

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΜΣ ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ**

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

*Μεταπτυχιακή Διατριβή*

*«Απομόνωση και μελέτη των φαινολικών  
συστατικών οσπρίων *Phaseolus Vulgaris* και  
*Phaseolus Coccineus*»*

*Λευτέρης Σ. Νικολάου-Αλαβάνος*

*Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Χρήστος Παππάς*

**ΑΘΗΝΑ 2014**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΜΣ ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ**

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

*Μεταπτυχιακή Διατριβή*

*«Απομόνωση και μελέτη των φαινολικών  
συστατικών οσπρίων *Phaseolus Vulgaris* και  
*Phaseolus Coccineus*»*

*Λευτέρης Σ. Νικολάου-Αλαβάνος*

*Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Χρήστος Παππάς*

**ΑΘΗΝΑ 2014**

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΟΣΠΡΙΩΝ *Phaseolus Vulgaris* ΚΑΙ *Phaseolus Coccineus*

ΛΕΥΤΕΡΗΣ Σ. ΝΙΚΟΛΑΟΥ-ΑΛΑΒΑΝΟΣ

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων:

Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μέλη:

Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αθανάσιος Κυμπάρης, Επίκουρος Καθηγητής ΔΠΘ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Ολοκληρώνοντας την παρούσα εργασία θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Χρήστο Παππά, Επίκουρο Καθηγητή, εισηγητή του θέματος και επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου διατριβής, για την άριστη συνεργασία, τη διαρκή του έγνοια για την πρόοδο της μελέτης, τη συνολική του συμβολή για την ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κκ. Πέτρο Ταραντίλη, Αναπληρωτή Καθηγητή και Αθανάσιο Κυμπάρη, Επίκουρο Καθηγητή του ΔΠΘ, μέλη της Τριμελούς Επιτροπής για την παρούσα εργασία, για τις συμβουλές επί της βιβλιογραφίας και επί της σωστής εργαστηριακής πρακτικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μόσχο Πολυσίου, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας, για τη διάθεση του εργαστηριακού χώρου και εξοπλισμού, και για τα βοηθητικά του σχόλια κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Ευχαριστώ ακόμη τους Καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του Κλάδου ΙΙΙ και το προσωπικό του Εργαστηρίου Χημείας, για την προσφορά τους και την προθυμία τους να βοηθήσουν όποτε υπήρξε ανάγκη. Ιδιαίτερα ξεχωρίζω τη συνδρομή των Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα, για την πολύτιμη βοήθειά της στο HPLC και γενικότερα, Δρ. Ειρήνη Αναστασάκη, που μοιράστηκε μαζί μου την ειδίκευσή της σε όλες τις φωτομετρικές μεθόδους προσδιορισμού.

Τέλος ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές, με τους οποίους μοιραστήκαμε τον εργαστηριακό χώρο, για τις δύσκολες, εύκολες, αστείες και μη, όμως πάνω από όλα επικοινωνητικές εργαστηριακές εμπειρίες.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ την οικογένειά μου για τη στήριξη όλο αυτό το διάστημα, και για την επιμονή τους: χωρίς αυτά τα δύο δεν θα είχε ολοκληρωθεί η μεταπτυχιακή μου διατριβή.

Λ. Σ. Νικολάου-Αλαβάνος

Ιούνιος 2014

## Περίληψη

---

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν να απομονωθούν και να μελετηθούν τα φαινολικά συστατικά οσπρίων *Phaseolus Vulgaris L. var Vulgaris* (κοινό φασόλι) και *Phaseolus Coccineus L. ssp Coccineus* (φασόλι γίγαντας) με στόχο τον ποιοτικό προσδιορισμό και ταυτοποίησή τους, με τη χρήση των τεχνικών της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier – μέθοδος διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) και της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή συστάδας φωτοδιόδων (HPLC-DAD).

Τα δείγματα αφού κονιοποιήθηκαν εκχυλίστηκαν με μεθανόλη (MeOH):νερό 70:30 v/v με τη βοήθεια δύο διαφορετικών τεχνικών: εκχύλιση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με απλή ανάδευση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους θερμοστατούμενη στους  $25\pm 1^\circ$ , φυγοκεντρήθηκαν και λυοφιλιώθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε νερό και έγιναν όλοι οι προσδιορισμοί.

Εκτός από τη μελέτη των φαινολικών συστατικών με υπέρυθρη φασματοσκοπία και υγρή χρωματογραφία, στα λυοφιλιωμένα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και η αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση τους με τις μεθόδους DPPH και ABTS.

Προσδιορίστηκε ότι τα βασικά φαινολικά συστατικά των φασολιών και των δύο γενών ανήκουν στην τάξη των υδροξυκιναμικών οξέων, παράγωγα των φαινυλοπροπανοειδών. Μεταξύ άλλων, προσδιορίστηκαν ποιοτικά τα φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ και καφεϊκό οξύ.

Μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά των κοινών φασολιών και των γιγάντων με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και με δύο τεχνικές εκχύλισης και βρέθηκε ότι το φασόλι γίγαντας υπερτερεί σε φαινολικό περιεχόμενο του κοινού φασολιού (με αναγωγή σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος: φασόλι γίγαντας με απλή ανάδευση 3,56mg καφεϊκού οξέος/g, με υπερήχους 3,72mg/g , κοινό φασόλι με απλή ανάδευση 3,02mg/g, με υπερήχους 3,36mg/g) και ότι η τεχνική εκχύλισης με υπερήχους υπερτερεί της εκχύλισης με απλή ανάδευση ως προς την εκχύλιση φαινολικών συστατικών. Η συνολική περιεκτικότητα των φασολιών σε φαινολικά είναι μέτρια.

Μετρήθηκε η αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση των φασολιών με τις μεθόδους DPPH και ABTS και βρέθηκε ότι τόσο το κοινό φασόλι όσο και το φασόλι γίγαντας επιδεικνύουν χαμηλή αντιοξειδωτική δράση, ενώ επιβεβαιώνονται τα ευρήματα για τη μεταξύ τους σχέση και για τη σύγκριση των δύο τεχνικών εκχύλισης που δίνονται παραπάνω. Εκφρασμένα σε  $\mu\text{mol Trolox/g}$  δείγματος, τα αποτελέσματα είναι τα εξής: για τη μέθοδο DPPH φασόλι γίγαντας με απλή ανάδευση 2,416 $\mu\text{mol Trolox/g}$ , με υπερήχους 2,504 $\mu\text{mol Trolox/g}$ , κοινό φασόλι με

απλή ανάδευση 2,016μmol Trolox/g, με υπερήχους 2,106μmol Trolox/g, ενώ το IC<sub>50</sub> για το Trolox υπολογίστηκε στα 12,82 μmol Trolox. Για τη μέθοδο ABTS, πάλι εκφρασμένο στις ίδιες μονάδες, αντίστοιχα τα αποτελέσματα ήταν 1,126, 1,168, 0,826 και 0,902μmol Trolox/g ενώ το IC<sub>50</sub> υπολογίστηκε στα 6,28 μmol Trolox.

Συμπεραίνουμε ότι τόσο το κοινό φασόλι όσο και οι γίγαντες είναι τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, υδατάνθρακες με μέτρια περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Όλα τα παραπάνω καθιστούν τα φασόλια σε βασική τροφή η οποία συνδέεται με ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Μεταξύ του κοινού φασολιού και του φασολιού γίγαντα τα δεύτερα υπερτερούν σε περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα. Αντίστοιχα, η εκχύλιση με υπερήχους αποδεικνύεται αποδοτικότερη της εκχύλισης με απλή ανάδευση.

### Λέξεις κλειδιά

---

φασόλια, *P.vulgaris*, *P.coccineus*, HPLC-DAD, DRIFTS, φαινολικά, υδροξυκιναμικά οξέα, αντιοξειδωτική δράση

## Abstract

---

### *“Isolation and study of phenolic compounds of legumes *P.vulgaris* and *P.coccineus*”*

The objective of this post-graduate thesis was to isolate and study the phenolic compounds of legume seeds of the genera *Phaseolus Vulgaris L. var Vulgaris* (common bean) and *Phaseolus Coccineus L. ssp Coccineus* (giant bean) in order to identify qualitatively these phenolic compounds using the techniques of Fourier transformed infrared spectroscopy – Diffuse Reflectance (DRIFTS) and High Performance Liquid Chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD).

The original seed samples after grating in a ball-mill were extracted with methanol (MeOH): water 70:30 v/v with two different extraction methods: extraction in room temperature with mechanical stirring and extraction assisted by ultrasounds in  $25\pm 1^{\circ}$  C. After the extractions, the extracts were centrifuged and lyophilized, redissolved in water and analyzed.

Apart from the analysis of the phenolic compounds with infrared spectroscopy and HPLC, the lyophilized extracts were used to quantify the total phenolic content by Folin-Ciocalteu method as well as the antioxidant and antiradical activity using the methods of DPPH and ABTS.

The fundamental phenolic contents of the two bean genera were identified and belong to the class of hydroxycinnamic acids, products of the phenylpropanoid class. Among others, ferulic acid, sinapic acid, p-coumaric acid and caffeic acid were qualitatively identified.

The total phenolic content of common beans and giant beans was quantified with the Folin-Ciocalteu method and for two different extraction methods and it was found out that the giant bean is richer in phenolic content than the common bean (in mg caffeic acid/g of dry beans: giant bean with stirring 3.56 , with ultrasounds 3.72 , common bean with stirring 3.02, with ultrasounds 3.36) and that the extraction with ultrasounds is preferable than simple stirring for the extraction of phenolics. The total phenolic content of beans is deemed average.

The antioxidant and antiradical activity of beans was quantified with the methods of DPPH and ABTS and it was found that both common bean and giant bean have low antioxidant activity, while reiterating the results of their comparison as well as the comparison between the two extraction techniques. In  $\mu\text{mol Trolox/g}$  dry bean the results are as following: for DPPH giant bean with stirring 2,416, with ultrasounds 2.504, common bean with stirring 2.016, with ultrasounds 2.106  $\mu\text{mol Trolox/g}$ , and

the IC<sub>50</sub> for Trolox was 12,82µmol. For ABTS correspondingly the results were 1.126, 1.168, 0.826 and 0.902µmol Trolox/g and the IC<sub>50</sub> was 6,28 µmol Trolox.

We conclude that both common bean and giant bean is a food rich in proteins, metallic compounds, carbohydrates and with average content in phenolic compounds. The above mentioned elements confirm that beans are healthy food connected with various benefits for human health. Between the common beans and the giant beans, the latter show a better antioxidant activity and a higher concentration of phenolics. Between the two extraction methods, the ultrasound assisted extraction provides better results that the stir extraction.

### **Keywords**

---

beans, *P.vulgaris*, *P.coccineus*, HPLC-DAD, DRIFTS, phenolics, hydroxycinnamic acids, antioxidant activity



# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

---

Ευχαριστίες .....	ii
Περίληψη .....	iii
Abstract .....	v
Πίνακας περιεχομένων .....	vii
Ευρετήριο πινάκων .....	viii
Ευρετήριο εικόνων .....	ix
1 Θεωρητικό Μέρος .....	1
1.1 Εισαγωγή .....	2
1.2 Θεωρητικά .....	4
1.2.1 Παγκόσμια Παραγωγή.....	4
1.2.2 Εγχώρια Παραγωγή .....	6
1.2.3 Γενικά Στοιχεία για τα φυτά <i>P.vulgaris</i> – <i>P.coccineus</i> .....	8
Τα φυτά του γένους <i>Phaseolus</i> .....	8
Γεωγραφική Προέλευση .....	8
Βοτανική Περιγραφή του <i>P.vulgaris</i> .....	9
Βοτανική Περιγραφή του <i>P.coccineus</i> .....	10
Καλλιεργητικές απαιτήσεις .....	11
Χημική και διατροφική σύσταση .....	13
1.2.4 Φαινολικά των οσπρίων <i>P.vulgaris</i> – <i>P.coccineus</i> .....	19
1.2.5 Μέθοδοι διαχωρισμού- μελέτης φαινολικών .....	22
Α. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Υπερήχους .....	22
Β. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης .....	25
Γ. Υπέρυθρη φασματοσκοπία .....	28
Δ. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών .....	35

Ε. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης .....	36
ΣΤ. Σκοπός της μελέτης.....	40
2 Πειραματικό Μέρος - Αποτελέσματα .....	42
2.1 Κατεργασία του φυτικού υλικού .....	44
2.2 Απόδοση σε λυοφιλωμένο στερεό των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων	46
2.3 Μελέτη Ολικών Φαινολικών – Αντιοξειδωτικής Δράσης.....	47
Μελέτη Ολικών Φαινολικών Συστατικών .....	47
Μελέτη Αντιοξειδωτικής δράσης με DPPH .....	48
Μελέτη Αντιοξειδωτικής δράσης με ABTS .....	49
2.4 Αποτελέσματα ολικών φαινολικών – αντιοξειδωτικής δράσης.....	50
Μελέτη Ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	50
Μελέτη Αντιοξειδωτικής δράσης με DPPH – ABTS....	52
2.5 Χρωματογραφική μελέτη των φαινολικών των εκχυλισμάτων.....	56
2.6 Αποτελέσματα μελέτης λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων με HPLC-DAD....	58
2.7 Φασματοφωτομετρική μελέτη με τη μέθοδο DRIFTS.....	69
2.8 Αποτελέσματα φασματοφωτομετρικής μελέτης με μεθόδους DRIFTS-ZnSe..	71
3 Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	81
Μέρος 4 Βιβλιογραφία .....	84
Ξενόγλωσση αρθρογραφία και συγγράμματα .....	84
Βιβλιογραφία και συγγράμματα στα ελληνικά .....	87
Διαδικτυακές πηγές .....	88
Μέρος 5 Παραρτήματα .....	89
Α. Φάσματα IR δειγμάτων και προτύπων.....	90
Β. Χρωματογραφήματα δειγμάτων και προτύπων .....	95

# Ευρετήριο Πινάκων

---

Πίνακας 1.1 : Περιεκτικότητα φασολιών σε πρωτεΐνες και ιχνοστοιχεία .....	16
Πίνακας 1.2 : In Vitro Αντιοξειδωτικές Μέθοδοι Προσδιορισμού .....	36
Πίνακας 2.1 : Απόδοση λυοφιλιωμένων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων .....	52
Πίνακας 2.2: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο σε mg καφεϊκού οξέος/g ξηρού φασολιού .....	49
Πίνακας 2.3: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH .....	52
Πίνακας 2.4: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο ABTS.....	53
Πίνακας 2.5 : Πρόγραμμα έκλουσης για την ανάλυση των δειγμάτων .....	55
Πίνακας 2.6: Απορροφήσεις UV-Vis και χρόνοι έκλουσης των υδροξυκιναμικών οξέων .....	59
Πίνακας 2.7: Απόδοση με βάση το $t_R$ .....	64
Πίνακας 2.8 : Συχνότητες απορρόφησης κυριότερων ομάδων στο IR.....	71
Πίνακας 2.9 : Συχνότητες απορρόφησης κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο IR.....	75

# ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

---

Εικόνα 1.1 : Παγκόσμια παραγωγή φασολιού 1960 – 2014.....	4
Εικόνα 1.2 : Σύγκριση της παραγωγής φασολιού παγκοσμίως (2010-12).....	5
Εικόνα 1.3 : Εισαγωγές φασολιών στην Ελλάδα (σε χιλιάδες τόνους) .....	7
Εικόνα 1.4 : Σύγκριση φυταρίων <i>P.vulgaris</i> και <i>P.coccineus</i> .....	11
Εικόνα 1.5 : Βοτανικά χαρακτηριστικά του πολυανθούς φασολιού.....	13
Εικόνα 1.6 : Πολυσακχαρίτες και άμυλο .....	16
Εικόνα 1.7 : Απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα .....	19
Εικόνα 1.8 : Υδροξυκιναμικά οξέα και παράγωγά τους .....	21
Εικόνα 1.9 : Διαδικασία δημιουργίας και κατάρρευσης φυσαλίδων .....	24
Εικόνα 1.10 : Φυσαλίδα κατά τη διαδικασία κατάρρευσης.....	25
Εικόνα 1.11 : Σχεδιάγραμμα HPLC.....	26
Εικόνα 1.12 : Δονήσεις τάσης και κάμψης από απορρόφηση IR .....	30
Εικόνα 1.13 : Το συμβολόμετρο Michelson .....	32
Εικόνα 1.14 : Σχεδιάγραμμα φασματοφωτόμετρου FT-IR .....	33
Εικόνα 1.15 : Το εξάρτημα λήψης φάσματος DRIFTS.....	34
Εικόνα 1.16 : Μηχανισμός δράσης DPPH .....	37
Εικόνα 1.17 : Μηχανισμός δράσης ABTS .....	38
Εικόνα 1.18 : Παραδείγματα τριών τάξεων φαινολικών .....	39
Εικόνα 2.1 : Οργανόγραμμα Μελέτης.....	42
Εικόνα 2.2 : Δοκιμαστικοί σωλήνες κατά την αλκαλική υδρόλυση .....	43
Εικόνα 2.3 : Η δομή του Trolox .....	47
Εικόνα 2.4 : Διάγραμμα Παρεμπόδισης % DPPH προς συγκέντρωση Trolox .....	52
Εικόνα 2.5 : Διάγραμμα Παρεμπόδισης % ABTS προς συγκέντρωση Trolox .....	53
Εικόνα 2.6 : Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε .....	55

Εικόνα 2.7 : Χρωματογράφημα κοινού φασολιού εκχυλισμένου με απλή ανάδευση στα 270, 325nm.....	57
Εικόνα 2.8: Χρωματογράφημα φασολιού γίγαντα εκχυλισμένου με υπερήχους στα 270,325nm .....	58
Εικόνα 2.9: Φάσματα UV-Vis του Καφεϊκού (αριστερά) και του π-Κουμαρικού οξέος.....	59
Εικόνα 2.10: Φάσμα UV-Vis του Φερουλικού Οξέος .....	60
Εικόνα 2.11: Χρωματογράφημα πρότυπων υδροξυκιναμικών οξέων στα 270, 325nm .....	60
Εικόνα 2.12: Λεπτομέρεια χρωματογραφήματος στα 325 nm .....	61
Εικόνα 2.13: <i>P.vulgaris</i> με απλή ανάδευση μετά την αλκαλική υδρόλυση (325nm).....	62
Εικόνα 2.14: <i>P.vulgaris</i> Ultrasound assisted μετά την αλκαλική υδρόλυση (325nm).....	62
Εικόνα 2.15: <i>P.coccineus</i> με απλή ανάδευση μετά την αλκαλική υδρόλυση (325nm) .....	63
Εικόνα 2.16: <i>P.coccineus</i> Ultrasound assisted μετά την αλκαλική υδρόλυση (325nm) .....	63
Εικόνα 2.17: Χρωματογράφημα <i>P.vulgaris</i> Ultrasound assisted στα 270nm .....	66
Εικόνα 2.18: Χρωματογράφημα <i>P.vulgaris</i> Ultrasound assisted στα 270nm .....	66
Εικόνα 2.19: Εξάρτημα για τη λήψη φάσματος με τη μέθοδο DRIFTS όπου φαίνεται η υποδοχή του micro-cup και η διάταξη των κατόπτρων .....	68
Εικόνα 2.20: Φασματοφωτόμετρο FT-IR Thermo Nicolet 6700 .....	69
Εικόνα 2.21 : Φάσματα FT-IR <i>P.vulgaris</i> και <i>P.coccineus</i> .....	70
Εικόνα 2.22: Φάσματα FT-IR κοινού φασολιού, λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος με μηχανική ανάδευση, λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος με υπερήχους.....	72
Εικόνα 2.23: Φάσματα FT-IR φασολιού γίγαντα, λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος με μηχανική ανάδευση, λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος με υπερήχους .....	73
Εικόνα 2.24 : Φάσματα DRIFTS του φερουλικού, π-κουμαρικού και σιναπικού οξέος .....	74

Εικόνα 2.25 : Μοριακές δομές των εν λόγω υδροξυκινηματικών οξέων .....	76
Εικόνα 2.26 : Φάσματα FT-IR σε ZnSe των αλκαλικά υδρολυμένων εκχυλισμάτων <i>P.coccineus</i> με μηχανική ανάδευση και υπερήχους .....	77

**1**

**ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε ολόκληρη την ανθρώπινη ιστορία, περισσότερα από 3000 είδη φυτών έχουν χρησιμοποιηθεί σαν τροφές. Παγκοσμίως, τα φυτά παρέχουν στους ανθρώπους το 65% των πρωτεϊνών που προσλαμβάνονται από την διατροφή και περισσότερο από το 80% της ενέργειας. Αφήνοντας έξω από τον υπολογισμό μας ένα μεγάλο τμήμα των φυτών, που έχει να κάνει με τα είδη φρούτων και λαχανικών που χρησιμοποιούνται σαν τροφές, μόνο περίπου 50 καλλιεργήσιμα είδη συμβάλλουν καθοριστικά στην ανθρώπινη διατροφή.

Από αυτά, τα δημητριακά αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα και ακολουθούνται από τα όσπρια, μιλώντας με όρους παγκόσμιας παραγωγής. Όμως, επειδή τα όσπρια περιέχουν 2-3 φορές περισσότερες πρωτεΐνες από ότι τα δημητριακά, η διατροφική τους σημασία σαν πηγές πρωτεϊνών είναι τεράστια. Από τα περισσότερα των 1300 ειδών οσπρίων, περίπου 20 καταναλώνονται συχνότερα από τους ανθρώπους. Μεταξύ αυτών, το κοινό ξηρό φασόλι, *Phaseolus vulgaris*, καταναλώνεται συχνότερα και σε μεγαλύτερες ποσότητες παγκοσμίως.

Τα ξηρά φασόλια έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο (Na), και καθόλου χοληστερόλη. Αποτελούν μία πλούσια πηγή πρωτεϊνών, σύνθετων υδατανθράκων, φυτικών ινών, βιταμινών και συγκεκριμένων μεταλλικών στοιχείων και ιχνοστοιχείων. Σε επίπεδο θερμιδικής διατροφικής αξίας, τα όσπρια είναι πιο θρεπτικά από ότι τα δημητριακά. Τα ξηρά φασόλια είναι αρκετά φθηνότερα από τα κτηνοτροφικά προϊόντα και όταν αποθηκευτούν σωστά έχουν σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο ζωής από τα ζωικά προϊόντα, τα φρούτα και τα λαχανικά.

Ακόμη, λόγω της ικανότητάς τους να απελευθερώνουν άζωτο στο οικοσύστημα έδαφος-καλλιέργειας, παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση και τον εμπλουτισμό της ποιότητας του εδάφους με αναγκαία θρεπτικά συστατικά για τα φυτά. (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004)

Μέχρι προσφάτως οι γενικές ευεργετικές ιδιότητες της κατανάλωσης φασολιών δεν είχαν μελετηθεί όσο έπρεπε, πράγμα που αλλάζει αισθητά τα τελευταία χρόνια. Κάποιες από τις ουσίες και τα συστατικά που περιέχονται στα φασόλια εμφανίζουν θετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Τέτοιοι είναι: τα ραφινοσάκχαρα που διεγείρουν την δραστηριότητα ευεργετικών βακτηρίων και προβιοτικών. Το φυτικό οξύ το οποίο επιδεικνύει αντικαρκινική δράση και έχει αντιοξειδωτική δράση και προλαμβάνει τις πέτρες των νεφρών. Τα πολυφαινολικά συστατικά που έχουν αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξογόνα δράση μεταξύ άλλων. (Doria, Campion, Sparvoli, Tava, Nielsen, 2012; Cardador-Martinez, Castano-Tostado, Loarca-Piña, 2002)



Τα όσπρια γενικά, και τα φασόλια ειδικότερα, δικαίως επομένως έχουν κερδίσει το χαρακτηρισμό “το κρέας του φτωχού”. Είναι τροφή που αντικαθιστά επάξια το κόκκινο κρέας, παρέχει στον καταναλωτή ενέργεια αλλά και το σύνολο των απαραίτητων αμινοξέων που δεν μπορούν να συντεθούν στον οργανισμό. Η μέση ελληνική οικογένεια καταναλώνει όσπρια δύο με τρεις φορές την εβδομάδα, εκ των οποίων η μία σίγουρα πρόκειται για ξηρό φασόλι, και οι υπόλοιπες αλλάζουν σε σχέση με την εποχή αλλά και τις τοπικές διατροφικές συνήθειες.

Με την έναρξη της επιβράδυνσης της οικονομίας το 2008-2009 και με το πέρασμα στην οικονομική κρίση η οποία σύμφωνα με τα ευρωπαϊκά παρατηρητήρια και ινστιτούτα βρισκόταν σε περίοδο εμβάθυνσης μέχρι και το 4ο τρίμηνο του 2012, περισσότεροι άνθρωποι στη χώρα μας λόγω της σοβαρής χειροτέρευσης της αγοραστικής τους δύναμης και του επιπέδου διαβίωσης στρέφονται σε εναλλακτικές λύσεις διατροφής χαμηλότερου κόστους.

Οι προβολές για την κατάσταση της οικονομίας των επόμενων πέντε χρόνων παραμένουν απαισιόδοξες, ιδιαίτερα για τα ευρεία τμήματα του πληθυσμού της χώρας που είδαν το εισόδημά τους να συρρικνώνεται έως και 40% σε 5 χρόνια. Ο στόχος του επιστημονικού δυναμικού της χώρας δεν μπορεί να είναι να δικαιολογεί με την επιστήμη του τα κακώς κείμενα, δηλαδή «φάε φασόλι αφού δεν έχεις για κρέας, σου κάνει και καλό».

Από τη σκοπιά του επιστήμονα που είναι στενά συνδεδεμένος με την αγροτική παραγωγή, το πρόβλημα που πρέπει να λυθεί είναι η εξασφάλιση για το σύνολο του πληθυσμού σωστής διατροφής στα πλαίσια της ανάπτυξης της διατροφικής επάρκειας της χώρας. Ο στόχος δεν μπορεί να είναι “ο σκοπός να αγιάζει τα μέσα” δηλαδή να εγκωμιάσουμε σήμερα το φασόλι, γιατί “η τσέπη είναι άδεια”.

Η Ελλάδα, όπως και σχεδόν όλες οι χώρες του κόσμου, έχει τη δυνατότητα να αναπτύξει την αγροτική της παραγωγή, σε όλους τους κλάδους, και να αποκτήσει την διατροφική της αυτάρκεια, όπως την είχε τη δεκαετία του 1980. Το σημείο κλειδί βρίσκεται στο ποιος σχεδιάζει και ποιος υλοποιεί την αγροτική ανάπτυξη, σε ποιον ανήκουν οι καλλιεργήσιμες εκτάσεις, οι κτηνοτροφικές μονάδες και ποιος παίρνει στα χέρια του την παραγωγή. Προς ποιανού το όφελος νομοθετούνται μέτρα, ποιον εξυπηρετούν οι ευρωπαϊκές κατευθύνσεις και νομοθεσίες; Σε τελική ανάλυση, αυτό το πολύ σημαντικό ζήτημα ανάγεται στο κεντρικό κοινωνικό πρόβλημα, της ιδιοκτησίας της γης και του παραγόμενου πλούτου.

Στα πλαίσια ενός κοινωνικοποιημένου αγροτικού τομέα, ενταγμένο στον κεντρικό οικονομικό σχεδιασμό της παραγωγής μπορούν να λυθούν αυτές οι τρομερές αντιθέσεις της σημερινής κοινωνίας, να αναπτυχθεί πραγματικά η χώρα και η οικονομία συνολικά προς όφελος του ελληνικού λαού.

## 1.2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ

### 1.2.1 Παγκόσμια Παραγωγή

Τα όσπρια κατέχουν την πέμπτη θέση παγκοσμίως όσον αφορά στην ποσότητα μεταξύ των καλλιεργούμενων προϊόντων. Τα δε ξηρά φασόλια αποτελούν περίπου το 23% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής των καλλιεργούμενων ψυχανθών. Τα τελευταία δέκα χρόνια, η παγκόσμια κατά κεφαλήν παραγωγή σε ξηρά φασόλια κυμαίνεται 2,3-2,5kg ετησίως (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004).

Από τα στοιχεία που διατηρεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ (FAOSTAT), γνωρίζουμε ότι η παραγωγή των ξηρών φασολιών τείνει συνεχώς αυξανόμενη από το 1961 μέχρι σήμερα. Το 2011 η παγκόσμια παραγωγή ήταν κατά 107% μεγαλύτερη σε σχέση με το 1961 και κατά 33% σε σύγκριση με δέκα χρόνια πριν (1990), φτάνοντας συνολικά τους 23,25 εκατομμύρια τόνους.



*Εικόνα 1.1: Παγκόσμια Παραγωγή Φασολιού 1960-2014*

Η Ασία παράγει τη μεγαλύτερη ποσότητα (43-51%) των ξηρών φασολιών ακολουθούμενη από τη Νότια Αμερική (16-21%), την Αφρική (12-19%) και τη Βόρεια και Κεντρική Αμερική (17-9%). Η Ευρώπη έρχεται τελευταία ανάμεσα στις Ηπείρους – εξαιρώντας την Ωκεανία- με την παραγωγή της να αντιπροσωπεύει όλο και μικρότερο ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία 30 χρόνια, καταλήγοντας το 2012 να αφορά στο 2% της παγκόσμιας παραγωγής.

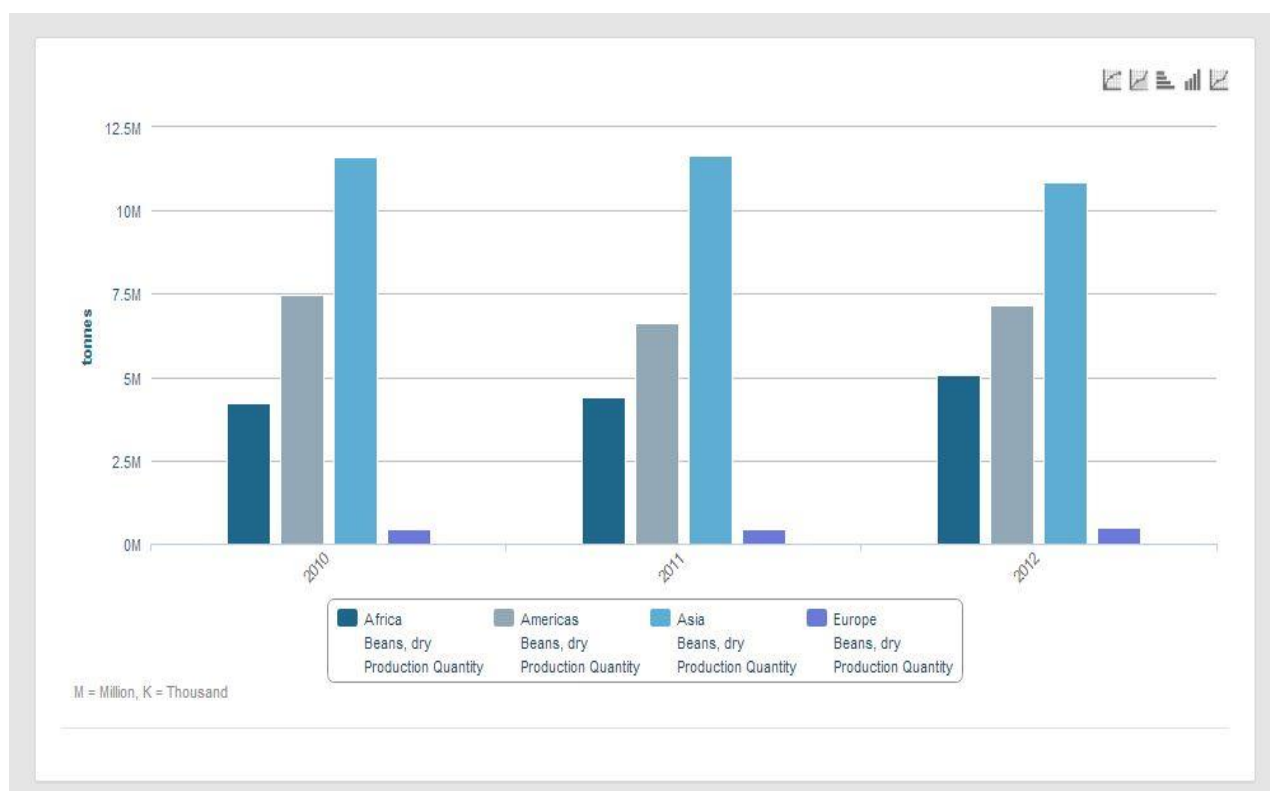
Τα τελευταία τριάντα χρόνια σταθεροί πρωταγωνιστές στην παγκόσμια παραγωγή αναδεικνύονται η Ινδία, η Βραζιλία, η Κίνα και οι ΗΠΑ. Ανερχόμενη παραγωγική δύναμη έχει

αποδειχτεί το Μιανμάρ αυξάνοντας ραγδαία την εγχώρια παραγωγή του. Το 2011 είχε σημείωση αύξηση κατά 1355% σε σχέση με το 1980 και κατέκτησε τη δεύτερη θέση το 2011 παράγοντας το 16% της παγκόσμιας παραγωγής. Αντίθετα το Μεξικό που κατείχε την έκτη θέση το 1980 έπεσε στην 8η το 2011 (2%). Συνολικά η παραγωγή των έξι αυτών χωρών αντιστοιχεί στο 62-65% της παγκόσμιας.

Οι εξαγωγές των προϊόντων αυτών ακολουθούν στο χρόνο μία ανάλογη σχέση με την παραγωγή με αποτέλεσμα το 2010 να έχουν αυξηθεί κατά 633% σε σχέση με το 1961 και κατά 246% σε σχέση με το 1980.

Οι κορυφαίες χώρες εξαγωγής σε ξηρά φασόλια στις μέρες μας είναι η Κίνα, η Μιανμάρ, οι ΗΠΑ, η Αργεντινή, και ο Καναδάς, αντιπροσωπεύοντας το 29%, το 15%, το 13% , το 10% και το 8% των εξαγωγών της υψηλίου αντίστοιχα, οι οποίες ανήλθαν σε πάνω από 2,74 δις δολάρια Αμερικής.

Το 2010 η Ινδία, η Βραζιλία, οι ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο, το Μεξικό , η Ιταλία και η Ιαπωνία, η Βενεζουέλα, η Κίνα, η Νότια Αφρική και η Ινδονησία, αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα το 16,12%, 5,89%, 4,62%, 4,07%, 3,82%, 3,51%, 3,48%, 3,36%, 3,20%, 2,85% και 1,95% της παγκόσμιας εισαγωγής το οποίο εκφράζεται στο 52,86% ή σε 1,635 δις δολάρια Αμερικής και στο 56,23% της συνολικής εμπορικής αξίας.



*Εικόνα : 1.2 Σύγκριση της παραγωγής ξηρού φασολιού παγκοσμίως (2010-12)*

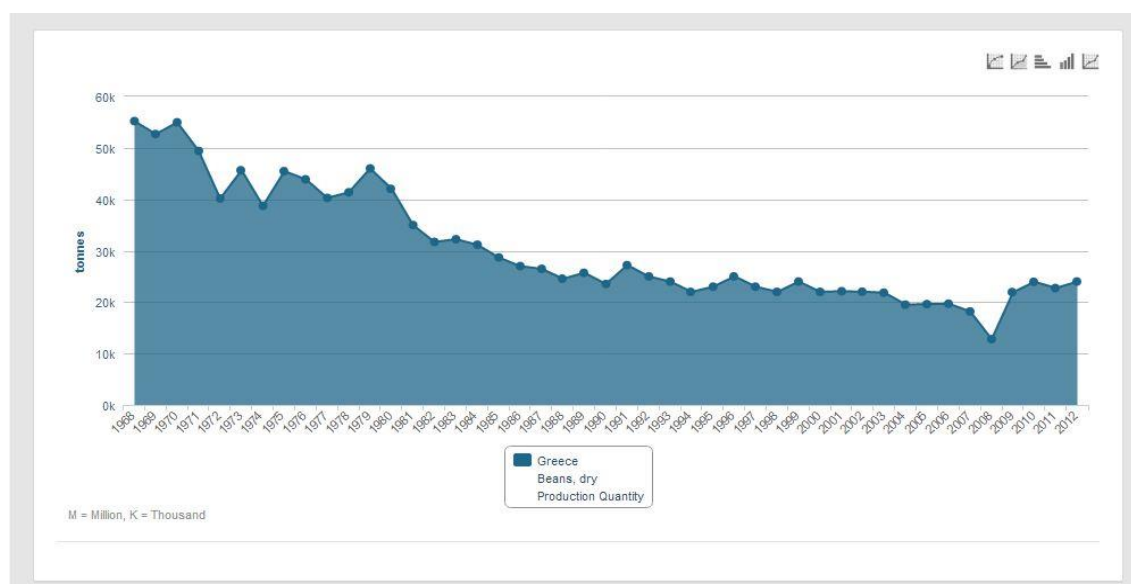
## 1.2.2 Εγχώρια Παραγωγή

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση τα όσπρια καλλιεργούνται σε ασημαντες, για την σπουδαιότητά τους και τα πλεονεκτήματά τους, εκτάσεις που χρόνο με το χρόνο μειώνονται. Τα κτηνοτροφικά ψυχανθή καταλαμβάνουν κάθε χρόνο έκταση περίπου 15 εκατομμυρίων στρεμμάτων με δεσπόζουσα καλλιέργεια αυτή της μηδικής που καταλαμβάνει σημαντικές εκτάσεις στην Ισπανία, την Ιταλία, τη Γαλλία, τη Ρουμανία, την Ουγγαρία και την Πολωνία.

Στην Ελλάδα, σε ότι αφορά την καλλιέργεια των οσπρίων, το σύνολο της καλλιεργούμενης έκτασης ανέρχεται σε 150.000 στρέμματα περίπου, με μέση παραγωγή τους 29.000 τόνους, εκ των οποίων τα φασόλια καλύπτουν το 64% των εκτάσεων και το 73% της συνολικής παραγωγής σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. (ΥΠΙΑΑΤ, 2007)

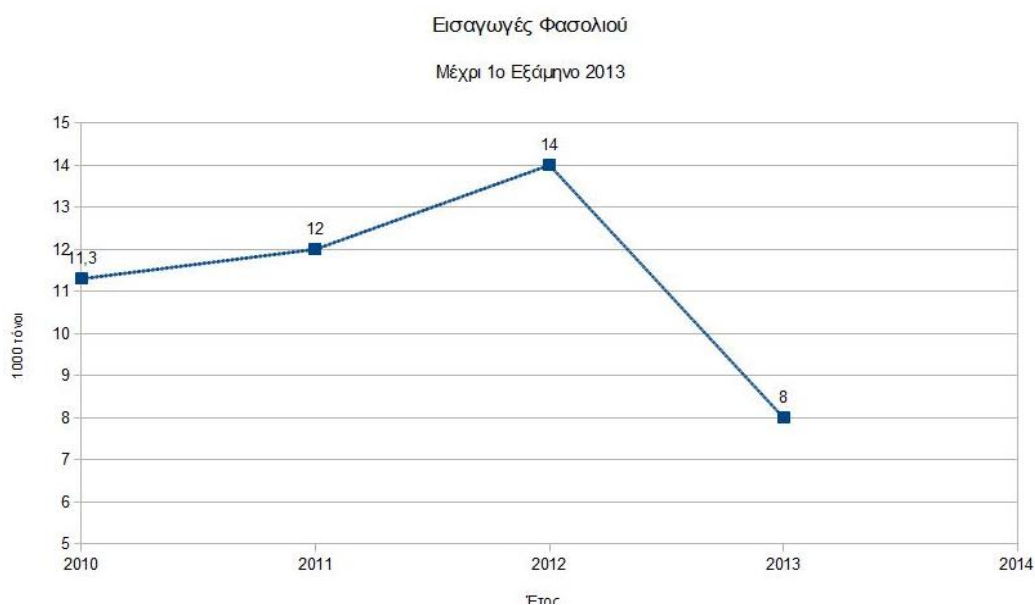
Στη χώρα μας, το φασόλι καλλιεργείται κυρίως ως αμιγής καλλιέργεια και σε περιορισμένη έκταση σε συγκαλλιέργεια με καλαμπόκι. Η μέση απόδοση αρδευόμενης μονοκαλλιέργειας φασολιού στη χώρα μας είναι γύρω στα 200kg ξηρού σπόρου/στρέμμα, όταν όμως χρησιμοποιηθούν βελτιωμένες ποικιλίες και κατάλληλη τεχνική καλλιέργειας, οι αποδόσεις είναι υψηλότερες. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι στο Νομό Καστοριάς οι αποδόσεις του κοινού φασολιού είναι 150-250kg/στρέμμα, ενώ οι γίγαντες δίνουν 200-450. Οι αποδόσεις της συγκαλλιέργειας στη χώρα μας υστερούν σε σχέση με τις αποδόσεις σε μονοκαλλιέργεια. Ενδεικτικά, σε σύστημα συγκαλλιέργειας η μέση απόδοση ξηρού σπόρου ανέρχεται στα 110 kg/στρέμμα. (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Σύμφωνα με τα στοιχεία της FAOSTAT, η Ελλάδα κατείχε το 1961 την 28η στην παγκόσμια κλίμακα. Η θέση αυτή από τότε μέχρι σήμερα τείνει συνεχώς φθίνουσα και ενδεικτικά παρατίθενται η κατάταξή της στον πίνακα που ακολουθεί:



Παρόλη την αύξηση της απόδοσης χάρη στις βελτιωμένες καλλιεργητικές τεχνικές που αναπτύχθηκαν τα τελευταία πενήντα χρόνια, η οποία μάλιστα υπερδιπλασιάστηκε, η συνολική παραγωγή μειώθηκε.

Μέχρι το 1980, η Ελλάδα παρουσίαζε μία αυτάρκεια, σε γενικές γραμμές, όσο αφορά στην κάλυψη της εγχώριας αγοράς σε ξηρά φασόλια. Το δεδομένο όμως αυτό αντιστρέφεται μετά το 1980, με αποτέλεσμα την τελευταία δεκαετία να εισάγουμε κατά μέσο όρο το 44% των ξηρών φασολιών που καταναλώνουμε. Οι κύριες χώρες από τις οποίες η Ελλάδα εισάγει τα φασόλια (κυρίως κοινά φασόλια και γίγαντες-ελέφαντες) είναι οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, η Αλβανία και η Αργεντινή. (Γραφείο Γενικού Γραμματέα Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων)



*Εικόνα 1.3: Εισαγωγές φασολιών στην Ελλάδα (σε χιλιάδες τόνους)*

Βάση των ίδιων στοιχείων διαφαίνεται ότι η κυριότεροι νομοί για την καλλιέργεια αυτού του οσπρίου είναι η Φλώρινα, η Ηλεία, η Καστοριά και η Καβάλα αντιπροσωπεύοντας το 40,6% της συνολικής έκτασης και 53,9% της συνολικής παραγωγής. Τις μεγαλύτερες στρεμματικές αποδόσεις παρουσιάζουν οι νομοί Καστοριά, Φλώρινας, Αιτωλοακαρνανίας, Καβάλας, Σέρρες και Χαλκιδική με αντίστοιχες τιμές 334, 304, 294, 274, 265 και 254 kg/στρέμμα.

### 1.2.3 Γενικά Στοιχεία για τα φυτά *Phaseolus vulgaris* L. και *Phaseolus coccineus* L.

#### Τα φυτά του γένους *Phaseolus*

Τα φυτά του γένους *Phaseolus* ανήκουν, στην οικογένεια *Leguminosae* (συνώνυμες με *Fabaceae* και *Papilionoicaceae*) της τάξης *Fabales*, (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Η οικογένεια *Leguminosae* ή ψυχανθή είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια ανθοφόρων φυτών – μετά τις *Compositae* και *Orchidaceae* - τόσο από οικονομική άποψη όσο και μεγέθους- καθώς εκτιμάται ότι περιλαμβάνει 750 γένη και 16.000-19.000 είδη. (S. K. Sathe και M. Venkatachalam, 2004).

Τα ψυχανθή από πλευράς σπουδαιότητας κατατάσσονται στη δεύτερη θέση, μετά τα σιτηρά και γενικότερα τα αγρωστωδή. Σε αυτά υπάγονται αρκετά αξιόλογα φυτά όπως η σόγια, ο βίκος, το μπιζέλι, το λούπινο, τα κουκιά, τα όσπρια κ.α. (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Σήμερα στον Ελλαδικό χώρο καλλιεργούνται δύο είδη κυρίως: το κοινό φασόλι ή *P. vulgaris* L. var. *vulgaris* – και οι γίγαντες ή *P. coccineus* L. subsp. *coccineus*, με την κοινή φασολιά ή *Phaseolus vulgaris* να είναι το σημαντικότερο από οικονομική άποψη είδος του γένους και το σημαντικότερο είδος της οικογένειας μετά τη σόγια (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

#### Γεωγραφική Προέλευση του φυτού

Πρώτοι οι αρχαιολόγοι με τα ευρήματά τους στο Karlan του Περού και στο Wittmack της Νοτιοδυτικής Αμερικής (1880) συνέλεξαν βάσιμες ενδείξεις ότι η φασολιά κατάγεται από την Κεντρική και Νότια Αμερική και ότι η καλλιέργειά της χρονολογείται από τους αρχαίους χρόνους (Ε.Μακρή, 2006).

Το κοινό φασόλι από την Κεντρική Αμερική έφτασε πιθανότατα στην Ευρώπη μέσω της Ισπανίας και της Πορτογαλίας το 1506, αλλά και το φασόλι των Άνδεων (Ν. Αμερική) θεωρείται ότι μεταφέρθηκε με τον ίδιο τρόπο το 1528, μετά την εξερεύνηση του Περού από τον Pizarro. Στην Ευρώπη εκτιμάται ότι το 67% των εγχώριων φασολιών έχουν προέλευση από τις Άνδεις, ενώ το 44% αποτελούν υβρίδια που προήλθαν και από τις δύο περιοχές της Αμερικής. Επιπλέον, επειδή σε όλη την Ευρώπη έχουν εντοπιστεί υβρίδια του φυτού με ανομοιόμορφη κατανομή - υψηλή συχνότητα στην Κ. Ευρώπη και χαμηλή στην Ισπανία και στην Ιταλία - θεωρείται το σύνολο της ευρωπαϊκής ηπείρου ως δευτερογενές κέντρο

διαφοροποίησης για τα κοινά φασόλια *P.vulgaris*.

Σήμερα φυτά του γένους *Phaseolus* καλλιεργούνται στην Αμερική (Κολομβία, Περού, Χιλή, Βραζιλία, Βενεζουέλα, Μεξικό), στην Αφρική (Αγκόλα, Μπουρούντι, Καμερούν, Ζαΐρ, Μοζαβίκη), στην Ασία (Συρία, Ιράν, Πακιστάν) και στην Ευρώπη (Ελλάδα, Βουλγαρία, Ισπανία, Γαλλία). Σε κάθε περίπτωση καλλιεργούνται διαφορετικές ποικιλίες. (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Το πολυανθές φασόλι (*Phaseolus coccineus* L.) εξημερώθηκε επίσης στην Κεντρική Αμερική και σήμερα καλλιεργείται στη Ν. και Β. Αμερική στην Ευρώπη, στην Ασία και στην Αφρική.

#### Βοτανική περιγραφή του είδους *Phaseolus vulgaris* L.

Το φασόλι είναι ετήσιο ποώδες φυτό. Κατά το φύτεμα το φυτό αναπτύσσει μια πασσαλώδη ρίζα (10-15 cm), σύντομα όμως αναπτύσσονται πλάγιες διακλαδώσεις οι οποίες κυριαρχούν έναντι της πρώτης. Χαρακτηρίζεται γενικά ως επιπολαιόριζο φυτό, γιατί συνήθως ο κύριος όγκος του ριζικού συστήματος βρίσκεται μέχρι τα 25cm βάθος. Στις ρίζες του υπάρχουν φυμάτια του αζωτοβακτηρίου *Rhizobium leguminosarum phaseoli*, χάρη στο οποίο προμηθεύεται ατμοσφαιρικό άζωτο για τις ανάγκες του. (Παπακώστα –Τασοπούλου, 2005; S. K. Sathe και M. Venkatachalam, 2005).

Το φασόλι ανήκει στα φυτά του επίγειου τύπου φυτρώματος στα οποία η ανάδυση των φυταρίων γίνεται με την επιμήκυνση του υποκοτυλίου και οι κοτύλες εξέρχονται πάνω από την επιφάνεια του εδάφους. Στη συνέχεια σταματά η ανάπτυξη του υποκοτυλίου και αρχίζει η επιμήκυνση του επικοτυλίου. Τα φυτά που φυτρώνουν με αυτό τον τρόπο δεν έχουν βοηθητικούς οφθαλμούς και σε περίπτωση καταστροφής των φυταρίων από αντίξοες συνθήκες η ζημία είναι ολική (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Τα πρώτα φύλλα είναι απλά, ενώ τα επόμενα είναι σύνθετα με τρία φυλλάρια. Τα απλά φύλλα έχουν παράφυλλα, είναι συμμετρικά, οξύληκτα, καρδιόσχημα με πτερύγια στο κάτω μέρος και φέρουν στη βάση του μίσχου μία καλώς ανεπτυγμένη ζώνη κινητικών κυττάρων που ρυθμίζουν την κίνηση του νερού στο φύλλο. Τα σύνθετα φύλλα έχουν παράφυλλα και ζώνη κινητικών κυττάρων, αποτελούνται από τρία ακέραια, οξύληκτα φυλλάρια, εκ των οποίων τα δύο πλευρικά είναι ασύμμετρα ενώ το μεσαίο συμμετρικό. Καθένα από τα τρία φυλλάρια φέρει επίσης παράφυλλα. Τα φύλλα είναι λιγότερο ή περισσότερο χνουδωτά, ανάλογα με την ποικιλία (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005; S. P. Singh, 1990).

Οι ποικιλίες του φασολιού διακρίνονται σε νάνες και αναρριχώμενες. Ορισμένοι

αναφέρουν και τρίτη κατηγορία, τις ημιαναρριχώμενες. Στις νάνες ποικιλίες ο βλαστός είναι σχετικά ισχυρός, όρθιας ανάπτυξης, έχει μικρό ύψος και διακλαδίζεται πλούσια.

Τα άνθη είναι μικρά και φέρονται είτε μεμονωμένα είτε σε ταξιανθία βότρυ των 2-8 ανθέων, στην κορυφή ενός ανθικού άξονα, ο οποίος εκφύεται από τις μασχάλες των φύλλων. Το χρώμα των ανθέων ποικίλει και μπορεί να είναι λευκό, ρόδινο, ιώδες ή υποκίτρινο και η άνθισή τους διαρκεί μέχρι και 20 ημέρες. Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται κυρίως με αυτογονιμοποίηση (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Ο καρπός είναι λοβός και περιέχει 4-8 σπόρους. Τα ξερά φασόλια (σπόροι) παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγάλη παραλλακτικότητα όσον αφορά το χρώμα, την ομοιομορφία του χρώματος, το βαθμό λαμπερότητας, καθώς επίσης το σχήμα και το μέγεθος. Οι σπόροι μπορεί να είναι μονόχρωμοι με ένα από τα βασικά χρώματα λευκό, υποκίτρινο, καστανό, μαύρο, ή κηλιδωτοί με στίγματα διαφόρων χρωμάτων και αποχρώσεων του βασικού χρώματος. Ο προσδιορισμός του χρώματος πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη συγκομιδή, γιατί με την αποθήκευση συχνά αλλοιώνεται. Το χρώμα του περισπερμίου συχνά σχετίζεται με το χρώμα του άνθους.

Το σχήμα του σπόρου είναι σφαιρικό, ωοειδές, ελλειπτικό, επίμηκες ή νεφροειδές. Το μέγεθος των σπόρων των διαφόρων ποικιλιών κυμαίνεται σε ευρύτατα όρια από 170 έως 1000 g/1000 σπόρους. Γενικά το μέγεθος έχει αυξηθεί με τη βελτίωση, σε σχέση με τους αρχέγονους τύπους (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

#### Βοτανική περιγραφή του είδους *P. coccineus* L.

Τα μεγαλόσπερμα φασόλια γίγαντες και ελέφαντες ανήκουν στο είδος *Phaseolus coccineus* L. καλλιεργούνται ως “ξερά φασόλια” παραδοσιακά σε διάφορες περιοχές της χώρας μας αλλά κυρίως στη Δυτική Μακεδονία (Καστοριά, Φλώρινα, Πρέσπες). Τα φασόλια γίγαντες και ελέφαντες διαφέρουν από το κοινό φασόλι τόσο μορφολογικά όσο και σε κλιματικές απαιτήσεις.

Έχουν ρίζα κονδυλώδη με υπόγειο φύτρωμα όπου οι κοτυληδόνες παραμένουν στο έδαφος σε αντίθεση με το κοινό φασόλι. Αυτό σημαίνει ότι υπό ευνοϊκές συνθήκες, επιμηκύνεται πρώτιστα το ριζίδιο του προς βαθύτερα εδαφικά στρώματα και έπειτα ακολουθεί η ανάπτυξη του επικοτυλίου. Το υποκοτύλιο δεν αναπτύσσεται με αποτέλεσμα οι κοτύλες να μένουν στο σημείο που τοποθετήθηκε ο σπόρος. Στην περίπτωση που το επίγειο τμήμα του φυτού καταστραφεί, υπάρχουν βοηθητικοί οφθαλμοί στο υπόγειο τμήμα του, που είναι σε θέση να δώσουν νέο φυτό (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).



Είναι αναρριχώμενο είδος με λεπτό βλαστό, το οποίο φθάνει σε ύψος τα 3m, ενώ η περιέλιξη των βλαστών στα υποστηρίγματα είναι αντίθετη από τη φορά των δεικτών του ρολογιού όπως φαίνεται όταν κοιτάζουμε από την κορυφή προς τη βάση των φυτών. (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Εμφανίζουν παρατεταμένη αύξηση και ανθοφορία. Τα άνθη είναι μεγάλα και φέρονται πολλά μαζί σε ένα μακρύ ανθικό άξονα (> 20 cm). Τα φύλλα και τα άνθη είναι μεγαλύτερα σε σχέση με το κοινό φασόλι. Το χρώμα των ανθέων είναι πορφυρό, λευκό ή σπανιότερα δίχρωμο. Οι ποικιλίες με πορφυρά μεγάλα άνθη χρησιμοποιούνται περισσότερο ως καλλωπιστικά φυτά και λιγότερο για την παραγωγή σπόρου, ενώ οι ποικιλίες με λευκά άνθη αποκλειστικά για παραγωγή ξερών φασολιών (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005). Οι σπόροι των γιγάντων έχουν βάρος 1000 σπόρων που κυμαίνεται από 1.200 μέχρι 1.800 g, ενώ οι σπόροι των ελεφάντων είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος, με βάρος 1.000 σπόρων πάνω από 1.800 g.



*Εικόνα 1.4: Σύγκριση φυταρίου P.vulgaris L. (αριστερά) και P.coccineus L. (δεξιά)*

#### Καλλιεργητικές απαιτήσεις

Το κοινό φασόλι προσαρμόζεται σε ποικίλα περιβάλλοντα στις τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές όλων των ηπείρων. Οι αποδόσεις είναι κατά κανόνα μεγαλύτερες στην

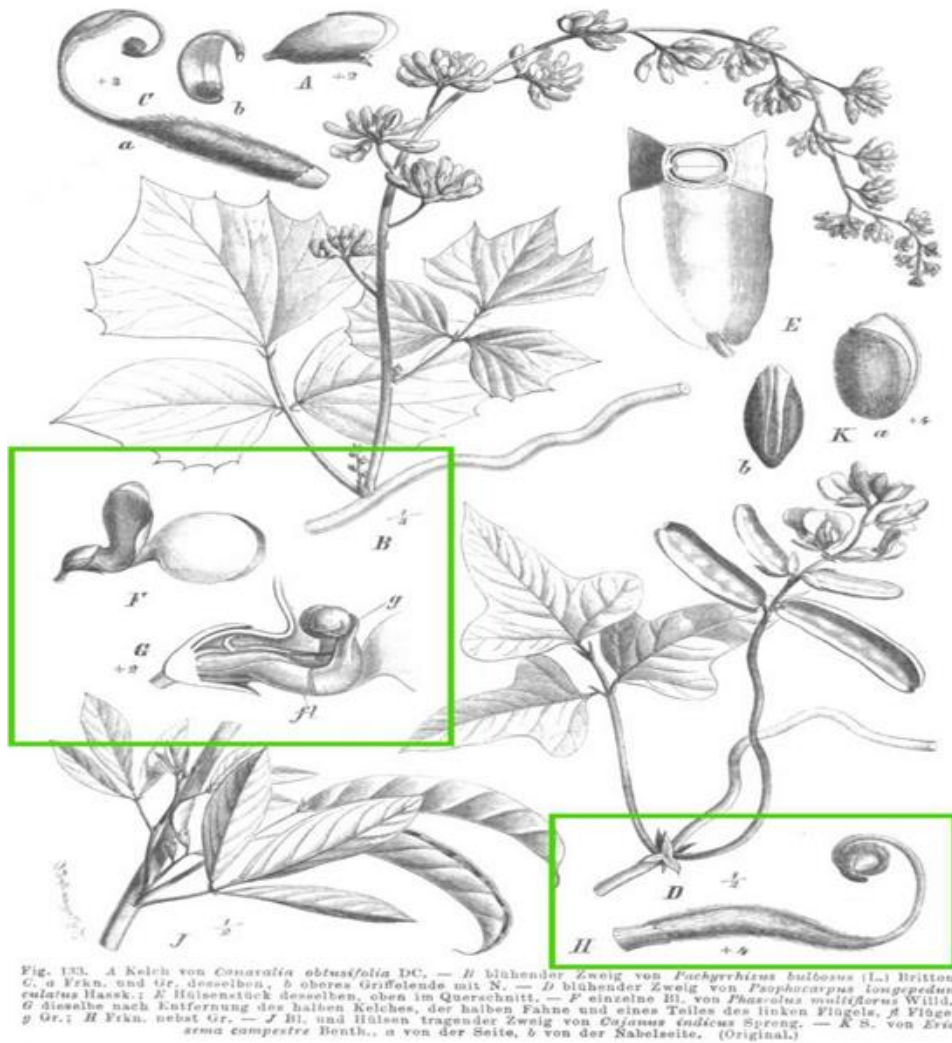
εύκρατη ζώνη, σε σχέση με την τροπική, αλλά σε αυτές καλλιεργείται μόνο κατά τη θερμή περίοδο του έτους.

Η άνθηση των σπόρων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις χαμηλές θερμοκρασίες, παρ' όλο που παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών. Η καλύτερη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 14-24°C. Τα φυτά είναι ιδιαίτερα ευπαθή στον παγετό σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους. Οι ιστοί νεκρώνονται όταν εκτίθενται στους 0°C ακόμα και για μικρή διάρκεια. Η μεγάλη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας καθυστερεί την αναπαραγωγική ανάπτυξη, ανεξάρτητα από τη μέση θερμοκρασία. Είναι φυτό απαιτητικό σε ένταση φωτός και ηλιοφάνεια και γι' αυτό χαρακτηρίζεται ως ηλιόφιλο. Ανέχεται όμως και συννεφιασμένο καιρό (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Χρειάζεται 300-400mm νερού για την ολοκλήρωση του βιολογικού του κύκλου, με ομοιόμορφη εδαφική υγρασία καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του. Παρ' όλες τις απαιτήσεις του, το 60% περίπου της παραγωγής στις αναπτυσσόμενες χώρες γίνεται κάτω από συνθήκες έλλειψης νερού. Η ξηρασία επιταχύνει την άνθηση και το γέμισμα του σπόρου, καθυστερεί όμως την εμφάνιση των φύλλων, με αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή. Η υπερβολική εδαφική υγρασία είναι εξίσου επιζήμια με τη μεγάλη ξηρασία. Για την κανονική ανάπτυξη είναι απαραίτητος ο καλός αερισμός του εδάφους και τα φυτά υφίστανται ζημιές όταν υποστούν κατάκλυση με νερό για περισσότερες από 12 ώρες (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Αναπτύσσεται σε ποικιλία εδαφών από αμμώδη έως αργιλώδη, αρκεί να εξασφαλίζεται καλή στράγγιση, αερισμός και ικανοποιητική υγρασία για την ανάπτυξή του. Επιθυμητό pH 5,2-6,8. Δεν συνιστώνται εδάφη πλούσια σε ασβέστιο και θεωρείται ευαίσθητο στην αλατότητα του εδάφους (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).

Το πολυανθές φασόλι, αν και δεν είναι ανθεκτικό στον παγετό, αναπτύσσεται καλύτερα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες 12-22°C σε σύγκριση με το κοινό φασόλι και δεν καλλιεργείται συνήθως στις τροπικές περιοχές. Επίσης αντέχει σε υψηλότερη βροχόπτωση υπό την προϋπόθεση καλής στράγγισης του εδάφους. Γενικά θεωρείται ηλιόφιλο φυτό αν και ανέχεται και ομιχλώδη καιρό (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2005).



Εικόνα 1.5: Βοτανικά χαρακτηριστικά του πολυανθούς φασολιού (*P.coccineus*)

### Χημική και διατροφική σύσταση

Η πλειοψηφία των θρεπτικών συστατικών στα ξηρά φασόλια βρίσκεται κυρίως στις κοτυληδόνες και αποτελεί το 90% της συνολικής διατροφικής αξίας του οσπρίου. Συνήθως, τα ξηρά φασόλια παρέχουν 1255-1464kj ενέργειας ανά 100g ξηρών σπόρων. Το μεγαλύτερο τμήμα των συστατικών των κοτυληδόνων είναι πρωτεΐνες και υδατάνθρακες που αντιστοιχούν στο 15-25% και 50-75% του συνολικού βάρους του σπόρου. Το υπόλοιπο αποτελείται από λίπη, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, φυτικές ίνες και βιταμίνες. Συνήθως, τα ξηρά φασόλια έχουν περιεκτικότητα σε λίπη και λιπαρά οξέα λιγότερο από 3% κατά βάρος. Αν και τα περισσότερα μεταλλικά στοιχεία βρίσκονται στις κοτυληδόνες, κάποια (όπως ο σίδηρος και το ασβέστιο)

μπορεί να υπάρχουν και στον φλοιό του σπόρου σε μεγάλες ποσότητες.

Τα ξηρά φασόλια δεν περιέχουν μόνο σημαντικές ποσότητες θρεπτικών συστατικών, αλλά επίσης πολλά άλλα συστατικά, που ονομάζονται αντιτροφικά: αναστολείς ενζύμων όπως η θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, αμυλάσες, λεκτίνες, φαινολικά συστατικά όπως οι ταννίνες, τοξικά αμινοξέα όπως η μιμοσίνη (mimosine) και το ντζενκολικό οξύ (djnkolic acid), κυανογενικούς γλυκοζίτες που παράγουν υδροκυάνιο (HCN), ολιγοσακχαρίτες όπως η ραφινόζη και η σταχυόζη που ευθύνονται για τη δημιουργία αερίων και πρηξίματος στο πεπτικό σύστημα (στομάχι-έντερο). Επειδή αυτά τα συστατικά είναι συνήθως παρόντα σε μικρές ποσότητες (λιγότερο από 5% του συνολικού βάρους του σπόρου), δεν αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για την υγεία υπό κανονικές συνθήκες

Η χημική σύσταση των ξηρών φασολιών επηρεάζεται από την ίδια την ποικιλία, τη γεωγραφική περιοχή, στην οποία καλλιεργείται, αλλά και από την αλληλεπίδραση ποικιλίας και τοποθεσίας (Z. Baramprama & R. E. Simard, 1993). Επίσης ήπιες θερμοκρασίες και μεγάλες βροχοπτώσεις αποδίδουν σπόρους με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε άμυλο, αμυλόζη και σακχαρόζη και χαμηλότερες σε πρωτεΐνες.

Το φασόλι γίγαντας έχει λίγο χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τέφρα σε σχέση με το κοινό φασόλι (Grela and Gunter, 1995). Γενικά θεωρείται ότι το μέγεθος του σπόρου έχει αντίστροφη σχέση με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (Prolla et al, 2010).

## A. Πρωτεϊνική σύσταση

Οι πρωτεΐνες των ξηρών φασολιών μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: τις αποθηκευτικές και τις μεταβολικές. Οι αποθηκευτικές δεν έχουν καταλυτικές ιδιότητες, ούτε παίζουν δομικό ρόλο στον ιστό των κοτυληδόνων. Αποθηκεύονται στα παρεγχυματικά κύτταρα των κοτυληδόνων σε ειδικά οργανίδια τα οποία περιβάλλονται από μεμβράνη και παραμένουν αμετάβλητες κατά την ωρίμανση των σπόρων. Προορισμός τους είναι η παροχή, μεταβολικής ενέργειας και αμινοξέων στο αναπτυσσόμενο φυτάριο κατά το φύτεμα. Είναι αδιάλυτες στο νερό αλλά διαλυτές σε αραιά αλατούχα διαλύματα. Οι δε μεταβολικές είναι υδατοδιαλυτές και έχουν καταλυτικές ιδιότητες (Παπακώστα –Τασοπούλου, 2005).

Μία αρχική ταξινόμηση που προτάθηκε από τον Osborne βασίστηκε στη διαλυτότητα των πρωτεϊνών σε μια σειρά διαλυτών και οδήγησε στο διαχωρισμό δύο πρωτεϊνικών κλασμάτων: τις αλβουμίνες και τις γλοβουλίνες αντίστοιχα. Οι γλοβουλίνες είναι αποκλειστικά αποθηκευτικές πρωτεΐνες ενώ το κλάσμα των αλβουμινών περιέχει τόσο αποθηκευτικές όσο

και μεταβολικές πρωτεΐνες. (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004).

### Γλοβουλίνες

Οι γλοβουλίνες ταξινομούνται ανάλογα με το συντελεστή καθίζησής τους σε 7S και 11S. Ανάλογα με την ποικιλία των φασολιών, η σχετική αναλογία των δύο τύπων πρωτεϊνών μπορεί να διαφέρει σημαντικά (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004).

Στα φασόλια οι 7S γλοβουλίνες αποτελούν τις κύριες αποθηκευτικές πρωτεΐνες και αποτελούν το 40-60% του συνόλου των πρωτεϊνών. Οι τρεις κύριοι τύποι 7S πρωτεϊνών που έχουν αναγνωριστεί, καθορίζονται βιοχημικά και χαρακτηρίζονται είναι: (1) Φασεολίνη, (2) Λεκτίνη, και (3) Αρκελίνη σε άγρια φασόλια από την πόλη Αρσέλια του Μεξικού. Όλες οι 7S γλοβουλίνες είναι γλυκοζυλιωμένες και περιέχουν κυρίως D-μαννόζη και D-γλυκοζαμίνη. (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004)

### Αλβουμίνες

Οι αλβουμίνες αποτελούν την άλλη σημαντική ομάδα πρωτεϊνών στα φασόλια και συγκριτικά με τις γλοβουλίνες εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε θειούχα αμινοξέα και κυρίως σε κυστεΐνη. Η περιεκτικότητά τους κυμαίνεται συνήθως από 10-30% των συνολικών πρωτεϊνών και εξαρτάται από την ποικιλία του φυτού. (J Boye et al, 2010).

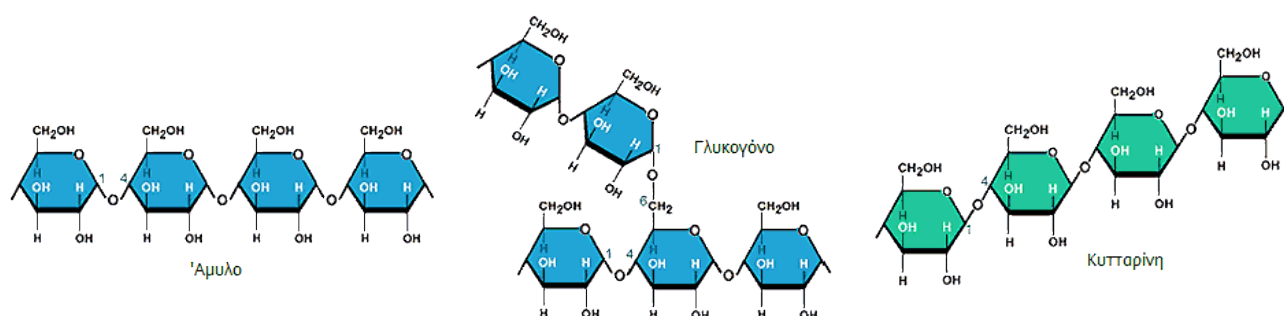
### B. Υδατάνθρακες

Οι συνολικοί υδατάνθρακες στα φασόλια αποτελούν το 50-70% του βάρους του ξηρού οσπρίου και περιλαμβάνουν μόνο-, δι- και ολιγοσακχαρίτες, άμυλο και άλλους πολυσακχαρίτες. Το άμυλο είναι το μεγαλύτερο σε αφθονία θρεπτικό συστατικό στα φασόλια, φτάνοντας το 70-80% επί του συνόλου των υδατανθράκων. Οι φυτικές ίνες αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνες (δεν είναι υδατάνθρακες), καθώς και από άλλους μη-αμυλώδεις πολυσακχαρίτες (πχ., πηκτίνες). Η υποχοληστερολαιμική επίδραση των ξηρών φασολιών οφείλεται κατά μέρος στην ύπαρξη μη αμυλωδών πολυσακχαριτών.

Το άμυλο αποτελείται από μίγμα δύο πολυσακχαριτών: την αμυλόζη, που είναι ένα μόριο με γραμμική αλυσίδα, και την αμυλοπηκτίνη, που εμφανίζει πολλές διακλαδώσεις. Η συγκέντρωση της αμυλοπηκτίνης διαφοροποιείται ανάλογα με την περιοχή που καλλιεργείται αλλά δεν φαίνεται να εξαρτάται από την ποικιλία των φασολιών (Florez et al, 2009).

Το άμυλο των ξερών φασολιών (ιδιαίτερα των μαγειρεμένων) παρουσιάζει πεπτικότητα συγκρίσιμη με αυτή πολλών δημητριακών στον άνθρωπο. Επειδή η πέψη του αμύλου γίνεται αργά, είναι υπογλυκαιμική και συνεπώς χρήσιμη στη διατροφή των διαβητικών (S. K. Sathe

and M. Venkatachalam, 2004; R. N. Chibbar et al, 2004).



Εικόνα 1.6: Πολυσακχαριτες και αμυλο

### Γ. Βιταμίνες και Μέταλλα

Τα φασόλια του γένους *Phaseolus* είναι καλές πηγές των βιταμινών του συμπλέγματος Β, ιδιαίτερα της θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, νιασίνης και φολασίνης. Συνήθως, η περιεκτικότητα των παραπάνω βιταμινών αντίστοιχα κυμαίνεται σε 0,5-1,14, 0,1-0,25, 0,4-3,14 και 0,037-0,676 mg/100g ξηρού σπόρου. Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη Ε κυμαίνεται από 0,72 έως 1,97mg/100g ενώ η Β<sub>6</sub> κυμαίνεται από 0,2-0,659mg/100g. Τα φασόλια δεν είναι καλές πηγές βιταμινών Α και C.

Τα φασόλια είναι εξαιρετικές πηγές διάφορων μετάλλων και ιχνοστοιχείων όπως Ca, Fe, Cu, Zn, P, K και Mg. Συνήθως τα ωμά ξηρά φασόλια περιέχουν 70-260, 0,5-1,40, 3,34-13,5, 160-320, 1,0-2,1, 380-570, 1320-1780, 4,0-21,0 και 1,9-6,5 mg/100g ξηρού φασολιού σε Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, Zn αντίστοιχα. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο και η υψηλή σε κάλιο τα καθιστά επιθυμητό στοιχείο στην ανθρώπινη διατροφή, ιδιαίτερα για ανθρώπους με προβλήματα υψηλής αρτηριακής πίεσης. (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004)

Πίνακας 1.1: Περιεκτικότητα φασολιών σε βιταμίνες και ιχνοστοιχεία

Βιταμίνη/Ιχνοστοιχείο	Περιεκτικότητα mg/100g ξηρού σπόρου
Θειασίνη	0,5-1,4
Ριβοφλαβίνη	0,1-0,25
Φολασίνη	0,4-3,14
Βιταμίνη Ε	0,72-1,97
Βιταμίνη Β <sub>6</sub>	0,2-0,659
Ca	70-260

Cu	0,5-1,40
Fe	3,34-13,5
Mg	160-320
Mn	1,0-2,1
P	380-570
K	1320-1780
Na	4,0-21,0
Zn	1,9-6,5

#### Δ. Λιπίδια

Τα φασόλια περιέχουν 1- 3% λιπίδια (κατά βάρος) ανάλογα με το είδος. Τα ουδέτερα λιπίδια (30-50% επί του συνόλου) και τα φωσφολιπίδια (25- 35% επί του συνόλου) είναι τα κύρια συστατικά. Έπονται τα γλυκολιπίδια τα οποία αποτελούν μέχρι το 10% του συνόλου των λιπιδίων. Ανεξάρτητα από την ποικιλία, τα λιπίδια των φασολιών περιέχουν κυρίως λινολαϊκό, λινολενικό, παλμιτικό και ελαϊκό οξύ. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα συνήθως αντιπροσωπεύουν το 55- 87% και 12-28% του συνόλου των λιπιδίων. (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004; Campos-Vega et al., 2010)

#### Ε. Φυτοστερόλες

Οι πιο κοινές φυτοστερόλες στα όσπρια είναι η β-σιτοστερόλη, η καμπεστερόλη, και η στιγμαστερόλη. Εμφανίζονται επίσης με τη μορφή των γλυκοζιδίων της στερόλης και εστεροποιημένα γλυκοζίδια στερόλης, με β-σιτοστερόλη. Οι φυτοστερόλες θεωρούνται υπεύθυνες για τη μείωση της χοληστερόλης στο αίμα. (R. Campos-Vega, 2010).

#### Στ. Αντιτροφικοί παράγοντες

Στα όσπρια γενικότερα περιέχονται μία σειρά από βιοδραστικές ουσίες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των οργανισμών και οι οποίες επηρεάζουν την απορρόφηση άλλων ουσιών (όπως των πρωτεϊνών) ή εκδηλώνουν τοξικότητα. Οι ουσίες που εμφανίζουν τέτοιες ιδιότητες ονομάζονται αντιτροφικοί παράγοντες και μπορούν να διαφοροποιούνται – ποιοτικά και ποσοτικά- ανάλογα με την ποικιλία, τις κλιματικές συνθήκες, την τοποθεσία. (A.F.B. Van der Poel, 1990) Στους αντιτροφικούς παράγοντες συγκαταλέγονται οι αναστολείς των πρωτεϊνών και της αμυλάσης, οι λεκτίνες, οι τανίνες και πολυφαινόλες, κάποιοι ολιγοσακχαρίτες και τα άλατα του φυτικού οξέος (S. K. Sathe and M. Venkatachalam,

2004).

#### Φυτικό οξύ και άλατα του φυτικού οξέος

Το φυτικό οξύ (μυο-ινοσιτόλη ή εξαφωσφορική InsP6), είναι η κύρια πηγή του φωσφόρου στα ξηρά φασόλια. Τα άλατα φυτικού του οξέος ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η επιδιόρθωση του DNA, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η ενδοκυττάρωση, τη λειτουργία του πυρηνικού αγγελιοφόρου m-RNA κ.α. (R. Campos-Vega, 2010).

Τα άλατα του φυτικού οξέος μπορούν να σχηματίζουν σύμπλοκα με μέταλλα, πρωτεΐνες και το άμυλο μειώνοντας τη διατροφική αξία του οσπρίου. Είναι σταθερά στη θερμότητα και δεν καταστρέφονται εύκολα κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. Μειώνονται μετά από βράσιμο κατά 50% έως 80%. Η ποσότητα του φυτικού οξέος στα φασόλια κυμαίνονται από 0,6% έως 2,1% (κατά βάρος) του συνολικού βάρους των ξηρών σπόρων. (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004).

Πέραν των αντιτροφικών τους ιδιοτήτων, θεωρούνται ότι έχουν και θετικές επιδράσεις, όπως η αντικαρκινική δράση τους και η προστασία που παρέχουν από καρδιακά νοσήματα ή διαβήτη (R. Campos-Vega, 2010).

#### Ταννίνες

Οι σημαντικότερες πολυφαινολικές ενώσεις των οσπρίων είναι κυρίως οι ταννίνες, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Τα όσπρια με την υψηλότερη περιεκτικότητα πολυφαινολικών είναι όσα έχουν έντονες χρωστικές (R. Campos-Vega 2010).

Οι ταννίνες (κυρίως οι συμπυκνωμένες ταννίνες) είναι θερμοσταθερές ενώσεις και ανιχνεύονται σε ποσοστό έως 2% του συνολικού βάρους. Απαντώνται στους έγχρωμους σπόρους, ενώ απουσιάζουν στους λευκούς. Λόγω του ιοντικού τους χαρακτήρα τους, μπορούν να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και να επηρεάζουν αρνητικά τη διατροφική βιοδιαθεσιμότητά τους. Επίσης αλληλεπιδρούν με ένζυμα, επηρεάζοντας τη δραστηριότητά τους. Οι ταννίνες πιστεύεται ότι προσφέρουν προστασία στο φυτό από έντομα και παράσιτα. Δεν καταστρέφονται εύκολα κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. (S. K. Sathe and M. Venkatachalam, 2004).

Αν και οι ταννίνες ταξινομούνται στις αντιτροφικές ουσίες, γενικά οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (R. Campos-Vega 2010).

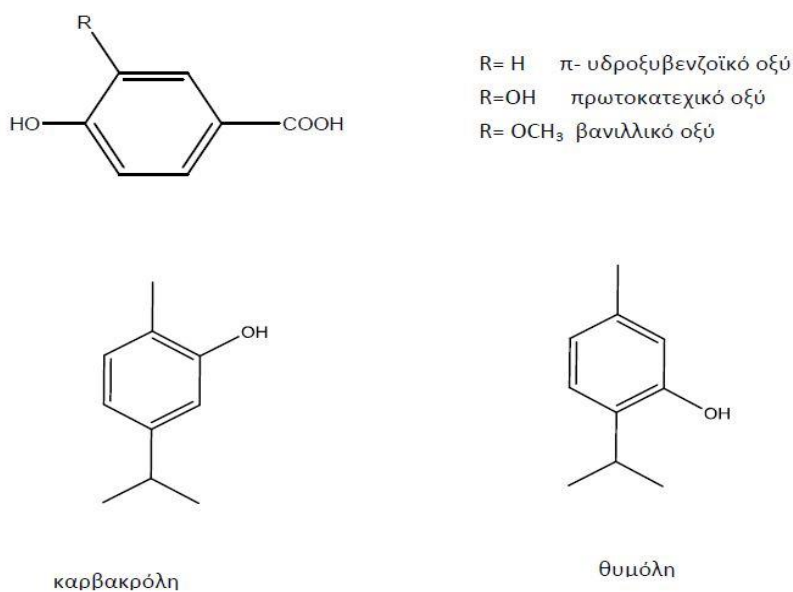
#### 1.2.4 Φαινολικά συστατικά των οσπρίων *Phaseolus Vulgaris* L. και *Phaseolus Coccineus* L.



## Γενικά για τα φαινολικά

Με τον όρο φαινολικά ή φαινολικές ενώσεις, στον κλάδο των φυσικών προϊόντων, εννοούμε έναν μεγάλο αριθμό παραγώγων του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών που έχουν στο μόριό τους ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολικών ενώσεων που απαντούν στα φυτά είναι:

- α) απλές μονοκυκλικές φαινόλες και φαινολικά οξέα
- β) φαινυλοπροπανοειδή
- γ) φαινολικές κινόνες
- δ) 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
- ε) πολυμερείς φαινολικές ενώσεις, όπως οι λιγνίνες, οι μελανίνες και οι ταννίνες.



*Εικόνα 1.7: απλές φαινόλες 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 οξείδωση κατά τη διάρκεια της απομόνωσης, οπότε χάνεται εύκολα η φαινολική παρουσία.

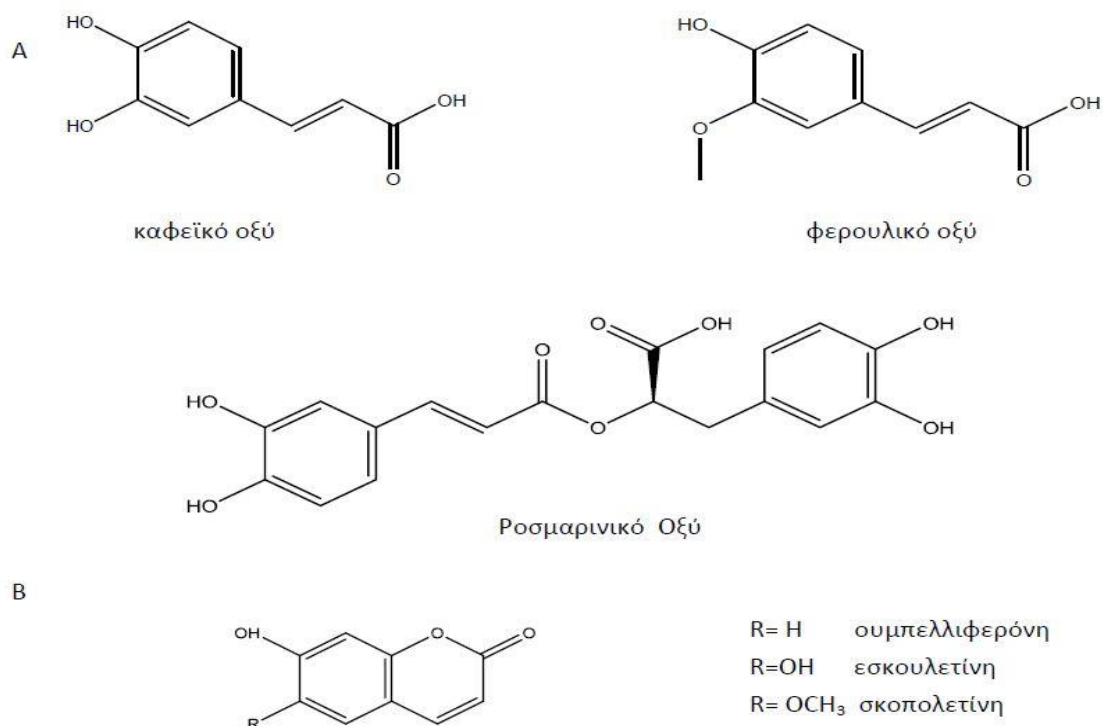
#### Φαινυλοπροπανοειδή

Η τάξη αυτή των φαινολικών φυσικών ενώσεων, εξίσου σημαντική με την προηγούμενη, 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-υδροξυκιναμωμικών οξέων.
- ❖ Τα φαινυλοπροπένια

Τα ύδροξυκιναμωμικά 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.



*Εικόνα 1.8: υδροξυκινναμικά οξέα (A) και παράγωγά τους (B)*

### Σημασία των Φαινολικών Συστατικών στη 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 του διαβήτη, της παχυσαρκίας, του καρκίνου του εντέρου και εντερικών και σπλαχνικών διαταραχών.

### Φαινολικά στο φασόλι

Τα φασόλια έχουν κερδίσει την διάκριση ότι είναι μία τροφή καλή για την υγεία, το οποίο βασίζεται και στην περιεκτικότητά τους σε φαινολικά, πράγμα το οποίο οδήγησε σε άνοδο της παραγωγής και της κατανάλωσής τους. Από την άλλη, αυτό δημιούργησε το πρόσθετο ενδιαφέρον για τους επιστήμονες να αναπτύξουν κατάλληλες μεθόδους και συστήματα για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών των φασολιών.

Τα διάφορα φαινολικά οξέα προκύπτουν με διάφορες μορφές στα φυτικά υποστρώματα: ελεύθερα φαινολικά οξέα, εστέρες, γλυκοζίτες, διάφορα άλλα συμπλέγματα. Αυτές οι διαφορετικές μορφές των φαινολικών έχουν σαν αποτέλεσμα την ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων που ανταποκρίνονται στην εκχύλισή τους. Ειδικά για τα φασόλια, περισσότερο από το 95% των φαινολικών τους συστατικών βρίσκονται σε διάφορες μορφές.

Συνήθως, η διαδικασία εκχύλισης ακολουθεί πολλά βήματα στα οποία απελευθερώνει τα φαινολικά οξέα από τις διάφορες μορφές στις οποίες βρίσκονται μέσα στο φυτικό υπόστρωμα. Τα συμπλεγμένα φαινολικά οξέα συνήθως απελευθερώνονται χρησιμοποιώντας αλκαλική, όξινη υδρόλυση ή και τις δύο. Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν την ενζυματική κατάλυση.

#### 1.2.5 Μέθοδοι Διαχωρισμού και Μελέτης Φαινολικών Συστατικών

##### A. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound Assisted Extraction)

Υπέρηχοι είναι τα ακουστικά κύματα τα οποία διαδίδονται με συχνότητα πάνω από 16 kHz και τα οποία δεν προκαλούν το αίσθημα της ακοής στο ανθρώπινο αυτί. Το ανώτατο όριο δεν καθορίζεται αυστηρά. Είναι της τάξης των 5MHz όταν η διάδοση γίνεται μέσα σε αέρια και 500MHz όταν η διάδοση γίνεται στα υγρά και στερεά. Η διάδοση των κυμάτων γίνεται με διαδοχικά πυκνώματα και αραιώματα. Παράγονται είτε από ειδικές ακίδες είτε από λουτρά

υπερήχων.

Οι υπέρηχοι εκτός των άλλων εφαρμογών (π.χ. στη μέτρηση αποστάσεων, ιατρική) χρησιμοποιούνται και στη Χημεία δημιουργώντας τον κλάδο της υπερηχοχημείας (sonochemistry).

Οι εφαρμογές των υπερήχων στη Χημεία έχουν ξεκινήσει από το 1940. Οι πρώτες εφαρμογές των υπερήχων έγιναν στον κλάδο της μεταλλουργίας όπως και στον καθαρισμό εργαστηριακών οργάνων. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν στη χημική σύνθεση (οργανική, οργανομεταλλική και ανόργανη) και στη χημεία των πολυμερών (σύνθεση και αποικοδόμησή τους).

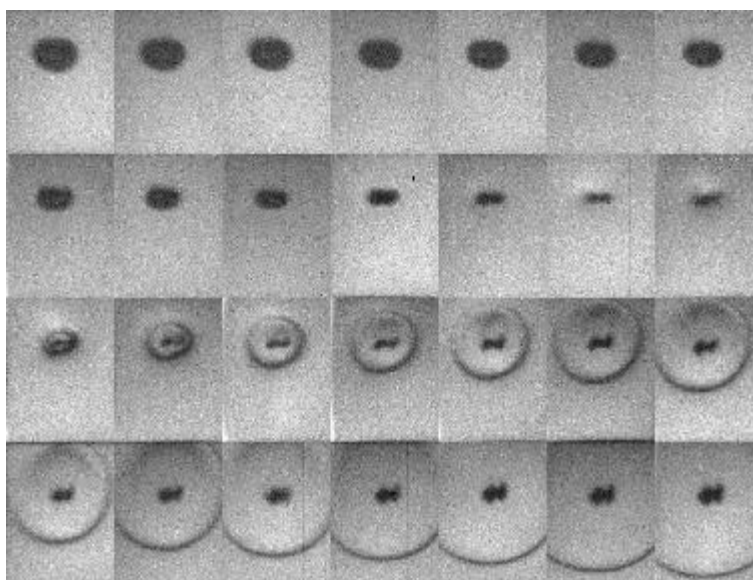
### Τρόπος δράσης κατά την εκχύλιση

Με τη βοήθεια του εναλλασσομένου ηλεκτρικού ρεύματος η ηχητική πηγή διεγείρεται, δηλαδή ταλαντώνεται με κάποια συχνότητα. Η κινητική ενέργεια της ταλάντωσης μεταφέρεται στα γειτονικά μόρια του υλικού με τα οποία έρχεται σε επαφή η πηγή. Στην παρούσα εργασία το υλικό είναι υγρό. Στην περίπτωση αυτή τα μόρια του υλικού αυτού μέσου αρχίζουν να ταλαντώνονται. Με τον τρόπο αυτό διαδίδεται το ηχητικό κύμα του οποίου η διεύθυνση διάδοσης είναι ίδια με τη διεύθυνση ταλάντωσης των μορίων του υλικού μέσου. Η ταλάντωση των μορίων οδηγεί στο σχηματισμό διαδοχικών πυκνωμάτων, μείωση των αποστάσεων μεταξύ των μορίων, και αραιωμάτων, αύξηση των αποστάσεων.

Κατά την ταλάντωση ενός μορίου, όσο η απομάκρυνσή του από τη θέση ισορροπίας αυξάνει, αυξάνει και η δύναμη επαναφοράς και επομένως η δύναμη που το απομακρύνει από τη θέση ισορροπίας μειώνεται και μηδενίζεται όταν το μόριο του υγρού αποκτήσει απομάκρυνση όσο είναι το πλάτος της ταλάντωσης. Η δύναμη που ασκείται σε μια στοιχειώδη επιφάνεια του υγρού και τείνει να απομακρύνει μια στοιχειώδη μάζα υγρού από τη θέση ισορροπίας προς το εμβάδόν της επιφάνειας αυτής λέγεται ακουστική πίεση ( $P_a$ ) και προκαλεί μεταβολή στην πίεση του υγρού. Η εξίσωση της ακουστικής πίεσης είναι:  $P_a = P_A \cdot \sin 2\pi f t$ , όπου  $f$  η συχνότητα του ηχητικού κύματος. Αποκτά μέγιστη τιμή όταν η απομάκρυνση των μορίων από τη θέση ισορροπίας γίνει ελάχιστη και αντιστρόφως.

Εξαιτίας του φαινομένου έχουμε μεταβολή της πίεσης του υγρού. Επομένως σε ένα αραιώμα η πίεση είναι ίση με  $P_h - P_a$ , όπου  $P_h$  η υδροστατική πίεση. Εάν σε ένα αραιώμα η  $P_a$  είναι αρκετά μεγάλη τότε οι διαμοριακές έλξεις μπορούν να υπερνικηθούν και οι αποστάσεις μεταξύ των μορίων του υγρού να υπερβούν μια κρίσιμη τιμή ( $R$ ). Τότε δημιουργούνται στο υγρό φυσαλίδες. Όσο μάλιστα αυξάνει η  $P_a$  το μέγεθος των φυσαλίδων

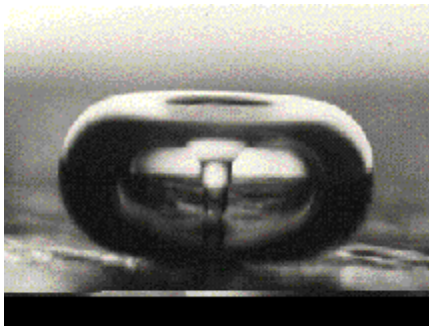
αυξάνει. Όταν όμως το αραίωμα αρχίζει να μετατρέπεται σε πύκνωμα η ολική πίεση που ασκείται στη φυσαλίδα γίνεται  $P_h + P_a$ . Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πολύ μεγάλη αύξηση της πίεσης και την κατάρρευση των φυσαλίδων αυτών (Εικόνες 1.8, 1.9).



*Εικόνα 1.9: Η διαδικασία δημιουργίας και κατάρρευσης των φυσαλίδων*

Η αναταραχή που ακολουθεί την κατάρρευση επηρεάζει πάρα πολύ όλη τη περιοχή έτσι ώστε να παρατηρείται πολύ μεγάλη διάβρωση ακόμη και σε σκληρά μέταλλα όπως το τιτάνιο. Όταν το στερεό είναι φυτικός ιστός τότε η διάβρωση στην οποία υπόκειται αφ' ενός μεν βοηθά τη διείσδυση του διαλύτη και επομένως την καλύτερη εκχύλιση αφ' ετέρου αποικοδομεί σε αρκετό βαθμό τα φυτικά πολυμερή με αποτέλεσμα την πιο εύκολη εκχύλισή τους. Όταν σαν διαλύτης χρησιμοποιείται νερό σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες  $H$ ,  $O$ ,  $OH$ ,  $O_2H$  οι οποίες βοηθούν τις οξειδώσεις. Έχει εκτιμηθεί ότι για να σχηματιστούν φυσαλίδες στο νερό απαιτείται, θεωρητικά, ακουστική πίεση περίπου 1500atm. Πειραματικά βρέθηκε ότι μπορεί να είναι και μικρότερη των 20atm. Αυτό ερμηνεύθηκε με την θεωρία των «ασθενών σημείων» που υπάρχουν μέσα στο νερό (ή γενικότερα σε ένα υγρό). Τα ασθενή αυτά σημεία οφείλονται σε μόρια αερίων τα οποία είναι διαλυμένα στο υγρό. Φαίνεται ότι τα μόρια αυτά των αερίων επειδή παρεμβάλλονται μεταξύ των μορίων του υγρού μειώνουν τις διαμοριακές έλξεις, διευκολύνοντας έτσι το σχηματισμό φυσαλίδων. Η άποψη αυτή επιβεβαιώθηκε όταν με απαέρωση του υγρού η απαιτούμενη, για τη δημιουργία φυσαλίδων, ακουστική πίεση

αυξήθηκε. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα μόρια των αερίων που είναι διαλυμένα στο υγρό δεν οφείλονται μόνον στον διαλυμένο ατμοσφαιρικό αέρα αλλά και σε ατμούς του ίδιου του υγρού.

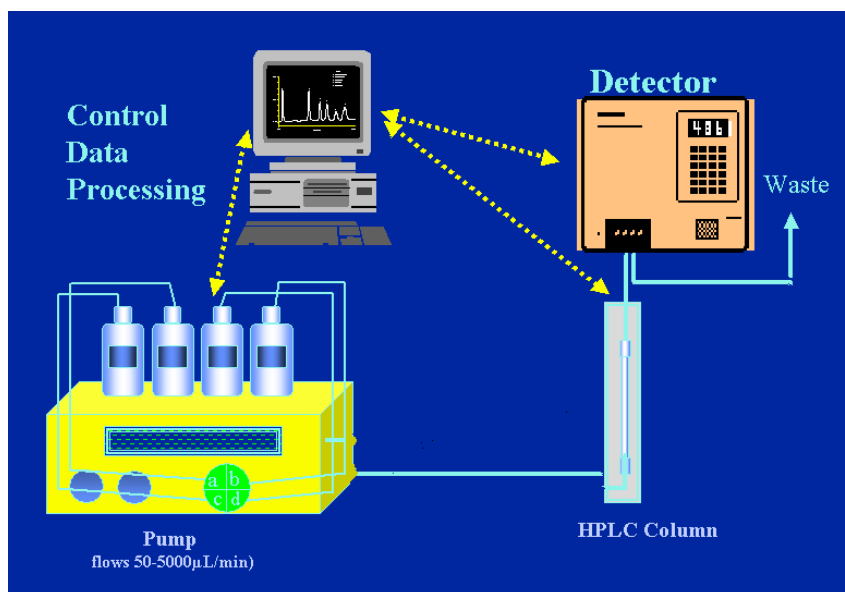


*Εικόνα 1.10: Φυσαλίδα κατά τη διάρκεια της κατάρρευσης*

Όμως τα μόρια των διαλυμένων αερίων δρουν και με έναν επιπλέον τρόπο, όταν μέσα στο υγρό βρεθεί ένα στερεό. Ορισμένα από τα μόρια των αερίων παγιδεύονται σε κοιλότητες ή σε χαραμάδες του στερεού. Όταν η ακουστική πίεση ασκηθεί επάνω τους με κατεύθυνση προς το στερεό, τότε δημιουργείται μία φυσαλίδα παγιδεύοντας μέσα μόρια αερίου, η οποία όταν η ακουστική πίεση αλλάξει κατεύθυνση γίνεται σφαιρική. Όσο αυξάνει η ακουστική πίεση η επιφάνεια επαφής της φυσαλίδας με το στερεό μειώνεται. Όταν η ακουστική πίεση αποκτήσει μια κρίσιμη τιμή η φυσαλίδα αποκόπτεται από την επιφάνεια του στερεού. Η κρίσιμη αυτή τιμή όταν πρόκειται για νερό είναι ίση με 1,78atm. Οι φυσαλίδες που δημιουργούνται μέσα σε ένα υγρό μπορεί να είναι κενές ή γεμάτες από αέρια συστατικά. (Παππάς, 2000)

#### B. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (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 1.11: Σχεδιάγραμμα μιας συσκευής HPLC*

## Οργανολογία

Μία συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

α. 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 (2μm 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 έκλυση (isocratic elution), ενώ όταν χρησιμοποιούνται δύο ή τρία συστήματα διαλυτών που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα έχουμε βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution).

β. Συστήματα άντλησης: η αντλία είναι υψηλής πίεσης (14-6000psi) 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 0,1-10mL/min και χωρίς παλμούς ροής.

γ. Σύστημα Έγχυσης Δείγματος: ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής η χωρητικότητα της οποίας κυμαίνεται από 1-500μL. 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 μεταβλητό όγκο έως 500μL, στον οποίο μπορούν να εισαχθούν δείγματα σε πιέσεις μέχρι και 7000psi με επαναληψιμότητα μερικών δεκάτων %.

δ. Στήλη: το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξειδωτος χάλυβας. Το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης είναι 2-3mm και το συνηθέστερο μήκος είναι γύρω στα 25-30cm. Η εσωτερική διάμετρος της στήλης είναι 4-10mm και το μέγεθος του υλικού πλήρωσης συνήθως διαμέτρου 5-10 μm. 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 εκλούνται τελευταίες από τη στήλη και β) ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

ε. Ανιχνευτής: ο πιο συνηθισμένος 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 – 600nm. Υπάρχουν τρεις τύποι του ανιχνευτή UV-Vis:

1. Ανιχνευτής σταθερού μήκους κύματος
2. Ανιχνευτής πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος
3. Ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (Diode Array Detector – DAD), ο οποίος και βοηθάει στη διαπίστωση της “καθαρότητας” μίας χρωματογραφικής

κορυφής, γιατί είναι δυνατό να πάρουμε πληροφορίες από μία πλήρη σάρωση μίας ευρείας περιοχής συχνοτήτων.

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

### Γ. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy FT-IR)

#### Γενικά στοιχεία για την υπέρυθρη φασματοσκοπία

Η φασματοσκοπία είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φως, ραδιοκύματα, ακτίνες x, κλπ.) με την ύλη. Τα άτομα, που αποτελούνται από ηλεκτρικά φορτισμένους πυρήνες και ηλεκτρόνια, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ταλαντευόμενο ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο του φωτός και απορροφούν την ενέργεια που μεταφέρει. Ένα άτομο/μόριο διεγείρεται μόνο από φωτόνια ενέργειας ίσης με την διαφορά ενέργειας μεταξύ της διεγερμένης και της ουδέτερης κατάστασης.

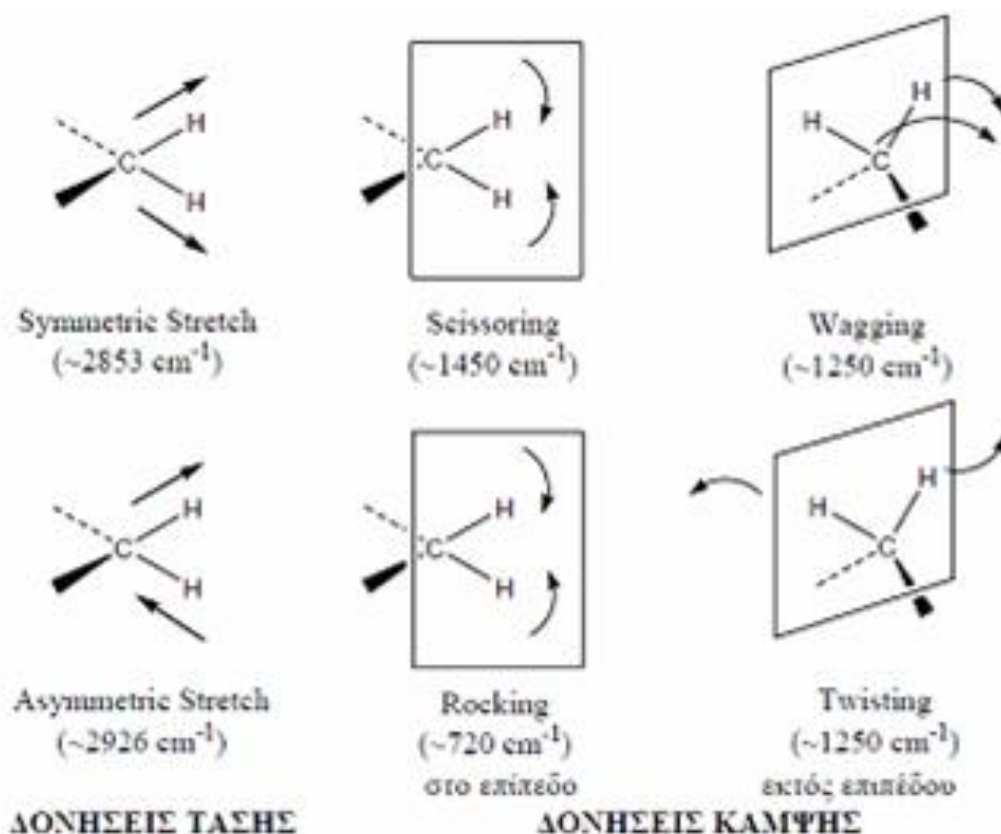
Ένα μόριο για να απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία πρέπει να υποστεί μεταβολή της διπολικής ροπής του ως αποτέλεσμα της δονητικής ή της περιστροφικής του κίνησης. Μόνο κάτω από αυτές τις συνθήκες το εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας μπορεί να αλληλεπιδράσει με το μόριο και να προκαλέσει αλλαγές στο μέγεθος κάποιας από τις κινήσεις του. Η διπολική ροπή καθορίζεται από την τιμή της διαφοράς φορτίου και την απόσταση μεταξύ δύο φορτισμένων κέντρων. Κατά συνέπεια, μόρια στα οποία η κατανομή φορτίου είναι ασύμμετρη εμφανίζουν απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας, κάτι όμως που δεν ισχύει για μόρια με συμμετρική κατανομή φορτίου. Ένα μόριο θα απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία μόνο εφόσον η διπολική ροπή του μορίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης (κατά μέγεθος ή κατεύθυνση). Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση.

Στην περιοχή υπέρυθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (IR) συμβαίνουν απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις τάσης ή κάμψεις των δεσμών μορίων με μόνιμη διπολική ροπή, που μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου και απορροφούν ισχυρά. Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται

(rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring) (Εικόνα 1.12).

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR) βασίζεται στην μέτρηση του μήκους κύματος και την ένταση της απορρόφησης του υπεριώδους φωτός που διέρχεται από ένα δείγμα. Κάθε λειτουργική ομάδα ή χαρακτηριστική δομή ενός μορίου έχει μία μοναδική συχνότητα δόνησης, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των λειτουργικών ομάδων στο δείγμα.

Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας εκτείνεται από την περιοχή του ορατού μέχρι τα μικροκύματα 0,75 – 1000 $\mu\text{m}$ . Οι διεγέρσεις δονήσεων και παραμορφώσεων βρίσκονται στην περιοχή 2,5 -16 $\mu\text{m}$ . Στην πράξη λαμβάνονται φάσματα στην περιοχή 2,5 -25  $\mu\text{m}$  ή 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  που είναι και η θεμελιώδης περιοχή του υπέρυθρου. Χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: Άπω υπέρυθη (Far IR, FIR) (50-1000 $\mu\text{m}$ ) , μέσο υπέρυθη (Mid IR, MIR) (2,5-50 $\mu\text{m}$ ) και εγγύς υπέρυθη (Near IR, NIR) (0,75-2,5 $\mu\text{m}$ ). Συνήθως όμως στο IR αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού ( $\nu$ ) ο οποίος ορίζεται σαν το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός.



Εικόνα 1.12: Δονήσεις τασής και καμψής απο απορροφηση ακτινοβολίας IR

#### Φασματοφωτόμετρα Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας

Ένα φασματομέτρο IR αποτελείται από τρία βασικά συστατικά: α) την πηγή

ακτινοβολίας, β) τον μονοχρωμάτορα και γ) τον ανιχνευτή.

Πηγή ακτινοβολίας:

Μία συνήθης πηγή ακτινοβολίας αποτελείται από ένα αδρανές στερεό που θερμαίνεται ηλεκτρικά σε 1000 έως 1800°C. Τέτοια υλικά είναι ο πυρρακτωτής Nernst (κατασκευάζεται από οξειδία σπανίων γαιών), η πηγή Globar (κατασκευάζεται από καρβίδιο του πυριτίου), και το σπείραμα nichrom (Ni-Cr), μεταξύ άλλων. Όλες οι πηγές παράγουν συνεχή ακτινοβολία σε όλη την υπέρυθη περιοχή, αλλά με διαφορετικά ενεργειακά προφίλ ακτινοβολίας.

Μονοχρωμάτορας:

Ο μονοχρωμάτορας είναι μια συσκευή που χρησιμοποιείται για να αναλύσει ένα ευρύ φάσμα της ακτινοβολίας σε ξεχωριστές λωρίδες φωτός με διαφορετικό (και σαφώς προσδιορισμένο) μήκος κύματος. Αποτελείται από ένα σύστημα λεπτών σχισμών καθρεπτών, γυάλινων πρισμάτων και του φράγματος περίθλασης.

Ανιχνευτής:

Ο ανιχνευτής (detector) είναι το τμήμα του φασματοφωτομέτρου που δέχεται τη δέσμη μετά το φράγμα περίθλασης και “ανιχνεύει” ποσοτικά το ποσοστό της απορροφούμενης ακτινοβολίας από το δείγμα της ουσίας. Τα σημερινά φασματοφωτόμετρα IR χρησιμοποιούν θερμικούς ανιχνευτές, δηλαδή η ακτινοβολία μετατρέπεται σε θερμική ενέργεια και η μεταβολή της θερμοκρασίας μετριέται με ένα θερμοστοιχείο ή με το στοιχείο Golay.

#### Φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier

Η φασματοσκοπία IR χρησιμοποιείται κυρίως στην περιοχή 4000-650cm<sup>-1</sup>, 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 και
- 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 - υπέρυθρου. 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 (HeNe). 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:

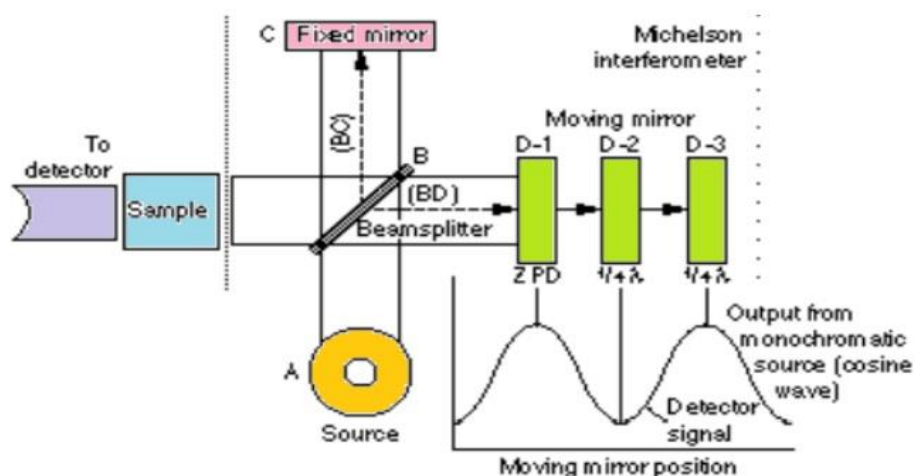
Οι δύο πιο δημοφιλείς ανιχνευτές για ένα φασματόμετρο FTIR είναι ο DTGS (κατασκευασμένος από δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη) και ο MCT (τελλουριούχος υδραργύρου-καδμίου). Ο ανιχνευτής DTGS είναι ένας πυροηλεκτρικός ανιχνευτής που παρέχει ταχεία ανταπόκριση επειδή μετρά τις μεταβολές στη θερμοκρασία και 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.

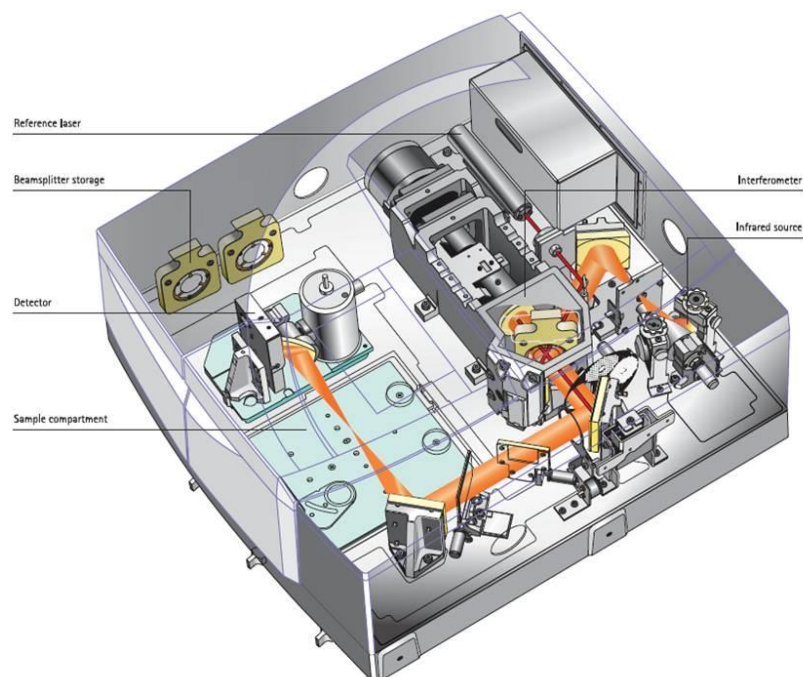
Η πολυχρωματική IR ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης B (beam splitter), ο οποίος είναι φτιαγμένος από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr. Εκεί το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται και πέφτει στον καθρέφτη D (moving mirror), ενώ το υπόλοιπο 50% περνά από το διαχωριστή και «χτυπάει» στον καθρέφτη C (fixed mirror). Ο διαχωριστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 45ο, 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.



**Εικόνα 1.13 : Συμβολόμετρο Michelson**

Στην περίπτωση μονοχρωματικής δέσμης φωτός, που εκπέμπεται από την πηγή και συνενώνεται στην πλάκα B υπόκειται σε θετική ή αρνητική συμβολή ανάλογα με τις

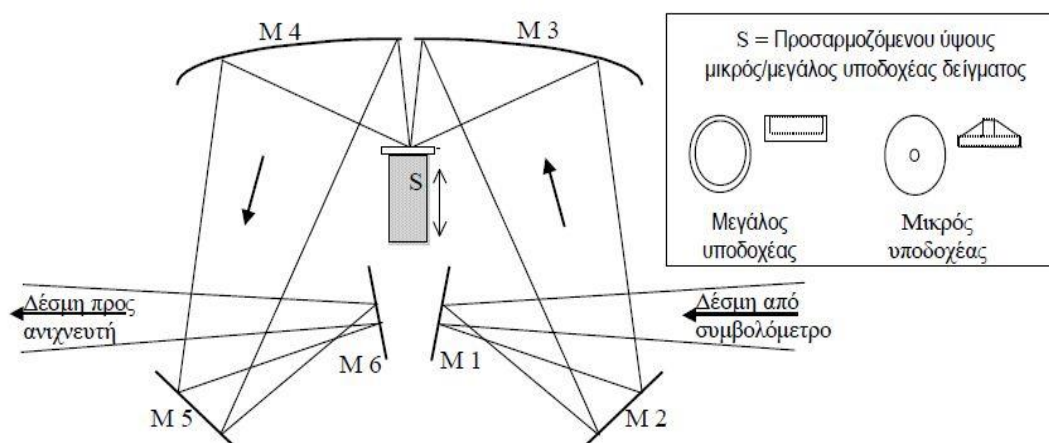
αποστάσεις του από τους καθρέπτες C και D. Εάν οι αποστάσεις αυτές είναι ίσες ή διαφέρουν κατά ένα ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της μονοχρωματικής δέσμης, τότε δημιουργείται θετική συμβολή που δίνει μια δέσμη φωτός μεγάλης έντασης. Εάν όμως οι αποστάσεις της B από τους C και D είναι πολλαπλάσιοι κατά  $(\kappa+1/2)$ , όπου  $\kappa$ -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 ( $\nu_1, \nu_2, \dots$  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.



*Εικόνα 1.14: Σχεδιαγράμμα φασματοφωτόμετρου FT-IR με περιγραφή των κυριων μερων (απο δεξια προς τα αριστερα: συμβολομετρο, πηγη IR, θαλαμος δειγματος, ανιχνευτης, λειζερ αναφορας)*

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

Η τεχνική διάχυτης ανάκλασης χρησιμοποιείται κυρίως για την απόκτηση φασμάτων IR από στερεά δείγματα με την μορφή σκόνης ή από τραχιά στερεή επιφάνεια όπως ο άνθρακας, το χαρτί, και το ύφασμα. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος. Το εξάρτημα αυτό διαθέτει 6 κάτοπτρα (Εικόνα ). 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 1.15 : 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.

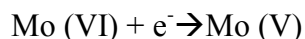
Ο υποδοχέας του δείγματος ρυθμίζεται κατά μήκος και κατά ύψος. Με τον τρόπο αυτό μεταβάλλεται η γωνία πρόσπτωσης και βελτιστοποιείται η εστίαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα. Αυτό επιβεβαιώνεται από τη μεγιστοποίηση του σήματος IR στην οθόνη του υπολογιστή.

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 βρωμιούχο κάλιο ή χλωριούχο κάλιο. Όταν εξετάζονται μίγματα, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην ομογενοποίησή τους.

#### Δ. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών (ΟΦΣ) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξειδωση 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 ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) και φωσφοβολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) 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  $(PMoW_{11}O_{40})^4$ , 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 725nm και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ουσίες εκφράζονται σε ισοδύναμα οξέος, συνήθως γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

#### Ε. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τις μεθόδους DPPH και ABTS

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).

Πίνακας 1.2: In Vitro Αντιοξειδωτικές Μέθοδοι Προσδιορισμού

HAT - αντιδράσεις	ORAC (ικανότητα απορρόφησης ρίζας Οξυγόνου) TRAP (συνολική ικανότητα παγίδευσης ρίζας) Μέθοδος λεύκανσης κροκινών
ET – αντιδράσεις	TEAC (ισοδύναμα Trolox) DPPH Folin - Ciocalteu

(Huang *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2009; Dudonne *et al.*, 2009)

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:

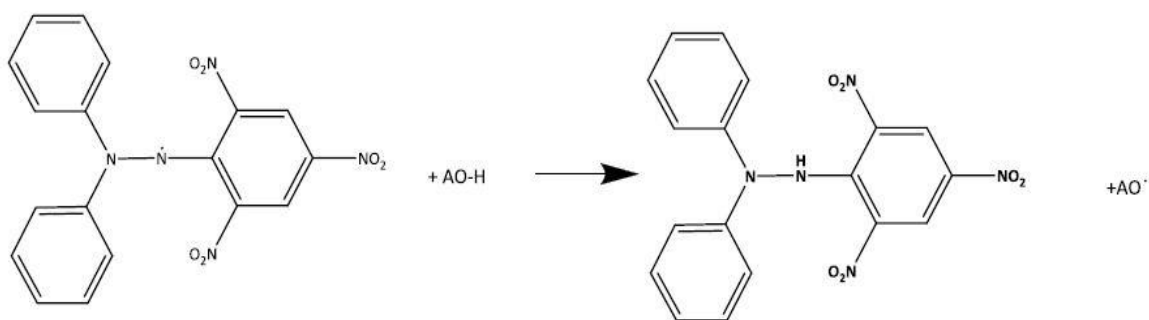
- Μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays – ET)
- Μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen

## 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).

## Μέθοδος του του διφαινυλοπικρυλυδραζιλίου – DPPH·

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μίας ουσίας. Το DPPH· είναι μία σταθερή ρίζα, το οργανικό διάλυμα του οποίου παρουσιάζει έντονο ιώδες χρώμα. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να αποχρωματίζουν το διάλυμα του διφαινυλοπικρυλυδραζιλίου (Εικόνα 1.15).



*Εικόνα 1.16 : Μηχανισμός δράσης του DPPH*

Το DPPH· σύμφωνα 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)

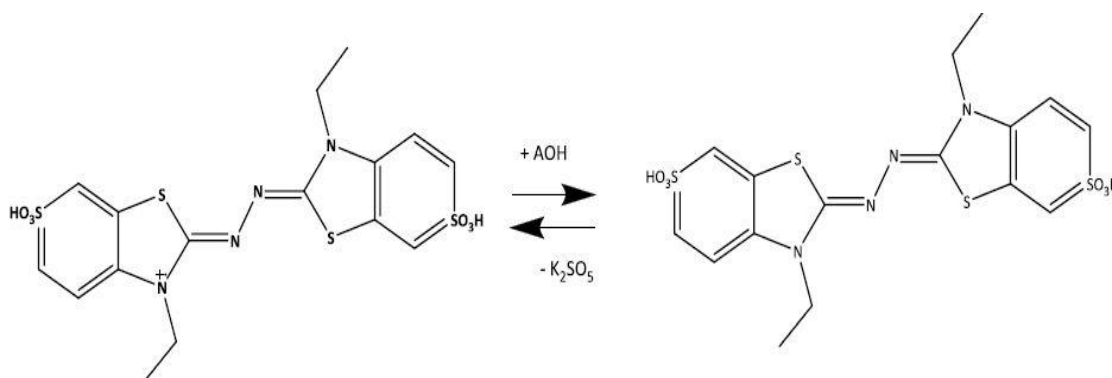


Μελέτες έδειξαν ότι στις αντιδράσεις των κινναμικών οξέων και των εστέρων τους με

το DPPH σε μεθανόλη και αιθανόλη υπερτερεί ο μηχανισμός ET-αντίδρασης που γίνεται αρκετά γρήγορα, ενώ η HAT αντίδραση γίνεται πολύ αργά. Σε πολικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη, το νερό, τα μόρια των φαινολικών ενώσεων σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη. Αποτέλεσμα αυτού είναι να μπορούν να αντιδράσουν αυτές σύμφωνα με το μηχανισμό μεταφοράς H στην ελεύθερη ρίζα (Foti *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005).

#### Μέθοδος του 2,2'-αζινοδι-(3-αιθυλβενζοδιαζολινο)-6-σουλφονικού οξέος 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 Re *et al.*, (1999). Στη βελτιωμένη έκδοσή της, το οξειδωτικό, το ριζικό κατιόν  $ABTS^+$  παράγεται από την οξείδωση του  $ABTS^{2-}$  με υπερθειικά ιόντα. Η ρίζα του κατιόντος  $ABTS^+$  έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα, η οποία αποχρωματίζεται παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών, σύμφωνα με την (Εικόνα 1.16)



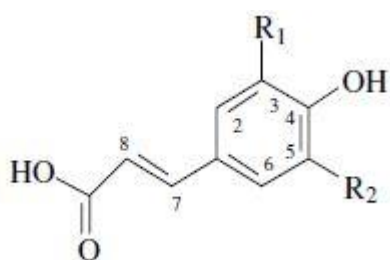
**Εικόνα 1.17 : Μηχανισμός δράσης του ABTS**

#### Σχέση δομής και αντιοξειδωτικής δράσης

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από το χημικό τύπο και πώς είναι κατανομημένες οι χαρακτηριστικές ομάδες (-OH) στο μόριο. Οι απλές φαινολικές ενώσεις έχουν μικρότερη δράση έναντι των πολυμερών φαινολών σε μεθόδους που παγιδεύουν τις ελεύθερες ρίζες (Moore *et al.*, 2001).

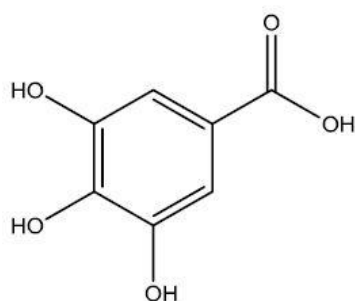
Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων σε σχέση με τη δραστική καρβοξυλομάδα (Rice-

Evans *et al.*, 1996, Robards *et al.*, 1999). Τα μόνο-ύδροξυ υποκατεστημένα βενζοϊκά οξέα με την υδροξυλομάδα (-OH) σε όρθο- ή πάρα- θέση σε σχέση με την καρβοξυλομάδα (-COOH) δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα, κάτι που δεν συμβαίνει όταν ο υποκαταστάτης είναι σε μέτα- θέση (Rice-Evans *et al.*, 1996). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων αυξάνεται όσο αυξάνεται ο βαθμός υδροξυλίωσης. Έτσι, το γαλλικό οξύ με τα 3 -OH παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με τα υπόλοιπα φαινολικά οξέα. Επιπλέον, η παρουσία της ομάδας CH=CH-COOH στα υδροξυκινναμικά οξέα προσδίδει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την παρουσία μόνο του καρβοξυλίου στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Rice-Evans *et al.*, 1996). Από τα υδροξυκινναμικά οξέα, το καφεϊκό έχει καλύτερη δράση από το φερούλικό και αυτό από το π-κουμαρικό οξύ.

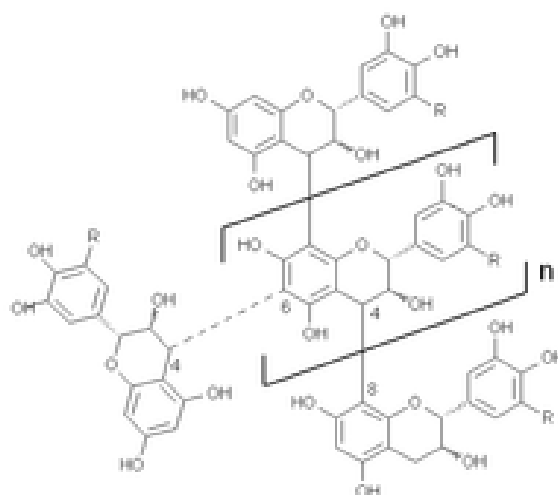


### Trans-Hydroxycinnamic acids

*p*-Coumaric acid: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H  
 Ferulic acid: R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=H  
 Sinapic acid: R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>=OMe



*Εικόνα 1.18: παραδειγματα τριων ταξεων φαινολικων (Υδροξυκινναμικα οξεα αριστερα), φαινολικά οξεα (γαλλικό οξύ κατω αριστερα) και συμπυκνωμενες ταννινες (κατω)*



## ΣΤ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η απομόνωση, μελέτη και σύγκριση μεταξύ των φαινολικών συστατικών δύο γενών φασολιών, του κοινού φασολιού *Phaseolus Vulgaris L.* και του φασολιού γίγαντα *Phaseolus Coccineus L.*

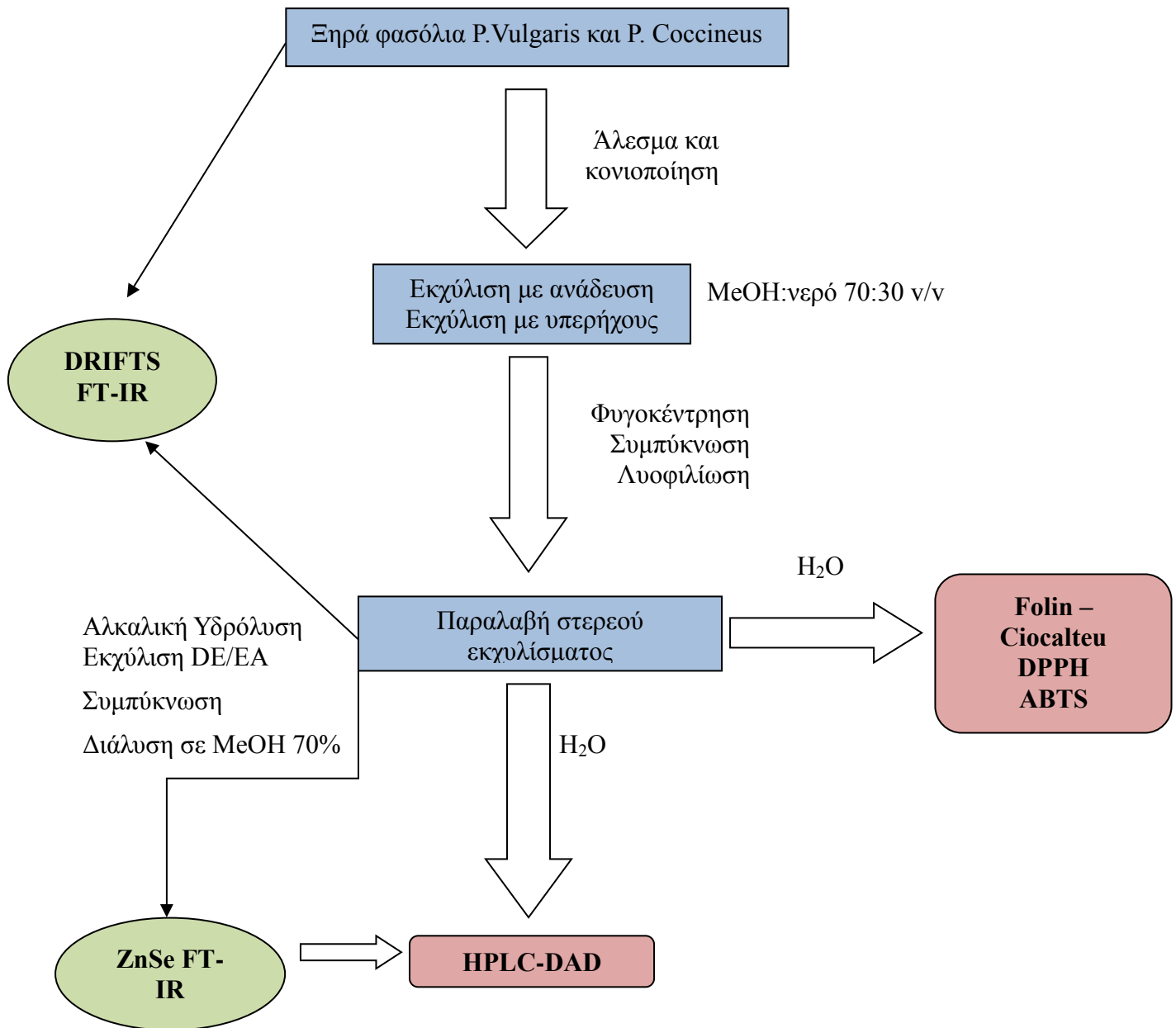
Η μελέτη των εν λόγω φαινολικών συστατικών που απομονώθηκαν από τα παραπάνω είδη οσπρίων με δύο διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης: α) εκχύλιση με απλή ανάδευση και β) εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, έγινε με φασματομετρία απορρόφησης υπερύθρου, με τη μέθοδο της διάχυτης ανάκλασης με μετασχηματισμό Fourier (DRIFTS) και με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Συστάδας Φωτοδιόδων (HPLC-DAD) με σύγκριση με τα δεδομένα που λήφθηκαν από αντίστοιχες πρότυπες φαινολικές ουσίες.

Περαιτέρω, μελετήθηκε ποσοτικά η περιεκτικότητα σε Ολικά Φαινολικά Συστατικά με τη φωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu, η αντιριζική και αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων φασολιών με τις μεθόδους DPPH και ABTS.

Συλλέγοντας τα παραπάνω στοιχεία, έγινε επίσης κατορθωτό να διακρίνουμε πιο από τα δύο γένη φασολιών είναι πλουσιότερο σε φαινολικά, εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση, αλλά και ποια από τις δύο μεθόδους εκχύλισης δίνει καλύτερα αποτελέσματα για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από το φυτικό υπόστρωμα.

**2**

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ -  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



*ΕΙΚΟΝΑ 2.1: Οργανόγραμμα της Μελέτης*



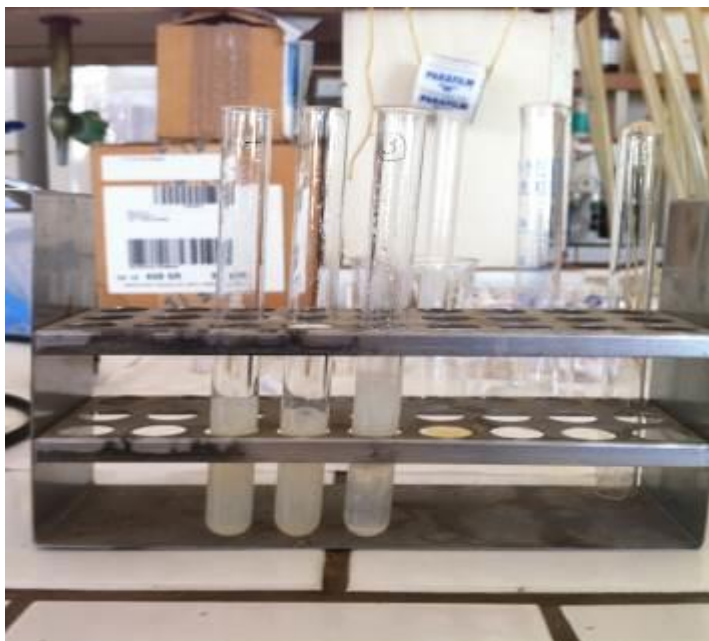
## 2.1 Κατεργασία Φυτικού Υλικού

### *Κονιοποίηση*

Επαρκής ποσότητα ξηρών οσπρίων δύο ποικιλιών, Αρχαίων Φενεού (*Phaseolus vulgaris L.*) και Γιγάντων Φενεού (*Phaseolus coccineus L.*), από την περιοχή του Φενεού αλέστηκαν σε εμπορικό μπλέντερ και στη συνέχεια κονιοποιήθηκαν σε σφαιρόμυλο για 15 λεπτά.

### *Εκχύλιση με μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου*

5g, επακριβώς ζυγισμένα, από τις δύο ποικιλίες ξηρών φασολιών τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη 250ml. Σαν μέσο εκχύλισης επιλέχθηκε διάλυμα μεθανόλης (MeOH) σε νερό περιεκτικότητας 70% v/v (Sutivisedsak, Cheng, Willet, Lesch, Tangsrud, Biswas, 2010). Το φυτικό υλικό εκχυλίστηκε με 100mL διαλύτη υπό μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) για 15min. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα. Τα εκχυλίσματα εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν για 10min στα 10.000g και θερμοκρασία 0°C σε φυγόκεντρο μοντέλο 3K18 της εταιρίας SIGMA, τα υπερκείμενα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα παραλήφθηκαν με πιπέτα Pasteur και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.



*Εικόνα 2.2: δοκιμαστικοί σωλήνες μετά το Vortex και πριν φυγοκεντρηθούν, κατά την αλκαλική υδρόλυση*

### *Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους*

5g, επακριβώς ζυγισμένα, από τις δύο ποικιλίες ξερών φασολιών τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη 250ml. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε εντός λουτρού υπερήχων της εταιρίας Sonorex μοντέλο super RK 255H συχνότητας 35kHz, θερμοστατημένο στους  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Το φυτικό υλικό εκχυλίστηκε με 100mL MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30 v/v για 15min. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα. Τα εκχυλίσματα εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 10.000g και θερμοκρασία  $0^{\circ}\text{C}$  σε φυγόκεντρο μοντέλο 3K18 της εταιρίας SIGMA, τα υπερκείμενα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα παραλήφθηκαν με πιπέτα Pasteur και αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

### *Συμπύκνωση και λυοφιλίωση*

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή υπό κενό μοντέλο RVO 400 SD BOECO με αντλία κενού LVS ILMVAC μέχρι πλήρους εξάτμισης της MeOH. Στη συνέχεια το υδατικό εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε ειδικές φιάλες λυοφιλίωσης που αφού ψύχθηκαν στους  $4^{\circ}\text{C}$  για μικρό χρονικό διάστημα, τοποθετήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 24h. Τα εκχυλίσματα λυοφιλιώθηκαν σε συσκευή Virtis 25 EL Freemobile, όπου μετά το πέρας 48h παραλάβαμε το στερεό εκχύλισμα. Το στερεό εκχύλισμα ζυγίστηκε και αποθηκεύτηκε σε ξηραντήρα μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

### *Αλκαλική υδρόλυση*

160,0mg των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων τοποθετήθηκαν σε εσφυρισμένες κωνικές φιάλες. Προστέθηκαν 5mL διαλύματος NaOH 2M, και τα διαλύματα αναδεύτηκαν σε θερμοκρασία  $40-45^{\circ}\text{C}$  σε ατμόσφαιρα N<sub>2</sub> για να υδρολυθούν. Εν συνεχεία, τα διαλύματα αφέθηκαν να επιστρέψουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το αλκαλικό περιβάλλον εξουδετερώθηκε με προσθήκη 1,4mL HCl 7.2 M και τα απελευθερωμένα φαινολικά οξέα συλλέχθηκαν με 12,8 mL διαλύματος διαιθυλαιθέρα (Et<sub>2</sub>O):οξικού αιθυλεστέρα (AcOEt) 1:1 v/v. Τα διαλύματα αναδεύτηκαν σε συσκευή Vortex για 45s και φυγοκεντρήθηκαν για 10min στα 6700g σε θερμοκρασία  $0^{\circ}\text{C}$  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. Το παραληφθέν στερεό διαλυτοποιήθηκε σε 5mL MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30 v/v, διηθήθηκε με φίλτρο πορώδους Chromafil Xtra PET διατομής 45nm και διαμέτρου 25mm, καταγράφηκε το φάσμα FT-IR και αναλύθηκε σε HPLC-DAD.

## 2.2 Απόδοση σε λυοφιλωμένο στερεό των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

Δίνεται σε πίνακα η απόδοση (A%) σε στερεό μετά τη λυοφιλίωση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων φασολιών *Phaseolus Vulgaris* και *Phaseolus Coccineus* που παραλήφθηκαν με δύο διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης: με μηχανική ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασίας περιβάλλοντος και με εκχύλιση σε υπερήχους για 15 λεπτά σε θερμοκρασία  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο λυοφιλώσεων.

Ο υπολογισμός της απόδοσης A% έγινε χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$A\% = (m_{\text{λυοφ}}/m_{\text{αρχ}}) * 100\%$ , όπου  $m_{\text{λυοφ}}$  = η μάζα του εκχυλίσματος μετά τη λυοφιλίωση (g),  $m_{\text{αρχ}}$  = η αρχική μάζα ξηρού δείγματος (g)

*Πίνακας 2.1: Απόδοση λυοφιλωμένων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων*

Δείγμα	$m_{\text{αρχ}}$ (g)	$m_{\text{λυοφ}}$ (g)	A%
PV <sup>st</sup>	5	0,4866	9,73
PV <sup>us</sup>	5	0,4854	9,70
PC <sup>st</sup>	5	0,6386	12,78
PC <sup>us</sup>	5	0,6033	12,10

\*PV = *Phaseolus Vulgaris*; PC = *Phaseolus Coccineus*; st= εκχύλιση με ανάδευση; us= εκχύλιση με υπερήχους

Είναι εμφανής η διαφοροποίηση ως προς την απόδοση μεταξύ των δύο ειδών φασολιών, ενώ φαίνεται και η διάκριση μεταξύ των δύο τεχνικών εκχύλισης. Τα φασόλια γίγαντες αποδίδουν μεγαλύτερη ποσότητα σε λυοφιλωμένο στερεό, έχοντας απόδοση κοντά στο 12-13% ενώ τα κοινά φασόλια κοντά στο 9-10%. Επίσης είναι εμφανές, μεταξύ των φασολιών του ίδιου είδους, ότι η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους αυξάνει την απόδοση κατά την εκχύλιση.

Βεβαίως, πρέπει να πάρουμε υπόψη ότι το λυοφιλωμένο στερεό δεν αποτελείται μόνο από φαινολικά συστατικά. Λόγω των συνθηκών εκχύλισης, σε όλα τα δείγματα

ενυπάρχει το σύνολο των πολικών, διαλυτών σε νερό (H<sub>2</sub>O) και μεθανόλη (MeOH), ουσιών που περιλαμβάνονται στο χημικό προφίλ του φασολιού (συζευγμένα και ελεύθερα φαινολικά συστατικά, πρωτεΐνες, σάκχαρα και πολυσακχαρίτες, άμυλο κ.ο.κ).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το μέγεθος του σπέρματος είναι αντιστρόφως ανάλογο με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και ανάλογο με την περιεκτικότητα σε σάκχαρα (Prolla et al, 2010). Αυτό δικαιολογεί και την αρκετά διαφορετική εικόνα των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων των κοινών φασολιών και των φασολιών γίγαντα: χαρακτηριστικά, το λυοφιλιωμένο εκχύλισμα των κοινών φασολιών είχε τη μορφή σκόνης, ενώ των γιγάντων είχε τη μορφή σκόνης και κρυστάλλων, που οφείλονται στην κρυστάλλωση σακχάρων κατά την λυοφιλίωση.

## 2.3 Μελέτη Ολικών Φαινολικών Συστατικών – Αντιοξειδωτικής Δράσης

### *Μελέτη των Ολικών Φαινολικών Συστατικών με τη Μέθοδο Folin-Ciocalteu*

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 50mg/mL. Σε δοχείο μικροτιτλοδότησης 12 θέσεων (12-well microtiter plate) προστέθηκαν 2,4mL απιονισμένο νερό, 40μL δείγματος και 200μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και αναδεύσαμε καλά. Μετά την πάροδο 3 λεπτών προστίθενται 600μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> έτσι ώστε να δημιουργηθεί αλκαλικό περιβάλλον και να λάβει χώρα η αντίδραση. Αραιώνουμε με 760μL απιονισμένο νερό μέχρι συνολικό όγκο 4mL. Μετά από επώαση δύο ωρών στο σκοτάδι μετريέται η απορρόφηση με φωτόμετρο HACH DR/2010 ρυθμισμένο στα 725nm. Ο μηδενισμός του οργάνου γίνεται με διάλυμα που παρασκευάζεται με την ίδια διαδικασία με προσθήκη νερού αντί για προς ανάλυση δείγμα. Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν.

Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu εκφράζονται σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος. Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων καφεϊκού οξέος (0-1.0 mg/mL) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη για το καφεϊκό οξύ.

### Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH

Η φασματοφωτομετρική αυτή μέθοδος χρησιμοποιεί τη ρίζα DPPH ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστηρίου και δείγματος για 30min, στους 25° C μετράται η απορρόφηση στα 515nm. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο τύπος:

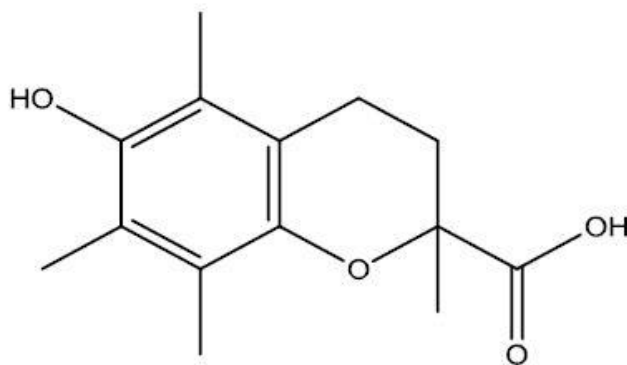
$$I\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$$

Όπου I% = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας DPPH, A<sub>0</sub> = απορρόφηση του τυφλού, A = η απορρόφηση του δείγματος.

Για την προετοιμασία του διαλύματος DPPH χρησιμοποιήθηκε διφαινυλοπικρυλυδραζίλιο της εταιρίας Sigma. Το διάλυμα του DPPH (101μM) παρασκευάζεται την ίδια μέρα διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα σε μεθανόλη (Bio-Rad, HPLC grade). Η απορρόφηση του διαλύματος είναι 1.1.

30μL από τα δείγματα προστέθηκαν σε 3mL διαλύματος DPPH. Για το τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 30mL απιονισμένου νερού, ενώ για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη. Μετά από περίοδο επώασης 30 λεπτών σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία 25° C, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515nm σε φωτόμετρο HACH DR/2010 και προσδιορίστηκε το ποσοστό της παρεμπόδισης (I%). Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα TROLOX (6-υδροξυ-2,5,7,8-



και ισχυρό αντιοξειδωτικό (Εικόνα 2.3). Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων TROLOX (0-20μM) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφουμε παραπάνω. Εν συνεχεία κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη.

*Εικόνα 2.3: Η δομή του Trolox*

### *Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του ABTS*

Μετά από επώαση αντιδραστηρίου και δείγματος για 6min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετράται η απορρόφηση στα 734nm. Για την εύρεση του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

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

Όπου I% = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας ABTS<sup>·+</sup>, A<sub>0</sub> = απορρόφηση του τυφλού, A = η απορρόφηση του δείγματος.

Διάλυμα αμμωνιακού άλατος ABTS 7mM παρασκευάζεται ζυγίζοντας ακριβώς 38,4mg σε 10 mL δις απεσταγμένο νερό. Το κατιόν ABTS<sup>·+</sup> παρασκευάζεται από την αντίδραση 7mM αμμωνιακού άλατος με 2,45mM υπερθειικού καλίου K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Η οξείδωση του ABTS αρχίζει αμέσως αλλά λόγω της στοιχειομετρικής αναλογίας 1:0,5 η απορρόφηση σταθεροποιείται μετά από 12h.

Μετά την παραμονή του διαλύματος της ρίζας για 12-16 ώρες στο σκοτάδι αυτό αραιώνεται με αιθανόλη έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι 0,700±0,005 στα 734nm σε φωτόμετρο HACH DR/2010. Ως δείγμα αναφοράς για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη.

Σε 3mL του διαλύματος προστίθενται 30μL από τα δείγματα ή νερό για το τυφλό. Αναμιγνύονται καλά και τοποθετούνται σε κλίβανο θερμοστατημένο στους 30°C. Μετά την πάροδο 6 λεπτών μετράται η απορρόφηση και υπολογίζεται το ποσοστό παρεμπόδισης της ρίζας σύμφωνα με τον τύπο.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σαν ισοδύναμα TROLOX, για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη TROLOX. Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων TROLOX (0-10μM) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως στα δείγματα.

## 2.4 Αποτελέσματα ολικών φαινολικών συστατικών – αντιοξειδωτικής δράσης

### Μελέτη των Ολικών Φαινολικών Συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

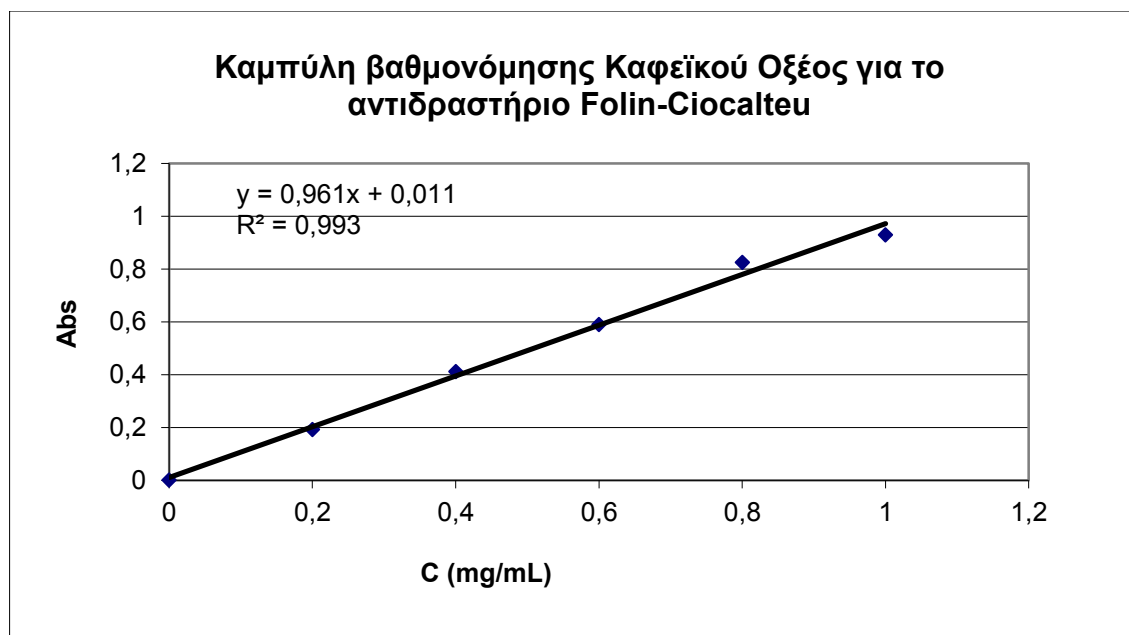
Στον Πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων φασολιών του γένους *Phaseolus Vulgaris* L και *Phaseolus Coccineus* L που παρασκευάστηκαν με δύο τρόπους: α) εκχύλιση με μεθανόλη 70% με μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και β) εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους θερμοστατημένη στους  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg καφεϊκού οξέος/g ξηρού φασολιού, που είναι η αρχική ποσότητα από την οποία ξεκινήσαμε την κατεργασία. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων, η δε τυπική τους απόκλιση (SD) δίνεται ξεχωριστά για κάθε δείγμα. Τέλος παρατίθεται η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης καφεϊκού οξέος βάσει της οποίας υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων.

*Πίνακας 2.2: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο σε mg καφεϊκού οξέος/g ξηρού φασολιού*

Δείγμα	Ισοδύναμα Καφεϊκού Οξέος $\pm$ SD (mg καφεϊκού οξέος/g ξηρού δείγματος)
PV <sup>st</sup>	3,02 $\pm$ 0,18
PV <sup>us</sup>	3,36 $\pm$ 0,16
PC <sup>st</sup>	3,56 $\pm$ 0,22
PC <sup>us</sup>	3,72 $\pm$ 0,12

\*PV = *Phaseolus Vulgaris*; PC = *Phaseolus Coccineus*; st= εκχύλιση με ανάδευση; us= εκχύλιση με υπερήχους



### Συζήτηση

Η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά, σε συσχέτιση με τα υπόλοιπα χημικά συστατικά των φασολιών, ποικίλλει βάσει του γένους, της ποικιλίας, των καλλιεργητικών και εδαφολογικών συνθηκών που επικρατούν. Ακόμη περισσότερο, τα ολικά φαινολικά συστατικά των φασολιών έχουν άμεση σχέση με τα βοτανικά χαρακτηριστικά μέσα στο γένος, ιδιαίτερα με το χρώμα των σπερμάτων. Είναι αποδεδειγμένο ότι τα έγχρωμα σπέρματα περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα λευκά φασόλια, καθώς οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, ανθοκυάνες) είναι οι βασικές χρωστικές των σπερμάτων (Oomah, Cardador-Martinez, Loarca-Piña, 2005; Ross *et al.*, 2009; Luthria *et al.*, 2005).

Η σχετική βιβλιογραφία δίνει για λευκά φασόλια, μόνο του είδους *Phaseolus Vulgaris L.*, αποτελέσματα που κυμαίνονται μεταξύ 0,4 - 3,62 mg/g (Ross *et al.*, 2009; Oomah *et al.*, 2005). Το μεγάλο εύρος τιμών έχει να κάνει με τις πολλές διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο αξιοποιούνται για τον προσδιορισμό οι μέθοδοι LC-MS και GC-MS (Ross *et al.*, 2009; Kalogeropoulos *et al.*, 2010) έναντι της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Το πρόβλημα έγκειται στο ότι ακριβώς επειδή τα φαινολικά στα όσπρια γενικά, και στα φασόλια ειδικά, είναι σε ποσοστό 90-95% συμπλεγμένα σε εστέρες, κυρίων λιπαρών οξέων, οι οποίοι προσδένονται στα κυτταρικά τοιχώματα, για να προσδιοριστούν χρωματογραφικά χρειάζεται να υποστούν υδρόλυση. Οι (Acosta-Estrada *et al.*, 2014) αναφέρουν κατά τη διάρκεια μίας



τυπικής όξινης υδρόλυσης τέτοιων υποστρωμάτων μπορεί να χαθεί έως και το 78% των φαινολικών συστατικών. Οι αλκαλικές υδρολύσεις έχουν κατά προσέγγιση αρκετά λιγότερες απώλειες σε φαινολικά συστατικά όπως επισημαίνουν οι (Ross *et al.*, 2009; Luthria *et al.*, 2005).

Μεταξύ των δύο γενών φασολιών, οι γίγαντες φαίνεται να είναι πλουσιότεροι από τα κοινά φασόλια κατά 1,5% ενώ η εκχύλιση με υπερήχους δίνει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά από την απλή ανάδευση.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεών μας αποδεικνύουν ότι τα φασόλια του γένους *Phaseolus* αποτελούν καλή πηγή φαινολικών συστατικών, εάν θεωρήσουμε ότι μία μερίδα υπολογίζεται στα 125g ξηρού σπόρου. Θεωρώντας επίσης ότι σύμφωνα με τους (Luthria, Pastor-Corrales, 2006) οι απώλειες φαινολικών συστατικών κατά το μούλιασμα των φασολιών είναι μικρότερες του 1% ενώ κατά το μαγείρεμα ανέρχονται σε 38,2% παράπανο από το μισό της ολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά περνάει μέσω της διατροφής στον καταναλωτή.

#### **Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Δράσης με τις μεθόδους DPPH. και ABTS<sup>+</sup>.**

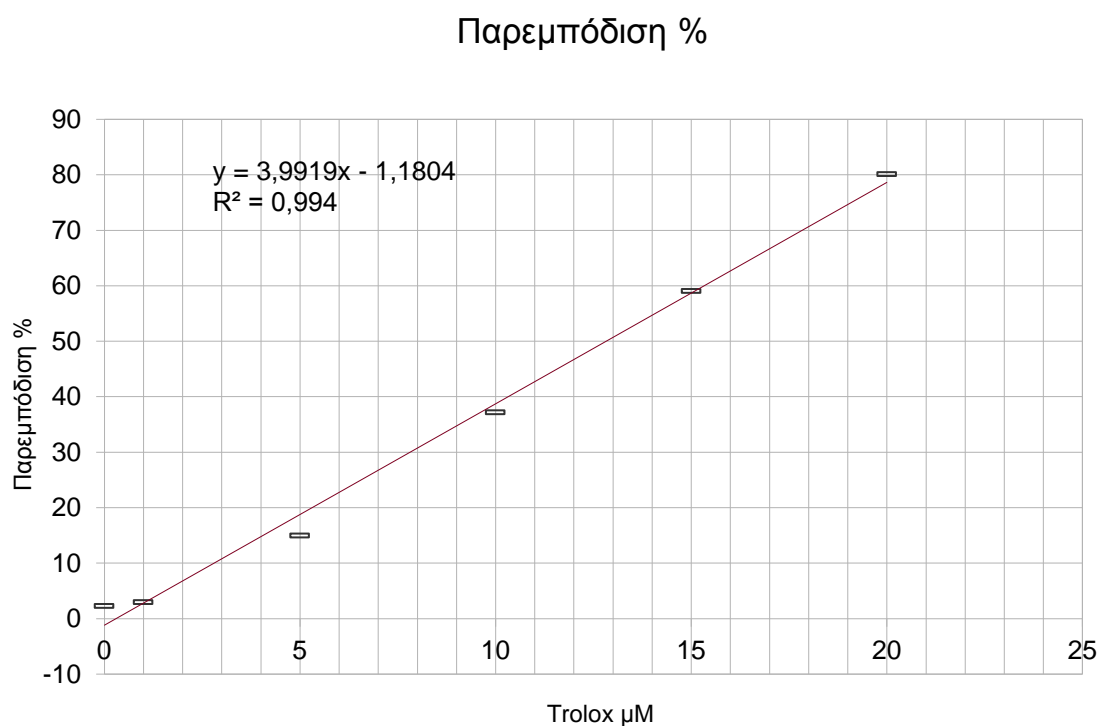
Παρουσιάζονται στην παρούσα παράγραφο τα αποτελέσματα της ικανότητας των εκχυλισμάτων των φασολιών γένους *P.vulgaris L* και *P.coccineus L* που παρασκευάστηκαν με δύο τρόπους: α) εκχύλιση με απλή ανάδευση και β) εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους να δρουν ως αντιοξειδωτικά, μελετώντας την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup> και του ελεύθερου ριζικού κατιόντος ABTS<sup>+</sup>.

Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις δύο μεθόδους προσδιορισμού τα οποία είναι εκφρασμένα σε  $\mu\text{mol Trolox/g}$  ξηρού σπόρου. Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και η αναγωγή στο Trolox έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης η οποία δίνεται παρακάτω. Από την καμπύλη προσδιορίστηκε το IC<sub>50</sub> σε  $\mu\text{mol Trolox}$  για κάθε μέθοδο.

**Πίνακας 2.3: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH**

Δείγμα	Παρεμπόδιση %	μmol Trolox/g	IC <sub>50</sub>
PV <sup>st</sup>	39,05	2,016	12,82
PV <sup>us</sup>	40,85	2,106	
PC <sup>st</sup>	47,06	2,416	
PC <sup>us</sup>	48,78	2,504	

\*PV = *Phaseolus Vulgaris*; PC = *Phaseolus Coccineus*; st= εκχύλιση με ανάδευση; us= εκχύλιση με υπερήχους



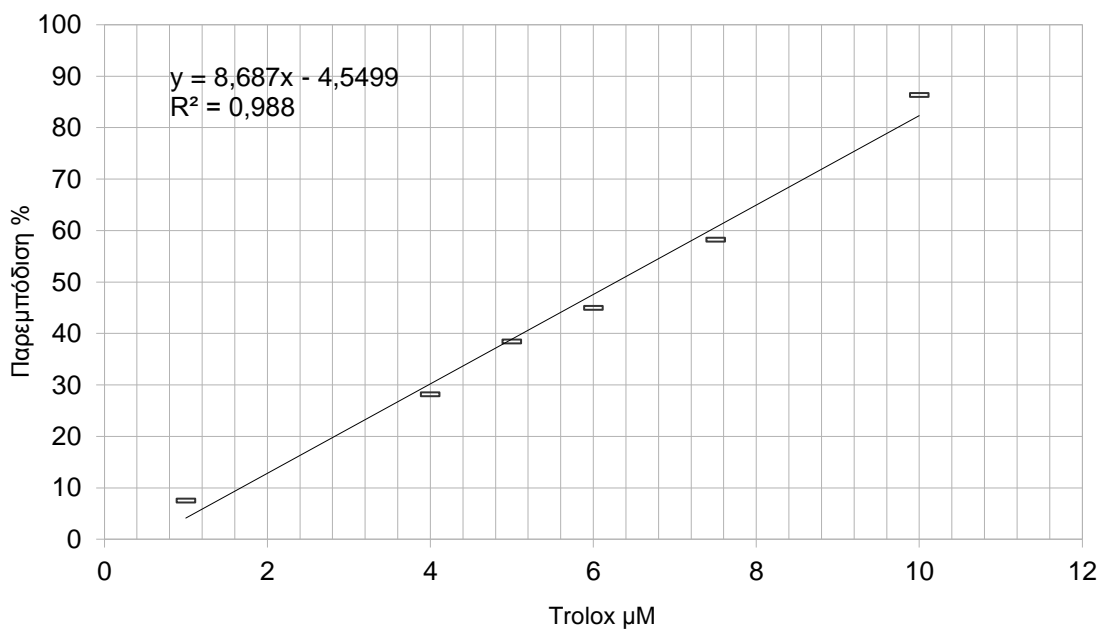
**Εικόνα 2.4: Διάγραμμα Παρεμπόδισης% DPPH προς συγκέντρωση Trolox**

**Πίνακας 2.4: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο ABTS**

Δείγμα	Παρεμπόδιση %	μmol Trolox/g	IC <sub>50</sub>
PV <sup>st</sup>	32,03	0,826	6,28
PV <sup>us</sup>	34,63	0,902	
PC <sup>st</sup>	44,36	1,126	
PC <sup>us</sup>	46,18	1,168	

\* PV = *Phaseolus Vulgaris*; PC = *Phaseolus Coccineus*; st= εκχύλιση με ανάδευση;  
us= εκχύλιση με υπερήχους

**Παρεμπόδιση% ABTS**



**Εικόνα 2.5: Διάγραμμα Παρεμπόδισης% ABTS προς συγκέντρωση Trolox**

Όπως περιγράψαμε και στο θεωρητικό μέρος, δεν υπάρχει μοναδική θεσμοθετημένη μέθοδος για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται είτε κατά το δοκούν είτε διότι παρουσιάζουν εξειδικευμένα αποτελέσματα έναντι συγκεκριμένων υποστρωμάτων, επί παραδείγματι, λιπαρά οξέα σε αντίθεση με υδατικά ή αλκοολικά διαλείμματα (Heimler *et al.*, 2005)

Ακριβώς για αυτό η εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης με τουλάχιστον δύο μεθόδους της επιλογής μας, αποτελεί υποχρεωτικό βήμα έτσι ώστε να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα και να βγάλουμε συμπεράσματα, να συνδέσουμε την περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, με την αντιοξειδωτική δράση. Σε αυτό το σημείο μπορούμε να αναφέρουμε ότι η ίδια η μέθοδος Folin-Ciocalteu, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών, είναι βασίζεται στην αντιοξειδωτική ιδιότητα των φαινολικών, είναι μία αντίστροφη μέθοδος που μετράει στην πραγματικότητα την αναγωγική ισχύ του συνολικού φαινολικού περιεχομένου ενός διαλύματος (Huang *et al.*, 2005) και προχωρεί μέσω ενός μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίου (ET assay).

Σύμφωνα με τους (Oomah *et al.*, 2005), στην αντιοξειδωτική δράση και στην παγίδευση των ελεύθερων ριζών των φασολιών συνεισφέρουν κατά 40-70% τα φαινολικά συστατικά και κατά 20-39% τα φλαβονοειδή. Συμπεραίνουμε από εδώ ξανά, ότι οι έγχρωμες ποικιλίες φασολιών έπιδεικνύουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τις λευκές, πράγμα που υποστηρίζεται από διάφορες μελέτες (Oomah *et al.*, 2005; Tsuda *et al.*, 1994; Heimler *et al.*, 2005)

Τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων υποστηρίζουν το συμπέρασμα που έχουμε βγάλει και από τη μελέτη των ολικών φαινολικών: ότι μεταξύ των κοινών φασολιών και των γιγάντων, υπερτερούν σε αντιοξειδωτική δράση τα δεύτερα, ενώ μεταξύ των δύο μεθόδων εκχύλισης, υπερτερεί η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους σε σχέση με την εκχύλιση με απλή ανάδευση.

Σε σχέση με τα αποτελέσματα μπορούμε να πούμε ότι γενικά τα φασόλια έπιδεικνύουν χαμηλή έως μέτρια αντιοξειδωτική δράση και παγίδευση των ελεύθερων ριζών. Τα αποτελέσματά μας είναι αναμενόμενα σε σχέση με τη διεθνή βιβλιογραφία. Επί παραδείγματι οι (Ranilla *et al.*, 2007; Oomah *et al.*, 2005) δίνουν τιμές για τα λευκά και ροζ είδη του γένους *Phaseolus vulgaris* L. που κυμαίνονται μεταξύ 1,02-6,1  $\mu\text{mol Trolox}$  / γραμμάριο δείγματος. Δεδομένης της σχέσης που αναφέρουμε παραπάνω, μεταξύ του

συνόλου των φαινολικών και της αντιοξειδωτικής δράσης, είναι προς διερεύνηση εάν το μεγάλο ποσοστό συμπλεγμένων φαινολικών των φασολιών σε γλυκοζίτες και εστέρες μειώνει την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα σε σχέση με αυτή που θα επιδείκνυαν εάν υπήρχε μεγαλύτερο ποσοστό ελεύθερων φαινολικών οξέων στο υπόστρωμα.

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν είναι αναμενόμενη, αφού η τεχνική ρίζας DPPH δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε υδρόφιλα υποστρώματα, όπως αυτό που χρησιμοποιήθηκε, ενώ η τεχνική της κατιοντικής ρίζας ABTS λειτουργεί καλύτερα σε λιπόφιλα υποστρώματα.

## 2.5 Χρωματογραφική μελέτη των φαινολικών των εκχυλισμάτων

Μελέτη των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων με HPLC-DAD

Τα εκχυλίσματα των φασολιών στη λυοφιλιωμένη τους μορφή 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.



*Εικόνα 2.6 : Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε*

Παρασκευάστηκαν διαλύματα σε απεσταγμένο νερό συγκέντρωσης 50mg/mL τα οποία πριν την εισαγωγή στη στήλη διηθήθηκαν σε μικροπορώδες φίλτρο διατομής 0,20μm και διαμέτρου 15mm (Chromafil Xtra PET – 20/15).

Χρησιμοποιήθηκε στήλη ανεστραμμένης φάσης (C<sub>18</sub>). Η κινητή φάση αποτελούνταν από συνδυασμό δύο διαλυτών. Ο διαλύτης Α ήταν δισαπεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό με περιεκτικότητα σε μυρμηκικό οξύ (HCOOH) 0,2% v/v και ο διαλύτης Β ήταν μεθανόλη (MeOH) υψηλής καθαρότητας για HPLC. Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος στη σταθερή τιμή 0,4mL/min. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε είναι η μέθοδος των (Luthria and Pastor-Corrales, 2006) με μικρές προσαρμογές ως προς την περιεκτικότητα σε μυρμηκικό οξύ (0.2% αντί 0,1) και στη ροή (0,4 αντί 0,7ml/min). Η πίεση κυμαινόταν από 40-70 bar. Η στήλη ήταν Supelco Discovery HS C<sub>18</sub>, μήκους 250mm και εσωτερικής διαμέτρου 4mm. 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 20μL. Το πρόγραμμα έκλουσης της στήλης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.5).

**Πίνακας 2.5: Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων**

Σύστημα Διαλυτών		
Χρόνος t (min)	%A	%B
0-5	95	5
5-70	70	30
70-90	0	100

Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 270 και 325nm. Τα υδροξυκινναμικά οξέα παρουσιάζουν μέγιστα συνήθως κοντά στα 200, 275 και 330nm. Επιλέγοντας αυτά τα δύο μήκη κύματος μπορούμε ταυτόχρονα να διακρίνουμε τα υδροξυκινναμικά οξέα από τα φαινολικά οξέα (280nm) και τα φλαβονοειδή (330nm) (Luthria and Pastor-Corrales, 2006; Ross *et al.*, 2008; Mattila and Kumpulainen, 2002).

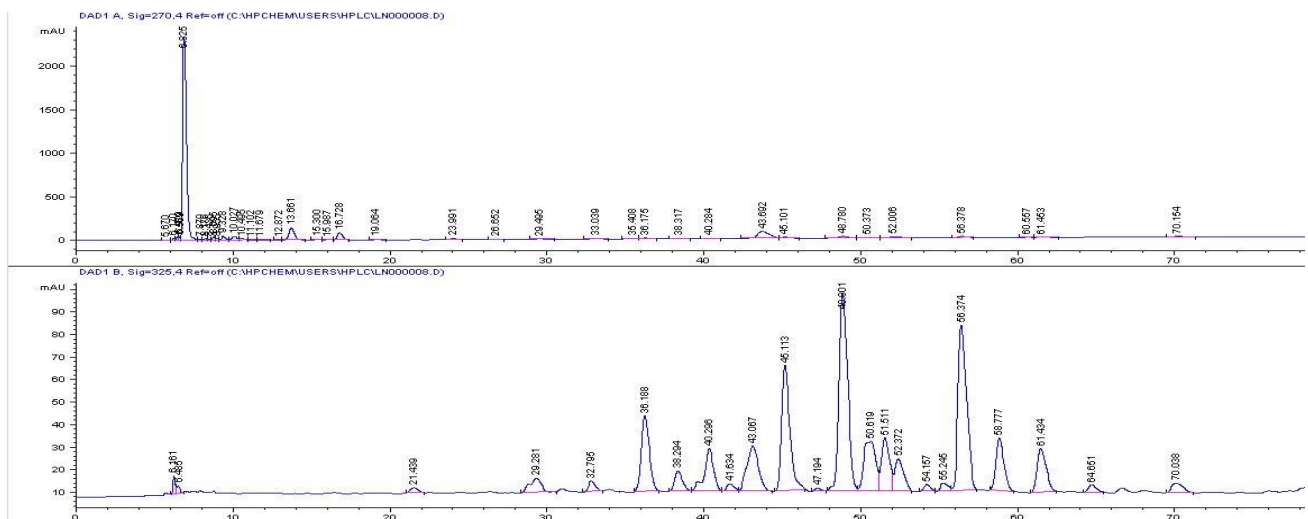
Για την ταυτοποίηση των ουσιών έγινε σύγκριση με χρωματογραφήματα μεμονωμένων

πρότυπων ουσιών. Τα χρωματογραφήματα των πρότυπων λήφθηκαν με τον ίδιο τρόπο που λήφθηκαν τα άγνωστα, χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους (χρόνους, σύστημα έκλουσης). Η σχετική ταυτοποίηση κάθε φορά γινόταν με συνδυασμό του χρόνου έκλουσης και του φάσματος UV-Vis του εκλούμενου συστατικού και τη σύγκριση με τα αντίστοιχα γνωστών πρότυπων ουσιών, καθώς και από τη σχετική βιβλιογραφία.

## 2.6 Αποτελέσματα μελέτης λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων με HPLC-DAD

Τα εκχυλίσματα *Phaseolus Vulgaris* και *Phaseolus Coccineus* που παραλήφθηκαν σε MeOH:water 70:30 v/v με δύο τεχνικές α) εκχύλιση με μηχανική ανάδευση και β) εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους και κατόπιν λυοφιλιώθηκαν, αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συνδυασμένη με ανιχνευτή φωτοδιόδων. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 270 και 325nm, ενώ ελέγχθηκαν και στα 525nm, μήκος κύματος όπου απορροφούν οι ανθοκυάνες. Σε κανένα από τα τέσσερα αρχικά δείγματα δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη ανθοκυανών. Η απουσία ανθοκυανών είναι αναμενόμενη εάν σκεφτούμε ότι εκχυλίσαμε φασόλια λευκού χρώματος.

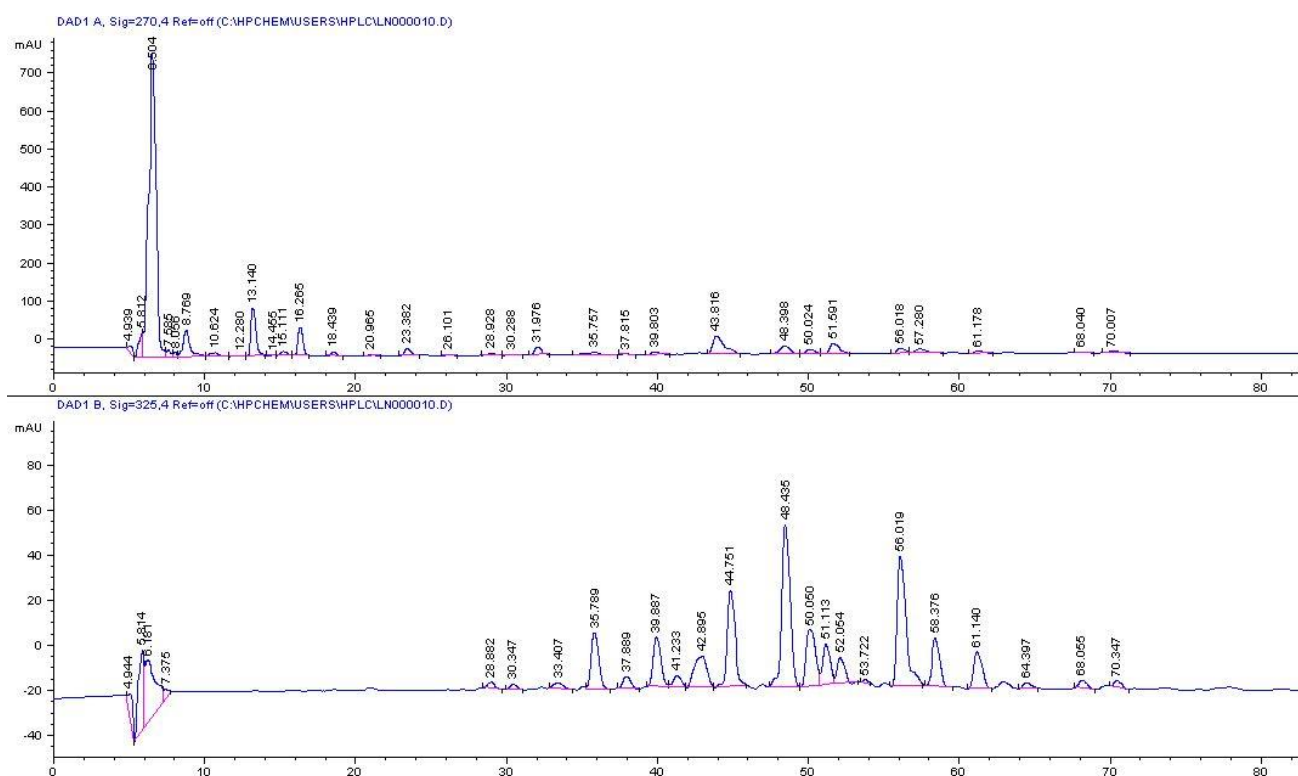
Στη συνέχεια, ακολουθώντας τις ίδιες συνθήκες έκλουσης, αναλύθηκαν πρότυπα δείγματα καφεϊκού, π-κουμαρικού, φερουλικού οξέος σε συγκεντρώσης 1mg/mL και τα λυοφιλιωμένα εκχυλίσματα αφού υπέστησαν αλκαλική υδρόλυση με NaOH.



Εικόνα 2.7: Χρωματογράφημα κοινού φασολιού εκχυλισμένου με απλή ανάδευση στα 270, 325nm

Οι κύριες ενώσεις που προσδιορίστηκαν είναι τα υδροξυκινναμικά οξέα φερουλικό, σιναπικό, π-κουμαρικό και καφεϊκό οξύ. Η ταυτοποίηση των παραπάνω φαινολικών συστατικών βασίστηκε στο χρόνο έκλουσης και σαν ένδειξη στο φάσμα υπεριώδους-ορατού (UV-vis), όπως καταγράφηκαν πειραματικά αλλά και από τη σχετική βιβλιογραφία.

Τα δείγματα παρουσιάζουν εμφανείς ομοιότητες και στα δύο μήκη κύματος που σαρώθηκαν. Και στα τέσσερα δείγματα το σύνολο των κορυφών που εμφανίζονται είναι γύρω στις 25. Στην πλειοψηφία τους έχουν να κάνουν με γλυκοζίτες και εστέρες υδροξυκινναμικών και κάποιων υδροξυβενζοϊκών οξέων. Προσοχή στην ερμηνεία της χρειάζεται η οξεία κορυφή που εμφανίζεται κοντά στην αρχή του χρωματογραφήματος με  $R_t=6,5-6,8\text{min}$ . Σύμφωνα με τους (Ross *et al.*, 2009) ενώ θα βάση του χρόνου έκλουσης ταιριάζει αυτή η κορυφή με το γαλλικό οξύ, το φάσμα UV-Vis και το φάσμα μάζας δεν το ταυτοποιούν.



**Εικόνα 2.8:** Χρωματογράφημα φασολιού γίγαντα εκχυλισμένου με υπερήχους στα 270,325nm

Από τους (Ross *et al.*, 2009; Luthria *et al.*, 2005; Kalogeropoulos *et al.*, 2010) γνωρίζουμε ότι στους σπόρους των φυτών του γένους Phaseolus όλων των ποικιλιών, τα κύρια φαινολικά



συστατικά είναι τα υδροξυκιναμικά οξέα π-κουμαρικό, φερουλικό και σιναπικό, και σε μικρότερες ποσότητες καφεϊκό, μ-κουμαρικό και άλλα.

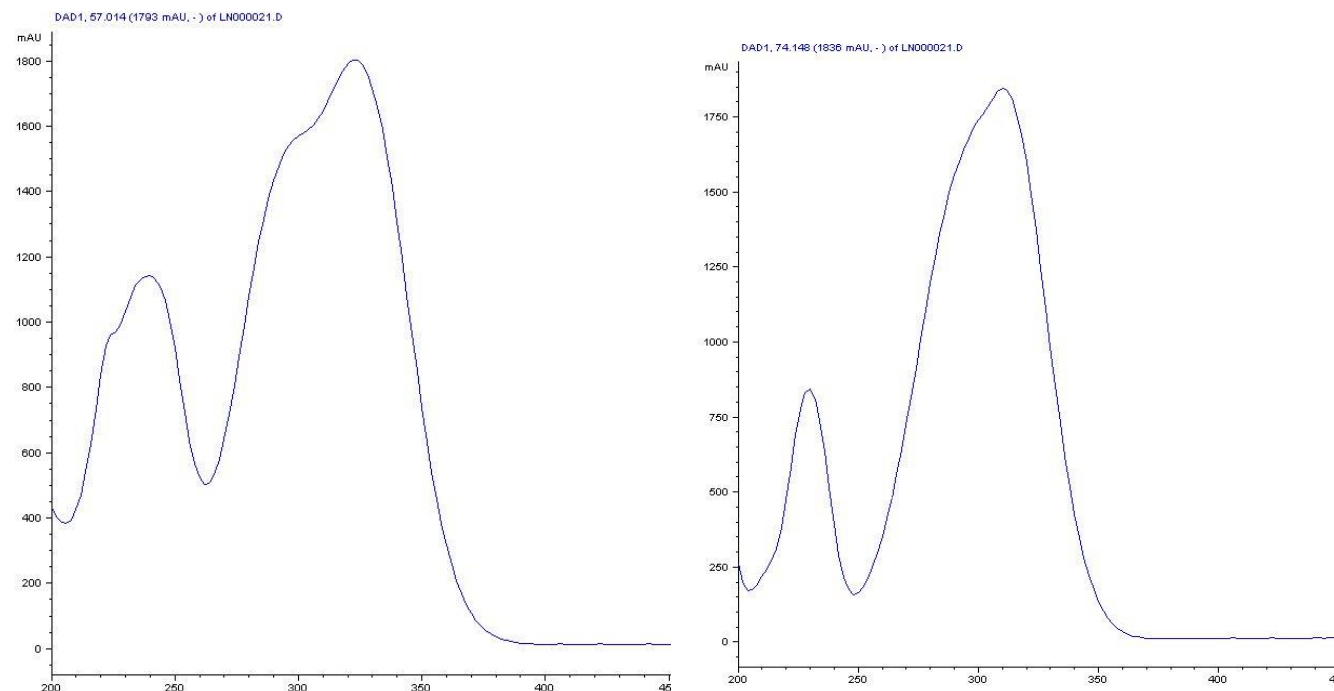
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υδροξυκιναμικών οξέων:

**Πίνακας 2.6: Απορροφήσεις UV-Vis και χρόνοι έκλουσης των υδροξυκιναμικών οξέων**

Υδροξυκιναμικό οξύ	$\lambda_{\max}$ (nm)*	$t_r$ (min) βιβλιογραφικό*	$t_r$ (πειραματικό)
Καφεϊκό οξύ	238, 301(ώμος), 325	24,721	57,214
π-Κουμαρικό οξύ	238, 324	37,381	74,426
Φερουλικό οξύ	220, 234(ώμος), 324	41,902	82,106
Σιναπικό οξύ	238, 324	43,370	-

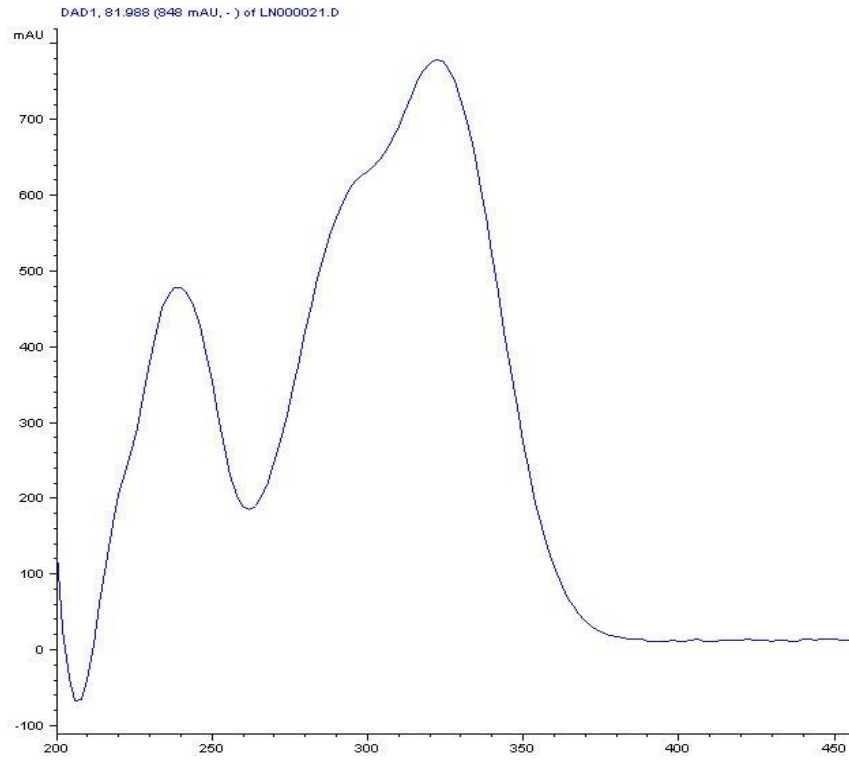
\*(Ross *et al.*, 2009; Luthria *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007)

Ακόμη, δίνονται τα φάσματα των προτύπων ουσιών όπως καταγράφηκαν στην περιοχή 200-600nm κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης των πρότυπων δειγμάτων καθώς και το χρωματογράφημα των τριών προτύπων υδροξυκιναμικών οξέων που αναλύθηκαν με

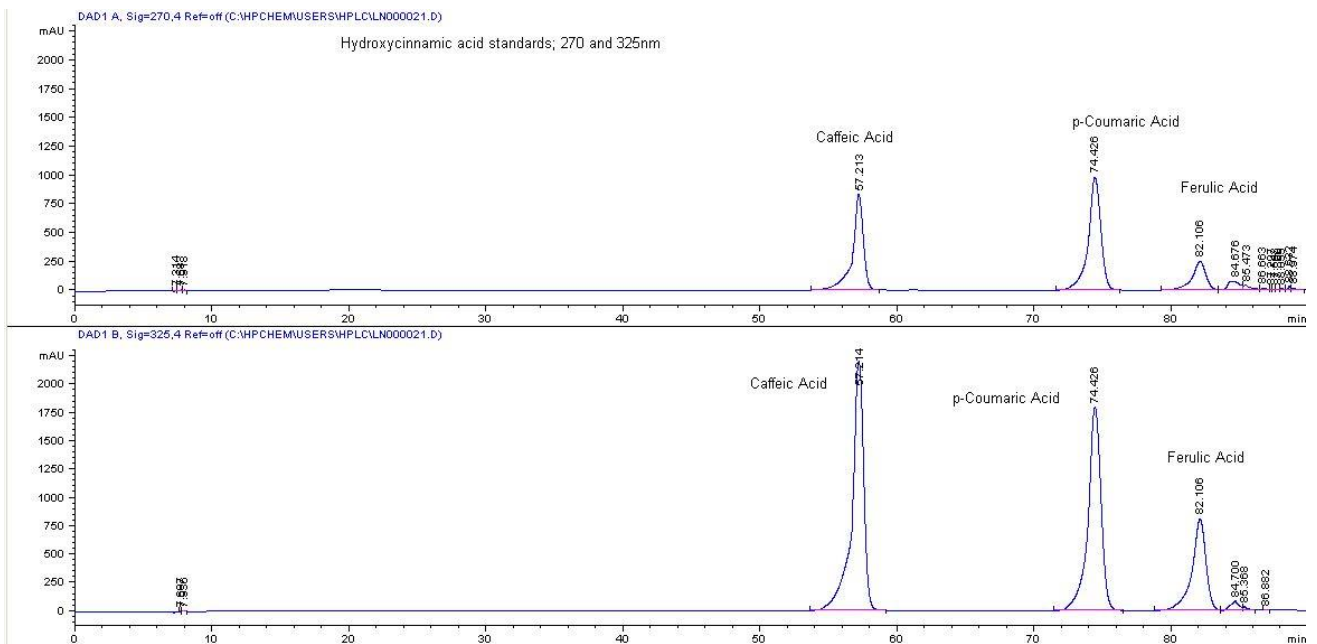


συνθήκες όμοιες με αυτές της ανάλυσης των εκχυλισμάτων.

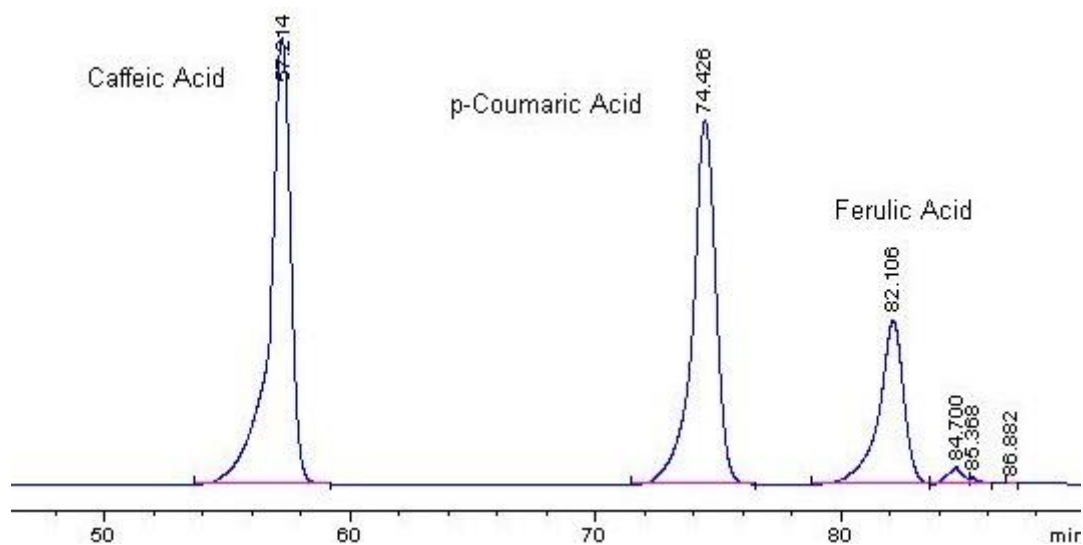
**Εικόνα 2.9: Φάσματα UV-Vis του Καφεϊκού (αριστερά) και του π-Κουμαρικού οξέος**



*Εικόνα 2.10: Φάσμα UV-Vis του Φερούλικού Οξέος*



*Εικόνα 2.11: Χρωματογράφημα πρότυπων υδροξυκινναμικών οξέων στα 270, 325nm*

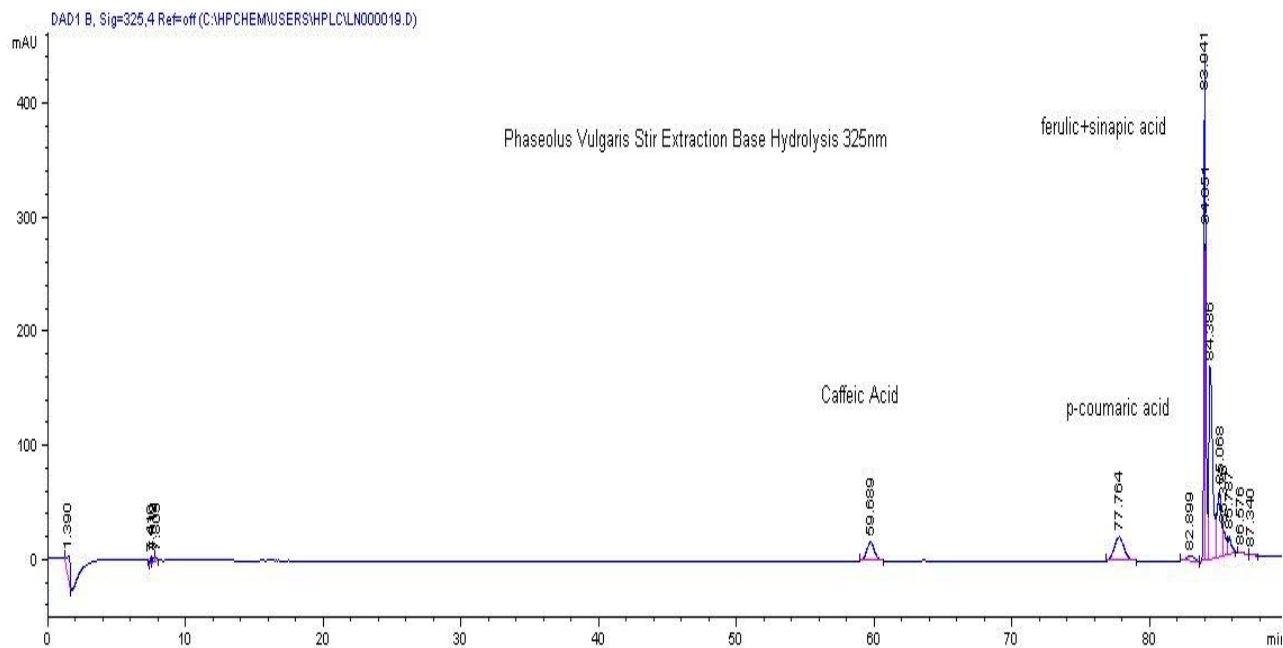


**Εικόνα 2.12: Λεπτομέρεια χρωματογραφήματος στα 325 nm**

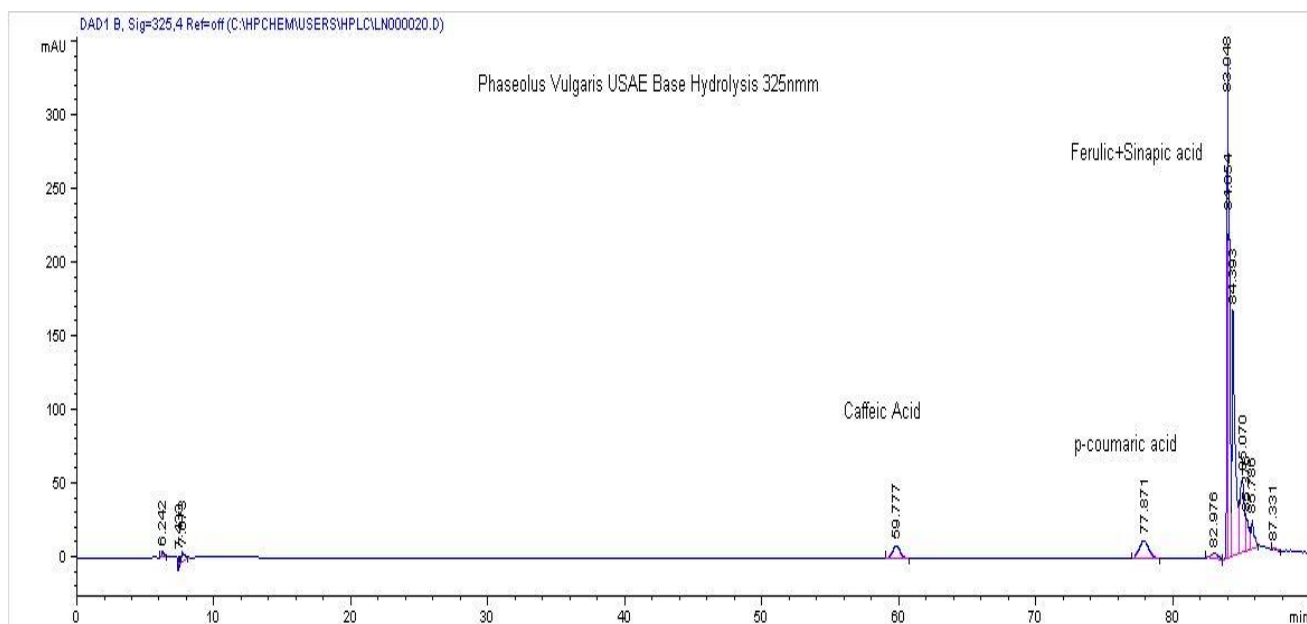
Τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα υπεριώδους ορατού των παραπάνω πρότυπων οξέων δεν μας βοηθούν να αποδώσουμε ποιοτικά τις κορυφές του χρωματογραφήματος στον αντίστοιχο χρόνο, καθώς όπως έχουμε αποδείξει προτύτερα τα υδροξυκιναμικά οξέα των φασολιών βρίσκονται συμπλεγμένα μέσα τόσο στο αρχικό υπόστρωμα, όσο και στο λυοφιλιωμένο εκχύλισμα.

Για να μπορέσουμε να κάνουμε απόδοση κορυφής σε υδροξυκιναμικό οξύ στο αρχικό διάλυμα χρειάζεται εκτεταμένη μελέτη με άλλη μέθοδο, όπως για παράδειγμα υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών. Αυτό όμως δεν αποτελούσε αντικείμενο μελέτης για την παρούσα εργασία.

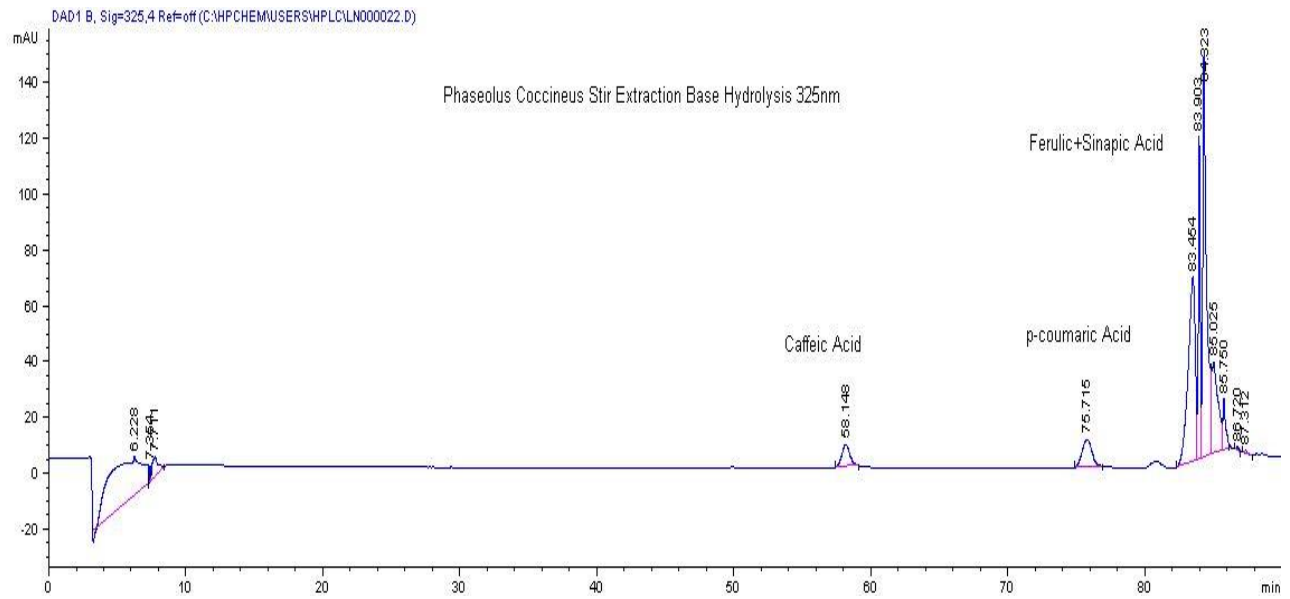
Εν συνεχεία, αναλύσαμε τα 4 δείγματα λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων με το ίδιο σύστημα HPLC-DAD αφού πρώτα κατεργαστήκαμε τα δείγματα με τη μέθοδο της αλκαλικής υδρόλυσης που περιγράφουμε εδώ . Παρακάτω, δίνουμε τα χρωματογραφήματα των αλκαλικά υδρολυμένων εκχυλισμάτων φασολιών δύο γενών – *Phaseolus Vulgaris L* και *Phaseolus Coccineus L* – που παραλήφθηκαν με δύο διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης – με απλή ανάδευση και υποβοηθούμενη από υπερήχους.



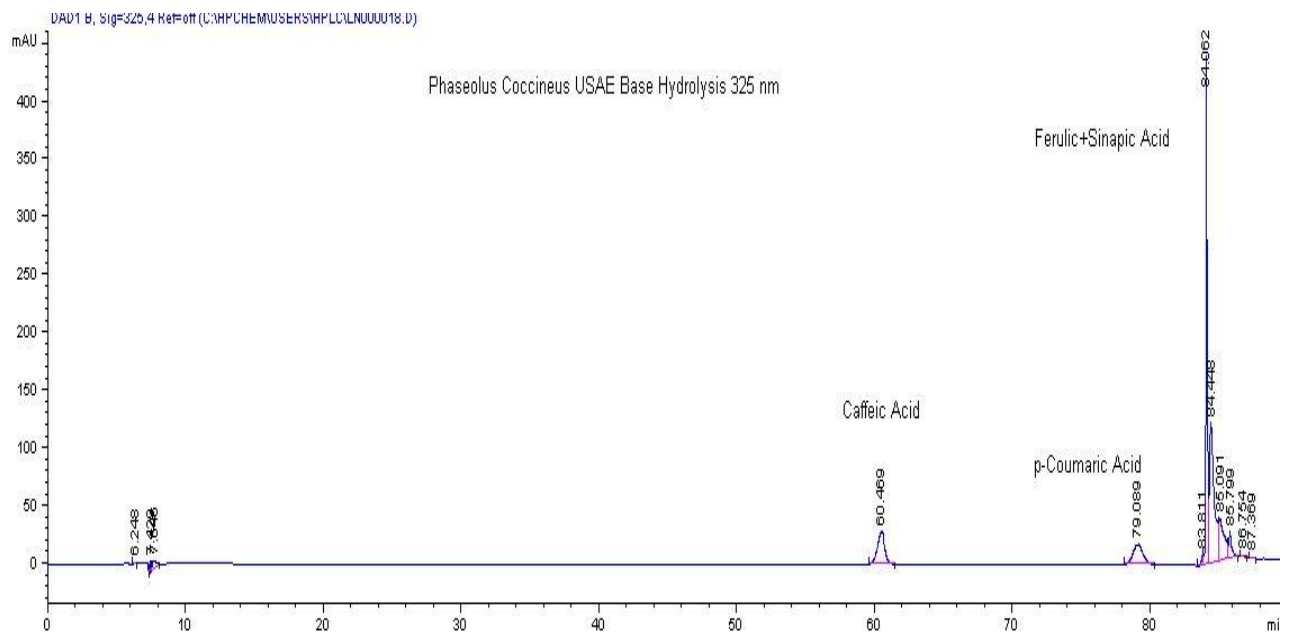
Εικόνα 2.13: *P.vulgaris* με απλή ανάδευση μετά την αλκαλική υδρόλυση (325nm)



Εικόνα 2.14: *P.vulgaris* Ultrasound assisted μετά την αλκαλική υδρόλυση (325nm)



Εικόνα 2.15: *P.coccineus* με απλή ανάδευση μετά την αλκαλική υδρόλυση (325nm)



Εικόνα 2.16: *P.coccineus* Ultrasound assisted μετά την αλκαλική υδρόλυση (325nm)

Τα δείγματα μετά την αλκαλική υδρόλυση παρουσιάζουν μία πολύ απλούστερη εικόνα. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα  $t_R$  των κορυφών οι οποίες αποδίδονται στα μελετούμενα υδροξυκιναμικά οξέα:

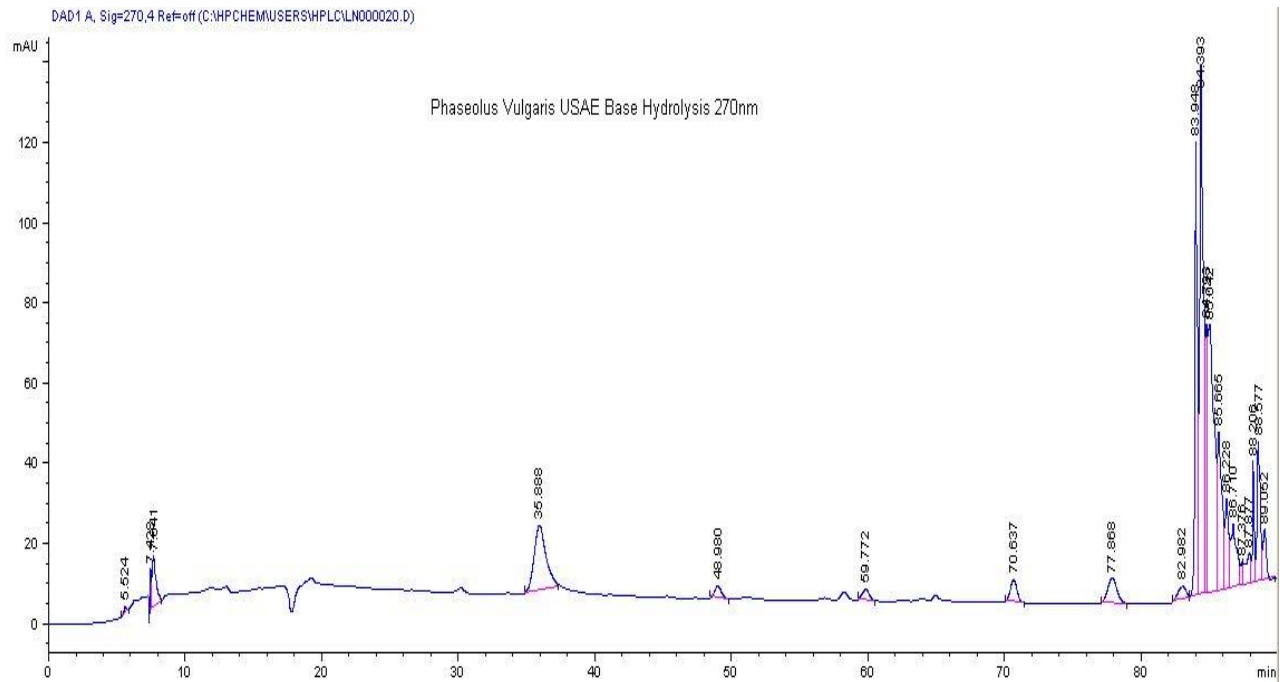
*Πίνακας 2.7: Απόδοση κορυφών με βάση το  $t_R$*

Υδροξυκιναμικό οξύ	$t_R$ (προτύπων)	$t_R$ (δειγμάτων)
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	57,214	PV <sup>st</sup> : 59,689
		PV <sup>us</sup> : 59,777
		PC <sup>st</sup> : 59,148
		PC <sup>us</sup> : 60,469
<b>π-Κουμαρικό οξύ</b>	74,426	PV <sup>st</sup> : 77,764
		PV <sup>us</sup> : 77,871
		PC <sup>st</sup> : 75,715
		PC <sup>us</sup> : 79,089
<b>Φερουλικό οξύ</b>	82,106	PV <sup>st</sup> : 83,041
		PV <sup>us</sup> : 83,048
		PC <sup>st</sup> : 83,454
		PC <sup>us</sup> : 84,062
<b>Σιναπικό οξύ</b>	-	PV <sup>st</sup> : 83,041
		PV <sup>us</sup> : 83,048
		PC <sup>st</sup> : 83,454
		PC <sup>us</sup> : 84,062

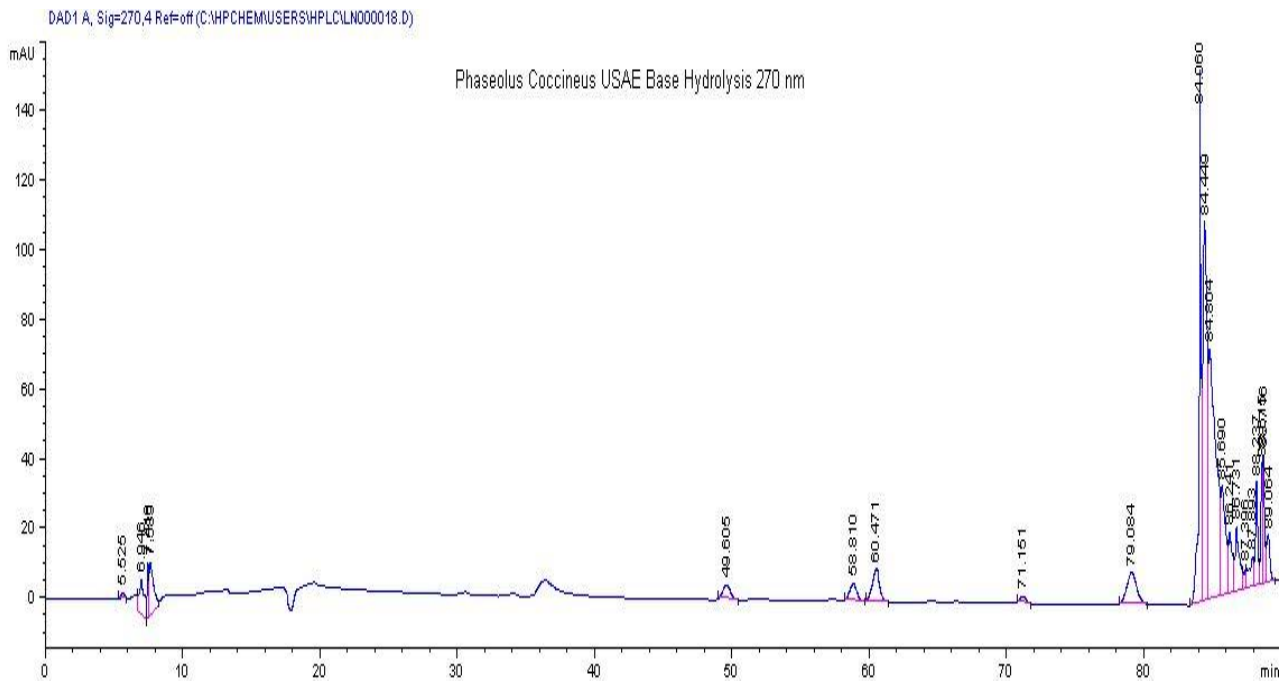
Στον παραπάνω πίνακα δεν δίνεται ξεχωριστή απόδοση κορυφής για το σιναπικό οξύ. Αυτό γίνεται διότι σύμφωνα με τους (Luthria *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2009) με την αλκαλική υδρόλυση το σιναπικό οξύ (3,5-δισ-μεθοξυ-4-ύδροξυ-κινναμικό οξύ) μετατρέπεται κατά ένα ποσοστό σε φερουλικό, δηλαδή στο μονο-μεθοξυ υποκατεστημένο υδροξυκινναμικό οξύ. Ενισχύοντας έτσι την κορυφή του φερουλικού. Λόγω γης παρόμοιας πολικότητας, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ έχουν την τάση να εκλούνται σε πολύ κοντινούς χρόνους. Δεν είναι τυχαίο μερικές φορές ακόμη και στην ίδια μελέτη, στο ένα χρωματογράφημα να παρουσιάζεται πρώτα το ένα και ύστερα το άλλο, και στη συνέχεια, με μικρή αλλαγή των συνθηκών να αναποδογυρίζουν.

Ανεξάρτητα από αυτό, στο σύνολό της η απόδοση των κορυφών των χρωματογραφημάτων με κριτήριο το χρόνο έκλυσης και το φάσμα υπεριώδους ορατού έχει ακρίβεια. Χωρίς αμφιβολία μπορούμε να ισχυριστούμε ότι οι τρεις βασικές κορυφές που απεικονίζονται στα χρωματογραφήματα για τους χρόνους που φαίνονται στον πίνακα παραπάνω ανήκουν στο καφεϊκό, π-κουμαρικό και φερουλικό μαζί με σιναπικό οξύ.

Τα φάσματα στα 270nm των ίδιων δειγμάτων παρουσιάζουν μία λιγότερο εύκολη εικόνα ως προς την απόδοση των κορυφών, καθώς εμφανίζονται άλλα συστατικά τα οποία απελευθερώνονται κατά την αλκαλική υδρόλυση, που δεν απορροφούν στα 325, παρά μόνο στα 270nm άρα δεν πρόκειται για υδροξυκινναμικά οξέα.



Εικόνα 2.17: Χρωματογράφημα *P.vulgaris* Ultrasound assisted στα 270nm.



Εικόνα 2.18: Χρωματογράφημα *P.vulgaris* Ultrasound assisted στα 270nm.



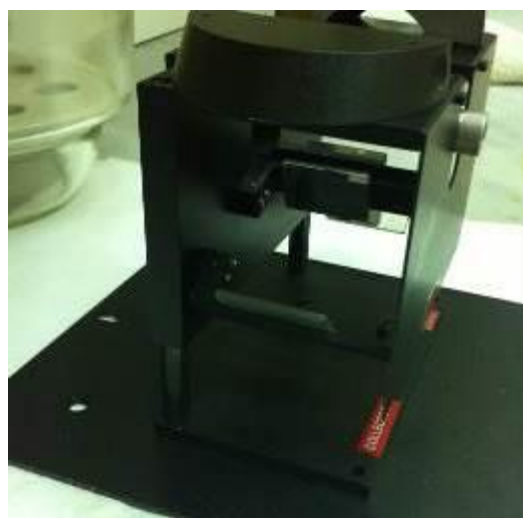
Τόσο στο εκχύλισμα του κοινού φασολιού όσο και του γίγαντα μετά την αλκαλική υδρόλυση, φαίνεται να απελευθερώνονται και άλλα φαινολικά, τα οποία εκλύονται σε χρόνους κοντά στα 35, 49, 58, 71, 84-85min. Ιδιαίτερα στο κοινό φασόλι, το συστατικό που εκλύεται στα 35min εμφανίζει έντονη κορυφή.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι συγκεκριμένες κορυφές με βάση το χρόνο έκλυσης και την απορρόφηση μόνο στα 270nm μπορούμε να εικάσουμε ότι ανήκουν σε άλλα ελάσσονα φαινολικά συστατικά που ανιχνεύονται σε μικρές ποσότητες στα φασόλια, ή ότι αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης κάτω από τις έντονα αλκαλικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλκαλική υδρόλυση και την εξουδετέρωση με ισχυρό οξύ.

Πιθανά φαινολικά συστατικά που ανταποκρίνονται σε αντίστοιχους χρόνους έκλυσης είναι: π-ύδροξυβενζοϊκό οξύ, γλωρογενικό οξύ, μ-κουμαρικό οξύ, το οποίο εκλύεται συνήθως μετά το σιναπικό και έχει εντονότερη απορρόφηση στα 270nm συνεισφέροντας στην «ουρά» που σέρνεται κοντά στο τέλος του χρωματογραφήματος σε όλα τα δείγματα.

## 2.7 Φασματοφωτομετρική Μελέτη με τη Μέθοδο DRIFTS

Στα αρχικά κονιοποιημένα δείγματα και στα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα *P.vulgaris* και *P.coccineus* έγινε φασματοφωτομετρική μελέτη υπερύθρου (IR) με τη μέθοδο της διάχυτης ανάκλασης. Ποσότητα 2mg από το κάθε δείγμα, πριν και μετά την εκχύλιση και τη λυοφιλίωση, σε μορφή σκόνης τοποθετήθηκε στο ειδικό δισκίο και λήφθηκε το φάσμα FT-IR σε φασματόμετρο Thermo Nicolet 6700. Ως φάσμα αναφοράς λαμβανόταν το φάσμα του καθαρού βρωμιούχου καλίου (KBr). Σε κάθε δείγμα γίνονταν 100 σαρώσεις (scans), η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν  $4\text{cm}^{-1}$ , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν  $0.3165\text{ mms}^{-1}$ . Σε όλα τα φάσματα FT-IR έγινε αυτόματη εξομάλυνση του σήματος (smoothing) και αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής (baseline correct) με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος OMNIC που συνοδεύει το όργανο. Οι επεξεργασίες αυτές αποσκοπούν στη βελτίωση της εικόνας του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς.



*Εικόνα 2.19: Εξάρτημα για τη λήψη φάσματος με τη μέθοδο DRIFTS όπου φαίνεται η υποδοχή του micro-cup (αριστερά) και η διάταξη των κατόπτρων (δεξιά)*

*Μελέτη φάσματος FT-IR των μεθανολικών διαλυμάτων από αλκαλική υδρόλυση σε δισκία  
σεληνιούχου ψευδαργύρου (ZnSe)*

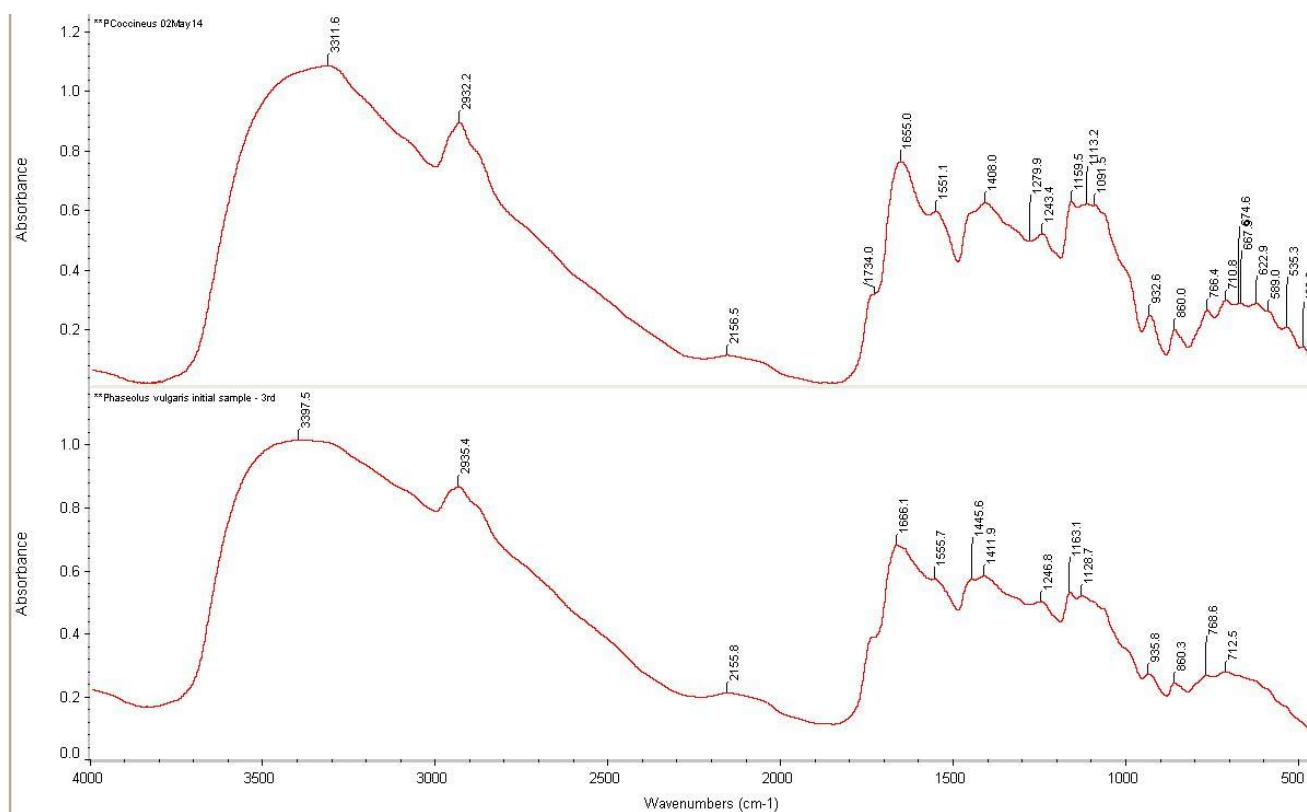
Μερικές σταγόνες από το κάθε μεθανολικό διάλυμα των εκχυλισμάτων που είχαν υποστεί αλκαλική υδρόλυση τοποθετήθηκαν πάνω σε δισκία σεληνιούχου ψευδαργύρου (ZnSe) και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε κλίβανο θερμοστατημένο στους  $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια το δισκίο τοποθετήθηκε στο ειδικό εξάρτημα και 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 2.20: Φασματοφωτόμετρο FT-IR Thermo Nicolet 6700*

## 2.8 Αποτελέσματα φασματοφωτομετρικής μελέτης με τις μεθόδους DRIFTS και ZnSe

Τα φάσματα FT-IR του αρχικού κονιοποιημένου δείγματος κοινών φασολιών και γιγάντων παραλήφθηκε με την τεχνική DRIFTS όπως περιγράφεται στο πειραματικό μέρος. Το φάσμα κάθε δείγματος λήφθηκε εις τριπλούν.



Εικόνα 2.21: Φάσματα FT-IR *P.vulgaris* (κάτω), *P.coccineus* (πάνω)

Παρατηρούνται απορροφήσεις στις περιοχές: α. 3600-3000cm<sup>-1</sup>, β. 3000-2800cm<sup>-1</sup> και γ. κάτω 1800cm<sup>-1</sup> με πολλές αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές. Τα ξηρά σπέρματα των φασολιών περιέχουν πρωταρχικά υδατάνθρακες, έπειτα πρωτεΐνες, σεβαστό ποσοστό σε νερό, λιπίδια και πλήθος άλλων μορίων – βιταμίνες, φυτικές ίνες, αλλά και DNA, RNA. Όπως αναμένεται λοιπόν, στα ληφθέντα φάσματα αναγνωρίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες των δομών αυτών.

Σύμφωνα με τους (Douka A., *et al.*, 2014; Pappas, 2002; Carbonaro *et al.*, 2007) οι βασικές απορροφήσεις στο ξηρό φασόλι μπορούν να συγκεντρωθούν στον παρακάτω πίνακα :

*Πίνακας 2.8: Συχνότητες απορρόφησης των κυριοτέρων ομάδων στην περιοχή του υπερύθρου*

Συχνότητα απορρόφησης (cm <sup>-1</sup> )	Απόδοση
3600- 3200	O–H (ισχυρή) των υδροξυλομάδων, N–H (αμίδιο A, B)
3000 -2800	C-H (ισχυρή) δόνησης τάσης
2300-2200	δόνηση τάσης O–H της ομάδας O=P-OH (φυτικό οξύ)
~1740	>C=O (ισχυρή) των εστέρων
1700-1500	C=N, C=O και C=C δόνηση τάσης Κάμψη πουρινικού και πυριμιδινικού δακτυλίου DNA
~1660	Αμίδιο I
1550–1520	Αμίδιο II
1646-1632	Δόνηση κάμψης του H <sub>2</sub> O
1470-1415	C-H δονήσεις κάμψης και παραμόρφωσης
1409-1404	C-O-H δονήσεις κάμψης
1328–1240	Αμίδιο III
1247-1242	–CH <sub>2</sub> OH δόνηση κάμψης της πλευρικής αλυσίδας
1250–1220	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> αντισυμμετρική δόνηση φωσφοδιεστερικού δεσμού
~1170	P=O, φυτικού οξέος
1165-1130	C-O-C η δόνηση τάσης του γλυκοζιτικού δεσμού
1122-1035	C-C, C-O-H, C-O, δονήσεις τάσης των δεσμών του δακτυλίου του σακχάρου με πολλαπλές κορυφές
1090–1085	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> συμμετρική δόνηση φωσφοδιεστερικού δεσμού
1070	C-O-P
930	Δόνηση της (1->4) γλυκοζιτικού δεσμού
~898 και ~845	δονήσεις α- και β- ανωμερών
>800 cm <sup>-1</sup>	Σκελετικές δονήσεις του πυρανοζιτικού δακτυλίου
800-640	Αμίδιο V (O-C-N)
767-625	Αμίδιο IV NH
606-537	Αμίδιο VI (C=O)

Με βάση τις παραπάνω αποδόσεις μπορούμε να εντοπίσουμε στα αρχικά μας δείγματα σειρά κορυφών που θα μας φανούν χρήσιμες για την ταυτοποίηση των βασικών φαινολικών συστατικών των φασολιών *Phaseolus Vulgaris* και *Phaseolus Coccineus*. Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι στην πλειοψηφία τους τα φαινολικά συστατικά των φασολιών αποτελούνται από γλυκοζίτες και εστέρες των υδροξυκινναμικών οξέων, κυρίως του φερουλικού, σιναπικού, π-κουμαρικού και λιγότερο του καφεϊκού, m-κουμαρικού και άλλων.

Η πλατιά απορρόφηση που παρουσιάζεται και στα δύο δείγματα περίπου στα 3300-3400 cm<sup>-1</sup> αποδίδει ακριβώς τις ισχυρές απορροφήσεις των υδροξυλομάδων –OH σε αυτή την περιοχή. Αντίστοιχα στις 3000-2800 έχουμε τις απορροφήσεις C-H των πλευρικών

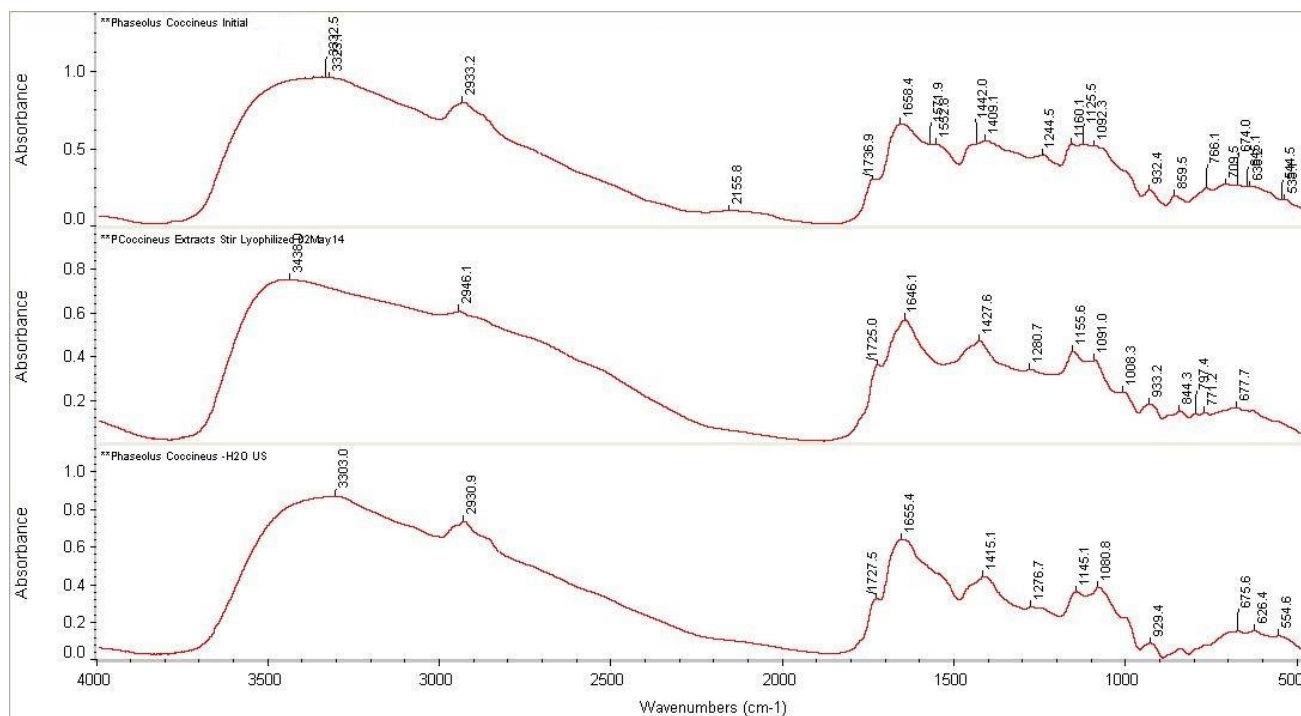
αλυσίδων. Ενώ η ασθενής πλατιά κορυφή στα  $2300-2200\text{cm}^{-1}$  εμφανής και στα δύο δείγματα αποδίδεται στη δόνηση τάσης του υδροξυλίου  $-\text{OH}$  της ομάδας του φωσφορικού οξέος  $\text{O}=\text{P}-\text{OH}$  του φυτικού οξέος.

Στα  $1740-1730\text{cm}^{-1}$  βρίσκεται η χαρακτηριστική ισχυρή απορρόφηση της ομάδας  $>\text{C}=\text{O}$  των εστέρων. Από τα  $1600\text{cm}^{-1}$  και κάτω ξεκινούν να εμφανίζονται μία σειρά απορροφήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών των σακχάρων, των γλυκοζιτών, των πυρανοζικών δακτυλίων.

Τόσο για τα κοινά φασόλια όσο και για τους γίγαντες, τα φάσματα περιέχουν τα ίδια χαρακτηριστικά αν και με διαφορές, που έχουν κυρίως να κάνουν με τις απορροφήσεις στα  $1470-1415$ ,  $1165-1130$  και  $1122-1035\text{cm}^{-1}$  οι οποίες αποδίδονται στις δονήσεις των σακχάρων και των γλυκοζιτών.

### Φασματοσκοπική μελέτη των λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων πριν και μετά την αλκαλική υδρόλυση

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα των λυοφιλιωμένων φασολιών και γιγάντων με δύο τρόπους εκχύλισης.

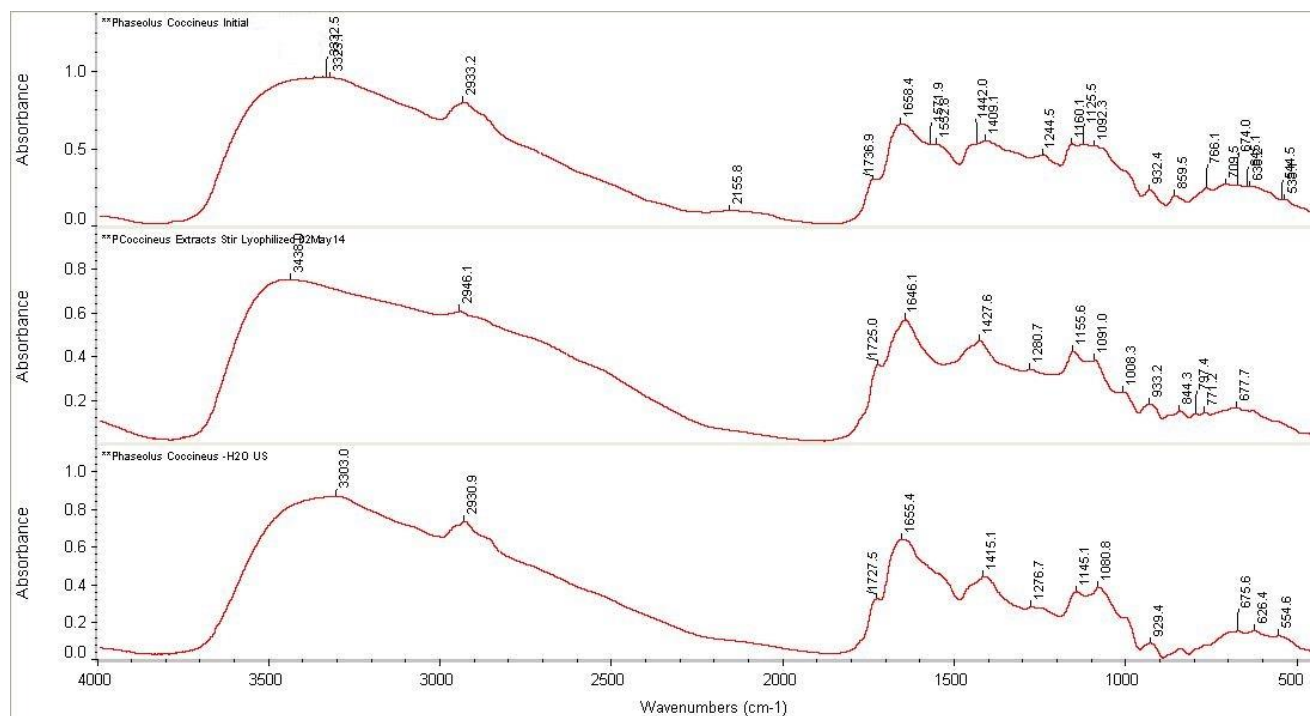


Εικόνα 2.22: Φάσματα FT-IR κοινού φασολιού (πάνω), λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος με μηχανική ανάδευση (μέση), λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος με υπερήχους (κάτω)



Σε σχέση με τα αρχικά δείγματα υπάρχουν αρκετές ομοιότητες όμως υπάρχουν και διαφοροποιήσεις. Φαίνεται να ενισχύονται οι κορυφές κοντά στα  $1600$  και  $1400\text{cm}^{-1}$  που αποδίδονται στις δονήσεις των πλευρικών υδροξυλομάδων C-OH. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο χάσιμο υγρασίας του δείγματος, πράγμα που περιορίζει τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των -OH των σακχάρων και τους επιτρέπει μεγαλύτερη ελευθερία.

Η ισχυρή απορρόφηση του εστεροποιημένου -COOH στα  $1730-1740\text{cm}^{-1}$  παραμένει ενώ λείπει εξ ολοκλήρου η πλατιά κορυφή στα  $2300-2200\text{cm}^{-1}$  που αποδίδεται στο φυτικό οξύ. Ακόμη φαίνεται να εξασθενούν οι απορροφήσεις των πρωτεϊνών στα  $1650$ ,  $1550$ ,  $1330-1200\text{cm}^{-1}$ .

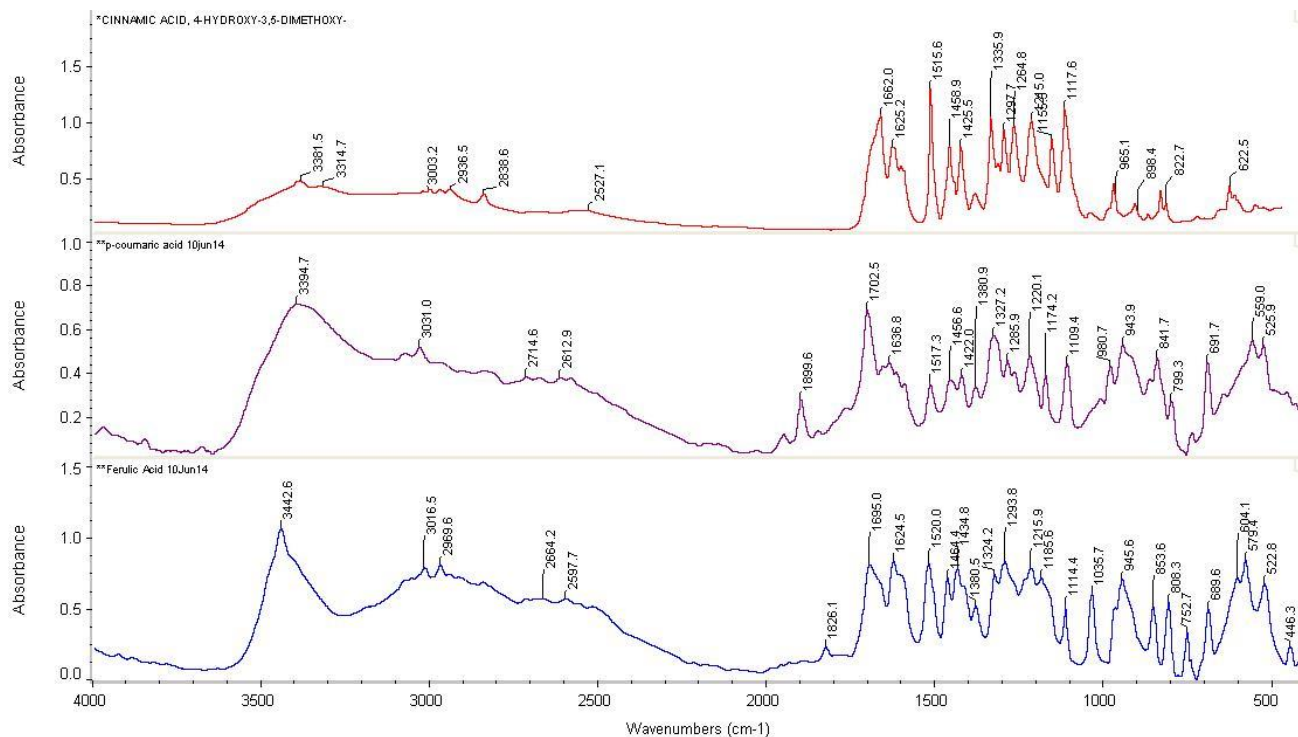


**Εικόνα 2.23:** Φάσματα FT-IR φασολιού γίγαντα (πάνω), λυοφιλωμένου εκχυλίσματος με μηχανική ανάδευση (μέση), λυοφιλωμένου εκχυλίσματος με υπερήχους (κάτω)

Είναι φανερό ότι τα φαινορικά συστατικά τα οποία θέλουμε να μελετήσουμε παραμένουν συμπλεγμένα, πράγμα που δεν μας επιτρέπει να βγάλουμε συμπέρασμα από τη φασματοσκοπική μελέτη των απορροφήσεων υπερύθρου.

## Φασματοσκοπική μελέτη των υδροξυκιναμικών οξέων (φερουλικό, σιναπικό, π-κουμαρικό οξύ)

Δίνονται παρακάτω φάσματα IR που παραλήφθηκαν με τη μέθοδο DRIFTS στερεών πρότυπων υδροξυκιναμικών οξέων – φερουλικό, σιναπικό, π-κουμαρικό οξύ. Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Sigma, καθαρότητας  $\geq 98,0\%$ .



Εικόνα 2.24: Φάσματα DRIFTS του σιναπικού, π-κουμαρικού και φερουλικού οξέος.

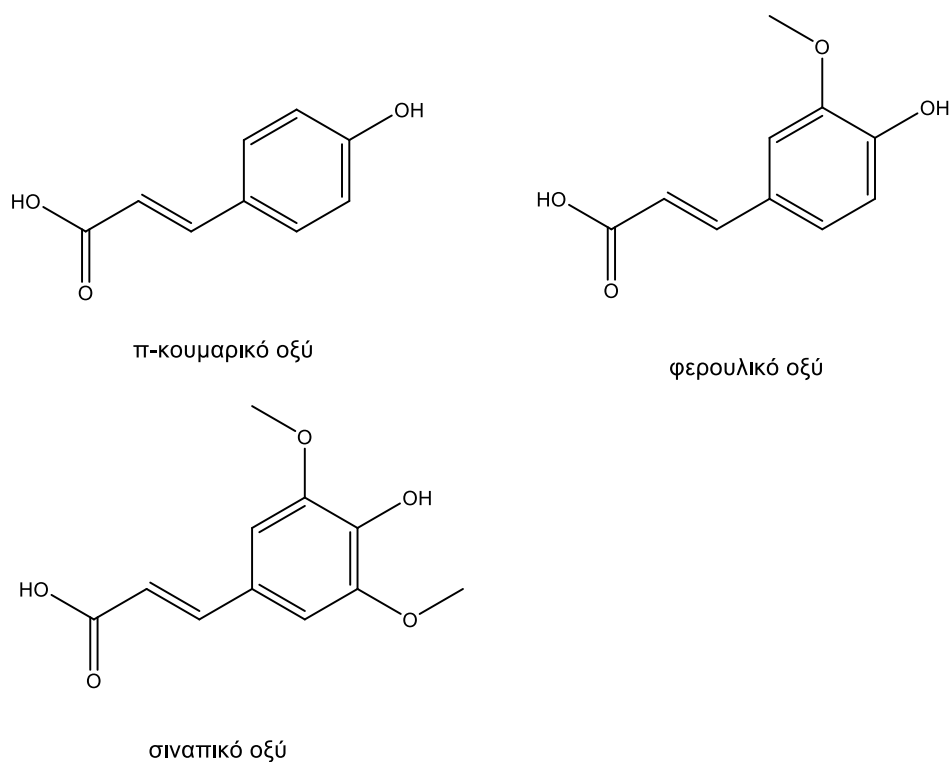
Οι αποδόσεις των απορροφήσεων για τα φάσματα των υδροξυκιναμικών οξέων έγιναν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:



*Πίνακας 2.9: Συχνότητες απορρόφησης των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στην περιοχή του υπερόθρου*

Δεσμός	Είδος ένωσης	Εύρος (cm <sup>-1</sup> ) συχνοτήτων	Ένταση
C-H	Αλκάνια	2970-2850	Ισχυρή
		1470-1340	Ισχυρή
C-H	Αλκένια	3095-3010	Μέτρια
		995-675	Ισχυρή
C-H	Αλκίνια	3300	Ισχυρή
C-H	Αρωματικοί δακτύλιοι	3100-3010	Μέτρια
		900-690	Ισχυρή
O-H	Μονομερείς αλκοόλες, φαινόλες	3650-3590	Κυμαινόμενη
	Αλκοόλες, φαινόλες με δεσμούς H	3600-3200	Κυμαινόμενη
	Μονομερή καρβοξυλικά οξέα	3650-3500	Μέτρια
	Καρβοξυλικά οξέα με δεσμούς H	2700-2500	Πλατιά
N-H	Αμίνες, αμίδια	3500-3300	Μέτρια
C=C	Αλκένια	1680-1610	Κυμαινόμενη
C=C	Αρωματικοί δακτύλιοι	1600-1500	Κυμαινόμενη
C≡C	Αλκίνια	2260-2100	Κυμαινόμενη
C-N	Αμίνες, αμίδια	1360-1180	Ισχυρή
C≡N	Νιτρίλια	2280-2210	Ισχυρή
C-O	Αλκοόλες, αιθέρες, καρβοξυλικά οξέα εστέρες	1300-1050	Ισχυρή
C=O	Αλδεΐδες, κετόνες, καρβοξυλικά οξέα, εστέρες	1760-1690	Ισχυρή
NO <sub>2</sub>	Νιτροενώσεις	1570-1500	Ισχυρή
		1370-1300	Ισχυρή

*(Skoog, Holler, Nieman, 1998)*



*Εικόνα 2.25: Μοριακές δομές των εν λόγω υδροξυκινναμικών οξέων*

Με βάση τις μοριακές δομές και τα φάσματα μπορούμε να κάνουμε τις εξής αποδόσεις. Και τα τρία οξέα παρουσιάζουν ευρείες απορροφήσεις στα  $3400-3300\text{cm}^{-1}$  που οφείλονται στις υδροξυλομάδες. Όσο αυξάνει ο βαθμός μεθυλίωσης των υδροξυλίων σε meta- θέση ως προς την προπενοϊκή αλυσίδα, μειώνεται η απορρόφηση των  $-\text{OH}$ , κατά πάσα πιθανότητα λόγω της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ του  $-\text{H}$  του υδροξυλίου και των οξυγόνων των μεθύξυ-ομάδων. Η απορρόφηση σε αυτή την περιοχή του φάσματος του σιναπικού οξέος εμφανίζεται αρκετά περιορισμένη σε σχέση με τα άλλα δύο καθώς ο αρωματικός του δακτύλιος είναι τετραυποκατεστημένος.

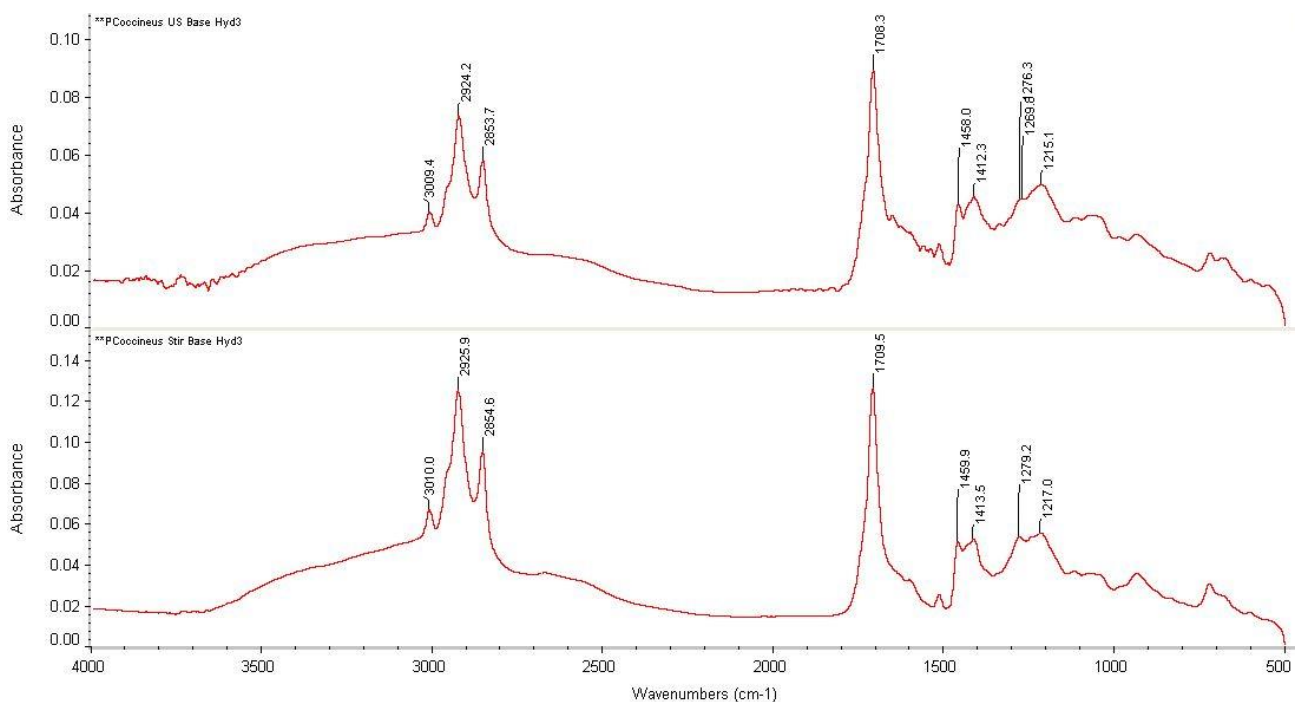
Το π-κουμαρικό οξύ εμφανίζει μέτρια απορρόφηση στα  $1850\text{cm}^{-1}$  που αποδίδεται στην υπερτονική σείση των αρωματικών  $-\text{H}$ , η οποία εμφανίζεται ασθενής στο φερουλικό και καθόλου στο σιναπικό. Είναι λογικό ότι όσο αυξάνεται ο βαθμός υποκατάστασης στον αρωματικό δακτύλιο τόσο θα εξασθενεί αυτή η απορρόφηση.

Και τα τρία οξέα παρουσιάζουν έντονες και ισχυρές απορροφήσεις στην περιοχή των  $1700\text{cm}^{-1}$  οι οποίες οφείλονται στη δόνηση τάσης της καρβονυλικής ομάδας του καρβονυλίου. Στη συνέχεια και τα τρία οξέα παρουσιάζουν εκταταμένες απορροφήσεις του αρωματικού δακτυλίου από τα  $1500-1000\text{cm}^{-1}$ . Χαρακτηριστική διαφορά παρουσιάζουν τα φάσματα του φερουλικού και του π-κουμαρικού σε σχέση με το σιναπικό, για την περιοχή

1100-500 $\text{cm}^{-1}$ . Ενώ τα δύο πρώτα εμφανίζουν εκτεταμένες απορροφήσεις οι οποίες αποδίδονται στις εντός και εκτός επιπέδου παραμορφώσεις, τάσεις των C-H, C-O-C, O-H και των συνδυασμών τους, το σιναπικό παρουσιάζει χαμηλής έντασης μικρές απορροφήσεις σε αυτή την περιοχή. Είναι πιθανό αυτές να οφείλονται στις στεreoχημικές παρεμποδίσεις που δημιουργεί ο υψηλός βαθμός υποκατάστασης του αρωματικού δακτυλίου, οδηγώντας σε μία πιο άκαμπτη διαμόρφωση του μορίου.

### **Μελέτη των αλκαλικά υδρολυμένων εκχυλισμάτων φασολιών *P.vulgaris* και *P.Coccineus***

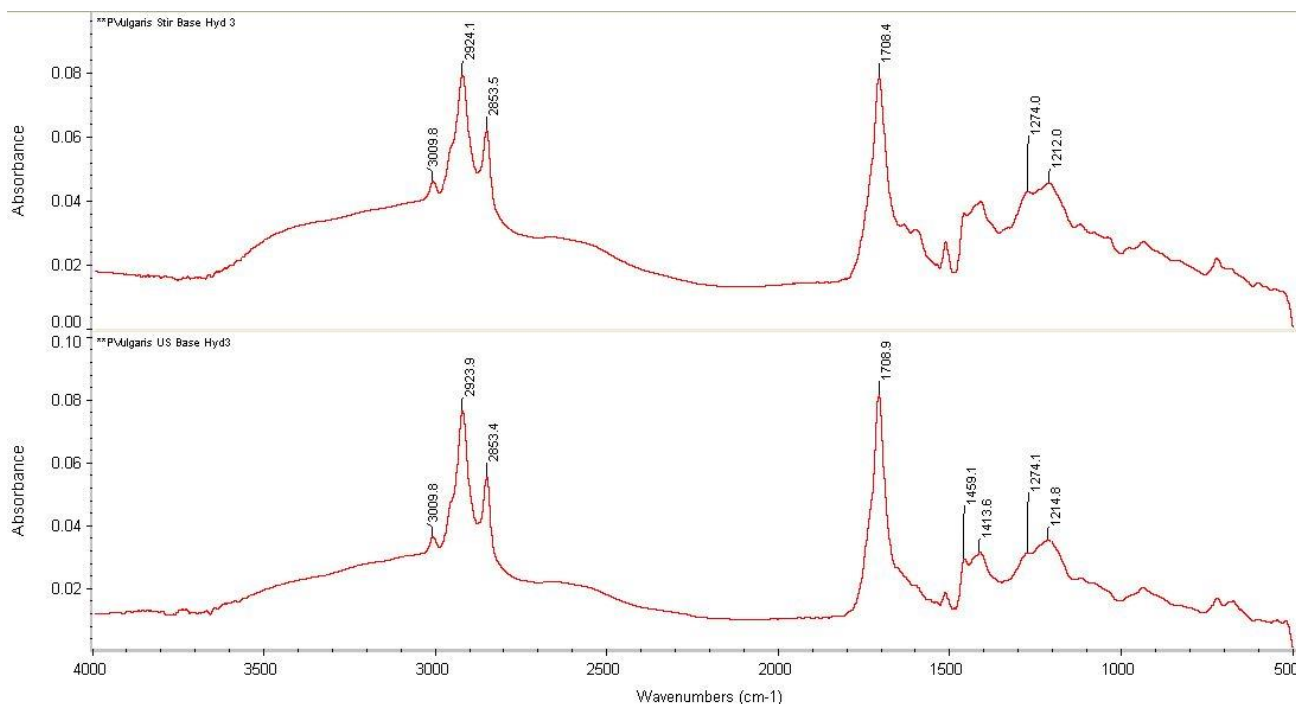
Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η υδρόλυση, και κυρίως η αλκαλική, επιτρέπει τη διάσπαση γλυκοζιτικών και εστερικών δεσμών των φαινολικών, δίνοντας την ευκαιρία να μελετηθούν. Παρακάτω παραθέτουμε φάσματα FT-IR σε δισκία ZnSe που παραλήφθηκαν μετά από αλκαλική υδρόλυση και εκχύλιση με οργανικό διαλύτη των τεσσάρων δειγμάτων (δύο γένη φασολιών x δύο τεχνικές εκχύλισης).



**Εικόνα 2.26: Φάσμα FT-IR σε ZnSe των αλκαλικά υδρολυμένων εκχυλισμάτων *P.coccineus* με μηχανική ανάδευση (κάτω) και με υπέρηχους (πάνω)**

Τα μετά την αλκαλική υδρόλυση φάσματα παρουσιάζουν μία αρκετά «καθαρή» εικόνα. Σε όλα είναι εμφανείς οι δονήσεις των αρωματικών, αλκανικών και αλκενικών C-H στην περιοχή 3010-2850, με τρεις ξεχωριστές κορυφές, εκ των οποίων η πρώτη μέτριας έντασης και οι δύο επόμενες ισχυρής έντασης. Η πλατιά κορυφή στην περιοχή 2700-2500 $\text{cm}^{-1}$

αποδίδεται στο O-H του καρβοξυλίου οξέων με δεσμούς H όπως για παράδειγμα αυτά που αναμένουμε να έχουμε στα δείγματά μας. Η ισχυρή οξεία απορρόφηση στα  $1700\text{cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστική για το C=O των καρβοξυλικών οξέων, πράγμα που σημαίνει ότι έχουν επιτυχώς σπάσει οι εστερικοί δεσμοί μέσω της αλκαλικής υδρόλυσης. Οι μέτριες επικαλυπτόμενες απορροφήσεις στα  $1500\text{-}1600\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στα -H του αρωματικού δακτυλίου ενώ οι πιο έντονες απορροφήσεις στα  $1400\text{-}1470$  αντιστοιχούν σε δονήσεις των αλκανικών -H. Οι πολλαπλές κορυφές που εμφανίζονται στα  $1200\text{-}1280$  αντιστοιχούν στις δονήσεις C-O των καρβοξυλικών οξέων και οι πολλαπλές κορυφές στο εύρος  $600\text{-}900$  αντιστοιχούν στις δονήσεις των αρωματικών -H.



**Εικόνα 2.27:** Φάσμα FT-IR σε ZnSe των αλκαλικά υδρολυμένων εκχυλισμάτων *P.vulgaris* με μηχανική ανάδευση (πάνω) και με υπέρηχους (κάτω)

### Συμπεράσματα

Μετά και την απόδοση των απορροφήσεων υπερέθρου στα υδρολυμένα εκχυλίσματα μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής: ο βασικός παράγοντας που μας δυσκολεύει να μελετήσουμε ποιοτικά τα φάσματα του αρχικού δείγματος αλλά και των εκχυλισμάτων είναι η εκτεταμένη ύπαρξη νερού. Οι απορροφήσεις του -OH είναι τόσο εκτεταμένες που σκεπάζουν εξολοκλήρου τις τρεις κορυφές περί των  $3000\text{cm}^{-1}$  που αποδίδονται στα αρωματικά, αλκενικά και αλκανικά -H, όπως επίσης και την περιοχή  $1600\text{-}1000\text{cm}^{-1}$  με αποτέλεσμα να μην είναι εμφανείς οι απορροφήσεις που οφείλονται στους άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου.

Παρόλα αυτά, όλες αυτές οι απορροφήσεις υπάρχουν και στο αρχικό φάσμα, αν και δεν είναι αναγνωρίσιμες: για παράδειγμα, οι τρεις κορυφές των αρωματικών, αλκενικών και αλκανικών –H εμφανίζονται σαν ένας πλατύς ώμος περίπου στα  $2900\text{cm}^{-1}$  πάνω στην ισχυρή πλατιά κορυφή του –OH που εκτείνεται από τα  $3600$  έως τα  $2400\text{cm}^{-1}$ . Με την αλκαλική υδρόλυση, εξουδετέρωση με οξύ και εν συνεχεία εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα και οξικό αιθυλεστέρα ( $\text{Et}_2\text{O}:\text{AcOOEt}$ ), καταφέρνουμε να συγκεντρώσουμε την περιεκτικότητα των φαινολικών στο δείγμα και να περιορίσουμε την ύπαρξη νερού.

Σε τελική ανάλυση μπορούμε να ισχυριστούμε ότι, αφού εξετάσαμε τα προφίλ των φασμάτων υπερύθρου αρχικών δειγμάτων, λυοφιλιωμένων εκχυλισμάτων και εκχυλισμάτων που υπέστησαν αλκαλική υδρόλυση, τα φαινολικά συστατικά του φασολιού είναι αυτά που παίζουν τον κύριο ρόλο στο φάσμα του, αν και λόγω των παραγόντων που περιγράψαμε παραπάνω δεν είναι εξαρχής εμφανές αυτό. Ακόμη, έχοντας μελετήσει τα φάσματα των προτύπων οξέων και κάνοντας τη σύγκριση με τη βιβλιογραφία, η φασματοφωτομετρική μελέτη υπερύθρου μας οδηγεί να υποθέσουμε ότι τα βασικά φαινολικά συστατικά που συνεισφέρουν στο προφίλ του φάσματος και των δύο ειδών φασολιών είναι: φερουλικό, σιναπικό και π-κουμαρικό οξύ.

Η μελέτη των δειγμάτων με υπέρυθη φασματοσκοπία επιβεβαιώνει με απόλυτο τρόπο τις ενδείξεις που μας έχει δώσει στο προηγούμενο στάδιο της μελέτης μας η Υγρή Χρωματογραφία.

# 3

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη και ο προσδιορισμός των βασικών φαινολικών των φασολιών του είδους *P.vulgaris* και του είδους *P.coccineus*, τα οποία αποτελούν δύο από τα σημαντικότερα όσπρια ως προς την καλλιέργεια και την κατανάλωση προσεγγίστηκε από διάφορα μονοπάτια.

Τα δείγματά μας εξετάστηκαν με αρκετούς από τους σύγχρονους τρόπους και μεθόδους ανάλυσης που ενδείκνυνται για τη μελέτη των φαινολικών και αντιοξειδωτικών συστατικών σε φυτικά υποστρώματα: φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) με δισκία σεληνιούχου ψευδαργύρου, φασματοφωτομετρία υπερύθρου με τη μέθοδο Διάχυτης Ανάκλασης με μετασχηματισμό Fourier (DRIFTS), Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Αποδοσης με ανιχνευτή φωτοδιόδων (HPLC-DAD). Προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων μας με τη φωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu, η αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση των δειγμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS.

Ταυτοποιήθηκαν ποιοτικά κάποια από τα βασικά φαινολικά συστατικά των οσπρίων, που φαίνεται ότι υπάρχουν και στα δύο είδη τόσο με την υπέρυθρη φασματοσκοπία όσο και με την υγρή χρωματογραφία. Πρόκειται για την τάξη των υδροξυκιναμικών οξέων, που ανήκουν στην κατηγορία των φαινυλοπροπυνοειδών, μία σημαντική κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών. Σαν βασικότερα συστατικά των φασολιών *P.vulgaris* και *P.coccineus* προσδιορίστηκαν το φερουλικό, σιναπικό, π-κουμαρικό και καφεϊκό οξύ, ενώ υπάρχουν υπόνοιες ότι πέραν αυτών ενυπάρχουν στα δείγματά μας ποσοτητες μ-κουμαρικού οξέος, άλλων υδροξυβενζοϊκών παραγώγων τα οποία δεν έγινε κατορθωτό να προσδιοριστούν επακριβώς.

Προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων και έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των δύο μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση α) εκχύλιση με απλή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και β) εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, και οι δύο για 15 λεπτά. Έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των δύο ειδών φασολιών, *P.vulgaris* και *P.coccineus*, σε σχέση με την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά. Η αποδοτικότερη εκ των δύο μεθόδων που χρησιμοποιήθηκε, όσον αφορά την εκχύλιση των φαινολικών είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους. Σε σχέση με τα δύο είδη φασολιών μετρήθηκε ότι το *P.coccineus* είναι πλουσιότερο σε φαινολικά συστατικά σε σχέση με το *P.vulgaris*. Η περιεκτικότητα των φασολιών και των γιγάντων σε ολικά φαινολικά είναι μέτρια.

Προσδιορίστηκε ακόμη η αντιριζική και αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των φασολιών και των γιγάντων χρησιμοποιώντας δύο από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους. Τόσο στη μέθοδο DPPH όσο και στη μέθοδο ABTS μετρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν χαμηλή αντιριζική και αντιοξειδωτική δράση και ότι η εκχύλιση με υπερήχους υπερτερεί της απλής ανάδευσης. Τα φασόλια *P.coccineus* δίνουν συστηματικά πιο αυξημένα αποτελέσματα σε σχέση με τα *P.vulgaris*, πράγμα που αποδεικνύει ότι είναι πλουσιότερα σε φαινολικό περιεχόμενο από τα κοινά φασόλια.

Ακόμη, μετρήθηκαν οι αποδόσεις επί ξηρού λυοφιλωμένου στερεού για τα δύο γένη φασολιών και τις δύο μεθόδους. Βρέθηκε ότι το είδος *P.coccineus* και η τεχνική της εκχύλισης με υπερήχους υπερτερούν στην απόδοση επί ξηρού προϊόντος του είδους *P.vulgaris* και της απλής ανάδευσης.

Εν κατακλείδι, τα φασόλια αποτελούν μία ολοκληρωμένη βασική τροφή για τον άνθρωπο. Κοντά στα άλλα βασικά για τη διατροφή συστατικά με τα οποία τον εφοδιάζουν: υδατάνθρακες, βασικές πρωτεΐνες και αμινοξέα, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, κάποια λιπαρά οξέα, τον εφοδιάζουν με πολύτιμα φαινολικά συστατικά που έχουν διάφορα ευεργετικά αποτελέσματα για τον οργανισμό, μεταξύ των οποίων η αντιοξειδωτική τους δράση.

Το γεγονός ότι τα φαινολικά των φασολιών είναι συμπλεγμένα σε γλυκοζίτες και πολύ περισσότερο, διμερισμένα ή εστεροποιημένα με λιπαρά οξέα τα κάνει αρκετά ανθεκτικά κατά την κατεργασία τους, με αποτέλεσμα οι απώλειες κατά το μαγείρεμα να είναι τις τάξης του 1/3 του συνόλου.

Η βακτηριακή χλωρίδα του ανθρώπινου εντέρου, σε συνδυασμό με διάφορα ένζυμα που καταλύουν την διάσπαση των εστέρων δίνουν τη δυνατότητα όλα αυτά τα φαινολικά συστατικά να περάσουν μέσω της πέψης στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα φαινολικά που σε τελική ανάλυση περνούν από τα φασόλια στον ανθρώπινο οργανισμό, έχοντας κατά νου ότι πρόκειται για τροφή που καταναλώνεται σε ποσότητες, με τη μερίδα να λογίζεται στα 125g είναι συγκρίσιμο μέγεθος με τα φαινολικά που περιέχονται σε μία κούπα αρωματικού αφεψήματος.



# **4**

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση Αρθρογραφία και Συγγράμματα

- Acosta-Estrada, B.A., Gutierrez-Uribe, J.A., Serna-Saldivar, S.O., (2014) Bound Phenolics in Food, A Review, *Food Chemistry*, 152, 46-55
- Barampama Z. & Simard R. E., (1993), Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi, *Food Chemistry* 47, 159-167
- Boye J. , Zare F., Pletch A., (2010). (Review), Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed, *Food Research International*, 43, 414–431
- Campos-Vega R., Loarca-Pina G., Oomah B. D., (2010). Review Minor components of pulses and their potential impact on human health, *Food Research International*, 43, 461–482
- Carbonarro, M., Maselli, P., Dore, P., Nucara, A., (2008) Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis, *Food Chemistry*, 108, 361-368
- Cardador-Martinez, A., Castano-Tostado., E., Loarca-Pina, G., 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Additives and Contaminants* 19, 62–69.
- Chibbar R. N., Ganeshan S., Baga M, and Khandelwal R. L., (2004) Carbohydrate Metabolism, *Encyclopedia of Grain Science*, p. 168-179
- Doria, E., Campion, B., Sparvoli, F., Tava, A., Nielsen, E., (2012) Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy, *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 72-80
- Douka A., Pappas C.S., Mitsi C., Polissiou M.,G., Tarantilis P.A., Botanical and geographical discrimination of common bean legumes (*Phaseolus vulgaris*) and giant bean (*Phaseolus coccineus*) using Diffues Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (DRIFTS) and Chemometrics
- 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
- Galvez-Ranilla, L., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., (2007) Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from brazillian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 90-98

- Grela, E.R, Gunter K.D., (1995). Fatty acid composition and tocopherol content of some legume seeds. *Animal Feed Science and Technology* 52, 325-331.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Romani, A., (2005) Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3053-3056
- Huang, Ou, Prior, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays (2005) *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1841-1856
- Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Ioannou, M., Karathanos, V.T., Hassapidou, M., Andrikopoulos, N. K., (2010) Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries, *Food Chemistry* 121, 682-690
- Lin, Long-Ze, Hamly, J.M., Pastor-Corrales, M.S., Luthria, D.L., (2008) The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Chemistry*, 107, 399-410
- Luthria, D.L., Pastor-Corrales, M., (2006) Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205-211
- Mattila, P., Kumpulainen, J., (2002) Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3660-3667
- 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, 407-412
- Narvaez-Cuenca, C.E., Vincken, J.P., Gruppen, H., (2012) Identification and quantification of (dihydro) hydroxycinnamic acids and their conjugates in potato by UHPLC-DAD-ESI-MS, *Food Chemistry*, 130, 730-738
- Oomah, D.B., Cardador-Martinez A., Loarca-Piña G., (2005) Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 935-942
- Pappas C., Tarantilis P., Daliani I., Mavromoustakos T., Poissiou M., (2002). Comparison of classical and ultrasound-assisted isolation procedures of cellulose from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus rodustrus* Sm.), *Ultrasonic Sonochemistry* 9, 19-23
- Prolla I. R. D., Barbosa R. G., Veeck A. P. L., Augusti P. R., Da Silva, L. P., Ribeiro N. D., Emanuelli T. (2010), Cultivar, harvest year, and storage conditions affecting nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(Supl.1): 96-102

- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay (1999) *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237
- 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, 933-956
- Robards K., Prenzler P.D., Tomassini Serravalle, L.R., Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from Argentinean herbs infusions (2010) *Food Chemistry*, 66, 401-436
- Ross, K.A., Beta, T., Arntfield, S.D., (2009) A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods, *Food Chemistry*, 113, 336-344
- Sathe S K and Venkatachalam M, (2004), Beans, *Encyclopedia of Grain Science*, p. 76-86.
- Sharma, O.P., Bhat, T.K., (2009) DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, 113, 1202-1205
- 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
- Skoog, Holler, Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 1998
- Sutivisedsak, N, Cheng, HN, Willett, JL, Lesch, WC, Tangsrud, RR, Biswas Atanu, (2010) Microwave assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus Vulgaris L.*) *Food Research International*, 43, 516-519
- Tsuda, Ohshima, Kawakishi, Osawa, (1994) Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris L.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 248-251

#### Βιβλιογραφία και συγγράμματα στα ελληνικά

#### Διδακτορικές και Μεταπτυχιακές Διατριβές

- Ιγνατιάδου-Ραγκούση Βαλεντίνη (1998) *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*
- Μακρή Ε.Α.(2006) *Μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών επιλεγμένων οσπρίων (Phaseolus vulgaris L. και Phaseolus coccineus L.) Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*
- Παπακώστα – Τασοπούλου, Δ., (2005) *Ψυχανθή (Καρποδοτικά – Χορτοδοτικά) Θεσσαλονίκη*
- Παππάς Χρήστος (2000), *Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού κενάφ (Hibiscus cannabinus L.) Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2007). Προοπτικές ανάπτυξης τομέα οσπρίων και κτηνοτροφικών φυτών (Με βάση προτάσεις & συμπεράσματα Περιφερειακών μελετών νέας ΚΑΠ).

Διαδικτυακές πηγές

FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>

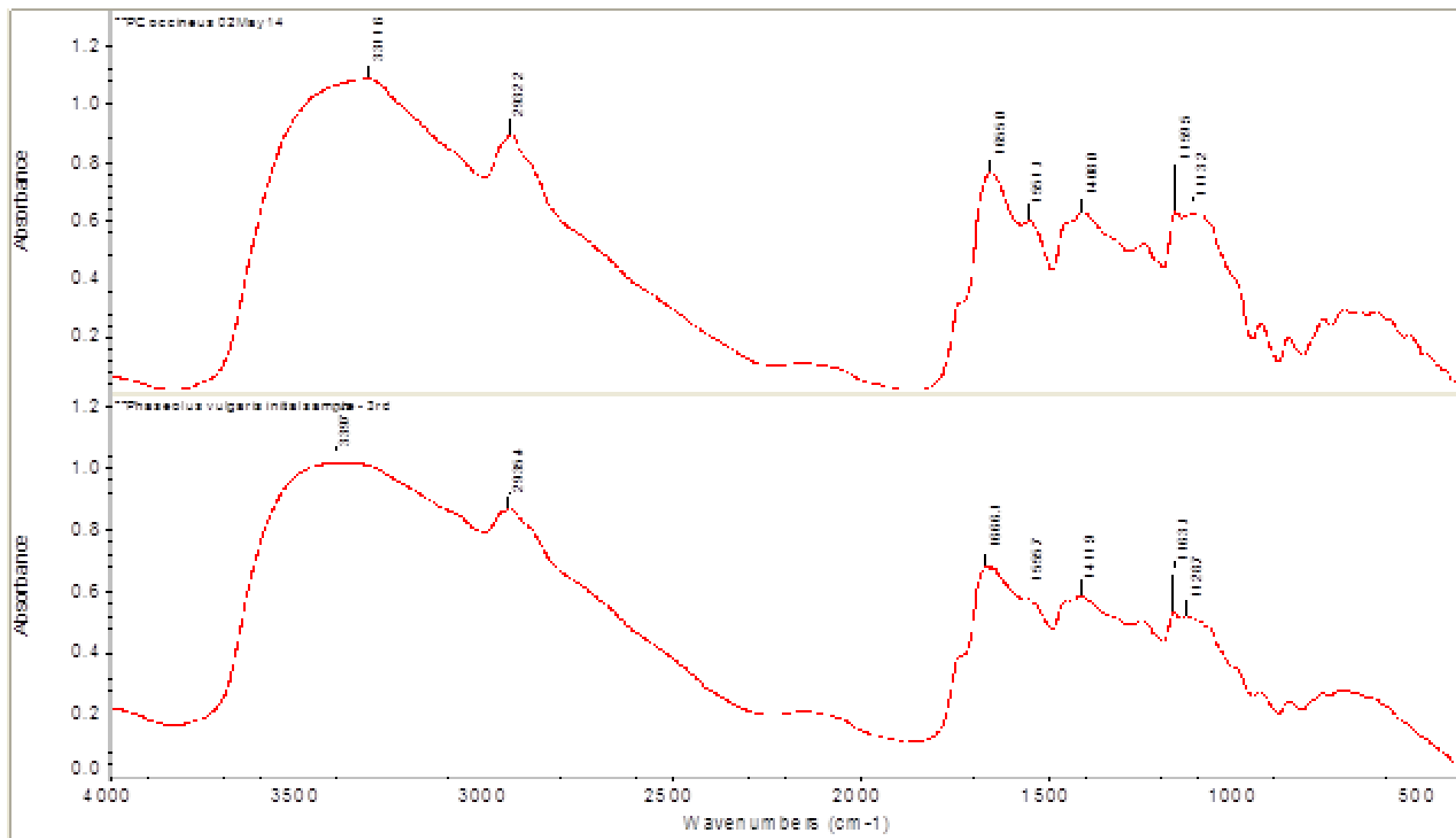
Βλαχοστέργιος Δ. (2011). Σύγχρονα προβλήματα και προοπτικές ανάπτυξης της καλλιέργειας των οσπρίων στην Ελλάδα. ΕΘΙΑΓΕ τεύχος 46, σελ. 8.

# **5**

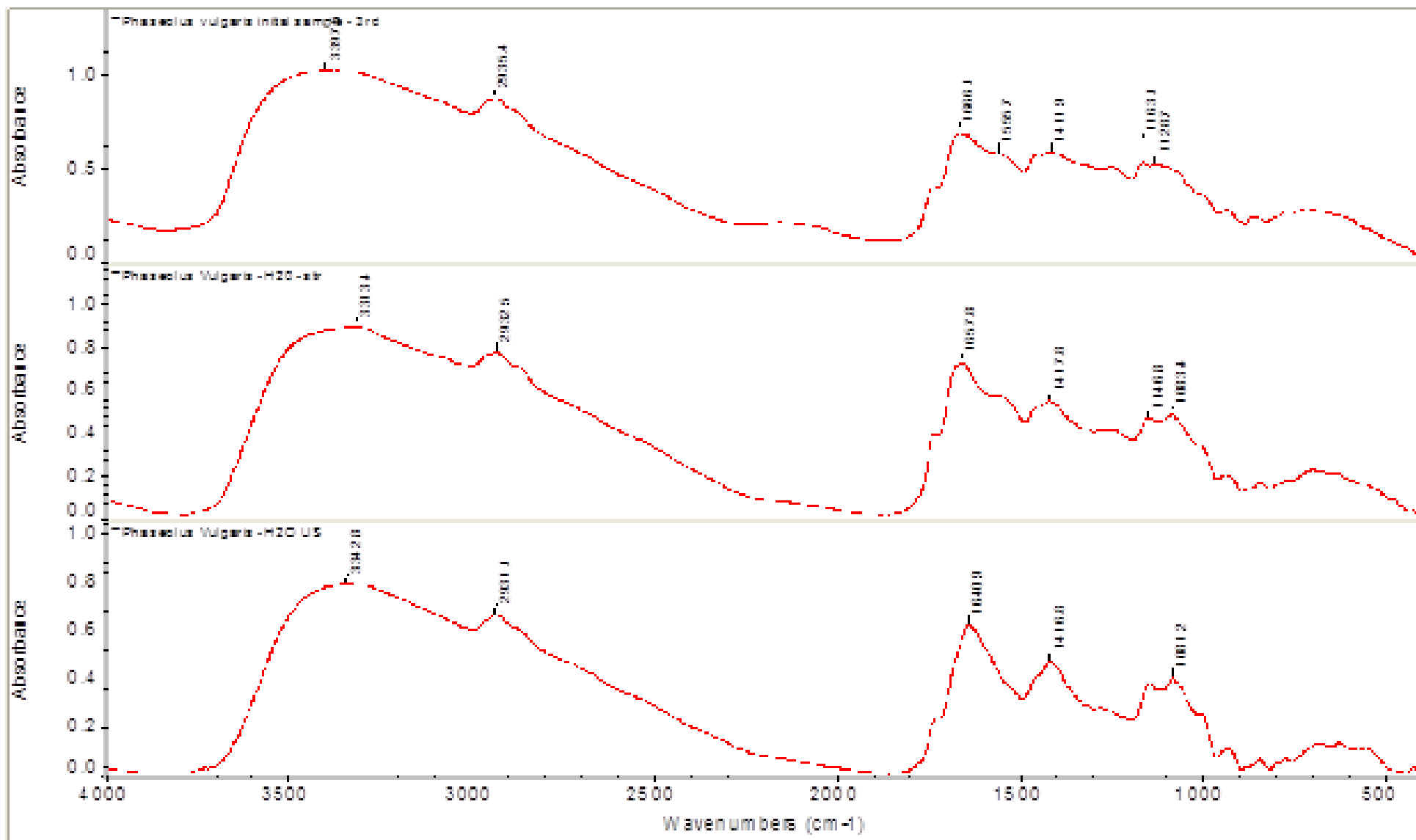
## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

### Α. Φάσματα IR δειγμάτων και προτύπων

Αρχικά Δείγματα Phaseolus vulgaris L.- Phaseolus coccineus L.

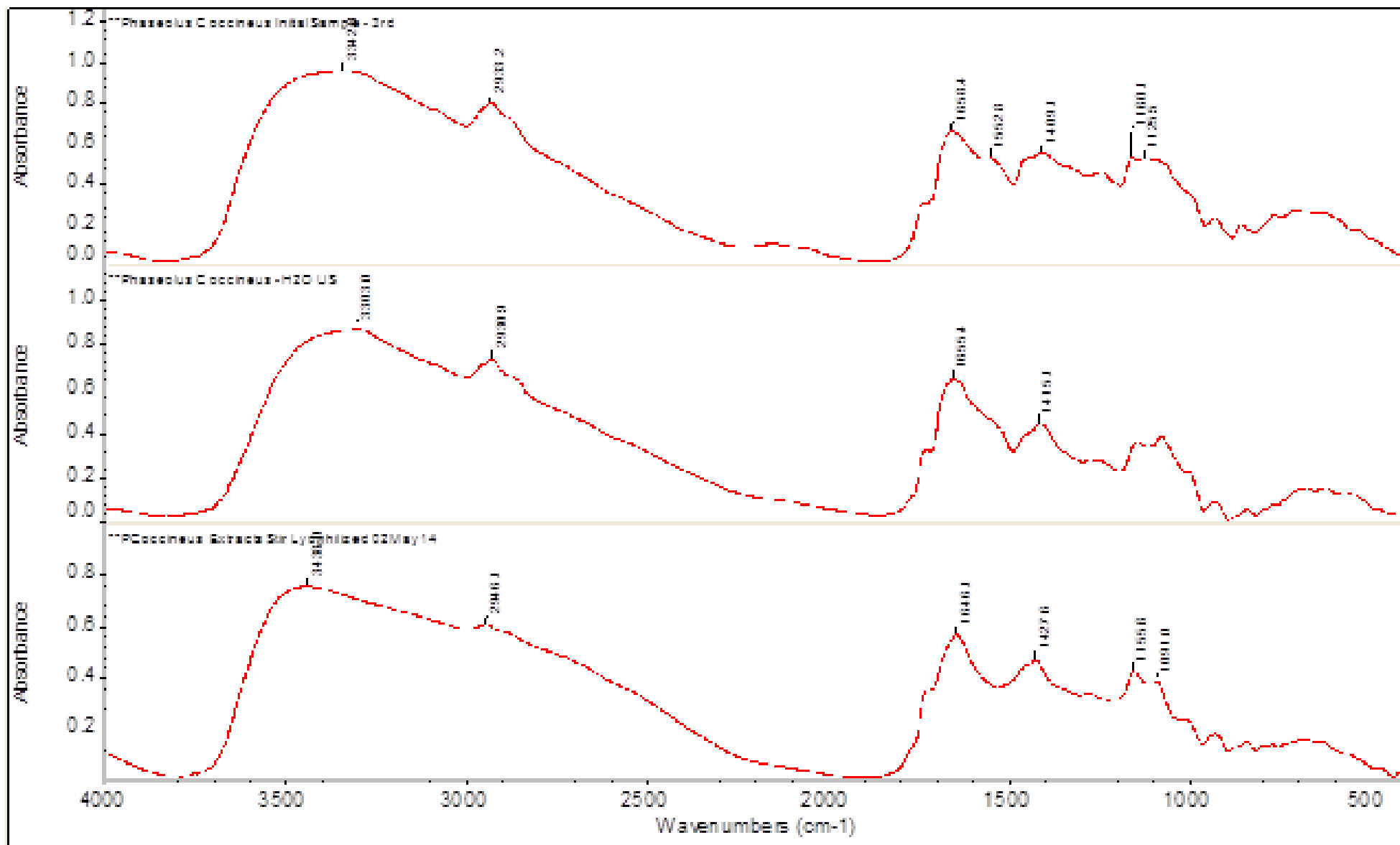


Σύγκριση αρχικού *P. vulgaris* L και λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων με απλή ανάδευση και με υπερήχους

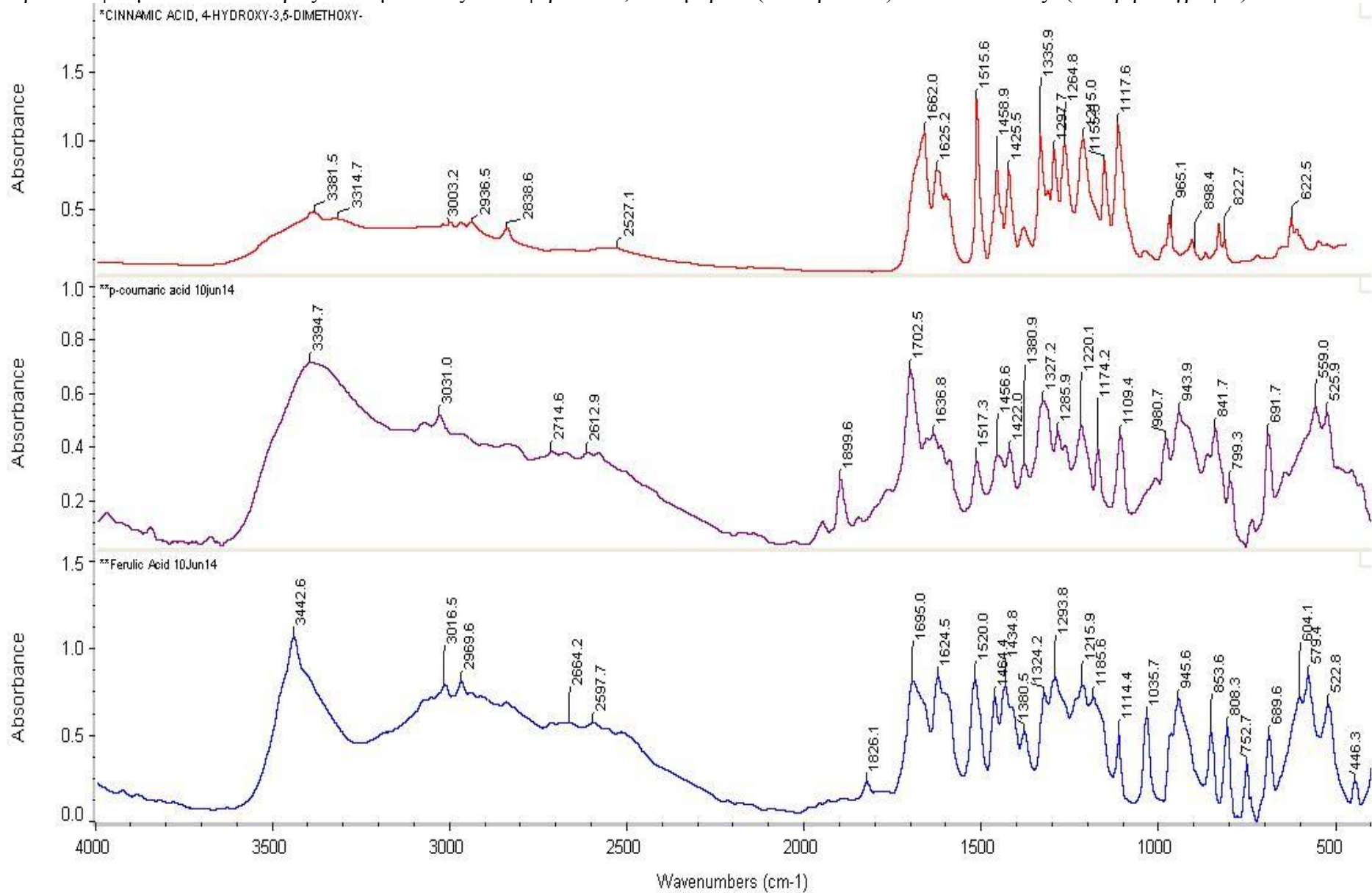




Σύγκριση αρχικού δείγματος *P.coccineus* L. και λυοφιλωμένων εκχυλισμάτων με απλή ανάδευση και με υπερήχους

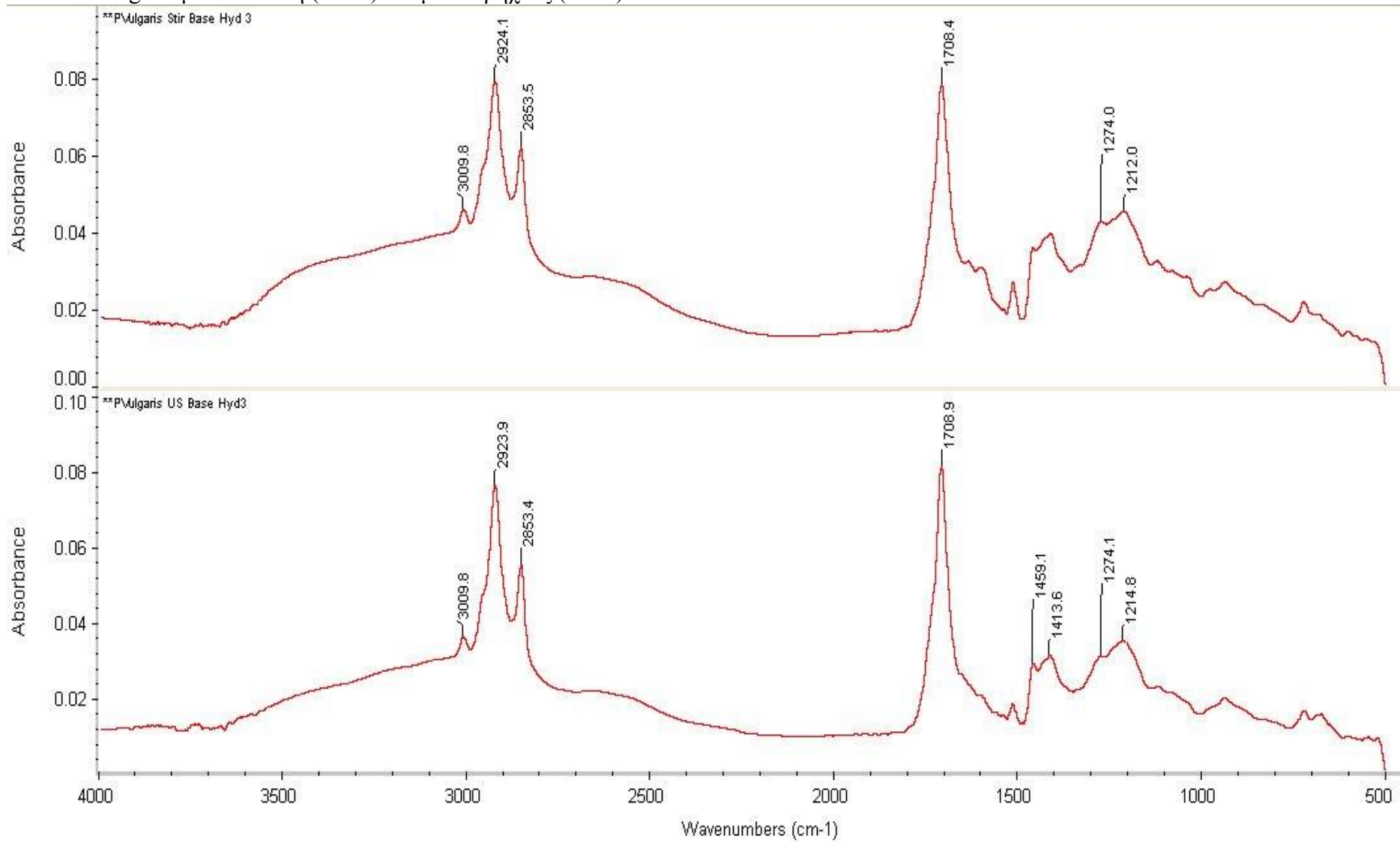


Πρότυπα φάσματα IR των υδροξυκιναμικών οξέων – φερουλικό,π-κουμαρικό (από πρότυπα) και σιναπικό οξύ (από βιβλιογραφία)

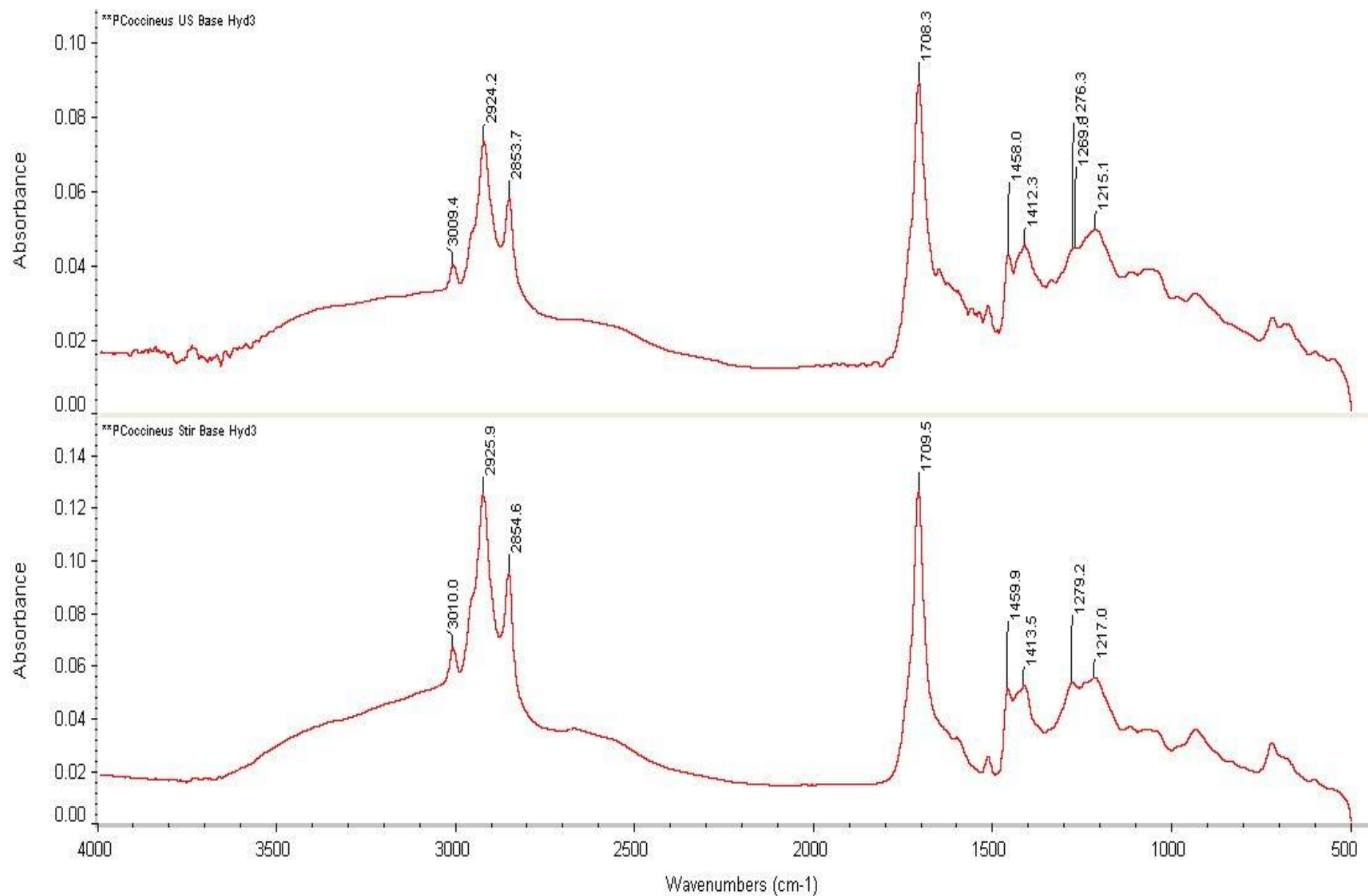


Φάσματα των τεσσάρων δειγμάτων μετά την αλκαλική υδρόλυση

*P. vulgaris* με ανάδευση (πάνω) και με υπερήχους (κάτω)

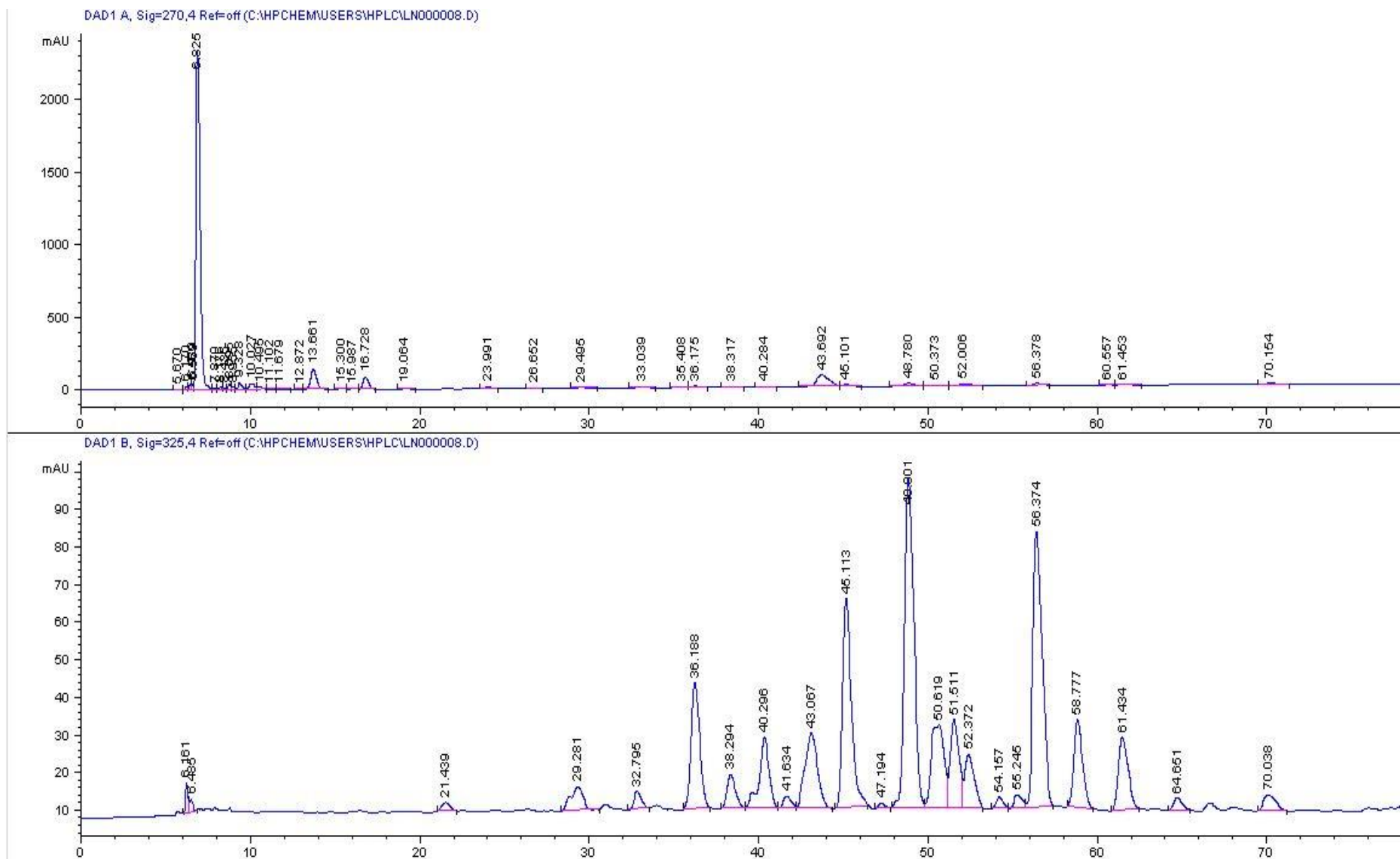


P.coccineus με υπέρηχους (πάνω) και με ανάδευση (κάτω)

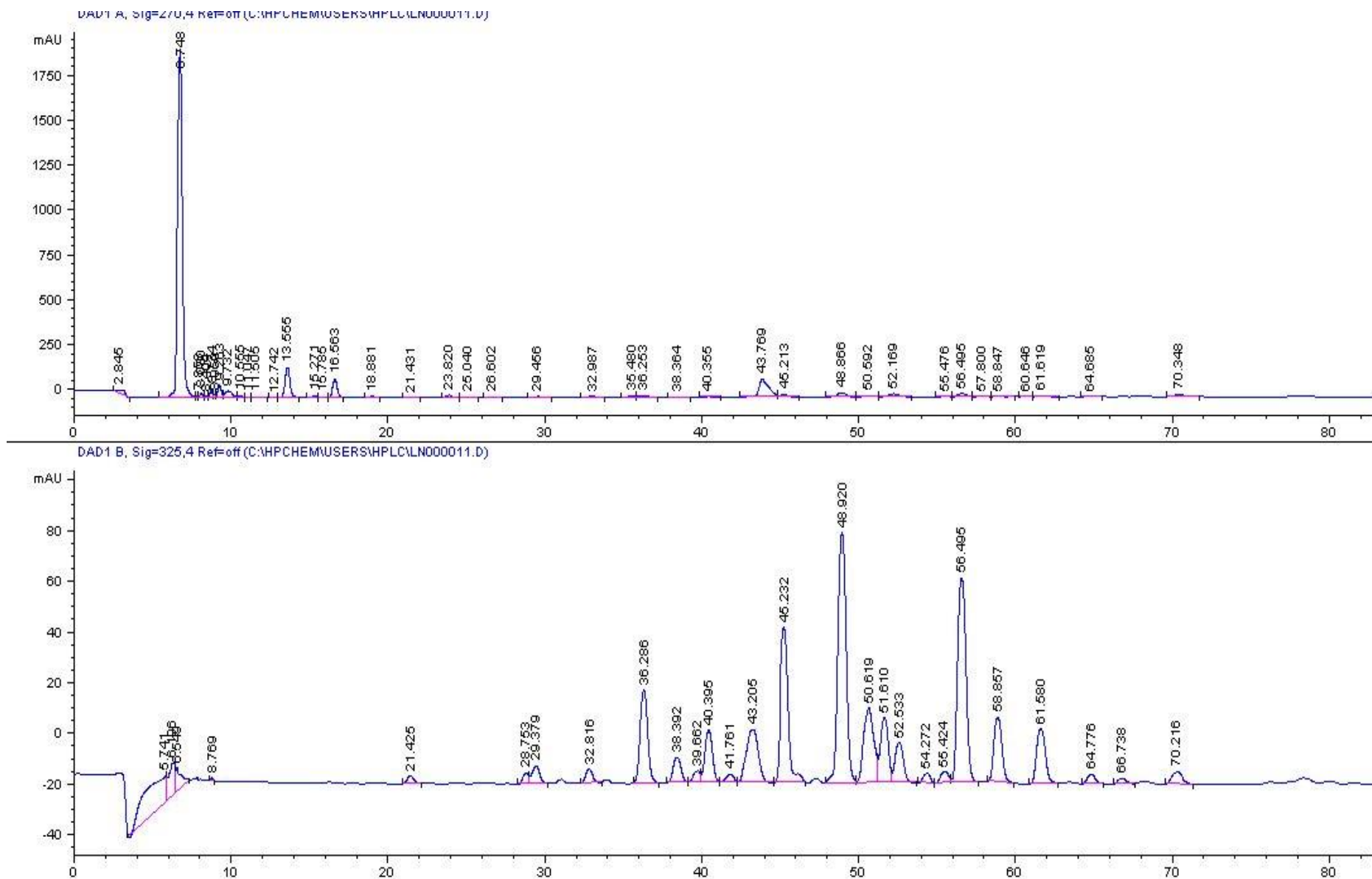


## B. Χρωματογραφήματα δειγμάτων και προτύπων

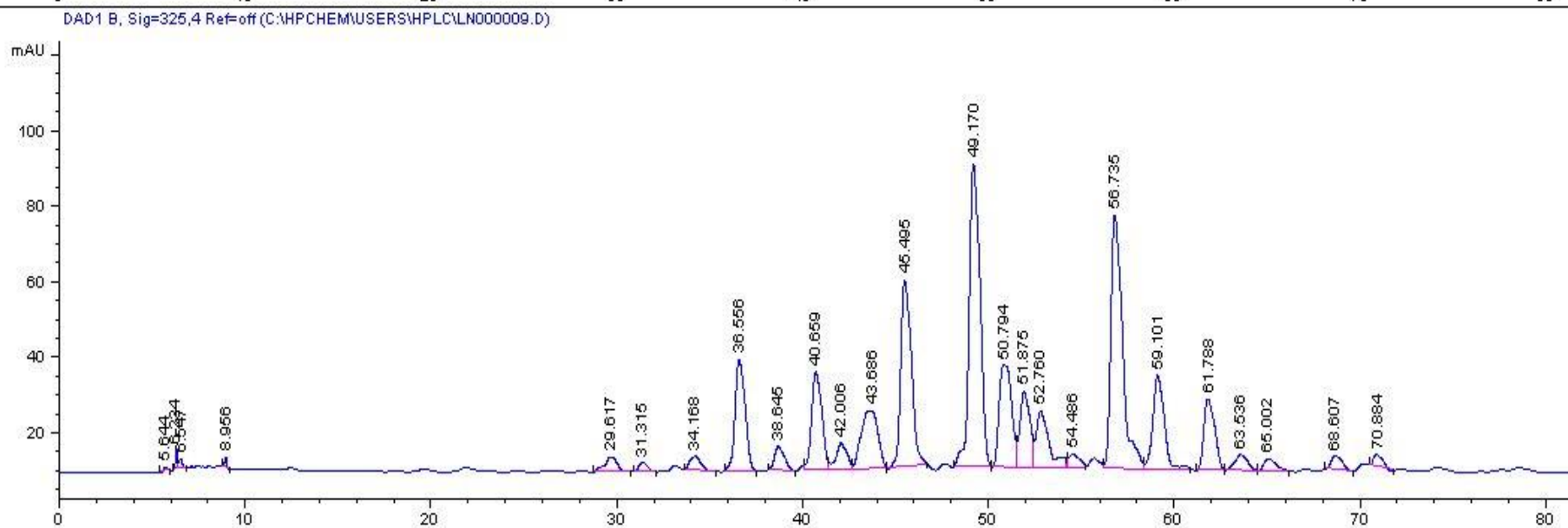
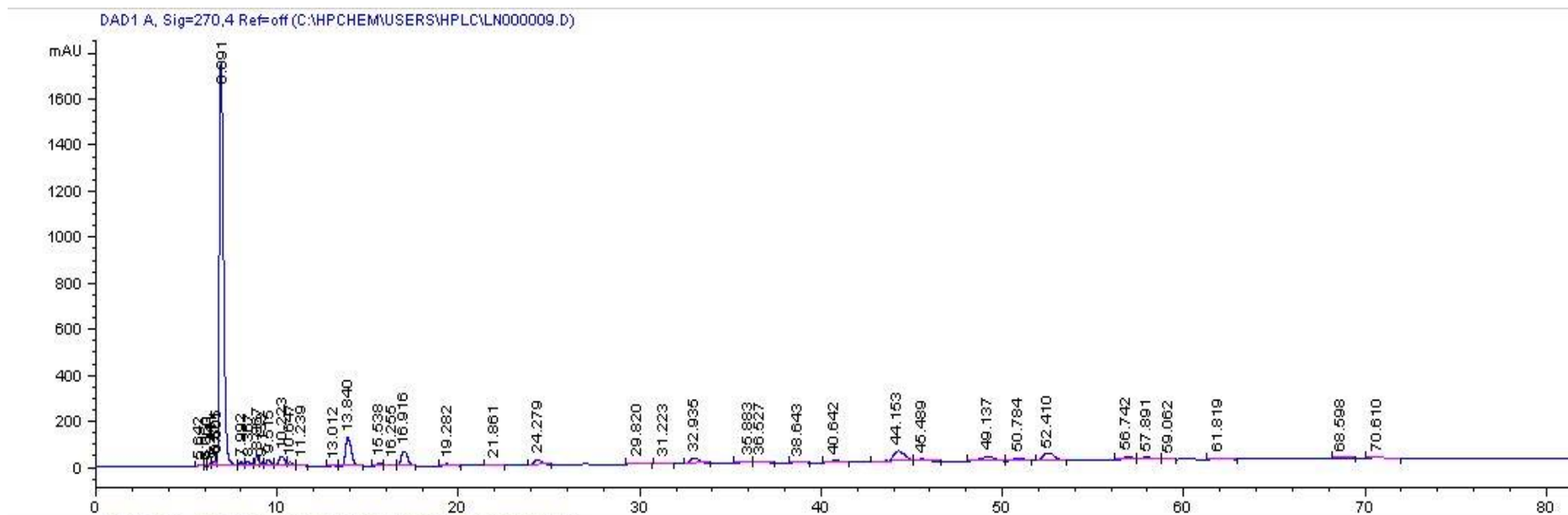
Χρωματογράφημα *P. vulgaris* στα 270, 325nm με απλή ανάδευση



Χρωματογράφημα *P.vulgaris* στα 270, 325nm με υπερήχους

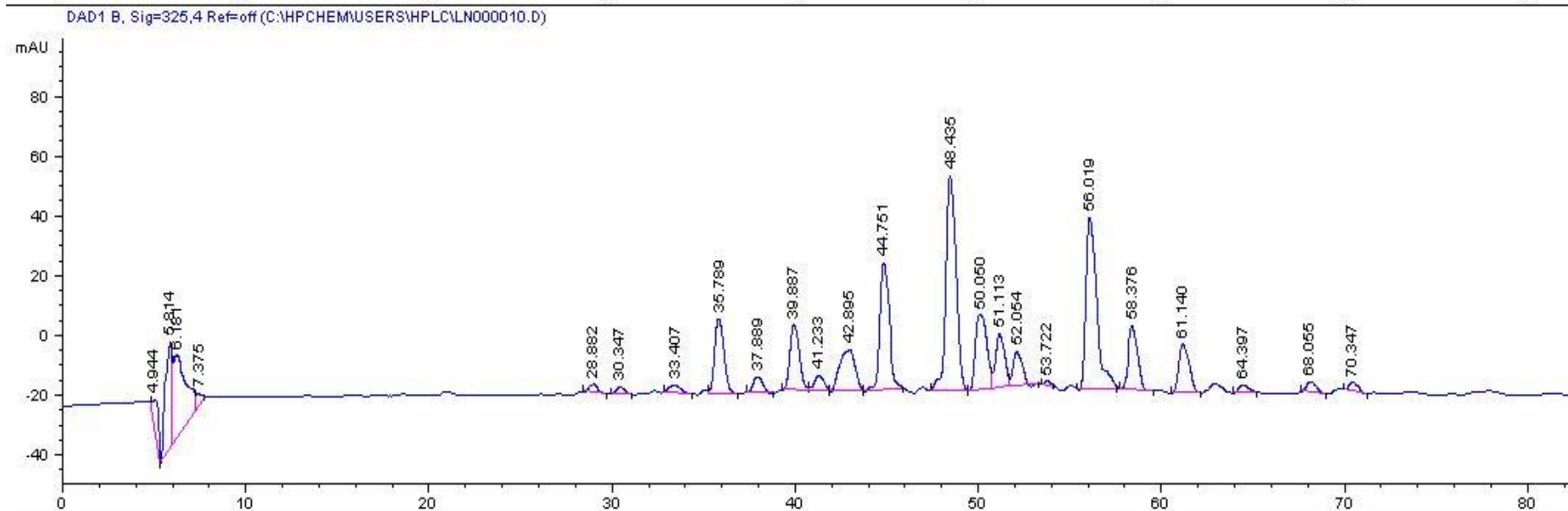
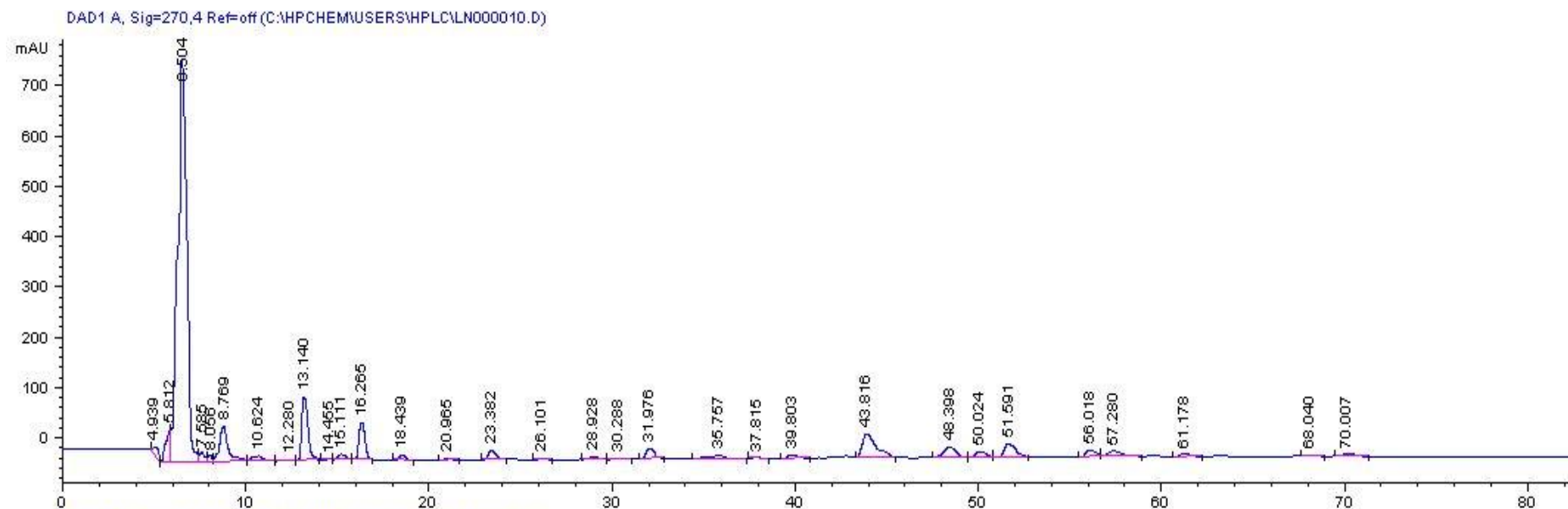


Χρωματογράφημα *P.coccineus* στα 270, 325nm με απλή ανάδευση



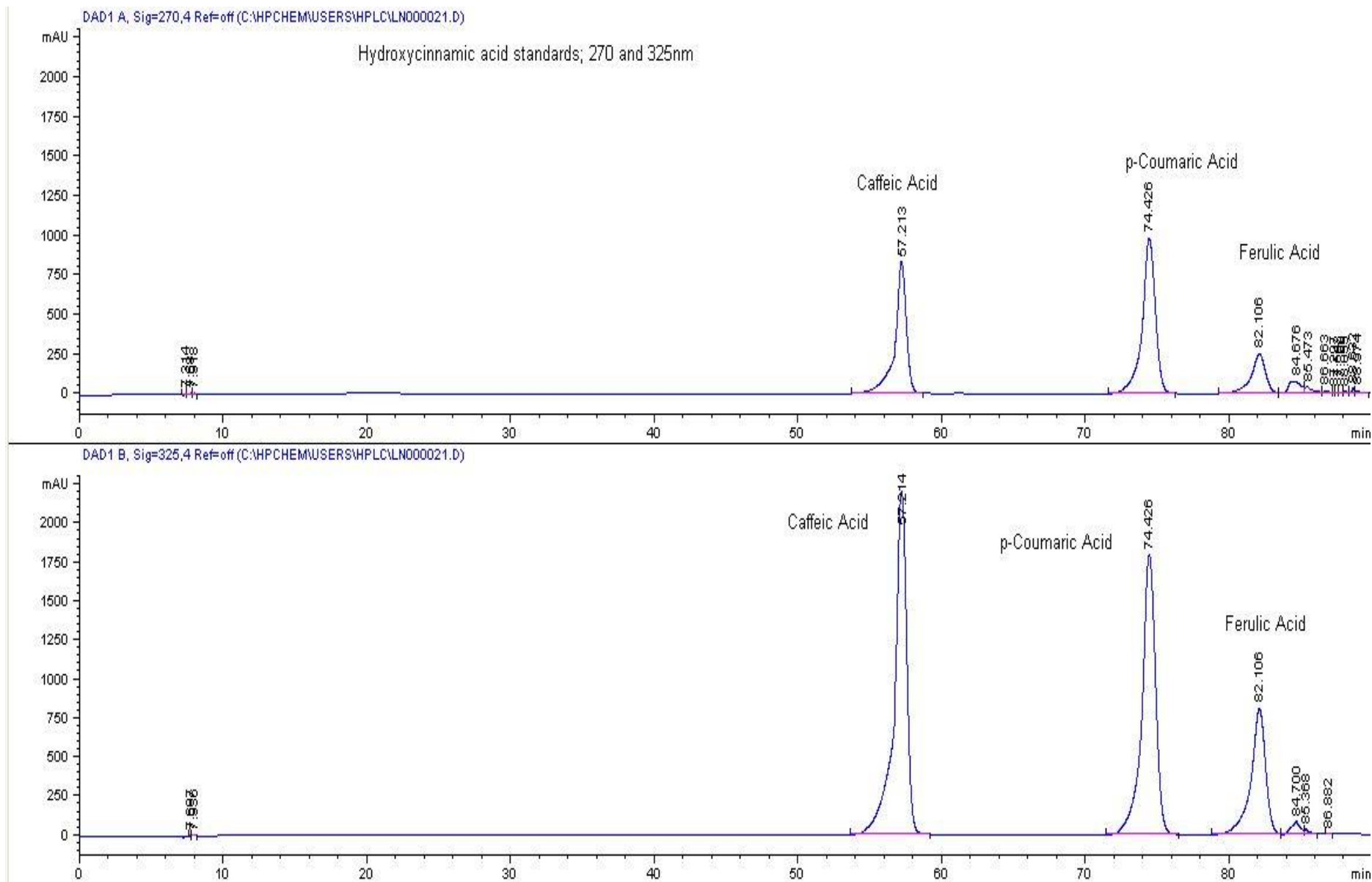


Χρωματογράφημα *P.coccineus* στα 270, 325nm με υπερήχους



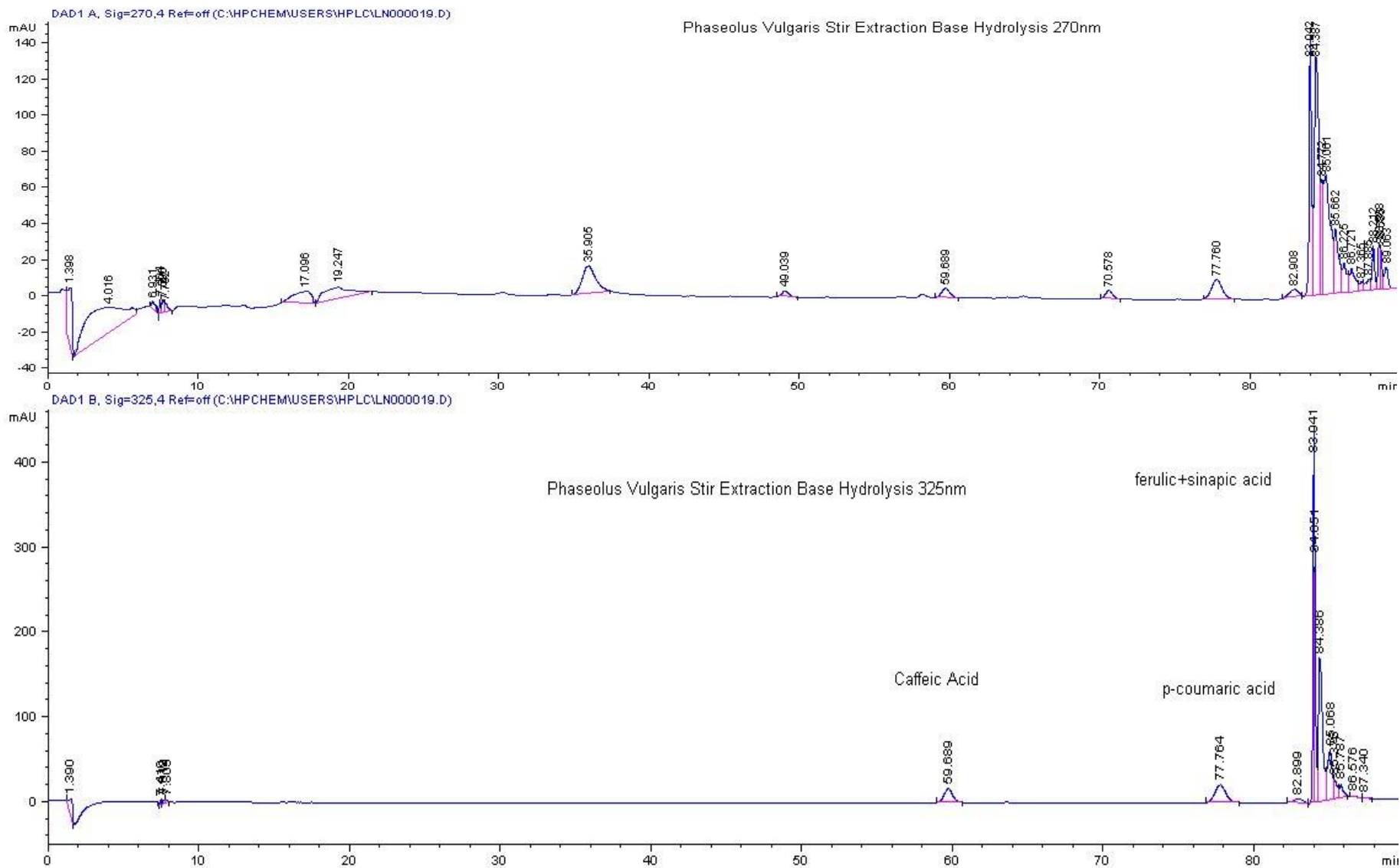


Χρωματογράφημα πρότυπων υδροξυκιναμικών οξέων στα 270, 325nm

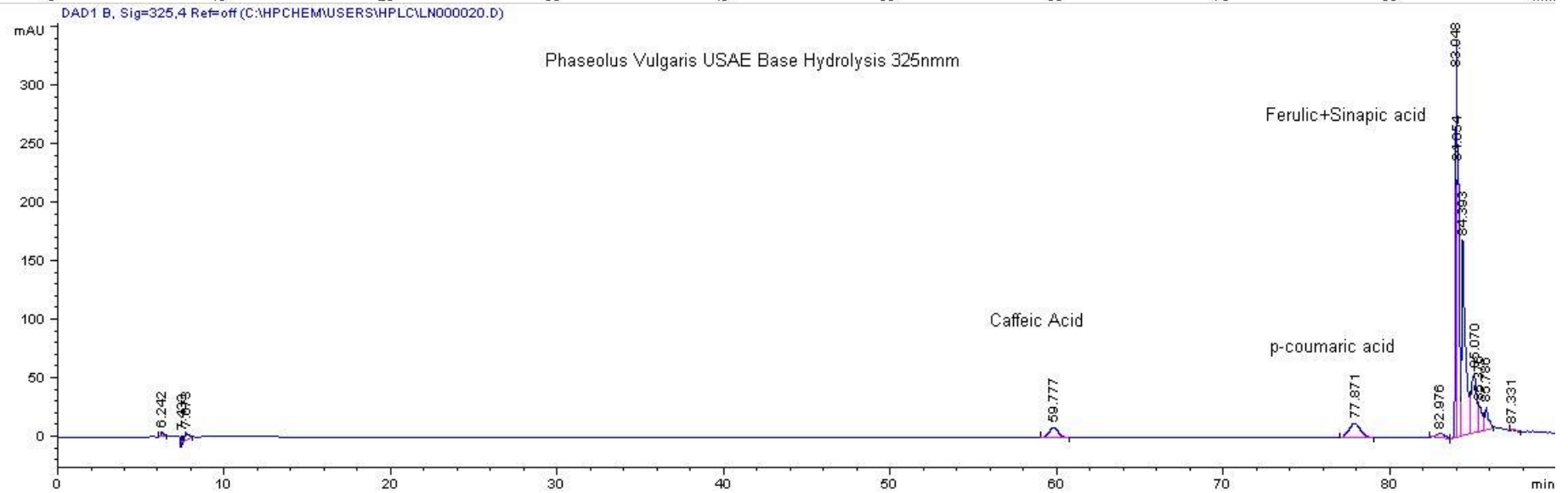
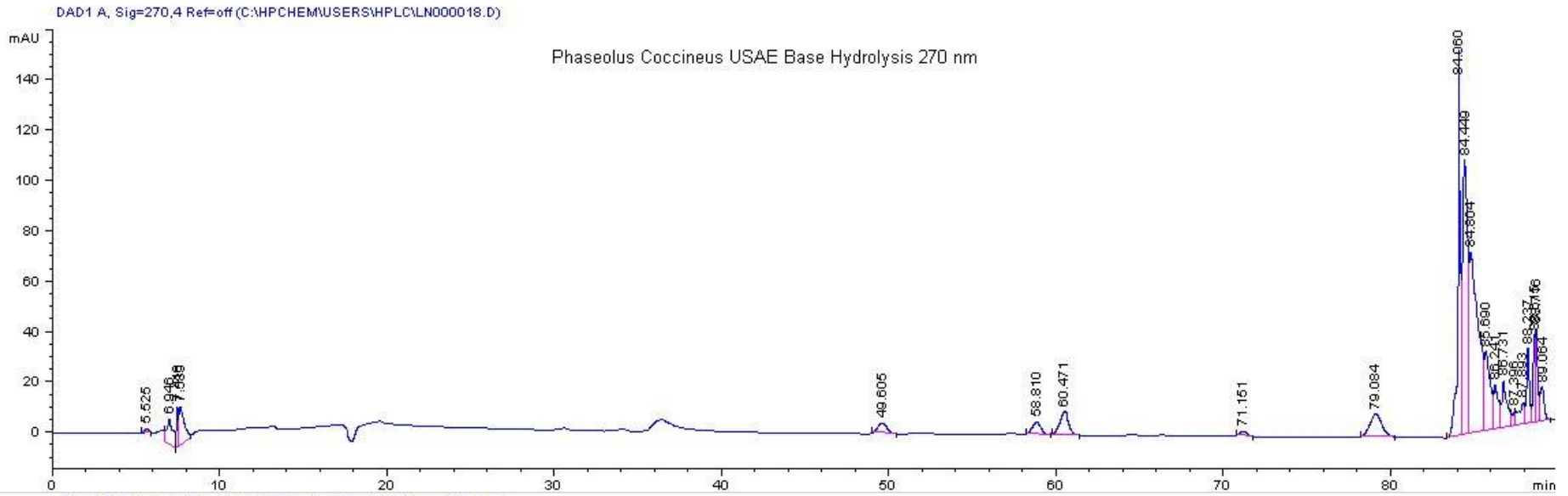


Χρωματογραφήματα των δειγμάτων φασολιών *P.vulgaris* L. και *P.coccineus* L. μετά την αλκαλική υδρόλυση στα 270, 325nm

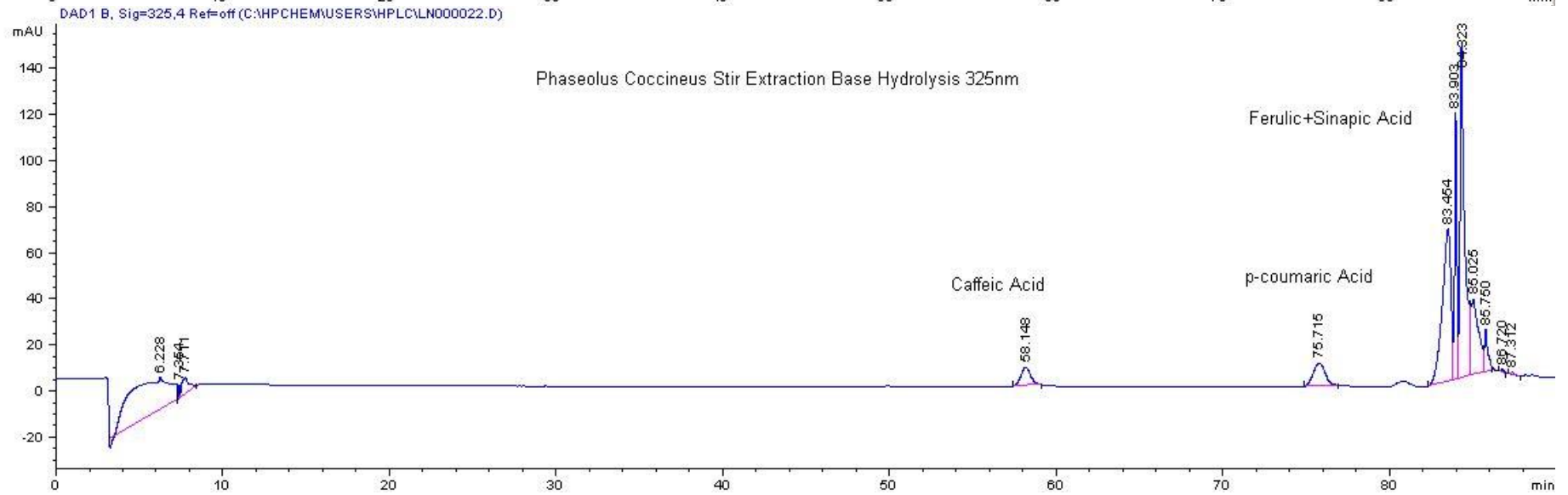
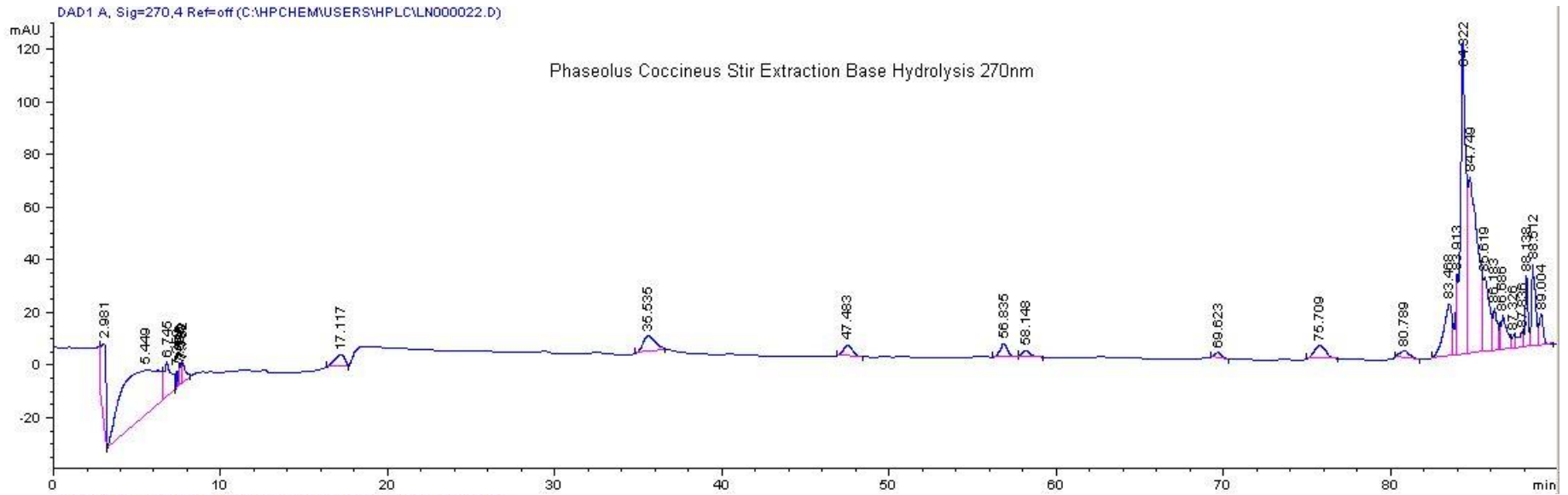
*P.Vulgaris* με απλή ανάδευση



P.vulgaris με υπερήχους



P.coccineus με απλή ανάδευση



# P.coccineus με υπερήχους

