



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή
του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Προσδιορισμός των πτητικών συστατικών και μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Asteraceae. Η περίπτωση του χαμομηλιού, της αχιλλέας, της αψιθιάς και του εστραγκόν»



Μαρία Κ. Κοκκίνη

Επιβλέπων Καθηγητής

Πέτρος Α. Ταραντίλης, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, 2016



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή
του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

«Προσδιορισμός των πτητικών συστατικών και μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων
φυτών της οικογένειας Asteraceae. Η περίπτωση του χαμομηλιού, της αχίλλειας, της αψιθιάς
και του εστραγκόν»

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

Μαρία Κ. Κοκκίνη

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πέτρος Ταραντίλης, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ

Χρήστος Παππάς, Επικ. Καθηγητής ΓΠΑ

Αθανάσιος Κυμπάρης, Αν. Καθηγητής ΔΠΘ

Αθήνα, 2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του ΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου» στην κατεύθυνση «Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων», του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, 2014-2016. Αντικείμενο της ήταν ο προσδιορισμός των πτητικών συστατικών και η μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων τεσσάρων φυτών της οικογένειας Asteraceae, του χαμομηλιού, της αχιλλέας, της αφιθιάς και του εστραγκόν.

Με την ολοκλήρωση της, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν και συνέβαλαν σε αυτή την προσπάθεια.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας Αναπληρωτή Καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη για τις επιστημονικές γνώσεις και την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας, τον ενθουσιασμό που μου μετέδωσε για το θέμα και την υποστήριξη του όλο αυτό το διάστημα. Το ταξίδι της έρευνας ήταν για μένα ανεκτίμητη εμπειρία που πρώτα απ' όλα βοήθησε στη διεύρυνση των γνώσεων μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Χρήστο Παπά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αθανάσιο Κυμπάρη, για το ενδιαφέρον τους, τις πολύτιμες συμβουλές τους και τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή, τη μελέτη και τη διόρθωση της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Σπύρο Κίντζιο και τη Διδάκτορα Ευαγγελία Φλαμπούρη του εργαστηρίου Κυτταρικής Τεχνολογίας για τη συνεργασία μας και την άμεση ανταπόκριση τους σε ό,τι κι αν χρειάστηκα. Επιπλέον δεν παραλείπω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Διδάκτορα Ευσταθία Σκώττη και τον Επίκουρο Καθηγητή Παναγιώτη Τρίγκα για τη σημαντική συμβολή τους στην πορεία της έρευνας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου, προσωπικό και φοιτητές, για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που σπάνια συναντά κανείς.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την υποψήφια Διδάκτορα Νεφέλη-Σοφία Σωτηροπούλου για τις πολύτιμες γνώσεις, την αμέριστη βοήθεια και τη φιλία της όλο αυτόν τον καιρό.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου Alejandro και Άννα για τη σχεδίαση και επιμέλεια του εξωφύλλου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου, γονείς και αδέρφια που στήριξαν τις σπουδές μου με κάθε τρόπο και τους φίλους μου για την αγάπη και κατανόηση τους όλον αυτόν τον καιρό.

Μαρία Κ. Κοκκίνη

Αθήνα 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μαρία Κ. Κοκκίνη

«Προσδιορισμός των πτητικών συστατικών και μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Asteraceae. Η περίπτωση του χαμομηλιού, της αχιλλέας, της αψιθιάς και του εστραγκόν»

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση των βοτάνων από τον άνθρωπο αυξάνεται συνεχώς σε όλο τον κόσμο. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν τέσσερα βότανα της οικογένειας Asteraceae: το χαμομήλι, η αψιθιά, η αχιλλέα και το εστραγκόν. Αντικείμενο της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των αιθερίων ελαίων και των αφεψημάτων τους. Ταυτόχρονα, έγινε σύγκριση των δειγμάτων γνωστής προέλευσης με άγνωστα δείγματα του εμπορίου. Επιπλέον, επειδή η ευρύτατη χρήση των βοτάνων θέτει και το ζήτημα της ασφάλειας τους για την υγεία του ανθρώπου, εκτιμήθηκε η τοξικότητα των αφεψημάτων.

Αρχικά, έγινε η παραλαβή των αιθερίων ελαίων και των οργανικών εκχυλισμάτων των αφεψημάτων τους και προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών τα πτητικά συστατικά τους, ποιοτικά και % ποσοτικά. Με τη χρήση πρότυπων καμπύλων αναφοράς, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση (mg/mL) της α - και β -θουγιόνης αλλά και της καμφοράς στα δείγματα όπου ανιχνεύτηκαν.

Επιπλέον, παρελήφθησαν τα φάσματα FT-IR του φυτικού υλικού και έγινε σύγκριση των φασμάτων με βάση την περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος. Τέλος, εκτιμήθηκε η τοξικότητα των αφεψημάτων με δύο διαφορετικές μεθόδους, τον αναλυτή Microtox® που χρησιμοποιεί το βακτήριο *Vibrio fischeri* και τη μέθοδο MTT σε κύτταρα Vero.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα της αψιθιάς και της αχιλλέας παρουσίασαν μεγάλη χημική ποικιλομορφία μεταξύ τους, υψηλή απόδοση αιθερίου ελαίου αλλά και μεγαλύτερο αριθμό πτητικών συστατικών σε σχέση με αυτά του χαμομηλιού και του εστραγκόν. Βρέθηκαν δύο σπάνιοι χημειότυποι στην περίπτωση της αψιθιάς και ένας που δεν έχει αναφερθεί ξανά, στο άγνωστο δείγμα της αχιλλέας, γεγονός που δημιουργεί αμφιβολία για τη βοτανική του προέλευση. Επιπλέον, στο άγνωστο δείγμα εστραγκόν είναι η πρώτη φορά που βρίσκεται η εστραγόλη σε τόσο υψηλό ποσοστό. Η μεγάλη ανομοιογένεια των άγνωστων δειγμάτων σε σχέση με τα υπόλοιπα θέτει υπό αμφισβήτηση την προέλευση και την ποιότητα τους.

Στην πλειοψηφία των αφεψημάτων το προφίλ των πτητικών συστατικών συμφωνούσε με αυτό των αντίστοιχων αιθερίων ελαίων εκτός λίγων εξαιρέσεων. Η β -θουγιόνη βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από την α - στα δείγματα αψιθιάς και αχιλλέας όπου ανιχνεύτηκε, ενώ ήταν αξιοσημείωτα μεγάλη στην αψιθιά από την Ιεράπετρα. Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις στα

αφεψημάτα με τα αντίστοιχα αιθέρια έλαια τους, σε μεγαλύτερο ποσοστό ανιχνεύεται η καμφορά και σε μικρότερο η α - και β -θουγιόνη.

Όσον αφορά τα φάσματα FT-IR, τα δείγματα των ειδών που ήταν πιο όμοια μεταξύ τους ήταν τα δείγματα του χαμομηλιού και της αψιθιάς και λιγότερο της αχιλλέας και του εστραγκόν. Η βιοδραστικότητα-τοξικότητα των αφεψημάτων που μελετήθηκε με τον αναλυτή Microtox® ήταν ανάλογη του φυτικού είδους με το εστραγκόν να εμφανίζει τη μεγαλύτερη, στη συνέχεια το χαμομήλι, η αχιλλέα και τέλος η αψιθιά τη μικρότερη. Φαίνεται ότι η ένδειξη αυτή της τοξικότητας δεν οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο τοξικό συστατικό αλλά στο συνολικό χημικό προφίλ του κάθε φυτικού δείγματος. Τέλος, ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των αφεψημάτων με τη μέθοδο MTT έδειξε ότι η αχιλλέα και στη συνέχεια το εστραγκόν παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας των νεφρικών κυττάρων Vero, και ακολούθησαν η αψιθιά και το χαμομήλι.

Λέξεις κλειδιά:	Βότανα, Χαμομήλι, Αψιθιά, Αχιλλέα, Εστραγκόν, Αιθέρια έλαια, Αφεψημάτα, Υδρο-απόσταξη, Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, Αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών, χημειότυπος, α - και β -θουγιόνη, καμφορά, FT-IR, Τοξικότητα, Microtox®, Μέθοδος MTT
-----------------	---

Νοέμβριος 2016

ABSTRACT

Maria K. Kokkini

«Determination of the volatile components and study of the bioactivity of extracts of plants in the Asteraceae family. The case of chamomile, yarrow, wormwood and tarragon»

During the past few decades, the use of herbs by humans has been globally increased. This thesis studies four herbs of the Asteraceae family: chamomile, wormwood, yarrow as well as tarragon. The main purpose of this study was to determine the volatile components of their essential oils and infusions. At the same time, plant samples of known origin were compared with ones of unknown origin. Moreover, since the wide use of herbs raises the question of their safety for human health, their toxicity was estimated.

Initially, the essential oils, as well as the organic components of their infusions of the above mentioned herbs were collected and their volatile compounds were subsequently identified using gas chromatography - mass spectrometry. Additionally, they were qualitatively and % quantitatively determined and with the help of standard curves, the concentration (mg/mL) of α -, β -thujone and camphor that were detected in the plant samples, were determined.

Moreover, the FT-IR spectra of the plant material were obtained and compared according to the fingerprint region. Finally, the toxicity of the infusions was evaluated using two different methods, the Microtox® Analyzer with the bacteria species *Vibrio fischeri* and the MTT method on kidney Vero cells.

The results of the experiment, showed that the samples of wormwood and yarrow exhibited high chemical diversity, high yield of essential oils and also a larger number of volatile components in comparison to those of chamomile and tarragon. In addition, two rare chemotypes of wormwood were determined, as well as one chemotype that has not been reported before, as far as the unknown yarrow sample is concerned, fact which casts doubts about its' botanical origin. Moreover, it is the first time that the estragole detected on the tarragon sample of unknown origin, was at such a high quota. The great heterogeneity between the plant samples of unknown origin, questions both their origin and quality.

In the majority of infusions, the chemical profile of the volatile components was consistent with that of the corresponding essential oils, with only a few exceptions. In contrast with α -thujone, β -thujone was found in greater concentration in wormwood and yarrow samples and was remarkably high in wormwood sample originated from Ierapetra, Crete. By comparing the concentrations in

infusions by their corresponding essential oils, a greater percentage of camphor was detected in comparison to α - and β -thujone.

According to the FT-IR spectra of the plant samples, the most similar to each other were the samples of chamomile and wormwood, whereas the less similar were those of yarrow and tarragon. Each herb's bioactivity-toxicity was estimated by the Microtox® Analyzer, resulting to determining that tarragon displays the greatest bioactivity-toxicity, followed by chamomile, wormwood and finally yarrow. This result indicates that the toxicity is not due to a particular toxic component but due to the total chemical profile of each plant sample. To conclude, by checking the cytotoxicity of each herb using the MTT method, wormwood and tarragon caused higher decrease of viability of the kidney Vero cells, whereas less decrease was caused by yarrow and chamomile.

Keywords:	Herbs, Chamomile, Yarrow, Wormwood, Tarragon, Essential oils, Infusions, Hydro-distillation, Organic solvent extraction, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Chemotype, α - and β -thujone, Camphor, FT-IR, Toxicity, Microtox®, MTT Method
-----------	--

November 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ii
ABSTRACT	iv
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Γενικά.....	1
1.2 Η οικογένεια Asteraceae και η φυλή Anthemideae.....	2
1.3 Τα τέσσερα φυτικά είδη	4
1.3.1 <i>Matricaria chamomilla</i> L., κοινώς Χαμομήλι.....	4
1.3.2 <i>Artemisia absinthium</i> L., κοινώς Αψιθιά.....	5
1.3.3 <i>Achillea millefolium</i> L., κοινώς Αχιλλέα.....	8
1.3.4 <i>Artemisia dracunculus</i> L., κοινώς Εστραγκόν.....	10
1.4 Αιθέρια έλαια	12
1.4.1 Υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger	14
1.5 Αφεψήματα.....	15
1.6 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών	16
1.7 Φασματοσκοπία Υπερύθρης Ακτινοβολίας	19
1.8 Τοξικότητα των βοτάνων	21
1.9 Το σύστημα ανάλυσης Microtox®.....	24
1.10 Κύτταρα Vero - Δοκιμή MTT	26
1.11 Σκοπός της Μελέτης.....	28
2. Υλικά και Μέθοδοι	30
2.2 Παραλαβή αιθερίων ελαίων	32
2.3 Παραλαβή αφεψημάτων.....	33
2.4 Παραλαβή των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων.....	33
2.5 Ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (GC-MS).....	35
2.6 Ανάλυση με Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR).....	36
2.7 Μέτρηση της τοξικότητας με το σύστημα ανάλυσης Microtox®.....	38
2.8 Μέτρηση της κυτταροτοξικότητας των αφεψημάτων με τη δοκιμή MTT.....	40
3. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	44
3.1 Απόδοση αιθερίου ελαίου	44
3.1.1 Απόδοση αιθερίου ελαίου χαμομηλιού	44
3.1.2 Απόδοση αιθερίου ελαίου αψιθιάς	45
3.1.3 Απόδοση αιθερίου ελαίου αχιλλέας	46
3.1.4 Απόδοση αιθερίου ελαίου εστραγκόν.....	47

3.2 Ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών των βοτάνων με GC-MS	48
3.2.1 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων του χαμομηλιού	48
3.2.2 Χημική σύσταση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων του χαμομηλιού	51
3.2.3 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων της αψιθιάς.....	54
3.2.4 Χημική σύσταση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων της αψιθιάς	57
3.2.5 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων της αχιλλέας.....	60
3.2.6 Χημική σύσταση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων της αχιλλέας	64
3.2.7 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων του εστραγκόν.....	67
3.2.8 Χημική σύσταση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων του εστραγκόν	70
3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός α - και β -θουγιόνης και καμφοράς	72
3.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός α - και β -θουγιόνης.....	73
3.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός καμφοράς.....	75
3.4 Ερμηνεία φασμάτων FT-IR.....	77
3.5 Εκτίμηση της τοξικότητας με το σύστημα ανάλυσης Microtox®	81
3.6 Εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας με τη δοκιμή MTT	84
4. Συμπεράσματα	88
Διεθνής Βιβλιογραφία.....	90
Ελληνική Βιβλιογραφία	93
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	94
I. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	94
II. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	95
III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	96
IV. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	97
V. ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΟΜΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	98
VI. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ	101

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Από πολύ νωρίς ο άνθρωπος, αναζητώντας την τροφή του, άρχισε να ανακαλύπτει τις ιδιότητες των φυτών. Έτσι, βρήκε ότι κάποια φυτά ήταν επικίνδυνα ή και δηλητηριώδη, ενώ άλλα θεράπευαν ή του ήταν χρήσιμα για κάποιο λόγο. Η γνώση αυτή μεταφερόταν από τη μια γενιά στην επόμενη και με τον τρόπο αυτόν συσσωρευόταν εμπειρία όσον αφορά τα φάρμακα που μπορούσε να βρει στα φυτά που υπήρχαν γύρω του. Η συσσώρευση αυτή παρατηρήσεων και γνώσεων ήταν ο σκοπός των ανθρώπων που ασχολούνταν με την «θεραπευτική» από την αρχαία εποχή. Συχνά, οι άνθρωποι αυτοί είχαν ταυτόχρονα σχέση με τη θρησκεία, ενώ η χρήση των βοτάνων συνδέθηκε και με τις μάγισσες, τις γυναίκες-θεραπεύτριες που εκδιώχθηκαν στον ευρωπαϊκό χώρο κατά το τέλος του Μεσαίωνα.

Οι παλαιότερες πληροφορίες που αφορούν τη χρήση φυτών ως φαρμάκων έρχονται από τους Σουμέριους και τους Ακκάδιους (3.000 π.Χ.). Στη συνέχεια οι Αιγύπτιοι στον περίφημο *Πάπυρο Ebers* (1500 π.Χ.) αναφέρουν μεγάλο αριθμό δρογών με ιδιαίτερη αξία στη σύγχρονη θεραπευτική. Ακολουθούν πολλοί συγγραφείς της αρχαιότητας που περιγράφουν φυτά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα με πιο σημαντικούς τους Ιπποκράτη «ο πατήρ της Ιατρικής» (460-377 π. Χ.), Θεόφραστο (370-287 π.Χ.), Πλίνιο τον Πρεσβύτερο (23-79 μ.Χ.), Διοσκουρίδη «*De Materia Medica*, Περί Ύλης Ιατρικής» (60-80 μ.Χ.) και Γαληνό (130-210 μ.Χ.). Κατά τον 16^ο και 17^ο αιώνα έχουμε τις υπερατλαντικές εξερευνήσεις και την εισαγωγή έτσι πολλών νέων δρογών στον ευρωπαϊκό χώρο, ενώ τον 18^ο αιώνα ο Λινναίος βοηθάει στην ανάπτυξη της φαρμακογνωσίας με την εφεύρεση του συστήματος ονοματολογίας και ταξινόμησης των φυτών. Ακολουθεί το 1803 η απομόνωση της μορφίνης από το όπιο που αποτελεί σταθμό στην ιστορία της ιατρικής και ξεκινάει έτσι η απομόνωση και η χημική ταυτοποίηση φαρμακολογικώς δραστικών ενώσεων από δρόγες, η οποία φυσικά συμπληρώνεται με την ανάπτυξη της οργανικής χημείας και συνεχίζεται έως και σήμερα (Samuelsson, 2004).

Σήμερα, η μελέτη των δρογών της παραδοσιακής ιατρικής σε διάφορες περιοχές του κόσμου, είναι αντικείμενο της φαρμακογνωστικής έρευνας, ενώ όταν η μελέτη αυτή αφορά μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή ονομάζεται εθνοφαρμακογνωσία.

Τα φυσικά προϊόντα που εντοπίζονται στα φυτά αυτά ή βότανα, όπως συνηθίζονται να ονομάζονται, αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους και είναι στις περισσότερες περιπτώσεις τα αόρατα όπλα τους, που χρησιμοποιούνται για την απόθεση των εχθρών τους και τη γενικότερη προστασία τους από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Σήμερα, τα φυσικά προϊόντα έχουν ευρύτατη χρήση από τον άνθρωπο, με κυριότερες τη φαρμακευτική, την κοσμητική αλλά και τη βιομηχανία τροφίμων.

Οι κυριότερες κατηγορίες των καταναλωτικών προϊόντων που βασίζονται σε φυσικά προϊόντα είναι (Common wealth Secretariat, 2001):

Διατροφικά φαρμακευτικά (nutraceuticals)

Διαιτητικά συμπληρώματα (dietary supplements)

Λειτουργικά τρόφιμα (functional foods)

Βοτανικά φάρμακα (herbal remedies)

Βοτανικά τσάγια και ροφήματα (herbal teas and infusions)

Φυτικά φάρμακα (phytomedicines)

Ομοιοπαθητικά φάρμακα (homeopathic drugs)

Αρωματοθεραπευτικά έλαια (aromatherapy oils)

Η ελληνική χλωρίδα έχει μεγάλη ποικιλία αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, είναι άλλωστε μια από τις πλουσιότερες στον ευρωπαϊκό χώρο, φιλοξενώντας περί τα 6600 φυτικά είδη και υποείδη. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκαν τέσσερα αρωματικά φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Asteraceae και πιο συγκεκριμένα στη φυλή Anthemideae.

1.2 Η οικογένεια Asteraceae και η φυλή Anthemideae

Η οικογένεια Asteraceae είναι η μεγαλύτερη οικογένεια της τάξης Asterales και η δεύτερη σε αριθμό ειδών οικογένεια, πιθανώς για μερικούς είναι ακόμη και η πρώτη, μετά την οικογένεια Orchidaceae, όλων των σπερματοφύτων. Μεταξύ των φυτών της υπάρχουν αρκετά αρωματικά, ζιζάνια, βιομηχανικά λαχανοφύτα (π.χ. η ταξιανθία των ειδών *Cynara* sp. και τα φύλλα), καλλωπιστικά (π.χ. ζέρμπερες, ντάλια), καθώς και φαρμακευτικά φυτά (π.χ. *Achillea millefolium*, *Echinacea* sp.).

Η οικογένεια αντιπροσωπεύεται από 1.900 περίπου γένη με περισσότερα από 30.000 είδη που εξαπλώνονται σε όλη τη γη και είναι η πλουσιότερη σε ενδημικά είδη οικογένεια στον ελλαδικό χώρο. Περιλαμβάνει ποώδη, μονοετή ή πολυετή φυτά, φρυγανώδη και σπάνια δενδρώδη.

Κοινό χαρακτηριστικό των φυτών της οικογένειας είναι ότι τα άνθη σχηματίζουν κεφάλια. Τα κεφάλια περιβάλλονται από παράνια μεμβρανώδη φύλλα ή σμήριγγες τα οποία σχηματίζουν τα περιβληματικά βράκτια. Τα κεφάλια αποτελούνται από μονογενή ή διγενή, ακτινόμορφα ή ζυγόμορφα άνθη. Τα ακτινόμορφα άνθη ονομάζονται σωληνανθή ή επιδίσκια, βρίσκονται συνήθως στο κέντρο της ταξιανθίας και έχουν σωληνοειδή στεφάνη που καταλήγει σε πέντε οδόντες και είναι διγενή. Τα ζυγόμορφα άνθη ονομάζονται γλωσσανθή ή επιχείλια, είναι μονόχειλα, σπάνια δίχειλα, βρίσκονται συνήθως στην περιφέρεια της ταξιανθίας και είναι θήλεα μονογενή. Ο κάλυκας τόσο των

σωληνανθών όσο και των γλωσσανθών ανθών έχει εξαλλοιωθεί σε λέπια, άκανθες, τρίχες ή σμήριγγες και ονομάζεται πάππος, «Pappus». Στα μονογενή άνθη δεν υπάρχουν στήμονες, ενώ στα διγενή υπάρχουν πέντε με ελεύθερα νήματα και ανθήρες ενωμένους σε σωλήνα, μέσα από τον οποίο εξέρχεται ο ύπερος με το δισχιδές στίγμα. Τα καρπόφυλλα είναι δύο, συμφυή, η ωοθήκη μονόχωρη, υποφυής και ο καρπός αχάινιο. Ο πάππος παραμένει συνήθως στον καρπό ως πτητική συσκευή και χρησίμευε για την μεταφορά του σε μεγάλες αποστάσεις. (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999; Σαρλής, 1999).

Τα τέσσερα φυτικά είδη που μελετήθηκαν ανήκουν στην οικογένεια Asteraceae αλλά έχουν και περαιτέρω βοτανική συγγένεια και ταξινομούνται στην ίδια υποοικογένεια (Asteroideae) και την ίδια φυλή, την Anthemideae (Watson, Evans, & Boluarte, 2000). Πιο συγκεκριμένα, η κοινή ταξινόμηση τους είναι:

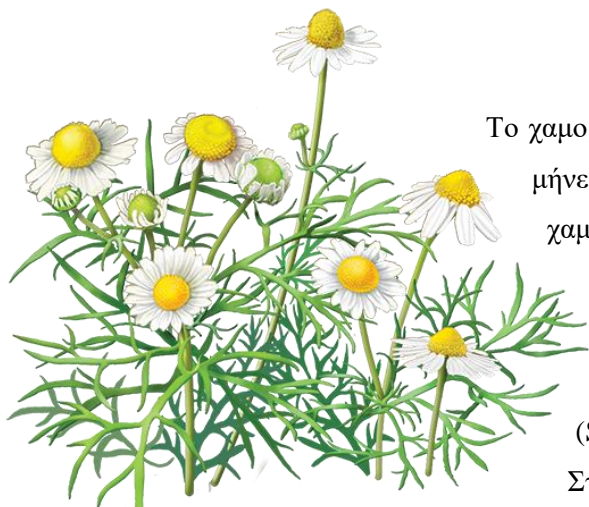
Πίνακας 1. Συστηματική ταξινόμηση της φυλής Anthemideae.

Βασίλειο:	Plantae
Άθροισμα:	Spermatophyta
Κλάση:	Magnoliopsida
Τάξη:	Asterales
Οικογένεια:	Asteraceae
Υποοικογένεια:	Asteroideae
Φυλή:	Anthemideae

Σύμφωνα με μελέτη φυλογενετικών αναλύσεων των (Oberprieler & al. 2006), η φυλή Anthemideae αποτελείται από 111 γένη και περίπου 1800 είδη. Τα περισσότερα είδη της συγκεντρώνονται στην Κεντρική Ασία, την περιοχή της Μεσογείου και τη Νότια Αφρική. Πολλά από αυτά είναι αρωματικά φυτά και χρησιμοποιούνται για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες ή/και την παρασιτοκτόνο τους δράση (Oberprieler et al., 2007).

1.3 Τα τέσσερα φυτικά είδη

1.3.1 *Matricaria chamomilla* L., κοινώς Χαμομήλι



Το χαμομήλι είναι ετήσιο ποώδες φυτό και ανθίζει κυρίως τους μήνες Απρίλιο-Ιούνιο (Σαρλής, 1999). Υπάρχουν δύο είδη χαμομηλιού, το λεγόμενο γερμανικό χαμομήλι (German Chamomile), (*Matricaria chamomilla* L./*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert / *Matricaria recutita* L.) και το ρωμαϊκό (Roman Chamomile) (*Chamaemelum nobile*) (Srivastava, Shankar, & Gupta, 2010).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το πρώτο είδος, καθώς είναι αυτό που χρησιμοποιείται ευρέως σαν αφέψημα και εντοπίζεται στον ελλαδικό χώρο.

Είναι είδος αυτοφυές στην Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική, ενώ καλλιεργείται στη Β. και Ν. Αμερική και σε πολλά άλλα μέρη του κόσμου. Είναι είδος ξηρικό που ευδοκμεί σε ποικιλία εδαφών, προτιμά όμως τα αμμοαργιλώδη εδάφη. Πολλαπλασιάζεται με σπόρο (Γκόλιου, 2008).

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το χαμομήλι έχει βλαστό λείο, όρθιο και πολύκλαδο ύψους 10-70 cm. Τα φύλλα του είναι πτεροσχιδή κατ' εναλλαγή, ενώ ο καρπός του είναι αχάινιο υποκυλινδρικό. Σχηματίζει ταξιανθία κεφάλιο μήκους 1,5 - 2,5 cm που αποτελείται από πολυάριθμα κίτρινα σωληνόμορφα ανθίδια σε κωνική ανθοδόχη με 12-16 λευκά γλωσσοειδή ανθίδια στην περιφέρεια της (Σαρλής, 1999).

Ιστορικά στοιχεία και Εθνοβοτανική

Είναι φυτό γνωστό από την αρχαιότητα και αδιαμφισβήτητα ένα από τα πιο αντιπροσωπευτικά φαρμακευτικά φυτά. Το όνομα του προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις χάμω και μήλο, δηλαδή ένα μήλο που βρίσκεται στο έδαφος, εξαιτίας του αρώματος του που θυμίζει μήλο. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι το θεωρούσαν δώρο που τους έστειλε ο Θεός Ήλιος, ενώ οι Αγγλοσάξονες το θεωρούσαν ένα από τα εννιά ιερά φυτά που τους χάρισε ο Θεός. Υπάρχουν αναφορές για το χαμομήλι στα κείμενα των Ιπποκράτη, Γαληνού και Ασκληπιού (Devrim, Demir, Tuba, & Demirci, 2012; Gupta, Mittal, Bansal, Khokra, & Kaushik, 2010). Αποδίδεται σε αυτό μια πληθώρα θεραπευτικών ιδιοτήτων. Οι επικρατούσες ιδιότητες του σύμφωνα με τις εθνοβοτανικές αναφορές είναι σαν αντιφλεγμονώδες, ευστόμαχο, σπασμολυτικό, αντιμικροβιακό, ενώ είναι ευρέως γνωστή η χρήση του σαν ήπιο ηρεμιστικό και υπνωτικό (Srivastava et al., 2010; Raal et al., 2012)

Χρήσεις του φυτού

Η πιο κοινή χρήση του φυτού είναι σαν αφέψημα (German chamomile) και υπολογίζεται ότι παγκοσμίως καταναλώνονται καθημερινά περισσότερες από ένα εκατομμύριο κούπες χαμομήλι, ενώ η ετήσια κατανάλωση χαμομηλιού είναι αρκετές χιλιάδες τόνοι. Για το αφέψημα χρησιμοποιούνται τα αποξηραμένα άνθη του φυτού, που περιέχουν πολλά τερπενοειδή και φλαβονοειδή, στα οποία αποδίδονται οι φαρμακευτικές του ιδιότητες (Raal et al., 2012; Srivastava et al., 2010).

Το χαμομήλι χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική και τη σαπωνοποιία. Παραλαμβάνεται επίσης το αιθέριο έλαιο από τα αποξηραμένα άνθη του χαμομηλιού, το οποίο μπορεί να έχει απόδοση 0.24-2.0 %, έχει συνήθως μπλε χρώμα (Gupta et al., 2010) και το οποίο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των καλλυντικών και των τροφίμων για το άρωμα του (Srivastava et al., 2010).

Τοξικότητα

Θεωρείται σε γενικές γραμμές ένα φυτό ασφαλές για κατανάλωση. Έχουν παρατηρηθεί όμως δερματικές αλλεργικές αντιδράσεις σε κάποιους ανθρώπους. Οι άνθρωποι με υπερευαισθησία στα ζιζάνια της οικογένειας Asteraceae και ειδικότερα του γένους *Ambrosia* θα πρέπει να είναι προσεκτικοί με τη χρήση του χαμομηλιού (Srivastava et al., 2010).

1.3.2 *Artemisia absinthium* L., κοινώς Αψιθιά



Η αψιθιά (*Artemisia absinthium* L.) είναι πολυετής πόα και ανθίζει κυρίως τους μήνες Ιούλιο-Σεπτέμβριο.

Στην Αγγλία είναι γνωστή σαν *wormwood*, στη Γαλλία σαν *absinthe*, στη Γερμανία *wermut* και στο Ιράν σαν *afsantine* (Agency et al., 2010).

Είναι είδος ιθαγενές στις εύκρατες περιοχές της Ευρασίας, ιδιαίτερα της Μεσογείου και της Βόρειας Αφρικής και είναι ευρέως εγκλιματισμένο στον Καναδά και τις βόρειες Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ καλλιεργείται σε πολλά μέρη του κόσμου. Ευδοκίμει κυρίως σε ξηρά και άγονα εδάφη, ενώ συχνά απαντάται σε πλαγιές και άκρες μονοπατιών και δρόμων. Πολλαπλασιάζεται με σπόρο ή και μοσχεύματα και είναι είδος ανεμογαμικό, δηλαδή η επικονίαση γίνεται μέσω του ανέμου (Σαρλής, 1999).

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το ύψος της αψιθιάς μπορεί να ξεπεράσει το 1 m και έχει γκριζοπράσινους μίσχους και φύλλα, ενώ ο καρπός της είναι αχαινίο. Τα φύλλα της είναι δις ή τρις πτεροσχιδή και καλύπτονται από αργυρόχρωμο χνούδι όπως και ο βλαστός της. Τα άνθη της έχουν κίτρινο χρώμα και σχηματίζουν βοτρυώδη ταξιανθία κεφάλιο (Σαρλής, 1999).

Ιστορικά στοιχεία και Εθνοβοτανική

Η λατινική ονομασία της (*Artemisia absinthium* L.) προέρχεται από τη θεά Άρτεμις και τη λέξη άψινθος που σημαίνει ότι δεν πίνεται επειδή είναι πικρός.

Η πρώτη αναφορά για τη χρήση της αψιθιάς σαν φαρμακευτικό φυτό έρχεται από τους Αιγύπτιους και τον Πάπυρο Έμπερς, ένα αρχαίο ιατρικό αρχείο που υπολογίζεται ότι γράφτηκε το 1552 π.Χ. Σύμφωνα με αυτόν, η αψιθιά έχει ανθελμινθικές ιδιότητες και καταπολεμά τους σκώληκες των εντέρων. Από αυτές τις ιδιότητες προκύπτει και η αγγλική κοινή ονομασία του, wormwood-σκουληκόξυλο (Lachenmeier & Nathan-maister, 2007).

Άλλες αναφορές στις φαρμακευτικές της ιδιότητες έρχονται από τον Πυθαγόρα, τον Ιπποκράτη, τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο, το Διοσκουρίδη που τη χρησιμοποιεί κατά της ανορεξίας και των ίκτερων και το Γαληνό που τη συστήνει κατά της ελονοσίας (Lachenmeier & Nathan-maister, 2007). Επιπλέον, δε λείπει η αψιθιά από την κινεζική παραδοσιακή ιατρική για τις ανθελμινθικές και νευροπροστατευτικές της ιδιότητες (Singh & Sharma, 2010).

Στα Ιμαλάια οι άνθρωποι πίνουν το αφένημα της αψιθιάς για να αντέξουν το κρύο και τις κακουχίες, ενώ η πικράδα της αντιπροσωπεύει μεταφορικά την αμαρτία στην Βίβλο (Judþentienë, 2004).

Σαν λαϊκό φάρμακο, οι κύριες ιδιότητες που του αποδίδονται είναι οι ανθελμινθικές, κατά της ανορεξίας, κατά των πόνων της γέννας, εντομοαπωθητικές, ηρεμιστικές, βοηθητικές της μνήμης και νευροπροστατευτικές (Judþentienë, 2004; Lachenmeier & Nathan-maister, 2007; Singh & Sharma, 2010).

Εκτός από τη χρήση της σαν φαρμακευτικό φυτό, η αψιθιά είναι ευρέως γνωστή για τη χρήση της σαν κύριο συστατικό στην παρασκευή του διάσημου αλκοολούχου ποτού ονόματι αφέντι. Το αφέντι παρασκευάζεται για πρώτη φορά το 1792 στην Ελβετία από τον Pierre Ordinaire, ο οποίος το αποκαλεί «πράσινη νεράιδα» και το προωθεί αρχικά σαν φαρμακευτικό παρασκεύασμα που θεραπεύει τα πάντα. Λίγο αργότερα ξεκινάει στη Γαλλία η παραγωγή του σαν απεριτίφ και το 1805 ιδρύεται στη Γαλλία η εταιρία *Pernod Fils* που θα το εισάγει αρκετά χρόνια αργότερα στα καφέ και στα καμπαρέ του Παρισιού, όπου θα βρει μεγάλη απήχηση στους καλλιτεχνικούς κύκλους. Μερικοί από τους φανατικούς θαυμαστές του που θεωρούν το αφέντι μούσα σε μπουκάλι, όπως λένε χαρακτηριστικά είναι οι Τουλούζ Λωτρέκ, Μπωντλέρ, Βερλέν, Ρεμπό, Ζολά, Πικάσο, Χέμινγκουι και Βαν Γκογκ. Η υπερβολική κατανάλωση του κάνει τους συντηρητικούς κύκλους να το κατηγορήσουν ότι προκαλεί σοβαρές παρενέργειες, όπως επιληπτικές κρίσεις και παραισθήσεις και «τρελαίνει» τους

ανθρώπους και καθιερώνεται έτσι η ονομασία του συνδρόμου «αψιθισμός». Το γεγονός αυτό και η δαιμονοποίηση της αψιθιάς οδηγεί στις αρχές του 20^{ου} αιώνα στην απαγόρευση του σε όλες σχεδόν τις ευρωπαϊκές χώρες—πλην της Τσεχίας, της Ισπανίας και της Πορτογαλίας. Σχεδόν έναν αιώνα αργότερα, το 1988, η απαγόρευση αίρεται με νόμο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ σήμερα συνεχίζει να ισχύει σε κάποιες χώρες, όπως οι ΗΠΑ και ορισμένες επαρχίες του Καναδά (Lachenmeier & Nathan-maister,2007)

Χρήσεις του φυτού

Οι διάφορες μορφές της αψιθιάς, είτε ως αποξηραμένο φυτικό υλικό είτε ως αιθέριο έλαιο βρίσκουν εφαρμογή στη φαρμακευτική, στην ποτοποιία (π.χ. αφέντι, βερμούτ), στη βιομηχανία τροφίμων, στην καταπολέμηση των εντόμων, ενώ συχνά καλλιεργείται ως καλλωπιστικό φυτό.

Επιπλέον, αρκετοί πίνουν το αφέντημα της αψιθιάς για τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Οι φρέσκοι ή αποξηραμένοι βλαστοί απωθούν τα έντομα και τα ποντίκια. Τα ξηραμένα φύλλα τους όταν τοποθετηθούν στα ρούχα απωθούν τους σκώρους. Διώχνει τους γυμνοσάλιαγκες και τα έντομα και για αυτό σήμερα χρησιμοποιείται στην παρασκευή εντομοαπωθητικών.

Τοξικότητα

Η αψιθιά περιέχει μερικά τοξικά συστατικά με κυριότερο το μονοτερπένιο θουγιόνη, μια νευροτοξική ουσία που δρα σαν GABA_A ανταγωνιστής του υποδοχέα και η οποία έχει βρεθεί ότι σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει επιληπτικής μορφής σπασμούς αλλά και νεφρική ανεπάρκεια. Για το λόγο αυτό, έχουν θεσπιστεί όρια για την α - και β -θουγιόνη και την ασφαλή κατανάλωση της από διάφορους οργανισμούς (EMA, NTP και SCF). Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA, European Medicines Agency), ορίζει ως ημερήσια αποδεκτή πρόσληψη (ADI) α - και β -θουγιόνης για την αψιθιά τα 3,0 mg/άτομο για διάρκεια κατανάλωσης έως και 2 εβδομάδες (Lachenmeier & Nathan-maister, 2007).

Επιπλέον, όσον αφορά το αφέντι, η περιεχόμενη αψιθιά επιτρέπεται να έχει έως 10 mg thujone/kg (Judp̄entien̄e, 2004).

1.3.3 *Achillea millefolium* L., κοινώς Αχιλλέα



Η αχιλλέα (*Achillea millefolium* L.) είναι πολυετές ποώδες φυτό και ανθίζει τους μήνες Ιούνιο-Οκτώβριο.

Άλλες κοινές της ονομασίες είναι χιλιοφύλλη και αγριαψιθιά, ενώ η αγγλική κοινή της ονομασία είναι *yarrow* ή *milfoil* ή *nosebleed* και η γαλλική *millefeuille*.

Είναι φυτό ενδημικό της Ευρώπης, Ασίας και Β. Αμερικής αλλά επιπλέον καλλιεργείται σε πολλά μέρη του κόσμου. Απαντάται αυτοφυές σε δάση, στις άκρες μονοπατιών, σε πλαγιές και βοσκοτόπους και είναι κατά μια έννοια ζιζάνιο. Προτιμά ηλιόλουστα μέρη και ξηρά και καλώς αποστραγγιζόμενα εδάφη και μπορεί να αναπτυχθεί σε παράκτιες περιοχές αλλά και σε υψόμετρο έως και 3500 m, ενώ αντέχει και σε αρκετά χαμηλές θερμοκρασίες. Πολλαπλασιάζεται με σπόρους (Γκόλιου, 2008; Σαρλής, 1999; Inês et al., 2013).

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το ύψος της αχιλλέας μπορεί να είναι από λίγα cm έως και 1 m. Έχει βλαστό διακλαδιζόμενο και φύλλα σύνθετα πτεροσχιδή με ανοιχτό γκριζοπράσινο χρώμα και μαλακή υφή. Ο καρπός της είναι αχάινιο. Τα άνθη της σχηματίζουν ταξιανθίες κεφάλια που οργανώνονται σε μεγάλους και συμπαγείς κορύμβους. Μπορεί να έχουν χρώμα λευκό, κίτρινο, κόκκινο, πορτοκαλί και ροζ (Γκόλιου, 2008). Χαρακτηρίζεται από μεγάλη πολυπλοειδία που έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγάλη ποικιλομορφία, μορφολογική και χημική, φυτών που κατατάσσονται στο ίδιο είδος και τη δύσκολη έτσι ταυτοποίηση της (Werner, Glasl, & Reznicek, 2006; Trumbeckaite, Benetis, Bumblauskiene, & Burdulis, 2011).

Ιστορικά στοιχεία και Εθνοβοτανική

Η λατινική ονομασία της (*Achillea millefolium* L.) προέρχεται από τον Αχιλλέα, ο οποίος λέγεται ότι στον τρωϊκό πόλεμο φρόντιζε τις πληγές των στρατιωτών του με τα φύλλα της, ενώ το όνομα του είδους *millefolium* – χιλιοφύλλη αναφέρεται στα ιδιαίτερα πτεροσχιδή σύνθετα φύλλα της.

Είναι ένα από τα παλαιότερα βότανα που καταγράφεται η χρήση τους από τον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα από τα 6 φαρμακευτικά φυτά των οποίων η γύρη βρέθηκε σε έναν τάφο *Homo neanderthalensis* στη σπηλιά *Shanidar* στο Ιράκ που χρονολογείται στα 65000 π.Χ. Αν και δεν είναι γνωστό αν η χρήση της αχιλλέας από τον άνθρωπο είναι από τότε συνεχής, υπάρχουν αναφορές σε αυτήν ανά τους αιώνες από πολλούς διαφορετικούς πολιτισμούς σε όλο τον κόσμο. Σύμφωνα με τον Duke, φυτά τα οποία χρησιμοποιούνται για παρόμοιους λόγους από πολιτισμούς που δε σχετίζονται μεταξύ τους, έχουν στατιστικά περισσότερες πιθανότητες να είναι στην πραγματικότητα βιοδραστικά (Purlet & Oerman, 2011).

Οι πρώτες γραπτές αναφορές για χρήση της αχιλλέας από το «δυτικό» κόσμο έρχονται από τους Πλίνιο τον Πρεσβύτερο και Διοσκουρίδη τον 1^ο αιώνα μ.Χ. που τη συστήνουν και οι δύο για να σταματήσει την αιμορραγία και τη φλεγμονή, είτε από πληγές είτε στη μήτρα για γυναικολογικά προβλήματα και κατά της δυσεντερίας. Αναφορές στις θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού κάνουν και πολιτισμοί όπως ο ρωμαϊκός, ο κινεζικός, οι Αγγλοσάξονες και μια πληθώρα φυλών ιθαγενών στην Αμερική, αναγνωρίζοντας την αχιλλέα σαν φαρμακευτικό φυτό με παρόμοιες ιδιότητες και συχνά σαν «πανάκεια» (Prlquist & Oerman, 2011). Θεωρείται επίσης «το βότανο της γυναίκας» και χρησιμοποιείται σαν εμμηναγωγό αλλά και για να μειώσει τους πόνους της μήτρας. (Innocenti et al., 2007).

Ανακεφαλαιώνοντας, οι πιο συχνά αναφερόμενες χρήσεις της σύμφωνα με την εθνοφαρμακογνωσία είναι σαν αιμοστατικό, εξωτερικά σαν επούλωτικό και αντιφλεγμονώδες, για γαστρεντερικά προβλήματα, για τις αιμορροΐδες, για να αυξήσει την όρεξη (λόγω της πικρής του γεύσης), για διάφορους κοιλιακούς-γυναικολογικούς πόνους, σαν ηπατοπροστατευτικό και σαν ήπιο ηρεμιστικό (Benedek & Kopp, 2007; Innocenti et al., 2007; Paulina et al., 2012; Dall'Acqua, Bolego, Cignarella, Gaion, & Innocenti, 2011; Prlequist & Oerman, 2011).

Χρήσεις του φυτού

Πέρα από την παραδοσιακή χρήση του φυτού σαν αφέψημα ή έγχυμα για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, η αχιλλέα χρησιμοποιείται στη βιομηχανία σε διάφορα μίγματα τσαγιών και βοτάνων αλλά και στη φαρμακευτική και τη φυτοθεραπεία στην παρασκευή φυτικών φαρμάκων (Benedek & Kopp, 2007).

Επιπλέον, χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών και τη σαπωνοποιία.

Τοξικότητα

Αν και στη χημική σύσταση της αχιλλέας έχουν βρεθεί τοξικά για τον άνθρωπο συστατικά (θουγιόνη, καμφορά), δεν έχουν θεσπιστεί όρια για την κατανάλωση της ή τη χρήση της σε άλλα προϊόντα. Δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε ανθρώπους που να ελέγχουν την τοξικότητα του βοτάνου, ενώ μελέτες σε ζώα (μικρής όμως διάρκειας) έχουν δείξει ότι το φυτό είναι σε γενικές γραμμές ασφαλές για τον ανθρώπινο οργανισμό και δεν έχει δυσμενείς συνέπειες.

Μια παρενέργεια που έχει παρατηρηθεί και καταγραφεί σε κάποιους ανθρώπους είναι ότι το φυτό προκαλεί αλλεργική δερματίτιδα όταν έρθει σε άμεση επαφή με το δέρμα. Υπεύθυνες ενώσεις έχει βρεθεί ότι είναι οι *guaianolides* (που ανήκουν στα σесκιτερπενοειδή) και ειδικότερα η *a-peroxyachifolid*, η οποία σε νωπό φυτικό υλικό βρίσκεται σε διάφορες συγκεντρώσεις (έως 0.6% στα άνθη και 0.05% στα φύλλα). Η συγκέντρωση αυτή μειώνεται στο ξηρό ή επεξεργασμένο φυτικό υλικό λόγω αποδόμησης της ένωσης (Prlquist & Oerman, 2011).

1.3.4 *Artemisia dracunculus* L., κοινώς Εστραγκόν



Το εστραγκόν (*Artemisia dracunculus* L.) είναι ένας πολυετής ποώδης θάμνος και ανθίζει τους μήνες Ιούλιο-Οκτώβριο.

Άλλες κοινές του ονομασίες ταραγκόν, τραχούρι, Αρτεμισία η δρακόντια, δρακόντι. Στα αγγλικά είναι γνωστό σαν *tarragon*, στα γαλλικά *estragon* και στα αραβικά *tarkhum*.

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες εστραγκόν, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο χημικό τους προφίλ. Οι τρεις πιο διαδεδομένες είναι η γαλλική (*French Tarragon*), η ρωσική (*Russian Tarragon*) και η άγρια ποικιλία με την πρώτη να είναι αυτή που κυκλοφορεί περισσότερο στο εμπόριο, καθώς θεωρείται ποιοτικά ανώτερη (Heinrich, 2011).

Είναι φυτό ενδημικό της Ευρασίας αλλά απαντάται και στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική. Οι κυριότερες χώρες στις οποίες μπορεί να βρεθεί είναι η Γαλλία, η Γερμανία, η Ρωσία, η Ινδία, οι ΗΠΑ και το Μεξικό. Απαντάται αυτοφυές σε ποταμούς, ρυάκια, λιβάδια αλλά και πιο ξηρά εδάφη. Αντέχει την ξηρασία αλλά και σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, χαμηλών και υψηλών. Προτιμά τα αμμοπηλώδη εδάφη με pH 6,5 - 7,0 και καλώς αποστραγγιζόμενα (Σαρλής, 1999).

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το ύψος του κυμαίνεται από 40 cm έως 1.50 m και τα φύλλα του είναι άμισχα και λογχοειδή, στενά και επιμήκη με έντονο πράσινο χρώμα και το μήκος τους μπορεί να φτάσει τα 10 cm, ενώ το πλάτος τους τα 6 mm. Εκφύονται εναλλάξ υπό γωνία 120°. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των φύλλων του είναι ότι το κατώτερο τμήμα τους έχει λαμπρό πράσινο χρώμα ενώ η άνω επιφάνεια τους έχει πιο θαμπό. Αναδίδουν μία οσμή που μοιάζει με του γλυκάνισου. Σε κάθε φυτό αναπτύσσονται πολλοί και έντονα διακλαδιζόμενοι βλαστοί.

Τον χειμώνα διατηρεί το υπόγειο του τμήμα, ενώ το υπέργειο καταστρέφεται. Το ριζικό του σύστημα αποτελείται από ριζώματα τα οποία φέρουν μεγάλο αριθμό υπόγειων οφθαλμών.

Τα άνθη είναι μικρά, κίτρινου ή κιτρινοπράσινου χρώματος, σε ταξιανθία σφαιρικής φόβης, τα οποία σπάνια ανοίγουν πλήρως. Ο καρπός είναι αχάινιο με μήκος περίπου 1.5 mm.

Τα άνθη της ρωσικής ποικιλίας είναι ερμαφρόδιτα και επικονιάζονται με τον άνεμο. Τα άνθη της γαλλικής όμως είναι στείρα και ο πολλαπλασιασμός του φυτού επιτυγχάνεται με μοσχεύματα ή με ριζώματα, δηλαδή με διαίρεση της ρίζας που γίνεται συνήθως τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο (Σαρλής, 1999; Heinrich, 2011).

Ιστορικά στοιχεία και Εθνοβοτανική

Το όνομα του είδους του (*dracunculus*) σημαίνει μικρός δράκος. Υπάρχουν δύο εκδοχές για την προέλευση του ονόματος, η μια είναι λόγω του σχήματος της ρίζας του, που μοιάζει με δράκο (φίδι) ή και του σχήματος των φύλλων που θυμίζει τη γλώσσα του φιδιού και η άλλη λόγω της ικανότητας του να θεραπεύει πληγές από δαγκώματα φιδιών. Η γαλλική του ονομασία *estragon* προέρχεται από τη φράση *Herbe au Dragon* που σημαίνει το «Βότανο του Δράκου».

Υπάρχουν πολλές αναφορές του σε βιβλία τον 17^ο-19^ο αιώνα για τις θεραπευτικές του ιδιότητες αλλά πολύ λίγες νεώτερα (Heinrich, 2011).

Οι Ρωμαίοι το βάζουν πάνω σε πληγές από δαγκώματα φιδιών. Το μίγμα χυμού εστραγκόν και μάραθου είναι δημοφιλές ποτό στους βασιλείς της Ινδίας. Στην Αγγλία φτάνει κατά τη Βασιλεία του Ερρίκου του 8^{ου}, ο οποίος όπως λέγεται, χωρίζει την Αικατερίνη της Αραγονίας επειδή χρησιμοποιεί απερίσκεπτα το εστραγκόν.

Στον αραβικό κόσμο το χρησιμοποιούν για να καταπολεμήσουν την αϋπνία. Στην ιρανική παραδοσιακή ιατρική, τα αποξηραμένα υπέργεια τμήματα του φυτού χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπίσουν την επιληψία (Sayyah, Nadjafnia, & Kamalinejad, 2004).

Οι ιθαγενείς της Αμερικής το χρησιμοποιούν για γυναικολογικά προβλήματα και για να αντιμετωπίσουν τους πόνους της γέννας, σαν εντομοαπωθητικό και για να απαλύνουν τον πόνο από πληγές.

Στην πρώην Σοβιετική Ένωση το χρησιμοποιούν για να αυξήσουν την όρεξη και να αντιμετωπίσουν το διαβήτη.

Σύμφωνα λοιπόν με τη λαϊκή ιατρική, οι κύριες θεραπευτικές ιδιότητες που του αποδίδονται είναι σαν αντιδιαβητικό, κατά της ανορεξίας, σαν αναισθητικό και αντιφλεγμονώδες για τον πονόδοντο, τις πληγές και τα κοψίματα και σαν σπασμολυτικό και ήπιο ηρεμιστικό (Heinrich, 2011; Eisenman, Poulev, Struwe, Raskin, & Ribnicky, 2011; Kalantari et al., 2013; Ribnicky et al., 2004).

Χρήσεις του φυτού

Το εστραγκόν θεωρείται ένα από τα πλέον χρήσιμα βότανα στη μαγειρική προσφέροντας ιδιαίτερο άρωμα και γεύση. Είναι ένα από τα υλικά στο μείγμα των αρωματικών *finer herbes* της Γαλλικής κουζίνας και βασικό συστατικό στη σάλτσα *béarnaise*. Χρησιμοποιείται σε σαλάτες, σάλτσες λευκών και κόκκινων κρεάτων και ψαριών, αυγά, παγωτά, φρουτοσαλάτες, κ.α. Τα φύλλα του προστίθενται σε σούπες για άρωμα. Οι βλαστοί του μαγειρεύονται σαν λαχανικό. Είναι από τα καλύτερα αρωματικά ξυδιού και μουστάρδας. Στο εμπόριο, πωλείται φρέσκο αλλά και αποξηραμένο.

Εκτός από αρτυματικό στη μαγειρική, χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και στην ποτοποιία για τη γεύση και το άρωμα του αλλά και στη βιομηχανία καλλυντικών. Εμπορικής σημασία έχει και το αιθέριο έλαιο του εστραγκόν (Ribnicky et al., 2004).

Είναι εντομοαπωθητικό φυτό, μια γλάστρα με εστραγκόν διώχνει μύγες, κουνούπια και άλλα ενοχλητικά έντομα (Σαρλής, 1999).

Τέλος, το φαρμακευτικό σκεύασμα Tarralin™, ένα αιθανολικό εκχύλισμα του ρωσικού εστραγκόν χρησιμοποιείται ευρέως κατά του διαβήτη (Ribnicky et al., 2004).

Τοξικότητα

Το αιθέριο έλαιο του γαλλικού εστραγκόν περιέχει σε μεγάλη περιεκτικότητα δύο τοξικές ενώσεις, την εστραγόλη (μεθυλο-τσαβικόλη) και τη μεθυλο-ευγενόλη (*1-methoxy-4-allylbenzene*), οι οποίες έχει βρεθεί ότι προκαλούν καταστροφές στην ακολουθία του DNA αναπτύσσοντας όγκους και είναι επιπλέον ηπατοτοξικές.

Σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες, η εστραγόλη δεν έχει άμεσα καρκινογόνο δράση. Ο παράγοντας που συντελεί στην καρκινογένεση είναι η μεταβολική της δραστηριότητα που οδηγεί στο σχηματισμό ασταθών μορίων (π.χ. *1'-hydroxyestragole*, *1'-sulfooxyestragole*) τα οποία αντιδρούν με τα νουκλεϊκά οξέα κι έτσι καταστρέφουν το DNA. Ο μεταβολισμός της εστραγόλης εξαρτάται από τη δόση στην οποία περιέχεται, έτσι μεγαλύτερες ποσότητες της έχουν σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό περισσότερων καρκινογόνων μεταβολιτών.

Έχουν γίνει αρκετές έρευνες σε ποντίκια για να ελέγξουν την τοξικότητα των δύο αυτών ενώσεων και να θεσπιστούν όρια ασφαλείας για την κατανάλωση του εστραγκόν, το οποίο όμως μέχρι τώρα δεν έχει καταστεί δυνατό. Οι έρευνες αυτές επιβεβαιώνουν την τοξική δράση των ουσιών αυτών. Ανάπτυξη όγκων παρατηρήθηκε στα 10 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για την εστραγόλη και στα 37 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για την μεθυλο-ευγενόλη.

Ο μεταβολισμός όμως των ίδιων ενώσεων μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στα ζώα και στον άνθρωπο. In vitro έρευνες που αφορούν αυτή τη μεταβολική δραστηριότητα στον ανθρώπινο οργανισμό έδειξαν ότι ο κίνδυνος μεταλλαξιγένεσης είναι πολύ μικρότερος. Επιπλέον, στα υδατικά εκχυλίσματα του εστραγκόν, οι συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών είναι πολύ μειωμένες. Το ρωσικό εστραγκόν περιέχει τις τοξικές αυτές ουσίες σε πολύ μικρά ποσοστά ή και καθόλου κι έτσι θεωρείται ασφαλές για τον άνθρωπο, διατηρώντας παράλληλα τις ευεργετικές του ιδιότητες.

Παρ' όλα αυτά, τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν μπορούν να αποκλείσουν τον πιθανό κίνδυνο από την κατανάλωση του και προτείνεται έτσι από την European Commission να λαμβάνεται με προσοχή και σε μειωμένες ποσότητες (Heinrich, 2011; Eisenman et al., 2011; Ribnicky et al., 2004).

1.4 Αιθέρια έλαια

Τα αρωματικά φυτά περιέχουν πτητικά συστατικά τα οποία όταν ανεβαίνει η θερμοκρασία του περιβάλλοντος εξαερώνονται και αναδίδουν μια οσμή χαρακτηριστική για κάθε φυτό. Η οσμή αυτή οφείλεται στο μίγμα πτητικών ουσιών πολύπλοκης χημικής σύνθεσης και ελαιώδους σύστασης που παράγουν τα φυτά, γνωστό ως αιθέριο έλαιο. Τα αιθέρια έλαια μπορεί να βρίσκονται σε διάφορα

μέρη του φυτού, όπως άνθη, φύλλα, καρπούς, βλαστούς ή ρίζες και βρίσκονται σε ειδικούς αδένες που λειτουργούν σαν φυσικοί αποθηκευτικοί χώροι και ονομάζονται ελαιογόνοι αδένες.

Αποτελούνται, όπως ειπώθηκε, από πτητικά συστατικά που μπορεί να ξεπεράσουν τα 150 σε ένα και μόνο φυτό και ανήκουν κυρίως στην ομάδα των τερπενίων, που είναι πτητικά οργανικά μόρια μικρού μοριακού βάρους. Κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα οξυγονούχα και τα μη οξυγονούχα συστατικά. Οξυγονούχα, όπως οι αλκοόλες (λιναλοόλη, γερανιόλη), οι αλδεΐδες (κιτράλη, μυρτενάλη), οι κετόνες (θουγιόνη, καμφορά), οι φαινόλες (θυμόλη, καρβακρόλη, ευγενόλη), τα οργανικά οξέα και οι εστέρες και μη οξυγονούχα, που συμβάλλουν λιγότερο στο άρωμα, όπως για παράδειγμα το λιμονένιο, το πινένιο και το καμφένιο. Κάποια αιθέρια έλαια περιέχουν μπορεί να περιέχουν θεϊκές, νιτρικές ενώσεις ή κουμαρίνες (Baser, 2010).

Η χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος του φυτού και να επηρεάζεται από το γονότυπο του, το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται και διάφορους άλλους παράγοντες, γεγονός που ονομάζεται χημικός πολυμορφισμός. Ακόμα και ανάμεσα σε φυτά που ανήκουν στο ίδιο είδος, μπορεί να εμφανιστούν χημικά προφίλ με πολύ μεγάλες διαφορές, τα οποία ονομάζονται χημειότυποι του φυτού. Ο χημειότυπος μπορεί να χαρακτηριστεί ως «καθαρός» όταν ένα μόνο συστατικό του ξεπερνά το 50% της συνολικής του σύστασης ή «μικτός», όταν δύο ή τρία κύρια συστατικά του καθορίζουν σαν σύνολο τη χημική του σύνθεση. Η γνώση του χημειότυπου ενός φυτού είναι πολύ σημαντική, καθώς καθορίζει τη βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου του (Rodríguez-solana et al., 2014).

Ανάλογα με την χρήση για την οποία προορίζονται τα αιθέρια έλαια καθορίζεται και η αξία των επιμέρους συστατικών τους. Στην αρωματοποιία, για παράδειγμα, ένας υδρογονάνθρακας θεωρείται περιττό συστατικό γιατί η συμβολή του στο άρωμα είναι μικρή, μπορεί όμως τα ίδια συστατικά να προσδίδει στο αιθέριο έλαιο υψηλή φαρμακευτική αξία.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χημειότυπο και τη σύνθεση ενός αιθερίου ελαίου είναι οι:

- Γονότυπος του φυτού
- Περιβάλλον, κλίμα, σύσταση του εδάφους
- Χρόνος συγκομιδής ή συλλογής
- Μετασυλλεκτικοί χειρισμοί, όπως ξήρανση και συντήρηση πριν από την απόσταξη
- Μέθοδος παραλαβής

Ανάλογα με το είδος του φυτικού υλικού, την περιεκτικότητά του σε αιθέριο έλαιο, τη σύσταση και την οικονομική του αξία χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων. Οι κύριες τρεις κατηγορίες μεθόδων είναι η απόσταξη, η εκχύλιση και η μηχανική παραλαβή.

Πιο αναλυτικά, οι κύριες μέθοδοι απόσταξης είναι:

- Υδροαπόσταξη (water distillation)
- Υδροατμοαπόσταξη (water and steam distillation)
- Απόσταξη με ατμούς (steam distillation)

Ενώ οι κύριες μέθοδοι εκχύλισης:

- Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες
- Εκχύλιση με ψυχρό ή θερμό λίπος
- Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (SFE)
- Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους
- Εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet

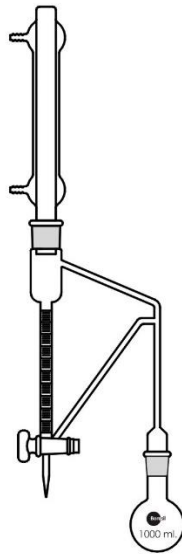
Η πιο διαδεδομένη μέθοδος απόσταξης αιθερίου ελαίου σε εργαστηριακό επίπεδο είναι η υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger και είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων στην παρούσα μελέτη.

1.4.1 Υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger

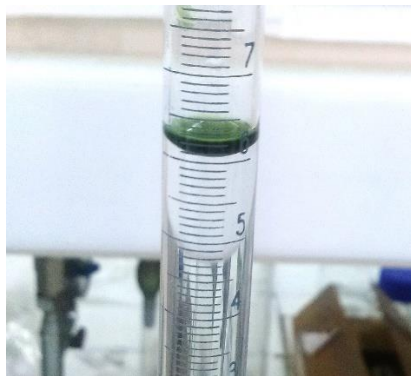
Στην υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger, το φυτικό υλικό τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με απεσταγμένο νερό, η οποία τοποθετείται σε θερμαντική συσκευή ή θερμομανδύα και συνδέεται με τη συσκευή Clevenger και με ψυκτήρα. Αρχικά, θερμαίνεται η σφαιρική φιάλη με το νερό και το φυτικό υλικό. Όταν ξεκινήσει ο βρασμός, οι ατμοί παρασύρουν τα αιθέρια έλαια από τους φυτικούς ιστούς τα οποία φτάνοντας στον ψυκτήρα, ψύχονται με αποτέλεσμα να υγροποιούνται και να συλλέγονται έτσι τα αιθέρια έλαια στη συσκευή Clevenger, δημιουργώντας ένα στρώμα στην ανώτερη επιφάνεια του.

Το χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι το νερό και το φυτικό υλικό είναι σε άμεση επαφή. Στην υδροαπόσταξη πρέπει να γίνεται ήπιος βρασμός και να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, ώστε να μην συμβαίνει θερμική διάσπαση διαφόρων συστατικών του αιθερίου ελαίου. Η διάρκεια της είναι συνήθως 1-3 ώρες, ανάλογα με το είδος του φυτικού υλικού.

Για την απόσταξη των αιθερίων ελαίων στην παρούσα μελέτη, ο χρόνος απόσταξης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 3 ώρες από την έναρξη του βρασμού.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της συσκευής Clevenger



Εικόνα 2. Συλλογή αιθερίου ελαίου στη συσκευή Clevenger

1.5 Αφεψήματα

Τα αφεψήματα χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο εδώ και χιλιάδες χρόνια και είναι ο πιο διαδεδομένος τρόπος χρήσης των φαρμακευτικών φυτών για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες και/ή για την ευχάριστη γεύση τους. Είναι το προϊόν βρασμού ενός φυτικού υλικού μέσα σε νερό και ουσιαστικά βασίζεται στη διαδικασία της εκχύλισης.

Η εκχύλιση είναι μια από τις παλαιότερες χημικές δραστηριότητες του ανθρώπου. Η παρασκευή ενός αφεψήματος, είναι κατά βάση μια διαδικασία εκχύλισης, η οποία βασίζεται στην κατανομή μιας ουσίας μεταξύ δυο φάσεων, που πρακτικά δεν αναμιγνύονται. Το φυτικό υλικό τοποθετείται σε νερό

που βράζει, εκχυλίζονται τα συστατικά του στο νερό και ακολουθεί διήθηση πριν από την κατανάλωση του. Έτσι, το αφέψημα είναι το υδατικό εκχύλισμα του φυτού.

Η ποσότητα του φυτικού υλικού και ο χρόνος εκχύλισης του με το βραστό νερό εξαρτάται από το είδος του φυτού. Εμπειρικά όμως, χρησιμοποιούνται περίπου 2 g φυτικού υλικού σε 200 mL νερού, όγκος που αντιστοιχεί σε μια κοινή κούπα και ο χρόνος που διαρκεί είναι το πολύ 10 min. Για το λόγο αυτό, τα αφεψημάτα που παρασκευάστηκαν στην παρούσα μελέτη ακολούθησαν τις παραπάνω ποσότητες και χρόνους.



Εικόνα 3. Υδατικό εκχύλισμα χαμομηλιού.

1.6 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών

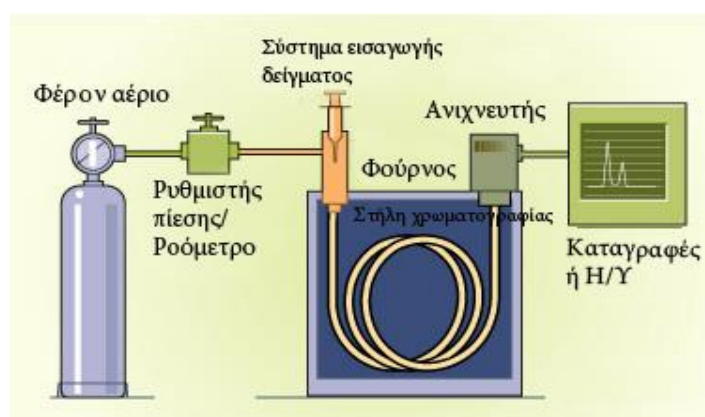
Για την ανάλυση των αιθερίων ελαίων και των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων επιλέχθηκε η Αέρια Χρωματογραφία, καθώς είναι η πιο διαδεδομένη και αποτελεσματική μέθοδος διαχωρισμού και απομόνωσης πτητικών ενώσεων.

Στην Αέρια Χρωματογραφία χρησιμοποιείται αέρια κινητή φάση με στερεή (αέρια-στερεή χρωματογραφία, GSC) ή υγρή (αέρια-υγρή χρωματογραφία, GLC) στατική φάση. Στην αέρια-υγρή χρωματογραφία ή απλώς αέρια χρωματογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο He) και ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοιχτών τριχοειδών στηλών. Όταν μια ουσία εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο, εξαερώνεται, εάν είναι δυνατόν ακαριαία, και παρασυρόμενη από την κινητή φάση εισέρχεται με αυτή στη στήλη. Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από τη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες, που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Στο τέλος της στήλης υπάρχει συνδεδεμένος ο ανιχνευτής ο οποίος με τη βοήθεια του ενισχυτή ενισχύει το σήμα που στέλνεται και τέλος ο καταγραφέας καταγράφει τις ουσίες με αποτέλεσμα την παραλαβή ενός τυπικού χρωματογραφήματος με διαχωρισμένες κορυφές. Τα συστατικά διαχωρίζονται μεταξύ τους έχοντας διαφορετικές ταχύτητες

άρα και διαφορετικό χρόνο συγκράτησης (retention time), που είναι ο χρόνος μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος στη στήλη μέχρι και την έξοδο του συστατικού από αυτή. (Χατζηιωάννου, 2015).

Η επιτυχής χρήση αερίου ως κινητής φάσης σε ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό βασίζεται στα εξής πλεονεκτήματα:

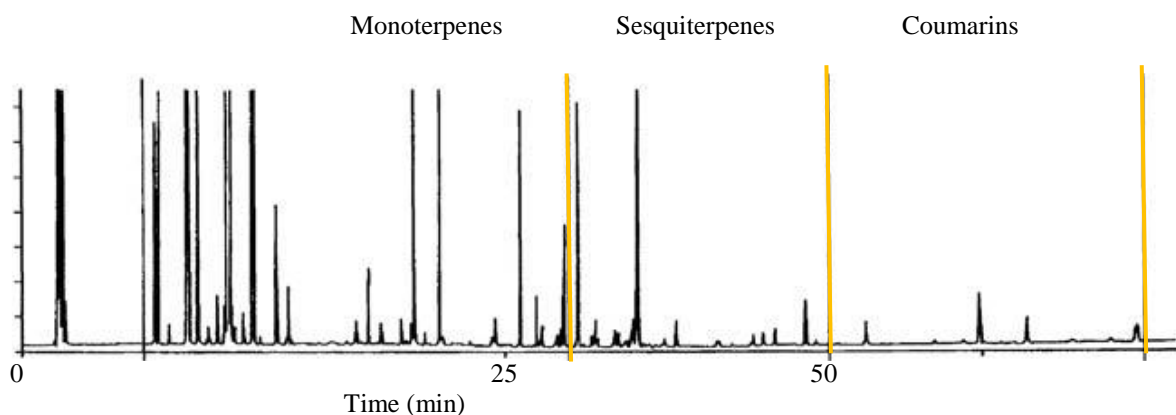
- 1) Το χαμηλό ιξώδες (πυκνότητα) των αερίων επιτρέπει τη χρήση στηλών μεγάλου μήκους, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητά τους και τη χρήση μεγάλων ταχυτήτων ροής, με αποτέλεσμα την επίτευξη ταχέων διαχωρισμών.
- 2) Η αδράνεια των αερίων, όσον αφορά την αλληλεπίδραση τους με τα προς διαχωρισμό συστατικά, κάνει την ισορροπία κατανομής στις δύο φάσεις να είναι πρακτικά ανεξάρτητη από το αέριο. Εξαιτίας αυτής της αδράνειας, η αέρια χρωματογραφία περιορίζεται μόνο σε διαχωρισμούς σχετικά πτητικών ουσιών (στη θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης).
- 3) Υπάρχουν πολλοί απλοί, ευαίσθητοι και ταχείας απόκρισης ανιχνευτές, ικανοί να παρακολουθούν τις συγκεντρώσεις των ουσιών στην αέρια φάση.



Εικόνα 4. Οργανολογία αερίου χρωματογράφου.

Η εξέλιξη της τεχνικής στο παρελθόν μπορεί εύκολα να αφηγηθεί με τέσσερα παραδείγματα για το διαχωρισμό με αέριο χρωματογράφο του αιθερίου ελαίου του απήγανου, ενός αρωματικού και φαρμακευτικού φυτού. Το αιθέριο έλαιο αναλύθηκε το 1961 από τον S. Bruno που οδήγησε στο διαχωρισμό 8 συστατικών και αποτέλεσε μια από τις πρώτες αναλύσεις του συγκεκριμένου αιθερίου ελαίου. Μόλις λίγα χρόνια αργότερα, το 1964, η ανάλυση του ίδιου ελαίου βελτιώθηκε χρησιμοποιώντας τον αέριο χρωματογράφο Perkin Elmer (PE) εξοπλισμένο με μία 2 m πληρωμένη στήλη και έναν ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (TCD) που λειτούργησε σε ισοθερμικές συνθήκες και έδωσε 20 διαχωρισμένα συστατικά. Περαιτέρω βελτίωση στο διαχωρισμό των συστατικών επιτεύχθηκε με την εισαγωγή του προγραμματισμού της θερμοκρασίας στον κλίβανο της στήλης που απέδωσε 80 συστατικά. Οι τελευταίες σημαντικές βελτιώσεις ήταν αποτέλεσμα της ανάπτυξης των

τριχοειδών στηλών υψηλής ανάλυσης και του ευαίσθητου ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID), όπου πλέον το 1981 το αιθέριο έλαιο του απήγανου μπορούσε να διαχωριστεί σε περίπου 150 συστατικά (Baser, 2010).



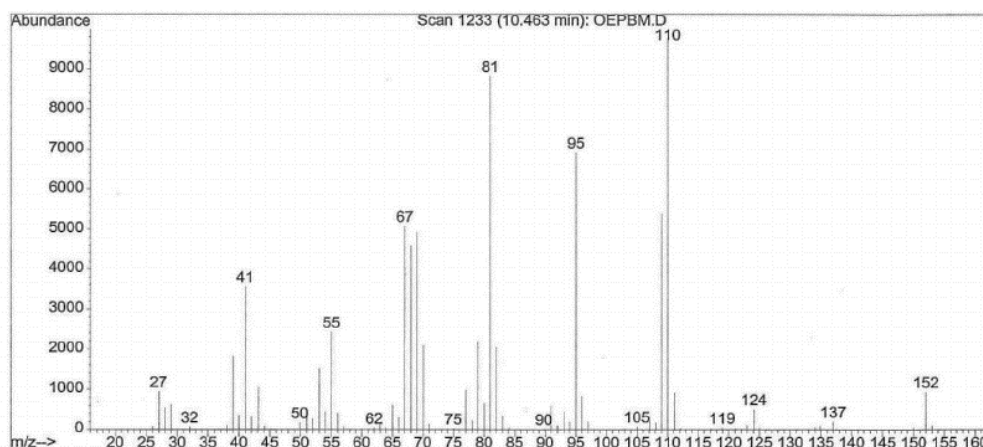
Σχήμα 1. Αέριο χρωματογράφημα και η σειρά που εμφανίζονται σε αυτό οι κύριες ομάδες των πτητικών συστατικών.

Για την ταυτοποίηση των συστατικών, η Αέρια Χρωματογραφία συνδυάστηκε με Φασματομετρία Μαζών. Μια μικρή ποσότητα δείγματος εισάγεται στο φασματόμετρο, όπου βομβαρδίζεται με μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Όταν ένα ηλεκτρόνιο, σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, προσκρούσει σε κάποιο μόριο μιας ένωσης που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, εκτοπίζει ένα ηλεκτρόνιο από τη στιβάδα σθένους του μορίου δημιουργώντας μια κατιοντική ρίζα και το μόριο μετατρέπεται σε ιόν με θετικό συνήθως φορτίο. Ο βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια μεταφέρει τόσο μεγάλη πυκνότητα ενέργειας στο μόριο, ώστε οι περισσότερες κατιοντικές ρίζες θραυματοποιούνται μετά το σχηματισμό τους. Προκύπτουν έτσι μικρά θραύσματα, μερικά από τα οποία έχουν θετικό φορτίο, ενώ άλλα είναι ουδέτερα. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη αυτή διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε θετικά φορτισμένο ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο (m/z), εκτρέπεται από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z .

Το γράφημα, που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος (πάντοτε σε σχετικές και όχι απόλυτες μονάδες), ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται φάσμα μαζών (mass spectrum) της ένωσης. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος. Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ουσίας και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της. Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ουσίας

από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της ονομάζεται Φασματομετρία Μαζών (MS) (McMurry, 2005; Χατζηιωάννου, 2015).

Στην παρούσα μελέτη για την ταυτοποίηση των συστατικών μελετήθηκαν τα φάσματα μαζών, τους χρόνους συγκράτησης (RT) των κορυφών των χρωματογραφημάτων και τις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες Adams, 4th Edition και Xcalibur του λογισμικού του οργάνου.



Σχήμα 2. Φάσμα μαζών της β-θουγιόνης.

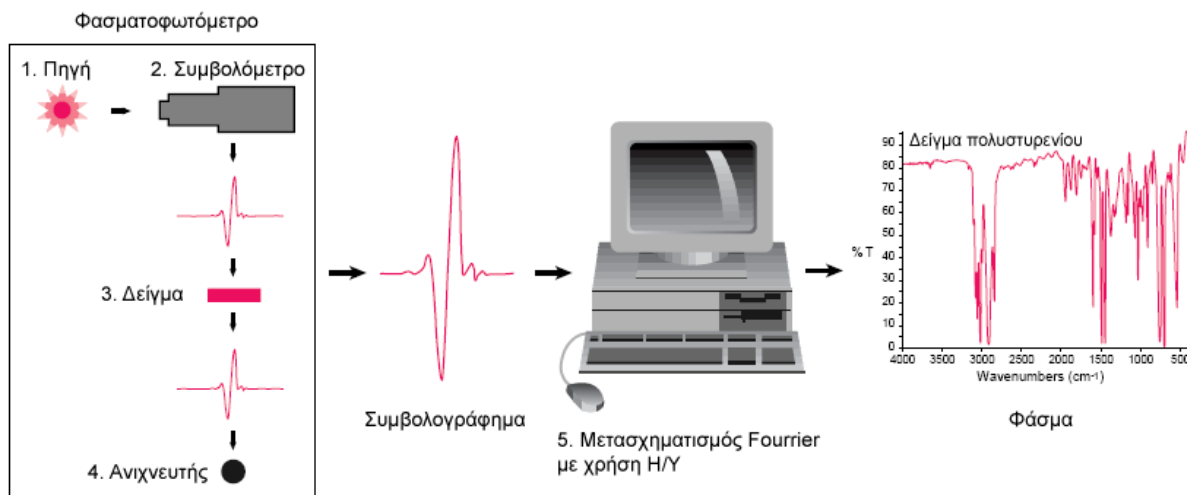
1.7 Φασματοσκοπία Υπέρυθρης Ακτινοβολίας

Τα δείγματα φυτικού υλικού για τα τέσσερα φυτικά είδη αναλύθηκαν με τη φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR.

Η αρχή στην οποία βασίζεται είναι η μελέτη της απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Η απορρόφηση ακτινοβολίας στην περιοχή του υπέρυθρου προκαλεί διεγέρσεις μεταξύ διαφόρων ενεργειακών σταθμών δόνησης και περιστροφής του μορίου, ενώ το μόριο παραμένει στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση. Απαραίτητη προϋπόθεση για να απορροφήσει ένα μόριο υπέρυθρη ακτινοβολία είναι να υποστεί μεταβολή της διπολικής ροπής του ως αποτέλεσμα της δονητικής ή της περιστροφικής κίνησής του. Όσο αυξάνει η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση. Η υπέρυθρη περιοχή εκτείνεται από το ορατό μέχρι τα μικροκύματα και περιλαμβάνει ακτινοβολίες, των οποίων οι κυματαριθμοί κυμαίνονται από $12.800-10\text{ cm}^{-1}$. Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι η περιοχή κυματαριθμών $4000-600\text{ cm}^{-1}$ (McMurry, 2005; Χατζηιωάννου, 2015). Το όργανο με το οποίο πραγματοποιείται η ανάλυση ονομάζεται φασματόμετρο FT-IR.

Δύο είναι οι κύριες σύγχρονες τεχνικές λήψης των φασμάτων που χρησιμοποιεί ένα φασματόμετρο FT-IR:

- η τεχνική της Διάχυτης Ανάκλασης (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy, DRIFTS), η οποία χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη και
- η τεχνική της Ολικής Εξασθενημένης Ανακλάσης (Attenuated Total Reflection, ATR)



Εικόνα 5. Διαδικασία λειτουργίας φασματοφωτόμετρου.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5**, ο ανιχνευτής του οργάνου δίνει το συμβολόγραμμα. Το συμβολόγραμμα μετασχηματίζεται κατά Fourier με τη χρήση Η/Υ και δημιουργείται ένα τυπικό φάσμα IR (%T συναρτήσει cm^{-1}).

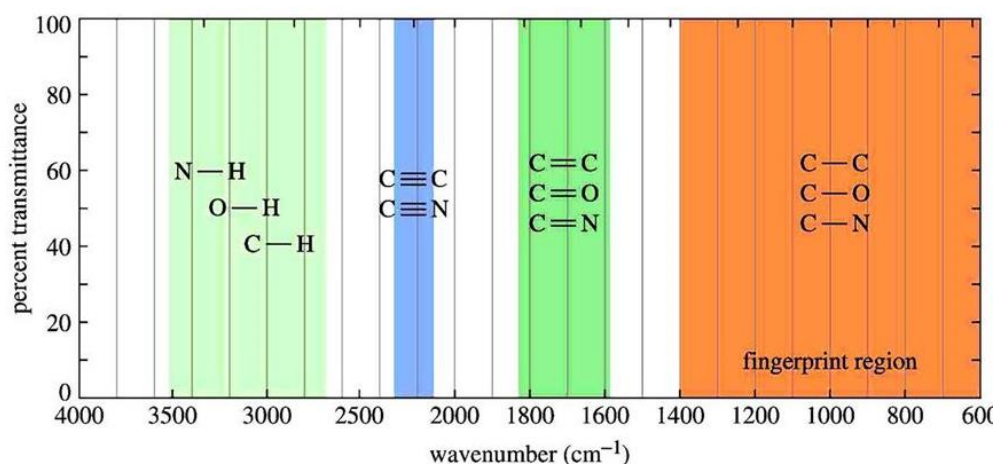
Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη λήψη των φασμάτων είναι:

- Η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου (Resolution) να ξεχωρίζει τις κορυφές απορρόφησης.
- Ο λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise Ratio, RSN), που αξιολογεί τα σήματα που δεν ανταποκρίνονται σε πραγματικές απορροφήσεις.
- Ο αποδισμός (Apodization), που οφείλεται στη μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό και οδηγεί στο σχηματισμό λοβών στη βάση των κορυφών.
- Ο ρόλος της ταχύτητας της κίνησης του κινητού κατόπτρου, όπου όσο μειώνεται η ταχύτητα, τόσο αυξάνεται η ένταση του φάσματος.

Το υπέρυθρο φάσμα αποτελείται από δύο κύριες περιοχές:

- Την περιοχή συχνότητας των ομάδων που βρίσκεται περίπου στα $4000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ όπου οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων με δύο μόνο άτομα και με συχνότητα χαρακτηριστική των μαζών τους και της σταθεράς δύναμης που τα συνδέει. Αυτή η απλοποίηση αγνοεί το υπόλοιπο του μορίου.
- Την περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος που βρίσκεται περίπου στα $1500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. Οι ζώνες απορρόφησης που υπάρχουν στην περιοχή αυτή σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου. Κάθε άτομο ασκεί μια αμοιβαία επίδραση στα άλλα (ζώνες συνδυασμών). Οι τελικές ζώνες ανήκουν αποκλειστικά σε ένα μόριο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση του.

Σε αυτή τη μελέτη σκοπός ήταν να γίνει σύγκριση των δειγμάτων σαν σύνολο με βάση τα φάσματα τους, έτσι μελετήθηκε η δεύτερη περιοχή, αυτή του δακτυλικού αποτυπώματος.



Σχήμα 3. Οι περιοχές ενός φάσματος IR.

1.8 Τοξικότητα των βοτάνων

Η χρήση των φυτικών φαρμάκων και των βοτάνων από τον άνθρωπο αυξάνεται συνεχώς σε όλο τον κόσμο. Εκτιμάται ότι έως και το 80% των ανθρώπων που ζουν στις αναπτυσσόμενες χώρες χρησιμοποιούν τα βότανα και την παραδοσιακή ιατρική πρακτική σαν τα βασικά θεραπευτικά τους μέσα. Οι λόγοι που τους οδηγούν εκεί είναι η παράδοση, η εύκολη διαθεσιμότητα των βοτάνων και το χαμηλό τους κόστος. Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση των βοτάνων σαν ένας εναλλακτικός τρόπος θεραπείας έχει εξαπλωθεί ευρέως και στις ανεπτυγμένες χώρες. Σε αντίθεση με τις αναπτυσσόμενες χώρες, ο λόγος που έχει εξαπλωθεί στις ανεπτυγμένες είναι ότι θεωρούνται πιο ασφαλή από τα συνθετικά φάρμακα και επιπλέον φιλικά προς το περιβάλλον. Επιπλέον, έχουν συσχετιστεί με έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής και με μια λιγότερο επιθετική προσέγγιση θεραπείας.

Η δημοφιλία τους αυτή έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των εταιριών που έχουν συμβάλει με τη σειρά τους στην προώθηση τους στο ευρύ κοινό. Το αποτέλεσμα είναι να βρίσκονται πλέον τα φαρμακευτικά φυτά όχι μόνο σε εξειδικευμένα καταστήματα που ελέγχουν την ποιότητα και την προέλευση των προϊόντων αλλά και σε καταστήματα τροφίμων και λαϊκές αγορές. Είναι ευρέως αποδεκτά από τους καταναλωτές που θεωρούν όμως βέβαιο ότι το «φυσικό» σημαίνει και «ασφαλές». Σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα, τα άγρια-αυτοφυή φυτά που συλλέγονται από τη «φύση» θεωρούνται καλύτερα και προτιμώνται από τα καλλιεργούμενα, ακόμα κι αν πρόκειται για το ίδιο φυτικό είδος.

Στην πραγματικότητα όμως η χρήση των βοτάνων αποτελεί ένα πολύπλευρο ζήτημα, στο οποίο δεν ισχύουν βεβαιότητες και συχνά τίθενται θέματα όπως αυτό της τοξικότητας. Ένα πρώτο σημαντικό θέμα που αφορά την τοξικότητα των βοτάνων, είναι η επιμόλυνση τους από άλλες τοξικές ουσίες που σχετίζονται με εξωτερικούς παράγοντες. Αρκετές φορές έχουν ανιχνευτεί βαρέα μέταλλα

σε δείγματα βοτάνων που πιθανότατα προήλθαν από το έδαφος στο οποίο είχαν αναπτυχθεί, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις φυτών που είχαν συλλεχθεί και όχι καλλιεργηθεί σε ένα γνωστής σύστασης έδαφος. Έτσι, η αγορά βοτάνων που δεν είναι πιστοποιημένα ως προς το φυτικό είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας τους ή δεν είναι καν γνωστή η προέλευση τους, μπορεί να εγκυμονεί κινδύνους και τελικά να προκαλεί μεγαλύτερο πρόβλημα στην υγεία από τις ωφέλιμες ιδιότητες του ίδιου του φυτού. Για αυτό το λόγο, στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν και βότανα, ένα για κάθε είδος, τα οποία προέρχονταν από την αγορά του κέντρου της Αθήνας από όπου προμηθεύονται ευρέως βότανα και μπαχαρικά οι κάτοικοι της πρωτεύουσας και για τα οποία δεν ήταν γνωστό τίποτα παρά μόνο η κοινή ονομασία τους, ώστε να συγκριθούν με τα αντίστοιχα δείγματα, τα οποία ήταν γνωστής βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης.

Ένα άλλο φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί είναι η νόθευση ή η λανθασμένη αναγνώριση του φυτικού είδους που χρησιμοποιείται στο τελικό προϊόν. Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις δηλητηριάσεων που προκλήθηκαν από την κατανάλωση ενός τέτοιου προϊόντος. Για παράδειγμα, το 1992 στο Βέλγιο 105 γυναίκες που κατανάλωναν ένα φυτικό παρασκεύασμα αδυνατίσματος, παρουσίασαν σοβαρά προβλήματα στα νεφρά, επειδή όπως αποδείχτηκε, στο συγκεκριμένο παρασκεύασμα το είδος *Stephania tetrandra* είχε λανθασμένα αντικατασταθεί από το τοξικό είδος *Aristolochia fangchi*. Άλλο ένα παράδειγμα που έχει οδηγήσει σε ανάλογα λάθη και δηλητηριάσεις είναι η μεγάλη ομοιότητα του είδους *Gentiana lutea* με το τοξικό *Veratrum album* (Kristanc & Kreft, 2016a).

Επιπλέον, αρκετά από τα βότανα έχει βρεθεί ότι περιέχουν τοξικές και επικίνδυνες για την υγεία του ανθρώπου ενώσεις. Βέβαια, τα φυτά εκείνα που είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα και δηλητηριώδη είναι ήδη γνωστά, στις περισσότερες περιπτώσεις από την εμπειρία της παραδοσιακής τους χρήσης. Τα φυτά όμως που δεν έχουν άμεσα τοξική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου αλλά προκαλούν μακροπρόθεσμα προβλήματα στην υγεία είναι δύσκολο ή και αδύνατο να ανιχνευτούν από την παραδοσιακή τους χρήση ή ακόμα και από κλινικές μελέτες. Έτσι, η μακροπρόθεσμη τοξικότητα ενός φυτού μπορεί να περάσει απαρατήρητη ακόμα κι αν αφορά ένα φυτό που καταναλώνεται ευρέως.

Γενικά, οι κύριες κατηγορίες τοξικών ουσιών στα φυτά είναι οι νευροτοξίνες, ενώσεις που μπορεί να είναι καρκινογόνες, να προκαλέσουν τερατογενέσεις ή ορμονικές διαταραχές και ακολουθούν οι κυτταροτοξίνες και οι τοξίνες που διαταράσσουν τη δομή και τη λειτουργία οργάνων όπως είναι το ήπαρ, η καρδιά, τα νεφρά, το γαστρεντερικό σύστημα και οι πνεύμονες.

Πιο αναλυτικά, τα κύρια τοξικά συστατικά που έχει βρεθεί ότι προκαλούν γενοτοξικότητα και καρκινογένεση είναι διάφορα αλκενυλο-βενζένια, όπως η εστραγόλη, η ευγενόλη, η μεθυλο-ευγενόλη, η ελεμικίνη, η β-ασαρόνη και η *trans*-ανηθόλη (αν και όπως φαίνεται ο κίνδυνος μειώνεται κατά την κατανάλωση από τη δράση άλλων συστατικών του ίδιου φυτού), τα αλκαλοειδή της πυρρολιζιδίνης και η ένωση μπραζίνη C (ptaquiloside) στην κοινή φτέρη του είδους *Pteridium aquilinum*.

Ενώσεις που μπορεί να προκαλέσουν τερατογενέσεις και/ή αποβολές είναι κυρίως οι ανθρακινόνες και οι γλυκοζίτες τους και διάφορα αλκαλοειδή, όπως η λουπινίνη, η αναταμπίνη, η βερατριδίνη, υοσκιαμίνη, η κωνιΐνη και η τριγωνελλίνη.

Συστατικά που δρουν σαν ενδοκρινικοί διαταρράκτες, δηλαδή παρεμποδίζουν την εύρυθμη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος, είναι διάφορα φυτοοιστρογόνα, δηλαδή δευτερογενείς μεταβολίτες που μοιάζουν δομικά ή λειτουργικά με τα οιστρογόνα των θηλαστικών, με κύριες ομάδες τους τις λιγνάνες, τις ισοφλαβόνες, όπως η ρεσβεραστρόλη, η γενιστεΐνη και η νταιντζεΐνη, τις κουμεστάνες, τα πρενυλφλαβονοειδή και τα στυλμπένια, ενώ σημαντική επίδραση έχει βρεθεί ότι έχει και το γλυκυρριζικό οξύ των ειδών *Glycyrrhiza* spp.

Σύμφωνα με ιατρικές βάσεις δεδομένων που αφορούν τα προβλήματα που προκαλούνται στο ήπαρ από τη χρήση φαρμάκων (drug-induced liver injury, DILI), το 2-16% οφείλεται σε φυτικά φάρμακα. Φυτά που έχει βρεθεί ότι προκαλούν ηπατοτοξικότητα είναι το φυτό Κάβα (*Piper methysticum*), είδη του γένους *Teucrium* λόγω του διτερπενίου τεουκρίνη Α, το φλισκούνη (*Mentha pulegium*) λόγω της ένωσης πουλεγόνη και διάφορα αλκαλοειδή της πυρρολιζιδίνης, όπως η ρετρορεκίνη, η ελιοτριδίνη και η οτονεκίνη.

Όσον αφορά τα φυτά που περιέχουν νευροτοξίνες, αρχικά είναι όσα φυτά παράγουν την ένωση σουαΐνσονίνη με κύριους εκπροσώπους τα είδη των γενών *Swainsona*, *Astragalus* και *Oxytropis* και προκαλούν την ασθένεια locoweed ή crazyweed που χαρακτηρίζεται από διάφορες νευρολογικές και συμπεριφορικές διαταραχές. Άλλη πάθηση είναι ο νευρολαθουρισμός, που σχετίζεται με την κατανάλωση φυτών του γένους *Lathyrus*. Τέλος, κάποια αλκαλοειδή της πιπεριδίνης, όπως η παλουστρίνη, που εντοπίζεται σε είδη του γένους *Equisetum* μπορεί να προκαλέσουν νευρολογικές διαταραχές με τη μακροχρόνια χρήση τους.

Τέλος, αυτά που προκαλούν νεφροτοξικότητα είναι αρχικά αυτά που περιέχουν αριστολογικό οξύ (*Asarum* sp. και *Aristolochia* sp.), οξαλικό οξύ (*Oxalis* sp., *Rumex* sp., *Amaranthus* sp. και *Chenopodium* sp.) και το είδος *Polygonatum multiflorum* που χρησιμοποιείται κατά του Αλτσχάιμερ και του Πάρκινσον αλλά περιέχει τις τοξικές ενώσεις κινόνες, όπως η ρεΐνη και η εμοδίνη.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι εκτός από τις ιδιότητες των τοξικών ενώσεων σε ένα φυτό, καθοριστικό ρόλο στην τοξικότητα παίζει και η δόση αλλά και η διάρκεια για την οποία λαμβάνεται το φυτό αυτό (Kristanc & Kreft, 2016a; Kristanc & Kreft, 2016b).

Τέλος, δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι η πλειοψηφία των βοτάνων δεν έχει μελετηθεί ενδελεχώς όσον αφορά την ασφάλεια τους για την υγεία του ανθρώπου. Οι μελέτες όσον αφορά τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου πρέπει να συνεχιστούν. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη, εκτός από την ανάλυση των πτητικών συστατικών των βοτάνων, πραγματοποιήθηκαν και έλεγχοι τοξικότητας με δύο διαφορετικές μεθόδους, τον αναλυτή Microtox® και τη μέθοδο MTT σε κύτταρα Vero.

1.9 Το σύστημα ανάλυσης Microtox®

Για την εκτίμηση της τοξικότητας των αφεψημάτων χρησιμοποιήθηκε αρχικά ο αναλυτής Microtox® και το βακτήριο *Vibrio fischeri*.

Vibrio fischeri

Το *Vibrio fischeri* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια Vibrionaceae. Είναι ραβδοειδούς μορφής (βάκιλος), διαθέτει πολικά μαστίγια, δε σχηματίζει σπόρια και βρίσκεται σε υδάτινα περιβάλλοντα. Είναι ετερότροφος οργανισμός που όταν βρίσκεται ελεύθερος αποικοδομεί την οργανική ύλη. Πιο συχνά όμως βρίσκεται να συμβιώνει με άλλους θαλάσσιους οργανισμούς, όπως με κάποια μαλάκια (*Eurytmna scolopes*) και ψάρια, στα οποία βρίσκεται σε εξειδικευμένα όργανα φωτός και συμβάλλει στην προστασία τους από τους εχθρούς. Σπανιότερα είναι παθογόνο για κάποια είδη ασπόνδυλων προκαλώντας τη νόσο «luminous Vibriosis» (Madigan, 2005).

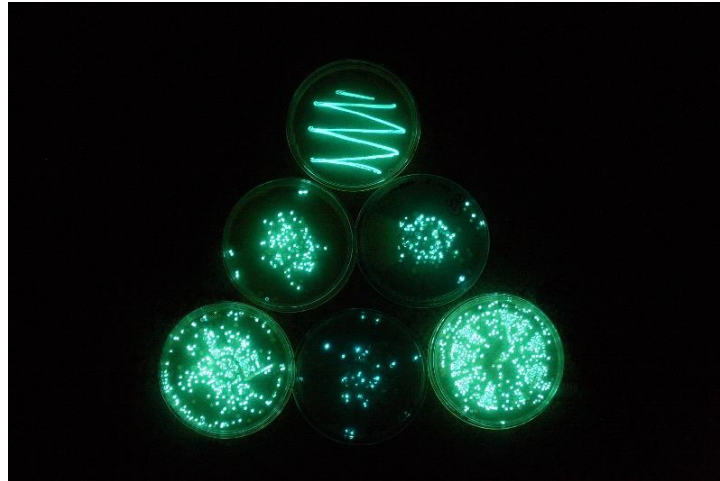
Πίνακας 2. Συστηματική ταξινόμηση του είδους *V. fischeri*

Βασίλειο	Bacteria
Φύλο	Protobacteria
Κλάση	Gamma Proteobacteria
Τάξη	Vibrionales
Οικογένεια	Vibrionaceae
Γένος	<i>Vibrio</i>
Είδος	<i>V. fischeri</i>

Κύριο χαρακτηριστικό του είναι η ικανότητα βιοφωταύγειας του. Το φως που εκπέμπουν οφείλεται στην παρακάτω αντίδραση οξειδωσης που καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση:

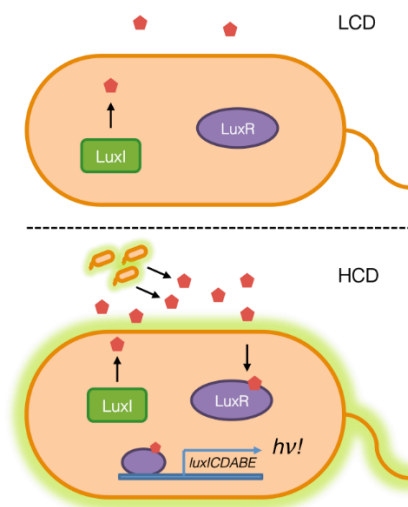


όπου FMNH₂ η ανηγμένη μορφή της λουσιφερίνης. Η λουσιφερίνη δεσμεύεται από τη λουσιφεράση και αντιδρά με το οξυγόνο δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο, την 4-υπεροξυφλαβίνη. Το σύμπλοκο αυτό οξειδώνει την αλειφατική αλδεϋδη (RCHO) και παράγεται το οξύ (RCOOH) και ενδιάμεσο σταθερό σύμπλοκο λουσιφεράσης-υδροξυφλαβίνης. Το σύμπλοκο αυτό βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και μεταπίπτει αργά σε σταθερή κατάσταση εκπέμποντας γαλαζοπράσινο φως στα 490 nm.



Εικόνα 6. Αποικίες των βιοφωταυγών βακτηρίων *V. fischeri*.

Τα γονίδια *lux* είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της βιοφωταύγειας, τα οποία βρίσκονται οργανωμένα σε ένα οπερόνιο και ελέγχονται από το σύστημα LuxR/LuxI και την αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (Quorum Sensing). Η έκφραση των γονιδίων επάγεται όταν η πυκνότητα του πληθυσμού του ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο όριο (πχ 10^9 - 10^{10} CFU/mL σε συνθήκες συμβίωσης με το *Eurytmna scolopes*).

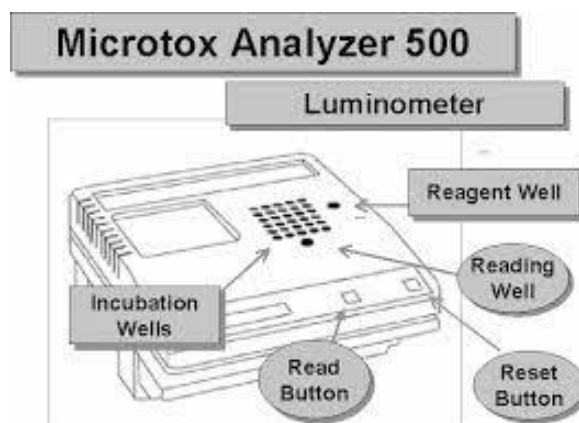


Εικόνα 7. Το σύστημα LuxR/LuxI και η επαγωγή της βιοφωταύγειας.

Microtox®

Έχει βρεθεί ότι το *V. fischeri* είναι ευαίσθητο σε ένα μεγάλο εύρος τοξικών ουσιών, οργανικών και ανόργανων συστατικών, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σαν βιοαισθητήρας. Ο αναλυτής Microtox® χρησιμοποιεί το *V. fischeri* και την ιδιότητα του εκπέμπει φως μετρώντας με ενσωματωμένο φωτόμετρο την % αναστολή της βιοφωταύγειας του μετά από την έκθεση του σε ένα

πιθανά τοξικό δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα αυτό εκθέτει το βακτήριο σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλυμάτων του δείγματος. Όταν ένα διάλυμα είναι τοξικό, προκαλεί την αναστολή της βιοφωταύγειας του βακτηρίου και η % μείωση της βιοφωταύγειας μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με την τοξικότητα (ISO 11348-3/98). Το φωτόμετρο του αναλυτή μετρά στα 490 nm μετά από χρόνο έκθεσης 5, 10 και 15 min και η % μείωση εκφράζεται τελικά με τη συγκέντρωση EC₅₀ του δείγματος στην οποία έχουμε 50% αναστολή της βιοφωταύγειας.



Εικόνα 8. Οργανολογία αναλυτή Microtox®

Όπως ειπώθηκε, η δοκιμή τοξικότητας με τον αναλυτή Microtox® είναι ειδικά σχεδιασμένη για τον έλεγχο της βιοδραστικότητας διαφόρων τύπων δειγμάτων και εμφανίζει ευαισθησία σε ένα μεγάλο εύρος τοξικών ουσιών. Πιο κοινή είναι η χρήση του για τον έλεγχο τοξικότητας σε δείγματα νερού. Οι (Conforti et al., 2008) ήταν οι πρώτοι που πρότειναν τη χρήση του για την εκτίμηση της τοξικότητας φυτικών εκχυλισμάτων και αφεψημάτων και να εκτιμήσουν την αλληλεπίδραση των υδατοδιαλυτών και πτητικών συστατικών στην τοξικότητα αυτή (Skotti, Anastasaki, Kanellou, Polissiou, & Tarantilis, 2014).

1.10 Κύτταρα Vero - Δοκιμή MTT

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των υδατικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων φυτικών ειδών χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα Vero και η δοκιμή MTT.

Κύτταρα Vero

Τα κύτταρα Vero, ATCC® CCL-81™ αποτελούν μια κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται σε κυτταρικές καλλιέργειες. Πρόκειται για αθανатоποιημένους φυσιολογικούς ινοβλάστες που απομονώθηκαν από επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα. Προέρχονται από έναν πράσινο αφρικανικό πίθηκο, τον *Chlorocebus* sp. (προηγούμενη ονομασία *Cercopithecus aethiops*) και η κυτταρική σειρά αναπτύχθηκε το 1962 στο πανεπιστήμιο Chiba της Ιαπωνίας. Το όνομα "Vero" προέρχεται από τη

συντομογραφία του *verda reno* που σημαίνει πράσινο νεφρό στην εσπεράντο, ενώ επιπλέον *vero* στην εσπεράντο είναι η αλήθεια.

Η κυτταρική σειρά είναι συνεχής, δηλαδή μπορεί να διαιρεθεί και να αναπαραχθεί πολλές φορές και χαρακτηρίζεται από ανευπλοειδία, δηλαδή δεν έχει τον κανονικό αριθμό χρωμοσωμάτων του είδους.

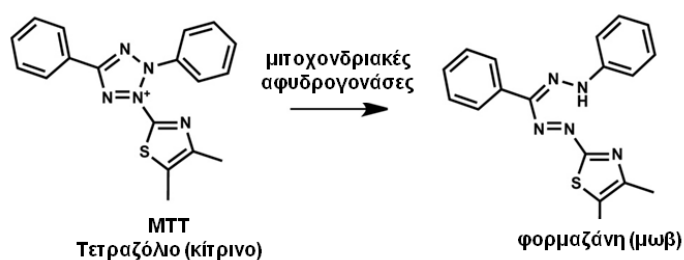
Ένα άλλο χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων είναι ότι δεν εκκρίνουν ιντερφερόνη (α - ή β -) όταν μολύνονται από ιούς. Παρ' όλα αυτά διαθέτουν τους αντίστοιχους υποδοχείς για την α - και β -ιντερφερόνη οπότε αντιδρούν φυσιολογικά αν προστεθεί από εξωτερική πηγή ιντερφερόνη στην καλλιέργεια.

Τα κύτταρα Vero χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς, όπως για τον έλεγχο της ύπαρξης συγκεκριμένων τοξινών σε ένα δείγμα και σαν κύτταρα-ξενιστές για ιούς ή διάφορα ευκαρυωτικά παράσιτα, όπως το τρυπανόσωμα.

Σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης τους για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας είναι η αποτελεσματικότητα τους σε συνδυασμό με τη μη αναγκαιότητα χρήσης πειραματόζωων.

Δοκιμή MTT

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των αφεψημάτων, χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος MTT, με κριτήριο τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων. Ο (Mosmann, 1983) περιέγραψε πρώτος τη μέθοδο του βρωμιούχου διμεθυλθιαζολιδιφαινυλτετραζολίου, που βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (MTT) σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης (Σχήμα 2). Πιο συγκεκριμένα, ο δακτύλιος του τετραζολίου μεταβολίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια από τη δραση αφυδρογονασών και το απαλό κίτρινο χρώμα του υποστρώματος μετατρέπεται σε πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι διαλύονται με ισοπροπανόλη δίνουν τελικά ένα σκούρο μωβ χρώμα που απορροφά στα 570 nm και μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί με ένα φασματοφωτόμετρο. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων στα μιτοχόνδρια των κυττάρων είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων.



Σχήμα 4. Μεταβολισμός του MTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες ζωντανών κυττάρων.

1.11 Σκοπός της Μελέτης

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση των βοτάνων από τον άνθρωπο αυξάνεται συνεχώς σε όλο τον κόσμο. Τα βότανα έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συνθετικά φάρμακα, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις έχουν παρενέργειες, προκαλούν εξάρτηση και επιβαρύνουν εν γένει τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, είναι φιλικά προς το περιβάλλον και δεν έχουν τις δυσμενείς επιπτώσεις και την παρέμβαση σε αυτό που έχουν για παράδειγμα τα αντιβιοτικά, των οποίων η αλόγιστη χρήση έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη στελεχών με ανθεκτικότητα σε αυτά και τη συνεχή ανάγκη για τη δημιουργία νέων. Για τους ίδιους λόγους, υπάρχει τα τελευταία χρόνια η τάση για τη χρήση των βοτάνων και των φυσικών τους προϊόντων για την καταπολέμηση των εχθρών των καλλιεργειών και την αντικατάσταση των συνθετικών συντηρητικών τροφίμων και καλλυντικών.

Οι σημαντικότερες οικογένειες αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών είναι η *Lamiaceae* και η *Asteraceae* και αποτελούν τις πλουσιότερες σε ενδημικά είδη στον ελλαδικό χώρο. Αν και η πρώτη είναι ευρέως μελετημένη, δεν έχουν γίνει εξίσου αρκετές έρευνες στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της δεύτερης που εντοπίζονται στην Ελλάδα. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τέσσερα φυτικά είδη της οικογένειας *Asteraceae*, τα οποία έχουν περαιτέρω βοτανική συγγένεια και ταξινομούνται στην ίδια υποοικογένεια (*Asteroideae*) και φυλή (*Anthemideae*).

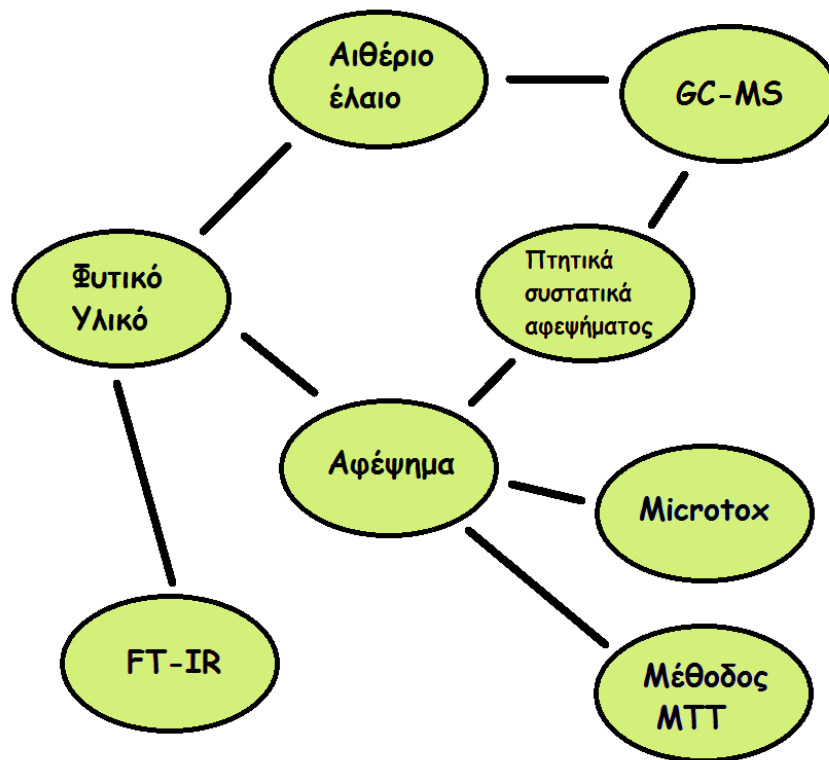
Μελετήθηκαν συνολικά 14 δείγματα φυτών και για τα τέσσερα φυτικά είδη. Τα δείγματα στην πλειοψηφία τους προήλθαν από πιστοποιημένους παραγωγούς, έτσι ώστε το φυτικό υλικό να είναι γνωστής βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης, όπως και γνωστής χρονολογίας συγκομιδής τους. Ταυτόχρονα όμως μελετήθηκαν και δείγματα (ένα για κάθε φυτικό είδος) από την αγορά του κέντρου της Αθήνας, από όπου προμηθεύονται ευρέως βότανα και μπαχαρικά οι κάτοικοι της πρωτεύουσας για να γίνει η σύγκριση με τα προηγούμενα. Για τα δείγματα αυτά δεν ήταν γνωστό τίποτα άλλο παρά η κοινή ονομασία τους.

Έγινε η παραλαβή των αιθερίων ελαίων και των αφεψημάτων τους και προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών τα πτητικά συστατικά τους, ποιοτικά και % ποσοτικά και ακολούθησε σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων κάθε φυτικού είδους. Με τη χρήση πρότυπων καμπύλων αναφοράς, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση (mg/mL) της α - και β -θουγιόνης αλλά και της καμφοράς στα δείγματα όπου ανιχνεύτηκαν.

Επιπλέον, παρελήφθησαν τα φάσματα FT-IR από όλα τα δείγματα φυτικού υλικού και έγινε σύγκριση των φασμάτων με βάση την περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος ($1500-800\text{ cm}^{-1}$), υπολογίζοντας τον % συντελεστή ομοιότητας των φασμάτων.

Τέλος, επειδή η ευρύτατη χρήση των βοτάνων θέτει και το ζήτημα της ασφάλειας τους για την υγεία του ανθρώπου, εκτιμήθηκε η τοξικότητα των αφεψημάτων με δύο διαφορετικές μεθόδους, τον αναλυτή *Microtox*® που χρησιμοποιεί το βακτήριο *Vibrio fischeri* και τη μέθοδο MTT σε κύτταρα Vero.

Ακολουθεί διαγραμματικά η πειραματική πορεία:



Σχήμα 5. Διάγραμμα Πειραματικής Πορείας

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δείγματα Φυτικού Υλικού

Τα τέσσερα φυτικά είδη που μελετήθηκαν, όπως προαναφέρθηκε, ανήκουν στην οικογένεια Asteraceae και ειδικότερα στη φυλή Anthemideae και ήταν τα:

Matricaria chamomilla L. (κν. χαμομήλι),

Artemisia absinthium L. (κν. αψιθιά),

Achillea millefolium L. (κν. αχιλλέα) και

Artemisia dracuncululus L. (κν. εστραγκόν).

Το φυτικό υλικό σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αποξηραμένο και περιελάμβανε ανά περίπτωση φύλλα, στελέχη ή και άνθη.



Εικόνα 9. Φυτικό υλικό *Achillea millefolium* L. (κν. αχιλλέα) στη μορφή που παραδόθηκε από τον προμηθευτή (ΑΝΘΗΡ).

Τα δείγματα στην πλειοψηφία τους προήλθαν από παραγωγούς, έτσι ώστε το φυτικό υλικό να είναι γνωστής βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης, όπως και γνωστής χρονολογίας συγκομιδής τους.

Ταυτόχρονα όμως μελετήθηκαν και δείγματα (ένα για κάθε φυτικό είδος) από την αγορά του κέντρου της Αθήνας, από όπου προμηθεύονται ευρέως βότανα και μπαχαρικά οι κάτοικοι της πρωτεύουσας για να γίνει η σύγκριση με τα προηγούμενα. Για τα δείγματα αυτά δεν ήταν γνωστό τίποτα άλλο παρά η κοινή ονομασία τους.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα δείγματα για κάθε φυτικό είδος. Στην τελευταία στήλη δημιουργήθηκε μια κωδικοποίηση για κάθε δείγμα για τη διευκόλυνση της παρουσίασης των αποτελεσμάτων:

Πίνακας 3. Δείγματα φυτικού υλικού χαμομηλιού.

Προμηθευτής	Φυτικό είδος	Προέλευση	Έτος συγκομιδής	Κωδ.
Γάκης Ιωάννης	<i>Matricaria chamomilla</i> L., 'Zloty Lan'	Καρδίτσα	2015	Mc-1
LAV	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Τρίκαλα	2015	Mc-2
Αγορά της Αθήνας	κν. χαμομήλι	-	-	Mc-A

Πίνακας 4. Δείγματα φυτικού υλικού αψιθιάς.

Προμηθευτής	Φυτικό Είδος	Προέλευση	Έτος συγκομιδής	Κωδ.
Βιολογικός Αγρός	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Κοζάνη	2015	Aa-1
ΑΝΘΗΡ	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Αγρίνιο	2015	Aa-2
Ο κήπος της Ρέας	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Ιεράπετρα	2015	Aa-3
Αγορά της Αθήνας	κν. αψιθιά	-	-	Aa-A

Πίνακας 5. Δείγματα φυτικού υλικού αχιλλέας.

Προμηθευτής	Φυτικό Είδος	Προέλευση	Έτος συγκομιδής	Κωδ.
Βιολογικός Αγρός	<i>Achillea millefolium</i> L.	Κοζάνη	2015	Am-1
ΑΝΘΗΡ	<i>Achillea millefolium</i> L.	Αγρίνιο	2015	Am-2
Βιο-Αγρόκτημα	<i>Achillea millefolium</i> L.	Χαλκιδική	2015	Am-3
Αγορά της Αθήνας	κν. αχιλλέα	-	-	Am-A

Πίνακας 6. Δείγματα φυτικού υλικού εστραγκόν.

Προμηθευτής	Φυτικό Είδος	Προέλευση	Έτος συγκομιδής	Κωδ.
Βιολογικός Αγρός	<i>Artemisia dracunculus</i> L.	Κοζάνη	2015	Ad-1
ΜΥΡΑΘΩΝ	<i>Artemisia dracunculus</i> L.	Μαραθώνας	2015	Ad-2
Αγορά της Αθήνας	κν. εστραγκόν	-	-	Ad-A

2.2 Παραλαβή αιθερίων ελαίων

Η παραλαβή του αιθερίου ελαίου για κάθε ένα από τα δείγματα έγινε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης με συσκευή τύπου Clevenger.

Πειραματική διαδικασία:

- Λειοτριβήση φυτικού υλικού σε μίξερ.
- Τοποθέτηση της σφαιρικής φιάλης 1L (40 g φυτικού υλικού + 500 mL H₂O) στο θερμομανδύα και στήσιμο της συσκευής Clevenger και του συμπυκνωτή (ψύξη με νερό βρύσης) (**Εικόνα 10**).
- Θέρμανση της σφαιρικής φιάλης στο θερμομανδύα.
- Διάρκεια απόσταξης 3 ώρες.



Εικόνα 10. Το σύστημα της απόσταξης (από κάτω προς τα πάνω) με το θερμομανδύα, τη συσκευή Clevenger και το συμπυκνωτή συνδεδεμένο με το νερό της βρύσης.

- Μετά το πέρας της απόσταξης, γινόταν η παραλαβή του αιθερίου ελαίου μαζί με το υδρόλυμμα του εξαιτίας της μικρής απόδοσης που έδιναν τα συγκεκριμένα φυτικά είδη.
- Εκχύλιση του παραληφθέντος με διαιθυλαιθέρα (DEE) σε αναλογία με το αιθέριο έλαιο και το υδρόλυμμα 1:1 (20 mL) σε διαχωριστική χοάνη για την παραλαβή του αιθερικού εκχυλίσματος του αιθερίου ελαίου.
- Συμπύκνωση του διαλύτη με αέριο N₂ έως τα 5 mL τελικού όγκου.
- Προσθήκη άνυδρου MgSO₄ ως ξηραντικό, φιλτράρισμα και φύλαξη στην κατάψυξη.

Για κάθε ένα δείγμα φυτικού υλικού (π.χ. *Artemisia absinthium* L., ANΘHP) έγιναν 3 παραλαβές-επαναλήψεις αιθερίου ελαίου (τριπλέτα) για πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

2.3 Παραλαβή αφεψημάτων

Η παραλαβή των αφεψημάτων, των υδατικών εκχυλισμάτων, έγινε με τρόπο ανάλογο της κοινής παρασκευής τους για οικιακή κατανάλωση.

Πειραματική διαδικασία:

- Ζύγιση 2 g φυτικού υλικού (στη μορφή που κυκλοφορεί στο εμπόριο).
- Εκχύλιση του φυτικού υλικού σε 200 mL (όγκος που αντιστοιχεί σε μια κοινή κούπα) βρασμένου εμφιαλωμένου νερού (*Ζαγόρι*)(**Εικόνα 11**).
- Η διάρκεια της εκχύλισης ήταν 10 min με ανάδευση στην αρχή, στα 5 min και στο τέλος της εκχύλισης.



Εικόνα 11. Τριπλέτα αφεψημάτων (εστραγκόν, αγορά της Αθήνας, Ad-3).

- Διήθηση με ηθμό και αναμονή για επαναφορά του αφεψήματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φύλαξη 10 mL αφεψήματος στην κατάψυξη.

Για κάθε ένα δείγμα φυτικού υλικού (π.χ. *Artemisia absinthium* L., ANΘHP) έγιναν 3 παραλαβές-επαναλήψεις αφεψημάτων (τριπλέτα) για πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

2.4 Παραλαβή των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων

Μετά τη φύλαξη των 10 mL από το κάθε αφέψημα, χρησιμοποιήθηκαν 150 mL από αυτό για την εκχύλιση υγρού-υγρού σε διαχωριστική χοάνη με διαλύτη το διαιθυλαιθέρα (DEE) και την παραλαβή έτσι των πτητικών συστατικών που περνούν από το φυτικό υλικό στα υδατικά εκχυλίσματα.

Πειραματική διαδικασία εκχύλισης L-L και παραλαβής:

- Προσθήκη 150 mL αφεψήματος σε διαχωριστική χοάνη (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12. Διαχωριστική χοάνη για την εκχύλιση L-L.

- Εκχύλιση του υδατικού διαλύματος με 150 mL διαιθυλαιθέρα (DEE) (3 φορές με 50 mL).
- Συλλογή των δύο φάσεων ξεχωριστά (υδατική και οργανική).
- Απόρριψη υδατικής φάσης.
- Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε στην παραληφθείσα οργανική φάση με διαλύτη το νερό.
- Στη συνέχεια έγινε συμπύκνωση της οργανικής φάσης με τον περιστροφικό εξατμιστή κενού (rotary evaporator) (Laborota 400 efficient, LinkLab, Heidolph) και στη συνέχεια με αέριο άζωτο έως τα 5 ml τελικού όγκου.
- Προσθήκη άνυδρου $MgSO_4$ ως ξηραντικό, φιλτράρισμα και φύλαξη στην κατάψυξη (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13. Το υδατικό εκχύλισμα (αφέψημα) (αριστερά) και το οργανικό εκχύλισμα του (δεξιά) από το δείγμα (*Artemisia absinthium* L., Ο κήπος της Ρέας, Aa-3).

Για κάθε ένα δείγμα φυτικού υλικού (π.χ. *Artemisia absinthium* L., ANΘHP) έγιναν 3 παραλαβές-επαναλήψεις (τριπλέτα) για πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

2.5 Ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

Τα δείγματα από την παραλαβή των αιθερίων ελαίων και των οργανικών εκχυλισμάτων των αφεψημάτων αναλύθηκαν στον αέριο χρωματογράφο συνδυασμένο με φασματόμετρο μαζών για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση αντίστοιχα των ενώσεων τους με σκοπό τον ποιοτικό και % ποσοτικό προσδιορισμό τους.

Για πιο ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου. Σαν εσωτερικό πρότυπο, χρησιμοποιήθηκε η κυκλοεξανόνη κι έτσι παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα κυκλοεξανόνης (10000 ppm):

- Προσθήκη 50 μL κυκλοεξανόνης σε 5 mL διαιθυλαιθέρα.

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων στο όργανο, προηγήθηκε η κατάλληλη προετοιμασία τους.

α) Προετοιμασία δειγμάτων αιθερίων ελαίων (σε φιαλίδιο):

- 450 μL διαιθυλαιθέρα
- 500 μL δείγματος
- 50 μL πρότυπου διαλύματος κυκλοεξανόνης

β) Προετοιμασία δειγμάτων οργανικών εκχυλισμάτων αφεψημάτων (σε φιαλίδιο):

- Συμπύκνωση του δείγματος έως το 1 mL τελικού όγκου.
- Προσθήκη 50 μL πρότυπου διαλύματος κυκλοεξανόνης.

Μετά την προετοιμασία, ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων στο όργανο. Ο αέριος χρωματογράφος (Trace GC ULTRA) ήταν συνδεδεμένος με φασματόμετρο μάζας (DSQ II), της εταιρείας Thermo Scientific (**Εικόνα 14**). Η στήλη του χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν Thermo-5MS (30m x 0,25mm, ID, πάχος φιλμ 0,25 μm). Το φέρον αέριο ήταν ήλιο (He), με ροή 1 mL/min. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με H/Y που χρησιμοποιούσε το πρόγραμμα Xcalibur.

Η μέθοδος ανάλυσης που επιλέχθηκε είχε διάρκεια 63.33 min για κάθε δείγμα. Ο όγκος του δείγματος που εισαγόταν στο όργανο κάθε φορά ήταν 1 μL και η εισαγωγή γινόταν χειροκίνητα στο σύστημα έγχυσης με ένεση.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία, ήταν αρχικά στους 60°C και αυξανόταν βαθμιαία μέχρι τους 250°C με ρυθμό 3°C/min.



Εικόνα 14. Το σύστημα GC-MS που χρησιμοποιήθηκε.

Αναλύθηκαν όλα τα δείγματα που είχαν παραληφθεί, δηλαδή τα αιθερικά εκχυλίσματα αιθερίου ελαίου και τα οργανικά εκχυλίσματα των αφεινημάτων.

Ακολούθησε η μελέτη των χρωματογραφημάτων και η ταυτοποίηση των συστατικών που διαχωρίστηκαν. Για κάθε κορυφή κάθε χρωματογραφήματος, το MS έδωσε το φάσμα μαζών που αντιστοιχούσε στην αντίστοιχη ένωση. Η ταυτοποίηση έγινε με τα φάσματα αυτά και τους χρόνους συγκράτησης (RT) των κορυφών των χρωματογραφημάτων και τη χρήση των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών Adams, 4thEdition και Xcalibur του λογισμικού του οργάνου.

Στη συνέχεια έγινε ο % ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών με βάση το εμβαδόν της κάθε κορυφής και το λόγο αυτού με το εμβαδόν της κορυφής του πρότυπου διαλύματος της κυκλοεξανόνης για κάθε χρωματογράφημα.

Τέλος, έγινε σύγκριση των τριών χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από κάθε τριπλέτα και προέκυψε έτσι ένας μέσος όρος όσο αφορά τον ποσοτικό % προσδιορισμό των συστατικών για κάθε δείγμα φυτικού υλικού.

2.6 Ανάλυση με Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR)

Για κάθε ένα από τα δείγματα φυτικού υλικού, έγινε ανάλυση στο φασματοφωτόμετρο FT-IR (Thermo Nicolet 6700) της εταιρίας Thermo Scientific, συνδεδεμένο με H/Y μέσω του προγράμματος OMNIC.

Σκοπός ήταν να γίνει σύγκριση των δειγμάτων και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή των φασμάτων που δίνει το δακτυλικό αποτύπωμα του φυτικού υλικού (περιοχή $1500-800\text{ cm}^{-1}$) και να υπολογιστεί ο % συντελεστής ομοιότητας των φασμάτων μεταξύ όλων των δειγμάτων.

Η τεχνική λήψης των φασμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν η τεχνική της Διάχυτης Ανάκλασης (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy, DRIFTS). Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η οπτική διαδρομή είναι μεγάλη και με τις διαδοχικές ανακλάσεις της

απορροφητικά ανακλώμενης υπέρυθρης ακτινοβολίας, οι πληροφορίες που συλλέγει προέρχονται από μεγάλο τμήμα του δείγματος. Έτσι, καθώς τα δείγματα ήταν σε στερεά μορφή και ως εκ τούτου όχι απόλυτα ομογενή, αυτή η τεχνική θα εξασφάλιζε πιο αντιπροσωπευτικά φάσματα.

Τα βασικά χαρακτηριστικά του οργάνου ήταν:

Πηγή ακτινοβολίας: Λυχνία νικελίου-χρωμίου (Nicrome)

Πηγή Laser: Διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (HeNe)

Συμβολόμετρο Michelson: Διαχωριστής δέσμης από KBr, Κινητό και Ακίνητο κάτοπτρο

Ανιχνευτής: Δευτεριωμένηθειική τριγλυκίνη (Deuterated TriGlycine Sulfate, DTGS)



Εικόνα 15. Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος για τη λήψη φασμάτων υπέρυθρου με την τεχνική DRIFTS.

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά, κονιορτοποίηση του φυτικού υλικού με γουδί ώστε να είναι όσο το δυνατόν πιο ομογενές και να δώσει έτσι πιο αντιπροσωπευτικό φάσμα.
- Πριν από την ανάλυση κάθε δείγματος έγινε η συλλογή του υποβάθρου (*background*), το οποίο καταγράφει τις συνθήκες του περιβάλλοντα χώρου, οι οποίες στη συνέχεια λαμβάνονται υπόψη κατά το μετασχηματισμό Fourier με τη χρήση του H/Y στο τελικό φάσμα IR κάθε δείγματος. Το υπόβαθρο συλλέχθηκε με την προσθήκη KBr στον υποδοχέα του εξαρτήματος, το οποίο δεν απορροφά στην υπέρυθρη ακτινοβολία. Το *background* συλλεγόταν εκ νέου κάθε 4-5 αναλύσεις δειγμάτων.
- Ακολούθησε η προσεκτική τοποθέτηση του κονιορτοποιημένου φυτικού υλικού στον υποδοχέα του εξαρτήματος, η τοποθέτηση του στο όργανο και η συλλογή του φάσματος για κάθε δείγμα. Οι βασικές παράμετροι που ρυθμίστηκαν ήταν:

Experiment: DRIFT

Collect No of scans: 100

Resolution: 4

- Για κάθε διαφορετικό δείγμα φυτικού υλικού έγιναν τουλάχιστον 3 επαναλήψεις για πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

Για την αρχική επεξεργασία των φασμάτων FT-IR με το πρόγραμμα OMNIC ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα, τα οποία έγιναν με τον ίδιο τρόπο για όλα τα φάσματα, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα:

α) Αφαίρεση σήματος CO₂ από το φάσμα.

β) Εξομάλυνση του σήματος.

γ) Διόρθωση της βασικής γραμμής.

δ) Δημιουργία του μέσου φάσματος από τα φάσματα-επαναλήψεις για κάθε δείγμα φυτικού υλικού.

Στη συνέχεια, για την αναγνώριση και απόδοση των κορυφών κάθε φάσματος έγινε αναφορά σε πίνακες που περιέχουν τις διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες με τους αντίστοιχους κυματιριθμούς τους.

2.7 Μέτρηση της τοξικότητας με το σύστημα ανάλυσης Microtox®

Για την εκτίμηση της τοξικότητας των βοτάνων, αναλύθηκαν τα υδατικά εκχυλίσματα, δηλαδή τα αφεψήματα για κάθε δείγμα φυτικού υλικού.

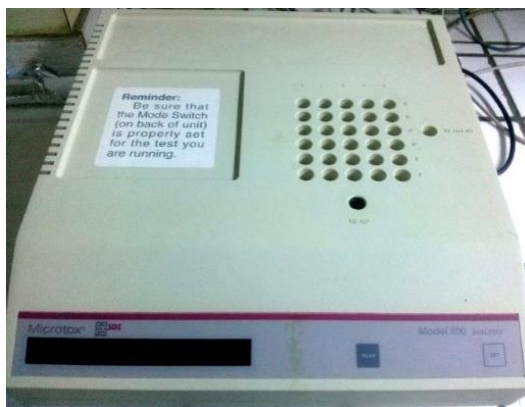
Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανάλυσης Microtox® Model 500 Analyzer (M500) της εταιρίας Azur Environmental συνδεδεμένο σε H/Y με το λογισμικό *Microtox Omni* και το βιοφωταυγές βακτήριο *Vibrio fischeri*. Όπως αναπτύχθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο (1.9), το σύστημα αυτό εκθέτει το βακτήριο σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλυμάτων του δείγματος. Όταν ένα διάλυμα είναι τοξικό, προκαλεί την αναστολή της βιοφωταύγειας του βακτηρίου και η % μείωση της βιοφωταύγειας μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με την τοξικότητα (“En iso 11348.03 2,” 2011)(ISO 11348-3/98).

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά-αντιδραστήρια:

- Diluent (ειδικά επεξεργασμένο, αποστειρωμένο και μη τοξικό 2% χλωριούχο νάτριο, NaCl), που χρησιμοποιήθηκε για την αραιώση των δειγμάτων και των βακτηρίων και παρείχε ωσμωτική προστασία.
- OAS (Osmotic Adjusting Solution, ειδικά επεξεργασμένο, αποστειρωμένο και μη τοξικό 22% χλωριούχο νάτριο, NaCl), που χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή της ωσμωτικής πίεσης του δείγματος σε περίπου 2% NaCl.
- Reconstitution Solution (ειδικά επεξεργασμένο, αποστειρωμένο και μη τοξικό νερό υψηλής καθαρότητας), που ενεργοποιούσε τα λυοφυλιωμένα βακτήρια.

- Λυοφυλιώμενα βακτήρια *Vibrio fischeri*, NRRLNoB-11177, τα οποία φυλάσσονταν στην κατάψυξη και κάθε φιαλίδιο περιείχε περίπου 100.000.000 βακτήρια. Κάθε καινούριο φιαλίδιο βακτηρίων χρησιμοποιούταν για 2-3 h μετά την παραλαβή του από την κατάψυξη και την ανασύστασή του.

Όλα τα αναλώσιμα ήταν της εταιρίας Strategic Diagnostic INC.



Εικόνα 16. Ο αναλυτής Microtox® Model 500 Analyzer (M500).

Για τη μέτρηση της τοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή οξείας τοξικότητας (Acute Toxicity Test) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο 81.9% Basic Test (AZUR, 1997) που εφαρμόζεται σε υδατικά εκχυλίσματα.

Πειραματική διαδικασία:

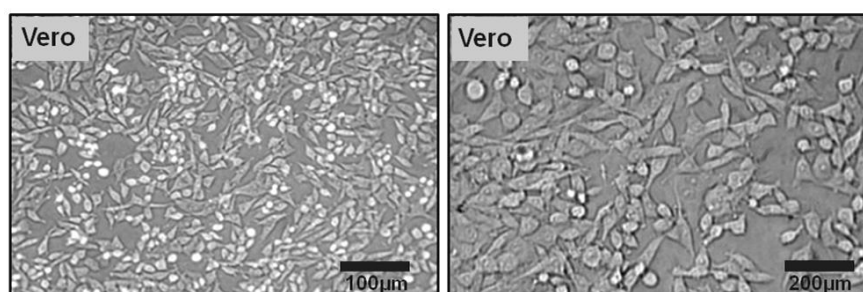
- Αρχικά, έπρεπε να βρεθεί η κατάλληλη πρωταρχική αραιώση για κάθε δείγμα ξεχωριστά έτσι ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση EC_{50} του δείγματος στην οποία έχουμε 50% αναστολή της βιοφωταύγειας (Effective Concentration where bioluminescence inhibition is 50%). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η δοκιμή 81.9% Screening Test.
- Στη συνέχεια, έχοντας τις πρωταρχικές αραιώσεις, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή 81.9% Basic Test για κάθε δείγμα ξεχωριστά, ακολουθώντας τις αναλυτικές οδηγίες του λογισμικού Microtox Omni.
- Σύμφωνα με το τεστ αυτό, το αρχικά αραιωμένο δείγμα υπέστη 5 διαδοχικές αραιώσεις με το αντιδραστήριο Diluent, προστέθηκε το OAS, ενώ υπήρχε και ένας μάρτυρας που δεν περιείχε δείγμα αφεψήματος. Οι αραιώσεις και οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ειδικά βοηθία επώασης στους 15 ± 0.5 °C, όπου ψυχόταν το όργανο.
- Ακολούθησε η ανασύσταση των βακτηρίων με το Reconstitution Solution και η επώαση τους για 15 min σε βοηθία ξεχωριστά από αυτά του δείγματος.
- Μετρήθηκε η βιοφωταύγεια των βακτηρίων πριν από την προσθήκη του αφεψήματος.
- Προστέθηκε 1 mL από κάθε διαδοχική αραιώση του δείγματος στα διαλύματα των βακτηρίων.
- Τέλος, μετρήθηκε η αναστολή της βιοφωταύγειας των βακτηρίων στα 5 και 15 min.

2.8 Μέτρηση της κυτταροτοξικότητας των αφεψημάτων με τη δοκιμή MTT

Σαν συνέχεια της εκτίμησης της τοξικότητας των αφεψημάτων, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή MTT σε κυτταρική σειρά *Vero*. Όπως αναπτύχθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο (1.10), η δοκιμή MTT είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που μπορεί να εκτιμήσει τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων. Βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (MTT) σε κρυστάλλους φορμαζάνης (μωβ χρώμα) που απορροφούν στα 570 nm. Έτσι, με τη δοκιμή αυτή μετριέται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μιας κυτταρικής σειράς που έχει εκτεθεί σε ένα πιθανά τοξικό δείγμα.

Για τη δοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά *Vero*, που είναι αθανатоποιημένοι φυσιολογικοί ινοβλάστες από υγιές νεφρό του αφρικανικού πράσινου πιθήκου (*Chlorocebus* sp, πρώην *Cercopithecus aethiops*, Vero, ATCC® CCL-81™).

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε μονοστοιβαδικές καλλιέργειες σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων των 75cm² (OrFlask, OrangeScientific) σε θρεπτικό υλικό DMEM (20 mL), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μόσχου (FBS), 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών. Η επώαση τους έγινε σε κατάλληλο επωαστικό θάλαμο (*HealForce® Model HF90*) στους 37°C και σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα με συνεχή παροχή 5% CO₂.



Εικόνα 17. Φωτογραφίες αντίθετης φάσης μονοστοιβάδας ζωντανών κυττάρων Vero καλλιεργημένων σε DMEM/10% FBS, από ανάστροφο μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.

Η αρχική καλλιέργεια προέκυψε από απόψυξη κυττάρων. Τα κύτταρα θηλαστικών μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά ώστε τα κύτταρα να μην υποστούν σοκ από τη διαφορά θερμοκρασίας σε κατάλληλα κρύο-φιαλίδια με θερμικά απενεργοποιημένο FBS (56 °C/30 min) και παρουσία 10% DMSO για να αποτραπεί ο σχηματισμός κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων κατά την ψύξη.

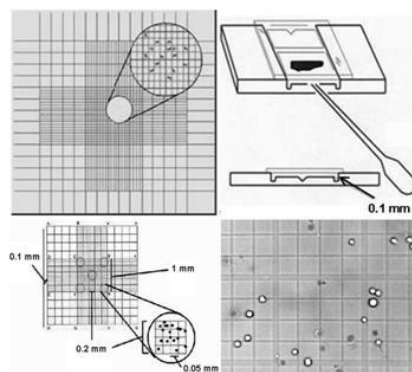
Η διαδικασία της απόψυξης των κυττάρων με σκοπό την ανακαλλιέργεια τους πραγματοποιήθηκε κάτω από ασηπτικές συνθήκες και όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου τα κύτταρα να μην εκτεθούν στο DMSO, το οποίο πιθανώς να δρούσε τοξικά. Μετά την εξαγωγή τους από τους -80 °C, τα κρύο-φιαλίδια τοποθετήθηκαν άμεσα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C ώσπου να αποψυχθούν.

Κατόπιν το διάλυμα των κυττάρων που προέκυψε από την απόψυξη αραιώθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM/10%FBS και τοποθετήθηκε σε φλάσκα των 75 cm² όπου και κατανεμήθηκε σε όλη την επιφάνειά της για την καλύτερη και ομοιόμορφη ανάπτυξη των κυττάρων. Ο συνολικός όγκος του διαλύματος ήταν 20 mL. Τέλος, η φλάσκα τοποθετήθηκε στον επωαστικό θάλαμο (37 °C, 5% CO₂) όπου και έγινε η επώαση των κυττάρων.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως ότου η μονοστοιβάδα τους να καλύψει το 90%-100% της επιφάνειας της φλάσκας, το οποίο ελέγχθηκε με απευθείας παρατήρηση της φλάσκας με ανάστροφο μικροσκόπιο. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με αποκόλληση των κυττάρων με διάλυμα θρυψίνης/EDTA. Επώαστηκαν στη θρυψίνη για 5 min στους 37 °C και ακολούθησε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για να απομακρυνθεί η θρυψίνη, επαναιωρήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρθηκαν σε νέες φλάσκες καλλιέργειας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα στρωτής ροής.

Πριν από τη δοκιμή MTT, μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί. Για την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιείται η πλάκα μέτρησης Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο και η χρωστική Κυανό του Τρυπανίου (Trypan Blue). Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Σε κάθε μια από αυτές έχει χαραχτεί ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα, υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.

Ο όγκος του κυτταρικού αιωρήματος που καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 0.1 mm³ ή 1×10⁻⁴ ml. Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό αιώρημα (κύτταρα/ml) είναι: αριθμός κυττάρων στο ένα από τα κύρια τετράγωνα×10.000.

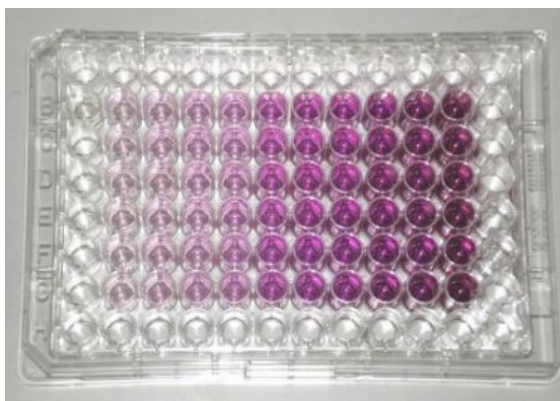


Εικόνα 18. Αιμοκυτταρόμετρο – πλάκα *Neubauer*. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει την επιφάνεια μέτρησης είναι 0.1mm³ ή 1×10⁻⁴ml.

Μετά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων και τη μέτρηση τους με το αιμοκυτταρόμετρο, ακολούθησε η δοκιμή MTT ή αλλιώς η δοκιμή του βρωμιούχου διμεθυλθιαζολ- διφαινυλτετραζολίου (3- (4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide).

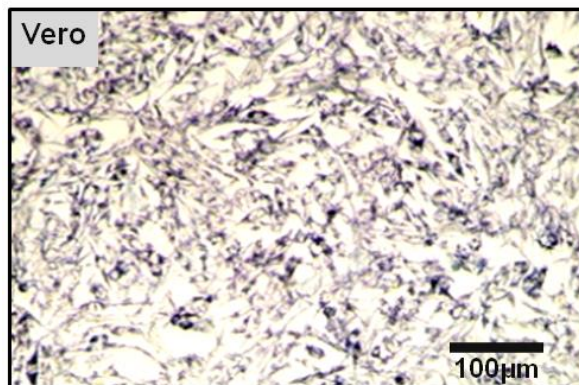
Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά καθορίστηκαν οι αραιώσεις του διαλύματος των κυττάρων, ώστε σε μικροπλάκα 96 βοθρίων έγινε επίστρωση 10^4 κυττάρων ανά βοθρίο σε τελικό όγκο 200 μL DMEM/10%FBS.
- Ακολούθησε επώαση για 24h στους 37°C και σε 5% CO_2 προκειμένου να προσκολληθούν.
- Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και ακολούθησε η προσθήκη των διαφορετικών φυτικών εκχυλισμάτων και των αραιώσεών τους, σε θρεπτικό υλικό συνολικού όγκου 200 μL , ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ίση ποσότητα απεσταγμένου νερού.
- Κατόπιν οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο, όπου επώαστηκαν ξανά για 24h σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO_2 .
- Μετά τις 24h πραγματοποιήθηκε προσθήκη του διαλύματος MTT:1/10 του όγκου του θρεπτικού μέσου ανά βοθρίο (20 μL) και συγκέντρωσης 5 mg/ml.
- Οι μικροπλάκες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστή (37°C , 5% CO_2) για 2h.



Εικόνα 19. Μικροπλάκα 96 βοθρίων μετά τη δοκιμή MTT. Το πιο έντονο μωβ χρώμα μεταφράζεται σε ύπαρξη ζωντανών κυττάρων στα βοθρία.

- Στη συνέχεια παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Ως δείκτης ικανοποιητικού μεταβολισμού του MTT στα βοθρία, που μεταφράζεται σε ύπαρξη ζωντανού κυττάρου, αποτελεί ο σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης στο εσωτερικό των κυττάρων (μωβ χρώμα) (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20. Μικροσκοπική παρατήρηση των κρυστάλλων της φορμαζάνης (μωβ χρώμα) στο εσωτερικό των κυττάρων Vero.

- Ακολούθησε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου που βρισκόταν στα βοθρία με πιπέτα, ξέπλυμα των κυττάρων (πυθμένες των βοθρίων) με PBS και προσθήκη 200 μL DMSO ανά βοθρίο.
- Κατόπιν ανακινήθηκαν ήπια, ώστε να μην υπάρχουν κρύσταλλοι φορμαζάνης οι οποίοι δεν είχαν διαλυθεί και έγινε φωτομέτρηση στα 570 nm με φασματοφωτόμετρο μικροπλακών (*BioTek™ PowerWave™ Microplate Spectrophotometer 340*) συνδεδεμένο με το λογισμικό Gen5 (Biotek).

Η αναστολή %_{MTT} του εκάστοτε εκχυλίσματος στην κυτταρική βιωσιμότητα της σειράς Vero υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\%_{\text{MTT}} = [(O.D._{\text{MTT}} \text{ κυττάρων μάρτυρα} - O.D._{\text{MTT}} \text{ κυττάρων με φυτικό εκχύλισμα}) / O.D._{\text{MTT}} \text{ κυττάρων μάρτυρα}] \times 100.$$

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Απόδοση αιθερίου ελαίου

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 14 (δείγματα) * 3 (τριπλέτα) = 42 αποστάξεις για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου. Για κάθε απόσταξη υπολογίστηκε η απόδοση αιθερίου ελαίου (% v/w) και στη συνέχεια για κάθε τριπλέτα ο μέσος όρος της απόδοσης αυτής. Παράλληλα, υπολογίστηκε η % υγρασία του φυτικού υλικού.

3.1.1 Απόδοση αιθερίου ελαίου χαμομηλιού

Η απόδοση (%) του αιθερίου ελαίου για τα τρία διαφορετικά δείγματα κυμάνθηκε από 0,52% έως 0,83% (**Πίνακας 7**) με τη μεγαλύτερη απόδοση να εμφανίζεται στο δείγμα του εμπορίου. Ο μέσος όρος για τα τέσσερα δείγματα υπολογίστηκε 0,70%.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το χαμομήλι έχει απόδοση 0,24% - 2,00%, ενώ η *European Pharmacopoeia* (EP), που δίνει πρότυπα και οδηγίες για την ποιότητα των φαρμάκων, συνιστά το χαμομήλι που χρησιμοποιείται να περιέχει τουλάχιστον 4 mL/kg, δηλαδή 0,4% αιθέριο έλαιο μπλε χρώματος (Gurta et al., 2010), (*European pharmacopoeia*, 2010). Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με τις αποδόσεις αιθερίου ελαίου που βρέθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Όσον αφορά το χρώμα, ήταν σε κάθε περίπτωση μπλε ή πράσινο (**Εικόνα 21**), γεγονός αναμενόμενο αφού είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού περιέχει την ένωση χαμαζουλένιο, που του προσδίδει μπλε χρώμα (Raal et al., 2012). Οι διαφορετικές αποχρώσεις ίσως να οφείλονται στη διαφορετική περιεκτικότητα του χαμαζουλενίου στα δείγματα. Τέλος, η υγρασία βρέθηκε να είναι σε φυσιολογικά επίπεδα.



Εικόνα 21. Αιθέριο έλαιο χαμομηλιού, δείγμα Mc-A.

Πίνακας 7. Απόδοση και χρώμα αιθερίου ελαίου χαμομηλιού.

Δείγμα χαμομηλιού	Απόδοση (% v/w)	Υγρασία (%)	Ξηρή Ουσία (%)	Χρώμα ελαίου
Mc-1	0,52	13,48	86,52	γαλάζιο
Mc-2	0,75	10,53	89,47	πράσινο
Mc-A	0,83	10,93	89,07	μπλε
M.O.	0,70	11,65	88,35	-

3.1.2 Απόδοση αιθερίου ελαίου αψιθιάς

Οι αποδόσεις για την αψιθιά κυμάνθηκαν από 0,91% έως 1,43% (Πίνακας 8) με τη μεγαλύτερη να δίνεται από το δείγμα του εμπορίου. Ο μέσος όρος για τα τέσσερα δείγματα υπολογίστηκε 1,14%.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αψιθιά έχει συνήθως απόδοση 0,10% – 1,10 %, ενώ μεγαλύτερες αποδόσεις έχουν βρεθεί στην Κούβα (1,25%) και στην Τυνησία (1,46%) (Nguyen & Németh, 2016) Η *European Pharmacopoeia* (EP), συνιστά η αψιθιά που χρησιμοποιείται να περιέχει τουλάχιστον 2 mL/kg, δηλαδή 0,2% αιθέριο έλαιο, (*European pharmacopoeia*, 2010). Με βάση τα στοιχεία αυτά, και τα τέσσερα δείγματα έδωσαν αναλογικά μεγάλη απόδοση, με την απόδοση της αψιθιάς από την αγορά της Αθήνας να δίνει με διαφορά τη μεγαλύτερη.

Όσον αφορά το χρώμα, παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλομορφία για τα τέσσερα διαφορετικά δείγματα (Εικόνα 22), γεγονός που πιθανώς να επιβεβαιώνει τα αναμενόμενα διαφορετικά χημικά προφίλ τους.

Τέλος, η υγρασία βρέθηκε να είναι σε φυσιολογικά επίπεδα.



Εικόνα 22. Αιθέριο έλαιο αψιθιάς, δείγματα (από αριστερά) Aa-2, Aa-3 και Aa-4.

Πίνακας 8. Απόδοση και χρώμα αιθερίου ελαίου αγιθιάς.

Δείγμα αγιθιάς	Απόδοση (% v/w)	Υγρασία (%)	Ξηρή Ουσία (%)	Χρώμα ελαίου
Aa-1	0,91	9,88	90,12	άχρωμο
Aa-2	1,09	9,41	90,59	πράσινο
Aa-3	1,12	10,49	89,51	μπλε
Aa-A	1,43	9,86	90,14	καφέ
M.O.	1,14	9,91	90,09	-

3.1.3 Απόδοση αιθερίου ελαίου αγιλλέας

Η απόδοση του αιθερίου ελαίου της αγιλλέας κυμάνθηκε από 0,71% έως 1,08% (Πίνακας 9), τιμές που δεν παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση μεταξύ τους. Ο μέσος όρος τους υπολογίστηκε 0,88%.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αγιλλέα έχει βρεθεί να έχει απόδοση 0,01 % - 1,09 % (Kazemi, 2015; Rimantas, 2007; Orav, Arak, & Raal, 2016; Shawl, Srivastava, Syamasundar, Tripathi, & Raina, 2002). Η *European Pharmacopoeia* (EP), συνιστά η αγιλλέα που χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς σκοπούς να περιέχει τουλάχιστον 2 mL/kg, δηλαδή 0,2% αιθέριο έλαιο. Με βάση αυτά τα στοιχεία, τα τέσσερα δείγματα έδωσαν αναλογικά μεγάλη απόδοση.

Όσον αφορά το χρώμα, τα αιθέρια έλαια παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους (Εικόνα 23). Αυτό πιθανόν να σημαίνει ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων των τεσσάρων δειγμάτων.

Τέλος, η υγρασία βρέθηκε να είναι σε φυσιολογικά επίπεδα.



Εικόνα 23. Αιθέριο έλαιο αγιλλέας, δείγματα (από αριστερά) Am-2 και Am-3.

Πίνακας 9. Απόδοση και χρώμα αιθερίου ελαίου αχιλλέας.

Δείγμα αχιλλέας	Απόδοση (% v/w)	Υγρασία (%)	Ξηρή Ουσία (%)	Χρώμα ελαίου
Am-1	1,08	9,06	90,94	γαλάζιο
Am-2	0,96	8,06	91,94	μπλε σκούρο
Am-3	0,71	9,22	90,78	πράσινο ανοιχτό
Am-A	0,75	10,78	89,22	πράσινο ανοιχτό
M.O.	0,88	9,28	90,72	-

3.1.4 Απόδοση αιθερίου ελαίου εστραγκόν

Η % απόδοση για το εστραγκόν κυμάνθηκε από 0,75% - 1,25%, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, με τη μικρότερη να δίνεται από το δείγμα του εμπορίου. Ο μέσος όρος τους υπολογίστηκε 1,05%.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το αιθέριο έλαιο του εστραγκόν έχει απόδοση 0,15% - 3,1% (Heinrich, 2011). Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με τις αποδόσεις αιθερίου ελαίου που βρέθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Όσον αφορά το χρώμα του αιθερίου ελαίου, ήταν σε όλες τις περιπτώσεις κίτρινο (Εικόνα 24)

Τέλος, η υγρασία βρέθηκε να είναι σε φυσιολογικά επίπεδα.



Εικόνα 24. Αιθέριο έλαιο εστραγκόν, δείγμα Ad-2.

Πίνακας 10. Απόδοση και χρώμα αιθερίου ελαίου εστραγκόν.

Δείγμα εστραγκόν	Απόδοση (% v/w)	Υγρασία (%)	Ξηρή Ουσία (%)	Χρώμα ελαίου
Ad-1	1,15	12,12	87,88	υποκίτρινο
Ad-2	1,25	8,71	91,29	κίτρινο
Ad-A	0,75	7,47	92,53	κίτρινο
M.O.	1,05	9,43	90,57	-

3.2 Ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών των βοτάνων με GC-MS

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων και των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων για τα τέσσερα βότανα πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS).

Αναλύθηκαν όλα τα δείγματα που είχαν παραληφθεί, δηλαδή τα αιθερικά εκχυλίσματα αιθερίου ελαίου και τα οργανικά εκχυλίσματα των αφεψημάτων.

Ακολούθησε η μελέτη των χρωματογραφημάτων για την ταυτοποίηση των συστατικών των δειγμάτων. Όπως έχει προαναφερθεί, η ταυτοποίηση έγινε μέσω των φασμάτων μαζών, των χρόνων συγκράτησης (RT) των κορυφών των χρωματογραφημάτων και της χρήσης των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών Adams, 4th Edition και Xcalibur του λογισμικού του οργάνου. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης *Kovats* (RI).

Στη συνέχεια έγινε ο ποσοτικός % προσδιορισμός των συστατικών με βάση το εμβαδόν της κάθε κορυφής. Για ποσοτικό προσδιορισμό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου (κυκλοεξανόνη).

Τέλος, έγινε σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων για κάθε ένα από τα τέσσερα φυτικά είδη και παρουσίαση των χημικών προφίλ τους. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο, όπως έχει προαναφερθεί (κεφάλαιο 1.4), με βάση τη σύσταση του, ένα δείγμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως «καθαρού» χημειότυπου όταν ένα μόνο συστατικό του ξεπερνά το 50% της συνολικής του σύστασης ή «μικτού» χημειότυπου όταν δύο ή τρία κύρια συστατικά του καθορίζουν τη χημική του σύνθεση. Όσον αφορά τα αφεψήματα και τα πτητικά συστατικά τους, έγινε παρουσίαση τους και σύγκριση με τα αντίστοιχα συστατικά των αιθερίων ελαίων.

3.2.1 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων του χαμομηλιού

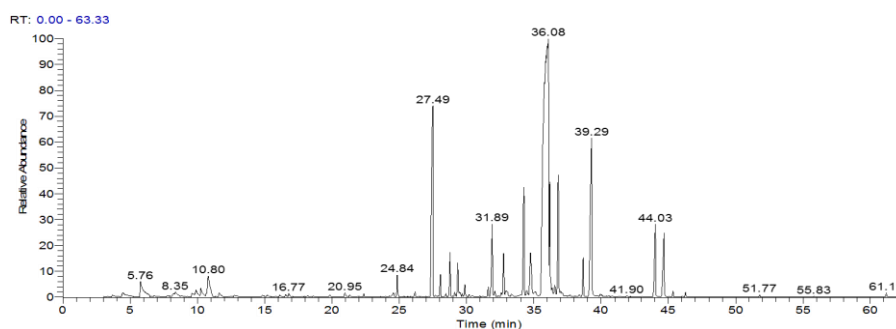
Στα αιθέρια έλαια από τα τρία διαφορετικά δείγματα χαμομηλιού ανιχνεύθηκαν συνολικά 36 πτητικά συστατικά. Παρουσιάζονται παρακάτω (**Πίνακας 11**) και μελετώνται μόνο αυτά που βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5%, τα οποία ήταν τελικά 22. Τα 6 από αυτά τα 22 συστατικά, ανιχνεύθηκαν και στα τρία διαφορετικά δείγματα, ενώ 11 από αυτά εντοπίστηκαν σε ένα μόνο από τα τρία δείγματα.

Πίνακας 11. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων χαμομηλιού, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης *Kovats* (RI).

A/A	RI	RT	Συστατικό	Mc-1 %	Mc-2 %	Mc-A %
1	998	7,57	αλκοόλη του <i>Yomogi</i>	-	-	0,75
2	1059	10,67	ακεταλδεΐδη βενζολίου	-	-	1,41
3	1062	10,78	κετόνη της αρτεμισίας	0,91	-	1,45

4	1083	11,69	λιναλόλη	-	0,54	-
5	1304	21,32	καρβακρόλη	-	-	0,60
6	1381	24,56	δεκανοϊκό οξύ	-	0,95	1,67
7	1387	24,85	β -ελεμένιο	0,71	-	-
8	1452	27,50	<i>E</i>-β-φαρνεσένιο	10,72	30,00	7,09
9	1465	28,05	ανδρο-σεσκικινεόλη	0,59	-	-
10	1482	28,78	<i>D</i> -γερμακρένιο	1,24	1,89	-
11	1495	29,35	δικυκλο-γερμακρένιο	0,91	-	-
12	1560	31,83	<i>Z</i> -νερολιδόλη	-	-	0,70
13	1561	31,88	εποξείδιο του καρυοφυλλενίου	2,60	-	-
14	1582	32,75	σπαθουλενόλη	1,55	0,57	1,39
15	1622	34,25	ελιφολενόλη	4,57	-	-
16	1635	34,75	δεν ταυτοποιήθηκε	3,01	-	-
17	1670	36,08	<i>α</i>-<i>B</i>-εποξείδιο μπισαμπολόλης	50,69	1,33	32,36
18	1688	36,77	<i>α</i>-<i>A</i>-εποξείδιο μπισαμπολόλης	4,04	50,73	10,00
19	1740	38,65	χαμαζουλένιο	1,09	-	4,35
20	1757	39,27	<i>α</i>-<i>A</i>-εποξείδιο μπισαμπολόλης	8,71	8,28	31,38
21	1896	44,08	<i>Z</i> -σπιροαιθέρας	3,69	4,26	4,09
22	1912	44,59	<i>E</i> -σπιροαιθέρας	2,06	0,51	-
			Σύνολο %	97,08	99,06	97,25

Στο αιθέριο έλαιο χαμομηλιού από την Καρδίτσα (δείγμα Mc-1) ανιχνεύθηκαν συνολικά 32 συστατικά, ενώ μελετήθηκαν τα 16 από αυτά που εμφάνισαν ποσοστό > 0,5% και απαρτίζουν το 97,08% του συνόλου. Το αιθέριο έλαιο μπορεί να χαρακτηριστεί ως «καθαρού» χημειότυπου *α* -*B*-εποξειδίου μπισαμπολόλης αφού βρέθηκε να αποτελεί το 50,69% της συνολικής σύστασης του. Ακολουθούν το *E*- β -φαρνεσένιο με 10,72%, το *α* -*A*-εποξείδιο μπισαμπολόλης με 8,71%, η ελινοφενόλη με 4,57% και το *α* -*A*-εποξείδιο μπισαμπολόλης με 4,04%. Ταυτοποιήθηκαν ακόμη ο *Z*- και *E*-σπιροαιθέρας με ποσοστά 3,69% και 2,06% αντίστοιχα, το εποξείδιο του καρυοφυλλενίου (2,60%), η σπαθουλενόλη (1,55%), το *D*-γερμακρένιο(1,24%) και το χαμαζουλένιο (1,09%).



Σχήμα 6. Αέριο χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου χαμομηλιού (Mc-1).

Στο αιθέριο έλαιο χαμομηλιού από τα Τρίκαλα (δείγμα Mc-2) ανιχνεύθηκαν συνολικά 12 συστατικά, τα 10 από αυτά βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5% που απαρτίζουν το 99,06% του συνόλου. Το αιθέριο έλαιο μπορεί να χαρακτηριστεί ως «καθαρό» χημειότυπου *α*-*A*-εποξειδίου μπισαμπολόλης με ποσοστό 50,73%, ακολούθησαν το *E*-*β*-φαρνεσένιο με 30,00%, το *α*-*A*-εποξειδίου μπισαμπολόλης με 8,28%, ο *Z*-σπιροαιθέρας με 4,26%, το *Δ*-γερμακρένιο με 1,89% και το *α*-*B*-εποξειδίου μπισαμπολόλης με 1,33%. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκε στο αιθέριο έλαιο το χαμαζουλένιο, γεγονός που επαληθεύεται από το χρώμα του ελαίου που ήταν πράσινο και όχι μπλε.

Τέλος, στο αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού από την αγορά της Αθήνας (δείγμα Mc-A) ανιχνεύθηκαν συνολικά 24 συστατικά, από τα οποία 13 βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5% και απαρτίζουν το 97,25% του συνόλου. Το αιθέριο έλαιο χαρακτηρίζεται από «μικτό» χημειότυπο, με τα συστατικά που επικρατούν να είναι το *α*-*B*-εποξειδίου μπισαμπολόλης και το *α*-*A*-εποξειδίου μπισαμπολόλης με ποσοστά 32,36 % και 31,38%, αντίστοιχα. Ακολούθησαν το *α*-*A*-εποξειδίου μπισαμπολόλης με 10,00%, το *E*-*δ*-φαρνεσένιο με 7,09%, το χαμαζουλένιο με 4,35% και ο *Z*-σπιροαιθέρας με 4,09%. Όσον αφορά το χαμαζουλένιο, η μεγαλύτερη περιεκτικότητα του συγκριτικά με τα άλλα δύο δείγματα επιβεβαιώνεται από το χρώμα του, που εμφανίστηκε πιο σκούρο μπλε.

Σε γενικές γραμμές, παρόλο που τα τρία δείγματα παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη σύσταση τους, τα κυριότερα συστατικά τους είναι κοινά, το *α*-*B*-εποξειδίου μπισαμπολόλης, το *α*-*A*-εποξειδίου μπισαμπολόλης, το *α*-*A*-εποξειδίου μπισαμπολόλης και το *E*-*δ*-φαρνεσένιο. Το αιθέριο έλαιο του Mc-1, που έδωσε τη χαμηλότερη απόδοση, είχε τα περισσότερα σε αριθμό συστατικά. Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια των Mc-1 και Mc-2 βρέθηκε να έχουν «καθαρό» χημειότυπο, ενώ το δείγμα του εμπορίου (Mc-A) «μικτό».

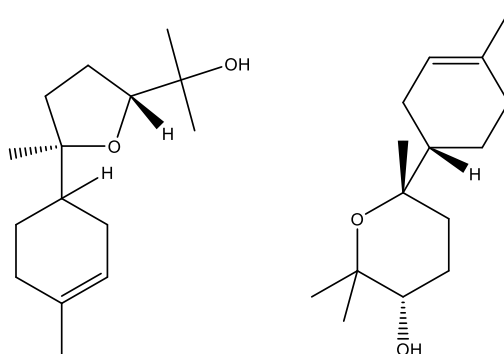
Πίνακας 12. Χημειότυποι των αιθερίων ελαίων του χαμομηλιού.

Δείγμα	Τύπος Χημειότυπου	Κύρια Συστατικά
Mc-1	καθαρός	<i>α</i> - <i>B</i> -εποξειδίου μπισαμπολόλης
Mc-2	καθαρός	<i>α</i> - <i>A</i> -εποξειδίου μπισαμπολόλης
Mc-A	μικτός	<i>α</i> - <i>B</i> -εποξειδίου μπισαμπολόλης και <i>α</i> - <i>A</i> -εποξειδίου μπισαμπολόλης

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του χαμομηλιού είναι το *α*-*B*-εποξειδίου μπισαμπολόλης, το *α*-*A*-εποξειδίου μπισαμπολόλης, η *α*-μπισαμπολόλη, το *α*-*A*-εποξειδίου μπισαμπολόλης, οι *E*- και *Z*-σπιροαιθέρας, το *E*-*β*-φαρνεσένιο και το χαμαζουλένιο, συστατικά στα οποία αποδίδονται οι αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες του

χαμομηλιού. Ειδικότερα, οι *E*- και *Z*-σπιροαιθέρας έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζουν την αφλατοξίνη G. (Raal et al., 2012; Murti, 2012; Gupta et al., 2010).

Τα στοιχεία αυτά είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με εξαίρεση την *α*-μπισαμπολόλη, που δε βρέθηκε σε κανένα από τα δείγματα, γεγονός που ίσως σημαίνει ότι είχε οξειδωθεί, και το χαμαζουλένιο, που βρέθηκε στα δύο από τα τρία δείγματα, ενώ η απουσία του έχει αναφερθεί σε άλλη μια έρευνα στο Ιράν (Ayoughi, Barzegar, Sahari, & Naghdibadi, 2011)



Σχήμα 7. Δομή των ενώσεων *α*-B-εποξειδίου μπισαμπολόλης (αριστερά) και *α*-A-εποξειδίου μπισαμπολόλης (δεξιά).

3.2.2 Χημική σύσταση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων του χαμομηλιού

Στα αφεψήματα από τα τρία διαφορετικά δείγματα χαμομηλιού ανιχνεύθηκαν συνολικά 24 πτητικά συστατικά, από τα οποία ταυτοποιήθηκαν τα 21, ενώ μελετήθηκαν τα 17 από αυτά που βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5%. Το *α*-A-εποξειδίου μπισαμπολόλης και οι *Z*- και *E*-σπιροαιθέρας ανιχνεύθηκαν και στα τρία δείγματα, ενώ 10 από αυτά εντοπίστηκαν μόνο σε ένα από τα τρία δείγματα.

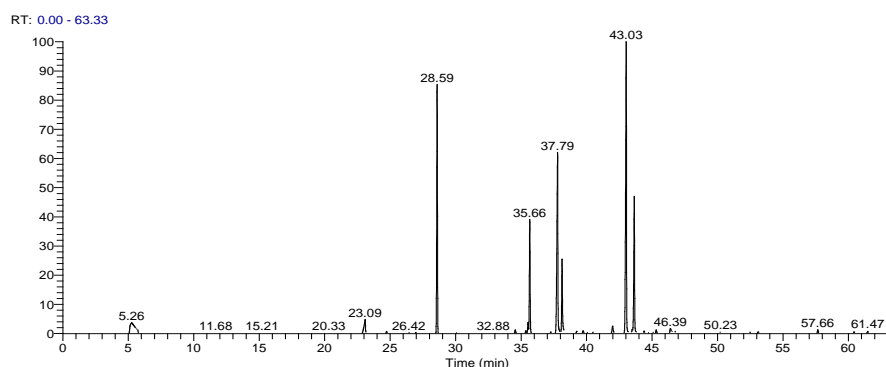
Πίνακας 13. Τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων χαμομηλιού, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης *Kovats* (RI).

A/A	RI	RT	Συστατικό	Mc-1 %	Mc-2 %	Mc-A%
1	926	6,68	<i>α</i> -πινένιο	-	-	10,04
2	1012	8,99	<i>δ</i> -3-καρένιο	-	-	9,03
3	1061	10,77	κετόνη της αρτεμισίας	-	-	4,59
4	1296	20,96	θυμόλη	0,66	-	0,94
5	1370	24,07	δεκανοϊκό οξύ	-	2,55	-
6	1571	32,27	<i>δ</i> -μεθυλο-κουμαρίνη	-	-	5,91
7	1659	35,64	<i>α</i>-B-εποξειδίου μπισαμπολόλης	27,49	-	15,40

8	1679	36,42	2,4 διμεθυλαιθέρας φλοροακετοφαινόνης	1,21	-	-
9	1685	36,65	<i>α-A</i>-εποξειδίο μπισαμπολόνης	0,70	10,95	-
10	1748	38,94	7-μεθοξυ-κουμαρίνη	7,68	30,85	-
11	1754	39,16	<i>α-A</i>-εποξειδίο μπισαμπολόλης	11,55	7,75	28,14
12	1835	41,99	7-υδροξυ-κουμαρίνη	-	1,55	-
13	1850	42,48	δεν ταυτοποιήθηκε	12,63	-	-
14	1894	44,00	<i>Z</i>-σπιροαιθέρας	11,25	30,97	10,55
15	1913	44,64	<i>E</i>-σπιροαιθέρας	10,60	15,05	15,40
16	-	47,52	δεν ταυτοποιήθηκε	10,62	-	-
17	-	49,75	δεν ταυτοποιήθηκε	1,33	-	-
			Σύνολο %	95,73	99,66	100,00

Στο αφέψημα του χαμομηλιού από την Καρδίτσα (δείγμα Mc-1) ανιχνεύθηκαν συνολικά 20 πτητικά συστατικά, ενώ μελετήθηκαν τα 11 από αυτά που εμφάνισαν ποσοστό > 0,5% και απαρτίζουν το 95,73% του συνόλου. Το κυριότερο συστατικό ήταν το *α-B*-εποξειδίο μπισαμπολόλης σε ποσοστό 27,49% και ακολούθησαν το *α-A*-εποξειδίο μπισαμπολόλης με 11,55%, οι *Z*-και *E*-σπιροαιθέρας με 11,25% και 10,60%, αντίστοιχα και η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη με 7,68%. Συγκριτικά με τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου του δείγματος, το συστατικό με το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν το ίδιο. Επιπλέον, εμφανίστηκαν συστατικά που δεν είχαμε στο αιθέριο έλαιο με κυριότερο την 7-μεθοξυ-κουμαρίνη. Τα συστατικά αυτά υπήρχαν στο αιθέριο έλαιο αλλά σε ποσότητες τόσο μικρές που, συγκριτικά με τα υπόλοιπα, δεν έδωσαν αξιόλογο ποσοστό. Κατά την παρασκευή του αφεψήματος όμως, λόγω της μεγαλύτερης διαλυτότητας τους στο νερό, εμφανίστηκαν σε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Στο αφέψημα του χαμομηλιού από τα Τρίκαλα (δείγμα Mc-2) ανιχνεύθηκαν 8 πτητικά συστατικά, 7 από αυτά σε ποσοστό > 0,5% που απαρτίζουν το 99,66% του συνόλου. Σε μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίστηκαν ο *Z*-σπιροαιθέρας (30,97%) και η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη (30,85%). Ακολούθησαν ο *E*-σπιροαιθέρας (15,05%), το *α-A*-εποξειδίο μπισαμπολόνης (10,95%) και το *α-A*-εποξειδίο μπισαμπολόλης (7,75%). Ομοίως, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα συστατικά του αιθερίου ελαίου. Κάποια συστατικά που βρέθηκαν σε υψηλό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο δεν ανιχνεύθηκαν στο αντίστοιχο αφέψημα (π.χ. *E*-δ-φαρνεσένιο) και το αντίστροφο.

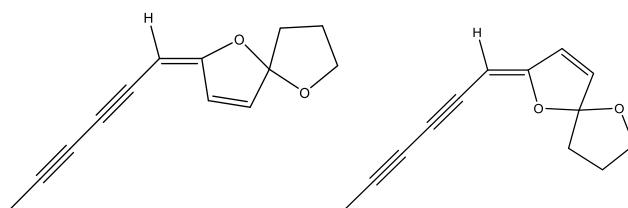


Σχήμα 8. Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών αφεψήματος χαμομηλιού (Mc-2).

Τέλος, στο αφέψημα του χαμομηλιού από την αγορά της Αθήνας (δείγμα Mc-A) ανιχνεύθηκαν 9 συστατικά, όλα σε ποσοστό $> 0,5\%$. Τα κυριότερα ήταν το *α*-*A*-εποξείδιο μπισαμπολόλης σε ποσοστό 28,14%, το *α*-*B*-εποξείδιο μπισαμπολόλης (15,40%), ο *E*-σπιροαιθέρας (15,40%), ο *Z*-σπιροαιθέρας (10,55%), το *α*-πινένιο (10,04%) και το *δ*-3-καρένιο (9,03%). Όπως και στα προηγούμενα δείγματα, παρατηρήθηκαν διαφορές σε σχέση με το αιθέριο έλαιο. Πιο συγκεκριμένα, το *α*-*A*-εποξείδιο μπισαμπολόνης παρόλο που βρέθηκε σε σημαντικό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο, δεν ανιχνεύθηκε στο αφέψημα του χαμομηλιού, ενώ άλλα συστατικά όπως ο *E*-σπιροαιθέρας και το *α*-πινένιο που δεν εντοπίζονται στο αιθέριο έλαιο, έχουν μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα και έτσι έδωσαν σημαντικά ποσοστά στο αφέψημα.

Και στα τρία δείγματα, τα πτητικά συστατικά που βρέθηκαν σε μεγαλύτερα ποσοστά ήταν το *α*-*B*-εποξείδιο μπισαμπολόλης, το *α*-*A*-εποξείδιο μπισαμπολόλης και οι *Z*- και *E*-σπιροαιθέρας. Ενδιαφέρον παρουσίασε, όπως αναφέρθηκε, ότι και στα τρία δείγματα βρέθηκαν ουσίες που δεν ανιχνεύθηκαν στο αιθέριο έλαιο με κυριότερη την 7-μεθοξυ-κουμαρίνη.

Δεν έχουν γίνει έρευνες που να μελετούν τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Ρουμανία (Iordache, Culea, Gherman, & Cozar, 2009) όπου μελετήθηκαν εκχυλίσματα χαμομηλιού αιθανόλης-απεσταγμένου νερού 1:1, τα συστατικά που βρέθηκαν ήταν παρόμοια με αυτά της παρούσας μελέτης. Επιπλέον, εντοπίστηκε η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη, επιβεβαιώνοντας πως αν και δεν υπάρχει σε αξιόλογο στο αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού, αποτελεί κύριο πτητικό συστατικό του υδατικού του εκχυλίσματος.



Σχήμα 9. Δομή των ενώσεων *E*-σπιροαιθέρας (αριστερά) και *Z*-σπιροαιθέρας (δεξιά).

3.2.3 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων της αψιθιάς

Στα αιθέρια έλαια από τα τέσσερα διαφορετικά δείγματα αψιθιάς ανιχνεύθηκαν συνολικά 80 πτητικά συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 76 από αυτά. Παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 14) και μελετώνται 56, τα οποία βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5%. Από 56 συστατικά, μόνο ένα, το χαμαζουλένιο ανιχνεύθηκε και στα τέσσερα διαφορετικά δείγματα σε ποσοστό > 0,5%, ενώ 27 από αυτά εντοπίστηκαν σε ένα μόνο από τα τέσσερα δείγματα, γεγονός που δείχνει τη μεγάλη χημική ποικιλομορφία στα δείγματα αυτά.

Πίνακας 14. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων αψιθιάς, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης *Kovats* (RI).

A/A	RI	RT	Συστατικό	Aa-1	Aa-2	Aa-3	Aa-A
1	926	5,78	<i>α</i> -πινένιο	-	-	-	0,81
2	973	7,72	σαμπινένιο	0,78	0,58	-	13,66
3	986	8,08	<i>α</i> -φελλανδρόνιο	-	-	-	3,04
4	1002	8,14	μυρκένιο	-	-	-	21,96
5	1012	8,53	<i>α</i> -τερπινένιο	-	-	-	1,09
6	1015	8,76	<i>para</i> -κυμένιο	-	-	-	2,95
7	1029	9,57	<i>ortho</i> -κυμένιο	-	0,87	-	-
8	1038	9,86	ευκαλυπτόλη	-	2,43	-	6,29
9	1044	10,09	<i>γ</i> -τερπινένιο	-	-	-	1,79
10	1074	11,31	<i>cis</i> -εποξείδιο της λιναλοόλης	-	0,71	-	-
11	1084	11,73	2-μεθυλο-2-μεθυλο-βουτυλο εστέρας βουτανοϊκού οξέος	-	-	0,80	-
12	1089	11,97	<i>trans</i> -εποξείδιο της λιναλοόλης	-	0,61	-	-
13	1100	12,48	λιναλοόλη	-	5,24	-	3,67
14	1117	13,09	<i>α</i> -θουγιόνη	-	-	0,99	0,52
15	1129	13,58	<i>β</i>-θουγιόνη	1,37	-	42,88	8,75
16	1139	13,96	Z-εποξυοκιμένιο	32,84	-	-	1,15
17	1145	14,21	<i>E</i> -εποξείδιο του οκιμενίου	1,57	-	-	-
18	1149	14,39	<i>trans</i> -σαμπινόλη	0,82	1,47	-	0,95
19	1161	14,90	καμφορά	0,62	-	-	1,49
20	1164	15,05	λαβαντουλόλη	-	-	-	0,57
21	1169	15,27	<i>β</i> -εποξείδιο του πινενίου	0,76	-	-	-
22	1177	15,64	βορνεόλη	-	-	-	0,83
23	1186	16,10	τερπινέν-4-όλη	-	0,78	0,59	1,86
24	1188	16,17	οτριενόλη	2,05	-	-	-
25	1200	16,78	<i>α</i> -τερπινεόλη	-	0,95	-	-
26	1283	20,34	αιθανικός εστέρας λαβαντουλλίου	1,26	-	-	-

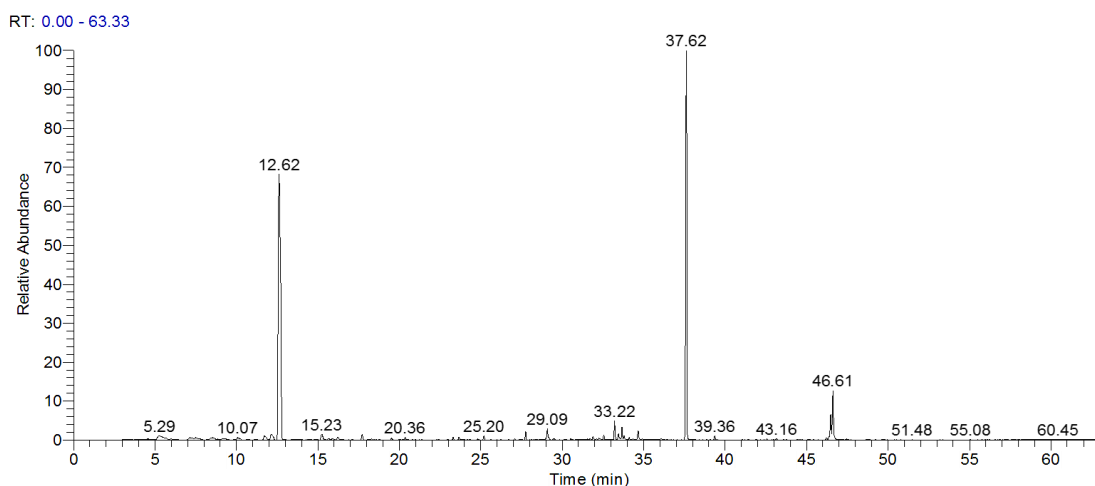
27	1260	19,25	<i>trans</i> -αιθανικός εστέρας χρυσανθενυλίου	-	2,44	-	-
28	1293	20,81	<i>trans</i>-αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου	24,71	46,83	-	-
29	1297	21,02	θυμόλη	-	2,20	-	-
30	1304	21,32	καρβακρόλη	2,71	0,67	-	-
31	1308	21,48	<i>cis</i> -αιθανικός εστέρας χρυσανθενυλίου	-	0,64	-	-
32	1374	24,26	α -κοπαένιο	0,95	-	-	-
33	1382	24,62	β -μπουρμπονένιο	0,54	-	-	0,52
34	1410	25,83	ισοβουτανικός εστέρας λαβαντουλλίου	0,71	-	-	-
35	1418	26,17	<i>E</i> -καρνοφυλλένιο	3,13	0,98	-	2,03
36	1474	28,45	γ -κουρκουμένιο	1,32	1,06	-	1,41
37	1479	28,66	<i>ar</i> -κουρκουμένιο	2,26	2,46	-	-
38	1481	28,75	<i>D</i> -γερμακρένιο	2,95	-	0,72	2,91
39	1484	28,88	α -σελινένιο	-	0,81	-	-
40	1489	29,09	β -σελινένιο	0,90	1,19	-	1,00
41	1495	29,34	ισοβαλερικός εστέρας λαβαντουλλίου	0,95	-	-	0,71
42	1497	29,45	2-μεθυλο-ισοβουτανικός εστέρας λαβαντουλλίου	0,75	-	-	-
43	1513	30,05	δεν ταυτοποιήθηκε	2,17	5,21	1,32	4,47
44	1521	30,36	σελινα-3,7(11)-διένιο	-	0,51	-	-
45	1574	32,42	ισοβαλερικός εστέρας νερυλίου	0,86	3,61	-	1,07
46	1580	32,63	σπαθουλενόλη	-	0,61	-	0,47
47	1585	32,87	εποξειδίο του καρνοφυλλενίου	0,67	-	-	0,50
48	1591	33,10	ισοβαλερικός εστέρας γερανυλίου	0,82	2,59	-	0,69
49	1622	34,28	δεν ταυτοποιήθηκε	-	3,05	1,70	2,51
50	1635	34,73	δεν ταυτοποιήθηκε	-	2,33	1,01	1,49
51	1673	36,19	ιντερμεδεόλη	-	3,18	-	-
52	1685	36,68	α -μπισαμπολόλη	0,68	-	-	-
53	1738	38,58	χαμαζουλένιο	0,62	1,45	38,17	0,73
54	1939	45,48	κεμπρένιο	1,03	-	-	-
55	1995	47,34	δεν ταυτοποιήθηκε	1,73	1,47	3,21	1,11
56	1999	47,48	δεν ταυτοποιήθηκε	1,98	1,58	5,03	0,59
Σύνολο %				94,48	98,52	96,65	93,59

Στο αιθέριο έλαιο της αψιθιάς από την Κοζάνη (δείγμα Aa-1) ανιχνεύθηκαν συνολικά 45 συστατικά εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 42, ενώ παρουσιάζονται τα 31 με ποσοστό > 0,5% που απαρτίζουν το 98,52% του συνόλου. Χαρακτηρίζεται ως αιθέριο έλαιο «μικτού» χημειότυπου των *Z*-εποξιοκιμένιου (32,84%) και του *trans*-αιθανικού εστέρα σαμπινυλίου (24,71%). Τα υπόλοιπα συστατικά ανιχνεύονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά, το *E*-καρνοφυλλένιο (3,13%), το *D*-

γερμακρένιο (2,95%), η καρβακρόλη (2,71%) και το *ar*-κουρκουμένιο (2,26%). Όσον αφορά τη θουγιόνη, εντοπίζεται μόνο η α -θουγιόνη σε ποσοστό 1,37%.

Στο αιθέριο έλαιο της αψιθιάς από το Αγρίνιο (δείγμα Aa-2) ανιχνεύθηκαν 34 συνολικά ενώσεις από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν οι 29. Παρουσιάζονται οι 29 από αυτές σε ποσοστό > 0,5% που απαρτίζουν το 99,66% του συνόλου. Το αιθέριο έλαιο Aa-2 χαρακτηρίζεται ως αιθέριο έλαιο «καθαρού» χημειότυπου *trans*-αιθανικού εστέρα σαμπινυλίου (46,83%), αφού το αμέσως επόμενο συστατικό σε περιεκτικότητα, η λιναλοόλη, εμφανίζει ποσοστό μόλις 5,24%. Άλλες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είναι ο ισοβαλερικός εστέρας νερόλης ή νερυλίου ή νεράλης (3,61%), η ιντερμεδεόλη (3,18%), το *ar*-κουρκουμένιο (2,46%), ο *trans*-αιθανικός εστέρας χρυσανθενυλίου (2,44%) και η *ευκαλυπτόλη* (2,43%).

Στο δείγμα της αψιθιάς από την Ιεράπετρα (Aa-3), ανιχνεύθηκαν 20 συστατικά αιθερίου ελαίου και ταυτοποιήθηκαν 16 από αυτά. Μόλις τα 12 από αυτά βρέθηκαν να είναι σε ποσοστό > 0,5% που απαρτίζουν το 96,65% του συνόλου. Χαρακτηρίζεται ως αιθέριο έλαιο «μικτού» χημειότυπου β -θουγιόνης (42,88%) και χαμαζουλενίου (38,17%), ενώ τα υπόλοιπα συστατικά βρίσκονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά, όπως η α -θουγιόνη (0,99%) και το Δ -γερμακρένιο (0,72%).



Σχήμα 10. Αέριο χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου της αψιθιάς από την Ιεράπετρα (δείγμα Aa-3).

Τέλος, στο αιθέριο έλαιο από το δείγμα της αγοράς της Αθήνας ανιχνεύθηκαν 49 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 45 από αυτά, ενώ σε ποσοστό > 0,5% ήταν τα 32, που απαρτίζουν το 93,58% του συνόλου. Το αιθέριο έλαιο χαρακτηρίζεται ως «μικτού» χημειότυπου μυρκένιου (21,96%) και σαμπινένιου (13,66%). Άλλα συστατικά είναι η β -θουγιόνη (8,75%), η *ευκαλυπτόλη* (6,29%), η λιναλοόλη (3,67%), το α -φελλανδρένιο (3,04%) και το *para*-κυμένιο (2,95%).

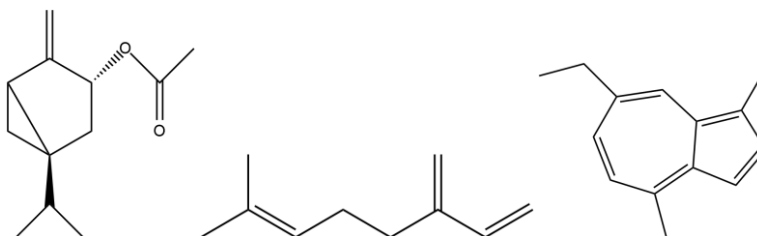
Συγκρίνοντας τα τέσσερα δείγματα, παρατηρήθηκε μεγάλη χημική ποικιλομορφία μεταξύ τους, ιδιαίτερα όσον αφορά το δείγμα από το εμπόριο όπου το κύριο συστατικό του (μυρκένιο) δεν

εντοπίστηκε σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα. Επιπλέον, ιδιαίτερο φτωχό σε συστατικά εμφανίστηκε να είναι το δείγμα από την Ιεράπετρα (Aa-3), αφού τα δύο κύρια συστατικά του καταλαμβάνουν περισσότερο από το 80% της συνολικής του σύστασης.

Πίνακας 15. Χημειότυποι των αιθερίων ελαίων της αψιθιάς.

Δείγμα	Τύπος Χημειότυπου	Κύρια συστατικά
Aa-1	μικτός	Z-εποξυοικιμένο και <i>trans</i> -αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου
Aa-2	καθαρός	<i>trans</i> -αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου
Aa-3	μικτός	β -θουγιόνη και χαμαζουλένιο
Aa-A	μικτός	μυρκένιο και σαμπινένιο

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αψιθιά παρουσιάζει μεγάλη χημική ποικιλομορφία όσον αφορά τη σύσταση του αιθερίου ελαίου της. Έχει βρεθεί να έχει συνήθως σαν κύρια συστατικά την α - και β -θουγιόνη, το Z-εποξυοικιμένο, τον αιθανικό εστέρα σαμπινυλίου, τον αιθανικό εστέρα χρυσανθενυλίου, (Nguyen & Németh, 2016; Bailen et al., 2013; Alic, 2006) και λιγότερο συχνά τη λιναλοόλη, το χαμαζουλένιο, το *para*-κυμένιο και το β -πινένιο, (Judpentienné, 2004; Nezhadali & Parsa, 2010) ενώ σε μια έρευνα βρέθηκε να έχει σαν κύριο συστατικό την καμφορά (Nezhadali & Parsa, 2010). Τα στοιχεία αυτά σε γενικές γραμμές συμφωνούν με αυτά της παρούσας μελέτης. Μια μόνο μελέτη στην Εσθονία (Orav, Raal, Arak, Müürisep, & Kailas, 2006) βρήκε επίσης το χημειότυπο μυρκενίου-σαμπινενίου, όπως βρέθηκε και στο δείγμα Aa-A. Τέλος, ασυνήθιστο είναι και το ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό χαμαζουλενίου που βρέθηκε στο δείγμα Aa-3, καθώς και συνολικά ο χημειότυπος του (β -θουγιόνη-χαμαζουλένιο) (Nguyen & Németh, 2016).



Σχήμα 11. Δομές των ενώσεων (από αριστερά): *trans*-αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου, μυρκένιο και χαμαζουλένιο.

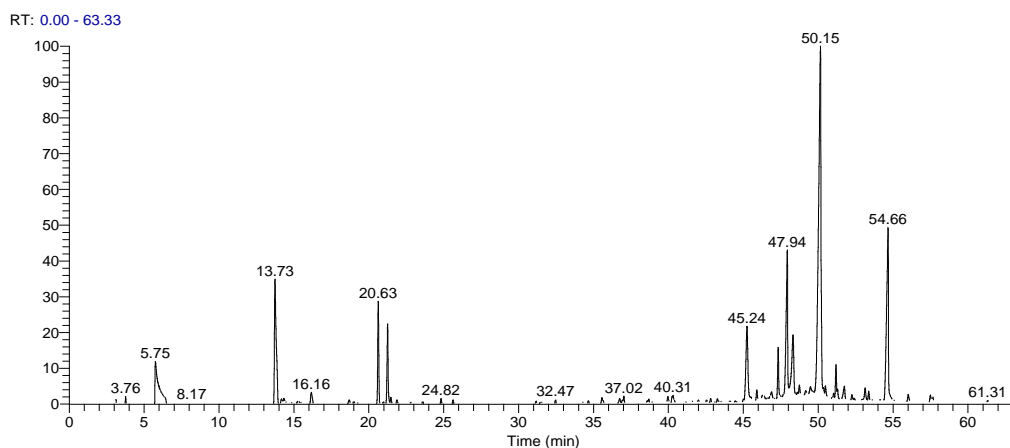
3.2.4 Χημική σύσταση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων της αψιθιάς

Στα αφεψήματα της αψιθιάς ανιχνεύθηκαν συνολικά 31 πτητικά συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 29 από αυτά. Παρουσιάζονται τα 24 από αυτά με ποσοστό > 0,5%. Μόνο ένα συστατικό, η νουκκατίνη, ανιχνεύθηκε και στα τέσσερα δείγματα, ενώ 12 συστατικά εντοπίστηκαν σε ένα μόνο από τα δείγματα.

Πίνακας 16. Τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων αμυγδαλιάς, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης *Kovats* (RI).

A/A	RI	RT	Συστατικό	Aa-1 %	Aa-2 %	Aa-3 %	Aa-A %
1	926	6,01	<i>α</i> -πινένιο	-	-	-	1,43
2	1004	8,27	<i>δ</i> -3-καρένιο	-	-	-	1,13
3	1017	9,15	ευκαλυπτόλη	-	1,91	-	2,84
4	1058	10,63	<i>cis</i> -ένυδρο σαμπινένιο	-	-	2,15	-
5	1083	11,68	λιναλόλη	-	1,95	-	2,64
6	1093	12,13	<i>α</i> -θουγιόνη	-	-	1,65	-
7	1103	12,58	<i>β</i>-θουγιόνη	-	-	83,20	5,34
8	1133	13,74	<i>Z</i>-εποξοκυμένιο	13,24	-	-	1,66
9	1138	13,92	καμφορά	-	-	-	1,56
10	1147	14,32	<i>trans</i> -σαμπινόλη	0,58	1,07	-	0,98
11	1151	14,47	λαβαντούλη	-	-	-	0,67
12	1161	14,94	βορνεόλη	-	-	-	0,64
13	1168	15,23	τερπινεν-4-όλη	-	-	0,58	-
14	1182	15,87	<i>α</i> -τερπινεόλη	-	0,60	0,54	-
15	1238	18,30	<i>cis</i> -αιθανικός εστέρας χρυσανθενυλίου	-	0,54	-	-
16	1289	20,63	<i>trans</i>-αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου	5,56	23,42	-	-
17	1296	20,97	θυμόλη	-	3,31	0,50	-
18	1304	21,32	καρβακρόλη	-	0,85	1,14	-
19	1547	31,34	σπαθουλενόλη	-	-	-	2,41
20	1709	37,58	χαμαζουλένιο	-	-	8,41	-
21	*	47,94	νουκκατίνη	12,41	15,43	1,86	14,12
22	-	48,84	δεν ταυτοποιήθηκε	38,70	37,68	-	38,99
23	*	50,04	μεθυλο-λινολαϊκός εστέρας	-	-	-	8,75
24	-	54,67	δεν ταυτοποιήθηκε	15,57	8,54	-	4,09
			Σύνολο %	86,06	95,30	100,63	87,26

Στο αφέψημα της αμυγδαλιάς από την Κοζάνη (δείγμα Aa-1) ανιχνεύθηκαν συνολικά 15 συστατικά, ταυτοποιήθηκαν 12 από αυτά και παρουσιάζονται τα 9 που εμφάνισαν ποσοστό > 0,5%, που απαρτίζουν το 86,06% του συνόλου. Τα κυριότερα ήταν το *Z*-εποξοκυμένιο (13,24%), η νουκκατίνη (12,41%), ο *trans*-αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου (5,56%) και δύο ενώσεις που δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν από τις διαθέσιμες ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες. Άλλα συστατικά ήταν η οτριενόλη (0,90%) και η *trans*-σαμπινόλη (0,58%). Συγκριτικά με το αιθέριο έλαιο, τα κύρια συστατικά ήταν κοινά με εξαίρεση τη νουκκατίνη που δεν ανιχνεύθηκε σε αξιόλογο ποσοστό στο αντίστοιχο αιθέριο έλαιο.



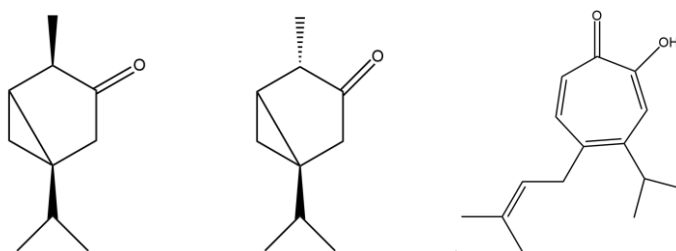
Σχήμα 12. Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών αφεψήματος αψιθιάς (Aa-1).

Στο αφέψημα της αψιθιάς από το Αγρίνιο (δείγμα Aa-2) ανιχνεύθηκαν 13 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 10 από αυτά, τα οποία απαρτίζουν το 93,58% του συνόλου. Τα κυριότερα ήταν ο *trans*-αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου (23,42%), η νουτκατίνη (15,43%) και δύο ενώσεις που δεν ταυτοποιήθηκαν με τις διαθέσιμες ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες. Άλλα συστατικά ήταν η θυμόλη (3,31%), η 6-μεθυλο-κουμαρίνη (3,30%) και η λιναλοόλη (1,95%). Τα κύρια συστατικά ταυτίζονται με αυτά του αντίστοιχου αιθερίου ελαίου εκτός από τη νουτκατίνη και την 6-μεθυλο-κουμαρίνη.

Στο αφέψημα της αψιθιάς από την Ιεράπετρα (δείγμα Aa-3) ανιχνεύθηκαν 11 πτητικά συστατικά, 10 από τα οποία βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5%. Κυρίαρχο συστατικό βρέθηκε να είναι η β -θουγιόνη με ποσοστό 83,20% και ακολούθησαν το χαμαζουλένιο (8,41%), το α -ένυδρο-σαμπινένιο (2,15%), η νουτκατίνη (1,86%), η α -θουγιόνη (1,65%) και η καρβακρόλη (1,14%). Τα κύρια συστατικά ταυτίζονται με αυτά του αντίστοιχου αιθερίου ελαίου με εξαίρεση ξανά την ένωση της νουτκατίνης.

Τέλος, στο αφέψημα της αψιθιάς από την αγορά της Αθήνας ανιχνεύθηκαν 19 πτητικά συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 17, ενώ 16 πτητικές ενώσεις βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5%. Κύριες ενώσεις ήταν η νουτκατίνη (14,12%), ο μεθυλεστέρας λινολεϊκού οξέος (8,75%), η β -θουγιόνη (5,34%) και οι δύο άγνωστες ενώσεις και ακολούθησαν η ευκαλυπτόλη (2,84%), η λιναλοόλη (2,64%) και η σπαθουλενόλη (2,41%). Σε σχέση με το αιθέριο έλαιο, ξανά η νουτκατίνη διαφοροποιεί τη σύνθεση των δύο εκχυλισμάτων.

Συγκρίνοντας τα τέσσερα δείγματα μεταξύ τους, τα Aa-1 και Aa-2 εμφανίζουν περισσότερες ομοιότητες σε σχέση με τα Aa-3 και Aa-A, ενώ η ένωση της νουτκατίνης βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό σε όλα τα δείγματα. Στο Aa-A βρέθηκαν τα περισσότερα συστατικά, πολλά από τα οποία δεν υπήρχαν στα άλλα δείγματα.



Σχήμα 13. Δομή των ενώσεων (από αριστερά): α - και β -θουγιόνη και νουτκατίνη.

3.2.5 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων της αγιλλέας

Στα αιθέρια έλαια της αγιλλέας ανιχνεύθηκαν συνολικά 116 διαφορετικές ενώσεις και ταυτοποιήθηκαν οι 115 από αυτές. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται όσες βρέθηκαν σε ποσοστό $> 0,5\%$ και οι οποίες ήταν 69. Από αυτά τα συστατικά, τα 8 βρέθηκαν σε ποσοστό $> 0,5\%$ και στα τέσσερα δείγματα, ενώ αντίστοιχα 46 συστατικά, δηλαδή ένα πολύ μεγάλο ποσοστό τους, βρέθηκαν μόνο σε ένα δείγμα.

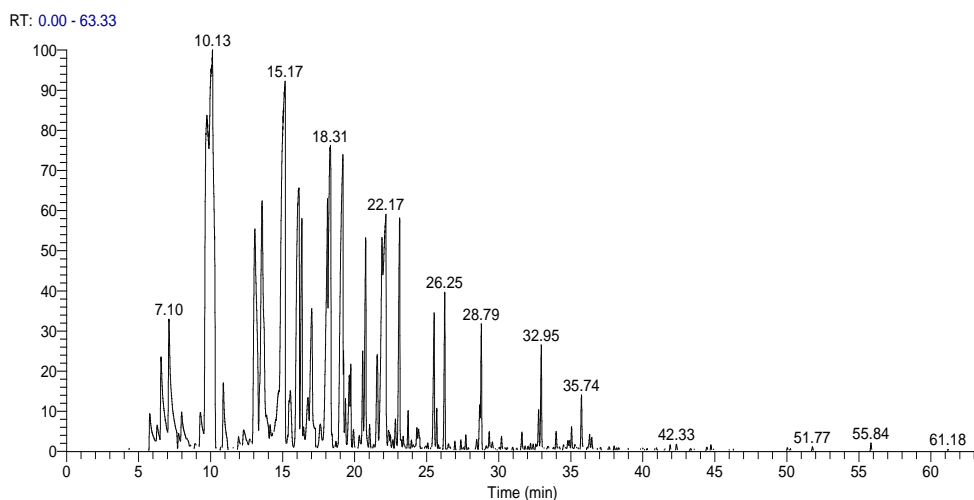
Πίνακας 17. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων αγιλλέας, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης *Kovats* (RI).

A/A	RI	RT	Συστατικό	Am-1 %	Am-2 %	Am-3 %	Am-A %
1	926	6,54	α -πινένιο	2,18	1,83	1,70	-
2	952	7,09	καμφένιο	3,36	-	-	1,14
3	973	7,75	σαμπινένιο	-	5,78	3,83	-
4	980	7,96	β-πινένιο	0,61	21,53	9,64	-
5	998	8,16	αλκοόλη του <i>Yomogi</i>	-	-	-	5,37
6	1005	8,75	<i>para</i> -κυμένιο	-	-	-	2,67
7	1020	9,26	α -τερπινένιο	0,64	0,98	-	-
8	1032	9,66	<i>ortho</i> -κυμένιο	9,28	-	2,06	-
9	1034	9,72	λιμονένιο	-	0,61	-	-
10	1042	10,03	ευκαλυπτόλη	14,94	5,39	5,94	12,08
11	1062	10,78	κετόνη της αρτεμισίας	-	7,66	-	24,72
12	1063	10,84	γ -τερπινένιο	1,10	-	1,77	-
13	1077	11,42	<i>cis</i> -ένυδρο-σαμπινένιο	-	-	0,60	-
14	1081	11,62	αλκοόλη της αρτεμισίας	-	-	-	1,83
15	1088	11,91	τερπινολένιο	-	0,51	-	-
16	1100	12,48	λιναλοόλη	-	-	-	2,09
17	1116	13,06	α -θουγιόνη	6,58	-	-	-
18	1123	13,32	χρυσανθενόνη	-	-	-	0,83
19	1128	13,52	β -θουγιόνη	5,75	-	4,17	-

20	1150	14,44	<i>trans</i> -πινοκαρβεόλη	-	-	-	0,70
21	1153	14,56	<i>trans</i> -σαμπινόλη	1,26	-	-	-
22	1164	15,07	καμφορά	11,62	2,48	2,15	14,86
23	1171	15,39	<i>cis</i> -χρυσανθενόλη	0,84	-	-	-
24	1184	16,00	βορνεόλη	5,21	-	3,29	8,31
25	1190	16,25	τερπινεν-4-όλη	2,44	7,12	1,67	1,28
26	1197	16,62	<i>para</i> -κυμεν-8-όλη	0,71	-	-	-
27	1204	16,91	α -τερπινεόλη	1,81	1,90	1,75	0,51
28	1227	17,85	φραγρανόλη	2,80	-	-	-
29	1236	18,21	<i>trans</i> -αιθανικός εστέρας χρυσανθενυλίου	5,38	-	-	0,95
30	1248	18,76	πουλεγόνη	-	-	0,79	-
31	1254	19,01	ασκαριδόλη	4,72	-	-	-
32	1256	19,09	κουμιναλδεΰδη	0,66	-	-	-
33	1266	19,52	πιπεριτόνη	0,64	-	-	-
34	1268	19,63	<i>cis</i> -εποξείδιο της πιπεριτόνης	0,51	-	-	-
35	1275	19,96	<i>trans</i> - α -αιθανικός εστέρας νεκροδυλίου	-	0,62	-	-
36	1286	20,50	αιθανικός εστέρας βορνυλίου	0,69	1,08	3,99	2,21
37	1291	20,72	<i>trans</i> -αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου	2,09	-	-	-
38	1296	20,97	θυμόλη	-	1,54	-	-
39	1303	21,29	<i>para</i> -κυμεν-7-όλη	0,94	-	-	-
40	1304	21,32	καρβακρόλη	-	-	2,62	3,12
41	1320	21,94	ισοασκαριδόλη	4,07	-	-	1,93
42	1346	23,02	δεν ταυτοποιήθηκε	1,89	-	-	-
43	1374	24,28	α -κοπαένιο	-	-	0,73	-
44	1384	24,70	7-επι-σεσκιθουγιένιο	-	-	0,60	-
45	1387	24,85	<i>B</i> -ελεμένιο	-	-	0,99	-
46	1400	25,44	<i>Z</i> -γιασμόνη	1,11	-	-	1,71
47	1419	26,20	<i>E</i> -καρνοφυλλένιο	1,06	9,77	3,75	2,92
48	1438	26,93	β -φουνεμπρένιο	-	-	0,57	-
49	1456	27,69	α -χουμουλένιο	-	1,31	0,86	-
50	1477	28,55	γ -κουρκουμένιο	-	-	1,36	-
51	1482	28,76	Δ-γερμακρένιο	0,79	3,85	7,98	1,54
52	1494	29,32	δικυκλογερμακρένιο	-	-	1,11	-
53	1507	29,84	β -κουρκουμένιο	-	-	0,51	-
54	1519	30,28	δ -καδινένιο	-	-	3,31	-
55	1555	31,64	ελεμόλη	-	-	5,03	-
56	1559	31,79	<i>E</i> -νερολιδόλη	-	-	2,13	-
57	1578	32,57	<i>allo</i> -εποξείδιο του αρωμαδενδρενίου	-	-	-	0,58
58	1582	32,72	σπαθουλενόλη	-	-	1,92	-

59	1582	32,74	<i>trans</i> -ενυδρο-σεσκισαμπινένιο	-	-	1,83	-
60	1586	32,91	εποξειδίο του καρνοφυλλενίου	0,59	1,23	3,05	1,07
61	1631	34,59	α -ευδεσμόλη	-	-	2,48	-
62	1633	34,67	καδινα-4,10(1,4)-διεν-1- β -όλη	-	-	1,06	-
63	1636	34,80	<i>cis</i> -καδιν-4-εν-7-όλη	-	-	-	1,05
64	1639	34,89	γ -ευδεσμόλη	-	-	1,75	-
65	1664	35,83	χιματσολόλη	-	-	3,41	-
66	1667	35,97	νεο-ιντερμεδεόλη	-	-	0,59	-
67	1688	36,78	α -μπισαμπολόλη	-	-	0,99	-
68	1714	37,75	2 <i>E</i> ,6--φαρνεσόλη	-	-	0,68	-
69	1743	38,77	χαμαζουλένιο	-	18,66	-	-
			Σύνολο %	96,28	93,84	92,69	93,47

Στο αιθέριο έλαιο της αγιλλέας από την Κοζάνη (δείγμα Am-1) ανιχνεύθηκαν συνολικά 58 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 57 από αυτά. Παρουσιάζονται 31 συστατικά με ποσοστό > 0,5%, που αποτελούν το 96,28% του συνόλου. Το αιθέριο έλαιο Am-1 μπορεί να χαρακτηριστεί ως αιθέριο έλαιο «μικτού» χημειότυπου ευκαλυπτόλης (14,94%) και καμφοράς (11,62%). Ακολούθησαν το *ortho*-κυμένιο (9,28%), η α - και β -θουγιόνη με 6,58% και 5,75% αντίστοιχα, ο *trans*-αιθανικός εστέρας χρυσανθενυλίου (5,38%), η βορνεόλη (5,21%), η ασκαριδόλη (4,72%) και η ισοασκαριδόλη (4,07%). Παρατηρείται ότι το αιθέριο έλαιο δεν έχει δύο ή τρία συστατικά που καθορίζουν τη σύνθεση του, αφού τα δύο πρώτα αποτελούν μόλις το 26,56% του συνόλου του.



Σχήμα 14. Αέριο χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου της αγιλλέας από την Κοζάνη (δείγμα Am-1).

Στο αιθέριο έλαιο της αγιλλέας από το Αγρίνιο (δείγμα Am-2) ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 46 συστατικά, εκ των οποίων παρουσιάζονται τα 18 με ποσοστό > 0,5% που αποτελούν το 93,84%

του συνόλου. Χαρακτηρίζεται ως «μικτού» χημειότυπου β -πινένιου (21,53%) και χαμαζουλένιου (18,66%). Ακολούθησαν το *E*-καρνοφυλλένιο (9,77%), η κετόνη της αρτεμισίας (7,66%), η τερπινεν-4-όλη (7,12%), το σαμπινένιο (5,78%) και η ευκαλυπτόλη (5,78%).

Στο αιθέριο έλαιο της αγιλλέας από τη Χαλκιδική (δείγμα Am-3) ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 61 πτητικά συστατικά από τα οποία τα 38 βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5% που αποτελούν το 92,69% του συνόλου. Μπορεί να χαρακτηριστεί αιθέριο έλαιο «μικτού» χημειότυπου β -πινένιου (9,64%) και Δ γερμακρένιου (7,98%). Παρατηρείται ότι αυτά τα δύο πρώτα συστατικά βρέθηκαν αναλογικά σε μικρά ποσοστά και καταλαμβάνουν μόνο το 17,62% του συνόλου των συστατικών. Άλλα συστατικά σε αξιοσημείωτα ποσοστά ήταν η ευκαλυπτόλη (5,94%), η ελεμόλη (5,03%), η β -θουγιόνη (4,17%), ο αιθανικός εστέρας βορνυλίου (3,99%), το σαμπινένιο (3,84%) και το *E*-καρνοφυλλένιο (3,75%).

Τέλος, το αιθέριο έλαιο από την αγορά της Αθήνας (δείγμα Am-A) έδωσε συνολικά 48 πτητικά συστατικά τα οποία ταυτοποιήθηκαν και παρουσιάζονται αυτά που βρέθηκαν σε ποσοστά > 0,5%, που ήταν τελικά 23 και αποτελούν το 93,47% του συνόλου. Χαρακτηρίζεται ως αιθέριο έλαιο «μικτού» χημειότυπου κετόνης της αρτεμισίας (24,72%), καμφοράς (14,86%) και ευκαλυπτόλης (12,08%). Άλλα συστατικά του ήταν η βορνεόλη (8,31%), η αλκοόλη του *Yomogi* (5,37%), η καρβακρόλη (3,12%), το *E*-καρνοφυλλένιο (2,92%) και το *para*-κυμένιο (2,67%).

Συγκρίνοντας τα τέσσερα δείγματα, παρατηρήθηκε αρκετά μεγάλη χημική ποικιλομορφία, ποιοτικά και % ποσοτικά. Τα κοινά συστατικά τους ήταν η καμφορά, η ευκαλυπτόλη, το *E*-καρνοφυλλένιο, το Δ -γερμακρένιο, η τερπινεν-4-όλη, ο αιθανικός εστέρας βορνυλίου, το εποξειδίο του καρνοφυλλένιου και η α -τερπινεόλη. Όλα τα δείγματα έδωσαν αιθέρια έλαια «μικτού» χημειότυπου. Επιπλέον, το δείγμα από την αγορά της Αθήνας βρέθηκε να έχει το μεγαλύτερο ποσοστό καμφοράς.

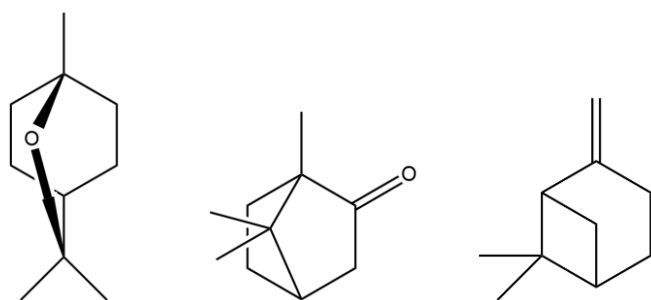
Πίνακας 18. Χημειότυποι των αιθερίων ελαίων της αγιλλέας.

Δείγμα	Τύπος Χημειότυπου	Κύρια συστατικά
Am-1	μικτός	ευκαλυπτόλη και καμφορά
Am-2	μικτός	β -πινένιο και χαμαζουλένιο
Am-3	μικτός	β -πινένιο και Δ -γερμακρένιο
Am-A	μικτός	κετόνη της αρτεμισίας, καμφορά και ευκαλυπτόλη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου της αγιλλέας είναι πιο συχνά τα μονοτερπένια καμφορά, ευκαλυπτόλη, τερπινεν-4-όλη και βορνεόλη και τα σεσκιτερπένια Δ -γερμακρένιο και εποξειδίο του καρνοφυλλένιου (Shawl et al., 2002; Oran et al., 2016; Kokkalou, Kokkini, & Hanlidou, 1992). Έχουν βρεθεί επίσης σε μεγάλα ποσοστά το χαμαζουλένιο, η α - και β -θουγιόνη, η λιναλοόλη, τα α - και β -πινένιο, το σαμπινένιο, το β -καρνοφυλλένιο, η *trans*-νερολιδόλη

και η α -τερπινεόλη (Mockute & Judzentiene, 2003; Rimantas, 2007; Kazemi, 2015). Σε μια μελέτη στην Β. Ελλάδα εντοπίστηκε σαν κυρίαρχο συστατικό η ασκαριδόλη (Chatzoroulou & Katsiotis, 1992).

Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με την παρούσα μελέτη που έρχεται να επαληθεύσει τη μεγάλη χημική ποικιλομορφία που εμφανίζει το είδος αυτό όσον αφορά τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου της. Επιπλέον, δεν υπάρχει άλλη αναφορά της κετόνης της αρτεμισίας σαν το κυρίαρχο συστατικό του αιθερίου ελαίου της αχιλλέας ούτε έχει αναφερθεί ξανά ο συγκεκριμένος χημειότυπος της (δείγμα Aa-A).



Σχήμα 15. Δομές των ενώσεων (από αριστερά): ευκαλυπτόλη, καμφορά και β -πινένιο.

3.2.6 Χημική σύσταση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων της αχιλλέας

Στα αφεψήματα της αχιλλέας ανιχνεύθηκαν συνολικά 55 πτητικά συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 52 από αυτά. Παρουσιάζονται τα 50 από αυτά που βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5%. Μόνο 4 συστατικά ανιχνεύθηκαν και στα τέσσερα δείγματα, ενώ 29 συστατικά εντοπίστηκαν σε ένα μόνο από τα δείγματα.

Πίνακας 19. Τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων αχιλλέας, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης Kovats (RI).

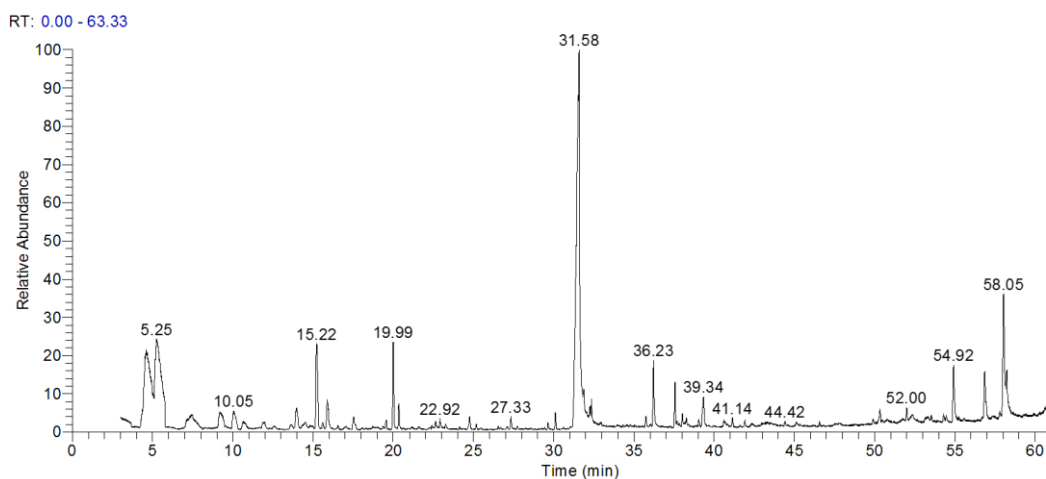
A/A	RI	RT	Συστατικό	Am-1 %	Am-2 %	Am-3 %	Am-A %
1	973	7,87	σαμπινένιο	-	9,02	3,00	-
2	998	8,38	αλκοόλη του <i>Yomogi</i>	-	-	-	4,87
3	1014	9,03	δ -3-καρένιο	-	-	-	1,21
4	1029	9,57	<i>ortho</i> -κυμένιο	1,33	-	-	-
5	1038	9,87	ευκαλυπτόλη	19,63	14,27	11,92	12,19
6	1060	10,73	κετόνη της αρτεμισίας	-	9,40	-	16,13
7	1078	11,46	<i>cis</i> -ένυδρο-σαμπινένιο	-	2,08	2,14	0,95
8	1088	11,89	<i>cis</i> -εποξειδίο της λιναλοόλης	-	-	-	1,00
9	1089	11,97	αλκοόλη της αρτεμισίας	-	-	-	3,27
10	1093	12,12	<i>trans</i> -εποξειδίο της λιναλοόλης	-	-	-	1,05

11	1104	12,62	λιναλοόλη	-	-	-	0,73
12	1105	12,67	<i>trans</i> -ένυδρο-σαμπινένιο	-	1,00	1,27	-
13	1113	12,96	α-θουγιόνη	8,00	-	-	0,53
14	1125	13,41	β -θουγιόνη	3,88	-	3,83	-
15	1129	13,59	χρυσανθενόνη	2,00	-	-	1,46
16	1147	14,32	<i>trans</i> -σαμπινόλη	3,59	-	-	-
17	1149	14,41	<i>trans</i> -πινοκαρβεόλη	-	-	-	1,68
18	1158	14,80	καμφορά	14,44	5,58	3,21	18,43
19	1169	15,30	<i>cis</i> -χρυσανθενόλη	1,07	-	-	-
20	1180	15,80	βορνεόλη	4,52	-	3,81	16,16
21	1181	15,85	δωδεκάνιο	-	-	1,47	-
22	1186	16,10	τερπινεν-4-όλη	1,34	14,32	1,53	1,02
23	1195	16,50	<i>para</i> -κυμεν-8-όλη	0,66	-	-	-
24	1200	16,78	α -τερπινεόλη	1,28	3,85	2,95	1,02
25	1217	17,43	βερμπενόνη	-	-	-	0,55
26	1221	17,62	φραγρανόλη	1,64	-	-	-
27	1232	18,06	<i>trans</i> -αιθανικός εστέρας χρυσανθενυλίου	2,23	-	-	0,93
28	1243	18,54	πουλεγόνη	-	-	1,22	-
29	1251	18,85	ασκαριδόλη	13,24	-	-	1,50
30	1254	19,00	κουμιναιδεύδη	0,61	-	-	-
31	1262	19,36	τσαβικόλη	-	-	-	0,95
32	1264	19,44	πιπεριτόνη	0,77	-	-	-
33	1266	19,56	<i>cis</i> -εποξείδιο της πιπεριτόνης	0,73	-	-	-
34	1283	20,34	αιθανικός εστέρας βορνυλίου	-	0,89	1,77	-
35	1289	20,62	<i>trans</i> -αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου	1,03	-	-	-
36	1296	20,97	θυμόλη	-	4,11	-	-
37	1299	21,09	<i>para</i> -κυμεν-7-όλη	1,43	-	-	-
38	1304	21,33	καρβακρόλη	-	1,27	4,46	3,67
39	1315	21,77	ισοασκαριδόλη	13,70	-	-	3,86
40	1359	23,59	ευγενόλη	-	-	0,73	0,65
41	1361	23,68	πιπεριτενόνη	-	-	-	0,53
42	1398	25,36	Z-γιασμόνη	0,91	-	-	1,99
43	1404	25,62	βανιλίνη	-	0,50	-	-
44	1414	26,01	δεν ταυτοποιήθηκε	1,79	-	-	-
45	1569	32,19	6-μεθυλο-κουμαρίνη	-	18,39	47,47	2,66
46	1694	37,03	δεν ταυτοποιήθηκε	-	-	6,29	-
47	1826	41,70	κρυπτομεριδιόλη	-	-	2,47	-
48	-	55,84	δεν ταυτοποιήθηκε	-	5,59	-	-
49	-	57,76	αργλαβίνη	-	4,11	-	-

50	-	58,84	γκρομισσίνη	-	3,99	-	-
			Σύνολο %	99,82	98,36	99,53	98,96

Στο αφέψημα της αχιλλέας από την Κοζάνη (δείγμα Am-1) ανιχνεύθηκαν 25 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν τα 24 από αυτά. Παρουσιάζονται τα 23 που βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5% και αποτελούν το 99,82% του συνόλου. Τα κύρια συστατικά ήταν η ευκαλυπτόλη (19,63%), η καμφορά (14,44%), η ισοασκαριδόλη (13,70%), η ασκαριδόλη (13,24%) και η α -θουγιόνη (8,00%). Ακολούθησαν η βορνεόλη (4,52%), η β -θουγιόνη (3,88%) και η *trans*-σαμπινόλη (3,59%). Συγκρίνοντας τη σύσταση των συστατικών με αυτή του αντίστοιχου αιθερίου ελαίου, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές ούτε ως προς τα κύρια συστατικά ούτε ως προς τα ποσοστά τους.

Στο αφέψημα της αχιλλέας από το Αγρίνιο (δείγμα Am-2) ανιχνεύθηκαν 22 συστατικά και ταυτοποιήθηκαν 21 από αυτά, ενώ τα 17 βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5%, που αποτελούν το 98,36% του συνόλου και παρουσιάζονται. Κύριες ενώσεις ήταν η δ -μεθυλο-κουμαρίνη (18,39%), η τερπινεν-4-όλη (14,32%), η ευκαλυπτόλη (14,27%), και ακολούθησαν η κετόνη της αρτεμισίας (9,40%), το σαμπινένιο (9,02%), η καμφορά (5,58%) και η αργλαβίνη (4,11%). Παρατηρήθηκαν ποιοτικές και % ποσοτικές διαφορές σε σχέση με το αιθέριο έλαιο, αφού τα δύο κύρια συστατικά του ελαίου, το β -πινένιο και το χαμαζουλένιο δε βρέθηκαν στο αφέψημα σε ποσοστό > 0,5%, ενώ αντίστροφα εμφανίστηκαν στα κύρια συστατικά του αφεψήματος η δ -μεθυλο-κουμαρίνη και η αργλαβίνη που δεν είχαν εντοπιστεί στο αιθέριο έλαιο.



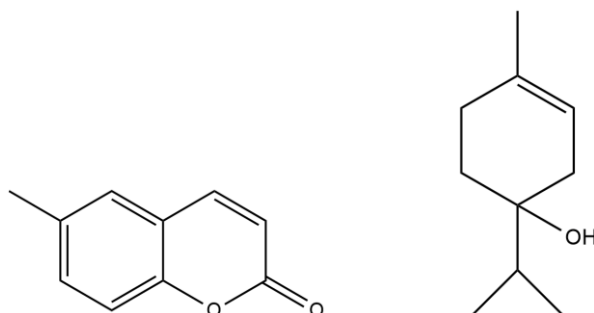
Σχήμα 16. Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών αφεψήματος αχιλλέας (Am-2).

Στο αφέψημα της αχιλλέας από τη Χαλκιδική (δείγμα Am-3) ανιχνεύθηκαν 18 συστατικά, ταυτοποιήθηκαν τα 17 και παρουσιάζονται τα 16, που βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5% και αποτελούν το 99,53% του συνόλου. Κυριότερα ήταν η δ -μεθυλο-κουμαρίνη (47,47%), η ευκαλυπτόλη (11,92%), η καρβακρόλη (4,46%), η β -θουγιόνη (3,83%), η βορνεόλη (3,81%), η καμφορά (3,21%) και το

σαμπινένιο (3,00%). Συγκρίνοντας με το αιθέριο έλαιο, πέρασαν πολύ λιγότερα σε αριθμό συστατικά και όσον αφορά τα κύρια συστατικά τους, κοινά ήταν μόνο η ευκαλυπτόλη και η β-θουγιόνη. Επιπλέον, παρατηρείται ξανά η ένωση της δ-μεθυλο-κουμαρίνης που δεν είχε ανιχνευτεί στο αιθέριο έλαιο.

Τέλος, στο αφέψημα της αχιλλέας από την αγορά της Αθήνας (δείγμα Am-A) ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 29 πτητικές ενώσεις από τις οποίες οι 26 σε ποσοστό > 0,5%, που αποτελούν το 98,96% του συνόλου. Κυριότερες ήταν η καμφορά (18,43%), η βορνεόλη (16,16%), η κετόνη της αρτεμισίας (16,13%) και η ευκαλυπτόλη (12,19%). Ακολούθησαν η αλκοόλη του *Yomogi* (4,87%), η ισοασκαριδόλη (3,86%), η καρβακρόλη (3,67%), η αλκοόλη της αρτεμισίας (3,27%) και η δ-μεθυλο-κουμαρίνη (2,66%). Συγκρίνοντας με το αντίστοιχο αιθέριο έλαιο, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά τα κύρια συστατικά με εξαίρεση την εμφάνιση στο αφέψημα της δ-μεθυλο-κουμαρίνης.

Τα συστατικά που ανιχνεύθηκαν και στα τέσσερα δείγματα ήταν η ευκαλυπτόλη, η καμφορά, η τερπινεν-4-όλη και η α-τερπινεόλη, όλα κύρια και κοινά συστατικά και των αντίστοιχων αιθερίων ελαίων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η δ-μεθυλο-κουμαρίνη που ανιχνεύθηκε στα Am-2, Am-3 και Am-A, ενώ δεν είχε ανιχνευθεί σε κανένα από τα αιθέρια έλαια. Δε βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές για τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων της αχιλλέας, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ τους.



Σχήμα 17. Δομές των ενώσεων (από αριστερά) δ-μεθυλ-κουμαρίνη και τερπινεν-4-όλη.

3.2.7 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων του εστραγκόν

Στα αιθέρια έλαια του εστραγκόν ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά 56 πτητικές ενώσεις, από τις οποίες παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 20) 22, όσες βρέθηκαν σε ποσοστό > 0,5%. Από αυτές, 3 ενώσεις ανιχνεύθηκαν σε αξιοσημείωτο ποσοστό και στα τρία δείγματα, ενώ 7 ανιχνεύθηκαν μόνο σε ένα από αυτά.

Πίνακας 20. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων εστραγκόν, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης *Kovats* (RI).

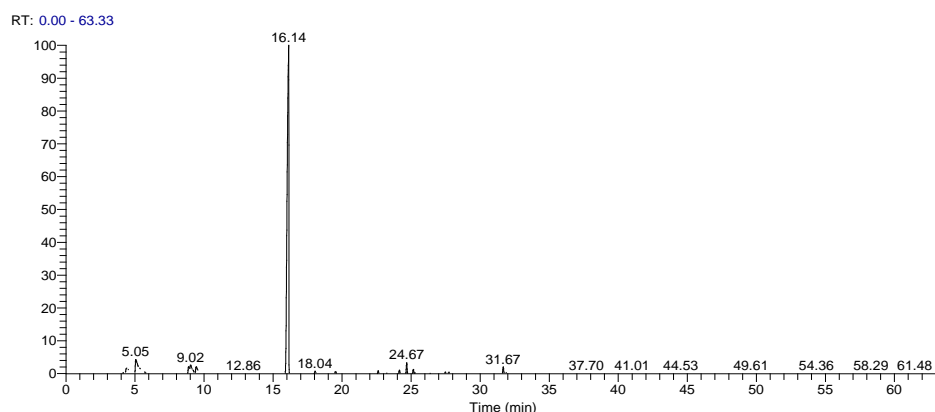
A/A	RI	RT	Συστατικό	Ad-1 %	Ad-2 %	Ad-A %
1	973	7,81	σαμπινένιο	13,89	17,24	-
2	980	8,18	<i>β</i> -πινένιο	2,36	-	-
3	1020	9,26	<i>α</i> -τερπινένιο	0,84	0,73	-
4	1034	9,72	λιμονένιο	-	-	2,46
5	1037	9,85	<i>Z</i> - <i>β</i> -οκιμένιο	0,84	-	-
6	1048	10,26	<i>E</i> - <i>β</i> -οκιμένιο	-	-	1,39
7	1063	10,83	<i>γ</i> -τερπινένιο	1,86	2,48	-
8	1188	16,19	τερπινεν-4-όλη	2,99	4,40	-
9	1204	16,92	εστραγόλη	0,57	0,51	84,45
10	1230	17,96	κιτρονελλόλη	0,66	-	-
11	1251	18,86	καρβόνη	-	-	0,78
12	1350	23,21	αιθανικός εστέρας κιτρονελλυλίου	2,70	2,27	-
13	1362	23,72	ευγενόλη	-	-	1,32
14	1378	24,46	αιθανικός εστέρας γερανυλίου	1,76	1,40	-
15	1408	25,75	μεθυλεστέρας κινναμμικού οξέος	-	-	1,30
16	1422	26,29	μεθυλο-ευγενόλη	26,64	28,39	3,45
17	1483	28,81	Δ γερμακρένιο	0,61	0,84	-
18	1484	28,88	<i>γ</i> -δεκαλακτόνη	-	-	0,74
19	1505	29,76	<i>E</i> -μεθυλο-ισοευγενόλη	2,32	1,00	-
20	1567	32,12	ελεμκίνη	19,95	20,46	-
21	1587	32,92	σπαθουλενόλη	2,26	1,87	2,23
22	1663	35,82	<i>Z</i>-ασαρόνη	13,11	14,90	-
Σύνολο %				93,36	95,97	98,10

Στο αιθέριο έλαιο του εστραγκόν από την Κοζάνη (δείγμα Ad-1) ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 48 συστατικά, από τα οποία παρουσιάζονται τα 16, που έδωσαν αξιοσημείωτο ποσοστό (> 0,5%) και αποτελούν το 93,36% του συνόλου. Μπορεί να χαρακτηριστεί αιθέριο έλαιο «μικτού» χημειότυπου μεθυλο-ευγενόλης (26,64%) και ελεμκίνης (19,95%). Άλλα συστατικά του ήταν το σαμπινένιο (13,89%), η *Z*-ασαρόνη (13,11%), η τερπινεν-4-όλη (2,99%), ο αιθανικός εστέρας κιτρονελλυλίου (2,70%), το *β*-πινένιο (2,36%), η *E*-μεθυλο-ισοευγενόλη (2,32%) και η σπαθουλενόλη (2,26%).

Στο αιθέριο έλαιο του εστραγκόν από το Μαραθώνα (δείγμα Ad-2) ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 28 συστατικά και παρουσιάζονται τα 12, που βρέθηκαν σε αξιοσημείωτο ποσοστό (> 0,5%) και αποτελούν το 98,10% του συνόλου. Το αιθέριο έλαιο χαρακτηρίζεται «μικτού» χημειότυπου μεθυλο-ευγενόλης (28,39%) και ελεμκίνης (20,46%). Ακολούθησαν το σαμπινένιο

(17,24%), η Z-ασαρόνη (14,90%), η τερπινεν-4-όλη (4,40%), το γ-τερπινένιο, ο αιθανικός εστέρας κίτρονελλυλίου (2,27%) και η σπαθουλενόλη (1,87%).

Τέλος, στο αιθέριο έλαιο του εστραγκόν από την αγορά της Αθήνας (δείγμα Ad-A) ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 14 πτητικά συστατικά και παρουσιάζονται τα 9 από αυτά με ποσοστό > 0,5% που αποτελούν το 95,97% του συνόλου. Το αιθέριο έλαιο χαρακτηρίζεται «καθαρού» χημειότυπου εστραγόλης (84,45%). Άλλα συστατικά του ήταν η μεθυλο-ευγενόλη (3,45%), το λιμονένιο (2,46%) και η σπαθουλενόλη (2,23%).



Σχήμα 18. Αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου εστραγκόν από την αγορά της Αθήνας,

RT: 16,14-εστραγόλη.

Συγκρίνοντας τα τρία δείγματα, παρατηρήθηκε ότι τα Ad-1 και Ad-2 είχαν παρόμοια χημική σύσταση με πολλές ποιοτικές και % ποσοτικές ομοιότητες όσον αφορά τα κύρια αλλά και τα δευτερεύοντα συστατικά τους. Αντιθέτως, το Ad-A έδωσε ένα τελείως διαφορετικό χημικό προφίλ με ένα πολύ μεγάλο ποσοστό εστραγόλης, που όπως έχει αναφερθεί είναι μια ένωση που παρουσιάζει τοξικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

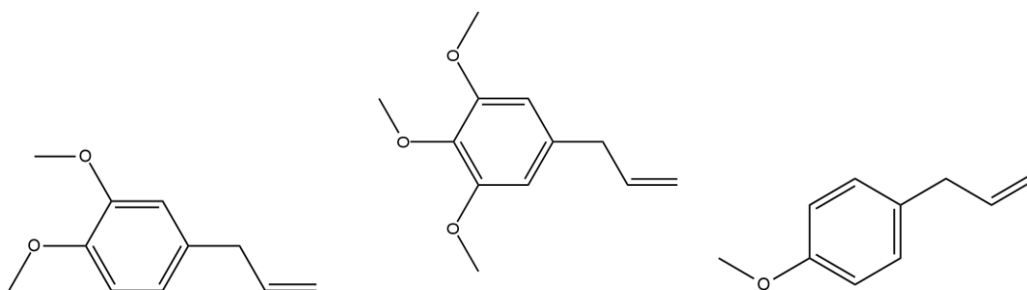
Πίνακας 21. Χημειότυποι αιθερίων ελαίων του εστραγκόν.

Δείγμα	Τύπος Χημειότυπου	Κύρια Συστατικά
Ad -1	μικτός	μεθυλο-ευγενόλη και ελεμκίνη
Ad -2	μικτός	μεθυλο-ευγενόλη και ελεμκίνη
Ad -A	καθαρός	εστραγόλη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του εστραγκόν είναι συνήθως η ελεμκίνη, το σαμπινένιο, η μεθυλο-ευγενόλη, η εστραγόλη, η τερπινεν-4-όλη, η 7-μεθοξύ-κουμαρίνη και το β-οκιμένιο (Heinrich, 2011). Έχουν επίσης αναφερθεί σαν κύρια συστατικά το λιμονένιο, η *trans*-ανηθόλη, (Sayyah et al., 2004), η Z-ασαρόνη, το τερπινολένιο, το β-πινένιο, η λιναλοόλη και το καπιλλένιο (Ayoughi et al., 2011; Aglarova, Zilfikarov, & Severtseva, 2008; Curini,

Epifano, & Genovese, 2006; Chauhan, Kitchlu, Ram, Kaul, & Tava, 2010; Lopes-lutz, Alviano, Alviano, & Kolodziejczyk, 2008).

Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν σε γενικές γραμμές με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά τα ποιοτικά και % ποσοτικά συστατικά του αιθερίου ελαίου. Επιπλέον, ο χημειότυπος των δειγμάτων Ad-1 και Ad-2 είναι πιο κοντά στο ρωσικό εστραγκόν με μικρότερη συγκέντρωση εστραγόλης και μεγαλύτερη μεθυλο-ευγενόλης, ενώ το δείγμα Ad-A μοιάζει χημειοτυπικά πιο πολύ με το γαλλικό εστραγκόν (Arabhosseini et al., 2006). Τέλος, είναι η πρώτη φορά που βρίσκεται η εστραγόλη να έχει τόσο υψηλό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο του εστραγκόν (Ad-A - 84,45%). Το πιο υψηλό ποσοστό μέχρι τώρα είχε βρεθεί σε έρευνα στη Γεωργία (82,06%) και τα αμέσως επόμενα σε αρκετά χαμηλότερα ποσοστά στη Γαλλία (Heinrich, 2011).



Σχήμα 19. Δομές των ενώσεων (από αριστερά) μεθυλο-ευγενόλη, ελεμικίνη και εστραγόλη.

3.2.8 Χημική σύσταση των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων του εστραγκόν

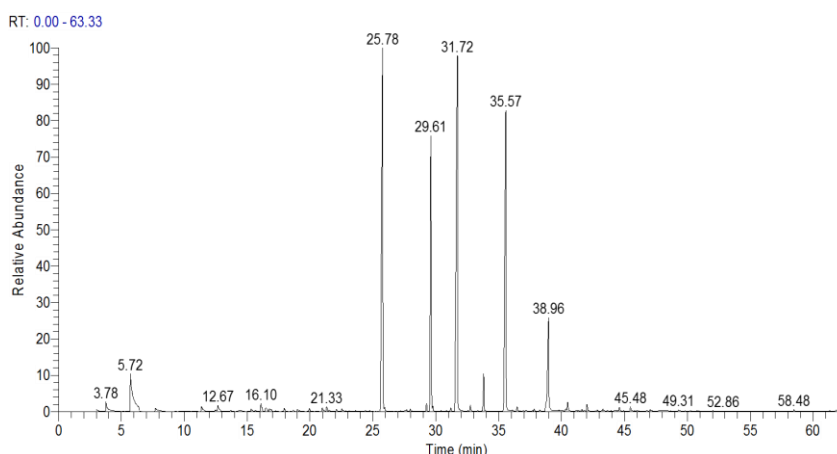
Στα αφεψήματα του εστραγκόν ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 27 πτητικά συστατικά και παρουσιάζονται 15 που έδωσαν αξιοσημείωτο ποσοστό (> 0,5%). Από αυτά, 2 συστατικά βρέθηκαν και στα τρία δείγματα, ενώ 10 βρέθηκαν σε ένα μόνο από αυτά.

Πίνακας 22. Τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων εστραγκόν, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης Kovats (RI).

A/A	RI	RT	Συστατικό	Ad-1 %	Ad-2 %	Ad-A %
1	973	7,72	σαμπινένιο	-	0,63	-
2	1076	11,38	<i>cis</i> -ενυδρο-σαμπινένιο	0,64	1,37	-
3	1105	12,67	<i>trans</i> -ενυδρο-σαμπινένιο	0,70	1,55	-
4	1186	16,10	τερπινεν-4-όλη	0,77	1,33	-
5	1210	17,16	εστραγόλη	-	-	38,43
6	1257	19,14	καρβόνη	-	-	0,91
7	1270	19,74	<i>para</i> -ανισαλδεΰδη	-	-	0,77
8	1360	23,63	ευγενόλη	-	0,56	1,03

9	1396	25,26	<i>E</i> -μεθυλεστέρας κινναμικού οξέος	-	-	0,71
10	1408	25,77	μεθυλο-ευγενόλη	27,53	15,30	2,23
11	1556	31,71	ελεμκίνη	30,29	23,70	-
12	1586	32,88	<i>E-para</i> -μεθοξυ-κινναμαλδεΐδη	-	-	1,67
13	1609	33,80	3,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΐδη	2,11	-	-
14	1657	35,56	<i>Z</i>-ασαρόνη	23,47	18,54	-
15	1749	38,96	7-μεθοξυ-κουμαρίνη	11,46	33,93	53,82
			Σύνολο %	96,95	96,89	99,58

Στο αφέψημα του εστραγκόν από την Κοζάνη (δείγμα Ad-1) ανιχνεύθηκαν 21 συστατικά, εκ των οποίων τα 8 σε ποσοστό > 0,5% που αποτελούν το 96,95% του συνόλου. Κυριότερα ήταν η ελεμκίνη (30,29%), η μεθυλο-ευγενόλη (27,53%), η *Z*-ασαρόνη (23,47%) και ακολούθησαν η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη (11,46%) και η 3,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΐδη (2,11%). Συγκρίνοντας τα συστατικά του αφεψήματος με το αντίστοιχο αιθέριο έλαιο, τα κύρια συστατικά είναι κοινά με την εξαίρεση της εμφάνισης της 7-μεθοξυ-κουμαρίνης, που εξαιτίας της υδατοδιαλυτότητας της, εμφανίστηκε στο αφέψημα σε αξιοσημείωτο ποσοστό.



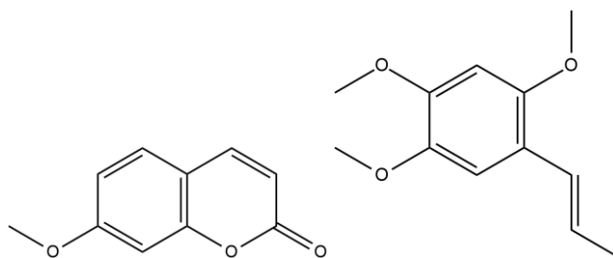
Σχήμα 20. Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών αφεψήματος εστραγκόν (Ad-1).

Στο αφέψημα του εστραγκόν από το Μαραθώνα (δείγμα Ad-2), ταυτοποιήθηκαν 14 συστατικά, 12 από τα οποία σε αξιοσημείωτο ποσοστό (> 0,5%), που αποτελούν το 99,58% του συνόλου. Τα κύρια ήταν η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη (33,93%), η ελεμκίνη (23,70%), η *Z*-ασαρόνη (18,54%), η μεθυλο-ευγενόλη (15,30%) και ακολούθησαν το *trans*-ένυδρο-σαμπινένιο (1,55%), το *cis*-ένυδρο-σαμπινένιο (1,37%) και η τερπινεν-4-όλη (1,33%). Ομοίως με το δείγμα Ad-1, τα κύρια συστατικά είναι τα ίδια με αυτά του αιθερίου ελαίου, εκτός από την ένωση της 7-μεθοξυ-κουμαρίνης που εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό.

Τέλος, στο αφέψημα του εστραγκόν από την αγορά της Αθήνας (δείγμα Ad-A) ταυτοποιήθηκαν 9 συστατικά, με τα 8 να βρίσκονται σε ποσοστό > 0,5% και να αποτελούν το 96,89% του συνόλου. Το μεγαλύτερο ποσοστό βρέθηκε να έχει η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη (53,82%) και η εστραγόλη (38,43%) και ακολούθησαν η μεθυλο-ευγενόλη (2,23%), η *E-para*-μεθοξυ-κινναμαλδεΰδη (1,67%) και η ευγενόλη (1,03%). Συγκρίνοντας με το αιθέριο έλαιο, εμφανίζονται σε γενικές γραμμές τα ίδια κύρια συστατικά με εξαίρεση την εμφάνιση στο αφέψημα της 7-μεθοξυ-κουμαρίνης.

Όπως και στην περίπτωση των αιθερίων ελαίων του εστραγκόν, έτσι και στα αφεψήματα, τα δείγματα Ad-1 και Ad-2 παρουσίασαν πολλές ποιοτικές και % ποσοτικές ομοιότητες, σε αντίθεση με το δείγμα από την αγορά της Αθήνας (Ad-A) που εμφάνισε διαφορετική χημική σύσταση. Και στα τρία δείγματα, η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη ήταν κυρίαρχο συστατικό.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το εστραγκόν ανήκει στην ομάδα των ειδών του γένους *Artemisia* που έχουν > 1% κουμαρίνες. Το παράγωγο της κουμαρίνης, 7-μεθοξυ-κουμαρίνη είναι συστατικό του αιθερίου ελαίου του εστραγκόν (Aglarova et al., 2008), οπότε πιθανότατα λόγω της υδατοδιαλυτότητας της, βρέθηκε σε αξιόλογα ποσοστά στα αφεψήματα και όχι στα αιθέρια έλαια (Heinrich, 2011). Επιπλέον, σύμφωνα με την έρευνα του (Heinrich, 2011), τα υδατικά εκχυλίσματα του εστραγκόν περιέχουν πολύ μικρή ποσότητα εστραγόλης και μεθυλο-ευγενόλης, όμως στα αποτελέσματα της μελέτης αυτής βρέθηκε μεγάλο ποσοστό εστραγόλης στο αφέψημα (Ad-A – 38,43%) κι έτσι χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της στο αφέψημα.



Σχήμα 21. Δομές των ενώσεων 7-μεθοξυ-κουμαρίνη και *Z*-ασαρόνη.

3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός α - και β -θουγιόνης και καμφοράς

Διάφοροι ευρωπαϊκοί και διεθνείς οργανισμοί, όπως οι EMA, SCF, NTP έχουν θεσπίσει όρια για την κατανάλωση κάποιων βοτάνων και των προϊόντων που τα περιέχουν. Κι αυτό γιατί τα βότανα αυτά περιέχουν ενώσεις που έχουν χαρακτηριστεί ως τοξικές. Για το λόγο αυτό, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των ενώσεων αυτών στα βότανα, στα αιθέρια έλαια αλλά και στα αφεψήματα τους. Στον ελλαδικό χώρο, η ανάγκη αυτή είναι ακόμα μεγαλύτερη λόγω της μακράς

παράδοσης της χρήσης των βοτάνων από τον άνθρωπο αλλά και λόγω της ιδιαίτερα πλούσιας βιοποικιλότητας του. Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της α - και β -θουγιόνης αλλά και της καμφοράς, που όπως έχει προαναφερθεί, είναι δύο ενώσεις που παρουσιάζουν τοξικότητα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς των συστατικών.

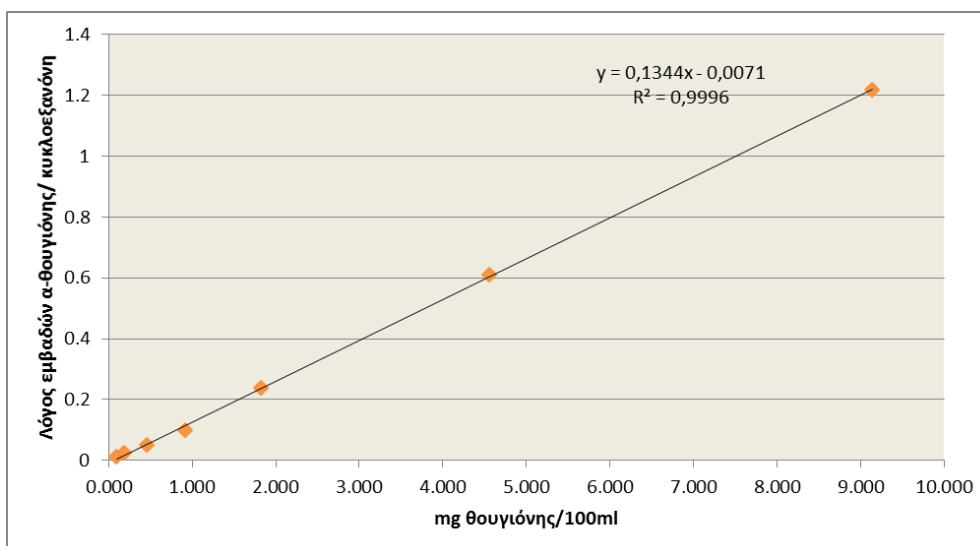
3.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός α - και β -θουγιόνης

Μετά από την ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων αλλά και των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων τους, ανιχνεύθηκε α -θουγιόνη ή/και β -θουγιόνη σε κάποια από τα δείγματα αψιθιάς και αχιλλέας, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στο χαμομήλι ούτε στο εστραγκόν. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται τα ποσοστά που ανιχνεύθηκαν στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 23. Τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε α - ή/και β -θουγιόνη, η προέλευση τους και τα αντίστοιχα ποσοστά τους.

Δείγμα	Φυτικό υλικό	Προέλευση	α -θουγιόνη %		β -θουγιόνη %	
			Αιθέριο έλαιο	Αφέψημα	Αιθέριο έλαιο	Αφέψημα
Aa-1	αψιθιά	Κοζάνη	-	-	1,37	-
Aa-3	αψιθιά	Ιεράπετρα	0,99	1,65	42,88	83,20
Aa-A	αψιθιά	Αγορά της Αθήνας	0,52	0,13	8,75	5,34
Am-1	αχιλλέα	Κοζάνη	6,58	8,00	5,75	3,88
Am-3	αχιλλέα	Χαλκιδική	-	-	4,17	3,83
Am-A	αχιλλέα	Αγορά της Αθήνας	0,27	0,53	0,37	-

Στη συνέχεια, με τη χρήση των πρότυπων καμπυλών αναφοράς που κατασκευάστηκαν, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση (mg/mL) της α - και β -θουγιόνης για το αιθέριο έλαιο και το αφέψημα κάθε δείγματος.



Σχήμα 22. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (mg/mL) της α - και β -θουγιόνης.

Πίνακας 24. Η συγκέντρωση (mg/mL) της α - και β -θουγιόνης για τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε, στο αιθέριο έλαιο και το αντίστοιχο αφέψημα τους.

Δείγμα	Φυτικό υλικό	Προέλευση	α -θουγιόνη mg/mL		β -θουγιόνη mg/mL	
			Αιθέριο έλαιο	Αφέψημα	Αιθέριο έλαιο	Αφέψημα
Aa-1	απιθιά	Κοζάνη	-	-	0,03	-
Aa-3	απιθιά	Ιεράπετρα	0,10	0,010	9,98	0,170
Aa-A	απιθιά	Αγορά της Αθήνας	0,01	0,008	0,13	0,014
Am-1	αχιλλέα	Κοζάνη	0,44	0,016	0,15	0,033
Am-3	αχιλλέα	Χαλκιδική	-	-	0,04	0,004
Am-A	αχιλλέα	Αγορά της Αθήνας	0,005	0,002	0,007	-

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 24, η συγκέντρωση της β -θουγιόνης ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερη από αυτήν της α -θουγιόνης. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το δείγμα της αχιλλέας από την Κοζάνη (Am-1), όπου βρέθηκαν α - και β -θουγιόνη αλλά η συγκέντρωση της α - ήταν μεγαλύτερη.

Όπως ήταν αναμενόμενο, σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση της α - και β -θουγιόνης στο αιθέριο έλαιο ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτήν του αντίστοιχου αφεψήματος με το 90% ή και περισσότερο της συγκέντρωσης να μειώνεται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της σημασίας του υπολογισμού της συγκέντρωσης (mg/mL) αποτελεί το δείγμα από την Ιεράπετρα (Aa-3), όπου στον % ποσοτικό προσδιορισμό της β -θουγιόνης το αιθέριο έλαιο είχε 42,88% και το αφέψημα σχεδόν το

διπλάσιο, 83,20% αλλά πάντα σε σχέση με τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, αφού τελικά η συγκέντρωση του στο αφέψημα ήταν πολύ μικρότερη.

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση με διαφορά βρέθηκε στο δείγμα της αψιθιάς από την Ιεράπετρα. Αυτή η συγκέντρωση συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη που έδειξε ότι η συγκέντρωση της α - και β -θουγιόνης σε δείγματα αψιθιάς από τον ελλαδικό χώρο είναι υψηλότερη στη Ν. Ελλάδα. (Σωτηροπούλου Νεφέλη, 2014). Επιπλέον, σύμφωνα με την EMA, η συγκέντρωση της θουγιόνης είναι μεγαλύτερη στα φυτά που αναπτύσσονται σε υψόμετρο χαμηλότερο των 1000 m. (EMA, 2009).

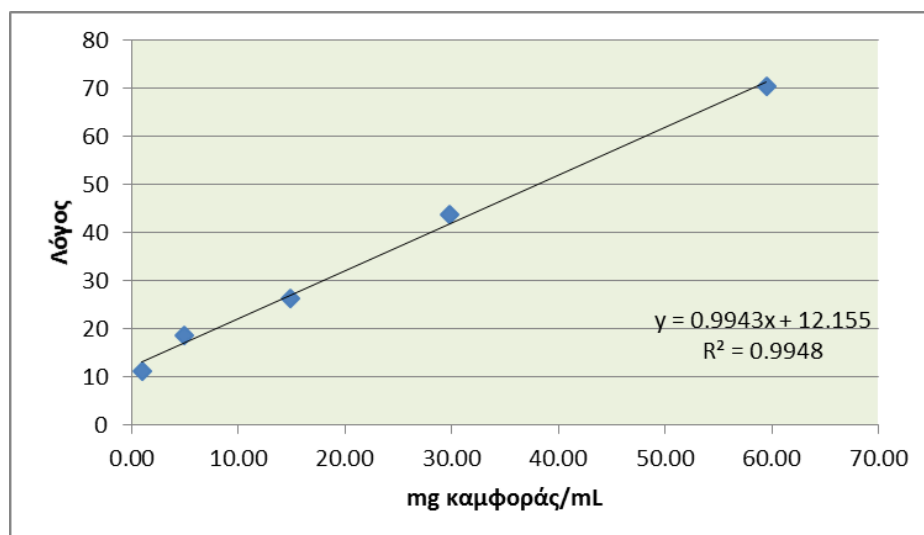
3.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός καμφοράς

Μετά από την ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων αλλά και των πτητικών συστατικών των αφεψημάτων τους, ανιχνεύθηκε καμφορά σε κάποια από τα δείγματα αχιλλέας και αψιθιάς, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στο χαμομήλι ούτε στο εστραγκόν. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται τα ποσοστά που ανιχνεύθηκαν (> 0,5%) στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 25. Τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε καμφορά, η προέλευση τους και τα αντίστοιχα ποσοστά τους.

Δείγμα	Φυτικό υλικό	Προέλευση	καμφορά %	
			Αιθέριο έλαιο	Αφέψημα
Aa-1	αψιθιά	Κοζάνη	0,62	-
Aa-A	αψιθιά	αγορά της Αθήνας	1,49	1,56
Am-1	αχιλλέα	Κοζάνη	11,62	14,44
Am-2	αχιλλέα	Αργίριο	2,48	5,58
Am-3	αχιλλέα	Χαλκιδική	2,15	3,21
Am-A	αχιλλέα	Αγορά της Αθήνας	14,86	18,43

Στη συνέχεια, με τη χρήση των πρότυπων καμπυλών αναφοράς που κατασκευάστηκαν, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση (mg/mL) της καμφοράς για το αιθέριο έλαιο και το αφέψημα κάθε δείγματος.



Σχήμα 23. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (mg/mL) της καμφοράς.

Πίνακας 26. Η συγκέντρωση (mg/mL) της καμφοράς για τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε, στο αιθέριο έλαιο και το αντίστοιχο αφέψημα τους.

Δείγμα	Φυτικό υλικό	Προέλευση	καμφορά (mg/mL)	
			Αιθέριο έλαιο	Αφέψημα
Aa-1	αψιθιά	Κοζάνη	0,02	-
Aa-A	αψιθιά	αγορά της Αθήνας	0,08	0,014
Am-1	αχιλλέα	Κοζάνη	0,97	0,344
Am-2	αχιλλέα	Αργίνιο	0,07	0,021
Am-3	αχιλλέα	Χαλκιδική	0,06	0,014
Am-A	αχιλλέα	Αγορά της Αθήνας	0,80	0,100

Όπως παρατηρείται, μεγαλύτερη συγκέντρωση καμφοράς βρέθηκε στα δείγματα της αχιλλέας, όπου ανιχνεύθηκε και στα τέσσερα δείγματα και πολύ μικρότερη στα δύο από τα τέσσερα δείγματα της αψιθιάς. Αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού η καμφορά είναι ένα από τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου της αχιλλέας (Oran et al., 2016).

Σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση της καμφοράς στο αιθέριο έλαιο ήταν μεγαλύτερη από αυτήν του αντίστοιχου αφεψήματος. Σε αντίθεση όμως με την α - και β -θουγιόνη, η διαφορά τους δεν είναι τόσο μεγάλη και χάνεται το 65-80%. Αυτό μπορεί να φανεί και στα % ποσοστά της καμφοράς όπου στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερα στο αφέψημα.

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση βρέθηκε στο δείγμα της αχιλλέας από την Κοζάνη και ακολούθησε το δείγμα από την αγορά της Αθήνας (Aa-A). Αν και το % ποσοστό της καμφοράς ήταν μεγαλύτερο στο δείγμα Am-A, η συγκέντρωση ήταν τελικά μεγαλύτερη στο δείγμα Am-1.

3.4 Ερμηνεία φασμάτων FT-IR

Παρελήφθησαν τα φάσματα FT-IR για κάθε ένα από τα δείγματα των τεσσάρων φυτικών ειδών με τρεις ή και περισσότερες επαναλήψεις για το καθένα. Ακολούθησε η επεξεργασία των φασμάτων (αφαίρεση CO₂, εξομάλυνση σήματος, διόρθωση της βασικής γραμμής και δημιουργία του μέσου φάσματος από τα φάσματα-επαναλήψεις). Προέκυψαν 14 τελικά φάσματα, ένα για κάθε δείγμα φυτικού υλικού. Σκοπός ήταν να γίνει σύγκριση των δειγμάτων με βάση την περιοχή των δακτυλικών τους αποτυπωμάτων (περιοχή 1500-800 cm⁻¹) που αλλάζει ανάλογα με την ποιοτική και ποσοτική χημική σύσταση ενός δείγματος και να γίνει περαιτέρω σύγκριση των δειγμάτων που ανήκαν στο ίδιο φυτικό είδος. Δημιουργήθηκε έτσι μια βιβλιοθήκη στο πρόγραμμα OMNIC που περιείχε όλα τα φάσματα και με βάση αυτήν υπολογίστηκε ο % συντελεστής ομοιότητας των φασμάτων.

Πίνακας 27. Συντελεστής ομοιότητας φασμάτων FT-IR (%).

Δείγμα	Mc-1	Mc-2	Mc-A	Aa-1	Aa-2	Aa-3	Aa-A	Am-1	Am-2	Am-3	Am-A	Ad-1	Ad-2	Ad-A
Mc-1	100	97,80	99,16	90,91	93,53	83,25	94,83	96,71	70	94,59	96	91,53	91,94	95,21
Mc-2	97,80	100	97,71	90,01	94,26	85,32	95,42	95,87	70,51	96,67	96,04	94,42	93,43	96,48
Mc-A	99,16	97,71	100	91,71	94,14	84,10	96,15	96,63	70,66	94,29	96,23	91,76	91,02	95,37
Aa-1	90,91	90,01	91,71	100	95,71	84,74	96,06	94,99	67,05	89,16	94,66	88,85	85,73	86,11
Aa-2	93,53	94,26	94,14	95,71	100	88,01	96,09	95,60	70,61	92,13	93,21	92,49	90,04	91,12
Aa-3	83,25	85,32	84,10	84,74	88,01	100	87,20	86,04	62,95	87,36	85,76	82,42	80,59	80,86
Aa-A	94,83	95,42	96,15	96,06	96,09	87,20	100	96,95	71,14	93,75	96,49	94,30	89,48	93,10
Am-1	96,71	95,87	96,63	94,99	95,60	86,04	96,95	100	69,72	92,52	97,38	93,08	90,05	91,42
Am-2	70	70,51	70,66	67,05	70,61	62,95	71,14	69,72	100	69,80	69,44	68,67	66,86	69,80
Am-3	94,59	96,67	94,29	89,16	92,13	87,36	93,75	92,52	69,80	100	94,81	93,57	94,81	94,63
Am-A	96	96,04	96,23	94,66	93,21	85,76	96,49	97,38	69,44	94,81	100	90,33	90,57	90,75
Ad-1	91,53	94,42	91,76	88,85	92,49	82,42	94,30	93,08	68,67	93,57	90,33	100	92,29	95,58
Ad-2	91,94	93,43	91,02	85,73	90,04	80,59	89,48	90,05	66,86	94,81	90,57	92,29	100	92,66
Ad-A	95,21	96,48	95,37	86,11	91,12	80,86	93,10	91,42	69,80	94,63	90,75	95,58	92,66	100

Στον **Πίνακα 27** παρουσιάζεται ο % συντελεστής ομοιότητας των φασμάτων. Ακολουθώντας στον πίνακα τη σειρά και τη στήλη δύο δειγμάτων, το σημείο τομής τους ορίζει το ποσοστό στο οποίο παρουσίασαν ομοιότητες τα φάσματα τους σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Όντας όλα δείγματα φυτικών ειδών που ανήκουν στην ίδια οικογένεια και περαιτέρω στην ίδια υποοικογένεια και φυλή, είναι αναμενόμενο να παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές μεγάλο συντελεστή ομοιότητας.

Τα τρία δείγματα χαμομηλιού παρουσίασαν περισσότερες ομοιότητες μεταξύ τους από ότι με όλα τα δείγματα των υπόλοιπων φυτικών ειδών. Πιο συγκεκριμένα, το φάσμα του δείγματος Mc-1 παρουσίασε ομοιότητες με αυτό του δείγματος Mc-A σε ποσοστό 99,16% και με αυτό του Mc-2 σε

ποσοστό 97,80%, ενώ ακολούθησαν περισσότερες ομοιότητες με τα δείγματα Am-1, Am-3 και Am-A της αχιλλέας. Τις λιγότερες ομοιότητες είχε με το δείγμα Am-2 της αχιλλέας από το Αγρίνιο και το Aa-3 της αψιθιάς από την Ιεράπετρα. Ανάλογα ποσοστά έδωσαν και τα άλλα δύο δείγματα χαμομηλιού Mc-2 και Mc-A. Και τα δύο δείγματα παρουσίασαν περισσότερες ομοιότητες με το Mc-1 και λιγότερες ξανά με τα Am-2 και Aa-3.

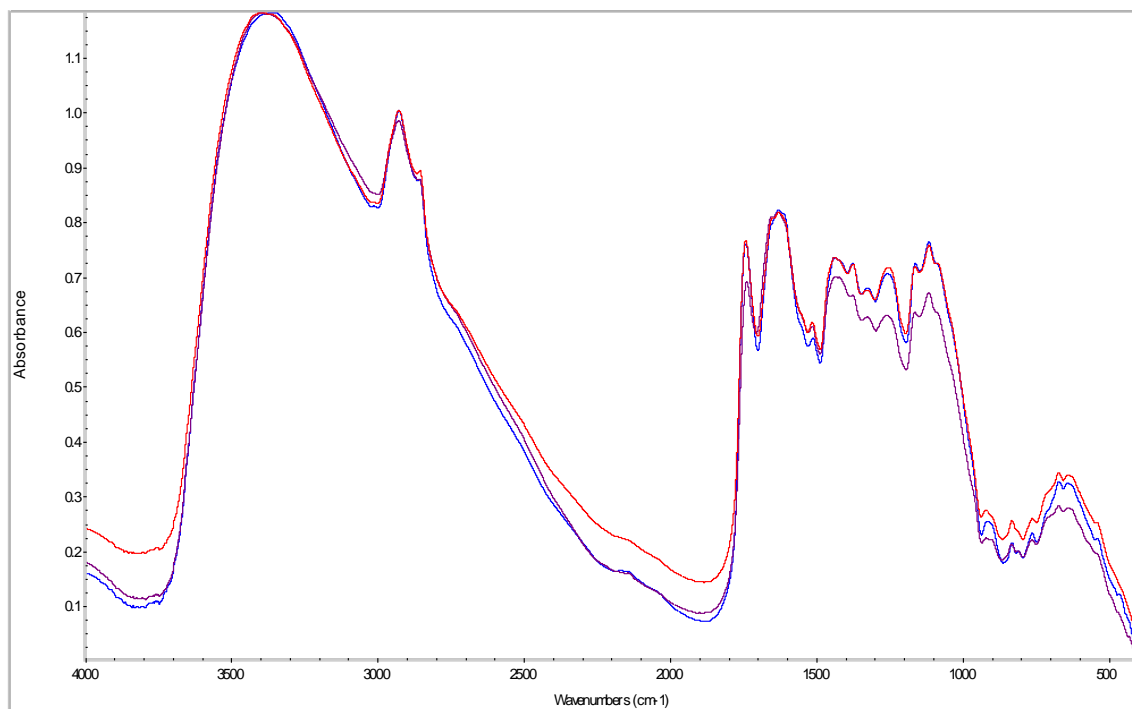
Τα δείγματα της αψιθιάς Aa-1, Aa-2 και Aa-A παρουσίασαν περισσότερες ομοιότητες μεταξύ τους σε αντίθεση με το Aa-3 του οποίου το φάσμα διέφερε σε μεγάλο ποσοστό με τα υπόλοιπα. Πιο αναλυτικά, το δείγμα Aa-1 είχε περισσότερες ομοιότητες με το Aa-A (96,06%) και στη συνέχεια με το Aa-1 (95,71%). Ακολούθησαν τα περισσότερα από τα δείγματα της αχιλλέας, τα δείγματα του χαμομηλιού, ενώ με τα φάσματα του εστραγκόν έμοιαζε λιγότερο συγκριτικά με τα υπόλοιπα φυτικά είδη. Το μικρότερο συντελεστή ομοιότητας είχε με τα δείγματα Am-2 (67,05%) και Aa-3 (84,74%). Το δείγμα Aa-2 είχε παρόμοια εικόνα με περισσότερες ομοιότητες με τα Aa-A και Aa-1, λιγότερες με τα δείγματα του εστραγκόν και τα μικρότερα ποσοστά με τα δείγματα Am-2 και Aa-3. Ενδιαφέρον παρουσίασαν τα ποσοστά του δείγματος Aa-3 που ενώ όλα τα φάσματα των δειγμάτων είχαν μικρό ποσοστό ομοιότητας με αυτό, το ίδιο έμοιαζε περισσότερο με τα δείγματα της αψιθιάς Aa-2 (88,01%) και Aa-A (87,20%), αν και τα ποσοστά αυτά ήταν αναλογικά χαμηλότερα. Το μικρότερο ποσοστό ομοιότητας είχε με το Am-2 (62,95%). Τέλος, το δείγμα Aa-A από την αγορά της Αθήνας, παρουσίασε περισσότερες ομοιότητες με τα δείγματα της αχιλλέας και του χαμομηλιού από ότι με τα υπόλοιπα δείγματα της αψιθιάς.

Όσον αφορά τα δείγματα της αχιλλέας εμφάνισαν σε γενικές γραμμές μεγάλο ποσοστό διαφορών μεταξύ τους συγκρινόμενα με τα υπόλοιπα φυτικά είδη. Το δείγμα Am-1 βρέθηκε να έχει τις περισσότερες ομοιότητες με το Am-A από την αγορά της Αθήνας (97,38%). Στη συνέχεια, παρουσίασε περισσότερες ομοιότητες με τα δείγματα του χαμομηλιού και τα περισσότερα από αυτά της αψιθιάς από ότι με το Am-3 της αχιλλέας από τη Χαλκιδική, ενώ ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τις λιγότερες ομοιότητες είχε με το φάσμα του Am-2 (69,72%). Το δείγμα της αχιλλέας από το Αγρίνιο (Am-2) παρουσίασε το χαμηλότερο συντελεστή ομοιότητας από όλα τα δείγματα. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το φάσμα του είχε περισσότερες ομοιότητες με αυτά της αψιθιάς και του χαμομηλιού από ότι με τα υπόλοιπα δείγματα της αχιλλέας, ενώ τις λιγότερες ομοιότητες είχε με το δείγμα Aa-3. Το δείγμα Am-3 είχε τις περισσότερες ομοιότητες με το δείγμα Mc-2 του χαμομηλιού και στη συνέχεια με το Am-A, ενώ τις λιγότερες με τα δείγματα Am-2 και Aa-3. Τέλος, το δείγμα Am-A από την αγορά της Αθήνας εμφάνισε το μεγαλύτερο συντελεστή ομοιότητας με το δείγμα Am-1 (97,38%) και το μικρότερο με το Am-2 (69,44%).

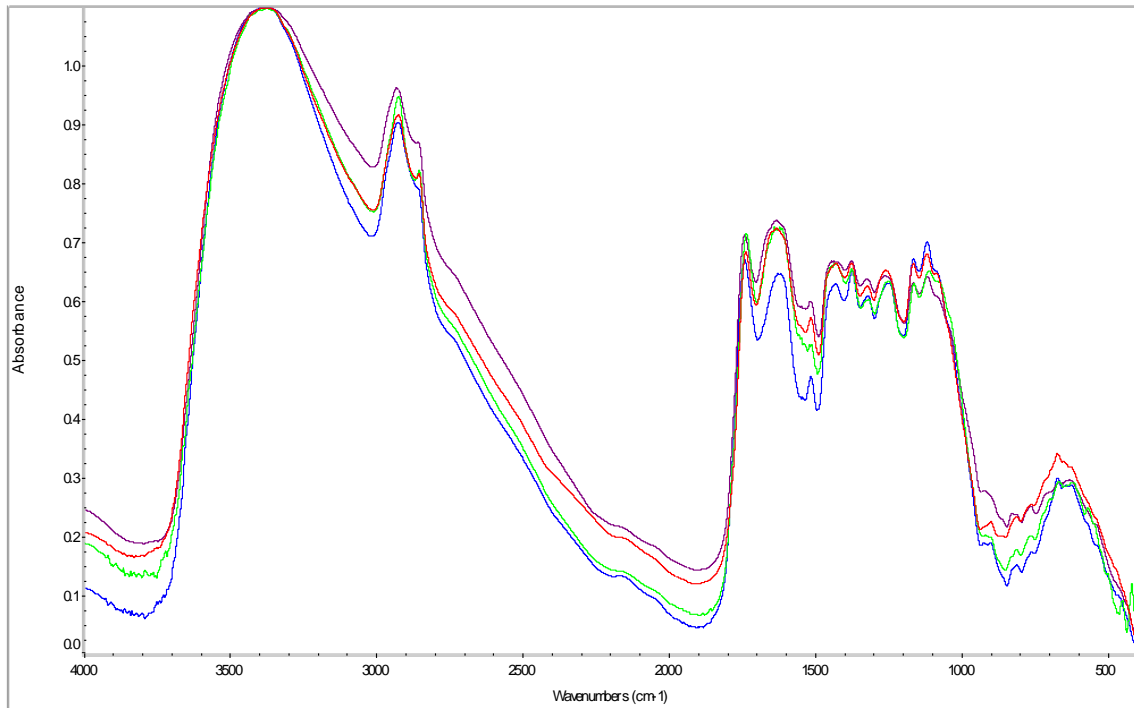
Τα φάσματα των δειγμάτων του εστραγκόν είχαν επίσης αρκετές διαφορές μεταξύ τους. Το δείγμα Ad-1 παρουσίασε τις περισσότερες ομοιότητες με το Ad-A (95,58%) και τις λιγότερες με το Am-2 (68,67%). Το Ad-2 έμοιαζε περισσότερο με το Am-3 (94,81%) και το Mc-2 (93,43%) από ότι με τα

υπόλοιπα δείγματα του εστραγκόν, Ad-A (92,66%) και Ad-1 (92,29%). Τέλος, το Ad-A είχε περισσότερες ομοιότητες με το δείγμα Mc-2 του χαμομηλιού, στη συνέχεια με το Ad-1, ακολούθησαν τα υπόλοιπα δείγματα του χαμομηλιού και μετά το Ad-2 του εστραγκόν. Ξανά, όλα τα δείγματα παρουσίασαν τις περισσότερες διαφορές με τα δείγματα Am-2 και Aa-3.

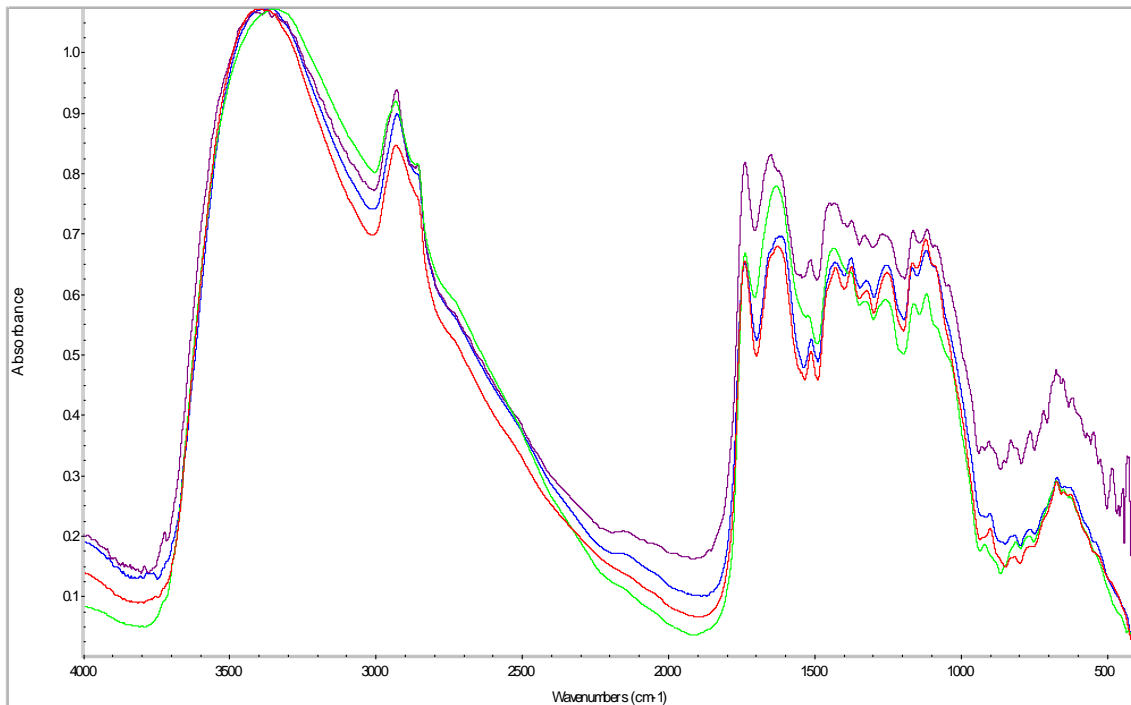
Ανακεφαλαιώνοντας, τα δείγματα των ειδών που ήταν πιο όμοια μεταξύ τους ήταν τα δείγματα του χαμομηλιού και της αψιθιάς και λιγότερο της αχιλλέας και του εστραγκόν. Το χαμομήλι εμφάνισε περισσότερες ομοιότητες με την αχιλλέα, στη συνέχεια με το εστραγκόν και λιγότερες με την αψιθιά. Η αψιθιά επίσης είχε πιο πολλές ομοιότητες με την αχιλλέα, με το χαμομήλι και λιγότερες με το εστραγκόν. Τα φάσματα της αχιλλέας ήταν πιο κοντά με αυτά της αψιθιάς και λιγότερο με αυτά του χαμομηλιού και του εστραγκόν, ενώ το εστραγκόν είχε περισσότερες ομοιότητες με το χαμομήλι και λιγότερες με την αχιλλέα και την αψιθιά. Τέλος, τα φάσματα που είχαν το μεγαλύτερο συντελεστή ομοιότητας ήταν τα Mc-1 και Mc-A (99,16%) και το μικρότερο τα Am-2 και Aa-3 (62,95%), τα οποία εμφάνισαν σημαντικές διαφορές και με όλα τα υπόλοιπα φάσματα.



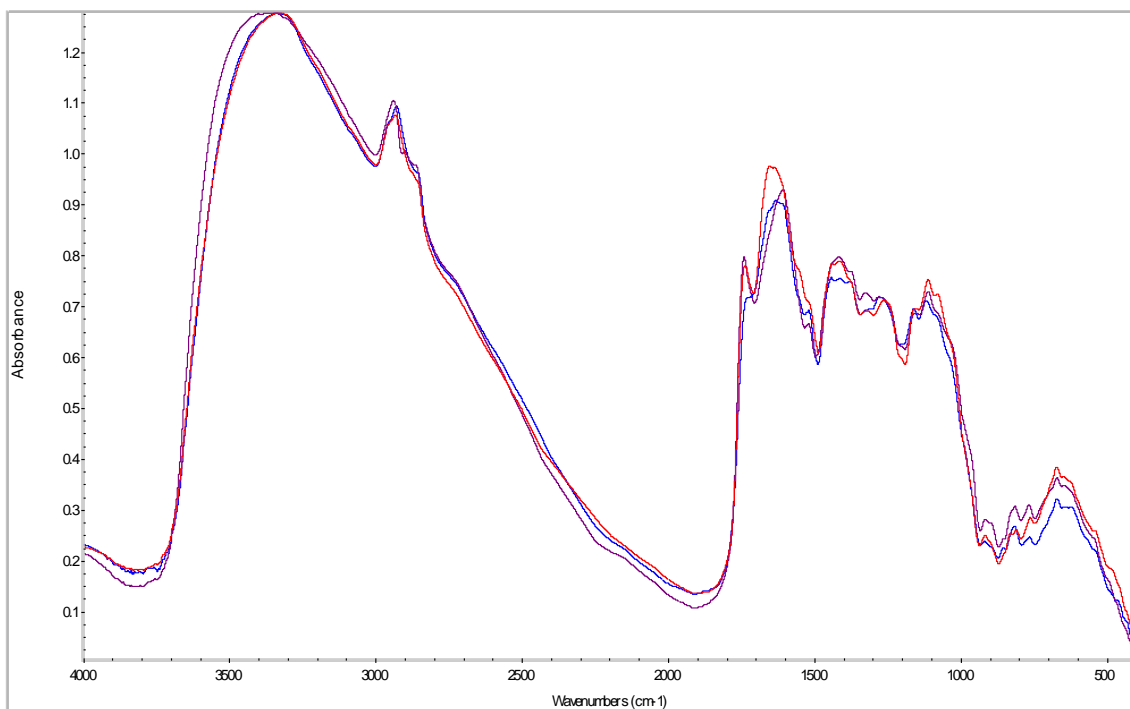
Σχήμα 24. Φάσματα FT-IR των τριών δειγμάτων χαμομηλιού, Mc-1 (μπλε χρώμα), Mc-2 (μωβ χρώμα) και Mc-A (κόκκινο χρώμα).



Σχήμα 25. Φάσματα FT-IR των τεσσάρων δειγμάτων αγιθιάς, Aa-1 (μπλε χρώμα), Aa-2 (μωβ χρώμα), Aa-3 (πράσινο) και Aa-A (κόκκινο χρώμα).



Σχήμα 26. Φάσματα FT-IR των τεσσάρων δειγμάτων αγιλλέας, Am-1 (μπλε χρώμα), Am-2 (μωβ χρώμα), Am-3 (πράσινο) και Am-A (κόκκινο χρώμα).



Σχήμα 27. Φάσματα FT-IR των τριών δειγμάτων εστραγκόν, Ad-1 (μπλε χρώμα), Ad-2 (μωβ χρώμα) και Ad-A (κόκκινο χρώμα).

3.5 Εκτίμηση της τοξικότητας με το σύστημα ανάλυσης Microtox®

Στο σύστημα ανάλυσης Microtox® αναλύθηκαν τα αφεψήματα για κάθε ένα από τα δείγματα των τεσσάρων φυτικών ειδών. Όπως έχει προαναφερθεί, το σύστημα Microtox® εκτιμά την τοξικότητα υδατικών διαλυμάτων.

Όλα τα αφεψήματα αρχικά αναλύθηκαν στην αρχική τους συγκέντρωση (10 mg/mL) και έπειτα επιλέχθηκε η κατάλληλη πρωταρχική αραιώση για κάθε δείγμα ξεχωριστά, έτσι ώστε να μπορεί να είναι υπολογίσιμη η συγκέντρωση EC_{50} του δείγματος στην οποία έχουμε 50% αναστολή της βιοφωταύγειας του *Vibrio fischeri*. Κατά αυτόν τον τρόπο, η πρωταρχική αραιώση για κάθε δείγμα αποτελεί μέρος των αποτελεσμάτων και συνυπολογίζεται στην τελική ένδειξη της βιοδραστικότητας του. Έγιναν αραιώσεις πολύ μεγάλες (0,08 ml αφεψήματος / 10 ml για το Ad-2) έως και πολύ μικρές (8 ml αφεψήματος / 10 ml για το Aa-A).

Πίνακας 28. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με το σύστημα Microtox® για όλα τα δείγματα και των τεσσάρων φυτικών ειδών.

Δείγμα	Αρχικές αραιώσεις (mL αφεψήματος/εμφιαλωμένο νερό)	Συγκέντρωση (mg/mL) του ξηρού φυτικού υλικού του αραιωμένου υδατικού εκχυλίσματος	EC ₅₀ μετά από έκθεση 15 min (%)	Συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της φωτούγειας μετά από 15 min (mg ξηρού φυτικού υλικού/mL αφεψήματος)	Συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της φωτούγειας μετά από 15 min (mg ξηρού φυτικού υλικού/200mL αφεψήματος)
<i>Matricaria chamomilla</i> (Mc-1)	1 / 10	1	6,56%	0,0656	13,12
<i>Matricaria chamomilla</i> (Mc-2)	0,5 / 10	0,5	9,13%	0,0457	9,13
χαμομήλι (Mc-A)	1 / 10	1	13,93%	0,1393	27,86
<i>Artemisia absinthium</i> (Aa-1)	7 / 10	7	32,07%	2,2449	448,98
<i>Artemisia absinthium</i> (Aa-2)	7 / 10	7	39,36%	2,7552	551,04
<i>Artemisia absinthium</i> (Aa-3)	8 / 10	8	31,73%	2,5384	507,68
αψιθιά (Aa-A)	8 / 10	7	22,30%	1,561	312,20
<i>Achillea millefolium</i> (Am-1)	5 / 10	5	11,30%	0,565	113,00
<i>Achillea millefolium</i> (Am-2)	8 / 10	8	34,50%	2,76	552,00
<i>Achillea millefolium</i> (Am-3)	5 / 10	5	16,32%	0,816	163,20
αχιλλέα (Am-A)	5 / 10	5	11,37%	0,5685	113,70
<i>Artemisia dracunculus</i> (Ad-1)	0,1 / 10	0,1	5,16%	0,0052	1,04
<i>Artemisia dracunculus</i> (Ad-2)	0,08 / 10	0,08	16,07%	0,0129	2,58
εστραγκόν (Ad-A)	1 / 10	1	26,94%	0,2694	53,88

Στον **Πίνακα 28**, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης όλων των δειγμάτων. Όπως παρατηρείται, η βιοδραστικότητα ήταν ανάλογη του φυτικού είδους με το εστραγκόν να εμφανίζει τη μεγαλύτερη, στη συνέχεια το χαμομήλι, η αχιλλέα και τέλος η αψιθιά τη μικρότερη. Εξαιρεση αποτέλεσε το εστραγκόν από την αγορά της Αθήνας (Ad-A) που εμφάνισε μικρότερη ένδειξη τοξικότητας από τα δείγματα του χαμομηλιού και η αχιλλέα από το Αγρίνιο (Am-2) που βρέθηκε να έχει μικρότερη από τα δείγματα της αψιθιάς. Αυτές όμως οι διαφορές ήταν αναλογικά μικρές και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι συνολικά για κάθε φυτικό είδος το *Vibrio fischeri* είχε παρόμοια απόκριση όσον αφορά την αναστολή της βιοφωταύγειας του.

Συγκρίνοντας τα δείγματα του χαμομηλιού μεταξύ τους, μεγαλύτερη ένδειξη τοξικότητας εμφάνισε το Mc-2 από τα Τρίκαλα, ακολούθησε το Mc-1 από την Καρδίτσα και τελευταίο ήταν το

Mc-A από την αγορά της Αθήνας που εμφάνισε με διαφορά τη μικρότερη συγκριτικά με τα άλλα δύο δείγματα.

Τα δείγματα της αφιθιάς εμφάνισαν σχετικά μικρές διαφορές μεταξύ τους με τη μεγαλύτερη ένδειξη τοξικότητας να εμφανίζει το δείγμα από την αγορά της Αθήνας (Aa-A) και τη μικρότερη το δείγμα Aa-2 από το Αγρίνιο. Σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, το Aa-A ήταν επιπλέον αυτό που είχε τα περισσότερα πτητικά συστατικά στα αφεψήματα του, αρκετά από τα οποία δεν υπήρχαν στα υπόλοιπα.

Η αχιλλέα έδωσε παρόμοιες τιμές στα τρία από τα τέσσερα δείγματα της με τη μικρότερη ένδειξη τοξικότητας να δίνει με διαφορά το Am-2 από το Αγρίνιο και τη μεγαλύτερη να δίνουν με πολύ μικρή διαφορά τα δείγματα από την Κοζάνη (Am-1) και την αγορά της Αθήνας (Am-A). Μια παρατήρηση που μπορεί να γίνει είναι ότι τα δύο τελευταία (Am-1 και Am-A) παρουσίασαν τις περισσότερες ομοιότητες όσον αφορά το χημειότυπο τους και τα κύρια πτητικά συστατικά των αφεψημάτων τους.

Τέλος, το εστραγκόν, όπως ειπώθηκε, εμφανίστηκε να είναι συνολικά αυτό με τη μεγαλύτερη ένδειξη τοξικότητας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το δείγμα από την αγορά της Αθήνας (Ad-A), που όπως έδειξε ο ποιοτικός και % ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών του συστατικών παρουσίασε ένα χημικό προφίλ τελείως διαφορετικό από αυτόν των άλλων δύο δειγμάτων που είχαν πολλές ομοιότητες, είχε αναλογικά πολύ διαφορετική απόκριση και στην ανάλυση αυτή, δίνοντας με διαφορά τη μικρότερη ένδειξη τοξικότητας.

Μια ακόμη παρατήρηση είναι ότι σε γενικές γραμμές όσο περισσότερα πτητικά συστατικά περιείχε το δείγμα ενός φυτικού είδους, τόσο αυξανόταν και η ένδειξη τοξικότητας του.

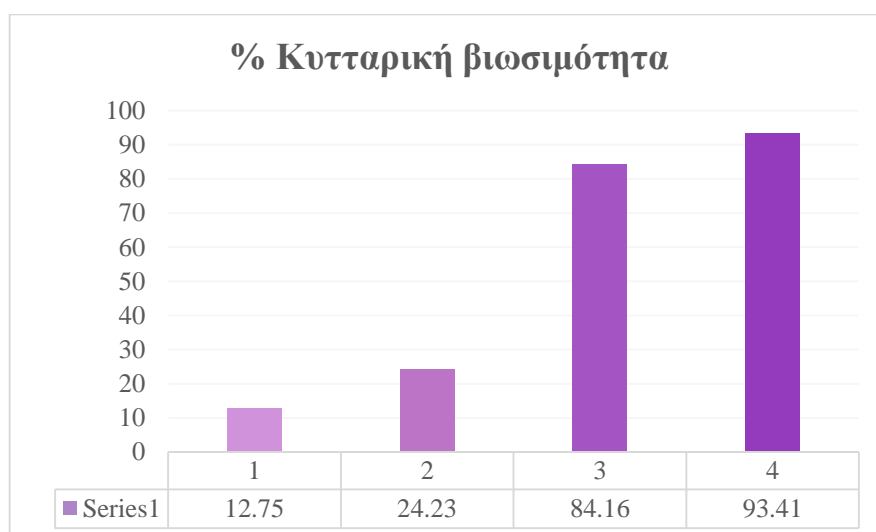
Δε φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των τοξικών ενώσεων που έχουν αναφερθεί και προσδιοριστεί στη συγκεκριμένη μελέτη και της ένδειξης τοξικότητας που δίνει το Microtox®. Αυτό που φαίνεται όμως είναι ότι η ένδειξη αυτή της τοξικότητας που εκτιμάται με το Microtox® δεν οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο τοξικό συστατικό αλλά στο συνολικό χημικό προφίλ του κάθε φυτικού δείγματος, που όπως ειπώθηκε εμφάνισε παρόμοια απόκριση στη μείωση της βιοφωταύγειας.

Σε μελέτη των (Conforti et al., 2008) που μελέτησαν την τοξικότητα διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων, τα είδη *E. vulgare* και *M. sylvestris* έδωσαν τη μεγαλύτερη ένδειξη τοξικότητας που συνιστά την κατανάλωση των συγκεκριμένων φυτών με προσοχή και όχι για μεγάλο χρονικό διάστημα. Άλλη μελέτη που χρησιμοποίησε το σύστημα ανάλυσης Microtox® έδειξε ότι το *Origanum vulgare* L. και το *Origanum dictamnus* L. έδωσαν τη μεγαλύτερη ένδειξη τοξικότητας. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι αυτή η ένδειξη οφείλεται ως επί το πλείστον στα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων τους, μέσω του υπολογισμού της αλληλεπίδρασης πτητικών και υδατοδιαλυτών συστατικών (Synergism Ratios) και όχι στα φαινορικά συστατικά τους ή την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα (Skotti et al., 2014).

3.6 Εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας με τη δοκιμή MTT

Η δοκιμή MTT στα νεφρικά κύτταρα Vero πραγματοποιήθηκε σε τριπλές και μελετήθηκαν τα αφεψήματα των τεσσάρων φυτικών ειδών, χρησιμοποιώντας ένα δείγμα για κάθε φυτικό είδος. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν το χαμομήλι Mc-1, η αψιθιά Aa-1, η αχιλλέα Am-1 και το εστραγκόν Ad-1. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα υδατικά εκχυλίσματα των ίδιων δειγμάτων, όπως αναλύθηκαν στον αναλυτή Microtox® μελετώντας αν υπάρχει συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο μικροπλακών αλλά και από την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.

Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράστηκε ως το % ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων και προσδιορίστηκε με την εκτίμηση ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων.



Σχήμα 28. Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων αχιλλέας (1), εστραγκόν (2), αψιθιάς (3) και χαμομηλιού (4) στη βιωσιμότητα των νεφρικών κυττάρων Vero, μέσω εκτίμησης της μιτοχονδριακής δραστηριότητας, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα.

Το αφέψημα του χαμομηλιού είχε πολύ μικρή επίδραση στη βιωσιμότητα των ινοβλαστών *Vero* με την τιμή της να είναι στο 93,41% σε σχέση με το μάρτυρα, που είχε οριστεί στο 100%. Το αφέψημα της αψιθιάς είχε κάποια επίδραση στα νεφρικά κύτταρα και η βιωσιμότητα τους ανήλθε στο 84,16% σε σχέση με το μάρτυρα. Ακολούθησε το εστραγκόν του οποίου το υδατικό εκχύλισμα είχε σημαντική επίδραση στο % ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων, που βρέθηκε στο 24,12%. Τέλος, η αχιλλέα είχε τη μεγαλύτερη επίδραση, αφού μείωσε σημαντικά η βιωσιμότητα των κυττάρων (12,75%).

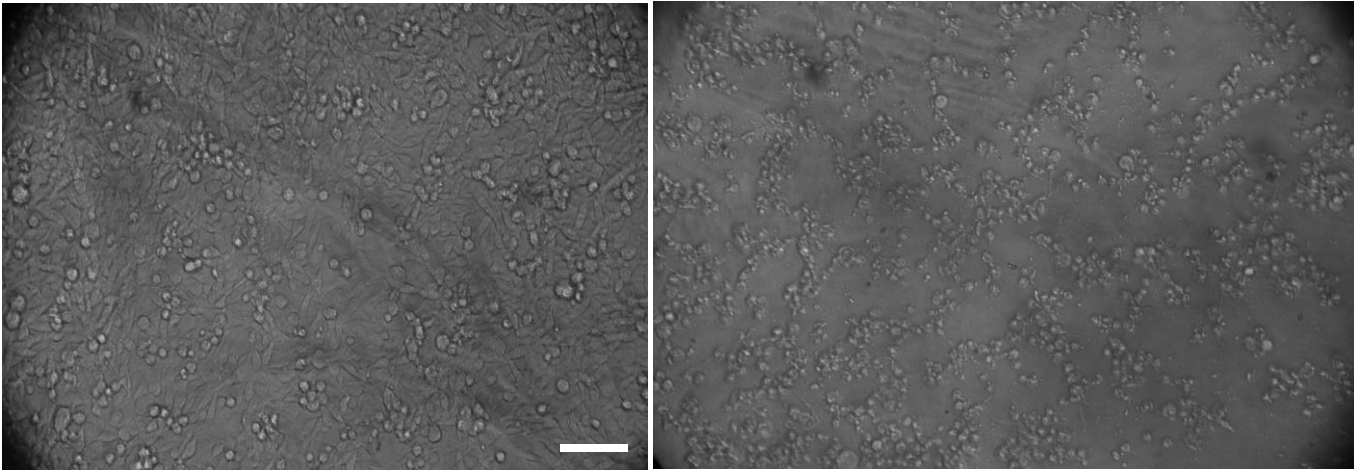
Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκαν η δοκιμή MTT χρησιμοποιώντας τα αραιωμένα υδατικά εκχυλίσματα, με τις ίδιες αραιώσεις που αναλύθηκαν στο Microtox®.

Τα αραιωμένα υδατικά εκχυλίσματα του χαμομηλιού, της αψιθιάς και του εστραγκόν δεν είχαν καμία ή είχαν πολύ μικρή επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων με την τιμή της να ανέρχεται στο 104,82%, 110,34% και 99,95%, αντίστοιχα, σε σχέση με το μάρτυρα. Αντιθέτως, το αραιωμένο εκχύλισμα της αχιλλέας είχε ξανά σημαντική επίδραση στο ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων, που έφτασε μόλις το 11,77%. Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών δεν μπορούν να συγκριθούν με τα προηγούμενα, αφού οι αραιώσεις διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Η αραιώση για το χαμομήλι ήταν 5/100, για την αψιθιά 10/100, για το εστραγκόν 0,5/100 και για την αχιλλέα 50/100. Συγκρίνοντας τα με τα αποτελέσματα του αναλυτή Microtox®, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ τους, με εξαίρεση το εστραγκόν που εμφάνισε σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, όπως και στην ανάλυση με το σύστημα Microtox®.



Σχήμα 29. Επίδραση αραιωμένων φυτικών εκχυλισμάτων αχιλλέας (1), εστραγκόν (2), αψιθιάς (3) και χαμομηλιού (4) στη βιωσιμότητα των νεφρικών κυττάρων Vero, μέσω εκτίμησης της μιτοχονδριακής δραστηριότητας, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα.

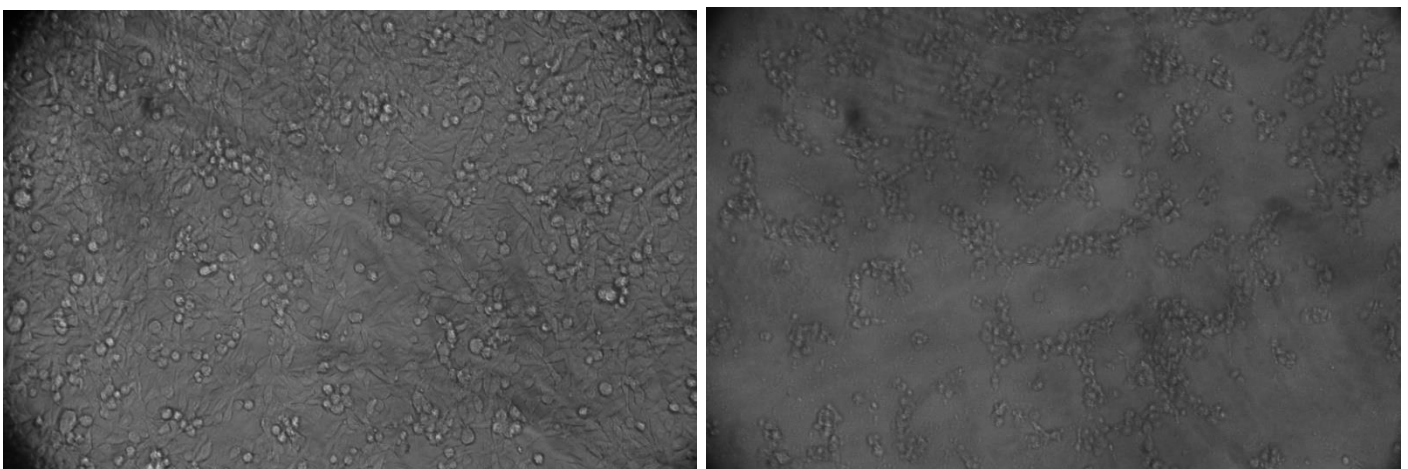
Ακολούθησε η παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης για τη διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων επηρεάζονται οι κυτταρικές λειτουργίες και την καταγραφή επαγόμενων μορφολογικών αλλαγών, μετά από επώαση τους με τα φυτικά εκχυλίσματα. Η παρατήρηση έγινε σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, μετά από 24 ώρες έκθεσης των κυττάρων στα φυτικά εκχυλίσματα, συγκρίνοντάς τα με το μάρτυρα (DMEM με απεσταγμένο νερό).



Εικόνα 25. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, ο μάρτυρας (αριστερά) και κύτταρα μετά από 24h έκθεσης τους στο αφέψημα της αχιλλέας, κλίμακα 100μm, μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.

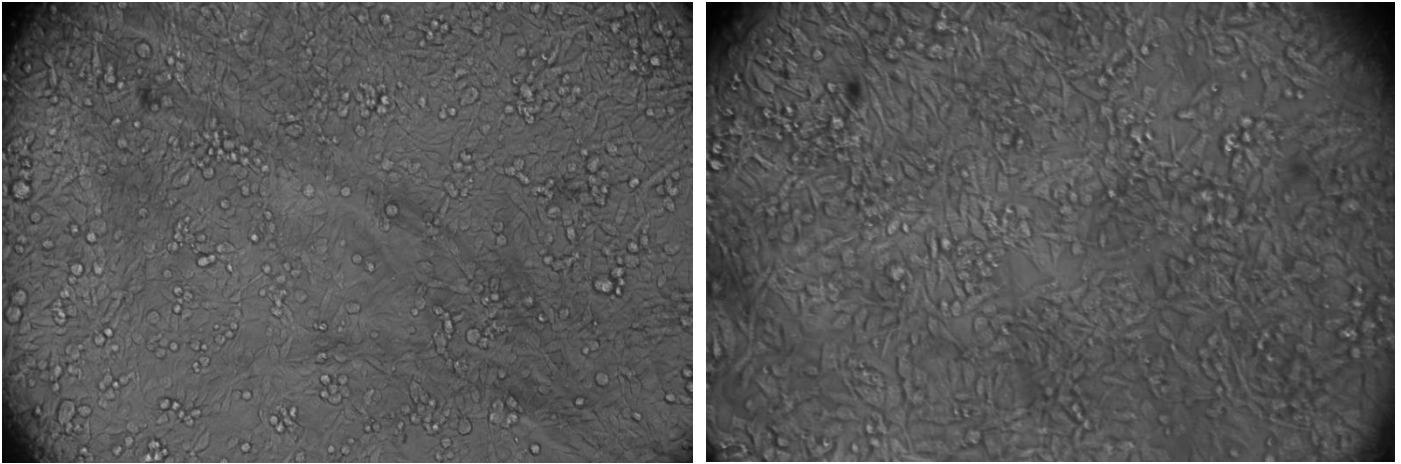
Στην **Εικόνα 25**, παρατηρούνται οι μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα Vero μετά από 24h έκθεση τους στο αφέψημα της αχιλλέας σε σύγκριση με το μάρτυρα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται συρρίκνωση των κυττάρων που αποτελεί μορφολογικό στοιχείο απόπτωσης.

Σημαντικές μορφολογικές αλλαγές παρατηρούνται και στην **Εικόνα 26** συγκρίνοντας την επίδραση του εκχύλισματος του εστραγκόν με το μάρτυρα. Η μικροσκοπική παρατήρηση ανέδειξε μικρή πλήρωση στην επιφάνεια κυτταροκαλλιέργειας και αδυναμία δημιουργίας της χαρακτηριστικής μονοστοιβάδας υγιών κυττάρων. Ο μειωμένος αριθμός κυττάρων υποδεικνύει πως το εκχύλισμα δεν επέτρεψε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον τα εκτεθειμένα κύτταρα εμφανίζονται συρρικνωμένα με απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης τους. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά αποτελούν χαρακτηριστικά νέκρωσης.



Εικόνα 26. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, ο μάρτυρας (αριστερά) και κύτταρα μετά από 24h έκθεσης τους στο αφέψημα του εστραγκόν, κλίμακα 100μm, μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.

Τέλος, στην **Εικόνα 27** παρουσιάζονται τα κύτταρα Vero μετά από έκθεσή τους στα φυτικά εκχυλίσματα του χαμομηλιού σε σύγκριση με το μάρτυρα. Το εκχύλισμα του χαμομηλιού δε φαίνεται να επηρέασε τη μορφολογία των κυττάρων, τα οποία διατήρησαν το τυπικό σχήμα ινοβλάστη με δι- ή πολυ-πολικό (bipolar/multipolar) επίμηκες σώμα και ελάχιστη κυτταροπλασματική κοκκίωση.



Εικόνα 27. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, ο μάρτυρας (αριστερά) και κύτταρα μετά από 24h έκθεσης τους στο αφέψημα του χαμομηλιού, κλίμακα 100μm, μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.

επίδραση στη βιωσιμότητα των νεφρικών κυττάρων Vero και η επίδραση αυτή θα πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω.

Σύμφωνα με μελέτες των (Vasilijev, Miti, & Vukovi, 2015; Mitic, 2011), η καμφορά, η θουγιόνη και η ευκαλυπτόλη, συστατικά που ανιχνεύθηκαν και στα φυτικά είδη που μελετώνται σε αυτή τη μελέτη, προκαλούν καταστροφές στο DNA βακτηρίων αλλά και σε κύτταρα Vero. Ωστόσο σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως βιο-αντιμεταλλαξιγόνες ουσίες συμβάλλοντας σε διεργασίες επιδιόρθωσης του DNA. Λόγω αυτής της προστατευτικής τους επίδρασης έχουν αποτελέσει αντικείμενο για περαιτέρω μελέτες όσον αφορά τη χημειοπροστατευτική τους δράση.

4. Συμπεράσματα

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση των βοτάνων από τον άνθρωπο αυξάνεται συνεχώς σε όλο τον κόσμο. Μελετήθηκαν τέσσερα βότανα της οικογένειας Asteraceae: το χαμομήλι, η αψιθιά, η αχιλλέα και το εστραγκόν. Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των αιθερίων ελαίων και των αφεψημάτων τους. Ταυτόχρονα, έγινε σύγκριση των δειγμάτων γνωστής προέλευσης με άγνωστα δείγματα του εμπορίου. Επιπλέον, επειδή η ευρύτατη χρήση των βοτάνων θέτει και το ζήτημα της ασφάλειας τους, εκτιμήθηκε η τοξικότητα των αφεψημάτων με δύο διαφορετικές μεθόδους, τον αναλυτή Microtox® και τη μέθοδο MTT σε κύτταρα Vero.

Κατά την μελέτη των βοτάνων αρχικά έγινε παραλαβή των αιθερίων ελαίων. Όσον αφορά την απόδοση τους, χαρακτηριστικά υψηλές αποδόσεις βρέθηκαν να έχουν τα αιθέρια έλαια της αψιθιάς και της αχιλλέας, ενώ αυτές του χαμομηλιού και του εστραγκόν βρέθηκαν σε κανονικά επίπεδα. Στη συνέχεια, έγινε παραλαβή των αφεψημάτων των βοτάνων και εκχύλιση των πτητικών συστατικών τους και πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση και ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, καθώς και αυτών των αιθερίων ελαίων με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Στην περίπτωση του χαμομηλιού, οι χημειότυποι των αιθερίων ελαίων ήταν «καθαροί» για τα δύο δείγματα που προήλθαν από παραγωγούς και «μικτός» για το δείγμα από την αγορά της Αθήνας. Ο αριθμός των συστατικών που απάρτισαν τα αιθέρια έλαια εμφάνισαν διαφοροποίηση, το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των αφεψημάτων. Τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων εμφανίστηκαν και στα αφεψήματα, αν και σε διαφορετικά ποσοστά. Άξιο αναφοράς είναι τα μεγάλα ποσοστά στα αφεψήματα του *E*- και *Z*-σπιροαιθέρα, καθώς και η ανίχνευση σε αυτά της 7-μεθοξυ-κουμαρίνης.

Όσον αφορά την αψιθιά, οι χημειότυποι των αιθερίων ελαίων παρουσίασαν μεγάλη χημική ποικιλομορφία. Σε καμία περίπτωση δε βρέθηκε ο ίδιος χημειότυπος (3 «μικτοί» και 1 «καθαρός»). Οι «μικτοί» χημειότυποι των δειγμάτων από την αγορά της Αθήνας και την Ιεράπετρα ήταν ιδιαίτερα ασυνήθιστοι, με τα συστατικά μυρκένιο-σαμπινένιο και β -θουγιόνη-χαμαζουλένιο, αντίστοιχα. Στα αφεψήματα παρατηρήθηκε το ίδιο προφίλ πτητικών συστατικών με τα αντίστοιχα αιθέρια έλαια, με εξαίρεση την ένωση της νουκατίνης, καθώς και παρόμοιος αριθμός συστατικών μεταξύ τους.

Οι χημειότυποι των αιθερίων ελαίων της αχιλλέας ήταν όλοι «μικτοί» και διαφορετικοί μεταξύ τους. Αξιοσημείωτο είναι ότι για πρώτη φορά βρέθηκε χημειότυπος κετόνης της αρτεμισίας-καμφοράς-ευκαλυπτόλης στο δείγμα από την αγορά της Αθήνας, που δημιουργεί αμφιβολία για την ακριβή βοτανική προέλευση του δείγματος. Τα αφεψήματα εμφάνισαν παρόμοιο προφίλ πτητικών συστατικών μεταξύ τους αλλά και σε σύγκριση με τα αιθέρια έλαια. Σε τρία από τα τέσσερα αφεψήματα εμφανίστηκε η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη.

Τέλος, όσον αφορά το εστραγκόν, στα δύο γνωστής προέλευσης δείγματα, ο χημειότυπος ήταν ο ίδιος και «μικτός» μεθυλο-ευγενόλης - ελεμικίνης, αν και διαφοροποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των συστατικών τους. Το άγνωστο δείγμα από την αγορά της Αθήνας διέφερε τελείως από τα δύο προηγούμενα, αφενός ποιοτικά, λόγω «καθαρού» χημειότυπου εστραγόλης και συνολικά διαφορετικού προφίλ και αφετέρου ποσοτικά λόγω μικρότερου αριθμού συστατικών. Έντονη διαφοροποίηση παρουσίασαν τα αφεψήματα σε σχέση με τα αντίστοιχα αιθέρια έλαια τους, όπου και στα τρία, η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη ήταν κυρίαρχο συστατικό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό της εστραγόλης στο δείγμα από την αγορά της Αθήνας.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της α - και β -θουγιόνης και της καμφοράς έγινε στα βότανα της αψιθιάς και της αχιλλέας όπου και ανιχνεύτηκαν. Η β -θουγιόνη βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (mg/mL) σε σχέση με την α - σε όλες τις περιπτώσεις (αιθέρια έλαια και αφεψήματα) εκτός από την αχιλλέα της Κοζάνης, όπου παρατηρήθηκε το αντίστροφο. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση β -θουγιόνης βρέθηκε με διαφορά στην αψιθιά από την Ιεράπετρα, στο αιθέριο έλαιο και στο αφεψήμα. Σε όλες τις περιπτώσεις, μόνο το 10% ή και λιγότερο της συγκέντρωσης που προσδιορίστηκε στα αιθέρια έλαια, βρέθηκε στα αφεψήματα. Όσον αφορά την καμφορά, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν στα δείγματα της αχιλλέας από την Κοζάνη και την αγορά της Αθήνας. Σε αυτή την περίπτωση, συγκρίνοντας αφεψήματα και αιθέρια έλαια, βρέθηκε στα πρώτα το 20-35% της συγκέντρωσης των αντίστοιχων αιθερίων ελαίων.

Στη συνέχεια, παρελήφθησαν τα φάσματα FT-IR για κάθε ένα από τα δείγματα των τεσσάρων φυτικών ειδών με σκοπό να γίνει σύγκριση των δειγμάτων με βάση την περιοχή των δακτυλικών τους αποτυπωμάτων και να υπολογιστεί ο % συντελεστής ομοιότητας τους. Τα δείγματα των ειδών που ήταν πιο όμοια μεταξύ τους ήταν τα δείγματα του χαμομηλιού και της αψιθιάς και λιγότερο της αχιλλέας και του εστραγκόν.

Η βιοδραστικότητα-τοξικότητα των αφεψημάτων που μελετήθηκε με τον αναλυτή Microtox® ήταν ανάλογη του φυτικού είδους με το εστραγκόν να εμφανίζει τη μεγαλύτερη, στη συνέχεια το χαμομήλι, η αχιλλέα και τέλος η αψιθιά τη μικρότερη. Φαίνεται ότι η ένδειξη αυτή της τοξικότητας δεν οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο τοξικό συστατικό αλλά στο συνολικό χημικό προφίλ του κάθε φυτικού δείγματος. Τέλος, με τη μέθοδο του MTT ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα των αφεψημάτων σε κύτταρα Vero. Η αχιλλέα και στη συνέχεια το εστραγκόν παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας των νεφρικών κυττάρων Vero, και ακολούθησαν η αψιθιά και το χαμομήλι.

Καταλήγοντας, η συνέχιση της μελέτης των βοτάνων της Asteraceae από τον ελλαδικό χώρο πρέπει να συνεχιστεί για τον προσδιορισμό της χημικής ποικιλομορφίας τους αλλά και η σύγκριση τους με τα δείγματα του εμπορίου, των οποίων η προέλευση και η ποιότητα τίθενται υπό αμφισβήτηση. Επιπλέον, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης περισσότερων τοξικών συστατικών των παραπάνω βοτάνων είναι σημαντικός για την περαιτέρω εκτίμηση της τοξικότητας τους.

Διεθνής Βιβλιογραφία

- Agency, E. M., Papyrus, E., Greek, T., Greek, T., Naturalis, H., Ages, M., & Historiae, T. S. (2010). *Journal of Ethnopharmacology*, *131*, 224–227. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.062>
- Aglarova, A. M., Zilfikarov, I. N., & Severtseva, O. V. (2008). BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND USEFUL PROPERTIES OF TARRAGON (ARTEMISIA DRACUNCULUS L .) (REVIEW), *42*(2), 81–86.
- Alic, R. A. P. (2006). Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*, (ii), 4780–4789.
- Arabhosseini, A., Padhye, S., Beek, T. A. Van, Boxtel, A. J. B. Van, Huisman, W., Posthumus, M. A., & Joachim, M. (2006). Loss of essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus* L .) due to drying, *2550*(October), 2543–2550. <http://doi.org/10.1002/jsfa>
- Ayoughi, F., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Naghdibadi, H. (2011). Chemical Compositions of Essential Oils of *Artemisia dracunculus* L . and Endemic *Matricaria chamomilla* L . and an Evaluation of their Antioxidative Effects, *13*, 79–88.
- Bailen, M., Julio, L. F., Diaz, C. E., Sanz, J., Martínez-díaz, R. A., Cabrera, R., ... Gonzalez-coloma, A. (2013). Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L . cultivated under different environmental conditions. *Industrial Crops & Products*, *49*, 102–107. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.055>
- Benedek, B., & Kopp, B. (2007). *Achillea millefolium* L . s . l . revisited : Recent findings confirm the traditional use, 312–314. <http://doi.org/10.1007/s10354-007-0431-9>
- Chatzopoulou, P., & Katsiotis, S. T. (1992). An Ascaridole Containing Essential Oil of the *Achillea millefolium* L . Complex Growing Wild in Northern Greece, *459*(5), 457–459.
- Chauhan, R. S., Kitchlu, S., Ram, G., Kaul, M. K., & Tava, A. (2010). Chemical composition of capillene chemotype of *Artemisia dracunculus* L . from North-West Himalaya , India. *Industrial Crops & Products*, *31*(3), 546–549. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.02.005>
- Conforti, F., Ioele, G., Statti, G. A., Marrelli, M., Ragno, G., & Menichini, F. (2008). Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(10), 3325–3332. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.004>
- Curini, M., Epifano, F., & Genovese, S. (2006). COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Artemisia dracunculus* “ PIEMONTESE ” FROM ITALY, *42*(6), 738–739.
- Dall’Acqua, S., Bolego, C., Cignarella, A., Gaion, R. M., & Innocenti, G. (2011). Vasoprotective activity of standardized *Achillea millefolium* extract. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *18*(12), 1031–6. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.005>
- Devrim, Ö., Demir, Ü., Tuba, H., & Demirci, B. (2012). Phytomedicine Psychopharmacological profile of Chamomile (*Matricaria recutita* L .) essential oil in mice. *European Journal of Integrative Medicine*, *19*(3–4), 306–310. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.001>

- Eisenman, S. W., Poulev, A., Struwe, L., Raskin, I., & Ribnicky, D. M. (2011). Fitoterapia Qualitative variation of anti-diabetic compounds in different tarragon (*Artemisia dracunculus* L .) cytotypes. *Fitoterapia*, 82(7), 1062–1074. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.07.003>
- En iso 11348.03 2. (2011).
- European pharmacopoeia, 7th edition, Volume 1 (2010). Strasbourg: Council of Europe.
- Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S. L., & Kaushik, D. (2010). Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*- A Review, 2(1), 12–16.
- Heinrich, M. (2011). *Artemisia dracunculus* L . (Tarragon): A Critical Review of Its Traditional Use , Chemical Composition , Pharmacology , and Safety *Artemisia dracunculus* L . (Tarragon): A Critical Review of Its Traditional Use , Chemical Composition , Pharmacology , and Safety, (SEPTEMBER). <http://doi.org/10.1021/jf202277w>
- Inês, M., Barros, L., Pereira, E., Maria, A., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P., ... Ferreira, I. C. F. R. (2013). Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L . and bioactivity of the methanolic extract , infusion and decoction, 141, 4152–4160. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.018>
- Innocenti, G., Vegeto, E., Acqua, S. D., Ciana, P., Giorgetti, M., & Agradi, E. (2007). In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L ., 14, 147–152. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.05.005>
- Iordache, A., Culea, M., Gherman, C., & Cozar, O. (2009). Characterization of some plant extracts by GC-MS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267(2), 338–342. <http://doi.org/10.1016/j.nimb.2008.10.021>
- Judpentiene, A. (2004). Chemical composition of essential oils of *Artemisia absinthium* L . (wormwood) growing wild in Vilnius, (4), 64–68.
- Kalantari, H., Galehdari, H., Zaree, Z., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D., ... Juhasz, B. (2013). Toxicological and mutagenic analysis of *Artemisia dracunculus* (tarragon) extract. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 51, 26–32. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.052>
- Kazemi, M. (2015). Chemical composition and antimicrobial , antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L ., *Anethum graveolens* L ., and *Carum copticum* L . essential oils. *Perspectives in Medicine*, 5(4), 217–222. <http://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.09.001>
- Kokkalou, E., Kokkini, S., & Hanlidou, E. (n.d.). Volatile Constituents of *Achillea millefolium* in Relation to their Intraspecific Variation.
- Kristanc, L., & Kreft, S. (2016a). European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part I : Plants with carcinogenic , teratogenic and endocrine-disrupting effects. *Food and Chemical Toxicology*, 92, 150–164. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.007>
- Kristanc, L., & Kreft, S. (2016b). European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part II : Plants with hepato- , neuro- , nephro- and immunotoxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, 92, 38–49. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.014>

- Lachenmeier, D. W., & Nathan-maister, D. (2007). Systematic Misinformation about Thujone in Pre-ban Absinthe, 255–263.
- Lopes-lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Phytochemistry Screening of chemical composition , antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils, 69, 1732–1738. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>
- Mitic, D. (2011). Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor , eucalyptol and thujone in Escherichia coli and mammalian cells ~ evic ~ evic, 49, 2035–2045. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.015>
- Mockute, D., & Judzentiene, A. (2003). Variability of the essential oils composition of Achillea millefolium ssp . millefolium growing wild in Lithuania, 31, 1033–1045. [http://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00066-8](http://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00066-8)
- Murti_Pharmacological_Properties_of_Matricaria_recutita_2012.pdf. (n.d.).
- Nezhadali, A., & Parsa, M. (2010). Study of the volatile compounds in Artemisia absinthium from Iran using HS / SPME / GC / MS, 1(3), 174–179.
- Nguyen, H. T., & Németh, Z. É. (2016). Sources of variability of wormwood (Artemisia absinthium L.) essential oil. *Journal of Dermatological Science*. <http://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.07.005>
- Oberprieler, C., Himmelreich, S., Vogt, R., Oberprieler, C., Himmelreich, S., & Vogt, R. (n.d.). A new subtribal classification of the tribe Anthemideae (Compositae), 37(1), 89–114. <http://doi.org/10.3372/wi.37.37104>
- Orav, A., Arak, E., & Raal, A. (2016). Phytochemical analysis of the essential oil of Achillea millefolium L . from various European Countries, 6419(September). <http://doi.org/10.1080/14786410500510849>
- Orav, A., Raal, A., Arak, E., Müürisepp, M., & Kailas, T. (2006). Composition of the essential oil of Artemisia absinthium L . of different geographical origin, 155–165.
- Paulina, I., Américo, R., Fávero, V., Aparecida, C., Kassuya, L., Gasparotto, A., ... Andreatini, R. (2012). Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with Achillea millefolium L . extract, 140, 46–54. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.047>
- Pplequist, W. E. L. A., & Oerman, D. A. E. M. (2011). Yarrow (Achillea millefolium L .): A Neglected Panacea ? A Review of Ethnobotany , Bioactivity , and Biomedical Research 1, 65(April), 209–225.
- Raal, A., Orav, A., Püssa, T., Valner, C., Malmiste, B., & Arak, E. (2012). Content of essential oil , terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (Chamomilla recutita L . Rauschert) teas from different countries. *Food Chemistry*, 131(2), 632–638. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.042>
- Ribnicky, D. M., Poulev, A., Neal, J. O., Wnorowski, G., Malek, D. E., & Ja, R. (2004). Toxicological evaluation of the ethanolic extract of Artemisia dracunculus L . for use as a dietary supplement and in functional foods, 42, 585–598. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.002>
- Rimantas, P. (2007). Chemotypes of Achillea millefolium transferred from 14 different locations in Lithuania to the controlled environment, 35. <http://doi.org/10.1016/j.bse.2007.03.016>

- Rodríguez-solana, R., Daferera, D. J., Mitsi, C., Trigas, P., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Comparative chemotype determination of Lamiaceae plants by means of GC – MS , FT-IR , and dispersive-Raman spectroscopic techniques and GC-FID quantification. *Industrial Crops & Products*, 62, 22–33. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.003>
- Sayyah, M., Nadjafnia, L., & Kamalinejad, M. (2004). Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L . essential oil, 94, 283–287. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.021>
- Shawl, A. S., Srivastava, S. K., Syamasundar, K. V, Tripathi, S., & Raina, V. K. (2002). Essential oil composition of *Achillea millefolium* L . growing wild in Kashmir , India, 165–168. <http://doi.org/10.1002/ffj.1074>
- Singh, K., & Sharma, A. (2010). Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L . on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(3), 403–409. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.030>
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content , antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops & Products*, 53, 46–54. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.013>
- Srivastava, J. K., Shankar, E., & Gupta, S. (2010). Chamomile : A herbal medicine of the past with a bright future (Review), 895–901. <http://doi.org/10.3892/mmr.2010.377>
- Trumbeckaite, S., Benetis, R., Bumblauskiene, L., & Burdulis, D. (2011). *Achillea millefolium* L . s . l . herb extract : Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. *Food Chemistry*, 127(4), 1540–1548. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.014>
- Vasilijevi, B., Miti, D., & Vukovi, B. (2015). Chemico-Biological Interactions Comparative study of genotoxic , antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor , eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells fi, 242. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.10.012>
- Watson, L. E., Evans, T. M., & Boluarte, T. (2000). Molecular Phylogeny and Biogeography of Tribe Anthemideae (Asteraceae), Based on Chloroplast Gene ndh F, 15(1), 59–69. <http://doi.org/10.1006/mpev.1999.0714>
- Werner, I., Glasl, S., & Reznicek, G. (2006). Infrared Spectroscopy as a Tool for Chemotaxonomic Investigations within the *Achillea millefolium* Group, 3, 27–33.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γκόλιου Ρ., (2008), 200 Βότανα και οι θεραπευτικές τους ιδιότητες, Εκδόσεις Μαλλιάρης.
- Σαρλής Γ. Π., (1999), *Συστηματική Βοτανική-Εφαρμογές Κορμοφύτων*, Εκδόσεις Σταμούλη.
- Στεφανάκη-Νικηφοράκη Μ., (1999), *Συστηματική Βοτανική-Κλείδες, Τόμος Β'*, Εκδόσεις Σταμούλη.
- Σωτηροπούλου, Ν., (2014). Προσδιορισμός της θουγιόνης σε βότανα της ελληνικής χλωρίδας και στα αφενήματά τους.
- Χατζηωάννου Θ.Π., Κουπάρη Μ., Α., (2015), *Ενόργανη ανάλυση*, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών

Madigan M., T., Martinko J., M., Parker J., (2005), *Brock-Βιολογία των μικροοργανισμών, Τόμος Ι*, Απόδοση στην Ελληνική, Γεωργακόπουλος Δ., Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

McMurry J., (2005), *Οργανική Χημεία, Τόμος Ι*, 5^η έκδοση, Απόδοση στην Ελληνική, Βάρβογλης Α., Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Samuelsson, G., (2004), *Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προελεύσεως, εγχειρίδιον φαρμακογνωσίας*, Απόδοση στην Ελληνική, Γενική Επιστημονική Επιμέλεια, Π. Κορδοπάτης, Ε. Μάνεση – Ζούπα, Γ. Παϊρας, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ι. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της συσκευής Clevenger.....	15
Εικόνα 2. Συλλογή αιθερίου ελαίου στη συσκευή Clevenger	15
Εικόνα 3. Υδατικό εκχύλισμα χαμομηλιού.....	16
Εικόνα 4. Οργανολογία αέριου χρωματογράφου.....	17
Εικόνα 5. Διαδικασία λειτουργίας φασματοφωτόμετρου.	20
Εικόνα 6. Αποικίες των βιοφωταυγών βακτηρίων <i>V. fischeri</i>	25
Εικόνα 7. Το σύστημα LuxR/LuxI και η επαγωγή της βιοφωταύγειας.	25
Εικόνα 8. Οργανολογία αναλυτή Microtox®	26
Εικόνα 9. Φυτικό υλικό <i>Achillea millefolium</i> L. (κν. αχιλλέα) στη μορφή που παραδόθηκε από τον προμηθευτή (ΑΝΘΗΡ).....	30
Εικόνα 10. Το σύστημα της απόσταξης (από κάτω προς τα πάνω) με το θερμομανδύα, τη συσκευή Clevenger και το συμπυκνωτή συνδεδεμένο με το νερό της βρύσης.	32
Εικόνα 11. Τριπλέτα αφεψημάτων (εστραγκόν, αγορά της Αθήνας, Ad-3).	33
Εικόνα 12. Διαχωριστική χοάνη για την εκχύλιση L-L.	34
Εικόνα 13. Το υδατικό εκχύλισμα (αφέψημα) (αριστερά) και το οργανικό εκχύλισμα του (δεξιά) από το δείγμα (<i>Artemisia absinthium</i> L., Ο κήπος της Ρέας, Aa-3).	34
Εικόνα 14. Το σύστημα GC-MS που χρησιμοποιήθηκε.....	36
Εικόνα 15. Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος για	37
Εικόνα 16. Ο αναλυτής Microtox® Model 500 Analyzer (M500).	39
Εικόνα 17. Φωτογραφίες αντίθετης φάσης μονοστοιβάδας ζωντανών κυττάρων Vero καλλιεργημένων σε DMEM/10% FBS, από ανάστροφο μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.	40
Εικόνα 18. Αιμοκυτταρόμετρο – πλάκα <i>Neubauer</i> . Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει την επιφάνεια μέτρησης είναι 0.1mm^3 ή $1 \times 10^{-4}\text{ml}$	41
Εικόνα 19. Μικροπλάκα 96 βοθρίων μετά τη δοκιμή MTT. Το πιο έντονο μωβ χρώμα μεταφράζεται σε ύπαρξη ζωντανών κυττάρων στα βοθρία.	42
Εικόνα 20. Μικροσκοπική παρατήρηση των κρυστάλλων της φορμαζάνης (μωβ χρώμα) στο εσωτερικό των κυττάρων Vero.	43
Εικόνα 21. Αιθέριο έλαιο χαμομηλιού, δείγμα Mc-A.	44

Εικόνα 22. Αιθέριο έλαιο αψιθιάς, δείγματα (από αριστερά) Aa-2, Aa-3 και Aa-4.....	45
Εικόνα 23. Αιθέριο έλαιο αχιλλέας, δείγματα (από αριστερά) Am-2 και Am-3.	46
Εικόνα 24. Αιθέριο έλαιο εστραγκόν, δείγμα Ad-2.....	47
Εικόνα 25. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, ο μάρτυρας (αριστερά) και κύτταρα μετά από 24h έκθεσης τους στο αφέψημα της αχιλλέας, κλίμακα 100μm, μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.....	86
Εικόνα 26. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, ο μάρτυρας (αριστερά) και κύτταρα μετά από 24h έκθεσης τους στο αφέψημα του εστραγκόν, κλίμακα 100μm, μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.....	86
Εικόνα 27. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, ο μάρτυρας (αριστερά) και κύτταρα μετά από 24h έκθεσης τους στο αφέψημα του χαμομηλιού, κλίμακα 100μm, μικροσκόπιο A. Krüss-MBL3200.....	87

II. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Αέριο χρωματογράφημα και η σειρά που εμφανίζονται σε αυτό οι κύριες ομάδες των πτητικών συστατικών.....	18
Σχήμα 2. Φάσμα μαζών της β-θουγιόνης.....	19
Σχήμα 3. Οι περιοχές ενός φάσματος IR.	21
Σχήμα 4. Μεταβολισμός του MTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες ζωντανών κυττάρων.	27
Σχήμα 5. Διάγραμμα Πειραματικής Πορείας.....	29
Σχήμα 6. Αέριο χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου χαμομηλιού (Mc-1).....	49
Σχήμα 7. Δομή των ενώσεων α-B-εποξειδίου μπισαμπολόλης (αριστερά) και α-A-εποξειδίου μπισαμπολόλης.....	51
Σχήμα 8. Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών αφεψήματος χαμομηλιού (Mc-2).	53
Σχήμα 9. Δομή των ενώσεων E-σπιροαιθέρας (αριστερά) και Z-σπιροαιθέρας (δεξιά).....	53
Σχήμα 10. Αέριο χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου της αψιθιάς από την Ιεράπετρα (δείγμα Aa-3).	56
Σχήμα 11. Δομές των ενώσεων (από αριστερά): trans-αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου, μυρκένιο και χαμαζουλένιο.	57
Σχήμα 12. Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών αφεψήματος αψιθιάς (Aa-1).....	59
Σχήμα 13. Δομή των ενώσεων (από αριστερά): α- και β-θουγιόνη και νουτκατίνη.....	60
Σχήμα 14. Αέριο χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου της αχιλλέας από την Κοζάνη (δείγμα Am-1).	62
Σχήμα 15. Δομές των ενώσεων (από αριστερά): ευκαλυπτόλη, καμφορά και β-πινένιο.	64
Σχήμα 16. Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών αφεψήματος αχιλλέας (Am-2).....	66
Σχήμα 17. Δομές των ενώσεων (από αριστερά) 6-μεθυλ-κουμαρίνη και τερπινεν-4-όλη.	67
Σχήμα 18. Αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου εστραγκόν από την αγορά της Αθήνας.....	69
Σχήμα 19. Δομές των ενώσεων (από αριστερά) μεθυλο-ευγενόλη, ελεμικίνη και εστραγόλη.....	70
Σχήμα 20. Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών αφεψήματος εστραγκόν (Ad-1).....	71
Σχήμα 21. Δομές των ενώσεων 7-μεθοξυ-κουμαρίνη και Z-ασαρόνη.....	72
Σχήμα 22. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (mg/mL) της α- και β-θουγιόνης.	74
Σχήμα 23. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (mg/mL) της καμφοράς.	76
Σχήμα 24. Φάσματα FT-IR των τριών δειγμάτων χαμομηλιού, Mc-1 (μπλε χρώμα), Mc-2 (μωβ χρώμα) και Mc-A (κόκκινο χρώμα).....	79

Σχήμα 25. Φάσματα FT-IR των τεσσάρων δειγμάτων αψιθιάς, Aa-1 (μπλε χρώμα), Aa-2 (μωβ χρώμα), Aa-3 (πράσινο) και Aa-A (κόκκινο χρώμα).....	80
Σχήμα 26. Φάσματα FT-IR των τεσσάρων δειγμάτων αχιλλέας, Am-1 (μπλε χρώμα), Am-2 (μωβ χρώμα), Am-3 (πράσινο) και Am-A (κόκκινο χρώμα).....	80
Σχήμα 27. Φάσματα FT-IR των τριών δειγμάτων εστραγκόν, Ad-1 (μπλε χρώμα), Ad-2 (μωβ χρώμα) και Ad-A (κόκκινο χρώμα).....	81
Σχήμα 28. Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων αχιλλέας (1), εστραγκόν (2), αψιθιάς (3) και χαμομηλιού (4) στη βιωσιμότητα των νεφρικών κυττάρων Vero, μέσω εκτίμησης της μιτοχονδριακής δραστηριότητας, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα.....	84
Σχήμα 29. Επίδραση αραιωμένων φυτικών εκχυλισμάτων αχιλλέας (1), εστραγκόν (2), αψιθιάς (3) και χαμομηλιού (4) στη βιωσιμότητα των νεφρικών κυττάρων Vero, μέσω εκτίμησης της μιτοχονδριακής δραστηριότητας, μετά από επώαση 24h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό % σε σχέση με τον μάρτυρα.....	85

III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

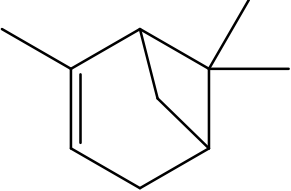
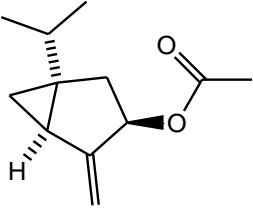
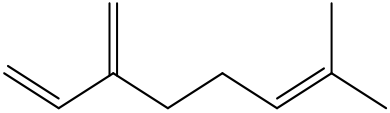
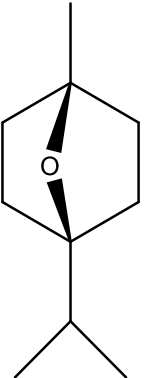
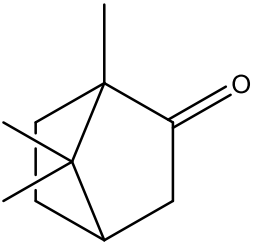
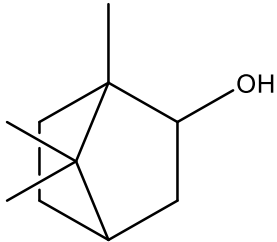
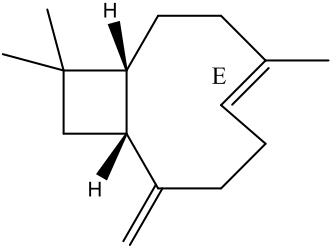
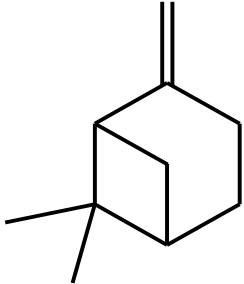
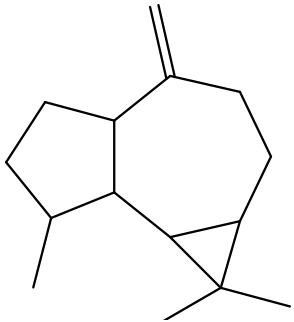
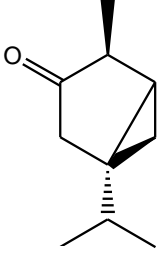
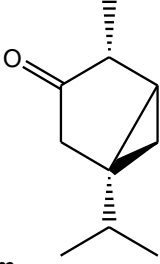
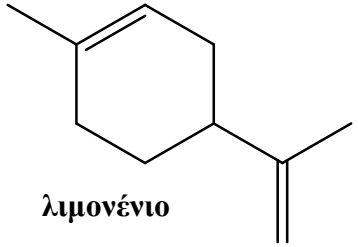
Πίνακας 1. Συστηματική ταξινόμηση της φυλής Anthemideae.....	3
Πίνακας 2. Συστηματική ταξινόμηση του είδους <i>V. fischeri</i>	24
Πίνακας 3. Δείγματα φυτικού υλικού χαμομηλιού.....	31
Πίνακας 4. Δείγματα φυτικού υλικού αψιθιάς.....	31
Πίνακας 5. Δείγματα φυτικού υλικού αχιλλέας.....	31
Πίνακας 6. Δείγματα φυτικού υλικού εστραγκόν.....	31
Πίνακας 7. Απόδοση και χρώμα αιθερίου ελαίου χαμομηλιού.....	45
Πίνακας 8. Απόδοση και χρώμα αιθερίου ελαίου αψιθιάς.....	46
Πίνακας 9. Απόδοση και χρώμα αιθερίου ελαίου αχιλλέας.....	47
Πίνακας 10. Απόδοση και χρώμα αιθερίου ελαίου εστραγκόν.....	47
Πίνακας 11. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων χαμομηλιού, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης <i>Kovats</i> (RI).....	48
Πίνακας 12. Χημειότυποι των αιθερίων ελαίων του χαμομηλιού.....	50
Πίνακας 13. Τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων χαμομηλιού, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης <i>Kovats</i> (RI).....	51
Πίνακας 14. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων αψιθιάς, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης <i>Kovats</i> (RI).....	54
Πίνακας 15. Χημειότυποι των αιθερίων ελαίων της αψιθιάς.....	57
Πίνακας 16. Τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων αψιθιάς, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης <i>Kovats</i> (RI).....	58
Πίνακας 17. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων αχιλλέας, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης <i>Kovats</i> (RI).....	60
Πίνακας 18. Χημειότυποι των αιθερίων ελαίων της αχιλλέας.....	63
Πίνακας 19. Τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων αψιθιάς, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης <i>Kovats</i> (RI).....	64
Πίνακας 20. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων εστραγκόν, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης <i>Kovats</i> (RI).....	68
Πίνακας 21. Χημειότυποι αιθερίων ελαίων του εστραγκόν.....	69

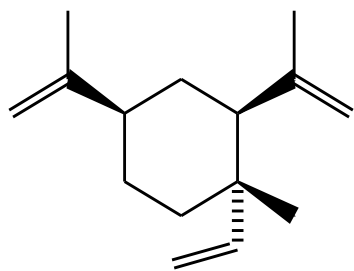
Πίνακας 22. Τα πτητικά συστατικά των αφεψημάτων εστραγκόν, ο % ποσοτικός προσδιορισμός τους, οι χρόνοι συγκράτησης τους (RT) και οι αναμενόμενοι χρόνοι συγκράτησης <i>Kovats</i> (RI).	70
Πίνακας 23. Τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε α - ή/και β -θουγιόνη, η προέλευση τους και τα αντίστοιχα ποσοστά τους.	73
Πίνακας 24. Η συγκέντρωση (mg/mL) της α - και β -θουγιόνης για τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε, στο αιθέριο έλαιο και το αντίστοιχο αφέψημα τους.	74
Πίνακας 25. Τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε καμφορά, η προέλευση τους και τα αντίστοιχα ποσοστά τους.	75
Πίνακας 26. Η συγκέντρωση (mg/mL) της καμφοράς για τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε, στο αιθέριο έλαιο και το αντίστοιχο αφέψημα τους.	76
Πίνακας 27. Συντελεστής ομοιότητας φασμάτων FT-IR (%).	77
Πίνακας 28. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με το σύστημα Microtox® για όλα τα δείγματα και των τεσσάρων φυτικών ειδών.	82

IV. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

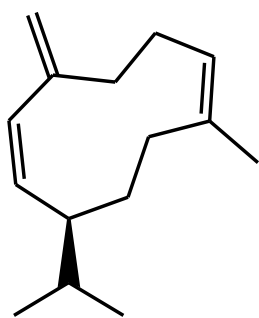
Σύντμηση	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	τροποποιημένο μέσο Eagle του Dulbecco
DRIFTS	Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy	φασματοσκοπία υπερύθρου με τεχνική διάχυτης ανάκλαση
EC ₅₀	Effective Concentration	αποτελεσματική συγκέντρωση
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EMA	European Medicines Agency	ευρωπαϊκός οργανισμός φαρμάκων
FBS	Fetal Bovine Serum	ορός εμβρύου μόσχου
FT-IR	Fourier Transform Infra Red spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με σχηματισμό Fourier
GABA	Gamma Amino Butyric Acid	γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GC	Gas Chromatography	αέρια χρωματογραφία
HD	Hydro Distillation	υδρο-απόσταξη
ISO	International Organism of Standardization	διεθνής οργανισμός τυποποίησης
KI	Kovats Index	δείκτης συγκράτησης
MS	Mass Spectrometry	φασματομετρία μαζών
MTT	Multi-Table Tournament	μέθοδος MTT
NTP	National Toxicology Program	εθνικό πρόγραμμα τοξικολογίας
PBS	Phosphate Buffered Saline	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
RT	Retention Time	Χρόνος Συγκράτησης
SCF	Scientific Committee of Food	επιστημονική επιτροπή για τα τρόφιμα
SFE	Supercritical Fluid Extraction	Υπερκρίσιμη Εκχύλιση

V. ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΟΜΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

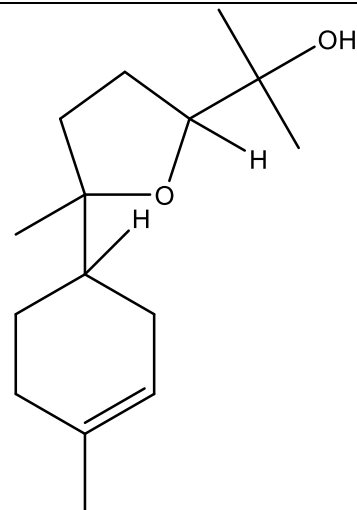
 <p><i>α</i>-πινένιο</p>	<p><i>trans</i>-αιθανικός εστέρας σαμπινυλίου</p> 	 <p>μυρκένιο</p>
 <p>ευκαλυπτόλη</p>	 <p>καμφορά</p>	 <p>βορνεόλη</p>
 <p><i>E</i>-καρνοφυλλένιο</p>	 <p><i>β</i>-πινένιο</p>	 <p>αρωμαδενδρένιο</p>
 <p><i>α</i>-θουγιόνη</p>	 <p><i>β</i>-θουγιόνη</p>	 <p>λιμονένιο</p>



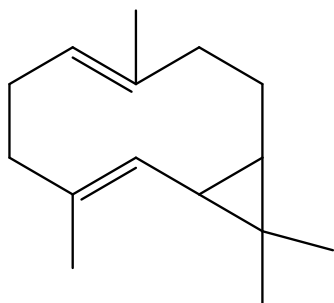
β-ελεμένιο



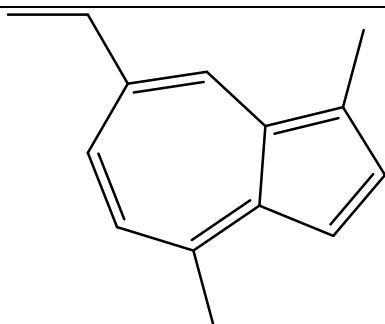
D-γερμακρένιο



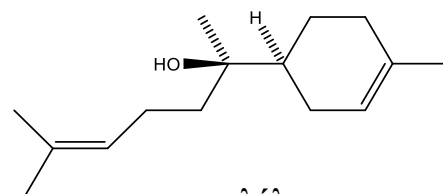
B-εποξείδιο μπισαμπολόλης



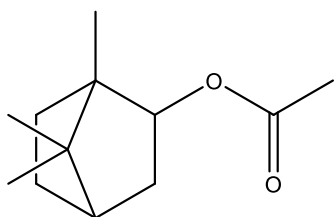
δικυκλογερμακρένιο



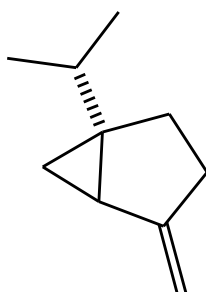
χαμαζουλένιο



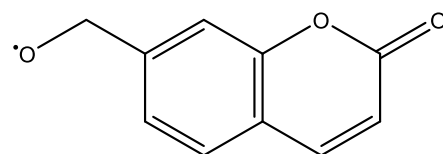
α- μπισαμπολόλη



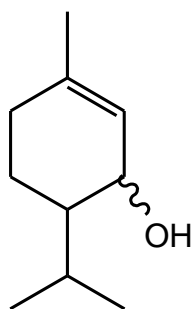
**αιθανικός εστέρας
βορνεόλης**



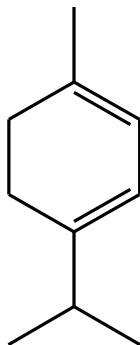
σαμπινένιο



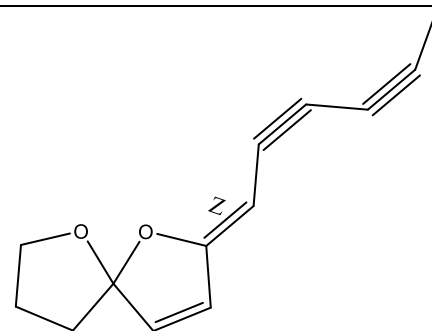
7-μεθόξυ κουμαρίνη



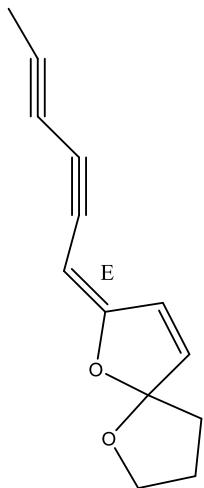
τερπινεν-4-όλη



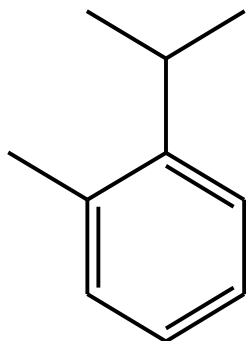
α-τερπινένιο



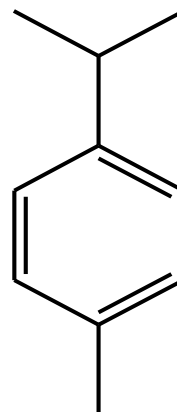
Z-σπιροαιθέρας



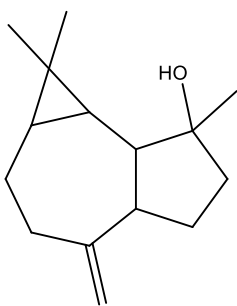
***E*-σπιροαιθέρας**



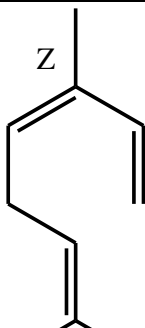
***ο*-κυμένιο**



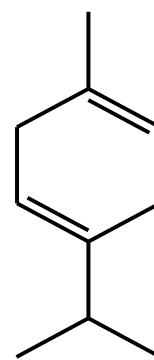
***p*-κυμένιο**



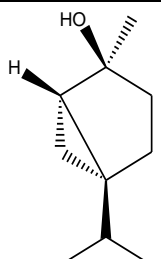
σπαθουλενόλη



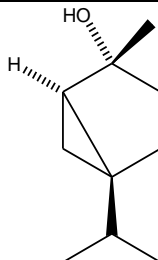
***E*-β-οκυμένιο**



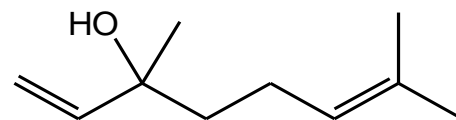
γ-τερπινένιο



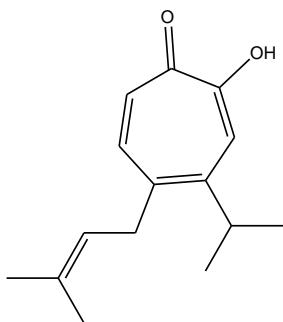
***cis*-ένυδρο σαμπινένιο**



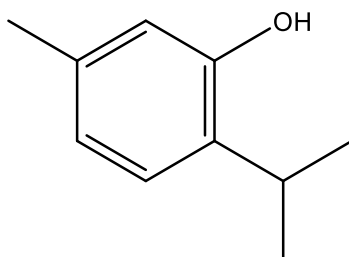
***trans*-ένυδρο σαμπινένιο**



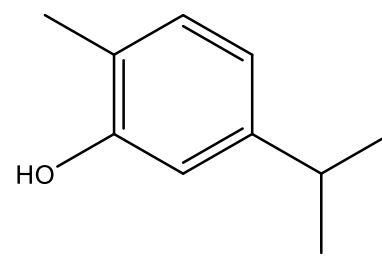
λιναλοόλη



νουτκατίνη



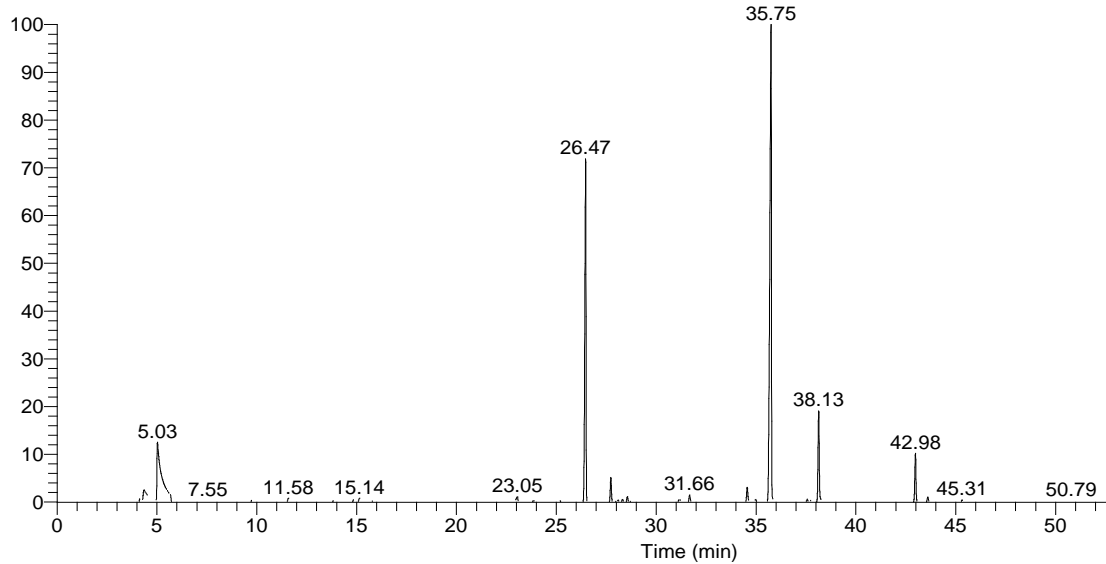
θυμόλη



καρβακρόλη

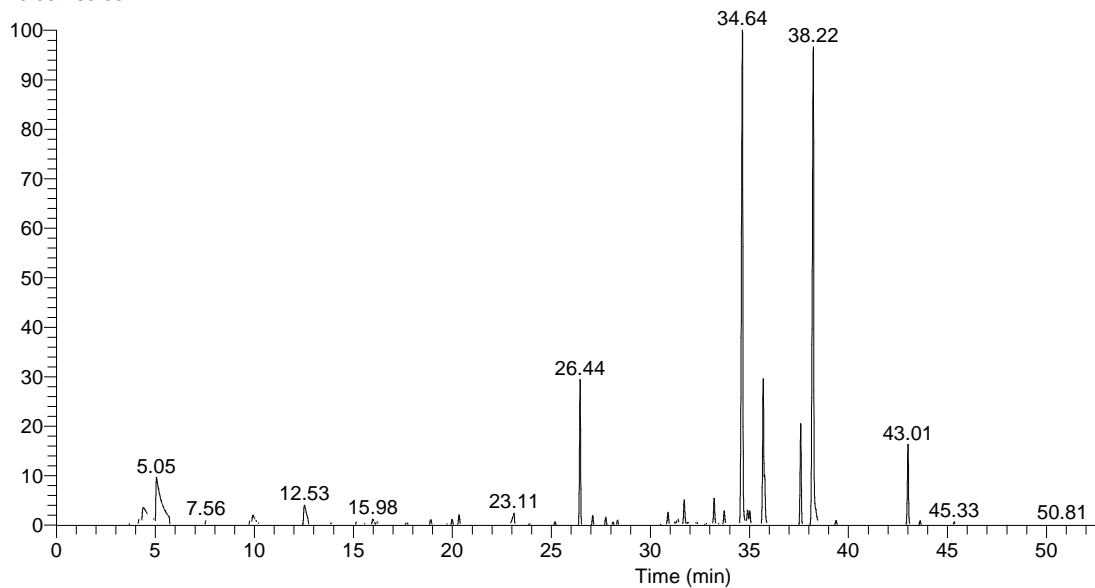
VI. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

RT: 0.00 - 63.33



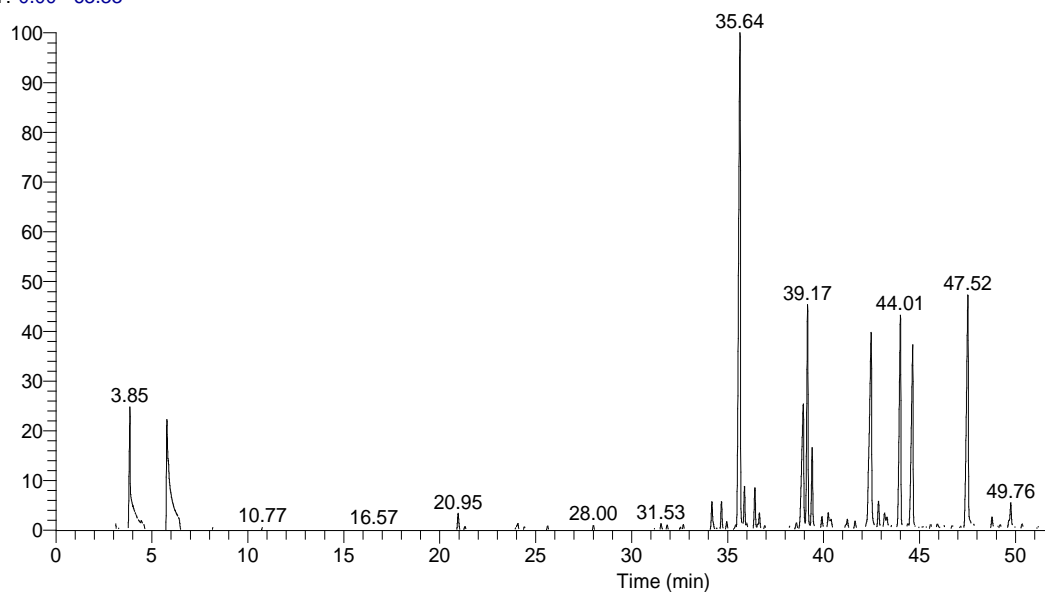
Αέριο χρωματογράφημα 1. Αιθέριο έλαιο χαμομηλιού Mc-2.

RT: 0.00 - 63.33



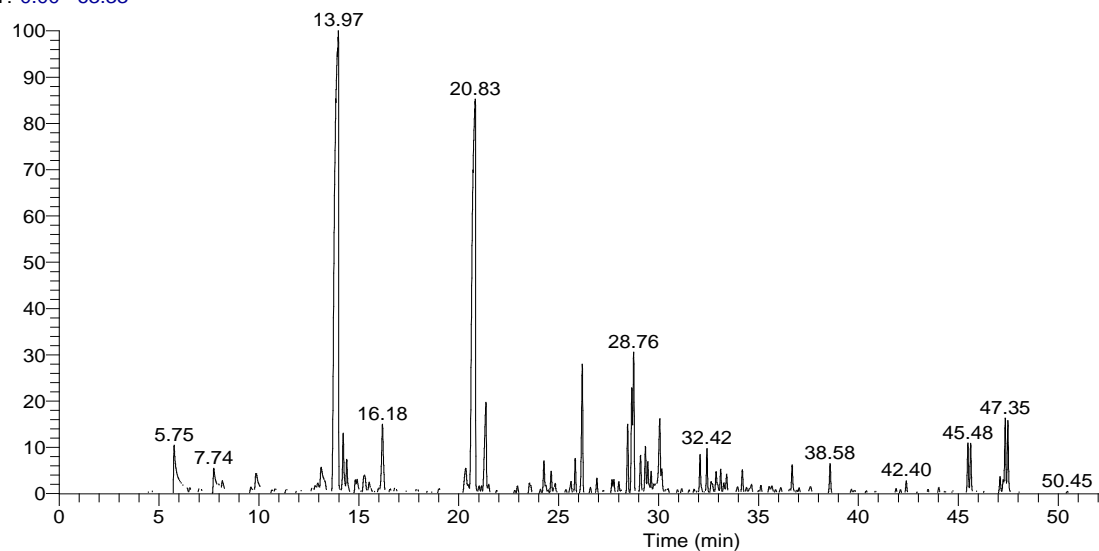
Αέριο χρωματογράφημα 2. Αιθέριο έλαιο χαμομηλιού Mc-A.

RT: 0.00 - 63.33



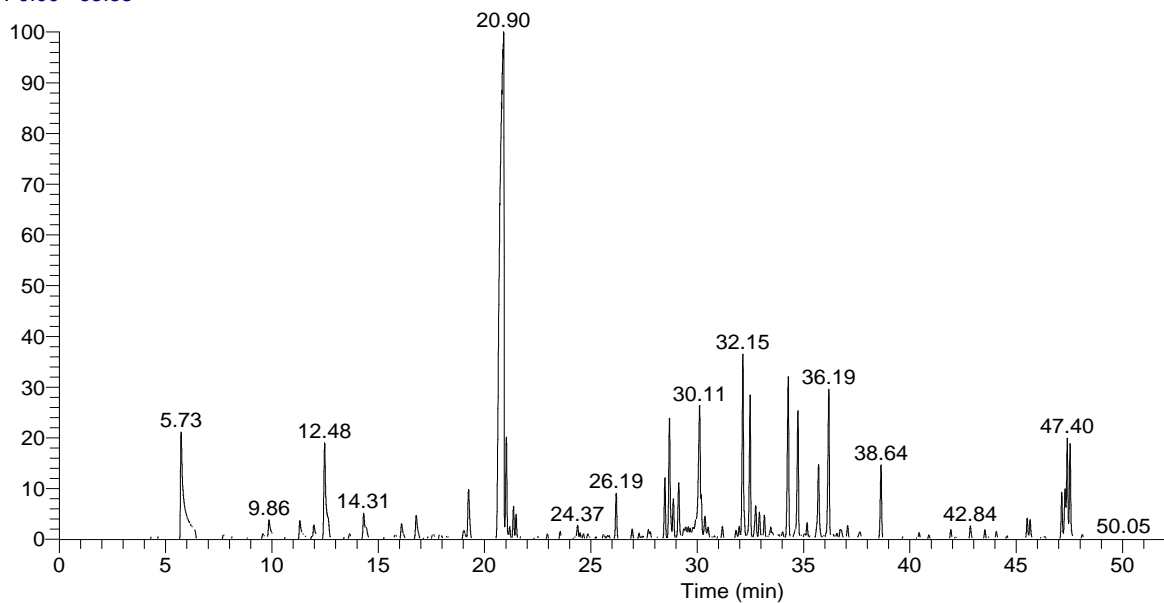
Αέριο χρωματογράφημα 3. Πτητικά συστατικά αφεψήματος χαμομηλιού Mc-1.

RT: 0.00 - 63.33



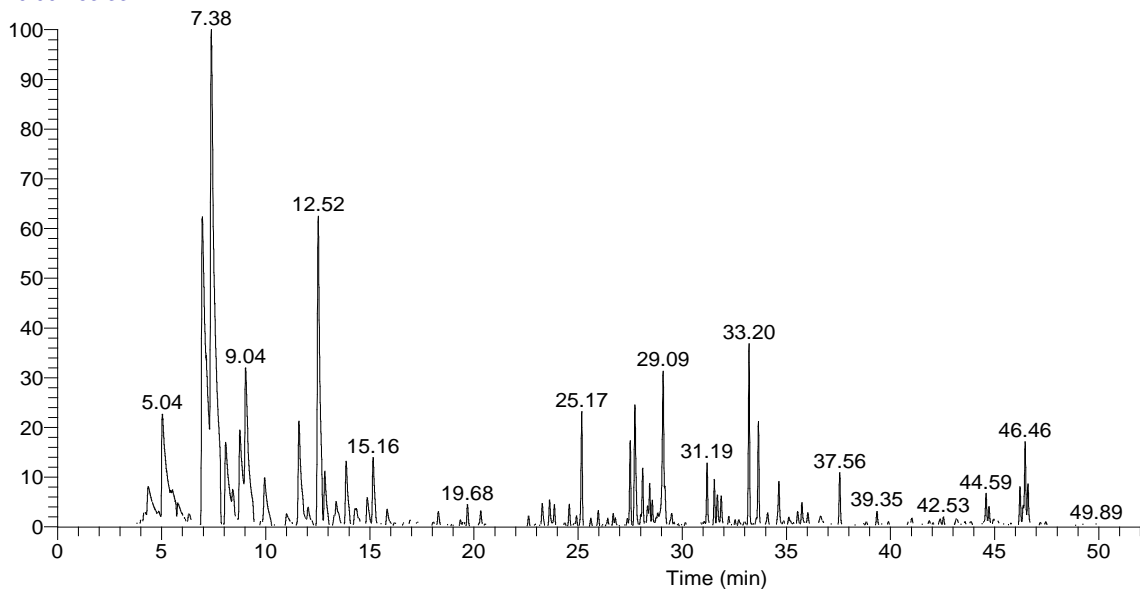
Αέριο χρωματογράφημα 4. Αιθέριο έλαιο αφιθιάς Aa-1.

RT: 0.00 - 63.33



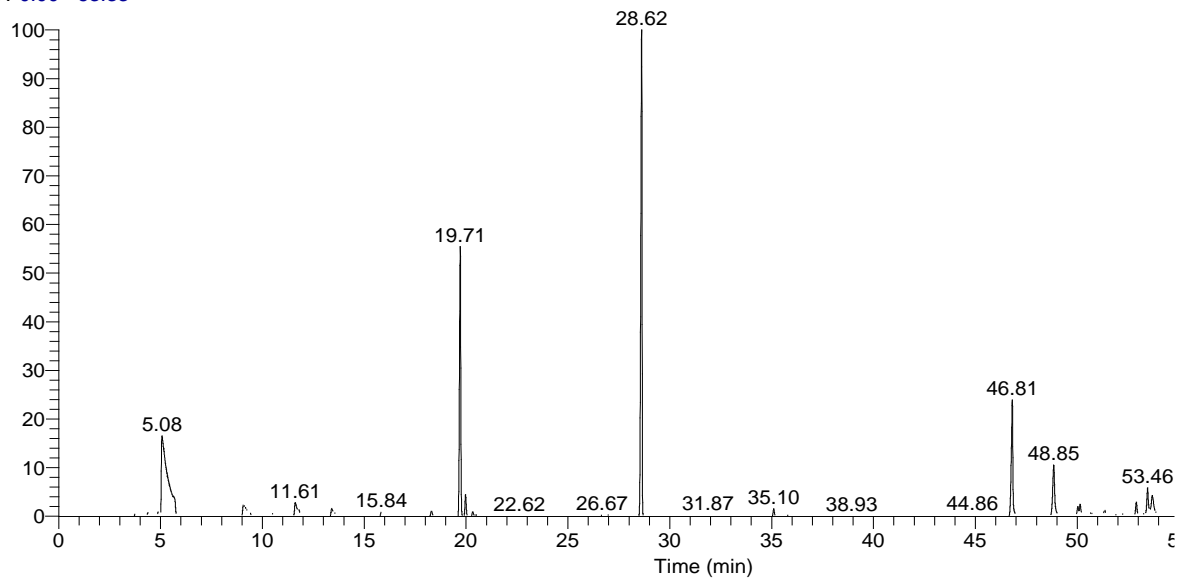
Αέριο χρωματογράφημα 5. Αιθέριο έλαιο αγιθιάς Aa-2.

RT: 0.00 - 63.33



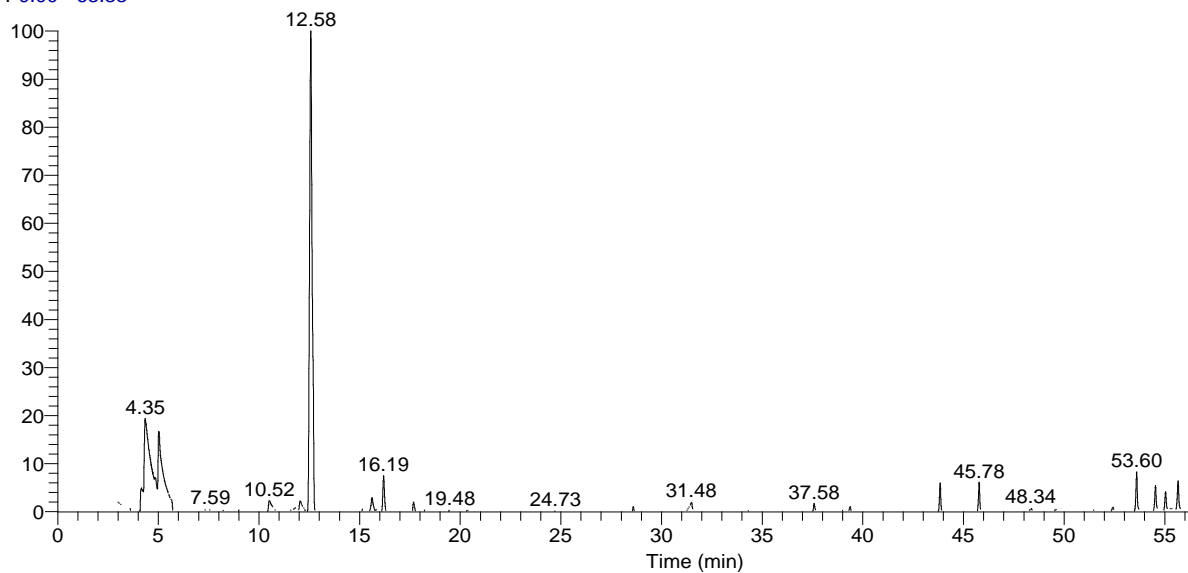
Αέριο χρωματογράφημα 6. Αιθέριο έλαιο αγιθιάς Aa-A.

RT: 0.00 - 63.33



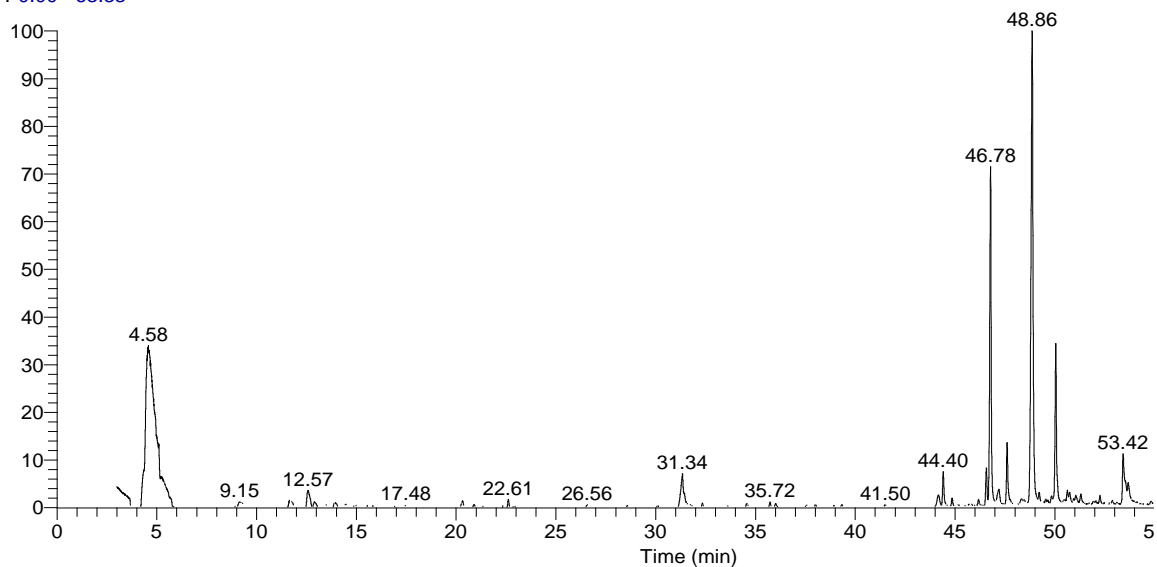
Αέριο χρωματογράφημα 7. Πτητικά συστατικά αφεψήματος αψιθιάς Aa-2.

RT: 0.00 - 63.33



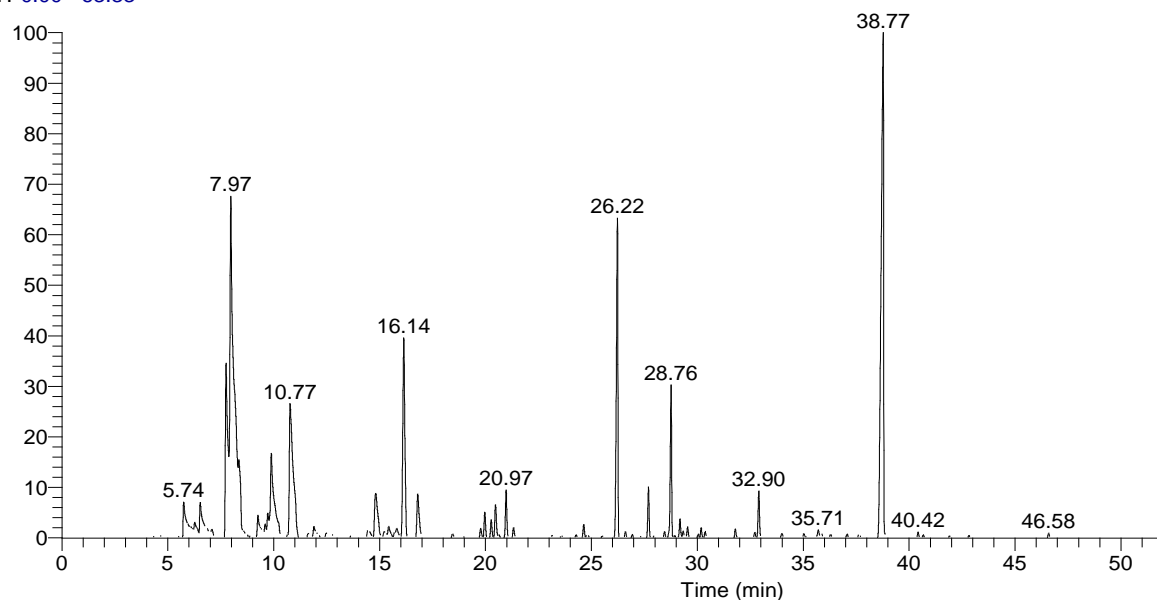
Αέριο χρωματογράφημα 8. Πτητικά συστατικά αφεψήματος αψιθιάς Aa-3.

RT: 0.00 - 63.33



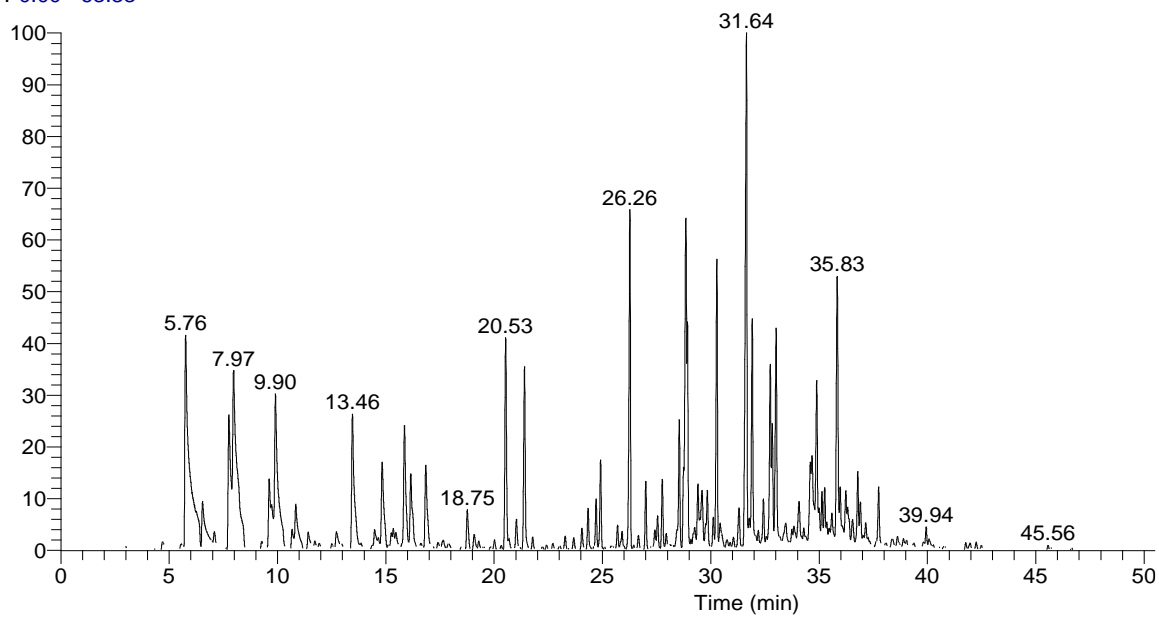
Αέριο χρωματογράφημα 9. Πτητικά συστατικά αφηνήματος αγιθιάς Αα-Α.

RT: 0.00 - 63.33



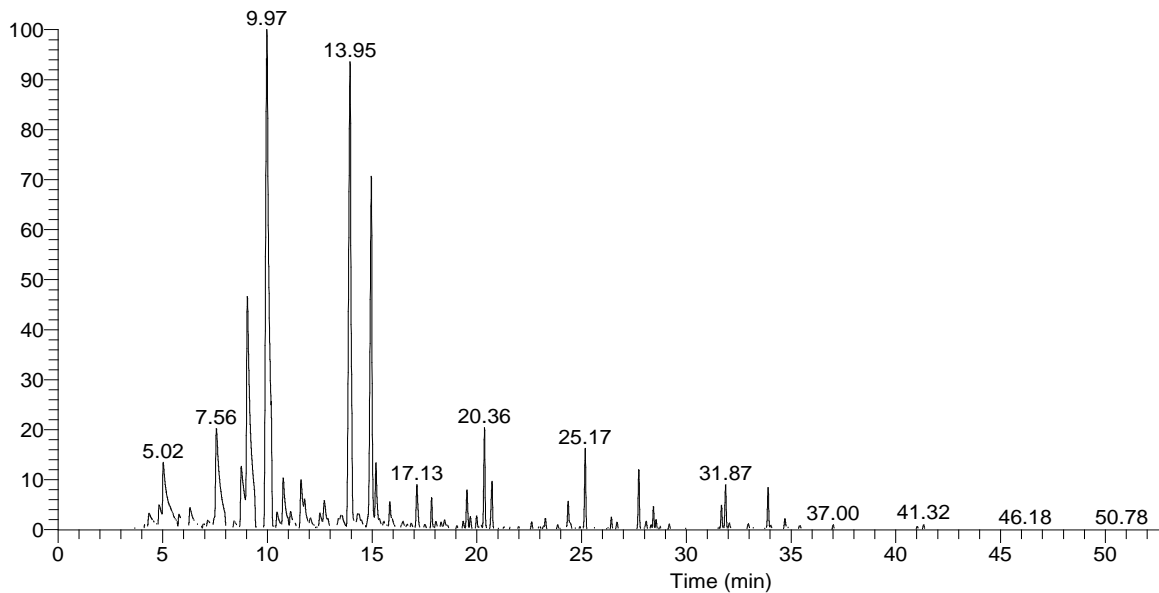
Αέριο χρωματογράφημα 10. Αιθέριο έλαιο αγιλλέας Αm-2.

RT: 0.00 - 63.33



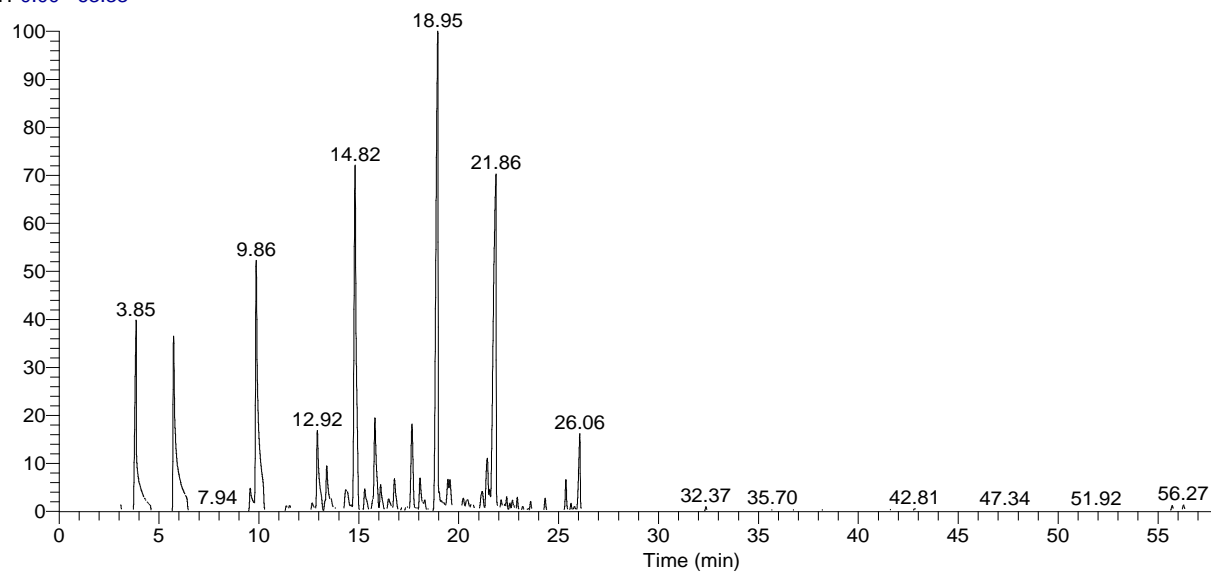
Αέριο χρωματογράφημα 11. Αιθέριο έλαιο αγιλλέας Am-3.

RT: 0.00 - 63.33



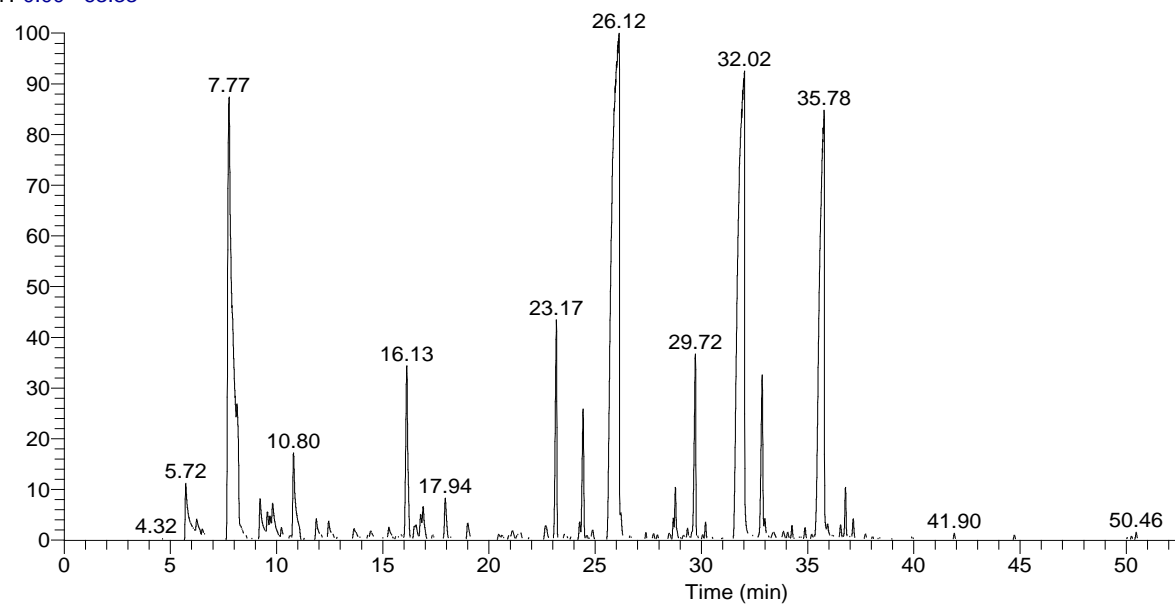
Αέριο χρωματογράφημα 12. Αιθέριο έλαιο αγιλλέας Am-A.

RT: 0.00 - 63.33



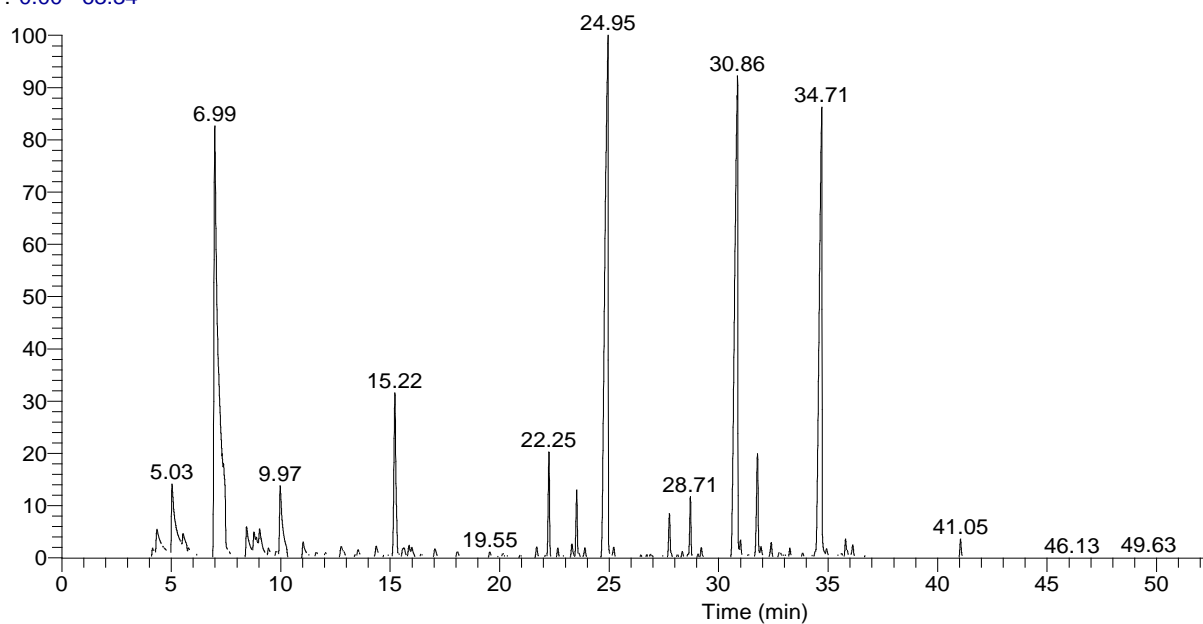
Αέριο χρωματογράφημα 13. Πτητικά συστατικά αφεψήματος αχιλλέας Am-1.

RT: 0.00 - 63.33



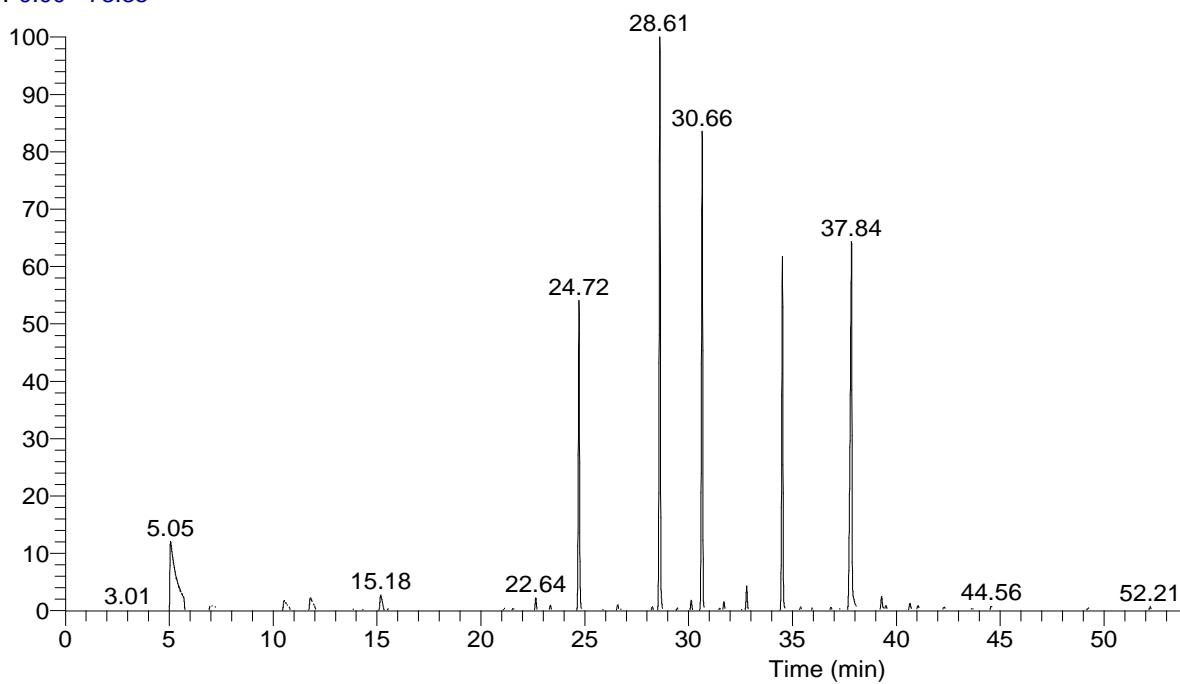
Αέριο χρωματογράφημα 14. Αιθέριο έλαιο εστραγκόν Ad-1.

RT: 0.00 - 63.34



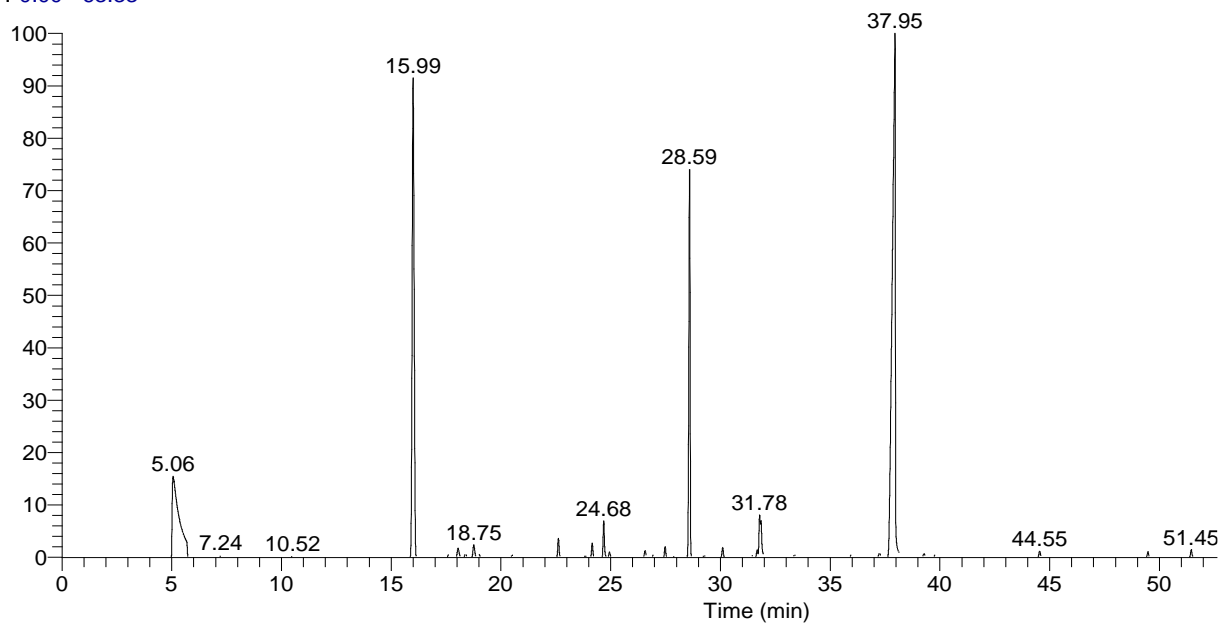
Αέριο χρωματογράφημα 15. Αιθέριο έλαιο εστραγκόν Ad-2.

RT: 0.00 - 73.35



Αέριο χρωματογράφημα 16. Πηκτικά συστατικά αφεψήματος εστραγκόν Ad-2.

RT: 0.00 - 63.33



Αέριο χρωματογράφημα 17. Πτητικά συστατικά αφεψήματος εστραγκόν Ad-A.