



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΜΣ «ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

«Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων από  
αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας»

Επιβλέπων καθηγητής: Ταραντίλης Π.

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Πολυσίου Μ.

Κωνσταντίνου Β.

Κανέλλου Γεωργία

Αθήνα, 2011

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων» και συγκεκριμένα στο Γενικό τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2010.

Το αντικείμενό της αφορά στη διερεύνηση των ολικών φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορισμένων βοτάνων της ελληνικής χλωρίδας τα οποία πολύ συχνά καταναλώνονται ως αφεψήματα καθώς και στη μελέτη των υδατοδιαλυτών και πτητικών συστατικών τους.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η βοήθεια που μου παρείχε ο κ. Π. Ταραντίλης, επίκουρος καθηγητής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου και επιβλέπων της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη συνολική καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Σημαντική ήταν και η βοήθεια του κ. Μ. Πολυσιού, διευθυντή του εργαστηρίου που πραγματοποιήθηκε η διπλωματική εργασία, καθώς και της κα. Β. Κωνσταντίνου, πρόεδρο του γενικού τμήματος, καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ε. Αναστασάκη, υποψήφια διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την υλοποίηση της εφαρμογής της εν λόγω διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου, οι οποίοι με την κατανόηση και τη συμπαράστασή τους συνέβαλλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Γεωργία Κανέλλου,

Αθήνα, Ιανουάριος 2011

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	ii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vi
ABSTRACT	viii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Ελεύθερες ρίζες	1
1.2. Αντιοξειδωτικά	2
1.3. Ενεργά είδη οξυγόνου και αζώτου	4
1.4. Φαινολικά συστατικά	5
1.4.1. Απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα	5
1.4.2. Φαινυλπροπανοειδή	7
1.4.3. Φαινολικές κινόνες	7
1.4.4. Φλαβονοειδή	8
1.4.4.1. Παράγωγα της φλαβόνης	8
1.4.4.2. Ανθοκυανίνες	11
1.4.5. Πολυφαινόλες (λιγνίνες, ταννίνες, μελανίνες)	11
1.5. Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών συστατικών	12
1.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολικών συστατικών	14
1.7. Παρουσίαση των βοτάνων	16
1.7.1. Μελισσόχορτο ( <i>Melissa officinalis</i> , οικ. <i>Lamiaceae</i> )	16
1.7.2. Δενδρολίβανο ( <i>Rosmarinus officinalis</i> , οικ. <i>Lamiaceae</i> )	17
1.7.3. Φασκόμηλο ( <i>Salvia officinalis</i> , οικ. <i>Lamiaceae</i> )	18
1.7.4. Δίκταμος ( <i>Origanum dictamnus</i> , οικ. <i>Lamiaceae</i> )	19
1.7.5. Δύσμος ( <i>Mentha spicata</i> , οικ. <i>Lamiaceae</i> )	20
1.7.6. Ύσσωπος ( <i>Yssopus officinalis</i> , οικ. <i>Lamiaceae</i> )	21
1.7.7. Ματζουράνα ( <i>Origanum majorana</i> , οικ. <i>Lamiaceae</i> )	22
1.7.8. Σιδερίτης ή τσάι του βουνού ( <i>Sideritis</i> sp., οικ. <i>Lamiaceae</i> )	22

1.7.9. Χαμομήλι ( <i>Chamomilla recutita</i> , οικ. <i>Asteraceae</i> )	23
1.8. Μέτρηση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας	24
1.8.1. Μέτρηση φαινολικών συστατικών	25
1.8.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	26
1.8.2.1. ABTS	27
1.8.2.2. DPPH	28
1.9. Αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μαζών (GC-MS)	29
1.10. Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)	29
1.11. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	31
1.12. Σκοπός	31
.ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1. Φυτικό υλικό	33
2.2. Προετοιμασία δειγμάτων	34
2.2.1. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους	34
2.3. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη	34
2.4. Λυοφιλίωση	35
2.5. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία –φασματοσκοπία μαζών (GC-MS)	36
2.6. Προετοιμασία αφεψημάτων με προσθήκη μελιού, γάλακτος και λεμονιού	36
2.7. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS, DPPH)	37
2.8. Μέτρηση φαινολικών συστατικών	39
2.9. Φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)	40
2.10. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
3.1. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου	45
3.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH	50
3.3. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS	54
3.4. Συσχετισμός τριών μεθόδων	57
3.5. Συσχέτιση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με βάση τον τρόπο εκχύλισης	60

3.6.	Έλεγχος αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά από προσθήκη μελιού, γάλακτος και λεμονιού	62
3.7.	Ταυτοποίηση πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων με GC-MS	67
3.8.	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αφεψημάτων με HPLC	78
3.9.	Φασματοσκοπική μελέτη των εκχυλισμάτων	91
3.10.	Μέτρηση των φαινολικών συστατικών με φασματοσκοπία FT-IR	94
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		100
	Διεθνής βιβλιογραφία	100
	Ελληνική βιβλιογραφία	115
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		116
I.	Συντμήσεις	116
II.	Πίνακες με αποτελέσματα πρότυπων καμπύλων αναφοράς	117
III.	Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων	119
IV.	Χρωματογραφήματα από το GC-MS των ζεστών εκχυλισμάτων	129
V.	Χρωματογραφήματα από το HPLC των ζεστών εκχυλισμάτων	132
VI.	Φάσματα UV ορισμένων πρότυπων ουσιών	138

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την παρασκευή των εκχυλισμάτων, 2g αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που είναι ευρέως διαδεδομένα στη μεσογειακή διατροφή (μελισσόχορτο, δενδρολίβανο, φασκόμηλο, δίκταμος, χαμομήλι, τσάι του βουνού, δυόσμος, ύσσωπος, ματζουράνα, τσάι Lipton,) εκχυλίστηκαν με 200mL (1 κούπα) ζεστού νερού (85 °C, 15 min) και κρύου νερού (θερμοκρασία δωματίου, 15 min) με ή χωρίς τη χρήση υπερήχων (35 MHz). Στη συνέχεια εκχυλίστηκαν τρεις φορές με πετρελαϊκό αιθέρα. Προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (εκφρασμένο σε καφεϊκό οξύ) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και η αντιοξειδωτική ικανότητα (εκφρασμένη σε Trolox) με τις μεθόδους DPPH και ABTS πριν και μετά την εκχύλιση με τον οργανικό διαλύτη. Επίσης προσδιορίστηκε και η γραμμικότητα της σχέσης των αποτελεσμάτων αυτών. Οι τιμές από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κυμαίνονται μεταξύ 8,33 και 197 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL, από τη μέθοδο DPPH μεταξύ 23,16 και 1266,34  $\mu\text{mole Trolox}/200\text{ mL}$  και από τη μέθοδο ABTS μεταξύ 33,52 και 1321,66  $\mu\text{mole Trolox}/200\text{ mL}$ . Από τα παραπάνω βρέθηκε ότι τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά την είχε το εκχύλισμα του μελισσόχορτου.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε % ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών που παρελήφθησαν με τον οργανικό διαλύτη με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (GC/MS).

Ακόμα, καταγράφηκε το φάσμα FT-IR των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFT) χρησιμοποιώντας μικροϋποδοχέα δείγματος (2 mg). Τα 60 δείγματα χωρίστηκαν τυχαία σε δύο κατηγορίες: τα δείγματα βαθμονόμησης (n=35) και τα δείγματα πρόβλεψης (n=17). Τα μοντέλα βαθμονόμησης για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο σχηματίστηκαν σε διάφορες περιοχές του φάσματος. Τα καλύτερα αποτελέσματα επετεύχθησαν στην περιοχή του φάσματος 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ . Οι τιμές από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κυμαίνονται μεταξύ 8,56 και 186 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL ενώ, οι τιμές που υπολογίστηκαν με τη

μέθοδο FT-IR κυμάνθηκαν από 6,78 έως 186,82 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL.

Η συσχέτιση των φαινολικών συστατικών και του τρόπου εκχύλισης του φυτικού υλικού καθώς και η σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και με τις δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (ABTS, DPPH) έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα ANOVA και χρήση του αλγορίθμου Tukey. Από τα παραπάνω, παρατηρείται ότι οι τρόποι εκχύλισης οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά από τους υπόλοιπους είναι η εκχύλιση με ζεστό νερό και η εκχύλιση με ζεστό νερό μετά την εκχύλιση με τον οργανικό διαλύτη.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των υδατοδιαλυτών συστατικών των ζεστών εκχυλισμάτων με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το γαλλικό, το καφεϊκό, το συριγγικό, το βανιλλικό, το p-κουμαρικό, το φερουλικό και το ροσμαρινικό οξύ, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η καμπερόλη, η κατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος, η επικατεχίνη του γαλλικού οξέος και η καφεΐνη. Ακόμα πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση του ροσμαρινικού οξέος που παρουσιάζεται σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και της καφεΐνης στο τσάι Lipton.

Τέλος, ελέγχθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα με τις μεθόδους DPPH και ABTS κατά την προσθήκη λεμονιού, μελιού και γάλακτος στα ζεστά αφεψήματα των φυτών μελισσόχορτο, δενδρολίβανο, χαμομήλι, φασκόμηλο και τσάι Lipton. Μετά την προσθήκη των παραπάνω συστατικών για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρατηρήθηκε ότι σχεδόν σε όλα τα αφεψήματα η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώθηκε με την προσθήκη γάλακτος και με τις δύο μεθόδους, κατά την προσθήκη του λεμονιού δεν υπάρχει σταθερή μεταβολή της ικανότητας αυτής, ενώ η προσθήκη μελιού φαίνεται ότι αυξάνει την ικανότητα αυτή.

## ABSTRACT

During the experimental processing, 2 g of aromatic and medicinal herbs widely used in the Mediterranean diet (lemon balm, rosemary, sage, dittany, chamomile, mountain tea, spearmint, hyssop, marjoram and Lipton tea) were steeped in 200 mL (1 cup) of hot water (85 °C, 15 min) and cold water (room temperature, 15 min) either without stirring or with the use of ultrasound (35 MHz). Infusions were extracted three times with petroleum ether. Total phenolic content (in terms of caffeic acid) was determined using a Folin-Ciocalteu assay and antioxidant capacity (in terms of Trolox) by DPPH and ABTS assays in herbal infusions, before and after the extraction with the solvent as the linearity correlation of those results. Total phenolic content was fluctuated between 8.33 and 197 mg phenolic compounds in terms of caffeic acid/200 mL. Antioxidant activity using the DPPH assay was fluctuated between 23.16 and 1266.34  $\mu\text{mole Trolox/ 200 mL}$  and using the ABTS assay was fluctuated between 33.52 and 1321.66  $\mu\text{mole Trolox/ 200 mL}$ . From the above, was found that the highest antioxidant capacity and the highest phenolic content were in herbal infusions of lemon balm.

Afterwards, the % qualitative and quantitative assignment of volatile compounds of all infusions was found using gas chromatography with mass spectrometry detector (GC/MS).

The infusions were then lyophilised and their FT-IR spectra was recorded in diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) mode using the micro-sampling cup of a Spectra-Tech diffuse reflectance accessory (2 mg of sample) against a KBr background. The 60 samples were divided randomly in two sets a calibration (n=35) and a prediction set (n=17). Calibration models for total phenolic content were built in different spectral regions. The best calibration model was achieved in the spectral region 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ . Total phenolic content as determined using the Folin-Ciocalteu reference assay were fluctuated between 8.54 and 186 mg phenolic compounds in terms



of caffeic acid/200 mL and the corresponding values as calculated using the FT-IR model ranged from 6.78 to 186.82 mg phenolic compounds in terms of caffeic acid/200 mL.

For the correlation of phenolic compound and antioxidant activity using both methods (DPPH, ABTS) with the way of extraction, the statistic program ANOVA and the Tukey algorithm were used. The ways of extraction that are differing notably from the others were the hot infusion before and after the extraction with the solvent.

Moreover, the analysis of water soluble compounds in hot infusions was defined with the high performance liquid chromatography technique (HPLC). The standard compounds were gallic, caffeic, syringic, vanillic, p-coumaric, feroulic, rosmarinic acid, quercetin, luteolin, luteolin-7-O-glucoside, kaempferol, catechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate and caffeine. From these compounds rosmarinic acid that was found in all *Lamiaceae* plants, luteolin-7-O-glucoside and caffeine in Lipton tea were also quantitative analyzed.

Finally, the antioxidant activity (DPPH, ABTS) were determined after the addition of lemon juice, honey and milk in hot herbal infusions of lemon balm, rosemary, chamomile, sage and Lipton tea. After the addition of those compounds the antioxidant activity decreased when milk was added, in the lemon juice addition the differences in antioxidant activity were not stable whereas, the honey addition probably increases this activity.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Ελεύθερες ρίζες

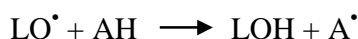
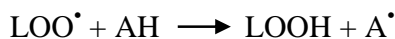
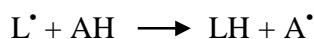
Η δυνατότητα της αξιοποίησης του οξυγόνου από τους ανθρώπους, παρέχει διάφορα πλεονεκτήματα όπως είναι ο μεταβολισμός των λιπών, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Παρ'όλα ταύτα, το οξυγόνο είναι ένα έντονα αντιδρών άτομο και είναι πιθανό να δημιουργήσει μόρια που ονομάζονται 'ελεύθερες ρίζες'. Μία ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε ένωση υπάρχει ανεξάρτητα και η οποία περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Halliwell *et al.*, 1994). Οι ρίζες αυτές έχουν την ικανότητα να επιτίθενται στα υγιή κύτταρα του σώματος, με αποτέλεσμα την απώλεια της δομής και της λειτουργίας τους.

Η καταστροφή των κυττάρων που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες φαίνεται ότι επηρεάζει έντονα το γήρας και τις εκφυλιστικές ασθένειες του γήρατος όπως είναι ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καταρράκτης, η καταπόνηση του ανοσοποιητικού συστήματος και η εγκεφαλική δυσλειτουργία. Γενικά, οι ρίζες αυτές έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεση τουλάχιστον πενήντα ασθενειών (Lengseth *et al.*, 1993, Halliwell *et al.*, 1994). Ευτυχώς, ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών μπορεί να περιοριστεί με φυσικό τρόπο από ποικιλία ευεργετικών συστατικών που είναι γνωστά ως αντιοξειδωτικά.

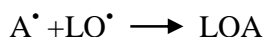
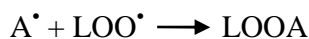
Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων που αναζητούν ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις ώστε να γίνουν ουδέτερες. Η αρχική πρόσληψη ηλεκτρονίων κάνει τη ρίζα ουδέτερη, όμως σχηματίζεται μία δεύτερη ελεύθερη ρίζα κατά τη διαδικασία, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο μία αλυσιδωτή αντίδραση. Μέχρι οι διαδοχικές ρίζες να γίνουν ανενεργές, έχουν προκύψει εκατοντάδες ρίζες μέσα σε δευτερόλεπτα από την αρχική αντίδραση. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν ή να απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες πριν επιτεθούν στα κύτταρα και είναι αναμφίβολα σημαντικά για τη διατήρηση της υγείας του οργανισμού (Percival, 1998).

## 1.2. Αντιοξειδωτικά

Το αντιοξειδωτικό ορίζεται ως 'οποιαδήποτε ουσία που όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε σχέση με τη συγκέντρωση του οξειδούμενου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή παρεμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού'. Επίσης, ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί μία ουσία η οποία παρεμποδίζει τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τον οργανισμό. Για ευκολία, τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται παραδοσιακά σε δύο κατηγορίες, τα βασικά αντιοξειδωτικά που διασπών την ανθρακική αλυσίδα και τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά. Τα βασικά αντιοξειδωτικά, AH, όταν βρίσκονται σε ίχνη, μπορούν να καθυστερήσουν ή να παρεμποδίσουν το αρχικό στάδιο της οξείδωσης αντιδρώντας με μία ρίζα λιπιδίου ή με παρεμπόδιση του σταδίου της διάδοσης αντιδρώντας με υπερόξυ- ή αλκόξυ ρίζες, όπως παρουσιάζονται στις παρακάτω αντιδράσεις. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα παρεμποδίζοντα φαινολικά (π.χ. BHT, BHA, TBHQ και οι τοκοφερόλες) και τα πολυυδρόξυ φαινολικά αντιοξειδωτικά (π.χ. γαλλικό οξύ). Τα βασικά αντιοξειδωτικά είναι αποτελεσματικά σε μικρές συγκεντρώσεις ενώ, σε υψηλότερα επίπεδα μπορεί να γίνουν προοξειδωτικά (Madhavi *et al.*, 1996):



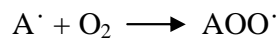
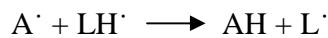
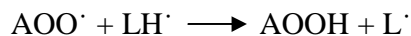
Η ελεύθερη ρίζα του αντιοξειδωτικού μπορεί να επεμβαίνει περισσότερο με παραγωγή αλυσιδωτών αντιδράσεων σχηματίζοντας υπερόξυ- αντιοξειδωτικά συστατικά (Antolovich *et al.*, 2001):



Τα αντιοξειδωτικά που διασπών την ανθρακική αλυσίδα μπορεί να υπάρξουν είτε φυσικά είτε μπορούν να παραχθούν συνθετικά όπως στην περίπτωση των BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), TBHQ (tert-

βουτυλο-υδροκινόνη) και του γαλλικού οξέος. Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων (Tsuda *et al.*, 1994) και εμπεριέχονται στη διατροφή των ανθρώπων (Meunier *et al.*, 1990, Ariga *et al.*, 1989). Τα τελευταία χρόνια η χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών (Igarashi *et al.*, 1989), έχει προαχθεί λόγω της ανησυχίας που προκύπτει από την ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών (Igarasi *et al.*, 1993, Kozłowska *et al.*, 1990). Τα αντιοξειδωτικά αυτά, μαζί με εναλλακτικά φυσικά συστατικά, όπως είναι οι φαινόλες που υπάρχουν στα φυτά, παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα ή και ακόμα υψηλότερη από αυτή των συνθετικών αντιοξειδωτικών.

Μία κατηγορία βασικών αντιοξειδωτικών είναι και τα παρεμποδιστικά φαινολικά συστατικά που έχουν υποκατεστημένες αλκυλομάδες ή ομάδες δότες ηλεκτρονίων σε θέση όρθο ή πάρα στον αρωματικό δακτύλιο, μειώνοντας τη δραστηριότητα της υδροξυλομάδας. Η υποκατάσταση με ομάδες που είναι δέκτες ηλεκτρονίων ή είναι μεγαλύτερης αλυσίδας ή έχουν διακλαδισμένες αλκυλομάδες σε θέση πάρα, μειώνουν τη δραστηριότητα λόγω της παρεμπόδισης που προκαλούν. Αντίδραση παρεμποδιστικών φαινολικών αντιοξειδωτικών με ελεύθερες ρίζες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας φαινόξυ ελεύθερης ρίζας. Οι φαινόξυ ρίζες σταθεροποιούνται με απεντόπιση του ασύζευκτου ηλεκτρονίου στον αρωματικό δακτύλιο και με ογκώδεις υποκαταστάτες σε θέση όρθο. Η υποκατάσταση επίσης μειώνει τον αριθμό των αντιδράσεων διάδοσης που μπορεί να περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές ελεύθερες ρίζες:



Γενικά, τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά μπορούν να χαρακτηριστούν ως παρεμποδιστές οξυγόνου και ως χηλικοί παράγοντες ενώ, έχουν τη δυνατότητα να λειτουργούν με πολλούς μηχανισμούς. Μπορεί να συμπεριφέρονται ως δότες υδρογόνου σε φαινόξυ ρίζα και ως εκ τούτου να δημιουργούν βασικά αντιοξειδωτικά. Γι' αυτό το λόγο, τα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλότερα επίπεδα όταν προστίθεται ταυτόχρονα στο τρόφιμο και ένα συνεργηστικό αντιοξειδωτικό. Τα αντιοξειδωτικά αυτά

παρέχουν ένα όξινο περιβάλλον που βελτιώνει τη σταθερότητα των βασικών αντιοξειδωτικών.

Οι παρεμποδιστές οξυγόνου όπως το ασκορβικό οξύ αντιδρούν με το ελεύθερο οξυγόνο και το μετακινούν σε ένα κλειστό σύστημα. Το ασκορβικό και το ασκορβυλ-παλμιτικό μπορούν να δράσουν συνεργηστικά με βασικά αντιοξειδωτικά και κυρίως με τοκοφερόλες. Χηλικοί παρεμποδιστές όπως το EDTA και το κιτρικό οξύ δεν είναι αντιοξειδωτικά, αλλά είναι πολύ αποτελεσματικά ως συνεργηστικά με βασικά αντιοξειδωτικά και με παρεμποδιστές οξυγόνου. (Madhavi *et al.*, 1996)

### **1.3. Ενεργά είδη οξυγόνου και αζώτου**

Τα ενεργά είδη οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) είναι ουσιώδη για τον εφοδιασμό του οργανισμού με ενέργεια, για αποτοξίνωση, για χημικά σήματα και για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράγονται συνεχώς στον ανθρώπινο οργανισμό και ελέγχονται από ενδογενή ένζυμα (υπεροξειδική δισμουτάση, υπεροξειδάση της γλουταθειώνης, καταλάση). Όταν υπάρχει υπερπαραγωγή των ειδών αυτών, έκθεση σε ένα εξωτερικό οξειδωτικό μέσο ή ανεπάρκεια στο μηχανισμό άμυνας, μπορεί προκληθούν σοβαρές αλλοιώσεις σε πολύτιμα βιομόρια όπως είναι το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες (Aruoma, 1998). Αυτές οι αλλοιώσεις σχετίζονται με αυξανόμενο κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνο και άλλες χρόνιες ασθένειες. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν και προλαμβάνουν τις αλλοιώσεις που προκύπτουν από την οξείδωση ενώ, η αυξημένη κατανάλωσή τους μέσω της διατροφής μειώνει τους κινδύνους των χρόνιων νοσημάτων (Stanner *et al.*, 2004). Αυτό εξηγεί το μεγάλο όγκο των ερευνών και την προσπάθεια πολλών ερευνητών να συνδυάσουν τη διατροφή που είναι πλούσια σε φυσικά αντιοξειδωτικά με εκφυλιστικές ασθένειες.

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που προκύπτουν, είναι το γεγονός ότι οι μελέτες σε ανθρώπους δεν έχουν δώσει τα θετικά αποτελέσματα που έχουν παρατηρηθεί από τις επιδημιολογικές έρευνες. Τέτοιες μελέτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία περιλαμβάνουν ακόμα και βιταμίνες που δρουν ως αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, βιταμίνη C, καροτενοειδή). Όμως, πρόσφατες έρευνες σε κορυφαία διατροφικά περιοδικά

υπογραμμίζουν τα θετικά αποτελέσματα της δράσης των πολυφαινολών σε ορισμένους τομείς της υγείας (Kroon *et al.*, 2005). Είναι επίσης γεγονός ότι οι μελέτες για τη βιοδιαθεσιμότητα είναι πολλές (Manach, *et al.*, 2004), ενώ νέα δεδομένα δημιουργούνται για τις διάφορες τάξεις των πολυφαινολών (Beecher, 2003; USDA, 2003). Η σημαντικότητα των φαινολικών συστατικών στα φυτά φαίνεται στην προσπάθεια των ερευνητών (Boskou, 2006):

- για αύξηση της περιεκτικότητας των φυτών σε φαινολικά συστατικά,
- για διερεύνηση νέων επιδράσεων και
- για διερεύνηση της ποσοτικής σχέσης μεταξύ δομής και δραστηριότητας των φαινολικών τάξεων (Nenadis, *et al.*, 2003; Kontogiorgis *et al.*, 2005).

#### **1.4. Φαινολικά συστατικά**

Η πλειονότητα των αρωματικών φυσικών προϊόντων που υπάρχουν στα φυτά είναι οι φαινόλες. Οι φαινόλες είναι ουσίες ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο καθώς αποτελούν χαρακτηριστικό συστατικό των φυτών ή ακόμα και κάποιου συγκεκριμένου οργάνου ή ιστού του φυτού (Scalbert *et al.*, 2000). Έχουν στο μόριο τους έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Οι φαινολικές ενώσεις τείνουν να είναι υδατοδιαλυτές, δεδομένου ότι εμφανίζονται πολύ συχνά συνδεδεμένες με σάκχαρα ως γλυκοζίτες (Morton *et al.*, 2000). Χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα, φαινυλπροπανοειδή, φαινολικές κινόνες, φλαβονοειδή, και πολυφαινόλες (λιγνίνες, μελαίνες, ταννίνες).

##### **1.4.1. Απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα**

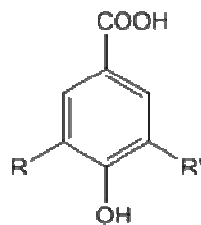
Οι περισσότερες απλές φαινόλες είναι μονομερή συστατικά των πολυμερών πολυφαινολών και οξέων τα οποία σχηματίζουν τους φυτικούς ιστούς μαζί με ουσίες όπως η λιγνίνη, η μελανίνη, και οι ταννίνες. (Kaufman *et al.*, 1999). Οι πιο συχνά απαντώμενες φαινόλες είναι η υδροκινόνη, ενώ συχνά απαντώνται η θυμόλη και η καρβακρόλη σε διάφορα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*.

Τα φαινολικά οξέα προκύπτουν βιογενετικά από την αποικοδόμηση των φαινυλπροπανοειδών και αποτελούν δομικές μονάδες της λιγνίνης. Ο όξινο χαρακτήρας τους, οδηγεί στην απομόνωση των φαινολικών παραγώγων από τα υπόλοιπα φυτικά συστατικά με εκχύλιση σε υδατικό ανθρακικό νάτριο. Η απομόνωση μπορεί να είναι προβληματική καθώς τα φαινολικά παράγωγα είναι δυνατόν να συνενωθούν με τις πρωτεΐνες μέσω δεσμών υδρογόνου και μέσω της ευαισθησίας στην ενζυμική οξείδωση που μπορεί να προκύψει κατά την όλη διαδικασία (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009). Τα πιο σημαντικά φαινολικά οξέα που συναντώνται συχνά στα φυτά είναι το π-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό, το βανιλλικό και το ο-πρωκατεχικό (Σχήμα 1.4.1).

Μία από τις σημαντικότερες φυσιολογικές δράσεις των φαινολικών συστατικών είναι η ικανότητάς τους να απελευθερώνονται στο περιβάλλον του φυτού που τις εκκρίνει, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη άλλων φυτών. Έτσι, μειώνεται ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά και νερό που ενδεχομένως θα προέκυπτε (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009).

#### ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Παράγωγα βενζοϊκού οξέος



R=R'=H: π-υδροξύ βενζοϊκό οξύ

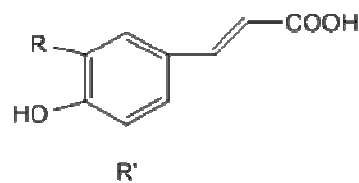
R=OH, R'=H: πρωτοκατεχικό οξύ

R=OCH<sub>3</sub>, R'=H: βανιλλικό οξύ

R=R'=OH: γαλλικό οξύ

R=R'=OCH<sub>3</sub>: σιριγγικό οξύ

Παράγωγα κινναμικού οξέος



R=R'=H: π-κουμαρικό οξύ

R=OH, R'=H: καφεϊκό οξύ

R=OCH<sub>3</sub>, R'=H: φερουλικό οξύ

R=R'=OCH<sub>3</sub>: σινναπικό οξύ

Σχήμα 1.4.1: Κύρια φαινολικά οξέα.

#### **1.4.2. Φαινυλπροπανοειδή**

Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι φαινολικές ενώσεις, που έχουν έναν αρωματικό δακτύλιο πάνω στον οποίο είναι συνδεδεμένη μια πλευρική αλυσίδα τριών ανθράκων. Προέρχονται βιοσυνθετικά από το αρωματικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη. Κοινά παραδείγματα αποτελούν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, τα φαινυλπροπένια και οι κουμαρίνες. Υδροξυκινναμωμικά οξέα όπως είναι το φερουλικό, το σιναπικό και το p-κουμαρικό (Σχήμα 1.4.1), βρίσκονται στη φύση με τη μορφή εστέρων επιδρώντας στην ομαλή αύξηση των φυτών καθώς και στην αύξηση της ανθεκτικότητας έναντι διαφόρων ασθενειών. Τα πιο γνωστά φαινυλπροπένια είναι η ευγενόλη, η μυριστικίνη και η σαφρόλη, ουσίες που παραλαμβάνονται από το αιθέριο έλαιο των φυτών και είναι υπεύθυνα για το άρωμά τους (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009).

#### **1.4.3. Φαινολικές κινόνες**

Οι κινόνες περιέχουν στο μόριό τους έναν κινόειδή δακτύλιο και τυπικά διαθέτουν έντονο χρώμα που καλύπτει όλο το φάσμα του ορατού. Συχνά το χρώμα τους υπερκαλύπτεται από άλλες χρωστικές διότι βρίσκονται στις εσωτερικές περιοχές του φυτού και επομένως δε μεταδίδουν το χρώμα τους σε ολόκληρο το φυτό (Kaufman *et al.*, 1999). Εκτός από την παρουσία τους σε πολλά φυτά, οι κινόνες βρίσκονται ακόμα σε ζώα, θαλάσσιους οργανισμούς, ακόμα και σε έντομα, λειχήνες, μύκητες και βακτήρια. Οι φυσικές χρωστικές κινόνες περιέχουν στο μόριό τους το δακτύλιο της p-βενζοκινόνης, η οποία αποτελείται από δύο καρβονύλο- ομάδες σε συζυγία με δύο διπλούς δεσμούς C=C. Επίσης περιέχουν στο μόριό τους υδροξύλια, με φαινολικές ιδιότητες και βρίσκονται στα φυτά είτε ενωμένες με σάκχαρα ως γλυκοζίτες είτε ως διμερείς κινόλες. Σε κάθε περίπτωση η όξινη υδρόλυση οδηγεί σε ελεύθερες κινόνες. Γενικά οι κινόνες διακρίνονται σε τέσσαρες κατηγορίες: τις βενζοκινόνες, τις ναφθοκινόνες, τις ανθρακινόνες και τις ισοπρενοειδείς κινόνες.



#### **1.4.4. Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή προέρχονται από την ίδια μητρική ένωση που είναι η φλαβόνη. Οι διαφορές στον ετεροκυκλικό δακτύλιο είναι και αυτές που καθορίζουν τις υποκατηγορίες των φλαβονοειδών (Hollman *et al.*, 1997). Οι ενώσεις αυτές είναι γενικά υδατοδιαλυτές και εκτός από το έντονο χρώμα που διαθέτουν, προσδίδουν στο εδώδιμο τμήμα του φυτού χαρακτηριστική γεύση και άρωμα. Τα πιο συζευγμένα συστατικά συχνά έχουν έντονο χρώμα. Από άποψη δομής ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα παράγωγα της φλαβόνης και τις ανθοκυανίνες. Συχνά παρατηρούνται σε φυτά ως γλυκοζίτες που μπορούν να περιπλέξουν τον προσδιορισμό της δομής (Kaufman *et al.*, 1999).

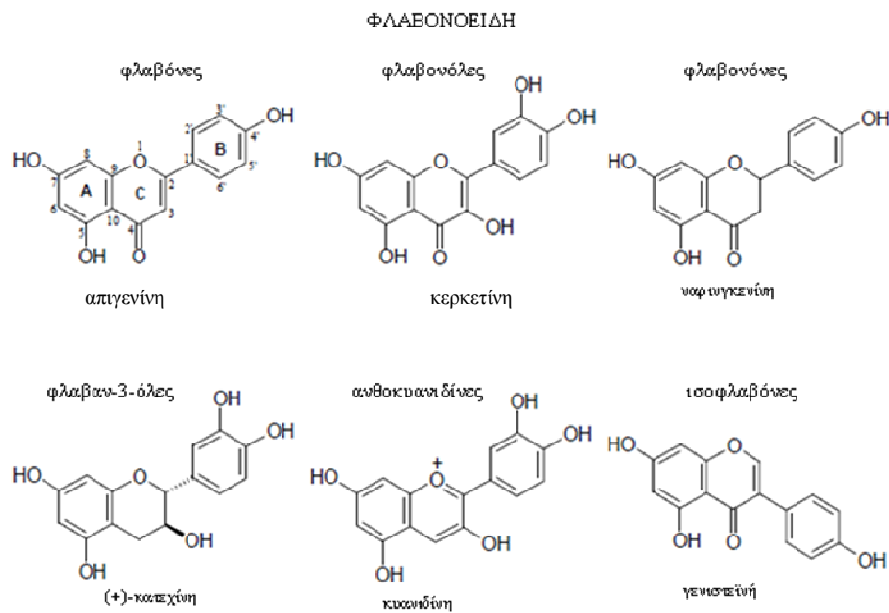
Τα φλαβονοειδή έχουν αποδειχθεί ότι έχουν αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντικαρκινικές και αντιγηραντικές ιδιότητες (Cody *et al.*, 1986, Middleton, 1984, Havsteen, 1983, Kuhnu, 1976). Τα περισσότερα θεραπευτικά αποτελέσματα οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή μπορούν να ασκούν προστασία ενάντια σε καρδιαγγειακά νοσήματα μέσω της παρεμπόδισης της δραστηριότητας της κυκλοοξυγενάσης και της λιποξυγενάσης στα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα κύτταρα (Havsteen, 1983).

##### **1.4.4.1. Παράγωγα της φλαβόνης**

Οι διαφορετικές τάξεις των παραγώγων της φλαβόνης που παρατηρούνται είναι οι φλαβανόνες, οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι χαλκόνες, και οι ισοφλαβόνες (Σχήμα 1.4.2, Πίνακας 1.4.1). Τα φλαβονοειδή βρίσκονται στα φυτά ενωμένα με σάκχαρα ως Ο-γλυκοζίτες, όπου μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες του φλαβονοειδούς αντιδρούν με ένα ή περισσότερα σάκχαρα σχηματίζοντας ημιακεταλικούς δεσμούς. Επίσης υπάρχουν και ως C-γλυκοζιτικά παράγωγα, όπου το σάκχαρο ενώνεται απευθείας με τον πυρήνα του φλαβονοειδούς με δεσμό C-C.

Οι φλαβονόλες είναι τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή στα τρόφιμα, με κύριους εκπροσώπους την κερκετίνη και την καμπφερόλη. Είναι ενώσεις που προκύπτουν από τις φλαβόνες με την εισαγωγή ενός υδροξυλίου στη θέση C<sub>3</sub>. Οι πλουσιότερες πηγές αυτών

είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα και το κινέζικο λάχανο. Βρίσκονται κυρίως συνδεδεμένα με μόρια γλυκόζης, ραμνόζης ή/και γαλακτόζης, αραβινόζης, ξυλόζης και γλυκορονικού οξέος. Η βιοσύνθεσή τους ενεργοποιείται από το φως, με αποτέλεσμα να βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια των φρούτων, στην επιδερμίδα και στα φύλλα (Manach *et al.*, 2004).



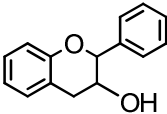
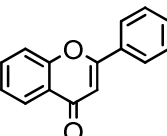
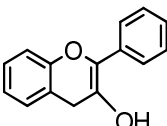
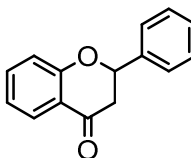
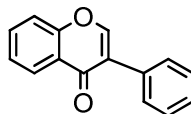
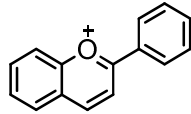
**Σχήμα 1.4.2:** Κατηγορίες φλαβονοειδών.

Οι φλαβόνες βρίσκονται σε μικρότερη συχνότητα από τις φλαβονόλες στα φρούτα και τα λαχανικά. Η κύρια μορφή τους είναι εστέρες με μόρια λουτεολίνης ή απιγενίνης. Οι κύριες πηγές τους είναι το σέλινο, ο μαϊντανός, οι γλυκές κόκκινες πιπεριές, ο φλοιός του κίτρου και ορισμένα δημητριακά, όπως το κεχρί και το σιτάρι (Manach *et al.*, 2004).

Οι φλαβανόνες, προκύπτουν από τις αντίστοιχες φλαβόνες με ανόρθωση του διπλού δεσμού Δ<sup>2</sup>. Είναι μόρια οπτικά ενεργά και συνήθως οι φυσικές είναι αριστερόστροφες. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η εσπεριτίνη και η ναρινγκενίνη. Η

απευθείας αφυδρογόνωση των φλαβονονών οδηγεί στο σχηματισμό των αντίστοιχων φλαβονών (Ιγνατιάδου-Ραγκούση,2009).

**Πίνακας 1.4.1:** Κατηγορίες φλαβονοειδών, χημικές δομές και κυριότεροι εκπρόσωποι.

ΤΑΞΗ	ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ
φλαβανόλη		(+)-κατεχίνη (-)-επικατεχίνη επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος
φλαβόνη		χρυσίνη απιγενίνη ρουτίνη λουτεολίνη γλυκοζίτης της λουτεολίνης
φλαβονόλη		καμπφερόλη κερκετίνη μυρισετίνη ταμαριξετίνη
φλαβανόνη		ναριγκινίνη ναριγκενίνη ταξιφολίνη εριοδικτυόλη εσπεριδίνη
ισοφλαβόνη		γενιστίνη γενιστεΐνη δαιζδίνη δαιζδεΐνη
ανθοκυανιδίνη		απιγενιδίνη κυανιδίνη

Οι χαλκόνες είναι φλαβονοειδή με ανοικτή ανθρακική αλυσίδα, όπου οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι ενώνονται μεταξύ τους με ένα ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα. Επίσης μπορούν εύκολα να ισομεριστούν σε φλαβονόνες, γι' αυτό δεν συναντώνται συχνά. Οι χαλκόνες έχουν έντονο χρώμα και συνήθως εμφανίζονται στα άνθη.

Οι ισοφλαβόνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ουσίας της ισοφλαβόνης, η οποία μπορεί να είναι μερικώς αλκυλιωμένη. Βρίσκονται στα φυτά είτε ελεύθερες είτε ενωμένες ως γλυκοζίτες.

#### **1.4.4.2. Ανθοκυανίνες**

Οι ανθοκυανίνες είναι η σπουδαιότερη ομάδα φυτικών χρωστικών. Σε αυτές τις ενώσεις οφείλονται οι διάφοροι έντονοι και ελκυστικοί χρωματισμοί των ανθέων, των καρπών κ.α.. Στα φυτά βρίσκονται με τη μορφή γλυκοζιτών, κυρίως στη θέση C<sub>3</sub>, των οποίων τα άγλυκα τμήματα είναι γνωστά ως ανθοκυανιδίνες και προκύπτουν με όξινη υδρόλυση των πρώτων. Ο θεμελιώδης πυρήνας των ανθοκυανιδίων είναι το χλωριούχο βενζοπυρίλιο, αλλά η μητρική τους ουσία είναι το χλωριούχο 2-φαινυλοβενζοπυρίλιο ή χλωριούχο φλαβύλιο. Κύριοι εκπρόσωποι είναι η πελαργονιδίνη, η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη καθώς και τα αιθερικά παράγωγα παιονιδίνη, πετουνιδίνη και δελφινιδίνη. Οι ανθοκυανιδίνες είναι ενώσεις υδατοδιαλυτές και έχουν επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα. Τα όξινα άλατα είναι συνήθως κόκκινα και τα μεταλλικά συνήθως μπλε.

#### **1.4.5. Πολυφαινόλες (λιγνίνες, τανίνες, μελανίνες)**

Οι λιγνίνες είναι φαινολικά πολυμερή συστατικά που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, οι οποίες μαζί με την κυτταρίνη, είναι υπεύθυνες για τη δυσκαμψία και την ακαμψία των φυτών. Οι λιγνίνες είναι από τα πλέον διαδεδομένα οργανικά συστατικά των ξυλωδών φυτών, δεδομένου ότι μέχρι 30% της οργανικής ουσίας των δένδρων αποτελείται από λιγνίνη.

Η δομή των λιγνινών ποικίλλει και εξαρτάται από το φυτό από το οποίο προέρχονται αλλά και από τη μέθοδο με την οποία απομονώνονται (με βάση το διαλύτη ή το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται για την παραλαβή της). Γενικά ανήκουν στα φαινολικά πολυμερή. Τα τρία σημαντικότερα μονομερή που λαμβάνουν μέρος στο σχηματισμό είναι η p-κουμαρυλική αλκοόλη, η κωνιφερυλική αλκοόλη και η σινναυλική αλκοόλη. Η αποικοδόμηση των λιγνινών, οδηγεί στην παραγωγή απλών φαινολικών συστατικών,

μερικά από τα οποία είναι η γουαγιακόλη, το πρωτοκατεχικό οξύ, η p-υδροξυβενζαλδεΐδη, η βανιλλοαλδεΐδη (βανιλίνη), η συριγγινοαλδεΐδη και η ευγενόλη.

Η δεύτερη ομάδα φαινολικών πολυμερών συστατικών που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες ή μικρότερες ποσότητες σε όλα σχεδόν τα φυτά, είναι οι ταννίνες. Οι ταννίνες παρουσιάζονται πολύ συχνά σε τραχειόφυτα που υπάρχουν αρχικά στους ξυλώδεις ιστούς. Αποτελούνται από πολλά φαινολικά συστατικά τα οποία αντιδρούν με πρωτεΐνες προς σχηματισμό μη υδατοδιαλυτών συν-πολυμερών. Οι φυτικοί ιστοί που είναι πλούσιοι σε ταννίνες έχουν έντονα στυφή γεύση. Οι ταννίνες μπορεί να είναι συμπυκνωμένες ή υδρολυόμενες. Οι πρώτες, σχηματίζονται βιοσυνθετικά από τη συμπύκνωση κατεχινών, ενώ οι υδρολυόμενες προέρχονται από το γαλλικό οξύ (Kaufman *et al.*, 1999).

Η τρίτη ομάδα φαινολικών πολυμερών συστατικών είναι οι μαύρες χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στους σπόρους των ανώτερων φυτών (π.χ. ηλίανθος, καρπούζι) και στα σπόρια του μύκητα *Ustilago maydis*. Αντίθετα από τις ζωικές μελανίνες που είναι βασισμένες στην 3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη και περιέχουν άζωτο, οι μελανίνες των φυτών είναι πολυμερή συστατικά που δεν περιέχουν άζωτο και βασίζονται στην κατεχόλη. Οι ζωικές μελανίνες είναι υπεύθυνες για το χρώμα του δέρματος του ανθρώπου. Επίσης βρίσκεται στα φτερά των πουλιών και στο μελάνι της σουπιάς του καλαμαριού κ.ά. (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009).

### **1.5. Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών συστατικών**

Ενώ οι πολυφαινόλες είναι πολύ κοινά συστατικά στο διαιτολόγιο των ανθρώπων ωστόσο, αυτό δε σημαίνει ότι είναι και τα πιο ενεργά μέσα στο σώμα, είτε γιατί έχουν μικρή εσωτερική δραστηριότητα είτε γιατί απορροφούνται μόνο ελάχιστα από το έντερο, μεταβολίζονται έντονα, ή απομακρύνονται γρήγορα. Επίσης, οι μεταβολίτες που υπάρχουν στο αίμα και στα όργανα στόχους και σχηματίζονται από τη δραστηριότητα του στομάχου ή του ήπατος μπορεί να διαφέρουν από τις αρχικές ενώσεις όσον αφορά στη βιολογική δραστηριότητα. Γι' αυτό το λόγο οι γνώσεις της βιοδιαθεσιμότητας των

πολυφαινολών είναι ουσιώδεις για την κατανόηση της επίδρασής τους στον ανθρώπινο οργανισμό (Manach *et al.*, 2004).

Οι βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών εξαρτώνται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Έμμεσα στοιχεία, που δείχνουν την απορρόφησης τους από το έντερο, είναι η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος μετά την κατανάλωση τροφίμων πλούσια σε πολυφαινόλες. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως είναι το τσάι (Serafini *et al.*, 1996, van het Hof *et al.*, 1997), το κόκκινο κρασί (Duthie *et al.*, 1998, Fuhrman *et al.*, 1995, Maxwell *et al.*, 1994, Serafini *et al.*, 1998, Whitehead *et al.*, 1995), η μαύρη σταφίδα και ο χυμός μήλου (Young *et al.*, 1999). Πιο εμπειριστωμένα στοιχεία της βιοδιαθεσιμότητας μερικών φαινολικών συστατικών προκύπτουν από τη μέτρηση της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα και στα ούρα μετά την κατανάλωση είτε των ίδιων είτε τροφίμων που περιέχουν τα συστατικά αυτά.

Η χημική δομή των πολυφαινολών καθορίζει το βαθμό και την έκταση της απορρόφησης από το έντερο και τη φύση των μεταβολιτών που κυκλοφορούν στο πλάσμα. Ορισμένες μελέτες της βιοδιαθεσιμότητας στους ανθρώπους δείχνουν ότι οι ποσότητες των πολυφαινολών που βρίσκονται ανέπαφες στα ούρα ποικίλουν ανάλογα με τη φαινολική ένωση. Τα επίπεδα είναι ιδιαίτερος χαμηλά για την κερκετίνη και τη ρουτίνη, ένα γλυκοζίτη της κερκετίνης (0,3-1,4%), αλλά οι τιμές είναι μεγαλύτερες για τις κατεχίνες στο πράσινο τσάι, τις ισοφλαβόνες στη σόγια, τις φλαβανόνες στα εσπεριδοειδή ή τις ανθοκυάνες στο κόκκινο κρασί (3-26%).

Από τις πολυφαινόλες που φτάνουν στον οργανισμό με την τροφή, μόνο ένα μικρό ποσοστό (1-25%) παρατηρείται στα ούρα. Αυτό δείχνει είτε ότι δεν έχουν απορροφηθεί μέσω του εντέρου, είτε μεταβολίστηκαν από τη χλωρίδα του στομάχου, είτε από τους ιστούς του σώματος.

Οι ίδιες μελέτες βιοδιαθεσιμότητας έχουν επίσης δείξει ότι οι συγκεντρώσεις των ανέπαφων φλαβονοειδών στο ανθρώπινο πλάσμα σπάνια υπερβαίνει το 1 mM όταν οι ποσότητες των πολυφαινολών που απορροφούνται δεν υπερβαίνουν αυτές που συνήθως απορροφούνται με τη διατροφή. Αυτές οι μέγιστες συγκεντρώσεις παρατηρούνται συνήθως 1-2 ώρες μετά την κατανάλωση (Aziz *et al.*, 1998, Balant *et al.*, 1979, Hollman

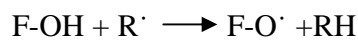
*et al.*, 1996, Kivits *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 1995, Unno *et al.*, 1996). Εξαίρεση αποτελούν οι πολυφαινόλες, που απορροφούνται μόνο μετά από μερική αποικοδόμηση από την εντερική χλωρίδα. Όσον αφορά στη ρουτίνη, η μέγιστη συγκέντρωση της κερκετίνης στο πλάσμα επιτυγχάνεται 9 ώρες μετά την κατανάλωση (Hollman *et al.*, 1997). Για τα περισσότερα φλαβονοειδή που απορροφούνται από το λεπτό έντερο, η συγκέντρωση στο πλάσμα μειώνεται ταχέως.

Η διατήρηση της υψηλής συγκέντρωσης στο πλάσμα απαιτεί επαναλαμβανόμενη κατανάλωση πολυφαινολών, όπως παρατηρήθηκε σε πειράματα που έγιναν σε εθελοντές οι οποίοι κατανάλωναν τσάι κάθε δύο ώρες (van het Hof *et al.*, 1999), αν και ο χρόνος ημιζωής των μεταβολιτών που σχηματίζονται στην εντερική χλωρίδα είναι μεγαλύτερος, λόγω του μεγαλύτερου χρόνου παραμονής των πολυφαινολών στο κόλον. Χρειάζονται λοιπόν περισσότερες από δύο μέρες για την εντεροδιόλη και την εντερολακτόνη (Nesbitt *et al.*, 1999) να φτάσουν στη βασική συγκέντρωση στο πλάσμα και στα ούρα μετά από κατανάλωση γάλατος από σόγια και λιναρόσπορο.

#### **1.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολικών συστατικών**

Έχει αναφερθεί ότι πολλά φαινολικά συστατικά έχουν πιθανή αντιοξειδωτική ικανότητα. Επιπλέον έχουν αντικαρκινικές, αντικαρκινογόνες/αντιμεταλλαξογόνες, αντιμικροβιακές, αντικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες σε μικρότερο ή σε μεγαλύτερο βαθμό (Chung *et al.*, 1998, Cassidy *et al.*, 2000, Gao *et al.*, 2000, Tapiero *et al.*, 2002). Οι φυσιολογικές και οι φαρμακολογικές τους ιδιότητες μπορεί να προέρχονται από την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ιδιότητα αυτή, σχετίζεται έντονα με τις δομές των φαινολικών συστατικών (Shahidi and Naczk, 1995, Rice-Evans *et al.*, 1996, Heim *et al.*, 2002). Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα είναι οι κύριοι τύποι των φαινολικών συστατικών και γι' αυτό έχει μελετηθεί εκτεταμένα η σχέση της δομής τους και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας που διαθέτουν σε υδατικά ή λιπόφιλα συστήματα (Rice-Evans *et al.*, 1996, Cao *et al.*, 1997, Arora *et al.*, 1998, Lien *et al.*, 1999, Natella *et al.*, 1999, Burda *et al.*, 2001, Nenadis *et al.*, 2004). Γενικά, η αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό και τις θέσεις των υδροξυλομάδων και ορισμένων άλλων υποκαταστατών καθώς και από τη

γλυκοζυλίωση των φλαβονοειδών. Η θέση των υποκαταστατών στο χώρο θεωρείται ότι είναι ο πιο σημαντικός και καθοριστικός παράγοντας της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με την κύρια δομή της φλαβάνης. Σύμφωνα με τα περισσότερα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά, η διαμόρφωση αλλά και ο συνολικός αριθμός των υδροξυλομάδων επηρεάζουν πολλούς μηχανισμούς αντιοξειδωτικής δράσης (Pannala *et al.*, 2001, Burda *et al.*, 2001, Cao *et al.*, 1997, Haenen *et al.*, 1997). Η παρεμποδιστική ικανότητα των ελεύθερων ριζών αρχικά αποδίδεται στην υψηλή δραστηριότητα των υδρόξυ υποκαταστατών που συμμετέχουν στην παρακάτω αντίδραση:



Η διαμόρφωση των υδροξυλίων στο Β-δακτύλιο είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας παρεμπόδισης των ενεργών ειδών οξυγόνου (Pannala *et al.*, 2001, Burda *et al.*, 2001) και αζώτου (Kerry *et al.*, 1999, Haenen *et al.*, 1997). Οι υδροξυλομάδες στο Β-δακτύλιο είναι δότες υδρογόνου και ενός ηλεκτρονίου στην υδρόξυ και υπερόξυ ρίζα, τις σταθεροποιούν και δίνουν τη δυνατότητα δημιουργίας μίας σχετικά σταθερής φλαβονοειδής ρίζας. Μεταξύ δομικών ομόλογων φλαβονών και φλαβονονών, η παρεμπόδιση των υπερόξυ και των υδρόξυ ομάδων αυξάνονται γραμμικά και καμπυλόγραμμα, σύμφωνα με το συνολικό αριθμό των υδροξυλίων.

Οι διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των πολυυδροξυλιωμένων και πολυμεθοξυλιωμένων φλαβονοειδών είναι πιο πιθανές λόγω των διαφορών στην υδροφοβικότητα και στη μοριακή επιπεδότητα. Η κερκετίνη είναι πιθανός παρεμποδιστής μίας υπερόξυ ρίζας, που ακολουθείται από Ο-μεθυλιωμένα και Ο-γλυκοσυλιωμένα παράγωγα (Dugas *et al.*, 2000). Καταστολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας με Ο-μεθυλίωση (Burda *et al.*, 2001, Dugas *et al.*, 2000, Arora *et al.*, 1998) μπορεί να επηρεάσει το χώρο διαταράσσοντας τη στερεοχημεία, αν και η αναλογία μεθόξυ ομάδων προς υπερόξυ ομάδων δεν προβλέπει απαραίτητα την παρεμποδιστική ικανότητα ενός φλαβονοειδούς. Ο Β-δακτύλιος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη θέση της μεθόξυ ομάδας (Heim *et al.*, 2002).

Η παρουσία συγκεκριμένων υδροξυλομάδων στα φλαβονοειδή εμπλουτίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Μοτίβα υποκατάστασης στον Α και Β δακτύλιο καθώς και ο



2,3 διπλός δεσμός και η 4-οξο ομάδα στον Γ δακτύλιο επίσης επηρεάζουν την ικανότητα αυτή. Η γλυκοσυλίωση των φλαβονοειδών μειώνει την ικανότητα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες αγλυκόνες (Gao *et al.*, 1999, Ratty *et al.*, 1988). Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένες μελέτες για τη σχέση της δομής και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορισμένων κουμαρινών, λιγνίνης, ταννινών και κινονών και μερικών συνθετικών κουρκουμινολών και στυλβενίων (Cai *et al.*, 2004b, Lu *et al.*, 2002, Cassidy *et al.*, 2000, Yokozawa *et al.*, 1998, Foti *et al.*, 1996, Sreejayan *et al.*, 1996).

### 1.7. Παρουσίαση των βοτάνων

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία ανήκουν κατά κύριο λόγο στην οικογένεια *Lamiaceae* και είναι το μελισσόχορτο, το δενδρολίβανο, το φασκόμηλο, ο δίκταμος, ο δυόσμος, ο ύσσωπος, η ματζουράνα και ο σιδερίτης, ενώ χρησιμοποιήθηκε και το χαμομήλι που ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae*.

#### 1.7.1. Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*, οικ. *Lamiaceae*)



Το μελισσόχορτο είναι αυτοφυές φυτό των μεσογειακών χωρών της Ευρώπης. Στην Ελλάδα αυτοφύεται σε υγρές πεδινές ή σε ορεινές δασώδεις εκτάσεις της Μακεδονίας, της Θράκης και των νησιών του Ιονίου. Καλλιεργείται σε χώρες της νότιας και βόριας Ευρώπης, της Αμερικής και της δυτικής Ασίας. Επίσης, στην Ελλάδα καλλιεργείται συστηματικά από τον αγροτικό συνεταιρισμό ΑΣΚΑΦΕΦΑ στην περιοχή του Αγρινίου και στην Κύπρο από τον αγροτικό συνεταιρισμό AGROPLANT στην περιοχή της Λεμεσού.

Το φυτό αυτό είναι πολυετής πόα, με βλαστό τετραγωνικό, τριχωτό, πολύκλαδο, ύψους 40-80 cm. Τα φύλλα είναι καρδιάσχημα με μακρύ μίσχο, αυλακωτό, μήκους 3-5 cm και πλάτους 3 cm με χείλη πριονωτά και χαρακτηριστική οσμή λεμονιού. Τα άνθη είναι

δίχειλα, μικρά, έχουν χρώμα λευκό, ροδίζον ή κίτρινο ανάλογα με την ποικιλία. Το μελισσόχορτο ανθίζει από τον Ιούνιο μέχρι και τον Αύγουστο.

Νωπά ή αποξηραμένα φύλλα του μελισσόχορτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μαγειρική, τη ζαχαροπλαστική, την παρασκευή ποτών και αφεψημάτων και την εξαγωγή αιθερίου ελαίου. Φαρμακευτικά αφεψήματα και παρασκευάσματα της δρόγης χρησιμοποιούνται σαν ηρεμιστικά, σε διαταραχές ύπνου και διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος (Κουτσός, 2006). Πιστεύεται ότι διεγείρει την όρεξη ενώ, τα εκχυλίσματα του φυτού δρουν ενάντια σε βακτήρια, μύκητες, ιούς και αποτελούν συστατικά σε αλοιφές και κρέμες εξωτερικής χρήσης (van Wyk *et al.*, 2005 ).

### 1.7.2. Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*, οικ. *Lamiaceae*)



Η ονομασία του φυτού 'δενδρολίβανο' είναι συνδυασμός των λέξεων δένδρο και λιβάνι, ενώ η λατινική ονομασία *Rosmarinus* σημαίνει ρόδο της θάλασσας. Κέντρο καταγωγής θεωρούνται οι μεσογειακές περιοχές της Ευρώπης. Στην Ελλάδα αυτοφύεται σε περιοχές της Στερεάς Ελλάδας, σε ορισμένα νησιά του Αιγαίου και Ιονίου πελάγους και καλλιεργείται συστηματικά στην περιοχή του Αγρινίου. Ήταν γνωστό στους αρχαίους Αιγύπτιους,

τους Έλληνες και Ρωμαίους, που το χρησιμοποιούσαν ως αρωματικό φυτό αλλά και στα στεφάνια των νικητών στους αγώνες. Σήμερα καλλιεργείται σε πολλές χώρες του κόσμου, με κύριο κέντρο παραγωγής τη Γαλλία, την Ισπανία, την Τυνησία και το Μαρόκο.

Το δενδρολίβανο είναι αειθαλής θάμνος, πολύκλαδος, ύψους 0,80-1,03 m. Τα φύλλα είναι άμισχα, δερματώδη, σταχτόχροα, στενόμακρα, με την επάνω πλευρά σκούρου χρώματος και την κάτω ανοιχτόχρωμη χνουδωτή. Τα άνθη είναι κυανά-ιώδη και σε ορισμένες ποικιλίες λευκά με ελαφρώς κυανή απόχρωση. Εκφύονται κατά σπονδύλους στις μασχάλες των φύλλων και σχηματίζουν επάκριους βότρυες. Ο κάλυκας είναι κωδωνοειδής, δίχειλος, με το άνω χείλος ωοειδές, ακέραιο και το κάτω δίλοβο. Η στεφάνη είναι δίχειλη, με το άνω χείλος χωρισμένο στα δύο και το κάτω τρίλοβο .

Άνθη μπορεί να παρατηρηθούν σε μερικούς βλαστούς σχεδόν όλο το χρόνο. Η γενική ανθοφορία όμως γίνεται πολύ νωρίς την άνοιξη και ακολουθεί μία δεύτερη αργά το φθινόπωρο. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές ποικιλίες δενδρολίβανου είτε ορθόκλαδες είτε πλαγιόκλαδες, άλλες πολύ αρωματικές και άλλες λιγότερο (Κουτσός, 2006).

Τα φύλλα του φυτού αυτού διατίθενται στο εμπόριο ως νωπή ή ξηρή δρόγη ή πωλείται το αιθέριο έλαιο του φυτού. Επίσης χρησιμοποιείται στη μαγειρική ως άρτυμα, καθώς και για την παραγωγή αφεψημάτων. Το έλαιο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών, καθώς και στην αρωματοθεραπεία. Το αφέψημα καταπολεμά τη διάρροια και την τριχόπτωση, ενώ ενδείκνυται μεταξύ άλλων για ατονία, πονοκέφαλο, κρυολόγημα, υπερκόπωση, εξάντληση και κατάθλιψη. Ενδείκνυται για κράμπες στο στομάχι και για το φούσκωμα, ανοίγει την όρεξη και προκαλεί έκκριση στομαχικών υγρών (van Wyk *et al.*, 2005). Έχει αντιβακτηριακή δράση και μάλιστα μέχρι τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα χρησιμοποιούνται ως αντισηπτικό σε γαλλικά νοσοκομεία.

### 1.7.3. Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*, οικ. *Lamiaceae*)



Το λατινικό του όνομα προέρχεται από τη λέξη ‘salvare’ που σημαίνει σώζω. Ο Ιπποκράτης και ο Γαληνός το χρησιμοποιούσαν για θεραπευτικούς σκοπούς, ενώ οι Λατίνοι το θεωρούσαν ιερό φυτό και το χρησιμοποιούσαν σε θρησκευτικές τελετές. Απαντάται σε πολλές χώρες της Μεσογείου και της Μ. Ασίας. Στην

Ελλάδα υπάρχουν πάνω από 20 είδη φυτών του γένους *Salvia*. Το είδος *Salvia officinalis* δεν καλλιεργείται συστηματικά στην Ελλάδα παρά μόνο στο Αγρίνιο, καλλιεργείται όμως σε περιοχές της κεντρικής και νοτιοανατολικής Ευρώπης καθώς και στην Αμερική.

Το φασκόμηλο είναι ένας μικρός, πολυετής, αειθαλής θάμνος, που το ύψος του φτάνει μέχρι τα 70 cm, με βλαστό πολύκλαδο, τετραγωνικό και χνουδωτό. Τα φύλλα είναι αντίθετα, αργυρότεφρα, χνοώδη στην κάτω επιφάνεια, μήκους 5-8 cm και πλάτους 2-3 cm. Είναι επίσης βραχύμυχα, επιμήκη που καταλήγουν σε οξεία γωνία, με νευρώσεις πυκνά διακλαδισμένες και βαθουλωμένες μέσα στο παρέγχυμα. Τα άνθη φύονται κατά

σπονδύλους, έχουν μήκος 1,5-2 cm, δύο χείλη, χρώμα ιώδες που άλλες φορές υπερισχύει το ερυθρό χρώμα και άλλες το μπλε, με λεπτό και μακρύ κάλυκα. Η ανθοφορία αρχίζει το μήνα Απρίλιο και ολοκληρώνεται το πρώτο δεκαήμερο του Μαΐου ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και το υψόμετρο στο οποίο βρίσκεται η καλλιέργεια (Κουτσός, 2006).

Η δρόγη του φυτού χρησιμοποιείται στη μαγειρική ως άρτυμα, αλλά και ως μέσο συντήρησης και αρωματισμού σε πολλά τρόφιμα. Χρησιμοποιείται επίσης με τη μορφή αφεψήματος σε φλεγμονές στο στόμα και το φάρυγγα, στο κοινό κρυολόγημα και σε γαστρεντερικές διαταραχές. Είναι αντισηπτικό, αντιβακτηριακό και διουρητικό και αποτελεί ιδανικό αφέψημα για τους διαβητικούς, διότι μειώνει τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα (van Wyk *et al.*, 2005). Το αιθέριο έλαιο του φυτού χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία και στη βιομηχανία καλλυντικών. Τέλος το φυτό θεωρείται ότι έχει και εντομοαπωθητικές ιδιότητες αλλά και ανακουφίζει από τσιμπήματα εντόμων. Η χρήση του βοτάνου απαγορεύεται στις θηλάζουσες μητέρες, διότι επηρεάζει την ποιότητα και τη γεύση του γάλακτος και συντελεί στη διακοπή του. Τέλος, σε εγκυμονούσες μπορεί να προκαλέσει αποβολή λόγω συσπάσεως της μήτρας.

#### **1.7.4. Δίκταμος (*Origanum dictamnus*, οικ. *Lamiaceae*)**

Ο δίκταμος είναι ενδημικό φυτό της Κρήτης και το όνομά του προέρχεται από τις λέξεις δίκτης και θάμνος που σημαίνει θάμνος του Δίκτη, βουνού της Κρήτης. Είναι γνωστό από την αρχαιότητα λόγω των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων που είχαν περιγραφεί από το Θεόφραστο, τον Ιπποκράτη, τον Αριστοτέλη και το Διοσκουρίδη. Επειδή η συλλογή του είναι δύσκολη, λόγω των απόκρημνων περιοχών που αυτοφύεται και τις αλόγιστες συλλογές, εισήχθη εδώ και μερικές δεκαετίες στην καλλιέργεια στην περιοχή της Κρήτης.



Ο δίκταμος είναι πολυετής πόα που εξελίσσεται σε πολύ μικρό συμπαγή θάμνο, με ύψος που φτάνει μέχρι τα 30 cm και η διάμετρος τα 20-30 cm. Τα φύλλα είναι ωοειδή μήκους

έως 2 cm στον πλατύφυλλο δίκταμο και 1 cm στο στενόφυλλο, τα οποία καλύπτονται σε όλες τις ποικιλίες από πυκνό λευκό τρίχωμα. Στην αρχή του καλοκαιριού, οι πυκνοί βλαστοί επεκτείνονται και σχηματίζουν κορυφαίες ταξιανθίες. Η ανθοφορία είναι συνεχής και διαρκεί όσο το φυτό βρίσκει υγρασία, μέχρι το τέλος του καλοκαιριού. Τα άνθη είναι ρόδινα και έχουν μήκος 11 mm (Κουτσός, 2006).

Από το δίκταμο χρησιμοποιείται η δρόγη του φυτού και το αιθέριο έλαιο. Το αιθέριο έλαιο του φυτού, χρησιμοποιείται για τον αρωματισμό ορισμένων ποτών, την αρωματοποίηση, ενώ έχει και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Το φυτό χαρακτηρίζεται ως αντιφλεγμονώδες, αντισηπτικό, ανθελμινθικό και σπασμολυτικό. Το αφέψημα βοηθάει σε πόνους στο λαιμό και το στομάχι. Επιπλέον, δρα κατά της ακμής, της διάρροιας και του πονοκεφάλου (Λιόλιος, 2004).

#### **1.7.5. Δυόσμος (*Mentha spicata*, οικ. *Lamiaceae*)**

Η ονομασία δυόσμος προέρχεται από τη λέξη 'ηδύοσμος' που σημαίνει ευχάριστη οσμή. Πατρίδα του φυτού αυτού είναι οι παραμεσόγειες χώρες, αν και συγγενή αυτοφυή είδη έχουν βρεθεί και σε πολλές άλλες χώρες. Σήμερα, καλλιεργείται παγκοσμίως, ενώ για την εξαγωγή αιθερίου ελαίου καλλιεργείται στη Ρωσία, τη Γερμανία, την Αγγλία, τις ΗΠΑ και τα τελευταία χρόνια στην Κύπρο.



Ο δυόσμος είναι πολυετής πόα που το ύψος της φτάνει μέχρι τα 70 cm. Τα φύλλα του φυτού εκφύονται αντίθετα ανά δύο εναλλασσόμενα στα γόνατα σταυροειδώς, καθώς και στις ταξιανθίες με τα άνθη τους. Τα άνθη είναι λευκά ή ροζ και οι διαστάσεις τους είναι 2,5-3 mm (Κουτσός, 2006).

Η κύρια χρήση του δυόσμου είναι στη μαγειρική όπου χρησιμοποιούνται τα φύλλα νωπά ή αποξηραμένα. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της δυσπεψίας και το έλαιο χρησιμοποιείται κυρίως για εισπνοές και για τη θεραπεία της καταρροής. Ενσωματώνεται σε στοματικά διαλύματα και οδοντόκρεμες (van Wyk *et al.*, 2005).

Επίσης, βρίσκει εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, ζαχαροπλαστικής, αρωματοποιίας και τέλος στην αρωματοθεραπεία.

#### 1.7.6. Ύσσωπος (*Hyssopus officinalis*, οικ. *Lamiaceae*)

Ο ύσσωπος θεωρείτο από τους Εβραίους φυτό ιερό ενώ ο Διοσκουρίδης το αναφέρει ως φαρμακευτικό. Κέντρο καταγωγής θεωρούνται οι μεσογειακές χώρες της Ευρώπης και της Ασίας στις οποίες αυτοφύεται και ιδιαίτερα στην Παλαιστίνη. Καλλιεργείται σε χώρες της Ευρώπης, της Ασίας, της Αμερικής και στην Ελλάδα στην περιοχή του Αγρινίου.

Ο ύσσωπος είναι πολυετής πόα, που στην πλήρη ανάπτυξη είναι πολύκλαδος θάμνος ενώ, το ύψος του φτάνει μέχρι 70 cm. Οι βλαστοί του είναι τετραγωνικής διατομής και παραμένουν πράσινοι και λείοι ακόμη και όταν ξυλοποιηθούν. Τα φύλλα είναι άμισχα, αντίθετα, επιμήκη, μήκους 3-4 cm με την ίδια πράσινη απόχρωση και στις δύο επιφάνειες, με λεία χείλη που το καθένα



φέρει στη βάση άλλα δύο παράφυλλα του ίδιου σχήματος. Το μήκος τους, άλλοτε μικρό και άλλοτε μεγάλο, μπορεί να φθάσει μέχρι τα  $\frac{3}{4}$  του πραγματικού φύλλου. Τα άνθη είναι κυανά, ροζ ή λευκά και εκφύονται κατά σπονδύλους στα επάνω γόνατα των βλαστών. Ο κάλυκας είναι κωδωνοειδής, με οδοντωτά χείλη και η στεφάνη δίχειλη, με τρεις στήμονες υπόγυνους, που μαζί με το στύλο προεξέχουν εμφανώς από τα χείλη των ανθέων. Σε μερικές ποικιλίες ύσσωπου παρατηρείται το φαινόμενο, στο ίδιο φυτό άλλοι βλαστοί να φέρουν άνθη μπλε και άλλοι βλαστοί ροζ. Η άνθιση σε ολόκληρο το φυτό γίνεται στο τέλος Μαΐου με αρχές Ιουνίου, ενώ μεμονωμένοι βλαστοί ανθίζουν σχεδόν όλο το χρόνο (Κουτσός, 2006).

Το φυτικό υλικό και το έλαιο του ύσσωπου χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών του αναπνευστικού ενώ, μπορεί και διεγείρει την κυκλοφορία του αίματος (van Wyk *et al.*, 2005). Το αιθέριο έλαιο του ύσσωπου χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, καλλυντικών και την αρωματοθεραπεία.

### 1.7.7. Ματζουράνα (*Origanum majorana*, οικ. *Lamiaceae*)

Η ματζουράνα είναι ένα από τα πολλά είδη του γένους *Origanum*. Αυτοφύεται σε χώρες της νοτίου Ευρώπης και της βόρειας Αφρικής αλλά όχι στην Ελλάδα. Στη χώρα μας συναντάται σε κήπους ως καλλωπιστικό και αρωματικό φυτό ενώ σε άλλες χώρες καλλιεργείται συστηματικά. Τα τελευταία χρόνια καλλιεργείται συστηματικά και στην Κύπρο.



Είναι πολυετής πόα, που φτάνει τα 50 cm. Μοιάζει μορφολογικά με τη ρίγανη αλλά έχει διαφορετικό άρωμα. Ο θάμνος της ματζουράνας είναι ορθόκλαδος από την αρχή της ανάπτυξής του. Τα φύλλα είναι μικρά, αντίθετα, πρασινωπά, ενώ τα άνθη του φυτού είναι λευκά ή ροζ. Η ανθοφορία διαρκεί από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο (Κουτσός, 2006).

Η ματζουράνα χρησιμοποιείται στη μαγειρική, ως καρύκευμα. Το αιθέριο έλαιο χρησιμοποιείται σε αρώματα και καλλυντικά. Το αφέψημα του φυτού χρησιμοποιείται ως τονωτικό, κατά της δυσπεψίας και των πονοκεφάλων. Επίσης θεωρείται ότι ανακουφίζει από τις αϋπνίες, το άσθμα, το κρυολόγημα και το βήχα. Έχει σπασμολυτικές, αντιεμετικές και εφιδρωτικές ιδιότητες, ενώ είναι χρήσιμο για παθήσεις του ουροποιητικού συστήματος (van Wyk *et al.*, 2005). Επιπλέον, είναι καλλωπιστικό και μελισσοτροφικό φυτό.

### 1.7.8. Σιδερίτης ή τσάι του βουνού (*Sideritis* sp., οικ. *Lamiaceae*)

Για την ονομασία σιδερίτης υπάρχουν δύο εκδοχές: η μία λόγω του ότι το χρησιμοποιούσαν για τη θεραπεία πληγών από σιδηρά αντικείμενα και η άλλη, επειδή τα είδη του γένους αυτού περιέχουν αρκετή ποσότητα σιδήρου. Τόπος καταγωγής πολλών ειδών του γένους αυτού είναι ο ελλαδικός χώρος. Αυτοφύεται στα βουνά της Κρήτης σε υψόμετρο 1300-2000 m, ενώ καλλιεργείται στα Βρύναινα (Νομός Μαγνησίας), στο Δομοκό (Νομός Φθιώτιδας) και σε διάφορες περιοχές της Κύπρου.

Ο σιδερίτης είναι πολυετής πόα που το ύψος της φτάνει τα 50 cm. Οι βλαστοί είναι συνήθως πλαγιόκλαδοι, λεπτοί, χνοώδεις. Τα φύλλα είναι σχήματος ωοειδούς με το οξύληκτο άκρο προς το μίσχο, καλύπτονται με πυκνό χνούδι και στις δύο επιφάνειες και έχουν χρώμα σταχυπράσινο. Την άνοιξη εκπτύσσει ορθόκλαδα ανθοφόρα στελέχη, τα οποία αποτελούν το εμπορικό τμήμα του φυτού. Τα βράκτια φύλλα των ανθοφόρων στελεχών είναι καρδιόσχημα, οξύληκτα, χρώματος πρασινοκίτρινου, με αδενώδεις τρίχες, χωρίς χνούδι (Κουτσός, 2006).



Ο σιδερίτης χρησιμοποιείται κυρίως με τη μορφή αφεψήματος της ξηρής δρόγης των ανθοφόρων στελεχών. Είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στην Ελλάδα και καταναλώνεται ευρύτατα, κυρίως κατά τους χειμερινούς μήνες. Έχει ευχάριστο άρωμα και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του κοινού κρυολογήματος. Θεωρείται καταπραϊντικό για το πεπτικό και το αναπνευστικό σύστημα. Το αφέψημα έχει αποχρεμπτικές, εφιδρωτικές και σπασμολυτικές ιδιότητες (van Wyk *et al.*, 2005). Χρησιμοποιείται κατά της διάρροιας, της δυσπεψίας και είναι διουρητικό. Εμπεριέχει φλαβονοειδή, ενώ δεν περιέχει καφεΐνη.

#### **1.7.9. Χαμομήλι (*Chamomilla recutita*, οικ. *Asteraceae*)**

Η ονομασία χαμομήλι προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις ‘χαμαί’ και ‘μήλο’ δηλαδή μήλο του εδάφους και ορισμένοι πιστεύουν πως το δεύτερο συστατικό του ονόματός του σχετίζεται με το άρωμα. Οι φαρμακευτικές του ιδιότητες ήταν γνωστές από την αρχαιότητα στους Αιγύπτιους, τους Έλληνες και τους Ρωμαίους. Προέρχεται από τη νότια Ευρώπη, όπου αυτοφύεται ως ζιζάνιο σε καλλιέργειες. Στην Ελλάδα είναι ευρύτατα διαδεδομένο καθώς αυτοφύεται σε πολλές χέρσες τοποθεσίες. Καλλιεργείται στη Γερμανία, τη Γαλλία, την Ιταλία, την Ουγγαρία, την Κροατία, τη Σερβία, τη Βουλγαρία, την Τσεχία, τη Σλοβακία, την Αίγυπτο και σε πολλές ακόμα περιοχές της εύκρατης ζώνης. Στην Ελλάδα καλλιεργείται στο Αγρίνιο, στην Καρδίτσα και στο Κιλκίς, ενώ καλλιέργειες υπάρχουν και στην Κύπρο.



Το χαμομήλι είναι ετήσια πόα, ύψους 20-60 cm, με βλαστό πολύκλαδο, όρθιο και φύλλα πτεροειδή, με τμήματα βραχέα, στενά, σχεδόν τριχοειδή. Όταν ένα τέτοιο φυτό έχει ελεύθερο χώρο γύρω του η διακλάδωσή του είναι πλούσια και αρχίζει σχεδόν από τη βάση του βλαστού. Τα άνθη έχουν το χαρακτηριστικό σχήμα της μαργαρίτας, με διάμετρο 10-17 mm και εκφύονται μεμονωμένα στην κορυφή κάθε βλαστιδίου. Το χρώμα του συμπαγούς ημισφαιρικού κεντρικού τμήματος είναι κίτρινο και τα περιφερειακά πέταλα της στεφάνης λευκά αργυρώδη. Η ανθοφορία του φυτού διαρκεί από τα μέσα Απριλίου μέχρι την πρώτη εβδομάδα του Ιουνίου. Ο καρπός είναι αχάινιο (Κουτσός, 2006).



Το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται είναι το άνθος με βραχύ μίσχο, το οποίο πωλείται ως ξηρή δρόγη ή χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθερίου ελαίου. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες του χαμομηλιού είναι ήδη γνωστές από την αρχαιότητα και επαληθεύονται με σύγχρονες μελέτες (Fidler *et al.*, 1996, Salamon, 1992, Szalontai *et al.*, 1976). Το αφέψημα του φυτού καθώς και ειδικά σκευάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξωτερικές χρήσεις σε ερεθισμούς του δέρματος καθώς και σε εκζέματα και εσωτερικές χρήσεις σε ερεθισμό στο στόμα, το φάρυγγα και το πεπτικό σύστημα και σε ελαφρές περιπτώσεις αϋπνίας. Ακόμα, ηρεμεί τους πονοκεφάλους και καταπραΰνει τους πόνους των δοντιών. Κάνει καλό στο πρόσωπο ειδικά γύρω από την περιοχή των ματιών και σε φλεγμονές των βλεφάρων. Επίσης, έχει αντιπυρετική, σπασμολυτική, ανθελμινθική, διουρητική και αντιαλλεργική δράση. Το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού χρησιμοποιείται στην αρωματοθεραπεία, την κοσμετολογία και την αρωματοποιία.

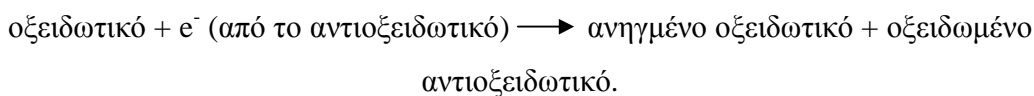
### **1.8. Μέτρηση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιούνται πολλές μέθοδοι που συχνά προκαλούν σύγχυση στην επιστημονική κοινότητα αλλά και στη βιομηχανία. Λόγω της έλλειψης μίας επίσημης ανάλυσης, η σύγκριση των δημοσιευμένων αποτελεσμάτων, που έχουν γίνει από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, είναι δύσκολη

και οι βιομηχανίες τροφίμων δεν μπορούν να παρουσιάσουν ακριβή ποιοτικά χαρακτηριστικά για τα αντιοξειδωτικά προϊόντα.

Ανάλογα με το είδος των χημικών αντιδράσεων, οι μέθοδοι για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μπορούν δύσκολα να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις αναλύσεις που βασίζονται στην αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει την αντίδραση που βασίζεται στη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, ET). Οι μέθοδοι που βασίζονται στο ET περιλαμβάνουν μία αντίδραση οξειδοαναγωγής με το οξειδωτικό.

Κατά την πειραματική διαδικασία όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είτε για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH, ABTS) είτε για τη μέτρηση των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων (Folin-Ciocalteu reagent) είναι αναλύσεις ET. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν δύο συστατικά στο αντιδρών μίγμα, το αντιοξειδωτικό και το οξειδωτικό, όπως παρουσιάζονται στην παρακάτω αντίδραση:



Το οξειδωτικό αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από το αντιοξειδωτικό, προκαλώντας αλλαγή του χρώματος του πρώτου. Ο βαθμός της αλλαγής του χρώματος σχετίζεται αναλογικά με τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών. Το τελικό σημείο της αντίδρασης λαμβάνει μέρος όταν η αλλαγή του χρώματος σταματά. Το διάγραμμα της αλλαγής της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού είναι ευθεία καμπύλη, όπου η κλίση της αντιστοιχεί στη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και η οποία εκφράζεται είτε σε ισοδύναμα Trolox είτε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Huang *et al.*, 2005) καθώς και καφεϊκού οξέος.

### 1.8.1. Μέτρηση φαινολικών συστατικών

Κατά την πειραματική διαδικασία η μέτρηση των φαινολικών συστατικών των διαφόρων αφεψημάτων έγινε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό αρχικά είχε

προταθεί για την ανάλυση πρωτεϊνών (Folin & Ciocalteu, 1927). Αρκετά χρόνια αργότερα, ο Singleton και οι συνεργάτες του επέκτειναν την μέθοδο αυτή για την ανάλυση των ολικών φαινολικών στο κρασί και από τότε η μέθοδος αυτή απέκτησε πολλές εφαρμογές (Singleton *et al.*, 1999). Πλέον είναι πολύ διαδεδομένη και είναι γνωστή ως η ‘μέθοδος των ολικών φαινολικών’ καθώς γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς το διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται στην πραγματικότητα μετρά τη μείωση της δραστηριότητας του δείγματος, κάτι που δε σχετίζεται με την παραπάνω ονομασία. Πολλές δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι η σχέση της ανάλυσης των ολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και ορισμένων άλλων ET αναλύσεων που μετρούν την αντιοξειδωτική ικανότητα π.χ. TEAC και FRAP είναι συχνά γραμμική, κάτι το οποίο δεν είναι περίεργο αν ληφθεί υπ’ όψιν η ομοιότητα στη χημεία των αναλύσεων (Huang *et al.*, 2005).

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελεί μίγμα μολυβδαινικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ), βολφραιμικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) και φωσφορικού οξέος ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) και προκαλεί οξειδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι ένα σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραιμίου χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που απορροφά στην περιοχή του ορατού (725 nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

### **1.8.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο μεθόδων: του ABTS και του DPPH. Αυτό έγινε γιατί ενώ υπάρχουν πολλές και διαφορετικές μέθοδοι για τη μέτρηση αυτή, δεν υπάρχει κάποια εγκεκριμένη και τυποποιημένη μέθοδος. Πλέον έχουν δημοσιευτεί πολλές και γρήγορες μέθοδοι για τον έλεγχο αυτό καθώς και πολλά *in vitro* αντιοξειδωτικά πρωτόκολλα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Packer *et al.*, 1998, Armstrong, 1998, Rajalakshmi *et al.*, 1996). Είναι φανερό ότι η σημασία και η αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών σε τρόφιμα και βιολογικά συστήματα εξαρτώνται σε

μεγάλο βαθμό από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Υπάρχουν πολλά αντιφατικά αποτελέσματα για διάφορα αναγνωρισμένα αντιοξειδωτικά, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται. Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα είναι ιδιότητες των αντιοξειδωτικών μεταξύ λιπιδίων και υδατικής φάσης (Frankel *et al.*, 1994, Frankel *et al.*, 1996, Schwarz *et al.*, 1996, Porter, 1993), οι συνθήκες οξείδωσης και η φυσική κατάσταση του οξειδωμένου υποστρώματος.

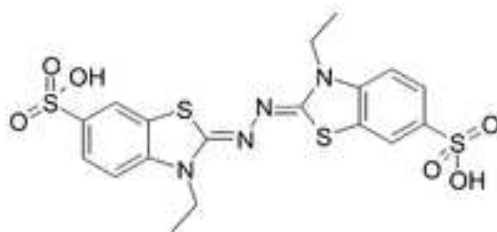
Έτσι λοιπόν τα δεδομένα που προκύπτουν από διαφορετικούς ερευνητές είναι πολύ δύσκολο να συγκριθούν και να ερμηνευθούν. Για την αντιμετώπιση τέτοιων προβλημάτων είναι καλύτερο να χρησιμοποιούνται περισσότεροι από μία μέθοδοι για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.(Frankel *et al.*, 2000).

#### **1.8.2.1. ABTS**

Η κατιοντική ρίζα του ABTS [2,2'-αζινοδι (3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] (Σχήμα 1.8.1) χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση της σχετικής ικανότητας παρεμπόδισης των φλαβονοειδών και των φαινολικών συστατικών μέσω της ικανότητας που έχουν ως δότες ηλεκτρονίων ή πρωτονίων (Rice-Evans *et al.*, 1996, 1995, Miller *et al.*, 1993, 1996 and 1997). Το φάσμα της πράσινης σταθερής ρίζας στην περιοχή του εγγύς-υπερύθρου αποτελείται από τρεις κορυφές στα 637, 734 και 812 nm. Όταν η ρίζα αλληλεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μειώνεται, εμποδίζοντας την απορρόφηση της πράσινης ρίζας σε μία μεγάλη και ακριβή κλίμακα που εξαρτάται από την αντιοξειδωτική ικανότητα της ουσίας που ερευνάται. Η μέθοδος αυτή δεν επηρεάζεται από άλλους παράγοντες που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η αρχή της μεθόδου είναι η δημιουργία ενός χρωμοφόρου ABTS<sup>+</sup> και η σχετική ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μειώσουν την ένταση της ρίζας σε σχέση με αυτή του Trolox. Γι' αυτό τα ισοδύναμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορίζονται ως η συγκέντρωση του Trolox με το ισοδύναμο της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε συγκέντρωση 1 mM της ουσίας που ερευνάται. Η μέθοδος αυτή είναι μία ανάλυση αποχρωματισμού, κατάλληλη για λιπόφιλα (και υδατικά) συστήματα στα οποία τα αντιοξειδωτικά προστίθενται για το σχηματισμό κατιοντικής ρίζας. Η ρίζα αυτή

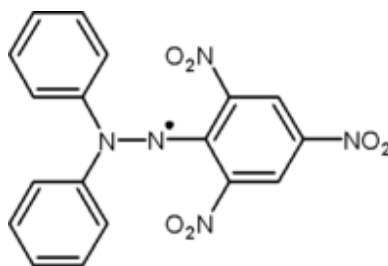
παράγεται κατά την οξείδωση ενός ηλεκτρονίου του ABTS και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών όπως τα καροτενοειδή και λιπόφιλα εκχυλίσματα συστατικών της διατροφής (Pellegrini *et al.*, 1999).



Σχήμα 1.8.1: Χημική δομή ABTS.

#### 1.8.2.2. DPPH

Εκτός από τη μέθοδο του ABTS, για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των διαφόρων αφεψημάτων χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος DPPH (2,2 διφαινυλ-πικρυλ-υδραζίλιο) (Σχήμα 1.8.2). Το DPPH είναι μία μέθοδος εκτίμησης του πολυφαινολικού περιεχομένου που βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών. Στην ικανότητα αυτή των πολυφαινολών αποδίδεται η αντιοξειδωτική τους δράση με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να δίνει μετρήσεις της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολών του δείγματος (Parejo *et al.*, 2000). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα που έχουν τα διαλύματα που περιέχουν ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες να αποχρωματίζουν το διάλυμα του DPPH το οποίο είναι έντονο μωβ. Η ρίζα αυτή απορροφά στην περιοχή του ορατού και συγκεκριμένα στα 515-517 nm.



Σχήμα 1.8.2: Χημική δομή DPPH.

### **1.9. Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζων (GC-MS)**

Η αέρια χρωματογραφία είναι μία καλά εδραιωμένη τεχνική διαχωρισμού για την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση των συστατικών ενός δείγματος που μπορεί να υπάρχουν σε πτητική μορφή χωρίς να αποσυντεθούν. Η έκλυση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μίας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια αδρανούς στερεού.

Όταν η αέρια χρωματογραφία συνδυαστεί με φασματομετρία μαζών (MS) τότε η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Το υπό εξέταση δείγμα αφού διαχωρισθεί στα συστατικά του εξέρχεται από τον χρωματογράφο και εισέρχεται σε αέρια κατάσταση στο MS όπου βομβαρδίζεται από ηλεκτρόνια μεγάλης κινητικής ενέργειας. Με αυτό τον τρόπο προκαλείται ιονισμός των μορίων που οδηγεί σε διάσπαση ώστε να δημιουργηθούν ιόντα μικρότερης μάζας. Μόλις αυτά δημιουργηθούν, επιταχύνονται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και ακολούθως αποκλίνουν της αρχικής τους πορείας, ανάλογα με το λόγο  $m/e$  (μάζα/φορτίο). Το ρεύμα το οποίο παράγεται μετράται με τη βοήθεια κατάλληλου ανιχνευτή. Το διάγραμμα το οποίο θα προκύψει από την ένταση του μετρούμενου ρεύματος συναρτήσει του λόγου  $m/e$ , αποτελεί το φάσμα μαζών.

Τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας έναντι των άλλων τεχνικών διαχωρισμού είναι η μεγάλη ευαισθησία, η ταχύτητα και η απλότητα. Επίσης, δίνει τη δυνατότητα πραγματοποίησης δύσκολων διαχωρισμών που συνήθως είναι αδύνατον να γίνουν με άλλες τεχνικές (Ταραντίλης, Πολυσίου 2008).

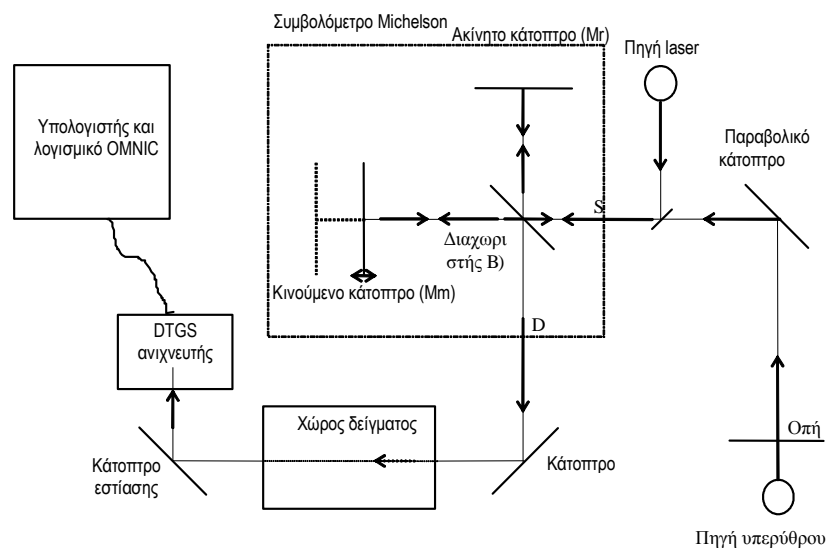
### **1.10. Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)**

Η φασματοσκοπία υπερύθρου, είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται πολύ συχνά λόγω της ευκολίας σύγκρισης των φασμάτων που λαμβάνονται με άλλα γνωστά. Χρησιμοποιείται κυρίως στην οργανική και στη φαρμακευτική χημεία καθώς μέσω

τέτοιων φασμάτων δίνεται η δυνατότητα διερεύνησης της μοριακής σύνταξης και της ταυτοποίησης άγνωστων ουσιών.

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού και του τμήματος των ραδιοκυμάτων. Το πιο χρήσιμο κομμάτι της υπέρυθρης περιοχής για τη φασματοσκοπία είναι μεταξύ  $4000-600\text{ cm}^{-1}$ . Όλες σχεδόν οι ανόργανες και οργανικές ενώσεις απορροφούν ακτινοβολία στην παραπάνω περιοχή και γι' αυτό θεωρείται απαραίτητη.

Τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier (Σχήμα 1.10.1) παρέχουν φάσματα στο μεγαλύτερο τμήμα της μέσης περιοχής του υπέρυθρου, με λόγο σήματος προς θόρυβο μεγαλύτερο από τα καλής ποιότητας φασματομέτρα διασποράς. Η ανάλυση κατά Fourier ή μετασχηματισμός Fourier είναι η ανάλυση μιας μαθηματικής συνάρτησης ή μιας πειραματικά λαμβανομένης καμπύλης με τη μορφή μιας τριγωνομετρικής σειράς. Χρησιμοποιείται ως μέθοδος προσδιορισμού των συστατικών ενός πολύπλοκου περιοδικού κύματος (Ταραντίλης, Πολυσίου 2008).



**Σχήμα 1.10.1:** Φασματοφωτόμετρο FT-IR.

### **1.11. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, όπως και όλες οι χρωματογραφικές τεχνικές, είναι περισσότερο μία τεχνική διαχωρισμού και λιγότερο τεχνική ταυτοποίησης των συστατικών του δείγματος. Σε αυτό το είδος χρωματογραφίας τη στατική φάση την αποτελούν σωματίδια μικρής διαμέτρου που είναι κατασκευασμένα από στερεό πορώδες υλικό, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό. Η διαβίβαση της κινητής φάσης πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για το διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλουσης με αυτούς των πρότυπων διαλυμάτων σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού (Ταραντίλης, Πολυσίου 2008).

### **1.12. ΣΚΟΠΟΣ**

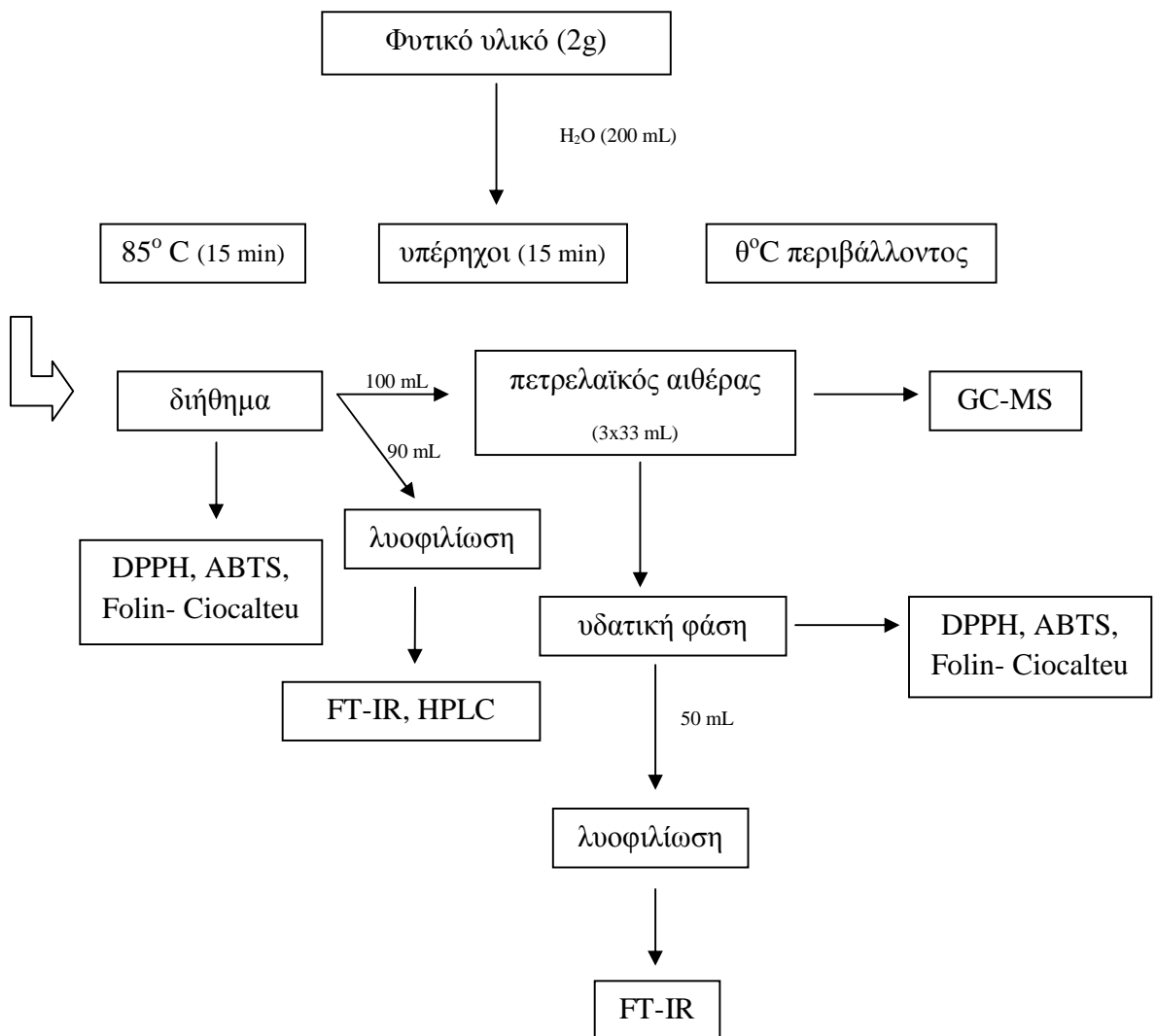
Τις τελευταίες δεκαετίες το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί, μεταξύ άλλων, στα φαινολικά συστατικά, μία κατηγορία ενώσεων για την οποία τα στοιχεία υποστηρίζουν σθεναρά ότι παρέχουν ευεργετικές επιδράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς φαίνεται ότι δρουν κατά των ελεύθερων ριζών και έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Ανάμεσα στα προϊόντα που περιέχουν φαινολικά συστατικά βρίσκονται τα βότανα και τα αφεψήματα. Τα περιορισμένα όμως, δεδομένα σχετικά με την ποσότητα πρόσληψης και την περιεκτικότητα των πολυφαινολών στα αφεψήματα βοτάνων, αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ολικού φαινολικού περιεχομένου καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων βοτάνων της ελληνικής χλωρίδας που καταναλώνονται ως αφέψημα. Ακόμα προσδιορίστηκαν τα πτητικά και τα υδατοδιαλυτά συστατικά για να προσδιοριστεί που οφείλεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε φυτικού εκχυλίσματος. Σημαντική είναι επίσης, η διερεύνηση διαφόρων



τρόπων κατανάλωσης των αφεψημάτων και συγκεκριμένα η προσθήκη γάλακτος, μελιού και χυμού λεμονιού καθώς και πως η προσθήκη αυτή μπορεί να επηρεάσει τη μετρούμενη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Στο παρακάτω σχήμα (1.12.1) παρουσιάζεται διαγραμματικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρούσα μελέτη.



Σχήμα 1.12.1: Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Φυτικό υλικό

Τα φυτά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία για την παρασκευή των αφεψημάτων ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* και είναι το μελισσόχορτο, το δενδρολίβανο, ο δίκταμος, ο ύσσωπος η ματζουράνα, ο δυόσμος, το φασκόμηλο και το τσάι του βουνού. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και χαμομήλι που ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae*, φυτό που χρησιμοποιείται ως αφέψημα πολύ συχνά. Το παραπάνω φυτικό υλικό προήλθε από τους αγροτικούς συνεταιρισμούς ΑΣΚΑΦΕΦΑ (Αγροτικός Συνεταιρισμός Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και Ενεργειακών Φυτών Αιτωλοακαρνανίας) και από τον κυπριακό συνεταιρισμό AGROPLANT LTD (Πίνακας 2.1.1). Τέλος χρησιμοποιήθηκε και κοινό τσάι Lipton (yellow label) που κυκλοφορεί στο εμπόριο.

**Πίνακας 2.1.1:** Χαρακτηριστικά φυτικού υλικού.

Φυτικό υλικό	Προέλευση	Προμηθευτής	Χρονολογία κοπής
μελισσόχορτο	Παναιτωλικό, Αιτωλοακαρνανία	ΑΣΚΑΦΕΦΑ	2009
φασκόμηλο	Γιαννούσι, Αιτωλοακαρνανία	ΑΣΚΑΦΕΦΑ	2007
δενδρολίβανο	Μέσα Χώρα Αγρινίο, Αιτωλοακαρνανία	ΑΣΚΑΦΕΦΑ	2009
ύσσωπος	Παναιτωλικό, Αιτωλοακαρνανία	ΑΣΚΑΦΕΦΑ	2009
μελισσόχορτο	Κύπρος	AGROPLANT LTD	2009
χαμομήλι	Κύπρος	AGROPLANT LTD	2009
τσάι του βουνού	Κύπρος	AGROPLANT LTD	2009
ματζουράνα	Κύπρος	AGROPLANT LTD	2009
δυόσμος	Κύπρος	AGROPLANT LTD	2009
δίκταμος	Κρήτη	Τοπική αγορά	2009

Το τμήμα του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση ήταν τα φύλλα, με εξαίρεση το δίκταμο όπου το δείγμα περιελάμβανε και τα άνθη. Όλα τα φυτικά τμήματα ήταν αποξηραμένα. Αρχικά, το φυτικό υλικό κονιορτοποιήθηκε με το χέρι και αφαιρέθηκαν οι ξυλοποιημένοι βλαστοί που τυχόν υπήρχαν. Στην περίπτωση του συσκευασμένου τσαγιού Lipton χρησιμοποιήθηκε το φυτικό υλικό χωρίς το ειδικό φακελάκι ενώ, δεν πραγματοποιήθηκε άλλη κατεργασία.

## **2.2. Προετοιμασία δειγμάτων**

Για κάθε φυτό ετοιμάστηκαν αφεψήματα με τρεις διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης: με ζεστό νερό, με νερό σε θερμοκρασία δωματίου και με νερό σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιώντας λουτρό υπερήχων για την καλύτερη εκχύλιση του φυτικού υλικού. Σε κάθε περίπτωση ζυγίζονταν 2 g φυτικού υλικού τα οποία εκχυλίζονταν σε 200 mL (μία κούπα) εμφιαλωμένου νερού (νερό Κρήτης). Η εκχύλιση κάθε φορά διαρκούσε 15 min, ενώ τα πρώτα 30 sec γινόταν ανάδευση. Μετά το πέρας των 15 min τα αφεψήματα φιλτράρονταν υπό κενό με χωνί Buchner σε διηθητικό χαρτί Whatman και ακολούθως το καθέ δείγμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL.

### **2.2.1. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους**

Με την τεχνική αυτή το φυτικό υλικό μαζί με την προκαθορισμένη ποσότητα του νερού τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων, που λειτουργεί σε συγκεκριμένη συχνότητα (35 MHz). Η εκχύλιση λαμβάνει μέρος σε θερμοκρασία μικρότερη των 30° C η οποία ελέγχεται ώστε να παραμένει σταθερή κατά την πειραματική διαδικασία.

### **2.3. Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη**

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των αφεψημάτων, που παρασκευάστηκαν και με τους τρεις τρόπους, με πετρελαϊκό αιθέρα. Κατά την τεχνική αυτή 100 mL του παραπάνω εκχυλίσματος έρχεται σε επαφή με τον όγκο του πετρελαϊκού αιθέρα στο

εσωτερικό εκχυλιστικής χοάνης η οποία ανακινείται καλά μέχρι να αναμειχθούν οι δύο φάσεις που αρχικά σχηματίστηκαν. Μετά την ανάμειξη επέρχεται έπειτα από μικρό χρονικό διάστημα η ισορροπία και διαχωρίζονται οι φάσεις. Κατόπιν, παραλαμβάνονται χωριστά οι δύο φάσεις με εκροή της κατώτερης στοιβάδας από το κάτω μέρος της χοάνης. Για την καλύτερη εκχύλιση των πτητικών συστατικών η τεχνική αυτή πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα, χρησιμοποιώντας κάθε φορά 33 mL από τον οργανικό διαλύτη (Ταραντίλης, 2008). Η φάση του πετρελαϊκού αιθέρα στη συνέχεια συμπυκνώθηκε με περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού (RVO 400 SP OECO, Germany) και ακολούθησε η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία. Στην υδατική φάση πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

#### **2.4. Λυοφιλίωση**

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης των αφεψημάτων με FT-IR χρειάστηκε πρώτα η μετατροπή των υγρών αφεψημάτων σε σκόνη. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της λυοφιλίωσης (VIRTIS 25 EL FREEMOBILE, USA) όπου ουσιαστικά είναι μία μέθοδος συντήρησης τροφίμων αλλά και φυτικού υλικού. Η λυοφιλίωση είναι η πιο ήπια μέθοδος συντήρησης καθώς δεν καταστρέφει τις προ εξέταση ουσίες. Κατά την τεχνική αυτή το φυτικό υλικό τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή που λειτουργεί υπό κενό, η επιφάνεια της οποίας διατηρείται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-60 έως -70° C), μετατρέποντας το νερό από την υγρή φάση στη στερεή. Στη συνέχεια, ο πάγος εξαχνώνεται και οι υδρατμοί από το κατεψυγμένο φυτικό υλικό μεταφέρονται γρήγορα στην ψυχρή επιφάνεια (Ταραντίλης, 2008). Κατά τη διαδικασία αυτή 100 mL από το αφέψημα τοποθετούνταν στα ειδικά γυάλινα δοχεία της λυοφιλίωσης. Μετά το πέρας 24 ωρών τα δείγματα αφαιρούνταν από τη συσκευή, τοποθετούνταν σε φιαλίδια και στη συνέχεια ζυγίζονταν.

## **2.5. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζων (GC-MS)**

Για την ανάλυση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων χρησιμοποιήθηκε η φάση του πετρελαϊκού αιθέρα που προήλθε από την εκχύλιση των αφεψημάτων των φυτών. Τα συστατικά αυτά των αφεψημάτων αναλύθηκαν με αέριο χρωματογράφο Hewlett Packard 5890 II ο οποίος ήταν εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη Rtx-5MS (30m X 0,25 mm, πάχος film 0,25 μm) και έναν ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών Hewlett Packard 5972 (70 eV). Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής δείγματος και στο φασματόμετρο μαζών ρυθμίστηκε στους 220 °C και στους 290 °C, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία της στήλης αρχικά παραμένει στους 50° C για 3 min, στη συνέχεια αυξάνεται βαθμιαία στους 180 °C με ρυθμό 3 °C/min και τελικά αυξάνεται στους 250° C με ρυθμό 15° C/min όπου παρέμεινε για 5 min. Ο ρυθμός ροής του ηλίου ήταν 1 mL/min. Δείγματα του 1μL εισήχθησαν χειροκίνητα με ένεση. Η αβέβαιη αναγνώριση των συστατικών βασίστηκε στη σύγκριση των σχετικών δεικτών συγκράτησης και των φασμάτων από το MS, με αυτών των βιβλιοθηκών Adams07, Wiley275, NBS75K με δεδομένα του συστήματος GC-MS και από δεδομένα της βιβλιογραφίας. Τα σχετικά % ποσοστά των συστατικών προκύπτουν ηλεκτρονικά από τα δεδομένα της % περιοχής.

## **2.6. Προετοιμασία αφεψημάτων με προσθήκη μελιού, γάλακτος και λεμονιού**

Ακολούθως εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα σε κοινά αφεψήματα καθώς και πως επηρεάζεται η ικανότητα αυτή σε περίπτωση προσθήκης μελιού, γάλακτος και λεμονιού. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν είναι το χαμομήλι, το μελισσόχορτο, το δενδρολίβανο, το φασκόμηλο και το τσάι Lipton. Για την παρασκευή των παραπάνω αφεψημάτων αρχικά 2g του φυτικού υλικού προστέθηκαν σε 150 mL ζεστού νερού θερμοκρασίας 85° C για 5 min, χρονικό διάστημα που θεωρείται κλασικό για την παρασκευή αφεψημάτων. Στη συνέχεια προστίθεται στο εκχύλισμα μία μερίδα (14 mL) συμπυκνωμένο γάλα χαμηλών λιπαρών ή 10 g μέλι ή 1mL χυμό από λεμόνι. Τέλος, προστίθεται ζεστό νερό μέχρι ο τελικός όγκος των αφεψημάτων να γίνει 200 mL

## 2.7. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS, DPPH)

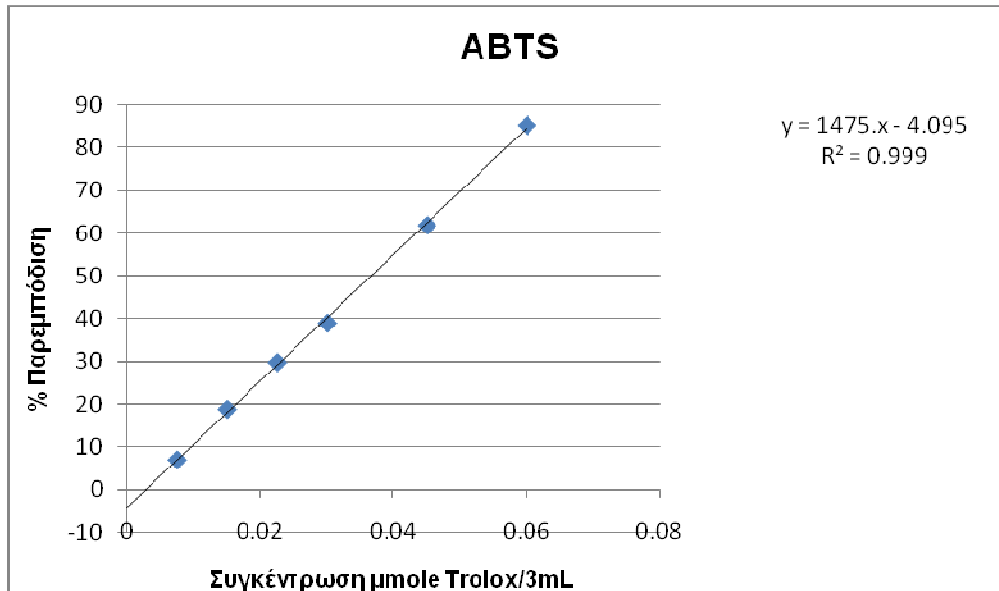
Σε όλα τα αφευρήματα που ετοιμάστηκαν καθώς και σε αυτά που προέρχονται από την υδατική φάση της εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα μετρήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με ABTS και DPPH. Το ABTS και το DPPH είναι δύο πολύ γνωστές ελεύθερες ρίζες που χρησιμοποιούνται στην αποτίμηση της παρεμποδιστικής ικανότητας και την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η παραδοσιακή μέθοδος του DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995) τροποποιήθηκε για τις ανάγκες της μελέτης αυτής. Αρχικά ετοιμάστηκε διάλυμα DPPH σε 80% αιθανόλη. Το διάλυμα αυτό (3,9 mL: απορρόφηση  $0,68 \pm 0,005$  στα 515 nm) προστέθηκε σε 0,1 mL δείγματος. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια των 20 mL σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους για 30 min. Ακολούθως μετράται η απορρόφηση όλων των δειγμάτων με φωτόμετρο σε μήκος κύματος 515 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (ανάλογο της βιταμίνης E).

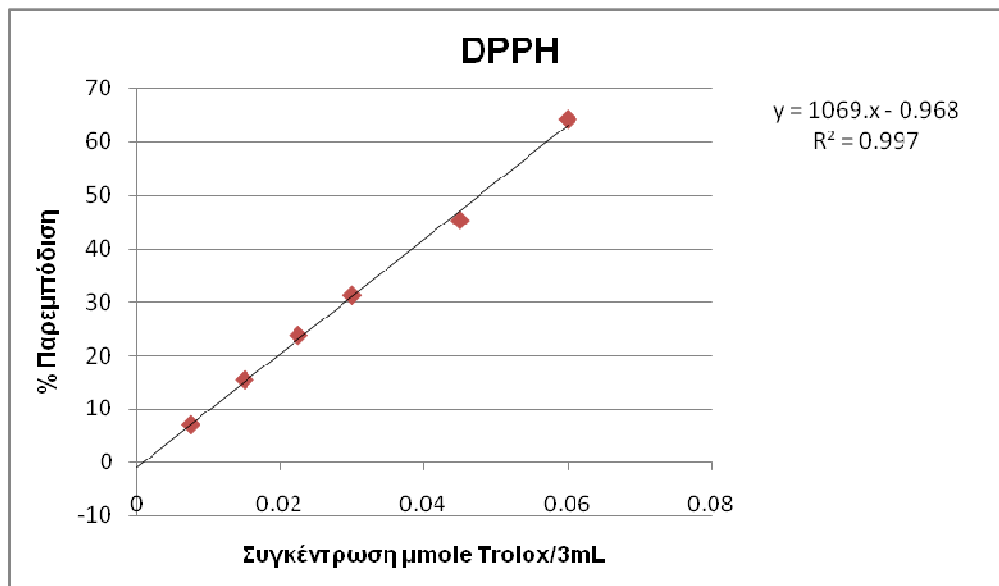
Για την παρασκευή του ABTS, η ουσία διαλύεται σε δις απιονισμένο νερό που βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η ρίζα του ABTS παρασκευάζεται από την αντίδραση 7 mM ABTS με 2,45 mM υπερσουλφιδικό κάλιο ( $K_2S_2O_8$ ) και το μίγμα παραμένει σε συνθήκες σκότους για 12-16 ώρες πριν από τη χρήση. Λόγω του ότι το ABTS και το  $K_2S_2O_8$  αντιδρούν στοιχειομετρικά σε αναλογία 1:0,5, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ημιτελή οξείδωση του ABTS. Η οξείδωση του ABTS ξεκινά αμέσως, αλλά η απορρόφηση δεν είναι μέγιστη και σταθερή μέχρι να περάσουν 6 min. Το διάλυμα της ρίζας του ABTS διαλύεται σε αιθανόλη 80% με απορρόφηση  $0,70 \pm 0,005$  στα 734 nm. Στη συνέχεια 3 mL από το παραπάνω δείγμα αναμιγνύονται καλά με 30  $\mu$ L από το εξεταζόμενο δείγμα και τοποθετούνται σε κλίβανο που διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία στους 30° C. Μετά από χρονικό διάστημα 6 min μετριέται η απορρόφηση με φωτόμετρο στα 734 nm. Και στην περίπτωση του ABTS τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (Cai *et al.*, 2006).

Για τις δύο αυτές μεθόδους μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρασκευάζονται πρότυπες καμπύλες αναφοράς με μέτρηση της απορρόφησης διαλύματος DPPH και

ABTS με διαφορετικές συγκεντρώσεις Trolox (Σχήματα 2.7.1 και 2.7.2). Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν 0,0075, 0,015, 0,225, 0,03, 0,045, 0,06  $\mu\text{g}$  Trolox/ 3 mL.



Σχήμα 2.7.1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την αντιοξειδωτική ικανότητα (ABTS).



Σχήμα 2.7.2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH).

Η παρεμπόδιση κάθε φορά δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\%Π = \frac{A_C - A_S}{A_S} \times 100$$

Όπου  $A_C$  : η απορρόφηση του τυφλού και

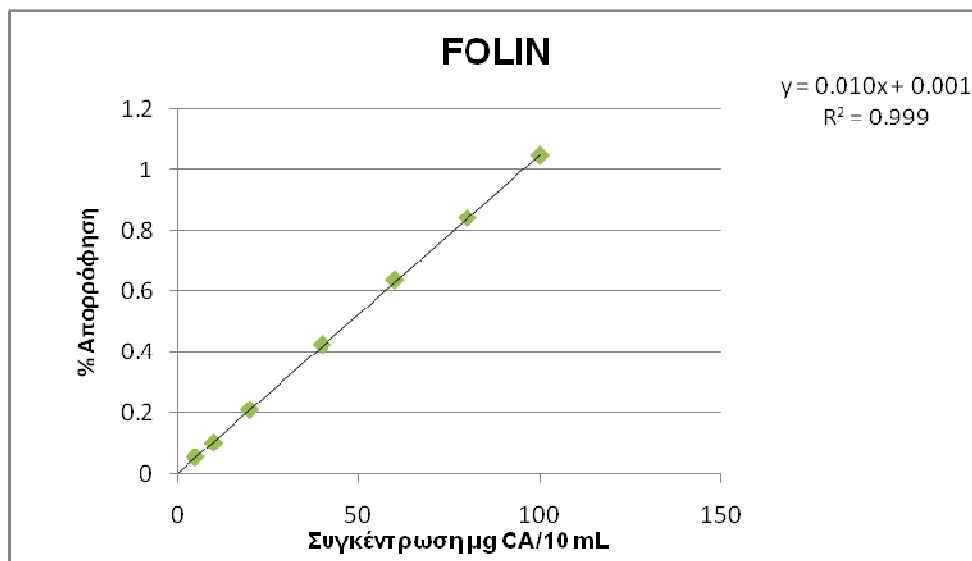
$A_S$ : η απορρόφηση του δείγματος.

## 2.8. Μέτρηση φαινολικών συστατικών

Για τη μέτρηση των φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα διάφορα αφεψήματα που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Κατά τη μέθοδο αυτή, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, 6 mL απιονισμένο νερό, 100  $\mu$ L απο το εξεταζόμενο δείγμα και 500  $\mu$ L από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, τα οποία αναδεύονται καλά. Μετά από 3 min προστίθενται 1,5 mL ανθρακικό ασβέστιο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) και συμπληρώνεται νερό μέχρι τα 10 mL. Μετά από διάστημα 2 h μετριέται η απορρόφηση με φωτόμετρο στα 725 nm.

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα καφεϊκού οξέος (1 mg/mL) και ακολούθως με αραίωση παρασκευάζονται οι επιθυμητές συγκεντρώσεις για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης (Σχήμα 2.8.1). Οι τελικές συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων είναι 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ g καφεϊκού οξέος/10 mL. Στη συνέχεια ακολουθείται η πειραματική πορεία όπως περιγράφεται παραπάνω.





**Σχήμα 2.8.1:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τα ολικά φαινολικά συστατικά (Folin-Ciocalteu).

## 2.9. Φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)

Για την παραλαβή των φασμάτων IR χρησιμοποιήθηκαν τα λυοφιλωμένα δείγματα όλων των εκχυλισμάτων τα οποία αναλύθηκαν με την τεχνική DRIFT. Σε αυτή την τεχνική μικρή ποσότητα δείγματος τοποθετείται σε ειδικό μικροϋποδοχέα όπου κάθε δείγμα συλλέγεται και καταγράφεται τρεις φορές. Το φασματόμετρο υπερύθρου που χρησιμοποιήθηκε είναι Thermo Nicolet 7600 και συνοδεύεται με το λογισμικό Omnic 7.1 για την επεξεργασία του δείγματος.

## 2.10. Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για την ανάλυση των υδατοδιαλυτών συστατικών καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ροσμαρινικού οξέος που είναι άφθονο στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* και κυρίως στο μελισσόχορτο, του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης καθώς και της καφεΐνης στο τσάι Lipton, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε χρωματογράφος 1100 Agilent HPLC

Chemstation, με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού UV-Vis μεταβαλλόμενου μήκους κύματος Diode-Array Detector (DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP ChemStation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ανεστραμμένης φάσης (reversed-phase) HPLC όπου η κινητή φάση ήταν μη πολική. Για την κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός δύο διαλυτών, δις απιονισμένο και φιλτραρισμένο νερό (pH 2,5) που ρυθμίζεται με μυρμηγκικό οξύ (formic acid) και μεθανόλη υψηλής καθαρότητας (99,9%) για HPLC. Η ροή κινητής φάσης ρυθμίζεται ώστε να ξεκινήσει με αναλογία 25% μεθανόλη και 75% νερό (pH: 2,5 ) με σταθερή ροή 0,400 mL /min. Η πίεση κυμαινόταν από 25-70 bar. Η στατική φάση αποτελείται από SUPELCO (DISCOVERY HS C18) με πορώδες 5μm, μήκος 250 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm.

Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία. Αυτό έγινε με στόχο να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με ειδική σύριγγα HPLC και ο όγκος εισαγωγής ήταν 20 μL (injection volume 20 μL). Το πρόγραμμα έκλουσης της στήλης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.10.1)

**Πίνακας 2.10.1:** Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε.

Χρόνος (Min)	Μεθανόλη %	νερό (pH 2,5 )[%]
0	25	75
2	25	75
40	90	10

Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 260, 280 και 330 nm για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πρότυπων διαλυμάτων. Για τον εντοπισμό ουσιών έγινε σύγκριση με χρωματογράφημα μεμονωμένου πρότυπου των παρακάτω ενώσεων. Το

χρωματογραφήματα του πρότυπου λήφθηκε με τον ίδιο τρόπο των άγνωστων, χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους (χρόνους, συγκεντρώσεις διαλυτών κινητής φάσης).

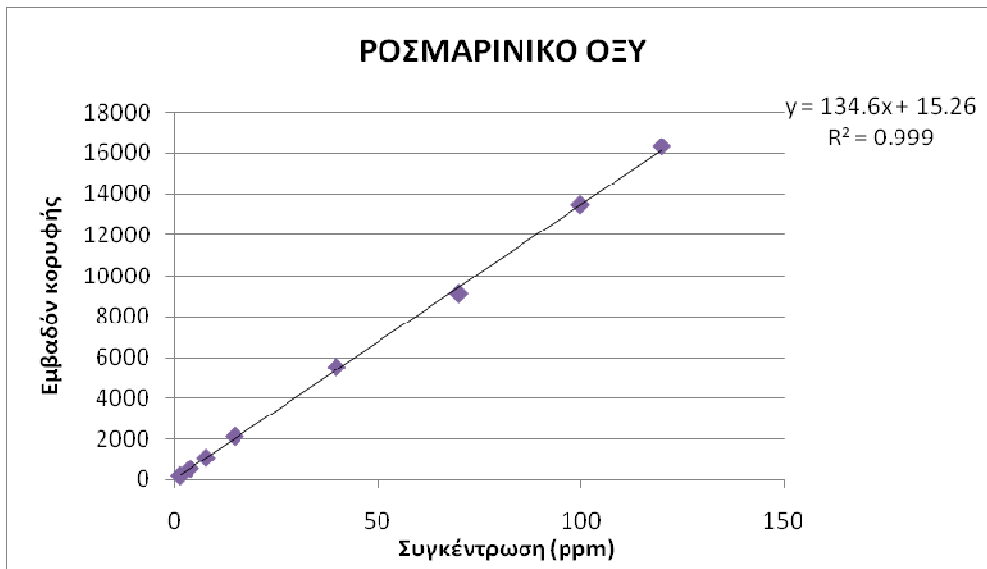
Τα πρότυπα διαλύματα του ροσμαρινικού, του καφεϊκού, του γαλλικού, του φερουλικού, του συριγγικού, του βανιλλικού, του p-κουμαρικού, του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης, της κερκετίνης, της καμπερόλης και της λουτεολίνης, όπως και της κατεχίνης, επικατεχίνης, επικατεχίνης του γαλλικού οξέος και της επιγαλλοκατεχίνης του γαλλικού οξέος που δημιουργήθηκαν για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών συστατικών των αφεψημάτων ετοιμάστηκαν με μεθανόλη και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση τους. Τα διαλύματα τα οποία τελικά εισήχθησαν στον χρωματογράφο αραιώθηκαν με την κινητή φάση.

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε κατά την χρωματογραφική ανάλυση ήταν τα λυοφιλωμένα αφεψήματα που προήλθαν από την εκχύλιση όλων των φυτών καθώς και του τσαγιού Lipton με το ζεστό νερό σε θερμοκρασία  $85^{\circ}\text{C}$ . Το φυτικό υλικό διαλύθηκε στην κινητή φάση μέχρι η συγκέντρωση να γίνει 2000 ppm και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα.

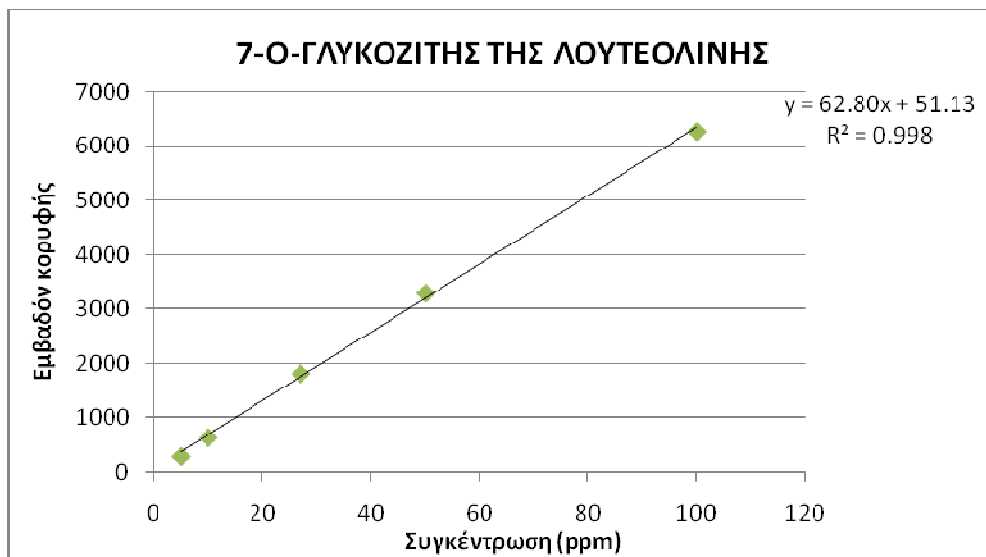
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ροσμαρινικού οξέος πραγματοποιήθηκαν ενέσεις πρότυπου διαλύματος σε διάφορες συγκεντρώσεις 1,5, 4, 8, 15, 40, 70, 100 και 120 ppm. Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων, δημιουργείται πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 2.10.1) στην οποία παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων του ροσμαρινικού οξέος και του εμβαδού των κορυφών των χρωματογραφημάτων τους που αντιστοιχούν στην % περιεκτικότητα του ροσμαρινικού οξέος. Από την εξίσωση της καμπύλης που δημιουργείται, βρίσκεται η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

Κατά τον ίδιο τρόπο πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός και για τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης καθώς εμφανίζεται πολύ συχνά σε αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Τα πρότυπα διαλύματα της παραπάνω ένωσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε συγκεντρώσεις 5, 10, 27, 50 και 100 ppm ενώ, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της καφεΐνης που ενδεχομένως να υπάρχει στα αφεψήματα οι

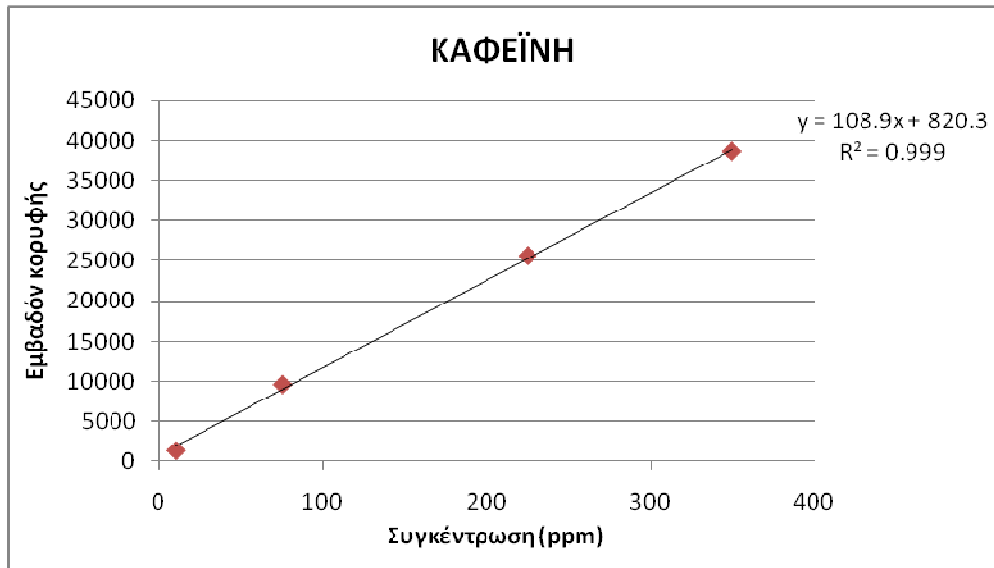
συγκεντρώσεις που αναλύθηκαν ήταν 10, 75, 225 και 350 ppm. Οι πρότυπες καμπύλες του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και της καφεΐνης παρουσιάζονται στα Σχήματα 2.10.2 και 2.10.3.



**Σχήμα 2.10.1:** Καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων του ροσμαρινικού οξέος.



**Σχήμα 2.10.2:** Καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης.



**Σχήμα 2.10.3:** Καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων της καφεΐνης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 3.1. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Κατά την πειραματική διαδικασία προσδιορίστηκε ο αριθμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα διάφορα αφεψήματα που παρασκευάστηκαν καθώς και σε αυτά που προέκυψαν από την υδατική φάση της εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL όπου αναφέρεται στην ποσότητα αφεψήματος που αντιστοιχεί σε μία κούπα, δηλαδή την ποσότητα των φαινολικών συστατικών που λαμβάνει ο ανθρώπινος οργανισμός, ύστερα από την κατανάλωση μίας κούπας αφεψήματος. Η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος σε περιοχές συγκεντρώσεων 0-100 mg/10 mL. Η καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 2.8.1) που χρησιμοποιήθηκε για τον παραπάνω ποσοτικό προσδιορισμό είναι η ακόλουθη:

$$y = 0,010x + 0,001$$

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των διαφόρων αφεψημάτων από τα αρωματικά φυτά καθώς και από το τσάι Lipton, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1. και κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 8,5 και 197,0 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL. Συγκεκριμένα, για τα αφεψήματα που προέρχονται από την εκχύλιση με ζεστό νερό, οι τιμές των φαινολικών συστατικών κυμάνθηκαν από 28,5 έως 197,0 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL, για αυτά που προήλθαν από την εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία δωματίου από 8,3 έως 135,8 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL ενώ, οι τιμές αυτών που προήλθαν από την εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων από 10,2 έως 160,2 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων της υδατικής φάσης οι τιμές κυμάνθηκαν από 27,1 έως 185,9 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL όταν χρησιμοποιήθηκε ζεστό νερό, από 8,7 έως 118,8 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL για την περίπτωση της εκχύλισης με νερό σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος από 8,5 έως 114,8 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL στην περίπτωση που

χρησιμοποιήθηκαν υπέρηχοι. Όλες οι μέγιστες τιμές αναφέρονται στο μελισσόχορτο από την Ελλάδα και όλες οι ελάχιστες αναφέρονται στο δενδρολίβανο και στο χαμομήλι.

Το μελισσόχορτο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ένα φυτό που περιέχει μεγάλες ποσότητες ροσμαρινικού οξέος, που είναι και το κύριο φαινολικό συστατικό που διαθέτει (Dastmalchu *et al.*, 2008, Carnat *et al.*, 1998, Zgorcka *et al.*, 2006, Ziakova *et al.*, 2002, 2003). Το ροσμαρινικό οξύ υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες και στο δενδρολίβανο, όμως η παραλαβή μεγάλης ποσότητας φαινολικών συστατικών με νερό είναι δύσκολη και δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο λόγω των πολύ σκληρών φύλλων που διαθέτει εμποδίζοντας την εκχύλιση ακόμα περισσότερων συστατικών. Επίσης, από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι όταν χρησιμοποιείται ζεστό νερό παραλαμβάνεται πολύ μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα φαινολικά που παραλαμβάνονται από τους υπερήχους ενώ, ακόμα λιγότερη ποσότητα παραλαμβάνεται στην τρίτη περίπτωση, συχνά με μικρή διαφορά από την περίπτωση των υπερήχων. Τέλος, από τα αρχικά αφεψήματα παραλαμβάνεται μεγαλύτερη ποσότητα με όλους τους τρόπους εκχύλισης που όμως είναι συγκρίσιμα, χωρίς έντονες διαφορές.

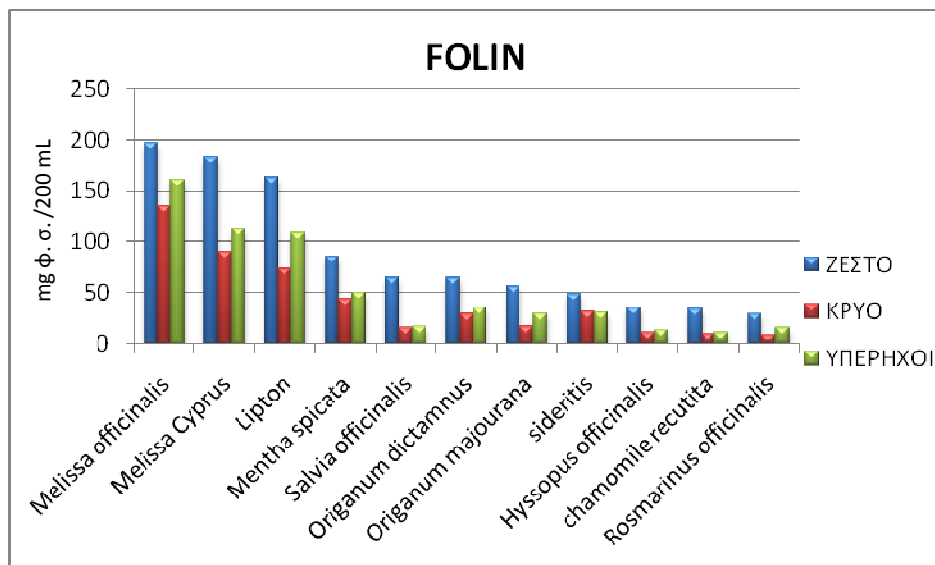
**Πίνακας 3.1.1:** Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των ολικών φαινολικών συστατικών που παρελήφθησαν με τη μεθοδο Folin-Ciocalteu.

Φυτικό υλικό	Αφεψήματα*			Αφεψήματα μετά από εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα*		
	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό
Μελισσόχορτο	135,8	160,2	197,0	118,8	114,8	185,9
Μελισσόχορτο Cyp	90,1	112,7	183,0	91,5	131,7	177,7
Χαμομήλι	9,5	10,2	33,4	8,7	8,5	29,6
Τσάι του βουνού	31,2	31,4	48,1	28,9	29,7	45,6
Ματζουράνα	17,2	29,2	56,3	18,6	20,9	50,8
Δυόσμος	43,7	50,4	85,2	42,1	49,3	82,9
Δενδρολίβανο	8,3	14,9	28,5	8,8	13,6	27,1
Φασκόμηλο	15,5	16,9	64,5	15,5	28,0	61,8
Δίκταμος	28,7	34,5	63,9	27,9	32,9	51,3
Ύσσωπος	10,7	13,1	34,9	10,4	15,0	31,7
Τσάι Lipton	73,4	109,2	162,6	72,8	106,4	158,8

\* mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL (κούπα)

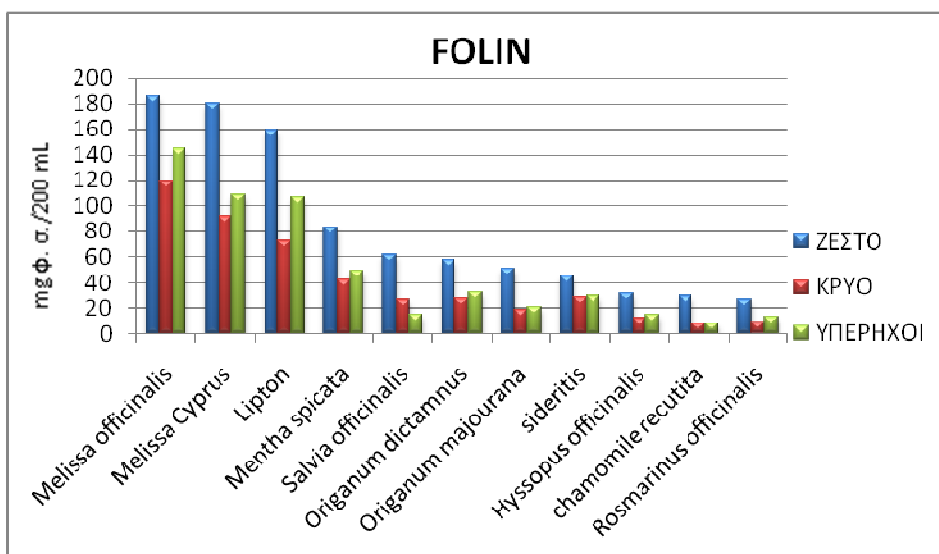
Η σειρά κατάταξης των αφεψημάτων ανάλογα με τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των ολικών φαινολικών συστατικών όπως παρουσιάζονται και στα

παρακάτω ραβδογράμματα (Σχήματα 3.1.1 και 3.1.2) είναι κατά ελλατώμενη σειρά για τις περιπτώσεις του ζεστού εκχυλίσματος: μελισσόχορτο Ελλάδας, μελισσόχορτο Κύπρου, τσάι Lipton, δυόσμος, φασκόμηλο, δίκταμος, ματζουράνα, τσάι του βουνού, ύσσωπος, χαμομήλι και δενδρολίβανο. Όταν η εκχύλιση πραγματοποιείται με υπερήχους η ελλατώμενη σειρά της περιεκτικότητας των ολικών φαινολικών συστατικών των αφεψημάτων είναι: μελισσόχορτο Ελλάδας, μελισσόχορτο Κύπρου, τσάι Lipton, δυόσμος, δίκταμος, τσάι του βουνού, ματζουράνα, φασκόμηλο, δενδρολίβανο, ύσσωπος, χαμομήλι, ενώ τα αποτελέσματα της εκχύλισης με νερό σε θερμοκρασία δωματίου ήταν: μελισσόχορτο Ελλάδας, μελισσόχορτο Κύπρου, τσάι Lipton, δυόσμος, τσάι του βουνού, δίκταμος, ματζουράνα φασκόμηλο, ύσσωπος, χαμομήλι και δενδρολίβανο. Από τα παραπάνω παρατηρείται ότι τα φυτά με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά για όλους τους τρόπους εκχύλισης είναι τα ίδια, ενώ οι διαφοροποιήσεις υπάρχουν στα φυτά με τη μικρότερη περιεκτικότητα. Ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα παρατηρούνται και για τα εκχυλίσματα στα οποία έγινε η κατεργασία με τον οργανικό διαλύτη.



**Σχήμα 3.1.1:** Σύγκριση των τριών τρόπων εκχύλισης των αφεψημάτων με βάση τα ολικά φαινολικά συστατικά (Folin-Ciocalteu).





**Σχήμα 3.1.2:** Σύγκριση των τριών τρόπων εκχύλισης των αφεψημάτων που προέρχονται από την υδατική φάση του πετρελαϊκού αιθέρα με βάση τα ολικά φαινολικά συστατικά (Folin-Ciocalteu) .

Αντίστοιχα αποτελέσματα σε ένα άλλο είδος μελισσόχορτου (*Melissa folium*) παρουσίασαν και οι Katalinic *et al.* (2006) καθώς βρήκαν ότι το φυτό αυτό έχει τη μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών, σε σχέση με τα υπόλοιπα βότανα που εξέτασαν και προέρχονταν από διάφορες οικογένειες φυτών. Άλλη έρευνα μεταξύ των φυτών χαμομήλι, μελισσόχορτο και τσάι του βουνού έδειξε και αυτή ότι το μελισσόχορτο έχει σχεδόν έξι φορές μεγαλύτερη ποσότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά σε σχέση με τα άλλα δύο φυτά που μελετήθηκαν (Ivanova *et al.*, 2005). Η ίδια σειρά ταξινόμησης παρατηρείται και στα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα σε διαφορετικό βέβαια ποσοστό, όπως ήταν και αναμενόμενο, καθώς τα επιμέρους συστατικά των φυτών και κατ' επέκταση και των αφεψημάτων επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες κυρίως περιβαλλοντικούς. Τα πειράματα των Chan *et al.* (2010) που αφορούσαν σε διάφορα φυτά και εμπορικά σκευάσματα έδειξαν ότι το τσάι Yellow Label, που στην προκειμένη περίπτωση είναι το τσάι Lipton, έχει σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα από το δυόσμο ενώ, και το χαμομήλι έχει σχετικά μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία ξεπερνάει κατά πολύ τις τιμές που μετρήθηκαν για την

περίπτωση του δενδρολίβανου. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς οι διάφορες τιμές που μετρήθηκαν για τα δύο φυτά ήταν σχεδόν ίδιες με μικρές διαφοροποιήσεις. Ίδια περίπου κατάταξη όπως και παραπάνω παρατηρείται και σε άλλες έρευνες καθώς έχει βρεθεί ότι το φασκόμηλο έχει μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών από το τσάι του βουνού, ενώ ο δίκταμος και το χαμομήλι έχουν σχεδόν την ίδια, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την πειραματική διαδικασία, καθώς η διαφορά της περιεκτικότητας σε φαινολικά μεταξύ δίκταμου και χαμομηλιού είναι αρκετά μεγάλη (Atoui *et al.*, 2005). Σε περίπτωση παραλαβής του δείγματος με άλλο τρόπο, όπως για παράδειγμα με υδροαπόσταξη, τα αποτελέσματα διαφέρουν αρκετά καθώς φαίνεται ότι το δενδρολίβανο έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά από το φασκόμηλο, κάτι που σημαίνει ότι το δενδρολίβανο είναι πιθανό να έχει υψηλό φαινολικό περιεχόμενο άλλα λόγω της φυσιολογίας του φυτού είναι αρκετά δύσκολο να εκχυλιστούν τα συστατικά αυτά μόνο με ζεστό νερό και για 15 min. Διαφορετικά είναι και τα αποτελέσματα από την εκχύλιση φυτών με διαλύτη καθώς η ματζουράνα παρουσιάζεται να έχει δέκα φορές μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά από το μελισσόχορτο, ενώ και το δενδρολίβανο παρουσιάζεται να έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα από το μελισσόχορτο (Dorman *et al.*, 2003). Τέλος, οι Wojdyło *et al.* (2007) έδειξαν ότι το μελισσόχορτο έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά από το φασκόμηλο και το δενδρολίβανο, όχι όμως και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι το μελισσόχορτο παρουσιάζει μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά καθώς τα δύο είδη του φυτού αυτού που εξετάστηκαν, αν και συγκομίστηκαν σε διαφορετικές περιοχές, είναι αυτά με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα. Η μικρότερη περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών σχεδόν πάντα εμφανίζεται στα εκχυλίσματα του δενδρολίβανου και του χαμομηλιού. Ο τρόπος εκχύλισης φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά την εκχύλιση των συστατικών αυτών αφού παρατηρούνται έντονες διαφορές μεταξύ του ζεστού εκχυλίσματος ενώ, οι άλλοι δύο τρόποι έχουν παρόμοιες μετρήσεις, με την εκχύλιση με υπερήχους να υπερέχει σε μικρό βαθμό. Ακόμα, τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και από την εξέταση των δειγμάτων της υδατικής φάσης του οργανικού διαλύτη. Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των

αφεψημάτων και των εκχυλισμάτων που προέρχονται από την υδατική φάση του πετρελαϊκού αιθέρα που όμως είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους.

### **3.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH**

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφεψημάτων με τη μέθοδο DPPH εκφράζονται σε  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$  (κούπα). Η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 2.7.2) του Trolox σε περιοχές συγκεντρώσεων 7,5-60  $\mu\text{mole Trolox}/3 \text{ mL}$  η εξίσωση της οποίας είναι η ακόλουθη:

$$y = 1069x - 0.968$$

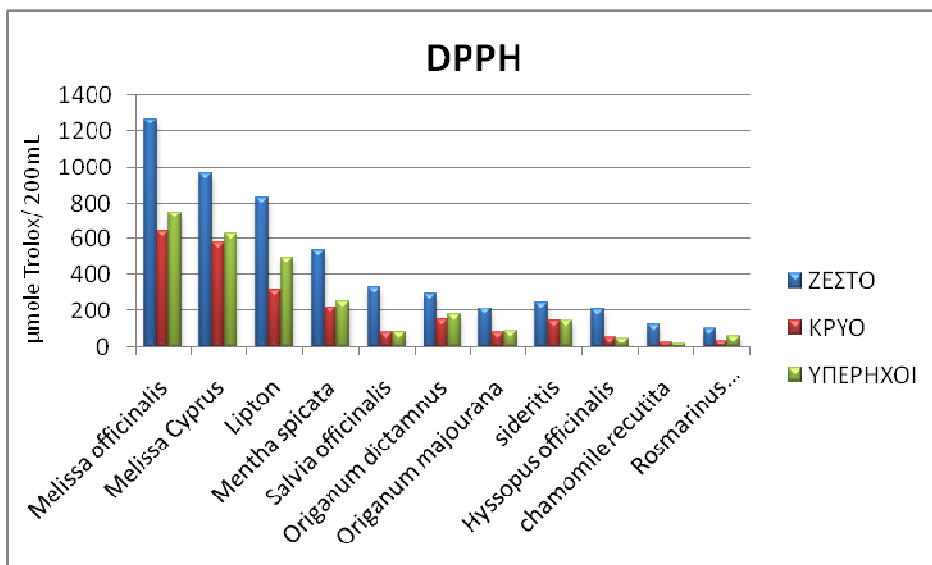
Τα αποτελέσματα από την παραπάνω ανάλυση παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.1 και κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 23,2 και 1266,3  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ . Συγκεκριμένα, τα αφεψήματα που προέρχονται από το ζεστό νερό κυμαίνονται από 100,4 έως 1266,3  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ , τα εκχυλίσματα σε θερμοκρασία δωματίου από 28,3 έως 644,5  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$  και αυτά που προέρχονται από του υπερήχους κυμαίνονται από 20,8 έως 750,0  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ . Στις περιπτώσεις των εκχυλισμάτων της υδατική φάση οι τιμές είναι 98,0 έως 1240,0  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ , 24,4 έως 605,4 και τέλος, 23,2 έως 672,3  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ , αντίστοιχα. Όλα τα μέγιστα και στη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αναφέρονται στο μελισσόχορτο από την Ελλάδα και τα ελάχιστα στο χαμομήλι και το δενδρολίβανο.

**Πίνακας 3.2.1:** Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH.

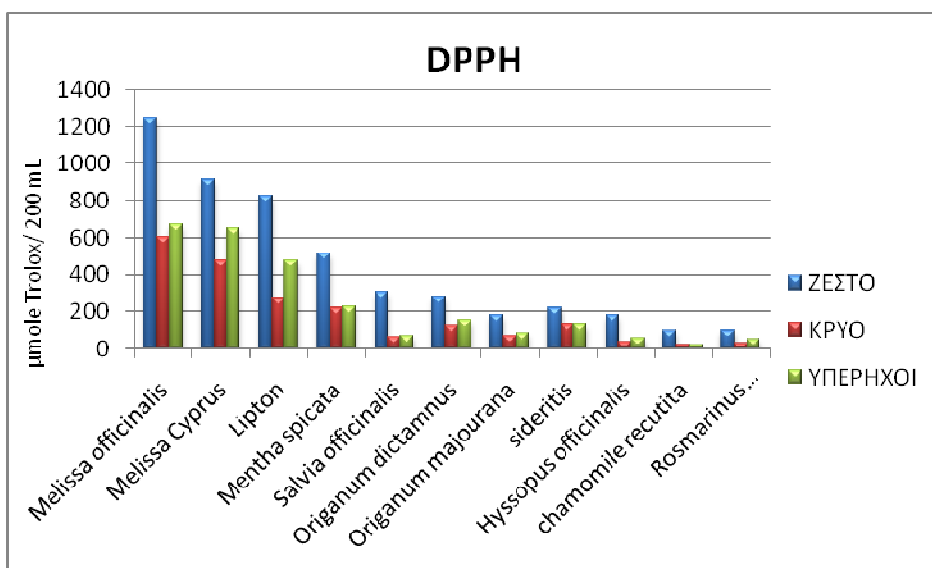
Φυτικό υλικό	Αφεψήματα*			Αφεψήματα μετά από εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα*		
	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό
Μελισσόχορτο	644,5	752,7	1268,3	605,4	672,3	1240,0
Μελισσόχορτο Cyp	584,3	629,9	961,2	478,8	649,3	911,5
Χαμομήλι	28,3	20,8	124,5	24,4	23,2	98,0
Τσάι του βουνού	145,8	140,4	244,4	132,6	132,6	216,8
Ματζουράνα	79,4	86,9	211,8	73,0	82,9	182,6
Δυόσμος	218,7	256,0	538,0	202,3	224,6	518,8
Δενδρολίβανο	35,1	57,0	100,4	30,3	49,8	102,2
Φασκόμηλο	77,7	83,7	328,2	66,3	68,6	306,9
Δίκταμος	153,5	177,0	299,7	123,7	155,5	227,7
Ύσσωπος	51,5	49,7	206,4	39,2	55,7	182,5
Τσάι Lipton	316,6	496,6	831	275,4	473,4	828,8

\*  $\mu\text{mole Trolox} / 200\text{mL}$  (κούπα)

Η ελλατώμενη σειρά κατάταξης των αφεψημάτων ανάλογα με τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως παρουσιάζονται και στα παρακάτω ραβδογράμματα (Σχήματα 3.2.1 και 3.2.2) είναι για την περίπτωση του ζεστού εκχυλίσματος: μελισσόχορτο Ελλάδας, μελισσόχορτο Κύπρου, τσάι Lipton, δυόσμος, φασκόμηλο, δίκταμος, τσάι του βουνού, ματζουράνα, ύσσωπος, δενδρολίβανο και χαμομήλι. Στις δύο άλλες περιπτώσεις η ελλατώμενη σειρά είναι η εξής: μελισσόχορτο Ελλάδας, μελισσόχορτο Κύπρου, τσάι Lipton, δυόσμος, δίκταμος, τσάι του βουνού, ματζουράνα, φασκόμηλο, δενδρολίβανο, ύσσωπος και χαμομήλι με τη διαφορά ότι στο κρύο εκχύλισμα ο ύσσωπος έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το δενδρολίβανο. Επίσης, τα αποτελέσματα της ικανότητας αυτής μετά την εκχύλιση με τον διαλύτη έχουν μικρές διαφορές από τα προηγούμενα. Οι διαφορές αυτές παρατηρούνται κυρίως στα φυτά με τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.



**Σχήμα 3.2.1:** Σύγκριση των τριών τρόπων εκχύλισης των αφεψημάτων με βάση την αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH).



**Σχήμα 3.2.2:** Σύγκριση των τριών τρόπων εκχύλισης των αφεψημάτων που προέρχονται από την υδατική φάση του πετρελαϊκού αιθέρα με βάση την αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH).

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας σχετίζονται με τις τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών καθώς τα αποτελέσματα είναι αντίστοιχα. Οι διαφορές που παρατηρούνται είναι στις χαμηλότερες τιμές οι οποίες ανήκουν κατά κύριο λόγο στο χαμομήλι και όχι στο δενδρολίβανο όπως στην προηγούμενη περίπτωση. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην απουσία ροσμαρινικού οξέος από το χαμομήλι καθώς είναι φαινολικό συστατικό που βρίσκεται κατά κύριο λόγο στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμπίπτουν και με τη μελέτη των Chan *et al.* (2010) καθώς βρήκαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτών κατά μειούμενη σειρά είναι: τσάι που υπάρχει στο εμπόριο, δυόσμος, δενδρολίβανο και χαμομήλι, με τη διαφορά ότι το χαμομήλι έχει αρκετά μικρότερη ικανότητα από το δενδρολίβανο, παρόλο που η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με ζεστό νερό. Επίσης, παρόμοια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Atoui *et al.* (2005) έδειξε ότι το χαμομήλι και το τσάι του βουνού έχουν χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, ακολουθεί το φασκόμηλο ενώ, τη μεγαλύτερη από όλα τα εκχυλίσματα την έχει ο δίκταμος. Τα παραπάνω αποτελέσματα διαφέρουν σημαντικά από τα αποτελέσματα μίας έρευνας που πραγματοποιήθηκε στη Βραζιλία, καθώς παρατηρήθηκε ότι το μελισσόχορτο έχει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το χαμομήλι ενώ, όταν κατά την εκχύλιση χρησιμοποιούνται φρέσκα φύλλα μελισσόχορτου η διαφορά γίνεται μεγαλύτερη. Το αντίθετο συνέβη κατά τη μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu καθώς το μελισσόχορτο διαθέτει πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά από το χαμομήλι αλλά ακόμα και από το μαύρο και το πράσινο τσάι (Moraes-de-ouza *et al.*, 2008). Ακόμα, οι Wojdyło *et al.* (2007) αναφέρουν ότι το φυτό με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα είναι το δενδρολίβανο και ακολουθούν το μελισσόχορτο και το φασκόμηλο με πολύ μεγάλη διαφορά από το πρώτο, αποτελέσματα τα οποία δε συνάδουν με αυτά που παρατηρήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH είναι σχεδόν όμοια με τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu με μικρές διαφορές κυρίως στα φυτά με τις μικρότερες μετρήσεις. Και σε αυτή την περίπτωση τα δείγματα του μελισσόχορτου έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ, η μικρότερη παρουσιάζεται στο χαμομήλι και στο δενδρολίβανο. Κατά

την εκχύλιση με ζεστό νερό στους 85°C παρατηρείται η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα που μειώνεται αρκετά με τη χρήση των άλλων τρόπων εκχύλισης που επιλέχθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία. Ακολουθούν τα αφεψήματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν οι υπέρηχοι και τέλος τα κρύα αφεψήματα με μοναδικές εξαιρέσεις την περίπτωση του αφεψήματος χαμομηλιού και του ύσσωπου όπου στο κρύο αφεψήμα παρατηρούνται λίγο μεγαλύτερες τιμές.

### 3.3. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του ABTS εκφράζεται και πάλι σε  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$  (κούπα) όπως ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το DPPH. Η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε με καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 2.7.1) του Trolox σε συγκεντρώσεις 7,5-60  $\mu\text{mole Trolox}/3 \text{ mL}$ . Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε είναι:

$$y = 1475x - 4,095$$

Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως μετρήθηκαν με την παραπάνω μέθοδο παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.1. Τα αποτελέσματα κυμαίνονται από 8,3 έως 1321,7  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ . Αναλυτικότερα, τα αφεψήματα που προήλθαν από την εκχύλιση με ζεστό νερό είχαν πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα που κυμάνθηκε από 28,5 -1321,7  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ , στην περίπτωση της χρήσης του νερού σε θερμοκρασία δωματίου οι τιμές ήταν από 8,3 -767,3  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$  και στην εκχύλιση με υπερήχους οι τιμές ήταν από 14,9 -871,8  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ . Αντίστοιχα, οι τιμές που παρατηρούνται στην υδατική φάση κατά την εκχύλιση με οργανικό διαλύτη ήταν 13,6 -1319,5  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ , 8,8 -684,3  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$  και τέλος, 49,4 -835,4  $\mu\text{mole Trolox}/200 \text{ mL}$ . Όπως και προηγουμένως τα δύο είδη μελισσόχορτου είναι αυτά που έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και μάλιστα με αρκετή διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης, παρατηρείται ότι όταν χρησιμοποιείται ζεστό νερό για την παραλαβή των διάφορων συστατικών με αντιοξειδωτική ικανότητα, η ικανότητα αυτή είναι αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με τις άλλες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.

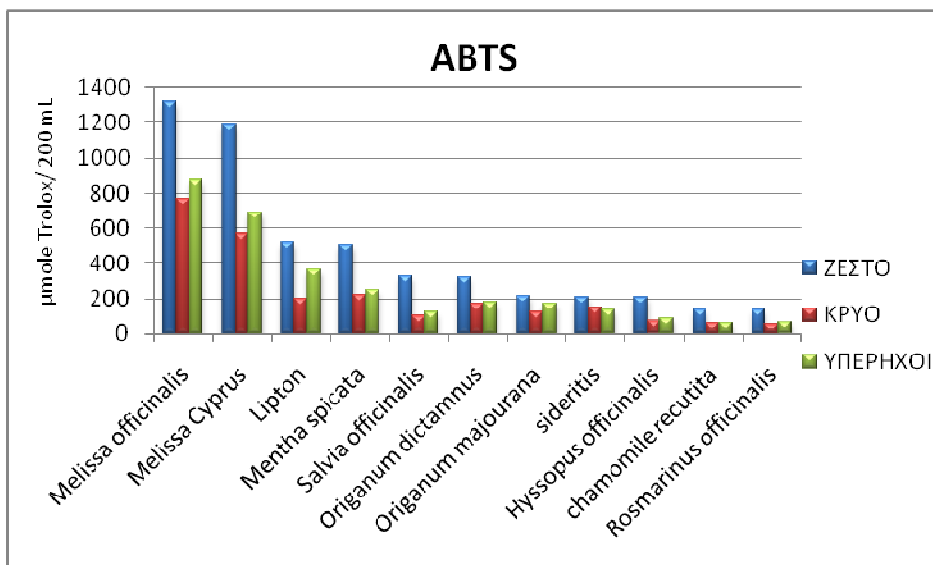
**Πίνακας 3.3.1:** Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS.

Φυτικό υλικό	Αφεψήματα*			Αφεψήματα μετά από εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα*		
	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό
Μελισσόχορτο	767,3	871,8	1321,7	684,3	835,4	1319,5
Μελισσόχορτο Cyp	591,2	689,5	1186,2	539,7	714,5	1103,9
Χαμομήλι	61,8	61,4	135,8	56,6	49,4	121,7
Τσάι του βουνού	148,8	133,8	208,6	137,6	126,5	200,7
Ματζουράνα	118,4	172,3	215,6	124,1	157,7	230,9
Δυόσμος	221,7	253,3	504,3	223,5	214,1	479,0
Δενδρολίβανο	8,3	14,9	28,5	8,8	13,6	27,1
Φασκόμηλο	99,2	123,1	326,1	89,6	107,9	323,1
Δίκταμος	169,5	179,6	321,0	139,1	160,3	312,0
Ύσσωπος	69,6	85,2	206,8	71,0	86,1	190,16
Τσάι Lipton	439,4	559,5	920,3	349,9	504,2	828,1

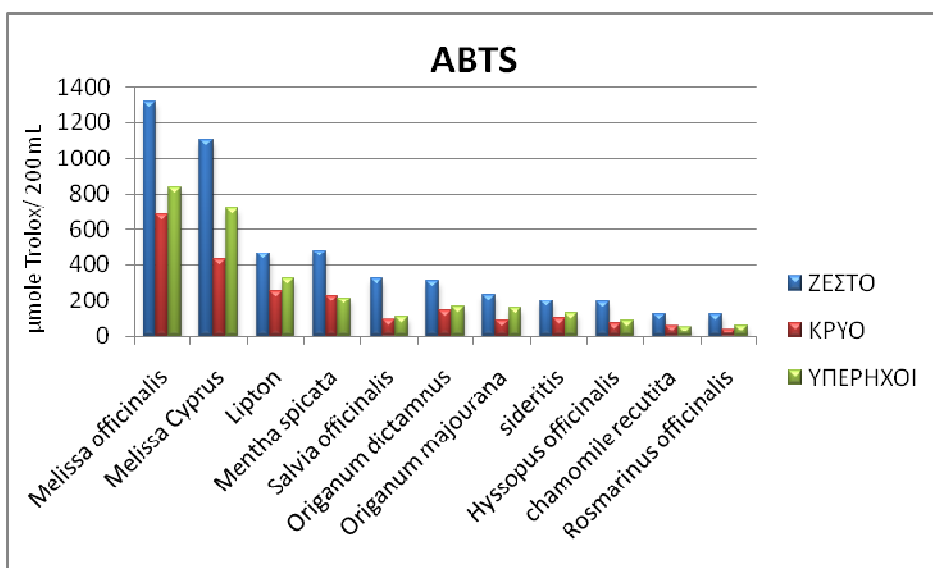
\* $\mu\text{mole Trolox/ 200mL}$  (κούπα)

Η σειρά κατάταξης των αφεψημάτων ανάλογα με τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως παρουσιάζονται και στα παρακάτω ραβδογράμματα (Σχήματα 3.3.1 και 3.3.2) ήταν κατά ελλατώμενη σειρά για την περίπτωση του ζεστού εκχυλίσματος: μελισσόχορτο Ελλάδας, μελισσόχορτο Κύπρου, τσάι Lipton, δυόσμος, φασκόμηλο, δίκταμος, ματζουράνα, τσάι του βουνού, ύσσωπος, χαμομήλι και δενδρολίβανο. Στην περίπτωση του απλού εκχυλίσματος η σειρά ήταν: μελισσόχορτο Ελλάδας, μελισσόχορτο Κύπρου, τσάι Lipton, δυόσμος, δίκταμος, σιδερίτης, ματζουράνα, φασκόμηλο, ύσσωπος, χαμομήλι και δενδρολίβανο. Τέλος, τα αποτελέσματα από την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους ήταν: μελισσόχορτο Ελλάδας, μελισσόχορτο Κύπρου, τσάι Lipton, δυόσμος, δίκταμος, ματζουράνα, τσάι του βουνού, φασκόμηλο, ύσσωπος, χαμομήλι και δενδρολίβανο. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τα εκχυλίσματα όπου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με τον πετρελαϊκό αιθέρα.





**Σχήμα 3.3.1:** Σύγκριση των τριών τρόπων εκχύλισης των αφεψημάτων με βάση την αντιοξειδωτική ικανότητα (ABTS).



**Σχήμα 3.3.2:** Σύγκριση των τριών τρόπων εκχύλισης των αφεψημάτων που προέρχονται από την υδατική φάση του πετρελαϊκού αιθέρα με βάση την αντιοξειδωτική ικανότητα (ABTS).

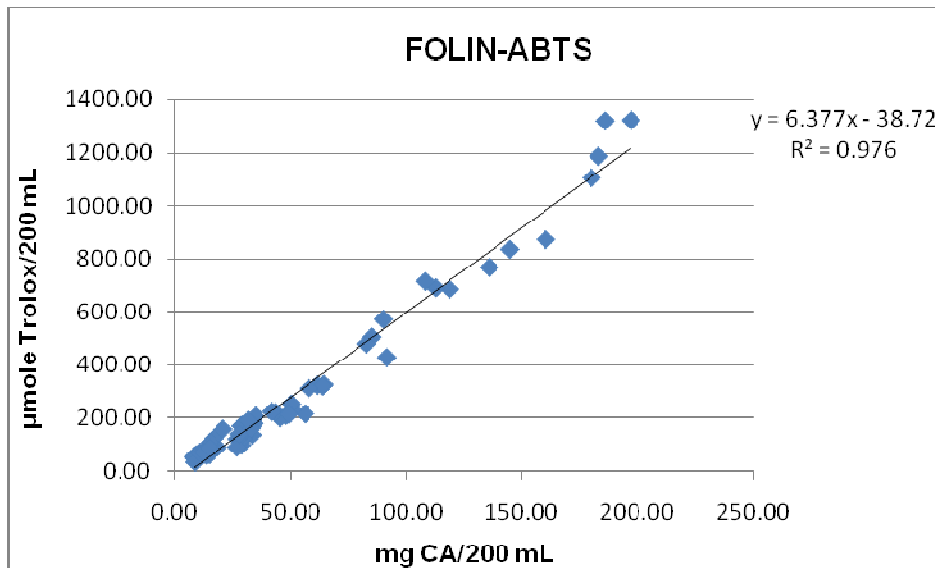
Τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα που μετρήθηκε με τη μέθοδο του ABTS και πάλι την είχε το δενδρολίβανο κατά κύριο λόγο και δευτερευόντως το χαμομήλι. Τα

παραπάνω αποτελέσματα είναι αντίστοιχα με τα αποτελέσματα των Ivanova *et al.* (2005) όπου βρήκαν ότι το μελισσόχορτο έχει κατά πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το χαμομήλι και το τσάι του βουνού που έχουν σχεδόν την ίδια. Αντίθετα, οι Wojdyło *et al.* (2007) από τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS αναφέρουν ότι το δενδρολίβανο έχει την ισχυρότερη δράση σε σχέση με το μελισσόχορτο και ακολουθεί το φασκόμηλο.

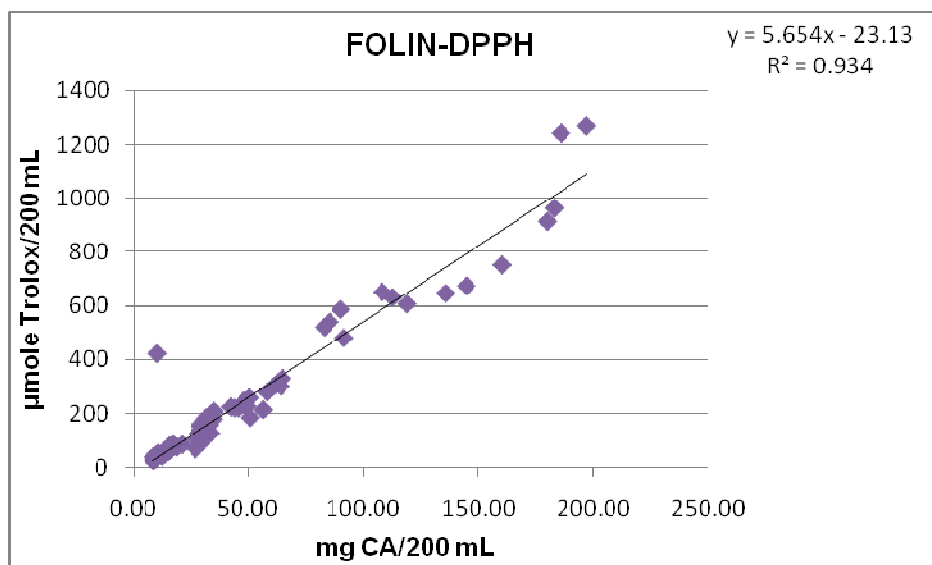
Από τα παραπάνω συμπεραίνεται όπως και προηγουμένως ότι την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα την έχουν τα δείγματα του μελισσόχορτου ενώ, οι μικρότερες μετρήθηκαν στο χαμομήλι και στο δενδρολίβανο. Επίσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι αρκετά μεγαλύτερη στο ζεστό αφέψημα που οφείλεται στην εκχύλιση περισσότερων φαινολικών συστατικών όπως αποδείχθηκε και με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

### **3.4. Συσχετισμός τριών μεθόδων**

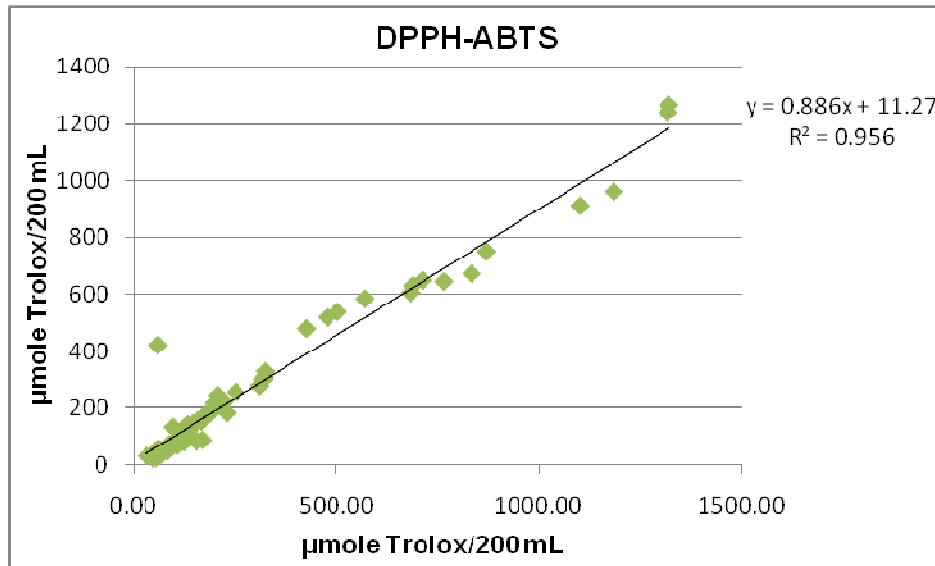
Για την καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε η σχέση που έχουν οι μέθοδοι μέτρησης των ολικών φαινολικών συστατικών και η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS και DPPH. Για την πραγματοποίηση του συσχετισμού αυτού δημιουργήθηκαν τρεις καμπύλες: FOLIN-ABTS, FOLIN-DPPH και DPPH-ABTS (Σχήματα 3.4.1, 3.4.2 και 3.4.3). Στην κατασκευή των καμπυλών χρησιμοποιήθηκαν όλα τα αφεψήματα που κατασκευάστηκαν από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, ενώ δεν περιλαμβάνεται η περίπτωση του τσαγιού Lipton λόγω κάποιας ιδιαιτερότητας που παρουσιάζει κυρίως στην περίπτωση της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορά που υπάρχει σε σχέση με τα υπόλοιπα αφεψήματα στα φαινολικά συστατικά τα οποία κατά κύριο λόγο απαρτίζονται από διάφορα είδη κατεχινών, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Dong *et al.*, 2010, Almajano *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2007, Boloni *et al.*, 2003).



**Σχήμα 3.4.1:** Συσχέτιση ολικών φαινολικών συστατικών (Folin-Ciocalteu) και αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS).



**Σχήμα 3.4.2:** Συσχέτιση ολικών φαινολικών συστατικών (Folin-Ciocalteu) και αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH).



**Σχήμα 3.4.3:** Συσχέτιση των δύο μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH-ABTS).

Με τη βοήθεια των παραπάνω διαγραμμάτων υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ολικών φαινολικών συστατικών, καθώς συγκρίθηκαν και οι δύο τεχνικές μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο αριθμός των δειγμάτων και το εύρος των τιμών των παραμέτρων που εξετάζονται μπορούν να επηρεάσουν το συντελεστή αυτό ( $R^2$ ) γι' αυτό, περισσότερα δείγματα μπορούν να δώσουν λογικές τιμές του  $R^2$  και πιο αντιπροσωπευτική συσχέτιση. Η σχέση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα (60 δείγματα) ήταν θετική και γραμμική, πράγμα που δηλώνει ότι υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο των αρωματικών φυτών, έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι σταθερές συσχέτισης  $R^2$  για την περίπτωση σύγκρισης της FOLIN-ABTS είναι 0,976, για τη FOLIN-DPPH είναι 0,934 και τέλος, για τις μεθόδους DPPH-ABTS είναι 0,956.

### 3.5. Συσχέτιση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με βάση τον τρόπο εκχύλισης

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των φαινολικών συστατικών και του τρόπου εκχύλισης του φυτικού υλικού, καθώς και σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και με τις δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (ABTS, DPPH), ώστε να διαπιστωθεί αν διαφέρουν σημαντικά οι διάφοροι τρόποι εκχύλισης ως προς αυτά τα χαρακτηριστικά. Η σύγκριση αυτή έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα ANOVA. Με βάση το πρόγραμμα αυτό, οι διάφοροι τρόποι εκχύλισης για κάθε φυτό κατατάσσονται σε κατηγορίες οι οποίες αντιστοιχούν σε κάποιο γράμμα όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 3.5.1-3.5.3). Οι τρόποι εκχύλισης που παρουσιάζονται στους πίνακες με το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου και αναφέρονται στο ίδιο φυτικό εκχύλισμα δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Από τα αποτελέσματα του στατιστικού προγράμματος παρατηρείται ότι οι τρόποι εκχύλισης οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά από τους υπόλοιπους είναι η εκχύλιση με ζεστό νερό και η εκχύλιση με τη χρήση του οργανικού διαλύτη που γίνεται με τον ίδιο τρόπο. Η διαλογή αυτή έγινε με τη χρήση του αλγόριθμου Tukey που δίνεται από το πρόγραμμα.

**Πίνακας 3.5.1:** Συσχέτιση των τρόπων εκχύλισης των αρωματικών φυτών ανάλογα με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

FOLIN	Αφεψήματα*			Αφεψήματα μετά από εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα*		
	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι
ματζουράνα	56,3±0,2d	17,2±1,3a	29,2±1,8b	50,8±4,6c	18,6±0,2a	20,9±0,4a
δενδρολίβανο	28,5±1,0c	8,3±1,2a	14,9±0,6b	27,1±0,8c	8,8±0,2a	13,6±0,4b
φασκόμηλο	64,5±1,0c	15,5±1,0a	16,9±3,0a	62,0±2,2c	15,5±0,6a	28,0±0,7b
σιδερίτης	48,03±1,4d	30,4±0,2a,b	31,7±0,6b	45,6±0,4c	28,9±0,6a	29,7±0,6a,b
χαμομήλι	33,4±0,4d	9,5±1,2a,b	10,2±0,2b	29,6±0,4c	8,7±0,4a	8,5±1,2a
ύσσωπος	34,9±0,4d	10,7±0,4a	13,1±0,6b	31,7±0,8d	10,4±0,4b	15,0±1,2c
μελισσόχορτο Cyp.	183,0±6,4 c	90,1±2,8a	112,7±0,8a,b	177,7±6,4c	91,5±1,0a	131,7±0,8b
δύσμος	85,5±0,4b	43,6±0,8a	50,4±1,4a	82,9±1,2b	42,1±1,8a	49,3±1,0a
δίκταμος	63,9±0,2c	28,3±1,2a	34,5±0,4a	51,3±1,4b	27,9±0,4a	32,9±0,2a
μελισσόχορτο	197,1±2,0f	135,8±1,2b	159,9±0,4d	185,9±3,4e	119,1±0,2a	144,7±0,8c
τσάι Lipton	162,6±3,2 c	73,4±1,0a	109,2±2,0b	158,8±2,8c	72,8±1,0a	106,4±1,6b

\*mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/ 200mL (κούπα)

**Πίνακας 3.5.2:** Συσχέτιση των τρόπων εκχύλισης των αρωματικών φυτών ανάλογα με την αντιοξειδωτική ικανότητα (ABTS).

ABTS	Αφεψήματα*			Αφεψήματα μετά από εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα*		
	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι
ματζουράνα	215,6±21,4c	118,4±13,0a	172,3±1,4b	230,5±22,8c	124,1±5,6a	157,7±2,6a,b
δενδρολίβανο	28,5±0,4c	8,3±2,0a	14,9±2,0b	27,1±1,8c	8,8±2,6a	13,6±4,0b
φασκόμηλο	326,1±4,6e	99,2±3,0b	123,1±2,2d	323,1±6,4e	89,6±1,2a	107,9±2,2c
σιδερίτης	208,6±1,6c	148,8±1,0b	133,8±0,4a	200,7±3,0c	137,6±0,4a,b	126,5±12,6a
χαμομήλι	135,8±5,0d	61,8±1,0b	61,4±2,6b	121,7±4,2c	56,6±2,4b	49,4±2,2a
ύσσωπος	206,8±3,6d	69,2±3,8a	85,2±8,2b	190,2±3,8c	71,0±4,8a	86,1±2,2b
μελισσόχορτο Cyp.	1186,2±16,0c	591,2±6,6a	689,5±3,8b	1103,9±48,6c	539,7±18,4a	714,5±3,2b
δύσμος	504,3±4,2a	221,7±4,2a	253,3±12,8b	479,1±5,5c	223,5±12,4a	214,1±23,6a
δίκτημος	321,0±1,0f	169,6±1,4c	179,6±0,6d	311,9±1,0e	139,1±5,8a	160,3±1,0b
μελισσόχορτο	1321,7±8,6e	766,8±5,0b	871,8±3,8d	1319,5±10,4e	684,3±3,2a	834,9±1,6c
τσάι Lipton	920,3±8,5e	439,4±13,3b	559,5±13,6c	828,1±56,8d	349,9±25,0a	504,2±19,1c

\*μmole Trolox/200mL (κούπα)

**Πίνακας 3.5.3:** Συσχέτιση των τρόπων εκχύλισης των αρωματικών φυτών ανάλογα με την αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH).

DPPH	Αφεψήματα*			Αφεψήματα μετά από εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα*		
	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι	Ζεστό	Κρύο	Υπέρηχοι
ματζουράνα	211,9±8,2c	79,4±8,4a	86,9±2,5a	182,6±4,0b	73,0±8,3a	82,9±6,5a
δενδρολίβανο	100,4±1,8b	35,1±3,7a	57,0±2,5a	102,1±0,8b	30,3±1,7a	49,4±2,6a
φασκόμηλο	328,2±1,8e	77,6±3,6b	83,7±3,4c	306,9±2,2d	66,3±1,8a	68,6±0,6a
σιδερίτης	244,4±0,4c	145,8±10,0a	140,4±17,0a	216,8±2,4b	132,6±1,8a	132,6±0,8a
χαμομήλι	124,5±1,4c	28,2±3,4a	20,8±4,4a	97,9±2,4b	24,4±3,6a	23,2±0,8a
ύσσωπος	206,4±1,4d	51,5±5,0a	49,7±19,2a	182,5±2,6b	39,2±0,8a	55,7±8,0a
μελισσόχορτο Cyp.	961,2±10,8c	584,3±6,8b	629,9±36,1b	911,5±24,9c	478,4±25,4a	649,3±22,2b
δύσμος	538,6±1,4e	218,6±8,6b	256,0±3,4c	518,8±0,8d	202,3±8,4a	224,5±10,4b
δίκτημος	299,7±2,6e	153,5±2,6b	177,0±3,4c	277,7±4,4d	123,7±4,4a	155,5±3,6b
μελισσόχορτο	1268,3±10,2e	644,5±14,9b	752,7±9,4d	1240,1±6,8e	605,5±18,2a	676,0±11,4c
τσάι Lipton	831±45,0 c	316,6±38,8a	496,6±5,2b	8,28±24,8c	275,4±24,8a	473,4±15,8b

\*μmole Trolox/200mL (κούπα)

Σε γενικές γραμμές παρατηρείται ότι οι διάφοροι τρόποι εκχύλισης δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους όπως στην περίπτωση του δενδρολίβανο και του φασκόμηλου για τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου οι τρόποι εκχύλισης

διαφέρουν μεταξύ τους όπως συμβαίνει για παράδειγμα στο μελισσόχορτο (Folin-Ciocalteu) και στο φασκόμηλο (DPPH). Αυτό όμως που παρατηρείται σχεδόν σε όλα τα φυτά είναι ότι τα ζεστά εκχυλίσματα είτε προέρχονται από την εκχύλιση με οργανικό διαλύτη είτε όχι, διαφέρουν σημαντικά από τους άλλους τρόπους εκχύλισης των φυτικών υλικών.

### 3.6. Έλεγχος αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά από προσθήκη μελιού, γάλακτος και λεμονιού

Στη συνέχεια του πειράματος εξετάστηκαν τρεις κοινοί τρόποι κατανάλωσης αφεψημάτων: προσθήκη μελιού, γάλακτος και χυμού λεμονιού καθώς και πως τα προϊόντα αυτά επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των συστατικών που εισέρχονται στον οργανισμό μετά από την κατανάλωσή τους. Τα αποτελέσματα και σε αυτό το σημείο είναι εκφρασμένα σε  $\mu\text{mole Trolox} / 200 \text{ mL}$ , ποσότητα που αντιστοιχεί στην κατανάλωση μίας κούπας αφεψήματος. Τα αποτελέσματα για την περίπτωση του ABTS παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6.1 και για την περίπτωση του DPPH παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6.2.

**Πίνακας 3.6.1:** Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS) σε αφεψήματα μετά από προσθήκη μελιού, γάλακτος και λεμονιού.

Φυτικό υλικό	Αφέψημα*	Αφέψημα* με		
		Λεμόνι	Μέλι	Γάλα
δενδρολίβανο	67,42	74,16	77,2	72,64
χαμομήλι	122,84	120,68	134,1	118,3
φασκόμηλο	250,98	199,02	318,96	288,66
μελισσόχορτο	1205,12	1227,92	1161,26	1093,32
τσάι Lipton	1217,62	1210,06	1160,34	973,36

\* $\mu\text{mole Trolox} / 200\text{mL}$  (κούπα)

Μετά την προσθήκη των παραπάνω συστατικών για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρατηρήθηκε ότι σχεδόν σε όλα τα αφεψήματα η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώθηκε με την προσθήκη γάλακτος και με τις δύο μεθόδους, στην περίπτωση

προσθήκης του λεμονιού δεν υπάρχει σταθερή μεταβολή της ικανότητας αυτής και τέλος, η προσθήκη μελιού φαίνεται να αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα, η προσθήκη γάλακτος, όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ABTS, προκάλεσε μείωση σχεδόν σε όλα τα αφεψήματα και κυρίως στο μελισσόχορτο και το τσάι Lipton. Η προσθήκη λεμονιού, φαίνεται ότι στο μελισσόχορτο αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα και μόνο στην περίπτωση του φασκόμηλου τη μειώνει. Το μέλι σχεδόν πάντα την αυξάνει με αποκορύφωμα την περίπτωση του φασκόμηλου.

**Πίνακας 3.6.2:** Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH) μετά από προσθήκη μελιού, γάλακτος και λεμονιού.

Φυτικό υλικό	Αφέψημα*	Αφέψημα* με		
		Λεμόνι	Μέλι	Γάλα
δενδρολίβανο	59,94	55,18	58,74	-
χαμομήλι	83,66	88,46	78,84	20,78
φασκόμηλο	275,1	233,52	275,4	171,14
μελισσόχορτο	1256,52	1284,18	1220,62	1127,9
τσάι Lipton	649,04	737,02	599,84	555,12

\* $\mu\text{mole Trolox} / 200\text{mL}$  (κούπα)

Για την περίπτωση της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH, παρατηρείται σημαντική μείωση σε όλες τις προσθήκες, ακόμα και στο κανονικό αφέψημα του τσαγιού Lipton ενώ, λίγο μεγαλύτερη ήταν η αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα με την προσθήκη του χυμού λεμονιού. Ακόμα, ελάχιστη ήταν και εδώ η μείωση στο μελισσόχορτο με την προσθήκη μελιού που όμως παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή με την προσθήκη λεμονιού σε αντίθεση με το φασκόμηλο. Αξιοσημείωτη ήταν και η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αφέψημα χαμομηλιού μετά την προσθήκη γάλακτος, καθώς η ικανότητα αυτή ήταν τέσσερις φορές μικρότερη (Σχήματα 3.6.1 και 3.6.2).

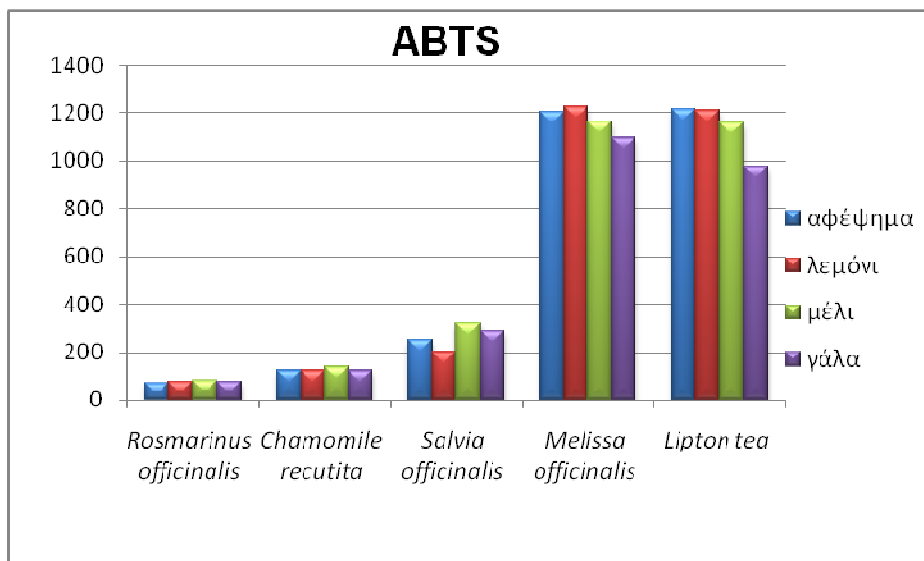
Η μείωση που προκαλείται στην αντιοξειδωτική ικανότητα μετά την προσθήκη του γάλακτος μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι σε διάφορα διαλύματα, οι πολυφαινόλες μπορούν να σχηματίσουν αδιάλυτα σύμπλοκα (Liang *et al.*, 2003, Dubeau *et al.*, 2010),



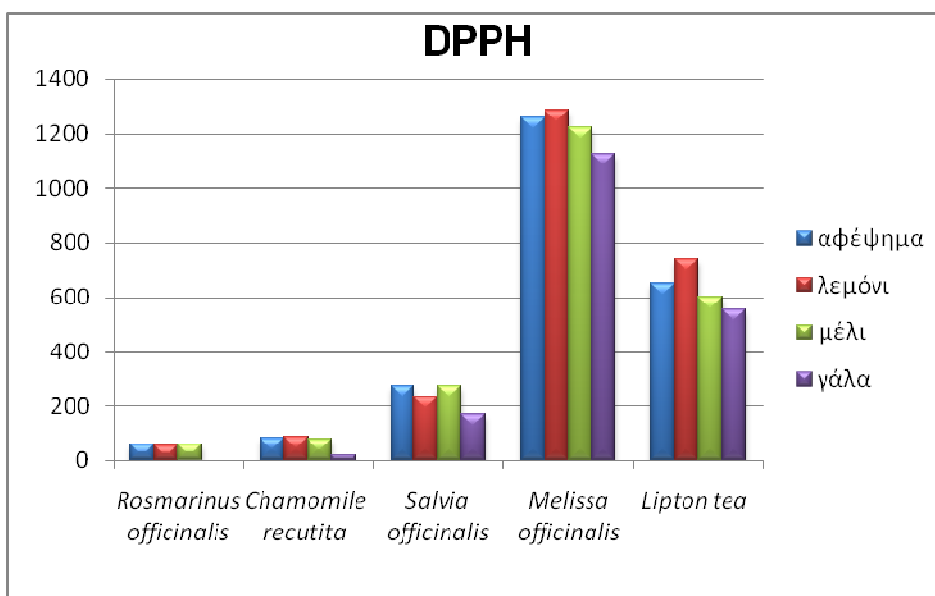
αλληλεπιδρώντα με πλούσιες σε προλίνη πρωτεΐνες, όπως η β-καζεΐνη που υπάρχει στο γάλα σε μεγάλη περιεκτικότητα. Η ένωση των πολυφαινολών με τις πρωτεΐνες εξαρτώνται από το μοριακό τους βάρος (De Freitas *et al.*, 2001) και αυξάνεται με την αύξηση αυτού. Μεγάλα μόρια πολυφαινολών όπως αυτά που υπάρχουν στο μαύρο τσάι, είναι πιο πιθανό να συνδεθούν με τις πρωτεΐνες. Η ένωση αυτή μπορεί να επηρεάσει την αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνοντας τις ελεύθερες υδρόξυ ομάδες. Όντως, έχει δειχθεί ότι η προσθήκη γάλακτος στο τσάι μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα (Langley-Evans, 2000, Horzic *et al.*, 2009) αλλά υπάρχει περίπτωση να μην προκαλέσει καμία αλλαγή (Richelle *et al.*, 2001).

Στην περίπτωση της προσθήκης χυμού λεμονιού, συνήθως η εκχύλιση των πολυφαινολικών συστατικών με νερό επιταχύνεται και γι' αυτό στις περισσότερες μετρήσεις που προέκυψαν, η αντιοξειδωτική ικανότητα όταν χρησιμοποιείται το λεμόνι είναι λίγο μεγαλύτερη. Οι Friedman *et al.* (2000) τόνισαν ότι η αλλαγή στο pH μπορεί να επηρεάσει την κινητική των κατεχινών, αφού η παρουσία των υδροξυλομάδων υποδηλώνει ευαισθησία στην επίδραση του pH που έχει ως αποτέλεσμα τον ιονισμό του μορίου. Τα αποτελέσματα που βρήκαν οι Rusac *et al.* (2008) δείχνουν όπως και στην περίπτωση αυτή ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των υδατικών εκχυλισμάτων διαφόρων βοτάνων και τσαγιών δεν είναι σταθερή, καθώς άλλοτε μειώνεται και άλλοτε αυξάνεται ενώ, οι Horzic *et al.* (2009) βρήκαν ότι η προσθήκη του χυμού δεν επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η προσθήκη ποσότητας μελιού στα αφεψημάτα αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα στα δείγματα, κάτι που συμφωνεί με την έρευνα των Kesic *et al.* (2010), οι οποίοι αναφέρουν ότι η προσθήκη μελιού αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων και μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού τόσο περισσότερο αυξάνεται και στα αφεψημάτα.



**Σχήμα 3.6.1:** Συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (ABTS) ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής των αφεψημάτων.



**Σχήμα 3.6.2:** Συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH) ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής των αφεψημάτων.

Εκτός από τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, πραγματοποιήθηκε και μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu στα κανονικά

αφεψήματα, για να γίνει γνωστή η διαφορά που υπάρχει στην εκχύλιση των συστατικών αυτών μεταξύ των 5 και 15 min. Από τις μετρήσεις αυτές, παρατηρήθηκαν ότι οι διαφορές είναι μικρές εκτός από την περίπτωση του δενδρολίβανου και του τσαγιού Lipton (Πίνακας 3.6.3), πράγμα που σημαίνει ότι συνήθως η μεγαλύτερη ποσότητα των συστατικών αυτών εκχυλίζεται τα πρώτα 5 min και συνεχίζεται με μειωμένη ένταση μέχρι τα 10 min (Katalinin *et al.*, 2006).

**Πίνακας 3.6.3:** Αποτελέσματα μέτρησης ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu στα 5 και 15 min.

Φυτικό υλικό	Διάρκεια εκχύλισης	
	5 min	15 min
Δενδρολίβανο	5,33*	14,23*
Χαμομήλι	15,67	16,70
Φασκόμηλο	27,37	32,27
Μελισσόχορτο	93,90	98,50
Τσάι Lipton	63,05	81,30

\*mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL (κούπα)

Είναι φανερό ότι ο τρόπος κατανάλωσης των διαφόρων αφεψημάτων από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η προσθήκη γάλακτος σύμφωνα με τα παραπάνω είναι πολύ πιθανό να μειώσει την ικανότητα αυτή σε σχέση με το κανονικό αφέψημα ενώ, η προσθήκη μελιού μάλλον φαίνεται να την αυξάνει. Η προσθήκη του χυμού λεμονιού είτε αυξάνει είτε μειώνει ελαφρώς την αντιοξειδωτική ικανότητα κατά τρόπο ο οποίος είναι πιθανό να εξαρτάται από το είδος του φυτού από το οποίο προέρχεται το αφέψημα. Τέλος, σημαντική είναι η μείωση που παρατηρείται σε όλες τις μετρήσεις του τσαγιού Lipton στο DPPH κάτι που μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά είδη των φαινολικών συστατικών που υπάρχουν, καθώς κατά κύριο λόγο είναι κατεχίνες.

### 3.7. Ταυτοποίηση πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων με GC-MS

Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών που περιέχονται ως άρωμα στα διάφορα δείγματα που εξετάστηκαν έγινε με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα. Με την τεχνική αυτή ταυτοποιήθηκαν διάφορες ενώσεις χαρακτηριστικές για κάθε φυτό, όπως πραγματοποιήθηκε και ποσοτικός προσδιορισμός. Παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα των αφεψημάτων στις διάφορες ενώσεις είναι αρκετά μικρή, που καθιστά αδύνατο και τον ποιοτικό προσδιορισμό, παρ'όλο που προηγείται πάντα εκχύλιση και συμπύκνωση με οργανικό διαλύτη. Η μικρή περιεκτικότητα οφείλεται κυρίως στον τρόπο εκχύλισης του φυτικού υλικού, καθώς όταν χρησιμοποιείται ως διαλύτης το νερό εκχυλίζονται πολύ λιγότερες ουσίες και σε μικρότερο βαθμό από αυτές που αναμένονται από την εκχύλιση με οργανικό διαλύτη.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 3.7.1-3.7.9) παρουσιάζονται όλες οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν από τα αρωματικά φυτά καθώς και το ποσοστό της κάθε ένωσης. Από τα αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων, συμπεραίνεται ότι όλα τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων εμφανίζονται από τα 16 έως τα 30 min με εξαίρεση τα συστατικά του χαμομηλιού όπου εμφανίζονται πολύ αργότερα (45-51 min)

Αρχικά, παρατηρείται ότι στα εκχυλίσματα που έχει χρησιμοποιηθεί το νερό στους 85° C, τα συστατικά σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις είναι περισσότερα. Ακολουθούν τα εκχυλίσματα με τους υπερήχους και τέλος τα εκχυλίσματα που προέρχονται από την εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία δωματίου. Τα περισσότερα πτητικά συστατικά εμφανίζονται στο φασκόμηλο, το δενδρολίβανο και στο δυόσμο, ενώ το μελισσόχορτο από την Κύπρο έχει περισσότερα πτητικά συστατικά από αυτό της Ελλάδας.

Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στην περίπτωση των δύο ειδών μελισσόχορτου είναι η νεράλη και η γερανιάλη οι οποίες αποτελούν την κιτράλη και η θυμόλη με την καρβακρόλη ενώ, το μελισσόχορτο Κύπρου έχει επιπλέον πινοκαρβόνη, καρβόνη και θυμοκινόνη. Στην περίπτωση της εκχύλισης με τους υπερήχους για το δείγμα από την περιοχή της Κύπρου τα συστατικά είναι φυσικά λιγότερα αλλά παρατηρούνται και ορισμένες αλλαγές. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται το κυμένιο ενώ, στην περίπτωση της

εκχύλισης σε θερμοκρασία δωματίου εμφανίζεται η καμφορά, ενώσεις που δεν εμφανίζονται σε αφεψήματα που έχουν παραληφθεί με άλλο τρόπο εκχύλισης (Πίνακες 3.7.1 και 3.7.2). Κύρια συστατικά του μελισσόχορτου Κύπρου είναι η καρβόνη (27,20%) στο ζεστό εκχύλισμα ενώ στα άλλα δύο είναι η καρβακρόλη (55,86 και 72,14%) που εμφανίζεται σε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά από το πρώτο. Στο μελισσόχορτο της Ελλάδας το κύριο συστατικό που παρατηρείται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα είναι η γερανιάλη (60,78, 65,58 και 65,61%) με αρκετή διαφορά από τα υπόλοιπα αλλά και από την καρβακρόλη που υπάρχει σε μεγάλα ποσοστά στο άλλο δείγμα. Σε έρευνες οι οποίες έχουν γίνει στο αιθέριο έλαιο που παραλαμβάνεται από διάφορα τμήματα του φυτού τα συστατικά είναι πολύ περισσότερα και σε περιεκτικότητες οι οποίες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, σε έρευνα των Cosge *et al.* (2009) από τα κύρια συστατικά που βρέθηκαν στο έλαιο, η κιτράλη, δηλαδή ένα μίγμα νεράλης και γερανιάλης, η θυμόλη και η καρβακρόλη ταυτοποιήθηκαν και στην περίπτωση του αφεψήματος του φυτού. Επιπλέον, σε ανάλυση φυτού από το Ιράν βρέθηκαν συνολικά δώδεκα συστατικά εκ των οποίων κανένα δεν υπήρχε στα αφεψήματα είτε προέρχονται από την Ελλάδα είτε από την Κύπρο (Suschke *et al.*, 2007).

**Πίνακας 3.7.1:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών του μελισσόχορτου (Ελλάδα) (άρωμα αφεψήματος).

Ενώσεις	Τρόπος εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπέρηχοι νερό (%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
νεράλη	35,34	31,85	32,60
γερανιάλη	60,78	65,58	65,61
θυμόλη	1,49	1,02	0,67
καρβακρόλη	2,38	1,55	1,12

**Πίνακας 3.7.2:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών του μελισσόχορτου (Κύπρος) (άρωμα αφεψήματος).

Ενώσεις	Τρόπος Εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπέρηχοι νερό (%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
κυμένιο	-	5,12	-
καμφορά	-	-	2,98
πινοκαρβόνη	2,71	-	-
νεράλη	11,18	-	-
καρβόνη	27,20	16,46	-
θυμοκινόνη	6,00	4,78	-
γερανιάλη	17,57	4,51	8,02
θυμόλη	22,43	13,27	16,86
καρβακρόλη	12,90	55,86	72,14

Τα συστατικά που αναλύθηκαν στην περίπτωση του δυόσμου είναι η 1,8 κινεόλη, το *cis*-σαμπινένιο, η τερπινεόλη, βορνεόλη, η *cis*-διυδροκαρβόνη, η *trans*-καρβεόλη, η θυμόλη και η καρβακρόλη. Στους άλλους δύο τρόπους εκχύλισης εμφανίζεται επιπλέον η *cis*-καρβεόλη ενώ, κάποια άλλα συστατικά διαφέρουν σημαντικά. Τα συστατικά που αναλύθηκαν στο εκχύλισμα από τους υπερήχους είναι 1,8 κινεόλη, η τερπινεόλη, η *cis*-καρβεόλη, η καρβόνη και η καρβακρόλη και για την περίπτωση χρήσης νερού σε θερμοκρασία δωματίου είναι η 1,8 κινεόλη, η *cis*-τερπινεόλη, η βορνεόλη, *cis*-καρβεόλη και η καρβόνη (Πίνακας 3.7.3). Το κύριο συστατικό που παρατηρείται στο ζεστό δείγμα είναι η *trans*-καρβεόλη (80,86%) με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα συστατικά, στο δείγμα από τους υπερήχους η καρβόνη (87,50%) και στο κρύο η καρβακρόλη (86,68%). Από τα παραπάνω συστατικά που αναλύθηκαν στα αφεψήματα του δυόσμου η 1,8 κινεόλη, η λιναλοόλη, η βορνεόλη, η *cis* διυδρο-καρβόνη και η καρβόνη έχει βρεθεί και στο αιθέριο έλαιο φυτού που έχει συγκεμιστεί σε περιοχή κοντά στα Ημαλία (Chauhan *et al.*, 2009) που αν και υπάρχουν μεγάλες διαφορές σε περιβαντολογικές και γεωγραφικές συνθήκες ορισμένα από τα κύρια συστατικά είναι τα ίδια.

**Πίνακας 3.7.3:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών του δυόσμου (άρωμα αφεψήματος).

Ενώσεις	Τρόπος εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπέρηχοι νερό(%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
1,8 κινεόλη	8.93	6,76	6,76
cis-σαμπινένιο	2.26	-	-
τερπινεόλη	0.29	1,17	-
cis-τερπινεόλη	-	-	1.34
βορνεόλη	1.78	-	1.26
cis-διυδρο καρβόνη	3.52	-	-
trans-καρβεόλη	80.86	-	-
cis-καρβεόλη	-	3,42	3.96
καρβόνη	-	87,50	-
καρβακρόλη	1.12	1,16	86.68

**Πίνακας 3.7.4:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών του ύσσωπου (άρωμα αφεψήματος).

Ενώσεις	Τρόπος εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπέρηχοι νερό (%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
cis-σαμπινένιο	6,07	-	-
πινοκαρβόνη	25,56	25,06	19,57
ισοπινοκαμφόνη	56,67	68,91	54,15
μυρτεόλη	8,34	2,54	14,04
θυμόλη	1,00	-	-
καρβακρόλη	2,35	3,48	5,57

Στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα αφεψήματα που προέρχονται από τον ύσσωπο βρέθηκαν τα εξής συστατικά: cis-σαμπινένιο, πινοκαρβόνη, ισοπινοκαμφόνη, μυρτεόλη, θυμόλη και καρβακρόλη. Στις δύο άλλες περιπτώσεις δεν εμφανίζονται το cis-σαμπινένιο και η θυμόλη (Πίνακας 3.7.4). Το κύριο συστατικό που παρουσιάζεται σε όλους τους τρόπους εκχύλισης είναι η ισοπινοκαμφόνη (56,67, 28,91 και 54,15%). Κατά την ανάλυση του αιθερίου ελαίου του φυτού, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, τα συστατικά που αναλύθηκαν είναι επτά με μόνη κοινή ένωση την πινοκαμφόνη η οποία

και στο αιθέριο έλαιο και στο αφέψημα βρίσκονται στις μεγαλύτερες περιεκτικότητες ενώ, σε άλλη έρευνα η μόνη κοινή ουσία είναι η πινοκαρβόνη και το cis ισομερές του σαμπινένιου (Langa *et al.*, 2008).

**Πίνακας 3.7.5:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών του φασκόμηλου (άρωμα αφεψήματος).

Ενώσεις	Τρόπος εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπέρηχοι νερό (%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
p-κυμένιο	0,43	-	-
1,8 κινεόλη	20,87	20,70	22,55
λιναλοόλη	0,71	-	-
cis-θουγιόνη	26,71	31,03	29,80
trans-θουγιόνη	4,67	4,09	4,15
καμφορά	37,57	38,43	36,85
βορνεόλη	6,07	3,88	5,36
τερπινεν-4-όλη	0,75	-	-
οξικό βορνύλιο	0,44	0,70	0,72
θυμόλη	0,42	-	-
καρβακρόλη	1,35	1,16	0,56

Κατά τη μελέτη των συστατικών του φασκόμηλου εντοπίστηκαν έντεκα συστατικά τα οποία ήταν: το p-κυμένιο, η 1,8 κινεόλη, η λιναλοόλη, η cis-θουγιόνη, η trans-θουγιόνη, η καμφορά, η βορνεόλη, η τερπινεν-4-όλη, το οξικό βορνύλιο, η θυμόλη και η καρβακρόλη. Στα εκχυλίσματα που προήλθαν από τους άλλους τρόπους εκχύλισης δεν παρατηρούνται οι ενώσεις p-κυμένιο, η λιναλοόλη, η τερπινεν-4-όλη και η θυμόλη (Πίνακας 3.7.5). Το κύριο συστατικό που παρουσιάζεται και στους τρεις τρόπους εκχύλισης είναι η καμφορά (37,57, 38,43 και 36,85%). Στην εξέταση του αιθερίου ελαίου από τους Bernotiene *et al.* (2007) βρέθηκαν συνολικά 79 συστατικά, εκ των οποίων τα δέκα είναι κοινά, αφού όλα τα συστατικά που υπάρχουν στο αφέψημα βρίσκονται και στο αιθέριο έλαιο με εξαίρεση τη λιναλοόλη. Άλλες έρευνες στο έλαιο του φυτού έχουν δείξει την ύπαρξη 1,8 κινεόλης, λιναλοόλης, p-κυμενίου, βορνεόλης,



τερπινεν-4-όλη και οξικού βορνυλίου (Hayouni *et al.*, 2004), ενώ σε άλλη έρευνα δεν έχει βρεθεί η λιναλοόλη (Radulescu *et al.*, 2004).

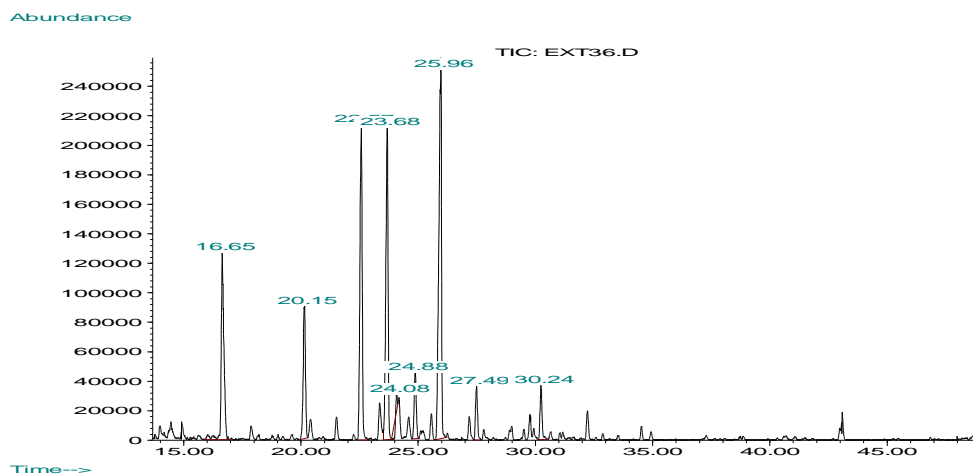
**Πίνακας 3.7.6:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών του δενδρολίβανου (άρωμα αφεψήματος).

Ενώσεις	Τρόποι εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπερήχοι νερό (%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
1,8 κινεόλη	12,19	14,44	15,27
λιναλοόλη	8,38	11,64	-
καμφορά	19,14	16,78	14,06
trans-πινοκαμφόνη	2,00	-	-
βορνεόλη	19,24	35,25	41,59
τερπινεν-4-όλη	1,94	-	-
p- κυμεν-8-όλη	1,28	-	-
α-τερπινεόλη	3,80	-	-
βερμπενόνη	28,45	12,41	10,02
θυμόλη	1,06	-	-
καρβακρόλη	2,50	9,48	19,06

Το δενδρολίβανο παρά τη δυσκολία εκχύλισης με τη χρήση νερού, έχει αρκετά πτητικά συστατικά σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά. Συνολικά αναλύθηκαν στο ζεστό αφέψημα 11 συστατικά τα οποία ήταν: η 1,8 κινεόλη, η λιναλοόλη, η καμφορά, η trans-πινοκαμφόνη, η βορνεόλη, η τερπινεν-4-όλη, η p-κυμεν-8-όλη, η α-τερπινεόλη, η βερμπενόνη, η θυμόλη και η καρβακρόλη. Στο εκχύλισμα από τους υπερήχους βρέθηκαν οι ενώσεις 1,8 κινεόλη, λιναλοόλη, καμφορά, βορνεόλη βερμπενόνη και η καρβακρόλη. Στην περίπτωση της εκχύλισης με νερό σε θερμοκρασία δωματίου παρατηρείται απουσία λιναλοόλης, σε σχέση με τους υπερήχους (Πίνακας 3.7.6). Το κύριο συστατικό που υπάρχει στο ζεστό αφέψημα είναι η βερμπενόνη (28,45%), ενώ στα άλλα δύο εκχυλίσματα είναι η βορνεόλη (35,25 και 41,59%). Από αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί στο αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου (Gachkar *et al.*, 2007) βρέθηκαν συνολικά είκοσι συστατικά εκ των οποίων τα έξι ήταν κοινά. Τα συστατικά αυτά είναι η 1,8 κινεόλη, η λιναλοόλη, η καμφορά, η βορνεόλη, η τερπινεν-4-όλη και η α-τερπινεόλη όπως ακριβώς και στην περίπτωση των Szumny *et al.* (2010) με τη διαφορά ότι δεν

υπάρχει η τερπινεν-4-όλη. Σε έρευνα των Cassel *et al.* (2009) από τα συνολικά 28 συστατικά του αιθερίου ελαίου του δενδρολίβανου που μελετήθηκε υπήρχαν όλα τα συστατικά που βρέθηκαν και στο αφέψημα εκτός από την trans πινοκαμφόνη, τη θυμόλη και την καρβακρόλη. Επίσης, στις έρευνες των Graber *et al.* (2009) από τα συνολικά εξήντα ένα συστατικά του αιθερίου ελαίου που παρελήφθησαν υπήρχαν όλα τα συστατικά του ζεστού αφεψήματος με εξαίρεση την p-κυμεν-8-όλη και την α-τερπινεόλη. Από την έρευνα αυτή παρατηρείται ακόμα ότι είναι η μοναδική στην οποία παρουσιάζονται οι ενώσεις θυμόλη και καρβακρόλη. Τέλος, στην μελέτη των Bousbia *et al.* (2009) παρουσιάζονται και στις δύο περιπτώσεις τα συστατικά λιναλοόλη, καμφορά, βορνεόλη, βερμπενόνη και α-τερπινεόλη.

Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 3.7.1) παρουσιάζεται το χρωματογράφημα που προέκυψε κατά την εξέταση του ζεστού αφεψήματος του δενδρολίβανου με τους χρόνους συγκράτησης των κορυφών που παρατηρήθηκαν.



**Σχήμα 3.7.1:** Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεψήματος του δενδρολίβανου.

Για το χαμομήλι ανιχνεύτηκαν στο ζεστό αφέψημα και σε αυτό που προήλθε από τους υπερήχους τα συστατικά α-οξείδιο της μπισαμπολόλης Β, οξείδιο της μπισαμπολόνης, α-

οξείδιο της μπισαμπολόλης Α, Ζ σπειροκυκλικός αιθέρας και Ε σπειροκυκλικός αιθέρας. Από το εκχύλισμα που έχει προέλθει από το νερό σε θερμοκρασία δωματίου δεν υπάρχει το οξείδιο της μπισαμπολόλης (Πίνακας 3.7.7). Το κύριο συστατικό που ανιχνεύτηκε σε όλες τις περιπτώσεις εκχύλισης χαμομηλιού είναι το α-οξείδιο της μπισαμπολόλης Α (38,10, 41,19 και 48,76%). Σε έρευνες (Povh *et al.*, 2001, Scalia *et al.*, 1999, Presibella *et al.*, 2006, Orav *et al.*, 2001) που έχουν γίνει στο αιθέριο έλαιο χαμομηλιού ο συνολικός αριθμός των συστατικών ποικίλει από 16-25 από τα οποία μόνο τα δύο είναι κοινά, το α-οξείδιο της μπισαμπολόλης Β και το α-οξείδιο της μπισαμπολόλης Α, τα οποία είναι από τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου.

**Πίνακας 3.7.7:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών του χαμομηλιού (άρωμα αφεψήματος).

Ενώσεις	Τρόπος εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπέρηχοι νερό (%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
α-οξείδιο της μπισαμπολόλης Β	16,56	23,22	31,59
οξείδιο της μπισαμπολόλης	8,15	10,14	-
α-οξείδιο της μπισαμπολόλης Α	38,10	41,19	48,76
Ζ σπειροκυκλικός αιθέρας	22,22	14,95	13,51
Ε σπειροκυκλικός αιθέρας	14,96	10,50	6,13

Στην περίπτωση του δίκταμου, ακόμα και στο το ζεστό αφέψημα βρέθηκαν μόνο τέσσερα συστατικά, το p-κυμένιο, η θυμοκινόνη, η θυμόλη και η καρβακρόλη. Οι διαφοροποιήσεις που υπάρχουν μεταξύ των τρόπων εκχύλισης είναι ότι δεν παρουσιάζεται το p-κυμένιο αλλά η λιναλοόλη, η οποία δεν υπάρχει στο ζεστό εκχύλισμα, η τερπινεν-4-όλη υπάρχει μόνο στο κρύο εκχύλισμα, ενώ και πάλι στα εκχυλίσματα με υπερήχους και με κρύο νερό δεν παρουσιάζεται η θυμόλη (Πίνακας 3.7.8). Το κύριο συστατικό όλων των εκχυλισμάτων ήταν η καρβακρόλη (84,80, 75,97 και 85,80%). Σε σύγκριση που πραγματοποιήθηκε με το αιθέριο έλαιο του φυτού που προήλθε από τα υπέργεια τμήματά του βρέθηκε ότι τα μόνα κοινά συστατικά είναι η

θυμόλη και η καρβακρόλη (Liolios et al., 2009) ενώ, οι Kouri et al. (2007) μελετώντας το φυτό σε πλήρη ανθοφορία βρήκαν επιπλέον την ένωση p-κυμένιο.

**Πίνακας 3.7.8:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών του δίκταμου (άρωμα αφειήματος).

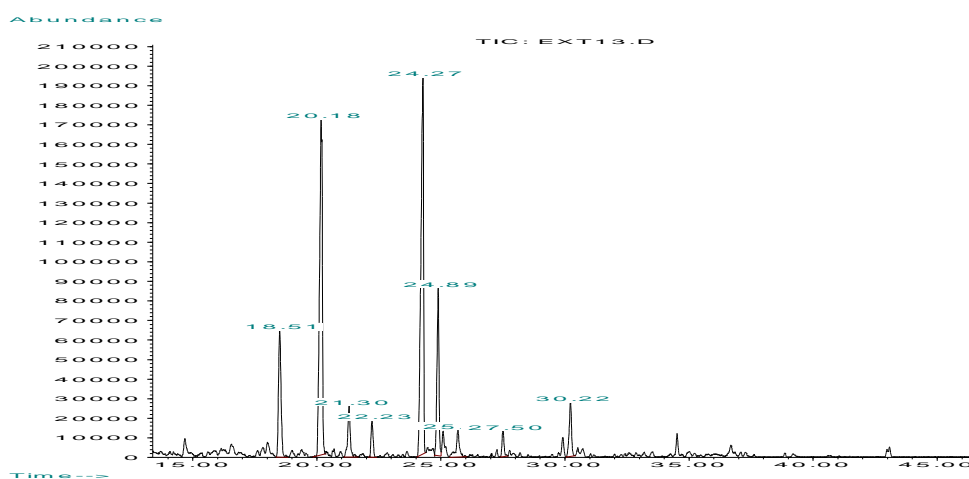
Ενώσεις	Τρόπος εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπέρηχοι νερό (%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
p κυμένιο	1,51	-	-
λιναλοόλη	-	4,32	1,64
θυμοκινόνη	13,37	19,70	12,07
τερπινεν-4-όλη	-	-	0,49
θυμόλη	0,32	-	-
καρβακρόλη	84,80	75,97	85,80

Όπως παρουσιάζονται και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.7.9) τα αποτελέσματα της ανάλυσης της ματζουράνας, βρέθηκε ότι τα πτητικά συστατικά που υπάρχουν στο ζεστό αφέψημα είναι το cis και το trans ισομερές του σαμπινένιου, τα ισομερή cis-p-2 μενθεν-1-όλη και trans-p-2 μενθεν-1-όλη, η τερπινεν-4-όλη, η α-τερπινεόλη, η cis και trans πιπεριτόλη, η καρβόνη και η καρβακρόλη, ενώ από τα υπόλοιπα δύο εκχυλίσματα της ματζουράνας απουσιάζουν τα δύο ισομερή της 2 μενθεν-1-όλη και η cis και trans πιπεριτόλη. Το κύριο συστατικό που παρατηρήθηκε και στα τρία είδη των εκχυλισμάτων ήταν η τερπινεν-4-όλη (32,04, 47,72 και 52,91%). Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία και αφορούν στο αιθέριο έλαιο του φυτού από τα συνολικά 38 συστατικά που αναφέρονται τα μόνα κοινά είναι τα ισομερή του σαμπινένιου, η καρβακρόλη και η τερπινεν-4-όλη που είναι και το κύριο συστατικό του ελαίου (Sellami et al., 2009). Σε άλλη έρευνα τα κοινά συστατικά είναι το cis-σαμπινένιο και η τερπινεν-4-όλη από τα 19 συστατικά που ταυτοποιήθηκαν. Από τις αναλύσεις που πραγματοποίησαν οι Vagi et al. (2005) συνολικά αναλύθηκαν 17 συστατικά από τα οποία τα κοινά ήταν το cis σαμπινένιο, η τερπινεν-4-όλη και η α-τερπινεόλη. Τέλος, σε ένα άλλο είδος ματζουράνας, *Majorana hortensis*, κοινό συστατικό ήταν μόνο η τερπινεν-4-όλη, αλλά υπάρχουν τα Z και E ισομερή των συστατικών σαμπινένιο και της πιπεριτόλης (Verma et al., 2010).

**Πίνακας 3.7.9:** Ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα των πτητικών συστατικών της ματζουράνας (άρωμα αφεψήματος).

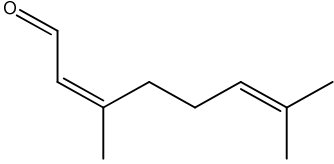
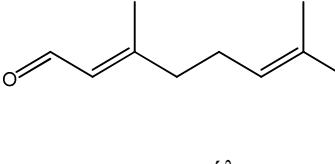
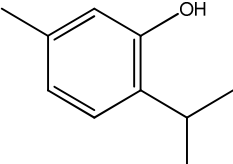
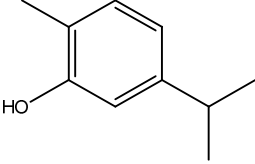
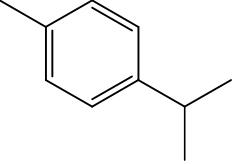
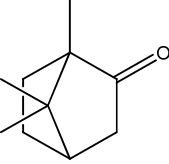
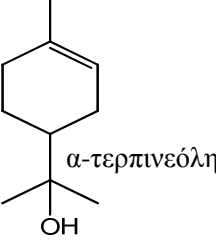
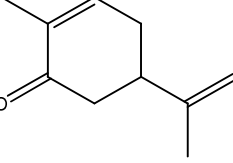
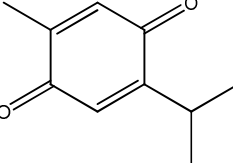
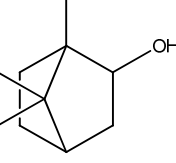
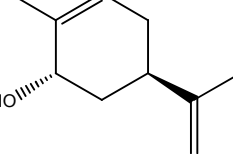
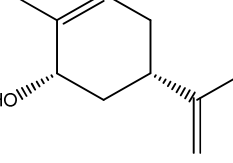
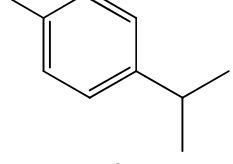
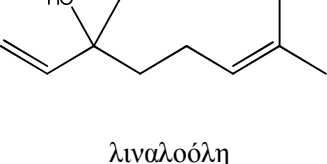
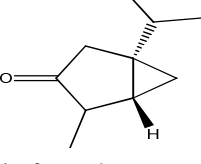
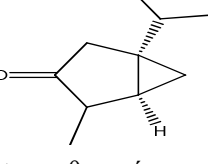
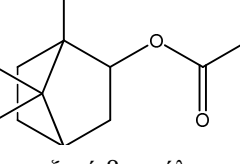
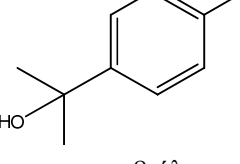
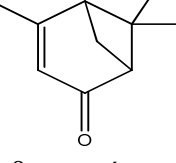
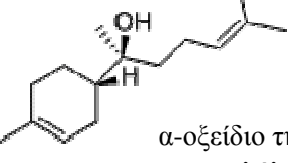
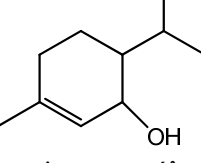
Ενώσεις	Τρόπος εκχύλισης		
	Ζεστό νερό (%)	Υπέρηχοι (%)	Νερό (θ°C περιβάλλοντος)(%)
cis-σαμπινένιο	10,10	7,87	5,57
trans-σαμπινένιο	29,95	23,98	19,22
cis-p-2 μενθεν-1-όλη	3,88	-	-
trans-p-2 μενθεν-1-όλη	2,43	-	-
τερπινεν-4-όλη	32,04	47,72	52,91
α-τερπινεόλη	11,18	12,48	13,79
cis-πιπεριτόλη	2,25	-	-
trans-πιπεριτόλη	2,25	-	-
καρβόνη	1,64	2,85	2,11
καρβακρόλη	4,27	5,09	6,40

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.7.2) παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος της ματζουράνας με τους χρόνους συγκράτησης των κορυφών που παρατηρήθηκαν.



**Σχήμα 3.7.2:** Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεψήματος της ματζουράνας.

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.7.3) παρουσιάζονται ορισμένα πτητικά συστατικά που βρέθηκαν μετά την ανάλυση των αφεψημάτων.

 νεράλη	 γερανιάλη	 θυμόλη
 καρβακρόλη	 κυμένιο	 καμφορά
 α-τερπινεόλη	 καρβόνη	 θυμοκινόνη
 βορνεόλη	 trans-καρβεόλη	 cis-καρβεόλη
 p-κυμένιο	 λιναλοόλη	 cis-θουγιόνη
 trans-θουγιόνη	 οξικό βορνύλιο	 p-κυμεν-8-όλη
 βερμπενόνη	 α-οξύδιο της μπισαμπολόλης Α	 cis-πιπεριτόλη

**Σχήμα 3.7.3:** Σημαντικότερα πτητικά συστατικά των αφηγημάτων.

Σε αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο αιθέριο έλαιο ορισμένων φυτών που χρησιμοποιήθηκαν και για τον προσδιορισμό των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων βρέθηκε ότι στο μελισσόχορτο (Ελλάδα) ταυτοποιήθηκαν συνολικά 27 συστατικά εκ των οποίων η νεράλη και η γερανιάλη που βρέθηκαν και στο αφέψημα είναι τα κύρια συστατικά, ενώ η θυμόλη και η καρβακρόλη βρίσκονται σε μικρές ποσότητες όπως και στο αφέψημα. Από τα συνολικά 22 συστατικά του αιθερίου ελαίου του φασκόμηλου απουσιάζουν οι ενώσεις λιναλοόλη, θυμόλη και καρβακρόλη. Επίσης, στο αιθέριο έλαιο του ύσσωπου και πάλι δεν ανιχνεύονται η θυμόλη και η καρβακρόλη. Τέλος στο έλαιο του δενδρολίβανου δεν παρουσιάζονται εκτός από τη θυμόλη και την καρβακρόλη, τα συστατικά trans-πινοκαμφόνη, τερπινέν-4-όλη και η p-κυμέν-8-όλη. Αυτό που παρατηρείται σε γενικές γραμμές είναι ότι σχεδόν όλα τα συστατικά που βρίσκονται στο αφέψημα είναι αυτά που έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο αιθέριο έλαιο και αποτελούν τα κύρια συστατικά του.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα συστατικά που έχουν αναλυθεί στο αφέψημα είναι πολικά και τα περισσότερα είναι οξυγονούχα τερπένια και στις περισσότερες περιπτώσεις οξυγονούχα μονοτερπένια. Αυτό που παρατηρείται σε όλα τα δείγματα είναι ότι το ζεστό αφέψημα έχει σχεδόν πάντα περισσότερα πτητικά συστατικά από τα δείγματα που προέρχονται από τους άλλους δύο τρόπους εκχύλισης. Τέλος, λόγω της πολύ μικρής περιεκτικότητας του σιδεριτή και του τσαγιού Lipton σε διάφορα συστατικά δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση των συστατικών ακόμα και στα δείγματα που προήλθαν από την εκχύλιση με το ζεστό νερό.

### **3.8. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αφεψημάτων με HPLC**

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ανάλυση των υδατοδιαλυτών συστατικών των αφεψημάτων ώστε να διερευνηθούν ορισμένα συστατικά τα οποία εισάγονται στον ανθρώπινο οργανισμό με την κατανάλωση των αφεψημάτων αυτών αλλά και να καθοριστούν ορισμένες ενώσεις που προσδίδουν στο αφέψημα αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι δύο κύριες κατηγορίες φαινολικών συστατικών που μελετήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Τα φαινολικά οξέα

αποτελούν φυσικά προϊόντα ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο, αναφέρονται συνήθως με το όρο 'φαινολικά' και έχουν ως βασική δομή τη φαινόλη (ένα αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο τουλάχιστον με μία υδροξυλομάδα). Τα φλαβονοειδή αναφέρονται συνήθως ως 'πολυφαινόλες' και περιέχουν τουλάχιστον δύο υπομονάδες φαινόλες. Τα φαινολικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα ήταν το γαλλικό, το καφεϊκό, το συριγγικό, το βανιλλικό, το p-κουμαρικό, το φερούλικό και το ροσμαρινικό οξύ ενώ, τα φλαβονοειδή ήταν η κερκετίνη, η λουτεολίνη, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η καμπφερόλη, η κατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος και η επικατεχίνη του γαλλικού οξέος. Χρησιμοποιήθηκε ακόμα και καφεΐνη η οποία ανήκει στην κατηγορία των αλκαλοειδών.

Τα δείγματα των εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν ήταν αυτά που προέρχονται από την εκχύλιση με ζεστό νερό σε θερμοκρασία 85° C, καθώς τα ζεστά αφεψήματα έχουν κατά πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τους άλλους τρόπους εκχύλισης. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού. Μετά την ανάλυση των εκχυλισμάτων των φυτών ελήφθησαν τα χρωματογραφήματά τους από τα οποία προκύπτει ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.8.1) παρουσιάζονται όλες οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα διάφορα εκχυλίσματα καθώς και η περιεκτικότητά τους στο κάθε εκχύλισμα. Η ταυτοποίηση κάθε φαινολικής ένωσης βασίστηκε στο συνδυασμό του χρόνου συγκράτησης, του φάσματος και του μήκους κύματος στο οποίο παρουσίασε το μέγιστο της απορρόφησης στο UV-Vis, σε σύγκριση με αυτά των πρότυπων ουσιών.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης συγκεκριμένων υδατοδιαλυτών συστατικών δίνονται από την καμπύλη αναφοράς κάθε πρότυπης ουσίας που χρησιμοποιήθηκε. Για την περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς σε περιοχές συγκεντρώσεων 1,5-120 ppm. Η καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 2.10.1) που χρησιμοποιήθηκε για τον παραπάνω ποσοτικό προσδιορισμό είναι η ακόλουθη:

$$y = 134,6x + 15,26$$



Αντίστοιχα, το εύρος των συγκεντρώσεων της πρότυπης καμπύλης του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (Σχήμα 2.10.2) κυμάνθηκε από 5-100 ppm και η εξίσωση είναι:

$$y = 62,80x + 51,13$$

Για τον προσδιορισμό της καφεΐνης (Σχήμα 2.10.3) οι συγκεντρώσεις ήταν από 10 έως 350 ppm. Η εξίσωση που προέκυψε είναι η ακόλουθη:

$$y = 108,9x + 820,3$$

Από τον παρακάτω πίνακα παραλείπονται οι ενώσεις οι οποίες δεν κατάφεραν να ανιχνευθούν σε κανένα φυτικό εκχύλισμα. Από τα αποτελέσματα του πίνακα αλλά και από τα επιμέρους υδατογραφήματα συμπεραίνεται ότι σε όλα τα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* εμφανίζεται το ροσμαρινικό οξύ όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία. Το ροσμαρινικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα δείγματα του μελισσόχορτου, γεγονός στο οποίο κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται και η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζει το φυτό αυτό. Η περιεκτικότητα των φυτών σε ροσμαρινικό οξύ κατά μειούμενη σειρά είναι μελισσόχορτο Κύπρου, μελισσόχορτο Ελλάδας, δίκταμος, δυόσμος, ματζουράνα, ύσσωπος, σιδερίτης, φασκόμηλο και δενδρολίβανο. Ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης ανιχνεύτηκε συνολικά σε τέσσερα φυτά. Τα φυτά αυτά κατά ελαττώμενη σειρά είναι: φασκόμηλο, δυόσμος, ματζουράνα και δενδρολίβανο.

**Πίνακας 3.8.1:** Ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα των υδατοδιαλυτών συστατικών σε ζεστά αφηνήματα.

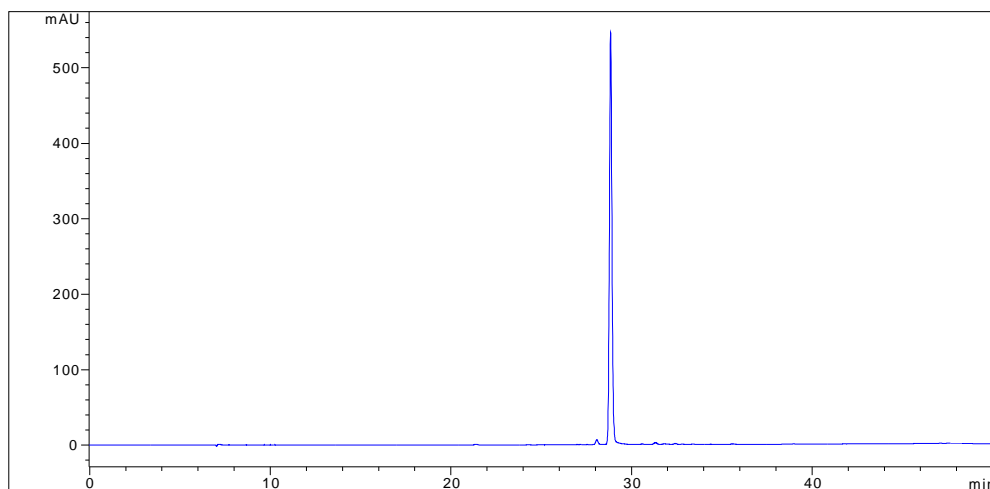
Φυτό	Φαινολικά οξέα (ppm)						Φλαβονοειδή (ppm)		Αλκαλοειδές (ppm)
	γαλλικό	καφεϊκό	συριγγικό	βανιλλικό	φερουλικό	ροσμαρινικό	7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	καμπερόλη	καφεΐνη
μελισσόχορτο	-	-	-	-	-	107,59	-	-	-
δενδρολίβανο	-	+	-	+	-	4,74	7,44	-	-
δυόσμος	+	-	-	-	-	48,29	48,97	-	-
φασκόμηλο	+	-	+	-	-	6,46	49,97	-	-
ματζουράνα	-	-	-	-	-	12,13	45,90	-	-
δίκταμος	-	-	-	-	-	55,22	-	-	-
μελισ. Cyp.	-	-	-	-	-	109,61	-	-	-
σιδερίτης	-	-	-	-	-	6,51	-	+	-
ύσσωπος	-	+	+	-	-	6,71	-	-	-
χαμομήλι	+	-	-	+	+	-	-	+	-
τσάι Lipton	-	-	-	-	-	-	-	-	189,29

+: η ένωση ανιχνεύθηκε.

Έχει βρεθεί ότι το ροσμαρινικό οξύ είναι το μοναδικό συστατικό που συνεισφέρει σημαντικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία των τεσσάρων υδροξυλομάδων στο μόριο του ροσμαρινικού οξέος καθώς άλλα φαινολικά συστατικά έχουν μόνο μία ή δύο υδροξυλομάδες (Chen *et al.*, 1997). Αυτά τα συστατικά, δεν μπορούν να είναι υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική ικανότητα, αφού δεν υπάρχουν σε σημαντικά ποσά (Hohmann *et al.*, 1999, Lu *et al.*, 1999, Guedon *et al.*, 1994). Το ροσμαρινικό οξύ βρίσκεται σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* (Tagashira *et al.*, 1998, Lamaison *et al.*, 1991, Hohmann *et al.*, 1999, Janicsak *et al.*, 1999). Έχει παρατηρηθεί ότι μερικά φαινολικά συστατικά δεν είναι σταθερά και αρχίζουν να διασπώνται, ενώ σε θερμοκρασία πάνω από τους 50° C, η θερμότητα τείνει να υδρολύσει και το ροσμαρινικό οξύ, παράγοντας με αυτό τον τρόπο καφεϊκό οξύ ( απώλεια 28,2-56,4%) (Rawn *et al.*, 1994, Caniova *et al.*, 2001). Κάτι τέτοιο δε συνέβη στην περίπτωση αυτή καθώς τα αφεψήματα θερμάνθηκαν μέχρι τους 85° C αλλά μόνο σε λίγα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* παρουσιάζεται καφεϊκό οξύ και βρίσκεται σε μικρές ποσότητες.

Επίσης, η ακτινοβολία UV έχει ισχυρή επίδραση στη θερμότητα των φαινολικών συστατικών (Rodríguez *et al.*, 1994). Στη φύση, τα φαινολικά οξέα (ροσμαρινικό, καφεϊκό και φερουλικό οξύ) εμφανίζονται σε *trans* ισομερή, αλλά με την έκθεση σε ακτινοβολία UV μετατρέπονται στο *cis* ισομερές (Buiarelli *et al.*, 1995).

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.8.1) παρουσιάζεται το χρωματογράφημα που προέκυψε κατά την ανάλυση πρότυπου διαλύματος ροσμαρινικού οξέος (2000 ppm).

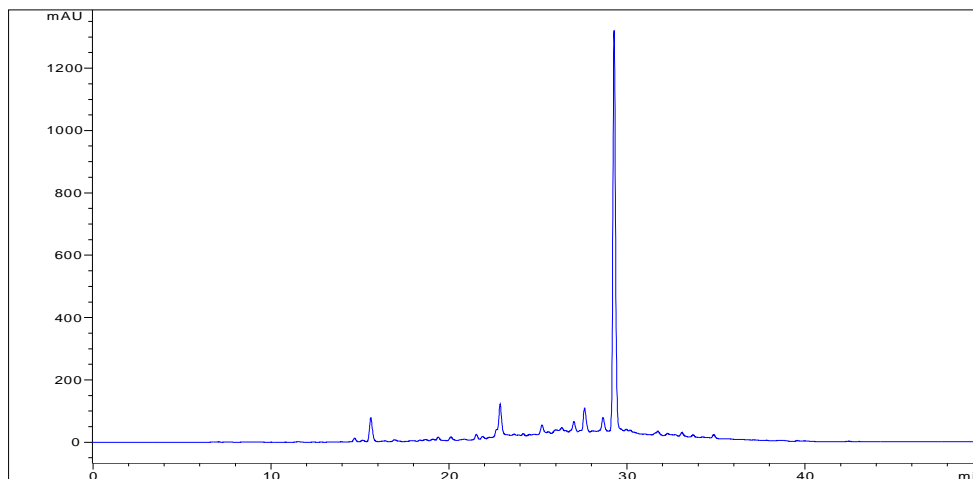


**Σχήμα 3.8.1:** HPLC-χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος του ροσμαρινικού οξέος ( $\lambda = 330 \text{ nm}$ ).

Στα δύο είδη αφεψημάτων που προέρχονται από τα δύο δείγματα του μελισσόχορτου εκτός από το ροσμαρινικό οξύ (107,59 και 109,61 ppm) δεν ταυτοποιήθηκε κάποιο άλλο συστατικό (Σχήμα 3.8.2). Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας του μελισσόχορτου σε ροσμαρινικό οξύ έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά. Η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος αναφέρεται πολύ συχνά από διάφορους ερευνητές (Zgorcka *et al.*, 2001, Caniova *et al.*, 2001). Αντίθετα, αναλύσεις σε μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού που αναφέρονται στη βιβλιογραφία έχουν επιπλέον ποσότητα καφεϊκού οξέος (Proestos *et al.*, 2005, Zgorcka *et al.*, 2001), φερουλικού οξέος και κατεχίνης (Zgorcka *et al.*, 2001) ενώ, στην ίδια έρευνα βρέθηκε ότι δύο άλλα φυτά της οικογένειας αυτής έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ, το θρούμπι και ο βασιλικός.

Το κύριο υδατοδιαλυτό συστατικό που αναφέρθηκε από τους Dastmalchi *et al.* (2008) σε φυτικό υλικό από την Τεχεράνη, ήταν το ροσμαρινικό οξύ. Το ροσμαρινικό οξύ ως κύριο συστατικό έχει αναφερθεί και σε άλλες έρευνες, αλλά και σε έρευνες που έχουν προκύψει από μελέτη άλλων φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (Carnat *et al.*, 1998, Dorman *et al.*, 2003, Zgorcka *et al.*, 2006, Ziakova *et al.*, 2002, 2003). Το λιγότερο σε αφθονία συστατικό ήταν το m-κουμαρικό οξύ. Επίσης, στα δείγματα αυτά βρέθηκαν και

τα φλαβονοειδή ναργινίνη και εσπεριδίνη, όπως και συστατικά που δεν ταυτοποιήθηκαν, όμως με βάση τη χρωματογραφική συμπεριφορά τους και τη φασματοφωτομετρία UV αναγνωρίστηκαν ως παράγωγα του υδροκιναμικού οξέος και ως φλαβονοειδή.



**Σχήμα 3.8.2:** HPLC-χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του μελισσόχορτου ( $\lambda=330$  nm).

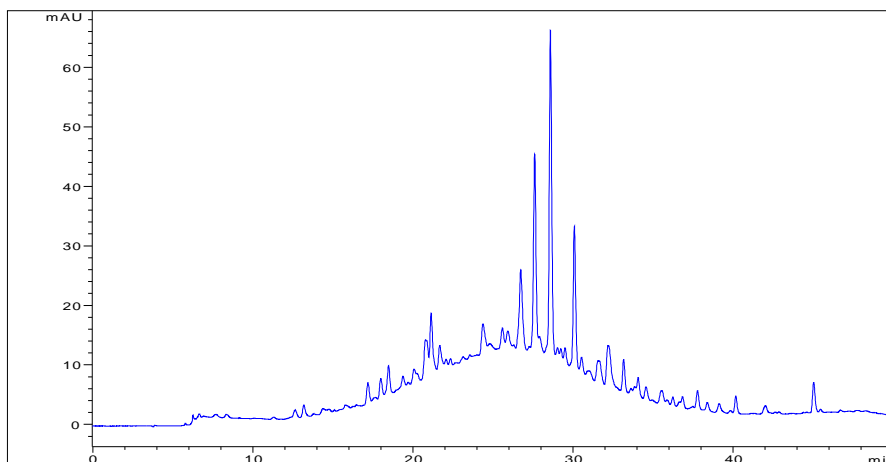
Σε πολλές έρευνες έχει αναφερθεί η παρουσία παραγώγων του βενζοϊκού οξέος, του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και άλλων γλυκοζιτών της λουτεόλης. Η απουσία αυτών των ουσιών από το δείγμα μπορεί να οφείλεται στη διαφορά που παρατηρείται στο κλίμα της κάθε περιοχής που καλλιεργείται, στη γεωγραφία και στη διαφορά της διαδικασίας εκχύλισης.

Οι Caniova και Brandstetenova (2001) μελετώντας και πάλι τα φαινολικά συστατικά του φυτού *Melissa officinalis* από περιοχή της Σλοβακίας, βρήκαν ότι οι αποδόσεις του ροσμαρινικού οξέος είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από τις αποδόσεις του καφεϊκού οξέος και των πρωτοκατεχικών οξέων. Επίσης, οι υψηλότερες αποδόσεις για όλους τους αναλύτες ήταν όταν χρησιμοποιήθηκε μείγμα μεθανόλης-νερού. Μόνο οι αποδόσεις της εκχύλισης του ροσμαρινικού οξέος είναι λίγο υψηλότερες όταν χρησιμοποιούνται μείγματα αλκοόλης-νερού σε χαμηλό pH.

Τα ίδια αποτελέσματα όπως και προηγουμένως προέκυψαν και για το δίκταμο ενώ στη βιβλιογραφία εκτός από το ροσμαρινικό οξύ (55,22 ppm) αναφέρονται και άλλα

φαινολικά συστατικά όπως το γαλλικό, το καφεϊκό, το p-κουμαρικό και η κατεχίνη (Proestos *et al.*, 2006).

Για την περίπτωση του αφεψήματος από το δενδρολίβανο βρέθηκε ροσμαρινικό οξύ σε συγκέντρωση 4,74 ppm και επιπλέον 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (7,44 ppm), καφεϊκό και βανιλλικό οξύ (Σχήμα 3.8.3). Παρόμοιες έρευνες που διεξήχθησαν από τους Proestos *et al.* (2005) βρήκαν επιπλέον συριγγικό, φερουλικό, κατεχίνη και λουτεολίνη η οποία όμως δεν ήταν συνδεδεμένη με κάποιο γλυκοζίτη. Επίσης, οι Zgorcka *et al.* (2001) βρήκαν επιπλέον p-κουμαρικό οξύ και πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ σε σχέση με άλλα φυτά που ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Από μελέτη των φλαβονοειδών που υπάρχουν στο φυτό έχει βρεθεί η λουτεολίνη και η απιγενίνη (Wojdyło *et al.*, 2007)



**Σχήμα 3.8.3:** HPLC-χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του δενδρολίβανου ( $\lambda=330$  nm).

Στο αφέψημα του δυόσμου εκτός από το ροσμαρινικό οξύ (48,29 ppm) ταυτοποιήθηκαν το γαλλικό και ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (48,97 ppm). Σε έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί για τα είδη των φλαβονοειδών βρέθηκε ότι υπάρχει κατεχίνη, επικατεχίνη καθώς και λουτεολίνη. Σε αυτή την περίπτωση η παραλαβή έγινε με εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet και με εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (CO<sub>2</sub>). Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν τα συστατικά ρουτίνη, μυρισετίνη, απιγενίνη και ναριγκενίνη. Η μεγαλύτερη απόδοση προκύπτει με τη χρήση της εκχύλισης με μεθανόλη, με μικρή

διαφορά από την περίπτωση χρήσης αιθανόλης. Η μικρότερη απόδοση παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται πετρελαϊκός αιθέρας, που δείχνει ότι τα πολικά συστατικά των φυτών εκχυλίζονται ευκολότερα από τους πιο πολικούς διαλύτες ενώ, διαλύτες μικρής πολικότητας εκχυλίζουν βιοενεργά συστατικά σε μεγάλη συγκέντρωση (Bimakt *et al.*, 2010).

Στο φασκόμηλο ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις ροσμαρινικό (6,46 ppm) γαλλικό, συριγγικό οξύ και ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (49,97 ppm). Από τις παραπάνω ενώσεις δεν αναφέρονται από τους Proestos *et al.* (2005) η δεύτερη και η τρίτη, ενώ ταυτοποίησαν το καφεϊκό καθώς και το φερουλικό, την κατεχίνη και τη λουτεολίνη σε ελεύθερη μορφή. Η έρευνα των Zgorika *et al.* (2001) εκτός από το φερουλικό και το καφεϊκό αναφέρει τη βανιλίνη και το ροσμαρινικό οξύ. Τέλος, καφεϊκό οξύ και ροσμαρινικό έχει βρεθεί σε μεθανολικό διάλυμα φασκόμηλου και από τους Min-hui *et al.* (2008) ενώ, σε ένα άλλο είδος φασκόμηλου (*Salvia virides*) ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις βανιλικό, p-κουμαρικό και φερουλικό οξύ και μάλιστα σε μεγαλύτερες περιεκτικότητες από αυτές που απαντώνται στο φυτό *Sideritis montana*. Εκτός από τα παραπάνω φαινολικά οξέα στο φυτό *Salvia officinalis* έχουν βρεθεί τα φλαβονοειδή κερκετίνη, λουτεολίνη και απιγενίνη.

Από την έρευνα προέκυψε ότι τα υδατοδιαλυτά συστατικά του αφεψημάτος του ύσσωπου ήταν το ροσμαρινικό (6,71 ppm), το συριγγικό και το καφεϊκό οξύ. Άλλα φαινολικά συστατικά του φυτού που έχουν αναφερθεί στο παρελθόν εκτός από το καφεϊκό και το συριγγικό είναι το φερουλικό και η κατεχίνη (Proestos *et al.*, 2005) ενώ οι Zgorika *et al.* (2001) βρήκαν επιπλέον βανιλικό και p-κουμαρικό.

Ακόμα, στο δείγμα της ματζουράνας, ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις ροσμαρινικό οξύ (12,13 ppm) και ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (45,90 ppm). Εκτός από τις παραπάνω ενώσεις, στη βιβλιογραφία αναφέρονται ακόμα και ποσότητες καφεϊκού και φερουλικού οξέος (Proestos *et al.*, 2005). Οι Zgorika *et al.* (2001) ταυτοποίησαν επιπλέον βανιλικό οξύ, κατεχίνη και φυσικά ροσμαρινικό σε πολύ μικρότερες όμως ποσότητες σε σχέση με το μελισσόχορτο, το δενδρολίβανο και το φασκόμηλο. Σε άλλες έρευνες, έχει ταυτοποιηθεί και το p-κουμαρικό οξύ αλλά και η κερκετίνη (Proestos *et al.*, 2006). Τέλος, έχουν βρεθεί σε ίχνη ποσότητες γαλλικού οξέος σε μεθανολικά εκχυλίσματα

φυτών (Proestos, Sereli *et al.*, 2006). Στο υδατικό εκχύλισμα του φυτού έχουν βρεθεί τα συστατικά αρμπουτίνη, εριοκιτρίνη, 7-O-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης (luteolin-7-O-rutinoside), 7-O-β-γλυκορονίδιο της λουτεολίνης (luteolin-7-O-β-glucuronide), λουτεολίνη, καφεϊκό, ροσμαρινικό και 3-O-μεθυλοροσμαρινικό οξύ (Fecka *et al.*, 2008).

Από τις διάφορες κορυφές που εμφανίζονται στο χρωματογράφημα του σιδερίτη μόνο το ροσμαρινικό οξύ (6,51 ppm) και η καμπερόλη κατάφεραν να αναγνωριστούν. Από όλα τα αφεψήματα που αναλύθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία και ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae*, μόνο ο σιδερίτης περιέχει ποσότητα καμπερόλης. Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε μεθανολικά διαλύματα του φυτού *Sideritis montana* έχουν βρεθεί τα φαινολικά οξέα βανιλλικό, φερουλικό και p-κουμαρικό οξύ. Άλλες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με LC/DAD/ESI-MS στα είδη *Sideritidis scardica* και *Sideritis raeseri* στην περίπτωση που καλλιεργούνται και που αυτοφύονται δείχνουν ότι τα φυτά περιείχαν τα ίδια συστατικά φυσικά σε πολύ διαφορετικές περιεκτικότητες. Τα συστατικά αυτά ήταν παράγωγα του υδροξυκιναμικού οξέος, phenylethanoid glycoside και flavonoid acetylglucosides (Petreska *et al.*, 2010).

Στο αφέψημα του χαμομηλιού δεν βρέθηκε καθόλου ροσμαρινικό οξύ, καθώς το φυτό αυτό ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae* και το οξύ αυτό δεν αποτελεί χαρακτηριστικό αντιοξειδωτικό. Αυτός μπορεί ενδεχομένως να είναι ο λόγος της χαμηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας του αφεψήματος του χαμομηλιού. Τα υδατοδιαλύτα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ήταν το γαλλικό, το βανιλλικό, το φερουλικό οξύ και η καμπερόλη. Με βάση την έρευνα των Novakova *et al.* (2010) βρέθηκε ότι το χαμομήλι έχει καφεϊκό οξύ, κερκετίνη, λουτεολίνη αλλά και καμπερόλη όπως βρέθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Τέλος, στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε εμπορικά σκευάσματα τσαγιού Lipton ταυτοποιήθηκε μόνο καφεΐνη και καμία από τις κατεχίνες κατεχίνη, επικατεχίνη, επικατεχίνη του γαλλικού οξέος και επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα διαλύματα και αναφέρονται πολύ συχνά και στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα οι Boloni *et al.* (2003) σε υδατικά εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού, το οποίο έχει μελετηθεί εκτεταμένα λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη τσαγιού, βρήκαν σημαντικές ποσότητες



γαλλοκατεχίνης (GC), επιγαλλοκατεχίνης (EGC), κατεχίνης (C), επιγαλλοκατεχίνης του γαλλικού οξέος (EGCG), επικατεχίνης (EC), γαλλοκατεχίνης του γαλλικού οξέος (GCG), επικατεχίνης του γαλλικού οξέος (ECG) και γαλλικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις της EGCG και της EGC να είναι σε ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα των Dong *et al.* (2010) από αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε πράσινο τσάι. Οι κατεχίνες που ταυτοποιήθηκαν ήταν κατά σειρά μειούμενης περιεκτικότητας: EGCG, EGC, EC, ECG, GC, GCG, C και CG. Από αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει και αυτές σε εμπορικά σκευάσματα πράσινου τσαγιού από το οποίο δεν είχε αφαιρεθεί το φακελάκι προκύπτει ότι οι κατεχίνες και η καφεΐνη με σειρά μειούμενης περιεκτικότητας είναι: EGCG, καφεΐνη, EGC, ECG, EC, C, GCG (Yang *et al.*, 2007) ενώ, σε άλλες που έχουν γίνει σε εμπορικά σκευάσματα μαύρου τσαγιού έχουν δείξει ότι η καφεΐνη βρίσκεται σχεδόν στη διπλάσια ποσότητα σε σχέση με την κατεχίνη που βρίσκεται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα (EGCG). Ακολουθούν οι κατεχίνες ECG, EGC, EC και τέλος το γαλλικό οξύ (Almajano *et al.*, 2008).

Εκτός από τα φαινολικά συστατικά που υπάρχουν στα διάφορα αφεψηήματα που εξετάστηκαν και της ποσότητας των ενώσεων ροσμαρινικό οξύ, 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και καφεΐνη, είναι καλό να εξεταστεί και η ποσότητα των συστατικών αυτών που υπάρχουν σε μία κούπα αφεψηήματος και που εισέρχεται στον οργανισμό με την κατανάλωση των παραπάνω αφεψημάτων. Τα συστατικά αυτά είναι κύρια, έχουν ευεργετικές ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό και προσδίδουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, ανάλογα με την ποσότητα στην οποία ανιχνεύονται.

Με βάση τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.8.2), τα φυτά ανάλογα με την περιεκτικότητα του ροσμαρινικού οξέος που καταναλώνεται μπορούν να διαχωρισθούν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα δύο δείγματα του μελισσόχορτου, η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει το δυόσμο και το δίκταμο ενώ η τρίτη κατηγορία τα φυτά ματζουράνα, σιδερίτης, φασκόμηλο, ύσσωπος και δενδρολίβανο. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος είναι αρκετά υψηλή στα δύο δείγματα μελισσόχορτου και ακολουθεί με μεγάλη διαφορά ο δυόσμος ο οποίος έχει λιγότερο από τη μισή ποσότητα ροσμαρινικού οξέος από τα δύο προηγούμενα. Για την περίπτωση του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης τα δείγματα

μπορούν να διαχωρισθούν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν ο δυόσμος, το φασκόμηλο και η ματζουράνα ενώ η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει το δενδρολίβανο όπου η περιεκτικότητα του συγκεκριμένου γλυκοζίτη είναι ελάχιστη. Δυστυχώς παρόμοια αποτελέσματα δεν έχουν αναφερθεί ως τώρα στη βιβλιογραφία ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων.

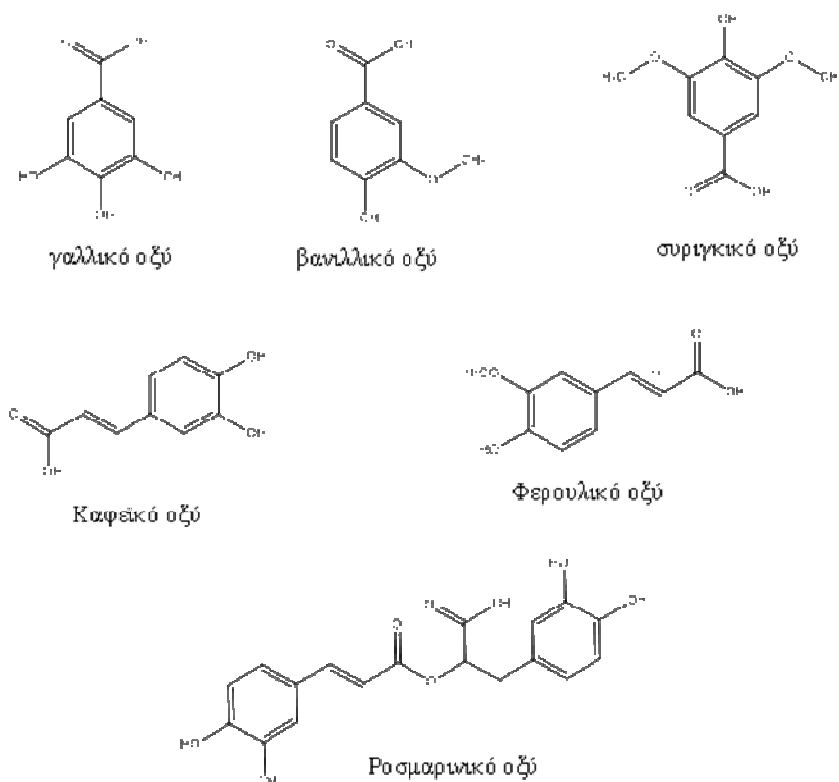
**Πίνακας 3.8.2:** Ποσότητες των ενώσεων ροσμαρινικό οξύ, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και καφεΐνη που λαμβάνονται κατά την κατανάλωση των αφεψημάτων.

Φυτικό υλικό	Ροσμαρινικό οξύ*	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	Καφεΐνη*
μελισσόχορτο	34	-	-
δενδρολίβανο	0,18	0,28	-
δυόσμος	9,76	9,96	-
φασκόμηλο	1,01	7,76	-
ματζουράνα	1,77	6,70	-
δίκταμος	12,16	-	-
μελισσόχορτο Cyp.	29,64	-	-
σιδερίτης	1,34	-	-
ύσσωπος	0,84	-	-
τσάι Lipton	-	-	52.31

\*mg/ 200 mL (κούπα)

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.8.4) παρουσιάζονται οι δομές του γαλλικού, του βανιλικού, του συριγγικού, του καφεϊκού, του φερουλικού και του ροσμαρινικού οξέος που αποτελούν τα βασικότερα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν σε διάφορα αφεψήματα.

**Σχήμα 3.8.4:** Χημικές δομές κύριων φαινολικών οξέων των αφεψημάτων.



Από τα παραπάνω (Πίνακας 3.8.2), συμπεραίνεται ότι σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* ανιχνεύεται το ροσμαρινικό οξύ. Ακόμα συμπεραίνεται ότι τα υδατοδιαλυτά συστατικά που λαμβάνονται με την κατάποση του αφεψήματος είναι σαφώς λιγότερα (20-25%) από εκείνα που προκύπτουν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των αντίστοιχων φυτικών υλικών που συνήθως τα αποτελούν τα υπέργεια τμήματα των αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών. Επίσης, παρατηρούνται μεγάλες διαφορές ως προς την ποσότητα των παρατηρούμενων συστατικών. Για μία ακόμα φορά, παρατηρείται μεγάλη διαφορά μεταξύ του δενδρολίβανου που έχουν εκχυλιστεί αρχικά με νερό σε σχέση με την εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Αυτό φανερώνει την έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού που όμως λόγω την φυσιολογίας του φυτού είναι σχετικά δύσκολη η παραλαβή τους. Εκτός από τις διαφορές που προκύπτουν από τον τρόπο εκχύλισης είναι φυσικό διαφορές να υπάρχουν και λόγω άλλων παραγόντων κυρίως περιβαλλοντικών, καλλιεργητικών αλλά και διαφορών που παρατηρούνται στα διάφορα είδη.

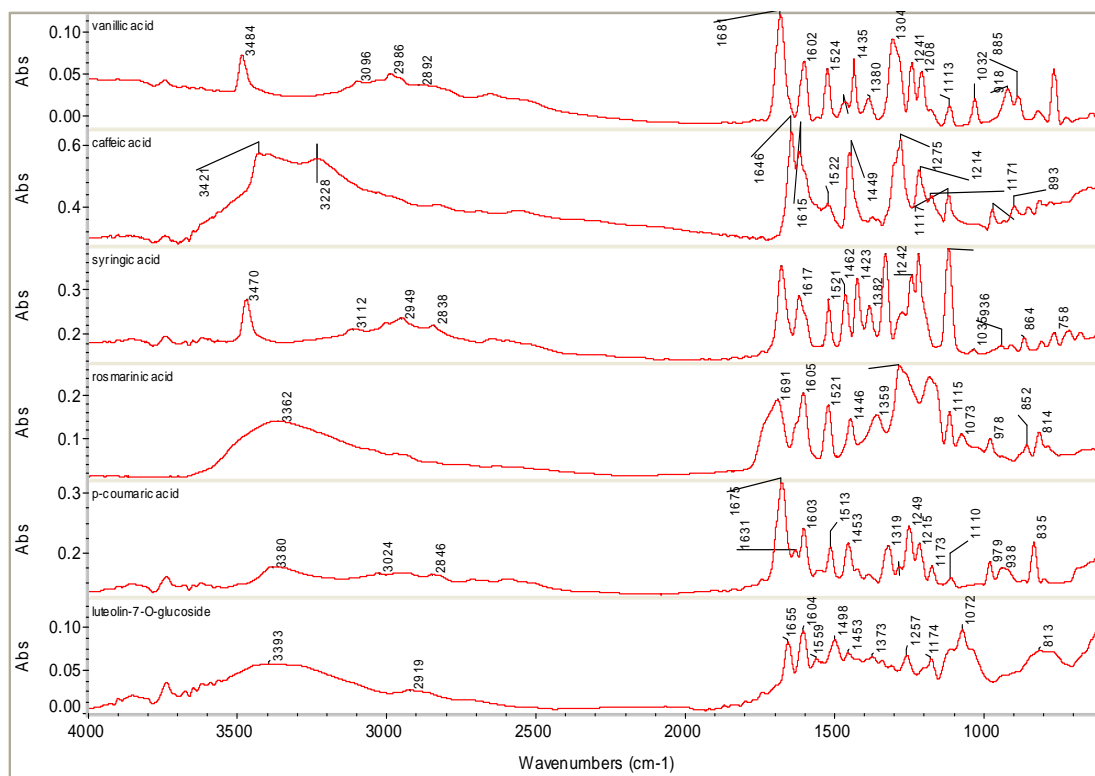
Επιπλέον, η παρουσία καφεΐνης ως πρόσθετου στο τσάι Lipton και όχι κάποιας από τις κατεχίνες που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα διαλύματα, μπορεί να είναι υπεύθυνη για τις διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στα αποτελέσματα της μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH λόγω του διαφορετικού τρόπου δράσης της καφεΐνης. Η καφεΐνη είναι ένα αλκαλοειδές με αντιοξειδωτική ικανότητα (Devasagaym *et al.*, 1996, Shi *et al.*, 1991) που πιστεύεται ότι η δράση αυτή οφείλεται στη διάσπαση της καφεΐνης στους μεταβολίτες μεθυλοξανθίνη και μεθυλουργικό οξύ (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2004).

### **3.9. Φασματοσκοπική μελέτη των εκχυλισμάτων**

Από τη χρωματογραφική μελέτη των εκχυλισμάτων, προσδιορίστηκαν οι ουσίες ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ και ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγγικό οξύ, βανιλλικό οξύ και ο γλυκοζίτης της λουτεολίνης. Στόχος της μελέτης των φασμάτων IR ήταν η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του HPLC και η προσπάθεια εφαρμογής μιας νέας πιο απλής και γρήγορης μεθόδου για τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων.

Στο σχήμα (Σχήμα 3.9.1) φαίνονται τα φάσματα FT-IR των παραπάνω προτύπων ουσιών. Οι απορροφήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων και του σκελετού των πρότυπων ουσιών καθώς και όλα τα φάσματα των εκχυλισμάτων παρουσιάζονται στο παράρτημα.

**Σχήμα 3.9.1:** Η περιοχή 4000- 600  $\text{cm}^{-1}$  των FT-IR φασμάτων των: βανιλικού οξέος, καφεϊκού οξέος, συριγγικού οξέος, ροσμαρινικού οξέος και του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης.

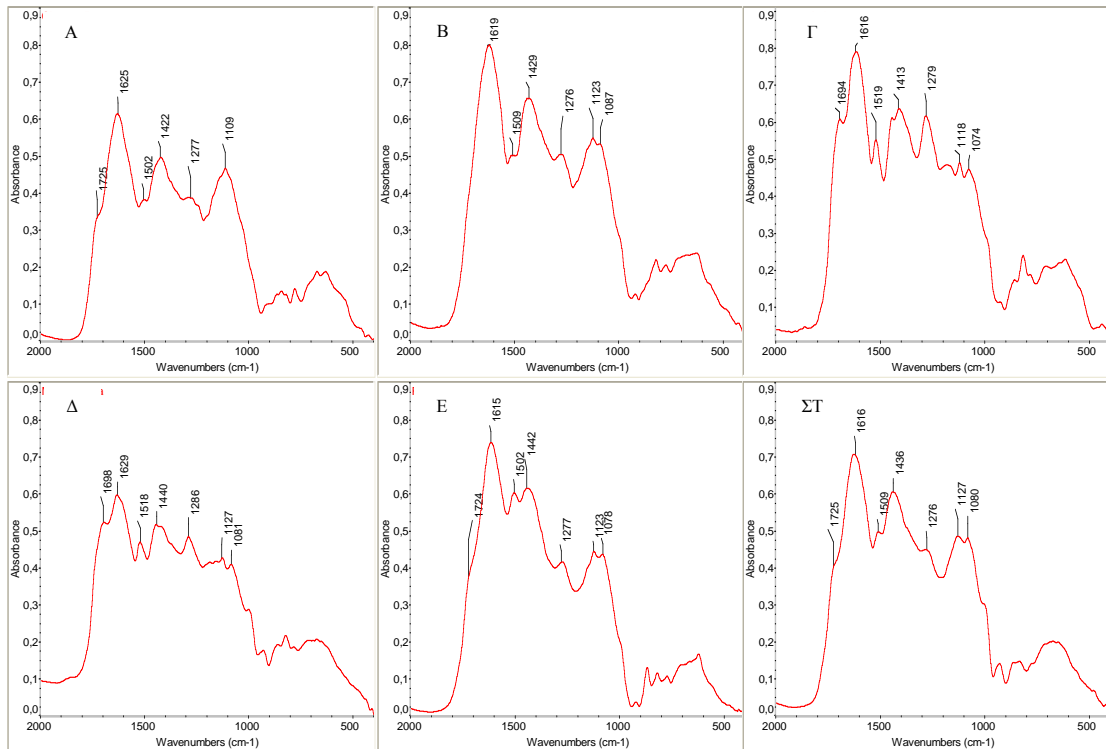


Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.9.2) φαίνονται τα φάσματα έξι διαφορετικών αφηγημάτων (χαμομήλι, δίκταμος, μελισσόχορτο, μελισσόχορτο Κύπρου, δενδρολίβανο και φασκόμηλο) που προέρχονται από την εκχύλιση με ζεστό νερό στην περιοχή από 2000 περίπου έως 400  $\text{cm}^{-1}$ . Οι φαρδιές ταινίες απορρόφησης στα φάσματα των εκχυλισμάτων υποδηλώνουν πως υπάρχει αλληλοεπικάλυψη κορυφών που προέρχονται από χαρακτηριστικές ομάδες διαφορετικών ουσιών και είναι αρκετά δύσκολο να εντοπιστούν κάποια συστατικά ξεχωριστά.

Πιο συγκεκριμένα, οι απορροφήσεις στην περιοχή 1700  $\text{cm}^{-1}$  αποδίδονται στην απορρόφηση του καρβονυλίου, ενώ στη φαρδιά ταινία απορρόφησης γύρω στα 1600  $\text{cm}^{-1}$  αλληλοεπικαλύπτονται αφ' ενός η τάση των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου και αφ'ετέρου οι απορροφήσεις των καρβοξυλικών ανιόντων στα 1600-1605  $\text{cm}^{-1}$  και το δεσμευμένο νερό στα 1620-1640  $\text{cm}^{-1}$  που δεν απομακρύνεται ακόμα και με τη

διαδικασία της λυοφιλίωσης. Η κορυφή στα  $1500\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στους C-H συζυγιακούς δεσμούς των αρωματικών δακτυλίων. Η κορυφή στα  $1400\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στον αρωματικό δακτύλιο και σε συνδυασμό της δόνησης τάσης του C-O, και της παραμόρφωσης του O-H. Οι κορυφές στα  $1127$  και  $1080\text{ cm}^{-1}$  αναφέρονται στη δόνηση τάσης του C-O των εστέρων και στις σκελετικές δονήσεις των C-OH και C-O-C των δακτυλίων της πυρανόζης των σακχάρων (Nakanishi *et al.*, 1997, Socrates, 1994, Schulz *et al.*, 2007, Παππάς, 2000).

**Σχήμα 3.9.2:** Αντιπροσωπευτικά φάσματα έξι φυτικών εκχυλισμάτων (χαμομηλιού- Α, δίκταμου- Β, μελισσόχορτου- Γ, μελισσόχορτο Κύπρου- Δ, δενδρόλιβανου- Ε και φασκόμηλου- ΣΤ) στην περιοχή  $2000-400\text{ cm}^{-1}$ .



Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι τα φάσματα είναι σχεδόν ίδια για τα αφεψημάτα που προέρχονται από το ίδιο φυτό, με διαφορετικό τρόπο εκχύλισης ενώ, παρατηρούνται κάποιες διαφορές μεταξύ των αφεψημάτων που προέρχονται από διαφορετικό φυτικό υλικό. Πιο ειδικά στα φάσματα Γ και Δ που αντιπροσωπεύουν τα δυο είδη μελισσόχορτου παρατηρείται ότι η κορυφή γύρω στα  $1520\text{ cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστική και σαφώς πιο έντονη από ότι στα υπόλοιπα φυτά. Η κορυφή αυτή είναι αρκετά έντονη

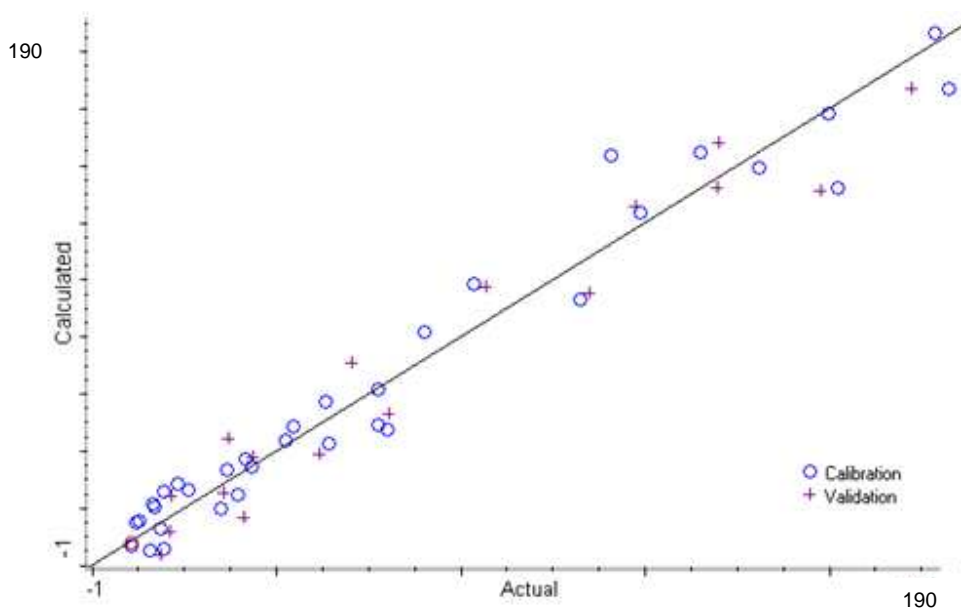
και χαρακτηριστική και στο φάσμα του ροσμαρινικού οξέος. Όσο πιο έντονη είναι η κορυφή στα  $1520\text{ cm}^{-1}$  τόσο πιο πλούσιο είναι το δείγμα σε ροσμαρινικό οξύ. Αυτή η παρατήρηση, αντικατοπτρίζεται και στα αποτελέσματα του HPLC, όπου αυτά τα δύο δείγματα ήταν τα πιο πλούσια σε ροσμαρινικό οξύ, ενώ επιπλέον αυτό ήταν και το κύριο προσδιοριζόμενο συστατικό.

### **3.10. Μέτρηση των φαινολικών συστατικών με φασματοσκοπία FT-IR**

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου σε συνδυασμό με χημειομετρεία έχει αποδειχθεί ως ένα γρήγορο και ικανό εργαλείο για την πρόβλεψη ή και την ποσοτικοποίηση κύριων συστατικών σε διάφορα προϊόντα όπως κρασί (Patz *et al.*, 2004), ποτά (Paradkar *et al.*, 2002), αιθέρια έλαια (Petrakis *et al.*, 2009). Στην παρούσα μελέτη έγινε μια προσπάθεια αξιοποίησης της ταχύτητας που παρέχει η φασματοσκοπία υπέρυθρου στον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν μοντέλα βαθμονόμησης μερικώς ελαχίστων τετραγώνων (partial least square model calibration) σε διαφορετικές περιοχές του φάσματος με το λογισμικό πρόγραμμα TurboQuant analyst software (TQ analyst) έκδοση 7.2.0.161 by Thermo Electron Corp. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες. Τα δείγματα που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση (n=35) και τα υπόλοιπα για την πρόβλεψη (n=17). Τα δείγματα που εξετάστηκαν συνολικά ήταν 60 και προκύπτουν από το μέσο όρο τριών επαναλήψεων για το κάθε δείγμα ενώ, οκτώ από αυτά αγνοήθηκαν.

Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 3.10.1) παρουσιάζεται η σχέση των δύο παραπάνω τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία όπως προέκυψε από το πρόγραμμα PLS.



**Σχήμα 3.10.1:** Καμπύλη συσχέτισης FT-IR και Folin-Ciocalteu.

Από το σχήμα παρατηρείται ότι πολλά σημεία βαθμονόμησης (o) και πρόβλεψης (+) βρίσκονται είτε πάνω στην καμπύλη είτε πολύ κοντά της. Η καμπύλη αυτή εκφράζει τη συσχέτιση μεταξύ της μεθόδου που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών και της τεχνικής FT-IR. Όταν η μέτρηση ενός δείγματος πέσει ακριβώς επάνω στην καμπύλη, δείχνει ότι τα φαινολικά συστατικά που προβλέπονται από την τεχνική FT-IR είναι πλήρως ισότιμα με αυτά της μέτρησης αναφοράς.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα στατιστικά στοιχεία (συντελεστής συσχέτισης ( $r$ ), μέση τετραγωνική ρίζα των σφαλμάτων βαθμονόμησης (RMSEC), μέση τετραγωνική ρίζα της πρόγνωσης (RMSEP), μέση τετραγωνική ρίζα σφαλμάτων της επικύρωσης (RMSCV)) για κάθε περιοχή τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.10.1. Με βάση τον πίνακα αυτό συμπεραίνεται ότι το καλύτερο μοντέλο βαθμονόμησης επιτεύχθηκε στην περιοχή του φάσματος  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ . Οι τιμές που δίνονται από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κυμαίνονται μεταξύ 8,54 και 186 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL ενώ, οι τιμές που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο FT-IR στην παραπάνω



περιοχή κυμάνθηκαν από 6,78 έως 186,82 mg φαινολικών συστατικών εκφρασμένα σε καφεϊκό οξύ/200 mL.

**Πίνακας 3.10.1:** Σύγκριση των μοντέλων βαθμονόμησης του ολικού φαινολικού περιεχομένου των φυτικών εκχυλισμάτων που αναπτύχθηκαν σε διάφορες περιοχές του φάσματος.

Περιοχή φάσματος (cm-1)	Βαθμονόμηση	Πρόβλεψη	Διασταυρούμενη επικύρωση (cross validation)		
	R	RMSEC	RMSEP	R	RMSECV
1300-1000	0,97	7,04	8,26	0,95	8,65
1800-400	0,98	5,40	6,06	0,96	7,66
1800-1500	0,98	5,51	6,06	0,96	7,69
1800-1500, 1320-1180	0,98	5,87	7,02	0,95	8,36
2000-800	0,98	5,51	5,99	0,96	7,79
4000-400	0,98	5,72	6,05	0,95	8,23

Συμπερασματικά η φασματοσκοπία υπερύθρου μπορεί να αντικαταστήσει τη μέθοδο Folin-Ciocalteu για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών καθώς τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων δε διαφέρουν σημαντικά. Η πληροφορία αυτή είναι σημαντική γιατί δίνει τη δυνατότητα μέτρησης του φαινολικού περιεχομένου ενός δείγματος σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από αυτό που απαιτεί η μέθοδος Folin-Ciocalteu που χρησιμοποιείται κατά κόρον και αναφέρεται πολύ συχνά και στη βιβλιογραφία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο προσδιορισμός του είδους και της ποσότητας των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της ελληνικής χλωρίδας, τα οποία καταναλώνονται ως αφεψημάτα, αποτελεί ένα ανοιχτό πεδίο που συγκεντρώνει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον. Δυστυχώς, είναι αρκετά δύσκολη η συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ τους λόγω των πολλών μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας αλλά και των διαφόρων τρόπων με τους οποίους πραγματοποιείται η εκχύλιση των φυτικών υλικών. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ολικών φαινολικών συστατικών καθώς και της πρόσληψης ευεργετικών για την ανθρώπινη υγεία συστατικών μετά την κατανάλωση κοινών αφεψημάτων, επομένως η αναγωγή των αποτελεσμάτων είχε ως αναφορά την κούπα.

Κατά τη μελέτη του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις μεθόδους DPPH και ABTS βρέθηκε ότι τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά την είχαν τα δύο είδη μελισσόχορτου από την περιοχή της Ελλάδας και της Κύπρου κάτι που έχει βρεθεί και από άλλους ερευνητές σε διάφορες μελέτες για τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*. Ακολουθούν κατά ελαττώμενη σειρά τα αφεψημάτα τσάι Lipton και αυτά που προέρχονται από τα φυτά δυόσμος, φασκόμηλο, δίκταμος, ματζουράνα, τσάι του βουνού, ύσσωπος, χαμομήλι, και τέλος το δενδρολίβανο. Επίσης, μεγάλη ήταν η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων στα οποία η εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί με ζεστό νερό θερμοκρασίας 85° C και στα δείγματα όπου η εκχύλιση ήταν υποβοηθούμενη από υπερήχους ή γινόταν με νερό σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η διαφορά των δύο τελευταίων τρόπων εκχύλισης είναι αρκετά μικρή. Οι τιμές που παρατηρούνται στα αφεψημάτα διέφεραν αλλά ήταν συγκρίσιμες με τις τιμές που προέκυψαν στα εκχυλίσματα μετά την εκχύλιση με τον πετρελαϊκό αιθέρα. Ακόμα βρέθηκε ότι η σχέση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα, ήταν θετική και

γραμμική, που δηλώνει ότι το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο έχει ως αποτέλεσμα την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων στα οποία είχε γίνει προσθήκη μελιού, λεμονιού και γάλακτος, τα οποία χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στην παρασκευή διαφόρων αφεψημάτων, έδειξε ότι δεν υπάρχει πάντα σταθερή μεταβολή. Αυτό που φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο είναι η περίπτωση που χρησιμοποιείται ποσότητα γάλακτος, καθώς σχεδόν σε όλα τα αφεψήματα μειώνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα όχι όμως πολύ αισθητά. Στην περίπτωση προσθήκης λεμονιού, ανάλογα με το φυτικό υλικό, παρατηρείται και αύξηση αλλά και μείωση της ικανότητας αυτής ενώ, η προσθήκη του μελιού μάλλον φαίνεται να την αυξάνει. Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα τα οποία πάρθηκαν από την εξέταση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του τσαγιού Lipton με DPPH όταν πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω προσθήκες, αφού η αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται αρκετά μικρότερη σε σχέση με τα αποτελέσματα του ABTS. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται όπως αποδείχθηκε και από τη μελέτη των υδατοδιαλυτών συστατικών με HPLC, στη μεγάλη περιεκτικότητα του αφεψήματος σε καφεΐνη και στο διαφορετικό τρόπο δράσης της σε σχέση με τα φαινολικά συστατικά.

Επίσης, κατά την φασματοσκοπική ανάλυση των λυοφιλιωμένων δειγμάτων, προέκυψε ότι τα φάσματα είναι σχεδόν τα ίδια όταν προέρχονται από ίδια φυτά με διαφορετικό όμως τρόπο εκχύλισης. Μεταξύ όλων των φυτών παρατηρούνται ελάχιστες διαφορές με σημαντικότερη την κορυφή που εμφανίζεται στα  $1520\text{ cm}^{-1}$  και η οποία αναφέρεται στα φαινολικά συστατικά. Συνεπώς τα φυτά που παρουσιάζουν μεγάλη κορυφή στην περιοχή αυτή είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά, με χαρακτηριστική περίπτωση τα δείγματα του μελισσόχορτου. Η σύγκριση της μεθόδου FT-IR και της Folin-Ciocalteu έδειξε ότι η FT-IR μπορεί να αντικαταστήσει τη Folin-Ciocalteu καθώς τα αποτελέσματά τους δε διαφέρουν σημαντικά. Έτσι λοιπόν δίνεται η δυνατότητα μέτρησης των φαινολικών συστατικών σε μικρότερο χρονικό διάστημα από αυτό που απαιτεί η Folin-Ciocalteu.

Λόγω του τρόπου εκχύλισης των φυτών, τα πτητικά συστατικά που αναλύθηκαν με την αέρια χρωματογραφία είναι κατά κύριο λόγο οξυγονούχα τερπένια και πολικά συστατικά. Τα συστατικά αυτά είναι πολύ λιγότερα από αυτά που έχουν αναλυθεί στο αιθέριο έλαιο και αναφέρονται στη βιβλιογραφία πράγμα που οφείλεται στον τρόπο

εκχύλισης του φυτικού υλικού. Στην περίπτωση χρησιμοποίησης νερού τα συστατικά που καταφέρνουν να εκχυλιστούν είναι λιγότερα και εκχυλίζονται και σε μικρότερο βαθμό. Επίσης, στα δείγματα που προέρχονταν από την εκχύλιση με ζεστό νερό τις περισσότερες φορές παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός συστατικών σε σχέση με τους άλλους δύο τρόπους εκχύλισης. Για την καλύτερη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών συστατικών αναγκαία ήταν και η μελέτη των υδατοδιαλυτών συστατικών των αφεψημάτων. Το συστατικό που βρέθηκε σε όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* είναι το ροσμαρινικό οξύ το οποίο λόγω των τεσσάρων υδροξυλομάδων που διαθέτει (ανά δύο σε όρθο θέση επάνω στους αρωματικούς δακτύλιους) θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό, κάτι που φάνηκε και από τα αποτελέσματα των δειγμάτων του μελισσόχορτου καθώς ήταν το μοναδικό συστατικό που ταυτοποιήθηκε και έχει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω πολλά από τα αφεψήματα της ελληνικής χλωρίδας που καταναλώνονται έχουν σημαντική ποσότητα φαινολικών συστατικών καθώς και ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα. Παρ' όλα αυτά είναι καλό να ληφθεί υπόψη και η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών συστατικών στον ανθρώπινο οργανισμό για να υπάρχει μία ολοκληρωμένη εικόνα της ποσότητας που τελικά χρησιμοποιείται από τον οργανισμό καθώς και των ευεργετικών επιδράσεων που φέρει η κατανάλωση των αφεψημάτων. Η εκδήλωση της αντιοξειδωτικής δράσης *in vitro* και *in vivo* μπορεί να παρουσιάζουν σημαντικές μεταξύ τους διαφορές.

Το κάθε μέλος της ομάδας των πολυφαινολών, ανάλογα με τη χημική του δομή, μπορεί να φτάνει σε διαφορετικό χρόνο στην ύψιστη τιμή στο αίμα, να μεταβολίζεται σε διαφορετικούς ρυθμούς και σε διαφορετικά όργανα και να αποβάλλεται σε διαφορετικό χρόνο. Κατά συνέπεια, εφόσον το κάθε αφέψημα έχει διαφορετικό σύνολο πολυφαινολών, θα παρέχει και ποικίλη αντιοξειδωτική ικανότητα, που δεν είναι απαραίτητο να αντιστοιχεί στη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά.

Περισσότερες έρευνες χρειάζεται να στραφούν στην ταυτοποίηση των πολυφαινολών των αφεψημάτων, κάτι που δεν έχει επιτευχθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Με την ακριβή ταυτοποίηση των πολυφαινολών θα μπορέσουν να εξηγηθούν και άμεσα οι διαφορές που

παρουσιάζουν στην αντιοξειδωτική δράση και βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών τους τα διάφορα αφεψήματα.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **Διεθνής βιβλιογραφία**

**Almajano, M.P., Carbo, R., Jimenez, J.A.L., & Gordon, M.H.** (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, 55-63.

**Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K.** (2001). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.

**Ariga, T., Koshiyama, I., & Fukushima, U.S.** (1989). Patent, 4,797,421.

**Armstrong, D. (Ed)** (1998). Free radical and antioxidant protocols, Vol 108 of methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ.

**Arora A., Nair, & M., Strasburg, G.M.** (1998). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine* 24(9), 1355-1363.

**Aruoma, I. O.** (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 199–212.

**Atoui, A., K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P.** (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27-36.

**Aziz, A.A., Edwards, C.A., Lean, M.E.J., & Crozier, A.** (1998) Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-49-O-b-glucoside and isorhamnetin-49-O-b-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radical Research*, 29, 257–269.

**Balant, L., Burki, B., Wermeille, M., & Golden, G.** (1979) Comparison of some pharmacokinetic parameters of (1)-cyanidanol-3 obtained with specific and non-specific analytical methods. *Arzneim. Forsch.* 29, 1758–1762.

**Beecher, G. R.** (2003). Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*, 133, 3248S–3254S.

- Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L., Selamat, J., Hamid, A., & Zardul, I.S.M.** Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha Spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing*, xxx (2010) xxx-xxx.
- Boloni, M., Pelillo, M., Toschi, T.G., & Lercker, G.** (2003). Analysis of green tea catechins: Comparative study between HPLC and HPCE. *Food Chemistry* 81, 631-638.
- Boskou, D.** (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 505-512.
- Bousbia, N., Abert Vian, M., Ferhat, M. A., Peticolas, E., Meklati, B. Y., & Chemat, F.** (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 144, 355-362.
- Buiarelli, F.; Cartoni, G.; Coccioli, F.; & Levetsovitu, Z.** (1995). Determination of phenolic acids in wine by high-performance liquid chromatography with microbore column. *Journal of Chromatography*, 695, 229-235.
- Burda, S., & Oleszek, W.** (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2774-2779.
- Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., & Corke, H.** (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 2872-2888.
- Cai, Y.Z., Sun, M., Xing, J., & Corke, H.** (2004b). Antioxidant phenolic constituents in roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: structure-radical scavenging activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7884-7890.
- Caniova, A., & Brandsteterova, E.** (2001). HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24 (17), 2647-2659.
- Cao, G., Sofie, E., & Prior, R.** (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.

- Carnat, A. B., Carnat, D., & Lamaison, J.-L.** (1998). The aromatic and polyphenolic compositions of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72, 301–305.
- Cassel, E., Vargas, R.M.F., Martinez, N., Lorenzo, D., & Dellacassa, E.** (2009). Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial crops and products* 29, 171-176.
- Cassidy, A., Hanley, B., & Lamuela-Raventos, R.M.** (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of Science of Food and Agriculture* 80(7), 1044-1062.
- Chan, E., W., C., Lim, Y., Y., Shong, K., L., Tan, L., B., & Wong, S.,K.** (2010). Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 185-189.
- Chauhan, R.S., Kaul, M.K., Shahi, A.K., Kumar, A., Ram, G., and Tawa, A.** (2009). Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accessing [IIIM (J) 26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial Crops and Products*, 29, 654-656.
- Chen, J.H., & Ho, C.T.** (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistr*, 45, 2374-2378.
- Cody, V., Middleton, E., & Harborne, J.B.** (1986) Plant flavonoids in biology and medicine biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships. Alan R. Liss, New York, NY.
- Cosge, B., Ipek, A., & Gurbuz, B.** (2009). GC/MS analysis of herbage essential oil from lemon balms (*Melissa officinalis* L.) grown in Turkey. *Journal of applied biological sciences*, 3(2), 136-139.
- Dastmalchi, K., Dorman, H. J., Oinonen, P. P., Darwis, Y., Laakso, I., & Hiltunen, R.** (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT*, 41, 391-400.
- De Freitas, N., & Mateus, S.** (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 83-91.

- Devasagayam, T. P., Kamat, J. P., Mohan, H., & Kesavan, P. C.** (1996). Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation induced by reactive species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1282, 63–70.
- Dong, J.-J., Ye, J.-H., Lu, J.-L., Zheng, X.-Q., & Ling, Y.-R.** Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination. *Food and Bioproducts processing*, xxx (2010) xxx-xxx.
- Dorman, H. J. D., Bachmayer, O., Kos-ar, M., & Hiltunen, R.** (2003). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4563–4569.
- Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., & Tikkanen, M.J.** (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83, 255-262.
- Dubeau, S., Samson, G., & Tajmir-Riahi, H.-A.** Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry*, xxx (2010) xxx-xxx.
- Dugas Jr, A.J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K.L., Fischer, N.H., & Winston, G.W.** (2000). Evaluation of the total peroxyl radical scavenging capacity of flavonoids: Structure-activity relationships, *Journal of Natural Products*, 63, 327–331.
- Duthie, G. G., Pedersen, M. W., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Jenkinson, A. M., McPhail, D. B. & Steele, G. M.** (1998) The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52, 733–736.
- Fecka, I. & Turek, S.** (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from *Lamiaceae*: thyme, wild thyme and sweet majoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108, 1039-1053.
- Fidler, P., Loprinzi, C. L., O' Fallon, J.R., Leitch, J.M., Lee, J.K., & Hayes, D.L.** (1996). Prospective evaluation of a chamomile mouthwash for prevention of S-FU-induced oral mucositis. *Cancer*, 77 (3), 522-525.
- Folin, O., & Ciocalteu, V.** (1927). Tyrosine and tryptophan determinations proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627.



- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M.Z., & Ruberto, G.** (1996). Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system: structure activity relationship. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 44(2), 497-501.
- Frankel, E.N., & Meyer, A.S.** (2000). Review: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1241.
- Frankel, E.N., Huang, S.-W., Kanner, J., & German, J.B.** (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1054-1059.
- Frankel, E.N., Huang, S.-W., Prior, E., & Aeschbach, R.** Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 201-208.
- Friedman, M., Kim, S. Y., Lee, S. J., Han, G. P., Han, J. S., & Lee, K. R.** (2005). Distribution of catechins, theaflavins, caffeine and theobromine in 77 teas consumed in the United States. *Journal of Food Science*, 70(9), 550–559.
- Fuhrman, B., Lavy, A. & Aviram, M.** (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 549–554.
- Gachkar, L., Yadegari, D., rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., & Rasooli, I.** (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102, 898-904.
- Gao, X.M., Xu, Z.M., & Li, Z.W.** (2000). Traditional Chinese Medicines. People's Health Publishing House, Beijing.
- Gao, Z., Huang, K., Yang, X., & Xu, H.** (1999). Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 472, 643–650.
- Graber, M.F., Perez-Correa, J.R., Verdugo, G., Del valle, J.M., & Agosin, E.** Spinning cone column isolation of rosemary essential oil. *Food Control* xxx (2009) xxx-xxx.

- Guédon, D.J.; & Pasquier, B.P.** (1994) Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Mentha x Piperita* clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 679-683.
- Haenen, G.R., Paquay, J.B., Korthouwer, R.E., & Bast, A.** (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 591–593.
- Halliwell, B.** (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344:721-724.
- Harbowy, M.E., Balentine, D.A.** (1997). Tea chemistry. *Critical Review in plant Sciences*, 16: 415–80.
- Havsteen, B.** (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharm*, 32(7):1141-1148.
- Hayouni, E.A., Chaief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., & Hamdi, M.** (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oil: their chemical composition and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 242-251.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J.** (2002). *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Hohmann, J.; Zupkó, I.; Rédei, D.; Csányi, M.; Falkay, G.; Máthé, I.; & Janicsák, G.** (1999). Protective effects of the aerial parts of *Salvia Officinalis*, *Melissa Officinalis* and *Lavandula Angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Medica*, 65, 576-578.
- Hollman, P.C.H., van Trijp, J.M.P., Buysman, M.N.C.P., van der Gaag, M.S., Mengelers, M.J.B., de Vries, J.H.M., & Katan, M.B.** (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.*, 418, 152–156.
- Hollman, P.C.H., van der Gaag, M., Mengelers, M.J.B., van Trijp, J.M.P., de Vries, J.H., & Katan, M.B.** (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biology & Medicine*, 21, 703–707.

- Horzic, D., Komes, D., Belscak, A., Ivekovic, D., & Karlovic, D.** (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115, 441–448.
- Huang, D., Boxin, O., & Prior, R.L.** (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Igarashi, K., Yoshida, T., & Suzuki, E.** (1993). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 40, 138.
- Igarashi, K., Takanashi, K., Makino, M., & Yasui, T.** (1989). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 36, 852.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., & Yankova, T.** (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 145-150.
- Janicsák, G.; Máthé, I.; Miklóssy-Vári, V.; & Blunden, G.** (1999). Comparative Studies of the Rosmarinic and Caffeic Acid Contents of Lamiaceae Species. *Biochemical. Systematics and Ecology*, 27, 733-738.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Lukic, M.** (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94, 550-557.
- Kaufman, B.P., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A., & Brielmann, H.L.** (1993). *Natural products from plants.* (pp 20-23). CRC Press.
- Kerry, N., & Rice-Evans, C.** (1999). Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. *Journal of Neurochemistry*, 73, 247–253.
- Kesic, A., Hodzic, Z., Crnkic, A., Saletovic, M., & Catovic, B.** (2010). Bioavailability of antioxidants from tea infusions with honey addition. *HealthMED- Volume 4/ Number 1.*
- Kivits, G.A.A., van der Sman, F.J.P., & Tijburg, L.B.M.** (1997) Analysis of catechins from green and black tea in humans: a specific and sensitive colorimetric assay of total catechins in biological fluids. *International Journal of Food Science & Nutrition*, 48, 387–392.

- Kontogiorgis, A.C., Pontiki, A.E., & Hadjipavlou-Litina, D.** (2005). A review on quantitative structure–activity relationships (QSAR) of natural and synthetic antioxidant compounds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5, 563–574.
- Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., & Oreopoulou, V.** (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 8, 155-162.
- Kozłowska, H., Nacz, M.** (1990). *Production, Chemistry, Nutrition, and Processing Technology* (F. Shahidi, Ed.), Van Nostrand Reinhold, New York, p. 193.
- Kroon, P., & Williamson, G.** (2005). Polyphenols: Dietary components with established benefits to health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1239–1240.
- Kuhnau, J.** (1976). “The flavonoids: a class of semi-essential food components: Their role in human nutrition”. (pp. 117-91). *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24.
- Lamaison, J.L.; Petitjean-Freytet, C.; & Carnat, A.** (1991). Lamiacées Médicinales à Propriétés Antioxydantes, Sources Potentielles d'Acide Rosmarinique. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 66 (7), 185-188.
- Langa, E., Cacho, J., Palavra, A.M.F., Burillo, J., Mainar, A.M., & Urieta, J.S.** (2009). The evolution of hyssop oil composition in the Supercritical extraction curve: Modelling of the oil extraction process. *Journal of Supercritical Fluids*, 49, 37-44.
- Langley-Evans, S. C.** (2000). Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential in humans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(5), 309–315.
- Langseth, L.** (1993). From the Editor: Antioxidants and Diseases of the Brain. *Antioxidant Vitamin Newsletter*, 4, 3.
- Lee, M.-J., Wang, Z.-Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A., & Yang, C. S.** (1995) Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 4, 393–399.
- Liang, Y., & Xu, Y.** (2003). Effects of extraction temperature on cream and extractability of black tea [*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 27-45.

- Lien, E.J., Ren, S.J., Bui, H.H., & Wang, R.** (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (3-4), 285-294.
- Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, J.** (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112, 77-83.
- Lu, M., Cai, Y.J., Fang, J.G., Zhou, Y.L., Liu, Z.L., & Wu, L.M.** (2002). Efficiency and structure-activity relationship of the antioxidant action of resveratrol and its analogs. *Pharmazie*, 57 (7), 474-478.
- Lu, Y.; & Foo, Y.** (1999). Rosmarinic acid derivatives from *Salvia Officinalis*. *Phytochemistry*, 51, 91-94.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., & Jimenez, L.** (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Maxwell, S., Cruickshank, A. & Thorpe, G.** (1994). Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*, 344, 193-194.
- Meunier, M.T., Duroux, E., Bastide, P.** (1990). *Plantes Medicine Phytotherapie*, 23(4), 267.
- Middleton, E.** (1984) "The flavonoids". pp. 335-8. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5.
- Miller, N.J. & Rice-Evans, C.A.** (1997). *Redox Rep.* 26, 195.
- Miller, N.J. & Rice-Evans, C.A.** (1996). *Redox Rep.* 2, 161.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L., Bramley, P., & Rice-Evans, C.A.** (1996). *FEBS Lett.* 384, 240.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, & V., Milner, A.** (1993). *Clinical Science.*, 84, 407.
- Min-hui, L., Jiam-min, C., Yong, & P., Pei-gen, X.** (2008). Distribution of phenolic acids in Chinese *Salvia* plants. *World Science and Technology* 10 (5), 46-52.
- Moraes-de-Souza, R.,A., Oldoni, T.,I.,C., Regitano-d'Arce, M.,A.,B., & Alencar, S.,M.** (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia Tecnologia Alimentaria*, 6(1), 41-47.

- Morton L.W, Caccetta R.A.A, Puddey I.B., & Croft K.D.** (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin Exper Pharm Phys.*, 27, 152-159.
- Nakanishi, K., & Solomon, P.H.** (1997). Infrared absorption spectroscopy, 2<sup>nd</sup> edition, Holden-Day Inc., San Francisco.
- Natella, F., Nardini, M., Felice, M.D., & Scaccini, C.** (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 47 (4), 1453-1459.
- Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M., & Zhang, H.Y.** (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS<sup>+</sup> assay. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 52 (15), 4669-4674.
- Nenadis, N., Zhang, H.-Y., & Tsimidou, M.-Z.** (2003). Structure– antioxidant activity relationships of ferulic acid derivatives: Effect of carbon side chain characteristic groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1874–1879.
- Nesbitt, P. D., Lam, Y., & Thompson, L. U.** (1999) Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed [In Process Citation]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 549–555.
- Novak, I., Zambori-Nemeth, E., Horvath, H., Seregery, Z., & Kaffka, K.** (2003). Study of essential oil components in different *Origanum* species by GC and sensory analysis. *Acta Alimentaria*, 32 (2), 14-150.
- Novakova, L., Vildova, A., Mateus, J.P., Goncalves, T., & Solich, P.** (2010). Development and application of UHPLC-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in chamomile flowers and chamomile tea extracts. *Talanta*, 82, 1271-1280.
- Orav, A., Kailas, T., & Ivask, K.** (2001). Volatile constituents of *Matricaria recutita* L. from Estonia. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry*, 104, 50, 1, 39-45.
- Packer, L., & Ong, A.S.H.** (1998). Biological oxidants: Molecular mechanisms and health effects. AOCS Press, Champaign, IL.
- Paradkar, M.M., & Irudayaraj, J.** (2002). Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chemistry*, 78(2), 261-266.

- Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C., & Kefalas, P.** (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co (II)/EDTA- induced luminal chemiluminescence and DPPH\_free radical assay. *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods*, 44, 507-512.
- Patz, C. D., Blieke, A., Ristow, R., & Dietrich, H.** (2004). Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica. Chimica. Acta* , 513, 81-89.
- Pellegrini, N., Re, R., Yang, M., & Rice-Evans, C.** (1999). Screening of Dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for antioxidant Activities Applying 2,2-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. *Methods in Enzymology*, VOL.
- Percival, M.** Antioxidants. Clinical nutrition insights. NUT031 1/96 Rev. 10/98. 1996 Advanced Nutrition Publications, Inc., Revised 1998.
- Petrakis, E., Kimbaris, A., Pappas, C., Tarantilis, P., & Polissiou, M.** (2009) Quantitative determination of 254 pennyroyal oil by FT-IR spectroscopy. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 57, 10044-10048.
- Petraska, J., Stefova, M., Ferreres, F., Moreno, D.A., Tomas-Barberan, F.A., Stefkov, G., Kulenova, S., & Gil-Izquierdo, A.** Potential bioactive phenolics of Macedonian Sideritis species used for medicinal 'Mountain tea'. *Food Chemistry* xxx (2010) xxx-xxx.
- Porter, W.L.** (1993). Paradoxical behavior of antioxadants in food and biological systems. *Toxicology and Industrial Health*, 9, 93-122.
- Povh, N.P., Marques, O.M.M., & Meireles, M.A.A.** (2001). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomile recutita* [L.] Rauschert). *Journal of Supercritical fluids*, 21, 241-256.
- Presibella, M.M., Villas-Boas, L B., Belleti, K.M., Moraes Santos, C. A., & Weffort-Santos, A.M.** (2006). Comparison of chemical constituents of chamomilla recuitita (L) Rauschert essential oil and its antichemotactic activity. *Brazilian archives of biology and technology*, Vol 49, n. 5, 717-724.
- Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G.-J.E., & Komaitis, M.** (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95, 664-671.

- Proestos, C., Sereli, D., & Komaitis, M.** (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, 95, 44-52.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., & Komaitis, M.** (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 1190-1195.
- Rajalakshmi, D., & Narasimhan, S.** (1996). Food antioxidants: Sources and methods of evaluation, in food antioxidants. (pp65-157). Ed by Madhavi, DL, Deshpande SS and Salunkhe DK, Marcel Dekker, New York.
- Ratty, A.K., Das, N.P.** (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 39, 69–79.
- Rawn, H., Pedersen, M.F.; Borum, J., Andary, C., Anthoni, U., Christophersen, C., & Nielsen, P.H.** (1994). Seasonal Variation and Distribution of Two Phenolic Compounds, Rosmarinic Acid and Caffeic Acid, in Leaves and Roots-Rhizomes of Eelgrass (*Zostera marina* L.). *Ophelia*, 40 (1), 51-61.
- Rice-Evens, C.A., Millew, N.J., Paganga, G.** (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Richelle, M., Tavazzi, T., & Offord, E.** (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3438–3442.
- Rodriguez de Sotillo, D.; Hadley, M.; & Holm, E.T.** (1994). Phenolics in aqueous potato peel extract: Extraction, identification and degradation. *Journal Food Science*, 59 (2), 649-651.
- Ross, J.A., & Kasum CM.** (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition*, Vol. 22, 19-34.
- Rusak, G., Komes, D., Likic S., Horzic D., & Kovac M.** (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110, 852–858.
- Salamon, I.** (1992). Chamomile, a medicinal plant. *The Herb, Spice and Medicinal Plant Digest*, 10:1-4.



- Sanchez-Gonzales, I., Jimenez-Escrig, A., & Saura-Calixto.** (2005). F. *Food Chemistry*, 90, 133-139.
- Scalbert A & Williamson G.** (2000). Dietary Intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, Vol. 130, 2073S-2085S.
- Scalia, S., Giuffreda, L., & Pallado, P.** (1999). Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 549-558.
- Schulz, H., Baranska, M.** (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrat. Spectrosc.* 2007, 43, 13-25
- Schwarz, K., Frankel, E.N., & German, J.B.** (1996). Partition behavior of antioxidative phenolic compounds in heterophase systems. *Fett/Lipid* 98:115-121.
- Sekher Pannala, A., Chan, T.S., O'Brien, P.J., & Rice-Evans, C.A.** (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 1161–1168.
- Sellani, I.H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannes, .A., Kchouk, M.E., & Marzouk, B.** (2009). Effects of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana L.*). *Industrial Crops and Products* 30, 395-402.
- Serafini, M., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A.** (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of nutrition*, 128, 1003–1007.
- Serafini, M., Ghiselli, A., & Ferro-Luzzi, A.** (1996) In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of clinical nutrition*, 50, 28–32.
- Shahidi, F., & Naczk, M.** (1995). *Food Phenolics: Sources, chemistry. Effects and applications.* Technomic Publishing Compan., Basel, Switzerland.
- Shi, X., Dalal, N., & Join, A.** (1991). Antioxidant behaviour of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chemistry Toxicology*, 29, 1–6.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178. System, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 1355–1363.

- Socrates, G.** (1994). Infrared characteristic group frequencies, tables and charts, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & sons, Chichester.
- Sreejayan, N., & Rao, M.N.A.* (1996). Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzeimittel-Forschung/Drug research*, 46 (1), 169-171.
- Stanner, S. A., Hughes, J., Kelly, C. N., & Buttriss, J.** (2004). A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutrition*, 7, 407–422.
- Suschke, U., Sporer, F., Schneele, J., Geiss, H. K., & Reichling, J.** (2007). Antibacterial and cytotoxic activity of *Nepeta cataria* L., *N. cataria* var. *citrioclora* (Beck) balm. and *Melissa officinalis* L. essential oil. *Natural product Communacations*, Vol. 2 (12).
- Szalontai, M., Verzar-Petri, G., & Florian, E.** (1976). Data on the antifungal effect of the biologically active components of *Matricaria chamomilla* L. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 46: 232-247.
- Szummy, A., Figiel, A., Gutierrez-Ortiz, A., & Carbonell-Barrachina, A.** (2010). Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 97, 253-260.
- Tagashira, M.; & Ohtake, Y.** (1998). A New Antioxidative 1,3-Benzodioxole from *Melissa Officinalis*. *Planta Medica*, 64, 555-558.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, N., & Mathe, G.** (2000). Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(25), 200-207.
- Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S., Osawa, T.** (1994) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 248.
- Unno, T., Kondo, K., Itakura, H., & Takeo, T.** (1996) Analysis of (2)-epigallocatechin gallate in human serum obtained after ingesting green tea. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60, 2066–2068.
- USDA** database for the flavonoid content of selected foods. (2003). [www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/FLAV/flav.html](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/FLAV/flav.html).

- Vagi, E., Simand, B., Suhajda, A., & Hethelyi, E.** (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Reserch International*, 38, 51-57.
- van het Hof, K. H., deBoer, H.S.M., Wiseman, S. A., Lien, N., Weststrate, J. A. & Tijburg, L.B.M.** (1997) Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 1125–1132.
- van het Hof, K. H., Wiseman, S. A., Yang, C. S. & Tijburg, L. B.** (1999). Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 220, 203–209.
- van Wyk, B.E., & Wink, M.** (2005). Medicinal plants of the world. (pp 177, 200, 204, 207, 221, 276, 283). Timber Press.
- Verma, R.S., Sashidhara, K.V., Yadav, A., & Naqvi, A.A.** (2010). Essential oil composition of *Majorana hortensis* (Moench) from subtropical India. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 52, 19-22.
- Whitehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., & Hale, A.** (1995). Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clinical Chemistry*, 41, 32–35
- Wilhelm, R., Klaus, K., & Juergen, S.** (2000). Method for increasing the content of flavonoids and phenolic substances in plants. BASF AG, Patent AO1N37/42.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., & Czemerys, R.** (2007). Antioxidants activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105, 940-949.
- Yang, C. S., Lee, M. J., & Chen, L. S.** (1999). Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 8, 83–89
- Yang, D. Y., Hwang, L. S., & Lin, J. T.** (2007). Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. *Journal of Chromatography A*, 1156, 312-320.
- Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I., & Nishioko, I.** (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 56(2), 213-222.

Zgorka, G., & Glowniak, K. (2006). Variation of free phenolics acid in medicinal plants belongin to the *Lamiaceae* family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 79–87.

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

**Ziakova, A., & Brandsteterova, E.** (2003). Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some Lamiaceae family plants. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 26, 443–453.

**Ziakova, A., & Brandsteterova, E.** (2002). Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 25, 3017–3032.

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

**Κουτσός, Θ.Β.** (2006). Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. (Σελ. 223-232, 301-322, 329-335) .Εκδόσεις Ζήτη.

**Λιόλιος, Χ.** (2004). Το δίκταμο της Κρήτης, τομέας Φαρμακογνωσίας-Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

**Παππάς, Χ.** (2000). Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού κενάφ. Διδακτορική διατριβή.

**Ραγκούση- Ιγνατιάδου, Β.** (2009). Χημεία Φυσικών Προϊόντων. (Σελ. 27-50). Εκδόσεις Συμμετρία.

**Ταραντίλης, Π., & Πολυσίου, Μ.** (2008). Ενόργανη ανάλυση. (Σελ. 6, 8, 23-85, 119-122). Πανεπιστημιακές σημειώσεις.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### I. Συντμήσεις

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	2,2'- αζινοδι (3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)
ΑΣΚΑΦΕΦΑ	-	Αγροτικός Συνεταιρισμός Καλλιεργητών Αρωματικών, Φαρμακευτικών και ενεργειακών Φυτών Αιτωλοακαρνανίας
Ar	argon	αργό
BHA	Butylated Hydroxytoluene	βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο
BHT	Butylated Hydroxyanisole	βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη
C		κατεχίνη
DAD	Diode Array Detector	ανιχνευτής με συστοιχία διόδων
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2 διφαινυλ-πικρυλ-υδραζίλιο
DRIFT	Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared spectroscopy	τεχνική διάχυτης ανάκλασης
EC	epicatechin	επικατεχίνη
ECG	epicatechingallate	επικατεχίνη του γαλλικού οξέος
EGC	epigallocatechin	επιγαλλοκατεχίνη
EGCG	epigallocatechingallate	επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος
ET	Electron Transfer	μεταφορά ηλεκτρονίου
FT-IR	Fourier transform infra red spectroscopy	φασματοσκοπία υπερώθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier
GC	galocatechin	γαλλοκατεχίνη
GCG	galocatechingallate	γαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος
GC-MS	Gas Chromatography	αέρια χρωματογραφία
HAT	Hydrogen Atom transfer	μεταφορά ατόμου υδρογόνου
He	helium	ήλιο
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
LC/DAD/ESI-MS	Liquid Chromatography/Diode Array Detector/ Electrospray Ionization- Mass Spectrometry	-
m/e	mass-to-charge ratio	μάζα/φορτίο
MS	Mass Spectrometry	φασματομετρία μαζών
N <sub>2</sub>	nitrogen	άζωτο
RMSEC	Root Mean Squared Error of Calibration	-
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation	-
RMSEP	Root Mean Squared Error of Prediction	-
RNS	Reactive Nitrogen Species	ενεργά είδη αζώτου
ROS	Reactive Oxygen Species	ενεργά είδη οξυγόνου
TBHQ	tert-Butylhydroquinone	tert-βούτυλο-υδροκινόνη
UV-VIS	Ultraviolet-Visible	φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού

## II. Πίνακες με αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

**Πίνακας 1:** Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS.

Συγκέντρωση (μg Trolox/3 mL)	% Παρεμπόδιση
0	0
0,0075	6,88
0,015	18,72
0,0225	29,67
0,03	38,88
0,045	61,74
0,06	85,14

**Πίνακας 2:** Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH.

Συγκέντρωση (μg Trolox/3 mL)	% Παρεμπόδιση
0	0
0,0075	6,90
0,015	15,32
0,0225	23,66
0,03	31,23
0,045	45,31
0,06	64,27

**Πίνακας 3:** Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου με Folin-Ciocalteu.

Συγκέντρωση (μg καφεϊκού οξέος/10 mL)	% Απορρόφηση
0	0,054
5	0,102
10	0,210
20	0,425
40	0,636
60	0,840
80	1,047

**Πίνακας 4:** Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ροσμαρινικού οξέος.

<b>Συγκέντρωση σε ppm</b>	<b>Εμβαδόν καρυφής</b>
1,5	198,5
4	546,45
8	1083,95
15	2137,10
40	5526,30
70	9119,80
100	13472,67
120	16324,15

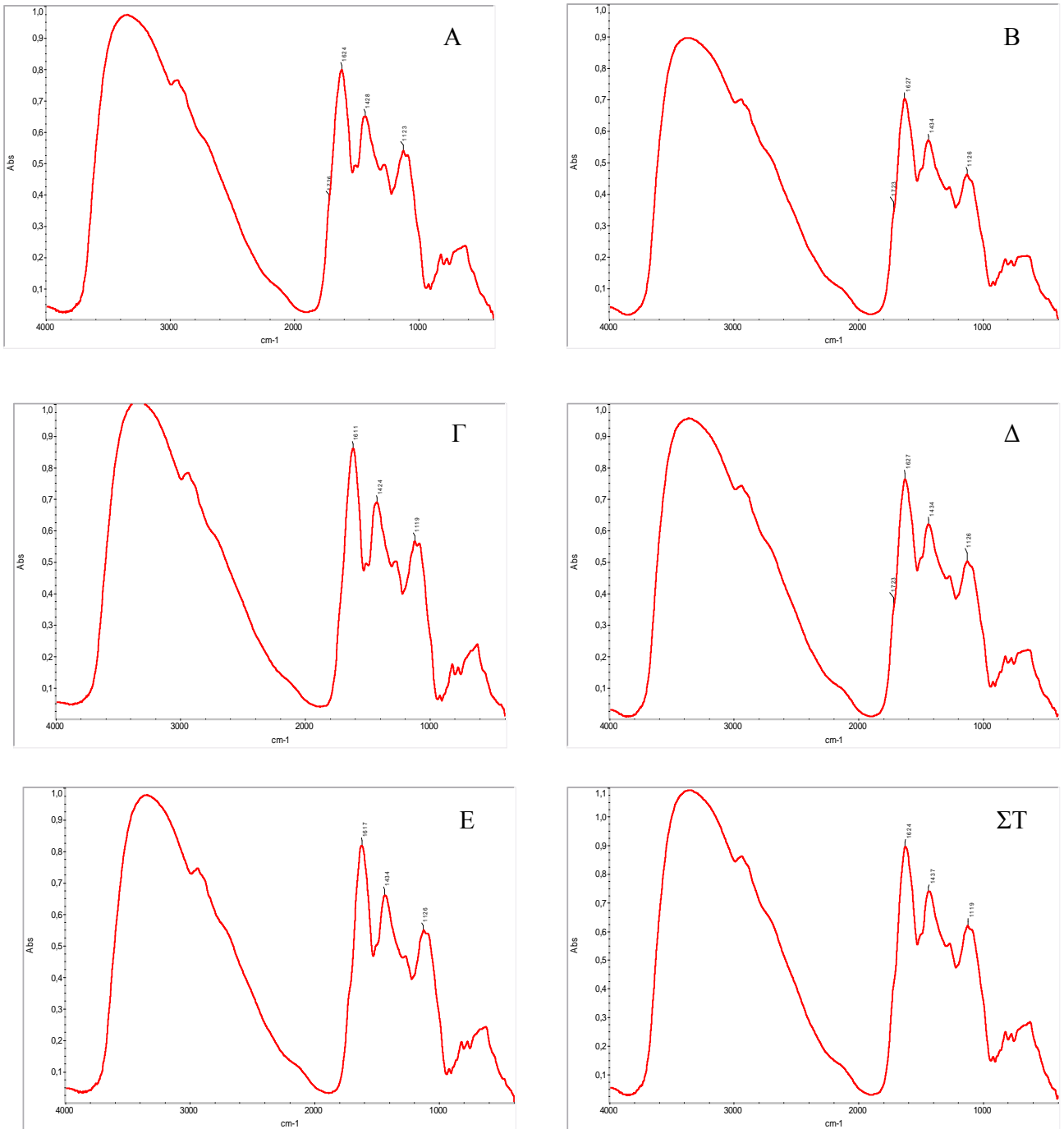
**Πίνακας 5:** Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης.

<b>Συγκέντρωση σε ppm</b>	<b>Εμβαδόν καρυφής</b>
5	294,8
10	639,9
27	1815,1
50	3296,2
100	6268,3

**Πίνακας 5:** Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της καφεΐνης.

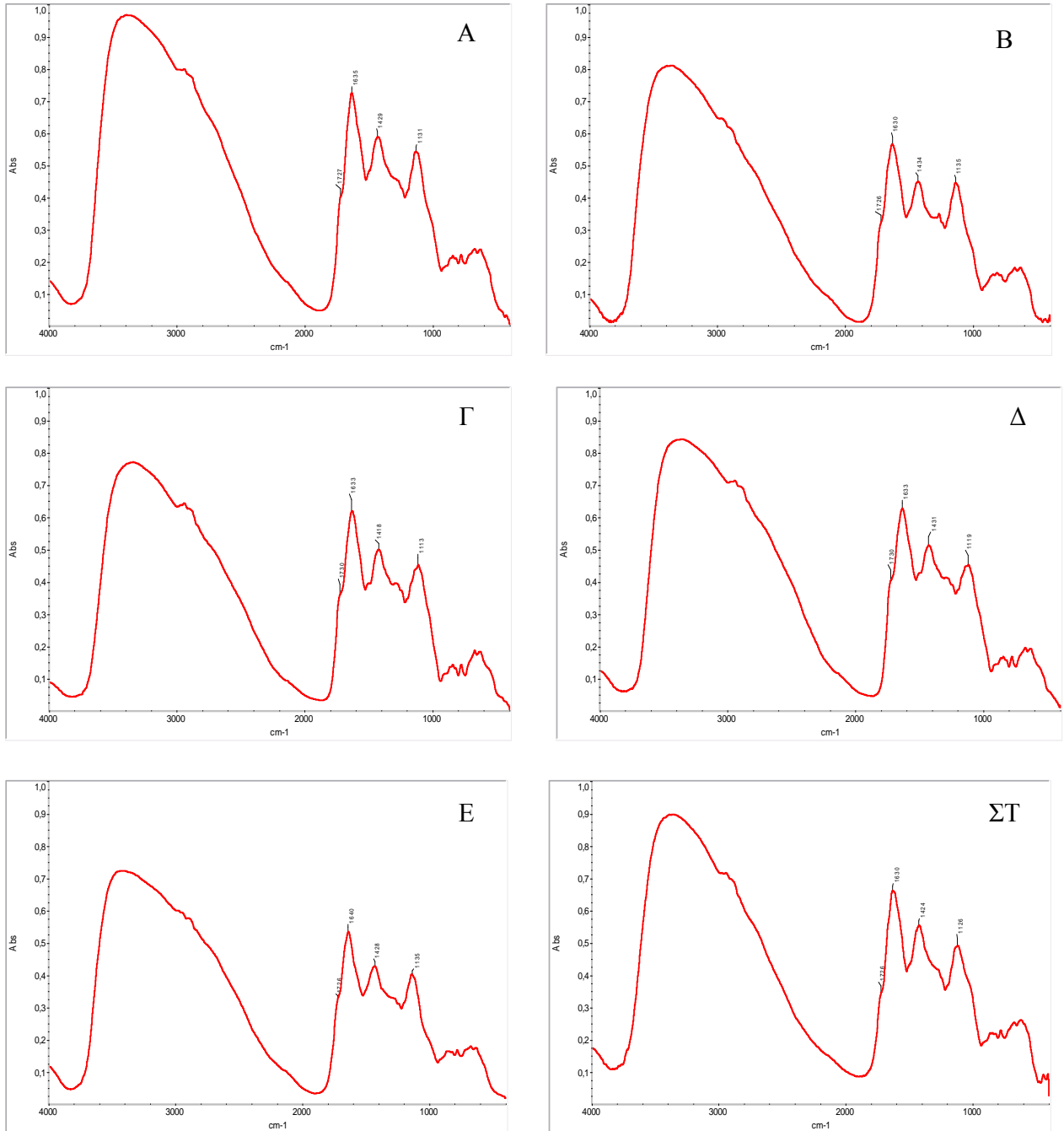
<b>Συγκέντρωση σε ppm</b>	<b>Εμβαδόν καρυφής</b>
10	1327,4
75	9582,4
225	25607,3
350	38653,3

### III. Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων

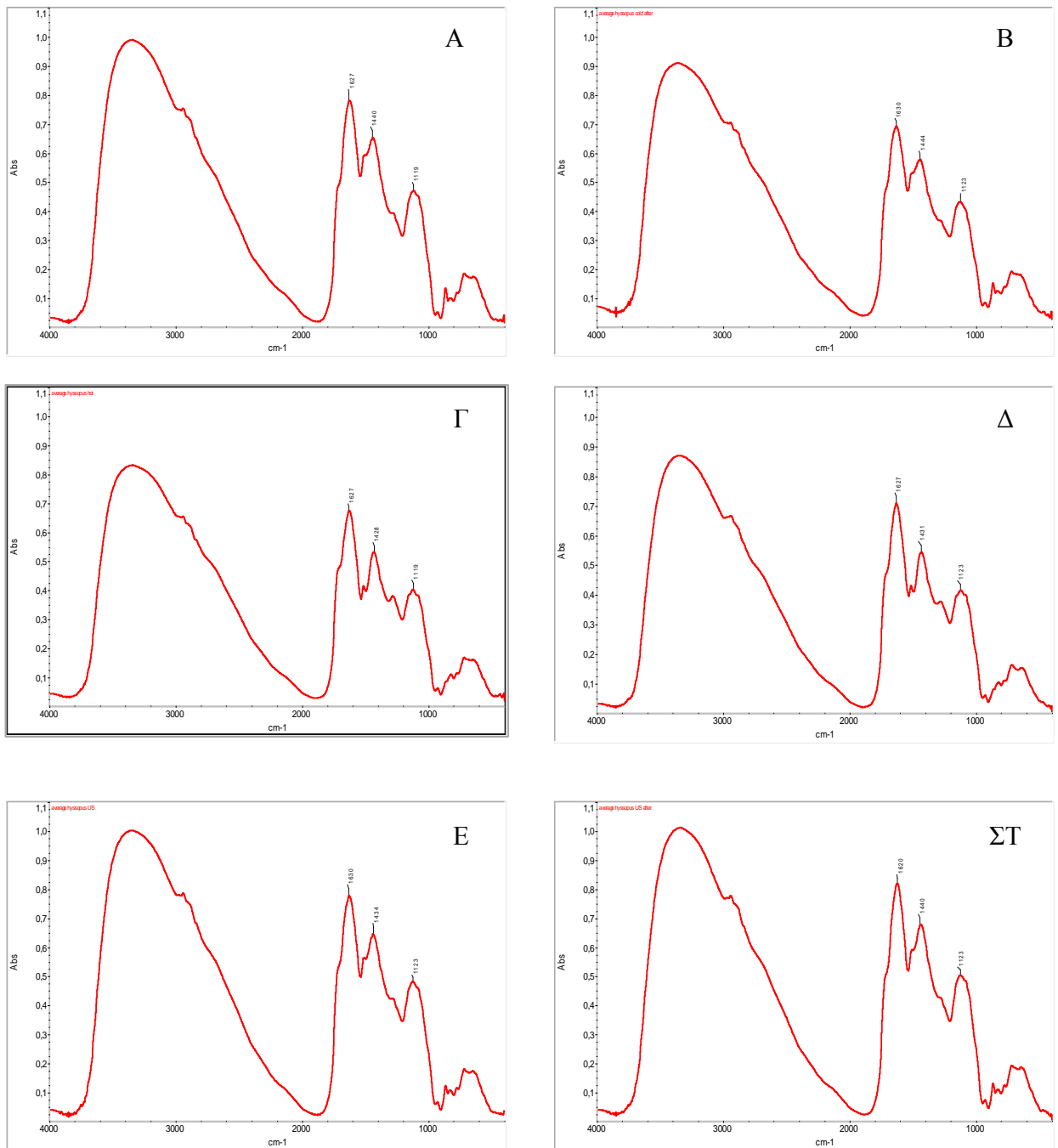


Σχήμα 1: Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων του δίκταμου.

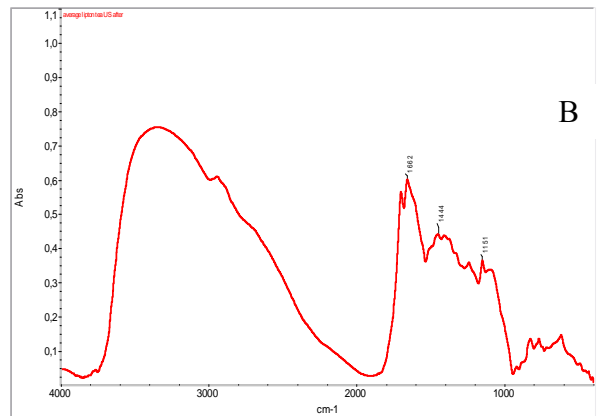
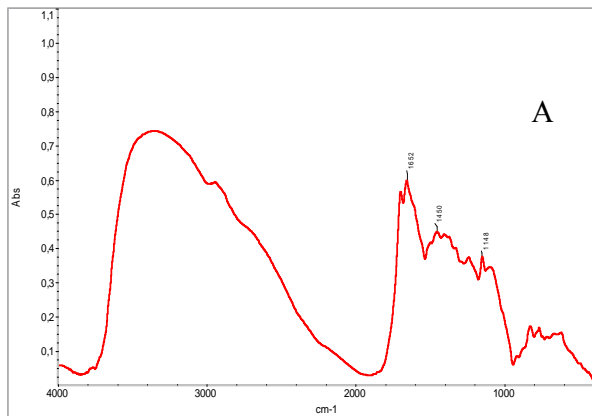
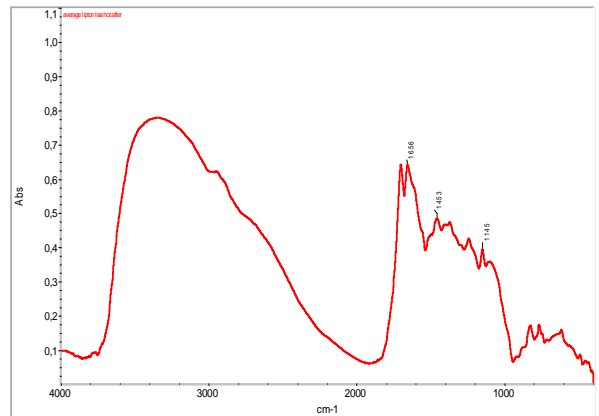
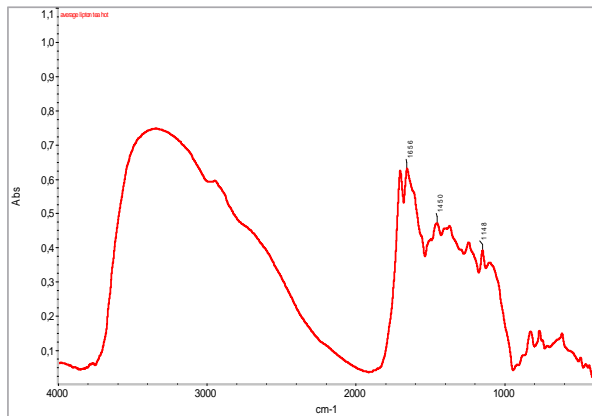
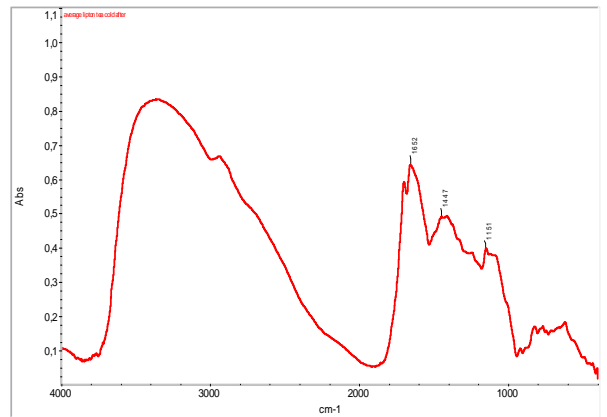
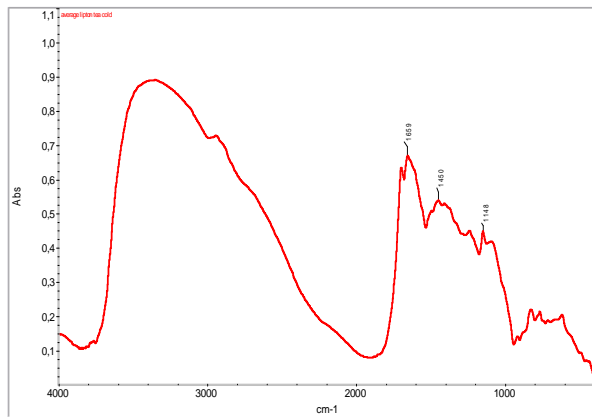




Σχήμα 2: Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων του χαμομηλιού.

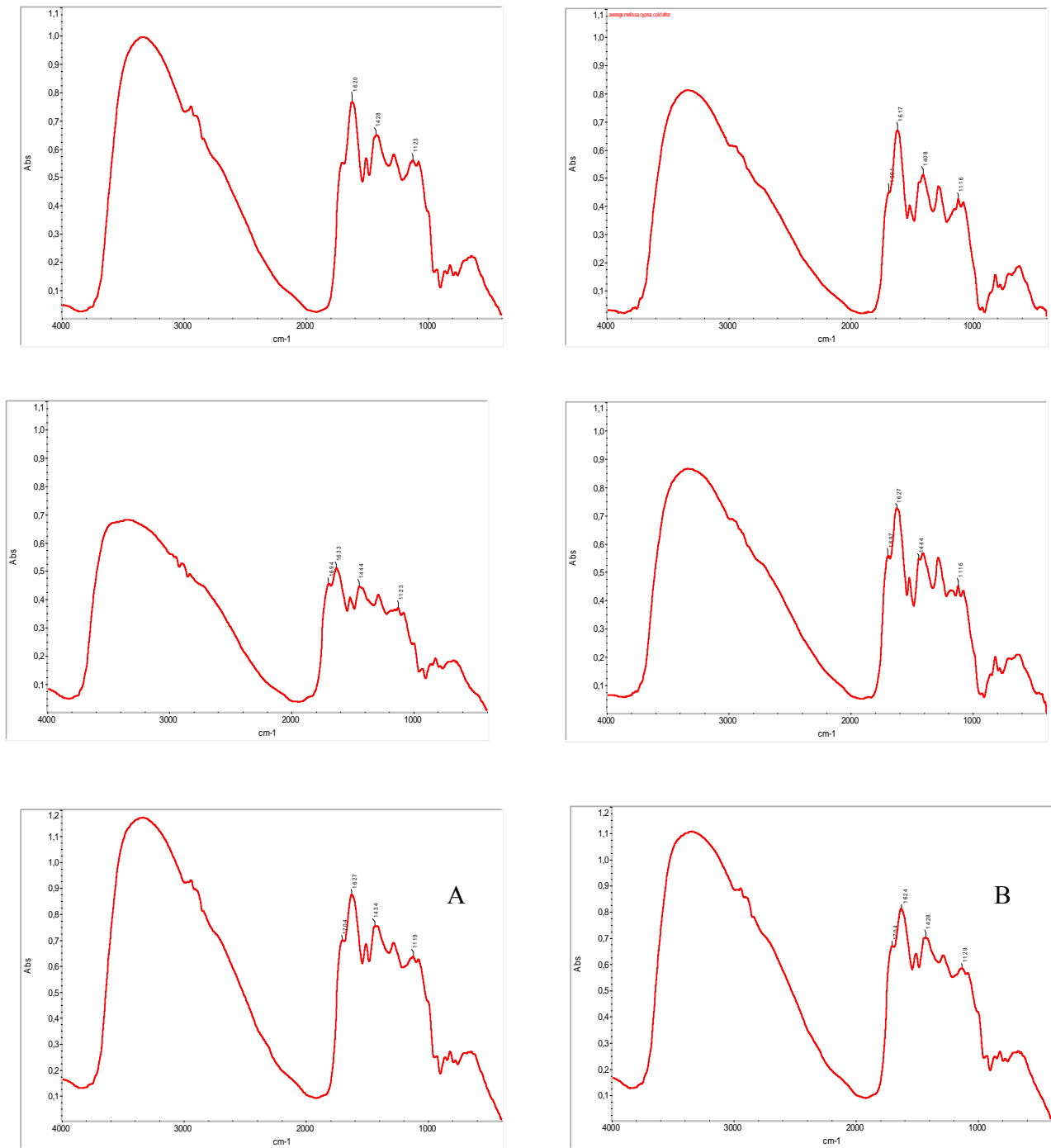


Σχήμα 3: Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων του ύσσωπου.



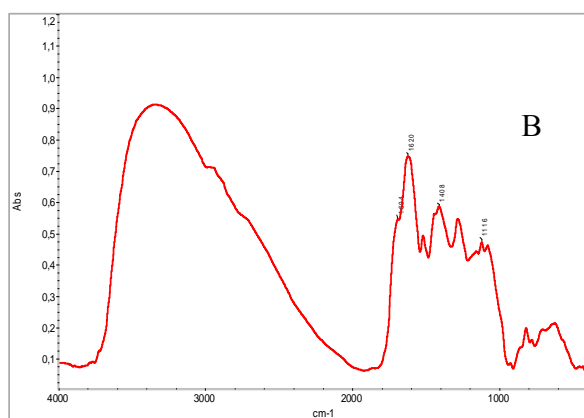
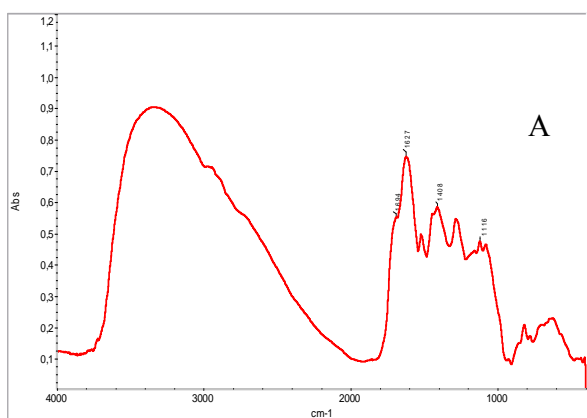
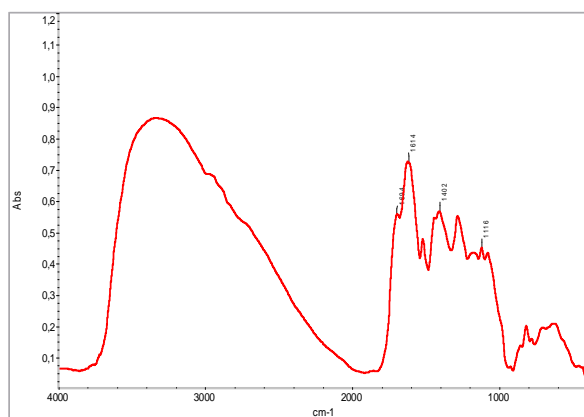
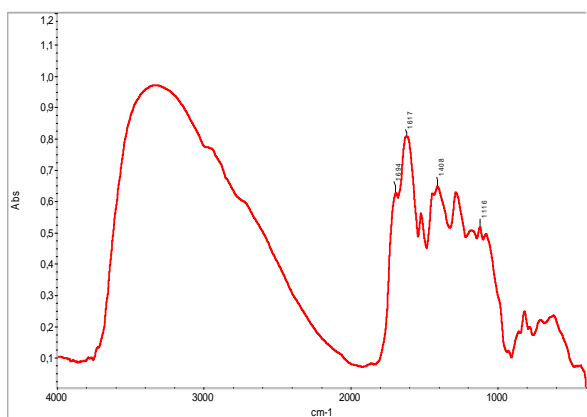
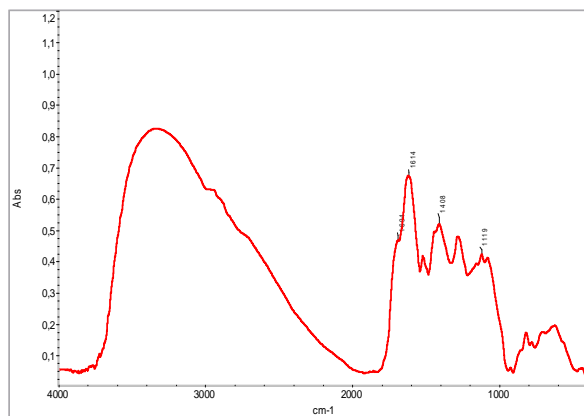
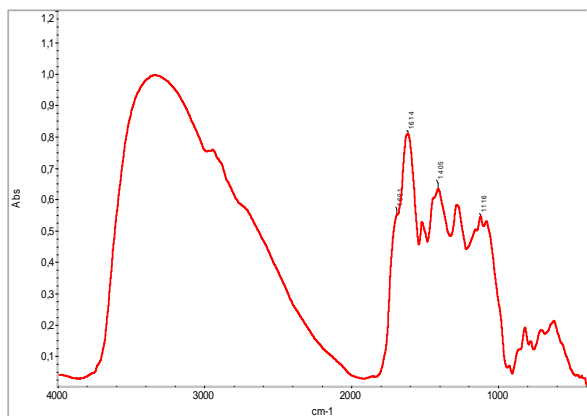
Σχήμα 4: Φάσματα FT-IR εκχυλισμάτων του τσαγιού Lipton.

Δ



Σχήμα 5: Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων του μελισσόχορτου (Ελλάδα).

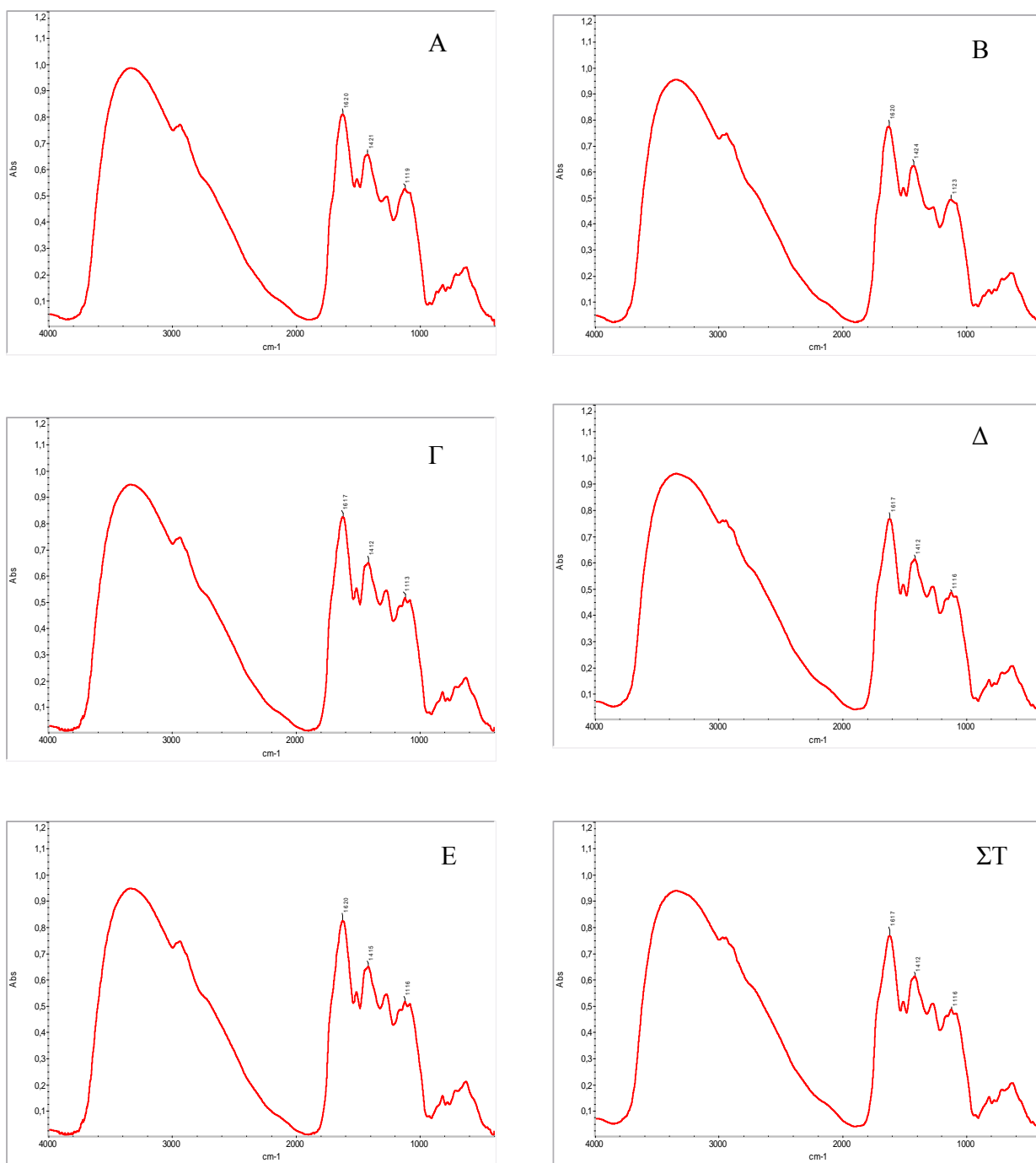
Δ



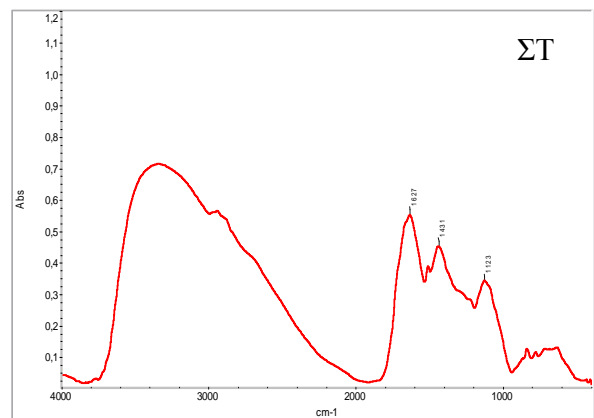
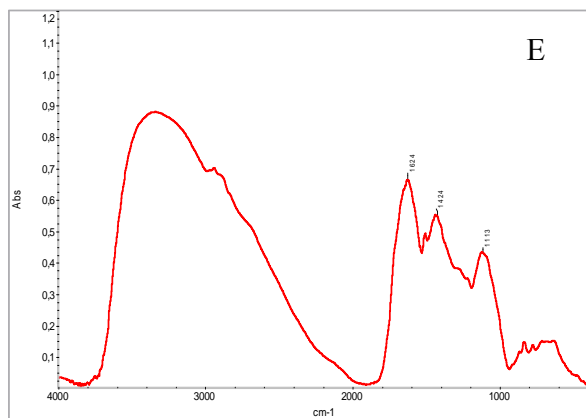
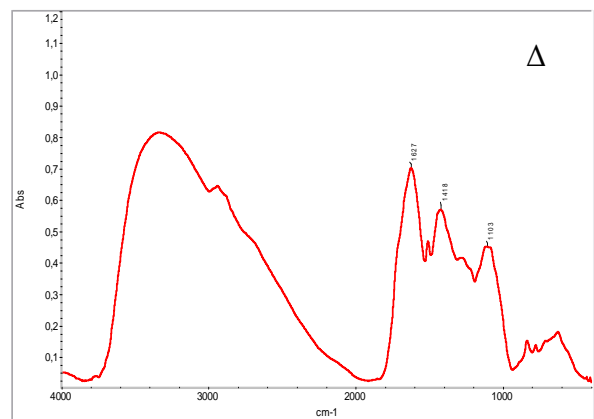
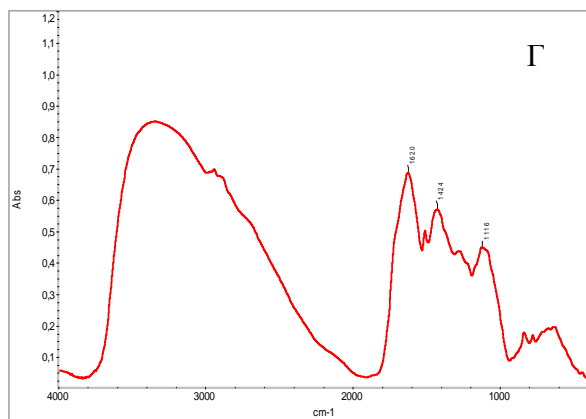
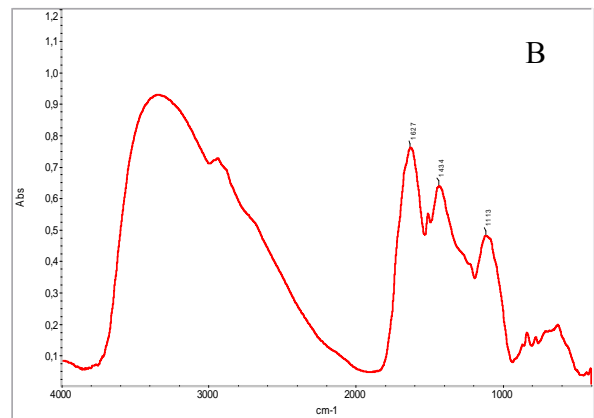
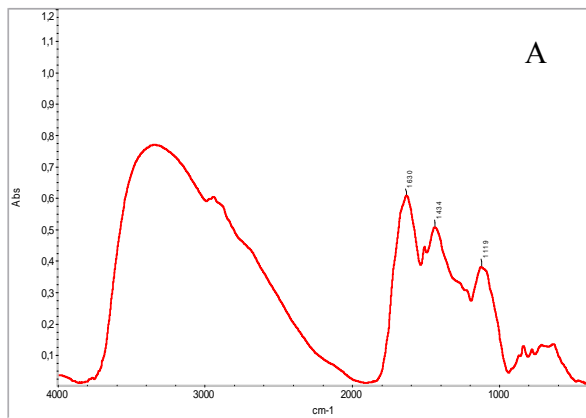
$\Gamma$

$\Delta$

**Σχήμα 6:** Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων του μελισσόχορτου (Κύπρος).

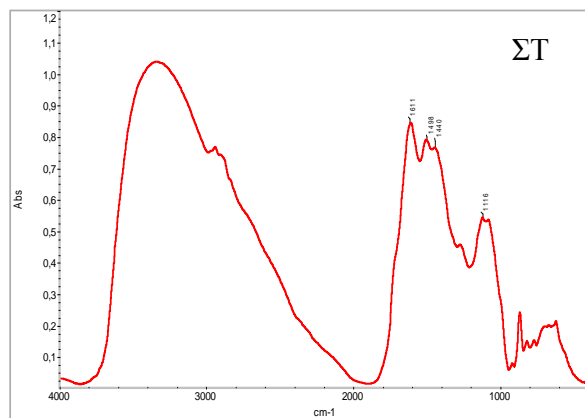
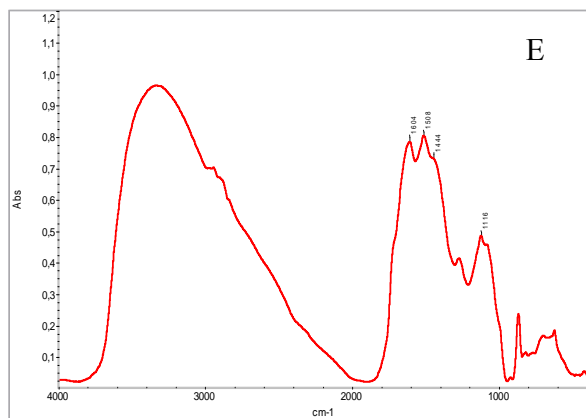
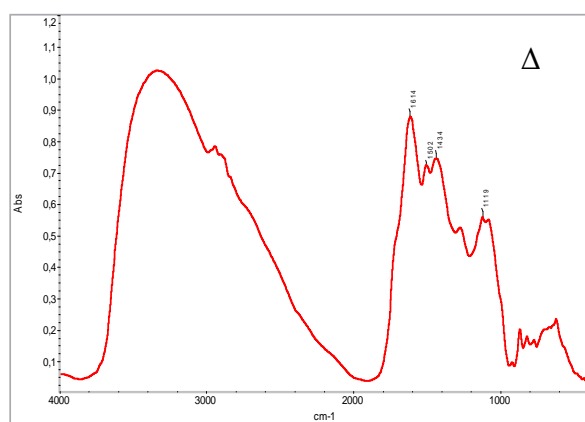
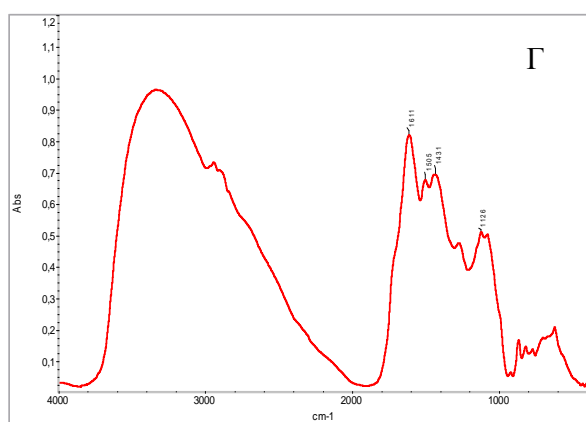
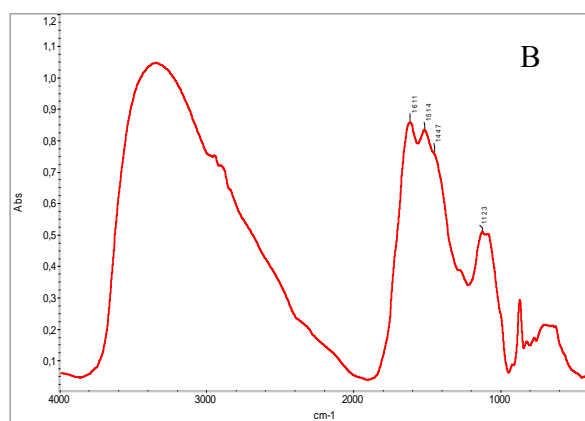
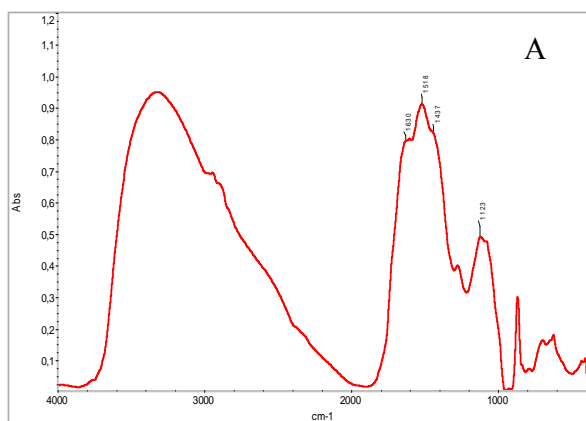


**Σχήμα 7:** Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων του δυόσμου.

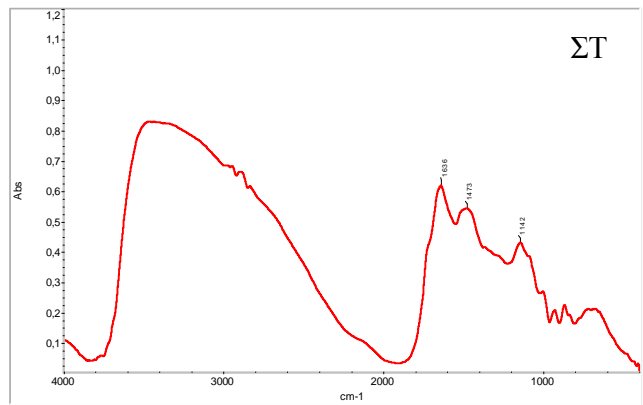
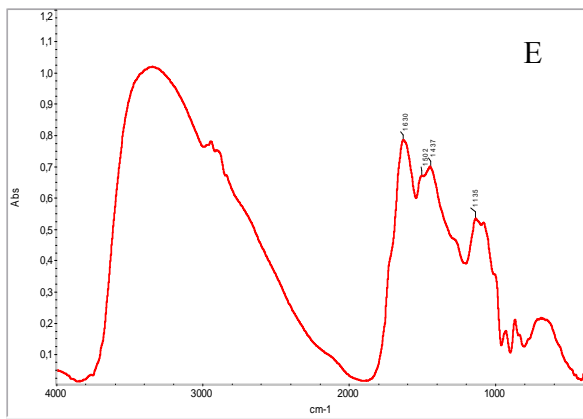
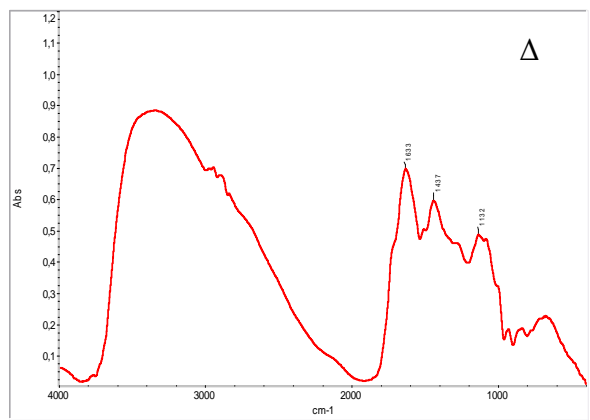
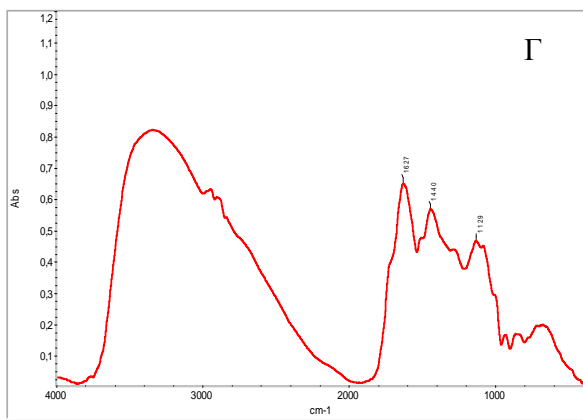
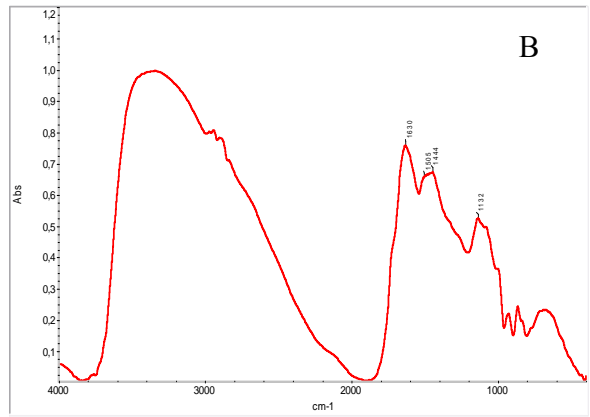
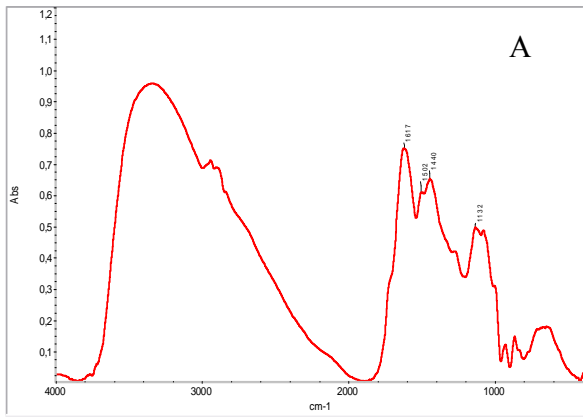


**Σχήμα 8:** Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων της ματζουράνας.





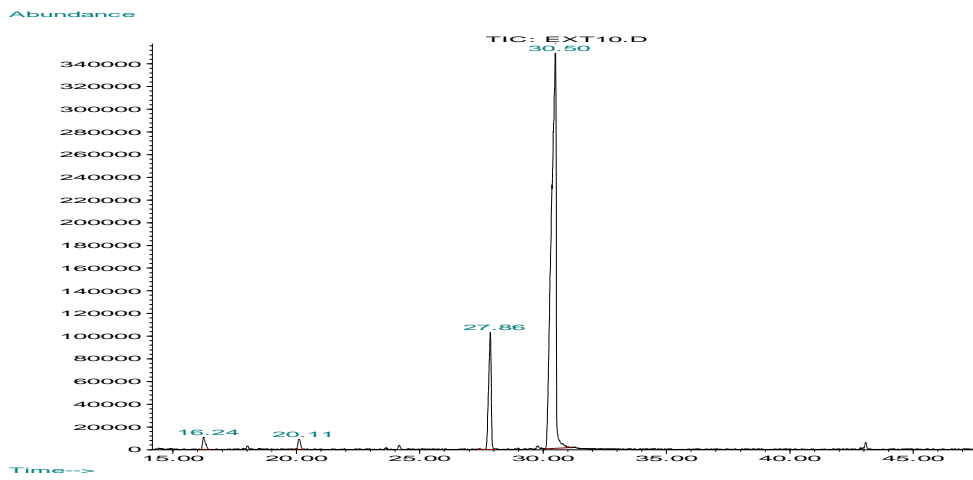
Σχήμα 9: Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων του δενδρολίβανου.



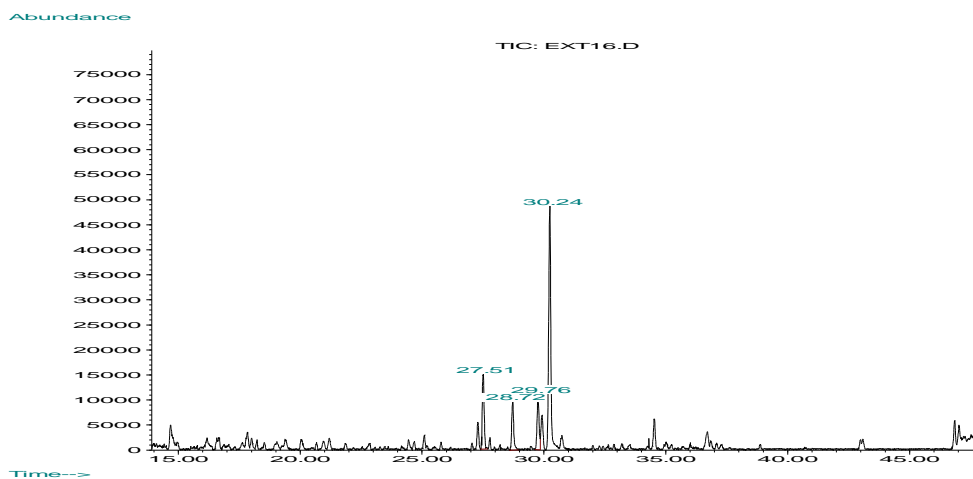
Σχήμα 10: Φάσματα FT-IR των εκχυλισμάτων του φασκόμηλου.

Όπου Α: κρύο αφέψημα, Β: κρύο εκχύλισμα σε πετρελαϊκό αιθέρα, Γ: ζεστό αφέψημα, Δ: ζεστό αφέψημα σε πετρελαϊκό αιθέρα, Ε: αφέψημα σε υπερήχους, ΣΤ: αφέψημα σε υπερήχους σε πετρελαϊκό αιθέρα.

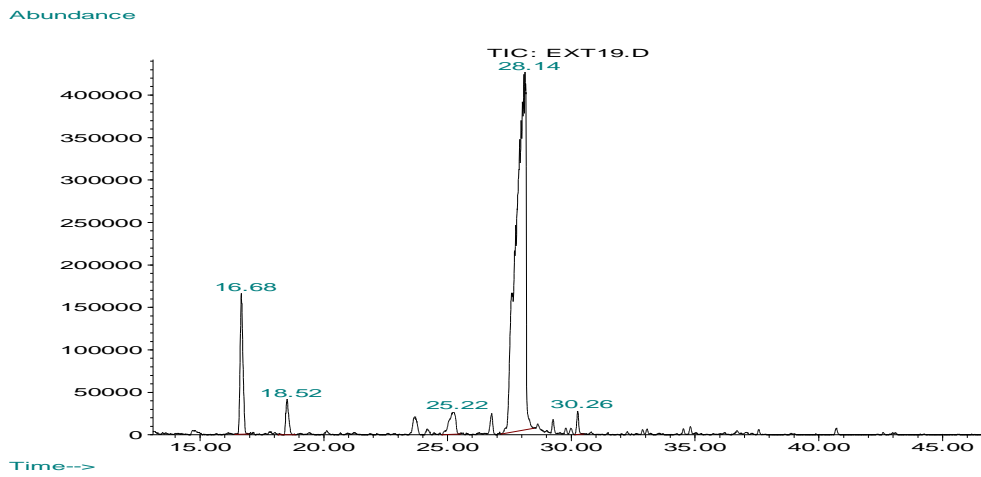
#### IV. Χρωματογραφήματα από το GC-MS των ζεστών εκχυλισμάτων.



Σχήμα 1: Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεψήματος του δίκταμου.

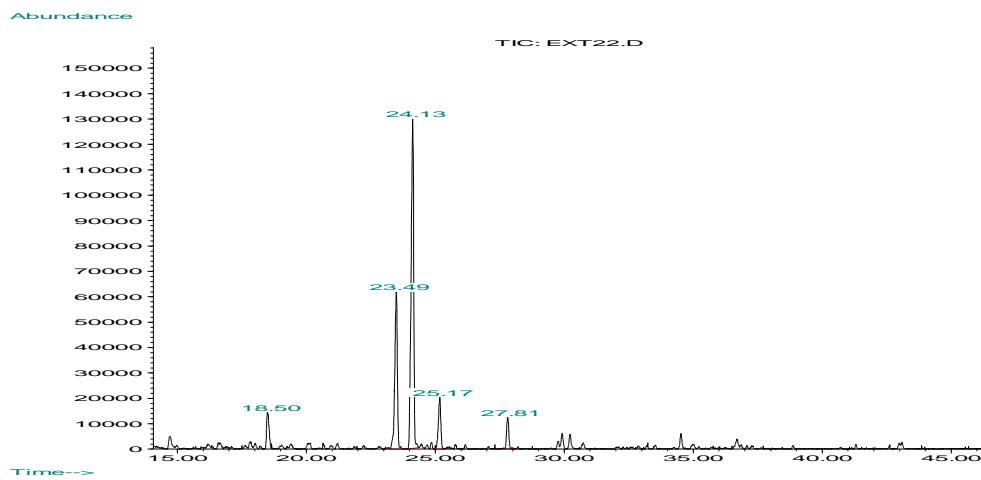


Σχήμα 2: Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεψήματος του μελισσόχορτου (Κύπρος).

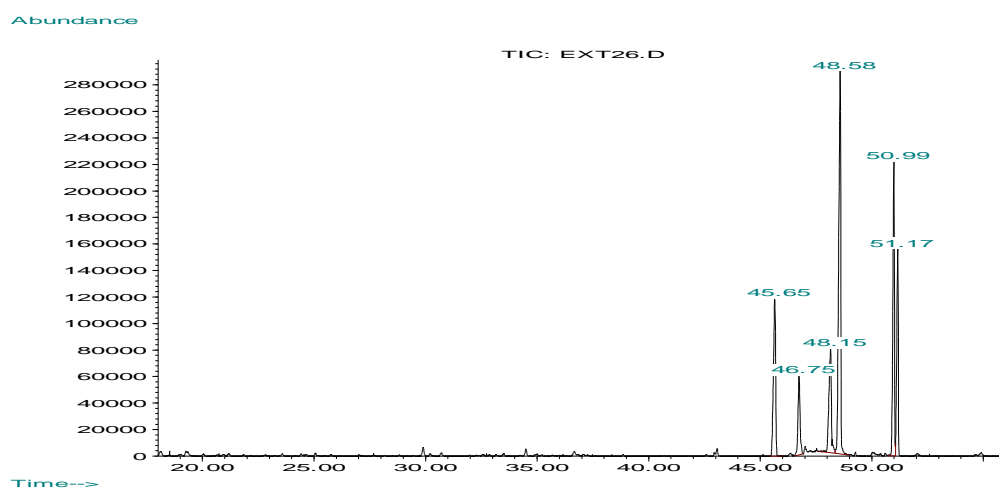


Σχ

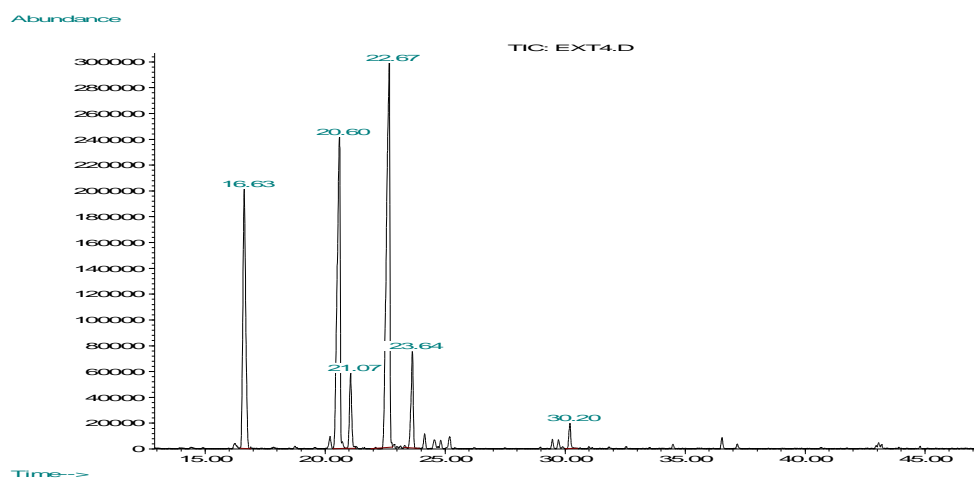
Σχήμα 3: Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεψήματος του δυόσμου.



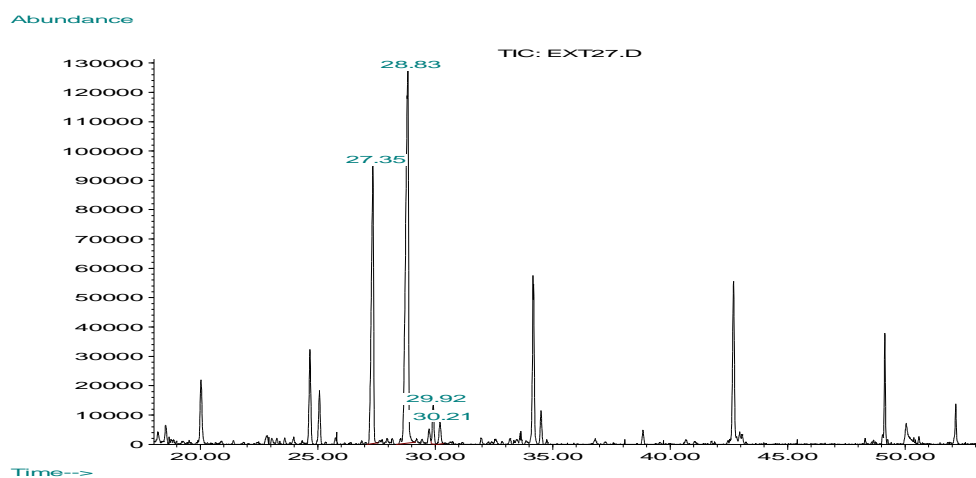
Σχήμα 4: Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεψήματος του ύσσωπου.



**Σχήμα 4:** Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεινήματος του χαμομηλιού.

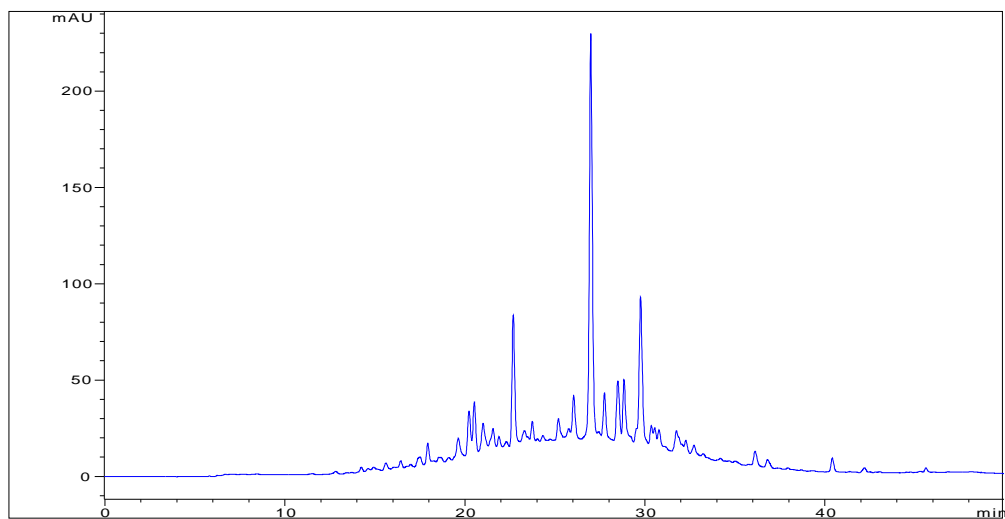


**Σχήμα 5:** Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεινήματος του φασκόμηλου.

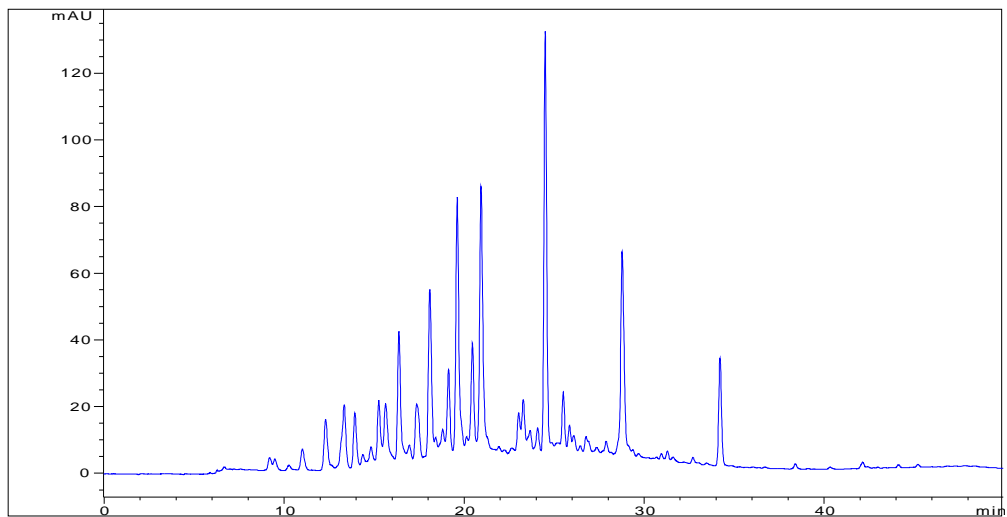


**Σχήμα 6:** Αέριο χρωματογράφημα του αρώματος του ζεστού αφεψήματος του μελισσόχορτου (Ελλάδα).

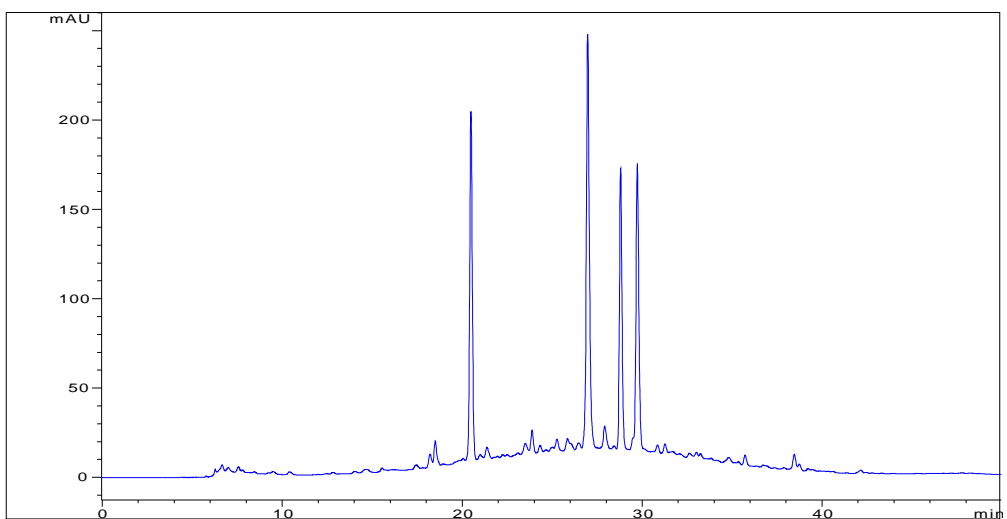
## V. Χρωματογραφήματα από το HPLC των ζεστών εκχυλισμάτων



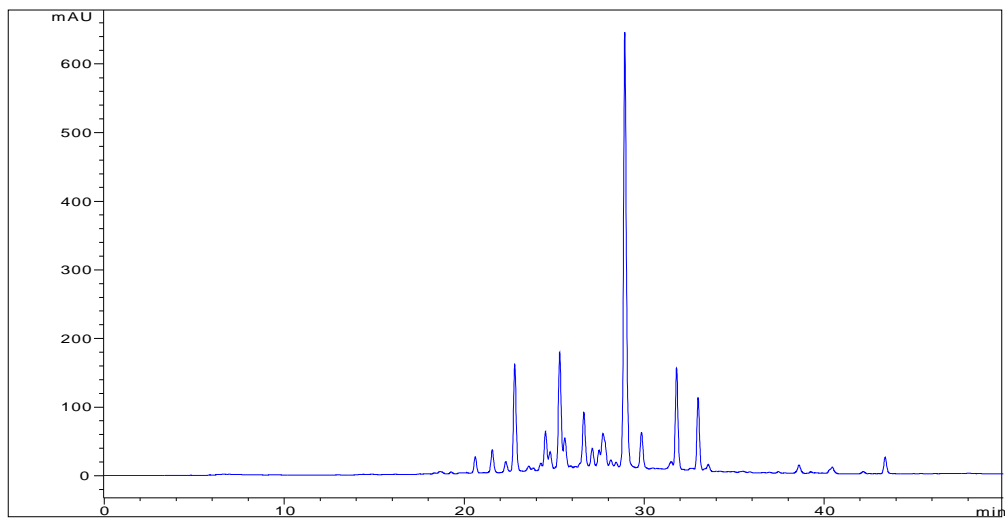
**Σχήμα 1:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του φασκόμηλου ( $\lambda = 300 \text{ nm.}$ )



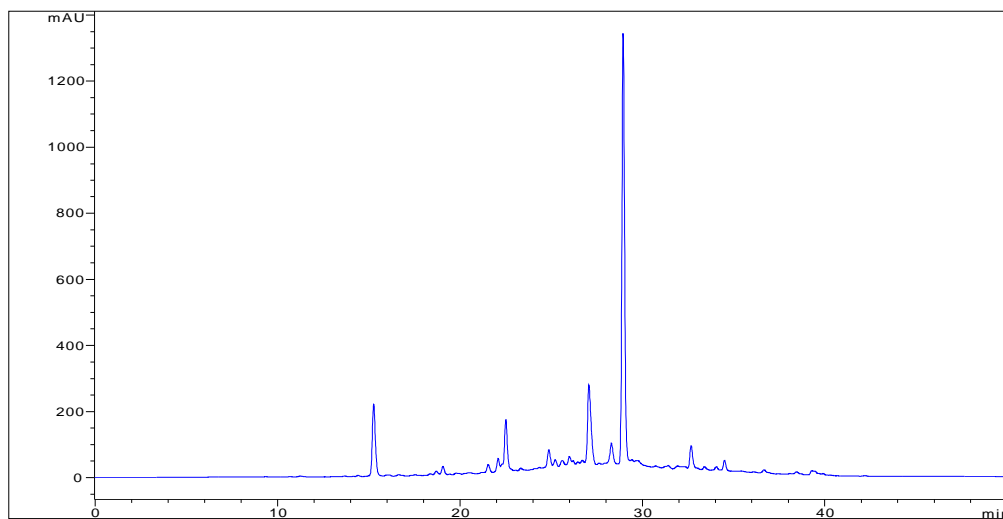
**Σχήμα 2:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του ύσσωπου ( $\lambda=300$  nm).



**Σχήμα 3:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος της ματζουράνας ( $\lambda=300$  nm).

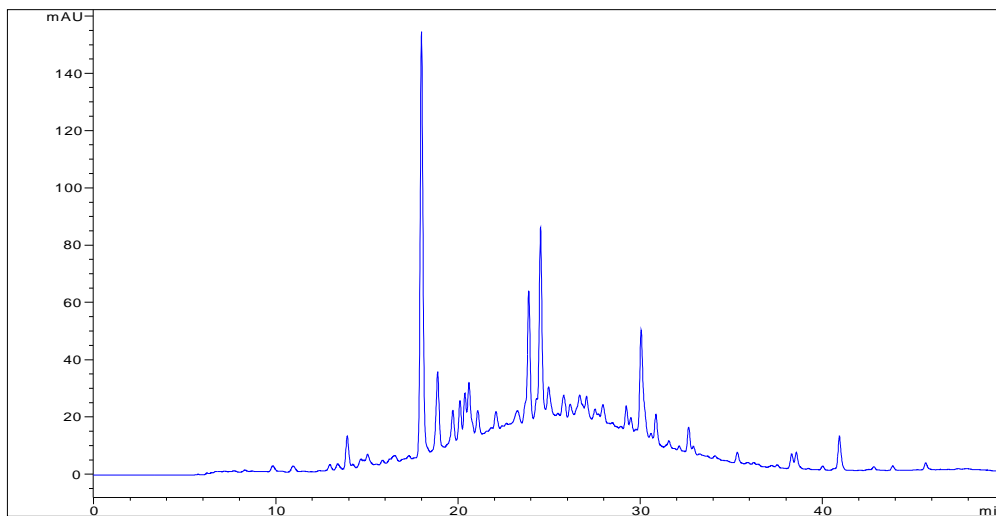


**Σχήμα 4:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του δίκταμου ( $\lambda=300$  nm).

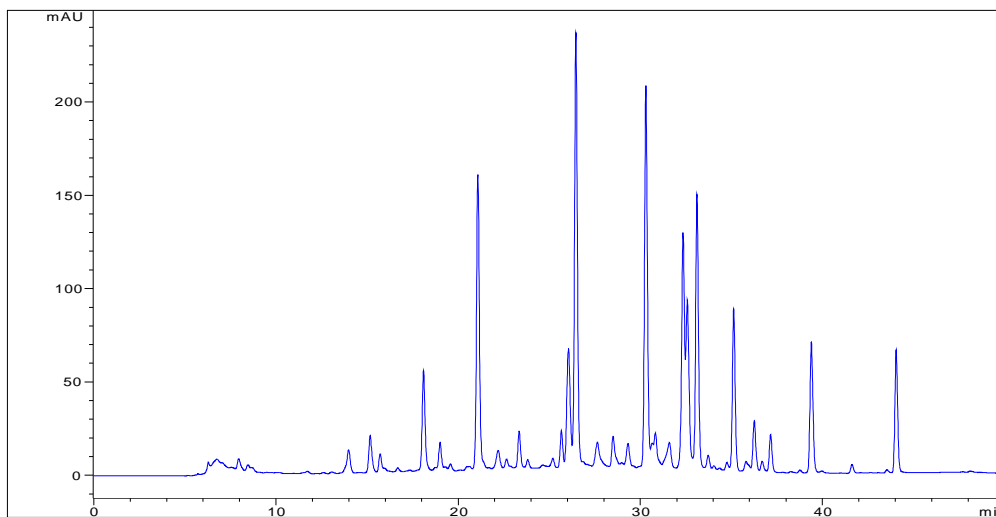


**Σχήμα 5:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του μελισσόχορτου (Κύπρος) ( $\lambda=300$  nm).

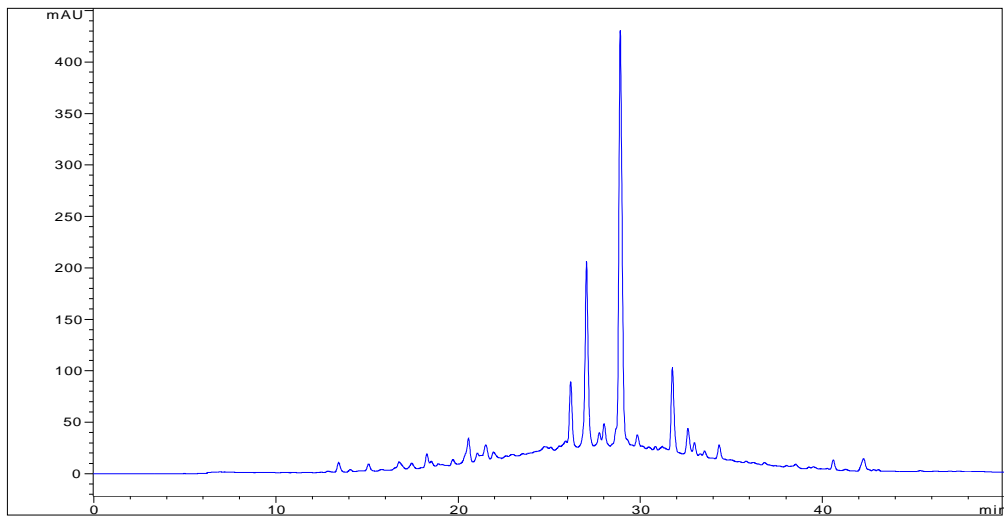




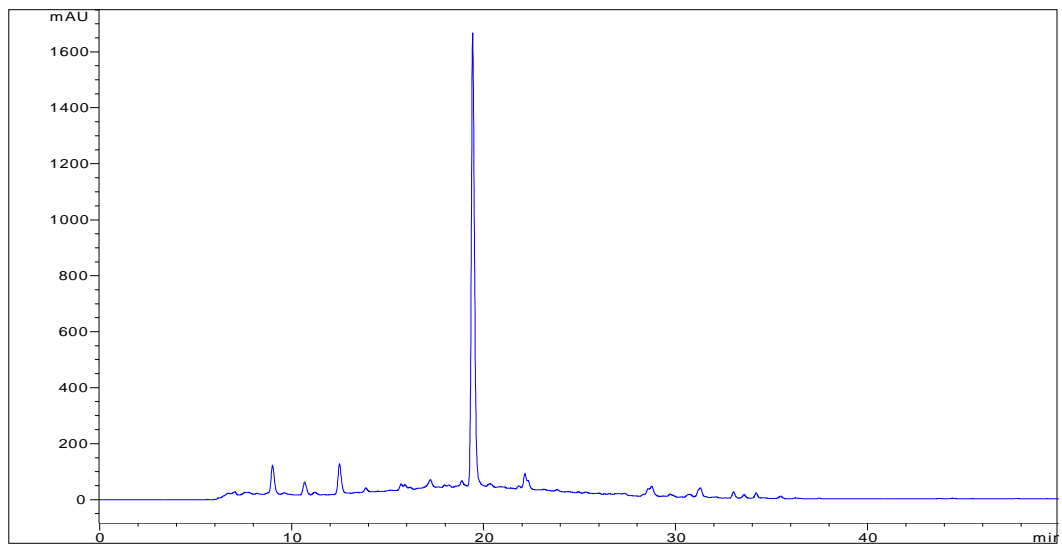
**Σχήμα 6:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του σιδερίτη ( $\lambda=300$  nm).



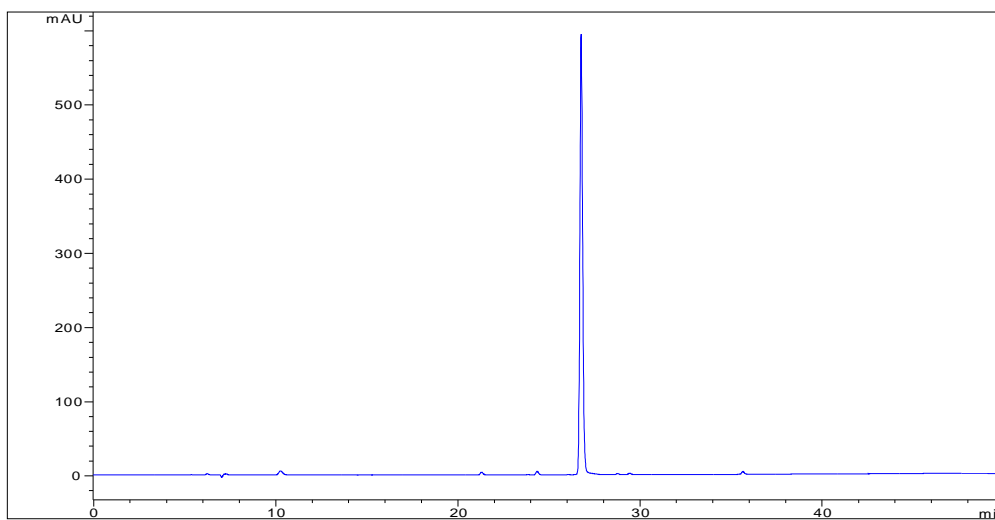
**Σχήμα 7:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του χαμομηλιού ( $\lambda=300$  nm).



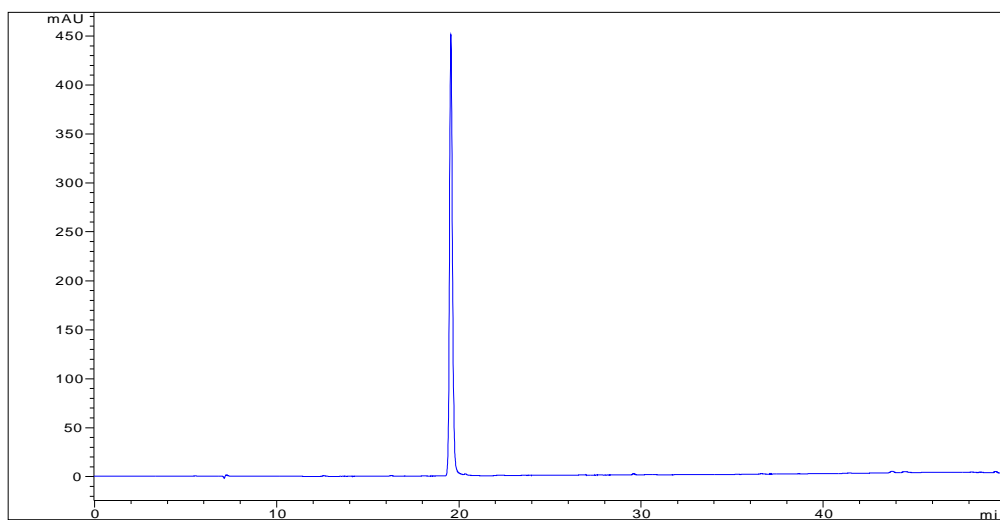
**Σχήμα 8:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του δυόσμου ( $\lambda=300$  nm).



**Σχήμα 9:** HPLC χρωματογράφημα του ζεστού αφεψήματος του τσαγιού Lipton ( $\lambda=280$  nm).

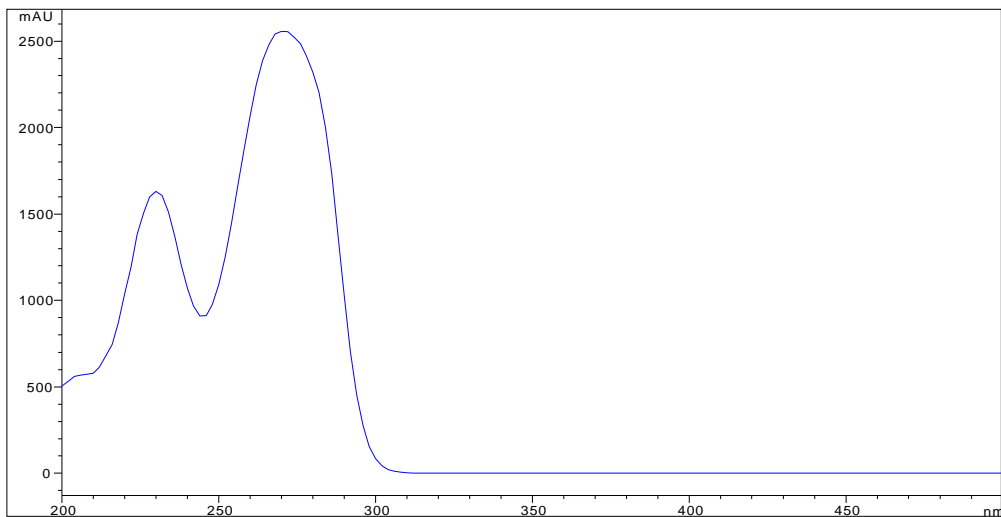


**Σχήμα 10:** HPLC χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης ( $\lambda=300$  nm).

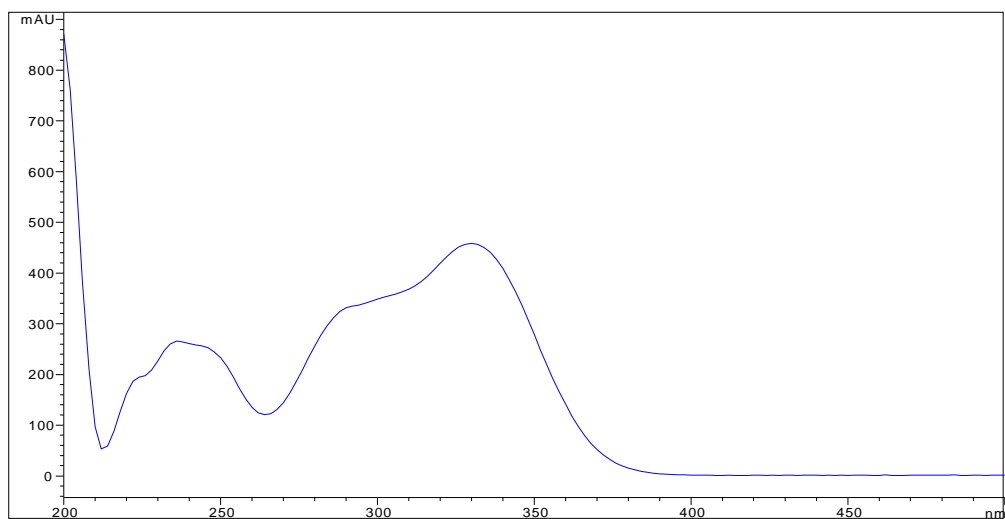


**Σχήμα 10:** HPLC χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος της καφεΐνης ( $\lambda=280$  nm).

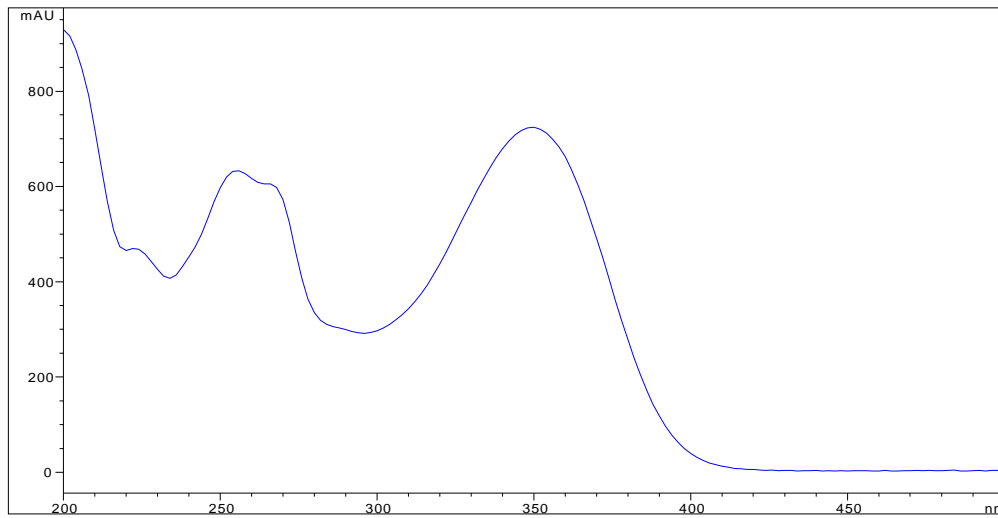
## VI. Φάσματα UV ορισμένων πρότυπων ουσιών



Σχήμα 1: Φάσμα UV του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (διαλύτης: μεθανόλη).



Σχήμα 1: Φάσμα UV του ροσμαρινικού οξέος (διαλύτης: μεθανόλη).



**Σχήμα 1:** Φάσμα UV της καφεΐνης (διαλύτης: μεθανόλη).