

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: «ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ & ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ
***BRASSICACEAE*. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗΣ**



ΕΙΡΗΝΗ-ΔΗΜΗΤΡΑ Β.ΜΕΣΗΜΕΡΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΒΙΟΛΕΤΤΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΤΔΑ

ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ & ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ
ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *BRASSICACEAE*.
ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗΣ**

**QUALITATIVE & QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLUCOSINOLITES
HYDROLYSIS PRODUCTS IN *BRASSICACEAE* FAMILY. ANTIFUNGAL ACTIVITY
OF IMPERVERIN**



ΕΙΡΗΝΗ-ΔΗΜΗΤΡΑ Β. ΜΕΣΗΜΕΡΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΒΙΟΛΕΤΤΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΤΔΑ

Εξεταστική Επιτροπή :

Β. Κωνσταντίνου, Καθηγήτρια ΕΤΔΑ

Χρ. Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΤΔΑ

Σωτ. Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΦΠ

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2019**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ & ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *BRASSICACEAE*. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗΣ

Λαχανικά που ανήκουν στο γένος *Brassica* όπως το μπρόκολο, το λάχανο σαβόι και τα λαχανάκια Βρυξελλών έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα για τις ευεργετικές ιδιότητές τους στην υγεία, καθώς περιέχουν διάφορες χημικές ενώσεις, τους λεγόμενους γλυκοζινολίτες (GLSs), που τα προϊόντα υδρόλυσής τους συμπεριλαμβανομένων των ισοθιοκυανικών ενώσεων και της ινδολο-3-καρβινόλης έχουν αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών (νιτρίλια, ισοθιοκυανικές και ενώσεις ινδολίου) στο μπρόκολο, στο λάχανο σαβόι και στα λαχανάκια Βρυξελλών με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας συζευγμένων με φασματομετρία μαζών. Ειδικότερα, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι ενώσεις: αλλυλο-ισοθιοκυανικό (AIC), ερουκίνη (ER), νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN), φαιναιθυλο-ισοθιοκυανικό (PITC), ιμπερβερίνη (3MIC), σουλφοραφάνη (SFN), ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Επίσης, μελετήθηκε η αντιμυκητιασική δράση της ισοθιοκυανικής ένωσης ιμπερβερίνης έναντι των φυτοπαθογόνων *Verticillium dahliae* και *Botrytis cinerea*.

Για τον σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα από νωπά λαχ. Βρυξελλών (με προέλευση από Ολλανδία, Θεσ/νίκη, Βόνιτσα), κατεψυγμένα λαχ. Βρυξελλών (από Βέλγιο), λάχανο σαβόι (από Θεσ/νίκη) και μπρόκολο (από Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών-ΓΠΑ, Βόνιτσα, Αγρίνιο, Άργος, Εύβοια, Πέλλα). Πιο συγκεκριμένα από το μπρόκολο της περιοχής του ΓΠΑ και της Βόνιτσας συλλέχτηκε όλο το μέρος του φυτού (ανθοκεφαλή, βλαστός, φύλλα, ρίζα), από τις περιοχές Αγρίνιο, Άργος, Εύβοια μόνο η ρίζα, ενώ από την Πέλλα μόνο η ανθοκεφαλή. Από τη μελέτη προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα: το αλλυλο-ισοθιοκυανικό (AIC) παρατηρήθηκε μόνο στα νωπά λαχ. Βρυξελλών, ενώ η ισοθιοκυανική ένωση ιμπερβερίνη παρατηρήθηκε μόνο στις ρίζες του φυτικού υλικού του μπρόκολου. Χαμηλή συγκέντρωση σε ισοθιοκυανικές, αλλά και σε ινδολο-3-καρβινόλη απαντάται στα λαχ. Βρυξελλών, ενώ αυξημένη συγκέντρωση σε ινδολο-3-ακετονιτρίλιο παρατηρείται στα λαχ. Βρυξελλών και στο λάχανο σαβόι. Είναι αξιοσημείωτο ότι στη ρίζα του μπρόκολου απαντώνται όλες οι ενώσεις που μελετήθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις, με εξαίρεση το νιτρίλιο I3CN που δεν παρατηρήθηκε στις ρίζες του μπρόκολου.

Επίσης, σε όλα τα δείγματα μπρόκολου, το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) είχε την υψηλότερη συγκέντρωση, ενώ τη δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση κατείχε η σουλφοραφάνη (SFN). Το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) δεν παρατηρήθηκε στα λαχ. Βρυξελλών και στο λάχανο σαβόι.

Το φυτικό υλικό του μπρόκολου που παραχωρήθηκε από καλλιέργεια του Εργαστηρίου Λαχανοκομίας του ΓΠΑ, ήταν βιολογικής καλλιέργειας και παρουσίαζε προσβολή από το έντομο *Pieris rapae*. Η ανάλυση της προνύμφης του εντόμου έδειξε την παρουσία των ενώσεων ινδολο-3-καρβινόλης (I3C), φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC) και ερουκίνης (ER) ενώ στο προσβεβλημένο βλαστό η συγκέντρωση του νιτρίλιου της ερουκίνης (5MITN) ήταν ιδιαίτερα αυξημένη.

Η μελέτη της αναστολής της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Verticillium dahliae* και *Botrytis cinerea* από την ισοθειοκυανική ένωση ιμπερβερίνη (3MIC) πραγματοποιήθηκε *in vitro* σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκε μείωση της ανάπτυξης του *Verticillium dahliae* ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης της ιμπερβερίνης από 1 mg/L έως 10 mg/L, ενώ σε αυτές τις συγκεντρώσεις η αναστολή της ανάπτυξης του *Botrytis cinerea* ήταν περιορισμένη. Πλήρης αναστολή της ανάπτυξης και των δύο μυκήτων παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση της ιμπερβερίνης 100 mg/L.

Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης
Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Επιστημονική περιοχή: Ενόργανη Χημική
Ανάλυση-Επιστήμη Τροφίμων-Φυσικά Προϊόντα
Λέξεις κλειδιά: *Brassicaceae*, Μπρόκολο, Σταυρανθή Λαχανικά,
Ισοθειοκυανικές ενώσεις, Νιτρίλια.

ABSTRACT

QUALITATIVE & QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLUCOSINOLITES HYDROLYSIS PRODUCTS IN *BRASSICACEAE* FAMILY. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF IMPERVERIN

Cruciferous vegetables are a rich source of phytochemicals, such as glucosinolates, that have been reported as precursors of human health promoting agents. Glucosinolates, upon hydrolysis, produce various products, including isothiocyanates, indole-3-carbinol and nitriles which have been reported to exhibit antimicrobial, antioxidative, antitumor and antiviral activity.

The aim of this study was: Qualitative and Quantitative determination of glucosinolate hydrolysis products in *Brassicaceae*'s family plants (broccoli, Brussels sprouts and savoy cabbage). More specifically, the chemicals compounds which examined a) isothiocyanates (allyl-isothiocyanate, phenylethyl-isothiocyanate, 3-(Methylthio)propyl isothiocyanate, erucin, sulforaphane) b) nitriles (6-Methylsulfanyl-hexane nitrile, indole-3-acetonitrile) and c) indole-3-carbinol. Also, we examined the antifungal activity *in vitro* of 3-(Methylthio)propyl isothiocyanate (iberiverin) against the phytopathogens fungi *Botrytis cinerea* and *Verticillium dahliae*. Broccoli samples (florets, leaves, stalks and roots) were collected from the Agricultural University of Athens (AUA) and Vonitsa. Roots from Agrinio, Argos and Evia. Floret from Pella. Also we collect Brussels sprouts from Holland, frozen (Belgium), Thessaloniki and Vonitsa and savoy cabbage from Thessaloniki. The samples were collected, dried and grounded before the extraction with CH_2Cl_2 .

The results led us to the following conclusions: allyl isothiocyanate (AIC) was observed only in Brussels sprouts and savoy cabbage while iberiverin was observed only at the roots of broccoli. All compounds are in high concentrations at the roots of broccoli. However, in the roots of broccoli indole-3-acetonitrile was not observed. Low concentration in isothiocyanates and indole-3-carbinol exhibit Brussels sprouts, while increased concentration is observed in them and in savoy cabbage in indole-3-acetonitrile.

Also, the broccoli plant material from AUA was conceded from planting laboratory. The broccoli was biological cultivation and appeared an infection from the *Pieris rapae* insect. Insect's larva analysis showed the presence of compounds indole-3-carbinol (I3C), phenethyl isothiocyanate (PITC) and erucin (ER) whereas in the stalk the concentration of 6-Methylsulfanyl-hexane nitrile was particularly high.

It is important to say that 6-Methylsulfanyl-hexane nitrile (5MITN) had the highest concentration in all broccoli samples while the second highest concentration was held by sulforaphane (SFN). Nevertheless, the nitrile 5MITN was not observed in Brussels and savoy cabbage. Additionally, we observed *in vitro* inhibition of growth in *Verticillium dahliae* and *Botrytis cinerea* from iberiverin at a concentration of 100 mg / L, for the first time.

Chemical Laboratory,
Department of Food science and Human Nutrition
Agricultural university of Athens
Scientific Area: Analytical Chemistry- Food science-Natural Products
Keywords: *Brassicaceae*, Broccoli, Cruciferous vegetables,
Isothiocyanates, Nitriles.

Στην οικογένεια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας, στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στο ΓΠΑ και η *in vitro* μελέτη της αναστολής της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Verticillium dahliae* και *Botrytis cinerea* στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, στο Τμήμα Επιστήμης της Φυτικής Παραγωγής στο ΓΠΑ, κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2017-2019 με θέμα «Ποιοτικός & Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών σε φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*. Αντιμυκητιασική δράση της ιμπερβερίνης».

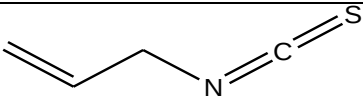
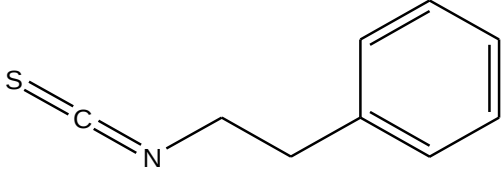
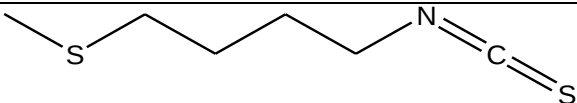
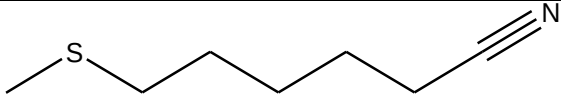
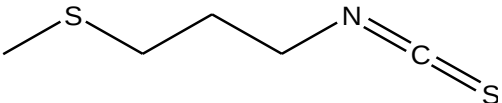
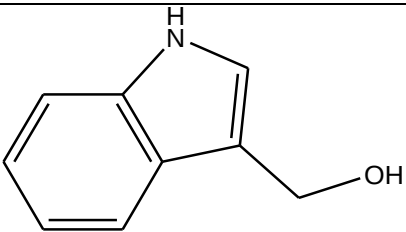
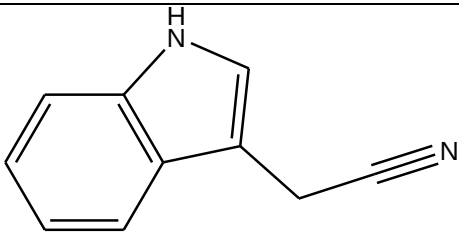
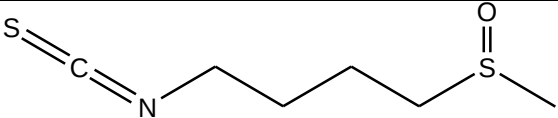
Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά ανθρώπων που χωρίς τη βοήθειά τους δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια ΕΤΔΑ, αλλά και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας, Βιολέττα Κωνσταντίνου για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης και για την πολύτιμη καθοδήγησή της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της μεταπτυχιακής μελέτης. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ, Σωτήριο Τζάμο για την καθοδήγησή του στα πειράματα μελέτης της αντιμυκητιασικής δράσης της ιμπερβερίνης. Επίσης, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος ΕΦΠ του ΓΠΑ, Γεώργιο Παπαδόπουλο για τη βοήθειά του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τα θηκογράμματα καθώς και τον Καθηγητή Κηπευτικών Καλλιεργειών του ΕΦΠ, Δημήτριο Σάββα για την παραχώρηση του φυτικού υλικού του μπρόκολου βιολογικής καλλιέργειας.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο μέλος της εξεταστικής επιτροπής, Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΤΔΑ, Χρήστο Παππά για τις υποδείξεις του και τις εύστοχες παρατηρήσεις του. Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη ΕΔΙΠ του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δρ. Χάρη Κανάκη και Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα για τη βοήθειά τους στην υγρή και αέρια χρωματογραφία. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενικής Χημείας και Φυτοπαθολογίας του ΓΠΑ για τη συνεργασία τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Παναγιώτα Ρεβέλου και τη Δρ. Μαρούλα Κόκοτου για τη βοήθειά τους στην ανάπτυξη των μεθόδων ανάλυσης στην υγρή χρωματογραφία και τη θαυμάσια συνεργασία που είχαμε.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτριά και φίλη μου Κωνσταντίνα Κούρου για τη συμπαράστασή της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Συντομογραφία	Ονομασία ένωσης	Δομή
AIC	Αλλυλο-ισοθειοκυανικό (Allyl isothiocyanate)	
PITC	Φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (Phenylethyl isothiocyanate)	
ER	Ερουκίνη (Erucin) (4-methylthiobutyl isothiocyanate)	
5MITN	Νιτρίλιο ερουκίνης (6-Methylsulfanylhexane nitrile)	
3MIC	Ιμπερβερίνη [3-(Methylthio)propyl isothiocyanate]	
I3C	Ινδολο-3-καρβινόλη (Indole-3-carbinol)	
I3CN	Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (Indole-3-acetonitrile)	
SFN	Σουλφοραφάνη (Sulforaphane) [4-(Methylsulfinyl)Butyl Isothiocyanate]	

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	15
1.1 ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ.....	15
1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ	15
1.3 ΜΠΡΟΚΟΛΟ	16
1.4 ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ	17
1.5 ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ.....	17
1.6 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΠΡΟΚΟΛΟ, ΤΑ ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ, ΤΟ ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ.....	17
1.7 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΑΓΕΙΡΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>BRASSICA</i>	18
1.8 ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ	19
1.8.1 ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ	19
1.8.2 ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	20
1.9 ΠΡΩΤΗ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ	21
1.10 ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΟΙ ΙΣΤΟΙ	21
1.11 ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΦΥΤΩΝ	21
1.12 ΔΟΜΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ	22
1.13 ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ <i>BRASSICACEAE</i>	22
1.14 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>BRASSICA</i>	23
1.15 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΗ- ΜΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ.....	23
1.16 ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ	24
1.16.1 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	24
1.16.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΝΙΤΡΙΑΙΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΘΕΙΟΝΙΤΡΙΑΙΩΝ	24
1.16.3 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΩΝ.....	26
1.16.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΔΑΚΤΥΛΙΟ ΙΝΔΟΛΙΟΥ	26
1.17 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	27

1.17.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΥΡΟΣΙΝΑΣΗ ΣΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΑΦΙΔΕΣ	27
1.17.2 ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ.....	28
1.17.3 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	29
1.18 ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΑΠΟ <i>PIERIS RAPAE</i>	29
1.19 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ , Ι3C ΚΑΙ Ι3CN .	31
1.19.1 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	31
1.19.1.1 Άλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC).....	31
1.19.1.2 Φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC).....	32
1.19.1.3 Σουλφοραφάνη (SFN)	32
1.19.1.4 Ερουκίνη (ER).....	32
1.19.1.5 Ιμπερβερίνη (3MIC)	33
1.19.1.6 Νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN)	33
1.19.1.7 Ινδολο-3-καρβινόλη (I3C).....	33
1.20 ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ.....	35
1.20.1 <i>Verticillium dahliae</i>	35
1.20.2 <i>Botrytis cinerea</i>	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	36
2.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	36
2.1.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	37
2.1.1.1 Οβίδα ή φιάλη φέροντος αερίου (κινητή φάση)	37
2.1.1.2 Ρυθμιστής πίεσης – ροόμετρο	37
2.1.1.3 Σύστημα εισαγωγής δείγματος	38
2.1.1.4 Θερμοστατούμενος κλίβανος	38
2.1.1.5 Στήλη	39
2.1.1.6 Ανιχνευτές	39
2.1.1.7 Ενισχυτής-Καταγραφέας-Παρουσίαση αποτελεσμάτων	39
2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	39
2.2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ- HPLC	40
2.2.1.1 Δοχείο κινητής φάσης-Διαλύτης	41
2.2.1.2 Αντλία.....	41
2.2.1.3 Σύστημα εισαγωγής δείγματος	41
2.2.1.4 Στήλες.....	42
2.2.1.5 Ανιχνευτές	43

2.2.1.6 Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής- εκτυπωτής	43
2.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	44
2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	44
2.4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΖΩΝ	44
2.4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (HRMS).....	45
2.4.3 ΠΗΓΕΣ ΙΟΝΤΩΝ.....	45
2.4.3.1 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ (electrospray ionization, ESI).....	46
2.4.3.2 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΠΡΟΣΚΡΟΥΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ (Electro Impact, EI)	47
2.4.4 ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΣΤΟ HRMS	48
2.4.4.1 Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole, Q).....	48
2.4.4.2 Αναλυτές μαζών τύπου «χρόνου πτήσης» (time-of-flight, TOF).....	49
2.4.5 ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ TOF	49
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
ΜΕΡΟΣ Α.....	51
A.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	51
A.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ	52
A.3 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	53
A.3.1 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ.....	53
A.3.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ GC-MC.....	53
A.3.3 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΟ GC-MS - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	53
A.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	54
A.4.1 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ.....	54
A.4.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ LC-HRMS	55
A.4.3 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΟ GC-MS - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	55
ΜΕΡΟΣ Β.....	57
B.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ IN VITRO ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ V.DAHLIAE ΚΑΙ B.CINEREA.....	57
B.1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	57
B.1.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ PDA (Potato Dextrose Agar)	57
B.1.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	57
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	58
Γ.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	58
Γ.1.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	58
Γ.1.1.1 ΑΛΛΥΛΟ-ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟ (AIC).....	58
Γ.1.1.2 ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΟ-ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟ (PITC).....	59
Γ.1.1.3 ΕΡΟΥΚΙΝΗ (ER).....	61
Γ.1.1.4 ΝΙΤΡΙΛΙΟ ΕΡΟΥΚΙΝΗΣ (5MITN).....	63
Γ.1.1.5 ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗ (3MIC).....	64
Γ.1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	66
Γ.1.2.1 ΣΟΥΛΦΟΡΑΦΑΝΗ (SFN)	66
Γ.1.2.2 ΙΝΔΟΛΟ-3-ΚΑΡΒΙΝΟΛΗ (I3C)	67
Γ.1.2.3 ΙΝΔΟΛΟ-3-ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ (I3CN)	68
.....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ.....	70
2.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	70
2.1.1 ΑΛΛΥΛΟ-ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟ (AIC)	70
2.1.2 ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΟ-ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟ (PITC)	72
2.1.3 ΕΡΟΥΚΙΝΗ (ER).....	77
2.1.4 ΝΙΤΡΙΛΙΟ ΕΡΟΥΚΙΝΗΣ (5MITN)	81
2.1.5 ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗ (3MIC).....	86
2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	87
2.2.1 ΣΟΥΛΦΟΡΑΦΑΝΗ (SFN).....	88
2.2.2 ΙΝΔΟΛΟ-3-ΚΑΡΒΙΝΟΛΗ (I3C).....	92
2.2.3 ΙΝΔΟΛΟ-3-ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ (I3CN).....	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	101
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ <i>IN VITRO</i> ΤΗΣ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 3MIC ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ <i>V.DAHLIAE</i> ΚΑΙ <i>B.CINEREA</i>	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ.....	107
4.1 ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΚΑΙ ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ.....	107
4.1.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	107
4.1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	107
4.1.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΑ ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΚΑΙ ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ.....	108

4.2 ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ (ΓΠΑ).....	109
4.2.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	109
4.2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	109
4.2.4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΟ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΓΠΑ.....	111
4.3 ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΒΟΝΙΤΣΑΣ	112
4.3.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	112
4.3.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	112
4.3.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΟ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΒΟΝΙΤΣΑΣ.....	113
4.4 ΡΙΖΕΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ : ΓΠΑ, ΒΟΝΙΤΣΑ, ΑΓΡΙΝΙΟ, ΑΡΓΟΣ ΚΑΙ ΕΥΒΟΙΑ	114
4.4.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	114
4.4.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	114
4.4.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΙΣ ΡΙΖΕΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ	115
4.5 ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ : ΓΠΑ, ΒΟΝΙΤΣΑ ΚΑΙ ΠΕΛΛΑ..	116
4.5.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	116
4.5.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	117
4.5.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΟ ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ.....	117
4.6 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ....	118
4.7 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗΣ (3MIC) ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ <i>BOTRYTIS CINEREA</i> ΚΑΙ <i>VERTICILLIM DAHLIAE</i>	119
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	120
5.1 ΓΕΝΙΚΑ	120
5.2 ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ ΚΑΙ ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ.....	122
5.3 ΜΠΡΟΚΟΛΟ.....	123
5.4 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ IN VITRO ΤΗΣ ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗΣ (3MIC) ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> ΚΑΙ <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	126
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	128
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	129
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι - ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	154
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ - ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	200

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΣΤΑΥΡΑΝΘΗ

Κοινά βρώσιμα λαχανικά της οικογενείας *Brassicaceae*, στα οποία ανήκουν το λάχανο, τα λαχανάκια Βρυξελλών, το μπρόκολο, το κουνουπίδι, η ρίζα γογγύλης και τα ραπάνια, θεωρούνται ευρέως ως τροφές υγείας, διότι έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, φυτικές ίνες και περιέχουν ποικιλία διατροφικών ουσιών με ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες όπως είναι το 3,3'-διϊνδολομεθάνιο, η σουλφοραφάνη και το σελήνιο (Τριχόπουλος & Πετρίδου, 2000). Η κατανάλωση λαχανικών μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου του παχέως εντέρου μέσω των αντικαρκινικών συστατικών τους, όπως αντιοξειδωτικά (καροτενοειδή, βιταμίνη C), φολικό οξύ, φλαβονοειδή, και προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών, οι λεγόμενες ισοθειοκυανικές ενώσεις (Collins, 2005).

Ο πρώτος που είχε υποπτευθεί τις πιθανές θεραπευτικές ιδιότητες των σταυρανθών λαχανικών ήταν ο Ρωμαίος Ρήτορας Κάτων ο Πρεσβύτερος (234-149 π.Χ.) ο οποίος συμβούλευε την επάλειψη με τριμμένα φύλλα λάχανου για τη θεραπεία των καρκινικών πληγών στο μαστό. Η σημασία των φυτών του γένους *Brassica* είναι γνωστή από τα αρχαιολογικά ευρήματα τα οποία χρονολογούνται από το 5000 π.Χ. Τα φυτά που ανήκουν στη συγκεκριμένη οικογένεια θεωρούνται ως τα πιο παλαιά καλλιεργούμενα φυτά, γνωστά στον άνθρωπο με γραπτά αρχεία από το 1500 π.Χ (Πετρόπουλος & Χα, 2014, Raymer, 2002).

1.2 BOTANΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ

Τα είδη του γένους *Brassica* ταξινομούνται σε έξι ομάδες :

Brassica oleracea Acephala Group : στην ομάδα αυτή ανήκουν η κράμβη και οι λαχανίδες.

Brassica oleracea Alboglabra Group : στην ομάδα αυτή ανήκει το κινεζικό μπρόκολο (kai-lan ή Chinese broccoli).

Brassica oleracea Botrytis Group : στην ομάδα αυτή ανήκει το κουνουπίδι και το Chou Romanesco.

Brassica oleracea Capitata Group : στην ομάδα αυτή ανήκει το λαχανάκι Βρυξελλών.

Brassica oleracea Gongylodes Group : στην ομάδα αυτή ανήκει το γογγύλι.

Brassica oleracea Italica Group : στην ομάδα αυτή ανήκει το μπρόκολο.

1.3 ΜΠΡΟΚΟΛΟ (*Brassica oleracea* L.var.*italica* Plenck ή *Brassica oleracea* convar.*botrytis* var. *italica*)

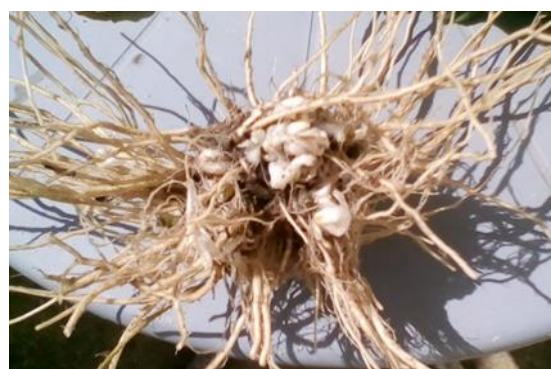
Το συγκεκριμένο λαχανικό (Εικόνα 1.1 και 1.2) ανήκει στην οικογένεια των Σταυρανθών (*Brassicaceae*) όπως και το κουνουπίδι, το λάχανο, το λαχανάκι Βρυξελλών και το γογγύλι. Είναι αρκετά διαδεδομένο στην Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή και την Ασία. Διετές φυτό με διπλοειδή αριθμό χρωματοσωμάτων $2n=18$. Καλλιεργείται κυρίως ως μονοετές, αφού το δεύτερο χρόνο παράγει άνθη και σπόρους. Στην οικογένεια *Brassicaceae*, που παλαιότερα ήταν γνωστή και ως οικογένεια *Cruciferae*, υπάγονταν περίπου 350 γένη και 3.000 ειδή. Τα λαχανικά που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια μπορεί να είναι μονοετή, διετή, ή πολυετή, αυτογονιμοποιούμενα ή σταυρογονιμοποιούμενα (ΟΛΥΜΠΙΟΣ, 2015).

Το καλλιεργούμενο μπρόκολο διακρίνεται σε τρεις τύπους ή βοτανικές ποικιλίες :

- Το μπρόκολο ή Καλαμπρέζε μπρόκολο (*Brassica oleracea* L. Convar. *Botrytis* (L.) Alef var. *italica* Plenck). Είναι ο πιο γνωστός τύπος μπρόκολου με συμπαγείς, πρασίνου χρώματος κεφαλές και χονδρούς μίσχους.
- Το μπρόκολο Ρομανέσκο (*Brassica oleracea* L. Convar. *Botrytis* (L.) Alef. Var. *botrytis*.f.*botrytis* cv. *Romanesco*). Σχηματίζει κιτρινοπράσινες κεφαλές με τους ανθικούς οφθαλμούς να είναι διαχωρισμένοι και να έχουν χαλαρή δομή.
- Το ιώδες μπρόκολο (*Brassica oleracea* L. Convar. *Botrytis* (L.) Alef. Var. *botrytis*.f. *erytrobotrys*). Η κεφαλή αποτελείται από μικρούς ανθικούς οφθαλμούς, οι οποίοι φέρουν μια ιώδη απόχρωση.



Εικόνα 1.1. Μπρόκολο (ανθοκεφαλή, φύλλα) ποικιλία *Marathon*.



Εικόνα 1.2. Ρίζα μπρόκολου ποικιλίας *Marathon*.

1.4 ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ (*Brassica oleracea* L. *convar. oleracea* var. *gemmifera*)

Το λαχανάκι Βρυξελλών (Εικόνα 1.3) είναι διετές φυτό το οποίο καλλιεργείται ως μονοετές για τους τρυφερούς βλαστικούς οφθαλμούς του (ανθοκεφαλές). Έχει διπλοειδή αριθμό χρωματοσωμάτων με $2n=18$. Αποτελεί ένα από τα πολλά συγγενή είδη του άγριου λάχανου (*Brassica oleracea*) και θεωρείται ότι προέρχεται από τη μετάλλαξη του κατσαρού λάχανου *Brassica oleracea capitata* L. *sabuda* subgroup. Το φυτό δεν σχηματίζει μεμονωμένη κεφαλή, αλλά πολλά μικρά κεφαλάκια στις βάσεις των φύλλων επί του κεντρικού βλαστού (ΟΛΥΜΠΙΟΣ, 2015).

1.5 ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ (*Brassica oleracea* var. *sabauda* L.)

Διετές φυτό (Εικόνα 1.4) με διπλοειδή αριθμό χρωματοσωμάτων με $2n=18$, ενώ καλλιεργείται κυρίως ως μονοετές επειδή το δεύτερο χρόνο παράγει άνθη και σπόρους. Οι ποικιλίες του λάχανου διακρίνονται σε αυτές που σχηματίζουν κεφαλή και σε αυτές που δεν σχηματίζουν. Οι κεφαλωτές ποικιλίες ανήκουν στη συμποικιλία *capitata* που περιλαμβάνει το λευκό και κόκκινο κεφαλωτό λάχανο καθώς και στη βοτανική ποικιλία *sabauda* που περιλαμβάνει κατσαρωτό κεφαλωτό λάχανο (savoy cabbage) με πράσινα κυματιστά φύλλα. Το φυλλώδες λάχανο που δεν σχηματίζει κεφαλή έχει ταξινομηθεί στη συμποικιλία *acephala* (Acephala Group) στην οποία ανήκει το λάχανο *kale* (ΟΛΥΜΠΙΟΣ, 2015).



Εικόνα 1.3. Λαχ. Βρυξελλών ποικιλία *Fraklin*.



Εικόνα 1.4. Λάχανο σαβόι ποικιλία *Famosa*.

1.6 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΠΡΟΚΟΛΟ, ΤΑ ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ, ΤΟ ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ

Το μπρόκολο έχει υψηλό βαθμό αναπνοής και επομένως γρήγορα υποβαθμίζεται η ποιότητά του, γι' αυτό εάν δεν σταλεί αμέσως στην αγορά πρέπει να αποθηκευτεί σε χαμηλές

θερμοκρασίες και υψηλή υγρασία. Οι συνιστώμενες συνθήκες αποθήκευσης είναι 1-2 εβδομάδες σε 0-2 °C και 95 % συνολική υγρασία. Ωστόσο, εάν το προϊόν βρίσκεται σε καλή κατάσταση και υπάρχει καλός αερισμός στο ψυγείο μπορεί να διατηρηθεί σε ικανοποιητική κατάσταση για 10-14 ημέρες και σε θερμοκρασία 10 °C. Περιέλιξη των ανθοκεφαλών κατά την αποθήκευση με πλαστικό φύλλο (μεμβράνη) διάτρητο ή διαπερατό στον αέρα μπορεί να βοηθήσει στην διατήρηση της υψηλής υγρασίας του προϊόντος.

Οι άριστες συνιστώμενες συνθήκες αποθήκευσης του λάχανου των Βρυξελλών είναι θερμοκρασία των 0 °C και σχετική υγρασία 95-98 %. Οι συνθήκες αυτές διατηρούν το προϊόν σε εμπορεύσιμη κατάσταση για 3-5 εβδομάδες. Μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε μαύρισμα των εξωτερικών φύλλων, σε απώλεια του φρέσκου λαμπερού χρώματος, σε μάρανση, σάπισμα και αποχρωματισμό των κομμένων μίσχων το κεφαλιού.

Οι συνιστώμενες άριστες συνθήκες αποθήκευσης για το λάχανο σαβόι είναι η θερμοκρασία των 0 °C και υψηλή σχετική υγρασία 95-98 %. Στις συγκεκριμένες ιδανικές συνθήκες μπορεί να αποθηκευτεί μόνο για τρεις μήνες έναντι του κοινού λευκού λάχανου που μπορεί να διατηρηθεί για 4-6 μήνες (Πετρόπουλος & Χα, 2014, ΟΛΥΜΠΙΟΣ, 2015).

1.7 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΑΓΕΙΡΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *BRASSICA*

Αρχικά, αυτό το οποίο έχει παρατηρηθεί είναι ότι η αποθήκευση και η μαγειρική επεξεργασία των λαχανικών του γένους *Brassica* μπορεί να επηρεάσει το περιεχόμενο των γλυκοζινολιτών και των σχετικών ισοθειοκυανικών ενώσεων. Τα λαχανικά συνήθως αγοράζονται από τοπικό κατάστημα ή αγρόκτημα και αποθηκεύονται στους 4-8 °C σε ψυγείο ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία εβδομάδα (Kelly et al., 1998). Ωστόσο, όταν το φυτικό υλικό μαγειρεύεται σε υψηλές θερμοκρασίες, το ένζυμο μυροσινάση μετουσιώνεται και μειώνεται η μετατροπή των γλυκοζινολιτών σε ισοθειοκυανικά (Aires et al., 2009). Επιπροσθέτως, τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών είναι πτητικά (Rungapamestry et al., 2007).

Ειδικότερα, βρασμός των λαχανικών οδηγεί σε σημαντικές απώλειες γλυκοζινολιτών λόγω της υδατοδιαλυτότητάς στο νερό του μαγειρέματος. Παράλληλα, αυτό το οποίο παρατηρήθηκε είναι ότι βρασμός (boiling) μετά από 30 λεπτά οδηγεί σε απώλεια των συνολικών γλυκοζινολιτών (σινιγκρίνη, γλυκοναστουρτίνη, γλυκοναπίνη, γλυκοιμπερίνη, γλυκοαλυσσίνη, προγοϊτρίνη, γλυκοραφανίνη) στα λαχανάκια Βρυξελλών σε ποσοστό 58% , στο μπρόκολο 77%, στο κουνουπίδι 75%, και στο πράσινο λάχανο 65 %. Παράλληλα, οι επιδράσεις άλλων μεθόδων μαγειρέματος όπως στον ατμό (steaming) για 0-20 λεπτά, το μαγείρεμα σε μικροκύματα

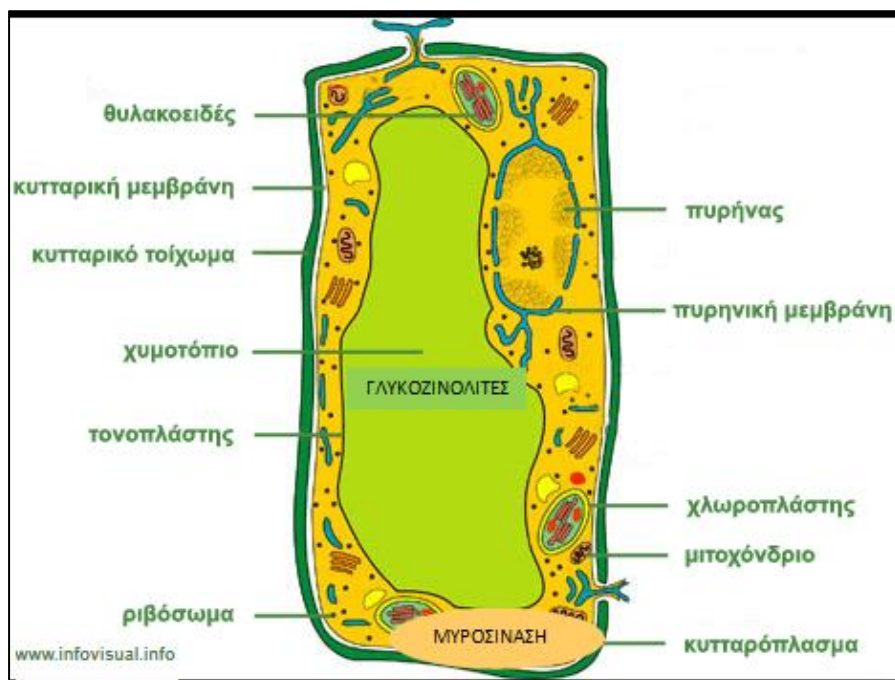
(microwaving) για 0-3 λεπτά και το τηγάνισμα με ανάδευση (stir-frying) για 0-5 λεπτά, δεν οδήγησε σε κάποια σημαντική απώλεια του συνολικού περιεχομένου των γλυκοζινολιτών στα παραπάνω λαχανικά κατά τη διάρκεια αυτών των περιόδων μαγειρέματος (Song & Thornalley, 2007).

1.8 ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ

Οι γλυκοζίτες είναι παράγωγα σακχάρων στον ανωμερικό άνθρακα, όταν το σάκχαρο βρίσκεται στην κυκλική δομή του. Διακρίνουμε τρία είδη γλυκοζιτών: τους Ο-γλυκοζίτες, όπου η ομοιοπολική σύνδεση του ανωμερικού άνθρακα γίνεται μέσω οξυγόνου και αυτοί είναι οι συνηθέστεροι, τους S-γλυκοζίτες, όπου η σύνδεση γίνεται μέσω θείου, οι N-γλυκοζίτες με σύνδεση μέσω αζώτου και οι C-γλυκοζίτες με σύνδεση μέσω άνθρακα). Όλοι οι παραπάνω γλυκοζίτες διακρίνονται σε *α-γλυκοζίτες* και οι *β-γλυκοζίτες* ανάλογα με την απεικόνιση του ανωμερικού άνθρακα. Η πλειονότητα των φυσικά απαντώμενων γλυκοζιτών είναι *β-γλυκοζίτες* και ειδικότερα *β-D-γλυκοκυρανοζίτες* (Σουλελές, 2000). Οι θειογλυκοζίτες που απαντώνται στα σταυρανθή λαχανικά είναι γνωστοί και ως γλυκοζινολίτες (Halkier & Gershenzon, 2006).

1.8.1 ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ

Λαχανικά που ανήκουν στο γένος *Brassica* όπως το λευκό και κόκκινο λάχανο, το μπρόκολο, το κουνουπίδι και τα λαχανάκια Βρυξελλών έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα για τις ευεργετικές ιδιότητές τους στην υγεία καθώς τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών (GLSs) που περιέχουν μπορεί να ρυθμίζουν την καρκινογένεση (Verhoeven et al., 1996, Fahey et al., 2001, Kall et al., 1997). Οι γλυκοζινολίτες διασπώνται εύκολα σε σάκχαρο και άγλυκο τμήμα με όξινη ή ενζυμική υδρόλυση. Όλα σχεδόν τα περιέχοντα γλυκοζινολίτες φυτά περιέχουν ένζυμα τα οποία καταλύουν την υδρόλυση τους (*γλυκοζιτάσες*). Τα ζωντανά κύτταρα περιέχουν φράγματα μεταξύ των ενζύμων και των γλυκοζινολιτών (Samuelsson, 2015). Πιο συγκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι οι γλυκοζινολίτες αποθηκεύονται στα χυμοτόπια και χωρίζονται σε ενδοκυτταρικό επίπεδο από το ένζυμο μυροσινάση (που επιδρά στους γλυκοζινολίτες και προκαλεί υδρόλυση) το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1.5) (Halkier & Gershenzon, 2006).



Εικόνα 1.5. Τυπικό φυτικό κύτταρο στο οποίο φαίνεται η θέση του ενζύμου μυροσινάση και του εκάστοτε γλυκοζινολίτη.

1.8.2 ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ

Σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου μπορεί να μειωθεί σημαντικά με μια πρόσληψη σταυρανθών λαχανικών μόλις 10 g ημερησίως (Graham, 1983, Wattenberg, 1993, Kohlmeier & Su, 1997). Μια διατροφή που περιλαμβάνει 3-5 μερίδες σταυρανθών λαχανικών ανά εβδομάδα είναι επαρκής για να προκαλέσει 30% ή 40% μείωση του κινδύνου εμφάνισης ενός αριθμού καρκίνων (Jeffery & Keck, 2008). Ειδικότερα αυτό το οποίο παρατηρούμε είναι ότι η κατανάλωση σταυρανθών ποικίλλει μεταξύ των πληθυσμών. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, εκτιμάται ότι ο μέσος ημερήσιος αριθμός λήψης συνολικών γλυκοζινολιτών είναι 14 mg / άτομο / ημέρα για άτομο που ζυγίζει 70 kg ή 0,2 mg / kg / ημέρα (Sones et al., 1984) σε αντίθεση με τις ΗΠΑ και τον Καναδά, όπου η μέση πρόσληψη είναι χαμηλότερη (Kruel et al., 2002), λαμβάνοντας υπόψη ότι ορισμένοι άνθρωποι αγνοούν τα λαχανικά του γένους *Brassica*, ενώ άλλοι καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες (Holst & Williamson, 2004).

1.9 ΠΡΩΤΗ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΚΑΙ ENZYMOY ΜΥΡΟΣΙΝΑΣΗ

Οι πρώτες παρατηρήσεις για τις μοναδικές ιδιότητες των γλυκοζινολιτών, αλλά και των προϊόντων υδρόλυσής τους, των λεγόμενων ισοθεικυανικών ενώσεων ή αλλιώς γνωστών ως έλαιων της μουστάρδας, καταγράφηκαν στις αρχές του 17^{ου} αιώνα, μετά την προσπάθεια για την κατανόηση της χημικής προέλευσης της έντονης γεύσης των σπόρων της μουστάρδας (*Brassica nigra*) (Polat, 2010). Απο την άλλη πλευρά, το ένζυμο που υδρολύει τους γλυκοζινολίτες, η μυροσινάση (θειογλυκοσιδική γλυκοϋδρολάση, EC 3.2.3.1), ανακαλύφθηκε στον μύκητα *Aspergillus sydowi* (Ohtsuru et al., 1969) και στο βακτήριο *Enterobacter cloacae* (Tani et al., 1974a,b). Επίσης το συγκεκριμένο ένζυμο βρέθηκε σε βακτήρια που σχετίζονται με τη μικροχλωρίδα του εντέρου των θηλαστικών (Fahey et al., 2012), αλλά και σε αφίδες (MacGibbon & Beuzenberg, 1978).

1.10 ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΟΙ ΙΣΤΟΙ

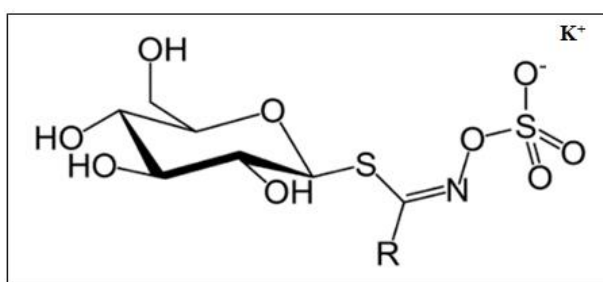
Τα ανθίδια του μπρόκολου περιέχουν συγκριτικά υψηλά επίπεδα γλυκοζινολιτών, ιδιαίτερα γλυκοραφανίνης, τα οποία είναι δευτερογενή μεταβολίτες που απαντώνται συνήθως στα λαχανικά των σταυρανθών δηλαδή στην οικογένεια *Brassicaceae* (Kushad et al., 1999, Rosa & Heaney., 1993). Γλυκοζινολίτες μπορούν να βρεθούν στις ρίζες, στους σπόρους, στα φύλλα και στο στέλεχος του φυτού, ενώ οι νεώτεροι ιστοί περιέχουν το υψηλότερο ποσό (Blažević et al., 2009). Η σύνθεση και τα περιεχόμενα των γλυκοζινολιτών στους φυτικούς ιστούς επηρεάζονται από τον γονότυπο, το κλίμα, τις καλλιεργητικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της λίπανσης, του χρόνου συγκομιδής, αλλά και τη θέση εγκατάστασης της φυτείας (Rangkadilok et al., 2002, Sang et al., 1984, Tripathi and Mishra, 2007, Verkerk et al., 2009).

1.11 ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΦΥΤΩΝ

Οι γλυκοζινολίτες είναι γνωστοί από λίγες μόνο οικογένειες αγγειοσπέρμων. Αυτές έχουν αναφερθεί σχεδόν αποκλειστικά από την τάξη *Capparales*, η οποία περιλαμβάνει 15 οικογένειες, συμπεριλαμβανομένων των *Brassicaceae*, *Capparaceae*, και *Caricaceae* (Rodman et al., 1996). Σημαντικό είναι να πούμε ότι οι γλυκοζινολίτες είναι γνωστοί από το γένος *Drypetes* της οικογένειας *Euphorbiaceae*, ένα γένος που δεν σχετίζεται με άλλες οικογένειες της ίδιας τάξης (Halkier & Gershenzon., 2006).

1.12 ΔΟΜΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ

Οι γλυκοζινολίτες έχουν μια κοινή δομή που περιέχει μια β-D-θειογλυκόζη συνδεδεμένη με μια σουλφονωμένη αλδοξίμη και μια πλευρική αλυσίδα R (Εικόνα 1.6) (RADOJCIC et al., 2008). Το άγλυκο είναι ανιόν, το οποίο στο φυτό σχηματίζει άλας με ένα ανόργανο ή οργανικό κατιόν (Samuelsson, 2015). Οι γλυκοζινολίτες κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη χημική δομή της πλευρικής αλυσίδας σε: αλειφατικούς, αρωματικούς και ινδολικούς και η βιοσύνθεσή τους έχει μελετηθεί λεπτομερώς σύμφωνα με τα πρόδρομα αμινοξέα από τα οποία προέρχονται (Clarke, 2010, Halkier & Gershenzon, 2006).

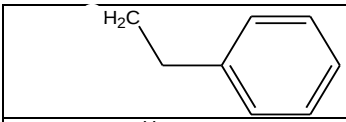
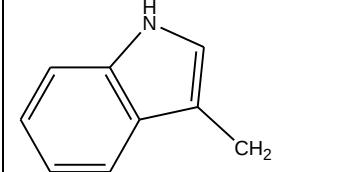


Εικόνα 1.6 Γενική δομή γλυκοζινολίων.

1.13 ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ *BRASSICACEAE*

Τα φυτά της οικογένειας *Brassicaceae* είναι ικανά να συνθέτουν γλυκοζινολίτες. Υπάρχουν πάνω από 120 γνωστοί γλυκοζινολίτες οι οποίοι είναι σταθεροί και υδατοδιαλυτοί (Agerbirk & Olsen, 2012). Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν γύρω στους 200 γλυκοζινολίτες οι οποίοι διαιρούνται σε τρεις κύριες ομάδες, αλειφατικοί, αρωματικοί και ινδολίου GLS, σύμφωνα με τα πρόδρομα αμινοξέα από τα οποία προέρχονται και μπορούν περαιτέρω να ταξινομηθούν κατά την πλευρική ομάδα R (Πίνακας Α.1) (Halkier and Gershenzon, 2006, Clarke, 2010).

Δομή πλευρικής ομάδας R	Ημισυστηματική ονομασία R- ομάδων	Κοινή ονομασία γλυκοζινολίων
	Άλλυλο (Allyl)	Σινιγκρίνη (Sinigrin)
	3-μεθυλθειοπρόπυλο (3-methylthiopropyl)	Γλυκοϊμπερβερίνη (Glucoiberberin)
	4-μεθυλθειοβούτυλο (4-methylthiobutyl)	Γλυκοερουκίνη (Glucorucin)
	4-μεθυλοσουλφινυλοβούτυλο (4-methylsulphinylbutyl)	Γλυκοραφανίνη (Glucoraphanin)

	Φαιναιθυλο (Phenylethyl)	Γλυκοναστουρτίνη (Gluconasturtiin)
	Ινδολο-3-υλομέθυλο (Indol-3-ylmethyl)	Γλυκομπρασικίνη (Glucobrassicin)

Πίνακας Α.1. Κυριότεροι γλυκοζινολίτες στα λαχ. Βρυξελλών, λάχανο σαβόι και μπρόκολο (άνθος, φύλλα, βλαστός, ρίζα).

1.14 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ *BRASSICA*

Η μοριακή δομή των πλευρικών αλυσίδων των γλυκοζινολιτών μπορεί να είναι: αλειφατική, αρωματική και ετεροκυκλική (ινδολίου) ανάλογα από το αμινοξύ που προέρχονται. Οι γλυκοζινολίτες που προέρχονται από τα αμινοξέα αλανίνη (Ala), λευκίνη (Leu), ισολευκίνη (Ile), μεθειονίνη (Met) ή βαλίνη (Val) ονομάζονται αλειφατικοί και αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό που απαντάται στο γένος *Brassica*. Οι γλυκοζινολίτες που προέρχονται από τα αρωματικά αμινοξέα φαινυλαλανίνη (Phe) ή τυροσίνη (Tyr) ονομάζονται αρωματικοί, ενώ αυτοί που περιέχουν ινδολικό δακτύλιο προέρχονται από την θρυπτοφάνη (Trp) και το περιεχόμενό τους σε ορισμένα φυτά, όπως στο μπρόκολο, είναι αρκετά υψηλό. Οι γλυκοζινολίτες οι οποίοι προέρχονται από μεθειονίνη υφίσταται ένα ευρύ φάσμα μετασχηματισμών και για αυτό παρατηρείται ένα ευρύ φάσμα αλειφατικών ισοθειοκυανικών ενώσεων (Fahey et al., 2001).

1.15 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΗ-ΜΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

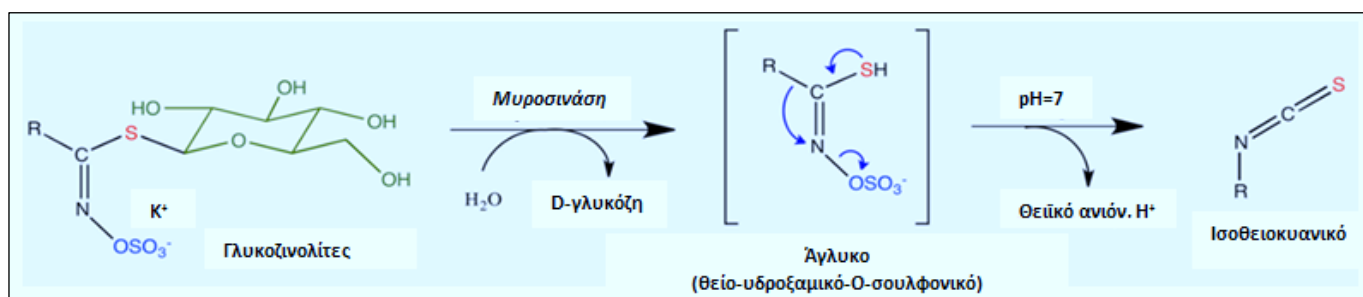
Η μυροσινάση στα φυτά είναι ένα κυτοσολικό ένζυμο (είναι το υγρό που βρίσκεται μέσα στα κύτταρα). Το ένζυμο και ο γλυκοζινολίτης διατηρούνται χωριστά για να αποφευχθεί η δράση του ενζύμου. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοζινολιτών βρεθήκαν σε εξειδικευμένα κύτταρα πλούσια σε θείο (*S-cells*) που βρίσκονται μεταξύ του φλοιώματος και της ενδοδερμίδας με το ένζυμο μυροσινάση να βρίσκεται στο φλοϊώδες παρέγχυμα του ιστού (Koroleva et al., 2010). Όταν δημιουργηθεί τραυματισμός των ιστών του φυτού είτε με κοπή, είτε με μάσηση, ο γλυκοζινολίτης και η μυροσινάση συναντώνται και ξεκινά η διαδικασία της υδρόλυσης. Με αυτό τον τρόπο οι γλυκοζινολίτες μετατρέπονται σε ισοθειοκυανικές ενώσεις (ITCs), θειοκυανικές ενώσεις, νιτρίλια, επιθειονιτρίλια και οξαζολιδινο-2-θειόνες (Dinkova-Kostova & Kostov, 2012, Fahey et al., 2001) ανάλογα με το pH ή η τη διαθεσιμότητα ιόντων σιδήρου (Bones & Rossiter, 1996) και ESP πρωτεϊνών (Foo et al., 2001).

1.16 ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ

Σε περίπτωση ζημιάς στο φυτό (όπως είναι η μάσηση) ο γλυκοζινολίτης υδρολύεται από το ένζυμο μυροσινάση και παράγεται ένα ασταθές άγλυκο ενδιάμεσο προϊόν το θειικό O-θειουδροξαμικό - (thiohydroxamate-O-sulfonate) από το οποίο προκύπτουν διάφορες ενώσεις όπως είναι : ισοθειοκυανικά, θειοκυανικά, νιτρίλια, επιθειονιτρίλια αλλά και προϊόντα αυθόρμητης κυκλοποίησης όπως είναι οξαζολιδίνη-θειόνη (oxazolidine-thione). Το ποια προϊόντα θα προκύψουν εξαρτάται από το pH, την παρουσία Fe^{2+} ή επιθειοεκλεκτικών πρωτεϊνών (epithiospecifier protein-ESP) (Mithen et al., 2000, Fahey et al., 2001, VanEtten & Tookey, 1983).

1.16.1 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Το πιο συνηθισμένο προϊόν υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών είναι οι ισοθειοκυανικές ενώσεις οι οποίες είναι αναγνωρισμένες ως κύριοι αναστολείς μικροβιακής δραστηριότητας (Wallsgrave et al., 1998, O'Callaghan et al., 2000). Σχηματίζονται από το άγλυκο τμήμα μετά από μια αναδιάταξη Lossen που περιλαμβάνει την μετακίνηση της πλευρικής αλυσίδας R από τον άνθρακα της οξίμης προς τη θέση του γειτονικού αζώτου. Σημαντικό είναι να πούμε ότι για να γίνει αυτή η μετακίνηση πρέπει να φύγει η ομάδα OSO_3^- η οποία είναι μια καλή αποχωρούσα ομάδα (Εικόνα 1.7) (Halkier and Gershenzon, 2006).



Εικόνα 1.7. Υδρόλυση των γλυκοζινολιτών από το ένζυμο μυροσινάση.

1.16.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΝΙΤΡΙΛΙΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΘΕΙΟΝΙΤΡΙΛΙΩΝ

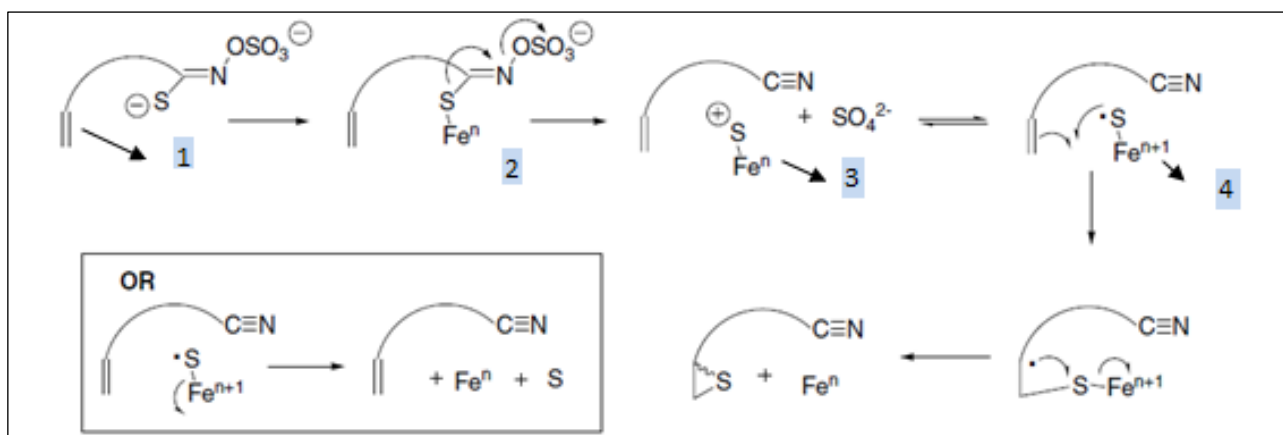
Η πρώτη παρατήρηση νιτρίλιων που περιέχουν τριμελή δακτύλιο με θείο ήταν από τον VanEtten et al., 1966. Αυτά τα νιτρίλια είναι τα λεγόμενα επιθειονιτρίλια (Daxenbichler et al., 1968). Τα συστατικά αυτά χαρακτηρίζονται σαν διαστερεοϊσομερή του (2S)-3-υδροξυ-3-(θειϊρανυλ-2-υλ)πρόπανο νιτρίλια ((2S)-3-hydroxy-3-(thiiranyl-2-yl)propane nitriles). Αρχικά

θεωρήθηκε ότι ο σχηματισμός των νιτρίλων ήταν μη ενζυμικός και ότι εξαρτάται μόνο από ιόντα σιδήρου και πρωτόνια. Ωστόσο, είναι πλέον αποδεκτό ότι η ESP πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των νιτρίλων, αν και ο πραγματικός μηχανισμός εξακολουθεί να είναι ένα ανοικτό ερώτημα. Η ESP πρωτεΐνη χρησιμοποιεί το ασταθές ενδιάμεσο προϊόν που παράγεται από το ένζυμο μυροσινάση για να παράγει νιτρίλια και επιθειονιτρίλια.

Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ESP χαρακτηρίστηκε πρώτη φορά από τον Tookey, 1973. Ειδικότερα πρόκειται για μια σχετικά σταθερή πρωτεΐνη η οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική στις αλληλεπιδράσεις φυτών-εντόμων (Lambrix et al., 2001). Η αντίδραση απαιτεί ιόντα σιδήρου για δραστηριότητα (de Torres Zabala et al., 2005), η οποία κατά πάσα πιθανότητα επιτρέπει τον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου προϊόντος μεταξύ του θειοϋδροξυμικού (thiohydroximate) και της ESP πρωτεΐνης. Σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι η ESP δεν δρα στο αρχικό υπόστρωμα, αλλά μόνο έναντι του ασταθούς ενδιάμεσου. Επίσης δεν έχει ενζυμική ενεργότητα όταν βρίσκεται μόνη της, αλλά μπορεί να δράσει με το ένζυμο μυροσινάση και να παράγει ένα διαφορετικό προϊόν (Foo et al., 2000). Η εισαγωγή θείου έχει δείξει ότι γίνεται μέσω ενδομοριακής αντίδρασης χρησιμοποιώντας επισημασμένο θείο ^{35}S (Brocker & Benn, 1983). Ένας πιθανός μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει τόσο το σχηματισμό νιτρίλου όσο και τον σχηματισμό δακτυλίου θειϊρανίου φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Bones & Rossiter, 2006).

Αυτό το οποίο παρατηρούμε στην εικόνα 1.8 είναι ότι ο Fe^{n} αποσπά το S (2) με μεταφορά του ζεύγους e^- (του δεσμού C-S) στον άνθρακα και επομένως το σχηματισμό του τριπλού δεσμού $\text{C}\equiv\text{N}$ (3), ενώ ταυτόχρονα έχουμε την αποχώρηση της OSO_3^- ομάδας. Στη συνέχεια, ή ενωση του θείου με το σίδηρο (3) οδηγεί στο σχηματισμό δακτυλίου θειυρανίου (Foo et al., 2000).

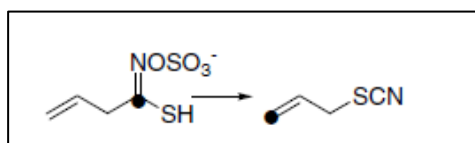
Η ESP πρωτεΐνη είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τα επίπεδα των ισοθειοκυανικών ενώσεων που παράγονται στο μπρόκολο, καθώς είναι σχετικά ευαίσθητη στη θερμότητα σε σχέση με το ένζυμο μυροσινάση (Matusheski et al., 2003, 2004). Πιο συγκεκριμένα, μια σύντομη θερμική επεξεργασία (δηλαδή βρασμός για λίγα λεπτά αδρανοποιεί την ESP), αλλά αφήνει το δραστικό ένζυμο μυροσινάση να ενεργοποιηθεί και να δημιουργήσει ισοθειοκυανικές ενώσεις, εφόσον βέβαια έχει προηγηθεί κατάλληλος τραυματισμός στο φυτό, όπως μάσηση.



Εικόνα 1.8. Μηχανισμός σχηματισμού επιθειονιτριλίων και νιτριλίων.

1.16.3 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΩΝ

Υπάρχουν διάφορες θεωρίες για τον σχηματισμό των θειοκυανικών. Για παράδειγμα ένα ένζυμο που αναδιατάσσει τον γλυκοζινολίτη, όπως π.χ. μια ισομεράση η οποία δρα επί της ισοθειοκυανικής ένωσης και παράγοντες που δρουν επί του άγλυκου τμήματος μπορεί να οδηγήσουν στη θειοκυανική ένωση. Ειδικότερα μπορούμε να πούμε ότι τα θειοκυανικά πιστεύεται ότι προέρχονται από γλυκοζινολίτες οι οποίοι μπορούν να δώσουν ένα σταθερό καρβοκατιόν όπως ο βένζυλο, προπένυλο- και 4-μεθυλοθειοβούτυλο- γλυκοζινολίτης (Luthy & Benn, 1977). Ο Miller το 1965 παρατήρησε ότι το άγλυκο τμήμα του γλυκοζινολίτη σινιγκρίνη (του 2-προπένυλο γλυκοζινολίτη) μετατράπηκε σε άλλυλο θειοκυανικό (3-thiocyanatoprop-1-ene) σε σπόρους του *Thlaspi arvense* (Εικόνα 1.9). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο σχηματισμός των θειοκυανικών απαιτεί τουλάχιστον δύο ένζυμα, μια μυροσινάση και έναν παράγοντα σχηματισμού θειοκυανικού (Bones & Rossiter, 2006).

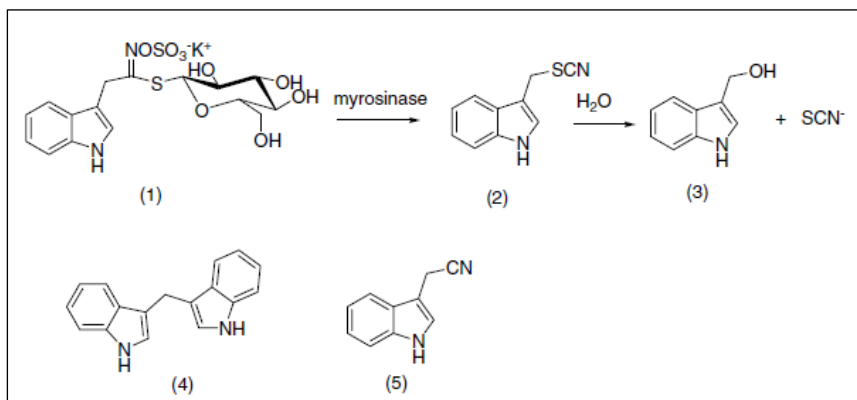


Εικόνα 1.9. Αναδιάταξη του ατόμου άνθρακα και ο σχηματισμός θειοκυανικής ένωσης άλλυλο θειοκυανικό (3-θειοκυανικό προπ-1-ένιο).

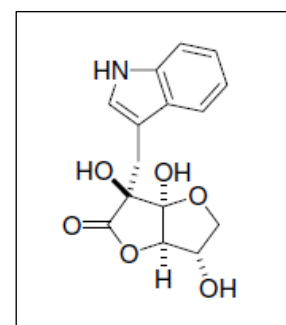
1.16.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΔΑΚΤΥΛΙΟ ΙΝΔΟΛΙΟΥ

Οι γλυκοζινολίτες που περιέχουν δακτύλιο ινδολίου (Εικόνα 1.10) δημιουργούν μια ποικιλία προϊόντων υδρόλυσης με τη βοήθεια του ενζύμου μυροσινάση. Έτσι ο ινδολο-3-

υλομέθυλο γλυκοζινολίτης (indol-3-ylmethyl glucosinolate) (1) δημιουργεί : την ινδολο-3-καρβινόλη [(1-*H*-indol-3-yl)methanol] (3), το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο [2-(1-*H*-indol-3-yl)acetonitrile] (5) και το 3,3'-διϊνδολυλομεθάνιο [di(1-*H*-indol-3-yl)methane] (4). Η ινδολο-3-καρβινόλη (3) πιστεύεται ότι προκύπτει από το αντίστοιχο ασταθές ισοθειοκυανικό 3-μεθυλοθειοκυανικόινδόλιο (3-(thiocyanatomethyl)-1-*H*-indole) (2) με υδρόλυση. Προσπάθειες απομόνωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης από τον ινδολο-3-υλομέθυλο γλυκοζινολίτη ήταν ανεπιτυχείς αν και η αντίστοιχη ισοθειοκυανική ένωση έχει απομονωθεί από τον 1-μεθοξυϊνδολο-3-υλομέθυλο γλυκοζινολίτη (1-methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate) (Hanley et al., 1990a,b; Hanley & Parsley, 1990). Προσπάθειες απομόνωσης του ινδολο-3-υλομέθυλο γλυκοζινολίτη ήταν ανεπιτυχείς. Η υδρόλυση του γλυκοζινολίτη οδηγεί στο σχηματισμό του ασκορβιγόνου (Εικόνα 1.11) παρουσία ασκορβικού οξέος (Agerbirk et al., 1998).



Εικόνα 1.10. Υδρόλυση γλυκοζινολιτών που περιέχουν δακτύλιο ινδολίου και τα αντίστοιχα προϊόντα τους.



Εικόνα 1.11. Δομή του ασκορβιγόνου.

1.17 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ

Εκτός από το ένζυμο μυροσινάση που απαντάται στα σταυρανθή, υπάρχουν επιλεγμένα βακτήρια που αποικίζουν την ανθρώπινη πεπτική οδό και είναι σε θέση να υδρολύουν τους γλυκοζινολίτες (Angelino & Jeffery, 2014). Γλυκοζινολίτες που υπάρχουν για παράδειγμα σε μαγειρεμένα λαχανικά στα οποία η μυροσινάση έχει απενεργοποιηθεί, μπορούν να υδρολυθούν από τα βακτήρια του εντέρου προς βιολογικά ενεργές ενώσεις οφέλιμες για την ανθρώπινη υγεία (Angelino & Jeffery, 2014).

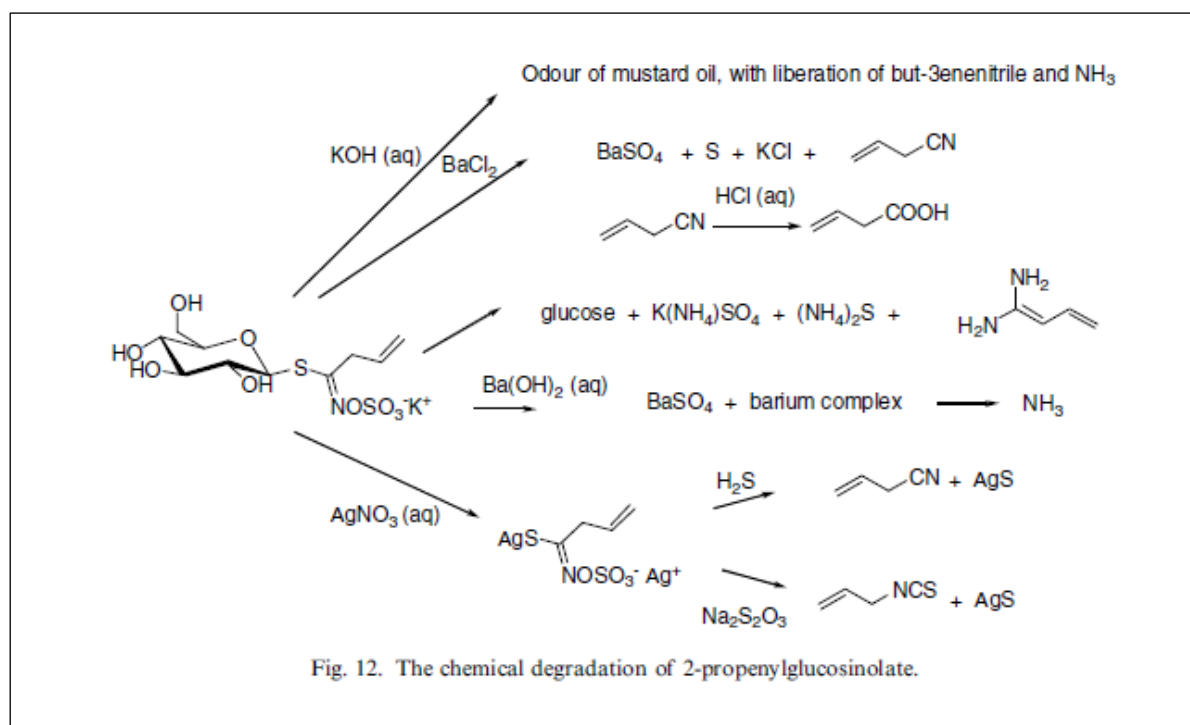
1.17.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΥΡΟΣΙΝΑΣΗ ΣΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΑΦΙΔΕΣ

Τα φυτά περιέχουν μια ομάδα ένζυμων, τις β-θειογλυκοσιδάσες οι οποίες είναι κοινά γνωστές με το όνομα μυροσινάση και έχουν την ιδιότητα να υδρολύουν τους γλυκοζινολίτες (Bones & Rossiter, 2006). Η μυροσινάση είναι πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μερικούς σπόρους

σταυρανθών και μπορεί εύκολα να ληφθεί με απλή κλασματοποίηση με χρήση θειϊκού αμμωνίου σε συνδυασμό με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Είναι χαρακτηριστικό ότι το ένζυμο ενεργοποιείται από το ασκορβικό οξύ λόγω αλλοστερικής επιδράσης (Ohtsuru & Hata, 1979, Ohtsuru et al., 1973). Πιο συγκεκριμένα, μόνο το L-ασκορβικό οξύ ενεργοποιεί το ένζυμο μυροσινάση στα φυτά, ενώ το D-ασκορβικό οξύ δεν προκαλεί ενεργοποίηση. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δραστηριότητα της μυροσινάσης είναι περίπου 55 °C απουσία του L-ασκορβικού οξέος, ενώ παρουσία του είναι περίπου 35 °C. Σημαντικό είναι να πούμε ότι κατάφεραν οι επιστήμονες να βρουν τη δομή του ενζύμου με τη βοήθεια των ακτινών X. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση ενός εκλεκτικού αναστολέα της μυροσινάσης (2-F-2-δεσοξυβενζυλογλυκοζινολίτη) που παγιδεύει το κατάλοιπο του γλουταμινικού οξέος (Glu409) (Burmeister et al., 1997).

1.17.2 ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ

Ο Gadamer (1987a,b) ήταν ένας από τους πρώτους χημικούς που μελέτησε τις μη ενζυμικές αντιδράσεις των γλυκοζινολιτών. Ο γλυκοζινολίτης ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 2-προπενυλο-γλυκοζινολίτης (σινιγκρίνη) και τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποίησε για την υδρόλυσή του ήταν : KOH (aq), BaCl₂, Ba(OH)₂ (aq), AgNO₃ (aq) (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12. Χημική αποικοδόμηση του 2-προπενυλο-γλυκοζινολίτη.

Όταν χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο KOH (aq) προκλήθηκε μια μυρωδιά ελαίου μουστάρδας με ταυτόχρονη απελευθέρωση του βουτεν-3-νιτρίλιου και NH₃. Όταν χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BaCl₂ προέκυψε το ίδιο νιτρίλιο με παραπάνω που στη συνέχεια με χρήση του HCl (aq) μετατράπηκε σε οξύ. Όταν ο γλυκοζινολίτης αντέδρασε με το Ba(OH)₂ (aq), προέκυψε το άλας BaSO₄ και ένα σύμπλοκο με κεντρικό άτομο το βάριο το οποίο στη συνέχεια μετατράπηκε σε αμμωνία. Ενώ η αντίδραση με το αντιδραστήριο AgNO₃ (aq) οδήγησε σε παράγωγο του αργύρου που παρουσία θειοθειϊκού νατρίου (sodium thiosulphate) οδήγησε κυρίως στην παραγωγή του ισοθειοκυανικού, ενώ παρουσία υδροθείου στα αντίστοιχα νιτρίλια.

1.17.3 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Όταν τα λαχανικά έχουν μαγειρευτεί για παρατεταμένο χρονικό διάστημα είτε με βρασμό (θερμοκρασίες αρκετά υψηλές > 45 °C) είτε σε φούρνο μικροκυμάτων, το ένζυμο μυροσινάση απενεργοποιείται. Τότε, οι άθικτοι γλυκοζινολίτες υδρολύονται από βακτήρια του εντέρου. Ο καταβολισμός των γλυκοζινολιτών δεν γίνεται στο τμήμα του λεπτού εντέρου, αλλά φαίνεται να περιορίζεται στο τελευταίο τμήμα του παχέος εντέρου (κόλον), κυρίως λόγω της ύπαρξης των κατάλληλων βακτηρίων (Aires et al., 2009). Βακτήρια τα οποία είναι ικανά να μεταβολίζουν τους γλυκοζινολίτες είναι : *Escherichia coli* (Oginsky et al., 1965), *Aspergillus niger* (Ohtsuru and Hata, 1973), *Enterobacter cloacae* (Tani et al., 1974a), *Bacillus cereus* (Huber et al., 1983), *Lactobacillus agilis* R16 (Llanos Palop et al., 1995) και *Bacteroides thetaiotaomicron* II8 (Elfoul et al., 2001) αλλά και η ζύμη *Geotrichum candidum* (Staron, 1975).

1.18 ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΑΠΟ *PIERIS RAPAE*

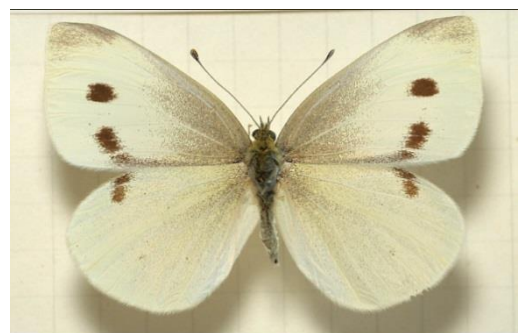
Οι προνύμφες του *P. rapae* εξειδικεύονται στα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια *Brassicaceae* (Miles et al., 2004). Τα προϊόντα διάσπασης των γλυκοζινολιτών, οι ισοθειοκυανικές ενώσεις, δεν είναι τοξικά για αυτές. Ο Verschaffelt από το 1910 έδειξε ότι οι προνύμφες του συγκεκριμένου εντόμου χρησιμοποιούν τους γλυκοζινολίτες ως «διεγερτικό τροφής» (Schoonhoven, 1972), ενώ τα θηλυκά ενήλικα άτομα χρησιμοποιούν τους γλυκοζινολίτες ως δείκτες αναγνώρισης των θέσεων ωοτοκίας (Huang and Renwick, 1994, Renwick et al., 1992, Van Loon et al., 1992). Ο γλυκοζινολίτης γλυκοναστουρτίνη είναι ιδιαίτερα

αποτελεσματικός ως διεγερτικό της ωτοκίας για τις θηλυκές πεταλούδες *P. rapae* (Huang and Renwick, 1994). Σχετικά πειράματα έδειξαν ότι το ινδόλιο και οι αρωματικοί γλυκοζινολίτες προκαλούν ισχυρότερα ερεθίσματα από αυτά των αλειφατικών γλυκοζινολιτών σε κύτταρα που βρίσκονται στον ταρσό του εντόμου και λειτουργούν ως χημειοποδοχείς προκειμένου να εξεταστούν τα φύλλα των φυτών πριν από την ωτοκία (Stadler et al., 1995). Πιο συγκεκριμένα, η αξιολόγηση της χημικής επιφάνειας των φύλλων είναι πιθανότερο να συμβεί όταν τα ενήλικα άτομα *Pieris* (Εικόνα 1.14) χτυπούν με το μπροστινό ταρσό των ποδιών τους το φύλλο πριν την ωτοκία (Terofal, 1965, Schoonhoven et al., 2005). Ωστόσο, η μικροσκοπική εξέταση της επιφάνειας του φύλλου δεν αποκάλυψε καμία φυσική βλάβη, με τους χημειοποδοχείς του ταρσού να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε αρωματικούς και ινδόλο γλυκοζινολίτες (Stadler et al., 1995).

Οι προνύμφες του *P. Rapae* (Εικόνα 1.13) εκκρίνουν στα περιττώματα τους απλά νιτρίλια (Agelopoulou et al., 1995) λόγω της δράσης μιας ειδικής νίτριλο πρωτεΐνης που βρίσκεται στο έντερο του εντόμου (nitrile specific protein–NSP) και κατευθύνει την υδρόλυση των γλυκοζινολιτών (ingested glucosinolates) προς όφελος των νιτρίλιων (Wittstock et al., 2004, Burow et al., 2006a). Έχει αποδειχθεί ότι στα περιττώματα εκκρίνονται κυρίως νιτρίλια που προέρχονται από γλυκοζινολίτες με αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες και από τους 4-υδροξυβενζυλο γλυκοζινολίτες (Wittstock et al., 2004). Η NSP φαίνεται να καταλύει τη μετατροπή των ασταθών άγλυκων τμημάτων που παράγονται από τις μυροσινάσες στα αντίστοιχα νιτρίλια (Burow et al., 2006a). Η πρωτεΐνη NSP λειτουργεί με ανάλογο τρόπο με την ESP κατευθύνοντας την διάσπαση των γλυκοζινολιτών προς τα λιγότερο τοξικά για το έντομο νιτρίλια, τα οποία εκκρίνονται στα περιττώματα (Wittstock et al., 2004).



Εικόνα 1.13. Ενήλικη προνύμφη *Pieris rapae*.



Εικόνα 1.14. Ενήλικο άτομο *Pieris rapae*.

1.19 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ, I3C ΚΑΙ I3CN

1.19.1 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων φρούτων και λαχανικών, ιδιαίτερα από τα σταυρανθή λαχανικά (π.χ. μπρόκολο, λάχανο, λάχανο kale και λαχανάκια Βρυξελλών), σχετίζεται με τη μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου (Block et al.,1992, Steinmetz et al.,1996, World Cancer Research.1997, van Poppel et al.,1999, Beecher et al.,1994, Michaud et al.,1999). Τα προϊόντα της υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών, ιδιαίτερα οι ισοθειοκυανικές αλλα και ενώσεις του ινδολίου, έχουν αποδειχθεί ότι δρουν ως αντικαρκινικές αναστέλλοντες τη φάση I¹ των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την βιοενεργοποίηση των καρκινογόνων και επάγοντας τη φάση II² των ενζύμων αποτοξίνωσης που επηρεάζουν τους ξеноβιοτικούς μετασχηματισμούς (Talalay & Fahey, 2001).

1.19.1.1 Άλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC)

Το AIC αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως ο καρκίνος του παχέως εντέρου (HT29 κύτταρα) (Lai et al., 2014), του πνεύμονα (NSCLC κύτταρα) (Tripathi et al., 2015) , η λευχαιμία (HL60 κύτταρα) (Xu et al., 2000) , ο καρκίνος του μαστού (Tsai et al., 2012) και της ουροδόχου κύστης (Bhattacharya et al., 2010,Savio et al., 2010), το νευροβλάστωμα (TRPA1 και TRPM8 κύτταρα) (Louhivuori et al., 2009) , ο καρκίνος στο ήπαρ (SK-Hep1 κύτταρα) (Hwang et al., 2009) και στον προστάτη (Srivastava et al., 2003, Xiao et al., 2003). Το AIC μπορεί και ενεργοποιεί το κανάλι TRPA1³, προκαλώντας αύξηση του ενδοκυτταρικού επιπέδου Ca²⁺, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην απελευθέρωση ινσουλίνης. Αυτό δείχνει ότι οι αγωνιστές TRPA1 θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως εκκριταγωγές ινσουλίνης (Cao et al., 2012, Numazawa et al., 2012).

¹ Η φάση I, περιλαμβάνει αντιδράσεις υδρόλυσης, αναγωγής και οξείδωσης. Αποτέλεσμα των αντιδράσεων αυτών είναι η εισαγωγή ή η αντικατάσταση στο μόριο της ξеноβιοτικής ουσίας κάποιας από τις ακόλουθες πολικές ομάδες: -OH,-COOH, -NH₂, -SH, αυξάνοντας σε ένα βαθμό την υδροφιλικότητα της ουσίας (Katzung, 2012).

² Η δεύτερη μεταβολική φάση των φαρμάκων περιλαμβάνει τις αντιδράσεις εκείνες που οδηγούν στην προσθήκη κάποιου φυσιολογικού υδατοδιαλυτού μορίου. Στις αντιδράσεις σύζευξης υπάγεται η προσθήκη γλυκουρονικού οξέος, θειικού οξέος, αμινοξέων, γλουταθειόνης, ακετυλίου και μεθυλίου. Η σύζευξη με κάποια από αυτές τις φυσιολογικές ενώσεις θα γίνει, εάν το μόριο του φαρμάκου περιέχει μια από τις ακόλουθες ομάδες: υδροξύλιο, καρβοξύλιο, πρωτοταγή ή δευτεροταγή αμινομάδα και σουλφυδρύλιο. Όπως είναι ευνόητο, φάρμακα που περιέχουν μια ή περισσότερες από αυτές τις ομάδες μπορούν να εισέλθουν κατ'ευθείαν στη δεύτερη μεταβολική φάση, χωρίς να προηγηθεί η πρώτη (Katzung, 2012)

³ Το TRPA1 είναι ένα διαπερατό μη εκλεκτικό κανάλι κατιόντων το οποίο εκφράζεται στα νευρωνικά γάγγλια. Ενεργοποιείται από αρκετές ηλεκτρονιόφιλες ουσίες όπως είναι το άλλυλο ισοθειοκυανικό (AIC) και εμπλέκεται σε διάφορες αισθητήριες διαδικασίες όπως είναι η ανίχνευσης του επιβλαβούς κρύου και η φλεγμονώδης υπεραλγησία (Numazawa et al., 2012) .

1.19.1.2 Φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC)

Η χορήγηση του PITC σε πειραματικά μοντέλα ποντικών μείωσε την επαγόμενη υπερπλασία του οισοφάγου (Ogawa et al., 1998), αλλά και ανέστειλε τις επιπτώσεις που μπορεί να δημιουργήσει ο όγκος στον προστάτη (Barve et al., 2008). Επίσης, προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του εντερικού πολύποδα, αλλά και μείωση του μεγέθους του εντερικού όγκου (Khor et al., 2008) καθώς και μείωση του μεγέθους των βλαβών που μπορεί να δημιουργήσει ο καρκίνος του μαστού (McCune et al., 2010).

1.19.1.3 Σουλφοραφάνη (SFN)

Αρκετές δεκαετίες έρευνας έδειξαν ότι η κυτταροπροστατευτική οδός του Nrf2⁴ μπορεί να επαχθεί προβλέψιμα από χαμηλές συγκεντρώσεις δραστικών μορίων σουλφωδρυλίου. Η SFN είναι ένας φυσικά απαντώμενος επαγωγέας του Nrf2 που εμφανίζει υψηλή αποτελεσματικότητα σε κυτταρικές καλλιέργειες (Dinkova-Kostova et al., 2002). Σημαντικό είναι να πούμε ότι η SFN είναι η πιο ευρέως μελετημένη ένωση με χημειοπροστατευτικές, αλλά και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Sharma et al., 2011, Wagner et al., 2013, Zhang et al., 1992). Η χορήγηση του SFN σε πειραματικά μοντέλα ποντικών έδειξε ότι καταστέλλει το σχηματισμό πολύποδα στο λεπτό έντερο (Hu. et al., 2006) και αναστέλλει τη νεοπλασία του ενδοθηλίου του προστάτη που ακολουθείται από πνευμονική μετάσταση (Keum. et al., 2009). Επίσης, η SFN αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231 που προκαλούν καρκίνο του μαστού (Kanematsu et al., 2010), στα HT29 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Gamet-Payrastre et al., 2000), σε κυτταρικές σειρές LNCaP και PC-3 καρκίνου του προστάτη (Choi et al., 2007), αλλά και στα LTP-A2 καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου πνεύμονα (Liang et al., 2008). Επίσης, η SFN καταστέλλει τον καρκίνο του στομάχου που προκαλείται από το *Helicobacter pylori* (Fahey et al., 2002) και έχει αποδειχθεί ότι έχει νευροπροστατευτική δράση έναντι της ασθένειας του Alzheimer σε πείραμα το οποίο διεξήχθη σε κυτταρικές σειρές ποντικών Neuro2A και N1E 115 (Park et al., 2009) και έναντι της ασθένειας του Parkinson σε πείραμα το οποίο διεξήχθη στη *Drosophila* (Trinh et al., 2008).

1.19.1.4 Ερουκίνη (ER)

Η συγκεκριμένη ισοθειοκυανική ένωση έχει σχηματική ομοιότητα με τη SFN και μπορεί να μετατρέπεται *in vivo* η μια μορφή στην άλλη, αλλά και το αντίστροφο. Η συγκεκριμένη

⁴ Η οδός Keap1-Nrf2 είναι ο κύριος ρυθμιστής της κυτταροπροστατευτικής αντιδράσης στις ενδογενείς και εξωγενείς καταπονήσεις που προκαλούνται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τα ηλεκτρονιόφιλα (Dinkova-Kostova et al., 2002).

ιδιότητα δίνει το πλεονέκτημα στη ER να έχει παρόμοιες βιολογικές δράσεις με τη SFN. Ωστόσο το πλήρες βιολογικό προφίλ της ER είναι ελλιπές λόγω ελαχίστων πειραματικών δεδομένων (Melchini et al., 2009). Η συγκεκριμένη ένωση έδειξε δράση έναντι της καρκινικής σειράς HepG2 που δημιουργεί καρκίνο στο ήπαρ (Lamy et al., 2008), στον πνεύμονα (A549 κυτταρική σειρά) (Conaway et al., 2005), σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα (Fimognari et al., 2004), αλλά και σε κύτταρα που δημιουργούν καρκίνο του παχέος εντέρου (Jakubikova et al., 2005).

1.19.1.5 Ιμπερβερίνη (3MIC)

Η 3MIC εμφανίζει παρόμοια δραστηριότητα με τη SFN στην επαγωγή του μονοπατιού Nrf2-Keap1. Λίγα όμως είναι γνωστά σχετικά με τη δραστηριότητα των χαμηλότερων ομολόγων της SFN όπως είναι η 3MIC (Ernst et al., 2013). Η 3MIC έδειξε ανασταλτική δράση στις καρκινικές σειρές A549 και NHBE που είναι υπεύθυνες για καρκίνο στον πνεύμονα (Wang et al., 2016). Επίσης μελετήθηκε η επαγωγή του μονοπατιού Nrf2-Keap1 στα NIH3T3 κύτταρα (Ernst et al., 2013).

1.19.1.6 Νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN)

Τόσο η αντικαρκινική δράση του συγκεκριμένου νιτρίλιού, όσο και η αντιμικροβιακή δράση έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών δεν έχει μελετηθεί.

1.19.1.7 Ινδολο-3-καρβινόλη (I3C)

Τόσο η I3C, όσο και τα παράγωγα της, έχουν δείξει ότι καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών όπως μαστού (Rahman et al., 2003, Katdare et al., 1998, Howells et al., 2002, Hong et al., 2002), κόλον (Frydoonfar et al., 2002, Hudson et al., 2003, Zheng et al., 2002), προστάτη (Chinni & Sarkar, 2002, Frydoonfar et al., 2003, Nachshon-Kedmi et al., 2003), ενδομήτριου (Leong et al., 2001) σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 50-100 μ M.

1.19.1.8 Ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN)

Το νιτρίλιο δεν έχει ιδιαίτερη αντικαρκινική δράση όπως έχει αποδειχθεί από πειραματικά δεδομένα (Henbest et al., 1953, Loub et al., 1975, Pantuck et al., 1976, Shertzer, 1984, Wortelboer et al., 1992). Τη μοναδική δράση που έχει δείξει είναι ότι τόσο το I3CN όσο και τα παράγωγα του ινδολίου (I3C και ασκορβιγόνο-ascorbigen) είναι η αναστολή της νεοπλασίας του προστόμαχου, αλλά και του σχηματισμού του μαστικού όγκου αυξάνοντας τη δραστηριότητα

των βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στην κυτταρική αποτοξίνωση (Wattenberg and Loub, 1978).

1.19.2 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Από τις αρχές της δεκαετίας του 30' παρατηρήθηκε η ανασταλτική δράση των καθαρών ισοθαιοκυανικών ενώσεων έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Ο πρώτος ο οποίος μελέτησε τη συγκεκριμένη δράση ήταν ο Walker et al., 1937 και είδε ότι ενώσεις όπως το AIC είναι εξαιρετικά τοξικές για μερικούς μύκητες όπως: *Colletotrichum circinans*, *Botrytis allii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus alliaceus*, *Gibberella saubinetii*. Η αντιμικροβιακή δράση παρατίθεται στο πίνακα Α.2.

AIC, SFN, PITC, I3CN, I3C	<i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas tomato</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Xanthomonas juglandis</i> , <i>Erwinia chrysantemi</i>	Aires et al., 2009a
	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Aires et al., 2009b
AIC	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Kyung & Fleming, 1997 Delaquis & Sholberg, 1997
ER, AIC	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Pythium irregular</i>	Vig et al., 2009, Manici et al., 1997
ER	<i>Streptococcus mutant</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Candida albicans</i>	Ko et al., 2016
PITC	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	Zsolnai, 1966
PITC, SFN, ER	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Serratia marcescens</i>	Wilson et al., 2013
5MITN, 3MIC	-	Δεν έχει μελετηθεί σαν καθαρή ένωση

Πίνακας Α.2. Αντιμικροβιακή δράση των ισοθαιοκυανικών ενώσεων AIC, PITC, ER, SFN, νιτριλίων 5MITN, I3CN και ινδόλο-3-καρβινόλης (I3C).

1.20 ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

1.20.1 *Verticillium dahliae*

Πρόκειται για το σημαντικότερο είδος του γένους και το σοβαρότερο εδαφογενές παθογόνο. Ο μύκητας *Verticillium dahliae* διατηρείται στο έδαφος με τη μορφή ανθεκτικών διαχειμαζόντων μορφών τα λεγόμενα μικροσκληρώτια. Προσβάλλει τις ρίζες των δέντρων και από τα αγγεία του κορμού των κλάδων φτάνει ακόμα και μέχρι τα φύλλα. Πάντοτε όμως μέσα στα αγγεία του ξύλου. Η παρουσία αλλά και οι τοξικές ουσίες που παράγει το παθογόνο μέσα στα αγγεία δυσχεραίνουν την κανονική διατροφή, αλλά και την ανάπτυξη του δέντρου. Το παθογόνο μεταδίδεται κυρίως από τα μολυσμένα φύλλα της ελιάς ή άλλων ευπαθών ξενιστών μέσα στα οποία σχηματίζονται τα μικροσκληρώτια. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο μεταχρωματισμός των φύλλων, η φυλλόπτωση και οι ημιπληγίες. Η ασθένεια είναι σοβαρή όταν ο ελαιώνας συγκαλλιεργείται με άλλα ευπαθή στο μύκητα φυτά όπως βαμβάκι, τομάτες, πατάτες κ.α. ή γειτνιάζει με ευπαθείς καλλιέργειες (Τζάμος, 2007).

1.20.2 *Botrytis cinerea*

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* διατηρείται στα νεκρά υπολείμματα των φυτών ως σαπροφυτικό μικκύλιο ή ως σκληρώτια. Τα αρχικά μολύσματα προέρχονται από κονίδια που μολύνουν τα φυτά κυρίως σε θέσεις πληγών ή σε σημεία που υπάρχουν νεκροί ιστοί. Η ανάπτυξη του παθογόνου είναι ταχυστάτη και σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής σχετικής υγρασίας και περιορισμένου εξαερισμού των θερμοκηπίων, το κύριο σύμπτωμα του μύκητα είναι η σήψη των οργάνων και των ιστών που προσβάλλει με χαρακτηριστική ανάπτυξη γκρίζας εξάνθησης πάνω στις παρασητούμενες επιφάνειες. Τα σπόρια μολύνουν συνήθως σε πληγές κλαδέματος. Ο μύκητας προκαλεί και λανθάνουσες προσβολές, προκαλώντας το σύμπτωμα «κηλίδα φάντασμα», αλλά προκαλεί και μετασυλλεκτικές σήψεις στο μπρόκολο (Τζάμος, 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

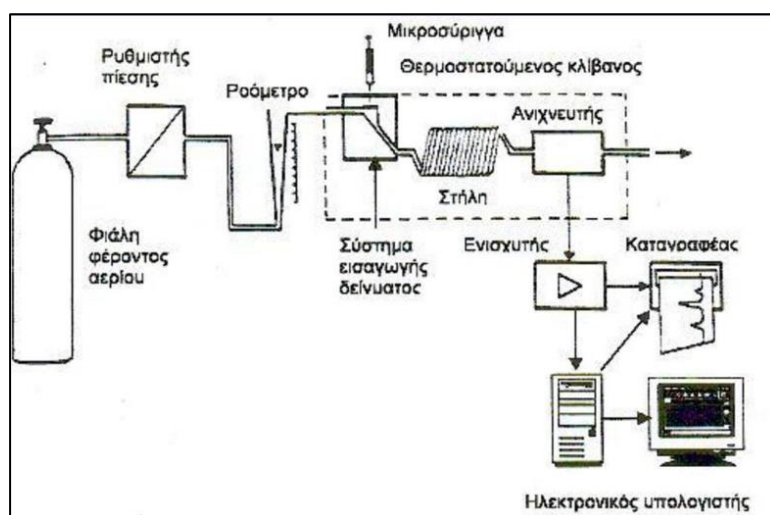
Η συγκεκριμένη χρωματογραφία αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1941 από τους Martin και Synge, ενώ το 1955 εμφανίστηκε στην αγορά το πρώτο εμπορικό σύστημα χρωματογραφίας αέριου-υγρού (Jones & Martin, 1952). Στην αέρια χρωματογραφία, το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλουση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο μόνος της ρόλος είναι η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Υπάρχουν δυο τύποι αέριας χρωματογραφίας : η χρωματογραφία αερίου- στερεού (gas-solid chromatography, GSC) και η χρωματογραφία αερίου- υγρού (gas-liquid chromatography, GLC). Η χρωματογραφία αερίου-υγρού χρησιμοποιείται σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών και συχνότερα αναφέρεται ως αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC). Η χρωματογραφία αερίου-υγρού βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού (Skoog et al., 2005).

Στην αέρια χρωματογραφία ο διαχωρισμός των συστατικών (αερίων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση) , καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών και ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο). Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα στη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες, που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Όταν μια ουσία Α εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο, εάν είναι δυνατόν μονομιάς, αυτή εξαερώνεται (εάν δεν βρίσκεται ήδη στην αέρια κατάσταση) και παρασυρόμενη από την κινητή φάση εισέρχεται με αυτή στη στήλη. Πιο συγκεκριμένα καθώς το δείγμα περνά μέσω της στήλης τα πτητικότερα συστατικά (τα οποία αλληλεπιδρούν λιγότερο με τη στατική φάση), κινούνται μέσα στη στήλη γρηγορότερα από τα λιγότερα πτητικά συστατικά. Τα συστατικά που διαχωρίζονται, βγαίνουν από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους, φτάνοντας μέσω γραμμής μεταφοράς, στη συσκευή ανίχνευσής τους π.χ. σε ένα φασματόμετρο μάζας, όπου τα μόρια ιοντίζονται και μπορούν να διασπαστούν σε θραύσματα (Wade, 2016). Το φέρον αέριο πρέπει να είναι χημικά αδρανές και μπορεί να είναι ήλιο, άζωτο ή υδρογόνο. Η επιλογή του φέροντος αερίου καθορίζεται από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Το σύστημα παροχής αερίου περιλαμβάνει ρυθμιστές πίεσης, μανόμετρα και ροόμετρα (Skoog et al., 2005).

2.1.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Τα βασικά μέρη ενός αέριου χρωματογράφου (Εικόνα 1.15) είναι τα παρακάτω :

1. Οβίδα ή φιάλη φέροντος αερίου (κινητή φάση).
2. Ρυθμιστής πίεσης – ροόμετρο.
3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος.
4. Θερμοστατούμενος κλίβανος.
5. Στήλη χρωματογραφίας.
6. Ανιχνευτής.
7. Ενισχυτής.
8. Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής-εκτυπωτής.



Εικόνα 1.15. Βασικά μέρη ενός αέριου χρωματογράφου.

2.1.1.1 Οβίδα ή φιάλη φέροντος αερίου (κινητή φάση)

Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση και πρέπει να είναι χημικώς αδρανές έναντι του υλικού κατασκευής του αέριου χρωματογράφου, του πληρωτικού υλικού της στήλης και των προς διαχωρισμό ουσιών. Το συνηθέστερο χρησιμοποιούμενο αέριο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας είναι το ήλιο, παρά το υψηλό κόστος επειδή έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα και μικρή πυκνότητα, που επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής αερίου, με αντίστοιχη μείωση του χρόνου αναλύσεως.

2.1.1.2 Ρυθμιστής πίεσης – ροόμετρο

Το φέρον αέριο στη φιάλη βρίσκεται σε πίεση 100-200 atm. Συνήθως, η πίεση στην είσοδο της στήλης είναι 1-3 atm. Αυτό επιτυγχάνεται με τον ρυθμιστή (μειωτήρα) πίεσης και στη

συνέχεια μέσα από το ροόμετρο μετρίεται με ακρίβεια η ταχύτητα (η ροή) του φέροντος αερίου. Η πολύ ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι απαραίτητη, ιδίως για την ταυτοποίηση των ενώσεων επειδή οι χρόνοι (όγκοι) κατακράτησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα. Χρησιμοποιούνται ροόμετρα με πλωτήρα στην είσοδο της στήλης ή ροόμετρα σαπωνοδιαλύματος στην έξοδό της. Η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου όταν χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες (capillary columns) είναι μερικά mL/min (1-6 mL/min).

2.1.1.3 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το δείγμα εισάγεται με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης, μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, που φράζεται με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό (septum) το οποίο δρα ως βαλβίδα, που επιτρέπει την είσοδο του δείγματος, όχι όμως την έξοδο αυτού και του φέροντος αερίου. Το δείγμα εισάγεται στο θάλαμο εξαέρωσης με μικροσύριγγα. Ο όγκος του δείγματος είναι 0,5-2 mL προκειμένου για αέρια και 1-10 μ L όταν πρόκειται για υγρά. Το μέγεθος του δείγματος που εισάγεται όταν χρησιμοποιούμε τριχοειδείς στήλες είναι 0,1-1 μ L.

2.1.1.4 Θερμοστατούμενος κλίβανος

Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος, η στήλη και ο ανιχνευτής θερμοστατούνται συνήθως στην περιοχή 50-300 °C. Ωστόσο η λειτουργία του φούρνου του χρωματογράφου μπορεί να είναι ισόθερμη ή αυξομειούμενης θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας συχνά είναι δύσκολο και μερικές φορές αδύνατο να επιτευχτεί πλήρης διαχωρισμός και ανίχνευση των συστατικών ενός μείγματος. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κορυφές των συστατικών με χαμηλά σημεία ζέσεως εμφανίζονται η μια κοντά στην άλλη ή και αλληλεπικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό (μικρή διαχωριστικότητα), ενώ οι κορυφές των λιγότερων πτητικών ουσιών (υψηλών σ.ζ) είναι μικρού ύψους, πλατιές και σε ορισμένες περιπτώσεις απέχουν τόσο πολύ μεταξύ τους (υπέρμετρη διαχωριστικότητα), ώστε οι ενώσεις υψηλού σ.ζ να μην ανιχνεύονται. Τα παραπάνω μειονεκτήματα της ισόθερμης λειτουργίας της στήλης αίρονται με αυξομείωση της θερμοκρασίας. Τότε η θερμοκρασία της στήλης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας, με βάση το προκαθορισμένο πρόγραμμα. Στην θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία εμφανίζονται διακριτές κορυφές για ενώσεις των οποίων τα σημεία ζέσεως βρίσκονται σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών και μάλιστα σε πολύ μικρότερο χρόνο απ' ό,τι με την ισόθερμη λειτουργία στήλης. Επιπλέον οι κορυφές είναι οξύτερες και περισσότερες ομοιόμορφες, ώστε τα ύψη τους να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς για ποσοτική ανάλυση.

2.1.1.5 Στήλη

Η στήλη αποτελεί το σπουδαιότερο τμήμα του αερίου χρωματογράφου και σε αυτό γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος. Η στήλη αποτελείται από ένα επιμήκη σωλήνα συνήθως με τη μορφή σπειράματος αρκετών εκατοντάδων μέτρων (10-50 m) και διάμετρο (0,2-1,2 mm) για τις τριχοειδείς στήλες. Η καταλληλότερη στατική φάση για δεδομένο δείγμα είναι εκείνη, η οποία είναι χημικά παρόμοια με αυτό (ιδίας πολικότητας).

2.1.1.6 Ανιχνευτές

Φασματόμετρο μάζας.

2.1.1.7 Ενισχυτής-Καταγραφέας-Παρουσίαση αποτελεσμάτων

Το σήμα που προέρχεται από τον ανιχνευτή είναι ασθενές και πρέπει να ενισχυθεί πριν από την καταγραφή του. Ο μόνος περιορισμός κατά την επιλογή του βαθμού ενισχύσεως είναι ότι η τιμή του λόγου S/N πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 2. Για την λήψη του χρωματογραφήματος απαιτείται καταγραφέας ταχείας αποκρίσεως και με υψηλό βαθμό σταθερότητας των ηλεκτρονικών. Τα σύγχρονα αεριοχρωματογραφικά συστήματα διαθέτουν ηλεκτρονικό υπολογιστή για τη συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία και παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Στο τέλος του αερίου χρωματογραφήματος δίνονται ο χρόνος κατακράτησης, το εμβαδόν και η εκατοστιαία σύσταση των συστατικών του δείγματος (ΚΟΥΠΑΡΗΣ & ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, 2017). Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος της εταιρίας THERMO GC ULTRA συζευγμένος με φασματόμετρο μαζών DSQ II (Εικόνα 1.16).



Εικόνα 1.16. Αέριος χρωματογράφος της εταιρίας THERMO GC ULTRA συζευγμένος με φασματόμετρο μαζών DSQ II.

2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Οι τέσσερις βασικοί τύποι υγρής χρωματογραφίας είναι : η χρωματογραφία κατανομής, η χρωματογραφία προσρόφησης ή χρωματογραφία υγρής-στερεάς φάσης, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού ή χρωματογραφία πηκτής (Skoog

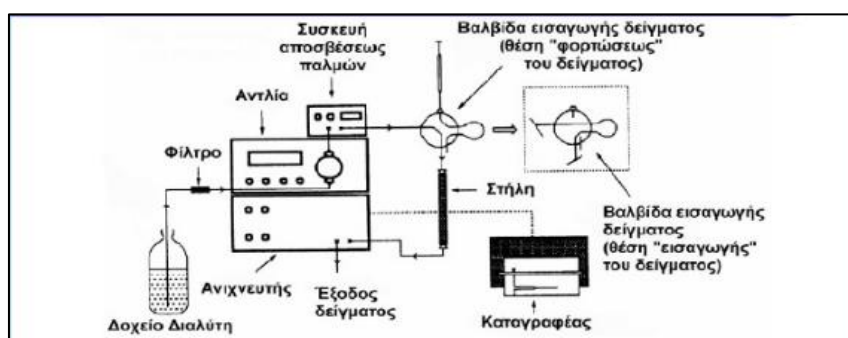
et al.,2005). Η χρωματογραφία προσρόφησης (ή χρωματογραφία υγρού-στερεού) είναι ο κλασικός τύπος της χρωματογραφίας που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Tswett στις αρχές του εικοστού αιώνα. Στην πιο σύγχρονη εποχή καθιερώθηκε ως μια από τις σπουδαιότερες τεχνικές HPLC (Saunders, 1977).

Η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε κλασσική, όταν η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από την στατική φάση πετυχαίνεται λόγω της βαρύτητας και η στατική φάση αποτελείται από σχετικής μεγάλης διαμέτρου σωματίδια και στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) όταν η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης γίνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης και η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντιστάσεως, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Οι μοναδικές στατικές φάσεις, που χρησιμοποιούνται στην HPLC υγρού-στερεού, είναι η πυρίτις (SiO_2) και η αλουμίνα. Η πρώτη προτιμάται λόγω της μεγάλης χωρητικότητας προσρόφησης του δείγματος και της μεγαλύτερης ποικιλίας χρησίμων μορφών της (Skoog et al., 2005). Στην υγρή χρωματογραφία στήλης (ή απλώς υγρή χρωματογραφία, LC), η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό (ΚΟΥΠΑΡΗΣ & ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, 2017).

2.2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ- HPLC

Μια συσκευή HPLC (Εικόνα 1.17) αποτελείται από τα εξής τμήματα:

1. Δοχείο κινητής φάσης-Διαλύτης.
2. Αντλία.
3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος.
4. Στήλη.
5. Ανιχνευτής.
6. Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής- εκτυπωτής.



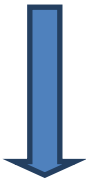
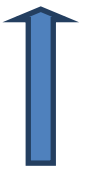
Εικόνα 1.17. Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

2.2.1.1 Δοχείο κινητής φάσης-Διαλύτης

Το δοχείο (ή τα δοχεία) κινητής φάσης (ή φάσεων) είναι συνήθως γυάλινο (γυάλινα) χωρητικότητας τουλάχιστον 500 mL. Στο σωλήνα τροφοδοσίας προσαρμόζεται ειδικό φίλτρο (2μm) που παρεμποδίζει τη μεταφορά σωματιδίων που μπορούν να «μπλοκάρουν» την αντλία. Ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) και να έχει απαερωθεί (degassed).

2.2.1.2 Αντλία

Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής (παροχής) της κινητής φάσης. Η αντλία είναι υψηλής πίεσης (14-6.000 psi) και συνδυάζεται με σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης (βαθμιδωτή έκλυση). Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλυση στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, στην βαθμιδωτή έκλυση η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα με βάση διάφορα προγράμματα. Στο πινάκα Α.3 δίνονται οι περισσότεροι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες στην HPLC με τη σχετική ισχύ έκλουσής τους (εκλουτροπική σειρά, eluotropic series) (Λιοδάκης, 2001).

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ
 Ισχυρός	Εξάνιο	 Ασθενής
	Τολουόλιο	
	Τριχλωρομεθάνιο	
	Διχλωρομεθάνιο	
	Αιθέρας	
	Οξικός αιθυλεστέρας	
	ακετονιτρίλιο	
	Μεθανόλη	
	Νερό	

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.3. Εκλουτροπική σειρά διαλυτών που χρησιμοποιούνται συχνά στην HPLC.

2.2.1.3 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής η χωρητικότητα της οποίας κυμαίνεται από 1-500 μL. Η βαλβίδα στη θέση «πλήρωσης» συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση «εισαγωγής» εισάγει το δείγμα στη στήλη. Η ποιότητα της βαλβίδας κρίνεται καταρχήν από την ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος. Σημαντικό ρολό παίζει η κεφαλή γιατί, από το σχήμα της εξαρτάται η κατανομή ταχυτήτων της κινητής φάσης, μέσα στη

στήλη. Φυσικά σημασία έχει και η ποιότητα των υλικών κατασκευής τα οποία θα πρέπει να είναι από αδρανή ως προς την χρησιμοποιούμενη κινητή φάση.

2.2.1.4 Στήλες

Το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξείδωτος χάλυβας. Χαρακτηριστικό είναι το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης (2-3 mm) για να αντέχει τις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται κατά τη λειτουργία του συστήματος. Το μήκος της στήλης κυμαίνεται από 10-100 cm (Συνήθως κατασκευάζονται στήλες μήκους 25-30 cm). Η αποτελεσματικότητα μιας στήλης κρίνεται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Από πρώτη άποψη είναι φανερό ότι μια μακριά στήλη ή σειρά στηλών θα έχει οπωσδήποτε μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών. Όμως, η διάρκεια του διαχωρισμού θα είναι μεγαλύτερη. Για την ελαχιστοποίηση των λιμναζόντων χώρων στη στήλη, απαιτείται άριστη πλήρωση της, δηλαδή οι πόροι του υλικού στηρίξεως πρέπει να γεμίσουν τελείως με την υγρή στατική φάση. Μια καλά πληρωμένη στήλη της μορφής αυτής μπορεί να έχει μια απόδοση περίπου 400 θεωρητικών πλακών ανά cm με σωματίδια 5-10 μm . Η υψηλή πίεση και οι μεγάλες ταχύτητες ροής, που χρησιμοποιούνται στην HPLC, προκαλούν μερικές φορές μηχανική απομάκρυνση μέρους της υγρής στατικής φάσεως από το υλικό στηρίξεως. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, αναπτύχθηκαν υλικά πληρώσεως (κυρίως μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου) με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις (chemically bonded stationary phases), που αποτελούν και τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη μορφή στατικής φάσεως στην HPLC. Τα σωματίδια αυτά είναι συνήθως διαμέτρου 5 μm με πόρους διαμέτρου 20 nm και διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια επαφής. Η υγρή στατική φάση συνδέεται ομοιοπολικά στην επιφάνεια της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου, όπως δείχνει το παρακάτω παράδειγμα:



Στις συνηθέστερες χρησιμοποιούμενες υγρές στατικές φάσεις, η ομάδα R είναι $(\text{CH}_2)_3\text{NH}$ ή $(\text{CH}_2)_3\text{CN}$, για τις πολικές φάσεις και $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ ή $(\text{CH}_2)_2\text{-C}_6\text{H}_5$ για τις μη πολικές φάσεις. Με αυτές τις χημικά συνδεδεμένες υγρές στατικές φάσεις πετυχαίνεται πολύ μεγάλος βαθμός ομοιομορφίας, με συμμετρικές κορυφές χρωματογραφήματος, χωρίς διαρροή της υγρής φάσεως από τη στήλη και με ποικιλία πολικότητας (ΚΟΥΠΑΡΗΣ & ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, 2017). Το υλικό πλήρωσης της χρωματογραφίας στήλης έχει μεγάλη πολικότητα και αποτελεί τη βάση για

την υγρή χρωματογραφία προσρόφησης. Μείωση της πολικότητας της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου επιτυγχάνεται με τη χημική της σύνδεση με αλκύλια που φέρουν άμινο-, κύανο- ή φαίνυλο-, ομάδες στο άκρο τους. Έτσι προκύπτουν οι χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις (bonded phase), που αποτελούν τη βάση της υγρής χρωματογραφίας κατανομής. Αν η στατική φάση είναι περισσότερο πολική σε σχέση με την κινητή φάση, τότε η HPLC χαρακτηρίζεται ως *κανονικής φάσης* (normal phase). Αν η στατική φάση είναι λιγότερο πολική σε σχέση με την κινητή φάση, τότε η HPLC χαρακτηρίζεται ως *αντίστροφης φάσης* (reverse phase) (Λιοδάκης, 2001).

2.2.1.5 Ανιχνευτές

Φασματοόμετρο μάζας.

2.2.1.6 Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής- εκτυπωτής

Ο καταγραφέας αποτελεί το φθηνότερο και απλούστερο τρόπο παρουσιάσεως του χρωματογραφήματος. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC, αντί καταγραφέα είναι εφοδιασμένα με ηλεκτρονικό υπολογιστή και εκτυπωτή (ΚΟΥΠΙΑΡΗΣ & ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, 2017). Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε μηχανήμα της εταιρίας Agilent Technologies της σειράς 1200 συζευγμένο με HRMS της σειράς 6530 Accurate-Mass (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17. Υγρός χρωματογράφος της εταιρίας Agilent Technologies της σειράς 1200 συζευγμένο με HRMS (Q-TOF) της σειράς 6530 Accurate-Mass.

2.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ταυτοποίηση των συστατικών του μίγματος έγινε με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης (t_{RX}) της άγνωστης ουσίας με αυτόν (t_{RS}) συγκεκριμένης ουσίας. Η περιοχή που περικλείεται από την κορυφή του χρωματογραφήματος και τη βασική γραμμή αντιστοιχεί στο εμβαδό της κορυφής το οποίο σχετίζεται με την ποσότητα του αντιστοίχου συστατικού μέσα στο δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο εξωτερικού πρότυπου (external standard). Πρότυπα διαλύματα της υπό μελέτης ουσίας παρασκευάζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και αναλύονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με το άγνωστο δείγμα. Έπειτα κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς όπου η συγκέντρωση της ουσίας είναι συνάρτηση του εμβαδού της κορυφής της. Από την καμπύλη αυτή και μετρώντας το εμβαδό της κορυφής της άγνωστης ουσίας, βρίσκεται η ποσότητά της στο δείγμα (ΚΟΥΠΑΡΗΣ & ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, 2017).

2.4 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

2.4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΖΩΝ

Η φασματομετρία μαζών άρχισαν να χρησιμοποιούνται στην Οργανική Χημεία σαν γενική φασματοσκοπική μέθοδος, για τη διευκρίνιση της συντάξεως, κυρίως μετά το 1960. Οι προηγούμενες μελέτες περιορίζονται σε αέρια προϊόντα, κυρίως υδρογονάνθρακες, με κύριο στόχο τον ακριβή προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους. Η αρχή της φασματομετρίας μαζών εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από το Wien (1898), ο οποίος πέτυχε απόκλιση θετικών ακτίνων μέσα σε μαγνητικό και ηλεκτρικό πεδίο. Αργότερα ο Thomson (1912) με ανάλογη τεχνική απέδειξε την ύπαρξη δυο ισοτόπων του Ne. Ο πρώτος όμως φασματογράφος μαζών⁵ για μετρήσεις ακριβείας κατασκευάστηκε από τους Dempster και Aston το 1919 (ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ, 1985).

Η φασματομετρία μαζών σε αντίθεση με τις κανονικές φασματοσκοπικές μεθόδους, δεν οφείλεται σε διεγέρσεις κατά την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αλλά συνίσταται στη δημιουργία ιοντικών θραυσμάτων των ενώσεων. Τα θραύσματα αυτά μελετούνται με βάση το λόγο m/z όπου m η μάζα του ιόντος και z το φορτίο του⁶. Το φάσμα μαζών μιας ένωσης παριστάνεται συνήθως ως γράφημα, με τη μάζα (τιμές m/z) στον άξονα των x και την ένταση (αριθμός ιόντων δεδομένης τιμής m/z που φθάνουν στον ανιχνευτή) στον άξονα των y . Στην

⁵ Η διαφορά μεταξύ φασματογράφου και φασματομέτρου μαζών είναι ότι στα δευτέρα η καταγραφή των διαφόρων ιόντων γίνεται ηλεκτρονικά με διαδοχική σάρωση του φάσματος ενώ στους φασματογράφους η καταγραφή των διαφόρων ιόντων γίνεται πάνω σε φωτογραφική πλάκα.

⁶ Ο λόγος μάζα προς φορτίο ενός ιόντος λαμβάνεται με διαίρεση της ατομικής ή μοριακής μάζας ενός ιόντος m με τον καθαρό αριθμό των θεμελιωδών φορτίων z που φέρει και είναι καθαρός αριθμός.

υψηλότερη κορυφή που αποκαλείται βασική κορυφή αποδίδεται αυθαίρετα ένταση 100% (θραυσματοποιημένη κατιοντική ρίζα). Παράλληλα σε ένα φάσμα μάζας βλέπουμε και την μητρική κορυφή ή το μοριακό ιόν που αντιστοιχεί στη μη θραυσματοποιημένη κατιοντική ρίζα της εκάστοτε ένωσης (McMURRY, 2010).

2.4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (HRMS)

Ο προσδιορισμός του μοριακού τύπου είναι δυνατός, με τη βοήθεια του φασματομέτρου μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS), στο οποίο χρησιμοποιούνται πρόσθετα επίπεδα ηλεκτροστατικής ή μαγνητικής εστίασης για το σχηματισμό ακριβούς δέσμης και την ανίχνευση σωματιδιακών μαζών με ακρίβεια 1 στα 20,000 μέρη. Η μάζα με πολλά σημαντικά ψηφία που προσδιορίζεται από το HRMS ονομάζεται ακριβής μάζα. Πιο συγκεκριμένα το φασματομέτρο HRMS περιλαμβάνει τη χρήση ενός ανιχνευτή που μπορεί να μετρήσει τις τιμές m/z με τέσσερα δεκαδικά ψηφία. Αυτή η τεχνική επιτρέπει τον προσδιορισμό του μοριακού τύπου μιας άγνωστης ένωσης (Klein, 2015). Αν και στην πραγματικότητα δεν είναι ακριβής είναι πολύ ακριβέστερη από τους συνηθισμένους ακέραιους μαζικούς αριθμούς. Με σύγκριση της ακριβούς μάζας με τις μάζες που υπολογίζονται από το μοριακό τύπο, καθίσταται δυνατή η εύρεση του σωστού τύπου. Αν και στα φάσματα μάζας οι μάζες των σωματιδίων στρογγυλοποιούνται στον πλησιέστερο αριθμό, οι μάζες στην πραγματικότητα δεν είναι ακέραιες. Η μάζα του πυρήνα ^{12}C ορίζεται ακριβώς ως 12 ατομικές μονάδες μάζας (amu) , ενώ οι μάζες όλων των άλλων πυρήνων βασίζονται στο πρότυπο αυτό. Για παράδειγμα η μάζα του πρωτονίου ισούται με 1, όχι όμως με απολυτή ακρίβεια : η μάζα του ισούται με 1.007825 amu. Στον πίνακα A.4 περιέχονται οι ατομικές μάζες των περισσότερων από τα συνηθισμένα ισότοπα που συναντούμε στις οργανικές ενώσεις.

ΙΣΟΤΟΠΟ	ΑΤΟΜΙΚΗ ΜΑΖΑ (amu)
^{12}C	12.000000
^1H	1.007825
^{16}O	15.994914
^{14}N	14.003050

Πίνακας A.4. Ατομικές μάζες και ισότοπα που συναντούμε στις οργανικές ενώσεις.

2.4.3 ΠΗΓΕΣ ΙΟΝΤΩΝ

Το αρχικό στάδιο σε μια μέτρηση με τη φασματομετρία μαζών είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αερίου αναλυτή, διαδικασία καθοριστική για τους στόχους της μέτρησης και της

ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Πράγματι, η μορφή του φάσματος μαζών μιας ουσίας εξαρτάται κατά πολύ από την τεχνική παράγωγης ιόντων. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται πολλές από τις πηγές ιόντων που χρησιμοποιούνται στην μοριακή φασματομετρία μαζών (ΠΙΝΑΚΑΣ Α.5). Οι πηγές αυτές χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες : *πηγές αέριας φάσης* (gas phase sources) και *πηγές εκρόφησης* (desorption sources). Στις πρώτες (οι τρεις πρώτες πηγές του πίνακα) το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται. Στις τελευταίες το δείγμα σε στερεά ή υγρή κατάσταση, μετατρέπεται απευθείας σε αεριώδη ιόντα. Πλεονεκτήματα των πηγών εκρόφησης είναι ότι μπορούν να εφαρμοστούν σε μη πτητικά ή θερμικός ασταθή δείγματα. Σήμερα τα εμπορικός διαθέσιμα φασματόμετρα μαζών διαθέτουν εξαρτήματα, που επιτρέπουν την εναλλαγή διαφόρων πηγών. Οι πηγές ιόντων διακρίνονται επίσης σε *μαλακές* και *σκληρές*. Οι σκληρές πηγές μεταδίδουν στα μόρια του αναλυτή αρκετή ενέργεια ώστε να παραμείνουν σε έντονα διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση. Στη συνέχεια η αποδιέγερση περιλαμβάνει επιπλέον σπάσιμο δεσμών και παράγωγή ιοντικών θραυσμάτων με λόγους m/z μικρότερους από του μοριακού ιόντος. Οι μαλακές πηγές προκαλούν περιορισμένο κατακερματισμό. Κατά συνέπεια, το λαμβανόμενο φάσμα μαζών των μαλακών πηγών ιοντισμού, συχνά αποτελείται από την κορυφή του μοριακού ιόντος και λίγες μόνο επιπλέον κορυφές. Οι πολλές κορυφές σε ένα φάσμα σκληρής πηγής παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τα είδη των δραστικών ομάδων και επομένως για τη δομή των αναλυτών. Τα φάσματα μαλακών πηγών είναι χρήσιμα επειδή παρέχουν ακριβείς πληροφορίες ως προς το μοριακό βάρος των μορίων του αναλύτη (SKOOG et al., 2007).

2.4.3.1 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ (electrospray ionization, ESI)

Σε αυτή την τεχνική η ένωση διαλύεται σε ένα ιοντικό διαλύτη (π.χ MeOH) και μετά ψεκάζεται μέσω μιας βελόνας υψηλής τάσης σε ένα θάλαμο κενού. Τα μικροσκοπικά σταγονίδια του διαλύματος φορτίζονται από τη βελόνα στη συνέχεια εξατμίζονται, οπότε δημιουργούνται μοριακά ιόντα σε αέρια φάση που φέρουν συνήθως πολλαπλά φορτία. Τα ιόντα που δημιουργούνται διέρχονται κατόπιν από το φασματόμετρο μάζας και καταγράφεται η τιμή m/z για το κάθε ιόν. Αυτή η τεχνική έχει αποδεδειχθεί ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματική για τη λήψη φασμάτων μάζας ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους με βιολογική σημασία, ιδιαίτερα επειδή τα μοριακά ιόντα που σχηματίζονται κατά κανόνα δεν υφίσταται θραυσματοποίηση. Για την τεχνική της ESI ο Δρ John Fenn (Πανεπιστήμιο Yale) μοιράστηκε το βραβείο Nobel Χημείας το 2002 (Klein, 2015).

	Όνομα	Παράγοντας ιοντισμού
Αέριας φάσης	Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electro impact, EI)	Ηλεκτρόνια μεγάλης ταχύτητας
	Χημικού ιοντισμού (chemical ionization, CI)	Αντιδραστήρια- ιόντα σε αέρια κατάσταση
	Ιοντισμός πεδίου (field ionization, FI)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
Εκρόφησης	Εκρόφηση πεδίου (field desorption, FD)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI)	Ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο
	Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)	Ακτίνα λέιζερ
	Εκρόφηση πλάσματος (plasma desorption,PD)	Θραύσματα σχάσης ²⁵² Cf
	Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (fast atom bombardment, FAB)	Δέσμη ατόμων μεγάλης ενεργείας
	Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (secondary ion mass spectroscopy, SIMS)	Δέσμη ιόντων μεγάλης ενέργειας
	Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (thermospray ionization, TS)	Υψηλή θερμοκρασία

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.5. Πηγές ιόντων που χρησιμοποιούνται στην μοριακή φασματομετρία μαζών.

2.4.3.2 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΠΡΟΣΚΡΟΥΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ (Electro Impact, EI)

Η πιο συνηθισμένη τεχνική ιοντισμού περιλαμβάνει τον βομβαρδισμό της ένωσης με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Αυτά μεταφέρουν ένα αξιοσημείωτο ποσό ενέργειας, συνήθως 1600 kcal/mol ή 70 ηλεκτρονιοβόλτ (eV). Όταν ένα ηλεκτρόνιο υψηλής ενέργειας συγκρουστεί με το μόριο, ένα από τα ηλεκτρόνια του μορίου αναγκάζεται να απομακρυνθεί. Αυτή η τεχνική παράγει ένα ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας που είναι συγχρόνως ρίζα και κατιόν. Είναι μια ρίζα επειδή έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και είναι ένα κατιόν επειδή φέρει θετικό φορτίο λόγω της απώλειας του ενός ηλεκτρονίου. Η μάζα του ηλεκτρονίου που απομακρύνεται είναι αμελητέας σε

σύγκριση με τη μάζα του μορίου, έτσι η μάζα της κατιοντικής ρίζας είναι ουσιαστικά ισοδύναμη με τη μάζα του αρχικού μορίου. Αυτή η κατιοντική ρίζα, που συμβολίζεται με $(M)^{+*}$, καλείται μοριακό ιόν ή μητρικό ιόν.

Το μοριακό ιόν είναι συχνά πολύ ασταθές και θραυσματοποιείται παράγοντας δυο διακριτά θραύσματα. Συνήθως, το ένα θραύσμα φέρει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, ενώ το άλλο φέρει το φορτίο. Με αυτό τον τρόπο, η διαδικασία του ιοντισμού παράγει πολλά διαφορετικά κατιόντα : το μοριακό ιόν, καθώς και πολλά διαφορετικά θραύσματα καρβοκατιόντων. Όλα αυτά τα ιόντα επιταχύνονται και στη συνέχεια οδηγούνται μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο, όπου εκτρέπονται ακολουθώντας καμπύλες διαδρομές. Τα αφόρτιστα θραύσματα που είναι ρίζες δεν εκτρέπονται από το μαγνητικό πεδίο και επομένως δεν ανιχνεύονται από το φασματομέτρο μάζας. Μόνο το μοριακό ιόν και τα κατιονικά θραύσματα εκτρέπονται. Τα μικρότερα ιόντα εκτρέπονται περισσότερο από τα μεγαλύτερα, ενώ τα ιόντα με πολλαπλά φορτία εκτρέπονται περισσότερο από τα ιόντα με φορτίο +1. Με αυτό τον τρόπο τα κατιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Το φορτίο (z) των περισσότερων ιόντων είναι +1 και επομένως το m/z μέτρα ουσιαστικά τη μάζα (m) κάθε κατιόντος (Klein, 2015).

2.4.4 ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΣΤΟ HRMS

Οι αναλυτές που χρησιμοποιούνται στο HRMS είναι: Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR)⁷, orbitrap⁸, Q, TOF.

2.4.4.1 Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole, Q)⁹

Καρδιά του τετραπολικού φασματομέτρου είναι οι τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδοι (αρχικά υπερβολές), οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με αυτή τη συσκευή, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10 V. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φθάνουν στο

⁷ Αναλυτής για τον καθορισμό m/z που βασίζεται στην κυκλοτροπία συχνότητα (cyclotron frequency) των ιόντων σε ένα τροποποιημένο μαγνητικό πεδίο (Xian et al., 2012).

⁸ Αναλυτής μάζας παγίδων ιόντων που αποτελείται από ένα εξωτερικό και ένα εσωτερικό ηλεκτρόδιο το οποίο παγιδεύει ιόντα σε τροχιακή κίνηση γύρω από τον άξονα (Hu et al., 2005).

⁹ Το συγκριμένο πείραμα διεξήχθη σε μηχανήμα της Agilent Accurate-Mass 6530 στο οποίο βρισκόταν και ο τετραπολικός αναλυτής μαζών για αυτό κρίνεται χρήσιμο να αναφερθεί η ιδιότητα του.

μεταλλάκτη μόνο τα ιόντα των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών λόγου m/z (Skoog et al., 2007).

2.4.4.2 Αναλυτές μαζών τύπου «χρόνου πτήσης» (time-of-flight, TOF)

Στα όργανα τύπου «χρόνου πτήσης» (time-of-flight, TOF) τα θετικά ιόντα παράγονται περιοδικά μετά από βομβαρδισμό του δείγματος με σύντομους παλμούς ηλεκτρονίων, δευτερογενών ιόντων ή φωτονίων ακτινοβολίας λέιζερ. Οι παλμοί έχουν τυπικές συχνότητες 10 έως 50 kHz και διάρκεια 0,25 ms. Τα ιόντα που παράγονται με τον τρόπο αυτόν επιταχύνονται σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο 10^3 έως 10^4 V ίδιας συχνότητας με τον παλμό, που προκαλεί τον ιοντισμό. Αυτός όμως εφαρμόζεται με μια μεικτή χρονική υστέρηση. Τα επιταχυνόμενα σωματίδια διέρχονται μέσω ενός σωλήνα πορείας (drift tube), ο οποίος είναι απαλλαγμένος από πεδία και έχει μήκος περίπου ένα μέτρο. Επειδή όλα τα ιόντα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια, τη στιγμή που εισέρχονται στον σωλήνα οι ταχύτητες τους στον σωλήνα πρέπει να είναι αντιστρόφως ανάλογες με τις μάζες τους. Τα ελαφρότερα σωματίδια φθάνουν στον ανιχνευτή νωρίτερα σε σχέση με τα βαρύτερα. Οι τυπικοί χρόνοι «πτήσης» των σωματιδίων βρίσκονται στην περιοχή των μικροδευτερολέπτων, για πτήση σε σωλήνα 1 μέτρου (Delgass & Cooks, 1987, Skoog et al., 2007).

2.4.5 ANIXNEYTES TOF

Όταν σε ένα φασματόμετρο μάζας χρησιμοποιείται ως αναλυτής TOF τότε έχουμε και τους αντίστοιχους ανιχνευτές όπως είναι : Πλάκα μικροδιοδίων (microchannel plate), ανιχνευτής μηχανικής νανομεμβράνης (mechanical nanomembrane detector)¹⁰ και κρυοανιχνευτής (cryodetector)¹¹. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι ο πρώτος ο οποίος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση σωματιδίων όπως είναι τα ηλεκτρόνια, ιόντα και νετρόνια. Είναι στενά συνδεδεμένος με έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων καθώς τόσο ο ανιχνευτής όσο και ο πολλαπλασιαστής ενισχύουν σωματίδια ή φωτόνια με τον πολλαπλασιασμό των ηλεκτρονίων μέσω δευτερογενούς εκπομπής (Tremsin et al., 2011, Wiza, 1979).

¹⁰ Ένα πακέτο ιόντων προκαλεί μηχανικές δονήσεις σε νανομεμβράνη νιτρίδιου του πυριτίου. Ο ανιχνευτής αυτός χρησιμοποιείται όταν έχουμε ως μέθοδο ιονισμού τύπου MALDI με δείγμα μεγέθους 5729 – 150000 daltons (Da) (Park & Blick, 2016).

¹¹ Λειτουργεί σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία συνήθως λίγους βαθμούς πάνω από το απολυτό μηδέν. Αυτοί οι αισθητήρες αλληλεπιδρούν με φωτόνια και παρέχουν ένα σήμα που μπορεί να σχετίζεται με τον τύπο του σωματιδίου αλλά και τη φύση της αλληλεπίδρασης (Frank et al., 1999).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τα φυτά της οικογενείας *Brassicaceae*, επειδή περιέχουν μια ομάδα ενώσεων που είναι γνωστοί ως γλυκοζινολίτες. Οι ενώσεις αυτές είναι σάκχαρα γλυκοζιτικά ενωμένα με θείο. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν έχουν κάποια βιολογική δράση. Έχουν όμως, τα προϊόντα υδρόλυσής τους, οι λεγόμενες ισοθειοκυανικές ενώσεις. Αρκετές μελέτες, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, αποδεικνύουν ότι οι ισοθειοκυανικές ενώσεις στα φυτά της οικογενείας *Brassicaceae* μπορούν να εξουδετερώσουν φλεγμονές συμμετέχοντας σε συγκεκριμένα βιοχημικά μονοπάτια και συγχρόνως παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική και αντιμυκητιασική δράση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι τόσο ο ποιοτικός όσο και ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων υδρόλυσης των γλυκοζινολιτών σε φυτά της οικογενείας *Brassicaceae*, όπως είναι το μπρόκολο, το λάχανο σαβόι και τα λαχανάκια Βρυξελλών, με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας των συζευγμένων με φασματομετρία μαζών.

Ειδικότερα, να γίνει ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση σε δείγματα διαφόρων ποικιλιών και διαφορετικών περιοχών φυτικού υλικού από μπρόκολο (ανθοκεφαλές, φύλλα, βλαστοί, ρίζες), λαχανάκια Βρυξελλών και λάχανο σαβόι, των ενώσεων:

- αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC)
- ερουκίνη (ER)
- νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN)
- φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC)
- ιμπερβερίνη (3MIC)
- σουλφοραφάνη (SFN)
- ινδολο-3-καρβινόλη (I3C)
- ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN)

Επίσης, να μελετηθεί η αντιμυκητιασική δράση, *in vitro*, της ισοθειοκυανικής ένωσης ιμπερβερίνης έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Verticillium dahliae*.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ Α

Α.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε τρεις διαφορετικές ποικιλίες μπρόκολου (*Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*). Η ποικιλία *Monrello* ήταν βιολογικής καλλιέργειας, παραχωρήθηκε από το εργαστήριο λαχανοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) και μελετήθηκαν η ανθοκεφαλή, τα φύλλα και η ρίζα. Η ποικιλία *Marathon* προέρχονταν από τοπικό παράγωγο της περιοχής της Βόνιτσας του Ν. Αιτωλ/νίας και μελετήθηκε η ανθοκεφαλή, τα φύλλα και η ρίζα. Η ποικιλία μπρόκολου *Parthenon* προέρχονταν από τοπικό κατάστημα του Ν. Αττικής και από την περιοχή Άθυρα του νομού Πέλλας και μελετήθηκε η ανθοκεφαλή. Επίσης, ρίζες μπρόκολου ποικιλίας *Marathon* και *Parthenon* συλλέχτηκαν από τοπικούς παραγωγούς του Ν. Εύβοιας (Βασιλικά), Αργολίδας (Άργους) και Ν. Αιτωλ/νίας (Αγρίνιο).

Οι μικρές κεφαλές από τα φρέσκα λαχανάκια Βρυξελλών τα οποία εξεταστήκαν προέρχονταν από ελληνικές καλλιέργειες του Ν. Θες/νίκης και του Ν. Αιτωλ/νίας, καθώς επίσης από την Ολλανδία. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν κατεψυγμένα λαχανάκια Βρυξελλών Βέλγικης προέλευσης. Το λάχανο Σαβόι ήταν από το Ν. Πέλλας και αγοράστηκε από τοπικό κατάστημα του Ν. Αττικής. Η συγκομιδή των λαχανικών έγινε από τον Οκτώβριο του 2017 μέχρι τον Φεβρουάριο του 2018. Οι ποικιλίες των λαχανικών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα Α.1:

ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ-ΣΥΝΤΕΤΑΓΜΕΝΕΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ
Μπρόκολο (άνθος, φύλλα, ρίζα)	Ν. Αττικής	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (37°59'2"N 23°42'19"E)	<i>Brassica oleracea</i> L.var. <i>italica</i> Plenck cv. <i>Monrello</i>
Μπρόκολο (άνθος, φύλλα, ρίζα)	Ν. Αιτωλ/νίας	Βόνιτσα (38.92°B 20.89° A)	<i>Brassica oleracea</i> L.var. <i>italica</i> Plenck cv. <i>Marathon</i>
Μπρόκολο (άνθος)	Ν. Πέλλας	Άθυρα (40°49'44.7"N 22°35' 37.8" E)	<i>Brassica oleracea</i> L.var. <i>italica</i> Plenck cv. <i>Parthenon</i>
Ρίζα	Ν. Ευβοίας	Βασιλικά (38° 58' 02.6"N 23°21'23.6" E)	<i>Brassica oleracea</i> L.var. <i>italica</i> Plenck cv. <i>Marathon</i>
Ρίζα	Ν. Αιτωλ/νίας	Αγρίνιο	<i>Brassica oleracea</i>

		(38°37'47.4" 21°24'41.6" E)	L.var. <i>italica</i> Plenck cv. <i>Parthenon</i>
Ρίζα	N. Αργολίδας	Άργος (37° 39'38.7"N22° 42'19.2"E)	<i>Brassica oleracea</i> L.var. <i>italica</i> Plenck cv. <i>Marathon</i>
Λαχ. Βρυξελλών	Ολλανδία	Pays-Bas (52°15'24.9" N4°46'16.3")	<i>Brassica oleracea</i> L. convar. oleracea var. <i>gemmifera</i> , cv. <i>Trafalgar</i>
Λαχ. Βρυξελλών	N. Θεσ/νίκης	Θεσ/νίκη (40°39'13.7"N22° 57'40.6"E)	<i>Brassica oleracea</i> L. convar. oleracea var. <i>gemmifera</i> , cv. <i>Abacus</i>
Λαχ. Βρυξελλών	N. Αιτωλ/νίας	Βόνιτσα (38.92°B 20.89°A)	<i>Brassica oleracea</i> L. convar. oleracea var. <i>gemmifera</i> , cv. <i>Fraklin</i>
Λαχ. Βρυξελλών (Κατεψυγμένα)	Βέλγιο	Ardoorie (50°57'29.3"N 3° 11'20.3"E)	-
Λάχανο Σαβόι	N. Πέλλας	Άθυρα (40°49'44.7"N 22°35' 37.8" E)	<i>Brassica oleracea</i> L. convar. var. <i>sabauda</i> . cv <i>Famosa</i>

Πίνακας Α.1. Ποικιλία και προέλευση φυτικού υλικού της μελέτης.

A.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΤΩΝ

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Kokotou et al., 2017:

Λυοφυλιωμένο μπρόκολο (ανθοκεφαλή, βλαστός, φύλλα, ρίζα), ή λαχανάκια Βρυξελλών (μικρές κεφαλές) ή λάχανο σαβόι, πολτοποιήθηκε σε ιγδίο και ζυγίστηκε ποσότητα ενός γραμμάριου. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως όπου προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα McIlvaine buffer ¹² [0,2 M Na₂HPO₄ (16,47 mL), 0,1M citric acid (3,53 mL)] (pH=7) και ο πολτός θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 45 °C για 3 ώρες. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 40 mL διχλωρομεθανίου και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολούθησε διήθηση από χαρτί Whatman τύπου 1, με τη βοήθεια χωνιού Buchner. Η εκχύλιση των στερεών συστατικών με διχλωρομεθάνιο επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές (2X40 mL). Τα διηθήματα συγκεντρώθηκαν σε εκχυλιστική χοάνη και απομακρύνθηκε η υδατική στοιβάδα. Η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 250 mL και ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄. Μετά τη διήθηση, το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε υπό κενό σε θερμοκρασία 35 °C μέχρι ξηρού και διατηρήθηκε στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή του. Πριν την ανάλυση σε κάθε συμπυκνωμένο

¹² McIlvaine TC (1921). "A buffer solution for colorimetric comparison" (<http://www.jbc.org/content/49/1/183.full.pdf>) (pdf). J. Biol. Chem. 49 (1) : 183-186.

εκχύλισμα προστέθηκε 1 mL κατάλληλου διαλύτη είτε CH₂Cl₂ (για ανάλυση στο GC-MS) είτε MeOH (για ανάλυση στο LC-HRMS).

A.3 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

A.3.1 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν THERMO GC ULTRA συνδυσασμένος με φασματόμετρο μαζών DSQ II.

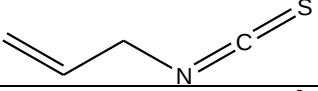
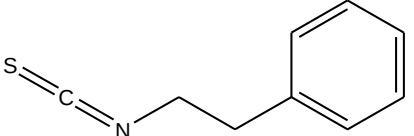
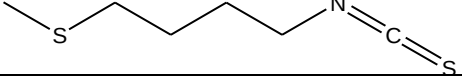
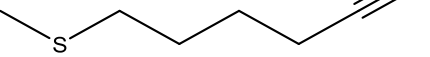
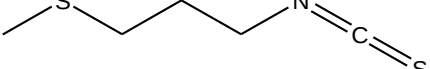
A.3.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ GC-MS

Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιον (He), ενώ τα πειραματικά δεδομένα διεξήχθησαν με ιοντισμό με ηλεκτρόνια (EI, Electron Ionization). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η TR-5ms (30X0,25 mm, film thickness-0,25). Οι ουσίες οι οποίες μελετήθηκαν ήταν: AIC, PITC, 3MIC, 5MITC, ER. Ο συνολικός χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν 36 min.

A.3.3 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΟ GC-MS - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιήσαμε ήταν από το Ciska et al.,2015 σύμφωνα με το οποίο: η αρχική θερμοκρασία του προγράμματος ήταν 35 °C για 5 min, μετά αυξήθηκε στο 210 °C με ρυθμό 8 °C /min και διατηρήθηκε για 10 min. Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής δείγματος ήταν 210 °C και στη γραμμή μεταφοράς 240 °C. Η μάζα αναζητήθηκε σε εύρος 35-550 m/z. Η θερμοκρασία πηγής ιόντων ήταν 230 °C και η ηλεκτρονική ενέργεια κρούσης (electronic impact energy) ήταν 70 eV. Τα μοριακά ιόντα και οι βασικές κορυφές των ενώσεων που αναλύθηκαν στον αέριο χρωματογράφο απεικονίζονται στον πίνακα A.2.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων αλλυλο-ισοθεικυανικό (AIC), φαιναιθυλο-ισοθεικυανικό (PITC), ερουκίνη (ER), νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN) και ιμπερβερίνη (3MIC) στην αέρια χρωματογραφία, βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης με τη χρήση προτύπων ενώσεων, αλλά και τη σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με την τεχνική EI με τα φάσματα των προτύπων ενώσεων, αλλά και με τη χρήση βιβλιοθηκών (Adams 07, Nist 98, Wiley 275).

Ενώσεις	Χημικός τύπος	Μοριακό Ίον (m/z)	Βασική κορυφή (m/z)
AIC ¹³		99,02	99,02
PITC ¹³		163,04	115,07
ER ¹⁴		161,03	91,06
5MITN ¹⁵		129,06	61,06
3MIC ¹⁶		147,02	101,05

Πίνακας Α.2. Χαρακτηριστικά μοριακά ιόντα και βασικές κορυφές στον EI ιοντισμό.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, παρασκευάστηκαν πρότυπα διάλυμα AIC (0.1-3 mg/L), ER (0.1-12 mg/L), PITC (0.1-12 mg/L), 3MIC (0.1-5 mg/L) και 5MITN (10-120 mg/L) σε διαλύτη CH₂Cl₂ και κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς στο GC-MS. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) στις καμπύλες αναφοράς υπολογίσθηκαν με βάση τις εξισώσεις: LOD= 3.3*Sa/b και LOQ= 10*Sa/b (όπου Sa είναι η τυπική απόκλιση και b είναι η κλίση).

A.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

A.4.1 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Για τη μελέτη με την υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα LC Agilent Technologies της σειράς 1200 συζευγμένο με HRMS της σειράς 6530 Accurate-Mass. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Qualitative Analysis B.07.00. Έγινε προσδιορισμός της σουλφοραφάνης (SFN), της ινδολο-3-καρβινόλης (I3C) και του ινδολο-3-ακετονιτρίλιου (I3CN) στον θετικό ιοντισμό με την τεχνική ESI και βασίστηκε στη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης και των φασμάτων μαζών τους με τις αντίστοιχες πρότυπες ενώσεις. Χρησιμοποιήθηκε η

¹³ Οι ισοθειοκυανικές ενώσεις PITC και AIC αγοράστηκαν από την εταιρία Acros organics.

¹⁴ Η σύνθεση της ισοθειοκυανικής ένωσης ER έγινε σύμφωνα με τους D'Souza et al., 2003.

¹⁵ Η σύνθεση του νιτρίλιου 5MITN έγινε σύμφωνα με τους Kjaer et al., 1955.

¹⁶ Η ισοθειοκυανική ένωση 3MIC αγοράστηκε από την εταιρία Alfa Aesar.

ακριβής μάζα των ιόντων $[M+H]^+$ για τη σουλφοραφάνη και το ινδολο-ακετονιτρίλιο και το $[M+Na]^+$ για την ινδολο-3-καρβινόλη. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω της κατασκευής καμπύλης αναφοράς.

A.4.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ LC-HRMS

Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε το άζωτο, ενώ τα πειραματικά δεδομένα διεξήχθησαν στον θετικό ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (positive ESI). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίστροφης φάσης, Zorbax Extend-C18 column (2,1x 50 mm, 1,8-Micron 600 Bar). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε $H_2O/MeOH$ (95/5, v/v) με ροή 0,4 mL/min για την I3C με συνολικό χρόνο χρωματογραφικής ανάλυσης τα 26,5 min, ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η MeOH. Για τη χρωματογραφική ανάλυση της SFN και I3CN προστέθηκε στην κινητή φάση του $H_2O/MeOH$ (95/5, v/v) 0,1 % μυρμηκικό οξύ (formic acid) και ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφήματος ήταν 37 min. Η μάζα αναζητήθηκε σε εύρος 50-1500 m/z. Οι μάζες αναφοράς (Reference Masses) ήταν: Purine (121.0509) και HP-0921 (922.0098). Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι. Θερμοκρασία πηγής: 300 °C, Θερμοκρασία αέριου ξήρανσης (N_2): 12 L/min, Πίεση νεφελοποιητή: 45 psig, Δυναμικό τριχοειδούς: 4000 V, Θραυσματοποιητής: 170 V.

A.4.3 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΟ GC-MS - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

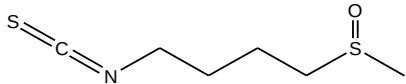
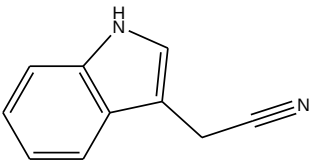
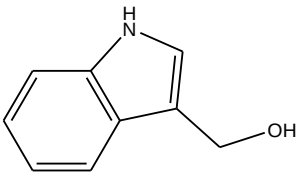
Στον πίνακα A.3 και A.4 φαίνονται τα προγράμματα ανάλυσης για την ινδολο-3-καρβινόλη (I3C), σουλφοραφάνη (SFN) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) αντίστοιχα. Παρασκευαστήκαν από κάθε ένωση πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000 mg/L σε MeOH και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Από αυτά παρασκευάστηκαν με αραίωση σε MeOH τα πρότυπα διαλύματα εργασίας. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν πρότυπα διάλυμα I3C (0.5-10 mg/L), SFN και I3CN (1-30 mg/L) για την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς. Τα χαρακτηριστικά ιόντα, το σφάλμα μάζας και η ένταση της κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό απεικονίζονται στο πίνακα A.5.

Χρόνος (min)	H ₂ O (%)	MeOH (%)	Ροή (m L/min)	Μέγιστο όριο πίεσης (bar)
0	95	5	0,4	600
1	95	5		
8,5	5	95		
12,5	5	95		
14,5	95	5		
26,5	95	5		

Πίνακας A.3. Πρόγραμμα ανάλυσης στο LC-HRMS για I3C.

Χρόνος (min)	H ₂ O (%)	MeOH (%)	Ροή (m L/min)	Μέγιστο όριο πίεσης (bar)
0	95	5	0,4	600
1	95	5		
8,5	5	95		
9,5	5	95		
11,5	95	5		
37,00	95	5		

Πίνακας Α.4. Πρόγραμμα ανάλυσης στο LC-HRMS για SFN και I3CN.

Ενώσεις	Χημικός τύπος	Θεωρητική μάζα (m/z) [M+H] ⁺	Παρατηρούμενη μάζα (m/z) [M+H] ⁺	Σφάλμα μάζας (ppm)	Ένταση κορυφής [M+H] ⁺	Κύρια θραύσματα (m/z)
SFN ¹⁷		178,0355	178,0357	1,1	1x10 ²	114,0372
I3CN ¹⁸		157,0760	157,0761	0,6	1x10 ²	130,0652
I3C ¹⁹		170,0576	170,0577	0,6	1x10 ²	130,0652

Πίνακας Α.5. Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον θετικό ESI ιοντισμό.

¹⁷ Η σύνθεση της ισοθειοκυανικής ένωσης SFN έγινε σύμφωνα με τους D'Souza et al., 2003.

¹⁸ Η σύνθεση του νιτριλίου I3CN έγινε σύμφωνα με τους Yamada et al., 1988.

¹⁹ Η σύνθεση της I3C έγινε σύμφωνα με τους Dashwood et al., 1989.

ΜΕΡΟΣ Β

Β.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ IN VITRO ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *V.DAHLIAE* ΚΑΙ *B.CINEREA*

Β.1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μικροοργανισμοί : 1) *Verticillium dahliae*, 2) *Botrytis cinerea* που παραχωρήθηκαν από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α. Η μελέτη έγινε σε αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία Petri.

Β.1.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ PDA (Potato Dextroze Agar)

Παρασκευάστηκε θρεπτικό διάλυμα που περιείχε εκχύλισμα πατάτας (200 g/L), δεξτρόζη (20 g/L), άγαρ (20 g/L) που συμπληρώθηκε μέχρι 1 L με απεσταγμένο νερό. Αποστειρώθηκε στους 120 °C σε υγρό κλίβανο, υπό πίεση 1 atm για 20 min.

Β.1.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Παρασκευάστηκε διάλυμα της 3MIC συγκέντρωσης 10000 mg/L. Για αυτό το λόγο, ζυγιστήκαν 30,9 mg πρότυπης ένωσης και διαλύθηκαν σε 3,09 mL DMSO. Από αυτό το διάλυμα μέσω διαδοχικών αραιώσεων παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 1000 mg/L και 100 mg/L. Από αυτά παρασκευάστηκαν τρεις συγκεντρώσεις $C_1 = 100$ mg/L, $C_2 = 10$ mg/L και $C_3 = 1$ mg/L ως εξής :

Για το C_1 : 200 μ L από το διάλυμα 10000 mg/L αραιώθηκαν με 20 mL PDA.

Για το C_2 : 200 μ L από το διάλυμα 1000 mg/L αραιώθηκαν με 20 mL PDA.

Για το C_3 : 200 μ L από το διάλυμα 100 mg/L αραιώθηκαν με 20 mL PDA.

Μελετήθηκε η αναστολή ανάπτυξης των μυκήτων από την ισοθειοκυανική ένωση ιμπερβερίνη (3MIC) σε τρεις συγκεντρώσεις $C_1 = 100$ mg/L, $C_2 = 10$ mg/L και $C_3 = 1$ mg/L και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DMSO. Έγιναν 4 επαναλήψεις για την επέμβαση στο *V.dahliae* και 5 επαναλήψεις για την επέμβαση στο *B.cinerea*.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

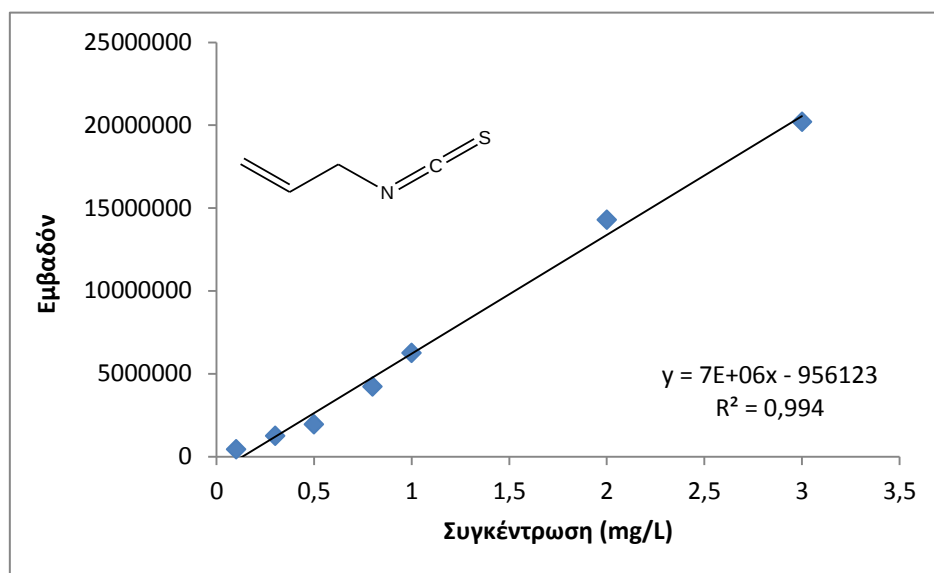
Γ.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Γ.1.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Οι ενώσεις που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία ήταν-τέσσερις ισοθειοκυανικές ενώσεις, το αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC), το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), η ερουκίνη (ER), η ιμπερβερίνη (3MIC) καθώς επίσης το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN).

Γ.1.1.1 ΑΛΛΥΛΟ-ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟ (AIC)

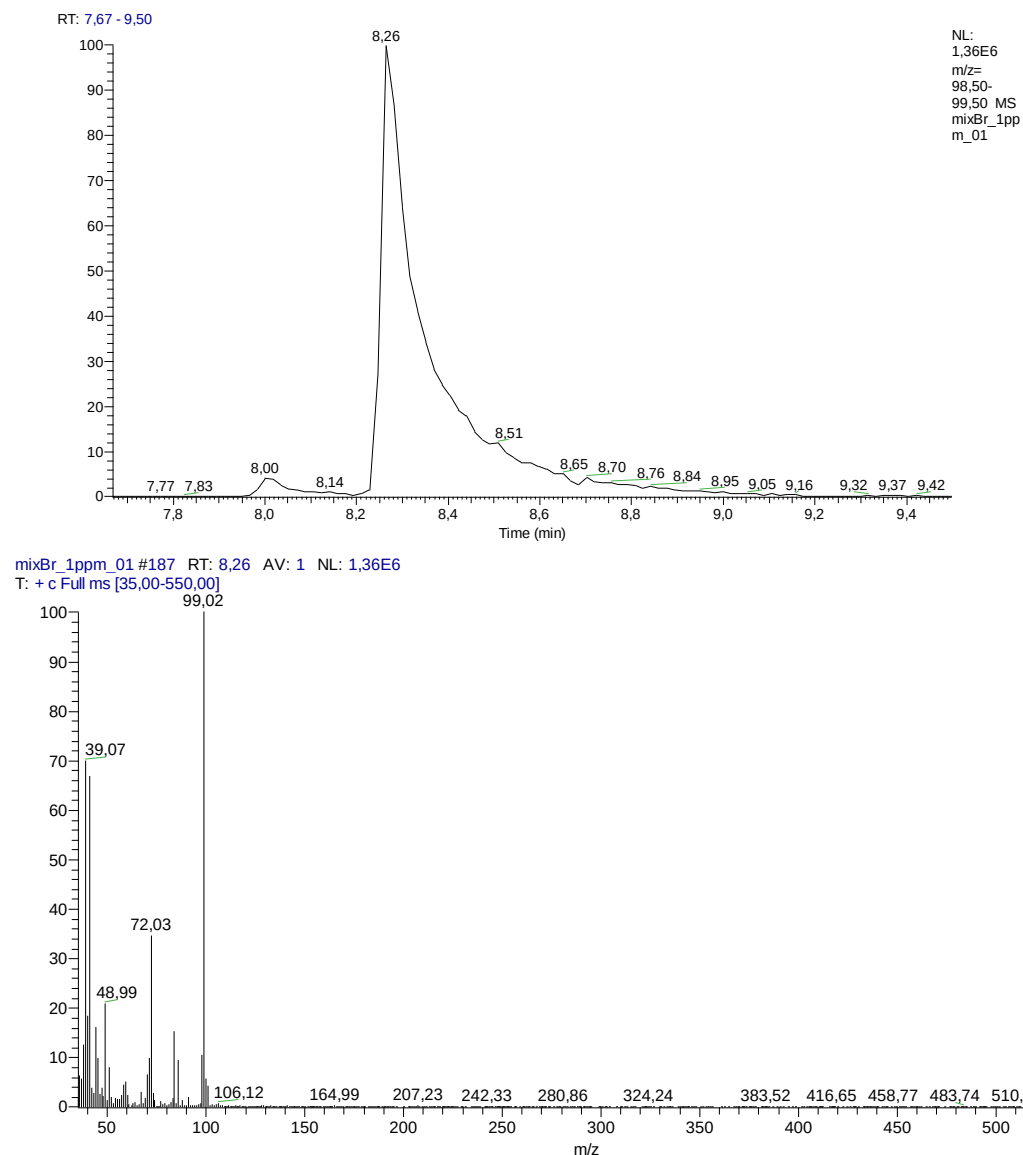
Στο σχήμα Α.1 δίνεται η καμπύλη αναφοράς που αφορά το αλλυλο-ισοθειοκυανικό και κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1, 2, 3 mg/L.



Σχήμα Α.1. Καμπύλη αναφοράς για την ισοθειοκυανική ένωση AIC.

Η καμπύλη αυτή εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2 = 0,994$. Επίσης, υπολογίστηκαν το LOD = 0,47 mg/L και το LOQ = 1,41 mg/L.

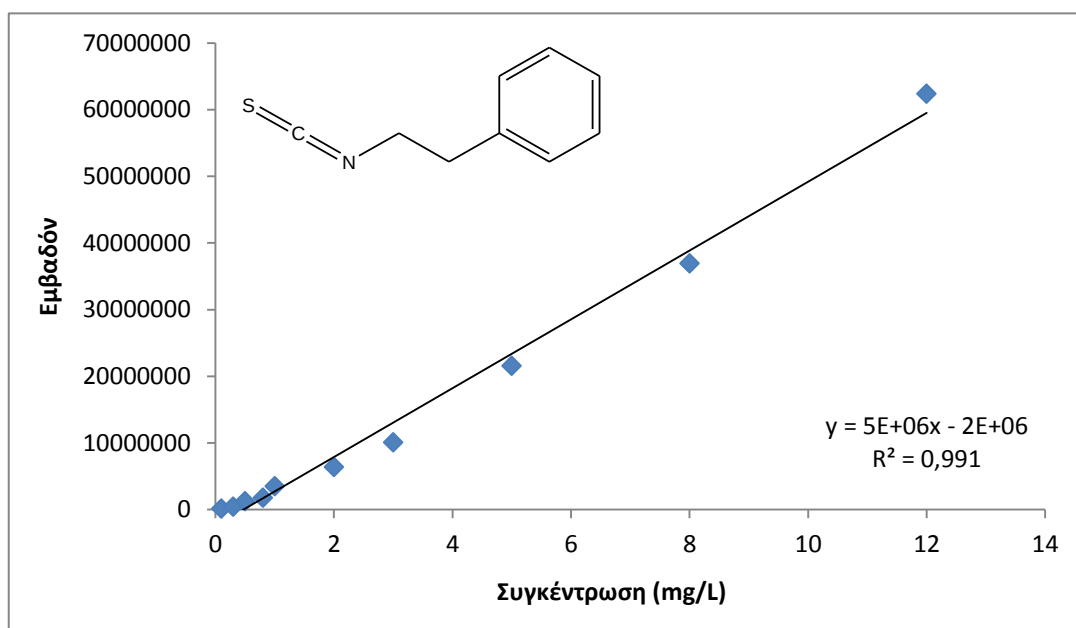
Από το χρωματογράφημα που δίνεται στο σχήμα Α.2 παρατηρούμε ότι η πρότυπη ισοθειοκυανική ένωση AIC έχει ως χρόνο κατακράτησης (*retention time*) τα 8,26 min. Στο φάσμα μάζας της ένωσης, η κορυφή του μοριακού ιόντος M^+ με $m/z = 99$ είναι και η βασική κορυφή, η κορυφή με τη μεγαλύτερη αφθονία. Το θραύσμα με $m/z = 72$ αντιστοιχεί στο ιόν $[M-28]^+$.



ΣΧΗΜΑ Α.2. Εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram) και φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης AIC (1 mg/L).

Γ.1.1.2 ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΟ-ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟ (PITC)

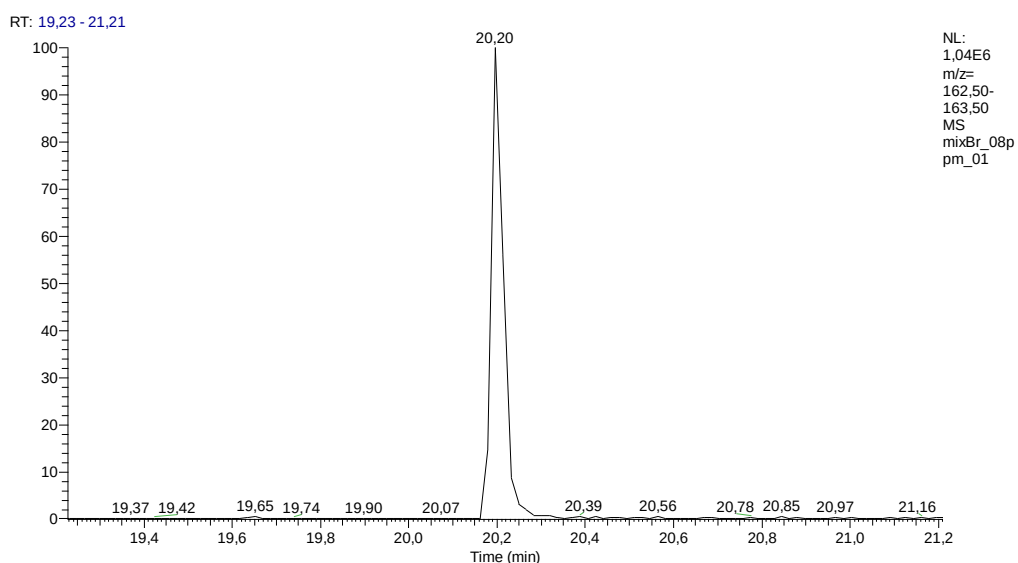
Στο σχήμα Β.1 δίνεται η καμπύλη αναφοράς που αφορά το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό και κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων συγκεντρώσεων 0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1, 2, 3, 5, 8, 12 mg/L.



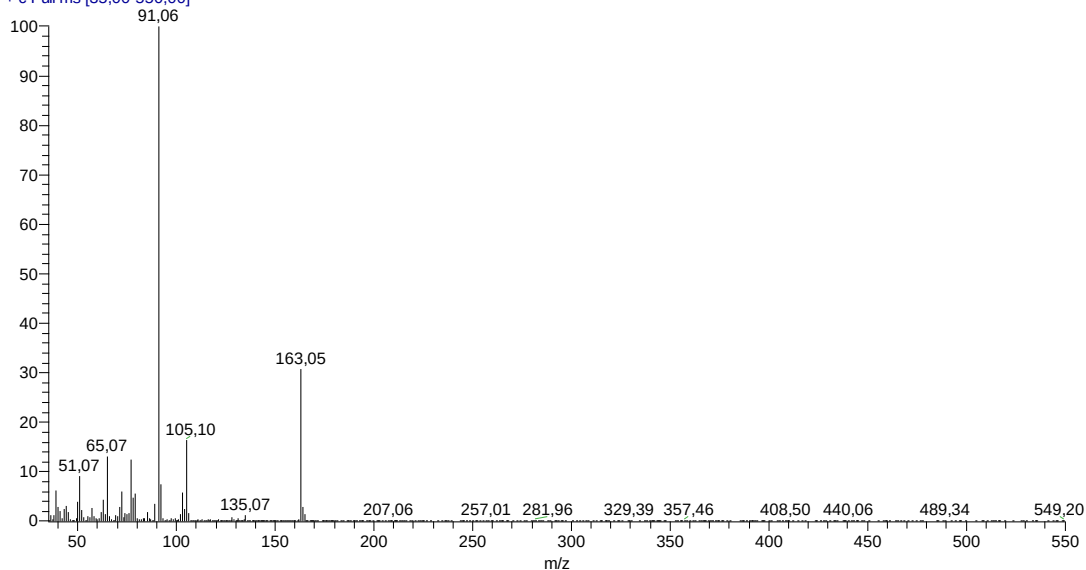
Σχήμα Β.1.Καμπύλη αναφοράς της ισοθειοκυανικής ένωσης PITC.

Η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2 = 0,991$. Υπολογίστηκαν $LOD = 0,18$ mg/L και $LOQ = 0,53$ mg/L.

Στο σχήμα Β.2 δίνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης PITC που εμφανίζει χρόνο κατακράτησης (*retention time*) τα 20,20 min. Στο φάσμα μάζας της ένωσης, η κορυφή με $m/z = 163$ αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της και η κορυφή με $m/z = 91$ (χαρακτηριστικό των ενώσεων με δακτύλιο βενζολίου) αντιστοιχεί στο ιόν $C_6H_5CH_2^+$, ενώ το ιόν με $m/z = 105$ αντιστοιχεί στο ιόν $C_6H_5CH_2CH_2^+$.



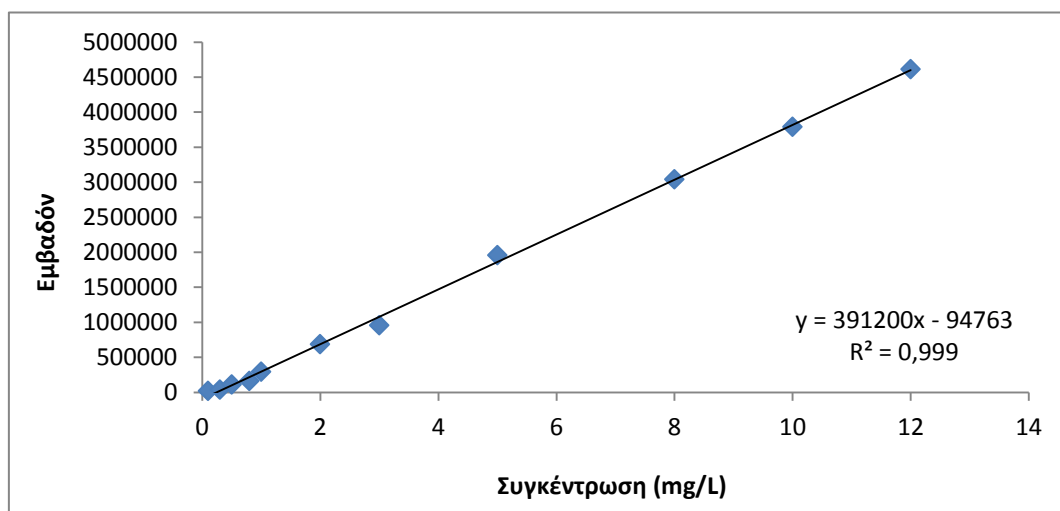
mixBr_08ppm_01 #867 RT: 20,20 AV: 1 NL: 3,39E6
T: + c Full ms [35,00-550,00]



ΣΧΗΜΑ Β.2. Εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram) και φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης PITC (8 mg/L).

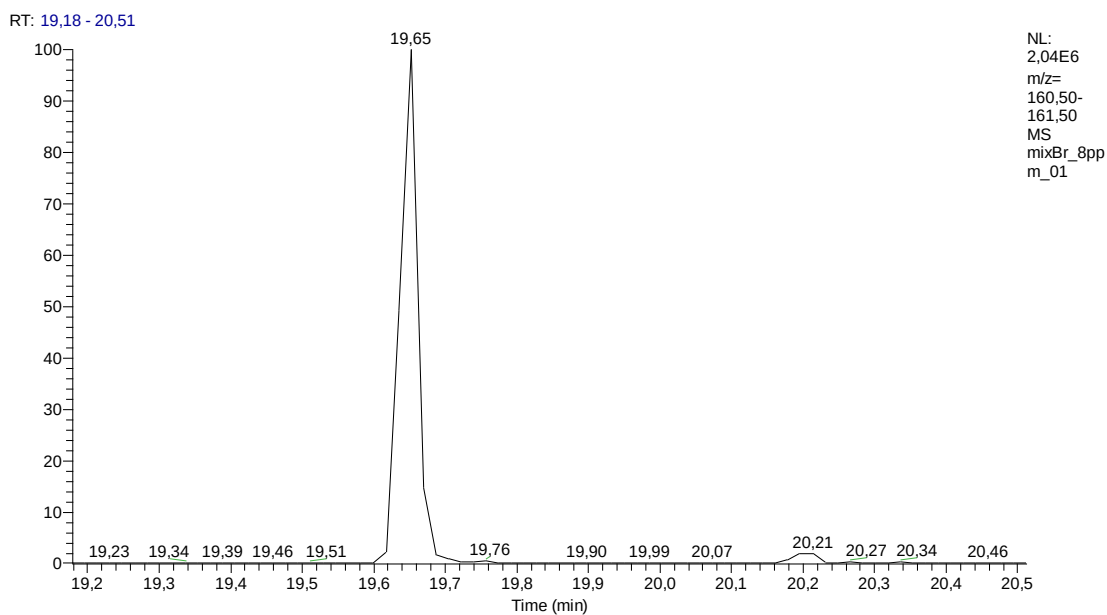
Γ.1.1.3 ΕΡΟΥΚΙΝΗ (ER)

Στο σχήμα Γ.1 δίνεται η καμπύλη αναφοράς που αφορά την ισοθειοκυανική ένωση, ερουκίνη και κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12 mg/L.

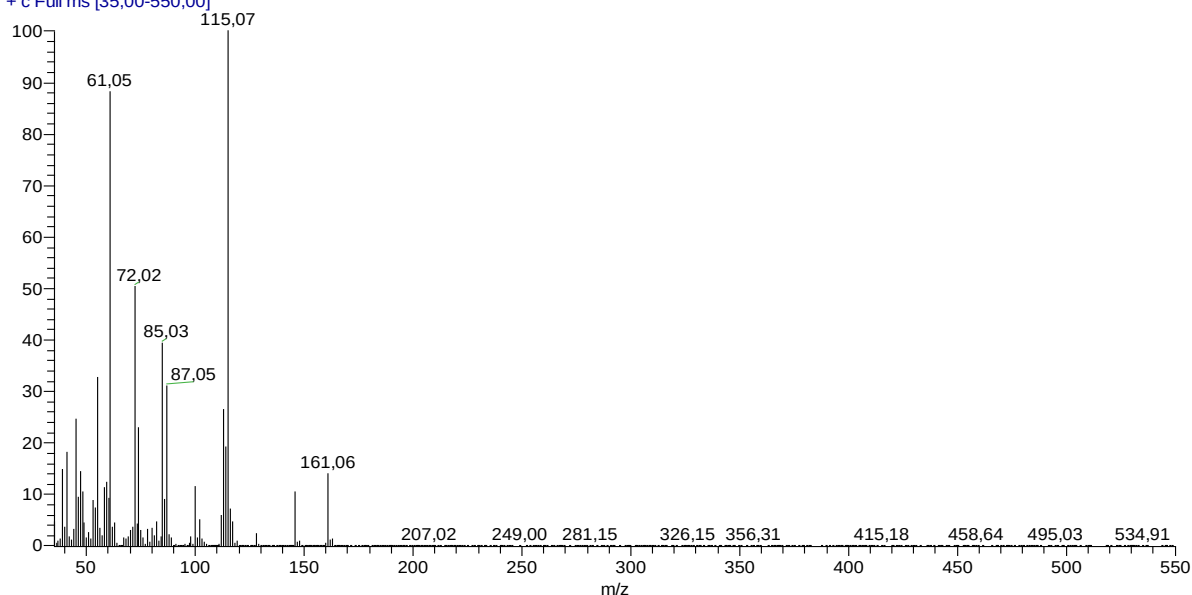


Σχήμα Γ.1. Καμπύλη -αναφοράς της ισοθειοκυανικής ένωσης ER.

Από το σχήμα Γ.1 παρατηρούμε ότι η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2 = 0,999$. Υπολογίστηκαν $LOD = 0,07$ mg/L και $LOQ = 0,20$ mg/L.



mixBr_8ppm_01 #836 RT: 19,65 AV: 1 NL: 1,45E7
T: + c Full ms [35,00-550,00]

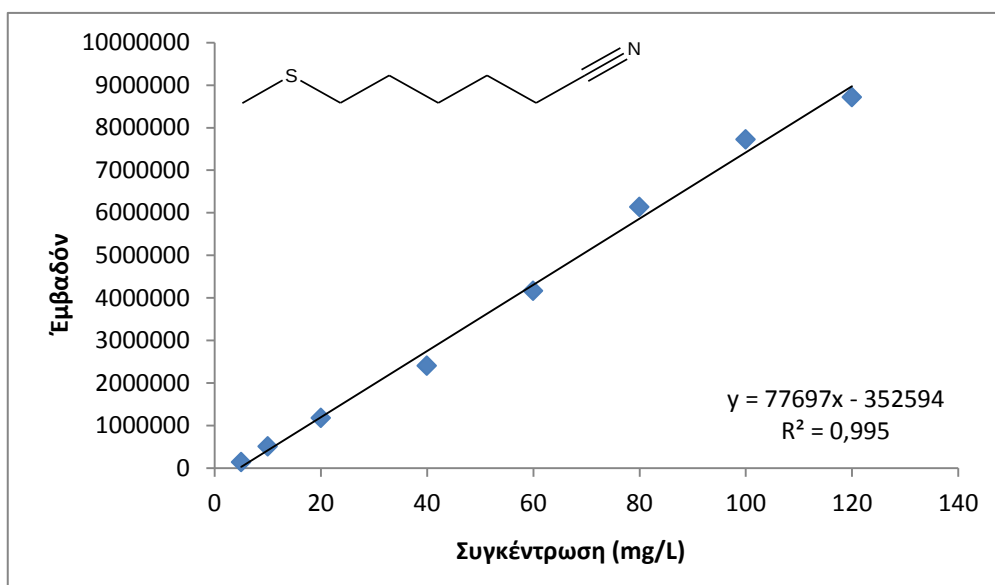


ΣΧΗΜΑ Γ.2. Εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram) και φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης ER (8 mg/L).

Στο σχήμα Γ.2 δίνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης ερουκίνης, που έχει ως χρόνο κατακράτησης (*retention time*) τα 19,65 min. Στο φάσμα μάζας της ένωσης η κορυφή με $m/z = 161$ αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν και η κορυφή $m/z = 115$ που αποτελεί τη βασική κορυφή αντιστοιχεί στο ιόν $[M-47]^+$.

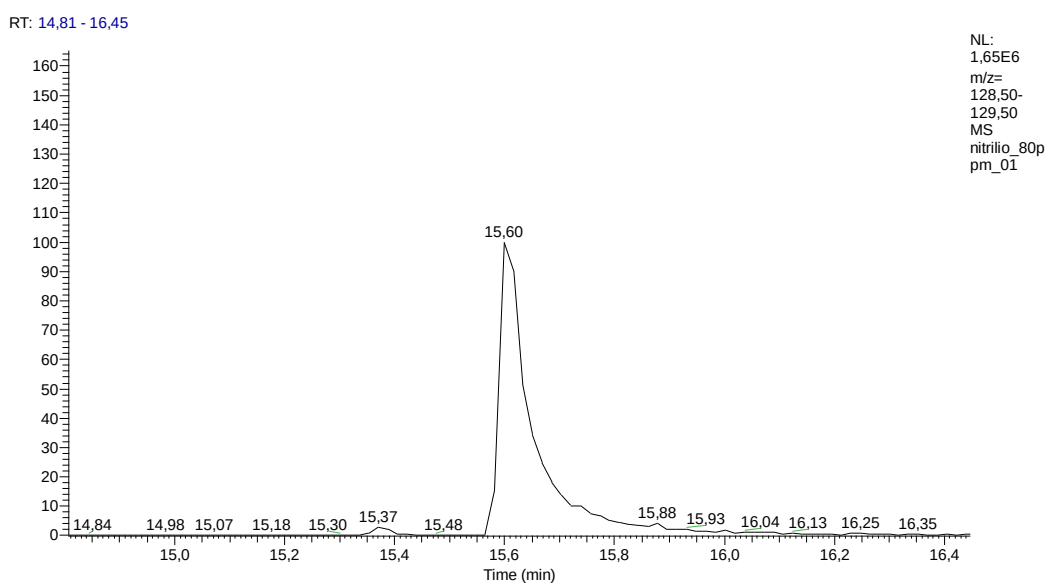
Γ.1.1.4 ΝΙΤΡΙΛΙΟ ΕΡΟΥΚΙΝΗΣ (5MITN)

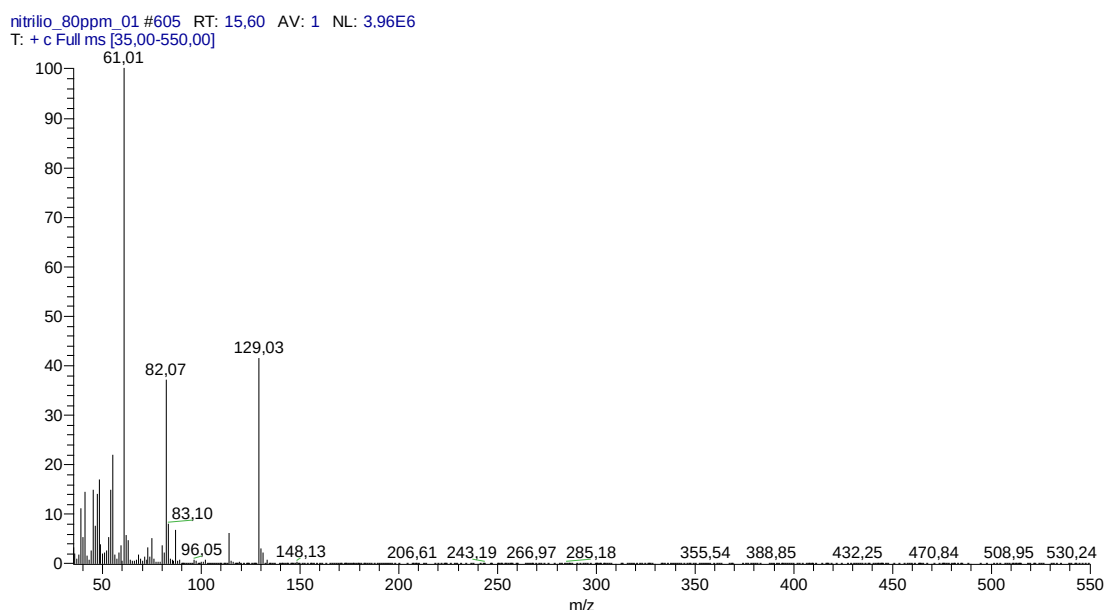
Στο σχήμα Δ.1 δίνεται η καμπύλη αναφοράς που αφορά το νιτρίλιο της ερουκίνης και κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mg/L.



Σχήμα Δ.1. Καμπύλη αναφοράς του νιτρίλιου 5MITN.

Από το σχήμα Δ.1 παρατηρούμε ότι η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2 = 0,995$. Υπολογίστηκαν LOD = 2,29 mg/L και LOQ = 6,93 mg/L.





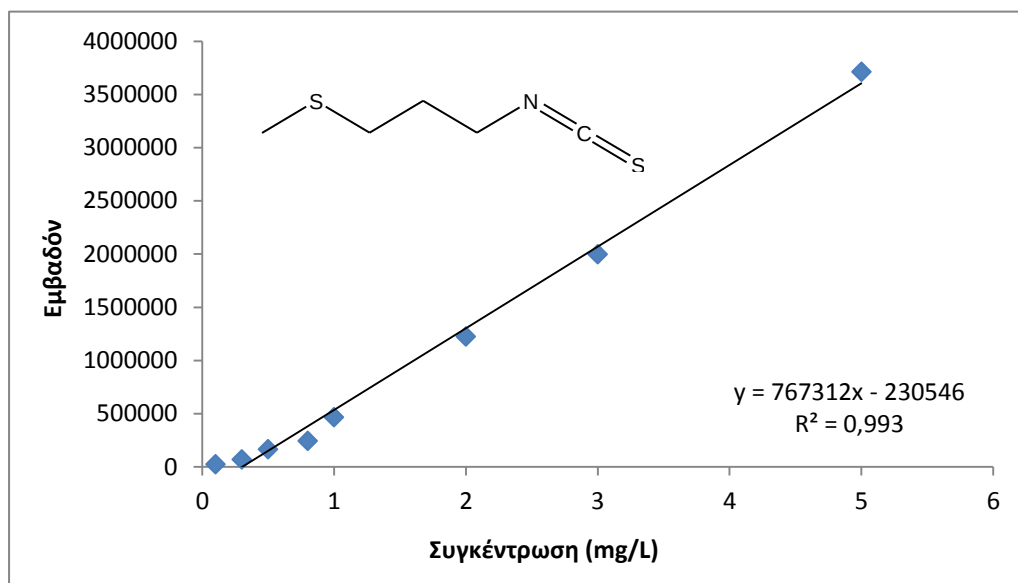
ΣΧΗΜΑ Δ.2. Εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram) και φάσμα μάζας του νιτριλίου 5MITN (80 mg/L).

Στο σχήμα Δ.2 δίνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας του νιτριλίου της ερουκίνης, 5MITN που έχει χρόνο κατακράτησης (*retention time*) τα 15,60 min. Στο φάσμα μάζας της ένωσης η κορυφή με $m/z = 129$ αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν και η κορυφή $m/z = 61$ αποτελεί τη βασική κορυφή και αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν $[M-69]^+$.

Γ.1.1.5 ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗ (3MIC)

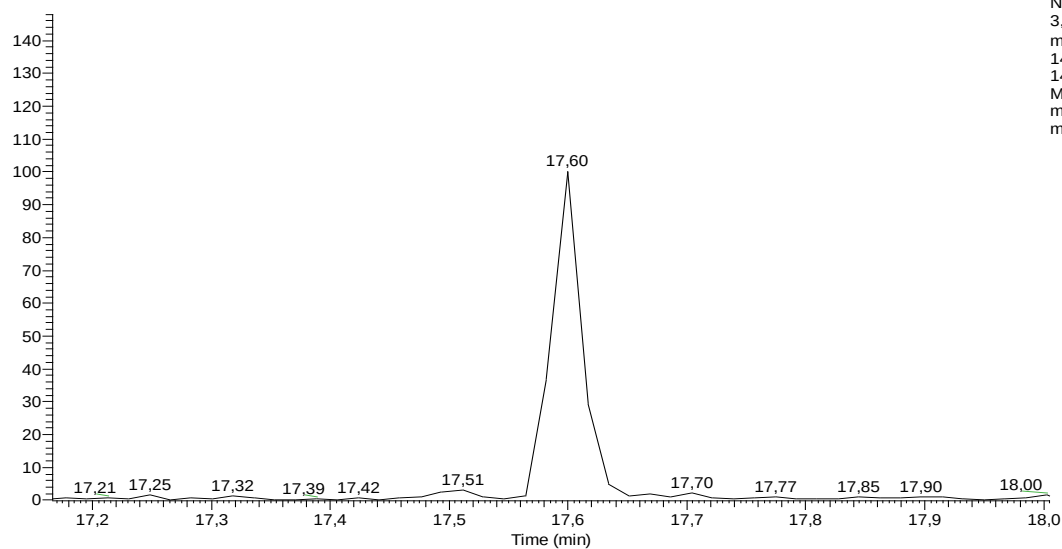
Στο σχήμα Ε.1 δίνεται η καμπύλη αναφοράς που αφορά την ισοθειοκυανική ένωση ιμπερβερίνη και κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1, 2, 3, 5 mg/L. Η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2 = 0,993$. Υπολογίστηκαν $LOD = 0,09$ mg/L και $LOQ = 0,27$ mg/L.

Στο σχήμα Ε.2 δίνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης, 3MIC που έχει χρόνο κατακράτησης (*retention time*) τα 17,60 min. Στο φάσμα μάζας της ένωσης η κορυφή με $m/z = 147$ αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν και η κορυφή με $m/z = 101$ που αποτελεί τη βασική κορυφή αντιστοιχεί στο ιόν $[M-47]^+$.



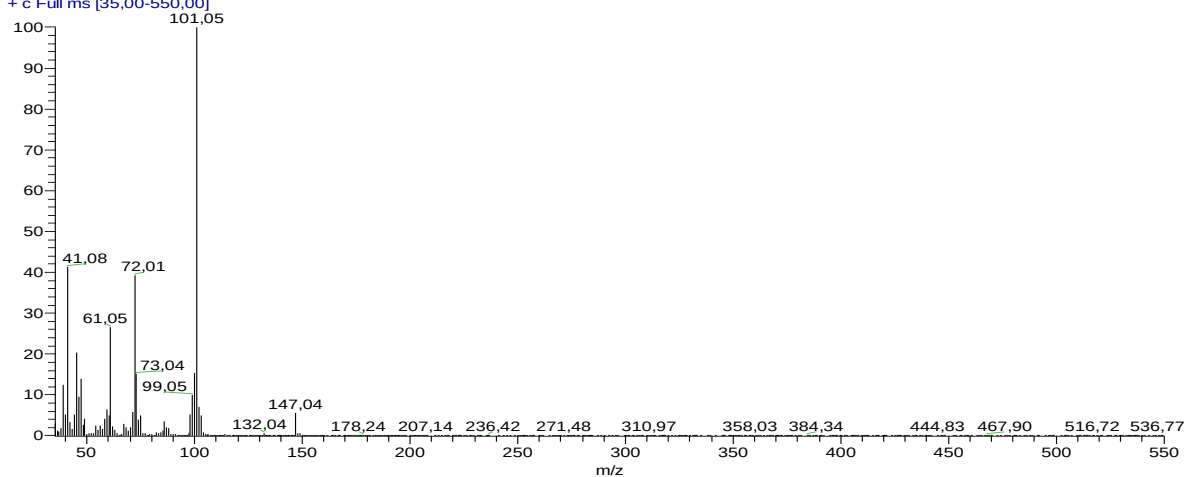
Σχήμα Ε.1. Καμπύλη βαθμονόμησης της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC.

RT: 17,17 - 18,01



NL:
3,40E5
m/z=
146,50-
147,50
MS
mixBr_1pp
m_01

mixBr_1ppm_01 #719 RT: 17,60 AV: 1 NL: 6,07E6
T: + c Full ms [35,00-550,00]



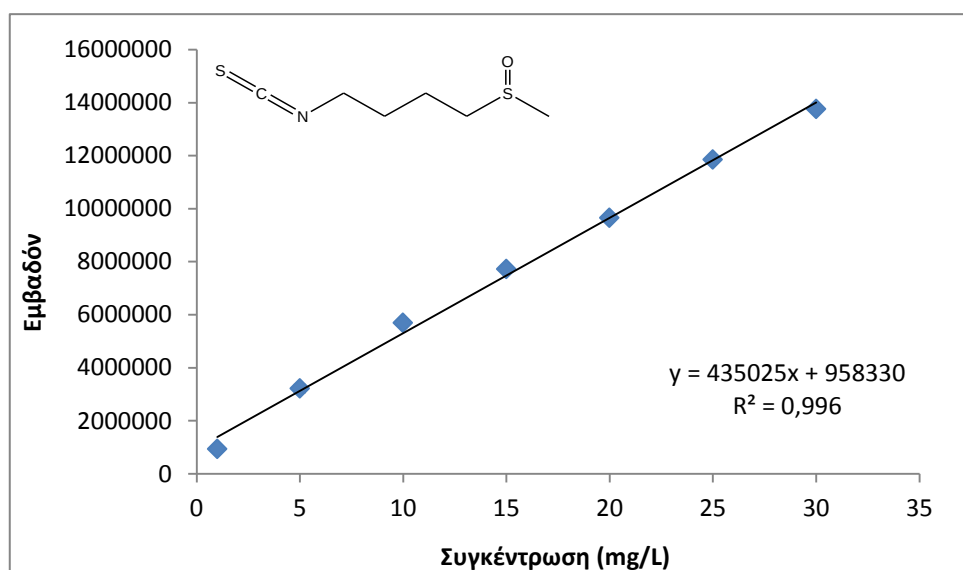
ΣΧΗΜΑ Ε.2. Εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram) και φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC (1 mg/L).

Γ.1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Ενώσεις οι οποίες αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία ήταν : η σουλφοραφάνη (SFN), η ινδόλο-3-καρβινόλη (I3C) και το ινδόλο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN).

Γ.1.2.1 ΣΟΥΛΦΟΡΑΦΑΝΗ (SFN)

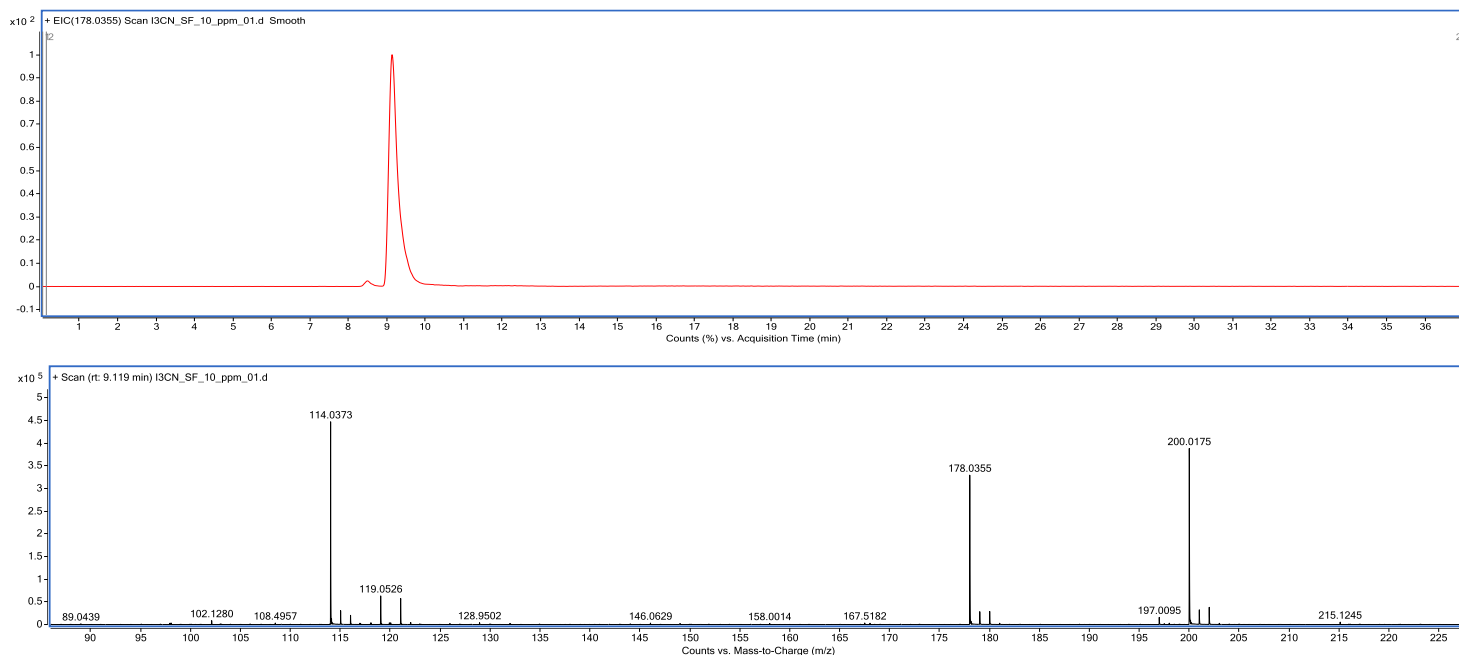
Στο σχήμα Z.1 δίνεται η καμπύλη αναφοράς που αφορά την ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη και κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L.



Σχήμα Z.1. Καμπύλη βαθμονόμησης της ισοθειοκυανικής ένωσης SFN.

Η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2 = 0,996$. Υπολογίστηκαν $LOD = 4,35$ mg/L και $LOQ = 13,19$ mg/L.

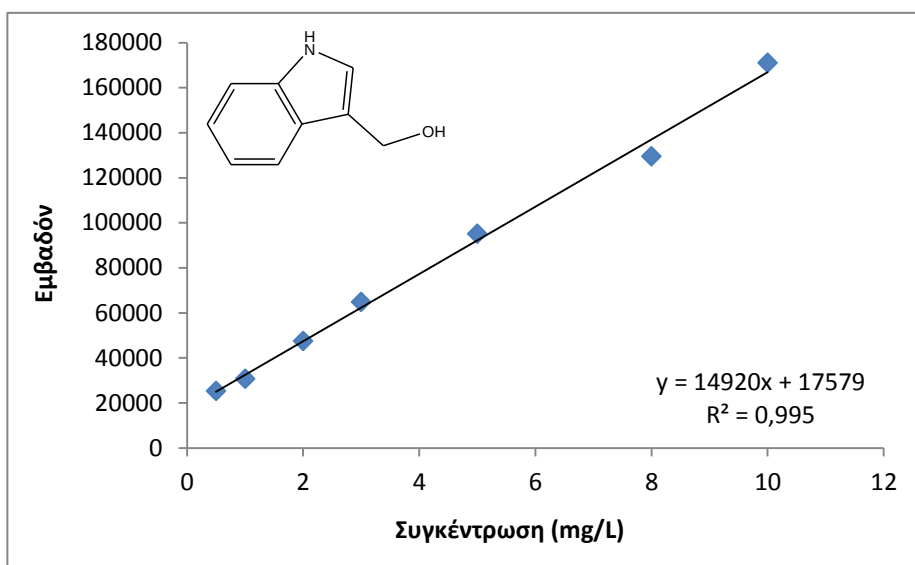
Στο σχήμα Z.2 δίνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης SFN που έχει χρόνο κατακράτησης (*retention time*) τα 9,144 min. Στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας παρατηρούμε το ιόν προσθήκης (adduct) $[M+H]^+ = 178,0355$ που σχηματίζεται κατά τον θετικό ιοντισμό της ένωσης. Το κύριο θραύσμα έχει $m/z = 114,0373$ και αντιστοιχεί στο ιόν $[M-63]^+$.



ΣΧΗΜΑ Ζ.2. Εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram) και φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης SFN (10 mg/L).

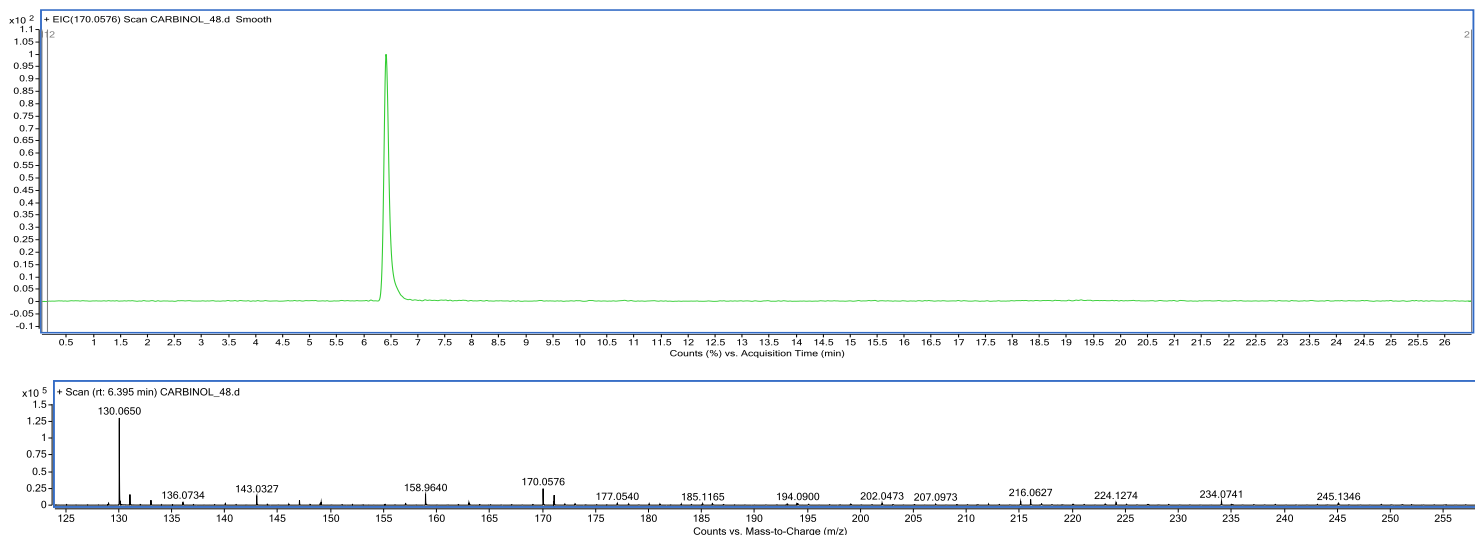
Γ.1.2.2 ΙΝΔΟΛΟ-3-ΚΑΡΒΙΝΟΛΗ (I3C)

Στο σχήμα Η.1 δίνεται η καμπύλη αναφοράς που αφορά την ινδολο-3-καρβινόλη και κατασκευάστηκε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 0,5, 1, 3, 5, 8, 10 mg/L. Η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2 = 0,995$. Υπολογίστηκαν LOD = 0,29 mg/L και LOQ = 0,89 mg/L.



Σχήμα Η.1. Καμπύλη βαθμονόμησης της ισοθειοκυανικής ένωσης I3C.

Στο σχήμα Η.2 δίνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας της πρότυπης ισοθειοκυανικής ένωσης I3C που έχει χρόνο κατακράτησης (*retention time*) τα 6,412 min. Στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας παρατηρούμε το ιόν προσθήκης (adduct) $[M+Na]^+ = 170,0576$ που σχηματίζεται κατά τον θετικό ιοντισμό της ένωσης, αλλά και το κύριο θραύσμα με $m/z = 130,0650$.

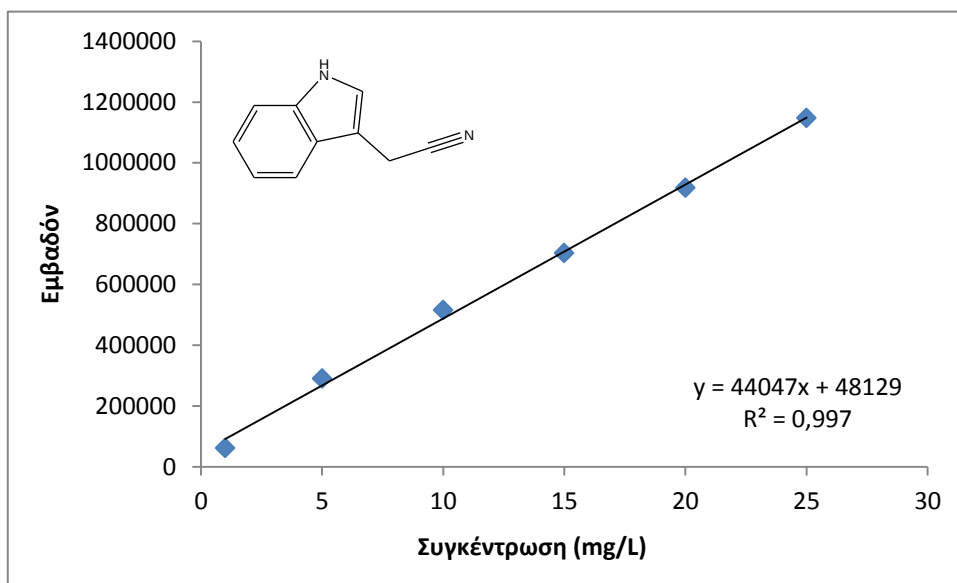


ΣΧΗΜΑ Η.2. Εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram) και φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της πρότυπης ένωσης I3C (10 mg/L).

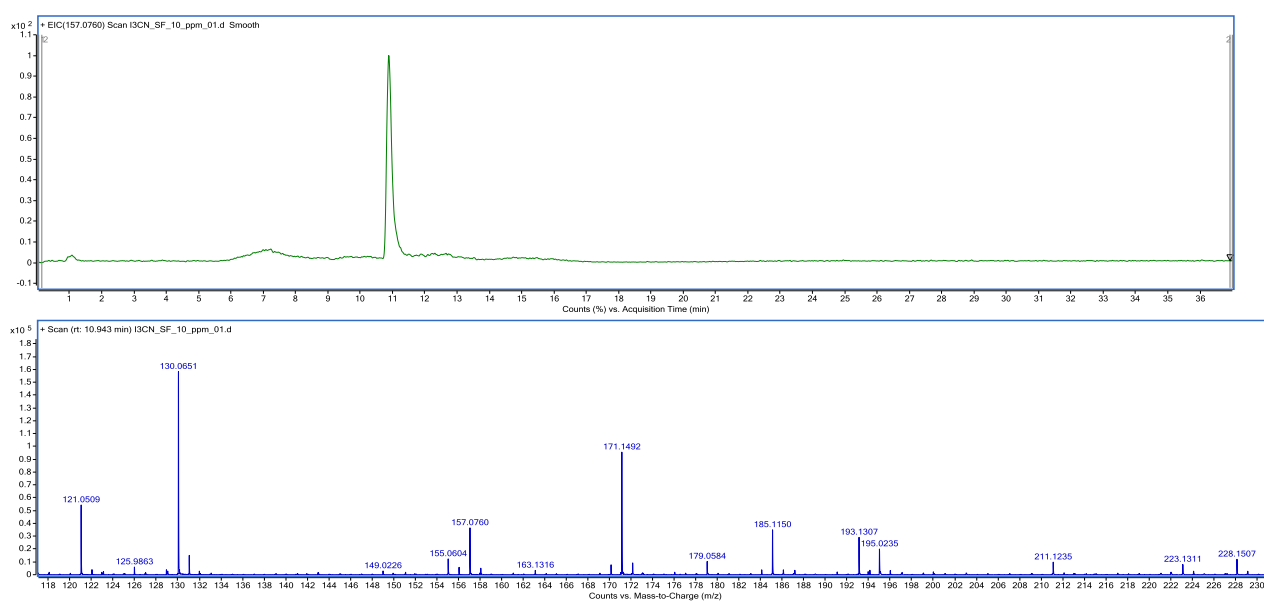
Γ.1.2.3 ΙΝΔΟΛΟ-3-ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ (I3CN)

Στο σχήμα Θ.1 δίνεται η καμπύλη αναφοράς που αφορά το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο και κατασκευάστηκε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 1, 5, 10, 15, 20, 25 mg/L.

Η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2 = 0,997$. Υπολογίστηκαν $LOD = 0,55$ mg/L και $LOQ = 1,66$ mg/L. Στο σχήμα Θ.2 δίνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας της πρότυπης ένωσης I3CN που έχει χρόνο κατακράτησης (*retention time*) τα 10,885 min. Στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας παρατηρούμε το ιόν προσθήκης (adduct) $[M+H]^+ = 157,0760$ που σχηματίζεται κατά τον θετικό ιοντισμό της ένωσης αλλά και το κύριο θραύσμα $m/z = 130,0651$.



Σχήμα Θ.1. Καμπύλη βαθμονόμησης του νιτριλίου I3CN.

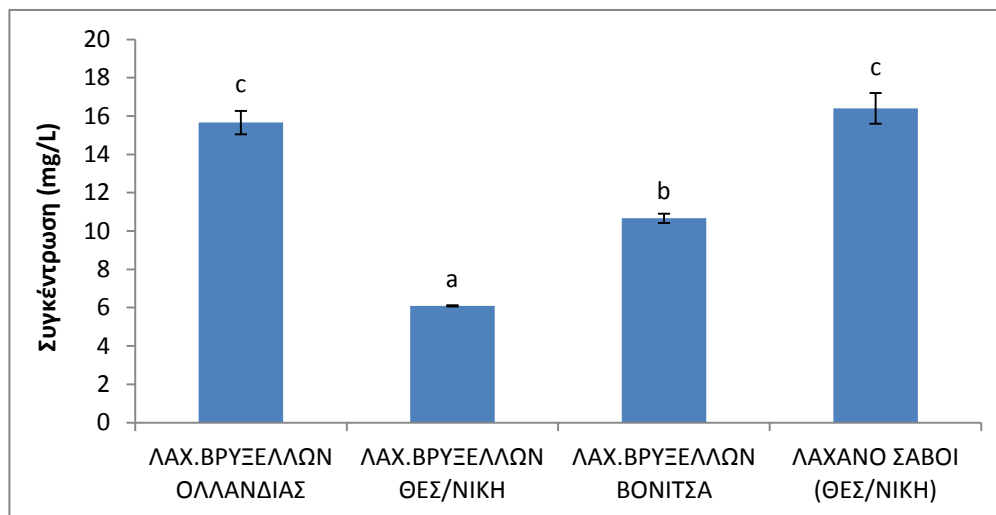


ΣΧΗΜΑ Θ.2. Εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram) και φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της πρότυπης ένωσης I3CN (10 mg/L).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

2.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

2.1.1 ΑΛΛΥΛΟ-ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟ (AIC)

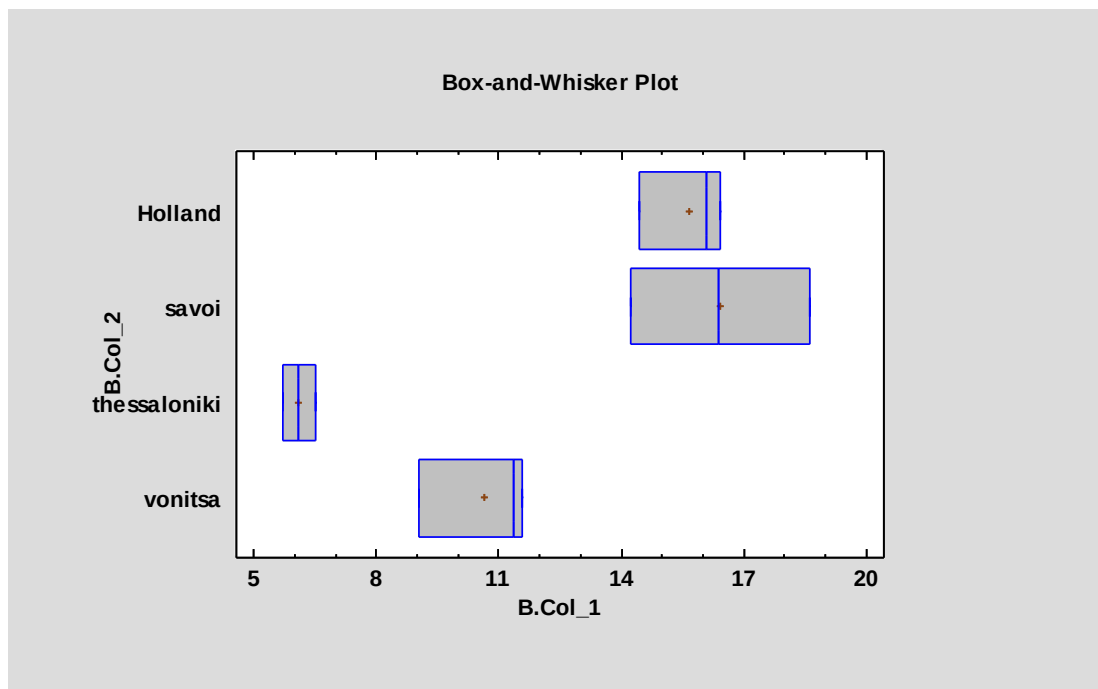


Σχήμα Α.3. Περιεκτικότητα AIC στα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβόι.

Η παρουσία του AIC ελέγχθηκε στα εκχυλίσματα από τα λαχ. Βρυξελλών προέλευσης Ολλανδίας, Θεσ/νίκης και Βόνιτσας αλλά και στο λάχανο σαβόι από την περιοχή της Θεσ/νίκης. Η ένωση AIC υπάρχει τόσο στα λαχανάκια Βρυξελλών όσο και στο λάχανο Σαβόι. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση βρέθηκε στο λάχανο σαβόι και στα λαχανάκια Βρυξελλών από τη Ολλανδία (δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο δειγμάτων). Σε μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκε στα λαχανάκια Βρυξελλών από τη Βόνιτσα και την Θεσσαλονίκη. Στα κατεψυγμένα λαχανάκια Βρυξελλών που επίσης μελετήθηκαν, η συγκέντρωση του AIC ήταν μικρότερη του ορίου ανίχνευσής του ($< LOD$).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (mg/L)	Μέγιστο (mg/L)	Εύρος
Λαχ. Βρυξελλών Ολλανδίας	3	15,6595	1,05319	6,72556%	14,4583	16,4249	1,96654
Λάχανο σαβόι	3	16,4024	2,20484	13,4422%	14,2189	18,6279	4,40908
Λαχ. Βρυξελλών Θεσ/νίκης	3	6,09287	0,412617	6,77212%	5,68888	6,5136	0,824724
Λαχ. Βρυξελλών Βόνιτσας	3	10,6632	1,39303	13,0639%	9,05786	11,553	2,49516
Συνολικά	12	12,2045	4,51282	36,9768%	5,68888	18,6279	12,939

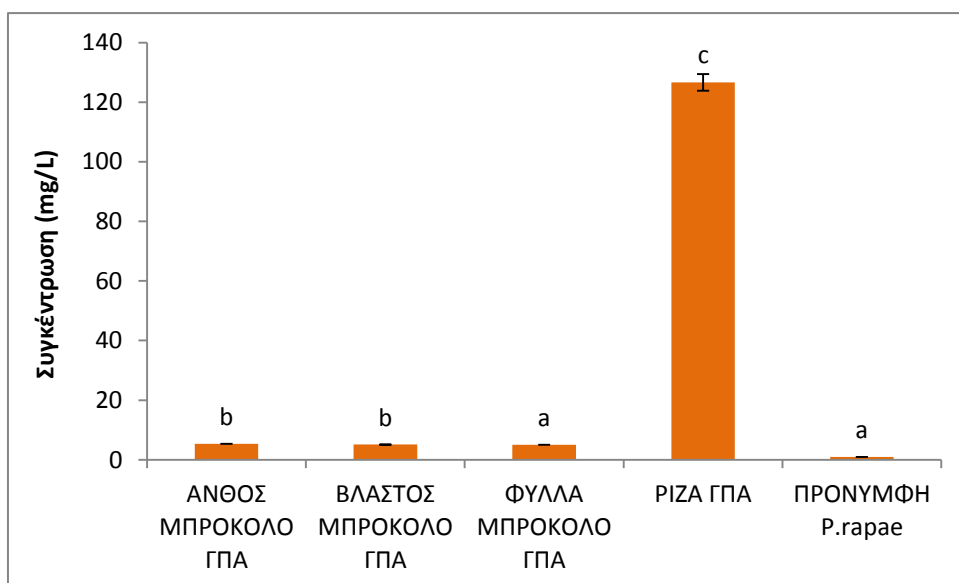
Πίνακας 1. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για την ισοθειοκυανική ένωση AIC.



Σχήμα Α.4. Θηκογράμματα της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης AIC ανά ποικιλία στα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβόι.

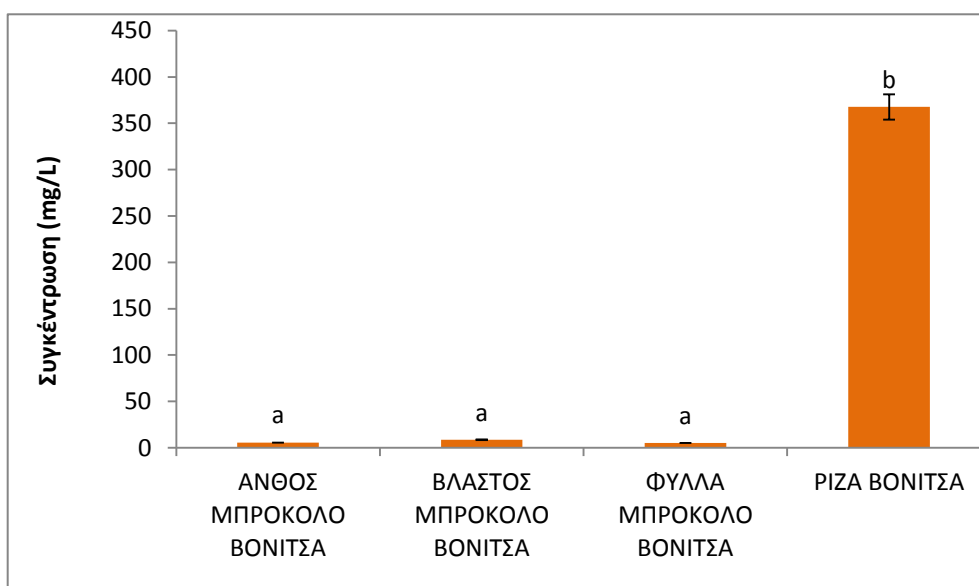
Στον πίνακα 1, για κάθε δείγμα παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης AIC, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή που βρέθηκε στα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, αυτό το οποίο παρατηρούμε από στατιστικής άποψης, τόσο στον πίνακα 1, όσο και στο σχήμα Α.4 είναι ότι στο λάχανο σαβόι εμφανίζεται η μεγαλύτερη μεταβλητότητα σε ποσοστό 13,44 % καθώς και στα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Βόνιτσας 13,06 %, ενώ τα δείγματα από την περιοχή της Ολλανδίας και της Θεσ/νίκης έχουν μικρή μεταβλητότητα. Από το σχήμα Α.4, όπου απεικονίζονται τα θηκογράμματα της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης AIC ανά περιοχή προέλευσης, φαίνεται ότι τα δείγματα από την περιοχή της Ολλανδίας και της Βόνιτσας εμφανίζουν αρνητική ασυμμετρία. Αυτό σημαίνει οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι περισσότερες από το 50 %.

2.1.2 ΦΑΙΝΑΙΘΥΛΟ-ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΟ (PITC)



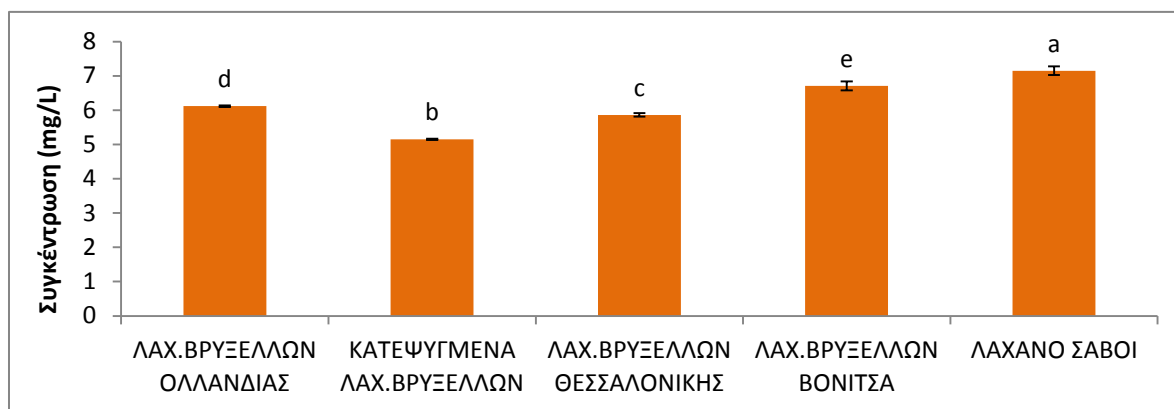
Σχήμα Β.2. Περιεκτικότητα PITC στο μπρόκολο ποικιλία *Monrello*.

Στο σχήμα Β.2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του PITC που προσδιορίστηκαν στο άνθος, στο βλαστό, στα φύλλα και στη ρίζα του ίδιου φυτικού υλικού μπρόκολου, ποικιλίας *Monrello* που διατέθηκε από το εργαστήριο Λαχανοκομίας του ΓΠΑ. Ήταν βιολογικής καλλιέργειας και από το ίδιο φυτό απομονώθηκε η προνύμφη του εντόμου *Pieris rapae*. Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα του PITC στα διάφορα τμήματα του ίδιου φυτού, παρατηρούμε ότι η ρίζα διαθέτει την υψηλότερη συγκέντρωση, δεκαπλάσια αυτής που βρίσκεται στο άνθος, βλαστό ή και στα φύλλα. Το PITC βρέθηκε και στην προνύμφη που τρεφόταν από το μπρόκολο.



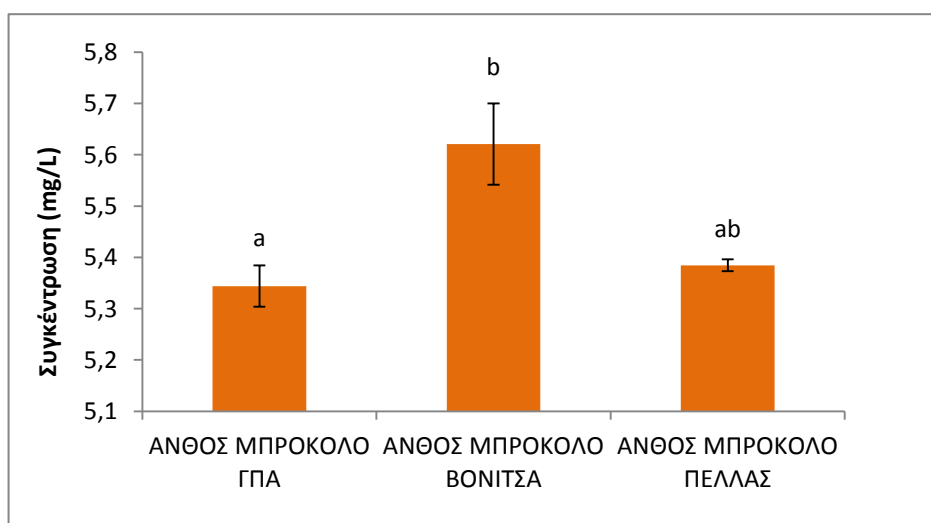
Σχήμα Β.3. Περιεκτικότητα PITC στο μπρόκολο ποικιλία *Marathon*.

Στο σχήμα Β.3 δίνονται οι συγκεντρώσεις του ΡΙΤC που βρέθηκαν στο άνθος, τον βλαστό, τα φύλλα και τη ρίζα μπρόκολου της ποικιλίας *Marathon*, προέλευσης Βόνιτσα. Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα του ΡΙΤC στα διάφορα τμήματα του ίδιου φυτού παρατηρούμε ότι η ρίζα διαθέτει πολλαπλάσια συγκέντρωση σε ΡΙΤC, ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ανάμεσα στο άνθος, στον βλαστό και στα φύλλα.



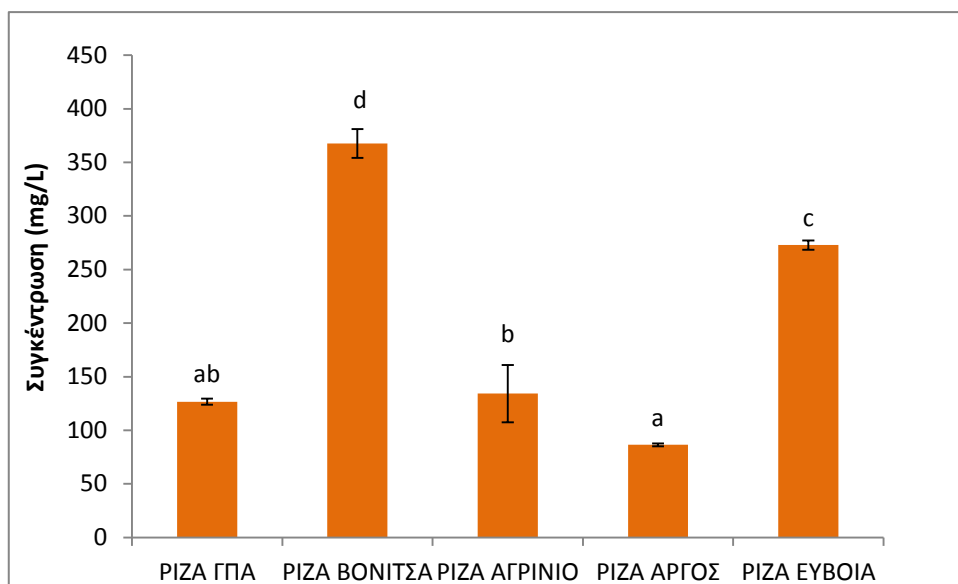
Σχήμα Β.4. Περιεκτικότητα ΡΙΤC στα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβόι.

Στο σχήμα Β.4 δίνονται οι συγκεντρώσεις του ΡΙΤC στα λαχ. Βρυξελλών από τις περιοχές της Ολλανδίας, Θεσ/νίκης, Βόνιτσας, αλλά και στο λάχανο σαβόι από την περιοχή της Θεσ/νίκης. Επίσης, εξετάστηκαν και τα κατεψυγμένα λαχανάκια Βρυξελλών. Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα του ΡΙΤC στα λαχ. Βρυξελλών, την υψηλότερη περιεκτικότητα έχει το λάχανο σαβόι, ενώ ακολουθούν τα λαχανάκια Βρυξελλών από την περιοχή της Βόνιτσας, της Ολλανδίας, της Θεσσαλονίκης και τέλος τα κατεψυγμένα, με στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.



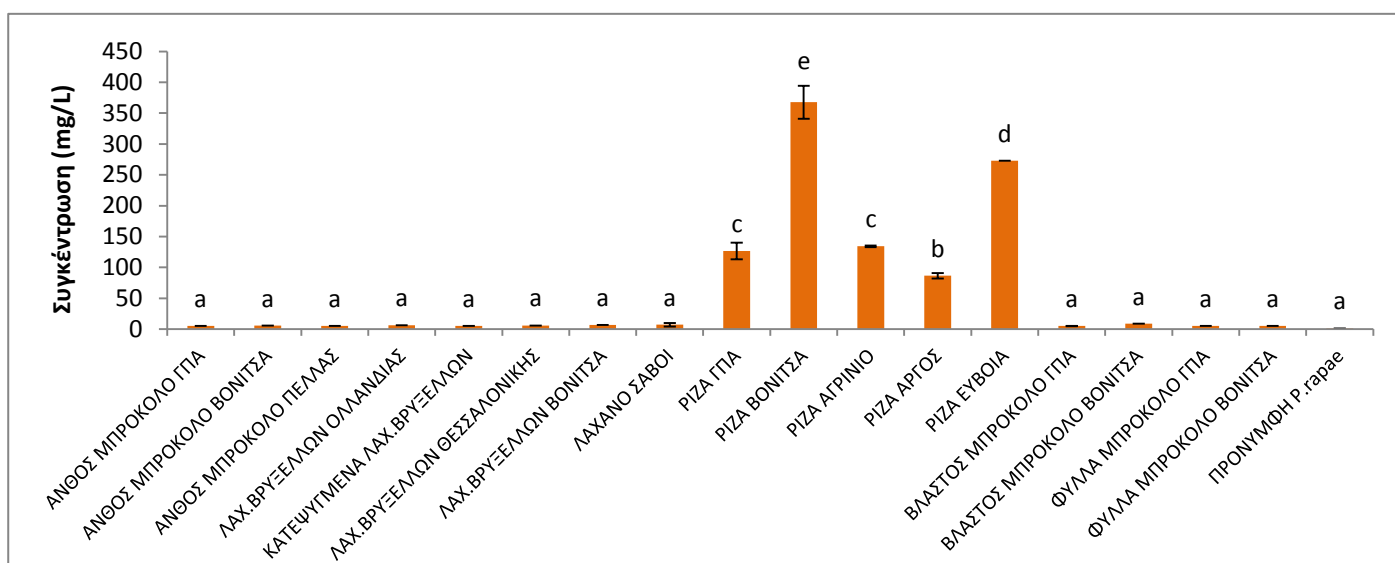
Σχήμα Β.5. Περιεκτικότητα ΡΙΤC στο άνθος μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στο σχήμα B.5 δίνονται οι συγκεντρώσεις του PUTC στο άνθος από το μπρόκολο από την περιοχή του ΓΠΑ, της Βόνιτσας και της Πέλλας. Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα του PUTC στα εκάστοτε άνθη μπρόκολου βρέθηκε ότι το μπρόκολο από την περιοχή της Βόνιτσας έχει την υψηλότερη συγκέντρωση σε PUTC και ακολουθεί το άνθος από την περιοχή της Πέλλας και τέλος το άνθος από το ΓΠΑ, ενώ η συγκέντρωση του άνθους από το μπρόκολο Πέλλας δεν διαφέρει στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από το άνθος από το μπρόκολο του ΓΠΑ και του άνθους από το μπρόκολο της περιοχής της Βόνιτσας.



Σχήμα B.6. Περιεκτικότητα PUTC σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello, Marathon, Parthenon*.

Στο σχήμα B.6 δίνονται οι συγκεντρώσεις του PUTC που βρέθηκαν στις ρίζες του μπρόκολου από τις περιοχές του ΓΠΑ, Βόνιτσας, Αργινίου, Αργούς και Εύβοιας. Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα στις ρίζες, παρατηρούμε ότι την υψηλότερη περιεκτικότητα σε PUTC διαθέτει η ρίζα από την περιοχή της Βόνιτσας, μετά ακολουθούν η ρίζα από την Εύβοια, το Αργίνιο, το ΓΠΑ και τέλος το Αργός. Ωστόσο η συγκέντρωση στη ρίζα από το ΓΠΑ, δεν διαφέρει στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από τη ρίζα από το Αργίνιο και το Αργός.

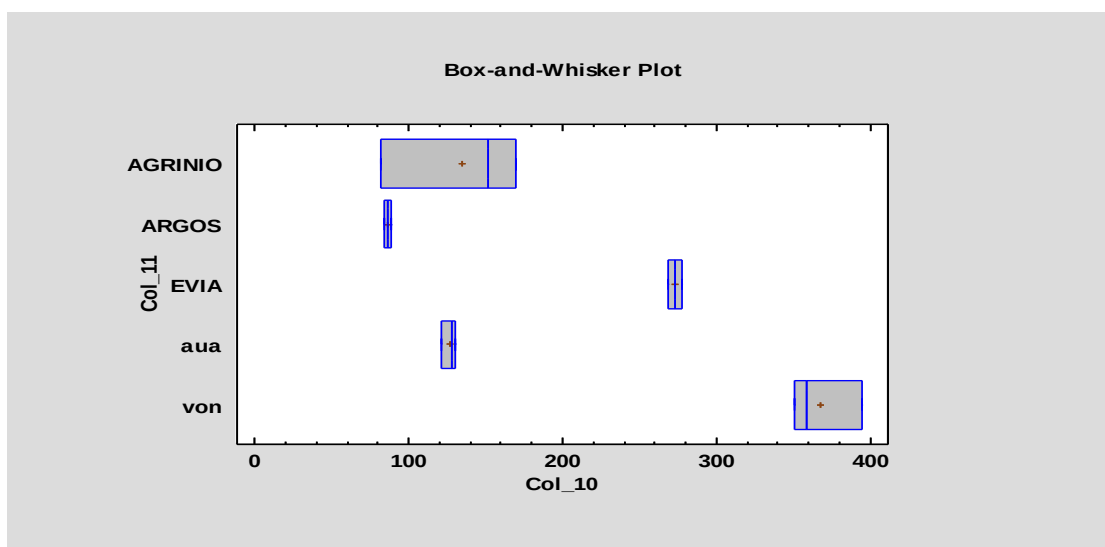


Σχήμα Β.7. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των δειγμάτων περιεκτικότητας ΡΙΤC.

Στο συγκεντρωτικό γράφημα Β.7 παρατηρούμε ότι μεταξύ των περισσότερων δειγμάτων δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στις ρίζες, με τη ρίζα Βόνιτσα να διαθέτει την υψηλότερη συγκέντρωση ΡΙΤC, ενώ ακολουθεί η ρίζα από την Εύβοια, το Αγρίνιο, το ΓΠΑ και το Άργος. Ωστόσο, ανάμεσα στη ρίζα από το Αγρίνιο και το ΓΠΑ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διάφορα σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (mg/L)	Μέγιστο (mg/L)	Εύρος
Άνθος μπρόκολο ΓΠΑ	2	5,3441	0,0569992	1,06658%	5,3038	5,38441	0,080609
Άνθος μπρόκολο Βόνιτσα	3	5,6209	0,136929	2,43607%	5,46301	5,70719	0,244177
Άνθος μπρόκολο Πέλλας	2	5,3845	0,0161382	0,299716%	5,37309	5,39591	0,0228229
Λαχ. Βρυξελλών Ολλανδίας	3	6,11566	0,0406839	0,66524%	6,07237	6,1531	0,0807319
Λαχ. Βρυξελλών κατεψυγμένα	3	5,14837	0,0319039	0,619689%	5,11588	5,17965	0,0637736
Λαχ. Βρυξελλών Θεσ/νίκης	3	5,86181	0,0839337	1,43187%	5,79919	5,95718	0,15799
Λαχ. Βρυξελλών Βόνιτσα	3	6,7056	0,230044	3,43063%	6,45331	6,90373	0,450419
Λάχανο σαβόι	3	0,714682	0,0217393	3,04181%	0,689737	0,729582	0,0398448
Ρίζα ΓΠΑ	3	126,669	4,82645	3,81028%	121,289	130,619	9,32953
Ρίζα Βόνιτσα	3	367,617	23,4333	6,37437%	350,234	394,266	44,0328
Ρίζα Αγρίνιο	3	134,264	46,4044	34,5621%	81,701	169,558	87,8574
Ρίζα Αργος	3	86,4702	2,42682	2,80654%	84,146	88,9881	4,84204
Ρίζα Εύβοια	2	272,796	6,15021	2,25451%	268,447	277,145	8,69771
Βλαστός μπρόκολο ΓΠΑ	3	5,07473	0,0187957	0,370379%	5,0604	5,09601	0,0356084
Βλαστός μπρόκολο Βόνιτσα	3	0,872865	0,0727584	8,33559%	0,788857	0,915744	0,126887
Φύλλα μπρόκολο ΓΠΑ	3	0,502351	0,00117903	0,234703%	0,501016	0,503249	0,00223313
Φύλλα μπρόκολο Βόνιτσα	3	0,524059	0,00277632	0,529771%	0,52129	0,526842	0,00555259
Προνύμφη <i>P.rapae</i>	3	0,539686	0,000725122	0,13436%	0,539077	0,540488	0,00141143
Συνολικά	51	55,3951	102,823	185,618%	0,501016	394,266	393,765

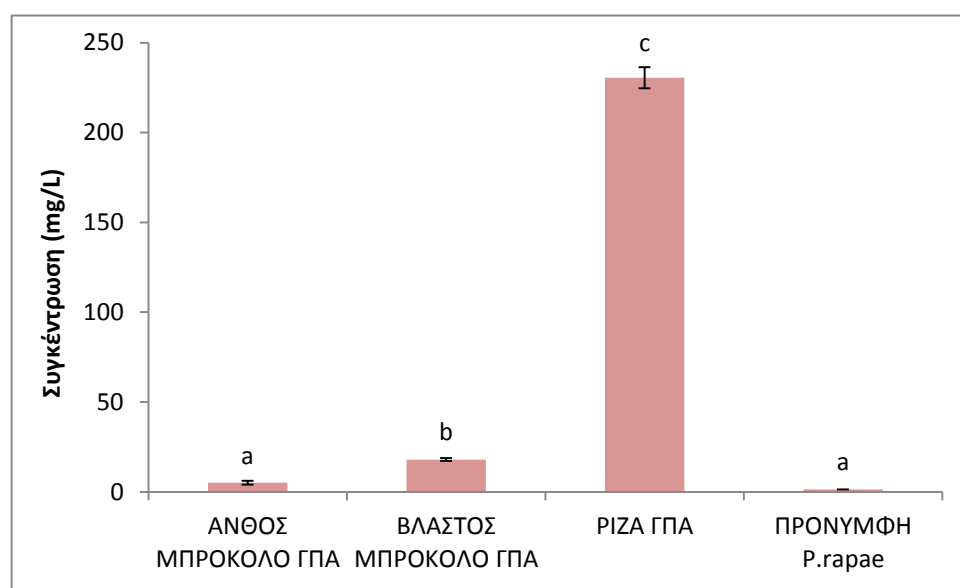
Πίνακας 2. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για την ισοθειοκυανική ένωση PITC.



Σχήμα Β.8. Θηκογράμματα της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης PITC σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στον πίνακα 2 για κάθε δείγμα παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης PITS, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή στα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, αυτό το οποίο παρατηρούμε τόσο από τον πίνακα 2 όσο και από το σχήμα Β.8 είναι ότι την μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρουσιάζεται στη ρίζα από την περιοχή του Αγρινίου με ποσοστό 34,56 %, ενώ σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα ο συντελεστής μεταβλητότητας είναι μικρότερος του 10 %, γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα δείγματα είναι ομοιογενή, δηλαδή παρουσιάζουν μικρή μεταβλητότητα. Από το σχήμα Β.8 όπου απεικονίζονται τα θηκογράμματα της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης PITS φαίνεται ότι τα δείγματα των ριζών από την περιοχή του Αγρινίου και της της Βόνιτσας έχουν την μεγαλύτερη μεταβλητότητα. Από τη μια πλευρά φαίνεται η ρίζα από το Αγρίνιο να εμφανίζει αρνητική ασυμμετρία, αυτό σημαίνει οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι περισσότερες από το 50 %. Από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι η ρίζα από τη Βόνιτσα εμφανίζει θετική ασυμμετρία, δηλαδή σημαίνει οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι λιγότερες από το 50 %.

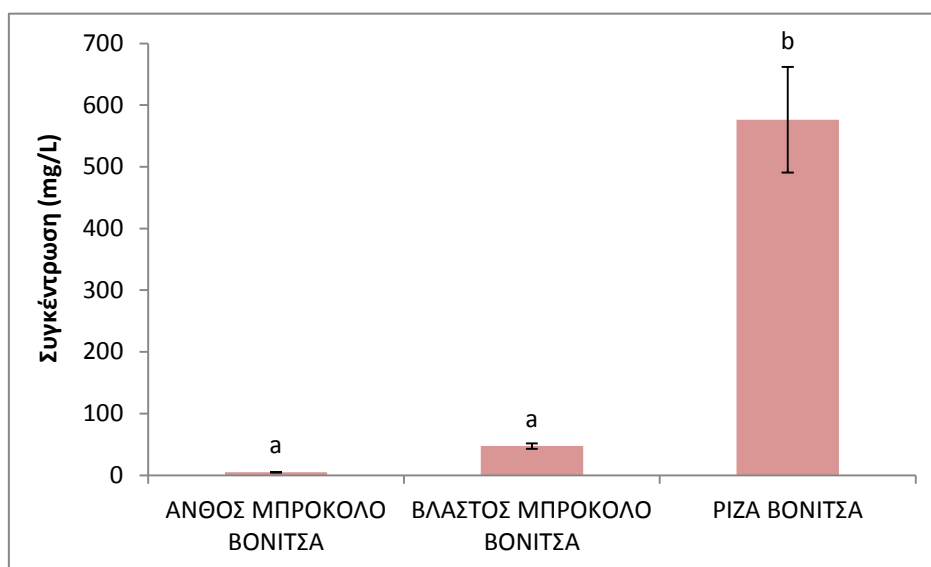
2.1.3 ΕΡΟΥΚΙΝΗ (ER)



ΣΧΗΜΑ Γ.3. Περιεκτικότητα ER στο μπρόκολο ποικιλία Monrelo.

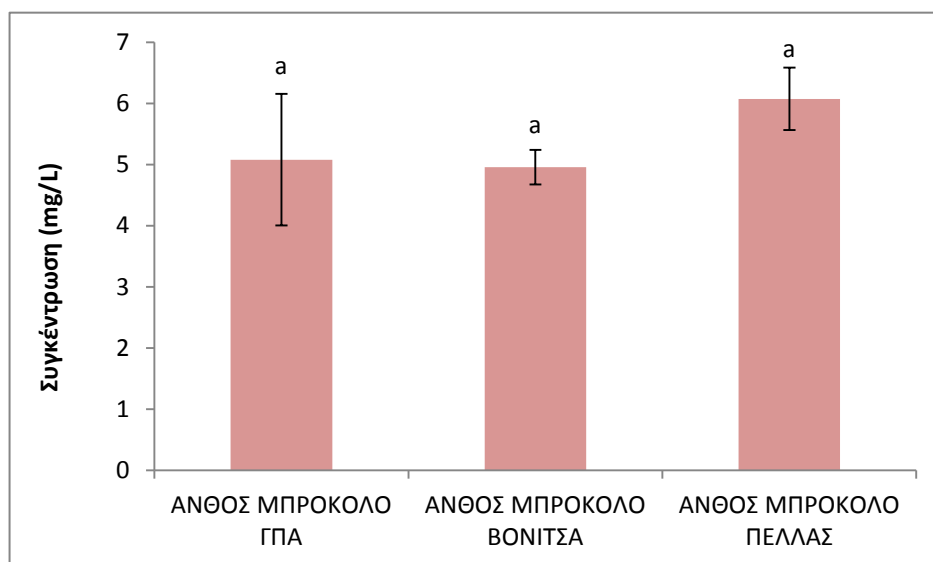
Στο σχήμα Γ.3 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της ER που προσδιορίστηκαν στο άνθος, στον βλαστό και στη ρίζα του φυτικού υλικού μπρόκολου που παραχωρήθηκε από το εργαστήριο λαχανοκομίας βιολογικής καλλιέργειας. Από αυτό το φυτικό υλικό απομονώθηκε η προνύμφη του εντόμου *Pieris rapae*.

Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα της ER στα διάφορα τμήματα του ίδιου φυτού βλέπουμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση έχει η ρίζα, ενώ ακολουθούν ο βλαστός και το άνθος και η προνύμφη *P.rapae*. Σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι στα φύλλα δεν ανιχνεύτηκε η συγκεκριμένη ουσία και για αυτό δεν απεικονίστηκε στο σχήμα. Τα δείγματα του άνθους και της προνύμφης δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.



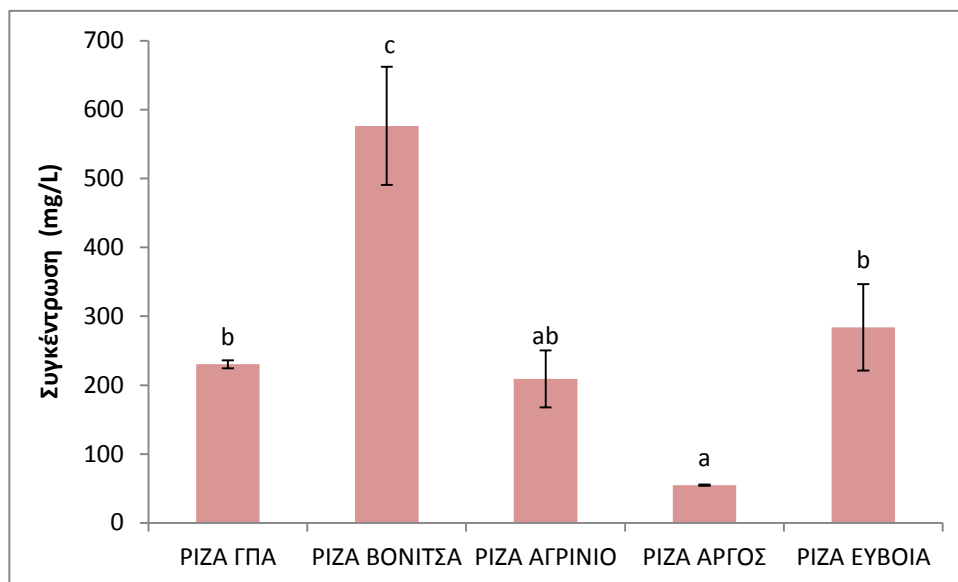
Σχήμα Γ.4. Περιεκτικότητα ER στο μπρόκολο ποικιλία *Marathon*.

Στο σχήμα Γ.4 δίνονται οι συγκεντρώσεις της ER που βρέθηκαν στο άνθος, στον βλαστό και στη ρίζα από το μπρόκολο της περιοχής Βόνιτσα. Την υψηλότερη συγκέντρωση έχει η ρίζα, ενώ ακολουθεί ο βλαστός με το άνθος χωρίς τα δυο δείγματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι στα φύλλα δεν ανιχνεύτηκε η συγκεκριμένη ουσία και για αυτό δεν απεικονίστηκε στο σχήμα.



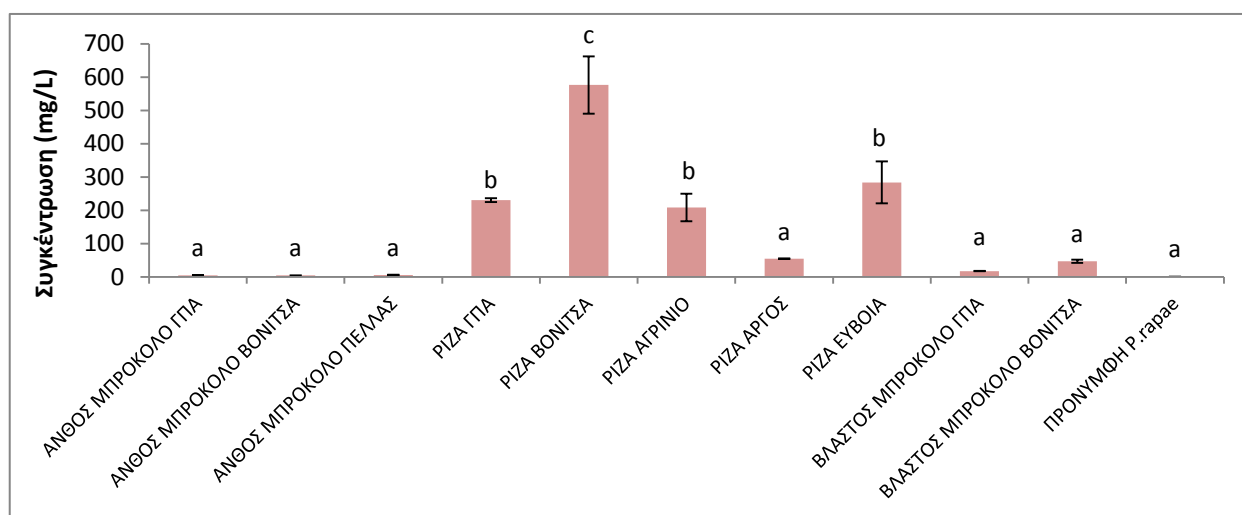
Σχήμα Γ.5. Περιεκτικότητα ER στο άνθος μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στο σχήμα Γ.5 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της ER που προσδιορίστηκαν στο άνθος από το φυτικό υλικό μπρόκολου από την περιοχή του ΓΠΑ, της Βόνιτσας και της Πέλλας. Αυτό το οποίο παρατηρούμε είναι ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% στην περιεκτικότητα της ER στο άνθος μπρόκολου ανάμεσα στις τρεις ποικιλίες.



Σχήμα Γ.6. Περιεκτικότητα ER σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες Monrello, Marathon, Parthenon.

Στο σχήμα Γ.6 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της ER που προσδιορίστηκαν στις ρίζες από την περιοχή του ΓΠΑ, της Βόνιτσας, του Αγρινίου, του Άργους και της Ευβοίας. Η υψηλότερη συγκέντρωση της ER παρατηρείται στη ρίζα από την περιοχή της Βόνιτσας και ακολουθεί η ρίζα από την περιοχή της Εύβοιας, του ΓΠΑ και τέλος του Αγρινίου και του Άργους, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ανάμεσα στη ρίζα από το ΓΠΑ και την Εύβοια.

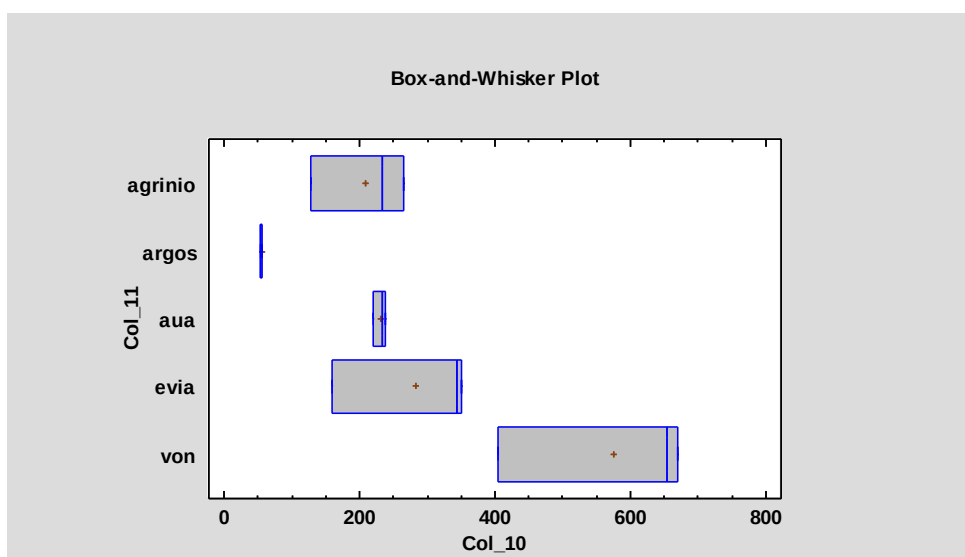


Σχήμα Γ.7. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των δειγμάτων περιεκτικότητας ER.

Στο συγκεντρωτικό γράφημα Γ.7 φαίνεται ότι μεταξύ των περισσότερων δειγμάτων δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στις ρίζες με τη ρίζα από την περιοχή της Βόνιτσας να διαθέτει την υψηλότερη συγκέντρωση ER, ενώ ακολουθούν οι ρίζες από τις περιοχές της Εύβοιας, του Αγρινίου και του ΓΠΑ, με την χαμηλότερη συγκέντρωση σε ER να έχει η ρίζα από το Αργος χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (mg/L)	Μέγιστο (mg/L)	Εύρος
Άνθος μπρόκολο ΓΠΑ	3	5,07759	1,86338	36,6981%	3,99802	7,22923	3,23121
Άνθος μπρόκολο Βόνιτσα	3	4,9544	0,49004	9,89101%	4,41734	5,37725	0,95991
Άνθος μπρόκολο Πέλλας	2	6,57753	0,163741	2,4894%	6,46175	6,69332	0,231565
Ρίζα ΓΠΑ	3	230,454	10,1369	4,39868%	219,282	239,066	19,7832
Ρίζα Βόνιτσα	3	576,274	148,509	25,7705%	405,022	669,619	264,596
Ρίζα Αγρίνιο	3	208,951	71,6819	34,3056%	127,998	264,37	136,372
Ρίζα Αργος	3	54,7297	1,67017	3,05167%	53,6864	56,6561	2,96965
Ρίζα Εύβοια	3	283,961	108,708	38,2826%	158,48	349,567	191,087
Βλαστός μπρόκολο ΓΠΑ	3	17,9936	1,37097	7,61919%	16,4117	18,8362	2,42454
Βλαστός μπρόκολο Βόνιτσα	3	47,4076	7,6234	16,0805%	38,6536	52,5859	13,9323
Προνόμφη <i>P.rapae</i>	2	1,37414	0,0155175	1,12925%	1,36317	1,38511	0,021945
Συνολικά	31	138,881	184,92	133,15%	1,36317	669,619	668,256

Πίνακας 3. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για την ισοθειοκυανική ένωση ER.

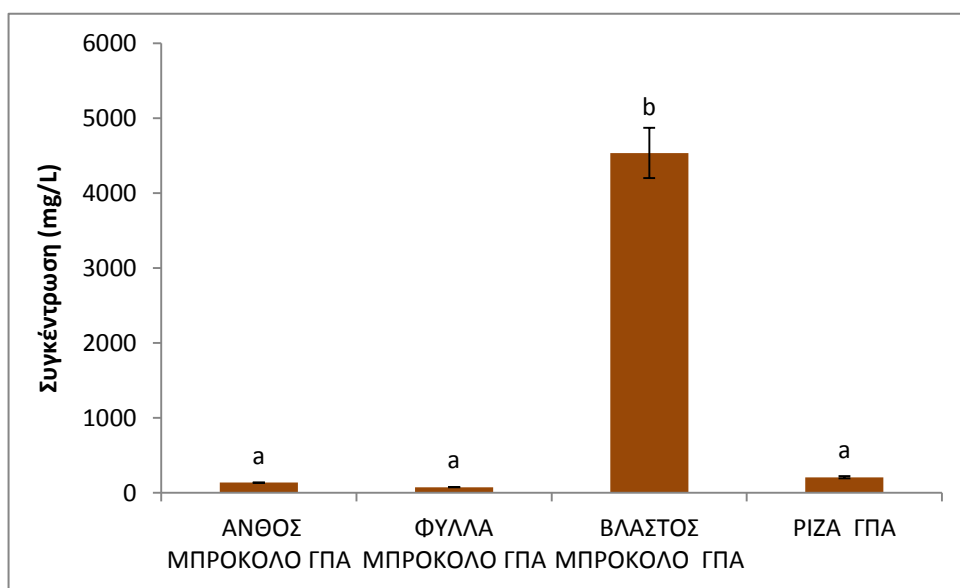


Σχήμα Γ.8. Θηκογράμματα της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης ER σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλία *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στον πίνακα 3 για κάθε δείγμα παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης ER, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή που παρατηρούνται στα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, από τον πίνακα 3 φαίνεται ότι μεγάλη μεταβλητότητα παρατηρείται στη ρίζα από την περιοχή της Εύβοιας σε ποσοστό 38,28 % , στη ρίζα από το Αγρίνιο σε ποσοστό 34,30 % και στη ρίζα από την περιοχή της Βόνιτσας σε ποσοστό 25,77 %. Επίσης, μεγάλη μεταβλητότητα υπάρχει στο άνθος και στο βλαστό από το μπρόκολο Βόνιτσας με ποσοστό 36,69 % και 16,08 %, αντίστοιχα. Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα, ο συντελεστής μεταβλητότητας είναι μικρότερος του 10 %, γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα δείγματα είναι ομοιογενή δηλαδή παρουσιάζουν μικρή μεταβλητότητα.

Στο σχήμα Γ.8 απεικονίζονται τα θηκογράμματα για τις συγκεντρώσεις της ισοθειοκυανικής ένωσης ER από όπου φαίνεται ότι οι ρίζες από το Αγρίνιο, την Εύβοια και την Βόνιτσα εμφανίζουν τόσο μεγάλη μεταβλητότητα όσο και αρνητική ασυμμετρία, το οποίο σημαίνει οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι περισσότερες από το 50 %.

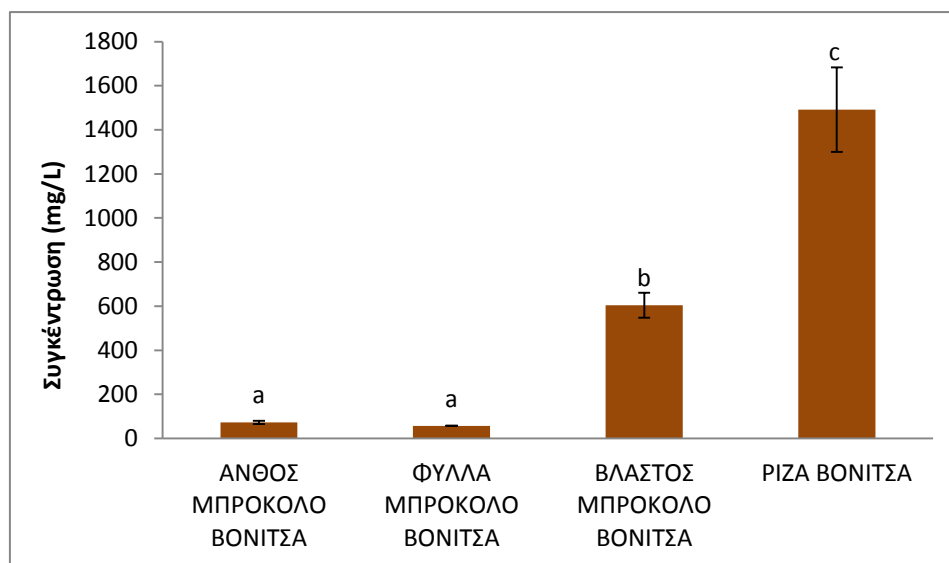
2.1.4 ΝΙΤΡΙΛΙΟ ΕΡΟΥΚΙΝΗΣ (5MITN)



ΣΧΗΜΑ Δ.1. Περιεκτικότητα 5MITN στο μπρόκολο ποικιλία *Monrello*.

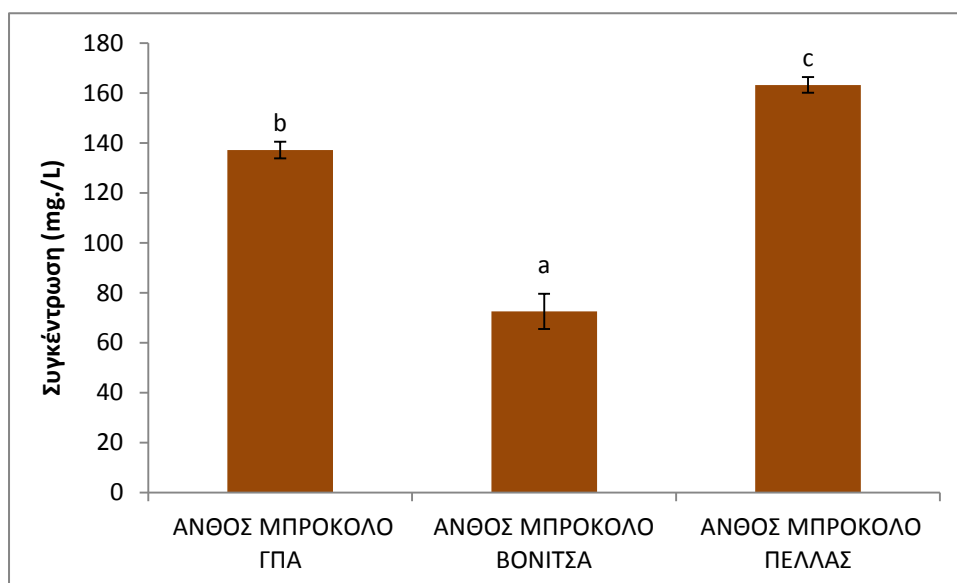
Στο σχήμα Δ.1 φαίνονται οι συγκεντρώσεις του νιτριλίου 5MITN που προσδιοριστήκαν στο άνθος, στον βλαστό, στα φύλλα και στη ρίζα του φυτικού υλικού μπρόκολου βιολογικής καλλιέργειας που παραχωρήθηκε από το εργαστήριο λαχανοκομίας. Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα του νιτριλίου 5MITN στα διάφορα τμήματα του ίδιου φυτού παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση σε 5MITN έχει ο βλαστός από την περιοχή του ΓΠΑ, ενώ

ακολουθούν η ρίζα, το άνθος και τα φύλλα χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.



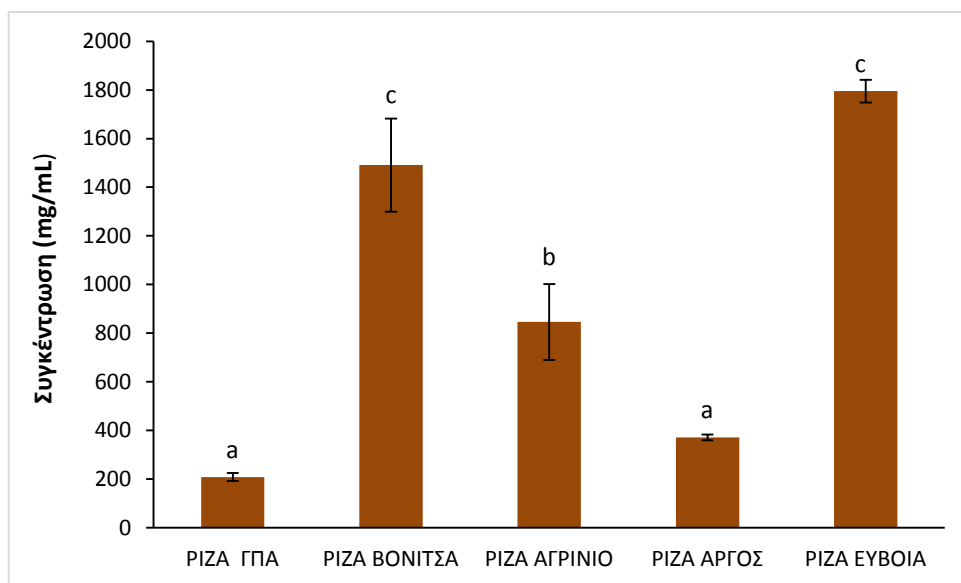
ΣΧΗΜΑ Δ.2. Περιεκτικότητα 5MITN στο μπρόκολο ποικιλία *Marathon*.

Στο σχήμα Δ.2 δίνονται οι συγκεντρώσεις του 5MITN που βρέθηκαν στο άνθος, στον βλαστό και στη ρίζα από το ίδιο μπρόκολο της περιοχής Βόνιτσα. Την υψηλότερη συγκέντρωση σε 5MITN, έχει η ρίζα ενώ ακολουθούν ο βλαστός και τέλος τα φύλλα μαζί με το άνθος στα οποία δυο τελευταία δεν παρατηρείται καμιά στατιστικά σημαντική διάφορα μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.



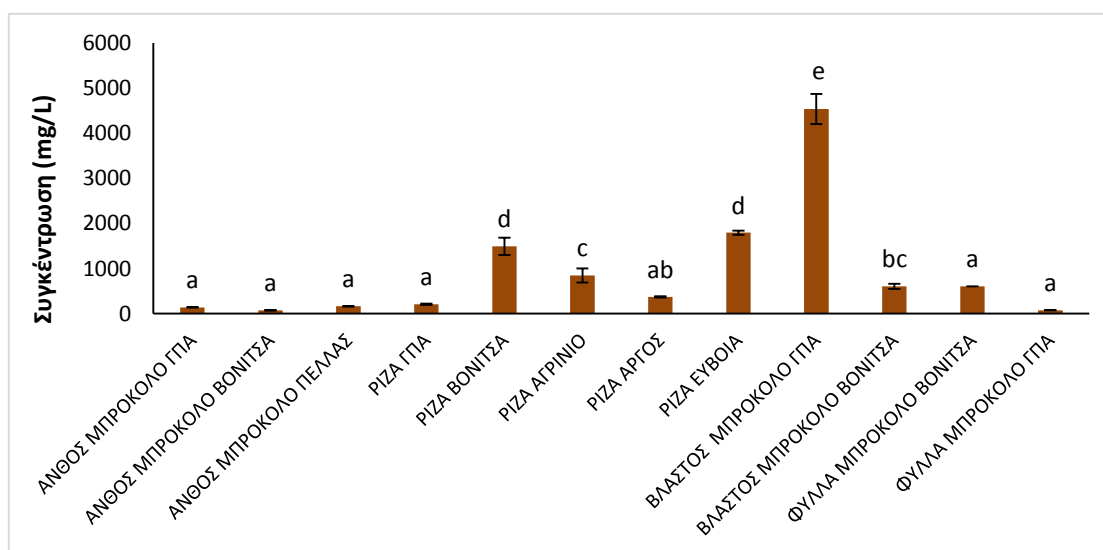
Σχήμα Δ.3. Περιεκτικότητα ER στο άνθος μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στο σχήμα Δ.3 φαίνονται οι συγκεντρώσεις του νιτρίλιου 5MITN που προσδιορίστηκαν στο άνθος από το φυτικό υλικό μπρόκολου από την περιοχή του ΓΠΑ, Βόνιτσας και Πέλλας. Παρατηρούμε ότι ανάμεσα και στις τρεις περιοχές υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Πιο συγκεκριμένα, την υψηλότερη συγκέντρωση σε 5MITN έχει το άνθος από την περιοχή της Πέλλας ενώ ακολουθούν το άνθος από την περιοχή του ΓΠΑ και της Βόνιτσας.



Σχήμα Δ.4. Περιεκτικότητα 5MITN σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello, Marathon, Parthenon*.

Στο σχήμα Δ.4 φαίνονται οι συγκεντρώσεις του νιτρίλιου 5MITN που προσδιορίστηκαν στις ρίζες από την περιοχή του ΓΠΑ, της Βόνιτσας, του Αγρινίου, του Άργους και της Ευβοίας. Η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρείται στη ρίζα από την περιοχή της Εύβοια ενώ ακολουθεί στη ρίζα από την περιοχή της Βόνιτσας, του Αγρινίου, του Άργους και του ΓΠΑ. Ωστόσο, μεταξύ των δειγμάτων από την περιοχή του ΓΠΑ και του Άργους δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

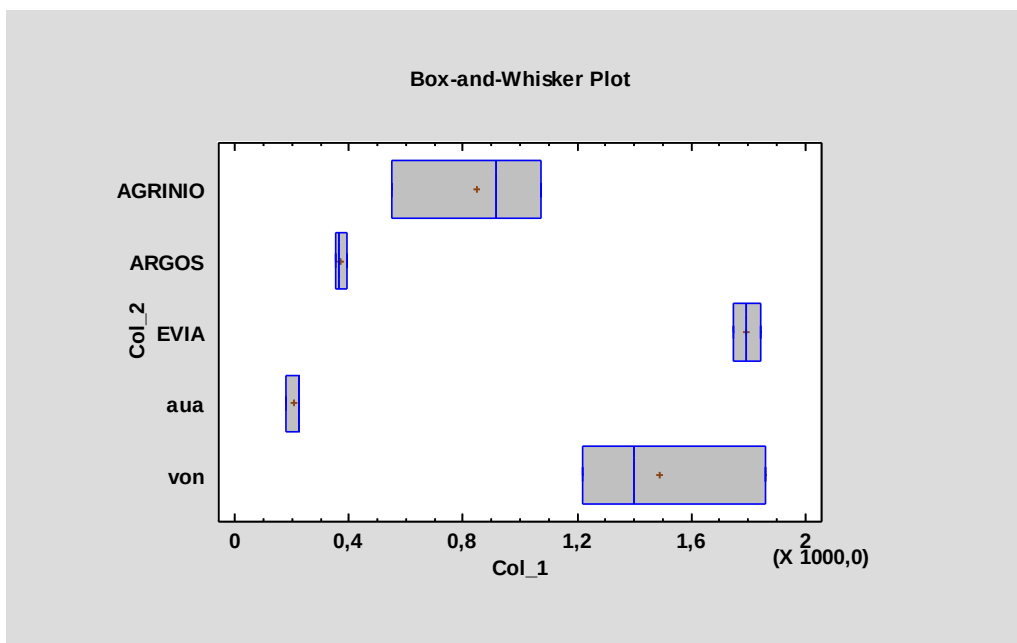


Σχήμα Α.5. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των δειγμάτων περιεκτικότητας 5MITN.

Από το συγκεντρωτικό γράφημα περιεκτικότητας στο νιτρίλιο 5MITN παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση διαθέτει ο βλαστός από την περιοχή του ΓΠΑ, ενώ ακολουθούν η ρίζα από την Εύβοια και τη Βόνιτσα χωρίς να διαφέρει μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά. Έπειτα ακολουθεί η ρίζα από το Αγρίνιο και ο βλαστός από το μπρόκολο Βόνιτσας ενώ μεταξύ του άνθους από την περιοχή του ΓΠΑ, της Βόνιτσας και της Πέλλας και των φύλλων του μπρόκολου από την περιοχή του ΓΠΑ και της Βόνιτσας δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (mg/L)	Μέγιστο (mg/L)	Εύρος
Άνθος μπρόκολο ΓΠΑ	3	137,164	5,72549	4,17418%	131,941	143,286	11,3449
Άνθος μπρόκολο Βόνιτσα	2	72,6029	9,91884	13,6618%	65,5892	79,6166	14,0274
Άνθος μπρόκολο Πέλλας	2	163,188	4,45378	2,72923%	160,039	166,337	6,2986
Ρίζα ΓΠΑ	3	208,275	27,9782	13,4333%	176,044	226,305	50,2604
Ρίζα Βόνιτσα	3	1491,12	331,553	22,2352%	1216,84	1859,57	642,729
Ρίζα Αγρίνιο	3	846,151	270,02	31,9115%	548,276	1074,86	526,584
Ρίζα Άργος	3	371,31	21,0312	5,66406%	353,982	394,709	40,7267
Ρίζα Εύβοια	2	1795,12	65,5954	3,65408%	1748,74	1841,51	92,7659
Βλαστός μπρόκολο ΓΠΑ	3	4534,72	578,984	12,7678%	3966,61	5124,0	1157,39
Βλαστός μπρόκολο Βόνιτσα	3	604,083	99,253	16,4304%	492,796	683,445	190,649
Φύλλα μπρόκολο ΓΠΑ	3	75,5235	3,94225	5,2199%	72,6916	80,026	7,33434
Φύλλα μπρόκολο Βόνιτσα	2	56,8095	1,1663	2,05301%	55,9848	57,6342	1,6494
Συνολικά	32	905,639	1314,35	145,13%	55,9848	5124,0	5068,01

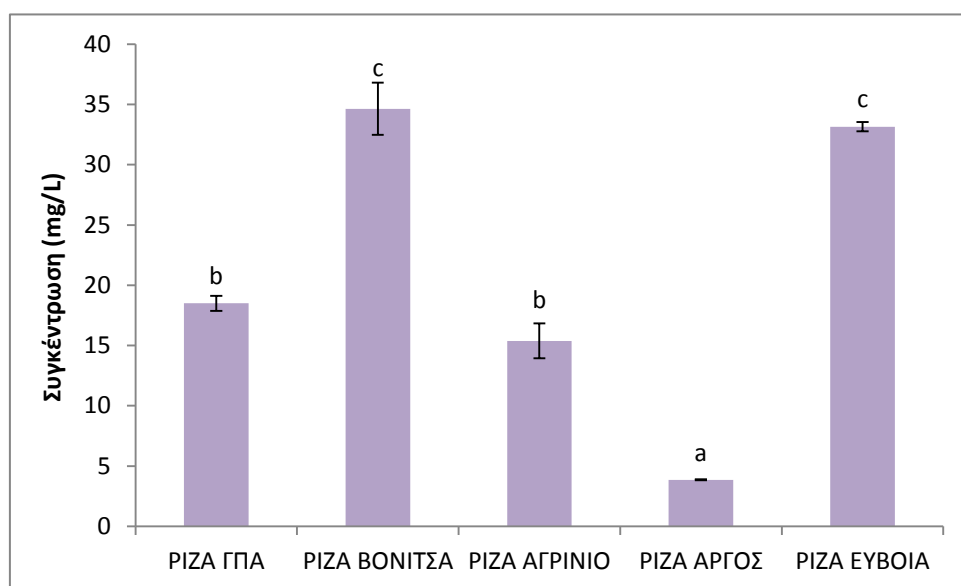
Πίνακας 4. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για το νιτρίλιο 5MITN.



Σχήμα Δ.6. Θηκογράμματα της συγκέντρωσης του νιτρίλιου 5MITN σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello, Marathon, Parthenon*.

Στον πίνακα 4 για κάθε δείγμα παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του νιτρίλιου 5MITN, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή που απαντάται στα δείγματα που μελετήθηκαν. Η μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται στη ρίζα από την περιοχή του Αγρινίου σε ποσοστό 34,30 % , στη η ρίζα από την Βόνιτσα σε ποσοστό 22,23 % και στη ρίζα από την περιοχή του ΓΠΑ σε ποσοστό 13,43 %. Επίσης, μεγάλη μεταβλητότητα υπάρχει στο άνθος και στον βλαστό από το μπρόκολο Βόνιτσας σε ποσοστό 13,66 % και 16,43 %, αντίστοιχα καθώς και στο βλαστό από το μπρόκολο του ΓΠΑ σε ποσοστό 12,76 %. Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα ο συντελεστής μεταβλητότητας είναι μικρότερος του 10 % γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα δείγματα είναι ομοιογενή, δηλαδή παρουσιάζουν μικρή μεταβλητότητα. Από το σχήμα Δ.6 όπου απεικονίζονται τα θηκογράμματα του νιτρίλιου 5MITN φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις στις ρίζες από το Αγρίνιο, και τη Βόνιτσα εμφανίζουν τόσο μεγάλη μεταβλητότητα όσο και ασυμμετρία. Ειδικότερα, στη ρίζα από το Αγρίνιο εμφανίζεται αρνητική ασυμμετρία το οποίο σημαίνει ότι οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι περισσότερες από το 50 %, ενώ στη ρίζα από τη Βόνιτσα εμφανίζεται θετική ασυμμετρία δηλ. οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι λιγότερες από το 50 %.

2.1.5 ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗ (3MIC)

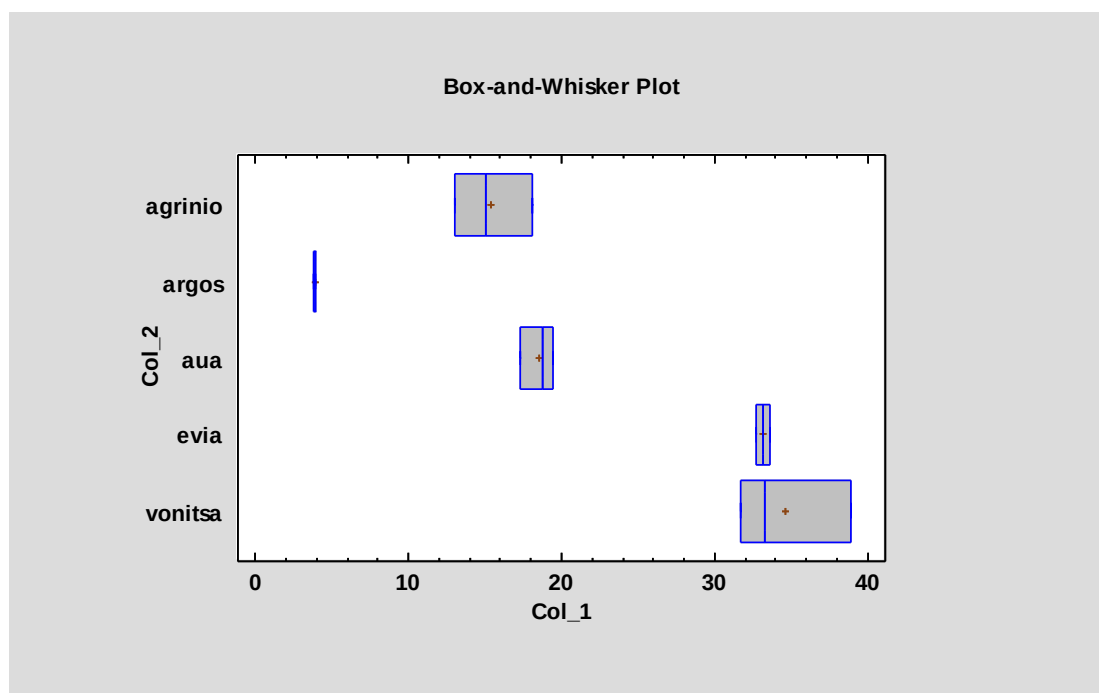


Σχήμα Ε.2. Περιεκτικότητα 3MIC σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello, Marathon, Parthenon*.

Στο σχήμα Ε.2 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MITC που προσδιορίστηκαν στις ρίζες του φυτικού υλικού μπρόκολου από τις περιοχές του ΓΠΑ, της Βόνιτσας, του Αγρινίου, του Άργους και της Ευβοίας. Η υψηλότερη συγκέντρωση σε 3MIC παρατηρείται στη ρίζα από τη Βόνιτσα χωρίς ωστόσο να διαφέρει σημαντικά από αυτό στη ρίζα από τη περιοχή της Ευβοίας. Επίσης, τη δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση διαθέτει η ρίζα από το ΓΠΑ και το Αγρίνιο χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, ενώ τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε 3MITC διαθέτει η ρίζα από το Άργος. Σημαντικό είναι να πούμε ότι η συγκεκριμένη ένωση ανιχνεύθηκε μόνο στη ρίζα και όχι σε άλλα μέρη τόσο του φυτικού υλικού μπρόκολου (άνθος, βλαστός, φύλλα) όσο και στα λαχ. Βρυξελλών και στο λάχανο σαβόι.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (mg/L)	Μέγιστο (mg/L)	Εύρος
Ρίζα ΓΠΑ	3	18,4983	1,0721	5,79565%	17,3175	19,4107	2,09319
Ρίζα Βόνιτσα	3	34,6369	3,74081	10,8001%	31,7548	38,8643	7,10954
Ρίζα Αγρίνιο	3	15,3876	2,51689	16,3565%	13,0509	18,0525	5,0016
Ρίζα Άργος	3	3,86315	0,0808936	2,09398%	3,78186	3,94364	0,161781
Ρίζα Εύβοια	2	33,1485	0,657283	1,98284%	32,6838	33,6133	0,929539
Συνολικά	14	20,2468	12,0346	59,4396%	3,78186	38,8643	35,0825

Πίνακας 5. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για την ισοθειοκυανική ένωση 3MIC.



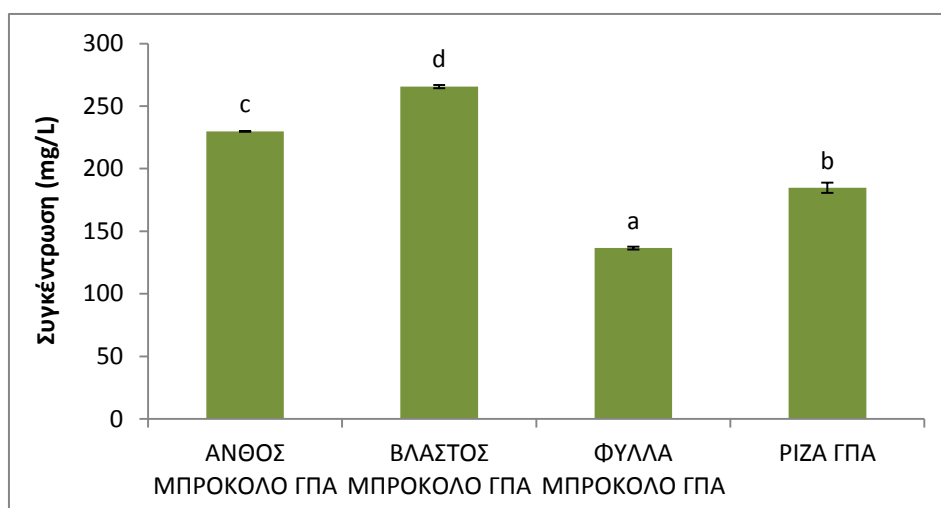
Σχήμα Ε.3. Θηκογράμματα της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στον πίνακα 5 για κάθε δείγμα παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή που παρατηρείται στα δείγματα. Η μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρουσιάζεται στη ρίζα από την περιοχή του Αγρινίου σε ποσοστό 16,35 % και στη ρίζα από τη Βόνιτσα σε ποσοστό 10,80 %. Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα ριζών, ο συντελεστής μεταβλητότητας είναι μικρότερος του 10 % γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα δείγματα είναι ομοιογενή, δηλαδή παρουσιάζουν μικρή μεταβλητότητα. Από το σχήμα Ε.3, όπου απεικονίζονται τα θηκογράμματα της ισοθειοκυανικής ένωσης 5MITC φαίνεται ότι οι ρίζες από το Αγρίνιο και τη Βόνιτσα εμφανίζουν τόσο μεγάλη μεταβλητότητα όσο και θετική ασυμμετρία, δηλαδή οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι λιγότερες από το 50 %.

2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

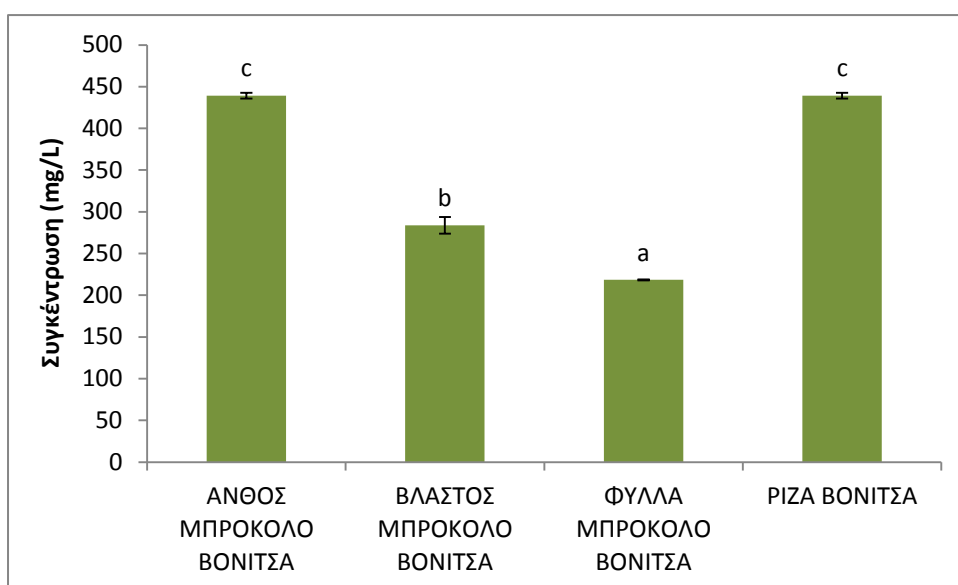
Οι ενώσεις που αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία ήταν : η σουλφοραφάνη (SFN), η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN).

2.2.1 ΣΟΥΛΦΟΡΑΦΑΝΗ (SFN)



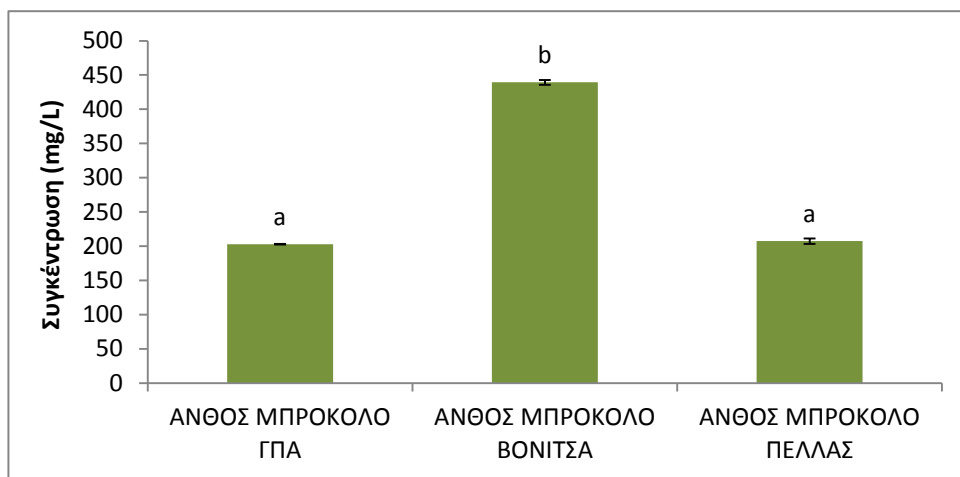
ΣΧΗΜΑ Z.3. Περιεκτικότητα SFN στο μπρόκολο ποικιλία *Monrello*.

Στο σχήμα Z.3 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της SFN που προσδιορίστηκαν στο άνθος, στον βλαστό και στη ρίζα του φυτικού υλικού μπρόκολου βιολογικής καλλιέργειας που παραχωρήθηκε από το εργαστήριο λαχανοκομίας. Από το ίδιο φυτό απομονώθηκε η προνύμφη του εντόμου /. Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα της SFN στα διάφορα τμήματα του ίδιου φυτού παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση σε SFN έχει ο βλαστός και ακολουθούν οι συγκεντρώσεις στο άνθος, στη ρίζα και τα φύλλα με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Το δείγμα προνύμφη από το έντομο *Pieris rapae* δεν απεικονίζεται διότι η συγκεκριμένη ισοθειοκυανική ένωση ήταν μικρότερη του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης (< LOD).



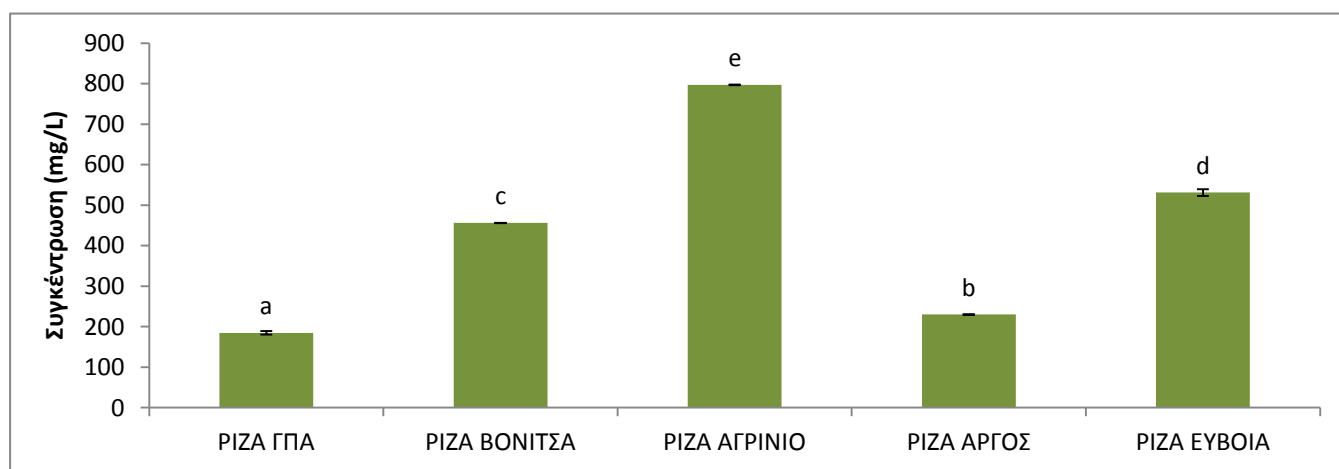
ΣΧΗΜΑ Z.4. Περιεκτικότητα SFN στο μπρόκολο ποικιλία *Marathon*.

Στο σχήμα Z.4 δίνονται οι συγκεντρώσεις της SFN που βρέθηκαν στο άνθος, βλαστό και ρίζα από το μπρόκολο της περιοχής Βόνιτσα. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση σε SFN έχει το άνθος και η ρίζα του μπρόκολου από την περιοχή της Βόνιτσας χωρίς να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5% και ακολουθούν ο βλαστός και τα φύλλα.



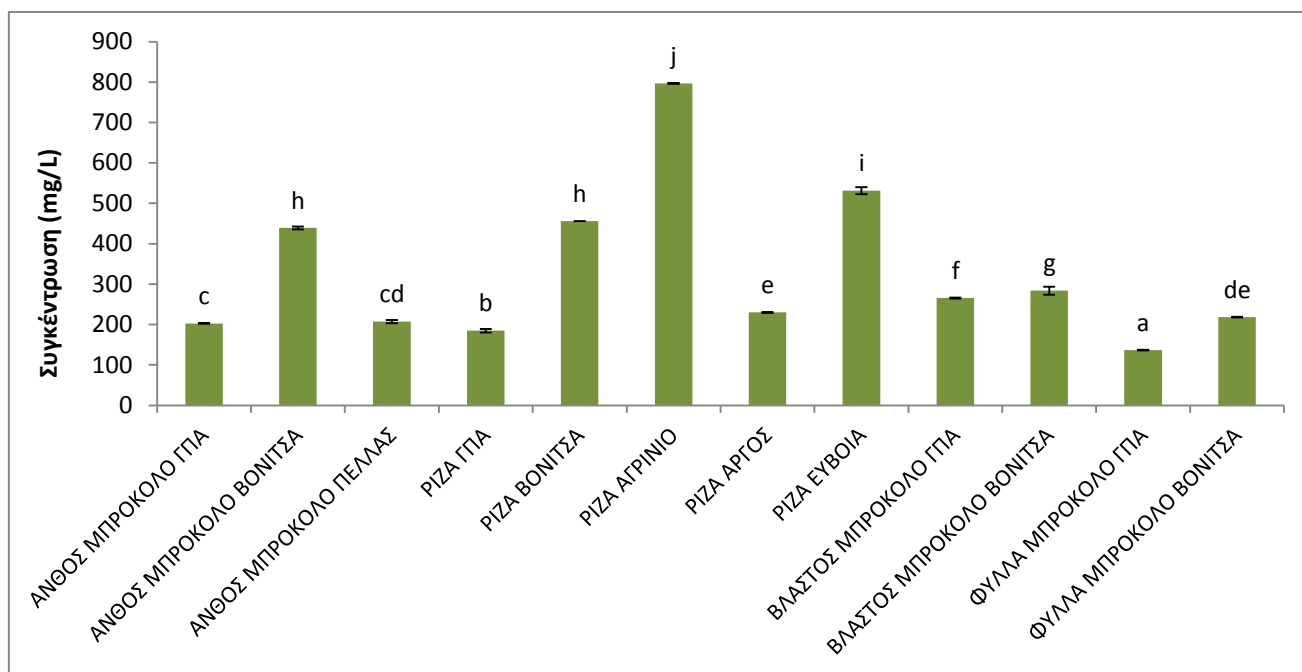
Σχήμα Z.5. Περιεκτικότητα SFN στο άνθος μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello, Marathon, Parthenon*.

Στο σχήμα Z.5 φαίνονται συγκριτικά οι συγκεντρώσεις της ισοθειοκυανικής ένωσης SFN που προσδιορίστηκαν στο άνθος από το φυτικό υλικό μπρόκολου από την περιοχή του ΓΠΑ, της Βόνιτσας και της Πέλλας. Η υψηλότερη συγκέντρωση σε SFN παρατηρείται στο άνθος από την περιοχή της Βόνιτσας. Ακολουθούν το άνθος από την περιοχή της Πέλλας και του ΓΠΑ χωρίς ωστόσο να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.



Σχήμα Z.6. Περιεκτικότητα SFN σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello, Marathon, Parthenon*.

Στο σχήμα Z.6 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της ισοθειοκυανικής ένωσης SFN που προσδιορίστηκαν στις ρίζες του φυτικού υλικού μπρόκολου από τις περιοχές του ΓΠΑ, Βόνιτσας, Αγρινίου, Αργούς και Ευβοίας. Η υψηλότερη συγκέντρωση σε SFN προσδιορίστηκε στη ρίζα από το Αγρίνιο και ακολουθούν οι συγκεντρώσεις στη ρίζα από την περιοχή της Εύβοιας, της Βόνιτσας, του Άργους και τέλος του ΓΠΑ οι οποίες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.



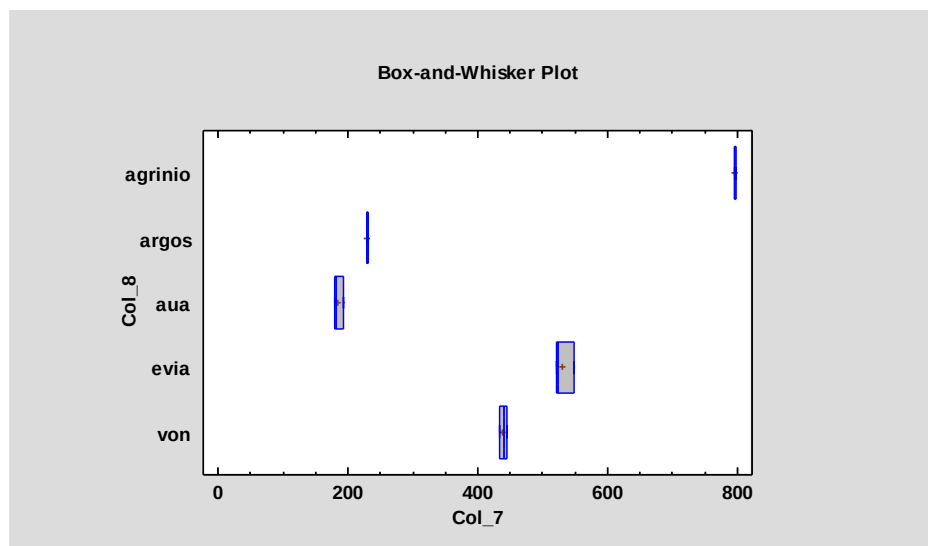
Σχήμα Z.7. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των δειγμάτων περιεκτικότητας SFN.

Από το συγκεντρωτικό γράφημα Z.7 παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε SFN παρατηρείται στις ρίζες και ειδικότερα στη ρίζα από το Αγρίνιο ενώ ακολουθούν η ρίζα από την Εύβοια, η ρίζα από την περιοχή της Βόνιτσας χωρίς ωστόσο να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το άνθος από την περιοχή της Βόνιτσας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλα τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (mg/L)	Μέγιστο (mg/L)	Εύρος
Άνθος μπρόκολο ΓΠΑ	3	202.742	0.551014	0.271781%	202.246	203.335	1.08896
Άνθος μπρόκολο Βόνιτσα	3	439.248	6.03226	1.37332%	432.94	444.961	12.0206
Άνθος μπρόκολο Πέλλας	3	207.245	6.5258	3.14883%	199.714	211.219	11.5055

Ρίζα ΓΠΑ	3	184.707	7.0571	3.82069%	179.03	192.609	13.5783
Ρίζα Βόνιτσα	3	439.248	6.03226	1.37332%	432.94	444.961	12.0206
Ρίζα Αγρίνιο	3	796.902	1.20702	0.151464%	795.677	798.09	2.41316
Ρίζα Αργος	3	229.844	0.64613	0.281117%	229.107	230.312	1.20567
Ρίζα Εύβοια	3	531.176	14.582	2.74523%	520.925	547.869	26.9445
Βλαστός ΓΠΑ	3	265.637	2.30579	0.868022%	262.975	267.008	4.03255
Βλαστός Βόνιτσα	3	283.85	17.4413	6.14455%	263.743	294.889	31.1465
Φύλλα μπρόκολο ΓΠΑ	3	136.604	1.89021	1.38371%	134.556	138.282	3.72552
Φύλλα μπρόκολο Βόνιτσα	3	218.406	1.00343	0.459435%	217.794	219.564	1.76977
Συνολικά	36	327.967	185.461	56.5486%	134.556	798.09	663.534

Πίνακας 6. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για την ισοθειοκυανική ένωση SFN.

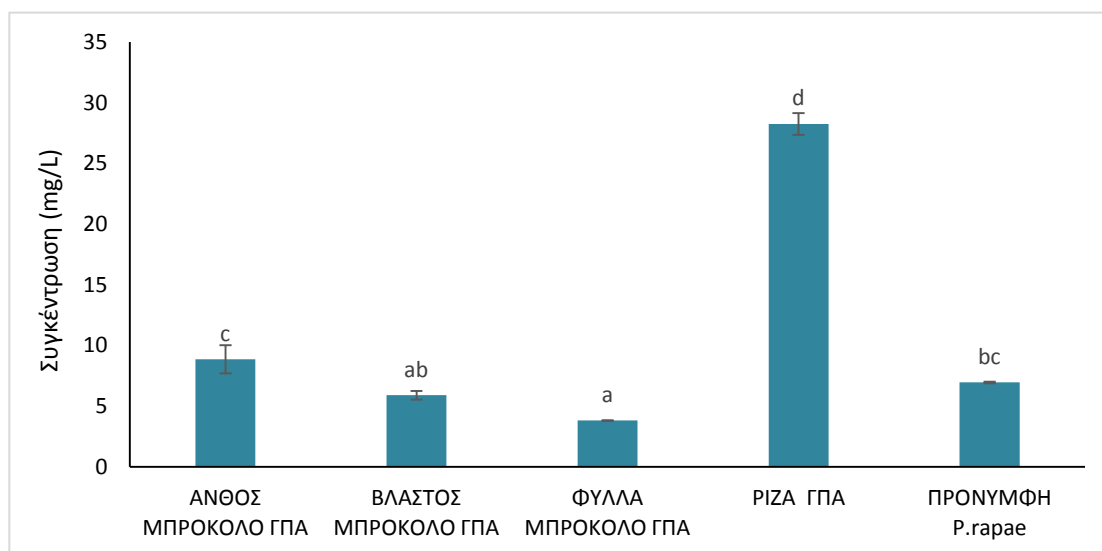


Σχήμα Ζ.8. Θηκογράμματα της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης SFN σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στον πίνακα 6, για κάθε δείγμα δίνεται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης SFN, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, αυτό το οποίο παρατηρούμε από τον πίνακα 6 είναι ότι ο συντελεστής μεταβλητότητας των δειγμάτων είναι μικρότερος του 10% γεγονός το οποίο μας δείχνει ότι τα δείγματα είναι ομοιογενή, δηλαδή παρουσιάζουν μικρή μεταβλητότητα. Στο Σχήμα Ζ.7 απεικονίζονται τα θηκογράμματα της ισοθειοκυανικής ένωσης SFN από όπου φαίνεται ότι

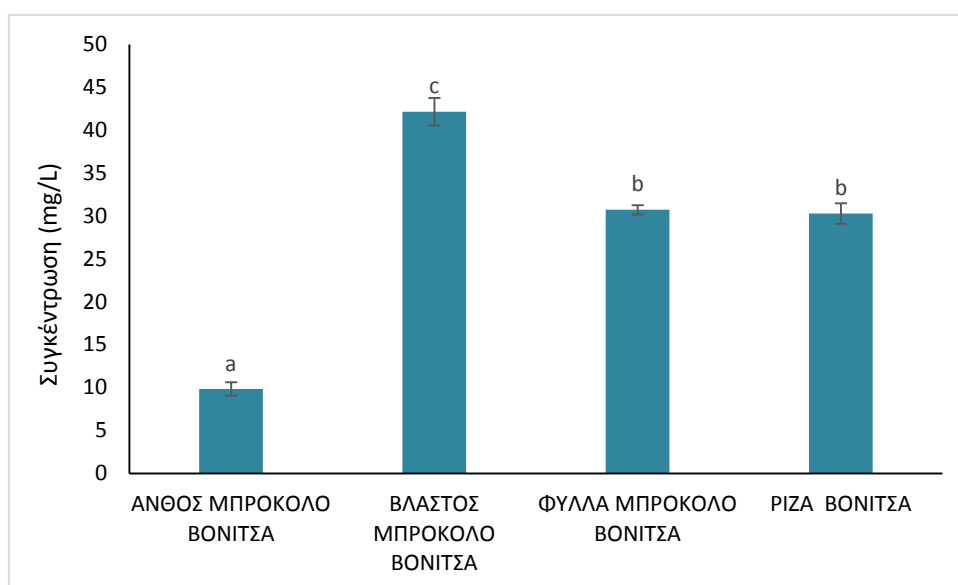
μόνο οι ρίζες από την περιοχή του ΓΠΑ και της Εύβοιας εμφανίζουν ελάχιστη μεταβλητότητα, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα είναι μηδαμινή.

2.2.2 ΙΝΔΟΛΟ-3-ΚΑΡΒΙΝΟΛΗ (I3C)



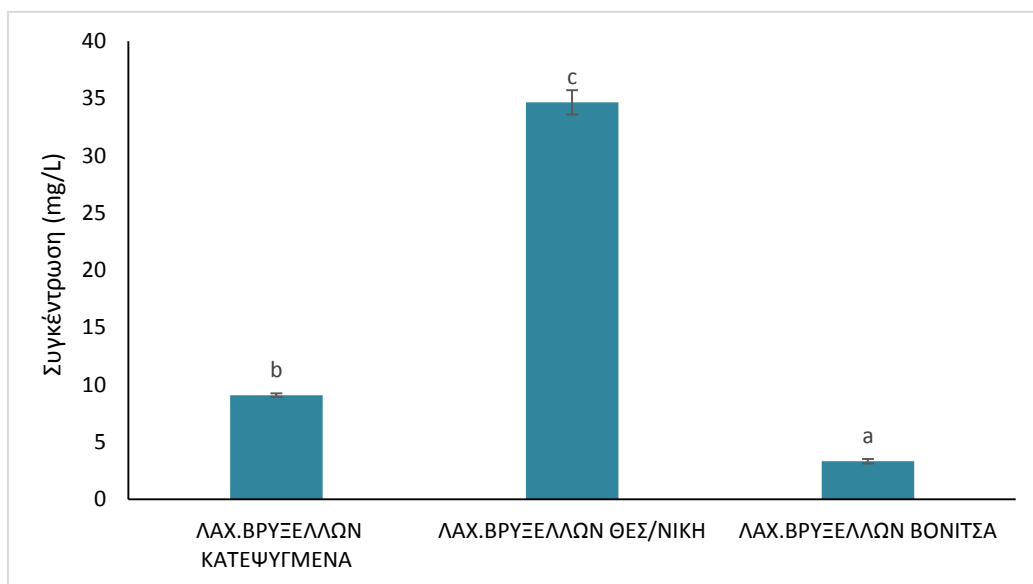
Σχήμα Η.3. Περιεκτικότητα I3C στο μπρόκολο ποικιλία *Monrello*.

Στο σχήμα Η.3 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της I3C που προσδιορίστηκαν στο άνθος, στον βλαστό και στη ρίζα του φυτικού υλικού μπρόκολου που παραχωρήθηκε από το εργαστήριο λαχανοκομίας βιολογικής καλλιέργειας καθώς και στην προνύμφη του εντόμου *Pieris rapae*. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε I3C βρέθηκε στη ρίζα ΓΠΑ η οποία διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθεί η περιεκτικότητα στο άνθος, στον βλαστό, στη προνύμφη του *P.rapae* και τέλος στα φύλλα.



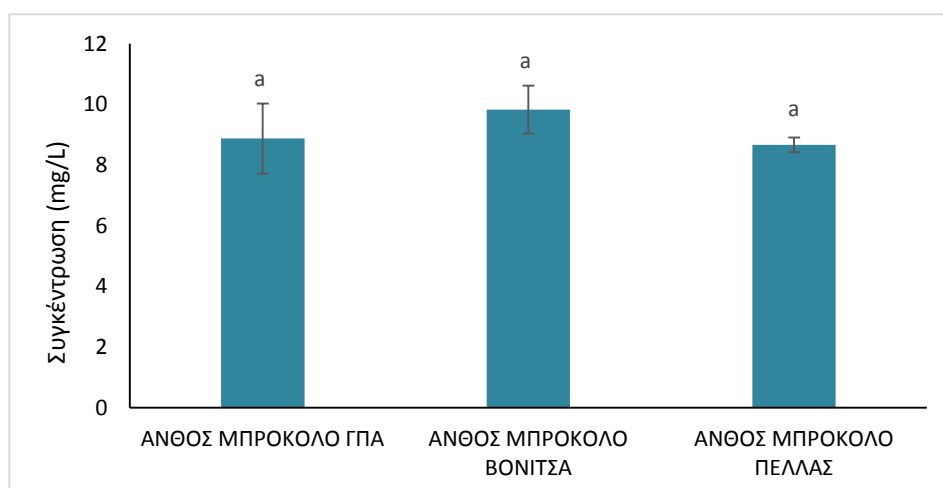
Σχήμα Η.4. Περιεκτικότητα I3C στο μπρόκολο ποικιλία *Marathon*.

Στο σχήμα Η.4 δίνονται οι συγκεντρώσεις της I3C που βρέθηκαν στο άνθος, βλαστό και ρίζα από το μπρόκολο της περιοχής Βόνιτσα. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε I3C περιέχεται στον βλαστό από το μπρόκολο της περιοχής της Βόνιτσας και ακολουθεί στα φύλλα και στη ρίζα που δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση περιέχεται στο άνθος.



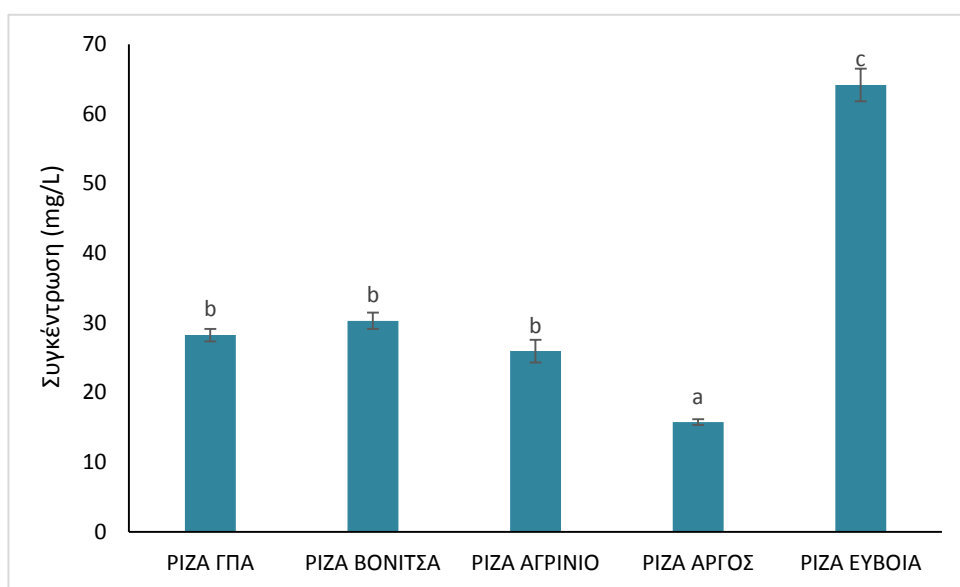
Σχήμα Η.5. Περιεκτικότητα I3C στα λαχ. Βρυξελλών.

Στο σχήμα Η.5 δίνονται οι συγκεντρώσεις του I3C που βρέθηκαν στα λαχ. Βρυξελλών από τις περιοχές της Θεσ/νίκης και της Βόνιτσας καθώς και στα κατεψυγμένα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή του Βελγίου. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε I3C προσδιορίστηκε στα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Θεσ/νίκης, ενώ ακολουθούν στα κατεψυγμένα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή του Βελγίου και η χαμηλότερη στα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Βόνιτσας. Όλα τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Ωστόσο τα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Ολλανδίας και το λάχανο σαβόι δεν απεικονίζονται στο γράφημα διότι ήταν οι περιεκτικότητές τους ήταν μικρότερες του ορίου ανίχνευσης (< LOD).



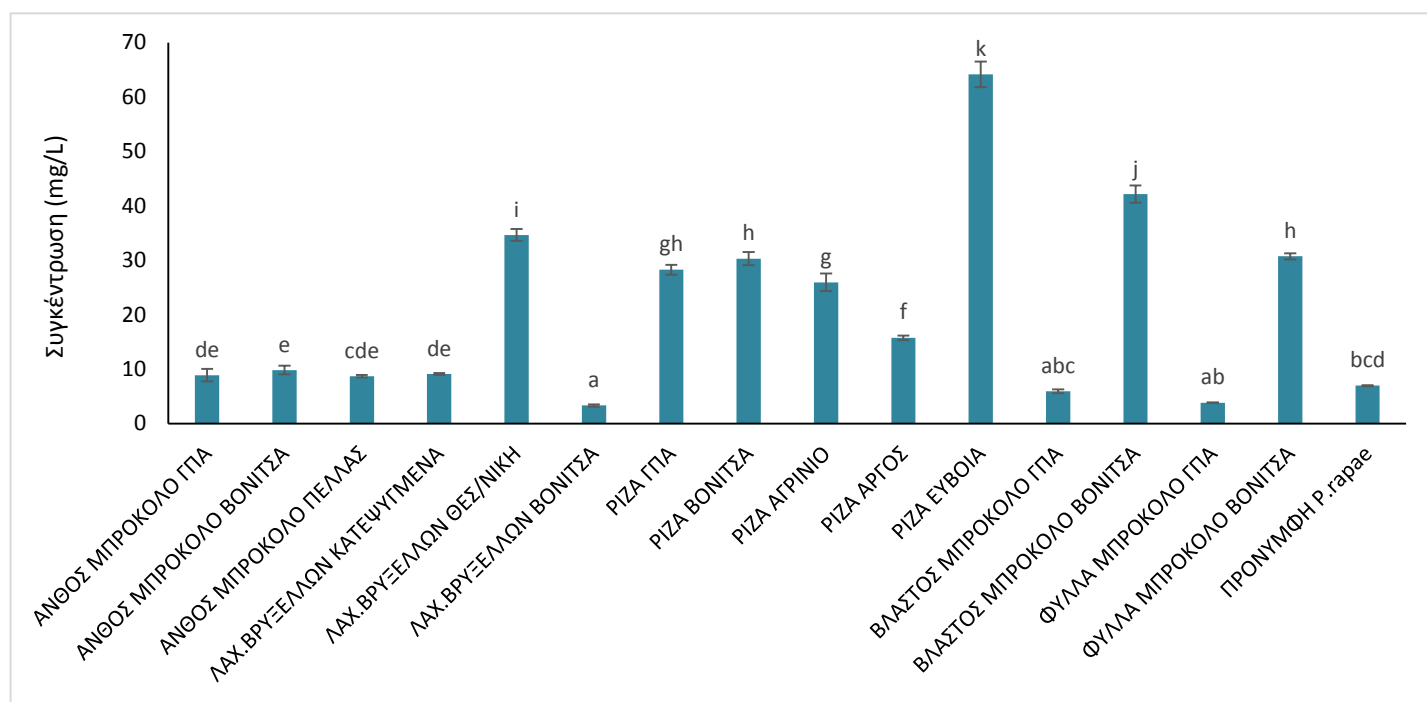
Σχήμα Η.6. Περιεκτικότητα I3C στο άνθος μπρόκολου στις ποικιλίες Monrello, Marathon, Parthenon.

Στο σχήμα Η.6 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της I3C που προσδιορίστηκαν στο άνθος από το φυτικό υλικό μπρόκολου από την περιοχή του ΓΠΑ, της Βόνιτσας και της Πέλλας. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη περιεκτικότητα σε I3C έχει το άνθος από την περιοχή της Βόνιτσας, ακολουθεί το άνθος από την περιοχή της Πέλλας και τέλος το άνθος από την περιοχή του ΓΠΑ χωρίς ωστόσο να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.



Σχήμα Η.7. Περιεκτικότητα I3C σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στο σχήμα Η.7 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της I3C που προσδιορίστηκαν στις ρίζες του φυτικού υλικού μπρόκολου από τις περιοχές του ΓΠΑ, Βόνιτσας, Αγρινίου, Αργούς και Εύβοιας. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη περιεκτικότητα σε I3C έχει η ρίζα από την περιοχή της Εύβοιας ενώ ακολουθεί η ρίζα από την περιοχή της Βόνιτσας, του ΓΠΑ και τέλος του Αγρινίου χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Ωστόσο η χαμηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στη ρίζα από την περιοχή του Αργούς.



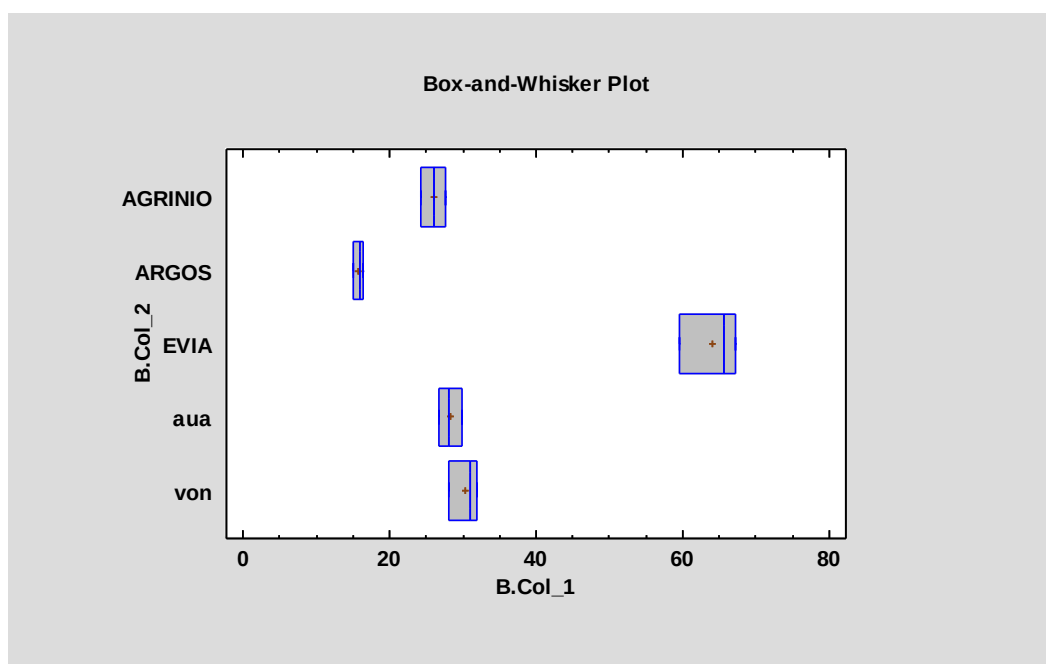
Σχήμα Η.8. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των δειγμάτων περιεκτικότητας I3C.

Από το συγκεντρωτικό γράφημα Η.8 προκύπτει ότι την υψηλότερη περιεκτικότητα σε I3C έχει η ρίζα από την περιοχή της Εύβοιας, ακολουθεί ο βλαστός από το μπρόκολο της περιοχής Βόνιτσα, τα λαχ. Βρυξελλών Θεσ/νίκης, τα φύλλα από το μπρόκολο της περιοχής Βόνιτσα, η ρίζα από την περιοχή της Βόνιτσας, η ρίζα από το ΓΠΑ, το Αγρίνιο και τέλος το Άργος. Ωστόσο στα υπόλοιπα δείγματα βλέπουμε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις χωρίς να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (mg/L)	Μέγιστο (mg/L)	Εύρος
Άνθος μπρόκολο ΓΠΑ	3	8.86785	2.00077	22.562%	7.00471	10.9825	3.97776
Άνθος μπρόκολο Βόνιτσα	3	9.82169	1.36724	13.9206%	8.24458	10.6726	2.42805
Άνθος μπρόκολο Πέλλας	3	8.6594	0.42042	4.85507%	8.39362	9.14411	0.750487
Λαχ. Βρυξελλών κατεψυγμένα	3	9.09188	0.274288	3.01684%	8.78042	9.2974	0.516976
Λαχ. Βρυξελλών Θεσ/νίκη	3	34.652	1.85829	5.36274%	33.0342	36.6817	3.64745
Λαχ.Βρυξελλων	3	3.31833	0.342192	10.3122%	3.00658	3.68445	0.677876

Βόνιτσα							
Ρίζα ΓΠΑ	3	28.2443	1.55902	5.51977%	26.7929	29.8923	3.0994
Ρίζα Βόνιτσα	3	30.2931	2.05959	6.79889%	27.9742	31.9096	3.93544
Ρίζα Αγρίνιο	2	25.9384	2.29488	8.84742%	24.3157	27.5611	3.24545
Ρίζα Άργος	3	15.732	0.706943	4.49366%	14.9582	16.3441	1.38587
Ρίζα Εύβοια	3	64.155	4.04047	6.29799%	59.5969	67.2964	7.69948
Βλαστός μπρόκολο ΓΠΑ	3	5.90035	0.627878	10.6414%	5.18461	6.35832	1.17371
Βλαστός μπρόκολο Βόνιτσα	3	42.1597	2.77142	6.57362%	39.8381	45.228	5.38984
Φύλλα μπρόκολο ΓΠΑ	2	3.82051	0.0132772	0.347525%	3.81112	3.8299	0.0187768
Φύλλα μπρόκολο Βόνιτσα	3	30.7163	0.954001	3.10584%	30.0015	31.7996	1.79807
Προνύμφη P.arae	3	6.95565	0.131333	1.88814%	6.86477	7.10622	0.241456
Συνολικά	46	20.7657	16.9384	81.5693%	3.00658	67.2964	64.2899

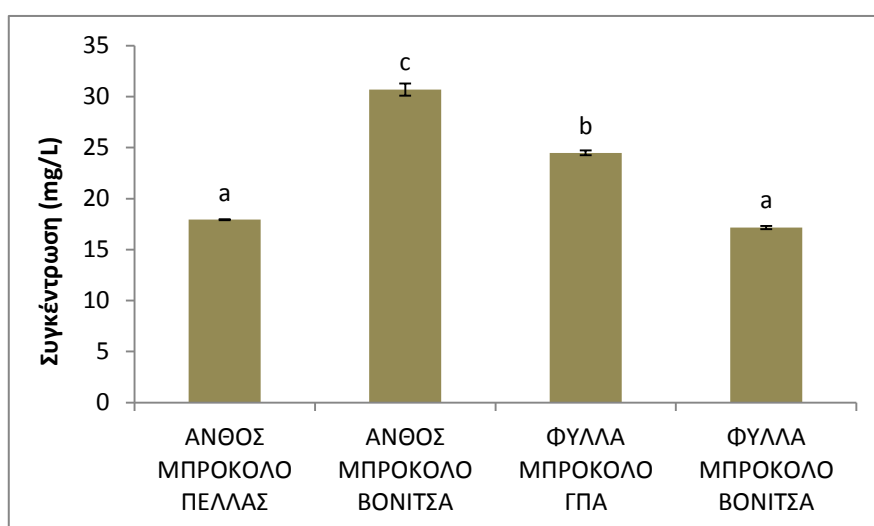
Πίνακας 7. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για την ισοθειοκυανική ένωση I3C.



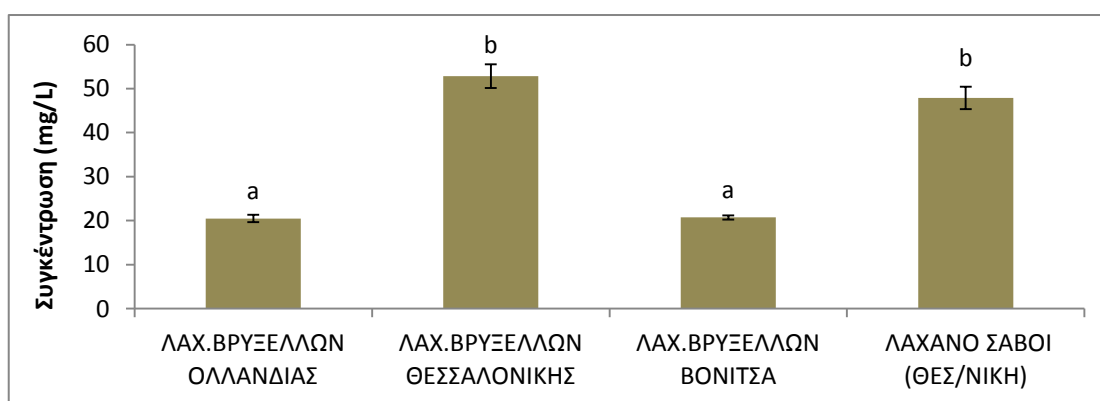
Σχήμα Η.9. Θηκογράμματα της συγκέντρωσης της ένωσης I3C σε ρίζες μπρόκολου στις ποικιλίες *Monrello*, *Marathon*, *Parthenon*.

Στον πίνακα 7 για κάθε δείγμα παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης IEC, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή των δειγμάτων. Παρατηρούμε ότι ο συντελεστής μεταβλητότητας των περισσότερων δειγμάτων είναι μικρότερος του 10%, γεγονός το οποίο μας δείχνει ότι τα δείγματα είναι ομοιογενή, δηλαδή παρουσιάζουν μικρή μεταβλητότητα. Στο σχήμα Η.9, όπου απεικονίζονται τα θηκογράμματα της ισοθειοκυανικής ένωσης I3C, φαίνεται ότι μόνο οι ρίζες από την περιοχή της Βόνιτσας και της Εύβοιας εμφανίζουν ελάχιστη μεταβλητότητα και αρνητική ασυμμετρία, δηλαδή οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι περισσότερες από το 50 %, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα η μεταβλητότητα είναι μηδαμινή.

2.2.3 ΙΝΔΟΛΟ-3-ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ (I3CN)



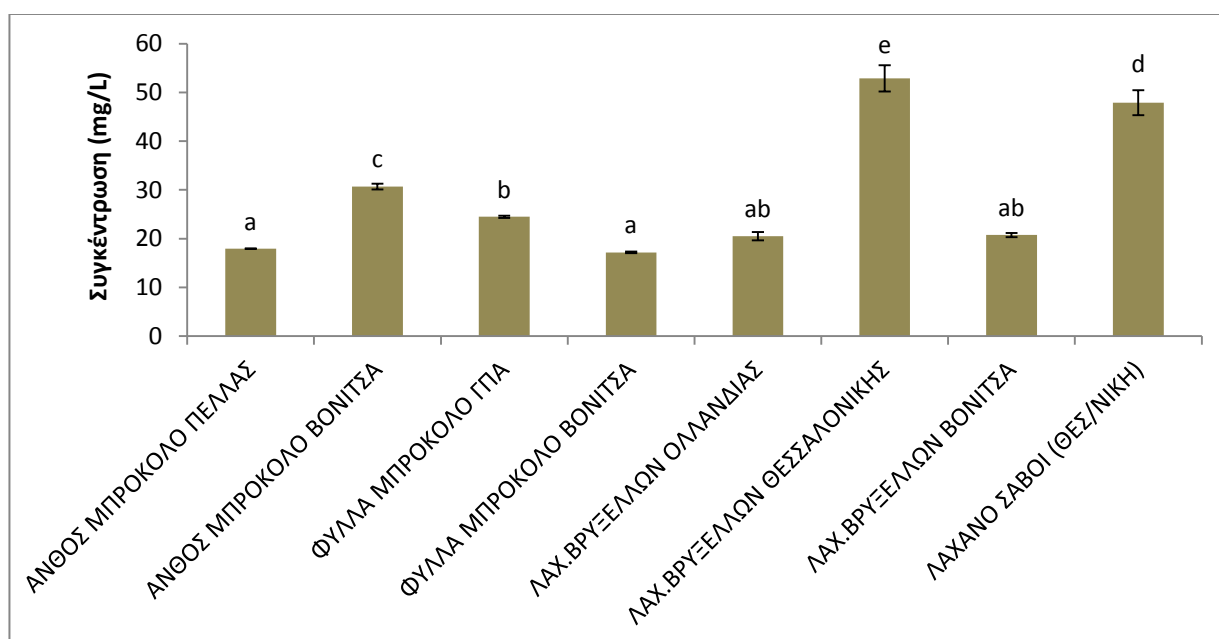
Σχήμα Θ.3. Περιεκτικότητα I3CN στο άνθος και στα φύλλα στο μπρόκολο ποικιλία *Parthenon, Marathon, Monrello*.



Σχήμα Θ.4. Περιεκτικότητα I3CN στα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβοί.

Ελέχθηκαν για την παρουσία του I3CN, το άνθος από την περιοχή της Πέλλας, το άνθος από την περιοχή της Βόνιτσας και τα φύλλα από την περιοχή του ΓΠΑ και της Βόνιτσας. Από το σχήμα Θ.3 παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση σε I3CN έχει το άνθος από το μπρόκολο Βόνιτσα, ακολουθούν τα φύλλα από το μπρόκολο του ΓΠΑ. Τη μικρότερη συγκέντρωση έχει το άνθος από την περιοχή της Πέλλας και τα φύλλα από την περιοχή της Βόνιτσας, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διάφορα μεταξύ των δυο αυτών δειγμάτων στη συγκέντρωση σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Αξίζει να τονισθεί ότι στις ρίζες καθώς και στο βλαστό από το μπρόκολο βιολογικής καλλιέργειας από την περιοχή του ΓΠΑ το συγκεκριμένο νιτρίλιο I3CN δεν παρατηρήθηκε, ενώ στο άνθος από το μπρόκολο της περιοχής του ΓΠΑ και στο βλαστό από το μπρόκολο από την περιοχή της Βόνιτσας η συγκέντρωση του I3CN ήταν μικρότερη του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης ($< LOD$) και δεν απεικονίζεται στο γράφημα.

Στο σχήμα Θ.4 δίνονται οι συγκεντρώσεις του I3CN που βρέθηκαν στα λαχ. Βρυξελλών από τις περιοχές της Ολλανδίας, Θεσ/νίκης και Βόνιτσας. Επίσης εξετάστηκε και το λάχανο σαβόι από την περιοχή της Θεσ/νίκης. Από το σχήμα Θ.4 παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση σε I3CN έχουν τα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Θεσ/νίκης και το λάχανο σαβόι χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Έπειτα ακολουθούν τα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Βόνιτσας και της Ολλανδίας χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Ωστόσο, τα κατεψυγμένα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή του Βελγίου δεν μπορούν να απεικονιστούν στο γράφημα διότι η συγκέντρωση τους ήταν μικρότερη του ορίου ανίχνευσης ($< LOD$).

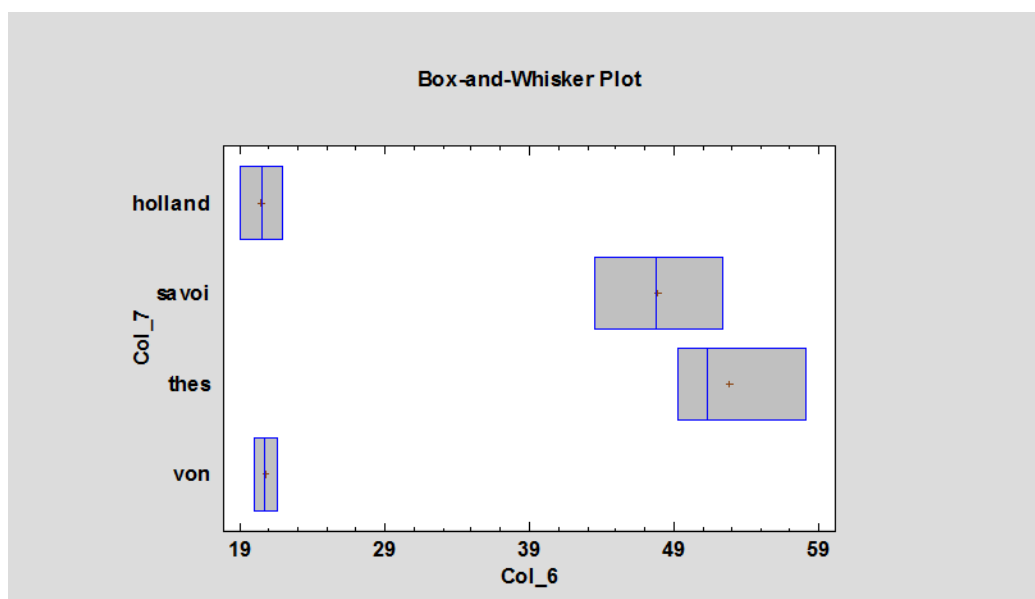


Σχήμα Θ.5. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των δειγμάτων περιεκτικότητας I3CN.

Από το συγκεντρωτικό γράφημα Θ.5 παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση σε I3CN έχουν τα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Θεσ/νίκης και το λάχανο σαβόι. Ακολουθούν το άνθος από το μπρόκολο της περιοχής της Βόνιτσας και τα φύλλα από το μπρόκολο της περιοχής του ΓΠΑ. Τα υπόλοιπα δείγματα έχουν μικρότερη συγκέντρωση και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (mg/L)	Μέγιστο (mg/L)	Εύρος
Άνθος μπρόκολο ΓΠΑ	3	30,6892	1,03665	3,37791%	29,7693	31,8125	2,04319
Άνθος μπρόκολο Πέλλας	3	17,9356	0,0725407	0,404451%	17,8538	17,992	0,138269
Λαχ. Βρυξελλών Ολλανδία	3	20,4909	1,44012	7,02811%	19,0022	21,877	2,87476
Λαχ. Βρυξελλών Θεσ/νίκη	3	52,8623	4,65731	8,81027%	49,1998	58,1038	8,90404
Λαχ. Βρυξελλών Βόνιτσα	3	20,7322	0,782125	3,77251%	20,0005	21,5565	1,55601
Λάχανο σαβόι	3	47,8945	4,42468	9,23839%	43,5102	52,3585	8,84829
Φύλλα μπρόκολο ΓΠΑ	3	24,4869	0,389192	1,58939%	24,1005	24,8788	0,778326
Φύλλα μπρόκολο Βόνιτσα	3	17,1636	0,268286	1,56311%	16,854	17,327	0,473072
Συνολικά	24	29,0319	13,4314	46,2642%	16,854	58,1038	41,2499

Πίνακας 8. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για το νιτρίλιο I3CN.



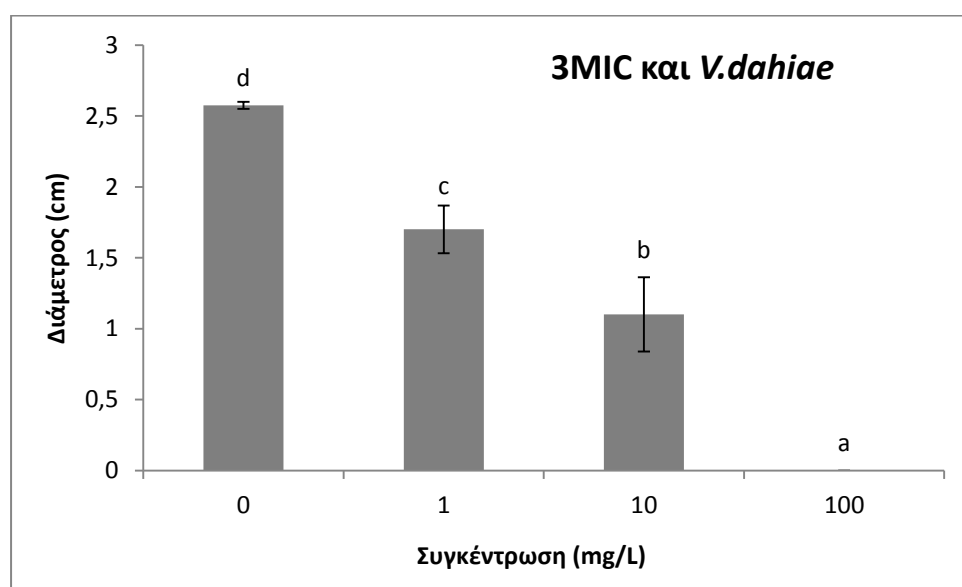
Σχήμα Θ.6. Θηκογράμματα της συγκέντρωσης του νιτρίλιου I3CN ανά ποικιλία στα λαχ.Βρυξελλών και λάχανο σαβόι.

Στον πίνακα 8 για κάθε δείγμα παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του νιτριλίου I3CN, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή των δειγμάτων. Ο συντελεστής μεταβλητότητας όλων των δειγμάτων είναι μικρότερος του 10 %, γεγονός το οποίο μας δείχνει ότι τα δείγματα είναι ομοιογενή δηλαδή παρουσιάζουν μικρή μεταβλητότητα. Από το σχήμα Θ.6 όπου απεικονίζονται τα θηκογράμματα της συγκέντρωσης του νιτριλίου I3CN στα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβόι φαίνεται ότι μόνο το λάχανο σαβόι και τα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Θεσ/νίκης εμφανίζουν κάποια μεταβλητότητα. Στο λάχανο σαβόι παρουσιάζεται συμμετρία (ο μέσος και η διάμεσος συμπίπτουν), ενώ τα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Θεσ/νίκης εμφανίζουν θετική ασυμμετρία, δηλαδή οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι λιγότερες από το 50 %, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα η μεταβλητότητα είναι μηδαμινή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

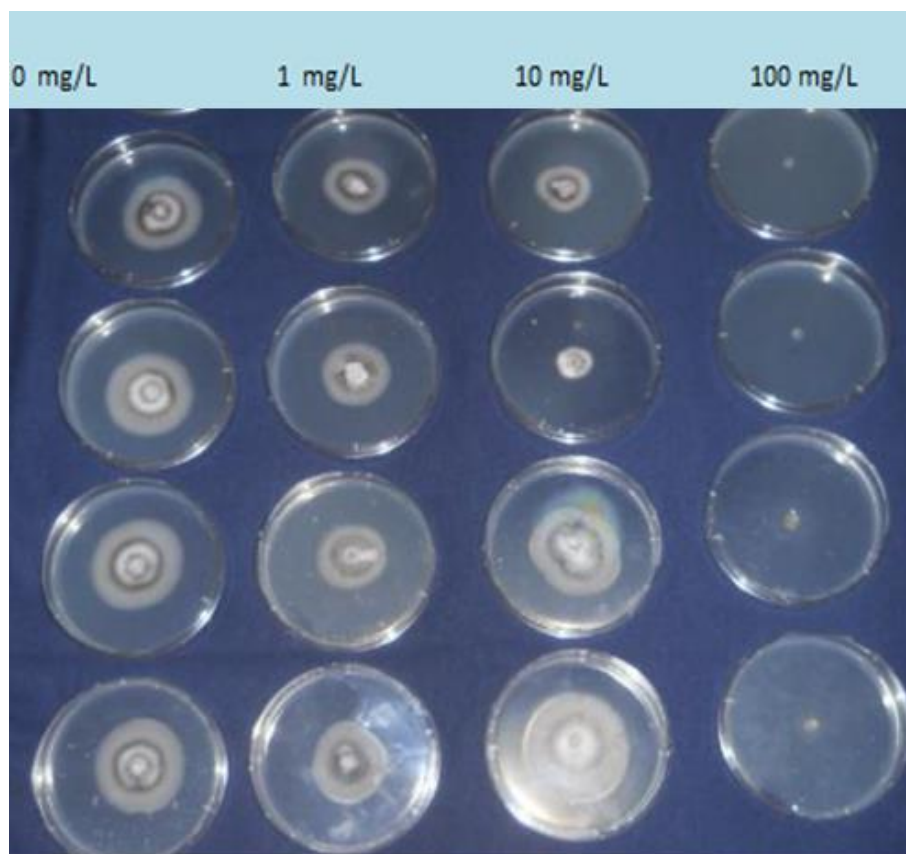
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ *IN VITRO* ΤΗΣ ΙΣΟΘΕΙΟΚΥΑΝΙΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 3MIC ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *V.DAHLIAE* ΚΑΙ *B.CINEREA*

Μελετήθηκε η ανασταλτική δράση της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *V.dahliae* και *B.cinerea*. Για αυτό το σκοπό επιστρώθηκαν τρυβλία με συγκεντρώσεις 0, 1, 10 και 100 mg/L της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC και μελετήθηκε η ανασταλτική δράση της ένωσης μία εβδομάδα μετά την ανάπτυξη των μυκήτων.



Σχήμα I.1. Αντιμικροβιακή δράση της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC έναντι του μύκητα *V.dahliae*.

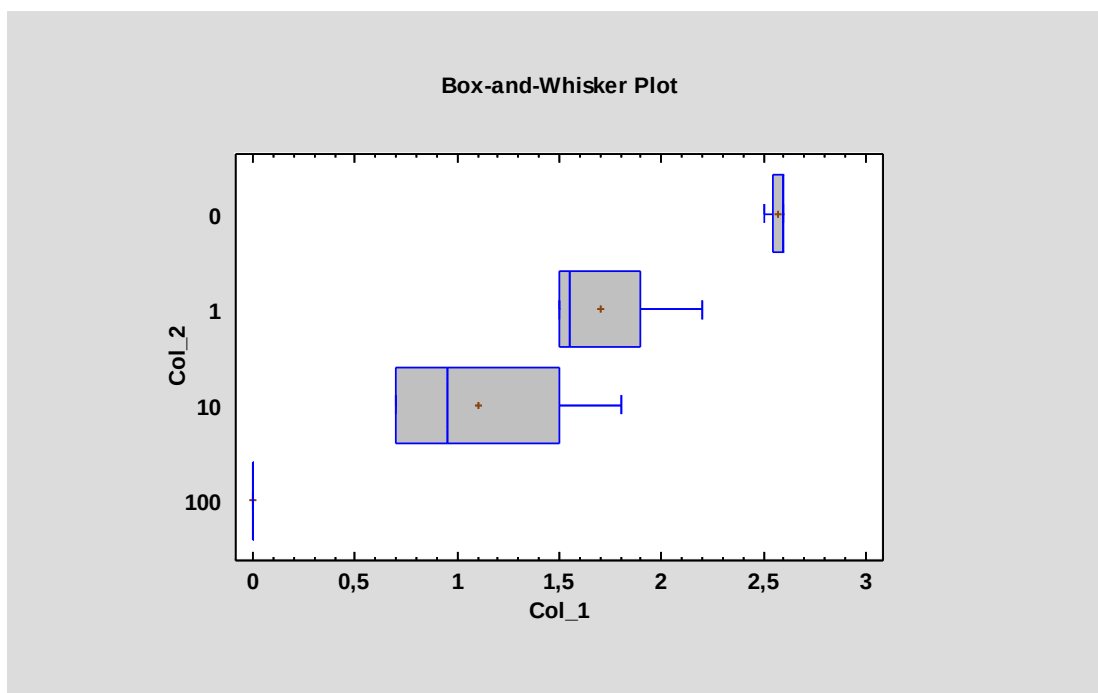
Στο σχήμα I.1 δίνεται η παρατηρούμενη ανάπτυξη του μύκητα στις συγκεντρώσεις 0, 1, 10 και 100 mg/L της 3MIC οι οποίες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Πιο συγκεκριμένα, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της ισοθειοκυανικής ένωσης αυξάνεται ανάλογα και η ανασταλτική δραστηριότητα του μύκητα *V.dahliae*, με την μέγιστη δράση να παρατηρείται στα 100 mg/L. Επίσης, η σημαντική διαφορά που παρατηρείται ανάμεσα στις συγκεντρώσεις 0, 1, 10 mg/L και 100 mg/L απεικονίζεται και στο σχήμα I.2.



Σχήμα 1.2. Ανάπτυξη του μύκητα *V.dahliae* μια εβδομάδα μετά το στρώσιμο των τρυβλίων με την ισοθειοκυανική ένωση 3MIC.

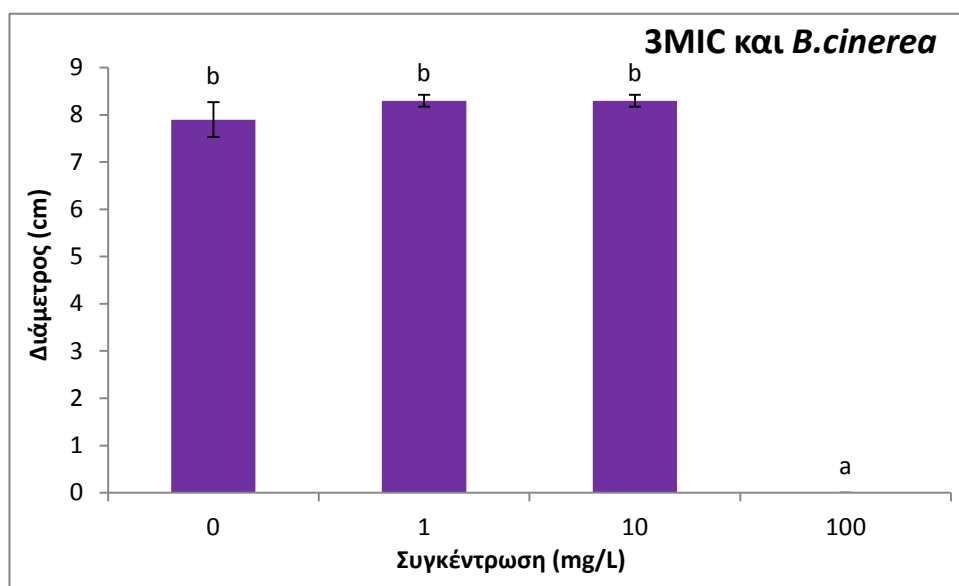
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (mg/L)	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (cm)	Μέγιστο (cm)	Εύρος
0	4	2,575	0,05	1,94175%	2,5	2,6	0,1
1	4	1,7	0,33665	19,803%	1,5	2,2	0,7
10	4	1,1	0,522813	47,5284%	0,7	1,8	1,1
100	4	0	0	%	0	0	0
Συνολικά	16	1,34375	1,00662	74,9115%	0	2,6	2,6

Πίνακας 9. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για την αντιμικροβιακή δράση της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC έναντι του μύκητα *V.dahliae*.



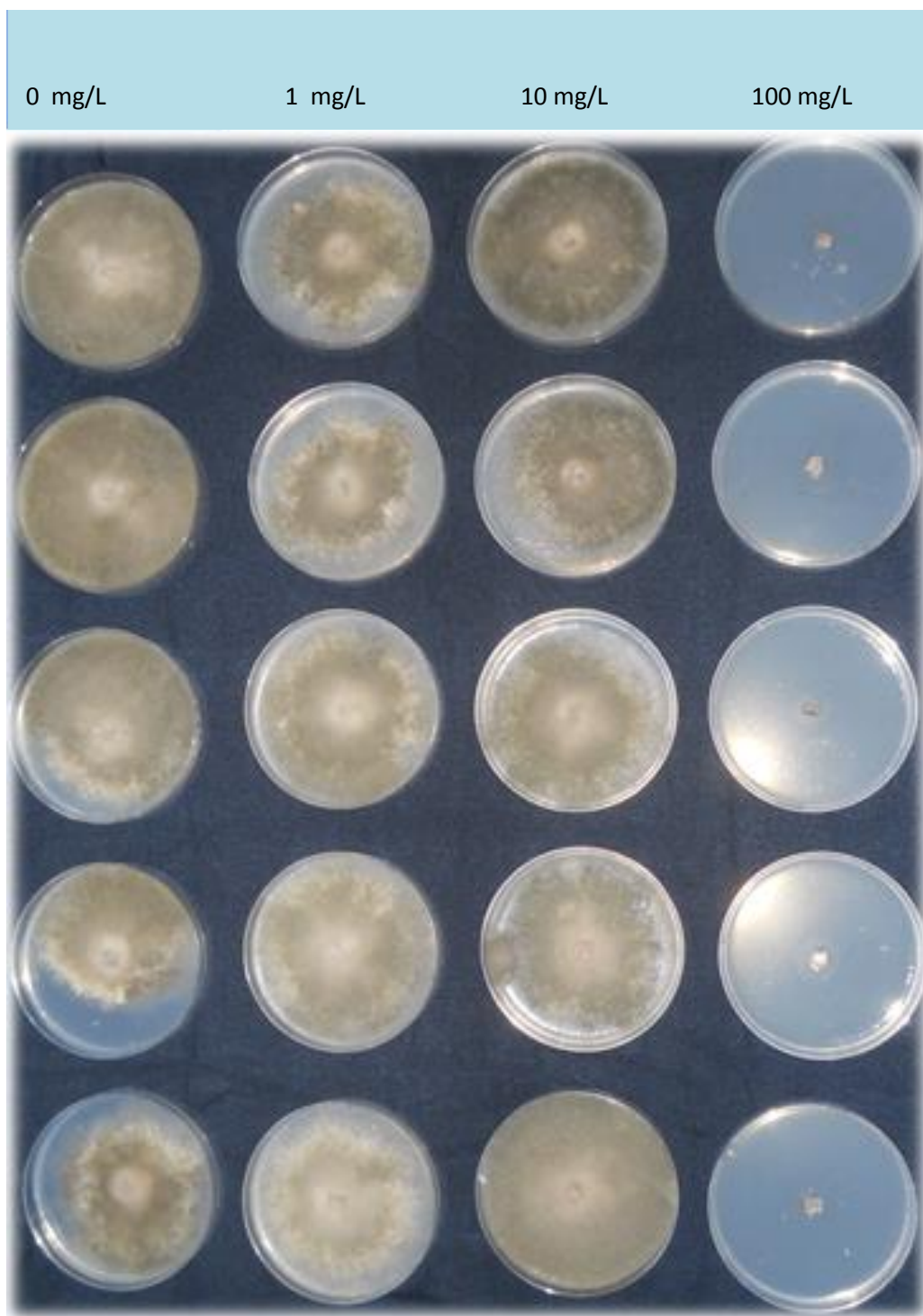
Σχήμα I.3.Θηκογράμματα ανά διαφορετική συγκέντρωση της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC έναντι του μύκητα *V.dahliae*.

Στον πίνακα 9 για κάθε διαφορετική συγκέντρωση παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης I3C έναντι του *V.dahliae*, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή των δειγμάτων. Ο συντελεστής μεταβλητότητας για τη συγκέντρωση 10 mg/L είναι αρκετά υψηλός της τάξης του 47,52 % και για τη συγκέντρωση 1 mg/L της τάξης του 19,80 %, γεγονός που μας δείχνει ότι υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα. Στο σχήμα I.3 όπου απεικονίζονται τα θηκογράμματα ανά διαφορετική συγκέντρωση της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC έναντι του *V.dahliae* βλέπουμε ότι εμφανίζουν θετική ασυμμετρία, δηλαδή οι τιμές που είναι πάνω από το μέσο όρο είναι λιγότερες από το 50 % ενώ στις συγκεντρώσεις 0 και 100 mg/L η μεταβλητότητα είναι μηδαμινή. Επίσης παρατηρείται και η εμφάνιση ακραίων τιμών στις συγκεντρώσεις 0, 1, και 10 mg/L.



Σχήμα Ι.4. Αντιμικροβιακή δράση της ισοθειουανικής ένωσης 3MIC έναντι του μύκητα *B.cinerea*.

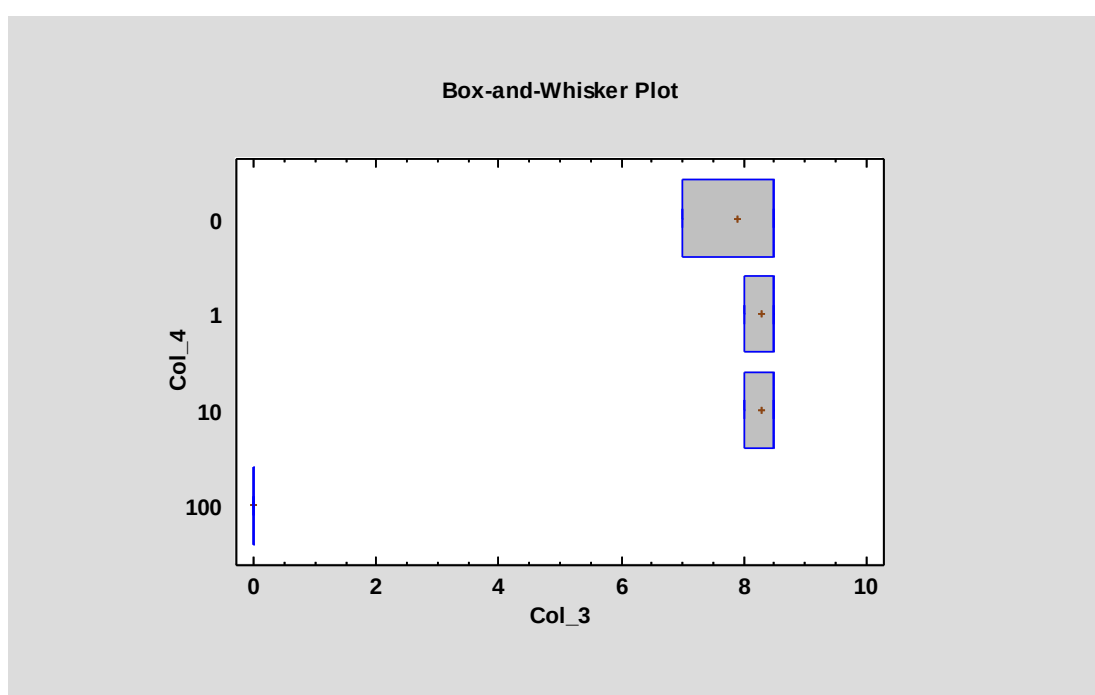
Από το σχήμα Ι.4, όπου παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μύκητα *B.cinerea* έναντι της 3MIC, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ανάμεσα στις συγκεντρώσεις 0, 1 και 10 mg/L. Ειδικότερα παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της ισοθειουανικής ένωσης η ανάπτυξη του μύκητα είναι σταθερή, ενώ η στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται στην συγκέντρωση 100 mg/L όπου δεν αναπτύσσεται ο μύκητας *B.cinerea*. Επίσης, η σημαντική διαφορά που παρατηρείται ανάμεσα στις συγκεντρώσεις 0, 1, 10 mg/L και 100 mg/L απεικονίζεται και στο σχήμα Ι.5.



Σχήμα 1.5. Ανάπτυξη του μύκητα *B.cinerea* μια εβδομάδα μετά το στρώσιμο των τρυβλίων με την ισοθειοκυανική ένωση 3MIC.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ Σ (mg/L)	Μετρήσεις	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση (SD)	Συντελεστής μεταβλητότητας (CV)	Ελάχιστο (cm)	Μέγιστο (cm)	Εύρος
0	5	7,9	0,821584	10,3998%	7,0	8,5	1,5
1	5	8,3	0,273861	3,29953%	8,0	8,5	0,5
10	5	8,3	0,273861	3,29953%	8,0	8,5	0,5
100	5	0	0	%	0	0	0
Συνολικά	20	6,125	3,65584	59,6871%	0	8,5	8,5

Πίνακας 10. Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για την αντιμικροβιακή δράση της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC έναντι του μύκητα *B.cinerea*.



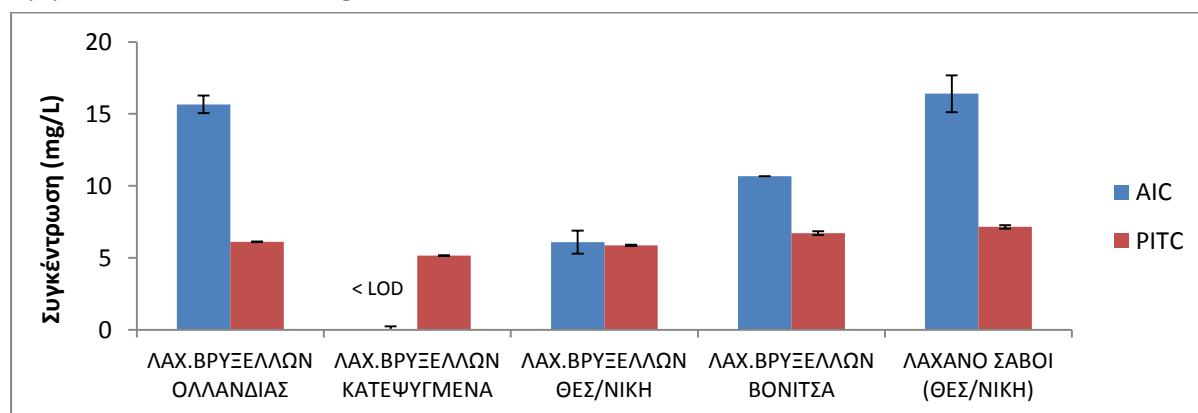
Σχήμα I.6.Θηκογράμματα ανά διαφορετική συγκέντρωση της ισοθειοκυανικής ένωσης 3MIC έναντι του μύκητα *B.cinerea*.

Στον πίνακα 10 για κάθε διαφορετική συγκέντρωση παρουσιάζονται ο αριθμός των μετρήσεων, ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισοθειοκυανικής ένωσης I3C έναντι του *B.cinerea*, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας, αλλά και το εύρος των τιμών μαζί με την ελάχιστη και μέγιστη τιμή των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, αυτό το οποίο παρατηρείται τόσο από τον πίνακα 10 όσο και από το σχήμα I.6 όπου απεικονίζονται τα θηκογράμματα είναι ότι ο συντελεστής μεταβλητότητας σε όλες τις συγκεντρώσεις είναι μικρότερος του 10 %, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει μικρή μεταβλητότητα στα δείγματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

4.1 ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΚΑΙ ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ

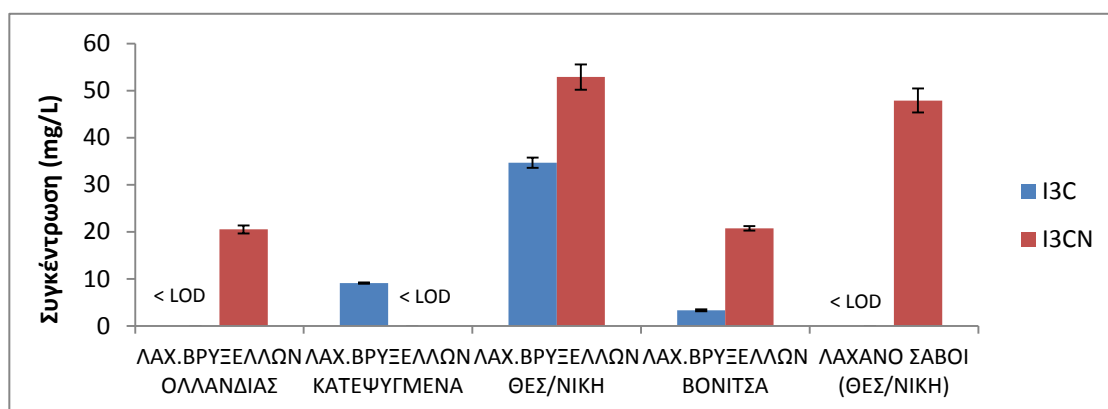
4.1.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



Σχήμα Α.1. Περιεκτικότητα στα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβόι στις ισοθειοκυανικές ενώσεις AIC και PITC που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία

Στο σχήμα Α.1 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ισοθειοκυανικών ενώσεων AIC και PITC που υπολογίστηκαν με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με MS. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση στις ισοθειοκυανικές ενώσεις έχει το λάχανο σαβόι τόσο σε περιεκτικότητα AIC όσο και σε PITC, ενώ ακολουθούν τα λαχ. Βρυξελλών από την περιοχή της Ολλανδίας. Στα κατεψυγμένα λαχανάκια η περιεκτικότητα σε AIC ήταν μικρότερη του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης (< LOD) και δεν απεικονίζεται στο γράφημα. Οι υπόλοιπες ενώσεις όπως είναι η ιμπερβερίνη (3MIC), ερουκίνη (ER), νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN) δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα.

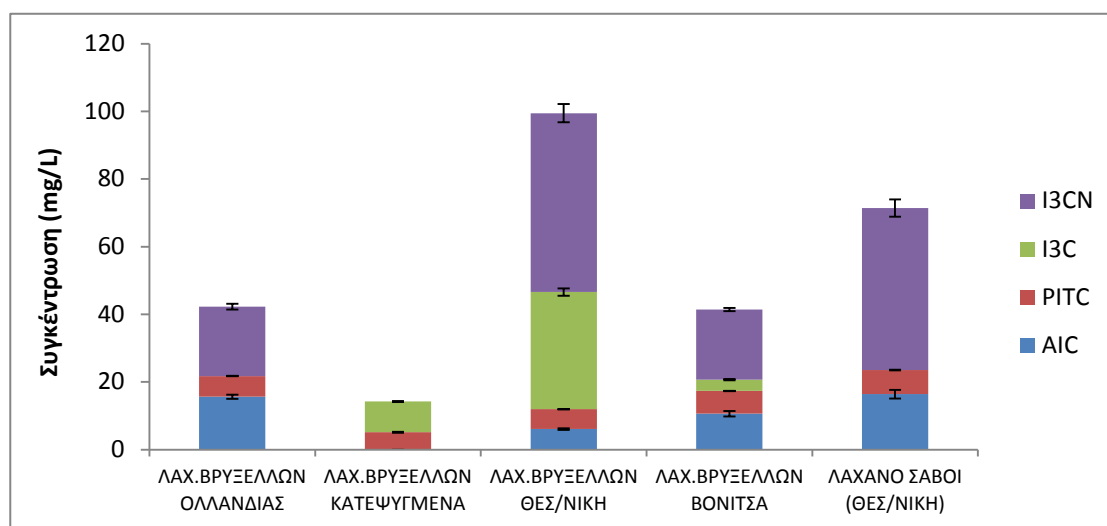
4.1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



Σχήμα Α.2. Περιεκτικότητα στα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβόι στις ισοθειοκυανικές ενώσεις I3C και I3CN που αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία.

Στο σχήμα Α.2 απεικονίζονται μόνο οι ινδολο ενώσεις I3C και I3CN που αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία. Παρατηρούμε ότι οι ενώσεις αυτές περιέχονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα λαχ. Βρυξελλών Θεσ/νίκης. Στα κατεψυγμένα λαχ. Βρυξελλών η περιεκτικότητα σε I3CN ήταν μικρότερη του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης (< LOD) και δεν απεικονίζεται στο γράφημα. Στο λάχανο σαβόι και λαχ. Βρυξελλών Ολλανδίας η περιεκτικότητα σε I3C ήταν μικρότερη του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης (< LOD). Η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN) ήταν μικρότερη του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης σε όλα τα δείγματα (< LOD) και δεν απεικονίζεται στο γράφημα.

4.1.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΑ ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΚΑΙ ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ

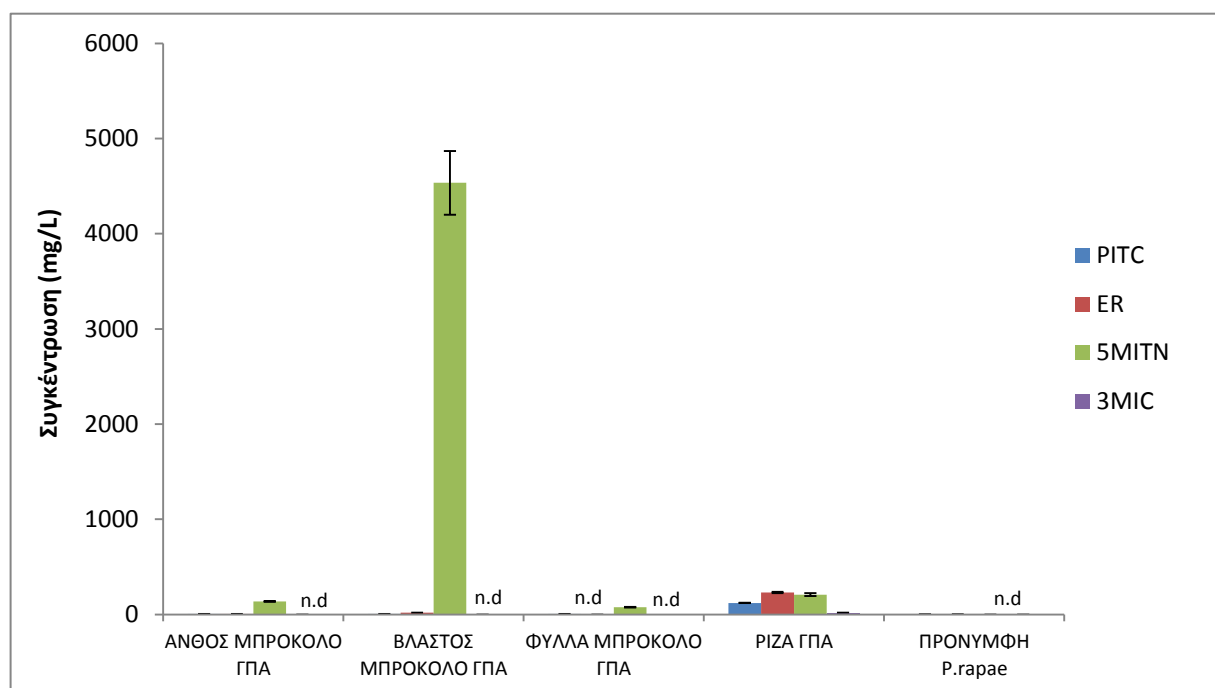


Σχήμα Α.3. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβόι.

Συγκεντρωτικά με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι τέσσερις ενώσεις ταυτοποιήθηκαν: αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC), φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Από το σχήμα Α.3 παρατηρούμε ότι το νιτρίλιο I3CN έχει την υψηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα, ακολουθεί το αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC), η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και τέλος με τη μικρότερη συγκέντρωση απαντάται το φαιναίθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC).

4.2 ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ (ΓΠΑ)

4.2.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



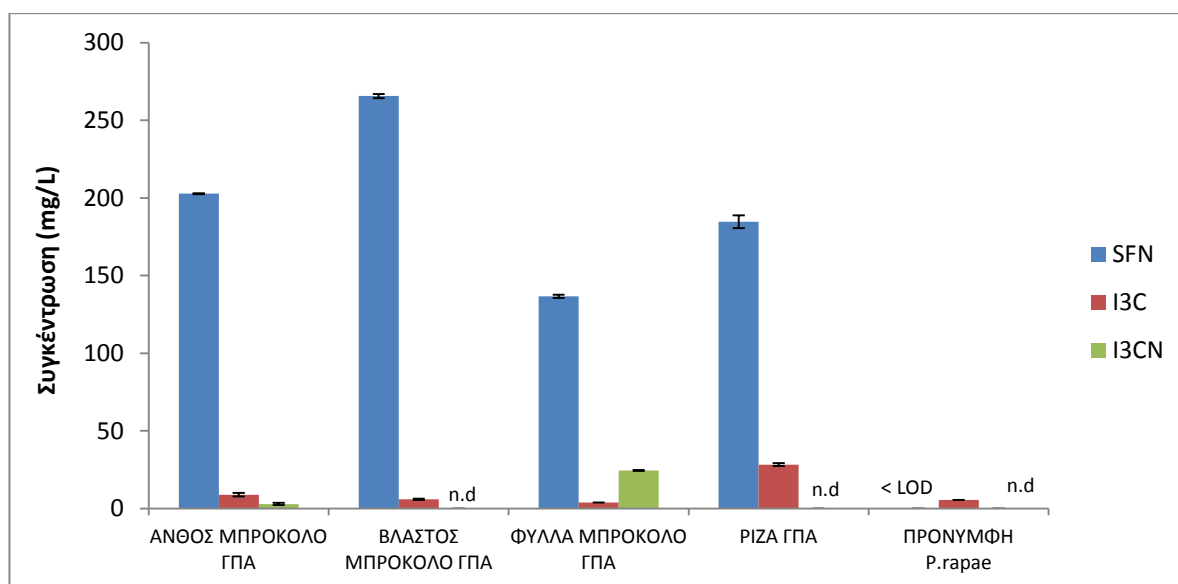
Σχήμα Β.1. Περιεκτικότητα στο μπρόκολο από την περιοχή του ΓΠΑ στις ενώσεις (PITC, ER, 5MITN, 3MIC) που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία.

Στο σχήμα Β.1 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων PITC, ER, 5MITN και 3MIC που υπολογίστηκαν με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με MS. Παρατηρούμε ότι η ρίζα έχει την υψηλότερη συγκέντρωση σε όλες τις ενώσεις. Ωστόσο, ο βλαστός είχε σε πολύ υψηλή συγκέντρωση μόνο το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN). Η συγκεκριμένη ένωση παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα, αλλά σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Στην προνύμφη του εντόμου *P.rapae* που βρισκόταν στον βλαστό δεν ανιχνεύθηκε το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN). Η ισοθειοκυανική ένωση ιμπερβερίνη (3MIC) ανιχνεύθηκε μόνο στη ρίζα, ενώ η ερουκίνη (ER) δεν ανιχνεύτηκε στα φύλλα.

4.2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

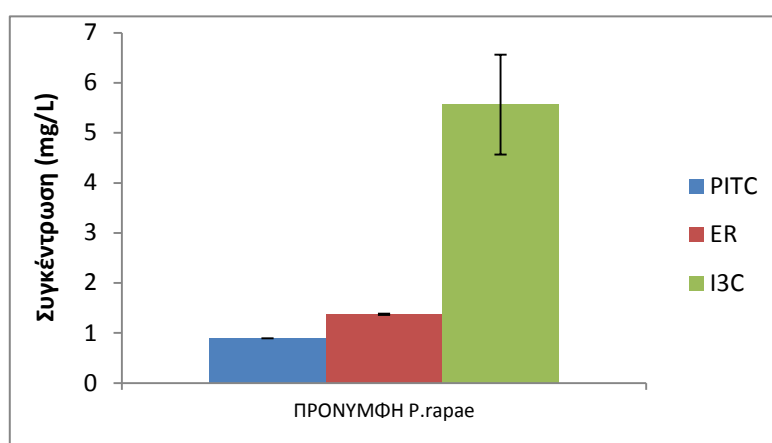
Στο σχήμα Β.2 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων SFN, I3C και I3CN που υπολογίστηκαν με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με MS. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα έχει η σουλφοραφάνη (SFN). Πιο συγκεκριμένα από το φυτικό υλικό του μπρόκολου, ο βλαστός έχει την υψηλότερη συγκέντρωση και ακολουθεί το άνθος, η

ρίζα και τα φύλλα. Η προνύμφη του εντόμου *P.rapae* περιείχε επίσης την ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN) σε μικρότερη του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης συγκέντρωση (< LOD). Επίσης, στο σχήμα B.2 παρατηρούμε ότι η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) έχει την δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση ειδικότερα στη ρίζα. Ωστόσο το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) δεν ανιχνεύτηκε στο βλαστό, στη ρίζα και στη προνύμφη του *P.rapae*



Σχήμα B.2. Περιεκτικότητα στο μπρόκολο από την περιοχή του ΓΠΑ στις ενώσεις (SFN, I3C, I3CN) που αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία.

4.2.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΝΥΜΦΗ *P.RAPAE*



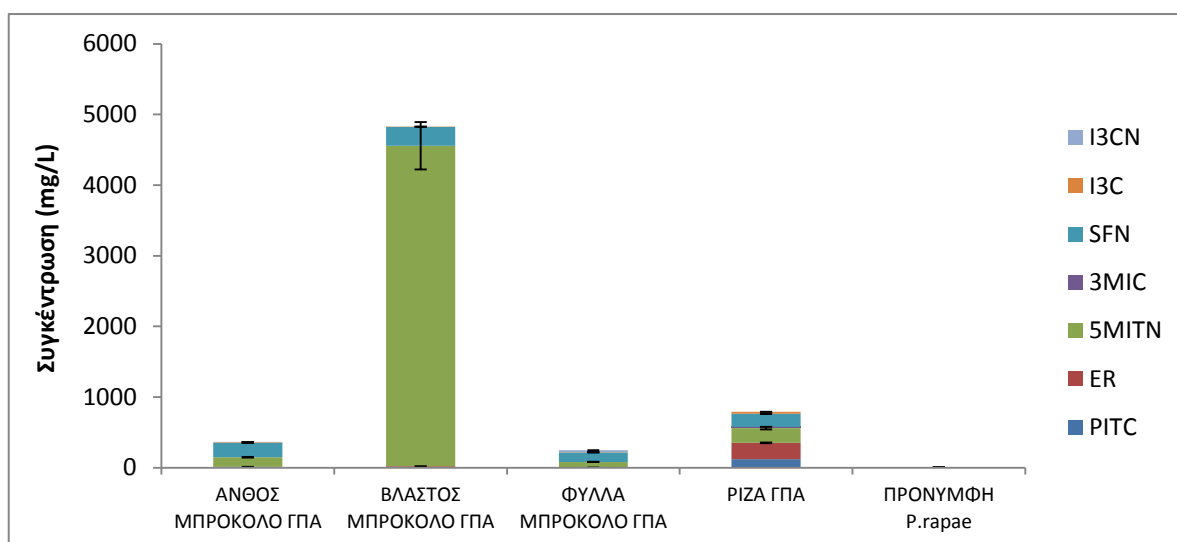
Σχήμα B.3. Περιεκτικότητα σε ισοθειοκυανικές ενώσεις (PITC, ER, I3C) στην προνύμφη *P.rapae*.

Στο σχήμα B.3 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων PITC, ER και I3C που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας συνδυασμένων με MS.

Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση στην προνύμφη *P.rapae* έχει η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C), ακολουθεί η ισοθειοκυανική ένωση ερουκίνη (ER) και τέλος το φαιναιυλο-ισοθειοκυανικό (PITC). Επίσης, παρατηρήθηκε και η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN), αλλά σε μικρότερη του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης συγκέντρωση ($< LOD$) και δεν απεικονίστηκε στο γράφημα. Οι υπόλοιπες ενώσεις όπως το AIC, 3MIC και τα νιτρίλια I3CN, 5MITN δεν ανιχνεύτηκαν.

4.2.4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΟ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΓΠΑ

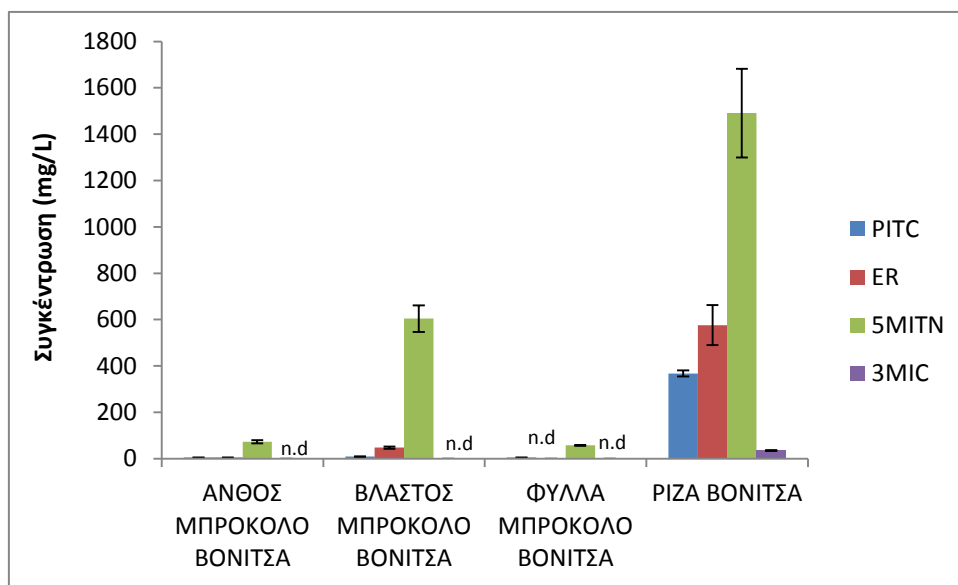
Συγκεντρωτικά με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι ενώσεις : ερουκίνη (ER), φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ιμπερβερίνη (3MIC), σουλφοραφάνη (SFN), ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Στο σχήμα B.4 παρατηρούμε ότι το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) στο βλαστό έχει την υψηλότερη συγκέντρωση, ακολουθούν η ρίζα, το άνθος, τα φύλλα και τέλος η προνύμφη του *P.rapae*.



Σχήμα B.4. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στο μπρόκολο από την περιοχή του ΓΠΑ.

4.3 ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΒΟΝΙΤΣΑΣ

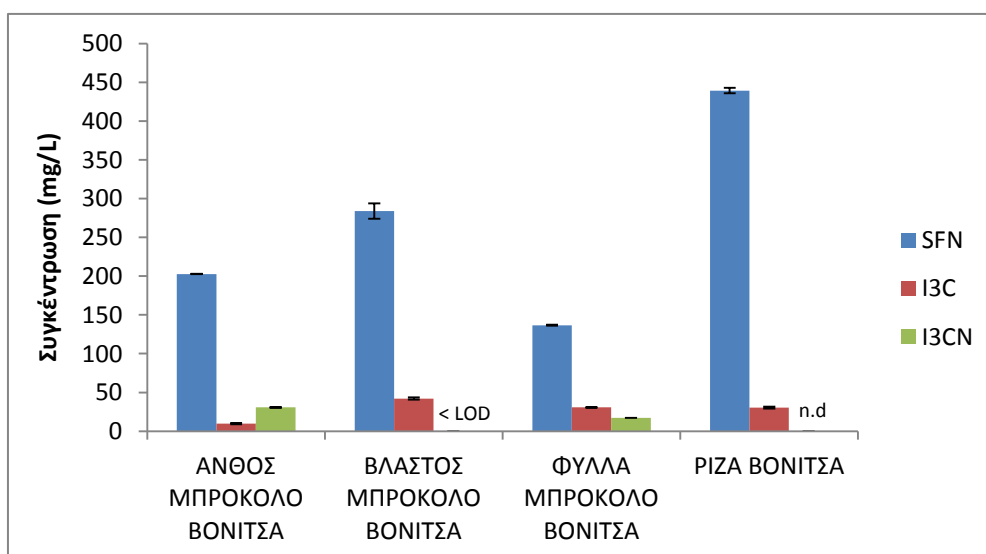
4.3.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



Σχήμα Γ.1. Περιεκτικότητα στο μπρόκολο από την περιοχή της Βόνιτσας στις ενώσεις (PITC, ER, 5MITN, 3MIC) που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία.

Στο σχήμα Γ.1 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων PITC, ER, 5MITN και 3MIC που υπολογίστηκαν με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με MS. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση στις ισοθειοκυανικές ενώσεις έχει η ρίζα. Το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) είναι η ένωση που βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα μέρη του φυτού (άνθος, βλαστός, φύλλα, ρίζα). Ωστόσο, η ισοθειοκυανική ένωση ιμπερβερίνη (3MIC) ανιχνεύθηκε μόνο στη ρίζα, ενώ η ερουκίνη (ER) δεν ανιχνεύτηκε στα φύλλα.

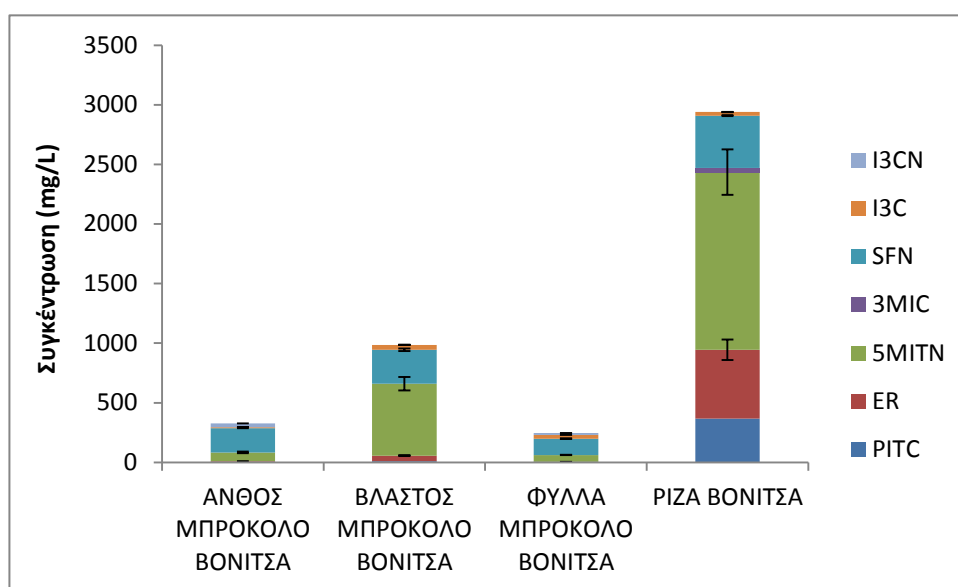
4.3.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



Σχήμα Γ.2. Περιεκτικότητα στο μπρόκολο από την περιοχή της Βόνιτσας στις ενώσεις (SFN, I3C, I3CN) που αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία.

Στο σχήμα Γ.2 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων SFN, I3C και I3CN που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με MS. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση έχει η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN) στη ρίζα του φυτού, ενώ ακολουθούν ο βλαστός, το άνθος και τα φύλλα. Η δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση είναι η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) η οποία είναι σε υψηλή συγκέντρωση στο βλαστό και στα φύλλα. Η συγκέντρωση του ινδολο-3-ακετονιτριλίου (I3CN) στο βλαστό ήταν μικρότερη του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης (< LOD) ενώ, στην ρίζα δεν ανιχνεύθηκε.

4.3.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΟ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΒΟΝΙΤΣΑΣ

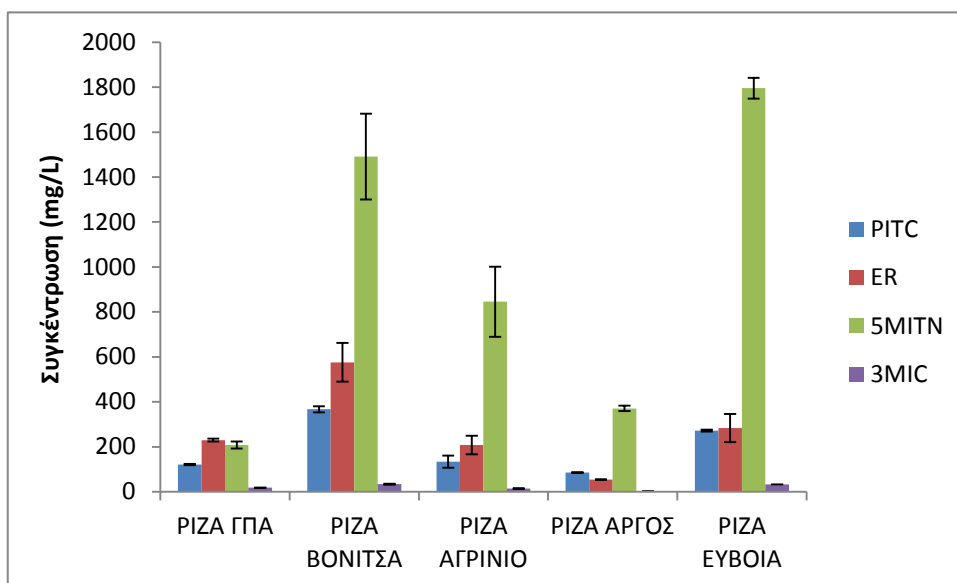


Σχήμα Γ.3. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στο μπρόκολο από την περιοχή της Βόνιτσας.

Συγκεντρωτικά με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι ενώσεις: ερουκίνη (ER), νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN), φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ιμπερβερίνη (3MIC), σουλφοραφάνη (SFN), ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Στο σχήμα Γ.3 παρατηρούμε ότι σε όλα τα μέρη του φυτού (άνθος, βλαστός, φύλλα, ρίζα) το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) απαντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Η υψηλότερη συγκέντρωση στο συγκεκριμένο νιτρίλιο παρατηρείται στην ρίζα. Παράλληλα, παρατηρούμε ότι σε υψηλή συγκέντρωση βρίσκεται και η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN) σε όλα τα μέρη του φυτού.

4.4 ΡΙΖΕΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ : ΓΠΑ, ΒΟΝΙΤΣΑ, ΑΓΡΙΝΙΟ, ΑΡΓΟΣ ΚΑΙ ΕΥΒΟΙΑ

4.4.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



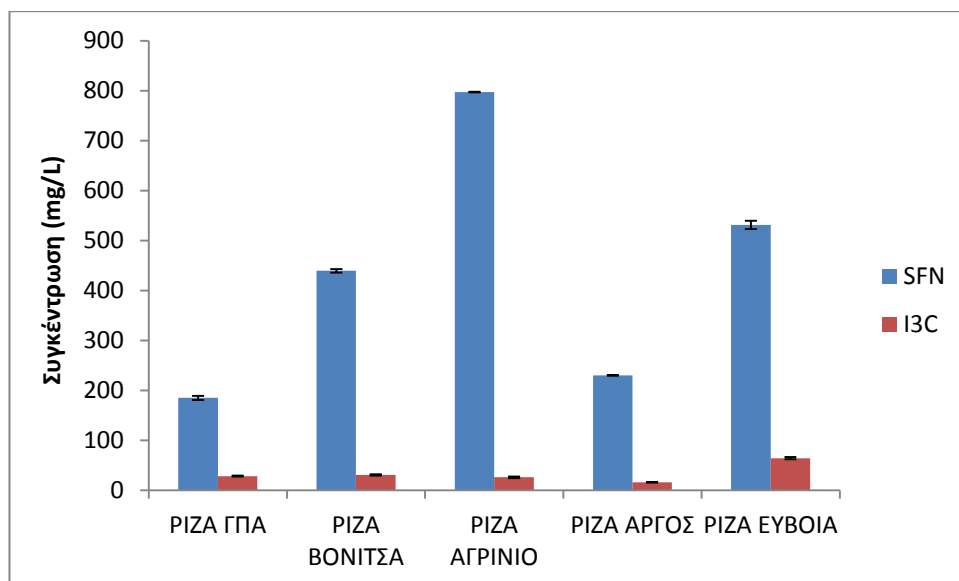
Σχήμα Δ.1. Περιεκτικότητα στις ρίζες από το μπρόκολο στις ενώσεις (PITC, ER, 5MITN, 3MIC) που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία.

Στο σχήμα Δ.1 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων PITC, ER, 5MITN και 3MIC που υπολογίστηκαν με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με MS. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση στις ενώσεις έχει το νιτρίλιο 5MITN στη ρίζα από την περιοχή της Εύβοιας. Σε μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκε στις ρίζες από τις περιοχές της Βόνιτσας, του Αγρινίου, Άργους και του ΓΠΑ. Επίσης, σε μεγάλες συγκεντρώσεις απαντάται η ισοθειοκυανική ένωση ερουκίνη (ER) και το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ενώ η ιμπερβερίνη (3MIC) βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

4.4.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

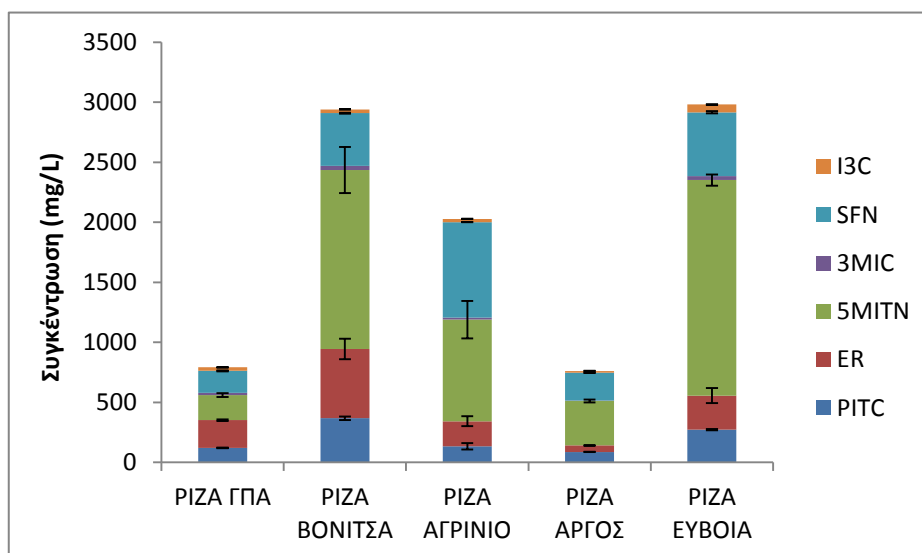
Στο σχήμα Δ.2 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων SFN και I3C που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με MS. Παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση έχει η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN) στη ρίζα από την περιοχή του Αγρινίου. Σε μικρότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα βρίσκεται η

ινδολο-3-καρβινόλη (I3C). Στις ρίζες του φυτικού υλικού του μπρόκολου δεν παρατηρήθηκε το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN).



Σχήμα Δ.2. Περιεκτικότητα στις ρίζες μπρόκολου στις ενώσεις (SFN, I3C) που αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία.

4.4.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΙΣ ΡΙΖΕΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ

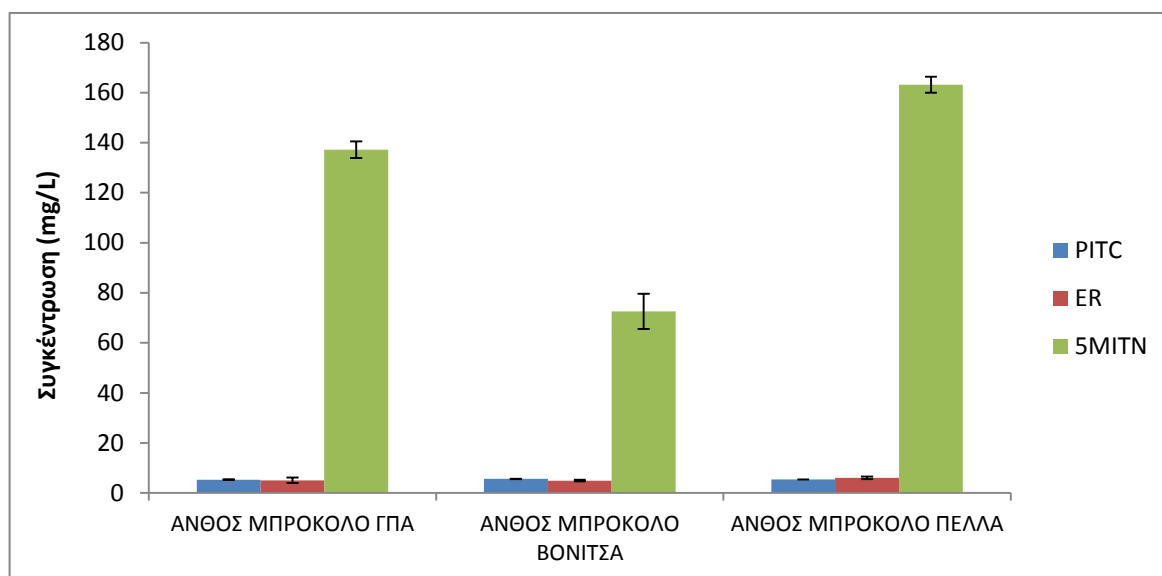


Σχήμα Δ.3. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στις ρίζες μπρόκολου.

Συγκεντρωτικά με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι ενώσεις: ερουκίνη (ER), νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN), φαιναιθυλοισοθειοκυανικό (PITC), ιμπερβερίνη (3MIC), σουλφοραφάνη (SFN) και ινδολο-3-καρβινόλη (I3C). Στο σχήμα Δ.3 παρατηρούμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση στις ρίζες του φυτικού υλικού του μπρόκολου έχει το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN). Μικρότερες συγκεντρώσεις με φθίνουσα σειρά έχουν οι ενώσεις: σουλφοραφάνη (SFN), ερουκίνη (ER), φαιναιθυλοισοθειοκυανικό (PITC), ενώ η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και η ιμπερβερίνη (3MIC) κυμαίνονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

4.5 ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ : ΓΠΑ, ΒΟΝΙΤΣΑ ΚΑΙ ΠΕΛΛΑ

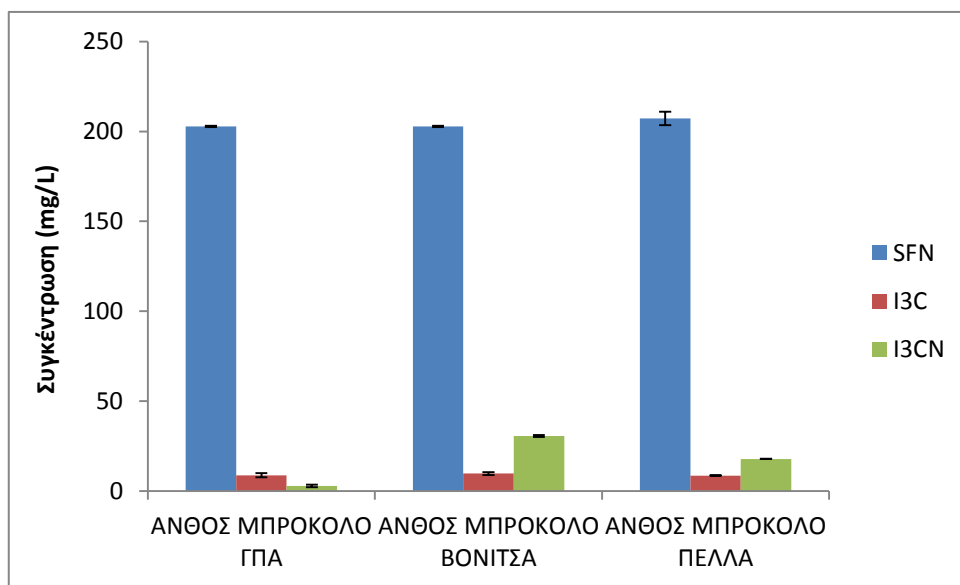
4.5.1 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



Σχήμα Ε.1. Περιεκτικότητα στο άνθος μπρόκολου στις ενώσεις (PITC, ER, 5MITN) που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία.

Στο σχήμα Ε.1 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων PITC, ER και 5MITN που υπολογίστηκαν με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με MS. Παρατηρούμε ότι το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) έχει υψηλή συγκέντρωση και στα τρία δείγματα. Η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρείται στο άνθος μπρόκολου από την περιοχή της Πέλλας, ακολουθεί αυτό της περιοχής του ΓΠΑ και τέλος της Βόνιτσας. Ωστόσο οι τιμές της ερουκίνης (ER) και του φαιναιθυλοισοθειοκυανικού (PITC) κυμαίνονται σε χαμηλές τιμές.

4.5.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

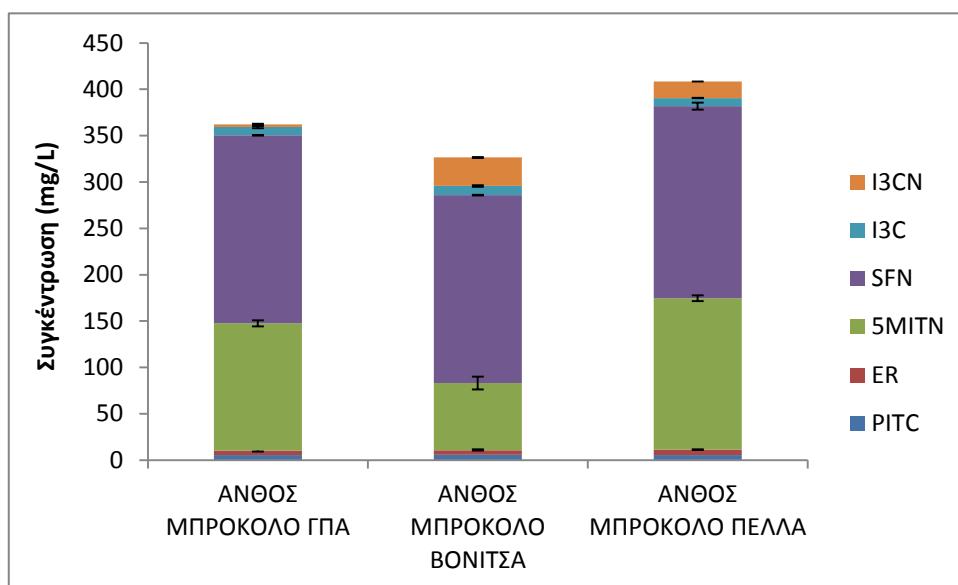


Σχήμα Ε.2. Περιεκτικότητα στο άνθος μπρόκολου στις ενώσεις (SFN, I3C, I3CN) που αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία.

Στο σχήμα Ε.2 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων SFN, I3C και I3CN που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένη με MS. Παρατηρούμε ότι η σουλφοραφάνη περιέχεται σε υψηλές συγκεντρώσεις με την υψηλότερη στο άνθος της περιοχής Πέλλας. Το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) βρέθηκε σε όλα τα άνθη που εξετάστηκαν με το μπρόκολο από την περιοχή της Βόνιτσας να έχει την υψηλότερη συγκέντρωση.

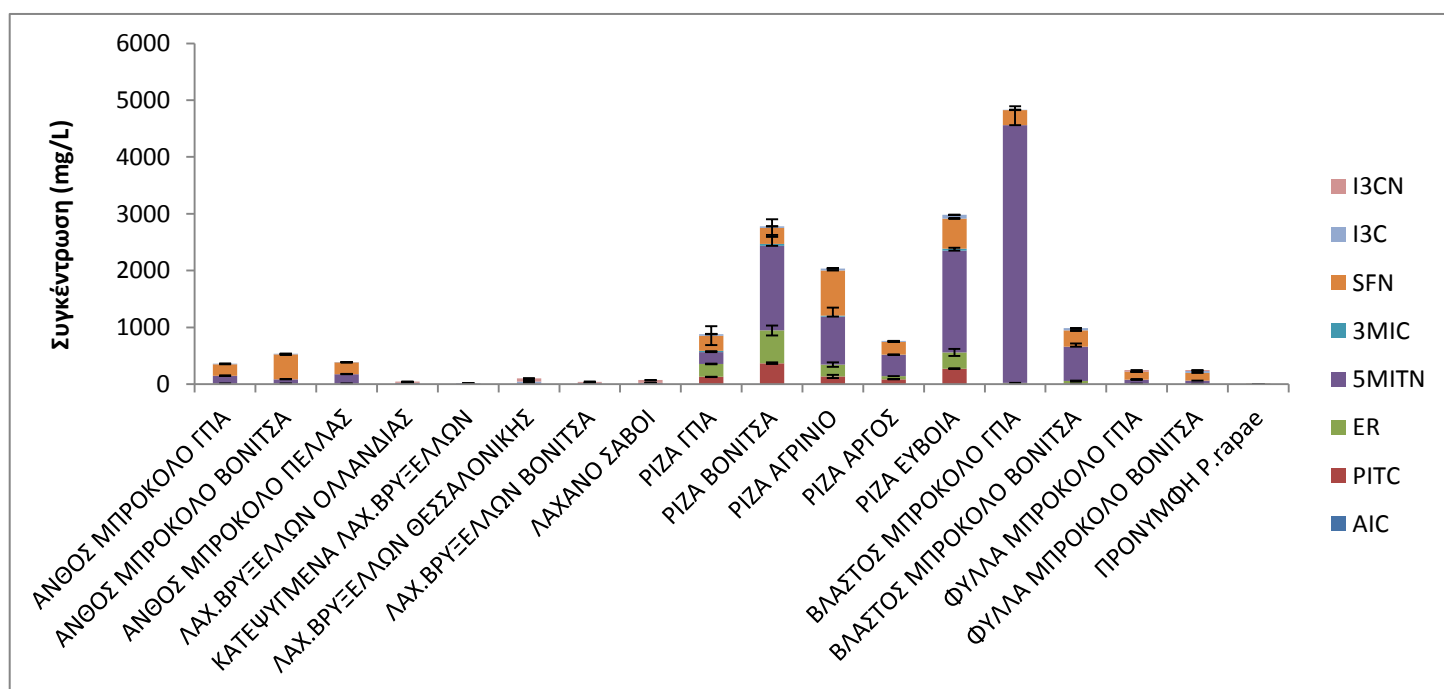
4.5.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΟ ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟΥ

Συγκεντρωτικά με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι ενώσεις: ερουκίνη (ER), νιτρίλιο ερουκίνης (5MITN), φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), σουλφοραφάνη (SFN) ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Στο σχήμα Ε.3 παρατηρούμε ότι η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN) έχει την υψηλότερη συγκέντρωση από όλες τις ενώσεις που εξετάστηκαν. Έπειτα ακολουθεί το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) και το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις ερουκίνη (ER), φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC) και ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα.



Σχήμα Ε.3. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στο άνθος μπρόκολου.

4.6 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

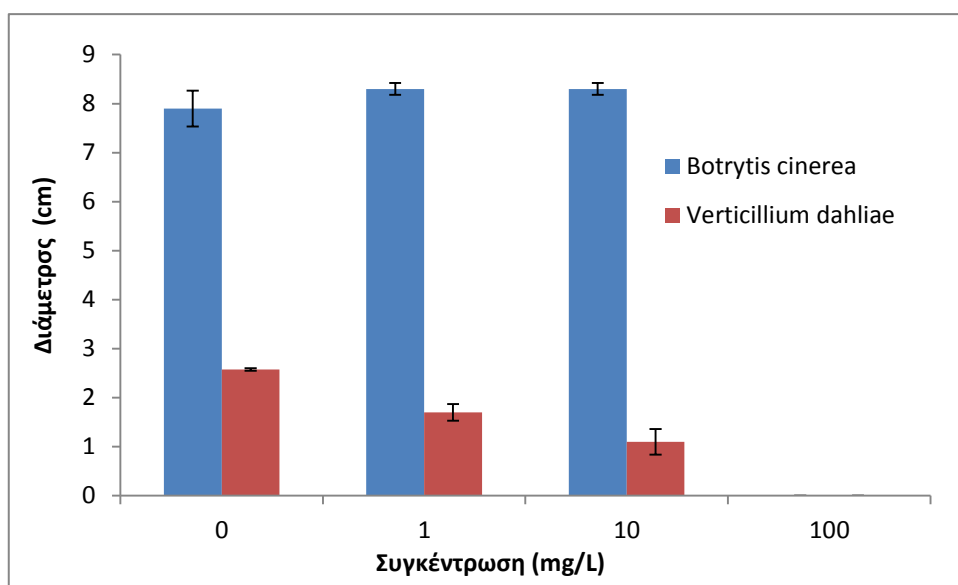


Σχήμα Ζ.1. Συγκεντρωτικό γράφημα όλων των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα λαχ. Βρυξελλών, λάχανο σαβόι, μπρόκολο (άνθος, βλαστός, φύλλα, ρίζα).

Συγκεντρωτικά με τη βοήθεια της υγρής και αέριας χρωματογραφίας ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι ενώσεις: άλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC), ερουκίνη (ER), νιτρίλιο

ερουκίνης (5MITN), φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ιμπερβερίνη (3MIC), σουλφοραφάνη (SFN), ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Από το σχήμα Ζ.1 παρατηρούμε ότι οι περισσότερες ενώσεις βρίσκονται στη ρίζα του μπρόκολου. Το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) έχει μεταξύ των συστατικών που μελετήθηκαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις στα δείγματα μπρόκολου παρατηρούνται η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN), ερουκίνη (ER), ενώ το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC) βρέθηκε και στα μπρόκολο και στα λαχανάκια Βρυξελλών και το λάχανο σαβόι. Επίσης παρατηρούμε ότι χαμηλή συγκέντρωση σε ισοθειοκυανικές και ινδολικές ενώσεις έχουν τα λαχ. Βρυξελλών και λάχανο σαβόι. Το άλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC) παρατηρείται μόνο στα λαχ. Βρυξελλών, ενώ η ισοθειοκυανική ένωση ιμπερβερίνη παρατηρείται μόνο στη ρίζες του φυτικού υλικού του μπρόκολου.

4.7 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗΣ (3MIC) ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ *BOTRYTIS CINEREA* ΚΑΙ *VERTICILLUM DAHLIAE*



Σχήμα Η.1. Συγκεντρωτικό γράφημα της αντιμικροβιακής δράσης *in vitro* της ένωσης 3MIC έναντι των *B.cinerea* και *V.dahliae*.

Από το σχήμα Η.1 παρατηρούμε ότι τόσο στο μύκητα *V.dahliae* όσο και στο *B.cinerea* δεν παρατηρείται ανάπτυξη στη συγκέντρωση 100 mg/L της 3MIC. Πιο συγκεκριμένα, στο *V.dahliae* βλέπουμε μια σταδιακή μείωση της ανάπτυξης καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της ισοθειοκυανικής ένωσης ιμπερβερίνης (3MIC). Ωστόσο στο μύκητα *B.cinerea* παρατηρούμε ότι ο μύκητας αναπτύσσεται κανονικά σε όλες τις συγκεντρώσεις 0, 1 και 10 mg/L.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα λαχανικά που ανήκουν στην οικογένεια των σταυρανθών (*Brassicaceae*), όπως το μπρόκολο, το λάχανο και τα λαχανάκια Βρυξελλών είναι πλούσια σε ισοθειοκυανικές ενώσεις, μια πολύ γνωστή ομάδα βιοδραστικών ενώσεων που πιστεύεται ότι προλαμβάνουν διαφόρους τύπους καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, το είδος των προϊόντων υδρόλυσης που σχηματίζονται φαίνεται ότι εξαρτώνται από τη χημική φύση της πλευρικής αλυσίδας του είδη υπάρχοντος γλυκοζινολίτη, αλλά και τις συνθήκες υδρόλυσής του. Για παράδειγμα, οι γλυκοζινολίτες με αλειφατική πλευρική αλυσίδα όταν υδρολύονται σε ουδέτερο pH=7 δίνουν ισοθειοκυανικές ενώσεις, ενώ σε όξινο pH<3 ή παρουσία ιόντων Fe^{+2} ευνοείται ο σχηματισμός νιτριλίων (Gil and MacLeod, 1980, MacLeod and Rossiter, 1986, Galletti et al., 2001).

Οι σπόροι των σταυρανθών και συναφών φυτών περιέχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοζινολιτών, οι οποίοι όταν υδρολυθούν παράγουν τα αντίστοιχα προϊόντα υδρόλυσής τους (Daxenbichler, 1991). Μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι ορισμένα νιτρίλια και οξαζολιδινο-2-θειόνες που απελευθερώνονται από γλυκοζινολίτες προκαλούν νεφρικές, θυρεοειδικές και ηπατικές δυσλειτουργίες (Van Etten, Daxenbichler & Wolff, 1969). Ωστόσο, εξαίρεση αποτελούν το νιτρίλιο που προέρχεται από τον γλυκοζινολίτη προγοϊτρίνη το λεγόμενο «crambene» (Butene, (S)-1-cyano-2-hydroxy-3-) (Nho & Jeffery, 2004), αλλά και το νιτρίλιο 1-κυανο-2,3-επιθειοπροπάνιο (1-cyano-2,3-epithiopropene) που προκύπτει από το άλλυλο ισοθειοκυανικό (Hansch et al., 2015) τα οποία εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Παρ'όλα αυτά ιδιαίτερα εκτεταμένη έρευνα για ποσοτικοποίηση έχει γίνει στους γλυκοζινολίτες και στις ισοθειοκυανικές ενώσεις άλλυλο ισοθειοκυανικό (AITC) και σουλφοραφάνη (SFN) και όχι τόσο στις υπόλοιπες ισοθειοκυανικές ενώσεις που αναλύσαμε στην συγκεκριμένη εργασία.

Ο κυρίαρχος γλυκοζινολίτης είναι η σινιγκρίνη σε πολλά λαχανικά όπως είναι τα λαχανάκια Βρυξελλών και το λάχανο σαβόι με εξαίρεση το μπρόκολο στο οποίο κυρίαρχος γλυκοζινολίτης είναι η γλυκοραφανίνη (Hwang & Jeffery, 2003, Song & Thornalley, 2007). Η χαμηλή μετατροπή των γλυκοζινολιτών σε ισοθειοκυανικές ενώσεις δεν αποδίδεται στην έλλειψη δραστηριότητας του ενζύμου μυροσινάση²⁰, αλλά στις συνθήκες υδρόλυσης (pH), στην παρουσία ιόντων σιδήρου και επιπλέον σε πρωτεϊνικούς παράγοντες όπως είναι οι επιθειοεκλεκτικές πρωτεΐνες (ESP-epithiospecifier protein), οι νιτριλοεκλεκτικές πρωτεΐνες (NSP-nitrile specific protein) και οι θειοκυανο-σχηματιζόμενες πρωτεΐνες (TFP-thiocyanate-forming protein) οι οποίοι αντιδρούν με την ενδιάμεσα σχηματιζόμενη ασταθή ένωση. Η δημιουργία διαφορετικών

²⁰ Στα νεαρά φυτά η δράση της μυροσινάσης είναι υψηλότερη από ότι στα ώριμα φυτά.

ενώσεων (νιτρίλια, επιθειονιτρίλια και θειοκυανικά) που δημιουργούνται με τη βοήθεια αυτών των πρωτεϊνών εξηγεί γιατί η υδρόλυση των γλυκοζινολιτών οδήγησε σε τόσο χαμηλή ποσότητα ισοθειοκυανικών και ινδολικών ενώσεων σε εκχυλίσματα που προήλθαν από τη λυοφιλοποίηση των λαχανικών που μελετήθηκαν.

Επίσης, οι ισοθειοκυανικές ενώσεις και οι ασταθείς ινδολικές μπορεί να μετατρέπονται σε προϊόντα που δεν προσδιορίζονται (Hanlon & Barnes, 2011). Οι γλυκοζινολίτες δεν έχουν κάποια αντιμικροβιακή ή αντικαρκινική δράση, αλλά τα προϊόντα υδρόλυσης τους, οι ισοθειοκυανικές ενώσεις (Burow et al., 2008, Ahuja et al., 2011). Αυτό έχει επιβεβαιωθεί και από ερευνητές στο τμήμα της φαρμακευτικής στο πανεπιστήμιο John Hopkins οι οποίοι μελέτησαν τον μεταβολισμό των ισοθειοκυανικών ενώσεων και διαπίστωσαν ότι είναι έξι φορές πιο βιοδιαθέσιμα στον οργανισμό από ό,τι οι γλυκοζινολίτες (Sharma et al., 2016). Το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC) που παρατηρείται στα λαχανάκια Βρυξελλών, λάχανο σαβόι, μπρόκολο (άνθος, φύλλα, βλαστός, ρίζα), η σουλφοραφάνη (SFN) που παρατηρείται στο μπρόκολο (άνθος, φύλλα, βλαστός, ρίζα) και το άλλυλο ισοθειοκυανικό (AITC) που παρατηρείται στα λαχανάκια Βρυξελλών και λάχανο σαβόι θεωρούνται οι ισοθειοκυανικές ενώσεις με την πιο ισχυρή αντικαρκινική δράση (Zubia, et al., 2008, Singh, et al., 2012).

Στη παρούσα μελέτη αναλύσαμε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών τις ισοθειοκυανικές ενώσεις²¹: αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC), ιμπερβερίνη (3MIC), ερουκίνη (ER), νιτρίλιο της ερουκίνης (SMITN) και φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ενώ με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματομετρία μαζών (HRMS) αναλύθηκαν²²: η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN), η ινδολο-3-καρβινόλη (I3CN) και το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Το πρόγραμμα που επιλέξαμε για να γίνει η ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο ξεκινά με θερμοκρασία (*injection temperature*) τους 35 °C. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία είναι πολύ σημαντική για την ανάλυση των ισοθειοκυανικών ενώσεων στον αέριο χρωματογράφο, διότι εάν αυξηθεί η αρχική θερμοκρασία από τους 40 °C στους 70 °C, ενώσεις όπως είναι το αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC) το οποίο ανιχνεύεται σε θερμοκρασία κοντά στου 40 °C και η ερουκίνη (ER) διασπώνται και οι περιεκτικότητες που προσδιορίζονται είναι χαμηλές (Arora et al., 2014).

Αν επιλεγούν υψηλότερες αρχικές θερμοκρασίες, τα ισοθειοκυανικά μετατρέπονται σε θειαζόλες και ισοθειαζόλες, όπως απεδείχθη από την έρευνα που έγινε από τους Van Nispen et al., 1982 και Mukerjee & Ashare, 1991. Επίσης, η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN)

²¹ Η σειρά πτητικότητας στο χρωματογράφημα επιβεβαιώνεται και από τις μελέτες των Arora et al., 2014, Aripin & Surugau, 2016.

²² Η σειρά πολικότητας στο χρωματογράφημα επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη των Kokotou et al., 2017.

μπορεί να ποσοτικοποιηθεί καλύτερα με υγρή χρωματογραφία και όχι με αέρια, διότι διασπάται και το 80 % της ένωσης μετατρέπεται σε 3-βουτένυλο-ισοθειοκυανικό (Chiang et al.,1998). Παράλληλα, παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και με την ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) η οποία όταν αναλυθεί στον αέριο χρωματογράφο δίνει μόνο το θραύσμα $[M-18]^+$ λόγω απώλειας νερού. Σε πείραμα το οποίο διεξήχθη από τον Tocco et al.,2017 ως αρχική θερμοκρασία ήταν 150 °C και διαλύτης το χλωροφόρμιο. Το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) δεν παρουσίασε κάποιο πρόβλημα στην ανάλυση του με αέρια χρωματογραφία. Παρόλα αυτά όμως εάν αναλυθεί με υγρή χρωματογραφία υπολογίζεται μεγαλύτερη αφθονία του (*abundance*).

Για τις ενώσεις όπως το αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC), η ιμπερβερίνη (3MIC), η ερουκίνη (ER), το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) και το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό²³ (PITC) στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ιόντων ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electro Impact, EI), μια σκληρή μέθοδος ιοντισμού η οποία θραυσματοποιεί τα μόρια. Η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN), η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) αναλύθηκαν με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας και ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI), μια ήπια μέθοδο ιοντισμού η οποία αφήνει τα μόρια δομικά ανέπαφα χωρίς να υφίσταται θραυσματοποίηση. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται με θηκογράμματα φαίνεται ότι οι ενώσεις που αναλυθήκαν με αέρια χρωματογραφία (λάχανο σαβόι, λαχ. Βρυξελλών και ρίζες μπρόκολου) και με υγρή προκύπτει ότι στην πρώτη περίπτωση τα δείγματα εμφανίζουν μεγαλύτερη μεταβλητότητα έναντι των ενώσεων που αναλύθηκαν με την υγρή. Αυτό συμβαίνει διότι στην πρώτη περίπτωση η εισαγωγή του δείγματος εντός της στήλης γινόταν χειροκίνητα, ενώ στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας με αυτόματο δειγματολήπτη.

5.2 ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ ΚΑΙ ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ

Στο λάχανο σαβόι, οι απαντώμενοι γλυκοζινολίτες είναι: η σινιγκρίνη (141,8 $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ FW), η γλυκοϊμπερίνη (289,8 $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ FW), η γλυκομπρασικίνη (27,6 $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ FW), η γλυκοναπίνη (3,7 $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ FW) και η γλυκοραφανίνη (7,8 $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ FW) (Kushad et al., 1999). Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι το λάχανο σαβόι μοιάζει στο προφίλ των πτητικών συστατικών του με τα λαχανάκια Βρυξελλών και παρουσιάζει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC) σε σύγκριση με τα λαχανάκια Βρυξελλών. Ωστόσο, ιδιαίτερα εκτεταμένη βιβλιογραφική αναφορά για την περιεκτικότητα σε

²³ Ενώσεις που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο μπορούν να αναλυθούν σε μηχανήμα υγρής χρωματογραφίας αλλά αντί για πηγή ιόντων ESI θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια πιο «σκληρή» πηγή ιόντων APCI (Atmospheric Pressure CI) που θα παράγει περισσότερα θραύσματα.

ισοθειοκυανικές ενώσεις στο λάχανο σαβόι δεν υπάρχει. Οι Hanschen & Schreiner, 2017 βρήκαν ότι το λάχανο σαβόι είχε υψηλή περιεκτικότητα στο νιτρίλιο 1-κυανο-2,3-επιθειοπροπάνιο (1-cyano-2,3-epithiopropane), ενώ οι συγκεντρώσεις στα υπόλοιπα ισοθειοκυανικά που αναλύθηκαν [ιμπερίνη, ιμπερβερίνη (3MIC), 2-προπενυλο-ισοθειοκυανικό] ήταν χαμηλότερες.

Στα λαχανάκια Βρυξελλών, οι απαντώμενοι γλυκοζινολίτες είναι: η σινιγκρίνη ($8,9 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/g DW}$), η γλυκοναπίνη ($6,9 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/g DW}$), η προγοϊτρίνη ($2,4 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/g DW}$) και η γλυκομπρασικίνη ($3,2 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/g DW}$) (Kushad et al., 1999). Σε πείραμα που διεξήχθη από τον Laky et al., 2002 ο οποίος μελέτησε την αντικαρκινική δράση του εκχυλίσματος από τα λαχανάκια Βρυξελλών βρήκε την ποσότητα των ισοθειοκυανικών ενώσεων άλλυλο-ισοθειοκυανικό (1-6 μM), σουλφοραφάνη ($2,5 \mu\text{mol}/100 \text{ g FW}$) και 2-φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό ($13,9 \mu\text{mol}/100 \text{ g FW}$). Ωστόσο, στο δικό μας πείραμα βρήκαμε ότι την υψηλότερη συγκέντρωση στα λαχανάκια Βρυξελλών είχε το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN), γεγονός το οποίο παρατηρήθηκε και από τους Ciska et al., 2015 οι οποίοι μελέτησαν νιτρίλια στα λαχ. Βρυξελλών και βρήκαν ότι η συγκέντρωση του νιτρίλιου I3CN ήταν $30 \mu\text{mol}/100 \text{ g FW}$. Στο δικό μας πείραμα η συγκέντρωση σε άλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC) είναι μικρότερη του ινδολο-3-ακετονιτρίλιου, ενώ την χαμηλότερη συγκέντρωση είχε η σουλφοραφάνη (SFN) που ήταν μικρότερη του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης ($< \text{LOD}$).

Τα κατεψυγμένα λαχανάκια Βρυξελλών ήταν το δείγμα με την μικρότερη συγκέντρωση τόσο στις ισοθειοκυανικές ενώσεις άλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC), φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), αλλά και σε ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Η ολική επίδραση των ισοθειοκυανικών ενώσεων στο άρωμα στα μαγειρεμένα κατεψυγμένα λαχανάκια Βρυξελλών είναι εμφανής σε σχέση με τα μαγειρεμένα νωπά λαχανάκια. Η ανάλυση έχει δείξει, ότι στην πρώτη περίπτωση, περιέχεται συγκριτικά λιγότερο άλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC) και περισσότερο άλλυλονιτρίλιο. Η μετατόπιση της αναλογίας των δύο συστατικών αποδίδεται στην αδρανοποίηση του ενζύμου μυροσινάση κατά το ζεμάτισμα, πριν την κατάψυξη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο άλλυλο γλυκοζινολίτης στα κατεψυγμένα λαχανάκια να αποικοδομείται μόνο θερμικά (κατά το μαγείρεμα) κατά προτίμηση προς νιτρίλια (Belitz et al., 2011).

5.3 ΜΠΡΟΚΟΛΟ

Οι πιο κοινοί γλυκοζινολίτες που έχουν βρεθεί στο μπρόκολο, είναι: η γλυκοραφανίνη (αλειφατικό) ($7,1 \pm 2,5$ $\mu\text{mol/g DW}$), η προγοϊτίνη ($1,0 \pm 0,8$ $\mu\text{mol/g DW}$), η γλυκοναπίνη ($1,0 \pm 1,5$ $\mu\text{mol/g DW}$) (αλκένυλο) και η γλυκομπρασικίνη ($1,1 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/g DW}$) (ινδόλιο) (Kushad et al., 1999). Αυτό έχει επιβεβαιωθεί και από μελέτες των Radosevic et

al., 2017 που βρήκαν ότι η περιεκτικότητα σε γλυκοραφανίνη στα άνθη ήταν 95,97 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ FW, ενώ ο Rybarzyk-Plonska et al., 2016 προσδιόρισε την περιεκτικότητα τόσο στο άνθος όσο και στους βλαστούς όπου η συγκέντρωση σε γλυκοραφανίνη ήταν $7,16 \pm 0,92\text{ mmol}/\text{kg DW}$ και $7,67 \pm 0,39\text{ mmol}/\text{kg DW}$ αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιποι γλυκοζινολίτες βρίσκονταν σε μικρότερη συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα, στο μπρόκολο η κύρια ισοθειοκυανική ένωση που παράγεται μετά την υδρόλυση του γλυκοζινολίτη γλυκοραφανίνη είναι η σουλφοραφάνη ($8,1 \pm 0,3\text{ }\mu\text{mol}/\text{g}$), όταν η αντίδραση πραγματοποιείται σε ουδέτερο pH και όταν οι επιθειοεκλεκτικές πρωτεΐνες (ESP) είναι ανενεργές (Shen et al., 2010).

Στο συγκεκριμένο μας πείραμα παρατηρήσαμε την ύπαρξη προνύμφης από το έντομο *Pieris rapae* στο μπρόκολο ποικιλία *Monrello* από την περιοχή του ΓΠΑ. Η ανάλυση που κάναμε στο έντομο *Pieris rapae* το οποίο τρέφονταν από το μπρόκολο είδαμε ότι την υψηλότερη περιεκτικότητα έχει η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C), ακολουθεί η ερουκίνη (ER) και τέλος το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ενώ δεν παρατηρήθηκαν καθόλου νιτρίλια²⁴. Στο δικό μας πείραμα ως «δείκτης αναγνώρισης ωστοκίας» θα μπορούσε να θεωρηθεί η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) στα φύλλα και ως «διεγερτικό τροφής» τα ποσοστά του φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικού (PITC) στο άνθος του μπρόκολου αλλά και στο βλαστό (Mumm et al., 2008).

Με άλλα λόγια, το σύστημα γλυκοζινολίτη-μυροσυνάσης διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην άμυνα των φυτών διότι κάποια από τα προϊόντα διάσπασης, όπως είναι η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη έχουν βρεθεί ότι είναι τοξικά ή αποτρεπτικά έναντι των φυτοφάγων ζώων και των παθογόνων μικροοργανισμών δρώντας με αυτό τον τρόπο ως φυτοαλεξίνες²⁵ (Vaughn, 1999). Οι φυτοαλεξίνες αποτελούν μέρος ενός συνόλου πολύπλοκων μηχανισμών της αντοχής των φυτών στις ασθένειες, ενώ η σύνθεση τους έχει διαπιστωθεί σε όλα τα όργανα ή ιστούς των φυτών (στελέχη, ρίζες, φύλλα, άνθη) (Τζάμος E., 2007). Αυτό το οποίο μπορούν να κάνουν είναι να καθυστερήσουν την ωρίμανση του εν λόγω φυτού, να διαταράξουν το μεταβολισμό του ή να εμποδίσουν την αναπαραγωγή του παθογόνου παράγοντα.

Στο μπρόκολο της ποικιλίας *Monrello* παρατηρείται διαταραχή του μεταβολισμού του φυτού το οποίο εμφανίζει σημαντικά ποσοστά στο νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) και μειωμένη συγκέντρωση στις ισοθειοκυανικές ενώσεις φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ερουκίνη (ER), ιμπερβερίνη (3MIC), σουλφοραφάνη (SFN) και στις ινδολικές ενώσεις ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) σε σύγκριση με το μπρόκολο της ποικιλίας *Marathon* από

²⁴ Εκτενής αναφορά για την μετατροπή των ισοθειοκυανικών ενώσεων σε νιτρίλια εντός του σώματος της προνύμφης γίνεται στην εισαγωγή.

²⁵ Φυτοαλεξίνες καλούνται οι μικρού μοριακού βάρους λιπόφιλες, αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται και συσσωρεύονται στα φυτικά κύτταρα είτε ως αποτέλεσμα μολύνσεως από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς είτε ως απόρροια επιδράσεως χημικών ή άλλης φύσεως μη παρασιτικών αιτιών (Τζάμος, 2007).

την περιοχή της Βόνιτσας που παρατηρούμε αυξημένες τιμές στις ισοθειοκυανικές ενώσεις σουλφοραφάνη (SFN), φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC) και ερουκίνη (ER). Το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο είναι μια φυτοαλεξίνη η οποία παρατηρήθηκε σε υψηλότερα ποσοστά στα φύλλα μπρόκολου από την περιοχή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών έναντι των φύλλων μπρόκολου από την περιοχή της Βόνιτσας όπου το φυτό ήταν υγιές.

Ωστόσο, οι φυτοαλεξίνες συχνά στοχεύουν σε συγκεκριμένους είτε παθογόνους μικροοργανισμούς είτε έντομα. Στο δικό μας πείραμα παρατηρήσαμε ότι όταν υπάρχει προσβολή από το έντομο *Pieris rapae* στο μπρόκολο της ποικιλίας *Monrello* η συγκέντρωση του νιτρίλιου της ερουκίνης (5MITN) αυξάνεται σε σημαντικό επίπεδο στο βλαστό, ενώ στο φυτό ποικιλίας *Marathon* από την περιοχή της Βόνιτσας βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στη ρίζα. Το συγκεκριμένο νιτρίλιο παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα και ιδιαίτερα στις ρίζες και είναι υπεύθυνο για το χαρακτηριστικό άρωμα στο μπρόκολο (Belitz et al., 2011) αλλά έχει και μια πιθανή δράση φυτοαλεξίνης. Αυτό το οποίο μπορούμε να πούμε είναι ότι οι χημικές δομές των φυτοαλεξινών αποτελούν γενικά παράγωγα των μεταβολιτών που παράγονται στα μη καταπονημένα φυτά κάτι που δείχνει ότι οι ενώσεις αυτές παράγονται από τροποποίηση του φυσιολογικού μεταβολισμού των φυτών (Γιαγκίνης, Καραντώνης & Θεοχάρης, 2015). Ωστόσο για το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) δεν έχουμε στη διάθεση μας αρκετά δεδομένα καθώς δεν έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα για την αντιμικροβιακή αλλά και αντικαρκινική δράση του. Ο Kirkegaard et al., 1996 πρότεινε ότι τα πράσινα μέρη των φυτών *Brassica* που χρησιμοποιούνται για «Βίο-απολύμανση» κατά των εδαφογενών ασθeneιών πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά, διότι οι ρίζες των φυτών *Brassica* είναι γενικά πιο ισχυρές έναντι των αντίστοιχων φύλλων επειδή είναι πιο πλούσιες σε αρωματικές ισοθειοκυανικές ενώσεις όπως το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC).

Επίσης στις ρίζες από το μπρόκολο ανιχνεύσαμε και την ύπαρξη της ισοθειοκυανικής ένωσης ιμπερβερίνης (3MIC) η οποία ήταν σε συγκέντρωση 3,8-34,6 mg/L. Η μικρότερη συγκέντρωση παρατηρείται στη ρίζα από την περιοχή του Άργους. Λίγα δεδομένα υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με τις μικρότερες δομές που μοιάζουν στην ισοθειοκυανικό ένωση σουλφοραφάνη (SFN) όπως είναι ιμπερβερίνη (3MIC) με παρόμοια δραστηριότητα εντός του κυττάρου (συμμετέχοντας στο μονοπάτι αποτοξικοποίησης Nrf2) (Ernst et al., 2013, Kore & Wallig, 1993, Leoni et al., 2000, Vaughn & Berhow, 2005, Song et al., 2006).

Η ρίζα από την περιοχή του Άργους ήταν σε καλλιεργημένο χωράφι όπου είχε τοποθετηθεί λίπασμα (άζωτο-θείο). Ιδιαίτερη αναφορά για το εάν τα επίπεδα των ισοθειοκυανικών ενώσεων επηρεάζονται από την λίπανση δεν υπάρχει. Η μόνη βιβλιογραφική αναφορά που υπάρχει είναι η μελέτη των Aires et al., 2006 οι οποίοι παρατήρησαν ότι η λίπανση

των νεαρών φυτών μπρόκολου μείωσε σε σημαντικά επίπεδα τους αλειφατικούς γλυκοζινολίτες, ενώ δεν επηρέασε τόσο πολύ τους γλυκοζινολίτες που έχουν αρωματικό η δακτύλιο ινδολίου. O Njoroge et al., 2011 παρατήρησαν ότι τα επίπεδα των αλειφατικών γλυκοζινολιτών στην ρίζα του μπρόκολου ήταν 6,18 φορές υψηλότερα από ότι στο βλαστό και δεν διαφοροποιούνταν με την πάροδο της ηλικίας του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, στο βλαστό του μπρόκολου τα επίπεδα της γλυκοραφανίνης αυξάνονται σταδιακά με την ηλικία ωστόσο τα επίπεδα στην ρίζα παραμένουν σταθερά. Επίσης, ο Kirkegaard, & Sarwar, 1998 παρατήρησαν ότι ο βλαστός στο μπρόκολο περιέχει κυρίως αλειφατικούς γλυκοζινολίτες, ενώ κυρίως στη ρίζα παρατηρούμε αρωματικούς γλυκοζινολίτες. Οι γλυκοζινολίτες που περιέχουν δακτύλιο ινδολίου υπήρχαν σε όλους τους ιστούς αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Στη δική μας μελέτη παρατηρήσαμε ότι όλες οι ενώσεις βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στη ρίζα του μπρόκολου και την υψηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα έχει το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN), η ισοθειοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN), ερουκίνη (ER) και το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC), ενώ οι ινδολικές ενώσεις βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Επιπρόσθετα, στις ρίζες από το μπρόκολο δεν ανιχνεύτηκε το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) διότι το συγκεκριμένο νιτρίλιο αναστέλλει την ανάπτυξη των ριζών. Ειδικότερα, σε πείραμα το οποίο διεξήχθη έδειξε ότι εξωγενής εφαρμογή ινδολο-3-ακετονιτριλίου ανέστειλε την ανάπτυξη των ριζών (Thimann, 1953; Park et al., 2003; Kriechbaumer et al., 2007) ενώ *in vivo* στη ρίζα του *Arabidopsis thaliana* παρατηρήθηκε η μετατροπή του ινδολο-3-ακετονιτριλίου σε ινδολοξικό οξύ (IAA) (Müller et al., 1998).

5.4 ANTIMIKROBIAKH ΔΡΑΣΗ IN VITRO ΤΗΣ ΙΜΠΕΡΒΕΡΙΝΗΣ (3MIC) ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ VERTICILIUM DAHLIAE ΚΑΙ BOTRYTIS CINEREA

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα αγρονομικών καλλιεργειών παγκοσμίως συμπεριλαμβανομένου του λάχανου και του κουνουπιδιού και εισέρχεται εντός του φυτού μέσω των ριζών (Klosterman et al., 2009, Koike et al., 1994, Τζάμος, 2007) . Ωστόσο το μπρόκολο εμφανίζει μια μερική ανθεκτικότητα διότι ο παθογόνος μύκητας στα προσβεβλημένα φυτά περιορίζεται μόνο στη ρίζα και όχι στο υπέργειο μέρος (άνθος, φύλλα, βλαστός). Φραγμοί στον αποικισμό του *Verticillium dahliae* αποτελούν η λιγνίνη, τα φαινολικά και οι γλυκοζινολίτες αποτελώντας το κλειδί για την κατανόηση της διαφορετικής ευαισθησίας που εμφανίζουν μεταξύ τους τα μέλη της οικογενείας *Brassicaceae* (Njoroge et al., 2011). Από την άλλη πλευρά η ασθένεια που προκαλείται από το μύκητα *Botrytis cinerea* είναι κυρίως γνωστή σαν βοτρυτής,

τεφρά ή τεφρές σήψεις και σταχτιές σήψεις, προξενεί σοβαρές ζημίες και μετασυλλεκτικές σήψεις (διακίνηση και αποθήκευση) σε πολλά καλλιεργούμενα φυτά ανάμεσα τους και στο άνθος του μπρόκολου (ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ, 2000). Το μπρόκολο το οποίο έχει συγκομισθεί την άνοιξη και πρέπει να πουληθεί την καλοκαιρινή περίοδο απαιτεί χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλά επίπεδα υγρασίας γεγονός που ευνοεί πληθώρα μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του μύκητα *Botrytis cinerea* (Fernández-León et al., 2013). Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήσαμε την ανασταλτική δράση που μπορεί να έχει η ισοθιοκυανική ένωση ιμπερβερίνη (3MIC) η οποία ανιχνεύτηκε στη ρίζα των δειγμάτων μπρόκολο έναντι των μυκήτων *Verticillium dahliae* και *Botrytis cinerea*. Ειδικότερα αυτό το οποίο παρατηρήσαμε είναι ότι ο μύκητας *V.dahliae* δείχνει να μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης ενώ στη συγκέντρωση 100 mg/L δείχνει να μην αναπτύσσεται. Από την άλλη πλευρά ο μύκητας *B.cinerea* δείχνει να αναπτύσσεται κανονικά μέχρι και τη συγκέντρωση 10 mg/L ενώ στη συγκέντρωση 100 mg/L δείχνει να μην αναπτύσσεται.

Σε πείραμα το οποίο διεξήχθη από την Manici et al.,1997 έδειξε ότι οι γλυκοζινολίτες δεν έχουν δράση έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων, αλλά έχουν τα προϊόντα υδρόλυσης τους. Σε έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με ισοθιοκυανικές ενώσεις που έχει το εκχύλισμα του μπρόκολου έχει αποδειχθεί ότι το φαιραιθυλο-ισοθιοκυανικό (PITC) ανέστειλε την ανάπτυξη του *V.dahliae* (Olivier et al.,1999, Neubauer et al.,2014), ενώ η ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου σε χωράφι μπορεί να ελέγξει την προσβολή από το μύκητα *V.dahliae* στο κουνουπίδι (Subbarao et al, 1999). Επίσης σε πείραμα το οποίο διεξήχθη από τους Koenraad et al.,2001 έδειξε ότι το εκχύλισμα από το φυτό *Arabidopsis thaliana* που ήταν πλούσιο στην ισοθιοκυανική ένωση σουλφοραφάνη (SFN) ανέστειλε την ανάπτυξη του μύκητα *B.cinerea*. Συμπερασματικά αυτό το οποίο παρατηρήσαμε είναι ότι η ισοθιοκυανική ένωση ιμπερβερίνη (3MIC) μπορεί να λειτουργήσει ως «αντιβιοτικό» και να βοηθήσει στην αντιμετώπιση σημαντικών φυτοπαθολόγων μυκήτων όπως είναι ο *B.cinerea* και το *V.dahliae*.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τρέχουσα εργασία παρέχει δεδομένα σχετικά με την ταυτοποίηση αλλά και την ποσοτικοποίηση ισοθειοκυανικών, αλλά και ινδολικών ενώσεων στα λαχανάκια Βρυξελλών, στο λάχανο σαβόι και στο μπρόκολο (άνθος, φύλλα, βλαστός, ριζά), κοινών βρώσιμων λαχανικών της οικογενείας *Brassicaceae* στη Δυτική διατροφή. Οι ενώσεις οι οποίες μελετήθηκαν ήταν: αλλυλο ισοθειοκυανικό (AIC), ιμπερβερίνη (3MIC), ερουκίνη (ER), νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN), φαιναιθυλο ισοθειοκυανικό (PITC) σουλφοραφάνη (SFN), ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) και ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN). Το αλλυλο-ισοθειοκυανικό (AIC) ανιχνεύτηκε στα λαχανάκια Βρυξελλών και στο λάχανο σαβόι, ενώ η ιμπερβερίνη (3MIC) ανιχνεύθηκε μόνο στη ρίζα του μπρόκολου. Το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (PITC) ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα και στις ρίζες παρατηρήθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση. Η ερουκίνη (ER) δεν ανιχνεύτηκε στα λαχανάκια Βρυξελλών, στο λάχανο σαβόι και στα φύλλα του μπρόκολου, αλλά στο άνθος, βλαστό και ρίζες του μπρόκολου όπου στα τελευταία είχε την υψηλότερη συγκέντρωση. Το νιτρίλιο της ερουκίνης (5MITN) είχε την υψηλότερη συγκέντρωση στις ρίζες και στο βλαστό του μπρόκολου από την περιοχή του ΓΠΑ. Η σουλφοραφάνη (SFN) και η ινδολο-3-καρβινόλη (I3C) στις ρίζες του μπρόκολου είχε την υψηλότερη συγκέντρωση, ενώ το ινδολο-3-ακετονιτρίλιο (I3CN) είχε υψηλή συγκέντρωση στα λαχανάκια Βρυξελλών και στο λάχανο σαβόι, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στις ρίζες του μπρόκολου. Επίσης, η ισοθειοκυανική ένωση ιμπερβερίνη (3MIC) έδειξε αντιμικροβιακή δράση *in vitro* έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Verticillium dahliae* και *Botrytis cinerea* σε συγκέντρωση 100 mg/L. Συμπερασματικά, αν και υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατανόηση του ρόλου των ισοθειοκυανικών ενώσεων στην ανθρωπινή υγεία, υπάρχει έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τις συγκεντρώσεις που πρέπει να βρίσκονται οι ισοθειοκυανικές ενώσεις, τα νιτρίλια και οι ινδολικές ενώσεις στα τρόφιμα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ Ν.Ε. 1985. ΓΕΝΙΚΗ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ- ΔΟΜΗ –ΦΑΣΜΑΤΑ- ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ, 3^η ΕΚΔΟΣΗ, ΤΕΥΧΟΣ Β΄, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ.
- ΒΑΡΒΟΓΛΗ Α.Γ., ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ Ν.Ε. 1981. ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, Γ΄ΕΚΔΟΣΗ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ & ΣΙΑ Ο.Ε ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ.
- Γιαγκίνης Κ., Καραντώνης Χ., Θεοχάρης Σ. 2015. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ, Θεσσαλονίκη.
- ΚΟΥΠΑΡΗΣ Μ.Α., ΧΑΤΖΗΙΩΑΝΝΟΥ Θ.Π. 2017 ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΜΑΥΡΟΜΜΑΤΗ, ΑΘΗΝΑ.
- Λιοδάκης Στυλιανός. 2001. Αναλυτική Χημεία, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
- ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Χ.Γ. 2000. Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών, Β΄ Έκδοση, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Σουλελές Χρήστος. 2000. Ν. Φαρμακογνωσία. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΗΓΑΣΟΣ. Θεσσαλονίκη.
- Τριχόπουλος Δ & Πετρίδου Ε. (2000). Προληπτική Ιατρική και Δημόσια Υγεία, Αθήνα, Εκδόσεις Ζήτα.
- Τζάμος Ε. 2007. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλη, Αθήνα.

A

- Agerbirk, N., Olsen, C.E., Sorensen, H. (1998). Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1563–1571.
- Agerbirk, N. & Olsen, C. E. Glucosinolate structures in evolution. (2012). *Phytochemistry*, 77, 16–45.
- Agrawal AA, Kurashige NS .(2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *J Chem Ecol*, 29:1403–1415.

Aggarwal BB, Ichikawa H.(2005). Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* ,4:1201–1215.

Aggarwal BB, Shishodia S.(2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 71:1397–1421.

Ahuja I, Rohloff J, Bones AM.(2011). Defence Mechanisms of Brassicaceae: Implications for Plant-Insect Interactions and Potential for Integrated Pest Management. 2. *Agron. Sustain. Dev.* 30:311–348.

Aires Alfredo, Rosa Eduardo and Rosa Carvalho. (2006). Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*). Society of Chemical Industry. *J Sci Food Agric*, 0022–5142.

Aires A., Mota V.R., Saavedra M.J. Monteiro A.A., Simoes M., Rosa E.A.S. and Bennett R.N.(2009). Initial in vitro evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria, Journal compilation a 2009 The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology*,106 2096–2105.

Aires A, Mota VR, Saavedra MJ, Rosa EA, Bennett RN.(2009). The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. *J Appl Microbiol*,106:2086–2095.

Al-Gendy Amal A., Nematallah Khaled A., Zaghloul Soumaya S. I and Ayoub Nahla A. (2016). Glucosinolates profile, volatile constituents, antimicrobial, and cytotoxic activities of *Lobularia libyca*. *Pharmaceutical Biology*, 12, 3257–3263

Aripin Nurazilah, Farhana Binti, Surugau Noumie. (2016). Effects of temperature and pH on Myrosinase Activity and Glucosinolate Hydrolysis Products in Watercress. *Transactions on Science and Technology*, Vol.3, No.2, 449-454.

Arora Rohit, Sharma Deepika, Kumar Rakesh, Singh Bikram, Vig Adarsh P., and Arora Saroj.(2014). Evaluating Extraction Conditions of Glucosinolate Hydrolytic Products from Seeds of *Eruca sativa* (Mill.) Thell. Using GC-MS. *Journal of Food Science* , C1964-C1969, Vol. 79, Nr. 10.

B

Barve,A. *et al.* (2008). Murine prostate cancer inhibition by dietary phytochemicals–curcumin and phenylethylisothiocyanate. *Pharm. Re.*, 25, 2181–2189.

Beecher, C. W. (1994). Cancer preventive properties of varieties of *Brassica oleracea*: a review. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 1166S–1170S.

Belitz H.-D.,Grosch W., Schieberle P.(2011). Χημεία Τροφίμων, 4^η Έκδοση, Εκδόσεις ΤΖΙΟΛΑ .

Bhattacharya A, Tang L, Li Y, Geng F, et al.(2010). Inhibition of bladder cancer development by allyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*, 31:281–286.

Block, G., Patterson, B., and Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, 18: 1–29.

Blažević I, Mastelić J.(2009). Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Food Chem*, 113 (1): 96-102.

Bones AM, Rossiter JT.(1996) .The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol Plant*, 97: 194±208.

Bones, A. M., & Rossiter, J. T. (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 67, 1053–1067.

Borowski, J., Szajdek, A., Borowska, E. J., Ciska, E. and Zielinski, H. (2008). Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli

(*Brassica oleracea* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 226:459–465.

Botti, M.G., Taylor, M.G., Botting, N.P. (1995). Studies on the mechanism of myrosinase. Investigation of the effect of glycosyl acceptors on enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 20530–20535.

Brocker, E.R., Benn, M.H. (1983). The intramolecular formation of epithioalkanenitriles from alkenylglucosinolates by *Crambe abyssinica* seed flour. *Phytochemistry* , 22, 770–772.

Bruinsma M, Van Dam NM, Van Loon JJA, Dicke M. (2007). Jasmonic acid induced changes in *Brassica oleracea* affect oviposition preference of two specialist herbivores. *J Chem Ecol*, 33: 655–668.

Burmeister, W.P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S., Henrissat, B. (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure*, 5, 663–675.

Burow, M., Markert, J., Gershenzon, J., and Wittstock, U. (2006). Comparative biochemical characterization of nitrile forming proteins from plants and insects that alter myrosinase catalysed hydrolysis of glucosinolates. *FEBS J*, 273:2432–2446.

Burow, M., Zhang Z-Y, Ober, JA., Lambrix, VM., Wittstock, U., Gershenzon J., et al. (2011). ESP and ESM1 mediate indol-3-acetonitrile production from indol-3-ylmethyl glucosinolate in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*, 69(3):663±71.

C

Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L, et al. (2012). Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One*, 7(5):e38005.

Chang YC, Riby J, Chang GH, Peng BC, Firestone G, Bjeldanes LF. (1999). Cytostatic and antiestrogenic effects of 2-(indol-3-ylmethyl)-3,3'-diindolylmethane, a major in vivo product of dietary indole-3-carbinol. *Biochem Pharmacol*, 58:825-34.

Chinni SR, Sarkar FH. (2002). Akt inactivation is a key event in indole-3-carbinol-induced apoptosis in PC-3 cells. *Clin Cancer Res*, 8:1228–1236.

Choi Sunga, Lew Karen L, Xiao Hui, Herman-Antosiewicz Anna, Xiao Dong, Brown Charles K and Singh Shivendra V. (2007). D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1. *Carcinogenesis*, 151–162.

Ciska Ewa, Drabinska Natalia , Honke Joanna , Narwojsz Agnieszka.(2015). Boiled Brussels sprouts: A rich source of glucosinolates and the corresponding nitriles. *Journal of Functional Foods*, 19, 91–99.

Clarke, D.B.(2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal. Methods*, 2, 310–325.

Cole, R. A. (1976) . Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in cruciferae. *Phytochemistry*, 15, 759-762.

Collins AR. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. (2005). *Eur J Cancer*, 10: 1016.

Conaway, C.C., Wang, C.X., Pittman, B., Yang, Y.M., Schwartz, J.E., Tian, D., McIntee, E.J., Hecht, S.S., Chung, F.L.(2005). Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice. *Cancer Res*, 5, 548–557.

D

Dashwood R.H.,Uyetake L., Fong A.T., Hendricks, J.D.,& Bailey, G.S.,(1989).The synthesis of [³H]-indole-3-carbinol, a natural anti-carcinogen from cruciferous vegetables. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 27(8),901-907.

Daxenbichler, M.E., Spencer, G.F., Carlson, D.G., Rose, G.B.,Brinker, A.M., Powell,R.G.(1991). Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry* , 30,2623–2638.

Delaquis PJ, Sholberg PL. (1997). Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate. *J Food Prot* 60:943–947.

Delgass W.N., Cooks R.G., *Science*, 1987, 235,545.

De Vos M, Van Zaanen W, Koornneef A, Korzelius JP, Dicke M, Van Loon LC, Pieterse CMJ. (2006). Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 142: 352–363.

De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Me'traux J-P, Van Loon LC, Dicke M, et al. (2005). Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact*, 18: 923–937.

D'Souza, C.A., Amin, S., &Desai, D. (2003). A facile and efficient synthesis of ¹⁴C-labelled sulforaphane. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 46(9), 851-859.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P.(2002). Direct Evidence That Sulfhydryl Groups of Keap1 Are the Sensors Regulating Induction of Phase 2 Enzymes That Protect Against Carcinogens and Oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:11908–11913.

Dinkova-Kostova, A. T. & Kostov, R. V.(2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med*, 18, 337–347.

Donkin SG, Eiteman MA, Williams PL. (1995). Toxicity of glucosinolates and their enzymatic decomposition products to *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol* 27: 258–262.

E

Elfoul, L., Rabot, S., Khelifa, N., Quinsac, A., Duguay, A. and Rimbault, A. (2001). Formation of allylisothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS Microbiol Lett*, 197(1):99-103.

Ernst Insa M.A, Palani Kalpana, Esatbeyoglu Tuba, Schwarz Karin, Rimbach Gerald. (2013). Synthesis and Nrf2-inducing activity of the isothiocyanates iberiverin, iberin and cheirolin, *Pharmacological Research*, 70, 155– 162.

F

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. and Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5–51.

Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, et al. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a] pyreneinduced stomach tumors. *PNAS*, 99(11):7610±5.

Fahey, J. W., Wehage, S. L., Holtzclaw, W. D., Kensler, T. W., Egner, P. A., Shapiro, T. A. & Talalay, P. (2012). Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. *Cancer Prev Res (Phila,)* 5, 603–611.

Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C. and González-Gómez, D. (2013). Different postharvest strategies to preserve broccoli quality during storage and shelf life: Controlled atmosphere and 1-MCP. *Food Chem*, 138: 564-573.

Fimognari, C., Nüsse, M., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2004). The new isothiocyanate 4-(methylthio)butylisothiocyanate selectively affects cell cycle progression and apoptosis induction of human leukemia cells. *Invest. New Drugs*, 22, 119–129.

Foo, H.L., Gronning, L.M., Goodenough, L., Bones, A.M., Danielsen, B., Whiting, D.A., Rossiter, J.T., (2000). Purification and characterization of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. *FEBS Letters*, 468, 243–246.

Francis, F., Lognay, G., Wathelet, J.-P., Haubruge, E., (2002). Characterisation of aphid myrosinase and degradation studies of glucosinolates. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 50, 173–182.

Frank, M., Labov, S. E., Westmacott, G., Benner, W. H. (1999). ENERGY-SENSITIVE CRYOGENIC DETECTORS FOR HIGH-MASS BIOMOLECULE MASS SPECTROMETRY, *Mass Spectrom. Rev*, 18, 155–186.

Friis, P., Larsen, P.O., Olsen, C.E., 1977. Base-catalyzed Neber-type rearrangement of glucosinolates [1-(b-D-glucosylthio)-N-(sulfonatooxy) alkylideneamines]. *Journal of the Chemical Society*, 661–665.

Frydoonfar HR, McGrath DR, Spigelman AD.(2002). Inhibition of proliferation of a colon cancer cell line by indole-3-carbinol. *Colorectal Dis*, 4:205–207.

Frydoonfar HR, McGrath DR, Spigelman AD.(2003). The effect of indole-3- carbinol and sulforaphane on a prostate cancer cell line. *ANZ J Surg* , 73:154–156.

G

Gadamer, J., (1897)a. Uber das Sinigrin. *Ber.Dtsch. Chem. Ges.* 30, 2322– 2326.

Gadamer, J., (1897)b. Uber die Bestandteile der Schwarzen under Weissen Senfsamens. *Arch. Pharmazie.* 235, 44–49.

Galletti, S., Bernardi, R., Leoni, O., Rollin, P., and Palmieri, S. (2001).Preparation and biological activity of four epiprogoitrin myrosinase-derived products. *J. Agric. Food Che.,* 49, 471–476.

Gil, V., and MacLeod, A.J. (1980). The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucoside glucohydrolase preparation.*Phytochemistry* **19**, 2547–2551.

Graham, S. (1983). Results of case-control studies of diets and cancer in Buffalo, New York. *Cancer Res*, 43, 2409-2413.

H

Halkier B.A. and Gershenzon J. (2006). Biology and Biochemistry of Glucosinolate. *Ann Rev Plant Biol.* 57, 303-333.

Hanley, A.B., Kwiatkowska, C.A., Fenwick, G.R., (1990)a. Enzymatic hydrolysis of glucosinolates in a low water-system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51, 417–420.

Hanley, A.B., Parsley, K.R., Lewis, J.A., Fenwick, G.R., (1990)b. Chemistry of indole glucosinolates – intermediacy of indol-3-ylmethyl isothiocyanates in the enzymatic-hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2273–2276.

Hanley, A.B., Parsley, K.R., (1990). Identification of 1-methoxyindolyl-3- methyl isothiocyanate as an indole glucosinolate breakdown product. *Phytochemistry* , 29, 769–771.

Hanlon P, Barnes D. (2011). Phytochemical composition and biological activity of 8 varieties of radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts and mature taproots. *J Food Sci*, 76:185–192.

Hanschen FS, Herz C, Schlotz N, Kupke F, Bartolomé Rodríguez MM, Schreiner M, Rohn S, Lamy E. (2015). The Brassica epithionitrile 1-cyano-2,3-epithiopropene triggers cell death in human liver cancer cells in vitro, *Mol Nutr Food Res.* 59 (11):2178-89.

- Hanschens FS and Schreiner M. (2017). Isothiocyanates, Nitriles, and Epithionitriles from Glucosinolates Are Affected by Genotype and Developmental Stage in Brassica oleracea Varieties. *Front. Plant Sci.*, 8:1095.
- Hasapis, X., MacLeod, A.J. (1982). Benzylglucosinolate degradation in heat-treated *Lepidium sativum* seeds and detection of a thiocyanateforming factor. *Phytochemistry*, 21, 1009–1013.
- Henbest H. B., Jones E. R. H. & Smith G. F. (1953). Isolation of a new plant growth hormone, 3-indolylacetonitrile. *J. chem. Soc.* 3796.
- Hu, Q, Noll, RJ, Li, H, Makarov, A, Hardman, M, Graham Cooks, R . (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry : JMS.* 40 (4): 430–43.
- Hu,R. *et al.* (2006) Cancer chemoprevention of intestinal polyposis in ApcMin/+ mice by sulforaphane, a natural product derived from cruciferous vegetable. *Carcinogenesis*, 27, 2038–2046.
- Hwang, E. S. & Kim, G. H. (2009). Allyl isothiocyanate influences cell adhesion, migration and metalloproteinase gene expression in SKHep1 cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 234, 105–11.
- Holst B, Williamson G. (2004). A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep*, 21, 425-47.
- Hong C, Firestone GL, Bjeldanes LF. (2002). Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 63:1085–1097.
- Huang XP, Renwick JAA (1994) Relative activities of glucosinolates as oviposition stimulants for *Pieris rapae* and *Pieris napi* oleracea. *J Chem Ecol*, 20:1025–1037.
- Huber, J., Kranz, G., Kreibich, G., Beining, K., Kruger, M. and Weissbach, F. (1983). Mikrobieller abbau von Glucosinolaten im rapsectraktionsschrot. *Nahrung*, 27, 257–263.
- Husebye, H., Arzt, S., Burmeister, W.P., Haertel, F.V., Brandt, A., Rossiter, J.T., Bones, A.M. (2005). Crystal structure at 1.1. Å resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to β-glucosidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 1311–1320.

Howells LM, Gallacher-Horley B, Houghton CE, Manson MM, Hudson EA. (2003). Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDA MB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line. *Mol Cancer Ther* , 1:1161–1172.

Hwang E.-S., Jeffery E.H. (2003). Evaluation of urinary N-acetyl cysteinyl allyl isothiocyanate as a biomarker for intake and bioactivity of Brussels sprouts, *Food and Chemical Toxicology* , 41, 1817–1825.

I

Ishida Masahiko, Hara Masakazu, Fukino Nobuko , Kakizaki Tomohiro and Morimitsu Yasujiro. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of rassicaceae vegetables. *Breeding Science*, 64: 48–59.

J

Jakubíková Jana , Sedlak Jan , Mithen Richard , Bao Yongping. (2005). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology*, 69, 1543–1552.

Jeffery, E. H., & Keck, A. S. (2008). Translating knowledge generated by epidemiological and in vitro studies into dietary cancer prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(Suppl. 1), S7–17.

Jones A.J., Martin A.J.P. (1952). Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem J.*, 50(5):679-90.

K

Kalla Morten A., Vang Ole, Clausen Jorgen. (1997). Effects of dietary broccoli on human drug metabolising activity, *Cancer Letters*, 114, 169-170.

Kanematsu S, Uehara N, Miki H, Yoshizawa K, Kawanaka A, Yuri T, Tsubura A.(2010). Autophagy Inhibition Enhances Sulforaphane-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Anticancer Res*, 30:3381–3390.

Katdare M, Osborne MP, Telang NT.(1998). Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncol Rep*, 5:311– 315.

Kjaer Anders, Larsen Ivan, Gmelin Rolf, isoThiocyanates XIV.(1955). 5-Methylthiopentyl isoThiocyanate a New Mustard Oil Present in Nature as a Glucoside (Glucobrteroin), *Acta Chem. Scand.*, 9:1311-1316.

Katzung BG. (2012). Basic & Clinical Pharmacology (12th ed). New York: McGraw-Hill.

Kelly, P.J., Bones, A., Rossiter, J.T. (1998). Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta*, 206, 370–377.

Keum,Y.S. *et al.* (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of broccoli sprouts on the suppression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: implication of induction of Nrf2, HO-1 and apoptosis and the suppression of Akt-dependent kinase pathway. *Pharm. Res.*, 26, 2324–2331.

Khor,T.O. *et al.* (2008) . Chemoprevention of familial adenomatous polyposis in *ApcMin/+* mice by phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Mol. Carcinog*, 321–325.

Kim YS, Milner JA.(2005). Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J Nutr Biochem*.16:65– 73.

Kirkegaard, J. A., and Sarwar, M. (1998). Biofumigation potential of brassicas. I. Variation in plant glucosinolate profiles of diverse field grown brassicas. *Plant Soil* ,201:71-89.

Klein David. (2015).Οργανική χημεία για τις επιστήμες της ζωής, εκδόσεις UTOPIA, Αθήνα.

Klosterman, S. J., Attalah, Z. K., Vallad, G. E., and Subbarao, K. V. 2009. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. *Annu. Rev. Phytopathol*, 49:39-62.

Koenraad F.M.-J. Tierens, Bart P.H.J. Thomma, Margreet Brouwer, Jurgen Schmidt, Katherine Kistner, Andrea Porzel, Brigitte Mauch-Mani, Bruno P.A. Cammue, and Willem F. Broekaert. (2001). Study of the Role of Antimicrobial Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Resistance of *Arabidopsis* to Microbial Pathogens. *Plant Physiol*, Vol. 125(4) : 1688–1699.

Kohlmeier, L.; Su, L.(1997). Cruciferous vegetable consumption and colorectal cancer risk: meta-analysis of the epidemiological evidence. *FASEB J*, 11, 369.

Koike, S. T., Subbarao, K. V., Davis, R. M., Gordon, T. R., and Hubbard, J. C. 1994. Verticillium wilt of cauliflower in California. *Plant Dis*, 78:1116-1121.

Kokotou M. G., Revelou P.-K., Pappas C., Constantinou-Kokotou V.(2017). High resolution mass spectrometry studies of sulforaphane and indole- 3-carbinol in broccoli. *Food Chem.* , 237, 566-573.

Koroleva, O. A., Gibson, T. M., Cramer, R. & Stain, C. (2010). Glucosinolate-accumulating S-cells in Arabidopsis leaves and flowerstalks undergo programmed cell death at early stages of differentiation. *Plant J*, 64, 456–469.

Kriechbaumer, V., Park, W. J., Piotrowski, M., Meeley, R. B., Gierl, A., and Glawischnig, E. (2007). Maize nitrilases have a dual role in auxin homeostasis and beta-cyanoalanine hydrolysis. *J. Exp. Bot*, 58, 4225–4233.

Krull C, Humblot C, Philippe C, et al. (2002). Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic *in vitro* large-intestinal model. *Carcinogenesis*, 23, 1009-16.

Kurilich, A. C., Tsau, G. J., Brown, A., Howard, L., Klein, B. P., Jeffery, E. H., Kushad,M.,Wallig,M. A. and Juvik, J. A. (1999). Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *J. Agric. Food Chem*, 47:1576–1581.

Kushad, M. M., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Juvik, J. A., Klein, B. P., Wallig, M. A., et al. (1999). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 1541–1545.

Kyung KH, Fleming HP. (1997). Antimicrobial activity of sulfur compounds derived from cabbage. *J Food Prot*, 60:67–71.

L

Lai, K. C. *et al.*(2014). Allyl isothiocyanate inhibits cell metastasis through suppression of the MAPK pathways in epidermal growth factor stimulated HT29 human colorectal adenocarcinoma cells. *Oncol. Rep*. 31, 189–196.

Lamy, E., Schröder, J., Paulus, S., Brenk, P., Stahl, T., Mersch-Sundermann, V. (2008). Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erucic acid in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. *Food Chem. Toxicol*, 46, 2415–2421.

Lambrix V, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ, Gershenzon J. (2001). The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell*, 13: 2793–2807.

Llanos Palop, M., Smiths, J.P. and ten Brink, B. (1995). Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16. *Int J Food Microbiol* 26, 219–229.

Loub W. D., Wattenberg L. W. & Davis D. W. (1975). Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occurring indoles of Cruciferous plants. *J. natn. Cancer Inst.* 54, 985.

Louhivuori, L. M. *et al.* (2009). Differentiation dependent expression of TRPA1 and TRPM8 channels in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J. Cell. Physiol.* 221, 67–74.

Ludikhuyze, L., Rodrigo, L. and Hendrickx, M. (2000). The activity of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. *Italica*): influence of intrinsic and extrinsic factors. *J. Food Protect.* 63:400–403.

Luthy, J., Benn, M.H., 1977. Thiocyanate formation from glucosinolates: a study of the autolysis of allylglucosinolate in *Thlaspi arvense* L. seed flour extracts. *Canadian Journal of Biochemistry.* 55, 1028– 1031.

M

MacGibbon, D. B. & Beuzenberg, E. J. (1978). Location of glucosinase in *Brevicoryne brassicae* and *Lipaphis erysimi* (Aphididae). *N Z J Sci*, 21, 389–392.

MacLeod, A.J., and Rossiter, J.T. (1986). Isolation and examination of thioglucoside glucosyltransferase from seeds of *Brassica napus*. *Phytochemistry* 25, 1047–1051.

- Maheshwari, P.N., Stanley, D.W., Van de Voort, F.R., Gray, J.I. (1980). The heat stability of allylglucosinolate (sinigrin) in aqueous and model systems. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* ,13, 28–32.
- Manici LM, Lazzeri L, Palmieri S (1997) In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *J Agric Food Chem* 45:2768–2773.
- Matusheski, N. V.; Jeffery, E. H.(2001). Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5743–5749.
- Matusheski, N.V., Juvik, J.A., Jeffery, E.H. (2003). Sulforaphane content and bioactivity of broccoli sprouts are enhanced by heat processing: A role for epithiospecifier protein. *FASEB Journal*, 17, A377.
- Matusheski, N.V., Juvik, J.A., Jeffery, E.H.(2004). Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry* 65, 1273–1281.
- McCune,K. *et al.* (2010). Loss of ERa and FOXA1 expression in a progression model of luminal type breast cancer: insights from PyMT transgenic mouse model. *Oncol. Rep.*, 24, 1233–1239.
- McMURRY J.(2010). Οργανική Χημεία τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Αθήνα.
- Melchini A., Costa C., Traka M. , Miceli N. , Mithen R., De Pasquale R. , Trovato A. (2009). Erucin, a new promising cancer chemopreventive agent from rocket salads, shows anti-proliferative activity on human lung carcinoma A549 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47 1430–1436.
- Michaud, D. S., Spiegelman, D., Clinton, S. K., Rimm, E. B., Willett, W. C., and Giovannucci, E. L.(1999). Fruit and vegetable intake and incidence of bladder cancer in a male prospective cohort. *J. Natl. Cancer Inst*, 91: 605–613, 1999.
- Miles Carol I. , del Campo Z Marta L., Renwick J. Alan A.(2008). Indole-3-Acetonitrile Production from Indole Glucosinolates Deters Oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiology*, 146,916–926.

Miles CI, del Campo ML, Renwick JA. (2005). Behavioral and chemosensory responses to a host recognition cue by larvae of *Pieris rapae*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 191: 147–155.

Mithen, R. F., Dekker,M., Verkerk, R., Rabot, S. and Johnson, I. T. (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J. Sci. Food Agric.* 80:967–984.

Mi-Ok Ko , Mi-Bo Kim, and Sang-Bin Lim. (2016). Relationship between Chemical Structure and Antimicrobial Activities of Isothiocyanates from Cruciferous Vegetables against Oral Pathogens , *J. Microbiol. Biotechnol*, 26(12), 2036–2042.

Mukerjee AK, Ashare R. (1991). Isothiocyanates in the chemistry of heterocycles. *Chem Rev*, 91:1–24.

Müller, A., Hillebrand, H., and Weiler, E. W. (1998). Indole-3-acetic acid is synthesized from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* , 206, 362–369.

N

Nachshon-Kedmi M, Yannai S, Haj A, Fares FA. (2003). Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food Chem Toxicol*, 41:745–752.

Neubauer Christian, Heitmann Benedikt, Caroline Müller. (2014). Biofumigation potential of Brassicaceae cultivars to *Verticillium dahliae*, *Eur J Plant Pathol* 140:341–352.

Nho Chu Won, Jeffery Elizabeth. (2004). Crambene, a bioactive nitrile derived from glucosinolate hydrolysis, acts via the antioxidant response element to upregulate quinone reductase alone or synergistically with indole-3-carbinol, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198 , 40–48.

Njoroge S. M. C., Vallad G. E., Park S.-Y., Kang S., Koike S. T., Bolda M., Burman P., Polonik W., and Subbarao K. V.(2011).. Phenological and Phytochemical Changes Correlate with Differential Interactions of *Verticillium dahliae* with Broccoli and Cauliflower. *Phytopathology*.,101(5):523-34.

Numazawa S, Takase M, Ahiko T, Ishii M, Shimizu S, Yoshida T.(2012). Possible involvement of transient receptor potential channels in electrophile-induced insulin secretion from RINm5F cells. *Biol Pharm Bull*,35(3):346–54.

O

Ohtsuru, M., Tsuruo, I. & Hata, T. (1969). Studies on fungous myrosinase. Part II. Effects of various reagents on its enzymatic activities. *Agric Biol Chem*, 33, 1315–1319.

O’Callaghan, K.J., Stone, P.J., Hu, X., Griffiths, D.W., Davey, M.R. and Cocking, E.C. (2000) . Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the root of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2185–2191.

Ogawa,K. *et al.* (1998). Stage and organ dependent effects of 1-*O*-hexyl-2,3, 5-trimethylhydroquinone, ascorbic acid derivatives, n-heptadecane-8-10-dione and phenylethyl isothiocyanate in a rat multiorgan carcinogenesis model. *Int. J. Cancer*, 76, 851–856.

Oginsky, E.L., Stein, A.E. and Greer, M.A. (1965). Myrosinaseactivity in bacteria as demonstrated by the conversion of progoitrin to goitrin. *Proc Soc Exp Med*, 119, 360–364.

Ohtsuru, M. and Hata, T. (1973). General characteristics of the intracellular myrosinase from *Aspergillus niger*. *Agric Biol Chem* 37, 2543–2548.

Ohtsuru, M., Hata, T.. (1979). The interaction of L-ascorbic acid with the active center of myrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 567, 384–391.

Ohtsuru, M., Tsuruo, I., Hata, T. (1973). Studies on fungous myrosinase. Production and stability of intracellular myrosinase from *Aspergillus niger*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37, 967–971.

Olivier Claudia , Vaughn Steven f., Mizubuti Eduardo S. G., and Rosemary Loria. (1999). Variation in allyl isothiocyanate production within *brassica* species and correlation with fungicidal activity. *Journal of Chemical Ecology*, 25(12):2687-2701.

P

Park H. M., Kim J.A., and Kwak M.K. (2009). “Protection against amyloid beta cytotoxicity by sulforaphane: role of the proteasome” . *Archives of Pharmacal Research*, vol. 32, no. 1, pp. 109–115.

Park Jonghoo and Blick Robert H. (2016). Mechanical Modulation of Phonon-Assisted Field Emission in a Silicon Nanomembrane Detector for Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Sensors (Basel)*, 16(2): 200.

Park, W. J., Kriechbaumer, V., Moller, A., Piotrowski, M., Meeley, R. B., Gierl, A., et al. (2003). The Nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiol*, 133, 794–802.

Polat Umit. (2010). The Effects on Metabolism of Glucosinolates and Theirs Hydrolysis Products. *J. BIOL. ENVIRON*, 4(10), 39-42.

Pozzani U.C., Carpenter C.P., Palm P.E., Weil C.S. and Nair J.H.(1959). Mammalian toxicity of acetonitrile, *J. Occup. Med.*, 1 (1959) 634.

Pantuck E. J., Hsiao K. C., Loub W. D., Wattenberg L. W., Kuntzman R. & Conney A. H. (1976). Stimulating effect of vegetables on intestinal drug metabolism in the rat. *J. Pharmac. exp. Ther*, 198, 278.

R

Radošević Kristina , Srcek Višnja Gaurina, Bubalo Marina Cvjetko, Brncić Suzana Rimac, Takács Krisztina, Radojčić Redovniković Ivana. (2017). Assessment of glucosinolates, antioxidative and antiproliferative activity of broccoli and collard extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 59–66.

Radojčić Redovniković Ivana, Glivetić Tatjana, Delonga Karmela, Vorkapić-Furac Jasna. (2008). Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum Biologorum UDC*, 57:61 VOL. 110, No 4, 297–309.

Rahman KM, Aranha O, Sarkar FH. (2003). Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells. *Nutr Cancer*, 45:101–112.

Raymer P.L. (2002) Canola: An emerging oilseed crop, in: Janwick J., Whipkey A. (Eds.), Trends in new crops and new uses, ASHS Press, Alexandria, VA, USA.

Rangkadilok, N., M.E. Nicolas, R.N. Bennett, R.R. Premier, D.R. Eagling and P.W.J. Taylor. (2002). Developmental changes of sinigrin and glucoraphenin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *Italica*). *Sci. Hortic*, 96: 11–26.

Renwick JAA, Radke CD, Sachdev-Gupta K, Stadler E. (1992). Leaf surface chemicals stimulating oviposition by the *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) on cabbage. *Chemoecology*, 3:33–38.

Renwick JAA, Lopez K. (1999). Experience-based food consumption by larvae of *Pieris rapae*: addiction to glucosinolates. *Entomol Exp Appl*, 91:51–58.

Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12: 707–719.

Rodman JE, Karol KG, Price RA, Sytsma KJ. (1996). Molecules, morphology, and Dahlgrens expanded order Capparales. *Syst. Bot*, 21:289–307.

Rogan EG. (2006). The natural chemopreventive compound indole-3-carbinol: state of the science. *In Vivo*, 20:221–228.

Rosa, E. A. S., & Heaney, R. K. (1993). The effect of cooking and processing on the glucosinolate content: studies on four varieties of Portuguese cabbage and hybrid white cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 259–265.

Rungapamestry, V.; Duncan, A. J.; Fuller, Z.; Ratcliffe, B. (2007). Effect of cooking *Brassica* vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *Proc. Nutr. Soc*, 66, 69–81.

S

Saarivirta, M.(1973)a. Formation of benzyl cyanide, benzyl thiocyanate, benzyl isothiocyanate and benzylamine from benzyl glucosinolate in *Lepidium*. *Farmaseuttinen Aikakauslehti* , 82, 11–15.

Saarivirta, M., (1973)b. Formation of benzyl cyanide, benzyl thiocyanate, benzyl isothiocyanate, and benzylamine from benzyl glucosinolate in *Lepidium*. *Planta Medica*, 24, 112–119.

Samuelsson Gunnar. (2015). Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προελεύσεως. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Sang, J.P., I.R. Minchinton, P.K. Johnstone and R.J.W. Truscott. (1984). Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Can. J. Plant Sci*, 64: 77–93.

Sarkar FH, Li Y. (2004). Indole-3-carbinol and prostate cancer. *J Nutr*, 134:3493S–3498S.

Saunders D. L. (1977), *J. Chromatogr. Sci.*, 15, 372

Savio, A. L., da Silva, G. N. & Salvadori, D. M. (2015). Inhibition of bladder cancer cell proliferation by allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 771, 29–35.

Schmid, H., Karrer, P., (1948)a. Constituents of radish. I. Sulforaphen, a mustard oil from radish seed (*Raphanus sativus* var. *alba*). *Helvetica Chimica Acta*, 31, 1017–1028.

Schmid, H., Karrer, P., (1948)b. Constituents of radish. II. Optically active 4-(methylsulfinyl)-3-butenyl cyanide as cleavage product of a glycoside from *R. sativus* seeds. *Helvetica Chimica Acta* 31, 1087–1092.

Schoonhoven LM. (1972). Secondary plant substances and insects. *Recent Adv Phytochem*, 5:197–224.7

Shen, L., Su, G., Wang, X., Du, Q., Wang, K., (2010). Endogenous and exogenous enzymolysis of vegetable-sourced glucosinolates and influencing factors. *Food Chem*, 119, 987e994.

Shapiro, T.A., Fahey, J.W., Wade, K.L., Stephenson, K.K., Talalay, P. (2001). Chemopreventive glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol. Biomark Prevent*, 10, 501–508.

Sharma Anubhuti, Sharma Ashok, Yadav Prashant, Singh Dhiraj. (2016). Isothiocyanates in Brassica: Potential Anti Cancer Agents, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (9), 4507-4510.

Sharma, C.; Sadrieh, L.; Priyani, A.; Ahmed, M.; Hassan, A.H.; Hussain, A. (2011). Anti-carcinogenic effects of sulforaphane in association with its apoptosis-inducing and anti-inflammatory properties in human cervical cancer cells. *Cancer Epidemiol*, 35, 272–278.

Shertzer H. G. (1984). Indole-3-carbinol protects against covalent binding of benzo[a]pyrene and N-nitrosodimethylamine metabolites to mouse liver macromolecules. *Chemico-Biol. Interactions* 48, 81.

Singh SV, Singh K. (2012). Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*, 33, 1833-1842.

Skoog D.A., Holler J.F., Nieman T.A. (2005). Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 5^η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα.

Skoog D.A., Holler J.F., Crouch S.R. (2007). Αρχές ενόργανης ανάλυσης, 6^η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα.

Sønderby, I.E., M. Burow, H.C. Rowe, D.J. Kliebenstein and B.A. Halkier. (2010) a Complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 153: 348–363.

Sones K, Heaney RK, Fenwick GR (1984). An estimate of the mean daily intake of glucosinolates from cruciferous vegetables in the UK. *J Sci Food Agric*, 35, 712-20.

Song Lijiang, Thornalley Paul J.(2007). Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 45,216–224.

Srivastava, S. K. *et al.*(2003). Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits growth of PC-3 human prostate cancer xenograft *in vivo*. *Carcinogenesis*, 24, 1665–1670.

Stadler E, Renwick JAA, Radke CD, Sachdev-Gupta K. (1995). Tarsal contact chemoreceptors response to glucosinolates and cardenolides mediating oviposition in *Pieris rapae*. *Physiol Entomol*, 20: 175–187.

Staron, T. (1975). Obtention des proteines a partir des grains oleagineuses par des methodes microbiologiques. *Proteins e Graines Oleagineuses*, 11-12, 579–589.

Steinmetz, K. A., and Potter, J. D.(1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, 96: 1027–1039.

Subbarao KV, Hubbard JC, Koike ST.(1999). Evaluation of broccoli residue incorporation into field soil for *Verticillium* wilt control in cauliflower. *Plant Disease*, 83:124-9.

T

Talalay, P. and Fahey, J.W. (2001). Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *Journal of Nutrition*, 131(11 supplement):3027S-3033S.

Tani, N., Ohtsuru, M. & Hata, T. (1974)a. Isolation of myrosinase producing microorganism. *Agric Biol Chem*, 38, 1617–1622.

Tani, N., Ohtsuru, M. & Hata, T. (1974)b. Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agric Biol Chem*, 38, 1623–1630.

Tanii, H., Higashi, T., Nishimura, F., Higuchi, Y., & Saijoh, K. (2008). Effects of cruciferous allyl nitrile on phase 2 antioxidant and detoxification enzymes. *Medical Science Monitor*, 14(10), 189– 192.

Terofal F. (1965). Zum Problem der Wirtsspezifität bei Pieriden (Lep.). *Mitt Mu nch Ent Ges*, 55: 1–76.

Thimann, K. V. (1953). Hydrolysis of indoleacetonitrile in plants. *Arch. Biochem. Biophys*, 44, 242–243.

Tocco Graziella I , Zedda Gloria , Casu Mariano, Simbula I Gabriella D and Begala Michela. (2017). Solvent-Free Addition of Indole to Aldehydes:Unexpected Synthesis of Novel 1-[1-(1H-Indol-3-yl)Alkyl]-1H-Indoles and Preliminary Evaluation of Their Cytotoxicity in Hepatocarcinoma Cells. *Molecules*, 2017, 22, 1747.

Tremsin, A.S.; McPhate, J.B.; Steuwer, A.; Kockelmann, W.; Paradowska, A.M.; Kelleher, J.F.; Vallerga, J.V.; Siegmund, O.H.W.; Feller, W.B. (2011). "High-Resolution Strain Mapping Through Time-of-Flight Neutron Transmission Diffraction with a Microchannel Plate Neutron Counting Detector". *Strain*, 48 (4): 296–305.

Trinh K., Moore K., Wes P. D. et al. (2008). "Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in *Drosophila* models of Parkinson's disease," *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 2, pp. 465–472.

Tripathi, M.K. and A.S. Mishra. (2007). Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Tech*, 132: 1–27.

Tripathi, K. et al. (2015). Allyl isothiocyanate induces replication-associated DNA damage response in NSCLC cells and sensitizes to ionizing radiation. *Oncotarget*, 6, 5237–5252.

Tsai, S. C. et al. (2012). ERK-modulated intrinsic signaling and G2/M phase arrest contribute to the induction of apoptotic death by allyl isothiocyanate in MDA-MB-468 human breast adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 41, 2065–2072.

V

VanEtten, C.H., Daxenbichler, M.E., Peters, J.E., Tookey, H.L.(1966). Variation in enzymatic degradation products from the major thioglucosides in *Crambe abyssinica* and *Brassica napus* seed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14, 426–430.

Van Etten, C. H., Daxenbichler, M. E., & Wolff, I. A. (1969). Natural glucosinolates (thioglucosides) in foods and feeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 17, 483–491.

VanEtten, C.H., Tookey, H.L.(1983). Glucosinolates. In: Rechcigl, M. (Ed.), *Naturally Occurring Food Toxicants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 15–30.

Van Loon JJA, Blaakmeer A, Griepink FC, van Beek TA, Schoonhoven LM, de Groot A (1992) Leaf surface compound from *Brassica oleracea* induces oviposition by *Pieris brassicae*. *Chemoecology*, 3:39–44.

Van Nispen SPJM, Bregman JH, van Engen DG, van Leusen AM, Saikachi H, Kitagawa T, Sasaki H. (1982). Synthesis of thiazoles and imidazoles from isothiocyanates and To-sylmethy-isocyanide. Base-induced ring transformation of 5-amino-1,3-thiazoles to imidazole-5-thiols. *Recueil Travaux Chim Pays-Bas* 101:28–34.

Van Poppel, G., Verhoeven, D. T., Verhagen, H., and Goldbohm, R. A.(1999). Brassica vegetables and cancer prevention. *Epidemiology and mechanisms. Adv. Exp. Med. Biol.*, 472: 159–168.

Vaughn, S.F.(1999) . Glucosinolates as natural pesticides. In: Cutler, H.G. and Cutler, S.J., (Eds.), Principles & Practices in Plant Allelochemical Interactions. *CRC Press, Boca Raton, FL*, pp. 81–91.

Verhoeven, D. T. H., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H. and van den Brandt, P. A. (1996). Epidemiological studies on *Brassica* vegetables and cancer risk. *Cancer Epidem. Biomar*, 5:733–748.

Verkerk, R., M. Schreiner, A. Krumbein, E. Ciska, B. Holst, I. Rowland, R.D. Schrijver, M. Hansen, C. Gerhäuser, R. Mithen *et al.* (2009). Glucosinolates in *Brassica* vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Mol. Nutr. Food Res*, 53: S219–S265.

Verschaffelt E. (1910). The cause determining the selection of food in some herbivorous insects. *Proc R Acad Amst* ,13:536–542.

Vig A, Rampal G, Thinda TH, Arora S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates – a review. *LWT – Food Sci Technol* , 42:1561–1572.

Vos de Martin , Kriksunov Ksenia L., and Jander Georg. (2008). Indole-3-Acetonitrile Production from Indole Glucosinolates Deters Oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiology*, Vol. 146, pp. 916–926.

W

Wade L.G.,JR. (2016). ORGANIKH XHMEIA, Εκδόσεις Τζιόλα.

Wagner, A.E.; Terschluessen, A.M.; Rimbach, G.(2013). Health promoting effects of brassica-derived phytochemicals: From chemopreventive and anti-inflammatory activities to epigenetic regulation. *Oxid. Med. Cell. Longev*, Article ID 964539, 12 pages.

Wallsgrave, R.M., Bennett, R.N. and Doughty, K. (1998). Glucosinolates. In *Plant Aminoacids- Biochemistry and Biotechnolgy ed. Singh, B.K.* pp. 523–561, New York: Marcel Dekker, Inc.

Wang Nan, Wang Wei, Liu Caiqin, Jin Jianchang, Shao Bo and Shen Lianqing. (2016). Inhibition of growth and induction of apoptosis in A549 cells by compounds from oxheart cabbage extract, *J Sci Food Agric*, 96: 3813–3820.

Wattenberg, L. W.; Loub, W. D. (1978). Inhibition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-induced Neoplasia by Naturally Occurring Indoles. *Cancer Res*, 38, 1410-1413.

Wiza, J. (1979). "Microchannel plate detectors". *Nuclear Instruments and Methods*, 162 (1–3): 587–601.

Wilson AE, Bergaentzlé M, Bindler F, Marchioni E, Lintz A, Ennahar S .(2013). In vitro efficacies of various isothiocyanates from cruciferous vegetables as antimicrobial agents against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control* 30:318–324.

WITTSTOCK, U., AGERBIRK, N., STAUBER, E. J., OLSEN, C. E., HIPPLER, M., MITCHELL-OLDS, T., GERSHENZON, J., and VOGEL, H. (2004). Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,101:4859–4864.

World Cancer Research Fund. Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research,1997.

Wortelboer HM, van der Linden EC, de Kruif CA, Noordhoek J, Blaauboer BJ, van Bladeren PJ, Falke HE. (1992). Effects of indole-3-carbinol on biotransformation enzymes in the rat: In vivo changes in liver and small intestinal mucosa in comparison with primary hepatocyte cultures. *Food Chem Toxicol*, 30:589-99.

X

Xiao, D. *et al.*(2003). Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis* 24, 891–897.

Xu, K. & Thornalley, P. J.(2000). Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates andtheir cysteine adducts *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 60, 221–231.

Y

Yamada F, Hashizume T, Somei M., (1988). Simple one step syntheses of indole-3-acetonitrile from indole-3-carboxaldehydes. *Heterocycles*. 47(1):509-516.

Z

Zang, X., Tanii, H., Kobayashi, K., Higashi, T., Oka, R., Koshino, Y., & Saijoh, K. (1999). Behavioral abnormalities and apoptotic changes in neurons in mice brain following a single administration of allylnitrile. *Archives of Toxicology*, 73, 22–32.

Zhang, Y.; Talalay, P.; Cho, C.G.; Posner, G.H.(1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 89, 2399–2403.

Zsolnai T. (1966). Antimicrobial effect of thiocyanates and isothiocyanates. *Arztl Forsch*, 16:870–876.

Zubía E, Ortega MJ, Hernández-Guerrero CJ, et al .(2008). Isothiocyanate sesquiterpenes from a sponge of the genus axinyssa. *J Nat Prod*, 71, 608-14.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι - ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΑΙΣ

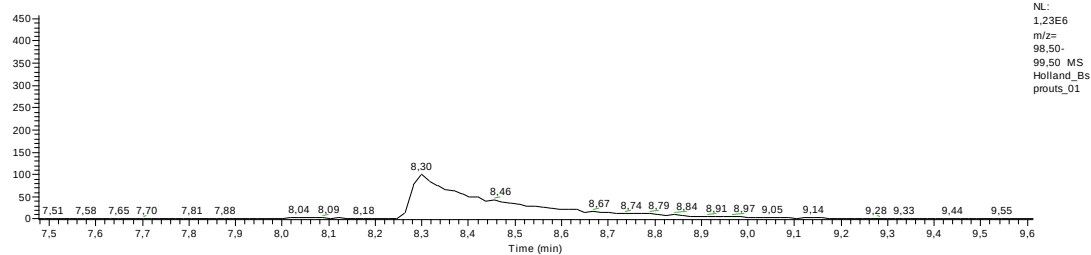
ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΟΛΛΑΝΔΙΑΣ

C:\Users\...\Holland_Bsprouts (1pros10_a

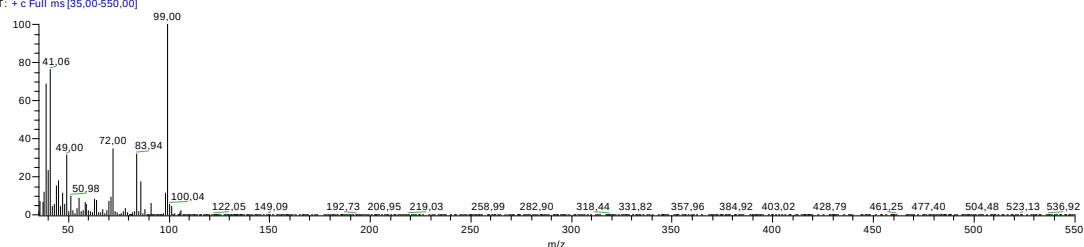
20/10/2018 3:28:58 μμ

1pros10_a

RT: 7.48 - 9.61



Holland_Bsprouts_01 #189 RT: 8.30 AV: 1 NL: 1.23E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

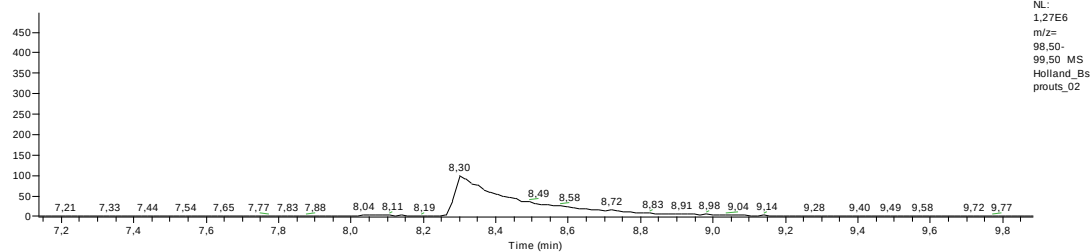


C:\Users\...\Holland_Bsprouts (1pros10_b

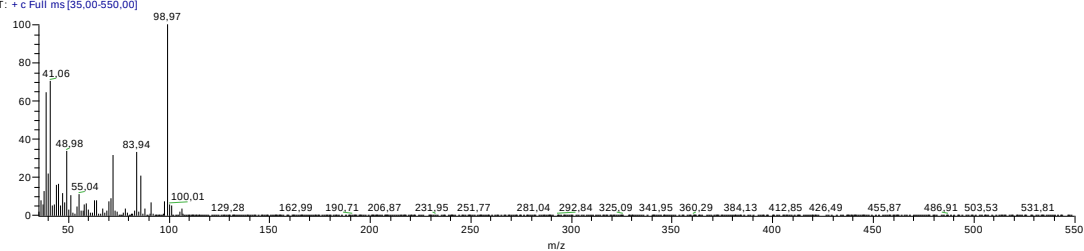
20/10/2018 4:18:27 μμ

1pros10_b

RT: 7.14 - 9.88



Holland_Bsprouts_02 #189 RT: 8.30 AV: 1 NL: 1.27E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

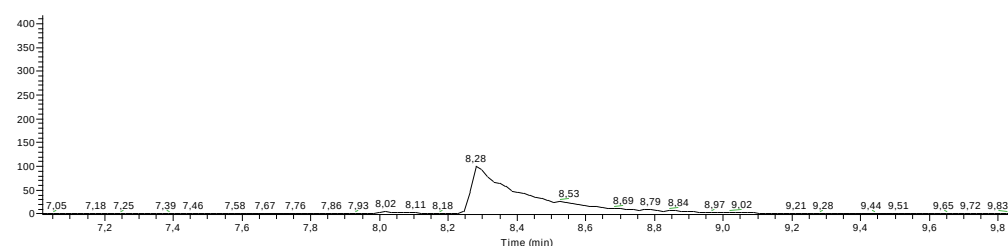


C:\Users\...\Holland_Bsprouts_
1pros10_c

30/10/2018 2:25:01 μμ

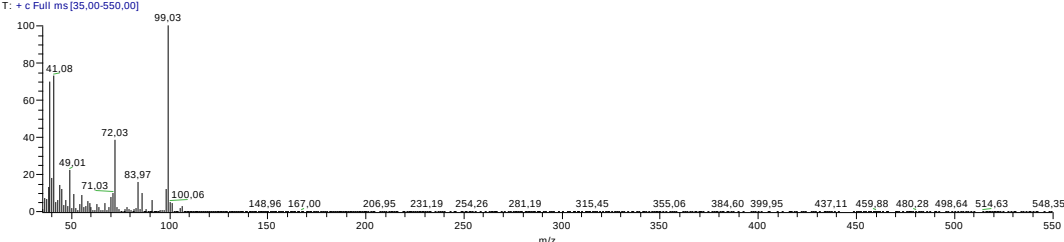
1pros10_c

RT: 7.02 - 9.84



NL:
1.42E6
m/z=
98.50-
99.50 MS
Holland_BS
prouts_03

Holland_Bsprouts_03 #188 RT: 8.28 AV: 1 NL: 1.42E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



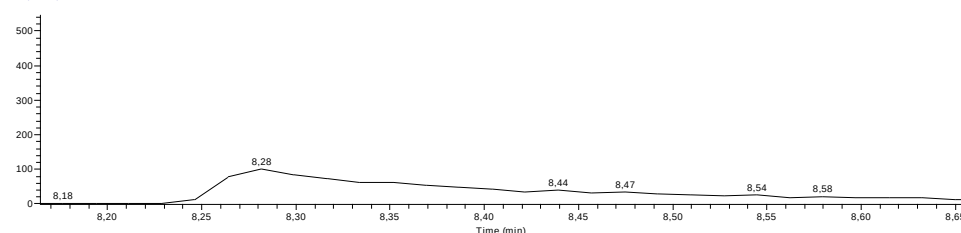
ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

C:\Users\...\VAXANAKIAIthessa
1pros10_a

19/10/2018 6:29:12 μμ

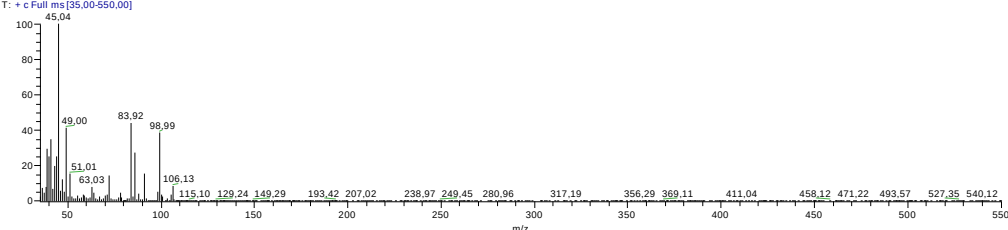
thessaloniki_1pros10_a

RT: 8.16 - 8.65



NL:
3.56E5
m/z=
98.50-
99.50 MS
thessaloniki
_01

thessaloniki_01 #188 RT: 8.28 AV: 1 NL: 9.20E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

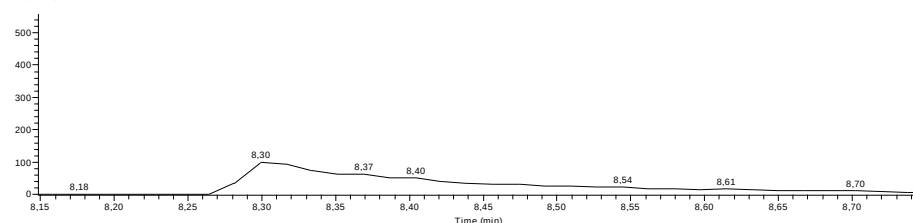


C:\Users\...\VAXANAKIAIthessa
1pros10_b

20/10/2018 12:57:07 μμ

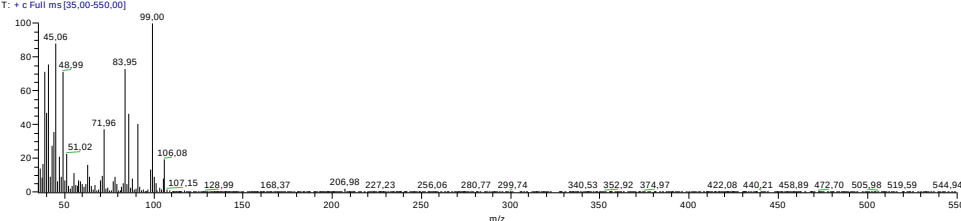
1pros10_b

RT: 8.15 - 8.75



NL:
5.24E5
m/z=
98.50-
99.50 MS
thessaloniki
_02

thessaloniki_02 #189 RT: 8.30 AV: 1 NL: 5.24E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

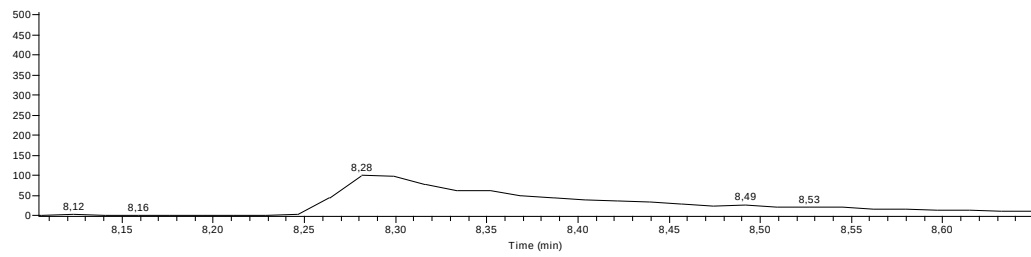


C:\Users\...\AXANAKIA\thessa
1pros10_c

30/10/2018 1:36:31 μμ

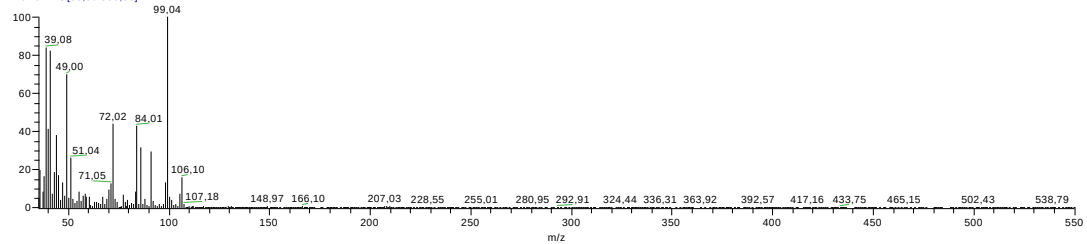
1pros10_c

RT: 8.10 - 8.65



NL:
4.59E5
m/z=
98.50-
99.50 MS
thessaloniki
_03

thessaloniki_03 #188 RT: 8.28 AV: 1 NL: 4.59E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



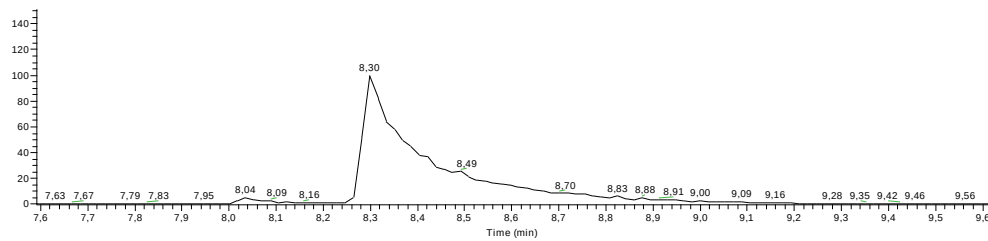
ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ BONITSA

C:\Users\...\Vonitsa_Bsprouts_
1pros10_a

20/10/2018 1:48:09 μμ

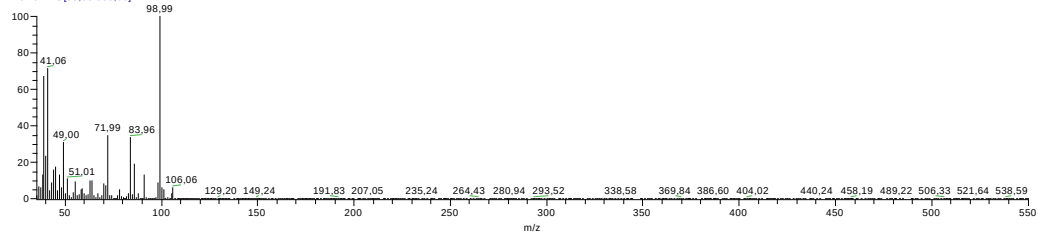
1pros10_a

RT: 7.59 - 9.61



NL:
1.16E6
m/z=
98.50-
99.50 MS
Vonitsa_Bs
prouts_01

Vonitsa_Bsprouts_01 #189 RT: 8.30 AV: 1 NL: 1.16E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

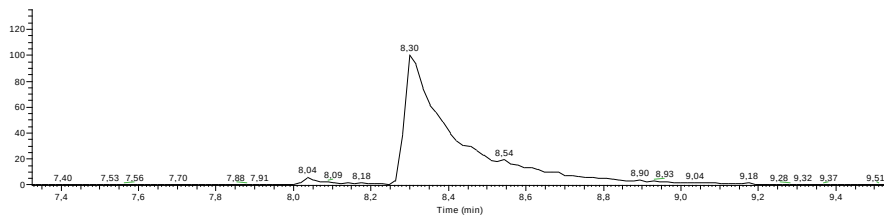


C:\Users\...\Vonitsa_Bsprouts_
1pros10_b

20/10/2018 2:39:20 μμ

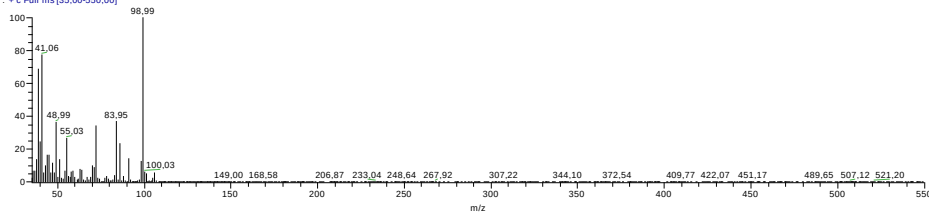
1pros10_b

RT: 7.32 - 9.54



NL:
1.08E6
m/z=
98.50-
99.50 MS
Vonitsa_Bs
prouts_02

Vonitsa_Bsprouts_02 #189 RT: 8.30 AV: 1 NL: 1.08E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

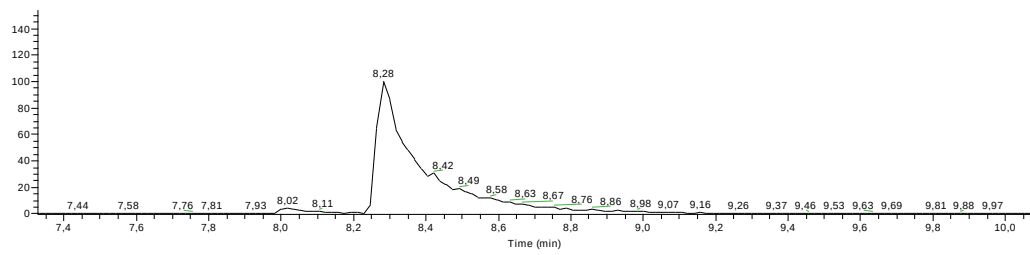


C:\Users\...\Vonitsa_Bsprouts_ (1pros10_05

6/11/2018 10:56:39 μμ

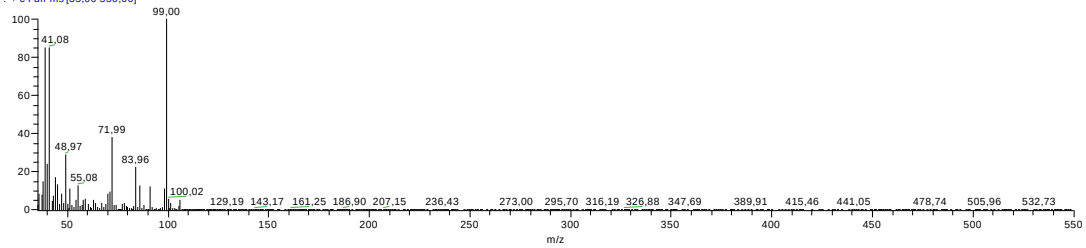
1pros10_05

RT: 7.33 - 10.07



NL: 9,51E5
m/z= 98,50-
99,50 MS
Vonitsa_Bs
prouts_05

Vonitsa_Bsprouts_05 #188 RT: 8.28 AV: 1 NL: 9,51E5
T: + c Full ms [35,00-550,00]



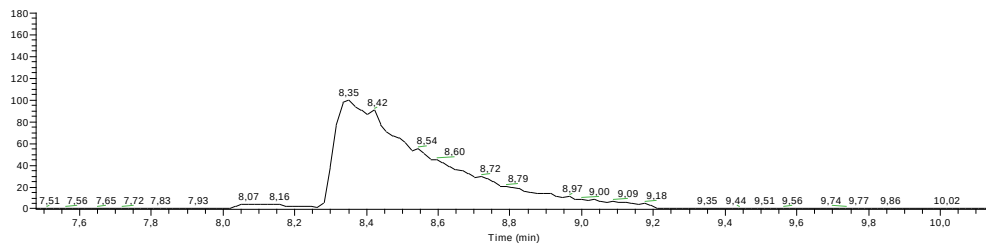
ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ

C:\Users\...\ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ\savoi_ (1pros10_a

20/10/2018 5:55:36 μμ

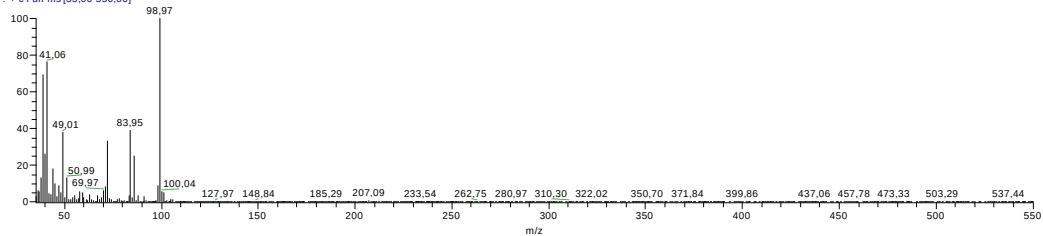
1pros10_a

RT: 7.48 - 10.15



NL: 1,04E6
m/z= 98,50-
99,50 MS
savoi_Gree
ce_01

savoi_Greece_01 #191 RT: 8.33 AV: 1 NL: 1,02E6
T: + c Full ms [35,00-550,00]

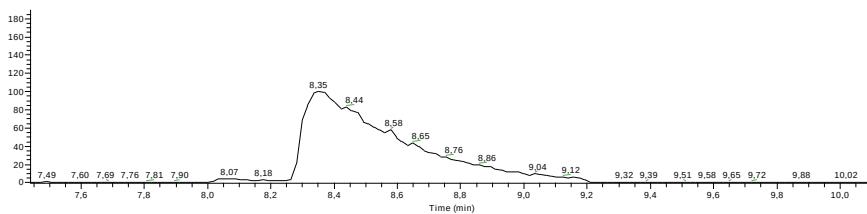


C:\Users\...\ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ\savoi_ (1pros10_b

20/10/2018 6:44:12 μμ

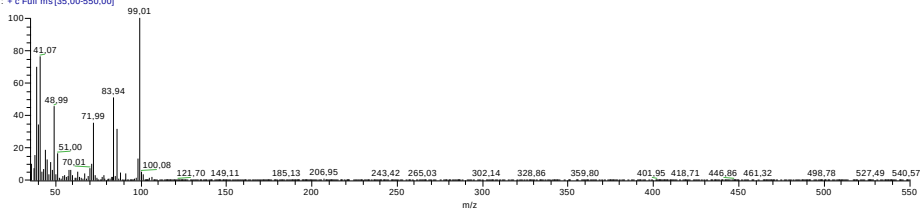
1pros10_b

RT: 7.44 - 10.11



NL: 7,85E5
m/z= 98,50-
99,50 MS
savoi_Gree
ce_02

savoi_Greece_02 #192 RT: 8.35 AV: 1 NL: 7,85E5
T: + c Full ms [35,00-550,00]

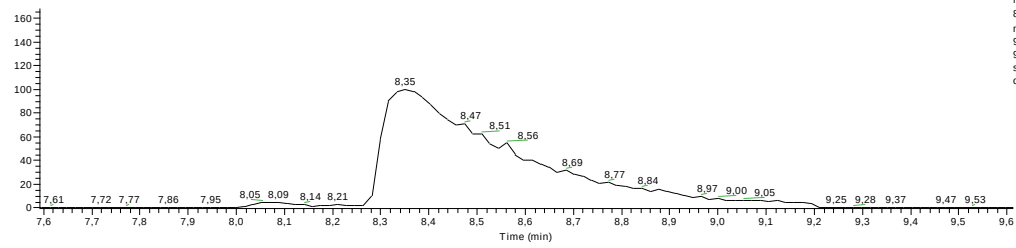


C:\Users\...\VAXANAKIA\saveoi_
1pros10_AUA_c

21/10/2018 5:16:56 μμ

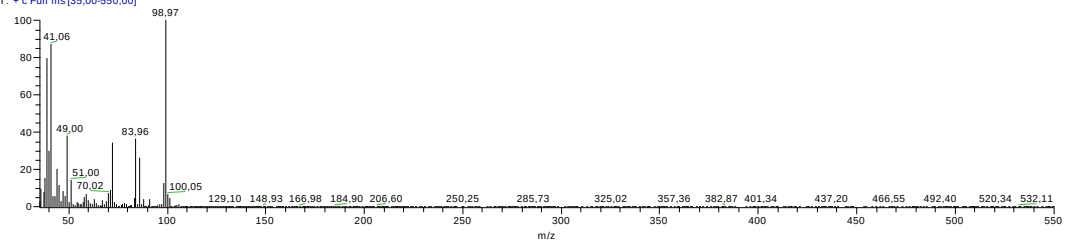
1pros10_AUA_c

RT: 7.59 - 9.61



NL:
8.94E5
m/z=
98.50-
99.50 MS
saveoi_Gree
ce_03

saveoi_Greece_03 #192 RT: 8.35 AV: 1 NL: 8.94E5
T: + c Full ms[35.00-550.00]



PITC

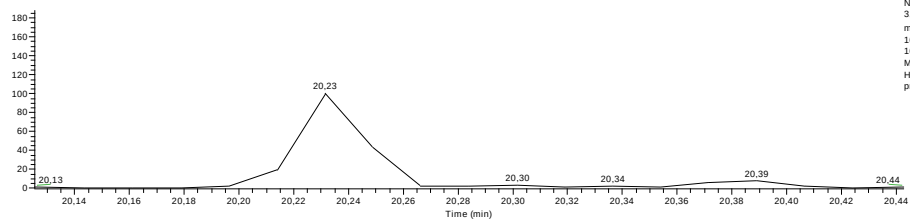
ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΟΛΛΑΝΔΙΑΣ

C:\Users\...\Holland_Bsprouts_
1pros10_a

20/10/2018 3:28:58 μμ

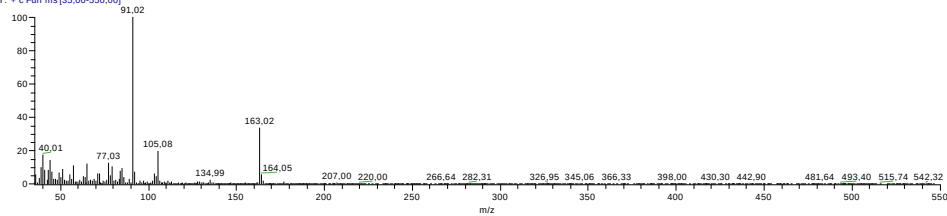
1pros10_a

RT: 20.13 - 20.44



NL:
3.57E5
m/z=
162.50-
163.50 MS
Holland_Bs
prouts_01

Holland_Bsprouts_01 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.05E6
T: + c Full ms[35.00-550.00]

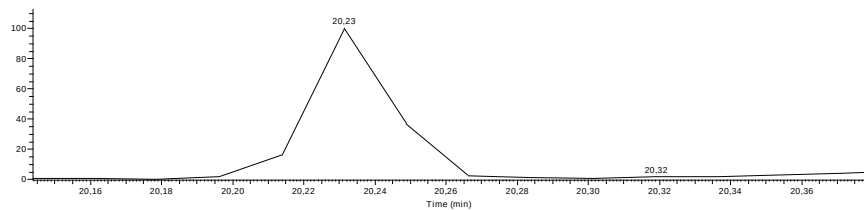


C:\Users\...\Holland_Bsprouts_
1pros10_b

20/10/2018 4:18:27 μμ

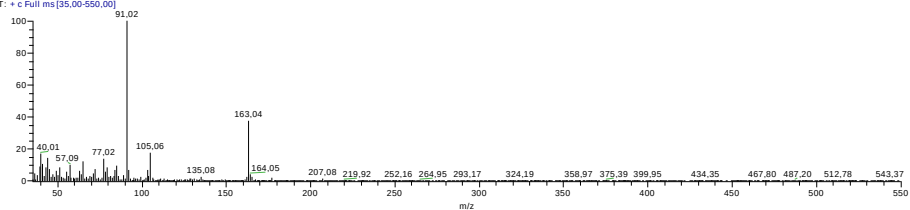
1pros10_b

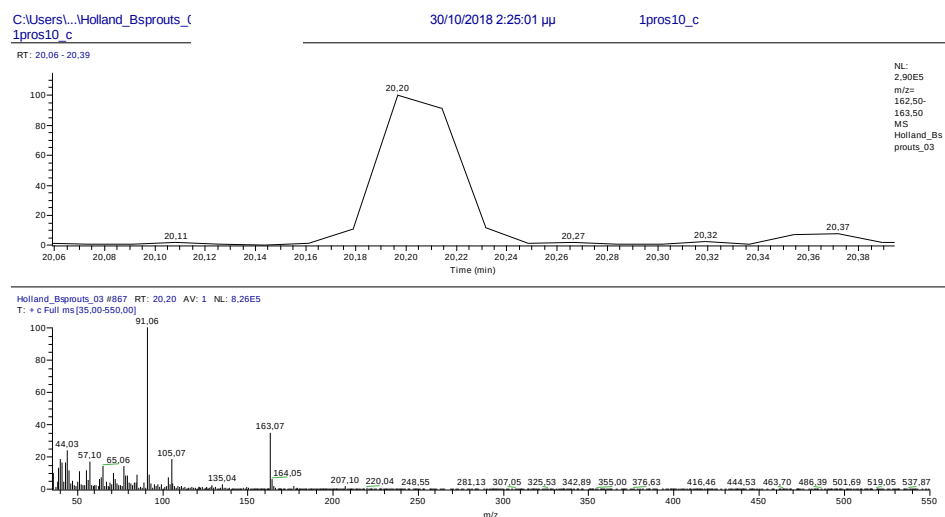
RT: 20.14 - 20.38



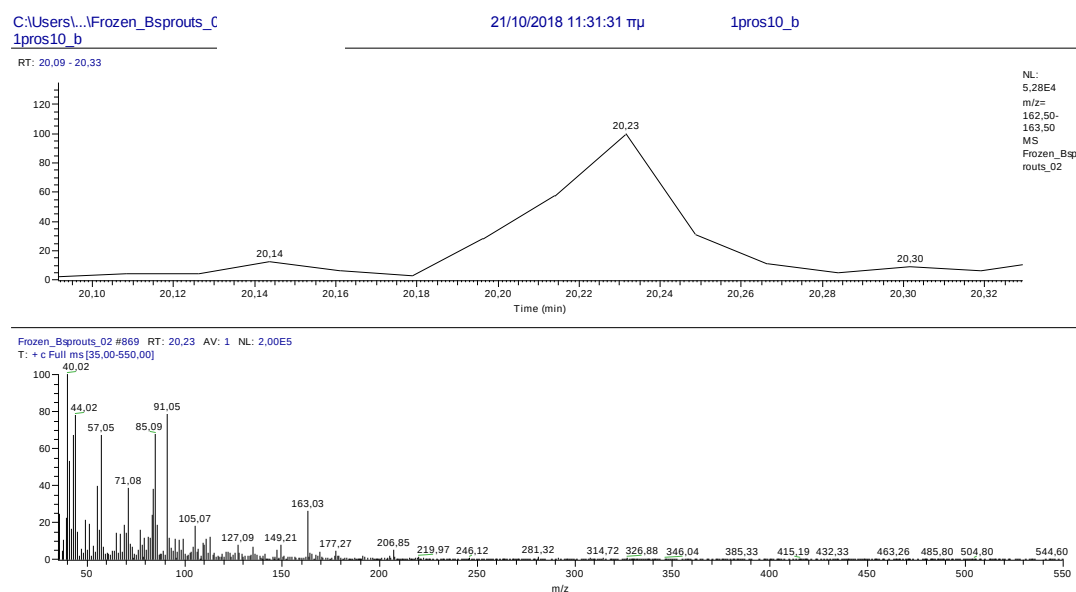
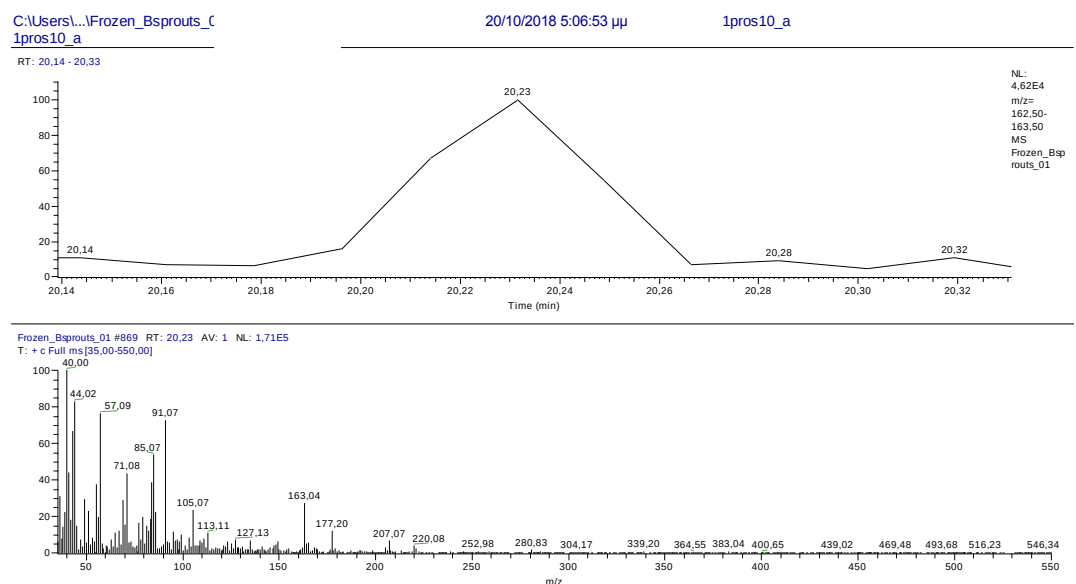
NL:
3.94E5
m/z=
162.50-
163.50 MS
Holland_Bs
prouts_02

Holland_Bsprouts_02 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.05E6
T: + c Full ms[35.00-550.00]





ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΑ

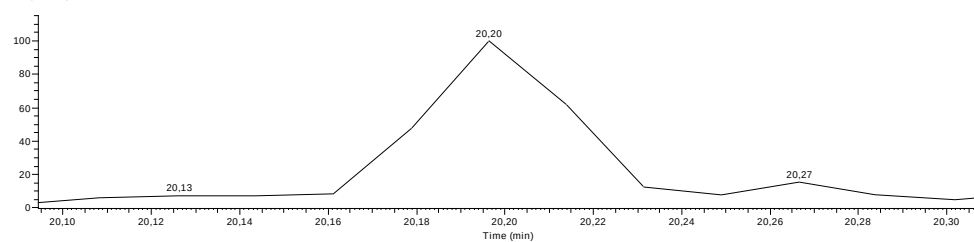


C:\Users\...\Frozen_Bsprouts_C
1pros10_c

30/10/2018 3:13:11 μμ

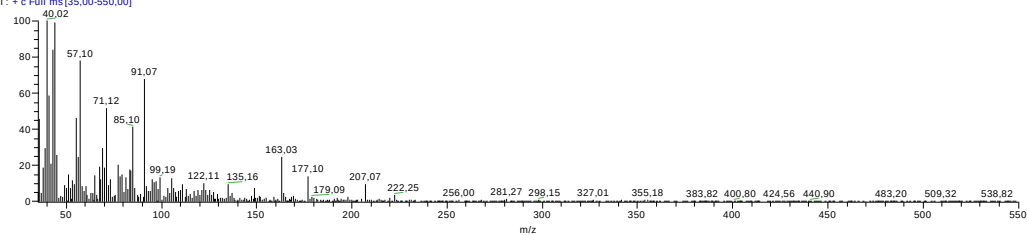
1pros10_c

RT: 20.09 - 20.31



NL:
4.19E4
m/z=
162.50-
163.50
MS
Frozen_Bsp
routs_03

Frozen_Bsprouts_03 #867 RT: 20.20 AV: 1 NL: 1.72E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



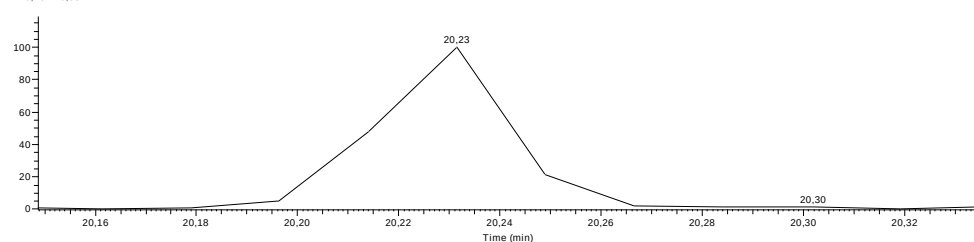
ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΘΕΣ/ΝΙΚΗΣ

C:\Users\...\VAXANAKIA\thessa
1pros10_a

19/10/2018 6:29:12 μμ

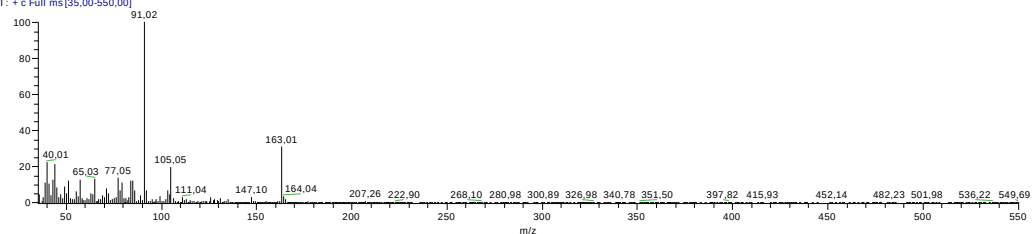
thessaloniki_1pros10_a

RT: 20.15 - 20.33



NL:
2.66E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
thessaloniki
_01

thessaloniki_01 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 8.59E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

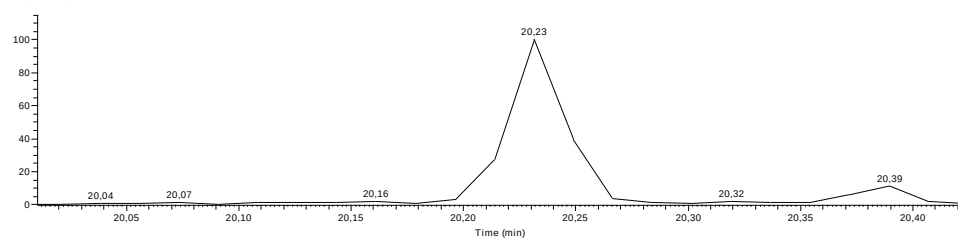


C:\Users\...\VAXANAKIA\thessa
1pros10_b

20/10/2018 12:57:07 μμ

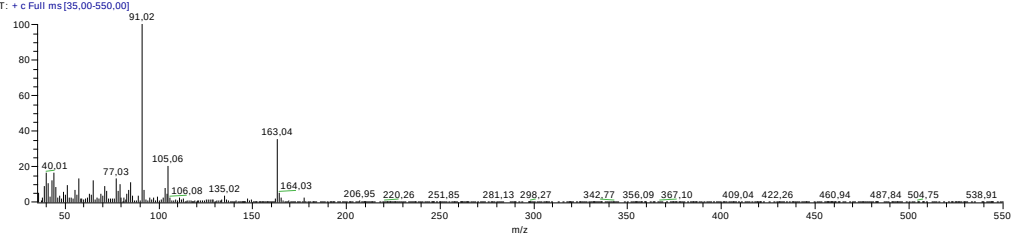
1pros10_b

RT: 20.01 - 20.42



NL:
3.70E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
thessaloniki
_02

thessaloniki_02 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.05E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

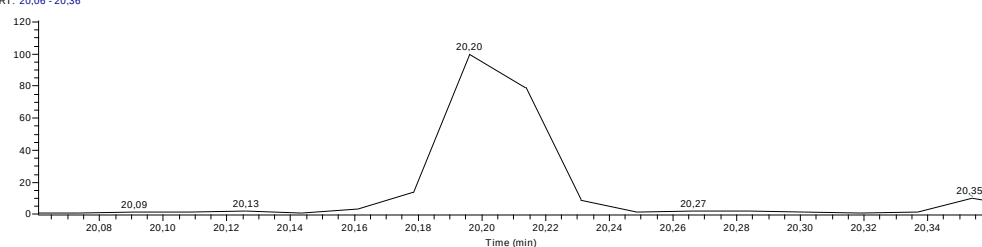


C:\Users\...\VAXANAKIA\thessa
1pros10_c

30/10/2018 1:36:31 μμ

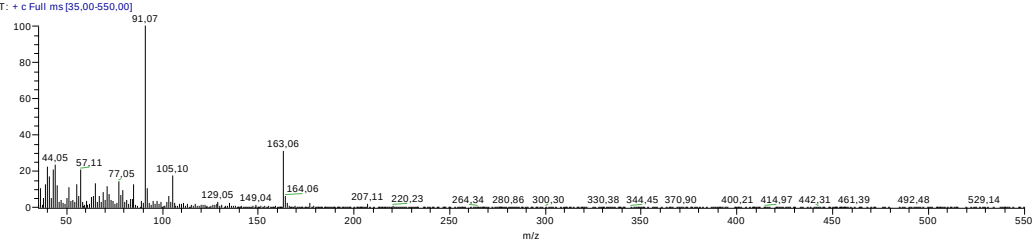
1pros10_c

RT: 20.06 - 20.36



NL:
2.17E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
thessaloniki
_03

thessaloniki_03 #867 RT: 20.20 AV: 1 NL: 6.99E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



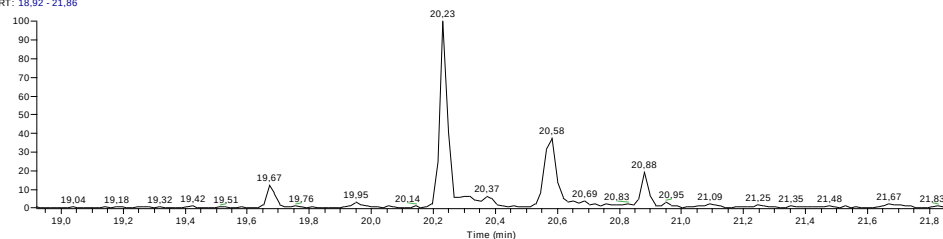
ΛΑΧ. ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ BONITZA

C:\Users\...\Vonitsa_Bsprouts_
1pros10_a

20/10/2018 1:48:09 μμ

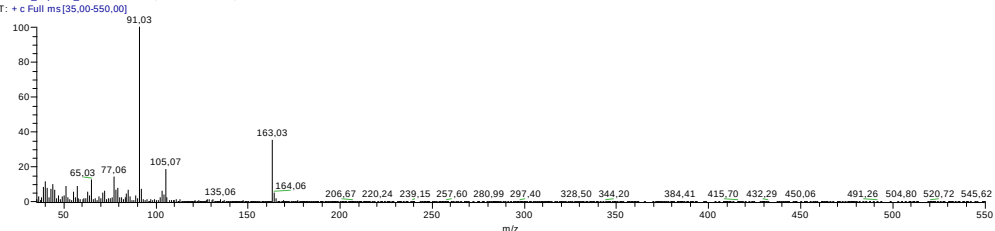
1pros10_a

RT: 18.92 - 21.86



NL:
5.20E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
Vonitsa_Bs
prouts_01

Vonitsa_Bsprouts_01 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.47E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

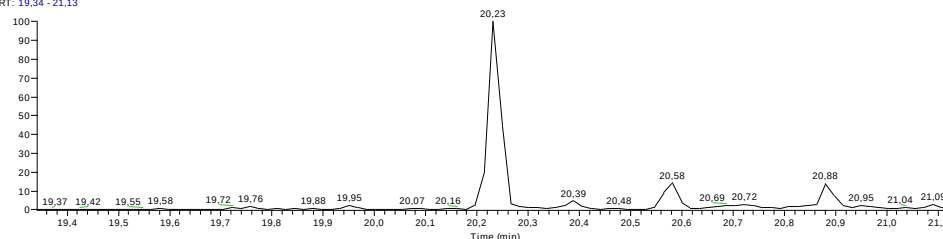


C:\Users\...\Vonitsa_Bsprouts_
1pros10_b

20/10/2018 2:39:20 μμ

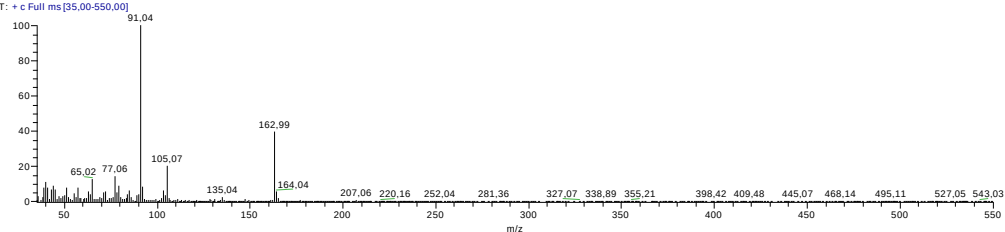
1pros10_b

RT: 19.34 - 21.13



NL:
7.29E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
Vonitsa_Bs
prouts_02

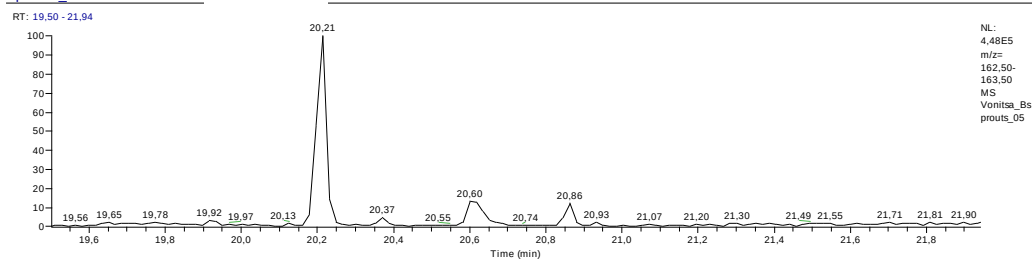
Vonitsa_Bsprouts_02 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.83E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



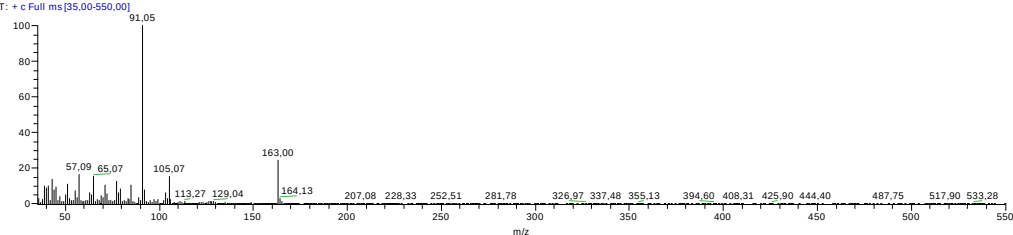
C:\Users\...\Vonitsa_Bsprouts_ (1pros10_05

6/11/2018 10:56:39 μμ

1pros10_05



Vonitsa_Bsprouts_05 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 1.81E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

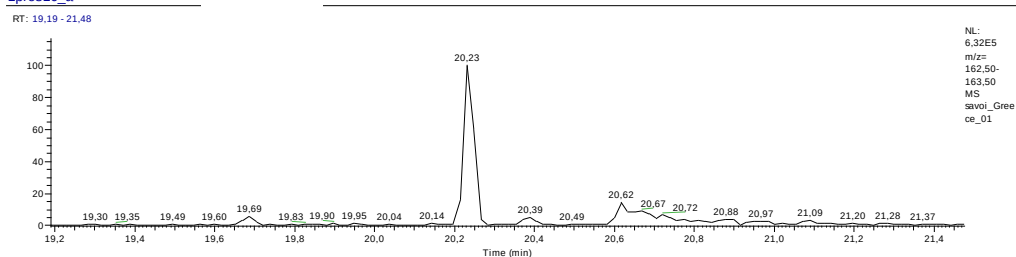


ΛΑΧΑΝΟ ΣΑΒΟΙ

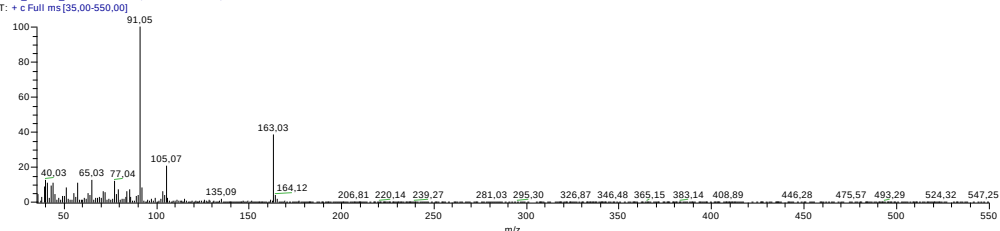
C:\Users\...\ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ\savoi_ (1pros10_a

20/10/2018 5:55:36 μμ

1pros10_a



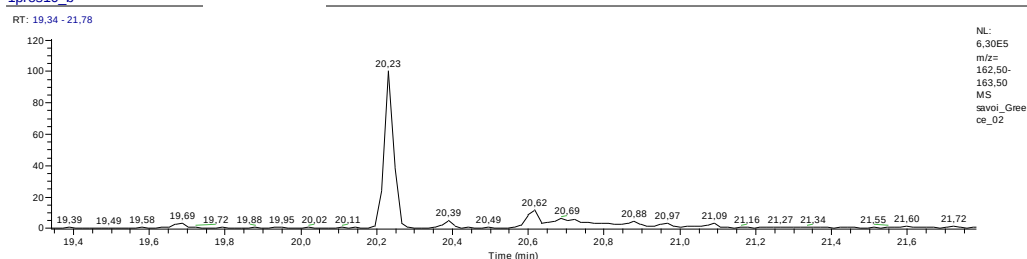
savoi_Greece_01 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.63E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



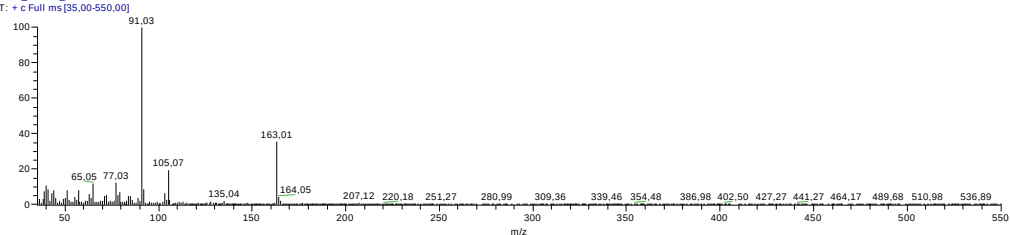
C:\Users\...\ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ\savoi_ (1pros10_b

20/10/2018 6:44:12 μμ

1pros10_b



savoi_Greece_02 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.78E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

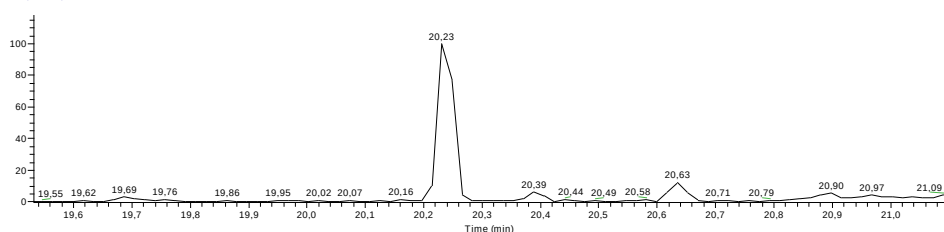


C:\Users\...V\AXANAKIA\savoi_1
1pros10_AUA_c

21/10/2018 5:16:56 μμ

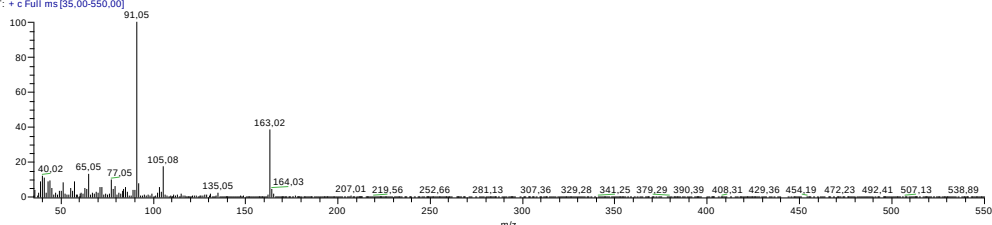
1pros10_AUA_c

RT: 19.53 - 21.10



NL: 6.53E5
m/z= 162.50-163.50
MS
savoi_Greece_03

savoi_Greece_03 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.68E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



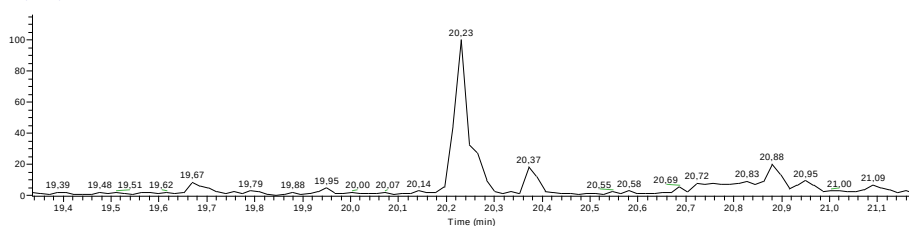
ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

C:\Users\...broccoli_anthos_vor
1pros10_a

24/10/2018 3:41:58 μμ

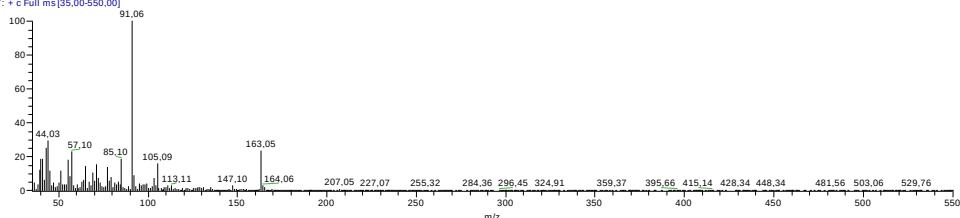
1pros10_broccoli_vonanthos_01

RT: 19.33 - 21.17



NL: 2.64E5
m/z= 162.50-163.50
MS
broccoli_anthos_vonitsa_01

broccoli_anthos_vonitsa_01 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.11E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

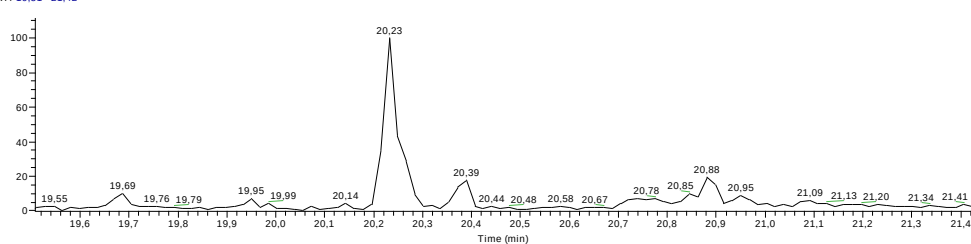


C:\Users\...broccoli_anthos_vor
1pros10_b

24/10/2018 4:30:35 μμ

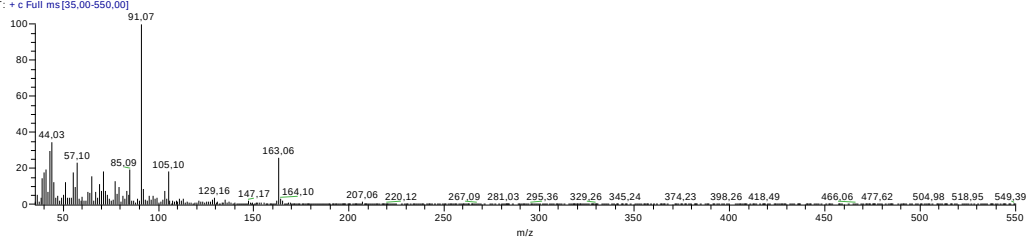
1pros10_broccoli_vonanthos_02

RT: 19.51 - 21.42



NL: 2.61E5
m/z= 162.50-163.50
MS
broccoli_anthos_vonitsa_02

broccoli_anthos_vonitsa_02 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.02E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

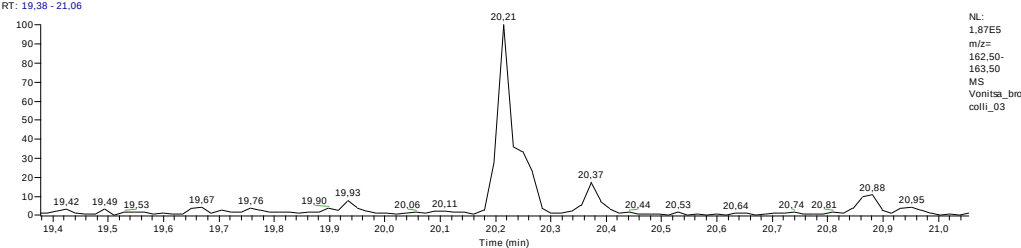


C:\Users\...Vonitsa_broccoli_03
1pros10_vonitsa_c

5/11/2018 4:26:17 μ

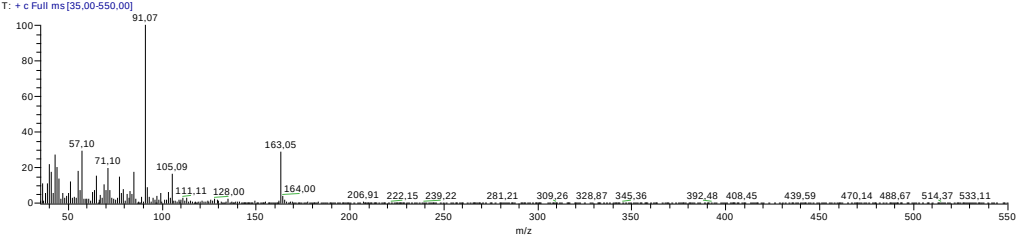
1pros10_vonitsa_c

RT: 19.38 - 21.06



NL:
1,87E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
Vonitsa_bro
colli_03

Vonitsa_broccoli_03 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 6,47E5
T: + c Full ms [35,00-550,00]



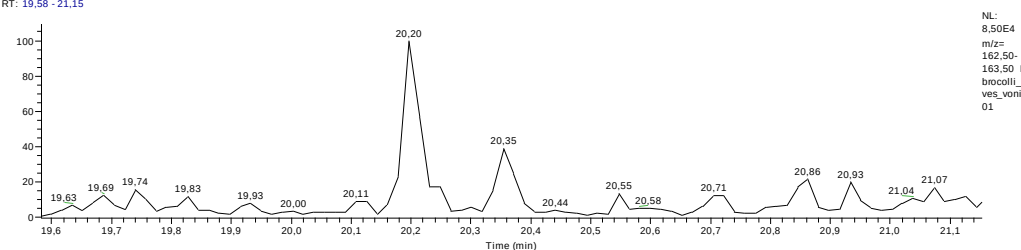
ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ BONITZA

C:\Users\...broccoli_leaves_von
1pros10_a

30/10/2018 4:01:30 μ

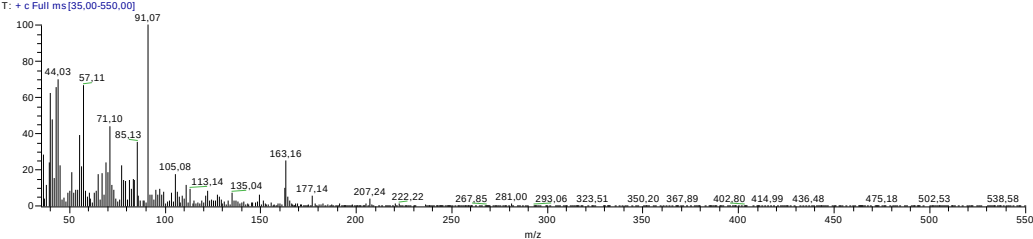
1pros10_leavesVon_01

RT: 19.58 - 21.15



NL:
8,50E4
m/z=
162.50-
163.50
MS
broccoli_lea
ves_vonitsa_
01

broccoli_leaves_vonitsa_01 #867 RT: 20.20 AV: 1 NL: 2,45E5
T: + c Full ms [35,00-550,00]

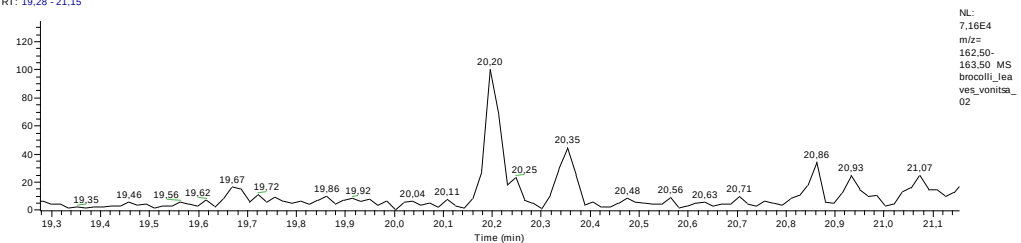


C:\Users\...broccoli_leaves_von
1pros10_b

30/10/2018 4:49:48 μ

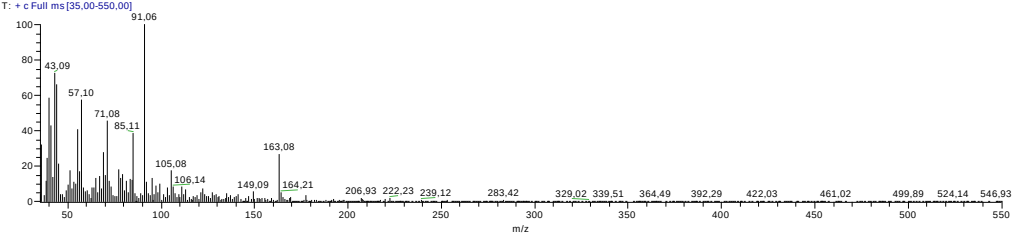
1pros10_leavesVon_02

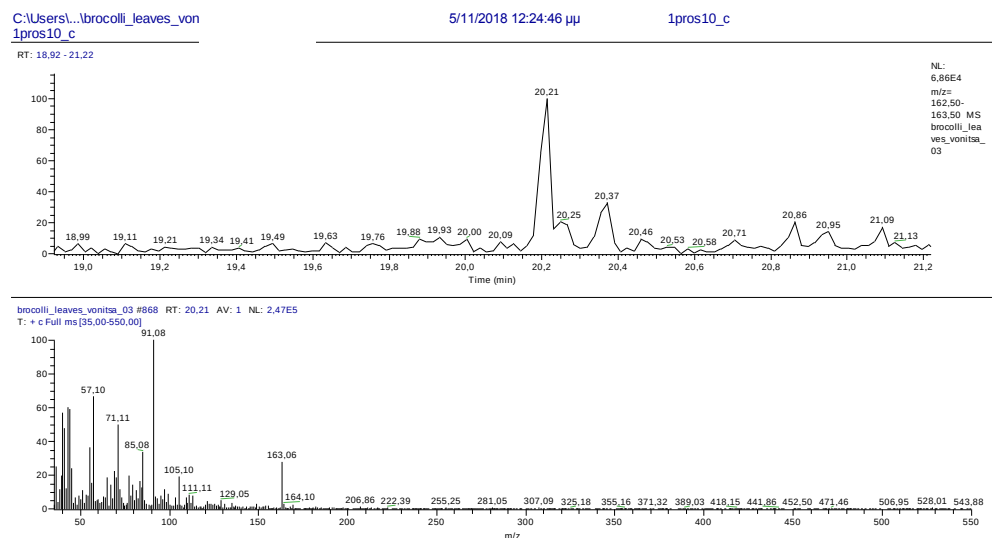
RT: 19.28 - 21.15



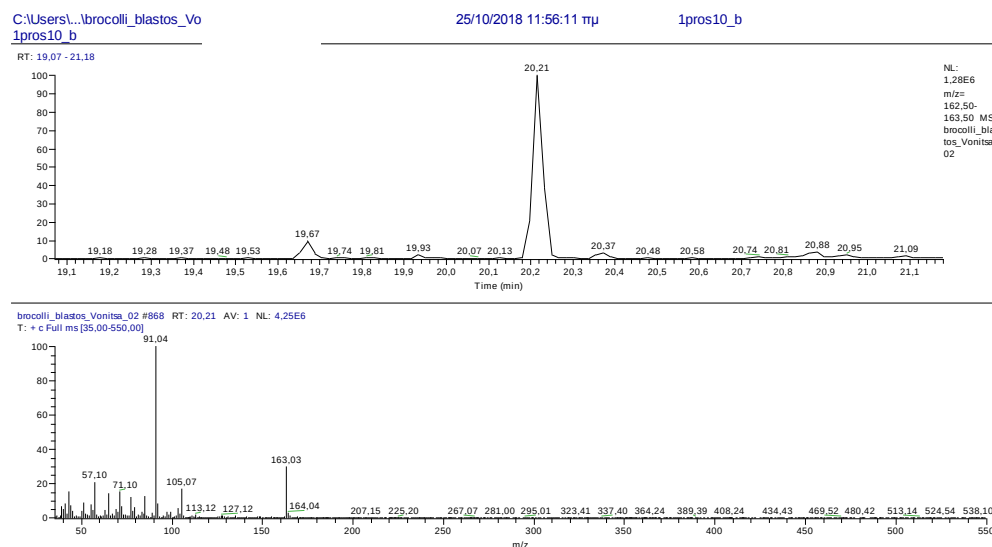
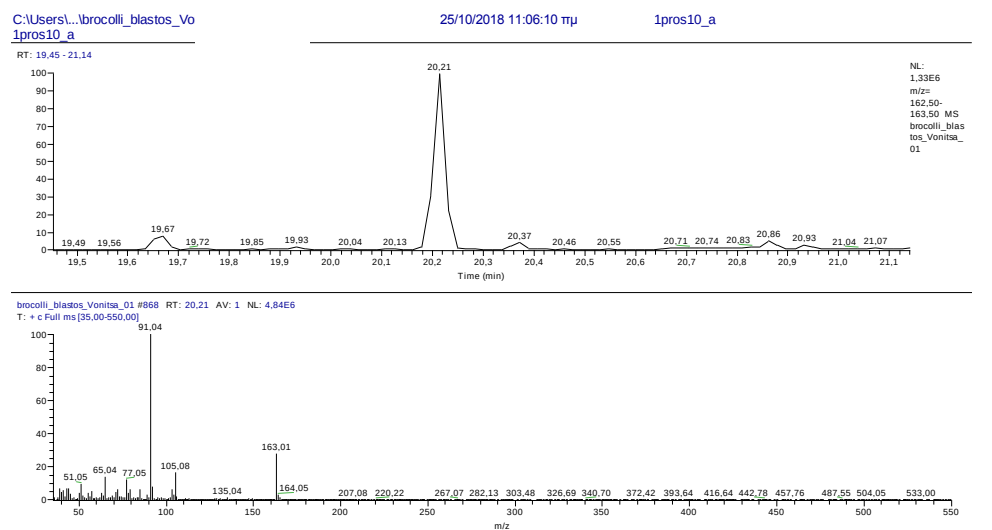
NL:
7,16E4
m/z=
162.50-
163.50
MS
broccoli_lea
ves_vonitsa_
02

broccoli_leaves_vonitsa_02 #867 RT: 20.20 AV: 1 NL: 2,69E5
T: + c Full ms [35,00-550,00]





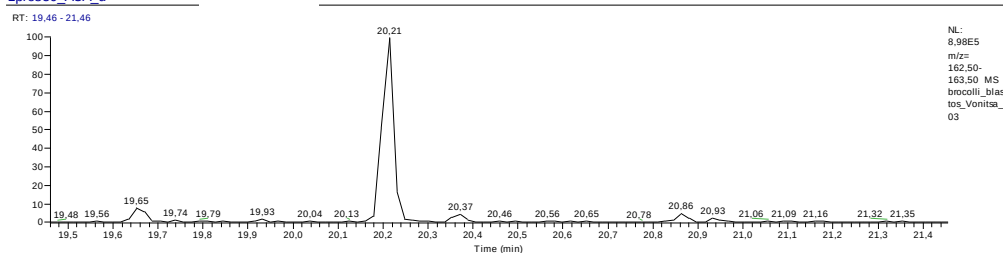
ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ



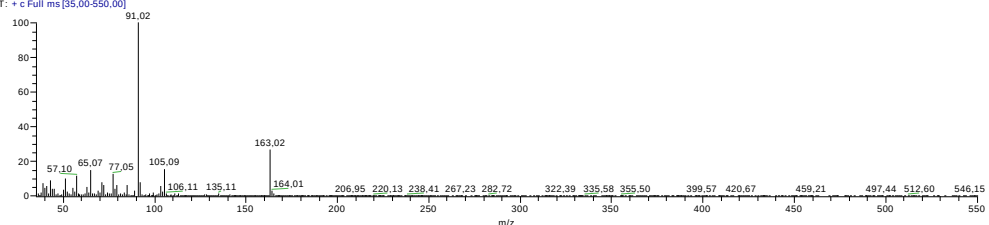
C:\Users\...\broccoli_blastos_Vo
1pros50_AUA_d

6/11/2018 12:32:40 µµ

1pros50_AUA_d



broccoli_blastos_Vonitsa_03 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 3.34E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

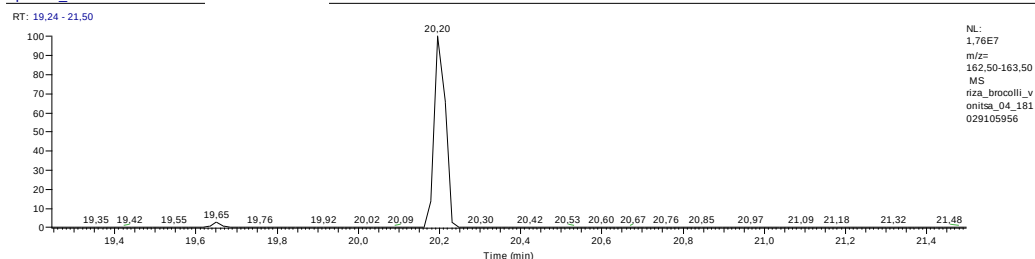


PIZA BONITZA

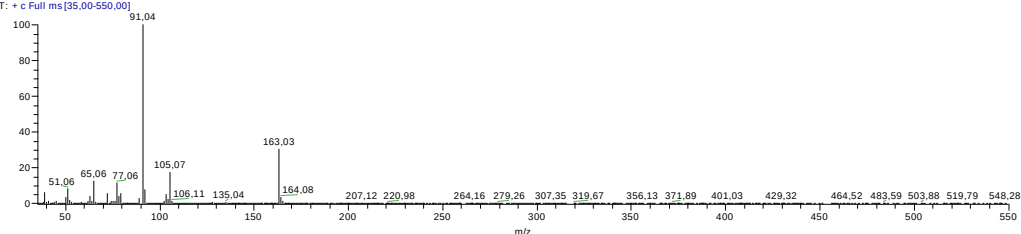
riza_broccoli_vonitsa_04_18102
1pros50_a

29/10/2018 10:59:56 µµ

1pros50_broccoli_von_01



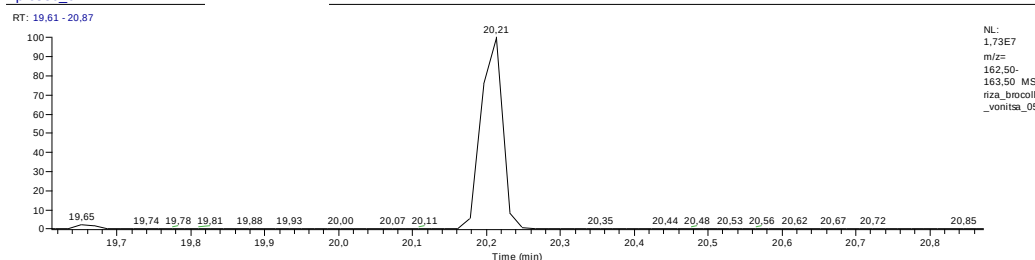
riza_broccoli_vonitsa_04_181029105956 #867 RT: 20.20 AV: 1 NL: 5.80E7
T: + c Full ms [35.00-550.00]



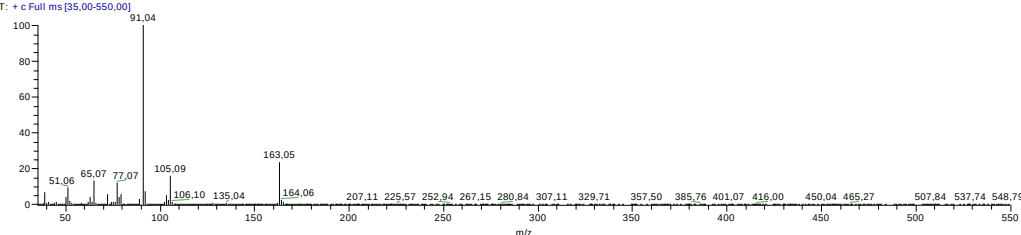
C:\Users\...\riza_broccoli_vonitsa_05
1pros50_b

29/10/2018 11:49:19 µµ

1pros50_broccoli_von_02



riza_broccoli_vonitsa_05 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 7.38E7
T: + c Full ms [35.00-550.00]

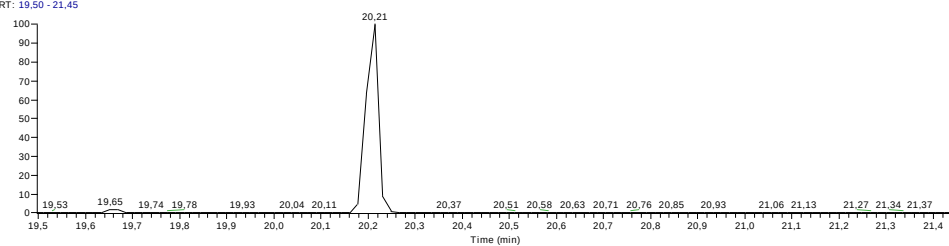


C:\Users\...riza_broccoli_vonitsa;
1pros50_c

29/10/2018 4:37:11 μμ

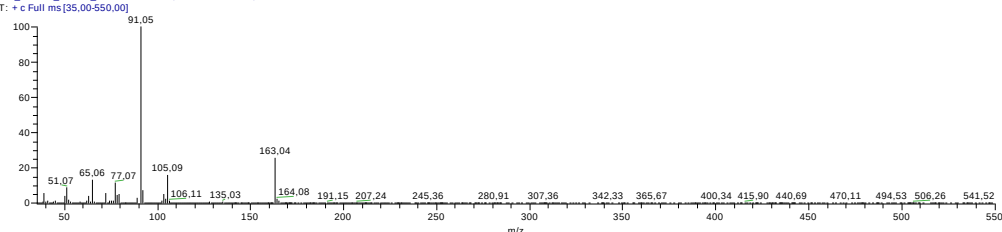
1pros50_broccoli_von_03

RT: 19.50 - 21.45



NL:
2.06E7
m/z:
162.50-
163.50 MS
riza_broccoli
_vonitsa_06

riza_broccoli_vonitsa_06 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 8.09E7
T: + c Full ms [35.00-550.00]



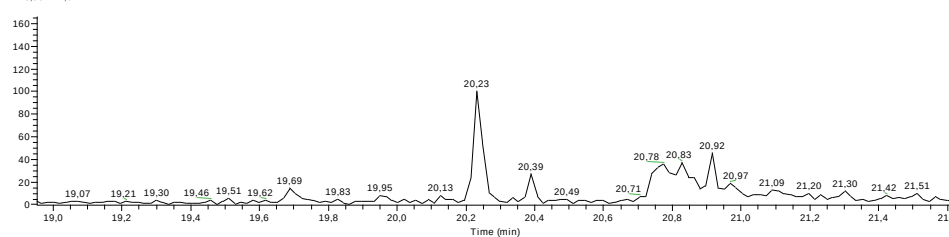
ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

C:\Users\...Vonitsa_broccoli_01
1pros10_a

21/10/2018 3:39:15 μμ

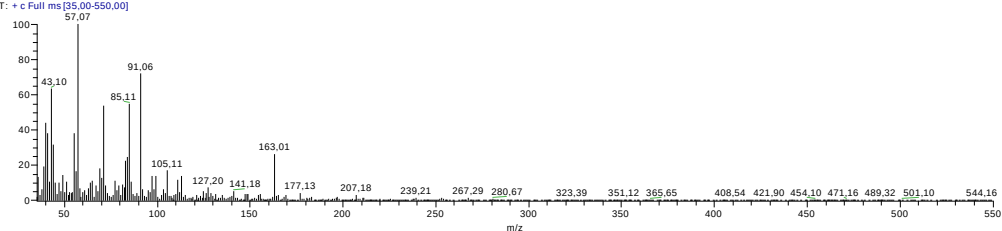
1pros10_a

RT: 18.95 - 21.62



NL:
1.22E5
m/z:
162.50-
163.50 MS
Vonitsa_bro
colli_01

Vonitsa_broccoli_01 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 4.69E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

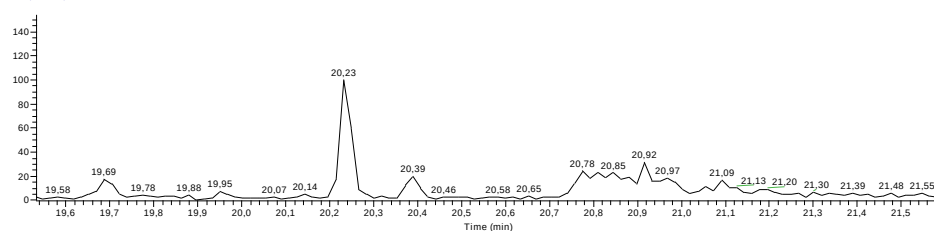


C:\Users\...Vonitsa_broccoli_02
1pros10_AUA_b

21/10/2018 4:28:13 μμ

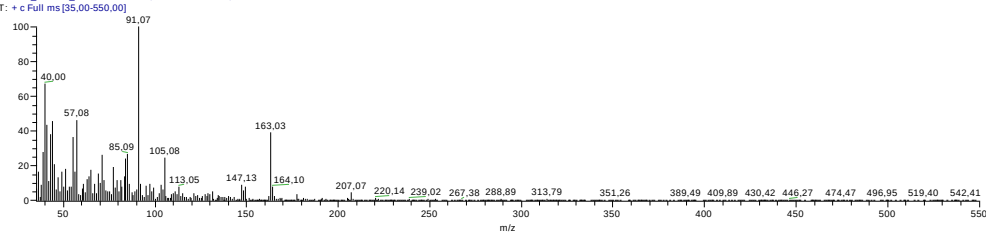
1pros10_AUA_b

RT: 19.53 - 21.59



NL:
1.21E5
m/z:
162.50-
163.50 MS
Vonitsa_bro
colli_02

Vonitsa_broccoli_02 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 3.08E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



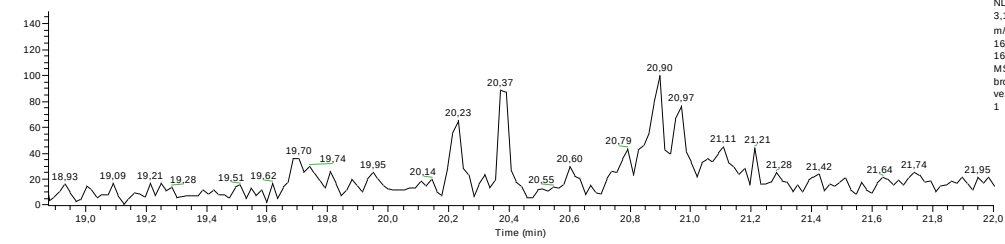
ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

C:\Users\...\broccoli_leaves_AU/
1pros10_a

24/10/2018 5:19:29 μμ

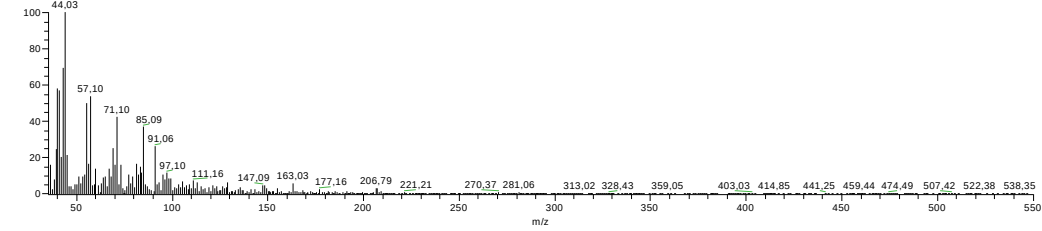
1pros10_broccoli_leavesAUA_02

RT: 18.88 - 22.00



NL: 3.10E4
m/z= 162.50-163.50
MS
broccoli_leaves_AUA_01

broccoli_leaves_AUA_01 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 3.47E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

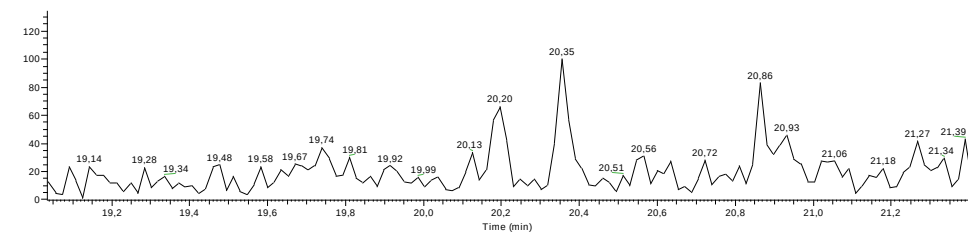


C:\Users\...\broccoli_leaves_AU/
1pros10_c

5/11/2018 10:47:33 μμ

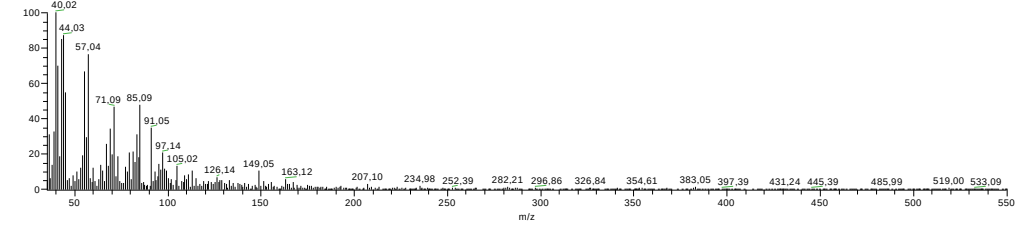
1pros10_c

RT: 19.03 - 21.40



NL: 1.91E4
m/z= 162.50-163.50
MS
broccoli_leaves_AUA_03

broccoli_leaves_AUA_03 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 1.47E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

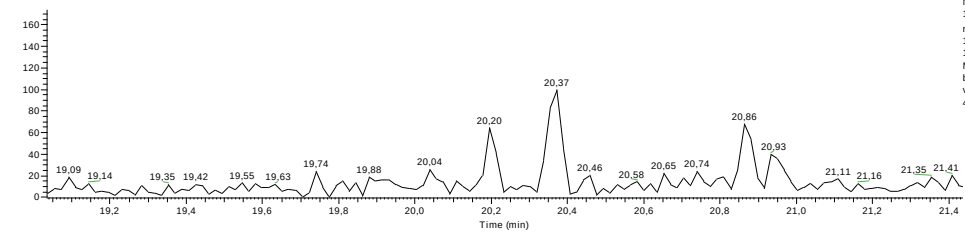


C:\Users\...\broccoli_leaves_AU/
1pros10_d

5/11/2018 11:36:55 μμ

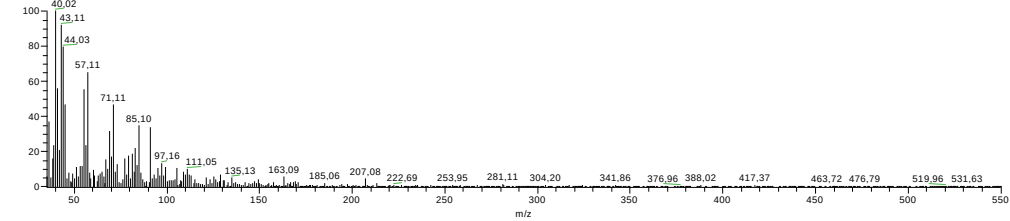
1pros10_d

RT: 19.03 - 21.44



NL: 1.98E4
m/z= 162.50-163.50
MS
broccoli_leaves_AUA_04

broccoli_leaves_AUA_04 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 1.40E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

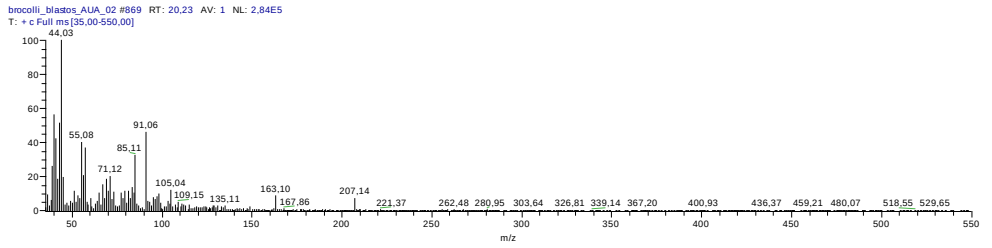
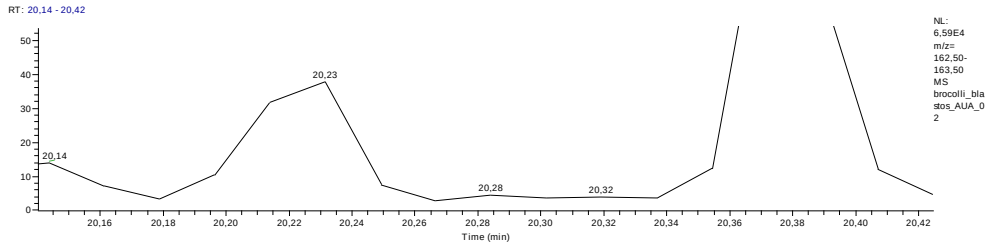


ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

C:\Users\...\broccoli_blastos_AU
1pros40_AUA_a

24/10/2018 11:40:54 πμ

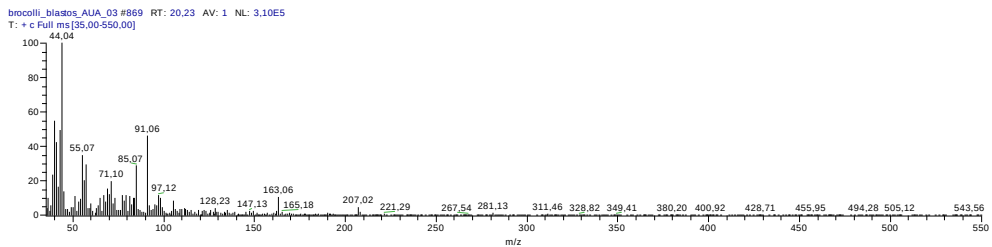
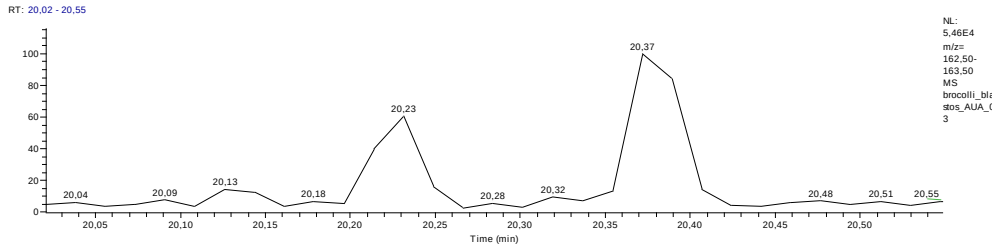
1pros40_AUA_blastos_01



C:\Users\...\broccoli_blastos_AU
1pros50_AUA_b

24/10/2018 12:28:45 μμ

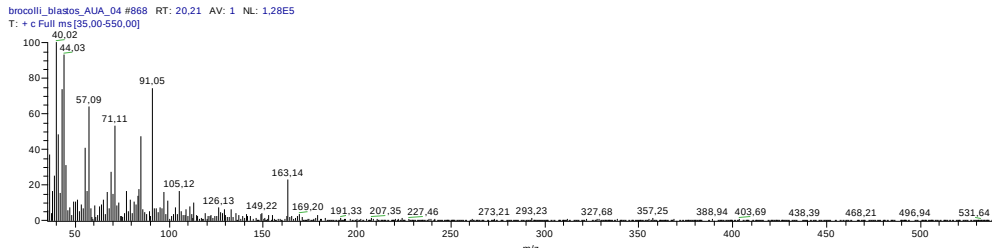
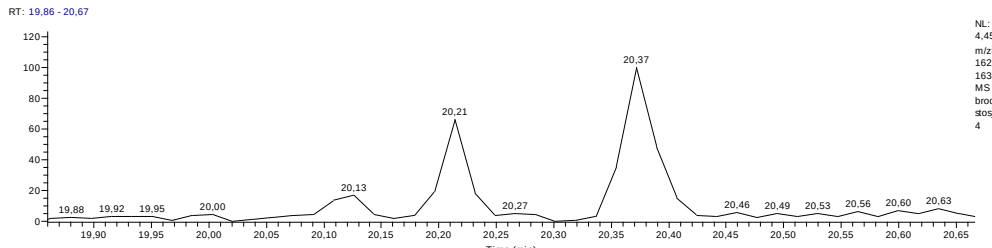
1pros50_AUA_blastos_02



C:\Users\...\broccoli_blastos_AU
1pros50_AUA_d

6/11/2018 11:45:01 πμ

1pros50_AUA_d



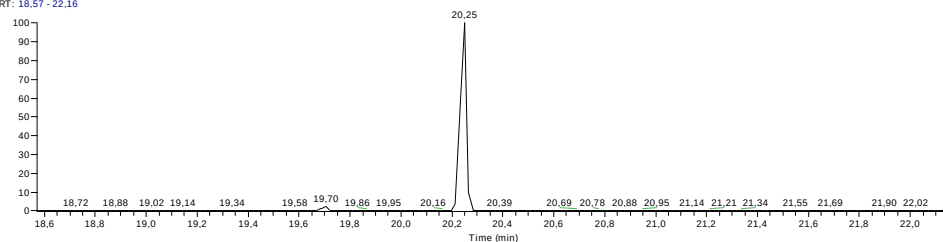
PIZA ΓΠΑ

C:\Users\...riza_broccoli_vonitsi:
1pros30_a

21/10/2018 1:10:26 μμ

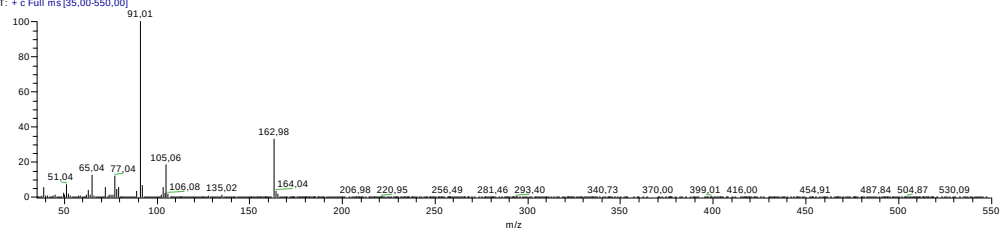
1pros30_a_broccoli_von

RT: 18.57 - 22.16



NL:
3.84E7
m/z=
162.50-
163.50 MS
riza_broccoli
_vonitsa_02

riza_broccoli_vonitsa_02 #870 RT: 20.25 AV: 1 NL: 1.16E8
T: + c Full ms [35.00-550.00]

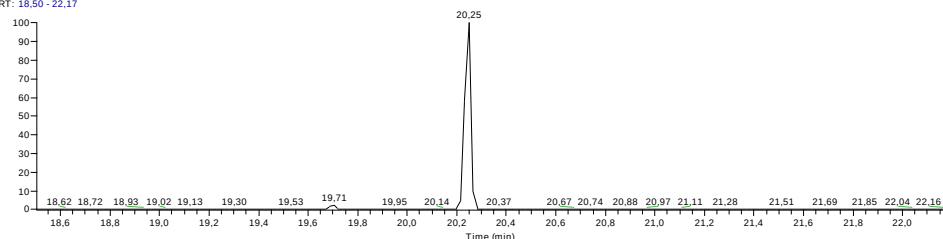


C:\Users\...riza_broccoli_vonitsi:
1pros30_b

21/10/2018 2:00:50 μμ

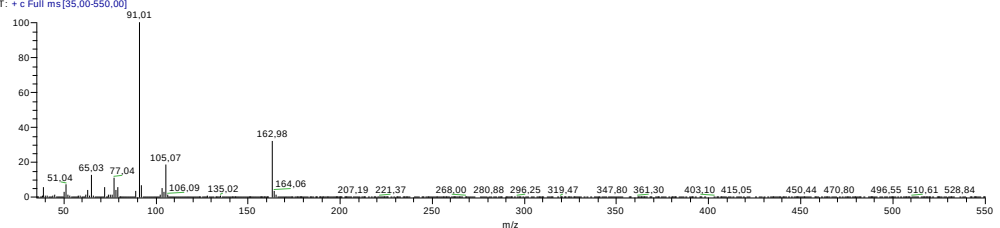
1pros30_b_broccoli_von

RT: 18.50 - 22.17



NL:
3.80E7
m/z=
162.50-
163.50 MS
riza_broccoli
_vonitsa_03

riza_broccoli_vonitsa_03 #870 RT: 20.25 AV: 1 NL: 1.19E8
T: + c Full ms [35.00-550.00]

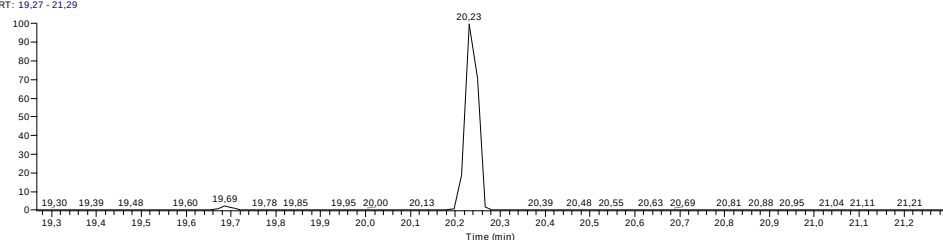


C:\Users\...riza_broccoli_vonitsi:
1pros30_c

24/10/2018 2:53:42 μμ

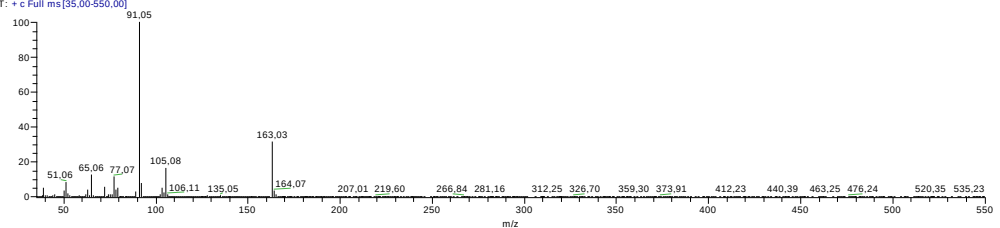
1pros30_broccoli_von

RT: 19.27 - 21.29



NL:
3.88E7
m/z=
162.50-
163.50 MS
riza_broccoli
_vonitsa_04

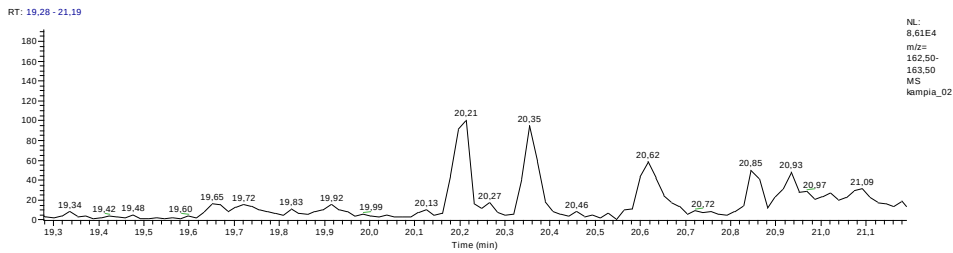
riza_broccoli_vonitsa_04 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 1.23E8
T: + c Full ms [35.00-550.00]



ΠΡΟΝΥΜΦΗ *P.rapae*

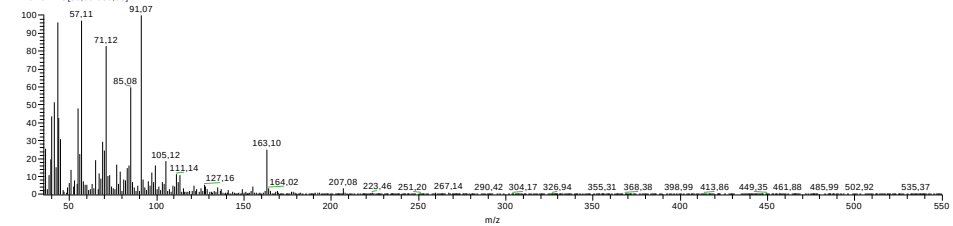
C:\Users\... \KAMPIA\kampia_02
kampia_01

3/11/2018 12:20:09 μμ
kampia_01



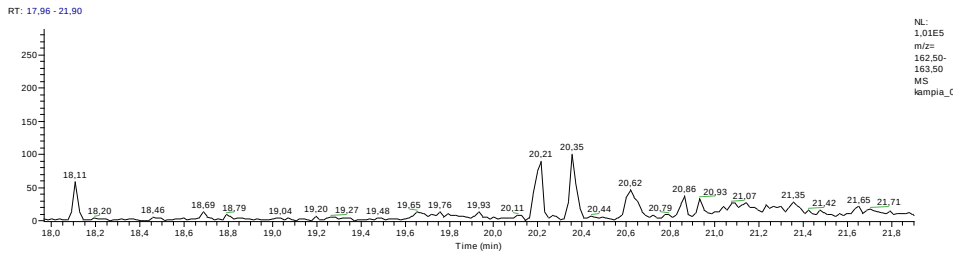
NL:
8.61E4
m/z=
162.50-
163.50
MS
kampia_02

kampia_02 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 3.49E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



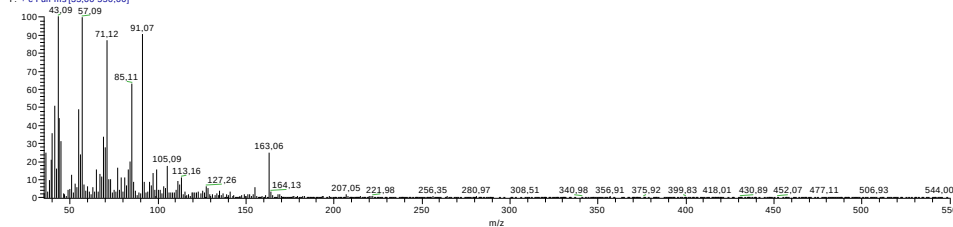
C:\Users\... \KAMPIA\kampia_03
kampia_03

3/11/2018 1:57:33 μμ
kampia_03



NL:
1.01E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
kampia_03

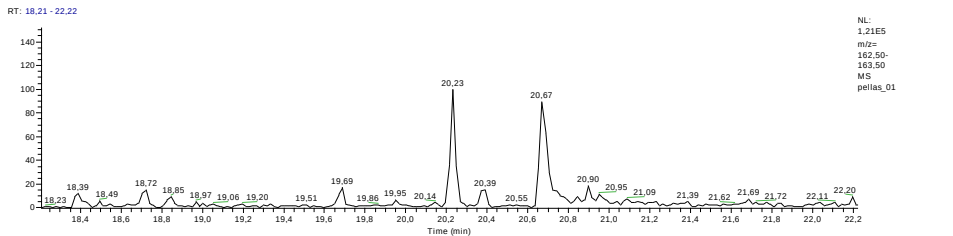
kampia_03 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 3.69E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΠΕΛΛΑΣ

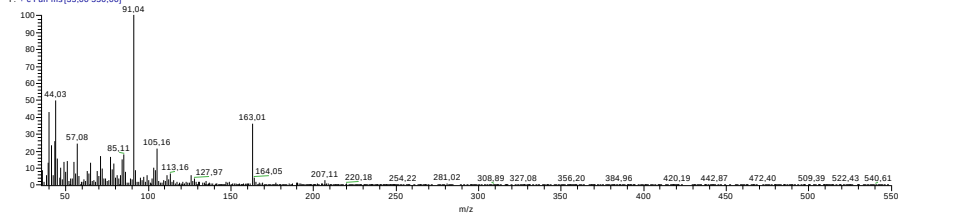
C:\Users\... \ΠΕΛΛΑΣ\pellas_01
1pros10_a

19/10/2018 4:28:57 μμ
pellas_1pros10_a



NL:
1.21E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
pellas_01

pellas_01 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 3.37E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

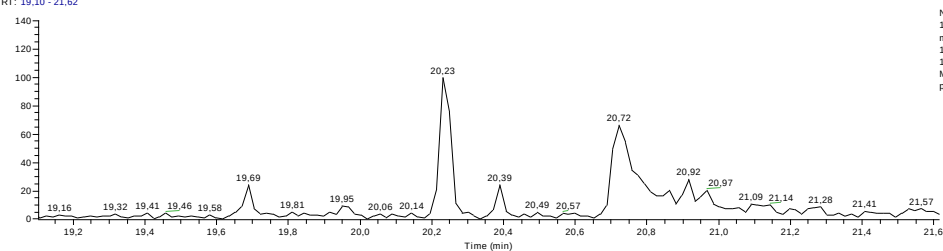


C:\Users\...ΠΕ\ΑΑΖ\pellas_02
1pros10_b

21/10/2018 2:50:24 μμ

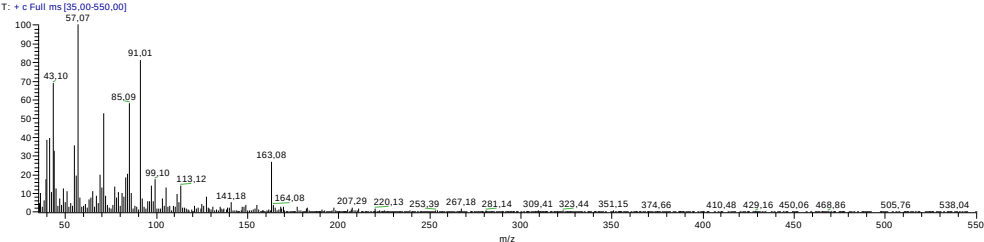
1pros10_b_

RT: 19.10 - 21.62



NL:
1.36E5
m/z=
162.50-
163.50
MS
pellas_02

pellas_02 #869 RT: 20.23 AV: 1 NL: 5.11E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



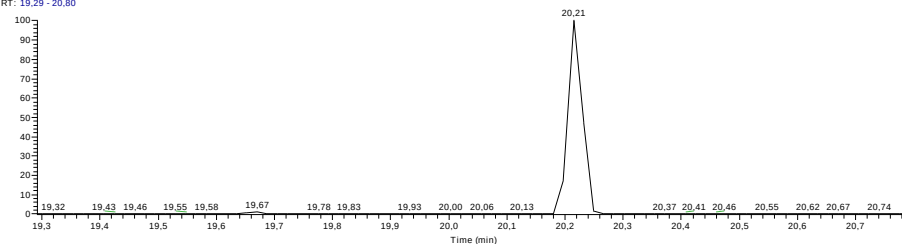
PIZA ΑΓΡΙΝΙΟ

C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_
1pros30_a

25/10/2018 12:44:05 μμ

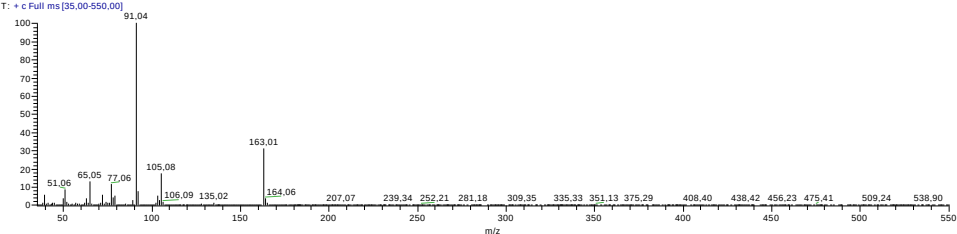
1pros30_rizaAgrinio_01

RT: 19.29 - 20.80



NL:
1.35E7
m/z=
162.50-
163.50 MS
riza_broccoli_
_Agrinio_01

riza_broccoli_Agrinio_01 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 4.33E7
T: + c Full ms [35.00-550.00]

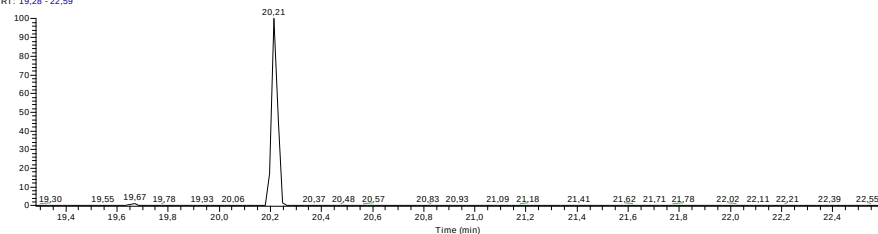


C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_
1pros30_b

25/10/2018 1:32:18 μμ

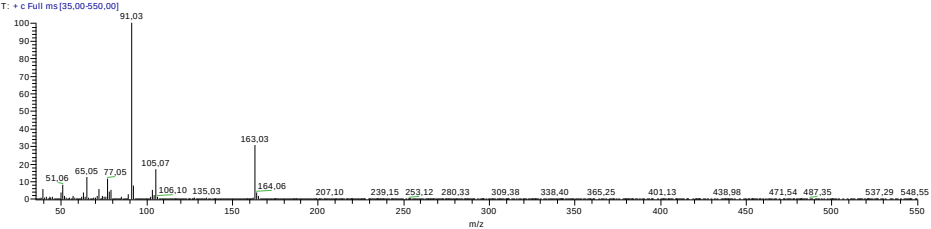
1pros30_rizaAgrinio_02

RT: 19.28 - 22.59



NL:
1.53E7
m/z=
162.50-
163.50 MS
riza_broccoli_
_Agrinio_02

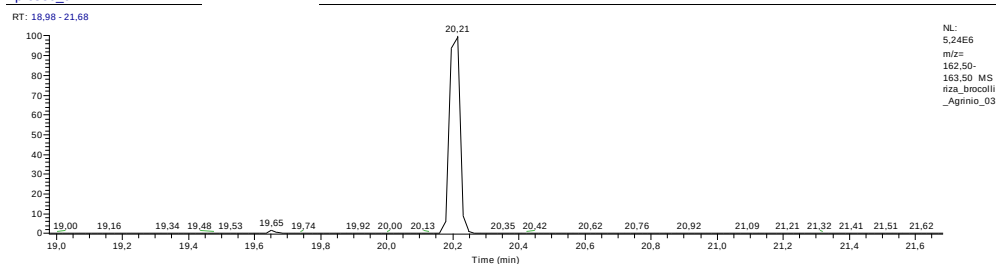
riza_broccoli_Agrinio_02 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 4.97E7
T: + c Full ms [35.00-550.00]



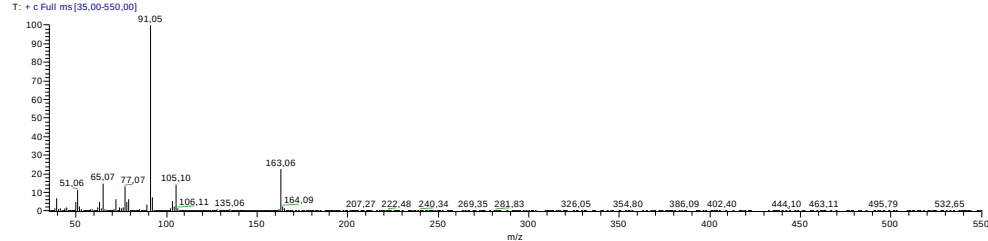
C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_
1pros30_c

30/10/2018 12:48:30 μμ

1pros30_rizaAgrinio_03



riza_broccoli_Agrinio_03 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 2,34E7
T: + c Full ms [35,00-550,00]

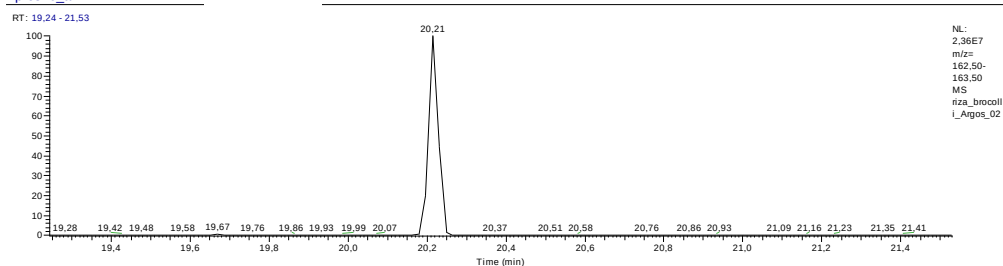


PIZA APΓΟΣ

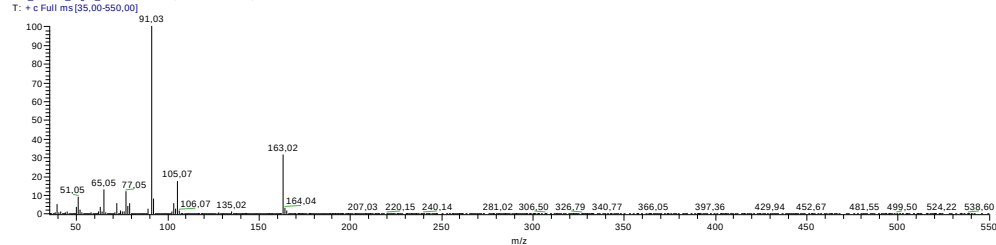
C:\Users\...riza_broccoli_Argos_
1pros10_a

25/10/2018 4:43:53 μμ

1pros10_rizaArgos_01



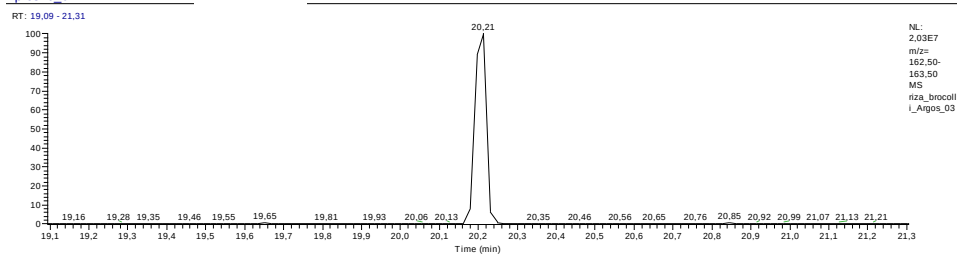
riza_broccoli_Argos_02 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 7,52E7
T: + c Full ms [35,00-550,00]



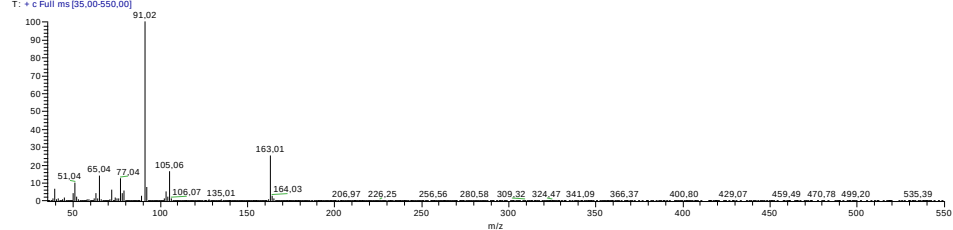
C:\Users\...riza_broccoli_Argos_
1pros10_b

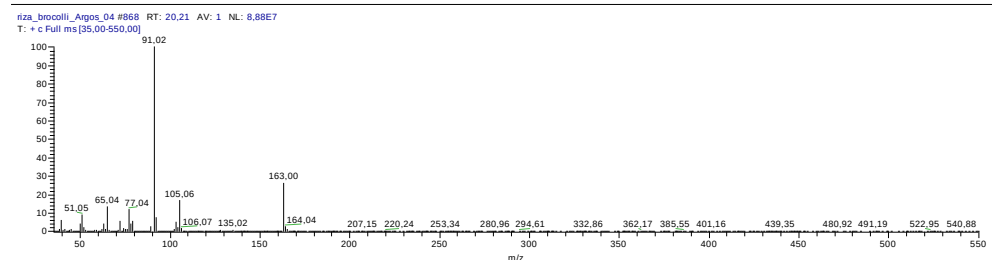
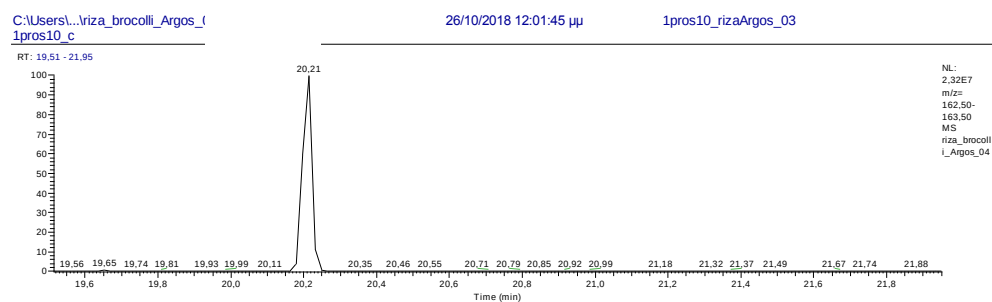
26/10/2018 11:12:55 μμ

1pros10_rizaArgos_02

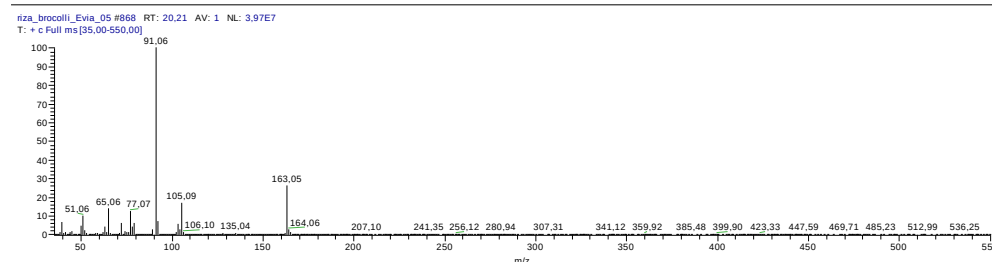
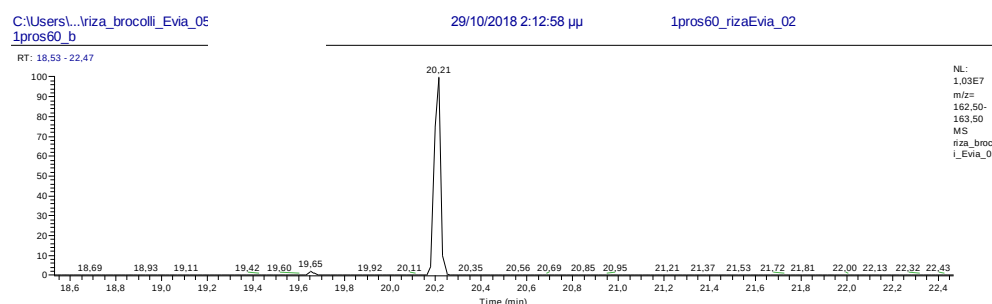
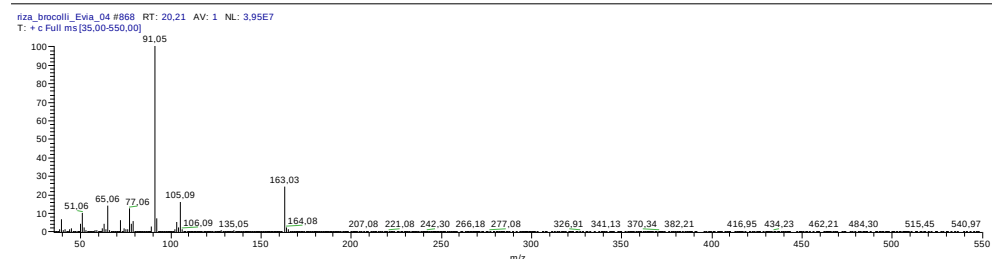
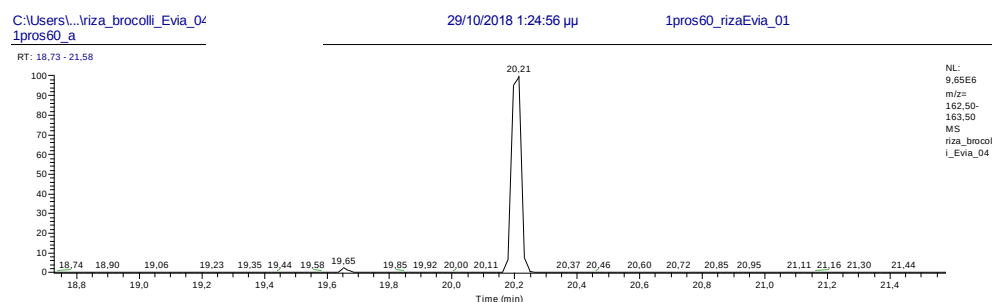


riza_broccoli_Argos_03 #868 RT: 20.21 AV: 1 NL: 8,04E7
T: + c Full ms [35,00-550,00]



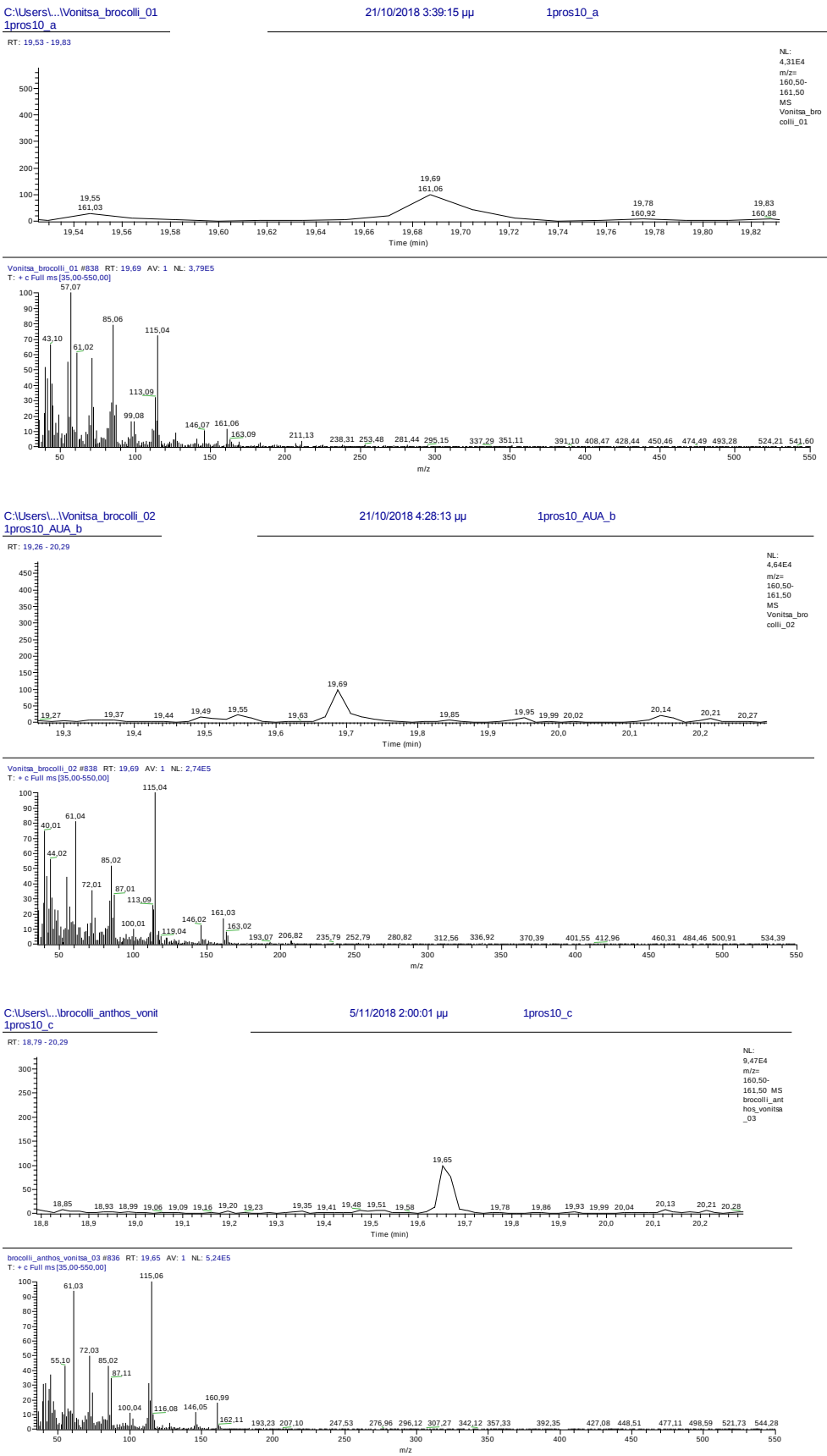


PIZA EYBOIA



ER

ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

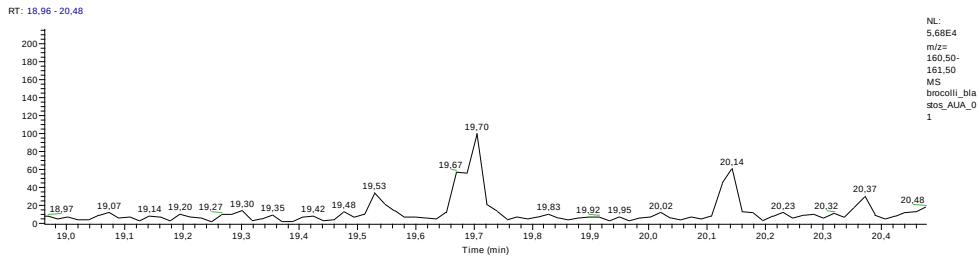


ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

C:\Users\...\broccoli_blastos_AUA
1pros10_AUA_a

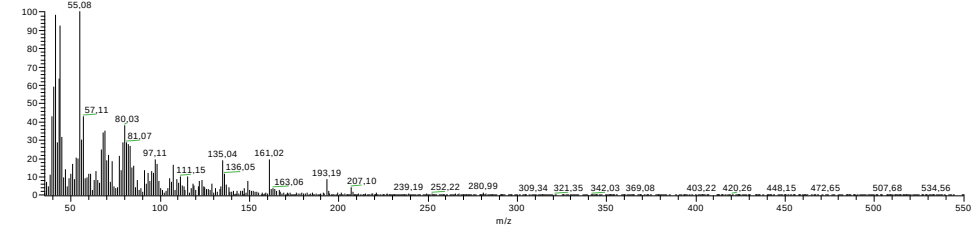
24/10/2018 10:47:38 πμ

1pros10_AUA_blastos_01



NL:
5.68E4
m/z=
160.50-
161.50
MS
broccoli_bla
stos_AUA_0
1

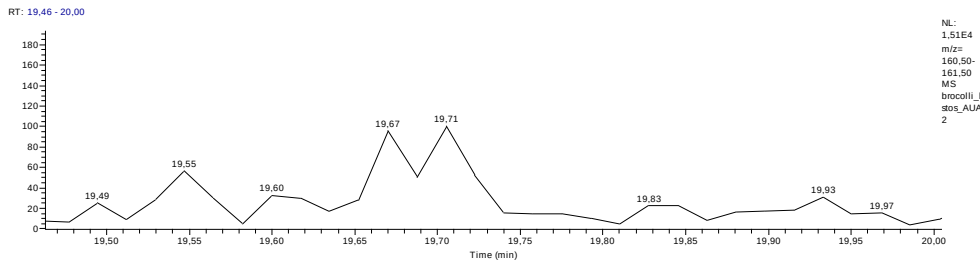
broccoli_blastos_AUA_01 #839 RT: 19.70 AV: 1 NL: 2.97E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



C:\Users\...\broccoli_blastos_AUA
1pros40_AUA_a

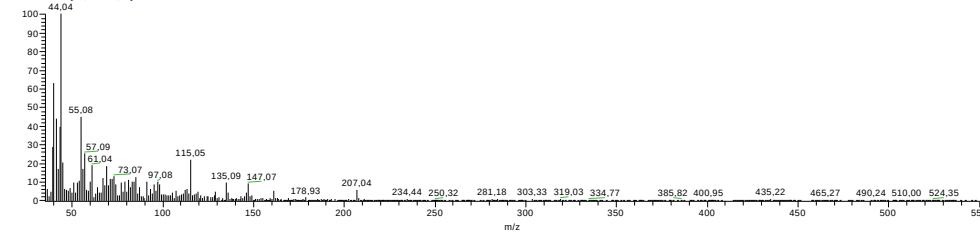
24/10/2018 11:40:54 πμ

1pros40_AUA_blastos_01



NL:
1.51E4
m/z=
160.50-
161.50
MS
broccoli_bla
stos_AUA_0
2

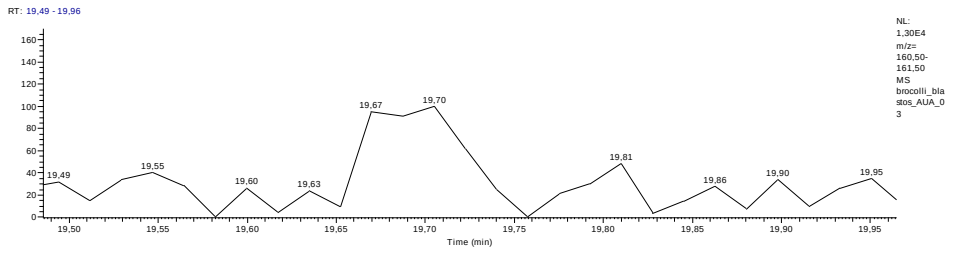
broccoli_blastos_AUA_02 #837 RT: 19.67 AV: 1 NL: 2.80E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



C:\Users\...\broccoli_blastos_AUA
1pros50_AUA_b

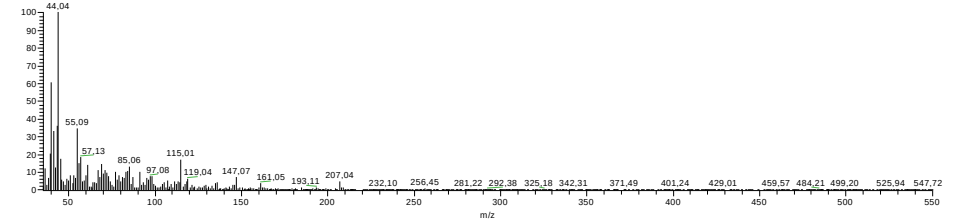
24/10/2018 12:28:45 μμ

1pros50_AUA_blastos_02



NL:
1.30E4
m/z=
160.50-
161.50
MS
broccoli_bla
stos_AUA_0
3

broccoli_blastos_AUA_03 #837 RT: 19.67 AV: 1 NL: 3.21E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



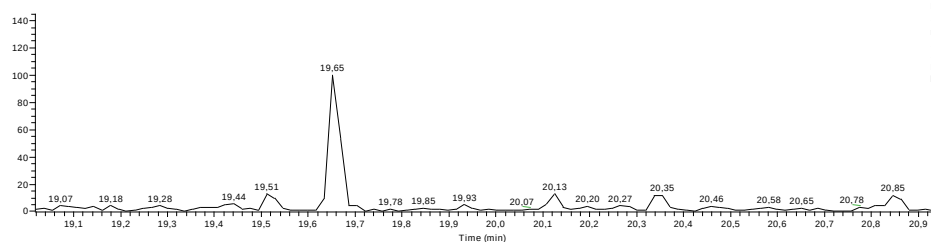
Προνύμφη *P. rapae*

C:\Users\...KAMPIA\kampia_02
kampia_01

3/11/2018 12:20:09 μμ

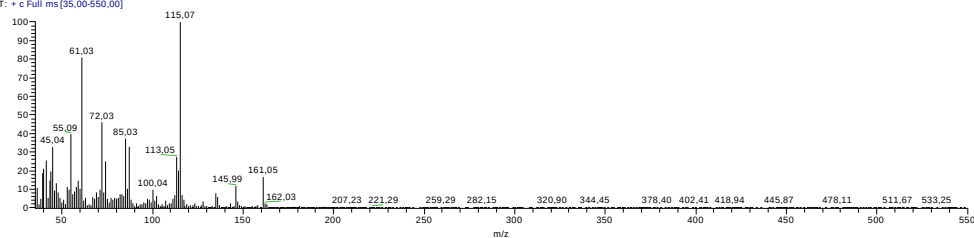
kampia_01

RT: 19.02 - 20.93



NL:
1.34E5
m/z=
160.50-
161.50
MS
kampia_02

kampia_02 #836 RT: 19.65 AV: 1 NL: 8.12E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]

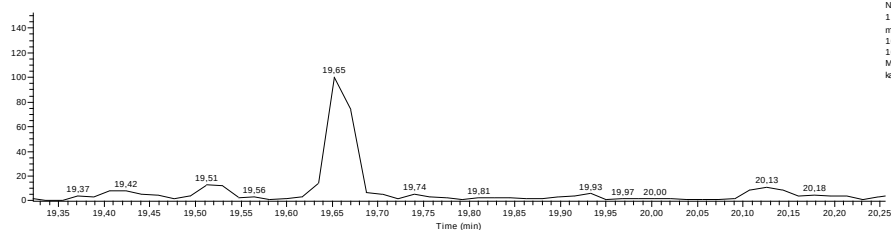


C:\Users\...KAMPIA\kampia_03
kampia_03

3/11/2018 1:57:33 μμ

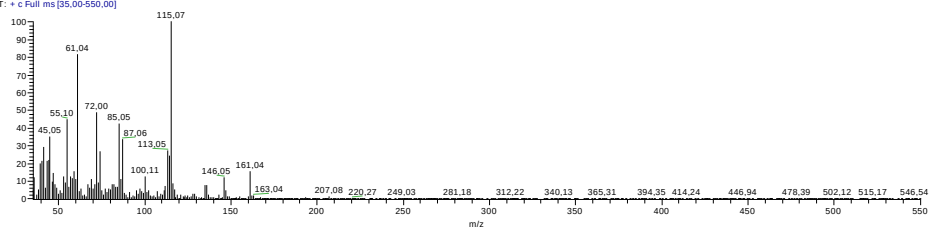
kampia_03

RT: 19.32 - 20.26



NL:
1.15E5
m/z=
160.50-
161.50
MS
kampia_03

kampia_03 #836 RT: 19.65 AV: 1 NL: 7.39E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



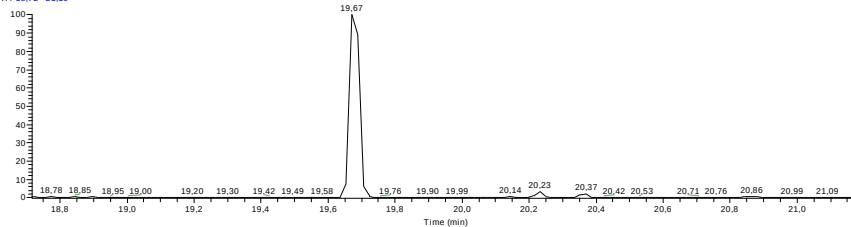
ΡΙΖΑ ΓΠΑ

C:\Users\...broccoli_riza_AUA_01
1pros30_AUA_b

24/10/2018 1:16:46 μμ

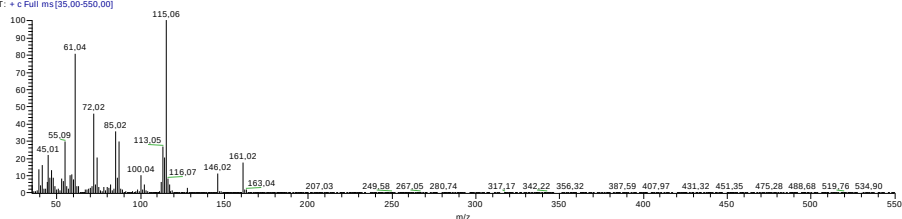
1pros30_AUA_riza_02

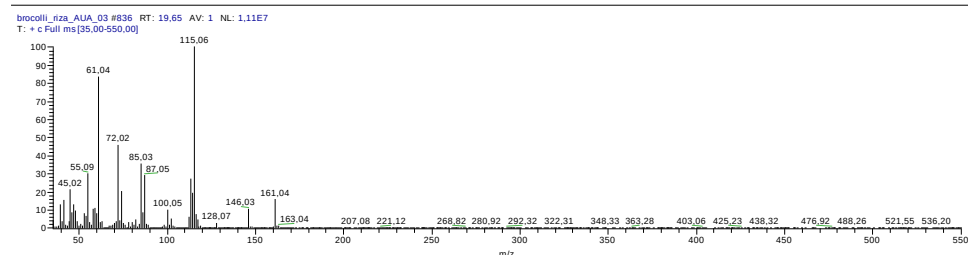
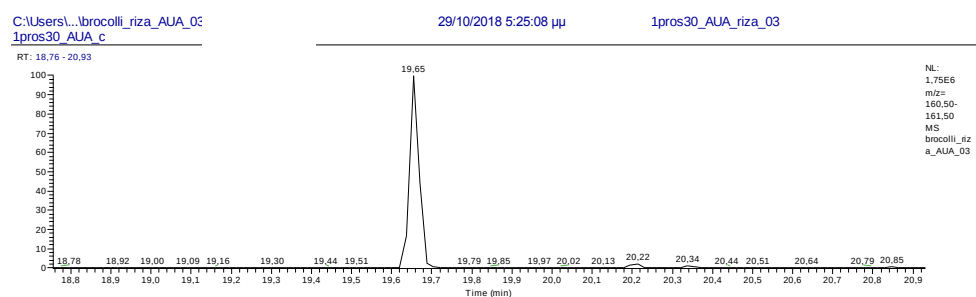
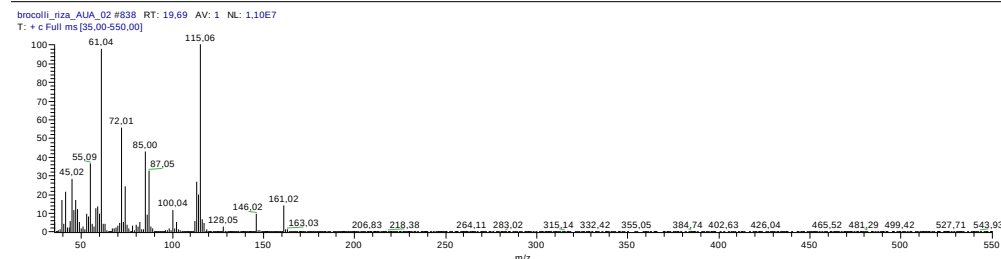
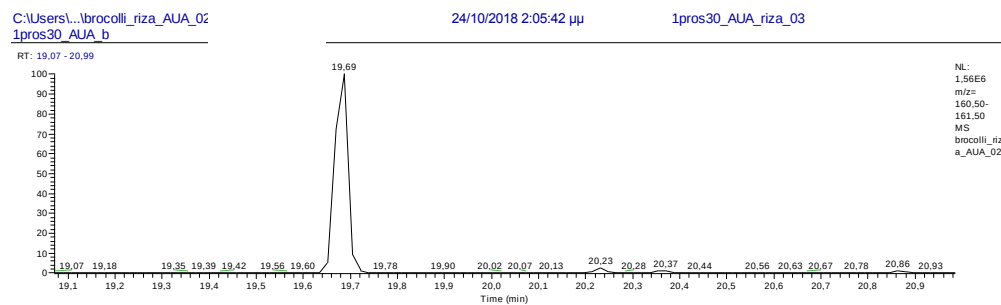
RT: 18.72 - 21.19



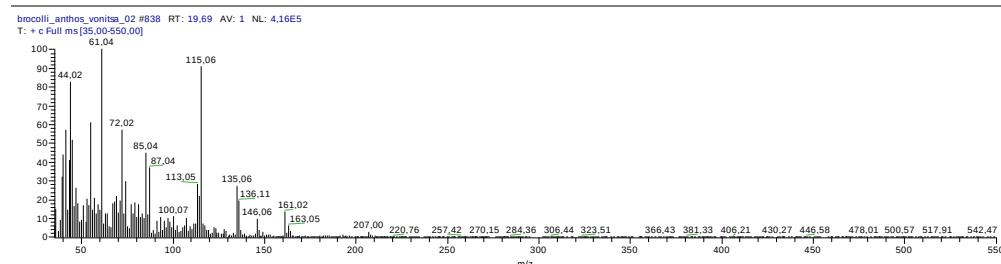
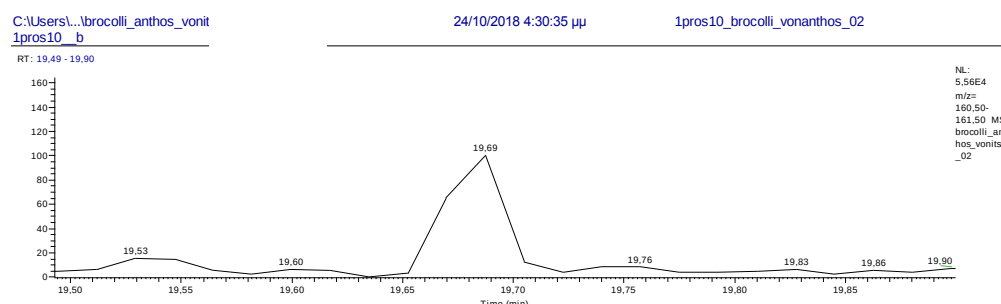
NL:
1.34E6
m/z=
160.50-
161.50
MS
broccoli_riz
a_AUA_01

broccoli_riza_AUA_01 #837 RT: 19.67 AV: 1 NL: 7.74E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]





ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

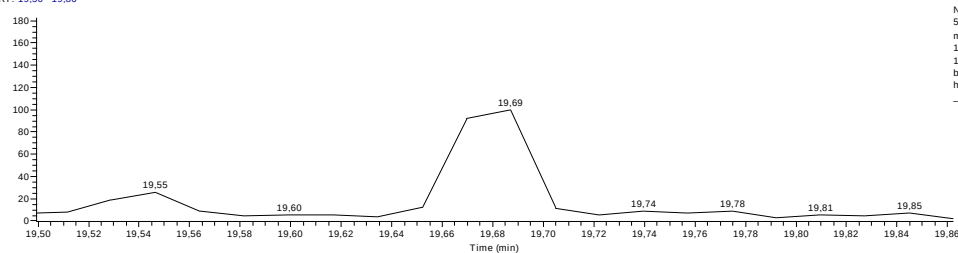


C:\Users\...\broccoli_anthos_vonit
1pros10_a

24/10/2018 3:41:58 μμ

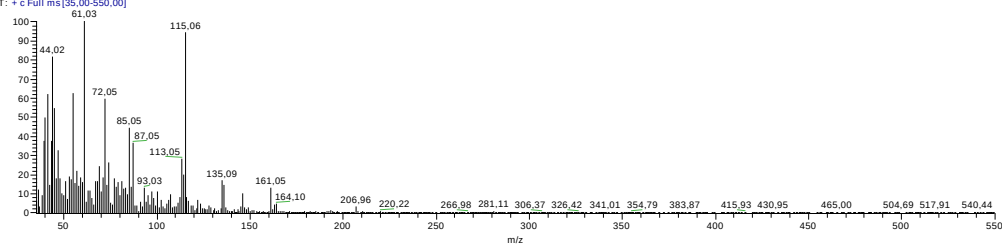
1pros10_broccoli_vonanthos_01

RT: 19.50 - 19.86



NL:
5.29E4
m/z=
160.50-
161.50 MS
broccoli_ant
hos_vonitsa
_01

broccoli_anthos_vonitsa_01 #838 RT: 19.69 AV: 1 NL: 4.15E5
T: + c Full ms [35,00-550,00]

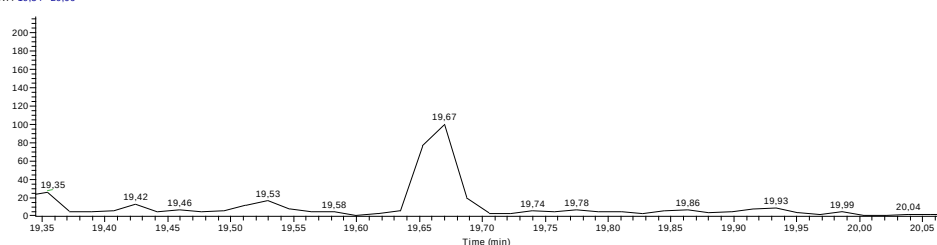


C:\Users\...\Vonitsa_broccoli_03
1pros10_vonitsa_c

5/11/2018 4:26:17 μμ

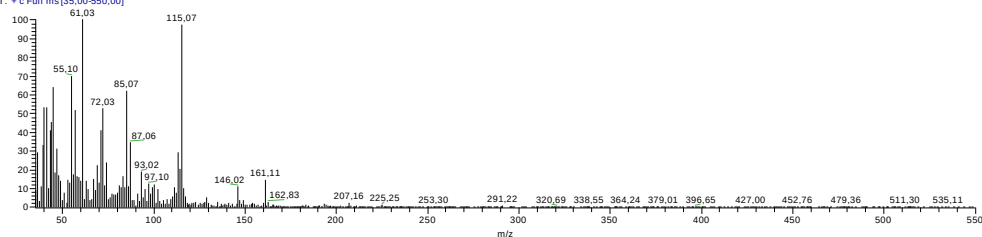
1pros10_vonitsa_c

RT: 19.34 - 20.06



NL:
3.83E4
m/z=
160.50-
161.50 MS
Vonitsa_bro
coli_03

Vonitsa_brocoli_03 #837 RT: 19.67 AV: 1 NL: 2.68E5
T: + c Full ms [35,00-550,00]



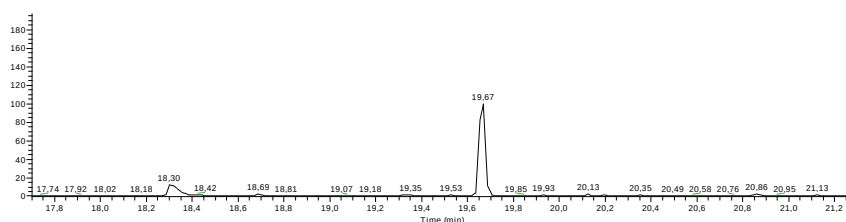
ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

C:\Users\...\broccoli_blastos_Von
1pros10_a

25/10/2018 11:06:10 μμ

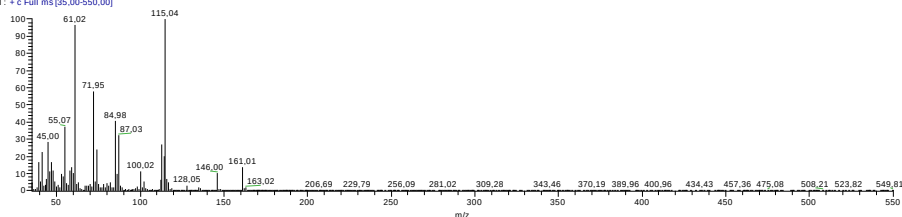
1pros10_a

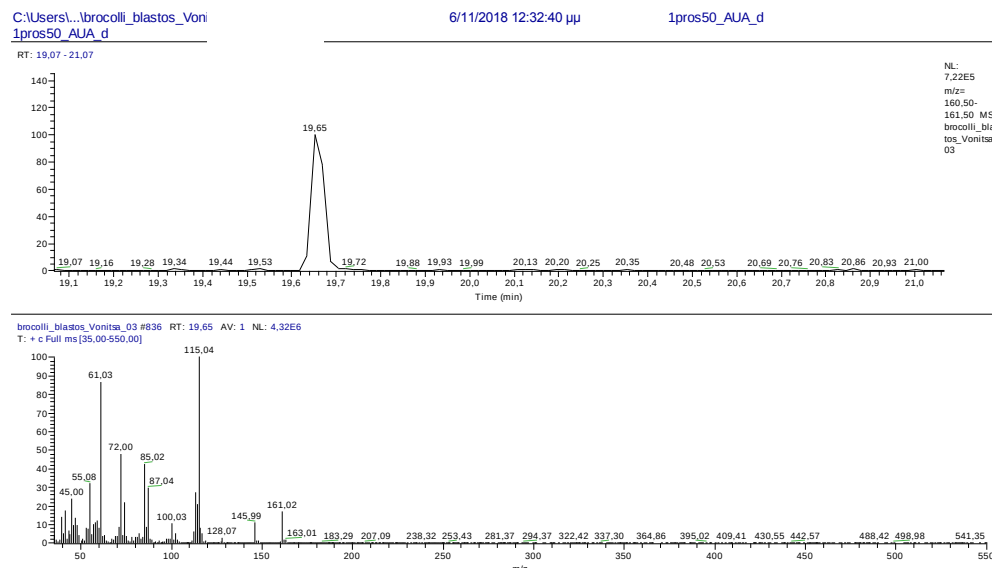
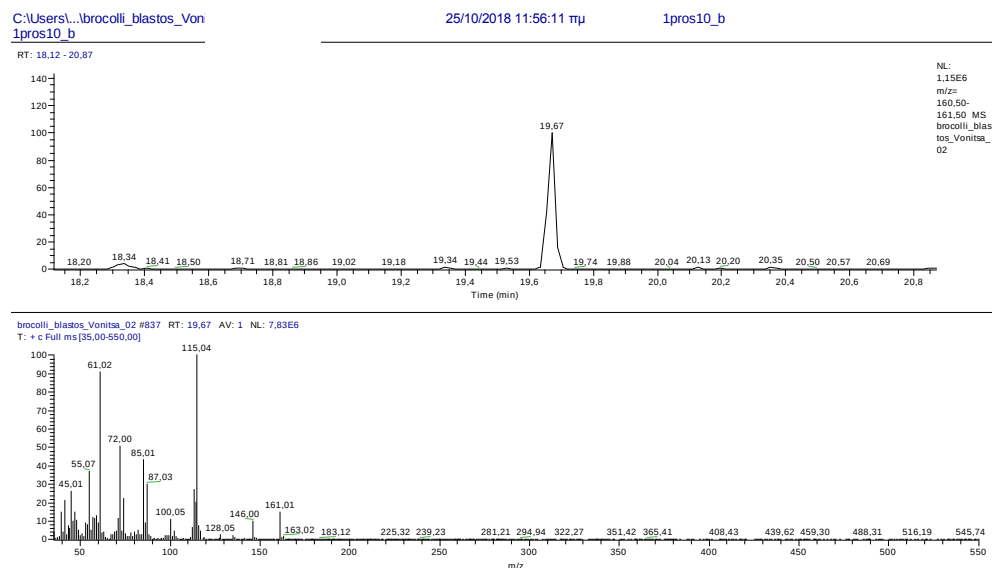
RT: 17.70 - 21.29



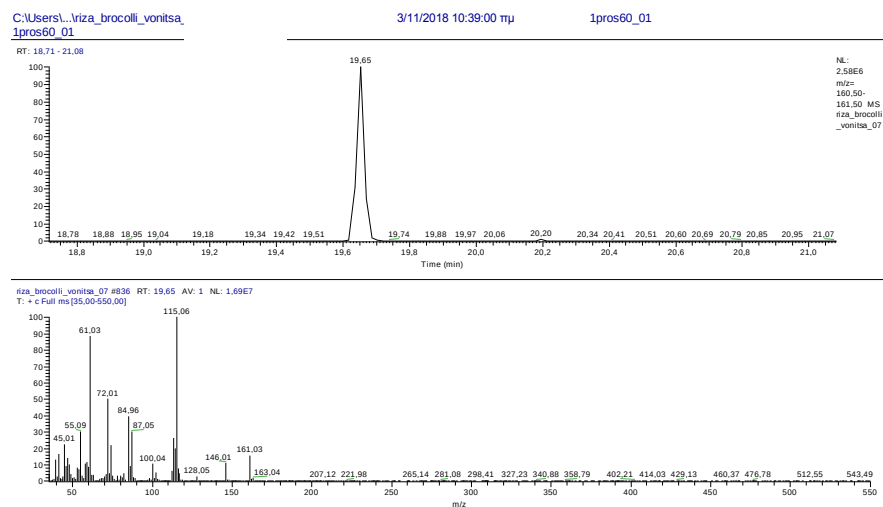
NL:
9.51E5
m/z=
160.50-
161.50 MS
broccoli_blas
tos_Vonitsa_
01

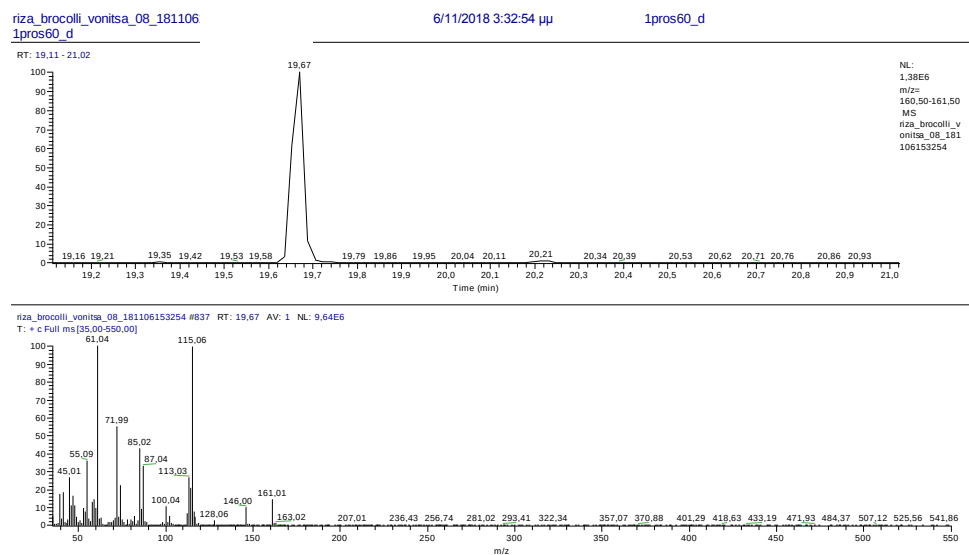
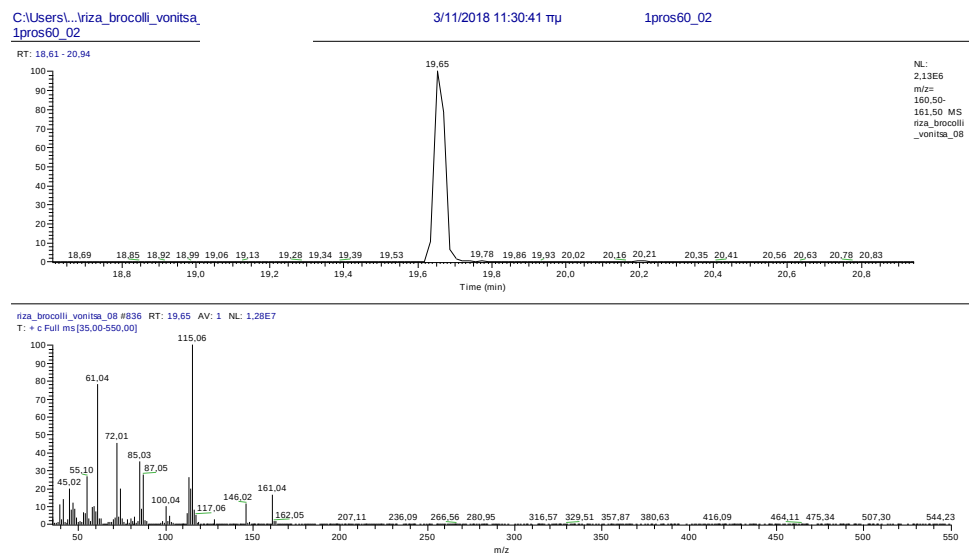
broccoli_blastos_Vonitsa_01 #837 RT: 19.67 AV: 1 NL: 7.01E6
T: + c Full ms [35,00-550,00]



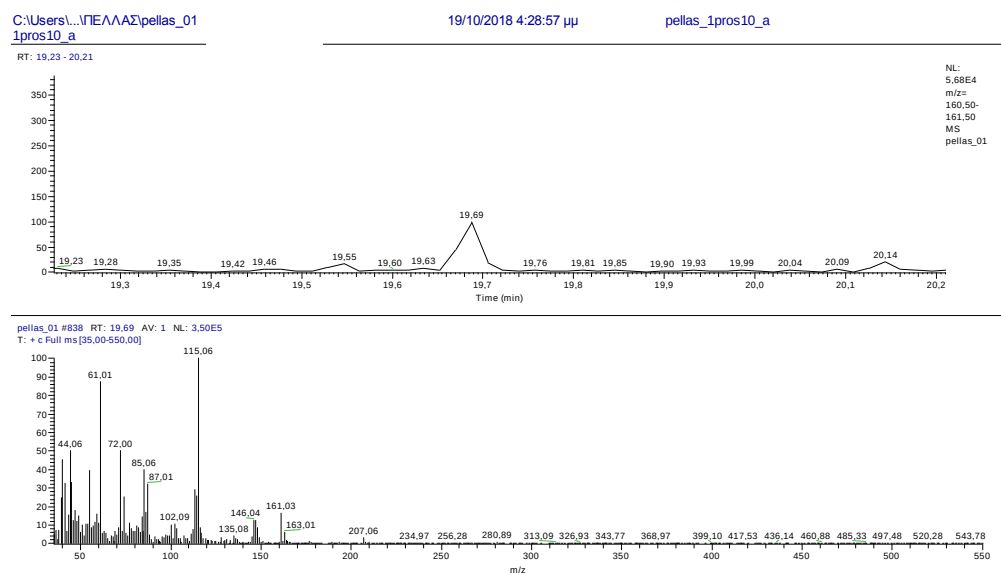


PIZA BONITZA





ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΠΕΛΛΑΣ

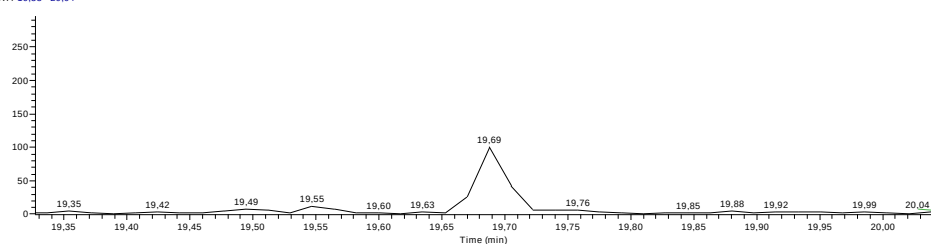


C:\Users\...ΠΕ\ΑΑ\pelas_02
1pros10_b

21/10/2018 2:50:24 μμ

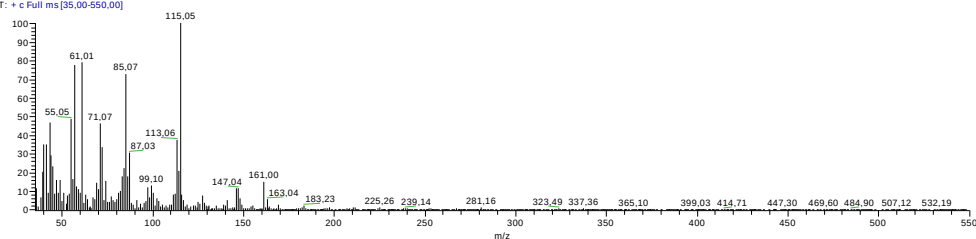
1pros10_b_

RT: 19.33 - 20.04



NL:
8.62E4
m/z=
160.50-
161.50
MS
pelas_02

pelas_02 #838 RT: 19.69 AV: 1 NL: 5.67E5
T: + c Full ms [35.00-550.00]



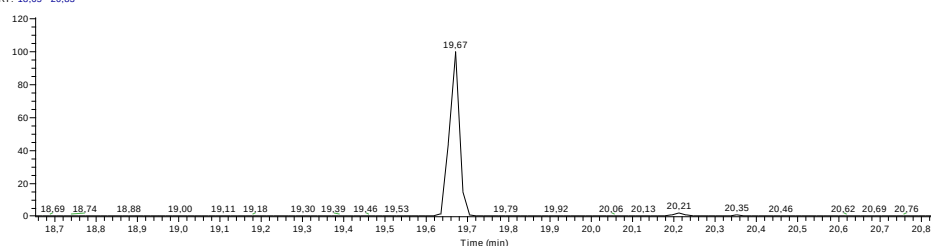
PIZA ΑΓΡΙΝΙΟ

C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_
1pros30_a

25/10/2018 12:44:05 μμ

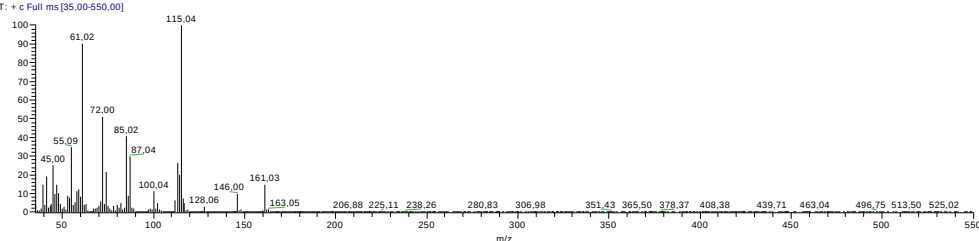
1pros30_rizaAgrinio_01

RT: 18.65 - 20.83



NL:
1.75E6
m/z=
160.50-
161.50 MS
riza_broccoli
_Agrinio_01

riza_broccoli_Agrinio_01 #837 RT: 19.67 AV: 1 NL: 1.23E7
T: + c Full ms [35.00-550.00]

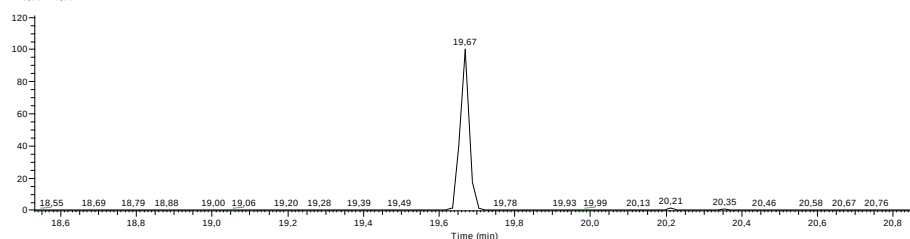


C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_
1pros30_b

25/10/2018 1:32:18 μμ

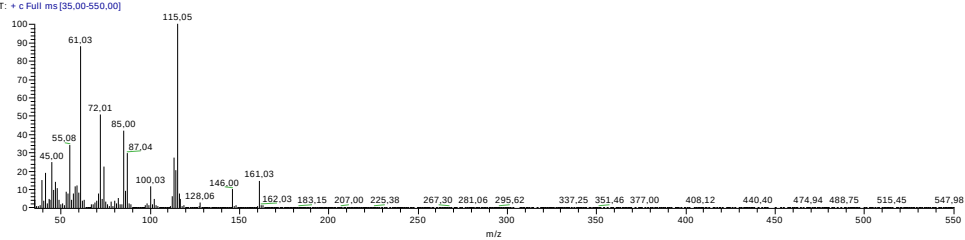
1pros30_rizaAgrinio_02

RT: 18.53 - 20.86



NL:
1.97E6
m/z=
160.50-
161.50 MS
riza_broccoli
_Agrinio_02

riza_broccoli_Agrinio_02 #837 RT: 19.67 AV: 1 NL: 1.35E7
T: + c Full ms [35.00-550.00]

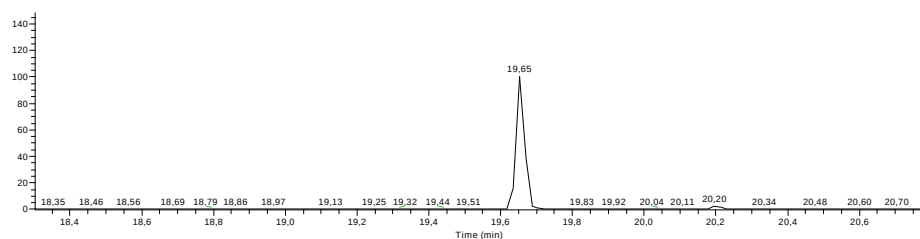


C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_
1pros30_c

30/10/2018 12:48:30 μμ

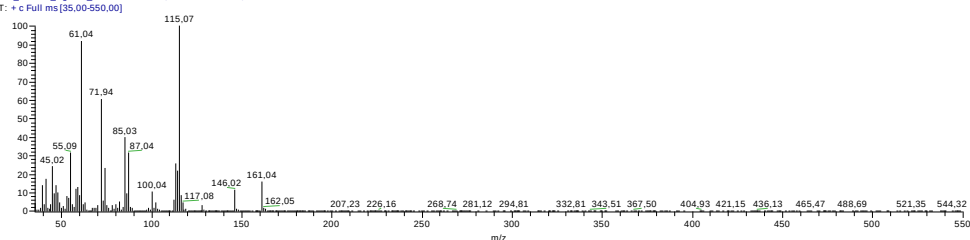
1pros30_rizaAgrinio_03

RT: 18.30 - 20.78



NL:
9.54E5
m/z=
160.50-
161.50 MS
riza_broccoli
_Agrinio_03

riza_broccoli_Agrinio_03 #836 RT: 19.65 AV: 1 NL: 6.00E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



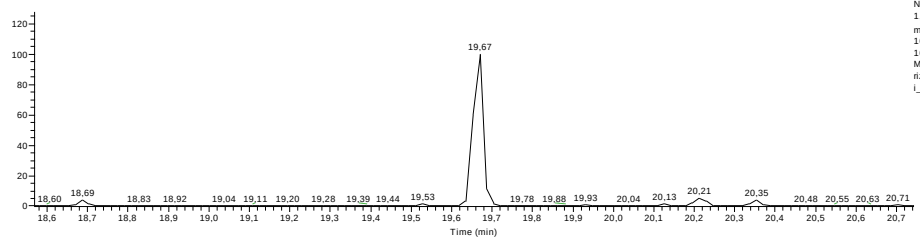
PIZA APΓΟΣ

C:\Users\...riza_broccoli_Argos_
1pros10_a

25/10/2018 4:43:53 μμ

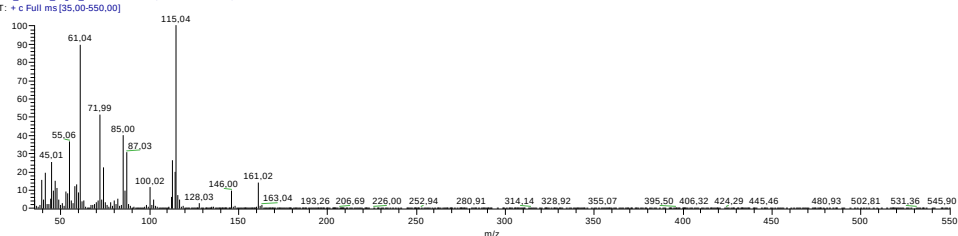
1pros10_rizaArgos_01

RT: 18.57 - 20.74



NL:
1.09E6
m/z=
160.50-
161.50 MS
riza_broccoli
_Argos_02

riza_broccoli_Argos_02 #837 RT: 19.67 AV: 1 NL: 7.84E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

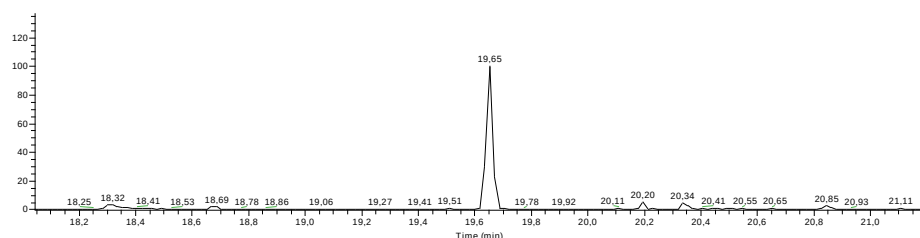


C:\Users\...riza_broccoli_Argos_
1pros10_b

26/10/2018 11:12:55 μμ

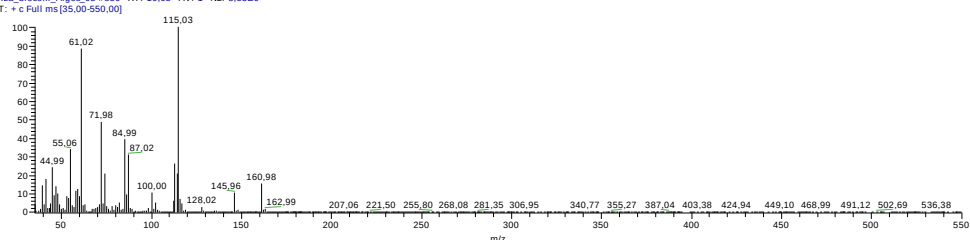
1pros10_rizaArgos_02

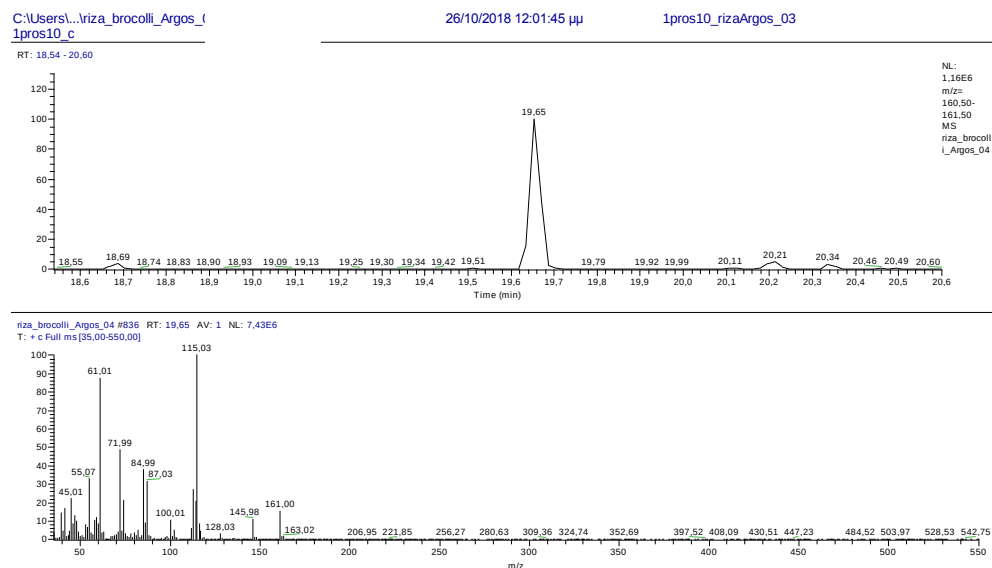
RT: 18.04 - 21.19



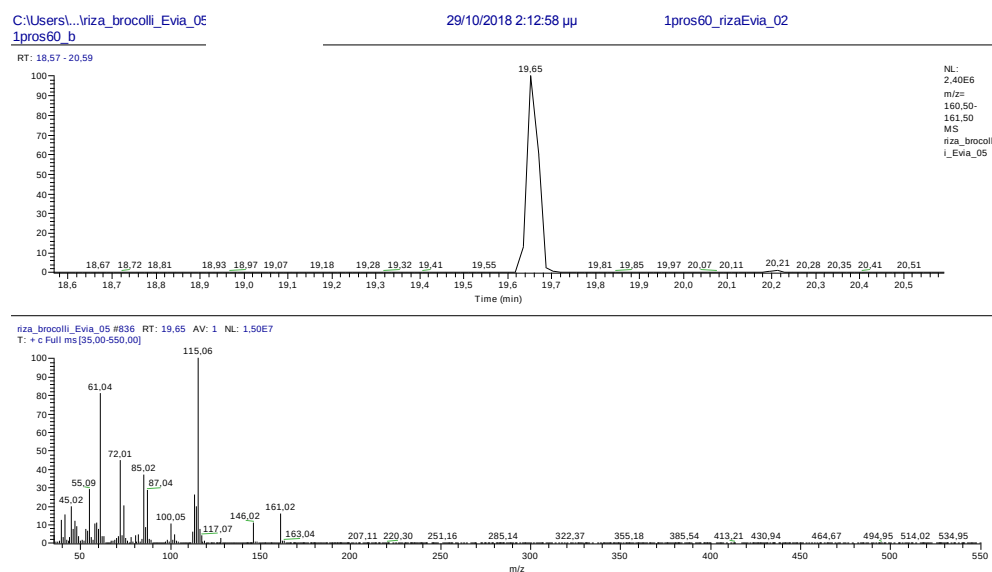
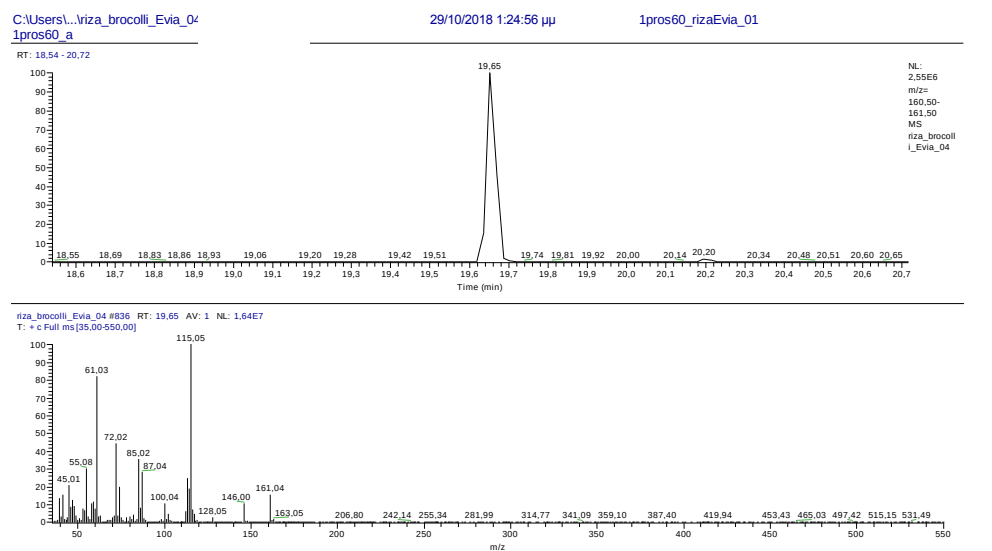
NL:
1.31E6
m/z=
160.50-
161.50 MS
riza_broccoli
_Argos_03

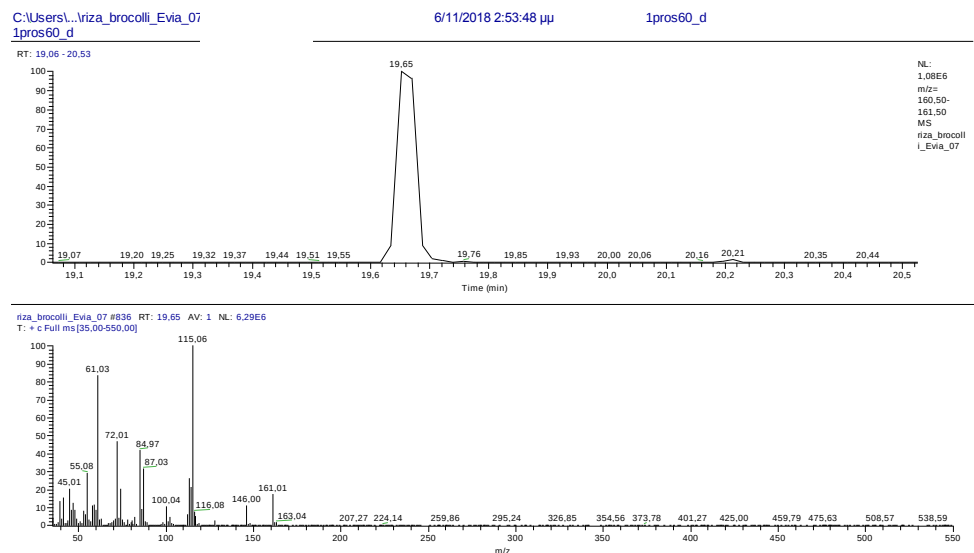
riza_broccoli_Argos_03 #836 RT: 19.65 AV: 1 NL: 8.55E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]





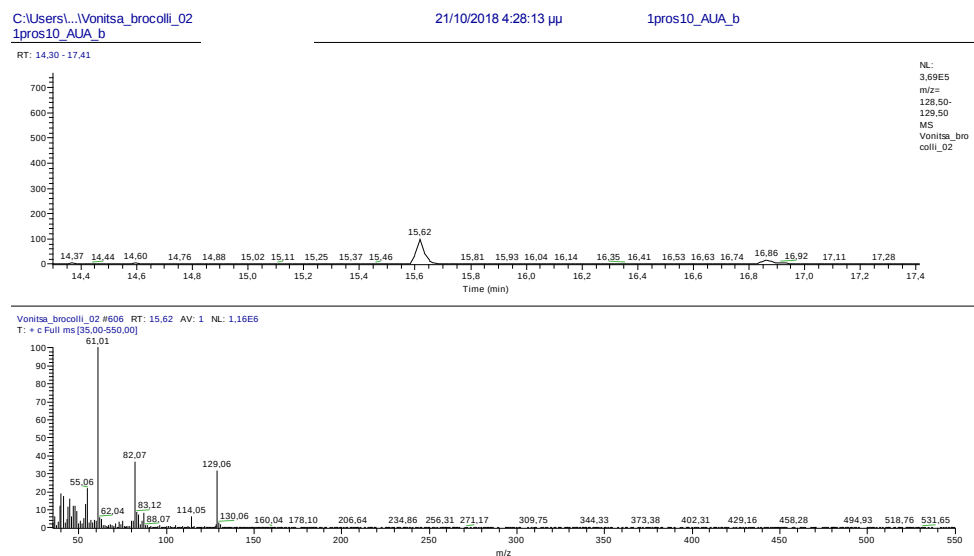
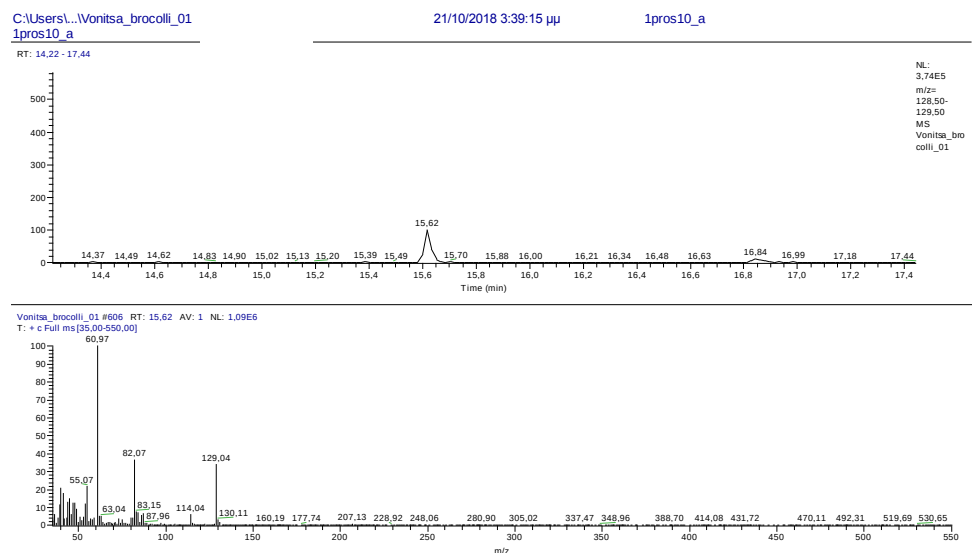
PIZA EYBOIA

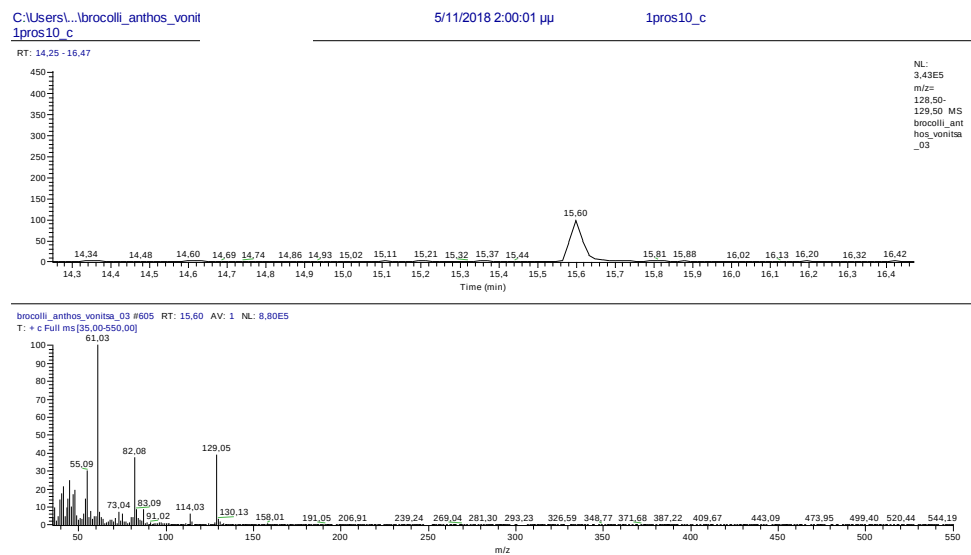
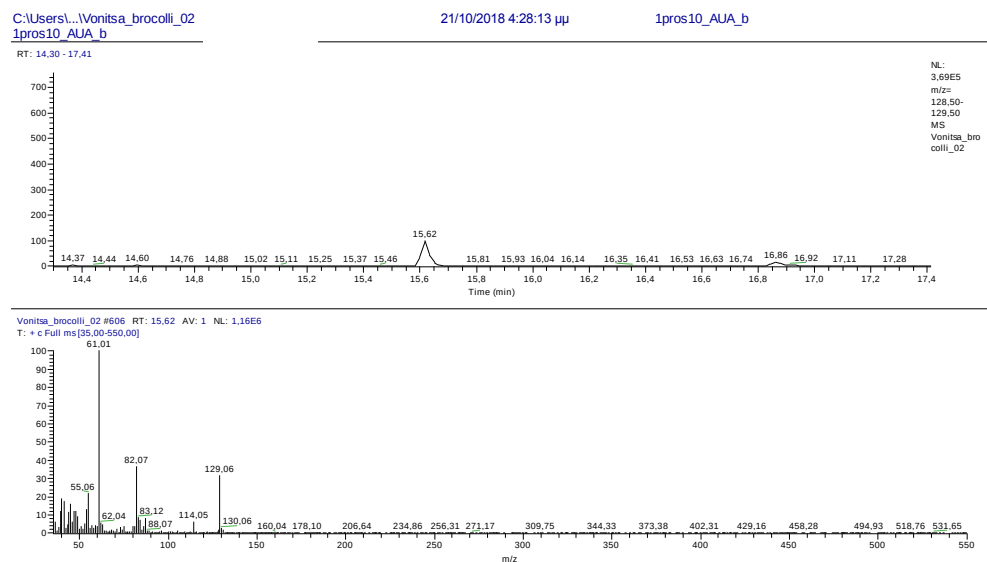




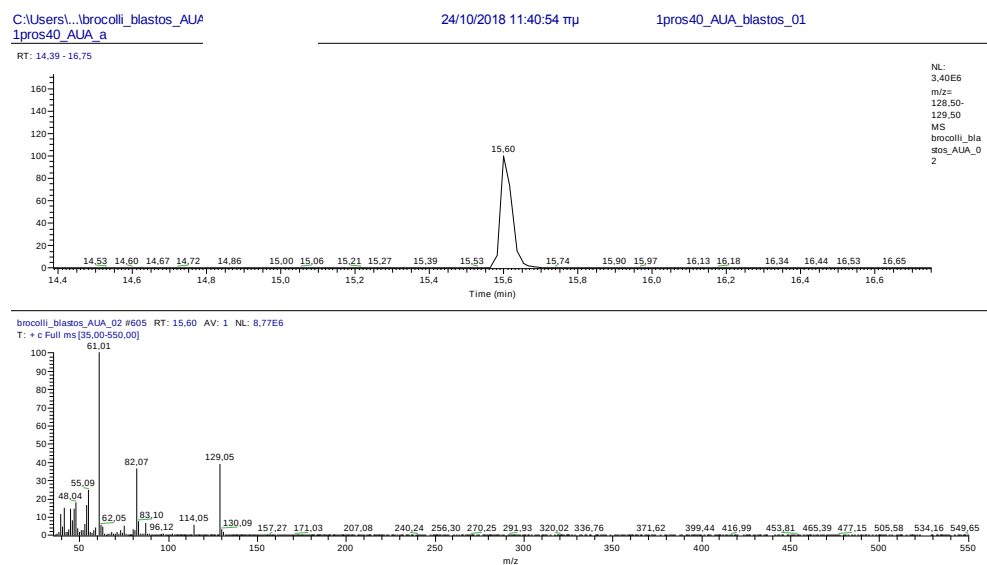
5MITN

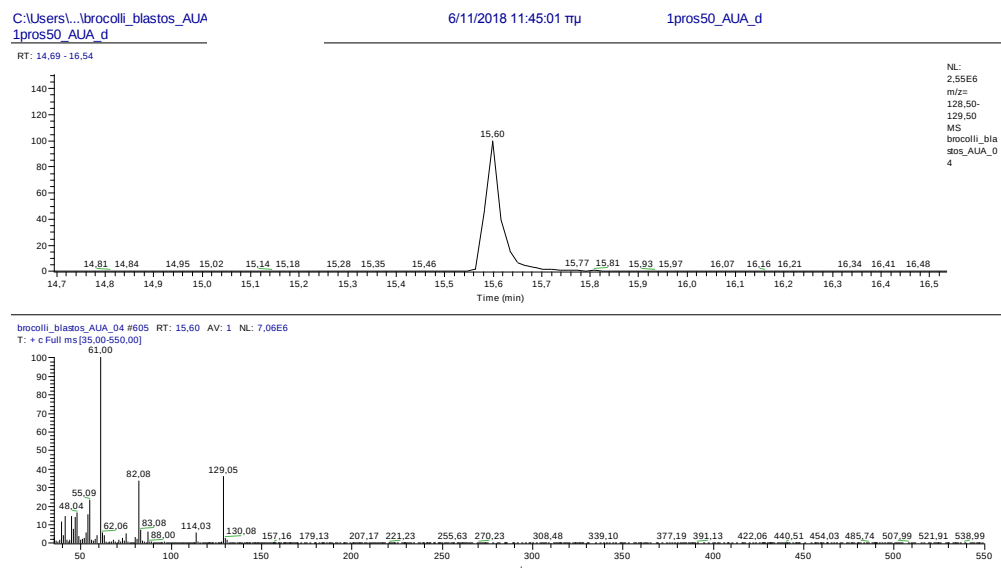
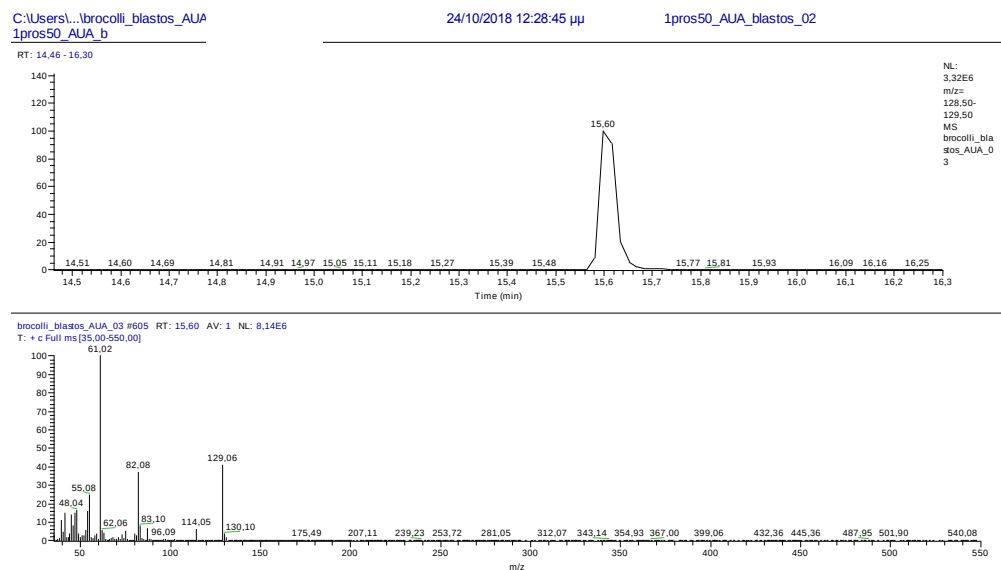
ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ



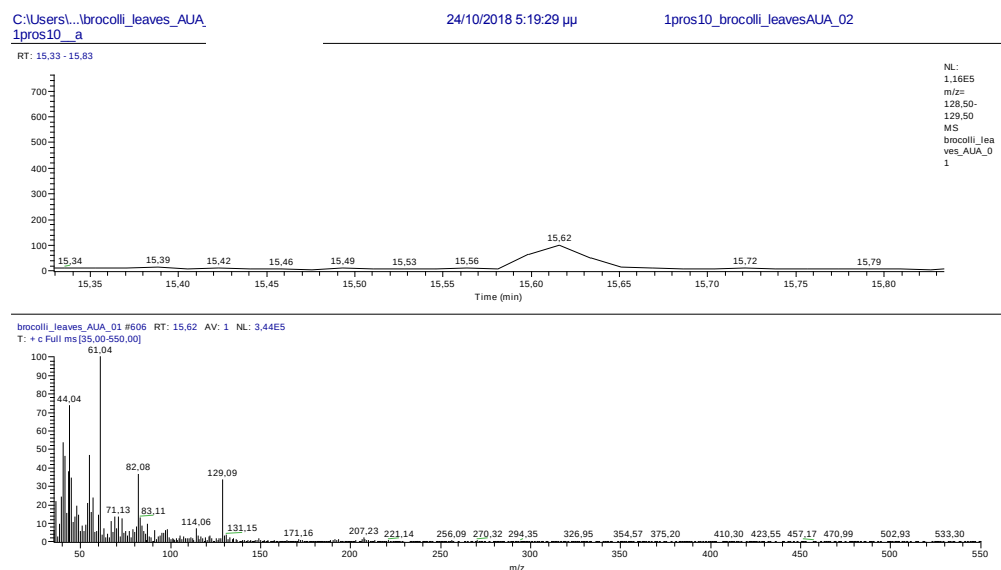


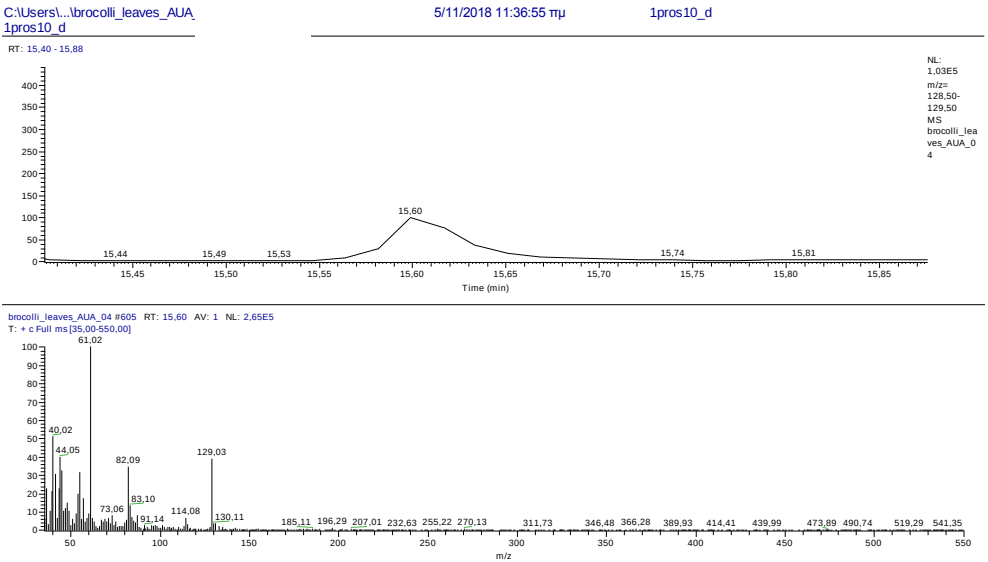
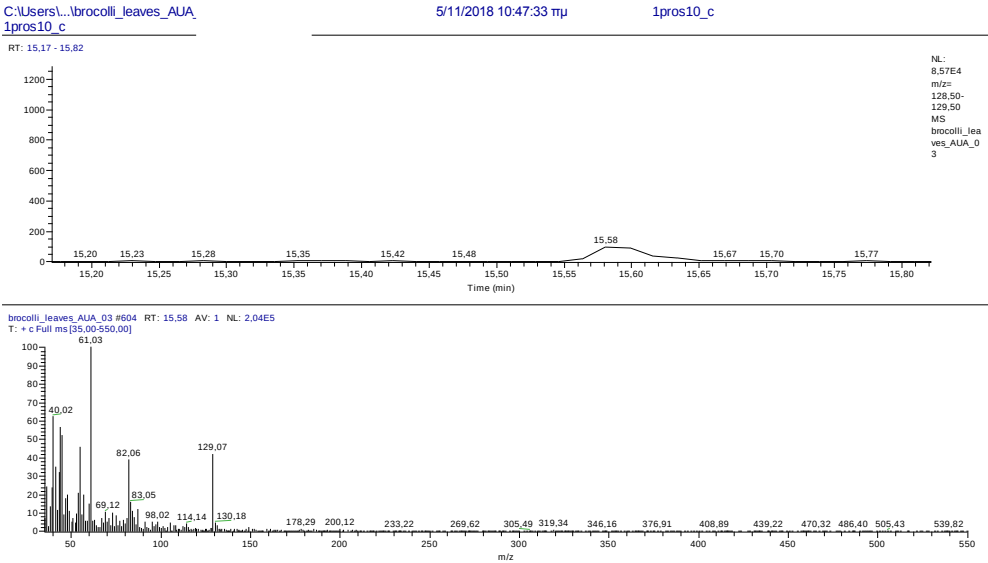
ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ



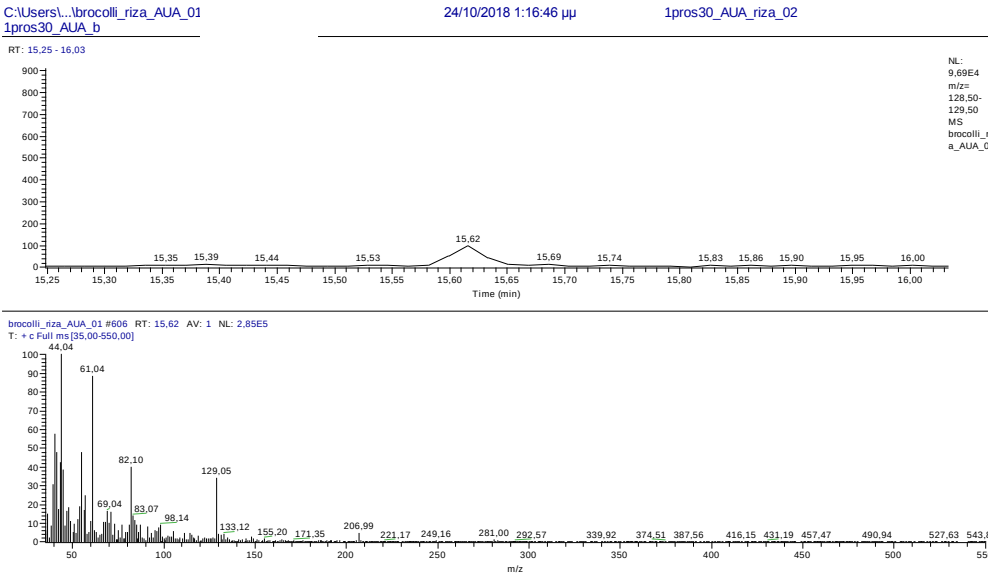


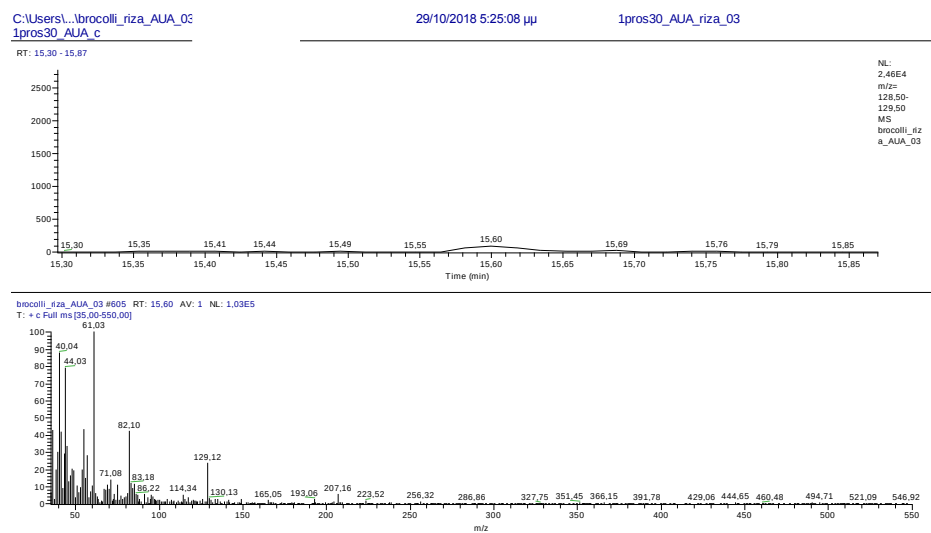
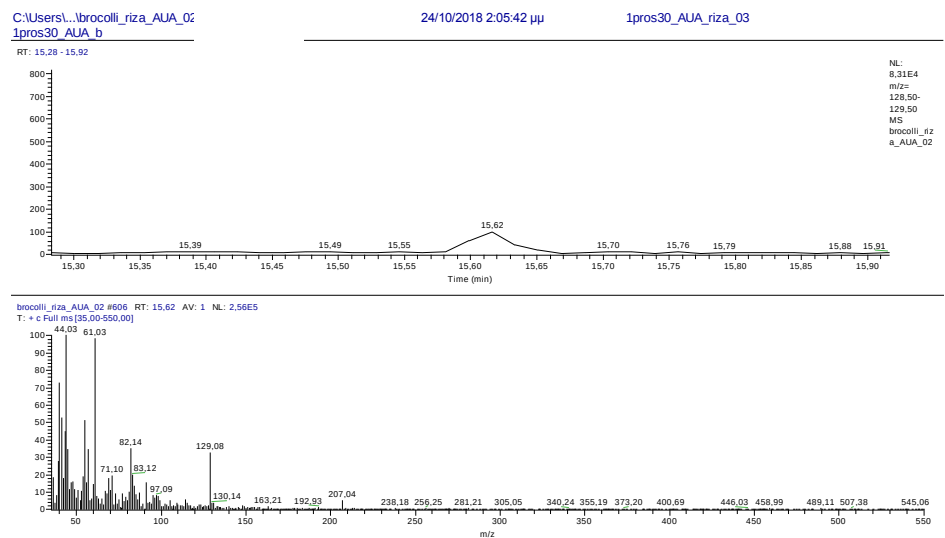
ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ



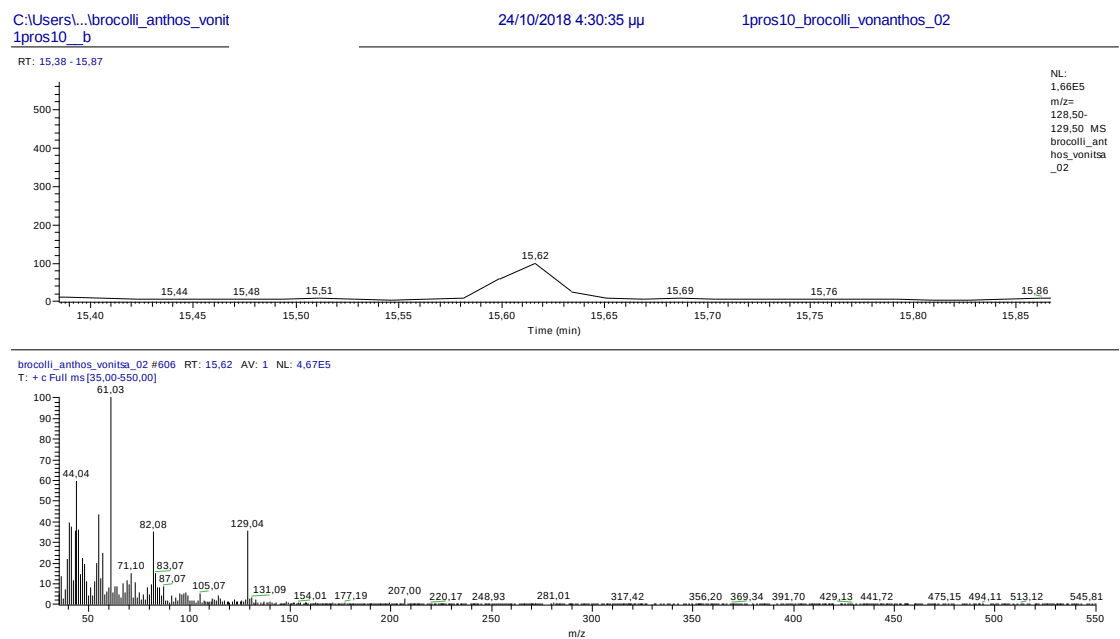


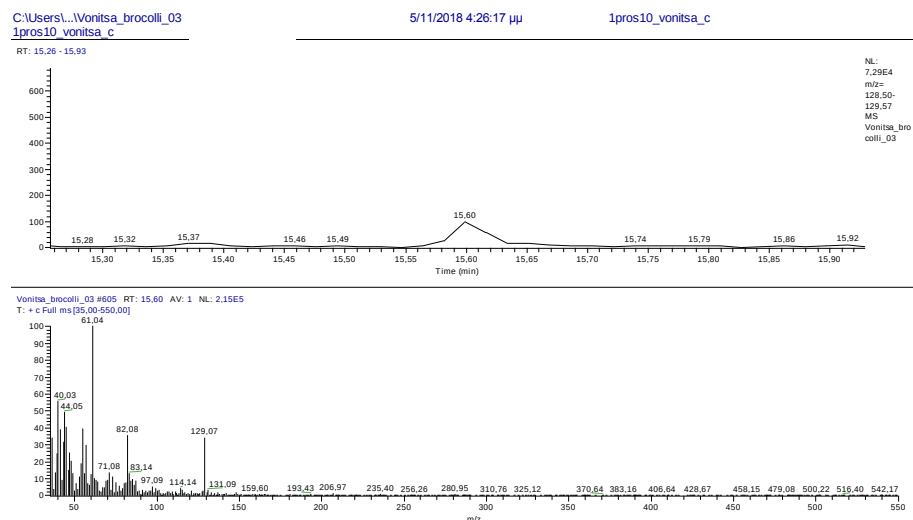
ΡΙΖΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ



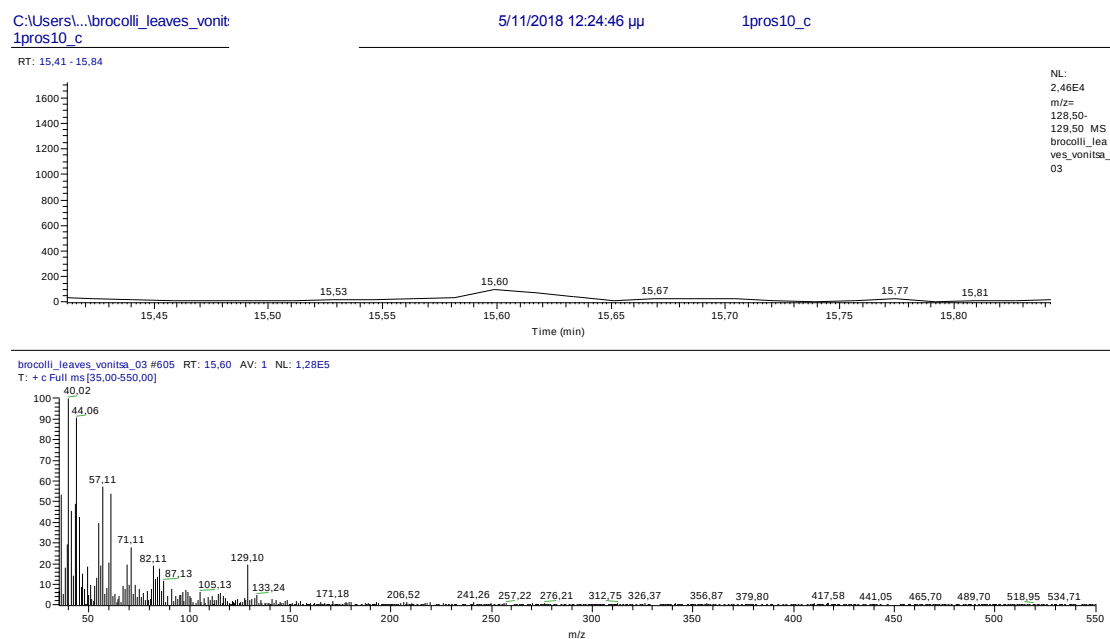
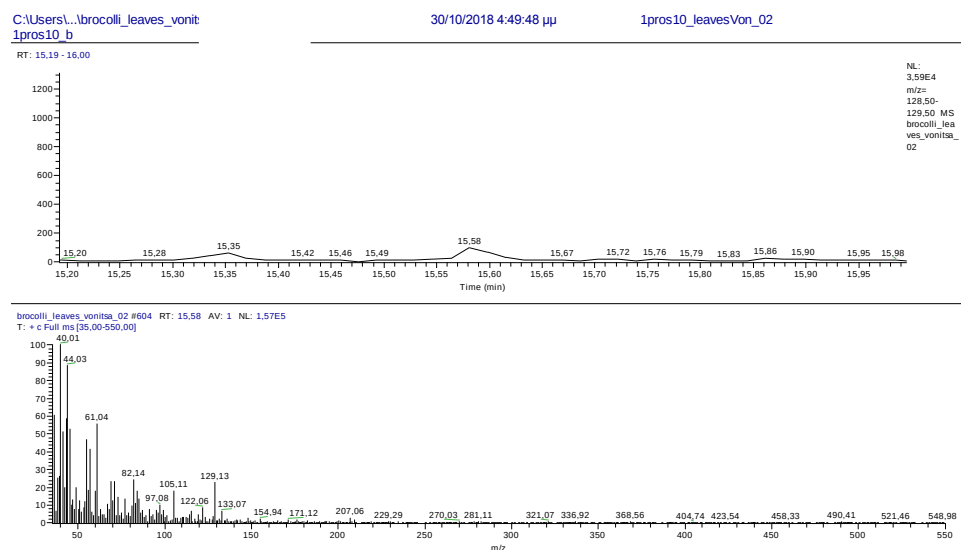


ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ





ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

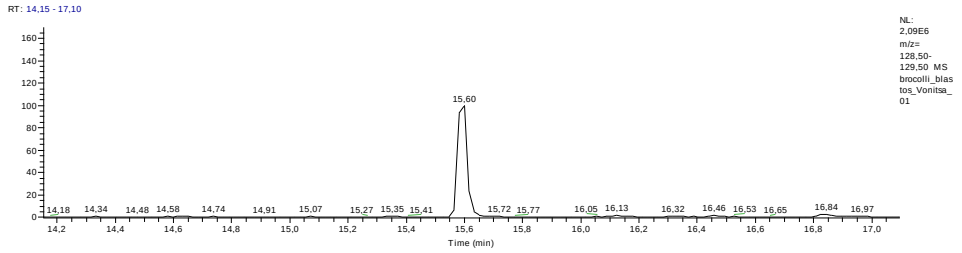


ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

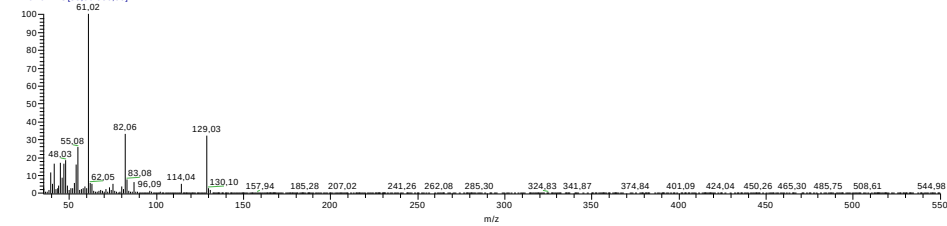
C:\Users\...\broccoli_blastos_Von
1pros10_a

25/10/2018 11:06:10 πμ

1pros10_a



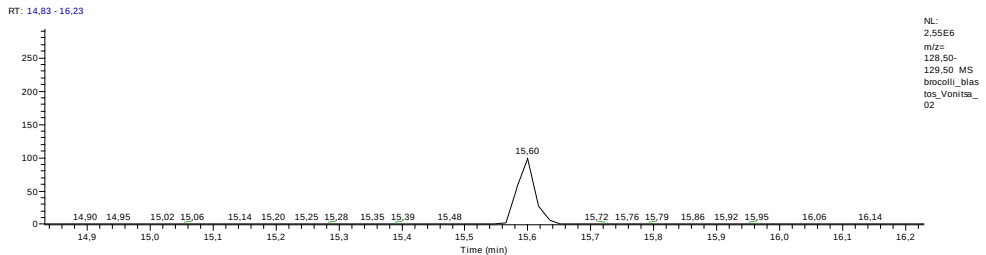
broccoli_blastos_Vonita_01 #605 RT: 15.60 AV: 1 NL: 6.47E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



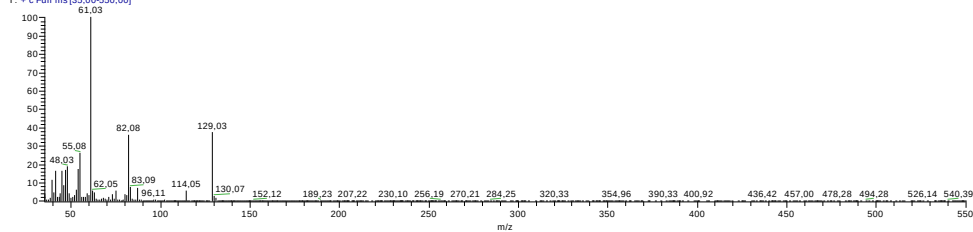
C:\Users\...\broccoli_blastos_Von
1pros10_b

25/10/2018 11:56:11 πμ

1pros10_b



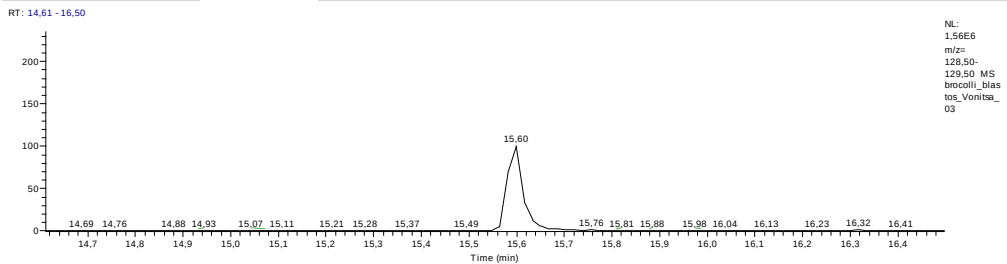
broccoli_blastos_Vonita_02 #605 RT: 15.60 AV: 1 NL: 6.78E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



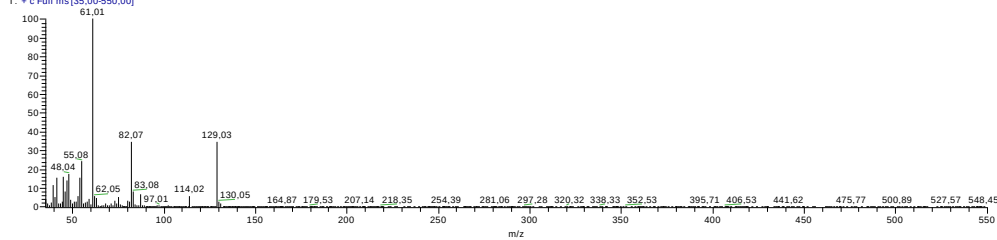
C:\Users\...\broccoli_blastos_Von
1pros50_AUA_d

6/11/2018 12:32:40 μμ

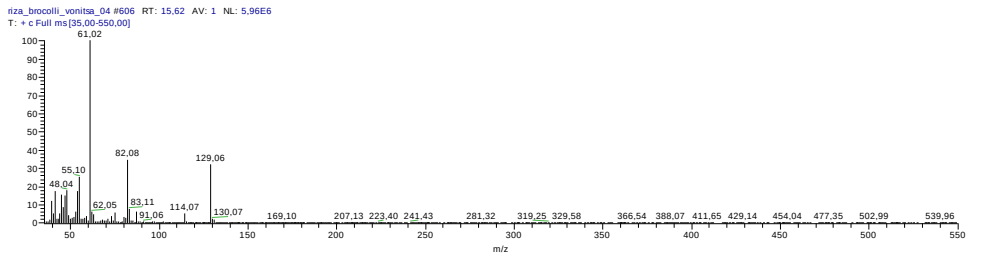
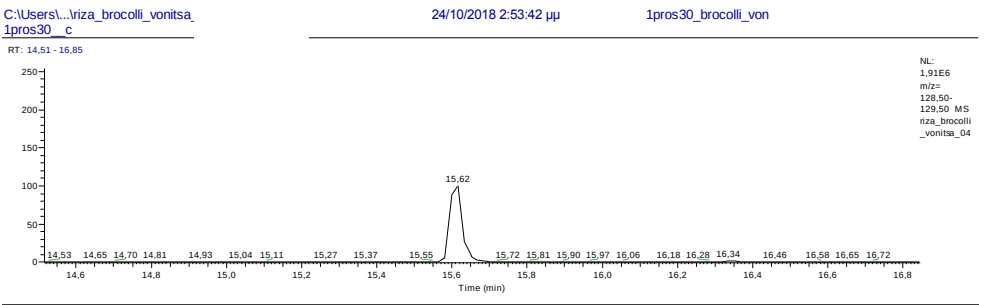
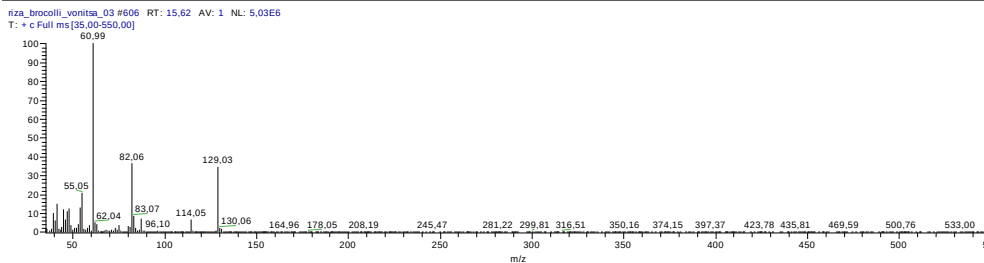
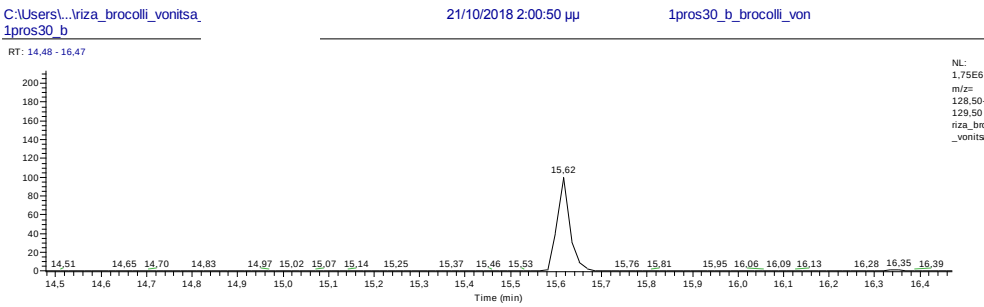
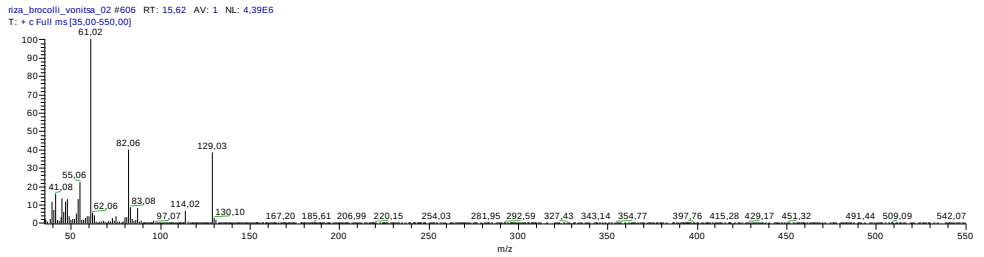
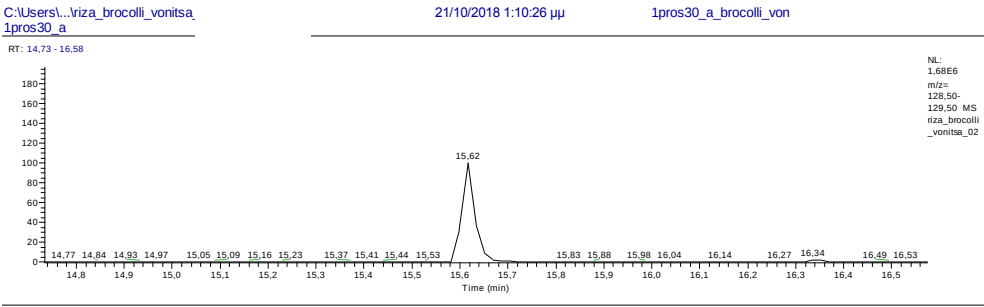
1pros50_AUA_d



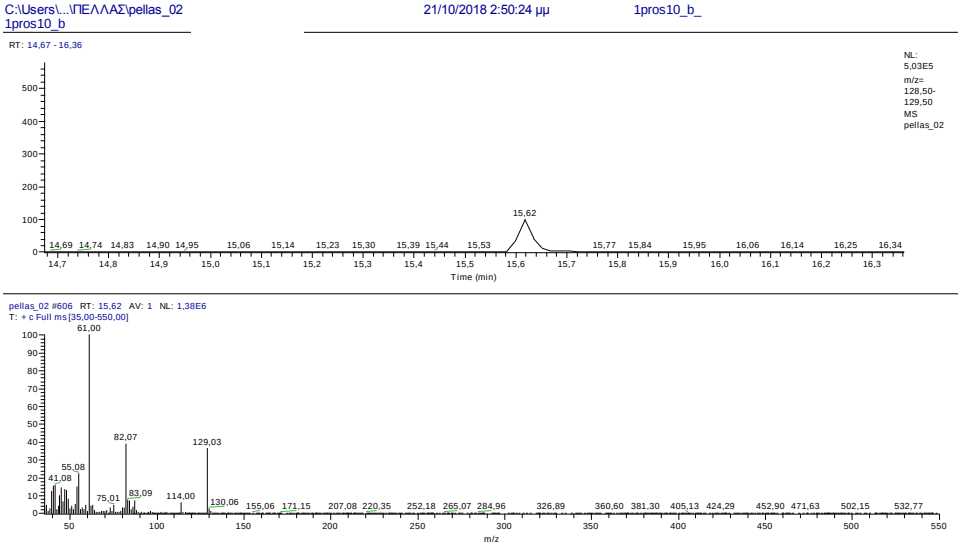
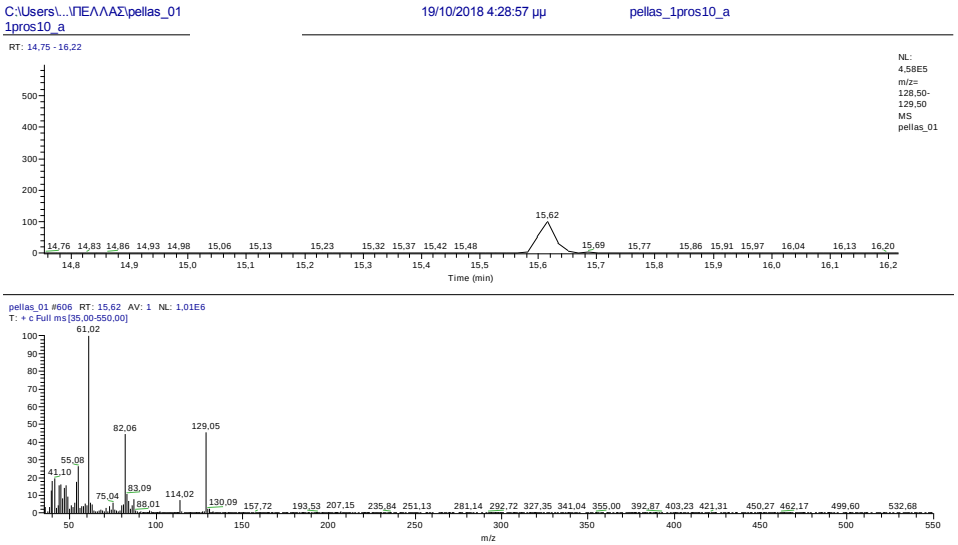
broccoli_blastos_Vonita_03 #605 RT: 15.60 AV: 1 NL: 4.54E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



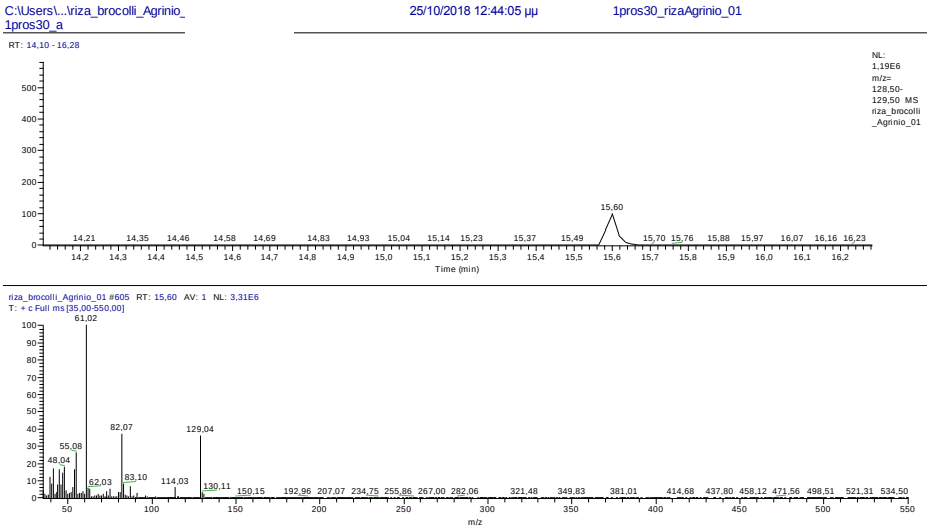
PIZA BONITZA

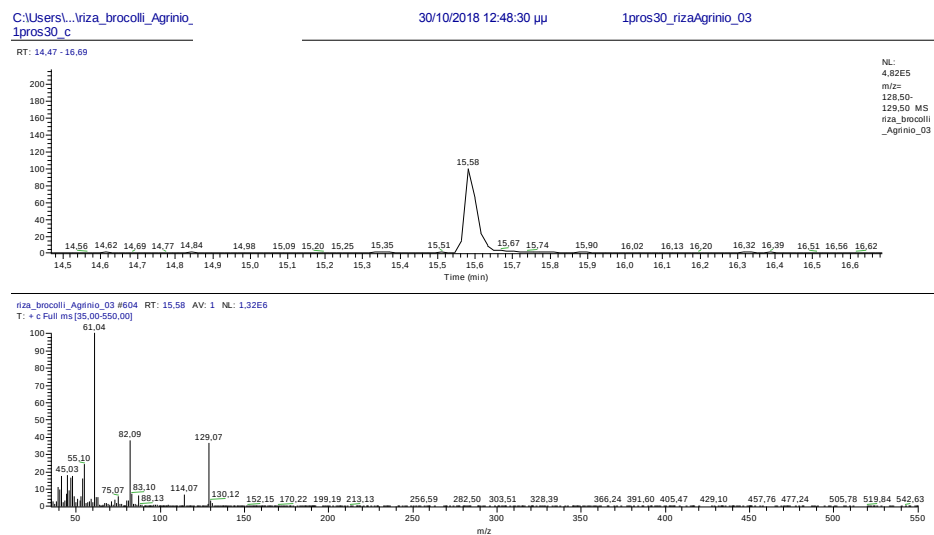
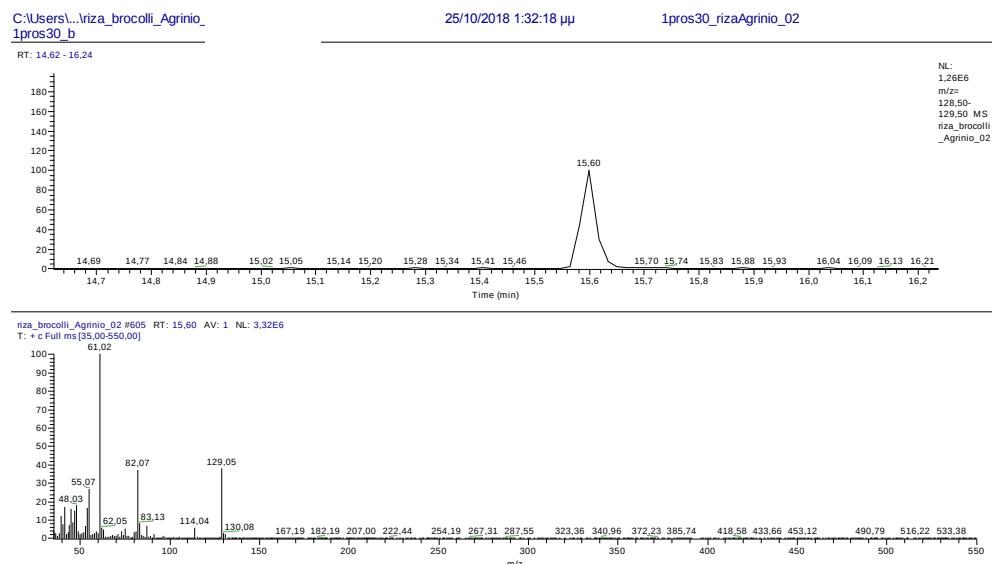


ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΠΕΛΛΑΣ

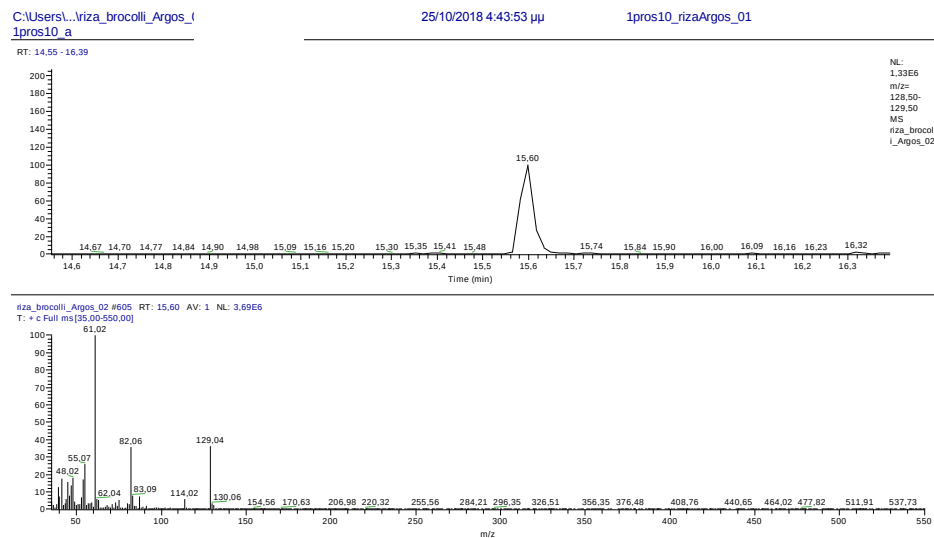


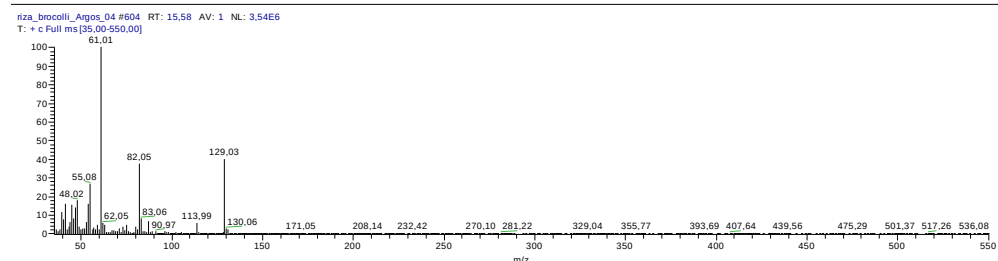
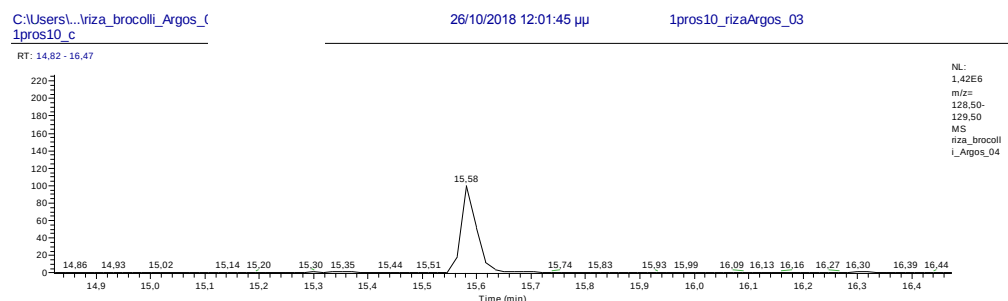
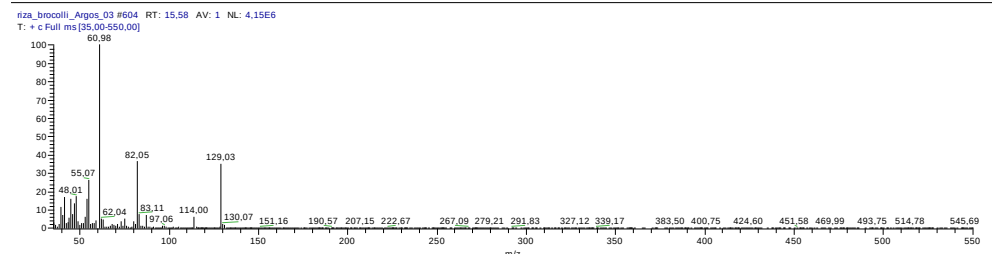
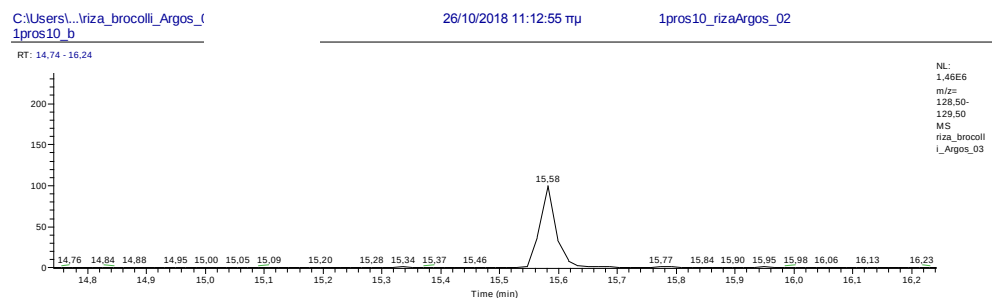
PIZA ΑΓΡΙΝΙΟ



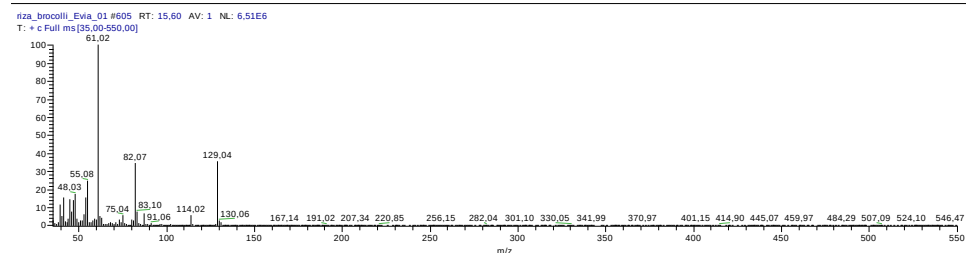
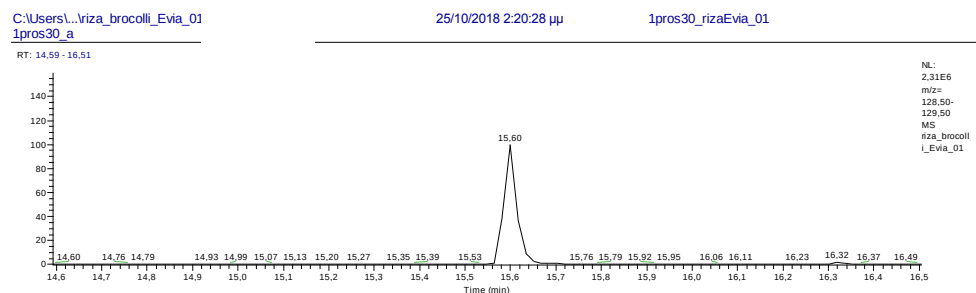


PIZA APΓOΣ





PIZA EYBOIA



3MIC

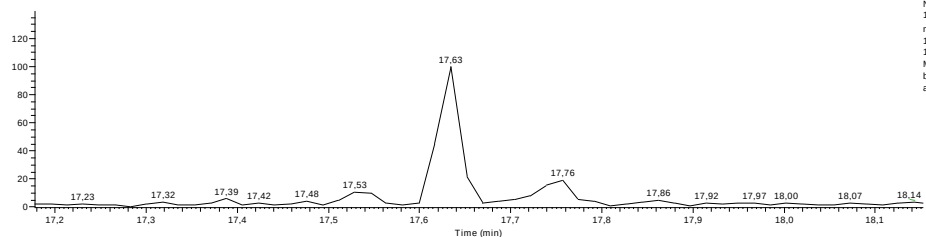
PIZA ΓΠΑ

C:\Users\...\broccoli_riza_AUA_01
1pros30_AUA_b

24/10/2018 1:16:46 μμ

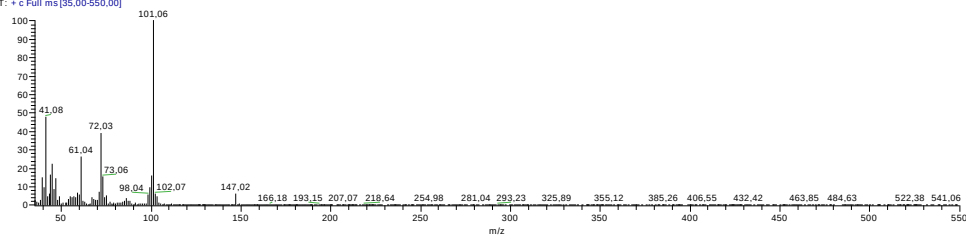
1pros30_AUA_riza_02

RT: 17.18 - 18.15



NL: 1.37E5
m/z= 146.50-147.50
MS
broccoli_riz
a_AUA_01

broccoli_riza_AUA_01 #721 RT: 17.63 AV: 1 NL: 2.28E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

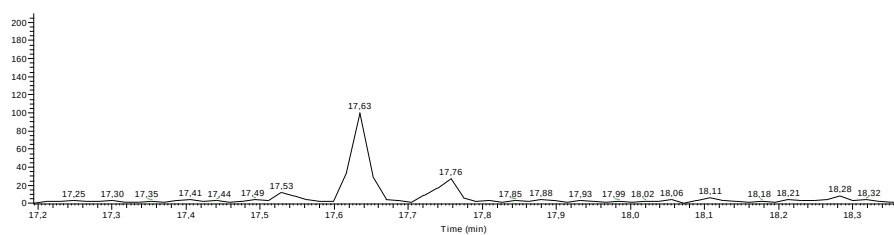


C:\Users\...\broccoli_riza_AUA_02
1pros30_AUA_b

24/10/2018 2:05:42 μμ

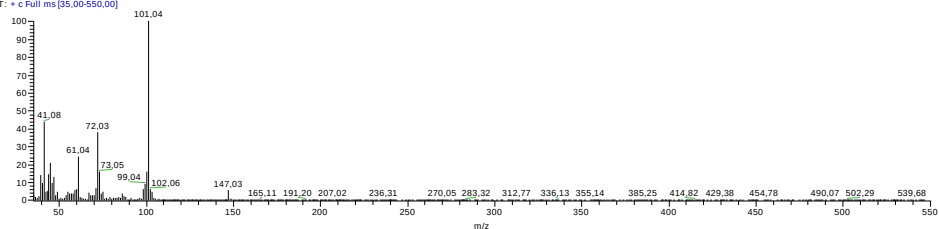
1pros30_AUA_riza_03

RT: 17.19 - 18.36



NL: 1.47E5
m/z= 146.50-147.50
MS
broccoli_riz
a_AUA_02

broccoli_riza_AUA_02 #721 RT: 17.63 AV: 1 NL: 2.59E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

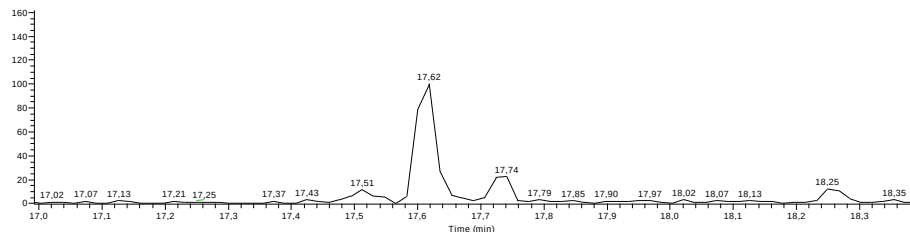


C:\Users\...\broccoli_riza_AUA_03
1pros30_AUA_c

29/10/2018 5:25:08 μμ

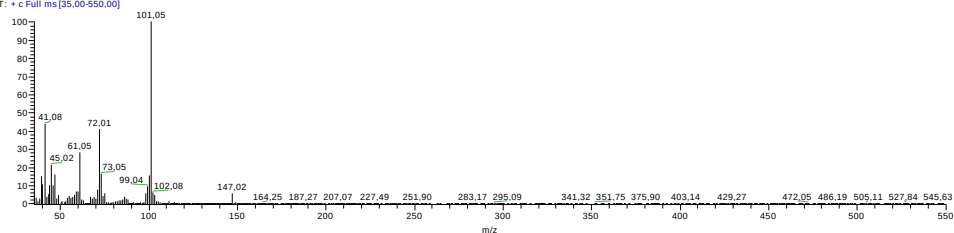
1pros30_AUA_riza_03

RT: 16.99 - 18.38



NL: 9.25E4
m/z= 146.50-147.50
MS
broccoli_riz
a_AUA_03

broccoli_riza_AUA_03 #720 RT: 17.62 AV: 1 NL: 1.64E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

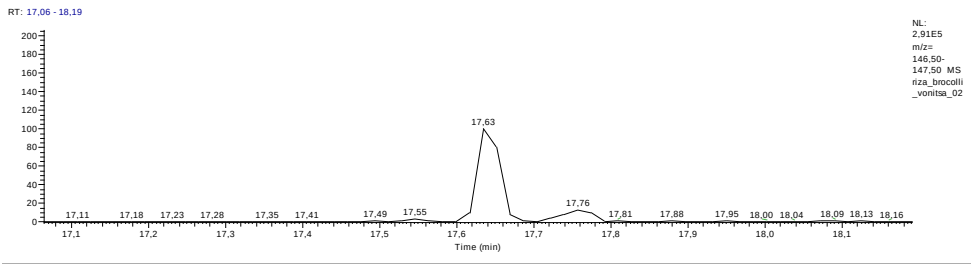


PIZA BONITΣA

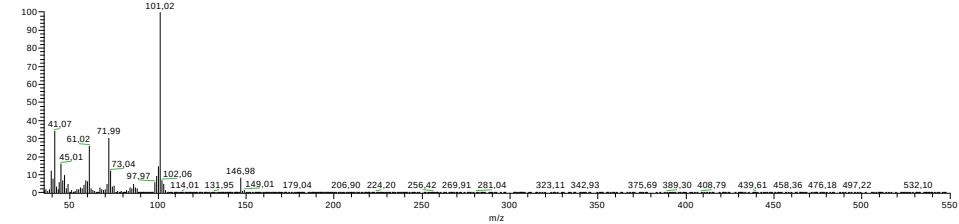
C:\Users\...riza_broccoli_vonitsa_1pros30_a

21/10/2018 1:10:26 μμ

1pros30_a_broccoli_von



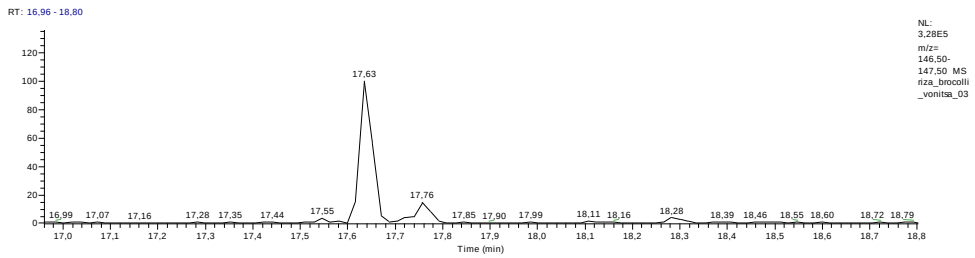
riza_broccoli_vonitsa_02 #721 RT: 17.63 AV: 1 NL: 3.58E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



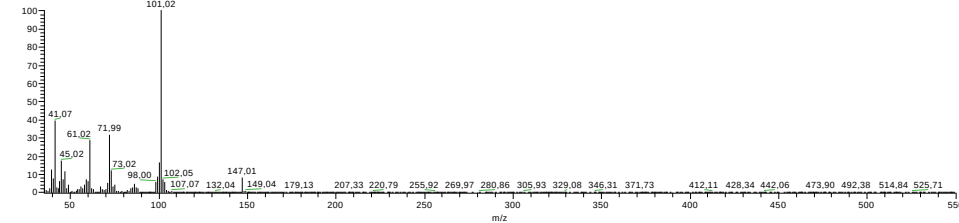
C:\Users\...riza_broccoli_vonitsa_1pros30_b

21/10/2018 2:00:50 μμ

1pros30_b_broccoli_von



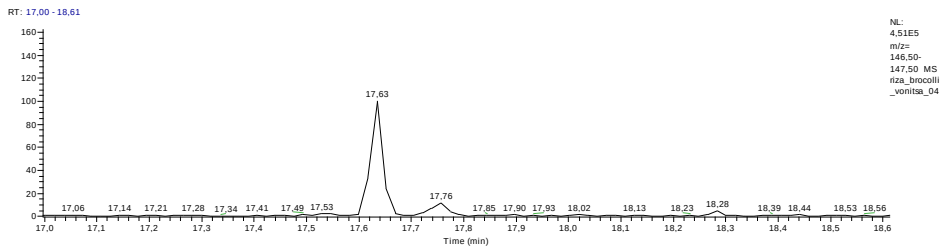
riza_broccoli_vonitsa_03 #721 RT: 17.63 AV: 1 NL: 4.15E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]



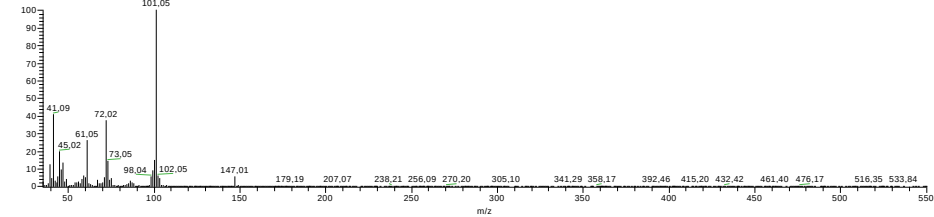
C:\Users\...riza_broccoli_vonitsa_1pros30_c

24/10/2018 2:53:42 μμ

1pros30_broccoli_von



riza_broccoli_vonitsa_04 #721 RT: 17.63 AV: 1 NL: 8.07E6
T: + c Full ms [35.00-550.00]

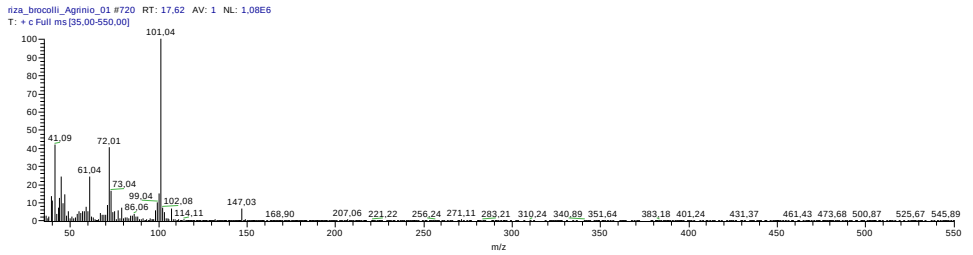
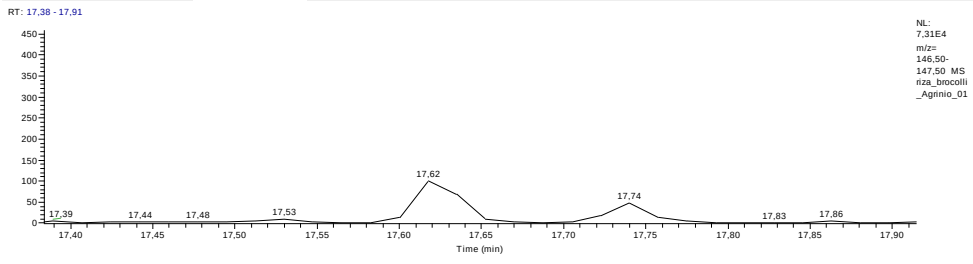


PIZA AGRINIO

C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_1pros30_a

25/10/2018 12:44:05 µµ

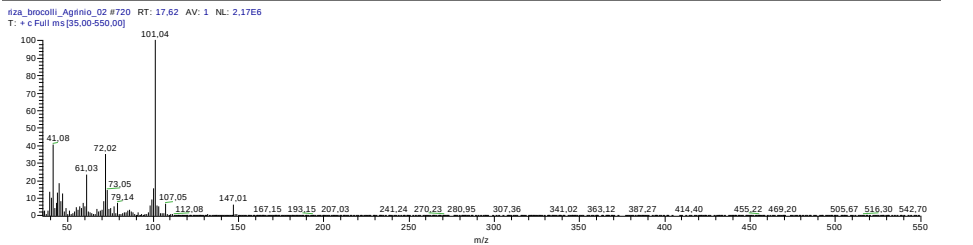
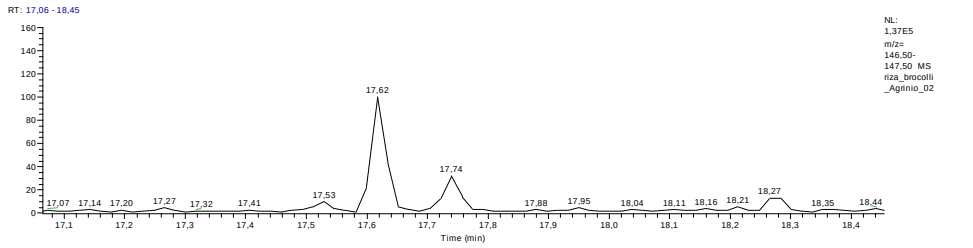
1pros30_rizaAgrinio_01



C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_1pros30_b

25/10/2018 1:32:18 µµ

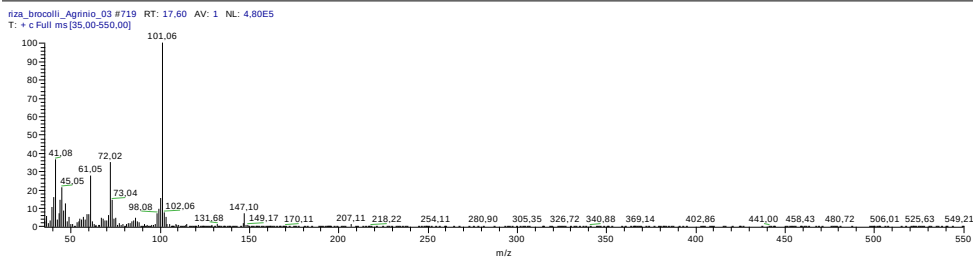
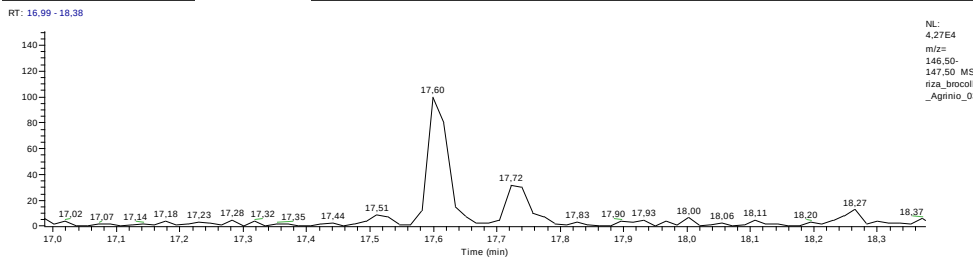
1pros30_rizaAgrinio_02



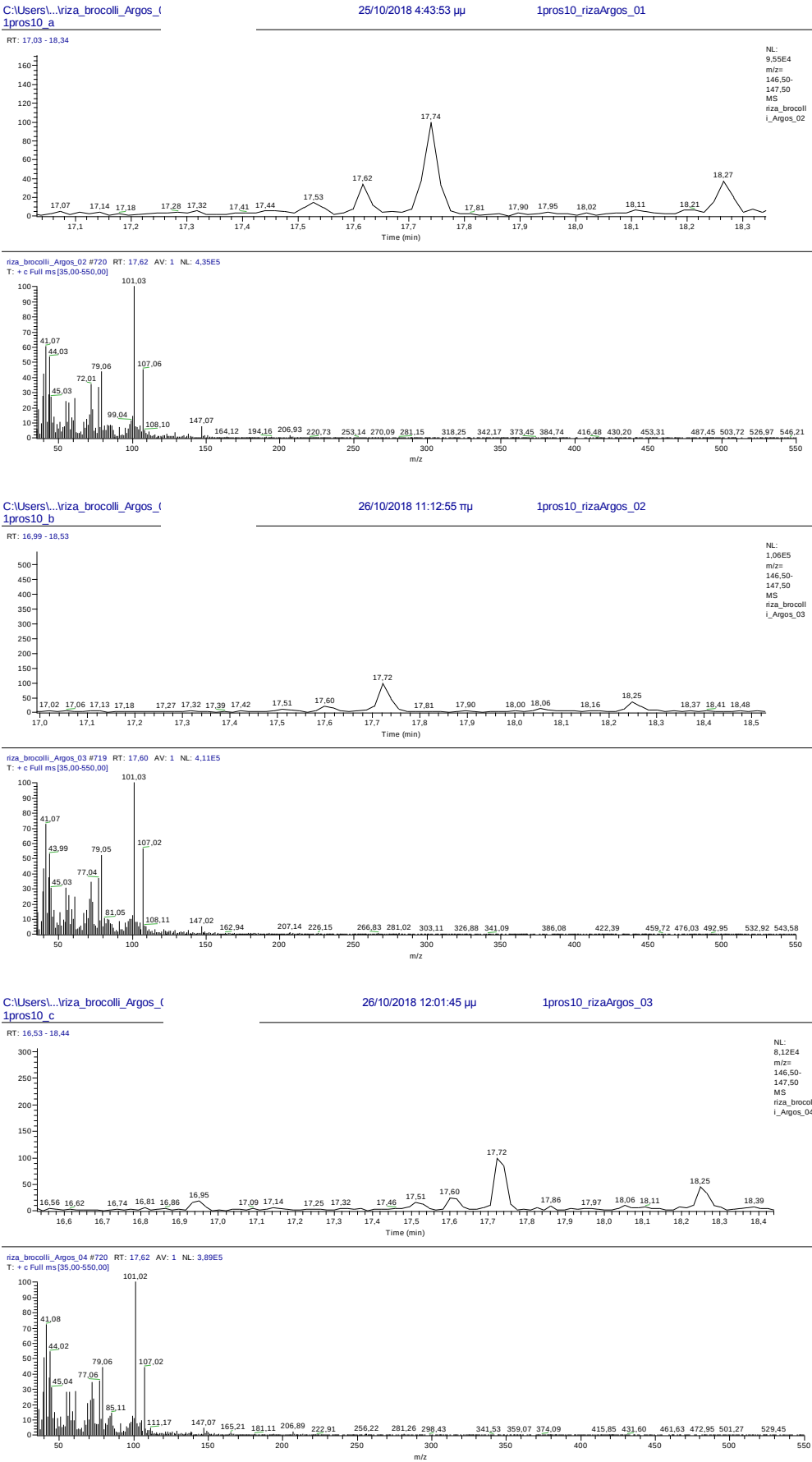
C:\Users\...riza_broccoli_Agrinio_1pros30_c

30/10/2018 12:48:30 µµ

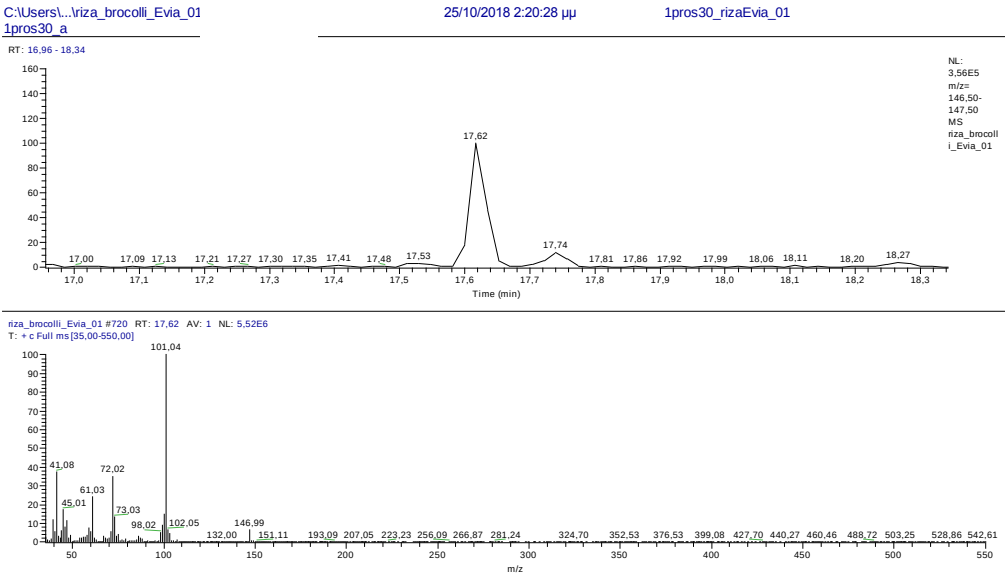
1pros30_rizaAgrinio_03



PIZA ΑΡΓΟΣ



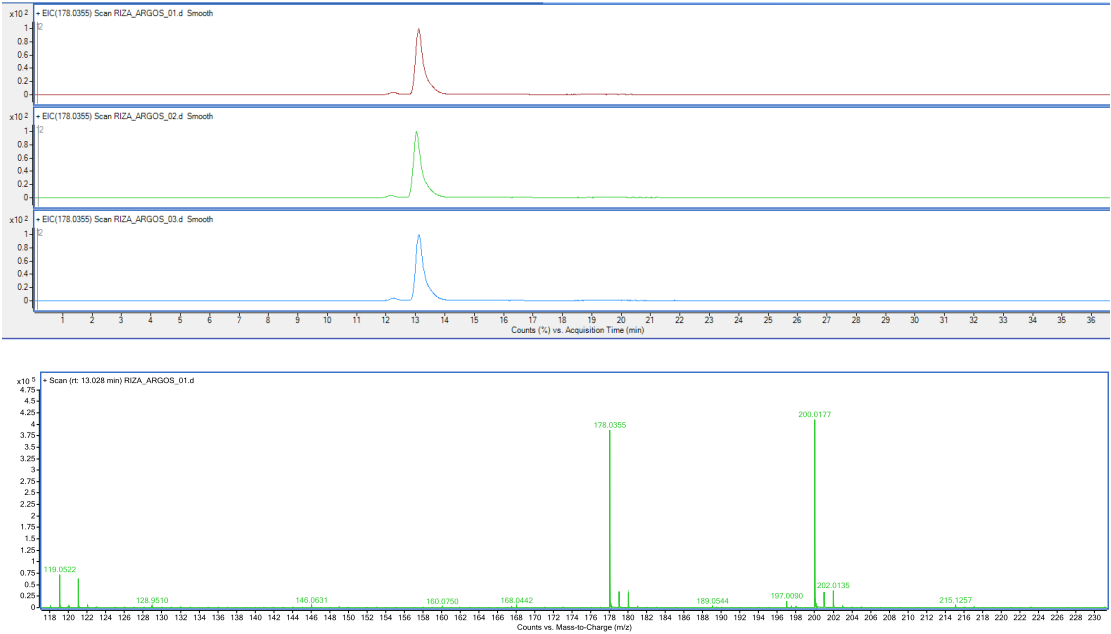
PIZA EYBOIA

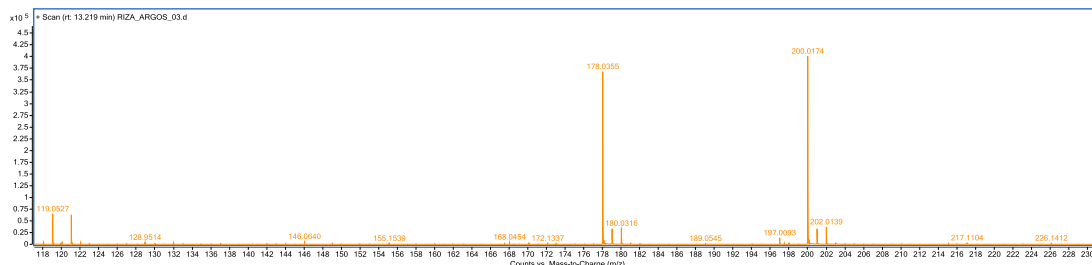
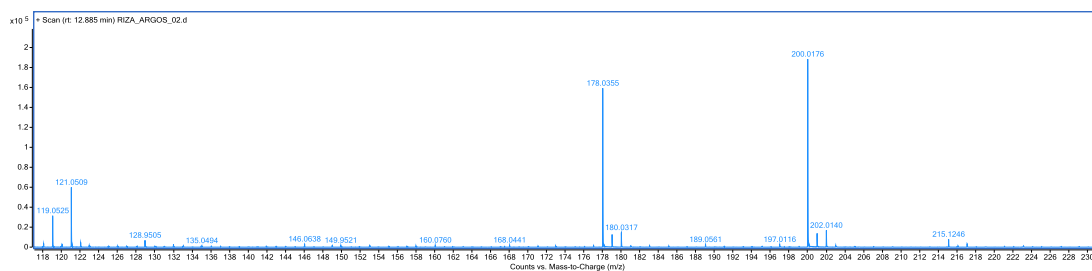


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II - ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

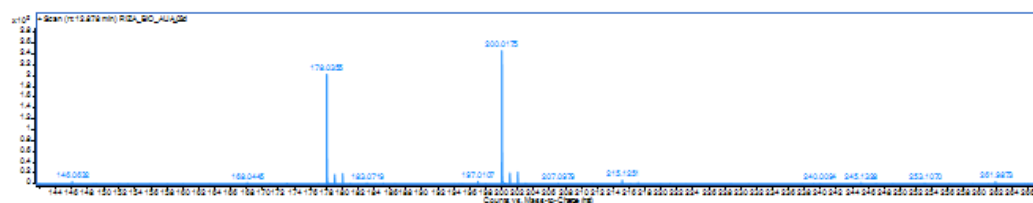
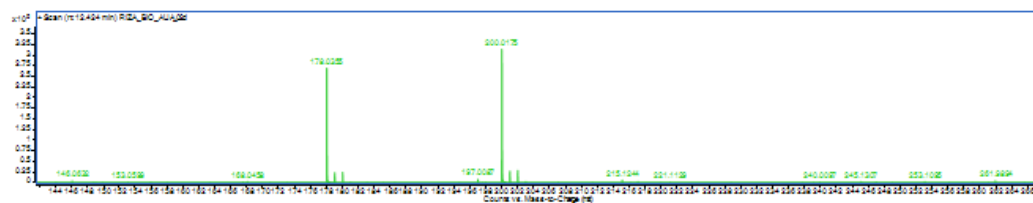
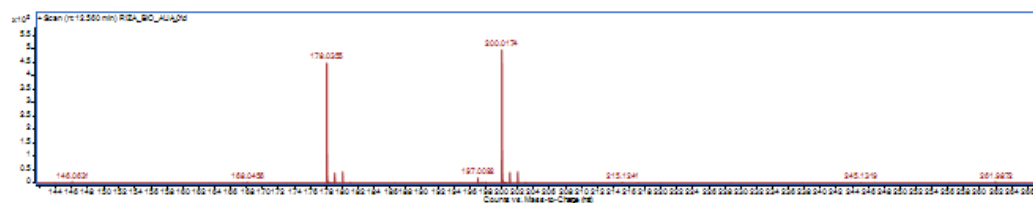
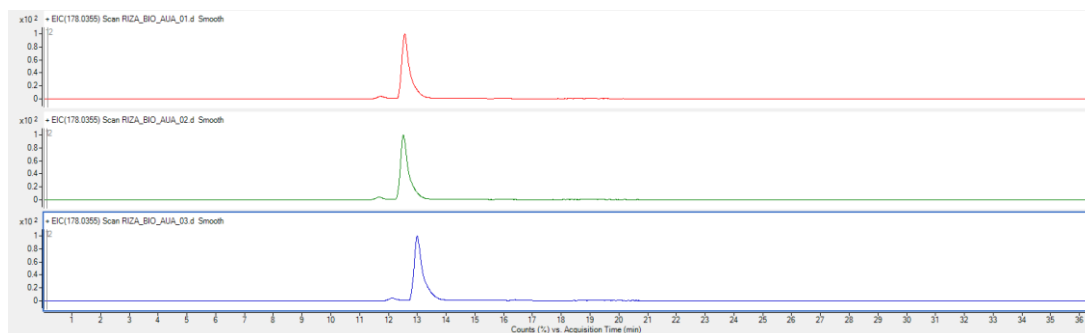
SFN

PIZA ΑΡΓΟΣ

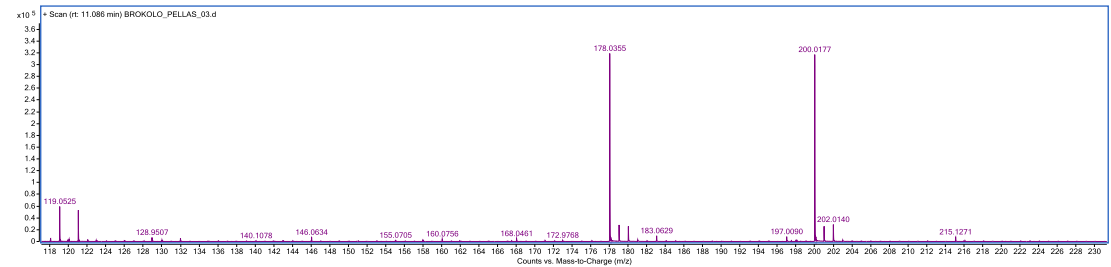
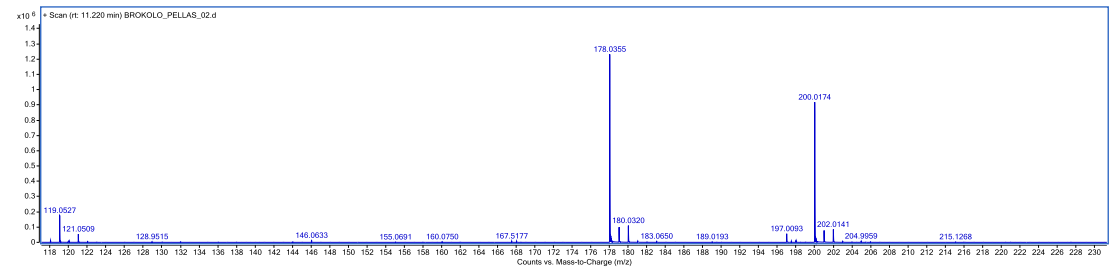
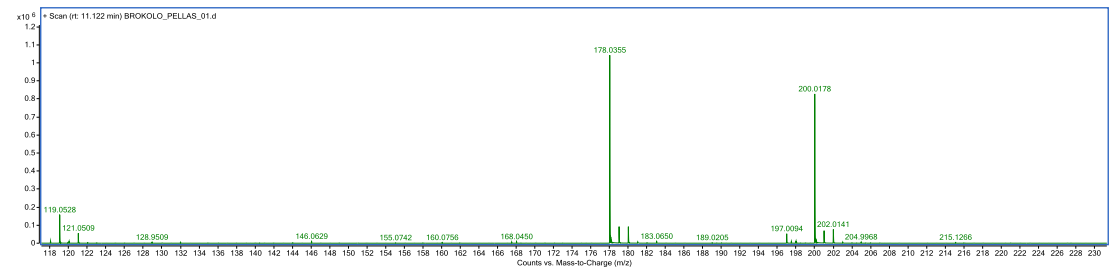
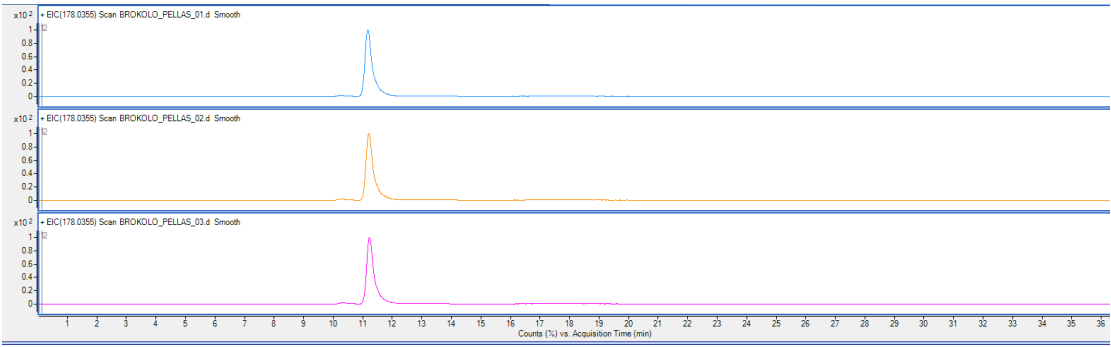




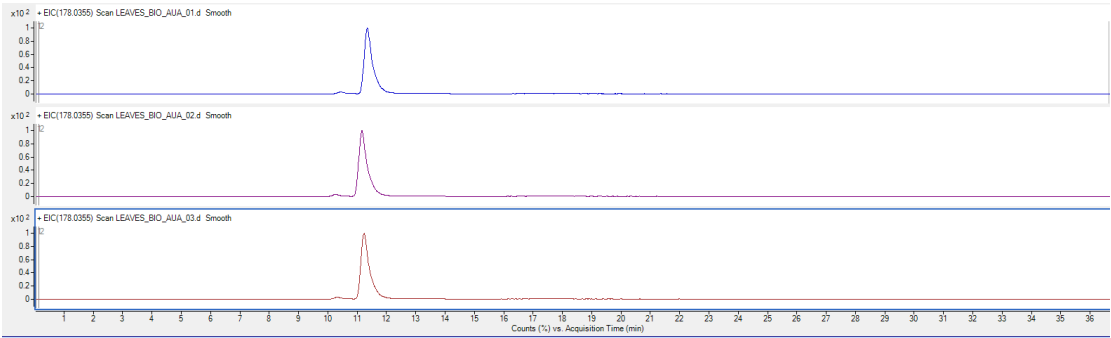
RIZA ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

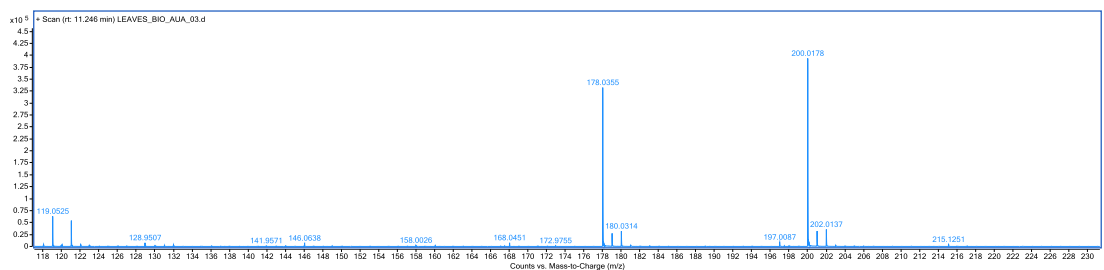
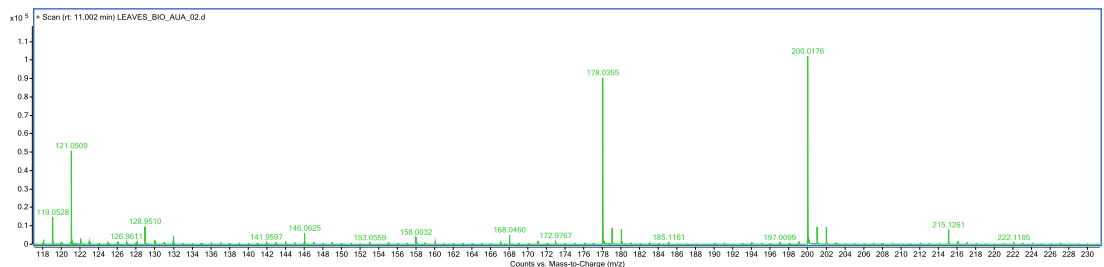
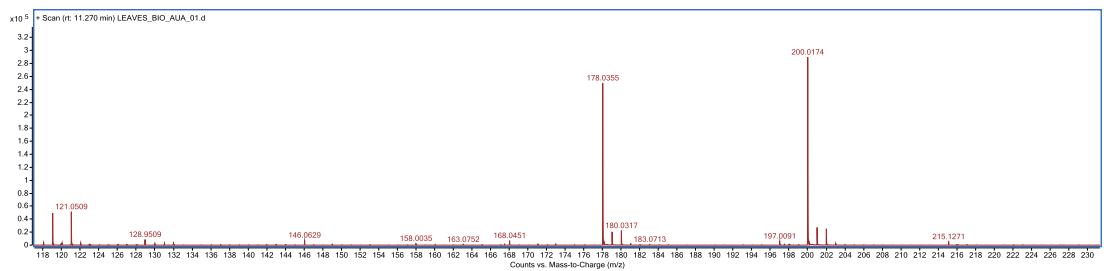


ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΠΕΛΛΑΣ

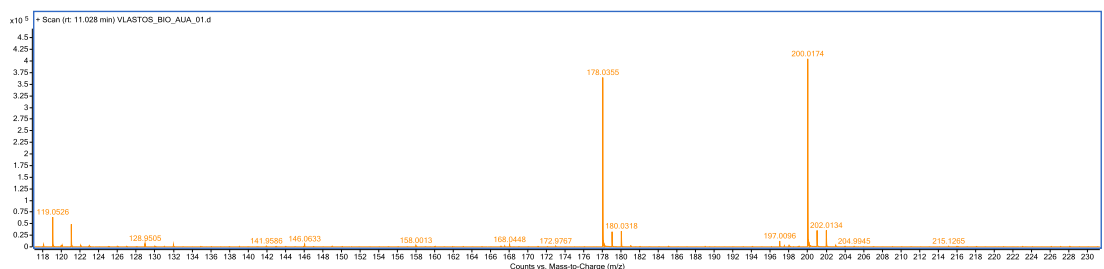
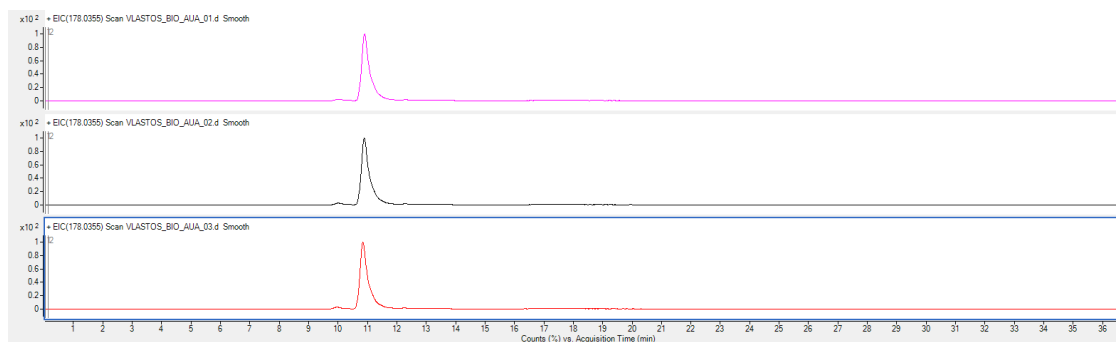


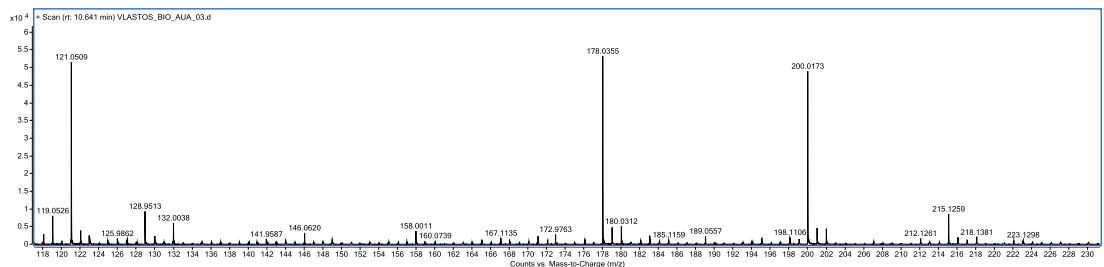
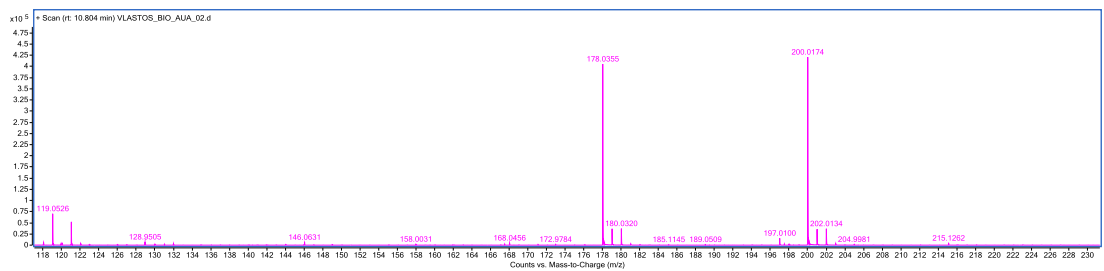
ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ



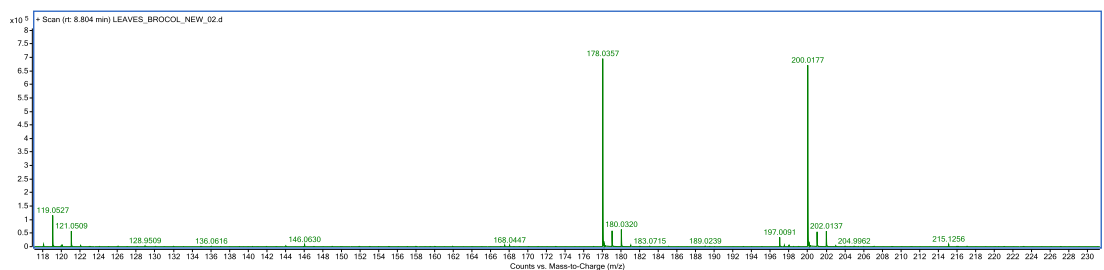
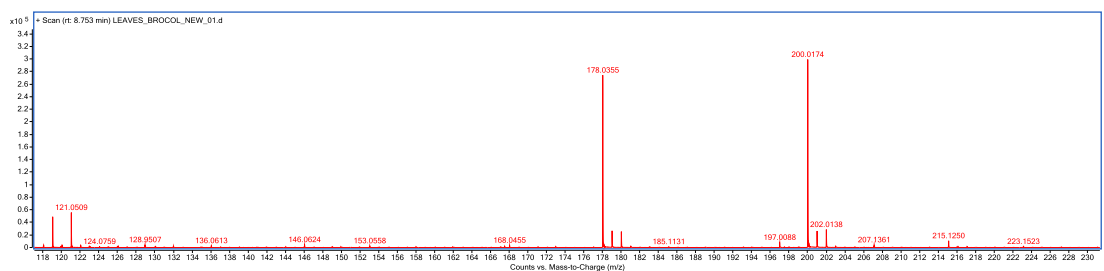
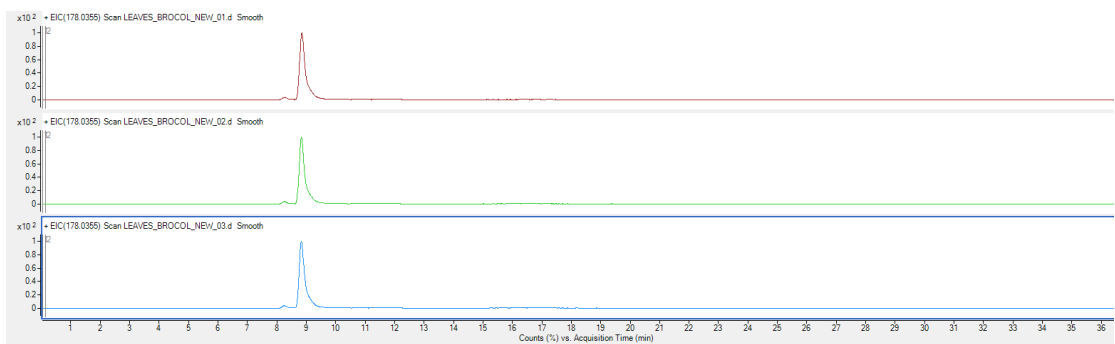


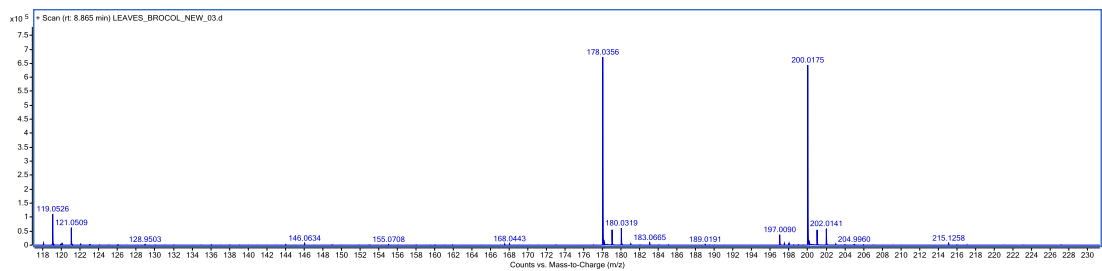
ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ



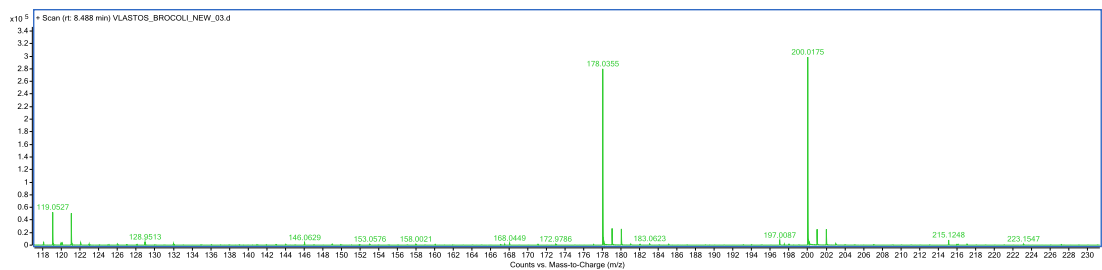
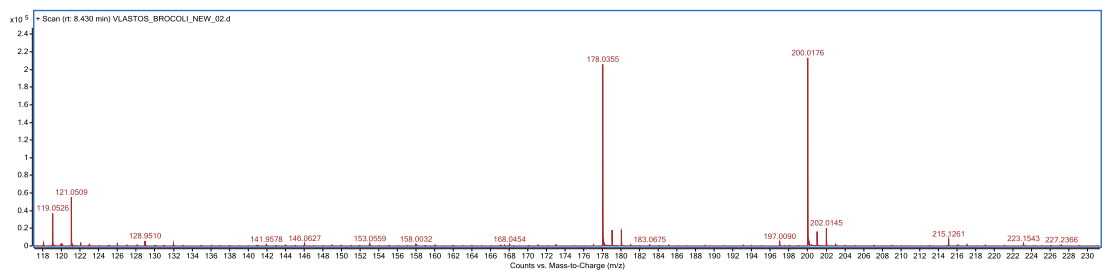
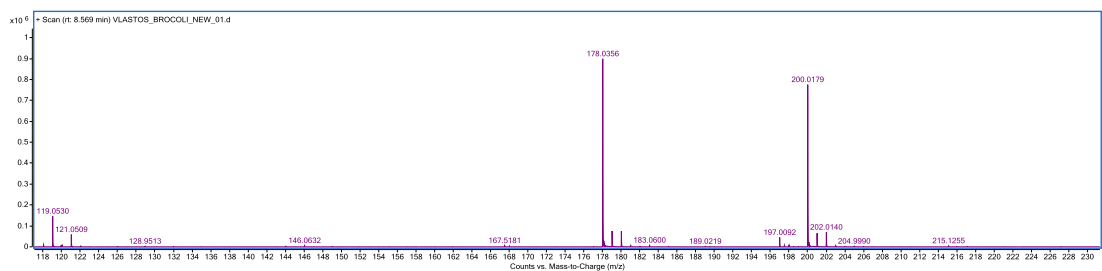
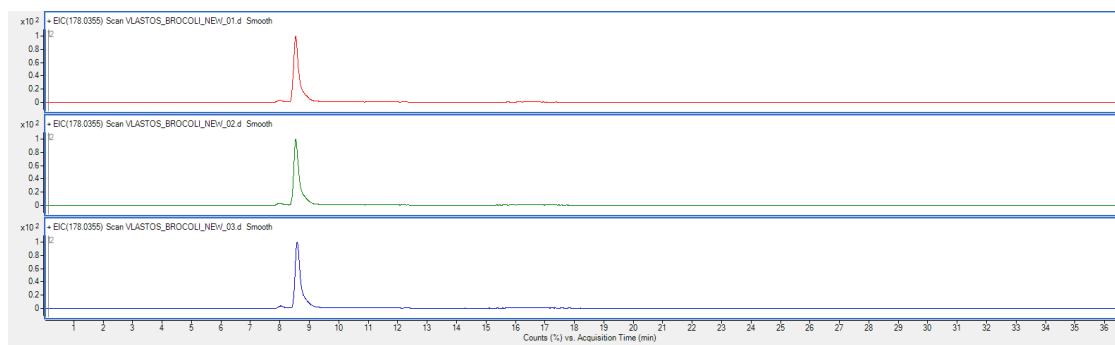


ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

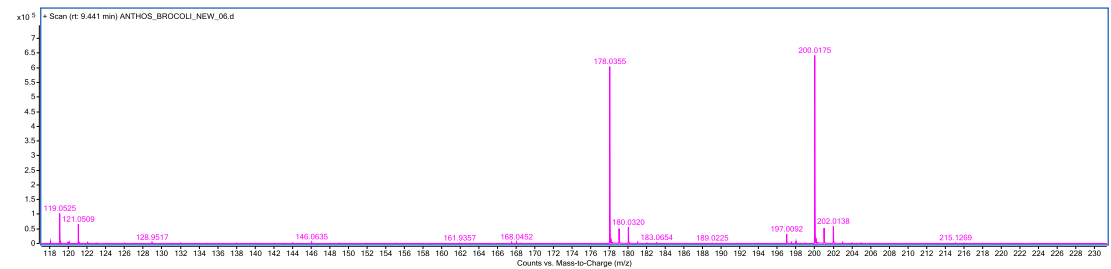
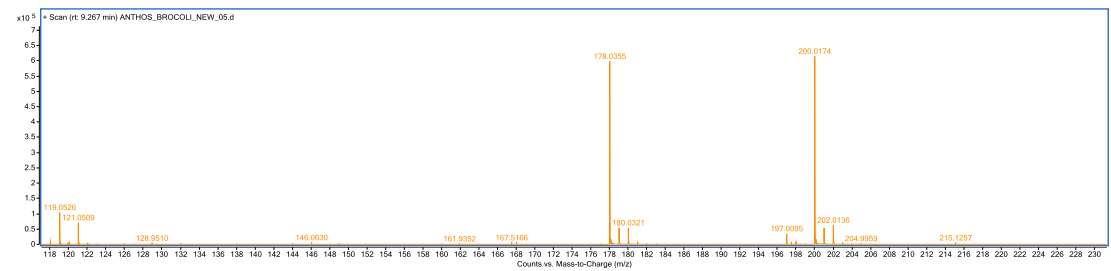
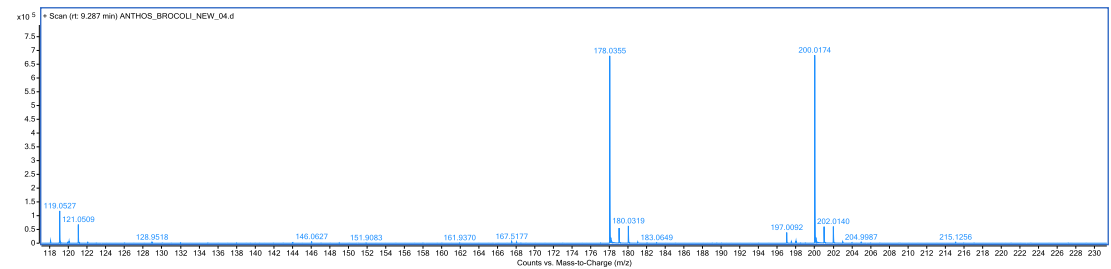
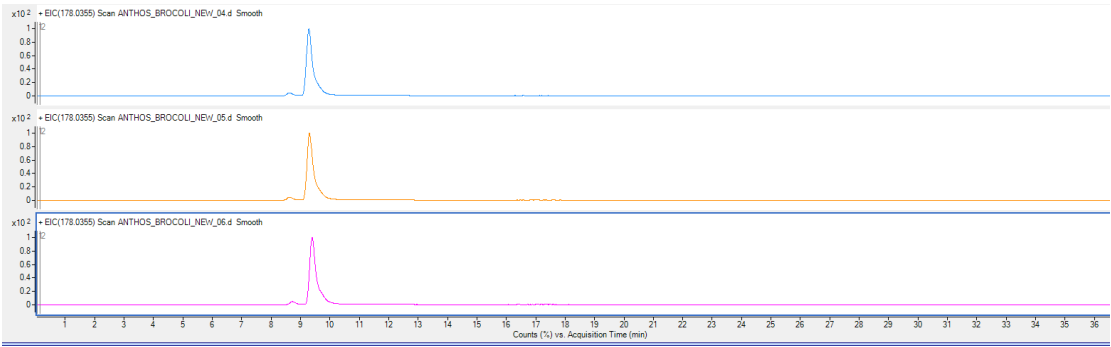




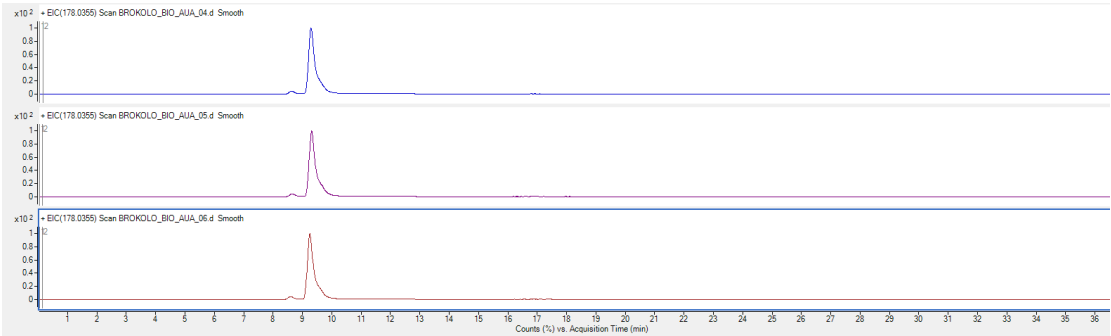
ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

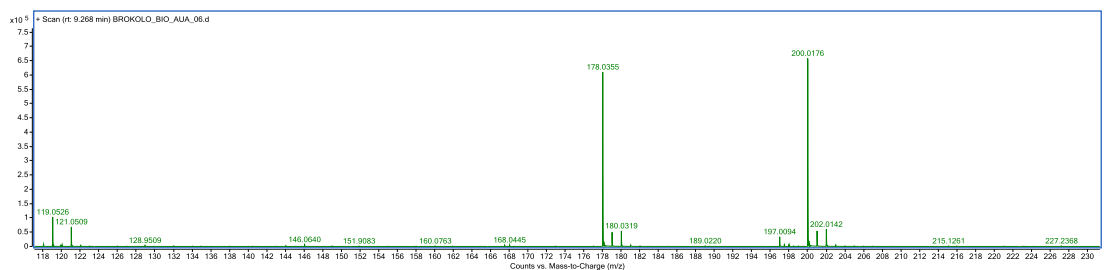
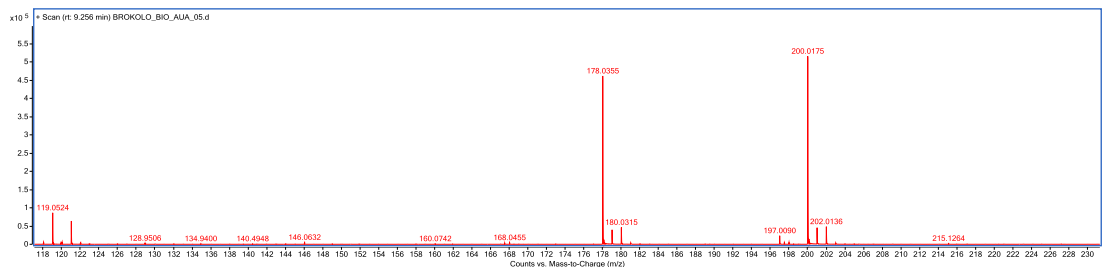
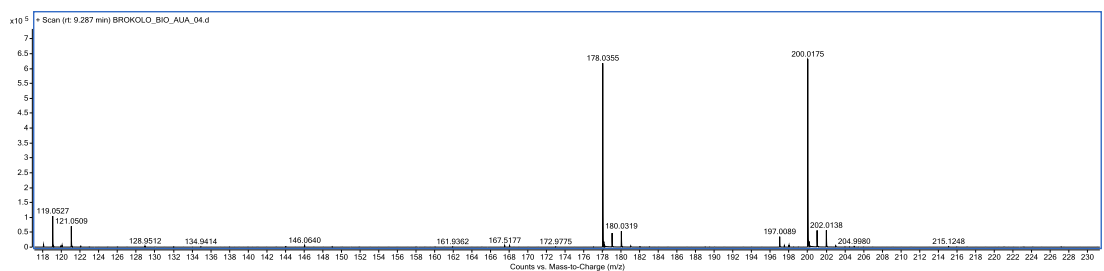


ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

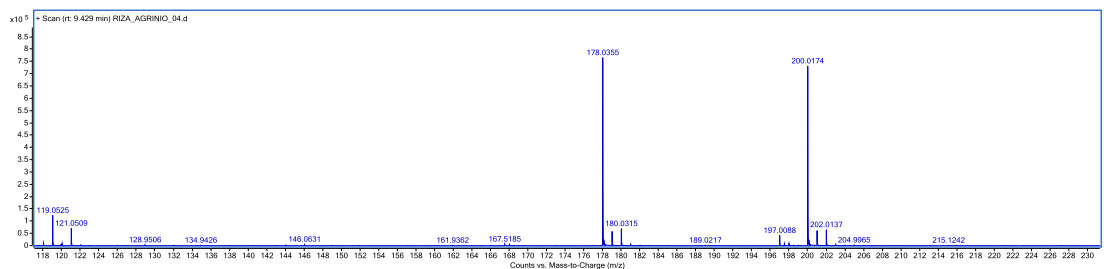
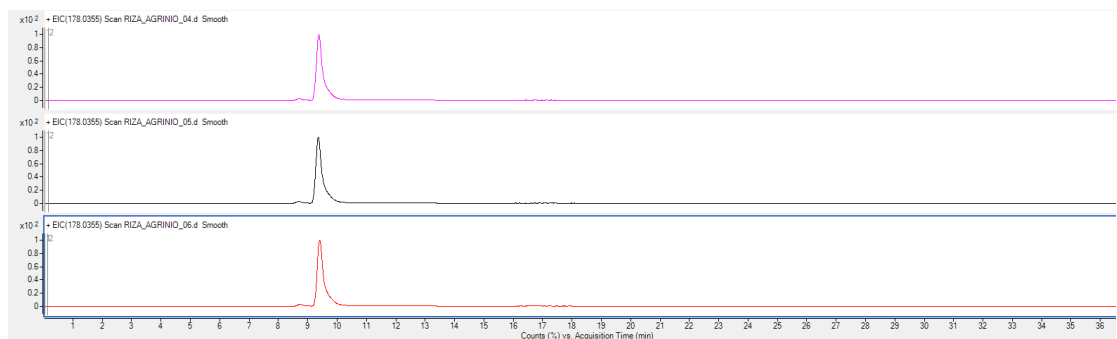


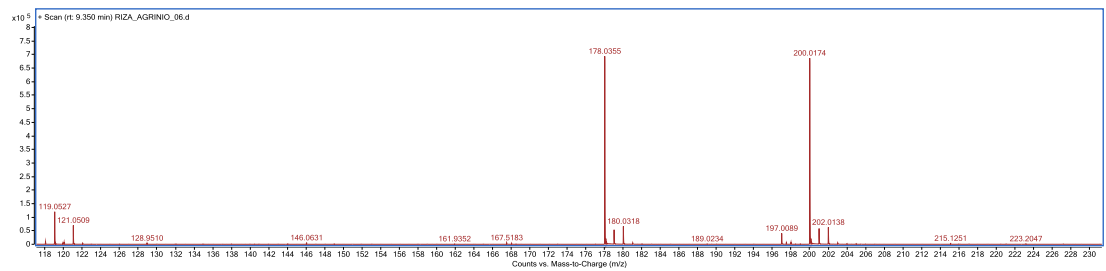
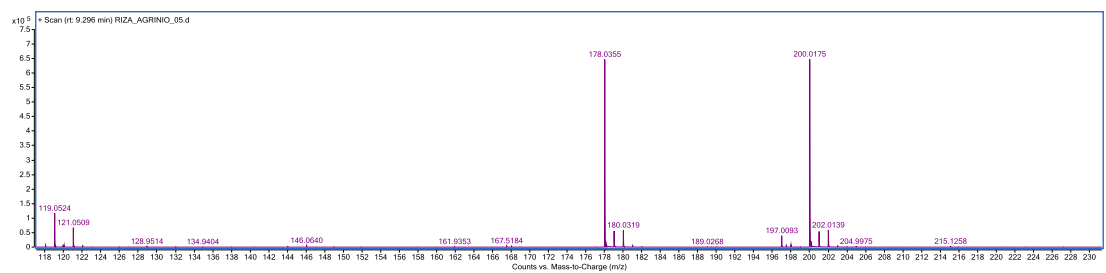
ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ



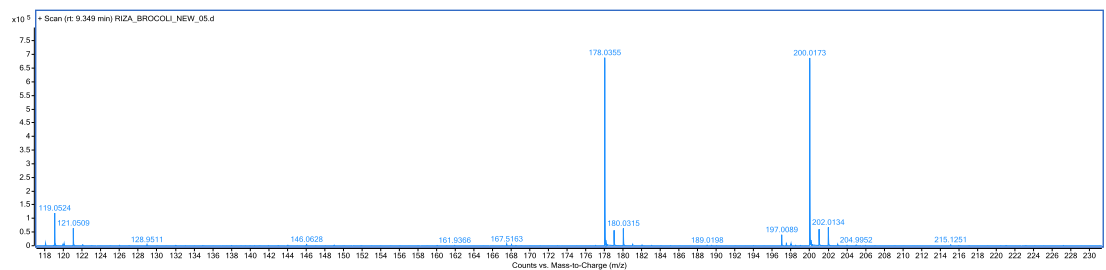
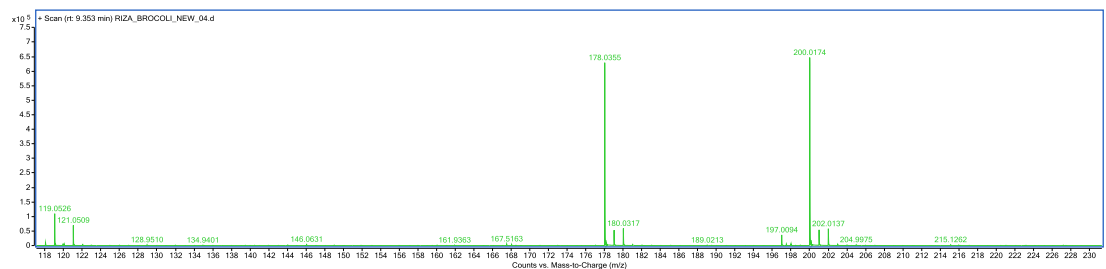
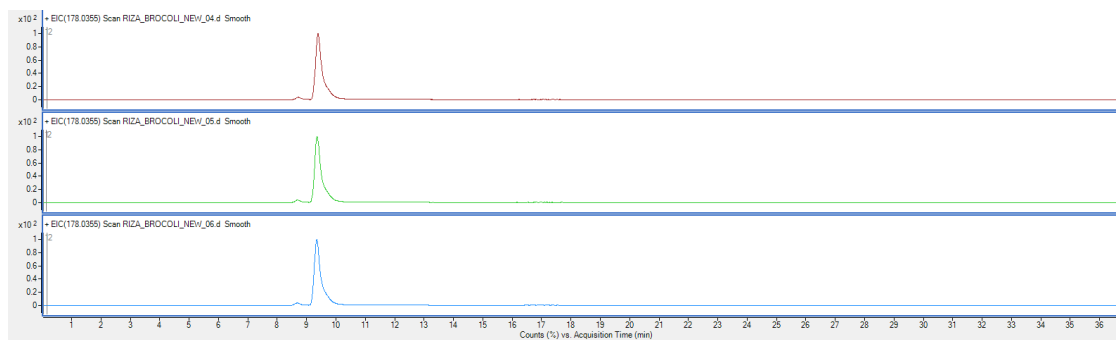


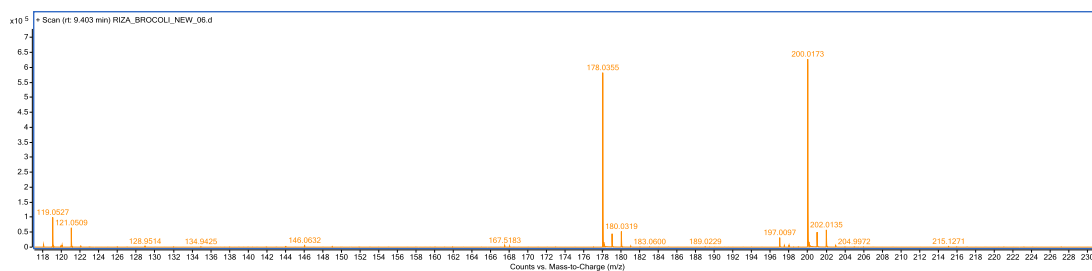
PIZA AGRINIO



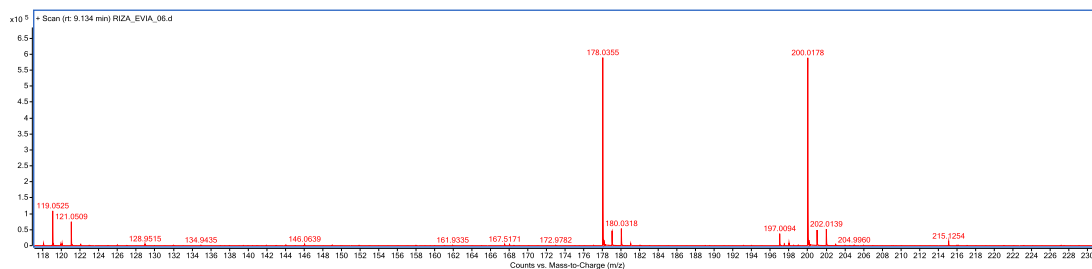
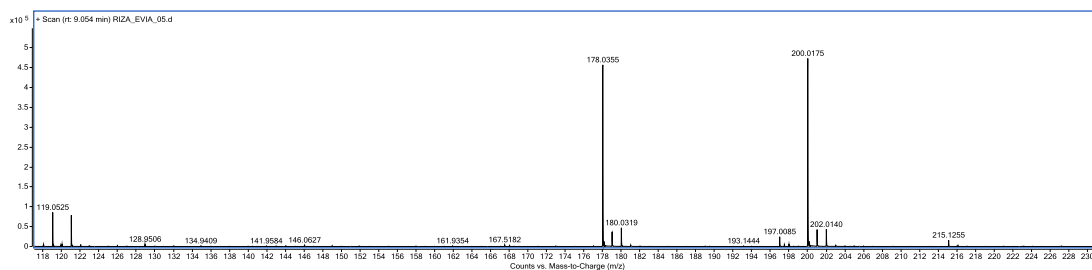
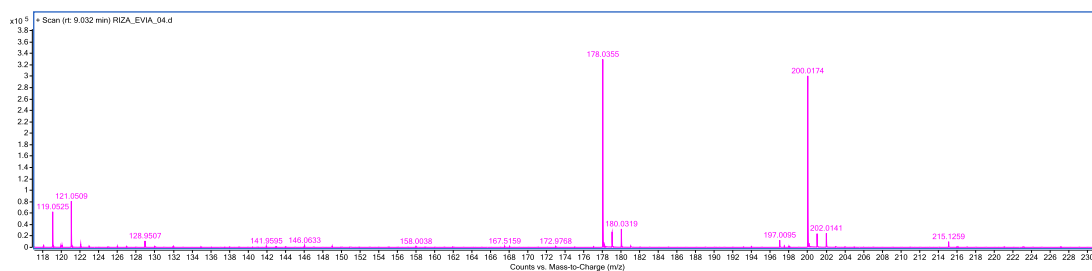
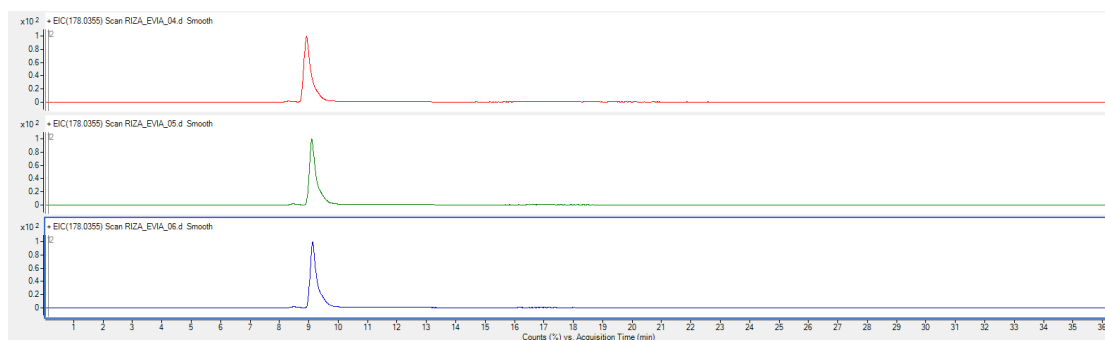


ΡΙΖΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

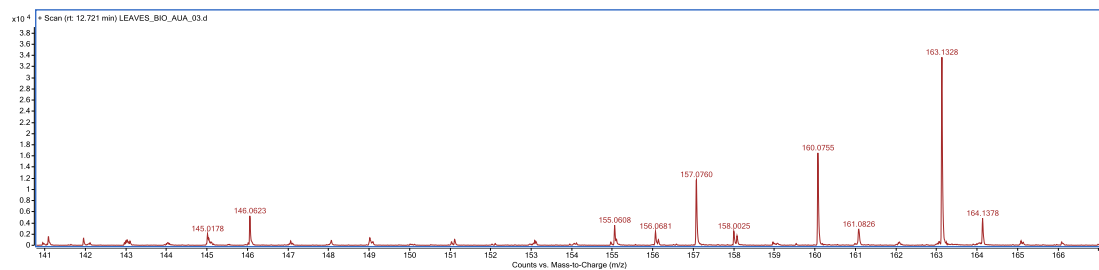
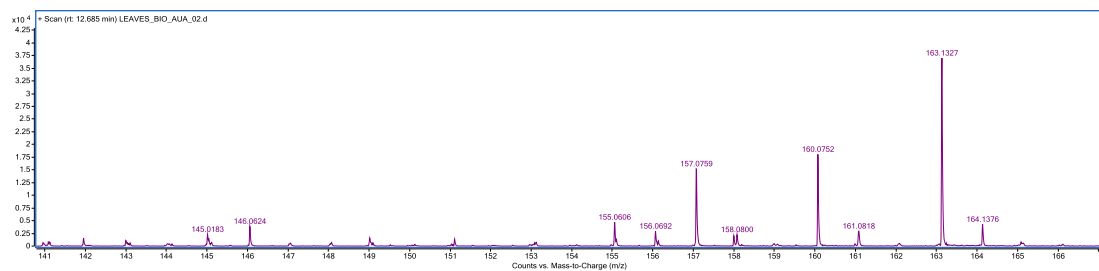
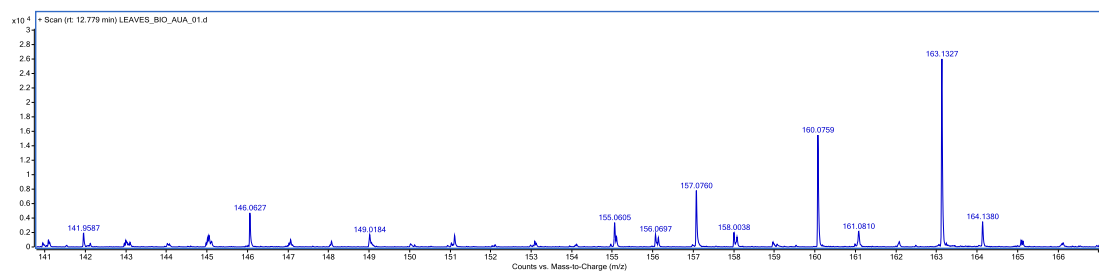
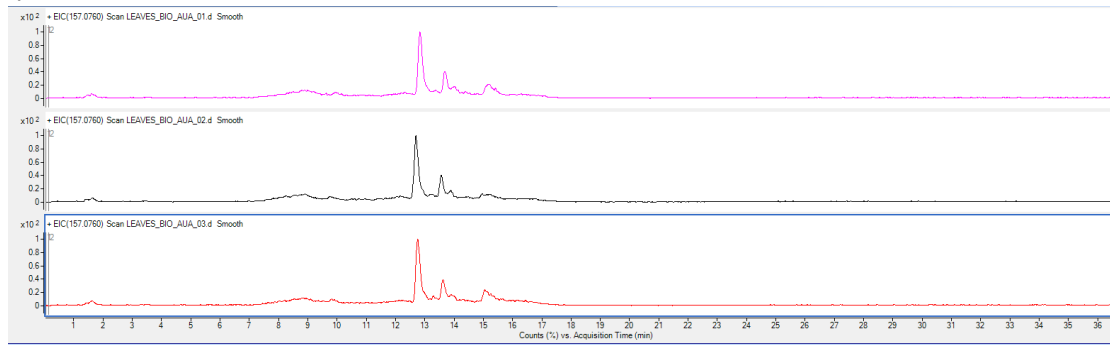




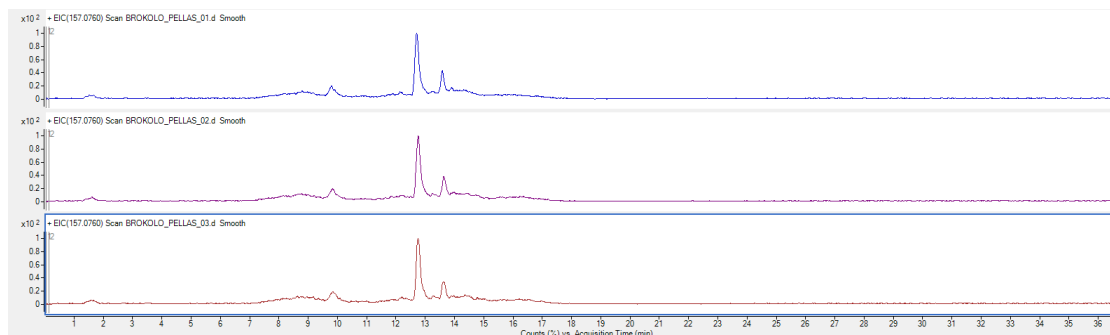
PIZA EYBOIA

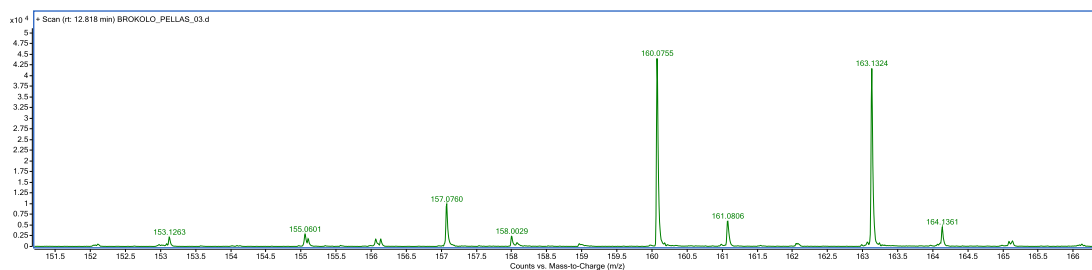
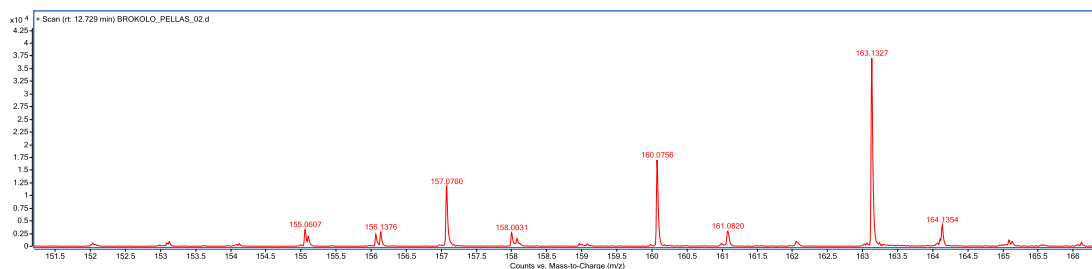
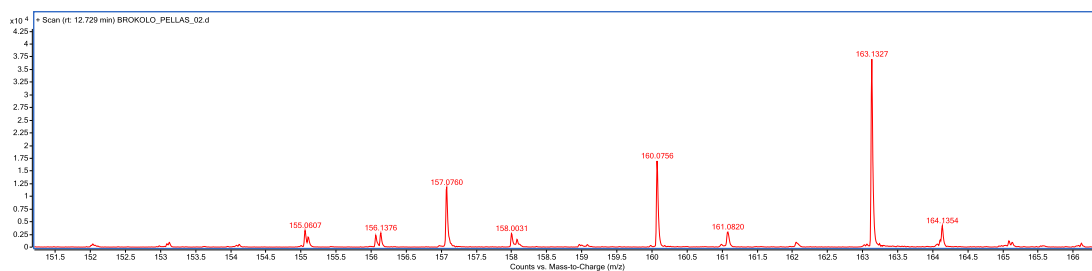


Ι3CN ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

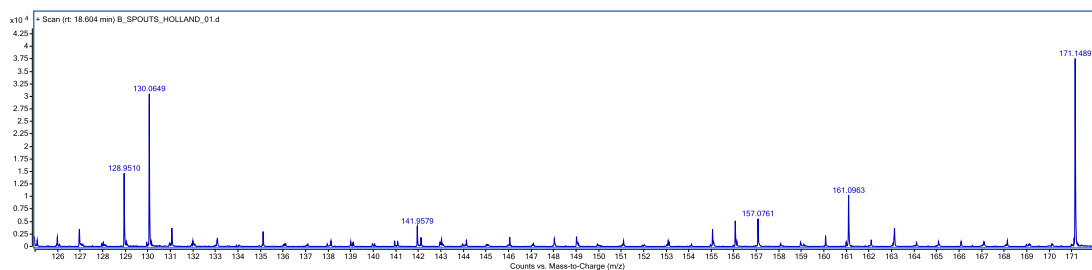
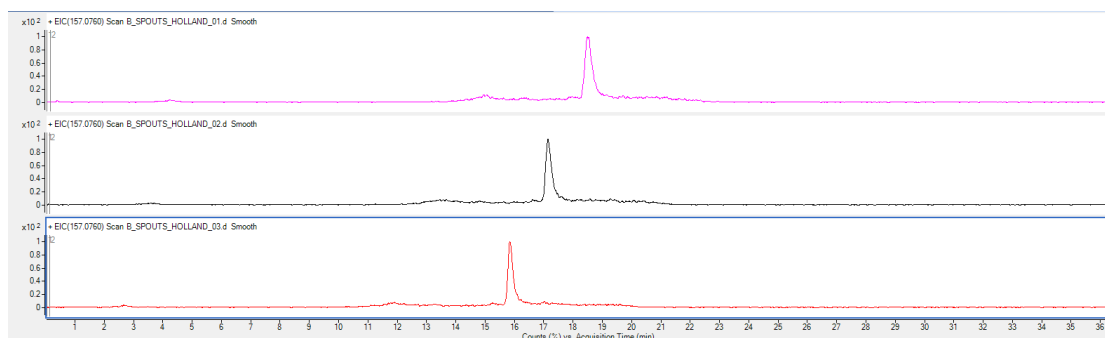


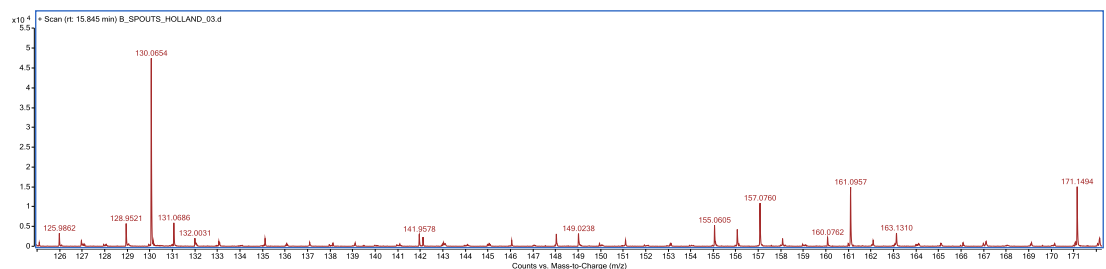
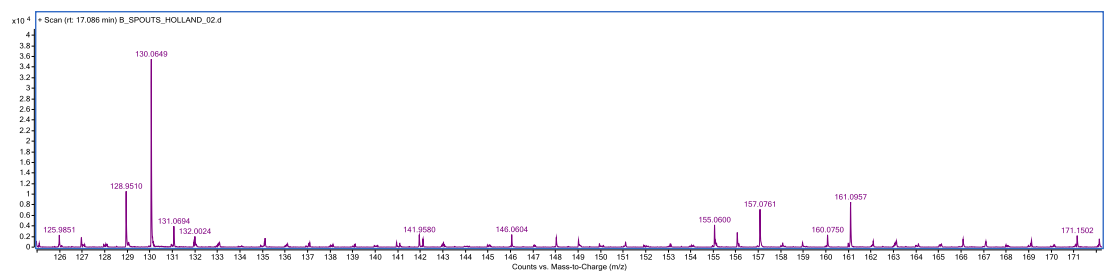
ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΠΕΛΛΑΣ



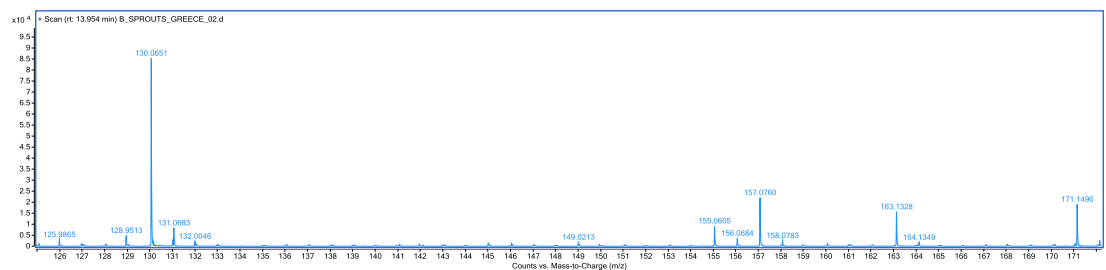
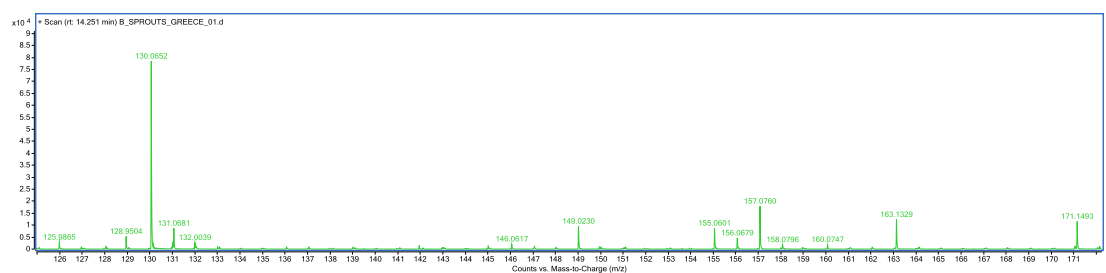
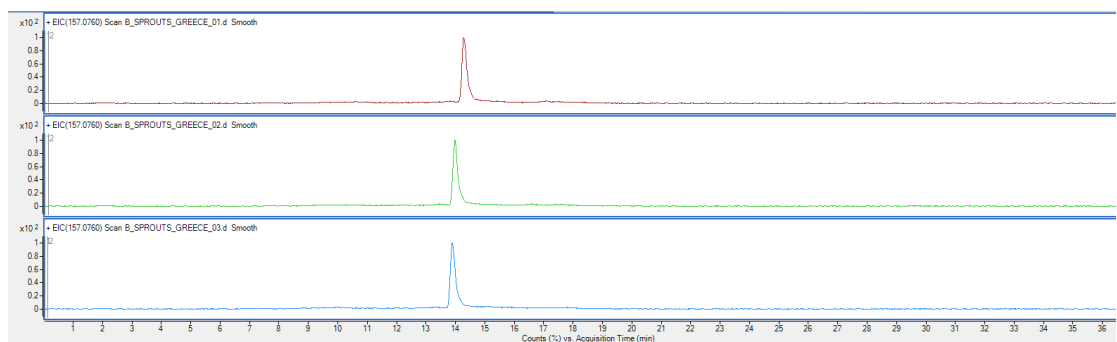


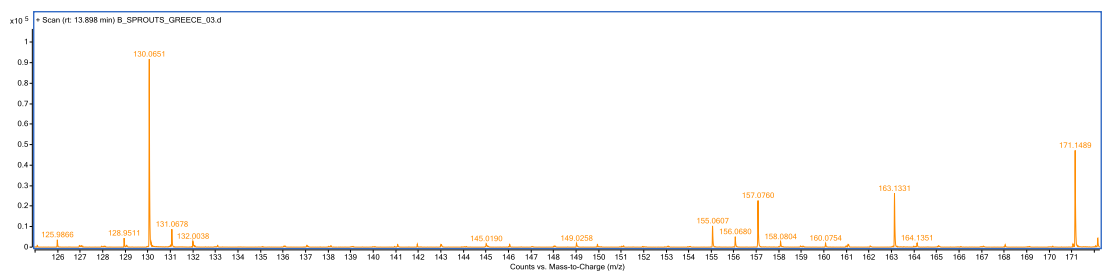
ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΟΛΛΑΝΔΙΑΣ



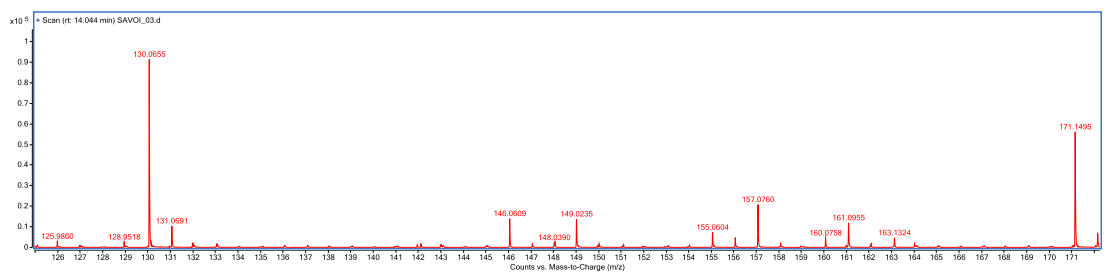
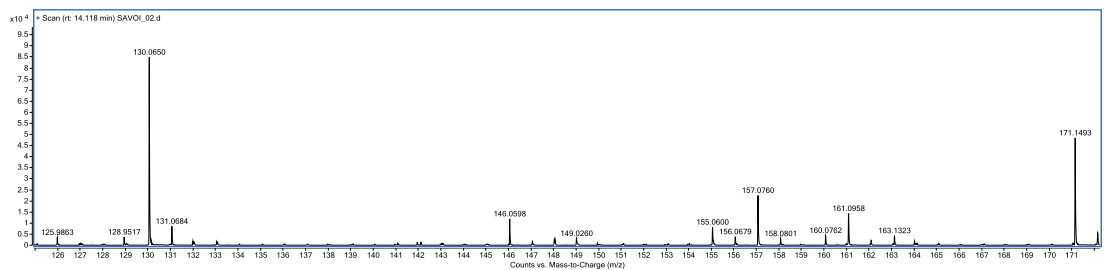
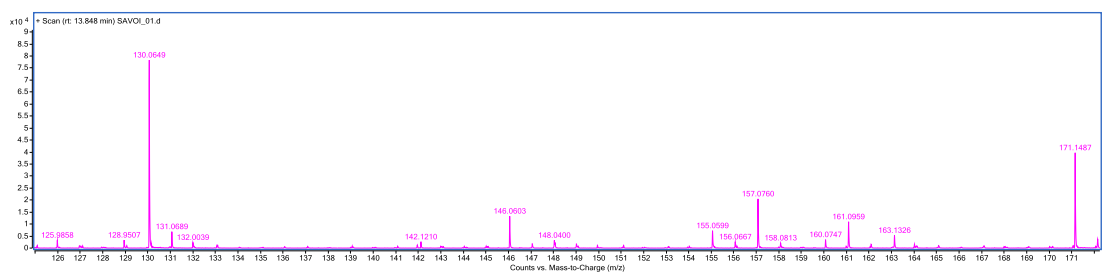
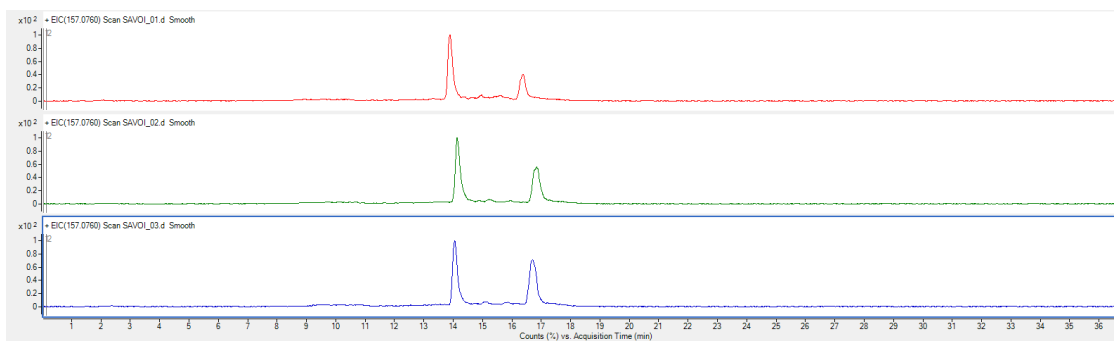


ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

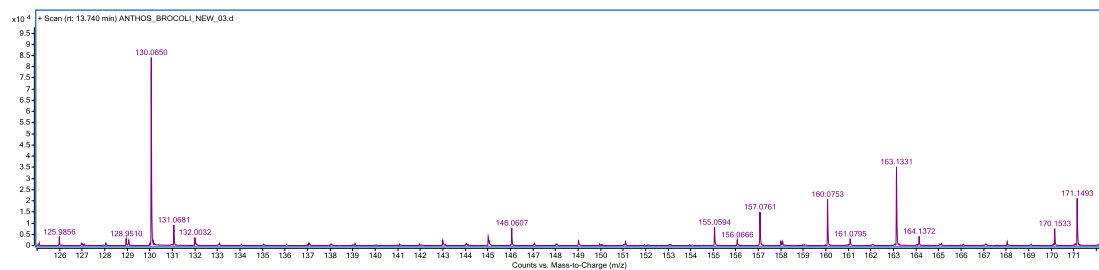
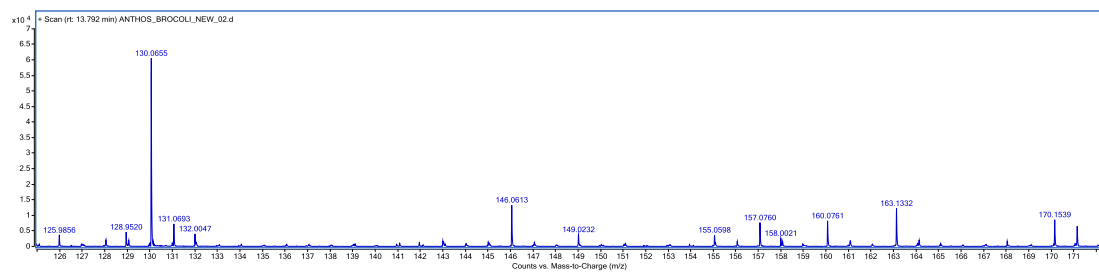
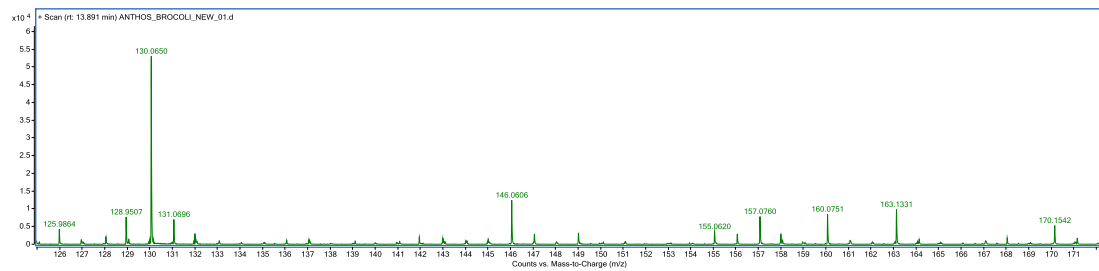
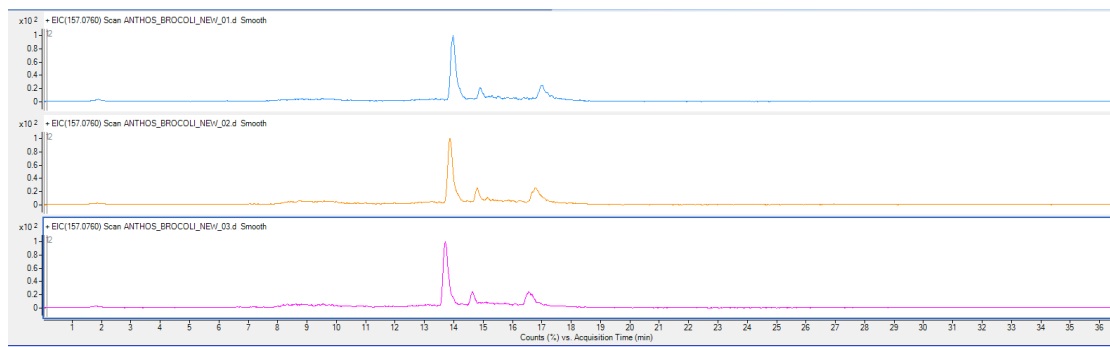




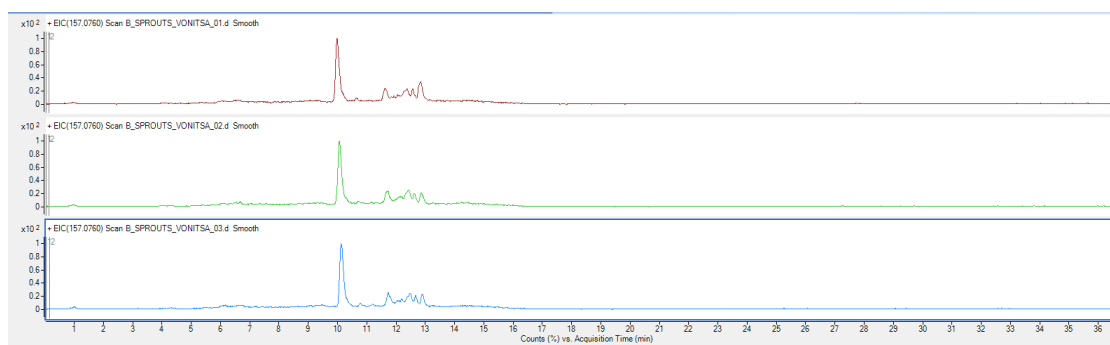
ΣΑΒΟΙ

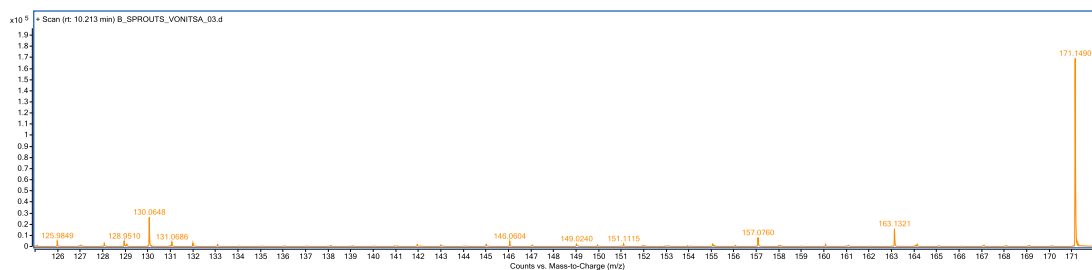
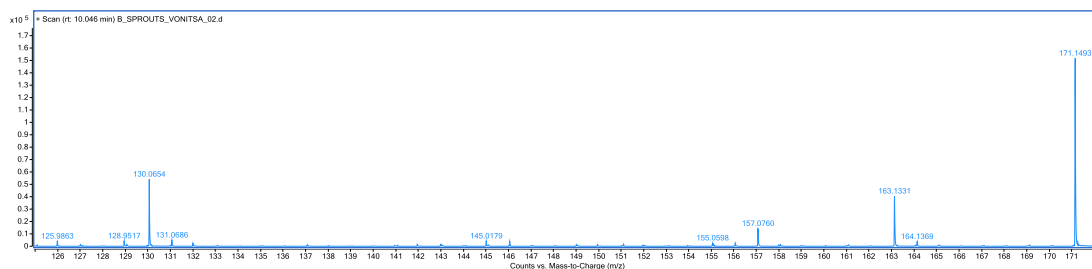
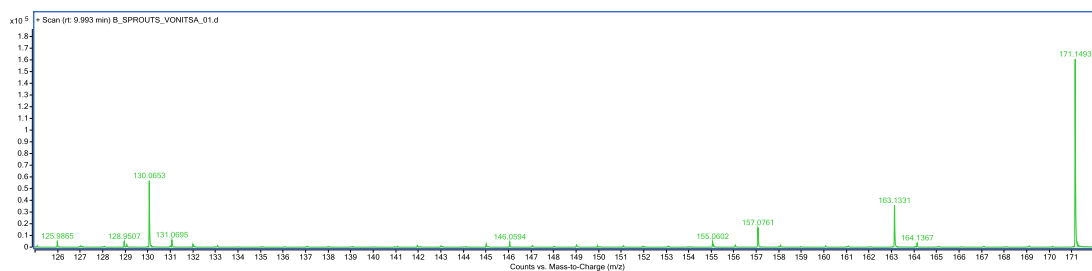


ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

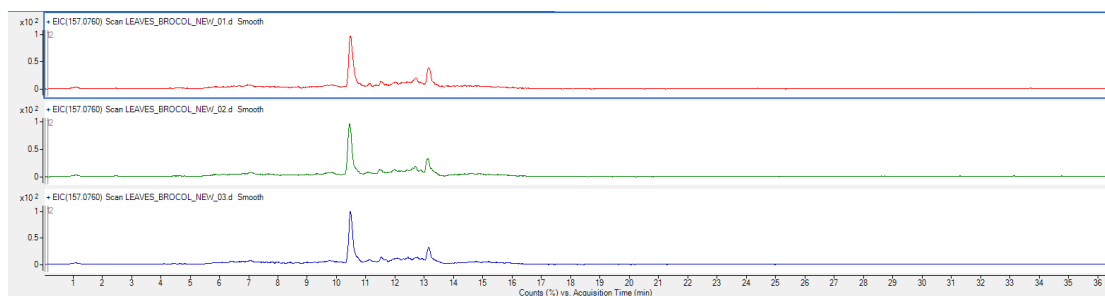


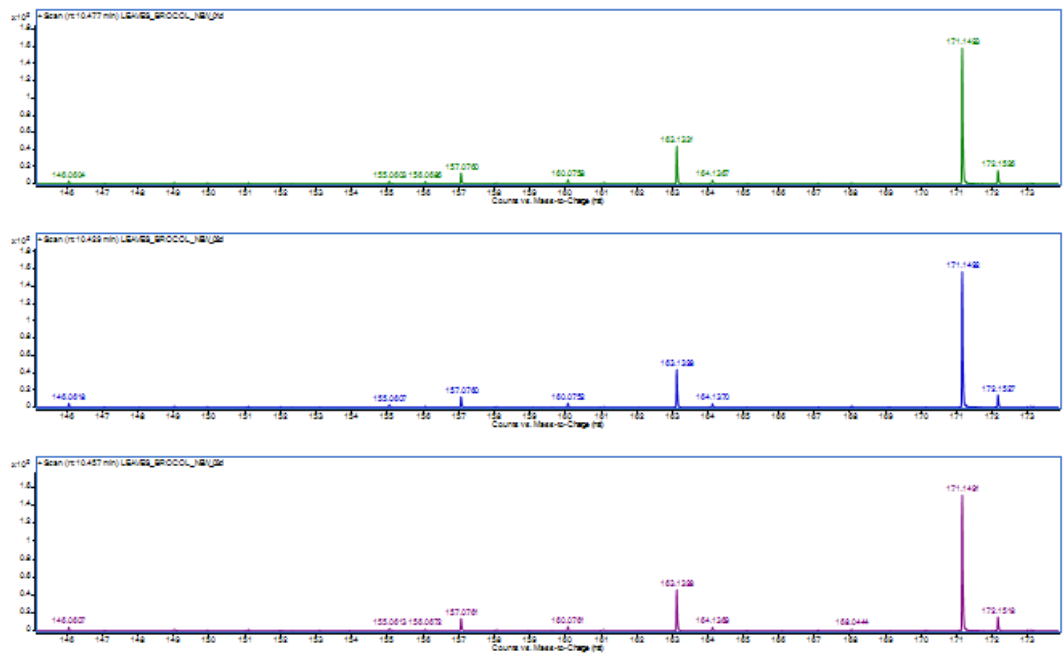
ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΒΟΝΙΤΣΑ





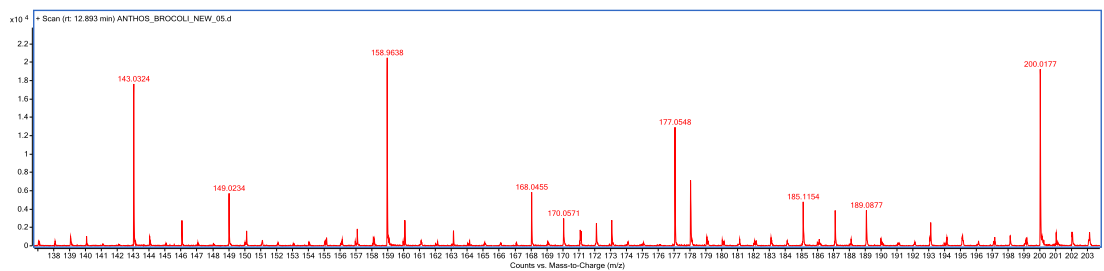
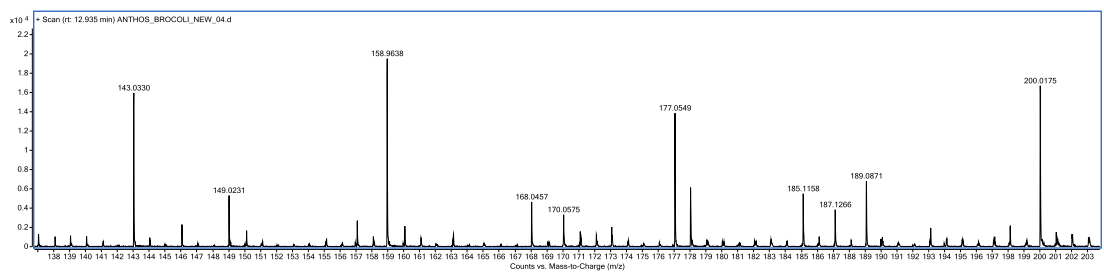
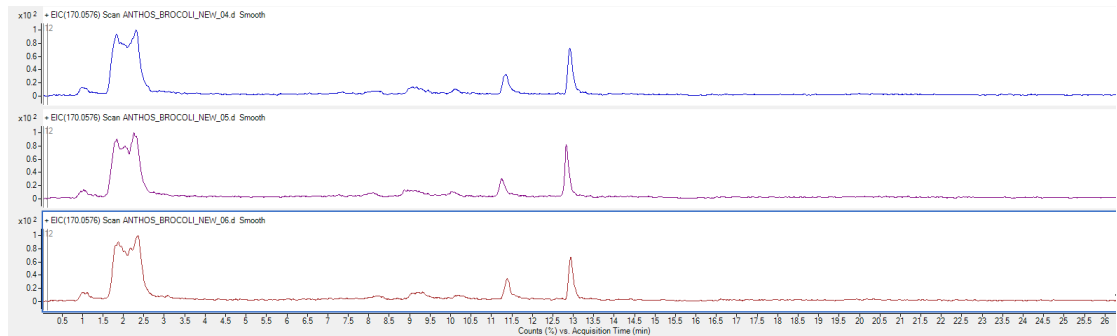
ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

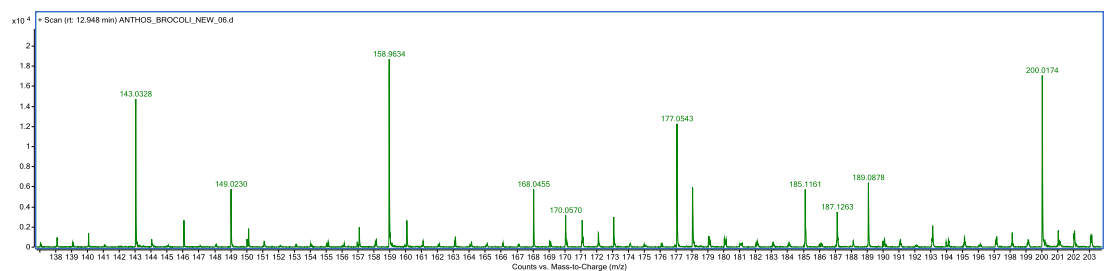




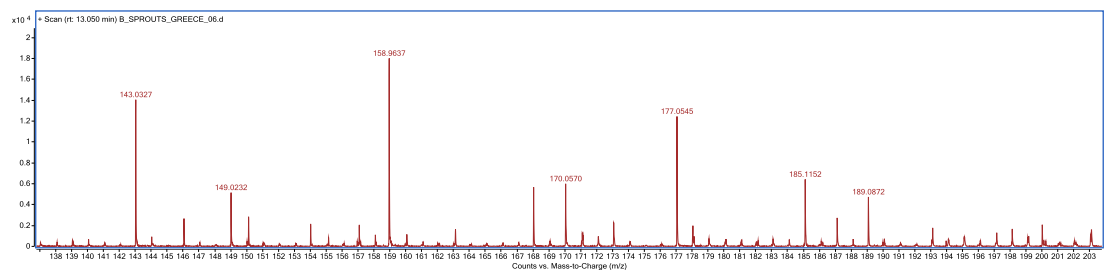
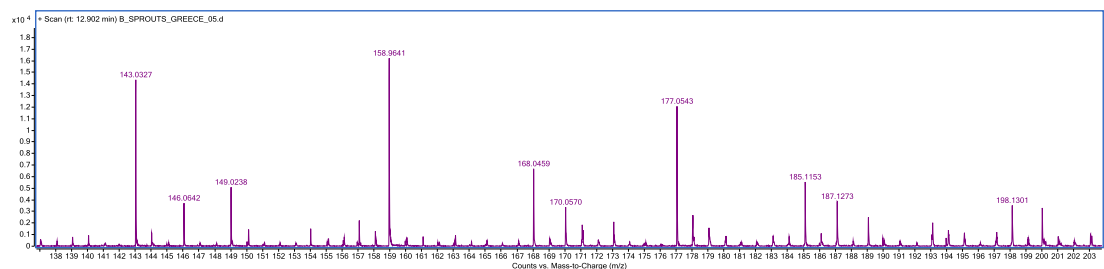
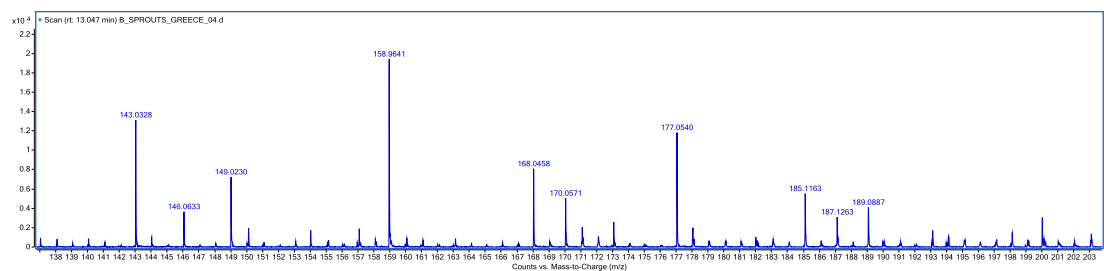
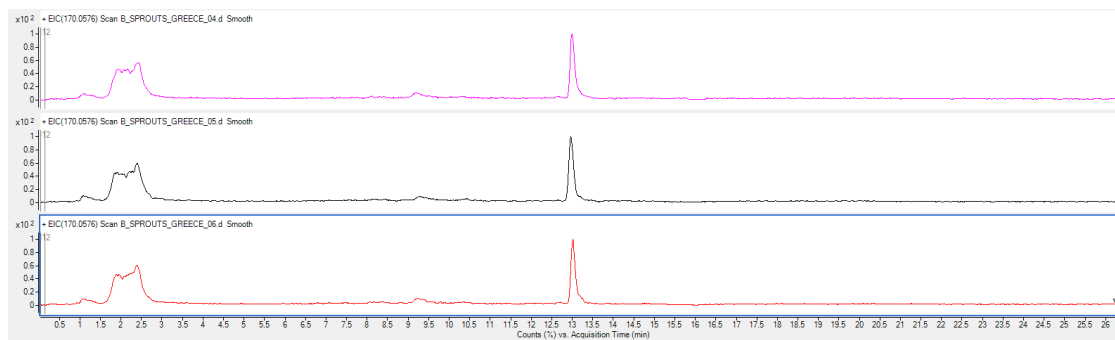
I3C

ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

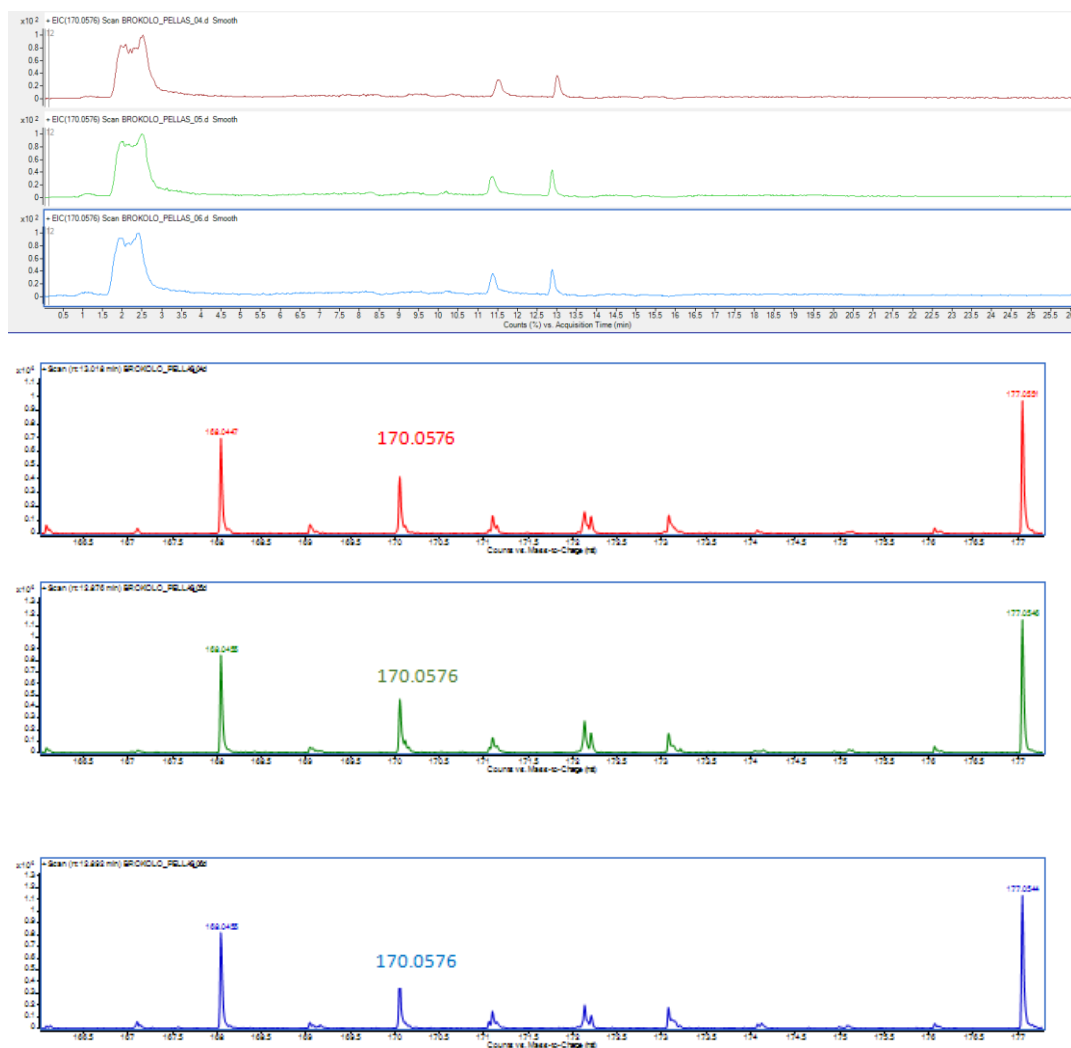




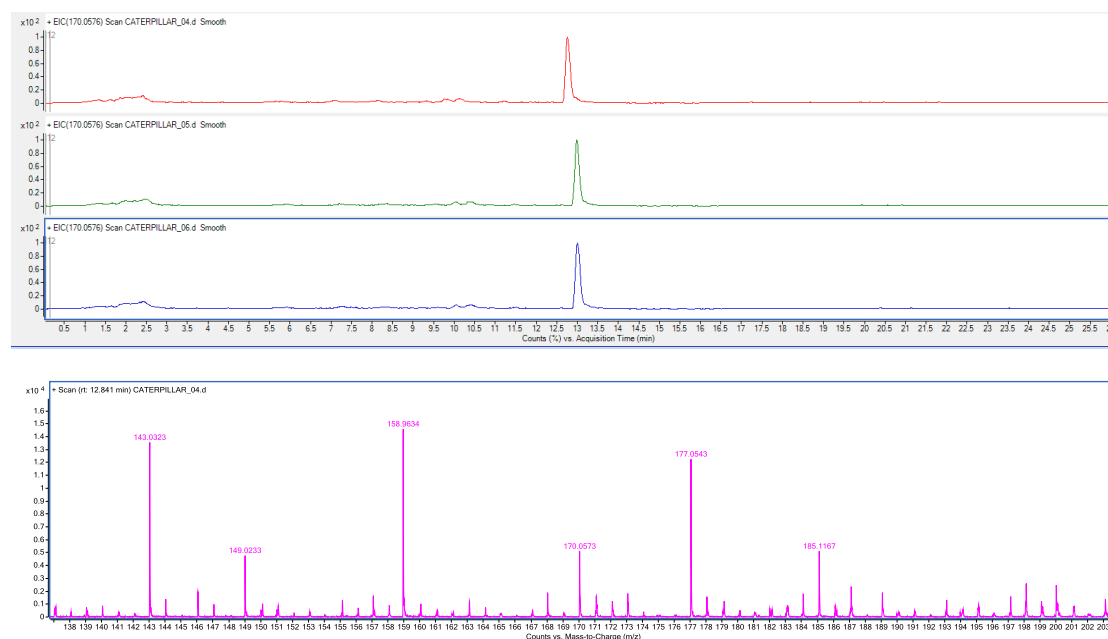
ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

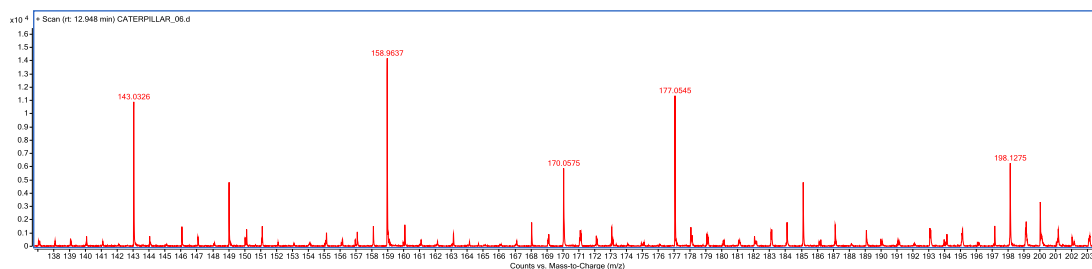
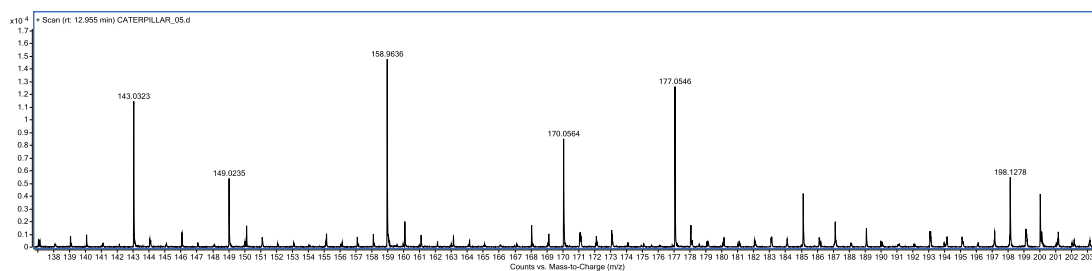


ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΠΕΛΛΑΣ

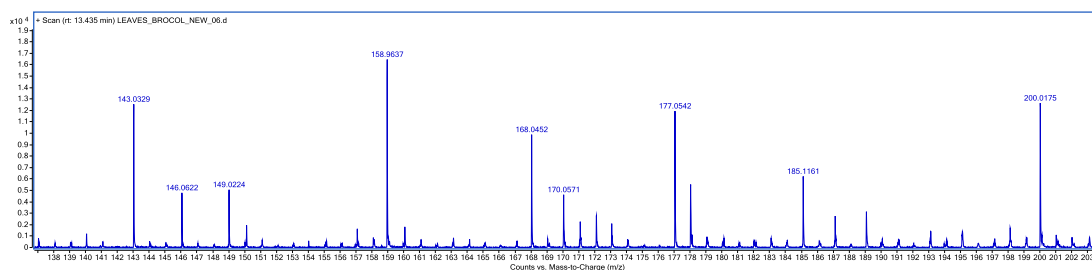
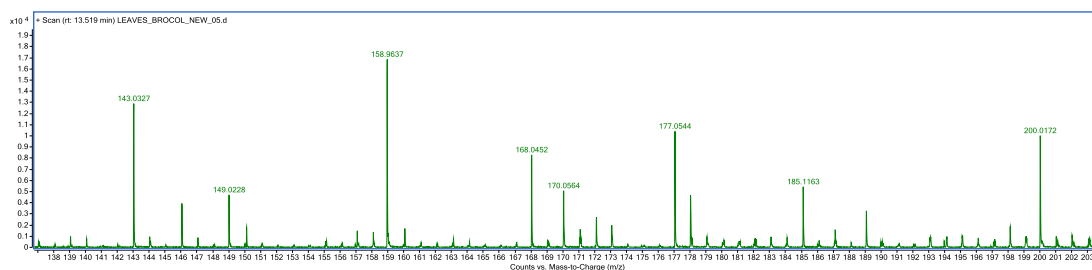
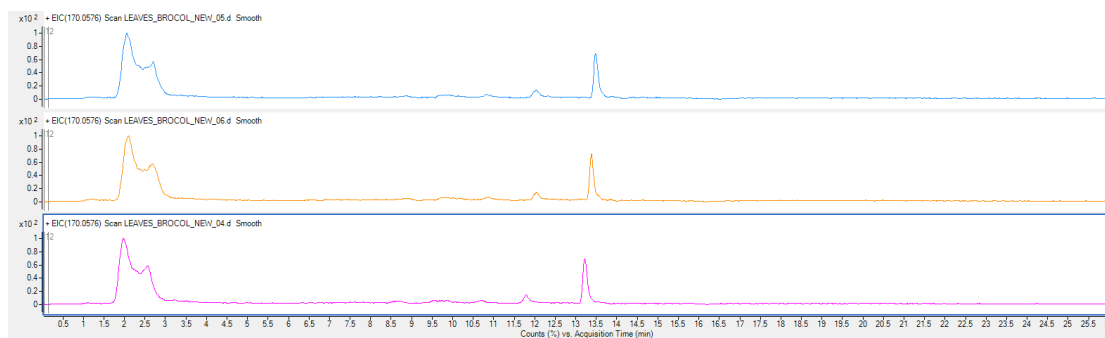


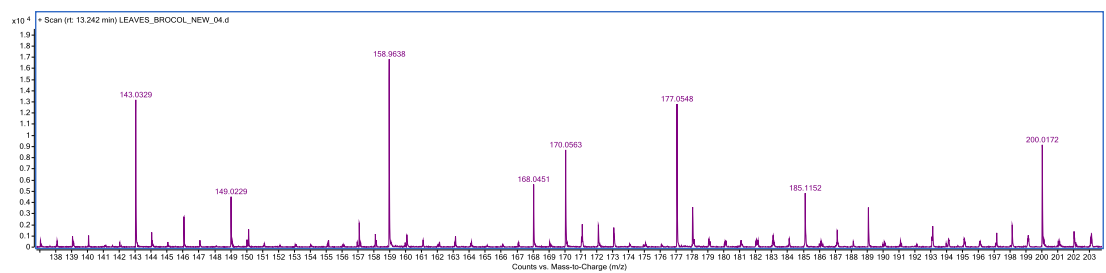
Προνύμφη *Pieris rapae*



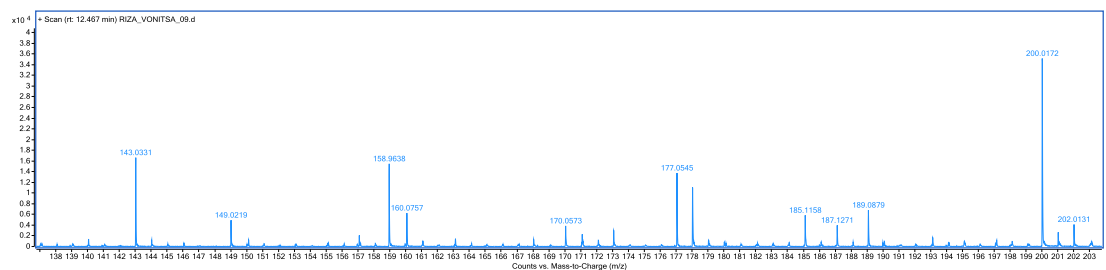
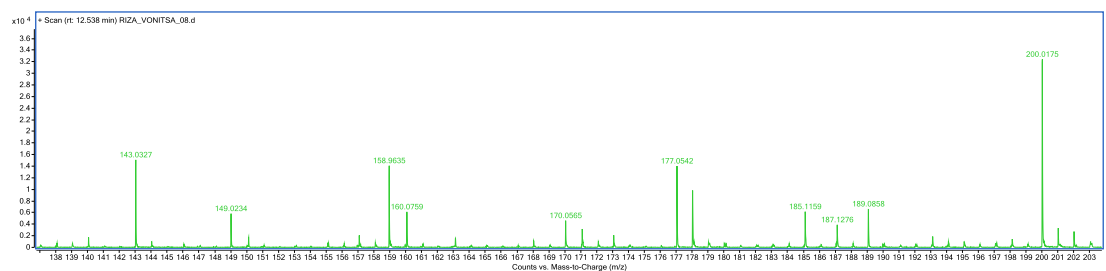
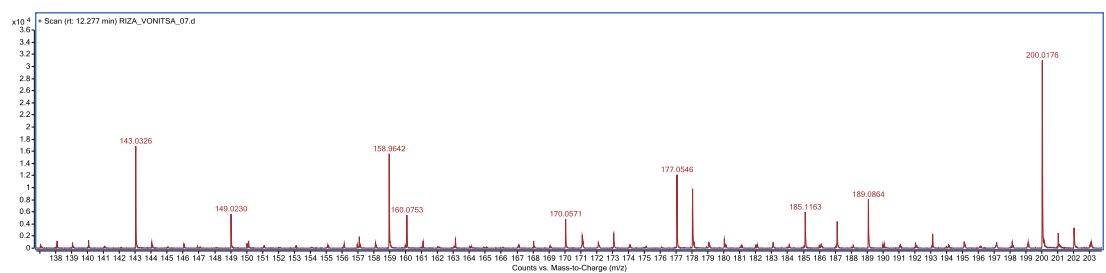
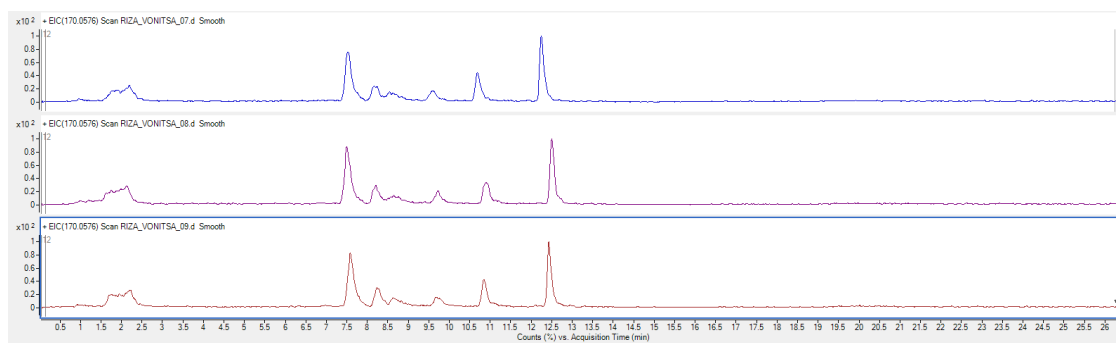


ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

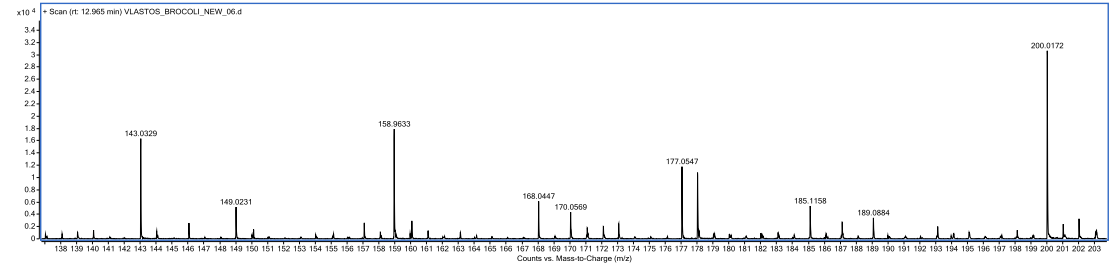
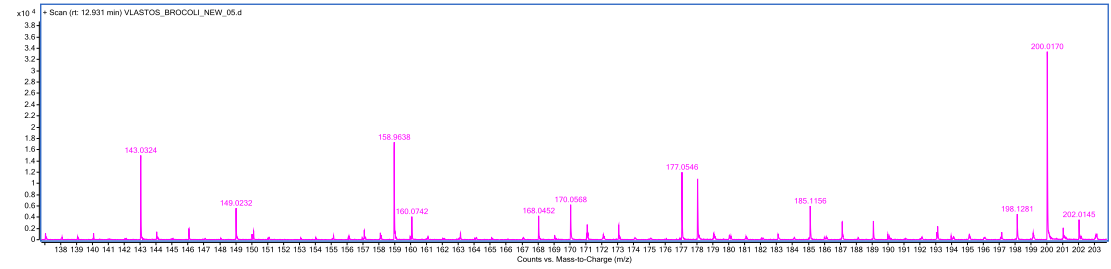
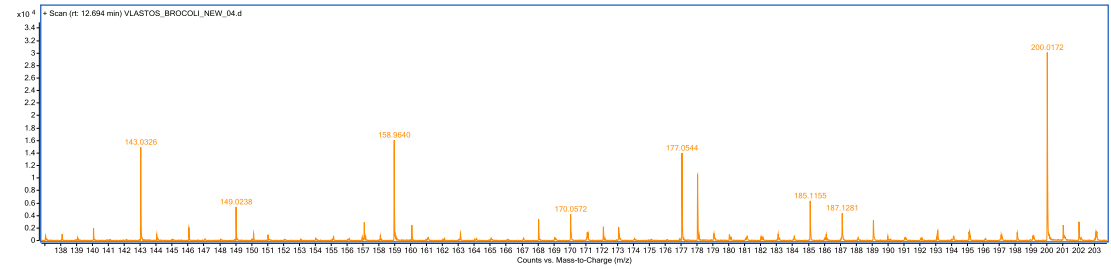
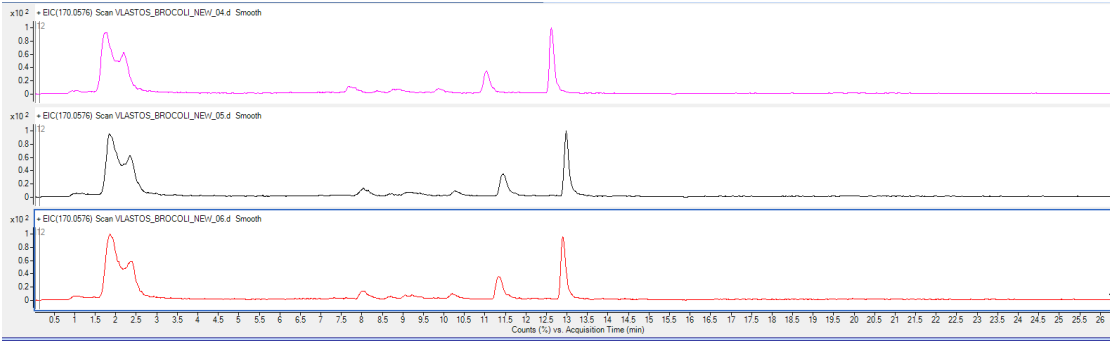




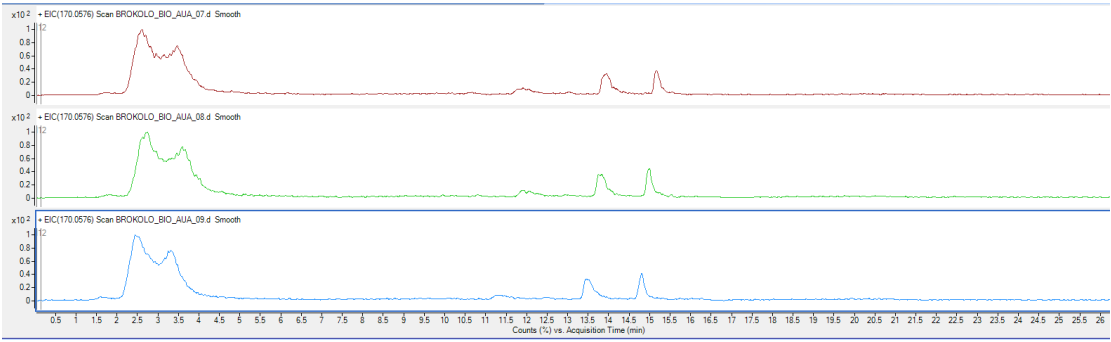
ΡΙΖΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

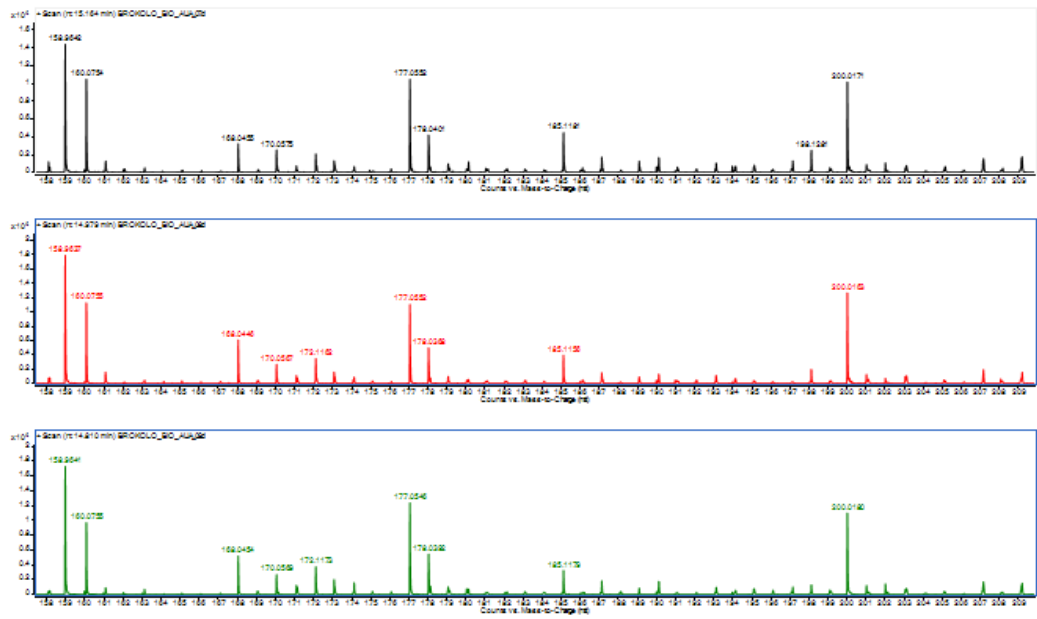


ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΒΟΝΙΤΣΑ

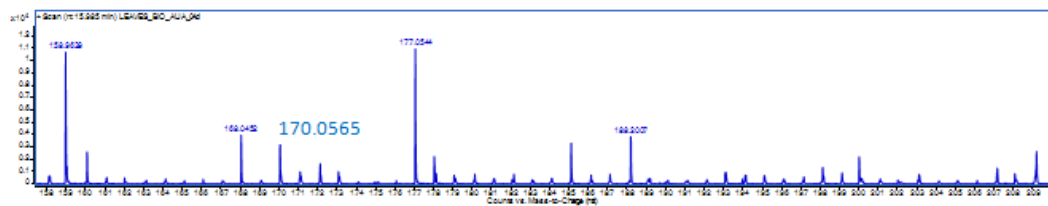
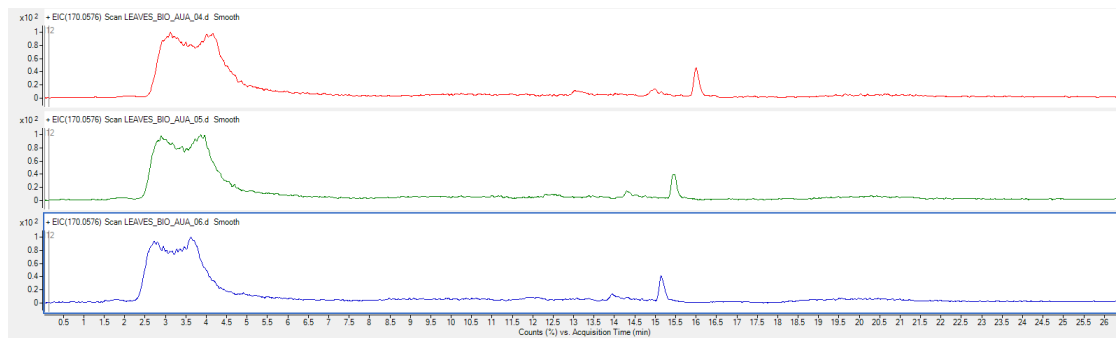


ΑΝΘΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

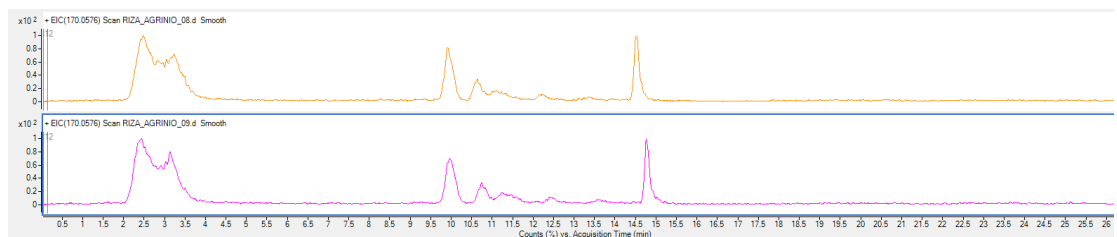


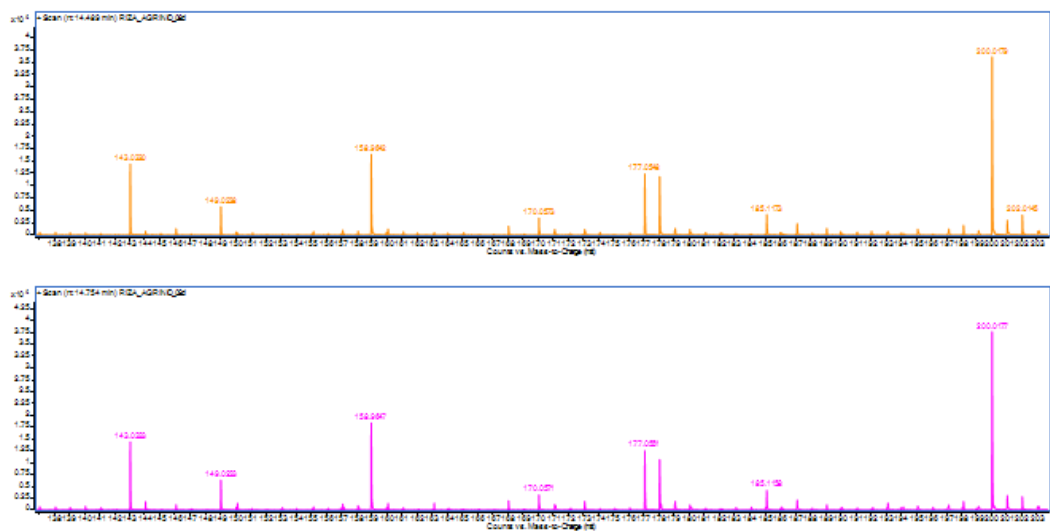


ΦΥΛΛΑ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

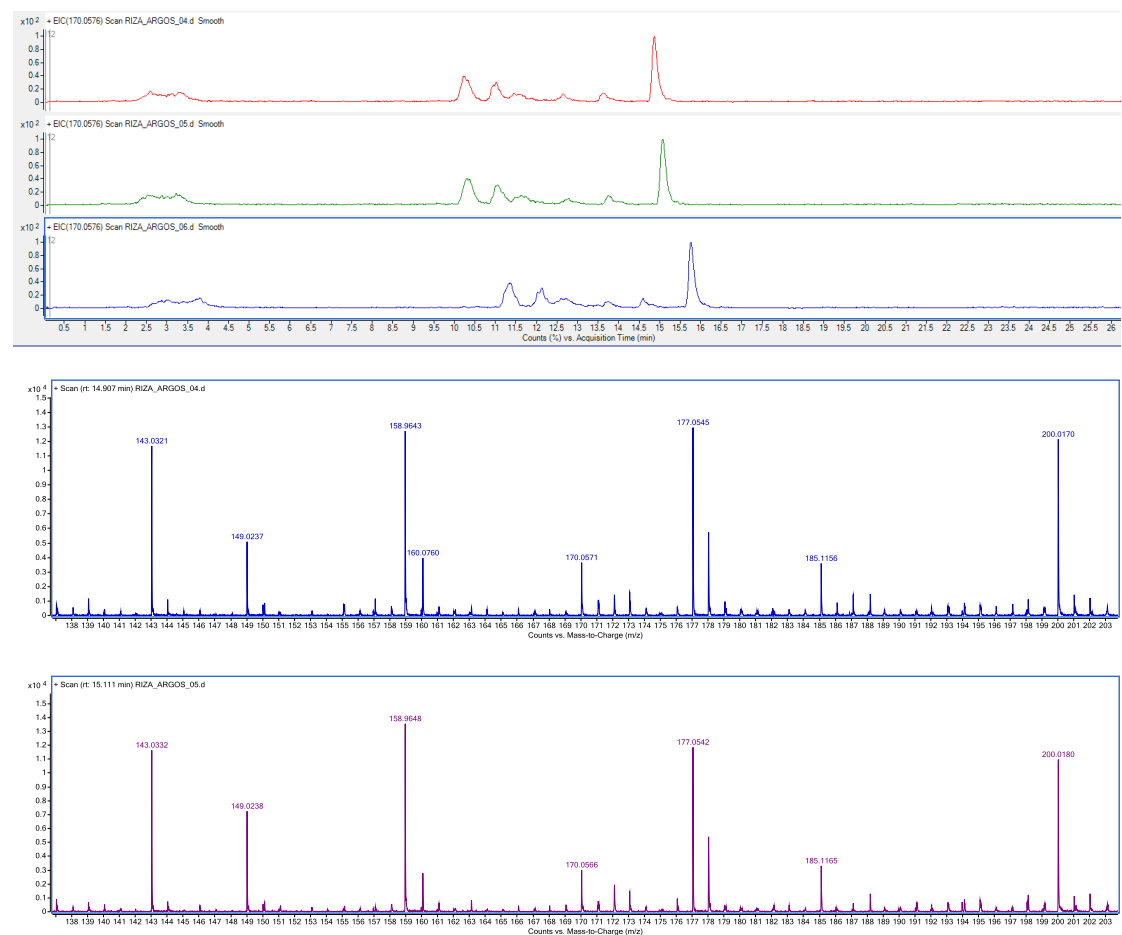


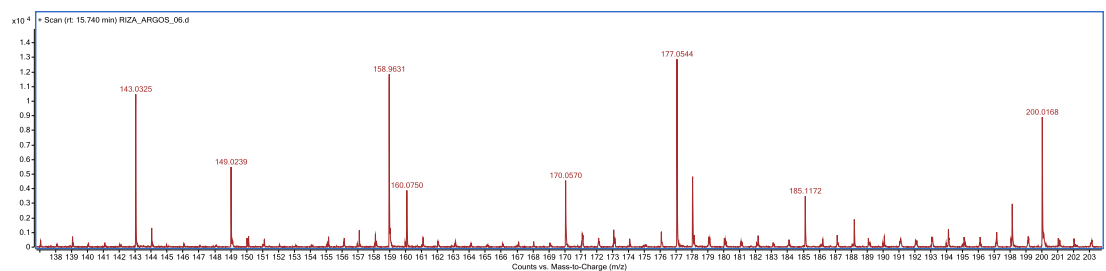
PIZA ΑΓΡΙΝΙΟ



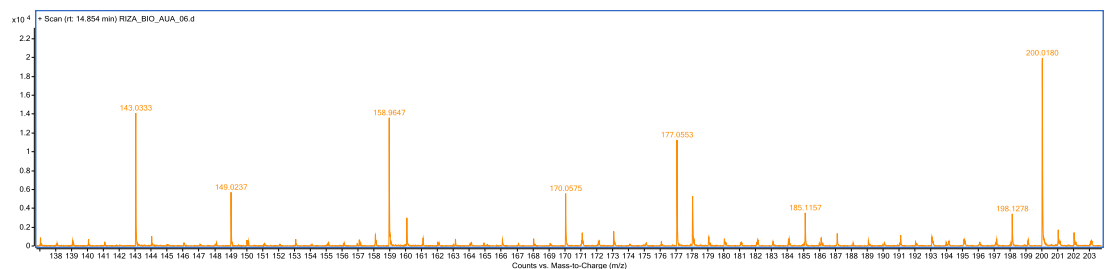
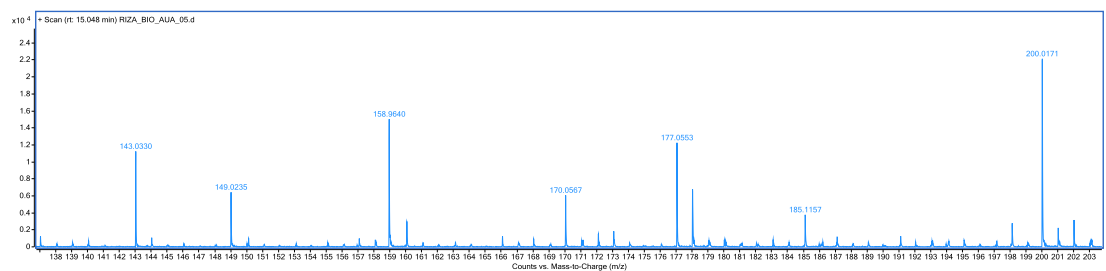
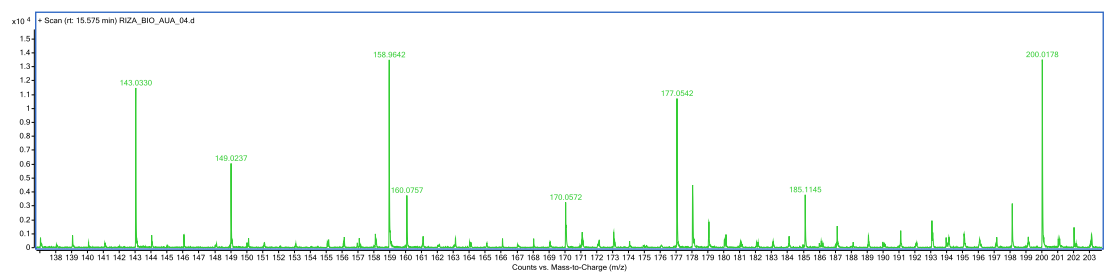
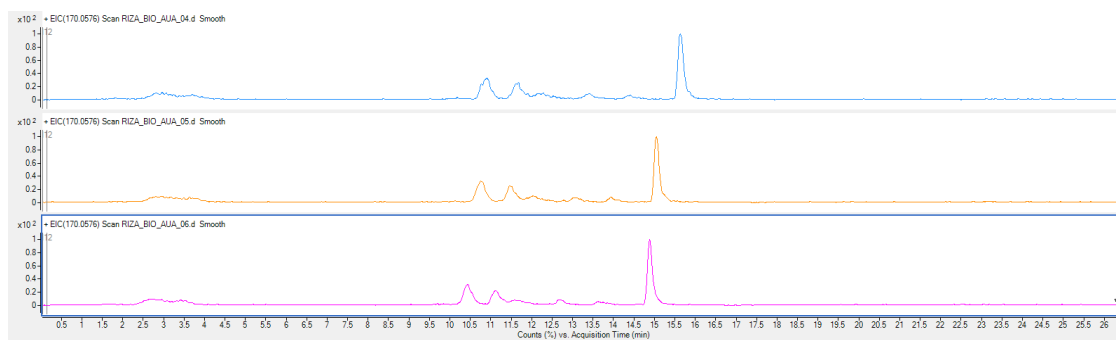


ΡΙΖΑ ΑΡΓΟΣ

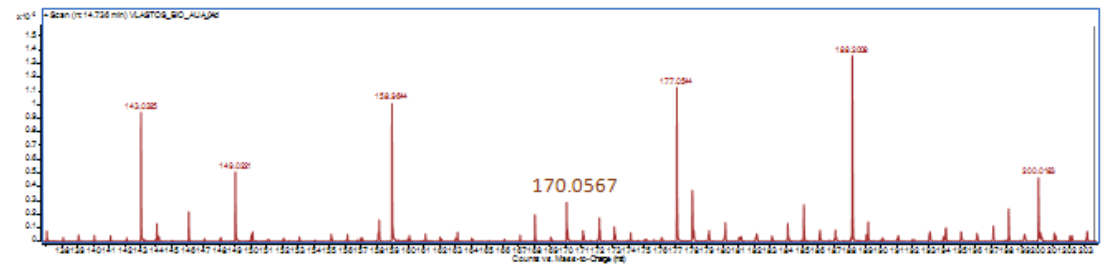
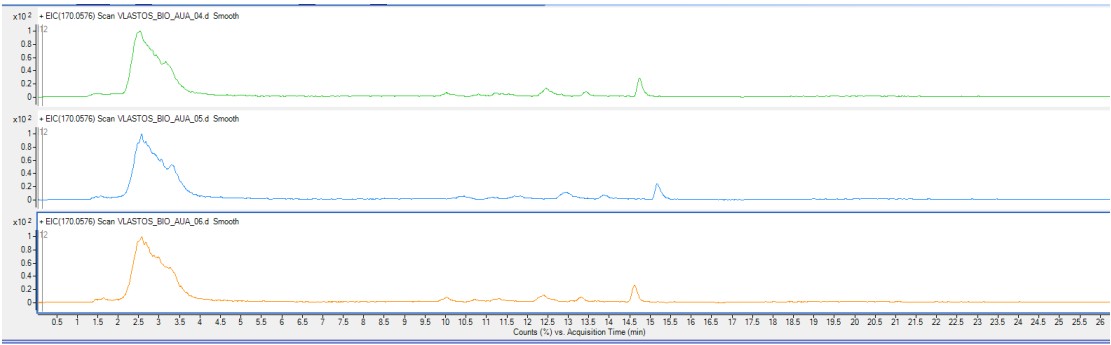




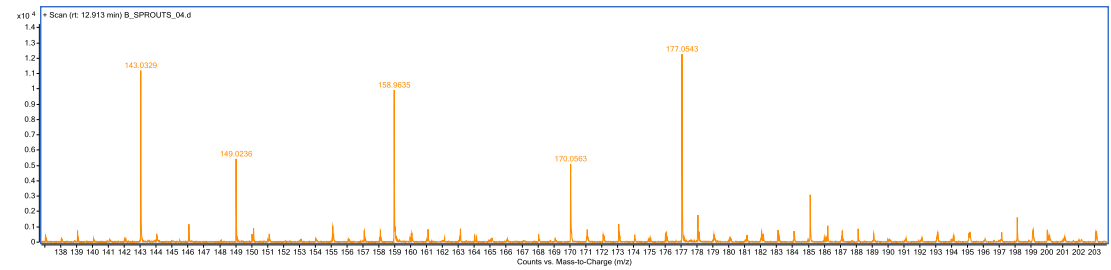
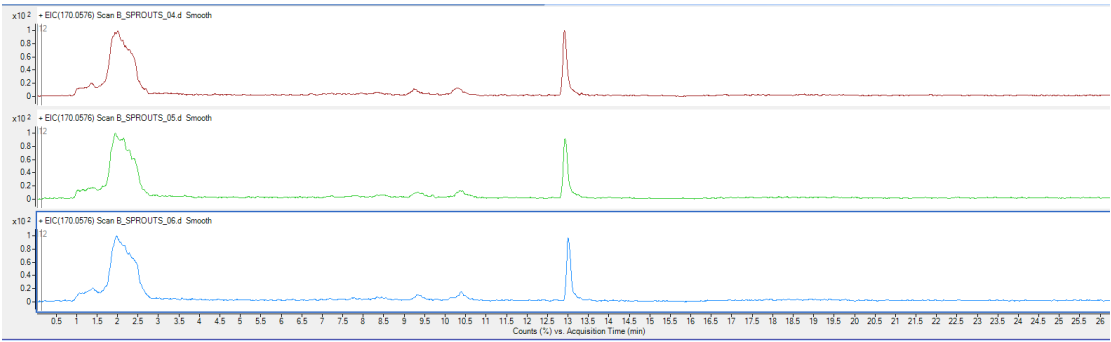
RIZA ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

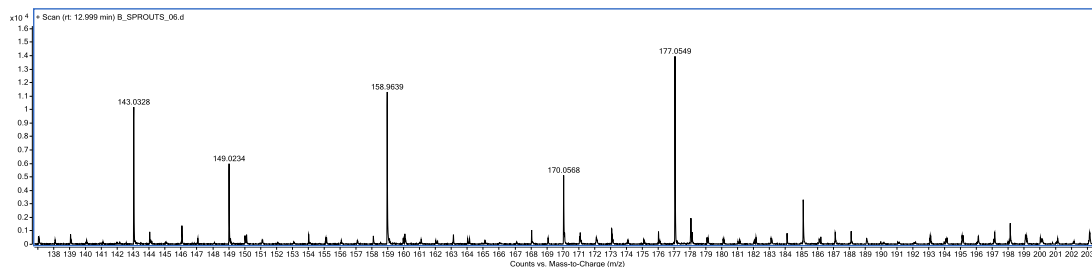
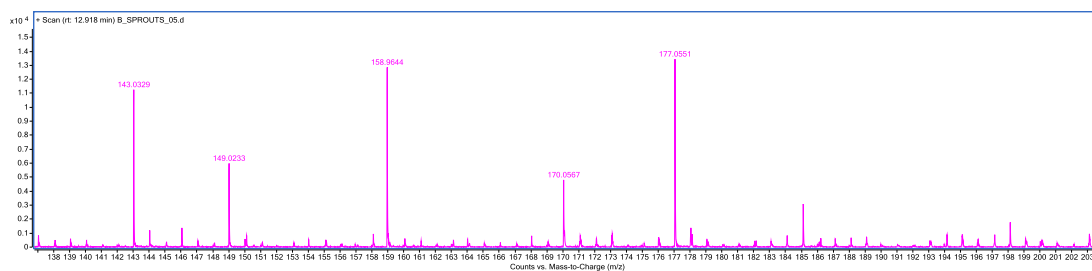


ΒΛΑΣΤΟΣ ΜΠΡΟΚΟΛΟ ΓΠΑ

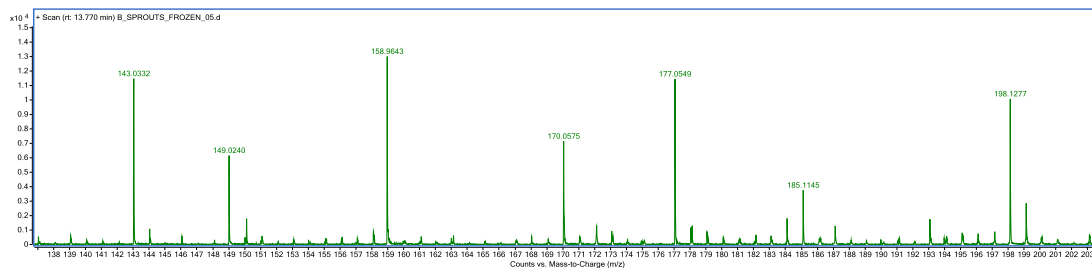
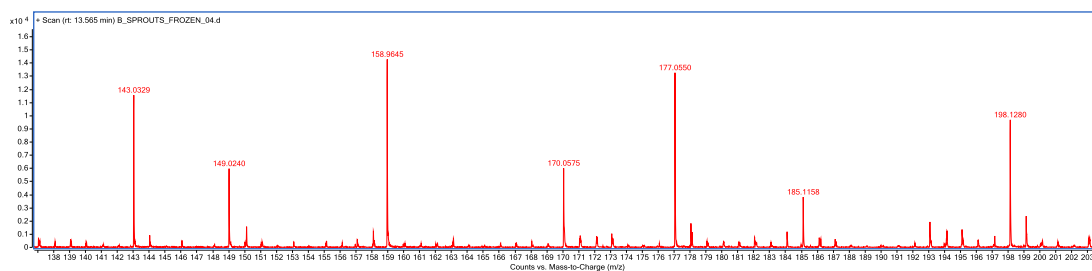
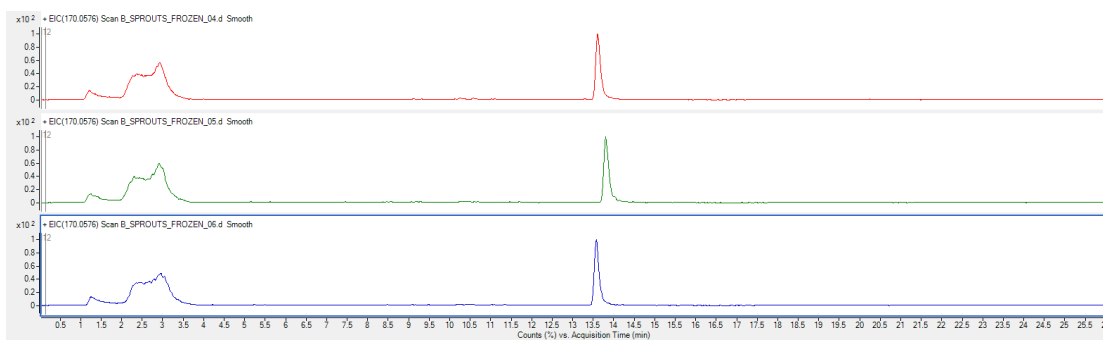


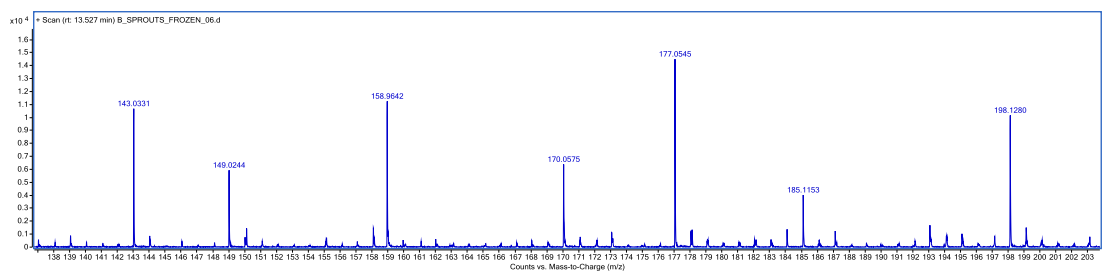
ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΒΟΝΙΤΣΑ





ΛΑΧΑΝΑΚΙΑ ΒΡΥΞΕΛΛΩΝ ΚΑΤΑΨΥΓΜΕΝΑ





PIZA EYBOIA

