



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ



«Μελέτη των συστατικών του βαλσαμόχορτου (*Hypericum perforatum* L.) και εκχυλισμάτων του σε ελαιόλαδο»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΜΑΡΙΑ Ι. ΣΤΡΙΓΓΛΟΓΙΑΝΝΗ

Επιβλέπων: Πέτρος Α. Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ, 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ



«Μελέτη των συστατικών του βαλσαμόχορτου (*Hypericum perforatum* L.) και εκχυλισμάτων του σε ελαιόλαδο»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΜΑΡΙΑ Ι. ΣΤΡΙΓΓΛΟΓΙΑΝΝΗ

Επιβλέπων: Πέτρος Α. Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ, 2018

Π.Μ.Σ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη των συστατικών του βαλσαμόχορτου (*Hypericum perforatum* L.) και εκχυλισμάτων του σε ελαιόλαδο»

ΜΑΡΙΑ Ι. ΣΤΡΙΓΓΛΟΓΙΑΝΝΗ

Έτος εγγραφής: 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ταραντίλης Πέτρος (Επιβλέπων), Καθηγητής ΓΠΑ

Παπάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Μαλλούχος Αθάνασιος, Λέκτορας ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2018

*Την παρούσα εργασία την αφιερώνω
στον Μάκη και την οικογένειά μου!*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αγαπητοί καθηγητές, συμφοιτητές και φίλοι, αξιότιμοι αναγνώστες, η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε και κυρίως ολοκληρώθηκε με πολύ κόπο και αγώνα και ο συναισθηματικός μου κόσμος βγαίνει βίαια μπροστά! Η ανεπάρκεια οικονομικών πόρων σε συνδυασμό με μία χρόνια και ανίατη ασθένεια όπως είναι η Σκλήρυνση κατά Πλάκας, κατέστησαν την ολοκλήρωσή της παρούσας διατριβής ένα αρκετά περίπλοκο και δύσκολο εγχείρημα. Για το λόγο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους ανθρώπους που με στήριξαν και μου έδωσαν τη δύναμη, μέσα από πολλές αναβολές και καθυστερήσεις, να ολοκληρώσω αυτό που με πολλή αγάπη και πολλά όνειρα ξεκίνησα πριν από μερικά χρόνια.

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω – πρώτα από όλους - την μητέρα μου Παναγιώτα Χριστοδούλου και τον πατέρα μου Ιωάννη Στριγγλόγιαννη, για τα πρωινά εκείνα που ξύπνησαν και τα βράδια που ξαγρύπνησαν, για να εργαστούν σε συνθήκες πέρα από τις δυνάμεις τους και τις αντοχές τους, με σκοπό να μου εξασφαλίσουν τη δυνατότητα να συνεχίσω τις σπουδές μου και την μεταπτυχιακή μου μελέτη.

Επίσης, ευχαριστώ τον ομάδα του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφεραν καθ'όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της εργασίας μου και συγκεκριμένα την κυρία Δήμητρα Δαφερέρα και τον κύριο Χάρη Κανάκη καθώς και τις φίλες που απέκτησα σε αυτά τα 15 τετραγωνικά μέτρα Νεφέλη, Ελπίδα, Τζίνα, Στελλίνα, Κατερίνα Αλεξάνδρα και περάσαμε μαζί λύπες, χαρές, επιτυχίες και αποτυχίες.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον καθηγητή μου και επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου διατριβής κύριο Πέτρο Ταραντίλη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να μελετήσω ένα θέμα που επιθυμούσα καιρό και θεωρούσα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αλλά και για τη στήριξη που μου παρείχε καθ'όλη την διάρκεια της εκπόνησής της. Επίσης ευχαριστώ τον κύριο Χρήστο Παππά που με στήριξε από την πρώτη μέχρι και την τελευταία μέρα και ήταν πάντα πρόθυμος να απαντήσει σε κάθε απορία και ανησυχία μου καθώς και τον κύριο Αθανάσιο Μαλλούχο για την επιστημονική του συμβολή. Παράλληλα, ευχαριστώ τους προμηθευτές των δειγμάτων ξηρής δρόγης βάλσαμου, ελαιολάδου & βαλσαμελαίων που αναφέρω σε επόμενη ενότητα αναλυτικά για την δωρεάν παροχή των πρώτων υλών για τα πειράματά μου.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, που ανέχτηκαν τα αρνητικά μου συναισθήματα και την εκδήλωσή τους κάθε φορά που οι δυσκολίες και οι φόβοι μου ήταν τόσο μεγάλες/οι που οι λέξεις «Τα παρατάω» και «Δεν αντέχω άλλο» ήταν οι πιο κοινές στο άκουσμά τους από εμένα. Τέλος ευχαριστώ τον Μάκη Κολιό, τον άνθρωπο που μου έδωσε τη δύναμη να γράψω αυτές τις 150 σελίδες και έδωσε νόημα στη ζωή μου τη στιγμή που όλα όσα ανέφερα στις πρώτες σειρές, προσπαθούσαν μανιωδώς να μου το στερήσουν μία για πάντα. Τον άνθρωπο με «Α» κεφαλαίο! Τον Άνθρωπό μου! Σε ευχαριστώ για όλα! Σας ευχαριστώ για όλα!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη των συστατικών του βαλσαμόχορτου (*Hypericum perforatum* L.) και εκχυλισμάτων του σε ελαιόλαδο

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μία βιβλιογραφική αλλά και πειραματική μελέτη του φυτού Βάλσαμο ή αλλιώς Υπερικό (*Hypericum perforatum* L.) και του ελαϊκού του εκχυλίσματος, κοινώς γνωστό ως Βαλσαμέλαιο (*Oleum Hyperici*). Ο κύριος σκοπός της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής είναι να μελετήσει τα συστατικά του βαλσαμελαίου και να αναλύσει τις διαφοροποιήσεις, ποιοτικά και ποσοτικά, που προκύπτουν ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισής τους (παραδοσιακός ή εργαστηριακός). Τέλος, θα μελετηθεί η επουλωτική δράση του φυτού και των διαφόρων εκχυλισμάτων του, η οποία είναι η πιο σημαντική από τις βιολογικές δράσεις που το χαρακτηρίζουν.

Το βιβλιογραφικό μέρος της διατριβής αποτελείται από εισαγωγικά στοιχεία του φυτού που περιλαμβάνουν την ποικιλομορφία που παρουσιάζει ο χημειότυπος ανάλογα με την εποχή καλλιέργειας και συλλογής του. Επιπλέον, αναλύονται οι σημαντικότερες τις βιολογικές δράσεις του φυτού όπως είναι η αντιοξειδωτική, η αντιμικροβιακή, η αντικαταθλιπτική και η αντικαρκινική. Αναφέρεται ο παραδοσιακός τρόπος παρασκευής του βαλσαμελαίου καθώς και η διαφοροποίηση στη βιολογική δράση και τη σύσταση του εκχυλίσματος βάσει της επιλογής της ελαϊκής βάσης που χρησιμοποιείται ως εκχυλιστής. Τέλος, παρουσιάζεται η επουλωτική δράση του φυτού και πιο συγκεκριμένα ο μηχανισμός δράσης των ουσιών που είναι υπεύθυνες για την διαδικασία της επούλωσης, καθώς αποτελεί την κυριότερη δράση που χαρακτηρίζει και το βαλσαμέλαιο.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εφαρμόστηκαν οι βασικότερες τεχνικές ενόργανης χημικής ανάλυσης όπως είναι η Αέρια και η Υγρή Χρωματογραφία, η Φασματοσκοπία Υπερύθρου και Raman, η Φασματομετρία Μαζών και Υπεριώδους – Ορατού καθώς και τεχνικές βιοδραστικότητας όπως η μέθοδος Folin – Ciocalteu, μετρήσεις κυτταροτοξικότητας μέσω υπολογισμού της ATP, μετρήσεις τοξικότητας μέσω του αναλυτή Microtox και μικροσκοπικές παρατηρήσεις της επουλωτικής ικανότητας και δράσης των διαφόρων εκχυλισμάτων μέσω ενός σετ δοκιμής επουλωτικής δράσης. Στα ελαϊκά εκχυλίσματα, μεταξύ άλλων, υπολογίστηκαν και οι ποιοτικοί συντελεστές «K» του ελαιολάδου καθώς και οι ολικές υπερικίνες των διαφόρων βαλσαμελαίων (εμπορικών και εργαστηριακών).

Ένα από τα βασικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα, είναι πως η βιοδραστικότητα του υπέρικου, όσον αφορά την επουλωτική δράση σε δερματικές τομές κρίνεται αδιαμφισβήτητη. Το αφέψημα αναδुकνεύεται το πιο δραστικό εκχύλισμα ενώ ακολουθεί το υδρόλυμα της σφαιρικής χοάνης που παραλαμβάνεται κατά την διαδικασία της υδροαπόσταξης. Η τοξικότητα των εκχυλισμάτων συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Το αιθέριο έλαιο βρέθηκε πλούσιο σε πτητικά συστατικά, αρκετά εκ των οποίων παρουσιάζονται πολύ σταθερά και σε υψηλή περιεκτικότητα, με αποτέλεσμα να

εντοπίζονται και στην υδατική φάση του αφεψήματος, που είναι η πιο συνηθισμένη παρασκευή για κατανάλωση του φυτού.

Διαφοροποιήσεις στις συνθήκες παρασκευής του ελαϊκού εκχυλίσματος φαίνεται να επιφέρουν διαφοροποίηση στη σύσταση αλλά και στο χρώμα του βαλσαμελαίου που προκύπτει. Επιπλέον παρατηρήθηκε πως όσο πιο έντονο ήταν το κόκκινο χρώμα του εκχυλίσματος, τόσο πιο υψηλή ήταν η περιεκτικότητα σε ολικές υπερικίνες. Το αποτέλεσμα αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι δύο αυτές παράμετροι (χρώμα βαλσαμελαίου – ολικές υπερικίνες) συσζετίζονται σε μεγάλο βαθμό.

Λέξεις κλειδιά:	Βότανα, Βάλσαμο, Βαλσαμέλαιο, Επουλωτική Δράση, Υπερικίνες, Υπερφορίνη, Αιθέριο Έλαιο, Αφέψημα, Εκχύλιση, Ελαϊκό Εκχύλισμα, Οργανικό Εκχύλισμα, Υδατικό Εκχύλισμα, Υδρο - Απόσταξη, Αέρια Χρωματογραφία, Φασματομετρία Μαζών, Φασματοσκοπία Υπερύθρου, Φασματοσκοπία Raman, Φασματομετρία Υπεριώδους – Ορατού, Μεθυλεστεροποίηση, Λιπαρά Οξέα, Εστέρες Λιπαρών Οξέων, Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο (Folin – Ciocalteu), Ολικές Υπερικίνες, Τοξικότητα (Microtox), Κυτταροτοξικότητα (ATP), Μικροσκόπιο, Επούλωση Δερματικών Κυττάρων
------------------------	---

ABSTRACT

Study of the constituents of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and its oleic extracts

The current thesis presents a bibliographic and experimental study of the St. John's Wort herb or *Hypericum perforatum* L. and its oleic extract, commonly known as Oleum Hyperici. The main aim of this master thesis is to study the components of St. John's Wort Oils and to analyze the quantitative and qualitative differentiations appearing, depending on their extraction method (traditional or laboratory). Lastly, the healing effect of the plant and its various extracts will be studied, which is the most important of the biological actions that characterize it.

The bibliographic part of the thesis consists of introductory data of the plant which include the diversity of the plant's chemotype according to its cultivation and collection period. Furthermore, the most important biological activities, such as the antioxidant, the antimicrobial, the antidepressant and the anticancer, are analyzed. The traditional way of Oleum Hyperici production is presented, as well as the differentiation to its biological activities and composition, due to the oil base used as an extractor. Finally, the healing effects of the plant and particularly the mechanism of action of the plant's substances that are responsible for the healing process, are being presented as this the main action which characterizes Oleum Hyperici.

In the performed experiments the basic techniques of instrumental chemical analysis were applied, such as Gas Chromatography, Infrared and Raman Spectroscopy, Mass and Ultraviolet – Visible Spectrometry, as well as Bioactivity Assays such as the Folin - Ciocalteu Method, Cytotoxicity Measurements by calculation of ATP, toxicity measurements by the Microtox analyzer and microscopic observations of the healing activity and action of the various extracts by a Wound Healing Kit Assay. In the oleic extracts the quantitative "K" factors were also calculated as well as the total Hypericins of the various Oleum Hypericis (commercial and laboratory).

One of the key findings from the above experiments and is that the bioactivity of St. John's wort and specifically the healing activity on skin incisions is unquestionable. The decoction was found to be the most active extract, followed by the hydrolyzate of the spherical funnel which derives from the hydro-distillation

process. The toxicity of the extracts was highly correlated with its total phenolic content. The essential oil was found rich in volatile components, many of which are presented very stable and in high concentration, thereby they are also found in the aqueous phase of the decoction, which is the most common preparation for the plant's consumption.

Differentiations in the oily extract preparation conditions results in a differentiation of the composition and the color of the resulting Oleum Hyperici. Moreover it was observed that the stronger the red color of the extract was, the higher the content of total Hypericins. As a result, the conclusion that there is a high correlation between the two parameters (Oleum Hyperici color - Total Hypericins) can be drawn.

<p>Key Words:</p>	<p>Herbs, St. John's Wort, Oleum Hyperici, Wound Healing Effect, Hypericins, Hyperforin, Essential Oil, Decoction, Extraction, Oleic Extract, Organic Extract, Aqueous Extract, Hydro - Distillation, Gas Chromatography, Mass Spectrometry, InfraRed Spectroscopy, Raman Spectroscopy, Ultraviolet – Visible Spectroscopy, Methylesterification, Fatty Acids, Esters of Fatty Acids, Total Phenolic Content (Folin – Ciocalteu), Total Hypericins, Toxicity (Microtox), Cytotoxicity (ATP), Microscope</p>
--------------------------	---

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Υπερικό (<i>Hypericum perforatum</i> L.) – Το φυτό «Βάλσαμο».....	1
1.1.1. Βοτανική Ταξινόμηση.....	1
1.1.2. Προέλευση – Μορφολογικά Χαρακτηριστικά – Καλλιέργεια.....	2
1.1.3. Ονομασία.....	5
1.1.4. Χρήσεις – Εθνοβοτανικές Αναφορές.....	6
1.1.5. Εμπορικές Χρήσεις – Εμπορικά Σκευάσματα.....	9
1.1.6. Χημική Σύσταση – Βιοδραστικά Συστατικά.....	11
1.2.Ελαϊκό Εκχύλισμα Βάλσαμου – Βαλσαμέλαιο – Oleum Hyperici.....	22
1.2.1. Ελαϊκά Εκχυλίσματα Φαρμακευτικών & Αρωματικών Φυτών.....	22
1.2.2. Βαλσαμέλαιο & Παραδοσιακός Τρόπος Παρασκευής.....	23
1.2.3. Επιλογή Ελαίου Βάσης για την Παρασκευή Βαλσαμελαίου.....	25
1.3. Βιολογικές Δράσεις Υπέρικου Γενικά.....	27
1.3.1. Αντιοξειδωτική Δράση.....	27
1.3.2. Αντιμικροβιακή Δράση.....	28
1.3.3. Αντιφλεγμονώδης Δράση.....	30
1.3.4. Αντικαταθλιπτική Δράση.....	31
1.3.5. Νευροπροστατευτική Δράση – Ενίσχυση Εγκεφαλικής Λειτουργίας.....	32
1.3.6. Αντινεοπλασιακή Δράση.....	33
1.4. Επουλωτική Δράση Υπέρικου.....	34
1.4.1. Μηχανισμός Επουλωτικής Δράσης Υπέρικου.....	34
1.4.2. Επουλωτική Δράση Υδατικών & Οργανικών Εκχυλισμάτων Υπέρικου.....	37
1.4.3. Επουλωτική Δράση Ελαϊκών Εκχυλισμάτων Υπέρικου Βαλσαμελαίου.....	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
2.1. Σχεδιάγραμμα Πειραματικής Πορείας.....	44
2.2. Πρώτες Ύλες.....	45
2.3. Προετοιμασία – Επεξεργασία Φυτικού Υλικού.....	45
2.4. Διαδικασία Κρυοξήρανσης – Λυοφυλίωσης.....	46
2.5. Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης.....	46
2.5.1. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών (GC- MS).....	48
2.5.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR).....	49
2.5.3. Φασματοσκοπία Raman (FT-Raman).....	56
2.5.4. Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis).....	61
2.6. Τεχνικές Ελέγχου Βιοδραστικότητας.....	65
2.6.1. Μέτρηση Ολικών Φαινολικών Συστατικών – Folin Ciocalteu.....	65
2.6.2. Μέτρηση Τοξικότητας – Αναλυτής Microtox®.....	65
2.6.3. Μέτρηση Κυτταροτοξικότητας με τη Μέθοδο Υπολογισμού ATP.....	66
2.7. Τεχνικές Ελέγχου Επουλωτικής Δράσης.....	67
2.7.1. Μικροσκοπική Παρατήρηση – Wound Healing Effect.....	67
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	70
3.Α. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΦΥΤΟΥ – <i>Hypericum perforatum</i> L.....	70

3.A.1. Προσδιορισμός Υγρασίας και Ξηρής Ουσίας (Ξ.Ο.) Δείγματος.....	70
3.A.2. Λήψη Φασμάτων IR με την τεχνική DRIFT.....	70
3.A.3. Παρασκευή Υδατικού Εκχυλίσματος – Αφέψημα.....	71
3.A.4. Λυοφυλίωση Εκχυλισμάτων Υπέρικου & Συμπύκνωση Οργανικών Εκχυλισμάτων σε Περιτροφικό Συμπυκνωτή (Rotary Evaporator).....	74
3.A.5. Παρασκευή Οργανικών Εκχυλισμάτων Υπέρικου.....	74
3.A.6. Υδροαπόσταξη με Συσκευή Clevenger.....	75
3.A.7. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών (GC-MS) (Αιθέριο έλαιο & Οργανική Φάση Αφεψήματος).....	77
3.A.8. Μετρήσεις Βιοδραστικότητας & Τοξικότητας.....	79
3.B. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΒΑΛΣΑΜΕΛΑΙΟΥ – <i>Oleum Hyperici</i>.....	83
3.B.1. Προετοιμασία Φυτικού Υλικού & Προετοιμασία Βαλσαμελαίου.....	83
3.B.2. Φασματοσκοπική Μελέτη Βαλσαμελαίου με Φασματοσκοπία IR & Raman.....	84
3.B.3. Φασματοφωτομετρικές Μέθοδοι Ανάλυσης.....	85
3.B.4. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών (GC-MS) - Ελαιόλαδο & Βαλσαμέλαιο).....	86
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
4.A. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΦΥΤΟΥ – <i>Hypericum perforatum L.</i>	
4.A.1. Αποτελέσματα Φασματοσκοπικής Ανάλυσης FT-IR (DRIFT).....	88
4.A.2. Αποτελέσματα Χρωματογραφικής Ανάλυσης με GC-MS.....	91
4.A.3. Αποτελέσματα Ελέγχων Βιοδραστικότητας & Τοξικότητας.....	97
4.B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΒΑΛΣΑΜΕΛΑΙΟΥ – <i>Oleum Hyperici</i>.....	104
4.B.1. Φασματοσκοπική Μελέτη με Φασματοσκοπία Raman & ATR.....	104
4.B.2. Αποτελέσματα Φασματοφωτομετρικών Μεθόδων Ανάλυσης UV-Vis...109	
4.B.3. Αποτελέσματα Χρωματογραφικής Ανάλυσης των Εστέρων των Λιπαρών Οξέων των Ελαίων με GC-MS.....	112
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	115
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	121
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	127-142

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Υπερικό (*Hypericum perforatum* L.) – Το φυτό «Βάλσαμο»

1.1.1. Βοτανική Ταξινόμηση



Εικόνα 1: *Hypericum perforatum* L.

Το φυτό *Hypericum perforatum* L. ανήκει στην οικογένεια Hypericaceae, που ορισμένοι την ταυτίζουν με την οικογένεια Guttiferae (σταγονοφόρα), της τάξης των Theales, η οποία περιλαμβάνει περίπου 300 είδη, εκ των οποίων τα 200 ανήκουν στο γένος *Hypericum*. Στην Ελλάδα υπάρχουν αυτοφυή περίπου τα 15 είδη αυτού του γένους. Τα σπουδαιότερα από τα αυτοφυή της χώρας μας εκτός από το *Hypericum perforatum*, είναι τα: *H. perforatum* L., *H. barbatum* Jaeg., *H. athoum* Boiss. & Orph., *H. olympicum* L., *H. crispum* L., *H. tetrapterum* L. Αναφέρονται ακόμη ως φαρμακευτικά του γένους *Hypericum* και τα παρακάτω είδη που αυτοφύονται σε διάφορες χώρες: *H. tomentosum*, *H. bithynicum*, *H. glandulosum*, *H. balearicum*, *H. roeperanum*, *H. drummondii*, *H. calycinicum* και *H. brasilliense*. (Κουτσός Θ.Β., 2006)

Η τάξη Theales (Guttiferales) περιλαμβάνει δενδρώδη ή θαμνώδη φυτά, σπάνια ποώδη και σε αυτή ανήκει και η οικογένεια Hypericaceae ή αλλιώς Υπερικήδες. Η οικογένεια αυτή, περιλαμβάνει δένδρα ή θάμνους, σπάνια ποώδη φυτά. Επίσης, περιλαμβάνει φυτά με ελαιογόνους αδένες ή ρητινοφόρους αγωγούς πλούσια σε αιθέρια έλαια, δίοικα ή μονόοικα. Στην οικογένεια ταξινομούνται 50 περίπου γένη με 1000 είδη τροπικών και θερμών περιοχών. Στην Ελλάδα αντιπροσωπεύεται από το γένος *Hypericum*. Το γένος *Hypericum* περιλαμβάνει αρκετά μονοετή ή πολυετή είδη τα οποία φύονται σε πετρώδη κυρίως εδάφη και είναι πλούσια σε υπερικίνη, κερσετίνη, τουρίνη και σε υπεροσίδια. Το *H. perforatum* μαζί με το *H. crispum* ανήκουν στα κυριότερα είδη της ελληνικής χλωρίδας και είναι φυτά φρυγανώδη, εμφανιζόμενα ως ζιζάνια σε εγκαταλελειμμένους αγρούς. Τα υπερικά είναι φυτά φωτοδυναμικά και επιφέρουν στα λευκοκέφαλα πρόβατα δερματίτιδα γύρω από το λαιμό γνωστή με το όνομα “φουκάλιασμα”. Η δερματίτιδα εμφανίζεται μετά από κατανάλωση τρυφερών φυτών και ταυτόχρονη έκθεση των προβάτων σε έντονο ηλιακό φως. (Στεφανάκη-Νικοφοράκη Μ., 1999)

Rank	Scientific Name and Common Name
Kingdom	Plantae – Plants
Subkingdom	Tracheobionta – Vascular plants
Superdivision	Spermatophyta – Seed plants
Division	Magnoliophyta – Flowering plants
Class	Magnoliopsida – Dicotyledons
Subclass	Dilleniidae
Order	Theales
Family	Clusiaceae / Guttiferae – Mangosteen family
Genus	<i>Hypericum</i> L. – St. Johnswort
Species	<i>Hypericum perforatum</i> L. – common St. Johnswort

Εικόνα 2. Βοτανική ταξινόμηση του φυτικού είδους (*Hypericum perforatum* L.)
Πηγή: United States Department of Agriculture, USDA

1.1.2. Προέλευση – Μορφολογικά Χαρακτηριστικά - Καλλιέργεια

Προέλευση

Το γένος *Hypericum* L. (*Hypericaceae*) περιλαμβάνει, σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες καταμετρήσεις 469 είδη που είτε προϋπάρχουν φυσικά είτε έχουν εισαχθεί σε κάθε ήπειρο του κόσμου πλην της Ανταρκτικής. Τα είδη αυτά εμφανίζονται ως βότανα, θάμνοι και σπανιότερα δένδρα σε μία ποικιλία οικοτόπων στις εύκρατες περιοχές και στα βουνά με μεγάλο υψόμετρο στις τροπικές περιοχές, αποφεύγοντας μόνο τις ζώνες με ακραίες τιμές ξηρασίας, θερμοκρασίας και/ή αλατότητας. (Crocketta S.L, Norman K. B., 2011)

Είδη του γένους *Hypericum* απαντώνται από τον ισημερινό μέχρι τα μέσα γεωγραφικά πλάτη όλων των Ηπείρων σε πεδινές και ορεινές περιοχές, κυρίως του Βορείου Ημισφαιρίου. Το είδος *H. perforatum* απαντάται αυτοφυές σε όλη την Ελλάδα σε χέρσες και ξηρές τοποθεσίες, σε βουνά και σε μη καλλιεργούμενα (σπανίως είναι ζιζάνιο σε καλλιέργειες) χωράφια, φτωχά έως μέτριας γονιμότητας. Καλλιεργείται ως φαρμακευτικό φυτό κυρίως στη Β. Αμερική και σε χώρες της Κεντρικής και Α. Ευρώπης. (Κουτσός Θ.Β, 2006)

Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Είναι πολυετής πόα ύψους 20-80 cm. Ο βλαστός είναι όρθιος, κυλινδρικός που διατρέχεται κατά μήκος από δύο αντίθετα τοποθετημένες γωνιώδεις προεξοχές. Τα φύλλα έχουν μήκος 3-5 εκ. και είναι επιμήκη, ωοειδή, άμισχα και αντίθετα διαταγμένα. Στο φως, πάνω στα φύλλα διακρίνονται εκκριματοφόρα κύτταρα που περιέχουν την ουσία υπερικίνη. Στην αρχή της ανάπτυξης των φυτών και μέχρι την έκπτυξη των ανθοφόρων βλαστών, τα φυτά έχουν πολύ πλάγια ανάπτυξη. Η άνθηση των φυτών αρχίζει τον Ιούνιο και διαρκεί μέχρι και δύο μήνες. Τα άνθη, στα οποία επίσης παρατηρούνται εκκριματοφόρα κύτταρα με υπερικίνη, έχουν πέντε λογχοειδή πέταλα, είναι κιτρινόχρυσα έως πορτοκαλεόχρωα με μαύρα στίγματα και σχηματίζουν κορυφαίες ταξιανθίες φόβης. Ο καρπός είναι κάψα που προεξέχει αρκετά από τον κάλυκα.



Εικόνα 3: Άνθη *Hypericum perforatum* L. και εκκριματοφόρα κύτταρα με υπερικίνη

Απαιτήσεις σε κλίμα, έδαφος, θρεπτικά στοιχεία και νερό

Ως αυτοφυές προτιμά ηλιόλουστες θέσεις και εδάφη που σχηματίστηκαν από ασβεστολιθικά πετρώματα που έχουν pH μέχρι 8. Οι καλλιέργειες αποδίδουν καλά και σε ελαφρώς όξινα εδάφη μέχρι pH 6, αρκεί να στραγγίζουν καλά. Δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία και νερό. Σε πολύ πτωχά εδάφη τα φυτά μπορούν να βοηθηθούν με λίγη αζωτούχο λίπανση. Επίσης απαιτούνται μερικά ποτίσματα στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών, κατά την εγκατάσταση των νέων καλλιεργειών. Το βαλσαμόχορτο σε μολυσμένο έδαφος ή ατμόσφαιρα, συγκεντρώνει πολλά βαρέα μέταλλα (Hg, Ni, Cd, Gr, Pd) γι' αυτό οι συλλογείς των αυτοφυών πρέπει να αποφεύγουν τη συλλογή του από μολυσμένες περιοχές, όπως είναι οι άκρες των εθνικών οδών των υψηλών ταχυτήτων κ.ά.

Τρόπος πολλαπλασιασμού και εποχή εγκατάστασης της καλλιέργειας

Το βαλσαμόχορτο πολλαπλασιάζεται με σπόρο. Η εγκατάσταση της καλλιέργειας γίνεται νωρίς την άνοιξη, όταν η μέση θερμοκρασία του εδάφους είναι 10 °C, ανεξάρτητα εάν υπάρχει ακόμη πιθανότητα παγετού ή όχι. Τα σπορεία για την απόκτηση γυμνόριζων σποροφύτων πρέπει να ετοιμάζονται εντός θερμοκηπίων από το πρώτο δεκαπενθήμερο του Ιανουαρίου μέχρι το Φεβρουάριο, το αργότερο. Για κάθε στρέμμα που θα καλλιεργηθεί με γυμνόριζα σπορόφυτα χρειάζονται 4-5 τ.μ. σπορείου. Για να διαμορφωθούν καλές συνθήκες φυτρώματος, σε κάθε τετραγωνικό μέτρο σπορείου ρίχνονται 35 λίτρα τύρφης και 35 λίτρα περλίτη ή 40 κιλά λεπτής άμμου και ανακατεύονται καλά μαζί με το χώμα του σπορείου, βρέχονται και κατόπιν ακολουθεί η σπορά. Ο σπόρος που απαιτείται ανά τ.μ. σπορείου είναι 2 γραμμάρια (8000 σπόροι ανά γραμμάριο) περίπου και δεν χρειάζεται κάλυψη μετά τη σπορά, αλλά ένα απλό ελαφρό πάτημα, καθώς χρειάζεται φως για το φύτευμα. Επειδή ο σπόρος μένει ακάλυπτος τα σπορεία πρέπει να ποτίζονται καθημερινά με λίγο νερό. Ο σπόρος φυτρώνει σε 7-10 μέρες. Τα σπορεία στη συνέχεια δέχονται όλες τις καλλιεργητικές φροντίδες (ποτίσματα, βοτανίσματα) και τα φυτά είναι έτοιμα για μεταφύτευση σε 10-12 εβδομάδες μετά τη σπορά. Μπορούν να αποκτηθούν και φυτάρια σε γλαστράκια.

Τρόπος καλλιέργειας

Στο χωράφι, όπου θα εγκατασταθεί η καλλιέργεια του βαλσαμόχορτου, πρέπει να γίνονται οι συνηθισμένες προετοιμασίες για την εγκατάσταση των Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών. Τα φυτάρια φυτεύονται σε αποστάσεις 60-80 cm. μεταξύ των γραμμών, 20-30 cm. επί της γραμμής και ποτίζονται αμέσως. Η επιθυμητή πυκνότητα φύτευσης είναι 5500-6500 φυτά. Στη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών γίνονται σκαλίσματα και βοτανίσματα για τον έλεγχο των ζιζανίων. Η διάρκεια ζωής της φυτείας είναι 6-7 χρόνια. Τα ζιζάνια αποτελούν πρόβλημα συνήθως το πρώτο και το δεύτερο έτος της φυτείας και μπορούν να αντιμετωπιστούν όχι μόνο με σκαλίσματα αλλά και με πλαστική εδαφοκάλυψη.

Συγκομιδή, απόδοση

Το φυτό καλλιεργείται για τη δρόγη του που αποτελείται από τις αποξηραμένες ανθοφόρες κορυφές μαζί με τα φύλλα του φυτού. Η καλλιέργεια φθάνει σε πλήρη απόδοση το δεύτερο έτος. Η συλλογή του υπέργειου τμήματος των φυτών γίνεται στο στάδιο της ανθοφορίας και ακολουθεί η ξήρανση σε ξηραντήρα με ελεγχόμενες συνθήκες και συσκευάζονται σε μορφή αποξηραμένης δρόγης. Η απόδοση σε ξηρή δρόγη σε ξερικές καλλιέργειες μπορεί να φτάσει τα 120 κιλά/στρέμμα. Οι απαιτήσεις της αγοράς για τη δρόγη είναι: περιεκτικότητα σε ξένες ύλες το μέγιστο 2%, στάχτη 5-8% και ελάχιστη περιεκτικότητα υπερικίνης 0,4%.

Ασθένειες, εχθροί, προβλήματα

Στις χώρες που καλλιεργείται εντατικά, βορειότερα της Ελλάδας, οι οποίες έχουν πιο υγρό κλίμα, προσβάλλεται από τους μύκητες *Colletotrihum* και *Anthraco*. Π.χ. μείζον πρόβλημα στη Σερβία είναι ο πρώτος ενώ στις Η.Π.Α ο δεύτερος μύκητας. Αντιμετωπίζονται όχι πάντα με επιτυχία με σκευάσματα χαλκού. Στην Ελλάδα στα αυτοφυή φυτά δεν έχουν παρατηρηθεί τέτοιες ασθένειες. Πρόβλημα για καλλιέργειες βαλσαμόχορτου στο κλίμα της Ελλάδας (δεν υπάρχουν αναφορές για συστηματικές καλλιέργειες) ίσως αποτελέσουν ορισμένα έντομα (κολεόπτερα ή κάμπιες λεπιδοπτέρων) που η βιβλιογραφία τα αναφέρει ως συνήθεις εχθρούς του είδους. (Κουτσός Θ.Β, 2006)

1.1.3. Ονομασία

Το *Hypericum perforatum* (**Υπερικό το διάτρητο**), γνωστό και ως βαλσαμόχορτο ή **βότανο του Αγίου Ιωάννη** (St. John's Wort), είναι ένα πολυετές ποώδες φυτό, εγγενές στην Ασία και την Ευρώπη. Η κοινή ονομασία βαλσαμόχορτο, σημαίνει χόρτο που γιατρεύει και προέρχεται από τη λέξη βάλαμο (γιατρικό). Άλλες κοινές ονομασίες του φυτού είναι **σπαθόχορτο, κοψοβότανο, προδρόμου βότανο, περίκη, λειχηνόχορτο, χελωνόχορτο, βάλαμο, βαλσαμόχορτο, μαστίγιο του διαβόλου, Χάρη του Θεού, Θαύμα του Θεού, βότανο της μάγισσας, αγούδουρας ή γούθουρα**. Σε άλλες γλώσσες: *Amber touch-and-heal, balm-of-warrior's wound, balsana, bassant, Blutkraut, bossant, corancillo dendlu, devil's scorge, Eisenblut, flor de Sao Joa, fuga daemonum, goatweed hartheu, heofarigo on herba de millepertius, herba hyperici, herrgottsblut, hexenkraut, hierba de San Juan, hipericao, hiperico hipericon, Johanniskraut, klammath weed, liebeskraut, LI 160, lord God's wonder plant, millepertius pelicao, perforate, pinillo de oro, rosin rose, tenturotou, Teufelsflucht, touch and heal Walpurgiskraut, witcher's herb*.

Υπάρχουν διάφορες εξηγήσεις για την προέλευση των ονομασιών “υπερικών” και “βότανο του Αγίου Ιωάννη”. Γενικά πιστεύεται ότι το όνομα “υπερικών” προέρχεται ετυμολογικά από τις ελληνικές λέξεις “υπέρ” (πάνω) και “εικών” (εικόνα), δηλαδή το φυτό που είναι υπεράνω της εικόνας, ενώ η ονομασία “βότανο του Αγίου Ιωάννη” μπορεί να οφείλεται στο ότι τα άνθη του φυτού ανθίζουν χρονικά περίπου την ημέρα του Αγίου Ιωάννη (24 Ιουνίου). (Barnes J, Anderson L.A, Phillipson J.D, “St John's 2001)

Η λέξη *υπερικών* έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για πολλούς λεξικογράφους παρόλο που η σημασία και η προέλευσή της είναι αρκετά σαφής. Η ονομασία δόθηκε από τους *αρχαίους Έλληνες* σε ένα φυτό που κρεμούσαν πάνω από τις θρησκευτικές τους εικόνες για να αποκρούσουν τα κακά πνεύματα από πάνω τους. Ακριβώς ποια είδη ήταν αυτά που χρησιμοποιούσαν δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα, αν και αρκετοί

συγγραφείς έχουν αναφέρει ως πιο πιθανά τα *H. empetrifolium* και *H. triquetrfolium* (*H. crispum* L.). Η πρώτη αναφορά του ονόματος που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα, είναι τον 2^ο αιώνα π.Χ. από τον **Νίκανδρο** (Αλεξιφάρμακα, γραμμή 603). Το φυτό αναφέρεται επίσης από τον **Διοσκουρίδη** (Περί ύλης ιατρικής, κεφάλαιο 3, 171), τον **Γαληνό** (12, 148) και τον **Πλίνιο** (26, 53). Η δύναμη του φυτού να διώχνει τα κακά πνεύματα ήταν πιο σημαντική για την κοινωνία εκείνης της εποχής, σε χρονικές περιόδους όπου τότε όπως πιστεύεται υπήρχαν σε αφθονία. Τέτοιες μέρες ήταν οι Απόκριες – Halloween (31 Οκτωβρίου) και η ημέρα του Θερινού ηλιοστασίου (23 Ιουνίου). Η παγανιστική εορτή στις 23 Ιουνίου υιοθετήθηκε από τον Χριστιανισμό και από τον 6^ο αιώνα και μετά η ημέρα εκείνη αφιερώθηκε στον Άγιο Ιωάννη τον Βαπτιστή. Η ημέρα αυτή έκτοτε είναι τόσο σημαντική για τον Χριστιανισμό που σε κάποια μέρη όλος ο Ιούνιος αναφέρεται ως “Αγιαννίτης”. Έτσι, το υπερικό, που χρησιμοποιούταν παραδοσιακά εκείνη τη μέρα, πήρε το όνομα *St John’s Wort* ή αλλιώς “το βότανο του Άι Γιάννη του Βαπτιστή”. Σε άλλες περιοχές μακριά από το Αιγαίο, το *H. perforatum* που είναι το πιο συνηθισμένο είδος του γένους *Hypericum* στην Ευρώπη, χρησιμοποιούταν ευρέως αντί του *H. empetrifolium* το οποίο δεν ήταν αυτόχθον εκεί. Ως εκ τούτου, μία μεσαιωνική ονομασία για αυτό το φυτό ήταν “*fuga daemonum*” δηλαδή “πτήση των δαιμόνων ή κάνει τους δαίμονες να φύγουν”. (Ernst E., 2003)

1.1.4. Χρήσεις – Εθνοβοτανικές Αναφορές

Το βάλαμο είναι ένα καθαρώς φαρμακευτικό φυτό. Η δρόγη του, που αποτελείται από τις αποξηραμένες ανθοφόρες κορυφές και τα φύλλα του φυτού, αποτελεί την πρώτη ύλη στις φαρμακοβιομηχανίες προς παρασκευή διαφόρων σκευασμάτων για την αντιμετώπιση της ήπιας μορφής κατάθλιψης, που οφείλεται σε ορισμένες βιολογικά δραστικές ουσίες που περιέχει, κυρίως της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης. Έχει ακόμα αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και διουρητικές ιδιότητες. Είναι γραμμένο στη Γερμανική, τη Γαλλική, τη Ρωσική φαρμακοποιία, της Ε.Ε. κ.ά. χωρών. Τελευταία διερευνάται πειραματικά εάν η συχνή χρήση των ουσιών αυτών έχουν αρνητική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Βρίσκει πολλές εφαρμογές και στη λαϊκή ιατρική (πολλές από τις θεραπευτικές ιδιότητες της δρόγης είναι γνωστές από την αρχαιότητα) ως επουλωτικό πληγών και εγκαυμάτων. Προς το σκοπό αυτό, η ξηρή δρόγη τοποθετείται σε ελαιόλαδο, όπου μένει αρκετό καιρό μέχρι να εκχυλιστούν οι δραστικές ουσίες, το οποίο κατόπιν χρησιμοποιείται εξωτερικά για την επούλωση πληγών ανθρώπων και ζώων. Η χρήση του βαλσαμόχορτου, ως αφέψημα δρόγης για θεραπευτικούς σκοπούς, πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή και δεν πρέπει να χορηγείται ποτέ σε βρέφη και παιδιά (έχουν αναφερθεί θάνατοι σε βρέφη). (Κουτσός Θ.Β, 2006)

Το *Hypericum perforatum* L. έχει χρησιμοποιηθεί για πολλούς αιώνες ως φαρμακευτικό φυτό και η αποτελεσματικότητά του καθώς και οι ενδείξεις χρήσης του έχουν τεκμηριωθεί από πολλούς επιστήμονες, με αφετηρία τον **Νίκανδρο** και στη

συνέχεια τον **Ιπποκράτη** (400 π.Χ), τον **Παράκελσο**, τον **Διοσκουρίδη** (Περί ύλης ιατρικής, κεφάλαιο 3, 171), τον **Γαληνό** (12, 148) και τον **Πλίνιο** (26, 53). Είναι ένα φυτό στο οποίο έχουν εφαρμοστεί πολλές κλινικές δοκιμές, παρέχοντας υψηλού επιπέδου αποτελέσματα και συμπεράσματα, ενώ έχει χαρακτηριστεί ως το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είδος σε εθνοβοτανικές έρευνες. (Koyu H., Haznedaroglu M.Z, 2015)

Το φυτό είναι γνωστό για περισσότερο από 2.400 χρόνια και διάσημο για τις επουλωτικές του ιδιότητες από τον 5^ο αιώνα μ.Χ. περίπου. Πολλές φυλές Ινδιάνων (**Cherokee, Iroquois, Montagnais**), χρησιμοποιούσαν το φυτό ως αντιπυρετικό και φάρμακο κατά του βήχα. Ο **Gerard (1597)**, διάσημος Άγγλος βοτανολόγος, αναφερόταν στην αλοιφή που έφτιαχνε από το υπέρικο, ως την καλύτερη και πιο πολύτιμη φυσική επουλωτική θεραπεία. Με δικά του λόγια:

“Το βαλσαμόχορτο, με τα άνθη του και τους σπόρους του όταν βράσει και καταναλωθεί προκαλεί την ούρηση και είναι ακριβώς καλό κατά της πέτρας στην ουροδόχο κύστη. Τα φύλλα, λιωμένα, είναι καλό να τοποθετούνται πάνω σε πληγές, καψίματα και έλκη.”

Η πιο αποτελεσματική και ευρέως γνωστή χρήση του φυτού μετά τον 16^ο αιώνα, ήταν το αιθέριο έλαιό του ως θεραπεία των πληγών και των μωλώπων (μελανιές). Ήταν τόσο αποτελεσματικό, που οι χειρουργοί γιατροί όχι μόνο το χρησιμοποιούσαν για να καθαρίζουν τις χειρουργικές τομές, αλλά το πρόσθεσαν και στην πρώτη επίσημη φαρμακοποιεία του Λονδίνου ως *Oleum Hyperici*.

Ο **Culpeper (1652)** σημείωσε τις μοναδικές επουλωτικές ιδιότητες της αλοιφής του φυτού. Τόνισε επίσης, τις ευεργετικές του ιδιότητες σε περίπτωση τσιμπήματος ή δαγκώματος από δηλητηριώδη ζώα-έντομα.

Άλλες αναφορές, αφορούν τη κατανάλωση του αφειψήματός του για άμμο και πέτρες του ουρητήρα (**Hill, 1808**), για πέτρα στα νεφρά, ως αντιπυρετικό και ανθελμινθικό, για τον ίκτερο και τους ρευματισμούς (**Greene, 1824**). Ο **Griffith (1847)** επισήμανε ότι το φυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έλαιο ή αλοιφή για έλκη, όγκους και ως διουρητικό.

Ένας από τους πιο διακεκριμένους χρήστες του φυτού ήταν ο Διοσκουρίδης ο οποίος το πρότεινε για την ισχιαλγία, για καψίματα και για περιοδικούς πυρετούς.

Στα τέλη του 1800, ο **King (1876)** έγραψε στο “The American Dispensatory” για τη χρήση του φυτού σε λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, τη διάρροια, τον ίκτερο, την έμμηνο ρήση, την υστερία, τους νευρικούς κλονισμούς και την κατάθλιψη και τέλος ως επουλωτικό για τραύματα. Λίγα χρόνια μετά, προτάθηκε η χρήση του βάμματος του φυτού για την αντιμετώπιση ερεθισμών της σπονδυλικής στήλης, σοκ, της διάσεισης και της υστερία (**Felter and Lloyd, 1898**).

Τον τελευταίο αιώνα, ο **Duke (1985)** εξιστορεί την χρήση του στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία του καρκίνου της μήτρας, του καρκίνου των ωοθηκών, του στομάχου καθώς και όγκων του λεμφικού συστήματος. Αναφέρει επίσης μία ρώσικη εφαρμογή, για το βρογχικό άσθμα και πολλές άλλες μεταξύ των οποίων, η διάρροια, η χρόνια καταρροή, η νευρασθένεια, η λύσσα και οι αιμορραγίες, μεταξύ άλλων που έχουν ήδη αναφερθεί παραπάνω.

Ο **Moerman (1998)** ανέφερε τη χρήση του φυτού από τις φυλές των Ινδιάνων. Η φυλή των **Cherokee** το χρησιμοποιούσε ως εμμηναγωγό, αντιδιαρροϊκό, αντιπυρετικό (το έγχυμα), θεραπεία για πληγές και αφροδίσια νοσήματα, για την αιμορραγία της μήτρας, για το δάγκωμα του φιδιού (μασημένη ρίζα ως κατάπλασμα) και για πλύσεις για να γίνουν τα παιδιά της φυλής πιο δυνατά (χρήση της ρίζας μόνο). Στη φυλή **Montagnais** έπιναν το αφέψημα του φυτού για θεραπεία του βήχα ενώ οι **Iraquois** το χρησιμοποιούσαν ως αντιπυρετικό και για την πρόληψη της στειρότητας. (Sadiqqe Z., Naeem I., Maimoona A., 2010)

1.1.5. Εμπορικές Χρήσεις – Εμπορικά Σκευάσματα

Ευρέως, στο υπερίκο έχει αποδοθεί η αντικαταθλιπτική δράση για εσωτερική χρήση (κατάποση) και ως επουλωτικό μέσο για πληγές και εγκαύματα για εξωτερική χρήση (επάλειψη). Πολλά εμπορικά σκευάσματα που βασίζονται σε αυτό το φυτό και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ήπιας και της μέτριας κατάθλιψης, είναι πολύ δημοφιλή στις Ηνωμένες Πολιτείες όπου αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μερίδιο της αγοράς. Επιπλέον, στη Γερμανία, έχει συνταγογραφηθεί πιο συχνά από ότι η φλουοξετίνη (Fluoxetine), ένα από τα πιο γνωστά αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Χάρη στην πληθώρα δραστικών ενώσεων και τις βιολογικές δράσεις που έχουν κατά καιρούς αποδοθεί στο φυτό και αναλύονται σε επόμενες ενότητες της παρούσας διατριβής, κυκλοφορούν πολλά σκευάσματα που έχουν ως βάση και κύριο συστατικό τη δρόγη του υπέρικου. Κάποιες από τις κύριες κατηγορίες των σκευασμάτων αυτών, που κυκλοφορούν στο εμπόριο για φαρμακευτική χρήση ή ως συμπληρώματα διατροφής, περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Όνομασία – Περιγραφή		Ενδείξεις Σκευάσματος
Βαλσαμέλαιο		Είναι καταπραϊντικό και αποσυμφορητικό της επιδερμίδας. Έχει επουλωτικές, αντιφλεγμονώδεις, στυπτικές ιδιότητες και αντιβακτηριδιακή δράση. Θεωρείται ηρεμιστικό και
(ελαϊκό υπέργειων υπέρικου μετά από έκθεση στον ήλιο)	εκχύλισμα τμημάτων σε ελαιόλαδο	
		



αγχολυτικό. Ειδικότερα ενδείκνυται για επάλειψη για την αντιμετώπιση των παρακάτω: Πληγές, ελαφρά εγκαύματα, έκζεμα, ερεθισμοί δερματικοί και Φλεγμονές της επιδερμίδας μετά από ακτινοθεραπεία, έλκη, νευραλγίες, ισχιαλγία, αρθρίτιδα, ρευματισμοί, ποδάγρα και οιδήματα. Συστήνεται επίσης για από του στόματος χορήγηση για εντερικές φλεγμονές.

Φυτική Κρέμα με Υπέρικο

(Φυτική κρέμα με 97% φυτικά συστατικά και έγχυμα υπέρικου. Περιέχει: 5% λάδι βάλσαμου, 0.5% εκχύλισμα βάλσαμου και 70% έγχυμα βάλσαμου).



Χρησιμοποιείται για την επούλωση και καταπραυντική του δράση και πιο συγκεκριμένα για: ήπια θερμικά και ηλιακά εγκαύματα, εκζέματα, ατοπικές δερματίτιδες, ψωριάσεις, πρόληψη δημιουργίας πληγών από κατακλίσεις αλλά και επούλωση. Επίσης ενυδατώνει την πολύ ξηρή επιδερμίδα

Αιθέριο Έλαιο Υπερικού

Αντιφλεγμονώδης, Αντιϊκή, Αντιμικροβιακή, Ηρεμιστική δράση.



Ελαιϊκό εκχύλισμα σε μορφή κάψουλας

(ελαιϊκό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων υπέρικου σε ελαιόλαδο μετά από έκθεση στον ήλιο, σε μορφή κάψουλας. Περιέχονται 430 mg εκχυλίσματος/κάψουλα)

Φυτικές ταμπλέτες υπέρικου

(Εκχύλισμα φρέσκων ανθέων υπέρικου, βιολογικής καλλιέργειας. Περιέχονται 330μg υπερικίνης / ταμπλέτα)

Φυτοκάψουλες – τιτλοδοτημένο εκχύλισμα υπέρικου

Περιέχονται: 300mg τιτλοδοτημένου εκχυλίσματος υπέρικου (1mg [0,3%] ολικές hypericins) σε σκόνη, 100mg ακατέργαστο (υπέργειο τμήμα υπέρικου) σε σκόνη / φυτοκάψουλα

Εκχύλισμα υπέρικου πλούσιο σε υπερικίνη

Τυποποιημένο εκχύλισμα υπέρικου. Περιέχονται 333mg εκχυλίσματος - 1000μg υπερικίνης / κάψουλα.



Ανακούφιση συμπτωμάτων ήπιας κατάθλιψης, στρες, άγχους και αϋπνίας. Καταπραΰνει το νευρικό σύστημα και καταπολεμά την κόπωση. Μπορεί να δράσει υποστηρικτικά έναντι της νευραλγίας, αρθρίτιδας και μυϊκών πόνων.

Ανακούφιση συμπτωμάτων ήπιας κατάθλιψης, στρες, άγχους και εποχικής συναισθηματικής διαταραχής.

Παρουσιάζει αντιβακτηριδιακές, αντιφλεγμονώδεις και κατά των ιών ιδιότητες. Επίσης έχει αντικαταθλιπτικές ιδιότητες και μπορεί να βοηθήσει θετικά καταστάσεις νευρικής υπερέντασης και ανησυχίας. Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως για τη βελτίωση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης.

Προσφέρει καταπραυντικές και ηρεμιστικές ιδιότητες, μπορεί να ελαττώσει την ήπια έως και μέτρια κατάθλιψη. Μπορεί να ανακουφίσει τη νευρικότητα, συμπεριλαμβανομένης αυτής που συνδέεται με την εμμηνόπαυση.

**Αναβράζοντα δισκία
υπέρικου ως συμπλήρωμα
διατροφής**

Περιέχονται 300mg
υδροαλκοολικού
εκχυλίσματος υπέρικου
(Extract Solvent Ethanol /
Water, DER 4:1) / δισκίο



Τονώνει τον οργανισμό,
ενισχύει την πνευματική
διαύγεια και την διάθεση και
βελτιώνει την ποιότητα του
ύπνου. Επίσης, βοηθά στην
αντιμετώπιση της ήπιας
κατάθλιψης και διαθέτει
επουλωτικές ιδιότητες.

Πίνακας 1. Εμπορικά σκευάσματα του φυτού *Hypericum perforatum* L.

1.1.6. Χημική Σύσταση - Βιοδραστικά Συστατικά

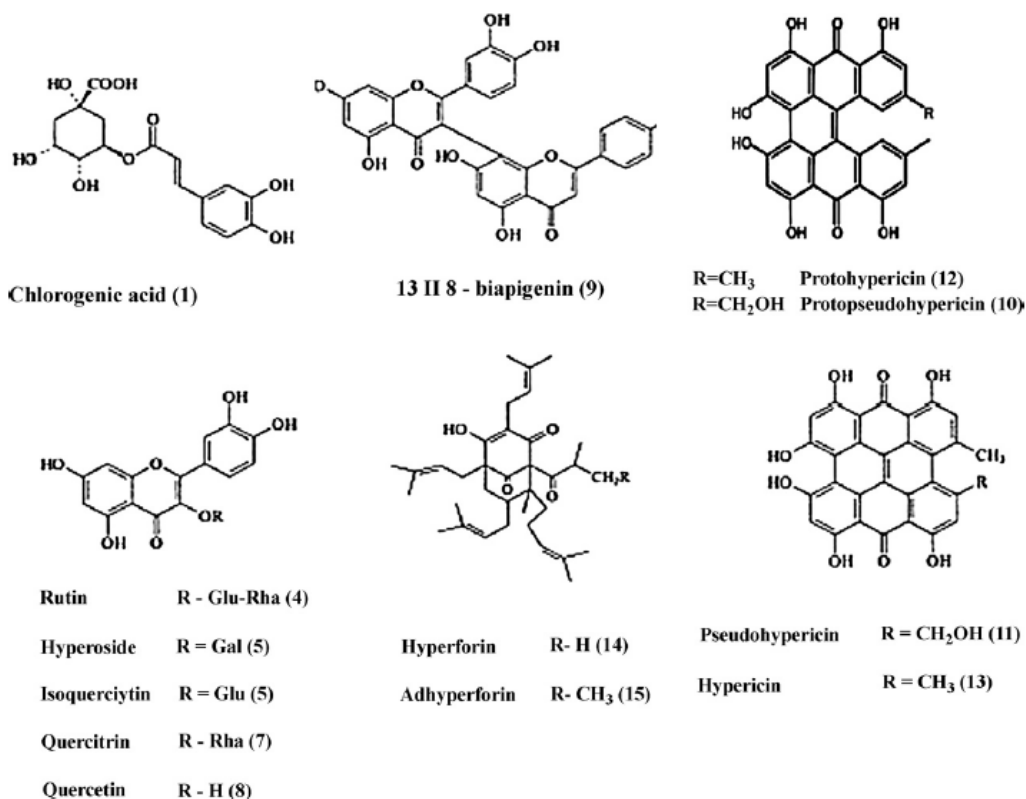
Το έντονο ενδιαφέρον για το φυτό αυτό σχετικά με την ήπια έως μέτρια κατάθλιψη, έχει οδηγήσει στην διερεύνηση των βιοδραστικών ενώσεων και άλλων ειδών του γένους *Hypericum*. Το βαλσαμόχορτο είναι η μόνη φυτική εναλλακτική των κλασσικών συνθετικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και πολυάριθμες έρευνες έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τη συγκεκριμένη δράση του φυτού.

Η χημική σύσταση του φυτού, που έχει γίνει έως τώρα γνωστή, περιλαμβάνει ομάδες όπως οι φλορογλουκινόλες, οι ναφθοδιανθρόνες, οι ξανθόνες, τα φλαβονοειδή κ.ά., με τις φλορογλουκινόλες και τις ναφθοδιανθρόνες να είναι οι επικρατέστερες για το είδος *Hypericum*. (Zhao J., Liu W., Wang J-C, 2015). Πιο συγκεκριμένα, τα κύρια δραστικά συστατικά που περιέχονται στο υπέρικο ανήκουν στις παρακάτω οικογένειες: (i) ναφθοδιανθρόνες (ii) φλορογλουκινόλες (iii) φλαβονοειδή (iv) διφλαβόνες (v) φαινυλοπροπανοειδή και (vi) προανθοκυανιδίνες. Ταυτόχρονα, εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες και διάφορες τανίνες, ξανθόνες, αιθέρια έλαια και αμινοξέα. (Barnes J., Anderson L.A, Phillipson J.D, 2001). Ως μεμονωμένες ουσίες, οι πιο δραστικές του φυτού έχει αποδειχθεί έως σήμερα πως είναι η υπερικίνη και η υπερφορίνη, μία ναφθοδιανθρόνη και μία πρενυλιωμένη φλορογλουκινόλη αντίστοιχα.

§ Φαινολικά Συστατικά

Οι κυριότερες ουσίες που περιέχονται στο βάλσαμο και ανήκουν σε αυτή την κατηγορία συγκαταλέγονται στις κύριες ομάδες των φλαβονοειδών, φαινολών, διφλαβονοειδών και φαινυλοπροπανοειδών. Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη κυριότερη ομάδα βιοδραστικών ουσιών του *Hypericum perforatum* L. (2%-4%). Οι κυριότερες αγλυκόνες φλαβονοειδών που έχουν ανιχνευτεί έως σήμερα περιλαμβάνουν την καμφερόλη, λουτεολίνη, μυρισετίνη και κερσετίνη. Το υπεροσίδιο (υπερίνη) και η ρουτίνη συνήθως κυριαρχούν μεταξύ των γλυκοσιδίων του φυτού, ακολουθούμενα

από την κερσετρίνη και ισοκερσετρίνη σε χαμηλότερα ποσοστά. Έχουν βρεθεί χημειότυποι που δεν περιέχουν καθόλου τη ρουτίνη ως συστατικό. Κάποιες από τις κυριότερες βιολογικές δράσεις των συστατικών που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και τις υπόλοιπες αυτής της ενότητας, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Επιπρόσθετα η καμφερόλη και η κερσετίνη ανήκουν στην υποκατηγορία των φλαβονολών, η λουτεολίνη συγκαταλέγεται στις φλαβόνες και τα υπεροσίδια, η ισοκερσετρίνη, η κερσετρίνη και η ρουτίνη στα γλυκοσίδια και τέλος περιέχονται και κατεχίνες. (Sadiqqe Z., Naeem I, Maimoona A., 2010, Barnes J, Anderson I.A, Phillipson D.J, 2001)



Εικόνα 4. Χημική Δομή Κυριότερων Βιοδραστικών Ουσιών του *Hypericum perforatum* L. (Hosna K. et. al, 2010)

Μία άλλη βασική κατηγορία φαινολικών συστατικών είναι οι φαινόλες. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οξέα όπως το καφεϊκό, χλωρογενικό, π-κουμαρικό, φερουλικό, π-υδροξυ-βενζοϊκό και βανιλλικό. (Barnes J., Anderson I.A, Phillipson J.D, 2001)

Οι διφλαβόνες επίσης, είναι μία σπάνια ομάδα βιοδραστικών ουσιών, που αποτελείται από διμερείς φλαβόνες και εντοπίζεται σε μερικά φυτικά είδη. Από την ομάδα αυτή, εντοπίζονται τρία κύρια συστατικά στο φυτικό είδος που μελετάμε: η Ι3',Π8''-διαπιγενίνη (0.1% - 0.5%), η αμεντοφλαβόνη (0.01%-0.05%) και η 6', 8''-δικερσετίνη. Παρόλο που η θεραπευτική δράση των συγκεκριμένων ουσιών δεν είναι ακόμα γνωστή, υπάρχουν στοιχεία για την αμεντοφλαβόνη που της αποδίδουν αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι έχει την ικανότητα

να προσδένεται στους εγκεφαλικούς υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών με συγγένεια ανάλογη αυτής της διαζεπάμης.

Τέλος, στα φαινολικά συστατικά συναντάμε την κατηγορία των φαινυλοπροπανοειδών. Οι ουσίες αυτές κυρίως προκύπτουν ως εστέρες των υδροξυκιναμικών οξέων, όπως το *π*-κουμαρικό και το καφεϊκό οξύ. Το χλωρογενικό οξύ εντοπίζεται στα εκχυλίσματα του *H. perforatum* σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 1%. Εκτός από τα προαναφερθέντα, έχουν αναφερθεί και τα φερουλικό, ισοφερουλικό, γεντισικό και σικμικό οξύ ως περιεχόμενα οξέα στο υπέρικο. (Sadiq Z, Naeem I, Maimoona A, 2010)

§ Αιθέριο Έλαιο – Πτητικά Συστατικά



Μέχρι σήμερα, οι βιολογικές δράσεις του φυτού έχουν μελετηθεί και καταγραφεί σε μία πληθώρα μελετών, οι κυριότερες από τις οποίες, επικεντρώνονται στις περιεχόμενες σε αυτό υπερίκίνη και υπερφορίνη. Παρόλα αυτά, αν και μικρότερες σε αριθμό, αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί και στα πτητικά συστατικά του αιθέριου ελαίου του φυτού με σκοπό την περαιτέρω χρήση του στην κοσμετολογία και την φαρμακοποιία. Οι κυριότερες δράσεις που του έχουν αποδοθεί έως σήμερα είναι η αντιοξειδωτική, αντιβακτηριδιακή και αντιμυκητιακή δράση. (Morshedloo M.R. et. al, 2015)

Εικόνα 5: Αιθέριο έλαιο Υπέρικου

Η απόδοση του υπέρικου σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται από 0.05-0.9% του ξηρού βάρους με κυριότερα συστατικά αυτά που αναφέρονται παρακάτω. Στο εμπόριο διατίθεται σε μικρές ποσότητες στην τιμή των 20-25 € τα 10 mL. Το άρωμά του μοιάζει με αυτό της βανίλιας και χρησιμοποιείται στην αρωματοθεραπεία για προβλήματα του αναπνευστικού, εκζέματα, ερεθισμένη επιδερμίδα, αγκώδεις και νευρικές διαταραχές. Το αιθέριο έλαιο του υπέρικου περιλαμβάνει μία ποικιλία από αλειφατικά συστατικά (2-μέθυλο-οκτάνιο, *n*- νονάνιο, *n*-δεκάνιο, *n*-εντεκάνιο, *n*-τετραδεκανόλη, 2-μέθυλο-δεκάνιο και 2-μέθυλο-δωδεκάνιο, μεταξύ άλλων) ανάμεσα στα διάφορα τερπενοειδή (*α*-πινένιο, *β*-πινένιο, γερανιόλη, *β*-καρνοφυλλένιο, *β*-φαρνεσένιο, χουμουλένιο και γερμακρένιο-*D*, επίσης μεταξύ άλλων). Έχουν αναφερθεί διαφορές στη βιοσύνθεση των σεσκιτερπενίων και των αλειφατικών υδρογονανθράκων στα διαφορετικά τμήματα του φυτού, όπως είναι τα φύλλα και τα άνθη. Επί παραδείγματι, τα ποσοστά σε περιεχόμενο *β*-καρνοφυλλένιο και οξείδιο του καρνοφυλλένιου εμφανίζονται υψηλότερα στο αιθέριο έλαιο από τα φύλλα, από ότι σε αυτό από τα άνθη. Αντιθέτως, τα συστατικά σπαθουλενόλη, βιριδοφλορόλη, καρτοτόλη, δωδεκανόλη και τετραδεκανόλη βρίσκονται σε υψηλότερη περιεκτικότητα στα άνθη παρά στα φύλλα. (Sadiq Z, Naeem I, Maimoona A, 2010)

Στον παρακάτω πίνακα, καταγράφονται τα χαρακτηριστικά πτητικά συστατικά που έχουν εντοπιστεί στο αιθέριο έλαιο υπέρικου (σε όλα τα είδη). Οι κύριες ομάδες που το χαρακτηρίζουν είναι υδρογονάνθρακες, μονοτερπένια και σесκίτερπένια. (Bertoli A, Cirak C., Teixeira da Silva J.A, 2011)

Table 3 Characteristic volatile compounds detected in the EOs of different *Hypericum* spp.

HYDROCARBONS	
aliphatic (saturated/unsaturated)	2-methyloctane, 3-methylnonane, <i>n</i> -decane, 2-methyl decane, <i>n</i> -undecane, 2,2,6-trimethyl-hepta-3,5-diene, 2-methyldodecane, <i>n</i> -tridecane, nonadecane, <i>n</i> -tricosane, <i>n</i> -heneicosane, <i>n</i> -docosane, <i>n</i> -tricosane, <i>n</i> -tetracosane, <i>n</i> -pentacosane, <i>n</i> -hexacosane, <i>n</i> -heptacosane, <i>n</i> -octacosane, <i>n</i> -nonacosane;
alcohols	<i>cis</i> -3-hexen-1-ol, 2-nonanol, undecanol, dodecanol, tetradecanol, pentadecanol;
aldehydes	benzene acetaldehyde, <i>trans</i> -2-hexenal, <i>n</i> -heptanal, <i>n</i> -octanal, <i>n</i> -nonanal, <i>E,E</i> -2,4-decadienal, <i>n</i> -octadecanal, <i>n</i> -dodecanal, 3,6-pentadecadienal;
ketone	acetophenone, 6-methyl-5-hepten-2-one, 2,6-dimethyl-3,5-heptanedione, 2-nonanone, 3-undecanone, 2-undecanone, 4-undecanone, pentadecan-2-one;
esters	methylbenzoate, 3-hexenylbenzoate;
etors	2-pentylfuran;
acids	myristic, hexanoic, <i>n</i> -octanoic, <i>n</i> -nonanoic, <i>n</i> -decanoic, <i>n</i> -dodecanoic, <i>n</i> -tetradecanoic, <i>n</i> -pentadecanoic, <i>n</i> -hexadecanoic.
MONOTERPENES They are formed from the coupling of two isoprene units (C ₁₀) and the most common structures with different functions are:	
hydrocarbons	<i>acyclic</i> : myrcene, camphene, <i>cis</i> - β -ocimene, <i>trans</i> - β -ocimene, limonene; <i>monocyclic</i> : α -thujene, verbenene, γ -terpinene, <i>p</i> -cimene, α/β -phellandrenes, <i>cis</i> sabinene hydrate, α -terpinolene; <i>bicyclic</i> : α/β -pinenes, 3-carene, camphene, sabinene;
alcohols	<i>acyclic</i> : geraniol, linalool, nerol; <i>monocyclic</i> : α -terpineol, δ -terpineol, 4-terpineol, <i>trans</i> -pinocarveol, <i>E</i> -anethole, <i>trans</i> -verbenol, myrtenol; <i>bicyclic</i> : borneol, fenchol;
aldehydes	<i>acyclic</i> : geraniol, α -campholenal, myrtenal, cuminyl aldehyde;
ketones	<i>monocyclic</i> : <i>trans</i> -thujone, pinocarvone, verbenone, pulegone, menthones, carvone, piperitone, piperitenone; <i>bicyclic</i> : camphor, fenchone, thuyone, ombellulone, pinocamphone, pinocarvone;
esters	<i>acyclic</i> : linalyl acetate/propionate, citronellyl acetate; <i>monocyclic</i> : menthyl or α -terpinyl acetate, camphor; <i>bicyclic</i> : isobornyl acetate;
ethers	1,8-cineole;
phenols	thymol, carvacrol, menthol, <i>E</i> -carveol, nerol, methyleugenol;
acids	myristic.
SESQUITERPENES They are formed from the assembly of three isoprene units (C ₁₅) and the extension of the chain increases the possibility of cyclisations with a great variety of structures and chemical functions.	
hydrocarbons	β -bourbonene, β -bisabolene, δ -cadinene, γ -cadinene, β -caryophyllene, α/γ -gurjunene, α/γ -muurolene, germacrene D, bicyclgermacrene, α -copaene, α -humulene, longifolene, α -curcumene, valencene, <i>trans</i> - β -farnesene, alloaromadendrene, γ -bisabolene, $\alpha/\beta/\delta$ -sclincene, α -gurjunene, germacrene B, γ -elemene, α -cubebene, aromadendrene, alloaromadendrene, viridiflorene;
alcohols	α/δ - <i>tr</i> -cadinol, bisabol, β -nerolidol, farnesol, cubenol, β -santalol, viridiflorol, ledol, spatulhenol, germacreinol;
ketones	pentadecanone, germacreone, <i>cis</i> -longipinan-2,7-dione, β -vetinone, turmerones;
epoxides	caryophyllene oxide, humulene epoxide II.

Πίνακας 2. Χημειοτυπικός Χαρακτηρισμός Αιθερίου Ελαίου του *Hypericum perforatum* L., (Bertoli A, Cirak C., Teixeira da Silva J.A, 2011)

Σύμφωνα με διάφορες φυτοχημικές μελέτες πάνω στο υπέρικο, έχει αναφερθεί ότι τα βασικά συστατικά του αιθερίου ελαίου ανήκουν σε διάφορες χημικές τάξεις και εμφανίζουν σημαντικές μεταβολή (ποιοτική και ποσοτική) στη σύνθεση. Αυτή η μεταβλητότητα θα μπορούσε να σχετίζεται με την επίδραση διάφορων παραγόντων, όπως γενετικούς παράγοντες, τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού, τα διάφορα είδη του γένους *Hypericum*, τις μεθόδους εκχύλισης, τις περιβαλλοντικές συνθήκες κ.ά. (Morshedloo M.R. et. al., 2015)

Χημειοτυπική μεταβλητότητα σύμφωνα με την περιοχή προέλευσης

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, μελετήθηκε η σύσταση του αιθερίου ελαίου του υπέρικου από υπέργεια τμήματα του φυτού κατά το στάδιο της ανθοφορίας που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Δυτικής Ευρώπης (Γαλλία, Ιταλία, Πορτογαλία, Ισπανία, Ελλάδα, Σερβία) καθώς επίσης και από την Τουρκία, τη Λιθουανία, το Ουζμπεκιστάν, την Κίνα και την Ινδία. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS). Λόγω της πληθώρας βιοσυνθετικών μονοπατιών που εξελίσσονται στον δευτερογενή μεταβολισμό του υπέρικου, είναι λογική η πολυπλοκότητα και μεταβλητότητα που εμφανίζεται στο αιθέριο έλαιό του. Μετά από σύγκριση των αιθερίων ελαίων από το *Hypericum perforatum* L. που φύεται σε περιοχές της Γαλλίας και της Σερβίας, βρέθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονταν από την παρουσία δύο κυρίως χημικών ομάδων και συγκεκριμένα από υδρογονάνθρακες και σεσκιτερπένια. Ωστόσο, υπέρικο που συλλέχθηκε από την Barelic, περιοχή της Σερβίας περιείχε ένα αξιοσημείωτο ποσοστό σε α -πινένιο (8.6%) ενώ το ίδιο είδος από τα βουνά Rujan, δεν περιείχε το συστατικό αυτό. Μονοτερπένια όπως το α - και β -πινένιο είναι τα κυριότερα συστατικά στο ελληνικό *Hypericum perforatum* L. (Petrakis PV, Couladis M, Roussis V, 2005)

Είδη του φυτού *Hypericum perforatum* L., από την περιοχή της Γαλλίας στις πρώτες μελέτες τους χαρακτηρίστηκαν από υψηλά ποσοστά 2-μέθυλο-οκτανίου (45%) και α -πινενίου (24%) ενώ το ίδιο είδος όταν συλλέχθηκε από περιοχές της Τουρκίας, της Σερβίας και της Ινδίας έδειξε το μονοτερπένιο α -πινένιο ως το κυριότερο συστατικό, το οποίο βρέθηκε σε περιεκτικότητες 50-67%, 3-9% και 67% αντίστοιχα. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το β -καρνοφυλλένιο και το οξείδιο του καρνοφυλλενίου είναι τα κυρίαρχα συστατικά του αιθερίου ελαίου του *Hypericum perforatum* L. από την περιοχή της νοτιοανατολικής Γαλλίας (16-19%, 16-17% αντίστοιχα) και της Σερβίας (14% περιεκτικότητα σε β -καρνοφυλλένιο). (Bertoli A, Cirak C, Teixeira da Silva J.A, 2011)

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα, το 2005, διάφοροι ερευνητές προσπάθησαν να ξεχωρίσουν 5 είδη υπέρικου, αυτόχθονα της ελληνικής χλωρίδας στην Κρήτη και το δυτικό Αιγαίο, βάσει της περιεκτικότητάς τους σε τερπενοειδή. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε η μέθοδος της κανονικής διακριτικής ανάλυσης σε 98 από τα πιο άφθονα τερπενοειδή των ειδών *Hypericum*. Μελετήθηκαν τα εξής είδη: *H. empetrifolium*, *H. perforatum*, *H. rumeliacum*, *H. perforatum* και *H. triquetrifolium*. Η ανάλυση με την τεχνική GC-MS έδειξε ως τα 5 κυριότερα συστατικά του αιθερίου ελαίου του *H. perforatum* τα: 2-μέθυλο-οκτανίου, α -πινένιο, (*E*) – καρνοφυλλένιο, γ -μουουρολένιο και σπαθουλενόλη. Επίσης, βρέθηκαν κάποια συστατικά τα οποία χαρακτηρίζουν μόνο το συγκεκριμένο είδος (α -θουγέννη, (*E*) – sabinene – hydrate acetate, 1,7,-δι-επι- β - κεδρένιο και (*E*) – νερολιδόλη) καθώς και κάποια συστατικά τα οποία χαρακτηρίζουν όλα τα υπόλοιπα είδη, έστω σε ίχνη, αλλά όχι το *H. perforatum* (καμφένιο, α -καμφολενάλη, καμφορά, camphene hydrate,

βιριδιφλορένιο, καδαλενάλη και 1- επι- κουμπενόλη). (Petraakis P.V, Couladis M, Roussis V, 2005)

Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία, επιβεβαιώνεται η μεγάλη μεταβλητότητα στη σύσταση του αιθερίου ελαίου του υπέρικου και ειδικά όσον αφορά την προέλευση του φυτικού υλικού. Παρόλα αυτά, είναι αρκετά δύσκολο να συγκριθούν όλα αυτά τα δεδομένα και να οδηγήσουν σε ένα συγκεκριμένο συμπέρασμα, λόγω έλλειψης επαρκών στοιχείων που αφορούν την κατάσταση του φυτού (ξηρό/νωπό), τις περιβαλλοντικές συνθήκες των περιοχών συλλογής του, τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά στην απόσταξη του ελαίου καθώς και τον κύκλο ανάπτυξης του φυτού. (Bertoli A, Cirak C, Teixeira da Silva J.A, 2011)

Χημειοτυπική μεταβλητότητα σύμφωνα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού

Μορφολογικά στοιχεία του φυτού έχουν δείξει πως το αιθέριο έλαιο του υπέρικου, συντίθεται είτε στους ημιδιαφανείς αδένες είτε στα εκκριτικά κανάλια του φυτού, τα οποία μπορεί να βρίσκονται στα φύλλα, τα πέταλα, τα σέπαλα, ή τους ύπερους των ανθέων, μέρη του φυτού τα οποία δεν υπάρχουν σε όλα τα στάδια του κύκλου ανάπτυξής του. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πληθυσμούς του φυτού από την περιοχή της Γαλλίας και αφορούσε τη σύγκριση του ποσοστού σε αιθέριο έλαιο στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του φυτού, οδήγησε σε σημαντικά συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, η υδροαπόσταξη των υπέργειων τμημάτων του φυτού είχε ως αποτέλεσμα την απόδοση ενός κιτρινωπού αιθερίου ελαίου. Η χαμηλότερη απόδοση παρουσιάστηκε στο στάδιο της καρποφορίας και αυξήθηκε από 0.07% σε 0.092% κατά το στάδιο της ανθοφορίας, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει και σε άλλα φυτικά είδη.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, ελέγχθηκαν οι ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές στα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου υπέρικου, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης που μελετήθηκαν, τα κυριότερα συστατικά που εντοπίστηκαν στο αιθέριο έλαιο ήταν τα: β- καρνοφυλλένιο, οξειδίο του καρνοφυλλενίου, 1-τετραδεκανόλη, β- φουνεμπρένιο, σπαθουλενόλη, 1-δωδεκανόλη και γ- μουουρολένιο. Συνολικά εντοπίστηκαν 97 διαφορετικά συστατικά, εκ των οποίων τα 64 ήταν κοινά σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, ενώ τα υπόλοιπα διέφεραν. Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση έγινε εμφανής στα μονοτερπένια και τις αλειφατικές αλκοόλες, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά σε γενικές γραμμές από όλα τα συστατικά, εμφανίστηκαν κατά την οντογένεση. Όσον αφορά την απόδοση σε αιθέριο έλαιο, η χαμηλότερη αντιστοιχούσε στην εποχή της καρποφορίας ενώ κατά την άνθιση αυτή αυξήθηκε αρκετά. (Bertoli A, Cirak C, Teixeira da Silva J.A, 2011)

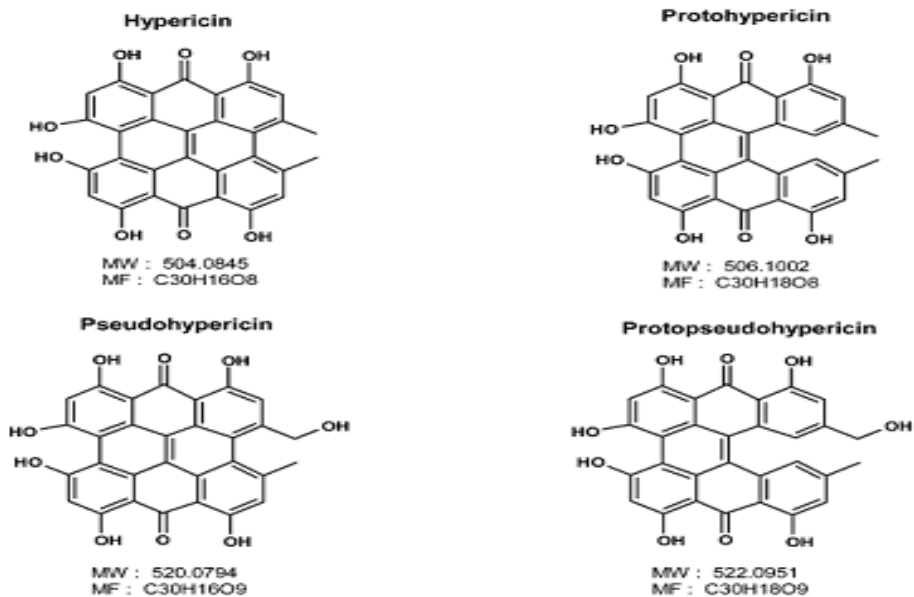
Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, ελέγχθηκαν οι ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές στα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου υπέρικου, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης που μελετήθηκαν, τα κυριότερα συστατικά που εντοπίστηκαν στο αιθέριο έλαιο ήταν τα: β- καρνοφυλλένιο, οξειδίο

του καρυοφυλλενίου, *I*-τετραδεκανόλη, *β*-φουνεμπρένιο, σπαθουλενόλη, *I*-δωδεκανόλη και *γ*-μουουρολένιο. Συνολικά εντοπίστηκαν 97 διαφορετικά συστατικά, εκ των οποίων τα 64 ήταν κοινά σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, ενώ τα υπόλοιπα διέφεραν. Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση έγινε εμφανής στα μονοτερπένια και τις αλειφατικές αλκοόλες, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά σε γενικές γραμμές από όλα τα συστατικά, εμφανίστηκαν κατά την οντογένεση. Όσον αφορά την απόδοση σε αιθέριο έλαιο, η χαμηλότερη αντιστοιχούσε στην εποχή της καρποφορίας ενώ κατά την άνθιση αυτή αυξήθηκε αρκετά. (Schwob I. et. al., 2004)

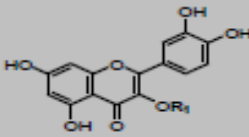
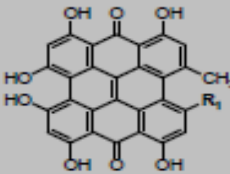
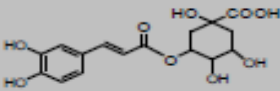
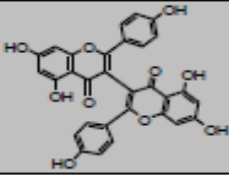
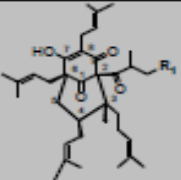
§ Ναφθοδιανθρόνες

Η ομάδα αυτή ουσιών, οι ονομαζόμενες ναφθοδιανθρόνες αποτελούν παράγωγα ανθρακινονών και είναι χαρακτηριστική του γένους *Hypericum*, αποτελούμενη από ουσίες που χαρακτηρίζονται από έντονο κόκκινο χρώμα και φωτοτοξικές ιδιότητες. Οι ουσίες αυτές, χαρακτηρίζονται από ένα φωτοδυναμικό αποτέλεσμα, το οποίο όμως πολλές φορές εκδηλώνεται μετά από το κατατριμματισμό της δρόγης/φαρμάκου και την έκθεση στο ηλιακό φως. Τα κύρια συστατικά αυτής της ομάδας ενώσεων είναι οι υπερικίνες. Δύο ουσίες αποκαλούμενες ως πρωτο-παράγωγα, η πρωτοϋπερικήνη και η ψευδοπρωτοϋπερικήνη, απομονώθηκαν από το φυτό αλλά λόγω της ασταθούς φύσης τους μετατρέπονται αποτελεσματικά στα σταθερά προϊόντα υπερικήνη (I) και ψευδοϋπερικήνη (II) αντίστοιχα. Η υπερικήνη με την ψευδοϋπερικήνη και η πρωτοϋπερικήνη, πρωτοψευδοϋπερικήνη και ισοϋπερικήνη, πρόδρομες βιοσυνθετικά ουσίες της υπερικήνης και της ψευδοϋπερικήνης αντίστοιχα, υπάρχουν στο φρέσκο φυτικό υλικό. Επίσης αναφέρεται και η κυκλοψευδοϋπερικήνη. Το περιεχόμενο σε υπερικίνες (περίπου 0.1% - 0.15 %) θεωρείται ότι περιλαμβάνει τόσο την υπερικήνη όσο και την ψευδοϋπερικήνη και αναφέρονται ενίοτε ως «ολικές υπερικίνες». Οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε πολύ λίγα φυτά, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του φυτού είναι κοινότυπα σε όλο το φυτικό βασίλειο. Το συνολικό ποσό της υπερικήνης πρέπει να προσδιορίζεται μετά από την έκθεση στο φως, το οποίο μετατρέπει τα πρόδρομα βιολογικά μόρια πρωτοϋπερικήνη και πρωτοψευδοϋπερικήνη σε υπερικήνη και ψευδοϋπερικήνη αντίστοιχα. Η ελάχιστη περιεκτικότητα σε υπερικήνη για εμπορική και φαρμακευτική χρήση πρέπει να είναι 0,04%, ενώ τα σημερινά σκευάσματα κατασκευάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να περιέχουν 0,1-0,4% υπερικήνης. Τα συστατικά της κατηγορίας αυτής είναι πιο σταθερά από ότι η υπερφορίνη εξαιτίας του συντονισμού που παρατηρείται στους αρωματικούς δακτυλίους τους. Εξαιρέση αποτελούν οι πρόδρομες μορφές οι οποίες είναι αρκετά ασταθείς κατά την έκθεσή τους στο φως. (Sadiqge Z, Naeem I, Maimoona A, 2010, Τέζιας Σ., Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2007)

NAPHTHODIANTHRONES



Εικόνα 6. Χημική Δομή Ναφθοδιανθρονών, (Liu et. al. 2005)

Φλαβονοειδή	Δομή	R ₁
Κερρατίνη Υπεροζίτης Ρουτίνη Ισοκερατρίνη Κεραιτρίνη		H Γαλακτόζη Γλυκόζη- Ραμνόζη Γλυκόζη Ραμνόζη
Ναφθοδιανθρόνες		
Υπερκίνη Ψευδοϊπερκίνη		CH ₃ CH ₂ OH
Φαινολικά οξέα		
Χλωρογενικό οξύ		
Διφλαβονοειδή		
Διαπυγενίνη Αμντοφλαβόνη		IB, IB'-διαπυγενίνη IB', IBB'-διαπυγενίνη
Φλωρογλουκινόλες		
Υπερφορίνη Αντι-υπερφορίνη		H CH ₃

Εικόνα 7. Χημική Δομή Κύριων Βιοδραστικών Ουσιών του *Hypericum perforatum* L., (Silva B.A., Malva J.O., Dias A.C.P., 2008, Μαργιάννη Ε., Διπλωματική Εργασία, 2011)

Η υπερικίνη (I) και η ψευδοϋπερικίνη (II) , εμφανίζονται στα άνθη και τα φύλλα του ξηρού φυτικού υλικού σε συγκεντρώσεις από 0.03% - 0.3% Ξ.Β., που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Η ψευδοϋπερικίνη είναι η κυριότερη ναφθοδιανθρόνη του υπέρικου και υπάρχει στο φυτό σε διπλάσια έως και τετραπλάσια περιεκτικότητα από την υπερικίνη. Επίσης, η κυκλοψευδοϋπερικίνη, ένα προϊόν οξείδωσης της ψευδοϋπερικίνης έχει αναφερθεί ως συστατικό του φυτού και μάλιστα είναι εν μέρει υπεύθυνο για το κόκκινο χρώμα των εκχυλισμάτων του φυτού. Το περιεχόμενο σε υπερικίνη (περίπου 0.1 – 0.15 %) περιλαμβάνει τόσο την υπερικίνη όσο την ψευδοϋπερικίνη και για το λόγο αυτό, συνήθως αναφερόμαστε σε αυτό με τον όρο “ολικές υπερικίνες”. Οι ναφθοδιανθρόνες εμφανίζουν περιορισμένη διαλυτότητα σε όλους σχεδόν τους διαλύτες. Οι καθαρές ενώσεις, κυρίως η υπερικίνη, είναι σχεδόν αδιάλυτες στο νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο, περισσότερο από το 40% του περιεχόμενου σε υπερικίνες μπορεί να εκχυλιστεί από το ξηρό φυτό όταν παρασκευάζουμε ένα τσάι με νερό στους 60° C – 80° C (περίπου το 35% από το ποσοστό της περιεχόμενης ψευδοϋπερικίνης και το 6% από αυτό της υπερικίνης). Η υπερικίνη είναι το μείζον φωτοευαισθητοποιό συστατικό του υπέρικου και έχει προταθεί η χρήση του για φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Η ψευδοϋπερικίνη δεν εμφανίζει φωτοτοξικότητα. (Sadiqqe Z., Naeem I, Maimoona A, 2010)

§ Φλορογλουκινόλες

Πρενυλιωμένες Φλορογλουκινόλες

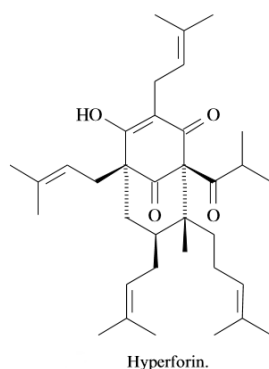
Τα παράγωγα φλορογλουκινόλης είναι ευρέως διαδεδομένα και διανεμημένα στα φυτά του γένους *Hypericum*. Δύο στενά συνδεδεμένα συστατικά που βρίσκονται στο υπέρικο είναι η υπερφορίνη, η οποία καλύπτει σε ποσοστό το 2.0% - 4.5% του ολικού περιεχομένου σε φλορογλουκινόλες και η αντιϋπερφορίνη η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία μία επιπλέον μεθυλικής ομάδας και καλύπτει σε ποσοστό το 0.2% - 1.9% του ολικού περιεχομένου σε φλορογλουκινόλες. Οι ουσίες αυτές εντοπίζονται μόνο στα αναπαραγωγικά μέρη του φυτού (σε ποσοστά περίπου 2% στα άνθη, 4.4% στους ώριμους και 4.5% στους άγουρους καρπούς). Ωστόσο, οι παραδοσιακές παρασκευές του υπέρικου ως τσάι, φαίνεται να περιέχουν ελάχιστες ποσότητες έως και μόνο ίχνη από τις ουσίες αυτές. Κάποια προϊόντα οξείδωσης της υπερφορίνης είναι επίσης ανιχνεύσιμα στο φυτό, όπως η φουρουϋπερφορίνη, η οποία βρίσκεται σε ποσοστό 5% στα υπέργεια τμήματά του. (Sadiqqe Z, Naeem I, Maimoona A, 2010)

Υπερφορίνη – Hyperforin:

Από όλα τα είδη του γένους *Hypericum*, μόνο το *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) περιέχει την ουσία αυτή σε τόσο υψηλά ποσοστά, ενώ υπάρχουν και κάποια άλλα είδη που την περιέχουν σε πολύ χαμηλότερα έως και ίχνη. Η πλειονότητα των εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων (υδρο-αλκοολικών) του St. John's Wort περιέχει την υπερφορίνη σε ποσοστά από 1%-5%.

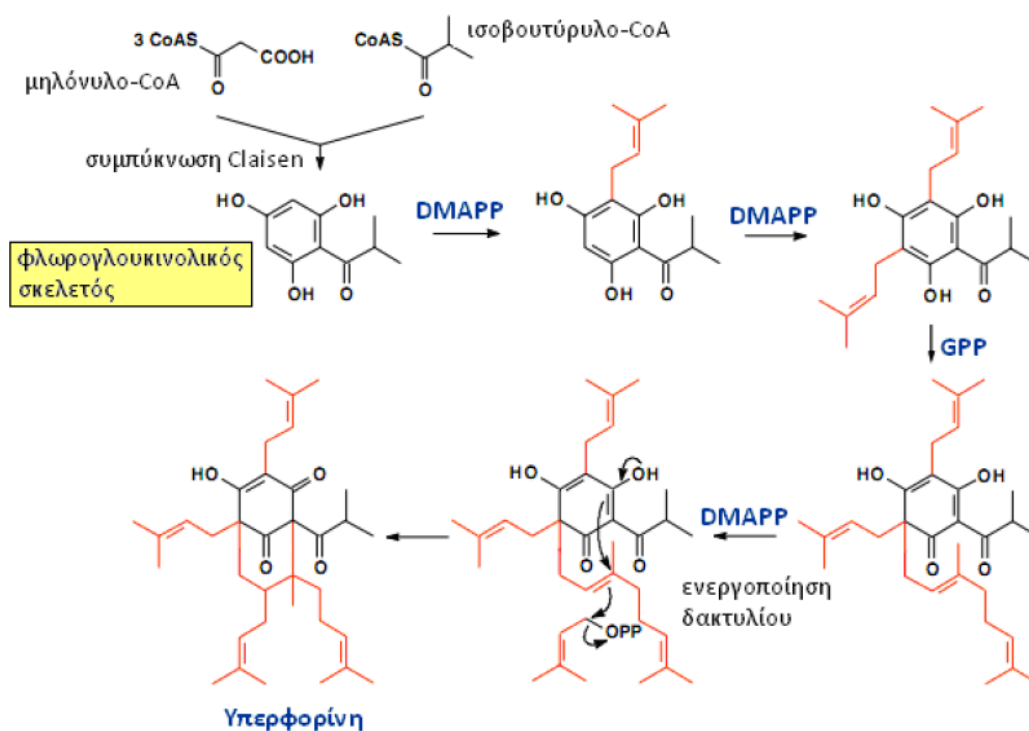
Η υπερφορίνη είναι ένα πολυπρενυλιωμένο παράγωγο ακυλ-φλορογλουκινόλης το οποίο περιέχεται στο φυτό *Hypericum perforatum* L. Ασκεί αντικαταθλιπτική δράση μέσω ενός καινοτόμου μηχανισμού δράσης, δρα ως αντιβιοτικό έναντι Gram (+) βακτηρίων και έχει αποδείξει αντι-νεοπλασιακή (αντι-ογκογόνο) δράση in vivo. Ταυτόχρονα οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων, μέσω της σύνδεσής του με έναν συγκεκριμένο υποδοχέα. Συνήθως συσσωρεύεται στον ύπερο και τους καρπούς του φυτού, όπου και συμμετέχει στο αμυντικό του σύστημα.

Το 1975, ο Bystrov και οι συνεργάτες του απομόνωσαν μία σύνθετη ένωση από το φυτό *Hypericum perforatum* L, την οποία ονόμασαν υπερφορίνη. Σήμερα, το υπέρικο είναι ένα από τα πιο διεξοδικώς μελετημένα φαρμακευτικά φυτά και η υπερφορίνη ένα από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα συστατικά. Φυτικά σκευάσματα που βασίζονται σε εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του φυτού χορηγούνται ως πολύ αποτελεσματικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Η ικανότητα τέτοιων σκευασμάτων να αντιμετωπίζουν την ήπιας – μέτριας μορφή κατάθλιψη έχει αποδειχθεί μέσα από πληθώρα μελετών που χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα του υπέρικου σε σύγκριση με placebo αλλά και με διάφορα γνωστά αντικαταθλιπτικά φάρμακα που κυκλοφορούν στην αγορά. Η υπερφορίνη είναι ένα δικυκλικό πολυπρενυλιωμένο παράγωγο ακυλ-φλορογλουκινόλης, του οποίου η δομή προσδιορίστηκε μέσα από εκτεταμένη χημική αποικοδόμηση και παραγοντοποίηση ενώ η ολική του διαμόρφωση στον χώρο προσδιορίστηκε μέσω της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X.



Εικόνα 8. Δομή Υπερφορίνης, (Beerhues L., 2006)

Η υπερφορίνη έχει μία μοναδική αρχιτεκτονική του μορίου και παρά το μικρό της μέγεθος, παραμένει έως και σήμερα μία πρόκληση για τους χημικούς συνθετικούς. Επίσης, το ενζυματικό μονοπάτι βιοσύνθεσής της παραμένει εν μέρει ανεξήγητο και πολύπλοκο. (Beerhues L., 2006). Ωστόσο, ένας μηχανισμός που προτείνεται για την παραγωγή της περιλαμβάνει τη συμμετοχή του ισοβουτυρο - συνενζύμου A ως αρχικό μόριο, το οποίο προέρχεται από τη βαλίνη. Αρχικά, ένα μόριο ισοβουτυρο-συνενζύμου A με 3 μόρια μηλόνυλο-συνενζύμου A αντιδρούν και με τη βοήθεια της συνθάσης της ισοβουτυροφαινόνης (BUS), πραγματοποιείται η συμπύκνωση Claisen η οποία παράγει μια φλωρο-ισοβουτυρο-φαινόνη. Στη συνέχεια 3 ηλεκτρόφιλες υποκαταστάσεις στον πυρήνα της υπερφορίνης με δύο διμεθυλ-αλλυλ-διφωσφορικές μονάδες (DMAPP) και ένα μόριο διφωσφορικού γερανυλίου (GPP) σχηματίζουν ένα ενδιάμεσο μόριο. Ένα τρίτο μόριο DMAPP μέσω ηλεκτρόφιλης προσθήκης στο 2'-3' διπλό δεσμό της (προϋπάρχουσας) αλυσίδας γερανυλίου ενεργοποιεί το δακτύλιο, κι έτσι κλείνει, δίνοντας το χαρακτηριστικό δικυκλικό “σύστημα” της δομής της υπερφορίνης (Beerhues, 2006). Το DMAPP είναι ο “μεσολαβητής” για όλες τις αντιδράσεις προσθήκης υδρόφοβων μορίων και είναι ο δότης πρενυλίων, ενώ η φλωρο-ισοβουτυρο-φαινόνη είναι ο δέκτης.



Εικόνα 9. Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Υπερφορίνης, (Beerhues L., 2006)

§ Άλλες ομάδες ουσιών

Στις άλλες ομάδες ουσιών που περιέχονται στο υπέρικο, σε μικρότερα ποσοστά από ότι οι παραπάνω κύριες ομάδες βιοδραστικών ενώσεων, περιλαμβάνονται οι τανίνες,

οι οποίες περιέχονται σε ποσοστό περίπου 8-9% και είναι κυρίως προανθοκυανιδίνες. τα μεγαλύτερα ποσοστά της κατηγορίας αυτής των ουσιών εμφανίζονται στο αναπαραγωγικό στάδιο του φυτού που προηγείται της άνθισης. Μεταξύ των υπόλοιπων συστατικών που περιέχονται στο υπέρικο βρίσκονται οι ξανθόνες (1,3,6,7-τετραυδροξυξανθόνη), τα οξέα (ισοβαλεριανικό, νικοτινικό, μυριστικό, παλμιτικό, στεαρικό), τα καροτενοειδή, η χολίνη, το νικοτιναμίδιο, η πηκτίνη, η β-σιτοστερόλη, οι υδρογονάνθρακες, οι αλκοόλες, τα λιπαρά οξέα, τα αμινοξέα, η βιταμίνη C και άλλα. (Barnes J, Anderson L.A, Phillipson J.D, 2001)

1.2. Ελαϊκό Εκχύλισμα Βάλσαμου – Βαλσαμέλαιο - *Oleum Hyperici*

1.2.1. Ελαϊκά εκχυλίσματα Φαρμακευτικών & Αρωματικών Φυτών

Τα τελευταία χρόνια, αρκετά νέα προϊόντα με βάση το ελαιόλαδο έκαναν την εμφάνισή τους στην παγκόσμια αγορά. Κάποια από αυτά τα προϊόντα είναι τα αρωματισμένα ελαιόλαδα με βότανα ή μπαχαρικά, τα λεγόμενα *Gourmet olive oils*, αλλά και φαρμακευτικά σκευάσματα όπως ελαιόλαδο ενισχυμένο με φαρμακευτικά φυτά για μασάζ, απευθείας επάλειψη στο δέρμα με σκοπό την επούλωση πληγών και ουλών, ακόμα και πόσιμο για γαστρεντερικές παθήσεις και ενίσχυση του ανοσοποιητικού.

Όσον αφορά την προσθήκη αρωματικών φυτών στο ελαιόλαδο με σκοπό την κατανάλωσή τους στη διατροφή του ανθρώπου, το κίνητρο της δημιουργίας τους αλλά και τα πλεονεκτήματα ποικίλουν και περιλαμβάνουν τόσο οργανοληπτικά όσο και ποιοτικά χαρακτηριστικά που επηρεάζονται. Εκτός από την ενίσχυση του αρώματος και της γεύσης του ελαιολάδου, επιτυγχάνεται ταυτόχρονα ενίσχυση της οξειδωτικής του σταθερότητας έναντι της οξείδωσης (τάγγισμα) που αυτό υφίσταται κατά την αποθήκευση (*επίδραση φωτός και οξυγόνου*) και κατά το μαγείρεμα (*επίδραση υψηλών θερμοκρασιών*) αλλά και μεταφορά κάποιων βιοδραστικών συστατικών των αρωματικών φυτών στο ελαιόλαδο, κάτι το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα, μεταξύ άλλων, την αύξηση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας και συνεπώς μεγάλα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. (Rubió L., et. al., 2012)

Στο εμπόριο κυκλοφορούν πολλά φαρμακευτικά έλαια, δηλαδή ελαϊκά εκχυλίσματα φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών. Τα κυριότερα και ευρέως γνωστά είναι το βαλσαμέλαιο, το χαμομηλέλαιο, το λάδι καλέντουλας και το λάδι λεβάντας.

1.2.2. Βαλσαμέλαιο και Παραδοσιακός Τρόπος Παρασκευής

Έχει καταγραφεί ότι τα ελαϊκά εκχυλίσματα του υπέρικου είναι μία δημοφιλής εξωτερική θεραπεία για την ταχεία αποκατάσταση τομών και εγκαυμάτων στην επιφάνεια του δέρματος. Για την παρασκευή του, τα φρέσκα ή αποξηραμένα ανθοφόρα στελέχη του φυτού τοποθετούνται σε ένα βάζο με λάδι και εκτίθενται στον ήλιο για περίπου 4 εβδομάδες. Για την προετοιμασία ενός αποτελεσματικού σπιτικού – γιατρικού, το κλειδί της προετοιμασίας περιγράφεται ως εξής: “*Το περιεχόμενο του βάζου θα πρέπει να εκτεθεί στη ζεστασιά του ήλιου και το αεράκι της νύχτας*”. Βιβλιογραφικές έρευνες έχουν δείξει ότι το γιατρικό αυτό είναι γνωστό παγκοσμίως και όχι μόνο στις Μεσογειακές χώρες από όπου προήλθε. Βάσει δεδομένων που προήλθαν από την εφαρμογή χρωματογραφικών τεχνικών, η υπερφορίνη φαίνεται να είναι το κυρίαρχο συστατικό του ελαϊκού αυτού εκχυλίσματος και υπεύθυνο για τις επουλωτικές δράσεις του εκχυλίσματος. Παρά την παγκοσμίως γνωστή αυτή δράση όμως του βαλσαμέλαιου, η *in vivo* επουλωτική δράση του και ο μηχανισμός δράσης δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς από την παγκόσμια ερευνητική κοινότητα. (Suntar I.P. et. al., 2011)

Πιο αναλυτικά ο παραδοσιακός τρόπος παρασκευής περιγράφεται ως εξής:

Το φυτό βάλσαμο συλλέγεται στα τέλη Μαΐου προς αρχές Ιουνίου και συγκεκριμένα την ημέρα της Αναλήψεως - εορτή του Αγίου Ιωάννη του Βαπτιστή, ενώ βρίσκεται στην ανθοφορία του. Οι ανθισμένες κορυφές και τα φύλλα (υπέργεια τμήματα φυτού) συλλέγονται και τοποθετούνται σε σκιερό (μαύρο) μπουκάλι που περιέχει ελαιόλαδο. Το μπουκάλι συμπληρώνεται μέχρις ότου να μη περιέχει καθόλου αέρα και σφραγίζεται. Η αναλογία φυτού/ελαιολάδου διαφέρει ανά περιοχή όμως κυμαίνεται περίπου στο 1:4. Στη συνέχεια, τα γυάλινα μπουκάλια που περιέχουν το ελαιόλαδο και τα υπέργεια τμήματα του φυτού τοποθετούνται σε μέρος που έχει άμεση επαφή με τον ήλιο (ταράτσα σπιτιού) όπου και παραμένει για περίπου 40-45 ημέρες. Με το πέρασμα του χρόνου αυτού, το βαλσαμέλαιο είναι έτοιμο και ακολουθεί η στράγγιση του φυτικού υλικού και η απομάκρυνσή του. Το χρώμα του ελαιολάδου έχει μέχρι εκείνη τη στιγμή μετατραπεί σε κόκκινο (συνήθως πολύ σκούρο) λόγω της εκχύλισης των βιοδραστικών ουσιών του βάλσαμου στο λάδι.



Εικόνα 10: Παραδοσιακός τρόπος παρασκευής Βαλσαμέλαιου
(Εναρξη **↔** Αριστερά και Ολοκλήρωση **↔** Δεξιά)

Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι το βαλσαμόχορτο είναι το πιο συχνά αναφερόμενο ανάμεσα στα φαρμακευτικά φυτά. Συγκεκριμένα σε έρευνα στην περιοχή της ανατολικής Σερβίας, όπου συμμετείχαν ηλικιωμένοι κάτοικοι της περιοχής, συγκρίθηκαν 45 διαφορετικά είδη φαρμακευτικών φυτών και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *Hypericum perforatum* L. ήταν το πιο δημοφιλές από όλα (ποσοστό ερωτηθέντων που το ανέδειξαν: 40.5 %), ανάμεσα σε 7 διαφορετικούς τύπου παρασκευής, τα υπέργεια τμήματα του φυτού σε μορφή εγχύματος καθώς και το εκχύλισμά του σε ελαιόλαδο φαίνεται να είναι η πιο συχνά εφαρμοζόμενη (47.3%). Οι κυριότερες ενδείξεις των παρασκευασμάτων του ποσοστιαία, περιλαμβάνουν κυρίως τις γαστρεντερικές παθήσεις (πεπτικό έλκος), και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. (Zlatković B.K., Bogosavljević S.S., Radivojević A.R., Pavlović M.A., 2014)

Μία από τις πιο χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες του βαλσαμελαίου είναι το κόκκινο χρώμα του, όταν αυτό παρασκευάζεται νωπό φυτικό υλικό. Μελέτες έχουν αναφέρει ότι σε αυτή την παρασκευή δεν περιέχεται ως ουσία η υπερικίνη (δεδομένα στηριζόμενα σε αναλύσεις μέσω HPLC και TLC). Αντίθετα, το κόκκινο χρώμα και ο φθορισμός αποδίδεται σε λιπόφιλα παράγωγα φωτο- και θερμο-αποικοδόμησης της υπερικίνης, λόγω της μακράς έκθεσής του στο ηλιακό φως και κυρίως στην ουσία ψευδοϋπερικίνη. Η χρωστική που καθορίζεται από την απορρόφησή της στα 590 nm είναι η υπερικίνη. Σύμφωνα με τον Schilling (1969), η υπερικίνη μπορεί να διαλυθεί σε λιπαρό – ελαϊκό περιεχόμενο ύστερα από παρατεταμένη θέρμανση. Ο Berghofer (1987), απέτυχε να διαλύσει την υπερικίνη στο ελαιόλαδο, όπως συνέβη και στην περίπτωση της Sanne (1954) η οποία δεν βρήκε υπερικίνη στο βαλσαμόλαδο, αλλά μόνο λιπόφιλες ενώσεις παρόμοιες σε χρώμα και φθορισμό με την υπερικίνη. Οι Maisenbacher και Kovar ανέλυσαν το βαλσαμέλαιο με τις τεχνικές TLC και HPLC σύμφωνα με τη μέθοδο που προδιαγράφει η Γερμανική Φαρμακοποιεία. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία της υπερφορίνης και αναλόγων της καθώς και κάποιων φλαβονοειδών όπως η 13,II8, διαπιγενίνη και ξανθόνες. (Maisenbacher P., Kovar K.A, 1992)

Η Επιτροπή Φυτικών Φαρμακευτικών Προϊόντων (Committee on Herbal Medicinal Products – HMPC) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (European Medicines Agency – EMA) προτείνει την παραδοσιακή εφαρμογή στο δέρμα, υγρών εκχυλισμάτων βάλσαμου, που παρασκευάζονται με φυτικά έλαια για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων και βλαβών του υποδόριου ιστού, για εγκαύματα 1^{ου} βαθμού και εγκαύματα από τον ήλιο καθώς και για μυοσκελετικές διαταραχές όπως η μυαλγία και οι ρευματισμοί (*European Medicines Agency, Annual Report, 2009*). Έτσι, σήμερα, εκτός από τα υδρο-αλκοολικά εκχυλίσματα του βάλσαμου, χρησιμοποιούνται ευρέως και τα ελαϊκά του εκχυλίσματα για τη θεραπεία διαφόρων (δερματικών και μη).

1.2.3. Επιλογή Ελαίου Βάσης για την Παρασκευή Βαλσαμέλαιου

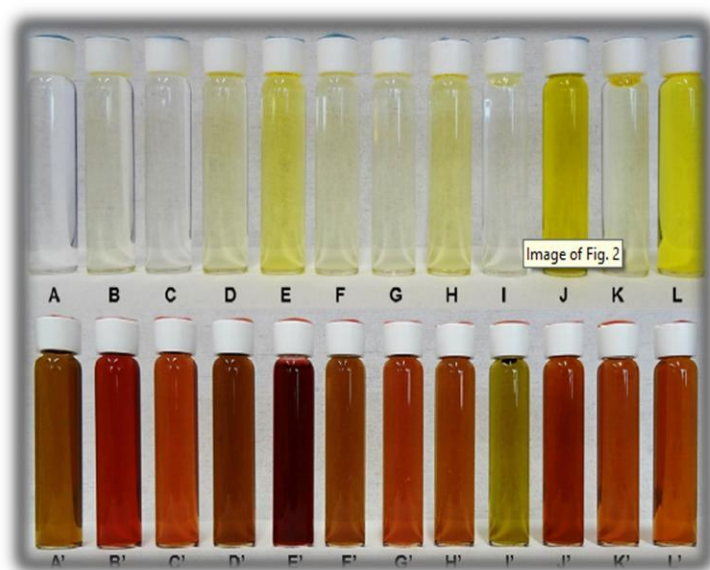
Παραδοσιακά το βαλσαμέλαιο παρασκευάζεται με έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, ως βάση εκχύλισης, παρότι διάφορα έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για την παρασκευή του. Η επιλογή του λιπαρού ελαίου για την παρασκευή του βαλσαμέλαιου είναι πολύ σημαντική και επηρεάζει την εκχύλιση των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και τη σταθερότητα αυτών, καθώς και την εμφάνιση (χρώμα) του τελικού προϊόντος. Για την παρασκευή των ελαϊκών εκχυλισμάτων του βάλσαμου έχουν περιγραφεί βιβλιογραφικά διάφορες διαδικασίες οι οποίες διαφέρουν σε σημαντικές παραμέτρους διεργασίας μεταξύ των οποίων και η επιλογή των διαλυτών που χρησιμοποιούνται (στην περίπτωση του ελαϊκού εκχυλίσματος, στην επιλογή του φυτικού ελαίου). (Heinrich M., et. al. 2017)

Το 1989 οι Hölzl, L. Dernisch, και S. Stock μέτρησαν τις ολικές υπερικίνες σε παραδοσιακά παρασκευάσματα βαλσαμέλαιου με ελαιόλαδο, λάδι σόγιας και ηλιέλαιο σε σύγκριση με πειραματικά παρασκευασμένα βαλσαμέλαια και προσπάθησαν να συσχετίσουν τις τιμές αυτές με τις τιμές των υπεροξειδίων στο κάθε έλαιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσο αυξανόταν η περιεκτικότητα σε υπερικίνες τόσο μειωνόταν η τιμή των υπεροξειδίων και αντίστροφα. Επίσης στα παραδοσιακά παρασκευάσματα οι τιμές των ολικών υπερικινών κυμαίνονταν μεταξύ 0.58 and 2.63 mg/100mL τη στιγμή που στα πειραματικά παρασκευάσματα ήταν 3-4 φορές υψηλότερες. (Hölzl, L., Dernisch L., Stock S., 1989)

Πολύ πιο πρόσφατα, το 2010, μελετητές από τη Σερβία παρασκεύασαν πειραματικά 3 ελαϊκά εκχυλίσματα βάλσαμου με προσθήκη των υπέργειων τμημάτων του νωπού φυτού σε ελαιόλαδο, ηλιέλαιο και φοινικέλαιο και παραμονή αυτών στον ήλιο για 40 ημέρες. Μελετήθηκε η γαστροπροστατευτική δράση τους την οποία προσπάθησαν να συσχετίσουν με την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε κερσετίνη. Η περιεκτικότητα σε κερσετίνη βρέθηκε πολύ υψηλότερη στο εκχύλισμα με φοινικέλαιο, ακολούθησε το εκχύλισμα με ηλιέλαιο και τέλος αυτό με το ελαιόλαδο. Παρότι το εκχύλισμα με ελαιόλαδο παρουσίασε τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε κερσετίνη, είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη γαστροπροστατευτική δράση κάτι το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δράση αυτή οφείλεται στα υπόλοιπα συστατικά του. (Arsić I. et. al., 2010)

Στη πιο πρόσφατη μελέτη που αφορά το βαλσαμέλαιο, παρασκευάστηκαν 12 βαλσαμέλαια με 12 διαφορετικά φυτικά έλαια (τριγλυκερίδια μεσαίας αλυσίδας, εξευγενισμένο αραχιδέλαιο, σογιέλαιο, αμυγδαλέλαιο, εξευγενισμένο ηλιέλαιο βιολογικής καλλιέργειας, λάδι μακαντάμια, σησαμέλαιο, ελαιόλαδο και έλαιο σπόρου *Simmondsia chinensis*) ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο παρασκευής. Το φυτοχημικό προφίλ των ελαίων μελετήθηκε και εκφράστηκε με την μέθοδο της Υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (UHPLC-DAD) και φωτομετρικές μεθόδους (UV-Vis), τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ανήκαν στις φλορογλουκινόλες, φλαβονόλες, διαφλαβόνες και ναφθοδιανθρόνες). Όσον αφορά το

περιεχόμενο σε ολικές υπερικίνες η εκχύλιση με αμυγδαλέλαιο έδωσε τις υψηλότερες τιμές (5.5 mg/100 mL). Αντιθέτως, η εκχύλιση με έλαιο μακαντέμια οδήγησε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα κύρια δραστικά συστατικά του βάλαμου την υπερφορίνη και την αντι-υπερφορίνη ενώ ένας ημι-συνθετικός διαλύτης τριγλυκεριδίων μεσαίας αλυσίδας οδήγησε στην υψηλότερη εκχύλιση φλαβονοειδών όπως η κερσετίνη, η καμφερόλη και η Ι3,Ι18- διαπιγενίνη. Το χρώμα του τελικού παρασκευάσματος ανάλογα με το χρώμα του αρχικού φυτικού ελαίου διέφερε σημαντικά. Επίσης μελετήθηκε η αποθήκευση των ελαίων για 6 μήνες σε διάφορες θερμοκρασίες (5°, 20° και 50° C) υπό και χωρίς την επήρεια φωτός. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για την καλύτερη διατήρηση των δευτερογενών μεταβολιτών που εκχυλίζονται στο λάδι από το φυτό, πρέπει αυτό να διατηρείται μετά την παρασκευή του, σε χαμηλές θερμοκρασίες (5° C) υπό την απουσία φωτός. (Heinrich M., et. al. 2017)



Εικόνα 11: Χρωματική διαφοροποίηση βαλσαμελαίου ανάλογα με το φυτικό λιπαρό έλαιο βάσης εκχύλισης και συσχετισμός με Ολικό Περιεχόμενο σε Υπερικίνες. Οι απόστροφοι (κάτω σειρά) αφορά τα έλαια μετά την εκχύλιση: A: μεσαίας-αλυσίδας τριγλυκερίδια, B: ραφινρισμένο αραχιδέλαιο, C: βιολογικό ραφινρισμένο αραχιδέλαιο, D: ραφινρισμένο σογιέλαιο, E: αμυγδαλέλαιο, F: βιολογικό ραφινρισμένο ηλιέλαιο, G: ραφινρισμένο ηλιέλαιο, H: ραφινρισμένο καλαμποκέλαιο, I: βιολογικό ραφινρισμένο έλαιο μακαντέμια, J: βιολογικό ελαιόλαδο, K: ραφινρισμένο σησαμέλαιο, L: σπορέλαιο jojoba -*Simmondsia chinensis* (Heinrich M., et. al. 2017)

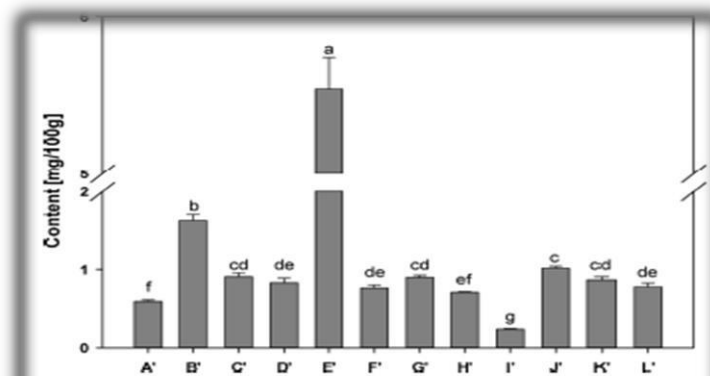


Fig. 4. Total hypericin contents [mg/100 g oil macerate], means \pm s.d. (n=3). Different lowercase letters (vertically) indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey's range test). Capital letters with apostrophes represent oil samples after extraction of SJW: A' (medium-chain triglycerides), B' (*Arachis* oil refined, Ph. Eur.), C' (*Arachis* oil refined, Ph. Eur., certified organic cultivation), D' (soybean oil refined), E' (almond oil, Ph. Eur.), F' (sunflower oil refined, certified organic cultivation), G' (sunflower oil refined), H' (maize germ oil refined, Ph. Eur.), I' (macadamia nut oil refined, certified organic cultivation), J' (olive oil, Ph. Eur., certified organic cultivation), K' (sesame oil refined, certified organic cultivation), L' (*Simmondsia chinensis* seed oil).

1.3. Βιολογικές Δράσεις Υπέρικου – Γενικά

Σύμφωνα με την παραδοσιακή ιατρική, το υπέρικο έχει πολλές θεραπευτικές ιδιότητες, κάποιες εκ των οποίων είναι έναντι της κατάθλιψης, των ελκών, της δυσπεψίας και των κοιλιακών πόνων, εγκαυμάτων, βακτηριακών λοιμώξεων, ημικρανιών και ισχιαλγίας. Πιο συγκεκριμένα, το υπέρικο θεωρείται αντιϊικό, στυπτικό και καταπραϋντικό, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία φλεγμονών, της διάρροια, για την επούλωση πληγών καθώς επίσης θεωρείται ότι βελτιώνει τη ροή του αίματος. Για το φυτό αυτό, έχουν διεξαχθεί έρευνες και για τη θεραπεία του AIDS. Χορηγείται ως θεραπεία – φάρμακο, τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά, για την ήπια - μέτρια μορφή κατάθλιψης και θεωρείται θεραπευτικά ισοδύναμο με την ιμιπραμίνη (imipramine). (Rancic A. et. al, 2005)

Οι κυριότερες δράσεις που έχουν αποδοθεί στο φυτό και τις διάφορες μορφές του (αιθέριο έλαιο, αφέψημα, οργανικό εκχύλισμα) είναι:

1.3.1. Αντιοξειδωτική Δράση

Η αντιοξειδωτική δράση του υπερίκου έχει αποδειχθεί στα διάφορα εκχυλίσματά του (αιθανολικό, υδατικό, μεθανολικό κ.ά.) και έχει συσχετιστεί με το ολικό φαινολικό του περιεχόμενο και συγκεκριμένα με κάποια φλαβονοειδή που χαρακτηρίζουν την κύρια σύστασή του.

Οι Silva et. al., ερευνώντας την αντιοξειδωτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων υπερίκου και απομονωμένων φαινολικών συστατικών τους, με τις δοκιμές DPPH & AAPH κατέληξαν στα εξής συμπεράσματα: Τα ολικά αιθανολικά εκχυλίσματα έδωσαν παρόμοιες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας και στις δύο δοκιμές που εφαρμόστηκαν. Όσον αφορά τα απομονωμένα φαινολικά συστατικά, την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση έδωσαν το υπεροσίδιο αι η κερσετίνη ενώ ακολούθησαν η λουτεολίνη και το χλωρογενικό οξύ, σύμφωνα με τις τιμές EC₅₀. Όσον αφορά την αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η κερσετίνη και η καμφερόλη αποδείχθηκαν οι πιο δραστικές ουσίες. Ένα αξιοσημείωτο συμπέρασμα, από τη συνολική εικόνα και τις μετρήσεις του πειράματος, είναι ότι οι αγλυκόνες των φλαβονοειδών ήταν σε γενικές γραμμές πιο αποτελεσματικά συστατικά από τα αντίστοιχα γλυκοσίδια. (Silva B.A., Malva J.O, Dias A.C.P., 2008)

Αντιοξειδωτική Δράση ανά τμήμα φυτού

Οι Gioti et. al. το 2009 στην Ελλάδα, μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων τμημάτων του φυτού, αφού αυτά πρώτα τα διαχώρισαν από την αρχική δρόγη. Τα 5 τμήματα του φυτού που μελετήθηκαν ήταν: βλαστοί με φύλλα, μη ανθοφόρες κεφαλές, ανθοφόρες κεφαλές, οφθαλμοί ανθέων & άνθη. Στη συνέχεια, τα φυτικά αυτά μέρη, εκχυλίστηκαν με οργανικούς και υδατικούς διαλύτες. Συγκεκριμένα η πρώτη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με μεθανόλη (MeOH) και εν

συνεχία με μίγμα αιθανόλης:νερού (EtOH:H₂O) (60:40 v/v) ενώ το δεύτερο εκχύλισμα ήταν υδατικό με προσθήκη μόνο νερού, σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκε μελέτη των φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο HPLC και η δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας DPPH. Την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά έδειξαν οι ανθοφόρες κεφαλές και τα άνθη, ενώ όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα υψηλότερη δράση δείχνουν οι βλαστοί και οι κλαδίσκοι του φυτού (μη ανθοφόρες κεφαλές). Μετά από συσχέτιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας, φαίνεται αυτή να είναι μικρή και να παίζει κάποιο ρόλο κυρίως το χλωρογενικό οξύ και τα παράγωγά του. (Gioti E.M., et. al., 2009)

Αντιοξειδωτική Δράση Hypericum perforatum L. σε σύγκριση με άλλα είδη του γένους Hypericum

Μελέτη σε 9 διαφορετικά είδη του γένους *Hypericum* από την περιοχή των Βαλκανίων, συμπεριλαμβανομένου και του *Hypericum perforatum* L., έδειξε ότι τα μεθανολικά τους εκχυλίσματα σε in vitro μοντέλα, εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση, με το *H. hirsutum* να φανερώνει την πιο ισχυρή δράση έναντι όλων των δοκιμαζόμενων μικροβίων ενώ το εκχύλισμα από τα άνθη του *H. perforatum* φανέρωσε την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Μεταξύ των δύο αυτών ειδών, το *H. perforatum* φανέρωσε υψηλότερο περιεχόμενο σε φλαβονοειδή από ότι το *H. hirsutum*. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων φαίνεται να οφείλεται κυρίως στην παρουσία των φλαβονοειδών και όχι της υπερικίνης και της υπερφορίνης. Στο συμπέρασμα ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αυτών σχετίζεται με τα φλαβονοειδή και τα παράγωγά τους, κατέληξαν 3 ακόμη μελέτες, με παρόμοιο θέμα έρευνας, που αφορούσαν τα είδη *H. perforatum* και *H. triquetrifolium* καταλήγοντας να προτείνεται το πρώτο ως συμπλήρωμα διατροφής για την αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου, λόγω της ισχυρής του αντιοξειδωτικής δράσης. (Radulovic N. et. al., 2007)

Επίσης, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Βουλγαρία το 2010, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και οι ολικές τανίνες σε 13 είδη του γένους *Hypericum*. Το εκχύλισμα των φυτών που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας ήταν μεθανολικό (αφού είχε προηγηθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂). Τα αποτελέσματα από τρεις διαφορετικές δοκιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH, ABTS & FRAP) έδειξαν ότι όλα τα είδη που μελετήθηκαν είχαν έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα με τα πιο δραστικά είδη να είναι τα *H. cerastoides*, *H. perforatum* και *H. maculatum* και το *H. perforatum* να κυριαρχεί μεταξύ όλων. (Zheleva-Dimitrova D., Nedialkov P., Kitanov G., 2010)

1.3.2. Αντιμικροβιακή Δράση

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία, δείχνει πως το υπέρικο είναι ισχυρότερο έναντι των Gram (+) βακτηρίων από ότι των Gram (-) και πως τα αλκοολικά του εκχυλίσματα

(μεθανολικά/αιθανολικά) είναι πιο δραστικά από τα υδατικά εκχυλίσματα. Πολλές μελέτες *in vitro*, έχουν αποδείξει την αντιμικροβιακή δράση του φυτού. Τα αφηνήματα φαίνεται να είναι λιγότερο δραστικά από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα του φυτού έναντι του σταφυλόκοκκου, της σιγκέλας και του *Escherichia coli*. Συγκεκριμένα, τα αλκοολικά (αιθανολικά & μεθανολικά) εκχυλίσματα του φυτού, έχουν δείξει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση *in vitro*, τόσο έναντι των προαναφερθέντων βακτηρίων, όσο και διαφόρων άλλων, με ισχυρότερη δράση έναντι των Gram (+) βακτηρίων, από ότι έναντι των Gram (-). Σε μελέτη που δοκιμάστηκαν εκχυλίσματα του φυτού, το οποίο είχε συλλεχθεί σε διάφορες ημερομηνίες, τα αποτελέσματα είχαν αρκετό ενδιαφέρον. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του φυτού που συλλέχθηκε τον Αύγουστο, έναντι 3 διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν από το φυτό που συλλέχθηκε κατά τον μήνα Ιούλιο, στην οποία περίπτωση δεν υπήρξε ανιχνεύσιμη αντιμικροβιακή δράση. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν σε ένα πρώιμο συμπέρασμα, ότι ίσως η εποχιακή διακύμανση επηρεάζει την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών με αντιμικροβιακή δράση και όχι μόνο. (Sadiq Z., Naeem I., Maimoona A, 2010)

Σε μελέτη των Suntar et. al. το 2015, ερευνήθηκε η αντιμικροβιακή δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος υπέρικου και κλασμάτων του (διαφορετικής πολικότητας) έναντι μικροβίων της στοματικής κοιλότητας που συμβάλλουν στη δημιουργία βιοφίλμ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το υδατικό κλάσμα του εκχυλίσματος έδειξε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των *S. sobrinus*, *L. plantarum* και *E. faecalis*. Το στέλεχος *S. sobrinus* βρέθηκε το πιο ευαίσθητο σε όλα τα κλάσματα του εκχυλίσματος. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, οι ερευνητές της παρούσας μελέτης προτείνουν ότι το υπέρικο θα μπορούσε να εφαρμοστεί ως αντιβακτηριακός παράγοντας σε σκευάσματα προστασίας της στοματικής κοιλότητας. (Suntar I. et. al., 2015)

Σε μία άλλη μελέτη από τους Avato et al. το 2004, ερευνήθηκε η αντιμικροβιακή δράση διαφόρων εκχυλισμάτων από τα υπέργεια τμήματα του φυτού (μεθανολικό, πετρελαϊκό αιθέρα, χλωροφορμίου και οξικού αιθυλεστέρα). Από αυτά, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα βρέθηκε το πιο δραστικό έναντι των δοκιμαζόμενων μικροοργανισμών. Μετά από ανάλυση των συστατικών του εκχυλίσματος με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης, ως κυριότερα συστατικά βρέθηκαν να είναι οι υπερφορίνες, οι υπερικίνες και διάφορα φλαβονοειδή. Ακολούθησε επώαση των μικροοργανισμών με τις καθαρές ουσίες των αντίστοιχων συστατικών που ανιχνεύθηκαν στην υγρή χρωματογραφία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι υπερικίνες και οι υπερφορίνες οδήγησαν στο σχηματισμό ζωνών αναστολής της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, ενώ την ίδια στιγμή τα φλαβονοειδή φαινόταν να είναι τελείως ανενεργά. (Avato, P., 2004)

Η υπερφορίνη έχει σημαντική αντιβιοτική δράση έναντι ορισμένων θετικών κατά Gram (Gram+) βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη,

Staphylococcus aureus και καθίσταται βιοδιαθέσιμη με από τους στόματος χορήγηση. (Dell'Aica et. al., 2007). Η υπερφορίνη, σε πειράματα, φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη Gram (+) βακτηρίων όπως το *Corynebacterium diphtheriae* σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο το 0.1 μg/mL. Επίσης, πολυανθεκτικά στελέχη του *Staphylococcus aureus* έχουν βρεθεί επιρρεπή στην υπερφορίνη. Παρόλα αυτά έναντι Gram (-) βακτηρίων και του γνωστού μύκητα *Candida albicans*, δεν έχει δείξει κάποια μορφή αναστολής. Η ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση της υπερφορίνης σε συνδυασμό με τη γνωστή αντιφλεγμονώδη δράση της, δίνουν μία λογική εξήγηση για τον παραδοσιακό τρόπο χρήσης του φυτού, ως άκρως επουλωτικό για πληγές, εγκαύματα, ουλές και φλεγμονώδεις διαταραχές του δέρματος. (Beerhues L, 2006)

Αντιμικροβιακή Δράση Αιθερίου Ελαίου

Το αιθέριο έλαιο των φυτών που ανήκουν στα είδη του γένους *Hypericum* έχουν δείξει, σύμφωνα με αρκετές μελέτες, έντονη αντιμικροβιακή δράση. Συγκεκριμένα το αιθέριο έλαιο του *Hypericum perforatum* L. φαίνεται να έχει αντιμυκητιασική δράση έναντι του *Trichophyton mentagrophytes* (Inouye, 2008) καθώς και αντιβακτηριδιακή έναντι Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων που προσβάλλουν τα τρόφιμα. Από αυτά, σε μελέτη που διεξάχθηκε στη Βουλγαρία, το *Staphylococcus aureus* βρέθηκε να είναι πιο ευαίσθητο, ενώ το *Pseudomonas aeruginosa* το πιο ανθεκτικό. (Gochev et. al. , 2008) (Bertoli A, Cirak A, Teixeira da Silva J.A, 2011)

Σε μία άλλη έρευνα, που πραγματοποιήθηκε το 2005 στη Σερβία, μελετήθηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων των φυτών: *Myrrhis odorata* L., *Hypericum perforatum* L. και *Helichrysum arenarium* L. Η μελέτη του αιθερίου ελαίου του υπέρικου, έδωσε 35 συστατικά εκ των οποίων τα 5 κυριότερα ήταν τα: νονάνιο, π- κυμένιο, αλλο- αρομαδενδρένιο, β- σελινένιο και α- πατσουλένιο.

Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του αιθερίου ελαίου του υπέρικου, στη συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκαν έναντι 6 στελεχών μυκήτων και 7 βακτηρίων. Όσον αφορά την αντιβακτηριδιακή δράση, αυτή φαίνεται να είναι ισχυρότερη από ότι η αντιμυκητιασική. Σύμφωνα με τη μέγιστη δοκιμαζόμενη δόση, ισχυρότερο φαίνεται να είναι έναντι των: *E.coli*, *M. luteus* και *S. aureus*. (Rancic A. et. al, 2005)

1.3.3. Αντιφλεγμονώδης Δράση

Η αντιφλεγμονώδης δράση του υπέρικου μπορεί να σχετίζεται εν μέρει με την αναστολή της επαγωγίσιμης συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) και της κυκλοξυγενάσης-2 (COX-2). Τα δύο αυτά ισοένζυμα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, νιτρικού οξειδίου και προσταγλανδινών στην περιοχή της φλεγμονής. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης της εχινάκειας *Echinacea purpurea* (L.) Moench και του υπέρικου *Hypericum perforatum* (L.), εκχυλίσματα των βοτάνων αυτών χορηγήθηκαν από του στόμα σε ποντικούς στους

οποίους είχε προκληθεί επαγόμενο οίδημα στην περιοχή των ποδιών από καρραγενάνη. Το εκχύλισμα του υπέρικου βρέθηκε πιο δραστικό καθώς ανέστειλε την έκφραση τόσο του iNOS όσο και της COX-2 ενώ αυτό της εχινάκειας ανέστειλε μόνο την έκφραση της COX-2. (Raso G. M., 2002)

Η ψευδοϋπερική και η υπερφορίνη βρέθηκαν να είναι τα κύρια αντιφλεγμονώδη συστατικά του υπέρικου, μαζί με τα φλαβονοειδή, έχοντας την ικανότητα να αναστέλλουν την παραγωγή προσταγλανδίνης E(2) PGE₂, σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού. (Hammer K.D.P. et.al., 2007). Το υπεροσεΐδιο, ένα άλλο βασικό συστατικό του υπέρικου, έχει αποδειχθεί πως έχει αντιφλεγμονώδη δράση έχοντας την ικανότητα να καταστέλλει την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF- α μέσω καταστολής της ενεργοποίησης του παράγοντα NF- κ B, του νιτρικού οξειδίου και της ιντερλευκίνης-6 σε μακροφάγα κύτταρα από την περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικού. (Kim S-J, Um J-Y, Hong S-H, Lee J-Y, 2013)

1.3.4. Αντικαταθλιπτική Δράση

Το βαλσαμόχορτο θα μπορούσε από πολλούς να θεωρηθεί ως το «βάλσαμο της ψυχής» καθότι χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες για τις ηρεμιστικές και αντικαταθλιπτικές του ιδιότητες σε περιπτώσεις ήπιας κατάθλιψης. Θεωρείται από πολλούς ως το φυσικό Πρόζακ. Σύμφωνα, μάλιστα, με έρευνα που δημοσιεύτηκε στο ιατρικό περιοδικό «British Medical Journal», το εκχύλισμα βαλσαμόχορτου φάνηκε εξίσου αποτελεσματικό για την αντιμετώπιση της μέτριας κατάθλιψης σε σύγκριση με τη φαρμακευτική αγωγή (συγκεκριμένα, την παροξετίνη, που ανήκει στους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης). Το βαλσαμόχορτο είναι πολύ δραστικό, γι' αυτό δεν πρέπει να λαμβάνεται παράλληλα με αντικαταθλιπτικά ή και άλλα φάρμακα (λόγω αλληλεπίδρασης στο ήπαρ). Όταν χρησιμοποιείται σε μεγάλες ποσότητες, μπορεί να προκαλέσει αυξημένη ευαισθησία του δέρματος και των ματιών στο φως του ήλιου, ζάλη, ναυτία, ξηροστομία, δερματικά εξανθήματα και κόπωση.

Η υπερφορίνη είναι ένας ευρείας-ζώνης αναστολέας της επαναπρόσληψης των νευροδιαβιβαστών, η οποία επηρεάζει την συναπτοσωμική πρόσληψη της σεροτονίνης, ντοπαμίνης και νοραδρεναλίνης (νορεπινεφρίνης), του γλουταμινικού και γ -αμινο-βουτυρικού (GABA) οξέος με παρόμοια αποτελεσματικότητα σε όλες τις περιπτώσεις. Η οξεία αυτή επίδραση ακολουθείται προσαρμοστικές αλλαγές στο σύστημα του υποδοχέα. Ο υποκείμενος μηχανισμός δράσης είναι μοναδικός για την υπερφορίνη, καθώς η ένωση δεν αλληλεπιδρά απευθείας με τους μεταφορείς των διαβιβαστών αλλά αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση νατρίου, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο, την βαθμιδωτά-καθοδηγούμενη επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών. Η επίδραση αυτή του νατρίου έχει αποδοθεί στην ενεργοποίηση μη-εκλεκτικών καναλιών κατιόντων. Εν αντιθέσει, τα εμπορικά διαθέσιμα αντικαταθλιπτικά, είναι ανταγωνιστικοί αναστολείς είτε ενός είτε το πολύ δύο μεταφορέων, στις θέσεις πρόσδεσης των διαβιβαστών. Έτσι η υπερφορίνη είναι τόσο

δομικά όσο και λειτουργικά ένα «νέο» αντικαταθλιπτικό. Στην αντικαταθλιπτική δράση του υπέρικου λέγεται ότι συμβάλλουν και οι υπερικίνες και τα διάφορα φλαβονοειδή του. (Beerhues L, 2006)

1.3.5. Νευροπροστατευτική Δράση – Ενίσχυση Εγκεφαλικής Λειτουργίας

Πλήθος μελετών έχει πραγματοποιηθεί για την νευροπροστατευτική δράση του υπέρικου, εκχυλισμάτων του και απομονωμένων συστατικών του. Οι κύριες ενώσεις του υπέρικου περιγράφονται ως νευροπροστατευτικές σε αρκετές μελέτες, με τη δράση αυτή να σχετίζεται με άμεσες (in vitro & in vivo νευροπροστατευτική δράση) και έμμεσες οδούς και μονοπάτια καθώς και με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Τα κύρια συστατικά του υπέρικου στα οποία έχει αποδοθεί η νευροπροστατευτική του δράση ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών συστατικών και είναι η κερσετίνη, το υπεροξίδιο, η κερσιτρίνη, η ρουτίνη, η καμφερόλη, η διαπιγενίνη και τα δύο κύρια συστατικά του, η υπερικίνη και η υπερφορίνη. (Oliveira A.I. et. al., 2016)

Οι Lu et. al το 2004 αναφέρουν την νευροπροστατευτική δράση στανταρισμένων εκχυλισμάτων υπέρικου (0,3%) σε τραύμα που προκλήθηκε από υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂ σε κυτταρικές σειρές PC12 από ποντίκια (κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ευρέως σε in vitro μοντέλα οξειδωτικού στρες και νευρικών βλαβών) , μετά από 24 ώρες χορήγησης. Το εκχύλισμα βελτίωσε το ποσοστό βιωσιμότητας των νευρικών κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, με συγκεντρώσεις 1-40 μg/mL έχοντας ως αποτέλεσμα 133% ποσοστό βελτίωσης στη μέγιστη χορηγούμενη συγκέντρωση των 40 μg/mL. Το εκχύλισμα του υπέρικου όταν χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις από 1-100 μg/mL μείωσε επίσης τα ενδο- και εξω-κυτταρικά επίπεδα ελευθέρων ριζών. (Lu Y.H. et. al., 2004)

Μία άλλη μελέτη ανέδειξε την δράση στανταρισμένων εκχυλισμάτων υπέρικου στην προστασία από την ενζυματική και μη-ενζυματική υπεροξειδωση των λιπιδίων σε εγκέφαλο ποντικού. Η δράση αποδόθηκε στην αναστολή της εξαρτώμενης από το NADPH υπεροξειδωσης των λιπιδίων και την απόσβεση/εξασθένηση της μη ενζυματικής Fe²⁺/ασκορβικού εξαρτώμενης οξειδωσης των λιπιδίων, λόγω παραγωγής ελευθέρων ριζών, σε μιτοχόνδρια του φλοιού του εγκεφάλου. (Benedi J. et. al., 2004)

Οι Breyer et al., το 2007 μελέτησαν την νευροπροστατευτική δράση εκχυλισμάτων υπέρικου σε , επαγόμενη από το γλουταμινικό, θνησιμότητα σειράς νευρικών κυττάρων (HT22) του ιππόκαμπου του εγκεφάλου. Το γλουταμινικό, ως νευροδιαβιβαστής, όταν συσσωρεύεται εξωκυτταρικά οδηγεί σε υπερδιέγερση των μετασυναπτικών γλουταμικών υποδοχέων, με ακόλουθη αναστολή της ενδοκυτταρικής σύνθεσης γλουταθειόνης και υπερφόρτωση σε ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺), μπορεί να δράσει τοξικά και να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο. Τα

αποτελέσματα έδειξαν πως μετά το πέρας των 8 ωρών, τα εκχυλίσματα κατάφεραν να αποτρέψουν τον κυτταρικό θάνατο στη σειρά HT22. (Breyer A. et. al., 2007)

Η γνωστή σε όλους μας νόσος του Alzheimer, χαρακτηρίζεται από νευρωνικό εκφυλισμό, ιδιαίτερα των πυραμιδικών νευρώνων του ιππόκαμπου, του ενδορινικού φλοιού και άλλες νεοφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου, ο οποίος περιλαμβάνει την ειδική απώλεια των χολινεργικών νευρώνων της διαμέσου του πρόσθιου μέρους του εγκεφάλου. Μία από τις κύριες αιτίες που οδηγούν στον νευρωνικό εκφυλισμό είναι η τοξικότητα που επάγεται από το β -αμυλοειδές, ένα ετερογενές πεπτίδιο το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως νευροτοξικό και συμμετέχει σε πολλά στάδια του οξειδωτικού στρες. Σε μελέτη των Silva et. al. μελετήθηκε η νευροπροστατευτική δράση αιθανολικού εκχυλίσματος υπέρικου σε επαγόμενο κυτταρικό θάνατο από το β -αμυλοειδές σε νευρώνες ιππόκαμπου από αρουραίους. Ως δείκτης οξειδωτικού στρες χρησιμοποιήθηκε η υπεροξειδωση των λιπιδίων ακολουθώντας τον σχηματισμό TBARS στα εγκεφαλικά συναπτοσώματα του φλοιού μετά από επώαση με ασκορβικό οξύ/ Fe^{2+} , με ή χωρίς την παρουσία του αιθανολικού εκχυλίσματος υπέρικου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα του υπέρικου και τα δραστικά κλάσματά του (αυτά που περιείχαν φλαβονοειδή και φαινολικά συστατικά ως κύριες ουσίες), ανέστειλαν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και προστάτευσαν τα κύτταρα από τον επαγόμενο νευροεκφυλισμό. (Silva B.A. et. al., 2004)

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2006 μελέτησε την ενισχυμένη νευροπροστατευτική δράση μέσω συνδυασμού εκχυλισμάτων υπέρικου και βρωμοκρυπτίνης, ενός αντιπαρκινσονικού φαρμάκου αναστολέα της προλακτίνης, ορμόνης του οπισθίου λοβού της υπόφυσης του εγκεφάλου. Η νευροπροστατευτική δράση ελέγχθηκε σε επαγόμενη νόσο του Parkinson μέσω της νευροτοξίνης MPTP σε αρσενικούς αρουραίους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνδυασμένη χορήγηση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων υπέρικου και της βρωμοκρυπτίνης, ανέστειλε την υπεροξειδωση των λιπιδίων και βελτίωσε το αντιοξειδωτικό προφίλ στην περιοχή του εγκεφάλου, προστατεύοντας έτσι από τις επιπτώσεις της νευροτοξίνης στα εγκεφαλικά νευρικά κύτταρα. Η συνδυασμένη χρήση των δύο ουσιών έδειξε πολύ ισχυρότερα αποτελέσματα σε σχέση με την κάθε ουσία ξεχωριστά. (Mohanasundari M. et. al., 2006)

1.3.6. Αντινεοπλασιακή Δράση

Η υπερφορίνη αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο αντικαρκινικό παράγοντα. Σε πειράματα έχει δείξει την αναστολή της ανάπτυξης μίας πληθώρας σειρών καρκινικών κυττάρων (ανθρώπου και ποντικού), μέσω επαγωγής της διαδικασίας της απόπτωσης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (τιμές IC_{50} από 3-20 μM). Η επίδρασή της έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων βρέθηκε πειραματικά συγκρίσιμη με αυτή της πακλιταξέλης (ταξόλης) χωρίς την εμφάνιση κάποιας οξείας τοξικότητας. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι προλαμβάνει και αντιπαραβάλλει την εξάπλωση και μετάσταση του καρκίνου, καθώς επίσης αναστέλλει την αγγειογένεση

(in vivo) και βασικά βήματα αυτής της διαδικασίας (in vitro). Δοκιμές σε ένα συνθετικό παράγωγο της υπερφορίνης, με βελτιωμένη σταθερότητα και διαλυτότητα, έδειξαν ότι μπορεί να διατηρήσει τις αντικαρκινικές ιδιότητες της αρχικής ένωσης, χωρίς να επάγει κάποια τοξικότητα. (Beerhues L, 2006)

1.4. Επουλωτική Δράση Υπέρικου

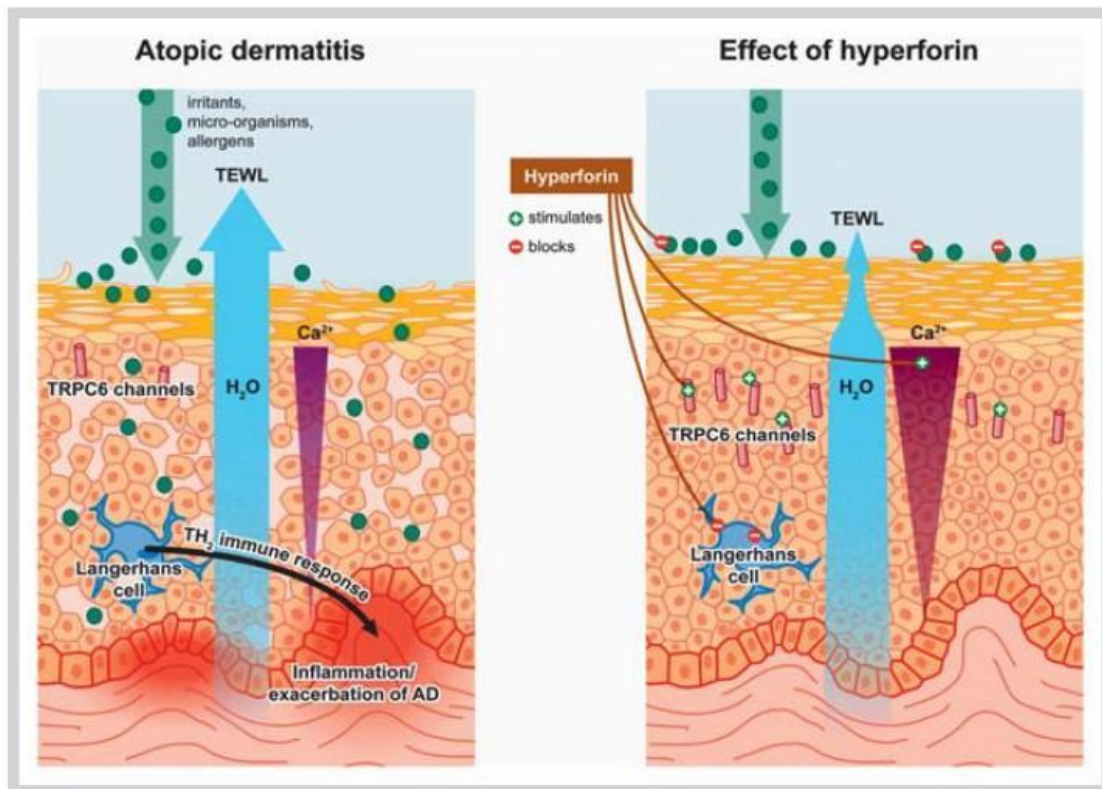
1.4.1. Μηχανισμός επουλωτικής δράσης Υπέρικου

Παρότι το βαλσαμόχορτο έχει περιέχει ένα ευρύ φάσμα δραστικών φαρμακευτικών ουσιών, δύο είναι οι κύριες κατηγορίες στις οποίες έχει αποδοθεί η θεραπευτική του δράση σε δερματολογικές παθήσεις και φθορές, οι φλορογλουκινόλες (υπερφορίνες) και οι ναφθοδιανθρόνες (υπερικίνες).

Η επίδραση του υπέρικου όσον αφορά τη διαδικασία της επούλωσης, δεν περιορίζεται στην πολλαπλασιαστική φάση της επούλωσης του τραύματος αλλά επεκτείνεται επίσης στη βελτίωση της λειτουργίας της επιδερμίδας όταν έχει προσφάτως δημιουργηθεί εκ νέου μετά από έναν τραυματισμό, ή όταν εξασθενεί λειτουργικά από ασθένειες όπως η ατοπική δερματίτιδα και η ψωρίαση. (Leuner K et. al., 2011)

Ο ανεπαρκής σχηματισμός των ανώτερων επιδερμικών στοιβάδων οδηγεί σε απώλεια νερού, μικροβιακές λοιμώξεις, φλεγμονή και κνησμό. Η υπερφορίνη, μία από τις κύριες δραστικές ουσίες του υπέρικου, εκτός από την αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση της, είναι ικανή να αποκαταστήσει την εξασθενημένη επιδερμική λειτουργία και οργάνωση διεγείροντας την διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και τον σχηματισμό του *κερατινοποιημένου περιβλήματος*. Η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων προωθείται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα του κατιοντικού διαύλου TRPC6 (ένας μηχανισμός που εμπλέκεται και στην αντικαταθλιπτική δράση της υπερφορίνης), με την αύξηση του φυσιολογικού ερεθίσματος και της συγκέντρωσης του εξωκυτταρικού ασβεστίου. (Müller M et. al., 2008).

Εφόσον οι υποδοχείς TRP συνδέονται επίσης με τον κνησμό, η υπερφορίνη φαίνεται να είναι ένα δερματολογικό φάρμακο με πολλαπλούς στόχους (Εικόνα 7.).



Εικόνα 12: Η πολλαπλών στόχων δράση της υπερφορίνης στο δέρμα (Wölfle U., Seelinger G., Schempp C.M, 2014)

Η κλινική αιτιολόγηση της επουλωτικής δράσης του φυτού προκύπτει από τις αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του και από τη διέγερση της κινητικότητας των ινοβλαστών, την παραγωγή κολλαγόνου και την διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, όπως αναφέραμε και παραπάνω. (Wölfle U., Seelinger G., Schempp C.M, 2014)

Συσχετισμός επουλωτικής δράσης με αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση βαλσαμέλαιου

Πλήθος μελετών έχουν διεξαχθεί σχετικά με την αντιφλεγμονώδη δράση του υπέρικου ενώ άλλες έχουν επιβεβαιώσει την αντιβακτηριδιακή και αντιϊκή του δράση, ιδιότητες που μπορεί να εμπλέκονται στην επουλωτική του δράση. Άλλωστε όπως είναι γνωστό, ο πρώτος στόχος στην διαχείριση ενός τραύματος είναι η αποφυγή των λοιμώξεων και των επιπλοκών. Η επούλωση του τραύματος είναι μία φυσική απόκριση του τραυματισμένου δερματικού ιστού και αποτελείται από τις σύνθετες φάσεις της φλεγμονής, του πολλαπλασιασμού και της αναδιαμόρφωσης. Το πρώτο στάδιο της επουλωτικής διαδικασίας είναι η φλεγμονή, ως μηχανισμός άμυνας του ιστού που παρέχει αντίσταση στις μικροβιακές λοιμώξεις. Έτσι, η αντιφλεγμονώδης δράση του φυτού φαίνεται να είναι αμφιλεγόμενη σε σχέση με την διαδικασία επούλωσης, ειδικά στο πρώτο στάδιο των φάσεων. Είναι όμως γεγονός ότι μεγάλη παραμονή στη φάση της φλεγμονής, οδηγεί σε καθυστέρηση της ολικής διαδικασίας επούλωσης. Έτσι, με σκοπό τη συντόμευση της διαδικασίας επούλωσης

και την μείωση του πόνου και του μεγέθους της σχηματιζόμενης ουλής, απαιτείται η αντιφλεγμονώδης δραστηριότητα. Τα αποτελέσματα των Suntara et. al., δείχνουν ότι το υπέρικο οδηγεί σε συντόμευση του χρόνου φλεγμονής και αντίσταση στις μολύνσεις. Κατά πάσα πιθανότητα παρέχει ένα φράγμα έναντι των μικροβιακών λοιμώξεων κατά την έναρξη της διαδικασίας επούλωσης του τραύματος. Ένα ακόμα δεδομένο που επιβεβαιώνει την παραπάνω άποψη είναι ότι το υπέρικο περιέχει συστατικά με ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση, όπως η υπερφορίνη και διάφορα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή άλλωστε είναι γνωστό πως είναι δραστικές αντιοξειδωτικές ενώσεις υπεύθυνες για την αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην πρόληψη των κυτταρικών βλαβών και την αύξηση της βιωσιμότητας των ινιδίων κολλαγόνου.

Ο ρόλος του NF-κB στο μηχανισμό της επουλωτικής δράσης του υπέρικου

Η επούλωση ενός δερματικού τραύματος είναι μία συλλογική διεργασία φυσιολογικής απόκρισης της επιδερμίδας στον τραυματισμό που βασίζεται στη συντονισμένη δράση διαφορετικών ιστών, κυττάρων και μεσολαβητών. Κανονικά, εξελίσσεται με συγκεκριμένο τρόπο και συγκριμένη σειρά συμβάντων. Χωρίζεται σε τρεις φάσεις οι οποίες είναι: **(i)** η φλεγμονώδης φάση, **(ii)** η φάση του πολλαπλασιασμού και **(iii)** η φάση αναδιαμόρφωσης ιστού. Η διάσπαση αυτής της αλληλουχίας οδηγεί σε παρατεταμένη φλεγμονή, καθυστερημένη θεραπεία των οξέων τραυμάτων και εξ ου χρόνιων πληγών και ελκών. Το στάδιο της φλεγμονής ξεκινά από τη στιγμή που ένα τραύμα αρχίζει να καλύπτεται από έναν θρόμβο αίματος, τη λεγόμενη αιμόσταση. Βασικά κύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος, ιδίως ουδετερόφιλα, μεταναστεύουν και συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της πρόωρης φλεγμονής στη περιοχή του οξέος τραύματος. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των φλεγμονών αποτελεί το οξειδωτικό «ξέσπασμα» με την απελευθέρωση φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένων των ενεργών ριζών οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS αντίστοιχα). Ενώ οι ROS σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι εξαιρετικά βακτηριοστατικές, σε χαμηλές συγκεντρώσεις λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταφορείς.

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF-α είναι μία πολυλειτουργική, προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη που συμμετέχει σε πολλές διαφορετικές οδούς της ομοιόστασης και εμπλέκεται στη ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων, πολλαπλασιασμού του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης και είναι ένας βασικός μεσολαβητής κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους φάσης της επούλωσης των πληγών. Τα επίπεδα της TNF-α αυξάνονται σημαντικά, τόσο στα κοινά όσο και στα οξεία τραύματα. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι ένας παράγοντας του μονοπατιού σηματοδότησης της TNF-α παίζοντας κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση πολλών γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή φλεγμονικών μεσολαβητών ή πρωτεϊνών (TNF-α, IL-1, VCAM-1, ICAM-1, iNOS). Διάφορα εκχυλίσματα υπέρικου (ελαϊκά ή μη) έχουν δείξει ανασταλτική δράση έναντι της ενεργοποίησης του NF-κB όταν αυτή επάγεται από την TNF-α. Ταυτόχρονα όμως, το ελαιόλαδο από μόνο του όπως και τα

λιπαρά του οξέα ξεχωριστά, έχουν δείξει επουλωτική δράση και/ή απενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB. Σε σύγκριση του ελαιολάδου και του βαλσαμελαίου από τους Suntar et. al. (2010) το ελαιόλαδο έδειξε υψηλή επουλωτική δράση όμως αυτή του βαλσαμελαίου ήταν σημαντικά υψηλότερη. Δοκιμές με χορήγηση ολεϊκού και λινοελαϊκού οξέος έχουν δείξει ότι και τα δύο χαρακτηρίζονται από τη δράση στην οποία αναφερόμαστε, τόσο την επουλωτική όσο και την ανασταλτική έναντι του παράγοντα NF-κB, που σχετίζεται με την πρώτη. Ο κυριότερος μεταβολίτης του ελαιολάδου, πλην των λιπαρών του οξέων, που έχει δείξει παρόμοια δράση είναι η τυροσόλη (Lu et. al., 2013).

Τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν ότι η επουλωτική δράση (όσον αφορά εξωτερική τοπική εφαρμογή) του βαλσαμελαίου είναι αρκετά πολύπλοκη και πιθανότατα συμπεριλαμβάνει πολλαπλούς μηχανισμούς. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η ανασταλτική δράση των βαλσαμελαίων έναντι του NF-κB είναι μικρή, όμως μπορεί να επαρκεί σε αυτά τα επίπεδα για τη μείωση της φλεγμονής ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της οξείας δερματικής φλεγμονής. Η χρήση του ελαιολάδου για την παρασκευή του εκχυλίσματος μπορεί να προσφέρει συνεργιστική ή διατηρητέα αναστολή του NF-κB ή άλλων μηχανισμών που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της φλεγμονής του δέρματος. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες και η αντιοξειδωτική δράση, τόσο του ελαιολάδου όσο και του υπέρικου μπορεί επίσης να συμβάλλουν στη θεραπεία του τραύματος. (Orhan I.E. et. al., 2014)

Η υπόθεση ότι η επουλωτική δράση του βαλσαμελαίου θα μπορούσε να συμπεριλαμβάνει την εμπλοκή της αναστολής του μονοπατιού σηματοδότησης του μεταγραφικού ρυθμιστή NF-κB επιβεβαιώνεται και από τους Suntar et. al. Το μονοπάτι αυτό εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η φλεγμονή και η κυτταρική επούλωση. Έτσι, στη σχετική μελέτη, ερευνήθηκε η ανασταλτική δράση 10 παραδοσιακών και 13 εμπορικών βαλσαμελαίων έναντι της επαγόμενης από την TNF-α ενεργοποίηση του NF-κB. Η επίδραση των βαλσαμελαίων στην επαγόμενη από την TNF-α μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB μελετήθηκε μέσω δοκιμής με το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράση. Χρησιμοποιήθηκε σειρά ανθρώπινων κυττάρων K562, θετικών στο χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας, χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Τα αποτελέσματα της δοκιμής έδειξαν ότι μόνο τα 7 από τα 23 δείγματα βαλσαμελαίων είχαν επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB, μειώνοντάς τη, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Στα υπόλοιπα δείγματα δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση. (Suntar et. al., 2011)

1.4.2. Επουλωτική Δράση Υδατικών & Οργανικών Εκχυλισμάτων Υπέρικου

Εφαρμογή σε τομές

Σε μελέτη που ερευνήθηκαν κλάσματα εκχυλισμάτων υπέρικου με σκοπό την αξιολόγηση της επουλωτικής τους δράσης και γενικότερα του φυτού, το ελαϊκό

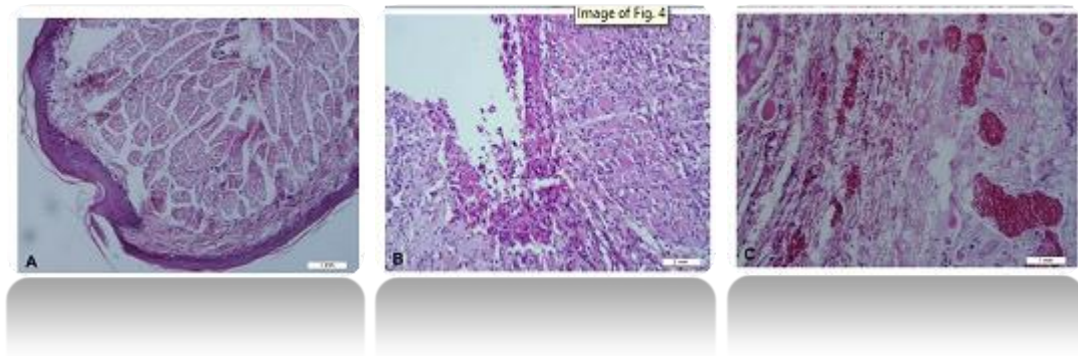
εκχύλισμα έδειξε πολύ ισχυρή επουλωτική δράση σε μοντέλα τομών, ενώ μελετήθηκαν ταυτόχρονα το αιθανολικό εκχύλισμα και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα από το φυτού αφού πραγματοποιήθηκαν καθοδηγούμενες διαδικασίες κλασματοποίησης. Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα καθώς και τα κλάσματά του, αποτελούμενα από φλαβονοειδή όπως η ρουτίνη, ισοκερσιτρίνη, υπεροσίδιο, επικατεχίνη αλλά και τις γνωστές σε όλους υπερικίνες, έδειξαν ισχυρή επουλωτική δράση επίσης. Ταυτόχρονα, τα εκχυλίσματα αυτά και τα κλάσματά τους, παρουσίασαν μία δοσοεξαρτώμενη αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα κάτι το οποίο κάνει τον ενισχυτικό ρόλο της αντιφλεγμονώδους δράσης των δραστικών κλασμάτων του φυτού στην διαδικασία της επούλωσης, ένα άκρως ρεαλιστικό σενάριο. (Suntar I., et. al., 2011)

Εφαρμογή σε πληγές

Σε μία άλλη έρευνα μελετήθηκε η επουλωτική δράση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων του υπέρικου σε πληγές σε κουνέλια. Υδροαλκοολικά εκχυλίσματα (30:70 % v/v) σε συγκεντρώσεις 0%, 2%, 5% και 10% προστέθηκαν σε βάση κρέμας ευκερίνης (eucerin crème – κρέμα επούλωσης). Η κρέμα (ενισχυμένη με εκχύλισμα υπέρικου ή μη ενισχυμένη), τοποθετήθηκε στις τομές που πραγματοποιήθηκαν στο δέρμα των κουνελιών για 7 ημέρες, σε καθημερινή βάση. Ελέγχθηκε η επιφάνεια του τραύματος και οι ιστοπαθολογικές μεταβολές με δείγμα ιστού δέρματος. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη δράση κρέμας φαινοτυΐνης (1%) ως πρότυπο θεραπευτικό μέσο. Το εκχύλισμα του υπέρικου αύξησε σημαντικά το ρυθμό επούλωσης του τραύματος σε σύγκριση με τις ομάδες που δεν έλαβαν καμία αγωγή. Η κρέμα με την προσθήκη εκχυλίσματος 2% έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα επούλωσης. Τα εκχυλίσματα του υπέρικου πιθανόν συμμετέχουν στην προώθηση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και μυοϊονβλαστών, με αποτέλεσμα το υψηλότερο ποσοστό επούλωσης. (Hemmati AA, Rashidi I, Jafari M, 2007)

Εφαρμογή σε πληγές και έλκη στοματικής βλενογοννίτιδας

Η στοματική βλενογοννίτιδα είναι μία κοινή επιπλοκή της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας η οποία αφορά στον ερεθισμό, οίδημα και πληγές στη στοματική κοιλότητα. Οι υπάρχουσες θεραπείες δεν έχουν καταφέρει την πλήρη ύφεση της επιπλοκής. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκε η θεραπευτική δράση της τοπικής και συστηματικής χορήγησης εκχυλίσματος υπέρικου. Η θεραπευτική δράση μελετήθηκε σε επαγόμενη από 5-φθοροουρακίλη στοματική βλενογοννίτιδα σε αρουραίους (72 αρσενικούς). Τα αποτελέσματα των ιστοπαθολογικών μελετών – βιοψιών της στοματικής κοιλότητας, των αιματολογικών εξετάσεων και άλλων μετρήσεων έδειξαν ότι το εκχύλισμα του υπέρικου οδήγησε σε σημαντική ανακούφιση αρχικά από τα συμπτώματα της στοματικής βλενογοννίτιδας και στη συνέχεια σε επιτάχυνση της επούλωσης των πληγών-φθορών του στόματος σε σύγκριση με τις ομάδες ποντικών στις οποίες δεν χορηγήθηκε θεραπεία με φυτικό εκχύλισμα(Εικόνα



Εικόνα 13: Αξιολόγηση του θεραπευτικού αποτελέσματος του εκχυλίσματος *Hypericum perforatum* με ιστοπαθολογική μελέτη. Βαθμολόγηση της επαγόμενης από το στόμα βλενογοννίτιδας με 5-φθοροουρακίλη. (Α) Βαθμολογία 0, από την ομάδα που έτυχε θεραπείας με τοπική γέλη από εκχύλισμα *Hypericum perforatum* (10%), που δείχνει το φυσιολογικό επιθήλιο και τον συνδετικό ιστό χωρίς σημάδια φλεγμονής, (Β) Βαθμολογία 2, από την ομάδα που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με βάση γέλης που δεν περιείχε εκχύλισμα, δείχνοντας εξελκώσεις στη μεμβράνη της επιφάνειας του βλεννογόνου, (C) Βαθμολογία 2, Από την ομάδα που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με βάση γέλης που δεν περιείχε εκχύλισμα, δείχνοντας την παρουσία αιμορραγικών περιοχών, αγγειακών βλαβών και χρόνια φλεγμονή στο συνδετικό ιστό. (Tanideh N. et. al., 2014)

Εφαρμογή σε εγκαύματα

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκε η επουλωτική δράση του υπέρικου σε εγκαύματα σε ποντίκια, σε σύγκριση με κρέμα σουλφαδιαζίνης. Ουσιαστικά μελετήθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα του υπέρικου σε μορφή gel σε σύγκριση με την κρέμα σουλφαδιαζίνης και κρέμα placebo που δεν περιείχε δραστική ουσία. Παρατηρήθηκε ότι ο αποχρωματισμός του κολλαγόνου, στην περίπτωση της χορήγησης εκχυλίσματος υπέρικου, εντοπίστηκε μόνο στο κάτω μέρος της επιδερμικής στοιβάδας και όχι στο άνω, όπως στις ομάδες που δεν χορηγήθηκε το εκχύλισμα. Επίσης η επιδερμίδα οι θύλακες των τριχών και οι σμηγματογόνοι αδένες παρέμειναν προστατευμένοι σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες. Διαπιστώθηκε ότι το επιδερμικό πάχος και ο αριθμός των αγγείων, ήταν σημαντικά υψηλότερος στην περίπτωση ομάδας που χορηγήθηκε το υπέρικο και η ομάδα αυτή ήταν η πιο κοντινή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, όσον αφορά αυτές τις παραμέτρους. Τέλος, ο αριθμός των εκφυλισμένων τριχοθηλακίων βρέθηκε σημαντικά μικρότερος. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τους επιστήμονες της έρευνας να οδηγηθούν στο συμπέρασμα ότι η εφαρμογή της κρέμας υπέρικου 4 φορές την ημέρα, στο πρώτο 24ωρο θεραπείας είναι καθαρά αποτελεσματική στην επούλωση των πειραματικά δημιουργηθέντων εγκαυμάτων 2^{ου} βαθμού σε ποντίκια και είναι σημαντικά ανώτερη σε σύγκριση με τη θεραπεία με σουλφαδιαζίνη. (Kiyan S. et.al., 2015)

1.4.3. Επούλωτική Δράση Ελαϊκών Εκχυλισμάτων Υπέρικου – Βαλσαμέλαιο

Η εξέλιξη της επούλωσης αποτελείται από συστηματικές διαδικασίες που αποκαθιστούν τον κατεστραμμένο ιστό, μερικώς ή πλήρως. Αυτή η σύνθετη αλληλουχία συμβάντων αρχίζει από τη στιγμή του τραυματισμού και συνεχίζεται για διάφορες χρονικές περιόδους, ανάλογα με τη σοβαρότητα του τραύματος. Η διαδικασία γενικά μπορεί να χωριστεί σε τρία κύρια στάδια: Τη φλεγμονώδη φάση (αποτελείται από την εγκατάσταση και ομοιόσταση της φλεγμονής), τη πολλαπλασιαστική φάση (συστολή και επιθηλίωση) και τέλος τη φάση αναδιάρθρωσης η οποία καθορίζει τελικά την τη δύναμη και την εμφάνιση του επούλωμένου ιστού. Οι επούλωτικές διαδικασίες, προωθούνται αποτελεσματικά με τη χρήση παραδοσιακών θεραπειών οι οποίες βασίζονται ως επί το πλείστον σε φυτικές πηγές. Οι θεραπείες αυτές, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν ένα ή περισσότερα από τα στάδια της επούλωσης. Σε αυτό το πλαίσιο οι παραδοσιακές θεραπείες μπορεί να μας δώσουν πολύ σημαντικές πληροφορίες για τις αρχικές πηγές διαφόρων φαρμάκων. Ανάμεσα στις παραδοσιακές θεραπείες για την επούλωση πληγών και τραυμάτων, το ελαϊκό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων από το φυτό βάλσαμο, κατέχει μία εξαιρετική θέση στην παραδοσιακή Τουρκική ιατρική. Το ελαϊκό αυτό εκχύλισμα αποτελεί μία δημοφιλή σπιτική θεραπεία για την ταχεία αποκατάσταση ουλών και τραυμάτων εξωτερικά αλλά και για πεπτικά έλκη εσωτερικά.

Επούλωτική δράση βαλσαμέλαιου με χρήση ελαιολάδου ως φυτικό έλαιο εκχύλισης

Το ελαιόλαδο είναι γνωστό για την εξαιρετική του γεύση και τα οφέλη του στην υγεία, ιδιαίτερα στις μεσογειακές χώρες. Ταυτόχρονα όμως είναι γνωστό και το ότι βελτιώνει τη διαδικασία της επούλωσης τραυμάτων σε παραδοσιακές θεραπείες. Σε χώρες όπως η Βουλγαρία η Ιταλία και η Πορτογαλία χρησιμοποιείται για να καταπραΰνει και να θεραπεύσει τα εγκαύματα, ενώ σε άλλες ανατολικές χώρες, τοποθετείται μαζί με αλάτι και αλεσμένο σαπούνι πάνω σε πληγές και κοψίματα για ταχεία επούλωση. (Suntar I., et. al., 2011)

Ελαϊκά εκχυλίσματα του *Hypericum perforatum* L. και άλλες παρασκευές του, που περιέχουν υπερφορίνη, υπερίκίνη ή τα παράγωγά τους είναι κατάλληλα για εφαρμογή σε γρατζουνιές, εκδορές, εγκαύματα και έλκη. Παρόλο που η εφαρμογή του σε τραύματα, μώλωπες και μυαλγία αναφέρεται ως παραδοσιακές θεραπείες, μέχρι σήμερα δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που να το αποδεικνύουν. Έχουν όμως πραγματοποιηθεί έρευνες που αναδεικνύουν την επούλωτική δράση του φυτού και των ελαϊκών εκχυλισμάτων του, έναντι εγκαυμάτων, χειρουργικών τομών και δερματικών παθήσεων. (Wölflle U., Seelinger G., Schempp C.M, 2014)

Η πρώτη έρευνα που διεξήχθη στο βαλσαμόλαδο έγινε από τους Maisenbacher & Kovar (1992). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνάς τους, στο ελαϊκό εκχύλισμα του υπέρικου του οποίου η σύσταση αναλύθηκε με TLC και HPLC, βρέθηκε κυρίως

υπερφορίνη και όχι υπερικίνη και έτσι συμπεράναν ότι πιθανώς το υπεύθυνο συστατικό για την επουλωτική δράση του βαλσαμόλαδου είναι η υπερφορίνη και όχι η υπερικίνη. Ωστόσο σε αντίθεση με το αναμενόμενο αποτέλεσμα, οι Suntar et. al., (2011) βρήκαν στο ελαϊκό εκχύλισμα κυρίως υπερικίνες και φλαβονοειδή (υπεροσίδιο, ισοκερσιτρίνη, ρουτίνη & επικατεχίνη) και όχι υπερφορίνη. Επίσης, τα κλάσματα που περιείχαν υπερφορίνη βρέθηκε να είναι ανενεργά ή ελάχιστα δραστικά έναντι στα μοντέλα επουλωτικών δοκιμών.

Το ελαϊκό εκχύλισμα του βαλσαμόχορτου, στην Τουρκία ονομάζεται “sari kantaron yagi” και πωλείται ευρέως σε παραδοσιακά μαγαζιά με βότανα. Χρησιμοποιείται εξωτερικά, όπως και στον υπόλοιπο κόσμο, για τις αντισηπτικές του ιδιότητες καθώς και για την επουλωτική του δράση και συγκεκριμένα για την άμεση θεραπεία σε πληγές, τραύματα και καψίματα.

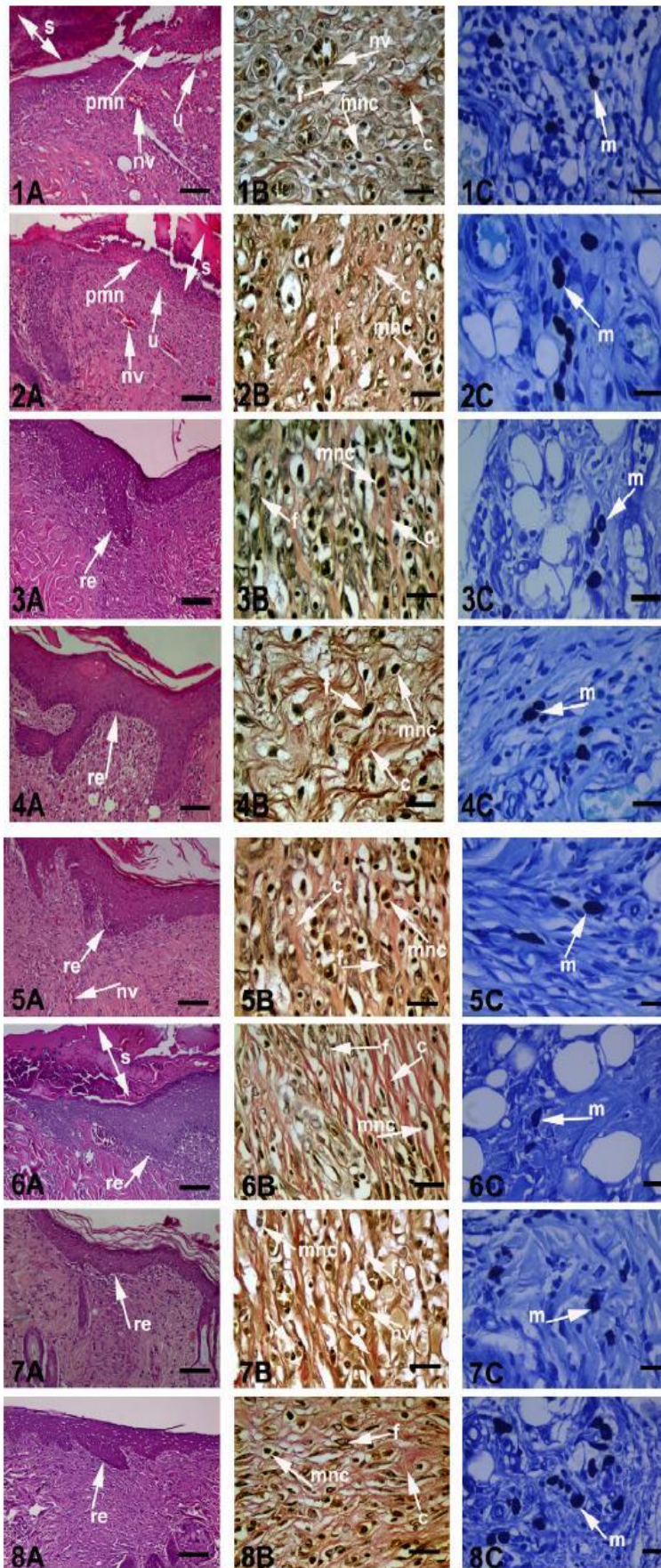
Οι Suntar et. al., το 2011, στηριζόμενοι στις γνωστές - στην παραδοσιακή Τουρκική ιατρική - θεραπευτικές δράσεις του ελαιολάδου, του βαλσαμόχορτου, της ρίγανης και του φασκόμηλου κατά των φλεγμονών και στην επούλωση πληγών του δέρματος, ανέπτυξαν μία νέα φόρμουλα (αλοιφή) με σκοπό να παρέχει όσο το δυνατόν αποδοτικότερη δράση επούλωσης. Η φόρμουλα αυτή περιείχε βαλσαμόλαδο (ελαϊκό εκχύλισμα νωπών υπέργειων τμημάτων βάλσαμου) καθώς και ένα μείγμα αιθερίων ελαίων. Περαιτέρω, η επουλωτική δράση του κάθε συστατικού ξεχωριστά επίσης διερευνήθηκε για να προσδιοριστεί η βελτίωση στην ικανότητα επούλωσης του σκευάσματος μετά την προσθήκη του κάθε ενός από αυτά με πειράματα *in vitro*, *in vivo* σε αρουραίους και ποντίκια καθώς και μέσω ιστοπαθολογικών μεθόδων και τέλος συγκρίθηκε και με τη φαρμακευτική αλοιφή αναφοράς Madecassol[®]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φόρμουλα που περιείχε όλα τα παραπάνω συστατικά, καθώς και το βαλσαμόχορτο μόνο του, έδειξαν την υψηλότερη δραστικότητα και στα δύο μοντέλα τομών (γραμμική και κυκλική) που δοκιμάστηκαν σε σύγκριση με την φαρμακευτική αλοιφή αναφοράς Madecassol[®] την ίδια στιγμή που τα άλλα δύο συστατικά (αιθέρια έλαια ρίγανης και φασκόμηλου) ανεξάρτητα δεν έδειξαν κάποια αξιοσημείωτη αντίστοιχη δραστικότητα. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της φόρμουλας που περιείχε όλα τα συστατικά βρέθηκε σημαντικά ισχυρότερη από αυτή του βαλσαμόχορτου ως ξεχωριστό συστατικό, κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε και μετά από ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Από την άλλη πλευρά η φόρμουλα δεν μείωσε τη δράστη της ελαστάσης *in vitro*, αλλά ανέστειλε αυτή της κολλαγενάσης ενώ ταυτόχρονα παρουσίασε αντιβακτηριδιακές και αντιμυκητιασικές δράσεις. (Suntar I., et. al., 2011)

Τα αποτελέσματα της έρευνας των Suntar et.al. έδειξαν ότι όντως το ελαϊκό εκχύλισμα του υπέρικου είναι αποτελεσματικό στην επούλωση τραυμάτων. Το ελαιολάδο από μόνο του, ως μέσο (διαλύτης) για την παρασκευή του εκχυλίσματος, έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό στην επούλωση τραυμάτων, ωστόσο η προσθήκη του υπέρικου αύξησε σημαντικά τη συγκεκριμένη δράση του.

Το δραστικό εκχύλισμα και τα κλάσματά του, οδήγησαν σε αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση στο σχηματισμό αγγείων και τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών. Η δραστηριότητα αυτή, πιθανόν να οφείλεται στην ενίσχυση της “μετανάστευσης” ινοβλαστών και την εναπόθεση κολλαγόνου. (Suntar I.P et.al., 2011)

Επούλωτική δράση βαλσαμέλαιου με χρήση γιγαρτελαίου ως φυτικό έλαιο εκχύλισης

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2010, ερευνητές θέλησαν να αξιολογήσουν την επώλωτική δράση του *Hypericum perforatum* και συγκεκριμένα του ελαϊκού εκχυλίσματός του, σε καισαρικές τομές και τις υπερτροφικές τους ουλές. Για το σκοπό αυτό, το φυτικό υλικό ξηράνθηκε, τρίφτηκε και εκχυλίστηκε σε γιγαρτέλαιο (1 μέρος φυτού – 3 μέρη γιγαρτελαίου) για 1 εβδομάδα, μετά τοποθετήθηκε στον φούρνο για 15 λεπτά, φιλτραρίστηκε και «αποστειρώθηκε». Πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια μία τυχαία, double-blind κλινική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 144 γυναίκες με καισαρική τομή μετά από γέννα, και αφού πληρούσαν τα επιλέξιμα κριτήρια. Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες, και η θεραπεία εφαρμόστηκε για 40 ημέρες. Ανάλογα με το στάδιο της επώλωσης, τα αποτελέσματα κρίθηκαν βάσει της κλίμακας REEDA αρχικά και έπειτα με τη κλίμακα Vancouver. Πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων, τα οποία έδειξαν ότι τη 10^η ημέρα θεραπείας οι διαφορές και αλλαγές στην επώλωση του τραύματος και στην 40^η ημέρα θεραπείας οι αλλαγές στη μορφή της ουλής, ήταν εμφανείς μεταξύ της ομάδας θεραπείας και της ομάδας που λάμβανε τη placebo θεραπεία. Επίσης, από την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε η αλοιφή με το βαλσαμέλαιο αναφέρθηκαν κι άλλα αποτελέσματα όπως ο μειωμένος πόνος και κνησμός. (Samadi S. et. al., 2011)



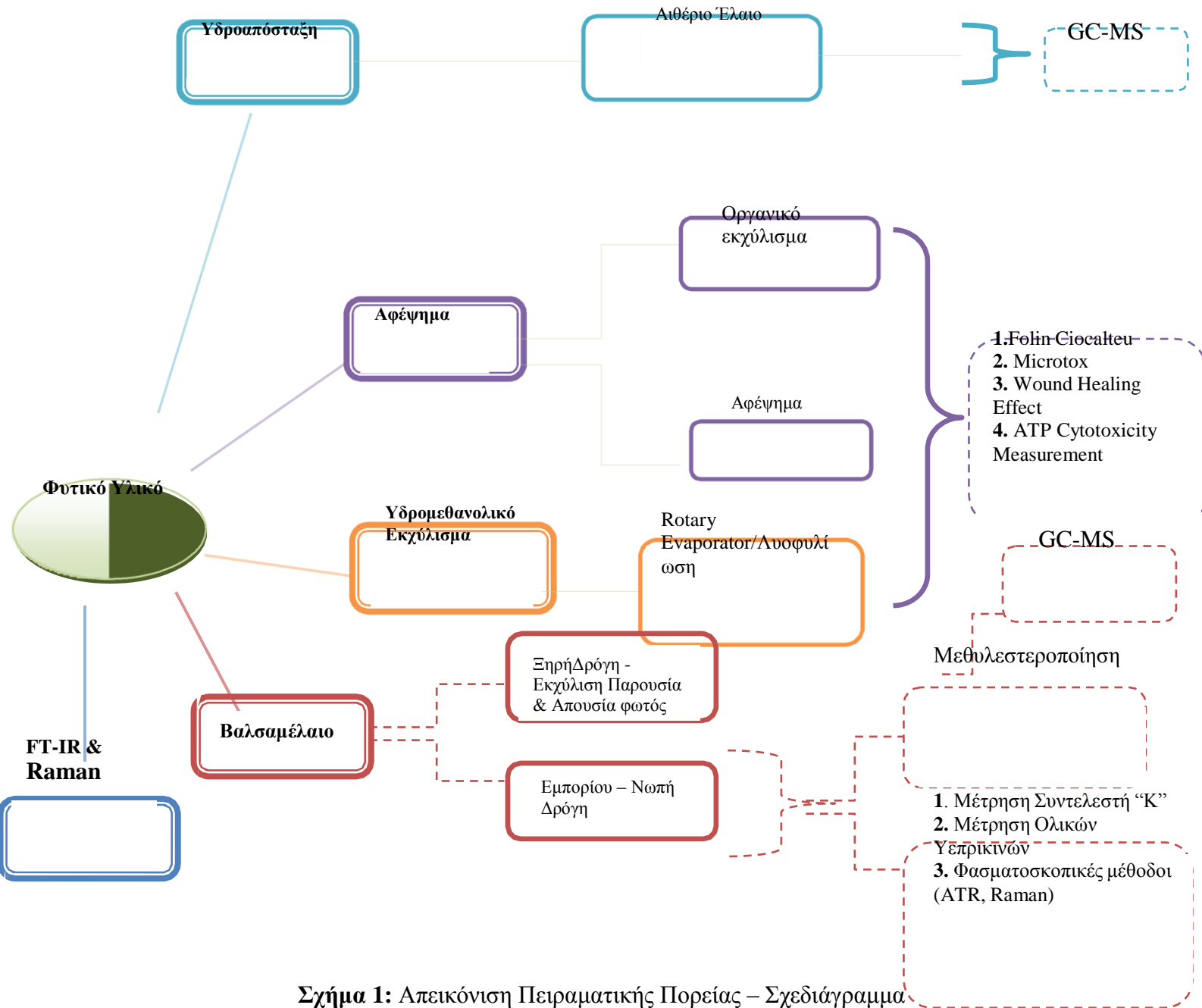
Εικόνα 14: Ιστοπαθολογική εκτίμηση επούλωσης τραύματος και επιδερμικής/δερματικής αναγέννησης μετά από χορήγηση δείγματος αναφοράς (control), αλοιφών *Hypericum perforatum*, ελαιολάδου, *Origanum aetheroleum*, *Salviae trilobae aetheroleum*, κρέμα Rotöl και αγωγή με Madecassol®. Τα τμήματα του δέρματος παρουσιάζουν την επιδερμίδα που έχει χρωματιστεί με αιματοξυλίνη και ιοσίνη στο A και με την τριχρωμη χρώση Masson's (MT) και το μπλε της τολουιδίνης (TB) στο B και το C, αντίστοιχα.

Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά των 6 ζώων ανά ομάδα. (1) Ομάδα control, ιστός πληγής ηλικίας 10 ημερών που υποβλήθηκε σε αγωγή μόνο με control, (2) ομάδα αρνητικού μάρτυρα, ιστός τραύματος ηλικίας 10 ημερών, ομάδα χωρίς θεραπεία, (3) ομάδα *Hypericum perforatum* (10%), (4) ομάδα ελαιολάδου, ιστών τραύματος ηλικίας 10 ημερών επεξεργασμένο με αλοιφή ελαιολάδου (10%), (5) Ομάδα *Origanum aetheroleum*, ιστός τραύματος ηλικίας 10 ημερών που υποβλήθηκε σε θεραπεία με αλοιφή *Origanum aetheroleum* (12,5%), (6) ομάδα *Salviae trilobae aetheroleum*, με αλοιφή *Salviae trilobae aetheroleum* (7,5%), (7) ομάδα HPP crème mit Rotöl, ιστός τραύματος ηλικίας 10 ημερών που υποβλήθηκε σε αγωγή με HPP crème mit Rotöl, (8) ομάδα αναφοράς φαρμάκου, ιστός τραύματος ηλικίας 10 ημερών που υποβλήθηκε σε αγωγή με Madecassol®.

Βέλη που δείχνουν τα γεγονότα κατά τη διάρκεια της επούλωσης τραύματος: s: ψωρίαση, re: επανα-επιθηλιοποίηση, f: ινοβλάστες, c: κολλαγόνο, mnc: μονοπύρρηνα κύτταρα, pmn: πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, m: μαστοκύτταρα, Nv: νεοαγγειοποίηση. (Santur et al., 2011)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Σχεδιάγραμμα Πειραματικής Πορείας



Σχήμα 1: Απεικόνιση Πειραματικής Πορείας – Σχεδιάγραμμα

2.2. Πρώτες Ύλες

Φυτικό Υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν ξηρή δρόγη βάλσαμου. Προμηθεύτηκε από δύο διαφορετικούς παραγωγούς α) την εταιρεία “Το Βάλσαμο” και β) την εταιρεία “VRINO”. Και τα δύο φυτικά υλικά άνηκαν στο είδος *Hypericum perforatum* και ήταν εσοδείας του έτους 2016. Το φυτικό δείγμα της εταιρείας “Το Βάλσαμο” προήλθε από το όρος Όρβηλο (βουνό της Μακεδονίας κοντά στη Δράμα) ενώ το φυτικό δείγμα της εταιρείας “VRINO” προήλθε από τον όρο Όρθο του νομού Μαγνησίας. Τα τμήματα των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα υπέργεια τμήματα δηλαδή κυρίως τα φύλλα, τα άνθη και το επάκριο άνω μέρος των ανθοφόρων βλαστών.

Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο που χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την παρασκευή των εργαστηριακών βαλσαμελαίων προμηθεύτηκε από το «Ελαιοτριβείο Κορμπάκης Πέτρος & ΣΙΑ Ο.Ε.» που εδρεύει στη Σκάλα Λακωνίας του Δήμου Ευρώτα.

Βαλσαμέλαια Εμπορίου

Τα έτοιμα βαλσαμέλαια εμπορίου που προμηθευτήκαμε προήλθαν από τους παρακάτω παραγωγούς/εμπόρους: α) “Χριστοδούλου Παναγιώτα ” – Σπάρτη Λακωνίας, β) “ΑΘΟΣ”, Αγγελιανά Ρεθύμνου, γ) “Herbs&Spices”, δ) “ΕΥ ΖΗΝ”, Τήνος, ε) “Open Cosmetics”, Άνω Λιόσια Αττικής.

2.3. Προετοιμασία – Επεξεργασία φυτικού υλικού

Η προετοιμασία που υφίσταται η δρόγη του φυτικού υλικού πριν τις περαιτέρω αναλύσεις αφορά συνήθως την κονιοποίηση, άλεση και κοσκίνισμα. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη η άλεση του φυτικού υλικού οδηγεί σε καλύτερη προσβασιμότητα στα βιοδραστικά του συστατικά κατά την εκχύλιση με διαλύτες, σε σύγκριση με τα μη αλεσμένα φυτά. Τα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά, φαίνεται να εξαρτώνται πολύ από το μέγεθος των σωματιδίων, φανερώνοντας μία διαφορετική κατανομή των ενώσεων μετά το στάδιο του κοσκίνισματος. Η δοκιμασία DPPH, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η ποσοτικοποίηση των ενώσεων μέσω LC-ESI/MS επιβεβαιώνει το συμπέρασμα αυτό και την ύπαρξη βέλτιστης κοκκομετρικής τάξης για την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών του φυτού. Η μέγιστη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές και βιοδραστικές ενώσεις επιτεύχθηκε για τα ενδιάμεσα κλάσματα σκόνης (50-100 μm, 100-180 μm, 180-315 μm). Το μικρότερο κλάσμα (20-50 μm), οδήγησε σε απώλειες στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο λόγω της ανόδου της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της άλεσης, η οποία είναι επιβλαβής για αυτή την

κατηγορία των ενώσεων, ενώ τα κλάσματα άνω των 315 μm αναμένεται να περιέχουν περισσότερες ίνες και συνεπώς μικρότερη ποσότητα σε βιοδραστικές ενώσεις. (Becker L. et. al, 2016)

2.4. Διαδικασία Κρυοξήρανσης – Λυοφυλίσωσης

Στη διεργασία της ξήρανσης, η υγρασία ενός υλικού απομακρύνεται από αυτό με θέρμανση, και το υλικό διοχετεύεται στο επόμενο στάδιο της διαδικασίας, όμως υπάρχουν και προβλήματα σ' αυτή τη διεργασία καθώς ορισμένες ουσίες υφίστανται παραμορφώσεις ή/και φθορές κατά την ξήρανση και υπάρχει κίνδυνος να υποστούν αλλοιώσεις ή, ειδικά στα τρόφιμα, μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, που να τα καθιστούν δυσάρεστα και ανεπιθύμητα. Επίσης, με την απλή ξήρανση μόνο το 90%-95% της υγρασίας μιας ουσίας μπορεί να απομακρυνθεί. Σε ευαίσθητες σε αλλοιώσεις ουσίες, όπως π.χ. στα τρόφιμα, το υπολειπόμενο νερό είναι αρκετό για να διατηρηθεί μια μικρή μεν αλλά υπαρκτή ενζυμική ή/και μικροβιακή δραστηριότητα, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία αλλοίωση του προϊόντος. Ένας εναλλακτικός τρόπος ξήρανσης αυτών των ευαίσθητων υλικών είναι να ψυχθούν σε χαμηλή θερμοκρασία, και στη συνέχεια το νερό να απομακρυνθεί από αυτά με εξάχνωση. Η διεργασία αυτή ονομάζεται κρυοξήρανση ή λυοφυλίσωση και βρίσκεται ευρύτατη εφαρμογή σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους, όπως για παράδειγμα στη συντήρηση τροφίμων, εκχυλισμάτων φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών, και την παρασκευή φαρμάκων και φαρμακευτικών ειδών. Ένα σύστημα λυοφυλίσωσης αποτελείται από: α) κρύο θάλαμο, β) ψυχόμενη ατμοπαγίδα, γ) ψυκτική μονάδα και δ) αντλία κενού.

Κατό το τριπλό σημείο (T, P) μια ουσία μεταβαίνει από τη στερεή στην αέρια φάση απευθείας, με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής φάσης. Συνεπώς, προκειμένου να ξηρανθεί μια ουσία, μπορούμε να ακολουθήσουμε την εξής διαδικασία: αρχικά, ψύχουμε την ουσία, οπότε το περιεχόμενο σ' αυτή νερό παγώνει. Στη συνέχεια, την τοποθετούμε σε αεροστεγή χώρο όπου μειώνεται η πίεση σε σημείο κάτω από το τριπλό σημείο του νερού (ή γενικότερα του διαλύτη, σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί άλλο υγρό). Στη χαμηλή αυτή πίεση, το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση και απομακρύνεται με κατάλληλο συμπυκνωτή – παγίδα υδρατμών, ενώ ταυτόχρονα το υλικό ψύχεται, δεδομένου ότι για την εξάχνωση του νερού απαιτείται η αντίστοιχη λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης. Συνήθως για την επιτάχυνση της διεργασίας το υλικό θερμαίνεται ελαφρά. (Ζουμπούλη Α.Ι., Καραπάντσιος Θ., Μάτη Κ.Α., Μαύρος Π., 2003)

2.5. Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης

Η χημεία των φυτών ή φυτοχημεία, είναι ένα αντικείμενο το οποίο αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια μεταξύ της οργανικής χημείας των φυσικών προϊόντων και της βιοχημείας φυτών. Ουσιαστικά, ο ρόλος του αντικειμένου αυτού είναι η ανάλυση

μίας ποικιλίας οργανικών ενώσεων που παράγονται από τα φυτά και η ενασχόληση με τη χημική τους δομή, το μεταβολισμό τους και τη βιολογική τους δράση. Για τη μελέτη όλων των παραπάνω είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλων μεθόδων εκχύλισης, απόσταξης, διαχωρισμού, απομόνωσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης των διαφορετικών συστατικών που περιέχουν τα φυτά.

Ο αριθμός των ουσιών που παράγονται από τα φυτά είναι πολύ μεγάλος και συνήθως έχουν πολύ μεγάλο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η μεγάλη πρόοδος της φυτοχημείας, που αφορά την συνεχή ανακάλυψη και περιγραφή νέων τέτοιων ουσιών, βασίζεται κυρίως στην ανάπτυξη γρήγορων και αξιόπιστων μεθόδων ανάλυσης όπως είναι οι χρωματογραφικές και οι φασματοσκοπικές τεχνικές. Οι τεχνικές αυτές, βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη γεωργία, τη διατροφή, τη βιομηχανία τροφίμων και ιδίως στην φαρμακευτική έρευνα καθώς και στους περισσότερους κλάδους της επιστήμης των φυτών όπως είναι η φυσιολογία φυτών, η φυτοπαθολογία, η οικολογία, η γενετική κ.ά. (Ταραντίλης Π., Πολυσιού Μ., Παππάς Χ, 2013)

Η ενόργανη χημική ανάλυση συγκριτικά με τις κλασσικές μεθόδους χημικής ανάλυσης (υγροχημικές) έχει πολλά πλεονεκτήματα. Κάποια από αυτά περιλαμβάνουν τον μικρό χρόνο ανάλυσης, τη μικρή απαιτούμενη ποσότητα δείγματος, τη μεγάλη ευαισθησία, την ανάλυση πολλαπλών στοιχείων συγχρόνως, την αξιοπιστία και άλλα. Όμως ταυτόχρονα, η εφαρμογή αυτών των τεχνικών έχει και κάποιες απαιτήσεις όπως είναι ο ακριβός εξοπλισμός που απαιτείται, οι γνώσεις ηλεκτρονικών υπολογιστών και φυσικής, οι απαιτούμενες πρότυπες πιστοποιημένες ουσίες αναφοράς, το εξειδικευμένο προσωπικό κ.ά. (Οξενκιουν – Πετροπούλου, 2005)

Οι τεχνικές ενόργανης ανάλυσης:

- Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μαζών (**GC-MS**)
- Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (**HPLC**)
- Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συνδεδεμένη με Φασματομετρία Μαζών (**LC-MS**)
- Φασματοσκοπία Υπερύθρου (**FT-IR**)
- Φασματοσκοπία Raman (**FT-Raman**)
- Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (**UV-Vis**)

Όσον αφορά τις Χρωματογραφικές τεχνικές, ο διαχωρισμός των συστατικών των δειγμάτων επιτυγχάνεται με την κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, της στατικής και της κινητής που βρίσκονται στη στήλη της χρωματογραφίας. Η κινητή φάση διέρχεται από τη στατική και προκαλεί μετατόπιση των συστατικών πάνω σε αυτή με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται μεταξύ τους και να εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Ο χρόνος στον οποίο εμφανίζεται το κάθε συστατικό

ονομάζεται χρόνος συγκράτησης (retention time) δηλαδή είναι ο χρόνος μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος στη στήλη μέχρι και την έξοδο του συστατικού από αυτή. Στο τέλος της στήλης υπάρχει συνδεδεμένος ένας ανιχνευτής που παράγει σήμα κάθε φορά που εκλύεται ένα συστατικό δηλαδή εμφανίζεται μια χρωματογραφική κορυφή .

2.5.1. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

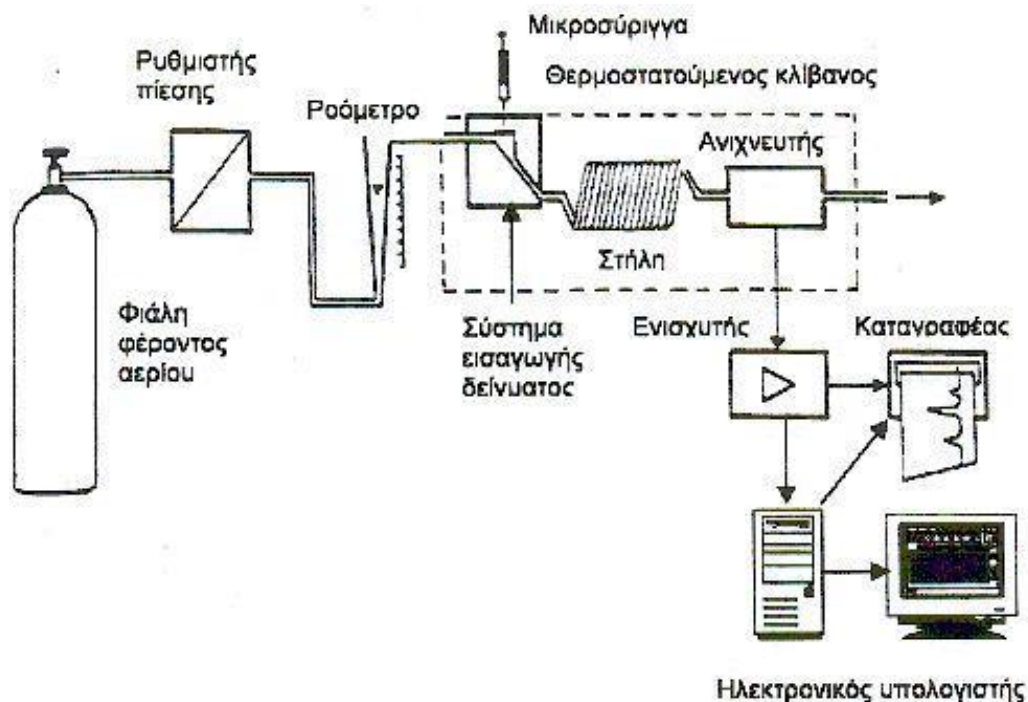
Με τη χρήση του αέριου χρωματογράφου έγινε ο προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των δειγμάτων και των λιπαρών οξέων των ελαϊκών δειγμάτων. Στην προκειμένη περίπτωση η στατική φάση είναι το πτητικό υγρό το οποίο είναι καθηλωμένο στα τοιχώματα της στήλης και η κινητή φάση είναι το φέρον αέριο (He) το οποίο περνάει και παρασύρει τα συστατικά μέσα από τη στήλη. Τα συστατικά διαχωρίζονται μεταξύ τους έχοντας διαφορετικές ταχύτητες άρα και διαφορετικό χρόνο συγκράτησης (t_r) λόγω των διαφορετικών τάσεων ατμών και τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση.

Η αέρια χρωματογραφία (GC, Gas Chromatography) είναι μια καλή μέθοδος διαχωρισμού συστατικών των μειγμάτων που αναλύονται, ωστόσο όταν συνδυάζεται και με φασματοφωτόμετρο μαζών (MS, Mass Spectrometry) γίνεται εξίσου και προσδιορισμός των συστατικών αυτών. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ένα ισχυρό μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων.

Στην περίπτωση του αέριου χρωματογράφου η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με τη χρήση μικροσύριγγας χωρητικότητας 10 μ L. Το δείγμα με την εισαγωγή εξαερώνεται αυτόματα και μεταφέρεται μέσα στη στήλη η οποία είναι τοποθετημένη σε ένα θερμοστατούμενο κλίβανο. Μόλις ξεκινήσει η μεταφορά της κινητής φάσης δηλαδή του φέροντος αερίου ξεκινάει και η ανάλυση του δείγματος. 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 πλεονεκτήματα χρήσης της αέριας χρωματογραφίας είναι:

1. η μεγάλη ευαισθησία
2. η μεγάλη ταχύτητα
3. η απλότητα
4. η επίτευξη διαχωρισμών που είναι αδύνατο να γίνουν με άλλες μεθόδους
5. η απομόνωση συστατικών



Εικόνα 15: Οργανολογία Αέριου Χρωματογράφου (GC-MS)

Μέθοδος εσωτερικού προτύπου (internal standard method):

Στο τέλος των αναλύσεων επιτεύχθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων δηλαδή προσδιορισμός των συστατικών του δείγματος και ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των συστατικών (%) με τη χρήση εσωτερικού προτύπου.

Το εσωτερικό πρότυπο είναι μια ουσία επιλεγμένη από τον αναλυτή η οποία χρησιμοποιείται σε σταθερή γνωστή ποσότητα κάθε φορά και προστίθεται μέσα στα άγνωστα δείγματα και μέσα στα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης.

Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζεται σε κάθε δείγμα ο λόγος της κάθε άγνωστης ουσίας που περιέχει το δείγμα προς το λόγο του εσωτερικού προτύπου με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της άγνωστης ουσίας. Το εσωτερικό πρότυπο που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει ελεγχθεί και να μην εμφανίζεται στον ίδιο χρόνο με κάποια άλλη επιθυμητή ουσία. Ωστόσο θα πρέπει να είναι χημικά παρόμοια με τις άλλες ουσίες που βρίσκονται στο δείγμα.

2.5.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Όλα τα στοιχεία εκπέμπουν και απορροφούν ακτινοβολία σε συγκεκριμένα και χαρακτηριστικά μήκη κύματος. Οι φασματομετρικές μέθοδοι ανάλυσης βασίζονται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τα άτομα ή τα μόρια

ενός δείγματος. Η αποσαφήνιση της δομής των φυτικών ουσιών περιλαμβάνει εφαρμογές από διάφορες τεχνικές. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές ανάλυσης ανήκουν στις οπτικές τεχνικές ανάλυσης, οι οποίες περιλαμβάνουν γενικότερα τεχνικές στις οποίες μετριέται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία η οποία πηγάζει από την ύλη ή αλληλεπιδρά με αυτή. Συγκεκριμένα, οι φασματοσκοπικές τεχνικές βασίζονται στην ικανότητα διάφορων ουσιών να εκπέμπουν ή να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων και στη μέτρηση φασμάτων. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την απόκτηση πληροφοριών που αφορούν τη δομή και τη συγκέντρωση ουσιών που αλληλεπιδρούν με μία δεδομένη ακτινοβολία.

Στις φασματοσκοπικές τεχνικές μετράται η απορρόφηση (A), η διαπερατότητα (T) του δείγματος και η ισχύς – ένταση της ακτινοβολίας. Σύμφωνα με αυτές τις μετρήσεις μπορεί στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί ποσοτική και ποιοτική ανάλυση. Τα φάσματα που λαμβάνονται με αυτές τις τεχνικές ουσιαστικά παρέχονται από την απεικόνιση της απορρόφησης, διαπερατότητας ή της έντασης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (λ) που δηλώνει την απόσταση μεταξύ των δύο γειτονικών κορυφών του ηλεκτρονικού φάσματος. Το φάσμα που λαμβάνεται χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη χαρακτηριστικών ομάδων, για να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών ή ακόμη και για να ταυτοποιηθούν οι ουσίες που περιέχονται στο δείγμα που αναλύεται κάθε φορά. Πολύ σημαντικό ρόλο στις αναλύσεις και στην ακρίβειά τους, έπαιξε η εισαγωγή της πληροφορικής και του ηλεκτρονικού υπολογιστή στα φασματομέτρα, καθώς διευκόλυναν την έρευνα σε μεγάλο βαθμό.

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου IR, είναι μία από τις καλύτερες φασματοσκοπικές τεχνικές που εφαρμόζεται ευρέως και θεωρείται η πλέον απαραίτητη. Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, βρίσκεται μεταξύ της περιοχής του ορατού και των ραδιοσυχνοτήτων (0,75 – 1000 μm) αλλά συνήθως λαμβάνονται φάσματα στη κύρια περιοχή του υπέρυθρου η οποία είναι από 4000 – 400 cm^{-1} . Το πιο χρήσιμο κομμάτι της υπέρυθρης περιοχής για τη φασματοσκοπία είναι αυτό μεταξύ 4000-600 cm^{-1} καθώς σε αυτή την περιοχή είναι σε θέση να απορροφήσουν ακτινοβολία σε ορισμένες συχνοτήτες οι περισσότερες οργανικές και ανόργανες ουσίες.

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης, τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Συνήθως στο IR, αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας, χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού, ο οποίος ισούται με το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς τη συχνότητα του φωτός. (Οξενκιουν – Πετροπούλου Μ., 2005)

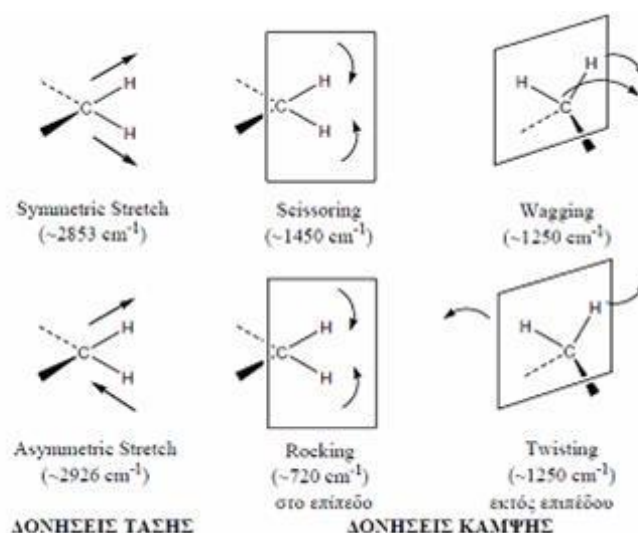
Κύριες προϋποθέσεις για να απορροφήσει ένα μόριο ακτινοβολία στην περιοχή (4000 – 600 cm^{-1} , είναι: α) Η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να ισούται με τη συχνότητα δόνησης ή περιστροφής των ατόμων του μορίου και β) Ο τρόπος δόνησης του μορίου να είναι τέτοιος, ώστε η διπολική ροπή του να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης. Σε αντίθετη περίπτωση η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο

υπέρυθρο. Όσο μεγαλύτερη η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη η απορρόφηση, έτσι συμπερασματικά, τα πολύ συμμετρικά μόρια δεν παρουσιάζουν απορρόφηση ακτινοβολίας. Κάθε χαρακτηριστική ομάδα ή δομή, έχει μία μοναδική συχνότητα δόνησης η οποία συμβάλλει στον προσδιορισμό τους. (Ταραντίλης Π., Πολυσιού Μ., Παππάς Χ., 2013)

Δύο είναι οι βασικές δονήσεις που παρέχουν απορροφήσεις στο IR:

α) Δονήσεις τάσης (stretching vibrations): Είναι οι δονήσεις κατά τις οποίες τα συνδεδεμένα άτομα πάλλονται συνεχώς μεταβάλλοντας το μήκος του δεσμού που τα ενώνει, χωρίς όμως να αλλάξουν κατεύθυνση ή τις γωνίες δεσμού.

β) Δονήσεις κάμψης (bending vibrations): Είναι οι δονήσεις κατά τις οποίες μεταβάλλεται συνεχώς η γωνία των δεσμών. Διακρίνονται σε αυτές που γίνονται εντός του επιπέδου ισορροπίας (ψαλιδισμού, αιώρησης), και εκτός επιπέδου ισορροπίας (σεισης, στρέψης).



Εικόνα 16: Τύποι Δονήσεων (Δονήσεις Τάσης και Κάμψης)

Μετασχηματισμός *Fourier*

Στην φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) το συμβολόμετρο Michelson, αποτελεί την καρδιά της τεχνικής. Το σήμα που στέλνει η πηγή υπερέυθρου είναι συνάρτηση συχνοτήτων και άρα κυματαριθμών. Όταν το σήμα εισέλθει στο συμβολόμετρο υπόκειται σε συμβολή με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Ο τύπος όμως της συμβολής ουσιαστικά εξαρτάται από την καθυστέρηση του κινουμένου κατόπτρου και επομένως το συμβολόγραμμα, είναι συνάρτηση της καθυστέρησης και ως τέτοια φθάνει στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο μετασχηματισμός Fourier είναι ένα μαθηματικό «εργαλείο» με τη βοήθεια του οποίου

το συμβολόγραμμα μετασχηματίζεται ξανά σε συνάρτηση κυματαριθμών με βάση τον τύπο

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) e^{-i2\pi\bar{\nu}\delta} d\delta$$

όπου $B(\bar{\nu})$ η συνάρτηση των κυματαριθμών, όπως αυτοί εκπέμπονται από την πηγή, και $I(\delta)$ η συνάρτηση καθυστέρησης. Ουσιαστικά, με τον μαθηματικό μετασχηματισμό Fourier γίνεται η αποκωδικοποίηση των συμβολογραμμάτων και η μετατροπή τους σε συμβατικά IR φάσματα τα οποία μπορούν στη συνέχεια να αξιολογηθούν. Τα φάσματα που λαμβάνονται με αυτό τον τρόπο είναι πολύ πιο ευκρινή σε σχέση με τα συμβατικά φάσματα IR (λόγος σήματος/θόρυβου). (Οξενκιουν - Πετροπούλου, 2005) , (Π. Ταραντίλης, Μ. Πολυσίου, Χ. Παππάς, 2013)

Οργανολογία Φασματόμετρου FT-IR

Τα φασματόμετρα υπέρυθρου αποτελούνται από τις ίδιες λειτουργικές μονάδες με τα φασματόμετρα υπεριώδους – ορατού (UV –Vis), διαφέρουν όμως στη θέση τοποθέτησης του δείγματος. Στο IR η κυψελίδα με το δείγμα τοποθετείται πριν το μονοχρωμάτορα προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η παρασιτική ακτινοβολία και να προστατευτεί ο ανιχνευτής από κάθε ακτινοβολία που δεν επιλέγεται από τον μονοχρωμάτορα, ενώ στο UV-Vis τοποθετείται μετά τον μονοχρωμάτορα. (Χατζηγιάννου Θ.Π, Κουπάρη Μ.Α, 2010)

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας διακρίνονται δύο κύριες περιοχές: α) Την περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων (O-H, NH₂ κλπ) η οποία εκτείνεται στην περιοχή 4000- 1400 cm⁻¹ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων και β) Την περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων που εκτείνεται στην περιοχή 1400-600 cm⁻¹ και οι απορροφήσεις οφείλονται στις δονήσεις ολόκληρου του μορίου. Στην περιοχή 4000-600 cm⁻¹ που χρησιμοποιείται στο IR, ο θόρυβος καλύπτει τις ταινίες απορρόφησης λόγω της χαμηλής ευαισθησίας του οργάνου. Η λύση στο πρόβλημα αυτό των κοινών φασματοφωτομέτρων, δόθηκε από τη φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT – IR). (Π. Ταραντίλης, Μ. Πολυσίου, Χ. Παππάς, 2013)

Ένα κοινό φασματόμετρο FT-IR αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα:

- α) Πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας*
- β) Πηγή λείζερ*
- γ) Συμβολόμετρο Michelson*
- δ) Ανιχνευτής*



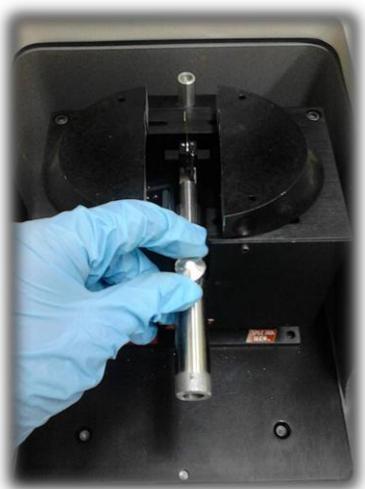
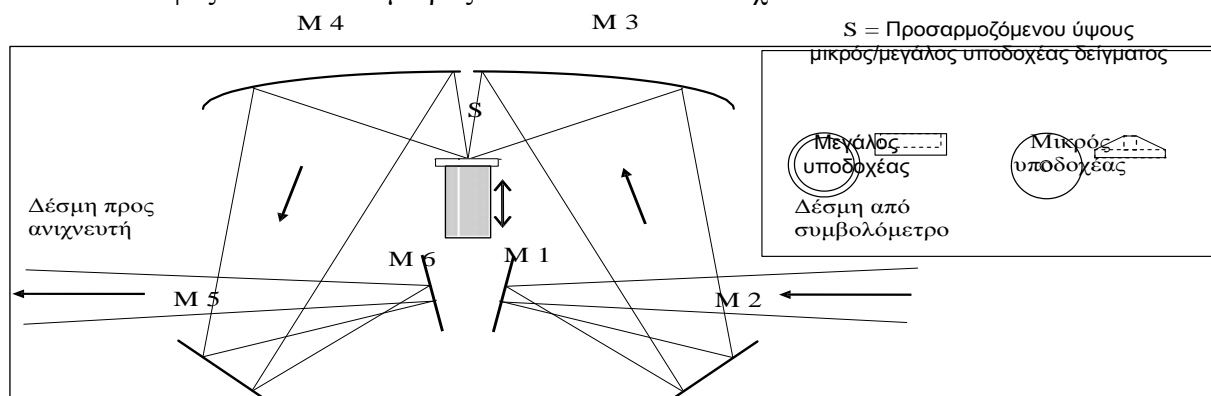
Εικόνα 17: Φασματόμετρο Υπερύθρου FT-IR, Nicolet 6700

Πλεονεκτήματα FT-IR

Οι αναλύσεις με όργανα FT-IR πλεονεκτούν ισχυρά έναντι άλλων αναλύσεων για τις οποίες χρησιμοποιούνται συμβατικά φασματόμετρα IR. Συγκεκριμένα τα όργανα FT-IR πλεονεκτούν ιδιαίτερα στο θέμα της ταχύτητας καθώς έχουν την ικανότητα να μετρούν όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα σε αντίθεση με τα συμβατικά όργανα που μετρούν κάθε μία χωριστά. Έτσι όταν τα συμβατικά όργανα IR απαιτούν 10 λεπτά για την καταγραφή ενός φάσματος, ένα μηχάνημα FT-IR χρειάζεται μόλις μερικά δευτερόλεπτα. Ένα δεύτερο πλεονέκτημα, εξίσου σημαντικό με το προηγούμενο, είναι η ευαισθησία του οργάνου η οποία όντας μεγαλύτερη οδηγεί σε μειωμένα σφάλματα λόγω θορύβου και γενικότερα πολύ μικρότερο θόρυβο. Τέλος, έχει συμβάλλει πολύ θετικά στην προτίμηση αυτών των οργάνων από τους επιστήμονες η ευκολία τους στη χρήση. Με τον όρο αυτό, αναφερόμαστε τόσο στη μηχανική απλούστευση, καθώς το μόνο κινητό εξάρτημα του οργάνου είναι το κινητό κάτοπτρο με αποτέλεσμα η πιθανότητα βλάβης να μειώνεται αισθητά, όσο και στην εσωτερική βαθμονόμηση. Τα όργανα FT-IR χρησιμοποιούν ένα λέιζερ HeNe ως εσωτερικό πρότυπο βαθμονόμησης του μήκους κύματος (κάτι το οποίο ονομάζεται και πλεονέκτημα Connes) και έτσι ο χρήστης δεν χρειάζεται να βαθμονομεί το όργανο το οποίο αυτοβαθμονομείται. Επίσης, Η χρήση των υπολογιστών στην φασματοσκοπία FTIR προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα αφού παρέχει την δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων, υπολογισμού του μέσου όρου τους, επεξεργασίας και αποθήκευσης των δεδομένων, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μέτρηση υψηλής ποιότητας φασμάτων. (Καμίτσος Ε.Ι., Χρυσικός Γ.Δ., 1999)

Λήψη φασμάτων FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης DRIFT (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared spectroscopy) - Στερεά

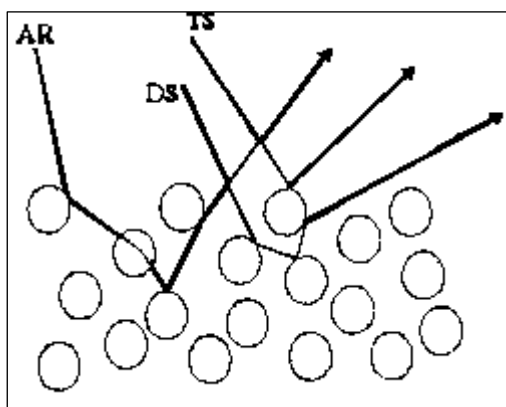
Μία από τις τεχνικές λήψης φασμάτων FT-IR από στερεής μορφής δείγματα είναι η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης, στην οποία τα δείγματα είναι σε μορφή σκόνης-πούδρας. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος το οποίο διαθέτει 6 κάτοπτρα (Εικόνα 19). Τα κάτοπτρα M_1 , M_2 και M_3 εστιάζουν τη δέσμη της ακτινοβολίας που έρχεται από το συμβολόμετρο επάνω στο δείγμα, ενώ τα M_4 , M_5 και M_6 εστιάζουν την ανακλώμενη ακτινοβολία από το δείγμα προς τον ανιχνευτή. Ο χώρος όπου τοποθετείται το δείγμα (υποδοχέας) μπορεί να είναι δύο μεγεθών. Ο μεγαλύτερος έχει διάμετρο 13 mm και ύψος 2 mm ενώ ο μικρός 3 και 2 mm αντίστοιχα.



Εικόνα 18: Εξάρτημα φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης.

Όταν η υπέρυθη ακτινοβολία προσπέσει στην επιφάνεια του υλικού ένα τμήμα της ανακλάται (ή διαχέεται), ένα τμήμα διαθλάται και ένα τμήμα περιθλάται. Ουσιαστικά η τεχνική DRIFT στηρίζεται στο φαινόμενο της ανάκλασης. Η υπέρυθη ακτινοβολία υπόκειται σε τριών ειδών ανακλάσεις: α) την απορροφητική, β) τη διαχυτική και γ) την αληθινή ανάκλαση. Από τα τρία αυτά είδη μόνο η απορροφητική παρέχει

πληροφορίες για το δείγμα και αυτή εξαρτάται από: α) το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος, β) τη μετωπική επιφάνεια και την πυκνότητα πακεταρίσματος του δείγματος στον υποδοχέα γ) το δείκτη διάθλασης του δείγματος και τέλος, δ) τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας επάνω στο δείγμα.



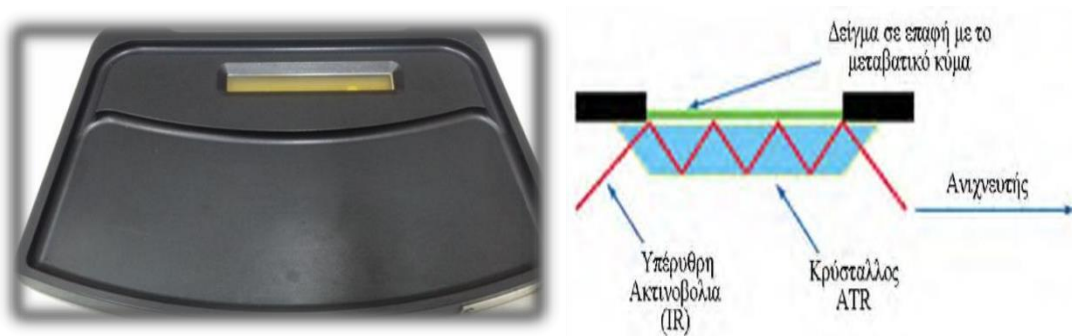
Εικόνα 19: Τα τρία είδη ανάκλασης της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε δείγμα σε μορφή σκόνης (AR: απορροφητική, DS: διαχυτική, TS: αληθινή).

Επιπλέον είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη συλλογή και τη διοχέτευση της ακτινοβολίας αυτής στον ανιχνευτή.

Το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος, η πυκνότητα του δείγματος (πακετάρισμα) και η επιφάνεια του δείγματος στον υποδοχέα, καθορίζουν την ποιότητα του φάσματος λαμβάνεται κάθε φορά. Γενικά, το μέγεθος των σωματιδίων πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερο, η πυκνότητα του δείγματος να μην είναι πολύ μεγάλη και η επιφάνεια να είναι ομαλή. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζουμε καλής ποιότητας φάσμα (βελτιστοποίηση εστίασης προσπίπτουσας ακτινοβολίας, υψηλότερης έντασης απορροφήσεις, μεγιστοποίηση σήματος IR στον υπολογιστή) και λιγότερο θόρυβο

Λήψη φάσματος FT-IR με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance spectroscopy – ATR) - Υγρά

Η τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης χρησιμοποιείται για συλλογή φασμάτων από ρευστά υλικά καθώς και σε δείγματα σε μορφή φιλμ όπως πολυμερή, ελαστικά, υφάσματα κλπ. Γίνεται χρήση ενός εξαρτήματος που ονομάζεται ATR (σχήμα).



Εικόνα 20: Εξάρτημα φασματοσκοπίας εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated total reflectance spectroscopy, ATR)

Από Αριστερά έρχεται η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας IR προς τον ανιχνευτή η οποία μέσω ενός κατόπτρου (M1) ανακλάται εσωτερικά στον κρύσταλλο από ZnSe με μία γωνία 45° . Η ακτινοβολία στον κρύσταλλο παράγει πρόσκαιρο κύμα και από τις δύο πλευρές του κρυστάλλου. Έτσι είναι δυνατή η λήψη φασμάτων ουσιών σε υδατικά διαλύματα μειώνοντας έντονα την απορρόφηση του διαλύτη. Όταν το δείγμα τοποθετείται στην επιφάνεια του κρυστάλλου απορροφά ακτινοβολία. Η εναπομένουσα ακτινοβολία ανιχνεύεται απευθείας από τον ανιχνευτή μέσω ενός δεύτερου κατόπτρου (M2).

Η ATR είναι μέθοδος εξέτασης της επιφάνειας του δείγματος που σημαίνει ότι το εσωτερικό της μάζας του δείγματος μπορεί να έχει διαφορετική σύσταση. Η λήψη των φασμάτων με το εξάρτημα ATR είναι μία πολύ εύκολη εργασία. Αρχικά λαμβάνεται το φάσμα του διαλύτη (φάσμα αναφοράς) και κατόπιν του δείγματος. Ο υποδοχέας του δείγματος πρέπει να καθαρίζεται επιμελώς γιατί υπολείμματα στην κρυσταλλική επιφάνεια επηρεάζουν την ποιότητα των φασμάτων που λαμβάνονται. Όταν στο λογισμικό του οργάνου ενεργοποιείται η διόρθωση για τη χρήση του ATR το φάσμα που λαμβάνεται διορθώνεται αυτόματα ως προς τον κυματαριθμό λαμβάνοντας υπόψη το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στο δείγμα. (Ταραντίλης Π., Πολυσιού Μ., Παππάς Χ., 2013)

2.5.3. Φασματοσκοπία Raman (FT-Raman)

Η φασματοσκοπία Raman στηρίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης. Η σκέδαση Raman είναι ένα από τα φαινόμενα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και ύλης. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της σκέδασης Raman είναι η αλλαγή στη συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός, η συχνότητα δηλαδή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι διαφορετική από αυτήν της προσπίπτουσας. Όταν μία ακτίνα φωτός πέσει σε ένα δείγμα, ένα πολύ μικρό μέρος του, λιγότερο από 0,0001% σκεδάζεται από τα δείγματα με αλλαγή της συχνότητάς του σε μία συχνότητα διαφορετική από αυτήν της αρχικής ακτίνας. Αυτή η μετατόπιση της

συχνότητας καλείται φαινόμενο Raman και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία, ακτινοβολία Raman.

Το φαινόμενο Raman είναι φασματοσκοπία εκπομπής, κατά την οποία η αλληλεπίδραση μεταξύ φωτονίων και μορίων γίνεται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και οι ταινίες του φάσματος Raman αντιστοιχούν σε φωτόνια, τα οποία «σκεδαζονται» ανελαστικά από τα μόρια. Οι φασματικές γραμμές των οποίων η συχνότητα είναι μικρότερη της συχνότητας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και καλούνται γραμμές Stokes οφείλονται στην σύγκρουση φωτονίων με τα μόρια που βρίσκονται στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση, ενώ οι φασματικές γραμμές με συχνότητα μεγαλύτερη, οι οποίες καλούνται γραμμές anti-Stokes, οφείλονται στη σύγκρουση φωτονίων με μόρια που βρίσκονται σε διεγερμένες ενεργειακές καταστάσεις. Στη δεύτερη περίπτωση η περίσσεια ενέργειας μεταφέρεται στα φωτόνια καθώς τα μόρια επανέρχονται στην αρχική θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση.

Για την ερμηνεία του φαινομένου Raman, πρέπει να θεωρηθεί ότι η ενέργεια ενός μορίου μπορεί να χωριστεί σε 3 συνιστώσες:

- α) την περιστροφή του μορίου σαν σύνολο
- β) την περιστροφή των ατόμων που το αποτελούν και
- γ) την κίνηση των ηλεκτρονίων του

Για να έχουμε σκέδαση Raman, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η μεταβολή της πολωσιμότητας κατά τη διάρκεια της δόνησης. Έτσι, το φάσμα Raman παράγεται όταν μοριακή δόνηση ή περιστροφή ενός μορίου, προκαλεί κάποια μεταβολή στην πολωσιμότητά του, ενώ στα φάσματα IR η μοριακή δόνηση ή περιστροφή παράγει αλλαγές του ηλεκτρικού δίπολου (μεταβολή της διπολικής ροπής).

Οργανολογία Φασματομέτρου FT-Raman

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της FT-Raman σε σχέση με την κλασσική φασματοσκοπία Raman βρίσκεται στη χρήση λέιζερ που εκπέμπει στην περιοχή του εγγύς IR (near-IR) ως πηγή διέγερσης. Αυτή η πηγή περιορίζει ή εξαλείφει το πρόβλημα φθορισμού.

Η φασματοσκοπία FT-Raman είναι φασματοσκοπία σκέδασης, όμως το φασματόμετρο που χρησιμοποιείται είναι παρόμοιο με αυτό του FT-IR. Η βασική διαφορά βρίσκεται στην πηγή ακτινοβολίας. Τα όργανα Raman μπορεί να είναι αυτόματα και να στηρίζονται όπως και τα όργανα IR στην τεχνική μετασχηματισμού Fourier ή να αποτελούν εξάρτημα φασματόμετρων FT-IR.

Οι πηγές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι λέιζερ και δίνουν μία στενή, υψηλής ακρίβειας, μονοχρωματική ακτίνα φωτός. Η πηγή λέιζερ που χρησιμοποιεί το φασματόμετρο της Nicolet (μοντέλο Magna 750 Series II) και αποτελεί εξάρτημα

του αντίστοιχου φασματόμετρου FT-IR είναι κατασκευασμένη από ιόντα νεοδυμίου και πυριτικά άλατα υτρίου-αργιλίου (Nd³⁺/Yttrium-Aluminum Garnet, Nd/YAG) εκπέμπει συνεχώς στα 1064 nm. Στο φασματόμετρο της Nicolet, ο διαχωριστής δέσμης είναι κατασκευασμένος από φθοριούχο ασβέστιο και ο ανιχνευτής είναι ινδίου-γάλλιου-αρσενικού (Indium-Gallium-Arsenic, InGaAs).

Πλεονεκτήματα FT-Raman

Η φασματοσκοπία Raman πλεονεκτεί σε σχέση με τις άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές, στη μελέτη βιολογικών μορίων για τους παρακάτω λόγους:

- α) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ουσιών σε υδατικά διαλύματα γιατί η ένταση του νερού στο φάσμα Raman είναι χαμηλή και επεμβαίνει ελάχιστα στο φάσμα της ουσίας που μελετάται.
- β) Η ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιείται είναι πολύ μικρή.
- γ) Είναι εφαρμόσιμη σε βιολογικά μόρια σε κάθε κατάσταση και σε ποικίλες πειραματικές συνθήκες. Μπορούμε να πάρουμε φάσματα ουσιών από φυτικούς ή ζωικούς ιστούς χωρίς να προηγηθεί εκχύλιση, διαχωρισμός και καθαρισμός τους γιατί δεν φθορίζουν όταν η πηγή ακτινοβολίας είναι στην περιοχή του εγγύς-υπέρυθρου.

Ερμηνεία φασμάτων FT-IR & FT-Raman

Φάσματα FT-IR:

Γενικά, στην αρχή της μελέτης ενός φάσματος επικεντρωνόμαστε στο να διακρίνουμε αν υπάρχουν χαρακτηριστικές ομάδες όπως C=O, O-H, C-C, NO₂ και C-X. Συγκεκριμένα:

α) Αν υπάρχει καρβονύλιο (C=O) που απορροφά στην περιοχή των 1820 – 1660 cm⁻¹ τότε μπορεί να έχουμε οξύ, αμίδιο, εστέρα, ανυδρίτη, αλδεΐδη ή κετόνη ανάλογα με τη κορυφή απορρόφησης που εμφανίζεται. Συγκεκριμένα μπορεί να έχουμε:

- **Οξύ**, όταν υπάρχει φαρδιά απορρόφηση του –OH στα 3400 -2400 cm⁻¹ , που επικαλύπτονται συχνά από αυτή του C-H
- **Αμίδιο**, όταν υπάρχει και μέτρια απορρόφηση του –NH κοντά στα 3500 cm⁻¹ που μερικές φορές είναι διπλή
- **Εστέρα**, όταν υπάρχει και η απορρόφηση ισχυρής έντασης του C-O στην περιοχή 1300 – 1100 cm⁻¹
- **Ανυδρίτη**, όταν παρουσιάζονται δύο κορυφές για το C=O στα 1810 και 1760 cm⁻¹

- **Αλδεΐδη**, όταν υπάρχουν και δύο ασθενείς απορροφήσεις στα 2850 και 2750 cm^{-1} του C-H της αλδεΐδης, δεξιά των άλλων απορροφήσεων C-H και τέλος,
- **Κετόνη**, όταν οι προηγούμενες πέντε εκδοχές έχουν αποκλειστεί

β) Στην περίπτωση που δεν υπάρχει καρβονύλιο (C=O), τότε έχουμε αλκοόλη ή φαινόλη, αμίνη ή αιθέρα ανάλογα με τη συχνότητα απορρόφησης που παρουσιάζεται. Συγκεκριμένα, μπορεί να έχουμε:

- **Αλκοόλη ή Φαινόλη**, όταν υπάρχει έντονη και φαρδιά απορρόφηση στα 3600 – 3300 cm^{-1} , που επιβεβαιώνεται από την απορρόφηση του C-O στα 1300-1100 cm^{-1} .
- **Αμίνη**, όταν παρουσιάζει μέτρια απορρόφηση του N-H στα 3500 – 3300 cm^{-1} .
- **Αιθέρα**, όταν παρουσιάζει έντονη απορρόφηση του C-O στην περιοχή 1300 – 1100 cm^{-1} .

γ) Οι διπλοί δεσμοί, οι τριπλοί δεσμοί, οι υδρογονάνθρακες και οι νιτροομάδες παρουσιάζουν επίσης χαρακτηριστικές απορροφήσεις. Συγκεκριμένα έχουμε:

Διπλοί δεσμοί ή Αρωματικοί Δακτύλιοι

- **Ο διπλός δεσμός C=C**, παρουσιάζει μία μέτρια απορρόφηση στα 1650 cm^{-1} .
Οι αρωματικοί δακτύλιοι, παρουσιάζουν μέτριες απορροφήσεις στην περιοχή 1650 – 1450 cm^{-1} .
- Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται από την περιοχή των C-H που βρίσκονται αριστερά από τα 3000 cm^{-1} .

Τριπλοί δεσμοί

- **Ο τριπλός δεσμός C≡N**, παρουσιάζει μία μέτρια και λεπτή απορρόφηση στα 2250 cm^{-1} .
- **Ο τριπλός δεσμός C≡C**, παρουσιάζει μία μέτρια και λεπτή απορρόφηση στα 2150 cm^{-1} .

Υδρογονάνθρακες

Πολύ απλό φάσμα, παρουσιάζει απορρόφηση μόνο στις περιοχές 3000, 1450 και 1375 cm^{-1} .

Νιτροομάδες

Παρουσιάζουν δύο έντονες απορροφήσεις στα 1600 – 1500 cm^{-1} και στα 1390 - 1300 cm^{-1} .

Φάσματα Raman

Ο συνδυασμός φασματοσκοπίας IR και Raman δίνει περισσότερες πληροφορίες για τη δομή των χημικών μορίων γιατί οι δύο αυτές φασματοσκοπίες είναι συμπληρωματικές κυρίως για συμμετρικά μόρια όπως είναι τα συζυγιακά συστήματα. Γενικά η φασματοσκοπία IR δίνει πληροφορίες για τις χαρακτηριστικές ομάδες των μορίων, ενώ η Raman για το σκελετό του μορίου. Σύγκριση φασμάτων FT-IR & Raman για παράδειγμα βοηθά στην ταυτοποίηση των cis-trans ισομερών καρτοτενοειδών. Τα φάσματα FT-IR και Raman είναι συμπληρωματικά. Τα πρώτα δίνουν περισσότερο πληροφορίες για το καρβονύλιο C=O ($1650 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) και τον απλό δεσμό C-O ($1230-1100 \text{ cm}^{-1}$) ενώ στα δεύτερα για τους διπλούς δεσμούς C=C (απλή έντονη κορυφή περίπου στα 1540 cm^{-1}) και τους απλούς δεσμούς C-C (μετρίας εντάσεως κορυφή στα $1300-1100 \text{ cm}^{-1}$). Σημειώνεται ότι η κορυφή αυτή είναι απλή για τα trans ισομερή ενώ γίνεται πολλαπλή για τα cis.

Για την αναγνώριση και απόδοση των κορυφών ενός φάσματος Raman υπάρχει η δυνατότητα αναφοράς σε πίνακες, όπως και στην περίπτωση των φασμάτων IR, που περιέχουν τις διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες με τους αντίστοιχους κυματαριθμούς.

Λήψη Φασμάτων με την τεχνική Raman – Υγρές Ουσίες

Αν και παλαιότερα απαιτούνταν 10-20 mL σήμερα είναι αρκετά τα 1-2 mL. Το δείγμα τοποθετείται σε λεπτούς δειγματοληπτικούς σωλήνες που σφραγίζονται και τοποθετούνται στον υποδοχέα του δείγματος. Επάνω στο δείγμα προσπίπτει η ακτινοβολία από την πηγή του λέιζερ και καταγράφεται στο φάσμα σκέδασης Raman.



Εικόνα 21: Φασματόμετρο Raman (FT-Raman), Advantage NIR, DeltaNu

2.5.4. Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού (Ultraviolet – Visible, UV-Vis) είναι μία οπτική μέθοδος ανάλυσης. Βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων. Τα ηλεκτρόνια σθένους των στοιχείων διαφόρων μορίων, κατά την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (200-400 nm) και ορατής ακτινοβολίας (400-800 nm), απορροφούν ενέργεια ($E=h\nu$) και διεγείρονται από τη βασική τους στάθμη, σε μία αντιδεσμική κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Κάθε διεγέρση απαιτεί συγκεκριμένη ενέργεια και πραγματοποιείται μόνον όταν το μόριο φωτοβοληθεί με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος (ή συχνότητας). Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας καλείται χρωμοφόρο.

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού χρησιμοποιείται, όπως είναι ευρύτατα γνωστό, τόσο για τη διερεύνηση της δομής και την ταυτοποίηση μίας άγνωστης ένωσης, όσο και για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Η απεικόνιση της απορρόφησης (A) σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (λ) παρέχει το φάσμα απορρόφησης.



Εικόνα 22: Φάσμα απορρόφησης

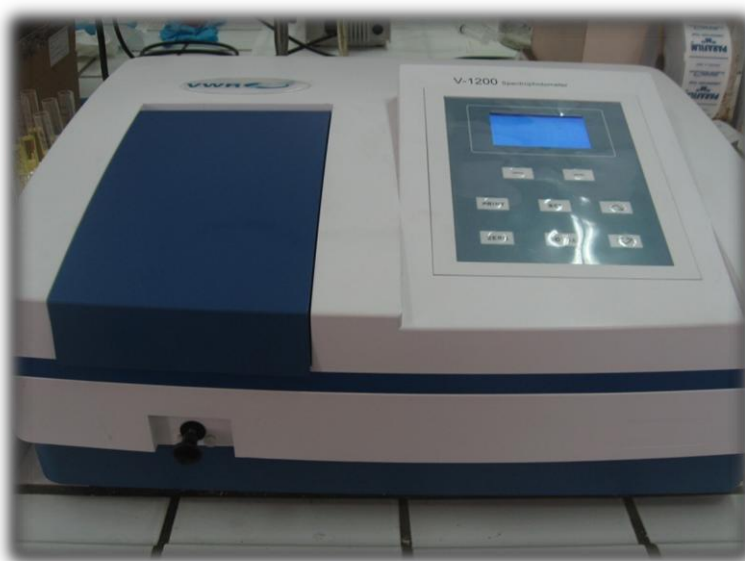
Συνοπτικά, οι αρχές και εφαρμογές της ποσοτικής φασματοφωτομετρίας περιγράφεται ως εξής:

Όταν πολυχρωματική ακτινοβολία περάσει μέσα από διάλυμα που περιέχει ουσία η οποία απορροφά, γίνεται εκλεκτική απορρόφηση εκείνων των συχνοτήτων που οδηγούν σε κατάσταση υψηλότερης εσωτερικής ενέργειας των μορίων. Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλεί μεταπτώσεις στα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στοιβάδων. Εάν κάποιο διάλυμα απορροφά στο ορατό είναι έγχρωμο, το δε χρώμα που βλέπει το ανθρώπινο μάτι είναι το συμπληρωματικό του απορροφώμενου. Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία περάσει από διάλυμα που περιέχει ουσία η οποία απορροφά, η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται κατά μήκος της διαδρομής. Η μείωση αυτή της ισχύος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας που απορροφά και από την απόσταση που διανύει η δέσμη μέσα στο διάλυμα.

Για τη μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιούνται φωτόμετρα και φασματοφωτόμετρα. Οι ορισμοί των δύο οργάνων δίδεται παρακάτω.

Φωτόμετρο: Κάθε όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ισχύος (ένταση) της ακτινοβολίας. Χρησιμοποιεί φίλτρο για την απομόνωση στενής περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Φασματοφωτόμετρο: Πολυπλοκότερο και πιο ευέλικτο όργανο που χρησιμοποιεί μονοχρωμάτορα για να γίνεται η απομόνωση της μονοχρωματικής δέσμης.



Εικόνα 23: Φασματοφωτόμετρο V-1200 Spectrophotometer, VWR

Τα φασματοφωτόμετρα περιέχουν τις εξής βασικές δομικές μονάδες:

- α)** Πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος ή πηγή φωτός
- β)** Επιλογέας μήκος κύματος για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας
- γ)** Κυψελίδα για την τοποθέτηση δείγματος
- δ)** Ανιχνευτή ακτινοβολίας, που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρονικό
- ε)** Σύστημα μέτρησης, που αποτελείται από ενισχυτή σήματος και όργανο ανάγνωσης.

Οι παράγοντες που επιδρούν στην παρουσίαση των φασμάτων απορρόφησης είναι:

- α)** Ο διαλύτης: Επηρεάζει ελαφρά τη θέση της μέγιστης απορρόφησης (λ_{max}).
- β)** Το pH
- γ)** Οι χρωμοφόρες ομάδες
- δ)** Οι αυξόχρωμες ομάδες
- ε)** Η συζυγία και τέλος
- ζ)** Η στερεοχημεία

Στην παρούσα μελέτη, με τη τεχνική της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) πραγματοποιήθηκαν οι έλεγχοι βιοδραστικότητας (DPPH, Folin-Ciocalteu) που περιγράφονται παρακάτω με τη χρήση φωτόμετρου και απορροφήσεις στην περιοχή του ορατού (400-800 nm).

Επίσης, ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις στο ελαιόλαδο και τα ελαιϊκά εκχυλίσματα βάλσαμου πραγματοποιήθηκαν με αυτή την τεχνική. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των συντελεστών “K” στο ελαιόλαδο και τα βαλσαμέλαια και η μέτρηση των ολικών υπερικινών στα βαλσαμέλαια με τη χρήση φασματοφωτόμετρου και μετρήσεις στην περιοχή του υπεριώδους (200-400 nm) και του ορατού (400-800 nm) αντίστοιχα.

§ Μετρήσεις Συντελεστών “K” (K_{232} , K_{270} , ΔK)

Η οξειδωτική κατάσταση του ελαιολάδου, εξαρτάται από τον αριθμό των υπεροξειδίων και τους συντελεστές απορρόφησης στο υπεριώδες, τα λεγόμενα **K**. Η φασματοφωτομετρική εξέταση του ελαιολάδου στο υπεριώδες μετρά τις απορροφήσεις στα μήκη κύματος 232nm και 270nm, τις οποίες στη συνέχεια συμβολίζουμε με **K** (K_{232} , K_{270}). Επίσης, ο δείκτης ΔK ορίζεται από μία μαθηματική σχέση υπολογισμού η οποία είναι: $\Delta K = K_{270} - [(K_{266} + K_{274})]/2$

Η απορρόφηση στα 232nm οφείλεται στα υδροϋπεροξειδία, τα οποία παράγονται σε πρωταρχικό στάδιο οξείδωσης αλλά και στα συζυγή διένια, τα οποία με τη σειρά τους παράγονται σε ένα ενδιάμεσο στάδιο οξείδωσης. Έτσι, η τιμή του συντελεστή K_{232} αυξάνεται όταν ο ελαιόκαρπος αποθηκεύεται για πολλές μέρες μέχρι την έκθλιψή του, αλλά και όταν το ελαιόλαδο έχει αποθηκευτεί σε άσχημες συνθήκες.

Η απορρόφηση στα 270nm οφείλεται σε ενώσεις με καρβονυλικές ομάδες (όπως αλδεΐδες και κετόνες), οι οποίες αποτελούν δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, καθώς και από ενώσεις (συζυγή τριένια), που παράγονται κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής επεξεργασίας. Έτσι, η τιμή του συντελεστή απορρόφησης K_{270} εξαρτάται ουσιαστικά από το πόσο φρέσκο είναι το ελαιόλαδο. Επιπλέον η τιμή του K_{270} αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας του ελαιολάδου, την έκθεση του στην ηλιακή ακτινοβολία και την αποθήκευσή του σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η απορρόφηση λοιπόν του ελαιολάδου στο υπεριώδες, αποτελεί ένα σημαντικό κριτήριο της ποιότητάς του. Επιπλέον, ο συντελεστής K_{270} και ο δείκτης ΔK μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως κριτήρια γνησιότητας σε ενδεχόμενη νοθεία του.

Σύμφωνα με την Κοινοτική Νομοθεσία οι συντελεστές **K** για το τυποποιημένο ελαιόλαδο θα πρέπει να είναι :

1. Ο συντελεστής K_{232}

- μικρότερος του 2,50 για το «εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο»,
- μικρότερος του 2,60 για το «παρθένο ελαιόλαδο» ενώ,
- για το ελαιόλαδο «αποτελούμενο από εξυγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα» δεν υπάρχει όριο.

2. Ο συντελεστής K_{270}

- μικρότερος του 0,22 για το «εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο»,
- μικρότερος του 0,25 για το «παρθένο ελαιόλαδο» και
- μικρότερος του 0,90 για το ελαιόλαδο «αποτελούμενο από εξυγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα»

3. Ο δείκτης ΔΚ

- μικρότερος του 0,01 για το «εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο»,
- μικρότερος του 0,01 για το «παρθένο ελαιόλαδο» και
- μικρότερος του 0,15 για το ελαιόλαδο «αποτελούμενο από εξυγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα».

Στη δική μας έρευνα, μετρήθηκαν οι συντελεστές **K** με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού UV-Vis. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

Αρχικά, 0,1 g από το ελαιόλαδο και το βαλσαμέλαιο (διαφόρων παρασκευών – εμπορίου και χειροποίητου), ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με κυκλοεξάνιο καθαρότητας >95%. Για την απορρόφηση στα 232nm απαιτήθηκε αραιώση από 1:4 έως 1:5 με κυκλοεξάνιο με σκοπό να επιτευχθεί τιμή απορρόφησης μεταξύ των επιθυμητών ορίων (0,1-0,8). Στη συνέχεια, καταγράφηκαν οι απορροφήσεις κάθε δείγματος.

§ Μέτρηση Ολικών Υπερικινών στα Βαλσαμέλαια (*Total Hypericins Measurement*)

Ο υπολογισμός των ολικών υπερικινών στις διάφορες παρασκευές βαλσαμελαίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους – ορατού. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε με βάση την απορρόφηση στα 590 nm όπου παρουσιάζεται το λ_{max} της ομάδας των υπερικινών και τη χρήση μίας εξίσωσης με ειδικό συντελεστή απορρόφησης. Η αναλυτική διαδικασία υπολογισμού περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας.

2.6. Τεχνικές Ελέγχου Βιοδραστικότητας

2.6.1. Μέτρηση Ολικών Φαινολικών Συστατικών – Folin-Ciocalteu

Τα φαινολικά συστατικά είναι ενώσεις που περιέχουν ένα ή περισσότερα –OH συνδεδεμένα απευθείας με έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή/και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Στη φύση απαντούν κυρίως υπό τη μορφή εστέρων ή/και γλυκοζιτών. Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου ενός εκχυλίσματος εφαρμόζεται η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Η Folin-Ciocalteu είναι μία φωτομετρική μέθοδος που δεν επιφέρει διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο είναι ένα διάλυμα σύνθετων ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφοβολφραϊμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα (αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu).

Η χημική αντίδραση δεν είναι ακριβώς γνωστή. Σε αλκαλικό περιβάλλον (διάλυμα Na_2CO_3), τα φαινολικά συστατικά οξειδώνονται ενώ τα ετεροπολυμερή οξέα ανάγονται σε μίγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}).

Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται συνήθως σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι: α) οξειδώνονται και ομάδες αζώτου (άζωτο σε δακτύλιο, αμίνες, νιτροενώσεις) και β) οξειδώνονται και σάκχαρα όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις.

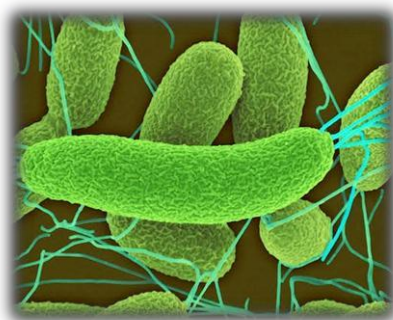
2.6.2. Μέτρηση Τοξικότητας - Αναλυτής Microtox®

Το Microtox είναι ένας αναλυτής στον οποίο μετριέται η τοξικότητα των δειγμάτων με τη χρήση των βακτηρίων *Vibrio fischeri*. Το *Vibrio fischeri* είναι ετερότροφο, αρνητικό κατά gram βακτήριο, που βρίσκεται στο υδάτινο περιβάλλον θερμών και υποτροπικών περιοχών. Η γνωστή του ιδιότητα η οποία έγινε και αφορμή για να χρησιμοποιηθεί σε μετρήσεις για τον έλεγχο της τοξικότητας ήταν ότι εκπέμπει φώς με αποτέλεσμα να μετριέται η μείωση της φωταύγειας του σε κάθε πείραμα.

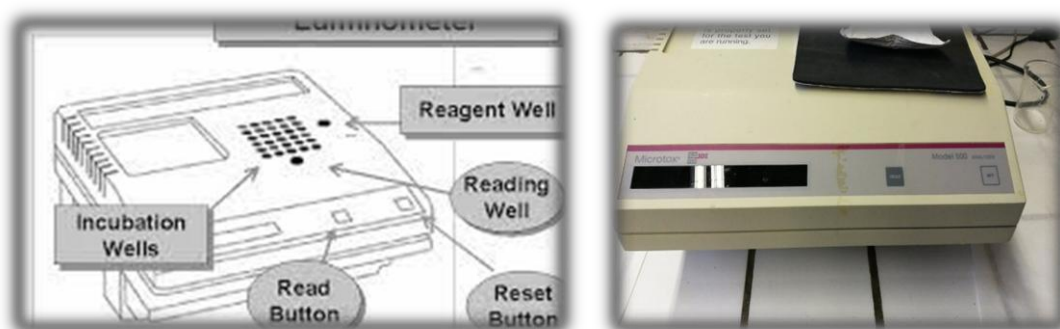
Η εκπομπή φωτός προκαλείται από πέντε γονίδια luxCDABE, τα οποία ρυθμίζονται από τα γονίδια luxR και luxI. Η παραγωγή φωτός εκφράζει τη μεταβολική του δραστηριότητα με αποτέλεσμα τη μείωση της φωταύγειας σε κάθε παρεμπόδιση της ενζυματικής του δραστηριότητας. Όσο μεγαλύτερη η φωταύγειά τους τόσο μικρότερη η τοξικότητα του δείγματος και αντιστρόφως. Η φωταύγεια μετράται σε μήκος κύματος 490 nm.

Η εκτίμηση της τοξικότητας με τον αναλυτή Microtox μετριέται με τη συγκέντρωση EC_{50} η οποία εκφράζει το 50% της μείωσης της φωταύγειας του πληθυσμού. Η διάρκεια της μέτρησης κρατάει συνολικά δεκαπέντε λεπτά, με την πρώτη μέτρηση να

γίνεται στα πέντε λεπτά. Συνεπώς στο τέλος έχουμε αποτελέσματα σε δύο χρόνους τα οποία είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους.



Εικόνα 24: Βακτήριο *Vibrio fisheri*



Εικόνα 25: Οργανολογία Αναλυτή Microtox®

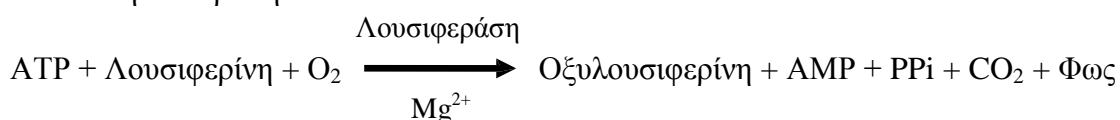
2.6.3. Μέτρηση Κυτταροτοξικότητας με τη Μέθοδο Υπολογισμού ATP

Το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της λειτουργικής ακεραιότητας των ζωντανών κυττάρων, δεδομένου ότι όλα τα κύτταρα απαιτούν το ATP για να παραμείνουν ζωντανά και για να εκτελέσουν τις εξειδικευμένες λειτουργίες τους. Έτσι, ο προσδιορισμός των επιπέδων της ATP μπορεί να οδηγήσει στην ταχεία και ασφαλή ανίχνευση του πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας κυττάρων θηλαστικών και κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια.

Για τον συγκεκριμένο σκοπό έχουν δημιουργηθεί ειδικά δοκιμαστικά σετ πολλών θέσεων – μικροπλακών. Το ViaLight™ Plus Kit της εταιρείας Lonza που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την άμεση εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων καθώς κάθε μεμονωμένο κύτταρο περιέχει ATP.

Το ATP μπορεί να ανιχνευθεί με τη δοκιμή προσδιορισμού καθιστώντας το έτσι υποκατάστατο της πρόσληψης της τριτιωμένης θυμιδίνης και της αναγωγής της χρωστικής του τετραζολίου σε δοκιμασίες πολλαπλασιασμού κυττάρων. Οποιαδήποτε μορφή κυτταρικής βλάβης έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων ATP και έτσι το σετ δοκιμής και προσδιορισμού ViaLight™ plus μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντικατάσταση ενός ευρέως φάσματος μετρήσεων τελικού σημείου στις δοκιμές βιωσιμότητας κυττάρων. Το κιτ ViaLight™ plus προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους, αποφεύγοντας τη χρήση ραδιοϊσοτόπων, δίνοντας μεγαλύτερη αναπαραγωγικότητα και υψηλότερη ευαισθησία, καθώς και με πολύ γρήγορο ρυθμό. Επιπροσθέτως, το κιτ έχει διαμορφωθεί ώστε να χρησιμοποιηθεί μαζί με ένα φωτόμετρο ανάγνωσης πλάκας μικροτιτλοδότησης για πλήρη αυτοματοποίηση της ανάλυσης.

Το σετ δοκιμής και προσδιορισμού της κυτταροτοξικότητας, βασίζεται στη μέτρηση της βιοφωταύγειας του ATP που υπάρχει σε όλα τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα. Η μέθοδος της βιοφωταύγειας χρησιμοποιεί ένα ένζυμο, τη λουσιφεράση, η οποία καταλύει τον σχηματισμό φωτός από την ATP και τη λουσιφερίνη σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Σχήμα 2: Σχηματισμός φωτός από την ATP μέσω του ενζύμου της λουσιφεράσης – Μέθοδος βιοφωταύγειας.

Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός σχετίζεται γραμμικά με την συγκέντρωση της ATP και μετράται με τη χρήση ενός φωτόμετρου. Η δοκιμασία διεξάγεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18°C -22°C), που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για το ένζυμο λουσιφεράση. Η βιοφωταύγεια είναι πλέον η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανίχνευση του ATP λόγω της πολύ υψηλής ευαισθησίας, της ευρείας δυναμικής περιοχής και της ευκολίας χρήσης.

2.7. Τεχνικές Ελέγχου Επούλωτικής Δράσης

2.7.1. Μικροσκοπική Παρατήρηση – Wound Healing Effect (Cytoselect™ Assay Kit)

Ο τραυματισμένος ιστός ξεκινά μια πολύπλοκη και δομημένη σειρά εκδηλώσεων - γεγονότων για την αποκατάσταση της ζημιωμένης περιοχής. Αυτά τα γεγονότα μπορεί να περιλαμβάνουν αυξημένη αγγείωση από αγγειογόνους παράγοντες, αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της εναπόθεσης εξωκυτταρικού υλικού καθώς και διήθηση από φλεγμονώδη ανοσοκύτταρα ως μέρος της διαδικασίας για την καταστροφή του νεκρωτικού ιστού. Η διαδικασία επούλωσης πληγών αρχίζει καθώς

τα κύτταρα πολώνονται προς το τραύμα, εκκινούν την εξώθηση, μεταναστεύουν και κλείνουν την περιοχή του τραύματος. Αυτές οι διαδικασίες αντανakλούν τη συμπεριφορά μεμονωμένων κυττάρων καθώς και ολόκληρου του συμπλόκου ιστών.

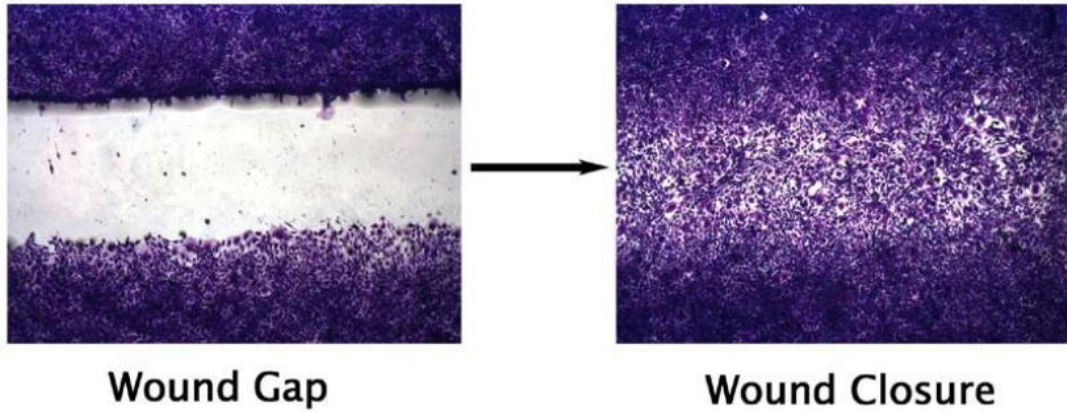
Οι βιοδοκιμές επούλωσης πληγών έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ερευνητές εδώ και χρόνια για να μελετήσουν την κυτταρική πόλωση, την αναδιαμόρφωση του δερματικού ιστού και για να εκτιμήσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τα ποσοστά μετανάστευσης διαφορετικών κυττάρων. Οι δοκιμασίες επούλωσης πληγών έχουν χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η ρύθμιση της κυτταρικής πολικότητας και της κυτταροσκελετικής δομής της ακτίνης μέσω του ρόλου των GTPασών της οικογένειας Rho , του προσανατολισμού των μικροσωληνίσκων και του Golgi, του ρόλου της p53 στην κυτταρική μετανάστευση καθώς και άλλων φυσιολογικών διεργασιών.

Αυτές οι βιοδοκιμές τυπικά περιλαμβάνουν καλλιέργεια μιας κυτταρικής μονοστοιβάδας και στη συνέχεια μετατόπιση ή καταστροφή μιας ομάδας κυττάρων με ξύσιμο μιας γραμμής μέσω της μονοστοιβάδας. Το ανοικτό κενό που δημιουργείται από αυτό το "τραύμα" στη συνέχεια μελετάται μικροσκοπικά με την πάροδο του χρόνου καθώς τα κύτταρα μετακινούνται και γεμίζουν την κατεστραμμένη περιοχή. Αυτή η διαδικασία "επούλωσης" μπορεί να διαρκέσει αρκετές ώρες έως αρκετές ημέρες ανάλογα με τον τύπο κυττάρου, τις συνθήκες και την επιφάνεια της "πληγωμένης" περιοχής. Το μειονέκτημα αυτών δοκιμών είναι η έλλειψη μιας καθορισμένης επιφάνειας πληγής ή ενός κενού μεταξύ των κυττάρων. Αυτά τα τραύματα έχουν ποικίλα μεγέθη και πλάτη, τα οποία αναστέλλουν τα συνεπή αποτελέσματα και δημιουργούν διακυμάνσεις από δοκιμή σε δοκιμή. Επιπλέον, η δοκιμή με "πληγή μέσω γρατσουνιάς" συχνά προκαλεί βλάβη στα κύτταρα στην άκρη του τραύματος, γεγονός που μπορεί να παρεμποδίσει τη μετανάστευση των κυττάρων στην περιοχή του τραύματος και συνεπώς και την επούλωση.

Το kit επούλωσης πληγών CytoSelect™ ξεπερνά αυτή την ασυνέπεια που προαναφέρθηκε παρέχοντας τα δικά του ένθετα που μπορούν να παράγουν πληγή ή κενό καθορισμένου πεδίου. Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρις ότου σχηματίσουν μία μονοστοιβάδα γύρω από το ένθετο. Το ένθετο αφαιρείται, αφήνοντας ένα ακριβές ανοικτό "τραυματισμένο πεδίο" 0,9 mm μεταξύ των κυψελών. Τα κύτταρα μπορούν να υποβληθούν σε "θεραπεία" και να παρακολουθούνται σε αυτό το σημείο για μετανάστευση και πολλαπλασιασμό εντός του πεδίου της πληγής. Η εξέλιξη αυτών των γεγονότων μπορεί να μετρηθεί με απεικονιστικά δείγματα καθορισμένων χρονικών σημείων ή με τη βοήθεια σύγχρονης μικροσκοπίας με *in vivo* απεικόνισης (time-lapse microscopy).

Το kit βιοδοκιμών Biolabs CytoSelect™ Kit για την ανίχνευση πληγών - τραυμάτων περιλαμβάνει δικά του ένθετα "τραύματος πεδίου" για τη δοκιμασία των μεταναστευτικών και θεραπευτικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Το kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την αξιολόγηση 24 δειγμάτων (24 θέσεις δοκιμών). Το

ένθετο είναι συμβατό για χρήση με τους περισσότερους τύπους κυττάρων και κάτω από τις περισσότερες πειραματικές συνθήκες. Το πεδίο πληγής των 0,9 mm που παράγεται είναι συμβατό για χρήση με τα περισσότερα μικροσκόπια και συστήματα απεικόνισης.



Εικόνα 26: Αριστερά το πεδίο της πληγής του «τραύματος» και δεξιά η πλέον θεραπευμένη τραυματισμένη περιοχή. (CytoSelect™ 24 – Well Wound Healing Assay - *Product Manual* -, CELL BIOLABS INC).

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.A. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΦΥΤΟΥ – *Hypericum perforatum* L.

3.A.1. Προσδιορισμός Υγρασίας και Ξηρής Ουσίας (Ξ.Ο.) Δείγματος

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των βοτάνων σε νερό βρέθηκε με προσδιορισμό της υγρασίας όταν αυτό ήταν σε στερεή κατάσταση. Η διαδικασία ακολούθησε ως εξής, ζυγίστηκε 0,5 g. φυτικού υλικού σε προζυγισμένη και προξηραμένη κάψα. Η κάψα με το δείγμα μεταφέρθηκε σε κλίβανο σε θερμοκρασία 110 °C για περίπου 12 ώρες. Αφού ακολούθησε ψύξη της κάψας (θερμοκρασία περιβάλλοντος), ζυγίστηκε και η υγρασία υπολογίστηκε από τη σχέση $Y\% = (M1 - M2) * 100 / (M1 - B)$ $\Xi \% = 100 - Y \%$, όπου M1 : μικτό βάρος πριν την ξήρανση M2 : μικτό βάρος μετά την ξήρανση. Η ξήρανση για τον προσδιορισμό της υγρασίας και της ξηρής ουσίας τους δείγματος πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Τα αποτελέσματα για τα δύο δείγματα που αναλύθηκαν ήταν τα εξής: Ξ.Β (%) - M.O._(V) = 91,7 % και Υγρασία (%) – M.O._(V) = 8,257 % για το δείγμα της εταιρείας “VRINO” και Ξ.Β. (%) - M.O._(B) = 92,1 % Υγρασία (%) – M.O._(B) = 7,92 % για το δείγμα της εταιρείας “Το Βάλσαμο”.

3.A.2. Λήψη Φασμάτων IR με την τεχνική DRIFT

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η άλεση και το κοσκίνισμα του φυτικού υλικού. Τόσο η ξηρή δρόγη του φυτού όσο και τα λυοφυλιωμένα εκχυλίσματά του αναλύθηκαν με την τεχνική DRIFT.

Όσον αφορά τη ξηρή δρόγη: Μικρή ποσότητα από το κάθε δείγμα ξηρού φυτικού υλικού, τοποθετήθηκε σε κοινό πολυμίξερ της εταιρίας Philips και κονιοποιήθηκε μέχρι την παραλαβή μίας ομοιόμορφης πούδρας. Τμήματα του φυτού όπως οι ανθοφόροι βλαστοί, δεν κονιοποιήθηκαν μέχρι μεγίστου. Για το λόγο αυτό, το δείγμα κοσκινίστηκε με κόσκινο που είχε διάμετρο πλέγματος περίπου 500 μm και ακολούθησε μέγιστη κονιοποίηση σε γουδί.

Όσον αφορά τα λυοφυλιωμένα εκχυλίσματα: Όπως παραλήφθηκαν από τη διαδικασία της λυοφυλίωσης, τοποθετήθηκαν στα καψίδια του οργάνου, πακεταρίστηκαν ελαφρώς και πραγματοποιήθηκε απευθείας η λήψη των φασμάτων.

Με το πέρας της προετοιμασίας των φυτικών δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε η λήψη των υπέρυθρων FT-IR φασμάτων. Το φασματόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο Thermo Nicolet 6700 της εταιρείας Thermo Electron Corporation. Το όργανο είχε πηγή ακτινοβολίας IR λυχνία νικελίου-χρωμίου, πηγή λείζερ ατόμων

ηλίου και νέου (HeNe) και θερμικό ανιχνευτή. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είχε εγκατασταθεί το λογισμικό OMNIC 7.3. Στο πρόγραμμα επιλέξαμε την τεχνική DRIFT (διάχυτης ανάκλασης), καθώς δουλέψαμε σε στερεά δείγματα που φέραμε σε μορφή σκόνης και με την επιλογή αυτή εξασφαλίσαμε ταχύτητα και ευκολία στις αναλύσεις μας.

Αρχικά, έγινε λήψη του υποβάθρου (background) με την τοποθέτηση βρωμιούχου καλίου (KBr) στον υποδοχέα, με σκοπό τον περιορισμό των απορροφήσεων που οφείλονταν αποκλειστικά στο CO₂ της ατμόσφαιρας καθώς και στην υγρασία του περιβάλλοντος τη δεδομένη στιγμή. Η λήψη του υποβάθρου επαναλήφθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανάλογα με τη χρονική διάρκεια των αναλύσεων. Μετά τη λήψη του υποβάθρου, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ειδικό καψίδιο και πραγματοποιήθηκε η λήψη των φασμάτων. Σε κάθε λήψη πραγματοποιούνταν 100 σαρώσεις, η διαχωριστική ικανότητα ήταν ρυθμισμένη στα 4 cm⁻¹ και κάθε λήψη διαρκούσε περίπου 2,5 λεπτά.

Για κάθε δείγμα πήραμε 5 διαφορετικά φάσματα. Στη συνέχεια με το λογισμικό OMNIC 8.2 επεξεργαστήκαμε τα φάσματα με σκοπό να πάρουμε για κάθε δείγμα το καλύτερο δυνατό. Κατά την επεξεργασία με το πρόγραμμα OMNIC όλα τα φάσματα εξομαλύνθηκαν (smoothing), διορθώθηκε η βασική τους γραμμή (baseline correct) και κανονικοποιήθηκε η κλίμακά τους (normalize scale). Επίσης, η κορυφή απορρόφησης του CO₂ διορθώθηκε – αποκόπηκε, καθώς δεν μας έδινε πληροφορίες για το χημικό υπόβαθρο των δειγμάτων μας αλλά η τιμή της επηρεαζόταν μόνο από τον αριθμό των ατόμων που βρίσκονταν στον χώρο λήψης των φασμάτων, την χρονολογία του υποβάθρου και άλλους τέτοιους παράγοντες.

3.A.3. Παρασκευή Υδατικού Εκχυλίσματος – Αφέψημα

§ Παραλαβή Αφεψήματος

Για την παρασκευή του αφεψήματος ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Αρχικά ζυγίστηκε 1 g φυτικού υλικού από κάθε δείγμα και ογκομετρήθηκαν 100 mL απιονισμένου νερού σε ογκομετρικό κύλινδρο.
- Το νερό προστέθηκε σε ποτήρι ζέσεως και καλύφθηκε με ύαλο.
- Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα με θέρμανση και θερμάνθηκε μέχρι να φτάσει τη θερμοκρασία των 80°C (η θερμοκρασία ελεγχόταν τακτικά με θερμομόμετρο υγρών).
- Όταν το νερό έφτασε τη θερμοκρασία αυτή, προστέθηκε σε αυτό το φυτικό υλικό που είχε ζυγιστεί αρχικά.
- Ακολούθησε ανάδευση για ένα λεπτό στην αρχή με την τοποθέτηση του φυτικού υλικού, σταθεροποίηση για 4 λεπτά, ανάδευση ξανά για 1 λεπτό,

σταθεροποίηση για 4 λεπτά και τέλος ανάδευση για ένα λεπτό (συνολικός χρόνος 10 λεπτά).

- Ακολούθως, το αφέψημα διηθήθηκε σε ηθμό και αφέθηκε να σταθεροποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μία ποσότητα από το αφέψημα τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη μέχρι την επόμενη χρήση του.



Εικόνα 27: Αφέψημα υπέρικου – *Hypericum perforatum* L.

§ Παραλαβή οργανικού εκχυλίσματος αφεψήματος & Υδατικής φάσης χοάνης

Σε συνέχεια της παραπάνω διαδικασίας, μετά την παραλαβή του αφεψήματος ακολούθησε εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (diethylether) με σκοπό την απομόνωση του οργανικού τμήματος του αφεψήματος στο οποίο περιέχονταν τα πτητικά συστατικά. Πιο συγκεκριμένα:

- Στην υπολειπόμενη ποσότητα αφεψήματος (περίπου 60 mL) πραγματοποιήθηκε εκχύλιση για την παραλαβή δύο φάσεων.
- Αρχικά, το αφέψημα εκχυλίστηκε με ίση ποσότητα EtOEt σε διαχωριστική χοάνη. Προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα NaCl για καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων (οργανική & υδατική).
- Η υδατική φάση της διαχωριστικής χοάνης απομακρύνθηκε και μία ποσότητα αποθηκεύτηκε σε γυάλινο φιαλίδιο, αφού απομακρύνθηκε το σχηματισμένο γαλάκτωμα, και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη μέχρι την επόμενη χρήση του.
- Η οργανική φάση της διαχωριστικής χοάνης, εκχυλίστηκε με ίση ποσότητα απιονισμένου νερού, με σκοπό την απομάκρυνση της υδατικής φάσης από το γαλάκτωμα που σχηματίστηκε ανάμεσα στις δύο φάσεις του αφεψήματος.
- Η οργανική φάση συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο.
- Ακολούθησε συμπύκνωση σε υγρό άζωτο μέχρι τον όγκο των 5 mL.

- Προστέθηκε μικρή ποσότητα από άνυδρο θειϊκό μαγνήσιο (anhydrous magnesium sulfate) για την απομάκρυνση του όποιου υδατικού υπολείμματος.
- Το εκχύλισμα φιλτραρίστηκε με ειδικό φίλτρο (CHROMAFIL - PTFE 0.20) και τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο σφραγίστηκε με parafilm και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη μέχρι την επόμενη χρήση του.
- Και για τα δύο δείγματα, οι παρασκευές των αφενημάτων πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

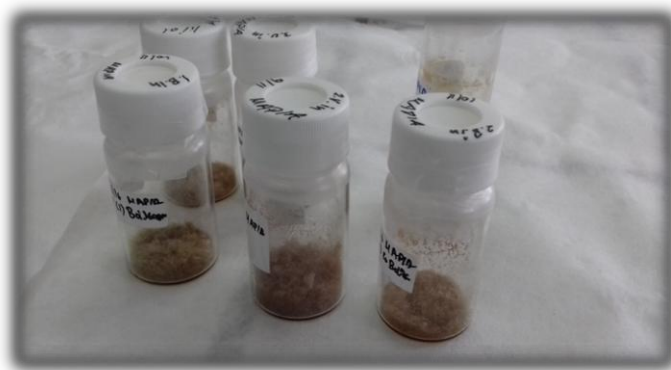


Εικόνα 28: Παραλαβή οργανικού εκχυλίσματος και υδατικής φάσης χοάνης, αφενήματος υπέρικου. **A:** Εκχύλιση αφενήματος με οργανικό διαλύτη (diethylether) σε διαχωριστική χοάνη **B, C:** Διαχωρισμός οργανικής (αριστερά) και υδατικής (δεξιά) φάσης εκχυλίσματος χοάνης, **D:** Συμπύκνωση οργανικού εκχυλίσματος αφενήματος σε άζωτο μέχρις όγκου 5 mL.

3.A.4. Λυοφυλίωση Εκχυλισμάτων Υπέρικου & Συμπύκνωση Οργανικών Εκχυλισμάτων σε Περιστροφικό Συμπυκνωτή (Rotary evaporator)

Αρχικά τα υδατικά εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη και ψύχθηκαν στους -40°C για μία ημέρα αφού πρώτα είχαν τοποθετηθεί στις ειδικές φιάλες λυοφυλίωσης. Όταν οι συνθήκες του λυοφυλιωτή άγγιξαν τους -80°C θερμοκρασία και τα 100 mTorr πίεσης, οι φιάλες τοποθετήθηκαν απευθείας για λυοφυλίωση. Τα δείγματα αφέθηκαν για 2 ημέρες στο ειδικό όργανο έως ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία.

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα (70:30 MeOH/H₂O) πριν την τοποθέτησή τους στον λυοφυλιωτή, συμπυκνώθηκαν με περιστροφικό συμπυκνωτή – Rotary evaporator μέχρι ξηρού με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη (μεθανόλη). Αφού απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης, συμπληρώθηκε ο όγκος του διαλύματος με νερό και στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της λυοφυλίωσης, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω για τα υδατικά εκχυλίσματα.



Εικόνα 29: Λυοφιλωμένα εκχυλίσματα *Hypericum perforatum* L.

Το όργανο λυοφυλίωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο Sentry 2.0. της εταιρείας VIRTIS και ο περιστροφικός συμπυκνωτής ήταν το μοντέλο Laborota 4000 efficient της εταιρείας Heidolph - Ecoline Staredition και RE106 της LAUDA.

3.A.5. Παρασκευή Οργανικών Εκχυλισμάτων Υπέρικου

Αρχικά, κονιοποιήθηκαν 40 g φυτικού υλικού (σε κοινό πολυμίξερ για 3 περίπου λεπτά) από κάθε δείγμα με σκοπό να χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις, έτσι ώστε το φυτό να έχει υποστεί την ίδια επεξεργασία σε όλες τις εκχυλίσεις που ακολουθούν.

§ Οργανικό Εκχύλισμα MeOH/H₂O (70:30 v/v)

Αρχικά ζυγίστηκαν 2 g κονιοποιημένου ξηρού φυτικού υλικού από κάθε δείγμα, εις τριπλούν, και 20 mL MeOH/H₂O (70:30 v/v), δηλαδή 14 mL MeOH και 6 mL

απιονισμένου νερού. Το κάθε δείγμα με τους διαλύτες του, προστέθηκαν σε ποτήρια ζέσεως των 100 mL και αναδεύτηκαν σε stirrer στις 300 περίπου στροφές (rpm) για 24 ώρες. Τα δείγματα τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο λόγω των φωτοευαίσθητων ουσιών που περιείχαν. Μετά το πέρας των 24 ωρών, τα δείγματα απομακρύνθηκαν από τους αναδευτήρες και τοποθετήθηκαν με τη σειρά σε χωνί Buchner. Αφού διαχωρίστηκε το υγρό εκχύλισμα από το ίζημα, μεταφέρθηκε με πιπέτα Pasteur σε γυάλινα φιαλίδια. Τα φιαλίδια στη συνέχεια σφραγίστηκαν με parafilm, τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη.



Εικόνα 30: Υδρομεθανολικά Εκχυλίσματα υπέρικου (MeOH:H₂O 70:30 v/v)

3.A.6. Υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger

§ Παραλαβή Αιθέριου Ελαίου (essential oil)

Αρχικά, από κάθε δείγμα (“VRINO”, “Το βάλσαμο”), διαχωρίστηκαν περίπου 220 γραμμάρια από τα υπέργεια τμήματα (φύλλα & άνθη) και κονιοποιήθηκαν με κοινό πολυμίξερ. Κάποια μικρά τμήματα βλαστών παρέμειναν μέσα στο δείγμα. Οι παραλαβές πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, αφού προηγήθηκε κινητική της απόσταξης. Κατά την κινητική, βρέθηκε ότι μετά από τις 3 ώρες το αιθέριο έλαιο δεν αυξάνεται. Έτσι, ως ιδανική διάρκεια απόσταξης κρίθηκαν οι 3 ώρες.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- Αρχικά, προστέθηκαν 40 γραμμάρια τριμμένου φυτικού υλικού σε σφαιρική φιάλη των 1000 mL.
- Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 mL απιονισμένου νερού και το περιεχόμενο ανακινήθηκε ελαφρά.
- Προστέθηκαν κομμάτια πορσελάνης για πιο ήπιο βρασμό.
- Μετά το πέρας των 3 ωρών, η απόσταξη τερματίστηκε.

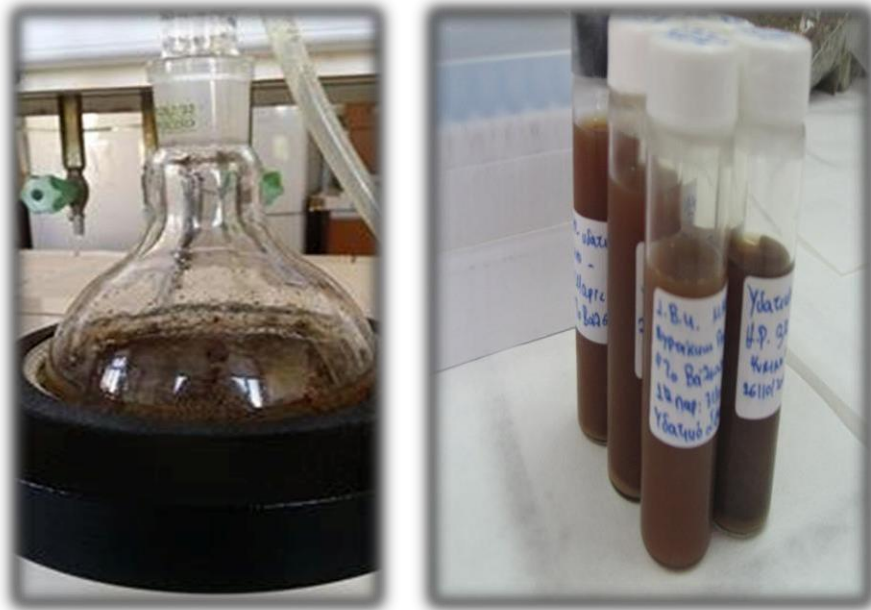
- Το αιθέριο έλαιο και το υδρόλυμα ελήφθησαν μαζί λόγω της πολύ μικρής ποσότητας καθαρού ελαίου.
- Υπολογίστηκε η ποσότητα του διαλύματος και μετρήθηκε ίση ποσότητα οργανικού διαλύτη EtOEt (με BHT) με τον οποίο ακολούθησε εκχύλιση για τον διαχωρισμό της οργανικής φάσης.
- Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε 3 στάδια, χωρίζοντας τη συνολική ποσότητα σε 3 ισόποσες.
- Η πρώτη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για να «ξεπλύνουμε» το υπόλοιπο του ελαίου από την συσκευή της απόσταξης.
- Στη συνέχεια, ακολούθησαν τα 2 επόμενα στάδια της εκχύλισης και παραλάβαμε την οργανική φάση του διαλύματος.
- Προστέθηκε μικρή ποσότητα από άνυδρο θειικό μαγνήσιο (anhydrous magnesium sulfate) για την απομάκρυνση του όποιου υδατικού υπολείμματος.
- Το εκχύλισμα φιλτραρίστηκε με ειδικό φίλτρο (CHROMAFIL - PTFE 0.20) και τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο σφραγίστηκε με parafilm και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη μέχρι την επόμενη χρήση του.



Εικόνα 31: Παραλαβή αιθερίου ελαίου *Hypericum perforatum* L.

§ Παραλαβή Υδατικού Αποσμομένου Υδρολύματος Σφαιρικής

Το υδατικό κλάσμα της σφαιρικής, απομακρύνθηκε με διαχωρισμό του υγρού (νερό) από το βρασμένο φυτικό υλικό. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με ηθμό από διηθητικό χαρτί. Η ποσότητα που διαχωρίστηκε αποθηκεύτηκε σε γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο σφραγίστηκε με parafilm, στην κατάψυξη μέχρι την επόμενη χρήση του.



Εικόνα 32: Υδατικό αποσπασμένο εκχύλισμα σφαιρικής

3.A.7. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών (GC-MS) (Αιθέριο έλαιο & Οργανική Φάση Αφεψήματος)

Τα αιθέρια έλαια, το οργανικό (διαιθυλαιθερικό) εκχύλισμα της ξηρής δρόγης, καθώς και το οργανικό εκχύλισμα του αφεψήματος του υπέρικου, μελετήθηκαν με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών (GC-MS).

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος (*Trace GC ULTRA*) εφοδιασμένος με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας (*DSQ II*), της εταιρείας Thermo Scientific. Η στήλη του χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν Thermo-5MS (30m x 0,25mm, ID, πάχος φιλμ 0,25μm). Τα φέρον αέριο ήταν ήλιο (He), με ροή 1mL/min.

Αιθέριο έλαιο: Αρχικά το αιθέριο έλαιο βρισκόταν σε μορφή οργανικού εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα σε συγκέντρωση 80.000 ppm. Αφού αραιώθηκε μέχρι συγκέντρωσης 800 ppm ήταν έτοιμο για ποιοτική ανάλυση. Με σκοπό την ποσοτική ανάλυση του αιθερίου ελαίου, πραγματοποιήθηκε προσθήκη εσωτερικού προτύπου. Μετά από δοκιμές, επιλέχθηκε ως καταλληλότερη ουσία για αυτή τη χρήση η καμφορά (*Camphor*, Fluka Chemica, καθαρότητας $\geq 97\%$). Για τη χρήση του εσωτερικού προτύπου, αρχικά δημιουργήθηκε διάλυμα stock, συγκέντρωσης 4,3 mg/mL από το οποίο προστέθηκαν 30 μ L σε κάθε διάλυμα που προοριζόταν για ένεση. Έτσι, η τελική συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου ισούταν με 129 μ g/mL. Κάθε διάλυμα προς ένεση περιείχε: 870 μ L διαλύτη διαιθυλαιθέρα, 100 μ L

οργανικού εκχυλίσματος αιθερίου ελαίου και 30 μL καμφοράς ως εσωτερικό πρότυπο. Όλες οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Οργανικό εκχύλισμα αφεψήματος: Η διαδικασία παραλαβής της οργανικής φάσης του αφεψήματος αναλύεται σε παραπάνω ενότητα. Η αρχική ποσότητα ισούταν με 5 mL από την οποία όμως προχωρήσαμε σε συμπύκνωση μέχρι όγκου 0.5 mL. Στον τελικό αυτό όγκο, προστέθηκαν 15 μL εσωτερικού προτύπου καμφοράς, γνωστής συγκέντρωσης και ίσης με αυτή του προτύπου που προστέθηκε στο αιθέριο έλαιο.

Οργανικό (δισουλφαιθερικό) εκχύλισμα ξηρής δρόγης: Το οργανικό εκχύλισμα που προέκυψε με εκχύλιση 2 g κονιοποιημένης ξηρής δρόγης βάλσαμου σε 20 mL δισουλφαιθέρα, για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, οδηγήθηκε για ανάλυση με τη τεχνική GC-MS. Αφού συμπυκνώθηκε μέχρι τον όγκο των 5 mL ακολούθησε η ίδια προεργασία δείγματος που πραγματοποιήθηκε και στο οργανικό εκχύλισμα του αιθερίου ελαίου.

Οι συνθήκες που συγκρότησαν τη μέθοδό μας ήταν οι παρακάτω:

Αέριος χρωματογράφος:

Αρχική θερμοκρασία: 60°C, Τελική θερμοκρασία: 250 °C, ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας: 3 °C/λεπτό, Συνολικός χρόνος μεθόδου: 63.33 λεπτά, Max temperature (oven): 350 °C, Prep Run Timeout (10.00 min), Equilibration time: 5 min., Left SSL: Temperature: 220 °C, Split Flow: 50 mL/min, Splitless time: 1 min, Constant septum: Purge, Mode: Splitless, Left Carrier: Flow-On: 1 mL/min, Flow Mode: Constant flow, Vacuum compensation, Gas Saver-Flow: 25 mL/min, Time: 2 min, Aux Zones-MS Transfer Line: 250 °C

Φασματόμετρο μαζών:

End Run: GC run time, Heated Zones-Ion Source: 250 °C, Acquisition threshold: 0.00, Start time: 3.00 min, Detector gain-Use method: 3.00×10^5 (Multiplier voltage: 1481 V), Scan Mode: Full scan, Mass Range: 50-500, Ions: Positive, Tune-tune file: Autotune (use for entire segment), Emission current: Use tune file (use for entire segment), Total scan time: 0.92 s, Scan time: 0.92 s, Rate: Scans per second: 1.0834, Scan rate (amu/sec): 500.0, Mass defect (mmu/100 amu): 0.00.

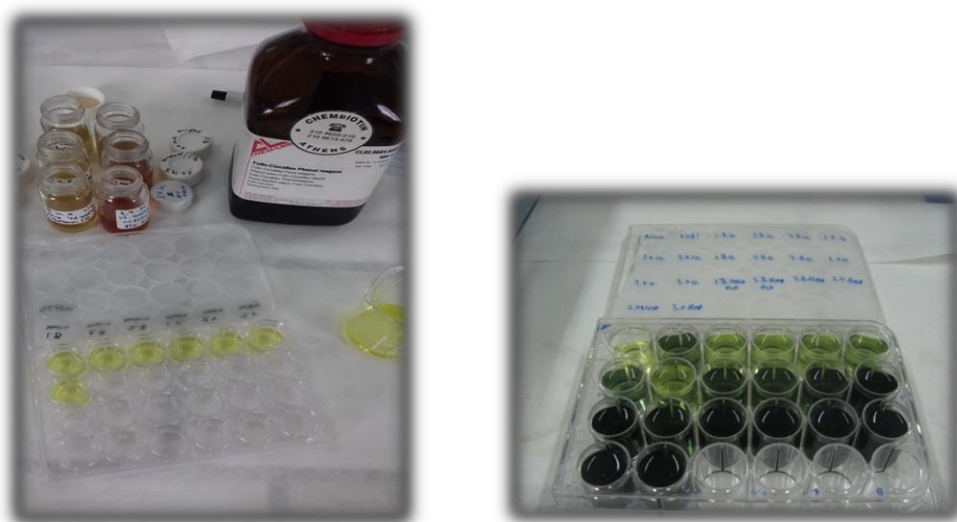
Η ταυτοποίηση των συστατικών των ελαίων έγινε με σύγκριση των δεικτών κατακράτησης και των φασμάτων μαζών με τα αντίστοιχα των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών *Adams 0,7HP* και *Xcalibur* που υπάρχουν στο λογισμικό *Xcalibur* του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας (*Adams, 4th Edition*). Η ποσοτικοποίηση των ουσιών έγινε με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου και συγκεκριμένα, στην περίπτωση μας, της καμφοράς.

3.A.8 Μετρήσεις Βιοδραστικότητας & Τοξικότητας

§ Μέτρηση ολικών φαινολικών συστατικών (TPC) - (Folin Ciocalteu)

Για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα του υπέρικου εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα ανθρακικού νατρίου (NaCO_3) 2% w/v.
- Σε ειδικά micropates πολλαπλών θέσεων προστέθηκαν, με τη σειρά, 1.5 mL απιονισμένο H_2O , 25 μL από το προς εξέταση δείγμα και 125 μL αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu.
- Τα τρυβλία παρέμειναν στο σκοτάδι για 3 λεπτά.
- Μετά το πέρας των 3 λεπτών, προστέθηκαν επιπλέον 375 μL NaCO_3 και 475 μL απιονισμένο H_2O .
- Ακολούθησε επώαση με παραμονή των τρυβλίων για 2 ώρες στο σκοτάδι.
- Πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του Blank (τυφλό) το οποίο παρασκευάστηκε με την παραπάνω διαδικασία, με τη διαφορά ότι στη θέση του δείγματος προστέθηκε μεθανόλη (MeOH).
- Ακολούθησε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 725 nm.
- Στα δείγματα που η απορρόφηση ξεπερνούσε την τιμή «1», πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:4 και στη συνέχεια αναγωγή στην αρχική συγκέντρωση δείγματος.
- Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις ήταν το φωτόμετρο V-1200 Spectrophotometer, VWR και όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.
- Τέλος κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/mL ισοδύναμα καφεϊκού οξέος.



Εικόνα 33: Μέθοδος Folin-Ciocalteu στα Εκχυλίσματα Υπέρικου

§ Μέτρηση Τοξικότητας εκχυλισμάτων με τον αναλυτή Microtox® M500

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκε η τοξικότητα των αφεψημάτων και άλλων υδατικών εκχυλισμάτων των βοτάνων. Για τη συγκεκριμένη έρευνα, αρχικά, επιλέχθηκαν τα δείγματα τα οποία προορίζονταν για ανάλυση. Ο συγκεκριμένος αναλυτής είναι κατάλληλος μόνο για υδατικά εκχυλίσματα. Έτσι, από όλες τις παραλαβές μας, επιλέχθηκαν μόνο τα αφεψήματα υδατικά αποσπασμένα εκχυλίσματα της σφαιρικής κατά την υδροαπόσταξη και η υδατική φάση της χοάνης κατά την εκχύλιση του αφεψήματος. Τα λυοφυλιωμένα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα επίσης, μετά από επαναδιαλυτοποίησή τους σε νερό, αναλύθηκαν μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα.

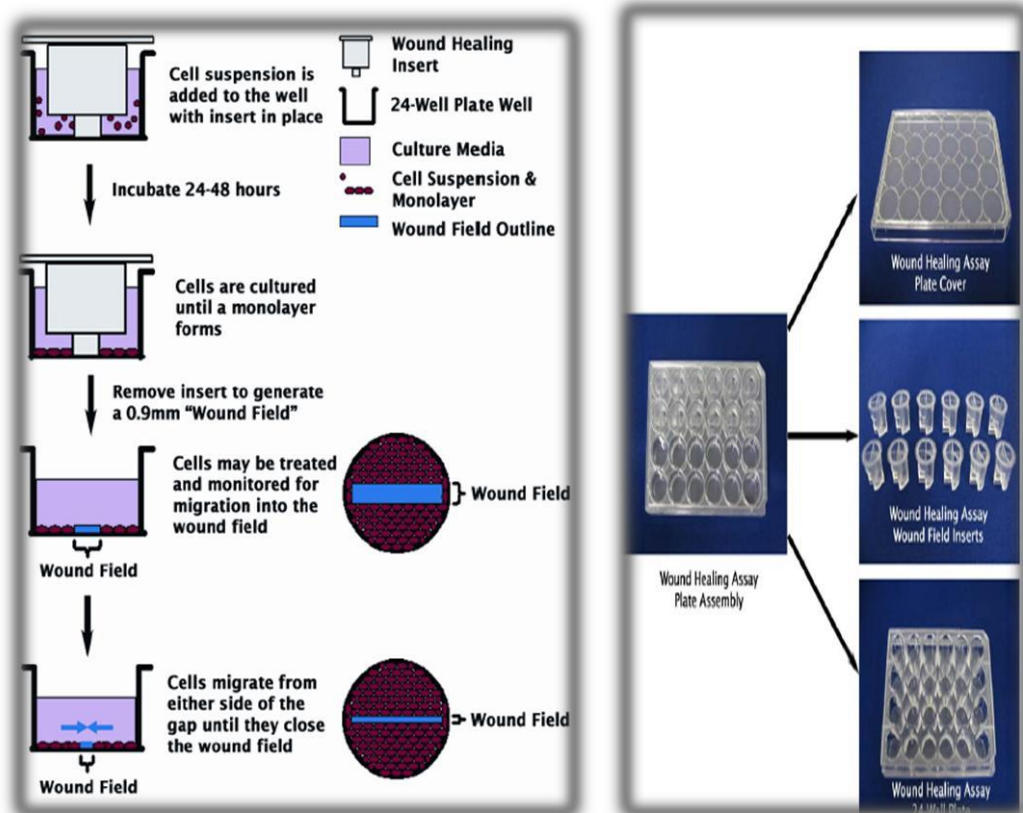
Το ενδιαφέρον για την τοξικότητα των αφεψημάτων προϋπήρχε της έρευνας και ήταν αρκετά μεγάλο διότι υπάρχουν αρκετές αναφορές για ηπατικές και νεφρικές τοξικότητες που προκαλούνται έπειτα από μεγάλη κατανάλωση τους και για το λόγο αυτό η ευρωπαϊκή ένωση έχει θεσπίσει κάποια επιτρεπτά όρια κατανάλωσης. Η εκτίμηση της τοξικότητας των αφεψημάτων πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή *Microtox, M500 Analyzer* της εταιρίας AZUR Environmental. Η επιφάνεια εργασίας της συσκευής περιέχει ειδικά διαμορφωμένες εσοχές που δέχονται τις κυψελίδες τους αναλυτή στις οποίες μεταφέρονται τα βακτήρια και τα δείγματα. Στη μία εσοχή λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση των βακτηρίων με την προσθήκη 1 mL υγρού ενεργοποίησης και υπάρχει και μία εσοχή στην οποία μετριέται η απορρόφηση της ακτινοβολίας. Η συσκευή διατηρεί τα φιαλίδια και το περιεχόμενο τους σε σταθερή χαμηλή θερμοκρασία των 15 °C.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα screening test με το οποίο πήραμε μία ένδειξη για την επίδραση που είχαν τα εκχυλίσματά μας στο βακτήριο του αναλυτή. Όσο μεγαλύτερη η ένδειξη στο όργανο, τόσο μικρότερο το effect του δείγματος προς ανάλυση. Η κλίμακα είναι από 0-100 και στην περίπτωσή μας, σε όλα τα δοκιμαζόμενα δείγματα στο screening test, η ένδειξη ήταν ίση με 0, κάτι το οποίο αποτέλεσε ένδειξη πως άξιζε να μελετηθούν περαιτέρω καθώς φαίνεται να είναι πολύ ισχυρά – δραστικά. Για το σκοπό αυτό, ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με σκοπό τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης, αφού πρώτα βρέθηκε μετά από δοκιμές η βέλτιστη αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, η αναλυτική δοκιμή που ακολούθησε ήταν το Basic test 81,9%, κατά το οποίο, γίνονται διαδοχικές αραιώσεις μεταξύ των κυψελίδων για να υπολογιστεί το EC₅₀ (Effective Concentration) που υπολογίζεται απευθείας από το λογισμικό του οργάνου.

§ Μικροσκοπική Παρατήρηση Επουλωτικής Δράσης – Wound Healing Kit

Η Αρχή Προσδιορισμού της επουλωτικής δράσης με το κιτ βιοδοκιμών CytoSelect™ παρουσιάζεται παρακάτω: Το κιτ προσδιορισμού περιέχει 2 x 24 θέσεις μικροπλακών η κάθε μία εκ των οποίων περιέχει 12 ιδιόκτητα επεξεργασμένα πλαστικά ένθετα. Τα ένθετα δημιουργούν ένα τραυματισμένο πεδίο με καθορισμένο κενό 0,9 mm για τη μέτρηση των μεταναστευτικών και πολλαπλασιαστικών επιπέδων των κυττάρων. Τα μεταναστευτικά κύτταρα είναι σε θέση να επεκτείνουν τις προεξοχές και τελικά να εισβάλλουν και να κλείσουν το πεδίο του τραύματος. Οι ρυθμοί πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της μετανάστευσης μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας χειροκίνητη σταθεροποίηση και μικροσκοπική απεικόνιση. Μαζί με το κιτ παρέχεται ένα διάλυμα σταθεροποίησης για τη διακοπή των κυττάρων σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία. Επίσης, παρέχονται κηλίδες κυττάρων και χρώση DAPI για την παρακολούθηση των αποτελεσμάτων μέσω μικροσκοπίας φωτός και φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθείται παρουσιάζεται και απεικονιστικά στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 34: Διαδικασία Βιοδοκιμής CytoSelect™ για την μικροσκοπική παρατήρηση της επουλωτικής δράσης των κυττάρων.

Πειραματικά, τα στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής (όλα υπό συνθήκες αποστείρωσης):

Μετανάστευση κυττάρων

- Η πλάκα των 24 θέσεων με τα ένθετα επούλωσης πληγών CytoSelect™ αφέθηκε για 10 λεπτά ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Χρησιμοποιώντας στείρες λαβίδες, προσανατολίσαμε τον επιθυμητό αριθμό ενθέτων στην πλάκα με το "πεδίο πληγής" τους ευθυγραμμισμένο στην ίδια κατεύθυνση, αφού πρώτα βεβαιωθήκαμε ότι τα ένθετα έχουν σταθερή επαφή με τον πυθμένα της πλάκας. (Οι δοκιμές για κάθε δείγμα, έγιναν σε τριπλέτες).
- Στη συνέχεια, δημιουργήσαμε ένα κυτταρικό εναιώρημα που περιείχε $0,5-1,0 \times 10^6$ κύτταρα/ml σε μέσο που περιείχε 10% ορό εμβρύου βοδιού (FBS).
- Προσθέσαμε 500 μ L εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε θέση της πλάκας, εισάγοντας προσεκτικά το ρύγχος της πιπέτας μέσω του ανοικτού άκρου στην κορυφή του ενθέματος. Για βέλτιστη διασπορά των κυττάρων, προσθέσαμε 250 μ L κυτταρικού εναιωρήματος σε κάθε πλευρά των ανοιχτών άκρων στην κορυφή του ενθέματος.
- Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν σε έναν επωαστήρα κυτταροκαλλιέργειας όλη τη νύχτα (μέχρι να σχηματιστεί μια μονοστοιβάδα) και αφαιρέσαμε προσεκτικά το ένθετο από τη θήκη της πλάκας για να ξεκινήσουμε τον προσδιορισμό της επούλωσης τραύματος.
- Αναρροφήσαμε αργά και απορρίψαμε το μέσο καλλιέργειας από τις θήκες και στη συνέχεια τα πλύναμε με μέσο ώστε να αφαιρέσουμε τα νεκρά κύτταρα. Τέλος, προσθέσαμε νέο μέσο για να κρατήσουμε τα κύτταρα ενυδατωμένα. Με ένα μικροσκόπιο φωτός ελέγξαμε εάν το πλύσιμο ήταν επαρκές και στη συνέχεια προχωρήσαμε στα επόμενα βήματα.
- Όταν ολοκληρώθηκε το πλύσιμο, προσθέσαμε μέσο με FBS για να συνεχίσουμε την κυτταρική καλλιέργεια και τη διαδικασία επούλωσης τραύματος και τα κύτταρα επώαστηκαν σε επωαστήρα κυτταροκαλλιέργειας.
- Αφού πρώτα δημιουργήσαμε το καθορισμένο εμβαδόν επιφάνειας τραύματος πολλαπλασιάζοντας το πλάτος του πεδίου πληγής (0,9 mm) με το μήκος, ακολούθως παρακολουθήσαμε το κλείσιμο του τραύματος με ένα μικροσκόπιο φωτός. Τα αποτελέσματα επούλωσης τραύματος εμφανίστηκαν και εκτιμήθηκαν μέσω της κηλίδωσης κυττάρων. (*CytoSelect™ 24 – Well Wound Healing Assay - Product Manual -, CELL BIOLABS INC*).

3.B. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΒΑΛΣΑΜΕΛΑΙΟΥ – *Oleum Hyperici*

3.B.1. Προετοιμασία Φυτικού Υλικού & Παρασκευή Βαλσαμέλαιου

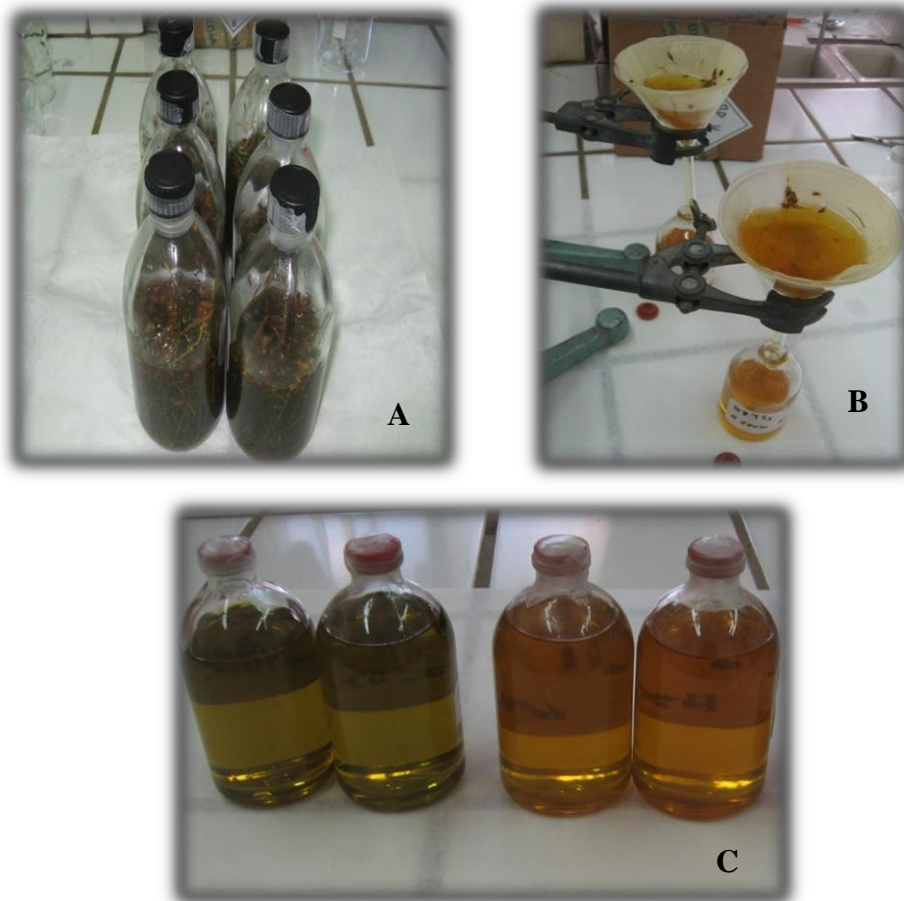
Το φυτικό υλικό, μετά την απομάκρυνση ζιζανίων και υπολειμμάτων από άλλα φυτά, κονιοποιήθηκε σε κοινό πολυμίξερ ακριβώς πριν τις παραλαβές (εκχυλίσεις - αποστάξεις).

Για την παρασκευή του βαλσαμέλαιου, σε εργαστηριακή κλίμακα, χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το υπέργειο τμήμα του φυτού χωρίς κονιοποίηση, καθώς ακολουθήθηκε ο παραδοσιακός τρόπος παρασκευής με μόνη διαφορά ότι, στη θέση της νωπής δρόγης εμείς χρησιμοποιήσαμε ξηρή δρόγη. Ο παραδοσιακός τρόπος παρασκευής βαλσαμόλαδου είναι κοινός σε όλες τις περιοχές της Ελλάδος αλλά και παγκοσμίως, ενώ έχουν παρατηρηθεί μικρές τροποποιήσεις σε ορισμένες παρασκευές, χωρίς όμως να παρατηρείται κάποια ουσιαστική διαφορά.

Εργαστηριακός Τρόπος Παρασκευής:

Παραδοσιακά, το βαλσαμέλαιο παρασκευάζεται με παραμονή του φυτικού υλικού στο ελαιόλαδο για περίπου 4-5 εβδομάδες, απουσία ή παρουσία φωτός ανάλογα με τη χρήση του (εσωτερική & εξωτερική αντίστοιχα). Τα μπουκάλια ανακινούνταν κάθε 3 ημέρες κατά την εκχύλιση.

Για το συγκεκριμένο πείραμα, για να επιτύχουμε την ίδια αναλογία φυτού/ελαιολάδου, εφόσον μετρήσαμε την υγρασία και το ξηρό βάρος του φυτού, καταλήξαμε με αναγωγή στις κατάλληλες ποσότητες για την παρασκευή του βαλσαμέλαιου. Πιο συγκεκριμένα: σε 180 mL ελαιολάδου εμβαπτίστηκαν 9 g ξηρής δρόγης φυτικού υλικού. Το περιεχόμενο τοποθετήθηκε σε μαύρα μπουκάλια για να αντανakλάται η ακτινοβολία του ήλιου και να χρησιμοποιείται μόνο η θερμότητά του που απαιτείται για την εκχύλιση των βιοδραστικών ουσιών, μειώνοντας ταυτόχρονα τις αρνητικές επιπτώσεις της οξείδωσης λόγω ακτινοβολίας. Τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν στην παροχή του αζώτου για να φύγει ο υπολειπόμενος ατμοσφαιρικός αέρας και σφραγίστηκαν με πώμα και Parafilm. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον ήλιο αλλά και στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (παρουσία και απουσία φωτός) για 40 ημέρες. Με το πέρας των 40 ημερών, τα βαλσαμέλαια διηθήθηκαν σε ηθμό από διηθητικό χαρτί, για την απομάκρυνση του φυτικού υλικού, τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια τα οποία σφραγίστηκαν με parafilm και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. μέχρι την επόμενη χρήση όλες. Όλες οι παρασκευές πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.



Εικόνα 35: Εργαστηριακή Παρασκευή Βαλσαμελαίου **A:** Δείγματα για τοποθέτηση στο σκοτάδι, **B:** Διήθηση για απομάκρυνση φυτικού υλικού, **C:** Βαλσαμέλαια μετά από εκχύλιση στο σκοτάδι (αριστερά) και στον ήλιο (δεξιά) με ξηρή δρόγη υπέρικου για 40 ημέρες.

3.B.2. Φασματοσκοπική Μελέτη Βαλσαμελαίου με Φασματοσκοπία IR και Raman

Για τη λήψη των υπέρυθρων φασμάτων στο ελαιόλαδο και τα διάφορα δείγματα βαλσαμελαίου, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ATR. Για την τεχνική ATR χρησιμοποιήθηκε το ίδιο όργανο με αυτό της τεχνικής DRIFT, με διαφορετικό/κατάλληλο εξάρτημα. Με την τεχνική αυτή πραγματοποιήθηκε η λήψη των υπέρυθρων φασμάτων στα υγρά εκχυλίσματα του φυτού στο ελαιόλαδο (βαλσαμέλαιο) και στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια μικροπιπέτας (10 – 100 μL) τοποθετήθηκαν 400 μL από κάθε δείγμα, στα πλακίδια ZnSe και ακολούθησε η λήψη του φάσματος. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε τριπλέτες και ανάμεσα σε κάθε τριπλέτα δειγμάτων έγινε λήψη του υποβάθρου (background) με πλακίδιο ZnSe χωρίς προσθήκη δείγματος.

Για την λήψη των φασμάτων με την τεχνική Raman, χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο Raman (FT-Raman), Advantage NIR της εταιρίας DeltaNu. Αρχικά

πραγματοποιήθηκε η βαθμονόμηση του οργάνου με κυκλοεξάνιο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα ισόπαχα φιαλίδια (τύπου NMR) μέχρι τα $\frac{3}{4}$ περίπου του όγκου τους. Στη συνέχεια ακολούθησε η λήψη των φασμάτων, αφού πρώτα έγινε pre-scan σε όλα τα δείγματα.

3.B.3. Φασματοφωτομετρικές Μέθοδοι Ανάλυσης

§ Υπολογισμός Συντελεστών «K» (K_{232} , K_{270} , ΔK)

Στην έρευνά μας, μετρήθηκαν οι συντελεστές K με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού UV-Vis Cary 60 , *Agilent Technologies & V-550, Jasco*.

Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

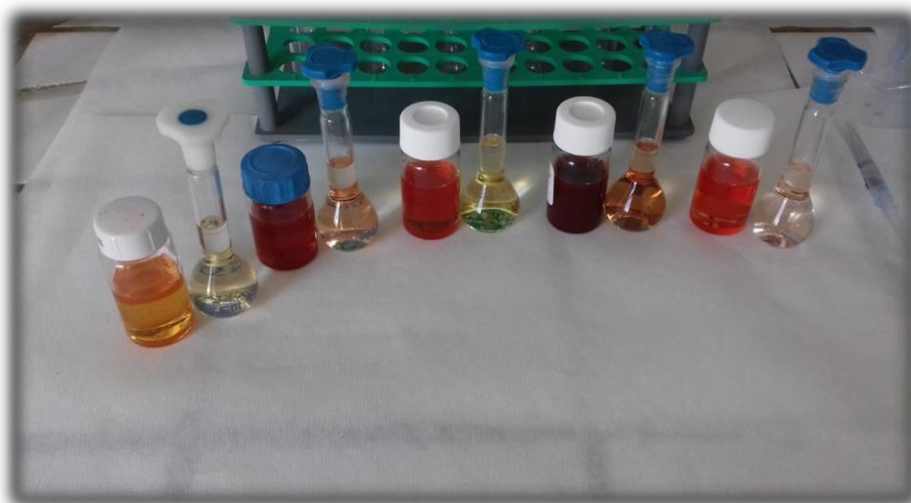
Αρχικά, 0,1 g από το ελαιόλαδο και το βαλσαμέλαιο (διαφόρων παρασκευών – εμπορίου και χειροποίητου), ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με κυκλοεξάνιο καθαρότητας >95%. Για την απορρόφηση στα 232nm απαιτήθηκε αραιώση από 1:4 έως 1:5 με κυκλοεξάνιο με σκοπό να επιτευχθεί τιμή απορρόφησης μεταξύ των επιθυμητών ορίων (0,1-0,8).

Καταγράφονται οι ειδικές αποσβέσεις (συντελεστές αποσβέσεως) στα διάφορα μήκη κύματος, υπολογιζόμενες ως εξής:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

όπου:

K λ : ειδική απόσβεση σε μήκος κύματος λ , **E λ** = απόσβεση μετρηθείσα σε μήκος κύματος λ , **c**: συγκέντρωση του διαλύματος σε g/100 ml,
s: πάχος της κυψελίδας σε cm.



Εικόνα 36: Προετοιμασία Δειγμάτων για μέτρηση Συντελεστών “K” στα βαλσαμέλαια

§ Υπολογισμός Ολικών Υπερικινών (*Total Hypericins Measurement*)

Οι αποχρώσεις του κόκκινου χρώματος στα βαλσαμέλαια που παρασκευάστηκαν, απουσία και παρουσία φωτός, μπορούν άμεσα να συσχετισθούν με το ολικό περιεχόμενο σε υπερικίνες. (*Heinrich et.al., 2017*). Για τον υπολογισμό του περιεχομένου σε ολικές υπερικίνες χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο UV-Vis, Cary 60 , *Agilent Technologies & V-550*, της εταιρείας *Jasco*. Τα βαλσαμέλαια διαλύθηκαν στο έλαιο βάση (έξτρα παρθένο ελαιόλαδο) και μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 590 nm σε κυψελίδα πάχους 1 cm. Το περιεχόμενο σε ολικές υπερικίνες εκφράστηκε σε ισοδύναμα υπερικίνης ανά 100 g ελαϊκού εκχυλίσματος.

3.B.4. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών (GC-MS) – Ελαιόλαδο & Βαλσαμέλαιο

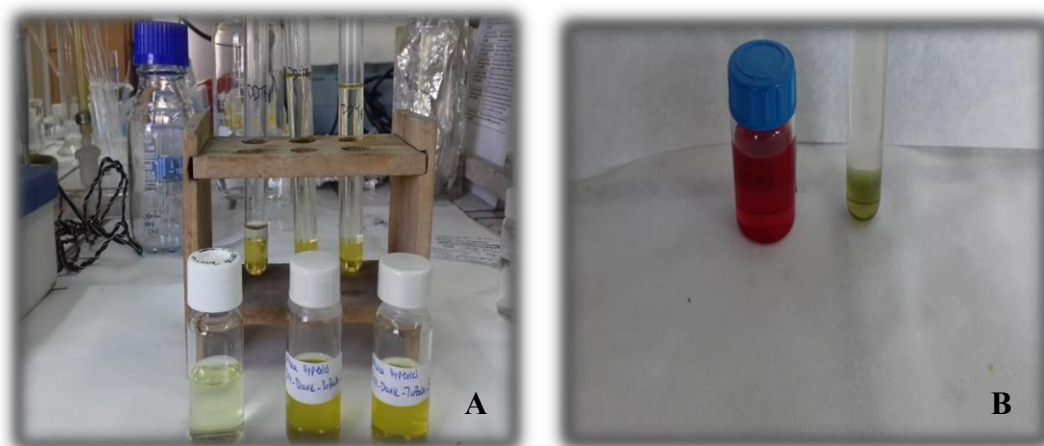
Τα λάδια που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών (GC-MS). Σε αυτά περιλαμβάνεται το ελαιόλαδο (ως μάρτυρας), τα βαλσαμέλαια που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο (από ξηρή δρόγη, στο φως και στο σκοτάδι) και τα εμπορικά βαλσαμέλαια από νωπή δρόγη.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επεξεργασία του δείγματος είναι η μεθυλεστεροποίηση και περιγράφεται παρακάτω:

§ Διαδικασία Μεθυλεστεροποίησης:

Αρχικά, παρασκευάστηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10mL διάλυμα υδροξειδίου του καλίου σε μεθανόλη (2M). Μετά σε δοκιμαστικούς σωλήνες με στεγανό πόμα

προστέθηκε 1mL δείγματος, 2mL KOH και 10 mL εξάνιο 99% καθαρότητας για GC-MS. Ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή vortex για 2-3 min και το δείγμα αφέθηκε να ηρεμήσει για περίπου 10 λεπτά μέχρι να διαχωριστούν καλά οι δύο φάσεις. Αφού το μίγμα έγινε διαυγές παραλήφθηκε το υπερκείμενο (οργανική φάση) και αποθηκεύτηκε σε ειδικά μπουκαλάκια για την περαιτέρω χρήση του. Το δείγμα, αραιώθηκε περαιτέρω σε αναλογία 1:5 με εξάνιο 99% καθαρότητας και σε αυτό προστέθηκε σταθερή ποσότητα εσωτερικού προτύπου γνωστής συγκέντρωσης (δεκανοϊκό οξύ).



Εικόνα 37: Διαδικασία μεθυλεστεροποίησης στα διάφορα βαλσαμέλαια **A:** Βαλσαμέλαιο παρασκευασμένο με ξηρή δρόγη και **B:** Βαλσαμέλαιο εμπορίου, παρασκευασμένο με νωπή δρόγη. Η πάνω φάση είναι η οργανική και αυτή στην οποία πραγματοποιείται η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος (*Trace GC ULTRA*) εφοδιασμένος με ανιχνευτή φασματομέτρο μάζας (*DSQ II*), της εταιρείας Thermo Scientific. Η στήλη του χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν Thermo-5MS (30m x 0,25mm, ID, πάχος φιλμ 0,25μm). Τα φέρον αέριο ήταν ήλιο (He), με ροή 1mL/min.

Οι συνθήκες που συγκρότησαν τη μέθοδό μας ήταν οι εξής:

Αέριος χρωματογράφος:

Αρχική θερμοκρασία: 110°C, με ρυθμό αύξησης 4°C/λεπτό η θερμοκρασία ανέβηκε στους 205°C. Στη συνέχεια, με ρυθμό αύξησης 1°C/λεπτό η θερμοκρασία ανέβηκε στους 215 °C και τέλος, με ρυθμό αύξησης 4°C/λεπτό η θερμοκρασία ανέβηκε στους 250°C όπου και παρέμεινε σταθερή για 15 λεπτά. Συνολικός χρόνος μεθόδου: 57.50 λεπτά, Max temperature (oven): 350 °C, Prep Run Timeout (10.00 min), Equilibration time: 0,10 min., Left SSL: Temperature: 220 °C, Split Flow: 50 mL/min, Splitless time: 1 min, Constant septum: Purge, Mode: Splitless, Left Carrier: Flow-On: 1

mL/min, Flow Mode: Constant flow, Vacuum compensation, Gas Saver-Flow: 25 mL/min, Time: 2 min, Aux Zones-MS Transfer Line: 250 °C

Φασματόμετρο μαζών:

End Run: GC run time, Heated Zones-Ion Source: 240 °C, Acquisition threshold: 0.00, Start time: 4.00 min, Detector gain-Use method: 3.00×10^5 (Multiplier voltage: 1481 V), Scan Mode: Full scan, Mass Range: 50-400, Ions: Positive, Tune-tune file: Autotune (use for entire segment), Emission current: Use tune file (use for entire segment), Total scan time: 0.26 s, Scan time: 0.26 s, Rate: Scans per second: 3,8911, Scan rate (amu/sec): 1491.9, Mass defect (mmu/100 amu): 0.00

Η ταυτοποίηση των συστατικών των ελαίων έγινε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης και των φυσικών μαζών με αυτό των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών *Adams 0,7HP* και *Xcalibur* που υπάρχουν στο λογισμικό *Xcalibur* του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας (*Adams, 4th Edition*). Η ποσοτικοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του εσωτερικού προτύπου και συγκεκριμένα, του δεκανοϊκού οξέος.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.A. Αποτελέσματα Αναλύσεων Φυτού (*Hypericum perforatum L.*)

4.A.1. Αποτελέσματα Φασματοσκοπικής Ανάλυσης FT-IR (DRIFT)

Η υπέρυθη φασματοσκοπία IR έχει χρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλων και για την εξέταση των διαφορών μεταξύ διαφόρων ειδών υπέρικου αλλά και για την εξέταση της βοτανικής διαφοροποίησης του υπέρικου από άλλο φυτικό είδος μέσω του υπέρυθρου φάσματος. Συνολικά, σε μελέτη των Kokalj et. al, εξήντα δείγματα έξι ειδών *Hypericum* (*H. Perforatum*, *H. Hirsutum*, *H. montanum*, *H. Dubium*, *H. Maculatum*, *H. Tetrapterum*) αναλύθηκαν με τέσσερις τρόπους φασματοσκοπίας IR για να αναγνωριστεί ο καλύτερος τρόπος προσδιορισμού του είδους. Διαπιστώθηκε ότι η τεχνική DRIFT και η χρήση του KBr παρείχε τα καλύτερα αποτελέσματα καθώς υπήρχε σωστή ταξινόμηση των ειδών κατά 97%. Τα φάσματα ελήφθησαν στην φασματική περιοχή των κυματαριθμών 450-4000 cm^{-1} με ευκρίνεια 1 cm^{-1} . Η ερευνητική ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η υπέρυθη φασματοσκοπία IR είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό των φυτικών ειδών, αλλά η επιλογή του καλύτερου τρόπου πρέπει να βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτικού υλικού. (Kokalj M et. al., 2011). Οι Zhu et. al. αντίστοιχα, διερεύνησαν 20 κινέζικα είδη *Hypericum* συμπεριλαμβανομένου του *Hypericum perforatum L.* και μπόρεσαν να διακρίνουν τα είδη μεταξύ των άλλων ειδών αλλά δεν συμπεριέλαβαν μερικά από τα συνηθέστερα είδη που υπάρχουν εκτός Κίνας. Το είδος *H. japonicum* (το οποίο θεωρείται ότι χρησιμοποιείται για νοθεία των ειδών) ήταν αυτό που διαχωρίστηκε καλύτερα από όλα τα υπόλοιπα. (Zhu B. et. al. 2003). Κλείνοντας με

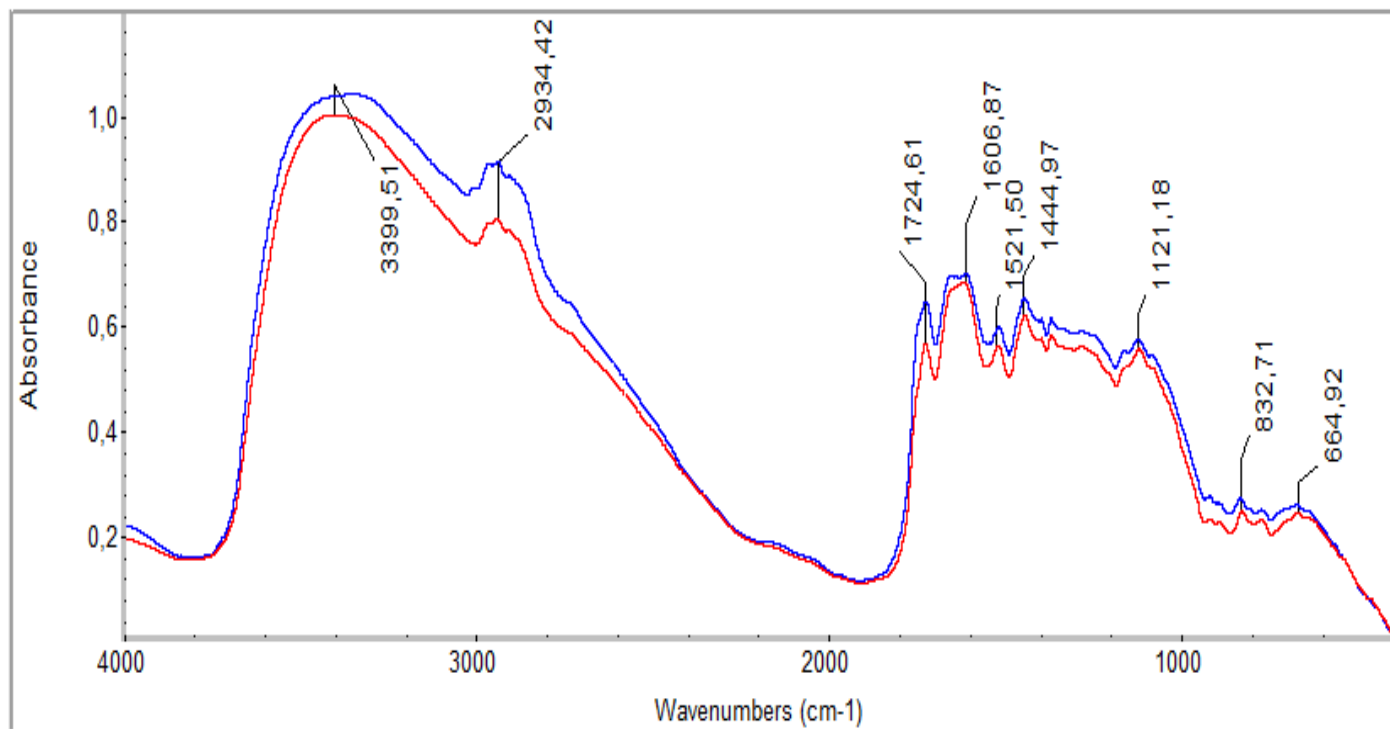
τις βιβλιογραφικές αναφορές, οι Nichita et. al. χρησιμοποίησαν στο πείραμά τους φασματοσκοπικές (UV-VIS-NIR, FT-IR), χημικές και χρωματογραφικές τεχνικές (TLC) και κατάφεραν να αναγνωρίσουν την παρουσία φλαβονοειδών ενώσεων στο *Hypericum perforatum* L. Για τη φασματοσκοπική ανάλυση, χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία UV-VIS-NIR στην περιοχή μήκους κύματος 190-2300 nm ενώ στην φασματοσκοπία FT-IR το εύρος κυματαριθμών 4000-400 cm^{-1} . (Nichita C et. al. 2007). Παρόλα αυτά, η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIRS) η οποία απορροφά και εκπέμπει στο φασματικό εύρος 12.821 – 4000 cm^{-1} και ανιχνεύει τις δονήσεις κυρίως των δεσμών -OH, -CH, -NH, -SH, είναι μια γρήγορη και μη επεμβατική αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε τόσο για την ποιοτική όσο και για την ποσοτική ανάλυση του φυτικού υλικού και συνολικά, έχει εφαρμοστεί σε συνδυασμό με χημειομετρικά στοιχεία πολύ επιτυχώς, στον ποιοτικό έλεγχο του φυτικού υλικού, συμπεριλαμβανομένης της ποσοτικής ανάλυσης χημικών ουσιών του υπέρυθρου. (Roggo Y et. al., 2007, Agarouda A., 2017).

Στην παρούσα μελέτη τα φάσματα FT-IR των βοτάνων που ελήφθησαν χρησιμοποιήθηκαν, κυρίως, για να γίνει όσο το δυνατόν πιο γρήγορα ποιοτικός προσδιορισμός των χαρακτηριστικών ομάδων του κάθε φυτού αξιοποιώντας την ταχύτητα της μεθόδου. Η συνηθισμένη περιοχή συχνοτήτων που χρησιμοποιείται για αναλύσεις ρουτίνας κυμαίνεται από 4000-600 cm^{-1} . Αυτή η περιοχή καλύπτει τις περισσότερες ενδιαφέρουσες δονήσεις μιας οργανικής ουσίας. Σε ένα υπέρυθρο φάσμα διακρίνονται δύο περιοχές: των χαρακτηριστικών ομάδων (4.000-1400 cm^{-1}) και των δακτυλικών αποτυπωμάτων (1400-600 cm^{-1}). Για την αναγνώριση και την απόδοση των κορυφών των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν πίνακες που περιέχουν τις διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες με τους αντίστοιχους κυματαριθμούς.

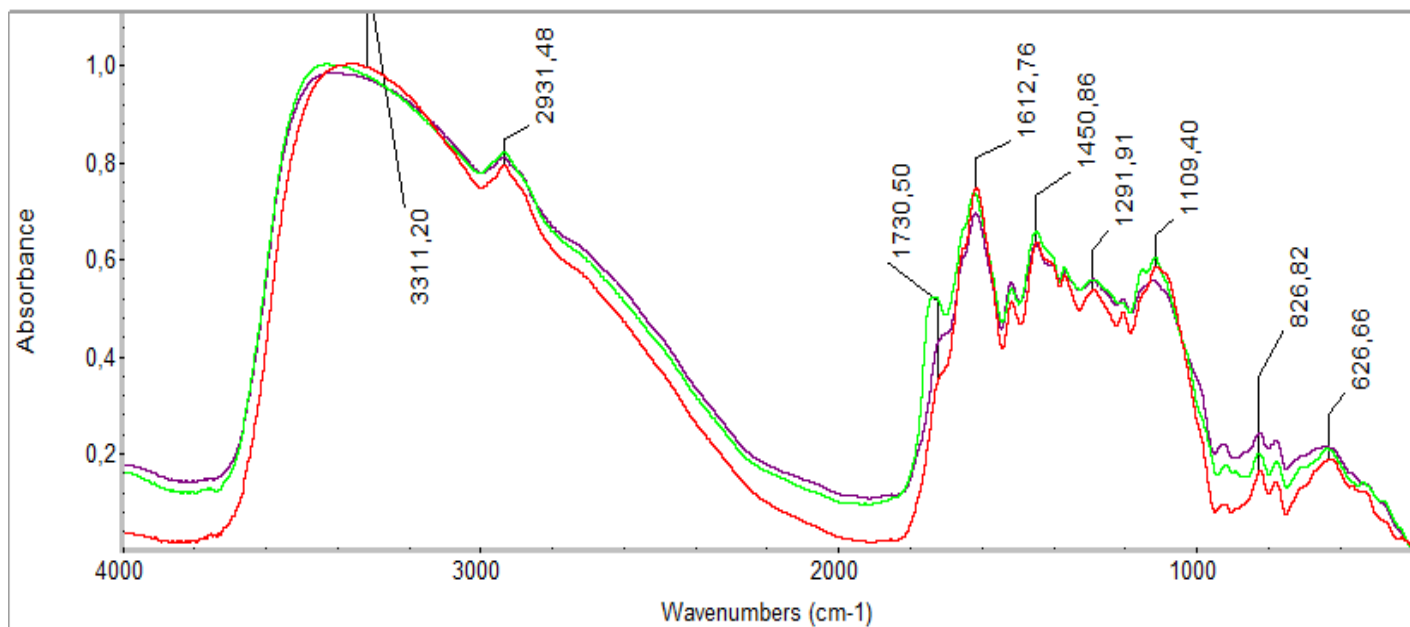
Οι απορροφήσεις στην περιοχή από τα 1800-1500 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις του καρβονυλίου και αρωματικών δακτυλίων. Η περιοχή, που εκτείνεται συνήθως από τα 1800 έως τα 800 cm^{-1} θεωρείται ως δακτυλικό αποτύπωμα του φυτικού υλικού γιατί το προφίλ αλλάζει με βάση την ποιοτική και ποσοτική χημική σύστασή του. Η απορρόφηση γύρω στα 1515 cm^{-1} , οφείλεται στην τάση των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου. Η κορυφή στα 1400 cm^{-1} αποδίδεται στον αρωματικό δακτύλιο και σε συνδυασμό με την εντός επιπέδου κάμψη των -CH₂-, και -CH₃ καθώς στη δόνησης τάσης του C-O, και της παραμόρφωσης του O-H. Στα 1280 cm^{-1} αποδίδεται η εντός επιπέδου κάμψη του -OH, ενώ στα 1120 cm^{-1} η δόνηση τάσης του C-O των εστέρων. Τέλος, οι απορροφήσεις στα 1100 cm^{-1} και 1080 cm^{-1} αναφέρονται στις σκελετικές δονήσεις των -C-OH και -C-O-C των δακτυλίων της πυρανόξης των σακχάρων. Εξαιρείται η περιοχή που καταγράφεται το -OH περίπου 3300 cm^{-1} (πλατειά κορυφή) γιατί επηρεάζεται καθοριστικά από την υγρασία του δείγματος και την ατμόσφαιρα και εφόσον όλα τα δείγματα έχουν υγρασία θα τα αναγνώριζε ως όμοια. Παρατηρείται επίσης η περιοχή 2362, 2335 cm^{-1} που οφείλεται στο CO₂ της ατμόσφαιρας.

Όπως αναφέραμε και στο πειραματικό μέρος, για κάθε δείγμα λήφθηκαν 5 διαφορετικά φάσματα τα οποία επεξεργαστήκαμε με τη βοήθεια του λογισμικού OMNIC 8.2 με σκοπό να πάρουμε για κάθε δείγμα το καλύτερο δυνατό. Τελικά, από τα 5 φάσματα κάθε δείγματος πήραμε το μέσο φάσμα και πραγματοποιήσαμε τις αντίστοιχες συγκρίσεις που παρουσιάζονται παρακάτω. Τα φάσματα που βλέπουμε αντιστοιχούν σε υπέρυθρο φάσμα ξηρής δρόγης αλλά και λειοφυλιωμένων

εκχυλισμάτων υπέρικου (αφέψημα, υδρομεθανολικό εκχύλισμα και αποσμωμένο υδρόλυμα σφαιρικής κατά την υδροαπόσταξη αιθερίου ελαίου).



Σχήμα 3: Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων και βασικών κορυφών απορρόφησης, ξηρής δρόγης υπέρικου από διαφορετικούς παραγωγούς. **Κόκκινο Χρώμα:** “VRINO”, **Μπλε χρώμα:** “Το Βάλσαμο”.



Σχήμα 4: Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων και βασικών κορυφών απορρόφησης, διαφορετικών λειοφυλιωμένων εκχυλισμάτων υπέρικου από τον παραγωγό “Το Βάλσαμο”. Με **κόκκινο χρώμα:** Αφέψημα, Με **πράσινο χρώμα:** Αποσμωμένο υδρόλυμα σφαιρικής και με **Μωβ χρώμα:** Υδρομεθανολικό εκχύλισμα υπέρικου.

Με μία πρώτη ματιά στο πρώτο διάγραμμα παρατηρούμε ότι μεταξύ δύο διαφορετικών δειγμάτων του ίδιου φυτικού είδους, από άλλον παραγωγό, εμφανίζεται παραλλακτικότητα στο υπέρυθρο φάσμα σε συγκεκριμένες περιοχές, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο από τη στιγμή που όταν αναφερόμαστε σε υπέρυθρο φάσμα μιλάμε ουσιαστικά για ένα «δακτυλικό αποτύπωμα του φυτού». Το στοιχείο αυτό επιβεβαιώνει με τη σειρά του τις βιβλιογραφικές αναφορές που αναφέρουν την ικανότητα της διαφοροποίησης μεταξύ ειδών αλλά και μεταξύ του ίδιου είδους βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών ή καλλιεργητικών τεχνικών. Παρόλα αυτά, στο δεύτερο διάγραμμα οι διαφορές είναι εμφανέστερες καθώς εδώ βλέπουμε 3 διαφορετικά εκχυλίσματα του ίδιου φυτού με άλλον διαλύτη. Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση και στα δύο διαγράμματα σύγκρισης φασμάτων, παρουσιάζεται στην περιοχή των κυματηρίθμων $1700 - 1100 \text{ cm}^{-1}$, δηλαδή, μέσα στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος.

4.A.2. Αποτελέσματα Χρωματογραφικής Ανάλυσης με GC-MS

Με την αέρια χρωματογραφία αναλύθηκε η χημική σύσταση **α)** του αιθέριου ελαίου, και **β)** του οργανικού μέρους του αφεψήματος που παραλάβαμε μετά από εκχύλιση.

Αρχικά για το αιθέριο έλαιο η σύσταση παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες:

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	“Το Βάλσαμο” Περιεκτικότητα(%)	SDTV1	“VRINO” Περιεκτικότητα(%)	SDTV2
2-μέθυλο-οκτάνιο	17,09	11,13	2,41	3,04
νονάνιο	1,33	0,23	0,76	0,76
α-πινένιο	24,47	13,75	4,92	6,32
3-μέθυλο-νονάνιο	3,76	3,02	1,07	1,07
β-πινένιο	5,35	3,35	2,43	2,43
(E)-β-οκιμένιο	2,08	0,81	0,33	0,33
2-μέθυλο-δεκάνιο	4,12	3,13	1,39	1,44
(Z)-οξείδιο της λιναλοόλης	0,76	0,76	ND	ND
(E)-οξείδιο της λιναλοόλης	0,56	0,33	ND	ND
εντεκάνιο	1,29	0,59	0,75	0,75
βορνεόλη	0,42	0,02	0,10	0,10
α-τερπινεόλη	0,79	0,38	0,12	0,02
2-μέθυλο-δωδεκάνιο	1,02	0,45	0,55	0,38

Θυμόλη	0,16	0,07	10,80	2,6
καρβακρόλη	1,10	0,51	4,78	3,12
α-υλανγκένιο	0,57	0,25	0,49	0,27
α-κοπαένιο	1,68	0,73	0,73	0,20
νέο-ιντερμεδεόλη	ND	ND	0,68	0,38
(E)-καρνοφυλλένιο	15,82	6,81	16,07	1,39
β-κοπαένιο	0,49	0,22	0,45	0,02
άλλο-αρωμαδενδρένιο	0,69	0,30	0,45	0,30
2-methyl-butyl-benzoate	0,69	0,30	0,33	0,30
(E)-β-φαρνεσένιο	4,75	2,03	6,31	0,54
α-χουμουλένιο	0,55	0,23	0,67	0,04
α-χιμαχαλένιο	ND	ND	2,32	1,84
γ-μουρολένιο	3,97	1,79	4,28	0,68
γ-χιμαχαλένιο	2,00	1,35	2,00	2,00
γερμακρένιο-D	1,65	1,01	1,66	0,25
φαρνεσόλη	0,91	0,91	ND	ND
β-σελινένιο	1,60	0,80	5,86	1,93
α-σελινένιο	0,40	0,15	5,13	1,63
α-μουρολένιο	0,63	0,34	ND	ND
γ-καδινένιο	2,14	0,97	1,45	0,18
δ-καδινένιο	3,19	1,38	2,32	0,24
(Z)-καλαμενένιο	1,13	0,56	0,63	0,14
α-καδινένιο	0,53	0,26	0,37	0,26
α-καλακορένιο	1,23	1,04	0,31	1,04
(E)-νερολιδόλη	0,84	0,08	0,88	0,22
σπαθουλενόλη	1,55	1,59	1,61	0,58
οξείδιο του καρνοφυλλενίου	5,83	2,94	4,75	1,97
λεδόλη	0,51	0,33	ND	ND
α-καδινόλη	0,75	0,66	1,34	0,33
ν-τετραδεκανόλη	1,59	1,14	3,15	0,68
6,10,14-τριμεθυλο-2-πενταδεκανόνη	0,75	0,37	0,38	0,15
νοναδεκάνιο	0,61	0,27	ND	ND
Heneicosane	0,76	0,34	0,17	0,04

Πίνακας 3: Σύσταση αιθερίου ελαίου υπέρικου

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνουμε αρχικά ότι μεταξύ δύο δειγμάτων υπέρικου από άλλον παραγωγό οι διαφορές είναι αρκετά μεγάλες αλλά εξίσου μεγάλες είναι και οι διαφορές μεταξύ στο αιθέριο έλαιο που προέρχεται από το ίδιο δείγμα αλλά από διαφορετικές αποστάξεις (τυπική απόκλιση τριπλέτας).

Αρχικά, κάποια συστατικά του αιθερίου ελαίου εμφανίζονται μόνο στο δείγμα από τον παραγωγό “Το Βάλσαμο” και αυτά είναι το (*E*)-, (*Z*)- οξείδιο της λιναλοόλης, η φαρνεσόλη, το α -μουουρολένιο, η λεδόλη και το νοναδεκάνιο (συστατικά με ανοιχτή πράσινη σήμανση στον πίνακα). Λιγότερα αλλά υπαρκτά είναι και τα συστατικά που υπάρχουν μόνο στο δείγμα από τον παραγωγό “Vrino” και απουσιάζει από το δείγμα του άλλου παραγωγού. Αυτά είναι η νεο-ιντερμεδεόλη και το α -χιμαχαλένιο (συστατικά με ανοιχτή μωβ σήμανση στον πίνακα).

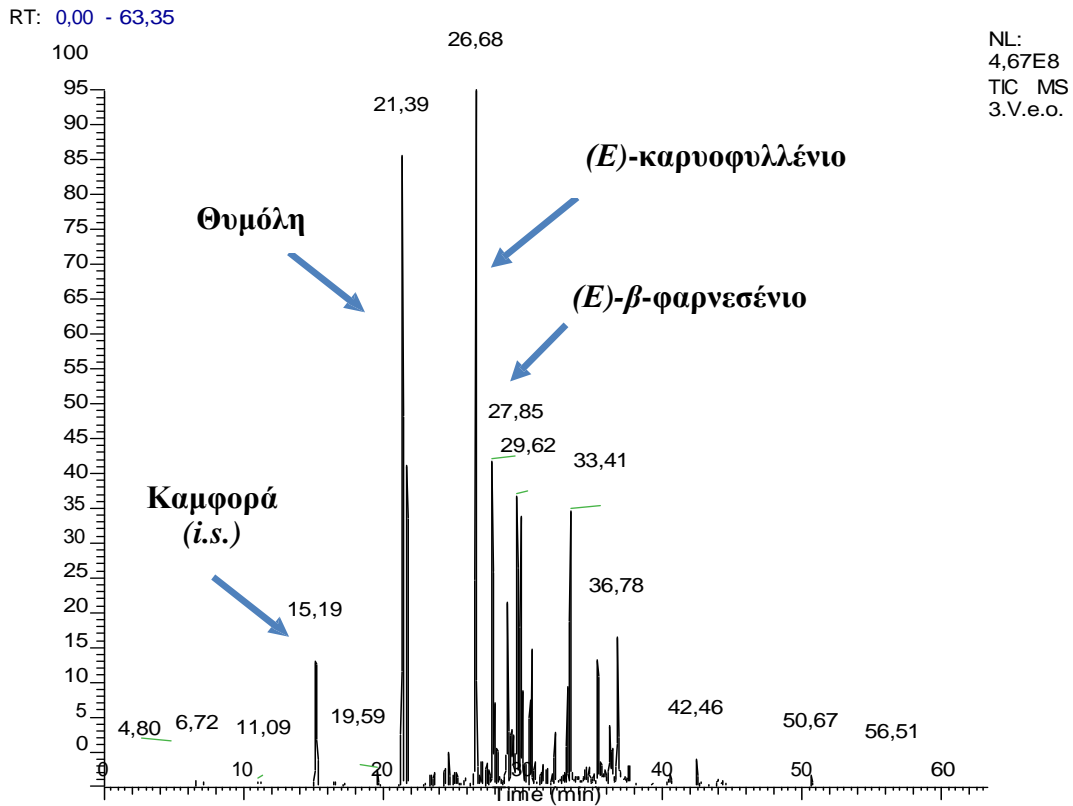
Όσον αφορά τα συστατικά με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα για κάθε δείγμα, αυτά παρουσιάζουν και διαφορές και ομοιότητες. Πιο συγκεκριμένα, για το δείγμα του παραγωγού “Το Βάλσαμο”, τα σημαντικότερα συστατικά του αιθερίου ελαίου είναι: Το α -πινένιο με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ίση με 24,47% και ακολουθούν το 2-μέθυλο-οκτάνιο (17,09%), το (*E*)-καρνοφυλλένιο (15,82%), το οξείδιο του καρνοφυλλενίου (5,83%), το β -πινένιο (5,35%), το (*E*)- β -φαρνεσένιο (4,75%) και το γ -μουουρολένιο (3,97%). Αντίστοιχα, για το δείγμα του παραγωγού “Vrino”, τα σημαντικότερα συστατικά του αιθερίου ελαίου είναι: το (*E*)-καρνοφυλλένιο με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ίση με 16,07% και ακολουθούν η θυμόλη (10,80%), το (*E*)- β -φαρνεσένιο (6,31%), το α -πινένιο (4,92%), η καρβακρόλη (4,78%) και το 2-μέθυλο-οκτάνιο (2,41%). Όλα τα συστατικά με την υψηλότερη περιεκτικότητα στα δύο δείγματα, εμφανίζονται με μία ελαφρά ροζ σήμανση στον πίνακα.

Τα πιο σταθερά συστατικά που εμφάνισαν τη μικρότερη τυπική απόκλιση (< 0,2%) μεταξύ των ποσοστών περιεκτικότητας των αιθέριων ελαίων που προέκυψαν από τις τρεις διαφορετικές αποστάξεις είναι: η βορνεόλη, η θυμόλη, η (*E*)-νερολιδόλη, το α -σελινένιο και το β -κοπαένιο για το δείγμα από τον παραγωγό “Το Βάλσαμο” και η α -τερπινεόλη, το β -κοπαένιο, το α -χιμαχαλένιο, το δ -καδινένιο και το ενεικοσάνιο για το δείγμα από τον παραγωγό “Vrino”.

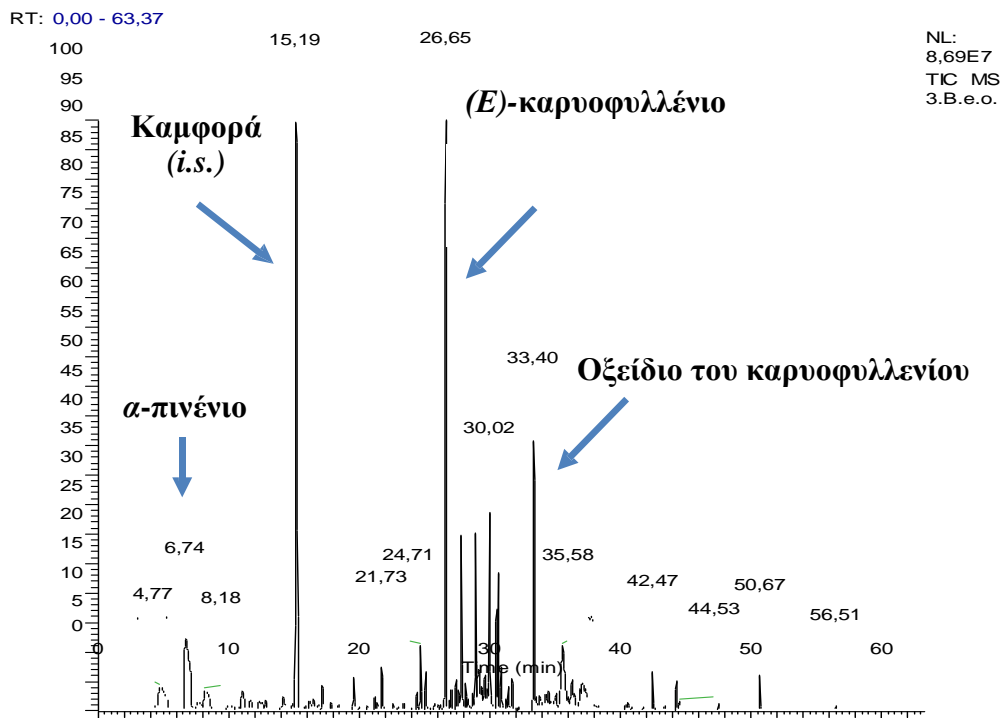
Όσον αφορά τα συστατικά που παρουσίασαν τις μεγαλύτερες διαφορές στην περιεκτικότητα ανάμεσα στα δύο διαφορετικά δείγματα, αυτά είναι: το 2-μέθυλο-οκτάνιο που βρέθηκε περίπου κατά 20% υψηλότερο σε περιεκτικότητα στο δείγμα “Το Βάλσαμο” από ότι στο “Vrino”, το α -πινένιο με διαφορά που άγγιξε το 15% μεταξύ των δύο δειγμάτων, η θυμόλη που βρέθηκε σε περιεκτικότητα 10% στο δείγμα “Vrino” ενώ σε σχεδόν μηδενική περιεκτικότητα στο δείγμα “Το Βάλσαμο” καθώς και το β -πινένιο, η καρβακρόλη και τα α -, β -σεληνένιο.

Τέλος, τα συστατικά που βρέθηκαν σε όμοιες περιεκτικότητες και στα δύο δείγματα και ανήκουν και στα σημαντικότερα της σύστασης των αιθέριων ελαίων του υπέρικου είναι: το (*E*)-καρνοφυλλένιο, το (*E*)- β -φαρνεσένιο, το γ -μουουρολένιο, το γ -

χιμαχάλενιο, το γερμακρένιο-*D*, το γ -καδινένιο, το δ -καδινένιο, η σπαθουλενόλη, η ν -τετραδεκανόλη και το οξείδιο του καρνοφυλλενίου (Συστατικά με ελαφρά γαλάζια σήμανση στον πίνακα).



Σχήμα 5: Αέριο Χρωματογράφημα Αιθερίου Ελαίου “Vrino” (3.V)



Σχήμα 6: Αέριο Χρωματογράφημα Αιθερίου Ελαίου “Το Βάλσαμο” (3.B)

Ακολουθεί η σύσταση του οργανικού μέρους του αφεψήματος υπέρικου:

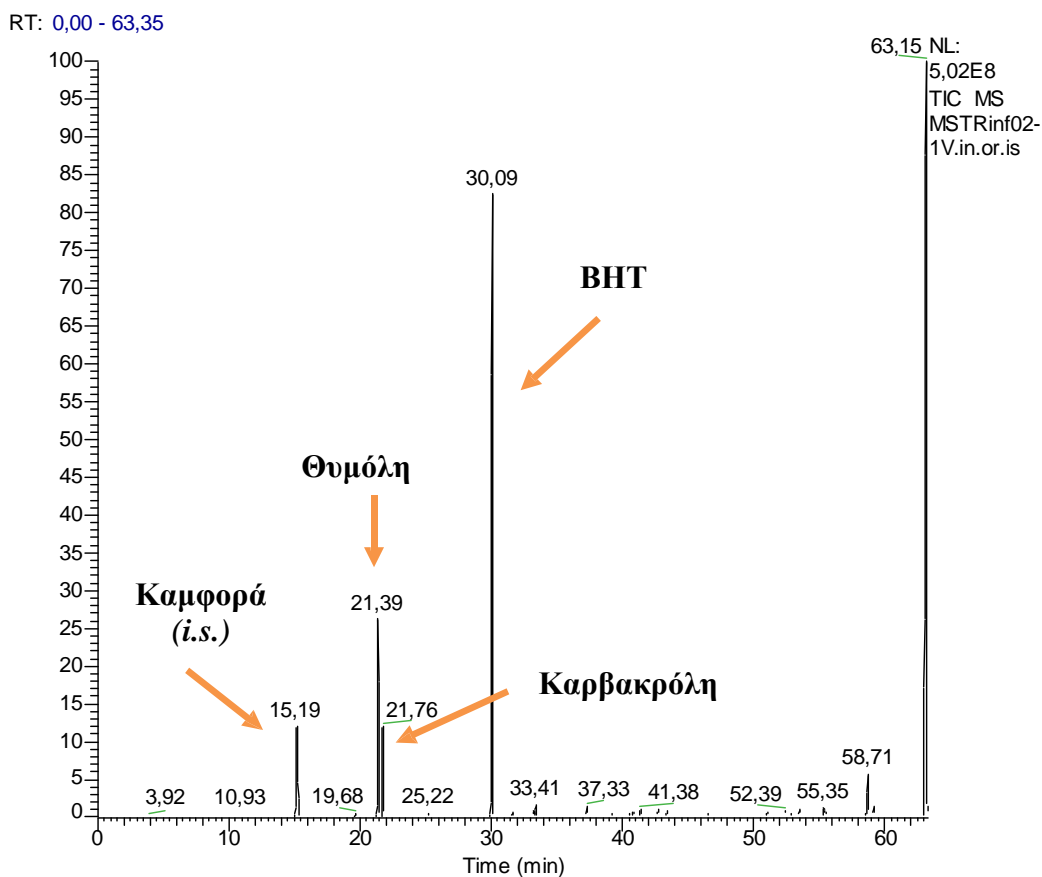
A/A	Συστατικό				
		Vrino (%)	SDTV1 (%)	“Το Βάλσαμο” (%)	SDTV2 (%)
1	Εξανοϊκό οξύ	3.54	1.08	7.4	0,31
2	(E)-οξείδιο της λιναλοόλης	ND	ND	3.7	3.38
3	(Z)-οξείδιο της λιναλοόλης	ND	ND	1.4	0.91
4	Βενζοϊκό οξύ	2.51	1.09	ND	ND
5	4-τερπινεόλη	1.07	0.17	3.0	0.41
6	Βερμπενόνη	ND	ND	1.50	0.80
7	Θυμοκινόνη	0.59	0.10	ND	ND
8	Θυμόλη	41.72	4.72	0.90	0.13
9	Καρβακρόλη	21.40	0.88	4.30	1.43
10	(E)-καρνοφυλλένιο	0.84	0.02	0.17	0.90
11	2,6, δι-βουτυλ-βενζοκινόνη	0.71	0.08	1.40	0.49
12	Δι-υδρο-ακτινιδιολίδιο	0.91	0.06	6	2.05
13	Σπαθουλενόλη	1.67	0.19	2.7	1.11
14	Οξείδιο του καρνοφυλλενίου	3.20	0.44	4.7	2.43
15	Δεκαεξάνιο	ND	ND	3.0	1.22
16	Ισο-λονγκιφολόλη	1.99	0.23	0.81	0.55
17	Οπλοπανόνη	0.97	0.12	1.5	0.45
18	Δεκαεξανοϊκό οξύ	1.41	0.62	3.2	1.65

Πίνακας 4: Σύσταση οργανικού μέρους αφεψήματος υπέρικου

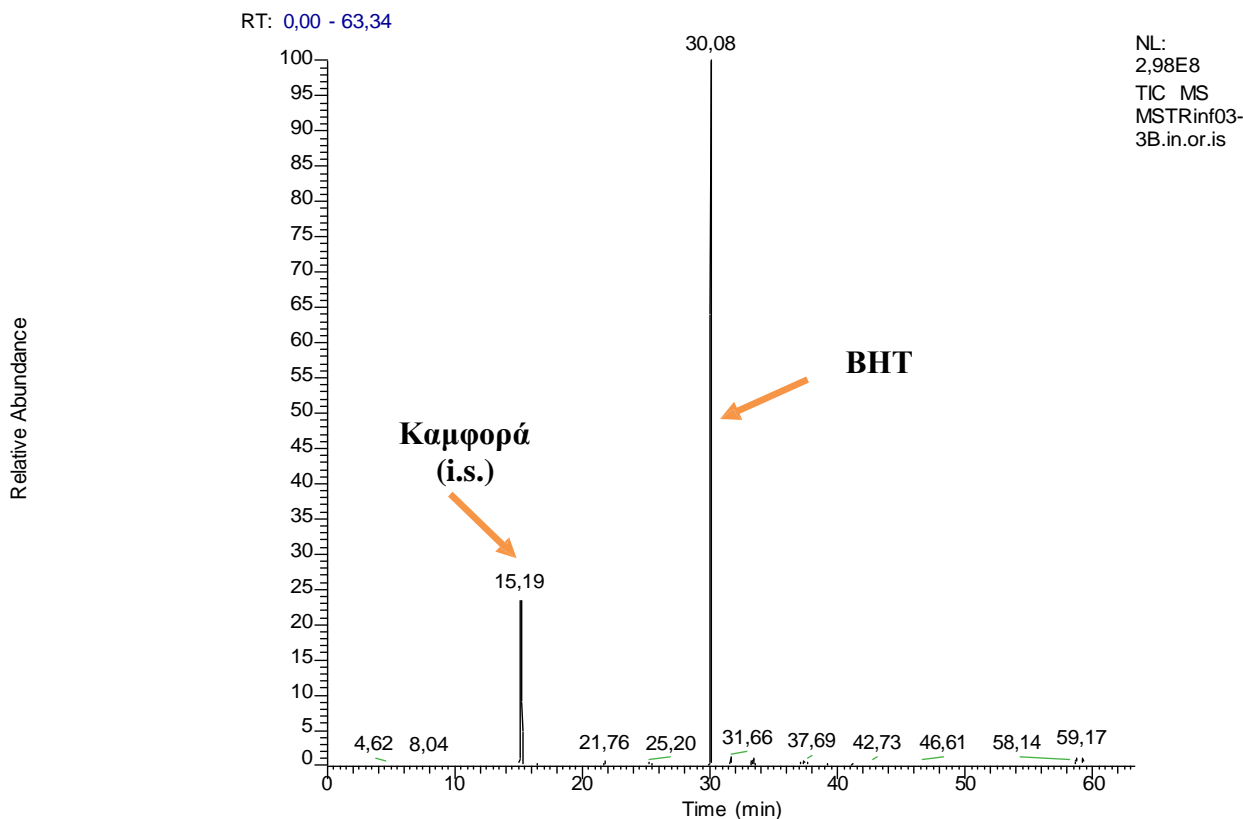
Αρχικά από τον παραπάνω πίνακα συμπεραίνουμε ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην σύσταση του οργανικού μέρους του αφεψήματος υπέρικου ανάμεσα στα δύο διαφορετικά δείγματα των παραγωγών “Vrino” και “Το Βάλσαμο”. Επί παραδείγματι, υπάρχουν συστατικά τα οποία συναντάμε αποκλειστικά και μόνο στο ένα από τα δύο δείγματα. Τα συστατικά αυτά για το δείγμα του παραγωγού “Vrino” είναι: τα (E)- και (Z)-οξείδιο της λιναλοόλης, η βερμπενόνη και το δεκαεξάνιο (συστατικά με ελαφριά ροζ σήμανση στον πίνακα) και αντίστοιχα, για το δείγμα του παραγωγού “Το Βάλσαμο”, το βενζοϊκό οξύ και η θυμοκινόνη (συστατικά με αλαφρά πράσινη σήμανση στον πίνακα).

Εν συνεχεία, αναλύοντας λίγο περαιτέρω τις μετρήσεις μας παρατηρούμε ότι για το δείγμα από τον παραγωγό “Το Βάλσαμο” το συστατικό με την υψηλότερη περιεκτικότητα είναι το εξανοϊκό οξύ και ακολουθούν η 4-τερπινεόλη, το οξείδιο του καρνοφυλλενίου και το δεκαεξανοϊκό οξύ (συστατικά με ελαφριά μωβ σήμανση στον πίνακα) ενώ για το δείγμα από τον παραγωγό “Vrino” τα συστατικά με την υψηλότερη περιεκτικότητα είναι η θυμόλη και η καρβακρόλη (συστατικά με ελαφρά πορτοκαλί σήμανση στον πίνακα).

Τέλος, σε γενικές γραμμές τα συστατικά που εντοπίζονται και στα δύο δείγματα δεν εμφανίζουν σημαντική διαφοροποίηση στις τιμές της περιεκτικότητας ανά συστατικό, με μόνη εξαίρεση τη θυμόλη και την καρβακρόλη που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση και ανάμεσα στα δείγματα της τριπλέτας κάθε δείγματος όσο και ανάμεσα στα δύο διαφορετικά δείγματα των δύο παραγωγών αλλά η πολύ χαμηλότερη περιεκτικότητα των συστατικών των δειγμάτων από τον παραγωγό “Το Βάλσαμο” με αποτέλεσμα να μην είναι, σε ορισμένες περιπτώσεις, εμφανή στα χρωματογραφήματα (Βλέπε Σχήμα 8).



Σχήμα 7: Αέριο Χρωματογράφημα Οργανικού Μέρους Αφεψήματος “Vrino” (1.V)



Σχήμα 8: Αέριο Χρωματογράφημα Οργανικού Μέρους Αφεψήματος “Το Βάλσαμο” (3.B)

4.A.3. Αποτελέσματα Ελέγχων Βιοδραστικότητας & Τοξικότητας

§ Υπολογισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών (TPC)

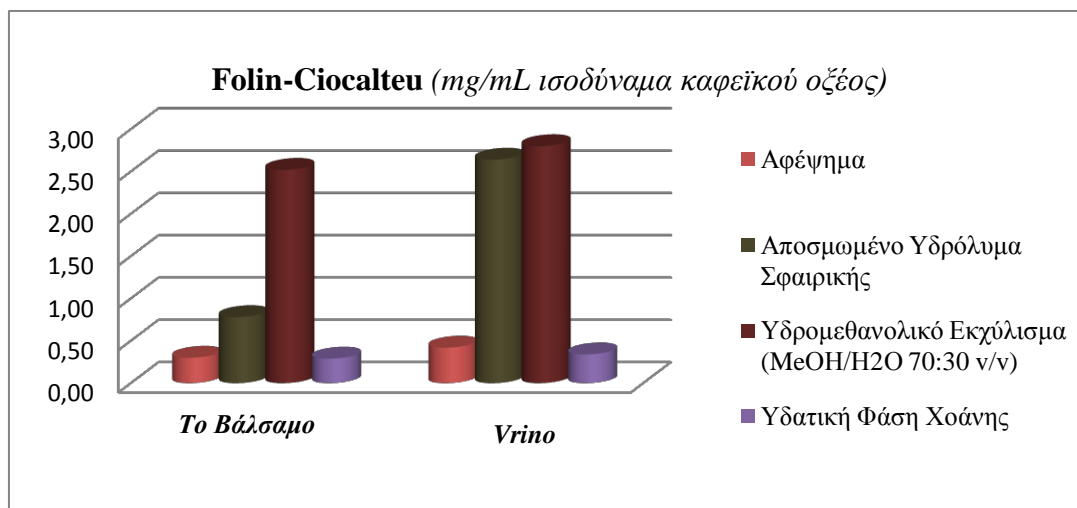
Τα εκχυλίσματα του υπέρικου που παρασκευάστηκαν, όπως περιγράφεται στο πειραματικό μέρος της εργασίας, μελετήθηκαν ως προς το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/mL) σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που παρασκευάστηκε με καφεϊκό οξύ σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα καθώς και διαγραμματικά στην συνέχεια.

Δείγμα	M.O. Absorbance	mg/mL ισοδύναμα καφεϊκού οξέος	mg/mL ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (Βάσει αραίωσης)	mg/200mL ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (ανά κούπα αφεψήματος)
Αφέψημα "Το Βάλσαμο"	0,164	0,30	0,30	60,02
Αφέψημα "Vrino"	0,264	0,42	0,42	83,28
Αποσμωμένο Υδρόλυμα Σφαιρικής "Το	0,580	0,78	0,78	-

Βάλσαμο"				
Αποσπασμένο Υδρόλυμα Σφαιρικής "Vrino"	0,476	0,66	2,64	-
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα (MeOH/H ₂ O 70:30 v/v) "Το Βάλσαμο"	0,445	0,63	2,52	-
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα (MeOH/H ₂ O 70:30 v/v) "Vrino"	0,509	0,70	2,80	-
Υδατική Φάση Χοάνης "Το Βάλσαμο"	0,151	0,29	0,29	57,09
Υδατική Φάση Χοάνης "Vrino"	0,202	0,34	0,34	68,91

Πίνακας 5: Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο εκχυλισμάτων υπέρικου

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα καθώς και το αποσπασμένο υδρόλυμα σφαιρικής της εταιρείας "Vrino" αραιώθηκαν σε αναλογία 1:4 καθώς η τιμή της απορρόφησης στο μη αραιωμένο εκχύλισμα ήταν αρκετά πάνω από την τιμή "1". Τα εκχυλίσματα της εταιρείας "Το Βάλσαμο" φαίνεται να είναι μερικώς πιο πλούσια σε φαινολικά συστατικά από αυτά της εταιρείας "Vrino" χωρίς όμως να εμφανίζουν κάποια αξιοσημείωτη διαφοροποίηση. Συγκριτικά, τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα είναι πολύ πιο πλούσια σε φαινολικά συστατικά από όλες τις παραλαβές. Ακολουθεί το αποσπασμένο υδρόλυμα της σφαιρικής κατά την υδροαπόσταξη, το αφέψημα και τέλος η υδατική φάση της χοάνης. Η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά στο αφέψημα και την υδατική φάση της χοάνης είναι σχεδόν ίση. Για τα αφεψήματα και την υδατική φάση της χοάνης πραγματοποιήθηκε και αναγωγή στα 200 mL αφεψήματος για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών ανά κούπα αφεψήματος. Η συγκριτική απεικόνιση των τεσσάρων παραλαβών σε σχέση με το φαινολικό τους περιεχόμενο απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση Ολικού φαινολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων Υπέρικου σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/mL)

§ Υπολογισμός τοξικότητας

Όλα μας τα δείγματα ήταν σε μορφή λυοφυλιωμένου εκχυλίσματος. Ανάλογα με τις ενδείξεις δραστηριότητας των εκχυλισμάτων που λάβαμε από τις δοκιμές Folin-Ciocalteu και DPPH, εφαρμόστηκαν κατάλληλες αναλογίες εκχυλίσματος:νερού για την ανάλυση των δειγμάτων. Η μεγαλύτερη αναλογία εφαρμόστηκε στο αφέψημα ενώ στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε αρκετά μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για τις μετρήσεις. Συγκεκριμένα, για τα αφεψήματα η πρωταρχική αναλογία αραιώσης ήταν 0,5/10, για τα αποσσωμένα εκχυλίσματα της σφαιρικής ήταν 0,1/10 και τέλος για τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα 0,05/10. Στη συνέχεια, έγιναν οι κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις (5 στο σύνολο) και επιτεύχθηκε το EC₅₀ χωρίς να απαιτείται επεξεργασία των δεδομένων.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

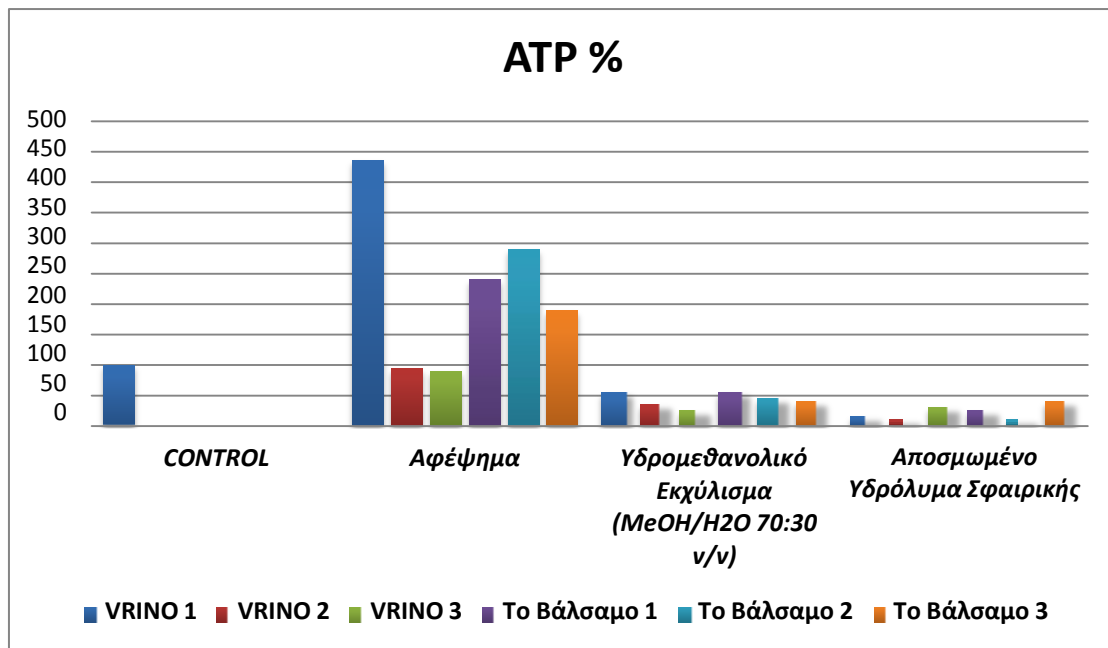
Εκχύλισμα Υπέρικου	EC ₅₀	
	5' min	15' min
Αφέψημα		
«Vrino»	70,76%	69,56%
«Το Βάλσαμο»	54,18%	45,95%
Αποσσωμένο υδρόλυμα σφαιρικής		
«Vrino»	40,16%	30,32%
«Το Βάλσαμο»	40,60%	30,74%
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα		
«Vrino»	44,63%	38,21%
«Το Βάλσαμο»	35,26%	27,25%

Πίνακας 6: Παρουσίαση τιμών EC₅₀ εκχυλισμάτων στα 5' και 15' min

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, υψηλότερη ένδειξη τοξικότητας από όλες τις παραλαβές έδωσε το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του φυτικού υλικού και των δύο παραγωγών – εμπόρων. Στη συνέχεια ακολούθησε το αποσσωμένο υδρόλυμα της σφαιρικής και τέλος τη χαμηλότερη ένδειξη τοξικότητας έδωσε το αφέψημα του υπέρικου από το φυτικό υλικό και των δύο παραγωγών.

§ Υπολογισμός Κυτταροτοξικότητας

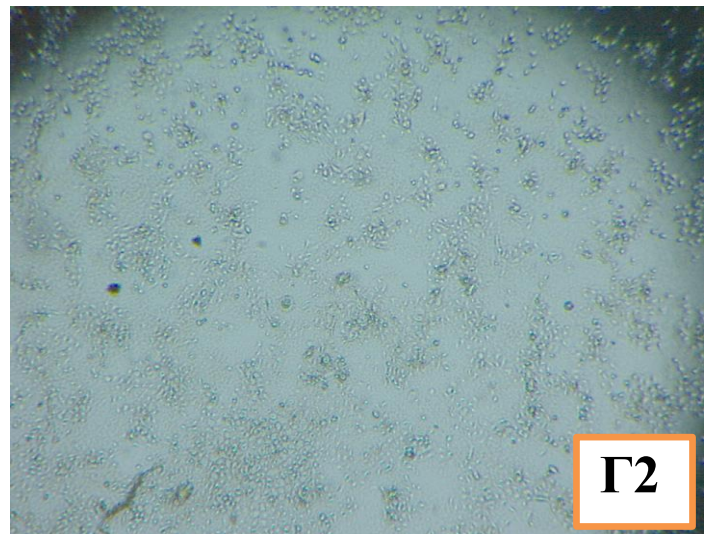
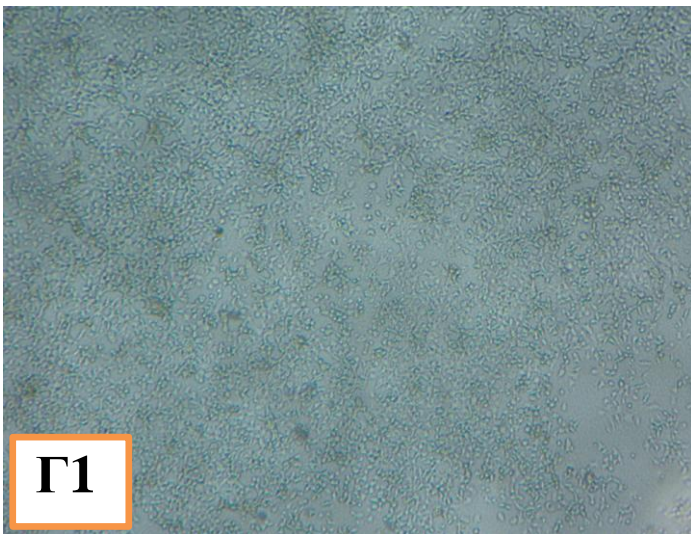
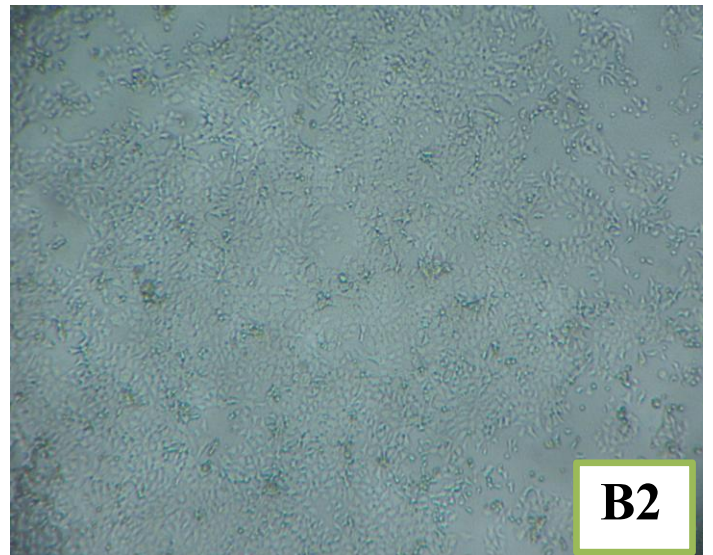
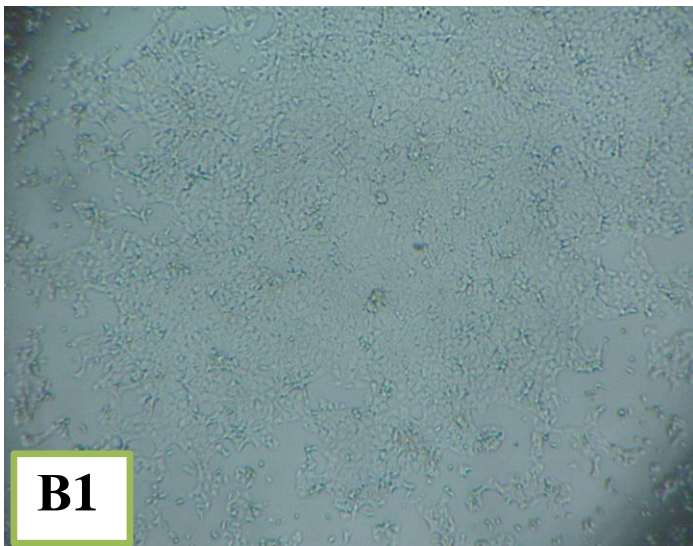
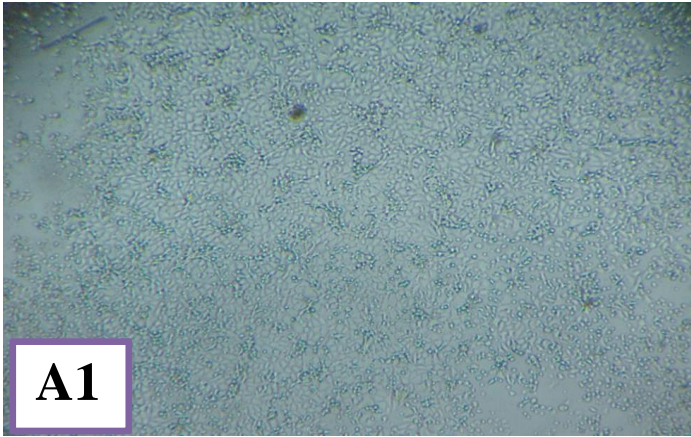
Όπως αναφέραμε και στην παραπάνω ενότητα, ο προσδιορισμός του ATP βασίστηκε στο τεστ Βιοδοκιμών ViaLight HS BioAssay Kit της εταιρείας Lonza και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το φωτόμετρο GloMax 20/20 single-tube luminometer (Promega) μετά από 24 ώρες επώασης των κυττάρων με τα εκχυλίσματα του φυτού. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:

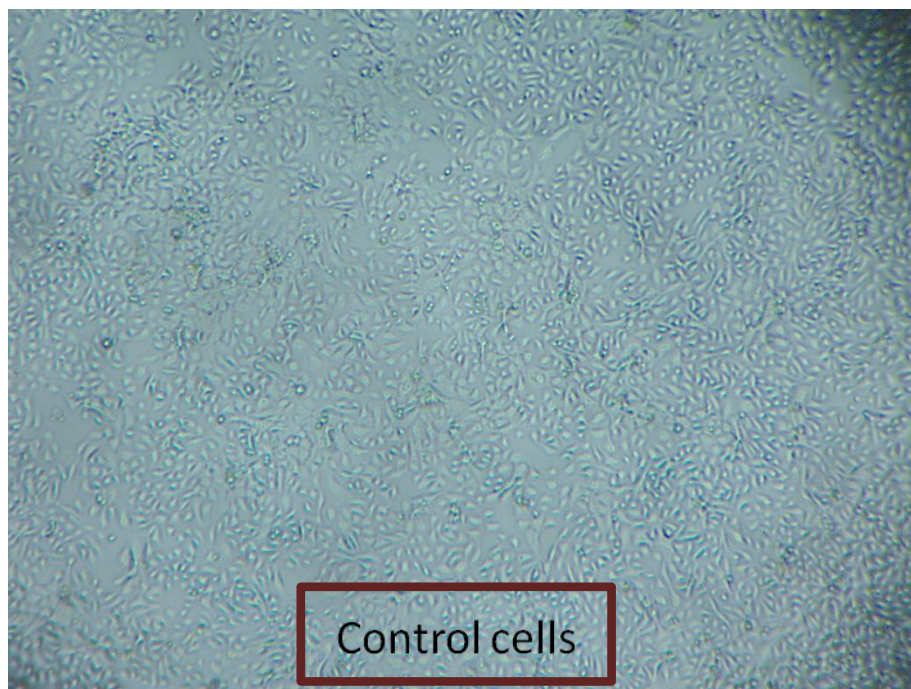


Σχήμα 10: Μέτρηση παραγωγής ATP μετά από εφαρμογή διαφόρων εκχυλισμάτων υπέρικου σε πρωτογενή ανθρώπινα δερματικά κερατινοκύτταρα NHEK και επώασή τους για 24 h.

Όπως ήδη γνωρίζουμε, οποιαδήποτε μορφή κυτταρικής βλάβης έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων ATP, επίσης η αύξηση του ποσοστού των νέων – αναγεννημένων κυττάρων είναι ανάλογη με την αύξηση των επιπέδων του κυτταροπλασματικού ATP. Έτσι όπως γίνεται φανερό από το παραπάνω διάγραμμα, η μεγαλύτερη αναστροφή – μείωση των επιπέδων της κυτταρικής βλάβης έχει επιτευχθεί μετά την επώαση των κυττάρων με αφέψημα υπέρικου ενώ αντιθέτως, μετά την εφαρμογή των υπόλοιπων εκχυλισμάτων διαπιστώνουμε πολύ μικρή διαφορά στα επίπεδα της κυτταρικής βλάβης σε σχέση με τον μάρτυρα.

§ Αποτελέσματα Μικροσκοπικής Παρατήρησης Επουλωτικής Δράσης

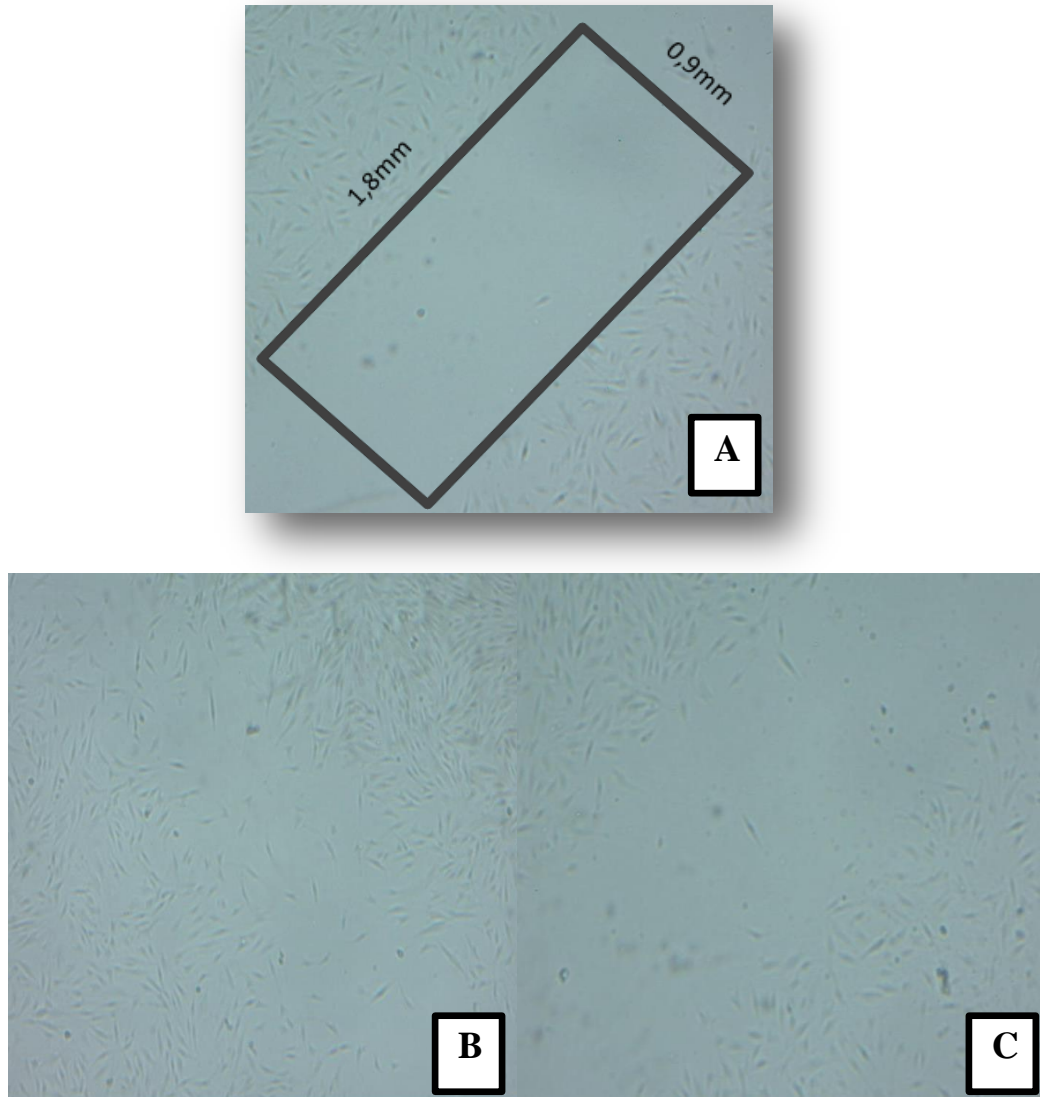




Εικόνα 38: Μικροσκοπική παρατήρηση επουλωτικής δράσης εκχυλισμάτων υπέρικου μετά από εφαρμογή τους σε τομή πρωτογενών ανθρώπινων δερματικών κερατινοκυττάρων NHEK και επώαση για 24 h. Από πάνω προς τα κάτω: **A1, A2:** Αποσπασμένα Υδρολύματα Σφαιρικής («Το Βάλσαμο», Vtino αντίστοιχα), **B1, B2:** Αφεψήματα και **Γ1, Γ2:** Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα (MeOH/H₂O 70:30 v/v %) και τέλος τα κύτταρα ελέγχου (Control cells).

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 38) παρατηρούμε, με λίγο μεγαλύτερη δυσκολία και μικρότερη ευκρίνεια από ότι στο ίδιο το μικροσκόπιο, πως με την εφαρμογή των αφεψημάτων (B1, B2) λαμβάνουμε ένα πολύ καλό αποτέλεσμα όσον αφορά την επουλωτική δράση τόσο σε αριθμό όσο και σε μέγεθος αναγεννημένων δερματικών κερατινοκυττάρων. Ακολουθούν τα αποσπασμένα υδρολύματα της σφαιρικής (A1, A2) ενώ τέλος τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα (Γ1,Γ2) φαίνεται να εμφανίζουν τη μικρότερη δραστηριότητα. Παρόλα αυτά, και οι 3 παραλαβές φαίνεται να εκκινούν τη διαδικασία της επουλωτικής δράσης, με το αφέψημα να ξεχωρίζει, στην εικόνα, κατά πολύ από τις υπόλοιπες από πλευράς έντασης δραστηριότητας.

Εδώ θα πρέπει να τονίσουμε ότι η εικόνα από το μικροσκόπιο μπορεί να ξεγελάσει τον παρατηρητή δημιουργώντας μία λανθασμένη εικόνα αραιότερων ή λιγότερων κυττάρων από ό,τι στην πραγματικότητα. Αυτό οφείλεται στην αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων μετά από την χορήγηση των εκχυλισμάτων. Παρόλα αυτά, από τις φωτογραφίες μπορούμε να είμαστε σίγουροι μόνο για ποιοτικές και όχι ποσοτικές αλλαγές και άρα το τελικό συμπέρασμα προκύπτει από σύγκριση των αποτελεσμάτων της μικροσκοπικής παρατήρησης και των μετρήσεων των κυτταροπλασματικών επιπέδων του ATP η οποία μας δείχνει και το ποσοστό των νέων κυττάρων και για τον λόγο αυτό, εν τέλει, στηρίζομαστε σε αυτές για την εξαγωγή των τελικών μας συμπερασμάτων.



Εικόνα 39: Μικροσκοπική παρατήρηση επίδρασης δείγματος “Vriino Αφέψημα”, σε τομή πρωτογενών ανθρώπινων δερματικών κερατινοκυττάρων NHEK μετά από μία ημέρα. Από πάνω προς τα κάτω, **A:** Τομή δερματικών κερατινοκυττάρων, **B:** Αποτελέσματα εφαρμογής Αφεψημάτος Vriino μετά από 24 h, **C:** Control μετά από 24 h. Τα αποτελέσματα της επουλωτικής δράσης εκτιμήθηκαν μέσω του σετ βιοδοκιμών CytoSelect™ (CytoSelect™ Wound Healing Assay kit).

Στην δεύτερη εικόνα (Εικόνα 39) είναι εμφανής η μετανάστευση των κυττάρων και το «κλείσιμο» της πληγής του τραύματος σε μεγάλο ποσοστό στην Φωτογραφία Μικροσκοπίου “B”. Το κεντρικό κενό πεδίο της τομής έχει αρχίσει να γεμίζει από δερματικά κερατινοκύτταρα μέσα σε μία ημέρα στην περίπτωση της εφαρμογής θεραπείας με αφέψημα υπέρικου σε αντίθεση με το δείγμα των κυττάρων ελέγχου όπου η διαδικασία της επούλωσης δεν φαίνεται να έχει ξεκινήσει όπως βλέπουμε στην Φωτογραφία Μικροσκοπίου “C”. Έτσι, αποδεικνύεται ότι το αφέψημα του υπέρικου, ως θεραπεία του τραύματος της πληγής, προάγει την διαδικασία της

επούλωσης και της μετανάστευσης των κυττάρων προς το πεδίο του τραύματος και μάλιστα παρουσιάζει και έναν αρκετά ταχύ ρυθμό μετανάστευσης κυττάρων.

4.B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΒΑΛΣΑΜΕΛΑΙΟΥ (*Oleum Hyperici*)

4.B.1. Φασματοσκοπική Μελέτη με Φασματοσκοπία Raman & ATR

§ Αποτελέσματα Φασματοσκοπικής Μελέτης Raman

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι σε συνδυασμό με τη χημειομετρία αποτελούν τον πιο άμεσο και εύκολο τρόπο διαπίστωσης της νοθείας του ελαιολάδου με άλλα έλαια χαμηλότερης ποιότητας και της οξειδωσής του (θερμικής ή λόγω μακροχρόνιας αποθήκευσης), σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνικές. Ειδικά οι ζώνες Raman αντικατοπτρίζουν δονήσεις χαρακτηριστικές για χημικούς δεσμούς και δομικές μονάδες στα ελαϊκά μόρια.

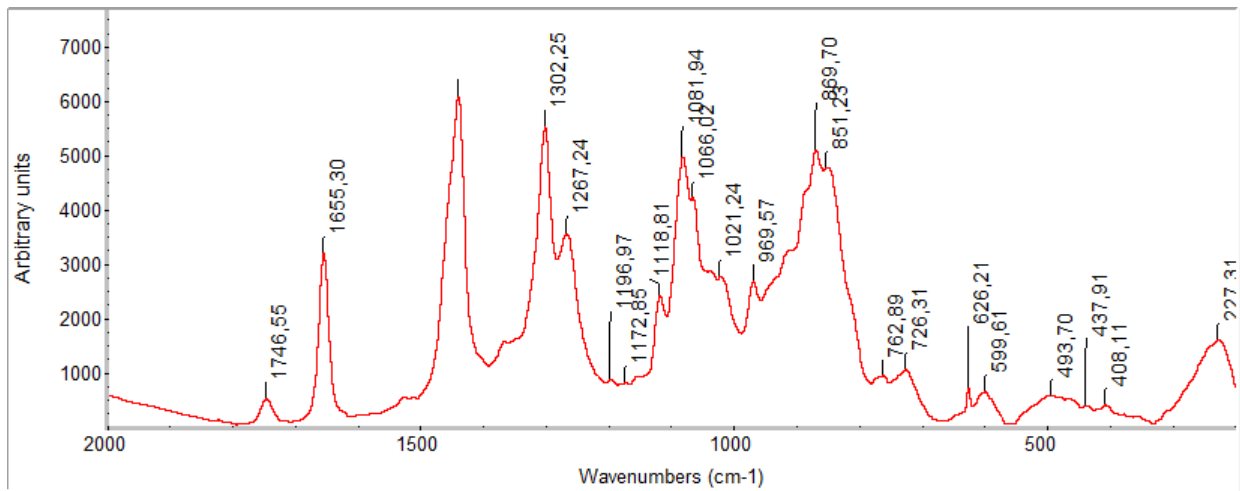
Μέχρι τώρα μέσω της φασματοσκοπίας Raman έχει γίνει εφικτή η εξακρίβωση της νοθείας ελαιολάδου με καλαμποκέλαιο, φουντουκέλαιο, σογιέλαιο και πυρηνέλαιο. Οι αναλογίες έντασης των ζωνών δονήσεων των *cis*- δεσμών =C-H και C=C στους κυματαριθμούς 1441 cm^{-1} έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση του ελαιολάδου από άλλα έλαια.

Είναι γενικά γνωστό ότι οι ζώνες μετατόπισης των δονήσεων στα 1265 cm^{-1} και 1657 cm^{-1} λόγω της δόνησης των δεσμών *cis*-(=C-H) και *cis*-(C=C) αντίστοιχα, σχετίζονται άμεσα με τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στα διάφορα έλαια. Το ελαιόλαδο απαρτίζεται κυρίως από το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ ενώ το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο, το καλαμποκέλαιο και το κραμβέλαιο έχουν υψηλό ποσοστό σε λινελαϊκό οξύ το οποίο έχει την ίδια ανθρακική αλυσίδα με το ελαϊκό αλλά περιέχει έναν επιπλέον διπλό δεσμό (C=C). Συνεπώς, η ένταση των ζωνών απορρόφησης σε κάθε κυματαριθμό αλλάζει όσο αλλάζει και η αναλογία στα περιεχόμενα έλαια. Η περιοχή των κυματαριθμών $1000\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ είναι αυτή που μας παρέχει πληροφορίες για τη συγκεκριμένη περίπτωση. (Zou M-Q, 2009). Οι χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης στο Raman για τα έλαια, επιβεβαιώνονται από τη βιβλιογραφία και αναφέρονται συλλογικά στον παρακάτω πίνακα:

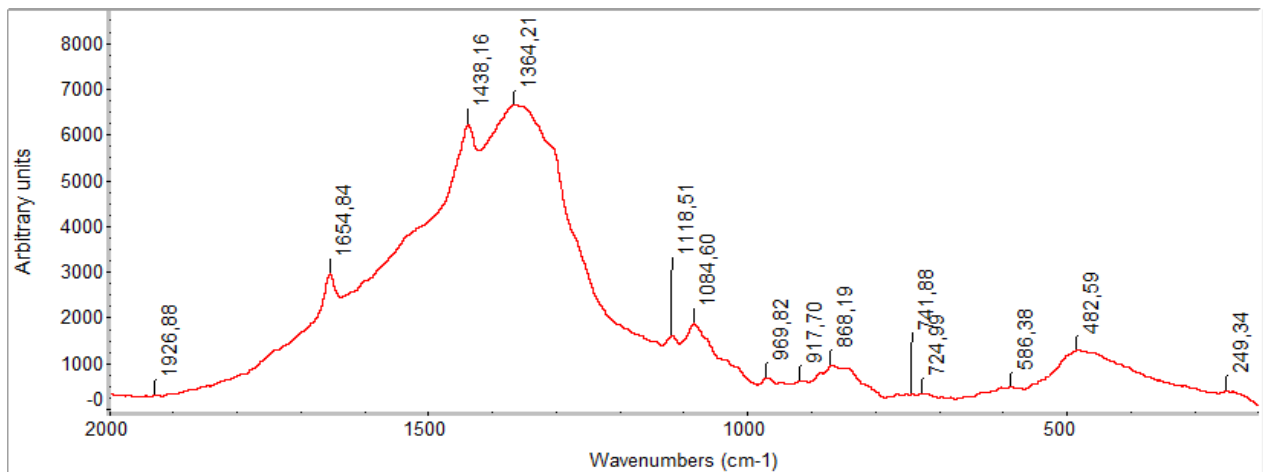
Table 1 Assignment of major Raman peaks in edible oils		
Wavenumber (cm ⁻¹)	Molecule/group	Vibrational mode
3005	<i>cis</i> RHC=CHR	=C-H symmetric stretching
2924	-CH ₂	C-H asymmetric stretching
2897	-CH ₃	C-H symmetric stretching
2850	-CH ₂	C-H symmetric stretching
1750	RC=OOR	C=O stretching
1650	<i>cis</i> RHC=CHR	C=C stretching
1525	RHC=CHR	C=C stretching
1440	-CH ₂	C-H bending (scissoring)
1300	-CH ₂	C-H bending (twisting)
1265	<i>cis</i> RHC=CHR	=C-H bending (scissoring)
1150	-(CH ₂) _n -	C-C stretching
1008	HC-CH ₃	CH ₃ bending
968	<i>trans</i> RHC=CHR	C=C bending
868	-(CH ₂) _n -	C-C stretching

Πίνακας 7: Κύριες ζώνες απορρόφησης Raman σε εδώδιμα έλαια., (El-Abassy R.M. Donfack P., Materny A., 2009)

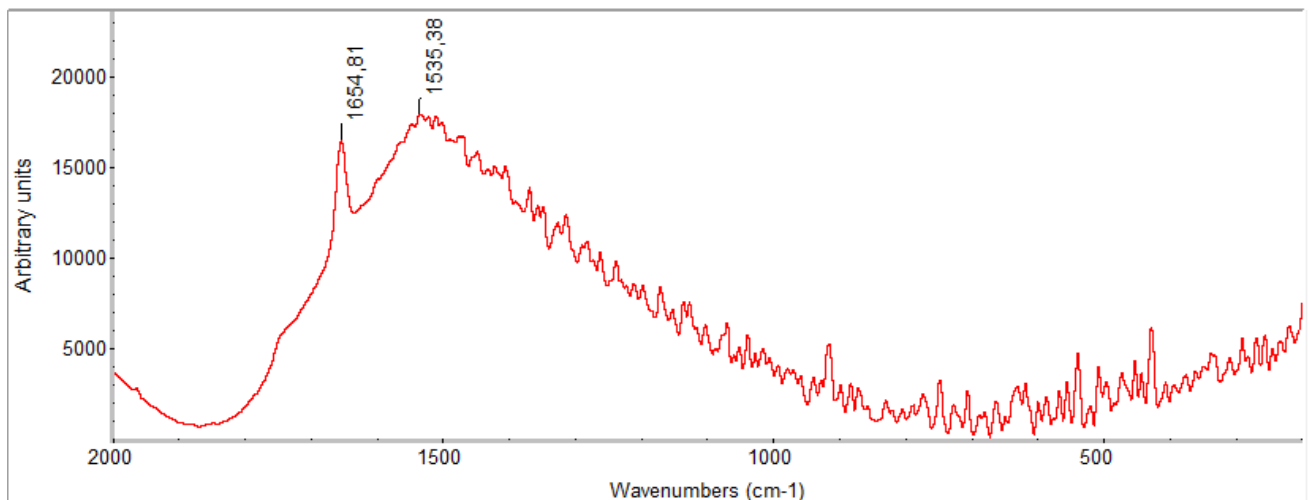
Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η λήψη των φασμάτων Raman στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) και τα βαλσαμέλαια που προέκυψαν με τις διάφορες παρασκευές. Τα βαλσαμέλαια που παρασκευάστηκαν με νωπή δρόγη υπέρικου και είχαν έντονο κόκκινο χρώμα, δεν απέδωσαν φάσμα Raman. Αντιθέτως, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και τα βαλσαμέλαια που παρουσιάστηκαν με ξηρή δρόγη στο σκοτάδι απέδωσαν φάσματα Raman των οποίων τα μέσα φάσματα που προέκυψαν από το μέσο όρο της κάθε τριπλέτας παρουσιάζονται παρακάτω:



Σχήμα 11: Φάσμα Raman Έξτρα Παρθένου Ελαιολάδου (EVOO)



Σχήμα 12: Φάσμα Raman Βαλσαμελαίου που παρασκευάστηκε στο σκοτάδι από ξηρή δρόγη.



Σχήμα 13: Φάσμα Raman βαλσαμελαίου που παρασκευάστηκε στο φως από νωπή δρόγη.

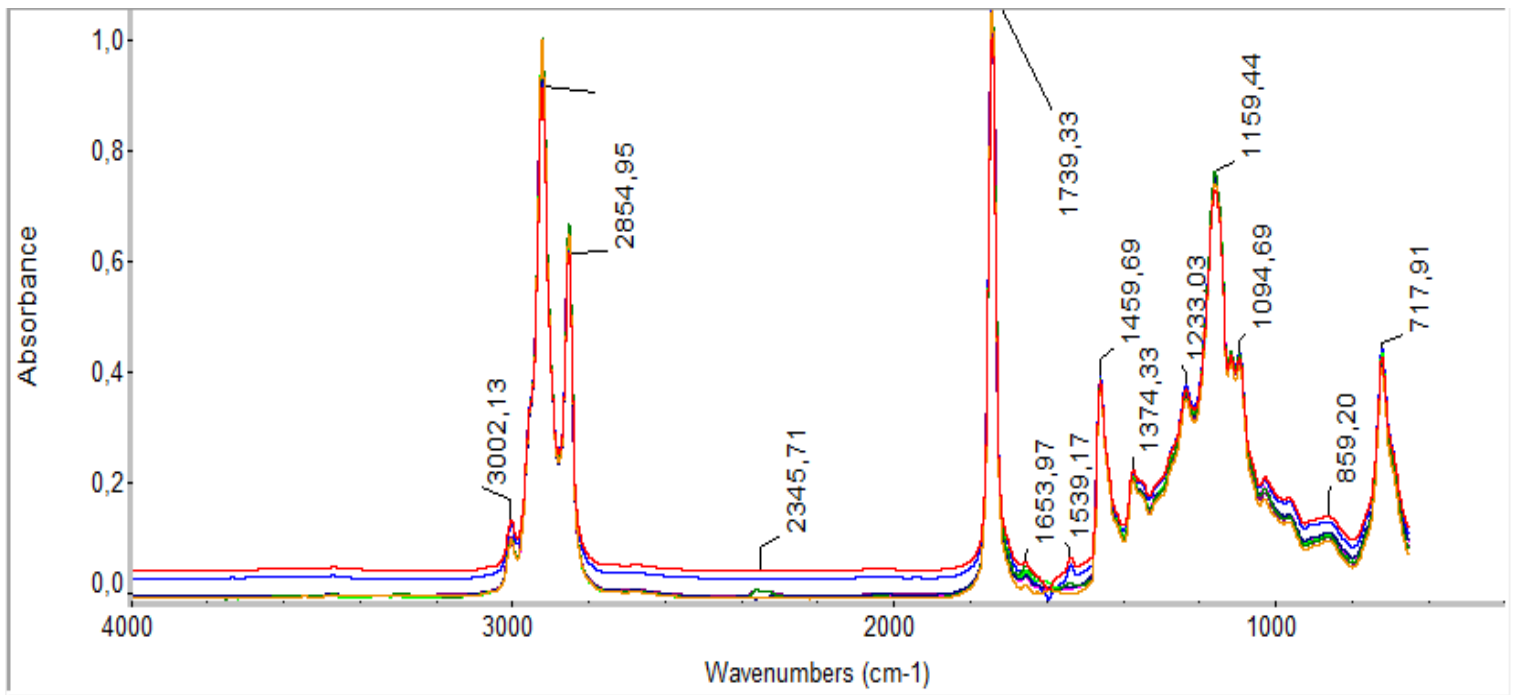
§ Αποτελέσματα Φασματοσκοπικής Μελέτης με Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (ATR)

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές κυριαρχούν ανάμεσα στις τεχνικές ενόργανης ανάλυσης για την κατηγορία των ελαίων και των λιπιδίων. Στην υπέρυθρη φασματοσκοπία, το λιπιδικό περιεχόμενο υπολογίζεται συνήθως από την ισχυρή ζώνη απορρόφησης της καρβονυλικής ομάδας ($\nu\text{C}=\text{O}$) στους κυματαριθμούς 1745 cm^{-1} και της ομάδας CH_2 ($\nu\text{C}-\text{H}$) στον κυματαριθμό 2855 cm^{-1} . Η υπέρυθρη φασματοσκοπία επίσης εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ακορεστότητας του λιπαρού οξέος. Η κύρια ζώνη απορρόφησης των *trans*-ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι στα 966 cm^{-1} ($\delta\text{C}-\text{H}$) τη στιγμή που τα *cis*-ακόρεστα λιπαρά οξέα απορροφούν στις περιοχές των κυματαριθμών 3008 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{H}$) ή στα 1650 cm^{-1} . Η τεχνική ATR όπως περιγράφηκε παραπάνω στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιείται για την λήψη του υπέρυθρου φάσματος από ένα λιπιδικό υπόστρωμα χωρίς περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος. Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζονται οι κύριες περιοχές κυματαριθμών απορρόφησης που χαρακτηρίζουν τα έλαια και πιο συγκεκριμένα το ελαιόλαδο:

frequency (cm^{-1})	functional group	mode of vibration
3005	$=\text{C}-\text{H}$ (<i>cis</i> -)	stretching
2924	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_2)	stretching (asymmetrical)
2855	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_2)	stretching (symmetrical)
1746	$-\text{C}=\text{O}$ (ester)	stretching
1653	$-\text{C}=\text{C}-$ (<i>cis</i> -)	stretching
1466	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_2 , CH_3)	bending (scissoring)
1377	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_3)	bending (symmetrical)
1238	$-\text{C}-\text{O}$, $-\text{CH}_2-$	stretching, bending
1163	$-\text{C}-\text{O}$, $-\text{CH}_2-$	stretching, bending
1118	$-\text{C}-\text{O}$	stretching
1097	$-\text{C}-\text{O}$	stretching
721	$-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{HC}=\text{CH}-$ (<i>cis</i> -)	bending (rocking)

Πίνακας 8: Κύριες απορροφήσεις στο IR του ελαιολάδου
(Hennessy S., Downey G., O' Donnell C.P., 2009)

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η λήψη των υπέρυθρων φασμάτων (IR) με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) τόσο για το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο όσο και για τα διάφορα βαλσαμέλαια που προέκυψαν με διαφορετικές παρασκευές. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε τριπλέτα και υπολογίστηκε το μέσο φάσμα για το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η σύγκριση των μέσων φασμάτων των δειγμάτων παρουσιάζεται παρακάτω:



Σχήμα 14: Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων και βασικές κορυφές απορρόφησης στα διάφορα βαλσαμέλαια με την τεχνική ATR.

Αρχικά, για να αναλύσουμε λίγο περισσότερο τα υπέρυθρα φάσματα των ελαιικών εκχυλισμάτων του υπέρικου ξεκινάμε από τις εμφανείς οπτικές διαφορές. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται το φάσμα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, με κόκκινο χρώμα το φάσμα του ενός από τα πιο έντονα σε χρώμα βαλσαμελαίου της εταιρείας “Herbs & Spices” και με μπλε χρώμα το βαλσαμέλαιο από την εταιρεία Athos το οποίο ήταν και το πιο ανοιχτόχρωμο από τα εμπορικά βαλσαμέλαια που προμηθευτήκαμε για το πείραμά μας. Ένα αρχικό συμπέρασμα που μπορούμε να βγάλουμε από την οπτική παρατήρηση των φασμάτων καθώς συγκρίνονται, είναι πως οι κορυφές των δύο βαλσαμελαίων που προαναφέραμε μόλις, βρίσκονται λίγο πιο ψηλά από τις υπόλοιπες. Αυτό ίσως οφείλεται στον τρόπο παρασκευής του εκάστοτε βαλσαμελαίου. Επί παραδείγματι, το βαλσαμέλαιο της εταιρείας Athos έχει παρασκευαστεί με τεχνητή θέρμανση και όχι μετά από παραμονή στο φως του ηλίου και φυσική θέρμανση επί ημερών. Επίσης, οι 3 κατώτερες κορυφές αντιστοιχούν στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και τα βαλσαμέλαια που παρασκευάστηκαν με ξηρή δρόγη στο σκοτάδι αλλά και στο φως σε μαύρα μπουκάλια. Μία εμφανής διαφοροποίηση παρουσιάζεται και στην περιοχή των κυματαριθμών $1650 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ όπου συναντάμε και τα *cis*-ακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι συνθήκες παρασκευής των βαλσαμελαίων που παρασκευάστηκαν εργαστηριακά ήταν ελεγχόμενες και συνεπώς, δεν υπήρξε κάποια οξείδωση λόγω θερμότητας ή ηλιακού φωτός. Αντιθέτως, στα εμπορικά βαλσαμέλαια ο τρόπος παρασκευής και εκχύλισης δεν είναι πάντα γνωστός και άρα οποιαδήποτε μεταβολή στο προφίλ των κορυφών των λιπαρών οξέων στα υπέρυθρα φάσματα είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε κάποια οξείδωση κατά την διαδικασία παρασκευής των ελαιικών εκχυλισμάτων. Ωστόσο, οι διαφορές στα υπέρυθρα φάσματα είναι αρκετά μικρές και δεν οδηγούν σε κάποιο σημαντικό ερευνητικό αποτέλεσμα.

4.B.2. Αποτελέσματα Φασματοφωτομετρικών Μεθόδων Ανάλυσης

§ Υπολογισμός Συντελεστών “Κ” (K_{232} , K_{270} , ΔK)

Στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν οι συντελεστές Κ με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο Cary 60 της εταιρείας *Agilent Technologies*.

Αφού καταγράφηκαν οι ειδικές απορροφήσεις όπως περιγράφεται στο πειραματικό μέρος της εργασίας, οι ειδικές αποσβέσεις (συντελεστές απόσβεσης Κ) υπολογίστηκαν στα διάφορα μήκη κύματος σύμφωνα με τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$K\lambda = \frac{2.303}{s} \log \frac{I_0}{I}$$

όπου:

Κλ: ειδική απόσβεση σε μήκος κύματος λ,
Ελ: απόσβεση μετρηθείσα σε μήκος κύματος λ,
c: συγκέντρωση του διαλύματος σε g/100 ml και
s: πάχος της κυβελίδας σε cm.

Για τον προσδιορισμό της σχέσης ΔK λαμβάνονται οι απορροφήσεις και σε άλλα μήκη κύματος έχοντας υπόψη ότι η σχέση ΔK υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\Delta K = K_{270} - [(K_{266} + K_{274})/2]$$

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Όνομασία Δείγματος	K_{232}	K_{270}	ΔK
Ελαιόλαδο – Κορμπάκης, Σκάλα Λακωνίας (08/2016)	1,84	0,15	0,0014
Ελαιόλαδο – Κορμπάκης, Σκάλα Λακωνίας (03/2017)	2,25	0,18	0,0018
Ελαιόλαδο – Σωτηρόπουλος, Αγρίλι Κυπαρισσίας	2,45	0,16	0,0013
Βαλσαμέλαιο (Ξηρό-Σκοτάδι) – “Το Βάλσαμο”	2,37	0,28	0,0051
Βαλσαμέλαιο (Ξηρό-Ήλιος) – “Το Βάλσαμο”	2,42	0,45	0,0109
Βαλσαμέλαιο (Ξηρό – Σκοτάδι) – “Vrino”	2,41	0,31	0,0288
Βαλσαμέλαιο (Ξηρό – Ήλιος) – “Vrino”	2,56	0,40	0,0119
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Χριστοδούλου Παναγιώτα”, Δαφνί Λακωνίας	2,68	0,50	0,0324
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Αθός”, Αγγελιανά Ρέθυμνο Κρήτης	2,13	0,47	0,0207
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Herbs & Spices”	2,62	0,57	0,3897
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Εύ ζην”, Τήνος	2,08	0,40	0,0256
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Open Cosmetics”, Άνω Λιόσια	2,51	0,58	0,0219
Βαλσαμέλαιο (Νωπό σε ηλιέλαιο) - “Open Cosmetics”, Άνω Λιόσια	4,16	3,81	3,4180

Πίνακας 9: Συντελεστές “Κ” ελαίων

Αρχικά, όσον αφορά τον συντελεστή K_{232} , τα λάδια που βρέθηκαν να ξεπερνούν την τιμή του κατώτερου ορίου ήταν μόνο τρία δείγματα βαλσαμελαίου που είχε παρασκευαστεί με νωπό φυτικό υλικό και παραμονή στον ήλιο για περίπου 1 μήνα. Για τα ελαιόλαδα «βάσεις» ο δείκτης βρέθηκε εντός των ορίων για τον χαρακτηρισμό τους ως *έξτρα παρθένα ελαιόλαδα*.

Όσον αφορά τον συντελεστή K_{270} , μόνο ένα δείγμα βαλσαμελαίου και συγκεκριμένα το βαλσαμέλαιο που είχε παρασκευαστεί με ηλιέλαιο και νωπό φυτικό υλικό, βρέθηκε εκτός των κατώτερων ορίων για τον χαρακτηρισμό τους ως *ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα*.

Για τα ελαιόλαδα «βάσεις» ο δείκτης βρέθηκε εντός των ορίων για τον χαρακτηρισμό τους ως *έξτρα παρθένα ελαιόλαδα*.

Όσον αφορά τον συντελεστή ΔΚ, στα βαλσαμέλαια που παρασκευάστηκαν εργαστηριακά, τόσο στο σκοτάδι όσο και στον ήλιο, με φυτικό υλικό από την εταιρεία «Το Βάλσαμο» η τιμή του παρέμεινε $< 0,01$ που είναι το κατώτερο όριο για τον χαρακτηρισμό ως παρθένο ελαιόλαδο. Στα υπόλοιπα δείγματα βαλσαμελαίου, τόσο στα εργαστηριακά παρασκευασμένα από την εταιρεία “Vigno” όσο και στα εμπορικά διαθέσιμα ο συντελεστής ΔΚ βρέθηκε να έχει μεγαλύτερη τιμή από 0,01.

Για τα ελαιόλαδα «βάσεις» ο δείκτης ΔΚ βρέθηκε εντός των ορίων για τον χαρακτηρισμό τους ως *έξτρα παρθένα ελαιόλαδα*.

Παρατηρείται ότι στα βαλσαμέλαια που έχουν παρασκευαστεί με νωπό φυτικό υλικό και παραμονή στον ήλιο για 1 μήνα περίπου, οι τιμές των συντελεστών απόσβεσης αυξάνονται στις περισσότερες περιπτώσεις με κάποιες εξαιρέσεις, όπου δεν παρατηρείται σημαντική απόκλιση από τις τιμές των κατώτερων ορίων βάσει νομοθεσίας.

§ Υπολογισμός Ολικών Υπερικινών

Οι αποχρώσεις του κόκκινου χρώματος στα βαλσαμέλαια που παρασκευάστηκαν, απουσία και παρουσία φωτός, μπορούν άμεσα να συσχετισθούν με το ολικό περιεχόμενο σε υπερικίνες. (Heinrich et.al., 2017). Για τον υπολογισμό του περιεχομένου σε ολικές υπερικίνες χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο UV-Vis, Cary 60 , Agilent Technologies & V-550, της εταιρείας Jasco. Τα βαλσαμέλαια διαλύθηκαν στο έλαιο βάση (έξτρα παρθένο ελαιόλαδο) και μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 590 nm σε κυψελίδα πάχους 1 cm. Το περιεχόμενο σε ολικές υπερικίνες εκφράστηκε σε ισοδύναμα υπερικίνης ανά 100 g ελαϊκού εκχυλίσματος.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των τιμών η παρακάτω εξίσωση, με συγκεκριμένο συντελεστή απορρόφησης 870 [1/% x cm]:

Ολικό περιεχόμενο σε υπερικίνες (mg ισοδύναμων υπερικίνης / 100 g ελαϊκού εκχυλίσματος [mg/100 g])= ((wT + wS)/wS) x (A590 nm x (1000/870)).

Όπου wT το βάρος του δοκιμαζόμενου δείγματος και wS το βάρος του διαλύτη.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και το αντίστοιχο διάγραμμα στη συνέχεια:

Δείγμα	Ολικές Υπερικίνες (mg/100 g)
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – Χριστοδούλου Παναγιώτα, Σπάρτη	2,96
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Εύ ζην”, Τήνος	3,53
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Αθός”, Αγγελιανά Ρέθυμνο Κρήτης	1,00
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Herbs & Spices”	5,66
Βαλσαμέλαιο (Νωπό) – “Open Cosmetics”, Άνω Λιόσια	1,06
Βαλσαμέλαιο (Ξηρό-Σκοτάδι) – “Το Βάλσαμο”	0.33
Βαλσαμέλαιο (Ξηρό – Σκοτάδι) – “Vrino”	0.29
Βαλσαμέλαιο (Ξηρό-Ήλιος) – “Το Βάλσαμο”	0.15
Βαλσαμέλαιο (Ξηρό – Ήλιος) – “Vrino”	0.31

Πίνακας 10: Υπολογισμός Ολικών Υπερικινών Βαλσαμελαίων

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα συμπεραίνουμε ότι την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές υπερικίνες βάση της φασματοσκοπικής μελέτης την παρουσιάζει το Νωπό Βαλσαμέλαιο της εταιρείας “Εύ ζην” το οποίο παρουσιάζει ταυτόχρονα και το πιο έντονο – σκούρο μπορντό χρώμα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Γενικότερα η διαβάθμιση στην περιεκτικότητα είναι ανάλογη της έντασης του κόκκινου χρώματος όπως είναι και αναμενόμενο και έτσι την χαμηλότερη περιεκτικότητα την παρουσιάζουν τα βαλσαμέλαια που έχουν παρασκευαστεί από ξηρή δρόγη είτε στο φως είτε στο σκοτάδι και έχουν ένα κίτρινο σκούρο προς πορτοκαλί χρωματισμό.

4.B.3. Αποτελέσματα Χρωματογραφικής Ανάλυσης των Εστέρων των Λιπαρών Οξέων των Ελαίων με GC-MS

Μετά τη διαδικασία της μεθυλίωσης που περιγράφεται στην ενότητα του πειραματικού μέρους της εργασίας, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ακολούθησε η ανάλυσή του με αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών (GC-MS). Η απόδοση των εστέρων των λιπαρών οξέων ανά έλαιο που μελετήθηκε παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα. Συνολικά εντοπίστηκαν 11 διαφορετικά συστατικά, εκτός από την περίπτωση του βαλσαμελαίου που είχε παρασκευαστεί με τη χρήση ηλιέλαιου στη θέση του ελαιολάδου, όπου τα διαφορετικά συστατικά που εντοπίστηκαν ήταν 16. Η απόδοση έγινε στο 99% - 100% του περιεχομένου του ελαίου. Στους παρακάτω πίνακες, διαχωρίζονται οι αποδόσεις των συστατικών στα βαλσαμέλαια εμπορίου που παρασκευάστηκαν με νωπή δρόγη και στα βαλσαμέλαια που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο με ξηρή δρόγη.

Απόδοση Συστατικού (%v/w)	Δείγμα Ελαίου (Βαλσαμέλαια Εμπορίου – Νωπή Δρόγη)					
	EVOO	Aθός	Ευζήν	Νωπό Σπάρτης	Herbs&Spices	Open Cosmetics
Παλμιτελαϊκό Οξύ	1,20	1,05	1,02	0,98	1,42	1,18
Παλμιτικό Οξύ	12,77	14,05	11,74	12,73	14,40	13,56
2-hexyl-Cyclopropaneoctanoic acid	0,08	0,06	0,19	0,12	0,08	0,08
Μαργαρικό Οξύ	0,05	0,05	0,09	0,05	0,06	0,04
Λινελαϊκό Οξύ	10,01	16,95	8,83	0,62	7,81	2,93
cis-9-Ολεϊκό Οξύ	72,10	52,99	74,11	81,18	72,58	78,53
Στεατικό Οξύ	3,09	4,01	3,33	3,46	2,78	2,88
Λινολενικό Οξύ	-	-	0,08	-	-	-
11-εικοσενοϊκό Οξύ	0,26	0,28	0,23	0,29	0,28	0,31
Αραχιδικό Οξύ	0,37	0,48	0,37	0,46	0,37	0,41
Βεγενικό Οξύ	0,08	0,08	0,08	0,11	-	0,09
Σκουαλένιο	-	-	-	-	0,21	-

Πίνακας 11: Σύσταση Λιπαρών Οξέων Βαλσαμελαίων Εμπορίου – Νωπής Δρόγης

Δείγμα Ελαίου (Βαλσαμέλαια Εργαστηρίου – Ξηρή Δρόγη)

Απόδοση Συστατικού (%v/w)	“Το	STDEV	“Vrino” -	STDEV%	“Το	STDEV%	“Vrino”	STDEV
	Βάλσαμο” - Σκοτάδι	%	Σκοτάδι		Βάλσαμο” - Ήλιος		- Ήλιος	%
Παλμιτελαϊκό Οξύ	1,23	0,08	1,13	0,04	1,16	0,05	1,22	0,07
Παλμιτικό Οξύ	13,77	0,64	13,40	0,49	13,12	0,37	13,82	0,42
2-εξί- κυκλοπροπανοοκτανοϊκό acid	0,09	0,00	0,08	0,01	0,09	0,00	0,10	0,01
Μαργαρικό Οξύ	0,04	0,00	0,06	0,00	0,04	0,01	0,05	0,01
Λινελαϊκό Οξύ	7,85	0,04	9,84	0,12	7,56	1,18	8,24	1,05
cis-9-ελαϊκό Οξύ	73,04	0,44	71,71	0,58	74,01	1,02	72,64	0,73
Στεατικό Οξύ	2,96	0,10	2,97	0,15	2,90	0,10	2,99	0,06
11-εικοσενοϊκό Οξύ	0,29	0,03	0,29	0,02	0,32	0,03	0,28	0,01
Αραχιδικό Οξύ	0,43	0,06	0,44	0,04	0,47	0,01	0,43	0,01
Βεχενικό Οξύ	0,09	0,03	0,08	0,02	0,09	0,01	0,10	0,02
Σκουαλένιο	0,19	0,07	-	-	0,23	0,02	0,18	0,01

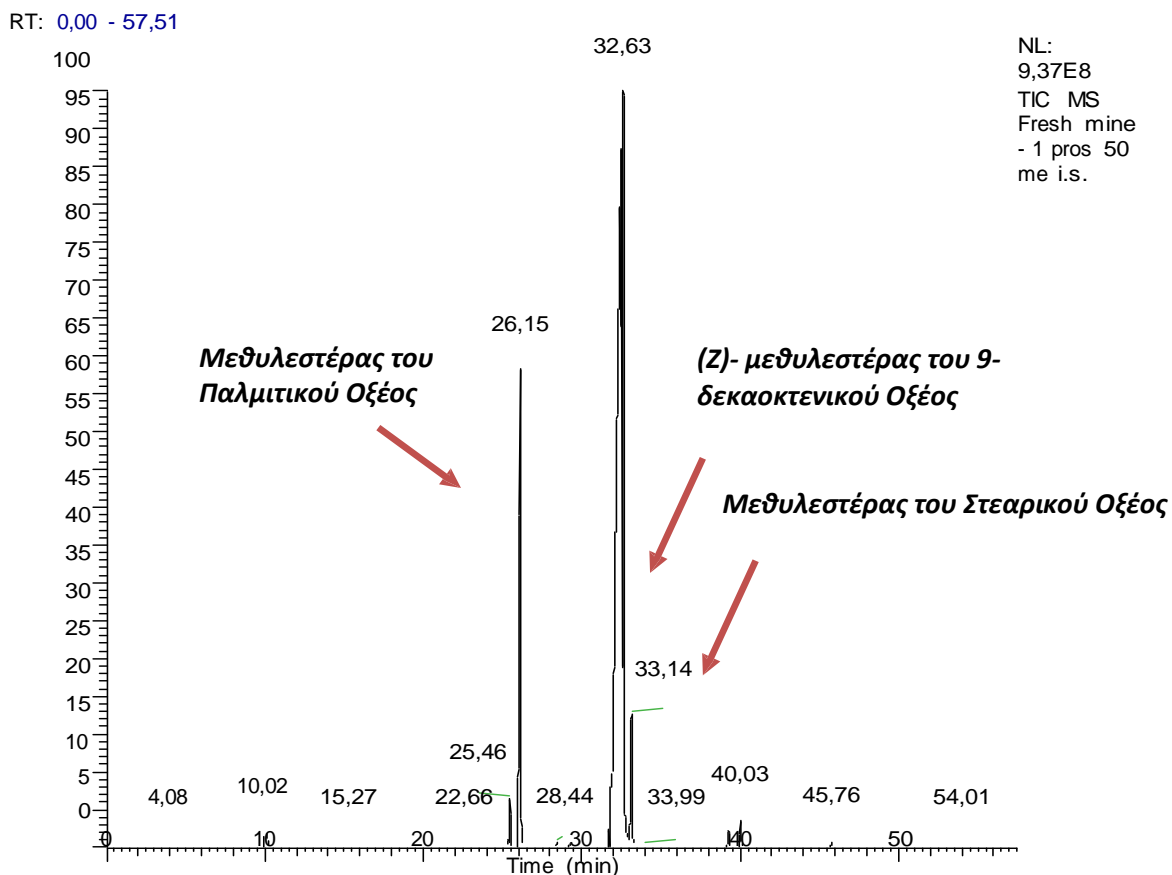
Πίνακας 12: Σύσταση Λιπαρών Οξέων Βαλσαμελαίων Εργαστηρίου - Ξηρής Δρόγης

Όσον αφορά τα δείγματα του εμπορίου παρατηρείται μεγαλύτερη παραλλακτικότητα στα ποσοστά ανά συστατικό, σε σχέση με τα δείγματα που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (σταθερή αναλογία δρόγης-ελαίου βάσης, σταθερή περίοδος εκχύλισης, σταθερές συνθήκες αποθήκευσης). Πιο συγκεκριμένα, μόνο σε ένα δείγμα φρέσκου βαλσαμελαίου εμπορίου εντοπίζεται μία μικρή ποσότητα σκουαλενίου, τη στιγμή που στα εργαστηριακά βαλσαμέλαια εντοπίζεται σε όλα τα δείγματα. Το νωπό Βαλσαμέλαιο από την Σπάρτη Λακωνίας εμφάνισε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στην κύρια ουσία που είναι το *cis*-9-ελαϊκό οξύ με ποσοστό 81,18% την στιγμή που εμφάνισε ταυτόχρονα τη μικρότερη περιεκτικότητα σε λινολεϊκό οξύ, με ποσοστό 0,62%. Αντιθέτως, το δείγμα από την εταιρία «Αθός» από το Ρέθυμνο της Κρήτης, εμφάνισε τη χαμηλότερη περιεκτικότητα στην κύρια ουσία με ποσοστό 52,99% την ίδια στιγμή που εμφάνισε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λινολεϊκό οξύ με ποσοστό 16,95%.

Όσον αφορά τα δείγματα του εργαστηρίου, είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους τόσο στη σύσταση όσο και στην απόδοση ανά συστατικό. Η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά την εκχύλιση στα μισά από τα αναλυόμενα δείγματα, δεν φαίνεται να είχε κάποια επίδραση στην σύσταση των λιπαρών οξέων των ελαίων, καθώς τόσο στην εκχύλιση με παρουσία ηλιακού φωτός όσο και στην εκχύλιση απουσία ηλιακού φωτός, στο σκοτάδι, η σύσταση παρέμεινε ίδια.

Δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική διαφοροποίηση στη σύσταση μεταξύ των εμπορικών και των εργαστηριακά παρασκευασμένων βαλσαμελαίων.

Η κύρια σύσταση των λιπαρών οξέων των ελαίων, κάθε τύπου, είναι το *cis*-9-ελαϊκό οξύ ως κύρια ουσία με την υψηλότερη περιεκτικότητα και ακολουθούν το παλμιτικό οξύ, το λινελαϊκό οξύ, το στεατικό οξύ και το παλμιτελαϊκό οξύ ως οι ουσίες που εμφανίζονται με τα υψηλότερα ποσοστά. Ακολουθούν, σε αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις, το 2-εξι-κυκλοπροπανοοκτανοϊκό οξύ, το μαργαρικό οξύ, το βεχενικό οξύ, το 11-εικοσενοϊκό οξύ και το σκουαλένιο. Τέλος, τόσο σε κάποια εμπορικά όσο και σε κάποια εργαστηριακά βαλσαμέλαια, εντοπίστηκαν ίχνη από μεθυλεστέρες του λινολενικού και μυριστικού οξέος.



Σχήμα 15: Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων Εμπορικού Βαλσαμελαίου “Χριστοδούλου Παναγιώτα” με αραιώση 1:50

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρχικά, ένα πρώτο συμπέρασμα προκύπτει από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (FTIR - DRIFT). Εδώ συμπεραίνουμε ότι η τεχνική αυτή μπορεί να μας παρέχει σαφή διαφοροποίηση ανάμεσα σε δείγματα του ίδιου φυτικού είδους από άλλη προέλευση-παραγωγό ή/και ανάμεσα σε δείγματα διαφορετικού φυτικού είδους. Επίσης, σαφή διαφοροποίηση μπορεί να μας δώσει ανάμεσα σε φυτικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διαφορετικό διαλύτη. Η διαφοροποίηση αυτή εντοπίζεται και στις 3 περιπτώσεις στην περιοχή των κυματαριθμών $1700 - 1100 \text{ cm}^{-1}$, δηλαδή όπως είναι αναμενόμενο, μέσα στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος. Το αποτέλεσμα και στη συνέχεια συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνει τις βιβλιογραφικές αναφορές των Zhu B. et. al. 2003, Nichita C et. al. 2007, Roggo Y et. al., 2007, Kokalj M et. al., 2011 και Agarouda A., 2017, για την υπέρυθη φασματοσκοπία IR η οποία έχει χρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλων και για την εξέταση των διαφορών μεταξύ διαφόρων ειδών υπέρικου αλλά και για την εξέταση της βοτανικής διαφοροποίησης του υπέρικου από άλλο φυτικό είδος μέσω του υπέρυθρου φάσματος.

Εν συνεχεία, τα αποτελέσματα των αναλύσεων με Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών επιβεβαιώνουν τις παραδοχές και τα πειραματικά αποτελέσματα των ερευνητών που έχουν μελετήσει κατά καιρούς τη σύσταση του αιθερίου ελαίου του υπέρικου αλλά και την μεταβλητότητα που αυτή παρουσιάζει από διάφορους παράγοντες που επιδρούν σε αυτή. Αρχικά, οι κύριες ομάδες που το χαρακτηρίζουν είναι υδρογονάνθρακες, μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, όπως πολύ σωστά πρώτοι υποστήριξαν οι Bertoli A, Cirak C., Teixeira da Silva J.A το 2011 στο άρθρο τους.

Ύστερα, διαπιστώνουμε ότι μεταξύ δύο δειγμάτων υπέρικου από άλλον παραγωγό οι διαφορές είναι αρκετά μεγάλες αλλά εξίσου μεγάλες είναι και οι διαφορές ανάμεσα στο αιθέριο έλαιο που προέρχεται από το ίδιο δείγμα αλλά από διαφορετικές αποστάξεις (τυπική απόκλιση τριπλέτας), όπως πολύ σωστά και εδώ πρώτοι υποστήριξαν οι Schwob I. et. al., το 2004, οι Petrakis PV, Couladis M, Roussis V, το 2005, οι Bertoli A, Cirak C., Teixeira da Silva J.A το 2011 και οι Morshedloo M.R. et. al. το 2015. Κάποια από τα βασικά συστατικά του αιθερίου ελαίου εμφανίζονται μόνο στο ένα δείγμα και απουσιάζουν από το άλλο. Αυτά είναι: το (*E*)-, (*Z*)- οξείδιο της λιναλοόλης, η φαρνεσόλη, το α -μουουρολένιο, η λεδόλη και το νοναδεκάνιο (συστατικά που εντοπίζονται μόνο στο δείγμα «Το Βάλσαμο») και: η νεο-ιντερμεδεόλη και το α -χιμαχαλένιο (συστατικά που εντοπίζονται μόνο στο δείγμα «Vrino»).

Τα κύρια συστατικά με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα για κάθε δείγμα παρουσιάζουν και διαφορές και ομοιότητες. Παρόλα αυτά, τα πιο σταθερά συστατικά που εμφανίζουν τη μικρότερη τυπική απόκλιση μεταξύ των ποσοστών περιεκτικότητας των αιθέριων ελαίων που προέκυψαν από τις τρεις διαφορετικές αποστάξεις είναι: η βορνεόλη, η θυμόλη, η (*E*)-νερολιδόλη, το α -σελινένιο και το β -

κοπαένιο για το δείγμα από τον παραγωγό “Το Βάλσαμο” και η α -τερπινεόλη, το β -κοπαένιο, το α -χιμαχαλένιο, το δ -καδινένιο και το ενεϊκοσάνιο για το δείγμα από τον παραγωγό “Vrino”. Συστατικά που όπως τονίζουν και οι Bertoli A, Cirak C., Teixeira da Silva J.A το 2011 θεωρούνται από τα πολύ βασικά του αιθερίου ελαίου του υπέρικου.

Κάποια πολύ βασικά και αναπόσπαστα συστατικά όπως είναι το 2-μέθυλο-οκτάνιο, το α -πινένιο, η θυμόλη, το β -πινένιο, η καρβακρόλη και τα α -, β -σεληνένιο παρουσίασαν εμφανώς μεγάλες διαφορές, που άγγιζαν το 20%, της περιεκτικότητας ανάμεσα στα δύο διαφορετικά δείγματα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην παραλλακτικότητα λόγω διαφορετικών κλιματικών & καλλιεργητικών συνθηκών αλλά και λόγω διαφορετικού σταδίου ανάπτυξης του φυτού ανάμεσα στα δύο δείγματα των διαφορετικών παραγωγών. Τέλος, κάποια συστατικά βρέθηκαν σε σχεδόν απαράλλακτες τιμές περιεκτικότητας ανάμεσα στα δύο δείγματα. Αυτά ανήκουν επίσης στα σημαντικότερα της σύστασης των αιθερίων ελαίων του υπέρικου και είναι: το (*E*)-καρνοφυλλένιο, το (*E*)- β -φαρνεσένιο, το γ -μουουρολένιο, το γ -χιμαχαλένιο, το γερμακρένιο-*D*, το γ -καδινένιο, το δ -καδινένιο, η σπαθουλενόλη, η *n*-τετραδεκανόλη και το οξείδιο του καρνοφυλλενίου. Αυτά λοιπόν συμπεραίνουμε ότι είναι από τα συστατικά που βρίσκονται σχεδόν πάντα στο αιθέριο έλαιο του υπέρικου στην ίδια συγκέντρωση ανεξάρτητα με το στάδιο ωρίμανσης του φυτού ή τις καλλιεργητικές και κλιματικές συνθήκες που επικρατούσαν κατά την ανάπτυξή του.

Όσον αφορά το οργανικό μέρος του αφεψήματος του υπέρικου, αυτό βρέθηκε αρκετά πιο αραιό σε συγκέντρωση και παρουσία οργανικών ουσιών κατά την ανάλυσή του και εδώ εντοπίζουμε επίσης διαφοροποιήσεις στην σύσταση ανάμεσα στα δύο διαφορετικά δείγματα των παραγωγών “Vrino” και “Το Βάλσαμο”. Συνολικά τα συστατικά του οργανικού μέρους του αφεψήματος είναι σχεδόν το 1/5 σε αριθμό από τα συστατικά του αιθερίου ελαίου, τιμή η οποία είναι αναμενόμενη σύμφωνα με τη φύση της κάθε παραλαβής καθώς και αν λάβουμε υπόψη τη διαδικασία απομόνωσης των πτητικών συστατικών στην περίπτωση του αφεψήματος, όπου πραγματοποιείται με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Όσον αφορά την παραλλακτικότητα, υπάρχουν συστατικά τα οποία συναντάμε αποκλειστικά και μόνο στο ένα από τα δύο δείγματα. όπως τα (*E*)-, (*Z*)-οξείδιο της λιναλοόλης, η βερμπενόνη και το δεκαεξάνιο (εντοπίζονται μόνο στο δείγμα «Vrino») και: το βενζοϊκό οξύ και η θυμοκινόνη (εντοπίζονται μόνο στο δείγμα «Το Βάλσαμο»).

Τα συστατικά με την υψηλότερη περιεκτικότητα στο οργανικό μέρος του αφεψήματος ταυτίζονται με κάποια από τα βασικά και κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου, μεταξύ των οποίων είναι: το εξανοϊκό οξύ, την 4-τερπινεόλη, το οξείδιο του καρνοφυλλενίου, το δεκαεξανοϊκό οξύ, η θυμόλη και η καρβακρόλη. Επίσης, σε γενικές γραμμές τα συστατικά που παρουσιάζονται και στα δύο δείγματα δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στις τιμές της περιεκτικότητας ανά συστατικό, με μόνη εξαίρεση τη θυμόλη και την καρβακρόλη που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση τόσο ανάμεσα στις παραλαβές της τριπλέτας κάθε δείγματος όσο και ανάμεσα στα δύο διαφορετικά δείγματα των δύο παραγωγών, αποτέλεσμα που τα

καθιστά αρκετά ασταθή συστατικά κατά την εκχύλιση και απομόνωση των πτητικών συστατικών με οργανικό διαλύτη.

Όσον αφορά το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, τα εκχυλίσματα του ενός δείγματος (της εταιρείας “Το Βάλσαμο”) φαίνεται να είναι λίγο πιο πλούσια από το άλλο. Παρόλα αυτά, και στα δύο δείγματα, τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα είναι πολύ πιο πλούσια σε φαινολικά συστατικά από όλες τις παραλαβές αγγίζοντας τα 2,8 mg/mL σε περιεκτικότητα. Ακολουθεί το αποσπασμένο υδρόλυμα της σφαιρικής κατά την υδροαπόσταξη, το αφένημα και τέλος η υδατική φάση της χοάνης. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τις βιβλιογραφικές αναφορές των Barnes J, Anderson .A Phillipson D.J, 2001 και Sadiqqe Z., Naeem I, Maimoona A., 2010, για ύπαρξη φαινολικών συστατικών στο υπέρικο και μάλιστα για κατάταξή τους στα κυριότερα συστατικά του, μεταξύ των οποίων οι ομάδες των φλαβονοειδών, φαινολών, διφλαβονοειδών και φαινυλοπροπανοειδών με τα φλαβονοειδή να αποτελούν τη κυριότερη ομάδα βιοδραστικών ουσιών του *Hypericum perforatum* L. (2%-4%). Τα ποσοτικά αποτελέσματα είναι αναμενόμενα και επιβεβαιώνουν τις βιβλιογραφικές αναφορές όσον αφορά τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, ενώ όσον αφορά το αποσπασμένο υδρόλυμα της σφαιρικής, είναι η πρώτη φορά που μελετάται το φαινολικό περιεχόμενο της συγκεκριμένης παραλαβής σε δείγμα υπέρικου και υποθέτουμε ότι πιθανότατα λόγω της μεγάλης διάρκειας βρασμού κατά την υδροαπόσταξη, τα φαινολικά συστατικά εκχυλίστηκαν καλύτερα στην συγκεκριμένη περίπτωση από ότι στο αφένημα, συμπεράσμα το οποίο αντιτίθεται του αναμενόμενου καθώς θα περιμέναμε ο έντονος βρασμός να έχει οξειδώσει και συνεπώς - καταστρέψει τα περισσότερα από τα φαινολικά συστατικά της παραλαβής. Τέλος, η υδατική φάση της χοάνης κατά την απομόνωση των πτητικών συστατικών, η οποία επίσης μελετάται για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία, δίνει αποτελέσματα που επιβεβαιώνουν τις υποψίες μας καθώς μιλάμε για μία παραλαβή που προέρχεται από εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, κατά την οποία πιθανότατα πολλά φαινολικά συστατικά αλλοιώθηκαν και χάθηκαν με αποτέλεσμα να μειωθεί η τελική τιμή του ολικού φαινολικού περιεχομένου.

Την υψηλότερη ένδειξη τοξικότητας από όλες τις παραλαβές έδωσε το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του φυτικού υλικού και των δύο παραγωγών – εμπόρων, ενώ ακολούθησε το αποσπασμένο υδρόλυμα της σφαιρικής και τέλος το αφένημα. Οι τιμές φαίνεται να είναι παράλληλες με τις τιμές του ολικού φαινολικού περιεχομένου κάτι το οποίο οδηγεί σε ένα πρώτο συμπέρασμα πως όσο αυξάνεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο τόσο αυξάνεται και η τοξικότητα του αφεινήματος αναλογικά. Συμπέρασμα που επιβεβαιώνεται από μετέπειτα αποτελέσματα των αναλύσεων κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο υπολογισμού των επιπέδων του ATP. Γνωρίζοντας ότι οποιαδήποτε μορφή κυτταρικής βλάβης έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων ATP παρατηρείται ότι και εδώ, η μεγαλύτερη αναστροφή – μείωση των επιπέδων της κυτταρικής βλάβης έχει επιτευχθεί μετά την επώαση των κυττάρων με το αφένημα του υπέρικου, το οποίο βρέθηκε το λιγότερο τοξικό, την ίδια στιγμή που η εφαρμογή των υπόλοιπων εκχυλισμάτων οδήγησε σε πολύ μικρή διαφορά στα επίπεδα της κυτταρικής βλάβης σε σχέση με τον μάρτυρα.

Τέλος, αυτό μικροσκοπικά παρατηρείται και επιβεβαιώνεται στις Εικόνες 38 και 39, όπου φαίνεται ξεκάθαρα πως το αφένημα του υπέρικου, ως θεραπεία του τραύματος της πληγής, προάγει την διαδικασία της επούλωσης και της μετανάστευσης των κυττάρων προς το πεδίο του τραύματος και μάλιστα παρουσιάζει και έναν αρκετά ταχύ ρυθμό μετανάστευσης κυττάρων και αναγέννησης δερματικών κερατινοκυττάρων. Σε αυτό το σημείο τονίζουμε και πάλι πως από τις εικόνες του μικροσκοπίου μπορούμε να διακρίνουμε με βεβαιότητα μόνο τις ποιοτικές και όχι τις ποσοτικές αλλαγές και για το λόγο αυτό, στηρίζομαστε στις μετρήσεις των κυτταροπλασματικών επιπέδων ATP για το τελικό μας συμπέρασμα. Παρόλα αυτά, είναι αδιαμφισβήτητο από την μικροσκοπική παρατήρηση, πως το αφένημα του υπέρικου μετά από την εφαρμογή του, οδηγεί σε συμπλήρωση του κεντρικού κενού πεδίου της τομής από δερματικά κερατινοκύτταρα, σε αντίθεση με το δείγμα των κυττάρων ελέγχου αλλά και σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από τα υπόλοιπα δείγματα που δέχτηκαν θεραπεία με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, με το υδρομεθανολικό εκχύλισμα να φαίνεται το λιγότερο επουλωτικό από όλα σε συνέχεια των προηγούμενων συμπερασμάτων σχετικών με τη τοξικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων των Hemmati AA, Rashidi I, Jafari M, 2007, Suntar I, et. al., 2011, , Tanideh N. et. al., 2014 και Kiyani S. et.al., 2015 οι οποίοι αποδεικνύουν στις βιβλιογραφικές τους αυτές αναφορές την επουλωτική δράση διαφόρων υδατικών και οργανικών εκχυλισμάτων του υπέρικου. Παρόλα αυτά, η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη εκτενή μελέτη της επουλωτικής δράσης του αφενήματος του υπέρικου ως μεμονωμένη παραλαβή.

Όσον αφορά το βαλσαμέλαιο και τα συμπεράσματα που απορρέουν από τα αποτελέσματα των αναλύσεών του, αρχικά η Φασματοσκοπία Raman δεν οδήγησε σε κάποιο σαφές συμπέρασμα καθώς στα περισσότερα δείγματα δεν ήταν δυνατή η λήψη του φάσματος λόγω του έντονου κόκκινου χρώματος των δειγμάτων βαλσαμελαίου. Παρόλα αυτά, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη τεχνική δεν ενδείκνυται για αναλύσεις βαλσαμελαίων και άλλων έντονα χρωματισμένων ελαϊκών εκχυλισμάτων ενώ όπως αποδεικνύουν οι Zou M-Q, 2009 και El-Abassy R.M. Donfack P., Materny A., 2009 αποτελεί μία πολύτιμη μέθοδο ανάλυσης, διαχωρισμού και ποιοτικής και ποσοτικής διαφοροποίησης του ελαιολάδου και άλλων φυτικών ελαίων.

Τα δείγματα σε δεύτερη φάση αναλύθηκαν και με την τεχνική της Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας ATR. Ένα αρχικό συμπέρασμα που μπορούμε να βγάλουμε από την οπτική παρατήρηση των φασμάτων καθώς συγκρίνονται, είναι πως οι κορυφές κάποιων βαλσαμελαίων βρίσκονται λίγο πιο ψηλά από τις υπόλοιπες. Αυτό ίσως οφείλεται στον τρόπο παρασκευής του εκάστοτε βαλσαμελαίου (τεχνητή θέρμανση ή φυσιολογική εκχύλιση στον ήλιο). Επίσης, στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και τα βαλσαμέλαια που παρασκευάστηκαν με ξηρή δρόγη στο σκοτάδι αλλά και στο φως σε μαύρα μπουκάλια εντοπίζονται οι κατώτερες κορυφές. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη έκθεση στη θερμότητα έχει υποστεί ένα λάδι τόσο υψηλότερα παρουσιάζονται οι κορυφές του στο υπέρυθρο φάσμα. Επίσης, εμφανής είναι και η διαφοροποίηση που παρουσιάζεται στην περιοχή των κυματαριθμών $1650 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ όπου συναντάμε και τα *cis*-ακόρεστα λιπαρά οξέα, επιβεβαιώνοντας τους Hennessy S., Downey G., O' Donnell C.P., 2009 που τη χαρακτηρίζουν ως μία από τις σημαντικότερες περιοχές φάσματος του ελαιολάδου και άλλων ελαίων. Οι συνθήκες παρασκευής των βαλσαμελαίων που παρασκευάστηκαν εργαστηριακά ήταν ελεγχόμενες και συνεπώς, δεν υπήρξε κάποια σημαντική οξειδωση λόγω θερμότητας ή ηλιακού φωτός.

Αντιθέτως, στα εμπορικά βαλσαμέλαια ο τρόπος παρασκευής και εκχύλισης δεν είναι πάντα γνωστός και άρα οποιαδήποτε μεταβολή στο προφίλ των κορυφών των λιπαρών οξέων στα υπέρυθρα φάσματα είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε κάποια οξείδωση κατά την διαδικασία παρασκευής των ελαϊκών εκχυλισμάτων.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στα συστατικά των ελαϊκών εκχυλισμάτων γίνεται εμφανής και στα αποτελέσματα των μετρήσεων των συντελεστών “Κ” όπου παρατηρείται ότι στα βαλσαμέλαια που έχουν παρασκευαστεί με φυσιολογική αργή εκχύλιση με παραμονή στον ήλιο για περίπου 40 ημέρες, οι τιμές των συντελεστών απόσβεσης αυξάνονται ελαφρώς στις περισσότερες περιπτώσεις με κάποιες εξαιρέσεις, όπου δεν παρατηρείται σημαντική απόκλιση από τις τιμές των κατώτερων ορίων βάσει νομοθεσίας.

Οι ολικές υπερικίνες υπολογίστηκαν φασματοσκοπικά και βρέθηκαν σε υψηλότερες τιμές στα έντονα χρωματισμένα ελαϊκά εκχυλίσματα ενώ η διαβάθμιση στην περιεκτικότητα βρέθηκε να είναι ανάλογη της έντασης του κόκκινου χρώματος. Σύμφωνα με αυτό το αποτέλεσμα προκύπτει το συμπέρασμα ότι όσο πιο έντονο το κόκκινο χρώμα στο βαλσαμέλαιο, τόσο υψηλότερη η περιεκτικότητά του σε ολικές υπερικίνες και άρα τα βαλσαμέλαια που παρασκευάζονται είτε από ξηρή δρόγη είτε στο σκοτάδι και οδηγούν στην παρασκευή βαλσαμελαίων με κίτρινο – πορτοκαλί ανοιχτό χρώμα, αναμένεται να έχουν χαμηλότερο υπερικινικό περιεχόμενο και συνεπώς και την αντίστοιχη βιοδραστικότητα που αντιστοιχεί στις συγκεκριμένες δραστικές ουσίες του υπέρικου. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Heinrich M., et. al. οι οποίοι στο επιστημονικό τους άρθρο, που δημοσίευσαν το 2017, μελέτησαν την περιεκτικότητα σε ολικές υπερικίνες σε διάφορα ελαϊκά εκχυλίσματα υπέρικου που προήλθαν από διαφορετικά έλαια βάσης. Και εδώ, τα πιο σκουρόχρωμα έδωσαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε υπερικίνες και τα πιο ανοιχτόχρωμα χαμηλότερη. Η διαφοροποίηση αυτή είναι εμφανής στην Εικόνα 11, Σελ. 26 της εργασίας μας όπου παρουσιάζονται τα διάφορα εκχυλίσματα και το διάγραμμα συσχέτισμού τους με την περιεκτικότητα σε ολικές υπερικίνες.

Τέλος, από τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης των βαλσαμελαίων, προκύπτει ότι τα εργαστηριακά παρασκευασμένα δείγματα παρουσιάζουν μία πιο σταθερή ποσοτική σύσταση λιπαρών οξέων από ότι τα εμπορικά δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, μόνο σε ένα δείγμα φρέσκου βαλσαμελαίου εμπορίου εντοπίζεται μία μικρή ποσότητα σκουαλενίου, τη στιγμή που στα εργαστηριακά βαλσαμέλαια εντοπίζεται σε όλα τα δείγματα. Η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά την εκχύλιση σε κάποια από τα αναλυόμενα δείγματα, δεν φαίνεται να είχε κάποια επίδραση στην σύσταση των λιπαρών οξέων των ελαίων. Δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική διαφοροποίηση στη σύσταση μεταξύ των εμπορικών και των εργαστηριακά παρασκευασμένων βαλσαμελαίων.

Κλείνοντας, από την έρευνά μας επιβεβαιώνεται η βιοδραστικότητα του υπέρικου, όσον αφορά την επουλωτική δράση σε δερματικές τομές, καθώς επίσης επιβεβαιώνεται η ύπαρξη και η ανάλογη σχέση μεταξύ τοξικότητας και υψηλής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά. Πιο έντονα επουλωτικό αποδεικνύεται το

αφέψημα και ακολουθεί το αποσπασμένο υδρόλυμα της σφαιρικής και τέλος το υδρομεθανολικό εκχύλισμα. Το αιθέριο έλαιο του υπέρικου, αν και σχετικά παραμελημένο από την ερευνητική κοινότητα, αποδεικνύεται πολύ πλούσιο σε πτητικά συστατικά, αρκετά εκ των οποίων είναι τόσο σταθερά και υψηλά σε περιεκτικότητα που διατηρούνται και περνούν στην φάση του αφεψήματος κατά την παρασκευή του με βρασμό σε νερό με τη διαδικασία που αναφέρουμε στην Ενότητα 3. του Πειραματικού Μέρους. Μία παρασκευή που θεωρείται από τις συνηθέστερες για την κατανάλωση του φυτού, τόσο στην χώρα μας όσο και ανά τον κόσμο. Τέλος, συμπεραίνουμε ότι η διαφοροποίηση στις συνθήκες παρασκευής του ελαϊκού εκχυλίσματος επιφέρει διαφοροποίηση τόσο στη σύσταση όσο και στο χρωματισμό του εκχυλίσματος. Σε μερικές τιμές οι δύο αυτοί παράγοντες είναι ανάλογοι ενώ σε άλλες δε συγχέονται πουθενά. Επί παραδείγματι, αποδεικνύεται η ανάλογη σχέση της περιεκτικότητας σε ολικές υπερικίνες στα διάφορα βαλσαμέλαια και του χρώματος του ελαϊκού εκχυλίσματος. Όσο πιο πορφυρό κόκκινο το χρώμα του βαλσαμελαίου τόσο μεγαλύτερη και η περιεκτικότητα σε ολικές υπερικίνες. Συμπέρασμα αναμενόμενο αλλά εξίσου σημαντικό.

Κλείνοντας, θεωρώ πως είναι απαραίτητη η μετέπειτα πειραματική και ερευνητική ενασχόληση με το συγκεκριμένο φυτό και το ελαϊκό του εκχύλισμα. Πιο συγκεκριμένα κρίνεται απαραίτητη η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων, η ανάλυση, εξακρίβωση και ταυτοποίηση των συστατικών που είναι υπεύθυνα για την επουλωτική δράση και τέλος πειράματα βιοδραστικότητας στα διάφορα βαλσαμέλαια με σκοπό την απόδειξη της επουλωτικής τους δράσης και την υπεροχή τους – ή μη – έναντι της επουλωτικής δράσης του απλού ελαιολάδου ως μεμονωμένη ελαϊκή βάση. Οι συγκεκριμένες μετρήσεις αποτελούν μετρήσεις που πραγματοποιούνται για πρώτη φορά στην ερευνητική κοινότητα και θα απαντήσουν σε πολλά ερωτήματα, όπως πιο συγκεκριμένα στο ερώτημα που προσπαθήσαμε να απαντήσουμε εμείς μέσω του πειράματός μας: “Έπηρεάζει το είδος της δρόγης και ο τρόπος εκχύλισης (νωπό-ξηρό, ήλιος-θέρμανση-σκοτάδι, αντίστοιχα) το βιοδραστικό περιεχόμενο των βαλσαμελαίων”; Και αν ναι, τι επίδραση έχει αυτό στην επουλωτική δράση που χαρακτηρίζει το φυτό και το ελαϊκό του εκχύλισμα;.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agapouda A., Booker A., Kiss T., Hohmann J., Heinrich M., Csupor D., “*Quality control of Hypericum perforatum L. analytical challenges and recent progress*”: A Review”, Royal Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology (2017)
2. Arsić I., Žugić A., Runjajić Antić D., Zdunić G., Dekanski D., Marković G., Tadić V., “*Hypericum Perforatum L. Hypericaceae/Guttiferae Sunflower, Olive and Palm Oil Extracts Attenuate Cold Restraint Stress – Induced Gastric Lesions*”, *Molecules* 2010, 15(10), 6688-6698
3. Avato, P., Raffo, F., Guglielmi, G., Vitali, C., Rosato, A., “*Extracts from St. John’s Wort and their antimicrobial activity*”, *Phytotherapy Research* 18 (2004) 230–232.
4. Barnes J., Anderson L.A., Phillipson J.D., “*St John’s wort (Hypericum perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties*”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology JPP*, 2001, 53: 583–600
5. Becker L., Zeiter A., Petit J., Zimmer D., Karam M-C, Baudelaire E., Scher J., Dicko A., “*Improvement of antioxidant activity and polyphenol content of Hypericum perforatum and Achillea millefolium powders using successive grinding and sieving*”, *Industrial Crops and Products* 87 (2016) 116-123
6. Benedi J., Arroyo R., Romero C., Martin-Aragon S., Villar AM., “*Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of Hypericum perforatum on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells*”, *Life Sciences* 75 (2004) 1263-1276
7. Bertoli A., Cirak C., Teixeira J.A. da Silva, “*Hypericum Species as Sources of Valuable Essential Oils*”, *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 5 (Special Issue 1), 29-47, (2011) Global Science Book
8. Breyer A., Elstner M., Gillissen T., Weiser D., Elstner E., “*Glutamate-induced cell death in neuronal HT22 cells is attenuated by extracts from St. John’s wort (Hypericum perforatum L.)*”, *Phytomedicine* 14 (2007) 250-255
9. Crockett S.L, Norman K. B., “*Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus Hypericum*”, *Med Aromat Plant Sci Biotechnol* . 2011, (Special Issue 1): 1–13
10. CytoSelect™ 24 – Well Wound Healing Assay - *Product Manual* -, CELL BIOLABS INC.
11. Dell’Aica et. al., “*Hyperforin Blocks Neutrophil Activation of Matrix Metalloproteinase-9, Motility and Recruitment, and Restrains Inflammation-Triggered Angiogenesis and Lung Fibrosis*”, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007, 492-500
12. El-Abassy, Donfack P., Materny A., “*Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration*”, *Journal of Raman Spectroscopy*, 40 (2009) pp. 1284-1289

13. Ernst E., *“Hypericum – The genus Hypericum”*, Published by Taylor & Francis, 2003
14. European Medicines Agency, *Annual Report*, 2009
15. Gioti E.M., Fiamegos Y.C., Skalkos D.C., Stalikas C.D., *“Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of Hypericum perforatum L. from Epirus, Greece”*, Food Chemistry, 2009
16. Hammer K.D.P. et.al., *“Inhibition of Prostaglandin E2 Production by Anti-inflammatory Hypericum perforatum Extracts and Constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells”*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55, 7323-7331
17. Heinrich M., Vikuk V., Daniels R., Stintzing F.C., Kammerer D.R., *“Characterization of Hypericum perforatum L. (St. John’s Wort) macerates prepared with different fatty oils upon processing and storage”*, Phytochemistry Letters, 2017
18. Hemmati AA, Rashidi I, Jafari M, *“PROMOTION OF WOUND HEALING BY HYPERICUM PERFORATUM EXTRACT IN RABBIT”*, Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 2007; 2(2): 78-86
19. Hennessy S., Downey G., O’ Donnell C.P., *“ Confirmation of Food Origin Claims by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics: Extra Virgin Olive Oil from Liguria”* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (2009) pp. 1735-1741
20. Hölz I., Dernisch L., Stock S., *“Comparison of the Hypericin and Peroxide Concentration of Commercial and Self-Produced Oleum Hyperici and its Effect on Serotonin Uptake”*, Planta Medica 55 (1989) 601-602
21. Hosna K. et. al., *“Bioactive components of three Hypericum species from Tunisia: A comparative study”*, Industrial Crops and Products 31 (2010) 158-163
22. Huang D, Ou B, Prior RL, *“The chemistry behind antioxidant capacity assays”*, Journal of Agricultural and Food Chemistry (2005) pp. 1841-1856
23. Isaachi B., Bergonzi M.C., Carnevali F., van der Esch S.A., Vincieri F.F., Bilia A.R., *“Analysis and stability of the constituents of St. John’s Wort oils prepared with different methods”*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45 (2007) pp. 756-761.
24. Kim S-J, Um J-Y, Hong S-H, Lee J-Y, *“Anti-Inflammatory Activity of Hyperoside Through the Suppression of Nuclear Factor- κ B Activation in Mouse Peritoneal Macrophages”*, The American Journal of Chinese Medicine, Vol. 39, No. 1, (2013) 171-181
25. Kıyan S. et.al., *“Investigation of acute effects of Hypericum perforatum (St. John’s Wort – Kantaron) treatment in experimental thermal burns and comparison with silver sulfadiazine treatment”*, Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, (2015) Vol. 21, No. 5)

26. Kokalj M et al., “Differences among *Epilobium* and *Hypericum* species revealed by four IR spectroscopy modes: transmission, KBr tablet, diffuse reflectance and ATR”, *Phytochemical Analysis*, (2011) , 541–546
27. Kopprivnjak O., Skevin D., Valic S., Majetic V., Petricevic S., Ljubenkovic I., “The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids”, *Food Chemistry* 111 (2008) 121-126
28. Koyu H., Haznedaroglu M.Z., “Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract”, *Journal of Food and Drug Analysis, JFDA*, 23, (2015) 545-551
29. Leuner K et. al., “Reduced TRPC channel expression in psoriatic keratinocytes is associated with impaired differentiation and enhanced proliferation”, *PLoS One*, 2011
30. Lu Y.H, Du C.B, Liu J.W, Hong W, Wei D.Z, “Neuroprotective effects of *Hypericum perforatum* on trauma induced by hydrogen peroxide in PC12 cells”, *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 32, No. 3, 397-405, 2004
31. Ludger Beerhues, “Molecules of Interest - Hyperforin”, *Phytochemistry* 67 (2006) 2201-2207
32. Maisenbacher P., Kovar K.A., “Analysis and Stability of *Hyperici Oleum*”, *Planta Med.* 58, 1992
33. Mohanasundari M., Srinivasan M.S, Sethupathy S., Sabesan M., “Enhanced neuroprotective effect by combination of bromocriptine and *Hypericum perforatum* extract against MPTP-induced neurotoxicity in mice”, *Journal of the Neurological Sciences* 249 (2006) 140-144
34. Morshedloo M.R, Ebadi A., Maggi F., Fattahi R., Yazdani D, Jafari M, “Chemical characterization of the essential oil compositions from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L.”, *Industrial Crops and Products* 76 (2015) 565-573
35. Mosmann T., “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of Immunological Methods* 65 (1983), pp. 55-63
36. Müller M et. al., “Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation”, *J Biol Chem.* (2008) (49): 33942-54
37. Nichita C et al., “Vegetal antioxidants obtained from *Hypericum perforatum* species”, *Rev Chim Bucharest Orig Ed* (2007), 910–913.
38. Oliveira A.I, Pinho C., Sarmiento B., Dias A.C.D, “Neuroprotective Activity of *Hypericum perforatum* and its mayor components”, Review, *Frontiers in Plant Science*, (2017) Volume 7, Article 1004
39. Orhan I.E., Kartal M., Gulpinar A.P., Cos P., Matheussen A., Maes L., Tasdemir D., “Assessment of antimicrobial and antiprotozoal activity of the olive oil macerate samples of *Hypericum perforatum* and their LC–DAD–MS analyses”, *Food Chemistry* 138 (2013) pp. 870-875.
40. Orhan I.E., , Kartal M., Gulpinar A.R, Yetkin G., Orlikova B., Diederich M., Tasdemir D., “Inhibitory effect of *St. John’s Wort* oil macerates on TNF α -

- induced NF- κ B activation and their fatty acid composition*”, Journal of Ethnopharmacology 155 (2014) 1086-1092
41. Petrakis PV, Couladis M, Roussis V, “*A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: The case of five Hellenic Hypericum L. species*”, Biochemistry and Systematic Ecology 33, (2005) 873-898
 42. Radulovic N. et. al., “*Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine Hypericum species from the Balkans*”, Food Chemistry 103 (2007) 15-21
 43. Rancic A., Sokovic M., Vukojevic J., Simic A., Marin P., Duletic-Lausevic S., Djokovic S., “*Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Myrrhis odorata (L.) Scop, Hypericum perforatum L and Helichrysum arenarium (L.) Moench*”, Journal of Essential Oil Research, 17, 2005, 341 – 345
 44. Raso G. M., Pacilio M., Di Carlo G., Esposito E., Pinto L., Meli R., “*In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of Echinacea purpurea and Hypericum perforatum*”, Journal of Pharmacy and Pharmacology, JPP (2002) 54:1379-1383
 45. Roggo Y et al., “*A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies.*”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (2007), 683–700.
 46. Rubió L., Motilva M-J., Maciá A., Ramo T., Romero M-P., “*Development of a phenol-enriched olive oil with both its own phenolic compounds and complementary phenols from thyme*”, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60 (2012) 3105-3112
 47. Sadiq Z., Naeem I., Maimoona A., “*A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L.*”, Journal of Ethnopharmacology 131 (2010) 511-521
 48. Samadi S., Khadivzadeh T., Emami A., Moosavi N.S., Tafaghodi M., Behnam H.R., “*The Effect of Hypericum perforatum on the Wound Healing and Scar of Cesarean*”, The journal of alternative and complementary medicine, 16-1 (2010) 113-117
 49. Schwob I., Bessiere J-M, Masotti V., Viano J., “*Changes in essential oil composition in Saint John’s Wort (Hypericum perforatum L.) aerial parts during its phenological cycle*”, Biochemical Systematics and Ecology 32 (2004) 735-745
 50. Silva B.A., Malva J.O., Dias A.C.P., “*St. John’s Wort (Hypericum perforatum) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress*”, Food Chemistry 110 (2008) 611-619
 51. Silva B.A., Malva J.O., Dias A.C.P, Ferreres F., Oliveira C.R, “*Neuroprotective effect of H. perforatum extracts on β -amyloid- Induced Neurotoxicity*”, Neurotoxicity Research, 2004, VOL. 6 (2). pp. 119-130

52. Suntar I., Oyardı O., Akkol E.K, Ozcelik B., “*Antimicrobial effect of the extracts from Hypericum perforatum against oral bacteria and biofilm formation*”, Pharmaceutical Biology, 2015
53. Suntar I., Akkol E.A., Keles H., Oktem A., Husnu Can Baser K., Yesilada E., “*A novel wound healing ointment: A formulation of Hypericum perforatum oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge*”, Journal of Ethnopharmacology 134 (2011) 89-96
54. Tanideh N., Namazi F., Andisheh Tadbir A., Ebrahimi H., Koohi-Hosseinabadi O., “*Comparative assessment of the therapeutic effects of the topical and systemic forms of Hypericum perforatum extract on induced oral mucositis in golden hamsters*”, International Journal of Oral Maxillofacial Surgery, 2014, International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons)
55. Wölfl U., Seelinger G., Schempp C.M, “*Topical application of St. John’s Wort (Hypericum perforatum)*”, Planta Med 2014; 80: 109–120
56. Zheleva-Dimitrova D., Nedialkov P., Kitanov G., “*Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from Hypericum species growing in Bulgaria*”, PHCOG MAG, 2010
57. Zhao J., Liu W., Wang J-C, “*Recent Advances Regarding Constituents and Bioactivities of Plants from the Genus Hypericum*”, Chemistry & Biodiversity – Vol. 12 (2015), 309-349
58. Zhu B et al., “*Identification of 20 species Hypericum with near-infrared diffuse reflectance spectrometry.*”, Acad J Second Mil Med Univ (2003) 4: 39
59. Zlatković B.K., Bogosavljević S.S., Radivojević A.R., Pavlović M.A., “*Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison*”, Journal of Ethnopharmacology 151 (2014) 704-713)
60. Zou M-Q et.al., “*Rapid Authentication of Olive Oil Adulteration by Raman Spectrometry*”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57, 6001-6006

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ζουμπούλη Α.Ι., Καραπάντσιος Θ., Μάτη Κ.Α., Μαύρος Π., “*Στοιχεία Φυσικών Διεργασιών*”, Βοηθήματα - ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, 2003
2. Καμίτσος Ε.Ι., Χρυσικός Γ.Δ., “*Εφαρμοσμένη Μοριακή Φασματοσκοπία - Στοιχεία Φασματοσκοπίας Υπερύθρου*”, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Τμήμα Χημείας), Ινστιτούτο Θεωρητικής & Φυσικής Χημείας (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών), Ιούλιος 1999
3. Κουτσός Β. Θεόδωρος, «*Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά*», Εκδόσεις Ζήτη, 2006
4. Μαργιάννη Ε. “*Φυτοχημική Ανάλυση Εκχυλίσματος Πόας Υπερικού*”, Διπλωματική Εργασία, Δ.Π.Μ.Σ. “*Ιατρική Χημεία: Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων*”, Πάτρα, 2011

5. Μηνιώτη Α., “Ανάπτυξη νέων μεθόδων προσδιορισμού Ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας και εφαρμογή στο ελαιόλαδο”, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, 2009
6. Όξενκιουν – Πετροπούλου Μ., “Φασματομετρικές Μέθοδοι - Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης”, ΕΜΠ, Αθήνα 2005
7. Στεφανάκη-Νικοφοράκη Μαρία, “Συστηματική Βοτανική - Αγγειόσπερμα”, Τόμος Α, Εκδόσεις Α.Θ. Σταμούλης, Αθήνα, 1999
8. Ταραντίλης Π., Πολυσίου Μ., Παππάς Χ., “Ενόργανη Ανάλυση - Πανεπιστημιακές Σημειώσεις”, Εργαστήριο Χημείας- Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2013
9. Τέζιας Σ., Μεταπτυχιακή Διατριβή “Τα είδη του γένους *Hypericum*”, Π.Μ.Σ. “Φαρμακολογία και Θεραπευτική”, Α.Π.Θ, Θεσσαλονίκη, 2007
10. Χατζιωάννου Θ.Π, Κουπάρη Μ.Α, “Ενόργανη Ανάλυση”, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2010

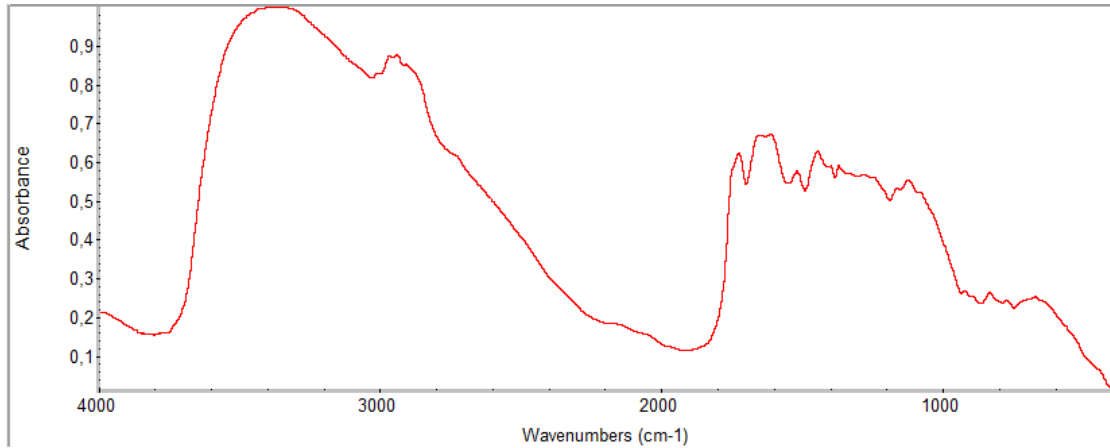
ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ

- 1) United States Department of Agriculture, USDA, <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ACMI2>

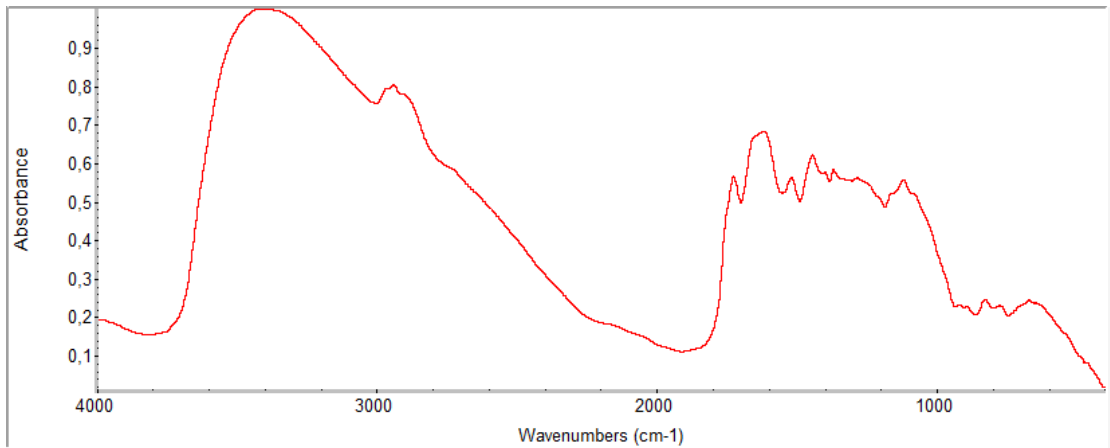
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΥΠΕΡΥΘΡΑΦΑΣΜΑΤΑ DRIFT -IR

Μέσα Φάσματα Ξηρής Δρόγης

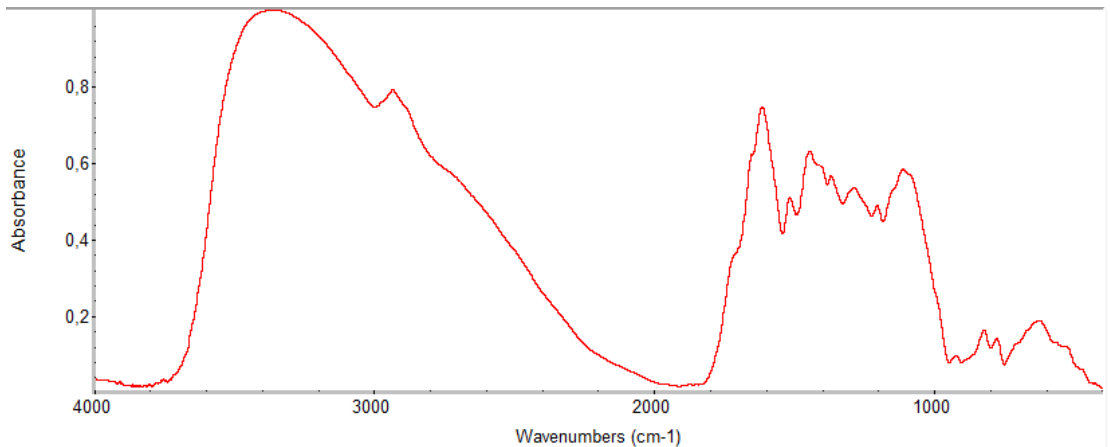


Μέσο Φάσμα Τριπλέτας Ξηρής Δρόγης Δείγματος “Το Βάλσαμο”

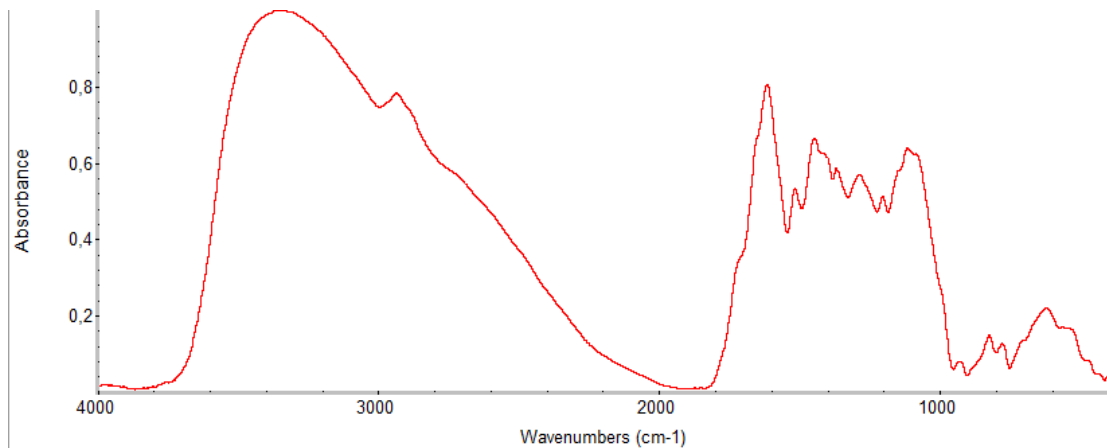


Μέσο Φάσμα Τριπλέτας Ξηρής Δρόγης Δείγματος “Vrino”

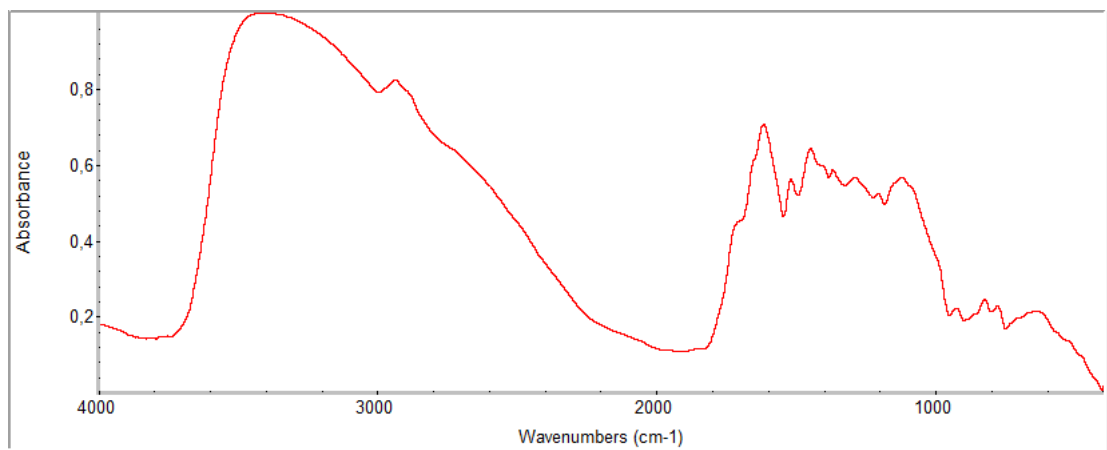
Μέσα Φάσματα Λειοφυλιωμένων Εκχυλισμάτων



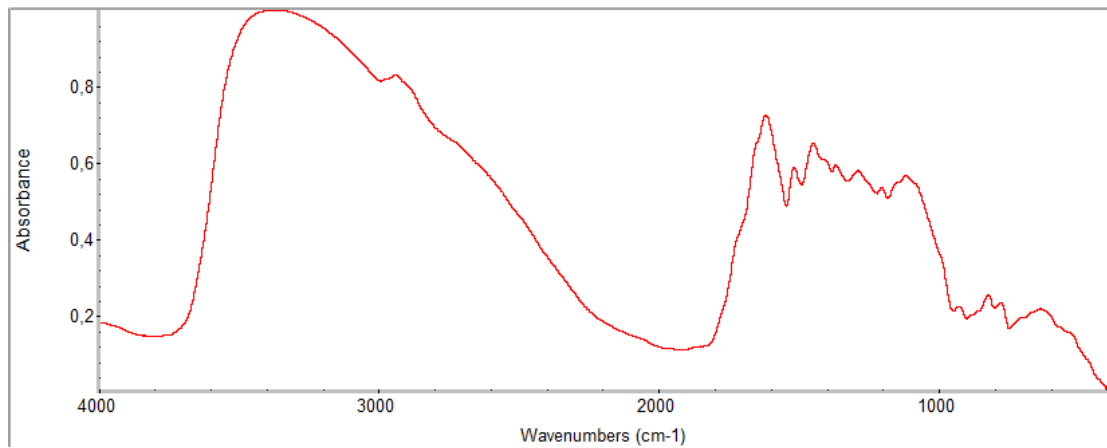
Μέσο Φάσμα Τριπλέτας Λειοφυλιωμένου Αφεψήματος “Το Βάλσαμο”



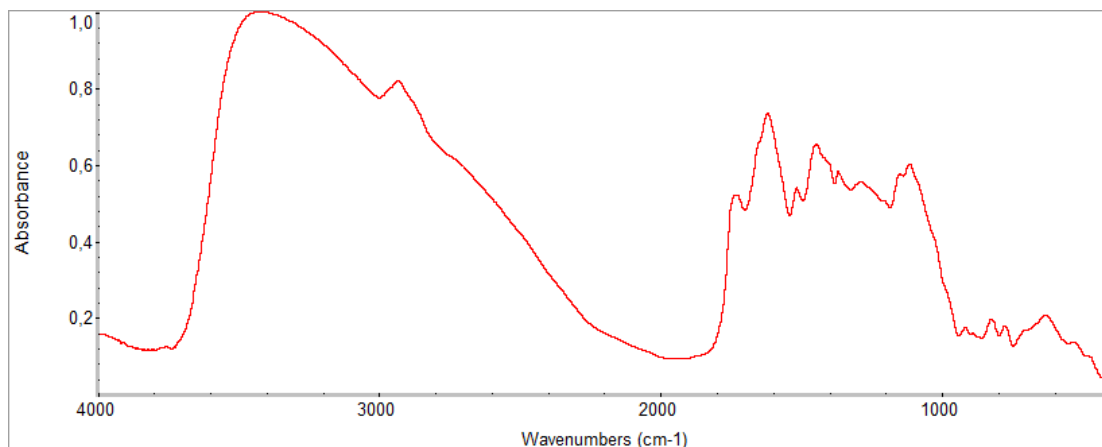
Μέσο Φάσμα Τριπλέτας Λειοφυλιωμένου Αφεψήματος “Vrino”



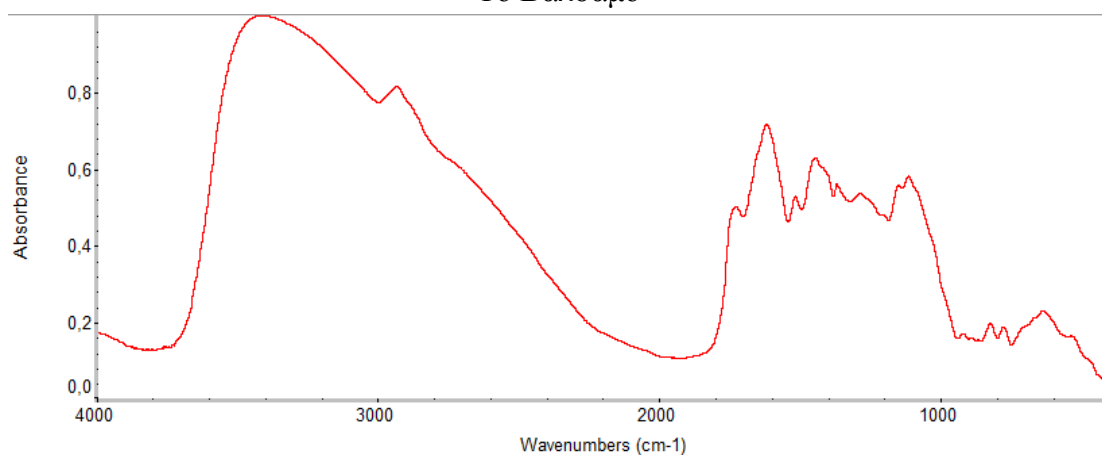
Μέσο Φάσμα Τριπλέτας Λειοφυλιωμένου Υδρομεθανολικού Εκχυλίσματος “Το Βάλσαμο”



Μέσο Φάσμα Τριπλέτας Λειοφυλιωμένου Υδρομεθανολικού Εκχυλίσματος “Vrino”

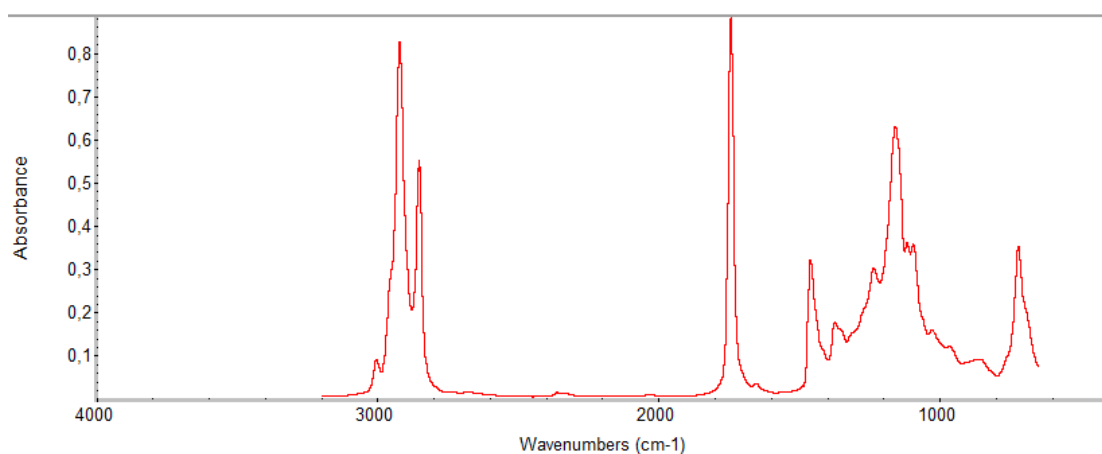


Μέσο Φάσμα Τριπλέτας Λειοφυλιωμένου Αποσπασμένου Υδρολύματος Σφαιρικής
“Το Βάλσαμο”

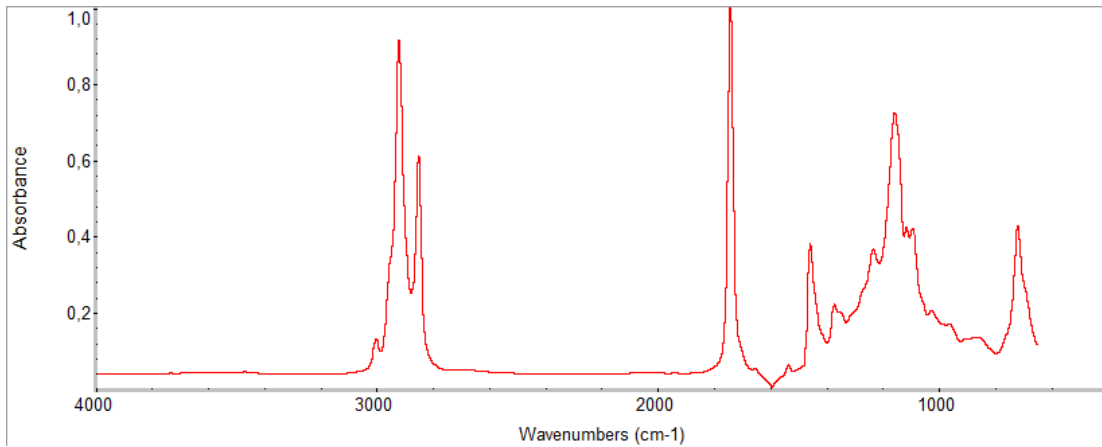


Μέσο Φάσμα Τριπλέτας Λειοφυλιωμένου Αποσπασμένου Υδρολύματος Σφαιρικής
“Vrino”

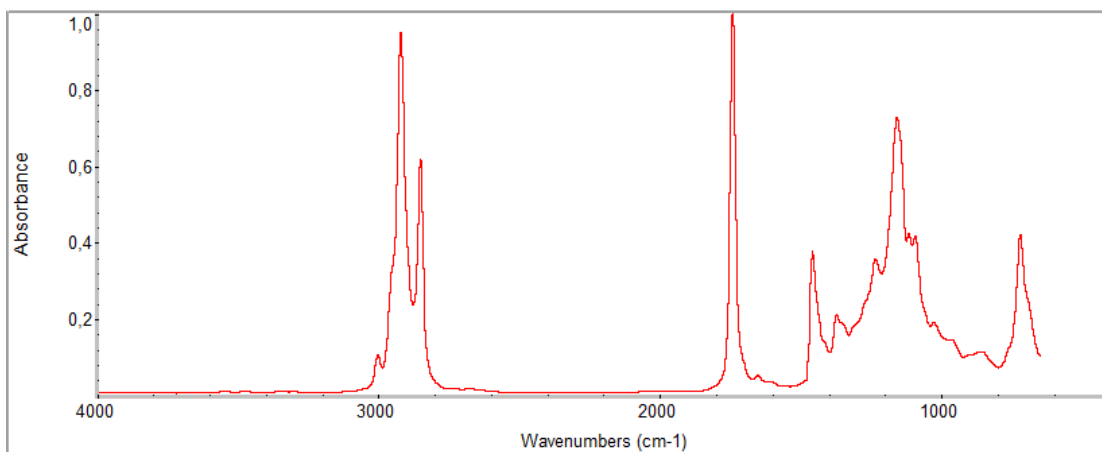
ΥΠΕΡΥΘΡΑΦΑΣΜΑΤΑATR –Oils



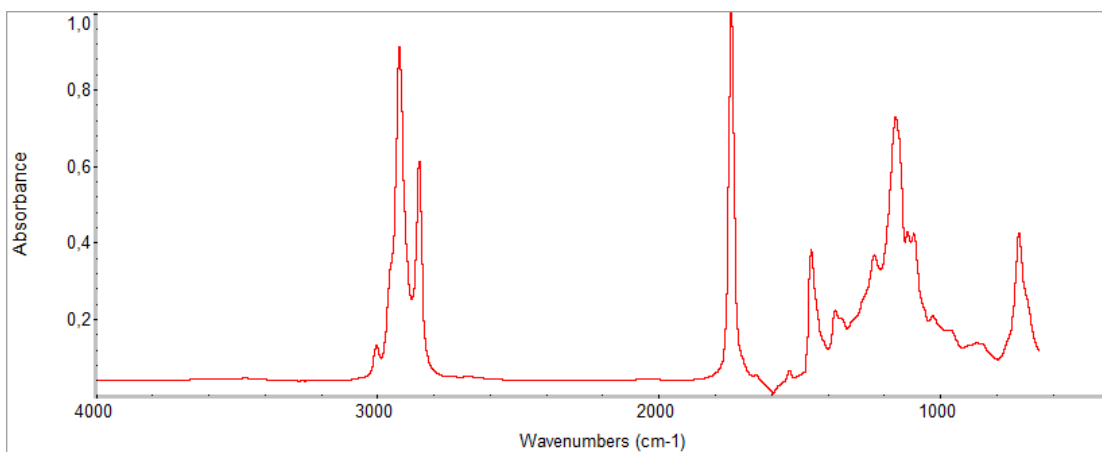
Μέσο Φάσμα Έξτρα Παρθένου Ελαιολάδου – ΕVOO Κορμπάκης



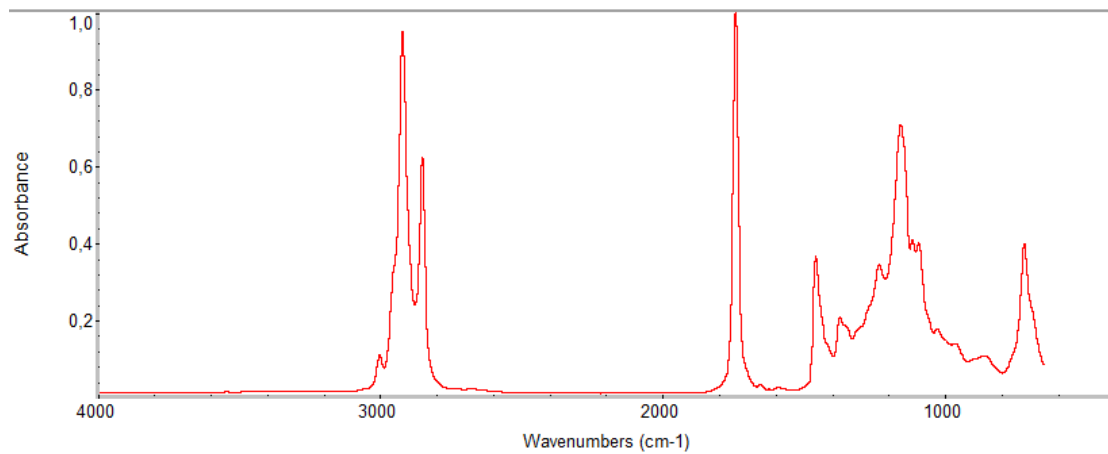
Μέσο Φάσμα Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Αθός”



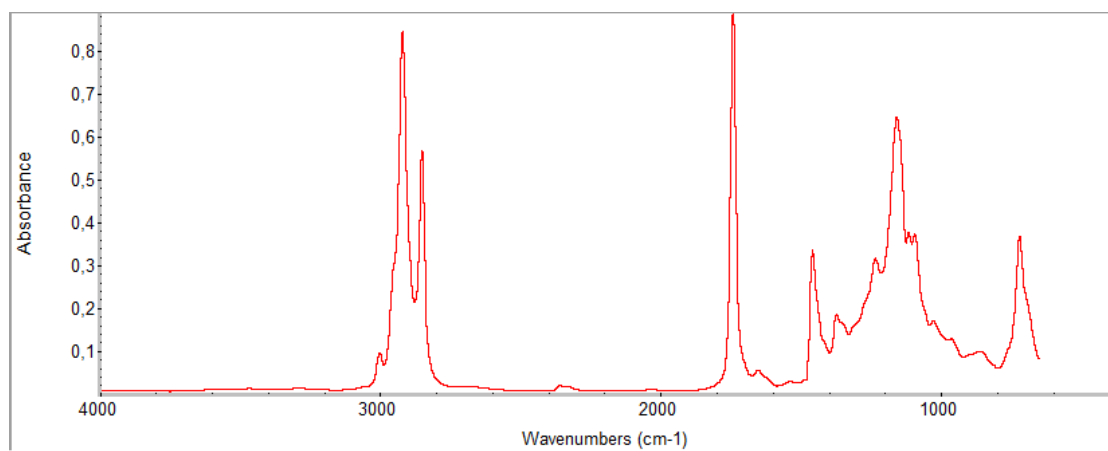
Μέσο Φάσμα Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Εύ Ζην”



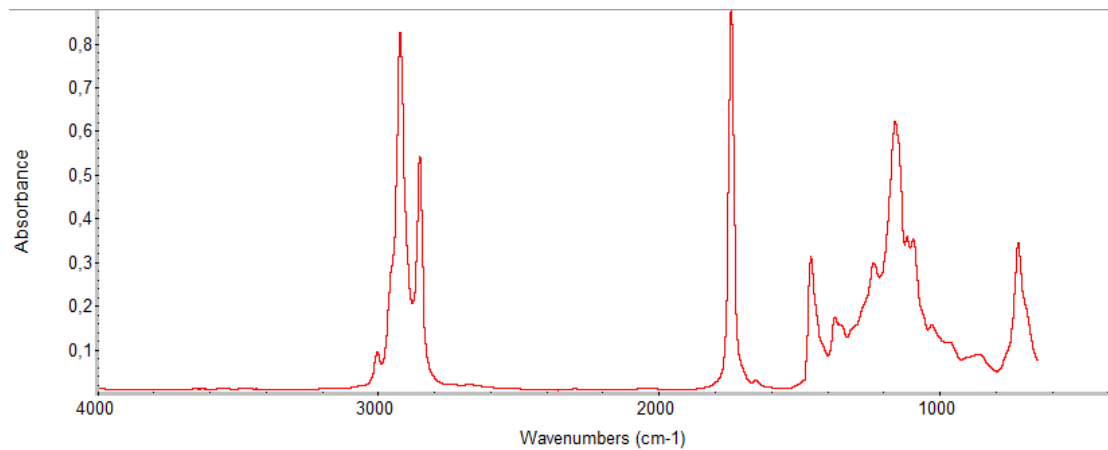
Μέσο Φάσμα Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Herbs & Spices”



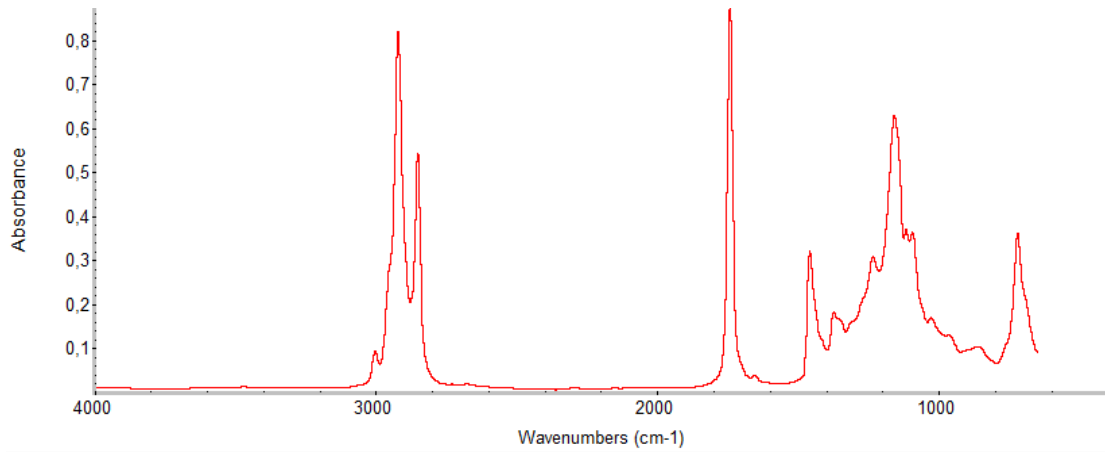
Μέσο Φάσμα Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Open Cosmetics”



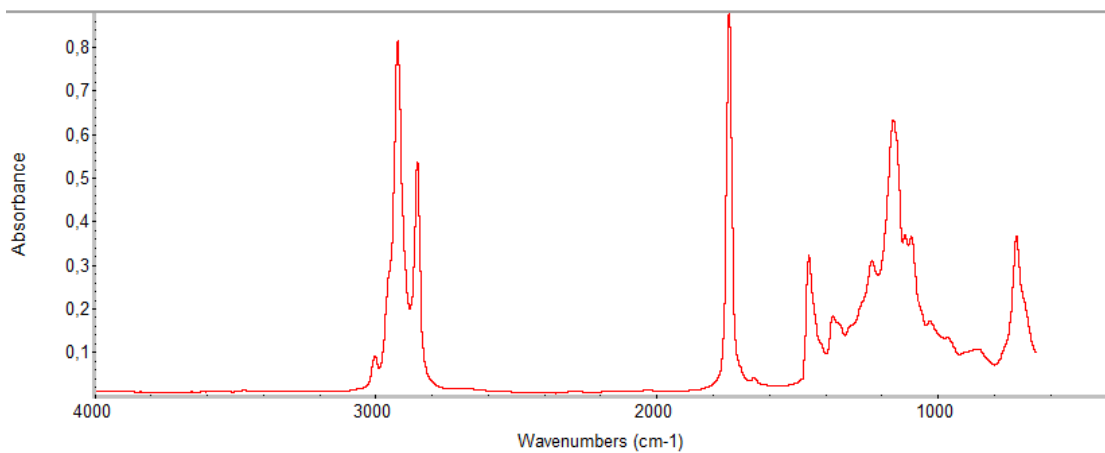
Μέσο Φάσμα Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Χριστοδούλου Παναγιώτα”



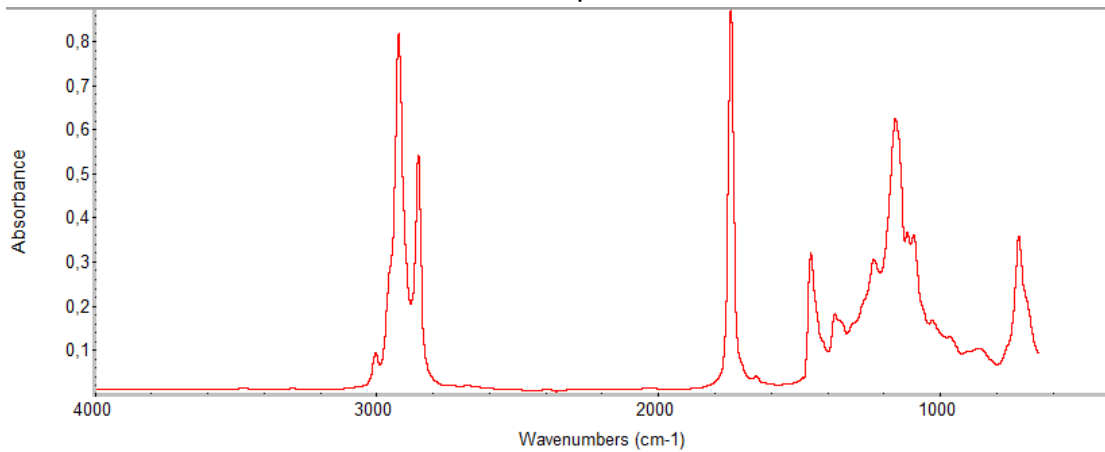
Μέσο Φάσμα Εργαστηριακού Βαλσαμελαίου (Σκοτεινή Παρασκευή) – “Το Βάλσαμο”



Μέσο Φάσμα Εργαστηριακού Βαλσαμελαίου (Σκοτεινή Παρασκευή) – “Vrino”

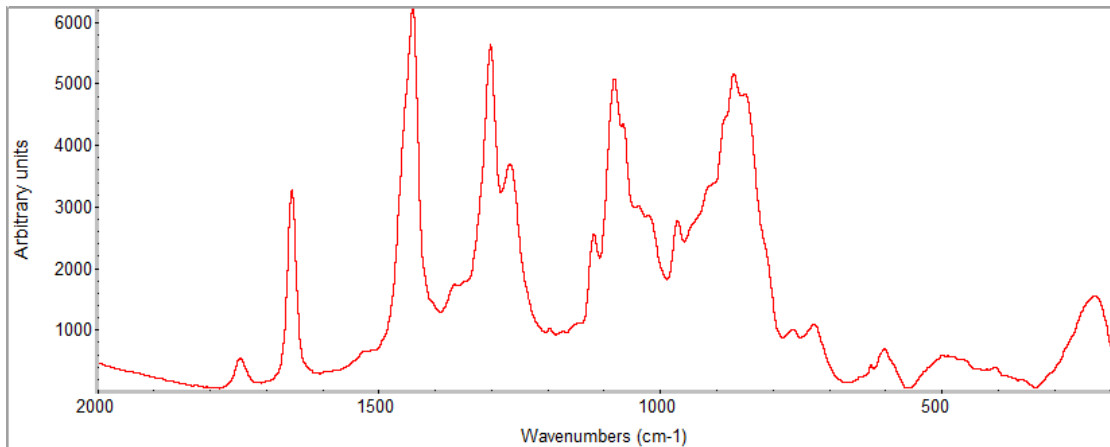


Μέσο Φάσμα Εργαστηριακού Βαλσαμελαίου (Φωτεινή Παρασκευή) – “Το Βάλσαμο”

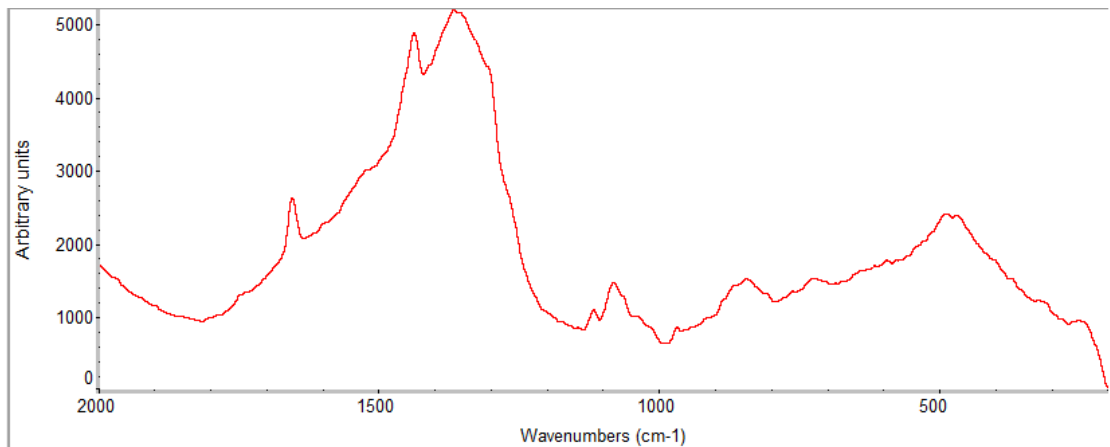


Μέσο Φάσμα Εργαστηριακού Βαλσαμελαίου (Φωτεινή Παρασκευή) – “Vrino”

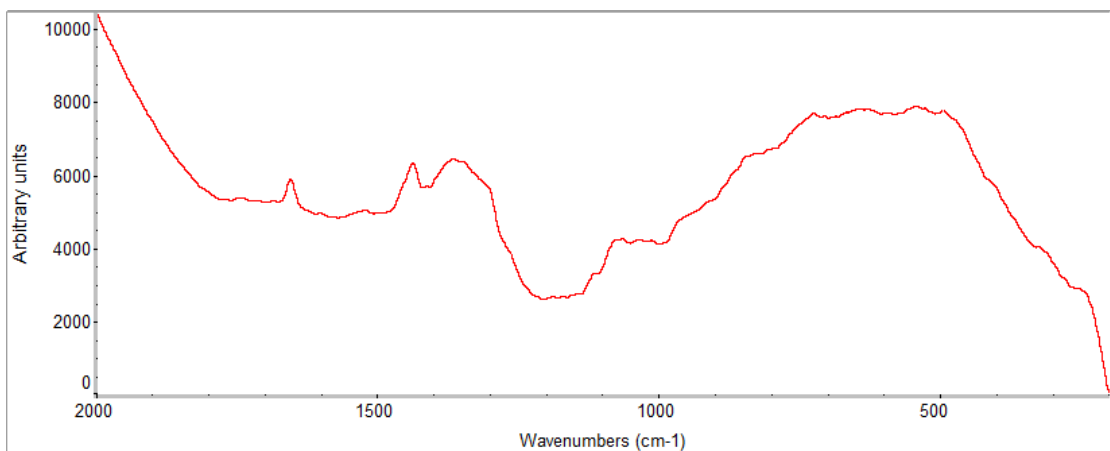
ΥΠΕΡΥΘΡΑΦΑΣΜΑΤΑ RAMAN



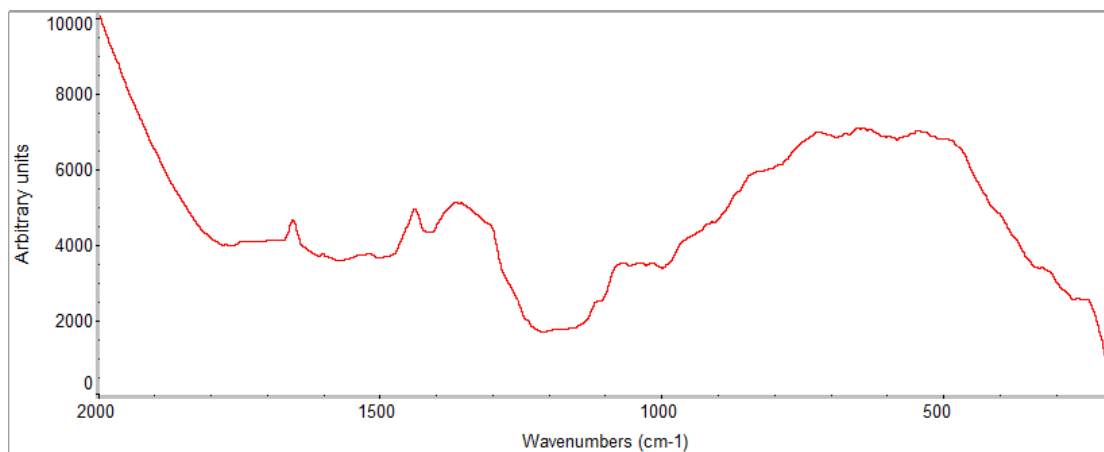
Μέσο Φάσμα Raman Έξτρα Παρθένου Ελαιολάδου – ΕΝΟΟ Κορμπάκης



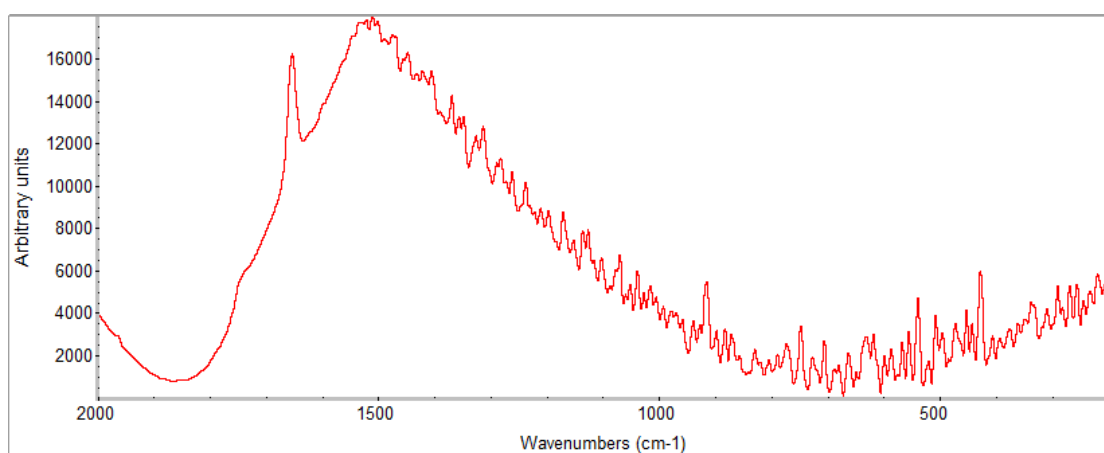
Μέσο Φάσμα Raman Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Αθός”



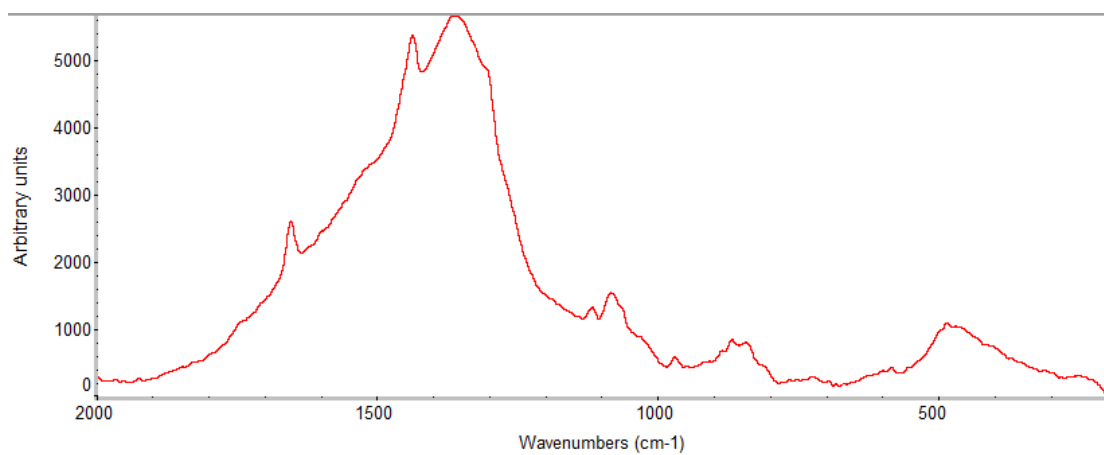
Μέσο Φάσμα Raman Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Εύ Ζήν”



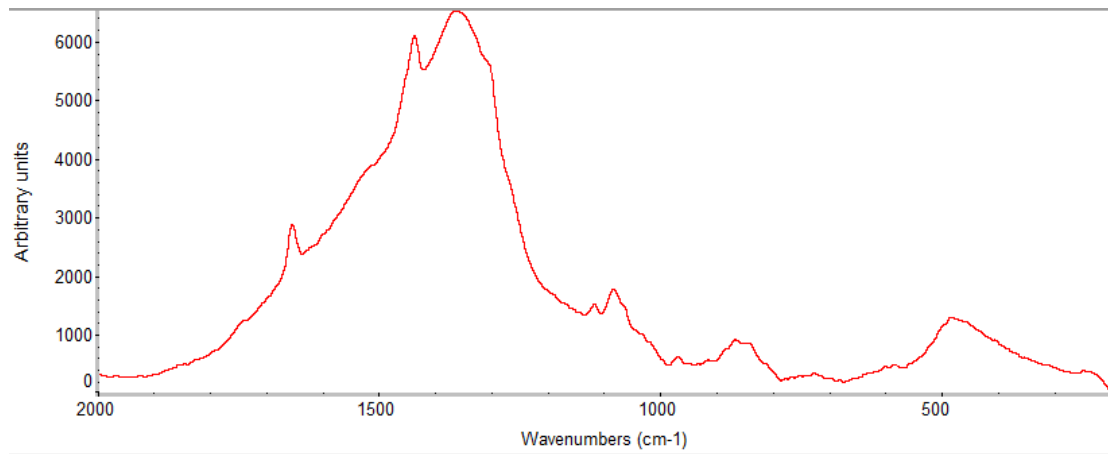
Μέσο Φάσμα Raman Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Herbs & Spices”



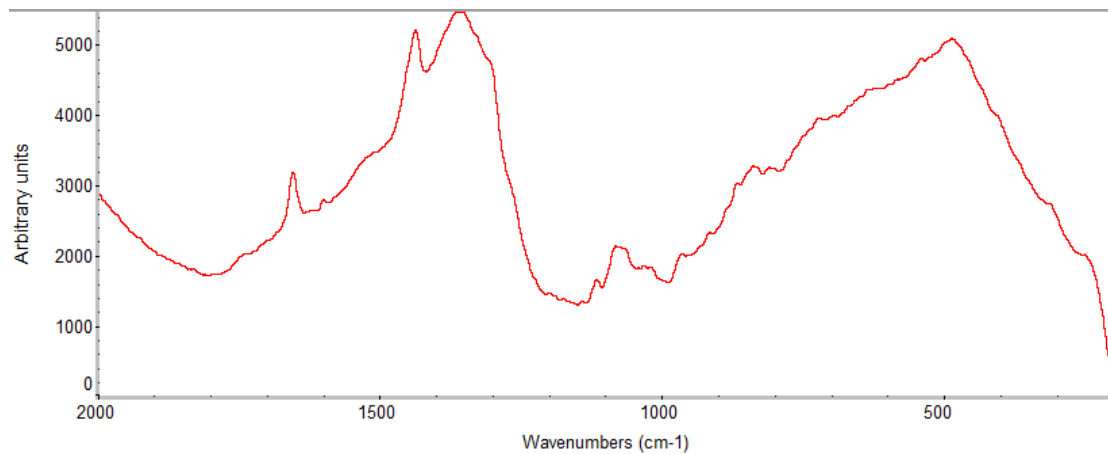
Μέσο Φάσμα Raman Εμπορικού Βαλσαμελαίου – “Χριστοδούλου Παναγιώτα”



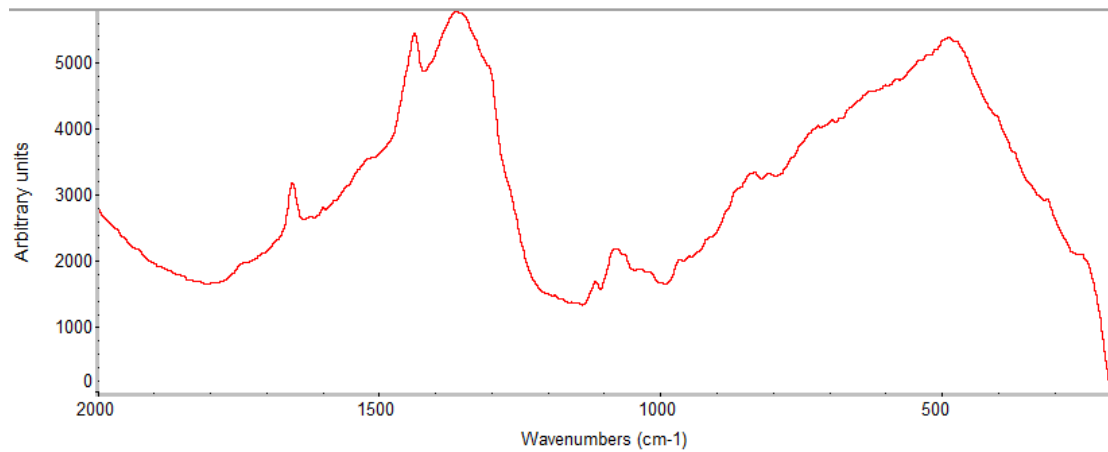
Μέσο Φάσμα Raman Εργαστηριακού Βαλσαμελαίου (Σκοτεινή Παρασκευή) – “Το Βάλσαμο”



Μέσο Φάσμα Raman Εργαστηριακού Βαλσαμελαίου (Σκοτεινή Παρασκευή) – “Vrino”



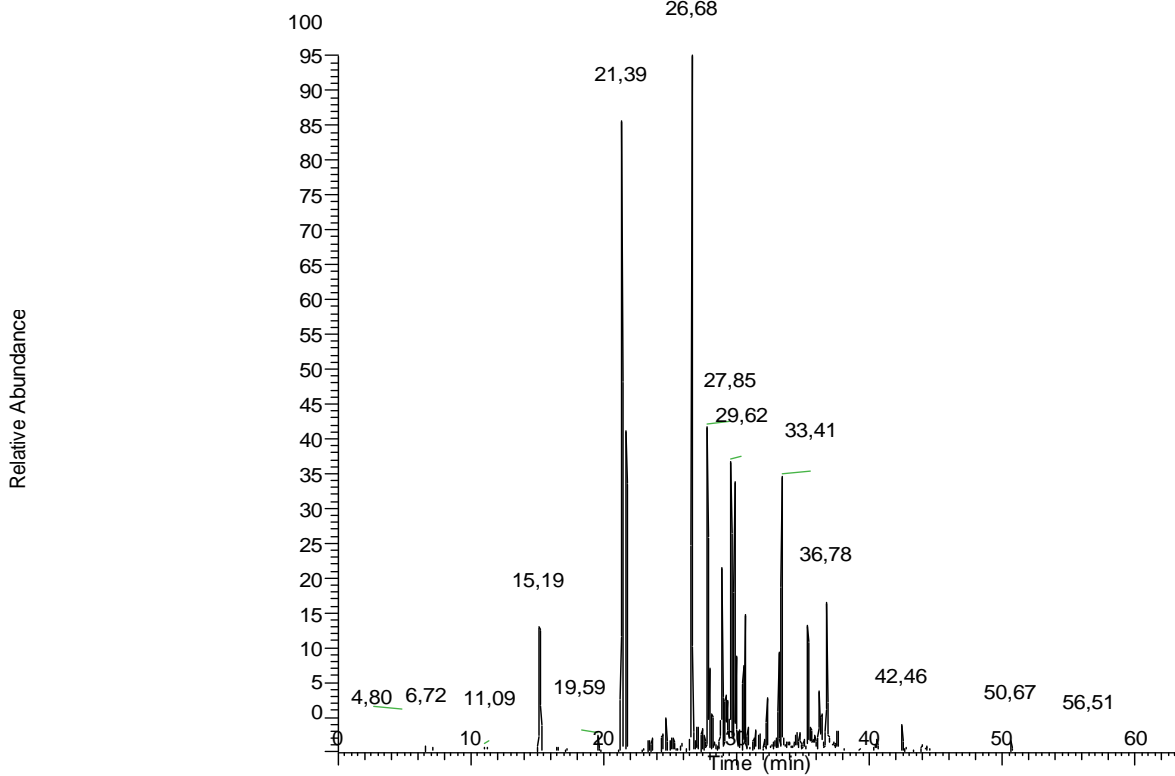
Μέσο Φάσμα Raman Εργαστηριακού Βαλσαμελαίου (Φωτεινή Παρασκευή) – “Το Βάλσαμο”



Μέσο Φάσμα Raman Εργαστηριακού Βαλσαμελαίου (Φωτεινή Παρασκευή) – “Vrino”

Αέρια Χρωματογραφήματα GC-MS

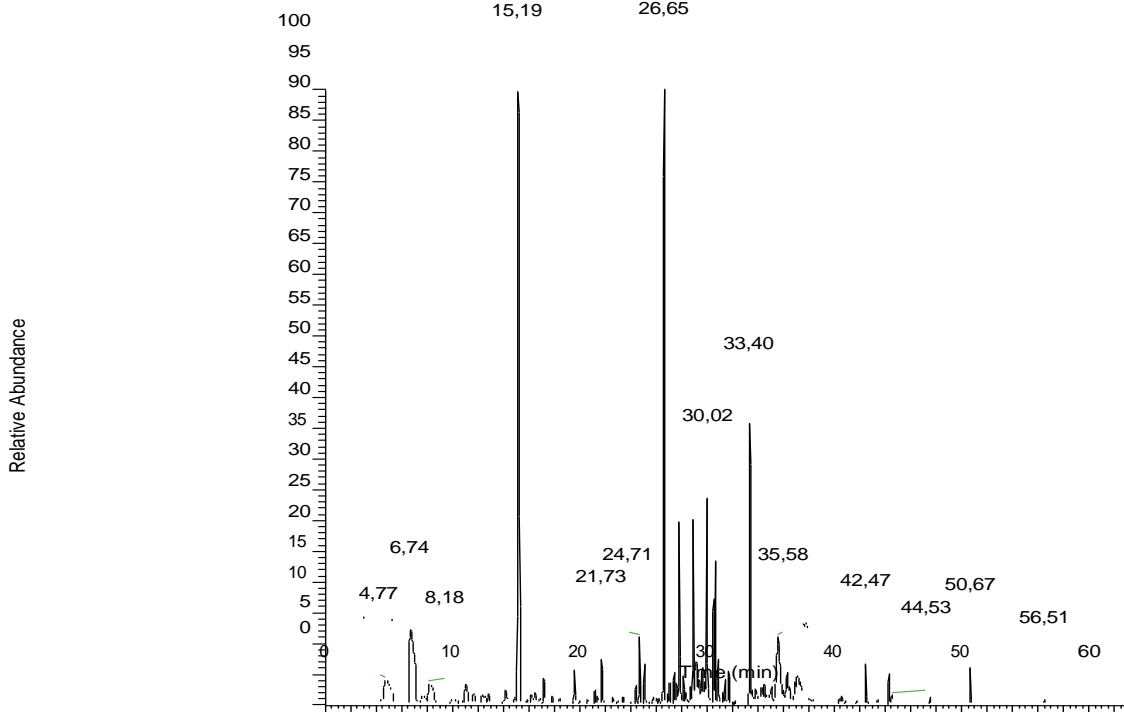
RT: 0,00 - 63,35



NL:
4,67E8
TIC MS
3.V.e.o.

Αέριο Χρωματογράφημα Αιθερίου Ελαίου "Vrino" (3.V)

RT: 0,00 - 63,37

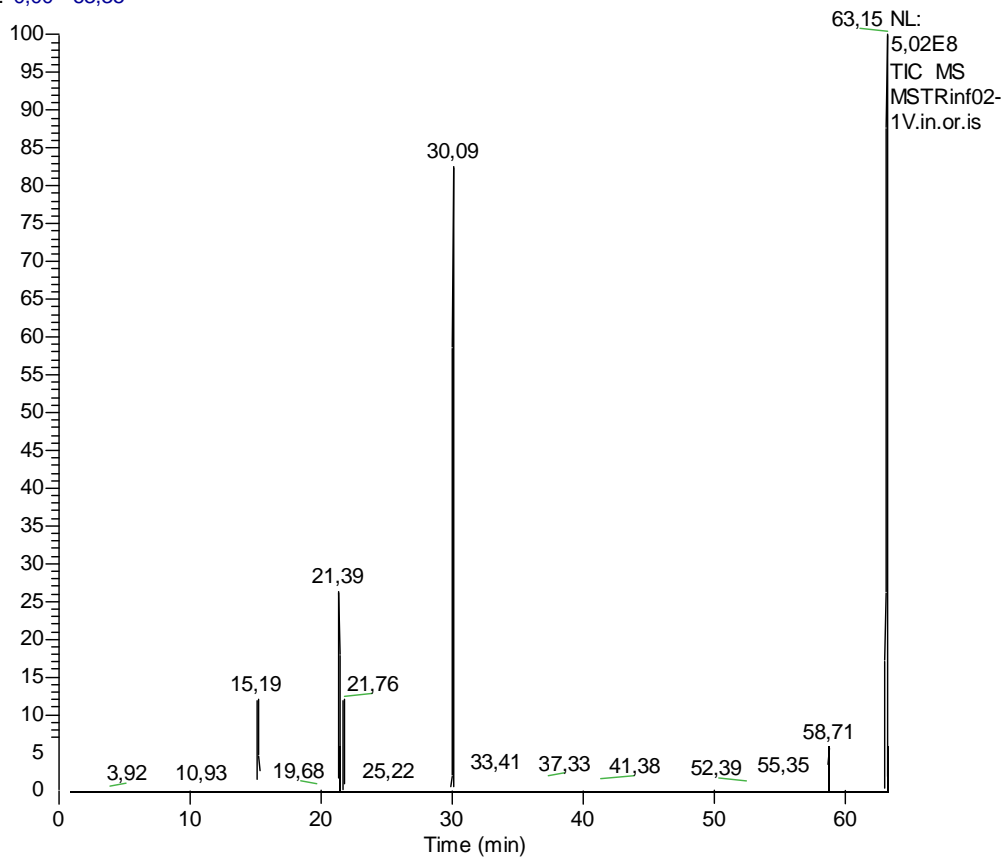


NL:
8,69E7
TIC MS
3.B.e.o.

Αέριο Χρωματογράφημα Αιθερίου Ελαίου "Το Βάλσαμο" (3.B)

RT: 0,00 - 63,35

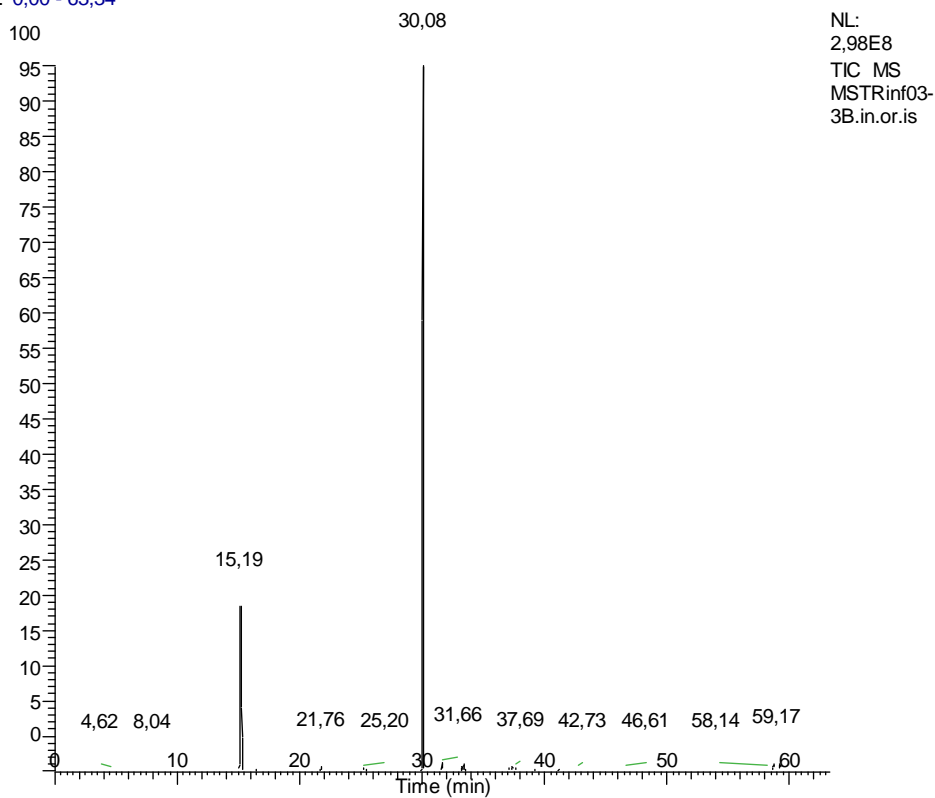
Relative Abundance



Αέριο Χρωματογράφημα Οργανικού Μέρους Αφεψήματος “Vrino” (1.V)

RT: 0,00 - 63,34

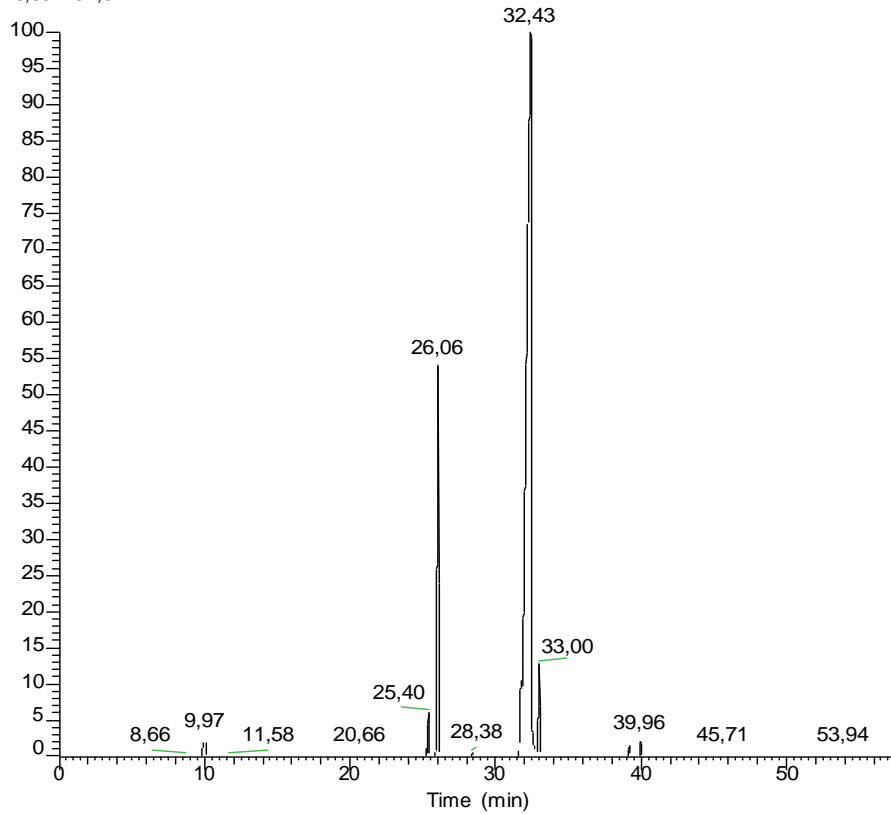
Relative Abundance



Αέριο Χρωματογράφημα Οργανικού Μέρους Αφεψήματος “Το Βάλσαμο” (3.B)

RT: 0,00 - 57,51

Relative Abundance

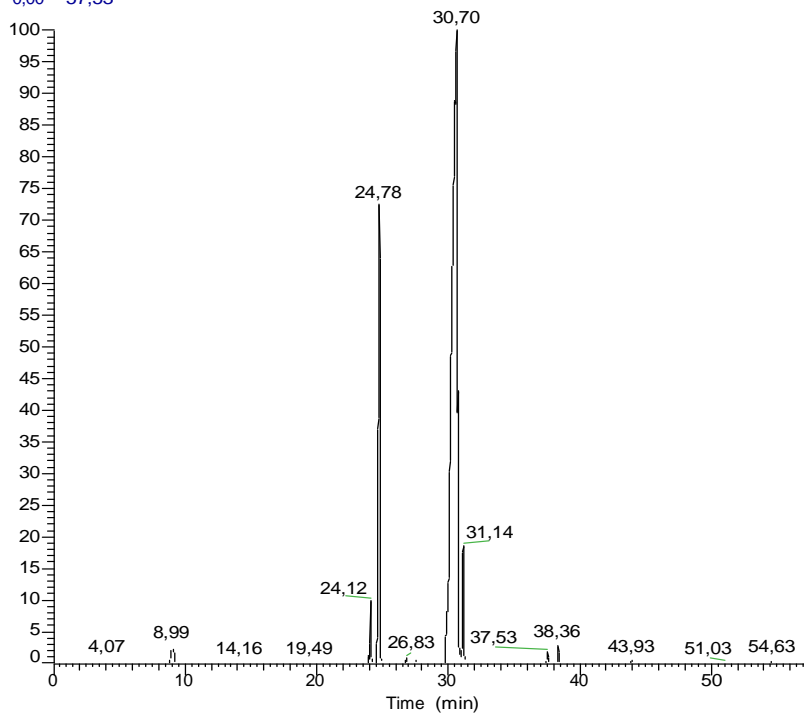


NL:
7,96E8
TIC MS
EVOO
arxiko + i.s.

Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων – Έξτρα Παρθένο Ελαιόλαδο (EVOO)

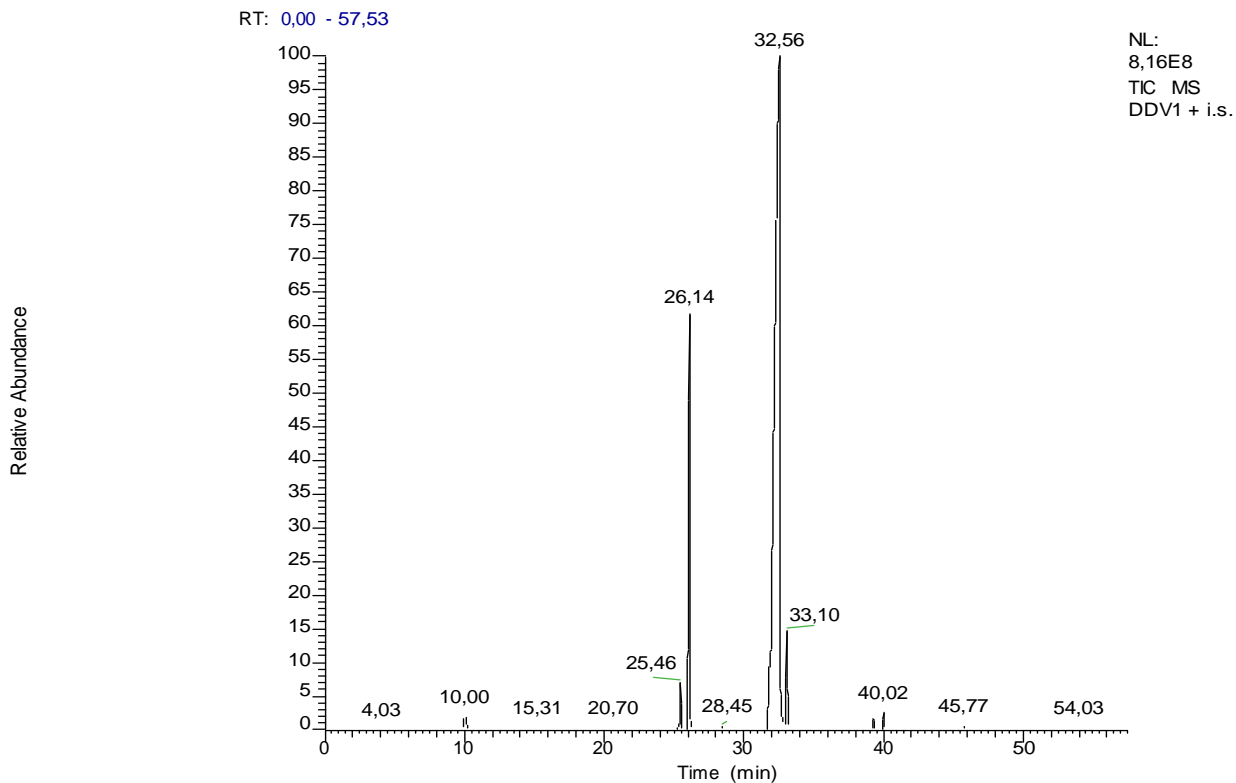
RT: 0,00 - 57,53

Relative Abundance

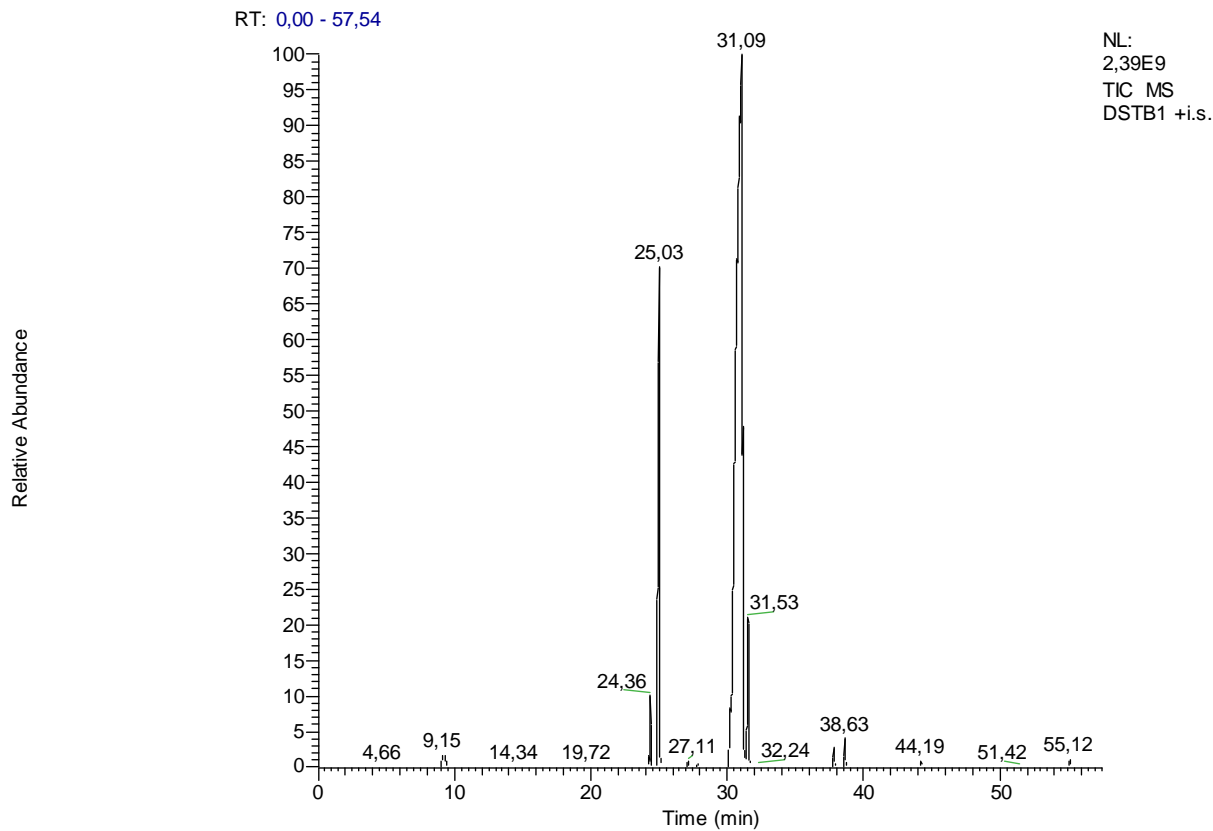


NL:
2,42E9
TIC MS
DDTB1 +
i.s.

Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων – Εργαστηριακά Παρασκευασμένου Βαλσαμελαίου στο Σκοτάδι “Το Βάλσαμο”

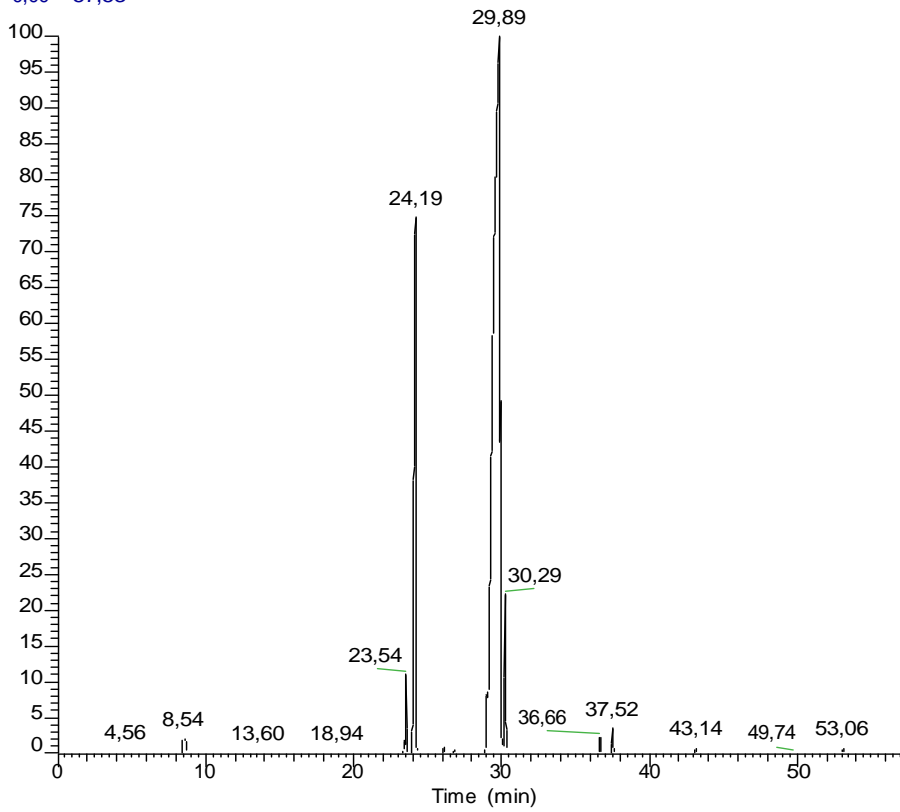


**Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων – Εργαστηριακά
Παρασκευασμένου Βαλσαμελαίου στο Σκοτάδι “Vrino”**



**Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων – Εργαστηριακά
Παρασκευασμένου Βαλσαμελαίου στον Ήλιο “Το Βάλσαμο”**

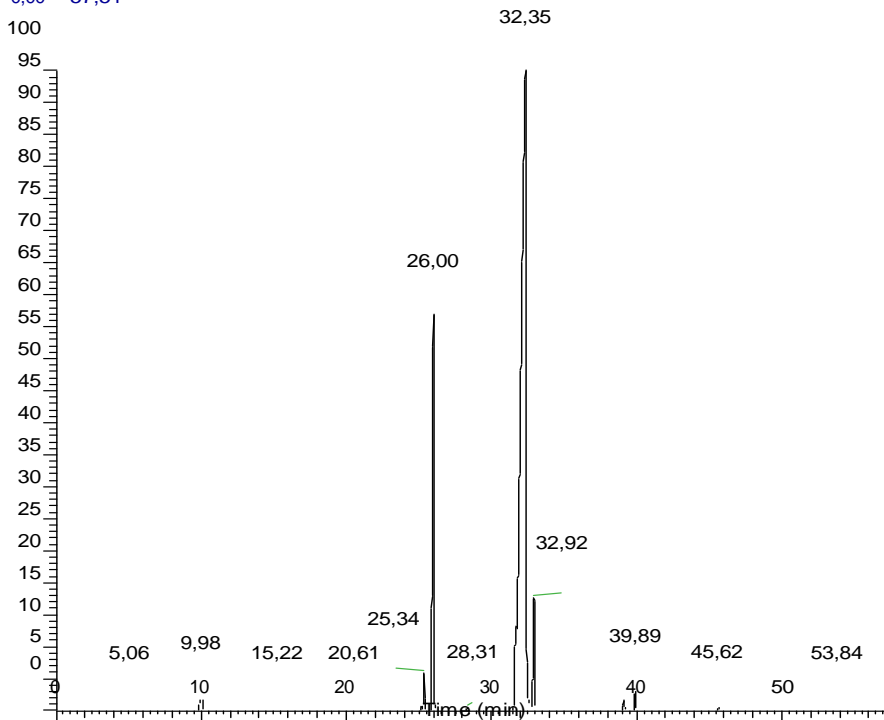
RT: 0,00 - 57,53



NL:
2,29E9
TIC MS
DSV1 + i.s.

Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων – Εργαστηριακά Παρασκευασμένου Βαλσαμελαίου στον Ήλιο "Vrino"

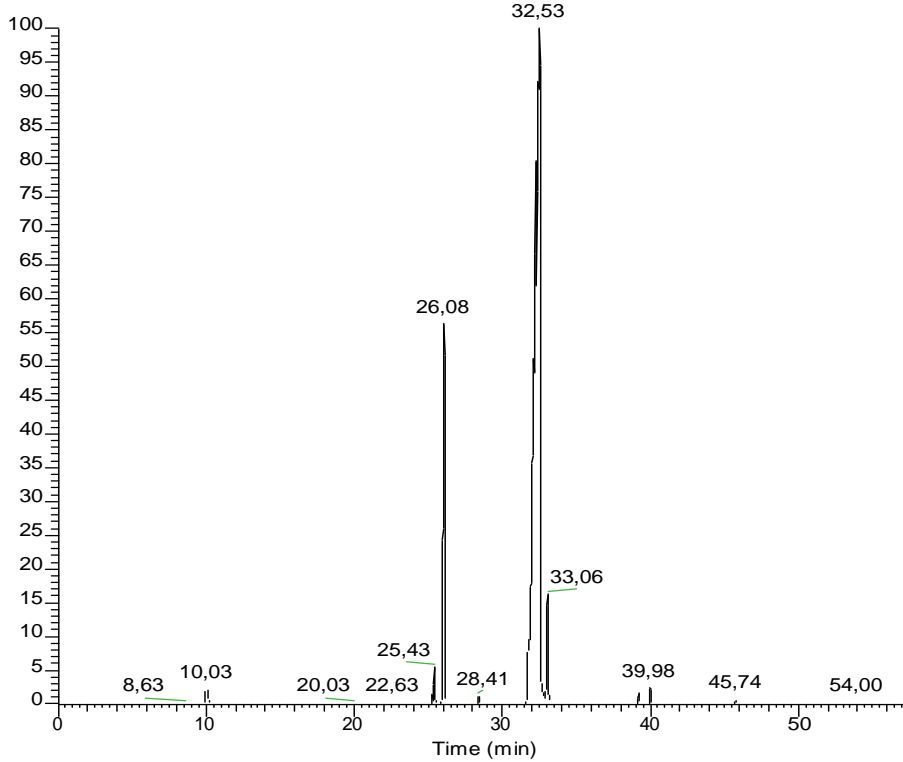
RT: 0,00 - 57,51



NL:
7,89E8
TIC MS
Athos_fresh
_ + i.s.

Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων Εμπορικού Βαλσαμελαίου "Αθός"

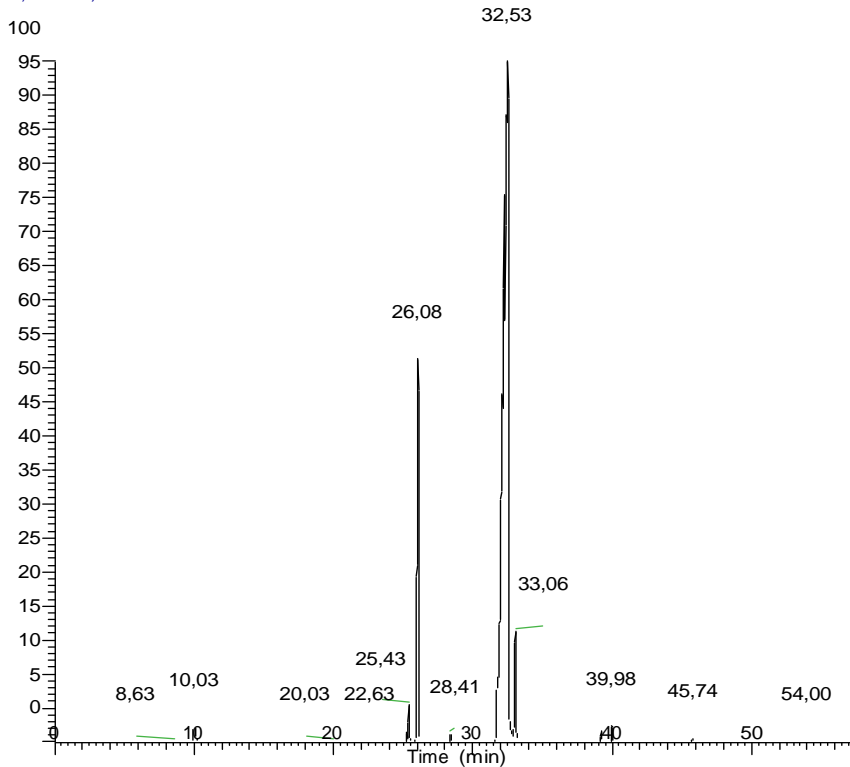
RT: 0,00 - 57,53



NL:
8,85E8
TIC MS
Fresh EY
ZH-N - 1
pros 50 me
i.s.

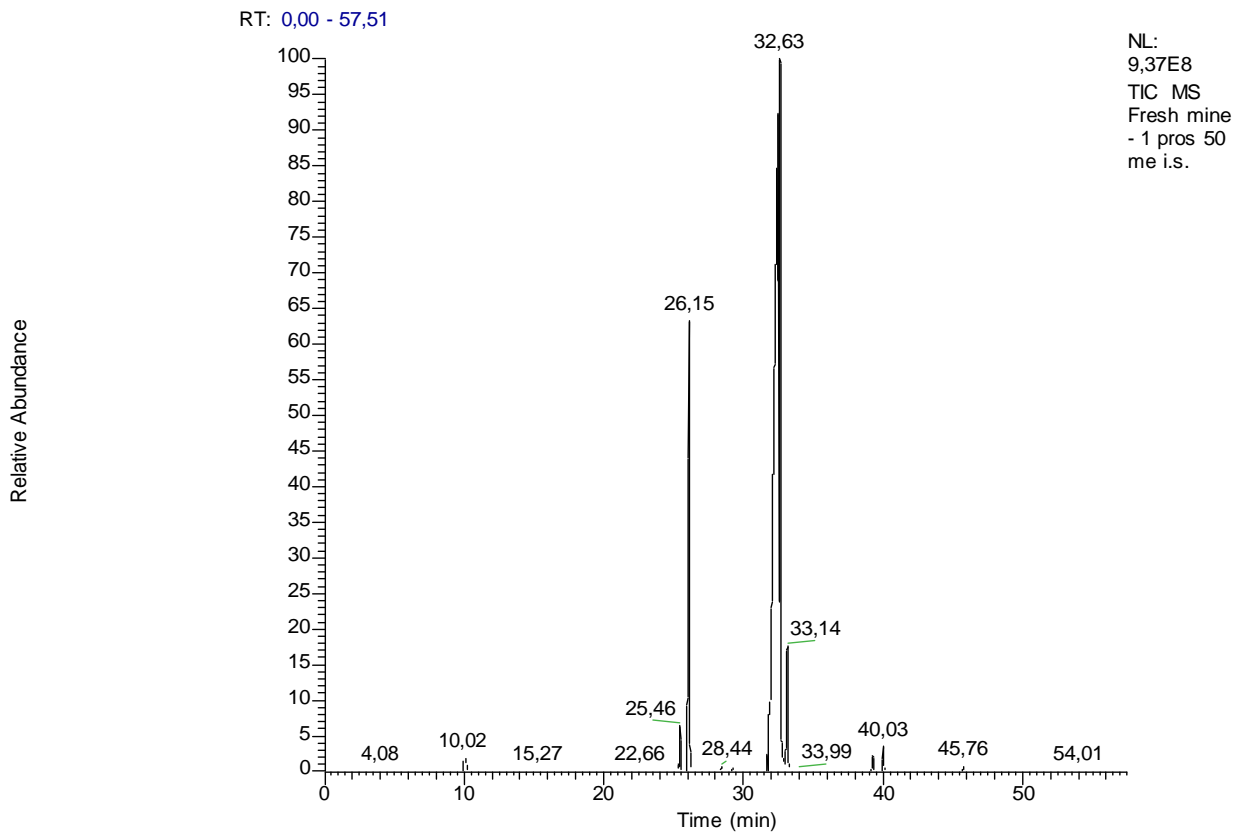
Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων Εμπορικού Βαλσαμελαίου "Αθός"

RT: 0,00 - 57,53

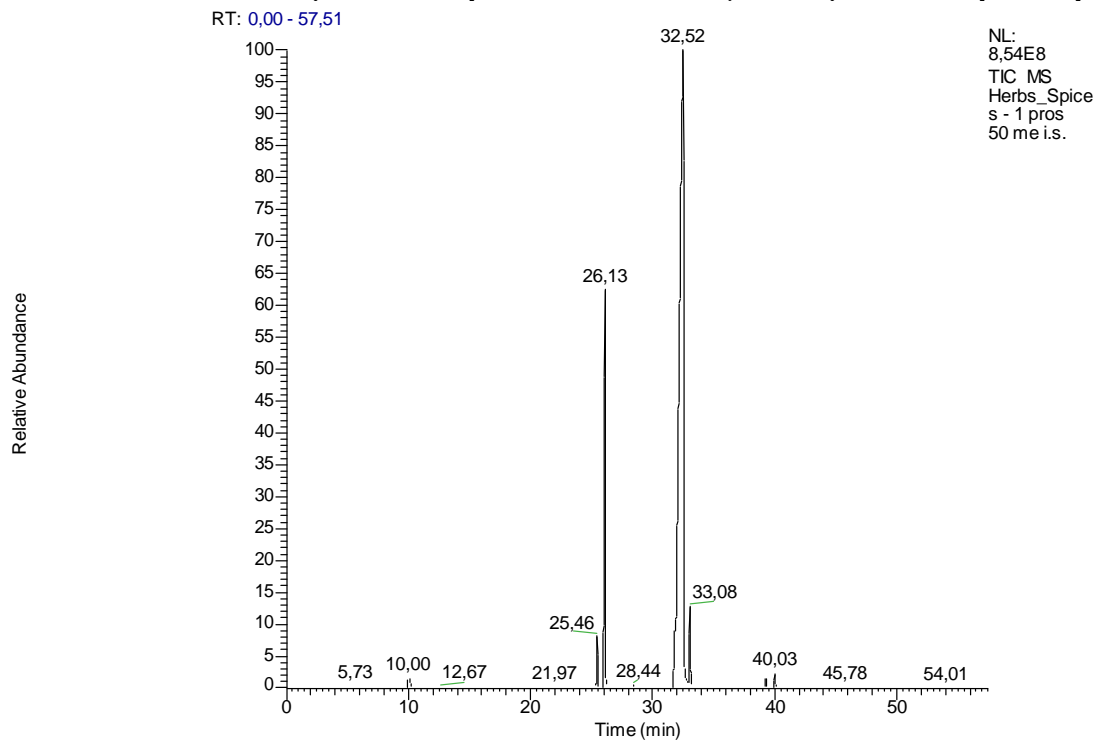


NL:
8,85E8
TIC MS
Fresh EY
ZH-N - 1
pros 50 me
i.s.

Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων Εμπορικού Βαλσαμελαίου "Ευ Ζήν" μετά από αραίωση 1:50



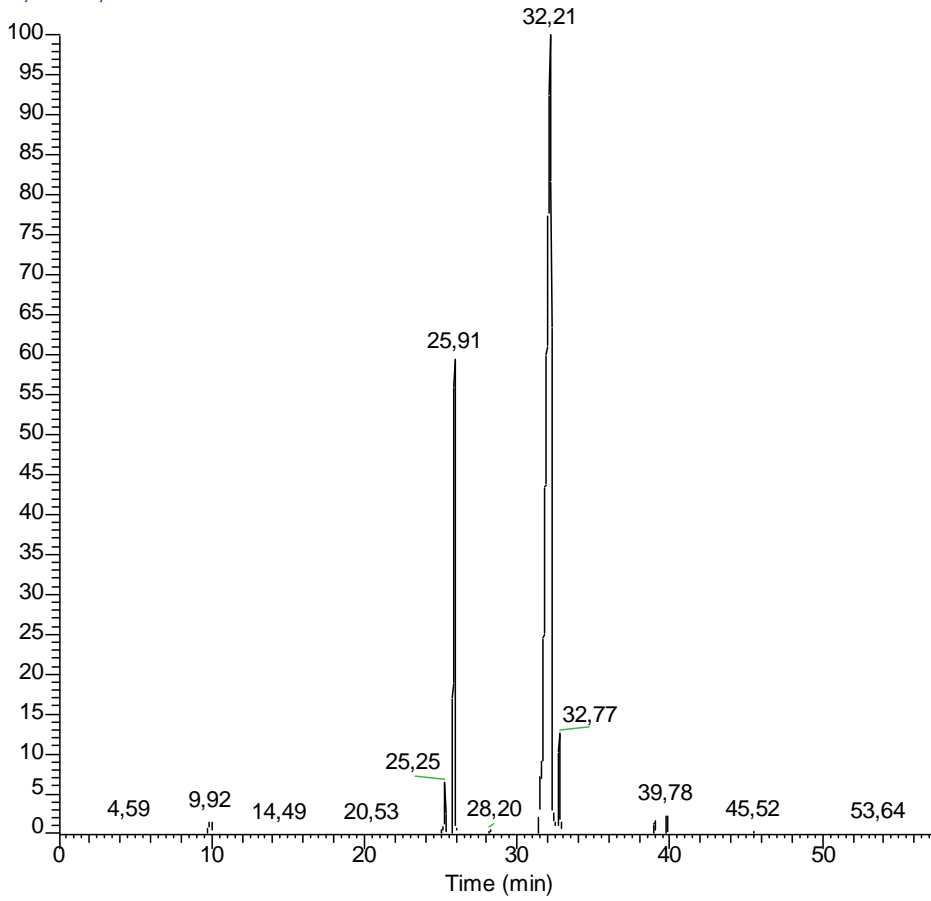
Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων Εμπορικού Βαλσαμελαίου “Χριστοδούλου Παναγιώτα” μετά από αραίωση 1:50



Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων Εμπορικού Βαλσαμελαίου “Herbs&Spices” μετά από αραίωση 1:50

RT: 0,00 - 57,53

Relative Abundance



NL:
8,22E8
TIC MS
OpenCosme
tics_WITH
EVOO_fresh
+ i.s.

**Αέριο Χρωματογράφημα Εστέρων των Λιπαρών Οξέων Εμπορικού
Βαλσαμελαίου "Open Cosmetics"**