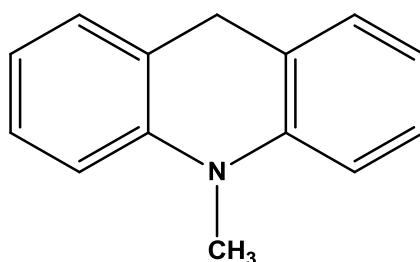




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

**N-MΕΘΥΛΟ-9,10-ΔΙΥΔΡΟΑΚΡΙΔΙΝΗ: ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ  
ΔΕΙΚΤΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ  
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**



**MB 195.25**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΔΗΜΟΤΙΚΑΛΗ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2015**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φωταύγειας του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος” το 2014 σε συνεργασία με τον Τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

Η εργασία χωρίζεται σε τρία μέρη. Στο ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ παρουσιάζονται οι βασικές έννοιες του φθορισμού και οι κατηγορίες των ενεργών μορφών του οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών ουσιών, με ειδική αναφορά στα φαινολικά παράγωγα. Στο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ αναφέρονται τα αντιδραστήρια, οι συσκευές καθώς και η πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε για την πραγματοποίηση των μετρήσεων φθορισμού και απορρόφησης και τέλος, στην ενότητα ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ γίνεται παρουσίαση και σχολιασμός των αποτελεσμάτων των μετρήσεων φθορισμού για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών έναντι δύο ελευθέρων ριζών (DPPH και ανιοντική ρίζα του υπεροξυλίου) και εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα φυσικών προϊόντων όπως εκχυλίσματα τσαγιών και καφέ. Η νέα μέθοδος συγκρίθηκε με τις διεθνώς καθιερωμένες φασματοσκοπικές τεχνικές του DPPH και ABTS.

Θα ήθελα να εκφράσω ευχαριστίες στην κα *Δήμητρα Δημοτίκαλη*, Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, για την ανάθεση του θέματος, την υποστήριξή της και την συνεχή επίβλεψη και βοήθεια που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον *Δρ. Κυριάκο Παπαδόπουλο*, Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος” και υπεύθυνο του Εργαστηρίου Φωταύγειας καθώς και την κα *Ελίνα Γιαννακοπούλου*, Ειδικό Τεχνικό Επιστήμονα του εργαστηρίου, για την καθοδήγησή τους στις πειραματικές διεργασίες και την ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων.



## ΣΚΟΠΟΣ-ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας ήταν η διερεύνηση της καταλληλότητας της χρήσης της οργανικής ένωσης N-μεθυλο-9,10-διυδροακριδίνης ως φθορισμομετρικού δείκτη για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων πρότυπων οργανικών ενώσεων και εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων έναντι της ελεύθερης ρίζας του 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλουδραζιδίου (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) και της ανιοντικής ρίζας του υπεροξυλίου ( $O_2^{\cdot-}$ ). Η N-μεθυλο-9,10-διυδροακριδίνη συντέθηκε στο εργαστήριο σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο η ακριδίνη μετατράπηκε σε μεθυλο-ακριδινικό άλας με χρήση του μεθυλιωτικού αντιδραστηρίου διμεθυλοθειικό εστέρα και ακολούθησε αναγωγή του άλατος στο δεύτερο στάδιο με βοροϋδρίδιο του νατρίου. Κατά την αντίδραση της N-μεθυλο-9,10-διυδροακριδίνης με την ελεύθερη ρίζα του 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλουδραζιδίου (DPPH) ή την ανιοντική ρίζα του υπεροξυλίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) παράγονται τα προϊόντα οξείδωσης N-μεθυλο-ακριδινικό άλας και N-μεθυλο-ακριδόνη αντιστοίχως, ο φθορισμός των οποίων μειώνεται σημαντικά παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων. Η μείωση αυτή του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών. Από τις μετρήσεις φθορισμού των προϊόντων οξείδωσης, παρουσία και απουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων, προέκυψε ότι οι φαινολικές ενώσεις με δύο υδροξύλια σε γειτονική θέση (γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, γλωρογενικό οξύ κ.α.) παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από αυτές με μία υδροξυλ-ομάδα (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο, BHT). Η μέθοδος εφαρμόστηκε επίσης για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων διαφόρων ειδών τσαγιού έναντι των δύο προαναφερθέντων ελευθέρων ριζών. Βρέθηκε ότι εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού παρουσιάζουν, γενικά, υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από ότι το μαύρο τσάι, ενώ το τελευταίο μεγαλύτερη από το τσάι βουνού, το χαμομήλι, το τίλιο, το φασκόμηλο, τη μέντα κ.α. Η αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων καφέ βρέθηκε να είναι περίπου στο ήμισυ του μαύρου και πράσινου τσαγιού έναντι της ελεύθερης ρίζας του DPPH και ίση με αυτή του πράσινου και μαύρου τσαγιού έναντι της ανιοντικής ρίζας του υπεροξυλίου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φυσικών προϊόντων εκφράστηκε σε ισοδύναμα του Trolox ανά γραμμάριο αποξηραμένου υλικού ( $\mu\text{M TE per gram dry matter}$ ). Η νέα μέθοδος συγκρίθηκε με τις διεθνώς καθιερωμένες φασματοσκοπικές τεχνικές του DPPH και ABTS (διαμμωνιακό άλας του 2,2-αζω-δισ(3-αιθυλοβενζοθιοαζολίνη-6-σουλφονικού οξέος) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ABTS).

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	σελ.
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	3
<b>ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	5
<b>A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>1. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ</b>	<b>9</b>
1.1. Βασικές έννοιες του φθορισμού	9
1.2. Μηχανισμός του φθορισμού	9
1.3. Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του φθορισμού	11
1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν το φθορισμό	12
1.5. Οργανολογία της φθορισμομετρίας	16
1.6. Εφαρμογές της φθορισμομετρίας	18
<b>2. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ</b>	<b>22</b>
2.1. Ελεύθερες ρίζες	22
2.2. Ενεργές μορφές οξυγόνου	22
2.2.1. Ρίζα υπεροξυλίου ( $O_2^{\cdot-}$ )	24
2.2.2. Υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )	25
2.2.3. Ρίζα υδροξυλίου ( $\cdot OH$ )	26
2.3.1. Οξυγόνο απλής κατάστασης ( $^1O_2$ )	27
<b>3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ</b>	<b>28</b>
3.1. Κατηγοριοποίηση των αντιοξειδωτικών	29
3.1.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	29
3.1.2. Μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά	30
3.1.3. Φυσικά αντιοξειδωτικά	33

<b>4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ</b>	<b>38</b>
4.1. Κατηγοριοποίηση των μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας	38
4.1.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στον αποχρωματισμό σταθερών ελευθέρων ριζών	39
4.1.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στην μέτρηση των προϊόντων οξείδωσης	43
4.1.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης βασισμένη στην ικανότητα δειγμάτων να ανάγουν μέταλλα με υψηλό οξειδωτικό σθένος (ιόντα σιδήρου III και χαλκού II)	45
4.2. Κριτική της αξιοπιστίας των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας	46

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ – ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ</b>	<b>48</b>
5.1. Αντιδραστήρια	48
5.2. Παρασκευή διαλυμάτων	49
5.3. Όργανα μετρήσεων	49
5.4. Εργαστηριακός εξοπλισμός	51
5.5. Σύνθεση της N-μεθυλο-9,10-διϋδροκρινιδίνης	52
5.6. Διαδικασία παρασκευής εκχυλισμάτων τσαγιών και καφέ	54
5.7. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της νέας φθορισμομετρικής μεθόδου	54
5.8. Μετρήσεις εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του DPPH	61
5.9. Μετρήσεις εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του ABTS	61

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

<b>6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>	<b>62</b>
6.1. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας πρότυπων αντιοξειδωτικών ενώσεων	65

6.2. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων τσαγιών και καφέ.	69
6.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών με τις μεθόδους DPPH και ABTS	72
6.4. Συμπεράσματα	74
6.5. Προοπτικές	76
<b>Δ. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b>	<b>77</b>
<b>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>79</b>



# A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## 1. Φθορισμομετρία

### 1.1. Βασικές έννοιες του φθορισμού

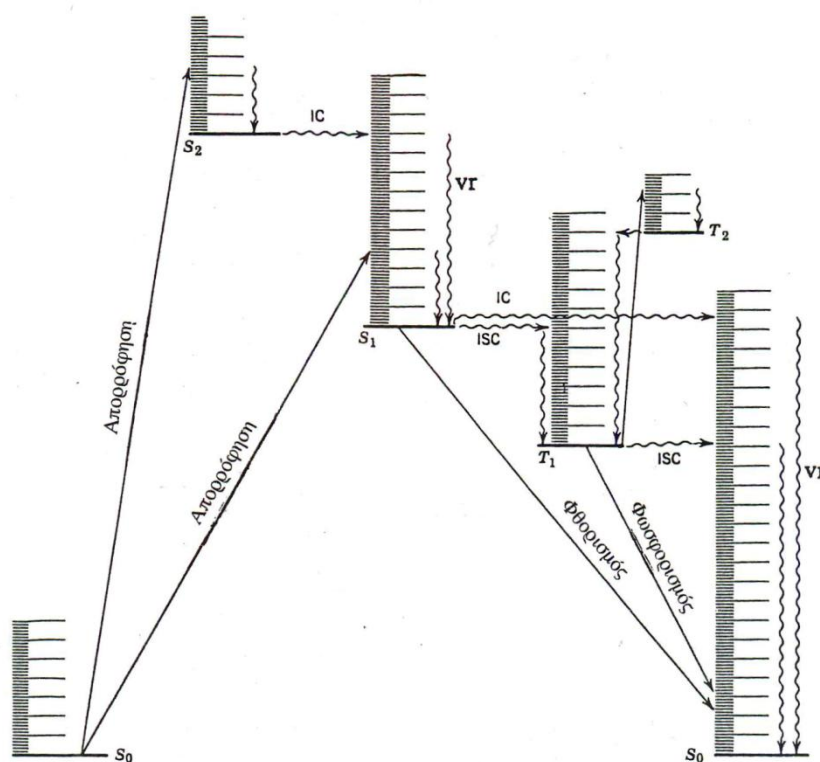
Φθορισμός ονομάζεται η εκπομπή υπεριώδους, ορατής ή υπέρυθρης ακτινοβολίας από ηλεκτρονικά διεγερμένες απλές καταστάσεις των μορίων κατά την αποδιέγερσή τους προς τη βασική απλή κατάσταση του μορίου ( $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ ) σε χρονικά πλαίσια  $10^{-9}$  μέχρι  $10^{-6}$  s μετά τη διέγερση. Όταν η εκπομπή ακτινοβολίας πραγματοποιείται κατά την αποδιέγερση της διεγερμένης τριπλής κατάστασης στη βασική απλή κατάσταση του μορίου ( $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ ) και σε χρονικά πλαίσια της τάξης των  $10^{-4}$  μέχρι 10 s, τότε η εκπομπή ακτινοβολίας ονομάζεται φωσφορισμός. Η μικρή διάρκεια του φθορισμού καθιστά αναγκαία τη μέτρησή του κατά τη διάρκεια της διέγερσης και όχι μετά τον τερματισμό αυτής [1].

Οι ουσίες που φθορίζουν είναι κυρίως οργανικές ή ανόργανες χημικές ενώσεις καθώς και σύμπλοκα οργανομεταλλικών ενώσεων. Παραδείγματα οργανικών ενώσεων που φθορίζουν είναι συνήθως αρωματικοί υδρογονάνθρακες, όπως ναφθαλένιο, ανθρακένιο, φενανθρένιο, πυρένιο, περυλένιο, ή φλουορεσκεΐνες, ροδαμίνες, κουμαρίνες, οξαζίνες, πολυένια, διφενυλπολυένια, αμινοξέα (τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φενυλαλανίνη) κ.α.. Στις ανόργανες φθορίζουσες ουσίες περιλαμβάνονται τα ιόντα ουρανυλίου ( $UO_2^+$ ), ιόντα λανθανιδών, γυαλιά εμπλουτισμένα με μέταλλα (doped glasses), όπως μέταλλα Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag, θειώδεις, σεληνιώδεις ή φωσφορώδεις ενώσεις ψευδαργύρου, καδμίου, γαλλίου (ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, GaS, GaP). Στα φθορίζοντα σύμπλοκα οργανομεταλλικών ενώσεων συγκαταλέγονται, κυρίως, σύμπλοκα του ρουθηνίου με πολυαρωματικές ενώσεις, όπως  $Ru(biPy)_3Cl_2$  και σύμπλοκα περιέχοντα ιόντα λανθανιδών με φθορίζοντες οργανικούς υποκαταστάτες, όπως 8-υδροξυκινολίνη [2].

### 1.2. Μηχανισμός φθορισμού

Η απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από ένα οργανικό μόριο οδηγεί σε ηλεκτρονιακές διεγέρσεις τύπου  $\eta-\pi^*$  ή  $\pi-\pi^*$  ( $\eta$ ,  $\pi$ ,  $\pi^*$ : μη δεσμικά, δεσμικά και αντιδεσμικά τροχιακά, αντιστοίχως), οπότε το μόριο μεταβαίνει από τη θεμελιώδη απλή κατάσταση  $S_0$  σε

διεγερμένες απλές καταστάσεις  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  κ.ο.κ (Σχήμα 1). Η ηλεκτρονική κατάσταση ενός ατόμου ορίζεται από την ποσότητα  $2S+1$ , η οποία ονομάζεται πολλαπλότητα του spin, όπου  $S=\sum s_i$ , ο ολικός κβαντικός αριθμός του spin και  $s_i$  το spin κάθε ηλεκτρονίου του ατόμου. Όταν η πολλαπλότητα ισούται με 1 η κατάσταση είναι απλή (singlet, S) και όλα τα ηλεκτρόνια είναι συζευγμένα με αντιπαράλληλα spin, όταν η πολλαπλότητα ισούται με 2 η κατάσταση είναι διπλή (doublet) και υπάρχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, όταν η πολλαπλότητα είναι 3 η κατάσταση είναι τριπλή (triplet, T) και υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spin κ.ο.κ [3]. Μια τριπλή κατάσταση T έχει χαμηλότερη ενέργεια από την αντίστοιχη απλή κατάσταση S. Η μετάπτωση  $S_0 \rightarrow S_1$  είναι επιτρεπτή, ενώ η μετάπτωση  $S_0 \rightarrow T_1$  είναι “απαγορευμένη”, λόγω της μικρής πιθανότητας να λάβει χώρα αναστροφή του spin στο διεγερμένο ηλεκτρόνιο (η μετάπτωση  $S_0 \rightarrow T_1$  είναι περίπου  $10^6$  φορές λιγότερο πιθανή από τη μετάπτωση  $S_0 \rightarrow S_1$ ).



**Σχήμα 1:** Διάγραμμα Jablonski. Ενδομοριακές φωτοφυσικές διεργασίες αποδιέγερσης μιας οργανικής ένωσης.  $S_0$ ,  $S_1$  και  $S_2$ : θεμελιώδης, πρώτη και δεύτερη απλή κατάσταση,  $T_1$ : πρώτη τριπλή κατάσταση [3].

Κατά την αποδιέγερση του μορίου όλες οι ανώτερες διεγερμένες απλές καταστάσεις  $S_3$ ,  $S_2$  καταλήγουν αρχικώς στη χαμηλότερη στάθμη δόνησης της διεγερμένης απλής κατάστασης  $S_1$ . Αυτό γίνεται αρχικώς με δονητική χαλάρωση (vibrational relaxation, vr) εντός της ίδιας κατάστασης και μετά με εσωτερική μετατροπή (Internal Conversion, IC), π.χ.  $S_3 \rightsquigarrow S_2$ ,  $S_2 \rightsquigarrow S_1$  (οριζόντια κυματοειδής γραμμή στο Σχήμα 1) και κατόπιν πάλι με δονητική χαλάρωση εντός της

$S_1$ . Κατά τη δονητική χαλάρωση εκλύεται θερμότητα. Η δε περαιτέρω αποδιέγερση σε θερμοκρασία δωματίου από την  $S_1$  στην  $S_0$  λαμβάνει χώρα μέσω μιας εκ των παρακάτω τεσσάρων διεργασιών [1]:

(α) Εκπομπή φθορισμού:  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\phi\theta}$  ( $\nu_{\phi\theta} < \nu_{\delta}$ , όπου  $\nu_{\delta}$  και  $\nu_{\phi\theta}$  είναι οι συχνότητες της ακτινοβολίας διέγερσης και φθορισμού αντιστοίχως).

(β) Εσωτερική μετατροπή (Internal Conversion, IC):  $S_1 \rightsquigarrow S_0 + \text{θερμότητα}$  (το βέλος  $\rightsquigarrow$  υποδηλώνει μετάπτωση άνευ εκπομπής ακτινοβολίας).

(γ) Διασυστηματική διασταύρωση (Intersystem Crossing, ISC):  $S_1 \rightsquigarrow T_1$ , η οποία είναι πιθανό να οδηγήσει σε εκπομπή φωσφορισμού,  $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\phi\omega}$  (όπου  $\nu_{\phi\omega}$  είναι η συχνότητα της ακτινοβολίας εκπομπής φωσφορισμού).

(δ) Απόσβεση (quenching) κατά τη σύγκρουση με μόρια άλλων ουσιών.

Επειδή το αποδιεγειρόμενο μόριο δύναται να καταλήξει σε οποιαδήποτε από τις δονητικές στάθμες της  $S_0$ , το φάσμα φθορισμού συνίσταται από πλήθος γραμμών, κυρίως στην περιοχή του ορατού. Παρουσία διαλύτη οι γραμμές πλαταιίνουν και αλληλεπικαλύπτονται και ως εκ τούτου τα λαμβανόμενα φάσματα φθορισμού είναι φάσματα ταινιών παρόμοια με τα φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες ή το ορατό (σχέση αντικειμένου – ειδώλου).

### 1.3. Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του φθορισμού

Κατά τη φθορισμομετρική μελέτη μιας ουσίας λαμβάνονται δύο είδη φασμάτων, αυτό της διέγερσης και αυτό της εκπομπής. Στην πρώτη περίπτωση, καταγράφεται η ένταση της ακτινοβολίας διέγερσης σε διάφορα μήκη κύματος διατηρώντας το μήκος κύματος της ακτινοβολίας εκπομπής σταθερό, ενώ στα φάσματα εκπομπής καταγράφεται η ένταση της ακτινοβολίας εκπομπής σε διάφορα μήκη κύματος διατηρώντας το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης σταθερό. Τα φάσματα διέγερσης (excitation spectrum) και εκπομπής (emission spectrum) λαμβάνονται με φασματοφθορισμόμετρα, τα οποία είναι εξοπλισμένα με δύο μονοχρωμάτορες που ρυθμίζουν την ακτινοβολία διέγερσης και φθορισμού, αντιστοίχως. Χαρακτηριστική διαφορά των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής είναι ότι τα δεύτερα εμφανίζονται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Στα προαναφερθέντα φάσματα διέγερσης και φθορισμού δε λαμβάνεται υπόψη η εξάρτηση της έντασης  $I_0$  της ακτινοβολίας διέγερσης και της απόκρισης του φωτοανιχνευτή από το μήκος κύματος. Αυτά τα φάσματα συνήθως είναι ικανοποιητικά για εργασία ρουτίνας, αν και δύναται να ληφθούν “διορθωμένα” φάσματα με κατάλληλες διορθώσεις όπως, στην τιμή  $I_0$  με ρύθμιση του εύρους της σχισμής του

μονοχρωμάτορα διέγερσης ώστε η ένταση  $I_0$  να διατηρείται σταθερή, είτε στο σήμα εξόδου του ανιχνευτή. Το “διορθωμένο” φάσμα διέγερσης αποτελεί είδωλο του φάσματος απορρόφησης της ουσίας, μετατοπισμένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, μπορεί δε να χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση μιας φθορίζουσας ουσίας [4].

#### 1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τον φθορισμό

Προκειμένου ένα μόριο να παρουσιάζει τη δυνατότητα φθορισμού, θα πρέπει η δομή του να πληροί κάποιες προϋποθέσεις. Κατά κανόνα φθορίζουν οι ενώσεις οι οποίες περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους ή πολλαπλούς συζυγείς διπλούς δεσμούς. Υποκαταστάτες με περίσσεια ή έλλειμμα ηλεκτρονίων επηρεάζουν επίσης σε μεγάλο βαθμό το φθορισμό των μορίων, όπως για παράδειγμα οι αμινομάδες ( $R-NH_2$ ) ή οι υδροξυλομάδες ( $R-OH$ ) οι οποίες διευκολύνουν τη μετάπτωση  $S_1 \rightarrow S_0$ . Αντιθέτως, ηλεκτρονιόφιλες ομάδες όπως καρβοξυλικές ( $-COOH$ ) ή νίτρο ( $-NO_2$ ) ομάδες και αλογονοϊόντα μειώνουν ή ακόμη και εκμηδενίζουν το φθορισμό. Επίσης, ο σχηματισμός χηλικών ενώσεων με μεταλλοϊόντα ενισχύει το φθορισμό. Σημαντικό ρόλο στο φθορισμό ενός μορίου παίζουν και οι παρακάτω παράγοντες [1, 2, 4]:

(α) *Ξένα μόρια*. Η ύπαρξη ξένων μορίων στο περιβάλλον του φθορίζοντος μορίου μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ένταση του φθορισμού λόγω απορρόφησης μέρους της ακτινοβολίας διέγερσης ή φθορισμού ή λόγω αντίδρασης αυτών με το φθορίζον μόριο.

(β) *Διαλύτης*. Ο φθορισμός αυξάνεται, κατά κανόνα, με την πολικότητα και το ιξώδες του διαλύτη. Ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης είναι, ωστόσο, πιθανόν να απορροφά την ακτινοβολία διέγερσης ή φθορισμού.

(γ) *pH*. Όταν το pH επιδρά στο φορτίο της χρωμοφόρου ομάδας και των μεσομερών τύπων μιας ένωσης, επηρεάζεται έντονα ο φθορισμός της ένωσης αυτής. Για παράδειγμα, η ανιλίνη φθορίζει σε pH 7 και 12, όχι όμως σε pH 2, διότι σε αυτό φθορίζει το μόριο αυτής και όχι το κατιόν ανιλινίου. Αντιθέτως, η κινίνη φθορίζει μόνο σε ισχυρά όξινα διαλύματα. Ορισμένες ουσίες είναι μάλιστα τόσο ευαίσθητες στο pH, ώστε είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες σε φθορισμομετρικές ογκομετρήσεις εξουδετέρωσης. Οι φθορισμομετρικοί δείκτες πλεονεκτούν έναντι των πρωτολυτικών δεικτών [5] ως προς το ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την ογκομέτρηση θολών, έγχρωμων ή αραιών διαλυμάτων.

(δ) *Θερμοκρασία*. Αύξηση της θερμοκρασίας συνήθως συνεπάγεται μείωση της έντασης φθορισμού, διότι η αυξανόμενη τυχαία κίνηση των μορίων αυξάνει την πιθανότητα των συγκρούσεων μεταξύ των μορίων και συνεπώς την αποδιέγερση αυτών με έκλυση θερμότητας.

(ε) Επίδραση της συγκέντρωσης στην ένταση του φθορισμού. Από το νόμο των Lambert - Beer είναι γνωστό ότι το κλάσμα της διερχόμενης ακτινοβολίας δια μέσου ενός διαλύματος είναι:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon bc} \quad (1.1)$$

όπου I και I<sub>0</sub> είναι η ένταση της εξερχόμενης και της ακτινοβολίας διέγερσης αντιστοίχως (φωτόνια/cm<sup>2</sup> - sec), c η συγκέντρωση της ουσίας που απορροφά (mol/L), b το πάχος της κυψελίδας (cm) και ε (L/mol-cm) ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας. Το ε είναι χαρακτηριστικό για κάθε ένωση και εκφράζει την ικανότητα της ουσίας να απορροφά ακτινοβολίες συγκεκριμένου μήκους κύματος.

Το αντίστοιχο κλάσμα της απορροφούμενης ακτινοβολίας που προκύπτει από την (1.1) είναι:

$$1 - \frac{I}{I_0} = 1 - e^{-\epsilon bc} \quad (1.2)$$

Από την (1.2) έχουμε:

$$I_0 - I = I_0(1 - e^{-\epsilon bc}) \quad (1.3)$$

όπου I<sub>0</sub> - I είναι η ποσότητα της απορροφούμενης από το διάλυμα ακτινοβολίας στη μονάδα του χρόνου, δηλαδή η ταχύτητα απορρόφησης της ακτινοβολίας. Η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού I<sub>φθ</sub> είναι ανάλογη του όρου (I<sub>0</sub> - I) και του συντελεστή κβαντικής απόδοσης φθορισμού Φ<sub>φθ</sub> (0 < Φ<sub>φθ</sub> < 1):

$$I_{\phi\theta} = (I_0 - I)\Phi_{\phi\theta} = \Phi_{\phi\theta}I_0(1 - e^{-\epsilon bc}) \quad (1.4)$$

Η κβαντική απόδοση φθορισμού, Φ<sub>φθ</sub>, δίνεται από τη σχέση:

$$\Phi_{\phi\theta} = \frac{\text{αριθμός εκπεμπομένων φωτονίων από την } S_1 \text{ κατάσταση / cm}^3 \cdot \text{sec}}{\text{αριθμός απορροφούμενων φωτονίων από την } S_0 \text{ κατάσταση / cm}^3 \cdot \text{sec}} \quad (1.5)$$

Για πολύ αραιά διαλύματα, στα οποία ο όρος εbc είναι μικρότερος του 0.05, η Εξίσωση (1.4) απλοποιείται στην εξίσωση:

$$I_{\phi\theta} = \kappa\Phi_{\phi\theta}I_0\epsilon bc = \kappa'c \quad (1.6)$$

όπου ο συντελεστής  $\kappa$  είναι σταθερά που έχει σχέση με το χρησιμοποιούμενο όργανο και με τη γεωμετρία της διάταξης μέτρησης του  $I_{\phi\theta}$  (ο φθορισμός εκπέμπεται προς όλες τις κατευθύνσεις, μετράται όμως μικρό μέρος αυτού, συνήθως υπό γωνία  $90^\circ$  ως προς τη διεγείρουσα ακτινοβολία). Η γραφική απεικόνιση της Εξίσωσης (1.6) δηλαδή του  $I_{\phi\theta}$  συναρτήσει του  $c$ , πρέπει να δώσει μια ευθεία καμπύλη αναφοράς, ανάλογη προς τη λαμβανόμενη βάσει του νόμου των Lambert - Beer στη φασματοφωτομετρία. Η καμπύλη αναφοράς είναι ευθεία μέχρι μιας μέγιστης συγκέντρωσης,  $c_{\text{μεγ}}$ , η οποία ορίζεται από τη σχέση  $c_{\text{μεγ}} = 0.05 / \epsilon b$ , όπου  $\epsilon$  είναι η μοριακή απορροφητικότητα στο μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης. Για  $c > c_{\text{μεγ}}$ , η καμπύλη αναφοράς γίνεται μη γραμμική, με μείωση της κλίσης της. Τελικά, όταν η απορρόφηση της προσπίπτουσας στο διάλυμα ακτινοβολίας είναι σχεδόν πλήρης, η Εξίσωση (1.6) απλοποιείται στην:

$$I_{\phi\theta} = \kappa \Phi_{\phi\theta} I_0 \quad (1.7)$$

Προκύπτει, δηλαδή, ότι το σήμα του ανιχνευτή είναι ανεξάρτητο της συγκέντρωσης της φθορίζουσας ουσίας. Επειδή η καμπύλη αναφοράς, συνήθως, καλύπτει μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων (δυναμική περιοχή  $\sim 10^3$  μέχρι και  $10^5$ ) πολλές φορές χρησιμοποιούνται διαγράμματα του  $\log I_{\phi\theta}$  συναρτήσει του  $\log c$ .

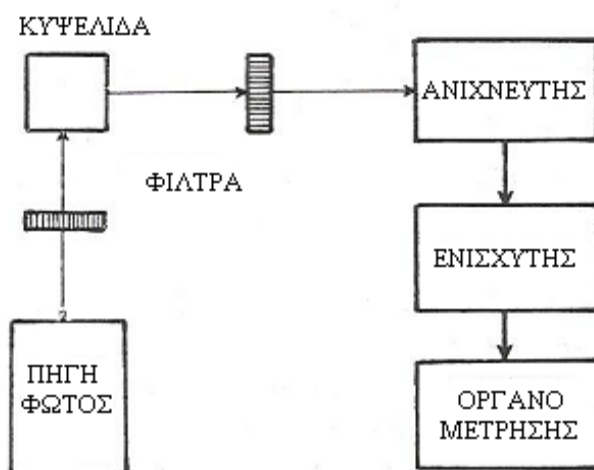
Από την Εξίσωση (1.6) φαίνεται ότι η αύξηση της ευαισθησίας (μείωση της συγκέντρωσης) δύναται να επιτευχθεί με χρησιμοποίηση ακτινοβολίας διέγερσης η οποία να αντιστοιχεί στο μέγιστο του φάσματος απορρόφησης και με αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας διέγερσης  $I_0$ , μέχρι ενός ορίου όμως, διότι αφενός μεν η υπέρμετρος αύξηση του  $I_0$  (ιδίως σε μήκη κύματος  $< 250 \text{ nm}$ ) δύναται να προκαλέσει φωτοδιάσπαση της ουσίας, αφετέρου δε η τυχόν παρεμποδιστική δράση του διαλύτη και φθορίζουσών ακαθαρσιών καθίσταται σημαντικότερη σε μικρότερες συγκεντρώσεις της προσδιοριζόμενης ουσίας. Υπάρχει βασική διαφορά μεταξύ φασματοφωτομετρίας απορρόφησης και φθορισμομετρίας στον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης, το οποίο καθορίζεται στη μεν φασματοφωτομετρία από την ελάχιστη ανιχνεύσιμη διαφορά έντασης μεταξύ προσπίπτουσας και διερχόμενης ακτινοβολίας, στη δε φθορισμομετρία από το μέγεθος του θορύβου στο κύκλωμα ανιχνευτή - ενισχυτή (το φθορισμόμετρο πρέπει να διακρίνει μεταξύ σκότους και μιας ελάχιστης τιμής έντασης φθορισμού). Η φθορισμομετρία επιτρέπει τον προσδιορισμό πολύ μικρών συγκεντρώσεων, συνήθως δε η ευαισθησία αυτής είναι  $10^2 - 10^4$  φορές μεγαλύτερη από την ευαισθησία της φασματοφωτομετρίας απορρόφησης. Στην περίπτωση που ο συντελεστής  $\epsilon$  ή η κβαντική απόδοση  $\Phi_{\phi\theta}$  (ή και οι δύο) είναι μικρά, δύναται να διευθετηθεί κατάλληλα η πηγή φωτός ή ο μονοχρωμάτορας, ώστε να καταστεί δυνατή η

ανάλυση. Αυτή η διευθέτηση, συνήθως, γίνεται στη φασματοφωτομετρία. Η φθορισμομετρία υπερτερεί της φασματοφωτομετρίας απορρόφησης και ως προς την εκλεκτικότητα, κάτι που οφείλεται, αφενός μεν στο ότι μόνο μικρό ποσοστό ουσιών, οι οποίες απορροφούν στο υπεριώδες ή το ορατό, φθορίζει (πλεονέκτημα, αλλά και μειονέκτημα, διότι περιορίζει τον αριθμό των ουσιών οι οποίες μπορούν να προσδιοριστούν φθορισμομετρικά), αφετέρου δε στο ότι στη μεν φθορισμομετρία έχουμε δύο είδη φασμάτων (επομένως και μεγαλύτερη πειραματική ευελιξία, διότι είναι δυνατόν να επιλεγεί το μήκος κύματος, είτε της ακτινοβολίας διέγερσης, είτε της μετρούμενης ακτινοβολίας εκπομπής), διέγερσης και φθορισμού, ενώ στη φασματοφωτομετρία έχουμε μόνο το φάσμα απορρόφησης. Ως μειονεκτήματα της φθορισμομετρίας μπορούν να θεωρηθούν η πιθανότητα ανεπιθύμητης αλληλεπίδρασης των διεγερμένων μορίων (απόσβεση, φωτοαποσύνθεση κλπ.) και η σχετικώς μικρή ακρίβεια αυτής, συνήθως  $\pm 2$  έως 10 %.

Η μείωση της έντασης φθορισμού κάτω της αναμενόμενης, βάσει της Εξίσωσης (1.6), τιμής, ονομάζεται *απόσβεση* (quenching). Η απόσβεση οφείλεται σε πολλές αιτίες, όπως: (α) στην αποδιέγερση των διεγερμένων μορίων της προσδιοριζόμενης ουσίας A, λόγω των συγκρούσεων μεταξύ τους ή με μόρια άλλων ουσιών, (β) στη φωτοδιάσπαση της προσδιοριζόμενης ουσίας, λόγω της πλούσιας σε ενέργεια ακτινοβολίας διέγερσης (για αυτό οι μετρήσεις γίνονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα), (γ) στην αυτοαπορρόφηση της ακτινοβολίας φθορισμού από μόρια της ουσίας A, τα οποία βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση  $S_0$ , κλπ [4, 6]. Η αυτοαπορρόφηση συνεπάγεται καμπύλωση της καμπύλης αναφοράς προς τον άξονα των συγκεντρώσεων. Επίσης, η αυτοαπορρόφηση διαπιστώνεται με μέτρηση της έντασης φθορισμού του δείγματος και εν συνεχεία αραιωμένου δείγματος, οπότε και γίνονται οι απαραίτητες διορθώσεις. Προς αποφυγή της απόσβεσης του φθορισμού από τυχόν παραμαγνητικές ουσίες, αυτές πρέπει να απομακρύνονται από το διάλυμα. Για παράδειγμα, το παραμαγνητικό διαλυμένο οξυγόνο (η βασική κατάσταση του οποίου είναι η τριπλή,  $T_0$ , και διαθέτει δύο ηλεκτρόνια με παράλληλα spin στα δύο αντιδεσμικά τροχιακά  $2p_y$  και  $2p_z$ ) απομακρύνεται με διαβίβαση αερίου αζώτου στο διάλυμα, ιδίως κατά την εργασία σε οργανικούς διαλύτες [7].

## 1.5. Οργανολογία της φθορισμομετρίας

Οι βασικές μονάδες των οργάνων, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της ακτινοβολίας φθορισμού, είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες μονάδες των φωτομέτρων και των φασματοφωτομέτρων. Διακρίνονται δύο τύποι τέτοιων οργάνων, τα *φθορισμόμετρα* και τα *φασματοφθορισμόμετρα*, αναλόγως του εάν τα οπτικά τους συστήματα αποτελούνται από φίλτρα ή από μονοχρωμάτορες. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται σχηματικό διάγραμμα ενός φθορισμόμετρου. Η εκπεμπόμενη από την πηγή φωτός ακτινοβολία διέρχεται μέσω ενός πρωτογενούς φίλτρου (φίλτρο διέγερσης), το οποίο επιτρέπει τη διόδο μόνο του τμήματος εκείνου της δέσμης φωτός, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση των μορίων (περίπου το 95 – 98 % της ακτινοβολίας διέγερσης διέρχεται από την κυψελίδα του δείγματος χωρίς να απορροφηθεί από το φίλτρο), ενώ ανακόπτεται η ακτινοβολία, η οποία εκπέμπεται στη συνέχεια από το ακτινοβληθέν δείγμα. Η ακτινοβολία φθορισμού εκπέμπεται από το δείγμα προς όλες τις κατευθύνσεις, συνήθως όμως μετράται υπό γωνία 90° ως προς τη διεγείρουσα ακτινοβολία, προς ελαχιστοποίηση της ανίχνευσης της δέσμης διέγερσης και της παρασιτικής ακτινοβολίας (ευθυγράμμιση πηγής φωτός - δείγματος - ανιχνευτή, καθιστά προβληματική τη διάκριση της ασθενούς ακτινοβολίας φθορισμού από την ισχυρή ακτινοβολία διέγερσης). Η ακτινοβολία φθορισμού διέρχεται μέσω ενός δευτερογενούς φίλτρου (φίλτρο φθορισμού), το οποίο επιτρέπει τη διόδο μικρού τμήματος αυτής και προσπίπτει στον ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστής). Το σήμα εξόδου του ανιχνευτή ενισχύεται και παρουσιάζεται σε ένα όργανο μετρήσεως (μετρητής, καταγραφείας ή παλμογράφος).



Σχήμα 2: Σχηματικό διάγραμμα φθορισμομέτρου

Τα φασματοφθορισμόμετρα μοιάζουν με τα φασματοφωτόμετρα, περιέχουν όμως δύο μονοχρωμάτορες, για την απομόνωση της επιθυμητής συχνότητας της ακτινοβολίας διέγερσης



και της ακτινοβολίας φθορισμού. Στο εμπόριο διατίθενται δύο τύποι φασματοφθορισμομέτρων. Στον πρώτο τύπο χρησιμοποιείται φίλτρο για τον περιορισμό της ακτινοβολίας διέγερσης και φράγμα (ή πρίσμα) για την απομόνωση μιας κορυφής του φάσματος εκπομπής (στο εμπόριο διατίθενται φασματοφωτόμετρα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φασματοφθορισμόμετρα αυτού του τύπου με την προσθήκη ορισμένων εξαρτημάτων προσαρμογής, όπως: ξεχωριστής πηγής φωτός, υποδοχέα φίλτρων, κυψελίδων και διάταξης για την εστίαση της ακτινοβολίας φθορισμού στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα). Στο δεύτερο τύπο χρησιμοποιούνται δύο φράγματα (ή πρίσματα) για την απομόνωση πολύ στενών τμημάτων της ακτινοβολίας διέγερσης και φθορισμού. Τα όργανα του δεύτερου τύπου χρησιμοποιούνται κυρίως κατά τη μελέτη των ηλεκτρονικών και δομικών χαρακτηριστικών ενός μορίου και την ταυτοποίηση των ουσιών, μπορούν δε να χρησιμοποιηθούν και στην ποσοτική ανάλυση, όπου όμως είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται τα φθηνότερα φασματοφθορισμόμετρα του πρώτου τύπου ή ακόμη καλύτερα τα συγκριτικώς πολύ φθηνότερα φθορισμόμετρα. Πολλά φασματοφθορισμόμετρα διαθέτουν και δεύτερο ανιχνευτή (αναφοράς), για τον έλεγχο της σταθερότητας της έντασης της ακτινοβολίας διέγερσης κατά τη διάρκεια των μετρήσεων.

Για συγκεκριμένη πηγή φωτός, τα φίλτρα επιτρέπουν τη δίοδο δέσμης φωτός μεγαλύτερου εύρους από ότι οι μονοχρωμάτορες, επομένως και μεγαλύτερες εντάσεις  $I_0$ . Ως εκ τούτου, τα φθορισμόμετρα είναι, κατά κανόνα, πιο ευαίσθητα από τα φασματοφθορισμόμετρα.

Οι βασικές μονάδες των φθορισμόμετρων και των φασματοφθορισμομέτρων διαφέρουν μόνο σε κάποιες λεπτομέρειες από τις αντίστοιχες μονάδες των φωτομέτρων και των φασματοφωτομέτρων, για αυτό παρακάτω εξετάζονται οι εν λόγω διαφορές [1].

*Πηγές φωτός.* Στη φθορισμομετρία, σε αντίθεση με τη φασματοφωτομετρία στην οποία χρησιμοποιείται λυχνία βολφραμίου ή υδρογόνου, χρησιμοποιείται είτε λυχνία τόξου υδραργύρου υψηλής πίεσεως, η οποία παρέχει γραμμικό φάσμα με μέγιστα στα 365, 398, 436, 546, 579, 690 και 734 nm, και όταν η πίεση είναι μικρή έχει μέγιστο και στα 254 nm, είτε λυχνία τόξου αερίου ξένου, η οποία παρέχει συνεχές φάσμα στην περιοχή 250 - 600 nm με μέγιστο στα ~ 470 nm, ενώ υπάρχει και η δυνατότητα χρήσης και ακτινοβολίας laser, στην περίπτωση που απαιτείται μονοχρωματική ακτινοβολία για τη διέγερση. Για μετρήσεις με ακτινοβολίες με  $\lambda < 300$  nm απαιτείται η λήψη των κατάλληλων μέτρων προστασίας για τα μάτια και το δέρμα. Προκειμένου μια πηγή φωτός να χαρακτηριστεί ως κατάλληλης ποιότητας για τη χρήση της σε μια μέτρηση, θα πρέπει η ακτινοβολία που εκπέμπει αυτή να χαρακτηρίζεται από καλή σταθερότητα και υψηλή ένταση. Η ένταση πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη (μεγάλο  $I_0$ ), χωρίς όμως να μειώνει τη σταθερότητα της λυχνίας. Μεταβολές στην ένταση της πηγής και

στην απόκριση του ανιχνευτή, οι οποίες οφείλονται στην παλαίωση (γήρανση) αυτών, επιβάλλουν τη βαθμονόμηση του οργάνου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ύαλος που περιέχει άλατα ουρανίου ή πρότυπο διάλυμα θειικής κινίνης [8].

*Επιλογείς μηκών κύματος.* Χρησιμοποιούνται φίλτρα υάλου, αποκοπής ή συμβολής. Τα περισσότερα από τα φασματοφθορισμόμετρα περιέχουν φράγματα. Τα φίλτρα επιτρέπουν τη διόδο μεγαλύτερου κλάσματος ακτινοβολίας διέγερσης από ό,τι τα φράγματα, λόγω του μεγαλύτερου εύρους ταινίας των φίλτρων. Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα μεν για τον προσδιορισμό μικροποσοτήτων, καθίσταται όμως μειονέκτημα, όταν συνυπάρχουν παρεμποδίζουσες ουσίες, οι οποίες διεγείρονται σε συχνότητες παραπλήσιες με την προσδιοριζόμενη ουσία, οπότε απαιτείται κατά το δυνατόν μονοχρωματική ακτινοβολία (πρέπει να συνεξετάζονται η απαιτούμενη εκλεκτικότητα και ευαισθησία). Κατά τη λήψη ενός φάσματος διέγερσης, είναι προτιμότερο το εύρος των σχισμών του μεν μονοχρωμάτορα διέγερσης να είναι μικρό (προς επίτευξη καλής διαχωριστικότητας), του δε μονοχρωμάτορα εκπομπής μεγάλο (προς επίτευξη υψηλής ευαισθησίας). Το αντίστροφο ισχύει για τη λήψη φάσματος εκπομπής [4].

*Ανιχνευτές.* Χρησιμοποιούνται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα φωτοπολλαπλασιαστές λόγω της μικρής έντασης της ακτινοβολίας διέγερσης.

*Κυψελίδες.* Χρησιμοποιούνται ορθογώνιες ή κυλινδρικές κυψελίδες από γυαλί ή χαλαζία.

Η χρήση μικροεπεξεργαστών (microprocessors) στα φθορισμόμετρα και τα φασματοφθορισμόμετρα κατά τα τελευταία χρόνια βελτίωσε τη λειτουργία αυτών και κατέστησε δυνατή την αυτοματοποίηση διεργασιών (προγραμματισμός λήψης φασμάτων, λήψη διορθωμένων φασμάτων, αυτόματη βαθμονόμηση κλπ).

## **1.6. Εφαρμογές της φθορισμομετρίας**

Στην περίπτωση που το προς ανάλυση μόριο ή χημική ένωση φθορίζει, τότε είναι δυνατός ο άμεσος φθορισμομετρικός προσδιορισμός με χρήση ενός φασματοφθορισμόμετρου, ρυθμισμένο στο κατάλληλο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής της φθορίζουσας ουσίας. Τέτοιες είναι οι περιπτώσεις μέτρησης αρωματικών υδρογονανθράκων (πχ. αργό πετρέλαιο), πρωτεϊνών (πχ. αίμα, γάλα αγελάδας), φάρμακα (πχ. μορφίνη), χλωροφύλλες και άλλα. Οι τομείς στους οποίους έχουν εφαρμογή τέτοιοι προσδιορισμοί είναι πολυάριθμοι: ανάλυση ρυπαντών αέρα και νερού, τρόφιμα, πετρέλαια, φάρμακα, παρακολούθηση βιομηχανικών διεργασιών, παρακολούθηση ειδών κλινικού ενδιαφέροντος και στην εγκληματολογία [2]. Δεδομένου, όμως ότι τα περισσότερα ιόντα και μόρια δε φθορίζουν, καθίσταται αναγκαία η χρήση έμμεσων

μεθόδων προσδιορισμού τους. Οι κύριες μέθοδοι είναι:

(α) Παραγοντοποίηση: Αντίδραση του προς ανάλυση μορίου με ένα φθορίζον αντιδραστήριο με αποτέλεσμα την μετατροπή του αναλύτη σε φθορίζον μόριο, το οποίο μπορεί να προσδιορισθεί φθορισμομετρικά. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία και σύστημα ανίχνευσης φθορισμό [9].

(β) Σχηματισμός ενός φθορίζοντος συμπλόκου: Μέθοδος η οποία αποτελεί τη βάση των περισσότερων μεθόδων για την φθορισμομετρική ανίχνευση ιόντων και μορίων.

(γ) Απόσβεση φθορισμού: Απόσβεση προκύπτει από τη σύγκρουση του αναλύτη με μια φθορίζουσα ένωση. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση αερίων όπως το διαλυμένο στο αίμα και το νερό οξυγόνο, το διοξείδιο του θείου, το υδρόθειο, την αμμωνία και άλλα.

Η φθορισμομετρία χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό ενώσεων πολύ μικρών συγκεντρώσεων στις οποίες ανάλυση με τις συνήθεις φασματοφωτομετρικές μεθόδους είναι πρακτικά αδύνατη. Μεγάλο πλεονέκτημα παρουσιάζει η μέθοδος του φθορισμού στην ανάλυση μίγματος δύο ουσιών Α και Β χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό τους. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με δύο τρόπους: (α) με κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος διέγερσης σε περίπτωση που τα μόρια Α και Β απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος και (β) με κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος εκπομπής σε περίπτωση που τα μόρια Α και Β απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος αλλά εκπέμπουν ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος.

Ο αριθμός των εφαρμογών της φθορισμομετρίας στην οργανική ανάλυση είναι εντυπωσιακός, τόσο ως προς το πλήθος των προσδιοριζόμενων ουσιών (κυρίως πολυκυκλικά μόρια), όσο και ως προς το ευρύ φάσμα προέλευσης των δειγμάτων (ενώσεις με πολύ μικρούς συντελεστές κβαντικής απόδοσης,  $\Phi_{\text{φθ}} < 0,01$ ). Ιδιαίτερη σπουδαιότητα έχουν οι εφαρμογές της φθορισμομετρίας στη Φαρμακευτική Χημεία [10], την Κλινική Χημεία, τη Βιοχημεία [11], την Ιατρική [11], τη Χημεία Τροφίμων [12], τη Χημεία Φυσικών Προϊόντων, όπως και στη μελέτη της ρύπανσης της ατμόσφαιρας [13].

Χαρακτηριστικά παραδείγματα φθορισμομετρικής ανάλυσης φαρμάκων είναι ο προσδιορισμός της κινίνης, της ασπιδίνης, των βαρβιτουρικών και του διαιθυλοαμιδίου του λυσεργικού οξέος (Lysergic acid diethylamide, LSD). Παρ' όλο που η ποσότητα των φαρμάκων σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα είναι συνήθως μεγάλη, ώστε να μην είναι απαραίτητη η μεγάλη ευαισθησία των φθορισμομετρικών μεθόδων ανάλυσης, οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων και των προερχόμενων από αυτά μεταβολιτών στο αίμα, τα ούρα και σε άλλα βιολογικά δείγματα είναι δυνατόν να είναι πολύ μικρές, και ως εκ τούτου η φθορισμομετρία χρησιμοποιείται ευρέως σε ποσοτικές μελέτες που αφορούν την ταχύτητα και το μηχανισμό απορρόφησης των φαρμάκων, όπως και του μεταβολισμού και της έκκρισης αυτών.

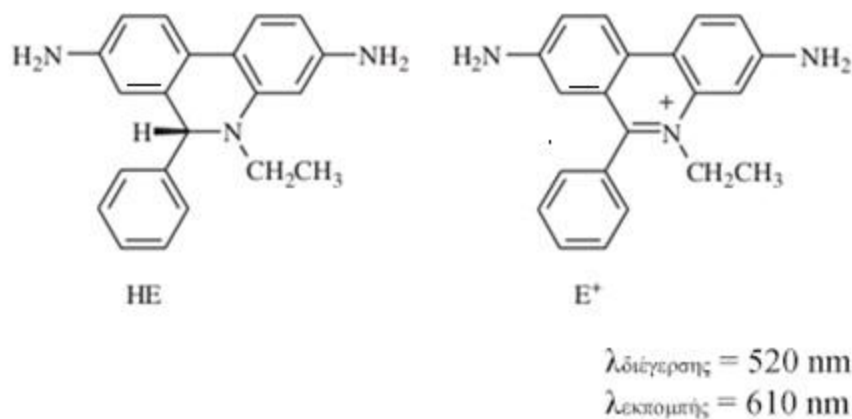
Ιδιαίτερη σπουδαιότητα έχει ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός ορισμένων ενώσεων σε βιολογικά υγρά για διαγνωστικούς σκοπούς στην ιατρική, όπως π.χ. της φαινυλαλανίνης στον ορό του αίματος για τη διαπίστωση της φαινυλκετονουρίας, μιας μεταβολικής διαταραχής που προκαλεί διανοητική καθυστέρηση.

Πολλές πρωτεΐνες περιέχουν ένα φθορίζον συνένζυμο, όπως π.χ. την ανηγμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτιδίου (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH), το οποίο επιτρέπει τη φθορισμομετρική ανάλυση αυτών. Το συνένζυμο NADH επιτρέπει και την φθορισμομετρική παρακολούθηση της κινητικής πολλών ενζυμικών αντιδράσεων [14].

Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα εφαρμογής της φθορισμομετρίας στον έλεγχο της ρύπανσης της ατμόσφαιρας αποτελεί ο προσδιορισμός διαφόρων πολυκυρηνικών υδρογονανθράκων στον αέρα, πολλοί εκ των οποίων έχουν καρκινογόνες ιδιότητες.

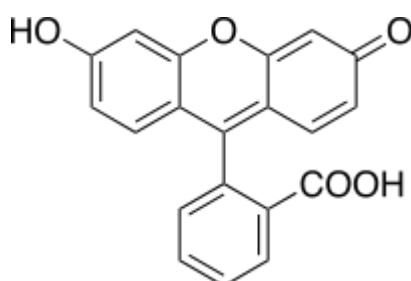
Σε πολλές περιπτώσεις η φθορισμομετρία συνδυάζεται με μία χρωματογραφική μέθοδο, π.χ. με υγρή χρωματογραφία για την παρακολούθηση και ανάλυση των εξερχομένων από τη στήλη ουσιών, με χρωματογραφία επί χάρτου ή λεπτής στιβάδας για την ανίχνευση και τον καθορισμό της θέσης άχρωμων φθορίζουσών ενώσεων επί χρωματογραφημάτων, με έκθεση αυτών σε υπεριώδη ακτινοβολία κλπ [5]. Τέλος, ιδιαίτερη σημασία έχει η χρησιμοποίηση φθορίζουσών ουσιών ως ιχνηθετών για την παρακολούθηση της υπόγειας διαδρομής υδατοπηγών και γενικότερα για τη μελέτη της ροής υδάτων και της μόλυνσας αυτών.

Φθορισμομετρικές τεχνικές έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό ελευθέρων ριζών και διαφόρων ενεργών μορφών του οξυγόνου. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται κυρίως στη χρήση αναγωγικών αντιδραστηρίων τα οποία σε αντίδραση με διάφορες ενεργές μορφές οξυγόνου ή διάφορες ελεύθερες ρίζες οξειδώνονται και παράγουν φθορίζοντα προϊόντα από την ένταση φθορισμού των οποίων προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ριζών αυτών. Ανάλογα με την ενεργή μορφή οξυγόνου ή τη ρίζα που προσδιορίζεται, επιλέγεται και το αντίστοιχο αναγωγικό αντιδραστήριο [15]. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι για τον προσδιορισμό της ρίζας υπεροξυλίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) χρησιμοποιείται η υδροεθιδίνη (*hydroethidine*, HE [16]). Η υδροεθιδίνη παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς τη ρίζα του υπεροξυλίου και οξειδούμενη από αυτήν μετατρέπεται στο εθιδινικό άλας (*ethidium*,  $E^+$ ) (Σχήμα 3), το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση ακτινοβολίας στα 520 nm και μέγιστη εκπομπή στα 610 nm. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις η ακρίβεια του αποτελέσματος αλλοιώνεται. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που η πηγή ριζών υπεροξυλίου είναι τα μιτοχόνδρια, στο διάλυμα εντοπίζεται το κυτόχρωμα c (*cytochrome c*), το οποίο οξειδώνει την υδροεθιδίνη σε εθιδινικό άλας, το οποίο ωστόσο δεν προέρχεται από την αντίδραση της εθιδίνης με τη ρίζα του υπεροξυλίου, μην επιτρέποντας έτσι σίγουρα συμπεράσματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό του.



**Σχήμα 3:** Χημική δομή της υδροεθιδίνης (HE) και του αντίστοιχου εθιδινικού άλατος ( $E^+$ ) [16].

Άλλος σημαντικότερος φθορισμομετρικός δείκτης για τον προσδιορισμό διαφόρων ενεργών μορφών οξυγόνου είναι η φλουορεσκεΐνη (Σχήμα 4). Η φλουορεσκεΐνη είναι ένας από τους πιο γνωστούς φθορισμομετρικούς δείκτες με  $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$  και  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ . Μπορεί να οξειδωθεί από διάφορες ενεργές μορφές οξυγόνου, παράγοντας ένα μη φθορίζον προϊόν. Η μέθοδος HORAC (Hydroxyl radical averting capacity) βασίζεται στη χρήση της φλουορεσκεΐνης για τον προσδιορισμό της ρίζας του υδροξυλίου. Η τελευταία, οξειδώνοντας τη φλουορεσκεΐνη, προκαλεί μείωση της έντασης του αρχικού φθορισμού του δείκτη και επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της ρίζας με χρήση καμπυλών φθορισμού. Τέλος, φθορισμομετρικές τεχνικές έχουν βρει εφαρμογή και σε τομείς όπως την εγκληματολογία, για την ανίχνευση δακτυλικών αποτυπωμάτων από αίμα. Έχει γίνει χρήση μεγάλου αριθμού ενώσεων προκειμένου να υπερνικηθούν εμπόδια όπως η διάχυση των φθορίζουσών ουσιών και προϊόντων στα δακτυλικά αποτυπώματα και στην επιφάνεια εφαρμογής τους και ο περιορισμένος χρόνος ζωής και σταθερότητα των φθορίζουσών ουσιών και των προϊόντων τους μετά την εφαρμογή τους [17].



**Σχήμα 4:** Χημική δομή της φλουορεσκεΐνης

## 2. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

### 2.1. Ελεύθερες ρίζες

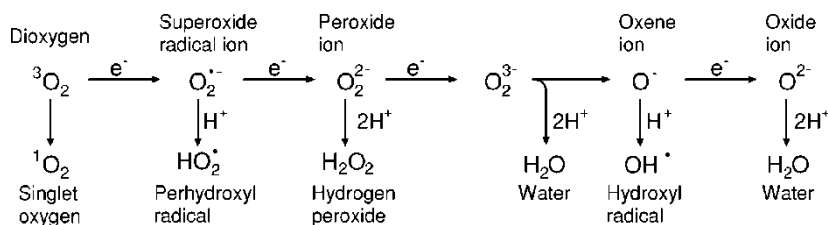
Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή ένα άτομο με ένα αδέσμευτο (ασύζευκτο) ηλεκτρόνιο (unpaired). Τα ηλεκτρόνια ενός ατόμου ή μορίου τείνουν να συζευχθούν σε ζεύγη με αντίθετη ιδιοτροφορμή (spin), σχηματίζοντας ένα σύστημα χαμηλότερης ενέργειας. Ιδιοτροφορμή ονομάζεται η περιστροφική κίνηση ενός ηλεκτρονίου η οποία μπορεί να έχει δύο κατευθύνσεις, δεξιόστροφη και αριστερόστροφη. Δύο ελεύθερες ρίζες με ηλεκτρόνια αντίθετων spin σχηματίζουν δεσμό και η διαδικασία σχηματισμού του συμβολίζεται ως εξής:  $\uparrow+\downarrow=\uparrow\downarrow$

Σε μοριακά τροχιακά, ζυγός αριθμός ηλεκτρονίων οργανώνεται σε ζεύγη αντιπαράλληλων spin τόσο σε δεσμούς όσο και σε μη-δεσμικά ηλεκτρονιακά ζεύγη. Συνήθως, η δημιουργία αυτών των ζευγών ηλεκτρονίων είναι ευνοϊκή. Σε κάποιες περιπτώσεις, ωστόσο, από ενεργειακής σκοπιάς είναι πιο συμφέρουσα ενεργειακά η μη σύζευξη δύο ηλεκτρονίων, οδηγώντας στη συνύπαρξη δύο ηλεκτρονίων με ίδια κατεύθυνση spin. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται τριπλή και τα ηλεκτρόνια εντοπίζονται σε ένα ή σε πολλά διαφορετικά άτομα. Η παρουσία ασύζευκτων ηλεκτρονίων σε χημικές ενώσεις έχει ως συνέπεια την πολύ υψηλή δραστικότητα αυτών και την τάση σύζευξης των δύο ασύζευκτων ηλεκτρονίων προς σχηματισμό ενός σταθερότερου δεσμού [18].

### 2.2. Ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS)

Το μοριακό οξυγόνο στη θεμελιώδη (βασική) του κατάσταση είναι ρίζα με δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spin, κάθε ένα από τα οποία βρίσκεται σε ένα  $\pi^*$  αντιδεσμικό τροχιακό. Δηλαδή, η βασική κατάσταση του μοριακού οξυγόνου είναι τριπλή και συμβολίζεται  $^3\text{O}_2$  ή  $T_0$ . Θα περίμενε κανείς, λόγω της ύπαρξης των ασύζευκτων ηλεκτρονίων, το οξυγόνο να αντιδρά με διάφορα βιομόρια και να οδηγεί στην καταστροφή τους. Αυτό όμως δεν συμβαίνει, πιθανώς λόγω της μικρής δραστικότητας του οξυγόνου και πιθανότερα λόγω της ύπαρξης ενζύμων στον οργανισμό τα οποία δεσμεύουν το οξυγόνο και δεν το αφήνουν να μετατραπεί σε άλλες πιο δραστικές μορφές [19]. Παρόλα αυτά, κάτω από δραστικές συνθήκες (ιοντίζουσες ακτινοβολίες, φως υψηλής ενέργειας, μέταλλα χαμηλής οξειδωτικής κατάστασης κ.α.), μπορεί το οξυγόνο να μετατραπεί σε δραστικότερες μορφές προκαλώντας σημαντικές βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι σημαντικότερες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι: (α) το οξυγόνο

απλής κατάστασης ( $^1\text{O}_2 \Delta_g$ ), (β) η ρίζα υπεροξυλίου ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), (γ) το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), (δ) η ρίζα υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ), (ε) η ρίζα υδροϋπεροξειδίου  $\text{HO}_2^{\cdot}$  και (στ) το όζον ( $\text{O}_3$ ). Όλες αυτές οι μορφές οξυγόνου μπορούν να παραχθούν από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο με διαδοχική μεταφορά ενός, δύο, τριών ή τεσσάρων ηλεκτρονίων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.



**Σχήμα 5:** Σχηματική παράσταση παραγωγής των διαφόρων δραστικών μορφών οξυγόνου μετά από διαδοχική μεταφορά ηλεκτρονίων [19].

Δραστικές μορφές του οξυγόνου παράγονται συχνά στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά ευτυχώς σε πολύ μικρές ποσότητες, κυρίως κατά το μεταβολισμό του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια [20]. Παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως σε κάποιες μεταβολικές οδούς, στην κυτταρική σηματοδότηση, στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη διέγερση αυξητικών παραγόντων (growth factors). Άλλες σημαντικές λειτουργίες στις οποίες οι ελεύθερες ρίζες παίρνουν μέρος είναι ο προγραμματισμένος χρόνος θανάτου των κυττάρων (programmed cell death) ο οποίος είναι γνωστός με τον όρο “απόπτωση” και έχει ως σκοπό το συντονισμό της παραγωγής κυττάρων. Προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιότητα του οργανισμού, η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου πρέπει να εξισορροπείται από την παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών. Η αδυναμία του οργανισμού να διατηρήσει την ισορροπία αυτή οδηγεί σε οξειδωτικό στρες το οποίο επιφέρει ζημιές στα κύτταρα, το DNA, τα χρωμοσώματα, τις πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τα λιπίδια. Όσο μεγαλύτερη η ηλικία του ανθρώπου, τόσο μεγαλύτερη η αδυναμία των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού του να λειτουργούν αποτελεσματικά. Υπάρχουν ενδείξεις πως το οξειδωτικό στρες αποτελεί τη βάση από την οποία ξεκινά ο εκφυλισμός του νευρικού συστήματος, από την οποία ξεκινά η εμφάνιση νόσων όπως του Parkinson και του Alzheimer [9, 21-24]. Γενικότερα, η δράση των ενεργών μορφών οξυγόνου και η συσσώρευση των βλαβών που επιφέρει η οξειδωτική τους δράση στον ανθρώπινο οργανισμό έχει συσχετιστεί με την πρόωρη γήρανση του οργανισμού [25].

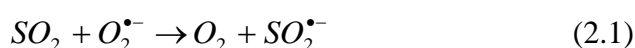
Για την προστασία του από τις ελεύθερες ρίζες και τις ενεργές μορφές του οξυγόνου, ο ανθρώπινος οργανισμός παράγει το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξυλίου (Superoxide dismutase, SOD), το οποίο δεσμεύει την δραστική ρίζα του υπεροξυλίου ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), μέσω του οποίου

παράγονται συνήθως και όλες οι άλλες δραστικότερες μορφές του οξυγόνου (ρίζες υδροξυλίου, ρίζες υδροϋπεροξειδίου).

### 2.2.1. Ρίζα υπεροξυλίου ( $O_2^{\bullet-}$ )

Αναγωγή του οξυγόνου με ένα ηλεκτρόνιο παράγει τη ρίζα υπεροξυλίου ( $O_2^{\bullet-}$ ) η οποία έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Θεωρείται η πρωταρχική ενεργή μορφή οξυγόνου, καθώς με την αντίδρασή της με άλλα μόρια οδηγεί στην παραγωγή των “δευτερευόντων” ενεργών μορφών οξυγόνου, είτε άμεσα είτε μέσω διεργασιών καταλυόμενες από ένζυμα ή μέταλλα [19, 22]. Η ρίζα υπεροξυλίου παράγεται εντός όλων, σχεδόν, των αερόβιων κυττάρων, κυρίως κατά την αλυσιδωτή μεταφορά ηλεκτρονίων μέσα στα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες και στο ενδοπλασμικό δίκτυο [25, 26]. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του οξυγόνου στον οργανισμό και όσο μεγαλύτεροι οι μεταβολικοί ρυθμοί και η εισαγωγή μεγάλων ποσοτήτων θερμίδων προερχόμενοι από τη διατροφή, τόσο μεγαλύτερη η αλυσιδωτή μεταφορά ηλεκτρονίων, άρα και τόσο μεγαλύτερη η παραγωγή ριζών υπεροξυλίου. Ποσότητες ριζών υπεροξυλίου παράγονται τέλος και κατά τα αναπνευστικά ξεσπάσματα (bursts) των φαγοκυττάρων (neutrophils, monocytes, macrophages, eosinophils). Οι ποσότητες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση διαφόρων βακτηρίων κι έλλειψη αυτών προκαλεί επίμονες και πολλαπλές μολύνσεις. Το υπεροξύλιο είναι ασθενές οξειδωτικό με χαμηλή δραστικότητα έναντι των βιολογικών μορίων.

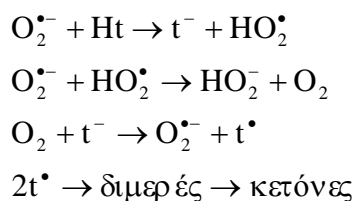
Η ρίζα του υπεροξυλίου αποτελεί τοξικό είδος για τον οργανισμό, ωστόσο η τοξικότητα της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται [27]. Σε πολλούς οργανικούς μη πρωτικούς διαλύτες η ρίζα του υπεροξυλίου είναι πολύ σταθερή. Σε μη πολικό περιβάλλον, η ρίζα υπεροξυλίου έχει τις ιδιότητες ισχυρής βάσης, είναι πυρηνόφιλη και συμπεριφέρεται ως αναγωγικό αντιδραστήριο. Ως τέτοιο, μπορεί να αναγάγει διαλυμένο αέριο διοξείδιο του θείου σε ανιοντική ρίζα του διοξειδίου του θείου:



Μπορεί να εκτοπίσει χλωριόντα ( $Cl^-$ ) από χλωριωμένους υδρογονάνθρακες όπως από τον τετραχλωράνθρακα ( $CCl_4$ ). Παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων, όπως η κατεχόλη, το ασκορβικό οξύ και η  $\alpha$ -τοκοφερόλη (βιταμίνη E), η ρίζα υπεροξυλίου δρα ως οξειδωτικός



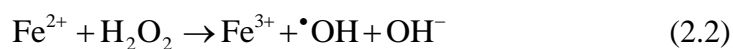
παράγοντας. Συνολικά, η ρίζα υπεροξυλίου ανάγεται σε άλας του υδροϋπεροξειδίου, μετά από διαδοχική μεταφορά πρωτονίου και ηλεκτρονίου, ενώ το υπόστρωμα Ht (ουσίες που μπορούν να δράσουν ως δότες H<sup>+</sup>, πχ. κατεχόλη, α-τοκοφερόλη) αρχικώς οξειδώνεται στο διμερές του και, τελικώς, σε κετόνη. Ο μηχανισμός των αντιδράσεων αυτών παρίσταται παρακάτω:



Σε υδατικά διαλύματα, οι βασικές ιδιότητες της ρίζας του υπεροξυλίου (πυρρηνοφιλία και οξειδωτική ικανότητα) μειώνονται κατά πολύ, μετατρέποντάς την σε αναγωγικό παράγοντα. Μπορεί, έτσι, να ανάγει ιόντα σιδήρου (III) και χαλκού (II) και το ίδιο το υπεροξύλιο να οξειδωθεί σε ρίζες υδροξυλίου [20, 27].

### 2.2.2. Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Το μόριο του υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν έχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, επομένως δεν είναι ρίζα. Είναι ήπιο οξειδωτικό και είναι από τις λιγότερο δραστικές ενεργές μορφές οξυγόνου [28]. Η σημασία του, ωστόσο, έγκειται στην μετατροπή του μέσα στον οργανισμό σε ρίζες υδροξυλίου (•OH) μέσω της αντίδρασης Fenton [22]:

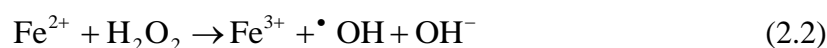


Το υπεροξειδίο του υδρογόνου αποτελεί, όπως και η ρίζα του υπεροξυλίου, ασθενές οξειδωτικό με μικρή δραστικότητα in vivo. Αντιδρά με θειόλες κι έτσι είναι δυνατόν να απενεργοποιήσει ένζυμα τα οποία περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα των θειολών. Σε αντίθεση με τη ρίζα του υπεροξυλίου, όμως, έχει τη δυνατότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, οπότε στην περίπτωση που συναντήσει ιόντα σιδήρου (II) ή χαλκού (I) αντιδρά με αυτά και παράγει ρίζες υδροξυλίου (•OH). Οι λειτουργίες του στο σώμα περιλαμβάνουν τη συμβολή του στη φαγοκυτταρική άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και σε μεταβολικές οδούς όπως την παραγωγή θυροξίνης στο θυρεοειδή αδένα.

### 2.2.3. Ρίζα υδροξυλίου (•OH)

Η ρίζα υδροξυλίου (•OH) είναι πολύ δραστική με χρόνο ημιζωής μικρότερο του 1 ns σε υδατικό διάλυμα. Αντιδρά μη εκλεκτικά με βιομόρια με αντίδραση που επηρεάζεται πρωτίστως από τη διάχυση. Δεδομένης της δραστικότητάς της, αντιδρά in vivo κοντά στην περιοχή που παράχθηκε, διασπώντας πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα [22, 26, 28].

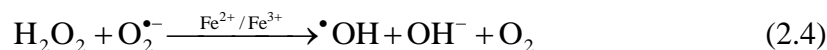
Η ρίζα υδροξυλίου παράγεται από το μοριακό οξυγόνο κάτω από διάφορες δραστικές συνθήκες και παίρνει μέρος σε κυτταρικές διαταραχές όπως φλεγμονές, τερατογενέσεις, καταστροφή κυττάρων και μικροοργανισμών. Παράγεται επίσης από υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία ιόντων σιδήρου II μέσω της αντίδρασης Fenton:



Ο σίδηρος ο οποίος είναι απαραίτητος για την παραγωγή υδροξυλίου βρίσκεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέχρι και 10 % στην αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη, και σε μικρότερη ποσότητα σε σιδηρούχα ένζυμα, σε ενδοκυτταρικές αποθηκευτικές πρωτεΐνες, τη φεριτίνη και την αιμοσιδερίνη (ferritin, hemosiderin) [27]. Τα ιόντα σιδήρου (II) προκύπτουν από αντίδραση των προαναφερθέντων σιδηρούχων βιομορίων με τις ρίζες του υπεροξυλίου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) [22, 29]:



Ο συνδυασμός των παραπάνω εξισώσεων είναι γνωστός ως καταλυόμενη από σίδηρο αντίδραση Haber – Weiss [25]:



Εκτός από την αντίδραση Fenton (2.2), ρίζες υδροξυλίου μπορούν να παραχθούν και με απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας από μόρια νερού καθώς και με φωτοκαταλυτική διάσπαση αλκυλο-υδροϋπεροξειδίων (alkylhydroperoxides) [22].

#### 2.2.4. Οξυγόνο απλής κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ ) [19]

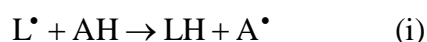
Η διεγερμένη απλή κατάσταση του μοριακού οξυγόνου (singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ ) θεωρείται ότι είναι ένα από τα πιο σημαντικά οξειδωτικά είδη σε βιολογικές διεργασίες, καθώς η χρήση του είναι ευρεία και τα χαρακτηριστικά του αρκετά γνωστά [30]. Το οξυγόνο απλής κατάστασης έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ζωής, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα έναντι σημαντικών βιομορίων όπως, νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα και λιπίδια. Οι οξειδωτικές βλάβες που μπορεί να προκαλέσει θεωρείται πως συνδέονται με παθογενέσεις διάφορων ανθρωπίνων ασθενειών [31]. Παράγεται με απορρόφηση ενέργειας 94 kJ από το μόριο του οξυγόνου, η βασική κατάσταση του οποίου είναι τριπλή,  $^3\text{O}_2$  ( $T_0$ ). Ο σχηματισμός του μπορεί να γίνει είτε χημικά από αντίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου με υποχλωριώδες νάτριο ή φωτοχημικά από ατμοσφαιρικό οξυγόνο παρουσία χρωστικών ουσιών όπως το πορτοκαλί της ακριδίνης, το κυανό του μεθυλενίου ή σε βιολογικά συστήματα παρουσία της χλωροφύλλης [32]. Το οξυγόνο απλής κατάστασης, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα, δεν έχει μονήρη ηλεκτρόνια, οπότε και δεν μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως ρίζα. Παραδείγματα στα οποία το μοριακό οξυγόνο τριπλής κατάστασης,  $^3\text{O}_2$ , διεγείρεται σε οξυγόνο απλής κατάστασης,  $^1\text{O}_2$ , είναι η πρόσπτωση ακτινοβολίας σε χρωστικές (όπως στην ίριδα του ματιού και στους χλωροπλάστες), οι οποίες έτσι διεγείρονται και μεταφέρουν ενέργεια σε ένα μόριο οξυγόνου θεμελιώδους ενεργειακής κατάστασης, διεγείροντάς το σε οξυγόνο απλής κατάστασης. Οξυγόνο απλής κατάστασης παράγεται επίσης και ως συνέπεια κάποιων παθήσεων, όπως οι πορφυρίες (porphyrias) οι οποίες σχετίζονται με τον ελαττωματικό μεταβολισμό των πορφυρινών. Οι πορφυρίνες εξέρχονται από το σώμα μέσω της ούρησης ή συσσωρεύονται στο δέρμα. Όταν αυτές εκτεθούν στο φως, παρατηρείται δυσάρεστο σκάσιμο και σκλήρυνση του δέρματος και δημιουργία ουλών. Επίσης, διάφορα ενζυμικά συστήματα όπως η λιποξυγενάση, η υπεροξειδάση και η ιοζινόφιλη υπεροξειδάση (eosinophil peroxidase) έχουν επίσης αναγνωριστεί ως βιοχημικές πηγές  $^1\text{O}_2$  [30].

Η αποδιέγερση του οξυγόνου απλής κατάστασης σε οξυγόνο θεμελιώδους ενεργειακής κατάστασης οδηγεί στην εκπομπή ακτινοβολίας. Η εκπομπή ακτινοβολίας εμφανίζεται στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος σε μήκος κύματος 1270 nm. Μπορεί όμως να παρατηρηθεί και ακτινοβολία σε μήκη κύματος 634 nm και 703 nm η οποία αποδίδεται σε σύγκρουση δύο μορίων οξυγόνου απλής κατάστασης και ονομάζεται “dimol emission”.

### 3. ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Ιστορικά, ο όρος αντιοξειδωτικό χρησιμοποιείται για κάθε χημική ένωση ή φυσικό προϊόν το οποίο εμποδίζει την οξείδωση μιας χημικής ένωσης ή ενός φυσικού προϊόντος από το μοριακό οξυγόνο [32]. Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται γενικά όλες οι ουσίες οι οποίες σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με αυτήν ενός οξειδώσιμου υποστρώματος επιβραδύνουν σημαντικά ή αναστέλλουν την οξείδωσή του. Τα αντιοξειδωτικά διαχωρίζονται κυρίως σε δύο ομάδες: (α) τα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά ή αλλιώς οξειδωτικά διάσπασης μίας αλυσιδωτής αντίδρασης και (β) τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά ή αλλιώς προληπτικά αντιοξειδωτικά [33].

Ένα πρωτεύον αντιοξειδωτικό αναστέλλει το στάδιο εκκίνησης μίας αλυσιδωτής αντίδρασης δεσμεύοντας τις αλκυλο-ρίζες που παρήχθησαν από την αντίδραση του υποστρώματος με κάποια ενεργή μορφή του οξυγόνου (αντίδραση i) ή τις αλκοξυ-ρίζες και τις αλκυλοπεροξυλο-ρίζες στο στάδιο διάδοσης μίας αλυσιδωτής αντίδρασης (αντιδράσεις ii και iii αντίστοιχα):



Ένα δευτερεύον αντιοξειδωτικό καθυστερεί το ρυθμό οξείδωσης, όπως για παράδειγμα με την αναστολή έναρξης της αντίδρασης Fenton (2.2) από συμπλοκοποιητές ιόντων των μετάλλων μετάπτωσης.

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά παίζουν ζωτικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας του σώματος και στην πρόληψη ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών και εγκεφαλοαγγειακών ασθενειών, κάποιων μορφών καρκίνου καθώς και πολλών διαταραχών που σχετίζονται με την παρουσία ελευθέρων ριζών ή ενεργών μορφών οξυγόνου. Μία σημαντική ιδιότητα που χαρακτηρίζει ένα αντιοξειδωτικό ως ωφέλιμο για τον ανθρώπινο οργανισμό είναι το κατά πόσο απορροφάται το ίδιο από αυτόν, καθώς και τη βιοδιαθεσιμότητά του. Στην περίπτωση που δεν απορροφάται, το σώμα δεν λαμβάνει καμία από τις ευεργετικές ιδιότητές του. Είναι, επίσης, πολύ σημαντικό το κατά πόσο τα αντιοξειδωτικά δρουν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά. Έρευνες έδειξαν πως κάποια αντιοξειδωτικά έχουν τη δυνατότητα να δρουν συνδυαστικά, προστατεύοντας έτσι το ένα το άλλο από φαινόμενα αυτοοξείδωσης [34].

### 3.1. Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών

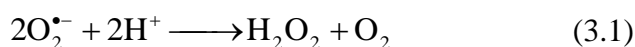
Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν γενικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες: (α) σε ενζυμικά και (β) σε μη-ενζυμικά. Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν η δισμουτάση του υπεροξυλίου, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase), η καταλάση, η θειορεδοξίνη (thioredoxin) και η γλουταρεδοξίνη (glutaredoxin) η οποία είναι επίσης γνωστή και ως θειολοτρανσφεράση (thioltransferase).

#### 3.1.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν τα παρακάτω ένζυμα:

*α) Δισμουτάσες του υπεροξυλίου (Superoxide dismutase, SOD)*

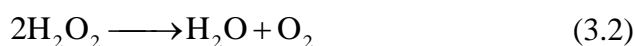
Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη μετατροπή του υπεροξυλίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο:



Οι δισμουτάσες είναι παρούσες σε κύτταρα σε επίπεδα ικανά να αδρανοποιήσουν το υπεροξύλιο, αναστέλλοντας το σχηματισμό συμπλόκων οξυγόνου με μέταλλα μετάπτωσης, την απελευθέρωση ελεύθερου σιδήρου και την πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton (2.2).

*β) Καταλάση*

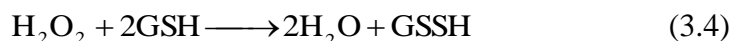
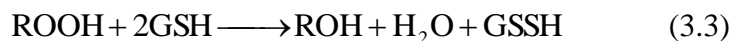
Το ένζυμο αυτό περιέχει πορφυρίνη και μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό:



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου συνήθως αποικοδομείται από τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, ωστόσο στην περίπτωση που το υπεροξείδιο διαχυθεί διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης η καταλάση μπορεί να προστατεύσει το κύτταρο.

γ) Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (*Glutathione peroxidase, GPx*)

Τα ένζυμα αυτά περιέχουν σελήνιο και καταλύουν την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων σε αλκοόλες καθώς και την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό, μέσω της συν-οξειδωσης (co-oxidation) της γλουταθειόνης [35].



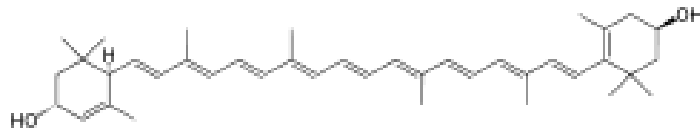
### 3.1.2. Μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Στην κατηγορία αυτή των αντιοξειδωτικών σημαντικό ρόλο παίζει η διαλυτότητά τους σε υδατικά ή λιπόφιλα διαλύματα. Πιθανότατα, η παραγωγή των ριζών *in vivo* γίνεται κατά κύριο λόγο σε υδατικό περιβάλλον, οπότε τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά είναι αυτά που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, καταστέλλοντας έτσι την έναρξη μίας αλυσιδωτής οξειδωτικής αντίδρασης. Ωστόσο, τα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά δεσμεύουν κυρίως λιποδιαλυτές ρίζες εντός των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών, αν και η  $\alpha$ -τοκοφερόλη, εντοπιζόμενη στην επιφάνεια μεμβρανών, είναι ικανή να δεσμεύσει και υδατοδιαλυτές ρίζες. Αυτή η ικανότητα είναι πολύ σημαντική, καθώς τα λιπίδια οξειδώνονται από έναν αλυσιδωτό μηχανισμό ελευθέρων ριζών και οι οξειδωτικές βλάβες αυξάνονται αν δε διακοπεί το στάδιο διάδοσης της αλυσίδας. Συμπερασματικά, το ανθρώπινο σώμα έχει ανάγκη και υδρόφιλα και λιπόφιλα αντιοξειδωτικά [34].

α) Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή (Σχήμα 6) αποτελούν μια ομάδα πολυακόρεστων υδρογονανθράκων με 40 άνθρακες, οι οποίοι ονομάζονται καροτένια, και τα οξυγονωμένα τους παράγωγα (ξανθοφύλλες, xanthophylls). Το ακατέργαστο φοινικέλαιο είναι μια από τις πλουσιότερες πηγές καροτενίων με συγκεντρώσεις 500-700 ppm. Οι ουσίες αυτές προσδίδουν ένα πορτοκαλοκόκκινο χρώμα στο λάδι, το οποίο έχει 15 φορές μεγαλύτερη ποσότητα ισοδύναμων ρετινόλης (μία από τις μορφές βιταμίνης Α στα ζώα [36]) απ' ό,τι τα καρότα και 300 φορές μεγαλύτερη από τις ντομάτες. Άλλη πλούσια σε καροτενοειδή πηγή είναι κάποια είδη βακτηρίων, όπως, π.χ. τα πράσινα κύτταρα *Hematococcus* τα οποία μπορούν να παράγουν  $\beta$ -καροτένιο και ασταξανθίνη. Τα φύκια *Alga Dunaliella Bardawil* είναι επίσης πλούσια πηγή

πληθώρας γεωμετρικών ισομερών του β-καροτενίου



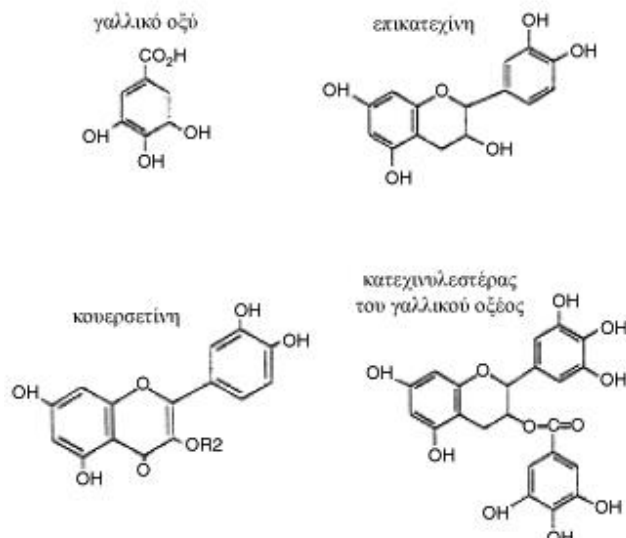
**Σχήμα 6:** Βασική μοριακή δομή ενός καροτενοειδούς

Τα καροτενοειδή δρουν ως βιολογικά αντιοξειδωτικά, ενώ η πρόσληψή τους μέσω της διατροφής έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης κάποιων μορφών καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων. Άλλες έρευνες έδειξαν πως τα καροτενοειδή προστατεύουν τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) από την οξείδωση [34].

Η δράση των καροτενοειδών δε σταματά στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Έχουν την ιδιότητα να προκαλούν την ενεργοποίηση της προβιταμίνης A, η οποία στη συνέχεια μετασχηματίζεται σε βιταμίνη A, η οποία βιταμίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην όραση. Επίσης τα καροτενοειδή είναι πρόδρομες ουσίες των ρετινοειδών (retinoids), τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση. Προστατεύουν κάποιες δερματικές διαταραχές προκαλούμενες από φωτοευαισθητοποίηση.

### *β) Φλαβονοειδή*

Τα φλαβονοειδή (Σχήμα 7) είναι πολυφαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση που παράγονται από τα φυτά κατά το μεταβολισμό τους. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι κατεχίνες και η κουερσετίνη (quercetin). Το τσάι είναι πηγή φλαβονοειδών [37].



**Σχήμα 7:** Μοριακές δομές κάποιων φλαβονοειδών. Στην εικόνα φαίνονται οι δομές του γαλλικού οξέος, της κατεχίνης, της κουερσετίνης και του κατεχινυλεστέρα του γαλλικού οξέος

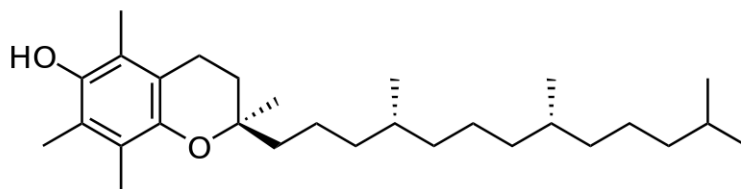
Τα φλαβονοειδή διαθέτουν πλήθος αντιοξειδωτικών δράσεων και ως αντιοξειδωτικά συμβάλουν στην αναστολή αλυσιδωτών αντιδράσεων μέσω ελευθέρων ριζών ενώ ως δότες υδρογόνου καταστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων αναγεννώντας την α-τοκοφερόλη. Προστατεύουν το DNA από οξειδωτικές βλάβες, απενεργοποιούν καρκινογόνες και ξеноβιοτικές ουσίες και αναστέλλουν ενζυμικές αντιδράσεις που προάγουν την καρκινογένεση.

Οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση, προστατεύουν το δέρμα από την υπεριώδη ακτινοβολία, προλαμβάνουν την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και προστατεύουν από τη φωτογήρανση, τις φλεγμονώδεις δερματοπάθειες και τις φωτοκαρκινογενέσεις [35].

### γ) Βιταμίνη E

Ο όρος «βιταμίνη E» αναφέρεται για ένα σύνολο φυσικών τοκοφερολών και τοκοτριολών που εμφανίζονται σε αφθονία σε φυτά και κυρίως σε έλαια αυτών. Χαρακτηριστικά της δομής τους είναι η ομάδα της χρωμανόλης (chromanol) και η πλευρική υδρογονανθρακική αλυσίδα (Σχήμα 8). Οι μεθυλικοί υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο των ενώσεων καθορίζουν αν η ονομασία των τοκοφερολών και των τοκοτριενολών θα είναι α-, β-, γ- ή δ-. Η διαφορά των διαφόρων ενώσεων έγκειται στην υδρόφοβη ουρά τους η οποία και δίνει την ιδιότητα σε κάθε είδους μόριο της ομάδας της βιταμίνης E να προσκολλάται σε μεμβράνες και λιποπρωτεΐνες.



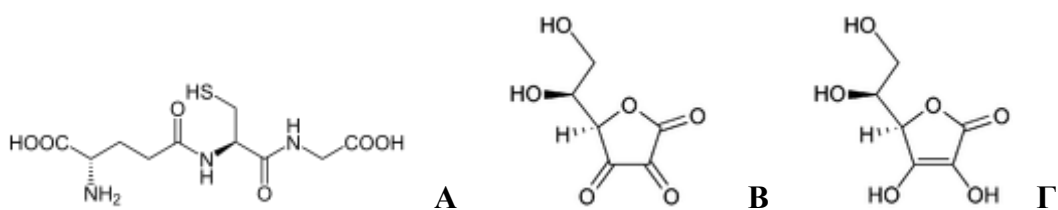


**Σχήμα 8:** Μοριακή δομή της α-Τοκοφερόλης

δ) Θειόλες ή θειοαλκοόλες ή μερκαπτάνια ( $R-SH$ )

Οι θειόλες αποτελούν μια κατηγορία ενώσεων με πολλαπλές αντιοξειδωτικές δράσεις στο εσωτερικό των κυττάρων. Δρουν ως αντιοξειδωτικά, ως υπόστρωμα σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις, ανακυκλώνουν άλλα αντιοξειδωτικά και επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων.

Στην κατηγορία των θειολών ανήκει και η γλουταθειόνη, η οποία είναι ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά που δρουν σε ενδομοριακό επίπεδο. Η γλουταθειόνη (Σχήμα 9) είναι το τριπεπτίδιο γ-γλουταμυλο-κυστείνυλο-γλυκίνη (**A**) ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) το οποίο αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό και συναντάται σε συγκεντρώσεις της τάξης των mmol στο ανθρώπινο σώμα. Παίρνει μέρος σε πλήθος αντιοξειδωτικών λειτουργιών: δρα ως υπόστρωμα στην αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξειδίων από την υπεροξειδάση. Δεσμεύει τις ενεργές μορφές του οξυγόνου όπως το οξυγόνο απλής κατάστασης. Επίσης, δρα συνδυαστικά και με άλλα αντιοξειδωτικά, όπως για παράδειγμα με το διυδροασκορβικό οξύ (**B**) (dehydroascorbic acid) το οποίο ανάγεται σε ασκορβικό οξύ (**Γ**) [34].



**Σχήμα 9:** Μοριακές δομές της γλουταθειόνης (**A**), διυδροασκορβικού οξέος (**B**) (οξειδωμένη μορφή της Βιταμίνης C) και ασκορβικού οξέος (**Γ**) (ανηγγμένη μορφή της Βιταμίνης C)

### 3.1.3. Φυσικά αντιοξειδωτικά

Δεδομένης της φυσικής παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου και ελευθέρων ριζών στο

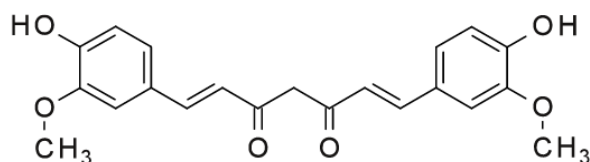
εσωτερικό όλων των αερόβιων οργανισμών, οι οργανισμοί αυτοί διαθέτουν και κατάλληλους μηχανισμούς άμυνας έναντι αυτών των ριζών. Επικεντρώνοντας στους φυτικούς οργανισμούς, πολιτισμοί σε κάθε σημείο της Γης έχουν αξιοποιήσει τις ιατρικές ιδιότητες φυτών, καρπών και βοτάνων από τα αρχαία χρόνια. Σήμερα, υπάρχει πληθώρα ερευνών που έχει διεκπεραιωθεί για την επεξήγηση και επιβεβαίωση των ιδιοτήτων των φυτών αυτών, καθώς η θεραπευτική χρήση τους γίνεται συχνά εμπειρικά, χωρίς γνώση της δράσης των δραστικών ουσιών τους [34]. Ειδικότερα, τα λαχανικά και τα αφεψήματα βοτάνων έχει αποδειχθεί πως αποτελούν σημαντικές πηγές αντιοξειδωτικών [38]. Τα κόκκινα σταφύλια και το κρασί που φτιάχνεται από αυτά, η σοκολάτα και το τσάι αποτελούν πηγές κατεχινών και επικατεχινών [35].

Στην Ελλάδα πολλά φυσικά φυτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται κατά παράδοση ως συστατικά για την παρασκευή αφεψημάτων, ως καρυκεύματα, ως πρόσθετα γεύσης και ως πηγές αιθέριων ελαίων. Η *Mentha spicata* (μέντα), η *Salvia fruticosa* (άγριο φασκόμηλο), το *Acinos Suaveolens* (φυτό συγγενικό του θυμαριού), το θυμάρι, η μαντζουράνα, το κρητικό δίκταμο, το δεντρολίβανο, το σπαθόχορτο, η κάπαρη, το κάστανο, το γιασεμί και το σπάρτο αποτελούν κάποια παραδείγματα φυτών που ευδοκιμούν στην Ελλάδα και περιέχουν φαινόλες, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα τα οποία τους προσδίδουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες [39, 40, 41].

Σε ασιατικές χώρες, όπως η Κίνα και η Ιαπωνία, η ιατρική έχει βασιστεί από αρχαιοτάτων χρόνων στην ευεργετική δράση διαφόρων φυτών και βοτάνων, τα οποία είναι ιθαγενή των χωρών αυτών. Συνδυασμοί βοτάνων όπως το Sho-saikoto-go-keishi-ka-shakuyaku-to (TJ-960) που περιέχει ρίζα *Bupleum*, στέλεχος Πινέλιας (*Pinellia tuber*), ρίζα Σκουτελλαρίας, καρπό Τζιτζιφιάς, ρίζα Τζίνσενγκ, ρίζα Γλυκόριζας, ρίζα Τζίντζερ, ρίζα Παιώνιας και φλοιό Κανέλλας χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση διαφόρων διαταραχών όπως επιληψία ή φλεγμονές όπως η ιογενής ηπατίτιδα. Η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας τέτοιων βοτάνων απέδωσε θετικά αποτελέσματα. Στην περίπτωση του TJ-960, τα ερευνητικά αποτελέσματα έδειξαν την ικανότητά του να δεσμεύει ρίζες 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλο-υδραζιδίου (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH), ρίζες υπεροξυλίου και υπεροξειδίου καθώς και να αναστέλλει την παραγωγή δραστικών ενώσεων θειοβαρβιτουρικού οξέος (thioarbituric acid reactive substances, TBARS) και ενδιάμεσων ριζών υπεροξειδίου, ενώ οι ερευνητές προτείνουν την ύπαρξη συσχέτισης της αντιοξειδωτικής ικανότητάς του με την αντιεπιληπτική του δράση. Ουσίες του TJ-960 με αντιοξειδωτική δράση είναι η saikosaponin b2, η baicalin, η baicalein, paeoniflorin, albiflorin, paeonol, shogaol, gingerol, glycyrrhizin, και το glycyrrhetinic acid. Η μεγάλη ποικιλία τους είναι ενδεικτική της ύπαρξης μεγάλου πλήθους φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών. Άλλα

παραδείγματα ασιατικών σκευασμάτων με αντιοξειδωτική δράση αποτελουμένων από φυσικά προϊόντα είναι το Kanglaojianshenye το οποίο περιέχει *Glymadenia conopsea*, *Cistanshe salsa*, και *Psoralea corylifolia* και έχει αντιοξειδωτική και αντιγηραντική δράση, και το *Ganoderma lucidum* το οποίο έχει τις ίδιες ιδιότητες [34].

Στην Ινδία υπάρχει μεγάλη ποικιλία τροπικών φυτών και βοτάνων με θεραπευτική δράση, πάνω στα οποία έχει αναπτυχθεί η ιατρική παράδοση Kabiraji και η Ayur-Vedic, η οποία μεταφράζεται ως “επιστήμη της ζωής” και αναγνωρίζεται επίσημα από την ινδική κυβέρνηση ως ιατρική επιστήμη και διδάσκεται σε πάνω από εκατό ινδικά κολέγια. Υποστηρίζεται και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (W.H.O.) και τη UNICEF. Δεδομένης της μεγάλης ποικιλίας των φυτών που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά στην Ινδία, η διεξοδική ανάλυση αυτών για τα οποία είναι γνωστή η θεραπευτική τους δράση συνεχίζεται μέχρι σήμερα με συνεχώς αυξανόμενους ρυθμούς. Η κουρκουμίνη (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-hetadiene-3,5-dione) (Σχήμα 10) είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό το οποίο είναι συστατικό και χρωστική των ριζών του *Curcume longa* L. (κουρκουμάς). Η κουρκουμίνη είναι γνωστή για τη χαρακτηριστική γεύση που δίνει στο κάρυ, το οποίο χρησιμοποιείται κατά κόρον στην ινδική κουζίνα.



**Σχήμα 10:** Μοριακή δομή της κετονικής μορφής της κουρκουμίνης

Από το σύνολο των φυσικών προϊόντων των οποίων η συνολική αντιοξειδωτική δράση έχει μετρηθεί, προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση ανάμεσα στα φρούτα παρουσιάζουν τα διάφορα είδη βατόμουρων (berries), ενώ ανάμεσα στα ροφήματα ο καφές και ανάμεσα στους χυμούς, αυτοί των εσπεριδοειδών [42].

Ανάμεσα στα πλέον καταναλισκόμενα ροφήματα και μη αλκοολούχα ποτά, το τσάι καταλαμβάνει την πρώτη θέση στην κατανάλωση, παγκοσμίως. Το πράσινο και το μαύρο τσάι έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή τα οποία, ως πολύ καλοί δεσμευτές ελευθέρων ριζών, προστατεύουν τα κύτταρα και τους ιστούς από οξειδωτικές βλάβες. Ανάλογα με τη βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών, η αντιοξειδωτική ικανότητά τους ξεκινά έπειτα από την

πρόσληψή τους από τον οργανισμό στον πεπτικό σωλήνα και σε άλλους ιστούς. Έρευνες έχουν δείξει πως κατανάλωση από 1 μέχρι 6 φλιτζάνια τσαγιού εντός μίας μέρας οδηγούν σε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου οργανισμού εντός μίας ώρας από την κατανάλωσή τους, ενώ υπάρχουν ενδείξεις πως η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος οδηγεί σε μικρότερη έκταση οξειδωτικών βλαβών σε μακρομόρια όπως το DNA και τα λιπίδια [35]. Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος φαίνεται πως οφείλεται στην αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων από το τσάι [43].

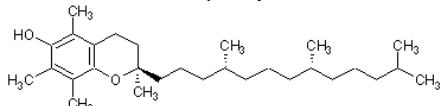
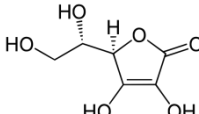
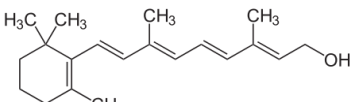
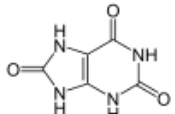
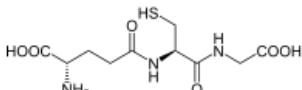
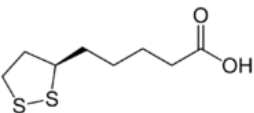
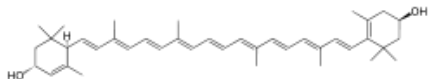
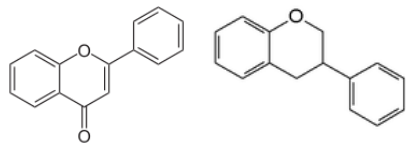
Το ελαιόλαδο αποτελεί κι αυτό πηγή φαινολικών ουσιών και τοκοφερολών οι οποίες προσδίδουν σε αυτό αντιοξειδωτική δράση. Η τελευταία περιορίζει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, χάρη στην υψηλή συγκέντρωση του ελαιόλαδου σε ελαϊκό οξύ, το οποίο είναι ανθεκτικό στην οξείδωση [34].

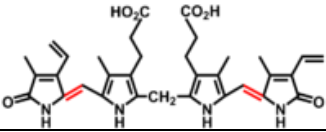
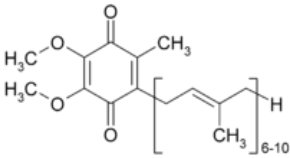
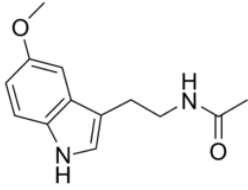
Στους Πίνακες 1 και 2 παρουσιάζονται τα βασικότερα αντιοξειδωτικά και οι κυριότερες ιδιότητές τους.

**Πίνακας 1.** Ενζυμικά αντιοξειδωτικά που αναφέρονται σε in vivo μετρήσεις, και οι βασικές τους ιδιότητες [18].

<b>Ενζυμικά αντιοξειδωτικά</b>	<b>Ιδιότητες</b>
Δισμουτάση του Υπεροξυλίου	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα.</li> <li>• Δεσμεύει τις ρίζες υπεροξυλίου.</li> </ul>
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη.</li> <li>• Απομακρύνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα οργανικά υπεροξειδία.</li> </ul>
Καταλάση	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εντοπίζεται κυρίως στα peroxisomes.</li> <li>• Απομακρύνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου</li> </ul>
Θειορεδοξίνη (Thioredoxin)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εντοπίζεται στους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς</li> <li>• Επιδιορθώνει τις οξειδωμένες θειούχες πρωτεΐνες</li> <li>• Δεσμεύει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και διάφορες ελεύθερες ρίζες.</li> </ul>
Γλουταρεδοξίνη (Glutaredoxin)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παίρνει μέρος στην προστασία και επιδιόρθωση των πρωτεϊνικών και μη πρωτεϊνικών θειολών στην περίπτωση οξειδωτικού στρες.</li> </ul>

**Πίνακας 2.** Μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά που αναφέρονται σε in vino μετρήσεις και οι βασικές τους δομές και ιδιότητες.

Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	Ιδιότητες
<p style="text-align: center;"><b>Βιταμίνη E</b></p>  <p>Vitamin E Tocopherol</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Φαινολική ένωση η οποία εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες.</li> <li>• Ανήκει στην κατηγορία των τοκοφερολών και τοκοτριενολών.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Βιταμίνη C</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εντοπίζεται στην υδατική φάση του κυττάρου, δρα ως δεσμευτής ριζών και ανακυκλώνει τη βιταμίνη E</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Βιταμίνη A</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Προέρχεται από τη διάσπαση του καροτένιου στο έντερο.</li> <li>• Αποτρέπει την υπεροξείδωση των λιπιδίων</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Ουρικό οξύ</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παραπροϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον ανθρώπινο οργανισμό.</li> <li>• Δεσμεύει τις ρίζες του υπεροξειδίου και του υδροξυλίου.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Γλουταθειόνη</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μη πρωτεϊνική θειόλη που βρίσκεται στα κύτταρα και έχει πολλαπλούς ρόλους στην κυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>α-Λιποϊκό οξύ (lipoic acid)</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Δρα ως αντιοξειδωτικό και ανακυκλώνει τη βιταμίνη C</li> <li>• Ισχυρός προγκουτανοθειονικός παράγοντας</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Καροτενοειδή</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αντιοξειδωτικά διαλυτά στα λιπίδια και βρίσκονται κυρίως στις μεμβράνες των ιστών</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Βασικές δομές</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Βασικά συστατικά φυτικών εκχυλισμάτων</li> <li>• Δεσμευτές ριζών και μετάλλων μετάπτωσης</li> </ul>

<p style="text-align: center;"><b>Bilirubin</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παραπροϊόν του μεταβολισμού της αίμης, πιθανώς και εξωκυτταρικό αντιοξειδωτικό</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Ubiquinone (Coenzyme Q10)</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Λιποδιαλυτά παράγωγα της κινόνης. Οι ανηγμένες μορφές τους είναι αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Μελατονίνη</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ορμόνη της επίφυσης. Βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Δεσμεύει διάφορες ρίζες.</li> </ul> </li> </ul>

#### 4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

##### 4.1. Κατηγοριοποίηση των μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Μια βασική κατηγοριοποίηση των μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στον τρόπο με τον οποίον γίνεται η οξειδοαναγωγή. Έτσι, οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής κατηγοριοποιούνται σε αυτές που βασίζονται σε μεταφορά ατόμου υδρογόνου και σε αυτές που βασίζονται σε μεταφορά ηλεκτρονίου. Στις αντιδράσεις της πρώτης κατηγορίας, γίνεται μέτρηση των ανταγωνιστικών κινητικών και η ποσοτικοποίηση προκύπτει από τις κινητικές καμπύλες, ενώ σε αυτές της δεύτερης κατηγορίας περιλαμβάνονται αντιδράσεις οξειδοαναγωγής στις οποίες το οξειδωτικό αποτελεί το δείκτη για την καταγραφή της κινητικής της αντίδρασης. Οι μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά υδρογόνου περιλαμβάνουν μια ουσία η οποία παράγει μια ελεύθερη ρίζα, ένα δείκτη ο οποίος οξειδώνεται κατά την πρόοδο της αντίδρασης και ένα αντιοξειδωτικό. Σκοπός των μεθόδων αυτών είναι η μέτρηση της ικανότητας του αντιοξειδωτικού να δεσμεύσει ελεύθερες ρίζες ή να παρεμποδίσει μία οξειδωτική αντίδραση. Οι μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης μπορούν να ταξινομηθούν: (α) σε διαδικασίες κατά τις οποίες η κατανάλωση μιας σταθερής ρίζας μετράται έπειτα από την προσθήκη του εξεταζόμενου δείγματος, (β) σε διαδικασίες στις οποίες καταγράφεται η κινητική της οξείδωσης, (γ) σε διαδικασίες στις οποίες προσδιορίζεται ποσοτικά η κατανάλωση του υποστρώματος της

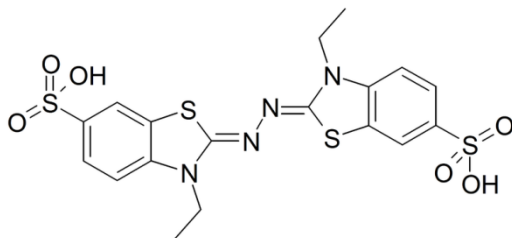
οξειδωσης, (δ) σε διαδικασίες στις οποίες προσδιορίζονται ποσοτικά τα προϊόντα οξειδωσης. Στις παραπάνω διαδικασίες η αναλυτική παράμετρος που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μπορεί να είναι: (i) ο χρόνος ανάσχεσης που απαιτείται για να καταναλωθούν όλα τα αντιοξειδωτικά που είναι παρόντα στο εξεταζόμενο δείγμα, (ii) η ποσότητα του αντιοξειδωτικού ώστε να επιτευχθεί συγκεκριμένη ανάσχεση της οξειδωσης, και τέλος (iii) το ποσοστό ανάσχεσης της οξειδωσης.

#### **4.1.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων βασιζόμενη στον αποχρωματισμό σταθερών ελευθέρων ριζών**

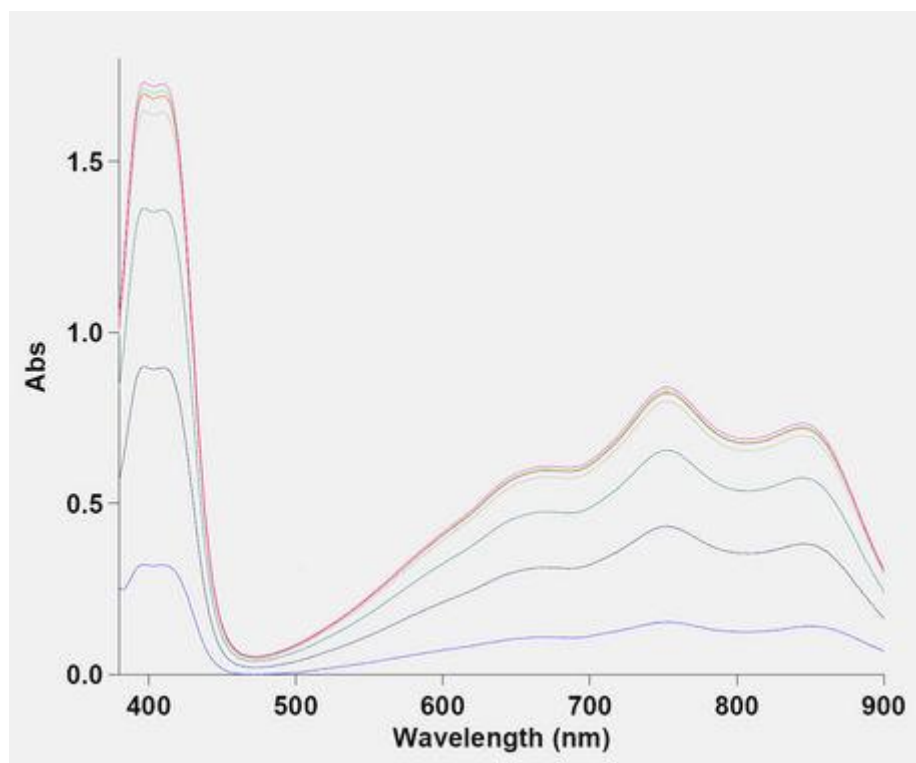
Οι μέθοδοι που βασίζονται στην κατανάλωση μιας σταθερής ελεύθερης ρίζας έχουν βρει πολλές εφαρμογές στην Αναλυτική Χημεία λόγω της απλής πειραματικής διαδικασίας και του χαμηλού κόστους εξοπλισμού. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται κυρίως στην υψηλή μοριακή απορρόφηση και σταθερότητα των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα αντιοξειδωτικά είτε με μεταφορά ηλεκτρονίου είτε με μεταφορά υδρογόνου και αυτές μετατρέπονται σε σταθερές ουδέτερες οργανικές ενώσεις, αποχρωματίζοντας ταυτόχρονα το διάλυμα στο οποίο βρίσκονται. Συνοπτικά όλες οι ελεύθερες οργανικές ρίζες που έχουν χρησιμοποιηθεί αναφέρονται παρακάτω.

##### **(α) Κατιονική ρίζα του ABTS<sup>•+</sup>**

Το διαμμονιακό άλας του 2,2-αζω-δισ(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικού οξέος) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ABTS) (Σχήμα 11), έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε αρκετές μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης. Έχει μέγιστη απορρόφηση στα 342 nm και παρουσιάζει μεγάλη διαλυτότητα και χημική σταθερότητα στο νερό. Το άλας αυτό οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου αλλά και άλλων ανόργανων ή οργανικών ριζών, όπως οι ρίζες υδροξυλίου ( $\text{HO}^\bullet$ ), οι αλκόξυ-ρίζες ( $\text{RO}^\bullet$ ), οι ανιοντικές ρίζες βρωμίου ( $\text{Br}_2^{\bullet-}$ ) και νιτρώδους οξέος ( $\text{NO}_2^{\bullet-}$ ), οι θειοαλκόξυ-ρίζες ( $\text{RS}^\bullet$ ) και αλκυλοπερόξυ-ρίζες ( $\text{ROO}^\bullet$ ) και δίνει την κατιονική ρίζα  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , η οποία έχει μέγιστη απορρόφηση ακτινοβολίας στα 414 nm και μικρότερες απορροφήσεις στα 645, 734 και 815 nm (Εικόνα 1). Η παρουσία ενός αντιοξειδωτικού στο δείγμα προκαλεί ανάσχεση του σχηματισμού της κατιονικής ρίζας  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Μετρώντας την έκταση και τα χρονικά χαρακτηριστικά της ανάσχεσης αυτής, προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται συνήθως φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 734 nm, στο οποίο δεν απορροφούν άλλες ουσίες, οπότε και δεν υπάρχουν παρεμποδίσεις στη μέτρηση.



**Σχήμα 11:** Μοριακή δομή του 2,2-αζω-δισ(3-αιθυλοβενζοθειασζολίνη-6-σουλφονικού οξέος) (ABTS)

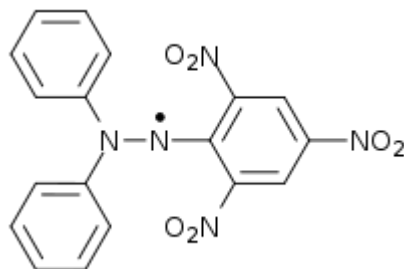


**Εικόνα 1:** Φάσματα απορρόφησης της κατιοντικής ρίζας του  $ABTS^{+\cdot}$  σε διάφορα στάδια της παραγωγής του.

### (β) Ρίζα του DPPH'

Η ρίζα του 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλο-υδραζιδίου (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH') (Σχήμα 12), είναι μάλλον η πιο διαδεδομένη ρίζα που έχει χρησιμοποιηθεί στις μελέτες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης. Το γεγονός ότι αποτελεί εμπορικό προϊόν και δε χρειάζεται να προπαρασκευαστεί έχει οδηγήσει στην επέκταση της χρήσης της και από λιγότερο έμπειρους ερευνητές της Χημείας Τροφίμων, Φαρμακογνώσιας, Φαρμακοχημείας





**Σχήμα 12:** Μοριακή δομή της ρίζας του 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλο-υδραζιδίου, (DPPH<sup>•</sup>) (M.B: 394.32 g/mol)

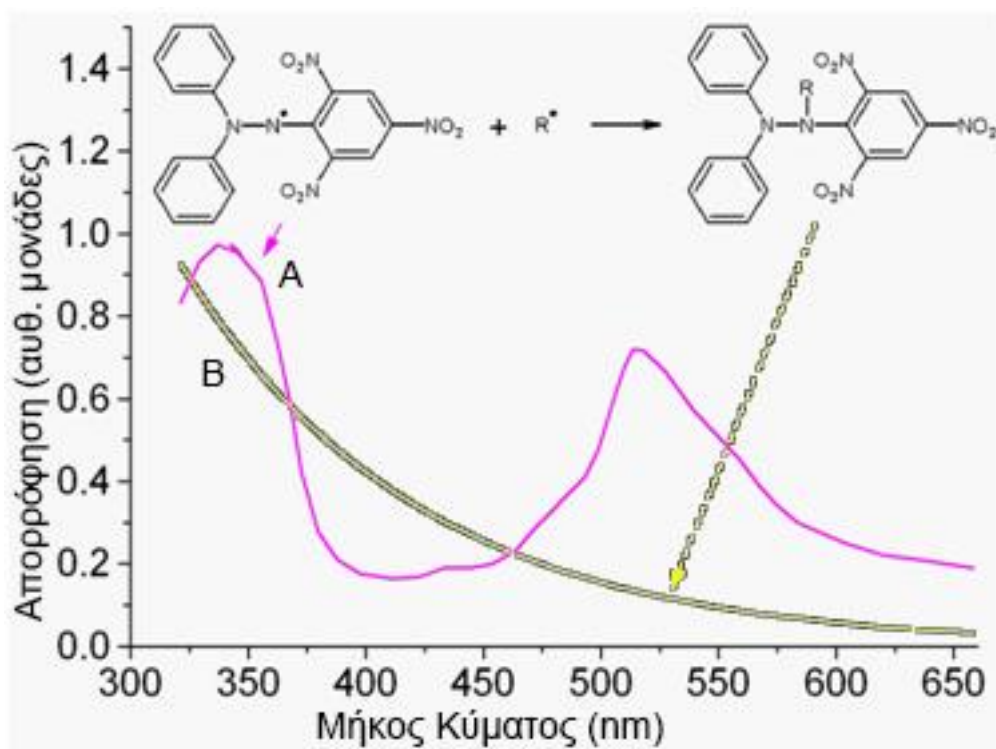
και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. Η ρίζα έχει μέγιστη απορρόφηση στα 515 nm (Εικόνα 2) και η μείωση της απορρόφησης παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών στο δείγμα χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εξεταζόμενου δείγματος. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε δύο εκδοχές, τη δυναμική και τη στατική. Στη δυναμική, μετράται ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού. Στη στατική εκδοχή μετράται η ποσότητα της ρίζας DPPH<sup>•</sup> που έχει δεσμευτεί από το εξεταζόμενο δείγμα. Συνήθως, χρησιμοποιείται η στατική εκδοχή και η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού η οποία απαιτείται ώστε να μειωθεί η συγκέντρωση της ρίζας στο ήμισυ (EC<sub>50</sub>). Άλλος δείκτης έκφρασης της αντιοξειδωτικής δράσης είναι ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει το σήμα σε ένα πλατό σε συγκέντρωση ίση με αυτή του EC<sub>50</sub> (T<sub>EC50</sub>). Ο συνδυασμός του T<sub>EC50</sub> και του EC<sub>50</sub> δίνει μια νέα παράμετρο που ονομάζεται ικανότητα δέσμευσης ριζών (antiradical efficiency, AE) και δίνεται από τον τύπο [44]:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot T_{EC50}} \quad (4.1)$$

Άλλες φορές, όμως, η αντιοξειδωτική δράση εκφράζεται ως ισχύς δέσμευσης ριζών (antiradical power, ARP) και δίνεται από τον τύπο:

$$ARP = \frac{1}{EC_{50}} \quad (4.2)$$

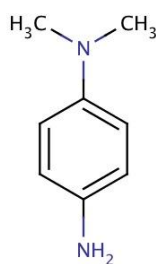
Όσο μεγαλύτερο είναι το ARP τόσο πιο αποτελεσματικό είναι το αντιοξειδωτικό. Τα αντιοξειδωτικά αντιδρούν με την ελεύθερη ρίζα του DPPH<sup>•</sup> και παράγουν την ουδέτερη ένωση 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλο-υδραζίνη (DPPH).



**Εικόνα 2:** Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης ρίζας του 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλο-υδραζιδίου ( $DPPH^{\bullet}$ ) (καμπύλη A) και της ουδέτερης ένωσης 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλο-υδραζίνης ( $DPPH$ ) (καμπύλη B)

### (γ) Κατιοντική ρίζα του $DMPD^{+\bullet}$

Η κατιοντική ρίζα της N,N-διμεθυλο-p-φαινυλοδιαμίνης (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine,  $DMPD^{+\bullet}$ ) (Σχήμα 13), παράγεται σε όξινο περιβάλλον από την αντίδραση ενός οξειδωτικού με N,N-διμεθυλο-p-φαινυλοδιαμίνη. Η παραγόμενη ρίζα απορροφά στα 505 nm και μείωση της απορρόφησης της παρουσία μιας αντιοξειδωτικής ουσίας αξιοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής της ικανότητας. Η αντίδραση της αντιοξειδωτικής ουσίας με τη ρίζα είναι γρήγορη (περίπου 10 min) και το τέλος της αντίδρασης είναι ευδιάκριτο και σταθερό [45].



**Σχήμα 13:** Μοριακή δομή της N,N-διμεθυλο-p-φαινυλοδιαμίνης ( $DMPD$ )

#### **4.1.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην μέτρηση των προϊόντων οξείδωσης**

Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στη μέτρηση των πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης. Η οξείδωση προκαλείται με χρήση θερμοδιασπώμενων αζω-ενώσεων ή μετάλλων μεταπτώσεως. Συνοπτικά οι μέθοδοι αυτές είναι:

##### ***(α) Προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίων (Peroxide value, PV)***

Η πρότυπη μέθοδος βασίζεται στον προσδιορισμό των υδροϋπεροξειδίων λιπαρών ουσιών με ογκομέτρηση του μοριακού ιωδίου που ελευθερώνεται από την οξείδωση διαλυμάτων ιωδιούχων ιόντων από τα ολικά υπεροξείδια ενός δείγματος [46]. Το τελικό διάλυμα ογκομετρείται με θειοθειϊκό νάτριο και δείκτη άμυλο. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζεται σε ισοδύναμα οξυγόνου ανά κιλό δείγματος ( $\text{meq O}_2 / \text{kg}$ ). Η μέθοδος αυτή, αν και αποτελεί την επίσημη μέθοδο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, είναι εμπειρική και παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, όπως μικρή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, πιθανή προσθήκη ιωδίου σε ακόρεστους δεσμούς και οξείδωση του ιωδίου από το διαλυμένο οξυγόνο. Επομένως, η ακρίβεια των αποτελεσμάτων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις πειραματικές συνθήκες, το χρόνο, το φως αλλά και το ατμοσφαιρικό οξυγόνο [47]. Εκτός από τον ιωδιομετρικό προσδιορισμό έχουν προταθεί και άλλες μεθοδολογίες για την εκτίμηση του αριθμού υπεροξειδίου [48] μια εκ των οποίων χρησιμοποιεί τη χημειοφωταυγή αντίδραση του δις-(2,4,6-τριχλωροφαινυλο)-οξαλικού εστέρα παρουσία αλάτων μαγγανίου II ( $\text{Mn(II)}$ ) ως καταλύτη και 9,10-διμεθυλο-ανθρακένιο ως φθοριστή [49].

##### ***(β) Προσδιορισμός του Αριθμού Ανισιδίνης (Anisidine Value, AnV)***

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ της p-ανισιδίνης (p-μεθοξυ-ανιλίνης) και των αλδευδών που σχηματίζονται κατά την οξείδωση μιας λιπαρής ουσίας. Το βασικό προϊόν των αντιδράσεων αυτών είναι οι 2-αλκενάλες, οι οποίες λόγω της εκτεταμένης συζυγίας που εμφανίζουν απορροφούν έντονα στα 350 nm σε διαλύτη ισοοκτάνιο ή 2-προπανόλη [50].

##### ***(γ) Μέθοδος TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances assay)***

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος με τη μηλονική διαλδεύδη. Η μηλονική διαλδεύδη σχηματίζεται από λιπαρά οξέα που έχουν λιγότερους από τρεις διπλούς δεσμούς. Η αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος με τη μηλονική διαλδεύδη

δίνει ένα έγχρωμο (κόκκινο) προϊόν το οποίο ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 532 nm [51]. Η οξείδωση που προκαλείται από τα μεταλλοϊόντα ή από την παρουσία μιας ελεύθερης ρίζας παρεμποδίζεται από την προσθήκη αντιοξειδωτικών και καταγράφεται η μείωση της απορρόφησης.

#### **(δ) Μέθοδος TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity)**

Η μέθοδος TOSC, είναι μια αρκετά συνηθισμένη μέθοδος στην οποία χρησιμοποιείται η αεριοχρωματογραφία για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιων ουσιών. Έχουν αναφερθεί κάποιες παραλλαγές της μεθόδου οι οποίες αφορούν κυρίως στο είδος των οξειδωτικών αντιδραστηρίων. Η πιο χαρακτηριστική από αυτές αναφέρεται στη θερμική διάσπαση του 2,2-αζω-δις-(αμινοπροπανίου), ABAP και την παραγωγή ριζών υπεροξειδίου. Οι ρίζες οξειδώνουν το 2-κετο-4-θειομεθυλοβουτυρικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή αιθυλενίου. Η παρουσία αντιοξειδωτικών στο δείγμα αποτρέπει την οξείδωση του 2-κετο-4-θειομεθυλοβουτυρικού οξέος. Με συνεχείς δειγματοληψίες στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανιχνεύεται το εκλυόμενο αιθυλένιο με αεριοχρωματογραφία. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα ενός πρότυπου διαλύματος με τα αποτελέσματα του δείγματος, προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του εξεταζόμενου δείγματος [52].

#### **(ε) Μέθοδος αποχρωματισμού του β καροτένιου (b- carotene bleaching assay)**

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αντίδραση του β-καροτενίου με τα προϊόντα διάσπασης του λινολεϊκού οξέος. Τα αντιοξειδωτικά του δείγματος εμποδίζουν την διάσπαση του λινολεϊκού οξέος και έτσι εμποδίζουν την αποικοδόμηση του β- καροτένιου. Η μείωση της απορρόφησης του β-καροτένιου στα 470 nm αποτελεί την αναλυτική παράμετρο. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί σε πρότυπες ουσίες αλλά και σε εκχυλίσματα φυτών [53, 54].

#### **(στ) Μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)**

Η μέθοδος ORAC μετρά την αντιοξειδωτική ικανότητα κάποιας ουσίας έναντι της ρίζας υδροπεροξυλίου (HOO<sup>·</sup>) που παράγεται από το διχλωριούχο 2,2'-αζω-δις-(2-αμινοπροπάνιο) στους 37 °C. Αρχικά, ως φθορίζων δείκτης, χρησιμοποιείτο η πρωτεΐνη B-phycoerythrin, η οποία ωστόσο αντικαταστάθηκε από την φλουορεσκεΐνη, λόγω των μεταβολών που παρουσίαζε στη δραστηριότητα της από παρτίδα σε παρτίδα και λόγω του αποχρωματισμού της από την

ακτινοβολία διέγερσης κατά τις μετρήσεις φθορισμού για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης τους [55].

#### **4.1.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης βασιζόμενη στην ικανότητα των δειγμάτων να ανάγουν μέταλλα με υψηλό οξειδωτικό σθένους [ιόντα σιδήρου (III) και χαλκού (II)]**

Η αναγωγική ικανότητα σε αρκετές μελέτες λανθασμένα αναφέρεται ως αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε καμία περίπτωση οι δυο έννοιες δεν πρέπει να συγχέονται. Η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός δείγματος αναφέρεται στην ικανότητα του να εμποδίζει μια οξείδωση ενώ η αναγωγική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητά του να αναγάγει μια ουσία. Συνοπτικά οι μέθοδοι που προσδιορίζουν την αναγωγική ικανότητα ενός δείγματος είναι:

##### **(α) Μέθοδος FRAP**

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι εκτίμησης της αναγωγικής ικανότητας ενός δείγματος βασιζόμενες στην αναγωγή του σιδήρου (III) σε σίδηρο (II). Το δυναμικό οξειδοαναγωγής του ζεύγους  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  είναι 0,77 V, το οποίο όμως στην περίπτωση που τα ιόντα σιδήρου είναι συμπλοκοποιημένα αλλάζει σημαντικά. Τα αντιδραστήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί για την συμπλοκοποίηση των ιόντων σιδήρου είναι η φαινανθρολίνη, η βαθρο-φαινανθρολίνη, η τριπυριδυλοτριαζίνη και τα σιδηροκυανιούχα [56]. Κάθε ιόν σιδήρου συμπλέκεται με 3 μόρια φαινανθρολίνης ή βαθρο-φαινανθρολίνης και με δυο μόρια τριπυριδυλοτριαζίνης. Από τις μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί για την εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας των αντιοξειδωτικών, η μέθοδος FRAP έχει καθιερωθεί διεθνώς [57]. Για τον ίδιο σκοπό έχουν χρησιμοποιηθεί, επίσης, και σύμπλοκα σιδήρου-φαινανθρολίνης [58] καθώς και σιδηροκυανιούχα άλατα [59].

##### **(β) Μέθοδος CUPRAC**

Η μέθοδος CUPRAC χρησιμοποιεί για την εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας την αναγωγή συμπλόκου δισθενούς χαλκού με τη νεοκουπροΐνη. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής του ζεύγους  $Cu^{2+}/Cu^+$  είναι 0,17 V ενώ το δυναμικό των αντίστοιχων συμπλόκων με νεοκουπροΐνη 0,6 V κάτι που σημαίνει ότι η αναγωγή αυτή γίνεται πιο εύκολα. Ο σχηματισμός του συμπλόκου  $Cu(Nc)_2^+$  παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm [60]. Η μέθοδος αυτή τα τελευταία χρόνια έχει βρει πολλές εφαρμογές στην ανίχνευση της αναγωγικής δράσης προτύπων

ουσιών και φυσικών προϊόντων [61, 62].

#### 4.2 Κριτική της αξιοπιστίας των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η μεγάλη ποικιλομορφία των αντιοξειδωτικών σε τρόφιμα και βιολογικές μήτρες καθιστά την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στα φυσικά προϊόντα δυσχερή, ενώ ταυτόχρονα η συνύπαρξη μεγάλου φάσματος διαφορετικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα και τα φυσικά προϊόντα δυσχεραίνει τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας [33]. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να αποτελέσουν εμπόδιο στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός φυτικού εκχυλίσματος είναι οι φυσικές ιδιότητές του όπως η διαλυτότητά του σε διάφορους διαλύτες και η κατανομή των συστατικών του μεταξύ των υδρόφιλων και υδρόφοβων φάσεων. Επίσης, όταν αξιολογούνται φυσικά αντιοξειδωτικά με μεθόδους που καταμετρούν τα προϊόντα της οξείδωσης λιπιδίων προκύπτουν ποικίλα αποτελέσματα, ανάλογα με το στάδιο της οξείδωσης στο οποίο βρίσκονται τα λιπίδια. Δεδομένων όλων αυτών των παραγόντων, είναι λογική η ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας στη βιβλιογραφία, οι οποίες είναι συνήθως αμφισβητήσιμης πιστότητας [35].

Είναι, λοιπόν, συνήθως προτιμότερο να μετράται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC) των φυτικών εκχυλισμάτων και των βιολογικών υγρών [33]. Η TAC προσδιορίζεται, κι αυτή, από πολλούς παράγοντες και όχι μόνο από τη χημική δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού έναντι των ελεύθερων ριζών. Εκτός από τη δραστηριότητα, οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας μέσα σε έναν οργανισμό είναι το σημείο στο οποίο εντοπίζεται το αντιοξειδωτικό και η κινητικότητά του στο μικροπεριβάλλον του, η θέση παραγωγής και δράσης των ελευθέρων ριζών εντός του οργανισμού ως προς τη θέση του αντιοξειδωτικού, η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με άλλα αντιοξειδωτικά και, τέλος, η ενσωμάτωση, διακίνηση, ασφάλεια και ο μεταβολισμός του αντιοξειδωτικού από τον οργανισμό [34]. Η πληθώρα των παραγόντων που επηρεάζουν τη μέτρηση, η πληθώρα των ουσιών που συνυπάρχουν και δρουν, πιθανώς, συνδυαστικά με τα αντιοξειδωτικά εντός των οργανισμών, η γεωγραφική προέλευση του προϊόντος του οποίου η αντιοξειδωτική ικανότητα μετράται και η δυσκολία ακριβούς αναπαραγωγής *in vitro* των μηχανισμών οξείδωσης που λαμβάνουν χώρα εντός των ζωντανών ιστών (*in vivo*), καθιστούν τις μεθόδους που μετρούν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα

μεθόδους μη ρεαλιστικές και αμφισβητήσιμης ακρίβειας [35, 42, 63, 64].

Ο κύκλος των μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας απαιτεί την ακριβή παρουσίαση των συνθηκών υπό τις οποίες έγινε η μέτρηση, όπως η πίεση, η θερμοκρασία, τα αντιδραστήρια, τα αντιδρώντα μέσα και τα σημεία αναφοράς. Το γεγονός αυτό δεν καθιστά κατάλληλη την ονομασία των αποτελεσμάτων οποιασδήποτε τέτοιας μεθόδου ως “δείκτες ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας”, καθώς οι διάφορες μέθοδοι δεν είναι συγκρίσιμες και θα πρέπει να αναφέρεται ρητά ως προς ποιο οξειδωτικό αναφέρονται (πχ. ποιο οξειδωτικό δεσμεύεται στις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας) [63].

## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

### 5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΟΡΓΑΝΑ - ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

#### 5.1 Αντιδραστήρια

Τα οξειδωτικά αντιδραστήρια, υπεροξύλιο του καλίου ( $\text{KO}_2$ ) και η ελεύθερη ρίζα του 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλο-υδραζιδίου (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH), που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πρότυπων αντιοξειδωτικών ουσιών ή εκχυλισμάτων τσαγιών και καφέ αγοράστηκαν από τις εταιρείες Alfa Aesar και Sigma, αντίστοιχα. Η κατιοντική ρίζα του  $\text{ABTS}^{++}$  παρασκευάστηκε από το 2,2-αζω-δισ(3-αιθυλοβενζοθειοαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ABTS) της Alfa Aesar παρουσία υπερθειϊκού καλίου ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) της εταιρείας Merck.

Οι αντιοξειδωτικές πρότυπες ενώσεις, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ και κατεχίνη αγοράστηκαν από την εταιρεία Aldrich, ενώ το 2,6-δι-tert-βουτυλο-4-μεθυλοφαινόλη (Butylated hydroxytoluene, BHT) από την εταιρεία ACROS ORGANICS. Τα αντιοξειδωτικά αντιδραστήρια Trolox-C και ασκορβικό οξύ αγοράστηκαν από τις εταιρείες Jansen και Riedel de Haen αντίστοιχα. Όλα τα αντιδραστήρια ήταν υψηλής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς καμιά προηγούμενη επεξεργασία.

Όλα τα τσάγια και ο καφές που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από Ελληνικά Super Markets.

Για την σύνθεση του νέου φθορισμομετρικού δείκτη, N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνη χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια διμεθυλο-θειϊκός εστέρας της εταιρείας Aldrich και το βοροϋδρίδιο του νατρίου ( $\text{NaBH}_4$ ) της εταιρείας Merck.

Οι διαλύτες, N,N-διμεθυλο-φορμαμίδιο (dimethylformamide, DMF) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις με υπεροξύλιο του καλίου είχαν ξηρανθεί προηγουμένως με πεντοξείδιο του φωσφόρου και αποστάχθηκαν απουσία οξυγόνου.



## 5.2. Παρασκευή διαλυμάτων

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων φθορισμού ήταν τα ακόλουθα:

(α) Κορεσμένο διάλυμα υπεροξυλίου του καλίου (8.0 mg / ml) σε ξηρό και αποσταγμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο το οποίο παρασκευαζόταν καθημερινά.

(β) Διαλύματα εργασίας της Ν-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης συγκέντρωσης 100  $\mu\text{M}$  παρασκευαζόταν καθημερινά προσθέτοντας 1.95 mg Ν-ΜΔΑ σε 100 ml DMF για μετρήσεις με υπεροξύλιο του καλίου ή 100 ml μεθανόλη για μετρήσεις με DPPH.

(γ) Διαλύματα παρακαταθήκης των αντιοξειδωτικών ενώσεων συγκεντρώσεων 1000  $\mu\text{M}$  παρασκευάζονταν καθημερινά με ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας και διαλυτοποίηση με τον κατάλληλο διαλύτη (DMF για μετρήσεις με υπεροξύλιο του καλίου και μεθανόλη για μετρήσεις με DPPH) και ακόλουθη αραιώση σε διαλύματα εργασίας 100  $\mu\text{M}$ .

(ε) Για τη διεξαγωγή της πρότυπης μεθόδου του DPPH παρασκευαζόταν καθημερινά αρχικό διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 1000  $\mu\text{M}$  (3.95 mg/10 ml) το οποίο στη συνέχεια αραιωνόταν με μεθανόλη στα 100  $\mu\text{M}$ .

## 5.3 Όργανα μετρήσεων

### (α) Φασματοφθορισμόμετρο

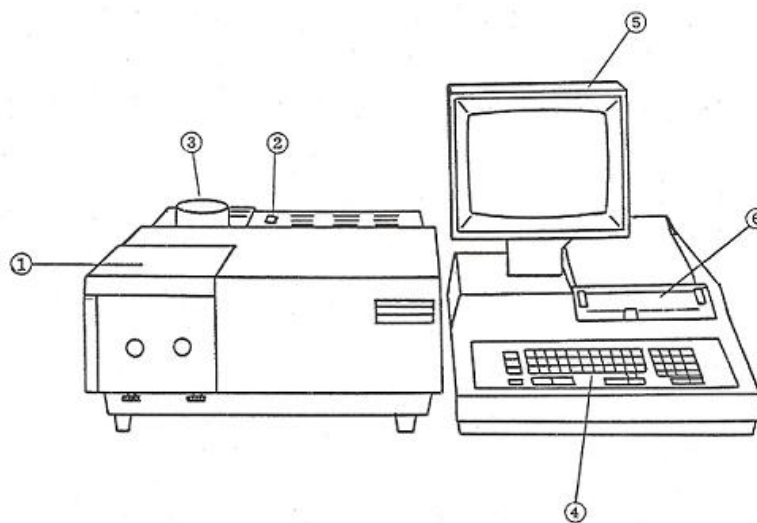
Οι μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφθορισμόμετρο της εταιρείας JASCO, μοντέλο FP-777 (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** Φασματοφθορισμόμετρο της εταιρείας JASCO, μοντέλο FP-777.

Το φασματοφθορισμόμετρο φέρει σκοτεινό θάλαμο με ειδική θέση, στην οποία τοποθετείται κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm εντός της οποίας πραγματοποιείται η μέτρηση για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Ο υποδοχέας της κυψελίδας έχει δύο σχισμές, μία στην πλευρά πρόσπτωσης του φωτός της λυχνίας ξένου 150 watt και μία μετά από αυτή από όπου εξέρχεται το φως και προσπίπτει στο φωτοπολλαπλασιαστή. Η προσθήκη των αντιδραστηρίων στην κυψελίδα πραγματοποιείται με σύριγγες ακριβείας της εταιρίας Hamilton.

Το όργανο παρέχει τη δυνατότητα ρύθμισης όλων των δυνατών παραμέτρων για την πραγματοποίηση των μετρήσεων. Τέτοιες παράμετροι είναι το μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης (Emission  $\lambda$  και Excitation  $\lambda$ , αντίστοιχα), τα πλάτη των σχισμών (Ex SBW, Em SBW), η ευαισθησία του φωτοπολλαπλασιαστή (PMT Gain) και η απόκριση του οργάνου (Response). Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής μεταξύ διαφόρων προγραμμάτων όπως η σάρωση εκπομπής (*emission scan*) για απεικόνιση του φάσματος εκπομπής, η σάρωση διέγερσης (*excitation scan*) για απεικόνιση του φάσματος διέγερσης και η σάρωση χρόνου (*time scan*) για λήψη του φάσματος έντασης συναρτήσεως του χρόνου. Τέλος, το όργανο φέρει καταγραφέα στον οποίον καταγράφονται τα φάσματα. Στο Σχήμα 14 παρουσιάζεται σε απλουστευμένη μορφή η γραφική αναπαράσταση του οργάνου, όπως δίνεται στο βιβλίο οδηγιών αυτού [65].



**Σχήμα 14:** Γραφική αναπαράσταση του φασματοφθορισμόμετρου: (1) Θάλαμος δείγματος, (2) Κουμπί έναρξης του οργάνου, (3) Πηγή φωτός, (4) Πίνακας λειτουργιών, (5) Οθόνη και (6) Καταγραφέας.

## **(β) Φασματοφωτόμετρο UV/VIS**

Τα φάσματα απορρόφησης για την πρότυπη μέθοδο DPPH μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV/VIS διπλής δέσμης της εταιρείας JASCO, μοντέλο V-560.



**Εικόνα 4:** Φασματοφωτόμετρο UV/VIS διπλής δέσμης της εταιρείας JASCO, μοντέλο V-560

Για την καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Στη μία κυψελίδα τοποθετήθηκε το δείγμα και στην άλλη το τυφλό διάλυμα (blank solution) έτσι ώστε να γίνεται αυτόματα διόρθωση του φάσματος του δείγματος ως προς την απορρόφηση του τυφλού διαλύματος. Το όργανο έχει δυνατότητα σάρωσης σε μήκη κύματος από 200 έως 900 nm και ταχύτητες από 100 έως 2000 nm ανά λεπτό.

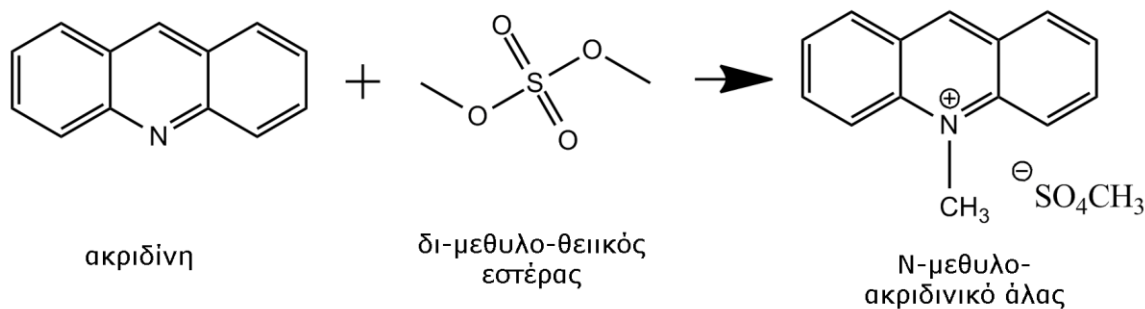
### **5.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός**

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει διακριβωμένο αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων της εταιρίας Sartorius, θερμαινόμενο αναδευτήρα της εταιρίας SCHOTT και αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 20 - 200  $\mu\text{L}$  και 100 - 1000  $\mu\text{L}$  της εταιρείας Lambda.

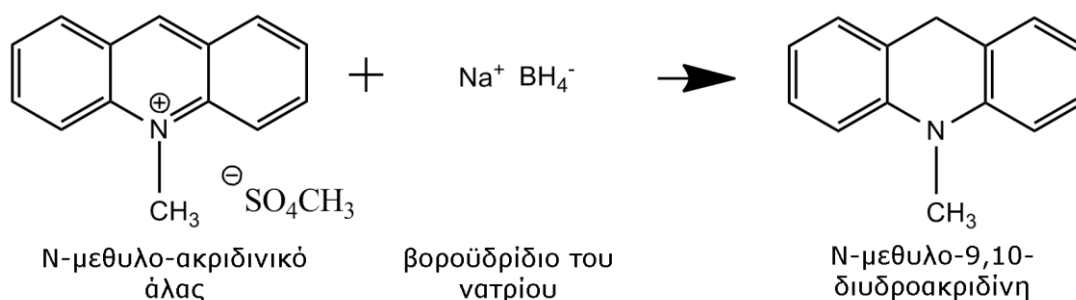
Στον εργαστηριακό εξοπλισμό περιλαμβάνονται, επίσης, ογκομετρικές φιάλες (5, 10, 25, 50, 100 mL), εσμυρισμένες σφαιρικές φιάλες με πόμα (250, 500 mL), διακριβωμένα σιφόνια (5, 10 mL), διακριβωμένες σύριγγες (100, 250, 500  $\mu\text{L}$ ), γυάλινα φιαλίδια των 25 mL με πόμα, σταγονόμετρα και γυάλινα χωνιά.

## 5.5. Σύνθεση της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης

Η N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνη παρασκευάστηκε από την ακριδίνη σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα (Σχήμα 15), η ακριδίνη μετατράπηκε με διμεθυλο-θειικό εστέρα στο αντίστοιχο N-μεθυλο-ακριδινικό άλας, το οποίο με τη σειρά του ανάχθηκε με βοροϋδρίδιο του νατρίου στην N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνη (Σχήμα 16).



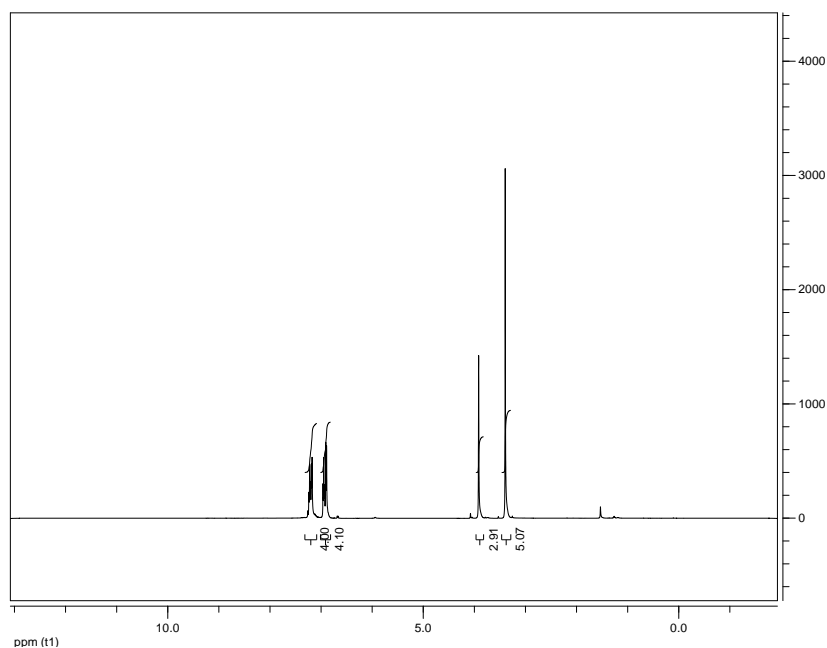
**Σχήμα 15:** Σύνθεση του N-μεθυλο-ακριδινικού άλατος από την ακριδίνη.



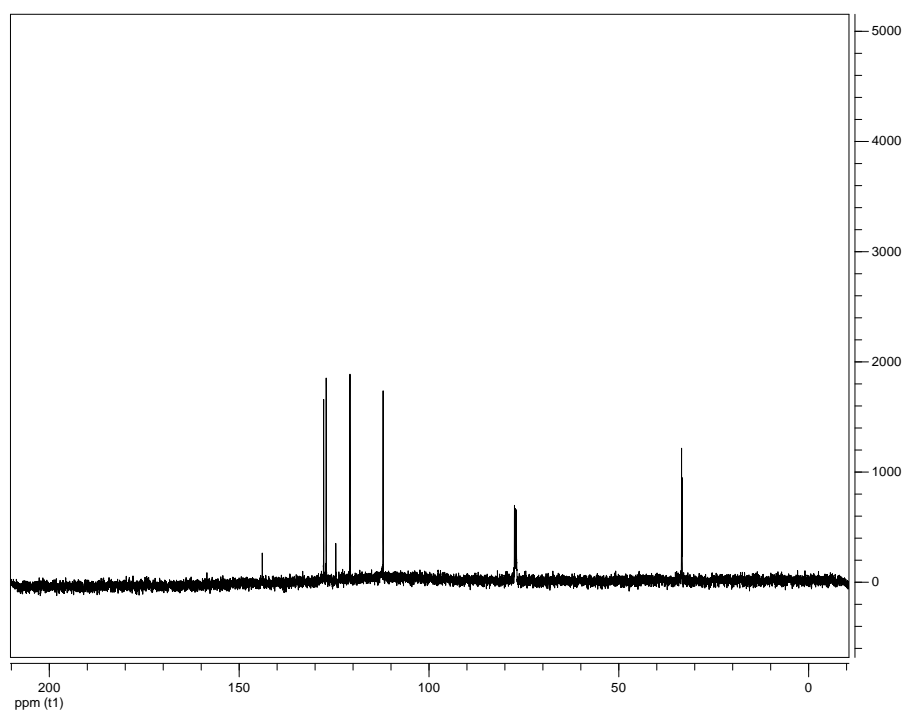
**Σχήμα 16:** Σύνθεση της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης από το N-μεθυλο-ακριδινικό άλας.

Συγκεκριμένα, σε μία σφαιρική φιάλη διαλυτοποιήθηκαν 1.79 g ακριδίνης (10 mmol) σε 30 ml ακετόνης, προστέθηκαν 1.3 g διμεθυλο-θειικού εστέρα (12 mmol) και το διάλυμα θερμάνθηκε υπό αναρροή για 18 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνθηκε και το στερεό άλας ξεπλύθηκε αρκετές φορές με ξηρή ακετόνη. Η χημική απόδοση ήταν 82 % (2.7 g). Το καθαρό προϊόν χρησιμοποιήθηκε αμέσως μετά για την παρασκευή της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης σύμφωνα με γνωστές διαδικασίες [66], αλλά μετά από κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 378 mg (10.0 mmol) NaBH<sub>4</sub> προστέθηκαν σε 50 % υδατικού διαλύματος μεθανόλης το οποίο περιείχε 2.0 g (8.2 mmol) N-μεθυλο-ακριδινικού άλατος και αναδεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου όλη τη νύχτα. Το προϊόν καθίζησης διηθήθηκε, ξεπλύθηκε αρκετές φορές με νερό και ξηράνθηκε σε ξηραντήρα υπό κενό παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου. Η καθαρότητα του προϊόντος και ο χαρακτηρισμός του

προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου και άνθρακα (Εικόνες 5 και 6). Υπολογίστηκε χημική απόδοση 86 % (1.3 g). Στην Εικόνα 5 δίνεται το φάσμα NMR του πρωτονίου:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ = 3.39 (s, 1H, NCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.87(d, J=6.67 Hz, 2H), 7.11(m, 4H) ppm. Στην Εικόνα 6 δίνεται το φάσμα NMR του  $^{13}\text{C}$ :  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ =33.32 (CH<sub>2</sub>), 33.45 (NCH<sub>3</sub>), 113.87, 121.06, 127.43, 129.03, 140.56 ppm.



**Εικόνα 5:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης



**Εικόνα 6:** Φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης

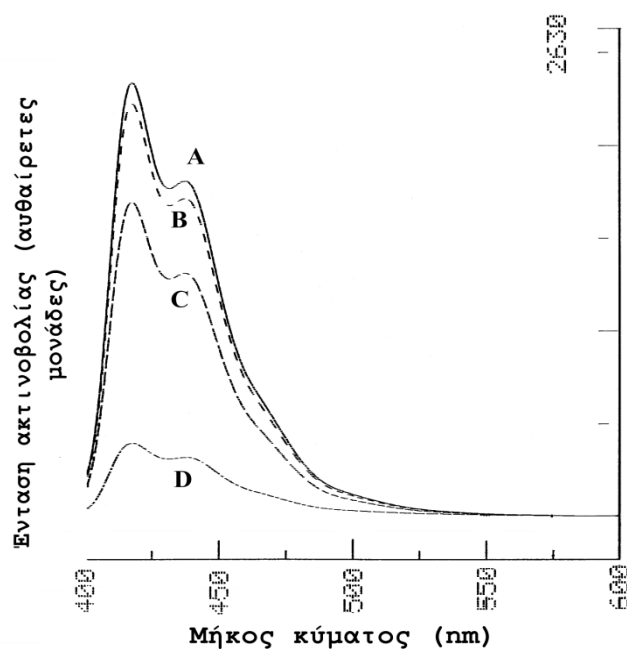
## 5.6. Διαδικασία παρασκευής εκχυλισμάτων τσαγιών και καφέ

Πριν την παρασκευή των εκχυλισμάτων τσαγιού, τα αποξηραμένα φύλλα και κοτσάνια του τσαγιού κονιορτοποιήθηκαν σε ένα ιγδίο για την επίτευξη μίας ομοιογενούς στερεάς σκόνης. Τα εκχυλίσματα τσαγιού παρασκευάστηκαν με την προσθήκη ενός γραμμαρίου σκόνης τσαγιού σε 100 ml αποσταγμένου νερού που βράζει για 10 λεπτά. Τα αδιάλυτα μέρη διηθήθηκαν με διηθητικό φίλτρο γυαλιού με διάμετρο πόρων 43–48  $\mu\text{m}$  και αραιώθηκαν με τον κατάλληλο διαλύτη έως ότου οι εντάσεις φθορισμού να βρίσκονται εντός της γραμμικής περιοχής της πρότυπης καμπύλης του Trolox. Στις μετρήσεις φθορισμού με υπεροξύλιο του καλίου, το νερό απομακρύνθηκε με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα στους 45 °C, τα υπολείμματα ξηράνθηκαν υπό κενό σε ξηραντήρα παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και διαλύθηκαν τόσες φορές μέχρι οι εντάσεις φθορισμού να είναι εντός της γραμμικής περιοχής της πρότυπης ένωσης.

## 5.7. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της νέας φθορισμομετρικής μεθόδου

Κατά την αντίδρασή της, η N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνη με υπεροξύλιο του καλίου ή με την ελεύθερη ρίζα του DPPH οξειδώνεται και παράγει ηλεκτρονικά διεγερμένα προϊόντα τα οποία αποδιεγειρόμενα εκπέμπουν φως. Το προϊόν οξείδωσης με  $\text{KO}_2$  σε μη πρωτικό διαλύτη (DMSO ή DMF) είναι η N-μεθυλοακριδόνη (Σχήμα 17) και με την ελεύθερη ρίζα του DPPH σε μεθανόλη είναι το N-μεθυλο-ακριδινικό άλας (Σχήμα 18). Η παραγωγή των προϊόντων αυτών ολοκληρώνεται μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Παρουσία ενός αντιοξειδωτικού, η ένταση του φθορισμού των παραγόμενων προϊόντων μειώνεται σταδιακά αυξανόμενης της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού. Από την μείωση του φθορισμού εκτιμάται τελικά η αντιοξειδωτική ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων καθώς και των εκχυλισμάτων των τσαγιών και του καφέ. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται τα φάσματα του προϊόντος οξείδωσης N-μεθυλακριδόνη του N-μεθυλακριδανίου με το υπεροξύλιο του καλίου απουσία αντιοξειδωτικού (φάσμα A) και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αντιοξειδωτικού Trolox (φάσματα B, C, D).





**Εικόνα 7:** Φάσματα του προϊόντος οξείδωσης *N*-μεθυλοακρυδόνης του *N*-μεθυλακρυδανίου με το υπεροξύλιο του καλίου απουσία και παρουσία του αντιοξειδωτικού Trolox. **A:** φάσμα φθορισμού του τυφλού διαλύματος (απουσία του αντιοξειδωτικού Trolox), **B, C, D:** φάσματα φθορισμού παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αντιοξειδωτικού Trolox ( $10^{-7}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-3}M$  αντίστοιχα)

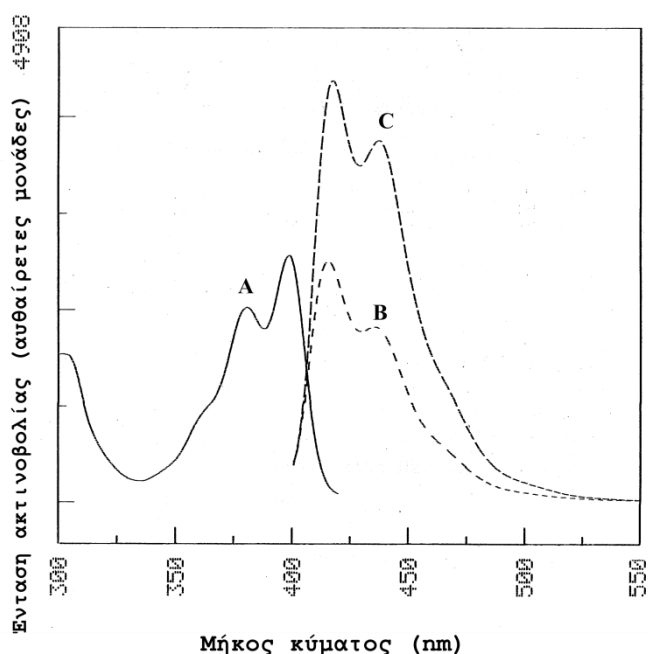
Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν επελέγησαν μετά από πειράματα βελτιστοποίησης τόσο των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων όσο και των διαφόρων παραμέτρων του οργάνου που παρουσιάζονται παρακάτω.

#### (α) Εύρεση των βέλτιστων μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής

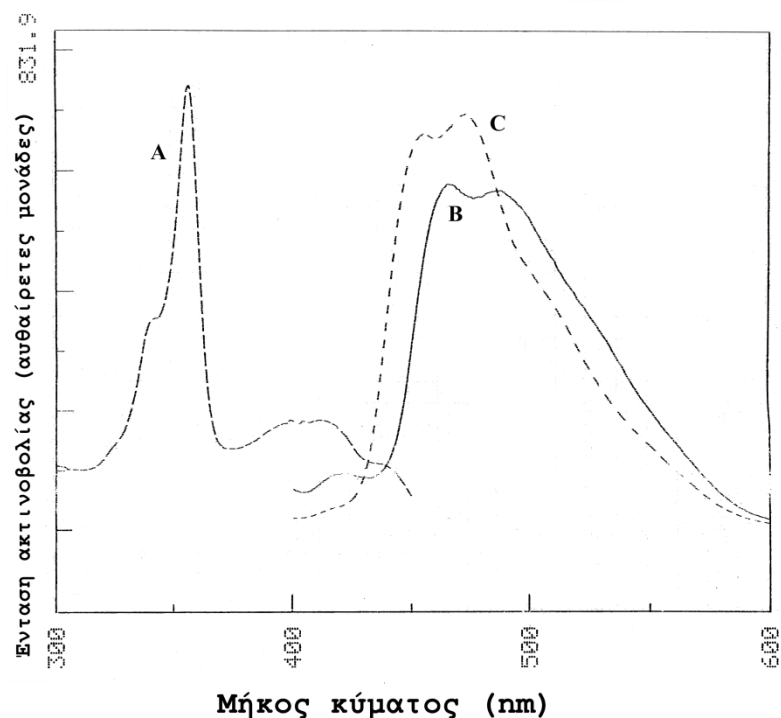
Πριν από τις μετρήσεις φθορισμού για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης καταγράφηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής των προϊόντων οξείδωσης της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακρυδίνης με υπεροξύλιο του καλίου και την ελεύθερη ρίζα του DPPH και προσδιορίστηκαν τα αντίστοιχα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αυτών. Επιλέχθηκαν τα μήκη κύματος στα οποία οι εντάσεις εκπομπής και διέγερσης εμφάνιζαν τις μέγιστες τιμές. Βρέθηκε ότι το φάσμα εκπομπής του προϊόντος οξείδωσης της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακρυδίνης με υπεροξύλιο του καλίου παρουσιάζει μέγιστες εντάσεις εκπομπής στα 416 και 436 nm και είναι ταυτόσημο με το φάσμα πρότυπου διαλύματος της *N*-μεθυλακρυδόνης (Εικόνα 8). Τα μήκη κύματος διέγερσης της *N*-μεθυλακρυδόνης είναι στα 380 και 399 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης όλων των αντιοξειδωτικών ενώσεων έναντι του υπεροξυλίου



επελέγησαν τα 380 και 436 nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, αντίστοιχα. Το φάσμα εκπομπής του προϊόντος οξείδωσης της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με την ρίζα του DPPH παρουσιάζει μέγιστες εντάσεις εκπομπής στα 456 και 487 nm με μήκος κύματος διέγερσης στα 353 ή 399 nm και είναι παραπλήσιο με το φάσμα πρότυπου διαλύματος του μεθοξυθειικού N-μεθυλακριδινικού άλατος (Εικόνα 9). Η μετατόπιση που παρατηρείται στα φάσματα φθορισμού των δύο προϊόντων οφείλεται πιθανώς στην παρουσία των διαφορετικών ανιόντων στο διάλυμα. Στην περίπτωση του προϊόντος οξείδωσης της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με την ρίζα του DPPH, το ανιόν του άλατος είναι το ανιόν του DPPH. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης όλων των αντιοξειδωτικών ενώσεων έναντι του υπεροξυλίου επελέγησαν τα 353 και 487 nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, αντίστοιχα.



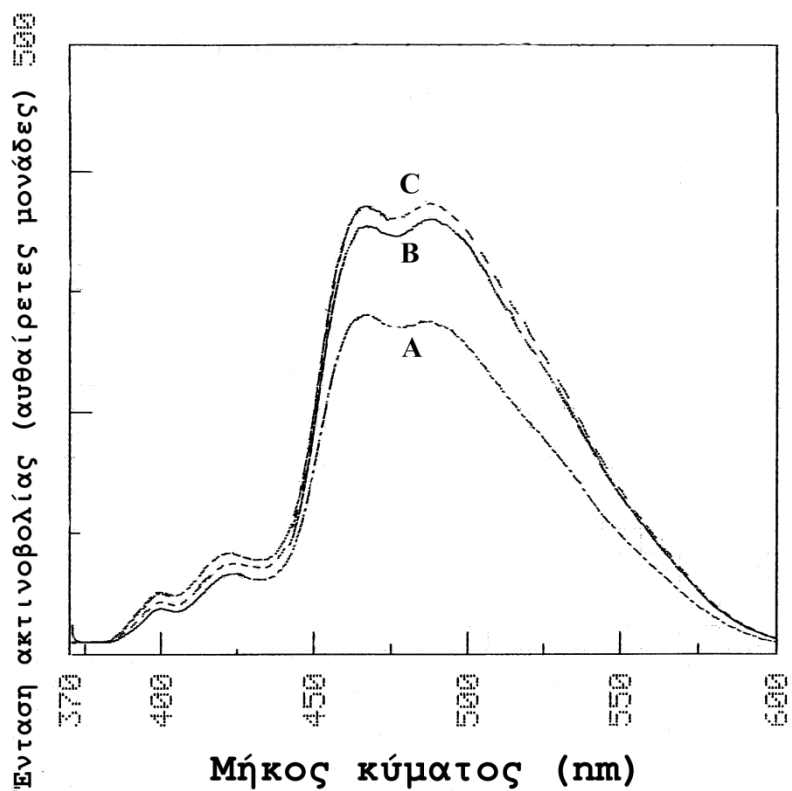
**Εικόνα 8:** Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του προϊόντος οξείδωσης της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με υπεροξύλιο του καλίου σε DMF. **A:** Φάσμα διέγερσης, **B:** Φάσμα εκπομπής, **C:** Φάσμα φθορισμού πρότυπου διαλύματος N-μεθυλακριδίνης σε DMF και KO<sub>2</sub>.



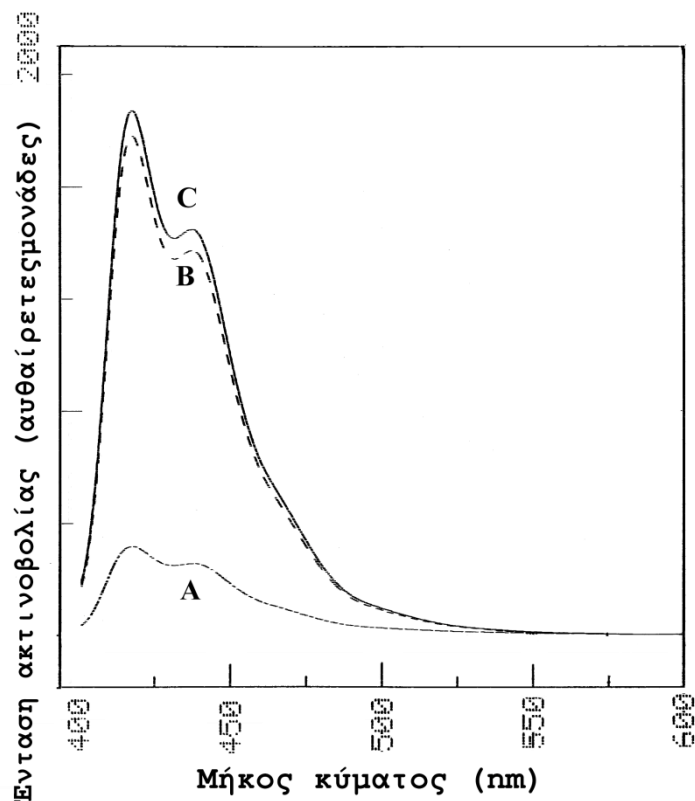
**Εικόνα 9:** Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του προϊόντος οξείδωσης της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με DPPH σε μεθανόλη. **A:** Φάσμα διέγερσης, **B:** Φάσμα εκπομπής του προϊόντος οξείδωσης της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης, **C:** Φάσμα εκπομπής αυθεντικού διαλύματος του μεθοξυθειϊκού *N*-μεθυλοακριδινικού άλατος

### (β) Εύρεση του βέλτιστου χρόνου οξείδωσης της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης

Μία άλλη σημαντική παράμετρος που έπρεπε να καθοριστεί ήταν ο χρόνος κατά τον οποίο ολοκληρώνεται η παραγωγή του προϊόντος οξείδωσης. Χρησιμοποιώντας τα μήκη κύματος που αναφέρθηκαν παραπάνω, καταγράφηκαν τα φάσματα φθορισμού του τυφλού διαλύματος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 10 και 11, η ένταση φθορισμού του προϊόντος οξείδωσης σταμάτησε να αυξάνεται μετά από 90 λεπτά για την αντίδραση της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με το DPPH, ενώ η αντίστοιχη αντίδραση με το υπεροξύλιο του καλίου ολοκληρώθηκε στα 120 λεπτά. Επομένως, στους παραπάνω χρόνους διεξήχθησαν όλες οι μετρήσεις φθορισμού που αφορούσαν την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πρότυπων ουσιών και των εκχυλισμάτων των τσαγιών και του καφέ.



**Εικόνα 10:** Φάσματα φθορισμού του προϊόντος οξείδωσης της αντίδρασης της *N*-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με *DPPH* σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης ήταν περίπου 90 λεπτά (φάσμα *C*). *A* και *B* φάσματα φθορισμού μετά από 50 και 70 min μετά την έναρξη της αντίδρασης, αντίστοιχα.



**Εικόνα 11:** Φάσματα φθορισμού του προϊόντος οξείδωσης της αντίδρασης της Ν-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με το υπεροξύλιο του καλίου ( $KO_2$ ) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης ήταν περίπου 120 λεπτά (φάσμα C). **A** και **B** φάσματα φθορισμού μετά από 50 και 100 min μετά την έναρξη της αντίδρασης, αντίστοιχα.

### (γ) Καθορισμός των βέλτιστων συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων

Έχοντας καθορίσει τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής και τον βέλτιστο χρόνο ολοκλήρωσης των αντιδράσεων οξείδωσης, το τελευταίο βήμα ήταν να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων. Ως βέλτιστες συγκεντρώσεις θεωρούνται οι συγκεντρώσεις εκείνες του υποστρώματος (N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνη) και των οξειδωτικών (DPPH ή  $KO_2$ ) με τις οποίες η μείωση φθορισμού του προϊόντος της συγκεκριμένης αντίδρασης παρουσιάζει τη μέγιστη μείωση φθορισμού παρουσία μίας σταθερής συγκέντρωσης αντιοξειδωτικού.

Από τις μετρήσεις φθορισμού προέκυψε ότι οι βέλτιστες συγκεντρώσεις εργασίας για την N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνη και το DPPH ήταν τα 100  $\mu M$ , ενώ για το υπεροξύλιο του καλίου το κορεσμένο διάλυμά του (8mg/ml). Στις συγκεντρώσεις αυτές, η μείωση φθορισμού του τυφλού διαλύματος των δύο αντιδράσεων είχε τη μεγαλύτερη τιμή (μείωση) για διάλυμα του αντιοξειδωτικού Trolox-C συγκέντρωσης 100  $\mu M$ .

## **5.8. Μετρήσεις εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την πρότυπη μέθοδο του DPPH**

Η μέθοδος του DPPH, αν και έχει τροποποιηθεί αρκετές φορές από διάφορους ερευνητές, είναι η πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος διεθνώς [67]. Οι μετρήσεις απορρόφησης καταγράφηκαν 30 λεπτά μετά την προσθήκη 1.0 mL διαλύματος DPPH συγκέντρωσης 100  $\mu$ M σε κυψελίδα η οποία περιείχε 1.0 mL διαλύματος αντιοξειδωτικού διαφορετικών συγκεντρώσεων και 1.0 mL μεθανόλης. Στην περίπτωση του τυφλού πειράματος, η κυψελίδα περιείχε 1.0 mL διαλύματος DPPH συγκέντρωσης 100  $\mu$ M και 2.0 mL μεθανόλης. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

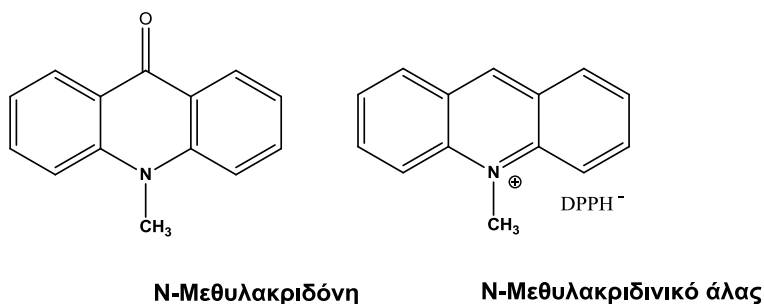
## **5.9 Μετρήσεις εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την πρότυπη μέθοδο του ABTS**

Η κατιοντική ρίζα του ABTS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε αρκετές μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας [68]. Έχει μέγιστη απορρόφηση στα 414 nm και μικρότερες απορροφήσεις στα 645, 734 και 815 nm. Η παρουσία ενός αντιοξειδωτικού στο δείγμα προκαλεί ανάσχεση του σχηματισμού της κατιοντικής ρίζας  $ABTS^{+\cdot}$ . Μετρώντας την έκταση και τα χρονικά χαρακτηριστικά της ανάσχεσης αυτής, προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται συνήθως φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 734 nm, όπου δεν υπάρχουν παρεμποδίσεις από άλλα συστατικά. Οι μετρήσεις απορρόφησης καταγράφηκαν 60 λεπτά μετά την προσθήκη 100  $\mu$ L διαλύματος του αντιοξειδωτικού Trolox διαφορετικών συγκεντρώσεων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ή 100  $\mu$ L εκχυλίσματος τσαγιού μετά την κατάλληλη αραίωση τους σε 2.0 ml διαλύματος  $ABTS^{+\cdot}$  απορρόφησης 0.7. Το διάλυμα παρακαταθήκης του  $ABTS^{+\cdot}$  παρασκευάστηκε προηγουμένως από το διαμμωνιακό άλας του 2,2-αζω-δισ(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικού οξέος) (7.4 mM) με υπερθειϊκό κάλιο (2.6 mM) σύμφωνα με γνωστή μέθοδο [80]. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 6. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στα πλαίσια της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας διερευνήθηκε η χρήση μιας νέας φθορισμομετρικής τεχνικής για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας γνωστών αντιοξειδωτικών ενώσεων και εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων, όπως τσαγιών και καφέ. Ως νέος φθορισμομετρικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε η N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνη η οποία με αντίδραση με ελεύθερες ρίζες αζώτου ή οξυγόνου οξειδώνεται και παράγει φθορίζοντα προϊόντα. Στην περίπτωση της αντίδρασης της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με υπεροξύλιο του καλίου ( $\text{KO}_2$ ) το προϊόν οξείδωσης ήταν η N-μεθυλο-ακριδόνη (Σχήμα 17), ενώ στην περίπτωση της αντίδρασης της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με τη ρίζα του DPPH το προϊόν οξείδωσης ήταν το N-μεθυλο-ακριδινικό άλας (Σχήμα 18), του οποίου το ανιόν πιθανώς είναι το ανιόν του DPPH (Σχήμα 19). Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των προϊόντων έγινε με τη βοήθεια φασμάτων φθορισμού και απορρόφησης. Τα φάσματα ήταν ταυτόσημα με τα φάσματα προτύπων διαλυμάτων της N-μεθυλοακριδόνης και του N-μεθυλο-ακριδινικού άλατος. Οι μοριακές δομές των δύο προϊόντων φαίνονται στο Σχήμα 19.



**Σχήμα 19:** Μοριακές δομές των προϊόντων οξείδωσης της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης με υπεροξύλιο του καλίου (N-μεθυλ-ακριδόνη) και τη ρίζα του DPPH (N-μεθυλο-ακριδινικό άλας).

Και στις δύο αντιδράσεις οξείδωσης της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης, οι εντάσεις φθορισμού των προϊόντων οξείδωσης ήταν μειωμένες παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων ή εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων. Η μείωση του φθορισμού ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών ενώσεων. Όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού, τόσο μεγαλύτερη ήταν και η μείωση του φθορισμού. Από την μείωση αυτή προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε ενός αντιοξειδωτικού. Συνολικά, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα επτά γνωστών αντιοξειδωτικών ενώσεων και έντεκα εκχυλισμάτων

τσαγιών και ενός εκχυλίσματος καφέ. Τα αποτελέσματα της νέας φθορισμομετρικής μεθόδου συγκρίθηκαν με αυτά δύο γνωστών φασματοσκοπικών μεθόδων, αυτής του DPPH και της ABTS. Ως ελεύθερες ρίζες αζώτου και οξυγόνου χρησιμοποιήθηκαν το N,N-διφαινυλο-N'-πικρυλο-υδραζίδιο (DPPH) και το υπεροξύλιο του καλίου (KO<sub>2</sub>), αντίστοιχα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα (A.I.) των πρότυπων αντιοξειδωτικών ενώσεων υπολογίστηκε από την εξίσωση :

$$A.I. \% = \left( \frac{I_0 - I}{I_0} \right) 100 \quad (6.1)$$

όπου I<sub>0</sub> και I οι εντάσεις φθορισμού του τυφλού διαλύματος και του διαλύματος που περιέχει την αντιοξειδωτική ουσία σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, αντίστοιχα. Ως δείκτης σύγκρισης επιλέχθηκε ο δείκτης IC<sub>50</sub> ο οποίος εκφράζει την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού η οποία μειώνει την ένταση του τυφλού δείγματος στο ήμισυ [69] καθώς και ο δείκτης TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ο οποίος εκφράζει το λόγο του IC<sub>50</sub> του Trolox προς το IC<sub>50</sub> της εκάστοτε ουσίας. Όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης αυτός τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του αντιοξειδωτικού.

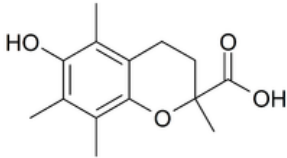
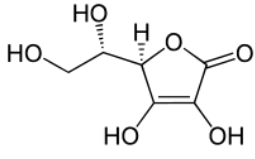
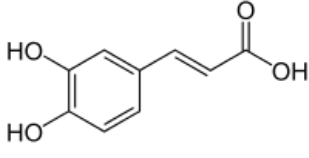
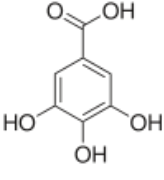
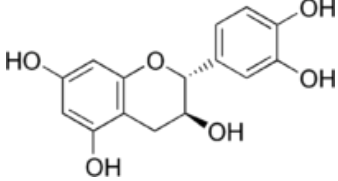
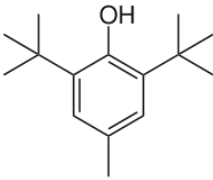
Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των τσαγιών και του καφέ χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης TEAC ο οποίος εκφράστηκε σε ισοδύναμα μΜ Trolox ανά γραμμάριο αποξηραμένου φυτικού υλικού, και υπολογίστηκε από τον τύπο [60]:

$$TEAC (\mu M TE/g) = \left[ 10^{\frac{A.I.-a}{b}} \right] D_f \quad (6.2)$$

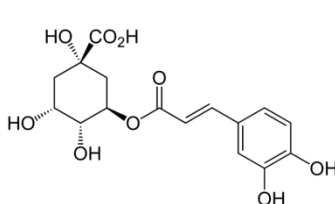
όπου D<sub>f</sub> συντελεστής αραίωσης των εκχυλισμάτων των φυσικών προϊόντων και A.I. η αντιοξειδωτική ικανότητα των διαλυμάτων η οποία υπολογίστηκε με τη βοήθεια της παραπάνω εξίσωσης στην αντίστοιχη αραίωση των διαλυμάτων και a και b οι παράμετροι της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του Trolox. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ουσιών υπολογίστηκε σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων και σε κάθε συγκέντρωση το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) των τιμών και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, %).

Οι μοριακές δομές και τα μοριακά βάρη (M.B.) όλων των αντιοξειδωτικών ενώσεων που μετρήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Ονομασίες και μοριακές δομές των πρότυπων αντιοξειδωτικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Διπλωματική Εργασία.

A/A	Ονομασία	Μοριακή δομή
1	6-Υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλο-χρωμανυλο-2-καρβοξυλικό οξύ	 <p>M.B.: 250,29</p>
2	Ασκορβικό οξύ	 <p>M.B.: 176,13</p>
3	Καφεϊκό οξύ	 <p>M.B.: 180,16</p>
4	Γαλλικό οξύ	 <p>M.B.: 188,14</p>
5	Κατεχίνη	 <p>M.B.: 290,28</p>
6	Δι-tert-βουτυλο-υδροξυ-τολουόλιο	 <p>M.B.: 220,35</p>



7	Χλωρογενικό οξύ	Chlorogenic acid	 <p>M.B.: 354,31</p>
---	-----------------	------------------	--

### 6.1. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας πρότυπων αντιοξειδωτικών ενώσεων.

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται σε πίνακες όλα τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των μετρήσεων που αφορούν στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης πρότυπων αντιοξειδωτικών έναντι των ριζών του DPPH (Πίνακες 4 και 5 και Εικόνα 12) καθώς και της ρίζας του υπεροξυλίου ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Πίνακες 6 και 7 και Εικόνα 13). Συγκεκριμένα, στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι γραμμικές περιοχές των πρότυπων καμπυλών μαζί με τις αντίστοιχες παραμέτρους, όπως κλίση των ευθειών, τομή της ευθείας με τον άξονα Y, συντελεστής συσχέτισης, όριο ανίχνευσης των αντιοξειδωτικών, καθώς και ο συντελεστής απόκλισης όλων των τιμών από την πρότυπη καμπύλη. Η τελευταία παράμετρος αφορά και την ακρίβεια της μεθόδου. Από τα δεδομένα των πινάκων υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των πρότυπων ουσιών και από αυτές οι δείκτες της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ουσιών αυτών. Όλες οι εξισώσεις των φθορισμομετρικών ενώσεων ήταν της μορφής:

$$Y = a + b \cdot \log C \quad (6.3)$$

Στις Εικόνες 12 και 13 παρουσιάζονται τα ιστογράμματα των συγκριτικών τιμών της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε τιμές TEAC που προέκυψαν από τις μετρήσεις φθορισμού της αντίδρασης του ακριδανίου με DPPH και  $KO_2$  που ελήφθησαν από τους Πίνακες 5 και 7 αντίστοιχα. Οι δείκτες της αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες εξισώσεις που αναγράφονται στους πίνακες, θέτοντας σε αυτές το Y ίσο με 50 για τον υπολογισμό του  $IC_{50}$  ή διαιρώντας το  $IC_{50}$  του Trolox με το  $IC_{50}$  της εκάστοτε ένωσης για την εύρεση της τιμής TEAC. Στον Πίνακα 5 αναγράφονται επίσης και οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας για τις συγκεκριμένες ενώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

**Πίνακας 4.** Αναλυτικά χαρακτηριστικά των εξισώσεων παλινδρόμησης των πρότυπων ουσιών που μελετήθηκαν με τη νέα φθορισμομετρική μέθοδο έναντι της ελεύθερης ρίζας του N,N-διφαινυλο-N-πικρυλο-υδραζιδίου (DPPH).

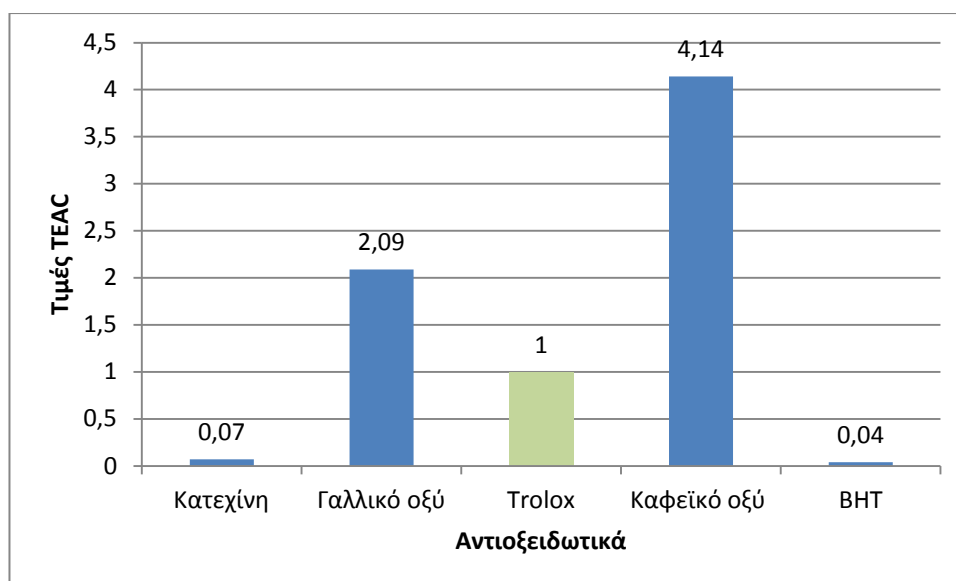
A/A	Αντιοξειδωτικές ενώσεις	Γραμμική περιοχή (M)	Σημείο τομής με τον άξονα y ( $\pm$ S.D.)	Κλίση της ευθείας ( $\pm$ S.D.)	Συντελεστής συσχέτισης (r)	Τυπική απόκλιση της ευθείας Sy/x, (N=4)	Όριο ανίχνευσης (M)
1	Κατεχίνη	$1.67 \cdot 10^{-5}$ - $3.33 \cdot 10^{-4}$	212.9 ( $\pm 6.5$ )	38.03 ( $\pm 1.6$ )	0.9983	1.64	$9.23 \cdot 10^{-6}$
2	Γαλλικό οξύ	$3.33 \cdot 10^{-7}$ - $3.33 \cdot 10^{-5}$	194.4 ( $\pm 5.7$ )	25.2 ( $\pm 0.95$ )	0.9978	1.52	$9.0 \cdot 10^{-8}$
3	Trolox	$1.67 \cdot 10^{-6}$ - $1.67 \cdot 10^{-5}$	421.2 ( $\pm 6.4$ )	68.5 ( $\pm 1.2$ )	0.9998	0.62	$1.44 \cdot 10^{-6}$
4	Καφεϊκό οξύ	$3.33 \cdot 10^{-7}$ - $1.67 \cdot 10^{-5}$	266.73 ( $\pm 0.05$ )	35.9 ( $\pm 0.01$ )	0.9999	0.005	$3.8 \cdot 10^{-8}$
5	BHT	$3.33 \cdot 10^{-5}$ - $1.66 \cdot 10^{-4}$	346.3 ( $\pm 15.5$ )	73.9 ( $\pm 3.9$ )	0.9986	2.85	$1.01 \cdot 10^{-4}$

Όλες οι παράμετροι υπολογίσθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος ORIGIN 7.5. Το όριο ανίχνευσης υπολογίσθηκε από την εκάστοτε εξίσωση της πρότυπης ένωσης θέτοντας Y ίσον με 3.3 φορές την τυπική απόκλιση της τομής της ευθείας με τον άξονα Y.

**Πίνακας 5.** Συγκεντρωτικές τιμές των δεικτών της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πρότυπων αντιοξειδωτικών ενώσεων που μετρήθηκαν με τη νέα φθορισμομετρική μέθοδο έναντι της ελεύθερης ρίζας του N,N-διφαινυλο-N-υδραζιδίου (DPPH).

A/A	Αντιοξειδωτικές ενώσεις	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> βιβλιογραφίας (μM)	TEAC <sup>2</sup>
1	Κατεχίνη	52.0 ( $\pm 0,0226$ )	20-120 [71,73]	0.07
2	Γαλλικό οξύ	1.82 ( $\pm 0,0207$ )	11-23 [71,75,76]	2.09
3	Trolox	3.81 ( $\pm 0,01006$ )	23-35 [72,74]	1.0
4	Καφεϊκό οξύ	0.92 ( $\pm 0,0001$ )	10-153 [71,73]	4.14
5	BHT	97.8 ( $\pm 0,0300$ )	4.2 [74]	0.04

<sup>1</sup>Ο δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας IC<sub>50</sub> υπολογίσθηκε από τις αντίστοιχες εξισώσεις των πρότυπων ενώσεων που αναφέρονται στον προηγούμενο πίνακα. <sup>2</sup>Οι τιμές TEAC υπολογίσθηκαν διαιρώντας το IC<sub>50</sub> του Trolox δια του IC<sub>50</sub> της αντίστοιχης αντιοξειδωτικής ένωσης.



**Εικόνα 12:** Ιστόγραμμα των συγκριτικών τιμών της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε τιμές TEAC που προέκυψαν από τις μετρήσεις φθορισμού της αντίδρασης του ακριδανίου με DPPH.

**Πίνακας 6.** Αναλυτικά χαρακτηριστικά των εξισώσεων παλινδρόμησης των πρότυπων ουσιών που μετρήθηκαν με τη νέα φθορισμομετρική μέθοδο έναντι της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ).

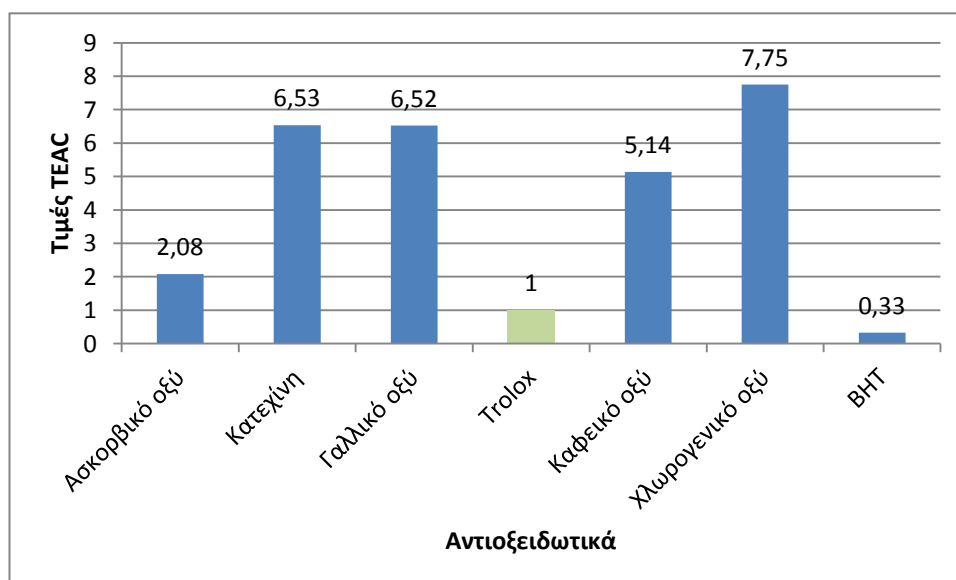
A/A	Αντιοξειδωτικές ενώσεις	Γραμμική περιοχή (M)	Σημείο τομής με τον άξονα y ( $\pm$ S.D.)	Κλίση της ευθείας ( $\pm$ S.D.)	Συντελεστής συσχέτισης (r)	Τυπική απόκλιση της ευθείας Sy/x, (N=4)	Όριο ανίχνευσης (M)
1	Ασκορβικό οξύ	$3.33 \cdot 10^{-6}$ - $3.33 \cdot 10^{-4}$	233.5 ( $\pm 4.4$ )	40.1 ( $\pm 0.95$ )	0.9994	1.37	$3.46 \cdot 10^{-6}$
2	Κατεχίνη	$1.67 \cdot 10^{-6}$ - $3.33 \cdot 10^{-5}$	365.3 ( $\pm 5.3$ )	62.0 ( $\pm 1.0$ )	0.9997	1.07	$2.42 \cdot 10^{-6}$
3	Γαλλικό οξύ	$1.67 \cdot 10^{-6}$ - $3.33 \cdot 10^{-5}$	334.7 ( $\pm 6.5$ )	62.0 ( $\pm 1.27$ )	0.9995	1.33	$2.65 \cdot 10^{-6}$
4	Trolox	$1.67 \cdot 10^{-5}$ - $3.33 \cdot 10^{-4}$	242.1 ( $\pm 7.1$ )	45.1 ( $\pm 1.7$ )	0.9986	1.78	$1.41 \cdot 10^{-5}$
5	Καφεϊκό οξύ	$3.33 \cdot 10^{-6}$ - $3.33 \cdot 10^{-5}$	473.9 ( $\pm 3.6$ )	85.3 ( $\pm 0.73$ )	0.9996	0.53	$3.73 \cdot 10^{-6}$
6	Χλωρογενικό οξύ	$3.33 \cdot 10^{-6}$ - $1.67 \cdot 10^{-5}$	613.7 ( $\pm 10.3$ )	109.5 ( $\pm 2.0$ )	0.9998	0.99	$5.10 \cdot 10^{-6}$
7	ΒΗΤ	$3.33 \cdot 10^{-5}$ - $3.33 \cdot 10^{-4}$	217.3 ( $\pm 6.7$ )	44.3 ( $\pm 1.7$ )	0.9993	1.23	$3.92 \cdot 10^{-5}$

Όλες οι παράμετροι υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος ORIGIN 7.5. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε από την εκάστοτε εξίσωση της πρότυπης ένωσης θέτοντας το Y ίσον με 3.3 φορές την τιμή της τυπικής απόκλισης της τομής της ευθείας με τον άξονα Y.

**Πίνακας 7.** Συγκενρωτικές τιμές δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας αντιοξειδωτικών ενώσεων που μετρήθηκαν με τη νέα φθορισμομετρική μέθοδο έναντι της ελεύθερης ρίζας του υπεροξυλίου ( $O_2^{\cdot-}$ ).

A/A	Αντιοξειδωτικές ενώσεις	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> βιβλιογραφίας (μM)	TEAC
1	Ασκορβικό οξύ	26.5	282, [76,77, 81]	2.08
2	Κατεχίνη	8.2	18-138 [71,73]	6.53
3	Γαλλικό οξύ	8.43	12-209 [71,75]	6.52
4	Trolox	55.03	27-160 [74,79]	1.0
5	Καφεϊκό οξύ	10.7	68.2 [78]	5.14
6	Χλωρογενικό οξύ	7.1	54.2 [78]	7.75
7	BHT	167.3	43.3 [74]	0.33

<sup>1</sup>Ο δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας IC<sub>50</sub> υπολογίστηκε από τις αντίστοιχες εξισώσεις των πρότυπων ενώσεων που αναφέρονται στον προηγούμενο πίνακα. <sup>2</sup> Οι τιμές TEAC υπολογίστηκαν διαιρώντας το IC<sub>50</sub> του Trolox δια του IC<sub>50</sub> της αντίστοιχης αντιοξειδωτικής ένωσης.



**Εικόνα 13:** Ιστόγραμμα των συγκριτικών τιμών της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε τιμές TEAC που προέκυψαν από μετρήσεις φθορισμού της αντίδρασης του ακριδανίου με υπεροξύλιο του καλίου ( $KO_2$ ).

Από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες προκύπτει ότι, η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών παραγώγων με δύο γειτονικές υδροξυλομάδες στον αρωματικό τους δακτύλιο (κατεχίνη, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ) είναι πολύ ισχυρότερη από αυτή των φαινολικών ενώσεων με μία μόνο υδροξυλομάδα (Trolox-C, BHT, BHA) (βλ. δομές στον Πίνακα 3). Η διαπίστωση αυτή συμβαδίζει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και εξηγείται με την καλύτερη σταθεροποίηση της παραγόμενης ελεύθερης ρίζας των φαινολικών παραγώγων από γειτονικές υδροξυλομάδες.

Η μέση επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση σε όλο το εύρος συγκεντρώσεων και στις δύο αντιδράσεις της N-μεθυλο-9,10-διϋδροακριδίνης ήταν μικρότερη από 4,93% και κρίνεται ικανοποιητική. Αντίστοιχα, για τα τυφλά διαλύματα αυτή ήταν περίπου 11% κάτι που σημαίνει σχετικά καλή επαναληψιμότητα όσο και αναπαραγωγισιμότητα. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονισθεί ότι οι αποκλίσεις ήταν μεγαλύτερες σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικού

## 6.2 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων τσαγιών και καφέ.

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται οι δείκτες που αφορούν στην αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων τσαγιών και καφέ έναντι της ελεύθερης ρίζας του DPPH (Πίνακας 8) και της ελεύθερης ρίζας του υπεροξυλίου ( $O_2^{\bullet -}$ ) (Πίνακας 9). Στην πρώτη στήλη των πινάκων 8 και 9 αναφέρονται τα είδη τσαγιών που χρησιμοποιήθηκαν και το όνομα της εταιρείας που τα διακινεί. Στις υπόλοιπες στήλες αναφέρονται οι τιμές που υπολογίσθηκαν για την εκτίμηση των προϊόντων αυτών και ο τρόπος υπολογισμού τους. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση [60]:

$$TEAC (\mu M TE/g) = \left[ 10^{\frac{Y-a}{b}} \right] D_f \quad (6.2)$$

όπου  $D_f$  ο συντελεστής συνολικής αραίωσης των εκχυλισμάτων,  $Y$  το ποσοστό μείωσης του φθορισμομετρικού σήματος στην αραίωση που αναφέρεται στην δεύτερη στήλη και  $a$  και  $b$  οι παράμετροι της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του Trolox, η οποία στις μετρήσεις με τη ρίζα του DPPH είναι:

$$Y(\%) = 421.2 + 68.5 \cdot \log C \quad (6.3)$$

ενώ για τις αντιδράσεις με υπεροξύλιο είναι:

$$Y(\%) = 242.1 + 45.1 \cdot \log C \quad (6.4)$$

**Πίνακας 8:** Συγκεντρωτικές τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων τσαγιών και καφέ έναντι της ελεύθερης ρίζας του N,N-διφαινυλο-N-πικρυλο-υδραζιδίου (DPPH). Ο δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράζεται σε  $\mu\text{M}$  ή σε  $\text{mg}$  ισοδύναμα Trolox ανά γραμμάριο φυτικού υλικού.

A/A	Εκχυλίσματα τσαγιών και καφέ <sup>1</sup>	Συντελεστής αραιώσης <sup>2</sup>	Ποσοστό μείωσης του σήματος (%)	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>3</sup> ( $\mu\text{M TE / g}$ )	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>4</sup> ( $\text{mg TE / g}$ )
1	Πράσινο τσάι Green Tea, (Lord Nelson)	60000	56.3 $\pm$ 1.15	0.294	73.6
2	Πράσινο τσάι Green tea Chinese Dragon (Madras)	60000	61.1 $\pm$ 1.8	0.332	83.1
3	Μαύρο τσάι Black tea (Lord Nelson)	60000	55.4 $\pm$ 1.46	0.286	71.6
4	Καφές φίλτρου Filter coffee (Jacobs)	60000	28.6 $\pm$ 1.72	0.114	28.5
5	Τσάι Λουίζα Verbena officinalis (Εύριπος)	30000	33.9 $\pm$ 0.39	0.068	17.1
6	Τσάι μέντα Peppermint (Εύριπος)	30000	34.5 $\pm$ 0.28	0.070	17.5
7	Τσάι Φασκόμηλο Sage (Εύριπος)	30000	46.6 $\pm$ 1.22	0.106	26.5
8	Τσάι βουνού Mountain Tea, (Fino)	30000	42.6 $\pm$ 0.4	0.089	22.3
9	Χαμομήλι Chamomille (Εύριπος)	30000	34.5 $\pm$ 0.5	0.07	17.01
10	Τσάι τίλιο Linden tea (Εύριπος)	30000	48.6 $\pm$ 1.1	0.109	27.3
11	Τσάι Valeriana officinalis, (Εύριπος)	15000	65.8 $\pm$ 2.95	0.102	25.6
12	Τσάι Κανελλογαράφαλλο Cinnamon-Clove tea, (Εύριπος)	15000	87.5 $\pm$ 1.1	0.215	53.8

<sup>1</sup>Σε παρένθεση αναφέρονται οι εταιρείες που διακινούν το προϊόν. <sup>2</sup>Η συνολική αραιώση των εκχυλισμάτων μέχρι το ποσοστό μείωσης να βρίσκεται στη γραμμική περιοχή της πρότυπης καμπύλης του Trolox. <sup>3</sup>Οι τιμές υπολογίσθηκαν από την εξίσωση  $\text{TEAC}(\mu\text{M TE/g}) = [10^{(Y-a)/b}] \cdot D_f$ , όπου  $D_f$  ο συντελεστής συνολικής αραιώσης των εκχυλισμάτων,  $Y$  το ποσοστό μείωσης του φθορισμομετρικού σήματος στην αραιώση που αναφέρεται στην δεύτερη στήλη και  $a$  και  $b$  οι παράμετροι της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του Trolox, η οποία στις μετρήσεις με τη ρίζα του DPPH είναι:  $Y(\%) = 421.2 + 68.5 \cdot \log C$ . <sup>4</sup>Οι τιμές υπολογίσθηκαν από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στην τέταρτη στήλη επί το μοριακό βάρος του Trolox σε χιλιοστόγραμμα (milligrams).

**Πίνακας 9:** Συγκριτικός πίνακας της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων τσαγιών και καφέ έναντι της ελεύθερης ρίζας του υπεροξυλίου ( $O_2^{\bullet-}$ ). Ο δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράζεται σε  $\mu\text{M}$  ή σε  $\text{mg}$  ισοδύναμα Trolox ανά γραμμάριο φυτικού υλικού.

A/A	Εκχυλίσματα τσαγιών και καφέ <sup>1</sup>	Συντελεστής αραίωσης <sup>2</sup>	Ποσοστό μείωσης του σήματος (%)	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>3</sup> ( $\mu\text{M TE / g}$ )	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>4</sup> ( $\text{mg TE / g}$ )
1	Πράσινο Τσάι Green Tea (Lord Nelson)	3000	72.7 ± 4.1	0.526	131.7
2	Μαύρο Τσάι Black tea (Lord Nelson)	3000	77.3 ± 5.9	0.665	166.5
3	Πράσινο Τσάι Green tea Chinese Dragon (Madras)	3000	82.2 ± 1.4	0.854	213.7
4	Καφές φίλτρου Filter coffee (Jacobs)	3000	79.5 ± 6.1	0.75	18.63
5	Τσάι Τίλιο ή Φλάμουρο Linden tea (Εύριπος)	3000	51.8 ± 2.5	0.18	45.3
6	Τσάι Φασκόμηλο Sage (Εύριπος)	3000	42.1 ± 4.6	0.11	27.6
7	Χαμομήλι Chamomile (Εύριπος)	3000	8.9 ± 0.2	0.02	5.1

<sup>1</sup>Σε παρένθεση αναφέρονται οι εταιρείες που διακινούν το προϊόν. <sup>2</sup>Η συνολική αραίωση των εκχυλισμάτων μέχρι το ποσοστό μείωσης να βρίσκεται στη γραμμική περιοχή της πρότυπης καμπύλης του Trolox. <sup>3</sup>Οι τιμές υπολογίστηκαν από την εξίσωση TEAC ( $\mu\text{M TE/g}$ ) =  $[10^{(Y-a/b)}] \cdot D_f$ , όπου  $D_f$  ο συντελεστής συνολικής αραίωσης των εκχυλισμάτων,  $Y$  το ποσοστό μείωσης του φθορισμομετρικού σήματος στην αραίωση που αναφέρεται στην δεύτερη στήλη και  $a$  και  $b$  οι παράμετροι της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του Trolox, η οποία στις μετρήσεις με τη ρίζα του υπεροξυλίου είναι:  $Y(\%) = 242.1(\pm 7.1) + 45.1(\pm 1.7) \cdot \log C$ . <sup>4</sup>Οι τιμές υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στην τέταρτη στήλη επί το μοριακό βάρος του Trolox σε χιλιοστόγραμμα (milligrams).

### 6.3 Φασματομετρικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας της πρότυπης ουσίας Trolox και εκχυλισμάτων τσαγιών με DPPH και ABTS.

Για τη μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πρότυπων ουσιών ή των εκχυλισμάτων των φυσικών προϊόντων με τη νέα μέθοδο φθορισμού, θα ήταν σημαντικό αυτή να συγκριθεί και με μία τουλάχιστον διεθνώς αναγνωρισμένη μέθοδο. Αν και ήταν γνωστό ότι μια άμεση σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των οργανικών ενώσεων με διαφορετικές τεχνικές είναι μία δύσκολη υπόθεση, λόγω του ότι χρησιμοποιούνται διαφορετικές δραστικές ενεργές ελεύθερες ρίζες οι οποίες αντιδρούν



διαφορετικά, παρ' όλα αυτά αποτολμήθηκε η σύγκριση. Ως συγκριτικές μέθοδοι επιλέχθηκαν οι μέθοδοι του DPPH και του ABTS, τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνά και από άλλες ερευνητικές ομάδες. Στις μεθόδους αυτές μετρήθηκε η απορρόφηση της ελεύθερης ρίζας του DPPH και της κατιοντικής ρίζας του ABTS<sup>•+</sup> στα 517 nm και 734 nm, αντίστοιχα, παρουσία και απουσία τριών εκχυλισμάτων τσαγιών. Από την μείωση της απορρόφησης των τυφλών δειγμάτων παρουσία αραιωμένων διαλυμάτων των εκχυλισμάτων τσαγιών, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών με τις δύο μεθόδους και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα με αυτά της νέας φθορισμομετρικής μεθόδου. Όλα τα αποτελέσματα αναγράφονται στον Πίνακα 10. Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες IC<sub>50</sub> και TEAC.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα τριών εκχυλισμάτων τσαγιών έναντι των προαναφερθέντων ριζών υπολογίστηκε σε δύο διαφορετικές αραιώσεις και με τη βοήθεια εξισώσεων που προέκυψαν από τις πρότυπες καμπύλες του Trolox κατά την αντίδραση αυτού με το DPPH και την κατιοντική ρίζα του ABTS<sup>•+</sup>. Οι εξισώσεις ήταν της μορφής  $y = a + b \cdot \log x$ , και για το DPPH ήταν:

$$Y = 667.2 + 119.93 \cdot \log C \quad (6.5)$$

και για την κανιοντική ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> ήταν:

$$Y = 230.1 + 39.6 \cdot \log C \quad (6.6)$$

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τριών τσαγιών με τις γνωστές μεθόδους μαζί με αυτά της νέας φθορισμομετρικής μεθόδου εκπεφρασμένα σε ισοδύναμα  $\mu\text{M}$  Trolox ή χιλιοστόγραμμα Trolox ανά γραμμάριο αποξηραμένου υλικού τσαγιού. Αναγράφεται επίσης η ποσοστιαία αντιοξειδωτική ικανότητα και η αντίστοιχη αραιώση των τσαγιών κατά τις οποίες έγιναν οι μετρήσεις.

**Πίνακας 10.** Συγκριτικά στοιχεία της αντιοξειδωτικής ικανότητας τριών εκχυλισμάτων τσαγιών με την νέα φθορισμομετρική μέθοδο και τις διεθνώς καθιερωμένες φασματοσκοπικές μεθόδους DPPH και ABTS<sup>2+</sup>.

Εκχυλίσματα τσαγιών	Ποσοστιαία μείωση απορρόφησης <sup>1</sup>	Συντελεστής αραίωσης	TEAC <sup>2</sup> (μM TE/g dry matter)	TEAC <sup>3</sup> (mg TE/g dry matter)
Πράσινο Τσάι Green tea Chinese Dragon (Madras)	61.1, (νέα μέθοδος) 39.7, DPPH 18.9, ABTS	60000 60000 63000	0.332 0.351 0.292	83.1 87.8 73.2
Τσάι βουνού Mountain tea (Fino)	42.6, (νέα μέθοδος) 7.1, DPPH 12.4, ABTS	60000 30000 12600	0.089 0.094 0.04	22.3 23.5 10.0
Τσάι Τίλιο Linden tea (Εύριπος)	48.6, (νέα μέθοδος) 16.1 DPPH 26.9 ABTS	30000 30000 12600	0.109 0.112 0.093	27.3 28.1 23.3

<sup>1</sup> Οι τιμές υπολογίστηκαν από την εξίσωση  $[(I-I_0)/I_0] \cdot 100$ . <sup>2</sup> Οι τιμές υπολογίστηκαν από την εξίσωση  $TEAC (\mu M TE/g) = [10^{(Y-a/b)} - 1] \cdot D_f$ , όπου  $D_f$  ο συντελεστής συνολικής αραίωσης των εκχυλισμάτων,  $Y$  το ποσοστό μείωσης των σημάτων στις αντίστοιχες αραίώσεις που αναγράφονται στην τρίτη στήλη και  $a$  και  $b$  οι παράμετροι των αντίστοιχων εξισώσεων για το Trolox. Για τη νέα φθορισμομετρική μέθοδο με DPPH η εξίσωση είναι:  $Y=421.2+68.5 \cdot \log C$  και το  $IC_{50}=3.81 \pm 0.22 \mu M$  ( $rsd=5.77\%$ ). Για τη φασματοσκοπική μέθοδο του DPPH η εξίσωση είναι  $Y=667.2+119.93 \cdot \log C$  και το  $IC_{50}=7.14 \pm 0.31 \mu M$  ( $rsd=4.34\%$ ). Τέλος, για τη φασματοσκοπική μέθοδο του ABTS η εξίσωση είναι  $Y=230.1+39.6 \cdot \log C$  και το  $IC_{50}=28.3 \pm 3.8 \mu M$  ( $rsd=13.4\%$ ). <sup>3</sup> Οι τιμές υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στην τέταρτη στήλη επί το μοριακό βάρος του Trolox σε χιλιοστόγραμμα (milligrams).

## 6.4 Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας αναπτύχθηκε μια νέα φθορισμομετρική τεχνική για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας γνωστών αντιοξειδωτικών ενώσεων και εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων, όπως τσαγιών και καφέ. Ως νέος φθορισμομετρικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε η N-μεθυλο-9,10-διϋδροακρινιδίνη η οποία σε αντίδραση με ελεύθερες ρίζες ή ενεργές μορφές οξυγόνου οξειδώνεται και παράγει φθορίζοντα προϊόντα, από τον φθορισμό των οποίων εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων.

Συνολικά, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα επτά γνωστών αντιοξειδωτικών ενώσεων και έντεκα εκχυλισμάτων τσαγιών και ενός εκχυλίσματος καφέ έναντι μίας ελεύθερης ρίζας αζώτου, όπως αυτή του DPPH και μίας ενεργής μορφής του οξυγόνου, όπως αυτή της ανιοντικής ρίζας του υπεροξυλίου ( $O_2^{\cdot-}$ ). Τα αποτελέσματα της νέας φθορισμομετρικής μεθόδου συγκρίθηκαν με δύο καθιερωμένες φασματοσκοπικές μεθόδους, όπως του DPPH και του ABTS.

Μία πρώτη σύγκριση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της πρότυπης αντιοξειδωτικής ουσίας Trolox που μετρήθηκε και με τις τρεις μεθόδους παράγει παραπλήσια αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική ικανότητα του Trolox ( $IC_{50}$ )

υπολογίστηκε στα  $3,81 \pm 0,22 \mu\text{M}$  με τη νέα φθορισμομετρική μέθοδο, ενώ αυτές που ευρέθησαν με τις δύο άλλες καθιερωμένες φασματοσκοπικές μεθόδους ήταν  $7,44 \pm 0,3 \mu\text{M}$  για το DPPH και  $28,3 \pm 3,8 \mu\text{M}$  για τη μέθοδο του ABTS. Όσον αφορά την τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών στη συγκεκριμένη συγκέντρωση του Trolox και με τις τρεις τεχνικές, αυτές ήταν 5.77% για τη νέα μέθοδο, 4.03% για το DPPH και 13.4% για τη μέθοδο ABTS. Αυτό δείχνει ότι η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της μεθόδου που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της Διπλωματικής Εργασίας είναι συγκρίσιμη με αυτή του DPPH και πολύ καλύτερη από αυτή της ABTS μεθόδου.

Συγκρίνοντας τις τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τριών συγκεκριμένων εκχυλισμάτων τσαγιών με βάση τον δείκτη TEAC διαπιστώνεται ότι η νέα μέθοδος παρέχει ανάλογα αποτελέσματα με αυτά των μεθόδων DPPH και ABTS και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σκοπό αυτό (Πίνακας 10). Συγκεκριμένα, η τιμή TEAC εκπεφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox ανά γραμμάριο αποξηραμένου φυτικού υλικού υπολογίστηκε στα  $0,332 \mu\text{M TE}$  με τη νέα φθορισμομετρική μέθοδο, ενώ αυτές που ευρέθησαν με τις δύο άλλες φασματοσκοπικές μεθόδους ήταν  $0,351 \mu\text{M TE}$  για το DPPH και  $0,292 \mu\text{M TE}$  για τη μέθοδο ABTS.

Παρ' όλες τις ομοιότητες ή διαφοροποιήσεις της νέας φθορισμομετρικής μεθόδου με τις καθιερωμένες φασματοφωτομετρικές μεθόδους του DPPH και ABTS, η νέα μέθοδος παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες δύο. (α) Η γραμμική περιοχή στα διαγράμματα αντιοξειδωτικής δράσης - συγκέντρωσης αντιοξειδωτικού είναι αρκετά ευρεία και μπορεί να αξιοποιηθεί για περισσότερες ενδιάμεσες μετρήσεις. (β) Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι αρκετά ικανοποιητικές και παραπλήσιες με αυτές της διεθνώς καθιερωμένης φασματοφωτομετρικής μεθόδου του DPPH. (γ) Η μέθοδος παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία με όριο ανίχνευσης σε κάποια αντιοξειδωτικά μέχρι και μερικά nM (γαλλικό οξύ 90 nM, καφεϊκό οξύ 38 nM).

Συμπερασματικά, προκύπτει ότι η ακρίβεια και τα συγκρίσιμα αποτελέσματα με τις διεθνώς καθιερωμένες μεθόδους του DPPH και του ABTS καθιστούν τη μέθοδο ως μία εναλλακτική και φθηνή λύση για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πρότυπων αντιοξειδωτικών ενώσεων καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονισθεί ότι τα αποτελέσματα της νέας μεθόδου είναι προκαταρκτικά και βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης θα μπορούσε να οδηγήσει ενδεχομένως σε αποτελέσματα υψηλότερης αξιοπιστίας και ακρίβειας.

## 6.5 Προοπτικές

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής έδειξαν ότι η νέα φθορισμομετρική μέθοδος αποτελεί μία φθηνή και γρήγορη μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών με σχετικά αξιοσημείωτη ακρίβεια. Με δεδομένο ότι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε πολλά φυσικά προϊόντα αλλά και σε διατροφικά σκευάσματα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας θα μπορούσε να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω και να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των τροφίμων και των συμπληρωμάτων διατροφής που κατακλύζουν την αγορά.

## Δ. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABAP:	2,2'-azobis (2-aminopropane) Dihydrochloride, 2,2-αζω-δισ-(αμινοπροπάνιο)
ABTS:	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid, 2,2-αζω-δισ(3-αιθυλοβενζοθειοαζολίνη-6-σουλφονικού οξέος)
AE:	Antiradical Efficiency, ικανότητα δέσμευσης των ριζών
AnV:	Anisidine Value, αριθμός ανισιδίνης
ARP:	Antiradical Power, ισχύς δέσμευσης ριζών
BHT:	Butylated hydroxytoluene, βουτυλιωμένο υδροξυτολουένιο
CUPRAC:	Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity, αντιοξειδωτική ικανότητα αναγωγής ιόντος χαλκού
D <sub>f</sub> :	Dilution Factor, συντελεστής αραίωσης
DMF:	Dimethylformamide, N,N-διμεθυλο-φορμαμίδιο
DMPD:	N,N-dimethyl-p-phenylenediamine, N,N-διμεθυλο-p-φαινυλοδιαμίνη
DMSO:	Dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA:	Deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPPH:	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-διφαινυλο-1'-πικρυλυδραζίδιο
EC <sub>50</sub> :	Half maximal effective concentration, η συγκέντρωση ενός αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση μιας ρίζας στο ήμισυ
Em SBW:	Emission Spectral Bandwidth, πλάτος σχισμής φίλτρου φθορισμού
Ex SBW:	Excitation Spectral Bandwidth, πλάτος σχισμής φίλτρου διέγερσης
FRAP:	Ferric Reducing Antioxidant Power, αντιοξειδωτική ισχύς αναγωγής σιδήρου
GPx:	Glutathione peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
HE:	Hydroethidine, υδροεθιδίνη
HORAC:	Hydroxyl radical averting capacity, ικανότητα αποτροπής ριζών υδροξειδίου
IC:	Internal Conversion, Εσωτερική Μετατροπή
IC <sub>50</sub> :	Half maximum inhibitory concentration, η συγκέντρωση αντιοξειδωτικού η οποία μειώνει την ένταση του τυφλού δείγματος στο ήμισυ
ISC:	Intersystem Crossing, διασυστηματική διασταύρωση
LDL:	Low density lipoprotein, λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
LSD:	Lysergic acid diethylamide, διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος
NADH:	Nicotinamide adenine dinucleotide, νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο
NMR:	Nuclear magnetic resonance, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
ORAC:	Oxygen Radical Absorbance Capacity, ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου
PMT Gain:	Photomultiplier Tube Gain, ευαισθησία φωτοπολλαπλασιαστή
PV:	Peroxide Value, αριθμός υπεροξειδίων
ROS:	Reactive Oxygen Species, ενεργές μορφές οξυγόνου
RSD:	Relative Standard Deviation, σχετική τυπική απόκλιση
SD:	Standard Deviation, τυπική απόκλιση
SOD:	Superoxide dismutase, δισμουτάση του υπεροξυλίου
TAC:	Total Antioxidant Capacity, συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TBARS:	Thiobarbituric acid reactive substances, δραστικές ενώσεις θειοβαρβιτουρικού οξέος
TCBQ:	Tetrachloro-1,4-benzoquinone, τετραχλωρο-1,4-βενζοκινόνη
TE:	Trolox Equivalent, ισοδύναμα Trolox
TEAC:	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα Trolox

TJ-960:	Sho-saikoto-go-keishi-ka-shakuyaku-to, μίγμα αποξηραμένων βοτάνων
TOSC:	Total Oxyradical Scavenging Capacity, συνολική ικανότητα δέσμευσης οξυγονούχων ριζών
Trolox-C:	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, 6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλο-χρωμανυλο-2-καρβοξυλικό οξύ
UNICEF:	United Nations Children's Fund, Ταμείο Παιδιών του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών
vr:	Vibrational relaxation, δονητική χαλάρωση
W.H.O.	World Health Organization, Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
A.I.:	Αντιοξειδωτική Ικανότητα
MB:	Μοριακό Βάρος
N-MΔΑ:	N-μεθυλο-9,10-διυδροακριδίνη

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Θ.Π. Χατζηϊωάννου, Εργαστηριακά Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας, Αθήνα 1980, σ. 545-557.
2. B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, WILEY-VCH, Weinheim 2001, σ. 3-11, 37-41
3. Δ. Δημοτίκαλη, Βασικές Αρχές Φωτοχημείας, Εκδόσεις Ε.Μ. Πολυτεχνείου, Αθήνα 2011, σ. 17, 70
4. <http://www.turnerbiosystems.com>, An Introduction to Fluorescence Measurements, τελευταία επίσκεψη 24/7/2014
5. Θ.Π. Χατζηϊωάννου, Ποιοτική Ανάλυση και Χημική Ισορροπία, Αθήνα 1972, σ. 120, 567.
6. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition, Springer Science+Business Media, New York 2006, σ. 39-42, σ. 257-261.
7. H. Kautsky, Quenching of Luminescence by Oxygen, *Trans. Faraday Soc.* 35 (1939) 216-219
8. W.H Melhuish, Calibration of Spectrofluorometers for Measuring Corrected Emission Spectra, *J. Opt. Soc. Amer.* 52 (1962) 1256-1258
9. P.P. Fu, Q. Xia, H.-M. Hwang, P.C. Ray and H. Yu, Mechanisms of Nanotoxicity: Generation of Reactive Oxygen Species, *J. Food Drug Anal.* 22 (2014) 64-75
10. L.M. Davis, P.E. Williams, D.A. Ball, K.M. Swift and E.D. Matayoshi, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Bentham Science Publishers Ltd, 2003, σ. 451-462.
11. W. Rettig, B. Strehmel, S. Schrader and H. Seifert, *Applied Fluorescence in Chemistry, Biotechnology and Medicine*, Springer, Berlin 1998.
12. G.M. Strasburg and R.D. Ludescher, *Trends in Food Science and Technology*, Elsevier, 1995, σ. 69-82.
13. S.A. Green, *Applications of Fluorescence Spectroscopy to Environmental Chemistry*, Massachusetts Institute of Technology, 1992, σελ. 13-16, 157-186.
14. A. Mayevsky and G.G. Rogatsky, Mitochondrial Function In Vivo Evaluated by NADH Fluorescence: From Animal Models to Human Studies, *Am. J. Physiol.-Cell Ph.* 292 (2007) C615-C640

15. B. Bekdeşer, M. Özyürek Apak, K. Güçlü and R. Apak, Tert-Butylhydroquinone as a Spectroscopic Probe for the Superoxide Radical Scavenging Activity Assay of Biological Samples, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5652-5660
16. A. Gomes, E. Fernandes and J.L.F.C. Lima, Fluorescence Probes Used for Detection of Reactive Oxygen Species, *J. Biochem. Biophys. Methods* 65 (2005) 45–80
17. R.M. Strongin and M. Sibrian-Vazquez, Developing Fluorogenic Reagents for Detecting and Enhancing Bloody Fingerprints, BiblioGov, 2012
18. C.K. Sen, L. Packer and O.O.P. Hänninen, Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise, Elsevier Science B.V., Amsterdam 2000, σ. 6
19. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 1-85
20. D.S. Vikram, B.K. Rivera and P. Kuppusamy, In Vivo Imaging of Free Radicals and Oxygen, *Free Radicals and Antioxidant Protocols, Methods. Mol. Biol.* 610 (2010) 3-27
21. L. Zuo and M.S. Motherwell, The Impact of Reactive Oxygen Species and Genetic Mitochondrial Mutations in Parkinson's Disease, *Gene* 532 (2013) 18–23
22. M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur, Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40
23. M.T. Smith, Role of Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation in Chemically Induced Toxicity and Carcinogenesis, *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology, and Medicine*, ed. by A. Quintanilha, Plenum Press, New York 1988, σ. 157
24. E. Niki, Do Antioxidants Impair Signaling by Reactive Oxygen Species and Lipid Oxidation Products?, *FEBS Lett.* 586 (2012) 3767–3770
25. V.K. Koltover, Free Radical Theory of Aging: View Against the Reliability Theory, *Free Radicals and Aging*, ed. by I. Emerit; B. Chance, Birkhäuser Verlag, Basel 1992, σ. 11-22
26. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, Biologically Relevant Metal Ion-Dependant Hydroxyl Radical Generation, *FEBS Lett.* 307 (1992) 108-112
27. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease, *Biochem. J.* 219 (1984) 1-14
28. B. Uy, S.R. McGlashan and S.B. Shaikh, Measurement of Reactive Oxygen Species in the Culture Media using Acridan Lumigen PS-3 Assay, *J Biomol Tech* 22 (2011) 95–107



29. S. Chen and P. Schopfer, Hydroxyl-radical Production in Physiological Reactions, *Eur. J. Biochem.* 260 (1999) 726-735
30. X. Li, G. Zhang, H. Ma, D. Zhang, J. Li and D. Zhu, 4,5-Dimethylthio-4'-[2-(9-anthryloxy)ethylthio]tetrathiafulvalene, a Highly Selective and Sensitive Chemiluminescence Probe for Singlet Oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 11543-11548
31. A. Miyamoto, K. Nakamura, Y. Ohba, N. Kishikawa, K. Nakashima and N. Kuroda, Sequential Injection Analysis with Chemiluminescence Detection for the Antioxidative Activity against Singlet Oxygen, *Anal. Sci.* 22 (2006) 73-76
32. S. Baskin and H. Salem, Oxidants, Antioxidants and Free Radicals, CRC Press, 1997, σ. 6-34
33. R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K.M. Schaich, M. Özyürek and K. Güçlü, Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 85, No. 5 (2013) 957-998
34. L. Packer, M.G. Traber and W. Xin, Proceedings of the International Symposium on Natural Antioxidants: Molecular Mechanisms and Health Effects, AOCS Press, 1996, σ. 1-4, 11, 22, 45, 60, 96, 202, 223
35. E.N. Frankel, Antioxidants in Food and Biology: Facts and Fiction, Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2007, σ. 9, 13, 146, 190, 220
36. <http://en.wikipedia.org/wiki/Retinol>, τελευταία επίσκεψη 24/7/2014
37. A. Rietveld and S. Wiseman, Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials, Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet, *J. Nutr.* (2003), 3285S-3292S
38. E. Skotti, E. Anastasaki, G. Kanellou, M. Polissiou and P.A. Tarantilis, Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and Toxicity of Aqueous Extracts from selected Greek Medicinal and Aromatic Plants, *Ind. Crop Prod.* 53 (2014) 46- 54
39. A.C. Kaliora, D.A.A. Kogiannou, P. Kefalas, I.S. Papassideri and N. Kalogeropoulos, Phenolic Profiles and Antioxidant and Anticarcinogenic Activities of Greek Herbal Infusions; Balancing Delight and Chemoprevention?, *Food Chem.* 142 (2014) 233-241
40. C. Proestos, I.S. Boziaris, G.-J.E. Nychas and M. Komaitis, Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in Greek Aromatic Plants: Investigation of their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity, *Food Chem.* 95 (2006) 664-671

41. M. Couladis, O. Tzakou, E. Verykokidou and C. Harvala, Screening of Some Greek Aromatic Plants for Antioxidant Activity, *Phytother. Res.* 17 (2003) 194–195
42. A.M. Pisoschi and G.P. Negulescu, Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review, *Biochem. & Anal. Biochem.* 1 (2011) 1-10
43. C.-F. Tsai, Y.-W. Hsu, H.-C. Ting, C.-F. Huang and C.-C. Yen, The In Vivo Antioxidant and Antifibrotic Properties of Green Tea (*Camellia Sinensis*, Theaceae), *Food Chem.* 136 (2013) 1337–1344
44. C. Sánchez-Moreno, J.A. Larrauri and F. Saura-Calixto, A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency, *J. Sci. Food Agric.* 76 (1998) 270-276
45. V. Fogliano, V. Verde, G. Randazzo, and A. Ritieni, Method for Measuring Antioxidant Activity and its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines, *J. Agric. Food Chem* 47 (1999) 1035-1040
46. Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the Characteristics of Olive Oil and Olive-Residue Oil and on the Relevant Methods of Analysis, no. 2568/91, *J. Eur. Commun.*, no. L 248, 1991
47. T.G. Curtis, and W.R. Seitz, Chemiluminescence: a New Method for Detecting Fluorescent Compounds Separated by Thin-layer Chromatography, *J. Chromatogr.* 134 (1977) 343-350.
48. P.G. Nourou, C.A. Georgiou, and M. Polissiou, Direct Parallel Flow Injection Multichannel Spectrophotometric Determination of Olive Oil Peroxide Value, *Anal. Chim. Acta* 389 (1999) 239-245
49. V. Stepanyan, A. Arnous, C. Petrakis, P. Kefalas, and A. Calokerinos, Chemiluminescent Evaluation of Peroxide Value in Olive Oil, *Talanta* 65 (2005) 1056-1058.
50. E.P. Labrinea, N. S. Thomaidis, and C. A. Georgiou, Direct Olive Oil Anisidine Value Determination by Flow Injection, *Anal. Chim. Acta* 448 (2001) 201-206
51. J. Fernandez, J.A. Perez-Alvarez, and J.A. Fernandez-Lopez, Thiobarbituric Acid Test for Monitoring Lipid Oxidation in Meat, *Food Chem.* 59 (1997) 345-353
52. Y.F. Chu, J. Sun, X. Wu, and R.H. Liu, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6910-6916.
53. A. Moure, D. Franco, J. Sineiro, H. Dominguez, M.J. Nunez and JM Lema. Evaluation of Extracts from *Gevuina Avellana* Hulls as Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3890–3897.

54. I.I. Koleva, T.A. van Beek, J.P.H. Linssen, A. de Groot and L.N. Evstatieva, Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods, *Phytochem. Anal.* 13 (2001) 8–17.
55. B. Ou, M. Hampsch-Woodill and R.L. Prior, Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4619-4626
56. K.I. Berker, K. Güçlü, I. Tor, R. Apak, Comparative Evaluation of Fe(III) Reducing Power-based Antioxidant Capacity Assays in the Presence of Phenanthroline, Batho-phenanthroline, Tripyridyltriazine (FRAP), and Ferricyanide Reagents, *Talanta* 72 (2007) 1157–1165
57. I.F.F. Benzie and J.J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76
58. A. Szydłowska-Czerniak, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, E. Szlyk, Determination of Antioxidant Capacities of Vegetable Oils by Ferric-ion Spectrophotometric Methods, *Talanta* 76, (2008) 899–905
59. K. I. Berker, B. Demirata and R. Apak, Determination of Total Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants In the Same Solution by Using Ferric–Ferricyanide Assay, *Food Anal. Methods* 5 (2012) 1150-1158
60. R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata, M. Özyürek, S. E. Çelik, B. Bektaşoğlu, K. I. Berker and D. Özyurt, Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, *Molecules* 12 (2007) 1497-1547.
61. M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak, The Main and Modified CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement, *TrAC Trends, Anal. Chem.* 30 (2011) 652-664.
62. M. Özyürek, K. Güçlü, E. Tütem, K. S. Başkan, E. Erçağ, S. E. Çelik, S. Baki, L. Yıldız, Ş. Karaman and R. Apak, A Comprehensive Review of CUPRAC Methodology, *Anal. Methods* 3 (2011) 2439-2453
63. D. Huang, B. Ou and R.L. Prior, The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1841-1856
64. R.L. Prior, X. Wu and K. Schaich, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4290-4302

65. Instructions Manual for Model FP-777, Jasco Inc, Japan Spectroscopic Co., Ltd, 2967-5, Ishigawa-Cho, Hachioji City, Tokyo, Japan, 1990.
66. S. Fukuzumi, Y. Tokuda, T. Kitano, T. Okamoto and J. Otera, Electron-Transfer Oxidation of 9-Substituted 10-Methyl-9,10-dihydroacridines. Cleavage of the C-H vs C-C Bond of the Radical Cations, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 8960-8968
67. Aruna Prakash, Antioxidant Activity, [http://tpclabs.com/Downloads/Antiox\\_acti\\_.pdf](http://tpclabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf), Medallion Laboratories, 2001, τελευταία επίσκεψη 24/7/2014
68. M.B. Arnao, A. Cano, M. Acosta, The Hydrophilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity, *Food Chem.* 73 (2003) 239-244
69. <http://www.ecotoxique.com/glossary.html>, τελευταία επίσκεψη 24/7/2014
70. Y.-T. Tung, J.-H. Wu, C.-Y. Hsieh, P.-S. Chen and S.-T. Chang, Free radical-Scavenging Phytochemicals of Hot Water Extracts of Acacia Confusa Leaves Detected by an On-line Screening Method, *Food Chem.* 115 (2009) 1019–1024
71. V.G. Hartwig, L.A. Brumovsky, R.M. Fretes and L.S. Boado, A Novel Procedure to Measure the Antioxidant Capacity of Yerba Maté Extracts, *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* 32 (2012) 126-133
72. C.-Y. Hsu, Antioxidant Activity of Extract from Polygonum Aviculare L., *Biol Res* 39 (2006) 281-288
73. X. Li and C. Chen, Systematic Evaluation on Antioxidant of Magnolol in vitro, *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry* 2 (2012) 68-76
74. A. Vinayagam and P.N. Sudha, Free Radical Scavenging Activity of Leucas indica Flowers and Leaves, *Asian J. Chem.* 25 (2013) 3349-3352
75. I.M.C. Brighente, M. Dias, L.G. Verdi and M.G. Pizzolatti, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species, *Pharm. Biol.* 45 (2007) 156-161
76. A. Haripyaee, K. Guneshwor and M. Damayanti, *Not Sci Biol* 2 (2010) 68-71
77. J. Cheel, C. Theoduloz, J. Rodríguez and G. Schmeda-Hirschmann, Free Radical Scavengers and Antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), *J. Agric. Food. Chem.* 53 (2005) 2511-2517.
78. H.-J. Ko, A. Song, M.-N. Lai and L.-T. Ng., Antioxidant and Antiradical Activities of Wu Ling Shen in a Cell Free System, *Am. J. Chin. Med.* 37 (2009) 815–828
79. M. Packia Lincy, V.R. Mohan, S. Jeeva, In Vitro Evaluation of Antioxidant Activity of Aerial Part of Maerua Apetala. Roth (jacobs) (capparaceae), *Asian J Pharm Clin Res* 7 (2014) 77-81

80. Son S, Lewis BA. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship, *J Agric Food Chem* 50 (2002) 468–472