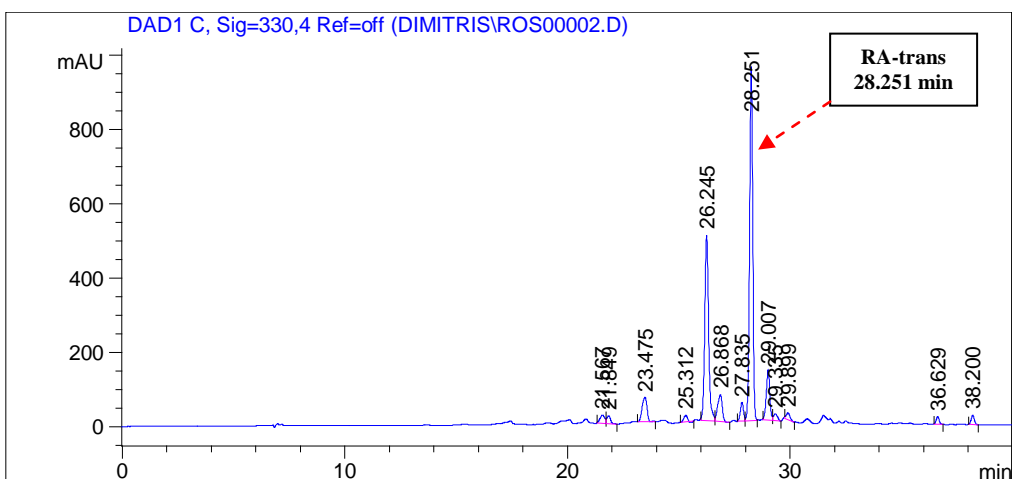
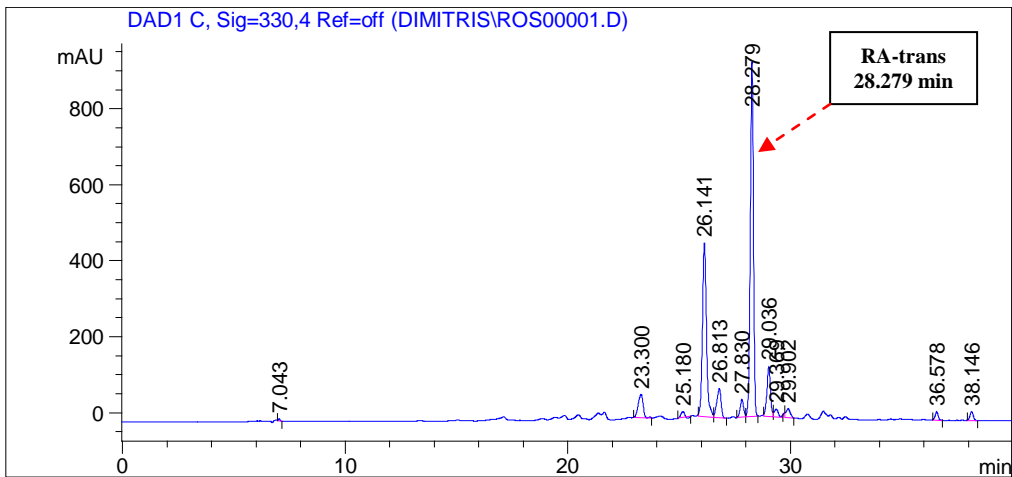
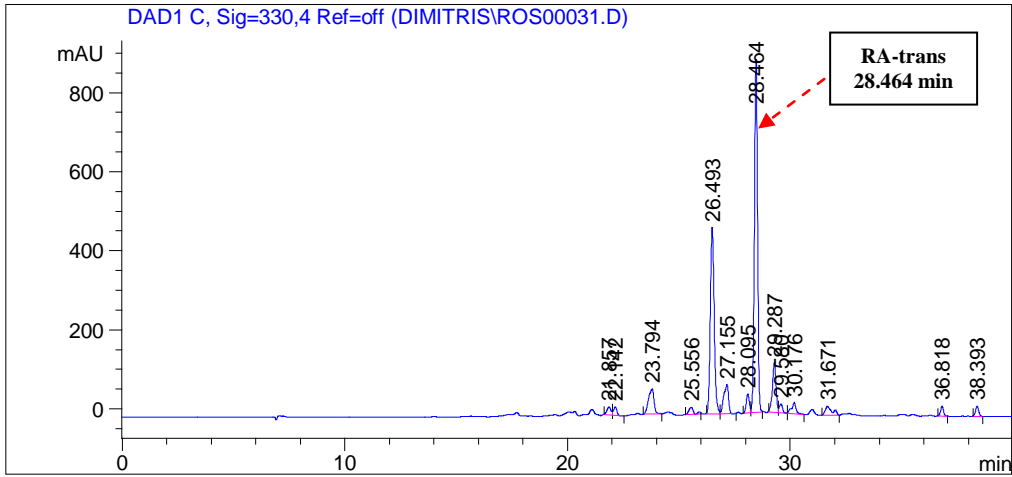
**Ταραντίλης Πέτρος** (2004). Τεχνικές εκχύλισης και απόσταξης, χρωματογραφικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης - Παραλαβή, διαχωρισμός, απομόνωση, καθαρισμός και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

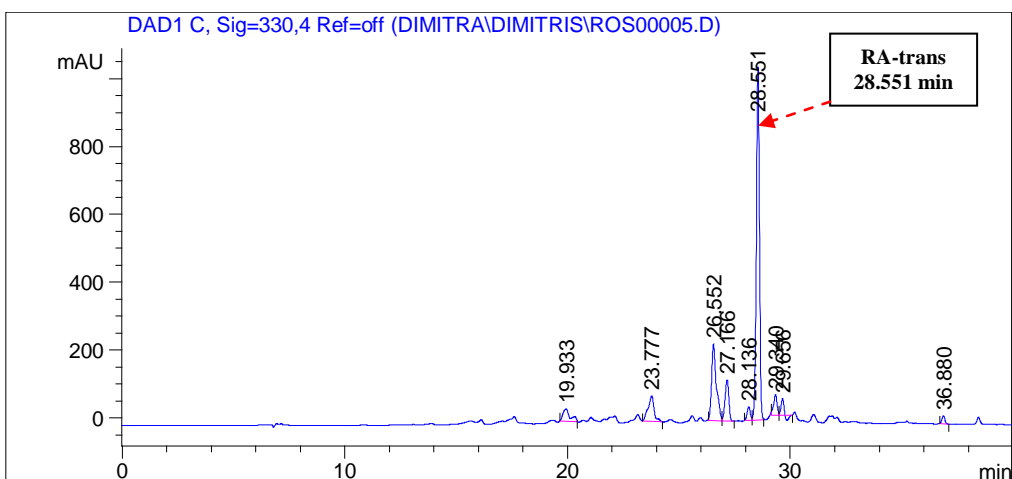
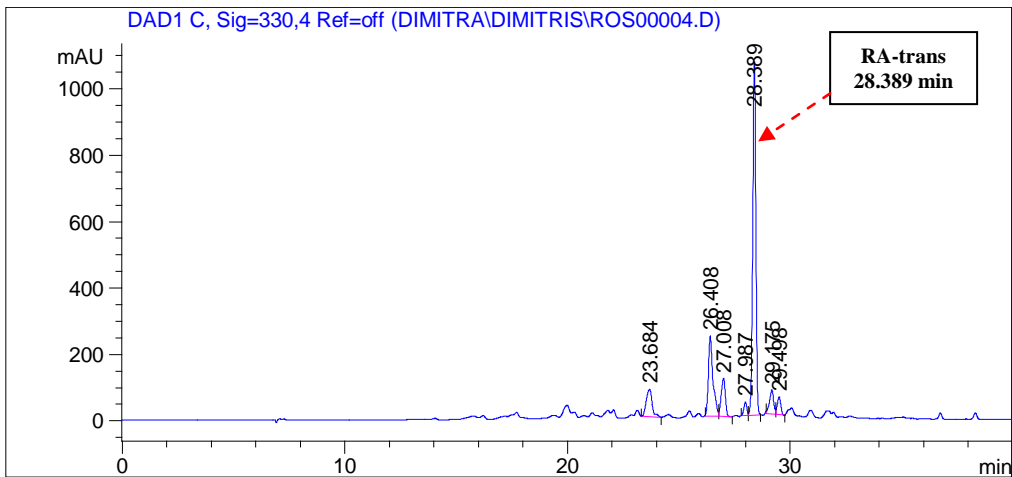
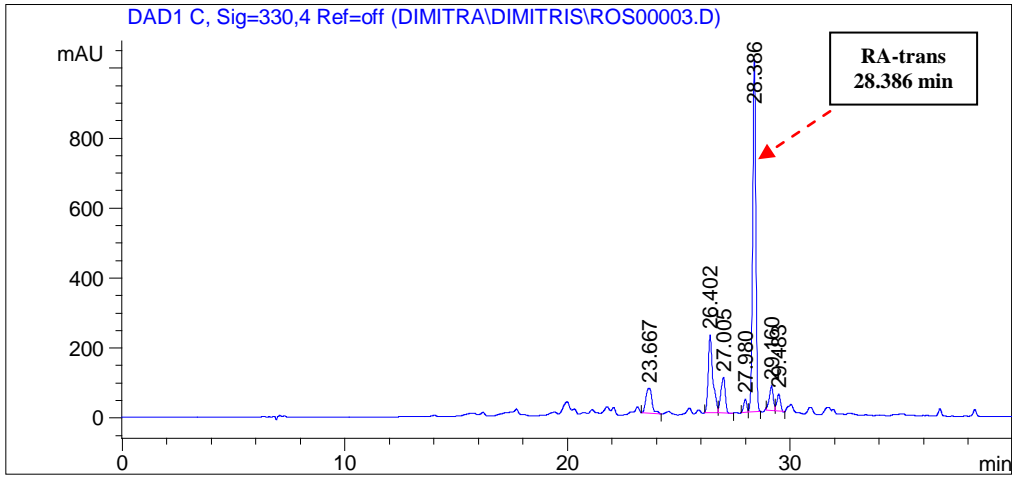
**ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΑ UV-vis  
ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ RA  
ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ Ο ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΕ HPLC**

Χρωματογραφήματα και φάσματα UV-vis  
του φυτικού υλικού (χωρίς επεξεργασία εικόνας)

Φασκόμηλο-15

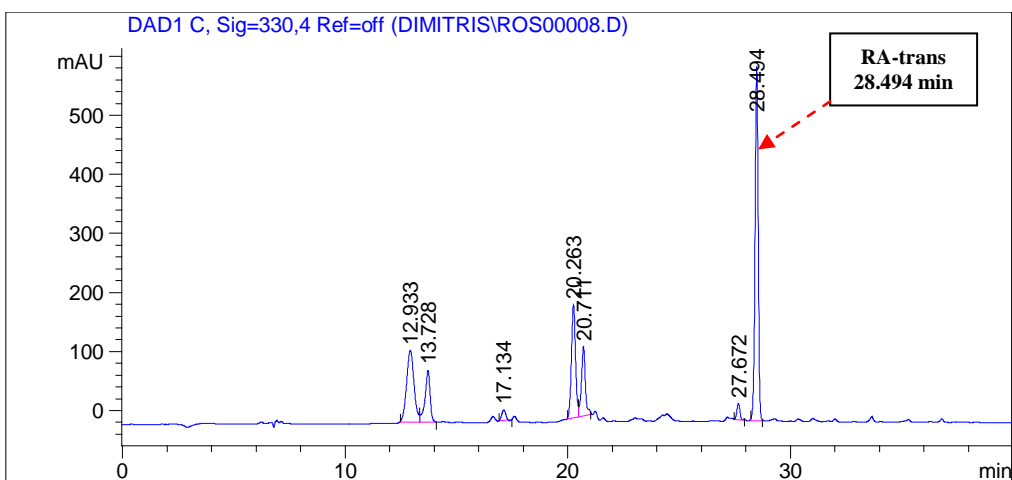
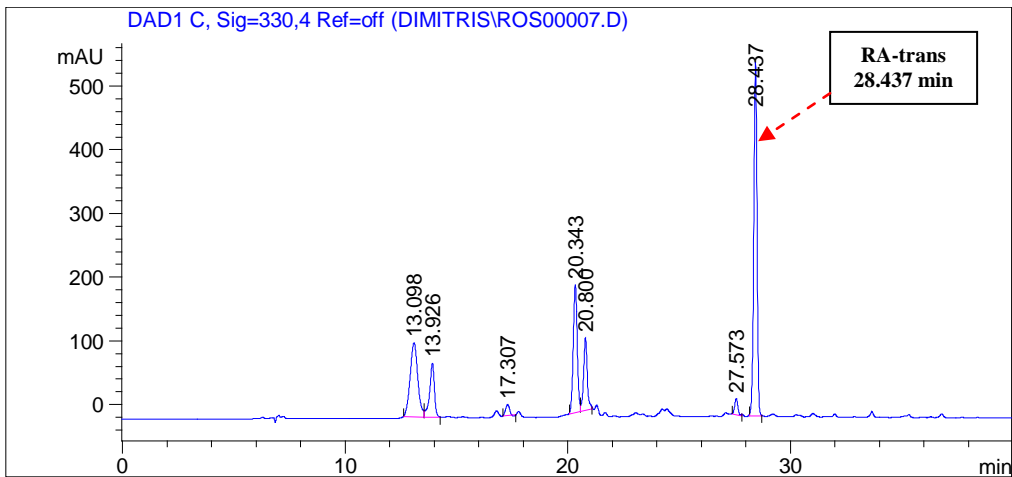
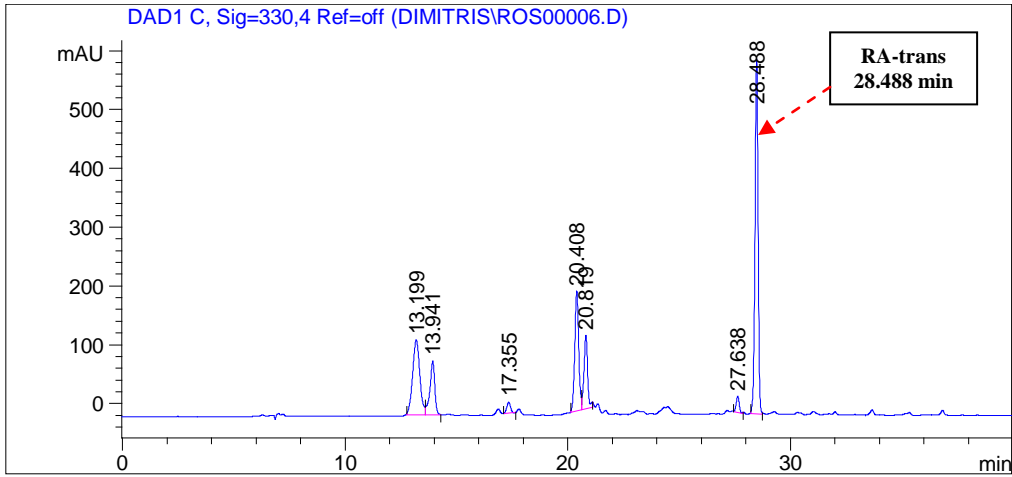


Φασκόμηλο-22

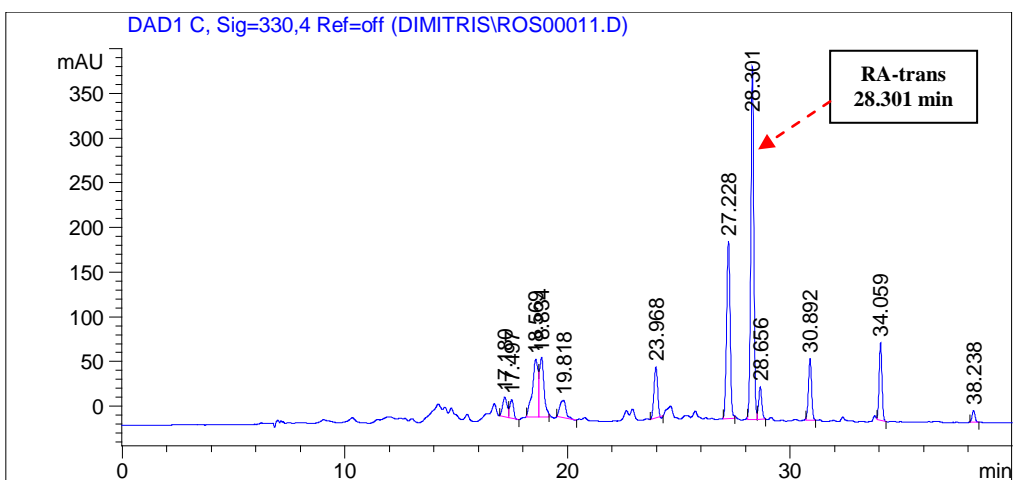
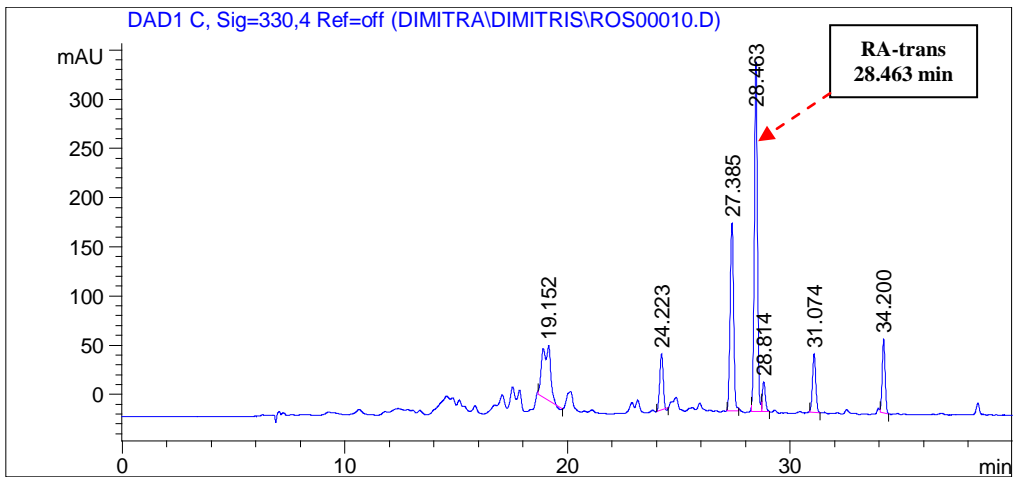
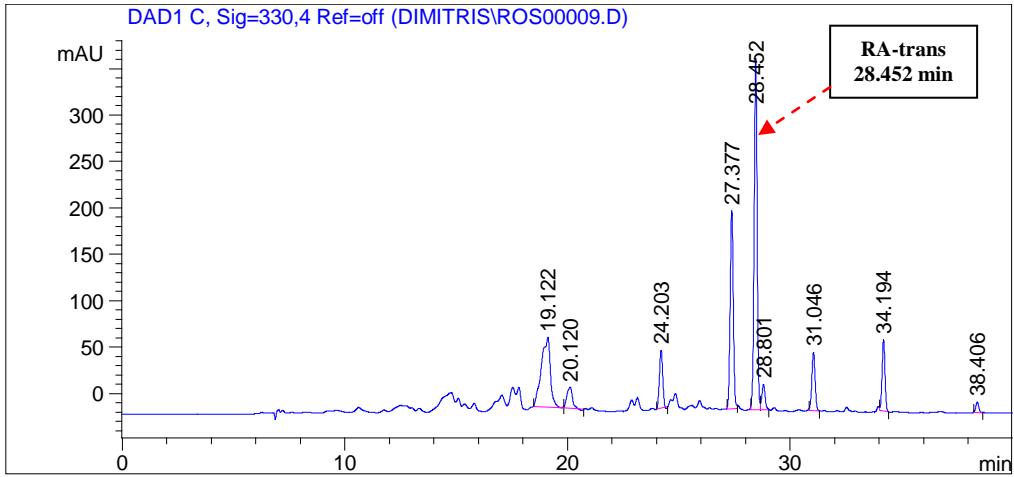




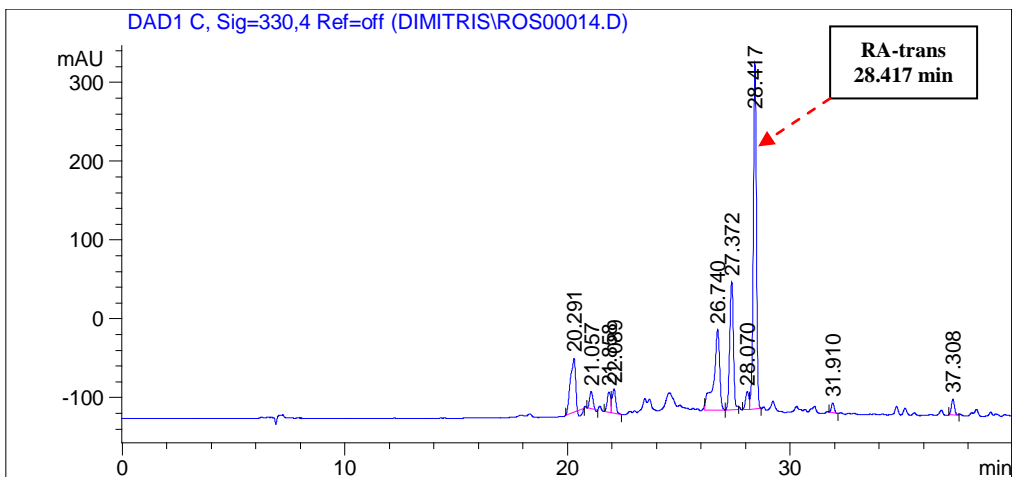
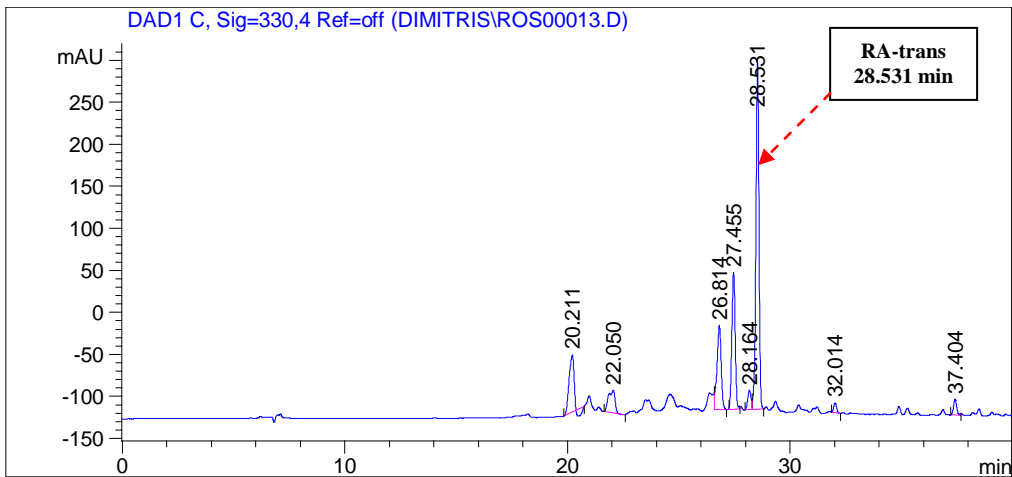
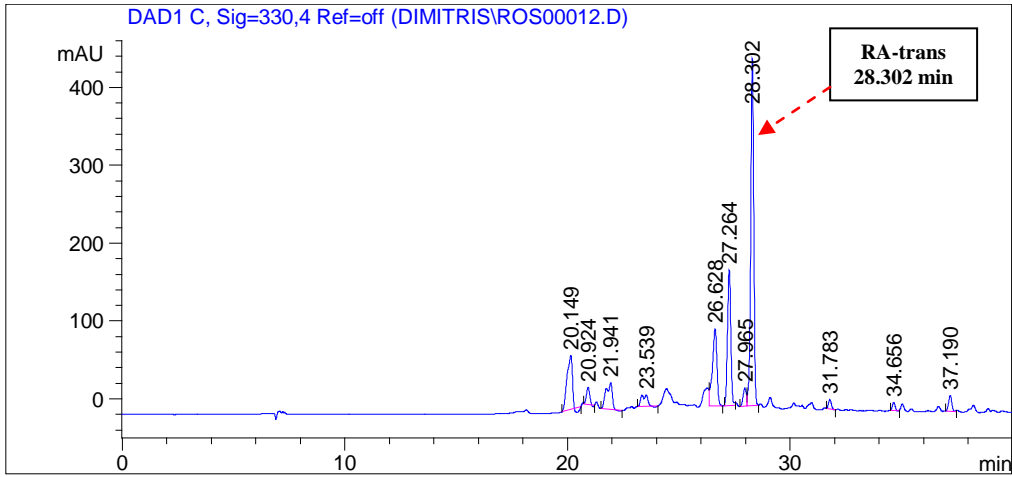
### Βασιλικός-43



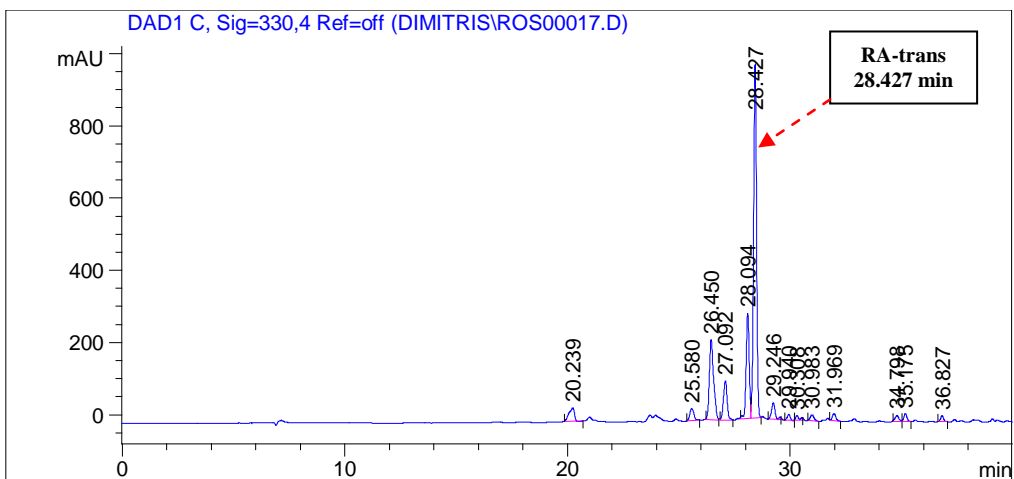
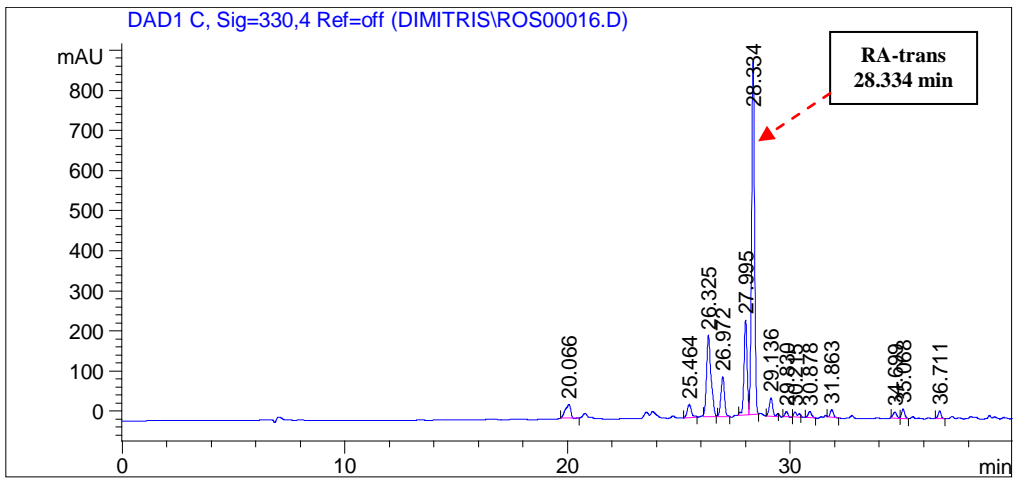
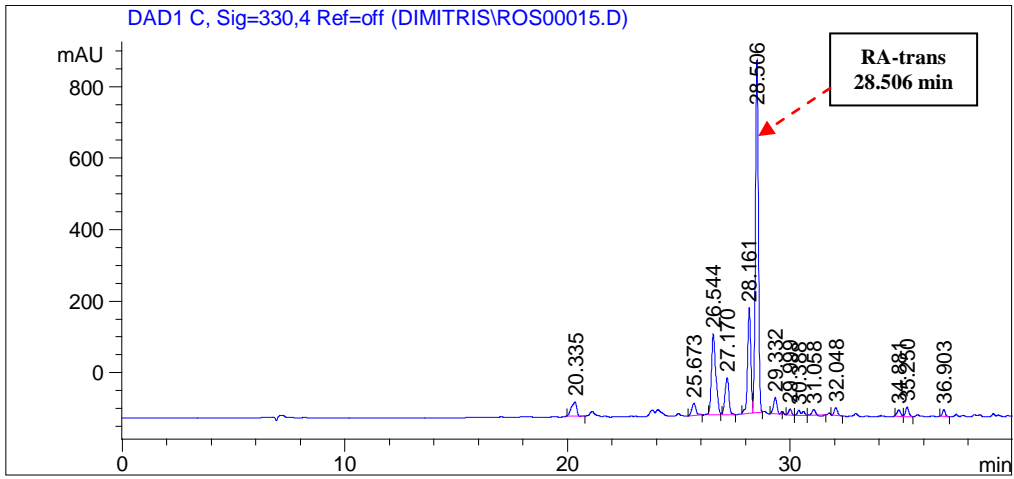
**Υσσωπος-29**



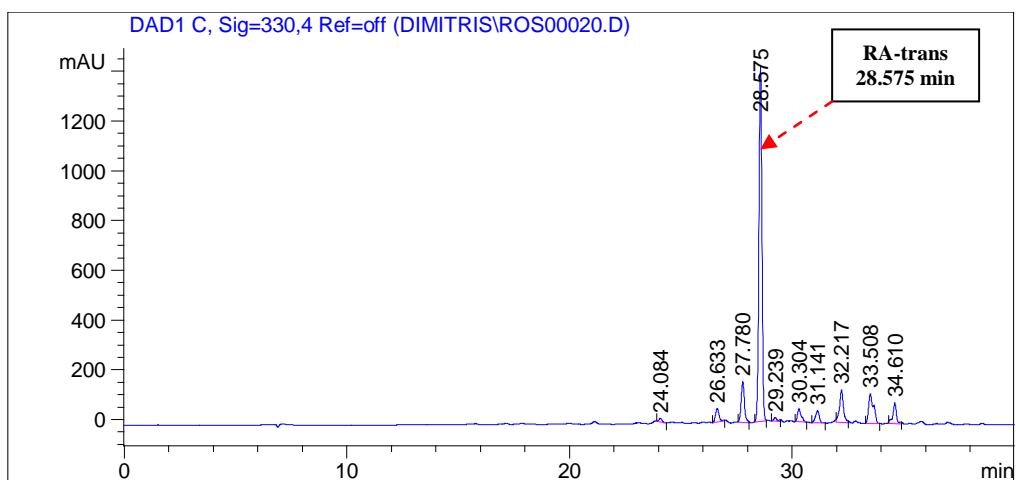
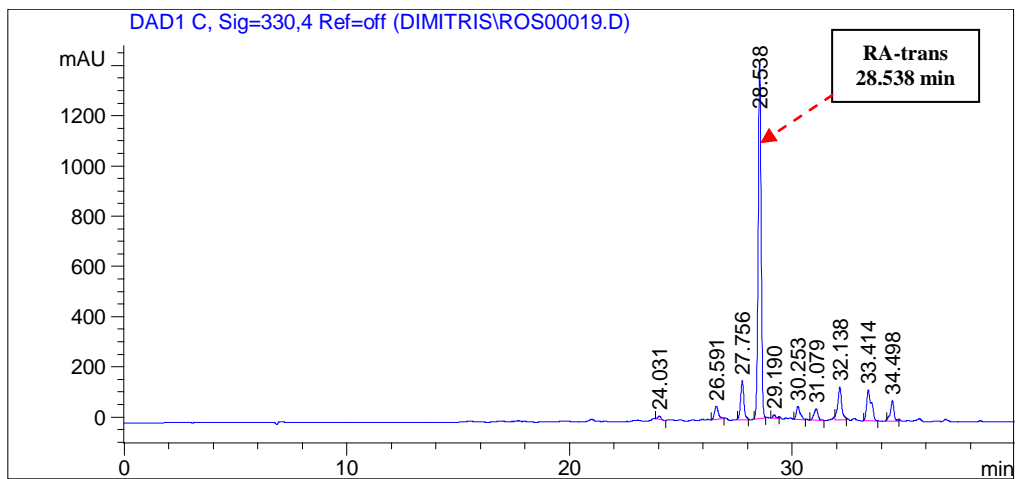
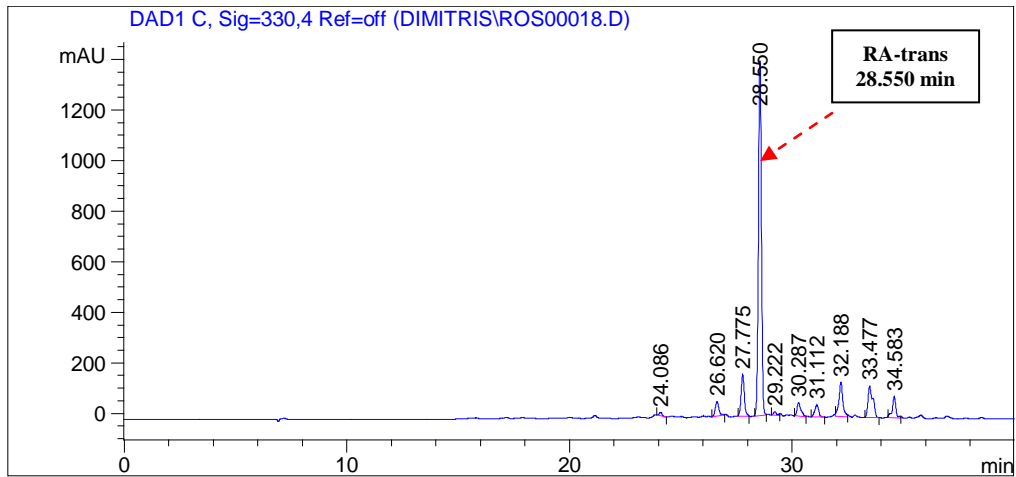
**Πίναξη-36**



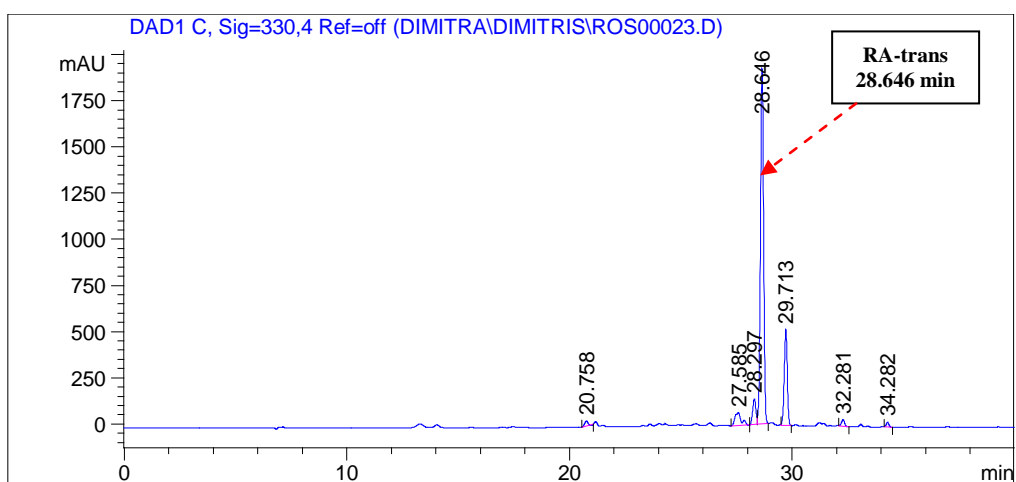
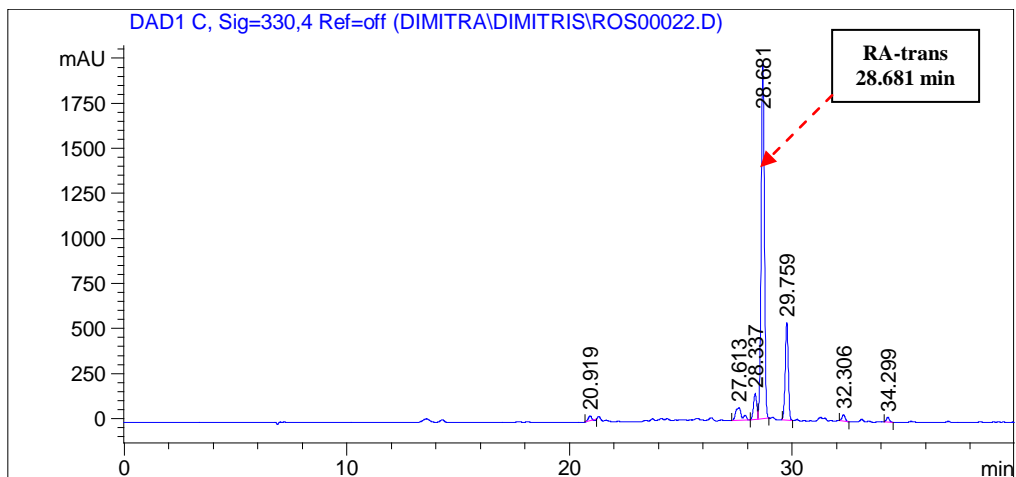
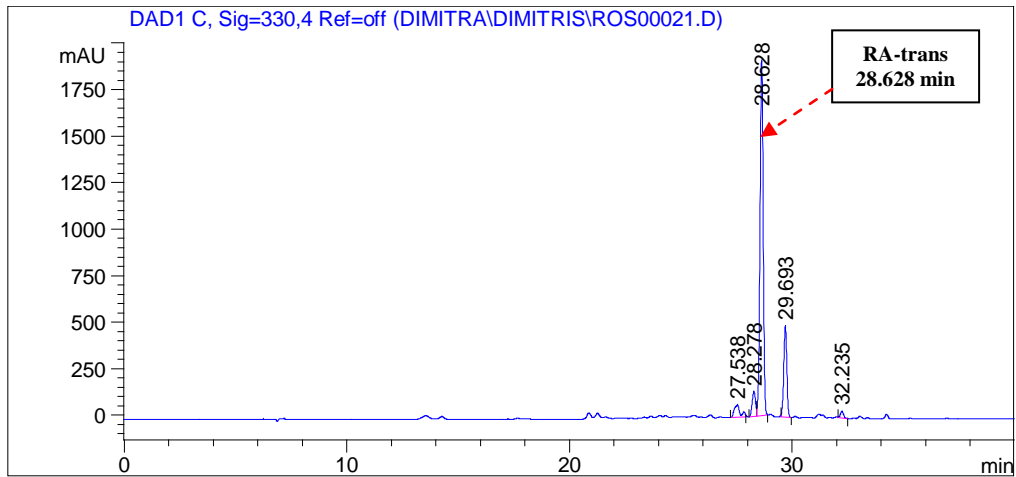
Θυμάρι-37



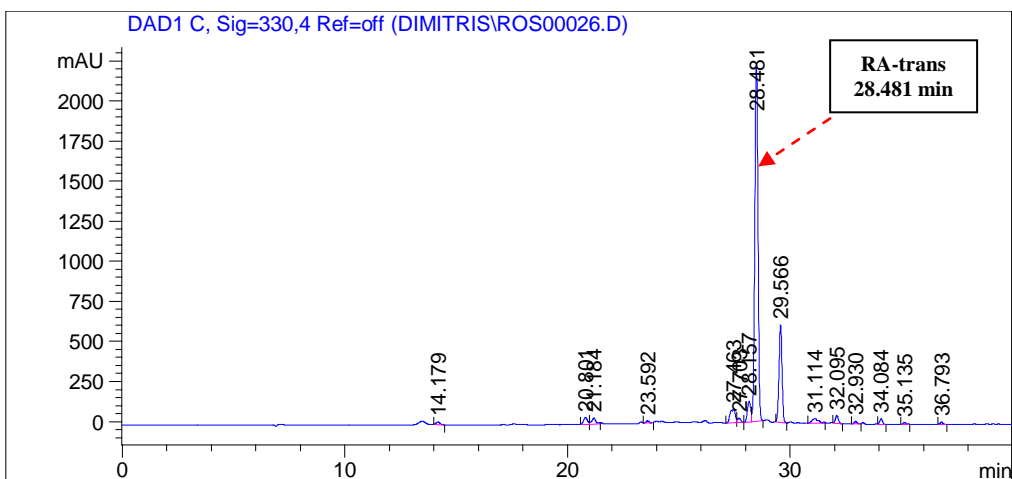
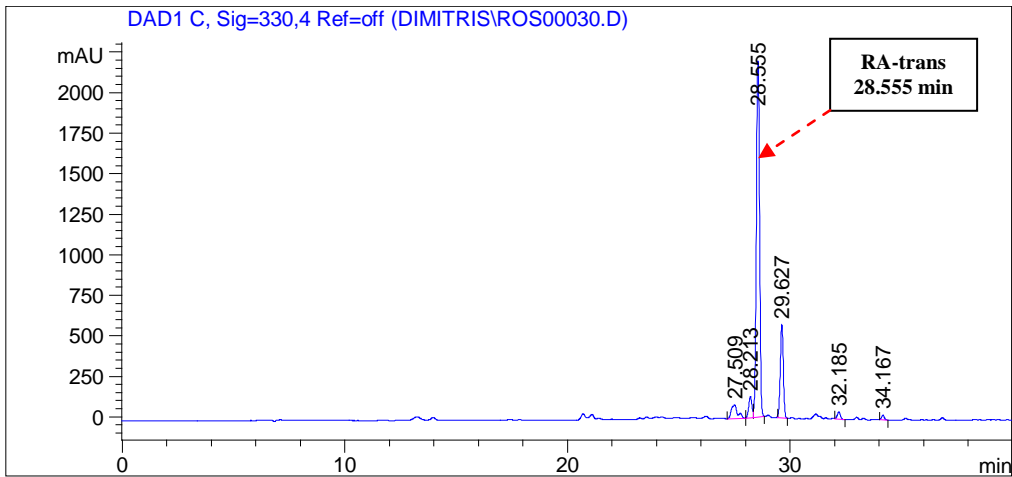
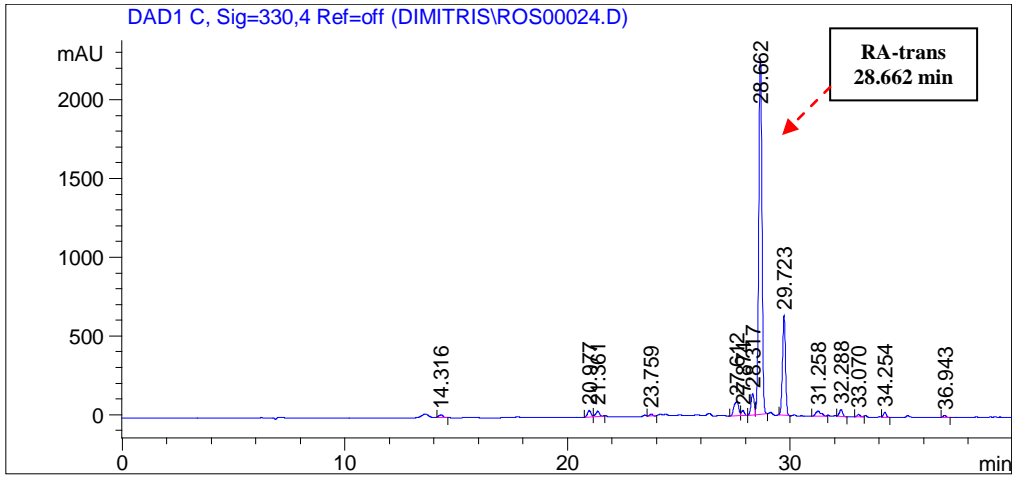
### Δενδρολίβανο-26



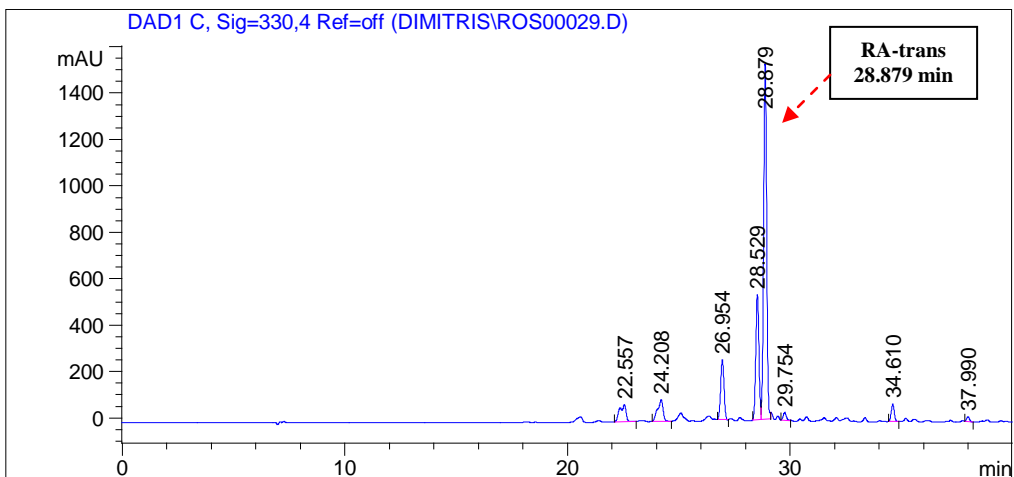
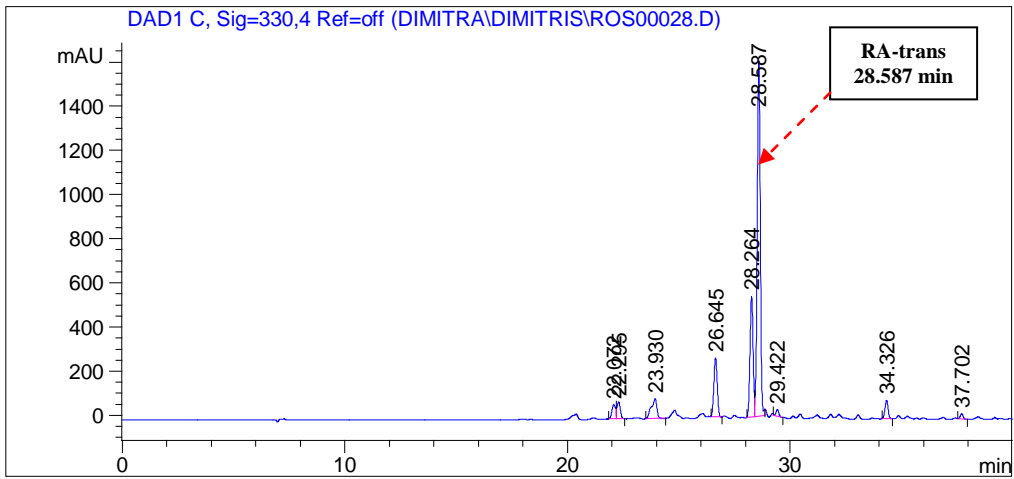
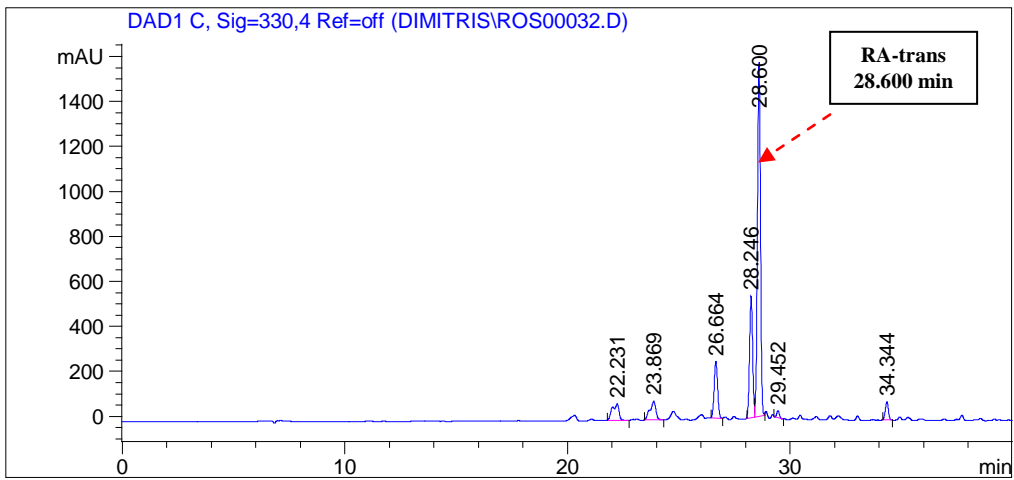
### Μελισσόχορτο-38



### Μελισσόχορτο-39

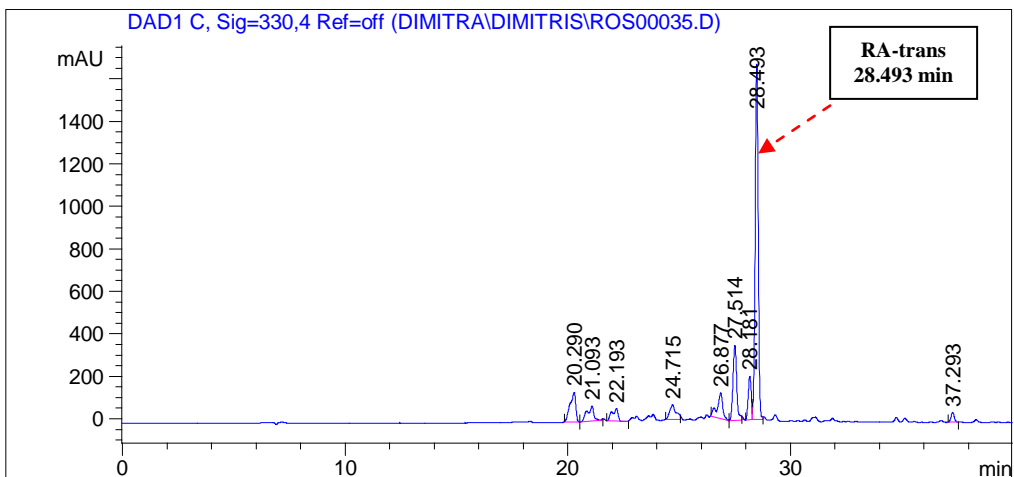
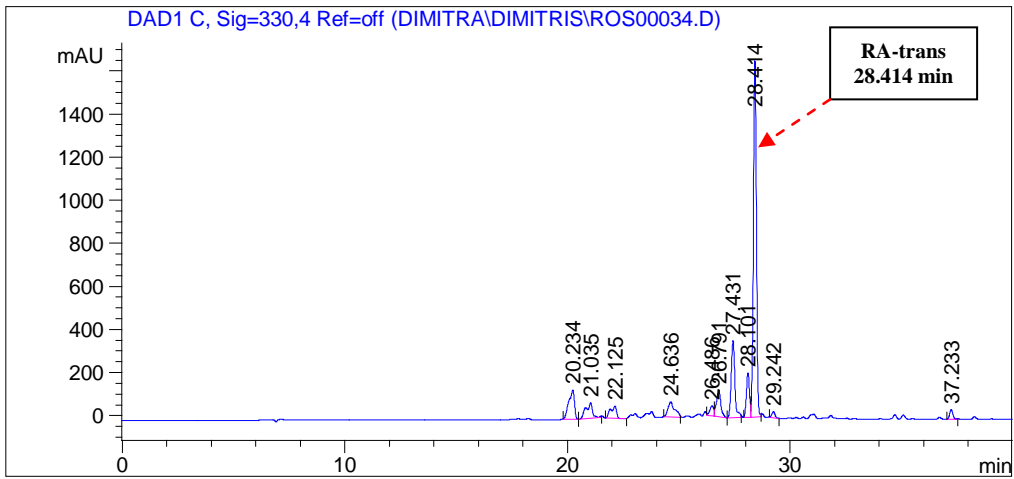
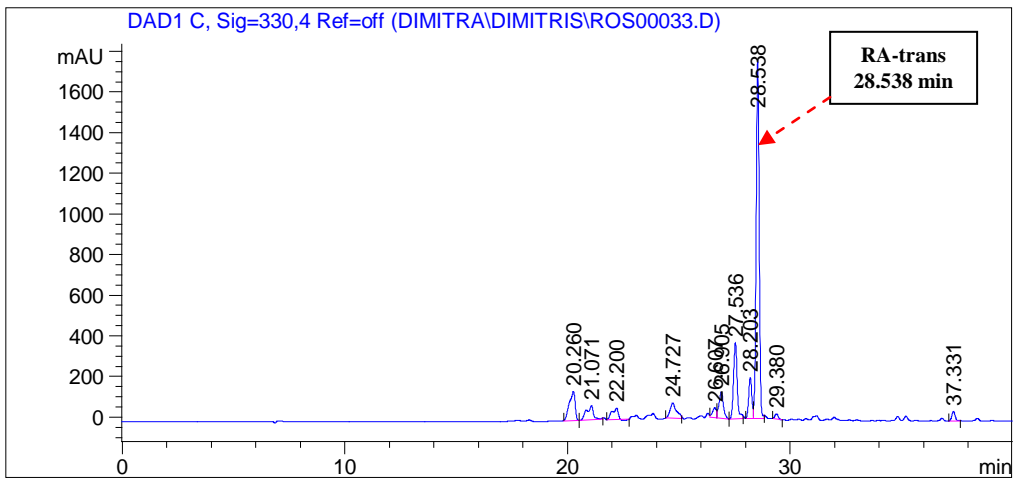


Θρούμπι-40

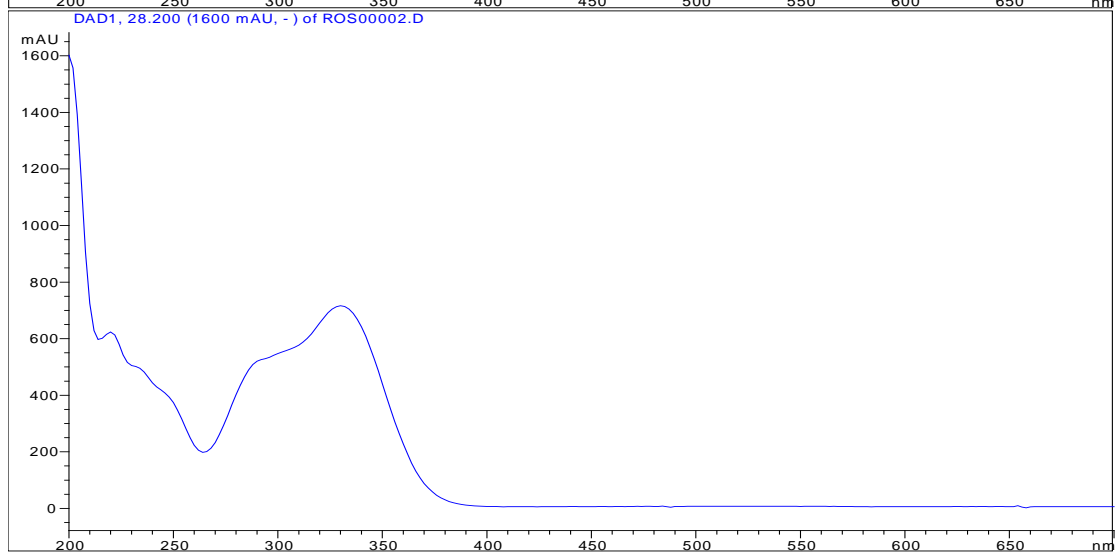
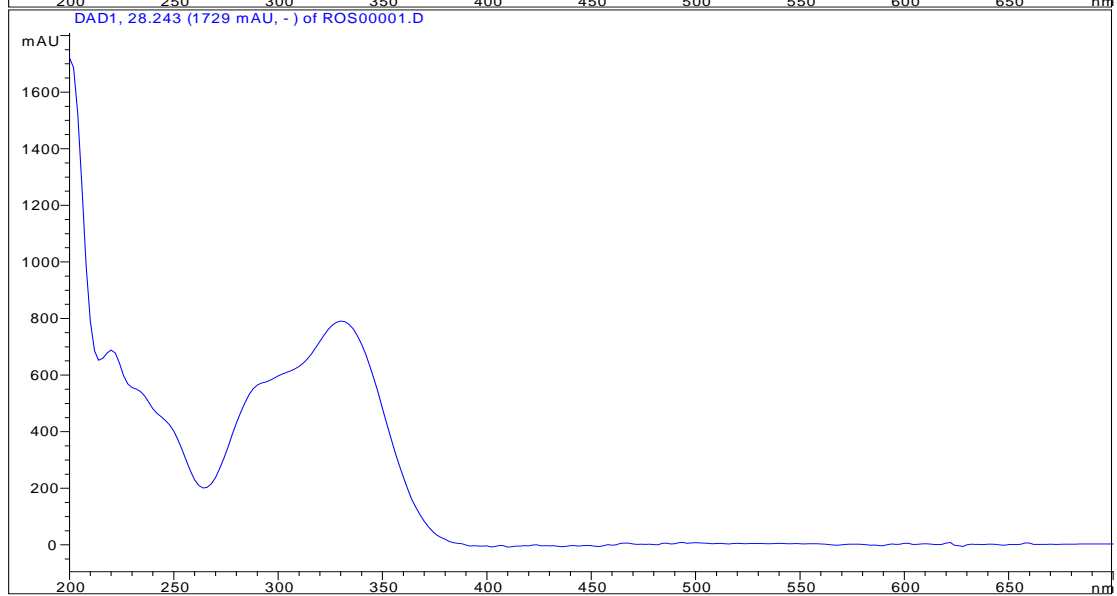
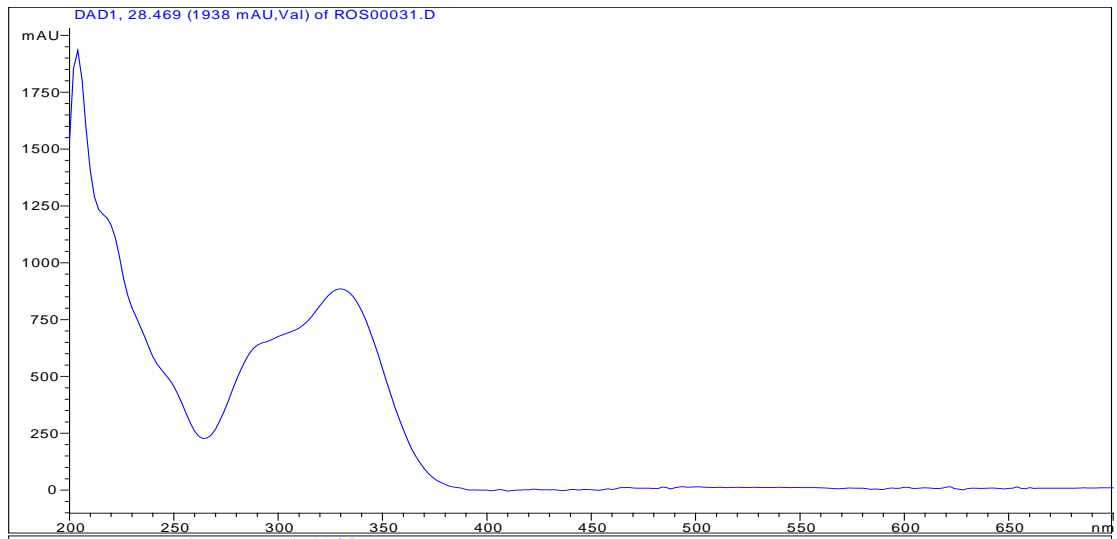




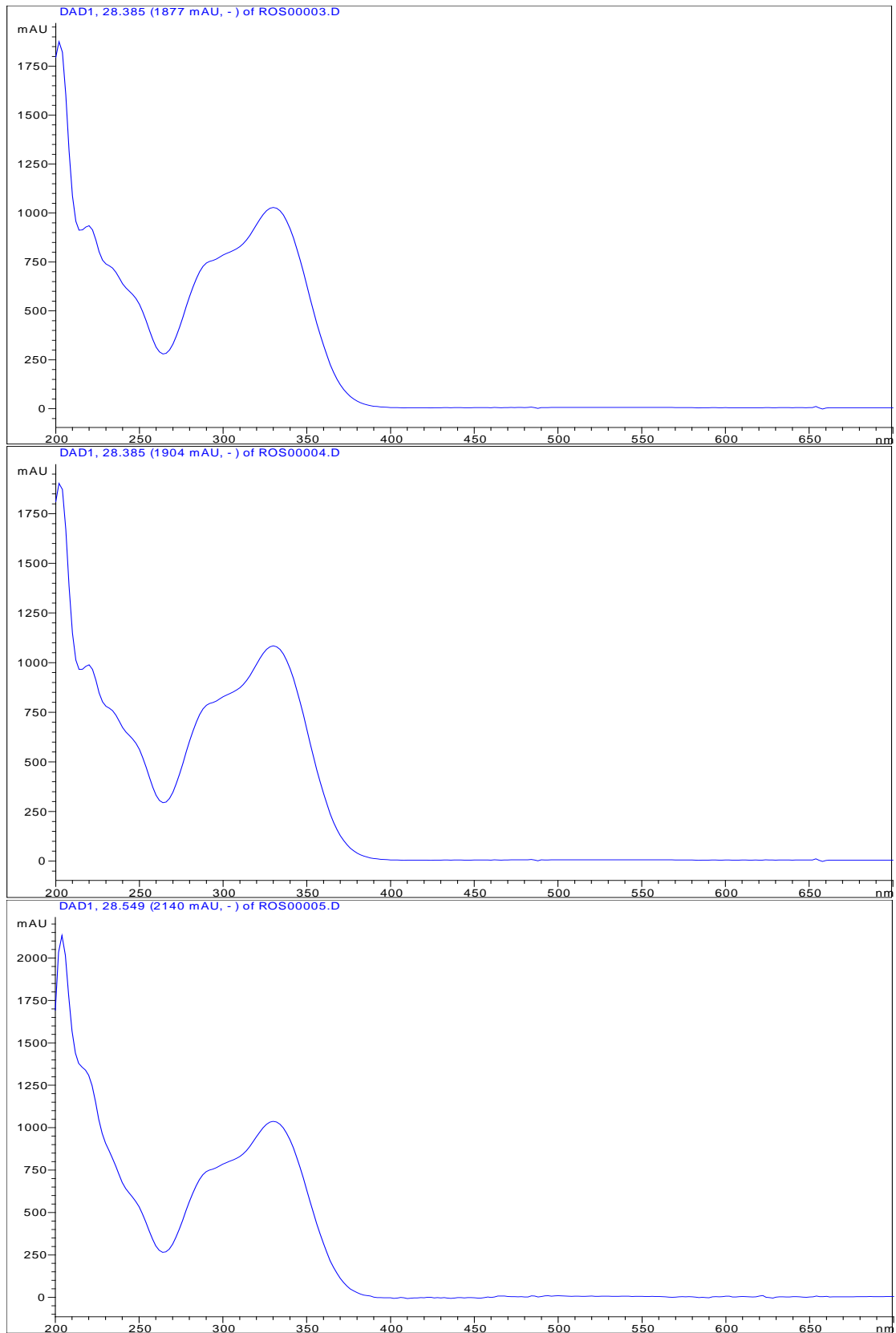
**Πίναξη-58**



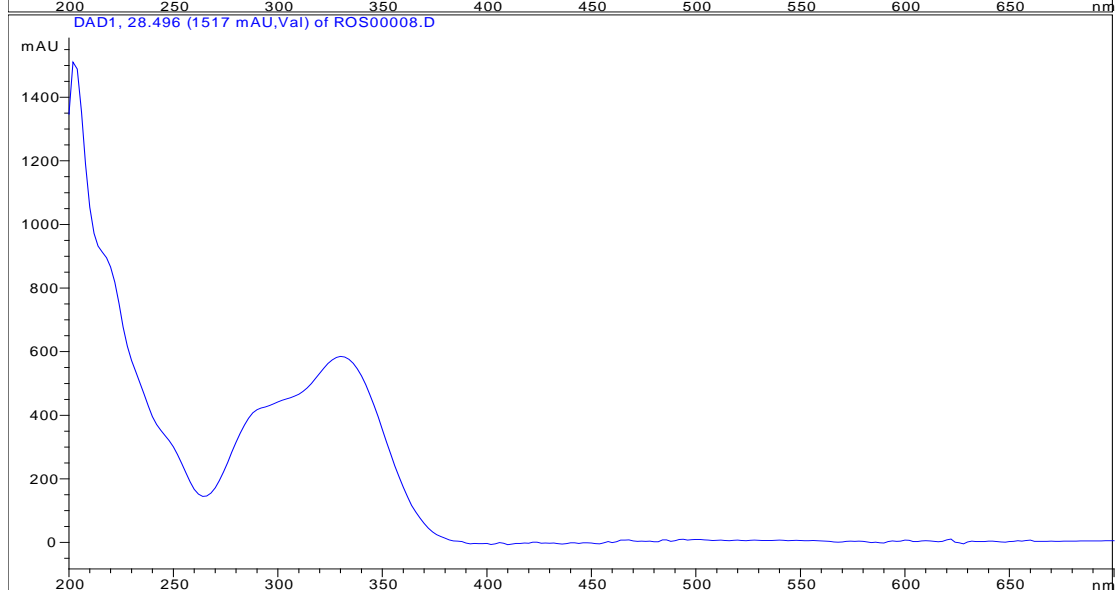
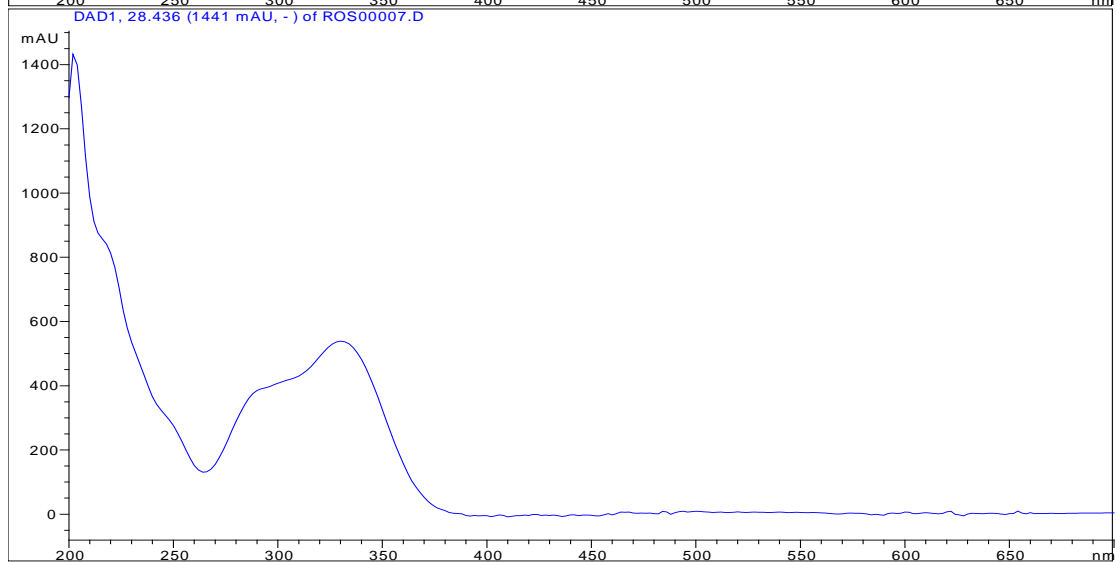
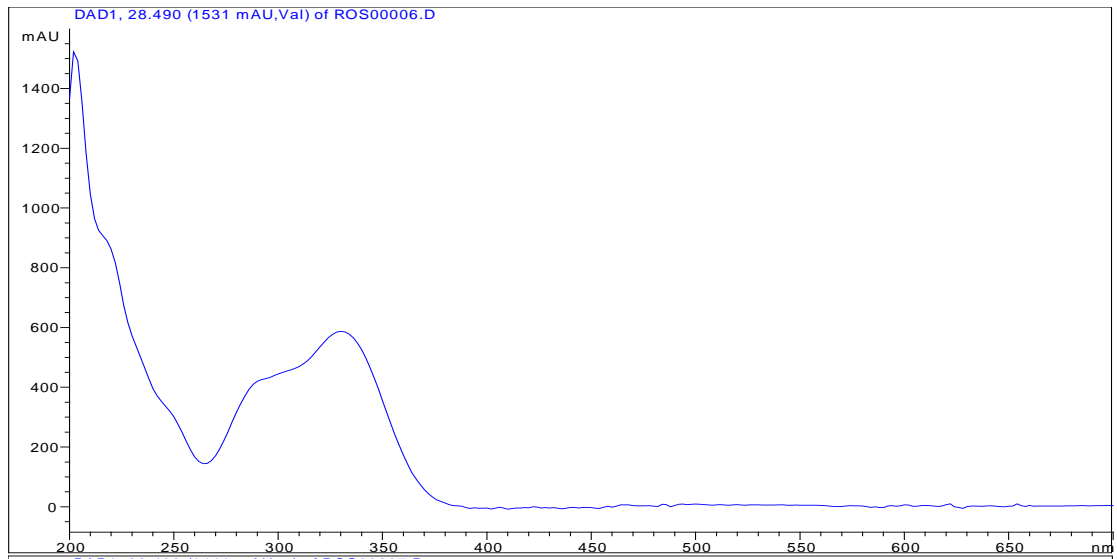
Φασκόμηλο-15



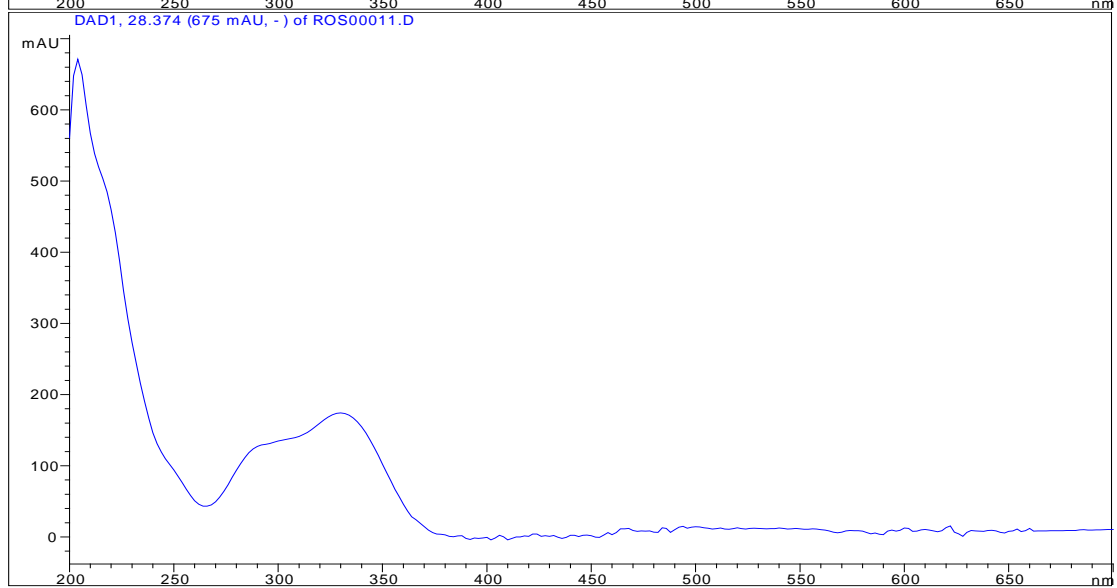
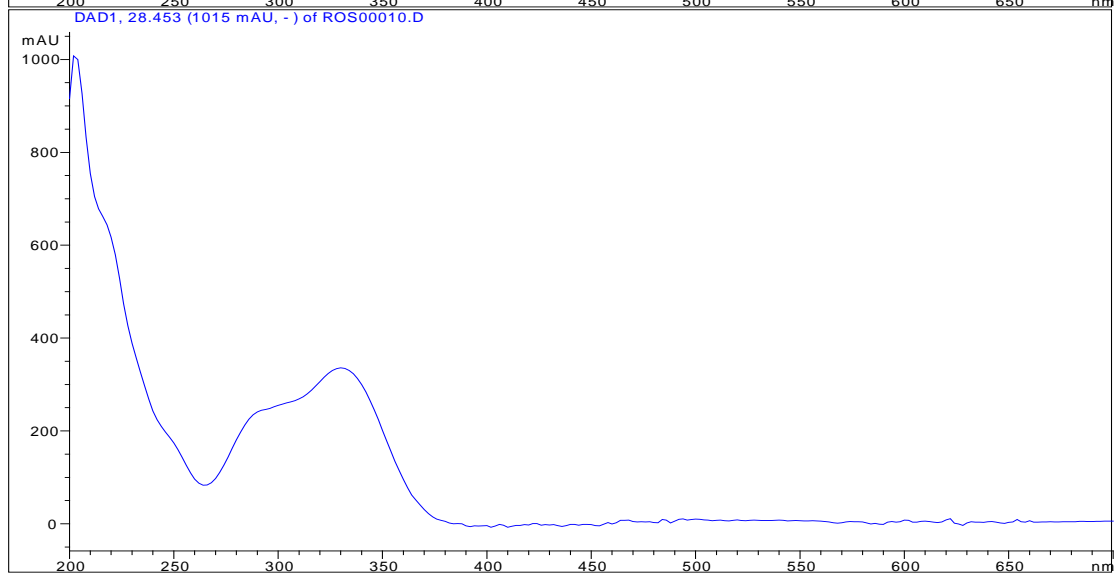
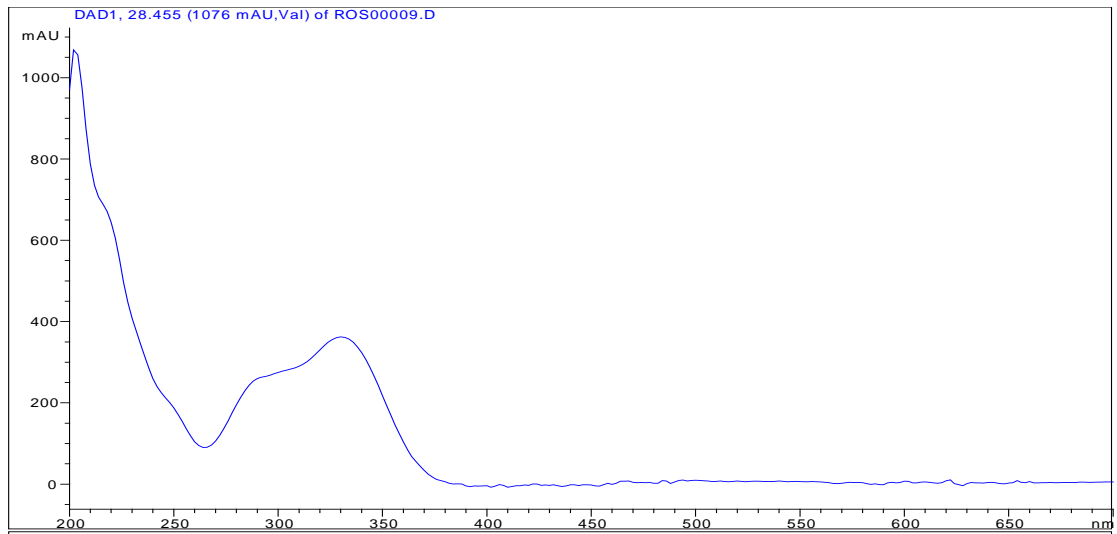
Φασκόμηλο-22



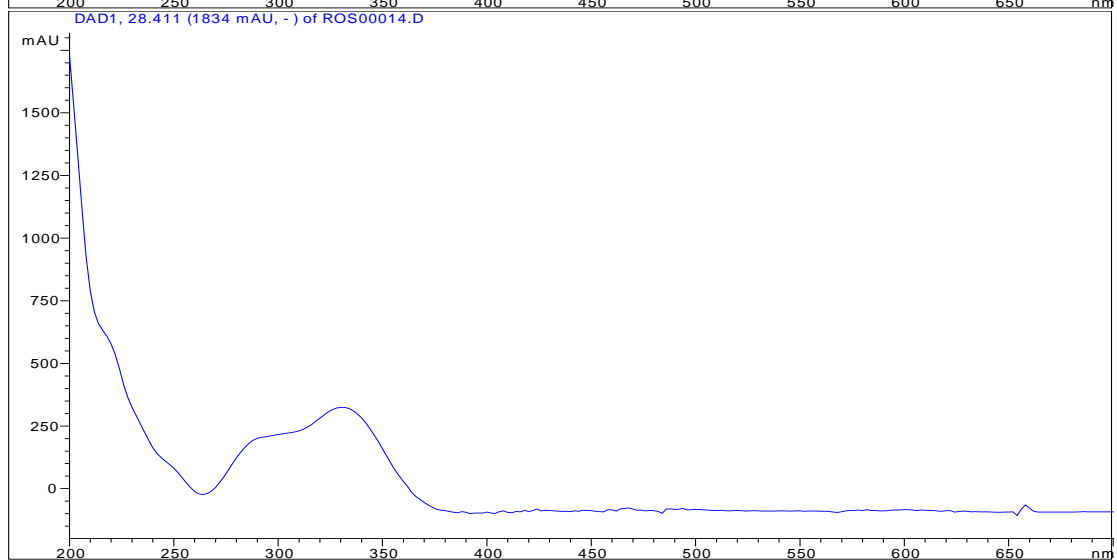
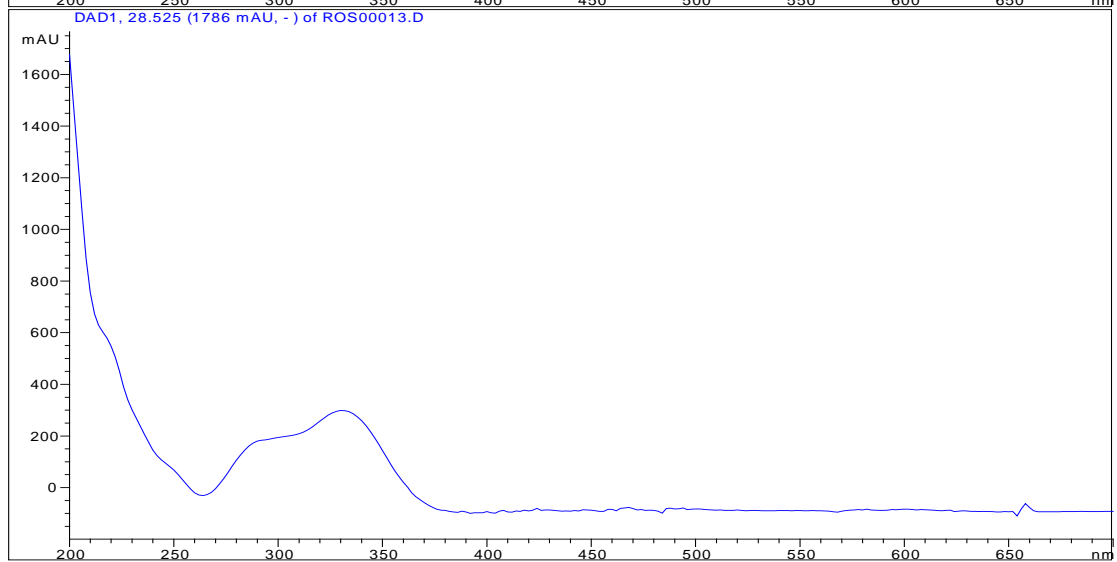
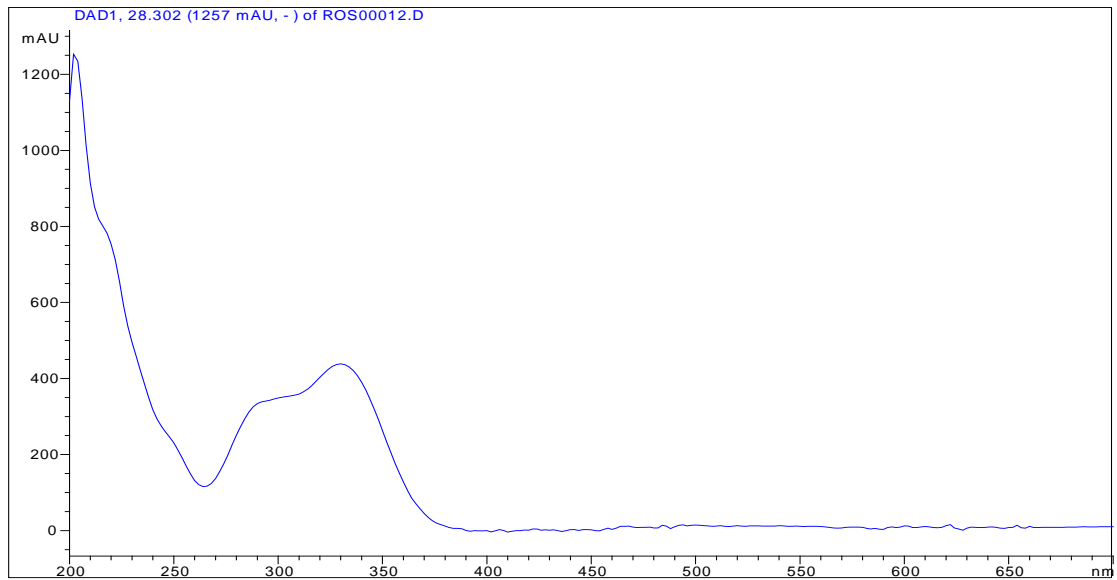
### Βασιλικός-43



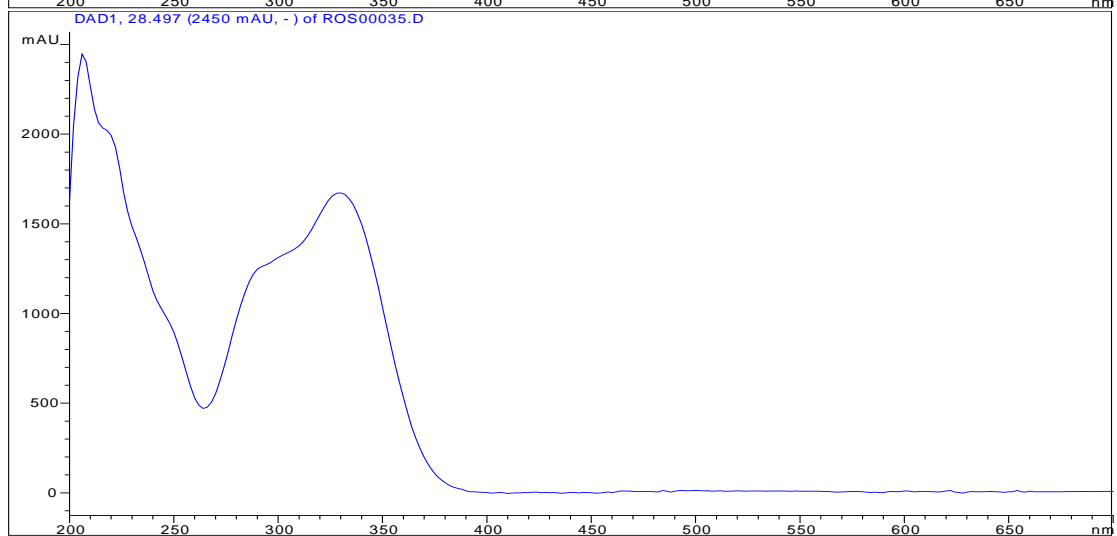
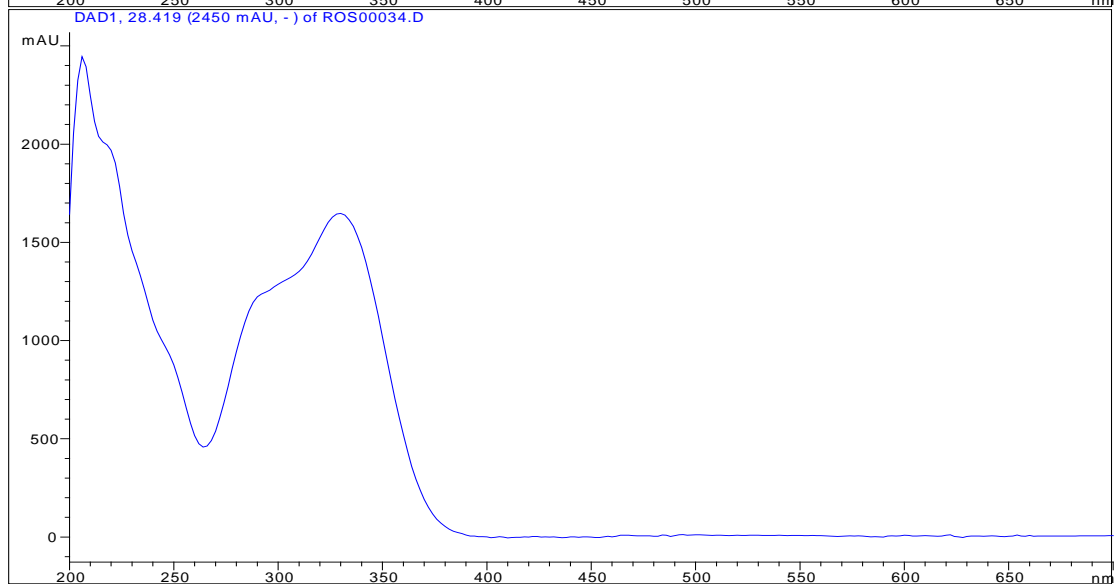
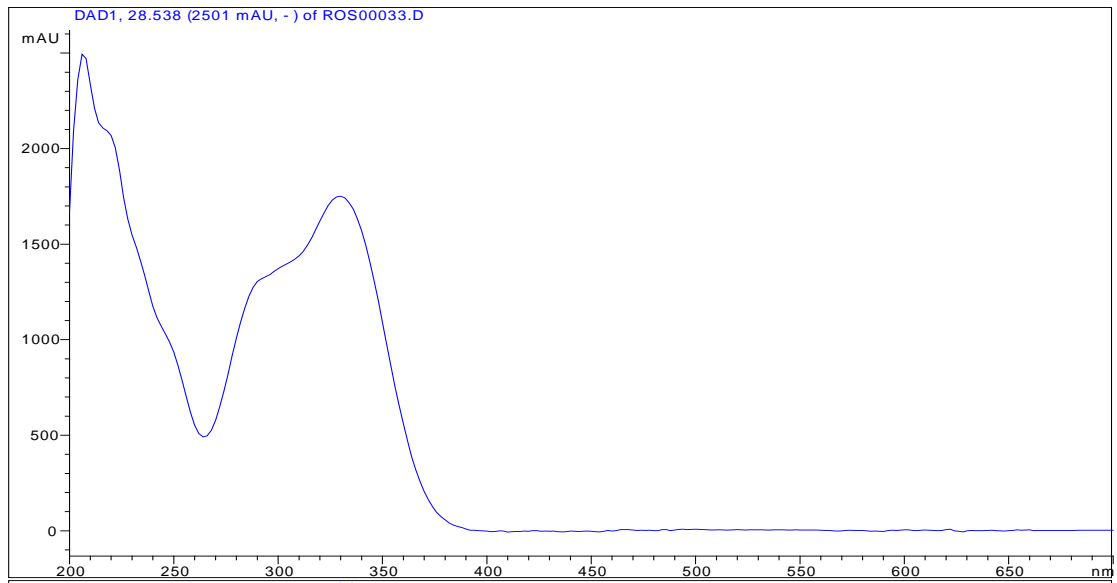
### Υσσωπος-29



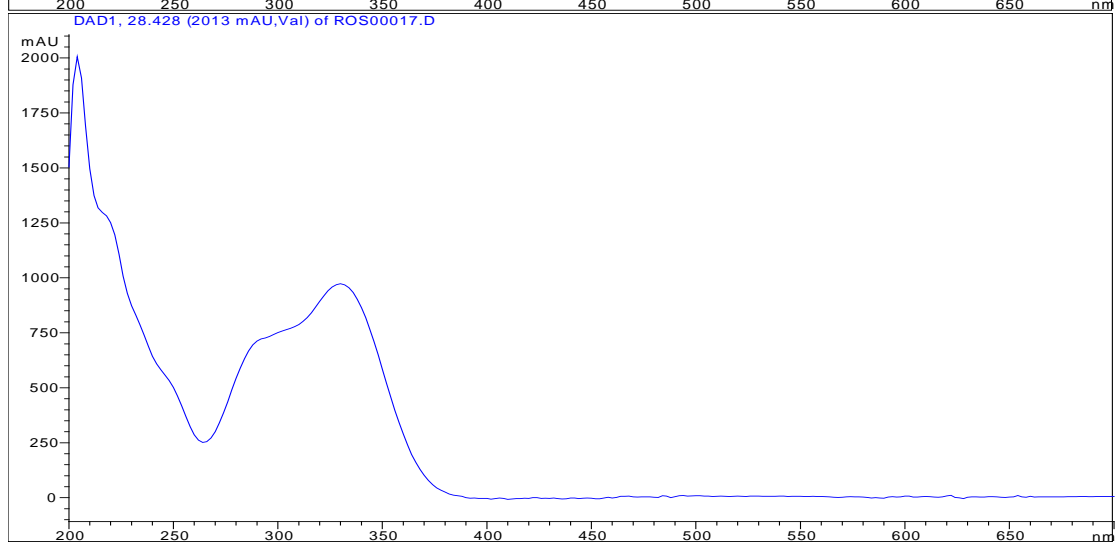
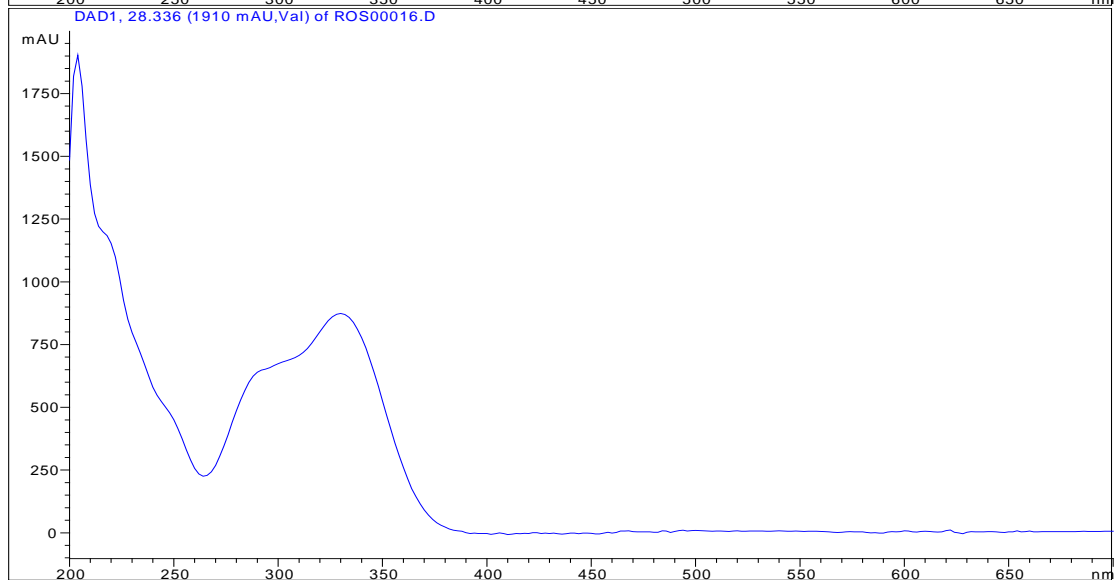
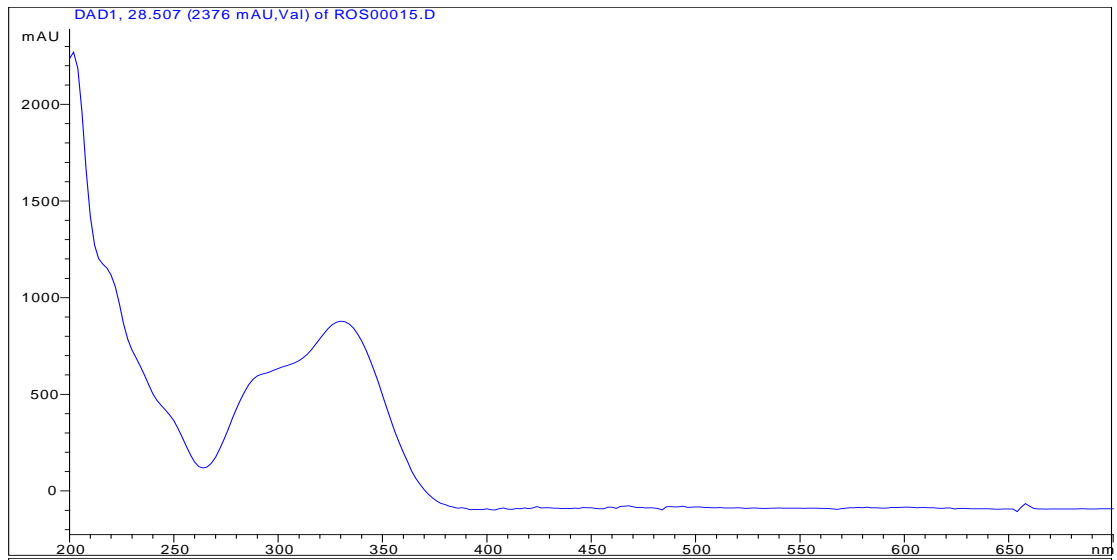
Ρίγανη-36



### Πίναξη-58

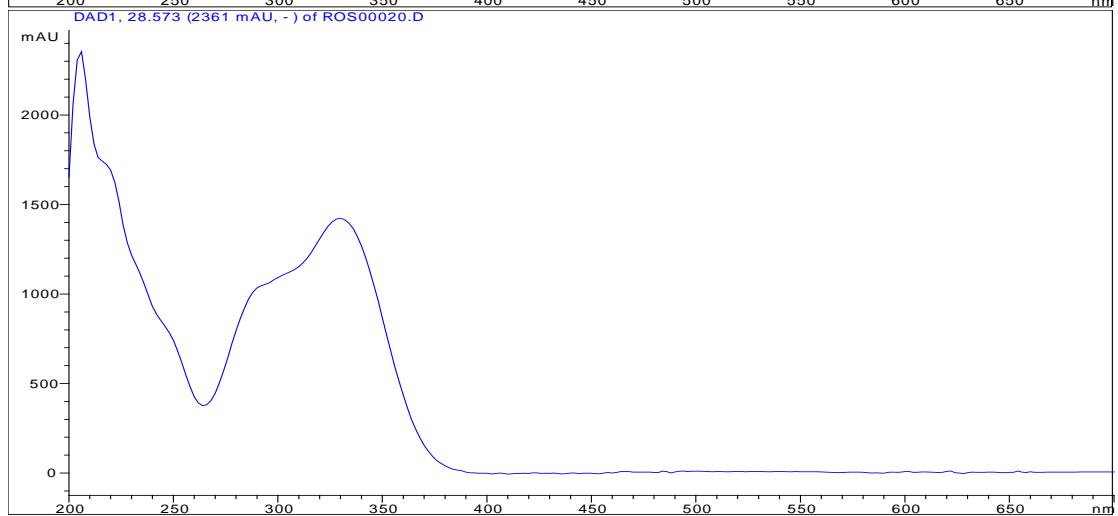
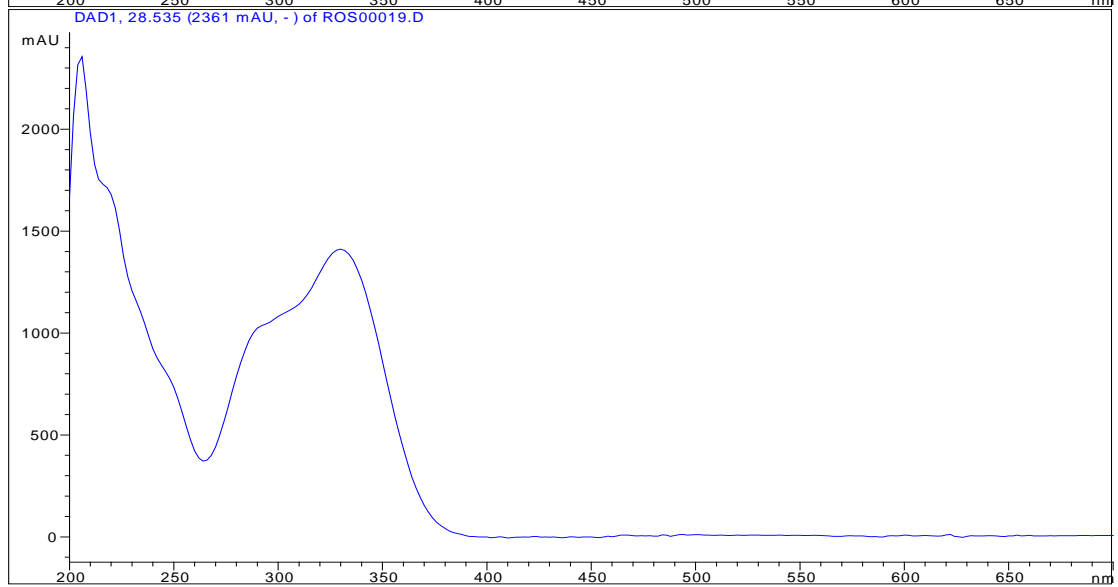
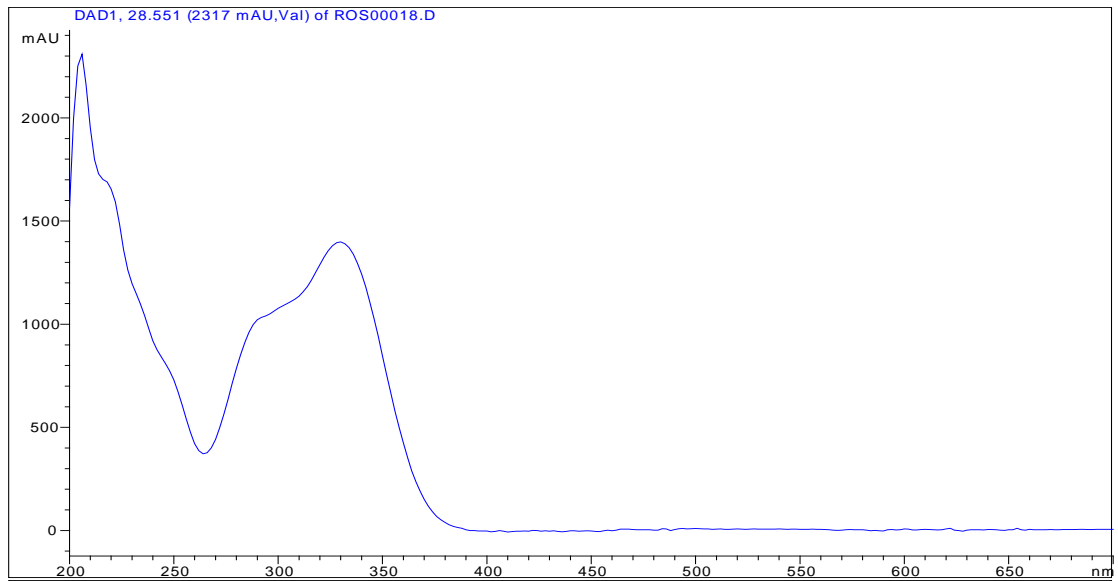


Θυμάρι-37

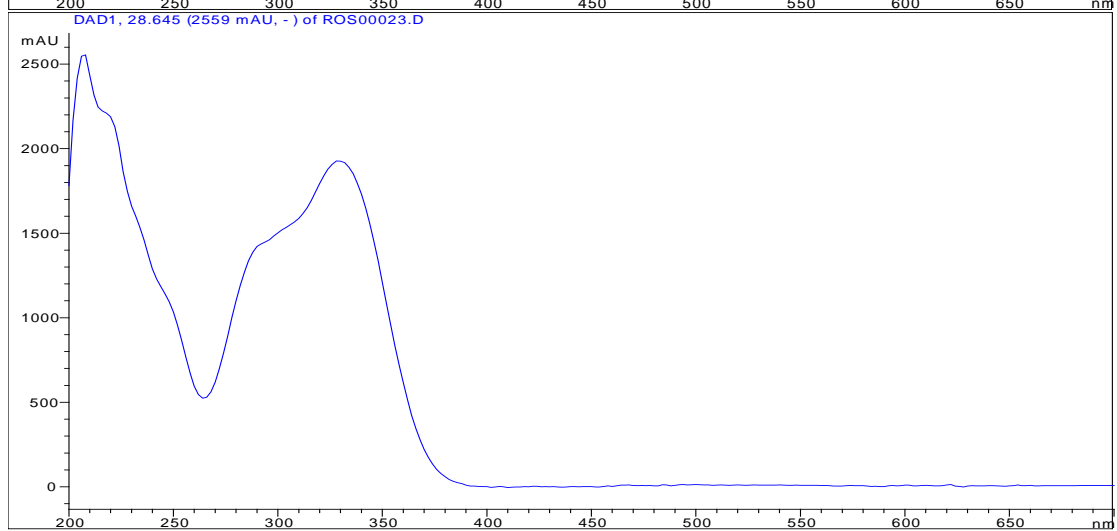
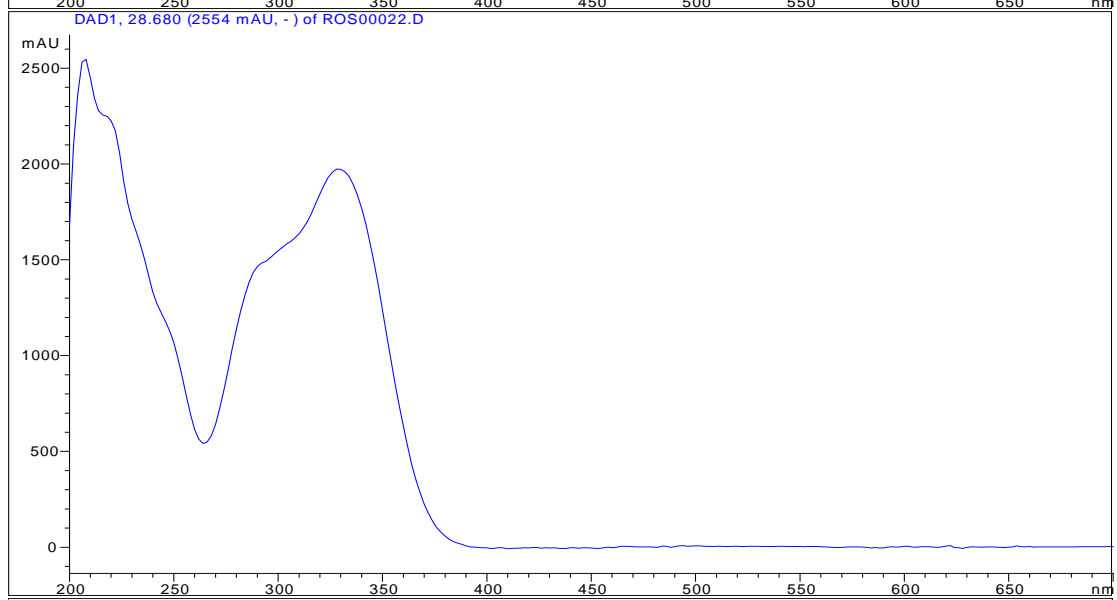
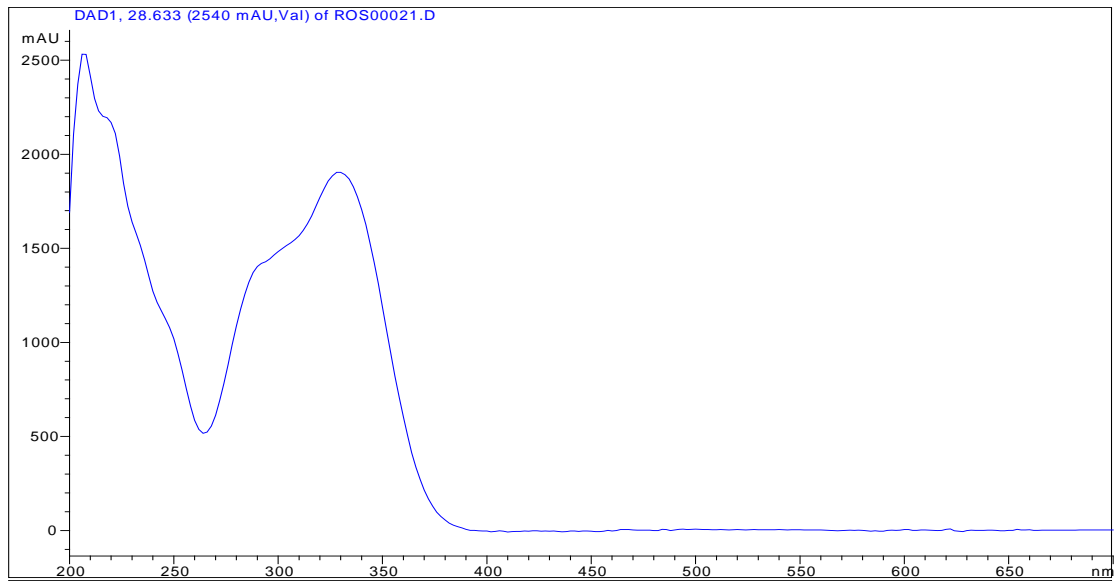




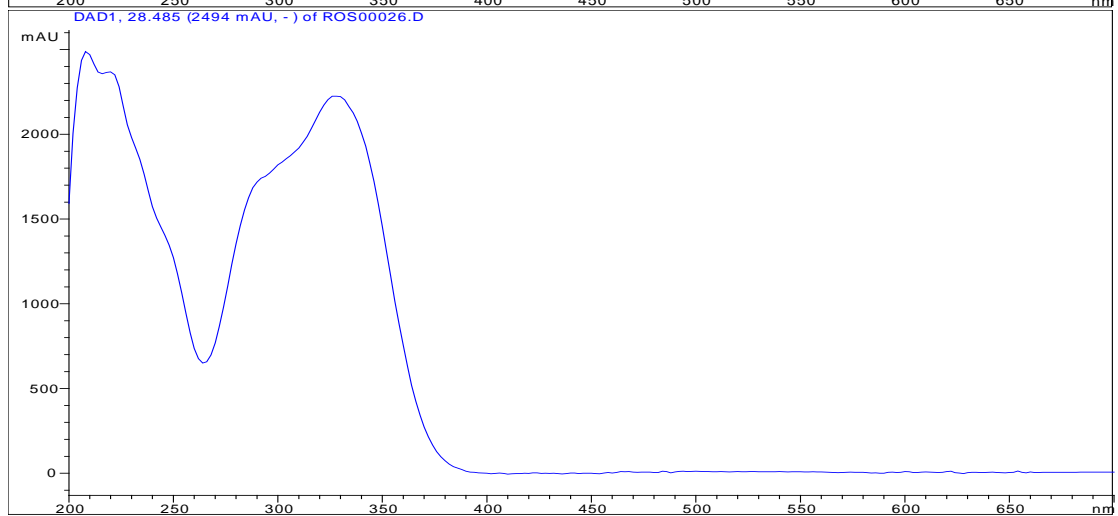
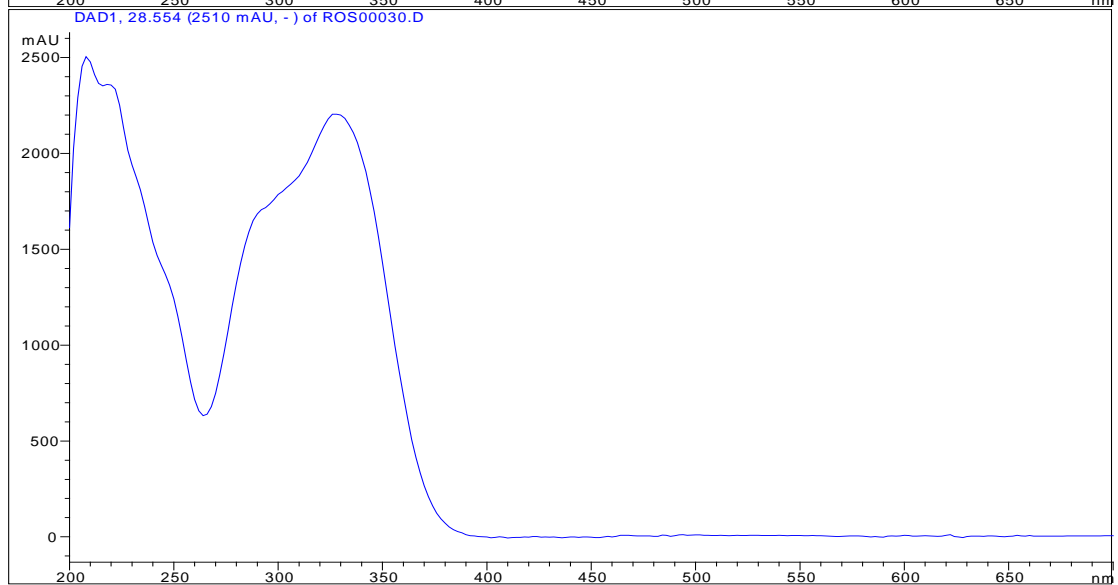
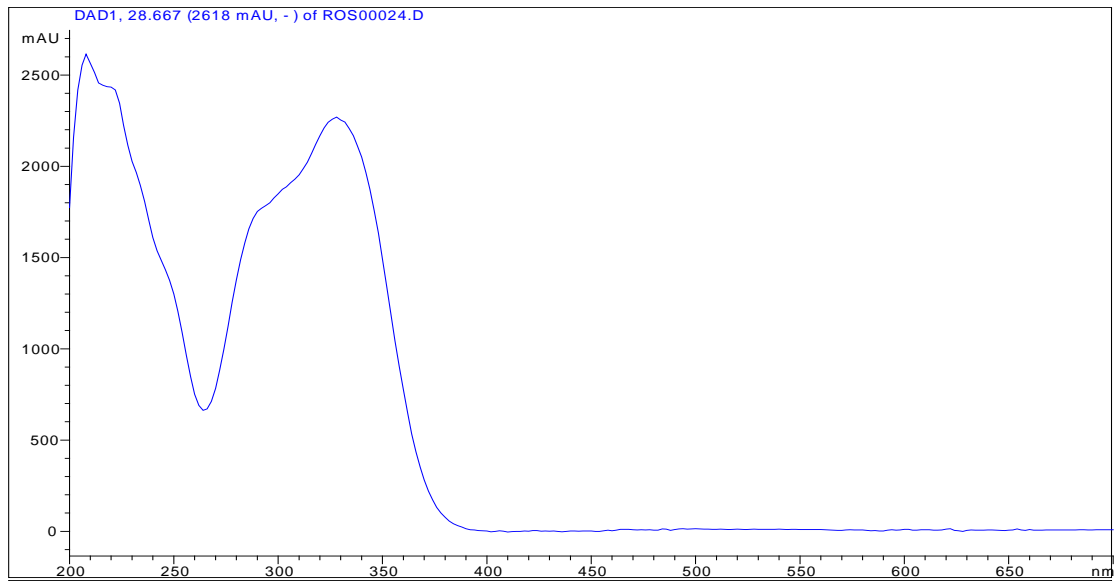
Δενδρολίβανο-26



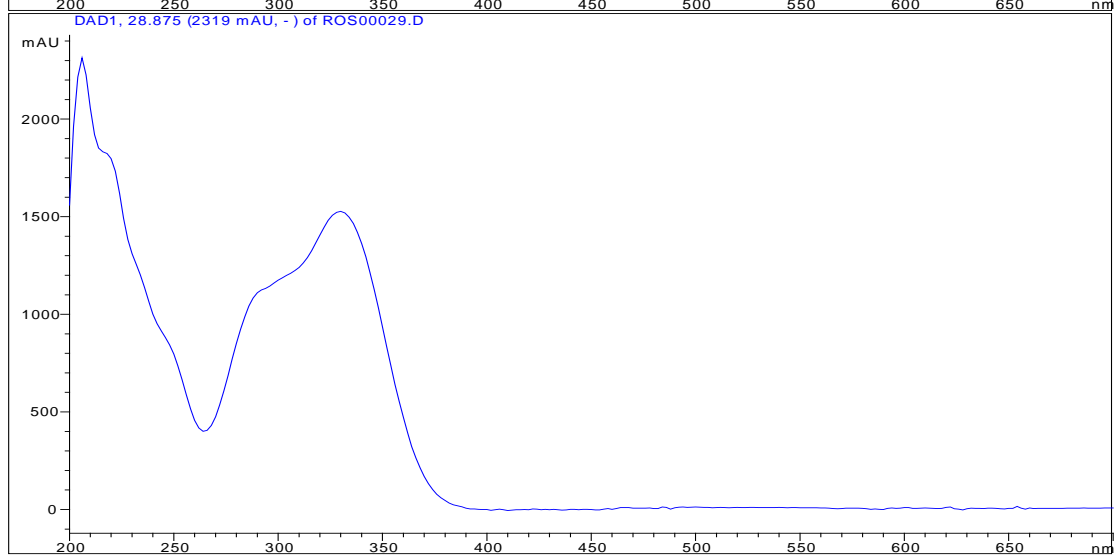
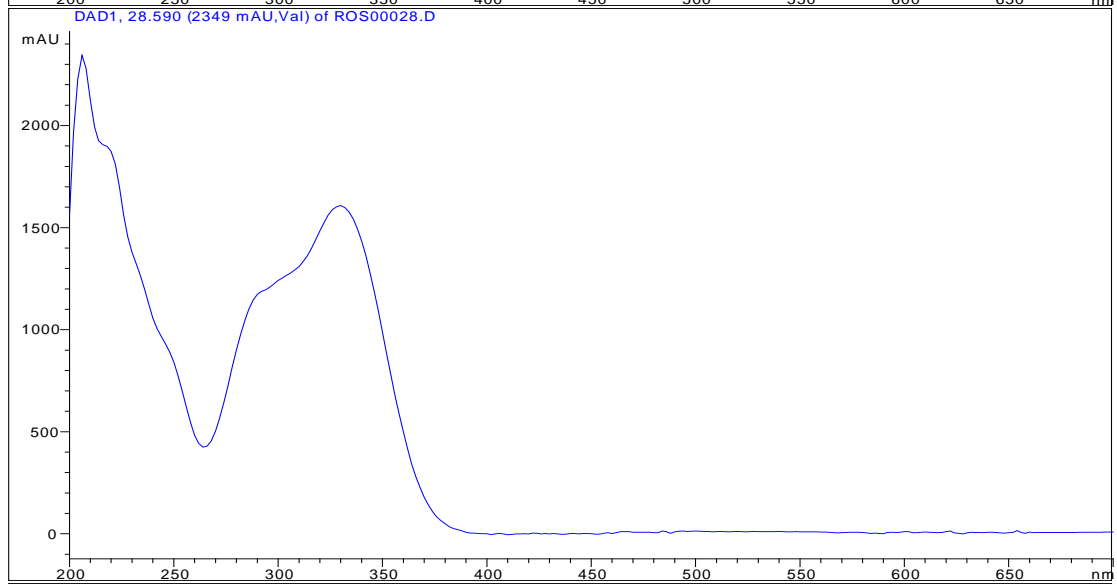
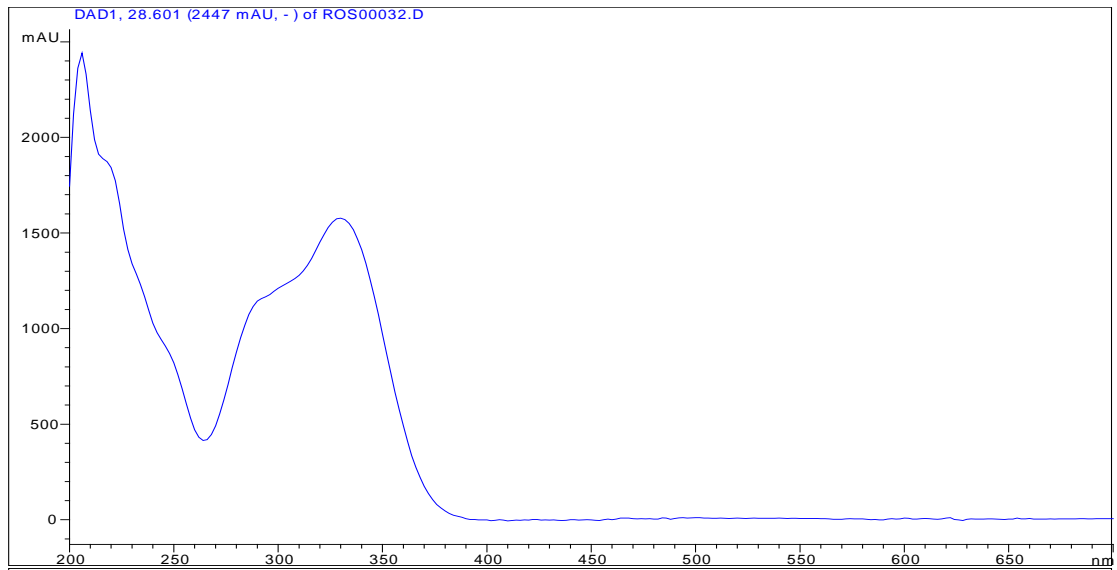
### Μελισσόχορτο-38



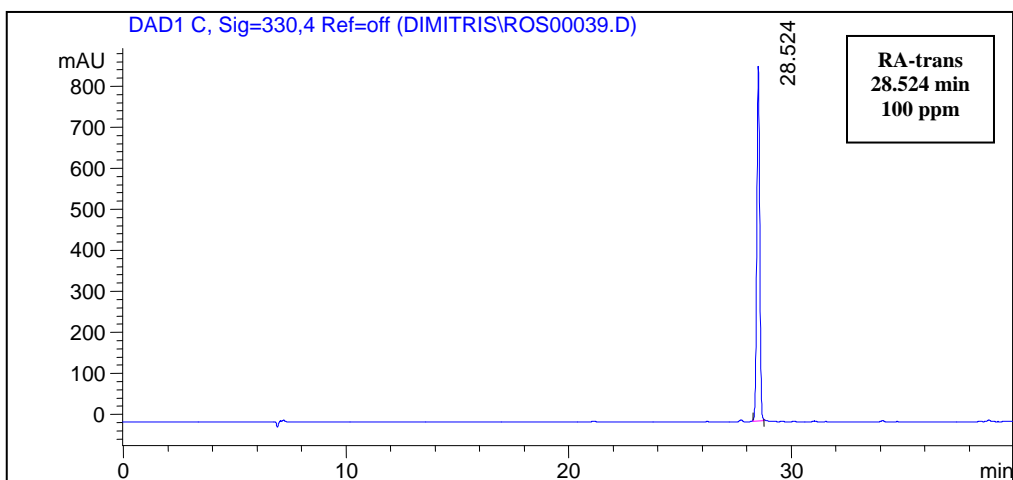
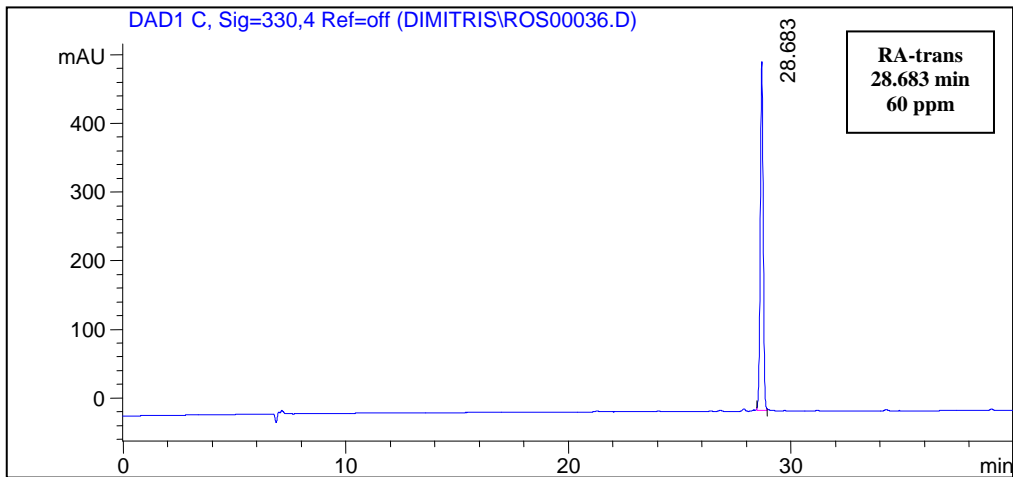
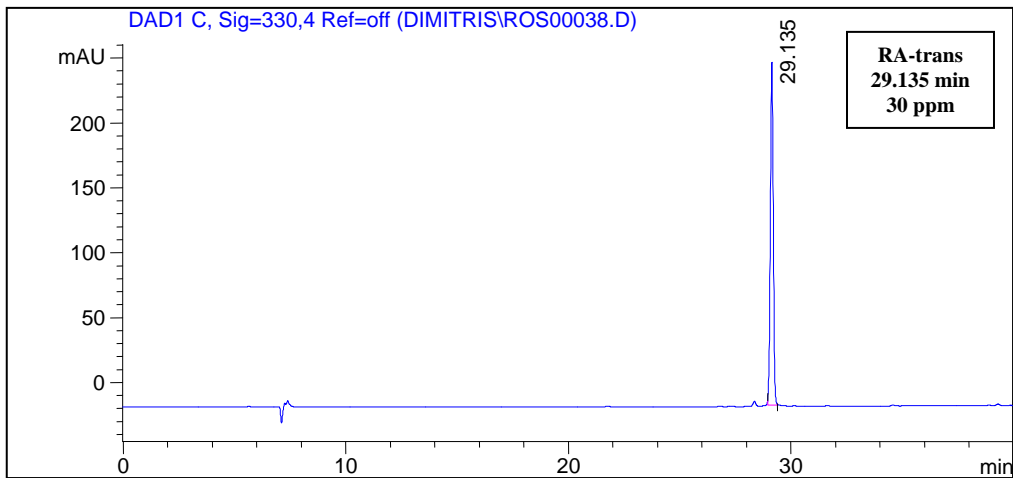
### Μελισσόχορτο-39

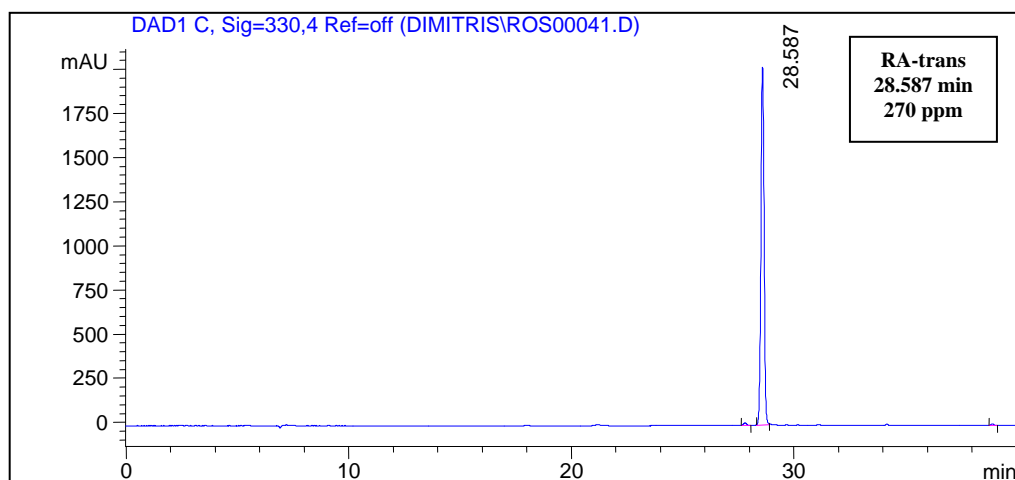
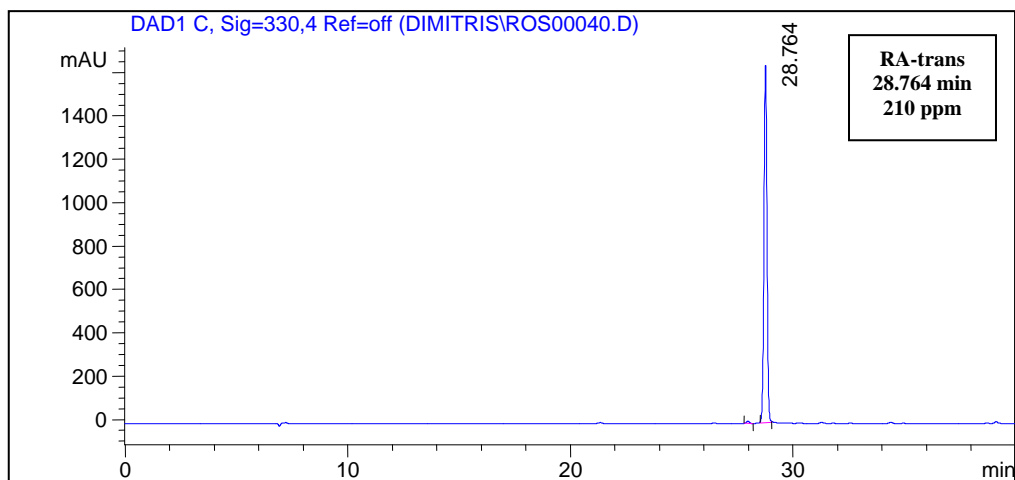
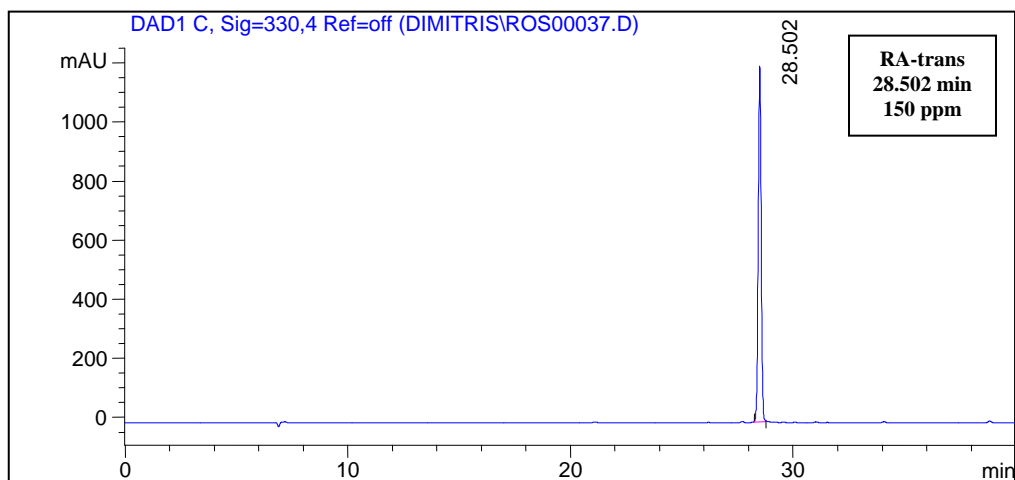


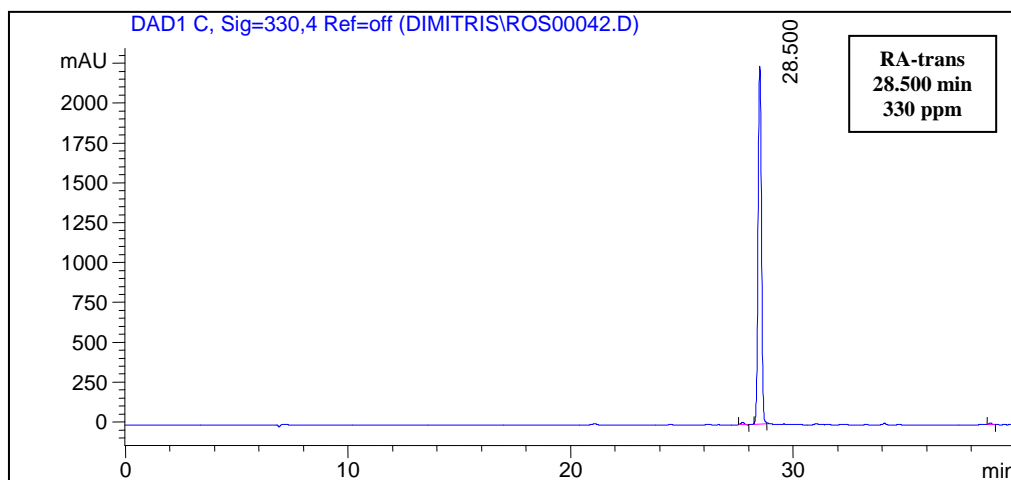
### Θρούμπι-40



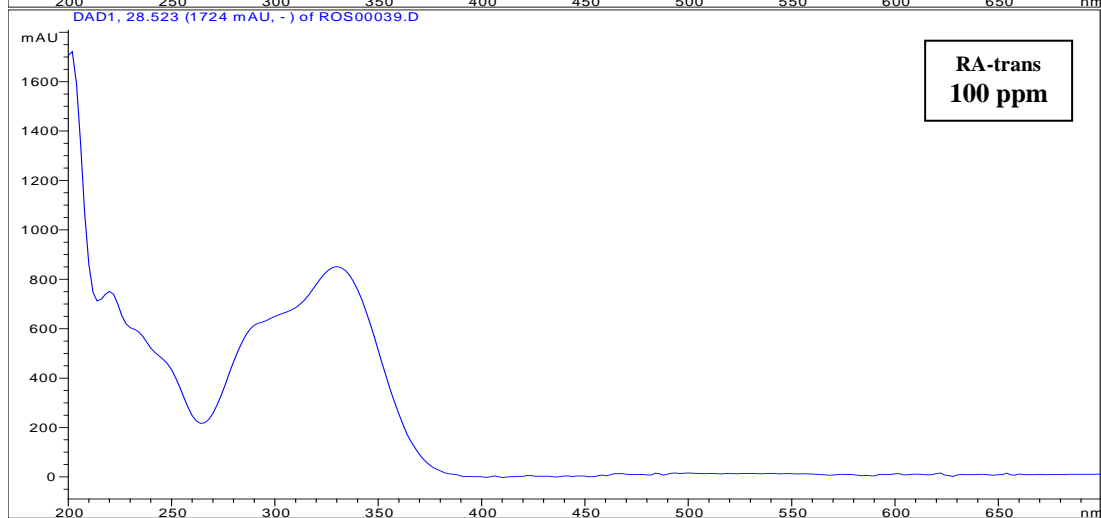
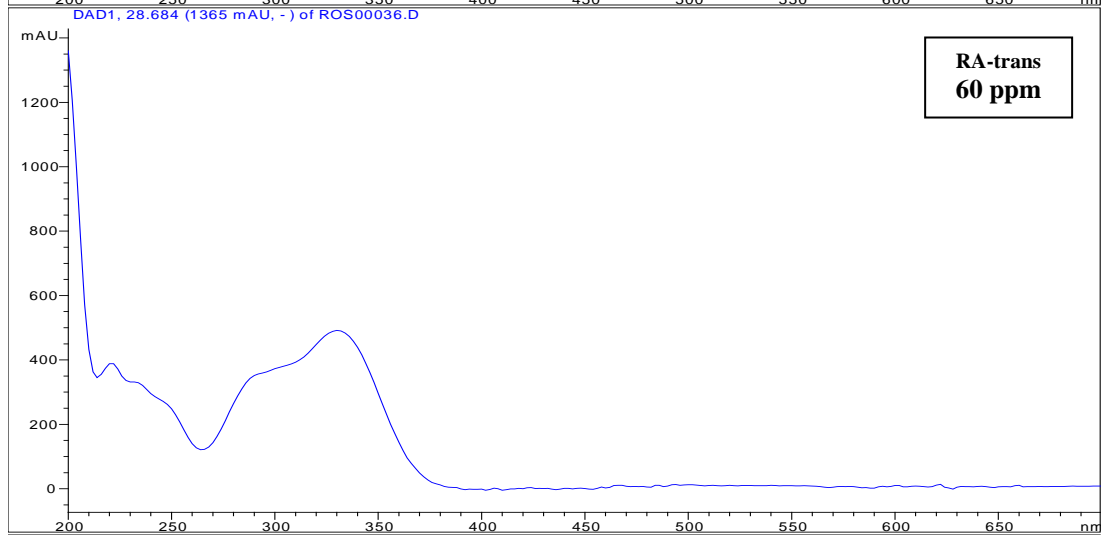
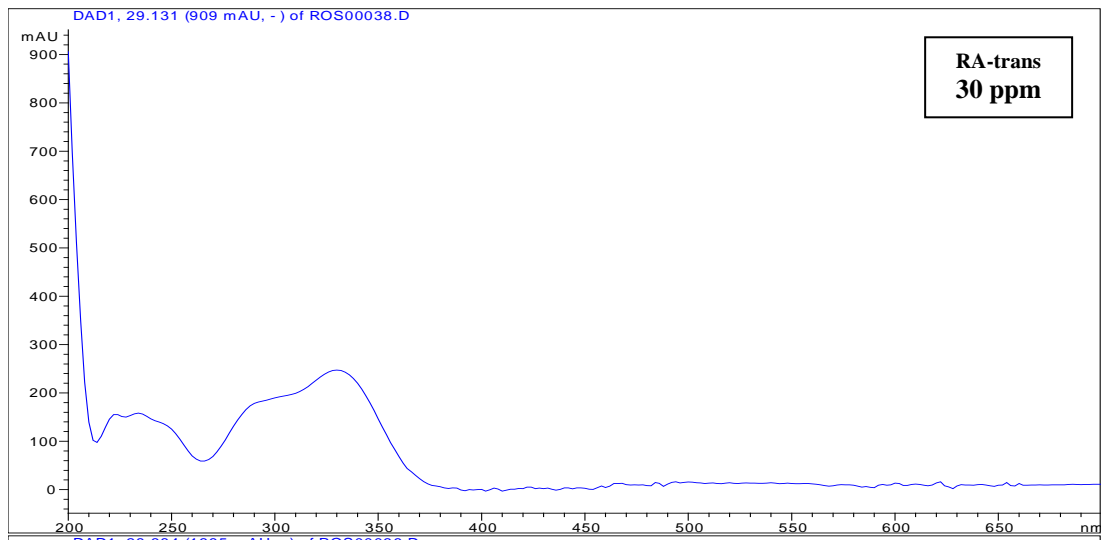
### Χρωματογραφήματα προτύπων RA



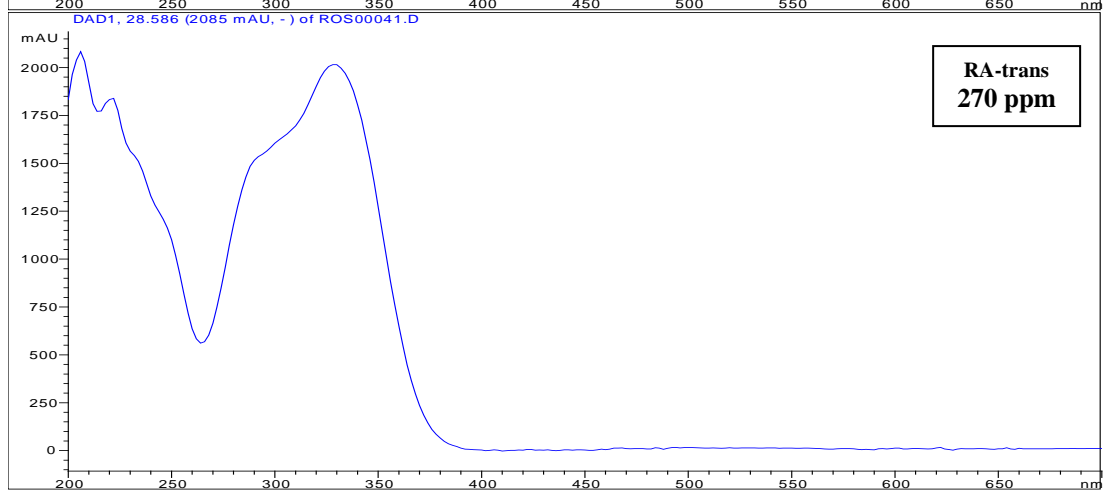
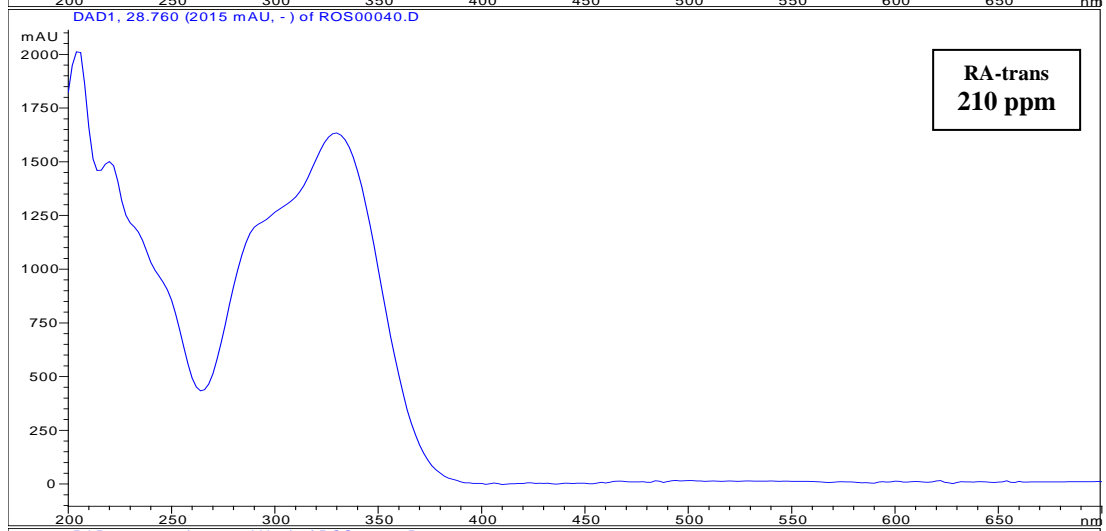
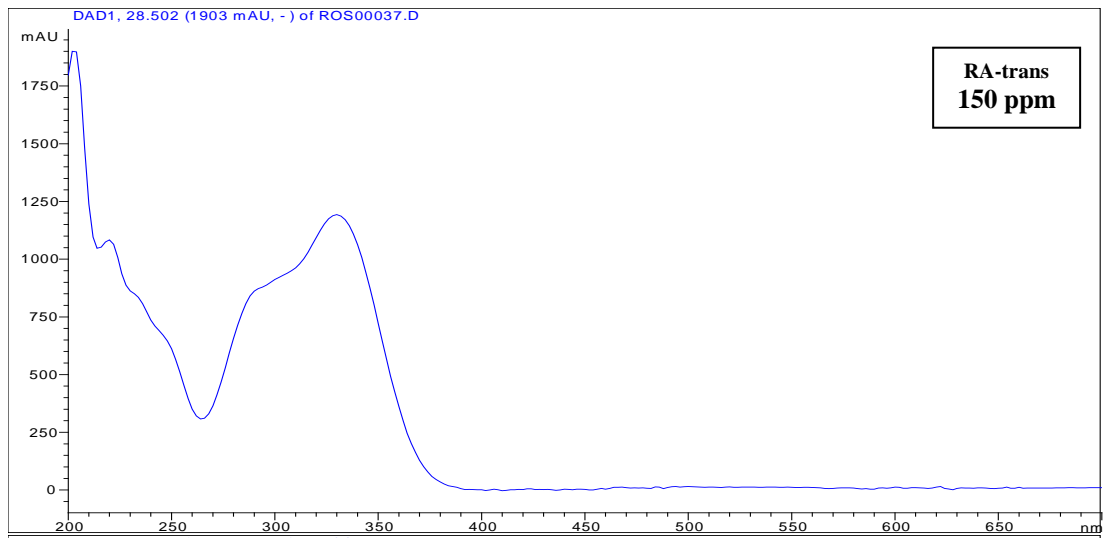


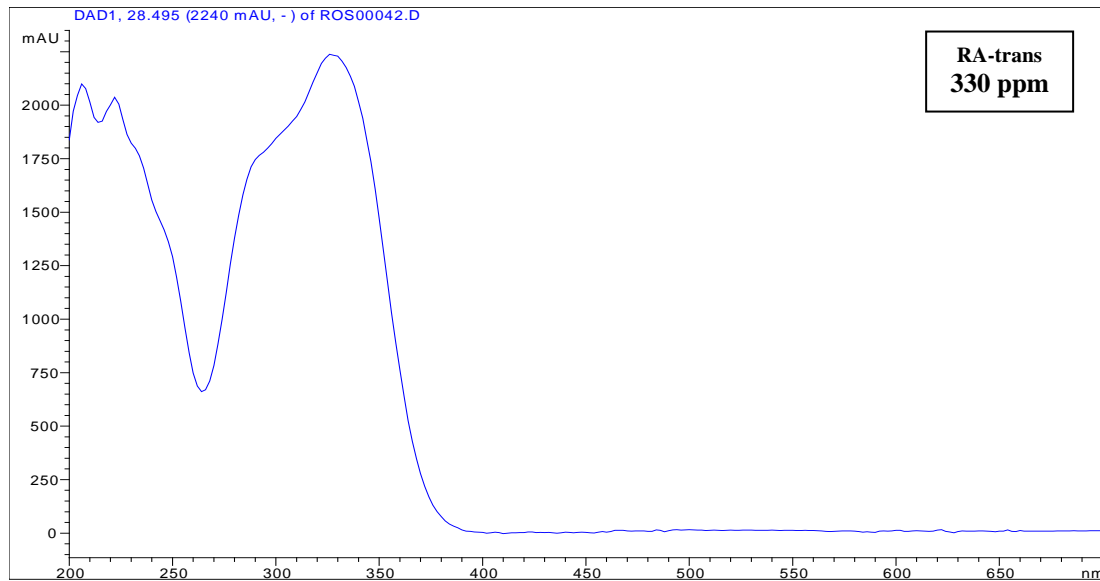


### Φάσματα UV-vis προτύπων RA









Πίνακας αποτελεσμάτων της ανάλυσης των προτύπων του RA με HPLC

Πρότυπο διάλυμα RA συγκέντρωσης σε (ppm)	Αριθμ. δείγμ.	Αρχείο χρωματογρ.	Χρόνος συγκράτησης $t_R$ (min)	Εμβαδόν κορυφής (mAU*s)	Ημερομηνία ένεσης	Πίεση στήλης* (bar)
30	1	ROS00038	29.135	2442.9	25/1/12	60-63
	2	ROS00043	28.723	2058.3	26/1/12	65-67
	3	ROS00053	28.725	2555.8	27/1/12	62-66
60	1	ROS00036	28.683	4677.3	25/1/12	63-67
	2	ROS00044	28.478	4223.0	26/1/12	63-65
	3	ROS00051	28.738	4776.1	27/1/12	64-66
100	1	ROS00039	28.524	8032.5	25/1/12	62-65
	2	ROS00045	28.563	7633.5	26/1/12	62-65
	3	ROS00055	28.509	7883.2	27/1/12	62-65
150	1	ROS00037	28.502	11312.6	25/1/12	63-65
	2	ROS00046	28.585	11631.3	26/1/12	62-66
	3	ROS00050	28.720	11181.1	27/1/12	66-68
210	1	ROS00040	28.764	15891.9	25/1/12	62-66
	2	ROS00047	28.547	16254.6	26/1/12	62-65
	3	ROS00056	28.491	16430.0	27/1/12	62-65
270	1	ROS00041	28.587	20476.3	25/1/12	62-65
	2	ROS00048	28.492	20631.3	26/1/12	62-65
	3	ROS00052	28.485	20698.2	27/1/12	62-65
330	1	ROS00042	28.500	24043.4	25/1/12	62-65
	2	ROS00049	28.489	24260.4	26/1/12	61-65
	3	ROS00054	28.636	24565.4	27/1/12	63-66

\* Η πίεση της στήλης, τη στιγμή της ένεσης και κατά την έκλουση της ουσίας (RA).