

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΜΣ ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΦΕΨΗΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΩΝ ΣΙΔΕΡΙΤΗ (*Sideritis sp.*)

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Ι. ΚΩΝΣΤΑΝΤΕΛΟΣ

Επιβλέπων: Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΜΣ ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΦΕΨΗΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΩΝ ΣΙΔΕΡΙΤΗ (*Sideritis sp.*)

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Ι. ΚΩΝΣΤΑΝΤΕΛΟΣ

Επιβλέπων: Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ 2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΦΕΨΗΜΑΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΣΙΔΕΡΙΤΗ (*Sideritis sp.*)

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Ι. ΚΩΝΣΤΑΝΤΕΛΟΣ

Επιβλέπων: Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α (Επιβλέπων)

Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Αθανάσιος Κυμπάρης, Επίκουρος Καθηγητής Δ.Π.Θ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη των εκχυλίσμάτων αφεινημάτων ειδών *Sideritis* κοινή ονομασία «τσάι του βουνού». Ο στόχος ήταν η ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών τους και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Αρχικά έγινε η απομόνωση των υδατοδιαλυτών φαινολικών συστατικών με εκχύλιση και διήθηση και ακολούθησε η λυοφιλίωση τους. Τα είδη του *Sideritis* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι με βοτανική ονομασία *Sideritis clandestina* (Προέλευση Ταυγέτου), *Sideritis scardica* (Προέλευση Μαγνησίας) και *Sideritis sipylea* (Προέλευση Μυτιλήνης)..

Στα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα των τριών ειδών μετρήθηκε η απόδοση και στην συνέχεια προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης έγινε με τις δοκιμές DPPH και ABTS.

Τα αποτελέσματα όσον αφορά το φαινολικό περιεχόμενο των λυοφιλωμένων εκχυλίσμάτων κυμαίνονται από 0,36 σε 0,50 ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/mL). Για την αντιοξειδωτική τους δράση, με την δοκιμή DPPH ο *Sideritis clandestina* παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε ισοδύναμα Trolox ($\mu\text{mol/mL}$) που ήταν 14 ($\mu\text{mol/mL}$). Με την δοκιμή ABTS ο *Sideritis sipylea* παρουσίασε συγκριτικά με τα άλλα είδη μια ελαφρά υπεροχή στην αντιοξειδωτική δράση σε ισοδύναμα Trolox ($\mu\text{mol/mL}$) 6,5 ($\mu\text{mol/mL}$). Ο *Sideritis clandestina* ήταν αυτός που παρουσίασε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο 0,49 (mg/mL) και στην αντιοξειδωτική δράση με την δοκιμή DPPH.

Το κύριο μέρος της εργασίας αυτής ήταν ότι από τα τρία είδη 10 mg του λυοφιλωμένου στερεού επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε νερό με ρύθμιση της τιμής του pH στην τιμή 1,5. Αυτό έγινε με προσθήκη HCl 1M και ακολούθησε μηχανική ανάδευση για 1, 1,5 και 2 h. Η όλη αυτή διαδικασία έγινε για να υπάρξει μια προσομοίωση των συνθηκών που επικρατούν στο στομάχι καθώς και την διάρκεια της πέψης.

Τα υδατικά διαλύματα με ρύθμιση της τιμής του pH στην τιμή 1,5 ελέγχθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τις δυο δοκιμές. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ήταν ότι ο *Sideritis sipylea* παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στην 1,5 h που εκφράστηκε σε ισοδύναμα Trolox ($\mu\text{mol/mL}$) 13 ($\mu\text{mol/mL}$). Αντίθετα με την δοκιμή ABTS ο *Sideritis scardica* παρουσίασε μια σχετικά πιο υψηλή αντιοξειδωτική δράση στις 2 h εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox ($\mu\text{mol/mL}$) 6,5 ($\mu\text{mol/mL}$).

Προέκυψε στην συνέχεια μια πιθανή συσχέτιση της δοκιμής DPPH και των φαινολικών συστατικών.

Περαιτέρω έγινε μελέτη των συστατικών που απομονώθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (HPLC- DAD) και έγινε σύγκριση με τα δεδομένα που λήφθηκαν από αντίστοιχες πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Παράλληλα , χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπερύθρου με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών που περιέχουν τα τρία είδη.

Ακολούθησε αλκαλική και όξινη υδρόλυση των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων, τα οποία μαζί με τα υδατικά διαλύματα με ρύθμιση της τιμής του pH στην τιμή 1,5 μελετήθηκαν ως προς τα φαινολικά συστατικά που περιέχουν με HPLC-DAD. Στην συνέχεια έγινε λήψη του φάσματος IR.

Από εκεί με βάση τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis , καθώς και τα φάσματα IR έγινε σύγκριση με τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

Επιστημονικό πεδίο : Γεωργικές επιστήμες

Άλλες επιστήμες

Λέξεις-Κλειδιά: Σιδερίτης; Φαινολικά Συστατικά; Αντιοξειδωτική Δράση; Αφεψήματα;

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to study the herbal extracts *Sideritis* species common name "mountain tea". The aim was to identify phenolic components and the evaluation of their antioxidant action.

Initially, isolation of the water soluble phenolic compounds by extraction and filtration followed by lyophilization performed first. The *Sideritis* species used in this study their botanical name was *Sideritis clandestina* (Source Taygetos), *Sideritis scardica* (Source Magnesia) and *Sideritis sipylea* (Source Mytilene) .

The yield of the three species of lyophilized extracts was measured and then assayed for total phenolic content by the method Folin-Ciocalteu, while the evaluation of the antioxidant activity tests done with DPPH and ABTS.

The results for the phenolic content of lyophilized extracts ranging from 0.36 to 0.50 equivalents of caffeic acid (mg / mL). For their antioxidant activity, the test DPPH *Sideritis clandestina* showed higher antioxidant activity equivalent Trolox ($\mu\text{mol} / \text{mL}$) which was 14 ($\mu\text{mol} / \text{mL}$). By testing the ABTS *Sideritis sipylea* compared to the other species in presented a slightly higher equivalent antioxidant Trolox ($\mu\text{mol} / \text{mL}$) 6.5 ($\mu\text{mol} / \text{mL}$). The *Sideritis clandestina* was he who showed a higher content of total phenolic content of 0.49 (mg / mL) and the antioxidant activity test DPPH.

The main part of this work was that from the three species 10 mg of lyophilized solid redissolved in water by adjusting the pH value to 1.5. This was done by adding HCl 1M, followed by mechanical agitation for 1, 1.5 and 2 h. This whole procedure was to be a simulation of the conditions prevailing in the stomach and during digestion.

The aqueous solutions by adjusting the pH value to 1.5 were tested for their antioxidant activity in both tests. The results obtained were that the *Sideritis sipylea* showed higher antioxidant activity in 1.5 h expressed in equivalents Trolox ($\mu\text{mol} / \text{mL}$) 13 ($\mu\text{mol} / \text{mL}$). Unlike the test ABTS *Sideritis scardica* presented a relatively high antioxidant activity in 2 h, expressed in equivalents of Trolox ($\mu\text{mol} / \text{mL}$) 6,5 ($\mu\text{mol} / \text{mL}$).

There was then a possible correlation test DPPH and phenolic components.

Further study was made of the components isolated by High Performance Liquid Chromatography with a variable wavelength detector (HPLC- DAD) and compared with the data obtained from corresponding standard phenolic compounds. Furthermore, using the Infrared spectroscopy technique of diffuse reflectance (DRIFTS) for the detection and identification of phenolic compounds containing in three species.

Followed by acidic and alkaline hydrolysis of the lyophilized extract, which together with the aqueous solutions by adjusting the pH value to 1.5 were studied for the phenolic containing components by HPLC-DAD. Then spectrum IR was taken.

From there on the basis of their elution times and spectra UV-Vis, and IR spectra were compared with the standard phenolic compounds used.

Discipline: Agricultural Sciences

Other Agricultural Sciences

Keywords: Sideritis; Phenolic compounds; Antioxidant activity; Infusions

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	1
1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	2
1.3 ΧΡΗΣΕΙΣ	3
1.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	5
1.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	5
1.6 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΟ ΤΣΑΪ ΤΟΥ ΒΟΥΝΟΥ	9
1.7 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	14
1.8 ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ (IR)	16
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	22
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	24
3.1 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	24
3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ – ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	26
3.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.	29
3.4 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ DRIFTS.....	31
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
4.1 ΑΠΟΔΟΣΗ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	33
4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	34

4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ(HPLC) (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) ΚΑΙ FT-IR.....	45
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	81
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το επιστημονικό του όνομα *Sideritis* προέρχεται από την ελληνική λέξη σίδηρος και κατά μια εκδοχή δόθηκε στο φυτό, εξαιτίας της ικανότητάς του να θεραπεύει τις πληγές που προκαλούνται από σιδερένια αντικείμενα. Σύμφωνα με άλλη πηγή, επειδή αποτελεί φυσική πηγή σιδήρου, αφού στα ροφήματα που παρασκευάζονται από αυτό περιέχεται αρκετός σίδηρος. Μια τρίτη άποψη υποστηρίζει ότι η ονομασία του οφείλεται στο σχήμα των δοντιών του κάλυκα, που μοιάζουν με αιχμή λόγχης. Εκτός από την επούλωτική του ιδιότητα τα είδη του *Sideritis* έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για αιώνες λόγω των αντιφλεγμονώδων, αντιμικροβιακών και αντι-ελκογόνων ιδιοτήτων τους. Η εκτεταμένη και σημαντική χρήση του *Sideritis spp.* στη μεσογειακή παραδοσιακή ιατρική έχει αναφερθεί σε πολλές φαρμακευτικά εγχειρίδια. Από το Λινναίο (1753) περιγράφεται το *Sideritis L. canariensis*. Ο Font Quer αργότερα επισημάνει στο βιβλίο του "Μια αναθεώρηση του Διοσκουρίδη" την αξιοσημείωτη ευρεία χρήση του *Sideritis angustifolia* ως επούλωτικό κυρίως στον τομέα της κτηνιατρική στην Καταλονία κατά το πρώτο μισό του εικοστού αιώνα. (Gonzalez-Burgos et al., 2011). Η βοτανική ταξινόμηση του γένους *Sideritis* στην Μακαρονησία είχε αποτελέσει αιτία διαμάχης. Οι Aiton (1789) και Poiret (1811) διατήρησαν το όνομα *Sideritis*, ενώ οι Webb και Berthelot (1845) πρότειναν τη δημιουργία ενός νέου γένους, *Leucophae*, που να συμπεριλαμβάνει το *Sideritis* τη Μακαρονησίας. Αργότερα, ορισμένοι συγγραφείς το αναφέραν με το όνομα *Sideritis*, ενώ άλλοι προτιμούσαν το *Leucophae*. Ο Huynh το 1972, βάσει παλυνολογικών δεδομένων, χώρισε τελικά το *Sideritis* της Μακαρονησίας σε δύο ομάδες, *Empedocleopsis* και *Marrubiastrum*, και επαλήθευσε τις ήδη υπάρχουσες τέσσερις ομάδες του γένους *Sideritis* της Μεσογείου (*Hesiodia*, *Burgsdorffia*, *Empedoclea* και *Sideritis*). (Fraga et al., 2012)

1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα είδη του γένους *Sideritis* είναι μονοετείς ή πολυετείς πόες, αποξυλωμένες ενίοτε στη βάση, χνουδωτές, που αναπτύσσονται μέχρι 40-50 cm και ανήκουν στα αρωματικά φυτά. Τα φύλλα του είναι συνήθως στενά, αντίθετα, επιμήκη - λογχοειδή, ακέραια ή πριονωτά, τα κατώτερα με μίσχο και τα ανώτερα άμισχα. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα κίτρινα ή λευκά, μικρά, κατά σπονδύλους απομακρυσμένους ή πλησίον αλλήλους χωρίς βράκτια, σε ταξιανθία στάχυ. Ο κάλυκας είναι σωληνοειδής που καταλήγει σε δόντια και σκεπάζεται από μακρύ και πυκνό τρίχωμα. Η στεφάνη είναι κίτρινη, κιτρινόλευκη, λευκή ή ροδοχροη με δύο χείλη, από τα οποία το επάνω αποτελείται από δύο συμφυή πέταλα και είναι δισχιδές και το κάτω καταλήγει σε τρεις λοβούς με το μεσαίο μεγαλύτερο. Έχει τέσσερις στήμονες, οι δύο μπροστινοί επιμηκέστεροι, το στύλο που καταλήγει σε δυο άνισα στίγματα και δίχωρη ωοθήκη που με ψευδή διαφράγματα γίνεται τετράχωρη (Γκόλιαρης *et al.*, 1999). Τα είδη του γένους *Sideritis* αναπτύσσονται άριστα σε πλήρη ήλιο και είναι καλά προσαρμοσμένα σε συνθήκες ξηρασίας. Βρίσκονται σε βραχώδεις πλαγιές και λιβάδια, από λίγα μέτρα πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας μέχρι και περισσότερο από 3000 m, και απαιτούν μέτρια πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και ελαφρώς αλκαλικά εδάφη.

Κατά τη διάρκεια της ιστορικής εξέλιξης, έχουν γίνει, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πολλές προσπάθειες για την ταξινομήση του γένους *Sideritis*. Ο βαθμός πολυμορφισμού, η παρουσία της διακύμανσης οικοτύπου και ο συχνός υβριδισμός μεταξύ των ειδών, καθιστά ακόμη πιο δύσκολη την ταξινόμηση του γένους. Η κατάταξη του βασίζεται στα μορφολογικά, κυταρολογικά, παλυνολογικά, γενετικά και χημικά χαρακτηριστικά του.

Το γένος *Sideritis* χαρακτηρίζεται όπως αναφέρθηκε από ισχυρές τάσεις υβριδισμού μεταξύ των ειδών. Αναφορικά ο *Sideritis rodriguezii* είναι των ειδών *Sideritis serrata* και *Sideritis bourgaeana*, ο *Sideritis laderoi* (υβρίδιο των *Sideritis hirsute* και *Sideritis lagascana*) και ο *Sideritis arizagae* (*Sideritis hyssopifolia* × *Sideritis incana*).

Ως αποτέλεσμα των υβριδισμών αυτών, η ταξινόμηση του γίνεται πιο δύσκολη. Τόσο η μελέτη κάποιων μορφολογικών χαρακτήρων όσο και η ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών (διτερπενοειδή και φλαβονοειδή) που θεωρούνται ως χημοταξονομικοί δείκτες αυτού του γένους, φάνηκαν χρήσιμοι για τον αποσαφήνισμό των προβλημάτων στη συστηματική ταξινόμηση των ειδών *Sideritis*.



Εικόνα 1: Βοτανικά χαρακτηριστικά του γένους *Sideritis*.

1.3 ΧΡΗΣΕΙΣ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται διεθνώς μια στροφή στη χρήση φυσικών προϊόντων ιδιαίτερα στον τομέα των φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι πολλά φάρμακα που κυκλοφορούν έχουν συστατικά φυτικής προέλευσης. Παράλληλα με τη συστηματική και σε βάθος έρευνα για τη μελέτη της χημικής σύστασης, της βιολογικής δράσης ή της βελτίωσης της ποιότητας, γίνεται ιδιαίτερη προσπάθεια σε διεθνή κλίμακα για την ανακάλυψη νέων φυτών - πηγών διαφόρων συστατικών - που μπορεί να έχουν φαρμακευτική ή βιομηχανική χρήση.

Τα είδη *Sideritis* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως αφεψήματα, βελτιωτικά γεύσης ή για θεραπευτικούς σκοπούς. Οι περισσότερες από τις θεραπευτικές χρήσεις του *Sideritis spp.* περιορίζονται στη λαϊκή ιατρική, αν και αξίζει να σημειωθεί ότι ολόένα και πιο συχνή γίνεται η παρουσία του *Sideritis spp.* σε βότανα της αγοράς με αποτέλεσμα την

αύξηση του αριθμού των συνταγών που περιέχουν το είδος του *Sideritis*. Οι διαφορές χρήσεις του *Sideritis* που έχουν παρατηρηθεί εξαρτώνται από το είδος και από την περιοχή που αναπτύσσονται. Ωστόσο, οι χρήσεις σε όλο τον κόσμο με βάση τις ιδιότητες των φυτών Εκτός από τις που χρήσεις αυτές που παρατίθενται, χρησιμοποιείται επίσης συχνά ως διακοσμητικό φυτό σε βραχόκηπους. (*Gonzalez-Burgos et al., 2011*)

Οι περισσότερες από τις ενώσεις που απομονώνονται από το γένος του *Sideritis* και μερικά παραγωγά τους έχουν δείξει ότι διαθέτουν διαφορετικού τύπου βιολογικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου ιδιότητες όπως αναλγητικές, αντι-φλεγμονώδεις, κυτταροστατικές, αντιϊκές, αντιβακτηριακές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές. (*Ghoumari et al., 2005*)

Τα είδη του *Sideritis* χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα και στην Ανατολή ευρύτατα σαν αρωματικά και θερμαντικά ροφήματα, ιδιαίτερα κατά τους χειμερινούς μήνες με το κοινό όνομα «τσάι του βουνού». (*Basile et al., 2005*) Η εκτεταμένη κατανάλωση του *Sideritis* ως παραδοσιακό ελληνικό τσάι, έχει δημιουργήσει την ανάγκη για καλλιέργεια του φυτού, εφόσον η αυτοφυή παραγωγή του δεν επαρκεί για να καλύψει τις αυξημένες ανάγκες. Για το λόγο αυτό, στις μέρες μας τα φυτά του γένους *Sideritis* καλλιεργούνται σε χαμηλής γονιμότητας λοφώδεις και ορεινές περιοχές, σε υψόμετρο πάνω από 1000 μέτρα.

1.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Το γένος *Sideritis* ανήκει στην *Lamiaceae*, περιλαμβάνει πάνω από 150 είδη που διανέμονται σε εύκρατες και τροπικές περιοχές του Βόρειου Ημισφαιρίου, από Μπαχάμες προς τη Δυτική Κίνα και από τη Γερμανία στο Μαρόκο. Τα περισσότερα είδη βρίσκονται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου, από τις Καναρίους Νήσους και τη Μαδέρα έως τον Καύκασο. Η Ισπανία και Τουρκία διαθέτουν το μεγαλύτερο αριθμό των διαφορετικών ειδών. Στην Ισπανία, τα περισσότερα από αυτά τα είδη κατανέμονται στο νοτιοανατολικό τμήμα της Ιβηρικής Χερσονήσου και των Καναρίων Νήσων, ενώ στην Τουρκία εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές του Μαρμαρά και του Αιγαίου. (*Gonzalez-Burgos et al., 2011*). Επιπλέον, είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι το γένος *Sideritis* περιέχει ένα μεγάλο αριθμό ενδημικών ειδών: 46 είδη, 12 υποείδη και δύο ποικιλίες αναπτύσσονται στην Τουρκία, 36 είδη, 10 υποείδη και δύο ποικιλίες των οποίων είναι ενδημικά (ποσοστό ενδημισμού 77%). Είκοσι-πέντε είδη *Sideritis* αναπτύσσονται στο Μαρόκο, 16 των οποίων είναι ενδημικά (*Ghoumari et al., 2005*). Στην Ιβηρική Χερσόνησο και στις Βαlearίδες Νήσους εντοπίζονται 49 είδη του *Sideritis*, 36 από τα οποία είναι ενδημικά. Τέλος στις Καναρίους Νήσους, αυτό γένος αντιπροσωπεύεται από 19 ενδημικά είδη (*Fraga et al., 2009*).

1.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενός ξεχωριστού συστατικού του φυτικού εκχυλίσματος είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί λόγω της πολυπλοκότητας της σύστασης του εκχυλίσματος, καθώς και της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των συστατικών. Υπάρχει πλήθος μεθόδων για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης αλλά καμία από αυτές δεν αποτελεί επίσημη μέθοδο προσδιορισμού, με αποτέλεσμα τα στοιχεία να μην μπορούν να συγκριθούν και να αξιολογηθούν «κατ' απόλυτο» τρόπο. Παρόλα αυτά, η πολυπλοκότητα των συστημάτων και των υποστρωμάτων της αντιοξειδωτικής δράσης επιβάλλει τη χρήση πολλών διαφορετικών μεθόδων μέτρησης (*Huang et al., 2005*). Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε χρήση του DPPH και ABTS.

Πίνακας 1.1 : In vitro Αντιοξειδωτικές μέθοδοι προσδιορισμού(*Huang et al., 2005; Sharma et al., 2009; Dudonne et al., 2009*)

HAT-Αντιδράσεις	ORAC(Ικανότητα απορρόφησης ρίζας οξυγόνου) TRAP(Συνολική ικανότητα παγίδευσης ρίζας) Μέθοδος λεύκανσης κροκινών
ET-Αντιδράσεις	TEAC(Ισοδύναμα Trolox) DPPH Follin-Ciocalteau

Η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών επηρεάζεται από τη μέθοδο προσδιορισμού, το χημικό τους τύπο, τους τρόπους εκχύλισης και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες έλαβε χώρα, τη συγκέντρωση του δείγματος. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι: μέθοδοι που παγιδεύουν τις υπάρχουσες ρίζες (free radical – trapping methods), μέθοδοι που προσδιορίζουν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν την οξείδωση των λιπιδίων (lipid oxidation). Σε σχέση με τις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος κατά τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, οι μέθοδοι χωρίζονται σε:

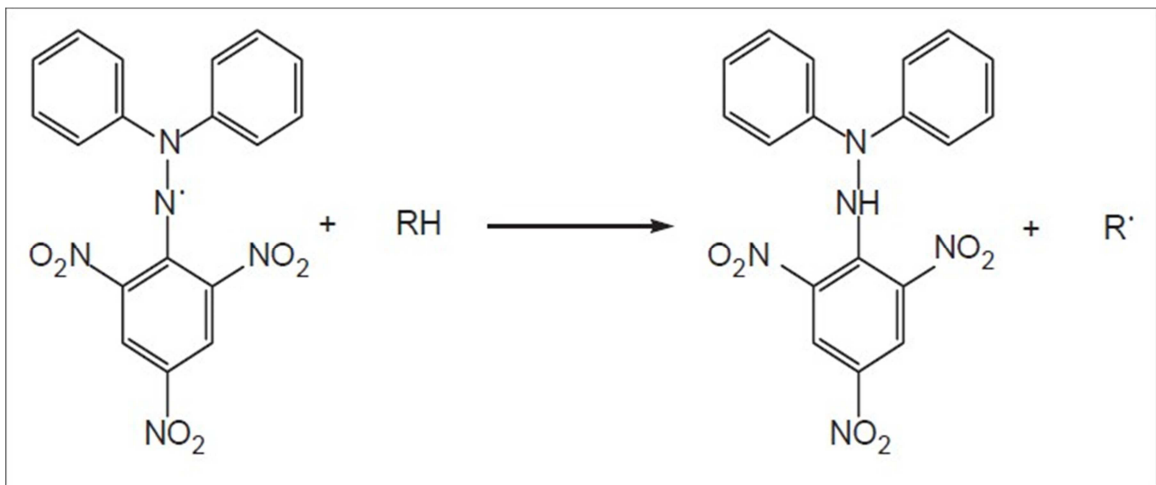
- Μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays – ET)
- Μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer based assays – HAT)

Οι ET μέθοδοι μετρούν την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αλλάζει χρώμα καθώς ανάγεται στην αντίδραση με το οξειδωτικό. Οι HAT μέθοδοι εξετάζουν την κινητική των αντιδράσεων και οι συγκεντρώσεις απορρέουν από τις κινητικές καμπύλες (*Huang et al., 2005*)

Πιο αναλυτικά:

Δοκιμή DPPH

Είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας. Το DPPH είναι μια σταθερή ρίζα, το οργανικό διάλυμα του οποίου παρουσιάζει έντονο ιώδες χρώμα. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να αποχρωματίζουν το διαλύμα του διφαινυλοπικρυλδραζυλίου. (**Εικ.2**)



Εικόνα 2: Μηχανισμός δράσης του DPPH

Το DPPH αντιδρά με τις φαινολικές ενώσεις (ArOH) με δύο διαφορετικούς τρόπους:

1. με απόσπαση ενός φαινολικού H από τη ρίζα του DPPH. (HAT- Αντίδραση)

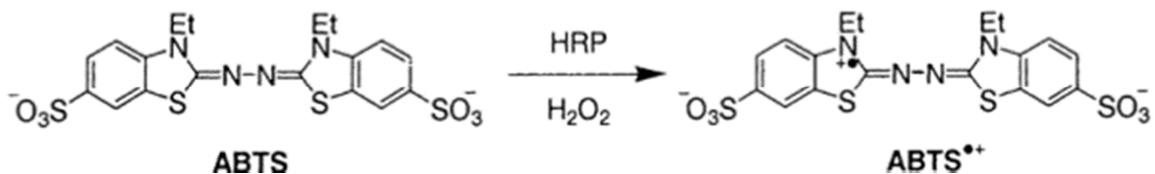


2. με μεταφορά ηλεκτρονίου από τη φαινολική ένωση ή από το φαινολικό ανιόν προς την ελεύθερη ρίζα. (ET-Αντίδραση)



Δοκιμή ABTS

Το αντιδραστήριο αυτής της μεθόδου είναι το 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] ABTS. Πρόκειται για μία σχετικά νέα μέθοδο που αναπτύχθηκε αρχικά από τους Miller και Rice-Evans το 1993 και εξελίχθηκε από τους (Rice-Evans *et al.*, 1999). Στη βελτιωμένη έκδοσή της, το οξειδωτικό, το ριζικό κατιόν ABTS^{•+} παράγεται από την οξείδωση του ABTS²⁻ με υπερθειικά ιόντα. Η ρίζα του κατιόντος ABTS^{•+} έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα, η οποία αποχρωματίζεται παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών, σύμφωνα με την (Εικ. 3).



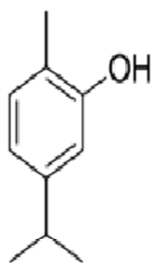
Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης του ABTS

1.6 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΟ ΤΣΑΪ ΤΟΥ ΒΟΥΝΟΥ

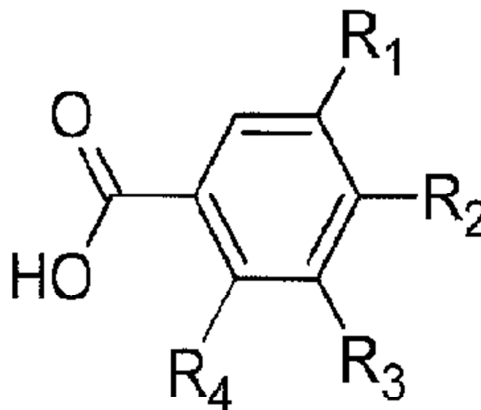
Γενικά στοιχεία

Με τον όρο φαινόλικά ή φαινολικές ενώσεις, στον κλάδο των φυσικών προϊόντων, εννοούμε έναν μεγάλο αριθμό κυρίως φυτικών ουσιών που έχουν στο μόριό τους ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολικών ενώσεων που απαντούν στα φυτά είναι:

- απλές μονοκυκλικές φαινόλες και φαινολικά οξέα
- φαινυλοπροπανοειδή
- φαινολικές κινόνες
- φλαβονοειδή: ενώσεις δηλαδή που περιέχουν στο μόριό τους το σκελετό της φλαβόνης ή του χλωριούχου φλαβυλίου και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των φυσικών φαινολικών ενώσεων
- πολυμερείς φαινολικές ενώσεις, όπως οι λιγνίνες, οι μελανίνες και οι ταννίνες.



Καρβακρόλη



Salicylic acid ($R_4 = \text{OH}$, $R_1, R_2, R_3 = \text{H}$);
Gentisic acid ($R_1, R_3 = \text{OH}$; $R_2, R_4 = \text{H}$);
p-Hydroxybenzoic acid ($R_2 = \text{OH}$, $R_1, R_3, R_4 = \text{H}$);
Protocatechuic acid ($R_1, R_2 = \text{OH}$; $R_3, R_4 = \text{H}$);
Vanillic acid ($R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$; $R_3, R_4 = \text{H}$);
Gallic acid ($R_1, R_2, R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{H}$);
Syringic acid ($R_1, R_3 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$; $R_4 = \text{H}$)

Εικόνα 4: Φαινόλη (καρβακρόλη) και φαινολικά οξέα

Φαινόλες και φαινολικά οξέα

Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα σπάνια απαντώνται ελεύθερα στο φυτό. Συνήθως βρίσκονται ενωμένα υπό μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών, στους οποίους αποτελούν το άγλυκο τμήμα της ένωσης. Όξινη υδρόλυση των φυτικών ιστών ελευθερώνει φαινολικά οξέα από τους εστέρες και τα άλατά τους και επίσης διασπά τους γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αλκαλική υδρόλυση ή αλκαλική σύντηξη διασπά ενώσεις της κατηγορίας των φλαβονοειδών προς απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα. Η υδροκινόνη είναι η περισσότερο διαδεδομένη φαινόλη, ενώ οι υπόλοιπες συναντώνται με μικρότερη συχνότητα. Έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα πολύπλοκες δομές φαινολών και έχει εξακριβωθεί η φυσιολογική τους δράση, όπως για παράδειγμα οι ουρουσιόλες, που είναι δηλητηριώδη συστατικά του ελαιώδους εκχυλίσματος του κισσού και της βελανιδιάς ή οι τετρακυκλίνες που έχουν αντιβιοτικά ευρέως φάσματος ενάντια σε μολύνσεις από στρεπτομύκητες.

Εκτός από τις φαινόλες, πολύ γνωστά φαινολικά οξέα που απαντούν συχνά στα φυτά και κυρίως στα αγγειόσπερμα είναι το π-ύδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό, το βανιλικό και το συριγγικό. Το γαλλικό οξύ, που χρησιμοποιείται ευρέως στις *in vitro* αναλύσεις για Ολικά Φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης σαν πρότυπο, βρίσκεται σε πολλά ξυλώδη φυτά υπό μορφή γαλλοταννίνης.

Τα φαινολικά οξέα προκύπτουν βιογενετικά από αποικοδόμηση των φαινυλοπροπανοειδών. Λόγω του όξινου χαρακτήρα τους, η απομόνωσή τους από τα άλλα φυτικά συστατικά γίνεται συχνά με εκχύλιση σε υδατικό ανθρακικό νάτριο. Η απομόνωση όμως αυτή από τους φυτικούς ιστούς παρουσιάζει τις περισσότερες φορές δυσκολίες, αφενός λόγω της τάσης τους να συμπλέκονται με τις πρωτεΐνες μέσω δεσμών υδρογόνου και αφετέρου διότι οι φαινόλες είναι ευαίσθητες στην ενζυματική οξειδωση κατά τη διάρκεια της απομόνωσης, οπότε χάνεται εύκολα η φαινολική παρουσία.

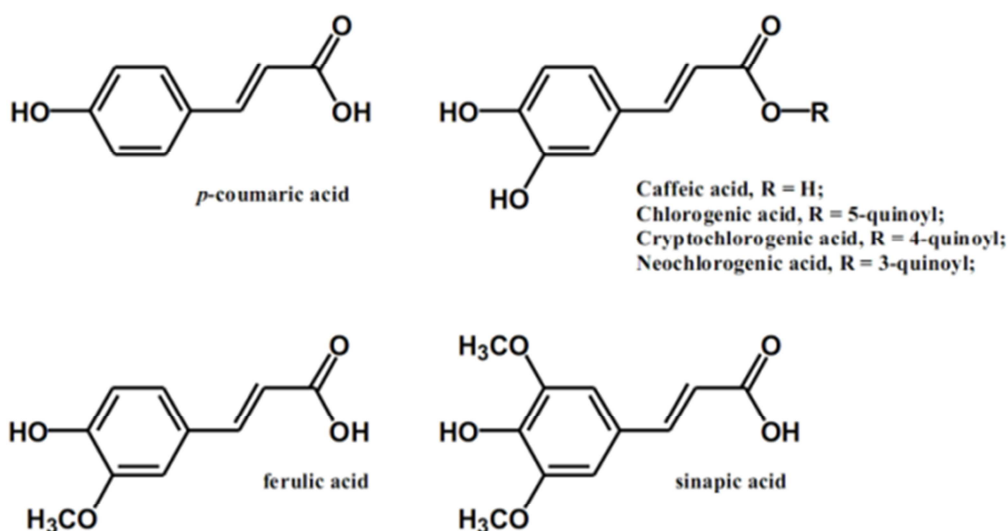
Φαινυλοπροπανοειδή

Η τάξη αυτή των φαινολικών φυσικών ενώσεων, είναι εξίσου σημαντική με την προηγούμενη, η οποία έχει στο φαινολικό δακτύλιο μια πλάγια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Τα σπουδαιότερα φαινυλοπροπανοειδή στα φυτά είναι:

- τα υδροξυκιναμωμικά οξέα, όπως φερουλικό, σιναπικό, καφεϊκό και π-κουμαρικό, τα οποία συνήθως βρίσκονται εστεροποιημένα μέσα στο φυτό.

- Οι κουμαρίνες, που είναι παράγωγα λακτονοποίησης των ο-υδροξυκινναμωμικών οξέων.
- Τα φαινυλοπροπένια

Τα ύδροξυκινναμωμικά οξέα που είναι τα πιο διαδεδομένα φαινυλοπροπανοειδή, επιδρούν στην ομαλή αύξηση και στην ανθεκτικότητα των φυτών στις ασθένειες. Οι κουμαρίνες βρίσκονται σε πολλά φυτά υπό μορφή γλυκοζιτικών παραγώγων. Έχουν άρωμα, που δε διακρίνεται πολλές φορές παρά μόνο μετά την υδρόλυση του γλυκοζίτη. Τα φαινυλοπροπένια βρίσκονται μαζί με τα τερπένια ως συστατικά των αιθερίων ελαίων και συμμετέχον στην οσμή των φυτών.



Cinnamic acids

Εικόνα 5: Μερικά υδροξυκινναμωμικά οξέα (φερουλικό, π-κουμαρικό, σιναπικό)

Φαινολικά συστατικά και διατροφή

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν βιολογικά δραστικές ουσίες και αποτελούν ένα τμήμα από τα πολλά παράγωγα του δευτερογενή μεταβολισμού κυρίως των φυτών. Οι απλές φαινολικές ενώσεις παράγονται σε συνθήκες πίεσης (κακές κλιματολογικές συνθήκες, τραυματισμοί, επίθεση από φυσικούς εχθρούς) και παίζουν προστατευτικό ρόλο για το φυτό ή λειτουργούν σαν αλληλοπαθητικά. Οι σύνθετες φαινολικές ενώσεις παίζουν βασικό ρόλο σαν φυσικές χρωστικές στα φυτά. Τόσο οι απλές όσο και οι σύνθετες εμφανίζουν ευεργετικές ιδιότητες για τον άνθρωπο. Η βασική ευεργετική συνέπεια που συνδέεται με τις φαινολικές ενώσεις είναι ότι προστατεύουν τον οργανισμό ενάντια στα

βλαβερά αποτελέσματα των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορίων οξυγόνου που εκκινούν οξειδωτικές διαδικασίες. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Ο πιο σημαντικός είναι η δομή τους, αφού ο αριθμός και η θέση των υδροξυλομάδων παίζουν σημαντικό ρόλο. Το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια για τα φυσικά αντιοξειδωτικά έχει ανθίσει, λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων για την πρόληψη και την μείωση του κινδύνου διάφορων παθήσεων όπως με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαβήτη, παχυσαρκίας, καρκίνου του εντέρου και εντερικών και σπλαχνικών διαταραχών.

Φαινολικά συστατικά στο τσάι του βουνού

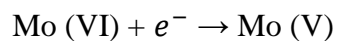
Το γένος του *Sideritis* είναι πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων και κυρίως φλαβονοειδών. Εκτενείς μελέτες έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των φλαβονοειδών στη Μεσόγειο και στον Ατλαντικό μιας και αποτελούν καλούς ταξινομικούς δείκτες και χρησιμοποιούνται για τη διάκριση ειδών και ιδιαίτερα υβριδίων του γένους. (Gonzalez-Burgos *et al.*, 2011)

Οι φαινολικές ενώσεις τείνουν να είναι υδατοδιαλυτές επειδή έχουν την τάση συχνά συνδυάζονται με σάκχαρα ως γλυκοζίτες και συνήθως βρίσκονται στο χυμοτόπιο των κυττάρων. (Jordan *et al.*, 2009) Τα φλαβονοειδή διακρίνονται: α) στα εξωτερικά, που είναι άγλυκα με λιπόφιλες ιδιότητες, και β) στα εσωτερικά, που είναι γλυκοζίτες με υδρόφιλες ιδιότητες. Γενικά, το άγλυκο μέρος θεωρείται ως πιο αξιόπιστος ταξινομικός δείκτης. Τα συμπλεγμένα φαινολικά οξέα συνήθως απελευθερώνονται χρησιμοποιώντας αλκαλική, όξινη υδρόλυση ή και τις δύο.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ (ΟΦΣ) ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ Folin-Ciocalteu.

Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1998). Χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων

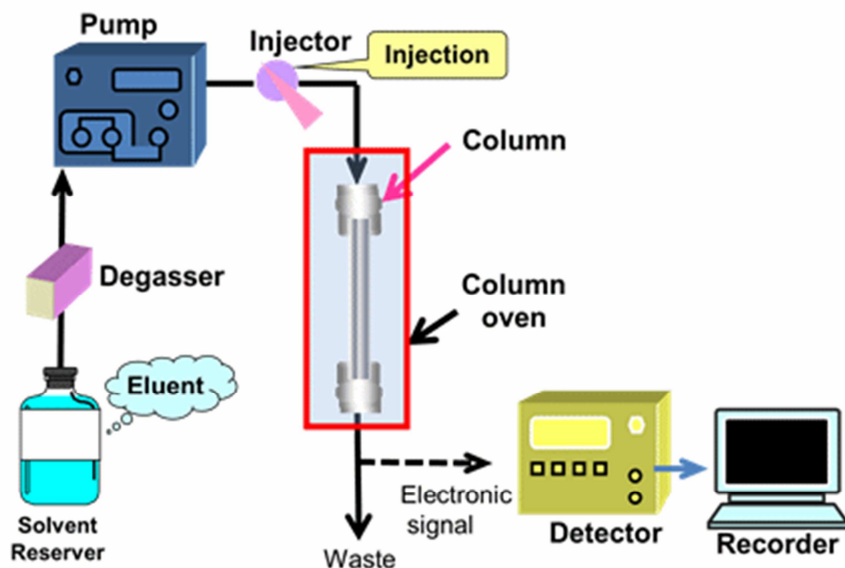
πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφοβολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων προς μείγμα οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}), πιθανώς $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$, με χαρακτηριστικό κυανό χρώμα. Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μία αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου λαμβάνει χώρα (*Huang et al., 2005*):



Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 725 nm και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ουσίες εκφράζονται σε ισοδύναμα οξέος, συνήθως γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

1.7 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό διαχωρισμό και τον υπολογισμό της ποσοτικής σύστασης των φαινολικών συστατικών. Οι λόγοι αυτής της αποδοχής έχουν να κάνουν με την ευαισθησία της, την εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, την καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και πρωτίστως η εφαρμοσιμότητά της σε προσδιορισμούς μεγάλου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία και πολλά επιστημονικά πεδία.



Εικόνα 6: Σχεδιάγραμμα HPLC

Μία συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

1. Δοχείο κινητής φάσης – συστήματα επεξεργασίας διαλυτών: ένα σύγχρονο σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με δοχεία κινητής φάσης, συνήθως γυάλινα. Τα δοχεία είναι εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων, που παρεμποδίζουν το σχηματισμό φυσαλίδων στη στήλη και στον ανιχνευτή. Τα συστήματα επεξεργασίας διαλυτών περιλαμβάνουν πορώδη φίλτρα (2 μm διατομής) απομάκρυνσης σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων από τους διαλύτες για να προληφθούν πιθανές βλάβες στις αντλίες ή στα συστήματα

έγχυσης, όπως και το φράξιμο της στήλης. Ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade), να έχει απαερωθεί (degassed) και φιλτραριστεί μέσω μικροπορώδους φίλτρου με εφαρμογή κενού (millipore filter). Ο διαχωρισμός στον οποίο χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης ονομάζεται ισοκρατική έκλουση (isocratic elution), ενώ όταν χρησιμοποιούνται δύο ή τρία συστήματα διαλυτών που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα έχουμε βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution).

2. Συστήματα άντλησης: η αντλία είναι υψηλής πίεσης (14-6000 psi) και συνδυάζεται με σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής (παροχής) της κινητής φάσης, με ταχύτητες που κυμαίνονται μεταξύ 0,1-10 mL/min και χωρίς παλμούς ροής.
3. Σύστημα Έγχυσης Δείγματος: ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής η χωρητικότητα της οποίας κυμαίνεται από 1-500 μ L. Η ποιότητα της βαλβίδας κρίνεται από την ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος εισαγωγής δείγματος βασίζεται σε βρόχους δειγμάτων. Οι διατάξεις αυτές είναι συχνά ένα αλληλένδετο τμήμα με μεγαβλητό όγκο έως 500 μ L, στον οποίο μπορούν να εισαχθούν δείγματα σε πιέσεις μέχρι και 7000 psi με επαναληψιμότητα μερικών δεκάτων %.
4. Στήλη: το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξειδωτος χάλυβας. Το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης είναι 2-3 mm και το συνηθέστερο μήκος είναι γύρω στα 25- 30 cm. Η εσωτερική διάμετρος της στήλης είναι 4-10 mm και το μέγεθος του υλικού πλήρωσης συνήθως διαμέτρου 5-10 μ m. Η αποτελεσματικότητα της στήλης κρίνεται από τον αριθμό θεωρητικών πλακών. Στήλες αυτού του τύπου διαθέτουν 40.000-60.000 θεωρητικές πλάκες/m. Το υλικό πλήρωσης της στήλης ως προς τη φύση του μπορεί να είναι α) πορώδες, με βάση την πυριτική γη (silica), β) μη πορώδες (pellicular) γ) σκληρή πηκτή με βάση το πολυστυρόλιο.

Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνεται

σε:

α) κανονικής φάσης (normal phase), κατά την οποία η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών οι οποίες εκλύονται τελευταίες από τη στήλη.

β) ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

5. Ανιχνευτής: ο πιο συνηθισμένος ανιχνευτής είναι το φωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis. Οι ουσίες που αναλύονται με αυτόν τον ανιχνευτή απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 190 – 600 nm. Υπάρχουν τρεις τύποι του ανιχνευτή UV-Vis:

A) Ανιχνευτής σταθερού μήκους κύματος

B) Ανιχνευτής πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος

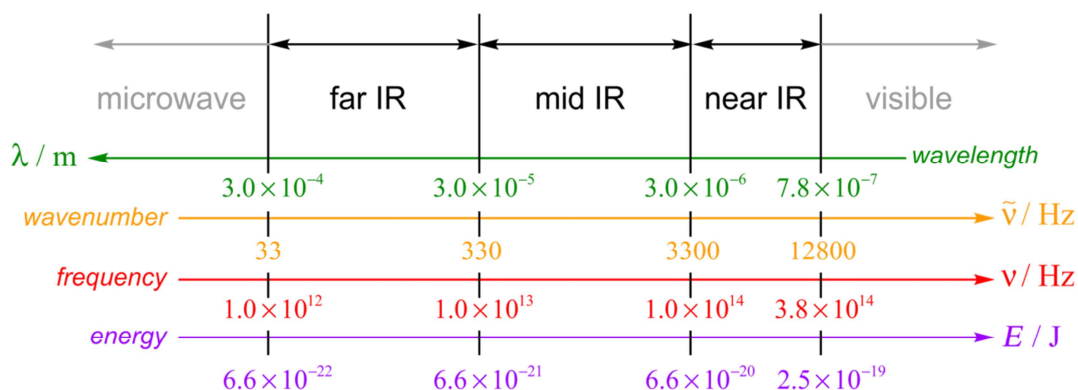
Γ) Ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (Diode Array Detector – DAD), ο οποίος και βοηθάει στη διαπίστωση της “καθαρότητας” μίας χρωματογραφικής κορυφής, γιατί είναι δυνατό να πάρουμε πληροφορίες από μία πλήρη σάρωση μίας ευρείας περιοχής συχνοτήτων.

Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής: Χρησιμοποιείται για την καταγραφή και παρουσίαση του χρωματογραφήματος. (Skoog, Holler, Nieman, *Principles of Instrumental Analysis et al.*, 1998)

1.8 ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ (IR)

Γενικά

Η σύγχρονη φασματοσκοπία υπέρυθρου (Infra Red Spectroscopy, IR) αποτελεί ένα εύχρηστο εργαλείο για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας. Οι εφαρμογές της ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, με βάση τις τρεις περιοχές του υπέρυθρου φάσματος. Η πιο χρησιμοποιούμενη περιοχή και με μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή (Mid IR), η οποία εκτείνεται περίπου από τα 4000 έως 600 cm^{-1} . Στην περιοχή αυτή λαμβάνονται φάσματα απορρόφησης εκπομπής και ανάκλασης, τόσο για ποιοτικούς όσο και για ποσοτικούς προσδιορισμούς. (Εικ. 7)



Εικόνα 7: Περιοχές του IR

Φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier

Η φασματοσκοπία IR χρησιμοποιείται κυρίως στην περιοχή 4000-650 cm⁻¹, στην περιοχή όμως αυτή η ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου IR είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο “θόρυβος” να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Ως «θόρυβος» εννοούνται όλα εκείνα τα σήματα τα οποία καταγράφονται και δεν ανταποκρίνονται σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος αλλά σε άλλους λόγους. Οι κυριότερες αιτίες που δημιουργούν θόρυβο οφείλονται α) στην κατάσταση του δείγματος, το οποίο όταν είναι σε στερεά κατάσταση ή δεν έχει διαλυθεί πλήρως στο διαλύτη διαχέει μέρος της προσπίπτουσας σε αυτό ακτινοβολίας, β) στην πηγή, γ) στο συμβολόμετρο, δ) στον ανιχνευτή, ε) στην ψηφιοποίηση του αναλογικού σήματος (αποδισμός), στ) στην υψηλή διαχωριστική ικανότητα που έχει ζητηθεί και ζ) σε διάφορους θορύβους ηλεκτρονικής ή τυχαίας φύσης. Η αδυναμία των κοινών φασματοφωτομέτρων IR υπερνικήθηκε με τη φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform IR Spectroscopy, FT-IR).

Η ανάλυση κατά Fourier ή μετασχηματισμός Fourier είναι η ανάλυση μιας μαθηματικής συνάρτησης με τη μορφή μιας τριγωνομετρικής σειράς. Χρησιμοποιείται ως μέθοδος προσδιορισμού των αρμονικών συστατικών ενός πολύπλοκου περιοδικού κύματος. Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή του φάσματος με συμβολομετρικές μετρήσεις (interferometric measurements) που υπερτερούν των κοινών μηχανισμών σάρωσης του φάσματος.

Τα κύρια τμήματα από τα οποία αποτελείται ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR είναι:

- η πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας
- το συμβολόμετρο
- η πηγή λέιζερ
- ο ανιχνευτής

Η πηγή ακτινοβολίας στην περίπτωση του φασματοφωτόμετρου με μετασχηματισμό Fourier, είναι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν για τα φασματοφωτόμετρα διασποράς. Η πλέον γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα μικρού κόστους είναι η λυχνία νικελίου – χρωμίου (Nichrom), με μικρή ισχύ και αερόψυκτη. Αναπτύσσει θερμοκρασία 1200–1250 °C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή του μέσο - υπερύθρου. Το μειονέκτημά της είναι ότι έχει μικρή σταθερότητα και σχετικά μικρή περίοδο ζωής.

Πηγή λέιζερ: Η παραγωγή της ακτίνας λέιζερ γίνεται με τη διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (He Ne). Ο ρόλος της είναι να ελέγχει και να οδηγεί την προσπίπτουσα ακτινοβολία στο συμβολόμετρο, οποίος την δέχεται ανά μικρά και ακριβή διαστήματα κατά τη διάρκεια της σάρωσης.

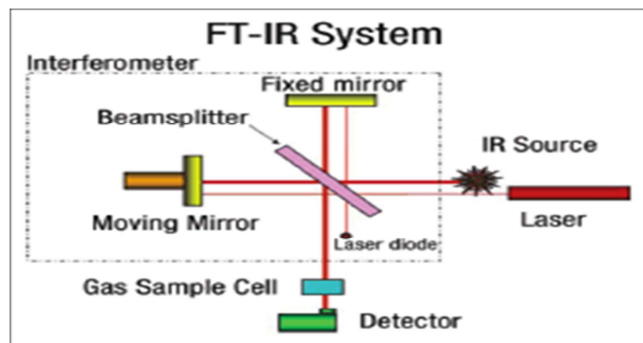
Ανιχνευτής: Οι δύο πιο δημοφιλείς ανιχνευτές για ένα φασματομέτρο FT-IR είναι ο DTGS (κατασκευασμένος από δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη) και ο MCT (τελλουριούχος υδραργύρου-καδμίου). Ο ανιχνευτής DTGS είναι ένας πυροηλεκτρικός ανιχνευτής που παρέχει ταχεία ανταπόκριση επειδή μετρά τις μεταβολές στη θερμοκρασία και όχι την ίδια τη θερμοκρασία. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού. Οποιαδήποτε διακύμανση της ενέργειας της υπέρυθρης ακτινοβολίας, λόγω απορρόφησης από το δείγμα, εκφράζεται από τον ανιχνευτή σαν μεταβολή τάσης και σαν τέτοια την στέλνει στη συνέχεια στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Λειτουργεί σε θερμοκρασία δωματίου και είναι αρκετά αποτελεσματικός στην απαλοιφή του «θορύβου».

Συμβολόμετρο: Το συμβολόμετρο αποτελεί την καινοτομία της φασματοσκοπίας υπερύθρου και το οποίο έχει αντικαταστήσει τον μονοχρωμάτορα. Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη οπτικών που χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και τις επανασυνθέτει αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές που διαφέρουν στο μήκος.

Οι μεταβολές της έντασης της επαλληλίας των δύο δεσμών ακτινοβολίας, ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή. Η πολυχρωματική IR ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης B (beam splitter), ο οποίος είναι φτιαγμένος από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως

KBr. Εκεί το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται και πέφτει στον καθρέφτη D (moving mirror), ενώ το υπόλοιπο 50% περνά από το διαχωριστή και «χτυπάει» στον καθρέφτη C (fixed mirror). Ο διαχωριστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 45°, ως προς την προσπίπτουσα δέσμη, ώστε να είναι μέγιστες οι εντάσεις τόσο του μέρους της δέσμης που ανακλάται, όσο και εκείνου που διαπερνά. Οι δύο δέσμες ανακλώνται στους καθρέπτες και γυρνούν στην πλάκα- διαχωριστή (beam splitter) της δέσμης του φωτός, όπου συνενώνονται πάλι σε μια δέσμη φωτός με κατεύθυνση το δείγμα της ουσίας και μετά στον ανιχνευτή.

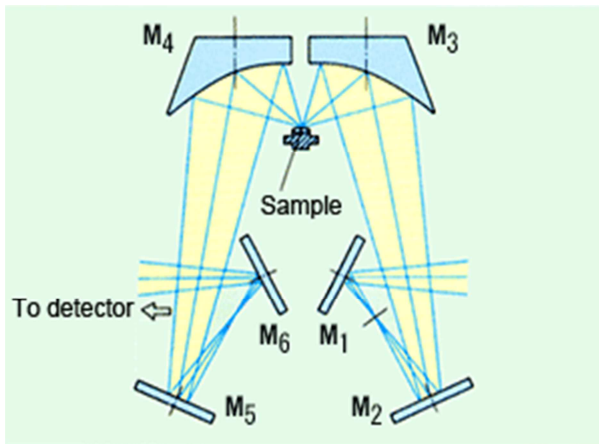
Στην περίπτωση μονοχρωματικής δέσμης φωτός, που εκπέμπεται από την πηγή και συνενώνεται στην πλάκα B υπόκειται σε θετική ή αρνητική συμβολή ανάλογα με τις αποστάσεις του από τους καθρέπτες C και D. Εάν οι αποστάσεις αυτές είναι ίσες ή διαφέρουν κατά ένα ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της μονοχρωματικής δέσμης, τότε δημιουργείται θετική συμβολή που δίνει μια δέσμη φωτός μεγάλης έντασης. Εάν όμως οι αποστάσεις της B από τους C και D είναι πολλαπλάσιοι κατά $(k+1/2)$, όπου k -ακέραιος, του μήκους κύματος, τότε οι δέσμες φωτός ανακλώνται στους καθρέπτες, επανέρχονται στην B και εξουδετερώνονται. Στη μονάδα συμβολομέτρου, ο καθρέπτης D κινείται αργά προς την πλάκα B ή απομακρύνεται από αυτή. Με τον τρόπο αυτό ο ανιχνευτής θα δέχεται ακτινοβολία εναλλασσόμενης έντασης λόγω φαινομένου συμβολής. Η πηγή μπορεί να εκπέμπει μια σειρά από μονοχρωματικές ακτινοβολίες (ν_1, ν_2, \dots κ.λπ) που θα δημιουργήσουν στον ανιχνευτή ένα περίπλοκο μίγμα ακτινοβολιών με εναλλασσόμενες εντάσεις. Με τη βοήθεια του μετασχηματισμού Fourier τα κενά αυτά μετατρέπονται στο κανονικό φάσμα IR. Συνήθως η καταγραφή των σημάτων στον ανιχνευτή γίνεται κάθε 0,001 sec και κάθε πληροφορία συσσωρεύεται σε ένα από τα 1000 σημεία του προγραμματισμένου φάσματος. Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής επεξεργάζεται τις πληροφορίες (εντάσεις απορροφήσεων σε διάφορες συχνότητες), εκτελεί τους μετασχηματισμούς Fourier σε ελάχιστα δευτερόλεπτα και παρουσιάζει κανονικό φάσμα, που έχει αναλυθεί σε 1000 σημεία, έτοιμο για καταγραφή στο βαθμολογημένο φασματογραφικό χαρτί. (Εικ .8)



Εικόνα 8: Οπτικό σχηματικό διάγραμμα φασματομέτρου FT-IR

Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy –DRIFTS)

Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης με μετασχηματισμό Fourier (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy –DRIFTS) , είναι μια από τις τεχνικές λήψης φασμάτων FT-IR από δείγματα σε στερεά κατάσταση, συνήθως υπό την μορφή σκόνης και χωρίς την προσθήκη άλλου υλικού. Για τη λήψη φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα υποδοχής του δείγματος. Το εξάρτημα αυτό διαθέτει 6 κάτοπτρα (Εικ. 9). Τα κάτοπτρα M1, M2 και M3 εστιάζουν τη δέσμη της ακτινοβολίας που έρχεται από το συμβολόμετρο επάνω στο δείγμα, ενώ τα M4, M5 και M6 εστιάζουν την ανακλώμενη ακτινοβολία από το δείγμα προς τον ανιχνευτή. Ο χώρος όπου τοποθετείται το δείγμα (υποδοχέας) μπορεί να είναι δύο μεγεθών. Ο μεγαλύτερος έχει διάμετρο 13 mm και ύψος 2 mm ενώ ο μικρός 3 και 2 mm αντίστοιχα.



Εικόνα 9: Το εξάρτημα λήψης φάσματος DRIFTS

Η IR ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στην επιφάνεια του στερεού δείγματος με αποτέλεσμα να συμβούν τρία είδη ανακλάσεων: η απορροφητική, η διαχυτική και η αληθινή ανάκλαση. Από τα τρία αυτά είδη ανάκλασης μόνον η απορροφητική περιέχει πληροφορίες για το δείγμα και η οποία εξαρτάται

α) από το μέγεθος των κόκκων του δείγματος,

β) τη μετωπική επιφάνεια και την πυκνότητα πακεταρίσματος του δείγματος στον υποδοχέα

γ) το δείκτη διάθλασης του δείγματος καθώς και από

δ) τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας επάνω στο δείγμα

Όταν το μέγεθος των σωματιδίων είναι μεγάλο επικρατεί το φαινόμενο σκέδασης της ακτινοβολίας με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά ο θόρυβος και να μειώνεται το ποσό της ακτινοβολίας που διεισδύει μέσα στο δείγμα και συνεπώς μειώνεται και η ένταση των απορροφήσεων. Αντίθετα όσο μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων που απαρτίζουν τη σκόνη, αυξάνεται η ένταση των κορυφών και μειώνεται αισθητά ο θόρυβος. Ιδανικό είναι το μέγεθος το οποίο είναι μικρότερο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται. Όμως αυτό εξαρτάται από τη φύση του δείγματος και δεν μπορεί αρκετές φορές να επιτευχθεί. Είναι επιθυμητό η επιφάνεια του δείγματος να εμφανίζει ομαλότητα για να μειώνεται αισθητά ο θόρυβος. Η ομαλότητα εξαρτάται από τη φύση του δείγματος, το μέγεθος των σωματιδίων και τον τρόπο τοποθέτησης του δείγματος. Τα στιλπνά όμως υλικά δημιουργούν προβλήματα διότι σημαντικό μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ανακλάται. Ο υποδοχέας του δείγματος ρυθμίζεται κατά μήκος και κατά ύψος. Με τον τρόπο αυτό μεταβάλλεται η γωνία πρόσπτωσης και βελτιστοποιείται η εστίαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα. Αυτό επιβεβαιώνεται από τη μεγιστοποίηση του σήματος IR στην οθόνη του υπολογιστή.

Η μέθοδος DRIFTS χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια γιατί είναι απλή, πάρα πολύ γρήγορη και δεν απαιτεί ουσιαστικά προηγούμενη κατεργασία του δείγματος. Η λήψη των φασμάτων γίνεται είτε με το δείγμα ως έχει είτε με ανάμιξη σε αναλογία συνήθως 1:100 με KBr ή KCl. Όταν εξετάζονται μίγματα, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην ομογενοποίησή τους.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής ήταν η απομόνωση , μελέτη και σύγκριση των φαινολικών συστατικών από τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα των τριών ειδών του γένους *Sideritis*. Η βοτανική ονομασία των τριών ειδών είναι *Sideritis clandestina* (Προέλευση Ταϋγέτου), *Sideritis scardica* (Προέλευση Μαγνησίας), *Sideritis sipylea* (Προέλευση Μυτιλήνης).

Σε πρώτη φάση, προσδιορίστηκε ποσοτικά η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Μελετήθηκε η αντιοξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με τις δοκιμές DPPH και ABTS.

Ακολούθησε η μελέτη των φαινολικών συστατικών που απομονώθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (HPLC- DAD). Στην συνέχεια, έγινε σύγκριση με τα δεδομένα που λήφθηκαν από αντίστοιχες πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Παράλληλα με φασματοσκοπία υπερύθρου με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) έγινε ανίχνευση και προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων.

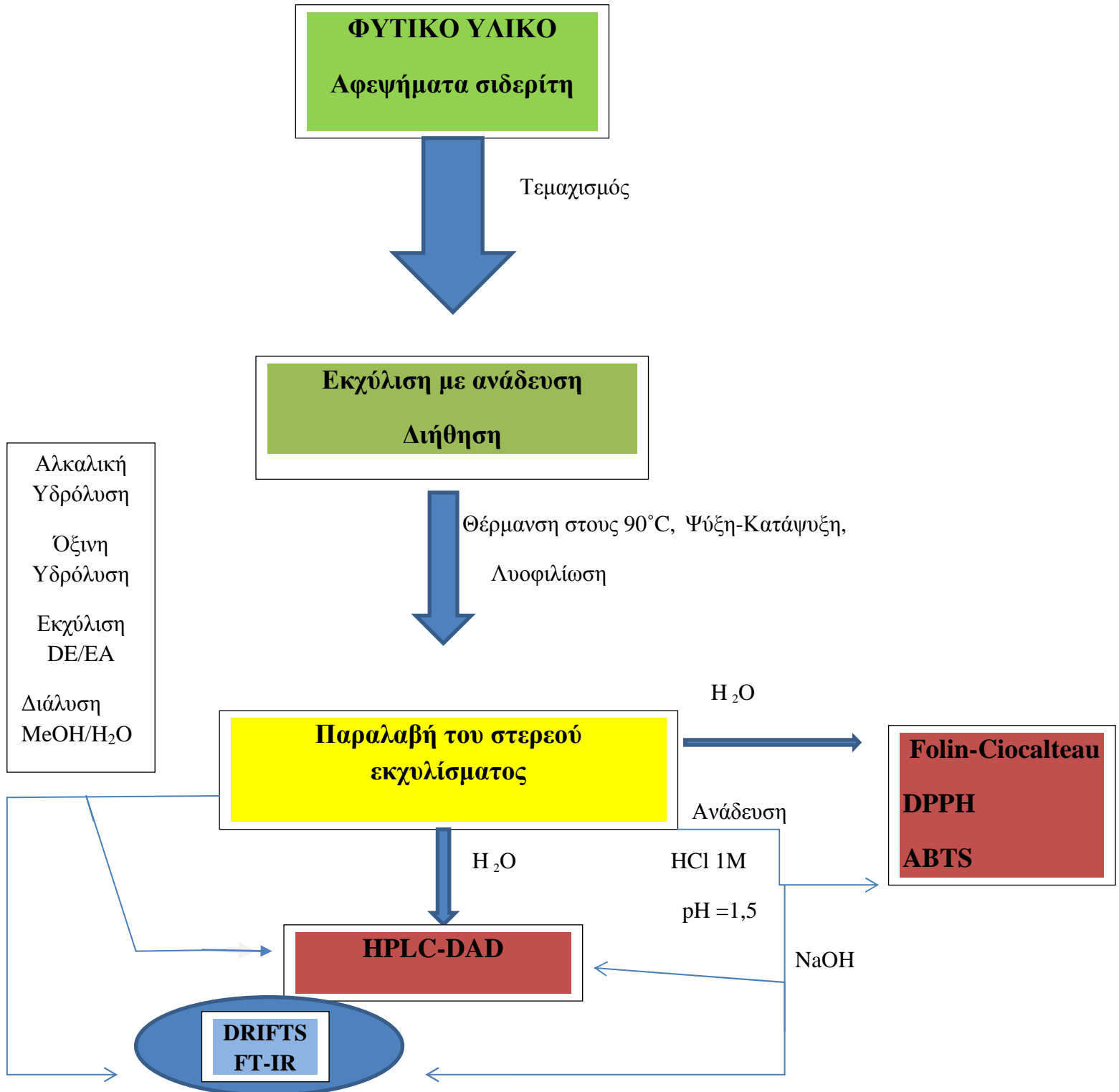
Σε δεύτερη φάση, με όξινη και αλκαλική υδρόλυση των λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων έγινε περαιτέρω απομόνωση των φαινολικών συστατικών των τριών ειδών. Διαχωρίστηκαν τα συστατικά αυτά με την (HPLC-DAD) και με την λήψη των φασμάτων IR έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών τους, όπως και στα λυοφιλωμένα εκχύλίσματα.

Τέλος, ένα μέρος του λυοφιλωμένου στερεού και από τα τρία είδη επαναδιαλυτοποιήθηκε σε νερό με ρύθμιση της τιμής του pH στην τιμή 1,5 με την προσθήκη HCl 1M. Ακολούθησε μηχανική ανάδευση για 1, 1,5 και 2 h, προκειμένου να γίνει προσομοίωση των συνθηκών που επικρατούν στο στομάχι και της διάρκειας της πέψης. Αφού μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση με τις δοκιμές DPPH και ABTS για την 1, 1,5 και 2 h, αντίστοιχα έγινε λήψη του χρωματογραφήματος τους με (HPLC-DAD) και του φάσματος IR όπως και στα παραπάνω.

Με την συλλογή των στοιχείων αυτών έγινε διακριτό ποιο από τα τρία είδη του γένους *Sideritis* ήταν πλουσιότερο σε φαινολικά συστατικά και εμφάνιζε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Ακόμα έγινε σύγκριση μεταξύ των τριών ειδών όσον αφορά τα συστατικά που μπορεί να περιέχουν καθώς και των υδατικών τους διαλυμάτων σε pH=1,5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Εικόνα 10: ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ



1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ



Εικόνα 11: Φυτικό υλικό Α) *Sideritis clandestine* (Προέλευσης Ταυγέτου), Β) *Sideritis scardica* (Προέλευσης Μαγνησίας), Γ) *Sideritis sipylea* (Προέλευσης Μυτιλήνης)

Φυτικό υλικό

Sideritis clandestine (Προέλευσης Ταυγέτου), *Sideritis scardica* (Προέλευσης Μαγνησίας), *Sideritis sipylea* (Προέλευσης Μυτιλήνης).

Το φυτικό υλικό τεμαχίστηκε με ψαλίδι σε κομμάτια πριν την έναρξη της διαδικασίας εκχύλισης.

Εκχύλιση με μηχανική ανάδευση και διήθηση

5 g τεμαχισμένου *Sideritis* τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσης των 500 mL σε θερμό νερό σε θερμοκρασία 90°C. Το φυτικό υλικό εκχυλίστηκε σε 500 mL ύδατος υπό μηχανική ανάδευση και ακολούθησε διήθηση. Η εκχύλιση και η διήθηση επαναλήφθηκαν εις τριπλούν για κάθε δείγμα. Ακολούθως τα διηθήματα αφέθηκαν να αποκτήσουν την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και τοποθετήθηκαν στην συντήρηση του ψυγείου (4-6 °C).

Λυοφιλίωση

Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν στα ειδικά δοχεία της λυοφιλίωσης και έμειναν στην κατάψυξη (-20 °C) για μια νύχτα. Στην συνέχεια λυοφιλιώθηκαν σε συσκευή Virtis 25 EL Freemobile, όπου μετά το πέρασ 24 h παραλήφθηκε το στερεό εκχύλισμα. Το στερεό εκχύλισμα ζυγίστηκε και αποθηκεύτηκε σε ξηραντήρα με P₂O₅ και σε ατμόσφαιρα αργού ή αζώτου μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Αλκαλική υδρόλυση

Σε 0,2 g λυοφιλιωμένου δείγματος προστέθηκαν 5 mL διαλύματος NaOH 2N. Το διάλυμα που προέκυψε, αναδεύτηκε μηχανικά στους 40-45°C και σε ατμόσφαιρα N₂ για 30 min, για να υδρολυθεί. Στη συνέχεια ψύχθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εξουδετερώθηκε με προσθήκη 1,4 mL HCl 7,2 N. Τα απελευθερωμένα φαινορικά οξέα συλλέχθηκαν με 12,8 mL διαλύματος διαιθυλαιθέρα : οξικού αιθυλεστέρα 1:1 (v/v). Ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή Vortex για 45 s και φυγοκέντριση για 10 min στα 6700 g και σε θερμοκρασία 0°C. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε εις διπλούν. Στη συνέχεια, οι υπερκείμενες οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν με πιπέτα Pasteur, συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό συμπυκνωτή, υπό κενό, μέχρι ξηρού. Τα υπολείμματα επαναδιαλύθηκαν σε 4,5 mL MeOH:H₂O 75:25 (v / v) κάθε φορά. Ακολούθως 1 mL από το διάλυμα αραιώθηκε με 1 mL μεθανόλη: νερό 75:25 (v / v) και στη συνέχεια διηθήθηκε με χρήση φίλτρου πορώδους Chromafil Xtra PET διατομής πόρων 45 nm και διαμέτρου 25 mm, καταγράφηκε το φάσμα FT-IR και χρωματογραφήθηκαν με χρήση του HPLC-DAD.

Όξινη υδρόλυση

0.2 g λυοφιλιωμένων δειγμάτων υδρολύθηκαν με 2,5 mL πυκνού HCl (12 N). Ακολούθησε επώαση του δείγματος στους 85°C για 30 min. Τα απελευθερωμένα φαινορικά οξέα εκχυλίστηκαν με 15 mL διαιθυλαιθέρα:οξικού αιθυλεστέρα 1:1. Τα διαλύματα που προέκυψαν αναδεύτηκαν σε συσκευή Vortex για 45 s και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 6700 g σε θερμοκρασία 0°C για να ξεχωρίσει η

υδατική από την οργανική φάση. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε εις διπλούν. Στη συνέχεια, οι υπερκείμενες οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν με πιπέτα Pasteur και συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό συμπυκνωτή υπό κενό μέχρι ξηρού. Τα υπολείμματα επαναδιαλύθηκαν σε 3 x 1.5 mL μεθανόλη: νερό (75:25, v / v) κάθε φορά. Τα διαλύματα αφού έγιναν 1:1 δηλαδή 1 mL από το διάλυμα και 1 mL MeOH:H₂O (75:25, v / v) καθαρίστηκαν περνώντας μέσα από φίλτρο πορώδους Chromafil Xtra PET διατομής 45 nm και διαμέτρου 25 mm, καταγράφηκε το φάσμα FT-IR και αναλύθηκαν με HPLC-DAD.

Παρασκευή υδατικού διαλύματος σε τιμή pH=1,5

Τρία δείγματα των 10 mg του λυοφιλιωμένου στερεού επαναδιαλυτοποιούνται σε νερό και ρυθμίζεται το pH στην τιμή 1,5 με HCl 1N και γίνεται μηχανική ανάδευση για 1, 1,5 και 2 h.

3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών – Αντιοξειδωτικής Δράσης

Προσδιορισμός των Ολικών Φαινολικών Συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων καφεϊκού οξέος (0-1,0 mg/mL). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν σε 12-well plate προστέθηκε 2,4 mL απιονισμένο νερό, 40 μ L από τα διαλύματα του καφεϊκού οξέος και 200 μ L από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και ακολούθησε ανάδευση. Μετά την πάροδο 3 min προστίθενται 600 μ L Na₂CO₃ έτσι ώστε να δημιουργηθεί αλκαλικό περιβάλλον και να λάβει χώρα η αντίδραση. Αραιώνουμε 760 μ L του διαλύματος με απιονισμένο νερό μέχρι συνολικού όγκου 4 mL. Μετά από επώαση δύο ωρών στο σκοτάδι μετριέται η απορρόφηση με φωτόμετρο HACH DR/2010 ρυθμισμένο στα 725 nm. Ο μηδενισμός του οργάνου γίνεται με διάλυμα που παρασκευάζεται με την ίδια διαδικασία με προσθήκη νερού αντί για το προς ανάλυση δείγμα. Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν. Στη συνέχεια σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη για το καφεϊκό οξύ.

Παρασκευάστηκαν στην συνέχεια υδατικά διαλύματα των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 4 g/L, και ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως με την μόνη διαφορά ότι έγινε προσθήκη 40 μ L από τα υδατικά διαλύματα των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων.

Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu εκφράστηκαν σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος. Με βάση την πρότυπη καμπύλη προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά των εκχυλισμάτων.

Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με τη δοκιμή DPPH

Αρχικά, για την προετοιμασία του διαλύματος DPPH χρησιμοποιήθηκε διφαινυλοπικρυλυδραζίλιο της εταιρίας Sigma. Το διάλυμα του DPPH (101 μM) παρασκευάζεται την ίδια μέρα διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα σε μεθανόλη (Bio-Rad, HPLC grade). Η απορρόφηση του διαλύματος ήταν 1,1.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων TROLOX (0-20μM), 30 μL από τα διαλύματα του TROLOX προστέθηκαν σε 3 mL διαλύματος DPPH. Για το τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 30 mL απιονισμένου νερού, ενώ για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη. Μετά από περίοδο επώασης 30 min σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25° C, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm σε φωτόμετρο HACH DR/2010 και προσδιορίστηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης (I%). Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν. Εν συνεχεία κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη.

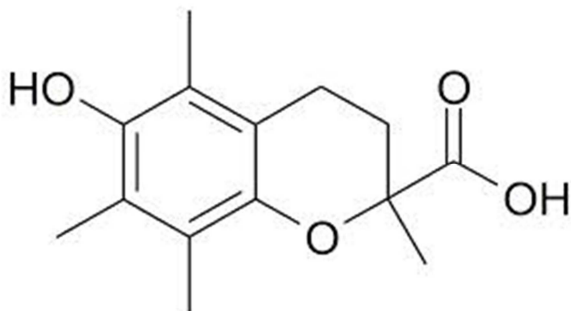
Παρασκευάστηκαν στην συνέχεια υδατικά διαλύματα των λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων και των υδατικών διαλυμάτων σε τιμή τιμή pH= 1,5 συγκέντρωσης 2 g/L. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε αντί για 30 μL TROLOX έγινε προσθήκη 30 μL από τα διαλύματα των δειγμάτων.

Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$I\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$$

Όπου I% = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας DPPH, A₀ = απορρόφηση του τυφλού, A = η απορρόφηση του δείγματος.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα TROLOX (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) το οποίο είναι το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνη E και ισχυρό αντιοξειδωτικό (Εικ. 12).



Εικόνα 12: Δομή του Trolox

Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη δοκιμή ABTS

Διάλυμα αμμωνιακού άλατος ABTS 7 mM παρασκευάζεται ζυγίζοντας ακριβώς 38,4 mg σε 10 mL δις απιονισμένο νερό. Το κατιόν $ABTS^+$ παρασκευάζεται από την αντίδραση 7 mM αμμωνιακού άλατος με 2,45 mM υπερθειικού καλίου ($K_2S_2O_8$). Η οξείδωση του ABTS αρχίζει αμέσως αλλά λόγω της στοιχειομετρικής αναλογίας 1:0,5 η απορρόφηση σταθεροποιείται μετά από 12 h. Μετά την παραμονή του διαλύματος της ρίζας για 12-16 h στο σκοτάδι αυτό αραιώνεται με αιθανόλη έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι $0,700 \pm 0,005$ στα 734 nm σε φωτόμετρο HACH DR/2010. Ως δείγμα αναφοράς για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων TROLOX (0-10 μ M). Σε 3 mL του διαλύματος ABTS προστίθενται 30 μ L από τα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων TROLOX ή νερό για το τυφλό. Αναμιγνύονται καλά και τοποθετούνται σε κλίβανο θερμοστατημένο στους 30°C. Μετά την πάροδο 6 min μετράται η απορρόφηση στα 734 nm και υπολογίζεται το ποσοστό παρεμπόδισης της ρίζας σύμφωνα με τον τύπο. Εν συνεχεία κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη.

Παρασκευάστηκαν στην συνέχεια υδατικά διαλύματα των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων και των υδατικών διαλυμάτων σε τιμή τιμή pH= 1,5 συγκέντρωσης 2 g/L. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε αντί για 30 μ L TROLOX έγινε προσθήκη 30 μ L από τα διαλύματα των δειγμάτων.

Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε κάθε υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$I\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$$

Όπου I% = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας $ABTS^+$, A_0 = απορρόφηση του τυφλού, A = η απορρόφηση του δείγματος.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα TROLOX.

3.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Μελέτη εκχυλισμάτων με HPLC-DAD

Τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα καθώς και τα διαλύματα που προέκυψαν από την όξινη και την αλκαλική υδρόλυση και την προσθήκη HCl 1M αναλύθηκαν με το σύστημα 1100 Agilent HPLC εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis (Diode Array Detector – DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP Chemstation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των πρότυπων χημικών ενώσεων συγκέντρωσης 0,2 g/L σε διάλυμα MeOH/H₂O, τα οποία στην συνέχεια αραιώθηκαν με διάλυμα MeOH/H₂O με αναλογία όγκων 1:1. Οι πρότυπες χημικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : 1) φερουλικό οξύ, 2) ροσμαρινικό οξύ, 3) γλωρογενικό οξύ, 4) p-κουμαρικό οξύ, 5) μυρικετίνη, 6) καμπφερόλη, 7) απιγενίνη, 8) καφεϊκό οξύ, 9) κερκετίνη-3',4'-δι-O-γλυκοζίδιο, 10) απιγενίνη-7-O-γλυκοζίδιο. Ακολούθως, παρασκευάστηκε και το μίγμα των προτύπων χημικών ενώσεων που αναφέραμε και το οποίο αραιώθηκε με διάλυμα MeOH/H₂O με αναλογία όγκων 1:1.

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα όλων των δειγμάτων συγκέντρωσης 40 mg/L τα οποία στην συνέχεια αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό με αναλογία όγκων 1:3. Τα διαλύματα που προέκυψαν από την όξινη και την αλκαλική υδρόλυση αραιώθηκαν με διάλυμα MeOH/H₂O με αναλογία όγκων 1:1.

Τα διαλύματα των δειγμάτων με τιμή pH=1,5 εξουδετερώθηκαν με NaOH και παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματά τους με συγκέντρωση 2 g/L.

Ακολούθως όλα τα διαλύματα διηθήθηκαν σε μικροπορώδες φίλτρο διατομής 0.45 μm και διαμέτρου 25 mm (Chromafil Xtra PET – 45/25).**(Εικ. 13)**



Εικόνα 13: Φίλτρο διατομής 0.45μm και διαμέτρου 25mm (Chromafil Xtra PET – 45/25).



Εικόνα 14: Agilent 1100

Χρησιμοποιήθηκε στήλη ανεστραμμένης φάσης. Η κινητή φάση αποτελούνταν από συνδυασμό δύο διαλυτών. Ο διαλύτης Α ήταν διάλυμα HCOOH με pH=2,25 και ο διαλύτης Β MeOH υψηλής καθαρότητας για HPLC. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,7 mL/min. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος των (Petreska, Stefova et al., 2011) με τη διαφοροποίηση στην τιμή του pH. Η πίεση κυμαίνονταν από 80-90 bar. Η στήλη ήταν Supelco Discovery HS C18, μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4 mm. Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία. Αυτό έγινε κατόπιν προγραμματισμού του οργάνου, με στόχο να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με κατάλληλη σύριγγα HPLC και ο όγκος εισαγωγής ήταν 80 μ L. Το πρόγραμμα έκλουσης της στήλης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1)

Πίνακας 3.1: Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων.

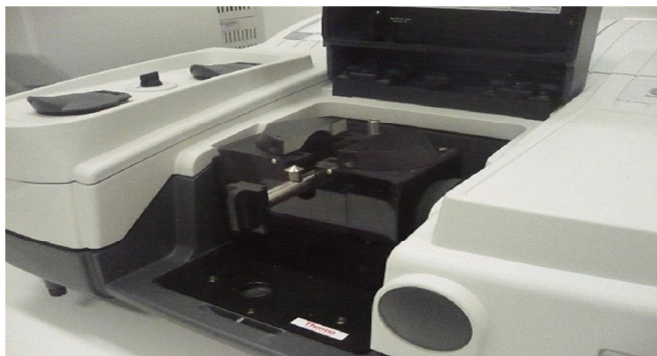
Χρόνος t (min)	ΔΙΑΛΥΤΗΣ A %	ΔΙΑΛΥΤΗΣ B %
0	80	20
25	50	50
60	5	95

62	80	20
-----------	-----------	-----------

Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 254, 280 και 330 nm. Για την ταυτοποίηση των ουσιών έγινε σύγκριση με χρωματογραφήματα μεμονωμένων πρότυπων ουσιών. Τα χρωματογραφήματα των πρότυπων λήφθηκαν με τον ίδιο τρόπο που λήφθηκαν τα άγνωστα, χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους (χρόνους, σύστημα έκλουσης). Η προσπάθεια ταυτοποίησης, κάθε φορά, γινόταν με συνδυασμό του χρόνου έκλουσης και του φάσματος UV-Vis του εκλουόμενου συστατικού και τη σύγκριση με τα αντίστοιχα γνωστών πρότυπων ουσιών, καθώς και από τη σχετική βιβλιογραφία.

3.4 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ DRIFTS

Στα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα του *Sideritis* έγινε φασματοφωτομετρική μελέτη IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS). Μικρή ποσότητα από το κάθε δείγμα λήφθηκε από τα λυοφιλωμένα δείγματα και τοποθετήθηκε στον ειδικό υποδοχέα όπου λήφθηκε το φάσμα FT-IR σε φασματόμετρο Thermo Nicolet 6700. Σαν φάσμα αναφοράς λαμβανόταν ως υπόβαθρο (background) το φάσμα του καθαρού βρωμιούχου καλίου (KBr). Σε κάθε δείγμα γίνονταν 100 σαρώσεις (scans), η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν 4 cm^{-1} , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν 0.3165 mms^{-1} . Σε όλα τα φάσματα FT-IR έγιναν οι επεξεργασίες: αποκοπή της περιοχής απορρόφησης του CO_2 ($2400\text{-}2200 \text{ cm}^{-1}$), εξομάλυνση του σήματος (smoothing) και διόρθωση της βασικής γραμμής (baseline correct). Οι επεξεργασίες αυτές αποσκοπούν στη βελτίωση της εικόνας του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς. Οι παραπάνω επεξεργασίες γίνονται χρησιμοποιώντας την αυτόματη διαδικασία από το λογισμικό πρόγραμμα OMNIC που συνοδεύει το όργανο.



Εικόνα 15: Εξάρτημα για τη λήψη φάσματος με τη μέθοδο DRIFTS όπου φαίνεται η υποδοχή του Micro-cup.

Καταγραφή των FT-IR φασμάτων των διαλυμάτων που προέκυψαν από όξινη και αλκαλική υδρόλυση καθώς και των διαλυμάτων με τιμή pH=1,5

Μερικές σταγόνες από το κάθε διάλυμα των εκχυλισμάτων που είχαν υποστεί αλκαλική και όξινη υδρόλυση καθώς και των διαλυμάτων με pH=1,5 τοποθετήθηκαν πάνω σε δισκία σεληνιούχου ψευδαργύρου (ZnSe) (**Εικ.16**) και αφέθηκαν να στεγνώσουν πλήρως σε κλίβανο θερμοστατημένο στους $50\pm 2^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια λήφθηκε το φάσμα FT-IR με τις ίδιες συνθήκες που περιγράψαμε παραπάνω. Σαν φάσμα αναφοράς λαμβανόταν ως υπόβαθρο το φάσμα του καθαρού δισκίου ZnSe.



Εικόνα 16: Δισκίο ZnSe



Εικόνα 17: Φασματόμετρο FT-IR THERMO NICOLET 6700

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΑΠΟΔΟΣΗ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.1) δίνεται η απόδοση σε στερεό μετά την λυοφιλίωση των εκχυλισμάτων για τα τρία είδη του γένους *Sideritis*.

Ο υπολογισμός της απόδοσης A% έγινε χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$A\% = (m_{\text{λυοφ}}/m_{\text{αρχ}}) * 100 \%$$

$m_{\text{λυοφ}}$ = η μάζα του εκχυλίσματος μετά την λυοφιλίωση

$m_{\text{αρχ}}$ = η αρχική μάζα ξηρού δείγματος

Πίνακας 4.1: Απόδοση λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων

ΔΕΙΓΜΑ	$m_{\text{αρχ}}$ (g)	$m_{\text{λυοφ}}$ (g)	A%
<i>Sideritis clandestina</i> (Ταϋγετος)	5	1,4	28
<i>Sideritis scardica</i> (Μαγνησία)	5	0,4	8
<i>Sideritis sipylea</i> (Μυτιλήνη)	5	1,2	24

Παρατηρείται ότι ο *Sideritis clandestina* και ο *Sideritis sipylea* παρουσιάζουν παραπλήσια απόδοση. Αισθητή μείωση παρουσιάζει ο *Sideritis scardica*.

4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Προσδιορισμός των Ολικών Φαινολικών Συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Στον πίνακα 4.2 αναγράφονται οι απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων καφεϊκού οξέος (mg/mL) και στην εικόνα 18 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη. Στον πίνακα 4.3 φαίνονται οι περιεκτικότητες σε ολικά φαινολικά συστατικά των δειγμάτων από τις τρεις ποικιλίες του *Sideritis*, εκφρασμένες σε mg/mL καφεϊκού οξέος.

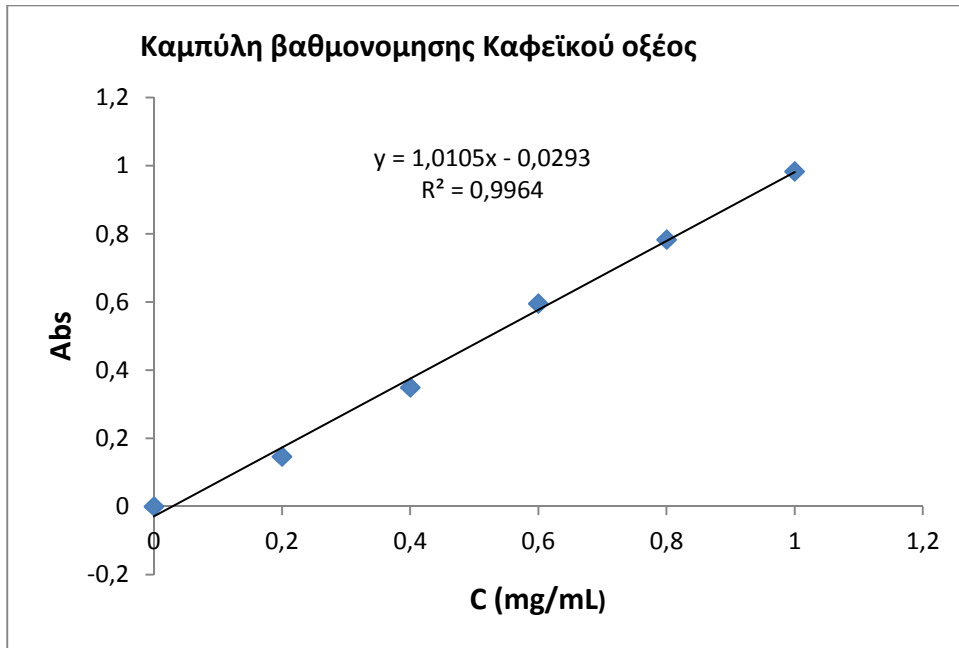
Οι τιμές που αναγράφονται (Πιν. 4.3) είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων και η τυπική τους απόκλιση (SD).

Πίνακας 4.2: Πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος (mg/mL).

Καφεϊκό οξύ (mg /mL)	Απορρόφηση
0	0
0,2	0,146
0,4	0,349
0,6	0,595
0,8	0,783
1	0,983

Πίνακας 4.3: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/mL) ± SD.

ΔΕΙΓΜΑ	Ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg /mL) ± SD
<i>Sideritis clandestina</i> (Ταϋγετος)	0,49 ± 0,01
<i>Sideritis scardica</i> (Μαγνησία)	0,44 ± 0,03
<i>Sideritis sipylea</i> (Μυτιλήνη)	0,38 ± 0,02



Εικόνα 18: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης του καφεϊκού οξέος

Από τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται ότι και τα τρία είδη παρουσιάζουν παραπλήσιο φαινολικό περιεχόμενο με τον *Sideritis clandestina* να παρουσιάζει μια ελαφρά υπεροχή. Για τον *Sideritis clandestina* δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές. Για τα υπόλοιπα είδη τα ολικά φαινολικά εκφράζονταν σε γαλλικό οξύ (*Todorova and Trendafilova 2014, Nakiboglu et al. 2007*) και επομένως δεν μπορούν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

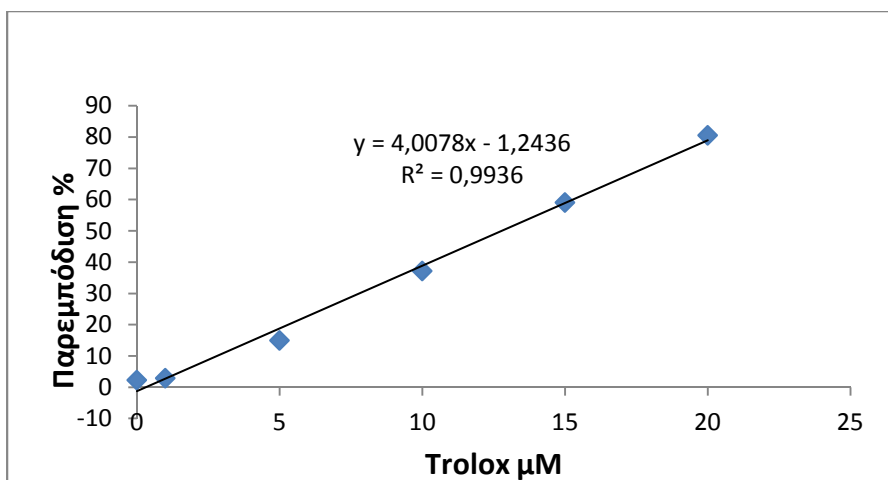
Προσδιορισμός της Αντιοξειδωτικής Δράσης με τις δοκιμές DPPH και ABTS

Σε αυτή την παράγραφο θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων των ειδών του γένους *Sideritis* σύμφωνα με τις δοκιμές DPPH και ABTS.

Αρχικά στον πίνακα 4.4 είναι τα αποτελέσματα της παρεμπόδισης % της ελεύθερης ρίζας του DPPH προς συγκέντρωση Trolox και ακολούθως το διάγραμμα της στους πίνακες που ακολουθούν είναι τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις δυο μεθόδους προσδιορισμού που εκφράζονται σε Trolox ($\mu\text{mol /mL}$). Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και η αναγωγή στο Trolox έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης η οποία δίνεται παρακάτω.

Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα παρεμπόδισης % της ελεύθερης ρίζας του DPPH προς συγκέντρωση Trolox.

Trolox μM	Παρεμπόδιση (%)
0	2,27
1	2,93
5	14,91
10	37,21
15	59,06
20	80,54
Acontrol DPPH= 1,057	



Εικόνα 19: Διάγραμμα παρεμπόδισης % της ρίζας του DPPH προς συγκέντρωση Trolox.

Πίνακας 4.5: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με την δοκιμή DPPH. Αποτελέσματα λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων.

Δείγμα	Παρεμπόδιση %	Trolox (μmol /mL)±SD
<i>Sideritis clandestina</i> (Ταϋγκετος)	57	14,0 ± 0,4
<i>Sideritis scardica</i> (Μαγνησία)	37	10,0 ± 0,2
<i>Sideritis sipylea</i> (Μυτιλήνη)	30	8 ± 1

Παρατηρείται και εδώ ότι ο *Sideritis clandestina* παρουσιάζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη. Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές ως μέτρο σύγκρισης. Για τον *Sideritis scardica* (Todorova and Trendafilova 2014) φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα σε βουτανόλη - οξικό αιθυλεστέρα και μεθανόλη έδειξαν ισχυρή δραστηριότητα στο DPPH (94,1 - 94,4%) για τον *Sideritis sipylea* έχει σχετική αναφορά στην βιβλιογραφία.

Προσδιορίστηκε επίσης η αντιοξειδωτική δράση υδατικών διαλυμάτων των τριών ειδών του *Sideritis* σε τιμή pH=1,5 (Πίνακας 4.6).

Πίνακας 4.6: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με την δοκιμή DPPH υδατικών διαλυμάτων με τιμή pH=1,5.

Δείγμα	Παρεμπόδιση %			Trolox($\mu\text{mol} / \text{mL}$) \pm SD		
	1 h	1,5 h	2 h	1 h	1,5 h	2 h
<i>Sideritis clandestina</i> (Ταϋγκετος)	47	42	34	12,1 \pm 0,1	11 \pm 0,2	8,7 \pm 0,3
<i>Sideritis scardica</i> (Μαγνησία)	47	45	39	12 \pm 0,4	12 \pm 0,2	10,1 \pm 0,2
<i>Sideritis sipylea</i> (Μυτιλήνη)	47	51	44	12,1 \pm 0,6	13 \pm 0,3	11,2 \pm 0,1

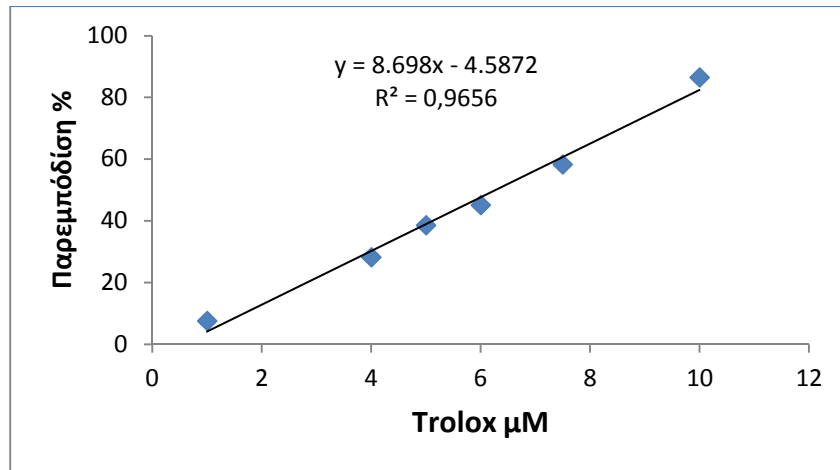
Παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα ότι υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση με την δοκιμή DPPH παρουσιάζει ο *Sideritis sipylea* (Προέλευσης Μυτιλήνης) και στην 1 και στην 1,5 και 2 h συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Σε σχέση με τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα , ο *Sideritis clandestina* παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση ενώ σε pH= 1,5 μόνο στην 1 h είχε πιο υψηλή αντιοξειδωτική δράση σε σχέση όμως με τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα και πάλι ήταν λιγότερη. Αξιοσημείωτο είναι ότι η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται καθώς περνάει ο χρόνος με εξαίρεση τον *Sideritis sipylea* που στην 1,5 h έχει πιο υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης σύμφωνα με τη δοκιμή ABTS.

Στον πίνακα 4.7 είναι τα αποτελέσματα της % παρεμπόδισης της ρίζας ABTS προς συγκέντρωση Trolox και ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.

Πίνακας 4.7: Αποτελέσματα παρεμπόδισης % της ρίζας ABTS προς συγκέντρωση Trolox.

Trolox μM	Παρεμπόδιση (%)
1	7,49
4	28,15
5	39,05
6	45,04
7,5	58,24
10	86,04
A_{CONTROL} ABTS= 0,689	



Εικόνα 20: Διάγραμμα παρεμπόδισης % ABTS προς συγκέντρωση Trolox

Πίνακας 4.8: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με την δοκιμή ABTS.

Αποτελέσματα λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων.

Δείγμα	Παρεμπόδιση %	Trolox (μmol /mL)±(SD)
<i>Sideritis clandestina</i> (Ταΰγετος)	51	6,4 ± 0,6
<i>Sideritis scardica</i> (Μαγνησία)	51	6,4 ± 0,4
<i>Sideritis sipylea</i> (Μυτιλήνη)	52	6,5 ± 0,3

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι παρ'όλο που και τα τρία είδη έχουν σχεδόν παραπλήσια αντιοξειδωτική δράση με την δοκιμή ABTS, ο *Sideritis sipylea* (Μυτιλήνη) παρουσιάζει σχετικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα άλλα. Για τον *Sideritis scardica* στη βιβλιογραφία (Ivanova et al.,2005) αναφέρεται ότι η συγκέντρωση σε Trolox \pm S.D είναι $0,86 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/mL}$, δηλαδή μικρότερης αντιοξειδωτικής δράσης. Για τα άλλα είδη δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία.

Αντίστοιχα όπως και στο DPPH και στο ABTS προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση υδατικών διαλυμάτων των τριών ειδών του *Sideritis* σε τιμή pH=1,5 (Πίνακας 4.9)

Πίνακας 4.9: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με την δοκιμή ABTS υδατικών διαλυμάτων με τιμή pH=1,5.

Δείγμα	Παρεμπόδιση %			Trolox($\mu\text{mol /mL}$) \pm SD		
	1h	1,5 h	2h	1h	1,5h	2h
<i>Sideritis clandestina</i> (Ταΰγετος)	36,4	43	41	4,7 \pm 0,1	6,0 \pm 0,3	5,2 \pm 0,4
<i>Sideritis scardica</i> (Μαγνησία)	42	51	52	5,4 \pm 0,2	6,4 \pm 0,6	6,5 \pm 0,2
<i>Sideritis sipylea</i> (Μυτιλήνη)	36	34	39,5	5 \pm 1	4,5 \pm 0,3	5,1 \pm 0,2

Από τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα σχετικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει ο *Sideritis sipylea* (Μυτιλήνη) σε σχέση με τα άλλα είδη του γένους *Sideritis*. Συγκριτικά με τον παραπάνω πίνακα σε υδατικά διαλύματα με τιμή pH=1,5 ο *Sideritis scardica* (Μαγνησία) παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και στη 1 και στην 1,5 αλλά και στις 2 h σε σχέση με τα άλλα είδη. Ο *Sideritis scardica* στις 2 h ξεπέρασε την αντιοξειδωτική δράση που είχε στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα, ενώ τα άλλα είδη κινήθηκαν σε χαμηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα τους. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι τα άλλα είδη παρουσίασαν μια πτώση στην 1,5 h.

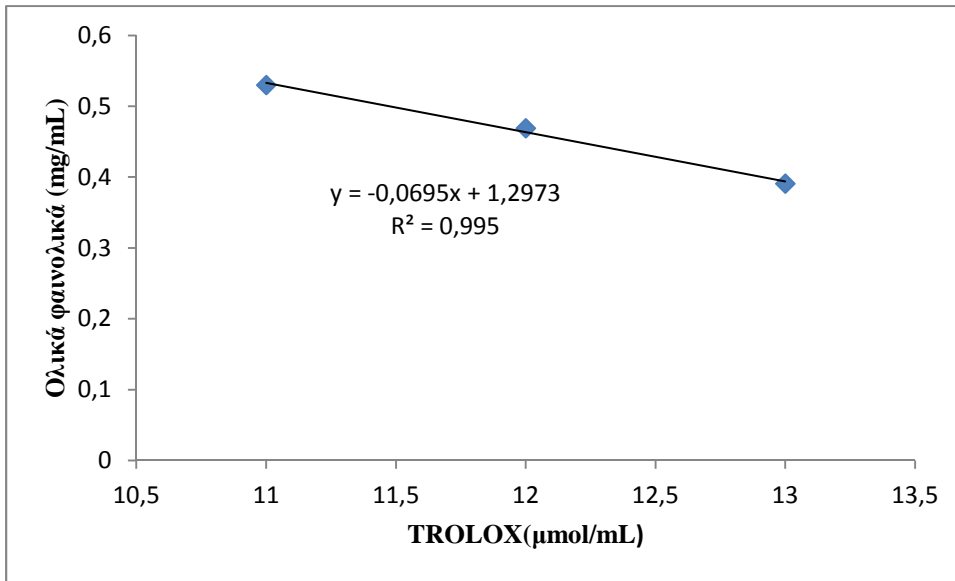
Συσχέτιση των ολικών φαινολικών με την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Συσχετίστηκε η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολικά φαινολικά με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (δοκιμές DPPH και ABTS).

Πίνακας 4.10: Συσχέτιση μεταξύ ολικών φαινολικών και DPPH και ABTS.

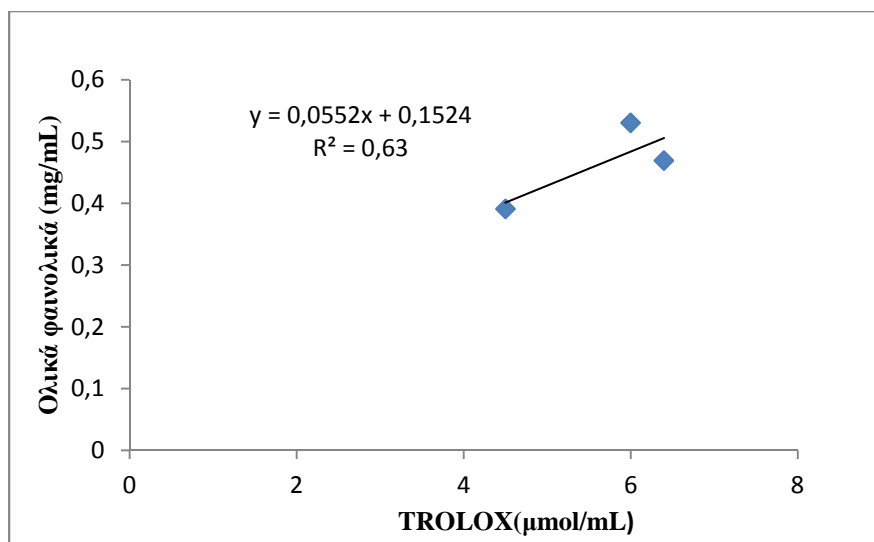
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Ολικά φαινολικά συστατικά Ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/mL) ± SD	Δοκιμή DPPH Trolox (μmol/mL)±SD	Δοκιμή ABTS Trolox(μmol/mL)±SD
<i>Sideritis clandestina</i> (Ταΰγετος)	0,49 ± 0,01	11±0,2	6±0,3
<i>Sideritis scardica</i> (Μαγνησία)	0,44 ± 0,03	12±0,2	6,4 ±0,6
<i>Sideritis sipylea</i> (Μυτιλήνη)	0,38 ± 0,02	13±0,3	4,5±0,3

Από τον πίνακα 4.10 προκύπτουν τρία διαγράμματα στις (Εικ. 21,22,23) είναι τα διαγράμματα συσχέτισης μεταξύ των ολικών φαινολικών και της δοκιμής DPPH και ακολούθως των ολικών φαινολικών και της δοκιμής ABTS και τέλος το διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των δύο δοκιμών.



Εικόνα 21: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των ολικών φαινολικών και της δοκιμής DPPH.

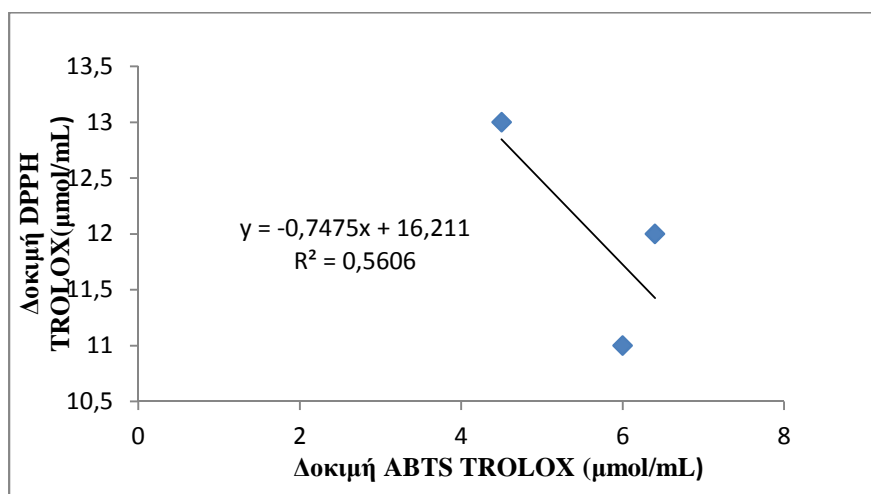
Από το διάγραμμα αυτό και με βάση την βιβλιογραφία (Ciesla *et al.*, 2012) η αντιοξειδωτική δράση που προσδιορίστηκε με τη δοκιμή DPPH σχετίζεται με τις πολυφαινόλες. Στη βιβλιογραφία (Alonso *et al.*, 2014, Seephonkai *et al.*, 2011) αναφέρεται ότι η δοκιμή DPPH σχετίζεται περισσότερο με τα υδρόφιλα συστατικά. Επομένως δικαιολογείται μια πιθανή γραμμική σχέση μεταξύ των ολικών φαινολικών και των αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής δράσης σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH.



Εικόνα 22: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των ολικών φαινολικών και της δοκιμής ABTS.

Παρατηρείται απο το διάγραμμα ότι δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής δράσης (δοκιμή ABTS). Επομένως φαίνεται ότι η δοκιμή ABTS δεν είναι ικανοποιητική για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των υδρόφιλων συστατικών.

Στην εικόνα 23 είναι το διάγραμμα συσχέτισης των δοκιμών ABTS και DPPH.



Εικόνα 23: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των δοκιμών DPPH και ABTS.

Με βάση την εικόνα 23 φαίνεται ότι δεν υπάρχει παρόμοια γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δυο δοκιμών DPPH και ABTS. Επομένως αποτελεί πάγια πρακτική να προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική δράση με δύο, τουλάχιστον, μεθόδους.

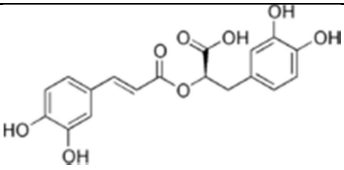
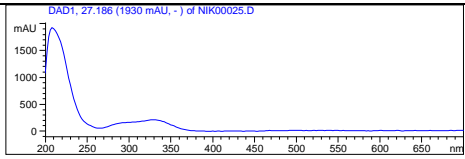
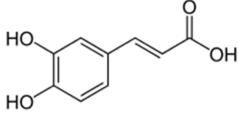
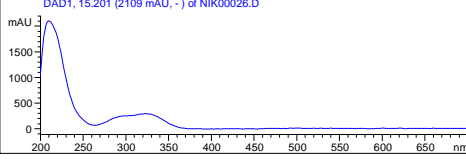
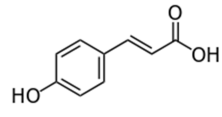
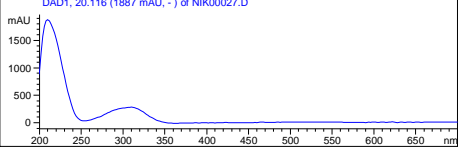
4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) ΚΑΙ FT-IR

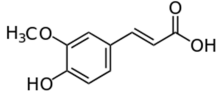
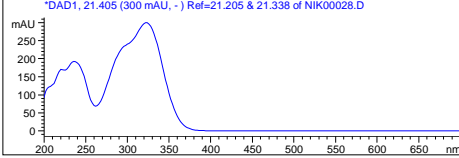
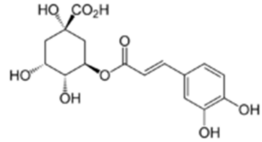
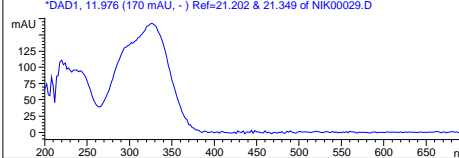
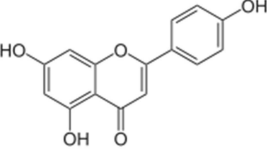
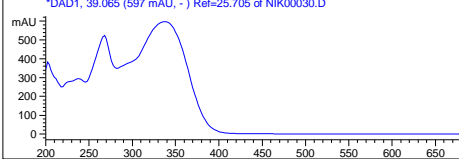
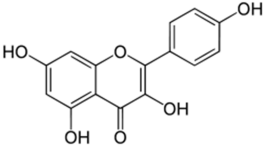
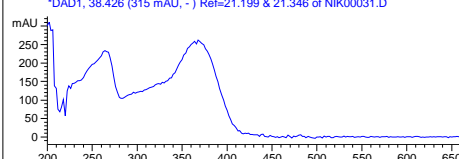
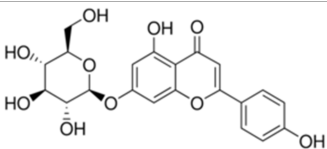
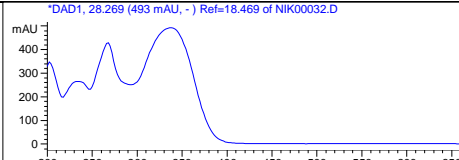
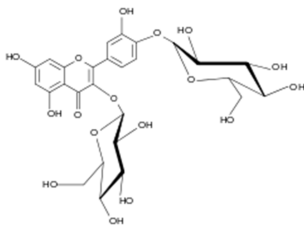
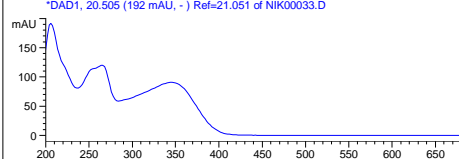
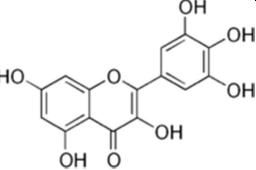
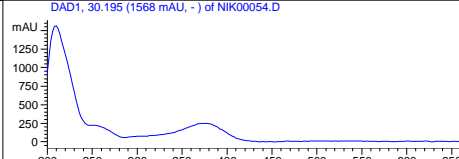
Τα δείγματα αναλύθηκαν HPLC-DAD. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 254, 280 και 330 nm.

Ακολούθως, χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες έκλουσης αναλύθηκαν οι πρότυπες ουσίες (Πίν.4.11) σε συγκέντρωση 0,2g/L MeOH/H₂O και τα λυοφιλιωμένα εκχυλίσματα αφού υπέστησαν αλκαλική με NaOH και όξινη υδρόλυση με HCl.

Η ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών βασίστηκε στο συνδυασμό του χρόνου έκλουσης και του φάσματος υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) όπως καταγράφηκαν πειραματικά.

Πίνακας 4.11: UV-Vis φάσματα των προτύπων χημικών ενώσεων

Πρότυπες χημικές ενώσεις	Χημικός τύπος	Φάσμα UV-Vis	λ _{max} (nm)
Ροσμαρινικό Οξύ			330
Καφεϊκό οξύ			295-327
p-κουμαρικό οξύ			238-324

Φερουλικό οξύ			218-236-295
Χλωρογενικό οξύ			325
Απιγενίνη			268-300-338
καμφερόλη			255-267-294-325-365
Απιγενίνη-7-O-γλυκοζίδιο			268-332
Κερκετίνη-3',4'-δι-O-γλυκοζίδιο			356
Μυρικετίνη			360

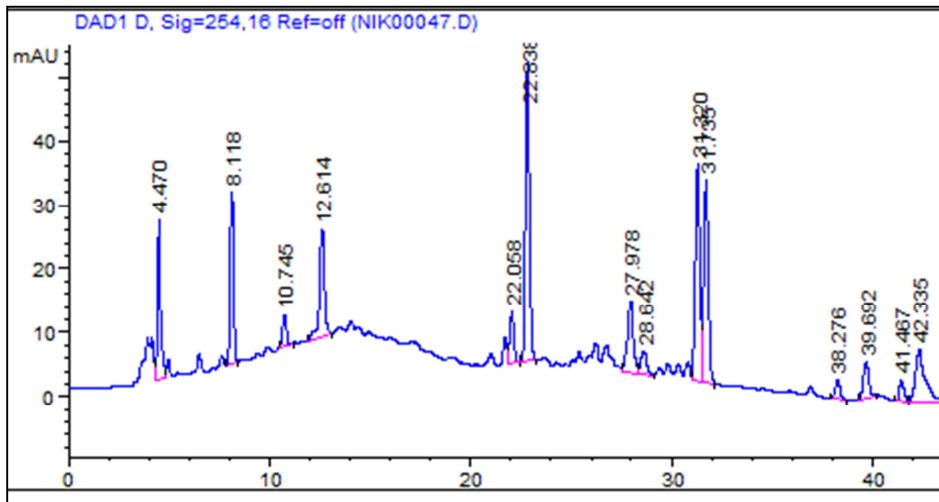
Στην συνέχεια στον πίνακα 4.12 που ακολουθεί έχουμε τους χρόνους έκλυσης των προτύπων χημικών ενώσεων.

Πίνακας 4.12: Χρόνοι έκλουσης προτύπων χημικών ενώσεων.

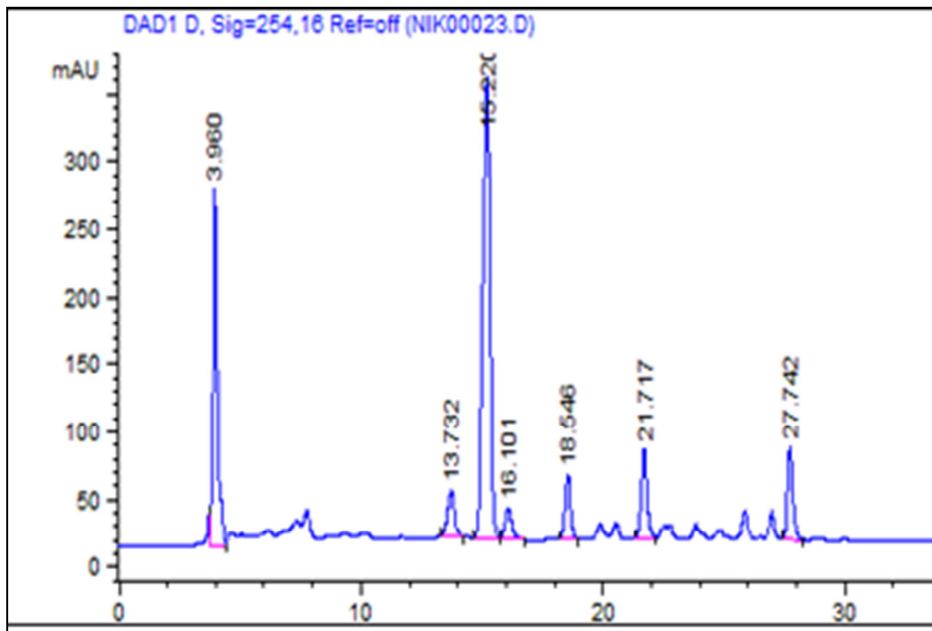
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΧΗΜΙΚΕΣ	t_R (ΠΡΟΤ) (min)	t_R (ΜΙΓΜ) (min)
	Ροσμαρινικό οξύ	27,252	29,868
	Καφεϊκό οξύ	15,076	16,587
	p-κουμαρικό οξύ	20,241	22,088
	Φερουλικό οξύ	21,348	21,404
	Χλωρογενικό οξύ	12,062	13,068
	Απιγενίνη	39,013	40,012
	Καμφερόλη	39,116	35,440
	Απιγενίνη-7-O- γλυκοζίδιο	28,274	29,106
	Κερκετίνη-3',4'-δι-O- γλυκοζίδιο	20,540	21,404
	Μυρικετίνη	29,970	29,868

Ακολούθως, στις εικόνες 24,25,26 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του *Sideritis clandestina* στα 254, 280 και 330 nm. Κάτω από κάθε εικόνα υπάρχει πίνακας που έχει τις πρότυπες ουσίες και το φάσμα UV-Vis της ουσίας που υπάρχει στο δείγμα και βάσει των χρόνων έκλουσης και του φάσματος καθώς και του φάσματος FT-IR με σκοπό τον προσδιορισμό των συστατικών.

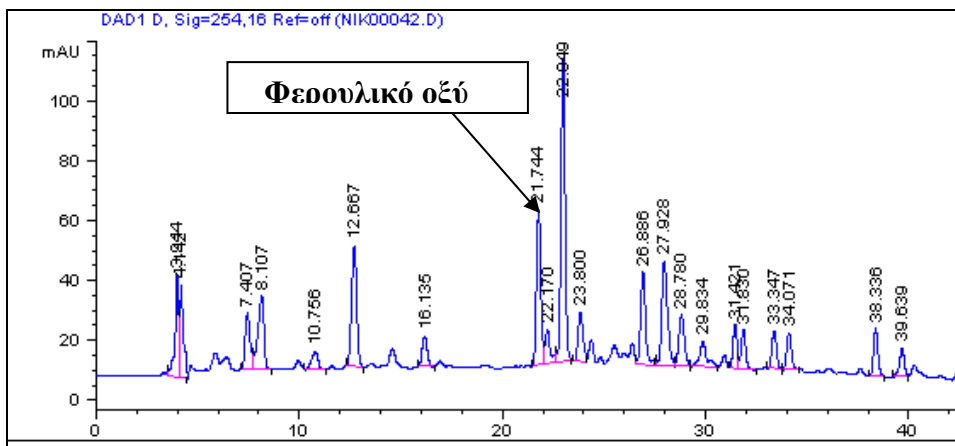
Sideritis clandestina στα 254 nm



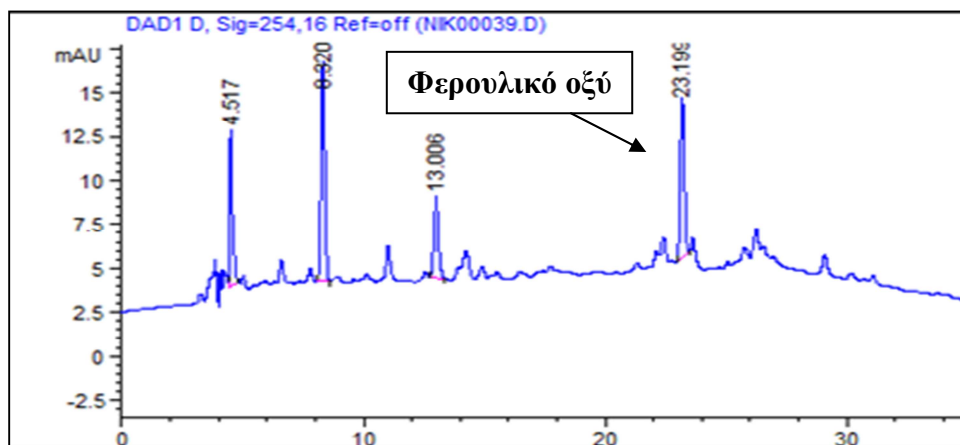
A



B



Γ

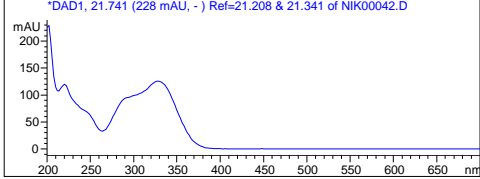
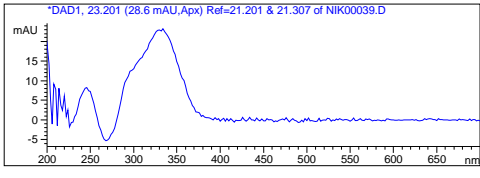


Δ

Εικόνα 24: Χρωματογραφήματα του *Sideritis clandestina* στα 254 nm Α) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

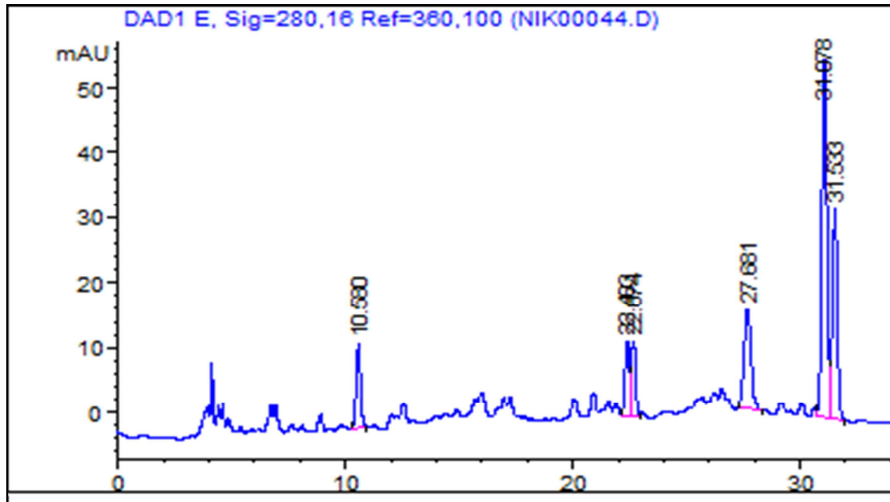
Στον πίνακα 4.13 που ακολουθεί περιέχει τις πρότυπες χημικές ενώσεις και τους χρόνους έκλυσης τους στα 254 nm καθώς και των αγνώστων ουσιών του *Sideritis clandestina*.

Πίνακας 4.13: Αποτελέσματα με βάση τα χρωματογραφήματα του *Sideritis clandestina* στα 254 nm (Εικόνα 24).

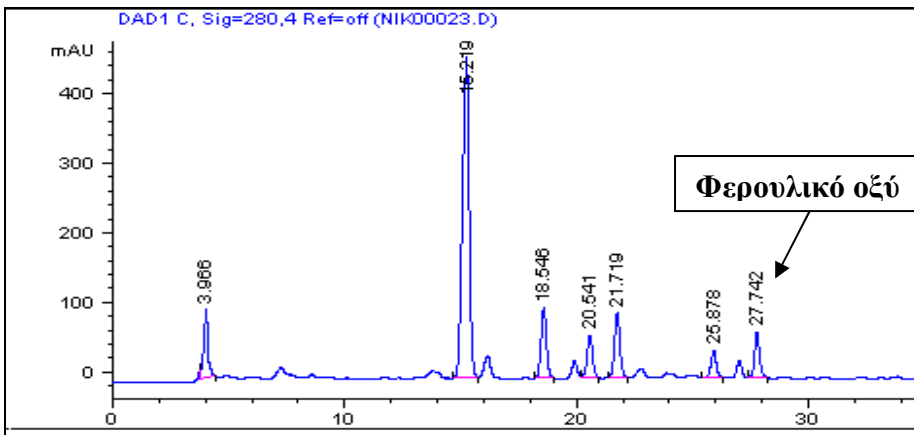
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	<i>Sideritis clandestina</i> 254 nm		
	t _R (ΜΙΓΜ) (min)	t _R (ΟΥΣΙΑΣ) (min)	ΦΑΣΜΑ UV-Vis
Φερουλικό οξύ	21,404	21,744 23,199	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 30px; margin: 5px auto;">Γ</div>  <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 30px; margin: 5px auto;">Δ</div>
Καμφερόλη	—	—	—
Απιγενίνη	—	—	—
Απιγενίνη-7-Ο- γλυκοζίδιο	—	—	—

Παρατηρείται ότι με βάση τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis στα 254 nm, ο *Sideritis clandestina* παρουσιάζει δυο ουσίες. Η μια στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση και η άλλη στο υδατικό διάλυμα σε pH=1,5 που πιθανόν να ταυτίζονται με την πρότυπη ένωση του φερουλικού οξέος.

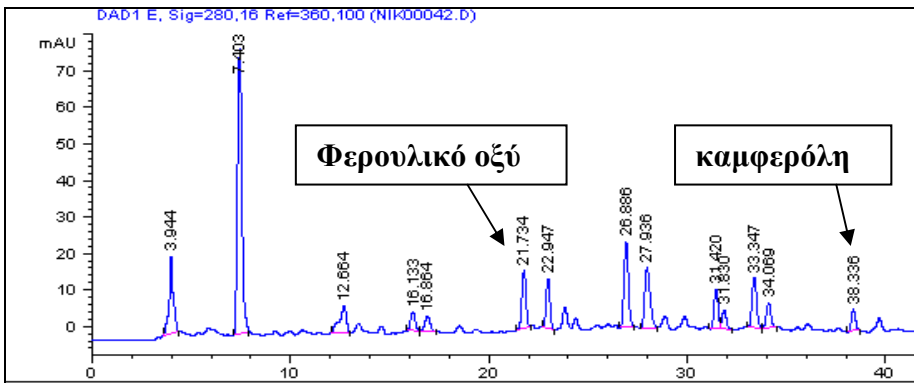
Sideritis clandestina στα 280 nm.



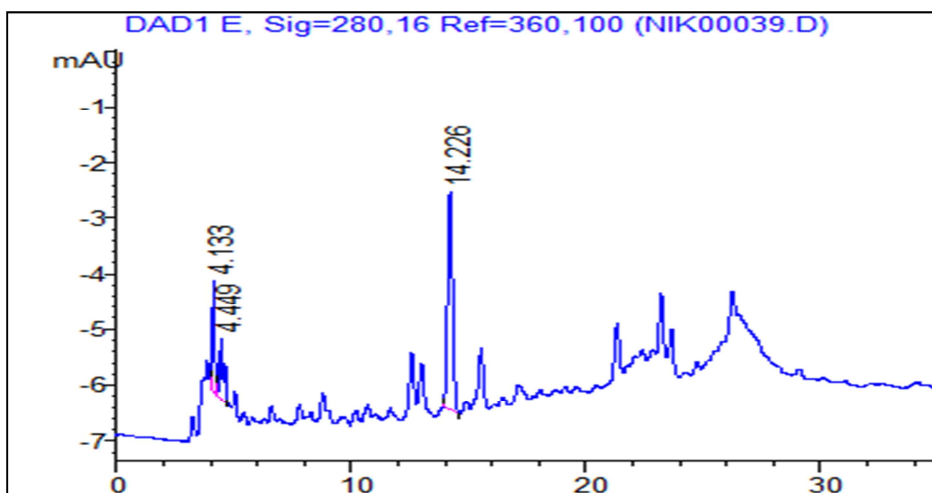
A



B



Γ

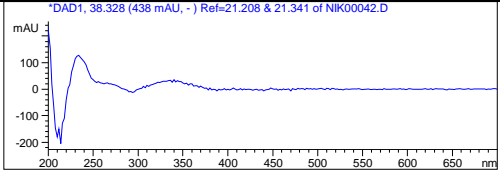


Δ

Εικόνα 25: Χρωματογραφήματα του *Sideritis clandestina* στα 280 nm Α) Λυοφιλιωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλιωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλιωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλιωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

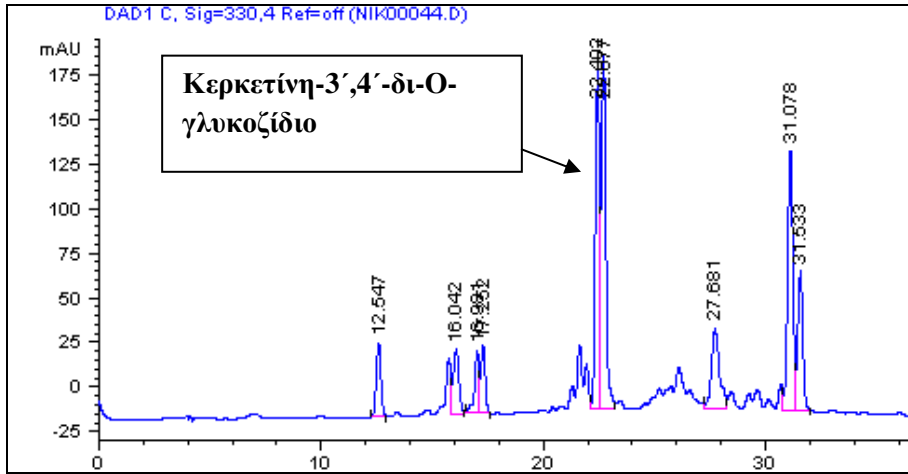
Πίνακας 4.14: Αποτελέσματα με βάσει τα χρωματογραφήματα του *Sideritis clandestina* στα 280 nm(Εικόνα 25).

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	<i>Sideritis clandestina</i> 280 nm		
	tr(MIGM) (min)	tr(ΟΥΣΙΑΣ) (min)	ΦΑΣΜΑ UV-Vis
Φερουλικό οξύ	21,404	21,719	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 10px;">B</div>
		21,734	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-left: 10px;">Γ</div>

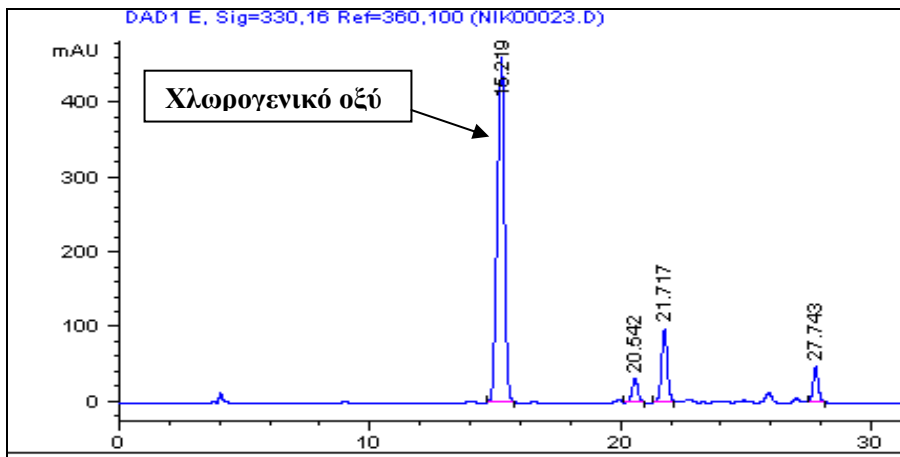
Καμφερόλη	35,440	38,336	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 30px; margin: 0 auto;">Γ</div>
Απιγενίνη	—	—	—
Απιγενίνη-7-O	—	—	—

Παρατηρείται ότι στα 280 nm με βάση τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis, δυο ουσίες του είδους πιθανόν να ταυτίζονται με το φερουλικό οξύ και την καμφερόλη. Συγκριτικά με τα 254 nm που εκεί πιθανόν βρέθηκαν δυο ουσίες που ταυτίζονται με το φερουλικό οξύ. Στα 280 nm βρέθηκαν δυο ουσίες που πιθανόν να ταυτίζονται με το φερουλικό οξύ. Η μια ουσία βρέθηκε στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση σε σχέση με τα 254 nm που δεν υπήρξε ταύτιση ουσίας. Αντίθετα στα 280 nm στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση βρέθηκαν δυο ουσίες που η μία πιθανώς να ταυτίζεται με το φερουλικό οξύ όπως και στα 254 nm. Η άλλη ουσία πιθανόν να ταυτίζεται με την καμφερόλη.

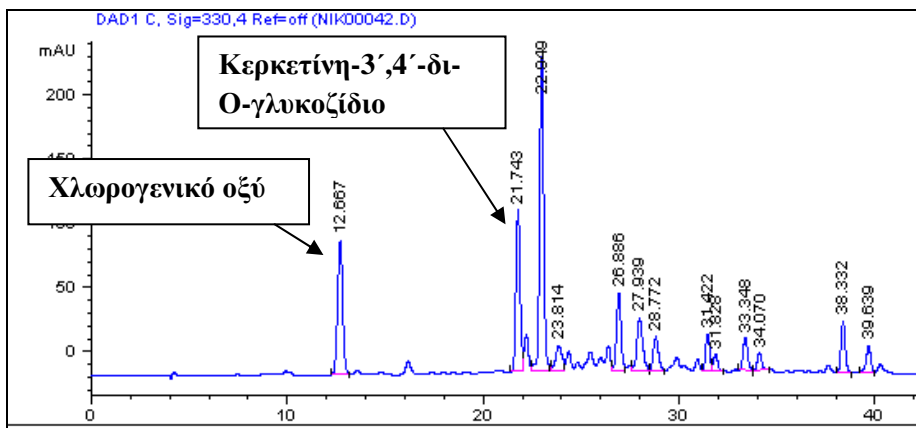
Sideritis clandestina στα 330 nm



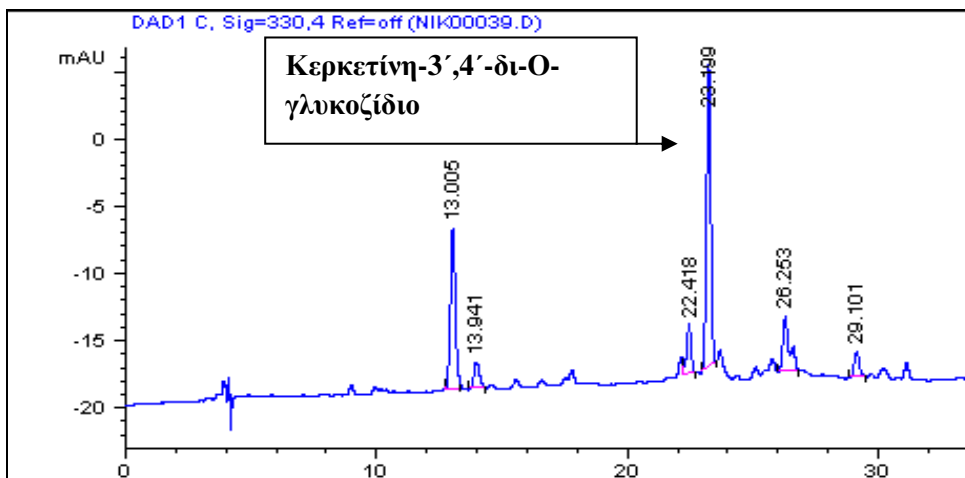
A



B



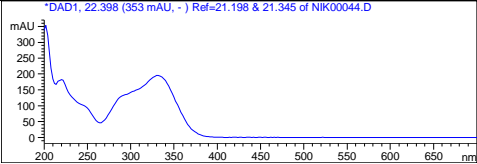
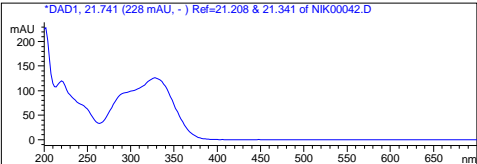
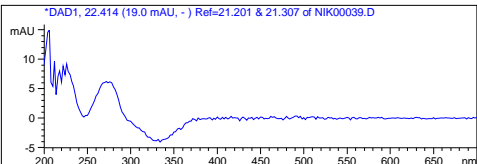
Γ



Εικόνα 26: Χρωματογραφήματα του *Sideritis clandestina* στα 330 nm Α) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

Πίνακας 4.15: Αποτελέσματα με βάσει τα χρωματογραφήματα του *Sideritis clandestina* στα 330 nm(Εικόνα 26).

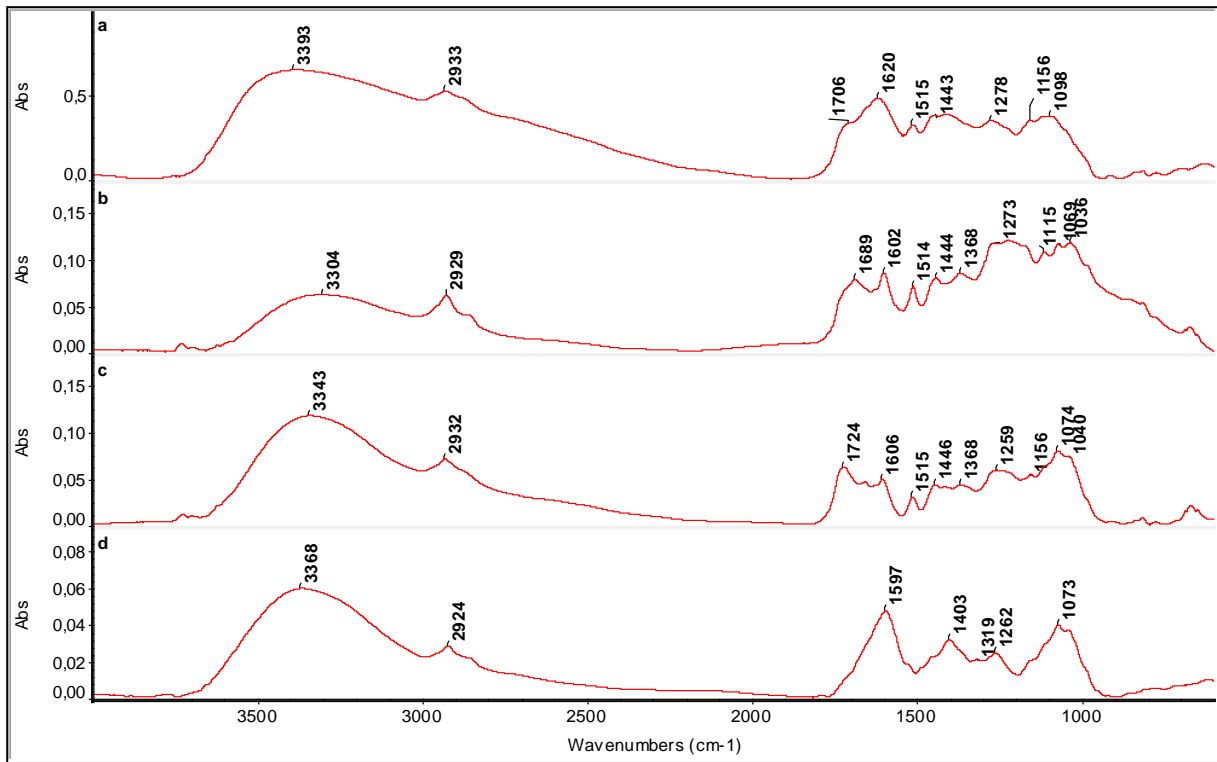
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	<i>Sideritis clandestina</i> 330 nm		
	tr(ΜΙΓΜ) (min)	tr(ΟΥΣΙΑΣ) (min)	ΦΑΣΜΑ UV-Vis
Ροσμαρινικό οξύ	—	—	—
Χλωρογενικό οξύ	13,068	15,219	
		12,667	

p-κουμαρικό οξύ	_____	_____	_____
Μυρικετίνη	_____	_____	_____
Καμφερόλη	_____	_____	_____
Απιγενίνη	_____	_____	_____
Απιγενίνη-7-O-γλυκοζίδιο	_____	_____	_____
Κερκετίνη-3',4'-δι-O-γλυκοζίδιο	21,404	22,838 21,743 22,199	   <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">Α</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">Γ</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Δ</div> </div>

Καφεϊκό οξύ	_____	_____	_____
--------------------	-------	-------	-------

Στα 330 nm σε σχέση με τα υπόλοιπα μήκη κύματος σε όλα τα χρωματογραφήματα με βάση τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis βρέθηκαν ουσίες. Στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μια ουσία που πιθανώς να ταυτίζεται με την κερκετίνη-3',4'-δι-O-γλυκοζίδιο. Στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση μια ουσία που πιθανώς να ταυτίζεται με το χλωρογενικό οξύ, στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση δυο ουσίες που πιθανόν να ταυτίζονται η μια με το χλωρογενικό οξύ και η άλλη με την κερκετίνη-3',4'-δι-O-γλυκοζίδιο. Στο υδατικό διάλυμα σε pH=1,5 μια ουσία που πιθανόν να ταυτίζεται με την κερκετίνη-3',4'-δι-O-γλυκοζίδιο, αν και δεν είναι σε μεγάλη αφθονία λόγω ότι είναι κάτω από την βασική γραμμή με βάση το χρωματογράφημα.

Ακολουθώς έχουμε το φάσμα FT-IR για τον *Sideritis clandestina* (Εικ. 27).



Εικόνα 27: FT-IR φάσματα δειγμάτων *Sideritis clandestina* (Προέλευσης Ταυγέτου) : α) Λυοφιλωμένο υδατικό εκχύλισμα, β) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος μετά από αλκαλική υδρόλυση, γ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος μετά από όξινη υδρόλυση δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

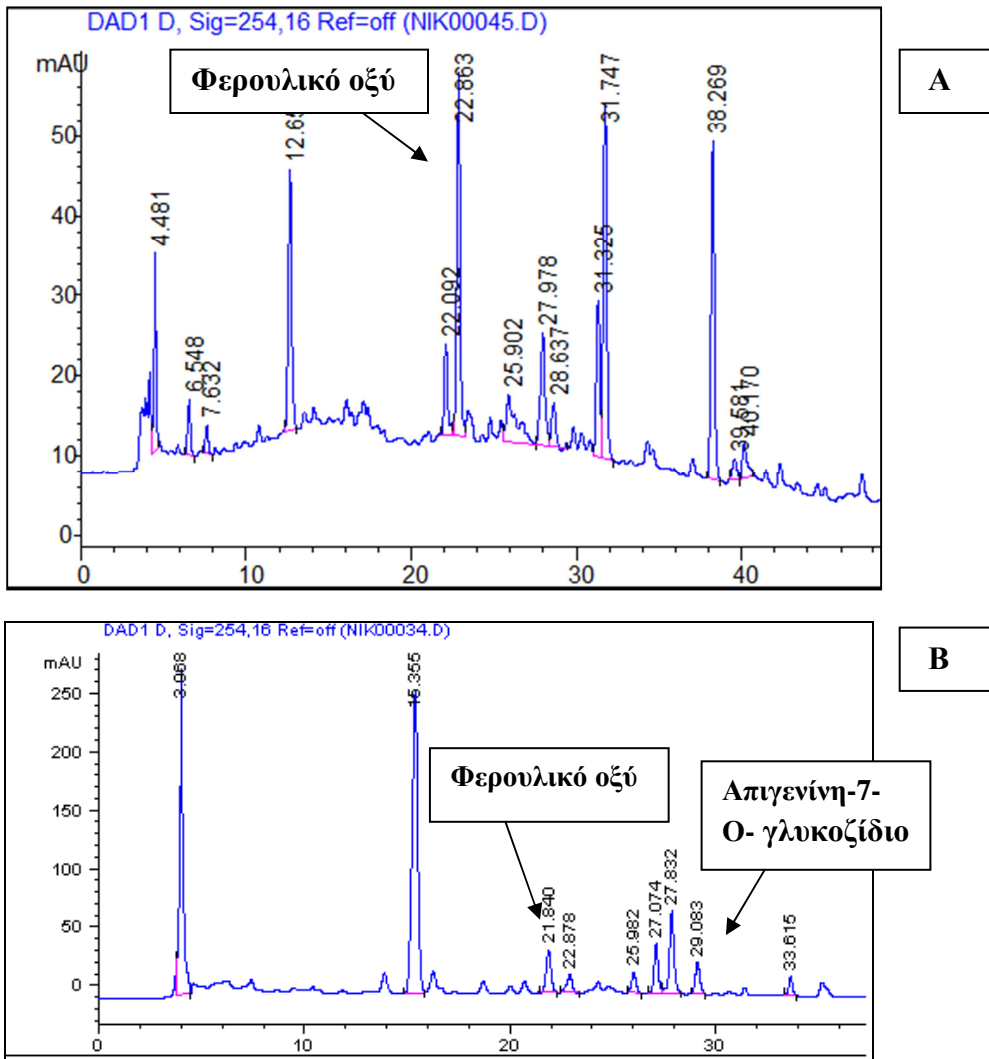
Πίνακας 4.16: Πίνακας αποδόσεων των απορροφήσεων των FT-IR φασμάτων δειγμάτων *Sideritis clandestina* (Προέλευσης Ταϋγέτου).

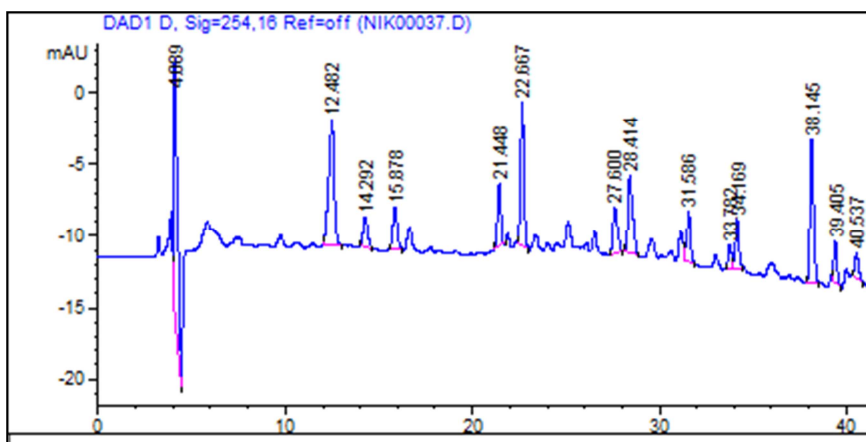
Απορρόφηση (cm ⁻¹)	Απόδοση
3393-3304	Δόνηση τάσης -OH
2933-2924	Δόνηση τάσης C-H
1724-1706	Δόνηση τάσης C=O
1620-1597	Δόνηση τάσης C=C, ασύμμετρη τάση του -COO ⁻ ενδομοριακή αλληλεπίδραση, σε όρθο- θέση ευρισκομένων C=O και -OH.
1515-1514	Δόνηση παραμόρφωσης του αρωματικού δακτυλίου.
1446-1403	Συνδυασμός της δόνησης παραμόρφωσης O-H, τάσης C-O των φαινολών και δόνηση κάμψης COH των φαινολών, συμμετρική τάση του -COO ⁻
1278-1259	Δόνηση τάσης C-O των φαινολών, συμμετρική τάση C-O-C
1156-1036	Δόνηση παραμόρφωσης των αρωματικών C-H, ασύμμετρη τάση C-O-C, δόνηση παραμόρφωσης O-H του -COOH.

Από την λήψη των φασμάτων IR και με βάση τις δομές των πρότυπων φαινολικών ουσιών στον Πίνακα 4.11 και τον Πίνακα 4.16, προσδιορίζονται ορισμένες από τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Ο Πίνακας 4.16 στα 3393-3304 cm⁻¹ δείχνει την παρουσία μιας ομάδας -OH, στην συνέχεια την παρουσία δεσμών C-H καθώς και στα 1515-1514 cm⁻¹ την δόνηση παραμόρφωσης του φαινολικού δακτυλίου. Απο αυτές τις δονήσεις και επειδή οι δομές των πρότυπων φαινολικών ενώσεων φέρουν αρωματικούς δακτύλιους, ομάδες -OH και δεσμούς C-H, προκύπτει ότι οι ουσίες που διαχωρίστηκαν στο είδος *Sideritis clandestina* τουλάχιστον ταυτίζονται με εκείνες τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις.

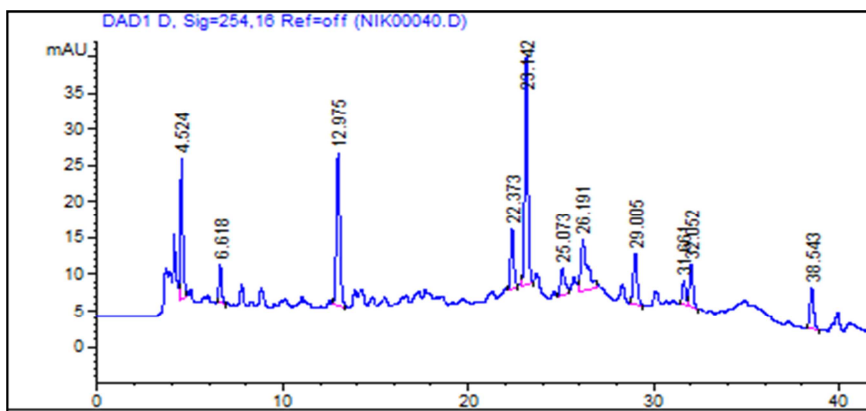
Όσον αφορά τον *Sideritis scardica* από τις εικόνες 28,29,30 και τους αντίστοιχους πίνακες που ακολουθούν την κάθε εικόνα, παρόμοια όπως και στον *Sideritis clandestina* θα διαπιστώσουμε αν υπάρχει ταύτιση μεταξύ των χρόνων έκλουσης, φάσματος UV-Vis και του φάσματος FT-IR μεταξύ των προτύπων χημικών ενώσεων και των ουσιών που περιέχονται στον *Sideritis scardica*.

Για τον *Sideritis scardica* στα 254 nm





Γ



Δ

Εικόνα 28: Χρωματογραφήματα του *Sideritis scardica* στα 254 nm Α) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

Πίνακας 4.17: Αποτελέσματα με βάσει τα χρωματογραφήματα του *Sideritis scardica* στα 254 nm(Εικόνα 28).

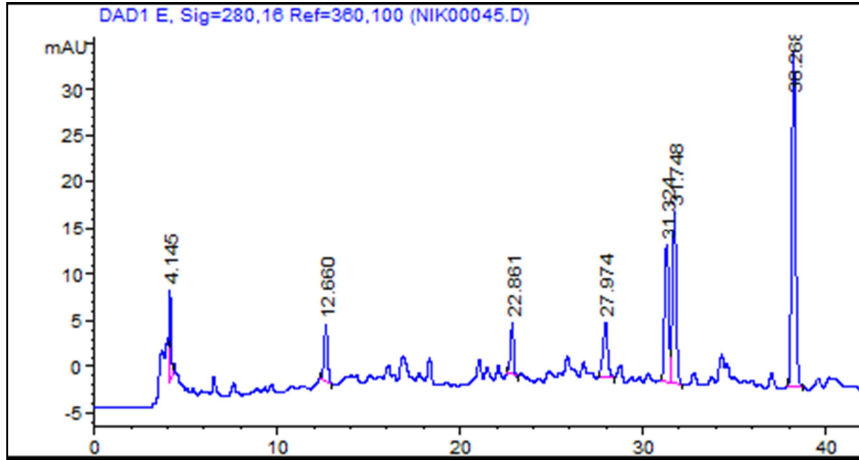
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	<i>Sideritis scardica</i> 254 nm		
	tr(ΜΙΓΜ) (min)	tr(ΟΥΣΙΑΣ) (min)	ΦΑΣΜΑ UV-Vis
Φερουλικό οξύ	21,404	22,863	

Α

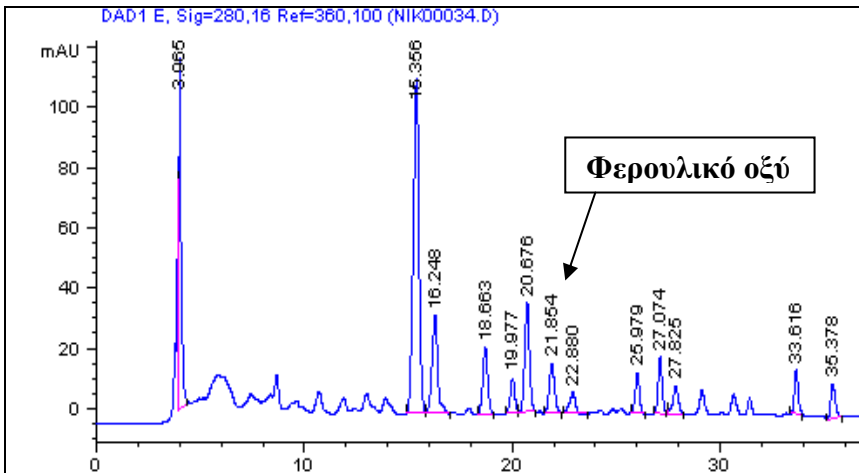
		21,840		B
Καμφερόλη	_____	_____	_____	
Απιγενίνη	_____	_____	_____	
Απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο	29,106	29,083		B

Αντίθετα από τον *Sideritis clandestina*, ο *Sideritis scardica* στα 254 nm παρουσιάζει αρκετές κορυφές στα χρωματογραφήματα του. Από τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα παρουσιάζει μια ουσία που πιθανώς να ταυτίζεται με το φερουλικό οξύ. Στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση παρουσιάζει δυο ουσίες που πιθανώς να ταυτίζονται η μια με το φερουλικό οξύ και η άλλη με την απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο.

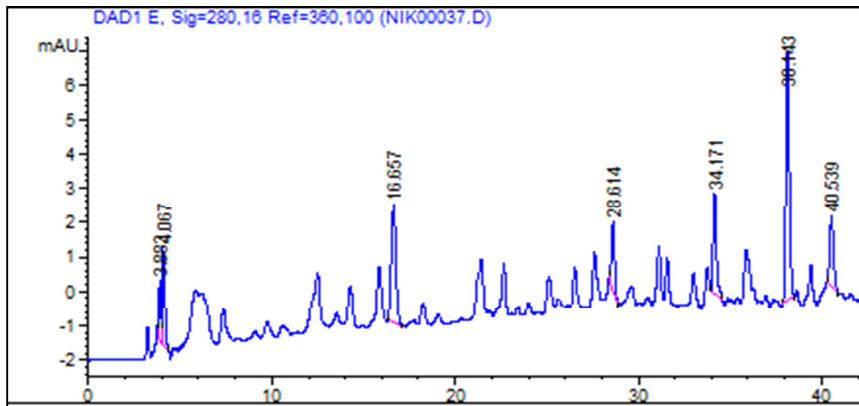
Sideritis scardica στα 280 nm.



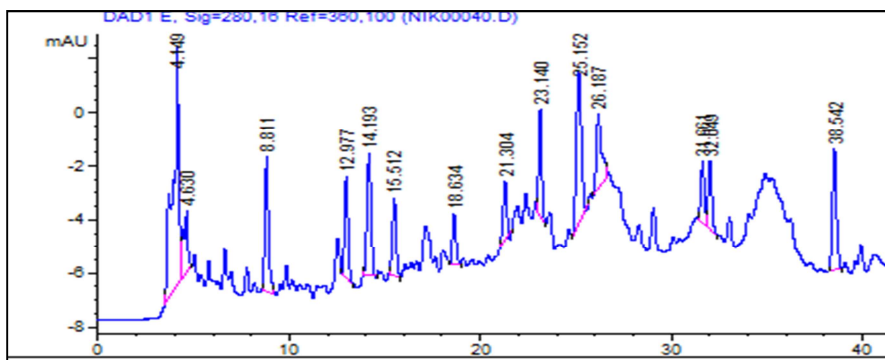
A



B



Γ



Δ

Εικόνα 29: Χρωματογραφήματα του *Sideritis scardica* στα 280 nm Α) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

Πίνακας 4.18: Αποτελέσματα με βάσει τα χρωματογραφήματα του *Sideritis scardica* στα 280 nm(Εικόνα 29).

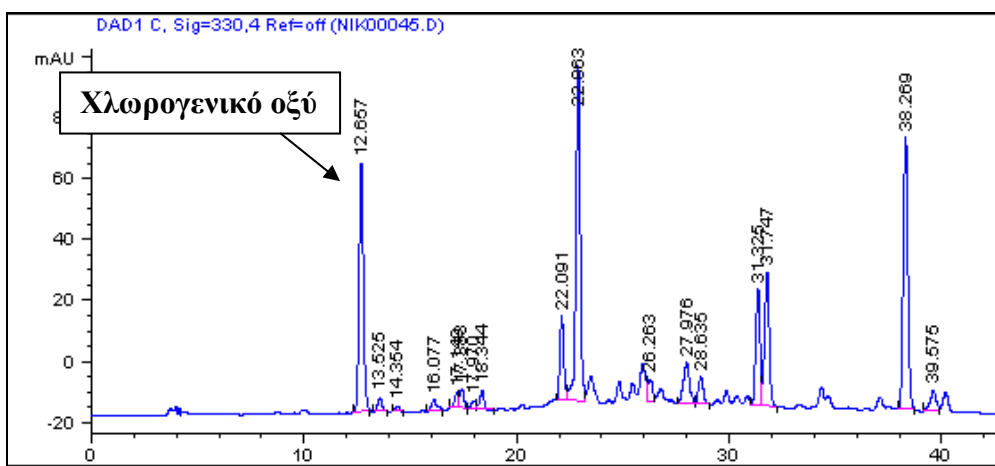
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	<i>Sideritis scardica</i> 280 nm		
	tr(ΜΙΓΜ) (min)	tr(ΟΥΣΙΑΣ) (min)	ΦΑΣΜΑ UV-Vis
Φερουλικό οξύ	21,404	21,854	
Καμφερόλη	_____	_____	_____
Απιγενίνη	_____	_____	_____

B

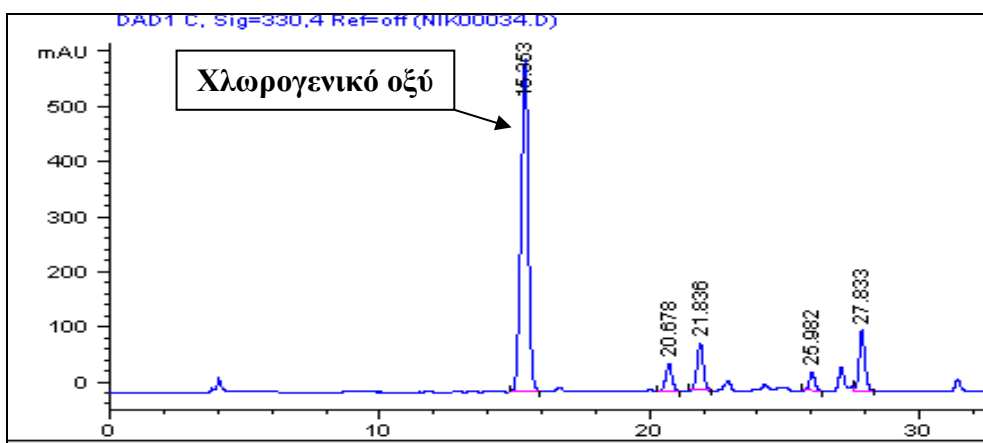
Απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο	_____	_____	_____
--------------------------	-------	-------	-------

Στα 280 nm παρ'όλο που τα χρωματογραφήματα είχαν αρκετές κορυφές μόνο το χρωματογράφημα του υδατικού διαλύματος σε pH=1,5 δεν υπήρχε αφθονία ουσιών. Από τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis παρουσιάζεται μια ουσία στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση που πιθανώς να ταυτίζεται με το φερουλικό οξύ. Αντίθετα στα 254 nm βρέθηκαν πιο πολλές ουσίες από τα 280 nm.

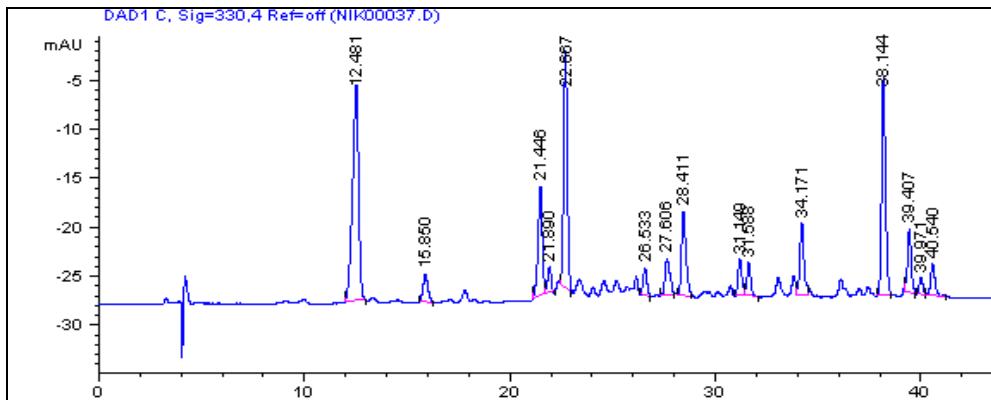
Sideritis scardica στα 330 nm.



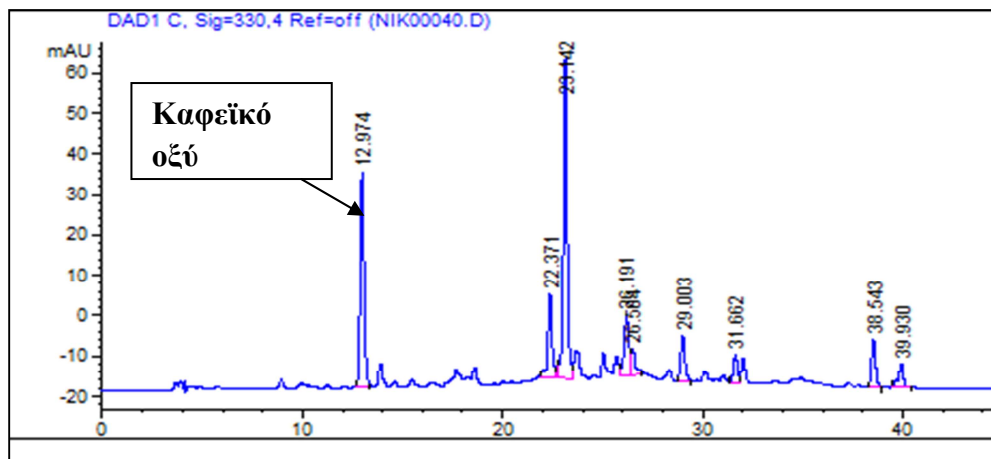
A



B



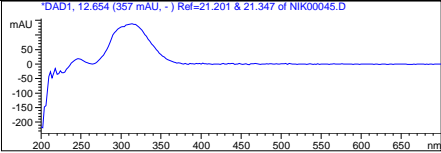
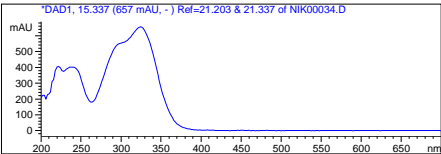
Γ

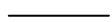
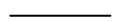
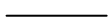
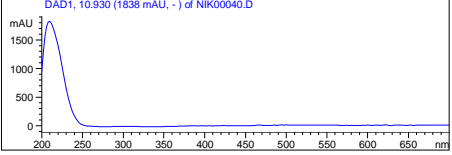


Δ

Εικόνα 30: Χρωματογραφήματα του *Sideritis scardica* στα 330 nm Α) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

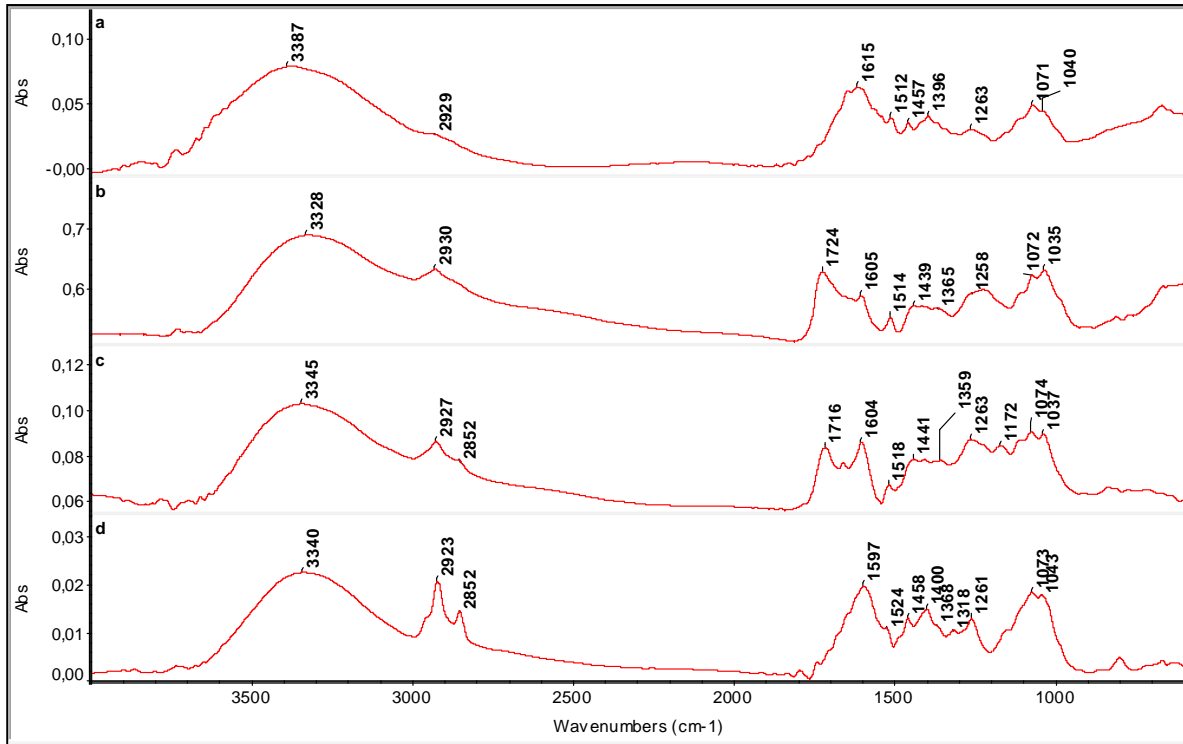
Πίνακας 4.19: Αποτελέσματα με βάση τα χρωματογραφήματα του *Sideritis scardica* στα 330 nm (Εικόνα 30).

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	<i>Sideritis scardica</i> 330 nm		
	tr(ΜΙΓΜ) (min)	tr(ΟΥΣΙΑΣ) (min)	ΦΑΣΜΑ UV-Vis
Ροσμαρινικό οξύ	_____	_____	_____
Χλωρογενικό οξύ	13,068	12,657 15,353	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 30px; margin: 5px auto;">A</div>  <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 30px; margin: 5px auto;">B</div>
p-κουμαρικό οξύ	_____	_____	_____
Μυρικετίνη	_____	_____	_____
Καμφερόλη	_____	_____	_____
Απιγενίνη	_____	_____	_____
Απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο	_____	_____	_____

Κερκετίνη-3',4'-δι-Ο-γλυκοζίδιο			
Καφεϊκό οξύ	16,587	12,974	 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 30px; float: right; text-align: center;"> Δ </div>

Στα 330 nm ο *Sideritis scardica* με βάση τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα παρουσιάζει μια ουσία που πιθανώς να ταυτίζεται με το χλωρογενικό οξύ. Στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση μια ουσία που διαχωρίστηκε ταυτίζεται και εκεί με το χλωρογενικό οξύ. Στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση οι περισσότερες κορυφές είναι κάτω από την βασική γραμμή. Στο υδατικό διάλυμα σε pH=1,5 παρουσιάζεται μια ουσία που πιθανώς να ταυτίζεται με το καφεϊκό οξύ.

Ακολουθώς έχουμε το φάσμα FT-IR για τον *Sideritis scardica* (Εικ. 31).



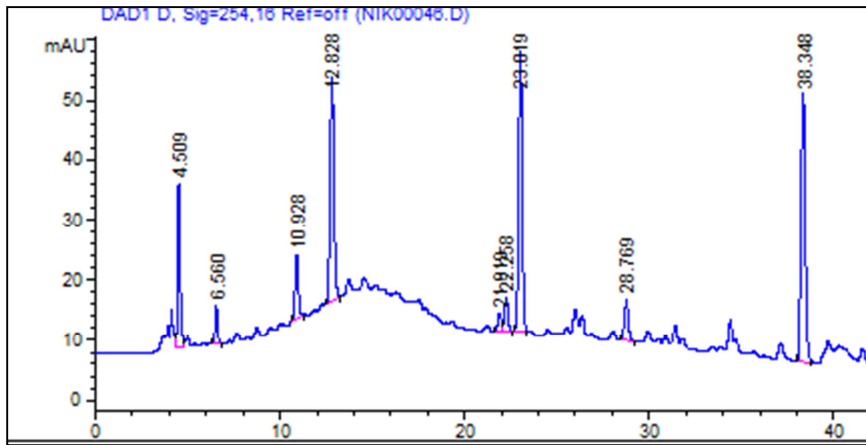
Εικόνα 31: FT-IR φάσματα δειγμάτων *Sideritis scardica* (Προέλευσης Μαγνησίας):
α) Λυοφιλωμένο υδατικό εκχύλισμα, β) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος μετά από αλκαλική υδρόλυση, γ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος μετά από όξινη υδρόλυση δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

Πίνακας 4.20: Πίνακας αποδόσεων των απορροφήσεων των FT-IR φασμάτων δειγμάτων *Sideritis scardica* (Προέλευσης Μαγνησίας).

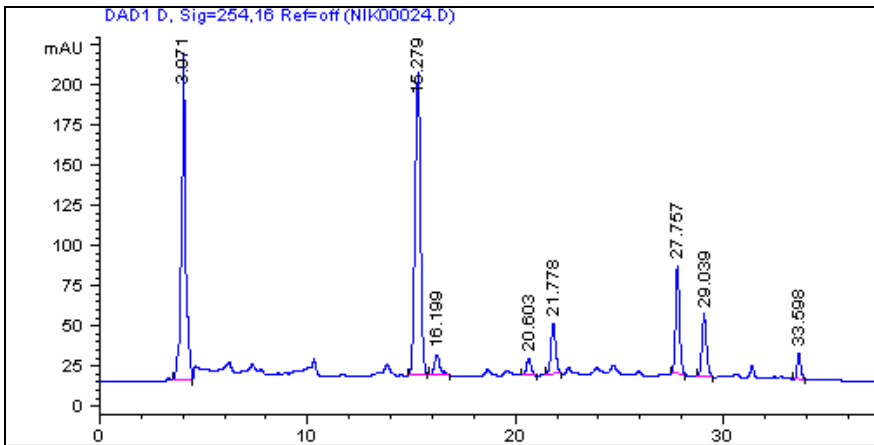
Απορρόφηση (cm ⁻¹)	Απόδοση
3387-3328	Δόνηση τάσης -OH
2930-2923	Ασύμμετρη δόνηση τάσης C-H
2852	Συμμετρική δόνηση τάσης C-H
1724-1716	Δόνηση τάσης C=O
1615-1597	Δόνηση τάσης C=C, ασύμμετρη τάση του -COO ⁻ ενδομοριακή αλληλεπίδραση, σε όρθο- θέση ευρισκομένων C=O και -OH.
1524-1512	Δόνηση παραμόρφωσης του αρωματικού δακτυλίου.
1457-1439	Συμμετρική τάση του -COO ⁻
1400-1396	Συνδυασμός της δόνησης παραμόρφωσης O-H, τάσης C-O των φαινολών και δόνηση κάμψης COH των φαινολών
1368-1359	Δόνηση παραμόρφωσης του -OH του -COOH, δόνηση τάσης C-O του -COOH.
1263-1258	Δόνηση τάσης C-O των φαινολών, συμμετρική τάση C-O-C
1074-1071	Ασύμμετρη τάση C-O-C, δόνηση παραμόρφωσης O-H του -COOH.
1043-1040	Συμμετρική τάση C-O-C

Από την λήψη των φασμάτων IR των εκχυλισμάτων προσδιορίζονται με βάση τον Πίνακα 4.20 κάποιες φαινολικές ενώσεις. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα έγινε διαχωρισμός ουσιών και με βάση τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis έφτα ουσίες του είδους *Sideritis scardica* πιθανόν να ταυτίζονται με τις αντίστοιχες πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Τα φάσματα IR αναδεικνύουν τις φαινολικές ενώσεις βάσει του Πίνακα 4.20 από τις δονήσεις τάσης.

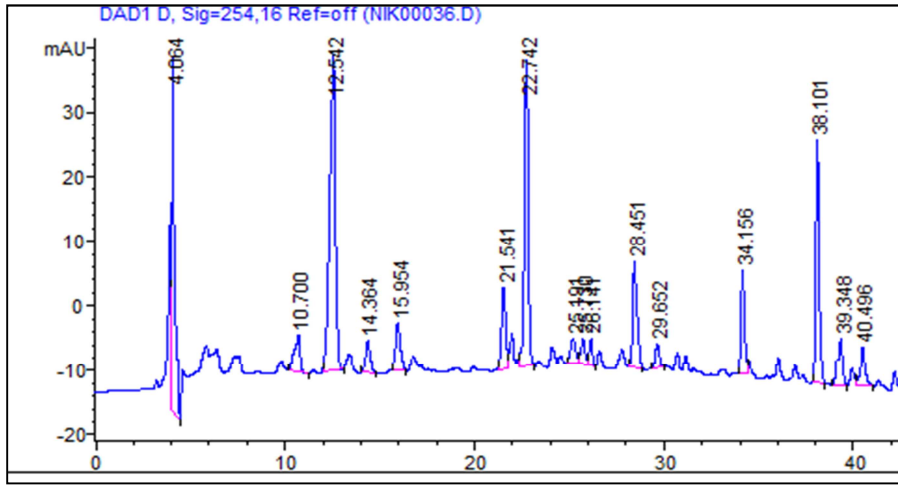
Για τον *Sideritis sipylea* από τις εικόνες 32,33,34 και τους αντίστοιχους πίνακες που ακολουθούν την κάθε εικόνα, ομοίως όπως και στα προηγούμενα θα διαπιστώσουμε αν υπάρχει ταύτιση μεταξύ των χρόνων έκλουσης, φάσματος UV-Vis και του φάσματος FT-IR μεταξύ των προτύπων χημικών ενώσεων και των ουσιών που περιέχονται στον *Sideritis sipylea*.



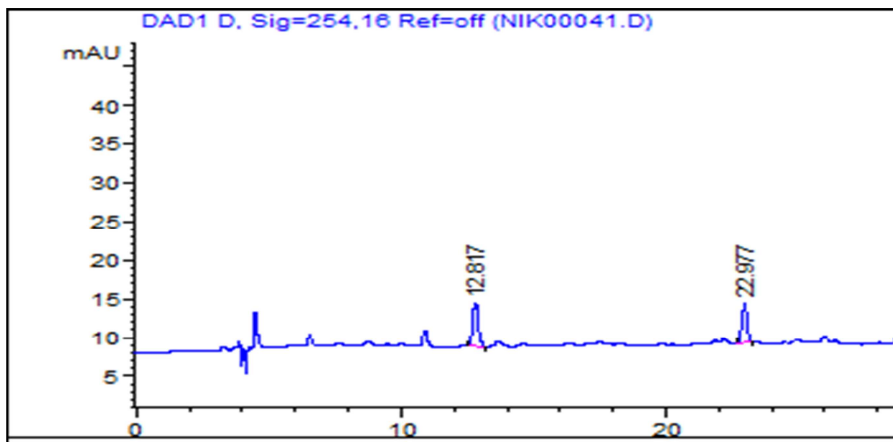
A



B



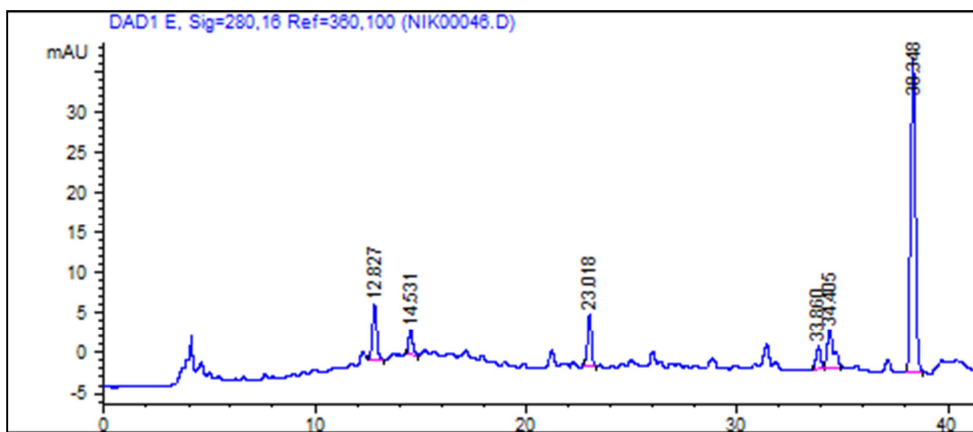
C



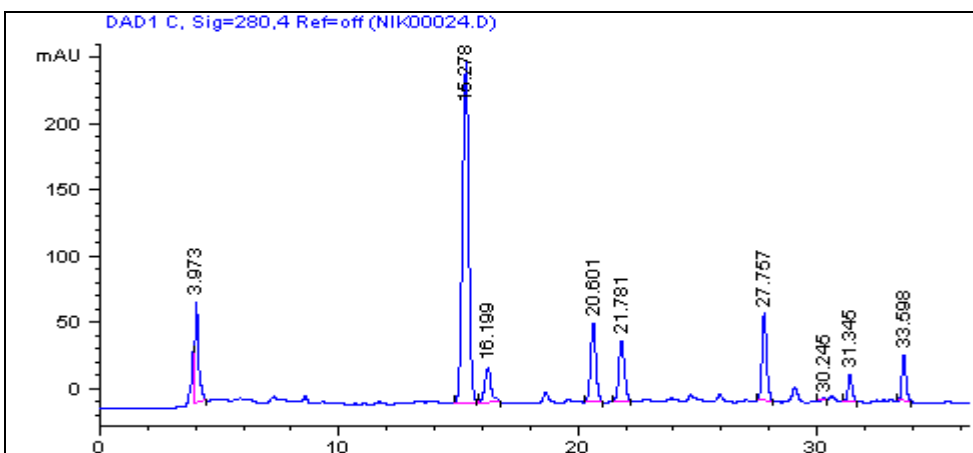
Δ

Εικόνα 32: Χρωματογραφήματα του *Sideritis sipylea* στα 254 nm Α) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

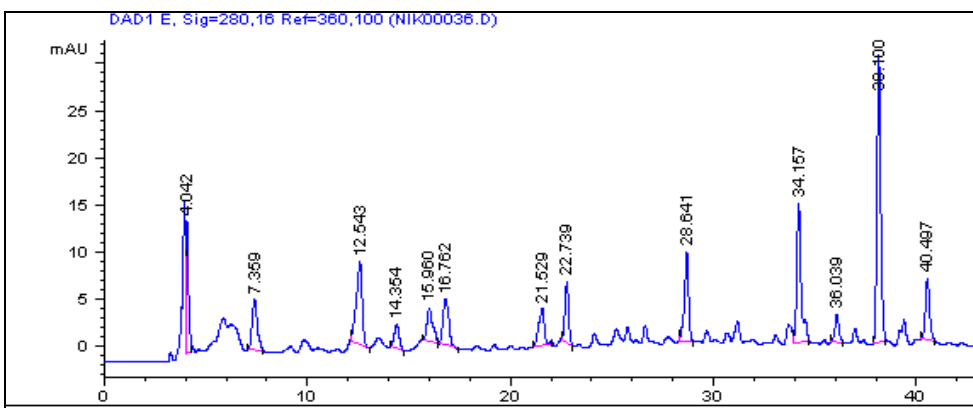
Sideritis sipylea στα 280 nm.



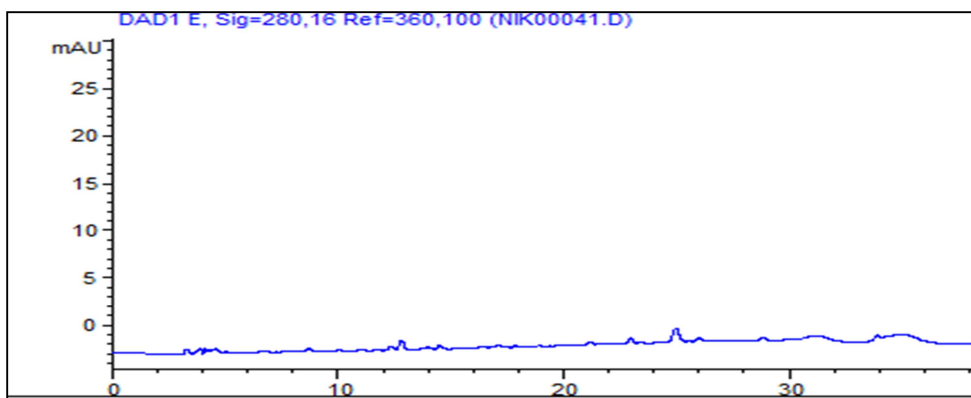
A



B



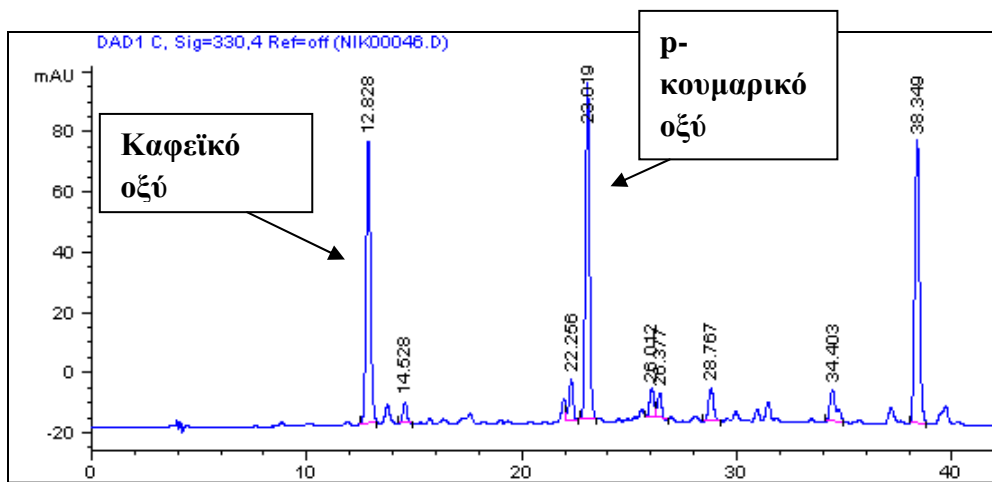
Γ



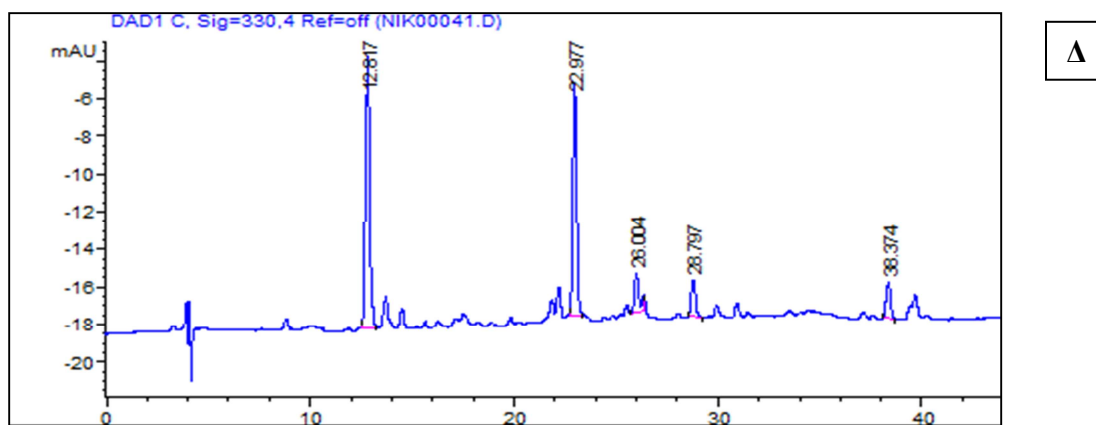
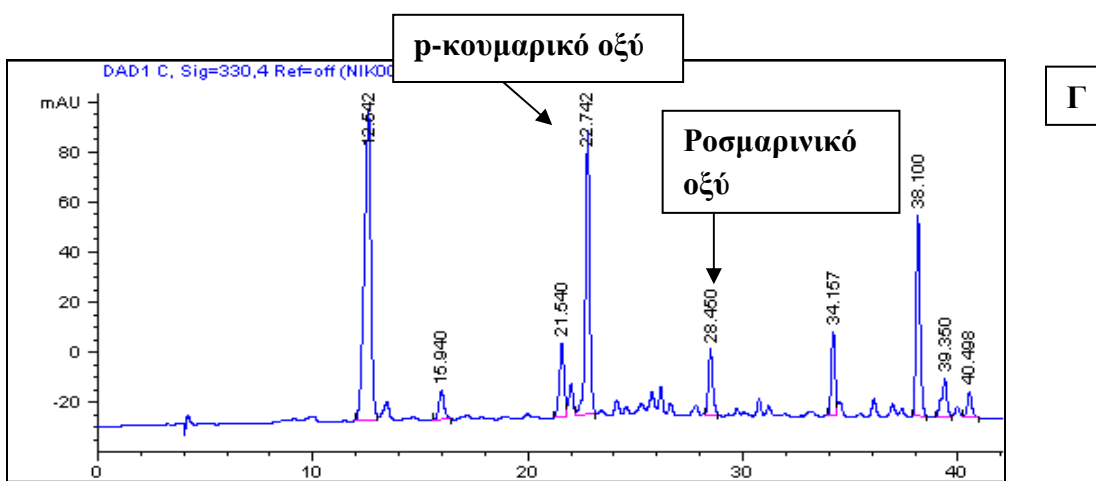
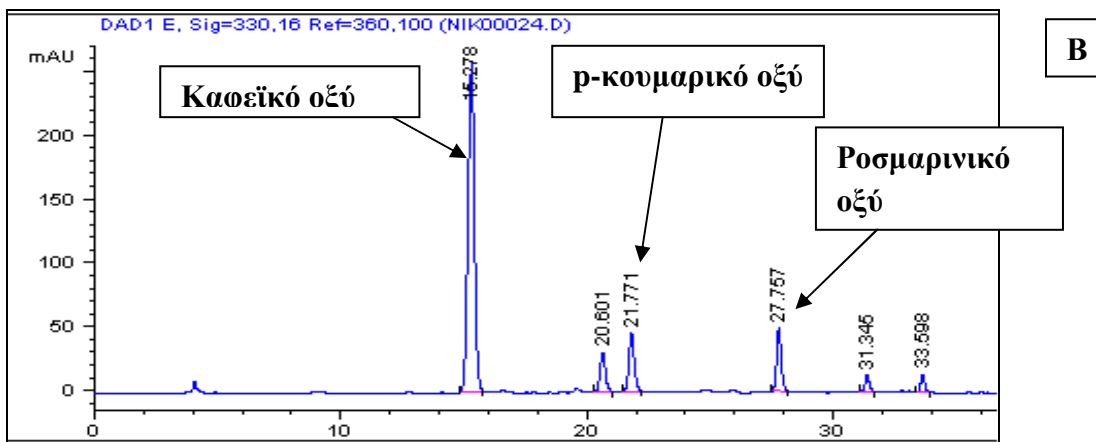
Δ

Εικόνα 33: Χρωματογραφήματα του *Sideritis sipylea* στα 280 nm Α) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

Sideritis sipylea στα 330 nm.

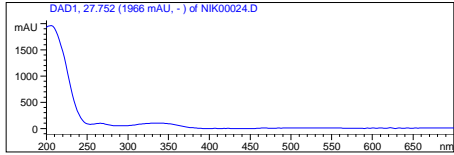
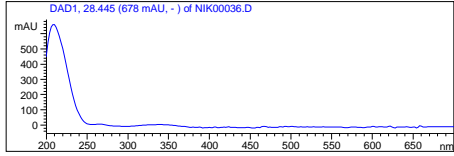
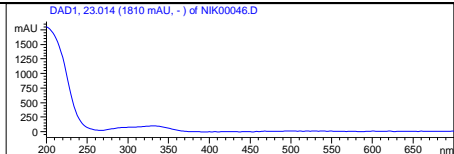
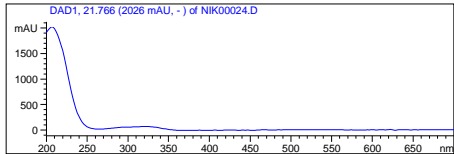
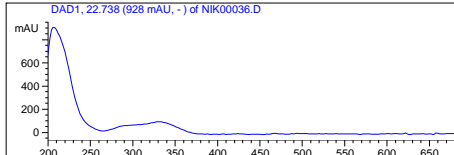


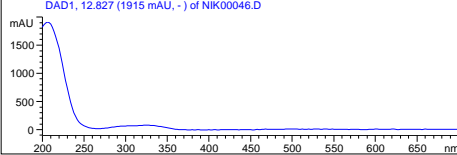
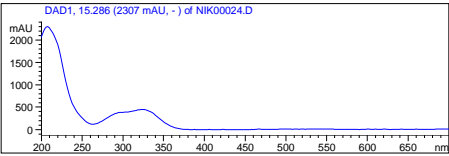
Α



Εικόνα 34: Χρωματογραφήματα του *Sideritis sipylea* στα 330 nm Α) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα, Β) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση, Γ) Λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση, Δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

Πίνακας 4.21: Αποτελέσματα με βάσει τα χρωματογραφήματα του *Sideritis sipylea* στα 330 nm(Εικόνα 34).

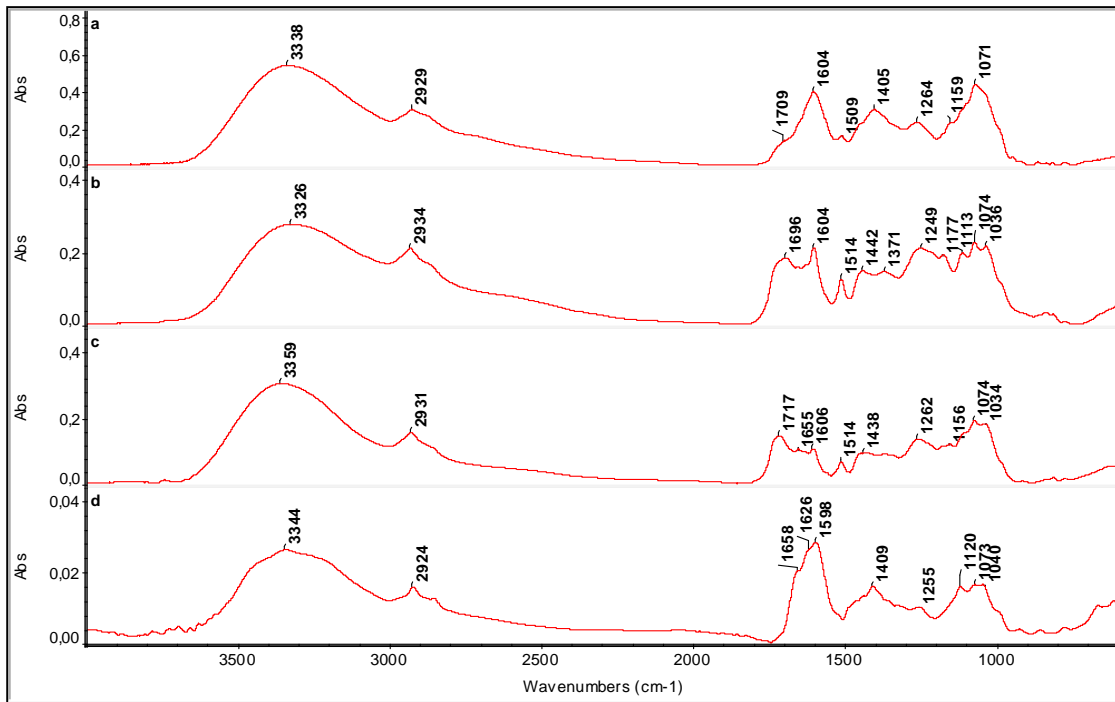
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	<i>Sideritis sipylea</i> 330 nm		
	tr(ΜΙΓΜ) (min)	tr(ΟΥΣΙΑΣ) (min)	ΦΑΣΜΑ UV-Vis
Ροσμαρινικό οξύ	29,868	27,757	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 20px; margin: 0 auto;">B</div>
		28,450	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 20px; margin: 0 auto;">Γ</div>
Χλωρογενικό οξύ	—————	—————	—————
p-κουμαρικό οξύ	22,088	23,019	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 20px; margin: 0 auto;">A</div>
		21,771	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 20px; margin: 0 auto;">B</div>
		22,742	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px; width: 20px; margin: 0 auto;">Γ</div>

Μυρικετίνη	_____	_____	_____	
Καμφερόλη	_____	_____	_____	
Απιγενίνη	_____	_____	_____	
Απιγενίνη-7- Ο-γλυκοζίδιο	_____	_____	_____	
Κερκετίνη- 3',4'-δι-Ο- γλυκοζίδιο	_____	_____	_____	
Καφεϊκό οξύ	16,587	12,828 15,278	 	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; text-align: center; margin: 5px auto;">A</div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; text-align: center; margin: 5px auto;">B</div>

Παρ'όλο που στα 254 και 280 nm ενώ διαχωρίστηκαν ουσίες βάσει των κορυφών δεν φάνηκε να υπήρχε πιθανή ταύτιση με τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Στα 330 nm από τα χρωματογραφήματα διαχωρίστηκαν αρκετές ουσίες. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε το χρωματογράφημα του υδατικού διαλύματος σε pH=1,5 όπου όλες οι κορυφές ήταν κάτω από την βασική γραμμή. Με βάση τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis στο λυοφιλιωμένο εκχύλισμα διαχωρίστηκαν τουλάχιστον τρεις ουσίες που πιθανόν να

ταυτίζονται με το p-κουμαρικό οξύ και με το καφεϊκό οξύ. Στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από αλκαλική υδρόλυση και εκεί τουλάχιστον τρεις ουσίες διαχωρίστηκαν, παρουσιάζουν πιθανή ταύτιση με το ροσμαρινικό οξύ, με το p-κουμαρικό οξύ και με το καφεϊκό οξύ. Στο λυοφιλωμένο εκχύλισμα μετά από όξινη υδρόλυση τουλάχιστον τρεις ουσίες πο πιθανώς να ταυτίζονται με το ροσμαρινικό οξύ, με το p-κουμαρικό οξύ και με το καφεϊκό οξύ.

Ακολουθώς έχουμε το φάσμα FT-IR για τον *Sideritis sipylea* (Εικ. 35).



Εικόνα 35: FT-IR φάσματα δειγμάτων *Sideritis sipylea* (Προέλευσης Μυτιλήνης): α) Λυοφιλωμένο υδατικό εκχύλισμα, β) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος μετά από αλκαλική υδρόλυση, γ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος μετά από όξινη υδρόλυση δ) Υδατικού διαλύματος λυοφιλωμένου υδατικού εκχυλίσματος σε pH=1,5.

Πίνακας 4.22: Πίνακας αποδόσεων των απορροφήσεων των FT-IR φασμάτων δειγμάτων *Sideritis sipylea* (Προέλευσης Μυτιλήνης).

Απορρόφηση (cm ⁻¹)	Απόδοση
3359-3326	Δόνηση τάσης -OH
2934-2924	Δόνηση τάσης C-H
1717-1709	Δόνηση τάσης C=O
1655-1626	Δόνηση τάσης C=C, ενδομοριακή αλληλεπίδραση σε όρθο- θέση ευρισκομένων C=O και -OH.
1606-1598	Ασύμμετρη τάση του -COO ⁻
1514-1509	Δόνηση παραμόρφωσης του αρωματικού δακτυλίου.
1442-1438	Συμμετρική τάση του -COO ⁻
1409-1405	Δόνηση κάμψης COH φαινολών
1371	Δόνηση παραμόρφωσης O-H του -COOH
1264-1249	Δόνηση τάσης C-O φαινολών, ασύμμετρη τάση =C-O-C
1177-1120	Ασύμμετρη τάση C -O-C
1074-1071	Δόνηση παραμόρφωσης αρωματικών C-H
1040-1036	Συμμετρική τάση C -O-C

Για το τρίτο είδος από την λήψη των φασμάτων IR και με βάση τον Πίνακα 4.22 προσδιορίζονται και εδώ κάποιες ουσίες που έχουν φαινολικό δακτυλίο αρχικά λόγω των δονήσεων και κάποιες χαρακτηριστικές ομάδες. Από τα χρωματογραφήματα με βάση τους χρόνους έκλουσης και τα φάσματα UV-Vis διαχωρίστηκαν κάποιες ουσίες που πιθανόν να ταυτίζονται με τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Παρ'όλο που στα 254 και στα 280 nm δεν προέκυψε ταύτιση και ακόμα στα χρωματογραφήματα του υδατικού διαλύματος σε pH=1,5 στο είδος αυτό δεν υπήρχαν αρκετές κορυφές ή ήταν κάτω από την βασική γραμμή. Αντίθετα στο φάσμα IR του υδατικού διαλύματος σε pH=1,5 προσδιορίζονται φαινολικές ενώσεις. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχει κάποια επικάλυψη των κορυφών από άλλες ουσίες.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα είδη του γένους *Sideritis* που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν ο *Sideritis clandestina* (Προέλευσης Ταυγέτου), ο *Sideritis scardica* (Προέλευσης Μαγνησίας) και ο *Sideritis sipylea* (Προέλευσης Μυτιλήνης). Αρχικά απομονώθηκαν τα υδατοδιαλυτά φαινολικά συστατικά και τα υδατικά τους διαλύματα λυοφιλιώθηκαν.

Στην συνέχεια μετρήθηκε η απόδοση τους. Προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με τις δοκιμές DPPH και ABTS.

Απο τα αποτελέσματα και αρχίζοντας από την απόδοση που ήταν σχετικά μικρή και στα τρία είδη του γένους *Sideritis*, παραπλήσια απόδοση παρουσίασε ο *Sideritis clandestina* με τον *Sideritis sipylea*. Από την μέθοδο Folin-Ciocalteu και πάλι ο *Sideritis clandestina* παρατηρήθηκε ότι παρουσίασε μια ελαφρά υπερόχη στο φαινολικό του περιεχόμενο σε σχέση με τα άλλα είδη. Προκύπτει δηλαδή ότι και τα τρία είδη έχουν φαινολικά συστατικά.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, από την δοκιμή DPPH στα λυοφιλιωμένα εκχυλίσματα ο *Sideritis clandestina* παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Με την δεύτερη μέθοδο αντιοξειδωτικής δράσης την δοκιμή ABTS, στα λυοφιλιωμένα εκχυλίσματα ο *Sideritis sipylea* είχε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Αν και παρατηρήθηκε ότι δεν είχαν πολύ μεγάλη διαφορά στην τιμή τους τα τρία είδη στην δοκιμή ABTS.

Το κύριο μέρος της εργασίας αυτής ήταν ότι από τα τρία είδη 10 mg του λυοφιλιωμένου στερεού επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε νερό με ρύθμιση της τιμής του pH στην τιμή 1,5. Αυτό έγινε με προσθήκη HCl 1M και ακολούθησε μηχανική ανάδευση για 1, 1,5 και 2 h. Με αυτόν τον τρόπο έγινε προσομοίωση των συνθηκών του στομαχιού καθώς και της διάρκειας της πέψης.

Τα υδατικά διαλύματα σε pH=1,5 ελέγχθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τις δοκιμές DPPH και ABTS. Με την δοκιμή DPPH ο *Sideritis sipylea* (Μυτιλήνη) εμφάνισε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα άλλα είδη και συγκεκριμένα πιο υψηλή ήταν στην 1,5 h. Με την δοκιμή ABTS ο *Sideritis scardica* παρουσίασε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και πιο υψηλή ήταν στις 2 h. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι και τα τρία είδη έχουν αντιοξειδωτική δράση βάσει των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων τους. Στα υδατικά διαλύματα με ρύθμιση του pH στην τιμή 1,5 η αντιοξειδωτική τους δράση είτε παρουσίαζε πτώση ή άνοδο. Σίγουρα θα ήταν αναγκαίο να γίνει περαιτέρω μελέτη για να υπάρξουν εξακριβωμένα στοιχεία.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε μια πιθανή γραμμική συσχέτιση μεταξύ της δοκιμής με DPPH και των φαινολικών συστατικών σε τρία σημεία. Αυτό επαληθεύτηκε και από την βιβλιογραφία, δηλαδή την συσχέτιση της δοκιμής του DPPH με τις πολυφαινόλες και τα υδρόφιλα συστατικά.

Για την μελέτη των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (HPLC- DAD) και η φασματοσκοπία υπερύθρου με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) και έγινε σύγκριση με τις δομές πρότυπων φαινολικών ενώσεων.

Με τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα IR που λήφθηκαν αρχικά για τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα, στην συνέχεια για τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα μετά απο αλκαλική και όξινη υδρόλυση και τέλος για τα υδατικά διαλύματα σε pH=1,5. Από εκεί διαχωρίστηκαν και προσδιορίστηκαν κάποιες ουσίες. Με βάση πρότυπες χημικές ενώσεις χρησιμοποιώντας τους χρόνους έκλουσης των ενώσεων και τα φάσματα UV-Vis και τα φάσματα FT-IR προσδιορίστηκαν:

Στον *Sideritis clandestine* τουλάχιστον τέσσερις ενώσεις.

Στον *Sideritis scardica* τουλάχιστον τέσσερις ενώσεις.

Στον *Sideritis sipylea* τουλάχιστον τρεις ενώσεις.

Σίγουρα και εδώ υπάρχουν πιο πολλές ουσίες που ταυτίζονται με τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις λόγω των πολλών κορυφών στα χρωματογραφήματα. Επίσης το είδος της Μυτιλήνης χρειάζεται περαιτέρω μελέτη και πιο πολύ μελέτη χρειάζονται τα υδατικά διαλύματα σε pH=1,5.

Συνοψίζοντας ο *Sideritis* κοινή ονομασία "τσαϊ του βουνού" παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική δράση και άλλα. Στη χώρα μας, λόγω του μεσογειακού κλίματος, ευδοκμεί σε σχετικά ορεινές περιοχές και καλλιεργείται σε πολύ μικρή κλίμακα. Σε χώρες του εξωτερικού (π.χ. Ισπανία) έχουν το καλλιεργούν με σκοπό τη παραγωγή αφεψημάτων καθώς και για φαρμακευτική χρήση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Αρθρόγραφια και Συγγραμματα

Alonso C., Rubio L., Touriño S., Martí M., Barba C., Fernández-Campos F., Coderch L., Parra J.L, Anti-oxidative effects and percutaneous absorption of five polyphenols, *Free Radical Biology and Medicine* (2014)

Basile Adriana a,*, Senatore Felice b, Gargano Rosalba a, Sorbo Sergio c, Del Pezzo Marisa d, Lavitola Alfredo d, Ritieni Alberto f, Bruno Maurizio g, Spatuzzi Daniela e, Rigano Daniela b, Vuotto Maria Luisa e, (2006). Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 240–248

Celik E.S., Ozyurek M., Guclu K., Apak R., Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulfate and FRAP methods, *Talanta* 81 (2010) 1300-1309

Ciesla L., Kryszen J., Stochmal A., Oleszek W., Waksmundzka-Hajnos M., Approach to develop a standardized TLC-DPPH radical dot test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, (2012) 126-135

Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Merillon, J.M., (2009) Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1768-1774

Fraga Braulio M, (2012) Phytochemistry and chemotaxonomy of *Sideritis* species from the Mediterranean region. *Phytochemistry* 76, 7–24

Fraga, B.M., Hernandez, M.G., Fernandez, C., Santana, J.M., (2009). A chemotaxonomic study of nine Canarian *Sideritis* species. *Phytochemistry* 70, 1038–1048.

Ghoumari, H., Benajiba, M.-H., Azmani, A., Garcia-Granados, A., Martinez, A., Parra, A., Rivas, F., Socorro, O., (2005). Ent-kauranoid derivatives from *Sideritis moorei*. *Phytochemistry* 66, 1492–1498.

Gonzalez-Burgos E., M.E. Carretero, M.P. Gomez-Serranillos, (2011). *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities. *Phytochemistry* 76, 7–24

Huang, Ou, Prior, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays (2005) *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1841-1856

Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T., Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology* 96 (2005) 145-150

Jordán María J., Martínez Rosa M., Martínez Monino C., I., Sotomayor Jose A., “Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels”, *Industrial Crops And Products* 29 (2009), 145–153

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates (1993) *Clinical Sciences*, 84, 407-41

Nakiboglu M, Urek Ozturk R, Kayali Ayar H, Tarhan L, Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey (2007) *Food Chemistry*, 104, 630-635

Petreska a J., Stefova a M., Ferreres b F., Moreno b D.A., Tomás-Barberán F.A. b, Stefkov G. c, Kulevanova c S, Gil-Izquierdo A b, (2011) Potential bioactive phenolics of Macedonian *Sideritis* species used for medicinal “Mountain Tea”, *Food Chemistry* 125, 13–20

Rice-Evans, C.A., Millew, N.J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids (1996) *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-9
Skoog, Holler, Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 1998

Seephonkai P., Samchai S., Thongsom A., Sunaart S., Kiemsanmuang B., Chakuton K., DPPH Radical Scavenging Activity and Total Phenolics of *Phellinus* Mushroom Extracts Collected from Northeast of Thailand, *Chinese Journal of Natural Medicines* Volume 9, Issue 6 (2011) 441-445.

Singleton, V.L, Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, RM., Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by mean of Folin-Cioaltea reagent, (1998), *Methods of Enzymology*, 1999, 299, 152-178

Sharma, O.P., Bhat, T.K., (2009) DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, 113, 1202-1205

Todorova M., Trendafilova A., *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity, *Journal of ethnopharmacology* 152(2014) 256-265.

Ελληνική βιβλιογραφία

Γκολιαρης Απ. Καλλιέργεια, αυτοφυή είδη και βελτίωση στο ελληνικό τσάι του βουνού (Sideritis L.). ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. Τμήμα Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών http://www.iama.gr/ethno/sideritis/tsai_tou_vounou_files/Tsai_tou_vounou_Gkoliaris_Apostol