



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ
ΜΕΛΕΤΗ & ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών και προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης καρπών κраниάς (*Cornus mas L.*) Ελληνικής καλλιέργειας



Κωνσταντίνος Ε. Πετράκης

Επιβλέπων καθηγητής:

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

**ΑΘΗΝΑ
2024**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών και προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης καρπών κρανιάς (*Cornus mas L.*) Ελληνικής καλλιέργειας

Study of secondary metabolites and determination of antioxidant activity
Of cornelian cherry (*Cornus mas L.*) cultivated in Greece

Κωνσταντίνος Ε. Πετράκης

Εξεταστική Επιτροπή:

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α. (επιβλέπων)

Παππάς Χρήστος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Γαρδέλη Χρυσαιγή, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών και προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης καρπών κρανιάς (*Cornus mas L.*) Ελληνικής καλλιέργειας

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή & Υγεία. Μελέτη & Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών καθώς και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από καρπούς του φυτού *Cornus mas L.* Ελληνικής καλλιέργειας.

Η συγκομιδή των καρπών έγινε τον μήνα Αύγουστο και σε πλήρη ωρίμανση από καλλιέργεια του νομού Φλώρινας. Τα δείγματα των φυτών ήταν δυο και καταγράφηκαν από το Εργαστήριο Συστηματικής Βοτανικής ως *Cornus mas 1* και *Cornus mas 2*. Προερχόντουσαν από διαφορετικές ποικιλίες του είδους *Cornus mas* με τους καρπούς τους να διαφοροποιούνταν μακροσκοπικά ως προς* το σχήμα.

Η σάρκα των καρπών, αφού αφαιρέθηκαν οι πυρήνες, λυοφιλιώθηκε και αποθηκεύτηκε σε βαθιά κατάψυξη. Έπειτα ποσότητα 5 g κονιορτοποιημένης σάρκας για κάθε ένα από τα δείγματα, εκχυλίστηκε επί τρεις φορές για 15 λεπτά στους 25 °C με χρήση λουτρού υπερήχων και με διαλύτη το σύστημα μεθανόλης – νερού σε αναλογία 80:20. Το τελικό εκχύλισμα, αφού συμπυκνώθηκε υπό κενό με τη βοήθεια περιστρεφόμενου συμπυκνωτή, λυοφιλιώθηκε εκ νέου και τοποθετήθηκε σε βαθιά κατάψυξη. Ποσότητα από τα δείγματα, σε μορφή πλέον σκόνης, ζυγίζοταν πριν από κάθε ανάλυση για την παρασκευή διαλύματος εργασίας.

Στα δυο εκχυλίσματα εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική δράση με τις δοκιμές DPPH και ABTS και προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη δοκιμή Folin Ciocalteu.

Στη συνέχεια, κάθε ένα από τα δείγματα αναλύθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ενώσεων. Για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των ουσιών στα εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με αναλυτή χρόνου πτήσης και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης. Τέλος για την περίπτωση των ανθοκυανών, τα δείγματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μικρές διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση των δυο εκχυλισμάτων με τους καρπούς του *Cornus mas 1* να υπερτερούν. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τις δύο δοκιμές, με τη δοκιμή ABTS να δίνει καλύτερα αποτελέσματα.

Ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, το *Cornelian cherry 1* υπερτερεί έναντι του *Cornelian cherry 2*, με τα αποτελέσματα εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού υλικού και στις δυο περιπτώσεις να είναι ικανοποιητικά.

Τα φάσματα UV – Vis παρουσίασαν έντονες κορυφές σε εύρη που υποδηλώνουν την παρουσία ανθοκυανών, ιριδοειδών και άλλων φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα.

Με την υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης, ταυτοποιήθηκαν στο Cornelian cherry 1 συνολικά 13 ενώσεις εκ των οποίων προέκυψαν 6 ιριδοειδή, 2 οργανικά οξέα, 2 φαινολικά οξέα και 3 φλαβονοειδή. Αντίστοιχα, στο εκχύλισμα του Cornus mas 2 ταυτοποιήθηκαν 11 ενώσεις από τις οποίες οι 4 ήταν ιριδοειδή, οι 2 οργανικά οξέα, οι 2 φαινολικά οξέα και οι υπόλοιπες 3 φλαβονοειδή.

Τέλος η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, έδειξε παρουσία ανθοκυανών στα εκχυλίσματα, τα οποία όμως δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν από την φασματομετρία μάζας.

Επιστημονική περιοχή: Φυσικά Προϊόντα

Λέξεις κλειδιά: *Cornus mas L.*, κράνα, Αντιοξειδωτική δράση, Ολικό φαινολικό περιεχόμενο, DPPH, ABTS, Folin Ciocalteu, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), LC – Q-ToF – HRMS, Φασματοσκοπία UV – Vis

Study of secondary metabolites and determination of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas L.*) cultivated in Greece

MSc Food Nutrition & Health. Study & Exploitation of Natural Products

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of General Chemistry

Abstract

The aim of this research was to study the secondary metabolites and antioxidant activity of extracts from the fruits of the plant *Cornus mas L.* cultivated in Greece. Fruit harvesting took place on August when they were fully ripe from a cultivation in Florina region. In the Laboratory of Systematic Botany two samples of *Cornus mas* plant were taken. Specifically, originating from different varieties of *Cornus mas*, *Cornus mas 1* and *Cornus mas 2*, were recorded and registered there. In terms of shape, fruits emanating from *Cornus mas 1* and *Cornus mas 2* plants, were different.

The procedure started with the removal of the seeds from the Cornelian cherry fruit. Consequently, the fruit pulp was lyophilized and stored in -20 °C. A 5 g quantity of lyophilized pulp was extracted three times for 15 minutes at 25°C using ultrasonic bath and a methanol-water solvent system in an 80:20 ratio. The final extract, condensed under vacuum using a rotary evaporator, was lyophilized again and stored in deep freeze. Before each analysis, a measured amount of the samples in powder form was weighed for preparation of a working solution.

The antioxidant activity of the two extracts was evaluated using the DPPH and ABTS methods, and the total phenolic content was determined using the Folin Ciocalteu method. Subsequently, each sample was analyzed using Ultraviolet-Visible spectroscopy for qualitative determination of compounds. High-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with Time-of-Flight analyzer and high-resolution mass spectrometry was employed for separation and identification of substances in the extracts. Additionally, for anthocyanins, samples were analyzed using high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector.

The results indicated slight differences in the antioxidant activity of the two extracts, with Cornelian cherry 1 showing superior results, as confirmed by both methods, with the ABTS test providing better outcomes. Regarding total phenolic content, Cornelian cherry 1 surpassed Cornelian cherry 2, with satisfactory results expressed in mg of gallic acid per gram of dry material in both cases.

UV-Vis spectra showed intense peaks indicating the presence of anthocyanins, iridoids, and flavonoids in the extracts. Using liquid chromatography in combination with high-resolution mass spectrometry, a total of 13 compounds were identified in Cornelian cherry 1, including 6 iridoids, 2 organic acids, 2 phenolic acids, and 3 flavonoids. Similarly, in the Cornelian cherry 2 extract, 11 compounds were identified, including 4 iridoids, 2 organic acids, 2 phenolic acids, and 3 flavonoids.

Finally, High-Performance Liquid Chromatography with a Diode array detector, demonstrated the presence of anthocyanins in the extracts, although they could not be identified by mass spectrometry.

Scientific area: Natural Products

Keywords: *Cornus mas L.*, Cornelian Cherry, Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, DPPH, ABTS, Folin Ciocalteu, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), LC – Q-Tof – HRMS, UV – Vis Spectroscopy

Πίνακας περιεχομένων

Λίστα Εικόνων	9
Λίστα Πινάκων	12
Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος.....	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Κρασιά (Cornus mas L.)	13
1.3 Κράνα (Cornelian cherry)	14
1.4 Βοτανική ταξινόμηση και ποικιλομορφία	15
1.5 Γεωγραφική κατανομή	16
1.6 Καλλιέργεια και πολλαπλασιασμός κρασιάς.....	17
1.6.1 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης	17
1.6.2 Πολλαπλασιασμός	19
1.7 Χημική σύσταση και βιοδραστικότητα καρπών κρασιάς	21
1.7.1 Χημική σύσταση.....	21
1.7.2 Βιοδραστικότητα.....	22
1.8 Φαρμακολογικές δράσεις και ιδιότητες καρπών Κρασιάς.....	25
1.8.1 Παραδοσιακή ιατρική	25
1.8.2 Φαρμακολογικές δράσεις.....	25
1.9 Αντιοξειδωτική δράση και ολικό φαινολικό περιεχόμενο	27
1.9.1 Δοκιμή DPPH	28
1.9.2 Δοκιμή ABTS.....	29
1.9.3 Μέθοδος Folin Ciocalteu	30
1.10 Χρωματογραφικές και Φασματοσκοπικές τεχνικές	30
1.10.1 Χρωματογραφικές τεχνικές	30
1.10.2 Φασματοσκοπικές τεχνικές	33
Σκοπός της μελέτης.....	35
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος	36
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	36
2.1.1 Προμήθεια φυτικού υλικού	36
2.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων	37

2.2	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	38
2.2.1	Δοκιμή DPPH.....	39
2.2.2	Δοκιμή ABTS.....	39
2.3	Ολικά φαινολικά συστατικά – Μέθοδος Folin Ciocalteu	40
2.4	Ανάλυση δειγμάτων με Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV – Vis) ..	40
2.5	Ανάλυση δειγμάτων με LC – Q-ToF – HRMS.....	41
2.6	Ανάλυση δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	43
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα – Συζήτηση		45
3.1	Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων.....	45
3.1.1	Δοκιμή DPPH.....	45
3.1.2	Δοκιμή ABTS.....	47
3.1.3	Σύγκριση DPPH με ABTS	50
3.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	51
3.3	Συσχετισμός Folin Ciocalteu με DPPH και ABTS	53
3.4	Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis).....	54
3.5	LC – Q-ToF – HRMS	56
3.6	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	72
Συμπεράσματα.....		76
Βιβλιογραφία		78

Λίστα Εικόνων

Εικόνα 1: Κρασιά (Cornus mas L.).....	14
Εικόνα 2: Κράνα (wikipedia.org/wiki/Cornus_mas).....	15
Εικόνα 3: Η κρασιά κατά της περίοδο της ανθοφορίας (vdberk.co.uk).....	16
Εικόνα 4: Γεωγραφική κατανομή κρασιάς στην Ευρώπη (Dinda et al., 2016).....	17
Εικόνα 5: Καλλιέργεια κρασιάς στο νομό Φλώρινας	18
Εικόνα 6: Τεχνικές πολλαπλασιασμού κρασιάς (Cornus mas L.)	20
Εικόνα 7: Χημική δομή και οι βασικές κατηγορίες φλαβονοειδών (Panche et al., 2016).....	24
Εικόνα 8: Χημική δομή των τριών βασικών κατηγοριών ιριδοειδών. (Wang et al., 2020, Ludwiczuk et al., 2017)	25
Εικόνα 9: Αντίδραση αποχρωματισμού DPPH	28
Εικόνα 10: Σταθεροποίηση της ρίζας ABTS+ μέσω των δομών συντονισμού. (Zucca et al., 2015)	29
Εικόνα 11: Διαδικασία αποχρωματισμού ABTS+	30
Εικόνα 12: Κρασιά (Cornus mas L.) από το Κτήμα Ηώς.....	36
Εικόνα 13: Συσκευή λυοφιλίωσης.....	37
Εικόνα 14: Σάρκα κράνων έπειτα από λυοφιλίωση.....	37
Εικόνα 15: Συμπύκνωση εκχυλίσματος με χρήση περιστρεφόμενου συμπυκνωτή.	38
Εικόνα 16: Δοκιμή DPPH σε εκχύλισμα καρπών Cornus mas.	39
Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού διπλής δέσμης (UV – Vis).	41
Εικόνα 18: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (LC – Q-ToF – HRMS).	43
Εικόνα 19: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC – DAD).....	44
Εικόνα 20: Εκχύλισμα Cornelian cherry 1.	45
Εικόνα 21: Εκχύλισμα Cornelian cherry 2.	46
Εικόνα 22: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.	46
Εικόνα 23: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με τη δοκιμή DPPH.....	47
Εικόνα 24: Εκχύλισμα Cornelian cherry 1.	48
Εικόνα 25: Εκχύλισμα Cornelian cherry 2.	48
Εικόνα 26: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.....	49
Εικόνα 27: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με τη δοκιμή ABTS.	49
Εικόνα 28: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων σύμφωνα με τις δοκιμές DPPH και ABTS.	50
Εικόνα 29: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.	51

Εικόνα 30: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων εκφρασμένο σε mgGAE/g.	52
Εικόνα 31: Συσχετισμός ολικών φαινολικών με αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων.	54
Εικόνα 32: Φάσμα UV – Vis δείγματος Cornelian cherry 1 συγκέντρωσης 0,3 mg/mL... 55	
Εικόνα 33: Φάσμα δείγματος Cornelian cherry 2 συγκέντρωσης 0,3 mg/mL.	55
Εικόνα 34: LC – Q-ToF – HRMS χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων εκχυλίσματος Cornelian cherry 1 σε αρνητικό ιοντισμό (-ESI).	56
Εικόνα 35: LC – Q-ToF – HRMS χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων εκχυλίσματος Cornelian cherry 2 σε αρνητικό ιοντισμό (-ESI).	56
Εικόνα 36: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας τρυγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	57
Εικόνα 37: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κιτρικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	57
Εικόνα 38: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας λογανικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	58
Εικόνα 39: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας λογανίνης από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	58
Εικόνα 40: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καφταρικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	59
Εικόνα 41: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καμφερόλη-3-Ο-ραμνοσίδη από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	59
Εικόνα 42: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας αλπιγενοσίδη από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	60
Εικόνα 43: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας σβεροσίδη από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	60
Εικόνα 44: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας σεκολογανίνης από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	61
Εικόνα 45: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας αρωμαδενδρίνης-7-Ο-γλυκοσίδη από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	61
Εικόνα 46: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας ελλαγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas.	62
Εικόνα 47: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κερκετίνης-3-Ο-ραμνοσίδη από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	62
Εικόνα 48: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κορνοουσίδη από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.	63
Εικόνα 49: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας τρυγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 2.	64

Εικόνα 50: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας μηλικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	65
Εικόνα 51: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας τρυγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	65
Εικόνα 52: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καφταρικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	66
Εικόνα 53: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καμφερόλης-3-Ο-ραμνοσίδη από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	66
Εικόνα 54: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας σεκοξυλογανίνης από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	67
Εικόνα 55: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας αλπιγενοσίδη από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	67
Εικόνα 56: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας ελλαγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	68
Εικόνα 57: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κερκετίνη-3-Ο-γαλακτοσίδη από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	68
Εικόνα 58: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καμφερόλης-3-Ο-γαλακτοσίδη από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	69
Εικόνα 59: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κορνουσίδη από το εκχύλισμα καρπών <i>Cornus mas</i> 2.....	69
Εικόνα 60: Μοριακές δομές φλαβονοειδών που αναγνωρίστηκαν στον καρπό της κρανιάς (<i>Cornus mas</i> L.), a) αρωμαδενδρίνη-7-Ο-γλυκοσίδης b) R=OH και R ₁ =rha: κερκετίνη- 3-Ο-ραμνοσίδης, R=OH και R ₁ =gal: κερκετίνη-3-Ο-γαλακτοσίδης και με R=H και R ₁ =gal: καμφερόλη-3-Ο-γαλακτοσίδης, R=H και R ₁ =rha: καμφερόλη-3-Ο-ραμνοσίδης	71
Εικόνα 61: Μοριακή δομή βασικών ιριδοειδών που αναγνωρίστηκαν στον καρπό της κρανιάς (<i>Cornus mas</i> L.).....	71
Εικόνα 62: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Cornelian cherry 1 συγκέντρωσης 10 mg/mL στα 520 nm.	72
Εικόνα 63: Φάσματα UV-Vis εκχυλίσματος καρπών <i>Cornus mas</i> 1 των αντίστοιχων κορυφών του χρωματογραφήματος.	73
Εικόνα 64: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Cornelian cherry 2 συγκέντρωσης 10 mg/mL στα 520 nm.	74
Εικόνα 65: Φάσματα UV-Vis Cornelian cherry 2 των αντίστοιχων κορυφών του χρωματογραφήματος.	75
Εικόνα 66: Μοριακή δομή ανθοκυανινών που βιβλιογραφικά έχουν αναγνωριστεί στον καρπό της κρανιάς (<i>Cornus mas</i> L.), όπου R=OH ή H και R ₁ σάκχαρο.	75

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 1: Βοτανική ταξινόμηση <i>Cornus mas</i> L. (Votaniki.gr)	15
Πίνακας 2: Πρόγραμμα έκλουσης δειγμάτων LC – Q-ToF – HRMS.	42
Πίνακας 3: Πρόγραμμα έκλουσης δειγμάτων για HPLC – DAD.	44
Πίνακας 4: Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων βάση δοκιμής DPPH.....	46
Πίνακας 5: Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων βάση δοκιμής ABTS.....	49
Πίνακας 6: Ολικό φαιολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων.	52
Πίνακας 7: Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο LC – Q-TOF – MS στο εκχύλισμα του Cornelian cherry 1.	63
Πίνακας 8: Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο LC – Q-TOF – MS στο εκχύλισμα του Cornelian cherry 2.	70

Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος

1.1 Εισαγωγή

Στην σημερινή εποχή πολλά από τα φυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως στον κόσμο λόγω των φαρμακευτικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων τους είναι γνωστά από παλαιότερους πολιτισμούς. Από το παρελθόν αποτελούσαν αναπόσπαστο κομμάτι της λαϊκής ιατρικής πράγμα που μεταφέρθηκε με το πέρασμα των χρόνων στη σημερινή εποχή διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην πλέον σύγχρονη ιατρική και φαρμακολογία. Σύμφωνα με έρευνες και μελέτες έχει αποδειχθεί πως η συμβολή πολλών βοτάνων, φυτών και παραγώγων τους είναι καθοριστική και ευεργετική στην υγεία αλλά και στην καταπολέμηση ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, το οξειδωτικό στρες και άλλες πολλές. Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω όλο και περισσότερα φυτά και βότανα μπαίνουν στο μικροσκόπιο των ερευνητών ώστε να μελετηθούν και να γίνουν γνωστές οι ιδιότητες που διαθέτουν.

Ένα από τα φυτά που έχει κινήσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του είναι η κρανιά με την επιστημονική ονομασία *Cornus mas* L., με τον καρπό (κράνα ή Cornelian cherry), τα φύλλα και τα άνθη του φυτού αυτού να αποτελούν αντικείμενα προς μελέτη. Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών αλλά επίσης αποτελούν ένα νόστιμο φρούτο με πλήθος θρεπτικών συστατικών. Σε μεγάλο μέρος του κόσμου καλλιεργείται ως καλλωπιστικό φυτό για διακόσμηση κήπων καθώς κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας διακρίνεται από μικρά κίτρινα άνθη. Έρευνες, κλινικές και φαρμακολογικές μελέτες, έχουν δείξει πως τα κράνα διαθέτουν αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και άλλες ιδιότητες πράγμα που τα καθιστά εξαιρετικά σημαντικά. (Hosseinpour-Jaghdani et al., 2017).

1.2 Κρανιά (*Cornus mas* L.)

Η κρανιά (*Cornus mas* L.) εντοπίστηκε στην νότια Ευρώπη και στη νοτιοδυτική Ασία εκατοντάδες χρόνια πριν από την εποχή των Πλινίου και του Βιργιλίου περίπου το 70 π.Χ. Το *Cornus* L. είναι γνωστό και ως «σκυλόξυλο», μια ονομασία η οποία οφείλεται στο σκληρό και ξυλώδες κορμό του. Πιο συγκεκριμένα, η ονομασία του προέρχεται από τις λατινικές λέξεις «Cornu» που σημαίνει κέρατο και «mas» από το «maschile» που σημαίνει πάρα πολύ σκληρό ξύλο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούταν από τον 7^ο αιώνα π.Χ. από Έλληνες τεχνίτες για την κατασκευή ακόντιων και τόξων. Το γένος *Cornus* L. είναι ευρέως διαδεδομένο στη νότια και κεντρική Ευρώπη, τη νοτιοδυτική Ασία, την ανατολική και δυτική Βόρεια και κεντρική Αμερική και την ανατολική Αφρική, με δυο είδη του γένους να είναι ενδημικά στη Νότια Αμερική και ένα είδος στην τροπική Αφρική. Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται ως καλλωπιστικό φυτό ενώ τα τελευταία χρόνια καλλιεργείται σε διάφορες περιοχές όλο και περισσότερο.

Ως προς το τομέα της παραδοσιακής ιατρικής έχει αναφερθεί πως μέρη του φυτού αυτού όπως ρίζες, φύλλα, καρποί αλλά και διάφορα παράγωγα τους, έχουν αξιοποιηθεί για την πρόληψη και καταπολέμηση μεγάλου φάσματος ασθενειών. Αυτές οι πληροφορίες κατέστησαν το *Cornus mas* ενδιαφέρον προς περεταίρω μελέτη και έρευνα για τα χημικά

συστατικά και τις φαρμακευτικές και θεραπευτικές του ιδιότητες. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για διάφορα τμήματα του φυτού αυτού, έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 100 διαφορετικές ενώσεις όπως ανθοκυανίνες, φλαβονοειδή, ιριδοειδή και άλλα χαρακτηρίζοντας έτσι το φυτό αυτό και τα παράγωγα του μεγάλης αξίας. (Dinda et al., 2016)



Εικόνα 1: Κρανιά (Cornus mas L.)

1.3 Κράνα (Cornelian cherry)

Οι καρποί της κρανιάς, γνωστοί στον ελλαδικό χώρο και ως κράνα (Cornelian cherry) είναι βρώσιμοι αλλά σε άγουρη φάση είναι στυπτικοί. Είναι μη τοξικοί, πράγμα που τους καθιστά ασφαλείς προς κατανάλωση. Από την αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν στην παραδοσιακή κουζίνα με τα σημαντικότερα προϊόντα να είναι οι μαρμελάδες, τα λικέρ αλλά και η απλή κατανάλωση ως αποξηραμένοι καρποί. Σημαντική θέση είχαν και στην παραδοσιακή ιατρική για την καταπολέμηση μεγάλου φάσματος ασθενειών όπως διάρροια, στομαχικές και γαστρεντερικές διαταραχές, πυρετό αλλά και παθήσεις των νεφρών και του ήπατος.

Διαφοροποιούνται γενικότερα ανάλογα με το είδος τους. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το σχήμα, μπορούν να διακριθούν είτε σε οβάλ αλλά και ωσειδές, με μήκος περίπου από 10 έως 23 cm. Το χρώμα συνήθως είναι σκούρο κόκκινο με πιθανότητα εμφάνισης αποχρώσεων σε κίτρινο ή ροζ, ανάλογα με το είδος. Το μέσο βάρος του καρπού κυμαίνεται γενικά μεταξύ 5 με 8 g, ανάλογα με τον γονότυπο του δένδρου. Ο πυρήνας που συνδέεται με την σάρκα, αποτελεί το 10 με 30% του συνολικού βάρους του καρπού. Η ωρίμανση αναμένεται να διαρκέσει από τα μέσα Ιουλίου έως και τις αρχές του

Οκτωβρίου, με την ακριβή χρονική περίοδο να εξαρτάται από την ποικιλία της κраниάς, τις τοπικές κλιματικές συνθήκες και τον τρόπο καλλιέργειας. Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός πως ωριμάζουν πλήρως αφού αποκοπούν από το δέντρο. (Dinda et al., 2016, Gološin et al., 2015, Brickell et al., 1990, Piórecki et al., 2007)



Εικόνα 2: Κράνα (wikipedia.org/wiki/Cornus_mas)

1.4 Βοτανική ταξινόμηση και ποικιλομορφία

Η κраниά με την επιστημονική ονομασία *Cornus mas* L. ανήκει στο γένος *Cornus* L. και στην οικογένεια *Cornaceae*. Στο γένος αυτό ταξινομούνται πάνω από 60 είδη με την πλειοψηφία να είναι δέντρα και θάμνοι. Κυρίως συναντάται στη νότια και κεντρική Ευρώπη, στα νοτιοδυτικά τμήματα της Ασίας αλλά και σε μεγάλα υψόμετρα του βορειοδυτικού και κεντρικού τμήματος της Αμερικής. Στο γένος *Cornus* L. ταξινομούνται τέσσερα είδη τα οποία είναι τα πλέον διαδεδομένα στην Ευρώπη και Ασία, με τους καρπούς τους να αποτελούν αντικείμενο μελέτης με μεγάλη διατροφική και φαρμακευτική αξία. Τα τέσσερα αυτά είδη είναι το *Cornus mas* L., το *Cornus officinalis*, το *Cornus controversa* και το *Cornus kousa*. (Dinda et al., 2016)

Πίνακας 1: Βοτανική ταξινόμηση *Cornus mas* L. (Votaniki.gr)

Κраниά	
Βασίλειο	<i>Plantae</i>
Υποβασίλειο	<i>Tracheophytes</i>
Κλάση	<i>Magnoliopsida</i>
Τάξη	<i>Cornales</i>
Οικογένεια	<i>Cornaceae</i>
Γένος	<i>Cornus</i>
Είδος	<i>Mas</i>

Στον Ελλαδικό χώρο το είδος το οποίο συναντάμε είναι αυτό του *Cornus mas L.*. Το συναντάμε ως μεγάλο θάμνο ή δέντρο με ύψος να κυμαίνεται από τα 5 έως τα 12 μέτρα. Αποτελείται από καφέ και πράσινα κλαδιά με φύλλα των οποίων οι διαστάσεις έχουν μήκος από 4 έως 10 και πλάτος από 2 έως 4 εκατοστά και αντίθετη διάταξη. Την περίοδο της ανθοφορίας, η οποία ξεκινάει από τέλη χειμώνα και πριν τη φυλλοποίηση, διακρίνεται από τετραμερή κίτρινα άνθη τα οποία θα δώσουν καρπούς με κίτρινο αρχικό χρώμα που στην συνέχεια κοκκινίζει.



Εικόνα 3: Η κρυνιά κατά της περίοδο της ανθοφορίας (vdberk.co.uk)

1.5 Γεωγραφική κατανομή

Αρχικά η κρυνιά εντοπίστηκε στους πρόποδες του Καυκάσου και έπειτα από εκεί εξαπλώθηκε σε διάφορες Ευρωπαϊκές και Ασιατικές χώρες. Φύεται κυρίως στις ανατολικές και νότιες χώρες της Ευρώπης αλλά και στη δυτική Ασία. Όσον αφορά την καλλιέργεια έχει επικρατήσει και καλλιεργείται κατά κύριο λόγο σε πάρα πολλές Ευρωπαϊκές χώρες με την Ελλάδα να βρίσκεται ανάμεσα σε αυτές. Εκτεταμένη καλλιέργεια έχουμε κυρίως στην Βαλκανική χερσόνησο αλλά και σε χώρες όπως Σλοβακία, Τσεχία, Πολωνία Αυστρία, Κροατία αλλά και κεντρικότερα όπως στην Βόρεια Ιταλία και τη Γερμανία και Γαλλία. Πολλές είναι και οι χώρες της Ασίας στις όποιες έχουμε σημαντική καλλιέργεια κρυνιάς όπως για παράδειγμα το Ιράν, το βόριο Ιράκ, η Ιαπωνία και άλλες. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται ενδεικτικά η κατανομή της κρυνιάς στην Ευρώπη. (Dinda et al., 2016)



Εικόνα 4: Γεωγραφική κατανομή κρανιάς στην Ευρώπη (Dinda et al., 2016)

1.6 Καλλιέργεια και πολλαπλασιασμός κρανιάς

1.6.1 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης

Η κρανιά (*Cornus mas* L.), κατά κύριο λόγο αναπτύσσεται αυτοφυώς σε υψόμετρο μέχρι περίπου και τα 1400 μέτρα. Συχνά εντοπίζονται κοντά σε δάση, κοιλάδες ποταμών αλλά ακόμα και σε πετρώδη εδάφη. Είναι φυτά προσαρμοσμένα να επιβιώνουν σε αντίξοες κλιματικές συνθήκες, περιλαμβάνοντας περιοχές με υψηλή ξηρασία και υψηλές θερμοκρασίες που φτάνουν έως τους 40°C τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ είναι επίσης ανθεκτικά και σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως αυτές του χειμώνα, που μπορεί να φτάσουν μέχρι και τους -36°C.

Η προσδοκώμενη διάρκεια ζωής της κρανιάς ανέρχεται σε 250-300 έτη, γεγονός που τα καθιστά ένα από τα μακροβιότερα δένδρα. Είναι δένδρα/θάμνοι που προτιμούν κυρίως θέσεις με έντονη ηλιοφάνεια, όμως παράλληλα ευδοκιμούν και σε σκιερά ή ημισκιερά περιβάλλοντα. Όσον αφορά την αντοχή τους στον άνεμο, οι κρανιές αντέχουν σε ισχυρούς ανέμους, ενώ αντίθετα είναι ευάλωτες σε αλατούχους ανέμους. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των κρανιών είναι η ερμαφρόδιτή τους φύση. Η επικονίασή τους επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της συνεργασίας μελισσών, οι οποίες αποτελούν κύριο

παράγοντα στη διαδικασία της επικονίασης. (Szotl et al., 2020, Gilman et al., 1993, Řeznicek et al., 2012).

Η κρτανιά αποτελεί ένα ενδιαφέρον είδος για καλλιέργεια λόγω της οικονομικής της αξίας και των πολλαπλών χρήσεων. Η επιτυχημένη καλλιέργεια της κρτανιάς απαιτεί να ληφθούν υπόψη πολλοί παράγοντες για την ανάπτυξη υγιών και ανθεκτικών δένδρων.

Για την καλύτερη απόδοση, η κρτανιά προτιμά ηλιόλουστα σημεία και ανοιχτούς χώρους, αλλά εντυπωσιάζει επίσης με την απόδοσή της σε ημισκιερή βλάστηση, όπως άκρες δασών αλλά ακόμα και σε περιοχές εντός ανοιχτών δασών. Όσον αφορά το έδαφος, προτιμά υγρά αλλά καλά στραγγιζόμενα εδάφη και είναι ανεκτική σε όλους τους τύπους εδάφους, από αμμώδη και βαριά αργιλώδη έως το ιδανικό ασβεστούχο έδαφος. Το ιδανικό pH εδάφους για την καλλιέργεια της κρτανιάς είναι το 7.4, αλλά ευδοκιμεί και σε ήπια όξινα ή ήπια αλκαλικά εδάφη, αποφεύγοντας δηλαδή τις ακραίες τιμές.

Η κατάλληλη περίοδος για την εγκατάσταση των δένδρων κρτανιάς είναι από μέσα Οκτωβρίου έως τα τέλη του Νοεμβρίου, εκμεταλλευόμενοι τις βροχές της εποχής για την εγκαθίδρυση των φυτών. Είναι σημαντικό να τηρείται απόσταση 3 έως 5 μέτρων μεταξύ των δένδρων, προσφέροντας έτσι επαρκή χώρο για την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος αλλά και την εξασφάλιση, γενικότερα, της βέλτιστης ανάπτυξης των φυτών.

Η καλλιέργεια της κρτανιάς μπορεί να αποτελέσει μια επιτυχημένη εναλλακτική επιλογή, εφόσον οι απαιτήσεις του εδάφους και του κλίματος της περιοχής ληφθούν υπόψη και η φυτεία προσαρμοστεί ανάλογα, δίνοντας έμφαση στην προστασία και τη φροντίδα των νέων δένδρων ώστε να εξασφαλιστεί η υγεία και ανθεκτικότητά τους. (Szotl et al., 2020, Gilman et al., 1993 ŘEZNÍČEK et al., 2012, Klimentenko et al., 2004).



Εικόνα 5: Καλλιέργεια κρτανιάς στο νομό Φλώρινας

Για να διασφαλιστεί μια επιτυχής καλλιέργεια, χρειάζεται να ληφθούν υπόψη πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών. Παράγοντες όπως η λίπανση, η άρδευση, το κλάδεμα, το βοτάνισμα αλλά και οι κίνδυνοι ως προς την υγεία του φυτού. Σχετικά με τη λίπανση, μετά τον πρώτο χρόνο της καλλιέργειας, εάν το έδαφος είναι φτωχό, συνίσταται να χρησιμοποιηθεί λίπασμα βραδείας αποδέσμευσης για να

προσφέρει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, για να βελτιωθεί η ανθοφορία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί λίπασμα που περιέχει κάλιο (K). Σε ό,τι αφορά την άρδευση, κατά την πρώτη χρονιά της καλλιέργειας, είναι απαραίτητο να παρέχεται νερό στα φυτά κατά τις περιόδους ξηρασίας, και συγκεκριμένα περίπου 30 λίτρα νερού ανά φυτό κάθε 1 με 2 εβδομάδες. Η κρυνιά είναι ικανή να αντέξει, όπως προαναφέρθηκε, στην ξηρασία αλλά είναι επιθυμητή η υγρασία στο έδαφος για να διασφαλιστεί η καλή ανάπτυξή της. Όσον αφορά το κλάδεμα, δεν απαιτείται υπερβολικά στο δέντρο, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη απόδοση. Συστήνεται ωστόσο η αφαίρεση τραυματισμένων και νεκρών τμημάτων προκειμένου να προωθηθεί η υγιής ανάπτυξη του δένδρου. Στον τομέα του βοτανίσματος, είναι σημαντικό σε φυτά μικρότερα του ενός έτους, να αφαιρούνται περιμετρικά τα ζιζάνια ώστε να διασφαλιστεί η βέλτιστη ανάπτυξή τους. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί προαιρετικά και στα μεγαλύτερα ηλικιακά φυτά. Τέλος όσον αφορά τους κινδύνους, η κρυνιά και πιο συγκεκριμένα το *Cornus mas*, αποτελεί ένα πολύ ανθεκτικό φυτό σε ασθένειες και προσβολές. Παρόλα αυτά ορισμένοι κίνδυνοι που ενδέχεται να επηρεάσουν μια καλλιέργεια, είναι η πιθανή σήψη των ριζών στην περίπτωση που μιλάμε για μη στραγγιζόμενα εδάφη αλλά και το βακτηριακό έλκος *Pseudomonas syringae* που συναντάται κυρίως σε περιοχές με υψηλές θερμοκρασίες και υγρασία. Επιπλέον, η μυκητιακή ασθένεια Ανθρακνόζη μπορεί να εμφανιστεί στα φύλλα με χαρακτηριστικές μαύρες κηλίδες, επιδεινώνοντας έτσι την κατάσταση των φυτών.

1.6.2 Πολλαπλασιασμός

Ο πολλαπλασιασμός είναι ένα βασικό κομμάτι αναπαραγωγής, καθώς επιτρέπει τη δημιουργία νέων φυτών με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Στην περίπτωση της κρυνιάς είναι μια απαραίτητη διαδικασία για τη διατήρηση των επιθυμητών αυτών χαρακτηριστικών. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου μπορεί να έχει σημαντικές επιδράσεις στην ανάπτυξη, την ανθοφορία και την καρποφορία των νέων φυτών.

Μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους από τους οποίους οι κυριότεροι είναι είτε αγενώς με μοσχεύματα, είτε εγγενώς με χρήση σπόρων. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τον στόχο της καλλιέργειας, τις επιθυμητές ιδιότητες των φυτών αλλά και τις επιλογές που μπορεί να έχει ο εκάστοτε καλλιεργητής.

Ο επιτυχής πολλαπλασιασμός απαιτεί μεγάλη προσοχή σε πολλούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση λοιπόν του αγενούς πολλαπλασιασμού γίνεται χρήση μοσχευμάτων τα οποία είτε είναι ήδη ξυλοποιημένα, είτε βρίσκονται σε φάση ημιξυλοποίησης. Τα γενετικά χαρακτηριστικά και η περίοδος συλλογής των μοσχευμάτων, είναι από τους πιο κρίσιμους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την επιτυχία της διαδικασίας αυτής. Επιπλέον, ο πολλαπλασιασμός μέσω μοσχευμάτων μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης όπως για παράδειγμα με διάφορες αυξίνες.

Από την άλλη πλευρά, ο εγγενής πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται με χρήση σπόρων που όμως και στην περίπτωση αυτή, απαιτείται στην συνέχεια οπωσδήποτε εμβολιασμός για τη διατήρηση των χαρακτηριστικών της ποικιλίας. Γενικότερα, αποφεύγεται ο

πολλαπλασιασμός εγγενώς καθώς υπάρχει ο κίνδυνος τα νέα φυτά να είναι πολύ διαφορετικά ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως επίσης και ο κίνδυνος να αργήσει αρκετά η καρποφορία τους.

Ειδικότερα, δέντρα που πολλαπλασιάζονται με αγενή τρόπο έχουν τη δυνατότητα να ανθίζουν και να φέρνουν καρπούς πιο γρήγορα σε σχέση με τα δέντρα που προέρχονται από σπόρους. Έχει παρατηρηθεί πως αγενώς πολλαπλασιασμένα φυτά, παρουσίασαν άνθιση και καρποφορία κατά το ήμισυ τον 2^ο χρόνο και πλήρως τον 3^ο. Εν αντιθέσει, τα εγγενώς πολλαπλασιασμένα φυτά άνθισαν και απέδωσαν μετά το 8^ο έτος ηλικίας. Τέλος, σε ερευνητικό όμως επίπεδο, επιτυχείς είναι οι προσπάθειες πολλαπλασιασμού με άλλες τεχνικές, όπως με τυχαία ριζοβολία αλλά και μικροπολλαπλασιασμό.

Περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη σε αυτόν τον τομέα μπορούν να βοηθήσουν στη βελτίωση των μεθόδων πολλαπλασιασμού και την αποτελεσματικότερη καλλιέργεια της κρνιαίας. (Szotl et al., 2020, Gilman et al., 1993 ŘEZNÍČEK et al., 2012, Durkovic 2009, Durkovic 2008)



Εικόνα 6: Τεχνικές πολλαπλασιασμού κρνιαίας (*Cornus mas* L.)

Συγκομιδή και απόδοση

Η συγκομιδή και η απόδοση αποτελούν παραμέτρους που κρίνουν το αποτέλεσμα μιας επιτυχούς καλλιέργειας. Έτσι λοιπόν, στα πλαίσια της καλλιέργειας της κρνιαίας τα στοιχεία αυτά καθίσταται απαραίτητο να εξετασθούν. Γενικότερα παγκόσμια αλλά κυρίως στον ελλαδικό χώρο, το μεγαλύτερο ποσοστό των καρπών λαμβάνεται από αυτοφυή - "άγρια" δέντρα ως αποτέλεσμα του περιορισμένου αριθμού καλλιεργειών, εκδηλώνοντας έτσι την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα και εξειδίκευση στον τομέα αυτό. Στην περίπτωση αυτής της συγκομιδής αντιμετωπίζονται δυσκολίες οι οποίες οφείλονται αφενός στις απρόσιτες συχνά θέσεις των φυτών, αφετέρου στη μη ταυτόχρονη ωρίμανση των καρπών.

Όσον αφορά τη συγκομιδή, στις καλλιέργειες αυτοί οι παράγοντες ελαχιστοποιούνται. Η περίοδος συγκομιδής εκτείνεται από τα μέσα Ιουλίου έως και τις αρχές Σεπτεμβρίου,

όπου ενδέχεται όμως να υπάρχουν μεταβολές ανάλογα με τις συνθήκες της καλλιέργειας και τα χαρακτηριστικά του γονότυπου.

Οι τρόποι συγκομιδής γενικότερα ποικίλουν, περιλαμβάνοντας τη συλλογή με τα χέρια, το τίναγμα με χρήση μηχανικού εξοπλισμού καθώς και την εφαρμογή διχτυού περιμετρικά του κάθε φυτού με πτώση των ώριμων καρπών εντός.

Όσον αφορά την απόδοση, στα αυτοφυή φυτά κυμαίνεται από περίπου 3 έως 10 kg καρπών ανά δέντρο ανάλογα και με την ηλικία του φυτού, ενώ σε μια έκταση της τάξης των 10 στρεμμάτων μπορεί να ανέλθει σε περίπου 1000 kg. Στην περίπτωση μιας καλλιέργειας, η απόδοση εκτιμάται περίπου σε 30 με μέγιστο τα 80 kg ανά δέντρο, ανάλογα πάντα και με τις επικρατούσες συνθήκες, με τιμές που φθάνουν τα 5000 με 10000 kg σε αντίστοιχη καλλιέργεια 10 στρεμμάτων.

Πρέπει να επισημανθεί ότι τα δέντρα αρχίζουν να είναι παραγωγικά από το 2^ο έτος της ηλικίας τους, αυξάνοντας και διατηρώντας την απόδοσή τους σταθερά μέχρι και το 50^ο έτος ηλικίας. Όλα τα παραπάνω αποτελούν σημεία μιας ενδεδειγμένης προσέγγισης της συγκομιδής και της απόδοσης της κρνιαίας, αναδεικνύοντας την πολυπλοκότητα και τις ποικίλες παραμέτρους που επηρεάζουν την επίτευξη θετικών αποτελεσμάτων στην καλλιέργειά της. (Szotl et al., 2020, Gilman et al., 1993 ŘEZNÍČEK et al., 2012)

1.7 Χημική σύσταση και βιοδραστικότητα καρπών κρνιαίας

1.7.1 Χημική σύσταση

Στην κρνιαία τα μέρη εκείνα που ξεχωρίζουν για την χημική τους σύσταση αλλά και τα πλούσια βιοενεργά συστατικά είναι οι καρποί, τα φύλλα και τα άνθη. Ακόμα και στους ίδιους τους καρπούς, υπάρχει διαφοροποίηση των συστατικών και της σύστασης στη σάρκα από τους πυρήνες. Τα κράνα τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί στο μικροσκόπιο πολλών ερευνητών λόγω της μεγάλης διατροφικής τους αξίας αλλά και το πλήθος των βιοενεργών συστατικών τα οποία διαθέτουν. Τα συστατικά αυτά ποιοτικά και ποσοτικά, εξαρτώνται από το γονότυπο του φυτού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και από τις συνθήκες καλλιέργειας.

Σύμφωνα με μελέτες οι καρποί της κρνιαίας στο μεγαλύτερο μέρος τους αποτελούνται από νερό. Η περιεκτικότητα σε ξηρή ύλη ανέρχεται σε 14 με 28%. Σημαντική θέση κατέχουν οι υδατάνθρακες οι οποίοι βρίσκονται σε μορφή σακχάρων με ποσοστό που κυμαίνεται από 6 έως 19%, με σημαντικότερη τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Πιο συγκεκριμένα τα αναγωγικά σάκχαρα αποτελούν το 2 με 12% ενώ η σακχαρόζη μπορεί να φτάσει έως και το 3%. Επίσης το περιεχόμενο σε οργανικά οξέα είναι σημαντικό με το ποσοστό να φτάνει έως και το 7%. Συνήθως όμως κυμαίνεται μεταξύ 2 και 4%, με τα κυριότερα να είναι το μηλικό, το τρυγικό και το κιτρικό οξύ. Όσον αφορά τα λιπαρά οξέα το μεγαλύτερο ποσοστό κατέχει το λινελαϊκό, ακολουθούμενο από το ελαϊκό οξύ. Τα κράνα είναι επίσης σημαντική πηγή μεταλλικών στοιχείων με κυριότερα, το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg), το νάτριο (Na), τον σίδηρο (Fe) και τον ψευδάργυρο (Zn). Σύμφωνα με μελέτες η κατανάλωση 100 g φρέσκων καρπών ημερησίως μπορεί να καλύψει περίπου το 6 με 25% της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης για τα στοιχεία

αυτά. Ακόμα, οι καρποί αυτοί είναι πλούσιοι σε βιταμίνες, με την περιεκτικότητα σε βιταμίνη C να αγγίζει τα 100 mg/100 g φρέσκου βάρους, ξεπερνώντας σε πολλές περιπτώσεις την αντίστοιχη άλλων δημοφιλών φρούτων όπως τα λεμόνια και οι φράουλες. Επιπλέον, τα κράνα είναι πηγή πρωτεϊνών και σύμφωνα με μελέτες έχουν βρεθεί παραπάνω από 15 αμινοξέα με πιο σημαντικά το ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ, τη σερίνη και τη λυσίνη. Τέλος, οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε πληθώρα και σε αυτές αποδίδονται οι περισσότερες δράσεις και ιδιότητες. Η συνολική περιεκτικότητα σε τέφρα ανέρχεται περίπου στο 0,8%. (Kazimierski et al., 2019, Dinda et al., 2016).

1.7.2 Βιοδραστικότητα

Ως δευτερογενείς μεταβολίτες ορίζουμε τις χημικές ενώσεις που παράγουν τα φυτά, όχι για την ανάπτυξη τους αλλά για την άμυνα έναντι παθογόνων οργανισμών, την ανταπόκρισή τους σε περιβαλλοντικές πιέσεις και τη ρύθμιση των βιολογικών τους διεργασιών, προσδίδοντας τους ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Είναι η μεταβολική εκείνη δραστηριότητα που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μεταβολικών προϊόντων τα οποία παράγονται μόνο σε επιμέρους ιστούς ή όργανα αλλά και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης. Δημιουργούνται μετά τη βιολογική μετατροπή των πρωτογενών μεταβολιτών και η σύνθεσή τους δεν ακολουθεί τις γνωστές πρωτογενείς μεταβολικές οδούς.

Δυο χαρακτηριστικές κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι φαινολικές ενώσεις και τα τερπένια. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν φυσικά προϊόντα τα οποία παρουσιάζουν ποικίλο φάσμα δομών και λειτουργιών. Είναι χημικές ενώσεις που περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια (-OH) συνδεδεμένα απευθείας με έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή/και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Στη φύση τις βρίσκουμε κυρίως, υπό τη μορφή εστέρων ή/και γλυκοζιδίων. Λόγω της όξινης φύσης των φαινολικών υδροξυλομάδων, οι φαινολικές ενώσεις είναι εξαιρετικά δραστικές. Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων είναι οι απλές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα αλλά και τα φλαβονοειδή με χαρακτηριστικές υποκατηγορίες τις φλαβόνες, τις ανθοκυάνες τις φλαβονόλες και άλλα.

Τα τερπένια, είναι επίσης φυσικά προϊόντα και αποτελούν ακόρεστες ενώσεις που σχηματίζονται ενώνοντας μαζί μονάδες ισοπρενίου. Στους φυτικούς οργανισμούς, τα τερπένια μπορούν να οξειδωθούν και να παράξουν τις ενώσεις εκείνες που είναι υπεύθυνες για τα διάφορα αρώματα. Τα τερπένια εκείνα που περιέχουν οξυγόνο ή άλλες λειτουργικές ομάδες όπως για παράδειγμα αλκοόλες, κετόνες, αλδεΐδες και άλλες, είναι γνωστά ως τερπενοειδή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τερπενοειδών είναι τα ιριδοειδή.

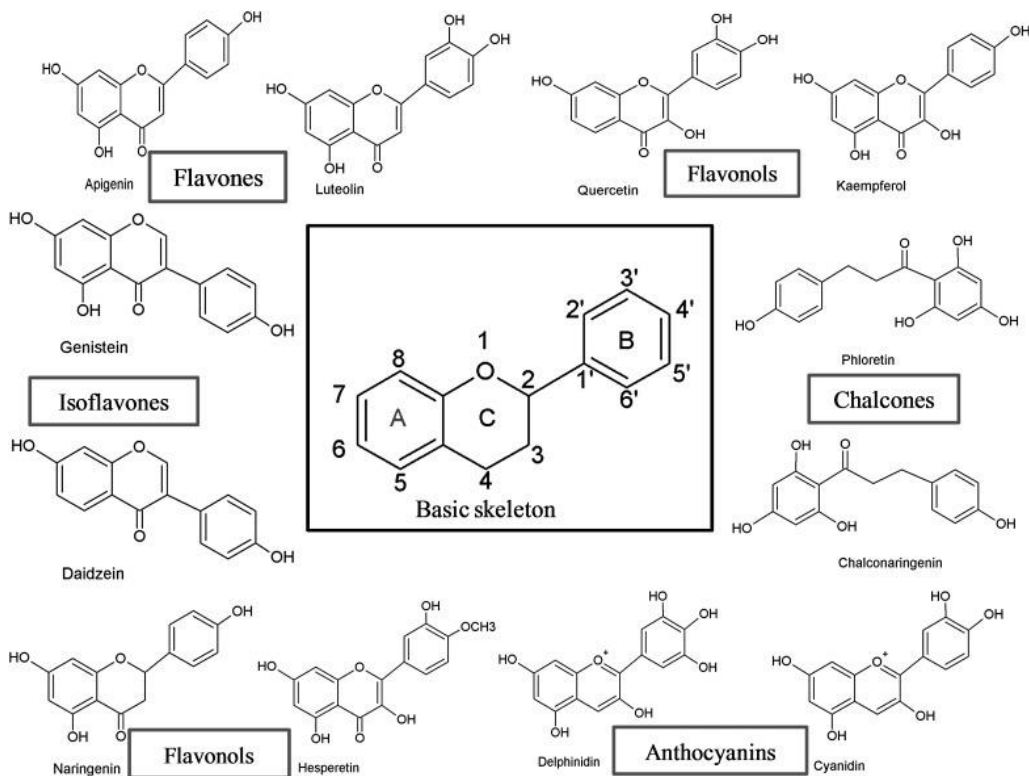
Όσον αφορά τα κράνα, έρευνες έχουν δείξει ότι είναι καρποί πλούσιοι σε φαινολικές ενώσεις, όπως φλαβονοειδή με κυρίαρχες τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμφερόλη, μυρικετίνη κ.α.), και τις ανθοκυάνες (πελαργονιδίνη, κυανιδίνη κ.α.) και φαινολικά οξέα αλλά σημαντική είναι ακόμα η περιεκτικότητα σε τερπενοειδή, με κύρια κατηγορία τα ιριδοειδή (λογανικό οξύ, λογανίνη κ.α.). Επίσης στον καρπό έχουν ταυτοποιηθεί παραπάνω από 10 καρτενοειδή όπως για παράδειγμα η νεοξανθίνη, η β-καροτένιο, η λουτεΐνη και διάφορες άλλες. (Horvath et al., 2007, Deng et al., 2013) Βέβαια όλα αυτά

εξαρτώνται από το γονότυπο του φυτού, την ωριμότητα του καρπού και ενδέχεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση και τις κλιματολογικές συνθήκες. (Milenkovic-Andjelkovic et al., 2015, Krivoruchko, 2014, Szumny et al., 2015).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες των φαινολικών συστατικών και τα συναντάμε στους φυτικούς οργανισμούς όπως στους καρπούς τους, γενικότερα στα λαχανικά, στα όσπρια αλλά και σε διάφορα μέρη του φυτού όπως από τις ρίζες μέχρι τα φύλλα και τον κορμό. Είναι φυτοχημικές ουσίες οπότε δεν μπορούν να παραχθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης είναι αποτέλεσμα δευτερογενούς μεταβολισμού και οι λειτουργίες τους ποικίλουν με χαρακτηριστικά παραδείγματα την προσέλκυση εντόμων για επικονίαση, την προστασία από επιβλαβείς οργανισμούς αλλά και διάφορες άλλες καταπονήσεις όπως από την υπεριώδη ακτινοβολία, την ξηρασία, τους παγετούς και άλλα πολλά. Επίσης από τις σημαντικές λειτουργίες είναι ο έλεγχος της αναπνοής, της φωτοσύνθεσης και η μεταφορά ενέργειας. Είναι οι ενώσεις εκείνες που προσδίδουν χρώμα στα άνθη και στους καρπούς των φυτών. Έχουν πολυφαινολική δομή και δημιουργούν αρκετές υποκατηγορίες ανάλογα με τις αλλαγές που γίνονται στον βασικό σκελετό ο οποίος αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα (C) όπου δύο αρωματικοί δακτύλιοι και ένας μη αρωματικός συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Τα συναντάμε με τη μορφή άγλυκου, Ο-γλυκοζίτη και αρκετά σπάνια C-γλυκοζίτη με συχνότερο σάκχαρο αυτό της γλυκόζης. Η βιολογική δράση και η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται από το σύνολο των υδροξυλίων που υπάρχουν αλλά και από την αντικατάσταση ή προσθήκη διάφορων λειτουργικών ομάδων στο μόριο. Ο λόγος που τα φλαβονοειδή έχουν από το παρελθόν βρεθεί στο μικροσκόπιο πολλών ερευνητών είναι λόγω των σημαντικών ιδιοτήτων και τις επιδράσεις που έχουν στην υγεία. Πάρα πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την ταυτοποίηση και την απομόνωση αυτών των φυσικών προϊόντων ώστε να μπορέσουν να χαρακτηριστούν και να ενσωματωθούν σε διάφορα φάρμακα, συμπληρώματα αλλά και καλλυντικά. Αυτό έγκειται στο γεγονός πως μπορούν και συμβάλουν σε διάφορα προβλήματα υγείας αφού είναι επιβεβαιωμένη η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση τους. Δυο μεγάλες κατηγορίες φλαβονοειδών, όπως προαναφέρθηκε, είναι φλαβονόλες και οι ανθοκυάνες. Οι δυο αυτές κατηγορίες αποτελούν βασικούς μεταβολίτες των κράνων. Οι φλαβονόλες αποτελούν φλαβονοειδή με μια ομάδα κετόνης στον C δακτύλιο. Είναι δομικά στοιχεία των προανθοκυανών με την μυρικετίνη την καμφερόλη και την κερκετίνη να είναι οι πιο διαδεδομένες. Τέλος, οι ανθοκυάνες είναι οι χρωστικές εκείνες στις οποίες οφείλονται τα χρώματα στα λουλούδια και στους καρπούς των φυτών. Το χρώμα της κάθε ανθοκυάνης εξαρτάται από το pH αλλά επίσης από τη μεθυλίωση ή την ακυλίωση των υδροξυλίων που βρίσκονται στον A και B δακτύλιο. Εμφανίζονται συνήθως στα εξωτερικά κυτταρικά τοιχώματα των καρπών.

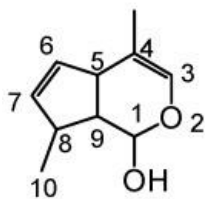
Ο βασικός σκελετός και ενδεικτικά κάποιες από τις κατηγορίες φλαβονοειδών παρουσιάζονται στην Εικόνα 7 . (Panche et al., 2016, Harborne et al., 1999).



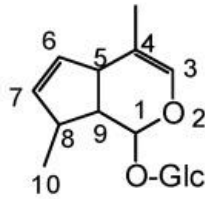
Εικόνα 7: Χημική δομή και οι βασικές κατηγορίες φλαβονοειδών (Panche et al., 2016)

Ιριδοειδή

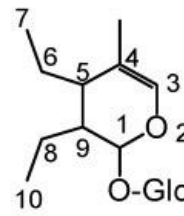
Τα ιριδοειδή είναι μια κατηγορία τερπενοειδών και πιο συγκεκριμένα μονοτερπενοειδή. Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες και συναντώνται σε ένα μεγάλο αριθμό φυτών. Η κύρια δομή τους χαρακτηρίζεται από έναν εξαμελή δακτύλιο με ένα άτομο οξυγόνου ενωμένο με ένα δακτύλιο κυκλοπεντανίου. Η δομή αυτή ουσιαστικά είναι απόρροια της ένωσης τερπενίων και αλκαλοειδών. Χωρίζονται σε 4 κύριες κατηγορίες, τους ιριδοειδής γλυκοσίδες, τα άγλυκα ιριδοειδή ή απλά ιριδοειδή, τα σεκοϊριδοειδή τα οποία επίσης είναι γλυκοζυλιωμένα και τα διμερή ιριδοειδή (δισ-ιριδοειδή). Συνηθέστερα συναντώνται ως γλυκοζίτες με το σάκχαρο τις πιο πολλές φορές να είναι μόριο γλυκόζης. Στους φυτικούς οργανισμούς η δράση τους είναι κατά κύριο λόγο αμυντική έναντι μολύνσεων από διάφορους μικροοργανισμούς και βακτήρια αλλά και φυτοφάγα ζώα. Ως προς τη δράση στον ανθρώπινο οργανισμό, έρευνες έχουν δείξει ότι τα ιριδοειδή διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα ιριδοειδών είναι το λογανικό οξύ, η λογανίνη, η ελευρωπαΐνη κ.α. Στην Εικόνα_ παρουσιάζονται οι χημικές δομές των τριών βασικών κατηγοριών ιριδοειδών. (Ludwiczuk et al., 2017)



Iridoid alcohol



Iridoid glycosides



Secoiridoids

Εικόνα 8: Χημική δομή των τριών βασικών κατηγοριών ιριδοειδών. (Wang et al., 2020, Ludwiczuk et al., 2017)

1.8 Φαρμακολογικές δράσεις και ιδιότητες καρπών Κρανιάς

1.8.1 Παραδοσιακή ιατρική

Διάφορα παράγωγα από μέρη κρανιάς (καρποί, άνθη, φύλλα κ.α.) έχουν χρησιμοποιηθεί εδώ και τουλάχιστον 1000 χρόνια για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών και προβλημάτων υγείας. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές για την παραδοσιακή ιατρική πολλών περιοχών όπως για παράδειγμα του Καυκάσου, της κεντρικής Ασίας, της Σλοβακίας και άλλων, φρέσκοι καρποί, αποξηραμένα φρούτα, φύλλα και έλαια χρησιμοποιούνταν ενδεικτικά για τη θεραπεία πονόλαιμου και τραυμάτων, έλκος στομάχου και πεπτικές διαταραχές, για ασθένειες του ήπατος και των νεφρών αλλά επίσης για τη θεραπεία της διάρροιας, του πυρετού για φλεγμονώδεις νόσους και άλλα πολλά. Όλα τα παραπάνω αποτέλεσαν κίνητρο για μελέτη και χρήση των παράγωγων κρανιάς σε διάφορα φάρμακα αλλά και παραφαρμακευτικά προϊόντα. (Dinda et al., 2016)

1.8.2 Φαρμακολογικές δράσεις

Οι χρήσεις των κράνων αλλά και των διάφορων παράγωγων κρανιάς στην παραδοσιακή ιατρική αποτέλεσαν λόγο για φαρμακολογικές μελέτες των εκχυλισμάτων αλλά και καθαρών απομονωμένων ενώσεων από αυτά. Αρκετές από τις έρευνες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία επιβεβαίωσαν τις παραπάνω χρήσεις αλλά πολλές είναι αυτές που δεν σχετίζονται με τις παραδοσιακές χρήσεις παρέχοντας προτάσεις για νέους τομείς εφαρμογής. *In vitro* αλλά και *in vivo* μελέτες έδειξαν πως εκχυλίσματα κράνων, φύλλων και άλλων παρουσίασαν αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, ηπατοπροστατευτική, αντιδιαβητική, κυτταροτοξική κ.α.

Αντιμικροβιακή δράση

Μελέτες *in vitro* έδειξαν πως εκχυλίσματα αλλά και έλαια από κράνα και φύλλα κρανιάς αποτελούν αποτελεσματικούς αντιμικροβιακούς και αντιμυκητιακούς παράγοντες έναντι μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών. Δόσεις εκχυλισμάτων παρουσίασαν σημαντική αντιβακτηριακή δράση έναντι του Gram-θετικού *Staphylococcus aureus*,

Gram-αρνητικού *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Αντιμυκητιακή δράση επίσης παρουσιάστηκε κατά των *Candida albicans* και *Aspergillus fumigates*. Συνολικά δράση υπήρξε έναντι 13 ειδών βακτηρίων και μυκήτων η οποία όμως επηρεαζόταν από τους διαλύτες και τον τρόπο παραλαβής των εκχυλισμάτων. Οι παραπάνω ιδιότητες θα μπορούσαν να είναι χρήσιμες στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. (Mamedov et al., 2004), Krzysciak et al., 2011)

Αντιφλεγμονώδη δράση

Διάφορα φλαβονοειδή που έχουν ταυτοποιηθεί σε εκχυλίσματα κράνων και πιο συγκεκριμένα φλαβονόλες όπως η κερκετίνη αλλά και ανθοκυάνες όπως η δελφινιδίνη, η κυανιδίνη και πελαργονιδίνη έχουν δείξει αντιφλεγμονώδη δράση. Ο τρόπος δράσης τους έγκειται στην ικανότητα να επηρεάζουν διάφορα ένζυμα που σχετίζονται με φλεγμονή όπως για παράδειγμα την κυκλοοξυγενάση I και II (*COX-I* και *-II*). (Seeram et al., 2002)

Αντιοξειδωτική δράση

Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν δείξει ότι τα κράνα έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ύπαρξη ασκορβικού οξέος, φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών όπως ανθοκυάνες, τα οποία έχουν την ικανότητα να αντιδρούν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον οργανισμό. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό βέβαια επηρεάζεται και διαμορφώνεται από πάρα πολλούς παράγοντες και αυτό διότι τα φυσικά αντιοξειδωτικά μπορούν να δρουν *in vivo* με διαφορετικούς μηχανισμούς. Παρ' όλα αυτά *in vitro* δοκιμές σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα. (Demir et al., 2003, Tural et al., 2008, Prior et al., 2005)

Ηπατοπροστατευτική δράση

Σύμφωνα με *in vivo* μελέτες, υδρομεθανολικά εκχυλίσματα κράνων πλούσια σε φλαβονοειδή όπως κερκετίνη και ανθοκυάνες, έδειξαν σημαντική ηπατοπροστατευτική δράση σε προκληθείσα ηπατοτοξικότητα από τετραχλωράνθρακα (*CCl₄*), με μείωση του οξειδωτικού στρες και των υψηλών επιπέδων *MDA* στο ήπαρ. Ταυτόχρονα οι δείκτες *AST* (Απαρτική αμινοτρανσφεράση), *ALT* (Αλανινική αμινοτρανσφεράση) και *ALP* (Αλκαλική φωσφατάση) βελτιώθηκαν εμφανώς. (Alavian et al., 2014)

Αντιδιαβητική / κατά της παχυσαρκίας δράση

In vivo μελέτες έχουν δείξει πως υδροαλκοολικά εκχυλίσματα κράνων παρουσίασαν αντιδιαβητική δράση με σημαντική μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα όπως επίσης και των επιπέδων της *LDL* χοληστερόλης (Low-Density Lipoprotein), των τριγλυκεριδίων (Triglycerides) καθώς και της *VLDL* (Very-Low-Density Lipoprotein) η οποία είναι υπεύθυνη για την μεταφορά των τριγλυκεριδίων από το ήπαρ στα υπόλοιπα

κύτταρα του σώματος. Αντίθετα αυξημένα παρατηρήθηκαν τα επίπεδα της HDL (High-Density Lipoprotein) χοληστερόλης.

Επίσης ανθοκυάνες και ουρσολικό οξύ που απομονώθηκαν από εκχύλισμα κράνων, έδειξαν σημαντική δράση κατά του διαβήτη και της παχυσαρκίας με μείωση του σωματικού βάρους και αύξηση του μεταβολισμού των λιπιδίων του αίματος και των επιπέδων ινσουλίνης. (Mirbadalzadeh et al., 2012, Rasoulia et al., 2012, Jayaprakasam et al., 2006)

1.9 Αντιοξειδωτική δράση και ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των φυσικών προϊόντων είναι η αντιοξειδωτική δράση που προσδίδουν στο φυτικό οργανισμό, είτε στα φύλλα, στους καρπούς και τα άνθη ή ακόμα και στις ρίζες. Κάθε τμήμα μπορεί να έχει από την πιο απλή μέχρι και την πιο σύνθετη σύνθεση ως προς το χημικό κομμάτι. Η πολυπλοκότητα αυτή αποτελεί το βασικό πρόβλημα στη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης καθώς δεν είναι δυνατή η απομόνωση και μελέτη για κάθε αντιοξειδωτικό ξεχωριστά. Επίσης λόγω του ότι πολλά αντιοξειδωτικά λειτουργούν συνεργατικά ασφαλέστερα συμπεράσματα θα προκύψουν με την μελέτη της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης.

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της δράσης μπορεί κάθε φορά να είναι διαφορετική ανάλογα με το υπό εξέταση δείγμα αλλά και τις υπάρχουσες ανάγκες. Η σωστή επιλογή της μεθόδου παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες λόγω της πληθώρας μεθόδων που υπάρχουν για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης *in vitro* αλλά επίσης λόγω και του ότι κάθε αντιοξειδωτικό αλληλοεπιδρά διαφορετικά με τις οξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην κάθε δοκιμή. Έτσι λοιπόν δεν υφίσταται ο ισχυρισμός ότι υπάρχει μια μόνο αποδεκτή μέθοδος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης.

Αρκετές είναι οι μέθοδοι που υπάρχουν για τον προσδιορισμό όμως καμία επίσημη. Λόγω της πολυπλοκότητας των συστημάτων για τα οποία προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα αλλά και της απουσίας επίσημης μεθόδου, είναι αναγκαίο ο προσδιορισμός να πραγματοποιείται από τουλάχιστον δυο μεθόδους. Παράγοντες όπως η μέθοδος προσδιορισμού, η χημική δομή και συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών αλλά και ο τρόπος και οι συνθήκες παραλαβής τους επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα που θα προκύψουν. Συνήθως, η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας γίνεται με την τιμή IC₅₀ (Inhibit Concentration) σύμφωνα με την οποία εκφράζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού ώστε να επιτευχθεί παρεμπόδιση στην οξείδωση του εκάστοτε υποστρώματος κατά 50%.

Η κατηγοριοποίηση των μεθόδων γίνεται ανάλογα με το μηχανισμό δράσης και επίσης ανάλογα με το μηχανισμό των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα. Διαχωρίζονται λοιπόν σε:

1. Μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays-ET) όπως η TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) και η DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

2. Μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (Hydrogenom Transfer based assays –HAT) όπως η ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Χαρακτηριστικό αποτέλεσμα των περισσότερων μεθόδων είναι η αλλαγή που προκύπτει στο χρώμα του διαλύματος της οξειδωτικής ένωσης η οποία είναι απόρροια της πρόσληψης ηλεκτρονίου από το αντιοξειδωτικό, με το βαθμό αλλαγής να είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης δημιουργείται καμπύλη της παρεμπόδισης συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Στην παρούσα εργασία οι δοκιμές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεταφοράς ηλεκτρονίου και πιο συγκεκριμένα η DPPH και ABTS.

1.9.1 Δοκιμή DPPH

Μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων είναι η DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Με τη δοκιμή αυτή μετράται η αντιοξειδωτική δράση που προκύπτει από το σύνολο των αντιοξειδωτικών που λειτουργούν συνεργατικά σε ένα δείγμα. Τα πιθανά αντιοξειδωτικά που εμπεριέχονται, αντιδρούν με το αντιδραστήριο DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζιλίου) με το αποτέλεσμα να προσδιορίζεται με χρήση φασματοφωτόμετρου και μέτρηση της απορρόφησης στα 515 nm μετά από επώαση σε συγκεκριμένες συνθήκες. Γενικότερα και σύμφωνα με την βιβλιογραφία τα πρωτόκολλα που υπάρχουν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης με τη δοκιμή DPPH είναι πολλά και προσαρμόζονται ανάλογα με τις ανάγκες και τις συνθήκες. Χρόνοι επώασης, διαλύτες και συνθήκες μπορεί κάθε φορά να είναι διαφορετικοί. Κατά κύριο λόγο οι πιο διαδεδομένοι και ευρέως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για τη δοκιμή αυτή είναι η μεθανόλη ενώ ακολουθεί η αιθανόλη με τον χρόνο επώασης να είναι τα 30 min. (Pavlor et al., 2002, Pyrzyńska et al., 2013).

Επίσης η φωτομέτρηση γίνεται στα 515 nm αλλά αναφορές υπάρχουν και για τα 517 nm. Κατά την ένωση της αντιοξειδωτικής ουσίας με το αντιδραστήριο DPPH, η ρίζα του DPPH το οποίο έχει μωβ χρώμα ανάγεται προσλαμβάνοντας ένα άτομο υδρογόνου και αποκτά χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Όσο πιο κίτρινο είναι το χρώμα τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό ελεύθερης ρίζας που έχει δεσμευτεί από τις αντιοξειδωτικές ουσίες του δείγματος. Η αντίδραση αυτή όπως και ο αποχρωματισμός παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9: Αντίδραση αποχρωματισμού DPPH

Για την εύρεση της παρεμποδιστικής δράσης ενός δείγματος έναντι του DPPH χρησιμοποιείται ο τύπος: $I (\%) = [(A_0 - A) / A_0] * 100$ όπου

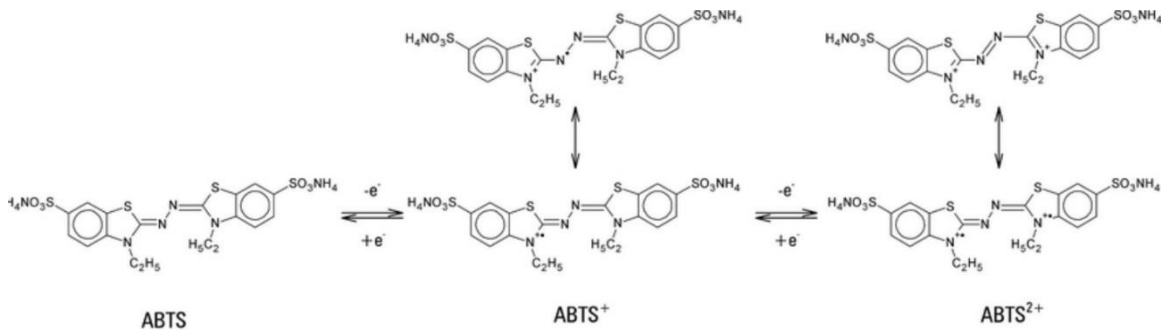
$I (\%)$ η % παρεμπόδιση της ρίζας του DPPH, A_0 η απορρόφηση του τυφλού (χωρίς δείγμα) και A η απορρόφηση του δείγματος.

Η αντιοξειδωτική ενεργότητα εκφράζεται με το προσδιορισμό του IC_{50} όπου όσο πιο χαμηλή είναι η τιμή αυτή τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκάστοτε δείγματος. Κυριότερο πλεονέκτημα της δοκιμής DPPH είναι ο απαιτούμενος χρόνος και το χαμηλό κόστος αλλά κύριο μειονέκτημα είναι η ταχύτητα με την οποία θα αντιδράσει το DPPH με τα αντιοξειδωτικά η οποία εξαρτάται από το πλήθος των υδροξυλίων που υπάρχουν στα μόρια της κάθε ένωσης. (Brand-Williams et al., 1995)

1.9.2 Δοκιμή ABTS

Η δοκιμή ABTS αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα μεθόδου που βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays-ET). Κύριο πλεονέκτημα της δοκιμής είναι η δυνατότητα εφαρμογής σε ενώσεις με αντιοξειδωτικό χαρακτήρα λιπόφιλο αλλά και υδρόφιλο. Στην περίπτωση αυτή η ρίζα $ABTS^{\cdot+}$ παράγεται από την οξείδωση του $ABTS^{2-}$ 2,2'-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) με υπερθειικά ιόντα $S_2O_8^{2-}$.

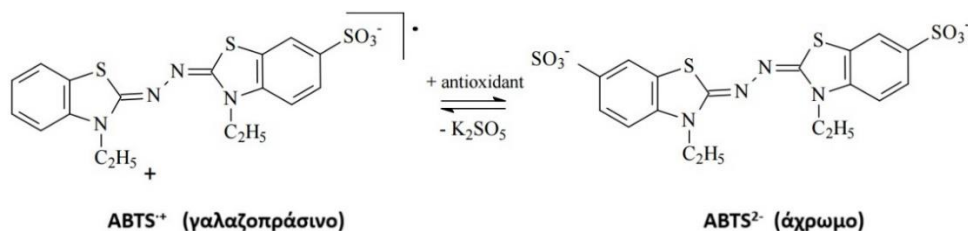
Η σταθεροποίηση της ρίζας $ABTS^{\cdot+}$ επιτυγχάνεται μέσω των δομών συντονισμού και οφείλεται στην εκτεταμένη συζυγία που παρουσιάζει (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Σταθεροποίηση της ρίζας $ABTS^{\cdot+}$ μέσω των δομών συντονισμού. (Zucca et al., 2015)

Το διάλυμα με το κατιόν $ABTS^{\cdot+}$ έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα και παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 415 nm, 645 nm, 734 nm και 815 nm. Κατά κύριο λόγο όμως το μέγιστο μήκος κύματος στο οποίο παρακολουθείται η αντίδραση της ρίζας, είναι στα 734 nm. (Cano et al, 2000).

Η δοκιμή βασίζεται στο γεγονός ότι το έγχρωμο γαλαζοπράσινο διάλυμα $ABTS^{\cdot+}$, μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικών, σταδιακά αποχρωματίζεται, με τον αποχρωματισμό να είναι ανάλογος της συγκέντρωσης, της αντιοξειδωτικής ικανότητας αλλά και του χρόνου αντίδρασης των αντιοξειδωτικών που εμπεριέχονται στο υπό εξέταση δείγμα (Εικόνα 11). (Grieve et al., 1998)



Εικόνα 11: Διαδικασία αποχρωματισμού ABTS⁺

Η παρεμποδιστική δράση $I(\%)$ έναντι της ρίζας $ABTS^+$ υπολογίζεται και σε αυτή την περίπτωση με τον τύπο $I(\%) = [(A_0 - A) / A_0] * 100$ όπου

$I(\%)$ η % παρεμπόδιση της ρίζας, A_0 η απορρόφηση του τυφλού (χωρίς δείγμα) και A η απορρόφηση του δείγματος, όπως επίσης και με τη χρήση της IC_{50} .

1.9.3 Μέθοδος Folin Ciocalteu

Η *Folin Ciocalteu* αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε ένα δείγμα. Είναι μια φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού χωρίς διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών αλλά και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Κύριο αντιδραστήριο της δοκιμής είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Για την εκτέλεση της μεθόδου απαιτείται αλκαλικό περιβάλλον το οποίο επιτυγχάνεται με προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3), όπου οι φαινολικές ενώσεις του υπό εξέταση δείγματος οξειδώνονται από το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu ενώ παράλληλα το αντιδραστήριο (ετεροπολυμερή οξέα) ανάγεται προς μίγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το αποτέλεσμα αυτού είναι ένα κυανό χρώμα που παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και είναι ανάλογο με την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Το αποτέλεσμα των φαινολικών ενώσεων που προσδιορίζονται με τη μέθοδο Folin Ciocalteu εκφράζονται συνήθως σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος. Ένα βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι εκτός των φαινολικών ενώσεων, οξειδώνονται και τα σάκχαρα ειδικά όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις.

1.10 Χρωματογραφικές και Φασματοσκοπικές τεχνικές

1.10.1 Χρωματογραφικές τεχνικές

Η χρωματογραφία αποτελεί τεχνική της αναλυτικής χημείας για τον διαχωρισμό και την απομόνωση διαφόρων συστατικών, ανόργανων και οργανικών ενός δείγματος μέσω της αλληλεπίδρασης τους ανάμεσα σε δύο φάσεις. Η μία φάση είναι ακινητοποιημένη μέσα σε μία στήλη ή πάνω σε μία πλάκα και ονομάζεται στατική φάση, ενώ η άλλη με τη μορφή ρευστού (υγρό ή αέριο) κινείται σε μία συγκεκριμένη κατεύθυνση αποτελώντας την κινητή φάση. Μικρές διαφορές στη αλληλεπίδραση των διαφόρων συστατικών με την στατική και την κινητή φάση οδηγούν σε διαφορές στην συγκράτηση τους στην στατική

φάση. Συνεπώς, κινούνται κατά μήκος της στατικής φάσης με διαφορετικές ταχύτητες και έτσι επιτυγχάνεται διαχωρισμός. Βασική αρχή της χρωματογραφίας είναι πως ουσίες που κατανέμονται περισσότερο στην κινητή φάση διαχωρίζονται διαδοχικά από άλλες που η κατανομή τους γίνεται περισσότερο στη στατική φάση. Διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα η πολικότητα, το μέγεθος των μορίων αλλά και το σημείο ζέσεως, είναι αυτές που κρίνουν και πετυχαίνουν το διαχωρισμό των ουσιών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα κλασικής χρωματογραφίας είναι αυτή της Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography) και αντίστοιχα ενόργανης της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης και της Αέριας Χρωματογραφίας. Να σημειωθεί πως η χρωματογραφία αποτελεί τεχνική διαχωρισμού και απομόνωσης αλλά όχι ταυτοποίησης ουσιών. Η ταυτοποίηση επιτυγχάνεται με φασματοσκοπικές τεχνικές όπως η φασματοσκοπία Υπεριώδους Ορατού (UV-Vis) αλλά και με φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry) σε συνδυασμό πάντα με τη χρωματογραφία.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης – HPLC

Μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές ενόργανης χρωματογραφίας είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*). Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση πολύπλοκων και πολυσύνθετων δειγμάτων λόγω της μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας που έχει. Αρχικά το δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί, διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη και έπειτα εισέρχεται μέσω ένεσης (*injection*), είτε χειροκίνητα είτε μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, στην στήλη (*column*) η οποία βρίσκεται σε συγκεκριμένες συνθήκες. Στη συνέχεια μεταφέρεται κατά μήκος αυτής με τη βοήθεια της κινητής φάσης (*mobile phase*) και με συνεχή ροή. Η κινητή φάση όπως και το προσροφητικό υλικό της στήλης (*στατική φάση – stationary phase*) θα πρέπει να είναι σωστά επιλεγμένα για να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός μέσω των αλληλεπιδράσεων. Ο βαθμός αλληλεπίδρασης συντελεί στο διαχωρισμό των διαφόρων συστατικών του υπό εξέταση δείγματος, με αυτά να εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους (*Rt*) από την στήλη. Μεγάλη αλληλεπίδραση συνεπάγεται ισχυρότερη κατακράτηση και μικρή ταχύτητα κίνησης οπότε και μεγάλος χρόνος εξόδου από τη στήλη. Ο όρος υψηλή απόδοση οφείλεται στο γεγονός ότι η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης, όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου συνεπώς μεγάλης αντιστάσεως, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης. Υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ο ανοξείδωτος χάλυβας με το πάχος των τοιχωμάτων να κυμαίνονται από 2 έως 3 mm. Το μήκος ανάλογα τις απαιτήσεις ξεκινάει από τα 10 cm και μπορεί να φτάσει τα 100 cm με τη διάμετρο να κυμαίνεται από 2 mm έως 10 mm. Όσον αφορά το υλικό πλήρωσης η διάμετρος των σωματιδίων, ξεκινάει από 3 μm, φτάνοντας έως και τα 10 μm.

Πολλές φορές, την HPLC ακολουθεί σε συνδεσμολογία, ένα μέσο ταυτοποίησης των ενώσεων που έχουν διαχωριστεί. Αυτό το μέσο μπορεί να είναι, είτε η φασματομετρία μαζών (*Mass Spectrometry*) είτε ένας ανιχνευτής και πιο συγκεκριμένα ένα φωτόμετρο UV-Vis. Στην δεύτερη περίπτωση είναι δυνατόν ο ανιχνευτής να είναι είτε σταθερού

μήκους κύματος, είτε πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος, είτε κυρίως μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (*Diode Array Detector – DAD*).

LC – Q-TOF – HRMS

Στην περίπτωση που η υγρή χρωματογραφία συνδυάζεται με φασματομετρία μαζών, προκύπτουν σαφή αποτελέσματα ως προς την ταυτοποίηση περίπλοκων συστατικών ενός δείγματος. Η φασματομετρία μάζας (*Mass Spectrometry*), η οποία αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές αναλυτικής χημείας, εφαρμόζεται ευρέως σε πολλούς κλάδους όπως στη φαρμακευτική βιομηχανία, τη βιολογία και γενικότερα στην έρευνα όπου η ταυτοποίηση των ουσιών είναι άκρως σημαντική. Τα μόρια έχοντας διαχωριστεί μέσω της χρωματογραφίας, μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και ακολουθεί διαχωρισμός ανάλογα με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Ο τρόπος ιοντισμού είναι πολύ σημαντικός καθώς για την ίδια ουσία μπορεί να προκύψει φάσμα εντελώς διαφορετικό ανάλογα με τις συνθήκες και την τεχνική που θα εφαρμοστεί.

Ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους ιοντισμού είναι ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (*Electrospray Ionization – ESI*). Σε αυτή την περίπτωση, στη βελόνα ιοντισμού εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό της τάξης των 3-4 kV, με αποτέλεσμα το σχηματισμό σταγονιδίων με ηλεκτρικά φορτία στην επιφάνειά τους. Αυξάνοντας την πυκνότητα του φορτίου σε κρίσιμα σημεία, οι σταγόνες διαιρούνται σε μικρότερες έως ότου δημιουργηθούν μικροσκοπικά σταγονίδια (αερόλυμα). Υπάρχουν δύο τρόποι ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, σε θετική λειτουργία (*positive mode*) και σε αρνητική (*negative mode*) και εφαρμόζονται ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες.

Ακολουθεί είσοδος στον τετραπολικό αναλυτή μαζών (*Quadrupole*) για περαιτέρω βελτίωση της ανάλυσης. Η βελτίωση αυτή οφείλεται στο γεγονός πως το τετράπολο λειτουργεί ανάλογα με οπτικά φίλτρα, το οποίο σημαίνει πως μόνο ιόντα συγκεκριμένης τιμής μάζας προς φορτίο (m/z) επιτρέπεται να περάσουν και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Τα δυναμικά των ρευμάτων σάρωσης (εναλλασσόμενο και συνεχές) των τεσσάρων πόλων αυξάνονται επηρεάζοντας έτσι την κίνηση των ιόντων. Τα υπόλοιπα ιόντα που δεν φτάνουν στο ανιχνευτή απορρίπτονται.

Τα επιλεγμένα σωματίδια – ιόντα, εισέρχονται στον αναλυτή «χρόνου πτήσης» (*Time of Flight – ToF*) όπου αρχικά επιταχύνονται μέσω ενός ηλεκτρικού πεδίου και στην συνέχεια διασχίζουν ένα σωλήνα πτήσης απαλλαγμένο από πεδία. Λόγω του ότι τα ιόντα εισερχόμενα στο θάλαμο, έχουν όλα την ίδια κινητική ενέργεια, ο χρόνος που χρειάζεται για να φτάσουν στον ανιχνευτή, συνεπώς και η ταχύτητά τους είναι αντιστρόφως ανάλογα με τη μάζα τους. Τα ελαφρύτερα σωματίδια φτάνουν στο ανιχνευτή πιο γρήγορα, ενώ τα μεγαλύτερης μάζας χρειάζονται περισσότερο χρόνο. Ο συνδυασμός των πληροφοριών αυτών συντελεί στον ακριβή προσδιορισμό της ακριβούς μάζας κάθε ιόντος.

Τέλος το φασματομέτρο μάζας καταγράφει, μέσω των παραπάνω πληροφοριών, τις ακριβείς μάζες των ιόντων δημιουργώντας φάσματα μαζών της έντασης συναρτήσεως του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z), παρέχοντας έτσι σημαντικές πληροφορίες για τις ενώσεις του δείγματος. (Ashcroft, 1997)

1.10.2 Φασματοσκοπικές τεχνικές

Η φασματοσκοπία αποτελεί μια ακόμα τεχνική για τη μελέτη και τον χαρακτηρισμό χημικών συστατικών και ενώσεων σε ένα δείγμα. Χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλούς κλάδους όπως η φαρμακολογία, η βιολογία και η χημεία. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης, απορρόφηση και εκπομπή, με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και την παραγωγή φασμάτων, στα οποία φάσματα βάση των συχνοτήτων και των μηκών κύματος είναι δυνατόν να αναγνωριστούν ουσίες και ενώσεις. Υπάρχουν δυο κύρια είδη φασματοσκοπίας που είναι διαδεδομένα, η ατομική και η μοριακή με βασικά παραδείγματα αυτά της ατομικής εκπομπής και απορρόφησης όσον αφορά την ατομική και της φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) και του υπερύθρου (IR) αντίστοιχα για την μοριακή. Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης (A) και της ισχύος της ακτινοβολίας και σαν αποτέλεσμα είναι το φάσμα όπου απεικονίζεται η απορρόφηση συναρτήσει τους μήκους κύματος. Στην περίπτωση των οργανικών ενώσεων, με έκθεση σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, γίνεται απορρόφηση ενέργειας σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα ακτινοβολώντας ένα δείγμα με ενέργεια πολλών και διαφορετικών μηκών κύματος να προσδιοριστεί το φάσμα απορρόφησης και κατ' επέκταση μια ένωση ή ουσία.

Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV – Vis)

Η φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (*Ultra Violet – Visible*) αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές μοριακής φασματοσκοπίας για ανάλυση και προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων. Βασίζεται στο γεγονός πως τα ηλεκτρόνια σθένους των στοιχείων διαφόρων μορίων και ενώσεων, κατά την επίδραση της αντίστοιχης ακτινοβολίας, απορροφούν ενέργεια και διεγείρονται από την αρχική τους κατάσταση σε αντιδεσμική υψηλότερης ενέργειας. Στη συνέχεια τα άτομα και τα μόρια επιστρέφουν στην βασική τους κατάσταση, αποβάλλοντας την ποσότητα ενέργειας που είχαν απορροφήσει. Σύμφωνα λοιπόν με την απορρόφηση της ακτινοβολίας και σε συνάρτηση με το μήκος κύματος ή της συχνότητας προκύπτει το φάσμα απορρόφησης το οποίο είναι γραμμικό στην περίπτωση των ατόμων και ταινία στα μόρια. Πηγή ακτινοβολίας είναι μια λάμπα βολφραμίου για την ορατή περιοχή (700 – 400 nm) και λάμπα δευτερίου για την περιοχή του υπεριώδους (400 – 190 nm). Στην περιοχή του υπεριώδους διακρίνονται δυο περιοχές, το εγγύς υπεριώδες (400 – 190 nm) και το άπω υπεριώδες (190 – 100 nm) με την οργανολογία όμως να περιορίζεται στο εγγύς λόγω μη δυνατότητας μέτρησης σε περιοχές κάτω των 190 nm. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την φασματοσκοπία UV-Vis βασίζονται στο νόμο *Beer – Lambert* σύμφωνα με τον οποίο η απορρόφηση της ακτινοβολίας εξαρτάται άμεσα από την ποσότητα της ουσίας από την οποία έγινε η απορρόφηση.

Να σημειωθεί πως το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ακτινοβολίας ονομάζεται χρωμοφόρο. Το μήκος κύματος όπου παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης ονομάζεται μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (λ_{\max}). Κάθε ουσία έχει χαρακτηριστικό μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, πράγμα που είναι χρήσιμο για τον χαρακτηρισμό. Τέλος υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που

επιδρούν στα φάσματα απορρόφησης όπως για παράδειγμα ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε (πολικός, μη πολικός), το pH και άλλοι.

Σκοπός της μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι ο ποιοτικός προσδιορισμός και η μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα καρπών κρνιαίας (*Cornus mas L.*) Ελληνικής καλλιέργειας με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας (Liquid Chromatography).

Αρχικά, αφού έγινε συγκομιδή των καρπών κρνιαίας, από επιβεβαιωμένη καλλιέργεια στην περιοχή της Φλώρινας το μήνα Αύγουστο, και σε πλήρη ωρίμανση, ακολούθησε αποθήκευση σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης. Έπειτα έγινε καθαρισμός της σάρκας από τους πυρήνες και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους. Το εκχύλισμα αφού συμπυκνώθηκε για την απομάκρυνση του διαλύτη, λυοφιλιώθηκε και αποθηκεύτηκε για την πραγματοποίηση των αναλύσεων.

Προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο *Folin Ciocalteu* και εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα με τις δοκιμές *DPPH* και *ABTS*. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ποιοτική μελέτη της σύστασης του εκχυλίσματος με χρήση της φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού (*UV-Vis*). Με την Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με τετραπλό αναλυτή χρόνου πτήσης και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (*LC-QToF-HRMS*) ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις για κάθε ένα από τα δείγματα. Τέλος, με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (*HPLC-DAD*) διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκε η παρουσία ανθοκυανών.

Η μελέτη επικεντρώθηκε στην παραλαβή και την ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών με χρήση της υγρής χρωματογραφίας καθώς οι πληροφορίες για καρπούς Ελληνικής καλλιέργειας είναι περιορισμένες. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στα φλαβονοειδή και τα ιριδοειδή στα οποία έχει αποδοθεί πλήθος δράσεων και βιολογικών ιδιοτήτων.

Συμπερασματικά η παρούσα έρευνα έχει σκοπό να συμβάλει στην μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών των καρπών κρνιαίας και την ανάδειξη τους ως μια σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών αλλά και άλλων ουσιών χρήσιμων για την υγεία.

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος

2.1 Υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Προμήθεια φυτικού υλικού

Τα δείγματα καρπών *Cornus mas* L. που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη ανήκουν στην οικογένεια *Cornaceae* και στο γένος *Cornus* L. Προμητεύτηκαν από το Κτήμα Ηώς του κυρίου Σταύρου Μαρουφίδη, παραγωγό και ιδιοκτήτη του κτήματος. Το αγρόκτημα βρίσκεται στο νομό Φλώρινας και πιο συγκεκριμένα στα Βαλτόνερα Φλώρινας του δήμου Αμυνταίου με γεωγραφικές συντεταγμένες 40,6356508 (40ο38'07''N) ως προς το γεωγραφικό πλάτος και 21,573636 (21ο34'25''E) για το γεωγραφικό μήκος αντίστοιχα. Το υψόμετρο της τοποθεσίας ανέρχεται στα 599 m.

Η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε το μήνα Αύγουστο του 2022 με τους καρπούς να βρισκόντουσαν σε πλήρη ωρίμανση. Μετά τη διαδικασία συγκομιδής οι καρποί τοποθετήθηκαν απευθείας σε ψυγείο μεταφοράς και σε ξηρό πάγο για τη μεταφορά τους από το κτήμα. Έπειτα αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη και σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-20 °C). Τα δείγματα στο σύνολο τους ήταν 2 και προερχόντουσαν από δυο διαφορετικές ποικιλίες οι οποίες διαφοροποιούνταν ως προς το σχήμα του καρπού αλλά και ως προς κάποια χαρακτηριστικά του δέντρου. Δείγματα από αποξηραμένα κλαδιά, φύλλα αλλά και φωτογραφίες των δέντρων στάλθηκαν στο Εργαστήριο Συστηματικής Βοτανικής και τον καθηγητή κύριο Παναγιώτη Τρίγκα για καταγραφή και ταξινόμηση των δύο φυτών. Τα δείγματα καταγράφηκαν ως *Cornus mas* 1 με voucher code No 012289 και *Cornus mas* 2 με αντίστοιχο voucher code No 012290.



Εικόνα 12: Κρανιά (*Cornus mas* L.) από το Κτήμα Ηώς.

2.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Από τους καρπούς και ενώ ήταν κατεψυγμένοι αφαιρέθηκαν οι πυρήνες (κουκούτσια) αλλά και διάφορα άλλα περιττά φυτικά υλικά όπως φύλλα και μίσχοι. Ο διαχωρισμός έγινε με μεγάλη προσοχή για την όσο λιγότερη καταπόνηση της σάρκας με όλες τις απαραίτητες συνθήκες υγιεινής. Στη συνέχεια τα δυο δείγματα καρπών, Cornelian cherry 1 και Cornelian cherry 2 τοποθετήθηκαν στις φιάλες λυοφιλίωσης και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες. Έπειτα τα δείγματα λυοφιλώθηκαν στη συσκευή λυοφιλίωσης του εργαστηρίου Γενικής Χημείας, Virtis 25 EL Freemobile για 72 ώρες.



Εικόνα 13: Συσκευή λυοφιλίωσης.



Εικόνα 14: Σάρκα κράνων έπειτα από λυοφιλίωση.

Ποσότητα λυοφιλωμένων καρπών κονιορτοποιήθηκε σε γουδί πορσελάνης από την οποία ζυγίστηκαν 5 g για την παραλαβή εκχυλίσματος για κάθε ένα από τα δυο δείγματα. Κάθε ποσότητα τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη όπου προστέθηκε διάλυμα μεθανόλης – νερού (MeOH – H₂O) σε αναλογία 80:20. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων. Η θερμοκρασία του απιονισμένου νερού στο λουτρό ρυθμίστηκε στους 25°C και η διάρκεια εκχύλισης ήταν 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών ακολούθησε διήθηση με χρήση χαάνης Buchner. Ακολούθησε συλλογή του ιζήματος και επανάληψη της εκχύλισης με τις ίδιες συνθήκες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές. Το τελικό εκχύλισμα προέκυψε από την ένωση των τριών εκχυλισμάτων.

Στη συνέχεια κάθε ένα από τα τελικά εκχυλίσματα για κάθε δείγμα, συμπυκνώθηκε υπό κενό στους 40°C με χρήση περιστρεφόμενου συμπυκνωτή (Rotary evaporator). Τα εκχυλίσματα, έχοντας απομακρύνει την μεθανόλη, τοποθετήθηκαν εκ νέου σε φιάλες λυοφιλίωσης και καταψύχθηκαν για 48 ώρες. Ακολούθησε λυοφιλίωση για 72 ώρες. Τα τελικά προϊόντα, σε στερεή πλέον μορφή αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη από τα οποία κάθε φορά ζυγίζοταν η επιθυμητή ποσότητα για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας.



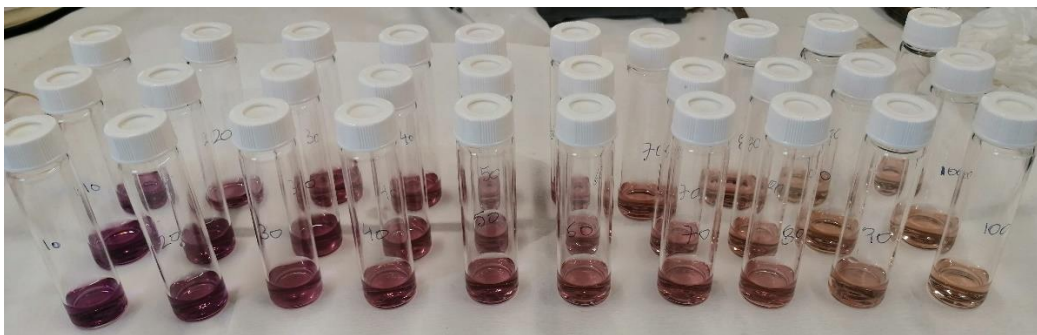
Εικόνα 15: Συμπύκνωση εκχυλίσματος με χρήση περιστρεφόμενου συμπυκνωτή.

2.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Στα δυο δείγματα εκχυλίσματος καρπών κρνιας μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων συγκεντρώσεων με τις δοκιμές DPPH και ABTS. Οι μέθοδοι τροποποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να εξυπηρετούν τις ανάγκες της παρούσας μελέτης.

2.2.1 Δοκιμή DPPH

Το 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζίλιο (DPPH) είναι μια σταθερή ρίζα που διατίθεται στο εμπόριο. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος καρπών κρανιάς, παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH, ζυγίζοντας 4 mg από το εμπορικό σκεύασμα DPPH, τα οποία διαλύθηκαν σε μεθανόλη έως τον τελικό όγκο των 100 mL με τη βοήθεια του λουτρού υπερήχων. Έπειτα κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με παρασκευή πρότυπων μεθανολικών διαλυμάτων συγκεντρώσεων Trolox 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 και 1,2 mg/mL. Στην συνέχεια, ποσότητα 30 μL από κάθε εκχύλισμα και σε διάφορες συγκεντρώσεις, αναμίχθηκαν με 3 mL διαλύματος DPPH. Τα διαλύματα αναδεύτηκαν για κάποια δευτερόλεπτα με χρήση συσκευής Vortex και αφέθηκαν για επώαση σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα. Τέλος ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης όλων των δειγμάτων με φωτόμετρο και σε μήκος κύματος 515 nm. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα όπου χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη αντί δείγματος. Για τα τελικά αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Λόγω των αντιοξειδωτικών που εμπεριέχονται στα εκχυλίσματα προκαλείται αποχρωματισμός τους διαλύματος DPPH. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως η απαραίτητη ποσότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών που απαιτείται για να προκληθεί παρεμπόδιση στην οξείδωση κατά 50% (IC_{50}). Για τον υπολογισμό της επί τοις εκατό παρεμπόδισης, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος: $I(\%) = (A_c - A_s / A_c) * 100$, όπου A_c είναι η απορρόφηση του μάρτυρα και A_s η απορρόφηση του κάθε δείγματος.



Εικόνα 16: Δοκιμή DPPH σε εκχύλισμα καρπών *Cornus mas*.

2.2.2 Δοκιμή ABTS

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υπό εξέταση εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε επίσης η δοκιμή $ABTS^{+}$. Το αντιδραστήριο $ABTS^{+}$ (2,2'-αζινο-δις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο 6 -σουλφονικό οξύ) διατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή αμμωνιακού άλατος. Για την δοκιμή, παρασκευάστηκε διάλυμα αμμωνιακού άλατος 7 mM, ζυγίζοντας 38,4 mg ABTS και διαλύοντάς τα σε 10 mL απιονισμένο νερό. Η παρασκευή της ρίζας πραγματοποιήθηκε με την αντίδραση 7 mM αμμωνιακού άλατος ABTS με 2,45 mM (6,6 mg) υπερθειϊκού καλίου ($K_2S_2O_8$). Το διάλυμα που παραλήφθηκε ήταν διαυγές. Η διαδικασία οξείδωσης του ABTS ξεκινάει άμεσα αλλά η σταθεροποίηση

της επιτυγχάνεται μετά από 12 ώρες. Έτσι το διάλυμα παρέμεινε για 16 με 18 ώρες στο σκοτάδι ώστε και προέκυψε ένα βαθύ κυανό χρώμα. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε κατάλληλη αραιώση του πυκνού διαλύματος, ώστε η απορρόφηση στα 734 nm να είναι στις 0,700 μονάδες με μια απόκλιση της κλίμακας των $\pm 0,005$. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη. Έπειτα 30 μL διαφόρων συγκεντρώσεων από τα εκχυλίσματα και 3 mL από το διάλυμα της ρίζας, αναμείχθηκαν σε vials με την χρήση συσκευής vortex και τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου προς επώαση για 6 min. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη αντί του δείγματος. Και σε αυτή την περίπτωση, η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε με τον προσδιορισμό της παρεμπόδισης στην οξειδωση κατά 50% (IC_{50}) όπως επίσης και συγκριτικά με το ισχυρό αντιοξειδωτικό Trolox για το οποίο κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με παρασκευή πρότυπων μεθανολικών διαλυμάτων συγκεντρώσεων 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1,0 mg/mL. Τα αντιοξειδωτικά των εκχυλισμάτων αντιδρούν με τη ρίζα ABTS⁺ και ως αποτέλεσμα έχουμε τον αποχρωματισμό του διαλύματος. Ομοίως με την δοκιμή DPPH υπολογίστηκε και σε αυτή την περίπτωση η παρεμπόδιση I(%).

2.3 Ολικά φαινολικά συστατικά – Μέθοδος Folin Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό του περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin Ciocalteu. Χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο Folin Ciocalteu το οποίο διατίθεται στο εμπόριο. Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 20% w/v ώστε να δημιουργηθεί αλκαλικό περιβάλλον κατά την αντίδραση των δειγμάτων με το αντιδραστήριο. Έπειτα σε vials τοποθετήθηκαν 1,5 mL απιονισμένου νερού, 25 μL δείγματος και 125 μL αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu. Μετά από 3 min προστέθηκαν 375 μL Na_2CO_3 και 475 μL απιονισμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση με χρήση συσκευής Vortex και στη συνέχεια επώαση 2 ωρών σε σκοτεινό περιβάλλον, σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 725 nm και για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Για τον μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε τυφλό διάλυμα στο οποίο αντί εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό στην ίδια ποσότητα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για το πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τις συγκεντρώσεις να είναι 100, 300, 500, 700 και 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα αυτού. Η ύπαρξη φαινολικών συστατικών αντικατοπτρίζεται στον αποχρωματισμό του διαλύματος Folin Ciocalteu και το συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά εκφράζεται σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού υλικού.

2.4 Ανάλυση δειγμάτων με Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV – Vis)

Τα εκχυλίσματα από τους καρπούς κρανιάς αναλύθηκαν, σε πρώτη φάση, με τη φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV – Vis). Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-Vis της εταιρίας Agilent Technologies και πιο συγκεκριμένα το

μοντέλο Cary 60 UV-Vis. Το φωτόμετρο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και το λογισμικό CaryWinUV για την λήψη και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν χαλαζία.

Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας και για τα δυο δείγματα καρπών και ακολούθησε αραίωση ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,3 mg/mL. Το όργανο μηδενίστηκε με χρήση blank διαλύματος που περιείχε μόνο το διαλύτη δηλαδή το σύστημα μεθανόλης – νερού (MeOH – H₂O) σε αναλογία 80:20, οξινισμένο με 0,1% τριφθοραιθανικό οξύ (trifluoroethanoic acid, TFA). Ακολούθησε καταγραφή των φασμάτων UV – Vis με εύρος από 800 έως 200 nm. Η ανάλυση με χρήση της φασματοσκοπίας UV – Vis είχε σκοπό την καθοδήγηση ως προς το είδος των ενώσεων, που έχουν βιβλιογραφικά ταυτοποιηθεί, για τις μετέπειτα αναλύσεις με τις χρωματογραφικές τεχνικές.



Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού διπλής δέσμης (UV – Vis).

2.5 Ανάλυση δειγμάτων με LC – Q-ToF – HRMS

Για την βαθύτερη ανάλυση των εκχυλισμάτων, για τον διαχωρισμό αλλά και την ταυτοποίηση των περιεχόμενων ουσιών, εφαρμόστηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με αναλυτή χρόνου πτήσης και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με το σύστημα 6530 Agilent Accurate-Mass συζευγμένο με αναλυτή τετραπόλου - χρόνου πτήσης (Quadrupole - Time Of Flight) και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και το λογισμικό Agilent MassHunter Data Acquisition για την λήψη των χρωματογραφημάτων και των μαζών και το Agilent MassHunter Qualitative Analysis για την επεξεργασία των δεδομένων.

Για την ανάλυση, παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα και για τα δυο δείγματα καρπών, με την τελική συγκέντρωση να είναι 10 mg/mL, με σύστημα διαλυτών ακετονιτριλίου –

νερού σε αναλογία 80:20, οξινισμένα με 0,1% τριφθοραιθανικό οξύ. Η στήλη ήταν Macherey-Nagel Nucleoshell Bluebird RP18 (αντίστροφης φάσης) με μήκος 100 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και πορώδες 2,7 μm . Εφαρμόστηκε θετικός και αρνητικός ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και για τα δυο δείγματα.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντεστραμμένης φάσης όπου για την κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών:

A: Απιονισμένο νερό (υπερκάθαρο) οξινισμένο με 0,1% μυρμηκικό οξύ

B: Ακετονιτρίλιο (LC-MS) οξινισμένο επίσης με 0,1% μυρμηκικό οξύ.

Εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για καλύτερο διαχωρισμό, όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2)

Πίνακας 2: Πρόγραμμα έκλουσης δειγμάτων LC – Q-ToF – HRMS.

t (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)
0	95	5
1	95	5
37	75	25
42	0	100
47	0	100
50	95	5
60	95	5

Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη στο 1,0 mL/min και η στήλη ρυθμίστηκε σε θερμοκρασία 25 °C. Η είσοδος του δείγματος στο σύστημα LC πραγματοποιήθηκε με αυτόματο δειγματολήπτη και ο όγκος της ένεσης ήταν 10 μL . Η θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού ήταν 350°C, η ροή αέριου (αζώτου) αποδιαλύτωσης ήταν 11 L/min, η πίεση αερίου εκνεφωτή ήταν 50 psi, το δυναμικό περιοχής εκνέφωσης 4000V. Τέλος, το εύρος ανιχνευόμενων μαζών (m/z) ορίστηκε μεταξύ 50 και 1700 και για τα δυο είδη ιοντισμού. Η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε βάση βιβλιογραφίας σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης t_R (retention time) όπως επίσης και από τα μοριακά ιόντα (m/z).



Εικόνα 18: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (LC – Q-ToF – HRMS).

2.6 Ανάλυση δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για την ανάλυση των εκχυλισμάτων και τον ποιοτικό προσδιορισμό των ανθοκυανών στα κράνα, χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Πιο συγκεκριμένα η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με το σύστημα 1100 Agilent HPLC εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis (Diode Array Detector, DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και το λογισμικό HP Chemstation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Για την ανάλυση, τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν και για τα δυο δείγματα καρπών, ήταν 10 mg/mL, με σύστημα διαλυτών ακετονιτριλίου – νερού (MeCN – H₂O) σε αναλογία 80:20, οξινοσμένα με 0,1% τριφθοραιθανικό οξύ (TFA). Και τα δύο εκχυλίσματα πριν την εισαγωγή στη στήλη διηθήθηκαν με φίλτρα πορώδους.

Για την πειραματική διαδικασία έγινε χρήση στήλης αντίστροφης φάσης Macherey-Nagel Nucleoshell Bluebird RP18 με μήκος 100 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και πορώδες 2,7 μm. Για την κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών:

A: Απιονισμένο νερό (H₂O) HPLC οξινοσμένο με 0,1% μυρμηκικό οξύ (formic acid)

B: Ακετονιτρίλιο (MeCN) HPLC οξινοσμένο επίσης με 0,1% μυρμηκικό οξύ.

Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη στο 1,0 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ήταν αυτή του περιβάλλοντος (24 °C). Τα δείγματα εισήχθησαν στο όργανο χειροκίνητα με χρήση ειδικής σύριγγας και ο όγκος της ένεσης ήταν 10 μL. Επίσης, ο ανιχνευτής DAD ρυθμίστηκε να πραγματοποιήσει σαρώσεις στα 520 nm. Στον παρακάτω πίνακα

παρουσιάζεται το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) που εφαρμόστηκε:

Πίνακας 3: Πρόγραμμα έκλουσης δειγμάτων για HPLC – DAD.

t (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)
0	95	5
1	95	5
37	75	25
42	0	100
47	0	100
50	95	5



Εικόνα 19: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC – DAD).

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων

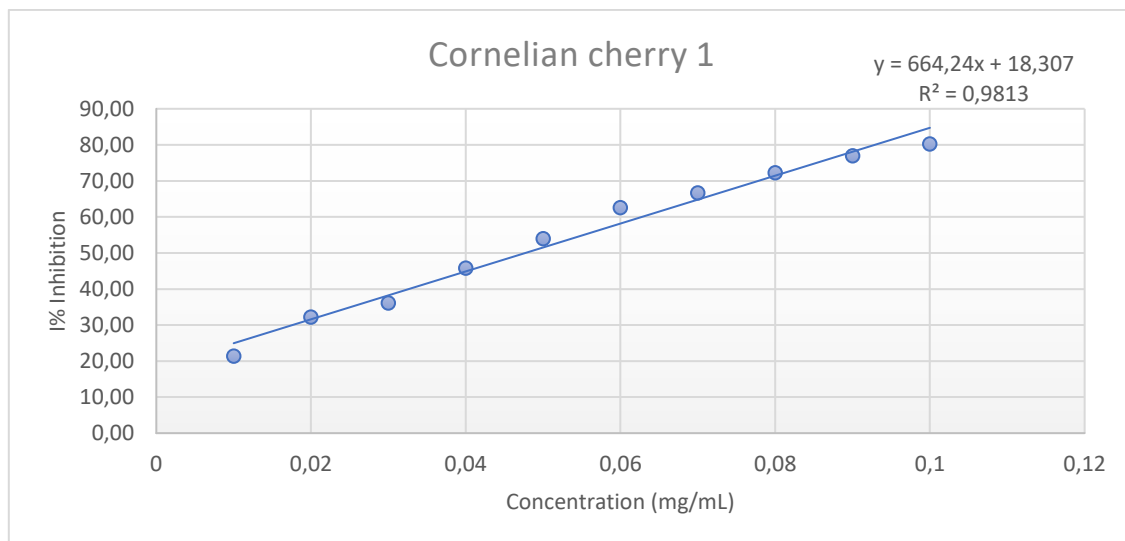
3.1.1 Δοκιμή DPPH

Στα εκχυλίσματα των καρπών κρανιάς μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH. Για κάθε έναν από τους καρπούς δημιουργήθηκε γραφική παράσταση στην οποία παρουσιάζεται το ποσοστό της επί τοις εκατό % παρεμπόδισης συναρτήσει της συγκέντρωσης του υπό εξέταση δείγματος. Επίσης δημιουργήθηκε και η γραφική παράσταση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της πρότυπης ουσίας Trolox.

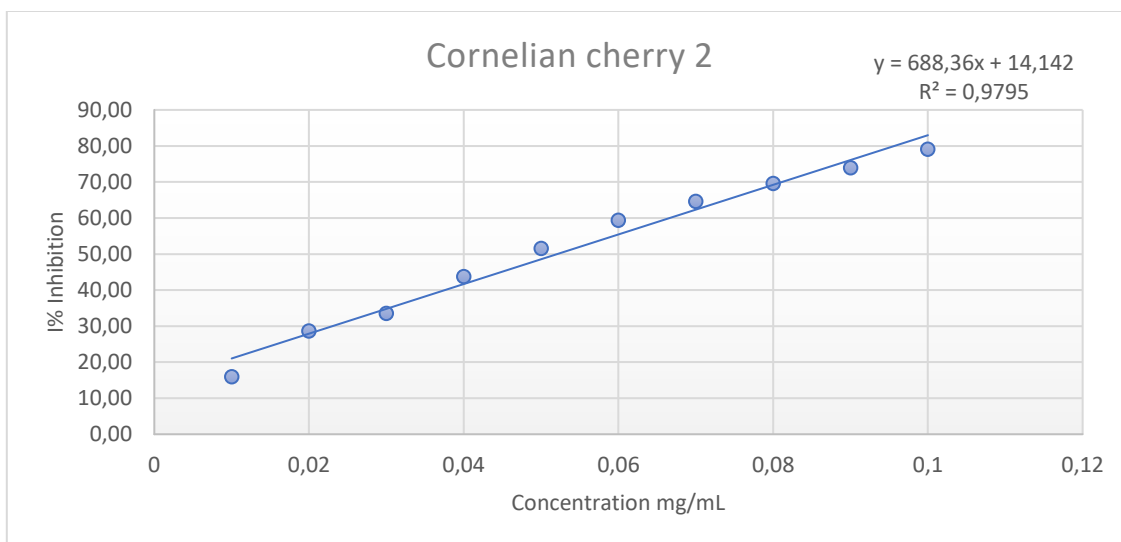
Από τις γραφικές παραστάσεις και τις αντίστοιχες εξισώσεις προσδιορίστηκαν οι τιμές IC₅₀ για το κάθε εκχύλισμα αλλά και για την πρότυπη ουσία.

Στην Εικόνα 20 και Εικόνα 21 παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις των δυο εκχυλισμάτων όπως επίσης στην Εικόνα 22 η γραφική παράσταση της πρότυπης ουσίας Trolox.

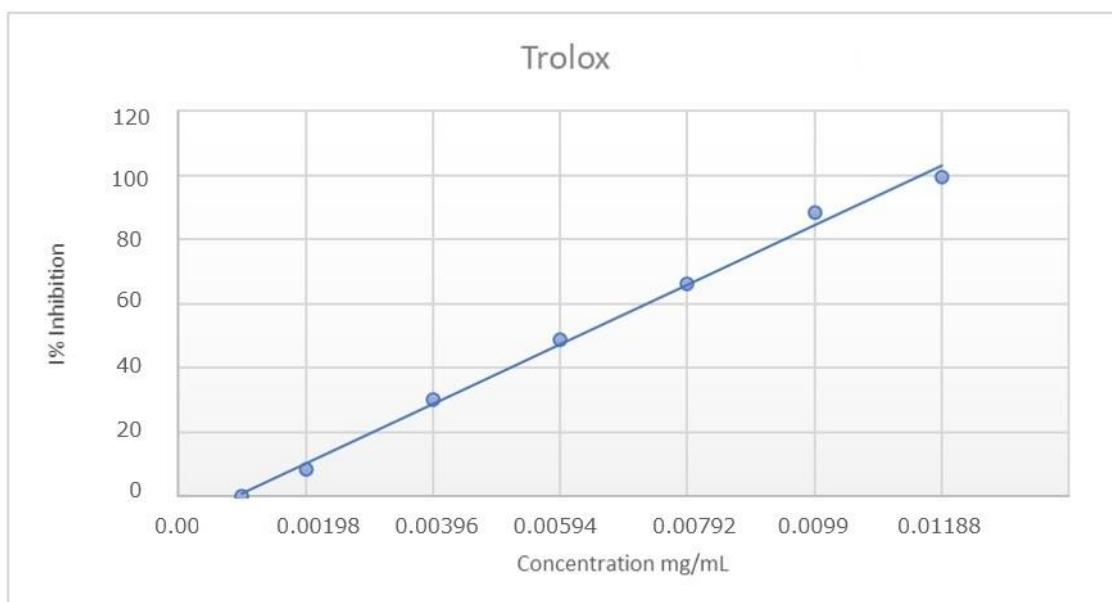
Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής και ακολουθεί σύγκριση αυτών στην Εικόνα 23.



Εικόνα 20: Εκχύλισμα Cornelian cherry 1.



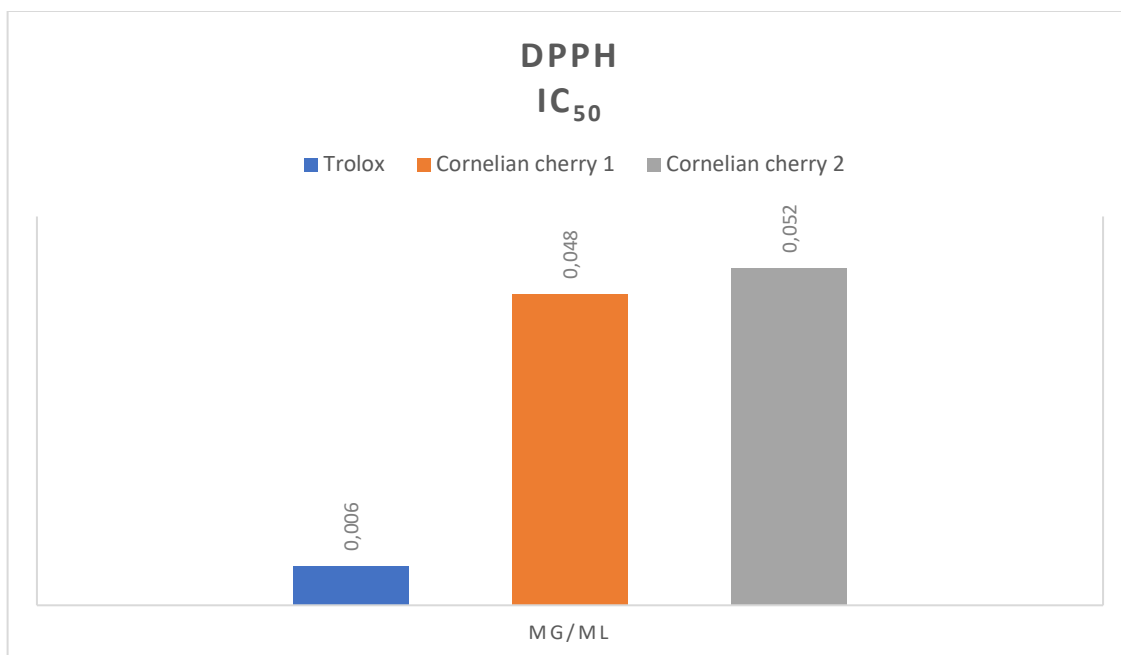
Εικόνα 21: Εκχύλισμα Cornelian cherry 2.



Εικόνα 22: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.

Πίνακας 4: Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων βάση δοκιμής DPPH.

IC₅₀ πρότυπου διαλύματος Trolox (mg/mL)	IC₅₀ εκχυλισμάτων (mg/mL)	
	Cornelian cherry 1	Cornelian cherry 2
0,006	0,048	0,052



Εικόνα 23: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με τη δοκιμή DPPH.

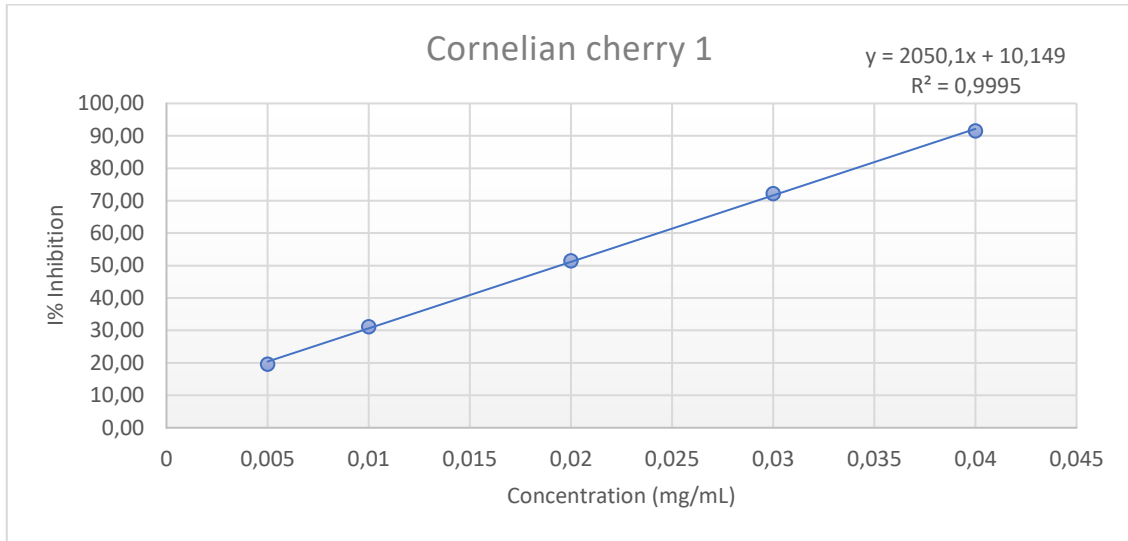
Σύμφωνα με τον Πίνακα 4 και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δοκιμή DPPH παρατηρείται πως το εκχύλισμα του Cornelian cherry 1 έχει μικρότερο IC₅₀ (0,048 mg/mL) από το αντίστοιχο Cornelian cherry 2 (0,052 mg/mL) άρα παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί οι τιμές IC₅₀ της παρούσας μελέτης, παρουσιάζουν μεγάλες διαφοροποιήσεις. Στη μελέτη που πραγματοποίησαν οι Stankovic et al.2014, η τιμή IC₅₀ εκχυλίσματος καρπών εκτιμήθηκε στα 0,25 mg/mL. Βέβαια, ο τρόπος παραλαβής του εκχυλίσματος ήταν διαφορετικός με τον διαλύτη να αποτελείται από 100% μεθανόλη. Επίσης η πειραματική διαδικασία που ακολούθησαν, είχε αρκετές διαφοροποιήσεις. Οπότε τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να αποτελέσουν ουσιαστικό μέτρο σύγκρισης. Δυστυχώς όπως προαναφέρθηκε, οι μελέτες στους καρπούς του *Cornus mas* είναι ελάχιστες.

3.1.2 Δοκιμή ABTS

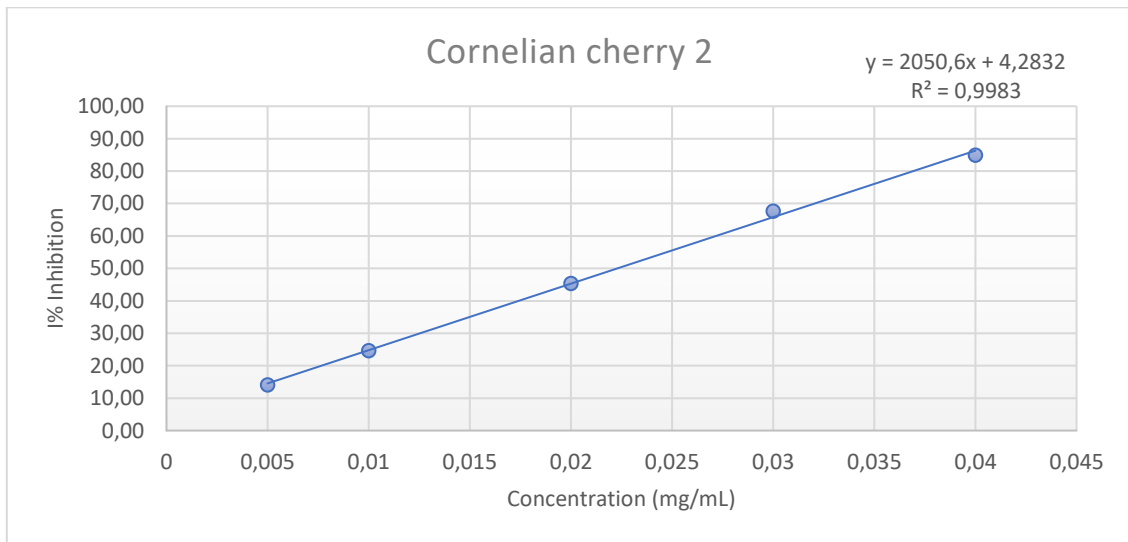
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δυο εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε επίσης με τη δοκιμή ABTS. Όπως στη δοκιμή DPPH έτσι και σε αυτή την περίπτωση, δημιουργήθηκε γραφική παράσταση της επί τοις εκατό % παρεμπόδισης συναρτήσει της συγκέντρωσης του υπό εξέταση δείγματος όπως επίσης και της πρότυπης αντιοξειδωτικής ουσίας Trolox. Και για τις τρεις περιπτώσεις προσδιορίστηκε η τιμή IC₅₀ βάση των εξισώσεων που προέκυψαν από τις γραφικές παραστάσεις.

Στις Εικόνες 24 και 25 παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις των δυο εκχυλισμάτων όπως προέκυψαν από τη δοκιμή ABTS, όπως επίσης στην Εικόνα 26 η γραφική παράσταση της πρότυπης ουσίας Trolox.

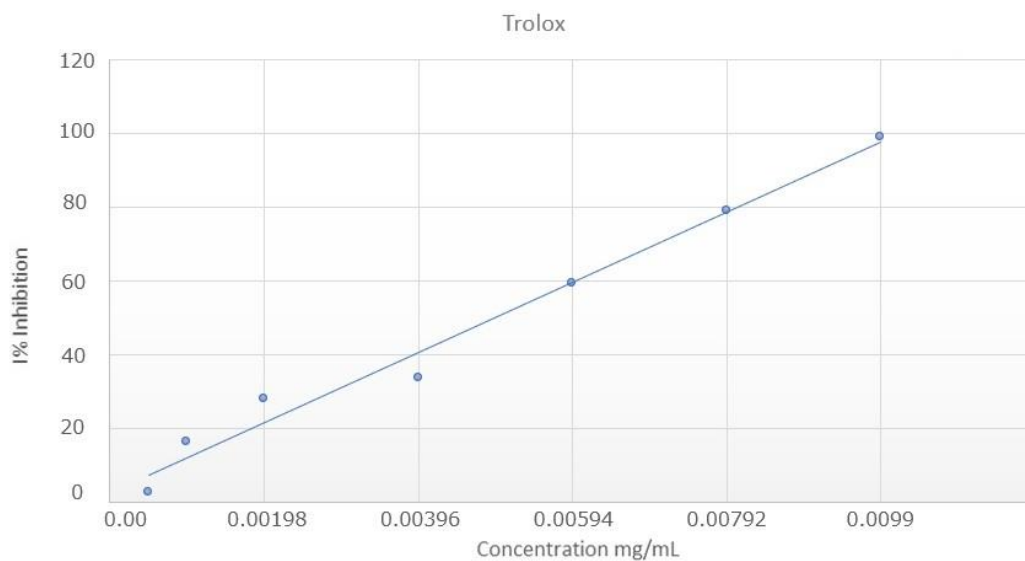
Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και ακολουθεί η σύγκριση αυτών στην Εικόνα 27.



Εικόνα 24: Εκχύλισμα Cornelian cherry 1.



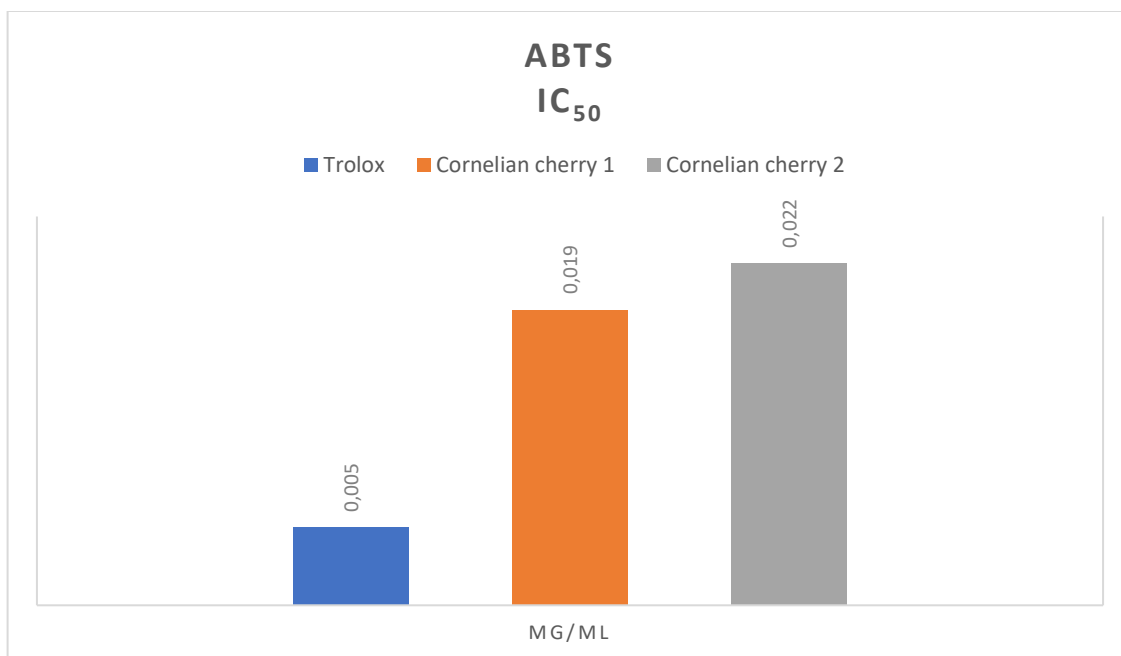
Εικόνα 25: Εκχύλισμα Cornelian cherry 2.



Εικόνα 26: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.

Πίνακας 5: Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων βάση δοκιμής ABTS

IC ₅₀ πρότυπου διαλύματος Trolox (mg/mL)	IC ₅₀ εκχυλισμάτων (mg/mL)	
	Cornelian cherry 1	Cornelian cherry 2
0,005	0,019	0.022

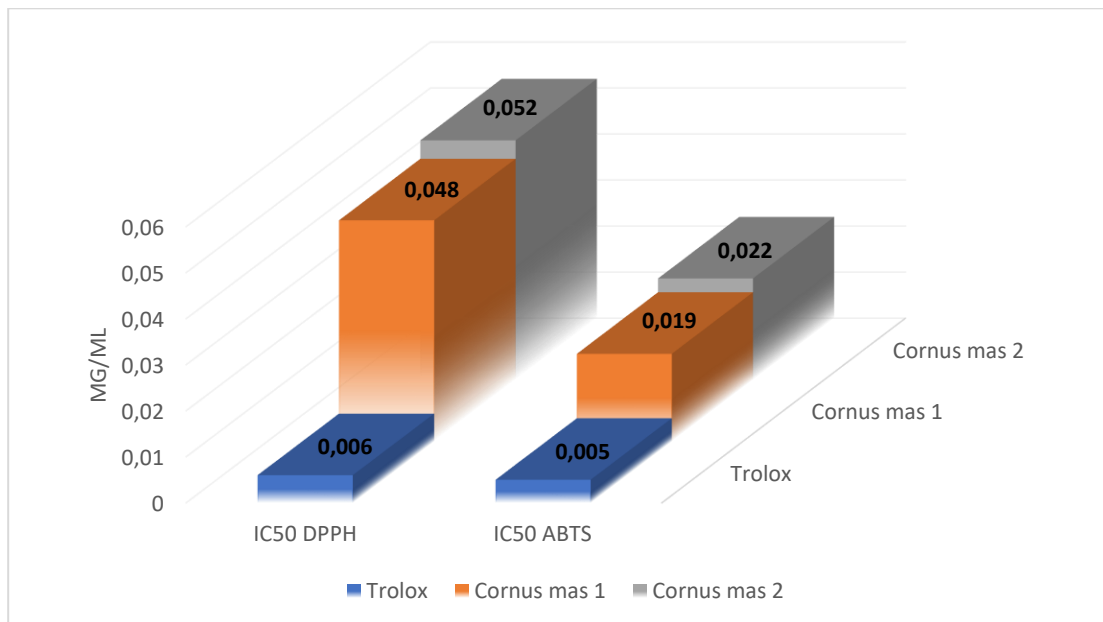


Εικόνα 27: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με τη δοκιμή ABTS.

Σύμφωνα με τη δοκιμή ABTS και τα αποτελέσματα που προέκυψαν, στην περίπτωση αυτή το εκχύλισμα του Cornelian cherry 1 έχει μικρότερο IC₅₀ (0,019 mg/mL) από το αντίστοιχο Cornelian cherry 2 (0,022 mg/mL). Αυτό σημαίνει πως οι καρποί του Cornus mas 1 παρουσιάζουν συγκριτικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Και στη περίπτωση της δοκιμής ABTS για την αντιοξειδωτική δράση των κράνων, οι βιβλιογραφικές αναφορές όπως και οι μελέτες είναι ελάχιστες. Σύμφωνα με τους Klymenko et. al., 2021 σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το Cornus officinalis, το οποίο ανήκει σε διαφορετικό γένος, η τιμή IC₅₀ εκτιμήθηκε στα 0,14 mg/mL. Και σε αυτή την περίπτωση όμως οι πειραματικές διαδικασίες παρουσιάζουν αρκετές διαφορές.

3.1.3 Σύγκριση DPPH με ABTS

Σύμφωνα με την Εικόνα 28 και τη σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των δυο εκχυλισμάτων όπως αυτή εκτιμήθηκε από τις δοκιμές DPPH και ABTS, παρατηρούμε πως τα δυο εκχυλίσματα παρουσιάζουν παραπλήσιες αντιοξειδωτικές ικανότητες. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς και τα δυο δείγματα καρπών προέρχονται από την ίδια καλλιέργεια που πρακτικά σημαίνει ίδιες συνθήκες ανάπτυξης (περιβαλλοντικές συνθήκες, άρδευση, έδαφος, λίπανση), ίδια περίοδο συγκομιδής (ίδια ωρίμανση) και παρόμοια χημική σύσταση. Επίσης από την παραπάνω σύγκριση παρατηρούμε πως η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων είναι και στις δυο περιπτώσεις μεγαλύτερη όσον αφορά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δοκιμή ABTS. Αυτό είναι λογικό και πιθανόν οφείλεται στο γεγονός πως σε αντίθεση με τη δοκιμή DPPH που εφαρμόζεται μόνο σε υδρόφιλα συστήματα, η ABTS μπορεί να εφαρμοστεί και σε λιπόφιλα. (Kim et al., 2002)



Εικόνα 28: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων σύμφωνα με τις δοκιμές DPPH και ABTS.

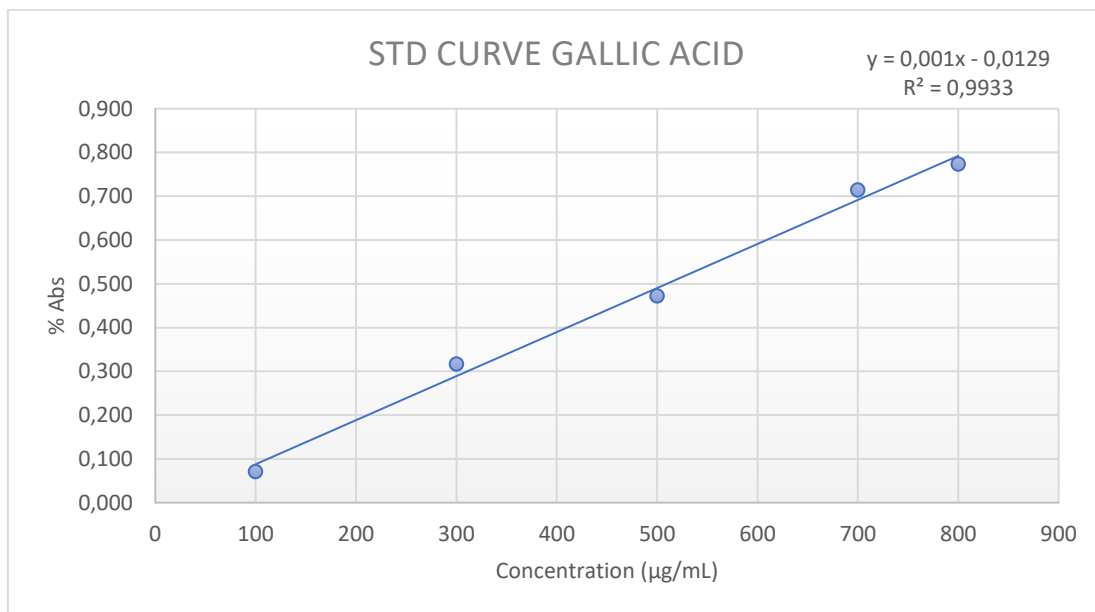
Συγκριτικά με το ισχυρό αντιοξειδωτικό Trolox, παρατηρούμε πως τα εκχυλίσματα και των δυο καρπών παρουσιάζουν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση. Αυτό επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία όπου σύμφωνα με μελέτες εκχυλίσματα καρπών κρανιάς έχουν δείξει πλήθος φαρμακολογικών δράσεων, μια εκ των οποίων είναι η αντιοξειδωτική.

Τέλος, δυο από τους κύριους μεταβολίτες που έχουν ταυτοποιηθεί στους καρπούς είναι τα ιριδοειδή και τα φλαβονοειδή. Για τις δυο αυτές ενώσεις έρευνες έχουν δείξει πως έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Ο συνδυασμός λοιπόν αυτών αλλά και άλλων ενώσεων προσδίδει στα κράνα μεγάλη αντιοξειδωτική αξία. [Viljoen et al., 2012, Rafiei et al., 2017)

3.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Μέθοδος Folin Ciocalteu

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin Ciocalteu. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού υλικού. Στην Εικόνα 29 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος και στον Πίνακα 6 τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δύο εκχυλίσματα.

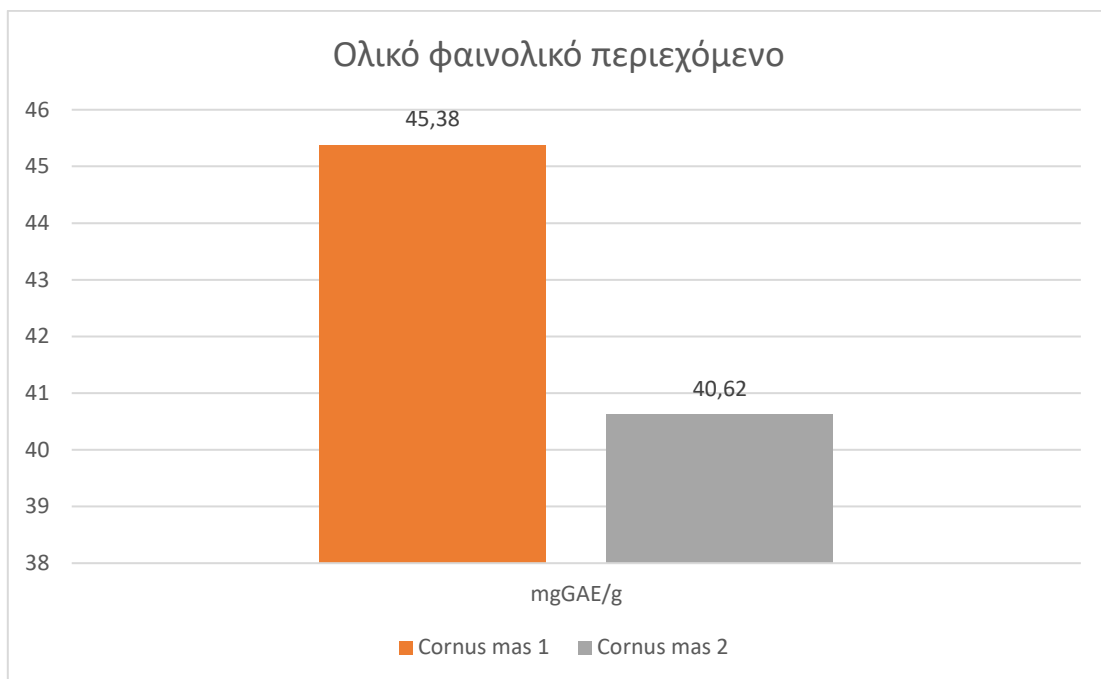


Εικόνα 29: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

Πίνακας 6: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων.

Δείγμα	Επανάληψη			Μ.Ο. (mgGAE/g)
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	
Cornelian cherry 1	46,00	45,42	44,70	45,38 ± 0,01
Cornelian cherry 2	39,66	38,94	43,26	40,62 ± 0,03

Στην Εικόνα 30 παρουσιάζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο συγκριτικά για τα δύο δείγματα καρπών.



Εικόνα 30: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων εκφρασμένο σε mgGAE/g.

Σύμφωνα με την Εικόνα 30 και τη σύγκριση που έγινε μεταξύ των δυο εκχυλισμάτων, παρατηρούμε πως το εκχύλισμα από το Cornelian cherry 1 παρουσιάζει μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με το αντίστοιχο του Cornelian cherry 2. Παρ' όλα αυτά η διαφορά μεταξύ τους είναι αρκετά μικρή.

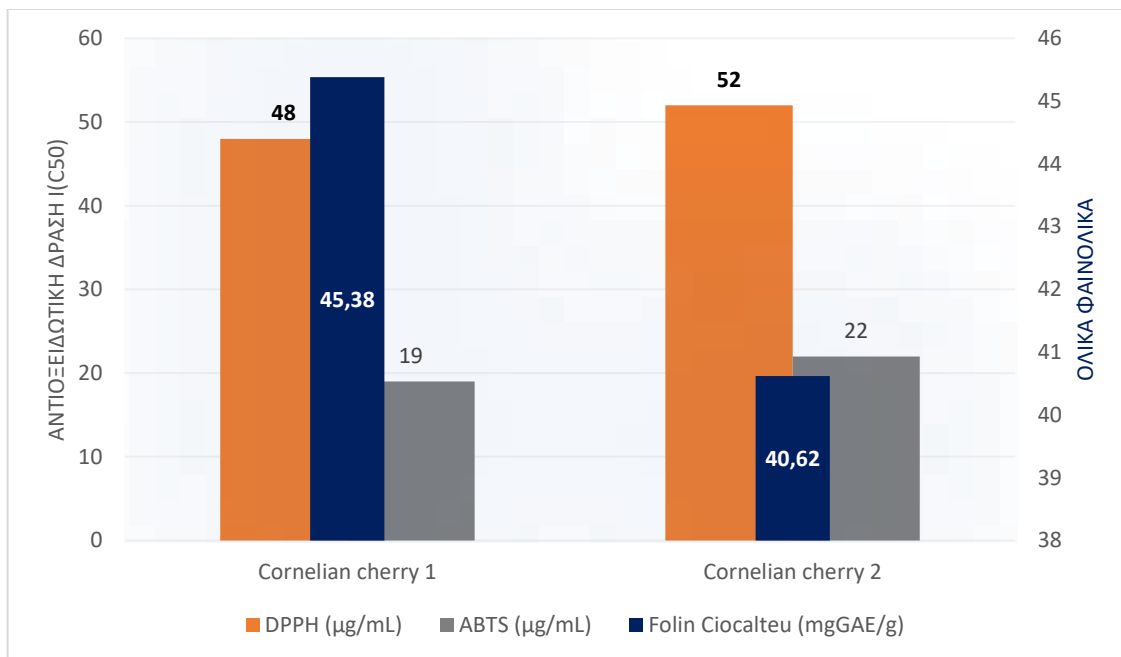
Σχετικά με τη βιβλιογραφία, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες πάνω στους καρπούς της κρνιαίας σε ότι έχει να κάνει με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin Ciocalteu αλλά και την αντιοξειδωτική δράση αντίστοιχα με τις δοκιμές DPPH και ABTS. Οι διαφορές στις τιμές και στα αποτελέσματα που προέκυψαν έχουν εξήγηση και οι λόγοι είναι αρκετοί. Διαφορές όπως η περίοδος συγκομιδής και το είδος του καρπού, καθώς στο γένος *Cornus mas L.* συναντάμε αρκετές περιπτώσεις καρπών

που διαφοροποιούνται ως προς το χρώμα, το σχήμα αλλά και τη χημική σύσταση. Επίσης σημαντικός είναι ο παράγοντας του τρόπου παραλαβής των εκχυλισμάτων με το διαλύτη ή το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο.

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τους Yilmaz et al., 2009 και Cetkovská et al., 2015 πάνω σε καρπούς *Cornus mas* L., το ολικό φαινολικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε στο εύρος μεταξύ 10,97 και 26,95 mg GAE/g σε καρπούς από το Αζερμπαϊτζάν και στο εύρος 26,59 με 74,83 mg GAE/g σε καρπούς από την Τουρκία. Συγκριτικά με τη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρούμε πως το ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι αρκετά καλύτερο από το αντίστοιχο του Αζερμπαϊτζάν και μη αμελητέο σε σχέση με το αντίστοιχο της Τουρκίας. Οι συγκρίσεις δεν είναι απόλυτα κατατοπιστικές καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικές διαδικασίες με κάποιες διαφορές.

3.3 Συσχετισμός Folin Ciocalteu με DPPH και ABTS

Σύμφωνα με την Εικόνα 31 μπορούμε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα όσον αφορά τα ολικά φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά για τα εκχυλίσματα των καρπών. Παρατηρούμε πως οι καρποί του *Cornus mas* 1 έχουν μεγαλύτερο περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις από αυτούς του *Cornus mas* 2. Ταυτόχρονα, παρουσιάζουν και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση όπως προέκυψε και από τις δυο δοκιμές (DPPH και ABTS). Παρατηρούμε πως οι διαφορές και από τις τρεις δοκιμές δεν είναι μεγάλες. Τα δυο εκχυλίσματα μπορούμε να πούμε πως παρουσιάζουν παραπλήσιες αντιοξειδωτικές δράσεις αλλά και παρόμοιο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Αυτό, δεδομένων των συνθηκών ανάπτυξης των φυτών, είναι απόλυτα λογικό. Η χημική σύσταση και οι ουσίες που περιέχουν τα δυο εκχυλίσματα μπορούν να δώσουν περεταίρω εξηγήσεις για τα παραπάνω αποτελέσματα.

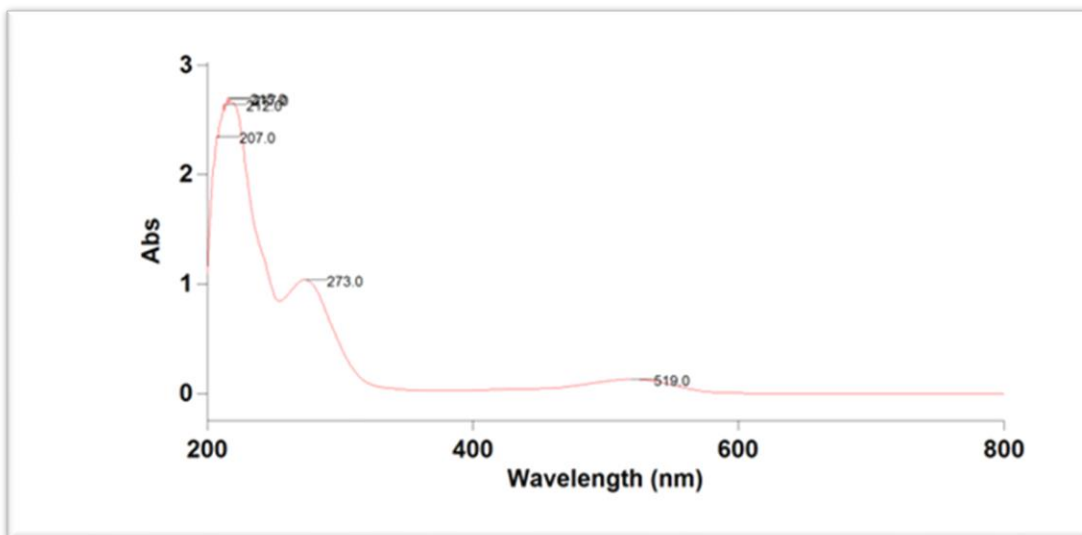


Εικόνα 31: Συσχετισμός ολικών φαινολικών με αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων.

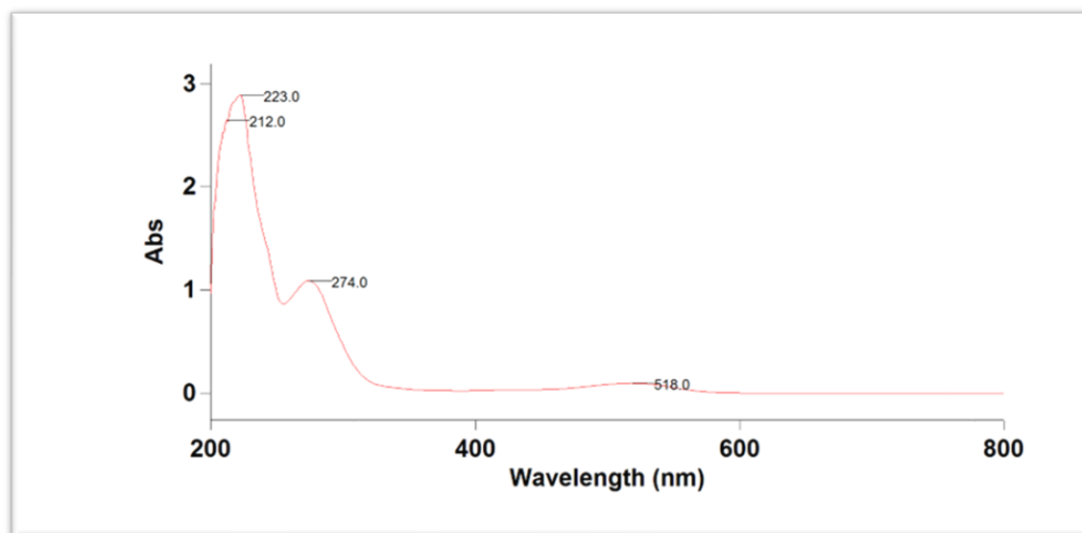
3.4 Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis)

Και τα δύο εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε πρώτη φάση με τη φασματοσκοπία UV – Vis. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα φάσματα των ανθοκυανών εμφανίζουν ζώνες απορρόφησης στο εύρος 500 με 550 nm. Αντίστοιχα, τα ιριδοειδή με τα φλαβονοειδή έχουν παρατηρηθεί στο εύρος στα 200 με 355 nm. (Kucharska et al., 2015, Pawlowska et al., 2010).

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 32 και Εικόνα 33) παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης για τα δυο δείγματα.



Εικόνα 32: Φάσμα UV – Vis δείγματος Cornelian cherry 1 συγκέντρωσης 0,3 mg/mL.

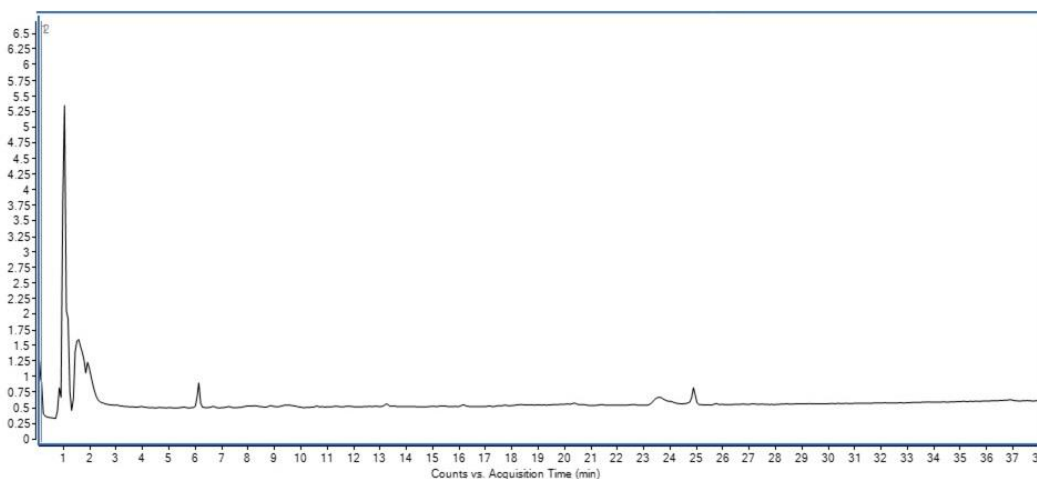


Εικόνα 33: Φάσμα δείγματος Cornelian cherry 2 συγκέντρωσης 0,3 mg/mL.

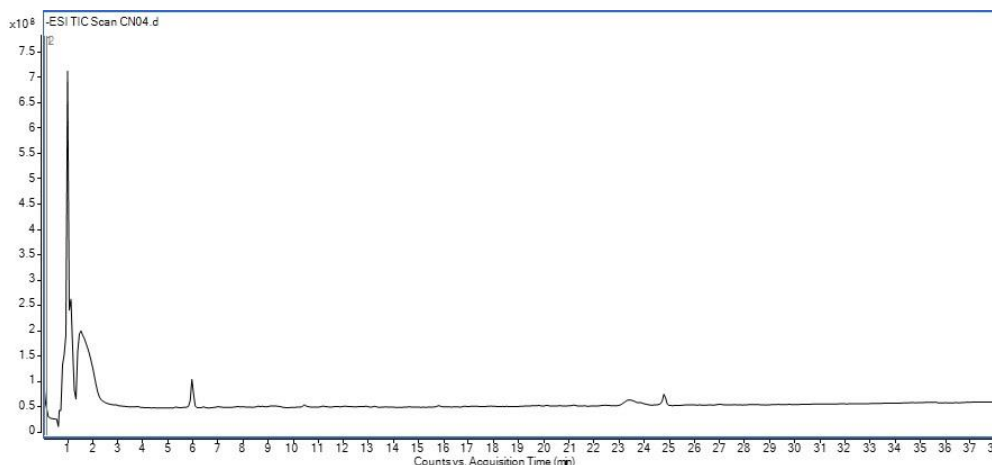
Τα αποτελέσματα και στις δυο περιπτώσεις έδειξαν κορυφή με απορρόφηση περίπου στα 520 nm. Αυτό υποδηλώνει ποιοτικά την ύπαρξη ανθοκυανών και στα δυο διαλύματα πράγμα που επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία. Επίσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρούμε έντονες κορυφές απορρόφησης στο εύρος 207 με 225 nm όπως επίσης και περίπου στα 274 nm. Στα εύρη αυτά συναντάμε φλαβονοειδή και ιριδοειδή τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχουν στα κράνα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατόν να προσδιορίσουμε ποιοτικά τις ενώσεις που υπάρχουν αλλά σε πρώτη φάση μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη κάποιων από αυτές.

3.5 LC – Q-ToF – HRMS

Για την ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε ανάλυση και των δυο δειγμάτων με χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με αναλυτή χρόνου πτήσης και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης. Βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν από τον αρνητικό ιοντισμό. Στις Εικόνες 34 και 35 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων των καρπών Cornus mas 1 και Cornus mas 2 αντίστοιχα.



Εικόνα 34: LC – Q-ToF – HRMS χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων εκχυλίσματος Cornelian cherry 1 σε αρνητικό ιοντισμό (-ESI).

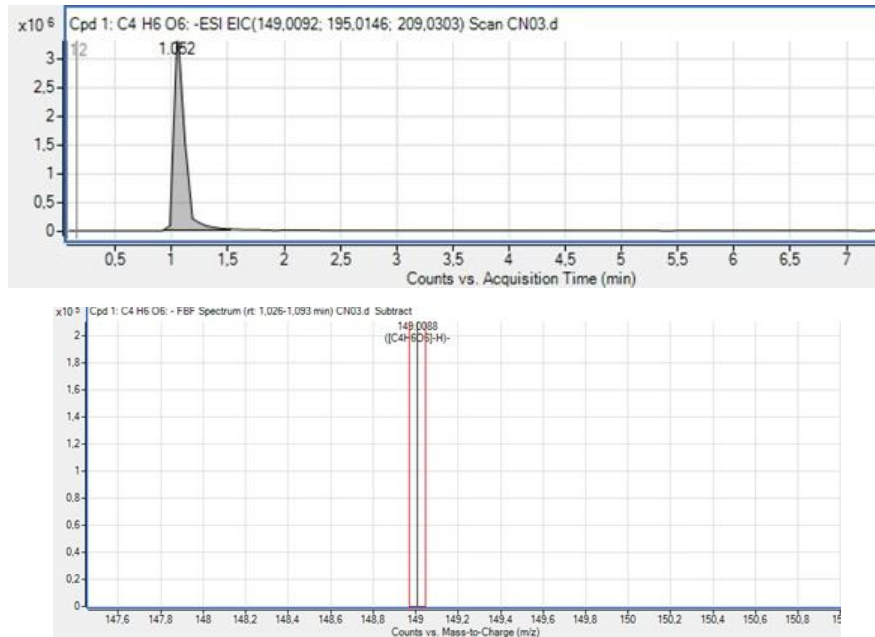


Εικόνα 35: LC – Q-ToF – HRMS χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων εκχυλίσματος Cornelian cherry 2 σε αρνητικό ιοντισμό (-ESI).

Πιο αναλυτικά, από τα χρωματογραφήματα και από τα φάσματα των μαζών όπως αυτά προέκυψαν από την ανάλυση με LC – Q-ToF – HRMS ταυτοποιήθηκαν οι παρακάτω ενώσεις:

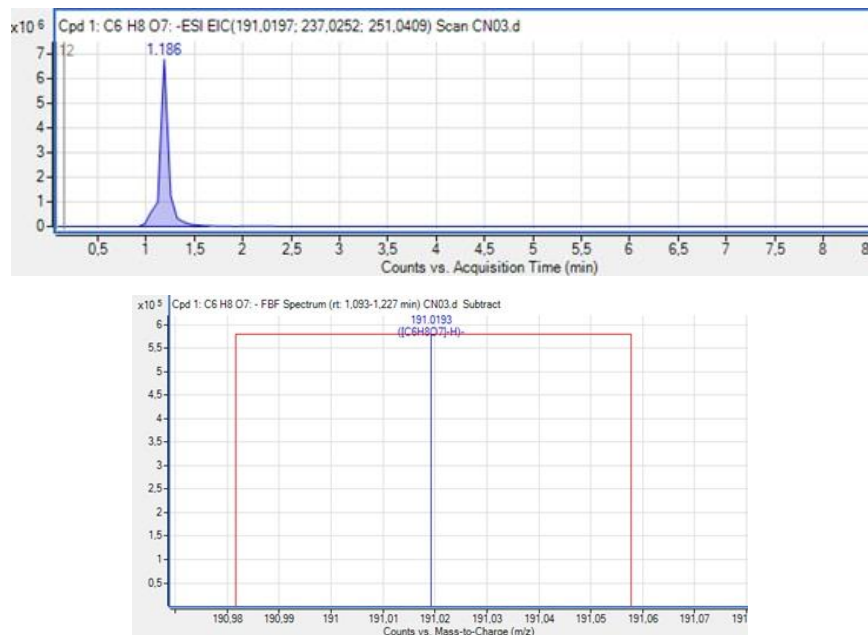
Για το Cornelian cherry 1:

- Τρυγικό οξύ ($C_4H_6O_6$)



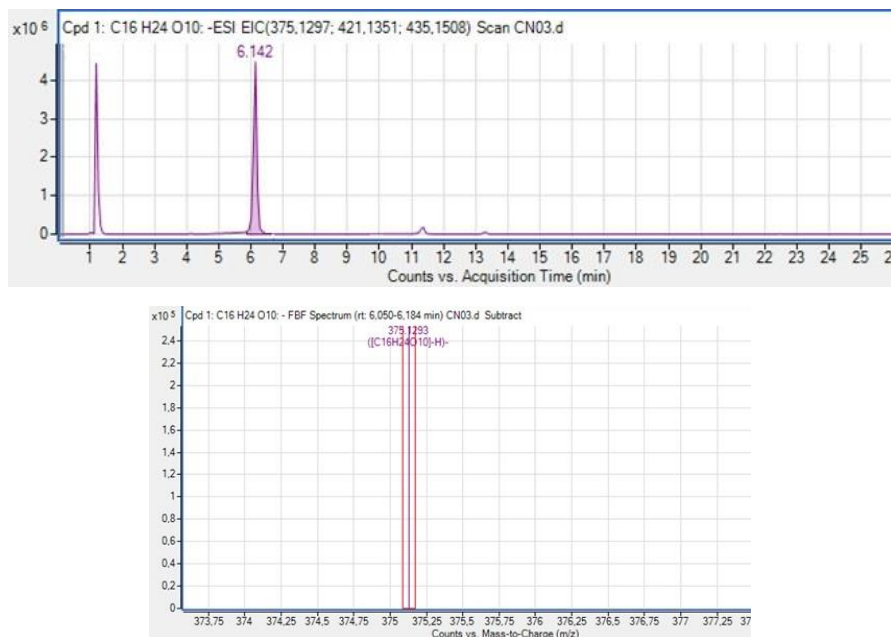
Εικόνα 36: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας τρυγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.

- Κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7$)



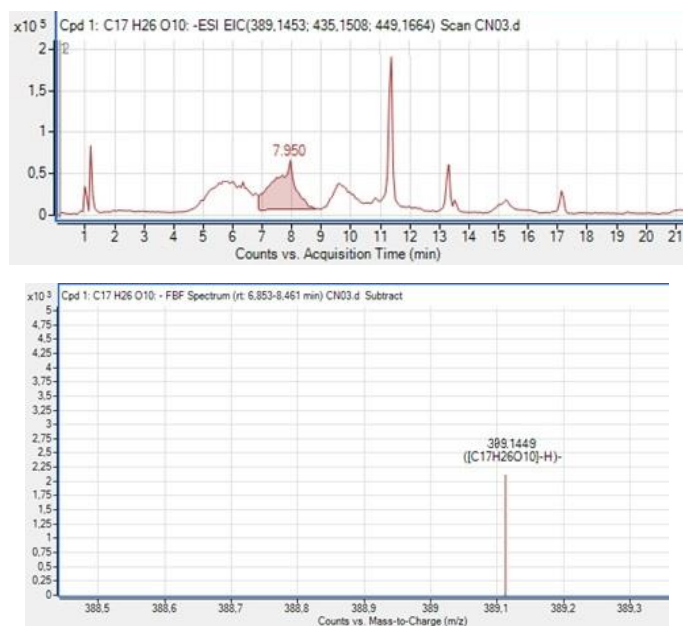
Εικόνα 37: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κιτρικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.

- Λογανικό οξύ ($C_{16}H_{24}O_{10}$)



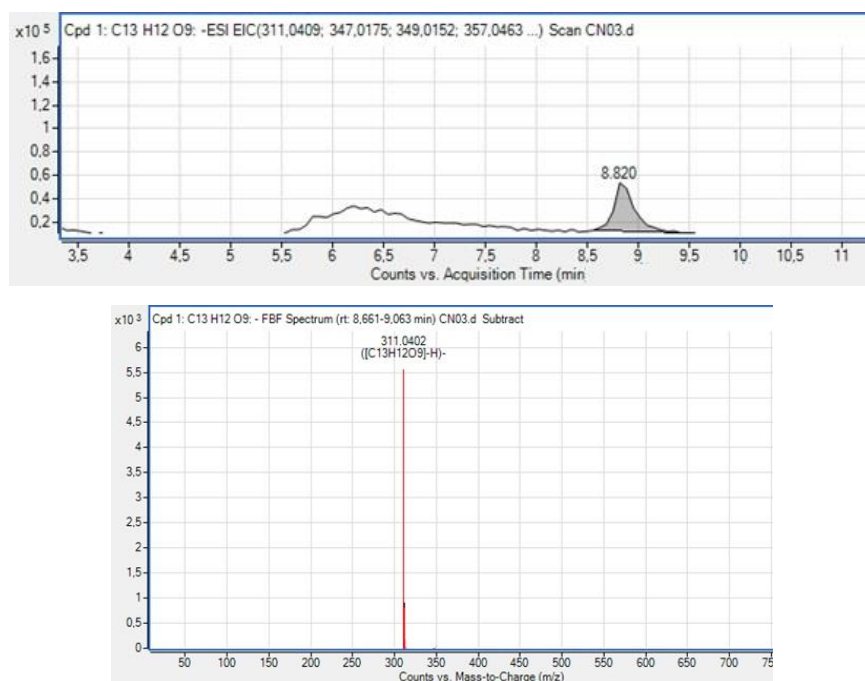
Εικόνα 38: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας λογανικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1.

- Λογανίνη ($C_{17}H_{26}O_{10}$)



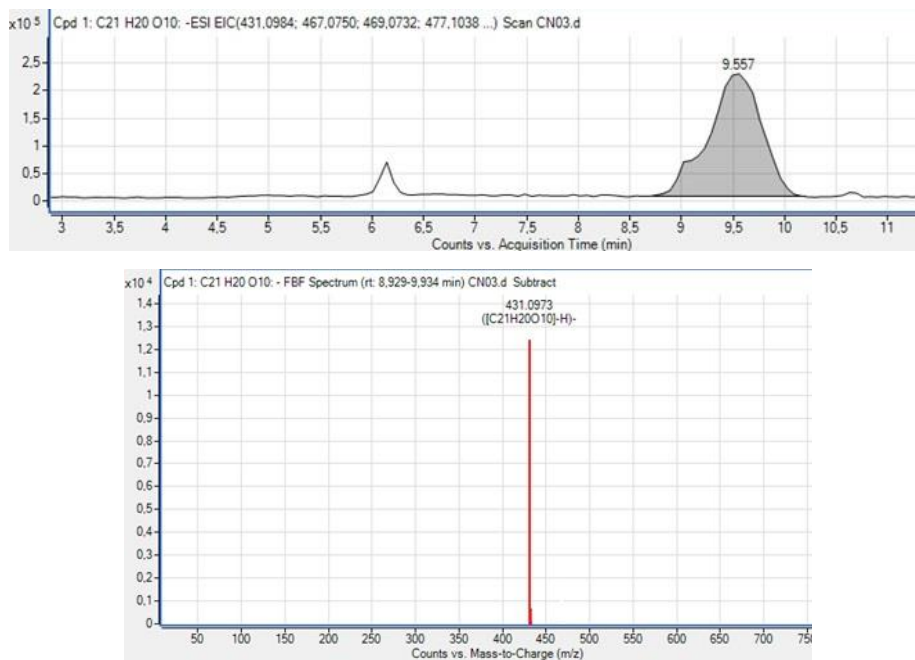
Εικόνα 39: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας λογανίνης από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1.

- Καφταρικό οξύ ($C_{13}H_{12}O_9$)



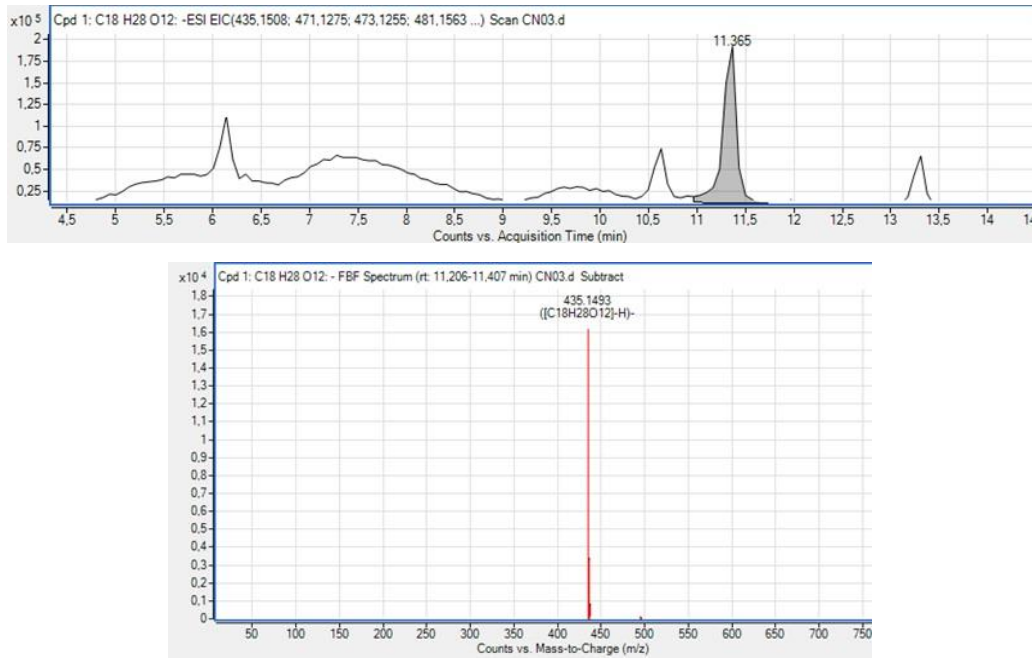
Εικόνα 40: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καφταρικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1

- Καμφερόλη- 3-O-ραμνοσίδη ($C_{21}H_{20}O_{10}$)



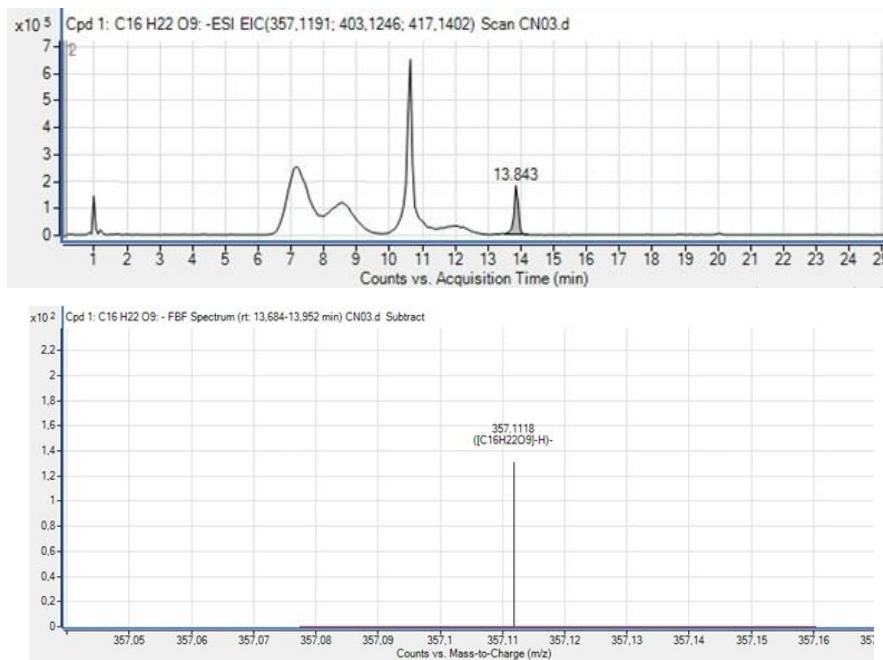
Εικόνα 41: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καμφερόλη-3-O-ραμνοσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1.

- Αλιγενοσίδης ($C_{18}H_{28}O_{12}$)



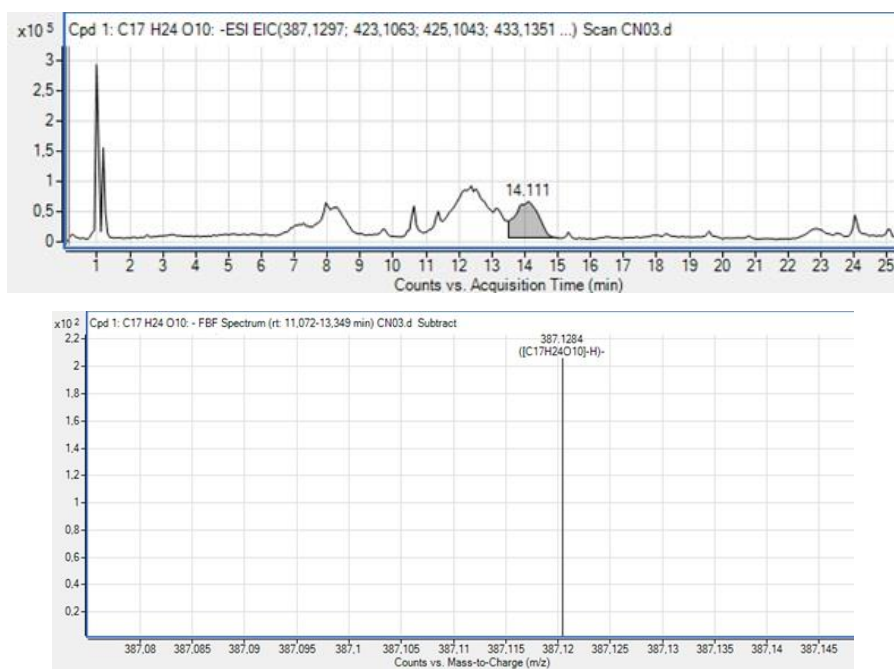
Εικόνα 42: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας αλιγενοσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1.

- Σβεροσίδης ($C_{16}H_{22}O_9$)



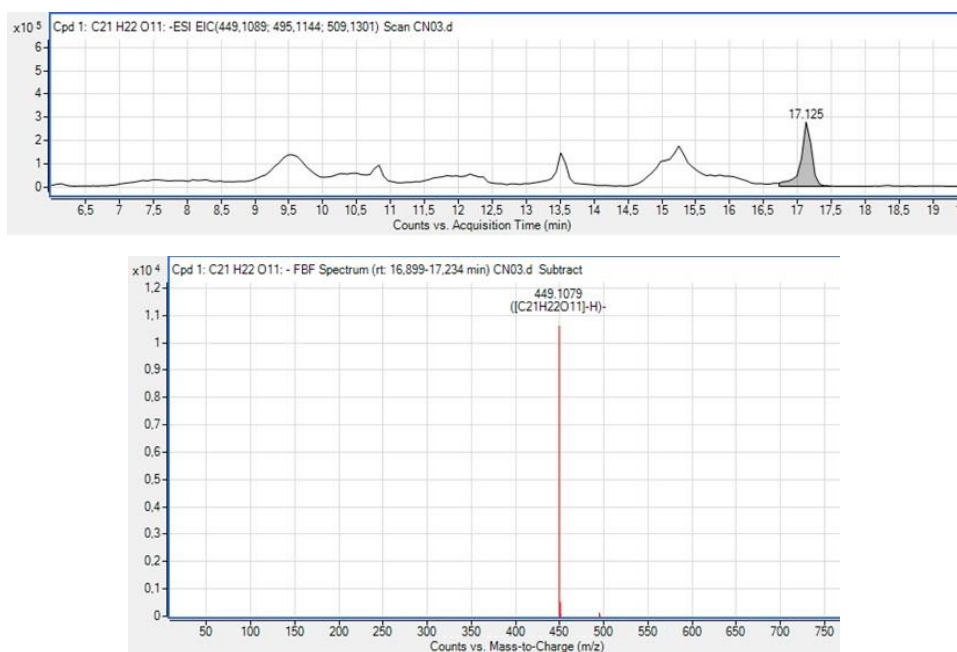
Εικόνα 43: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας σβεροσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1

- Σεκολογανίνη ($C_{17}H_{24}O_{10}$)



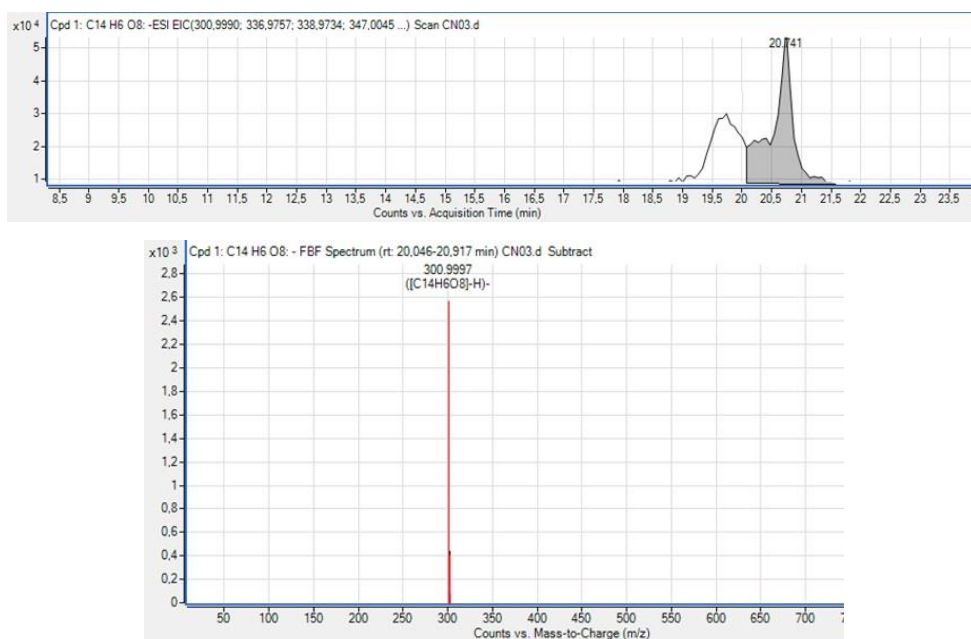
Εικόνα 44: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας σεκολογανίνης από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1.

- Αρωμαδενδρίνη-7-Ο-γλυκοσίδη ($C_{21}H_{22}O_{11}$)



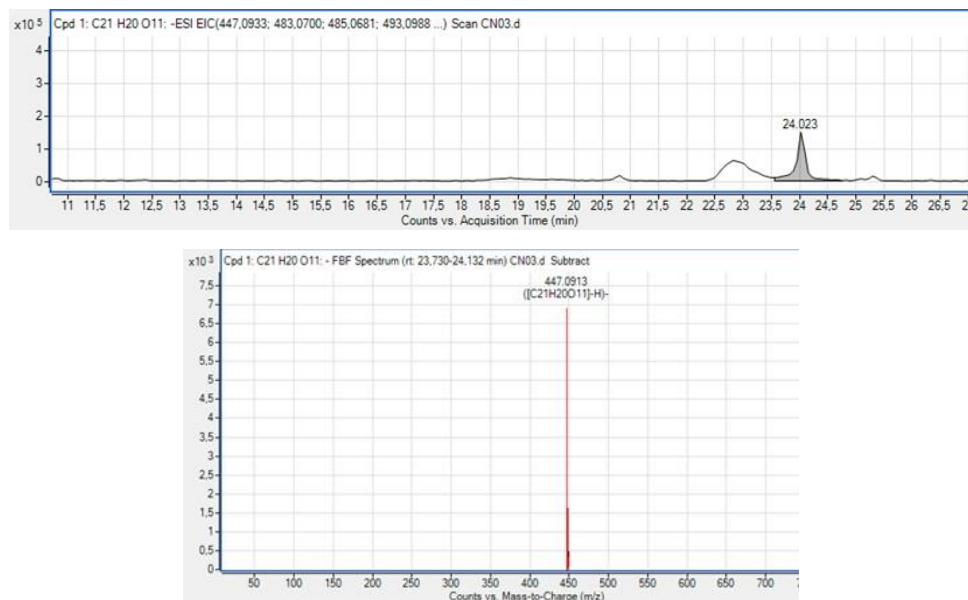
Εικόνα 45: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας αρωμαδενδρίνης-7-Ο-γλυκοσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1.

- Ελλαγικό οξύ ($C_{14}H_6O_8$)



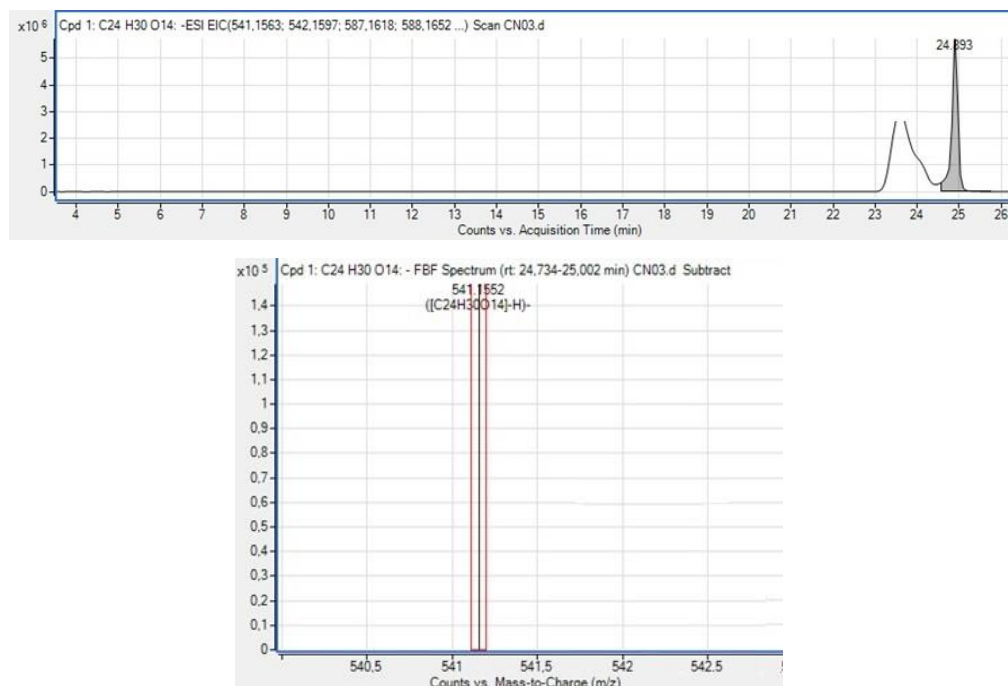
Εικόνα 46: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας ελλαγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas*.

- Κερκετίνη-3-Ο-ραμνοσίδης ($C_{21}H_{20}O_{11}$)



Εικόνα 47: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κερκετίνης-3-Ο-ραμνοσίδης από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 1.

- Κορνουσίδης (C₂₄H₃₀O₁₄)



Εικόνα 48: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κορνουσίδη από το εκχύλισμα καρπών Cornus mas 1.

Συγκεντρωτικά, στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι ουσίες που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα του Cornelian cherry 1 με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης, τη θεωρητική και πειραματική μάζα προς φορτίο (m/z) αλλά και το σφάλμα μάζας όπως αυτό υπολογίστηκε.

Πίνακας 7: Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο LC – Q-TOF – MS στο εκχύλισμα του Cornelian cherry 1.

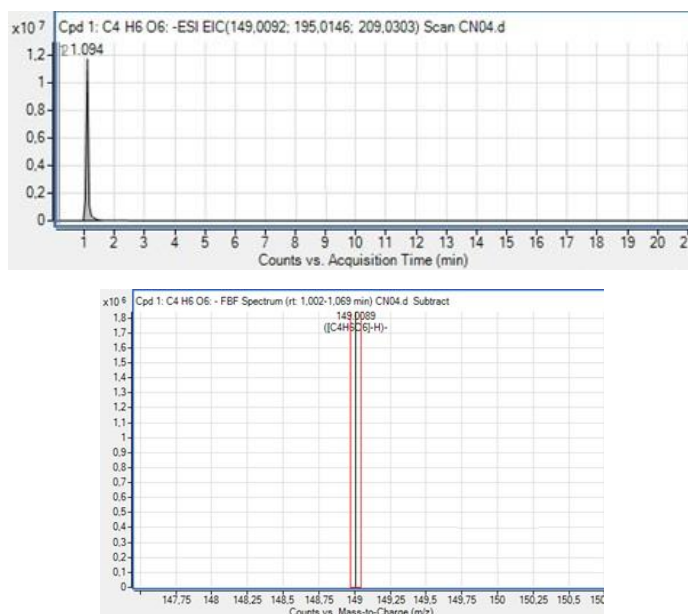
Ένωση	Χρόνος κατακράτησης R _t (min)	Θεωρητική μάζα (m/z)	Παρατηρούμενη μάζα (m/z)	ΔM (ppm)
Τρυγικό οξύ	1,052	149,0092	149,0088	-2,68
Κιτρικό οξύ	1,186	191,0197	191,0193	-2,09
Λογανικό οξύ	6,142	375,1297	375,1293	-1,07
Λογανίνη	7,950	389,1453	389,1449	-1,03
Καφταρικό οξύ	8,820	311,0409	311,0402	-2,25
Καμφερόλη-3-Ο-ραμνοσίδης	9,557	431,0984	431,0973	-2,55
Αλπιγενοσίδης	11.365	435,1503	435,1493	-2,30

Σβεροσίδης	13,843	357,1191	357,1188	-0,84
Σεκολογανίνη	14,111	387,1297	387,1284	-3,36
Αρωμαδενδρίνη-7-Ο-γλυκοσίδης	17,125	449,1089	449,1079	-2,23
Ελλαγικό οξύ	20,741	300,9990	300,9997	2,33
Κερκετίνη-3-Ο-ραμνοσίδης	24,023	447,0923	447,0913	-2,24
Κορνουσίδης	24,893	541,1563	541,1552	-2,03

Σύμφωνα με τον Πίνακα 7 και με χρήση της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με αναλυτή χρόνου πτήσης και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν 13 ενώσεις στο εκχύλισμα των καρπών του *Cornus mas* 1. Πρόκειται για 6 ιριδοειδή (λογανικό οξύ, λογανίνη, αλπικενοσίδης, σβεροσίδης, σεκολογανίνη και κορνουσίδης), 2 οργανικά οξέα (τρυγικό και κιτρικό οξύ), 2 φαινολικά οξέα (καφταρικό και ελλαγικό οξύ) και 3 φλαβονοειδή (καμφερόλη-3-Ο-ραμνοσίδης, αρωμαδενδρίνη-7-Ο-γλυκοσίδης και κερκετίνη-3-Ο-ραμνοσίδης). Σε όλες τις περιπτώσεις το σφάλμα μάζας ΔΜ δεν είναι σημαντικό (< 5).

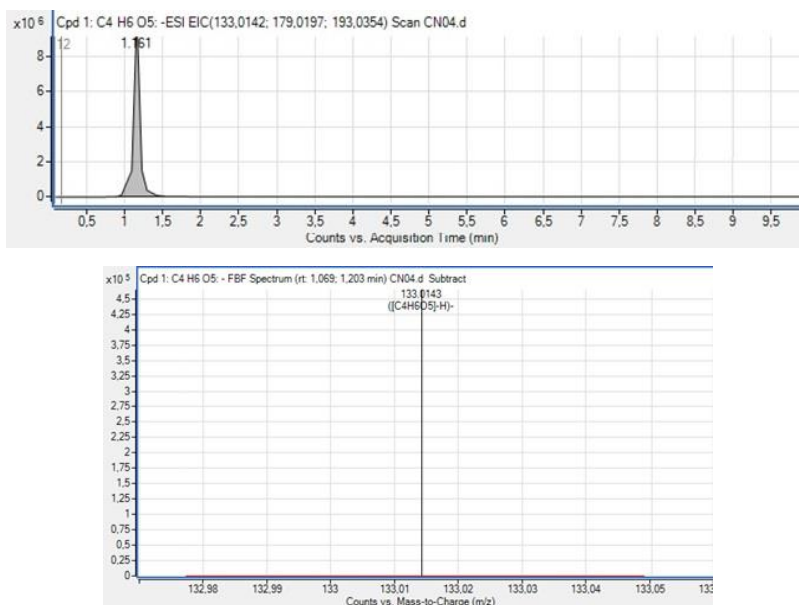
Για το *Cornelian cherry* 2:

- Τρυγικό οξύ ($C_4H_6O_6$)



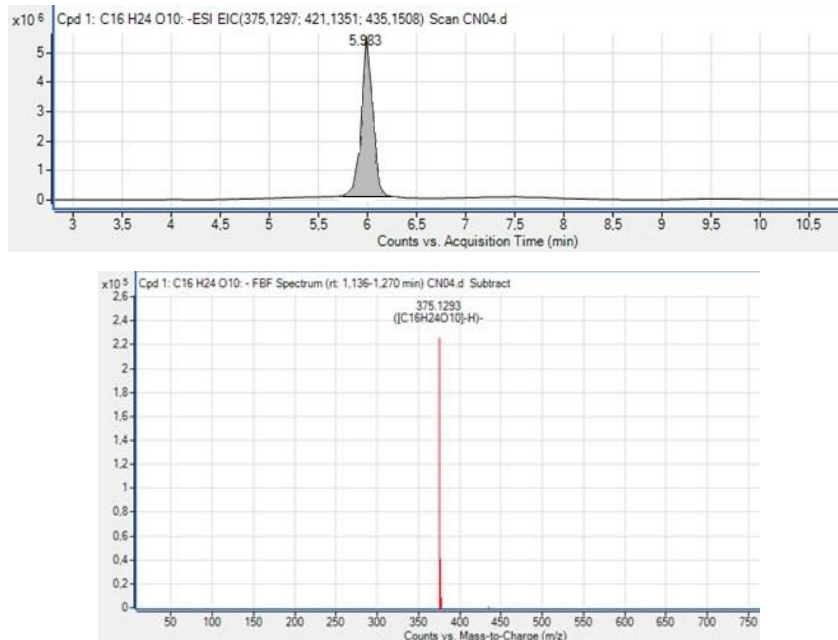
Εικόνα 49: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας τρυγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Μηλικό οξύ ($C_4H_6O_5$)



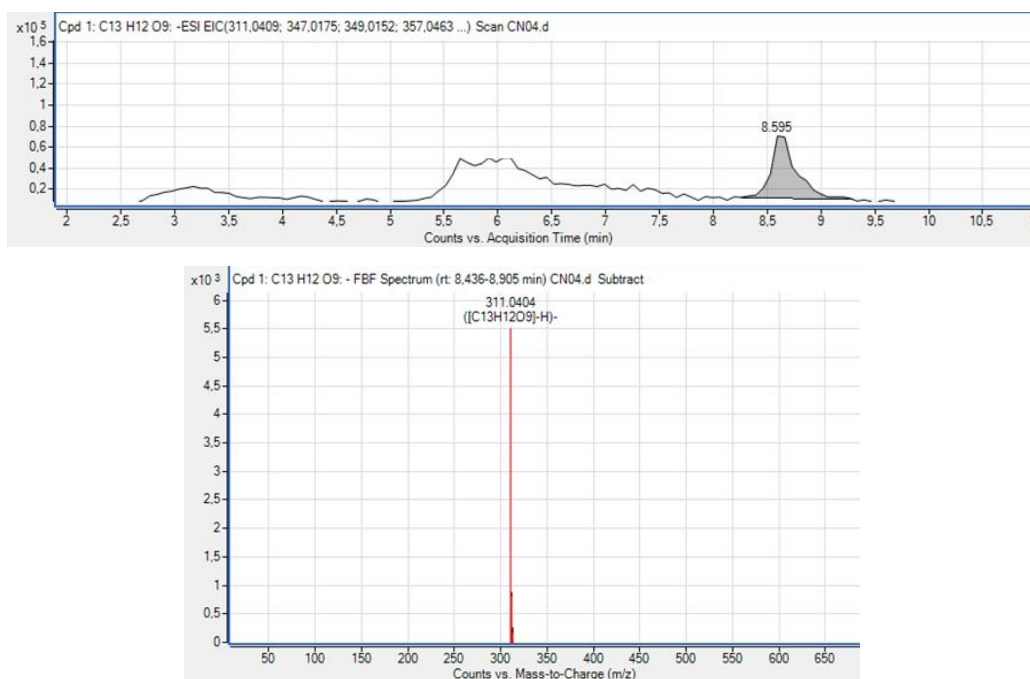
Εικόνα 50: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας μηλικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Λογανικό οξύ ($C_{16}H_{24}O_{10}$)



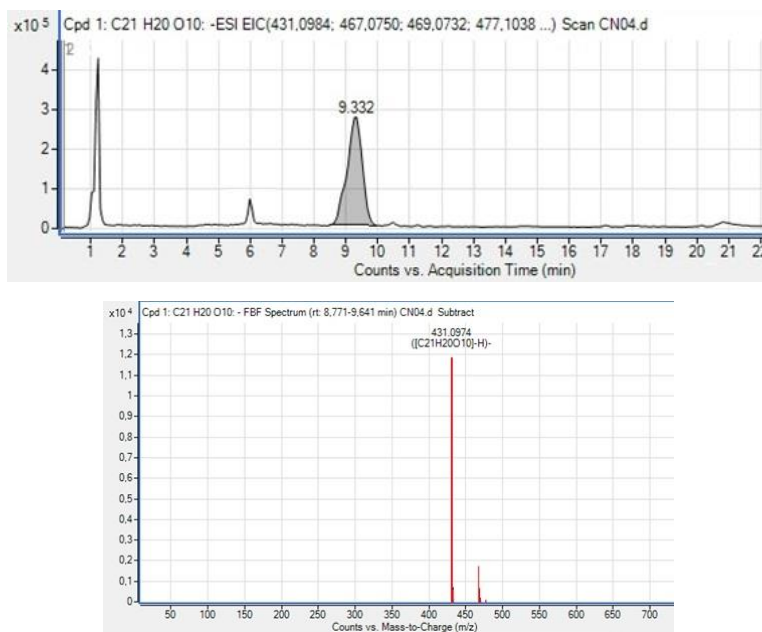
Εικόνα 51: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας τρυγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Καφταρικό οξύ ($C_{13}H_{12}O_9$)



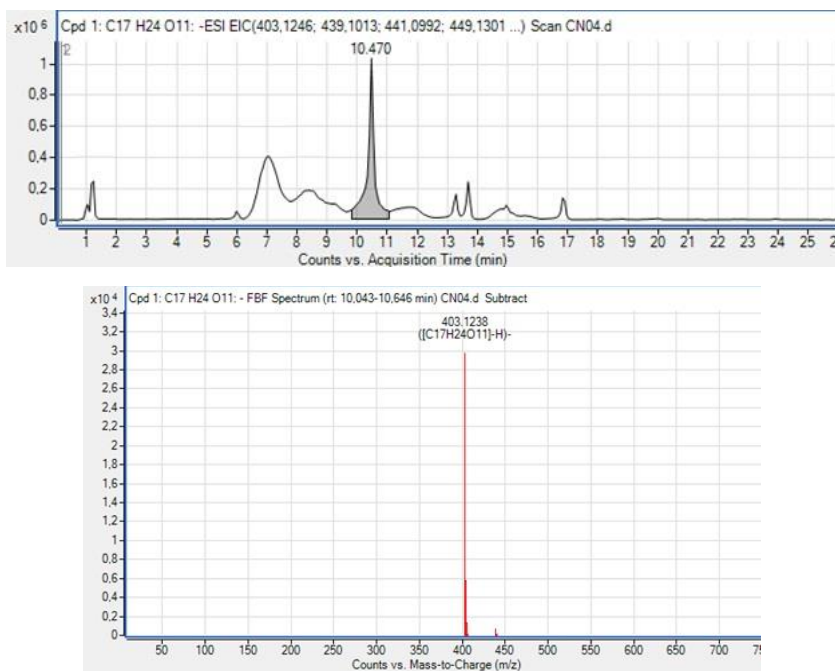
Εικόνα 52: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καφταρικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Καμφερόλη- 3-Ο-ραμνοσίδης ($C_{21}H_{20}O_{10}$)



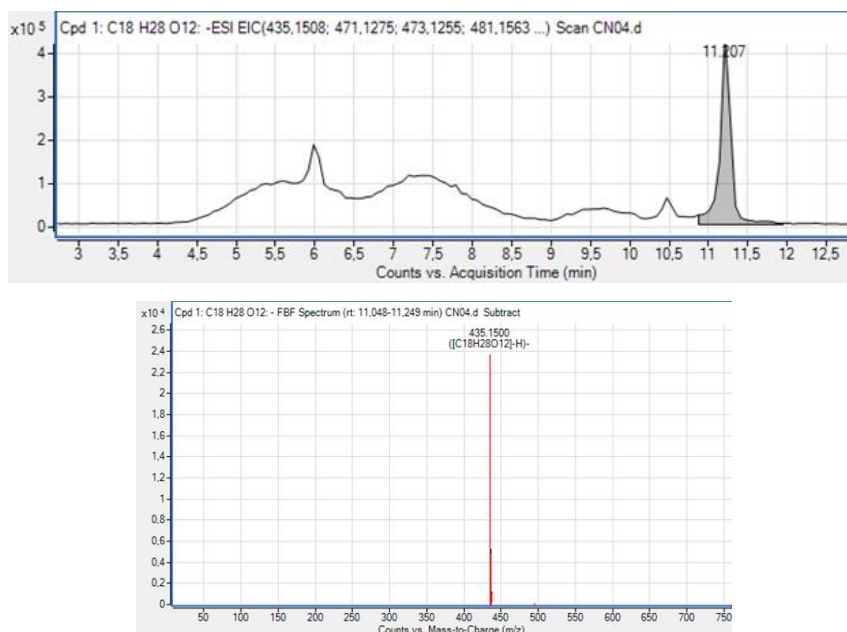
Εικόνα 53: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καμφερόλης-3-Ο-ραμνοσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Σεκοξυλογανίνη ($C_{17}H_{24}O_{11}$)



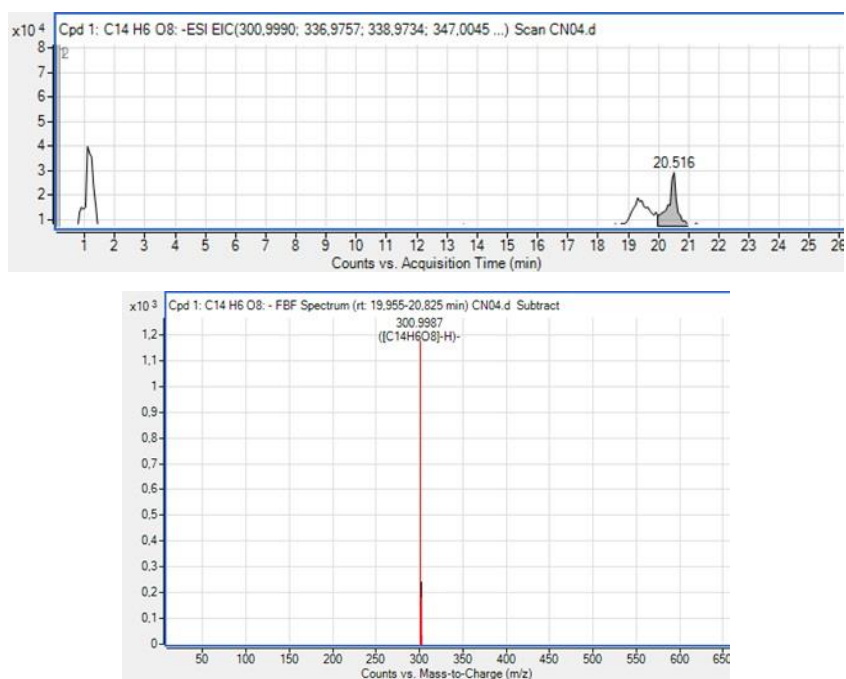
Εικόνα 54: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας σεκοξυλογανίνης από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Αλπιγενοσίδη ($C_{18}H_{28}O_{12}$)



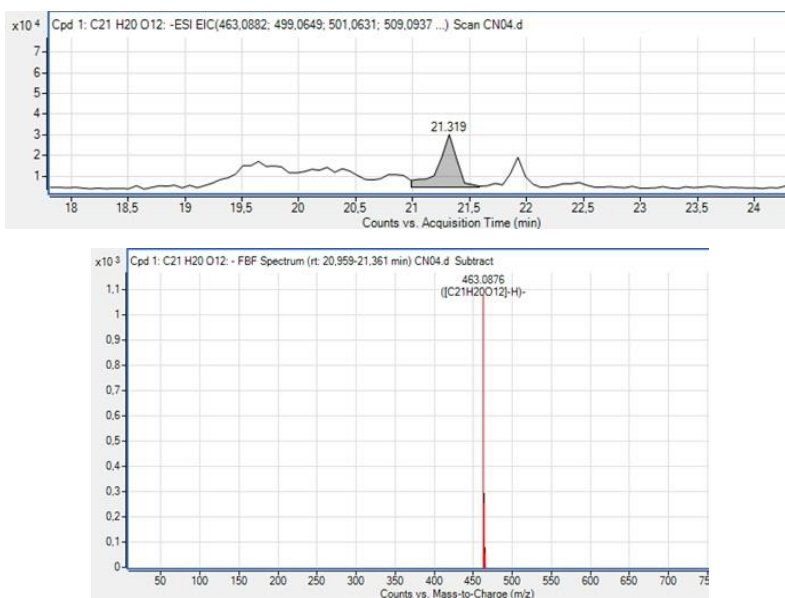
Εικόνα 55: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας αλπιγενοσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Ελλαγικό οξύ ($C_{14}H_6O_8$)



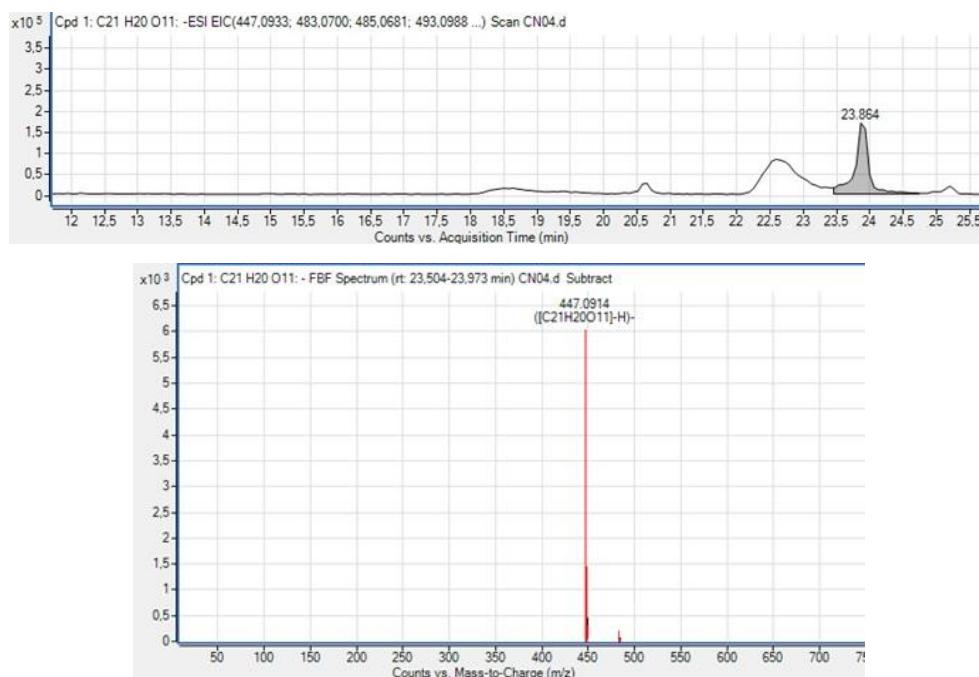
Εικόνα 56: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας ελλαγικού οξέος από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Κερκετίνη-3-Ο-γαλακτοσίδης ($C_{21}H_{20}O_{12}$)



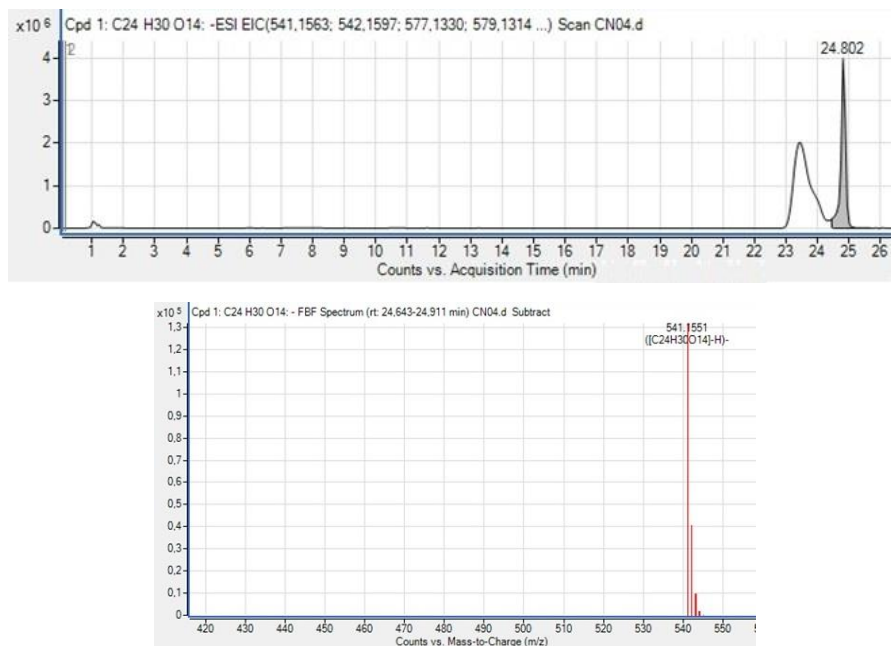
Εικόνα 57: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κερκετίνη-3-Ο-γαλακτοσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Καμφερόλη-3-O-γαλακτοσίδης ($C_{21}H_{20}O_{11}$)



Εικόνα 58: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας καμφερόλης-3-O-γαλακτοσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

- Κορνουσίδης ($C_{24}H_{30}O_{14}$)



Εικόνα 59: Κορυφή χρωματογραφήματος και φάσμα μάζας κορνουσίδη από το εκχύλισμα καρπών *Cornus mas* 2.

Πίνακας 8: Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο LC – Q-TOF – MS στο εκχύλισμα του Cornelian cherry 2.

Ένωση	Χρόνος κατακράτησης R _t (min)	Θεωρητική μάζα (m/z)	Παρατηρούμενη μάζα (m/z)	Σφάλμα μάζας (ppm)
Τρυγικό οξύ	1,094	149,0092	149,0089	-2,01
Μηλικό οξύ	1,161	133,0143	133,0143	0,00
Λογανικό οξύ	5,983	375,1297	375,1293	-1,07
Καφταρικό οξύ	8,595	311,0409	311,0404	-1,61
Καμφερόλη- 3-Ο-ραμνοσίδης	9,332	431,0984	431,0974	-2,32
Σεκοξυλογανίνη	10,470	403,1246	403,1238	-0,69
Αλπιγενοσίδης	11.207	435,1503	435,1500	-1,98
Ελλαγικό οξύ	20,516	300,9990	300,9987	-1,00
Κερκετίνη-3-Ο-γαλακτοσίδης	21,319	463,0882	463,0876	-1,30
Καμφερόλη- 3-Ο-γαλακτοσίδης	23,864	447,0923	447,0914	-2,01
Κορνοσίδης	24,802	541,1563	541,1551	-2,22

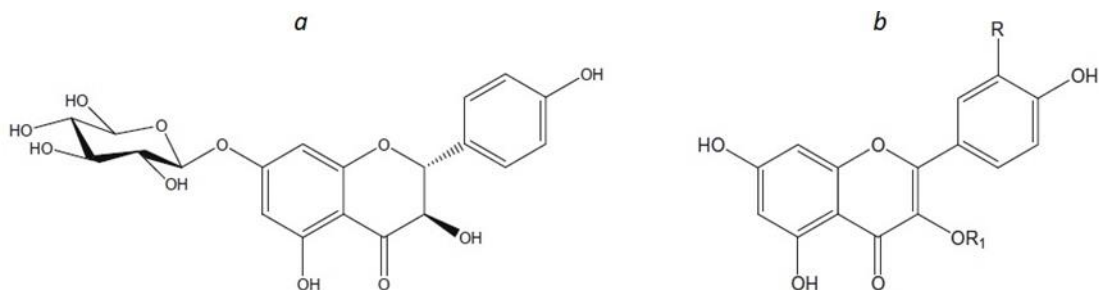
Σύμφωνα με τον Πίνακα 8 για το εκχύλισμα των καρπών Cornus mas 2, ταυτοποιήθηκαν 11 ενώσεις. Πρόκειται για 4 ιριδοειδή (λογανικό οξύ, σεκοξυλογανίνη, αλπιγενοσίδης, κορνοσίδης), 2 οργανικά οξέα (τρυγικό και μηλικό οξύ), 2 φαινολικά οξέα (καφταρικό και ελλαγικό οξύ) και 3 φλαβονοειδή (καμφερόλη-3-Ο-ραμνοσίδης, κερκετίνη-3-Ο-γαλακτοσίδης, καμφερόλη-3-Ο-γαλακτοσίδης). Σε όλες τις περιπτώσεις το σφάλμα μάζας ΔM δεν είναι σημαντικό (< 5).

Συγκριτικά τα δυο χρωματογραφήματα (Εικόνες 34 και 35) δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές. Σύμφωνα όμως με τον Πίνακα 7 και τον Πίνακα 8 και τις ουσίες που ταυτοποιήθηκαν από τα δυο εκχυλίσματα, εντοπίζονται διαφορές μεταξύ τους ως προς τα ιριδοειδή, τα φλαβονοειδή αλλά και τα οργανικά οξέα.

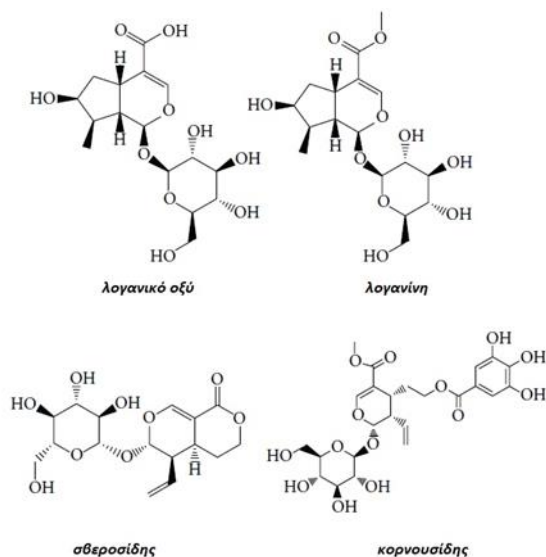
Πιο συγκεκριμένα, στους καρπούς Cornelian cherry 1 ταυτοποιήθηκαν 6 ιριδοειδή σε αντίθεση με το Cornelian cherry 2 όπου ταυτοποιήθηκαν 4 με τη λογανίνη και το σβεροσίδη να απουσιάζουν. Επίσης στο Cornelian cherry 1 ταυτοποιήθηκε η σεκολογανίνη ενώ αντίστοιχα στο Cornelian cherry 2 η σεκοξυλογανίνη. Η βασική διαφορά αυτών των δύο είναι πως στην περίπτωση της σεκολογανίνης έχουμε τη γλυκόζη να συνδέεται με το άγλυκο ιριδοειδές ενώ αντίστοιχα στη σεκοξυλογανίνη ένα μόριο ξυλόζης συνδέεται με το αντίστοιχο άγλυκο. Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, στο Cornelian cherry 2 ταυτοποιήθηκε επιπλέον η ένωση καμφερόλη 3-Ο-γαλακτοσίδης ενώ απουσιάζει η αρωμαδενδρινή-7-Ο-γλυκοσίδης. Επίσης διαφορά εντοπίζεται στο σάκχαρο με το οποίο συνδέεται η κερκετίνη. Στην περίπτωση του Cornus mas 1 η

κερκετίνη συνδέεται με ραμνόζη ενώ αντίστοιχα στο Cornelian cherry 2 με γαλακτόζη. Η καμφερόλη-3-O-ραμνοσίδης εντοπίζεται και στα δυο δείγματα. Ως προς τα οργανικά οξέα το τρυγικό οξύ ταυτοποιήθηκε και στα δυο εκχυλίσματα με τη διαφορά να βρίσκεται στο κιτρικό οξύ του Cornelian cherry 1 και αντίστοιχα στο μηλικό οξύ του Cornelian cherry 2. Τέλος, τα φαινολικά οξέα που μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν, το καφταρικό και το ελλαγικό, είναι κοινά και στα δυο δείγματα. Να σημειωθεί πως η παραλαβή των δυο εκχυλισμάτων όπως και οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν ήταν ίδιες και για τις δυο περιπτώσεις οπότε μπορούμε να κάνουμε μια ασφαλή σύγκριση. Οι διαφορές που σημειώθηκαν οφείλονται πιθανών στο διαφορετικό είδος των καρπών.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ουσίες που ταυτοποιήθηκαν στα κράνα της Ελληνικής καλλιέργειας συμπίπτουν με αυτές άλλων μελετών με αντίστοιχες μεθόδους και τεχνικές παραλαβής. (Pawlowska et al., 2010, Deng et al., 2013, Milenkovic-Andjelkovic et al., 2015, Perova et al., 2014, Krivoruchko et al., 2014)



Εικόνα 60: Μοριακές δομές φλαβονοειδών που αναγνωρίστηκαν στον καρπό της κρανιάς (*Cornus mas* L.), **a)** αρωμαδενδρίνη-7-O-γλυκοσίδης **b)** R=OH και R₁=rha: κερκετίνη- 3-O-ραμνοσίδης, R=OH και R₁=gal: κερκετίνη-3-O-γαλακτοσίδης και με R=H και R₁=gal: καμφερόλη-3-O-γαλακτοσίδης, R=H και R₁=rha: καμφερόλη-3-O-ραμνοσίδης

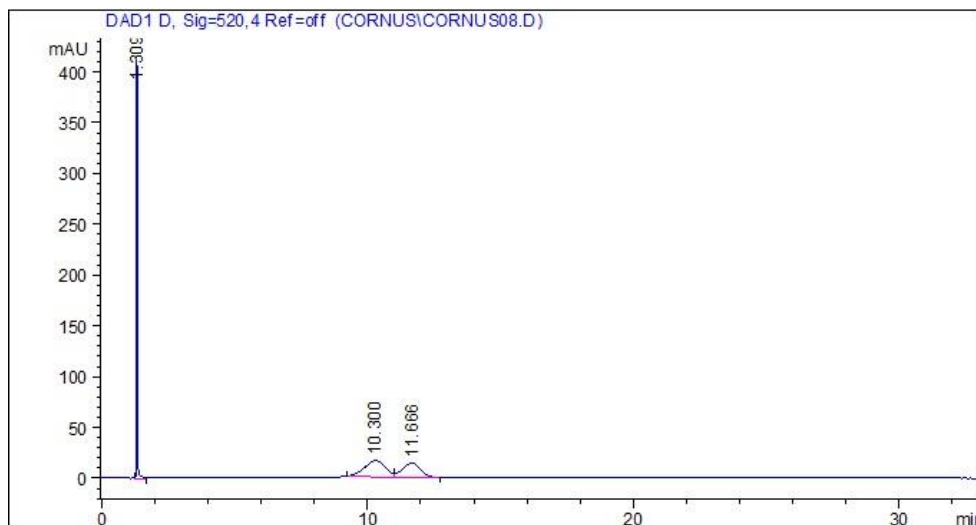


Εικόνα 61: Μοριακή δομή βασικών ιριδοειδών που αναγνωρίστηκαν στον καρπό της κρανιάς (*Cornus mas* L.)

3.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

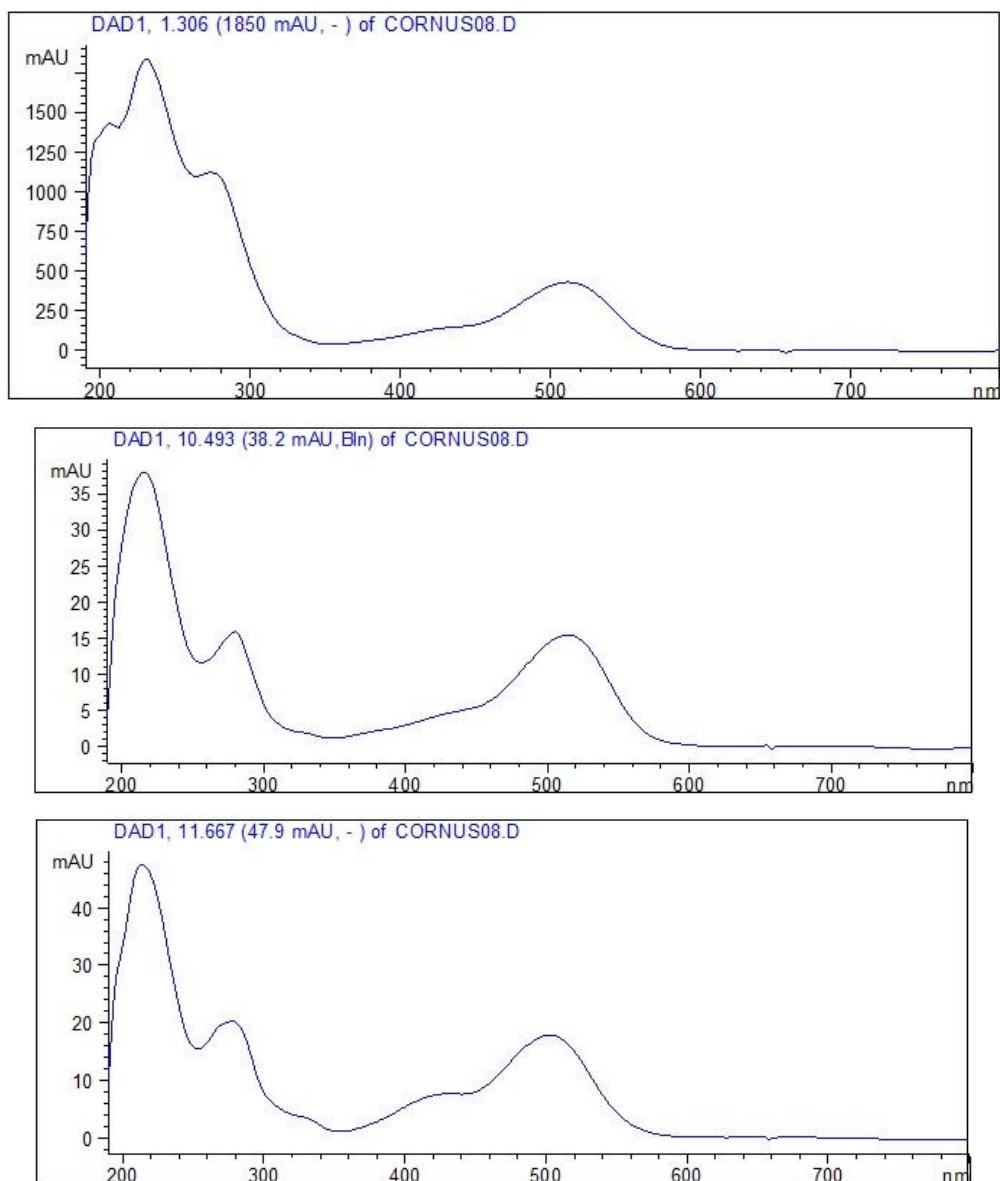
Τα δυο εκχυλίσματα των καρπών *Cornus mas* αναλύθηκαν με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) για τον εντοπισμό ανθοκυανών στα εκχυλίσματα. Ο προσδιορισμός των ανθοκυανών βασίστηκε στα φάσματα UV – Vis σε συγκεκριμένο μήκος κύματος όπου παρουσιάζεται και η μέγιστη απορρόφηση. Σύμφωνα με τους Kucharska et. al., 2015 και Pawlowska, A. et. Al., 2010, οι ανθοκυάνες στο *Cornus mas*, παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 500-522 nm. Το χρωματογράφημα καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα για τα δυο εκχυλίσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.

- Για το *Cornus mas* 1:



Εικόνα 62: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Cornelian cherry 1 συγκέντρωσης 10 mg/mL στα 520 nm.

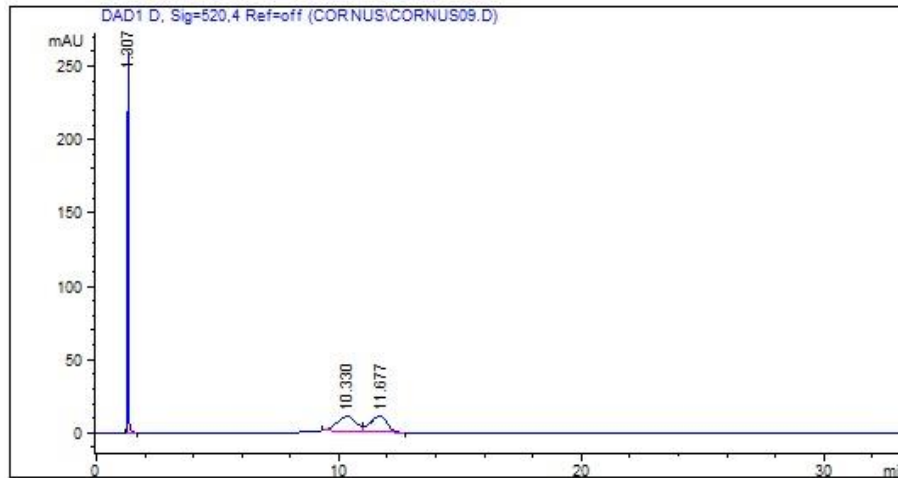
Σύμφωνα με την Εικόνα 60 και το αντίστοιχο χρωματογράφημα, στα 520 nm, για το εκχύλισμα των καρπών του *Cornus mas* 1, προκύπτουν 3 κορυφές με χρόνους έκλουσης στα 1,309, 10,300 και 11,666 min. Στην Εικόνα 61 παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis των αντίστοιχων κορυφών όπως προέκυψαν από τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων.



Εικόνα 63: Φάσματα UV-Vis εκχυλίσματος καρπών *Cornus mas* 1 των αντίστοιχων κορυφών του χρωματογραφήματος.

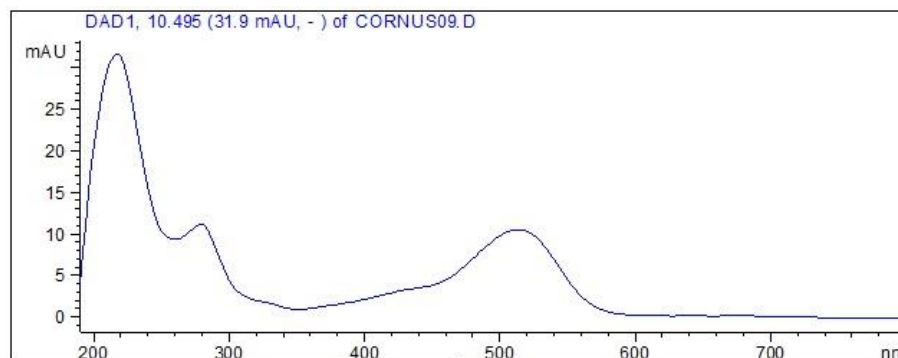
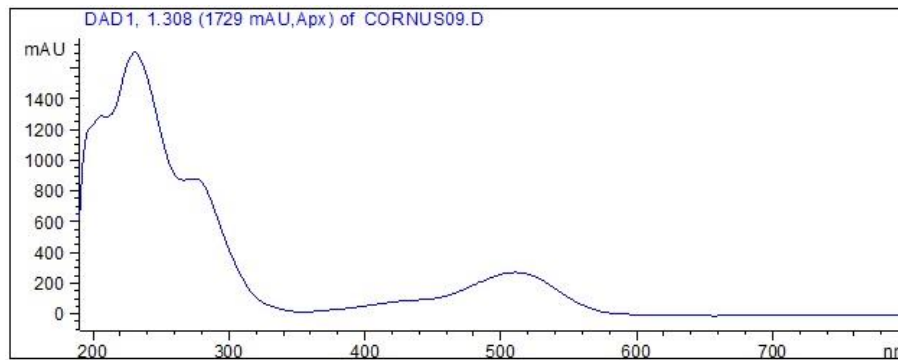
Σύμφωνα με την Εικόνα 61 και τα φάσματα στα 520 nm έπειτα από την ανάλυση με την HPLC-DAD, παρατηρούμε ζώνη απορρόφησης στο εύρος 500 με 520 nm γεγονός που υποδηλώνει παρουσία ανθοκυανών στο εκχύλισμα *Cornelian cherry* 1.

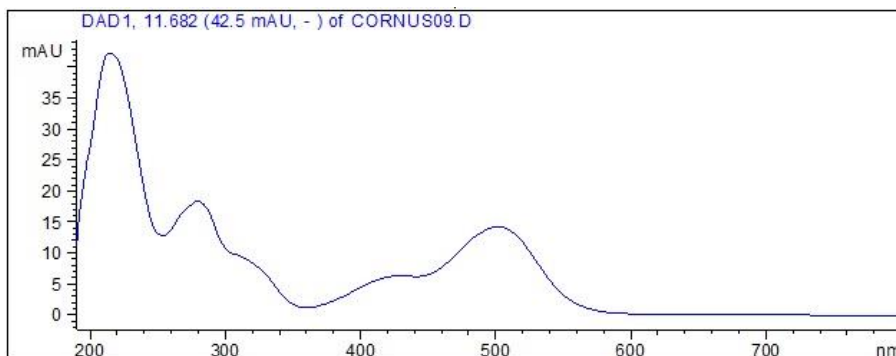
- Για το Cornelian cherry 2:



Εικόνα 64: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Cornelian cherry 2 συγκέντρωσης 10 mg/mL στα 520 nm.

Στην Εικόνα 62 και το αντίστοιχο χρωματογράφημα, στα 520 nm, για το εκχύλισμα των καρπών του *Cornus mas* 2, παρατηρούμε επίσης 3 κορυφές με χρόνους έκλουσης στα 1,307, 10,330 και 11,677 min. Στην Εικόνα 63 παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis των αντίστοιχων κορυφών.

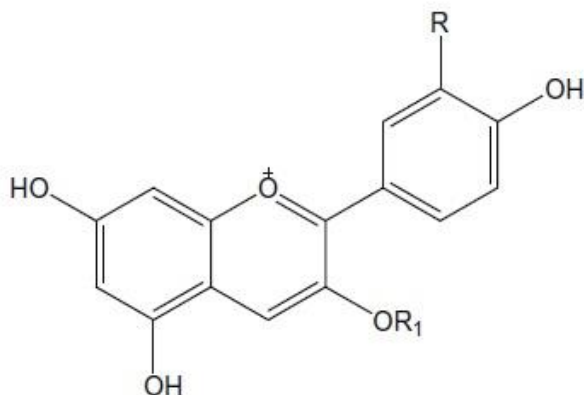




Εικόνα 65: Φάσματα UV-Vis Cornelian cherry 2 των αντίστοιχων κορυφών του χρωματογραφήματος.

Σύμφωνα με την Εικόνα 63 και τα φάσματα στα 520 nm των αντίστοιχων κορυφών, παρατηρούμε όπως και στην περίπτωση του *Cornus mas* 1, ζώνη απορρόφησης στο εύρος 500 με 520 nm. Επιβεβαιώνεται λοιπόν η παρουσία ανθοκυανών.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από την ανάλυση των εκχυλισμάτων με χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HPLC – DAD), παρατηρούμε πως τα δυο δείγματα Cornelian cherry 1 και Cornelian cherry 2, δεν διαφέρουν ως προς τις ανθοκυανές οι οποίες ανιχνεύθηκαν στα 520 nm. Και στις δυο περιπτώσεις οι ενώσεις είναι τρεις, με τους χρόνους έκλουσης να είναι σχεδόν ίδιοι με πολύ μικρές διαφορές. Ποιοτικά μπορούμε να συμπεράνουμε πως πρόκειται για ανθοκυανές όμως οι διαφορές στη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε αλλά ταυτόχρονα και η έλλειψη προτύπων ουσιών δεν μας επιτρέπουν να τις ταυτοποιήσουμε.



Εικόνα 66: Μοριακή δομή ανθοκυανινών που βιβλιογραφικά έχουν αναγνωρισθεί στον καρπό της κρνιαίας (*Cornus mas* L.), όπου R=OH ή H και R₁ σάκχαρο.

Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα καρπών κρανιάς (*Cornus mas L.*) Ελληνικής καλλιέργειας με χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών αλλά και της φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού.

Αρχικά προετοιμάστηκαν τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα από τους καρπούς *Cornus mas 1* και *Cornus mas 2* και ακολούθησε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις δοκιμές DPPH και ABTS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με το ισχυρό αντιοξειδωτικό Trolox το οποίο χρησιμοποιήθηκε και σχετικά μικρές διαφορές ανάμεσα στους δυο καρπούς. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η τιμή IC₅₀ του κάθε δείγματος και προέκυψε πως η αντιοξειδωτική δράση του *Cornelian cherry 1* ήταν μεγαλύτερη από αυτή του *Cornelian cherry 2*. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από τις δυο δοκιμές. Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση εμφανίζεται μικρότερη στη δοκιμή DPPH σε σχέση με αυτή της ABTS. Αυτό είναι αποτέλεσμα των ιδιαιτεροτήτων της δοκιμής ABTS, που όπως αναφέρθηκε δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε δείγματα που περιέχουν υδρόφιλες και λιπόφιλες ενώσεις.

Ακολούθησε εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin Ciocalteu. Το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού υλικού και έδειξε πως το εκχύλισμα του *Cornelian cherry 1* έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά από το αντίστοιχο του *Cornelian cherry 2*. Συγκριτικά με τη βιβλιογραφία, το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα όπως και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι ικανοποιητικά.

Συσχετίζοντας το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων παρατηρούμε πως το *Cornelian cherry 1* υπερτερεί σε ολικά φαινολικά συστατικά και ταυτόχρονα έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτά του *Cornelian cherry 2*.

Ως προς τη μελέτη της χημικής σύστασης των δειγμάτων, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού για μια αρχική εικόνα. Σύμφωνα με τα φάσματα προέκυψαν ζώνες απορρόφησης οι οποίες υποδηλώνουν την ύπαρξη ανθοκυανών, ιριδοειδών αλλά και φλαβονοειδών οι οποίες συμφωνούν και με τη βιβλιογραφία.

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ενώσεων στα δείγματα. Στο εκχύλισμα του *Cornelian cherry 1* ταυτοποιήθηκαν συνολικά 13 ενώσεις εκ των οποίων προέκυψαν 6 ιριδοειδή, 2 οργανικά οξέα, 2 φαινολικά οξέα και 3 φλαβονοειδή. Αντίστοιχα, στο εκχύλισμα του *Cornelian cherry 2* ταυτοποιήθηκαν 11 ενώσεις από τις οποίες οι 4 ήταν ιριδοειδή, οι 2 οργανικά οξέα, οι 2 φαινολικά οξέα και οι υπόλοιπες 3 φλαβονοειδή.

Τα δυο εκχυλίσματα, αν και από καρπούς δέντρων της ίδιας καλλιέργειας, διαφοροποιούνταν ως προς τη χημική τους σύσταση και στις τρεις κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών. Αρκετοί όμως μεταβολίτες είναι κοινοί και στις δυο περιπτώσεις. Η ύπαρξη των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα των καρπών επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία σε πολλές περιπτώσεις. Τροποποιήσεις και

βελτιώσεις στο πρόγραμμα έκλουσης μπορούν πιθανόν να δώσουν αρκετά καλύτερα αποτελέσματα με καλύτερο διαχωρισμό των ουσιών.

Τέλος η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, έδειξε παρουσία ανθοκυανών στα εκχυλίσματα τα οποία όμως δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν από την φασματομετρία μάζας. Και στην περίπτωση των ανθοκυανών, η παρουσία τους επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, διαπιστώνουμε πως οι δυο καρποί όντας του ίδιου είδους και ταυτόχρονα προερχόμενοι από την ίδια καλλιέργεια, παρουσίασαν διαφοροποιήσεις ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Αυτό δικαιολογείται όμως από τις διαφορές στη χημική τους σύσταση. Οι διαφορετικές ενώσεις που περιέχονται στο κάθε δείγμα προσδίδουν σε αυτό διαφορετική δράση. Παρ' όλα αυτά τα κρίνα αποτελούν μια σημαντική πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και γενικότερα δευτερογενών μεταβολιτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από βιομηχανίες φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών.

Βιβλιογραφία

- Alavian**, S. M., Banihabib, N., Haghi, M. E., & Panahi, F. (2014). Protective effect of Cornus mas fruits extract on serum biomarkers in CCl₄-induced hepatotoxicity in male rats. *Hepatology Monthly*, 14, e10330.
- Ashcroft**, A. E. (1997). *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*. RSC.
- Brand-Williams**, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical method to evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. U Technol.*, 28(1), 25-30.
- Brickell**, C. (1990). *The RHS Gardener's Encyclopedia of Plants and Flowers*. Dorling Kindersley Publishers Ltd. ISBN 0-86318-386-7.
- Cano**, A., Acosta, M. B., & Arnao, M. B. (2000). A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5, 365-370.
- Cetkovská**, J., Diviš, P., Vespalcová, M., Porízka, J., & Reznicek, V. (2015). Basic nutritional properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars grown in the Czech Republic. *Acta Aliment.*, 44, 357–364.
- Demir**, F., & Kalyoncu, I. H. (2003). Some nutritional, pomological and physical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *J. Food Eng.*, 60, 335–341.
- Deng**, S., West, B. J., & Jensen, C. J. (2013). UPLC-TOF-MS characterization and identification of bioactive iridoids in *Cornus mas* fruit. *J. Anal. Methods Chem.*, ID 710972.
- Dinda**, B., Kyriakopoulos, A. M., Dinda, S., Zoumpourlis, V., Thomaidis, N. S., Velegraki, A., et al. (2016). *Cornus mas* L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry. *J. Ethnopharmacol.*, 193, 670–690.
- Dokoupil**, L., & Řezniecek, V. (2012). Production and use of the Cornelian cherry – *Cornus mas* L. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2012, LX, No. 8, pp. 49–58.
- Durkovic**, J. (2008). Micropropagation of mature *Cornus mas* 'Macrocarpa. *Trees*, August 2008.
- Durkovic**, J. (2009). Adventitious rooting performance in micropropagated *Cornus mas*. *Biologia Plantarum*, December 2009.
- Gilman**, E. F., & Watson, D. G. (1993). *Cornus mas* - Cornelian-Cherry. Fact Sheet ST-193 November 1993.
- Gološin**, B. (2015). Pomological Characteristics of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Selections in Serbia and the Possibility of Growing in Intensive Organic Orchards. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, September 2015.
- Grieve**, M. (1998). *A Modern Herbal*. Tiger Books International PLC: Twickenham.
- Harborne**, J. B., & Baxter, H. (1999). *The Handbook of Natural Flavonoids*.

- Horvath, G., Turcsi, E., Molnar, P., Szabo, L. G., & Deli, J. (2007).** Isolation and identification of carotenoids in the fruit of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Planta Med.*, 73, 286–288.
- Hosseinpour-Jaghdani, F., Shomali, T., Gholipour-Shahraki, A., Rahimi-Madiseh, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2017).** *Cornus mas*: a review on traditional uses and pharmacological properties. *J. Complement. Integr. Med.*, 14, 20160137.
- Jayaprakasam, B., Olson, L. K., Schutzki, R. E., Tai, M. H., & Nair, M. G. (2006).** Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in cornelian cherry (*Cornus mas*). *J. Agric. Food Chem.*, 54, 243–248.
- Kazimierski, M., Reguła, J., & Molska, M. (2019).** Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) – characteristics, nutritional and pro-health properties. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.*, 18(1), 5-12.
- Kim, D.-O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002).** Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3713–3717.
- Klymenko, S. (2004).** THE CORNELIAN CHERRY (*Cornus mas* L.): COLLECTION, PRESERVATION, AND UTILIZATION OF GENETIC RESOURCES. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* vol. 12, 2004 Special ed.
- Klymenko, S., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., Piórecki, N., & Przybylska, D., et al. (2021).** Iridoids, Flavonoids, and Antioxidant Capacity of *Cornus mas*, *C. officinalis*, and *C. mas* X *C. officinalis* Fruits. *Biomolecules*, 2021, 11, 776.
- Krivoruchko, E. V. (2014).** Carboxylic acids from *Cornus mas*. *Chem. Nat. Compd.*, 50, 112–113.
- Krzysciak, P., Krosniak, M., Gastol, M., Ochonska, D., & Krzysciak, W. (2011).** Antimicrobial activity of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Post. Fitoter.*, 4, 227–231.
- Kucharska, A. Z., Szumny, A., Łętowska, A., Piorecki, N., & Klymenko, S. V. (2015).** Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 95–102.
- Ludwiczuk A., Skalicka-Woźniak K., Georgiev M.I. (2017).** Chapter 11-Terpenoids. *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies*, Pages 233-266
- Mamedov, N., & Craker, L. E. (2004).** Cornelian cherry: A prospective source for phytomedicine. *Acta Hortic.*, 629, 83–86.
- Milenkovic-Andjelkovic, A. S., Andjelkovic, M. Z., Radovanovic, A. N., Radovanovic, B. C., & Nikolic, V. (2015).** Phenol composition, DPPH radical scavenging, and antimicrobial activity of Cornelian cherry (*Cornus mas*) fruit and leaf extracts. *Hem. Ind.*, 69, 331–337.
- Mirbadalzadeh, R., & Shirdel, Z. (2012).** Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of *Cornus mas* extract in diabetic rats compared with glibenclamide. *Horm. Signal*, 47, 8969–8972.

- Panche** A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *J. Nutrition Sci.* 2016, 5: e47.
- Pavlov**, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., & Koleva, I. (2002). Biosynthesis and Radical Scavenging Activity of Betalains during the Cultivation of Red Beet (*Beta vulgaris*) Hairy Root Cultures. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57, 640-644.
- Pawlowska**, A. M., Camangi, F., & Braca, A. (2010). Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L. (Cornaceae) fruits. *Food Chem.*, 119, 1257–1261.
- Perova**, I. B., Zhogova, A. A., Poliakova, A. V., Eller, K. I., Ramenskaia, G. V., & Samylina, I. A. (2014). Biologically active substances of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.). *Vopr. Pitan.*, 83, 86–94.
- Piórecki**, N. (2007). Dereń jadalny (*Cornus mas* L.) – właściwości i możliwości [Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) – properties and opportunities]. *Szkołkarstwo*, 3, 86–88.
- Prior**, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290–4302.
- Pyrzynska**, K., & Anna, P. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples - *Analytical Methods* ISSU 17.
- Rafiei**, H., Omidian, K., & Bandy, B. (2017). Comparison of dietary polyphenols for protection against molecular mechanisms underlying nonalcoholic fatty liver disease in a cell model of steatosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(9).
- Rasoulia**n, H., Shahryar, H. A., Abbaspour, R., & Lotfi, H. (2012). Effects of dietary inclusion of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruit on body weight, insulin level, and glycemic status of hamsters. *Pak. J. Biol. Sci.*, 15, 547–550.
- Seeram**, N. P., Schutzki, R., Chandra, A., & Nair, M. G. (2002). Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in *Cornus* species. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2519–2523.
- Stankovic**, M. S., Zia-Ul-Haq, M., Bojovic, B. M., & Topuzovic, M. D. (2014). Total phenolic, flavonoid content and antioxidant power of leaf, flower and fruits from cornelian cherry. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 20, 358–363.
- Szotl**, T., Lipa, A., & Yareshchenko, A. (2020). Comparison of growth of maiden trees of cultivars and genotypes of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in a nursery. *Agronomy Research*, 18(S2), 1526–1536.
- Szumny**, D., Sozanski, T., Kucharska, A. Z., Dziewiszek, W., Piorecki, N., Magdalan, J., Chlebda-Sieragowska, E., Kupczynski, R., Szelag, A., & Szumny, A. (2015). Application of cornelian cherry iridoid-polyphenolic fraction and loganic acid to reduce intraocular pressure. *Evid. Based Complement Altern. Med.*, 939402.
- Tural**, S., & Koca, I. (2008). Physicochemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. *Sci. Hortic.*, 116, 362–366.

Viljoen, A., Mncwangi, N., & Vermaak, I. (2012). Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2104–2127.

Wang C., Gong X., Bo A., Zhang L., Zhang M., Zang E., Zhang C., Li M. (2020). Iridoids: Research Advances in Their Phytochemistry, Biological Activities and Pharmacokinetics. *Molecules*. 2020 Jan, 25(2): 287.

Yilmaz, K., Ercisli, S., Zengin, Y., Sengul, M., & Kafkas, E. (2009). Preliminary characterisation of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes for their physico-chemical properties. *Food Chem.*, 114, 408–412.

Zucca, P., Gianmarco, C., Sollai, F., & Sanjust, E. (2016). *Biocatalysis* 1.

Zucca, P., Cocco, G., Sollai, F. & Sanjust, E. (2016). Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. *Biocatalysis*, 1(1), 82-108. <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0007>

Ιστοσελίδες

vdberk.co.uk

Votaniki.gr