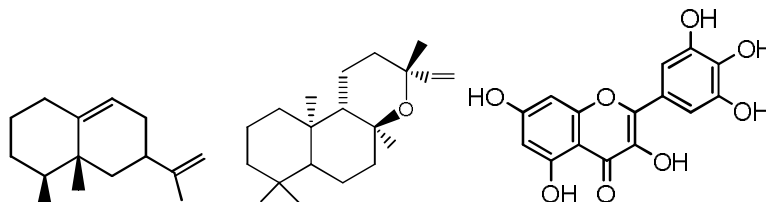


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
«ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

«Μελέτη του αιθερίου ελαίου και υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων
φυτών του γένους *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



Αναστασία Δ. Μπαστούνη

Γεωπόνος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ταραντίλης Πέτρος, Επίκ. Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Πολυσιού Μόσχος, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Γεωργίου Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Αθήνα
2011

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

**«Μελέτη του αιθερίου ελαίου και υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων
φυτών του γένους *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αναστασίας Δ. Μπαστούνη

Γεωπόνος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ταραντίλης Πέτρος, Επίκ. Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Πολυσίου Μόσχος, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Γεωργίου Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Αθήνα
2011

«...Κάτω στη γη πως καμαρώνει το αρχοντολόι του περιβολιού!
Όταν γυρίζει ο αλάδανος το αχτένιστο κεφάλι του
οι χαβούζες ξεχειλίζουνε κι η Ευαγγελίστρια μπαίνει
γυμνή σταλάζοντας αφρούς με αστερία στο μέτωπο
με αγέρι μοσχοκάρφης στα λυτά μαλλιά
κι ένα καβούρι που τρικλίζει ακόμη στον ηλιοκαμμένον ώμο της!...»

Γιάννης Ρίτσος από το ποίημα «Ναυτάκι του περιβολιού»



«Το γαλάζιο πουλί».

Τοιχογραφία από το παλάτι της Κνωσού.
Πάνω αριστερά διακρίνονται άνθη λαδανιάς.

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη, εισηγητή του θέματος και επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής για τη συνεχή καθοδήγηση, την άψογη συνεργασία, τις συμβουλές, την ενθάρρυνση και τη διόρθωση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα, ακόμα, να ευχαριστήσω το Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας του Γενικού Τμήματος και μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητή Μόσχο Πολυσίου για τη διάθεση του εργαστηριακού εξοπλισμού, τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του, τα επιστημονικά ερεθίσματα, αλλά και τη διόρθωση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Γεωργίου μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τις παρατηρήσεις και τα εποικοδομητικά του σχόλια στη διόρθωση της εργασίας.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες στην Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα για τη διαρκή και υπομονετική της επίβλεψη, βοήθεια και ψυχολογική στήριξη κατά τη διάρκεια της πειραματικής εργασίας και της επεξεργασίας και αξιολόγησης των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ πολύ τον Επίκ. Καθηγητή Αθανάσιο Κυμπάρη, τον Δρ. Χαράλαμπο Κανάκη, τους υποψήφιους διδάκτορες κα. Ειρήνη Αναστασάκη και κ. Ελευθέριο Πετράκη για τη βοήθειά τους στο εργαστήριο, και την κα. Νάντια Αστροκά για τη βοήθειά της στην ανάλυση LC/MS.

Ευχαριστώ και όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του Κλάδου ΙΙΙ, για το ενδιαφέρον και πλούσιο επιστημονικό ταξίδι που μου έδωσε τα εφόδια, ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία.

Πολλές εκ βαθέων ευχαριστίες σε όλα τα μέλη της οικογένειάς μου, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε αγωνία, δυσκολία, αλλά και χαρά σε όλη αυτή την προσπάθεια, δίνοντας μου κουράγιο και στήριξη για την επίτευξη των στόχων μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....	I
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	II
ABSTRACT.....	III
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Το γένος <i>Cistus</i>	1
1.2 Είδη του γένους <i>Cistus</i> της ελληνικής χλωρίδας.....	3
1.3 Δευτερογενείς Μεταβολίτες των φυτών του γένους <i>Cistus</i>	6
1.3.1 Δευτερογενείς Μεταβολίτες αιθερίου ελαίου.....	6
1.3.2 Δευτερογενείς Μεταβολίτες υδροαλκοολικού εκχυλίσματος.....	13
1.3.3 Βιολογικές δράσεις Δευτερογενών Μεταβολιτών.....	15
1.4 Χρήσεις των φυτών του γένους <i>Cistus</i>	19
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ	
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	21
2.1 Ανάλυση αιθερίου ελαίου.....	21
2.1.1 Τρόποι Παραλαβής.....	21
2.1.2 Αέρια Χρωματογραφία (GC/FID-GC/MS).....	22
2.2 Ανάλυση υδροαλκοολικού εκχυλίσματος.....	24
2.2.1 Τρόποι Παραλαβής.....	24
2.2.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών – Μέθοδος	
Folin-Ciocalteu.....	26
2.2.3 Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας – Μέθοδος	
του 2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλυδαζίου (DPPH).....	27
2.2.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC/DAD-LC/MS)..	30
3. ΣΚΟΠΟΣ.....	33
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
4. ΥΛΙΚΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
4.1 Φυτικό υλικό.....	35
4.2 Απομόνωση, παραλαβή και μελέτη του αιθερίου ελαίου.....	35

4.2.1 Απομόνωση-παραλαβή αιθερίου ελαίου.....	35
4.2.2 Μελέτη του αιθερίου ελαίου με GC/FID και GC/MS.....	37
4.3 Παραλαβή και μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων.....	38
4.3.1 Παραλαβή υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων.....	38
4.3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών	40
4.3.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής ενεργότητας.....	41
4.3.4 Ανάλυση υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανεστραμμένης Φάσης (HPLC/RP).....	42
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
5.1 Αποτελέσματα GC/FID και GC-MS – Συζήτηση	45
5.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού Ολικών Φαινολικών Συστατικών – Συζήτηση.....	66
5.3 Αποτελέσματα μελέτης της αντιοξειδωτικής ενεργότητας – Συζήτηση	68
5.4 Αποτελέσματα HPLC – Συζήτηση	72
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
BHT	Butylated Hydroxytoluene	Βουτυλιωμένο υδροξυτολουένιο
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής φωτοδιοδίων
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl	2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο
ECG	Epicatechin Gallate	Επικατεχίνη γαλλικού οξέος
ECGC	Epigallocatechin Gallate	Επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού οξέος
FID	Flame Ionization Detector	Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας
GAE	Gallic Acid Equivalent	Ισοδύναμο γαλλικού οξέος
GC	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
HD	Hydro-Distillation	Υδρο-απόσταξη
HPLC (LC)	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μαζών
MSDE	Micro- Steam Distillation Extraction	Μικρο-απόσταξη με υδρατμούς εκχύλιση με οργανικό διαλύτη
RP	Reversed Phase	Ανεστραμμένης Φάσης
USE	Ultra Sound Assisted Extraction	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους
ΟΦΣ	-	Ολικά Φαινολικά Συστατικά

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν: α) ο προσδιορισμός της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης του αιθερίου ελαίου των φύλλων φυτών του γένους *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας (Αιτωλοακαρνανίας, Κρήτης) με αναλύσεις GC/FID και GC/MS, β) η μελέτη υδροαλκοολικού και αλκοολικού εκχυλίσματος των φύλλων φυτών του γένους *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας, ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο DPPH και τη χημική τους σύσταση με αναλύσεις HPLC/DAD και LC/MS.

Αρχικά γίνεται εκτενής βιβλιογραφική αναφορά στο φυτικό υλικό του γένους *Cistus* και στους δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύονται στα είδη του. Επίσης, περιγράφονται οι τρόποι παραλαβής των δευτερογενών μεταβολιτών από τα φυτά και αναφέρονται οι μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών.

Στο πειραματικό μέρος περιγράφεται το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και η προέλευσή του, καθώς και οι τεχνικές παραλαβής του αιθερίου ελαίου από αυτό με απόσταξη σε συσκευή Clevenger και με μικρο-απόσταξη και εκχύλιση σε οργανικό διαλύτη σε συσκευή Lickens-Nickerson. Η ανάλυσή του έγινε με αέρια χρωματογραφία GC/FID και GC/MS. Επιπλέον, παραλήφθηκαν υδροαλκοολικά εκχυλίσματα με την τεχνική της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους τα οποία εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και ως προς την αντιοξειδωτική τους ενεργότητα με τη μέθοδο DPPH, αντίστοιχα. Επίσης, στα εκχυλίσματα έγινε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης HPLC/DAD και LC/MS.

Τα αιθέρια έλαια των φυτών *Cistus* αποτελούνται κυρίως από σεσκιτερπένια και οξυγονωμένα σεσκιτερπένια, καθώς και από λαβδανικά διτερπένια, ανεξάρτητα από την περιοχή συλλογής του φυτικού υλικού. Τα εκχυλίσματα είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά και παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC με την οποία διαπιστώθηκε η παρουσία φαινολικών οξέων και πολυφαινολών σε όλα τα εκχυλίσματα λαδανιάς.

ABSTRACT

The aim of this study was: a) the definition of the qualitative and the quantitative composition of the essential oil of the leaves of genus *Cistus* of the greek flora (Etoloakarnania, Crete) with GC/FID and GC/MS analysis, b) the study of aqueous alcohol extracts of the leaves of genus *Cistus* of the greek flora, for their total phenolic content with the Folin-Ciocalteu method, for their antioxidant activity with the DPPH method and for their chemical composition with HPLC/DAD και LC/MS analysis.

At first a detailed account to the plant material of genus *Cistus* and to the secondary metabolites of its species, is given. Furthermore, the distillation and the extraction techniques that are being used for the delivery of secondary metabolites of the plants are described as well as the instrumental methods of analysis that are applied for the separation and identification of these metabolites.

The experimental part provides a description of the plant material that was used and its origin and delivery techniques of its essential oil such as hydrodistillation with Clevenger apparatus and micro-distillation extraction in organic solvent with Lickens–Nickerson apparatus. The analysis of the essential oil was carried out with GC/FID and GC/MS analysis. Moreover, aqueous alcohol extracts were delivered by the ultra sound assisted extraction technique, which were screened for their total phenolic content with the Folin-Ciocalteu method and for their antioxidant activity with the DPPH method. To these extracts HPLC/DAD and LC/MS analysis were carried out, as well.

The essential oils of the *Cistus* plants were mostly consisted of sesquiterpenes and oxygenated sesquiterpenes as well as of labdane-type diterpenes, regardless of the plant origin. The extracts showed a high total phenolic content and a significant antioxidant activity. These data were confirmed by the results of the HPLC analysis by which the presence of phenolic acids and polyphenols was observed in all plant extracts.

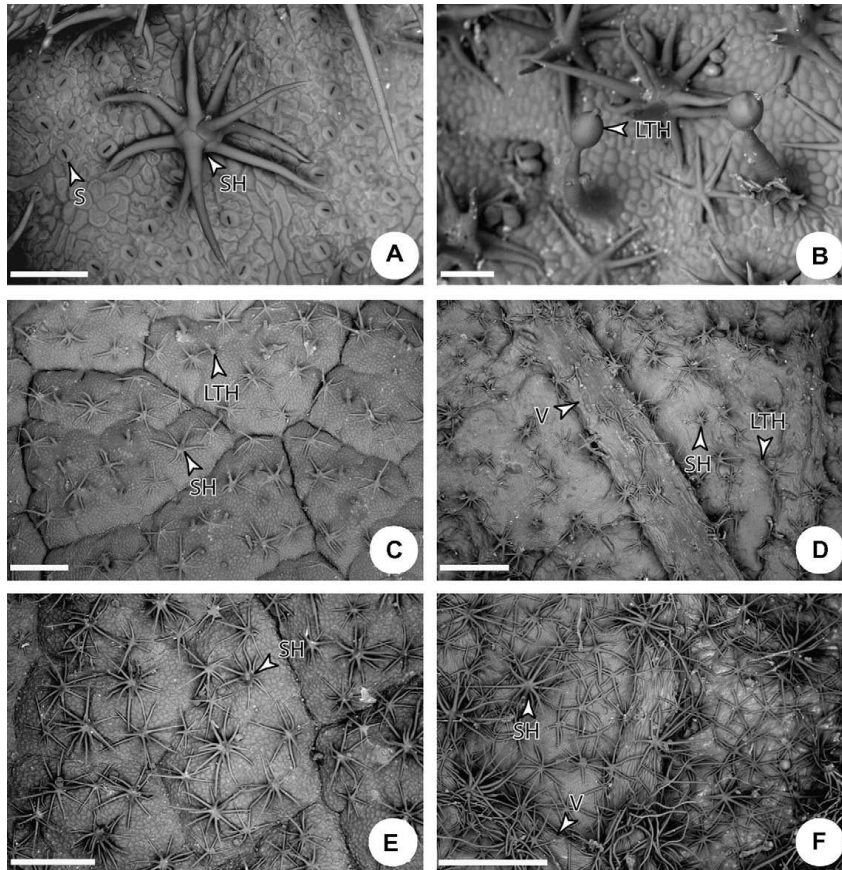
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το γένος *Cistus*

Το γένος *Cistus* L. είναι ένα σχετικά μικρό γένος με 21 αναγνωρισμένα αυτοφυή είδη, που στην πλειοψηφία τους κατανέμονται στη Μεσόγειο, εκτός από 5 είδη ενδημικά των Καναρίων Νήσων, το οποίο αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της μεσογειακής βλάστησης (Fernandez-Mazuecos & Vargas, 2010). Ωστόσο παρουσιάζει αξιοσημείωτη μορφολογική διαφοροποίηση και αποτελεί ένα σύνθετο γένος, λόγω του πολυμορφισμού των ειδών του και του συχνού υβριδισμού μεταξύ συγγενικών ειδών (Paolini et al., 2009). Ειδικά ο υβριδισμός, φαίνεται να είναι μια ενεργή διαδικασία στο *Cistus* (Ellul, Boscaiu, Vicente, Moreno & Rosselo, 2002) και πολλοί υβριδικοί συνδυασμοί ανάμεσα σε είδη με ροζ ή με λευκά άνθη έχουν καταγραφεί, σύμφωνα με τους ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες (Grosser, 1903). Για το λόγο αυτό έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με τη γενετική δομή και την εξέλιξη του γένους *Cistus* (Batista, Bañares, Caujari-Castells, Carque, Marrero-Gomez, Sosa, 2001; Farley and McNeilly, 2000; Guzman and Vargas, 2005; Guzman, Lledo & Vargas, 2009; Carlier et al., 2008). Βέβαια, σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του φαινότυπου των φυτών παίζει και το περιβάλλον, όπως η εποχή ή η γεωγραφική θέση ανάπτυξής τους (Aronne & De Micco, 2001; Fernandez -Mazuecos & Vargas, 2010).

Τα φυτά του γένους *Cistus* ανήκουν στην οικογένεια Cistaceae και είναι θάμνοι με ύψος που μπορεί να ξεπεράσει το ένα μέτρο με φύλλα συνήθως κυματοειδή, απλά αδιαίρετα, αντίθετα ή κατ' εναλλαγή με παράφυλλα. Στην επιφάνεια των φύλλων τους, αλλά και σε άλλα μέρη (στελέχη), φέρουν τριχώματα διαφόρων τύπων, όπως για παράδειγμα, αστεροειδή (*C. ladanifer*, *C. creticus* subsp. *eriocephalus*), που είναι μη εκκριτικά (Gülz et al., 1996) και δενδροειδή (*C. ladanifer*) ή κοντές έμμισχες μικρές κεφαλές ή απλούς μακριούς σωλήνες ή μακριούς σφαιροκέφαλους σωλήνες (*C. creticus* subsp. *corsicus*), τα οποία χαρακτηρίζονται εκκριτικά ή αδενώδη (**Εικ. 1.1**). Από τα αδενώδη τριχώματα εκκρίνονται το αιθέριο έλαιο και η ρητίνη ή λάδανο (ladanum, labdanum, ladano), πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, που παράγει το φυτό (Anoniss, 1995; Demetzos et al., 1999; Sosa, Alías, Escudero & Chaves, 2005). Επίσης, πιστεύεται ότι είναι τα σημεία βιοσύνθεσης, και συγκέντρωσης τερπενοειδών, χαρακτηριστικών του κάθε είδους (Paolini et al., 2009). Τα τριχώματα έχουν

μελετηθεί στο παρελθόν με σκοπό την ταξινόμηση ή τον προσδιορισμό μορφολογικών χαρακτήρων μεταξύ ειδών ή υποειδών, ανάλογα με το είδος, την πυκνότητα και τη μορφολογία τους (Tattini et al., 2007; Paolini et al., 2009).



Εικόνα 1.1: Τριχώματα σε φύλλα *Cistus creticus* subsp. *corsisus* και *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. (A) Αστεροειδείς τρίχες (Stellate Hairs, SM) του *Cistus creticus* subsp. *corsisus* (κάτω πλευρά φύλλου). Bar = 100μm. (B) Μακρείς σφαιροκέφαλοι σωλήνες (Long Ball-headed Tubes, LTH) του *Cistus creticus* subsp. *corsisus* (άνω πλευρά φύλλου). Bar=100μm. (C) Άνω πλευρά του *Cistus creticus* subsp. *corsisus*. Bar = 500μm. (D) Κάτω πλευρά του *Cistus creticus* subsp. *corsisus*. Bar = 500μm. (E) Άνω πλευρά του *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. Bar = 500μm. (F) Κάτω πλευρά του *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. Bar = 500μm. Παρατηρούμε ότι οι αστεροειδείς μη αδενώδεις τρίχες συνυπάρχουν με αδενώδεις. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. V: Νεύρο, S: Στομάτιο (Paolini et al., 2009).

1.2 Είδη του γένους *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας

Στη Μεσόγειο έχουν αναγνωριστεί 16 ενδημικά είδη του γένους *Cistus* και από αυτά στην Ελλάδα αυτοφύονται 6, τα: *Cistus incanus* subsp. *creticus* (συνώνυμο των *Cistus creticus* subsp. *creticus* και *Cistus villosus*), *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, *C. parviflorus*, *C. salviifolius*, *C. monspeliensis*, και *C. laurifolius*.

Τα άνθη είναι εκείνα που παρουσιάζουν εντυπωσιακή πολυμορφία, καθώς μπορεί να έχουν 3 ή 5 πέταλα μωβ, ρόδινου, πορφυρού ή λευκού χρώματος και αντίστοιχα 3 ή 5 σέπαλα (Εικ. 1.2).



C. salviifolius



C. incanus subsp. *creticus*



C. monspeliensis



C. parviflorus



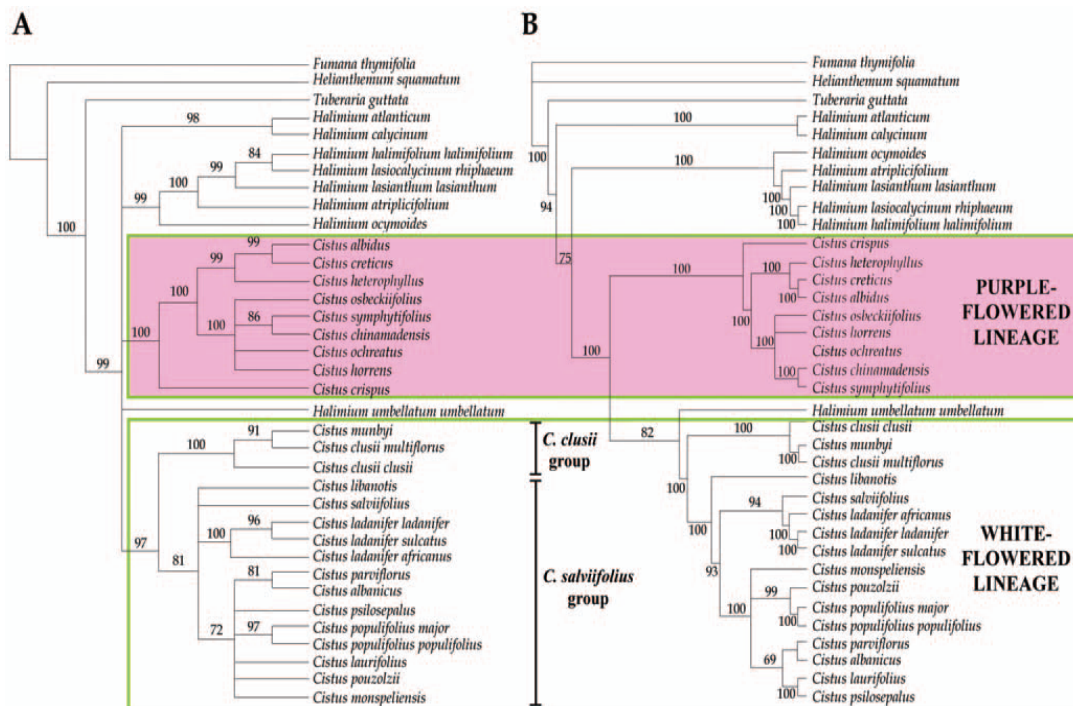
C. laurifolius

Εικόνα 1.2 : Άνθη ειδών *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας. (<http://www.pelion-paths.gr/Pelion-Species.aspx?ln=gr&id=352>)

Έχουν πολλούς στήμονες με κίτρινα στίγματα πλούσια σε γύρη οι οποίοι φύονται από την ανθοδόχη. Η ωθήκη είναι επιφυής, μονόχωρη ή με 2-10 χώρους και αποτελείται από 3-5 καρπόφυλλα. Οι χώροι μπορεί να είναι πλήρεις ή ατελείς, με δύο ή περισσότερους ανεμοβλάστες ορθότροπους. Ο στύλος έχει ένα έως τρία στίγματα και ο καρπός είναι πολύσπερμη κάψα με τρεις βαλβίδες ή 3-10 γλωχίνες. (Αθανασιάδης, 1986).

Αυτοφύονται σε θαμνότοπους κατά συστάδες σε ημιορεινές και ορεινές περιοχές σε μεγάλες εκτάσεις οι οποίες ονομάζονται κιστώνες και οι κοινές τους ονομασίες, ανάλογα με το είδος και την περιοχή είναι: κίστος, λαδανιά, αλάδανος, αγκίσαρος, κουνούκλα, ξισταριές, κίστος φασκομηλόφυλλος (Σαρλής, 1999; Σφήκας, 1999).

Τα φυτά του γένους *Cistus* σχηματίζουν μια συνεκτική και μεγάλη κλάση μέσα στη Cistaceae. Φυλογενετικές αναλύσεις σκιαγραφούν δυο κύριες κλάσεις μέσα στο γένος *Cistus*, μία κλάση με μωβ άνθη στην οποία ανήκουν και τα *Cistus incanus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *eriocephalus* και μία με λευκά στην οποία ανήκουν και τα *C. salviifolius*, *C. monspeliensis*, καθώς και το *Cistus parviflorus*, το οποίο έχει άνθη χρώματος ανοιχτού ροζ. Η κλάση των λευκών ανθέων διαιρείται σε δυο ομάδες, την ομάδα του *C. clusii* και εκείνη του *C. salviifolius*. Τα είδη *C. salviifolius*, *C. monspeliensis* και *C. parviflorus* ανήκουν στην ομάδα του *C. salviifolius* (Εικ. 1.3).



Εικόνα 1.3: Διαχωρισμός των διαφόρων ειδών της οικογένειας Cistaceae σε ομάδες, ανάλογα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα των ανθέων (Guzman et al., 2009).

Περαιτέρω ανάλυση των μορφολογικών χαρακτήρων δείχνουν ότι το *C. parviflorus* έχει τα ροζ άνθη που παραπέμπουν στην κλάση των μωβ ανθέων, αλλά

άμισχα στίγματα της κλάσης των λευκών ανθέων, μαρτυρώντας ένα δυναμικό περιστατικό δημιουργίας νέου είδους μέσω υβριδισμού.

Τα ασύμμετρα χαρακτηριστικά μεταξύ των δυο ομάδων (*C. clusii* και *C. salviifolius*) μαζί με οικολογικές αποδείξεις, υποστηρίζουν τη θεωρία της προσαρμοστικής ακτινωτής διαφοροποίησης (adaptive radiation) (Guzman et al., 2009). Προσαρμοστική ακτινωτή διαφοροποίηση είναι η εξελικτική διαδικασία μέσω της οποίας από ένα προγονικό είδος προκύπτει μια σειρά ειδών με μεγάλη οικολογική, μορφολογική ή συμπεριφορική ποικιλότητα (Whittaker & Fernandez-Palacios, 2009), φαινόμενο πολύ συχνό στο γένος *Cistus*.

Το είδος *Cistus incanus* subsp. *creticus*, που όπως αναφέρθηκε ανήκει στην πρώτη κλάση φύεται σε πολλά μέρη της Ελλάδας και κυρίως στην Κρήτη. Η άνθηση αρχίζει τον Μάιο και διαρκεί μέχρι και τον Αύγουστο. Η ρίζα του είναι πολύ σκληρή, ξυλώδης, λευκή εσωτερικά, κοκκινωπή εξωτερικά, με πολλά τριχοειδή ριζίδια, από δε τις ρίζες εξέρχονται πολλοί ξυλώδεις βλαστοί. Αυτοί είναι τραχείς, διηρημένοι σε πολλούς κοκκινωπούς κλώνους οι πιο τρυφεροί από τους οποίους είναι τριχωτοί με χρώμα λευκοπράσινο. Τα φύλλα του φυτού είναι αντίθετα, ωολογχοειδή με κυματώδεις παρυφές, τριχωτά, νευρώδη στην άνω επιφάνεια και γυρισμένα προς την βάση με χρώμα βαθυπράσινο. Η μεγαλύτερη πυκνότητα των αδενωδών τριχών στο φυτό παρουσιάζεται κατά μήκος των νεύρων της κάτω επιφάνειας των φύλλων καθώς και στα στελέχη. Τα άνθη του, διαμέτρου 4-6 εκ., φύονται στις κορυφές των τρυφερών κλώνων.

Είναι ιδιαίτερα γνωστό για τις μεγάλες αποδόσεις του σε λάδανο, που είναι η καφέ χρώματος ρητίνη που εκκρίνουν τα αδενώδη τριχώματα των φύλλων και των βλαστών του τις πιο ζεστές μέρες και ώρες του καλοκαιριού, σε αντίθεση με το υποείδος *Cistus incanus* subsp. *eriocephalus* που δεν παράγει σημαντικές ποσότητες ρητίνης.

Τα φυτά του είδους *C. parviflorus* είναι πιο συμπαγή από εκείνα του *C. incanus*, με μικρότερα άνθη (η διάμετρός τους δεν ξεπερνά τα 3 cm) που έχουν πιο ανοιχτό ροζ χρώμα. Η εποχή άνθησης είναι από το Μάρτιο ως το Μάιο (Αθανασιάδης, 1986).

Το είδος *C. salviifolius* είναι το πιο εντυπωσιακό από τα είδη του *Cistus*, καθώς η μεγάλη του στεφάνη με τα λευκά πέταλα θυμίζει τριαντάφυλλο και είναι διπλάσια σε μέγεθος από τα υπόλοιπα (Tani, 2004).

Το είδος *C. monspeliensis* είναι πυκνός, όρθιος, κολλώδης θάμνος με ύψος έως και 1 μ. Οι παλαιοί κλάδοι του μένουν γυμνοί και είναι σκουροερυθροκάστανοι. Οι νεαροί έχουν βραχύ και πυκνό τρίχωμα. Τα φύλλα του είναι απλά, γραμμοειδή, άμισχα και αντίθετα. Τα άνθη λευκά 2-3 εκ. με 5 πέταλα και ανά 3 έως 10, σε πυκνές, κυματοειδείς ταξιανθίες. Ανθίζει τους μήνες Απρίλιο έως και Ιούνιο (Αθανασιάδης, 1986; Αραμπατζής, 2001).

Το *C. laurifolius* είναι θάμνος κολλώδης, ύψους ως και 2 μ., με φύλλα ωοειδή σκούρου πράσινου χρώματος. Τα άνθη του είναι μεγάλα (5-7 εκ.), λευκά με κίτρινες κηλίδες που ανθίζουν Ιούλιο με Αύγουστο. Αυτοφύεται κυρίως στη Β. Ελλάδα, στην περιοχή Δαδιάς Σουφλίου.

1.3 Δευτερογενείς Μεταβολίτες των ειδών του γένους *Cistus*

1.3.1 Δευτερογενείς Μεταβολίτες αιθερίου ελαίου

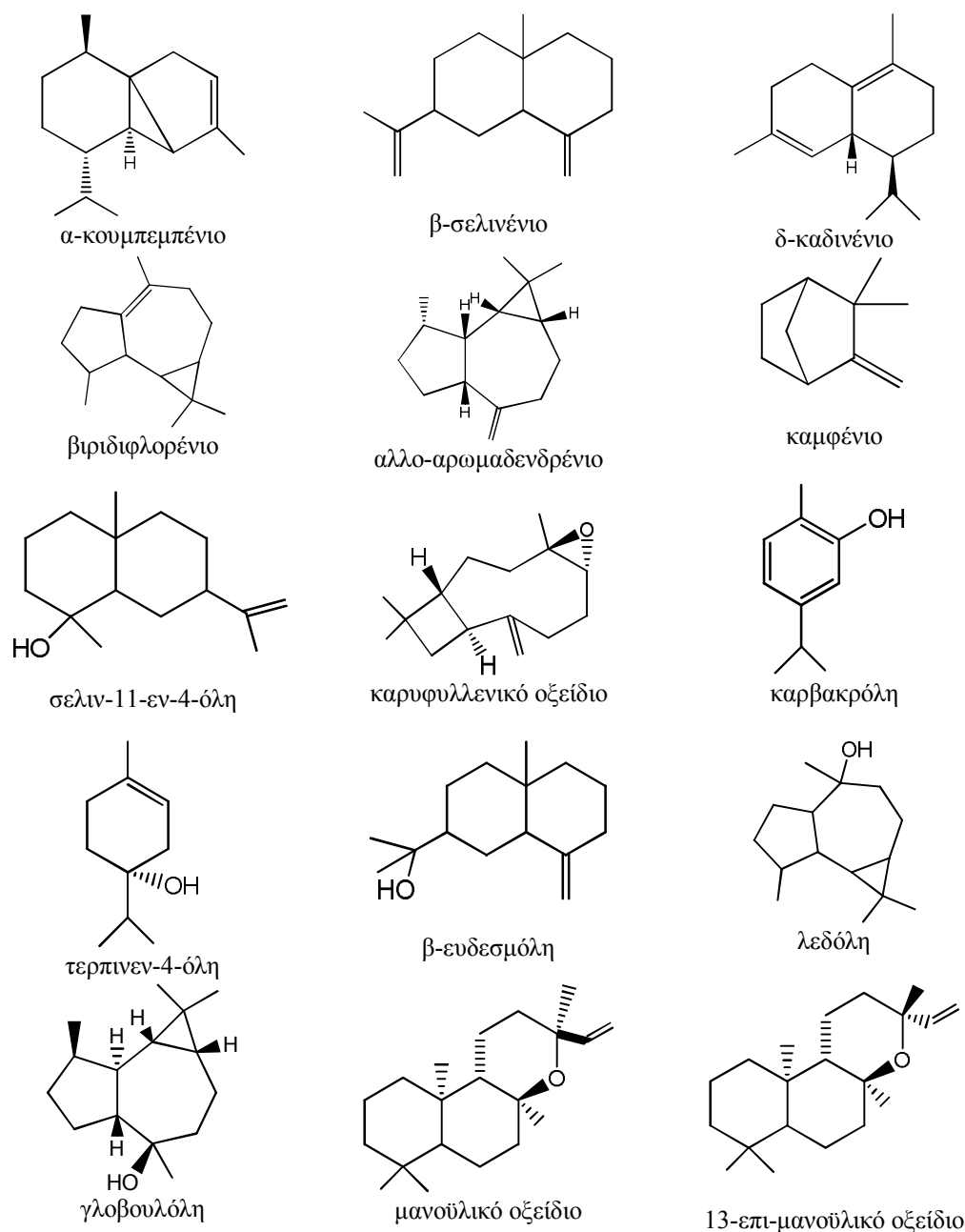
Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα αδενώδη τριχώματα των φυτών του γένους *Cistus* εκκρίνουν αιθέριο έλαιο και ρητίνη. Τα αιθέριο έλαιο των φυτών *Cistus* είναι πλούσιο σε δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως μονοτερπένια, οξυγονωμένα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, οξυγονωμένα σεσκιτερπένια (Robles & Garzino, 2000; Angelopoulou, Demetzos & Perdetzoglou, 2001; Demetzos, Anastasaki & Perdetzoglou, 2002; Robles, Bousquet-Melou, Garzino & Bonin, 2003; Rivoal et al., 2010) (Πίν. 1.1).

Πίνακας 1.1: Συστατικά του αιθερίου ελαίου διαφόρων ειδών του γένους *Cistus*, όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Συστατικό	Είδος	Αναφορά
α-καδινόλη	<i>Cistus monspeliensis</i> , <i>Cistus creticus sub.</i> <i>corsicus</i>	Robles & Garzino, 2000; Paolini et al., 2009
α-πινένιο	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C.</i> <i>creticus sub. corsicus</i>	Rivoal et al. 2010; Paolini et al., 2009
καμφένιο	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C.</i> <i>creticus sub. corsicus</i>	Rivoal et al. 2010; Paolini et al., 2009
λεμονένιο	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C.</i> <i>creticus sub. corsicus</i>	Rivoal et al. 2010; Paolini et al., 2009
γ-τερπινένιο	<i>C. creticus</i> , <i>C. creticus</i> <i>sub. corsicus</i>	Demetzos et al., 2002; Paolini et al., 2009
π-κυμένιο	<i>C. creticus</i> , <i>C. creticus</i> <i>sub. corsicus</i>	Demetzos et al., 2002; Paolini et al., 2009
α-κουμπεμπένιο	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
α-κοπαένιο	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
αλλο- αρωμαδενδρένιο	<i>C. parviflorus</i> , <i>C.</i> <i>salvifolius</i> , <i>C. creticus</i> <i>sub. corsicus</i>	Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002 ; Paolini et al., 2009
β-σελινένιο	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
α-μουουρολένιο	<i>C. parviflorus</i>	Angelopoulou et al., 2001
δ-καδινένιο	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> <i>sub. corsicus</i>	Angelopoulou et al., 2001; Paolini et al., 2009
καδινα-1,4-διένιο	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
α-καδινένιο	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i>	Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002
καμφορά	<i>C. parviflorus</i> , <i>C.</i> <i>monspeliensis</i> , <i>C.</i> <i>salviifolius</i>	Angelopoulou et al., 2001; Rivoal et al. 2010; Demetzos et al., 2002
τερπινεν-4-όλη	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> , <i>C. salviifolius</i>	Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002
α-τερπινεόλη	<i>C. parviflorus</i> , <i>C.</i> <i>monspeliensis</i> ,	Angelopoulou et al., 2001; Rivoal et al. 2010
θυμόλη	<i>C. parviflorus</i> , <i>C.</i> <i>salviifolius</i>	Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002
καρβακρόλη	<i>C. parviflorus</i> , <i>C.</i> <i>creticus</i> , <i>C. salvifolius</i>	Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002
<i>trans</i> -πινοκαρβεόλη	<i>C. creticus</i> , <i>C. creticus</i> <i>sub. corsicus</i>	Demetzos et al., 2002 ; Paolini et al., 2009
βορνεόλη	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C.</i> <i>creticus sub. corsicus</i>	Rivoal et al. 2010 ; Paolini et al., 2009
σαφρανάλη	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
β-κυκλοκιτράλη	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
β-καρυοφυλλένιο	<i>C. monspeliensis</i>	Robles & Garzino, 2000; Rivoal et al. 2010
α-καλακορένιο	<i>C. parviflorus</i>	Angelopoulou et al., 2001
ελεμόλη	<i>C. parviflorus</i>	Angelopoulou et al., 2001
σπαθουλενόλη	<i>C. monspeliensis</i> <i>C.</i> <i>parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> <i>sub. corsicus</i>	Robles & Garzino, 2000; Angelopoulou et al., 2001; Paolini et al., 2009
γλοβουλόλη	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> <i>sub. corsicus</i>	Angelopoulou et al., 2001; Paolini et al., 2009
βιριδιφλορόλη	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> , <i>C. creticus sub. corsicus</i>	Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002; Paolini et al., 2009
β-ευγενόλη	<i>C. creticus</i>	Demetzos et al., 2002
λεδόλη	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009

Συστατικό	Είδος	Αναφορά
κουμπενόλη	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
σελιν-11-εν-4α-όλη	<i>C. creticus, C. creticus sub. corsicus</i>	Demetzos et al., 2002; Paolini et al., 2009
β-ευδεσμόλη	<i>C. creticus, C. creticus sub. corsicus</i>	Demetzos et al., 2002; Paolini et al., 2009
μανούλικό οξείδιο	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
13-επι-μανούλικό οξείδιο	<i>C. monspeliensis, C. creticus, C. creticus sub. corsicus</i>	Robles & Garzino, 2000; Demetzos et al., 2002; Paolini et al., 2009
σκλαρεόλη	<i>C. creticus, C. creticus sub. corsicus</i>	Demetzos et al., 2002; Paolini et al., 2009
α-καουρένιο	<i>C. creticus sub. corsicus</i>	Paolini et al., 2009
λαβδ-7,13-διεν-15-όλη	<i>C. creticus</i>	Demetzos et al., 2002
εικοσιπεντάνιο	<i>C. monspeliensis, C. creticus sub. corsicus</i>	Robles et al., 2000; Paolini et al., 2009
μυριστικό οξύ	<i>C. monspeliensis</i>	Robles & Garzino, 2000
παλμιτικό οξύ	<i>C. monspeliensis</i>	Robles & Garzino, 2000

Οι χημικές δομές κάποιων συστατικών που είναι χαρακτηριστικά των αιθερίων ελαίων των φυτών του γένους *Cistus* φαίνονται στην **Εικ. 1.4** (Adams, 2007).



Εικόνα 1.4: Δομές συστατικών αιθερίου ελαίου φυτών του γένους *Cistus*.

Τα τερπένια είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες που κυριαρχούν στη σύσταση αιθερίων ελαίων διαφόρων φυτών. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 40.000 τερπενοειδείς ενώσεις, τουλάχιστον οι μισές από τις οποίες συντίθενται στα φυτά (Trapp & Croteau, 2001; Aharoni et al., 2005). Πρόκειται για ενώσεις που αποτελούνται από μονάδες πέντε ατόμων άνθρακα (ισοπρένιο), οι οποίες με

κατάλληλο συνδυασμό οδηγούν σε σκελετούς με C₁₀ (μονοτερπένια), C₁₅ (σεσκιτερπένια), C₂₀ (διτερπένια), C₃₀ (τριτερπένια), C₄₀ (καροτενοειδή) (Clark et al., 1997; Wink, 1999) (Πίν. 1.2).

Πίνακας 1.2: Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της ομάδας των τερπενίων

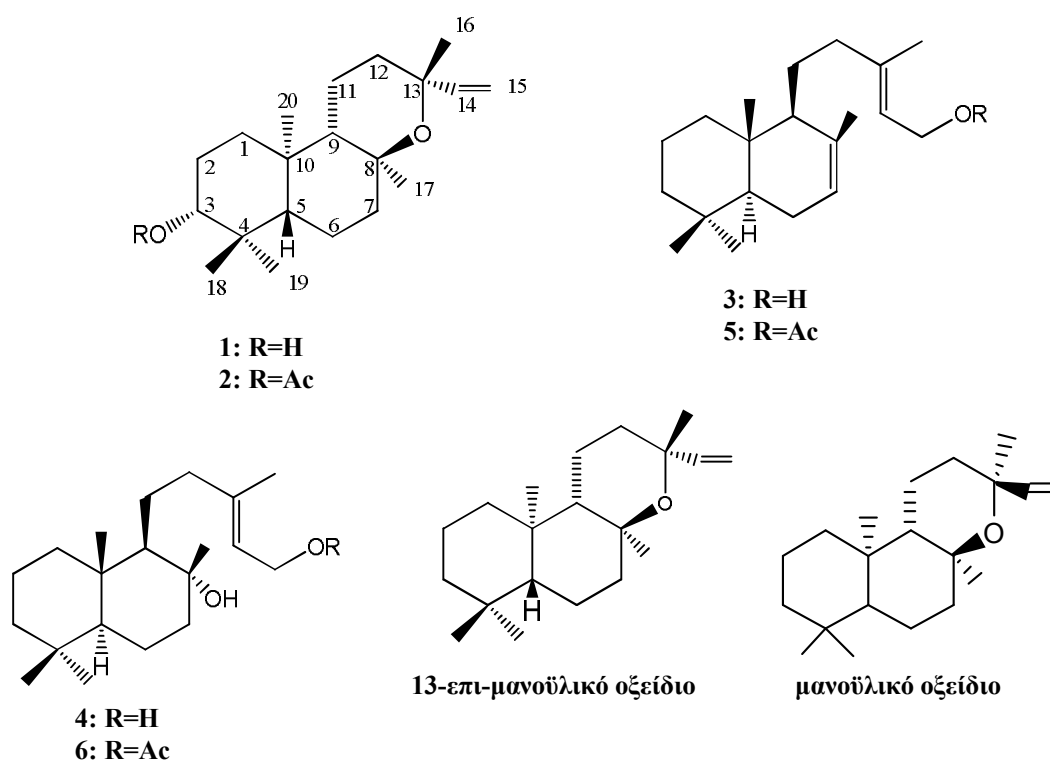
Αριθμός ατόμων C	Μοριακός τύπος	Κατηγορία ενώσεων	Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι
5	C ₅ H ₈	ισοπρένιο (ημιτερπένια)	ισοπεντενυλοφωσφορικό
10	C ₁₀ H ₁₆	μονοτερπένια	Γερανιόλες (μενθόλη, καμφορά, πινένιο, κιτρονελλάλη)
15	C ₁₅ H ₂₄	σεσκιτερπένια	Φαρνεζόλες (συμπικινόνη, πλαστοκινόνη, αμπισικό, ρισιτίνη)
20	C ₂₀ H ₃₂	διτερπένια	Γερανυλγερανιόλες (φυτόλη, καουρένιο, γιββερελικό, φουσικοσίνη)
30	C ₃₀ H ₄₈	τριτερπένια	Σκουαλένια (στεροειδή, σαπωνίνες)
40	C ₄₀ H ₆₄	τετρατερπένια	Φυτοένιο, καροτενοειδή
<i>n</i>	(C ₅ H ₈) _{<i>n</i>}	πολυτερπένια	Κόμμεα, γουταπέρκα

Τα σεσκιτερπένια και τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια, είναι ισοπρενοειδείς ενώσεις που απαντώνται σε υψηλά ποσοστά στη σύσταση του αιθερίου ελαίου των ειδών *Cistus*. Εκτός αυτών εντοπίζονται και σε άλλα χερσαία και θαλάσσια φυτά, μύκητες, βακτήρια και έντομα, αλλά όχι σε σπονδυλωτά. Στα φυτά μεγάλος αριθμός σεσκιτερπενίων συνιστούν συστατικά των αιθέριων ελαίων, κυρίως στις οικογένειες *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Pinaceae* και *Rutaceae*. Πρόκειται για φυσικά πτητικά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τα οποία συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις του φυτού με φυτά, έντομα, παθογόνα. Εντυπωσιακή είναι η δομική ποικιλία και στερεοχημική πολυπλοκότητα των σεσκιτερπενικών σκελετών. Έχουν χαρακτηριστεί περισσότερες από 300 δομές κυκλικών σεσκιτερπενίων, κάθε μία από τις οποίες βιογενετικώς προέρχεται από το ίδιο πρόδρομο άκυκλο μόριο πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (FDP) με την ενζυμική δράση των συνθετασών ή κυκλασών σεσκιτερπενίων.

Μια χημειομετρική διαπληθυσμιακή ανάλυση των αιθερίων ελαίων που συλλέχθηκαν από *Cistus creticus* ssp. *creticus* σε διάφορες περιοχές της Κρήτης έδειξε ότι τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια ανιχνεύονται σε ποσοστά (2.8% - 44.2%) και τα αντίστοιχα σεσκιτερπένια σε ποσοστά κάπως χαμηλότερα (2.1% - 20.4%).

Τα σημαντικότερα οξυγονωμένα σесκιτερπένια που ανιχνεύτηκαν ήταν η γουαϊόλη, η βιριδιφλορόλη, η β-ευδεσμόλη και η σελιν-11-εν-4α-όλη (Demetzos et al., 2002). Ομοίως, η μελέτη του αιθερίου ελαίου πληθυσμών των *C. salvifolius* (Demetzos, Angelopoulou & Perdetzoglou, 2002), *C. parviflorus* (Angelopoulou et al., 2001) που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Κρήτης φανέρωσε την αφθονία του ελαίου σε οξυγονωμένα σесκιτερπένια και την υπεροχή τους στη σύστασή του, αλλά και την παρουσία μονοτερπενίων, όπως η καμφορά και λαβδανικών διτερπενίων, όπως το μανοϋλικό οξείδιο και παράγωγά του.

Ειδικά για τα λαβδανικά διτερπένια του αιθερίου ελαίου της λαδανιάς έχουν γίνει μελέτες για την απομόνωση και διευκρίνιση της δομής τους, λόγω των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων. Στο είδος *C. creticus* subsp. *creticus* βρέθηκαν 7 λαβδανικά διτερπένια που φαίνονται στον **Εικ. 1.5** (Anastasaki, Demetzos, Perdetzoglou, Gazouli, Loukis & Harvala, 1999).



Εικόνα 1.5: Λαβδανικά διτερπένια αιθερίων ελαίων των ειδών *C. creticus* subsp. *creticus* και *C. creticus* subsp. *eriocephalus* **1:** 3β-υδροξυ-13-επι-μανοϋλικό οξείδιο, **2:** 3β-ακετοξυ-13-επι-μανοϋλικό οξείδιο, **3:** λαβδ-13(E)-εν-8α-15-διόλη, **4:** λαβδ-7,13(E)-διεν-15-όλη, **5:** λαβδ-13(E)-εν-8α-ολ-15-υλικός εστέρας, **6:** λαβδ-7,13(E)-διεν-15-υλικός εστέρας. (Anastasaki et al., 1999).

Το μανοϋλικό οξείδιο και το 13-επι-μανοϋλικό οξείδιο είναι τα διτερπένια που εντοπίζονται σε μεγάλη αφθονία και με μεγάλη συχνότητα σε διάφορα είδη *Cistus* ανεξάρτητα από το χρόνο και την τοποθεσία ανάπτυξης του φυτού (Demetzos et al. 1990; Anastasaki et al., 1999; Angelopoulou et al., 2001; Demetzos, Angelopoulou, Perdetzoglou, 2002; Demetzos et al., 2002; Robles et al., 2003; Paolini et al., 2009). Ακόμη, έχουν διάφορες μελέτες σχετικές με τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό τους σε μοριακό επίπεδο, με μεθόδους απομόνωσης και καθαρισμού του νουκλεϊκού τους οξέος (Pateraki & Kanellis, 2004; 2008; 2010), αλλά και μεθόδους διαχωρισμού τους, καθώς συνήθως βρίσκονται στο αιθέριο έλαιο ή στα εκχυλίσματα ως μίγματα C13 επιμερών (Demetzos et al., 2002).

Γενικά, η σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το κλίμα, το έδαφος. Οι Rivoal et al. (2010) που μελέτησαν το αιθέριο έλαιο του *C. monspeliensis* L. αφενός αναφέρουν ως κύρια συστατικά τα α-πινένιο και α-μυρκένιο, αφετέρου παρατηρούν πως ανάλογα με την εποχή, διαφέρει τόσο η συνολική ποσότητα του αιθερίου ελαίου όσο και οι ποσότητες των επιμέρους συστατικών του, με τη μεγαλύτερη απόδοση να παρουσιάζεται τους καλοκαιρινούς μήνες. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν και οι Angelopoulou et al. (2002) που διαπίστωσαν διακύμανση της σύστασης του αιθερίου ελαίου του *C. monspeliensis* ανάλογα με την εποχή και την ημερήσια ώρα συγκομιδής. Για το ίδιο είδος, αλλά και για το είδος *C. albidus* μελέτες των Robles & Garzino (1998; 2000), σχετικά με την επίδραση του εδάφους στη σύσταση του ελαίου έδειξαν πως αυτή διαφέρει αν το φυτό αναπτυχθεί σε ασβεστώδες ή σε πυριτικό έδαφος.

1.3.2 Δευτερογενείς Μεταβολίτες υδροαλκοολικού εκχυλίσματος

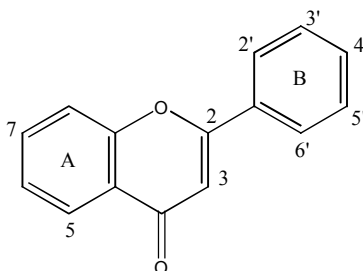
Σύμφωνα με μελέτες τόσο τα εκχυλίσματα, όσο και το λάδανο των φυτών *Cistus* έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, όπως απλές μονοκυκλικές φαινόλες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή (άγλυκα και γλυκοζίτες), προανθοκυανιδίνες και ταννίνες (Demetzos et al., 1989; Vogt and Gülz, 1991; Danne, A., Petereit, F. & Nahrstedt, A., 1994; Demetzos et al., 1999).

Στις φυσικές φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνεται ένας μεγάλος αριθμός φυτικών κυρίως ουσιών που έχουν στο μόριό τους τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια, όπως απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, φαινολικές κινόνες, φλαβονοειδή, τα οποία αποτελούν και τη μεγαλύτερη ομάδα φυσικών φαινολικών ενώσεων και πολυμερείς φαινολικές ενώσεις (λιγνίνες, μελανίνες, ταννίνες). Είναι ενώσεις που σπάνια απαντώνται ελεύθερα στο φυτό. Συνήθως βρίσκονται ενωμένα υπό μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών, στους οποίους αποτελούν το άγλυκο τμήμα της ένωσης. Ένας τρόπος απελευθέρωσης των φαινολικών οξέων από τους εστέρες και τα αλάτα τους, αλλά και διάσπασης των γλυκοζιτών είναι η όξινη υδρόλυση (Ραγκούση-Ιγνατιάδου, 1996). Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να απομονώσουμε το συστατικό που μας ενδιαφέρει, ώστε να το μελετήσουμε.

Οι απλές φαινόλες που ανιχνεύονται στα είδη *Cistus*, όπως έχει αναφερθεί είναι η καρβακρόλη, η θυμόλη, ευγενόλη (Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002). Από τα φαινολικά οξέα, έχει παρατηρηθεί η παρουσία του γαλλικού οξέος (Barrajon-Catalan et al., 2010), του κινικού και του σικιμικού οξέος (Fernandez-Arroyo, Barrajon-Catalan, Micol, Segura-Carretero & Fernandez-Gutierrez, 2010). Επίσης οι φλαβονόλες καμφερόλη, κερκετίνη, μυρισετίνη με τη μορφή γλυκοζιτών (Vogt & Gültz, 1994; Saracini, Tattini, Traversi, Vincieri & Pinelli, 2005; Sadhu, Okuyama, Fujimoto, Ishibashi & Yesilada, 2010; Fernandez-Arroyo et al., 2010), οι φλαβαν-3-όλες κατεχίνη (C), επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη (EC), επικατεχίνη του γαλλικού οξέος (ECG) και επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος με μορφή γλυκοζίτη (EGCG) (Danne, Petereit & Nahrstedt, 1993; Danne et al., 1994; Petereit, Kolodziej & Nahrstedt, 1991; Pomponio, Gottia, Santagatib & Cavrinia, 2003), γλυκοζίτες της απιγενίνης (φλαβονόνη) (Danne et al., 1994; Chaves, Rios, Guttierrez, Escudero, & Olias, 1998).

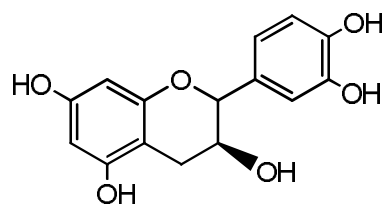
Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει την παρουσία ελλαγιταννινών, όπως η πουνικαλλαγίνη (Saracini et al., 2005; Barrajon-Catalan et al., 2010; Fernandez-Arroyo et al., 2010).

Συγκεκριμένα, οι Saracini et al. (2005) διέκριναν στα φύλλα του *C. salviifolius* τρεις κύριες τάξεις πολυφαινολών: ελλαγιταννίνες, γλυκοζίτες φλαβονολών και ακετυλο-γλυκοζυλο-φλαβονόλες.

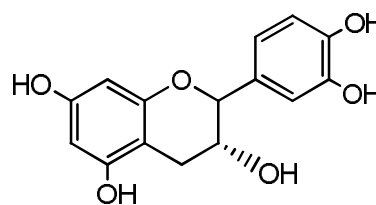


	3	5	7	2'	3'	4'	5'
Φλαβονόλη	OH	H	H	H	H	H	H
Καμπερόλη	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Κερκετίνη	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Μυρισετίνη	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Φλαβόνη	H	H	H	H	H	H	H
Απιγενίνη	H	OH	OH	H	H	OH	H

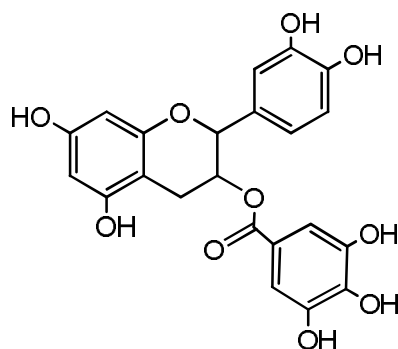
Εικόνα 1.6: Συνήθη παράγωγα φλαβονόλης και φλαβόνης που ανιχνεύονται στα εκχυλίσματα λαδανιάς με τη μορφή των γλυκοζιτών τους.



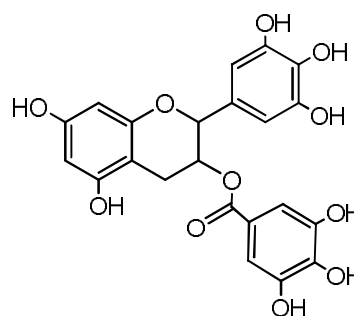
κατεχίνη



επικατεχίνη



επικατεχίνη γαλλικού οξέος



επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού οξέος

Εικόνα 1.7: Φλαβαν-3-όλες εκχυλισμάτων λαδανιάς.

Τα είδη του γένους *Cistus*, όπως αναφέρθηκε, κατανέμονται κυρίως σε μεσογειακά οικοσυστήματα και για το λόγο αυτό είναι συχνά εκτεθειμένα σε μια μεγάλη γκάμα περιβαλλοντικών αντιξοοτήτων, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια ξηρών και θερμών καλοκαιριών (Margaris & Vokou, 1982; Andres & Ojeda, 2002).

Ως συνέπεια, η εξελικτική προσαρμογή των ειδών *Cistus* σε τέτοια ακραία οικοσυστήματα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την απόδοση του μεταβολισμού δευτερογενών μεταβολιτών και ιδιαίτερα των πολυφαινολών. Υπάρχουν πολλές αναφορές στην αποτελεσματική προστασία των φυτών από τις πολυφαινόλες έναντι περιβαλλοντικού αβιοτικού και βιοτικού στρες (Aerts, 1995; Dixon & Palva, 1995; Bassman, 2004). Το πόσο καθοριστική είναι η επίδραση του περιβάλλοντος και του μικροκλίματος στη βιοσύνθεση φλαβονοειδών στη λαδανιά, το δείχνουν μελέτες μέτρησης του περιεχομένου φλαβονοειδών σε αυτοφυή και καλλιεργούμενα φυτά λαδανιάς ίδιου είδους. Σε μια προσπάθεια της χρήσης των φλαβονοειδών ως ταξονομικό κριτήριο των ειδών, διαπιστώθηκε ότι το περιεχόμενό τους διέφερε σημαντικά μεταξύ αυτοφυών και καλλιεργούμενων φυτών (Demetzos & Perdetzoglou, 1999).

1.3.3 Βιολογικές δράσεις Δευτερογενών Μεταβολιτών

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των αιθερίων ελαίων, αλλά και των εκχυλίσματων των φυτών έχουν ποικίλες βιολογικές δράσεις στο φυτό και κατ' επέκταση στον ανθρώπινο οργανισμό, αν απομονωθούν και αξιοποιηθούν κατάλληλα.

Η κάθε κατηγορία τερπενίων συμπεριλαμβανομένων των σесκιτερπενίων είναι σημαντική είτε για την ανάπτυξη είτε για το μεταβολισμό είτε για την άμυνα του φυτού. Έτσι λειτουργούν ως φυτοορμόνες, ως χρωστικές, ως αρωματικές ουσίες, ως ανάλογα ορμονών των εντόμων, ως προειδοποιητικές φερομόνες (πχ. β-φαρνεσένιο, γερμακρένιο A), ως φυτοαλεξίνες κατά την αλληλεπίδραση φυτού-παθογόνου (πχ. δ-καδινένιο) και ως σηματοδοτικά μόρια στην επικοινωνία φυτού-φυτού μετέχοντας στο μίγμα πτητικών ενώσεων με αλληλοπαθητική ανασταλτική δράση (πχ. β-καρνοφυλλένιο, γερμακρένιο D) (Wink, 1999; Arimura et al., 2000; Kessler and Baldwin, 2001; Pichersky and Gershenzon, 2002; Dudareva, Pichersky & Gershenzon, 2004).

Από αυτές τις λειτουργίες ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος που διαδραματίζουν τα σεσκιτερπένια στην άμυνα του φυτού. Η άμυνα αυτή περιλαμβάνει περιπτώσεις απώθησης ή δηλητηρίασης χορτοφάγων και παθογόνων εντόμων. Επίσης, την προσέλκυση αρθροπόδων και άλλων αρπακτικών που επιτίθενται ή παρασιτούν κατά των χορτοφάγων, προστατεύοντας το φυτό μέσω τριτροφικών αλληλεπιδράσεων και ελαχιστοποιώντας την περαιτέρω καταστροφή του φυτικού ιστού (Dicke, 1999). Έχει παρατηρηθεί ότι υπό συνθήκες στρες η παραγωγή τερπενίων στα φυτά αυξάνεται. Αυτό εξηγεί εν μέρει το ότι τα είδη *Cistus* αναπτύσσονται σε άγονες περιοχές. Επίσης, με τη συμβολή των σεσκιτερπενίων που παράγουν στους ιστούς τους εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων γειτονικών φυτών (Dias & Moreira, 2002) είτε περιορίζοντας την ανάπτυξη εναέριων τμημάτων τους είτε παρεμποδίζοντας την εκβλάστησή τους, λόγω φυτοτοξικότητας (Chaves et al. 2001a, b).

Αξιοσημείωτη είναι η αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση του αιθερίου ελαίου ορισμένων ειδών λαδανιάς (Demetzos et al., 1995; Demetzos, Chinou, Harvala & Homatidou, 1990; Chinou, Demetzos, Harvala, Roussakis & Verbist, 1994). Τα λαβδανικά διτερπένια του αιθερίου ελαίου εκτός της αντιμικροβιακής, έχουν και εξαιρετική γαστροπροστατευτική δράση (Attaguile et al., 1995; Yesilada et al. 1997a), ενώ το αιθέριο έλαιο του είδους *C. ladanifer*, έχει παρουσιάσει και αντιοξειδωτική δράση (Guimaraes, Sousa & Ferreira, 2010). Σύγχρονες μελέτες φανέρωσαν ότι λαβδανικά διτερπένια (σκλαρεόλη, (13E)- λαβδ- 13- εντ- 8α, 15- διόλη, (13E)- λαβδ- 7, 13- διενόλη, εντ- 3β- υδροξυ- 13- επί- μανοϋλικό οξείδιο), που αποτελούν το βασικό συστατικό της ρητίνης και του αιθερίου ελαίου (Anastasaki et al., 1999), παρουσιάζουν αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντικαρκινική και κυτταροτοξική (κυρίως αντιλευχαιμική) δράση, κυρίως μέσω επαγωγής της απόπτωσης (Chinou et al., 1994; Demetzos et al., 1994; Dimas et al., 1998; Demetzos et al., 1999; Dimas et al., 1999; Dimas et al., 2001; Kalpoutzakis et al., 2001; Matsingou et al., 2005; Dimas et al., 2006; Hatziantoniou et al., 2006).

Τα συστατικά, όμως, που είναι ευρέως γνωστά για την αντιοξειδωτική τους δράση είναι τα φαινολικά. Ο μηχανισμός δράσης δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, όμως γίνονται σημαντικές προσπάθειες προς την κατεύθυνση αυτή. Τα εκχυλίσματα φυτών *Cistus* (υδατικά, οργανικά) είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά και έχουν παρουσιάσει αξιόλογη αντιοξειδωτική ενεργότητα εφάμιλλη των βιταμινών C και E

(Andrade, Gil, Breitenfeld, Domingues & Duarte, 2009; Guimaraes et al., 2010; Barrajon-Catalan et al., 2010; Sadhu et al., 2006).

Πέρα της αντιοξειδωτικής τους δράσης τα παραπάνω φυσικά προϊόντα παρουσιάζουν και σημαντική αντιμικροβιακή δραστικότητα. Απλές φαινόλες, όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη, έχουν ισχυρή μυκοτοξική δράση έναντι του *Penicillium digitatum* και του *Bacillus cereus* (Daferera et al., 2000; Zheng & Wang, 2001). Έρευνες με τον τελευταίο έδειξαν ότι η καρβακρόλη αλληλεπιδρά με την κυτταρική του μεμβράνη, όπου διαλύεται στη διπλή στοιβάδα των φωσφορολιπιδίων και ευθυγραμμίζεται μεταξύ των αλυσίδων λιπαρών οξέων. Η αποσταθεροποίηση της φυσιολογικής δομής προκαλεί αύξηση της υδαρότητας, που με τη σειρά της αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης (Burt, 2004).

Φαινολικά συστατικά που έχουν βρεθεί σε εκχυλίσματα των φυτών του γένους *Cistus* έχουν δράση έναντι μυκήτων, ιών, βακτηρίων (Chinou et al., 1994; Bouamama et al., 1999) υπεύθυνων για ανθρώπινες ασθένειες (Koch, 1981; Russell, 1991). Η αποτελεσματικότητά τους στη μείωση πληθυσμών μυκήτων, όπως η *Candida glabrata*, η *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus* και βακτηρίων, όπως *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae* και *Pseudomonas aeruginosa* αποδεικνύουν τη φαρμακευτική χρησιμότητά τους (Peyron & Alessandri, 1986; Bouamama et al., 2006).

Η μυρισετίνη είναι μια πολυφαινόλη που ανιχνεύεται σε φρούτα, λαχανικά και αρωματικά φυτά, αλλά και σε φυτά του γένους *Cistus* κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών. Επίσης, αποτελεί φαινολικό συστατικό στο κόκκινο κρασί. Ως πολυφαινόλη έχει αντιοξειδωτική δράση (Moser, 2008), αλλά και αντικαρκινική δράση στον καρκίνο του προστάτη και του παγκρέατος (Knekt, et al. 2002; Nöthlings, Murphy, Wilkens, Henderson & Kolonel, 2007).

Η παρουσία της κερκετίνης φαίνεται να δρα παρεμποδιστικά σε κάποια ένζυμα του ιού HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus), γνωστός και ως ιός του AIDS, ενώ η απιγενίνη παρεμποδίζει τη διαδικασία μεταγραφής του ιού. Επίσης η καμφορόλη παρεμποδίζει την αντιγραφή του ιού του απλού έρπητα HVS (Herpes Simplex Virus) (Cushnie & Lamb, 2005). Η μυρισετίνη, η κερκετίνη και η καμφορόλη παρουσιάζουν και αντιβακτηριακή δράση. Η μυρισετίνη και η κερκετίνη έχουν εμφανίσει αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Pseudomonas aeruginosa* με εντονότερη εκείνη

της μυρισετίνης (D'Souza, Wahidulla & Devi, 2010). Η αποδοτικότητα και οι άριστες συγκεντρώσεις εξαρτώνται κάθε φορά από την επιλεγμένη μέθοδο και την ποσότητα του εμβολίου. Η θέση δύο ομάδων –OH στις θέσεις 3', 4', του Β δακτυλίου και 5, 7 του Α είναι καθοριστική για τη δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* (Tsuchiya et al., 1996). Μια πιο πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι οι 5-υδροξυ-φλαβανόλες και φλαβόνες παρεμποδίζουν επίσης την ανάπτυξη του παραπάνω βακτηρίου. Οι 5-υδροξυ-φλαβανόλες με υδροξύλια στις θέσεις 7, 3' ή 4', όπως η κερκετίνη, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των *Streptococcus mutans* και *Str. sobrinus* (Cushnie & Lamb, 2005). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης, με τους οποίους φλαβονοειδή αδρανοποιούν ένζυμα, επηρεάζουν τη διαπερατότητα των βακτηριακών μεμβρανών και παρεμβαίνουν στη βαθμίδωση της συγκέντρωσης των ιόντων H^+ κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης.

Ενώ από την αρχαιότητα είναι γνωστό ότι τα εκχυλίσματα λαδανιάς παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, το έχουν αποδείξει και σύγχρονες έρευνες (Yesilada et al., 1997; Singh et al., 1998; Demetzos et al., 2001). Οι Lendeckel et al. (2001) σε μια προσπάθεια να ερμηνεύσουν την από την αρχαιότητα χρήση των εκχυλισμάτων λαδανιάς ως αντιφλεγμονώδη, διαπίστωσαν ότι τα υδατικά της εκχυλίσματα (*C. incanus* subsp. *incanus*) παρεμποδίζουν την ενζυματική δράση πεπτιδασών και μειώνουν τη σύνθεση DNA των ανθρώπινων T- και μονοπύρηνων κυττάρων, τα οποία εντείνουν τη δημιουργία φλεγμονών.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως παράλληλα η βιολογική τους δράση περιλαμβάνει και άλλες δράσεις πέρα των προαναφερθέντων, όπως αντιθρομβωτική, αντικαρκινογόνο (Polunin, 1969; Dimas et al., 2000), αντική (Dimas et al., 2000). Η αντιθρομβωτική δράση αποδίδεται στα φλαβονοειδή, λόγω της ικανότητάς τους να αυξάνουν την αντίσταση των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων και παράλληλα να ελαττώνουν τη διαπερατότητά τους, καθώς και στην ενεργότητα των ουσιών αυτών να παρεμποδίζουν την αμιδολυτική ικανότητα της θρομβίνης (Mozzicafreddo et al., 2006; Barrajon-Catalan et al., 2010).

Οι Belmokhtar et al. (2009) μετά από σχετικές αναλύσεις κατέληξαν πως το υδατικό εκχύλισμα του *C. ladanifer* εμφανίζει αντιυπερτασική και αγγειοδιασταλτική δράση.

Επίσης, είναι εντυπωσιακός ο πιθανός ρόλος τους στην επίδραση της δυναμικής του εδαφικού αζώτου, μέσω της μείωσης της κινητικότητάς του και κατά συνέπεια τη διευκόλυνση της προσαρμογής των πιο αργά αναπτυσσόμενων μεσογειακών θάμνων, όπως η λαδανιά, σε άγονα εδάφη (Northup, Yu, Dahlgren, & Vogt, 1998). Λόγω της ευκολίας ανάπτυξης σε άγονα και βραχώδη εδάφη, αλλά και της ομορφιάς των ανθέων της η λαδανιά καλείται και «ρόδο των βράχων» («rock rose»).

1.4 Χρήσεις των φυτών *Cistus*

Η ρητίνη που παράγουν κάποια είδη του γένους *Cistus*, όπως τα *C. incanus subsp. creticus*, *C. ladanifer*, είναι πολύ γνωστή για τις αρωματικές και ευεργετικές ιδιότητές της και πολλοί είναι οι μύθοι που κατά καιρούς έχουν διαδοθεί σχετικοί με τη χρήση και τη συλλογή της. Ο Διοσκουρίδης δίνει μια λεπτομερή περιγραφή για τον τρόπο συλλογής του λάδανου: «η έκκριση του φυτού κολλά στα γένια και στα πόδια των τράγων και των αιγών όταν βόσκουν και από εκεί μαζεύεται και ζυμώνεται για να πάρει την τελική μορφή του». Ακόμη, στη Βίβλο υπάρχουν συχνές αναφορές στο μύρο, που ήταν άλλωστε και ένα από τα τρία Θεία Δώρα που οι Μάγοι προσέφεραν στο Θείο Βρέφος, το οποίο όμως δεν είναι ενδημικό της Παλαιστίνης. Αντίθετα, τα είδη *Cistus incanus* (*C. villosus*) ή *Cistus salviifolius* είναι ενδημικά της περιοχής αυτής και για το λόγο αυτό πιστεύεται ότι το λάδανο από αυτά τα φυτά χρησιμοποιούσαν αντί του μύρου.

Η εκμετάλλευση της κομμεορητίνης (λάδανου) του *Cistus creticus* αποτελεί σημαντική και παλαιότερα κύρια πηγή εισοδήματος για τους κατοίκους της κοινότητας Σισσών Μυλοποτάμου Ρεθύμνης, οι οποίοι ασχολούνται και σήμερα με την συλλογή της. Η ρητίνη συλλέγεται από φυσικούς πληθυσμούς του *C. creticus* που υπάρχουν στην ευρύτερη ζώνη της κοινότητας, με τον πατροπαράδοτο τρόπο με μηχανικά μέσα κατά τις θερμές ώρες της ημέρας στην διάρκεια της θερινής περιόδου. Φαίνεται ότι η εκμετάλλευση του φυτού στη Κρήτη άρχισε την περίοδο της Αραβοκρατίας. Η συλλογή απαιτεί επίπονη εργασία και η ημερήσια απόδοση κυμαίνεται από 0,5-1Kg. Οι ποσότητες που συλλέγονται εξάγονται στις Αραβικές κυρίως χώρες όπου χρησιμοποιούνται σαν θυμίαμα, αλλά και για την απολύμανση εσωτερικών χώρων (http://www.iama.gr/ethno/Ladano_files/Ladano_Oikonomakis.pdf).

Το αιθέριο έλαιο κάποιων ειδών, χρησιμοποιείται επίσης στην κοσμετολογία και τη φαρμακευτική. Το σεσκιτερπένιο βισαβολόλη για παράδειγμα, χρησιμοποιείται

εδώ και χρόνια σε καλλυντικά, λόγω θεραπευτικών δερματικών ιδιοτήτων της. Από φαρμακολογικής άποψης, επίσης, πολλά σεσκιτερπένια παρουσιάζουν χρήσιμες ιδιότητες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η βισαβολόλη ως αντιφλεγμονώδες και σπασμολυτικό (Kamatou & Viljoen, 2010), το β-καρνοφυλλένιο ως αντιφλεγμονώδες (Gertsch, J. et al., 2008), η αρτεμισινίνη ως ανθελονοσιακό (Douglas, Anstey, Angus, Nosten & Price, 2010), η πικροτοξίνη ως αντίδοτο σε δηλητηρίαση από βαρβιτουρικά (Nillson & Eyrich, 1950).

Όλα τα είδη *Cistus* χαρακτηρίζονται ως πυρόφυτα, λόγω της άμεσης ενεργοποίησης του φυτρώματος των σπερμάτων τους και της μεγάλης εξάπλωσής τους, αμέσως μετά από πυρκαγιά (Ferrandis, Herrantz & Martinez-Sanchez, 1999). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα σπέρματά τους είναι δύο ειδών. Το ένα είδος περιλαμβάνει σπέρματα που καλύπτονται από μια σκληρή, αδιάβροχη μεμβράνη, η οποία μόνο υπό συνθήκες στρες, όπως η έκθεση στις υψηλές θερμοκρασίες της πυρκαγιάς, διαρρηγνύεται επιτρέποντας την απορρόφηση νερού και το φύτρωμα του σπόρου (Thanos & Georghiou, 1988). Η διάρκεια της έκθεσης στις υψηλές θερμοκρασίες (<110°C) δεν επηρεάζει τη βλάστηση των σπόρων (Herrero, San Martin & Bravo, 2007). Υπάρχει, ωστόσο, και ένας μικρός αριθμός σπερμάτων που η μεμβράνη τους δεν είναι σκληρή και βλαστάνουν ευκολότερα, χωρίς την ανάγκη επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών (Thanos, 1992).

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

2.1 Ανάλυση Αιθερίου Ελαίου

2.1.1 Τρόποι παραλαβής

Η παραλαβή του αιθερίου ελαίου από το αποξηραμένο φυτικό υλικό γίνεται συνήθως με απόσταξη. Το έλαιο αποτελείται από πτητικά και σχετικά μικρότερου μοριακού βάρους συστατικά. Τεχνικές απόσταξης που χρησιμοποιούνται είναι:

- υδροαπόσταξη (hydrodistillation, HD)
- απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation, SD), με χρήση συσκευής Clevenger
- μικροαπόσταξη με υδρατμούς, εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (micro-steam distillation extraction, MSDE), με χρήση συσκευής Lickens-Nickerson
- απόσταξη με κενό (vacuum head space distillation, VHSD)
- παραλαβή στο χώρο πάνω από το φυτό (head space, HS).

Σε πιο πρόσφατες μελέτες για την παραλαβή πτητικών συστατικών έχουν χρησιμοποιηθεί κάποιες τεχνικές εκχύλισης, όπως:

- μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (solid-phase microextraction, SPME)
- εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (super critical fluids, SCF).

Στον Πίν. 2.1 φαίνονται κάποιες μελέτες των ειδών του γένους *Cistus* και οι τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.1: Τεχνικές απομόνωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη αιθερίου ελαίου λαδανιάς.

Δείγμα	Τεχνικές απομόνωσης	Μέθοδος ανάλυσης	Αναφορά
<i>C. ladanifer</i>	SD	GC, GC/MS	Robles et al., 2003
<i>C. creticus</i>	HD	GC/MS	Demetzos et al., 2002
<i>C. ladanifer</i>	SDE	GC, GC/MS	Texeira et al., 2007
<i>C. ladanifer</i>	SCF-CO ₂	GC/FID	Rincon, Lucas & Garcia, 2000
<i>C. creticus</i>	HS-SPME	GC, GC/MS	Paolini et al., 2009

2.1.2 Αέρια Χρωματογραφία (GC/FID-GC/MS)

Η Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography) διακρίνεται σε:

(α) Στερεά Αέρια Χρωματογραφία: Το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι μια στερεά φάση με ενεργή επιφάνεια. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος οφείλεται στην προσρόφηση αυτών πάνω στην ενεργή επιφάνεια της στερεάς φάσης, π.χ. Silica gel, Al₂O₃, μοριακά κόσκινα κ.α.

(β) Υγρή Αέρια Χρωματογραφία ή Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC): Η στατική φάση είναι ένα στερεό (κόκκοι) καλυμμένο με λεπτή στοιβάδα υγρού. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος οφείλεται στη διαφορά των συντελεστών κατανομής τους ανάμεσα στην υγρή και στην αέρια φάση. Όσο μεγαλύτερη χημική συγγένεια υπάρχει ανάμεσα στα συστατικά του αερίου μίγματος και στην υγρή επικάλυψη της στερεάς φάσης, τόσο ο χρόνος συγκράτησής του στη στήλη είναι μεγαλύτερος. Η περίπτωση (β) είναι αυτή που έχει επικρατήσει και χρησιμοποιείται συνήθως.

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος γίνεται μέσω εκλεκτικών προσροφήσεων ή κατανομών τους μεταξύ μιας υγρής ή στερεάς στατικής φάσης και μιας αέριας κινούμενης φάσης μέσα στη στήλη της χρωματογραφίας. Το φέρον αέριο (αδρανές, απαλλαγμένο από προσμίξεις), που είναι συνήθως N₂, ή He ή Ar, οδηγείται από τη φιάλη υψηλής πίεσης μέσα στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Η παροχή του αερίου ρυθμίζεται με ειδικές βαλβίδες και ροόμετρα.

Το σύστημα περιλαμβάνει ακόμα θερμοστατούμενο κλίβανο, στήλη χρωματογραφίας, ανιχνευτή, ενισχυτή και καταγραφέα ή ηλεκτρονικό υπολογιστή-εκτυπωτή. Ο ανιχνευτής μπορεί να είναι ιονισμού φλόγας (FID), θερμικής αγωγιμότητας (TCD), σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), Άζωτου-Φωσφόρου (NPD) ή Φλογοφωτομετρικός (FPD).

Λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων της η μέθοδος αυτή είναι η πιο διαδεδομένη. Χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση, καθώς και στον έλεγχο καθαρότητας ουσιών και μπορεί να εφαρμοσθεί τουλάχιστον στο 95% των οργανικών ενώσεων.

Η αέρια χρωματογραφία εφαρμόζεται για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και προσδιορισμό ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την

εφαρμογή της μεθόδου είναι οι εξεταζόμενες ουσίες να είναι πτητικές ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλα αντιδραστήρια.

Η ταυτοποίηση των συστατικών ενός μίγματος μπορεί να γίνει:

- με σύγκριση του χρόνου συγκράτησης του άγνωστου συστατικού με αυτόν του πρότυπου,
- με τη μέθοδο του εμβολιασμού (spiking), δηλαδή με προσθήκη στο δείγμα μετά τη λήψη του πρώτου χρωματογραφήματος, μικρής ποσότητας από την ουσία που θέλουμε να ανιχνεύσουμε,
- με προσδιορισμό του δείκτη Kovats (Kovats retention index), οπότε γίνεται σύγκριση του χρόνου συγκράτησης της άγνωστης ουσίας με τον αντίστοιχο των αλκανίων (Kovats index).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών γίνεται με:

- βάση το % εμβαδό (percentage of total)
- μέθοδο εξωτερικού προτύπου (external standard)
- μέθοδο εσωτερικού προτύπου (internal standard).

Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να συνδυαστεί με φασματογραφία μάζας (Mass Spectrometry, MS) και να γίνει πολύτιμο όργανο ταυτοποίησης πολύπλοκων μιγμάτων (GC/MS).

Στη μελέτη του αιθερίου ελαίου της λαδανιάς, που θεωρείται ιδιαίτερα σύνθετο μίγμα συστατικών με σημαντική δυσκολία στην ταυτοποίησή τους, συχνά χρησιμοποιείται η αέρια χρωματογραφία ως μέθοδος ανάλυσης.

Συνθήκες ανάλυσης, όπως η ροή του φέροντος αερίου, η στήλη, η θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικές για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των επιμέρους συστατικών (Πίν. 2.2).

Πίνακας 2.2: Συνθήκες ανάλυσης που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη αιθερίου ελαίου λαδανιάς.

Στήλη	Πρόγραμμα θερμοκρασίας	Δείγμα	Αναφορά
FFAP, 50m x 0.2 mm x 0.33 μm	10min στους 60 ⁰ C, ως 100 ⁰ C με 2 ⁰ C /min, 5min στους 100 ⁰ C, ως 180 ⁰ C με 2 ⁰ C /min, 5min στους 180 ⁰ C, ως 220 ⁰ C με 2 ⁰ C /min, 10 min στους 220 ⁰ C	<i>C. ladanifer</i>	Robles et al., 2003
HP MS, 30m x 0.25 mm x 0.25 μm	5 min 500C, ως 220 ⁰ C με 3 ⁰ C /min	<i>C. creticus</i>	Demetzos et al., 2002
1. Rtx-1 (πολυδιμεθυλοσιλοεξάνιο) 2. Rtx-wax (πολυαιθυλενογλυκόλη) 60m x 22mm x 0.25μm	από 60C ως 230 ⁰ C με 2 ⁰ C, 35 min στους 230 ⁰ C	<i>C. creticus</i>	Paolini et al., 2009
CP-Sil 5CB, 30m x 0.53mm x 1.5μm	1min στους 70 ⁰ C, ως 150 ⁰ C με 2 ⁰ C /min, 1min στους 150 ⁰ C, ως 280 ⁰ C με 15 ⁰ C /min, 15min στους 280 ⁰ C	<i>C. ladanifer</i>	Teixeira et al., 2007
HP-5MS, 30m x 0.25 mm x 0.25 μm	5min 50 ⁰ C, ως 280 ⁰ C με 3 ⁰ C /min	<i>C. parviflorus</i>	Angelopoulou et al., 2001
Ultra 2, 50m x 0.2 mm x 0.25μm	από 60 ⁰ C ως 220 ⁰ C με 3 ⁰ C, 5min στους 230	<i>C. monspeliensis</i>	Rivoal et al., 2010

2.2 Ανάλυση υδροαλκοολικού εκχυλίσματος

2.2.1 Τρόποι παραλαβής

Για την παραλαβή συστατικών μη πτητικών και μεγαλύτερου μοριακού βάρους, όπως τα φαινολικά συστατικά, από το αποξηραμένο φυτό εφαρμόζονται συνήθως κάποιες τεχνικές εκχύλισης. Εκτός από εκείνες που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.1.1, υπάρχουν και άλλες, όπως:

- απλή εκχύλιση σε «θερμοκρασία δωματίου» ή «εν θερμώ»
- εκχύλιση με συσκευή Soxhlet
- εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE)
- εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (micro-wave assisted extraction, MAE)
- εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (ultra sound assisted extraction USE).

Οι υπέρηχοι εφαρμόστηκαν στην εκχύλιση συστατικών, όπως σαπωνίνες, στεροειδή και τριτερπενοειδή από το είδος *Chresta spp.* εξοικονομώντας σχεδόν τον τριπλάσιο χρόνο από την κλασική εκχύλιση (Schinor et al., 2004). Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής έναντι της κλασικής εκχύλισης σε χρόνο, απόδοση, αλλά και σε οικονομικό όφελος υποστηρίζουν και οι Alurului et al., (2009) σε σχετική έρευνά τους.

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 σε αυτό με αποτέλεσμα τη διείσδυση του διαλύτη στον ιστό, την αποικοδόμηση των πολυμερών του σε μεγάλο βαθμό και τελικά την αποτελεσματικότερη εκχύλισή του (Keil, 2007). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των υπερήχων κατά τη διάρκεια της εκχύλισης είναι για παράδειγμα η συχνότητά τους, οι ιδιότητες του υγρού (διαλύτη), η θερμοκρασία του υγρού, η περιεκτικότητά του σε αέρια. Γενικά οι ιδανικές συνθήκες απαιτούν σχετικά χαμηλές συχνότητες υπερήχων, διαλύτη χαμηλού ιξώδους και θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 2.1: Λουτρό υπερήχων.

Η παραλαβή εκχυλίσματος από φυτά λαδανιάς γίνεται συνήθως με απλή εκχύλιση σε «θερμοκρασία δωματίου» ή «εν θερμώ» (Barrajon-Catalan et al., 2010; Andrade, et al., 2009; Fernandez-Arroyo, 2010; Saracini et al., 2005; Pomponio et al., 2003; Guimaraes et al., 2010). Διάφοροι διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φυτά του γένους *Cistus* και συγκριτικές μελέτες έχουν δώσει πληροφορίες για τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα. Έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί διαλύτες όπως: μεθανόλη, αιθανόλη, βουτανόλη, ακετόνη και απεσταγμένο νερό, μίγματα του νερού με οργανικούς διαλύτες (Demetzos et al., 1989; Volgt & Gulz, 1994; Saracini et al., 2005; Andrade et al., 2009; Fernandez-Arroyo, 2010; Barrajon-Catalan et al., 2010; Amensour, Sendra, Perez-Alvarez, Skali-Senhaji, Abrini & Fernandez-Lopez, 2010; Guimaraes et al., 2010).

2.2.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών – Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών, μια γνωστή μέθοδος που χρησιμοποιείται, είναι η χρωματομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή αρχικά είχε προταθεί για την ανάλυση πρωτεϊνών (Folin & Ciocalteu, 1927) και αποτελεί έναν τρόπο ανίχνευσης του συνόλου των υδροξυ-φαινυλομάδων ενός δείγματος χωρίς το διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών (Singleton & Rossi, 1965; Waterman & Mole, 1994). Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται όλο και συχνότερα λόγω της απλότητάς της, της επαναληψιμότητάς της και του γεγονότος ότι επηρεάζεται λιγότερο από ουσίες παρεμπόδισης, οι οποίες μεταβάλλουν το αποτέλεσμα.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι τα ολικά φαινολικά συστατικά ενός δείγματος σε αλκαλικό περιβάλλον, δίνουν ένα έντονο μπλε χρώμα ανάγοντας τα ετεροπολυμερή ιόντα του φωσφομολυβδενικού οξέος και του φωσφοβολφραμικού οξέος που περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, και από την απορρόφησή τους στα 765nm προκύπτει η τιμή της συγκέντρωσής τους στο δείγμα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών γίνεται με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τη χρήση γαλλικού οξέος, με αποτέλεσμα η τιμή της συγκέντρωσης κάθε δείγματος να εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών συστατικών διαφόρων εκχυλισμάτων του γένους *Cistus* (Amensour et al., 2010; Barrajon-Catalan et al., 2010; Andrade et al., 2009) (Πίν. 2.3).

Πίνακας 2.3: Μελέτες φαινολικών συστατικών εκχυλισμάτων φυτών *Cistus*.

Διαλύτης εκχύλισης	Δείγμα	ΟΦΣ	Αναφορά
απεσταγμένο H ₂ O	<i>C. ladanifer</i>	22.9±1.1 (g GAE/100g ξ.ο.)	Barrajon-Catalan et al., 2010
απεσταγμένο H ₂ O	<i>C. populifolius</i>	31.9±1.1 (g GAE/100g ξ.ο.)	
CH ₃ OH	<i>C. ladanifer</i>	18.4± 2.7 (mg GAE/g εκχυλίσματος)	Amensour et al., 2010
CH ₃ CH ₂ OH	<i>C. ladanifer</i>	11.9±0,5 (mg GAE/g εκχυλίσματος)	
CH ₃ CH ₂ OH	<i>C. ladanifer</i>	2.55±0.07 x 10 ² (mg GAE/g εκχυλίσματος)	Andrade, et al., 2009
CH ₃ COCH ₃	<i>C. ladanifer</i>	(3.35±0.32) x 10 ² (mg GAE/g εκχυλίσματος)	

Η τροποποιημένη μέθοδος Folin-Ciocalteu που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν των Tawaha et al. (2007).

2.2.3 Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας – Μέθοδος του 2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH)

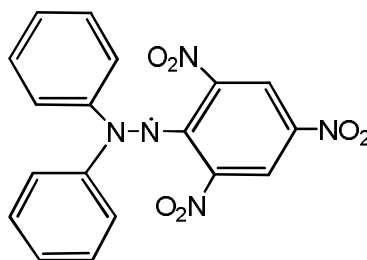
Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας υδροαλκοολικού εκχυλίσματος φυτών υπάρχουν διάφορες μέθοδοι. Διακρίνονται σε εκείνες που μπλοκάρουν την παρουσία ριζών (free radical trapping methods) και σε άλλες που προσδιορίζουν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν την οξείδωση των λιπαρών συστατικών (lipid oxidation) (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995). Ένα ακόμα κριτήριο της διάκρισης των μεθόδων αυτών είναι οι χημικές αντιδράσεις που παρατηρούνται κατά τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας. Βάσει αυτών των αντιδράσεων, διακρίνονται σε μεθόδους:

- με αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer based assays-HAT) και
- με αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays).

Η πλειονότητα των HAT-μεθόδων εφαρμόζει ένα ανταγωνιστικό σχήμα αντιδράσεων στο οποίο αντιοξειδωτικό και υπόστρωμα ανταγωνίζονται για τις παραγόμενες, ρίζες υπεροξειδίου. Οι ρίζες αποσπών άτομα υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση οξείδωσης του υποστρώματος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν: η παρεμπόδιση αυτο-οξείδωσης της χαμηλής πυκνότητας λιπορωτεΐνης (LDL), η Ικανότητα Απορρόφησης Ριζών Οξυγόνου (Oxygen Radical Absorbance Capacity-ORAC), το Συνολικό Δυναμικό Παγίδευσης Ριζών Υπεροξειδίου (Total Peroxyl Radical-Trapping Potential-TRAP), οι μέθοδοι αποχρωματισμού κροκίνης.

Οι ET-μέθοδοι βασίζονται και μετρούν την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αντιδρά και να δεσμεύει οξειδωτικά συστατικά, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό τους. Ο βαθμός του αποχρωματισμού σχετίζεται με τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού στο δείγμα. Μερικές από τις μεθόδους αυτές είναι: η μέθοδος του 2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH), η μέθοδος Trolox (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity-TEAC), η μέθοδος Αντιοξειδωτικής Ισχύος Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου (Ferric Reducing Antioxidant Power-FRAP) (Huang, Ou & Prior, 2005).

Η μέθοδος του DPPH είναι η παλαιότερη και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη. Το DPPH (**Εικ. 2.1**) είναι μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου, της οποίας το μεθανολικό διάλυμα έχει έντονο μωβ χρώμα. Τα αντιοξειδωτικά του εκχυλίσματος δεσμεύουν τη ρίζα αυτή, το διάλυμα αποχρωματίζεται και η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 515 nm.



Εικόνα 2.1: Το DPPH.

Το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης του εκχυλίσματος υπολογίζεται από τη σχέση:

$$I \% = [(A_0 - A) / A_0] * 100, \text{ όπου } I\%: \text{ η \% δέσμευση της ελεύθερης ρίζας}$$

A_0 : η απορρόφηση του τυφλού

A : η απορρόφηση του δείγματος.

Η συγκέντρωση του δείγματος που προκαλεί δέσμευση της ελεύθερης ρίζας κατά 50% ονομάζεται Inhibition Concentration (IC_{50}) και χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ισχύος.

Εκχυλίσματα ειδών του γένους *Cistus*, όπως *C. ladanifer* (Andrade et al., 2009; Amensour et al., 2010; Barrajon-Catalan et al., 2010), *C. incanus*, *C. monspeliensis* (Attaguile et al., 2000) έχουν μελετηθεί ως προς την αντιοξειδωτική τους ενεργότητα με διάφορες μεθόδους (DPPH, ABTS, FRAP, ORAC) και έχουν παρουσιάσει καλή δράση (Πίν. 2.4).

Πίνακας 2.5: Μελέτη εκχυλισμάτων φυτών *Cistus* ως προς την αντιοξειδωτική τους ενεργότητα.

Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ενεργότητας	Διαλύτης	<i>C. ladanifer</i>	<i>C. populifolius</i>	Αναφορά
TEAC (mmol TE/100g ξ.β.), n=8	απεσταγμένο H ₂ O	35.9±1.3	45.7±1.5	Barrajon-Catalan et al., 2010
FRAP (mmol Fe ²⁺ /100g ξ.β.), n=8	απεσταγμένο H ₂ O	117.7±4.4	179.1±3.4	Barrajon-Catalan et al., 2010
ORAC (μmol TE/g ξ.β.), n=8	απεσταγμένο H ₂ O	3329.0±182.1	2348.4±325.3	Barrajon-Catalan et al., 2010
DPPH (IC_{50} , μg/mL)	CH ₃ CH ₂ OH	7.85	-	Andrade et al., 2009

2.2.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC/DAD-LC/MS)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται για την ποιοτική και συχνά και για την ποσοτική σύσταση των φαινολικών συστατικών. 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, Π., 2004).

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

α) Δοχείο κινητής φάσης – διαλύτης: Το δοχείο ή τα δοχεία κινητής φάσης είναι συνήθως γυάλινα και στο σωλήνα τροφοδοσίας υπάρχει ειδικό φίλτρο (2 μm), που παρεμποδίζει τη μεταφορά σωματιδίων, που μπορούν να μπλοκάρουν την αντλία. Ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, (HPLC grade) και να έχει απαερωθεί (degassed).

β) Αντλία: Η αντλία είναι υψηλής πίεσης (14-6000 psi) και συνδυάζεται με σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής (παροχής), της κινητής φάσης.

γ) Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής η χωρητικότητα της οποίας κυμαίνεται από 1 – 500 μL . Η ποιότητα της βαλβίδας κρίνεται από την ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος.

δ) Στήλη: Το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξειδωτος χάλυβας. Το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης είναι 2 - 3 mm και το μήκος της κυμαίνεται από 10 – 100 cm, ενώ το συνηθέστερο μήκος είναι 25 – 30 cm. Η αποτελεσματικότητα της στήλης κρίνεται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Οι κόκκοι του υλικού πλήρωσης είναι διαμέτρου 5 – 10 μm , ενώ υπάρχουν και κόκκοι 3 μm , οι οποίοι επιτρέπουν τη χρήση στηλών μικρού μήκους, άρα ταχύτατους διαχωρισμούς.

Το υλικό πλήρωσης της στήλης ως προς τη φύση του μπορεί να είναι α) πορώδες, με βάση την πυριτική γη (silica), β) μη πορώδες (pellicular), γ) σκληρή πηκτή, με βάση το πολυστυρόλιο.

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, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκκλούνται τελευταίες από τη στήλη και β) **ανεστραμμένης φάσης (reversed phase)**, όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

ε) Ανιχνευτής: Ο πιο συνηθισμένος τύπος είναι το φωτόμετρο UV-Vis. Οι ουσίες που αναλύονται με αυτόν τον ανιχνευτή απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 190 – 600 nm. Υπάρχουν τρεις τύποι του ανιχνευτή UV-Vis:

- 1) Ανιχνευτής σταθερού μήκους κύματος
- 2) Ανιχνευτής πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος

3) Ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (Diode Array Detector-DAD), ο οποίος και βοηθάει στη διαπίστωση της «καθαρότητας» μιας χρωματογραφικής κορυφής, γιατί είναι δυνατό να πάρουμε πληροφορίες από μια πλήρη σάρωση μιας ευρείας περιοχής συχνοτήτων.

Επίσης, ο ανιχνευτής μπορεί να είναι φασματογράφος μάζας, οπότε έχουμε το σύστημα LC/MS που αποτελεί ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης φαινολικών μιγμάτων.

στ) Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής: Χρησιμοποιείται για την καταγραφή και παρουσίαση του χρωματογραφήματος (Ταραντίλης, Π., 2004).

Εφαρμογή της τεχνικής αυτής για το διαχωρισμό φαινολικών συστατικών σε εκχυλίσματα λαδανιάς γίνεται συχνά. Στον **Πίν. 2.5** φαίνονται στοιχεία αυτών των αναλύσεων.

Πίνακας 2.5: Ανάλυση εκχυλισμάτων φυτών *Cistus* με HPLC.

Στήλη	Πρόγραμμα έκλουσης	Δείγμα	Αναφορά
Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 μm , 150 x 4.6 mm)	Κινητή φάση: (A) Οξικό οξύ 0.5%, (B) CH_3CN B: 0 min – 0% 20 min – 20% 30 min – 30% 40 min – 50% 50 min – 75% 60 min – 100%	<i>C. ladanifer</i>	Fernandez- Arroyo et al., 2010
Polaris E, RP18 (5 μm , 4.6 x 250 mm)	Κινητή φάση: (A) $\text{H}_2\text{O}/\text{H}^+$, pH 3.2, (B) CH_3CN B: 0.1 min – 5% 20 min – 15% 25 min – 15% 35 min – 25% 43 min – 25% 53 min – 100%	<i>C. salviifolius</i>	Saracini et al., 2005
LiChrosorb RP18 (5 μm , 4.5 x 250 mm)	Κινητή φάση: 0.1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ σε H_2O -THF- CH_3OH - CH_3CN (56:22:16:6, ταχύτητα ροής 0.8mL/min)	<i>C. ladanifer</i>	Chaves et al., 1998
Sherisorb RP18 (5 μm , 4.6 x 150 mm)	Κινητή φάση: H_2O - CH_3OH - THF- (56: 16:28, ταχύτητα ροής 0.75mL/min)	<i>C. ladanifer</i>	Sosa et al., 2005

3. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν:

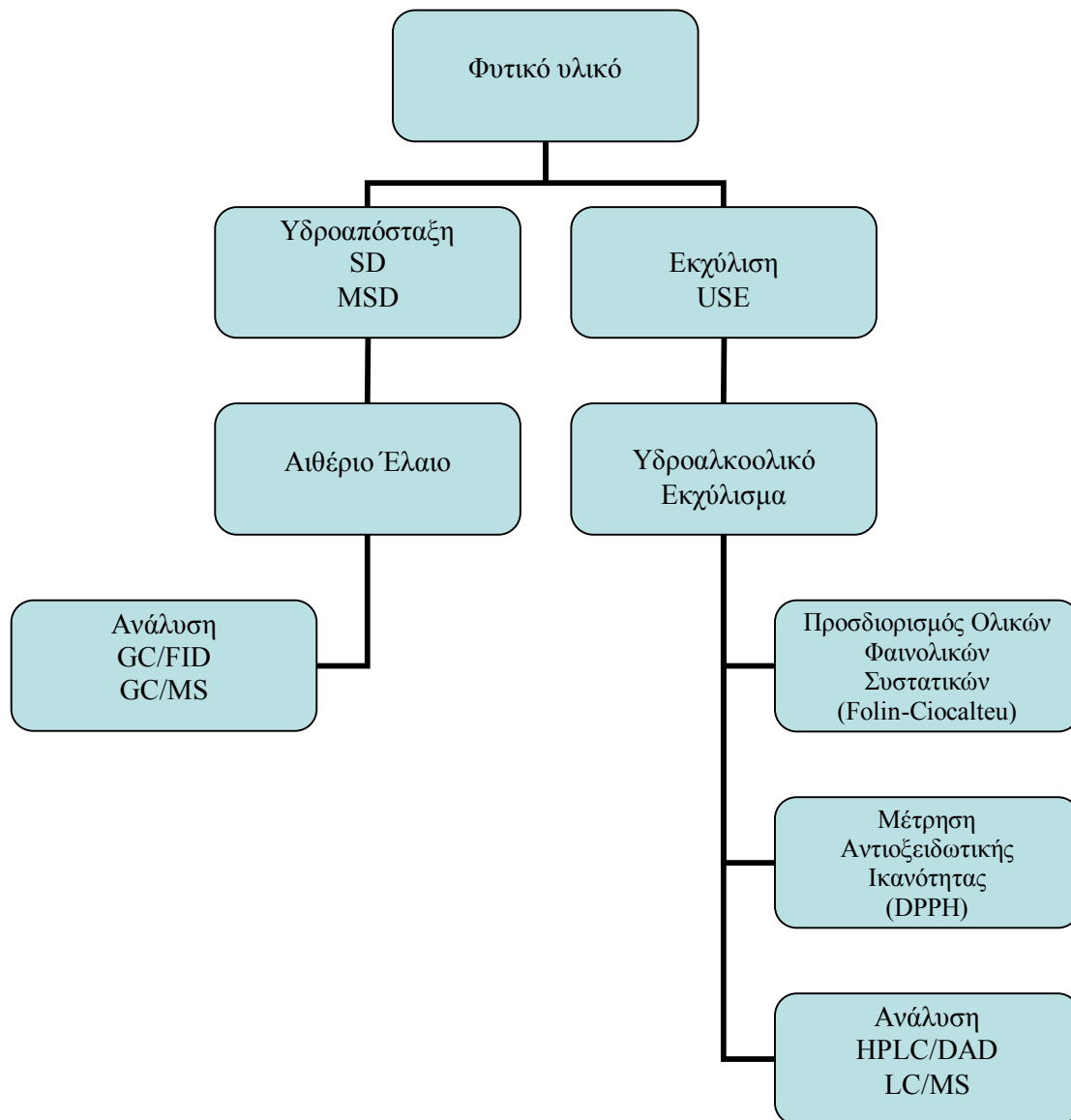
α) η μελέτη ως προς την ποιοτική και ποσοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου των φύλλων φυτών του γένους *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας, β) η μελέτη υδροαλκοολικού εκχυλίσματος των φύλλων φυτών του γένους *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας, ως προς το περιεχόμενό τους σε Ολικά Φαινολικά Συστατικά, την αντιοξειδωτική τους ενεργότητα και την ποιοτική τους σύσταση.

Το φυτικό υλικό προήλθε από φυτά του γένους *Cistus* που συλλέχθηκαν από διαφορετικά μέρη της Ελλάδας. Το γένος *Cistus* επιλέχθηκε, λόγω του ότι περιέχει είδη που από την αρχαιότητα ήδη ο άνθρωπος είχε ανακαλύψει τόσο την αντιμικροβιακή, αντισηπτική, γαστροπροστατευτική και πιο πρόσφατα την αντιοξειδωτική τους δράση, ως φαρμακευτικά, όσο και την αρωματική τους αξία, λόγω της εύοσμης ρητίνης που παράγουν. Οι ιδιότητες αυτές, όπως έχει διαπιστωθεί, μπορούν να αποδοθούν σε προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού.

Ειδικότερα ο σκοπός της μελέτης ήταν:

- η παραλαβή του αιθερίου ελαίου με υδροαπόσταξη σε συσκευή Clevenger και με απόσταξη και μικροεκχύλιση σε συσκευή Lickens-Nickerson
- η ανάλυση του αιθερίου ελαίου με αέρια χρωματογραφία (GC/FID-GC/MS)
- η παραλαβή υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων μέσω εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους
- ο προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu
- η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH
- η ανάλυση των εκχυλισμάτων με χρωματογραφία HPLC/DAD και LC/MS.

Σχηματικά τα στάδια της μελέτης αποδίδονται στο ακόλουθο οργανόγραμμα:



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΥΛΙΚΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Φυτικό υλικό

Εναέρια μέρη φυτών του γένους *Cistus* συλλέχθηκαν από τις ακόλουθες περιοχές της Ελλάδας: Αγρίνιο Αιτωλοακαρνανίας (ΑΑ), Γούβες Ηρακλείου (ΓΗΚ), Σίσσες Ρεθύμνου (ΣΡΚ) και Φόδελε Ηρακλείου (ΦΗΚ) τους μήνες Μάρτιο (ΑΑ), Ιούνιο (ΓΗΚ), Ιούλιο (ΣΡΚ, ΦΗΚ) (Πίν. 4.1). Αποξηραμένα φύλλα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου και των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με σκοπό την ανάλυσή τους.

Πίνακας 4.1: Κωδικοποίηση δειγμάτων *Cistus*, περιοχή και μήνας συλλογής.

Κωδικός Δείγματος	Περιοχή	Μήνας Συλλογής
ΑΑ	Αγρίνιο Αιτωλοακαρνανίας	Απρίλιος
ΓΗΚ	Γούβες Ηρακλείου Κρήτης	Ιούνιος
ΣΡΚ	Σίσσες Ρεθύμνου Κρήτης	Ιούλιος
ΦΗΚ	Φόδελε Ηρακλείου Κρήτης	Ιούλιος

4.2 Απομόνωση, παραλαβή και μελέτη αιθερίου ελαίου

Διαλύτες-Αντιδραστήρια

- Διαιθυλαιθέρας χωρίς BHT 99,7%, SDS
- Άνυδρο Θεικό Μαγνήσιο, Mallinckrodt AR

4.2.1 Απομόνωση-παραλαβή αιθερίου ελαίου

Σε 3 g λειοτριβιμένων φύλλων όλων των δειγμάτων (Εικ. 4.1) και επιπλέον σε 6 g του δείγματος ΑΑ έγινε μικρο-απόσταξη με υδρατμούς και εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (MSDE) με χρήση της συσκευής Lickens-Nickerson (Εικ. 4.2). Η απόσταξη - εκχύλιση είχε διάρκεια περίπου μία ώρα και τα αιθέρια έλαια παραλήφθηκαν σε διαιθυλαιθέρα. Στη συνέχεια ξηράθηκαν με άνυδρο $MgSO_4$, πέρασαν από φίλτρο Chromafil Xtra PTFE-45/25 και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους $-20^{\circ}C$ ως την ανάλυση.

Λόγω της έλλειψης μελετών του αιθέριου ελαίου από φυτά λαδανιάς προερχόμενα από το νομό Αιτωλοακαρνανίας, αλλά και της μεγαλύτερης διαθέσιμης ποσότητας δείγματος στο εργαστήριο, θεωρήθηκε σκόπιμη η περαιτέρω ανάλυση του δείγματος **ΑΑ**. Έτσι, πραγματοποιήθηκε υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger (**Εικ. 4.2**) για 3 ώρες σε 49 g φύλλων του δείγματος. Παραλήφθηκε μίγμα ελαίου και νερού και ο διαχωρισμός τους έγινε με εκχυλιστική χοάνη. Το αιθέριο έλαιο (**ΑΑ1**) ξηράνθηκε με άνυδρο $MgSO_4$ φιλτραρίστηκε και φυλάχθηκε στους $-20^{\circ}C$ την ανάλυση. Το αιθέριο έλαιο των φυτών από το νομό Αιτωλοακαρνανίας που παραλήφθηκε με συσκευή Lickens-Nickerson θα συμβολίζεται **ΑΑ**.



Εικόνα 4.1: Α. Αποξηραμένα φύλλα φυτών λαδανιάς.



Εικόνα 4.2: Α. Υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger. Β. Απόσταξη-εκχύλιση με συσκευή Lickens-Nickerson.

4.2.2 Μελέτη του αιθερίου ελαίου με GC/FID και GC-MS

Ανάλυση GC/FID

Τα αιθέρια έλαια αναλύθηκαν με αέριο χρωματογράφο (GC) Hewlett Packard 5890 II, τριχοειδούς στήλης Rtx-5MS (30 m X 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m) σε συνδυασμό με Ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας (FID) (Εικ. 4.3). Η θερμοκρασία στη στήλη αυξανόταν βαθμιαία από τους 60°C στους 280°C με ρυθμό 3°C/λεπτό. Το φέρον αέριο ήταν το Ήλιο (He) με ταχύτητα ροής 1 mL/λεπτό. Η θερμοκρασία στον εισαγωγέα ήταν 220°C και η θερμοκρασία στον ανιχνευτή ήταν 290°C. Ποσότητα του 1 μ L από κάθε αιθέριο έλαιο εισήχθη με την τεχνική «splitless». Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του κάθε ελαίου έγινε ηλεκτρονικά από το εμβαδό της κάθε κορυφής στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα, το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αντίστοιχης ουσίας στο υπό εξέταση δείγμα.

Ανάλυση GC-MS

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση GC-MS στον ίδιο αέριο χρωματογράφο και στο ίδιο πρόγραμμα σε συνδυασμό με φασματόμετρο μάζας (MS) Hewlett Packard 5972 με τη μέθοδο ιονισμού ηλεκτρονίων (70e). Ομοίως, οι θερμοκρασίες εισαγωγέα και γραμμής διαβίβασης ανιχνευτή ήταν 220°C και 290°C, αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε με σύγκριση δεδομένων των αντίστοιχων χρόνων συγκράτησης και των φασμάτων μάζας με εκείνα των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών Adams07, Wiley275 και Nist98 του συστήματος GC/MS και της βιβλιογραφίας.



Εικόνα 4.3: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας (GC) που χρησιμοποιήθηκε για τις αντίστοιχες αναλύσεις.

4.3 Παραλαβή και μελέτη υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων

Διαλύτες-Αντιδραστήρια-Πρότυπες ενώσεις

- Πετρελαϊκός αιθέρας, SDS
- 2,6-Δι-*tert*-βουτυλ-*p*-κρεσόλη (BHT) [(CH₃)₃C]₂C₆H₂(CH₃)OH 220.36, BDH
- Διαιθυλαιθέρας χωρίς BHT 99.7%, SDS
- Μεθανόλη (MeOH) HPLC 99.9%, Merck KGaA
- Υδροχλώριο (HCl) 36.46, BDH
- Οξικός αιθυλεστέρας 99.8%, LAB Scan Analytical Sciences
- Ακετονιτρίλιο (AcCN) HPLC 99.9%, LAB Scan
- Μυρμηγκικό οξύ (CH₃COOH) 98%, PA-ACS Panreac QUIMICA SA
- Διάλυμα Folin-Ciocalteu 2N, Merck KGaA
- Άνυδρο Ανθρακικό Νάτριο (Na₂CO₃) 99%, Merck KGaA
- 2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (C₁₈H₁₂N₅O₆), Sigma
- Γαλλικό οξύ (C₇H₆O₅) 98+%, Alfa Aesar-Johnson Matthey Company
- Κατεχίνη (C₁₅H₁₄O₆) 98%, Sigma-Aldrich
- Επικατεχίνη (C₁₅H₁₄O₆), Sigma
- Επικατεχίνη γαλλικού οξέος 98%, Sigma-Aldrich
- Επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού οξέος (C₂₂H₁₈O₁₁) 95%, Sigma
- Καμφερόλη, Extrasynthese GENAY France
- Κερκετίνη (C₁₅H₁₀O₇·2H₂O) HPLC 98%, Sigma

4.3.1 Παραλαβή υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων

Για την παραλαβή των υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ζυγίστηκαν 500 mg αποξηραμένων φύλλων του δείγματος (AA), τα οποία αλέστηκαν σε μίξερ και η σκόνη μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη με 15 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Μετά την παραμονή για 10 λεπτά σε λουτρό υπερήχων Bandelin Sonorex Super RK255H, 35 KHz, σε θερμοκρασία 25°C, το εκχύλισμα διαχωρίστηκε από το στερεό υλικό,

παραλήφθηκε και φυγοκεντρίθηκε στις 8000 στροφές για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία 15°C, σε φυγόκεντρο Sigma 3K 18, ενώ το στερεό υλικό με προσθήκη 15 mL πετρελαϊκού αιθέρα, επαναποθετήθηκε για ακόμα 10 λεπτά στο λουτρό υπερήχων. Μετά την παραλαβή και τη φυγοκέντρηση και του δεύτερου εκχυλίσματος, επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές στο ίδιο στερεό υλικό η ίδια διαδικασία με οργανικό διαλύτη διαιθυλαιθέρα και κατόπιν άλλες δύο φορές με διάλυμα MeOH:H₂O 80:20. Τα εκχυλίσματα του ίδιου διαλύτη αναμίχθηκαν μεταξύ τους, πέρασαν από φίλτρο και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη (-20 °C) ως την ανάλυσή τους.

Οι εκχυλίσεις αυτές με διάφορους διαλύτες έγιναν για την επίτευξη της κλασμάτωσης των συστατικών στα εκχυλίσματα και το διαχωρισμό τους ανάλογα με την πολικότητά τους, ώστε να ελεγχθεί το καθένα ως προς την περιεκτικότητά του σε ολικά φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική του ενεργότητα.

Η εκχύλιση επαναλήφθηκε εκ νέου σε 500 mg του κάθε δείγματος (AA, ΓHK, ΣPK, ΦHK) με μοναδικό διαλύτη το διάλυμα MeOH:H₂O 80:20. Μετά από τις τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις του φυτικού κάθε δείγματος τα 3 εκχυλίσματα της κάθε περιοχής αναμίχθηκαν μεταξύ τους, πέρασαν από φίλτρο και φυλάχθηκαν στους -20°C ως την ανάλυσή τους.

Όξινη υδρόλυση

Λόγω της πιθανότητας ύπαρξης Ο-γλυκοζιτών (π.χ. φαινόλες, φλαβονοειδή), σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στα εκχυλίσματα από φύλλα λαδανιάς, θεωρήθηκε αναγκαία η παραλαβή ενός εκχυλίσματος από την περιοχή του Αγρινίου και ενός από την περιοχή της Κρήτης με την εφαρμογή όξινης υδρόλυσης. Έτσι, σε κωνική φιάλη με δείγμα 500 mg αποξηραμένων φύλλων των δειγμάτων AA, ΣPK προστέθηκαν 50 mL διαλύματος HCl_(π)-H₂O με αναλογία 1:1. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά. Ακολούθησε διήθηση με συσκευή Büchner και 3 διαδοχικές εκχυλίσεις του διηθήματος, με οξικό αιθυλεστέρα σε εκχυλιστική χοάνη. Η οργανική φάση που συλλέχθηκε από τις εκχυλίσεις συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή (Rotary Evaporator) RVO 400 SD BOECO Germany, με αντλία LVS ILMVAC (Εικ. 4.4) στους 30°C μέχρι ξηρού και η ξηρά ουσία επαναδιαλύθηκε σε 5 mL MeOH. Τα δείγματα φυλάχθηκαν ως την ανάλυση στους -20°C.

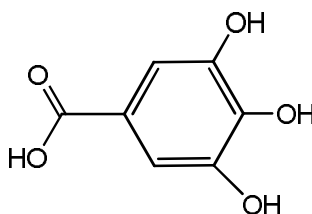


Εικόνα 4.4: Περιστροφικός συμπυκνωτής (rotary evaporator).

4.3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών

Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές τα εκχυλίσματα φυτών λαδανιάς είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά, έτσι κρίθηκε αναγκαία η ανάλυση των δειγμάτων για το σκοπό αυτό. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε Ολικά Φαινολικά Συστατικά (ΟΦΣ) έγινε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu με χρήση γαλλικού οξέος ($C_6H_2(OH)_3COOH$) (Εικ. 4.5) ως πρότυπου φαινολικού συστατικού.



ΕΙΚΟΝΑ 4.5: Το γαλλικό οξύ

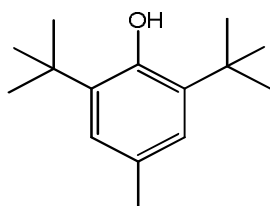
Για την εφαρμογή της μεθόδου προστέθηκαν διαδοχικά σε 50 μL οκτώ διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος (0-700 ppm), σε 50 μL τυφλού δείγματος ($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 80:20) και σε 50 μL του κάθε εκχυλίσματος (**ΑΑ**, **ΓΗΚ**, **ΣΡΚ**, **ΦΗΚ**) από 450 μL απιονισμένου H_2O , 2,5 mL διαλύματος Folin-Ciocalteu 0,2N και, μετά από 5 λεπτά, 2 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 7,5g/100 mL. Επίσης, η ανάλυση έγινε και στα κλάσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του διαιθυλαιθέρα του δείγματος **ΑΑ** με την ίδια μέθοδο. Όλα τα δείγματα φυλάχθηκαν για 90 λεπτά σε σκοτεινό μέρος με ανάδευση ανά 30 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί

η αντίδραση. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 765 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Uv-Vis, μοντέλο HACH DR/2010. Με βάση τα πρότυπα διαλύματα του γαλλικού οξέος και τις αντίστοιχες απορροφήσεις κατασκευάστηκε. Οι απορροφήσεις του γαλλικού οξέος σε συνδυασμό με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς και η περιεκτικότητα σε ΟΦΣ των εκχυλισμάτων εκφράστηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, mg GAE /g φυτικού υλικού. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με τρεις επαναλήψεις.

4.3.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής ενεργότητας

Μέθοδος του 2,2-Διφαινυλο-1-πυκρλυδραζυλίου (DPPH)

Η διαπίστωση της ύπαρξης φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των φύλλων των φυτών λαδανιάς, οδήγησε στη μελέτη της αντιοξειδωτικής τους ενεργότητας με τη μέθοδο του 2,2-Διφαινυλο-1-πυκρλυδραζυλίου (DPPH). Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH 0.004%. Παρασκευάστηκαν πρότυπα μεθανολικά διαλύματα 7 συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος (0-7 µg/mL) και 7 συγκεντρώσεων BHT (Εικ. 4.6) (0-20 µg/mL) και διαλύματα 7 γνωστών συγκεντρώσεων από κάθε εκχύλισμα (0-15.4 µg/mL), καθώς και από τα κλάσματα σε πετρελαϊκό αιθέρα και διαιθυλαιθέρα του δείγματος AA. Σε 50 µL του κάθε δείγματος προστέθηκαν 5 mL διαλύματος DPPH και μετά από επώαση 30 λεπτών σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25°C, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Uv-Vis. Οι αναλύσεις έγιναν με τρεις επαναλήψεις. Η συγκέντρωση αντιοξειδωτικού που απαιτείται για τη δέσμευση ποσοστού 50% των ελευθέρων ριζών στις πειραματικές συνθήκες (IC₅₀) προσδιορίστηκε από την καμπύλη της % δέσμευσης του DPPH και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu για το κάθε εκχύλισμα.



Εικόνα 4.6: Το BHT.

4.3.4 Ανάλυση υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανεστραμμένης Φάσης (HPLC-RP)

Ανάλυση HPLC-DAD

Τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα των φυτών λαδανιάς (**ΑΑ**, **ΓΗΚ**, **ΣΡΚ**, **ΦΗΚ**) και τα δείγματα **ΑΑ** και **ΣΡΚ** που παραλήφθηκαν με όξινη υδρόλυση αναλύθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (HPLC/DAD) με σκοπό τον εντοπισμό δευτερογενών μεταβολιτών και συγκεκριμένα φαινολικών ενώσεων.

Η ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων (MeOH:H₂O 80:20) έγινε με σύστημα Agilent Model 1100 HPLC, εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis (DAD) (**Εικ. 4.7**). Η στήλη ήταν OPTI-GUARD SUPELCO Analytical (Sigma-Aldrich) C18 ανεστραμμένης φάσης, μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης (5μm). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών. Ο διαλύτης Α ήταν δις απεσταγμένο νερό ρυθμισμένο σε pH 3.2 με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος και ο διαλύτης Β ήταν ακετονιτρίλιο μεγάλης καθαρότητας για HPLC. Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος στη σταθερή τιμή 1mL/min και η πίεση κυμαινόταν από 100-105 bar. Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία.



Εικόνα 4.7: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις.

Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλο προγραμματισμό του οργάνου, ώστε να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Το σύστημα ήταν

συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και το λογισμικό για την επεξεργασία των γραφημάτων ήταν το HP ChemStation. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης φαίνεται στον Πίν. 4.2.

Πίνακας 4.2: Πρόγραμμα έκλυσης που εφαρμόστηκε. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 mL/min και ο χρόνος ανάλυσης 53 min.

Χρόνος* (min)	A (%)	B (%)
0,1	95	5
20	85	15
25	85	15
35	75	25
43	75	25
53	0	100

* Οι χρόνοι πλυσίματος και εξισορρόπησης της στήλης δεν αναγράφονται

Τα δείγματα εισάγονταν στο σύστημα με βαλβίδα υψηλής πίεσης Rheodyne τύπου 7125 και ο όγκος του δείγματος ήταν 20μL. Η καταγραφή των εκλυόμενων συστατικών γίνονταν συνεχώς με καταγραφή του φάσματος απορρόφησης από τον ανιχνευτή διάταξης διόδων, καθώς και σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Η παρακολούθηση για τα φαινορικά συστατικά της λαδανιάς έγινε στην περιοχή από 210 ως 380 nm, στην οποία απορροφούν οι φλαβανόλες (210 και 280 nm), τα φαινορικά οξέα (280 nm και 310 nm) και τα φλαβονοειδή (320, 380 nm).

Εκτός από τα εκχυλίσματα λαδανιάς αναλύθηκαν με τη μέθοδο HPLC και διαλύματα πρότυπων ουσιών: γαλλικού οξέος, κατεχίνης, επικατεχίνης, επικατεχίνης γαλλικού οξέος, επιγαλλοκατεχίνης γαλλικού οξέος, καμφερόλης και κερκετίνης των οποίων τα χρωματογραφήματα λήφθηκαν με τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης (πρόγραμμα έκλυσης). Τα χρωματογραφήματα των προτύπων συγκρίθηκαν με εκείνα των εκχυλισμάτων, με σκοπό τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση συστατικών τους με τις πρότυπες, βάσει του χρόνου συγκράτησης και του φάσματος του κάθε συστατικού.

Ανάλυση LC-MS

Για τη χρωματογραφική επιβεβαίωση και ταυτοποίηση των συστατικών των εκχυλισμάτων και τη σύγκρισή τους με τα πρότυπα έγινε ανάλυση LC-MS, στις ίδιες συνθήκες (χρόνοι, διαλύτες, περιοχή UV) και με την ίδια στήλη που έγινε και η ανάλυση HPLC-RP. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρούνταν σταθερή στους 27°C.

Η λήψη των φασμάτων μάζας έγινε σε σύστημα Shimadzu LC/MS-2010A εξοπλισμένο με δυαδική αντλία LC-10ADvp, απαερωτή DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp ρυθμισμένο σε όγκο έγχυσης δείγματος 20μL, ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA) SPD-M10Avp και εκλεκτικό τετραπολικό ανιχνευτή μαζών (MSD) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (MS-ESI, ElectroSpray Ionisation, negative mode). Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν στο 1 mL/min και η πίεση δεν ξεπέρασε τα 140-160bar.

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

Θερμοκρασία πηγής ιοντισμού CDL 250 °C, ροή αερίου εκνέφωσης (N₂) 1,5L min⁻¹, πίεση αερίου ξήρανσης (N₂) 0,1MPa (ροή 10 L/min), θερμοκρασία heat block 300°C, δυναμικό περιοχής εκνέφωσης (interface), -3,5kV, τάση CDL (Curved Dissolvation Line) -20V, και τάση ανιχνευτή -1,48kV.

Στα χρωματογραφήματα LC-MS πλήρους σάρωσης (scan mode) καταγράφηκε η περιοχή από 100 έως 1300 amu (λόγος μάζας προς φορτίο, m/z) με χρόνο σάρωσης 6000amu/s. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού Lab Solutions της εταιρείας Shimadzu, LC-MS Solution Version 3.40.307.

Η αντιστοίχιση των κορυφών των δειγμάτων μεταξύ HPLC/DAD και LC/MS έγινε βάσει του χρόνου συγκράτησης και των φασμάτων απορρόφησης στο UV-Vis, σε σύγκριση με εκείνα των προτύπων (γαλλικού οξέος, κατεχίνης, επικατεχίνης, ECG, ECGC, καμφερόλης και κερκετίνης), ενώ όπου δεν υπήρχαν πρότυπα, βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων. Η ταυτοποίηση στη συνέχεια επιβεβαιωνόταν κατά τον ίδιο τρόπο με την ESI-MS ανάλυση.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Αποτελέσματα GC/FID και GC/MS – Συζήτηση

Η ανάλυση του δείγματος **AA** με υδροαπόσταξη (**AA1**) έδωσε απόδοση 0,03% επί ξηράς ουσίας. Στις **Εικ. 5.1** και **5.2** φαίνονται τα αέρια χρωματογράφηματα GC/MS του αιθερίου ελαίου από Αγρίνιο με απόσταξη σε συσκευή Clevenger (**AA1**) και από Φόδελε με απόσταξη εκχύλιση σε συσκευή Lickens-Nickerson (**ΦΗΚ**) αντίστοιχα. Στον **Πίν. 5.1** παρουσιάζονται ποιοτικά και ποσοτικά όλα τα συστατικά, που ανιχνεύθηκαν στα αιθέρια έλαια των φύλλων λαδανιάς από τις διάφορες περιοχές, όπως προέκυψαν από τη σύγκριση με ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες και βιβλιογραφία και τα εμβαδά των κορυφών, αντίστοιχα. Τα συστατικά αυτά παρουσίασαν ενδιαφέρον είτε ποιοτικό είτε ποσοτικό, όπως προέκυψε από τα αέρια χρωματογραφήματα των αιθερίων ελαίων (για τα δείγματα **AA2**, **ΓΗΚ** και **ΣΡΚ** βλ. Παράρτημα I).

Παρατηρούμε ότι στο **AA1**, ανιχνεύθηκαν 72 συστατικά και από αυτά ταυτοποιήθηκαν τα 53. Το συστατικό με το μεγαλύτερο ποσοστό είναι το 4,5-δι-επι-αριστολοχένιο (10,4%). Αξιοσημείωτο είναι και το ποσοστό του μίγματος 3-εξενάλης και 3-εξενόλης (7,7%), ενώ ακολουθούν το δ-καδινένιο (5,6%) και δύο χαρακτηριστικά λαβδανικά διτερπένια, το μανοϋλικό οξείδιο (4,6%) και το 13-επι-μανοϋλικό οξείδιο (3,7%). Γενικά, τα συστατικά του ελαίου θα μπορούσαν να χωριστούν σε σύνολα ανάλογα με τη δομή τους, οπότε το σύνολο των 17 σεσκιτερπενίων που ανιχνεύονται αποτελεί περίπου το 32% των συστατικών του ελαίου, τα 4 λαβδανικά διτερπένια περίπου το 13%, τα 7 οξυγονωμένα σεσκιτερπένια το 9% και τα 6 οξυγονωμένα μονοτερπένια περίπου 3%. Τα ποσοστά των συστατικών που δεν ανήκουν στα παραπάνω σύνολα κυμαίνονται από ίχνη έως 3,6%.

Σε φυτικό υλικό της ίδιας περιοχής, μετά από μικρο-απόσταξη με εκχύλιση, δίνει αιθέριο έλαιο (**AA2**) στη σύσταση του οποίου ανιχνεύθηκαν 38 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν 31. Το μίγμα 3-εξενάλης και 3-εξενόλης έχει σημαντικά μεγάλο ποσοστό (23,3%) και ακολουθούν το 4,5-δι-επι-αριστολοχένιο (11,1%), το μανοϋλικό οξείδιο (6,5%), το 13-επι-μανοϋλικό οξείδιο (5,7%) και το δ-καδινένιο (4,9%). Στα σύνολα τα 12 σεσκιτερπένια είναι περίπου στο 30%, τα 4 λαβδανικά διτερπένια περίπου στο 17% και τα 5 οξυγονωμένα σεσκιτερπένια στο 12%, ενώ το καθένα από

τα υπόλοιπα συστατικά συμμετέχει με ίχνη έως και 5,2% στη σύσταση. Παρατηρήθηκε ότι τα χρωματογραφικά προφίλ των συστατικών του δείγματος **ΑΑ**, που προκύπτουν από την υδροαπόσταξη και τη μικρο-απόσταξη με εκχύλιση, είναι παρόμοια ποιοτικά. Οι όποιες διαφορές τους μπορούν να αποδοθούν στη μικρότερη ποσότητα δείγματος, στη μικρο-απόσταξη με εκχύλιση, αλλά και στη διαφορετική τεχνική παραλαβής.

Το έλαιο του δείγματος **ΓΗΚ** έχει 31 συστατικά από τα οποία ταυτοποιήθηκαν 27. Σε μεγαλύτερο ποσοστό υπολογίστηκε το 13-επι-μανοϋλικό οξείδιο (18,9%) και ακολουθούν το 4,5-δι-επι-αριστολοχένιο (16,6%), το μανοϋλικό οξείδιο (11,1%) και το α-πινένιο με ποσοστό 4,8%. Τα 5 σεσκιτερπένια συνολικά είναι σε ποσοστό περίπου 20%, τα 4 λαβδανικά διτερπένια περίπου στο 33%, τα 6 οξυγονωμένα σεσκιτερπένια 11% και τα 2 υδρογονικά μονοτερπένια περίπου στο 7%. Τα ποσοστά των υπόλοιπων συστατικών και για το καθένα ξεχωριστά κυμαίνονται από ίχνη ως 2,9%.

Το δείγμα **ΣΡΚ** περιέχει στο έλαιό του 44 συστατικά, ενώ ταυτοποιήθηκαν 40. Όπως και στο **ΓΗΚ** σε μεγαλύτερη ποσότητα από τα άλλα συστατικά φαίνεται να εμφανίζεται το 13-επι-μανοϋλικό οξείδιο (21,5%) και ακολουθούν το 4,5-δι-επι-αριστολοχένιο (18,1%), το α-πινένιο με ποσοστό 6,1%, το μανοϋλικό οξείδιο (4,7%) και το καμφένιο με ποσοστό 4,4%. Τα 5 λαβδανικά διτερπένια αποτελούν περίπου το 28%, τα 4 σεσκιτερπένια το 20%, τα 4 υδρογονικά μονοτερπένια το 12%, τα 8 οξυγονωμένα μονοτερπένια περίπου το 10%, ενώ τα 5 οξυγονωμένα σεσκιτερπένια 8%. Τα υπόλοιπα συστατικά συμμετέχουν στη σύσταση από ίχνη ως 4,2%.

Τέλος, το αιθέριο έλαιο του **ΦΗΚ** έχει 38 συστατικά με 30 ταυτοποιημένα και εμφανίζει σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα ένα οξυγονούχο σεσκιτερπένιο, τη λεδόλη, με ποσοστό 11,9%. Το μανοϋλικό οξείδιο σε ποσοστό 8,7%, τη βιριδιφλορόλη στο 7,9%, το *trans*-καλομενένιο στο 6,8% και ακολουθούν το 13-επι-μανοϋλικό οξείδιο και η 1-επι-κουμπενόλη με ποσοστά 4,7% και 4%, αντίστοιχα. Συνολικά περιέχει 6 οξυγονωμένα σεσκιτερπένια που συμμετέχουν σε ποσοστό περίπου 30%, 4 λαβδανικά διτερπένια στο 18,5% και 9 σεσκιτερπένια σε ποσοστό 17%. Τα υπόλοιπα συστατικά, κυμαίνονται από 0,4 ως 2,4% το καθένα.

Παρατηρούμε ότι κάποια συστατικά υπάρχουν σε δείγματα όλων των περιοχών. Αυτά είναι: το καμφένιο (**4**), η *n*-νονανάλη (**9**), η βορνεόλη (**14**), το 2,5-

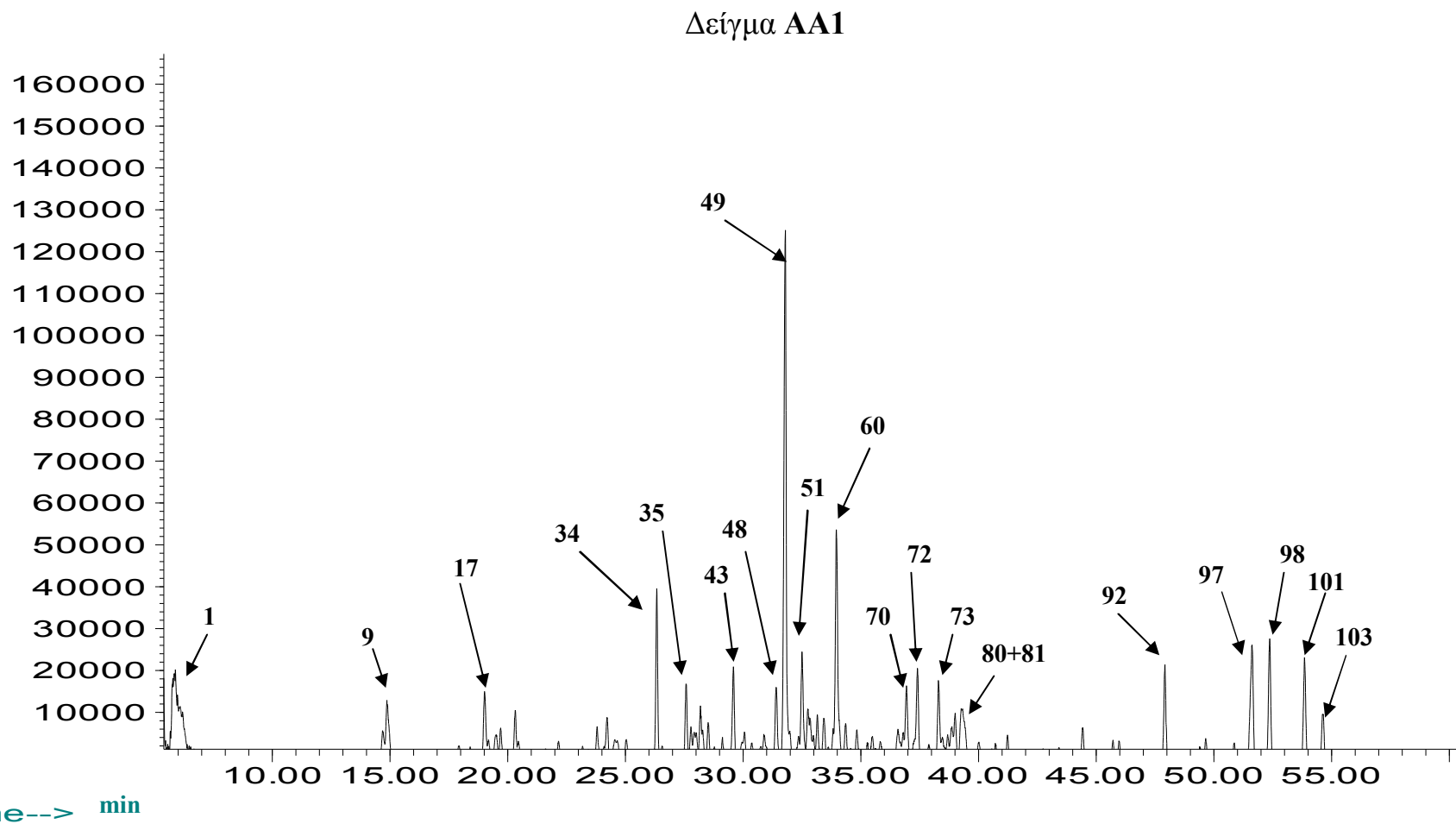
διαθυλοφουράνιο (**36**), το 4,5-δι-επι-αριστολογένιο (**49**), η καρυοφυλλα-4(12),8(13)-διεν-5-όλη (**76**), η δισμεθοξυ-ενσεκαλίνη (**79**), η σελιν-11-εν-4-όλη (**81**), η 6-ισοπροπυλο-4,4a-διμεθυλο-3,4,4a,5,6,7-εξαϋδροναφθαλεν-1(2H)-όνη (**84**), το 8,13-εποξυ-15,16-δινορλαβδ-12-ένιο (**92**), τα δυο λαβδανικά διτερπένια μανουϊλικό οξείδιο (**97**), 13-επι-μανουϊλικό οξείδιο (**98**) και η λαβδ-7,13-διεν-15-όλη (**103**). Το **4** είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό στο **ΣΡΚ**, ενώ παρατηρούμε ότι στο **ΑΑ2** είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα από ότι στο **ΑΑ1**.

Το αντίθετο συμβαίνει με τα **79** και **84**, που ανιχνεύονται σε σχετικά χαμηλά ποσοστά στο **ΑΑ1**, αλλά απουσιάζουν από το **ΑΑ2**. Το **49** παρατηρείται σε όλα τα δείγματα και έχει το υψηλότερο ποσοστό στο **ΣΡΚ** και το χαμηλότερο στο **ΦΗΚ**.

Το **81** (σελιν-11-εν-4-όλη), αν και υπάρχει σε όλα τα δείγματα, φαίνεται πως στα **ΑΑ1** και **ΑΑ2** δεν έχει επιτευχθεί ο διαχωρισμός του από το **80** (β-ευδεσμόλη) και έτσι τα δυο συστατικά εμφανίζονται ως μίγμα. Ως μίγμα εμφανίζονται επίσης και η 3-εξενάλη με την 3-εξενόλη (**1**), αλλά μόνο στα **ΑΑ1**, **ΑΑ2**, ενώ απουσιάζουν εντελώς από τα υπόλοιπα. Όσον αφορά τα λαβδανικά διτερπένια **97**, **98** παρατηρούμε ότι το μεν **97** εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά στα **ΣΡΚ** και **ΦΗΚ** και χαμηλότερα στα υπόλοιπα, το δε **98** είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα στο **ΣΡΚ** και **ΓΗΚ** και μικρότερη στα άλλα δείγματα.

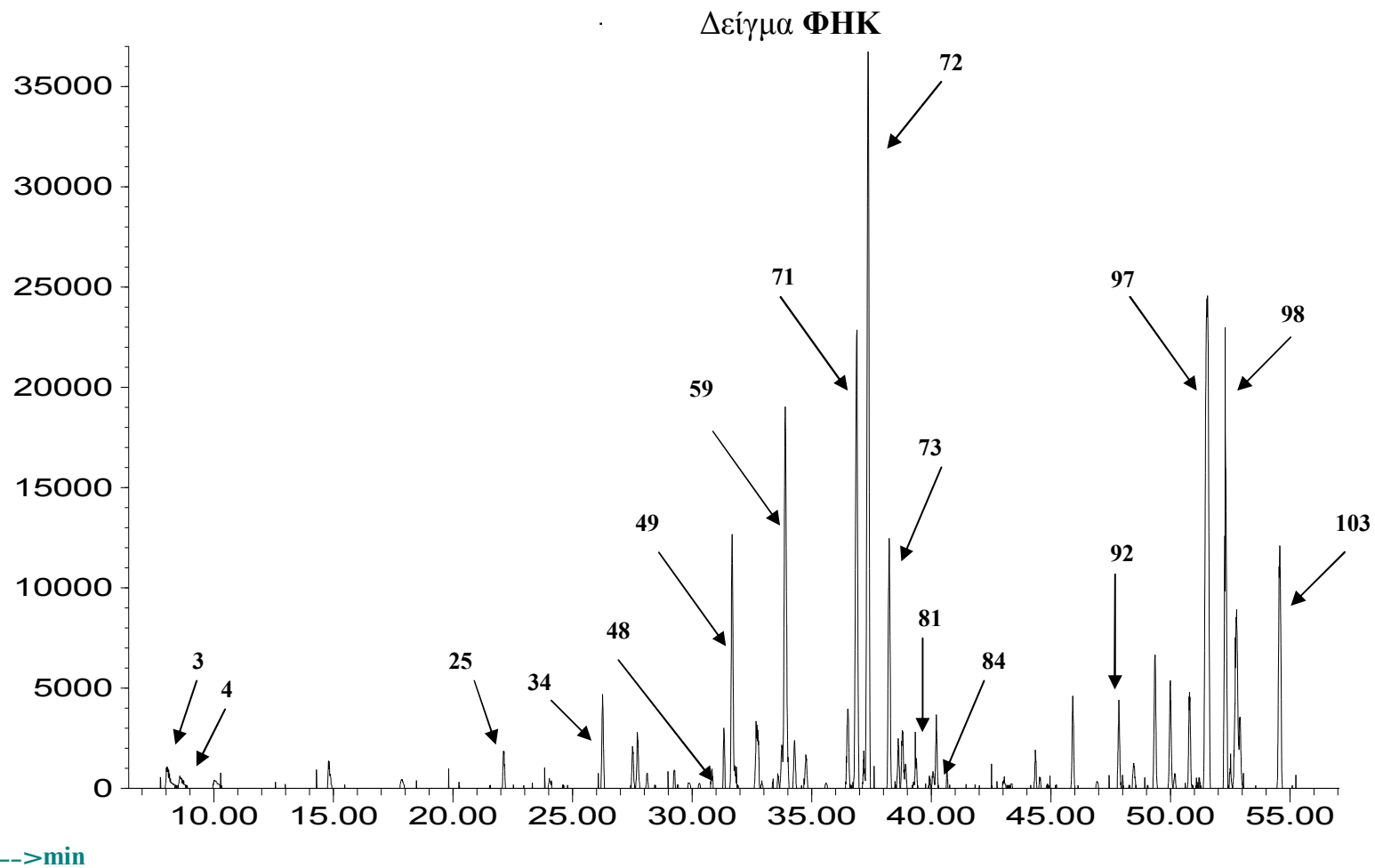
Τα υπόλοιπα συστατικά που προαναφέρθηκαν ότι παρατηρούνται σε όλα τα δείγματα δεν εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις στα ποσοστά τους μεταξύ των δειγμάτων. Ειδικά για το συστατικό **103** θα πρέπει να αναφερθεί ότι προτείνεται η ταυτοποίησή του με τη λαβδ-7,13-διεν-15-όλη, επειδή τα φάσματα μάζας ήταν ίδια, χωρίς όμως να ταιριάζουν απόλυτα και οι χρόνοι συγκράτησής τους, καθώς το συστατικό **103** έχει μικρότερο χρόνο συγκράτησης από τη λαβδ-7,13-διεν-15-όλη. Αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση το συστατικό **103** να είναι κάποιο λαβδανικό παράγωγο, ισομερές της παραπάνω ένωσης.

Abundance



Εικόνα 5.1: Αέριο Χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του δείγματος λαδανιάς Αγρίνιο Αιτωλοακαρνανίας. Η παραλαβή έγινε σε συσκευή Clevenger. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα συστατικά του Πίν. 5.1.

Abundance



Εικόνα 5.2: Χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου του δείγματος λαδανιάς από το Φόδελε Ηρακλείου Κρήτης. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στον Πίν. 5.1.

Πίνακας 5.1: Συστατικά των αιθερίων ελαίων φυτών του γένους *Cistus* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας.

A/A	Rt	Συστατικό	Κατηγορία	Απόσταση με Υδρατμούς	Μικρο- Απόσταση με Υδρατμούς - Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη				Βιβλιοθήκη
					AA1	AA2	ΓΗΚ	ΣΡΚ	
1	5,8	3-εξενάλη+3-εξενόλη ^a		7,7	23,3	-	-	-	Wiley275
2	7,9	α-θουγένιο	υδρογονικό μονοτερπένιο	-	-	-	0,7	-	Adams07
3	8,1	α-πινένιο	υδρογονικό μονοτερπένιο	-	-	4,8	6,1	1,4	Adams07
4	8,2	καμφένιο	υδρογονικό μονοτερπένιο	ίχνη	2,3	2,1	4,4	1,5	Adams07
5	9,6	β-πινένιο	υδρογονικό μονοτερπένιο	-	-	-	0,9	-	Adams07
6	9,6	1-οκτεν-3-όλη	αλκοόλη	-	-	0,9	-	-	Adams07
7	11,5	λεμονένιο	υδρογονικό μονοτερπένιο	ίχνη	ίχνη	-	-	-	Adams07
8	14,7	λιναλοόλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	0,5	-	-	-	-	Adams07
9	14,9	n-νονανάλη	αλδεΐδη	1,0	ίχνη	1,6	1,3	0,7	Wiley275
10	16,7	trans-πινοκαρβεόλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	-	-	0,5	2,1	-	Adams07
11	16,9	trans-βερμπενόλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	-	-	-	0,7	-	Adams07

A/A	Rt	Συστατικό	Κατηγορία	Μικρο- Απόσταση με Υδρατμούς - Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη					Βιβλιοθήκη
				ΑΑ1	ΑΑ2	ΓΗΚ	ΣΡΚ	ΦΗΚ	
12	17,1	5,6,6-τριμεθυλο-δικυκλο[2.2.1]επταν-5-όλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	-	-	-	0,6	-	Adams07
13	17,4	ισοβορνεόλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	-	-	-	0,7	-	Adams07
14	17,9	βορνεόλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	0,3	-	1,6	2,5	0,4	Adams07
15	18,4	τερπινεν-4-όλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	0,2	-	-	0,5	-	Adams07
16	18,7	p-κυμεν-8-όλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	-	-	-	ίχνη	-	Adams07
17	19,0	α-τερπινεόλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	1,2	ίχνη	0,5	1,6	-	Adams07
18	19,3	μυρτενόλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	-	-	-	1,10	-	Adams07
19	19,5	σαφρανάλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	0,6	-	-	-	-	Adams07
20	19,7	δ.τ. ^β	-	0,6	-	-	-	-	
21	20,0	νοναδιενάλη	αλδεΐδη	-	-	-	ίχνη	-	Adams07
22	20,3	trans-καρβεόλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	-	-	-	ίχνη	-	Adams07
23	20,3	δ.τ.	-	0,7	-	-	-	-	

A/A	Rt	Συστατικό	Κατηγορία	Απόσταση με Υδρατμούς	Μικρο- Απόσταση με Υδρατμούς - Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη					Βιβλιοθήκη
					AA1	AA2	ΓHK	ΣPK	ΦHK	
24	20,5	β-κυκλοκιτράλη	οξυγονωμένο μονοτερπένιο	0,2	-	-	-	-	Adams07	
25	22,1	E-2-δεκανάλη	αλδεΰδη	-	-	0,3	1,5	0,5	Adams07	
26	22,2	2,6,6-τριμεθυλο-1-κυκλοεξεν-1-ακεταλδεΰδη	αλδεΰδη	0,3	-	-	-	-	Wiley275	
27	23,2	δ.τ.	-	0,2	-	-	-	-		
28	23,8	n-τριδεκάνιο		0,3	-	-	-	-	Adams07	
29	24,2	δ.τ.	-	0,7	-	-	-	-		
30	24,6	4-υδροξυ-3-μεθυλακετοφαινόνη	φαινόνη	0,8	ίχνη	-	-	-	Wiley275	
31	25,0	2-μεθυλο-2-βουτενοϊκός 3-εξενυλεστέρας	εστέρας	0,3	-	-	-	-	Adams07	
32	26,0	δ.τ.	-	-	-	-	1,8	-		
33	26,8	2-ενδεκανάλη	αλδεΰδη	-	-	-	0,3	-	Adams07	
34	26,3	α-κουμπεμπένιο	σεσκιτερπένιο	2,2	1,9	-	-	1,2	Adams07	
35	27,6	α-κοπαένιο	σεσκιτερπένιο	1,1	0,9	-	-	0,8	Adams07	
36	27,8	2,5-διαθυλοφουράνιο		0,4	-	0,5	1,0	0,9	Nist98	
37	27,9	E-β-δαμασκενόνη	κετόνη	0,4	-	-	-	-	Adams07	
38	28,0	β-μπουρμπονένιο	σεσκιτερπένιο	0,4	-	0,5	-	-	Adams07	
39	28,2	β-κουμπεμπένιο	σεσκιτερπένιο	1,1	0,9	-	-	0,6	Adams07	
40	28,3	n-τετραδεκάνιο		-	1,6	-	-	-	Adams07	

A/A	Rt	Συστατικό	Κατηγορία	Απόσταση με Υδρατμούς	Μικρο- Απόσταση με Υδρατμούς - Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη				Βιβλιοθήκη
					AA1	AA2	ΓHK	ΣPK	
41	28,5	4-(2,2-διμεθυλο-6-μεθυλενκυκλοεξυλο)-2-βουτανόνη	κετόνη	0,5	0,6	-	-	-	Nist98
42	29,1	α-γκουρζουνένιο	σεσκιτερπένιο	0,3	-	-	-	-	Adams07
43	29,6	E-καρφοφυλλένιο	σεσκιτερπένιο	1,7	1,4	0,6	0,3	-	Adams07
44	30,1	γ-ελεμένιο	σεσκιτερπένιο	0,7	-	-	-	-	Adams07
45	30,4	δ.τ.	-	0,4	-	-	-	-	
46	30,8	δ.τ.	-	0,2	-	-	-	-	
47	30,9	<i>trans</i> -μουουρολα-3,5-διένιο	σεσκιτερπένιο	0,5	0,6	-	-	0,5	Adams07
48	31,4	αλλο-αρωμαδενδρένιο	σεσκιτερπένιο	1,6	1,6	-	-	1,3	Adams07
49	31,8	4,5-δι-επι-αριστολογένιο	σεσκιτερπένιο	10,4	11,1	16,6	18,1	3,8	Adams07
50	32,4	E-β-ιονόνη	κετόνη	0,3	0,7	-	-	-	Adams07
51	32,5	β-σελινένιο	σεσκιτερπένιο	2,2	2,6	1,4	1,6	-	Adams07
52	32,7	<i>trans</i> -μουουρολα-4(14),5-διένιο	σεσκιτερπένιο	2,1	2,0	-	-	-	Adams07
53	32,8	βιριδιφλορένιο	σεσκιτερπένιο	-	-	-	0,6	-	Adams07
54	33,0	α-μουουρολένιο	σεσκιτερπένιο	0,7	ίχνη	-	-	-	Wiley275
55	33,2	τριδεκανάλη	αλδεΐδη	0,5	-	-	-	-	Wiley275
56	33,4	γ-καδινένιο	σεσκιτερπένιο	-	-	0,68	ίχνη	-	Adams07
57	33,8	επι-κουμπεμπόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	-	-	-	-	2,0	Adams07

A/A	Rt	Συστατικό	Κατηγορία	Απόσταση με Υδρατμούς	Μικρο- Απόσταση με Υδρατμούς - Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη					Βιβλιοθήκη
					AA1	AA2	ΓHK	ΣPK	ΦHK	
58	33,8	1,1,4,5,6-πενταμεθυλο-2,3-διυδροϊνδένιο	σεσκιτερπένιο	ίχνη	-	0,7	0,7	0,4	Adams07	
59	33,9	<i>trans</i> -καλαμενένιο	σεσκιτερπένιο	-	-	-	-	6,8	Adams07	
60	34,0	δ-καδινένιο	σεσκιτερπένιο	5,6	4,9	-	-	-	Adams07	
61	34,4	<i>trans</i> -καδινα-1,4-διένιο	σεσκιτερπένιο	0,7	0,5	-	-	1,0	Adams07	
62	34,8	α-καλακορένιο	σεσκιτερπένιο	0,8	0,8	-	-	0,6	Adams07	
63	35,3	δ.τ.	-	0,4	-	-	-	-		
64	35,5	γερμακρένιο Β	σεσκιτερπένιο	0,6	-	-	-	-	Adams07	
65	35,5	Ε-νερολιδόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	-	-	-	ίχνη	-	Adams07	
66	35,8	βενζοϊκό εξενύλιο	εστέρας	0,4	-	-	-	-	Adams07	
67	36,5	δ.τ.	-	-	-	-	-	1,8		
68	36,6	οξείδιο του καρνοφυλλένιου	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	1,6	1,2	1,7	0,6	-	Wiley275	
69	36,8	δ.τ.	-	0,6	-	2,1	-	-		
70	36,9	γλοβουλόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	1,7	3,0	-	-	-	Adams07	
71	36,9	βιριδιφλορόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	-	-	-	-	7,9	Adams07	
72	37,4	λεδόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	1,9	2,8	2,5	-	11,9	Adams07	

A/A	Rt	Συστατικό	Κατηγορία	Απόσταση με Υδρατμούς	Μικρο- Απόσταση με Υδρατμούς - Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη				Βιβλιοθήκη
					AA1	AA2	ΓΗΚ	ΣΡΚ	
73	38,3	1-επι-κουμπενόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	1,7	2,5	-	-	4,0	Adams07
74	38,5	γ-ευδεσμόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	0,6	-	-	1,2	-	Adams07
75	37,9	δ.τ.	-	0,8	-	-	-	-	
76	38,7	καρυοφυλλα-4(12),8(13)-διεν-5-όλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	0,7	2,0	1,1	1,3	1,5	Adams07
77	38,8	δ.τ.	-	-	-	1,5	-	-	
78	38,9	κουμπενόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	0,9	-	-	-	2,2	Adams07
79	39,0	διμεθόξυ-ενσεκαλίνη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	1,0	-	1,9	1,1	2,4	Adams07
80	39,3	β-ευδεσμόλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	-	-	2,3	1,7	-	Wiley275
		β-ευδεσμόλη + σελιν-11-εν-4-όλη ^γ		2,5	3,2	-	-	-	Wiley275
81	39,4	σελιν-11-εν-4-όλη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	-	-	2,7	3,5	1,0	Adams07
82	40,0	δ.τ.	-	0,9	-	-	-	-	
83	40,2	δ.τ.	-	-	-	-	-	2,5	

A/A	Rt	Συστατικό	Κατηγορία	Μικρο- Απόσταξη με Υδρατμούς - Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη					Βιβλιοθήκη
				ΑΑ1	ΑΑ2	ΓΗΚ	ΣΡΚ	ΦΗΚ	
84	40,7	6-ισοπροπυλο-4,4a-διμεθυλο-3,4,4a,5,6,7-εξαϋδροναφθαλεν-1(2H)-όνη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	0,5	-	2,8	4,2	0,9	Wiley275
85	41,2	δ.τ.	-	0,3	0,7	-	-	-	
86	42,5	δ.τ.	-	-	-	-	-	0,6	
87	43,4	αμβροξειδίο	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	-	-	0,8	-	-	Adams07
88	44,4	δ.τ.	-	0,7	1,0	-	-	1,0	
89	44,6	δριμενόνη	οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο	-	-	ίχνη	-	-	Adams07
90	45,7	δ.τ.	-	0,3	-	-	-	-	
91	46,0	δ.τ.	-	0,3	-	-	-	1,1	
92	47,9	8,13-εποξυ-15,16-δινορλαβδ-12-ένιο	λαβδανικό διτερπένιο	2,2	3,3	2,9	0,8	1,7	Wiley275
93	49,4	δ.τ.	-	0,4	0,6	-	-	1,1	
94	49,6	δ.τ.	-	0,6	0,9	-	-	-	
95	50,0	δ.τ.	-	-	-	-	-	1,8	
96	50,9	δ.τ.	-	0,8	0,9	-	0,4	1,4	
97	51,6	μανούλικό οξείδιο	λαβδανικό διτερπένιο	4,6	6,5	11,1	4,7	8,7	Adams07

A/A	Rt	Συστατικό	Κατηγορία	Μικρο- Απόσταξη με Υδρατμούς - Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη					Βιβλιοθήκη
				ΑΑ1	ΑΑ2	ΓΗΚ	ΣΡΚ	ΦΗΚ	
98	52,4	13-επι-μανουλικό οξείδιο	λαβδανικό διτερπένιο	3,7	5,7	18,9	21,5	4,7	Adams07
99	52,8	δ.τ.	διτερπένιο	0,5	-	ίχνη	0,4	3,3	
100	53,3	καουρένιο	διτερπένιο	ίχνη	-	-	0,37	-	Adams07
101	53,8	δ.τ.	-	3,6	5,2	-	-	-	
102	54,3	σκληρολιπίδιο	σεσκιτερπενική λακτόνη	-	-	-	ίχνη	-	Adams07
103	54,6	λαβδ-7,13-διεν-15-όλη ^δ	λαβδανικό διτερπένιο	2,3	1,7	ίχνη	0,4	3,5	Adams07
104	60,4	2Α-υδροξυμανουλοξείδιο	λαβδανικό διτερπένιο	-	-	-	0,73	-	Wiley275
105	63,4	δ.τ.	-	-	-	2,7	1,8	-	

α: Τα συστατικά 3-εξενόλη και 3-εξενάλη δε διαχωρίστηκαν κατά την αέρια χρωματογραφία στα δείγματα **ΑΑ1** και **ΑΑ2** και εμφανίζονται ως μια κορυφή.

β: Δεν ταυτοποιήθηκε.

γ: Τα συστατικά β-ευδεσμόλη και σελιν-11-εν-4-όλη δε διαχωρίστηκαν κατά την αέρια χρωματογραφία στα δείγματα **ΑΑ1** και **ΑΑ2** και εμφανίζονται ως μια κορυφή.

δ: Η ένωση αυτή έχει μεγαλύτερο χρόνο συγκράτησης από το χρόνο του συστατικού **103**. Πιθανώς το συστατικό αυτό να είναι κάποιο ισομερές της, αφού το φάσμα μάζας της ταιριάζει με του συστατικού.

ΑΑ1: Αγρίνιο Αιτωλοακαρνανίας με υδροαπόσταξη σε συσκευή Clevenger.

ΑΑ2: Αγρίνιο Αιτωλοακαρνανίας με μικρο-απόσταξη και εκχύλιση σε συσκευή Lickens-Nickerson.

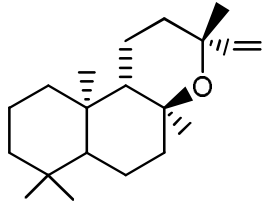
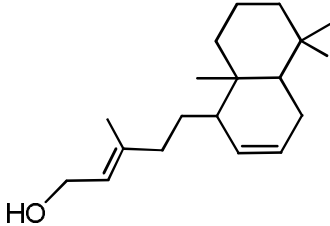
ΓΗΚ: Γούβες Ηρακλείου Κρήτης με μικρο-απόσταξη και εκχύλιση σε συσκευή Lickens-Nickerson.

ΣΡΚ: Σίτσες Ρεθύμνου Κρήτης με μικρο-απόσταξη και εκχύλιση σε συσκευή Lickens-Nickerson.

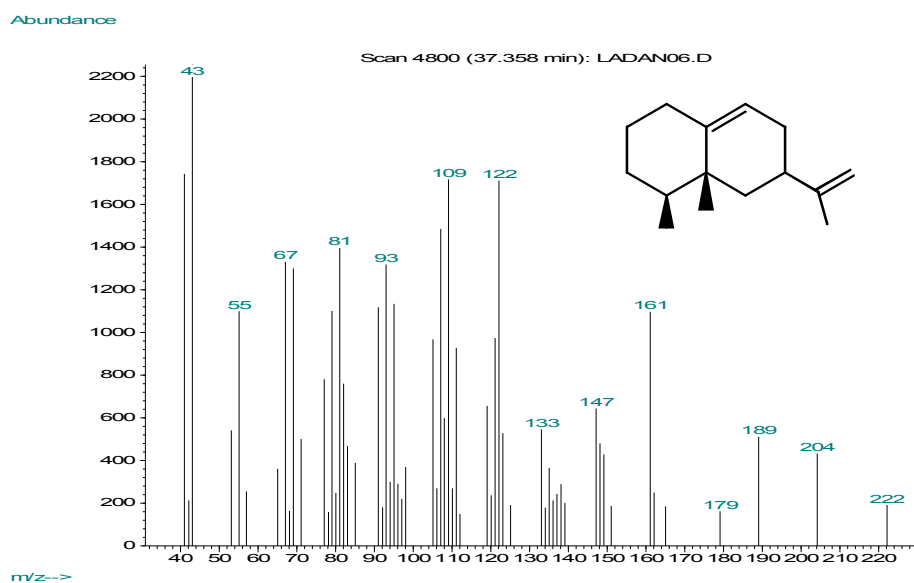
ΦΗΚ: Φόδελε Ηρακλείου Κρήτης με μικρο-απόσταξη και εκχύλιση σε συσκευή Lickens-Nickerson.

Πίνακας 5.2: Χαρακτηριστικά συστατικά των αιθερίων ελαίων των δειγμάτων *Cistus* που ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα ποσοστά. Στον πίνακα φαίνεται η εμπειρική ονομασία, η ονομασία κατά I.U.P.A.C., η δομή του κάθε συστατικού και το δείγμα στο οποίο ανιχνεύθηκε (Adams, 2007).

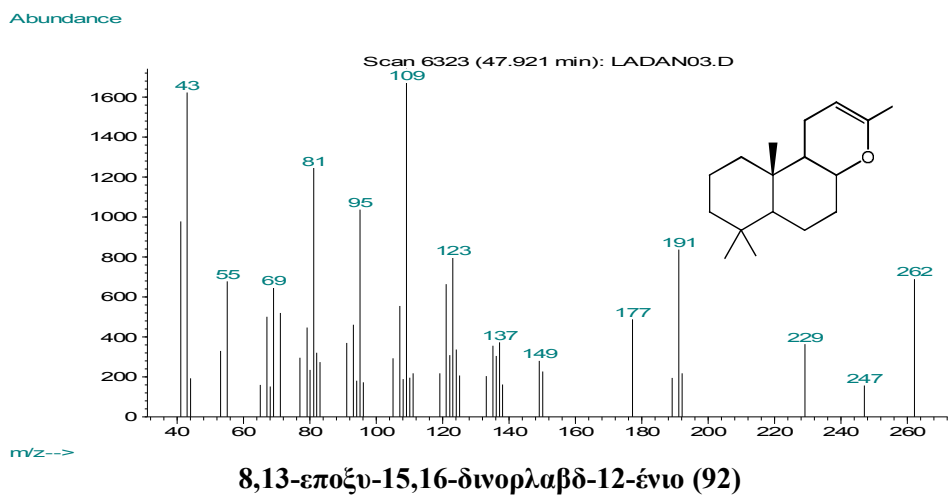
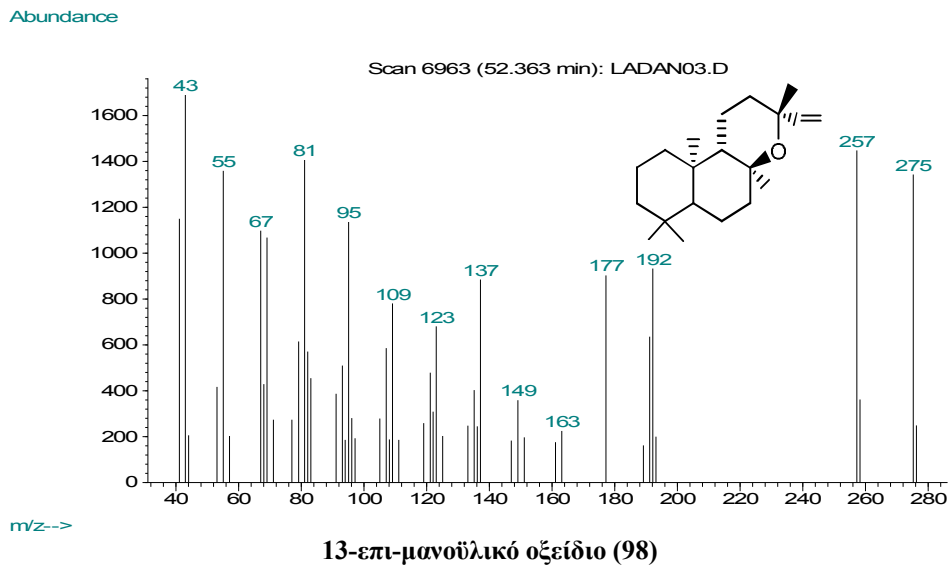
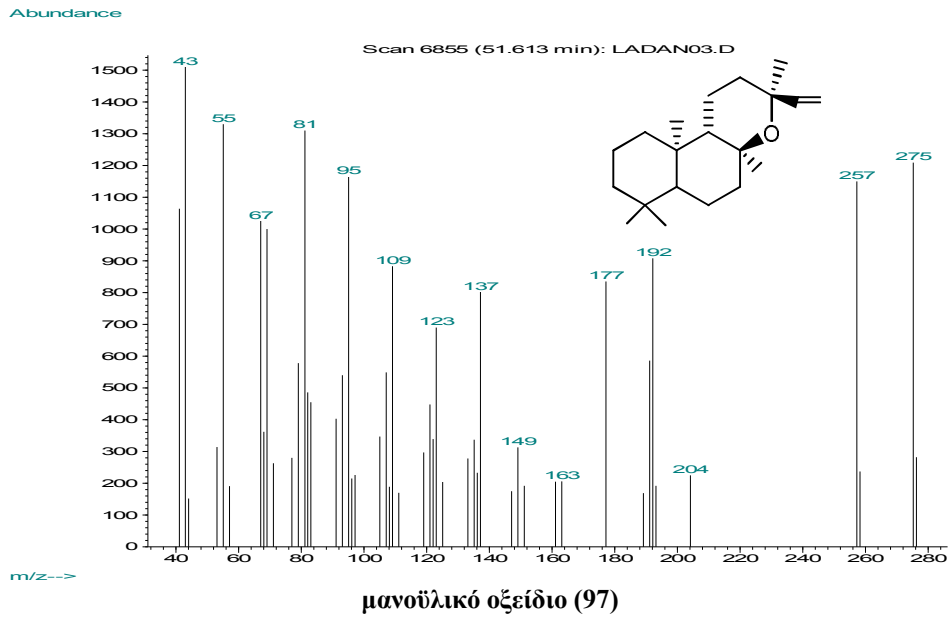
Συστατικό	Δομή	Δείγμα
α-πινένιο ή (1R,5R)-2,6,6-τριμεθυλοδικυκλο[3.1.1]επτ-2-ένιο		ΓΗΚ, ΣΡΚ, ΦΗΚ
4,5-δι-επι-αριστολογένιο ή 4,5-διεθυλο-6-(προπ-1-εν-2-υλο)-1,2,3,4,4a,5,6,7-οκταύδρωναφθαλένιο		ΑΑ1, ΑΑ2, ΓΗΚ, ΣΡΚ, ΦΗΚ
καρυοφυλλα-4(12),8(13)-διεν-5-όλη ή (1S,5S,9R)-10,10-διμεθυλο-2,6-διμεθυλενοδικυκλο[7.2.0]ενδεκαν-5-όλη		ΑΑ1, ΑΑ2, ΓΗΚ, ΣΡΚ, ΦΗΚ
σελιν-11-εν-4-όλη ή 1,4-διμεθυλο-7-(προπ-1-εν-2-υλο)δεκαύδρωναφθαλέ-1-όλη		ΓΗΚ, ΣΡΚ, ΦΗΚ
δ-καδινένιο ή (1S,8aR)1-ισοπροπυλο-4,7-διμεθυλο-1,2,3,5,6,8a-εξαύδρωναφθαλένιο		ΑΑ1, ΑΑ2
λεδόλη ή (1aR,4R,4aS,7R,7aS,7bS)-1,1,4,7-τετραμεθυλοδεκαύδρο-1H-κυκλοπροπα[e]αζουλεν-4-όλη		ΑΑ1, ΑΑ2, ΓΗΚ, ΦΗΚ
8,13-εποξυ-15,16-δινορλαβδ-12-ένιο ή (10aS)-3,7,7,10a-τετραμεθυλο-4a,5,6,6a,7,8,9,10,10a,10b-δεκαύδρο-1H-βενζο[f]χρωμένιο		ΑΑ1, ΑΑ2, ΓΗΚ, ΣΡΚ, ΦΗΚ
μανοϋλικό οξείδιο ή (3S,4aS,10aR,10bS)-3,4a,7,7,10a-πενταμεθυλο-3-βινυλοδωδεκαύδρο-1H-βενζο[f]χρωμένιο		ΑΑ1, ΑΑ2, ΓΗΚ, ΣΡΚ, ΦΗΚ

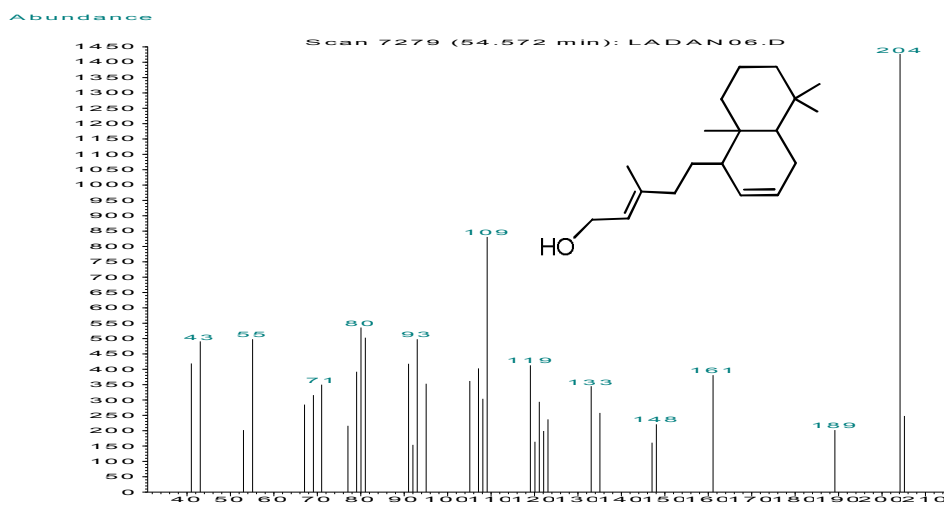
Συστατικό	Δομή	Δείγμα
13-επι-μανοϋλικό οξύ ή (3R,4aS,10aR,10bS)-3,4a,7,7,10a- πενταμεθυλο-3- βινυλοδοδεκαϋδρο-1H- βενζο[f]χρωμόνιο		ΑΑ1, ΑΑ2, ΓΗΚ, ΣΡΚ, ΦΗΚ
λαβδ-7,13-διεν-15-όλη ή (E)-3- μεθυλο-5-(5,5,8a-τριμεθυλο- 1,4,4a,5,6,7,8,8a- οκταϋδρόναφθαλεν-1-υλο)πεντ-2- εν-1-όλη (ή κάποιο ισομερές)		ΑΑ1, ΑΑ2, ΓΗΚ, ΣΡΚ, ΦΗΚ

Στην **Εικ. 5.3** παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας των 5 κύριων συστατικών των αιθερίων ελαίων της λαδανιάς.



4,5-δι-επι-αριστολογένιο (49)





λαβδ-7,13-διεν-15-όλη (103)

Εικόνα 5.3: Φάσματα μάζας των κυριότερων συστατικών των αιθερίων ελαίων φυτών λαδανιάς. Το φάσμα μάζας της κορυφής **103**, παραπέμπει στην ταυτοποίηση της με τη λαβδ-7,13-διεν-15-όλη, αν και θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι χρόνοι συγκράτησής τους διαφέρουν.

Τα θραύσματα μάζας των συστατικών που παρουσιάζουν ποσοτικό ενδιαφέρον, αλλά δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίησή τους λόγω έλλειψης χρωματογραφικών δεδομένων, παρατίθενται στον **Πίν. 5.3**.

Πίνακας 5.3: Πρωτεύουσες φασματοσκοπικές κορυφές και φάσματα μάζας συστατικών των αιθερίων ελαίων των δειγμάτων λαδανιάς, των οποίων η ταυτοποίηση δεν ήταν εφικτή.

Κορυφή	Πρωτεύουσες Φασματοσκοπικές Κορυφές	Φάσματα μάζας
32	41(50), 55(31), 77(51), 91(95), 105(98), 119(97), 133(63), 147(57), 161(71), 175(100), 190(83)	<p>Scan 3164 (26.001 min): LADAN08.D</p>

Κορυφή	Πρωτεύουσες Φασματοσκοπικές Κορυφές	Φάσματα μάζας																																
67	41(100), 55(46), 67(60), 79(80), 81(68), 91(78), 93(79), 107(55), 109(48), 121(67)	<p>Scan 4678 (36.511 min): LADAN06.D</p> <table border="1"> <caption>Peak Data for Scan 4678</caption> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Relative Abundance (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>41</td><td>100</td></tr> <tr><td>55</td><td>46</td></tr> <tr><td>67</td><td>60</td></tr> <tr><td>79</td><td>80</td></tr> <tr><td>81</td><td>68</td></tr> <tr><td>91</td><td>78</td></tr> <tr><td>93</td><td>79</td></tr> <tr><td>107</td><td>55</td></tr> <tr><td>109</td><td>48</td></tr> <tr><td>121</td><td>67</td></tr> </tbody> </table>	m/z	Relative Abundance (%)	41	100	55	46	67	60	79	80	81	68	91	78	93	79	107	55	109	48	121	67										
m/z	Relative Abundance (%)																																	
41	100																																	
55	46																																	
67	60																																	
79	80																																	
81	68																																	
91	78																																	
93	79																																	
107	55																																	
109	48																																	
121	67																																	
69	41(80), 55(63), 71(16), 91(68), 111(100), 126(71), 162(60), 187(23), 202(27), 220(16)	<p>Scan 4713 (36.753 min): LADAN07.D</p> <table border="1"> <caption>Peak Data for Scan 4713</caption> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Relative Abundance (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>41</td><td>80</td></tr> <tr><td>55</td><td>63</td></tr> <tr><td>69</td><td>23</td></tr> <tr><td>71</td><td>16</td></tr> <tr><td>81</td><td>68</td></tr> <tr><td>91</td><td>68</td></tr> <tr><td>111</td><td>100</td></tr> <tr><td>126</td><td>71</td></tr> <tr><td>135</td><td>27</td></tr> <tr><td>149</td><td>27</td></tr> <tr><td>162</td><td>60</td></tr> <tr><td>177</td><td>16</td></tr> <tr><td>187</td><td>23</td></tr> <tr><td>202</td><td>27</td></tr> <tr><td>220</td><td>16</td></tr> </tbody> </table>	m/z	Relative Abundance (%)	41	80	55	63	69	23	71	16	81	68	91	68	111	100	126	71	135	27	149	27	162	60	177	16	187	23	202	27	220	16
m/z	Relative Abundance (%)																																	
41	80																																	
55	63																																	
69	23																																	
71	16																																	
81	68																																	
91	68																																	
111	100																																	
126	71																																	
135	27																																	
149	27																																	
162	60																																	
177	16																																	
187	23																																	
202	27																																	
220	16																																	
83	41(43), 79(31), 91(53), 107(41), 121(35), 135(51), 159(100), 177(48), 220(29)	<p>Scan 5211 (40.212 min): LADAN06.D</p> <table border="1"> <caption>Peak Data for Scan 5211</caption> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Relative Abundance (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>41</td><td>43</td></tr> <tr><td>77</td><td>29</td></tr> <tr><td>79</td><td>31</td></tr> <tr><td>91</td><td>53</td></tr> <tr><td>107</td><td>41</td></tr> <tr><td>121</td><td>35</td></tr> <tr><td>135</td><td>51</td></tr> <tr><td>159</td><td>100</td></tr> <tr><td>177</td><td>48</td></tr> <tr><td>220</td><td>29</td></tr> </tbody> </table>	m/z	Relative Abundance (%)	41	43	77	29	79	31	91	53	107	41	121	35	135	51	159	100	177	48	220	29										
m/z	Relative Abundance (%)																																	
41	43																																	
77	29																																	
79	31																																	
91	53																																	
107	41																																	
121	35																																	
135	51																																	
159	100																																	
177	48																																	
220	29																																	

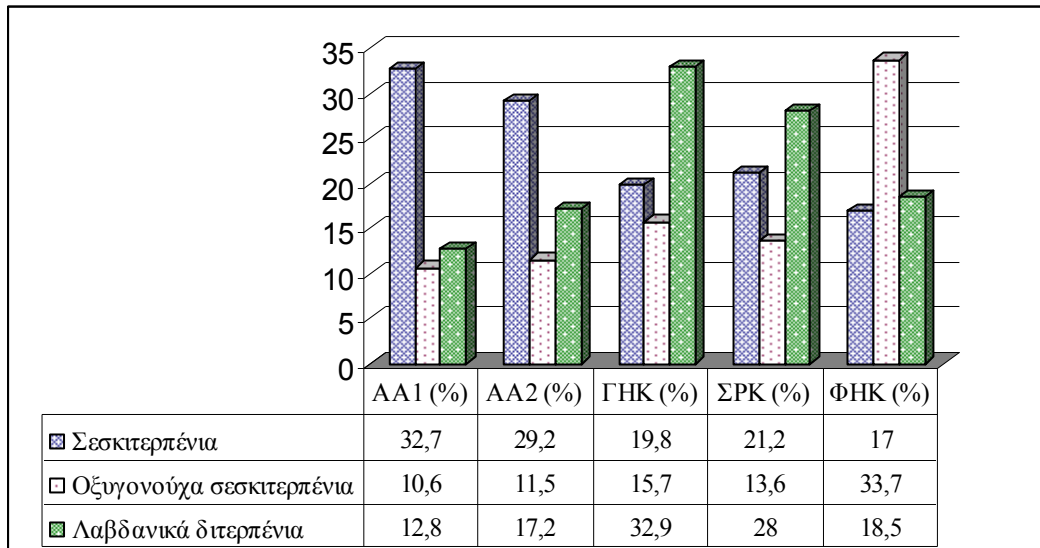
Κορυφή	Πρωτεύουσες Φασματοσκοπικές Κορυφές	Φάσματα μάζας
95	41(24), 55(19), 67(14), 81(16), 93(21), 109(26), 121(12), 135(43), 149(27), 164(100)	<p>Scan 6620 (49.996 min): LADAN06.D</p>
96	41(79), 55(53), 81(62), 93(98), 109(83), 119(52), 133(46), 161(38), 189(28), 204(100)	<p>Scan 6735 (50.794 min): LADAN06.D</p>
99	43(100), 55(48), 81(45), 95(41), 109(55), 123(47), 137(92), 167(27), 191(29), 207(57)	<p>Scan 7016 (52.738 min): LADAN06.D</p>

Κορυφή	Πρωτεύουσες Φασματοσκοπικές Κορυφές	Φάσματα μάζας
101	41(39), 55(29), 79(41), 93(41), 119(33), 147(28), 175(8), 189(100), 257(8), 272(14)	
105	43(100), 55(29), 81(29), 135(31), 175(24), 190(29), 201(9), 255(34), 273(8), 333(38)	

Παρατηρούμε ότι τα συστατικά με τα υψηλότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν σε όλα τα αιθέρια έλαια, ανεξάρτητα από τον τρόπο παραλαβής ή την προέλευσή τους. Εξαιρούνται το δ-καδινένιο που βρέθηκε στα δείγματα από Αγρίνιο και το α-πινένιο και η σελιν-11-εν-4-όλη που βρέθηκαν στα δείγματα από Κρήτη. Επίσης, η λεδόλη που εντοπίστηκε σε αρκετά υψηλά ποσοστά σε όλα τα δείγματα, απουσιάζει από το δείγμα που συλλέχθηκε στις Σίτσες.

Στη σύσταση των αιθερίων ελαίων της λαδανιάς είναι σαφής η επικράτηση των σεσκιτερπενίων, των οξυγονούχων σεσκιτερπενίων και των λαβδανικών διτερπενίων. Οι ομάδες αυτές εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά επί συνόλου στο κάθε δείγμα. Στα δείγματα του Αγρινίου (AA) το μεγαλύτερο ποσοστό έχουν τα σεσκιτερπένια

(32,7%), στα δείγματα από Γούβες Ηρακλείου (ΓΗΚ) και Σίσσες Ρεθύμνου (ΣΡΚ) τα λαβδανικά διτερπένια (32,9% και 28,0% αντίστοιχα) και στο δείγμα από Φόδελε Ηρακλείου (ΦΗΚ) τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια (33,7%). Συνοπτικά τα ποσοστά για τις ομάδες συστατικών με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα φαίνονται στο **Γράφ. 5.1**.

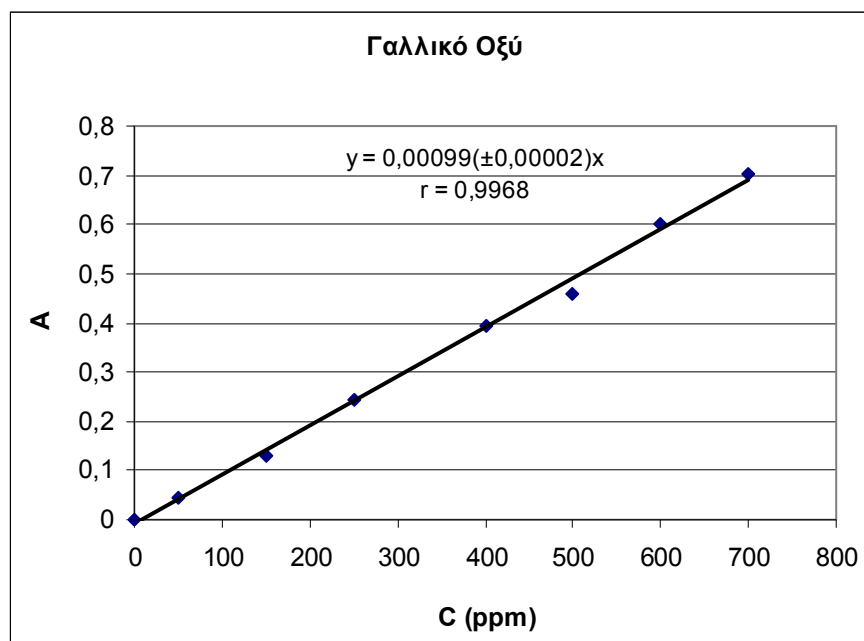


Γράφημα 5.1: Οι κυριότερες ομάδες ενώσεων που συμμετέχουν στη σύσταση του αιθερίου ελαίου λαδανιάς του κάθε δείγματος και τα ποσοστά συμμετοχής τους.

Το σεσκιτερπένιο **49** (4,5-δι-επι-αριστολοχένιο), σύμφωνα με τον Adams (2007), έχει βρεθεί από τη Harvala στη ρητίνη (λάδανο) φυτού του γένους *Cistus*. Η μη αναφορά του σε κάποιες μελέτες φυτών του γένους *Cistus* από τον ελλαδικό χώρο, ως συστατικό του αιθερίου ελαίου, παρά την ομοιότητα του τρόπου παραλαβής σε μερικές από αυτές, πιθανώς να οφείλεται σε διαφορά μεταξύ των ειδών, της ακριβούς γεωγραφικής προέλευσης του φυτού ή σε άλλους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά. Επίσης, αναφέρεται ως συστατικό αιθερίου ελαίου ειδών του γένους *Erodium* (Οικ. Geraniaceae) (Stojanović-Radić, Čomić, Radulović, Dekić, Randelović & Stefanović, 2010) τα οποία εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση, καθώς και των *Pogostemon cablin* (Οικ. Lamiaceae) (Deguerry, Pastore, Wu, Clark, Chappell & Schalk, 2006), *Psidium guajava* (Οικ. Myrtaceae) (Ogunwande, Olawore, Adeleke, Ekundayo, & Koenig, 2003), *Helichrysum italicum* ssp. *italicum* (Οικ. Asteraceae) (Morone-Fortunato et al., 2010).

5.2 Αποτελέσματα Προσδιορισμού Ολικών Φαινολικών Συστατικών – Συζήτηση

Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε από τις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος φαίνεται στο **Γράφ. 5.2**. Από την εξίσωση της καμπύλης $Y = (0.00099 \pm 0.00002)x$ ($r=0.9968$, $n=8$) υπολογίζουμε την περιεκτικότητα σε ΟΦΣ για τα δείγματα λαδανιάς **ΑΑ**, **ΓΗΚ**, **ΣΡΚ**, **ΦΗΚ**. Τα κλάσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του διαιθυλαιθέρα του δείγματος **ΑΑ** κατά τη μέτρηση της απορρόφησης έδωσαν μηδενικές τιμές. Στον **Πίν. 5.4** φαίνονται οι τιμές ΟΦΣ των υπό μελέτη δειγμάτων και στο **Γράφ. 5.3** διαγραμματική τους απεικόνιση.



Γράφημα 5.2: Καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος σε μήκος κύματος 765nm. Α: Απορρόφηση, C: Συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος (0-700 ppm) ($n=8$).

Πίνακας 5.4: Ολικά Φαινολικά Συστατικά (ΟΦΣ) των εκχυλισμάτων λαδανιάς σε mg GAE/g ξηρού φυτικού υλικού ($n=3$). **ΑΑ:** Αγρίνιο (Αιτωλοακαρνανίας), **ΓΗΚ:** Γούβες Ηρακλείου Κρήτης, **ΣΡΚ:** Σίσσες Ρεθύμνου Κρήτης, **ΦΗΚ:** Φόδελε Ηρακλείου Κρήτης.

Δείγμα	ΟΦΣ (mg GAE /g) φ.υ.
ΑΑ	115,2±5,2
ΓΗΚ	163,1±9,9
ΣΡΚ	149,5±11,5
ΦΗΚ	133,5±9,4



Γράφημα 5.3: Διαγραμματική απεικόνιση των τιμών της περιεκτικότητας σε ΟΦΣ των δειγμάτων λαδανιάς (n=3).

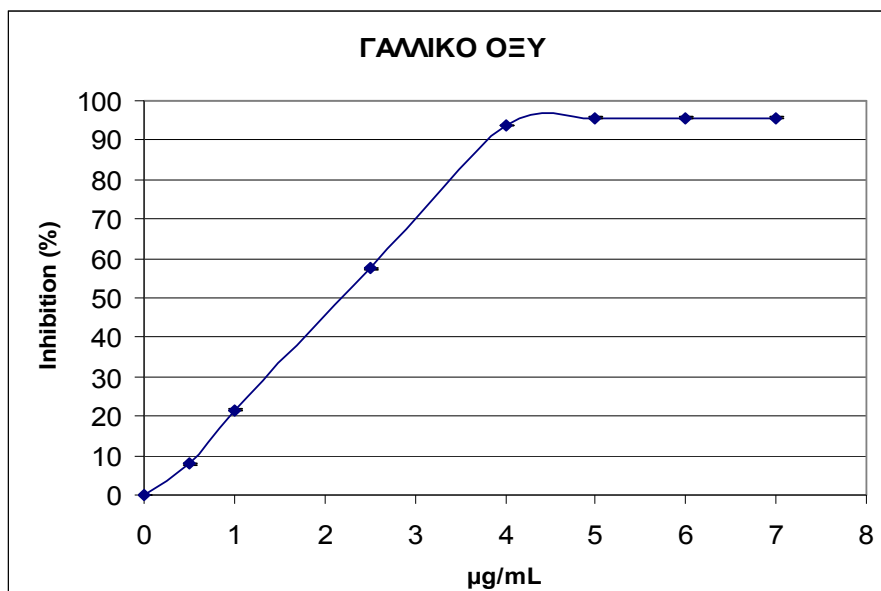
Το εκχύλισμα **ΓHK** παρουσιάζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ΟΦΣ, ενώ το δείγμα **AA** τη μικρότερη.

Μέτρηση της περιεκτικότητας σε ΟΦΣ του εκχυλίσματος **AA** μετά την παραμονή του, για χρονικό διάστημα 2 μηνών από την εκχύλιση, στην κατάψυξη, δεν έδειξε σημαντική μεταβολή της τιμής της.

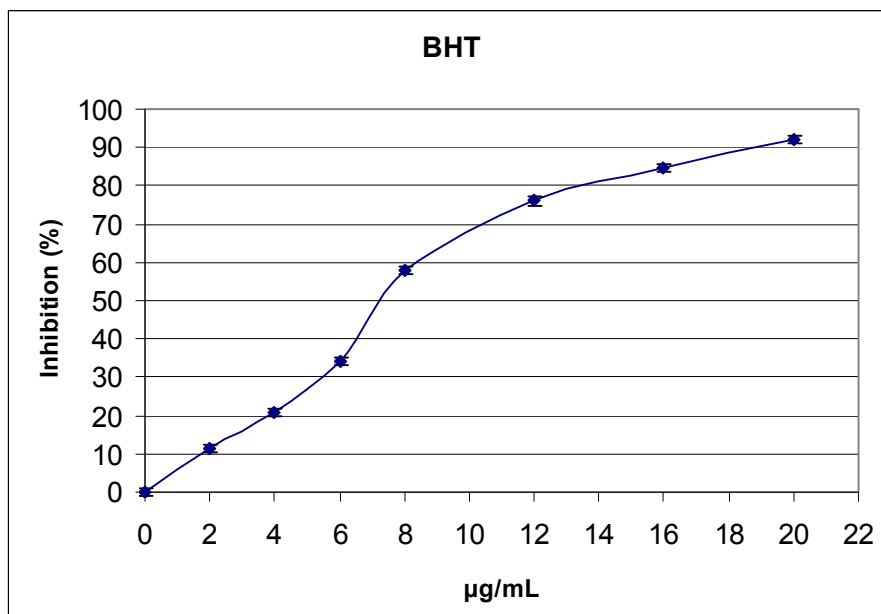
Η σειρά αύξησης της περιεκτικότητας ΟΦΣ είναι **ΓHK>ΣPK>ΦHK>AA**, ενώ στα κλάσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του διαιθυλαιθέρα, κάτω από αυτές τις συνθήκες, δεν ανιχνεύθηκαν φαινολικά συστατικά.

5.3 Αποτελέσματα Μελέτης της Αντιοξειδωτικής Ενεργότητας – Συζήτηση

Στα **Γράφ. 5.4** και **5.5** που ακολουθούν, φαίνεται η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος DPPH συναρτήσει των συγκεντρώσεων πρότυπων αντιοξειδωτικών συστατικών που μελετήθηκαν, του γαλλικού οξέος και του BHT.



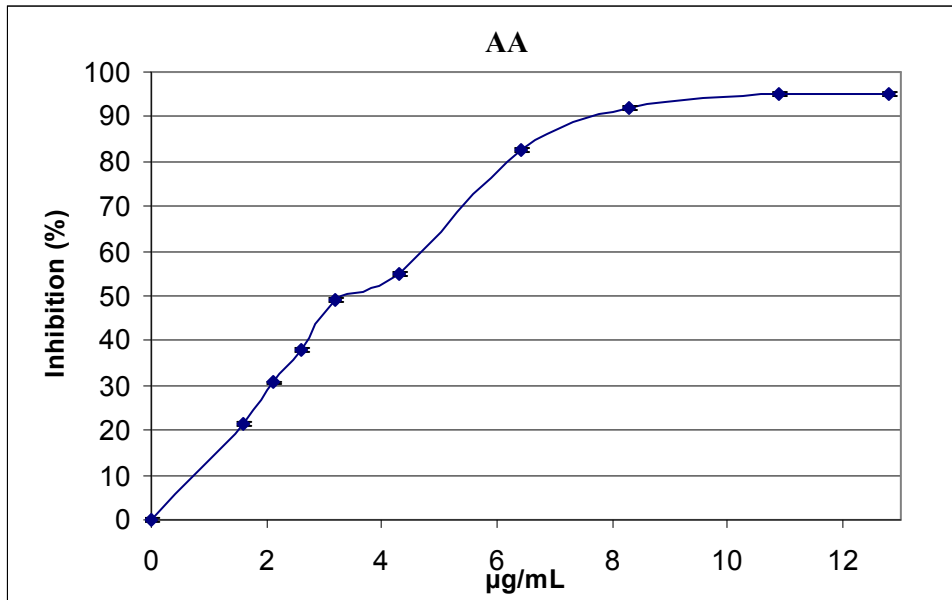
Γράφημα 5.4: Μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (αντιοξειδωτικό). $\text{IC}_{50} = 2,2 \mu\text{g/mL}$.



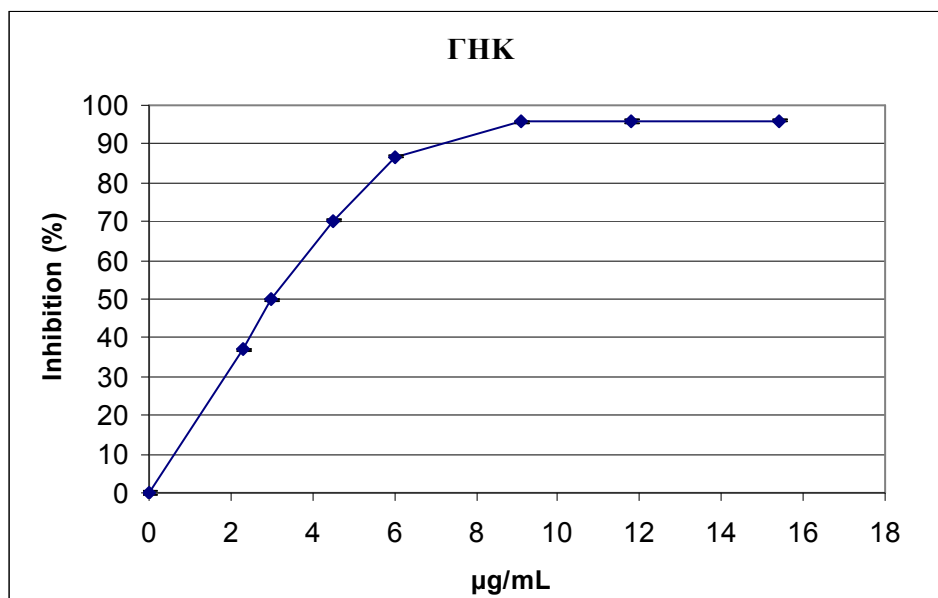
Γράφημα 5.5: Μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης BHT (αντιοξειδωτικό). $\text{IC}_{50} = 7,7 \mu\text{g/mL}$.

Οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν από τα αντίστοιχα γραφήματα και βρέθηκαν για το γαλλικό οξύ $IC_{50} = 2,2 \mu\text{g/mL}$ και για το ΒΗΤ $IC_{50} = 7,7 \mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα.

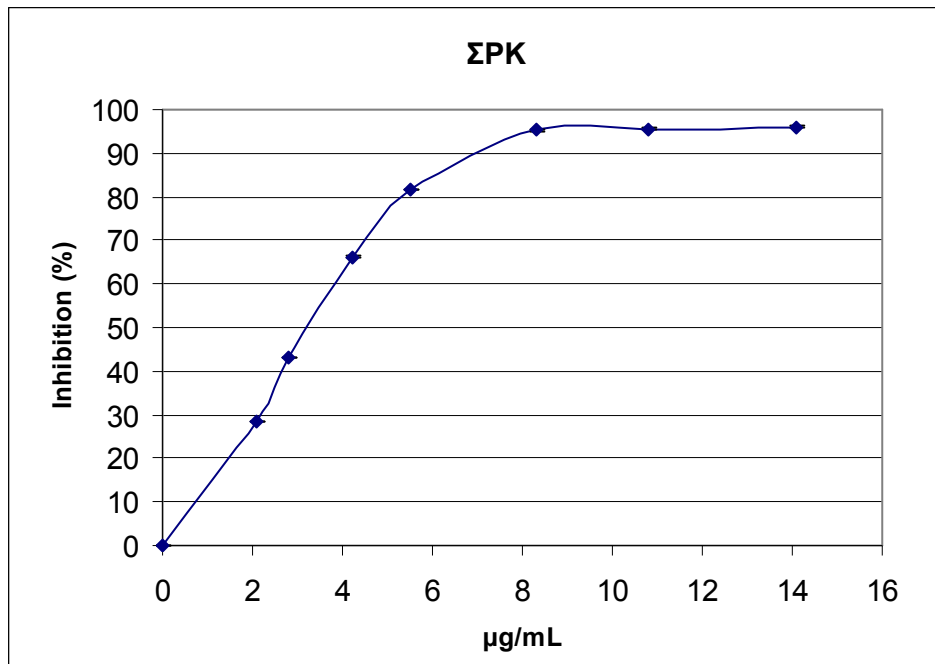
Ομοίως από τα **Γραφ. 5.6-5.9** των εκχυλισμάτων λαδανιάς υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} του καθενός και όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίν. 5.5**.



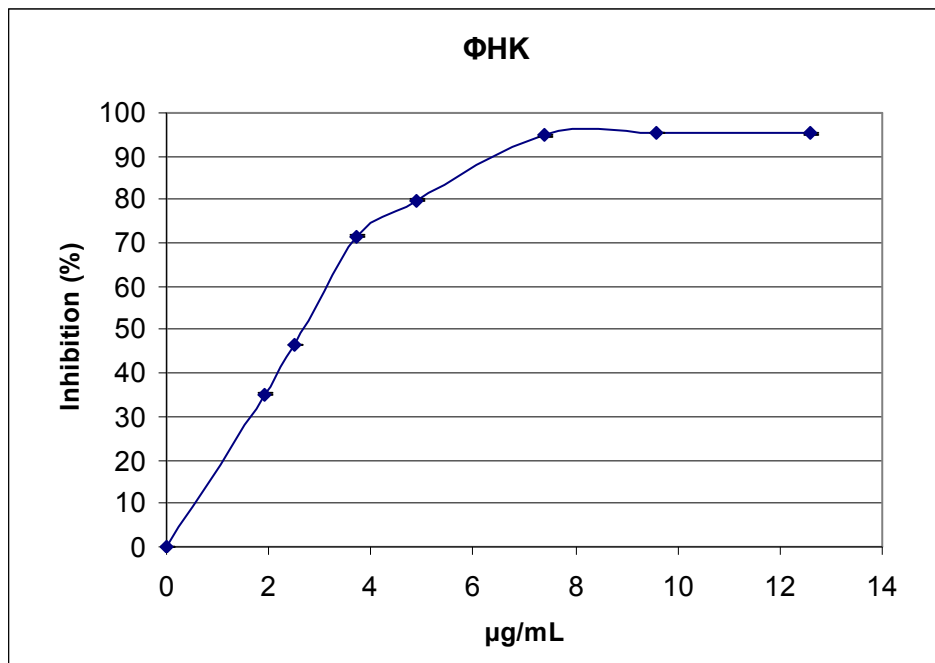
Γράφημα 5.6: Μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης ΟΦΣ του εκχυλίσματος ΑΑ. $IC_{50} = 3,4 \mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 5.7: Μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης ΟΦΣ του εκχυλίσματος ΓΗΚ. $IC_{50} = 3,1 \mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 5.8: Μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης ΟΦΣ του εκχυλίσματος ΣΡΚ. $IC_{50} = 3,1 \mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 5.9: Μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης ΟΦΣ του εκχυλίσματος ΦΗΚ. $IC_{50} = 2,6 \mu\text{g/mL}$.

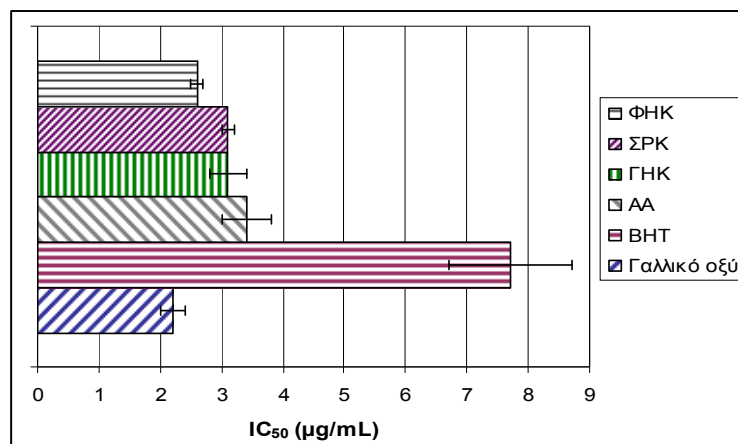
Πίνακας 5.5: Τιμές IC_{50} των πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών και των εκχυλισμάτων λαδανιάς (n=3).

Εκχύλισμα	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a
ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ	2,2±0,2
BHT	7,7±1,0
AA	3,4±0,4
ΓHK	3,1±0,3
ΣPK	3,1±0,1
ΦHK	2,6±0,1

^a Συγκέντρωση δείγματος που απαιτείται για τη δέσμευση του 50% των ελεύθερων ριζών του DPPH.

Τα κλάσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του διαιθυλαιθέρα, δεν παρουσίασαν αντιοξειδωτική ενεργότητα με την εφαρμογή της μεθόδου του DPPH.

Παρατηρούμε ότι οι τιμές IC_{50} όλων των εκχυλισμάτων λαδανιάς είναι από δύο έως τρεις φορές χαμηλότερες από του αντιοξειδωτικού BHT με διαφορά εύρους από 4,3 έως 5,1 $\mu\text{g/mL}$ και ελαφρώς υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του γαλλικού οξέος με διαφορά εύρους από 0,4 έως 1,2 $\mu\text{g/mL}$. Τη χαμηλότερη τιμή IC_{50} , εμφανίζει το εκχύλισμα (**ΦHK**) από την περιοχή Φόδελε της Κρήτης. Ακολουθούν τα εκχυλίσματα **ΓHK**, **ΣPK** με πολύ μικρές διαφορές τιμών και τέλος το εκχύλισμα **AA**. Λαμβάνοντας υπόψη και τις τιμές ΟΦΣ μπορεί να επισημανθεί ότι ενώ στο **AA** η ελαφρώς χαμηλότερη τιμή της περιεκτικότητας σε ΟΦΣ αντιστοιχεί και σε χαμηλότερη αντιοξειδωτική ενεργότητα, δεν ισχύει ακριβώς το ίδιο και για την αντιστοιχία των υπολοίπων αποτελεσμάτων. Στα δείγματα της Κρήτης η σειρά αύξησης της αντιοξειδωτικής ενεργότητας είναι **ΦHK**>**ΓHK**>**ΣPK**.



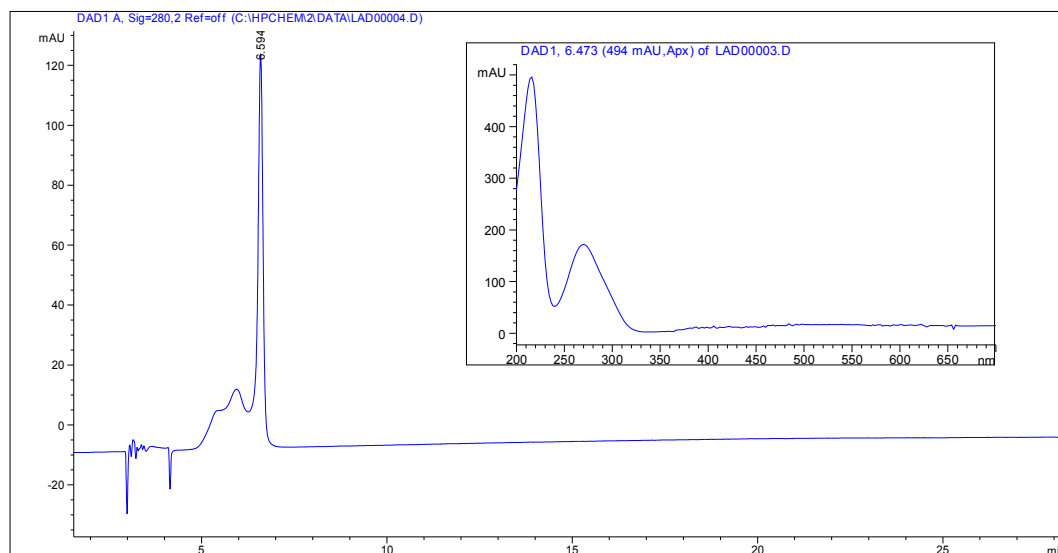
Γράφημα 5.10: Τιμές IC_{50} πρότυπων (γαλλικό οξύ και BHT) και εκχυλισμάτων λαδανιάς (n=3).

5.4 Αποτελέσματα χρωματογραφικής μελέτης (HPLC/DAD, LC/MS) – Συζήτηση

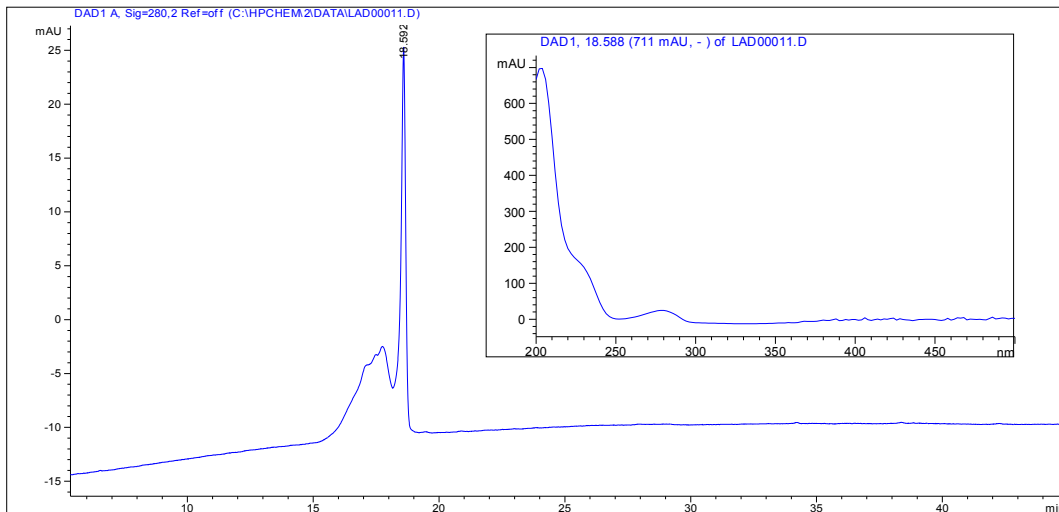
Στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα της λαδανιάς, ανεξάρτητα από την περιοχή και την εποχή συλλογής τους, ανιχνεύθηκαν Ολικά Φαινολικά Συστατικά. Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC/DAD) εφαρμόστηκε στα 4 υδροαλκοολικά εκχυλίσματα (ΑΑ, ΓΗΚ, ΣΡΚ και ΦΗΚ), σε 2 υδρολυμένα με όξινη υδρόλυση αλκοολικά δείγματα (ΑΑ, ΣΡΚ), καθώς και σε πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος, κατεχίνης, επικατεχίνης, επικατεχίνης του γαλλικού οξέος (ECG), επιγαλλοκατεχίνης του γαλλικού οξέος (ECGC), καμφερόλης και κερκετίνης. Η αναγνώριση των συστατικών των εκχυλισμάτων λαδανιάς βασίστηκε στη σύγκριση του χρόνου ανάκτησης και των φασμάτων τους, με τα αντίστοιχα των προτύπων. Τα φαινολικά συστατικά απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του υπεριώδους (UV). Λόγω έλλειψης προτύπων δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίηση όλων των συστατικών των υπό ανάλυση δειγμάτων. Ωστόσο, με τη βοήθεια των υδρολυμένων δειγμάτων, της βιβλιογραφίας και της ανάλυσης LC-MS προσδιορίστηκαν κάποια από αυτά.

Στην **Εικ. 5.4** φαίνονται τα χρωματογραφήματα των 7 πρότυπων ουσιών που λήφθηκαν με τη μέθοδο HPLC/DAD, καθώς και τα φάσματα UV-Vis της κάθε μιας.

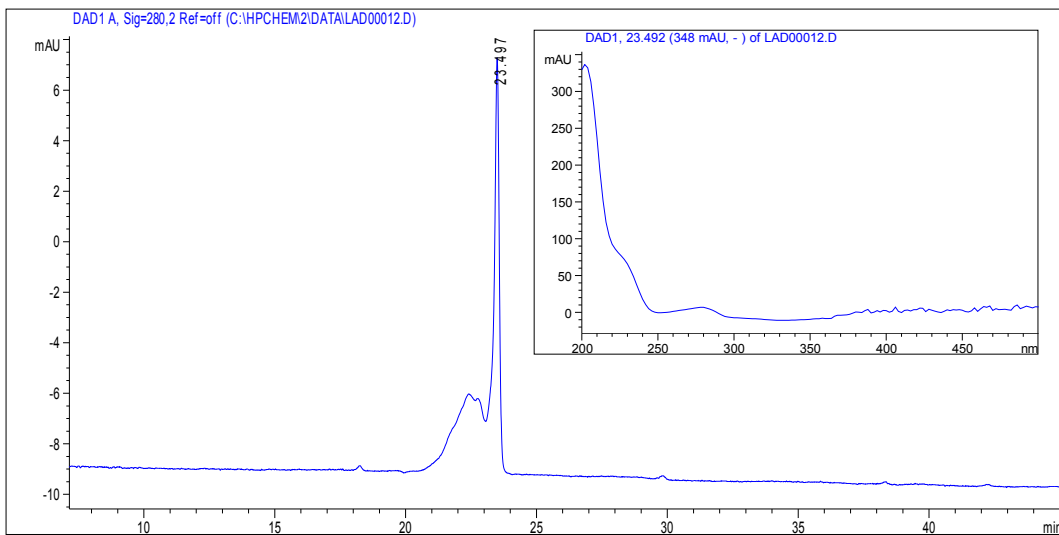
Α: Χρωματογράφημα HPLC/DAD γαλλικού οξέος και φάσμα UV-Vis στα 280nm.



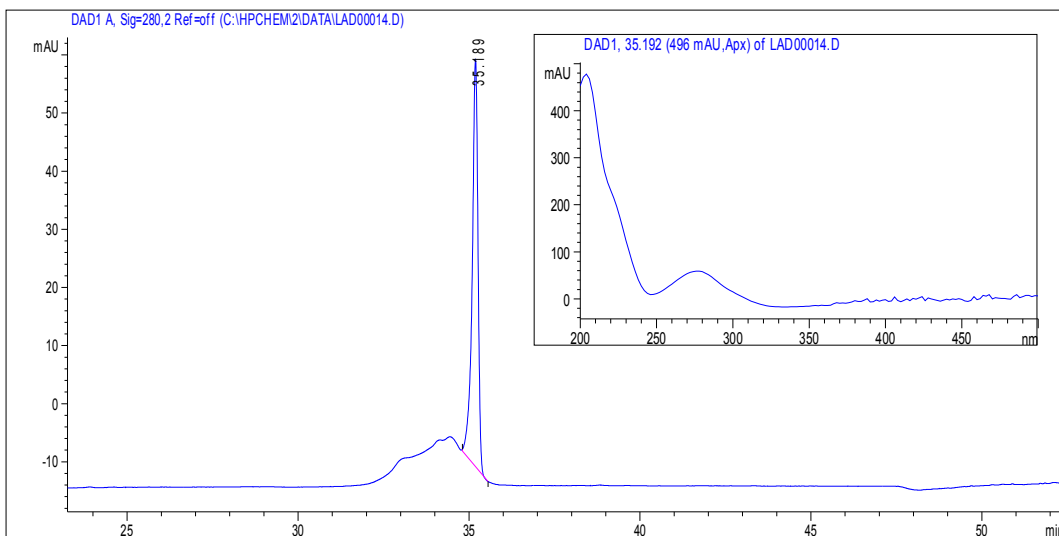
Β: Χρωματογράφημα HPLC/DAD κατεχίνης και φάσμα UV-Vis στα 280nm.

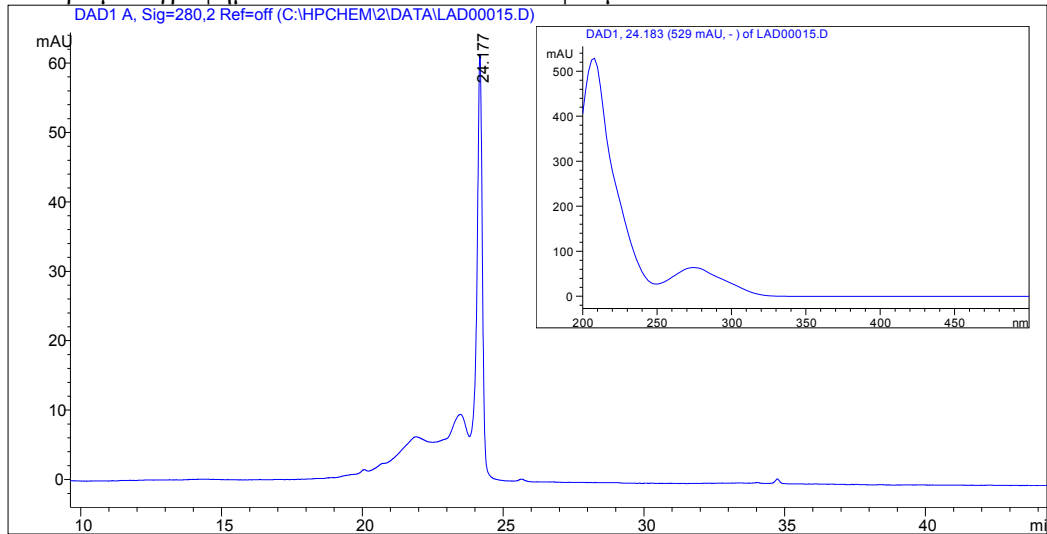
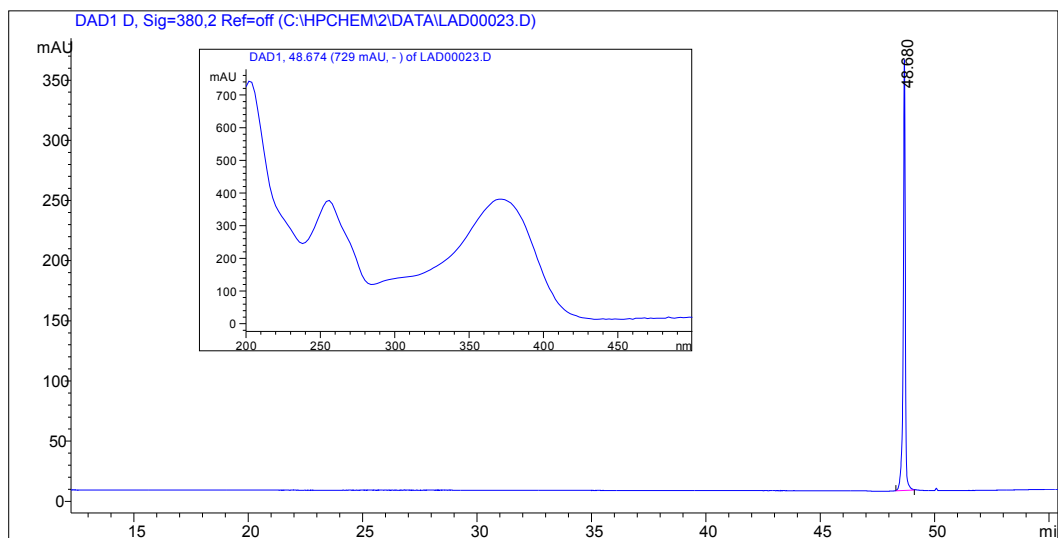
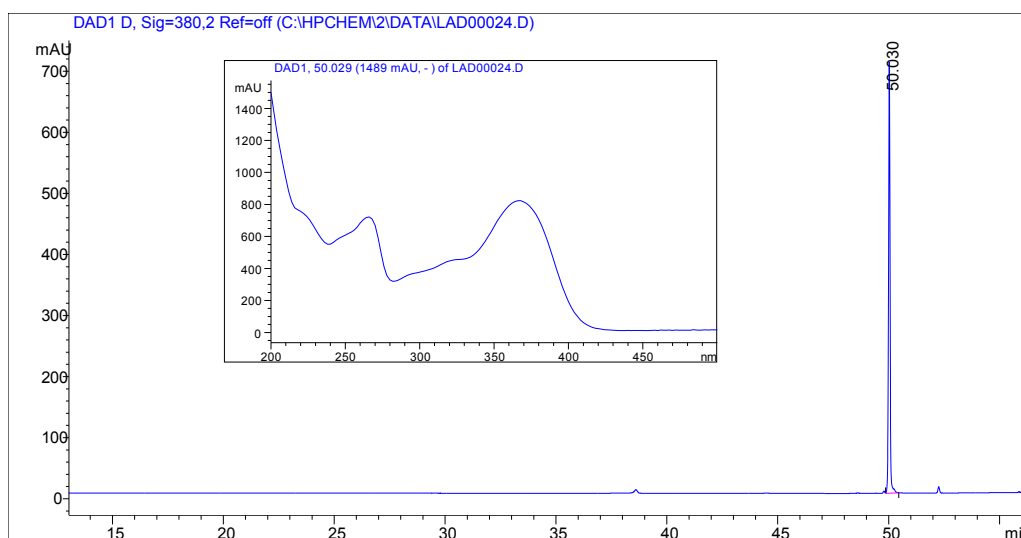


Γ: Χρωματογράφημα HPLC/DAD επικατεχίνης και φάσμα UV-Vis στα 280nm.



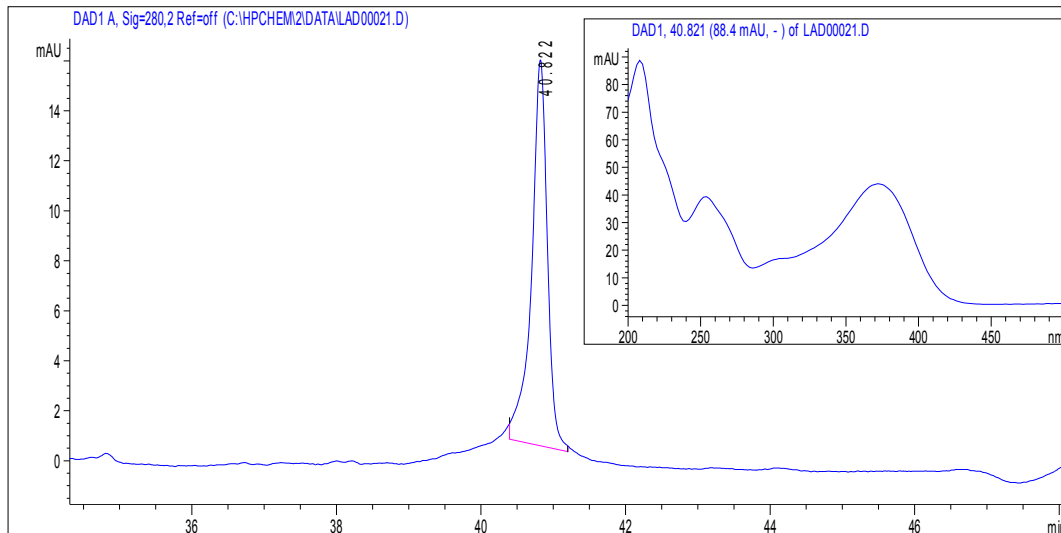
Δ: Χρωματογράφημα HPLC/DAD ECG και φάσμα UV-Vis στα 280nm.



Ε: Χρωματογράφημα HPLC/DAD ECGC και φάσμα UV-Vis στα 280nm.**ΣΤ:** Χρωματογράφημα HPLC/DAD κερκετίνης και φάσμα UV-Vis στα 380nm.**Z:** Χρωματογράφημα HPLC/DAD καμφερόλης και φάσμα UV-Vis στα 380nm.

Εικόνα 5.4: Χρωματογραφήματα HPLC/DAD πρότυπων ουσιών και φάσματα UV-Vis της κάθε πρότυπης ουσίας.

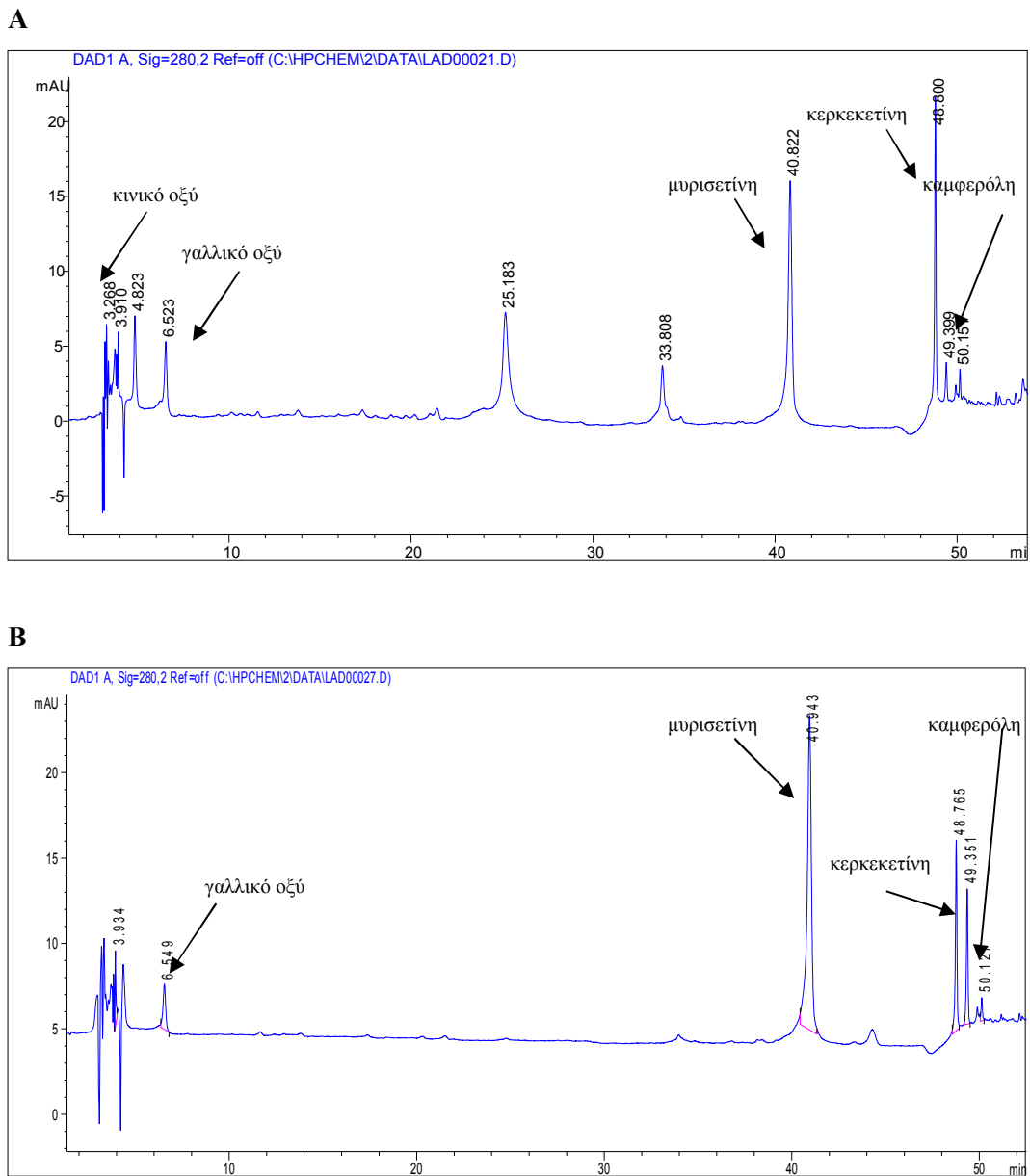
Στο υδρολυμένο δείγμα **AA**, μετά από σύγκριση χρωματογραφημάτων (χρόνων) και φασμάτων UV-Vis και μάζας με των διαθέσιμων προτύπων, ανιχνεύτηκαν γαλλικό οξύ, κερκετίνη και καμφερόλη. Επίσης, από τη βιβλιογραφία και το φάσμα μάζας της διαπιστώθηκε η παρουσία μυρισετίνης (**Εικ. 5.5**).



Εικόνα 5.5: Χρωματογράφημα HPLC/DAD μυρισετίνης και φάσμα UV-Vis στο υδρολυμένο εκχύλισμα από Αγρίνιο (**AA**).

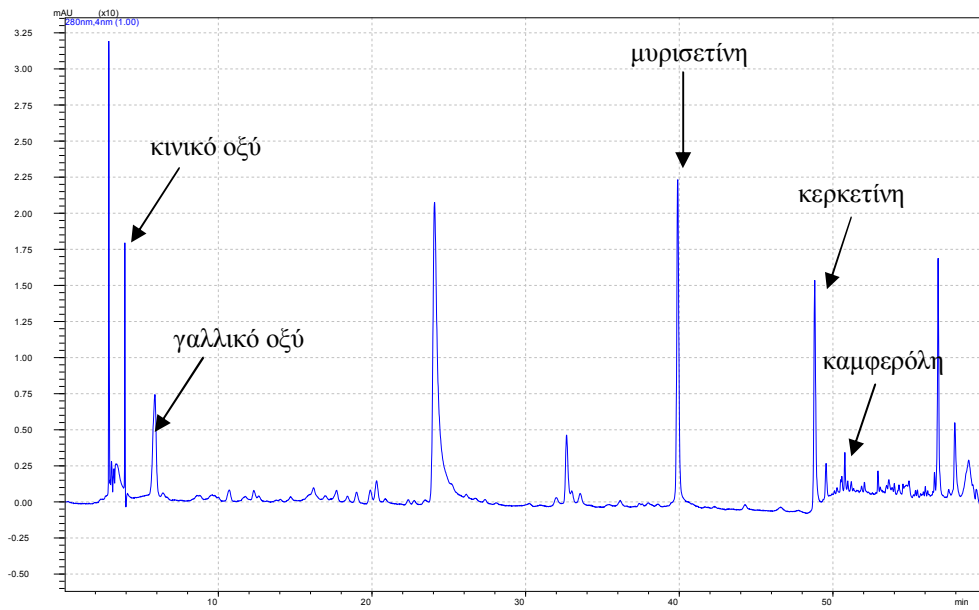
Στο υδρολυμένο δείγμα από Σίσες (**ΣPK**), παρατηρούμε διαφοροποίηση του χρωματογραφήματος στην περιοχή 20-35 min, όπου δεν ανιχνεύεται κανένα συστατικό. Στους ίδιους περίπου χρόνους με το δείγμα **AA** παρατηρούνται το κινικό οξύ, το γαλλικό οξύ, η μυρισετίνη, η κερκετίνη και η καμφερόλη (**Εικ. 5.6, 5.7**).

Από την ανάλυση με LC/MS των υδρολυμένων εκχυλισμάτων (**AA, ΣPK**) λήφθηκαν τα φάσματα μάζας. Στην **Εικ. 5.8** παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας των ουσιών που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα αυτά. Η ταυτοποίηση επιβεβαιώθηκε και μέσω σύγκρισης των φασμάτων UV-Vis, όπου αυτό ήταν εφικτό, λόγω ύπαρξης προτύπων ουσιών.

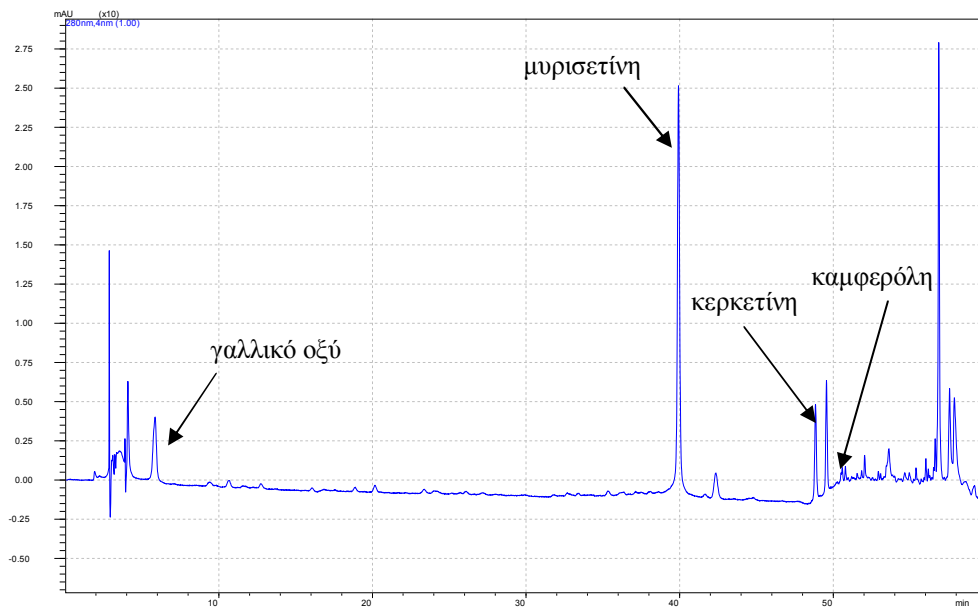


Εικόνα 5.6: Χρωματογραφήματα HPLC/DAD υδρολυμένου εκχυλίσματος λαδανιάς από
A: Αγρίνιο (AA) και B: Σίτσες (ΣPK).

Α

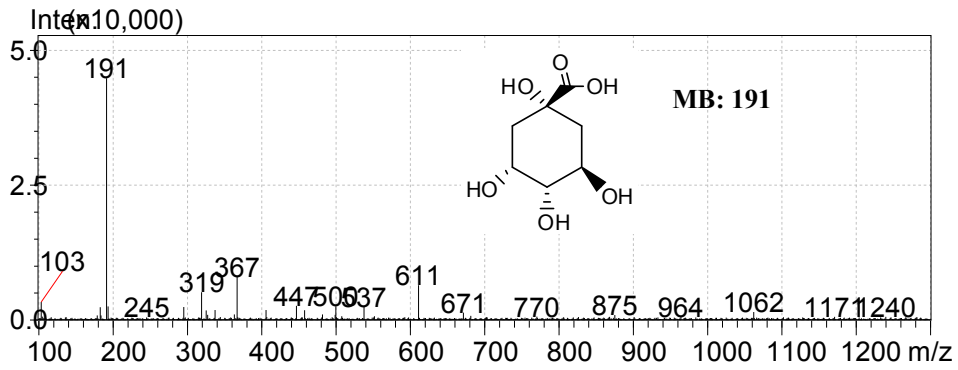


Β

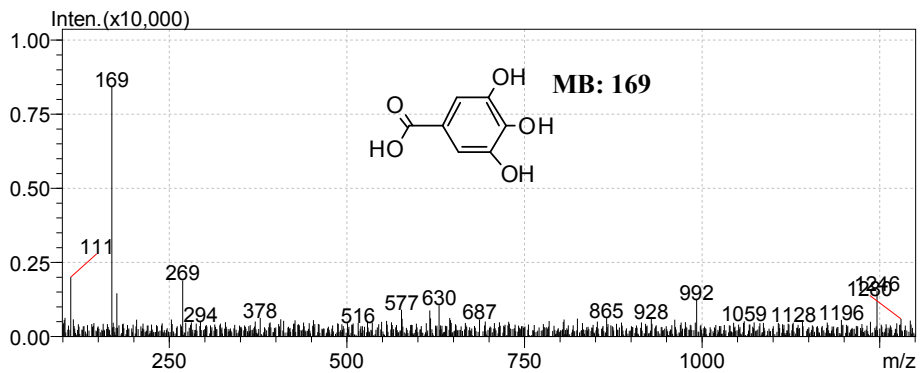


Εικόνα 5.7: Χρωματογραφήματα LC/MS υδρολυμένου εκχυλίσματος λαδανιάς από **A:** Αγρίνιο (AA) και **B:** Σίτσες (ΣΡΚ).

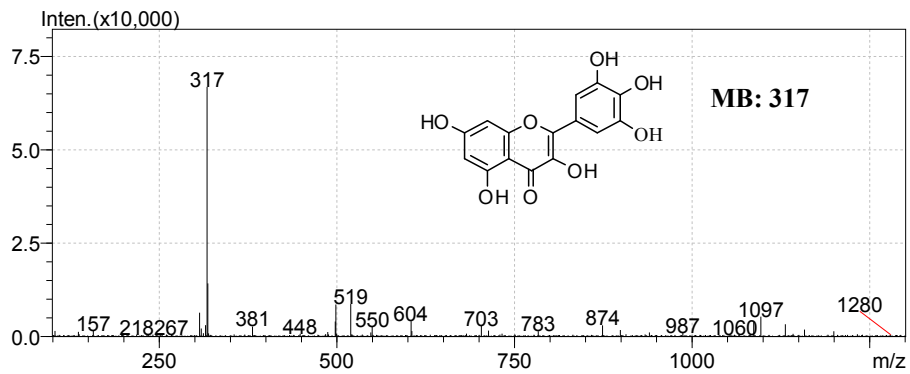
Κινικό οξύ



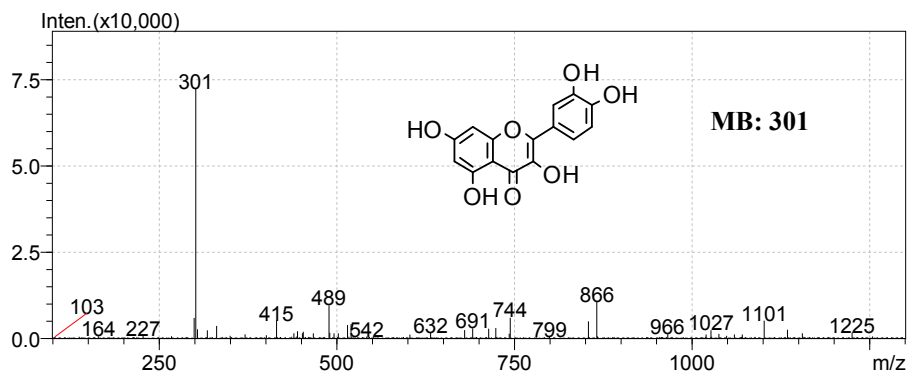
Γαλλικό οξύ



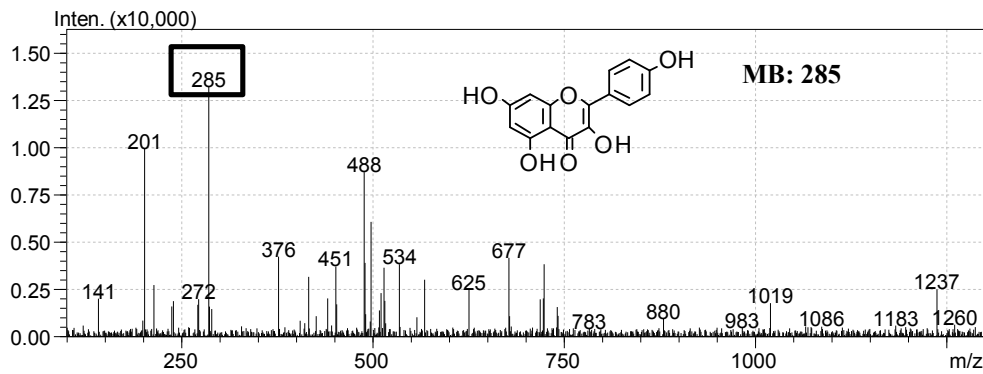
Μυρισετίνη



Κερκετίνη



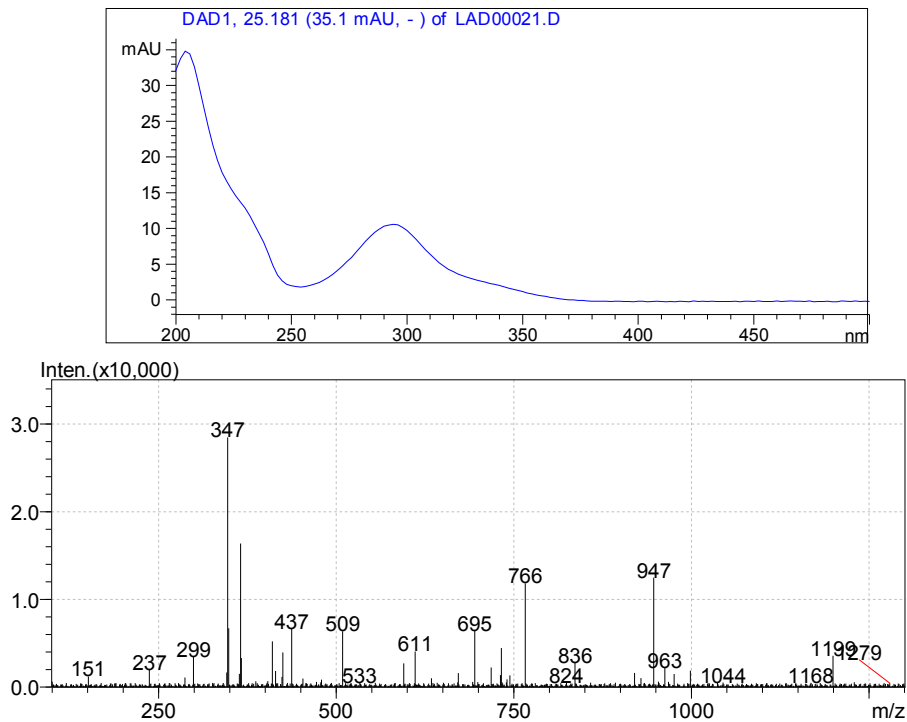
Καμφερόλη



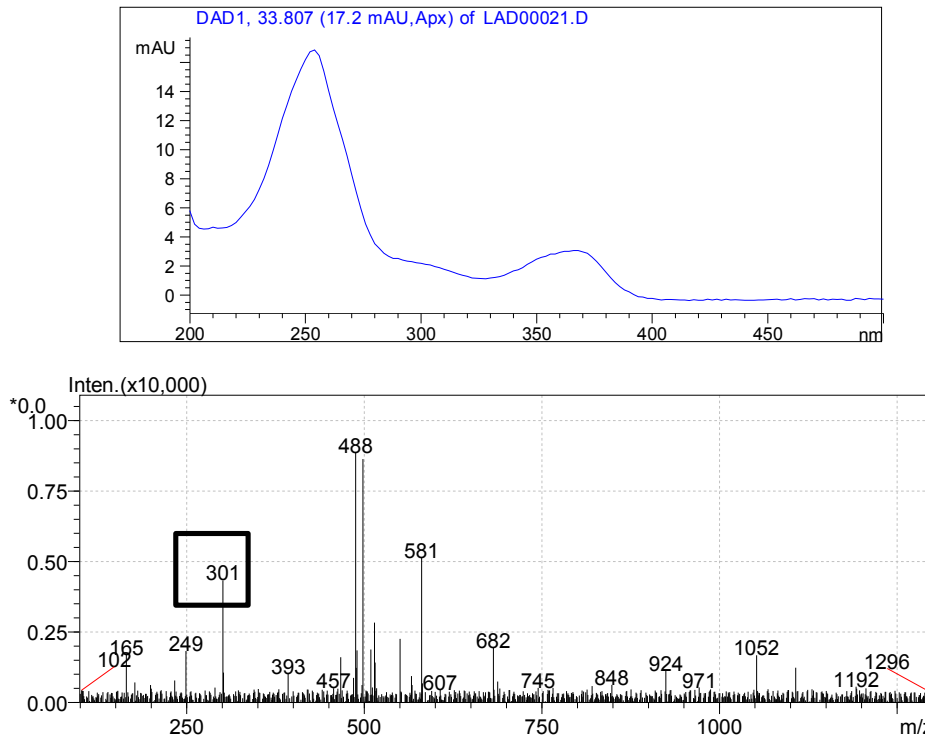
Εικόνα 5.8: Φάσματα μάζας συστατικών του υδρολυμένου εκχυλίσματος λαδανιάς (AA). Στο φάσμα της καμφερόλης, λόγω χαμηλής αφθονίας της στο δείγμα ο θόρυβος είναι σημαντικός.

Κάποια συστατικά των εκχυλισμάτων λαδανιάς, που ανιχνεύθηκαν μόνο στο εκχύλιμα AA και λόγω έλλειψης προτύπων δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίησή τους, φαίνονται στην **Εικ. 5.9**. Από τα φάσματα μάζας τους μπορούμε να υποθέσουμε πως ίσως να πρόκειται για γλυκοζίτες των οποίων η υδρόλυση δεν ολοκληρώθηκε. Ειδικά η κορυφή στα 33,8 min θα μπορούσε να θεωρηθεί μερικώς υδρολυμένος γλυκοζίτης της κερκετίνης.

A



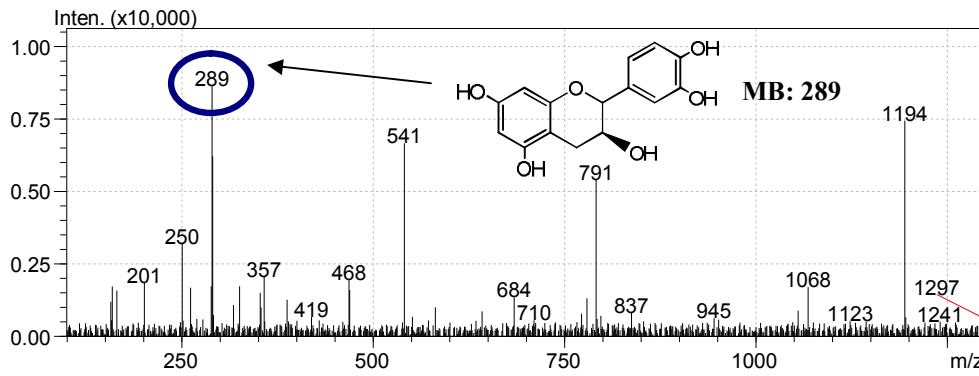
B



Εικόνα 5.9: Φάσματα Uv-Vis και μάζας αγνώστων συστατικών του υδρολυμένου εκχυλίσματος λαδανιάς από το Αγρίνιο (AA). **A:** στα 25,18 min και **B:** στα 33,81 min. Το θραύσμα 301 παραπέμπει στην κερκετίνη (MB: 301).

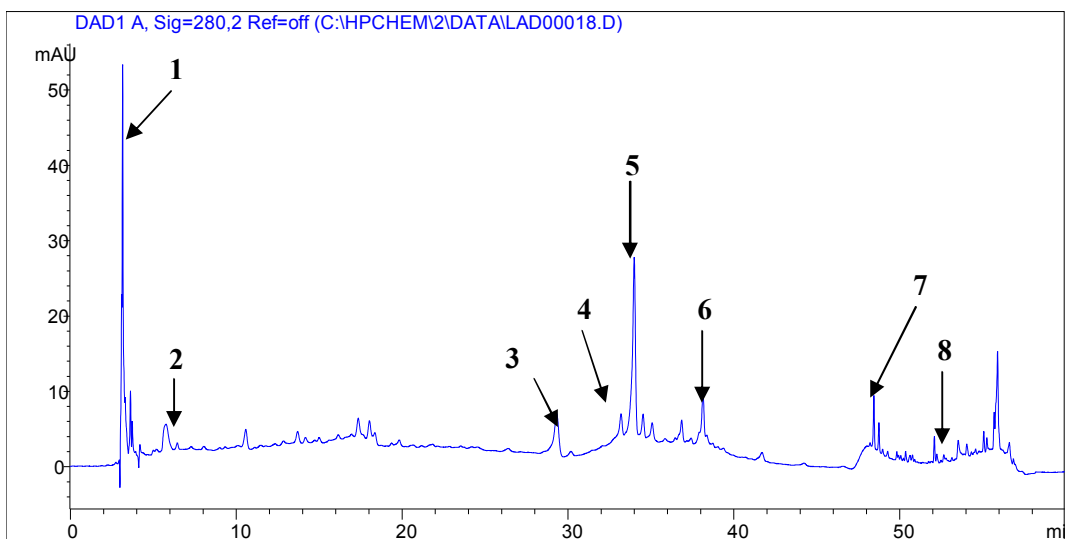
Παρά τις διαφορές στα υδρολυμένα δείγματα, τα εκχυλίσματα λαδανιάς (AA, ΓHK, ΣPK, ΦHK) είχαν παρόμοια χρωματογραφικά προφίλ, ανεξάρτητα από την εποχή και τον τόπο συλλογής. Παρατηρείται σε όλα τα εκχυλίσματα (όπως και στα υδρολυμένα), στα 3,0-3,2 min, η κορυφή (1) που από το φάσμα μάζας και τη βιβλιογραφία (Fernandez-Arroyo, 2010) μπορεί να αποδοθεί στο κινικό οξύ.

Συνοψίζοντας, στο χρονικό διάστημα 0-10 min εκλύονται φαινολικά οξέα (κινικό, γαλλικό) και στην περιοχή 30-55 min γλυκοζίτες πολυφαινολών (μυρισετίνης, κερκετίνης, καμφερόλης). Στην περιοχή 10-25 min, λόγω μικρής αφθονίας των συστατικών δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με βεβαιότητα. Ωστόσο, από τα φάσματα μάζας, Uv-Vis και τη βιβλιογραφία μπορεί να υποτεθεί η παρουσία κατεχινών ή εστέρων τους σε ίχνη. Για παράδειγμα, το φάσμα μάζας στα 18,03 min παραπέμπει στην παρουσία κατεχίνης (Εικ. 5.10). Στην Εικ. 5.11 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα HPLC/DAD όλων των εκχυλισμάτων λαδανιάς.

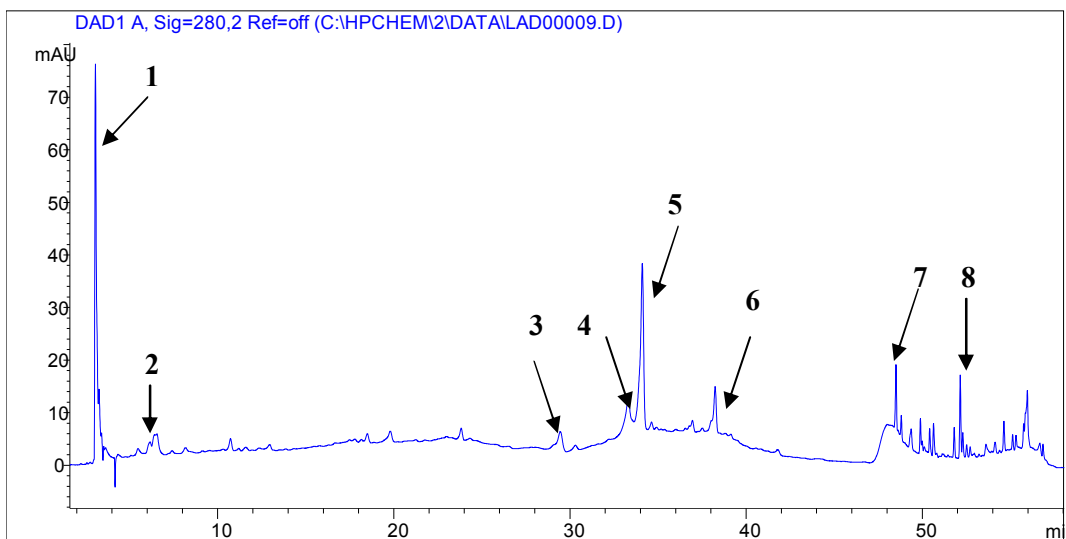


Εικόνα 5.10: Φάσμα μάζας που αντιστοιχεί στην κορυφή στα 18,03 min του χρωματογραφήματος HPLC του εκχυλίσματος από Αγρίνιο.

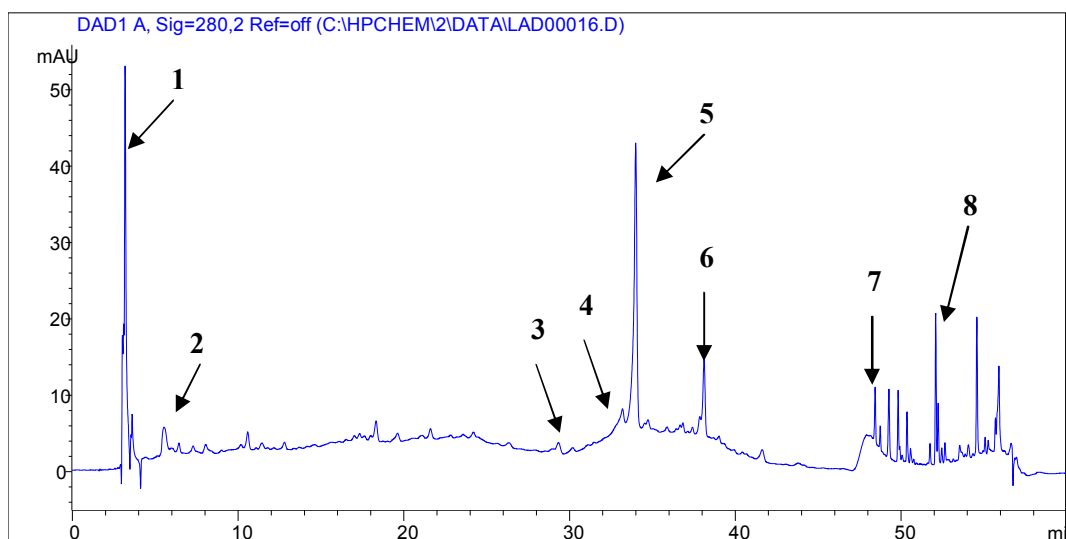
A



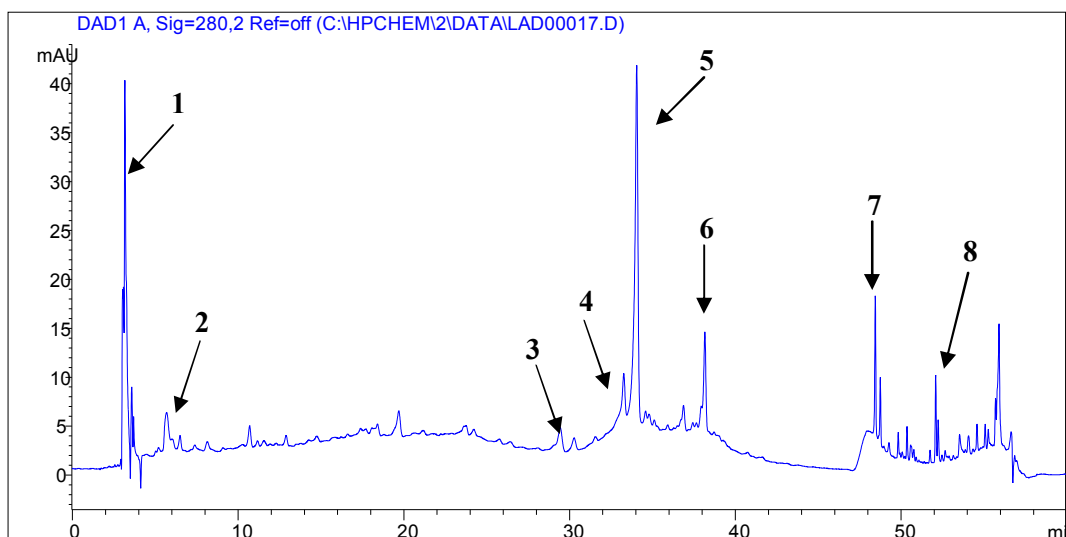
B



Γ



Δ



Εικόνα 5.11: Χρωματογραφήματα HPLC/DAD εκχυλισμάτων λαδανιάς από **Α:** Αγρίνιο (ΑΑ), **Β:** Γούβες (ΓΗΚ), **Γ:** Σίσσες (ΣΡΚ), **Δ:** Φόδελε (ΦΗΚ).

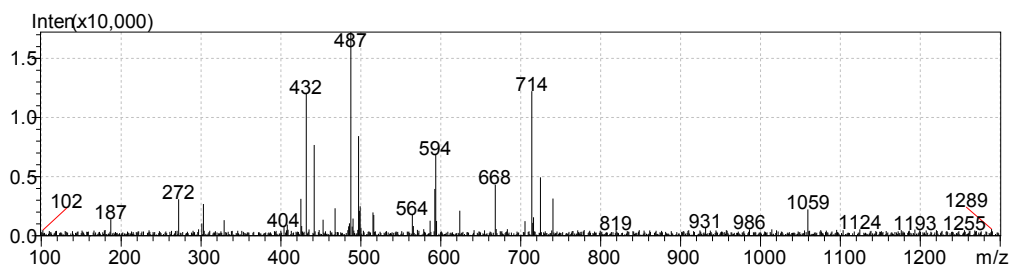
Στον **Πίν. 5.6** φαίνονται οι κατηγορίες των συστατικών των εκχυλισμάτων λαδανιάς και οι βιβλιογραφικές αναφορές τους. Τα φάσματα μάζας της ανάλυσης LC/MS παρατίθενται στο Παράρτημα II.

Οι κορυφές **7** και **8** δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν, ωστόσο παρατηρούνται σε όλα τα εκχυλίσματα και στην **Εικ. 5.12** φαίνονται τα φάσματα μάζας τους.

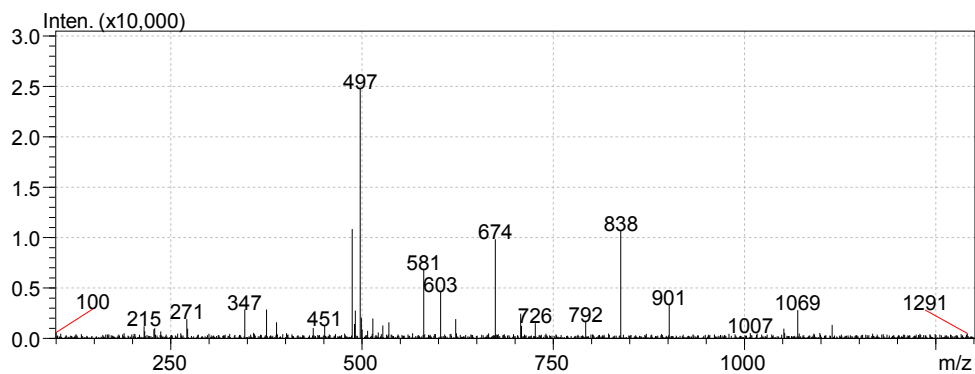
Πίνακας 5.6: Συστατικά εκχυλισμάτων λαδανιάς, όπως προκύπτουν από την ανάλυση HPLC/DAD.

Κορυφή	Χρόνος (min)	Κατηγορία Συστατικού	Αναφορά
1	3,2	κινικό οξύ	Fernandez-Arroyo et al. (2010)
2	5,8	παράγωγο γαλλικού οξέος	Barrajon-Catalan et al. (2010)
3	29,3	γλυκοζίτης πολυφαινόλης	Demetzos et al. (1989); Chaves et al. (1993); Chaves et al. (1998), Saracini et al. (2005)
4	33,2	γλυκοζίτης πολυφαινόλης	Demetzos et al. (1989); Saracini et al. (2005); Sosa et al. (2005)
5	33,9	γλυκοζίτης πολυφαινόλης	Demetzos et al. (1989); Saracini et al. (2005)
6	38,1	γλυκοζίτης πολυφαινόλης (κερκετίνης)	Demetzos et al. (1989); Chaves et al. (1993); Chaves et al. (1998), Saracini et al. (2005); Sosa et al. (2005)

7: 48,5 min



8: 52,04 min



Εικόνα 5.12: Φάσματα μάζας αγνώστων συστατικών των εκχυλισμάτων λαδανιάς στα 48,5 (7) και 52,04 (8) min.

Από τις αναλύσεις HPLC/DAD-LC/MS επιβεβαιώνεται η παρουσία φαινολικών συστατικών στα φύλλα της λαδανιάς. Ανιχνεύθηκαν κινικό οξύ, γαλλικό οξύ, καθώς και γλυκοζίτες μυρισετίνης, κερκετίνης και καμφερόλης. Δεν παρατηρήθηκε παρουσία κατεχινών (κατεχίνης, επικατεχίνης, ECG ή ECGC). Ωστόσο, όπως ήδη

αναφέρθηκε, τα εκχυλίσματα λαδανιάς παρουσίασαν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση συγκρινόμενα με δύο πρότυπα αντιοξειδωτικά (BHT, γαλλικό οξύ). Την έντονη αντιοξειδωτική δράση μπορεί να εξηγήσει τόσο η παρουσία του γαλλικού παραγώγου, όσο και η μυρισετίνη, της οποίας η αντιοξειδωτική δράση ενισχύεται λόγω της παρουσίας τριών ομάδων υδροξυλίου (-OH) στο Β δακτύλιο. Η συνεισφορά της κερκετίνης και της καμφερόλης είναι σαφώς αναμενόμενη. Τα συστατικά αυτά, χωρίς να μπορεί να αποδοθεί στο καθένα ακριβώς η αντιοξειδωτική του ενεργότητα, είναι στο σύνολό τους υπεύθυνα για την πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της λαδανιάς.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρατηρούμε ότι τα συστατικά με τα υψηλότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν σε όλα τα αιθέρια έλαια, ανεξάρτητα από τον τρόπο παραλαβής ή την προέλευσή τους.

Στη σύσταση των αιθερίων ελαίων της λαδανιάς είναι σαφής η επικράτηση των σεσκιτερπενίων, των οξυγονούχων σεσκιτερπενίων και των λαβδανικών διτερπενίων γεγονός που συμφωνεί και με τις αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με το γένος *Cistus*. Οι ομάδες αυτές εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά επί συνόλου στο κάθε δείγμα. Στο δείγμα από το Αγρίνιο το μεγαλύτερο ποσοστό είχαν τα σεσκιτερπένια, στα δείγματα από Γούβες και Σίσσες τα λαβδανικά διτερπένια και στο δείγμα από Φόδελε τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια.

Οι διαφορές αυτές, τόσο στην ποιοτική όσο και την ποσοτική σύσταση των ελαίων παρατηρούνται συχνά και στη βιβλιογραφία και μπορεί να οφείλονται στο διαφορετικό περιβάλλον ανάπτυξης του κάθε φυτού, στη διαφορά εποχής, αλλά ακόμα και ώρας μέσα στην ημέρα, συλλογής των δειγμάτων.

Σε όλα τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα παρατηρήθηκε η παρουσία Ολικών Φαινολικών Συστατικών σε αρκετά υψηλά επίπεδα (από 115,2 έως 163,1 mg GAE/g φ.υ.) και μικρές διαφορές διακύμανσης των τιμών τους. Τη μεγαλύτερη τιμή έδωσε το εκχύλισμα από Γούβες. Η παραμονή των εκχυλισμάτων στην κατάψυξη για διάστημα δύο μηνών δε φαίνεται να επηρεάζει την περιεκτικότητα σε ΟΦΣ. Στη βιβλιογραφία η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά έχει μελετηθεί αρκετά στο είδος *Cistus ladanifer* με χρήση διάφορων διαλυτών με απλή εκχύλιση σε θερμοκρασία δωματίου ή «εν θερμώ» και οι τιμές κυμαίνονται από 11,9 mg GAE/g εκχυλίσματος με διαλύτη αιθανόλη έως 334.5 mg GAE/g εκχυλίσματος με διαλύτη ακετόνη.

Παρατηρούμε ότι οι τιμές IC_{50} όλων των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων λαδανιάς είναι έως και τρεις φορές χαμηλότερες από του αντιοξειδωτικού BHT και ελαφρώς υψηλότερες από του γαλλικού οξέος. Τη χαμηλότερη τιμή IC_{50} εμφανίζει το εκχύλισμα από Φόδελε, το οποίο δεν είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ΟΦΣ, όπως ίσως θα περιμέναμε. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο συνδυασμό παρουσίας και δράσης και άλλων συστατικών, όπως ίσως αυτών του αιθερίου ελαίου, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές που μελετούν την αντιοξειδωτική δράση αιθερίου ελαίου φυτών του γένους *Cistus* ή και στην ποσοτική διακύμανση των επιμέρους φαινολικών συστατικών στο κάθε εκχύλισμα. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι η

αντιοξειδωτική δράση όλων των εκχυλισμάτων είναι ισχυρή και παρόμοια σε όλα τα δείγματα, αφού συγκρινόμενα με δύο πρότυπα αντιοξειδωτικά (BHT, γαλλικό οξύ), παρουσίασαν πολύ καλή αντιοξειδωτική ενεργότητα. Οι βιβλιογραφικές αναφορές, ενισχύουν το συμπέρασμα αυτό.

Από την ανάλυση HPLC/LC επιβεβαιώνεται η παρουσία φαινολικών συστατικών στα φύλλα της λαδανιάς. Ανιχνεύθηκαν κινικό οξύ, γαλλικό οξύ, καθώς και γλυκοζίτες μυρισετίνης, κερκετίνης και καμφερόλης. Η βιβλιογραφία αναφέρει πλήθος φαινολικών συστατικών που έχουν εντοπιστεί στα εκχυλίσματα φυτών *Cistus*, όπως απιγενίνη και γλυκοζίτες της, ελλαγιταννίνες και γλυκοζίτες τους και πουνικαλαγίνη, που όμως δε διαπιστώθηκε η παρουσία τους στα δείγματα είτε επειδή δεν περιέχονταν σε αυτά είτε επειδή, λόγω έλλειψης προτύπων, δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίησή τους. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης η παρουσία κατεχινών και εστέρων τους με γαλλικό οξύ, που από τα φάσματα μάζας των συστατικών στα εκχυλίσματα λαδανιάς τα οποία μελετήθηκαν, μπορεί να υποθεθεί ότι υπάρχουν σε ίχνη, υπόθεση που απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Η παρουσία της μυρισετίνης πρωταρχικά και ακολούθως των υπόλοιπων φαινολικών συστατικών, εξηγεί την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αθανασιάδης, Νικόλαος. *Δασική Βοτανική. Μέρος II*. Εκδ. Γιαχούδη-Γιαπούλη. Θεσσαλονίκη, 1986.
- Ραγκούση – Ιγνατιάδου, Βαλεντίνη. *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*. Αθήνα, 1996.
- Σαρλής, Γ.Π.. *Συστηματική Βοτανική-Εφαρμογές Κορμοφύτων*, Εκδ. Σταμούλη. Αθήνα, 1999.
- Σφήκας, Γεώργιος. *Αγριολούλουδα της Κρήτης*. Εκδ. Efstathiadis Group, 1999.
- Ταραντίλης, Π., 2004. Τεχνικές εκχύλισης και απόσταξης, χρωματογραφικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης. Παραλαβή Διαχωρισμός Απομόνωση Καθαρισμός Ταυτοποίηση Φυσικών Προϊόντων. Αθήνα, 2004.
- Aerts, R. (1995). The advantages of being evergreen. *Trends in Ecology and Evolution* **10**:402–407.
- Adams, R.P.. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. 4th Edition. Allured Publishing Corporation Carol Stream Ill., 2007.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A. & Bouwmeester, H.J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science* **10**: 594-602.
- Alupului, A., Calinescu, I. & Lavric, V. (2009). Ultrasonic vs. Microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants. *AIDIC Conference Series* **9**: 1-7.
- Amensour, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Skali-Senhaji, N., Abrini, J. & Fernandez-Lopez J. (2010). Antioxidant activity and Chemical Content of Methanol and Ethanol Extracts from Leaves of Rockrose. *Plant Foods for Human Nutrition* **65** (2): 170-178.
- Anastasaki, T., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., Gazouli, M., Loukis, A. & Harvala, C. (1999). Analysis of labdane-type diterpenes from *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS. *Planta Medica* **65**: 735-739.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues F. & Duartea, A.P. (2009). Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L.. *Industrial Crops and Products* **30**: 165–167.

- Andres, C. & Ojeda, F. (2002). Effects of afforestation with pines on woody plant diversity of Mediterranean heathlands in southern Spain. *Biodiversity and Conservation* **11**: 1511–1520.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C. & Perdetzoglou, D. (2001). An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology* **29**: 405-415.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C. & Perdetzoglou, D. (2002). Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical Systematics and Ecology* **30**: 189–203.
- Anonis, D.P. (1995). Amber odours of vegetable origin. *Perfume and Flavour* **20**: 43–46.
- Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka T., Boland, W. & Takabayashi, J. (2000). Herbivory induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* **406**: 512-515.
- Aronne, G. & De Micco, V. (2001). Seasonal Dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Annals of Botany* **87**: 789-794.
- Attaguile, G., et al. (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L.. *Cell Biology and Toxicology* **16**: 83-90.
- Barrajon-Catalan, E., Fernandez-Arroyo, S., Saura, D., Guillen, E., Fernandez-Gutierrez, A., Segura-Carretero, A. & Micol V. (2010). Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 2273–2282.
- Bassman, J.H. (2004). Ecosystem Consequences of Enhanced Solar Ultraviolet Radiation: Secondary Plant Metabolites as Mediators of Multiple Trophic Interactions in Terrestrial Plant Communities. *Photochemistry and Photobiology*, **79**:382–398.
- Batista, F., Banares, A., Caujapi-Castells, J., Carque, E., Marrero-Gómez, M., Sosa, P.A. (2001). Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary Islands: intraspecific comparisons and implications for genetic conservation. *American Journal of Botany* **88**: 1582–1592.

- Belmokhtar, M., et al. (2009). Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of aqueous extract of *Cistus ladaniferus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **389**: 145–149.
- Bouamamaa, H., Noel, T., Villard, J., Benharref, A. & Jana, M. (2006). Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of Ethnopharmacology* **104**: 104–107.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **28**: 25–30.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**: 223-253.
- Carlier, J., Leitao, J. & Fonseca F. (2008). Population genetic structure of *Cistus ladanifer* L. (Cistaceae) and genetic differentiation from co-occurring *Cistus* species. *Plant Species Biology* **23**: 141–151.
- Chaves, N., Rios, J.J., Guttierrez, C., Escudero, J.C., Olias, J.M. (1998). Analysis of secreted flavonoids of *Cistus ladanifer* L. by high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **799**: 111-115.
- Chaves, N., Sosa, T., Alias, J.C. & Escudero, J.C. (2001). Identification and Effects of Interaction Phytotoxic Compounds from Exudate of *Cistus ladanifer* Leaves. *Journal of Chemical Ecology* **27** (3): 611-621.
- Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C. & Verbist, J.F. (1994). Cytotoxic and antibacterial activity of labdane-type diterpenes isolated from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus* (L.) Heywood. *Planta Medica* **60**: 34-36.
- Clark, L.J., Hamilton, J.G.C., Chapman, J.V., Rhodes M.J.C., & Hallahan D.L. (1997). Analysis of monoterpenoids in glandular trichomes of the catmint *Nepeta racemosa*. *The Plant Journal* **11** (6): 1387–1393.
- Cushnie, T.P.T & Lamb, A.J. (2005). Review: Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**: 343–35.
- Daferera, D.J. et al. (2000). GC-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungotoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2576-2581.

- Danne, A., Petereit, F. & Nahrstedt, A. (1993). Proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* **34**(4): 1129-1133.
- Danne, A., Petereit, F. & Nahrstedt, A. (1994). Flavan-3-ols, Prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry* **37**(2): 533-538.
- Deguerry, F., Pastore, L., Wu, S., Clark A., Chappell J. & Schalk M. (2006). The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **454**: 123–136.
- Demetzos, C., Anastasaki, T. & Perdetzoglou, D. (2002). A Chemometric Interpopulation Study of the Essential Oils of *Cistus creticus* L. Growing in Crete (Greece). *Zeitschrift für Naturforschung* **57c**: 89-94.
- Demetzos, C., Angelopoulou, T. & Perdetzoglou, D. (2002). A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology* **30**: 651–665.
- Demetzos, C., Chinou, J. & Harvala, C. (1989). The essential oil of *Cistus parviflorus* and its antimicrobial activity in comparison with *Cistus monspeliensis*. *Fitoterapia* **5**: 439-442.
- Demetzos, C., Chinou, I., Harvala, C., & Homatidou, V. (1990). The essential oil of *Cistus parviflorus* and a comparative study of its antimicrobial activity with that of *Cistus monspeliensis*. *Fitoterapia* **LXI**(5): 439-444.
- Demetzos, C., Dimas, C., Hatziantoniou, S., Anastasaki, T. & Angelopoulou, D. (2001). Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and *cis*-clerodane type diterpenes. *Planta Medica* **67**: 614–618.
- Demetzos, C., Harvala, C., Philianos, S.M. & Skaltsounis, A.L. (1990). A new labdane-type diterpene and other compounds from the leaves of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Journal of Natural Products* **53**: 1365-1368.
- Demetzos, C., Kolocouris, A. & Anastasaki, T. (2002). A Simple and Rapid Method for the Differentiation of C-13 Manoyl Oxide Epimers in Biologically Important Samples Using GC–MS Analysis Supported with NMR Spectroscopy and Computational Chemistry Results. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **12**: 3605–3609.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A.L., Couladis, M., Harvala, C. & Libot, F. (1994a). Diterpene esters of malonic acid from the resin Ladano of *Cistus creticus*. *Phytochemistry* **35**: 979-981.

- Demetzos, C. & Perdetzoglou, D. (1999). Chemotaxonomic survey of wild and cultivated *Cistus* L. species. *Plant Biosystem* **133** (3): 251-254.
- Demetzos, C., Stahl, B., Anastassaki, T., Gazouli, M., Tzouvelekis, L. & Rallis, M. (1999). Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin Ladano, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Medica* **65**: 76-78.
- Demetzos, C., Loukis, A., Spiliotis, V., Zoakis, N., Stratigakis, N. & Katerinopoulos, H. (1994b). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* L. *Journal of Essential Oil Research* **7**: 407-410.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Couladis, M., Harvala, C. & Kokkinopoulos, D., (1994c). Natural metabolites of ent-13-epi-manoyl oxide and other cytotoxic diterpenes from the resin Ladano of *Cistus creticus*. *Planta Medica* **60**: 590-591.
- Dias, L.S. & Moreira, I. (2002). Interaction between water soluble and volatile compounds of *Cistus ladanifer* L. *Chemoecology* **12**: 77–82.
- Dicke, M. (1999). Evolution of induced indirect defense in plants. In CD Harwell, R Trollian, eds, *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press, Princeton NJ, pp: 62-88.
- Dimas, C., Demetzos, C., Marsellos, M., Sotiriadou, R., Malamas, M. & Kokkinopoulos, D. (1998). Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. *Planta Medica* **64**: 208-211.
- Dimas, K., Papadaki, M., Tsimplouli, C., Hatziantoniou, S., Alevizopoulos, K., Pantazis, P. & Demetzos, C. (2006). Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**: 127–133.
- Dixon, R. & Palva, N.L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, **7**:1085–1097.
- Douglas, N.M., Anstey, N.M., Angus, B.J., Nosten, F. & Price, R.N. (2010). Artemisinin combination therapy for vivax malaria. *The Lancet Infectious Diseases* **10** (6): 405–16.
- D'Souza, L., Wahidulla, S. & Devi, P. (2010). Antibacterial phenolics from the mangrove *Lumnitzera racemosa*. *Indian Journal of Marine Sciences* **39** (2): 294-298.
- Dudareva, N., Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* **135**: 1893-1902.

- Ellul, P., Boscaiu, M., Vicente, O., Moreno, V. & Rosselo, J. (2002). Intra- and Interspecific Variation in DNA Content in *Cistus* (Cistaceae). *Annals of Botany* **90** (3): 345-351.
- Farley, R.A. & McNeilly, T. (2000). Diversity and divergence in *Cistus salvifolius* (L.) populations from contrasting habitats. *Hereditas* **132**: 183–192.
- Ferrandis, P., Herrantz, J.M. & Martinez-Sanchez, J.J (1999). Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecology* **144**: 103-114.
- Fernandez-Arroyo, S., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Segura-Carretero, A. & Fernandez-Gutierrez, A. (2010). High-performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection Coupled to Electrospray Time-of-flight and Ion-trap Tandem Mass Spectrometry to Identify Phenolic Compounds from a *Cistus ladanifer* Aqueous Extract. *Phytochemical Analysis* **21**: 307-313.
- Fernandez-Mazuecos, M. & Vargas, P. (2010). Ecological rather than geographical isolation dominates Quaternary formation of Mediterranean *Cistus* species. *Molecular Ecology*, **19** (7): 1381-1395.
- Gertsch, J. et al. (2008). "Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (26): 9099–104.
- Grosser, W. (1903). Cistaceae. In: Engler, A. (Ed.), *Das Pflanzenreich*. Wilhelm Engelmann, Berlin, pp. 1–161.
- Guimaraes, R., Sousa, J.M & Ferreira, I.C.F.R. (2010). Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Industrial Crops and Products* **32**: 152–156.
- Gülz, P.G., Herrmann, T. & Hangst, K. (1996). Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora* **191**: 85-104.
- Gültz, P.-G., Kobold, U. & Vostbowsky, O. (1984). The composition of terpene hydrocarbons in the essential oils from leaves of *Cistus* species. *Zeitschrift für Naturforschung* **39c**: 699-704.
- Guzmán, B., Lledo, M.D. & Vargas, P. (2009). Adaptive Radiation in Mediterranean *Cistus* (Cistaceae). *PLoS ONE* **4** (7) e6362: 1-13.
- Guzmán, B. & Vargas, P., 2005. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution* **37**: 644–660.

- Guzmán, B. & Vargas, P. (2009). Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Organisms Diversity & Evolution* **9**:83-99.
- Herrero, C., San Martín, R. & Bravo, F. (2007). Effect of heat and ash treatments on germination of *Pinus pinaster* and *Cistus laurifolius*. *Journal of Arid Environments* **70** (3): 540-548.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). Review: The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (6): 1841–1856.
- Kamatou, G.P.P. & Viljoen, A.M. (2010). A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **87**: 1-7.
- Kessler, A. & Baldwin, I.T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**: 2141-2144.
- Keil, J.F. Modeling of Process Intensification, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- Knekt, P., et al. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition* **76** (3): 560–8.
- Koch, A.L. (1981). Evolution of antibiotic resistance gene function. *Microbiological Reviews* **45**: 355–378.
- Lendeckel, U., Arndt, M., Wolke, C., Reinhold D., Kähne, T. & Ansorge S. (2002). Inhibition of human leukocyte function, alanyl aminopeptidase (APN, CD13) and dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) enzymatic activities by aqueous extracts of *Cistus incanus* L. ssp. *incanus*. *Journal of Ethnopharmacology* **79**: 221–227.
- Margaris, N.S. & Vokou D (1982). Structural and physiological features of woody plants in phrygic ecosystems related to adaptive mechanisms. *Ecologia Mediterranea* **3**:449-459.
- Matsingou, C., Hatziantoniou, S., Georgopoulos, A., Dimas, K., Terzis, A. & Demetzos, C. (2005). Labdane-type diterpenes: thermal effects on phospholipid bilayers, incorporation into liposomes and biological activity. *Chemistry and Physics of Lipids* **138**: 1–11.
- Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Lorusso, E. & Avato, P. (2010). Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Industrial Crops and Products* **32**: 639–649.

- Moser B. (2008). Efficacy of myricetin as an antioxidant in methyl esters of soybean oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **110** (12): 1167-1174.
- Mozzicafredo et al. (2006). Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin. *Biochemie* **88**: 1297-1306.
- Nillson, E. & Eyrich B. (1950). On Treatment of Barbiturate Poisoning. *Acta Medica Scandinavica* **137** (6): 381-389.
- Northup, R.R., Yu, Z., Dahlgren, R.A. & Vogt, K.A. (1998). Polyphenol control of nitrogen release from pine litter. *Nature* **377**: 227-229.
- Nöthlings, U., Murphy, S.P., Wilkens, L.R., Henderson, B.E. & Kolonel, L.N. (2007). Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *American Journal of Epidemiology* **166** (8): 924-31.
- Ogunwande, I. A., Olawore, N.O., Adeleke, K.A., Ekundayo, O. & Koenig W.A. (2003). Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal* **18**: 136-138.
- Paolini, et al. (2009). Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry*, **70**: 1146-1160.
- Pateraki, I. & Kanellis, A., (2004). Isolation of high-quality nucleic acids from *Cistus creticus* ssp. *creticus* and other medicinal plants. *Analytical Biochemistry* **328**: 90-92.
- Pateraki, I. & Kanellis, A., (2008). Isolation and functional analysis of two *Cistus creticus* cDNAs encoding geranylgeranyl diphosphate synthase. *Phytochemistry* **69**: 1641-1652.
- Pateraki, I. & Kanellis, A., (2010). Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Cell Reports* **29**: 629-641.
- Petereit, F., Kolodziej, H. & Nahrstedt, A. (1991). Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* **30** (3): 981-985.
- Peyron, L. & Alessandri, A. (1986). Huile essentielle de feuillage de *Cistus ladaniferus* cultivate en Corse. *Parfums, Cosmetiques, Aromes* **67**: 59-67.
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 237-243.

- Pomponio, R., Gottia, R., Santagatib, N.A. & Cavrinia, V. (2003). Analysis of catechins in extracts of *Cistus* species by microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **990**: 215–223.
- Rincon, J., Lucas, A.D. & Garcia, I. (2000). Isolation of Rock Rose Essential Oil Using Supercritical CO₂ Extraction. *Separation Science and Technology* **35** (16): 2745 – 2763.
- Rivoal et al. (2010). Environmental control of terpene emissions from *Cistus monspeliensis* L. in natural Mediterranean shrublands. *Chemosphere* **78**: 942–949.
- Robles, C., Bousquet-Melou, A., Garzino, S. & Bonin, G. (2003). Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 339–343.
- Robles, C. & Garzino, S. (2000). Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry* **53**: 71-75.
- Russell, A.D. (1991). Mechanism of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology* **71**: 191–201.
- Saracini, E., Tattini, M., Traversi, M.L., Vincieri, F.F. & Pinelli, P. (2005). Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. leaves. *Chromatographia* **62** (5/6): 245-249.
- Sadhu, S.K., Okuyamab, E., Fujimoto, H., Ishibashi, M. & Yesilada, E. (2010). Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology* **108**: 371–378.
- Schinor, E.C., Salvador, M.J., Turatti, I.C.C., Zucchi, O.L. & Dias, D.A. (2004). Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp.. *Ultrasonis Sonochemistry* **11** (6): 415-424.
- Singh, M., Pal, M. & Sharma, R.P. (1998). Biological activity of labdane diterpenes. *Planta Medica* **65**: 2–8.
- Sosa, T., Alías, J.C., Escudero, J.C. & Chaves N. (2005). Interpopulational variation in the flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L. exudate. *Biochemical Systematics and Ecology* **33** (4): 353-364.
- Starmans, D.A.J. & Nijhuis, H.H. (1996). Extraction of secondary metabolites from plant material: A review *Trends in Food Science & Technology* **7** (6): 191-197.

- Stojanović-Radić, Z., Čomić, L., Radulović, N., Dekić M., Randelović V. & Stefanović O. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Erodium* species: *E. ciconium* L., *E. cicutarium* L., and *E. absinthoides* Willd. (Geraniaceae). *Chemical Papers* **64** (3): 368-377.
- Tani M.L.. *The flowers of Greece*. Bonechi, 2004.
- Tattini, M., Matteini, P., Saracini, E., Traversi, M.L., Giordano, C., Agati, G., 2007. Morphology and biochemistry of non-glandular trichomes in *Cistus salviifolius* L. leaves growing in extreme habitats of the Mediterranean basin. *Plant Biology* **9** (3): 411–419.
- Tavsanoğlu, C. (2010). Seed Production and Fruit Parasitism in *Cistus salviifolius* L. (Cistaceae) along a Post-Fire Successional Gradient. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **9** (7): 1120-1127.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. & El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* **104**: 1372-1378.
- Teixeira, S., Mendes A., Alves, A. & Santos, L. (2007). Simultaneous distillation–extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. *Analytica Chimica Acta* **584**: 439–446.
- Thanos, C.A., Georghiou, K., Kadis, C. & Pantazi, C. (1992). Cistaceae: A plant family with hard seeds. *Israel Journal of Botany* **41**: 251-263.
- Thanos, C.A., Georghiou, K. (1988). Ecophysiology of fire-stimulated seed germination in *Cistus incanus* ssp. *creticus* (L.) Hey wood and *C. salviifolius* L. *Plant, Cell & Environment* **11**(9): 841 – 849.
- Trapp, S.C. & Croteau, R.B. (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* **158**: 811-832.
- Tsuchiya, H. et al. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavonones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* **50**: 27-34.
- Vogt, T., Gülz, P.G. (1991). Isocratic column liquid chromatographic separation of a complex mixture of epicuticular flavonoid aglycones and intracellular flavonol glycosides from *Cistus laurifolius* L. *Journal of Chromatography* **537**: 453–459.
- Vogt, T., Proksch, P. & Gülz, P.G. (1987). Epicuticular flavonoids in the genus *Cistus*, Cistaceae. *Journal of Plant Physiology* **131**, 25-36.

- Whittaker, J.R., Fernandez-Palacios, J.M.. *Νησιωτική Βιογεωγραφία - Οικολογία, εξέλιξη και διατήρηση*. Παν. Εκδ. Κρήτης, 2009.
- Yesilada, E., Ustun, O., Sezik, E., Takaishi, Y., Ono, Y. & Honda, G. (1997). Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1, interleukin-1 and tumour necrosis factor. *Journal of Ethnopharmacology* **58**: 59–73.
- Zheng, W. & Wang, S.Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5165-5150.

Διαδίκτυο

<http://www.ladano.blogspot.com> (Ημερ. πρόσβασης: 16/06/11)

http://www.iama.gr/ethno/Ladano_files/Ladano_Oikonomakis.pdf (Ημερ. πρόσβ.: 16/06/11)

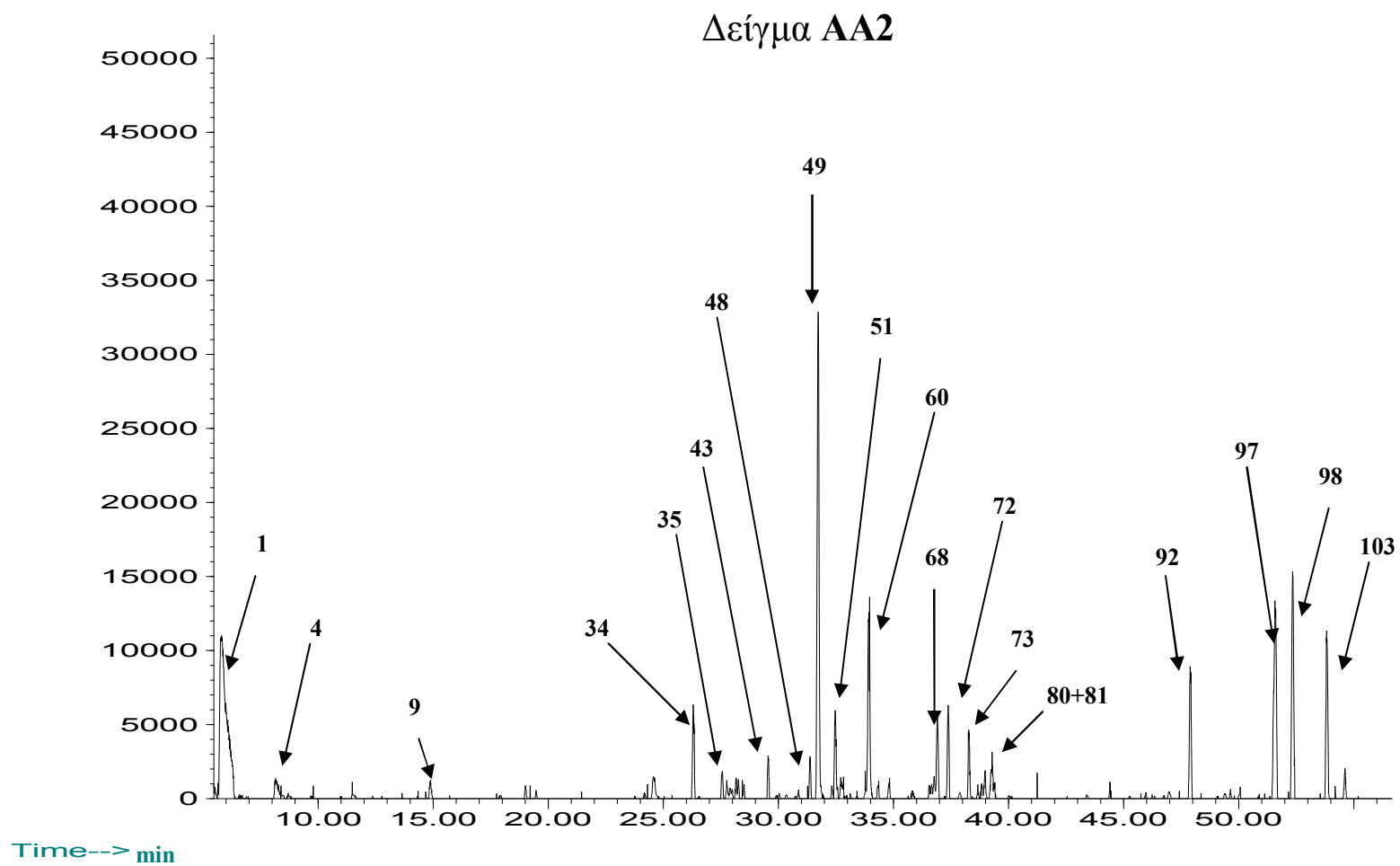
<http://www.pelion-paths.gr/Pelion-Species.aspx?ln=gr&id=352>

(Ημερ. πρόσβ.: 16/06/11)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

**Αέρια Χρωματογραφήματα
Ανάλυσης GC/MS
Αιθερίων Ελαίων Φυτών *Cistus*
Ελληνικής Χλωρίδας**

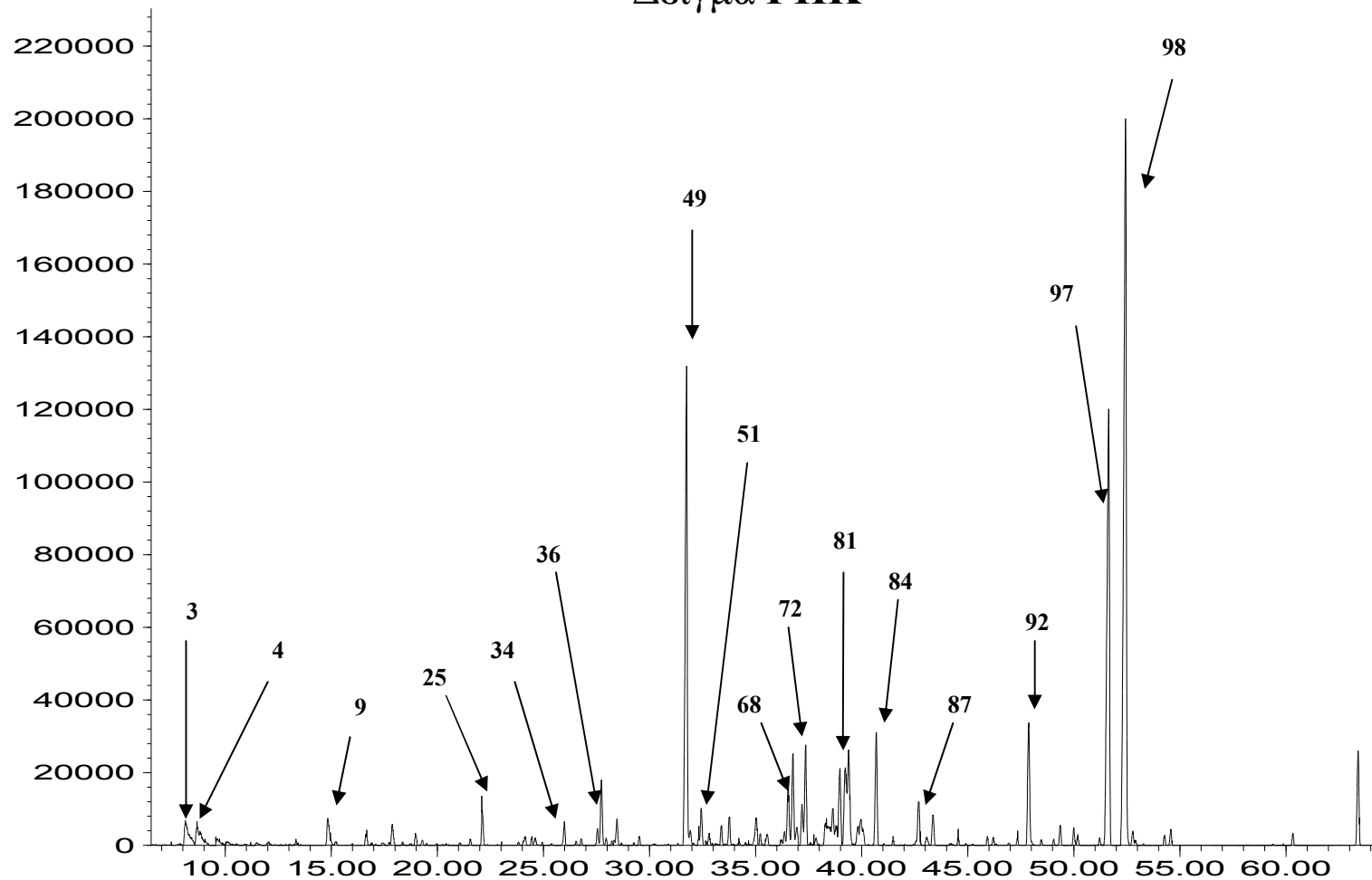
Abundance



Αέριο Χρωματογράφημα GC/MS αιθερίου ελαίου λαδανιάς από το Αγρίνιο (ΑΑ). Η παραλαβή έγινε σε συσκευή Lickens-Nickerson. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα συστατικά του Πίν. 5.1 (σελ. 50).

Abundance

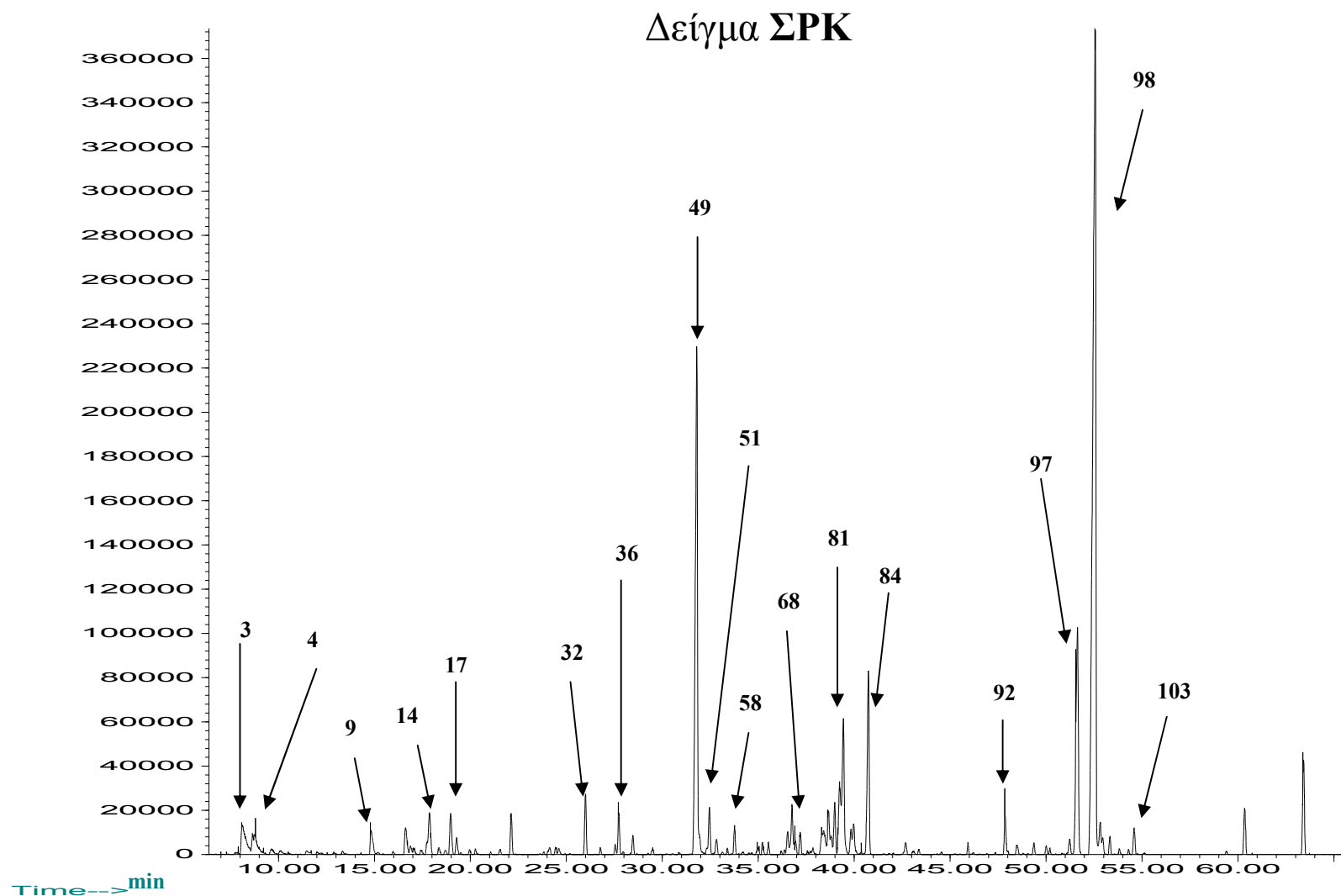
Δείγμα ΓΗΚ



Time-->min

Αέριο Χρωματογράφημα GC/MS αιθερίου ελαίου λαδανιάς από Γούβες Ηρακλείου (ΓΗΚ). Η παραλαβή έγινε σε συσκευή Lickens-Nickerson. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα συστατικά του Πίν. 5.1 (σελ. 50).

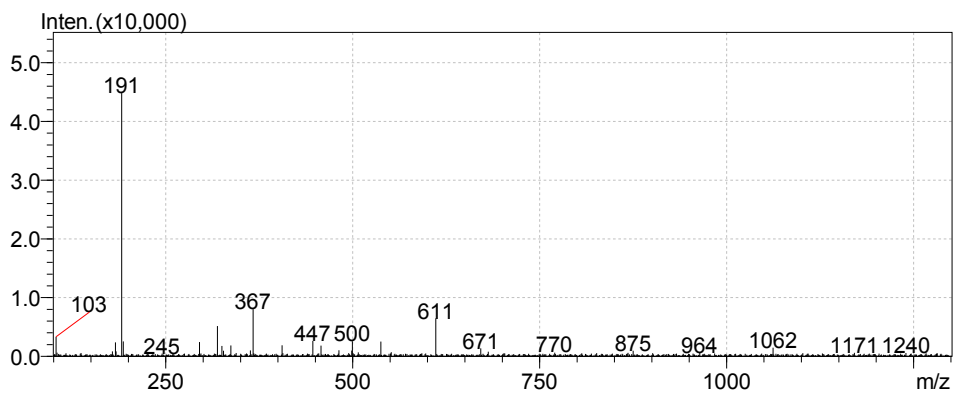
Abundance



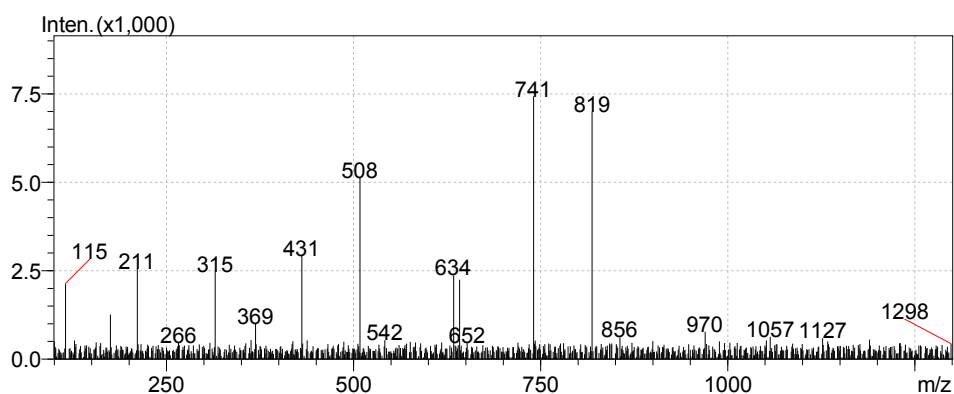
Αέριο Χρωματογράφημα GC/MS αιθερίου ελαίου λαδανιάς από Σίσσες Ρεθύμνου (ΣΡΚ). Η παραλαβή έγινε σε συσκευή Lickens-Nickerson. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα συστατικά του Πίν. 5.1 (σελ. 50).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

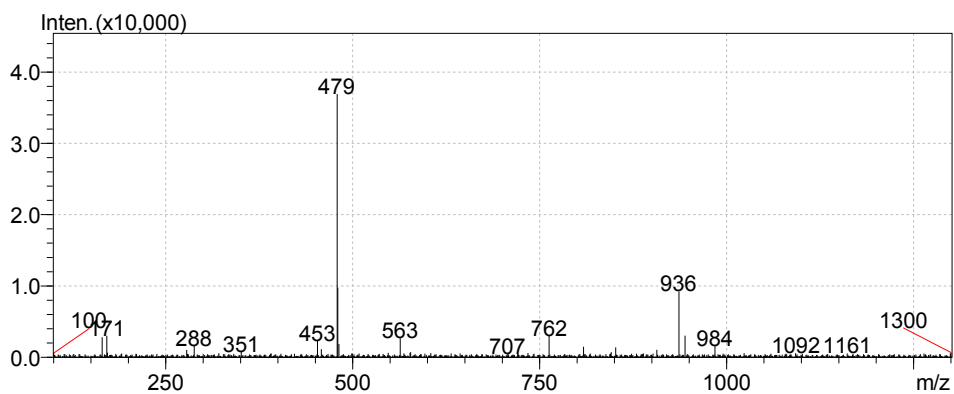
Φάσματα Μάζας
Ανάλυσης LC/MS Εκχυλίσματος Φυτού
Γένους *Cistus* Αγρινίου Αιτωλοακαρνανίας



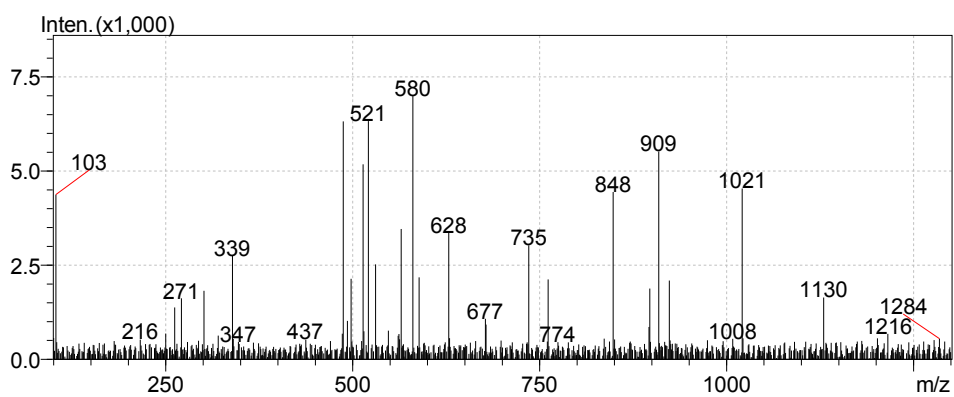
Φάσμα μάζας (LC/MS) της κορυφής **1** του Πίν. 5.6 (σελ. 83).



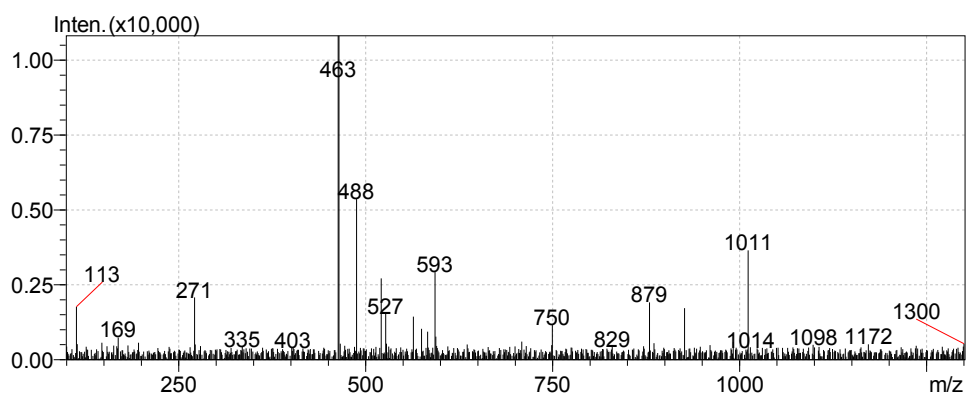
Φάσμα μάζας (LC/MS) της κορυφής **2** του Πίν. 5.6 (σελ. 83).



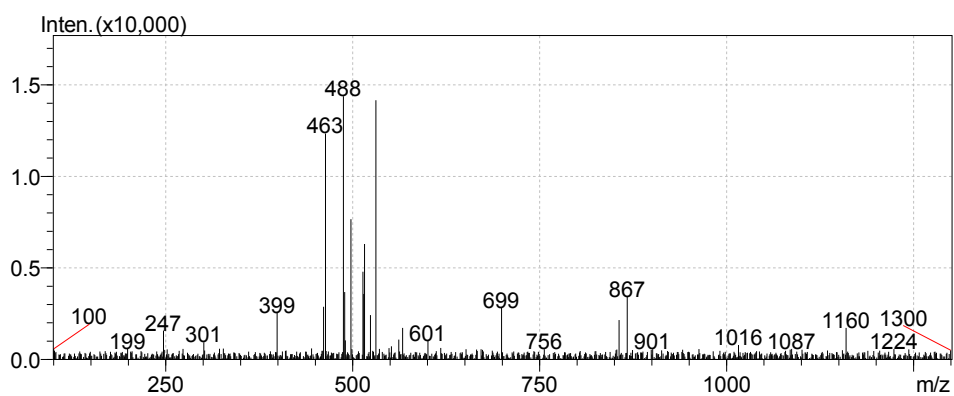
Φάσμα μάζας (LC/MS) της κορυφής **3** του Πίν. 5.6 (σελ. 83).



Φάσμα μάζας (LC/MS) της κορυφής 4 του Πίν. 5.6 (σελ. 83).



Φάσμα μάζας (LC/MS) της κορυφής 5 του Πίν. 5.6 (σελ. 83).



Φάσμα μάζας (LC/MS) της κορυφής 6 του Πίν. 5.6 (σελ. 83).