



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ
ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα και μελέτη καταλληλότητάς τους για χρήση σε καλλυντικά προϊόντα.

Συνεργασία με την εταιρία «ΚΟΡΡΕΣ Α.Ε.»
και το οριζόντιο αναλυτικό εργαστήριο της Σχολής
Υπεύθυνη: Λυμπεροπούλου Θεοπίστη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΧΑΤΖΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΚΕΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία, διεξήχθη κατά το 10^ο εξάμηνο, της Σχολής Χημικών Μηχανικών τη χρονική περίοδο Φεβρουαρίου-Σεπτεμβρίου 2016 και πραγματοποιήθηκε κατόπιν συνεργασίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών με την εταιρία Κορρές Α.Ε., φυσικά προϊόντα.

Το μεγαλύτερο μέρος της πειραματικής μελέτης πραγματοποιήθηκε, στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και στο Οριζόντιο εργαστήριο αναλύσεων. Το τμήμα της διπλωματικής, το οποίο αφορούσε την παρασκευή κρέμας, πραγματοποιήθηκε, για χρονική διάρκεια ενός μήνα, στο αναλυτικό εργαστήριο, των εγκαταστάσεων της εταιρίας Κορρές, στα Οινόφυτα.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους παράγοντες που συνέβαλαν στην περάτωση της συγκεκριμένης εργασίας:

Τον καθηγητή Ε.Μ.Π, Κέκο Δημήτρη, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, με την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Από την εταιρία Κορρές, τον κ. Πανταζή Θεόδωρο, ο οποίος συνετέλεσε στην επίτευξη συνεργασίας με την εταιρία, και την κ. Σταματογιάννη Χρυσούλα, η οποία ήταν υπεύθυνη της παρασκευής κρέμας και τον αναλύσεων των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών σταθερότητας. Επίσης, όλους τους εργαζόμενους του αναλυτικού εργαστηρίου, των εγκαταστάσεων του εργοστασίου στα Οινόφυτα, και ιδιαίτερα την κ. Μιχοπούλου Αναστασία, για την αμέριστη βοήθεια τους και το ευχάριστο περιβάλλον που εξασφάλισαν.

Την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου, θα ήθελα να την εκφράσω στην κ. Λυπεροπούλου Θεοπίστη, υπεύθυνη του οριζόντιου εργαστηρίου, για την ουσιαστική ηθική και πνευματική υποστήριξη που ανιδιοτελώς προσέφερε κατά την διάρκεια της περάτωσης της συγκεκριμένης εργασίας, δημιουργώντας ένα ιδανικό περιβάλλον συνεργασίας. Με την καθοδήγησή της, σε όλους τους τομείς, αποτέλεσε βασικό θεμέλιο ώστε να ολοκληρωθεί η διπλωματική και να έχει την τελική αυτή μορφή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές, διδάκτορες και υποψήφιους διδάκτορες της Σχολής Χημικών Μηχανικών για την βοήθεια τους σε διάφορα στάδια της διπλωματικής εργασίας.

Περίληψη

Πολλές ασθένειες, στη σημερινή εποχή, οφείλονται στο οξειδωτικό στρες. Οι οξειδωτικές ρίζες, αποτελούν κύριο παράγοντα για διάφορες αδυναμίες του ανθρώπινου οργανισμού και προκαλούν πρόωρη γήρανση. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις, στις οποίες ανήκουν οι πολυφαινόλες, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, αναστέλλουν την δράση των ελεύθερων ριζών καθώς και των οξειδωτικών μηχανισμών τους. Από τα πρώτα στάδια του ανθρώπινου πολιτισμού, τα φυτικά εκχυλίσματα, είναι γνωστά για την αντιοξειδωτική τους δράση και τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Το έντονο σημερινό ενδιαφέρον, οφείλεται στη δυνατότητα χρήσης των πολυφαινολικών συστατικών σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα. Η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων, αποδίδεται στις φαινολικές τους ενώσεις.

Σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η αξιολόγηση των φαινολικών ενώσεων, διαφορετικών εκχυλισμάτων, καθώς και η πιθανή χρήση τους, σε καλλυντικά προϊόντα. Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ήταν, το εκχύλισμα μαύρης πεύκης, της πρόπολης, της εχινάκεια και της άρνικας.

Η συνολική περιεκτικότητα φαινολικών προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με την διαδικασία Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος εφαρμόστηκε με χρήση διαφορετικών διαλυτών (αιθανόλη, μεθανόλη και νερό). Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις υπολογίστηκε ως ισοδύναμο γαλλικού οξέος (GAE) και καφεϊκού οξέος (GAE) για όλα τα εκχυλίσματα και τους διαφορετικούς διαλύτες. Από τα, προς μελέτη εκχυλίσματα, υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις (GAE > 500mg/g) είχε το εκχύλισμα της πρόπολης, αλλά και το εκχύλισμα μαύρης πεύκης (GAE > 200 mg/g).

Το σύνολο των ολικών φλαβονοειδών, προσδιορίστηκε με την χρήση χρωματομετρικής μεθόδου χλωριούχου αργιλίου και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα κερκετίνης. Μεταξύ των εκχυλισμάτων, την

υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή, παρουσίασε το εκχύλισμα της μαύρης πεύκης (QE = 35,5 mg/g).

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με τη χρήση της μεθόδου, του αντιδραστηρίου, DPPH (ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλ υδραζίλιο), τόσο στα εκχυλίσματα όσο και σε μια ποικιλία πρότυπων ενώσεων. Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, μετά από όλες τις σειρές μετρήσεων, παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα της πρόπολης και της μαύρης πεύκης, όπως επίσης και στα διαλύματα γαλλικού οξέος και της κατεχίνης. Αντίθετα, η χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση αποδίδεται στο εκχύλισμα της άρνικας.

Η διπλωματική εργασία περιελάμβανε επίσης, την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων στα τέσσερα διαφορετικά εκχυλίσματα, η οποία επιτεύχθηκε με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε βιβλιοθήκη φασμάτων LC-MS, αποτελούμενη από τυπικές φαινολικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, φαινολικά οξέα (γαλλικό, σαλικυλικό), υδροξυκινναμικά οξέα (καφεϊκό, φερουλικό) και διάφορα φλαβονοειδή (κατεχίνη, κερκετίνη και ρουτίνη). Τα φάσματα της βιβλιοθήκης κατασκευάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες, με διαφορετικούς τρόπους ιονισμού, ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI).

Από την ανάλυση της υγρής χρωματογραφίας στο εκχύλισμα μαύρης πεύκης, ανιχνεύτηκαν μονομερή των ενώσεων κερκετίνης, ρ-κουμαρικού και βενζοϊκού οξέος, καθώς και παράγωγα φερουλικού και καφεϊκού οξέος, κατεχίνης/επικατεχίνης και χλωροφαινόλης. Επιπλέον, στο εκχύλισμα πρόπολης, ανιχνεύθηκαν πολυφαινολικά παράγωγα κατεχίνης, ρουτίνης, φαινυλοξικού και βενζοϊκού οξέος. Όσο αφορά το εκχύλισμα εχινάκεια, σε καθαρή μορφή εντοπίστηκαν οι ενώσεις της κερκετίνης και ρουτίνης, ενώ σε μορφή συμπλόκων, οι ενώσεις του φερουλικού και του καφεϊκού οξέος. Τέλος, στο εκχύλισμα της άρνικας ανιχνεύτηκαν πολυφαινολικά παράγωγα κατεχίνης, κερκετίνης, φερουλικού και καφεϊκού οξέος. Το εκχύλισμα της μαύρης πεύκης, χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της κρέμας προσώπου στα

εργαστήρια της εταιρίας Κορρές. Η κρέμα αυτή, πέρασε από δοκιμές σταθερότητας σε ακραίες συνθήκες διάφορων θερμοκρασιών. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των μετρήσεων, η προσαρμογή του εκχυλίσματος στην κρέμα ικανοποίησε όλα τα φυσικά και χημικά πρότυπα ποιότητας, καθώς και την αισθητική εικόνα, κατά την διεξαγωγή των δοκιμών αυτών.

Abstract

Oxidative stress is considered as an important factor in several diseases. Free radicals are recognized as agents resulting to ageing acceleration. Antioxidant compounds like phenolic acids, polyphenols and flavonoids scavenge free radicals inhibiting the oxidative mechanisms. Herbal plants have been considered as good antioxidants since ancient times. The recent explosion of interest is due to the potential use of polyphenolic components as dietary constituents as well as cosmetic products. The phenolic fraction of plant extracts has been linked to their antioxidant capacity and antimicrobial activity.

The purpose of this thesis was to evaluate the phenolic profile of different extracts and the potential use in cosmetics. The extracts tested were those of Corsican black pine, Propolis, Echinacea and Arnica.

The total phenolic content was determined spectrophotometrically according to the Folin-Ciocalteu procedure. The method was applied using different solvents (ethanol, methanol and water). The phenolic content was calculated as gallic acid equivalents (GAE) as well as caffeic acid equivalents (GAE) for all extracts and different solvents. Among the tested extracts, a high total phenolic content ($GAE > 500 \text{mg/g}$) resulted for propolis as well as for black pine extract ($GAE > 200 \text{mg/g}$).

Total flavonoid contents were determined by using the aluminum chloride colorimetric method and the results were expressed as quercetin equivalents. Among the tested extracts, a high total flavonoid content ($QE = 35.5 \text{mg/g}$) resulted for Corsican black pine extract.

Antioxidant activity was evaluated according to the scavenging effect of the extracts determined spectrophotometrically with the DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical) method. The highest radical scavenging effect was observed in propolis and black pine extracts, but also in gallic acid and

Catechin solutions. The lowest radical scavenging effect was observed in arnica extract.

This study included the identification of phenolic compounds in the four different extracts. The identification was achieved using liquid chromatography technique coupled to a mass spectrometer (LC-MS). A spectra library for LC-MS was developed, using standard phenolic compounds. Phenolic acids (Gallic, salicylic), Hydroxycinnamic acids (Caffeic, Ferulic), and flavonoids (Catechin, Quercetin and Rutin) were also included and used. The spectra library was constructed under different conditions using electro spray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) as ionization methods.

Monomers of Quercetin, p-Coumaric acid and benzoic acid were detected in black pine extract. In the same extract, were also identified derivatives of Ferulic Catechin/Epicatechin Chlorophenol and Caffeic acid. Moreover, in the Propolis extract were detected polyphenolic derivatives of Catechin, Rutin, Phenylacetic and Benzoic acid. Furthermore, monomers of Quercetin and Rutin, in addition with derivatives of Ferulic and Caffeic acid were found in Echinacea extract. Finally, polyphenolic derivatives of Catechin Ferulic acid, Quercetin and Caffeic acid were identified in arnica extract.

The extract of black pine was used for the preparation of facial cream in Korres R&D laboratories. Stability tests were performed under conditions varying in temperature and light levels. The product met all physical and chemical quality standards as well as aesthetics when stored.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	3
Περίληψη.....	5
Abstract.....	8
A.Θεωρητικό Μέρος	
Εισαγωγή	16
1. Φυτικά Εκχυλίσματα.....	18
1.1 Το πεύκο της Κορσικής-Corsican Black Pine.....	18
1.1.1 Χαρακτηριστικά	19
1.1.2 Ιδιότητες - Χρήσεις	21
1.2 Πρόπολη.....	23
1.2.1 Χαρακτηριστικά – Φυσικές ιδιότητες – Χημική σύσταση	24
1.2.2 Βιολογικές Δράσεις – Θεραπευτικές Ιδιότητες	25
1.2.2.1 Αντιμικροβιακή Δράση.....	25
1.2.2.2. Αναισθητική δράση.....	25
1.2.2.3. Αντιφλεγμονώδης Δράση	25
1.3 Εχινάκεια.....	26
1.3.1 Χαρακτηριστικά – Φυσικές ιδιότητες – Χημική σύσταση	26
1.3.2 Βιολογικές Δράσεις – Θεραπευτικές Ιδιότητες	27
1.4 Άρνικα	27
1.4.1 Χημικές ιδιότητες – Βιολογικές δράσεις	28
2. Αντιοξειδωτικά.....	30
2.1 Φυσικά Αντιοξειδωτικά	32
2.1.1 Πρωτογενή αντιοξειδωτικά	33
2.1.2 Δευτερογενή αντιοξειδωτικά	34
2.2 Μηχανισμός Δράσης των Αντιοξειδωτικών	34
2.3 Μέθοδοι εκτίμησης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών.....	36
2.3.1 Μέθοδος μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2–διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH')	36

2.4 Αντιοξειδωτική δράση και ασθένειες	38
2.4.1 Αντιοξειδωτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων	38
2.4.2 Αντιοξειδωτική δράση έναντι της καρκινογένεσης.....	38
3. Φλαβονοειδή.....	39
3.1 Μοριακή δομή και κατηγορίες φλαβονοειδών	39
3.1.1 Φλαβόνες.....	40
3.1.2 Ανθοκυανιδίνες	41
3.1.3 Φλαβονόνες	42
3.1.4 Ισοφλαβόνες	43
3.1.5 Φλαβονόλες.....	44
3.1.6 Φλαβανόλες.....	45
3.2 Ιδιότητες Φλαβονοειδών	46
4. Φαινολικές Ενώσεις.....	48
4.1 Χημεία των φαινολικών ενώσεων.....	48
4.1.1 Φαινολικά Οξέα.....	50
4.2 Η Πολυλειτουργικότητα των φαινολικών ενώσεων	52
4.2.1. Σχέσεις δομής - δραστηριότητας στην αντιοξειδωτική δράση	53
5. Οργανολογία.....	55
5.1 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (Uv-Vis).....	55
5.1.1 Γενικά.....	55
5.1.2 Φασματόμετρα απλής δέσμης.....	56
5.2 Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας, LC/MS.....	57
5.2.1 Υγρή Χρωματογραφία LC	58
5.2.2 Φασματομετρία Μάζας.....	59
5.2.1.1 Βασικές Αρχές Λειτουργίας φασματογράφου μάζας.....	59
5.2.3 Βασικά Χαρακτηριστικά Οργάνων	60
5.2.3.1 Συστήματα Εισαγωγής του Δείγματος (Sample Inlet Systems)	61
5.2.3.2 Πηγές Ιόντων (Ion Sources)	61
5.2.3.3 Αναλυτής Μάζας (Mass Analyzer).....	64
5.2.3.4 Ανιχνευτές (Detectors)	66
6. Κοσμετολογία - Κορρές.....	67
6.1 Βασικές αρχές της ανάπτυξης καλλυντικών προϊόντων	67

6.1.1 Προϋποθέσεις για μια επιτυχημένη φόρμουλα	68
6.2 Κατηγορίες προϊόντων – Κρέμες.....	69
6.3 Χρήση των βοτάνων και φυτών στα καλλυντικά.....	70
6.3.1 Τα βότανα ως φυσικά προϊόντα	70
6.3.2 Εκχυλίσματα	71
6.4 Δοκιμές Σταθερότητας Προϊόντων.....	72
6.4.1 Οι δοκιμές καλλυντικών και η σταθερότητα των γαλακτωμάτων	73
6.4.1.1 Θερμοκρασία	74
6.4.1.2 Ρεολογία	74
6.4.1.3 Μέγεθος Σωματιδίων.....	75
6.4.2 Πρωτόκολλα δοκιμών για τα γαλακτώματα	75
6.4.3 Χημική αστάθεια των συστατικών των καλλυντικών	76
6.4.3.1 Μετεστεροποίηση.....	77
6.4.3.2 Διαλυτοποίηση	77
6.4.3.3 Οξειδωση	77

B. Πειραματικό Μέρος

Εισαγωγή - Σκοπός.....	80
Όργανα - Αντιδραστήρια.....	82
1. Πρότυπες Ενώσεις.....	84
2. Μέτρηση Ολικών Αντιοξειδωτικών και Αντιοξειδωτικής Δράσης.....	90
2.1 Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων (total phenolic compounds)	90
2.1.1 Διαλύτης Μεθανόλη (MeOH).....	90
2.1.2 Διαλύτης Αιθανόλη (EtOH)	95
2.1.3 Διαλύτης Νερό (H ₂ O).....	100
2.1.4 Συμπεράσματα.....	103
2.2 Ολικά Φλαβονοειδή (Total Flavonoids)	105
2.2.1 Συμπεράσματα.....	108
2.3 Αντιοξειδωτική Δράση - Δοκιμή DPPH(Antioxidant Activity).....	109
2.3.1 Συμπεράσματα.....	115

3. Ανάλυση Υγρής Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας (LC-MS).....	118
3.1 Δημιουργία Βιβλιοθήκης Πρότυπων Ενώσεων	118
3.2 Ανάλυση Εκχυλισμάτων και πρότυπων ενώσεων με Υγρή Χρωματογραφία	128
3.2.1. Εκχύλισμα Μαύρης Πεύκης-Κορρές.....	129
3.2.2 Εκχύλισμα Πρόπολης	140
3.2.3 Εκχύλισμα Εχινάκεια.....	142
3.2.4 Εκχύλισμα Άρνικα	144
3.3 Συμπεράσματα.....	146
4. Δημιουργία Κρέμας - Δοκιμές Σταθερότητας (Stability Tests).....	148
4.1 Κατασκευή Κρέμας	149
4.2 Δοκιμές Σταθερότητας - Stability Tests	153
4.2.1 Συμπεράσματα.....	159
5. Γενικά Συμπεράσματα και Προοπτικές.....	161
Βιβλιογραφία.....	165
Παράρτημα.....	174

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Από τις απαρχές του πολιτισμού, για την αντιμετώπιση σειράς ασθενειών, ο άνθρωπος στράφηκε στη φύση και τα φυσικά προϊόντα. Πληθώρα ερευνών, έχει αποδείξει ότι οι φαρμακευτικές ουσίες που προέρχονται από φυτικά προϊόντα, κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στις παραδοσιακές τεχνικές υγειονομικής περίθαλψης. Σύμφωνα με τις έρευνες αυτές, ο άνθρωπος φαίνεται να αντιλαμβάνεται τις δυνατότητες, που του παρέχουν τα φυσικά προϊόντα, από τα πρώτα στάδια της πορείας της εξέλιξής του.

Τα πρώτα ενδεικτικά στοιχεία, χρήσης φυσικών προϊόντων, είναι τα φυτά, που χρησιμοποιήθηκαν ως χρωστικές ουσίες, εξαιτίας του πλούσιου χρώματός τους. Επιπρόσθετα, από την αρχαιότητα, εξέχουσα θέση στην ιατρική κατέχουν τα αρωματικά φυτά, τα οποία, παρουσιάζουν θεραπευτικές και ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα αρωματικά φυτά επίσης, είναι πηγή διάφορων «ελιξιρίων» μακροζωίας και νεότητας. Δεν είναι τυχαίο μάλιστα, όπου σε περιόδους σκοταδισμού και ύφεσης του ανθρώπινου πολιτισμού, όπως ήταν η περίοδος του Μεσαίωνα, κάθε φυτικό παρασκεύασμα, ταυτιζόταν αυτόματα, με μυστήριο προϊόν με μαγικές ιδιότητες.

Η μελέτη των φυτικών εκχυλισμάτων, άρχισε να γίνεται συστηματική, με την αναγέννηση της χημείας, που πραγματοποιήθηκε κατά τον 17^ο αιώνα. Κομβικό σημείο, ήταν η απομόνωση των καθαρών ουσιών, από φυτικές πρώτες ύλες. Το 19^ο αιώνα, οι ουσίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν στην φαρμακευτική. Κατά τον 20^ο αιώνα, η εκθετική ανάπτυξη της χημείας, οδήγησε στην ταυτοποίηση χιλιάδων ενώσεων, από αρωματικά φυτά. Αυτό συνέβαλλε στην διαπίστωση της υψηλής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων, στα φυτικά εκχυλίσματα. Οι φαινολικές ενώσεις, είναι παρούσες σε χερσαία και υδάτινα ανώτερα φυτά και είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφες ενώσεις. Έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της συμβολής τους στην ανταπόκριση του φυτού, σε περιβαλλοντικό στρες, όπως είναι οι ρύποι, ή οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, οδήγησε μέρος της επιστημονικής

κοινότητας στην αναζήτηση αποτελεσματικών αντιοξειδωτικών από αρωματικά φυτά.

Σημερινός στόχος των ερευνητών, είναι η προσπάθεια εκμετάλλευσης, κάθε φυσικής πηγής. Το αγοραστικό κοινό, στρέφει το ενδιαφέρον του σε κάθε παρασκεύασμα-φυτικό προϊόν, ενώ στον χώρο της βιομηχανικής φαρμακολογίας τα φυσικά προϊόντα καταλαμβάνουν πρωταγωνιστική θέση. Συγκεκριμένα, διεξάγονται έρευνες για την εξέλιξη των φυτικών εκχυλισμάτων, τα οποία με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες αποτελούν πηγή νέων φαρμάκων και την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών. Πέρα όμως, από τη φαρμακοβιομηχανία, τα φυτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται, στην βιομηχανία τροφίμων, ως φυσικά πρόσθετα (χρωστικές, αρωματικές, γλυκαντικές ιδιότητες κλπ.), καθώς και στην παραγωγή καλλυντικών και ουσιών με ιατρική και κοσμητική χρήση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, γίνεται μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων, και συγκεκριμένα, εκχυλίσματος Μαύρης Πεύκης, σε συνεργασία με την εταιρία ΚΟΡΡΕΣ, Πρόπολης, Εχινάκεια και Άρνικας, για την παρουσία σε αυτά, φαινολικών ενώσεων (total phenolic compounds), φλαβονοειδών (total flavonoids), καθώς και για την μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης (antioxidant activity). Τα εκχυλίσματα αναλύονται, με τεχνική υγρής χρωματογραφίας, συζευγμένης με φασματομετρία μάζας, (LC-MS), με σκοπό την ταυτοποίηση αντιοξειδωτικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτά. Για το σκοπό αυτό, αναλύθηκαν πρότυπες ουσίες, και δημιουργήθηκε για πρώτη φορά, βιβλιοθήκη φασμάτων για την υγρή χρωματογραφία.

Η μελέτη, ως προς τη χρήση σε καλλυντικά προϊόντα, επικεντρώνεται κυρίως στο εκχύλισμα πεύκης (μαύρης πεύκης-πέυκου Κορσικής) της εταιρίας ΚΟΡΡΕΣ, το οποίο και συμμετείχε, στην παρασκευή κρέμας. Το εκχύλισμα Μαύρης Πεύκης, είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, προστατεύει και ενδυναμώνει το συνδετικό ιστό της επιδερμίδας, ενισχύοντας τη σύσφιγξη και την ανθεκτικότητά της. Έχει ισχυρή συσφικτική δράση και καταπολεμά τις ελεύθερες ρίζες. (Sadeghi Afjeh M. et al., 2014)

1. Φυτικά Εκχυλίσματα

1.1 Το πεύκο της Κορσικής-Corsican Black Pine

Στα βουνά της Κορσικής (Γαλλία - νησί της Μεσογείου), το κυρίαρχο δέντρο είναι το πεύκο της Κορσικής (*Pinus nigra* ssp *laricio* (Poir) Maire var *Corsicana*). Τα εκχυλίσματα πεύκου, παρουσιάζουν πολλαπλά οφέλη, γεγονός που οφείλεται και στην ποικιλομορφία της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες (Winkel-Shirley Brenda, 2001), (Alya Maimoona, et al. 2011).



Εικόνα 1.1. Προέλευση πεύκου Κορσικής

Το πεύκο της Κορσικής, ανήκει στο επιστημονικό γένος *Pinus* και είναι μέλος της οικογένειας των πεύκων (*Pinaceae*). Αναφέρεται και ως *Pinus nigra*, ή μαύρη πεύκη. Συναντάται σε όλη τη νότια Μεσόγειο, την Ευρώπη, από την Ισπανία προς την ανατολική Μεσόγειο, στην ανατολική χερσόνησο της Τουρκίας, στην Κορσική, στην Κύπρο, καθώς και τη Βόρεια Αφρική (Farjon, A., 1993), (Christensen, K. I., 2005). Στην Ελλάδα, αναπτύσσεται σε ορεινά και ημιορεινά εδάφη, με υψόμετρο από 400 μέχρι 1800 μέτρα. Συνήθως απαντάται σε ασβεστολιθικά πετρώματα, με αυξημένη υγρασία. Βρίσκεται σε δάση στην οροσειρά της Πίνδου, στα βουνά της Μακεδονίας και την Πελοπόννησο. Μικρή παρουσία υπάρχει στα βουνά της Κρήτης και στα νησιά του βορειοανατολικού Αιγαίου, Λέσβο, Θάσο και Σάμο. Μια ιδιαίτερη εξαίρεση είναι το παράκτιο δάσος μαύρης πεύκης στα Πετρωτά

Αλεξανδρούπολης, το οποίο αποτελείται από δέντρα νάνους (Κώστας Α. Θάνος, 2000).



Εικόνα 1.2. Corsican Black Pine

1.1.1 Χαρακτηριστικά

Το συγκεκριμένο είδος πεύκου έχει έναν σχετικά, ευθείας γραμμής φλοιό, με μικρές διακλαδώσεις. Ο φλοιός, αποτελείται από ένα παχύ στρώμα με χρώμα από γκρι-ροζ έως γκριζωπό-μαύρο (γεγονός στο οποίο αποδίδεται το όνομα *Nigra*). Ο φλοιός διαθέτει επίσης, ινώδη και λεπτή υφή, ενώ με την ηλικία το φυτό αποκτά βαθιά επιχρυσωμένα αυλάκια. Οι βλαστοί έχουν ένα κίτρινο-καφέ χρώμα και ελαφριές ραβδώσεις. Το άνθος του, αποτελείται από μπουμπούκια χρώματος καφέ, και μεγέθους 1.5-2cm, τα οποία έχουν σχήμα ευρύ στη βάση και στενό απότομα σε ένα αιχμηρό σημείο. Τα άνθη συχνά επικαλύπτονται από λευκή ρητίνη. Οι βελόνες είναι λεπτές, μακριές (8-14cm), γκρι-πράσινου χρώματος, απαλές με διακριτική συστροφή έτσι ώστε να εμφανίζονται κυματιστές. Αναπτύσσονται σε ζεύγη (Farjon, A., 1993),

(Christensen, K. I., 2005). Το πεύκο Κορσικής, είναι μονογονεϊκό. Αυτό σημαίνει, ότι στο ίδιο δέντρο βρίσκονται και τα δύο, αρσενικά και θηλυκά άνθη. Τα αρσενικά άνθη έχουν μέγεθος 1,3 εκατοστά σε σχήμα βαρελιού και αναπτύσσονται κυρίως στη βάση των βλαστών (εικόνα 1.3). Αντίθετα, τα θηλυκά άνθη, αναπτύσσονται στις άκρες του βλαστού. Είναι μικρότερα (5mm), ωοειδή και ρόδινα-ροζ (εικόνα 1.4). Το κάθε δέντρο γονιμοποιείται με την βοήθεια του ανέμου. Τέλος, οι κώνοι είναι μεγάλοι (5-8 εκατοστά), καφέ στο εσωτερικό και διαθέτουν ανομοιόμορφο σχήμα. Ωριμάζουν δύο χρόνια μετά την ανθοφορία και συνήθως κατά το μήνα Δεκέμβριο. Οι σπόροι είναι σχετικά μεγάλοι και φτερωτοί (Lee, C. H., 1968), (Dida, M., 2001).



Εικόνα 1.3. Αρσενικά Άνθη



Εικόνα 1.4. Θηλυκά Άνθη

Το πεύκο Κορσικής είναι ένα είδος, λιγότερο απαιτητικό και ταχέως αναπτυσσόμενο. Ανήκει στην οικογένεια κωνοφόρων, και αναπτύσσεται περίπου πάνω από τα σαράντα μέτρα σε ύψος. Βρίσκεται σε υψόμετρο που κυμαίνεται από το επίπεδο της θάλασσας έως 2.000 μέτρα, και συχνότερα από 250-1,600 μέτρα. Μεγαλύτερη ανθοφορία, παρουσιάζει τους μήνες Μάιο έως Ιούνιο. Συγκεκριμένα, οι σπόροι αρχίζουν να ωριμάζουν το Δεκέμβριο και συνήθως συλλέγονται τον Ιανουάριο. Σπέρνονται τέλη Μαρτίου / αρχές Απριλίου, όταν το έδαφος είναι θερμότερο, χωρίς να απαιτείται προεργασία.

Όσο αφορά το προσδόκιμο ζωής, στο Ηνωμένο Βασίλειο, το πεύκο της Κορσικής έχει φτάσει σε ηλικία 200 ετών (Lee, C. H., 1968), (Dida, M., 2001).

Ως ένα μεσογειακό δέντρο, αναπτύσσεται καλύτερα, σε περιοχές με χαμηλές βροχοπτώσεις και ψηλές θερμοκρασίες καθώς και σε αμμώδη εδάφη. Είναι ανεχτικό στη θερμότητα, και την ξηρασία, όπως και σε κάποια μόλυνση, αλλά είναι ευάλωτο σε παγετό. Δεν ανέχεται πολύ υγρό ή συμπιεσμένο έδαφος και μπορεί να αυξηθεί σε ασβεστολιθικά εδάφη με την προϋπόθεση να είναι καλά στραγγιζόμενα. (Farjon, A., 1993), (Christensen, K. I., 2005)

1.1.2 Ιδιότητες - Χρήσεις

Το ξύλο του συγκεκριμένου είδους είναι σταθερό και μέσης αντοχής, υψηλότερης από εκείνης του έλατου. Χρησιμοποιείται σε οικοδομικές εργασίες, όπως στέγες, δάπεδα και ξυλουργική εσωτερικών χώρων, καθώς και για τη λήψη κουτιών, σανίδων και χαρτοπολτού. Τα φύλλα και η ρητίνη του, χρησιμοποιούνται για δημιουργία υλικών όπως: κερί, βερνίκι, συντηρητικό ξύλου και κολοφωνίου για έγχορδα. Τα εκχυλίσματα από στελέχη πεύκου, έχουν πληθώρα θετικών για την υγεία επιδράσεων, γεγονός που καταμαρτυρά, η πλούσια περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες. Μελέτες σε γνωστά στελέχη πεύκου, έδειξαν την περιεκτικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων τους, σε προανθοκυανιδίνες να ανέρχεται στο 65-75%. Τα φυτικά αυτά εκχυλίσματα, έχουν χρησιμοποιηθεί από την εποχή του Ιπποκράτη, για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών. Αιθέρια έλαια πεύκου διαθέτουν αποσμητικές ιδιότητες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προϊόντα καθαρισμού του δέρματος και ως αντισηπτικό (Sadeghi Afjeh M., 2014), (Pasqualini V., 2003).

Η μεγάλη οικογένεια των πεύκων (90 είδη) είναι ευρέως γνωστή για την παρουσία φαινολικών ενώσεων τόσο στον κορμό, όσο και στις βελόνες. Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση των πολυφαινολικών συστατικών σε διάφορα είδη πεύκης, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας. Κλασικά παραδείγματα, είναι μια μελέτη στην Τουρκία (Yesil-Celiktas O. et al., 2009), η οποία ανέφερε την περιεκτικότητα σε κατεχίνες στο φλοιό του

γένους *P. Brutia*, αλλά και σε άλλα τουρκικά πεύκα. Δύο άλλες εκθέσεις, επικεντρώθηκαν στα φαινολικά συστατικά των πευκοβελόνων, των γενών *P. halepensis* και *P. laricio*. Η πρώτη μελέτη, έδειξε παρουσία *p*-κουμαρικού οξέος, βανιλικού οξέος και γαλλικού οξέος, ενώ από τη δεύτερη προέκυψε παρουσία *p*-κουμαρικού οξέος, βανιλικού οξέος και φερουλικού οξέος. Παρεμφερείς μελέτες για την ύπαρξη και προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων, έχουν πραγματοποιηθεί επίσης, στις νορβηγικές πευκοβελόνες (Sadeghi Afjeh M. et al., 2014). Σε ορισμένα στελέχη επίσης, βρέθηκαν φλαβονοειδή και συγκεκριμένα ισομερή κερκετίνης (Takahaski et al., 1960), ενώ παράλληλα, απομονώθηκε αριθμός από κατεχίνες και συγκεκριμένα, κατεχίνη επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη (Shumailona, 1971), (Gerard J., 1978). Έρευνες, σαν αυτές που αναφέρονται, βοήθησαν στην επιλογή των προτύπων ουσιών, για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης λόγω πιθανής παρουσίας στα εκχυλίσματα, που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας, με φαινολικές ουσίες και φλαβονοειδή, που έχουν εντοπιστεί σε στελέχη (πευκοβελόνες και κορμό) δύο διαφορετικών ειδών πεύκου (Alya Maimoona, et al., 2011):

Πίνακας 1.5. Φαινολικά και Φλαβονοειδή σε στελέχη δυο ειδών πεύκων

Φαινολικά/Φλαβονοειδή	Είδος <i>roxburghii</i>		Είδος <i>willichiana</i>		Αναφορές
	Κορμός	Βελόνες	Κορμός	Βελόνες	
Quercetin	+	+	+	+	Naeem et al.(2010) and Willfor et al.(2009)
Taxifolin	+	-	-	-	Willfor et al.(2009)
Catechin	+	-	+	-	Willfor et al.(2009)
Παράγωγο Quercetin	+	-	-	-	Willfor et al.(2009)
Παράγωγο Taxifolin	-	-	+	-	Will for et al.(2009)
Παράγωγα catechin και gallocatechin	+	-	+	-	Willfor et al.(2009)
Kaempferol	+	-	+	-	Naeem et al.(2010)
Rhamnentin	+	-	+	-	Naeem et al.(2010)
Isorhamnentin	-	-	+	+	Naeem et al.(2010)

Myricetin	-	+	+	-	Naeem et al.(2010)
3,4-dihydroxybenzoic acid	+	-	+	-	Willfor et al.(2009)
3,4-dihydroxycinnamic acid	+	-	-	-	Willfor et al.(2009)
Monomethyl Pinosylvin	-	-	+	-	Willfor et al.(2009)
Dihydro-monomethyl pinosylvin	+	-	+	-	Willfor et al.(2009)
Resveratrol glycoside	-	-	+	-	Willfor et al.(2009)
Pinoresinol	+	-	-	-	Willfor et al.(2009)

1.2 Πρόπολη

Έχει αποδειχθεί, ότι ένα από τα χαρακτηριστικά της πρόπολης μέλισσας, είναι η ενίσχυση των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού, ή του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που την καθιστά διπλά αποτελεσματική στην αντιμετώπιση λοιμώξεων κάθε είδους (Krel R. 1996). Στις αρχές της δεκαετίας του 1970, άρχισε να αναπτύσσεται μεγάλο ενδιαφέρον για τη μελέτη αυτού του προϊόντος στη Γιουγκοσλαβία, τη Ρωσία και την Πολωνία, καθώς και σε άλλα μέρη του κόσμου. Ένας Γάλλος επιστήμονας με το όνομα Lavie, καθώς και ένα πολωνικό φαρμακευτικό εργαστήριο, κατέδειξαν τις εξαιρετικές ιδιότητες της πρόπολης στην καταπολέμηση μυκήτων και βακτηριδίων. Ο Αριστοτέλης χρησιμοποιούσε την πρόπολη ως θεραπευτικό μέσο για πολλές διαφορετικές νόσους (Khorasgani EM., 2010). Σε πιο σύγχρονες εποχές, ένα βάμμα κατασκευασμένο από πρόπολη και βαζελίνη χρησιμοποιούνταν στον πόλεμο για την καταπολέμηση των επιμολύνσεων των τραυμάτων. Ρώσοι και Πολωνοί ερευνητές ανακάλυψαν ότι η πρόπολη είναι αποτελεσματική εναντίον του βακίλου της φυματίωσης, και εξίσου αποτελεσματική εναντίον ορισμένων ειδών μυκήτων ανθεκτικών στις συνήθεις θεραπείες, όπως η Candida. (Bankova S. Vassya, 2000), (Ghisalberti E.L., 2015)



Εικόνα 1.6. Φυσική πρόπολη μελισσών

1.2.1 Χαρακτηριστικά – Φυσικές Ιδιότητες – Χημική Σύσταση

Η πρόπολη (bee-glue) είναι κολλώδης ουσία, που παράγουν οι μέλισσες, για στεγανοποίηση και απολύμανση του εσωτερικού της κυψέλης, η οποία προκύπτει από την συλλογή ρητινωδών εκκρίσεων από τους φλοιούς φυτών, και εμπλουτισμό με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες (εικόνα 1.6). Το χρώμα της πρόπολης ποικίλει ανάλογα από το φυτό προέλευσής της και από τις προσμείξεις κεριού και γύρης. Είναι εντελώς αδιάλυτη στο νερό αλλά, διαλύεται στην αιθυλική αλκοόλη, στην γλυκόλη και σε άλλους οργανικούς διαλύτες. Η χημική σύσταση της πρόπολης όπως και οι φυσικές της ιδιότητες εξαρτώνται άμεσα από την χλωρίδα της κάθε περιοχής. Η χημική της σύσταση είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, καθώς σε αυτήν έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 300 χημικές ενώσεις. Αποτελείται κυρίως από ρητίνη (50%), κερί (30%), αιθέρια έλαια (10%), γύρη (5%). Τα υπόλοιπα συστατικά της είναι αρωματικές ουσίες, ζάχαρα, βάλσαμα, τερπένια, αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους, φλαβόνες, ανόργανες ουσίες, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και άλλα γνωστά και άγνωστα συστατικά (Krel R. 1996), (Bankova S. Vassya, 2000), (Ghisalberti E.L., 2015)

1.2.2 Βιολογικές Δράσεις – Θεραπευτικές Ιδιότητες

Η πρόπολη περιέχει αντιβακτηριδιακές και αντιμυκητιακές ουσίες, οι οποίες δρουν επιλεκτικά: επιτίθενται στα παθογόνα βακτήρια και τους τοξικούς μύκητες χωρίς να είναι επιβλαβείς για τον ανθρώπινο οργανισμό. Δεν επηρεάζει τη φυσική μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου και δεν παρουσιάζει παρενέργειες, ενώ η χρήση της ενισχύει την επίδραση των συνηθισμένων φαρμάκων. Η πρόπολη δρα κατά των ιών και είναι ισχυρό αντιβιοτικό και αντιπαρασιτικό. Η καθημερινή κατανάλωση της πρόπολης, θεωρείται πως ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ μπορεί επίσης να ληφθεί με ασφάλεια, μαζί με αντιβιοτικά για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς τους. Ένα βάμμα πρόπολης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία πληγών και για να καταπραΰνει τον πονόλαιμο. Η πρόπολη χρησιμοποιείται επίσης σε μερικές τσίχλες, οδοντόκρεμες, καλλυντικά, κρέμες και αλοιφές και μπορεί να έχει πιθανές χρήσεις στον τομέα της οδοντιατρικής να σκληρύνει το σμάλτο (Khorasgani EM., 2010). Συγκεκριμένα αναφέρονται παρακάτω τρεις δράσεις της φυτικής πρόπολης:

1.2.2.1 Αντιμικροβιακή Δράση

Θεραπευτικές ιδιότητες, σε ασθένειες όπως φαρυγγίτιδα, γρίπη, λαρυγγίτιδα, βρογχικό άσθμα, χρόνια πνευμονία και πνευμονική φθίση.

1.2.2.2. Αναισθητική Δράση

Αναισθητικό εγχειρήσεων διαφόρων οργάνων, θεραπεία και ανακούφιση του πόνου, της άνω αναπνευστικής οδού, των ρινικών κοιλοτήτων, των δοντιών, του αυτιού κ.λπ.

1.2.2.3. Αντιφλεγμονώδης Δράση

Η πρόπολη επουλώνει τραύματα και πληγές αυτιών, μύτης, έρπη ζωστήρα. Πρόκειται για ένα φυσικό αντιβιοτικό με αντιμικροβιακή δράση, όπως σταφυλόκοκκου, στρεπτόκοκκου κ.λπ. χωρίς παρενέργειες (Khorasgani EM., 2010), (Bankova S. Vassya, 2000).

1.3 Εχινάκεια

Η Εχινάκεια (*Echinacea*, *Echinacea purpurea*), είναι ένα πολυετές βότανο που χαρακτηρίζεται από ακανθωτούς ανθισμένους μοβ κώνους που το κάνουν να προσομοιάζει με την κοινή σε όλους μαργαρίτα (εικόνα 1.7). Αναπτύσσεται στους λειμώνες της Δυτικής Αμερικής και καλλιεργείται στην Ευρώπη. Το 19^ο αιώνα η χρήση του βοτάνου, διαδίδεται στην Ευρώπη και αρχίζει η καταγραφή της δράσης του. Το 1938, Γερμανοί επιστήμονες, μελέτησαν εις βάθος την εχινάκεια και σήμερα πλέον χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ενίσχυση της άμυνας και την αντιμετώπιση των λοιμώξεων του αναπνευστικού και ουροποιητικού συστήματος. Μετά την είσοδο των αντιβιοτικών στην αγορά η χρήση της περιορίστηκε αρκετά, τα τελευταία χρόνια, με την τάση που επικρατεί για την εφαρμογή ήπιων εναλλακτικών μεθόδων άρχισε και πάλι να διαδίδεται ευρύτερα. Μάλιστα, δεκάδες είναι οι έρευνες που διεξάγονται από πανεπιστήμια και ιατρικούς οργανισμούς στις ΗΠΑ, στη Μεγάλη Βρετανία και κυρίως στη Γερμανία, στις οποίες μελετώνται οι τρόποι που επιδρά η εχινάκεια στον οργανισμό μας. (Canlas J. et al., 2010)



Εικόνα 1.7. Άνθος Εχινάκεια

1.3.1 Χαρακτηριστικά – Φυσικές Ιδιότητες – Χημική Σύσταση

Το γένος εχινάκεια (*Echinacea*) αποτελείται από 9 είδη, από τα οποία μόνο τρία (*Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida*) χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς. Μερικές από τις χημικές ουσίες που περιέχει και στις οποίες οφείλονται οι ιδιαίτερες ιδιότητές της είναι

οι πολυσακχαρίτες, τα φλαβονοειδή, τα αιθέρια έλαια, τα αλκαμίδια και το καφεϊκό οξύ. Η εχινάκεια, έχει την ιδιότητα, να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα και να ενδυναμώνει τον οργανισμό, ενάντια σε κάθε είδους λοιμωξιολόγους παράγοντες, ιούς και βακτηρίδια. Η Εχινάκεια, δεν σκοτώνει ούτε απενεργοποιεί, ιούς και βακτηρίδια. Ενισχύει το ανοσοποιητικό, έτσι ώστε αυτό να μπορέσει να αντιμετωπίσει τους όποιους εισβολείς. (Barnes J et al., 2005), (Huntley AL. et al., 2005),

1.3.2 Βιολογικές Δράσεις – Θεραπευτικές Ιδιότητες

Η εχινάκεια είναι το κυριότερο βότανο, που μπορεί να βοηθήσει το σώμα να απαλλαγεί από τις μικροβιακές λοιμώξεις. Είναι αποτελεσματική τόσο για τα βακτήρια, όσο και για τους ιούς. Γι αυτό η εχινάκεια χρησιμοποιείται για προβλήματα ακμής, δοθιήνες, σηψαιμία, εγκαύματα και ηλιακά εγκαύματα, δερματίτιδας, ψωρίασης, έρπητα ζωστήρα, τσιμπήματα εντόμων και κεντρίσματα. Είναι εξίσου χρήσιμη για λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού, όπως η λαρυγγίτιδα και η αμυγδαλίτιδα καθώς και σε καταρροϊκές καταστάσεις της μύτης, σε οξεία βρογχίτιδα, κοινό κρυολόγημα, γρίπη και αδενικό πυρετό, σε προβλήματα μέσης ωτίτιδας, άφθες, πυόρροια, ουλίτιδα, θυλακίτιδα, σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα, οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδή αρθρίτιδα, έρπητα γεννητικών οργάνων, κολπίτιδα. (Barnes J. et al., 2005), (Huntley AL. et al., 2005), (Canlas J. et al., 2010)

1.4 Άρνικα

Η άρνικα είναι ένα πολυετές φυτό με άνθη που έχουν κίτρινα πέταλα και πορτοκαλί κέντρο (εικόνα 1.8) και ανθοφορεί σε Ευρώπη, Σιβηρία αλλά και Βόρεια Αμερική. Τα είδη του φυτού είναι πολλά, αλλά το πιο γνωστό είναι η *Arnica Montana*, η οποία φυτρώνει σε υψόμετρο 1000 μέτρων, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε όσο πιο μεγάλο υψόμετρο βρίσκεται, τόσο πιο αρωματική είναι. Τα άνθη της *Arnica Montana*, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του αρωματικού και κιτρινωπού αιθέριου ελαίου. (Braga P. C., 2008).



Εικόνα 1.8. Το φυτό Άρνικα

Ο παραδοσιακός τρόπος χρήσης της άρνικας είναι οι εξωτερικές επαλείψεις, ενώ δεν χρησιμοποιείται ποτέ σε πληγές ή εσωτερικά. Η άρνικα χρησιμοποιείται με διάφορους τρόπους και για ένα ευρύ φάσμα παθήσεων. (Waizel-Bucay J., 2014), (Delilah Alonso, 2002)

1.4.1 Χημικές Ιδιότητες – Βιολογικές Δράσεις

Τα κύρια συστατικά των εκχυλισμάτων άρνικας είναι μεταξύ άλλων, οι αμίνες (η βηταΐνη, η χολίνη και η τριμεθυλαμίνη), οι υδατάνθρακες, οι πολυσακχαρίτες (ινουλίνη) και οι κουμαρίνες (σκοπολετίνη, ουμπελιφερόνη). Παρατηρείται επίσης, υψηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών (γλυκουρονίδια, καμπφερόλη, λουτεολίνη και κερκετίνη) και άλλα συστατικά (αρνικίνη, καφεϊκό οξύ, καροτενοειδή, φυτοστερόλες, ρητίνη, και τανίνη) (Delilah Alonso, 2002). Το αιθέριο έλαιο της άρνικας είναι ισχυρό και μπορεί να αποδειχθεί τοξικό. Η διαλυμένη του όμως μορφή, που είναι και ο τρόπος που, κατά κύριο λόγο διατίθεται στην αγορά, είναι πολύ αποτελεσματική στην αντιμετώπιση οίδημάτων, μολύνσεων και στην άμεση ανακούφιση από τον πόνο (Waizel-Bucay J., 2014), (Delilah Alonso, 2002), (Braga P. C., 2008). Πιο συγκεκριμένα οι αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του εκχυλίσματος, καλύπτουν τα παρακάτω:

- Μυϊκούς πόνους, σπασμούς, τραβήγματα μυών ή ρευματικούς πόνους

- Στραμπουλήγματα, μελανιές και οιδήματα που οφείλονται σε κατάγματα
- Τσιμπήματα εντόμων
- Τριχόπτωση

Συνοπτικά οι δράσεις τις άρνηκας συνοψίζονται παρακάτω :

- ✚ Αντιαρθρικές
- ✚ Αντιρρευματικές
- ✚ Αντισηπτικές
- ✚ Απολυμαντικές
- ✚ Αντιμικροβιακές
- ✚ Τοπικές αντιερεθιστικές
- ✚ Αντιφλεγμονώδεις

2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Αντιοξειδωτική ορίζεται μία οποιαδήποτε ουσία, η οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε σχέση με τη συγκέντρωση ενός υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξειδωση αυτού του υποστρώματος. (W. J. V. Young I.S., 2006)

Οι ελεύθερες ρίζες, ευθύνονται για μια σειρά βλαβών, που πλήττουν τον οργανισμό. Ο οργανισμός από μόνος του, παράγει αντιοξειδωτικά, με σκοπό την δέσμευσή τους, ωστόσο η συστηματική συσσώρευση των ελεύθερων ριζών υπερκαλύπτει την προστατευτική ικανότητα του οργανισμού και τότε προκύπτουν μη αναστρέψιμες βλάβες της κυτταρικής δομής και της λειτουργίας του κυττάρου. Η καταστροφική δράση των ελεύθερων ριζών, θεωρείται ότι αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες της διαδικασίας της γήρανσης, καθώς και πλήθους εκφυλιστικών παθήσεων που αναφέρονται παρακάτω. Για τους παραπάνω λόγους έχει πραγματοποιηθεί στροφή του ενδιαφέροντος στα αντιοξειδωτικά. (Rohdewald P, 2002), (Touriño S, 2005).

Οι χημικές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, οδηγούν στη καταστροφή των συστατικών του κυττάρου. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών ως απενεργοποιητές ελευθέρων και υδροξυλιωμένων ελευθέρων ριζών, είναι να εμποδίσει αυτή την καταστροφή (W. J.V. Young I.S., 2006) (S. M. K. Ames B.N., Hagen T.M., 1990). Τα αντιοξειδωτικά, έχουν την δυνατότητα να σταθεροποιήσουν ή να απενεργοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες, πριν αυτές επιτεθούν σε κύτταρα και βιολογικούς στόχους. Έτσι, είναι κρίσιμα για την διατήρηση της ιδανικής υγείας του κυττάρου και του οργανισμού. (C. Swanson, 1998), (D. Belitz, 2015). Όταν η διαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών είναι μειωμένη, οι βλάβες της οξειδωσης, συσσωρεύονται και επιφέρουν αποτελέσματα οξειδωτικού στρες. (Yu-Tang Tung, 2007).

Η χημική έννοια του όρου "αντιοξειδωτικό" αναφέρεται στην τάση ενός μορίου για απόδοση ενός ηλεκτρονίου (e-) προς έναν οξειδωτικό παράγοντα (

συνήθως ελεύθερη ρίζα) με αποτέλεσμα την προφύλαξη άλλων μορίων, τα οποία θα ήταν πιθανοί στόχοι αυτού του παράγοντα. Προκειμένου μια ένωση π.χ. φαινόλη να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικό, πρέπει να έχει δύο ιδιότητες:

1. Όταν είναι παρούσα σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, να μπορεί να καθυστερήσει ή να αποτρέψει την αυτοοξείδωση ή την προκληθείσα από ελεύθερες ρίζες οξείδωση και
2. Η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται μετά τη δράση της πρέπει να είναι σταθερή (μέσω ενδομοριακού υδρογονικού δεσμού) σε περαιτέρω οξείδωση (H. J. Vinson J.A., 1998)

Ακόμη, ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά με το υπόστρωμα για την ενεργή διάμεση ουσία και να επαναγεννάται γρήγορα από το βιολογικό σύστημα ώστε να έχει πρόσβαση στην ενεργή διάμεση ουσία στο μικροπεριβάλλον. Το αντιοξειδωτικό πρέπει να βρίσκεται στον ίδιο χώρο με το προς οξείδωση υπόστρωμα (Δημακοπούλου Αγγελική, 2014).

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- Τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία είναι κυρίως ενώσεις φυτικής προέλευσης.
- Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά.

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία ενδέχεται να αντικαταστήσουν τα συνθετικά, διότι ορισμένα από τα τελευταία έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για καρκινογένεση (W. S. Y. Zheng W, 2006), (Τσιμογιάννης Δημήτριος, 2008), (Yu-Tang Tung, 2007), (Touriño S, 2005). Η διάκριση ωστόσο, των αντιοξειδωτικών, σε συνθετικά και φυσικά, δεν συνεπάγεται ότι όλα αδιακρίτως τα φυσικά ή όλα τα συνθετικά εμφανίζουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης. Η ακριβέστερη ταξινόμηση, βασίζεται στον τρόπο λειτουργίας τους. Ανάλογα με τις χημικές ιδιότητες, στις οποίες οφείλεται η δράση τους, διακρίνονται σε πρωτογενή και δευτερογενή αντιοξειδωτικά. Οι κατηγορίες αυτές θα αναλυθούν εν συντομία, ενώ θα γίνει εκτενέστερη

αναφορά για τα φυσικά αντιοξειδωτικά και συγκεκριμένα για τις φαινολικές ενώσεις και τα φλαβονοειδή, τα οποία και αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης στα εκχυλίσματα της συγκεκριμένης διπλωματικής (Δημακοπούλου Αγγελική, 2014), (D. Belitz, 2015).

2.1 Φυσικά Αντιοξειδωτικά

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι ουσίες φυτικής προέλευσης, με αντιοξειδωτική δράση. Έχουν αποτελέσει συστατικά της διατροφής για χιλιάδες χρόνια και ο άνθρωπος έχει προσαρμόσει τις διατροφικές του συνήθειες, ώστε να λαμβάνει σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών.

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά, περιέχονται ως περίπλοκα μίγματα πολλών ενώσεων με διαφορετική δραστηριότητα. Παραλαμβάνονται από τις φυσικές πρώτες ύλες, αλλά παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις με τα επιμέρους συστατικά αυτών. Η σύσταση επίσης, των συγκεκριμένων κλασμάτων διαφοροποιείται, ανάλογα με την περιοχή, και το έτος συγκομιδής των φυτών, οπότε κάθε σειρά-παρτίδα θα πρέπει να ελέγχεται ξεχωριστά για την αντιοξειδωτική ισχύ της. Επομένως, η αποτελεσματικότητα των φυσικών αντιοξειδωτικών, εξαρτάται κυρίως από τα φυτά, από τα οποία προέρχονται και από τον τρόπο παραλαβής τους. Είναι όμως γενικά αποδεκτό ότι τα αρωματικά φυτά, αποτελούν τις κυριότερες πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών. (Biljana Bozin, 2006). Τα φυτά παράγουν διάφορες αντιοξειδωτικές ενώσεις για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών με σκοπό την επιβίωσή τους. Σχεδόν όλα τα τρόφιμα που προέρχονται από βρώσιμα φυτά περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις. Οι πολυφαινόλες που προέρχονται από τα φυτά, είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση (Touriño S, 2005), (Rohdewald P, 2002). Ο τρόπος παραλαβής ενός αντιοξειδωτικού είναι είτε σε μορφή αιθέριου ελαίου, είτε ως εκχυλίσματος (extract). Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων, η αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται και από:

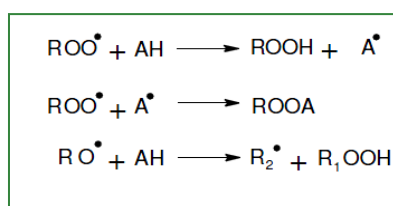
- ✓ Τις συνθήκες εκχύλισης που εφαρμόζονται στην παραλαβή τους και
- ✓ Την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή τους.

Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά είναι οι βιταμίνες, Α, C και Ε. Ωστόσο, υπάρχουν και τα λιγότερο γνωστά: πολυφαινόλες, σελήνιο, φλαβονοειδή και λυκοπένιο. Στην παρούσα μελέτη θα ασχοληθούμε με τα φλαβονοειδή και τις φαινόλες. Οι κυριότερες διατροφικές πηγές των τελευταίων αντιοξειδωτικών είναι:

- **Φλαβονοειδή:** ισχυρή ομάδα αντιοξειδωτικών που περιέχεται στα φρούτα και τα λαχανικά. Αντιπροσωπευτικές ενώσεις, είναι οι κατεχίνες (τσάι, κρασί), η κερκετίνη (μπρόκολα, σταφύλι), η ρουτίνη (μήλα), η απιγενίνη (σέλινο) και οι θειοφλαβίνες (τσάι).
- **Πολυφαινόλες:** ουσίες που περιέχονται σε ελιά και ελαιόλαδο, έχουν αρκετά καλή αντιοξειδωτική δράση και προστατεύουν από καρκινογενέσεις, αντιπροσωπευτικές είναι η προβιταμίνη Α, η βιταμίνη Ε και τα φαινολικά οξέα, γαλλικό, καφεϊκό, βανιλικό κ.λπ. (Δημακοπούλου Αγγελική, 2014), (D. Belitz, 2015).

2.1.1 Πρωτογενή Αντιοξειδωτικά

Ο ρόλος των πρωτογενών αντιοξειδωτικών είναι να διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελευθέρων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες, όπως φαίνεται στις αντιδράσεις του σχήματος παρακάτω. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται φαινολικές ενώσεις, όπως ΒΗΑ (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), ΒΗΤ (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), ΤΒΗQ (δι-τριπ.-βούτυλο-υδροκινόνη), ΡG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά. (Δημακοπούλου Αγγελική, 2014), (D. Belitz, 2015), (Τσιμογιάννης Δημήτριος, 2008).



Σχήμα 2.1. Πρωτογενή αντιοξειδωτικά.
Οι γενικές αντιδράσεις τους με τις υπεροξειδικές και τις αλκοξυ-ρίζες.

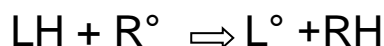
2.1.2 Δευτερογενή Αντιοξειδωτικά

Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά μπορεί να δρουν ως δεσμευτές οξυγόνου, δηλαδή να αντιδρούν με το οξυγόνο και να ελαττώνουν τη συγκέντρωσή του, σε ένα κλειστό σύστημα. Στην κατηγορία αυτή, εντάσσονται το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του καθώς και το θειώδες οξύ και τα άλατά του αλλά και τα καροτενοειδή. Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των δευτερογενών αντιοξειδωτικών είναι η δέσμευση μετάλλων, τα οποία με μεταφορά ηλεκτρονίου δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται επίσης οξέα ή παράγωγά τους που σχηματίζουν χημικές ενώσεις όπως EDTA, κιτρικό οξύ, φυτικό οξύ, λεκιθίνη (Δημακοπούλου Αγγελική, 2014), (D. Belitz, 2015), (Τσιμογιάννης Δημήτριος, 2008).

2.2 Μηχανισμός Δράσης των Αντιοξειδωτικών

Η διαδικασία της οξείδωσης, ενεργοποιείται από ένα μεγάλο αριθμό χημικών και φυσικών φαινομένων και εξελίσσεται πάνω σε κατάλληλο υπόστρωμα μέχρι κάποιος αμυντικός μηχανισμός, (π.χ. αντιοξειδωτικό) να παρεμποδίσει την διαδικασία. Τα υποστρώματα-στόχος είναι συνήθως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), φωσφορολιπίδια, χοληστερόλη και DNA. Η οξείδωση, έχει τη μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης, η οποία διαχωρίζεται σε τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμός (termination).

Στο πρώτο στάδιο παρουσία κάποιου οξειδωτικού παράγοντα (φωτός, θέρμανσης, μετάλλων Cu, Fe και μεγαλοπρωτεϊνών), σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



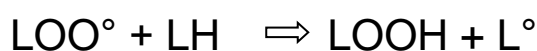
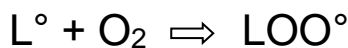
Όπου : LH : το λιπαρό υπόστρωμα

R[°] : ο οξειδωτικός παράγοντας

L[°] : η ρίζα

Στο επόμενο στάδιο, οι ρίζες (L[°]) αντιδρούν με οξυγόνο και σχηματίζουν υπεροξειδικές ρίζες (LOO[°]), οι οποίες αποσπών ένα μόριο υδρογόνου από

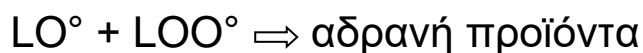
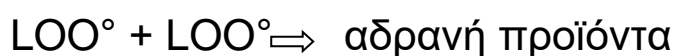
ένα άλλο μόριο (LH) προς σχηματισμό υπεροξειδίου (LOOH) και μιας άλλης ρίζας (L°). Η νέα ρίζα μπορεί να αντιδράσει με το οξυγόνο και να δώσει νέες ρίζες και υπεροξειδία. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται με τη μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης, σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Τα υπεροξειδία είναι άοσμα, αλλά διασπώνται σε αλδεΐδες, αλκοόλες και κετόνες, που προσδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή στις αλλοιωμένες λιπαρές ύλες, καθώς και υδρογονάνθρακες και αλκοξυλ-ρίζες (LO°).



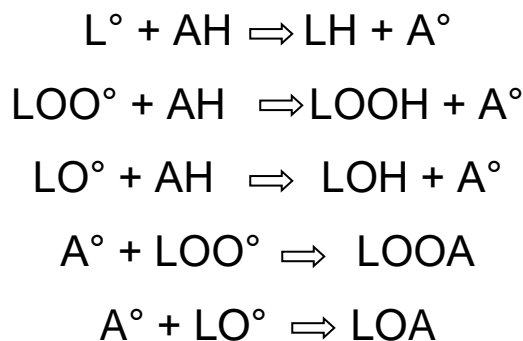
Στο στάδιο του τερματισμού, οι ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους, παρέχοντας αδρανή προϊόντα.



Η δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών, εντοπίζεται σε πολλά στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης της οξειδωσης. Με βάση τον τρόπο δράσης, τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες κατηγορίες:

- Τους παρεμποδιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης ή πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά (chain-breaking or primary antioxidants)
- Τα προστατευτικά ή δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά (preventive or secondary antioxidants) (Antolovich M., 2002).

Τα πρωτεύοντα καθυστερούν ή παρεμποδίζουν το στάδιο έναρξης, αντιδρώντας με τη 60^η ρίζα (L·) ή παρεμποδίζουν το στάδιο διάδοσης αντιδρώντας με τις υπεροξειδικές (LOO·) και αλκοξυλ-ρίζες (LO·). Παράλληλα, σχηματίζεται ελεύθερη αντιοξειδωτική ρίζα (A·), που δεν έχει την ικανότητα να αρχίσει και να προάγει νέα αλυσιδωτή αντίδραση, απλά μπορεί να αντιδράσει με τις ρίζες και να δώσει υπερόξυαντιοξειδωτικά συστατικά.



Τα δευτερεύοντα απλώς καθυστερούν τον ρυθμό της οξειδωσης. Υπάρχει όμως και τρίτος μηχανισμός, ο οποίος, αποτρέπει την οξειδωση μέσω συμπλοκοποίησης των μεταλλικών ιόντων, που καταλύουν την οξειδωση και δεν περιλαμβάνει ελεύθερες ρίζες. Εμποδίζει, απλώς, το μεταλλικό ιόν να συμμετάσχει σε αντιδράσεις αποικοδόμησης των υπεροξειδίων (LOOH), και κατά συνέπεια τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. (Δημακοπούλου Αγγελική, 2014), (D. Belitz, 2015), (Sagar B., 2011), (Yu-Tang Tung, 2007).

2.3 Μέθοδοι Εκτίμησης της Δραστικότητας των Αντιοξειδωτικών

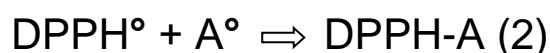
Ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος και τις συνθήκες της οξειδωσης, πολλά αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν ταυτόχρονα, με περισσότερους από έναν μηχανισμούς. Το φαινόμενο, γίνεται ακόμα πιο πολύπλοκο, όταν συνυπάρχουν δύο ή περισσότερα αντιοξειδωτικά. Για τους λόγους που αναφέρθηκαν, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων, καθεμία από τις οποίες στοχεύει στην εκτίμηση της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών σε πολύ συγκεκριμένα συστήματα. Παρακάτω, θα αναλυθεί αποκλειστικά η μέθοδος δοκιμής με χρήση DPPH η οποία χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μέρος.

2.3.1 Μέθοδος Μέτρησης της Αποικοδόμησης της Ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH')

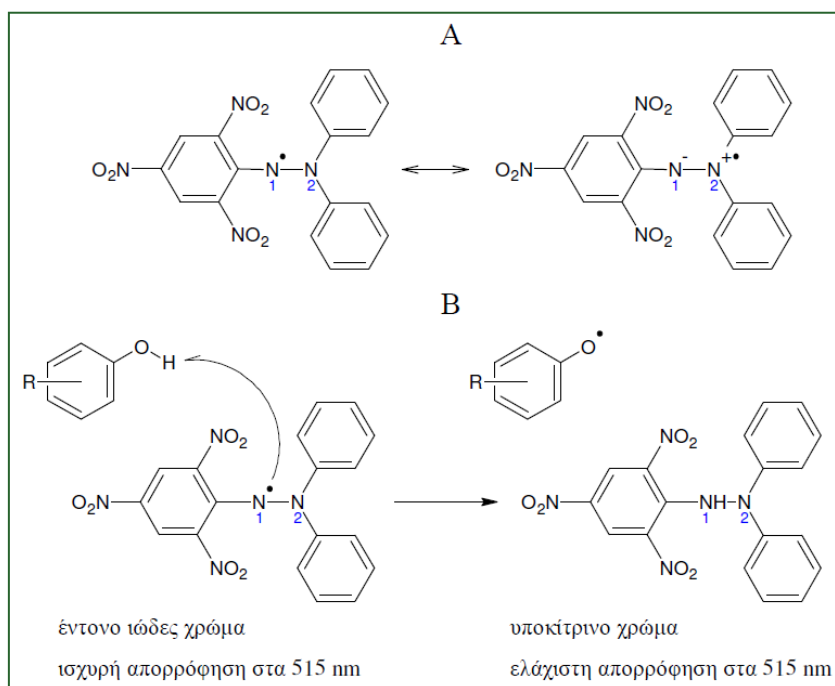
Στην συγκεκριμένη μέθοδο, ως αντιδραστήριο, χρησιμοποιείται η ρίζα του 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζιλίου (DPPH') που φέρει έντονο ιώδες χρώμα,

απορροφά ισχυρά στα 515 nm και εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα λόγω των αποκαθιστάμενων δομών συντονισμού (σχήμα Α).

Σύμφωνα με την μέθοδο, το αντιοξειδωτικό αντιδρά με την ρίζα του DPPH, είτε δίνοντάς του ένα υδρογόνο (αντίδραση 1), είτε με το να δεσμεύεται πάνω σε αυτήν (αντίδραση 2):



Η ρίζα, στην διάρκεια της αντίδρασης με την υπό εξέταση ένωση ή μίγμα ενώσεων, αποσπά άτομα υδρογόνου και παράγει την αντίστοιχη υδροζίνη. Η τελευταία ουσία, εξαιτίας της απουσίας του μονήρους ηλεκτρονίου απορροφά ελάχιστα στα μήκη κύματος της ορατής ακτινοβολίας (σχήμα Β). Ανάλογα με το πλήθος των φαινολικών υδρογόνων και την επιδεκτικότητα τους στην απόσπαση, η αντίδραση κάθε αντιοξειδωτικού με το DPPH διαφοροποιείται στοιχειομετρικά και κινητικά. Γενικά ένα αντιοξειδωτικό, χαρακτηρίζεται τόσο αποτελεσματικό όσο μεγαλύτερο είναι το πλήθος των ριζών που μπορεί να δεσμεύσει και μικρότερο το χρονικό διάστημα που επιτελεί τη δράση του (Τσιμογιάννης Δημήτριος, 2008).



Σχήμα 2.2.Α.Οι δύο δομές συντονισμού της ρίζας DPPH.

2.2.Β. Η αντίδραση του DPPH με τους δεσμευτές ελεύθερων ριζών

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Brand-Williams et al. (1995), η παραπάνω μέθοδος, έχει ευρύτατη εφαρμογή στη μελέτη πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων. Οι ερευνητές παρουσιάζουν την παράμετρο IC_{50} εκφρασμένη ως $mol_{antiox.}/mol_{DPPH}$ ή $g_{antiox.}/kg_{DPPH}$, που υποδηλώνει την ποσότητα αντιοξειδωτικού για την δέσμευση του 50% δεδομένης ποσότητας DPPH. (Τσιμογιάννης Δημήτριος, 2008), (Touriño S. 2005), (Kriengsak Thairong, 2006), (Marinova, G., 2011), (Sagar B., 2011)

2.4 Αντιοξειδωτική Δράση και Ασθένειες

2.4.1 Αντιοξειδωτική Δράση Έναντι των Καρδιαγγειακών Νοσημάτων

Πλήθος ερευνών, αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των αντιοξειδωτικών θρεπτικών συστατικών στην πρόληψη ασθενειών. Επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν ότι η υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, τα οποία είναι πλούσια σε βιταμίνη C και καροτενοειδή καθώς και σε άλλα θρεπτικά συστατικά, σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο έναντι καρδιακών νοσημάτων. Επιπρόσθετα, υψηλές προσλήψεις βιταμίνης E σχετίζονται με χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων σύμφωνα με εκτεταμένες μελέτες στις οποίες εξετάστηκαν μεγάλες ομάδες ανδρών και γυναικών.

2.4.2 Αντιοξειδωτική Δράση Έναντι της Καρκινογένεσης

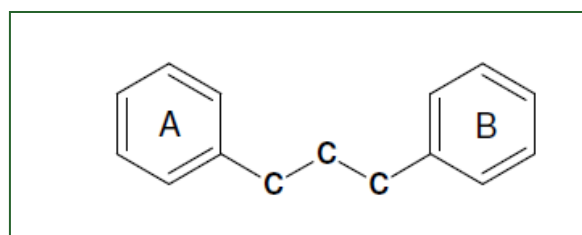
Τα φαινορικά αντιοξειδωτικά με πηγή προέλευσης τα φρούτα και τα λαχανικά, είναι γνωστά για την δράση τους ενάντια στην καρκινογένεση. Η δράση τους, εντοπίζεται στην προστασία του DNA, με καταστροφή των ελεύθερων ριζών. Επιπρόσθετα, πολλές από αυτές τις ουσίες «μπλοκάρουν» συγκεκριμένες καρκινογενετικές οδούς (G. P. Abdulla M., 2000). Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν την καρκινογένεση επηρεάζοντας τα μοριακά γεγονότα των σταδίων έναρξης, προώθησης και εξέλιξης (L.J.M. Yang C.S., 2001). Συνοπτικά, τα αντιοξειδωτικά έχουν κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση. (P. K. Colic M., 2000), (Δημακοπούλου Αγγελική, 2014)

3. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή κατέχουν ιδιαίτερη θέση ανάμεσα στα φυσικά αντιοξειδωτικά. Αποτελούν συστατικά όλων των φυτών, ενώ παράλληλα είναι από τις πιο περίπλοκες και σύνθετες κατηγορίες χημικών στη φύση. Τα φλαβονοειδή, συμπεριλαμβάνονταν ανέκαθεν στην ανθρώπινη διατροφή, μέσω της κατανάλωσης φρούτων λαχανικών και καρπών. Τα φλαβονοειδή, ως δευτερογενή προϊόντα των φυτών, έχουν προσελκύσει εδώ και χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών κυρίως για τις ιδιότητες που προσδίδουν στα φυτά, όπως για παράδειγμα οι κόκκινες, μπλε και μωβ χρωστικές ουσίες (Alva Maimoona, 2011), (Nijveldt J.Robert et al., 2001)

3.1 Μοριακή Δομή και Κατηγορίες Φλαβονοειδών

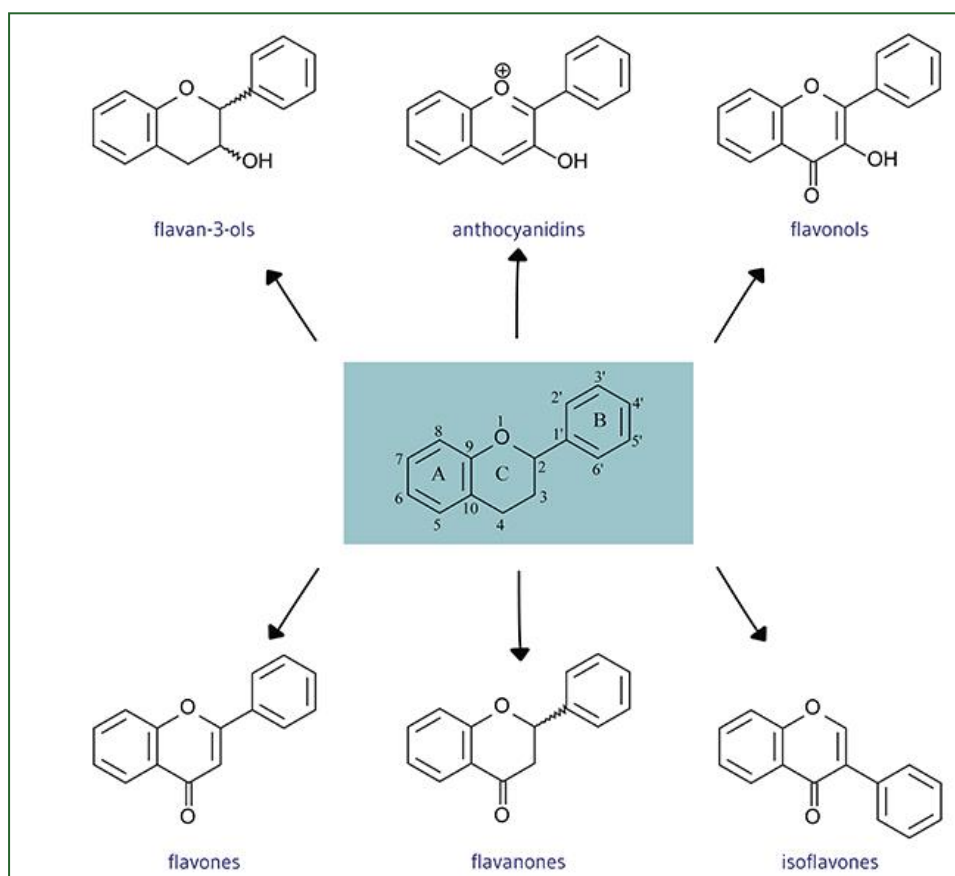
Μέχρι σήμερα, έχει συγκεντρωθεί ένας πλούτος πληροφοριών, σχετικά με την δομή, τις χημικές δραστηριότητες αλλά και τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ενώσεων. Στο παρακάτω σχήμα, παρατίθεται η βασική μοριακή δομή των φλαβονοειδών.



Σχήμα 3.1. Βασικός μοριακός σκελετός των φλαβονοειδών.

Τα φλαβονοειδή, αποτελούν μια ποικιλόμορφη οικογένεια αρωματικών μορίων. Οι βιοχημικές δραστηριότητες των φλαβονοειδών και οι μεταβολίτες τους εξαρτώνται από τη χημική τους δομή και από τον σχετικό προσανατολισμό των διαφόρων τμημάτων, επί το μόριο. Οι ενώσεις αυτές, είναι ταξινομημένες βάση της χημικής τους δομής. Η ταξινόμηση,

περιλαμβάνει έξι μεγάλες υποομάδες, οι οποίες απαντώνται στα περισσότερα ανώτερα φυτά. Οι ομάδες αυτές είναι: οι χαλκόνες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανδιόλες, οι ανθοκυανίνες, και οι συμπυκνωμένες ταννίνες (ή προανθοκυανιδίνες). Μερικά είδη φυτών, συνθέτουν επίσης εξειδικευμένες μορφές φλαβονοειδών, όπως τα ισοφλαβονοειδή που βρίσκονται στα όσπρια. Επιπρόσθετα, μια άλλη ομάδα ενώσεων, τα στυλβένια, τα οποία είναι στενά συνδεδεμένα με τα φλαβονοειδή, συντίθενται από μια ομάδα μη συνδεδεμένων, μεταξύ τους ειδών. Παρακάτω παρατίθεται η μοριακή δομή κάποιων κύριων κατηγοριών φλαβονοειδών. (Nijveldt J.Robert, 2001), (Li-Ping Guan et al., 2016), (Cyvind M. Andersen, 2006)

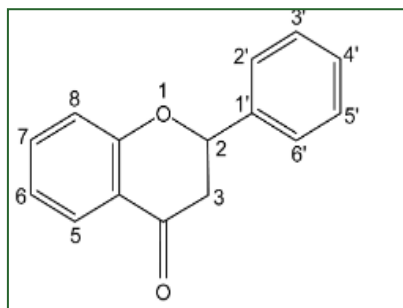


Σχεδιάγραμμα 3.2. Μοριακή δομή κατηγοριών φλαβονοειδών από την αρχική μορφή

3.1.1 Φλαβόνες

Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται, η λουτεολίνη και η απιγενίνη. Πλούσια πηγή σε φλαβόνες, αποτελεί το σέλινο, το μαϊντανό, τα διάφορα βότανα, καθώς και η καυτερή πιπεριά. Οι φλαβόνες, σχετίζονται συνολικά με

τα οφέλη της αντιοξειδωτικής δράσης καθώς και με τον μεταβολισμό των φαρμάκων. (Stalikas D. Constantine, 2007), (Nijveldt J.Robert, 2001), (Li-Ping Guan et al., 2016), (Cyvind M. Andersen, 2006)



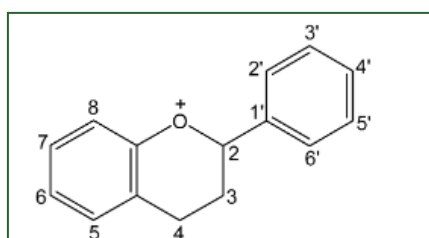
Σχήμα 3.3. Φλαβόνες

Πίνακας 3.4. Φλαβόνες

Φλαβόνες				
Θέση				
Σύνδεσης	5	7	3'	4'
Apigenin	OH	OH	-	OH
Luteolin	OH	OH	OH	OH
Chrysin	OH	OH	-	-

3.1.2 Ανθοκυανιδίνες

Τα κύρια μέλη της κατηγορίας, είναι η μαλβιδίνη, και η κυανιδίνη. Καλή πηγή ανθοκυανιδινών, είναι τα κόκκινα, μωβ και μπλε μούρα, τα ρόδια, τα δαμάσκηνα, το ερυθρό κρασί, αλλά και τα κόκκινα και μωβ σταφύλια. Η δράση των ανθοκυανιδινών, συνδέεται με την υγεία της καρδιάς, ενώ επιπρόσθετα, έχουν αντιοξειδωτική δράση και βοηθούν με την παχυσαρκία και την πρόληψη του διαβήτη. (Stalikas D. Constantine, 2007), (Nijveldt J.Robert, 2001), (Li-Ping Guan et al., 2016), (Cyvind M. Andersen, 2006)



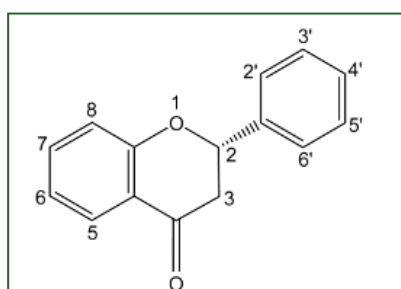
Σχήμα 3.5. Ανθοκυανιδίνες

Πίνακας 3.6. Ανθοκυανιδίνες

Ανθοκυανιδίνες						
Θέση Σύνδεσης	3	5	7	3'	4'	5'
Cyaniding	OH	OH	OH	OH	OH	-
Cyanin	O-Glu	OH	OH	OH	OH	-
peonidin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	-
Delphinidin	-	OH	OH	OH	-	OH
Perargonidin	OH	OH	OH	-	OH	-
malvidin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃

3.1.3 Φλαβονόνες

Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται η εσπερετίνη, η εριοδικτυόλη και η ναριγκενίνη. Οι φλαβονόνες, βρίσκονται σε αφθονία στα εσπεριδοειδή. Συνδέονται με την καρδιαγγειακή υγεία, τη χαλάρωση και τη συνολική αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. (Stalikas D. Constantine, 2007), (Nijveldt J.Robert, 2001), (Li-Ping Guan et al., 2016), (Cyvind M. Andersen, 2006)



Σχήμα 3.7. Φλαβονόνες

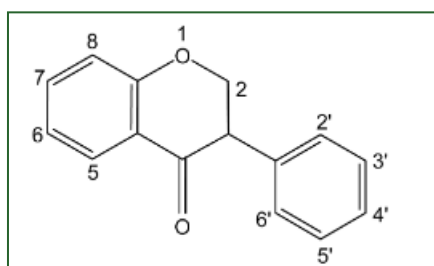
Πίνακας 3.8. Φλαβονόνες

Φλαβονόνες				
Θέση Σύνδεσης	5	7	3'	4'

Naringenin	OH	OH	-	OH
Naringin	OH	O-Rha-Glu	-	OH
Hesperidin	OH	O-Rha-Glu	OH	OCH ₃
hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃

3.1.4 Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες, είναι μια υποομάδα με κύρια ένωση την γλυκιτεΐνη. Βρίσκονται στη σόγια και τα προϊόντα της, καθώς και στα όσπρια. Οι ενώσεις αυτές, είναι φυτοοιστρογόνα, δηλαδή χημικές ουσίες με παρεμφερή δράση, με την ορμόνη οιστρογόνο. Οι επιστήμονες υποψιάζονται, ότι μπορεί να είναι επωφελείς στη μείωση του κινδύνου, των ορμονικών καρκίνων, όπως του μαστού, του ενδομητρίου και του προστάτη, με τις έρευνες ωστόσο, να βρίσκονται σε πολύ πρώιμο στάδιο. Σε διάφορες μελέτες, οι ισοφλαβόνες, άλλοτε δρουν ως αντιοξειδωτικά και μερικές φορές ως οξειδωτικά, γεγονός που κάνει πιο δύσκολη την ερμηνεία τους στην αντικαρκινική δράση. (Stalikas D. Constantine, 2007), (Nijveldt J.Robert, 2001), (Li-Ping Guan et al., 2016), (Cyvind M. Andersen, 2006)



Σχήμα 3.9. Ισοφλαβόνες

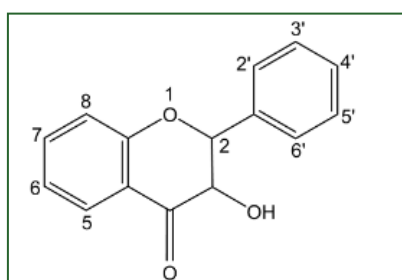
Πίνακας 3.10. Ισοφλαβόνες

Ισοφλαβόνες			
Θέση Σύνδεσης	5	7	4'
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	O-Glu	OH
Daidzein	-	OH	OCH ₃

Daidzin	-	O-Glu	OH
ononon	OH	O-Glu	CH ₃

3.1.5 Φλαβονόλες

Η πιο γνωστή ένωση της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι η κερκετίνη, η οποία αποτελεί και πρότυπη ουσία στην διεξαγωγή των παρακάτω πειραμάτων. Οι φλαβονόλες, βρίσκονται στα κρεμμύδια, τα πράσα, τα λαχανάκια Βρυξελλών, το λάχανο, το μπρόκολο, το τσάι, τα μούρα, τα φασόλια και τα μήλα. Η κερκετίνη, είναι ένα αντιισταμινικό, ενώ είναι γνωστή και για τα αντιφλεγμονώδη οφέλη της. (Stalikas D. Constantine, 2007), (Nijveldt J.Robert, 2001), (Li-Ping Guan et al., 2016), (Cyvind M. Andersen, 2006)



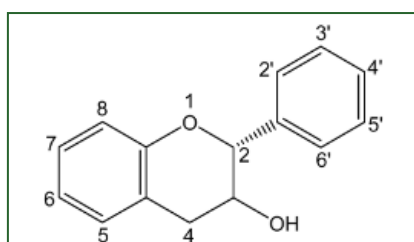
Σχήμα 3.11. Φλαβονόλες

Πίνακας 3.12. Φλαβονόλες

Φλαβονόλες					
Θέση					
Σύνδεσης	5	7	3'	4'	5'
Quercetin	OH	OH	OH	OH	-
Kaempferol	OH	OH	-	OH	-
Galangin	OH	OH	-	-	-
Fisetin	-	OH	OH	OH	-
Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH

3.1.6 Φλαβανόλες

Στην κατηγορία αυτή υπάγονται τρεις τύποι ενώσεων : οι μονομερείς, (ευρύτερα γνωστές ως κατεχίνες), τα διμερή και τα πολυμερή. Οι φλαβανόλες, εντοπίζονται στο τσάι, το κακάο, τα σταφύλια, τα μήλα, τα μούρα, τη φάβα και το κόκκινο κρασί. Οι κατεχίνες, απαντώνται ιδιαίτερα στο πράσινο και το λευκό τσάι, ενώ τα διμερή, τα οποία συνδέονται με τη μείωση της χοληστερόλης, βρίσκονται στο μαύρο τσάι. Οι επιστήμονες, υποψιάζονται ότι οι κατεχίνες, μπορεί συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων του συνδρόμου χρόνιας κόπωσης. Οι κατεχίνες, συνδέονται επίσης με την καρδιαγγειακή και νευρολογική υγεία. (Stalikas D. Constantine, 2007), (Nijveldt J.Robert, 2001), (Li-Ping Guan et al., 2016), (Cyvind M. Andersen, 2006)



Σχήμα 3.13. Φλαβανόλες

Πίνακας 3.14. Φλαβανόλες

Φλαβανόλες (Flavan-3-ols)						
Θέση Σύνδεσης	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-Catechin	βOH	OH	OH	OH	OH	-
(-)-Epicatechin	αOH	OH	OH	OH	OH	-
(-)-Epigallocatechin	αOH	OH	OH	OH	OH	OH

3.2 Ιδιότητες Φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή ήταν γνωστά για τις ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία, πολύ πριν απομονωθούν. Σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες, από 4.000 ποικιλίες φλαβονοειδών. Οι πολλαπλές ιδιότητες τους παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω. Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή:

- Ευθύνονται για τα ελκυστικά χρώματα των λουλουδιών, φρούτων, αλλά και των φύλλων.
- Προσελκύουν (ιδιαίτερως η ανθοκυανιδίνες), επικονιαστές, εξασφαλίζοντας την γονιμότητα του φυτού και ευθύνονται για την διασπορά των σπόρων.
- Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ανακαλύψεις του Mendel περί γενετικής.
- Παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες και συμμετέχουν με αυτόν τον τρόπο στην άμυνα του φυτού.
- Προστατεύουν τα φυτά από την ηλιακή ακτινοβολία.
- Ευθύνονται για τα αντικαρκινικά οφέλη τροφών. (Winkel-Shirley Brenda, 2001)

Όσο αφορά την συμβολή τους στις ανθρώπινες ασθένειες, παρακάτω παρουσιάζονται δράσεις των φλαβονοειδών, που τα καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικές ενώσεις, στην προάσπιση της ανθρώπινης υγείας.

Αντιοξειδωτική δράση

Ικανότητά μείωσης του σχηματισμού ελεύθερων ριζών ή και καταπολέμησης τους. Τα πιο ισχυρά φλαβονοειδή είναι οι φλαβόνες και οι κατεχίνες. Οι ενώσεις αυτές, μπορούν να παρεμβαίνουν με περισσότερες από τρεις διαφορετικές ρίζες και να παράγουν ελεύθερα συστήματα, αλλά και να αυξάνουν τη λειτουργία των ενδογενών αντιοξειδωτικών.

Αντιφλεγμονώδη δράση

Τα φλαβονοειδή έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία οφείλεται στην αναστολή ενζυμικών συστημάτων, που εμπλέκονται στο σχηματισμό και την εξέλιξη της φλεγμονής.

Αντιαθηροσκληρωτική δράση

Τα φλαβονοειδή, έχουν σημαντική επίδραση στο αγγειακό σύστημα. Διάφορες κλινικές μελέτες, αναφέρουν, πως η λήψη φλαβονοειδών συμβάλει στην προστασία, κατά της στεφανιαίας νόσου.

Αντικαρκινική δράση

Τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την καρκινογένεση. Αποτελούν ισχυρούς αναστολείς πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Μελέτες δείχνουν ότι σχετίζονται με την προστασία κατά του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και την παρεμπόδιση δημιουργίας μελανωμάτων.

Αντι-ική δράση

Ορισμένες κατηγορίες φλαβονοειδών, έχουν την ικανότητα να λειτουργούν, σε διαφορετικά στάδια του κύκλου αντιγραφής των ιών. Για παράδειγμα, ορισμένα φλαβονοειδή λειτουργούν στην ενδοκυτταρική αντιγραφή των ιών, ενώ άλλα, αναστέλλουν τις μολυσματικές ιδιότητες των ιών. Γνωστή είναι η κερκετίνη, η οποία έχει αναφερθεί ως το φλαβονοειδές που εμφανίζει αντιμολυσματική δράση. (Winkel-Shirley Brenda, 2001), ([Nijveldt J.Robert](#), 2001), ([Li-Ping Guan](#), 2016), (Cyvind M. Andersen, 2006)

4. Φαινολικές Ενώσεις

Ένα πλήθος οργανικών μορίων, γνωστό ως “δευτερογενείς μεταβολίτες”, είναι αποτέλεσμα φυτοχημικής σύνθεσης των αγγειωδών φυτών. Οι πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης, σχετίζονται με την μορφολογία και την ανάπτυξη των φυτών. Συγκεκριμένα, τα μόρια αυτά, διαδραματίζουν πληθώρα ρόλων, από δομικούς μέχρι και προστατευτικούς. Συντίθενται, από τα φυτά, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους και τα προστατεύουν από κινδύνους όπως μόλυνση, τραυματισμό, υπεριώδη ακτινοβολία, κλπ. Παράλληλα, εξασφαλίζουν και την προστασία των καρπών, πριν και μετά την διαδικασία της γονιμοποίησης. Οι πολυφαινόλες έχουν διάφορες εφαρμογές στη βιομηχανία (παραγωγή χαρτιού, χρωμάτων), καθώς και στην κοσμετολογία (παραγωγή καλλυντικών, φυτικών χρωμάτων, φαρμάκων). (Stalikas D., 2007), (Bravo Laura, 1998)

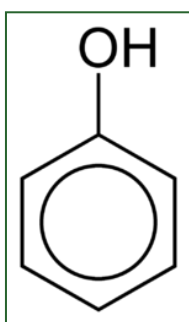
4.1 Χημεία των Φαινολικών Ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις, είναι από τις πιο πολυάριθμες και ευρέως καταναμημένες ομάδες ουσιών, στο φυτικό βασίλειο. Μέχρι σήμερα, αναγνωρίζονται περισσότερες από 8000 φυσικές ενώσεις, με φαινολική δομή. Βιογενετικά, προκύπτουν από δύο πιθανές συνθετικές οδούς: την οδό του σικιμικού οξέος (the shikimate pathway) και την οδό του οξικού οξέος (the acetate pathway).

Οι φυσικές πολυφαινόλες, μπορούν να κυμαίνονται από απλά μόρια, όπως φαινολικά οξέα, μέχρι εξαιρετικά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως είναι οι τανίνες. Εντοπίζονται κυρίως, σε συζευγμένη μορφή, με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα σακχάρου που συνδέονται με ομάδες υδροξυλίου. Τα σχετικά αυτά σάκχαρα, μπορούν να υπάρχουν ως μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ή ακόμη και ως ολιγοσακχαρίτες. Η γλυκόζη, είναι το πιο κοινό υπόλειμμα σακχάρου, ωστόσο συχνά συναντώνται επίσης η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη. Οι φαινολικές ενώσεις, συνδέονται επίσης και με

άλλες ενώσεις, όπως είναι τα καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, οι αμίνες και τα λιπίδια ενώ τέλος συνήθεις είναι και οι συνδέσεις με άλλες φαινόλες.

Σύμφωνα με τον Harborne (1984), οι πολυφαινόλες, μπορούν να διαιρεθούν σε τουλάχιστον 10 διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με βασική χημική δομή τους. Όλες όμως έχουν ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό, έναν αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο άμεσα με έναν τουλάχιστον υποκαταστάτη υδροξυλίου, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.1. (Stalikas D., 2007), (Bravo Laura, 1998), (Harborne J. B., 1984)



Σχήμα 4.1. Βασική χημική δομή φαινόλης.

Μια απλή ταξινόμηση, διαιρεί την ευρεία κατηγορία των φαινολικών, σε απλές φαινόλες και πολυφαινόλες, βασιζόμενη αποκλειστικά, στον αριθμό των φαινολικών υπομονάδων. Έτσι, ο όρος "φυτό-φαινολικά" περιλαμβάνει από απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, κουμαρίνες, φλαβονοειδή, στιλβένια, μέχρι υδρολυόμενες και συμπυκνωμένες τανίνες, λιγνάνες και λιγνίνες. Οι ενώσεις αυτές, αποτελούν ιδιαίτερα δραστικές ουσίες, λόγω του όξινου χαρακτήρα των υδροξυλικών ομάδων και των πυρηνόφιλων ιδιοτήτων των φαινολικών δακτυλίων.

Μεταξύ των συνηθέστερων και σημαντικότερων χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικών ενώσεων, είναι τα απλά φαινολικά παράγωγα και φλαβονοειδή. Οι απλές φαινόλες (C₆), όπως η ίδια η φαινόλη, η κρεζόλη, η θυμόλη, η ρεσορκινόλη, η ορκινόλη, κ.λπ., είναι ευρέως διαδεδομένες μεταξύ των διαφόρων ειδών φυτών, συμπεριλαμβανομένων της υδροκινόνης και των παραγώγων φλορογλουκινόλης. Οι φαινολικές ενώσεις με μοριακή δομή C₆-C₁, όπως είναι τα φαινολικά οξέα (π.χ. γαλλικό, βανιλικό, συριγγικό, p-υδροξυβενζοϊκό) αλλά και οι αλδεΐδες (π.χ. η βανιλίνη, η συριγγανδεΐδη και η

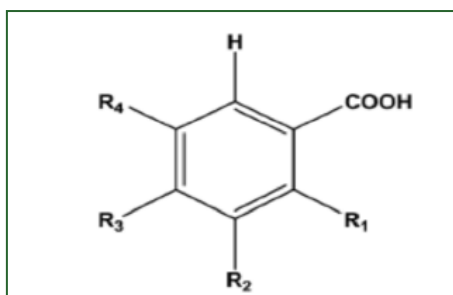
p-υδροξυβενζαλδεΐδη), είναι επίσης αρκετά διαδεδομένες σε ανώτερα φυτά και φτέρες. Τα φαινολοξικά οξέα και οι ακετοφαινόνες (C₆-C₂) περιγράφονται λιγότερο συχνά στην βιβλιογραφία. Τα φαινυλοπροπανοειδή παράγωγα (C₆-C₃) είναι μια επίσης σημαντική ομάδα φαινολικών, χαμηλού μοριακού βάρους. Οι χρωμόνες είναι λιγότερο γνωστές από τις κουμαρίνες. Οι πιο σημαντικές ενώσεις, από αυτή την κατηγορία είναι τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (όπως το p-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το σιναπικό) αλλά και τα παράγωγά τους. Τα φαινυλοπροπανοειδή, καθώς και οι πιο απλές φαινόλες (όπως βενζοϊκό οξύ και τα παράγωγα βενζαλδεΐδης), συνδέονται κυρίως με πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος. Τα φλαβονοειδή, αποτελούν την πιο κοινή και ευρέως κατανεμημένη ομάδα φυτικών φαινολικών. Στην κατηγορία, όμως των φλαβονοειδών έγινε εκτενέστερη αναφορά στο προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφ 3). (Stalikas D., 2007), (Bravo Laura, 1998), (Harborne J. B., 1984)

4.1.1 Φαινολικά Οξέα

Ο όρος «φαινολικά οξέα», γενικά, ορίζει φαινόλες που κατέχουν την λειτουργικότητα ενός καρβοξυλικού οξέος. Ωστόσο, όταν μιλάμε για μεταβολίτες φυτών, γίνεται αναφορά σε μια ξεχωριστή ομάδα των οργανικών οξέων. Τα φαινολικά οξέα, περιέχουν δύο ξεχωριστά ανθρακικά πλαίσια, τις υδροξυκινναμωμικές και υδροξυβενζοϊκές δομές. Αν και ο βασικός σκελετός παραμένει ο ίδιος, οι αριθμοί και οι θέσεις των ομάδων υδροξυλίου επί του αρωματικού δακτυλίου, διαφοροποιούνται και δημιουργούν ποικιλία ενώσεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα φαινολικά οξέα δε βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή στα φυτά. Οι καρβοξυλομάδες τους μετασχηματίζονται σε εστέρες και αμίδες. Οι υδροξυλομάδες τους, είναι πολύ δραστικές. Τα φαινολικά οξέα, απασχολούν τους ερευνητές εξαιτίας των αντιβιοτικών και αντισηπτικών ιδιοτήτων τους (Stalikas D., 2007), (Bravo Laura, 1998). Οι δυο κατηγορίες των φαινολικών οξέων παρατίθενται παρακάτω:

1. Τα βενζοϊκά οξέα

Τα οξέα αυτά, δεν βρίσκονται ελεύθερα στα φυτά. Συμμετέχουν στη δομή ταννινών και αποτελούν ένα από τα κύρια συστατικά τους. Τα κύρια βενζοϊκά οξέα είναι: το βανιλλικό, το γαλλικό, το p-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό και το συριγγικό οξύ. (σχήμα 4.2)



Σχήμα 4.2. Γενική μορφή υδροξυβενζοϊκών οξέων

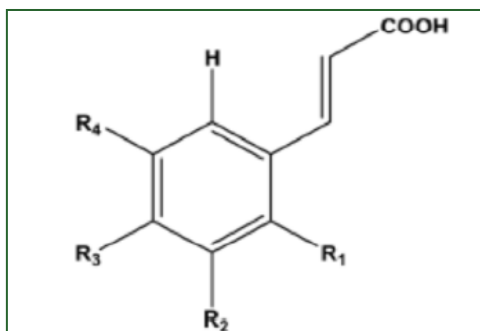
Πίνακας 4.3. Κατηγορίες υδροξυβενζοϊκών οξέων

Υδροξυβενζοϊκά Οξέα (Hydroxybenzoic Acids)				
Όνοματολογία	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Benzoic acid	H	H	H	H
p-Hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H
Vanillic acid	H	OCH ₃	OH	H
Gallic acid	H	OH	OH	OH
Photocatechuic acid	H	OH	OH	H
Syringic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Gentistic acid	OH	H	H	OH
Veratric acid	H	OCH ₃	OCH ₃	H
Salicylic acid	OH	H	H	H

2. Τα Κινναμωμικά οξέα

Τα κινναμωμικά οξέα, σχηματίζονται από την φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη. Τα πιο γνωστά είναι : το καφεϊκό, το p-κουμαρικό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ (σχήμα 4.4). Τα κινναμωμικά οξέα (C₆-C₃) απαντώνται τόσο σε

ελεύθερη μορφή, όσο και εστεροποιημένα, κυρίως με τρυγικό οξύ. Επίσης έχουν βρεθεί γλυκοζίτες κινναμωμικών οξέων στους οποίους το σάκχαρο είναι η γλυκόζη. Ορισμένοι εστέρες των κινναμωμικών οξέων, με τρυγικό οξύ, οι οποίοι απαντώνται στο γλεύκος, αποτελούν υποστρώματα οξειδωσης. (Ζερβόπουλος Δ. Σωτήρης, 2010), (Stalikas D., 2007), (Bravo Laura, 1998)



Σχήμα 4.4 Γενική μορφή υδροξυκινναμικών οξέων

Πίνακας 4.5. Κατηγορίες υδροξυκινναμικών οξέων.

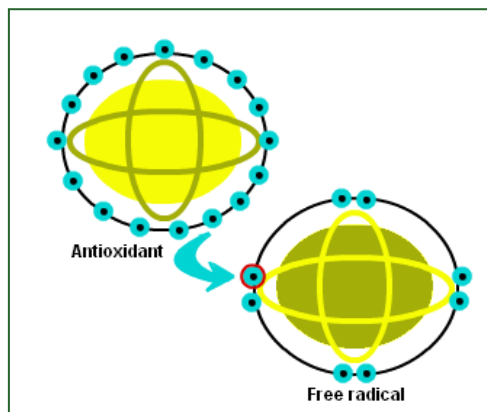
Υδροξυκινναμικά Οξέα (Hydroxycinnamic Acids)				
Ονοματολογία	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cinnamic acid	H	H	H	H
o-Coumaric acid	OH	H	H	H
m-Coumaric acid	H	OH	H	H
p-Coumaric acid	H	H	OH	H
Ferulic acid	H	OCH ₃	OH	H
Sinapic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Caffeic acid	H	OH	OH	H

4.2 Η Πολυλειτουργικότητα των Φαινολικών Ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις, επιδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ιδιοτήτων:

- ✚ Αντιαλλεργική
- ✚ Αντι-φλεγμονώδη
- ✚ Αντι-μικροβιακή
- ✚ Αντι-θρομβωτική

- ✚ Καρδιοπροστατευτική και αγγειοδιασταλτική
- ✚ Αντιοξειδωτική δράση. (Winkel-Shirley Brenda, 2001), (Dieter Treutter, 2010), (Nagendran Balasundram, 2006)



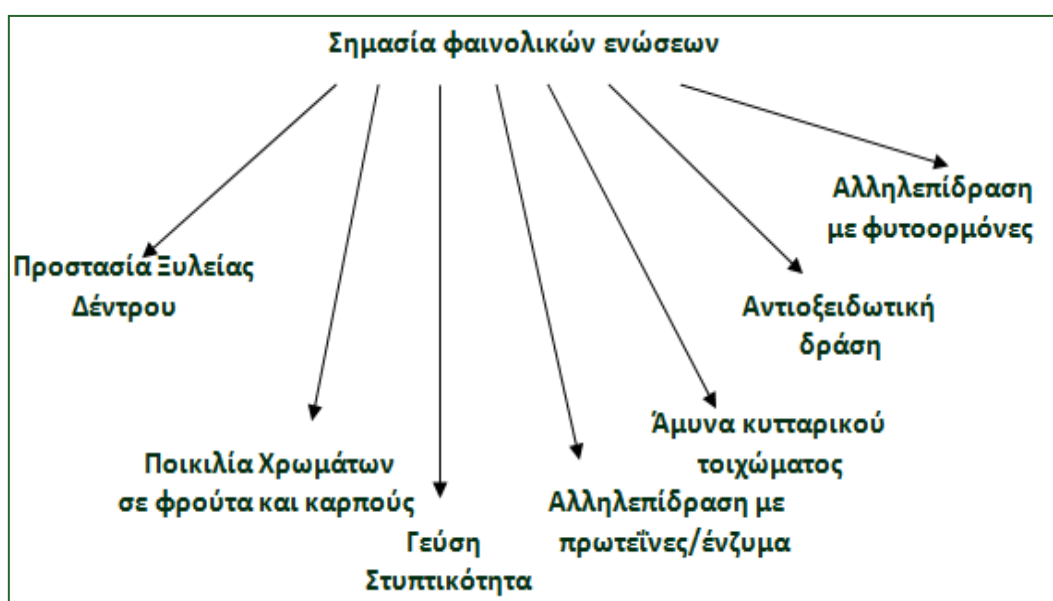
Σχήμα 4.6. Δράση αντιοξειδωτικού σε ελεύθερη ρίζα.

4.2.1. Σχέσεις Δομής - Δραστηκότητας στην Αντιοξειδωτική Δράση

Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, παρέχοντας άτομα υδρογόνου ή κατιόντα μετάλλων, είναι η πηγή της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Laura Bravo, 1998). Η δομή τους, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της δράσης τους, και αυτό αναφέρεται, ως σχέσεις δομής-δραστηκότητας (structure–activity relationships - SAR). Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων, για παράδειγμα, η αντιοξειδωτική δράση εξαρτάται από τον αριθμό και τις θέσεις των ομάδων υδροξυλίου σε σχέση με την λειτουργική ομάδα καρβοξυλίου. Τα μονοϋδροξυ- βενζοϊκά οξέα με χαρακτηριστική ομάδα -OH στην όρθο- ή πάρα-θέση προς την ομάδα -COOH δεν εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, με εξαίρεση το μ-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Rice-Evans et al., 1996). Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων, αυξάνει με την αύξηση του βαθμού υδροξυλίωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της περίπτωσης αυτής, είναι το τριϋδροξυλυμένο γαλλικό οξύ, το οποίο παρουσιάζει μια υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, η υποκατάσταση των ομάδων υδροξυλίου στη θέση 5,3 και με μεθοξύλια όπως στο συριγγικό οξύ μειώνει τη δραστηριότητα (Rice-Evans et al., 1996). Επιπρόσθετα, τα υδροξυκιναμωμικά οξέα εμφανίζουν υψηλότερη

αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Η υψηλότερη δράση του υδροξυκιναμωμικού οξέως θα μπορούσε να οφείλεται στην παρουσία δεσμών $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, που θα εξασφαλίζει μεγαλύτερη ικανότητα δότην Η- και σταθεροποίηση των ριζών, από την ομάδα $-\text{COOH}$ ομάδα στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Rice-Evans et al., 1996). Οι σχέσεις δομής-δραστικότητας (SAR) των φλαβονοειδών είναι γενικά πιο περίπλοκη από ό, τι εκείνη των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκιναμωμικών οξέων λόγω της σχετικής πολυπλοκότητας των φλαβονοειδών μορίων (Dieter Treutter, 2010), (Nagendran Balasundram, 2006). Στο κεφάλαιο 3 έχει γίνει εκτενής αναφορά στην αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών ενώσεων.

Συνοπτικά, παρουσιάζονται οι πολλαπλές δράσεις-οφέλη των φαινολικών ενώσεων σε διάφορους τομείς στο διάγραμμα που απεικονίζεται παρακάτω:



Διάγραμμα 4.7. Πολυλειτουργικότητα φαινολικών ενώσεων

5. Οργανολογία

Γενικά οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χημικής ανάλυσης, όπου ανήκει η Φασματοφωτομετρία UV-VIS, η υγρή χρωματογραφία LC αλλά και η φασματομετρία μάζας, χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την επίλυση διαφόρων χημικών προβλημάτων, που σχετίζονται με τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση, την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων, κ.α. Τα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι:

- Χρήση μικρής ποσότητας δείγματος.
- Μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία.
- Μικρός χρόνος μέτρησης. (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980)

5.1 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (Uv-Vis)

5.1.1 Γενικά

Η Φασματομετρία UV-Vis, στηρίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (~190- 800 nm), από τα μόρια των διαφόρων χημικών ενώσεων, τα οποία υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Η απορρόφηση στο UV-Vis, δεν χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο (όπως συμβαίνει με την φασματομετρία υπερύθρου, IR), αλλά δίνει πληροφορίες για ομάδες ατόμων στο μόριο. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση, ονομάζεται χρωμοφόρο και η απεικόνιση της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος, παρέχει το φάσμα απορρόφησης της υπό προσδιορισμό ουσίας.

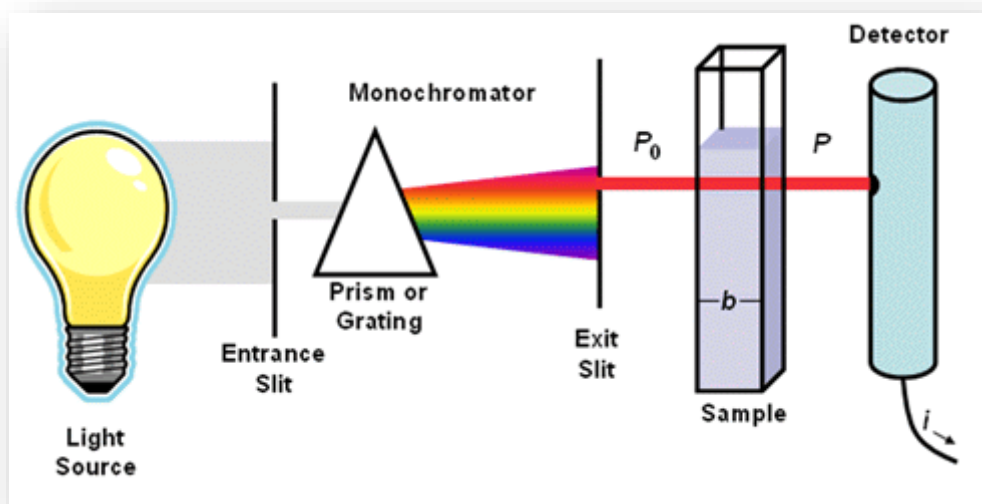
Η συνήθης οργανολογία και οι εφαρμογές της Φασματομετρίας UV-Vis περιορίζονται από το εγγύς υπεριώδες (190-400 nm) έως και το ορατό (400-800 nm).

Σημαντική παράμετρος της τεχνικής, είναι η επιλογή του διαλύτη. Βασικό κριτήριο ενός καλού διαλύτη για φάσματα UV-VIS, είναι να μην απορροφά στην ίδια θέση με τη διαλυμένη ουσία. Συνήθως, οι διαλύτες που δεν έχουν συζυγιακούς διπλούς δεσμούς, είναι οι πιο κατάλληλοι. Οι πιο κοινοί διαλύτες είναι: το νερό, η αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) και το κανονικό - εξάνιο ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), που δεν απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους των περισσότερων οργανικών ενώσεων. Άλλοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνά, είναι: το ακετονιτρίλιο (190 nm), το χλωροφόρμιο (240 nm), το κυκλοεξάνιο (195 nm, κύρια απορρόφηση), το 1,4-διοξάνιο (215 nm), η μεθανόλη (205 nm), το ισοοκτάνιο (195 nm) κλπ. Η διαφορά μεταξύ πολικών και μη πολικών διαλυτών, είναι ότι οι πολικοί διαλύτες δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη διαλυμένη ουσία και εξασθενίζουν την λεπτή υφή του φάσματος, ενώ με τους πολικούς διαλύτες η λεπτή υφή παραμένει, όπως στο φάσμα της ουσίας σε αέρια κατάσταση. (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 2009), (Τσαμαντιώτη Λαμπρινή, 2015). Η φασματοσκοπία UV-Vis αποτελεί την παλαιότερη μέθοδο ταυτοποίησης φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών, με εκτεταμένη εφαρμογή ακόμη και σήμερα.

5.1.2 Φασματόμετρα Απλής Δέσμης

Από τον μονοχρωμάτορα του οργάνου εξέρχεται μία και μόνη δέσμη. Για την αφαίρεση της παράσιτης ακτινοβολίας, υπάρχουν δυο επιλογές: 1) Εισαγωγή του τυφλού διαλύματος (blank) στην κυψελίδα και ρύθμιση της κλίμακας ανάγνωσης του οργάνου, ώστε να δείχνει απορρόφηση $A=0$ και, ακολούθως, τοποθέτηση του δείγματος της προσδιοριζόμενης ουσίας και μέτρηση της απορρόφησης, 2) Πραγματοποίηση δυο μετρήσεων απορρόφησης, τυφλού και δείγματος και αφαίρεση του σήματος του τυφλού από το δείγμα.

Η χρησιμοποιούμενη πηγή φωτός είναι συνήθως λυχνία υδρογόνου ή δευτερίου. Για την απομόνωση της ακτινοβολίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος χρησιμοποιείται μονοχρωμάτορας. Επίσης, το φασματοφωτόμετρο περιέχει ανιχνευτή και ενισχυτή του σήματος. (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 2009)



Εικόνα 5.1. Φασματόμετρο απλής δέσμης

Στο σχήμα 5.1 απεικονίζεται το εσωτερικό ενός φασματόμετρου απλής δέσμης. Υπάρχουν επιπρόσθετα φασματόμετρα διπλής δέσμης, όπου η μελέτη του τυφλού και του δείγματος, γίνεται παράλληλα. Ωστόσο στην διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο απλής δέσμης.

5.2 Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας, LC/MS

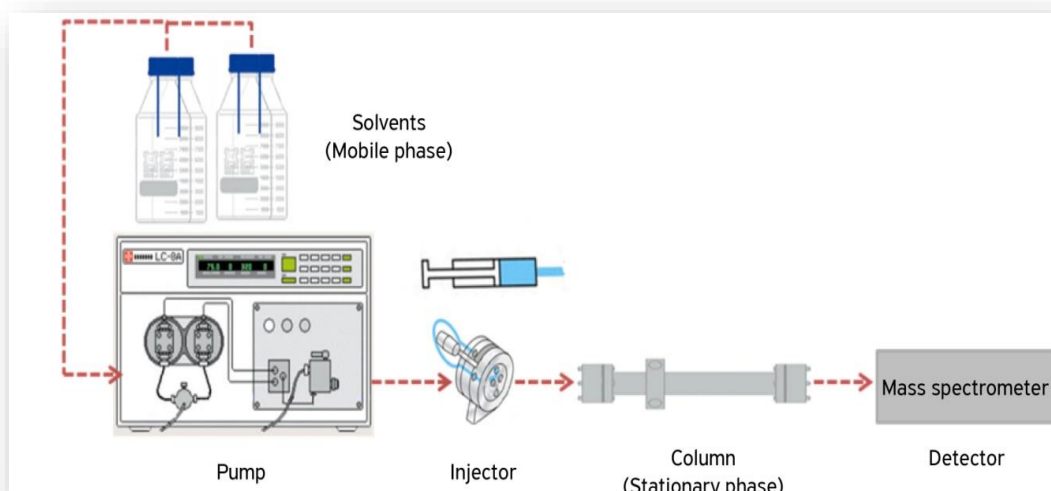
Η υγρή χρωματογραφία / φασματομετρία μάζας (LC / MS) είναι μία σημαντική αναλυτική τεχνική, που συνδυάζει την αναλυτική ικανότητα της υγρής χρωματογραφίας, με την εξειδίκευση της ανίχνευσης της φασματομετρίας μάζας. Η υγρή χρωματογραφία (LC), διαχωρίζει τα συστατικά του δείγματος και στη συνέχεια να τα εισάγει στο φασματόμετρο μάζας (MS). Η MS δημιουργεί και εντοπίζει τα φορτισμένα ιόντα. Τα δεδομένα LC / MS μπορεί να χρησιμοποιηθούν, για να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό βάρος, τη δομή, την ταυτότητα και την ποσότητα των επιμέρους συστατικών του δείγματος. Θέμα, μέχρι και σήμερα παραμένει η διεπαφή των δύο μεθόδων, η σύνδεση δηλαδή μεταξύ LC και MS. Η υγρή χρωματογραφία, χρησιμοποιεί υψηλή πίεση για το διαχωρισμό της υγρής φάσης και παράγει υψηλό φορτίο αερίου. Το φασματόμετρο μάζας, απαιτεί κενό και περιορισμένο φορτίο αερίου. Για παράδειγμα, η κοινή ροή από LC είναι 1

mL/min υγρού η οποία, όταν μετατρέπεται σε αέρια φάση, είναι 1 L/min. Ωστόσο, ένα τυπικό φασματομέτρο μάζας μπορεί να δεχθεί μόνο περίπου 1 mL/min αερίου. Επιπλέον, μια μονάδα LC λειτουργεί σε σχεδόν θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ αντίθετα μια μονάδα MS απαιτεί αυξημένη θερμοκρασία. Επιπρόσθετα, για τα δείγματα που αναλύονται από LC δεν υπάρχει εύρος μάζας, ενώ από την άλλη ο αναλυτής του MS θέτει περιορισμούς. Τέλος, μια άλλη ειδοποιός διαφορά, είναι ότι οι μονάδες LC μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα σε αντίθεση με τις μονάδες MS όπου προτιμώνται τα πτητικά ρυθμιστικά. (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 2009), (Λίτου Ζωή, 2002-2003)

5.2.1 Υγρή Χρωματογραφία LC

Η υγρή χρωματογραφία, είναι μια θεμελιώδης τεχνική διαχωρισμού, σε όλους τους τομείς της χημείας. Η τεχνική αυτή, μπορεί με ασφάλεια να διαχωρίσει, ένα πολύ ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων, από φάρμακα μικρού μοριακού βάρους μέχρι και πρωτεΐνες. Στην υγρή χρωματογραφία [Liquid Chromatography (LC)] η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση, μπορεί να είναι στερεή ή υγρή. Η LC βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή, σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία, με μοναδικό περιορισμό τη δυνατότητα διαλυτοποίησης των αναλυόμενων ουσιών στην κινητή φάση. Μη πτητικές και θερμό-ευαίσθητες ενώσεις διαχωρίζονται αποκλειστικά με υγρή χρωματογραφία. Τα δείγματα διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη και το διάλυμα εισάγεται στο φασματογράφο μαζών με μια κατάλληλη αντλία [π.χ., υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)]. Το υγρό, ψεκάζεται ώστε να φτιαχτούν σταγονίδια, τα οποία περνώντας από μια σειρά διαδικασιών, θα αφαιρέσουν το διαλύτη και θα μείνουν στερεά σωματίδια (δείγμα) που θα ιονιστούν. (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 2009), (Τσαμαντιώτη Λαμπρινή, 2015).

Στην εικόνα 5.2 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση μιας μονάδας υγρής χρωματογραφίας.



Εικόνα 5.2. Σχηματική παράσταση υγρού χρωματογράφου με φασματόμετρο μάζας.

5.2.2 Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας, είναι μια μέθοδος μεγάλης κλίμακας, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη ιονισμένων μορίων, σε αέρια φάση με στόχο τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό συστατικών ενός μείγματος, την αναγνώριση άγνωστων συστατικών, την ποσοτική ανάλυση γνωστών υλικών, τη μελέτη δραστηκότητας σε αέρια φάση, το χαρακτηρισμό φυσικών ιδιοτήτων των ιόντων και την απόκτηση δομικών πληροφοριών. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων), με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Είναι μια τεχνική, που σχετίζεται με πολύ υψηλά επίπεδα ιδιαιτερότητας και ευαισθησίας. Οι αναλύσεις, μπορούν συχνά να ολοκληρωθούν με πολύ μικρές ποσότητες - απαιτώντας ποσότητες υλικού, μερικές φορές μικρότερες από picogram. (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 2009), Fenn,

5.2.1.1 Βασικές Αρχές Λειτουργίας Φασματογράφου Μάζας

Η φασματομετρία μαζών, βασίζεται στην παραγωγή δέσμης, ιοντικών θραυσμάτων (fragments), με βομβαρδισμό των εξεταζόμενων μορίων, συνήθως με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Τα παραγόμενα θραύσματα στη

συνέχεια, διαχωρίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, ή με άλλες μεθόδους. Ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z), κάθε ιοντικού θραύσματος. Όπως γίνεται επομένως σαφές η φασματομετρία δεν μετράει απευθείας μάζα, αλλά το λόγο μάζα προς φορτίο. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα θραύσματα είναι μονοφορτισμένα ($z=1$) και για τον λόγο αυτό ο όρος "λόγος μάζα-προς-φορτίο", αντικαθίσταται από τον πλέον εύχρηστο όρο μάζα. Η φασματομετρία μάζας (MS), χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής για τεχνικές διαχωρισμού όπως η αέρια χρωματογραφία [Gas chromatography (GC)], ή η υγρή χρωματογραφία [Liquid chromatography (LC)], λόγω της μεγάλης της ευαισθησίας και της ικανότητάς της να αναγνωρίζει χημικές ενώσεις. Σε αυτό το συνδυασμό, περιλαμβάνονται συνήθως και τεχνικές ιονισμού. Επίσης χρησιμοποιείται ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων ίδιων σταδίων ανάλυσης μαζών. Η λειτουργία του φασματογράφου μάζας συνοψίζεται στα παρακάτω βήματα:

1. Δημιουργία ιόντων (μόρια που έχουν ηλεκτρικό φορτίο) σε αέρια φάση.
2. Διαχωρισμός των ιόντων στο χώρο ή το χρόνο ανάλογα με την λόγο μάζα-φορτίο.
3. Μέτρηση της ποσότητας των ιόντων (κάθε λόγου μάζας-φορτίου).

Οι τέσσερις σημαντικοί παράμετροι της τεχνικής είναι η μάζα, το φορτίο, η ταχύτητα και η ένταση. Η δυνατότητα διαχωρισμού των ιόντων στο φασματογράφο μαζών περιγράφεται από την διακριτική ικανότητα (resolution), που ορίζεται ως:

$$R = m/\Delta m$$

Όπου m είναι η μάζα των ιόντων και Δm είναι η διαφορά μάζας μεταξύ δύο ευδιάκριτων κορυφών στο φάσμα των μαζών.

(Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν - Πετροπούλου, 2009), (Λίτου Ζωή, 2002-2003)

5.2.3 Βασικά Χαρακτηριστικά Φασματομέτρων Μάζας

Σε γενικές γραμμές, η φασματομετρία μαζών περιλαμβάνει:

- Τα συστήματα εισαγωγής του δείγματος (sample inlet systems)
- Την πηγή των ιόντων (ion sources)
- Τον αναλυτή (φίλτρο) των μαζών (mass analyzer)
- Τον ανιχνευτή ιόντων (detector) και ανάλυση των δεδομένων

Στη συνέχεια, θα προχωρήσουμε στην ξεχωριστή ανάλυση κάθε μέρους φασματόμετρου μάζας. Θα αναλυθούν ωστόσο, μόνο οι εκάστοτε κατηγορίες που διαθέτει το φασματόμετρο μάζας, που χρησιμοποιήθηκε στην περάτωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

5.2.3.1 Συστήματα Εισαγωγής του Δείγματος (Sample Inlet Systems)

Τα συστήματα εισόδου, επιτρέπουν την εισαγωγή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος, στην πηγή των ιόντων. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι εισαγωγής, που περιλαμβάνουν: τη μεταφορά αέριων δειγμάτων στο χώρο εκτόνωσης (batch inlets), τη μεταφορά στερεών και μη πτητικών απευθείας στην πηγή ιονισμού με ειδικό δειγματοφορέα (direct probe inlets), και την εισαγωγή από αέριο ή υγρό χρωματογράφο (chromatographic inlets). (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 2009), (Λίτου Ζωή, 2002-2003)

5.2.3.2 Πηγές Ιόντων (Ion Sources)

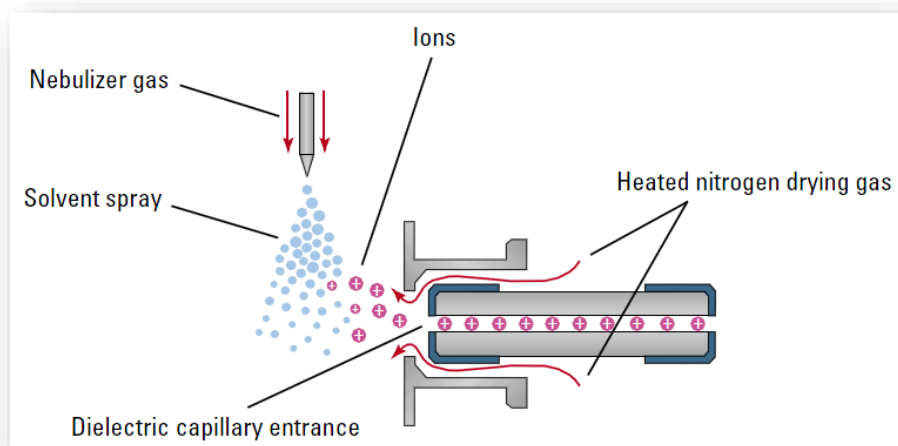
Το πρωταρχικό σημείο στην ανάλυση με φασματομετρία μαζών, είναι ο σχηματισμός ιόντων, σε αέρια μορφή. Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες τεχνικές ιονισμού, που παράγουν φορτισμένα μόρια σε αέρια μορφή. Αυτές, μπορεί να είναι: ιονισμός με δέσμη ηλεκτρονίων [Electron Impact Ionization (EI)], χημικός ιονισμός [Chemical Ionization (CI)], χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης [Atmospheric Pressure Chemical Ionization, (APCI)], ιονισμός με σπινθήρα [Spark Ionization, (SI)], ιονισμός πεδίου [Field Ionization, (FI)], ιονισμός εκκροφήσεως πεδίου [Field Desorption Ionization, (FD)], ηλεκτροεκνέφωση [Electrospray, (ES)] ιονισμός με Laser [Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, (MALDI)] και ιονισμός με άτομα [Fast Atom Bombardment, (FAB)]. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν ο ιονισμός με

ηλεκτροψεκασμό (ESI) και ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI). (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 2009)

Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)

Τα πρώτα πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ηλεκτροψεκασμού ήταν στα τέλη του 1930 από τον Charman. Η χρήση του ηλεκτροψεκασμού για ιονισμό δειγμάτων στη φασματομετρία μαζών, έγινε από τον Dole et al. στα τέλη του 1960. Η δουλειά αυτή, καθόρισε τις βασικές πειραματικές παραμέτρους, και είχε ως αποτέλεσμα τον ιονισμό δειγμάτων μεγάλης μάζας. Η πιο σημαντική ανακάλυψη, ήταν το φαινόμενο πολλαπλών φορτιών. Το 1980, οι Fenn και Mann et al. ανέπτυξαν την μέθοδο φασματομετρίας μαζών με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) όπως είναι σήμερα γνωστή.

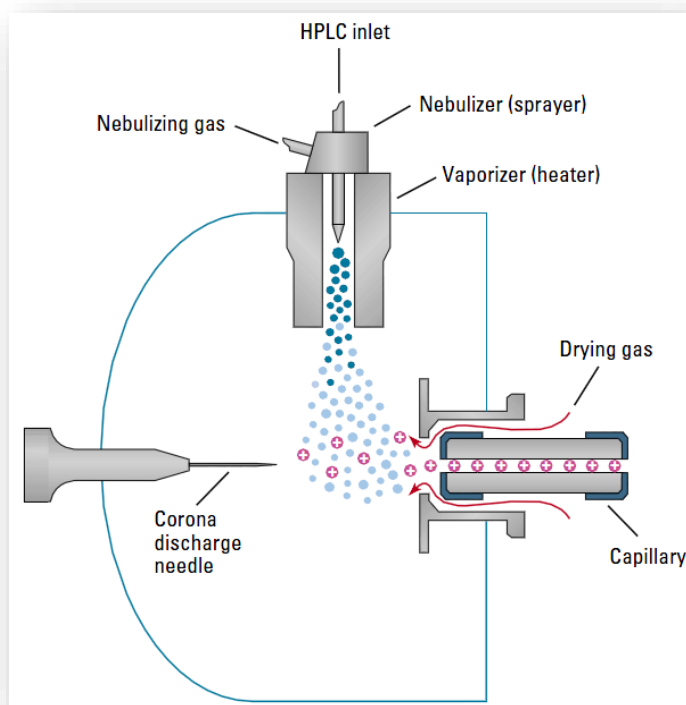
Η παραγωγή ιόντων από εξάτμιση φορτισμένων σταγονιδίων επιτυγχάνεται μέσω ψεκασμού. Είναι μια από τις τεχνικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure ionization, API) και άρχισε να χρησιμοποιείται στις αρχές του 1990. Το δείγμα διαλύεται και περνάει μέσα από ένα λεπτό ανοξειδωτο ασάλινο τριχοειδές. Στην άκρη του τριχοειδούς υπάρχει ατμοσφαιρική πίεση και εφαρμόζεται και ένα δυναμικό. Το υψηλό δυναμικό δημιουργεί ένα ηλεκτροστατικό ψεκασμό φορτισμένων σταγονιδίων, που έχουν όλα την ίδια πολικότητα και περιέχουν το δείγμα. Κατά τη διαδικασία του ψεκασμού, χρησιμοποιείται και η βοήθεια ενός ρεύματος αέριου αζώτου που κινείται μέσα σε ένα σωλήνα, παράλληλα με το κεντρικό τριχοειδές. Ο διαλύτης εξατμίζεται, το μέγεθος του σταγονιδίου ελαττώνεται και η συγκέντρωση φορτίου στην επιφάνεια του σταγονιδίου αυξάνεται. Τελικά, το σταγονίδιο εκρήγνυται και δημιουργεί μικρότερα, χαμηλότερου φορτίου σταγονίδια. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να σχηματιστούν μεμονωμένα φορτισμένα ιόντα (εικόνα 5.3). (Σογομών Μπογοσιάν et al.), (R. Pescok, 1980), (M. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 2009), (Λίτου Ζωή, 2002-2003)



Εικόνα 5.3 . Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό.

Χημικός Ιονισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)

Ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), είναι μια τεχνική ιονισμού, η οποία εφαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα πολικών και μη πολικών ενώσεων προς ανάλυση, οι οποίες έχουν μέτρια μοριακά βάρη. Ο ιονισμός APCI, είναι μια διαδικασία εξάτμισης η οποία ακολουθείται, στη συνέχεια, από ιονισμό, παρεμφερή με τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό. Επιπρόσθετα, η εκνέφωση, είναι παρόμοια με εκείνη του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό. Ωστόσο, η εκνέφωση στον ιονισμό APCI συμβαίνει σε ένα καυτό (τυπική θερμοκρασία: 250°C-400°C) θάλαμο ψεκασμού. Η θερμότητα εξατμίζει ταχέως τα σταγονίδια ψεκασμού. Τα μόρια του διαλύτη στην αέρια φάση ιονίζονται κατά το πέρασμά τους από μία βελόνα. Στον APCI ιονισμό, υπάρχει μεταφορά φορτίου από τα ιονισμένα ιόντα, στα μόρια αναλυόμενης ουσίας με έναν τρόπο που είναι παρόμοιος με χημικό ιονισμό με CG / MS. Αυτά τα ιόντα αναλυτή στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω των οπτικών ιόντων, προς το φίλτρο και τον ανιχνευτή (εικόνα 5.4). (Λίτου Ζωή, 2002-2003)



Εικόνα 5.4. Ιονισμός APCI

5.2.3.3 Αναλυτής Μάζας (Mass Analyzer)

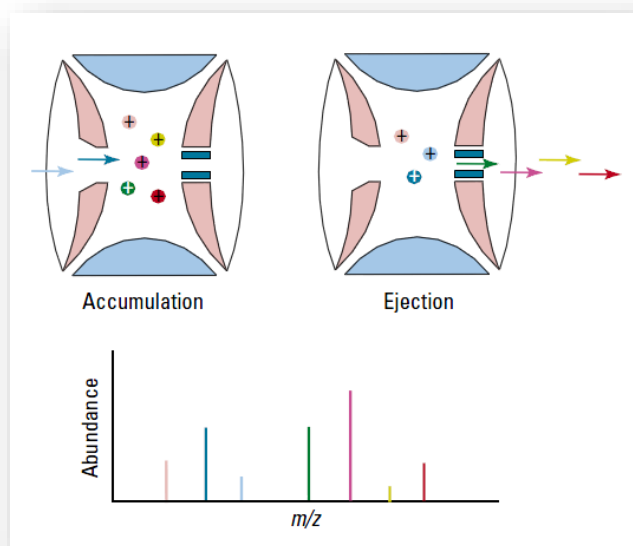
Ο διαχωρισμός μαζών, είναι το κρίσιμότερο στάδιο στην πορεία μιας ανάλυσης και έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι διαχωρισμού που διαφέρουν ως προς τα χαρακτηριστικά τους, τις δυνατότητες και τους περιορισμούς τους. Γενικά, δεν φαίνεται να υπάρχει μία μέθοδος διαχωρισμού μαζών, που να είναι εξ' ίσου αποτελεσματική σε όλες τις εφαρμογές της ανάλυσης με φασματομετρία μάζας.

Ο σκοπός του φίλτρου μαζών, είναι ο διαχωρισμός δέσμης ιόντων, σύμφωνα με την μοριακή τους μάζα, σε σχέση με μια δέσμη ιόντων, με παρόμοια μάζα (ταξινόμηση με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο) και η επιλογή των ιόντων με μάζα σε συγκεκριμένη περιοχή, έχοντας τη δυνατότητα μεγιστοποίησης των διαχωρισμένων εντάσεων (με διακριτική ικανότητα συνήθως 1 amu). Τα ταξινομημένα με βάση τη μάζα ιόντα, ανιχνεύονται από έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων και το σήμα που προκύπτει, στέλνεται σε ένα σύστημα δεδομένων για επεξεργασία. Η λειτουργία του αναλυτή μάζας, είναι ανάλογη με αυτή του πλέγματος στον οπτικό φασματογράφο (optical spectrometer).

Στη φασματομετρία μαζών, ο σκεδασμός (dispersion) βασίζεται στο λόγο μάζας προς φορτίο των ιόντων και όχι στο μήκος κύματος των πρωτονίων. Τα φασματομέτρα μαζών, κατηγοριοποιούνται με βάση τον τύπο του αναλυτή μάζας στο όργανο. Τα ιόντα που παράγονται, απωθούνται εκτός της πηγής ιόντων και επιταχύνονται προς την περιοχή της ανάλυσης. Παρόλο που παράγονται ταυτόχρονα και θετικά και αρνητικά ιόντα, επιλέγεται μια πολικότητα, και είτε θετικά είτε αρνητικά φορτισμένα ιόντα, αναλύονται και καταγράφονται. Τα μόρια που δεν ιονίζονται και παραμένουν ουδέτερα, απομακρύνονται και δεν ανιχνεύονται. Όλα τα φίλτρα μαζών, βασίζονται στην εφαρμογή ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων που επιδρούν στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων (ιόντων). (Λίτου Ζωή, 2002-2003)

Ανάλυση με Χρήση Τετραπολικής Παγίδας Ιόντων (Ion Trap Analysis)

Η ανάλυση με χρήση τετραπολικής παγίδας ιόντων, λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο με το τετραπολικό φίλτρο μάζας, μόνο που δεν λειτουργεί ως φίλτρο. Η παγίδα ιόντων, καταχωρεί τα ιόντα για επόμενα πειράματα και ανάλυση. Χρησιμοποιεί πεδία, που παράγονται από τάσεις συχνοτήτων, στην περιοχή των ραδιοκυμάτων RF (ή από συνεχές DC ηλεκτρικό πεδίο), που εφαρμόζονται στα ηλεκτρόδια τα οποία έχουν μια συγκεκριμένη διάταξη . Υπάρχει ένας δακτύλιος ηλεκτροδίων στη μέση, με δύο επιφάνειες ηλεκτροδίων να τον σκεπάζουν και από τις δύο πλευρές, (εισόδου και εξόδου). Τα ιόντα που παράγονται, μπαίνουν στην παγίδα, από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εισόδου. Για επιλεγμένα όρια λόγου μάζας προς φορτίο, που καθορίζονται από τις τάσεις που εφαρμόζονται, η συσκευή παγιδεύει ιόντα, στο χώρο που έχουν σχηματίσει τα ηλεκτρόδια (εικόνα 5.5). Τα ιόντα μένουν εκεί παγιδευμένα, με μια σταθερή τροχιά ταλάντωσης. Η ταλάντωση εξαρτάται από το δυναμικό παγίδευσης και το λόγο μάζας προς φορτίο των ιόντων. Κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης, το δυναμικό των ηλεκτροδίων μεταβάλλεται, προκαλώντας αστάθειες στην τροχιά των ιόντων, εξωθώντας τα με βάση τον αυξανόμενο λόγο μάζας προς φορτίο, από την επιφάνεια ηλεκτροδίου εξόδου. (Λίτου Ζωή, 2002-2003)



Εικόνα 5.5. Αναλυτής Παγίδας Ιόντων.

5.2.3.4 Ανιχνευτής (Detector)

Τα ιόντα διαχωρίζονται στον αναλυτή (mass analyzer), με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο και μετά συλλέγονται από έναν ανιχνευτή (detector). Ο ανιχνευτής ιόντων συλλαμβάνει τα προσπίπτοντα ιόντα και τα μετατρέπει σε ανάλογο ηλεκτρικό σήμα. Το σύστημα δεδομένων, επεξεργάζεται το μέγεθος των ηλεκτρικών σημάτων, το ψηφιοποιεί, το αποθηκεύει στη μνήμη ενός υπολογιστή, και παρουσιάζει το φάσμα των μαζών. Τα αποτελέσματα, εμφανίζονται σε ένα γράφημα σχετικής έντασης ως προς το λόγο μάζας προς φορτίο. Το μέγεθος των κορυφών, σχετίζεται με την ύπαρξη ιόντων και κατακερματισμένων ιόντων που παράγονται. Οι κορυφές κανονικοποιούνται, η πιο μεγάλη κορυφή στο φάσμα ονομάζεται μητρική κορυφή (base peak). Με βάση αυτή την κορυφή, που χρησιμοποιείται ως αναφορά, υπολογίζεται το ύψος κάθε κορυφής. (Λίτου Ζωή, 2002-2003)

6. Κοσμετολογία-Κορρές

6.1 Βασικές Αρχές της Ανάπτυξης Καλλυντικών Προϊόντων

Αναμφισβήτητα, η πιο σημαντική και ικανοποιητική δουλειά των επιστημόνων, που ασχολούνται με την παρασκευή καλλυντικών, είναι να μεταφράσουν τις νέες ιδέες, σε πραγματικά προϊόντα. Για το σκοπό αυτό, θα πρέπει να διαμορφωθούν λειτουργικά προϊόντα, να αξιολογηθούν τα υλικά συσκευασίας, και να δοκιμαστεί το προϊόν σε συνδυασμό με το υλικό συσκευασίας, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα του. Θα πρέπει επίσης, το προϊόν να μπορεί να υποστηρίξει τις απαιτούμενες απαιτήσεις των καταναλωτών, καθώς και να συμμορφώνεται με όλους τους σχετικούς κανονισμούς. Τέλος, απαραίτητη προϋπόθεση θα είναι το προϊόν να μπορεί να κατασκευαστεί σε αποδεκτό κόστος, για την εκάστοτε κατασκευαστική εταιρία.

Όλα τα νέα προϊόντα, έχουν ξεκινήσει ως ιδέα κάποιου. Η ιδέα αυτή, μπορεί να προέλθει από πολλά ερεθίσματα, ανάλογα με την εταιρική κουλτούρα. Το τμήμα marketing, μπορεί να έχει πρόσβαση σε πληροφορίες, για τη χρήση των καταναλωτικών προϊόντων, που μπορούν να ικανοποιήσουν τις ανάγκες της αγοράς και του κοινού, στο οποίο απευθύνεται το κάθε προϊόν. Το τμήμα έρευνας και ανάπτυξης (R&D), πραγματοποιεί έρευνα για τις νέες λειτουργικές πρώτες ύλες, ενώ η ομάδα συσκευασίας μπορεί να παρουσιάσει νέα στοιχεία συσκευασίας, που θα μπορούσαν να επιτρέψουν σε ένα νέο προϊόν, να είναι καινοτόμο και ελκυστικό στον καταναλωτή. Τέλος, άλλες υπηρεσίες αλλά και άτομα της εταιρίας, μπορούν να συμμετέχουν στην υλοποίηση νέων ιδεών. Μερικές από αυτές τις ιδέες, επικεντρώνονται σε πολύ συγκεκριμένους στόχους, όπως για παράδειγμα την αναβάθμιση ενός προϋπάρχοντος προϊόντος, ενώ άλλες αποσκοπούν σε καθαρή έρευνα. (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.1.1 Προϋποθέσεις για μια Επιτυχημένη Φόρμουλα

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες, που οι παρασκευαστές θα πρέπει να εξετάσουν, κατά την έναρξη οποιουδήποτε έργου του σχεδιασμού του προϊόντος. Τα κρίσιμα βήματα στον δρόμο για την κατασκευή του προϊόντος είναι : το όραμά του προϊόντος, η μορφή του, τα βασικά συστατικά που το απαρτίζουν, τα κρίσιμα συστατικά του, το χρονοδιάγραμμα του έργου, η απόδοση του προϊόντος, και τέλος οι καταναλωτικές απαιτήσεις. Η λίστα για την επιτυχία, παρατίθεται παρακάτω:

- ✚ Στόχοι marketing
- ✚ Λειτουργικότητα του προϊόντος
- ✚ Σταθερότητα της νέας φόρμουλας
- ✚ Ασφάλεια
- ✚ Ρυθμιστικές εκτιμήσεις
- ✚ Κόστος
- ✚ Εκτιμήσεις μεταποίησης/τροποποίησης

Ο σημαντικότερος παράγοντας, κατά τον σχεδιασμό, είναι η συμπεριφορά των πρώτων υλών κατά την παρασκευή ενός προϊόντος. Ανάλογα με την φυσική τους κατάσταση (υγρή, στερεή), τα συστατικά, απαιτούν και διαφορετική μεταχείριση. Για παράδειγμα, μια στερεή λιπαρή πρώτη ύλη, δεν μπορεί να αναμειχθεί με τα επιμέρους συστατικά, χωρίς πρώτα να θερμανθεί και να διαλυτοποιηθεί.

Αυτού του είδους η επιπλέον προσπάθεια, προσθέτει επιπλέον πίεση στο προσωπικό. Οι επιστήμονες επομένως, καλούνται να βρουν λύσεις σε κάθε πρόβλημα που προκύπτει. Μία ενδεικτική λύση, είναι η ανάθεση σε άλλη βιομηχανία, προετοιμασία μιγμάτων από επιμέρους συστατικά, ώστε να γίνεται απευθείας προσθήκη τους, στην παραγωγική διαδικασία. Τα μίγματα αυτά ωστόσο, μπορεί να επιφέρουν προβλήματα, όπως για παράδειγμα αδυναμία εξέτασης της ποιότητας του κάθε συστατικού μεμονωμένα. Παρά τους ανασταλτικούς παράγοντες, τα μίγματα απαιτούν λιγότερο χρόνο, που δαπανάται, για τη διασφάλιση της ποιότητας (επειδή μόνο ένα προϊόν

δοκιμάζεται αντί οκτώ), το χρόνο διάθεσης (γιατί υπάρχουν λιγότερα δοχεία να που χρησιμοποιούνται), και τη μείωση της ενεργειακής επεξεργασίας (δεδομένου ότι τα συστατικά στο μείγμα είναι προαναμεμειγμένα). (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.2 Κατηγορίες Προϊόντων – Κρέμες

Ίσως η πιο κοινή μορφή προϊόντος, που χρησιμοποιείται για ασύμβατα υλικά είναι οι κρέμες. Από τεχνικής πλευράς, οι κρέμες είναι γαλακτώματα. Ένα γαλάκτωμα, ορίζεται ως ένα ετερογενές σύστημα αποτελούμενο από ένα μη αναμίξιμο υγρό-διανομέα όπως για παράδειγμα, μικροσκοπικά σταγονίδια, μέσα σε ένα άλλο υγρό. Οι απλούστερες μορφές κρέμας είναι, μίγματα νερού και αδιάλυτων προς το νερό υλικών, τα οποία ομογενοποιούνται με την προσθήκη ενός γαλακτωματοποιητή.

Οι γαλακτωματοποιητές είναι μόρια, που έχουν ένα υδατο-διαλυτό και ένα έλαιο-διαλυτό μέρος. Όταν προστίθενται σε ένα σύστημα, που περιέχει έλαια και νερό, μπορούν να γαλακτωματοποιήσουν τα έλαια, σε μικροσκοπικά σταγονίδια και στη συνέχεια, να τα διασπείρουν σε όλο τον όγκο του υγρού. Το είδος αυτό της κρέμας, είναι ένα κλασικό παράδειγμα, ενός γαλακτώματος ελαίου σε νερό. Μια άλλη κατηγορία, είναι τα γαλακτώματα, νερού σε έλαιο. Άλλοι τύποι γαλακτωμάτων, περιλαμβάνουν τα γαλακτώματα πολλαπλού τύπου, στα οποία υπάρχει μία ασυνεχής εσωτερική φάση (π.χ. νερό διεσπαρμένο σε έλαιο, το οποίο στη συνέχεια, διασπείρεται σε νερό) και τα μικρογαλακτώματα, που έχουν σωματίδια τόσο μικρά, που είναι σχεδόν αόρατα.

Το γεγονός ότι οι κρέμες αποτελούνται από μη αναμίξιμα συστατικά, τις καθιστά αδιαφανείς ή θολές στην εμφάνιση. Το αυξημένο ιξώδες, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της φύσης των γαλακτοματοποιημένων σωματιδίων ή το αποτέλεσμα ενός επικουρικού συστήματος πάχυνσης. Οι κρέμες, ανάλογα με την περιεκτικότητα και την φύση των συστατικών που τις απαρτίζουν, έχουν περισσότερο ή λιγότερο λιπαρή υφή. Ανάλογα με την χρήση και το είδος της,

μία κρέμα μπορεί να περιλαμβάνει αντιδρωτικά, ενυδατικά στοιχεία, αλλά και συστατικά ιδανικά για το ξύρισμα.

Από άποψη σύνθεσης, μία κρέμα μπορεί να απαιτεί πολύπλοκη διαδικασία. Συγκεκριμένα, κατά την παραγωγή της, μια κρέμα συχνά απαιτεί δύο ξεχωριστές δεξαμενές, μία για κάθε φάση (υδατική και λιπαρή) πριν την ανάμιξη. Στη συνέχεια οι δύο φάσεις αναμειγνύονται, με σκοπό να σχηματίσουν το τελικό γαλάκτωμα. Στην περίπτωση των πιο πολύπλοκων συστημάτων, όπως είναι τα πολλαπλά γαλακτώματα, απαιτούνται τρεις δεξαμενές. Μια επιπλέον δυσκολία στην παραγωγή της κρέμας, είναι το γεγονός ότι πολλές από τις πρώτες ύλες της λιπαρής φάσης, είναι σε στερεή μορφή σε θερμοκρασία δωματίου, και αναμειγνύονται μόνο κατόπιν θέρμανσης, πάνω από το σημείο τήξης τους.

Οι κρέμες είναι πολυτελή προϊόντα, με μεγάλη αισθητική εμφάνιση. Ωστόσο, έχουν μειονεκτήματα, που μπορεί να λειτουργήσουν ως τροχοπέδη στην επιτυχή ανάπτυξη και δημιουργία του προϊόντος. Δεδομένου, του γεγονότος ότι οι κρέμες είναι γαλακτώματα, αυτό τις καθιστά ασταθείς. Για το λόγο αυτό απαραίτητη προϋπόθεση, για την κατασκευή ενός σταθερού γαλακτώματος είναι οι δοκιμές σταθερότητας, ειδικά όταν γίνεται κάποια οποιαδήποτε αλλαγή σε μία δοκιμασμένη φόρμουλα. Η παραμικρή ανισορροπία, σε κάποιο συστατικό, μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα αστάθειας. (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.3 Χρήση των Βοτάνων και Φυτών στα Καλλυντικά.

6.3.1 Τα βότανα ως Φυσικά Προϊόντα

Αρχικά, θα πρέπει να οριστεί, τι εννοούμε με τον όρο, "φυσικό". Ένας περιεκτικός ορισμός θα ήταν: «κάθε υλικό που συλλέγεται ή έχει εξορυχτεί και το οποίο στη συνέχεια, πλένεται, αποχρωματίζεται, αποστάζεται, κλασματοποιείται, αλέθεται με σκοπό να απελευθερώσει μία, ή πολλές χημικές ουσίες, οι οποίες υπάρχουν στην αρχική φυσική πηγή». Ως μια πρόσθετη τροποποίηση θα μπορούσε κανείς να συμπεριλάβει και τον

παρακάτω ορισμό: «φυσικά είναι τα προϊόντα που προέρχονται από τις ουσίες της δράσης των μικροοργανισμών, των ενζύμων, ή των ζυμών, έτσι ώστε να τροποποιήσουν, ή να αυξήσουν την απόδοση του επιθυμητού υλικού, με τη μέθοδο αυτή». Ένα κλασικό παράδειγμα είναι η παραγωγή αιθανόλης από τη δράση της μαγιάς σε υδατάνθρακες. Με τον ορισμό της "φυσικής προέλευσης» προσδιορίζεται η χρήση ενός φυτικού βοτάνου, ως πρώτη ύλη για την παραγωγή μίας νέας χημική ουσίας, η οποία δεν θα μπορούσε αυτούσια να υπάρχει στη φύση ή στην αντίστοιχη φυσική πηγή. (Ralph Gordon Harry, 2000)

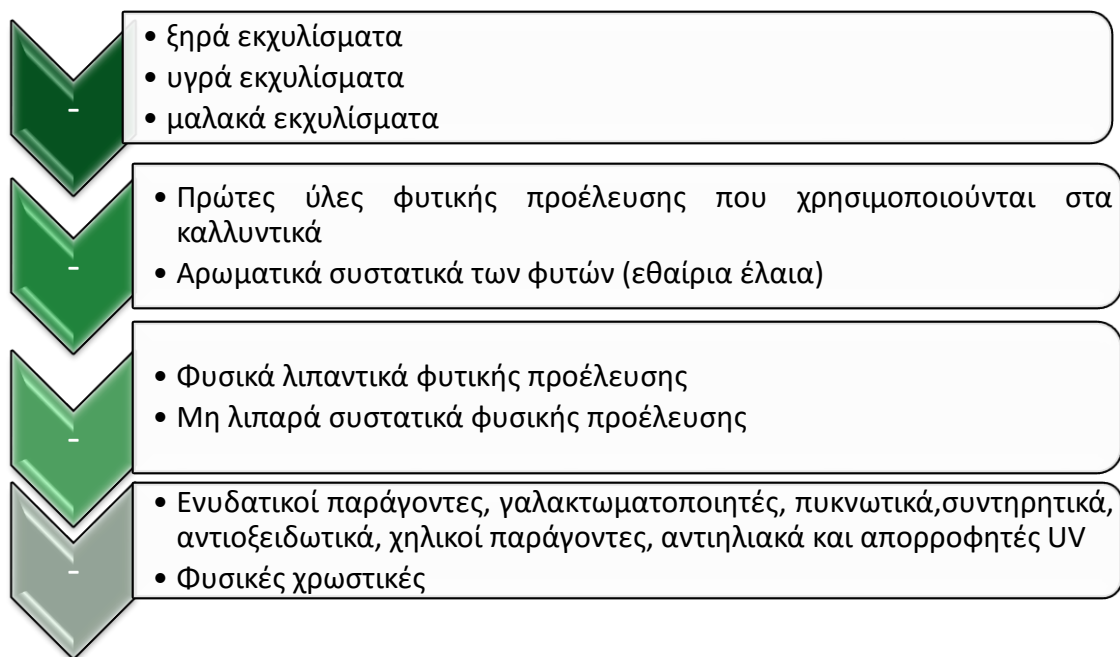


Εικόνα 6.1 Φυσικά Προϊόντα

6.3.2 Εκχυλίσματα

Οι μέθοδοι και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των εκχυλισμάτων, διαφέρουν οριακά από φαρμακοποιία σε φαρμακοποιία. Τα βοτανικά εκχυλίσματα, είναι συμπυκνωμένα παρασκευάσματα φυτικής ύλης, τα οποία λαμβάνονται, με την απομάκρυνση των επιθυμητών συστατικών των αντίστοιχων φυτών, με κατάλληλη διεργασία, η οποία περιλαμβάνει εξάτμιση του συνόλου ή σχεδόν όλου του διαλύτη, και με την προσαρμογή των υπολειμματικών μαζών ή σκονών, ανάλογα με τις προβλεπόμενες προδιαγραφές. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το εκχύλισμα που πρόκειται να εξαχθεί μπορεί να υποβληθεί σε προκαταρκτική επεξεργασία, για παράδειγμα, αδρανοποίηση των ενζύμων, άλεση, ή απολίπανση. Τα εκχυλίσματα, μπορούν να παραχθούν με διαβροχή, διήθηση, ή άλλες κατάλληλες

επικυρωμένες μεθόδους χρησιμοποιώντας αιθανόλη ή άλλο κατάλληλο διαλύτη. Μετά την εκχύλιση, ανεπιθύμητο υλικό απομακρύνεται, αν αυτό κρίνεται απαραίτητο. Παρακάτω διακρίνονται οι εξής κατηγορίες εκχυλισμάτων και διάφορων φυτικών προϊόντων, καθώς και η χρήση τους. (Ralph Gordon Harry, 2000)



6.4 Δοκιμές Σταθερότητας Προϊόντων

Οι παρασκευαστές καλλυντικών εξετάζουν τακτικά τη σταθερότητα του προϊόντος, χρησιμοποιώντας διάφορες διαδικασίες. Η πρόβλεψη της μακροπρόθεσμης σταθερότητας του κάθε προϊόντος, είναι σπάνια δυνατόν να προβλεφθεί, ακόμη και μετά από επανειλημμένες εξετάσεις του προϊόντος, πριν και μετά την έκθεσή του σε τεχνητές καταστάσεις στρες. Οι τυπικές αυτές καταστάσεις στρες είναι η θέρμανση, η ψύξη, και η φυγοκέντρωση, και χρησιμοποιούνται από τους παρασκευαστές με την ελπίδα ότι η απόδοση του προϊόντος και η εμφάνιση, δεν θα επηρεαστούν κατά την παραμονή του προϊόντος στο ράφι. Οι εκτιμήσεις διάρκειας ζωής, καθώς και συμπεριφοράς του κάθε προϊόντος, στη φαρμακοβιομηχανία γίνονται με μεγάλη αυστηρότητα. Αντίθετα, στα καλλυντικά, οι κανονισμοί είναι πιο ελαστικοί.

Κάθε τυποποιημένο προϊόν, υφίσταται αλλαγές που οφείλονται στη γήρανση και τη συσκευασία. Στην περίπτωση των καλλυντικών, οι αλλαγές αφορούν την καλλυντική κομψότητα, την αποδοχή τους από τους καταναλωτές, καθώς και τη χρησιμότητα τους. Οι αστάθειες που παρουσιάζονται, οφείλονται σε χημικές αλλαγές από τα συστατικά ή την παρουσία ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας. Τα προϊόντα που παρουσιάζουν αυτά τα ελαττώματα δεν είναι αποδεκτά, και πρέπει να απορριφθούν κατηγορηματικά. Οι φυσικές αλλαγές, ως σημάδια αστάθειας του γαλακτώματος μπορούν να γίνουν αποδεκτές, αν ο βαθμός της αλλοίωσης είναι αποδεκτός από τον καταναλωτή.

Για την αξιολόγηση της ποιότητας του παρασκευάσματος, ακολουθούνται δοκιμαστικές προσεγγίσεις, σε αυξημένες θερμοκρασίες και υγρασίες. Πρόκειται για κυκλικές δοκιμές (συμπεριλαμβανομένων ψύξης / απόψυξης), δοκιμή στην έκθεση στο φως, και τέλος, μηχανικές δοκιμές για αποσύνδεσης των στερεών, των γαλακτώματα και των αφρών. Στο σημείο αυτό, οι παρασκευαστές προκειμένου να αποφύγουν προβλήματα κατά την διάρκεια των δοκιμών αυτών, καλούνται να επιλέξουν τις ανθεκτικότερες πρώτες ύλες, οι οποίες δεν οδηγούν σε αστάθεια του τελικού προϊόντος. Τα κριτήρια τα οποία εξετάζονται στα καλλυντικά γαλακτώματα, περιλαμβάνουν, την εμφάνιση (διαχωρισμός συστατικών και αλλαγή χρώματος), την οσμή, το ιξώδες (δυνατότητα διανομής), τη διατήρηση, τις χημικές μεταβολές (pH, υδρόλυση, κλπ) και τη σταθερότητα στο φως. Άλλες ανησυχίες περιλαμβάνουν τη συσκευασία, την αλλαγή του βάρους, και την ευρωστία κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της πλήρωσης του προϊόντος στη συσκευασία. (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.4.1 Οι Δοκιμές Καλλυντικών και η Σταθερότητα των Γαλακτωμάτων

Η μακροπρόθεσμη σταθερότητα των μακρογαλακτωμάτων, στα καλλυντικά είναι απαραίτητη για την επιτυχή εμπορία όλων των τύπων κρεμών και λοσιόν. Η διάκριση μεταξύ μακρογαλακτωμάτων και μικρογαλακτωμάτων,

είναι θεμελιώδους σημασίας για τη σταθερότητα. Τα μακρογαλακτώματα, υπόκεινται σε φυσικά φαινόμενα, με τα οποία θα μπορούσαν να αναγνωριστούν ως ασταθή, σε συγκεκριμένη περιοχή θερμοκρασιών, κατά την διάρκεια αποθήκευσης και χρήσης. Αντίθετα τα μικρογαλακτώματα, στα οποία ανήκουν διαφανή και ιριδίζοντα παρασκευάσματα, είναι θερμοδυναμικά σταθερά. Σύμφωνα με την θερμοδυναμική των γαλακτωμάτων, οι ουσίες αυτές είναι ασταθείς και τείνουν να διαχωρίζονται σε ένα υδατικό στρώμα και ένα ελαιώδες στρώμα. Έτσι, η υπερβολική πίεση από την υψηλή θερμότητα, ή η υπερβολική μηχανική δύναμη, μπορούν να καταστρέψουν γρήγορα τα γαλακτώματα, ωστόσο υπάρχει μια αποδεκτή περιοχή συνθηκών στρες, στην οποία μπορούν να ανταπεξέλθουν, και είναι αυτή που καθορίζει την διάρκεια ζωής. Παρακάτω γίνεται σύντομη αναφορά στους διάφορους παράγοντες που καθορίζουν τις «δοκιμασίες στρες». (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.4.1.1 Θερμοκρασία

Η διαδικασία αυτή, περιλαμβάνει την τοποθέτηση ενός πρόσφατα σχηματισμένου γαλακτώματος, σε αυξημένη θερμοκρασία, για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, όπου το προϊόν εξετάζεται περιοδικά για ενδείξεις διαχωρισμού. Σαν γενικός κανόνας, επικρατεί, ότι η αποθήκευση του προϊόντος για 3 μήνες σε μετρίως αυξημένη θερμοκρασία, (μεταξύ περίπου 37°C και 45°C), χωρίς ενδείξεις διαχωρισμού, εγγυάται τη σταθερότητα του προϊόντος σε θερμοκρασία δωματίου (25°C έως 30°C) για περίπου ένα έτος. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται στις αρχές της εξίσωσης Arrhenius [$k = Ae^{-Ea/(RT)}$] και αυτό την καθιστά, πιθανότατα, μη αξιόπιστη. Η υπόθεση αυτή, με βάση την ενέργεια ενεργοποίησης, λειτουργεί αξιοθαύμαστα, στην περίπτωση που η αντίδραση, σε αυξημένη θερμοκρασία είναι ταυτόσημη με εκείνη που λαμβάνει χώρα, σε χαμηλότερη θερμοκρασία. (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.4.1.2 Ρεολογία

Ένας άλλος συνηθισμένος έλεγχος των παρασκευαστών, είναι η εξέταση των ρεολογικών αλλαγών του νεοσχηματιζόμενου προϊόντος. Το ιξώδες του

προϊόντος που το μεταβάλλει από υδαρό, λεπτόρρευστο, σε ημιστερεό γαλάκτωμα εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των σωματιδίων. Το μοτίβο της ρεολογίας τέτοιων καλλυντικών γαλακτωμάτων, είναι ιξωδοελαστικό, και για αυτό το λόγο οι μετρήσεις σε ένα μόνο σημείο δεν είναι ιδιαίτερα χρήσιμες. Τα πιο περίπλοκα σύγχρονα εργαλεία μέτρησης, μετρούν την τάση διάτμησης σε συνάρτηση με το ρυθμό διάτμησης και μπορούν να εμφανίσουν φαινόμενο υστέρησης. Ωστόσο, και στην περίπτωση της ρεολογίας, οι μελέτες του δείγματος, που έχει αποθηκευτεί σε υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία, μπορεί να είναι παραπλανητικές. (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.4.1.3 Μέγεθος Σωματιδίων

Οι μετρήσεις του μεγέθους σωματιδίων διασκορπισμένης φάσης, σε ένα γαλάκτωμα, απαιτούν ιδιαίτερα προσεκτική ερμηνεία. Στην ιδανική περίπτωση, τα σωματίδια θα πρέπει να εξετάζονται, χωρίς την ανάγκη για πολύπλοκες διαδικασίες αραίωσης. Εάν το μέσο μέγεθος των σωματιδίων παραμένει αναλλοίωτο, κάτω από κανονικές συνθήκες αποθήκευσης, ο παρασκευαστής μπορεί να υποθέσει ότι η συνένωση των σωματιδίων στο γαλάκτωμα δεν παρουσιάζει πρόβλημα. Ωστόσο, αυτό δεν αποκλείει την περίπτωση, ότι άλλοι τύποι αστάθειας παίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του προϊόντος. (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.4.2 Πρωτόκολλα Δοκιμών για τα Γαλακτώματα

Στη δεκαετία του 1980, διεξήχθη Ευρωπαϊκός διεργαστηριακός έλεγχος σταθερότητας γαλακτώματος, τριών προϊόντων και οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.1. Αρχικές δοκιμές σταθερότητας

Συνθήκες Δοκιμών	Χρονική στιγμή αξιολόγησης
-20°C	24 ώρες (μετά την απόψυξη)
-5°C	1 εβδομάδα (μετά την απόψυξη)
Θερμοκρασία δωματίου(σκοτάδι)	1 ^ο , 2 ^ο , 3 ^ο και 4 ^ο μήνα
40°C	3 ημέρες, 1 ^η , 2 ^η , 3 ^η και 4 ^η εβδομάδα

	2 ^ο και 3 ^ο μήνας
45°C	3 ημέρες, 1 ^η ,2 ^η ,3 ^η και 4 ^η εβδομάδα 2 ^ο και 3 ^ο μήνας
50°C	1 ^η και 3 ^η ημέρα, 1 ^η εβδομάδα

Ωστόσο, τα αποτελέσματα των παραπάνω δοκιμών δεν αποδείχθηκαν καθοριστικά για την γενική συμπεριφορά των προϊόντων. Έτσι, σήμερα, επικρατούν οι παρακάτω κατευθυντήριες οδηγίες για επιταχυνόμενη δοκιμή σταθερότητας.

Πίνακας 6.2. Συνθήκες των δοκιμών σταθερότητας που επικράτησαν.

Συνθήκες Δοκιμών	Χρονική στιγμή αξιολόγησης
25°C ± 2°C	1 χρόνος
30°C ± 2°C	1 χρόνος (ισοδύναμα με θερμοκρασία δωματίου)
40°C ± 2°C	6 μήνες
Πάγωμα/Απόψυξη	Κυκλική δοκιμή από 5°C έως 45°C
Δοκιμή φωτός	
Φθορίζων	1-2 εβδομάδες
Ξένο	1-2 εβδομάδες
Υπεριώδες	1-2 εβδομάδες
Φως ημέρας	1 χρόνος
Άλλες δοκιμές	
Ανακίνηση	1 εβδομάδα στους 30°C ή στους 40°C
Φυγοκέντρηση	1-2 ώρες

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων, μελετώνται στατιστικά σε συνάρτηση με άλλες παρτίδες ή άλλα προϊόντα. (Ralph Gordon Harry, 2000)

6.4.3 Χημική Αστάθεια των Συστατικών των Καλλυντικών

Εκτός από την αστάθεια των γαλακτωμάτων, και την αποσύνθεση των φαρμακευτικών ουσιών, οι παρασκευαστές, θα πρέπει να δώσουν προσοχή,

ώστε να προφυλάξουν το προϊόν και από άλλα χημικά φαινόμενα. Πολλά συστατικά καλλυντικών, υπόκεινται σε όλους τους τύπους αντιδράσεων αποσύνθεσης, οι οποίοι αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω:

6.4.3.1 Μετεστεροποίηση

Οι αντιδράσεις μετεστεροποίησης σπάνια, προκαλούν πρόβλημα κατά την διάρκεια παραγωγής της εκάστοτε φόρμουλας, αλλά η εμφάνιση τους μπορεί να γίνει εξαιρετικά ενοχλητική, κατά την διάρκεια των δοκιμών σταθερότητας. Μια τυπική περίπτωση, μπορεί να είναι οι αντιδράσεις μεταξύ ενυδατικών συστατικών, για παράδειγμα, της σορβιτόλης ή της γλυκερίνης, καθώς και των χρησιμοποιούμενων υδροξυβενζοϊκών.

6.4.3.2 Διαλυτοποίηση

Η διαλυτοποίηση των συντηρητικών από επιφανειοδραστικές ουσίες, είναι γνωστό ότι επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση. Αυτό το φαινόμενο, περιγράφηκε για πρώτη φορά περίπου πριν από 50 χρόνια, και έχει εξηγηθεί πολλές φορές ως φαινόμενο διαλυτοποίησης, κατά τη διάρκεια παραγωγής καλλυντικών και φαρμακευτικών σκευασμάτων.

6.4.3.3 Οξείδωση

Η πιο διαδεδομένη επίθεση επί της ακεραιότητας του προϊόντος, οφείλεται στην οξείδωση, ιδιαίτερα υπό την παρουσία φωτός. Η επίθεση του οξυγόνου για τα καλλυντικά συστατικά, δεν περιορίζεται στις ακόρεστες ουσίες. Στην πραγματικότητα, η πιο ύπουλη επίθεση είναι η υπεροξείδωση των αιθέρων πολυοξυαιθυλενίου. Για να προστατευτεί, ένα νέο προϊόν, οι παρασκευαστές φροντίζουν την αποφυγή υπεριώδους φωτός, επιμόλυνση με κάποιο μέταλλο, ή την έκθεση σε οξυγόνο. (Ralph Gordon Harry, 2000)

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή-Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, είναι η μελέτη εκχυλισμάτων φυτών γενικότερα, και ειδικά του εκχυλίσματος μαύρης πεύκης σε συνεργασία με την εταιρία ΚΟΡΡΕΣ.

Κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διεργασίας που έλαβε χώρα κατά την διάρκεια του 10^{ου} εξαμήνου :

- Έγινε προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων, στα προς εξέταση εκχυλίσματα. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι, με σκοπό την σύγκριση τους και την διεξαγωγή συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητά τους.
- Αναλύθηκαν τα τέσσερα εκχυλίσματα ως προς την περιεκτικότητά τους σε ολικά φλαβονοειδή.
- Μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των πρότυπων ενώσεων, με δοκιμές αντιδραστηρίου DPPH. Τα εκχυλίσματα όπως και τα πρότυπα συγκρίθηκαν μεταξύ τους ως προς την αντιοξειδωτική τους συμπεριφορά.
- Επιπρόσθετα, δημιουργήθηκε για πρώτη φορά στη Σχολή Χημικών Μηχανικών, βιβλιοθήκη σε υγρή χρωματογραφία (LC-MS) 24 πρότυπων ενώσεων ενδεικτικών από κάθε κατηγορία φαινολικών και φλαβονοειδών. Για το σκοπό αυτό, τα πρότυπα αναλύθηκαν με απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μάζας, με δύο διαφορετικές πηγές ιονισμού και με θετικό και αρνητικό ιονισμό και για τις δύο πηγές. Η χρησιμότητα της βιβλιοθήκης έγκειται στην δυνατότητα σύγκρισης των φασμάτων μάζας των πρότυπων ενώσεων, με αυτά των προς εξέταση εκχυλισμάτων, προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι υπάρχουσες ενώσεις.
- Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας, συζευγμένης με φασματομετρία μάζας για την ανάλυση των

εκχυλισμάτων αλλά και των πρότυπων ενώσεων. Ακολούθησε η ταυτοποίηση ενώσεων σε σύγκριση με τους χρόνους ανάσχεσης αλλά και με την βιβλιοθήκη πρότυπων ενώσεων προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη και άλλων πολυφαινολικών ενώσεων.

- Τέλος, ακολούθησε παραγωγή κρέμας, στα εργαστήρια του εργοστασίου ΚΟΡΡΕΣ Α.Ε., στα Οινόφυτα και ενσωμάτωση του εκχυλίσματος σε αυτή. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σταθερότητας, χρονικής διάρκειας ενός μήνα, σε κρέμα που περιείχε το εκχύλισμα και σε κρέμα χωρίς αυτό, με σκοπό την σύγκριση της συμπεριφοράς πριν και μετά την ενσωμάτωση του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα, όπως και δείγμα της κρέμας, παρατίθενται μαζί με την διπλωματική.

Όργανα-Αντιδραστήρια

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

Όργανα:

- Ζυγός Ακριβείας, Adventurer OHAUS ($\pm 0.0001\text{g}$)
- Φασματοφωτόμερο Uv-Vis Boeco S22
- Φασματόμετρο Μάζας Varian 500-MS, IT Mass Spectrometer
- Υγρός Χρωματογράφος Varian 212-LC, Chromatography Pump

Αντιδραστήρια:

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FCR)
- Μεθανόλη (HPLC grade)
- Αιθανόλη 40% w/v
- Ανθρακικό Νάτριο (NaHCO_3)
- Νιτρώδες Νάτριο (NaNO_2)
- Χλωριούχο Αλουμίνιο (AlCl_3)
- Όλες οι πρότυπες ενώσεις που αναφέρονται αναλυτικά στο Κεφ. 1 του πειραματικού μέρους.

Εκχυλίσματα:

- Εκχύλισμα Μαύρης Πεύκης (Σύστασης: 1%w/v βελόνες, 49,5%v/v νερό, 49,5%v/v γλυκερίνη). Παρασκευάστηκε από την εταιρία Κορρές Α.Ε.
- Εκχύλισμα Πρόπολης (Σύστασης: 10%w/v πρόπολη σε 95% αιθανόλη). Παρασκευάστηκε επί του εργαστηρίου" Τάκης Καναράκης, Φαρμακευτικός Κόσμος, 2001. "Καλλυντικά, συστατικά και εφαρμογές" Κ. Μουλοπούλου-Καρακίτσου, Δ. Ρηγόπουλος, Ι.Δ. Στρατηγός, ΒΗΤΑ Ιατρικές εκδόσεις, 1998.
- Εκχύλισμα Εχινάκεια (Σύστασης: 10%w/v πρόπολη σε 65% αιθανόλη). Παρασκευάστηκε επί του εργαστηρίου" Τάκης Καναράκης, Φαρμακευτικός Κόσμος, 2001. "Καλλυντικά, συστατικά και εφαρμογές"

Κ. Μουλοπούλου-Καρακίτσου, Δ. Ρηγόπουλος, Ι.Δ. Στρατηγός, ΒΗΤΑ Ιατρικές εκδόσεις, 1998.

- Εκχύλισμα Άρνικας (Σύστασης: 3%w/v άρνικας σε 95% νερό). Παρασκευάστηκε επί του εργαστηρίου Υλικών του Τομέα ΙΙΙ, καθ. κ. Χ.Καραγιάννη.

1. Πρότυπες Ενώσεις

Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας LC, προϋποθέτει την ύπαρξη συγκεκριμένης βιβλιοθήκης με πρότυπες ουσίες, έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση και η μελέτη με την εκάστοτε άγνωστη ουσία προς μέτρηση. Η κατασκευή της προσωπικής βιβλιοθήκης προτύπων, ήταν το πρώτο βήμα στην περάτωση της διπλωματικής εργασίας, καθώς τα πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή όλων των επιμέρους πειραμάτων.

Γιατί επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα πρότυπα :

- Πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική μελέτη σε βιβλία, άρθρα και δημοσιεύσεις με σχετικό θέμα. Συγκεκριμένα, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή, σε έρευνες και μελέτες, που αφορούσαν εκχυλίσματα πεύκου όπως παρουσιάζεται στο Κεφ. 1 του θεωρητικού μέρους. Με βάση την βιβλιογραφία συγκεντρώθηκαν, οι ενώσεις που αναμένεται να εμφανίζονται στα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν.
- Σύμφωνα με το Κεφ.3 και 4 του θεωρητικού μέρους, τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές ενώσεις διακλαδίζονται σε πολλές κατηγορίες. Οι πρότυπες ενώσεις που απαρτίζουν την βιβλιοθήκη, αποτελούν ενδεικτικά των κατηγοριών, έτσι ώστε να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά και η χημική σύσταση κάθε κατηγορίας, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω.

Παρακάτω, παρατίθεται ο πίνακας με τα πρότυπα που απαρτίζουν την προσωπική βιβλιοθήκη, τη μοριακή τους δομή, την ονοματολογία τους κατά IUPAC, καθώς και συνοπτικές πληροφορίες για κάθε ένωση. Όλες οι ενώσεις συγκεντρώθηκαν από τα εργαστήρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, με την βοήθεια και συνεργασία διαφορετικών Τομέων της Σχολής.

Πίνακας 1. Πρότυπες Ενώσεις

1. GALLIC ACID

Ονοματολογία κατά IUPAC :

3,4,5-Trihydroxybenzoic acid

Χημικός τύπος : C₇H₆O₅

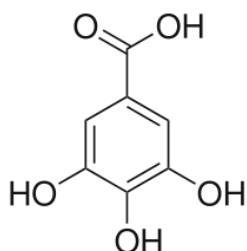
Μοριακό Βάρος : 170.12 g/mol

Εμφάνιση: Λευκοί ή κιτρινωποί κρύσταλλοι.

Πυκνότητα: 1.694 g/cm³

Σημείο τήξης : 260 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό, αλκοόλη, αιθέρα, γλυκερόλη και ακετόνη



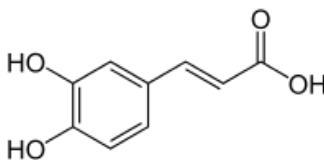
2. CAFFEIC ACID

Ονοματολογία κατά IUPAC :

3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid

Χημικός τύπος : C₉H₈O₄

Μοριακό Βάρος : 180.16 g/mol



Εμφάνιση: Κίτρινη λεπτή σκόνη

Πυκνότητα: 1.478 g/cm³

Σημείο τήξης : 223-225 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό, αλκοόλη, αιθέρα, γλυκερόλη και ακετόνη

3. VANILLIC ACID

Ονοματολογία κατά IUPAC :

4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid

Χημικός τύπος : C₈H₈O₄

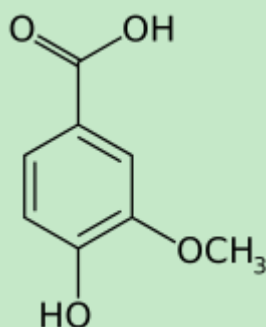
Μοριακό Βάρος : 168.14 g/mol

Εμφάνιση: Λευκοί ή κιτρινωποί σκόνη ή κρύσταλλοι.

Πυκνότητα: 1.694 g/cm³

Σημείο τήξης : 210-213 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό, αλκοόλη και μεθανόλη



4. BENZOIC ACID

Ονοματολογία κατά IUPAC :

benzoic acid

Χημικός τύπος : C₇H₆O₂

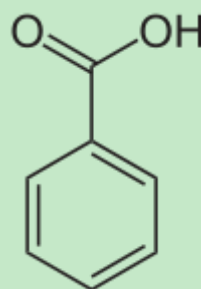
Μοριακό Βάρος : 122.12 g/mol

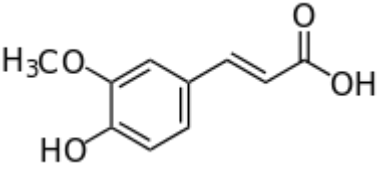
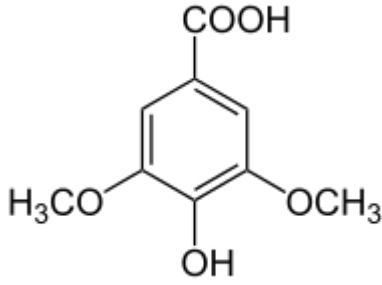
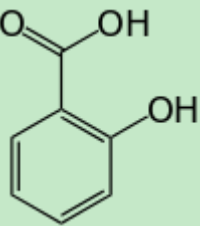
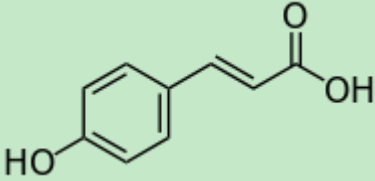
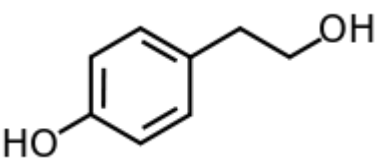
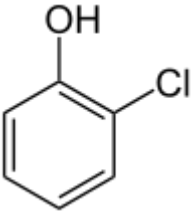
Εμφάνιση: Άχρωμο κρυσταλλικό στερεό.

Πυκνότητα: 1.2659 g/cm³

Σημείο τήξης : 122.41 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό, αλκοόλη, εξάνιο, αιθυλαιθέρα και υγρή αμμωνία

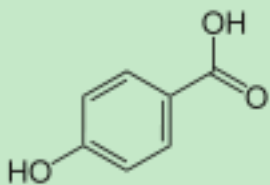


<p>5. FERULIC ACID</p> <p><u>Όνοματολογία κατά IUPAC :</u> (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid</p>  <p><u>Χημικός τύπος :</u> C₁₀H₁₀O₄</p> <p><u>Μοριακό Βάρος :</u> 194.18 g/mol</p> <p><u>Εμφάνιση:</u> Κρυσταλλική σκόνη</p> <p><u>Σημείο τήξης :</u> 168-172 °C</p> <p><u>Διαλυτότητα :</u> διαλυτό σε νερό και αλκοόλη</p>	<p>6. SYRINGIC ACID</p> <p><u>Όνοματολογία κατά IUPAC :</u> 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid</p>  <p><u>Χημικός τύπος :</u> C₉H₁₀O₅</p> <p><u>Μοριακό Βάρος :</u> 198.17 g/mol</p> <p><u>Εμφάνιση:</u> Κρυσταλλική σκόνη</p>
<p>7. SALICYLIC ACID</p> <p><u>Όνοματολογία κατά IUPAC :</u> 2-Hydroxybenzoic acid</p>  <p><u>Χημικός τύπος :</u> C₇H₆O₃</p> <p><u>Μοριακό Βάρος :</u> 138.12 g/mol</p> <p><u>Εμφάνιση:</u> Άχρωμοι ή λευκοί κρύσταλλοι.</p> <p><u>Πυκνότητα :</u> 1.443 g/cm³</p> <p><u>Σημείο τήξης :</u> 158.6 °C</p> <p><u>Διαλυτότητα :</u> διαλυτό σε νερό, προπανόλη, ακετόνη, αλκοόλη και τολουένιο.</p>	<p>8. p-COUMARIC ACID</p> <p><u>Όνοματολογία κατά IUPAC :</u> (E)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid</p>  <p><u>Χημικός τύπος :</u> C₉H₈O₃</p> <p><u>Μοριακό Βάρος :</u> 164.16 g/mol</p> <p><u>Εμφάνιση:</u> Λευκοί κρύσταλλοι.</p> <p><u>Σημείο τήξης :</u> 164.16 °C</p> <p><u>Διαλυτότητα :</u> διαλυτό σε νερό, αλκοόλη και μεθανόλη.</p>
<p>9. TYROSOL</p> <p><u>Όνοματολογία κατά IUPAC :</u> 4-(2-Hydroxyethyl)phenol</p>  <p><u>Χημικός τύπος :</u> C₈H₁₀O₂</p> <p><u>Μοριακό Βάρος :</u> 138.164 g/mol</p> <p><u>Εμφάνιση:</u> Λευκοί-κιτρινωποί κρύσταλλοι.</p> <p><u>Σημείο τήξης :</u> 91-92 °C</p>	<p>10. 4-CHLOROPHENOL</p> <p>11. 2-CHLOROPHENOL</p> <p><u>Όνοματολογία κατά IUPAC :</u> 2-Chlorophenol</p>  <p><u>Χημικός τύπος :</u> C₆H₅ClO</p> <p><u>Μοριακό Βάρος :</u> 128.56 g/mol</p> <p><u>Εμφάνιση:</u> Ελαφρά θαμπό υγρό</p> <p><u>Πυκνότητα :</u> 1.2634 g/cm³</p> <p><u>Σημείο τήξης :</u> 9.4 °C</p> <p><u>Διαλυτότητα :</u> διαλυτό σε νερό, αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα</p>

12. 4-HYDROXYBENZOIC ACID

Όνοματολογία κατά IUPAC :

4-Hydroxybenzoic acid



Χημικός τύπος : $C_7H_6O_3$

Μοριακό Βάρος : 138.121 g/mol

Εμφάνιση: Λευκοί κρύσταλλοι

Πυκνότητα: 1.46 g/cm³

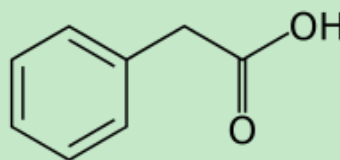
Σημείο τήξης: 214.5 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό, αλκοόλη, αιθέρα και χλωροφόρμιο

13. PHENYLACETIC ACID

Όνοματολογία κατά IUPAC :

Phenylacetic acid



Χημικός τύπος : $C_8H_8O_2$

Μοριακό Βάρος : 136.15 g/mol

Πυκνότητα: 1.0809 g/cm³

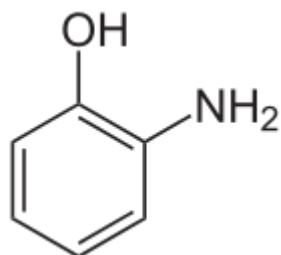
Σημείο τήξης : 265.5 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό και αιθανόλη

14. 2-AMINOPHENOL

Όνοματολογία κατά IUPAC :

2-Aminophenol



Χημικός τύπος : C_6H_7NO

Μοριακό Βάρος : 109.13 g/mol

Εμφάνιση: Λευκές ορθορομβικές βελόνες σε μορφή πυραμίδας

Πυκνότητα: 1.328 g/cm³

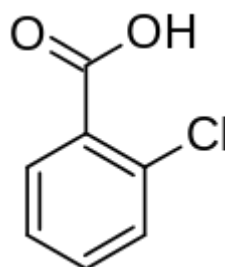
Σημείο τήξης : 174 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε ζεστό νερό.

15. 2-CHLOROBENZOIC ACID

Όνοματολογία κατά IUPAC :

2-Chlorobenzoic acid



Χημικός τύπος : $C_7H_5ClO_2$

Μοριακό Βάρος : 156.57 g/mol

Εμφάνιση: Στερεό χρώματος ανοιχτό καφέ

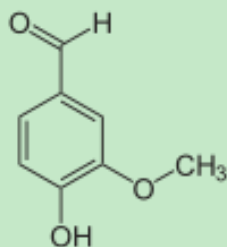
Σημείο τήξης : 142 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό.

16. VANILLIN

Όνοματολογία κατά IUPAC :

4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde



Χημικός τύπος : $C_8H_8O_3$

Μοριακό Βάρος : 152.15 g/mol

Εμφάνιση: Λευκοί κρύσταλλοι

Πυκνότητα: 1.056 g/cm³

Σημείο τήξης : 81-83 °C

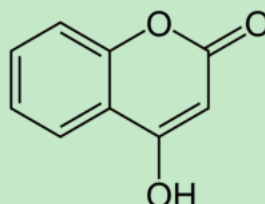
Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό και

αιθανόλη

17. 4-HYDROXYCOUMARIN

Όνοματολογία κατά IUPAC :

2-Hydroxycoumarin-4-one



Χημικός τύπος : $C_9H_6O_3$

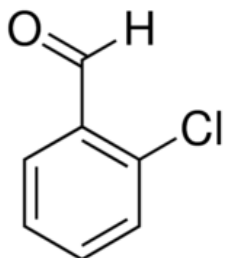
Μοριακό Βάρος : 162.14 g/mol

Εμφάνιση: Λευκοί κρύσταλλοι

Διαλυτότητα : διαλυτό στο νερό

18. 2-CHLOROBENZALDEHYDE

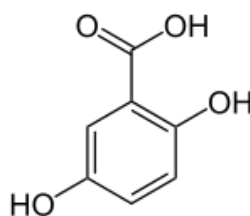
Όνοματολογία κατά IUPAC :
2-chlorobenzaldehyde



Χημικός τύπος : C₇H₅ClO
Μοριακό Βάρος : 152.15 g/mol
Σημείο τήξης : 209-215 °C
Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό και αιθανόλη

19. 2,5-DIHYDROXYBENZOIC ACID

Όνοματολογία κατά IUPAC :
2,5-dihydroxybenzoic acid



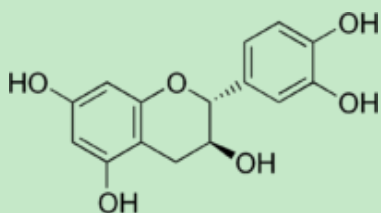
Χημικός τύπος : C₇H₆O₄
Μοριακό Βάρος : 154.12 g/mol
Εμφάνιση: Λευκή-κίτρινη σκόνη
Σημείο τήξης : 200-205 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό στο νερό και την αιθανόλη

20. (-) EPICATECHIN/

(+) CATECHIN

Όνοματολογία κατά IUPAC :
(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-3,5,7-triol



Χημικός τύπος :
C₁₅H₁₄O₆
Μοριακό Βάρος :
290.27 g/mol

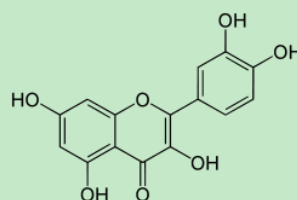
Εμφάνιση: Άχρωμο στερεό

Σημείο τήξης : 175-177 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό και αιθανόλη

21. QUERCETIN

Όνοματολογία κατά IUPAC :
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-one



Χημικός τύπος : C₁₅H₁₀O₇
Μοριακό Βάρος : 302.236 g/mol

Εμφάνιση: Κίτρινη κρυσταλλική σκόνη

Πυκνότητα : 1.799 g/cm³

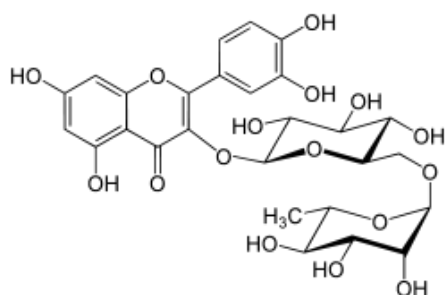
Σημείο τήξης : 316 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό και αιθανόλη

22. RUTIN

Όνοματολογία κατά IUPAC :

2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyloxy]-4H-chromen-4-one



Χημικός τύπος : C₂₇H₃₀O₁₆

Μοριακό Βάρος : 610.52 g·mol⁻¹

Εμφάνιση: Άχρωμο στερεό

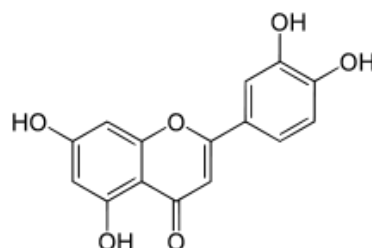
Σημείο τήξης : 242 °C

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό και αιθανόλη

23. LUTEOLIN

Όνοματολογία κατά IUPAC :

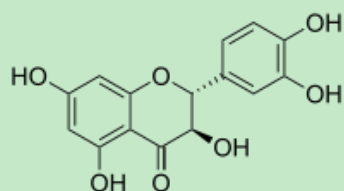
2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 5,7-dihydroxy-4-chromenone



Χημικός τύπος : C₁₅H₁₀O₆

Μοριακό Βάρος : 286.24 g·mol⁻¹

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό, αιθανόλη και μεθανόλη



24. TAXIFOLIN

Όνοματολογία κατά IUPAC :

(2*R*,3*R*)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-

trihydroxy-2,3-dihydrochromen-4-one

Χημικός τύπος : C₁₅H₁₂O₇

Μοριακό Βάρος : 304.25 g·mol⁻¹

Εμφάνιση: Καφέ σκόνη

Διαλυτότητα : διαλυτό σε νερό και αιθανόλη

2. Μέτρηση Ολικών Φαινολικών, Φλαβονοειδών και Αντιοξειδωτικής Δράσης

2.1 Μέτρηση Ολικών Φαινολικών Ενώσεων (Total Phenolic Compounds)

Για την εύρεση των ολικών φαινολικών ενώσεων, συγκρίθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι, με ειδοποιό διαφορά τους τον διαλύτη. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Μεθανόλη (MeOH), Αιθανόλη (EtOH) και νερό (H₂O). Οι μέθοδοι συγκρίθηκαν μεταξύ τους, ως προς την αποτελεσματικότητα και την ευαισθησία. Τα αποτελέσματα της κάθε μεθόδου, καθώς και γενικά συμπεράσματα, παρατίθενται παρακάτω.

2.1.1 Διαλύτης Μεθανόλη (MeOH)

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων στα φυτικά εκχυλίσματα, προσδιορίζεται με χρήση, της φασματοφωτομετρικής μέθοδο (Sigleton et al., 1999). Στην ανάλυση χρησιμοποιείται μεθανολικό διάλυμα του εκάστοτε εκχυλίσματος. Το μίγμα της αντίδρασης, παρασκευάζεται με ανάμιξη:

- ✓ 0,5 mL του μεθανολικού διαλύματος του κάθε εκχυλίσματος
- ✓ 2,5 mL αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu, διάλυμα 10% σε νερό
- ✓ 2,5 mL NaHCO₃ διάλυμα 7,5% σε νερό .

Τυφλό διάλυμα κατασκευάζεται ταυτόχρονα και περιέχει:

- ✓ 0,5 mL μεθανόλης
- ✓ 2,5 mL αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu, διάλυμα 10% σε νερό

✓ 2,5 mL NaHCO₃ διάλυμα 7,5% σε νερό .

Τα δείγματα στη συνέχεια επωάζονται σε θερμοστάτη στους 45 °C για 45 λεπτά. Η απορρόφηση προσδιορίζεται με φασματοφωτόμετρο Uv-Vis σε λ_{max} = 765 nm.

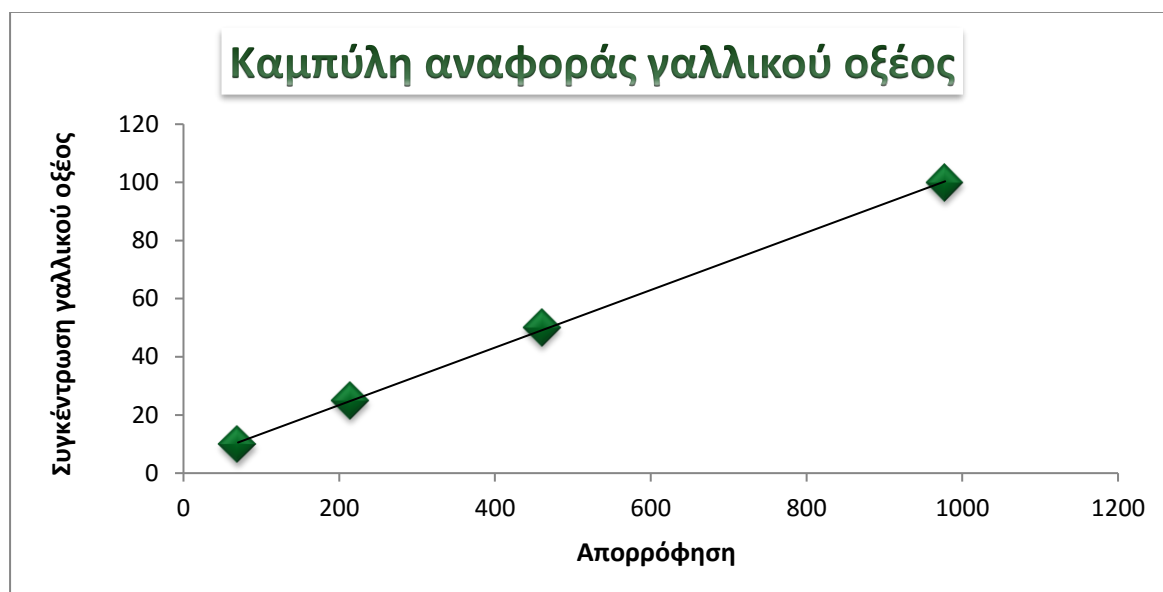
Αρχικά κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς, με χρήση γαλλικού και καφεϊκού οξέος ως πρότυπα (δύο ανεξάρτητοι κύκλοι πειραμάτων). Τα δείγματα κάθε κύκλου παρασκευάζονται επί τρεις φορές για κάθε ανάλυση και λαμβάνεται η μέση τιμή απορρόφησης. Με βάση την μετρούμενη απορρόφηση, η συγκέντρωση φαινολικών υπολογίστηκε σε mg/L από τη γραμμή βαθμονόμησης και η περιεκτικότητα φαινολικών στα εκχυλίσματα εκφράστηκε σε ισοδύναμο γαλλικού οξέος ή καφεϊκού οξέος αντίστοιχα (mg του γαλλικού/καφεϊκού οξέος/ g ξηρής μάζας). Ο υπολογισμός των φαινολικών σε συνάρτηση με το γαλλικό οξύ, έγινε με βάση την εξίσωση $C_{GA} = 0.0989129842 \cdot Abs_{765} + 3.6185037918$, με $R^2 = 0.9998$ που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος. Για τον υπολογισμό των φαινολικών εκφρασμένα ως ισοδύναμο καφεϊκού, έγινε χρήση της εξίσωσης $C_{CAF} = 0.216588457 \cdot Abs_{765} + 4.3942732108$, με $R^2 = 0,9999$. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ως y ορίζεται η συγκέντρωση του ισοδύναμου γαλλικού/καφεϊκού οξέος και ως x η απορρόφηση του εκάστοτε εκχυλίσματος. Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε φαινολικά, του κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$\text{Total Phenolic Content (TPC) (mg/g)} = \frac{C_{ga} \text{ (mg/L)} \times V_{\text{ext.solution}} \text{ (L)}}{M_{\text{extract}} \text{ (g)}} \quad (1)$$

Όπου: C_{ga} (mg/L), είναι η συγκέντρωση του ισοδύναμου γαλλικού οξέος που υπολογίστηκε από την εξίσωση, $V_{\text{ext.solution}}$ (L), είναι ο όγκος του διαλύτη του εκχυλίσματος και M_{extract} , η μάζα του φυτού του κάθε εκχυλίσματος σε γραμμάρια. (Stanković S. Milan, 2010)

Πίνακας 2.1. Απορρόφηση για κατασκευή καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος

Συγκέντρωση διαλυμάτων γαλλικού οξέος (mg/L)	Απορρόφηση
10	70
25	215
50	461
100	978



Διάγραμμα 2.2. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Πίνακας 2.3. Συγκέντρωση ισοδύναμων γαλλικού οξέος

Εκχύλισμα	C ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg/L)			
	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	3 ^η μέτρηση	M.O
Μαύρη Πεύκη				
Κορρές	472	457	484	471.2 ± 13
Πρόπολη	8013	7807	8800	8207 ± 524
Εχινάκεια	429	404	416	417 ± 18
Άρνικα	33	36	35	39 ± 9

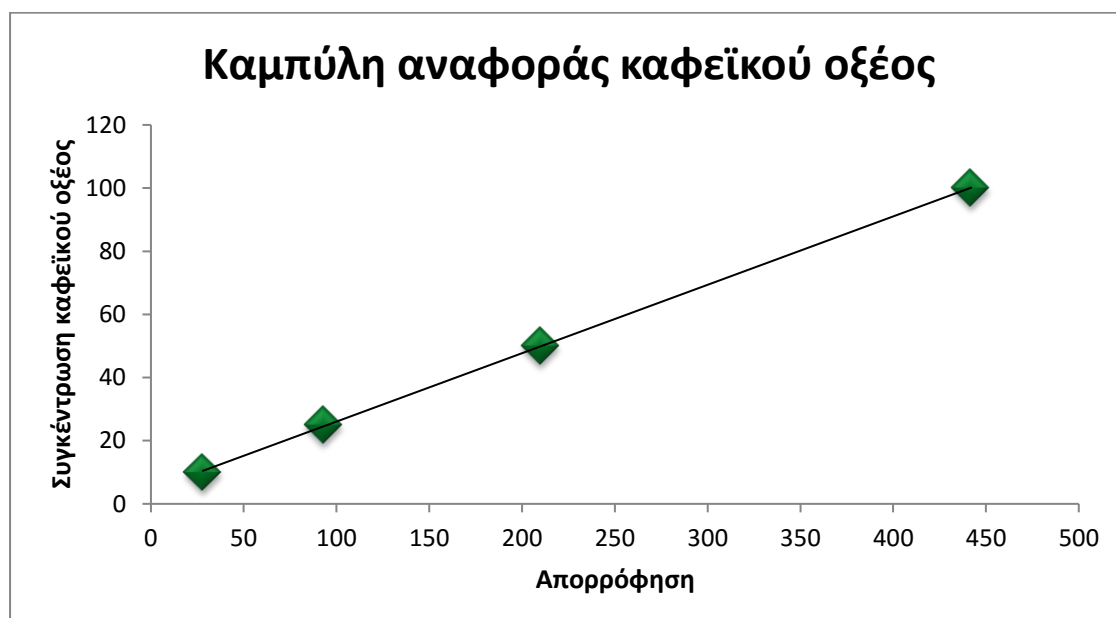
Επομένως σύμφωνα με την εξίσωση (1), προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 2.4. Ολικές φαινολικές ενώσεις με ισοδύναμο γαλλικό οξύ σε διαλύτη μεθανόλη

Εκχύλισμα	Total Phenolic Content (mg GA/g dry mass)
Μαύρη Πεύκη	
Κορρές	188.4
Πρόπολη	8207
Εχινάκεια	41.7
Άρνικα	6,5

Πίνακας 2.5. Απορρόφηση για κατασκευή καμπύλης αναφοράς καφεϊκού οξέος

Συγκέντρωση διαλυμάτων καφεϊκού οξέος (mg/L)	Απορρόφηση
10	28
25	93
50	210
100	442



Διάγραμμα 2.6. Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος

Πίνακας 2.7. Συγκέντρωση ισοδύναμων καφεϊκού οξέος

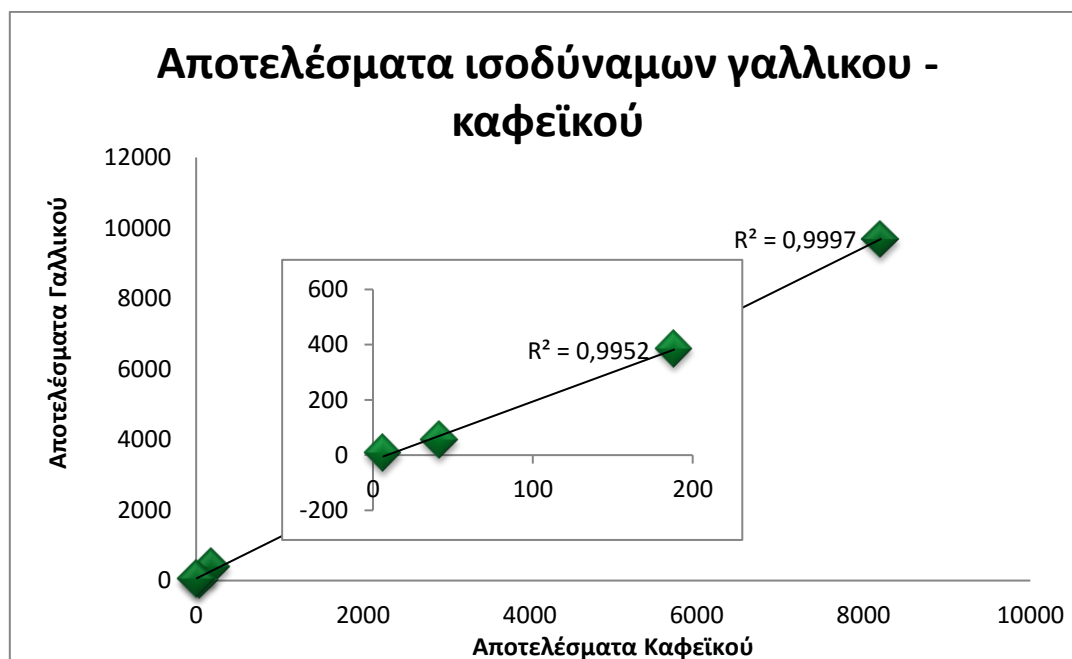
Εκχύλισμα	C ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/L)			
	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	3 ^η μέτρηση	M.O
Μαύρη Πεύκη				
Κορρές	895	1094	901	963 ±113
Πρόπολη	9930	8912	10200	9681 ± 679
Εχινάκεια	475	568	539	545 ± 61
Άρνικα	35	47	35	45± 9

Επομένως σύμφωνα με την εξίσωση (1), προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 2.8. Ολικές φαινολικές ενώσεις με ισοδύναμο καφεϊκό οξύ σε διαλύτη μεθανόλη

Εκχύλισμα	Total Phenolic Content (mg CA/g dry mass)
Μαύρη Πεύκη	
Κορρές	385,2
Πρόπολη	9681
Εχινάκεια	54,5
Άρνικα	7,5

Παρατηρούμε ότι με διαλύτη την μεθανόλη η εκτίμηση των ολικών φαινολικών διαφέρει ανάλογα με τα πρότυπα που χρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα, με την χρήση του καφεϊκού οξέος οι τιμές προκύπτουν μεγαλύτερες. Αυτό οφείλεται στη διαφοροποίηση μεταξύ γαλλικού και καφεϊκού οξέος, ως προς τη δομή και τη χημική σύσταση. Στο διάγραμμα 2.9 γίνεται συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων με ισοδύναμο το γαλλικό και των αποτελεσμάτων με ισοδύναμο το καφεϊκό, όπου και παρατηρείται γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στα δύο αποτελέσματα. (Το μικρότερο διάγραμμα απεικονίζει τις μικρές συγκεντρώσεις σε μεγαλύτερη ευκρίνεια.) Από το διάγραμμα συμπεραίνεται, ότι η επιλογή του ισοδύναμου δεν επηρεάζει την κατάταξη των δειγμάτων καίτοι διαφοροποιούνται οι τιμές.



Διάγραμμα 2.9. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο ισοδύναμων ενώσεων

2.1.2 Διαλύτης Αιθανόλη (EtOH)

Για την διεξαγωγή των συγκεκριμένων πειραμάτων, χρησιμοποιείται και πάλι η μεθοδολογία της φασματοφωτομετρική μεθόδου (Sigleton et al., 1999). Στην ανάλυση, αυτή τη φορά, μελετάται το αιθανολικό διάλυμα του εκάστοτε εκχυλίσματος. Το μίγμα της αντίδρασης, παρασκευάζεται με ανάμιξη:

- ✓ 0,5 mL του αιθανολικού διαλύματος του κάθε εκχυλίσματος
- ✓ 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, διάλυμα 10% σε νερό
- ✓ 2,5 mL NaHCO₃ διάλυμα 7,5% σε νερό .

Τυφλό διάλυμα κατασκευάζεται ταυτόχρονα το οποίο περιέχει:

- ✓ 0,5 mL αιθανόλης (40% σε υδατικό διάλυμα)
- ✓ 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, διάλυμα 10% σε νερό
- ✓ 2,5 mL NaHCO₃ διάλυμα 7,5% σε νερό .

Τα δείγματα στη συνέχεια επωάζονται στους 4 °C για 30 λεπτά. Η απορρόφηση προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο σε λ_{max} = 760 nm.

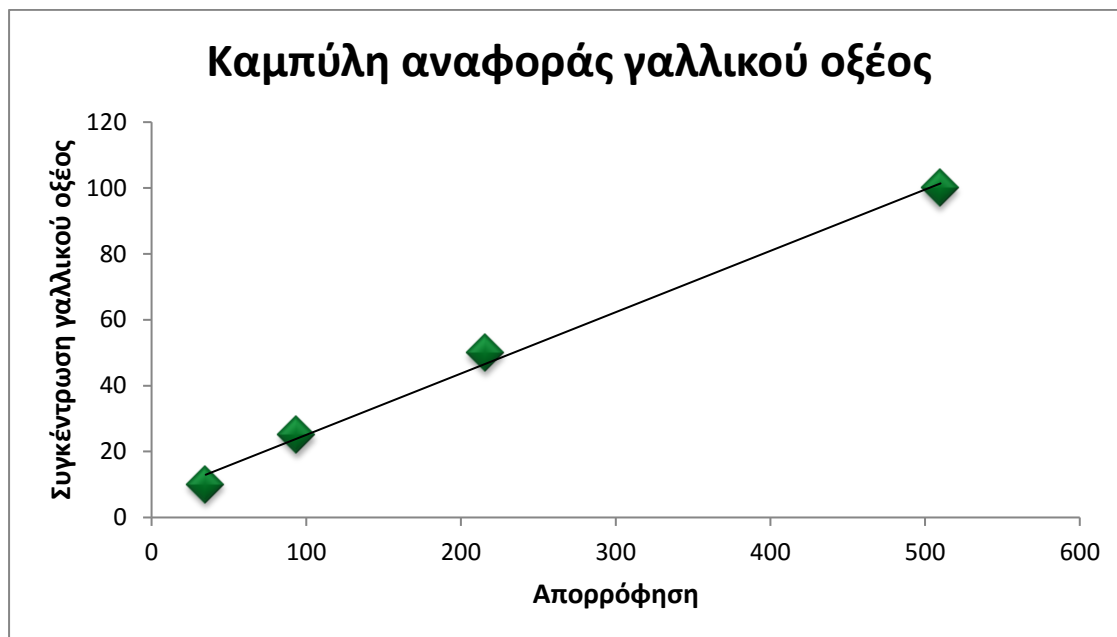
Αρχικά κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς, με χρήση γαλλικού και καφεϊκού οξέος ως πρότυπα (δύο ανεξάρτητοι κύκλοι πειραμάτων). Τα δείγματα κάθε κύκλου παρασκευάζονται επί τρεις φορές για κάθε ανάλυση και λαμβάνεται η μέση τιμή απορρόφησης. Με βάση την μετρούμενη απορρόφηση, η συγκέντρωση φαινολικών διαβάστηκε (mg/L) από τη γραμμή βαθμονόμησης και η περιεκτικότητα φαινολικών στα εκχυλίσματα εκφράστηκε σε ισοδύναμο γαλλικού οξέος ή καφεϊκού οξέος αντίστοιχα (mg του γαλλικού/καφεϊκού οξέος /g ξηρής μάζας). Ο υπολογισμός των φαινολικών σε συνάρτηση με το γαλλικό οξύ, έγινε με βάση την εξίσωση $C_{GA} = 0.1861562762 * Abs_{760} + 6,4590959696$, με $R^2 = 0.9951$ που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος. Για τον υπολογισμό των φαινολικών εκφρασμένα ως ισοδύναμο καφεϊκού, έγινε χρήση της εξίσωσης $C_{CAF} = 0.2005233579 * Abs_{760} + 2,8868238611$, με $R^2 = 0,9972$. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ως y ορίζεται η συγκέντρωση του ισοδύναμου γαλλικού/καφεϊκού οξέος και ως x η απορρόφηση του εκάστοτε εκχυλίσματος. Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε φαινολικά, του κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$\text{Total Phenolic Content (TPC) (mg/g)} = \frac{C_{ga} \text{ (mg/L)} \times V_{\text{ext. solution}} \text{ (L)}}{M_{\text{extract}} \text{ (g)}} \quad (1)$$

Όπου: C_{ga} (mg/L), είναι η συγκέντρωση του ισοδύναμου γαλλικού οξέος που υπολογίστηκε από την εξίσωση, $V_{\text{ext. solution}}$ (L) είναι ο όγκος του διαλύτη του εκχυλίσματος και M_{extract} , η μάζα του φυτού του κάθε εκχυλίσματος σε γραμμάρια. (Lluvia Artega Figueroa, 2014)

Πίνακας 2.10. Απορρόφηση για κατασκευή καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος

Συγκέντρωση διαλυμάτων	
γαλλικού οξέος (mg/L)	Απορρόφηση
10	35
25	94
50	216
100	510



Διάγραμμα 2.11. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Πίνακας 2.12. Συγκέντρωση ισοδύναμων γαλλικού οξέος

Εκχύλισμα	C ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg/L)			
	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	3 ^η μέτρηση	M.O
Μαύρη Πεύκη				
Κορρές	617	632	634	628 ±9
Πρόπολη	11775	12364	10692	11610 ± 848
Εχινάκεια	515	565	587	555 ± 36
Άρνικα	52	59	75	62 ± 11

Επομένως σύμφωνα με την εξίσωση (1), προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

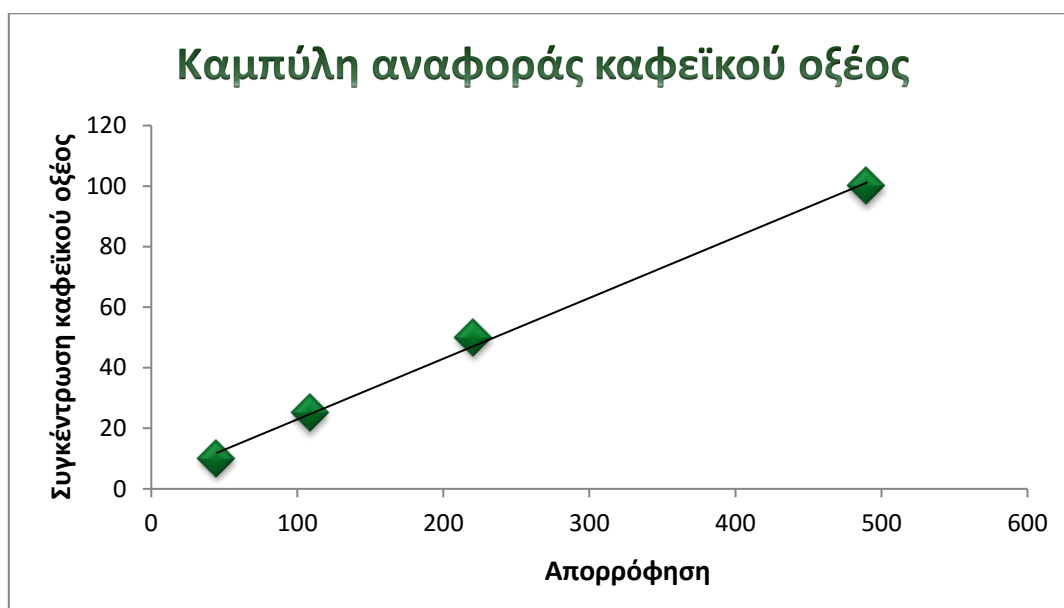
Πίνακας 2.13. Ολικές φαινολικές ενώσεις με ισοδύναμο γαλλικό οξύ σε διαλύτη αιθανόλη

Εκχύλισμα	Total Phenolic Content (mg GA/g dry mass)
Μαύρη Πεύκη	
Κορρές	251
Πρόπολη	11610
Εχινάκεια	55.5
Άρνικα	10.3

Παρατηρείται υψηλότερη ποσότητα φαινολικών με ισοδύναμο το γαλλικό οξύ σε διαλύτη αιθανόλη (πίνακες 2.11-2.12), έναντι μεθανόλης (πίνακες 2.3-2.4). Η διαφοροποίηση εκτιμάται ότι οφείλεται στη διαφορετική διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στα εκχυλίσματα.

Πίνακας 2.14. Απορρόφηση για κατασκευή καμπύλης αναφοράς καφεϊκού οξέος

Συγκέντρωση διαλυμάτων καφεϊκού οξέος (mg/L)	Απορρόφηση
10	45
25	109
50	221
100	490



Διάγραμμα 2.15. Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος

Πίνακας 2.16. Συγκέντρωση ισοδύναμων καφεϊκού οξέος

Εκχύλισμα	C ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/L)			
	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	3 ^η μέτρηση	M.O
Μαύρη Πεύκη				
Κορρές	654	697	668	673 ±22
Πρόπολη	8407	9415	9079	8967 ± 513

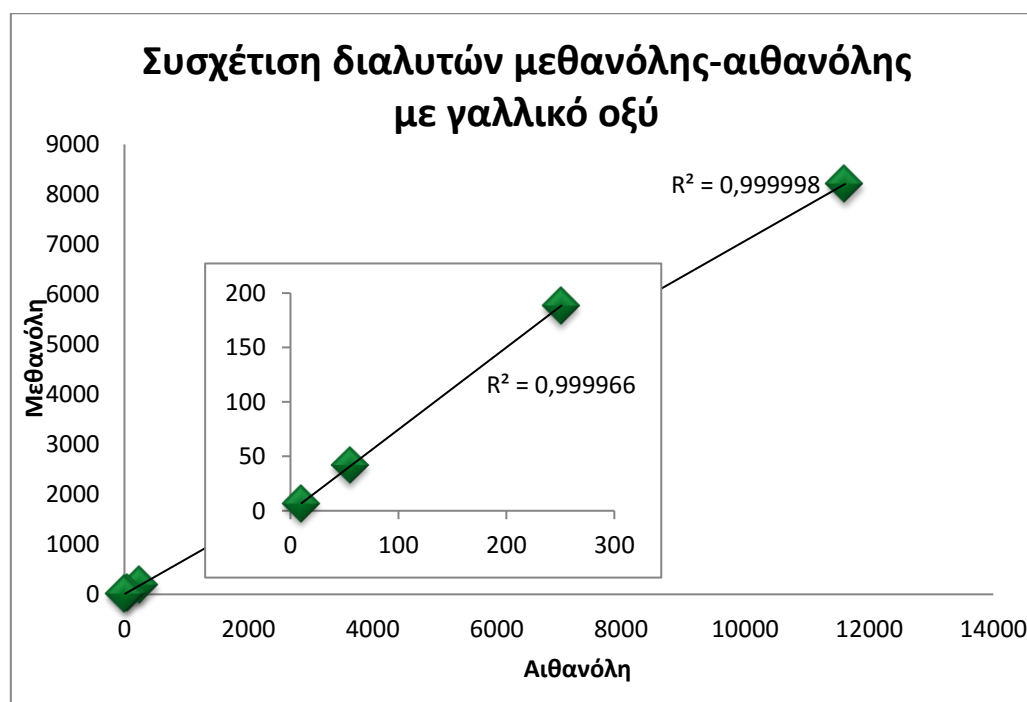
Εχινάκεια	584	620	624	610 ± 23
Άρνικα	35	45	45	42 ± 5

Επομένως σύμφωνα με την εξίσωση (1), προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 2.17. Ολικές φαινολικές ενώσεις με ισοδύναμο καφεϊκό οξύ σε διαλύτη αιθανόλη

Εκχύλισμα	Total Phenolic Content (mg CA/g dry mass)
Μαύρη Πεύκη Κορρές	269.2
Πρόπολη	8967
Εχινάκεια	61
Άρνικα	7

Στο διάγραμμα 2.18 συσχετίζονται οι μέθοδοι της μεθανόλης και της αιθανόλης με ισοδύναμο μόνο το γαλλικό οξύ. Το μικρότερο διάγραμμα απεικονίζει τις μικρές συγκεντρώσεις σε μεγαλύτερη ευκρίνεια. Η γραμμική συσχέτιση αποδεικνύει, ότι η κατηγοριοποίηση των εκχυλισμάτων είναι ανεξάρτητη από την επιλογή του διαλύτη, ενώ οι απόλυτες τιμές διαφοροποιούνται.



Διάγραμμα 2.18. Σύγκριση διαλυτών μεθανόλης-αιθανόλης με ισοδύναμο το γαλλικό οξύ

2.1.3 Διαλύτης Νερό (H₂O)

Στην τελευταία εκδοχή του πειράματος εύρεσης των ολικών φαινολικών ενώσεων, χρησιμοποιείται μια τροποποιημένη χρωματομετρική μέθοδος, που περιγράφηκε από τους Singleton και Rossi (1965). Η μέθοδος αυτή, περιλαμβάνει την αναγωγή αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με φαινολικές ενώσεις, με ταυτόχρονο σχηματισμό ενός μπλε συμπλόκου. Σε αυτή τη μελέτη αναμειγνύονται:

- ✓ 0.50 mL του εκάστοτε εκχυλίσματος
- ✓ 3 mL αποσταγμένου ύδατος
- ✓ 0,25 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.
- ✓ 0,75 mL κορεσμένου ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃)
- ✓ 0,95 mL αποσταγμένου νερού .

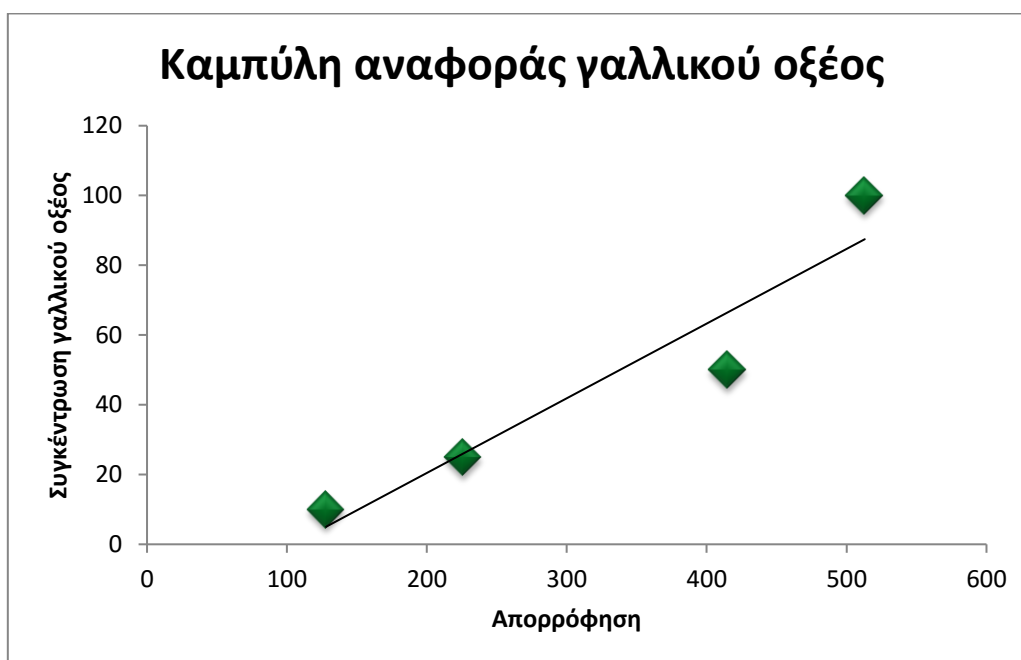
Στη συνέχεια, το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37 °C, και η απορρόφηση μετράται στα 765 nm σε φασματόμετρο UV-Vis. Όπως και στις προηγούμενες μεθόδους κατασκευάζεται καμπύλη με διάλυμα γαλλικού οξέος. Στην προκειμένη περίπτωση, δεν χρησιμοποιείται και διάλυμα καφεϊκού οξέος για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Ο λόγος είναι η μη ολοκληρωμένη διαλυτοποίηση του καφεϊκού οξέος στο υδατικό διάλυμα, με αποτέλεσμα τμήματα της ουσίας να παραμένουν αυτούσια στο ποτήρι ζέσεως. Ο υπολογισμός των φαινολικών σε συνάρτηση με το γαλλικό οξύ, γίνεται με βάση την εξίσωση $C_{GA} = 0.2140573864 \cdot Abs_{765} - 22,3553923434$, με $R^2 = 0.9027$ που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ως y ορίζεται η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος και ως x η απορρόφηση του εκάστοτε εκχυλίσματος. Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε φαινολικά, του κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$\text{Total Phenolic Content (TPC) (mg/g)} = \frac{C_{ga} \text{ (mg/L)} \times V_{\text{ext. solution}} \text{ (L)}}{M_{\text{extract}} \text{ (g)}} \quad (1)$$

Όπου: C_{ga} (mg/L), είναι η συγκέντρωση του ισοδύναμου γαλλικού οξέος που υπολογίστηκε από την εξίσωση, $V_{ext. solution}$ (L) είναι ο όγκος του διαλύτη του εκχυλίσματος και $M_{extract}$, η μάζα του φυτού του κάθε εκχυλίσματος σε γραμμάρια. (Henríquez Carolina et al., 2010)

Πίνακας 2.19. Απορρόφηση για κατασκευή καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος

Συγκέντρωση διαλυμάτων γαλλικού οξέος (mg/L)	Απορρόφηση
10	128
25	226
50	415
100	513



Διάγραμμα 2.20. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Πίνακας 2.21. Συγκέντρωση ισοδύναμων γαλλικού οξέος

Εκχύλισμα	C ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg/L)			
	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	3 ^η μέτρηση	M.O
Μαύρη Πεύκη				
Κορρές	467	582	502	517 ± 58
Πρόπολη	11158	12050	11269	11492 ± 487

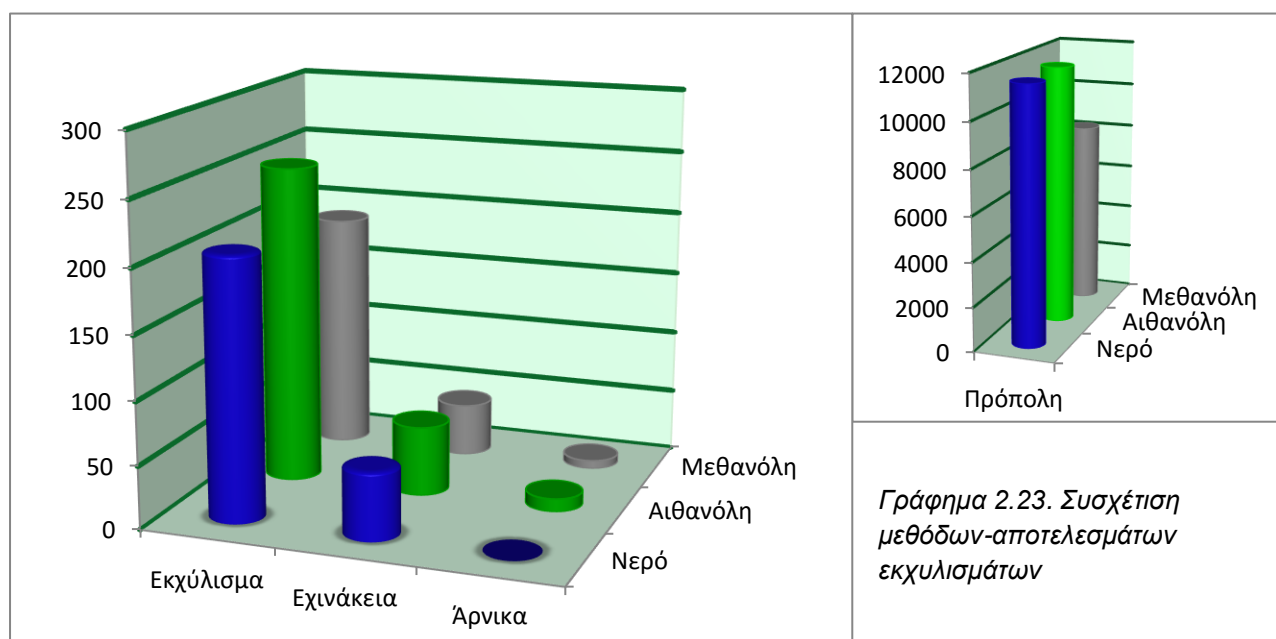
Εχινάκεια	560	563	501	541 ± 35
Άρνικα	-	-	-	-

Επομένως σύμφωνα με την εξίσωση (1), προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 2.22. Ολικές φαινολικές ενώσεις με ισοδύναμο γαλλικό οξύ σε διαλύτη νερό

Εκχύλισμα	Total Phenolic Content (mg GA/g dry mass)
Μαύρη Πεύκη	
Κορρές	206,8
Πρόπολη	11492
Εχινάκεια	54,1
Άρνικα	-

Στα παρακάτω γραφήματα γίνεται ταυτόχρονη σύγκριση των τριών μεθόδων, με διαλύτες το νερό, την αιθανόλη και την μεθανόλη, καθώς και των αποτελεσμάτων των τριών εκχυλισμάτων. Τα υψηλά αποτελέσματα της πρόπολης, επηρεάζουν την απεικόνιση του συνολικού γραφήματος, για αυτό το λόγο, παρατίθενται ξεχωριστά. Όπως απεικονίζεται, στο διαλύτη αιθανόλη, οι μετρήσεις είναι μεγαλύτερες σε όλα τα εκχυλίσματα. Η μεθανόλη έχει τις χαμηλότερες μετρήσεις, εκτός από την περίπτωση της άρνικας, που δεν έδωσε μέτρηση, με διαλύτη το νερό.



2.1.4 Συμπεράσματα

Μελετώντας την βιβλιογραφία, διαπιστώνεται η ύπαρξη πολλών διαφορετικών μεθόδων, για την εύρεση των ολικών φαινολικών ενώσεων ενός εκχυλίσματος. Ενδεικτικά έγινε η πειραματική μελέτη τριών διαφορετικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη και νερό). Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρατίθενται παραπάνω, αλλά και από όλες τις επαναλήψεις των εκάστοτε πειραμάτων:

- Το νερό (H₂O) ως διαλύτης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα είδη εκχυλισμάτων, συγκεκριμένα δεν έδωσε ένδειξη για την περίπτωση της άρνικας. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι δεν διαλύει το καφεϊκό οξύ, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για όλα τα πιθανά ισοδύναμα, όπως πράγματι έγινε στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος. Επομένως σαν μέθοδος εμφανίζει τα περισσότερα μειονεκτήματα και δεν προτείνεται.
- Ύστερα από την μελέτη της κλίσης των διαγραμμάτων των καμπυλών αναφοράς μπορούμε να εξάγουμε συμπέρασμα για την ευαισθησία κάθε διαλύτη. Η κλίση της ευθείας ορίζεται, ως ο λόγος :

$$\text{Κλίση} = \frac{\Delta C}{\Delta Abs}$$

Ενώ η ευαισθησία ως ο αντίστροφος λόγος :

$$\text{Ευαισθησία} = \frac{\Delta Abs}{\Delta C}$$

Συμπερασματικά, για το **γαλλικό οξύ**:

- Κλίση καμπύλης αναφοράς με διαλύτη μεθανόλη = 0.0989
- Κλίση καμπύλης αναφοράς με διαλύτη αιθανόλη = 0.1861
- Κλίση καμπύλης αναφοράς με διαλύτη νερό = 0.2141

Άρα ο διαλύτης μεθανόλη εμφανίζει την μεγαλύτερη ευαισθησία και το νερό την μικρότερη.

Για το **καφεϊκό οξύ**:

- Κλίση καμπύλης αναφοράς με διαλύτη μεθανόλη = 0.2166
- Κλίση καμπύλης αναφοράς με διαλύτη αιθανόλη = 0.2005

Στην περίπτωση με ισοδύναμο το καφεϊκό οξύ, την μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζει ο διαλύτης αιθανόλη.

- Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, καθώς και η περαιτέρω ανάλυση που έγινε, υποδηλώνουν ότι οι απόλυτες τιμές περιεκτικότητας φαινολικών εξαρτώνται από το διαλύτη, (αιθανόλη ή μεθανόλη), χωρίς όμως να επηρεάζεται η κατηγοριοποίηση των ενώσεων.
- Για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς, πραγματοποιήθηκαν τρεις σειρές μετρήσεων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Κατασκευάστηκαν επομένως τρεις καμπύλες αναφοράς για τον κάθε διαλύτη. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, προέκυψε διακύμανση από ημέρα σε ημέρα, ακόμα και για την ίδια μέθοδο. Προτείνεται επομένως η χρήση καινούριας καμπύλης βαθμονόμησης πριν από κάθε μέτρηση σε αντίθεση με την χρήση μίας μόνο εξίσωσης.
- Η σχετική απόκλιση ακόμα και για τον ίδιο διαλύτη και το ίδιο ισοδύναμο, είναι της τάξεως του 10%.
- Τα δείγματα που αναλύθηκαν έχουν προέλθει από εκχυλίσους διαφορετικής αναλογίας (Μαύρη πεύκη 1%, Πρόπολη 10%, Εχινάκεια 10%, Άρνικα 3%). Προκύπτει, ότι το διάλυμα της πρόπολης είναι πλούσιο σε ολικά φαινολικά, μάλιστα σε τριπλάσια συγκέντρωση από αυτά του εκχυλίσματος εχινάκεια. Επιπρόσθετα, το διάλυμα της μαύρης πεύκης παρουσιάζει ολικά φαινολικά σε παρεμφερή συγκέντρωση με αυτά του εκχυλίσματος εχινάκεια, αν και η σύσταση του είναι μικρότερη από την αντίστοιχη του εκχυλίσματος. Τέλος, το διάλυμα της άρνικας, παρουσιάζει χαμηλή συγκέντρωση φαινολικών, με αποκορύφωση την αδυναμία μέτρησής τους με διαλύτη το νερό. Με αναγωγή των μετρήσεων ανά γραμμάριο ξηρής μάζας της πρώτης ύλης, καθίσταται

σαφές ότι η πρόπολη παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση, ενώ ακολουθεί η μαύρη πεύκη.

2.2 Ολικά Φλαβονοειδή (Total Flavonoids)

Για την εύρεση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων σε κάθε εκχύλισμα προς μελέτη, χρησιμοποιείται, η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου, των C. Chang et al. (2002). Η μέθοδος αυτή εν συντομία, περιλαμβάνει την ανάμειξη :

- ✓ 50 μL εκχυλίσματος (1 mg/mL μεθανόλης)
- ✓ Συμπλήρωση μέχρι ποσότητα 1 mL με μεθανόλη
- ✓ 4 mL απεσταγμένο νερό
- ✓ 0,3 mL υδατικού διαλύματος 5% NaNO_2
- ✓ 0.3 mL υδατικού διαλύματος 10% AlCl_3 (μετά το πέρας 5 λεπτών επώασης)

Το μείγμα αφήνεται για χρονικό διάστημα έξι λεπτών και στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη :

- ✓ 2 mL διαλύματος NaOH , συγκέντρωσης 1 mol/L.
- ✓ 2.4 mL με δις-απεσταγμένο νερό.

Το μίγμα αφήνεται να σταθεί για 15 λεπτά, και στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση σε φασματοφωτόμερο Uv-Vis με λ_{max} στα 510 nm. Αρχικά κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης με χρήση κερκετίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις . Το σύνολο των φλαβονοειδών εκφράζεται ως mg ισοδύναμου κερκετίνης g ξηρής μάζας. Ο υπολογισμός, γίνεται με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης $C_{\text{QUER}} = 2.820960534715\text{Abs}_{510} - 23,427396643010$ με $R^2 = 0,914355129632$. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ως y ορίζεται η συγκέντρωση της κερκετίνης και ως x η απορρόφηση του εκάστοτε εκχυλίσματος. Για τον υπολογισμό του

συνολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή, του κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιείται η εξίσωση:

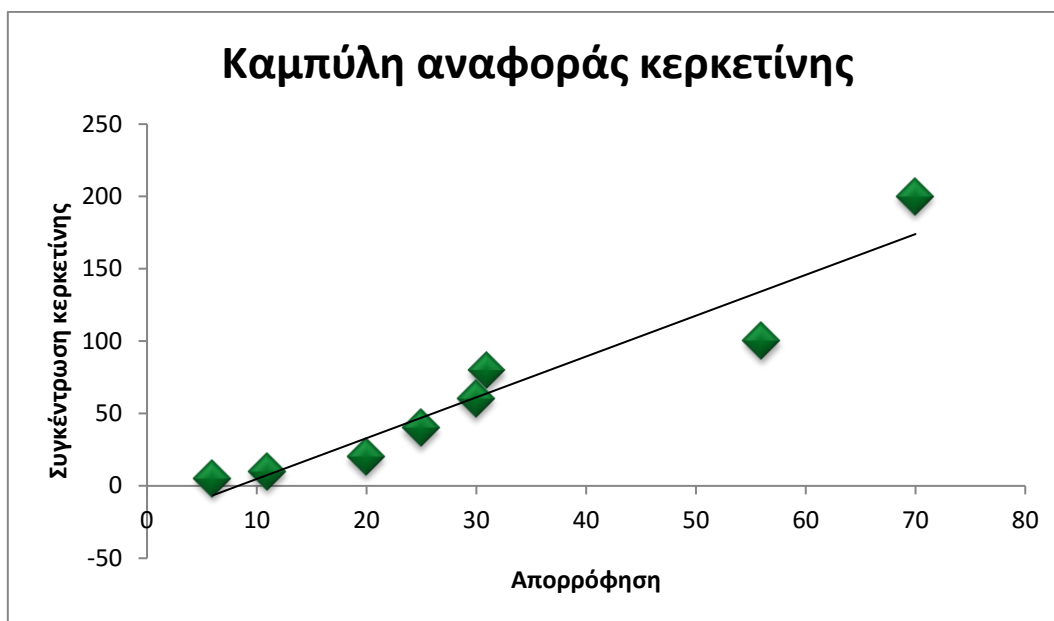
$$\text{Total Flavonoids Content (TFC) (mg/g)} = \frac{C_{\text{quer}} (\text{mg/L}) \times V_{\text{ext.solution}} (\text{L})}{M_{\text{extract}} (\text{g})} \quad (1)$$

Όπου: C_{quer} (mg/L), είναι η συγκέντρωση του ισοδύναμου κερκετίνης που υπολογίστηκε από την εξίσωση, $V_{\text{ext.solution}}$ (L) είναι ο όγκος του διαλύτη του εκχυλίσματος και M_{extract} , η μάζα του φυτού του κάθε εκχυλίσματος σε γραμμάρια. (Chang C., et al., 2002)

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα καθώς και η καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης.

Πίνακας 2.24. Αποτελέσματα απορρόφησης για καμπύλη αναφοράς κερκετίνης

Συγκέντρωση διαλύματος κερκετίνης (ppm)	Απορρόφηση
5	6
10	11
20	20
40	25
60	30
80	31
100	56
200	70



Διάγραμμα 2.25. Καμπύλη Αναφοράς Κερκετίνης

Πίνακας 2.26. Συγκέντρωση ισοδύναμων κερκετίνης

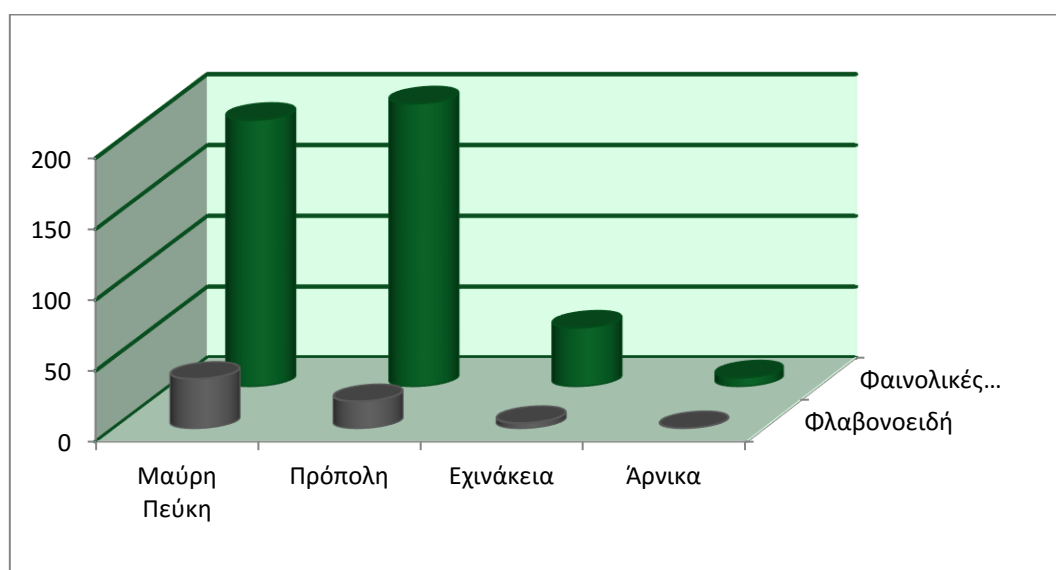
Εκχύλισμα	C ισοδύναμα κερκετίνης (mg/L)			
	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	3 ^η μέτρηση	M.O
Μαύρη Πεύκη				
Κορρές	332	365	359	352 ± 17
Πρόπολη	1782	2049	1978	1936 ± 138
Εχινάκεια	374	419	404	399 ± 22
Άρνικα	10	13	8	10 ± 2

Επομένως σύμφωνα με την εξίσωση (1), προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 2.27. Ολικά φλαβονοειδή εκχυλισμάτων με ισοδύναμο κερκετίνης σε διαλύτη μεθανόλη

Εκχύλισμα	Total Flavonoid Content (mg QE/g dry mass)
Μαύρη Πεύκη Κορρές	35,2
Πρόπολη	19,36
Εχινάκεια	3,99
Άρνικα	0,33

Στο παρακάτω γράφημα, απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών και ολικών φλαβονοειδών, όλων των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν στη διπλωματική. Οι μετρήσεις του εκχυλίσματος της πρόπολης, υπερβαίνουν τον άξονα των y τιμών, ωστόσο σε πραγματική κλίμακα, δεν παρουσιάζεται με ευκρίνεια η αναλογία. Όπως αναπαρίσταται στο γράφημα, όλα τα εκχυλίσματα έχουν υπερδιπλάσια συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων έναντι της συγκέντρωσης φλαβονοειδών. Αυτό είναι φυσιολογικό φαινόμενο, εφόσον τα φλαβονοειδή ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων.



Γράφημα 2.28. Συσχέτιση συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων με φλαβονοειδών με διαλύτη μεθανόλη

2.2.1 Συμπεράσματα

- Από τις μετρήσεις που απεικονίζονται στον πίνακα 2.27 προκύπτει ότι το εκχύλισμα μαύρης πεύκης είναι το πιο πλούσιο σε φλαβονοειδή, ενώ μάλιστα έχει την μικρότερη αναλογία (γραμμάρια ξηρής μάζας/ όγκο διαλύτη εκχυλίσματος). Επόμενο στις μετρήσεις είναι το εκχύλισμα της πρόπολης. Η πρόπολη παρουσίασε υψηλές τιμές στην συγκέντρωση ολικών φαινολικών, κάτι που δεν παρατηρείται και για την συγκέντρωση φλαβονοειδών. Τα εκχυλίσματα εχινάκεια και άρνικα, παρουσιάζουν χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή.

- Μετά από αναγωγή σε ξηρή μάζα πρώτης ύλης προκύπτει ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών παρατηρείται στη μαύρη Πεύκη.
- Από την σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων και των φλαβονοειδών, προκύπτει το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των φαινολικών είναι πολύ μεγαλύτερες. Αυτό είναι φυσιολογικό διότι τα φλαβονοειδή υπάγονται στην ομάδα των φαινολικών ενώσεων.
- Το γεγονός ότι το εκχύλισμα της εταιρίας Κορρές, παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών, έρχεται να επιβεβαιώσει την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του, που προσδίδει συσφικτικές και αντιγηραντικές ιδιότητες.
- Έπειτα από βιβλιογραφική έρευνα, (Κεφ. 1 θεωρητικού μέρους), το εκχύλισμα άρνικας, αναμενόταν να είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή. Ωστόσο, στο συγκεκριμένο εκχύλισμα δεν πιστοποιήθηκε αυτό από τις μετρήσεις. Η εξήγηση πιθανότατα είναι ότι τα χαρακτηριστικά κάθε φυτού εξαρτώνται από την εποχή, την τοποθεσία που αναπτύχθηκε, τον τρόπο συγκομιδής, την διαδικασία και τον διαλύτη εκχύλισης. Σημειώνεται ότι το εκχύλισμα της άρνικας είναι υδατικό.

2.3 Αντιοξειδωτική Δράση - Δοκιμή DPPH(Antioxidant Activity)

Για τις δοκιμές DPPH χρησιμοποιήθηκε μέθοδος των Brand-Williams et al. (1995). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, ζυγίζονται 0.0025 g DPPH, τα οποία μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Αρχικά προστίθενται 50 mL μεθανόλης και ακολουθεί έντονη ανακίνηση, μέχρι πλήρη διάλυση του αντιδραστηρίου. Στο σημείο αυτό, γίνεται και η προσθήκη της υπόλοιπης μεθανόλης, μέχρι τη χαραγή της φιάλης. Το συγκεκριμένο διάλυμα, πρέπει οπωσδήποτε να διατηρείται φρέσκο, γι' αυτό το λόγο, παρασκευαζόταν καθημερινά, μέχρι το πέρας των πειραμάτων. Σύμφωνα με την μέθοδο :

- ✓ 3.9 mL του διαλύματος DPPH αναμιγνύονται με

- ✓ 0.1 mL του διαλύματος του εκάστοτε αντιοξειδωτικού

Το μίγμα τοποθετείται σε γυάλινη κυψελίδα και καταγράφεται η μείωση της απορρόφησης στα 515 nm, που αποτελεί μέγιστο στο φάσμα UV-Vis της ρίζας. Να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι κάθε αντιοξειδωτικό μελετήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, ζυγιζόταν η απαιτούμενη ποσότητα προτύπου σε αναλυτικό ζυγό και στη συνέχεια, η ποσότητα αυτή μεταφερόταν σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL, όπου αραιωνόταν με μεθανόλη, μέχρι τη χαραγή. Από την παραπάνω φιάλη παράγονταν και τα υπόλοιπα διαλύματα με τις επιθυμητές αραιώσεις. Οι κυψελίδες πωματίζονταν ερμητικά, έτσι ώστε να μην εξατμίζεται ο διαλύτης και στη συνέχεια καταγραφόταν η απορρόφηση καθεμίας. Οι αντιδράσεις ολοκληρώνονταν όταν οι καμπύλες μείωσης της απορρόφησης έφταναν σε πλατό. (Τσιμογιάννης Δημήτριος, 2008)

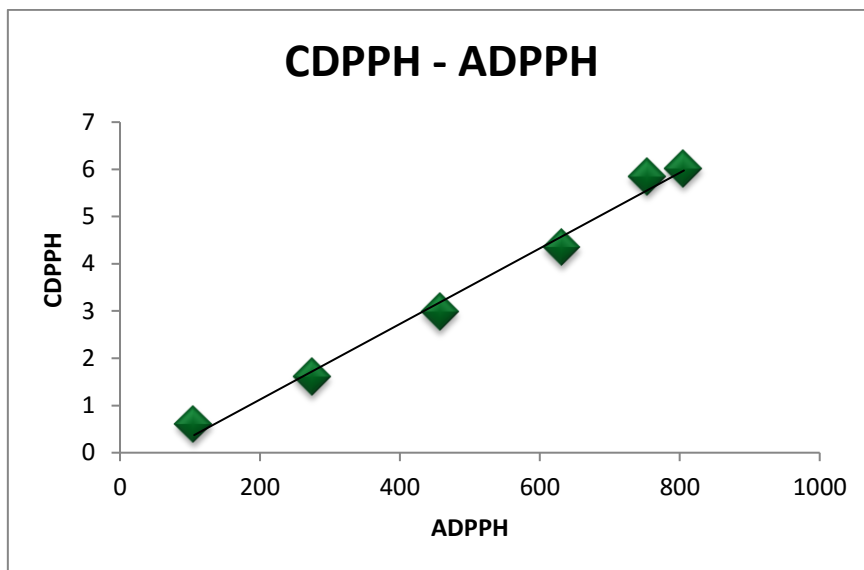
Το σύνολο των υπολογισμών, βασίζεται στην καμπύλη αναφοράς του αντιδραστηρίου DPPH (διάγραμμα $A_{DPPH} - C_{DPPH}$) Βάση της καμπύλης αυτής, υπολογίζεται η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος DPPH καθώς και του μη ανηγμένου DPPH, μετά το τέλος της εκάστοτε αντίδρασης. Για τον προσδιορισμό της στοιχειομετρίας της αντίδρασης αντιοξειδωτικού-DPPH, πραγματοποιούνται τα παρακάτω:

- Αναγωγή των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων σε τιμές συγκέντρωσης DPPH (μέσω της καμπύλης αναφοράς)
- Κατασκευή του γραφήματος $C_{antiox.} - \Delta C_{DPPH}$
- Προσαρμογή βέλτιστης ευθείας. Η κλίση της προκύπτουσας ευθείας εκφράζει το πλήθος των αναγόμενων ριζών ανά μόριο αντιοξειδωτικού.

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται βάση των παρακάτω μετρήσεων:

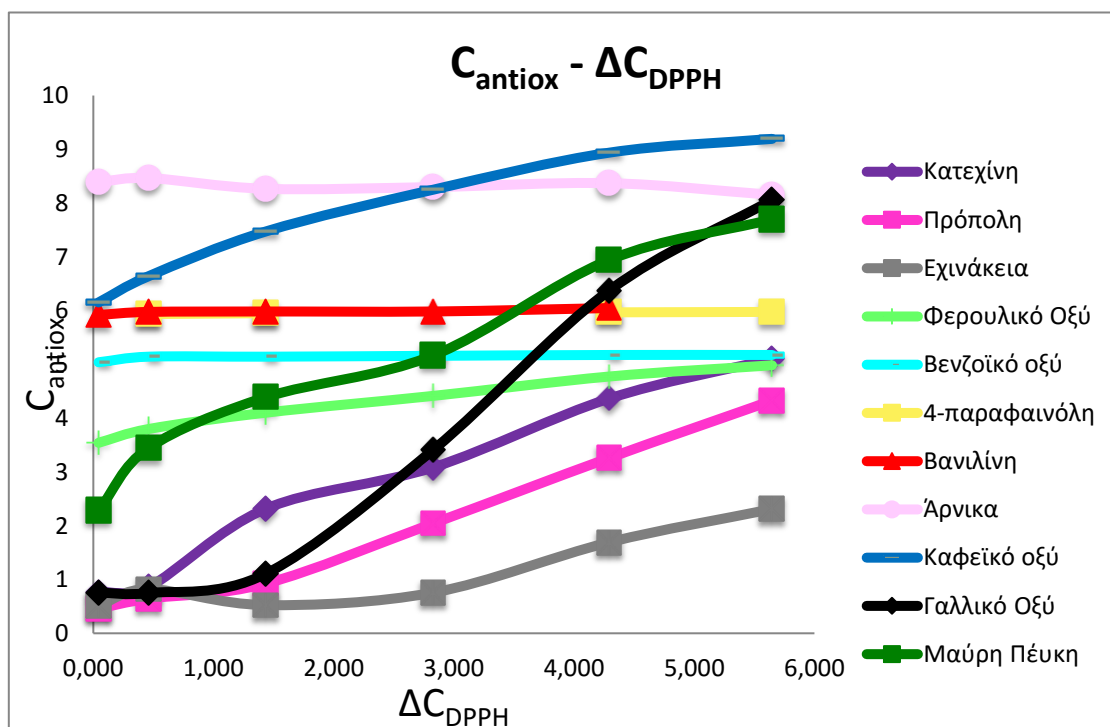
Πίνακας 2.29. Μετρήσεις $A_{DPPH} - C_{DPPH}$

$C_{DPPH} (x 10^{-5} M)$	A_{DPPH}
106	0,602
275	1,608
458	2,981
632	4,352



Διάγραμμα 2.30 καμπύλη αναφοράς DPPH

Η καμπύλη αναφοράς δίνει την εξίσωση $C_{DPPH} = 0,00480054546A_{DPPH} - 0.4760888139$, με $R^2 = 0.99$, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τους υπόλοιπους υπολογισμούς. Παρακάτω απεικονίζεται συγκεντρωτικό διάγραμμα $C_{antiox.} - \Delta C_{DPPH}$ για κάθε ουσία που μελετήθηκε για την αντιοξειδωτική της δράση και πίνακας που αναγράφονται οι κλίσεις κάθε καμπύλης του διαγράμματος. Η εκάστοτε κλίση εκφράζει το πλήθος των αναγόμενων ριζών ανά μόριο αντιοξειδωτικού.



Διάγραμμα 2.31. Συγκεντρωτικό διάγραμμα $C_{antiox} - \Delta C_{DPPH}$

Πίνακας 2.32. Πλήθος αναγόμενων ριζών εκχυλισμάτων και πρότυπων ενώσεων.

Εκχύλισμα- Πρότυπη ένωση	Πλήθος αναγόμενων ριζών ανά μόριο αντιοξειδωτικού
Κατεχίνη	0,7989
Μαύρη Πεύκη	0,9172
Πρόπολη	0,7039
Εχινάκεια	0,3004
Φερουλικό οξύ	0,2496
Βενζοϊκό οξύ	0,0170
4-χλωροφαινόλη	0,0072
Βανιλίνη	0,0230
Άρνικα	-0,0350
Καφεϊκό οξύ	0,5431
Γαλλικό οξύ	1,3992

Από την ανάλυση των μετρήσεων παρατηρείται ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν το γαλλικό οξύ, η μαύρη πεύκη, η κατεχίνη και η πρόπολη. Μέτρια δράση φαίνεται να έχουν τα διαλύματα του καφεϊκού και του φερουλικού οξέος, καθώς και το εκχύλισμα εχινάκεια. Τέλος, χαμηλή αντιοξειδωτική δράση έχουν τα διαλύματα της 4-χλωροφαινόλης, του βενζοϊκού οξέος και της βανιλίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κλίση στην καμπύλη του εκχυλίσματος άρνικας, προκύπτει αρνητική. Συμπερασματικά το συγκεκριμένο εκχύλισμα άρνικας δεν παρουσιάζει καμία αντιοξειδωτική δράση.

Εκτός από την παραπάνω ανάλυση, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, επίσης, με βάση τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH, η οποία εκτιμά το υπόλοιπο συγκέντρωσης της ρίζας, μετά την αντίδραση της με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις από το εκάστοτε εκχύλισμα, σύμφωνα με την εξίσωση:

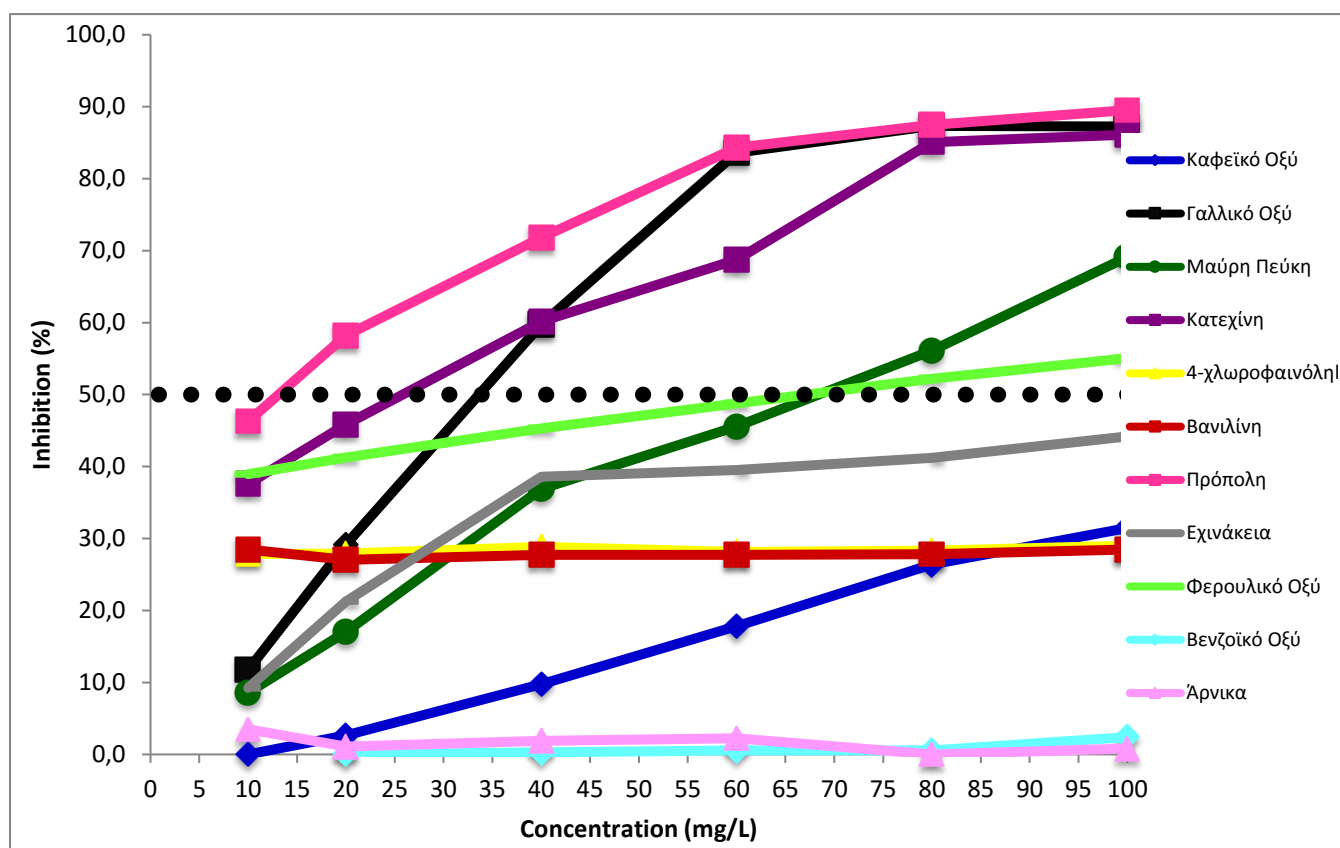
$$\% \text{Αναστολή του DPPH} = \left(\frac{\text{Ααρχική} - \text{Αδείγματος}}{\text{Ααρχική}} \right) \times 100$$

Όπου Αρχική είναι η απορρόφηση του DPPH χωρίς το εκχύλισμα, και Αδείγματος η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος. Η μελέτη για την αναστολή της δράσης του DPPH κατά 50%, δείκτης IC₅₀ έγινε μέσω της γραφικής παράστασης της συγκέντρωσης του διαλύματος σε σχέση με την αναστολή της ρίζας DPPH. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχύλισμα, υποδηλώνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης, εκτός από τα εκχυλίσματα επιλέχθηκαν και ορισμένα πρότυπα, από την βιβλιοθήκη. Τα πρότυπα αυτά επιλέχθηκαν, βάση της βιβλιογραφίας, αλλά και με σκοπό να αποτελούν ενδεικτικά κατηγοριών.

Πίνακας 2.33. Ποσοστιαία Αναστολή DPPH σε διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων

% Αναστολή DPPH											
C (mg/L)	Gallic acid	Caffeic acid	Ferulic acid	Benzoic acid	4-Chlorophenol	Vanillin	Catechin	Μαύρη Πεύκη	Πρόπολη	Εχινάκεια	Άρνικα
100	86,2	31,5	55,1	2,4	29,0	28,5	86,1	69,1	89,5	88,9	0,8
80	86,3	26,4	52,2	0,6	28,3	27,8	85,0	56,1	87,5	88,7	0,0
60	82,3	17,8	48,8	0,6	28,1	27,8	68,8	45,6	84,3	88,8	2,2
40	56,5	9,8	45,3	0,3	28,8	27,8	60,2	36,9	71,8	86,2	1,9
20	23,4	2,6	41,3	0,0	27,9	27,0	45,8	17,0	58,2	75,7	1,1
10	4,6	0,0	38,9	0,0	27,8	28,5	37,6	8,6	46,3	68,8	3,5

Βάση του πίνακα παραπάνω, κατασκευάζεται το ακόλουθο διάγραμμα που συσχετίζει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Από το διάγραμμα αυτό προκύπτουν και οι τιμές του δείκτη IC₅₀, που αναγράφονται στον πίνακα παρακάτω:



Διάγραμμα 2.34. Συσχέτιση αντιοξειδωτικής δράσης

Πίνακας 2.35. Δείκτης IC_{50}

Εκχύλισμα-Πρότυπη ένωση	Δείκτης IC_{50} (mg/L)
Gallic acid	33,9
Caffeic acid	>100
Ferulic acid	64,9
Benzoic acid	-
Catechin	26
4-Chlorophenol	-
Vanillin	-
Μαύρη Πεύκη-Κορρες	63,8
Πρόπολη	13,9
Εχινάκεια	>100
Άρνικα	-

Όσο μικρότερη είναι η τιμή του δείκτη, τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση της ένωσης που μελετάται. Επομένως, από τις μετρήσεις του δείκτη, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να έχουν τα διαλύματα της πρόπολης, της κατεχίνης του γαλλικού οξέος και της μαύρης πεύκης. Μέτρια δράση εμφανίζει το φερουλικό οξύ. Τέλος οι υπόλοιπες ενώσεις που μελετήθηκαν δεν εμφάνισαν δείκτη IC_{50} , γεγονός που επιβεβαιώνει την χαμηλή αντιοξειδωτική τους δράση.

2.3.1 Συμπεράσματα

Όπως προκύπτει από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα πρόπολης και μαύρης πεύκης. Αναλυτικότερα:

- Τα διαλύματα της πρόπολης καθώς και της κατεχίνης έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, από μικρές συγκεντρώσεις εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση κοντά στο 50% της ανάσχεσης του DPPH. Πιο αναλυτικά η πρόπολη έχει IC_{50} περίπου 14 mg/L, ενώ η κατεχίνη 26 mg/L. Όσο μικρότερος είναι ο συγκεκριμένος δείκτης, τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική δράση της ένωσης. Όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα 2.34 παρουσιάζουν μεγάλη κλίση, και τελικά εμφανίζουν πλατό σε παρεμφερή συγκέντρωση, περίπου στα 80 mg/L.
- Όσο αφορά το διάλυμα γαλλικού οξέος, στις χαμηλές συγκεντρώσεις εμφανίζει χαμηλή αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο, αυτή αυξάνεται εκθετικά, με μεγάλη κλίση, ώστε τελικά να παρατηρηθεί πλατό, όμοιο με τις παραπάνω ουσίες περίπου στη συγκέντρωση των 80 mg/L. Η υψηλή αντιοξειδωτική δράση που προκύπτει από τις μετρήσεις για το γαλλικό οξύ, είναι αναμενόμενη λόγω της παρουσίας τρίτης υδροξυ-ομάδας σε όρθο-θέση, η οποία θεωρείται, ως το αποτελεσματικότερο δομικό χαρακτηριστικό φαινολών και υδροξυβενζοϊκών οξέων. Εξαιτίας της χημικής δομής του επομένως, το γαλλικό οξύ είναι από τους ισχυρότερους παρεμποδιστές οξειδωσης, μέσα στις αντίστοιχες τάξεις ενώσεων.

- Τέλος, το εκχύλισμα της μαύρης πεύκης, σε χαμηλές συγκεντρώσεις εμφανίζει μικρή ποσοστιαία αναστολή της αντιοξειδωτικής δράσης του αντιδραστηρίου, ωστόσο στη συνέχεια παρουσιάζει μεγάλη κλίση. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το εκχύλισμα δεν παρουσιάζει πλατό όπως οι υπόλοιπες ουσίες σε συγκέντρωση των 100 mg/L γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν έχει κορεστεί σε αυτό το σημείο η αντιοξειδωτική του δράση. Σημειώνεται επίσης, ότι το εκχύλισμα μαύρης πεύκης αντιστοιχεί σε λόγο στερεού/υγρό 1/100 εν αντιθέσει με την πρόπολη που ο λόγος είναι 1/10.
- Μέτρια αντιοξειδωτική δράση εμφανίζουν τα διαλύματα του φερουλικού οξέος και του εκχυλίσματος εχινάκεια. Το πρώτο σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει ποσοστιαία ανάσχεση κοντά στο 50%, με IC₅₀ περίπου 65 mg/L, ενώ το δεύτερο φτάνει την 50% ανάσχεση σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 100 mg/L. Οι δύο ενώσεις, παρουσιάζουν πλατό μετά από την συγκέντρωση των 100 mg/L.
- Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος της μαύρης πεύκης, οφείλεται πιθανότατα στην υψηλή περιεκτικότητά του, σε φλαβονοειδή όπως προέκυψε στο Κεφ. 2.2. Τα φλαβονοειδή έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως αναλύθηκε στο Κεφ. 3 του θεωρητικού. Σε αυτές τις ενώσεις αποδίδονται οι θετικές προς την υγεία ιδιότητες του εκχυλίσματος.

Χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση, όπως προέκυψε από τις μετρήσεις, εμφανίζουν τα διαλύματα της 4-χλωροφαινόλης, της βανιλίνης, του καφεϊκού οξέος, του βενζοϊκού οξέος, καθώς και του εκχυλίσματος της άρνικας.

Αναλυτικότερα:

- Τα διαλύματα της 4-χλωροφαινόλης και της βανιλίνης, φαίνεται να έχουν μια πολύ σταθερή αντιοξειδωτική δράση, η οποία δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωση των διαλυμάτων, κοντά στο 30% της ανάσχεσης του αντιδραστηρίου DPPH. Η συμπεριφορά των ενώσεων δεν μεταβάλλεται, ούτε με την αλλαγή της συγκέντρωσης, ούτε με την πάροδο του χρόνου.

- Το καφεϊκό οξύ, σε μικρές συγκεντρώσεις έχει μηδενική ανάσχεση, ωστόσο παρουσιάζει μεγάλη κλίση και φτάνει σε ανάσχεση κοντά στο 30% σε συγκέντρωση 80-100 mg/L.
- Τέλος, τα διαλύματα του βενζοϊκού οξέος, και το εκχύλισμα της άρνικας, δεν παρουσιάζουν καμία ανάσχεση στο DPPH, επομένως δεν εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Το αποτέλεσμα αυτό δεν αλλάζει με την αύξηση της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων.
- Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους ανάλυσης των αποτελεσμάτων, καθώς και τους δείκτες IC₅₀ προκύπτουν ταυτόσημα συμπεράσματα, επομένως τα αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα. Σε κάθε μέθοδο, οι ενώσεις με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση είναι η πρόπολη, η κατεχίνη, το γαλλικό οξύ και το εκχύλισμα μαύρης πεύκης. Μέτρια συμπεριφορά έχει το φερουλικό, το εκχύλισμα εχινάκεια και ακόμα χαμηλότερη το καφεϊκό. Τέλος χαμηλή, έως και μηδενική αντιοξειδωτική δράση έχει, το εκχύλισμα της άρνικας, η 4-χλωροφαινόλη, η βανιλίνη και το βενζοϊκό οξύ.
- Τέλος, όπως μελετήθηκε και βιβλιογραφικά, το φυτό άρνικα έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ωστόσο αυτό δεν προκύπτει σε καμία από τις επιμέρους αναλύσεις. Το γεγονός αυτό αποδίδεται, στην χαμηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων όπως παρουσιάζεται στα Κεφ. 2.1 και 2.2.

3. Ανάλυση Υγρής Χρωματογραφίας- Φασματομετρίας Μάζας (LC-MS)

3.1 Δημιουργία Βιβλιοθήκης Πρότυπων Ενώσεων

Στην υγρή χρωματογραφία (LC), δεν υφίσταται η δυνατότητα ύπαρξης προκαθορισμένης βιβλιοθήκης, σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό, είναι διότι το φάσμα κάθε ουσίας, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Αναλυτικότερα, η θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος κατά την διαδικασία της υγρής χρωματογραφίας, επηρεάζεται από τον διαλύτη (νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο κ.λπ.), τις συνθήκες λειτουργίας, καθώς και τον τρόπο ιονισμού, κάθε μεθόδου που εφαρμόζεται. Για να γίνει πιο κατανοητό αυτό, το φάσμα, για παράδειγμα, του γαλλικού οξέος, με διαλύτη αιθανόλη και νερό, με χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) ιονισμό, είναι εντελώς διαφορετικό από το φάσμα της ίδιας ουσίας, με διαλύτες αυτή τη φορά, μεθανόλη και νερό, με ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Σύμφωνα επομένως με τα παραπάνω, απαιτείται δημιουργία προσωπικής βιβλιοθήκης, για κάθε εργαστήριο, και τύπο οργάνου που χρησιμοποιείται, ανάλογα πάντα με την μέθοδο που θα επιλεγεί.

Για πρώτη φορά, στη Σχολή Χημικών Μηχανικών, ξεκίνησε η δημιουργία προσωπικής βιβλιοθήκης, με σκοπό την κατασκευή φασμάτων πρότυπων ουσιών, για μελέτη και σύγκριση των φασμάτων αυτών με τα εκχυλίσματα, τα οποία εξετάζονται στην διπλωματική εργασία. Αρχικά συγκεντρώθηκαν οι ουσίες, σύμφωνα με τα απαιτούμενα κριτήρια, όπως παρουσιάζεται στο Κεφ. 1 του πειραματικού μέρους. Οι πρότυπες αυτές ουσίες μελετήθηκαν με τέσσερις διαφορετικές τεχνικές ιονισμού:

- Θετικός ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI positive)
- Αρνητικός ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI negative)

- Θετικός χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI positive)
- Αρνητικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI negative)

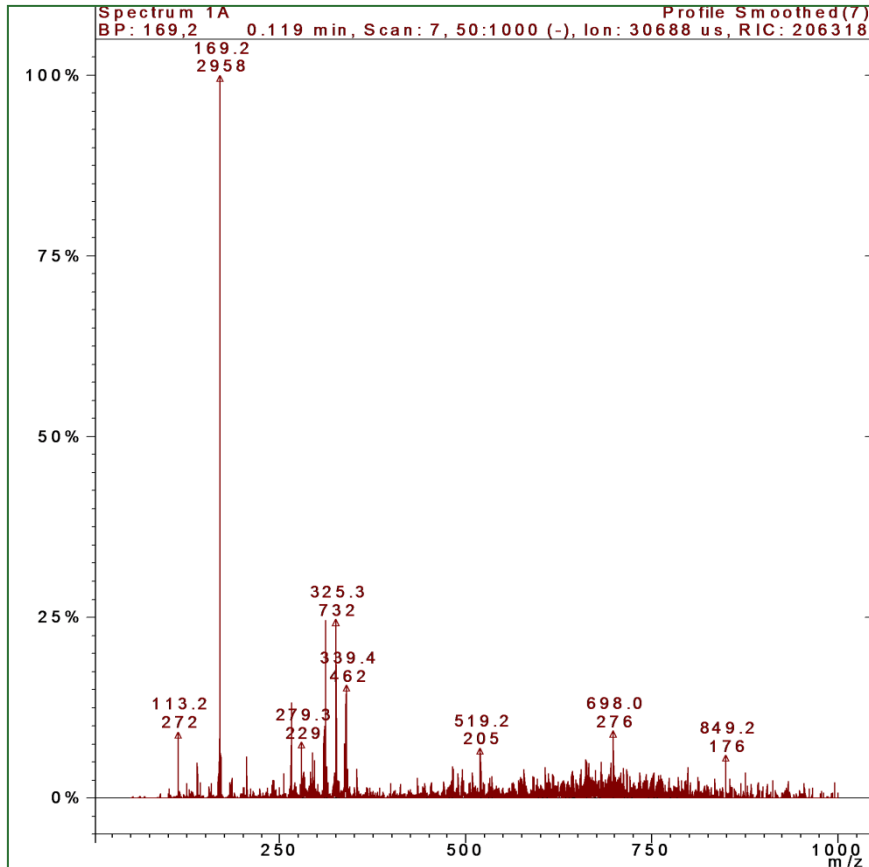
Για την συγκεκριμένη μελέτη, πραγματοποιείται με απευθείας έγχυση (direct infusion), βελτιστοποίηση των συνθηκών και των παραμέτρων λειτουργίας, για κάθε ένωση και τεχνική ιονισμού, ξεχωριστά. Η βελτιστοποίηση αυτή, χρησιμοποιείται στην υγρή χρωματογραφία, με σκοπό την αριστοποίηση των αποτελεσμάτων.

Για την απευθείας έγχυση, χρησιμοποιήθηκε το Varian 500-MS, IT Φασματόμετρο Μάζας (Mass Spectrometer), του οριζόντιου εργαστηρίου, της Σχολής Χημικών Μηχανικών. Ως διαλύτης κάθε πρότυπης ένωσης χρησιμοποιείται μεθανόλη (MeOH, HPLC grade). Η συγκέντρωση κάθε διαλύματος είναι 100 mg/L.

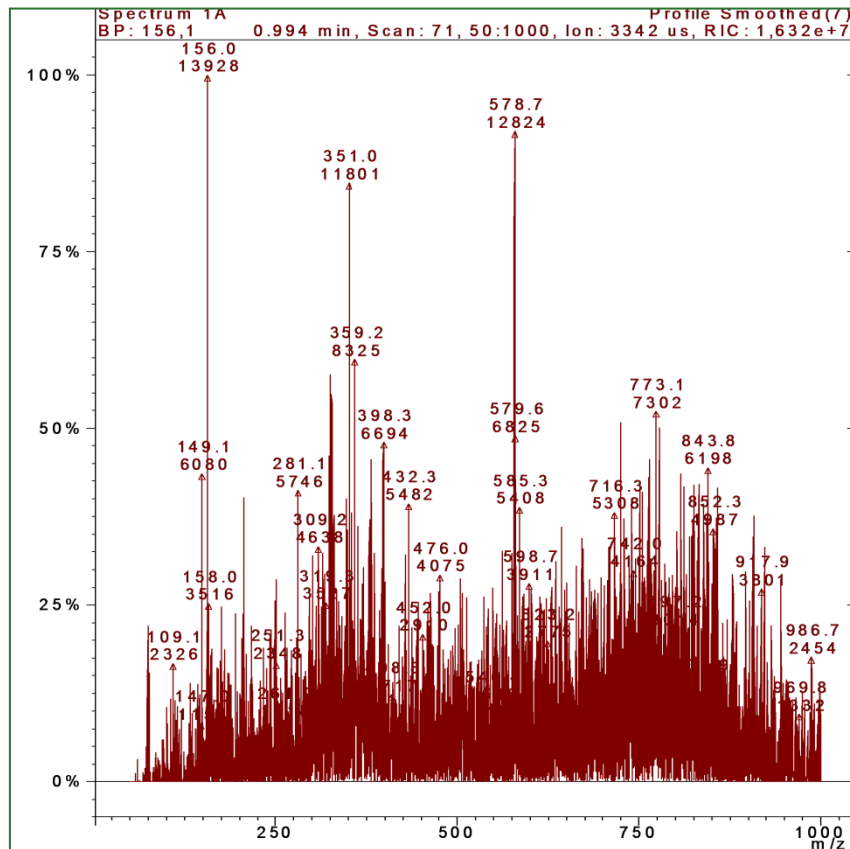
Στη συνέχεια, κατεγράφησαν τα φάσματα που προέκυψαν από τις 24 ενώσεις, σύμφωνα με τις παραπάνω διαδικασίες. Ακολούθησε σύγκριση και ερμηνεία των φασμάτων, καθώς και προσπάθεια ταυτοποίησης των ιόντων. Στις περισσότερες ενώσεις μάλιστα, ανιχνεύτηκε το μοριακό ιόν ($[M+H]$ ή $[M-H]$). Τα φάσματα όλων των ενώσεων σε όλες τις συνθήκες και τύπο ιονισμού παρατίθενται στο Παράρτημα 2. Στη συνέχεια, ακολουθεί ενδεικτικά, ανάλυση ορισμένων φασμάτων για να εξεταστούν διάφορες περιπτώσεις σε κάθε είδος από τους 4 τρόπους ιονισμού, που αναφέρθηκαν παραπάνω.

1. Σύγκριση θετικού και αρνητικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) – Γαλλικό Οξύ

Στην πρώτη περίπτωση συγκρίνονται τα φάσματα γαλλικού οξέος, μεταξύ αρνητικού (φάσμα 3.1) και θετικού ιονισμού (φάσμα 3.2) με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Το φάσμα του θετικού ιονισμού παρουσιάζει πιο έντονη θραυσματοποίηση. Στον αρνητικό ιονισμό ανιχνεύεται το μοριακό ιόν $[M-H] = 169.2$ στην κύρια κορυφή. Επίσης ανιχνεύεται το διμερές της ουσίας, $[2M-H] = 339.4$. Αντίθετα, στο θετικό ιονισμό, καμία κορυφή δεν δίνει το μοριακό ιόν ή κάποιο άλλο, ενδεικτικό ιόν.



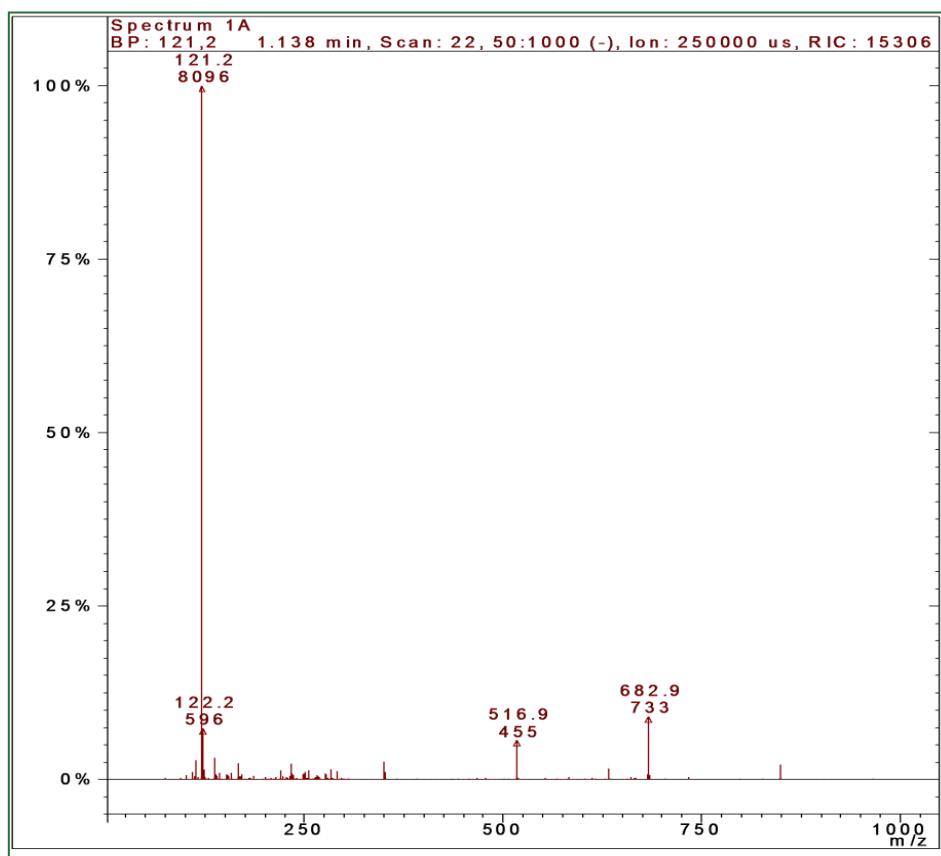
Φάσμα. 3.1. ESI negative-Gallic acid



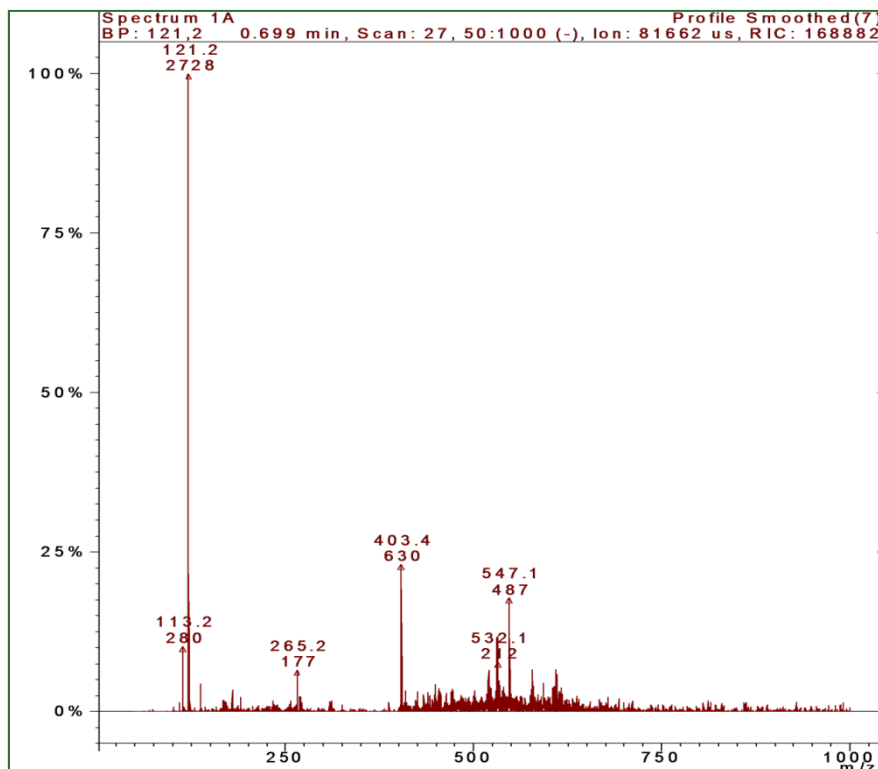
Φάσμα. 3.2. ESI positive-Gallic acid

2. Σύγκριση αρνητικών ιονισμών APCI και ESI – Βενζοϊκό οξύ

Στην δεύτερη περίπτωση, μελετάται ο αρνητικός ιονισμός για το βενζοϊκό οξύ, με χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) (φάσμα 3.3), και με ιονισμό με ηλεκτροψεκάσμο (ESI) (φάσμα 3.4). Παρατηρούμε ότι στον ιονισμό με ηλεκτροψεκάσμο, η θραυσματοποίηση είναι ελάχιστα εντονότερη, γεγονός το οποίο οφείλεται, κυρίως στον αρνητικό ιονισμό των δύο μεθόδων. Στις δύο περιπτώσεις εξίσου, αναγνωρίζεται το μοριακό ιόν, $[M-H] = 121,2$ ως κύρια κορυφή των φασμάτων. Η κύρια κορυφή των παρακάτω φασμάτων είναι ενδεικτική για την ταυτοποίηση του βενζοϊκού οξέος, στις διεργασίες που θα ακολουθήσουν.



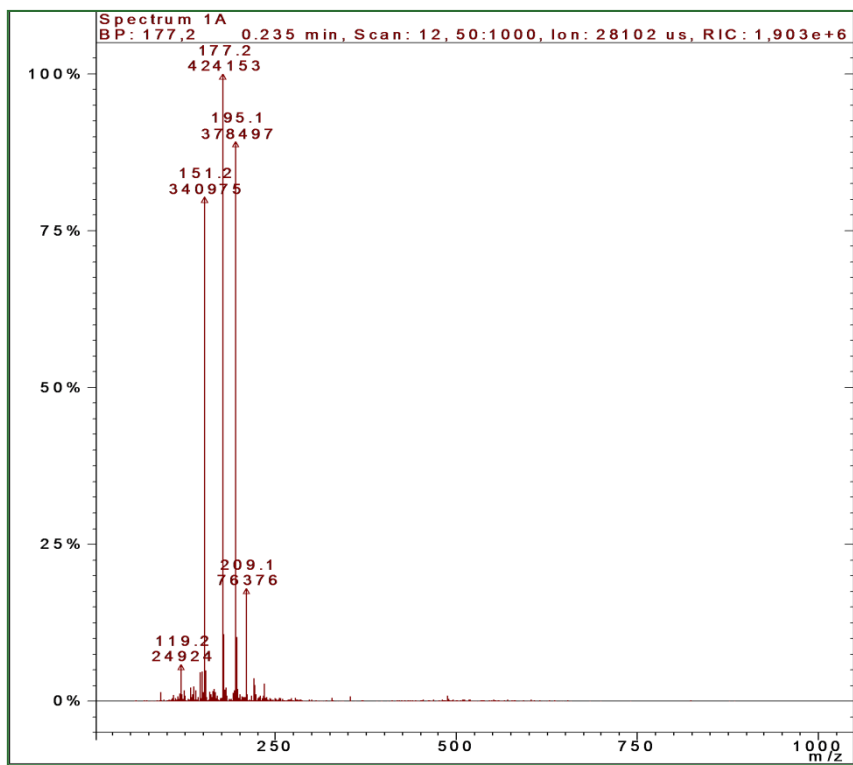
Φάσμα. 3.3. APCI negative-Benzoic acid



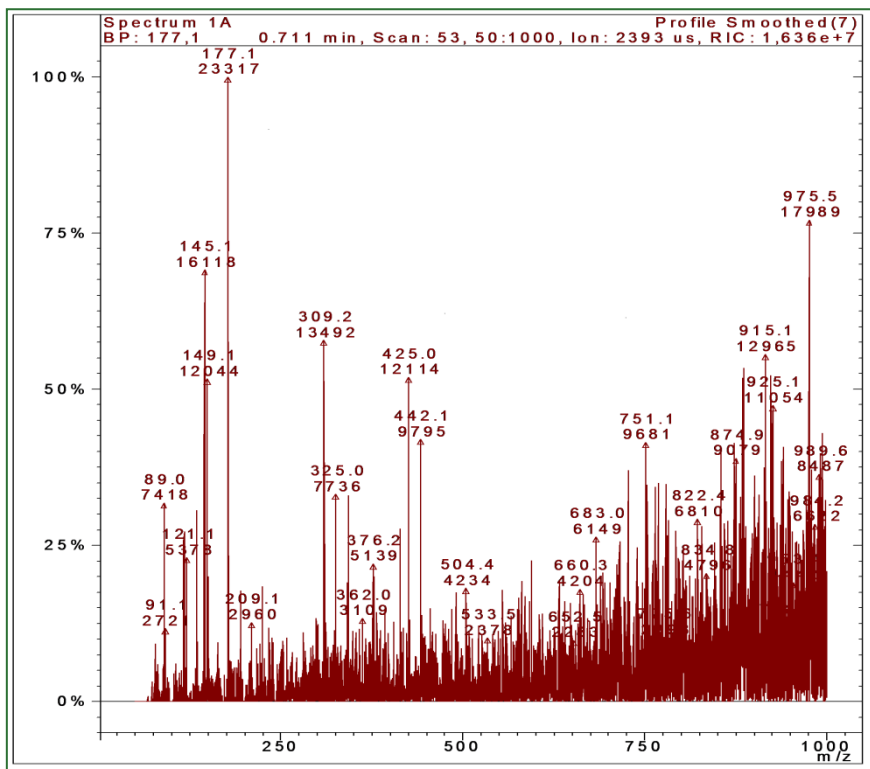
Φάσμα. 3.4. ESI negative-Benzoic acid

3. Σύγκριση θετικών ιονισμών APCI και ESI – Φερουλικό οξύ

Στην τρίτη περίπτωση μελετώνται δύο θετικά φάσματα, χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) (φάσμα 3.5), και ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) (φάσμα 3.6). Στο φάσμα 3.5 του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό, παρουσιάζεται μεγάλος αριθμός κορυφών, γεγονός που μαρτυρά πιο έντονη θραυσματοποίηση, από την μέθοδο του χημικού ιονισμού με ατμοσφαιρική πίεση. Αυτό που αξίζει να παρατηρηθεί, είναι ότι και τα δύο φάσματα, κατά το θετικό ιονισμό, έχουν κύρια κορυφή το μοριακό ιόν μετά την απώλεια ενός μορίου νερού, δηλαδή $[(M+H)-(H_2O)] = 177$. Το μοριακό ιόν, εντοπίζεται μόνο στο φάσμα του χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI). Επιπρόσθετα, στο φάσμα αυτό ταυτοποιείται και το ιόν, μετά την απώλεια μιας καρβοξυλομάδας, και την προσθήκη ενός υδρογόνου $[(M+H)-(-COOH)+(-H)] = 151,2$. Παρατηρείται ότι το φάσμα του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό, παρουσιάζει εντονότερη θραυσματοποίηση καίτοι οι δύο τεχνικές ανήκουν στις «ήπιες» μορφές ιονισμού.



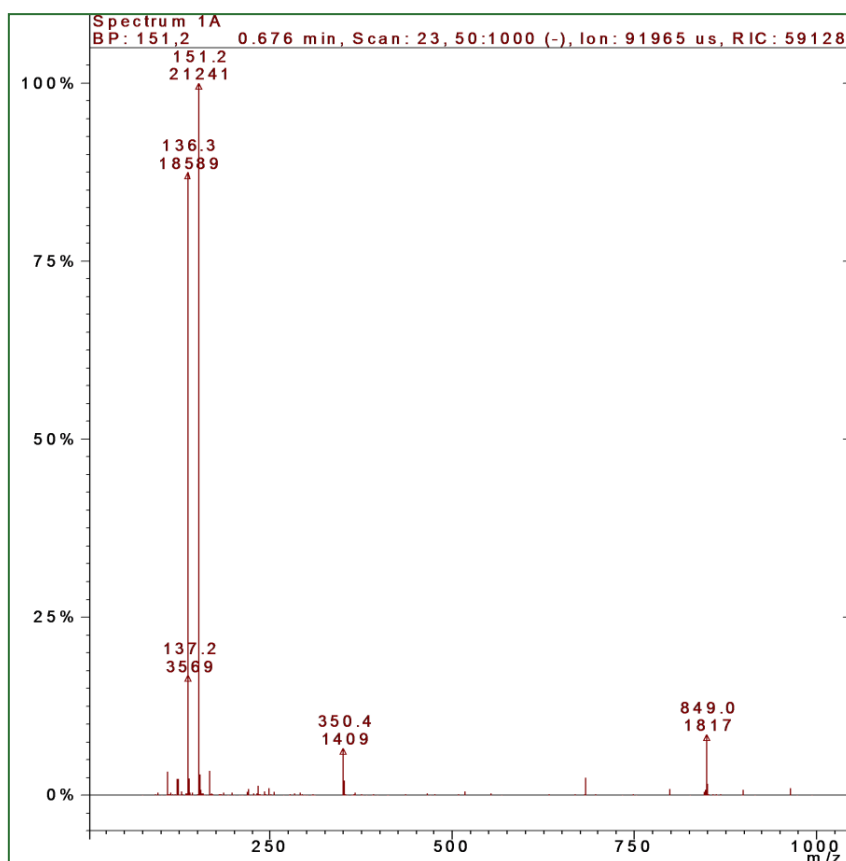
Φάσμα. 3.5. APCI positive-Ferulic acid



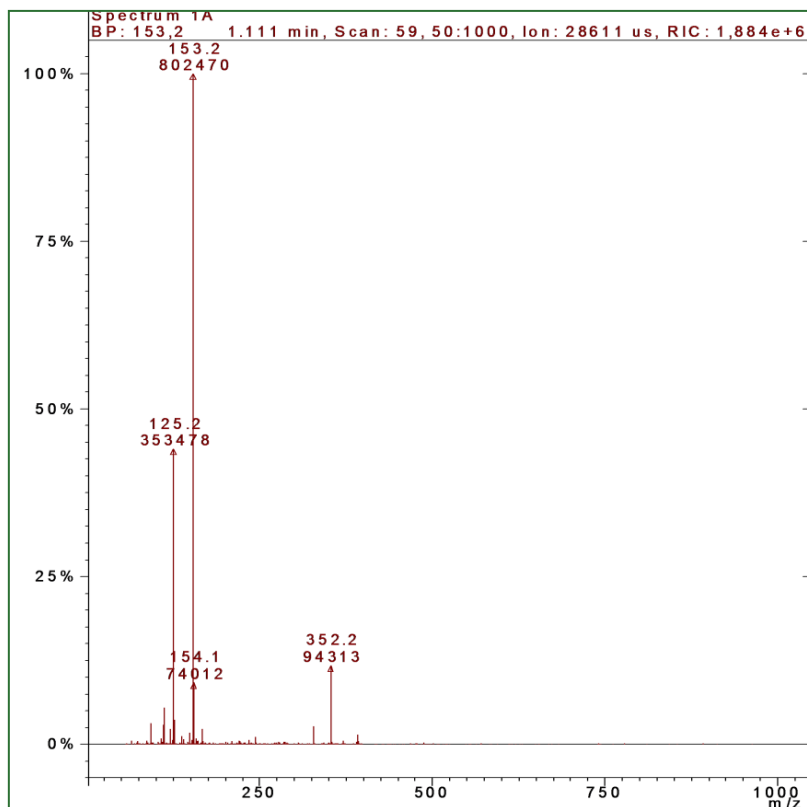
Φάσμα. 3.6. ESI positive-Ferulic acid

4. Σύγκριση θετικού και αρνητικού ιονισμού-Χημικός ιονισμός με ατμοσφαιρική πίεση (APCI)- Βανιλίνη

Η παρακάτω περίπτωση, είναι ένα κλασικό παράδειγμα, κατά την οποία το μοριακό ιόν απεικονίζεται ως κύρια κορυφή, τόσο στον αρνητικό όσο και στο θετικό ιονισμό. Παρατηρείται ότι τα φάσματα απεικονίζουν περίπου τον ίδιο αριθμό κορυφών, επομένως δεν έχουμε σε κάποιο τύπο ιονισμού μεγαλύτερη θραυσματοποίηση. Στον αρνητικό ιονισμό (φάσμα 3.7), το μοριακό ιόν αποδίδεται στην κύρια κορυφή $[M-H] = 151.2$. Επίσης απεικονίζεται το μοριακό ιόν μετά την αποβολή μίας αμινομάδας και την προσθήκη ενός υδρογόνου στην θέση της, συγκεκριμένα, $[(M-H)-(NH_2)+(-H)] = 136.3$. Αντίθετα στο θετικό ιονισμό (φάσμα 3.8), ερμηνεύεται μόνο το μοριακό ιόν ως κύρια κορυφή, $[M+H] = 153.2$.



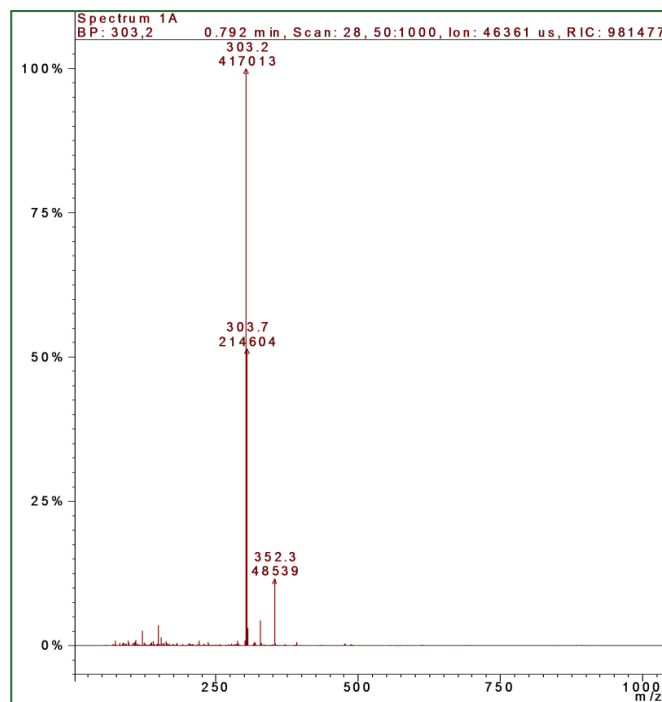
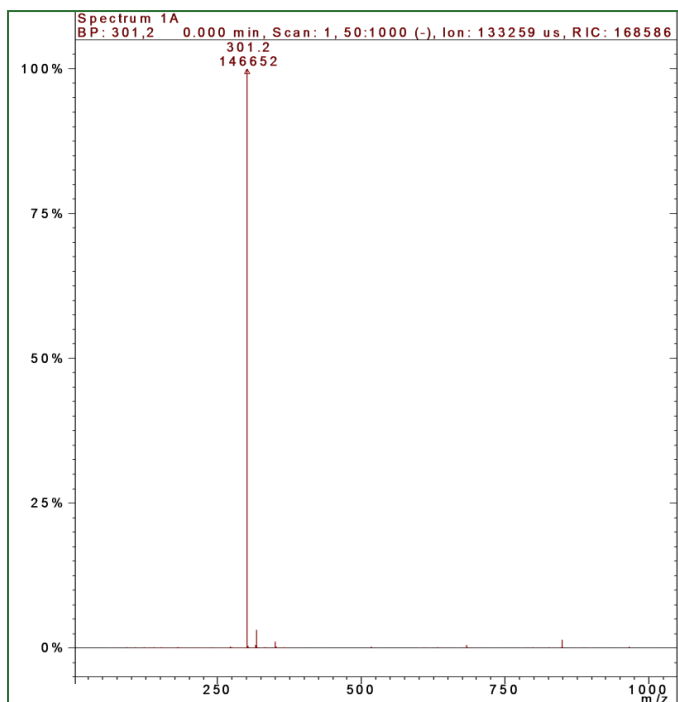
Φάσμα 3.7. APCI negative- Vanillin



Φάσμα 3.8. APCI positive – Vanillin

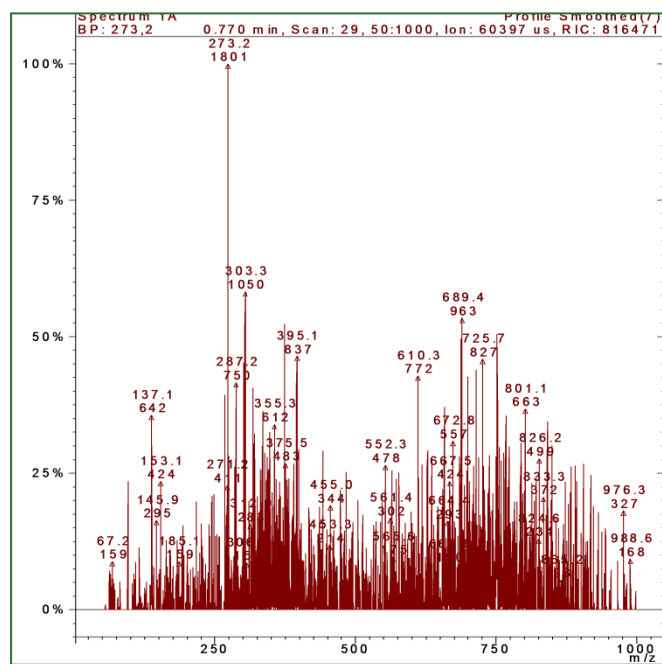
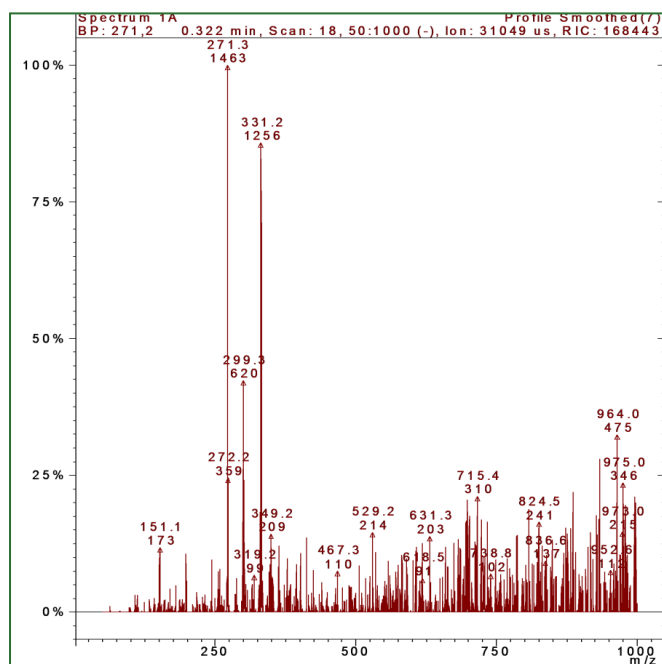
5. Ταυτόχρονη σύγκριση και των τεσσάρων τρόπων ιονισμού- Κερκετίνη

Με ταυτόχρονη παρατήρηση και των τεσσάρων φασμάτων, ανάμεσα στο χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI), (φάσματα 3.9 και 3.10) και στον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI), (φάσματα 3.11 και 3.12), πιο έντονη θραυσματοποίηση πραγματοποιείται στον δεύτερο. Στον αρνητικό ιονισμό APCI (φάσμα 3.9), απεικονίζεται ως κύρια και μοναδική κορυφή το μοριακό ιόν $[M-H] = 301.2$, ενώ στον θετικό ιονισμό ίδιου τύπου (φάσμα 3.10), το μοριακό ιόν απεικονίζεται ως κύρια κορυφή, $[M+H] = 303.2$. Όσο αφορά τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό, στο φάσμα 3.11 του αρνητικού ιονισμού, απεικονίζεται στην κύρια κορυφή, το ψευδομοριακό ιόν, $[(M-H)-(-OCH_3)+(-H)] = 271.3$, όπως και στο θετικό ιονισμό (φάσμα 3.12), $[(M+H)-(-OCH_3)+(-H)] = 273.3$. Επιπρόσθετα, στο φάσμα 3.12 του θετικού ιονισμού απεικονίζεται επίσης μοριακό ιόν $[M+H] = 303.3$, καθώς και το ψευδομοριακό ιόν, $[M+H]-NH_2 = 287.2$



Φάσμα 3.9. APCI-negative, Quercetin

Φάσμα 3.10. APCI-positive, Quercetin



Φάσμα 3.11. ESI-negative, Quercetin

Φάσμα 3.12. ESI-positive, Quercetin

Τα φάσματα όλων των πρότυπων ενώσεων που αποτελούν την βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε, παρατίθενται στο Παράρτημα 2. Παρακάτω, απεικονίζεται ο πίνακας, με τις βέλτιστες συνθήκες φασματομέτρου μάζας για κάθε πρότυπη ένωση, σε όλους τους τύπους ιονισμού.

Πίνακας 3.14. Βέλτιστες συνθήκες των πρότυπων ενώσεων (optimized compounds)

Πρότυπες Ενώσεις	Χημικός Ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση - APCI				Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI			
	Positive		Negative		Positive		Negative	
	Capillary	RF	Capillary	RF	Capillary	RF	Capillary	RF
	Voltage	(%)	Voltage	(%)	Voltage	(%)	Voltage	(%)
Gallic Acid	40	57	40	60	57	86	36	73
Caffeic Acid	57	57	24	96	18	83	33	81
Vanillic Acid	57	60	32	81	42	207	42	54
Benzoic Acid	42	45	33	69	6	87	42	63
Ferulic Acid	46	66	30	66	116	105	40	70
Syringic Acid	30	78	45	81	111	66	48	57
Salicylic Acid	55	75	27	75	111	105	6	96
p-Coumaric Acid	87	57	45	75	27	69	19	93
Tyrosol	27	50	51	96	36	51	70	96
4-chlorophenol	141	105	57	105	33	60	66	101
2-chlorophenol	55	105	48	105	144	93	60	105
4-hydroxybenzoic Acid	21	49	21	74	15	87	18	105
Phenylacetic Acid	39	111	15	75	39	94	21	69
2-Aminophenol	39	90	39	90	60	83	60	83
2-Chlorobenzoic Acid	9	51	26	51	6	50	30	84
Vanillin	42	87	42	87	60	95	60	95
4-hydroxycoumarin	50	60	57	66	84	53	60	90
2- Chlorobenzaldehyde	39	96	51	114	75	50	30	63
2.5-Dihydroxy- benzoic Acid	33	87	36	51	48	90	27	95
(-)Epicatechin	27	76	39	90	257	77	279	75
(+)Catechin	22	99	22	99	156	117	105	132
Quercetin	48	105	52	96	77	102	65	105

Rutin	50	150	48	165	65	110	35	140
Taxifolin	56	87	27	87	60	75	15	80
Luteolin	30	60	180	85	45	70	90	120
Eriodictyol	60	56	74	80	75	85	65	90

Με τις παραπάνω διαδικασίες ολοκληρώθηκε το εγχείρημα δημιουργίας βιβλιοθήκης πρότυπων ενώσεων, που πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά στη Σχολή Χημικών Μηχανικών. Όλες οι πρότυπες ενώσεις αναλύθηκαν επιπρόσθετα, με χρήση υγρής χρωματογραφίας, προκειμένου, για την ερμηνεία των φασμάτων, να χρησιμοποιηθούν τόσο τα μοριακά ιόντα της κάθε πρότυπης ένωσης όσο και ο χρόνος ανόσχεσης της κάθε ουσίας. Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάλυση, των προς μελέτη εκχυλισμάτων, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας.

3.2 Ανάλυση Εκχυλισμάτων και πρότυπων ενώσεων με Υγρή Χρωματογραφία

Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε σε υγρό χρωματογράφο Varian 212-LC Chromatography Pump, συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας Varian 500-MS, IT Mass Spectrometer. Καταρχάς, δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι από την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν στήλες διαφορετικού μεγέθους (5, 15 και 25 cm) και διαφορετικοί εκλούτες σε προγράμματα βαθμωτής (gradient) έκλουσης. Να σημειωθεί ότι οι περισσότερες αναφορές στη βιβλιογραφία, αφορούν υγρή χρωματογραφία με DAD/MS (Diode Array Detention) οργανολογία η οποία δεν ήταν διαθέσιμη. Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω μέθοδοι που δοκιμάστηκαν:

- Στήλη 15 cm, με εκλούτες: A. 0.2% φορμικό οξύ και νερό, και B. 0.2% φορμικό οξύ και ακετονιτρίλιο. Ροή, 1 mL/min. (Yesil-Celiktas O. et al., 2009)
- Στήλη 5 cm, με εκλούτες : A. Νερό και οξικό οξύ (100:1 v/v) και B. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, οξικό οξύ (95:5:1 v/v). Ροή 1.5 mL/min (McDonald Suzy et al., 2001)

- Στήλη 25 cm, με εκλούτες: Α. μεθανόλη και Β. νερό και οξικό οξύ (1:1 v/v). Ροή 0,1 mL/min (Nianbai Fang, 2002)

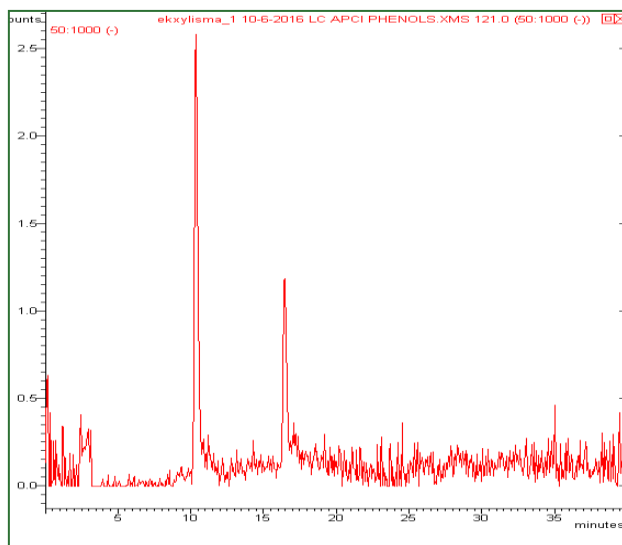
Επίσης δοκιμάστηκαν διαφορετικοί ιονισμοί, και συγκεκριμένα, ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI). Κατά τη δοκιμή με ηλεκτροψεκασμό, η ροή του εκλούτη μειώθηκε σε 0.3 mL/min. Σκοπός της έρευνας αυτής, ήταν ο καλύτερος δυνατόν διαχωρισμός των συστατικών των εκχυλισμάτων.

Κατόπιν της προκαταρκτικής μελέτης, αποφασίσθηκε η χρήση χημικού ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI), διότι η χρωματογραφική μέθοδος απαιτεί υψηλή ροή (0.8 mL/min), γεγονός που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα και οδηγεί στην επιλογή του συγκεκριμένου είδους ιονισμού. Επιπρόσθετα, επιλέχθηκε στήλη EC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 C₁₈ (REF: 720014.46, SN: N15030168, LOT:21304143), 25 cm x 5μm. Η στήλη αυτή επιλέχθηκε έναντι στηλών μήκους 5 και 15cm, διότι εξασφάλιζε καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ των ενώσεων των εκχυλισμάτων. Τέλος, ως εκλούτες χρησιμοποιήθηκαν Α. Νερό υπερκαθαρό οξινομένο με οξικό οξύ, (0,5% CH₃COOH) και Β. Μεθανόλη (CH₃OH, HPLC grade), με πρόγραμμα βαθμωτής (gradient) έκλουσης ως εξής:

Α. 70%, Β. 30% σε μηδενικό χρόνο // Α.60%, Β.40% μέχρι χρόνο 10 λεπτών // Α.20%, Β.80% μέχρι χρόνο 20 λεπτών // Α.0%, Β.100% μέχρι χρόνο 40 λεπτών. Συνεπώς ο συνολικός χρόνος της διεργασίας είναι 40 λεπτά. Η ροή των εκλουτών είναι 0.8 mL/min. Η ανάλυση των φασμάτων που ακολουθεί, βασίζεται τόσο στην βιβλιοθήκη που προκύπτει από το φασματοόμετρο μάζας (Κεφ. 3.1 πειραματικού) όσο και στους χρόνους ανάλυσης των πρότυπων ενώσεων που αναλύονται ξεχωριστά σε υγρό χρωματογράφο.

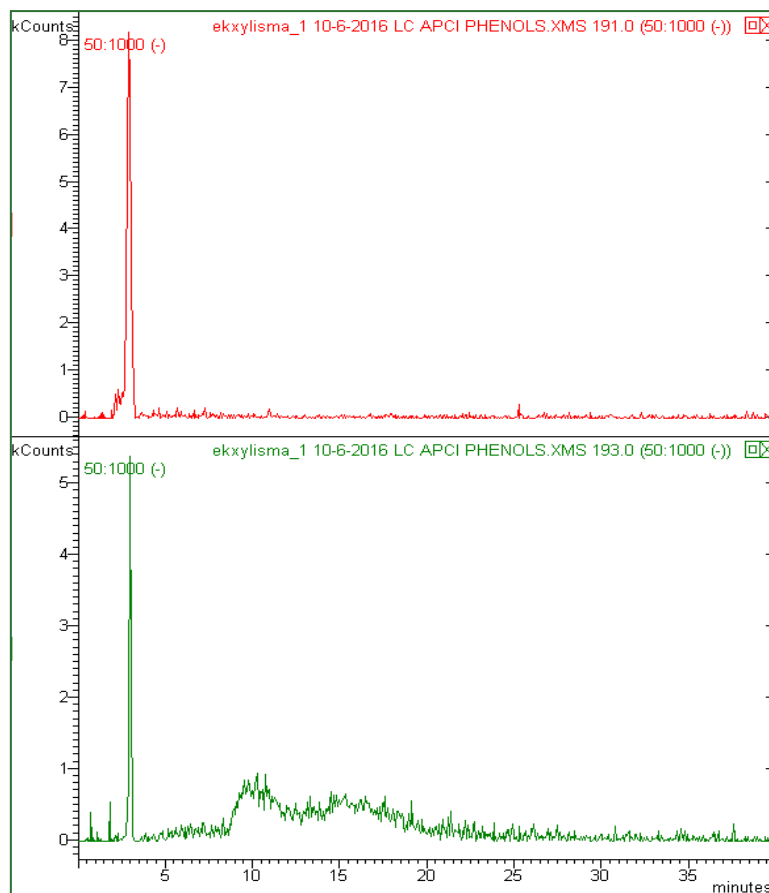
3.2.1. Εκχύλισμα Μαύρης Πεύκης-Κορρές.

Το φάσμα του εκχυλίσματος μαύρης πεύκης σε αρνητικό ιονισμό παρατίθεται παρακάτω (φάσμα 3.15).



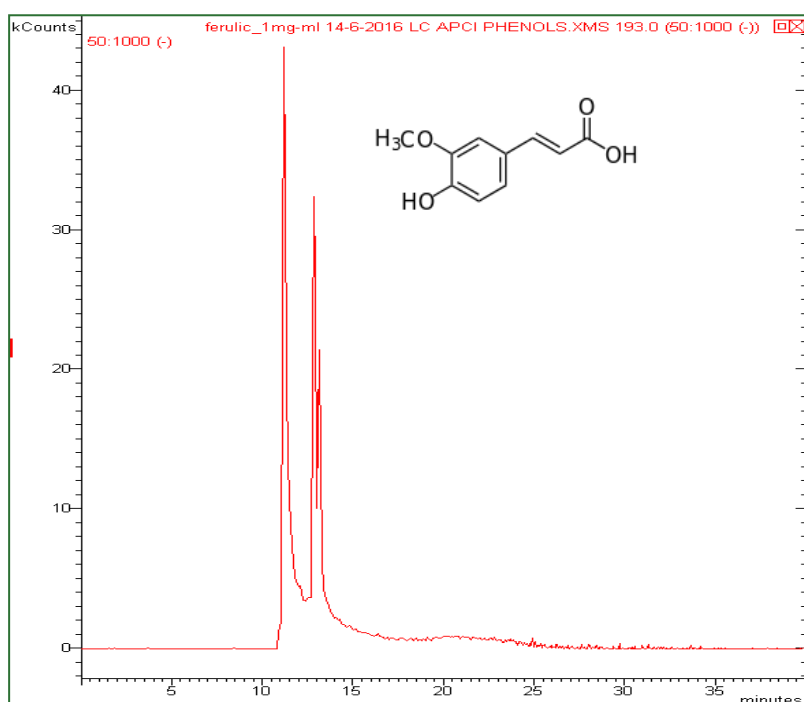
Φάσμα 3.15. Εκχύλισμα Μαύρης Πεύκης σε υγρό χρωματογράφο

Αρχικά, παρατηρείται η παρουσία δύο κορυφών με χρόνο ανάσχεσης 3.5 λεπτά. Το μοριακό ιόν 193, αποδίδεται στην ένωση φερουλικό οξύ [M-H] = 193, σύμφωνα με την βιβλιοθήκη πρότυπων ενώσεων.



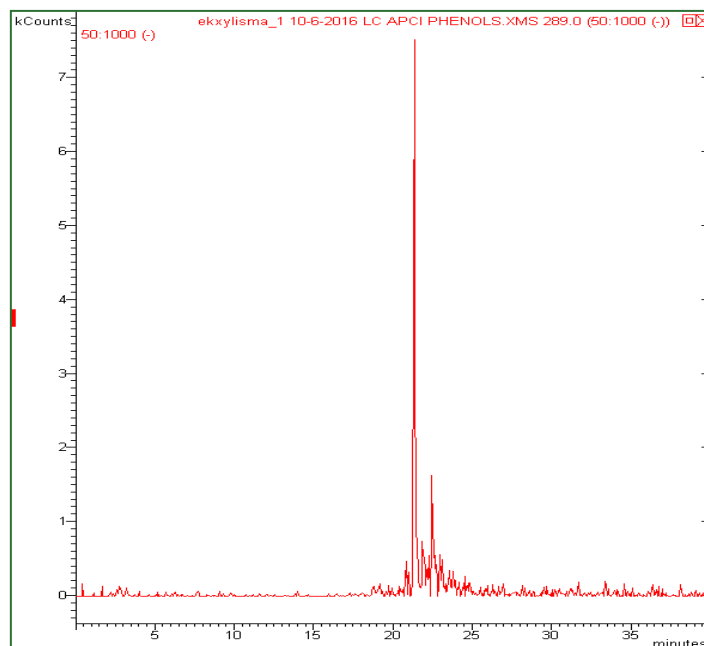
Φάσμα 3.16. Χρωματογραφήματα μοριακών ιόντων $m/z=191$ και $m/z=193$

Ωστόσο ο χρόνος ανάσχεσης του φερουλικού οξέος όταν αυτό αναλύεται μεμονωμένα στον υγρό χρωματογράφο, είναι 11.5 και 13 λεπτά (δύο κορυφές) όπως φαίνεται στο φάσμα 3.17 και δεν ταυτίζεται με τον χρόνο στο φάσμα του εκχυλίσματος. Συμπερασματικά, υποθέτουμε ότι η κορυφή στο φάσμα 3.16 αντιστοιχεί σε κάποια ένωση του φερουλικού οξέος, πιθανότατα με χημική ένωση της οποίας το θραύσμα, αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν 191,1 με το οποίο έχει ίδιο χρόνο ανάσχεσης.



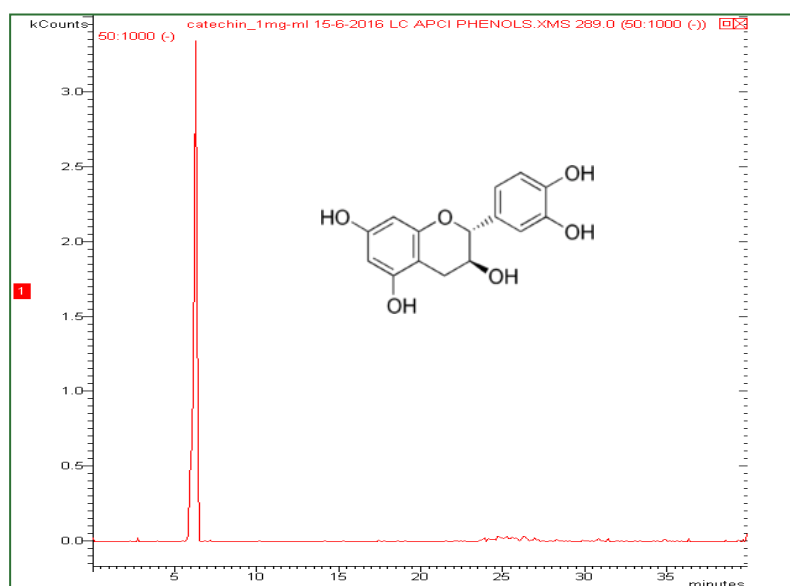
Φάσμα 3.17. Φερουλικό οξύ- Φάσμα υγρής χρωματογραφίας

Συνεχίζοντας την ανάλυση του εκχυλίσματος μαύρης πεύκης, προκύπτει η κορυφή του φάσματος 3.18 με χρόνο ανάσχεσης της κύριας κορυφής τα 21.5 λεπτά. Το ιόν 289, ταυτίζεται με το μοριακό ιόν της κατεχίνης/επικατεχίνης στον αρνητικό ιονισμό, $[M-H] = 289$



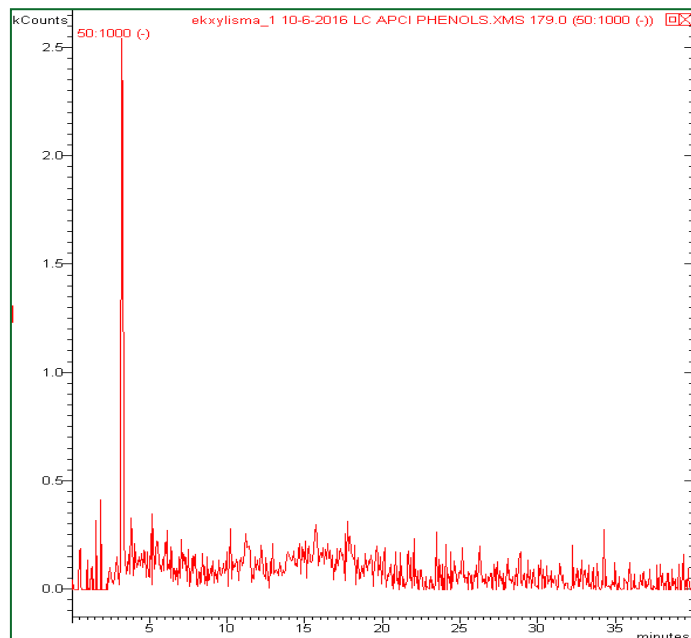
Φάσμα 3.18. Χρωματογράφημα μοριακού ιόντος $m/z=289$

Το φάσμα της κατεχίνης, όπως προκύπτει από την υγρή χρωματογραφία, δίνει το μοριακό ιόν σε χρόνο 6 λεπτά, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν πρόκειται για καθαρή ένωση κατεχίνης, αλλά για κάποιο σύμπλοκο της ουσίας αυτής με κάποια άλλη ένωση όπως για παράδειγμα γαλλικού οξέος, προς σχηματισμό επιγαλλοκατεχίνης.

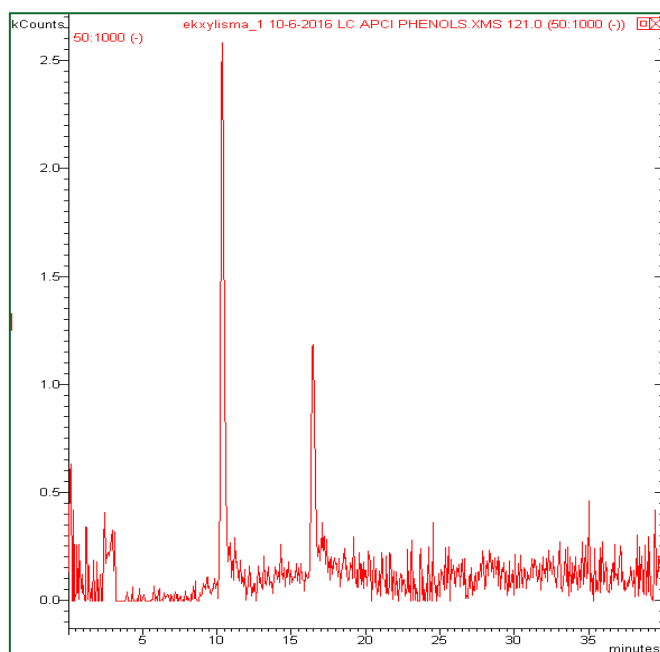


Φάσμα 3.19. Κατεχίνη/Επικατεχίνη. Φάσμα υγρής χρωματογραφίας

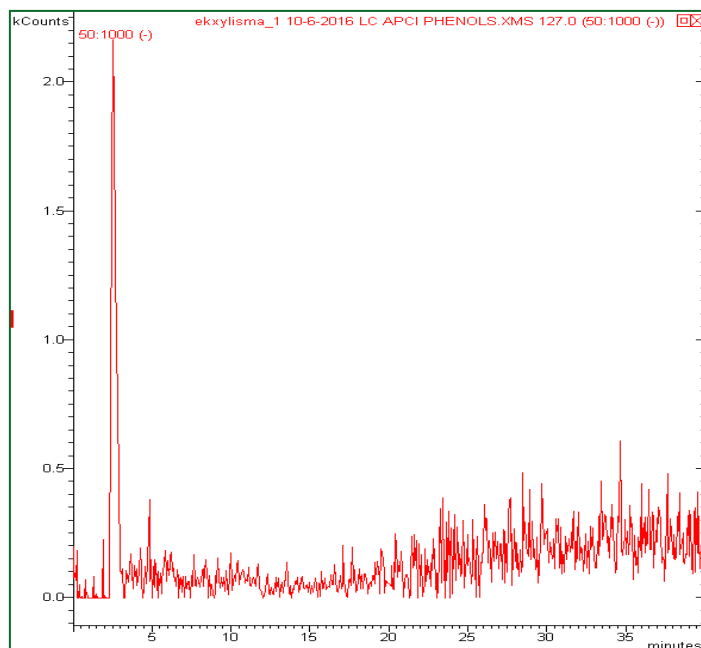
Παρακάτω παρατίθενται 4 διαφορετικές κορυφές από τις μελέτες του φάσματος του εκχυλίσματος. Υποθέτουμε ότι πρόκειται για την απεικόνιση τεσσάρων διαφορετικών ενώσεων που περιλαμβάνονται στο εκχύλισμα.



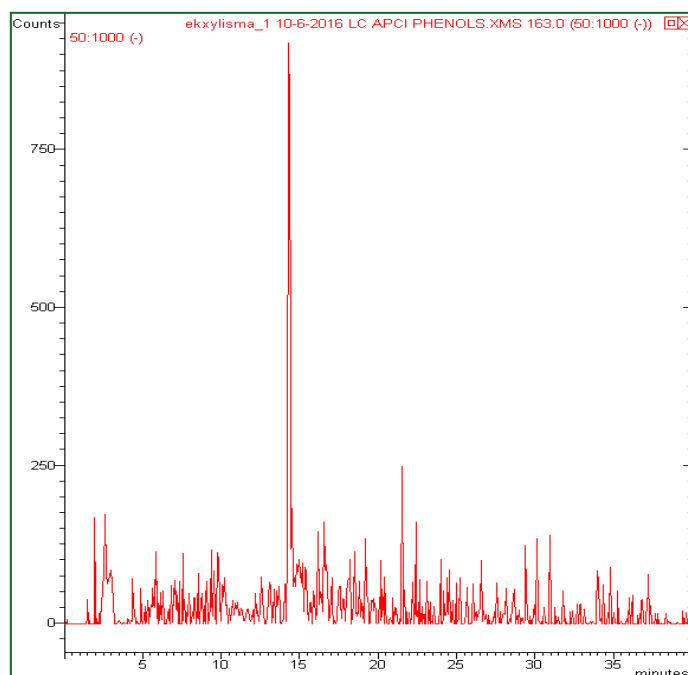
Φάσμα 3.20. Χρωματογράφημα μοριακού ιόντος $m/z=179$



Φάσμα 3.21. Χρωματογράφημα μοριακού ιόντος $m/z=121$



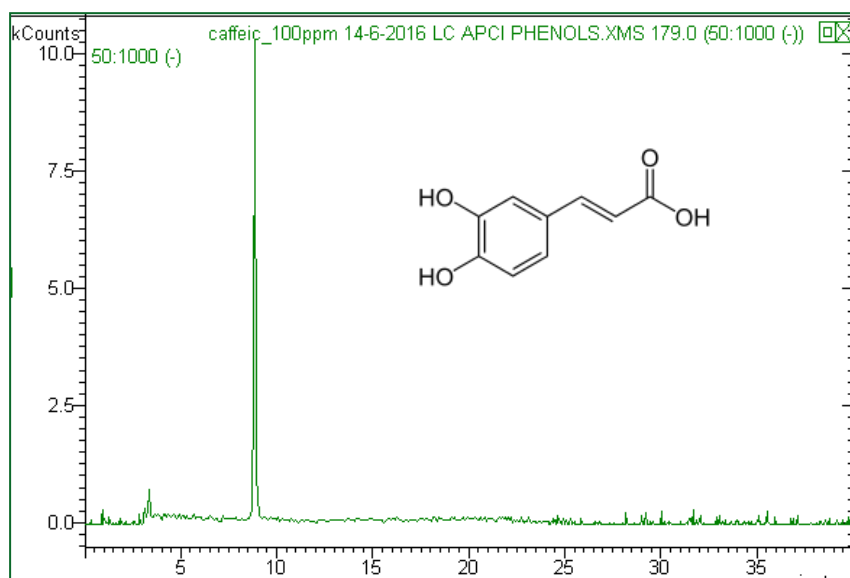
Φάσμα 3.22. Χρωματογράφημα μοριακού ιόντος $m/z=127$



Φάσμα 3.23. Χρωματογράφημα μοριακού ιόντος $m/z=163$

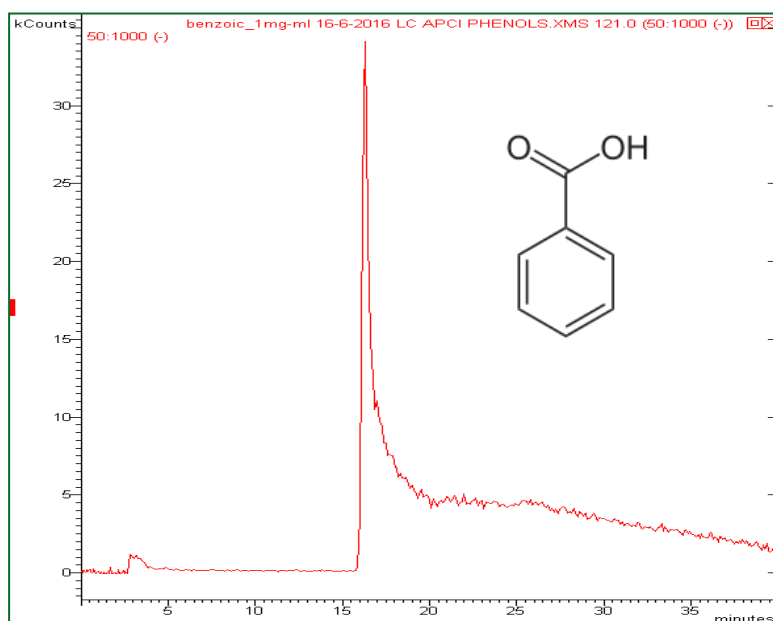
Συγκεκριμένα, στο φάσμα 3.20 το ιόν που παρουσιάζεται στην κύρια κορυφή, ταυτίζεται με το μοριακό ιόν του καφεϊκού οξέος, στον αρνητικό ιονισμό, $[M-H]^- = 179$. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι περίπου 4 λεπτά. Ωστόσο η ανάλυση υγρής χρωματογραφία μεμονωμένης της ένωσης, έδωσε διαφορετικό χρόνο ανάσχεσης όπως φαίνεται στο φάσμα 3.24. Επομένως προτείνεται ότι η

κορυφή του φάσματος 3.20 αντιστοιχεί σε παράγωγο του καφεϊκού οξέος και όχι στην καθαρή μορφή της συγκεκριμένης ουσίας.



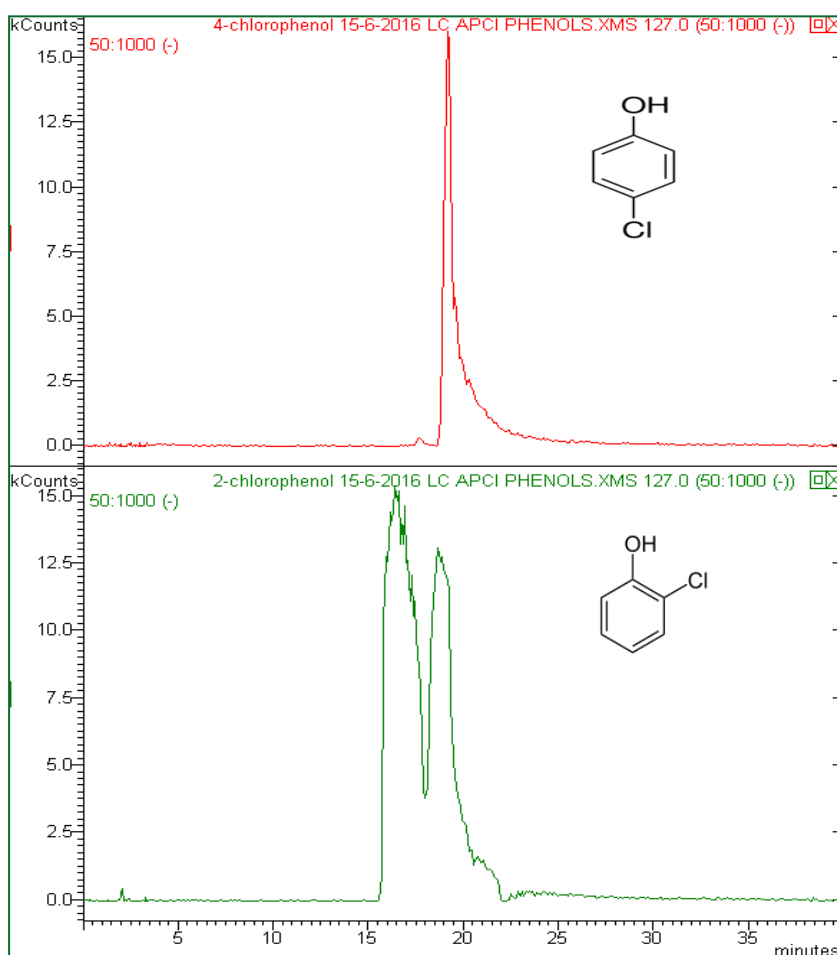
Φάσμα 3.24. Γρήγη χρωματογραφία στην ένωση του καφεϊκού οξέος

Το ιόν του φάσματος 3.21 ταυτίζεται με το μοριακό ιόν του βενζοϊκού οξέος, στον αρνητικό ιονισμό $[M-H] = 121$. Οι χρόνοι ανάλυσης των φασμάτων του εκχυλίσματος (φάσμα 3.21) και του διαλύματος του βενζοϊκού οξέος (φάσμα 3.25) ταυτίζονται, επομένως μπορούμε να ταυτοποιήσουμε την ύπαρξη βενζοϊκού οξέος στο εκχύλισμα μαύρης πεύκης .



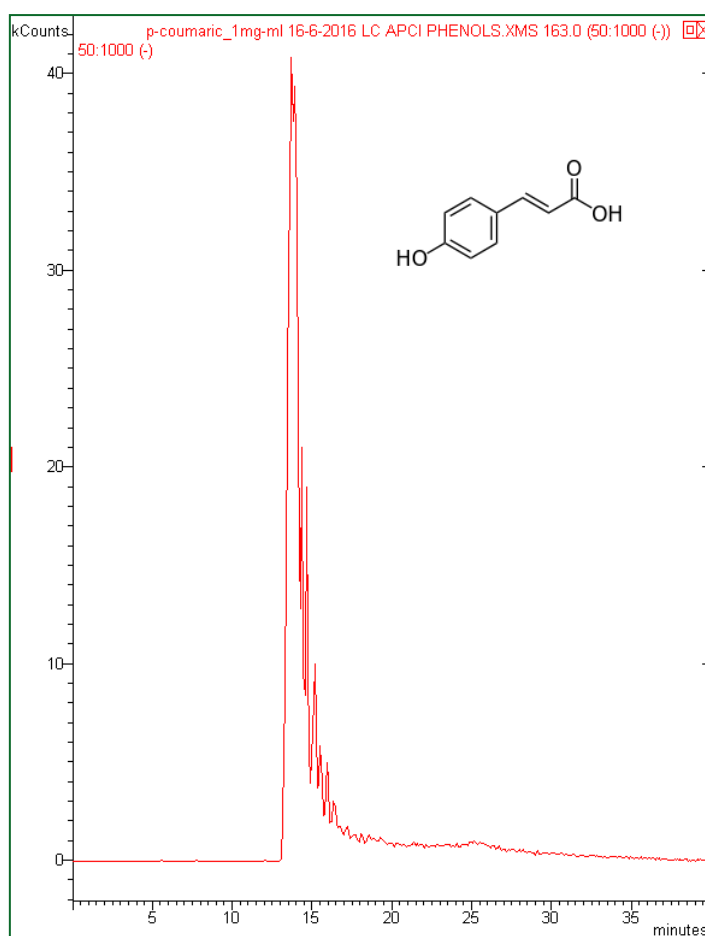
Φάσμα 3.25. Γρήγη χρωματογραφία βενζοϊκού οξέος.

Το τρίτο φάσμα του εκχυλίσματος (φάσμα 3.22) αποδίδει κορυφή με ιόν, το οποίο ταυτίζεται με το μοριακό ιόν στον αρνητικό ιονισμό της 4-χλωροφαινόλης και της 2-χλωροφαινόλης, με χρόνο ανάσχεσης τα 2,5 λεπτά. Ωστόσο ο χρόνος αυτός διαφέρει αρκετά, από το χρόνο ανάσχεσης της χρωματογραφίας μεμονωμένων των πρότυπων ενώσεων όπως παρίσταται στο φάσμα 3.26α και 3.26β. Επομένως δεν μπορεί να πιστοποιηθεί η παρουσία των καθαρών ενώσεων ή της μίας εξ αυτών στο εκχύλισμα, αλλά η κορυφή του φάσματος 3.22 αποδίδεται σε σύμπλοκο των ουσιών αυτών με κάποια άλλη ένωση, θραύσμα της οποίας αποτελεί το μοριακό ιόν της χλωροφαινόλης. Δεδομένου ότι η χλωροφαινόλη δεν παρουσιάζεται στην καθαρή της μορφή, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο χρόνος ανάσχεσης, ως καθοριστικός παράγοντας αναγνώρισης των ισομερών (2-,4-).



Φάσμα 3.26α. Υγρή Χρωματογραφία 4-χλωροφαινόλης // 3.26β. Υγρή χρωματογραφία 2-χλωροφαινόλης

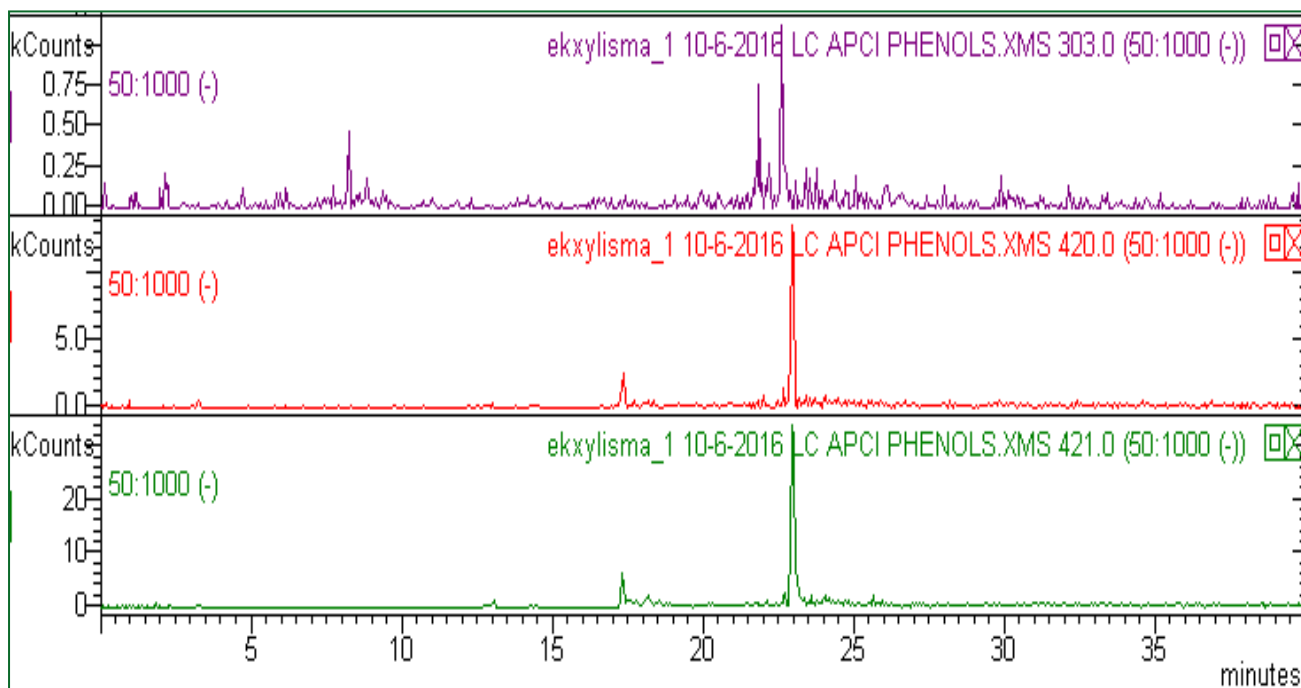
Τέλος το φάσμα 3.23 εμφανίζει ιόν που ταυτίζεται με το μοριακό ιόν , σε αρνητικό ιονισμό, του *p*-κουμαρικού οξέος $[M-H] = 163$, σε χρόνο ανάσχεσης 14,5 λεπτά. Οι πληροφορίες από την προσωπική βιβλιοθήκη πρότυπων ενώσεων (φάσματα μάζας), καθώς και ο χρόνος ανάσχεσης από το φάσμα της χρωματογραφίας της καθαρής ουσίας (φάσμα 3.27) ταυτίζονται με τις ενδείξεις του φάσματος του εκχυλίσματος, επομένως ταυτοποιείται η ύπαρξη της συγκεκριμένης ένωσης στο εκχύλισμα της μαύρης πεύκης.



Φάσμα 3.27.. Υγρή χρωματογραφία *p*-κουμαρικού οξέος

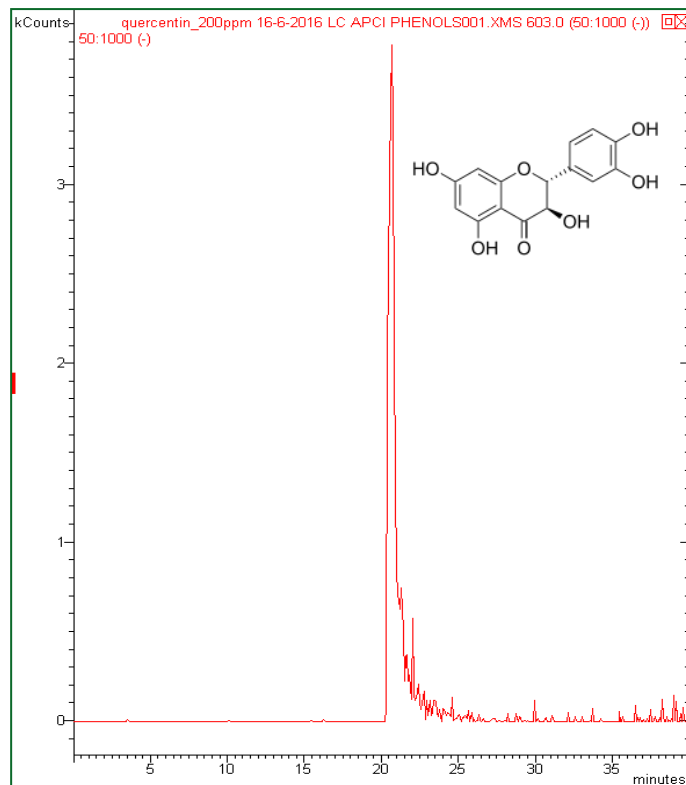
Ολοκληρώνοντας την ανάλυση του εκχυλίσματος μαύρης πεύκης παρατίθενται 3 φάσματα, στα οποία παρατηρείται το φαινόμενο της συνέκλουσης τριών διαφορετικών ιόντων. Στο φάσμα 3.28α, δίνεται το ιόν 303, το οποίο πιθανόν να ταυτίζεται είτε με το μοριακό ιόν της κερκετίνης σε θετικό ιονισμό, $[M+H]= 303$, είτε με το μοριακό ιόν της ταξιφολίνης σε αρνητικό ιονισμό , $[M-H] = 303$, είτε τέλος με το διμερές του μοριακού ιόντος της βανιλίνης, στο θετικό ιονισμό $[2M-H]= 303$.

Στην περίπτωση του διμερούς της βανιλίνης, θα έπρεπε ωστόσο να εμφανίζεται το μοριακό ιόν $[M-H] = 151$, όπως προκύπτει από την βιβλιοθήκη των προτύπων. Στα φάσματα 3.28β και 3.28γ, παρουσιάζονται τα ιόντα 420 και 421, τα οποία δεν έχουν ταυτιστεί με καμία από τις ενώσεις που αποτελούν την συγκεκριμένη βιβλιοθήκη. Συνεκτιμώντας τους χρόνους ανάλυσης της ταξιφολίνης (φάσμα 3.30) και του διμερούς της βανιλίνης (φάσμα 3.31) διαφέρουν φανερά, από αυτόν του εκχυλίσματος. Αντίθετα ο χρόνος ανάλυσης της κερκετίνης (φάσμα 3.29) είναι περίπου 23 λεπτά, και ταυτίζεται με τον χρόνο ανάλυσης του ιόντος του εκχυλίσματος. Επομένως το ιόν 303, αποδίδεται στην ύπαρξη κερκετίνης. Ωστόσο εφόσον έχουμε συνέκλωση και άλλων ιόντων (3.28β και 3.28γ), καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν πρόκειται για περίπτωση παρουσίας καθαρής ένωσης κερκετίνης αλλά, συμπλόκου με κάποια άλλη ένωση, με μοριακό ιόν ή θραύσματα της οποίας προκύπτουν στον ίδιο χρόνο. Πράγματι το σύμπλοκο κερκετίνης βενζοϊκού οξέος, στον αρνητικό ιονισμό, δίνει ψευδομοριακό ιόν ίσο με $421 [(M-H)+\text{βενζοϊκό οξύ}] = 421$

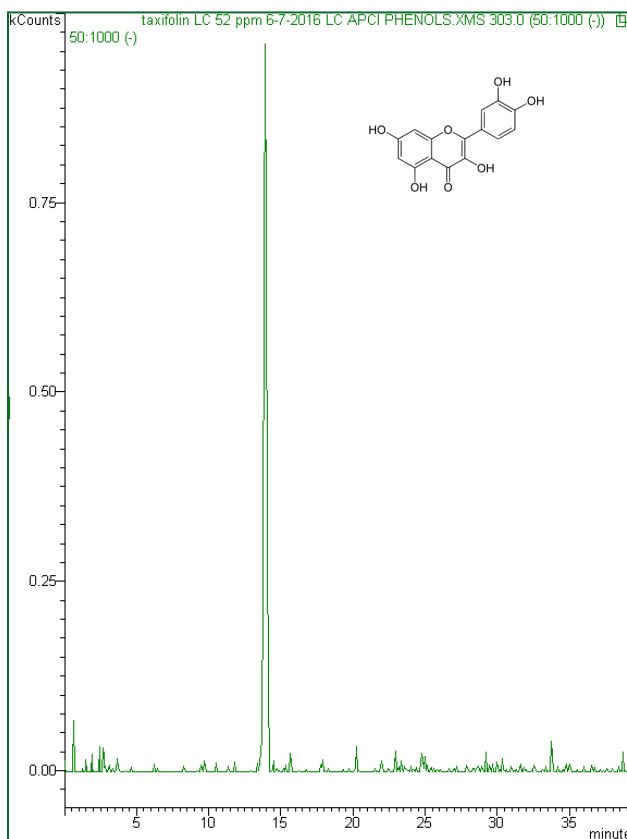


Φάσματα Χρωματογραφήματα μοριακών ιόντων 3.28α. $m/z=303$ // 3.28β. $m/z=420$ // 3.28γ.

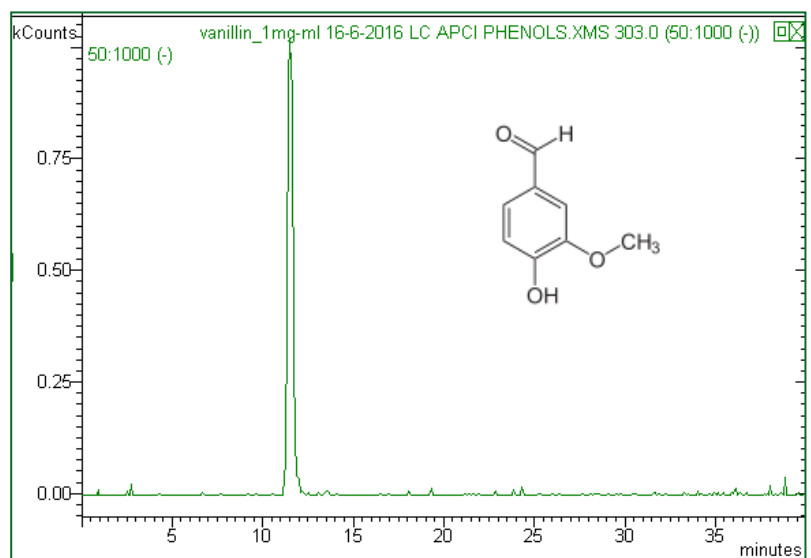
$m/z= 421$



Φάσμα 3.29. Υγρή χρωματογραφία κερκετίνης



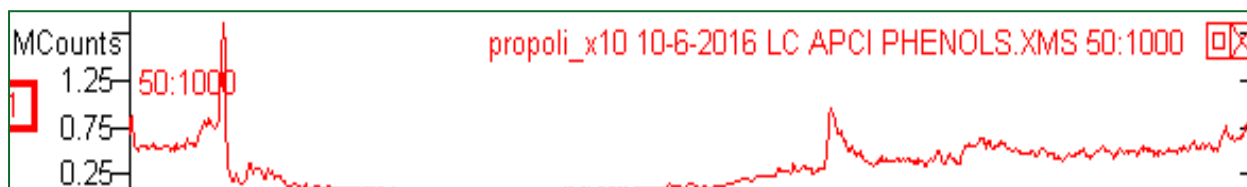
Φάσμα 3.30. Υγρή χρωματογραφία ταξιφολίνης



Φάσμα 3.31. Διμερές βανιλίνης

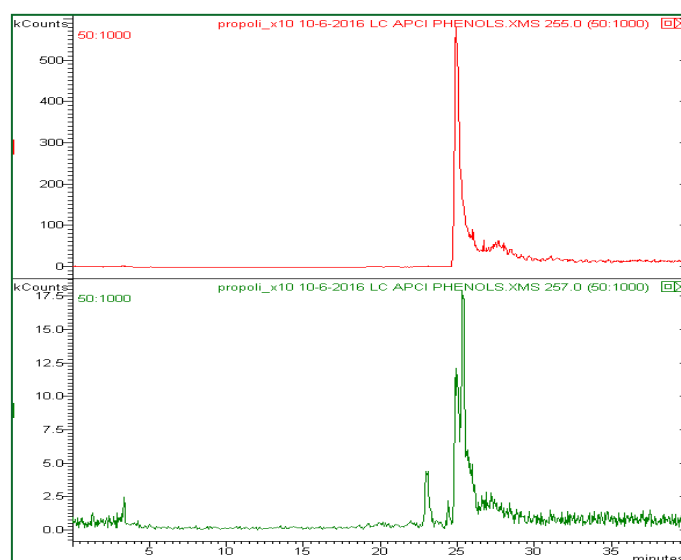
3.2.2 Εκχύλισμα Πρόπολης

Για το εκχύλισμα της πρόπολης, ακολουθείται η ίδια διαδικασία, με το κεφάλαιο 3.2.1. Συνεκτιμώνται τα φάσματα και του αρνητικού και θετικού ιονισμού. Παρακάτω παρατίθεται η μορφή του φάσματος της πρόπολης στο θετικό ιονισμό.



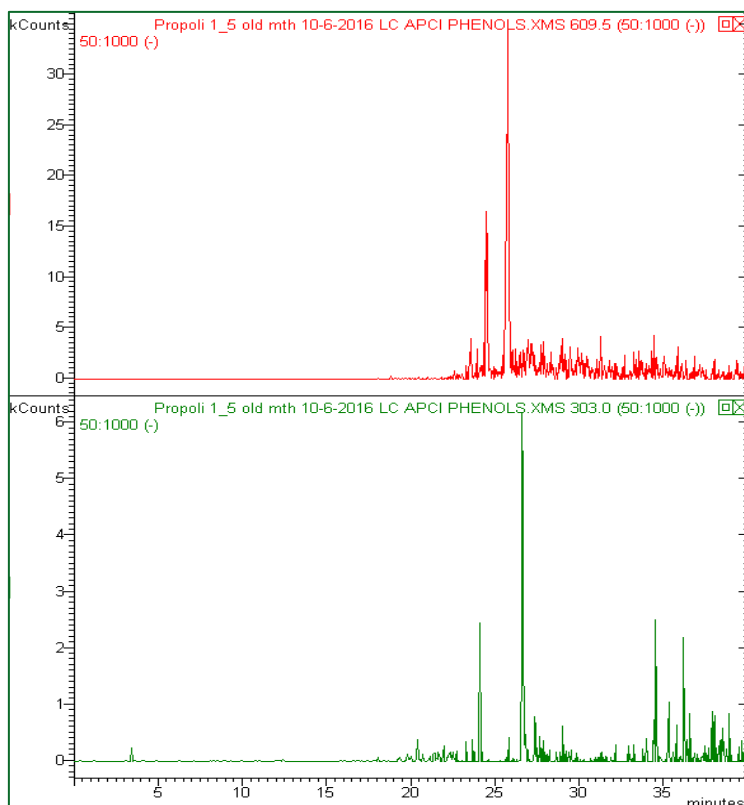
Φάσμα 3.32. Υγρή χρωματογραφία Πρόπολης, θετικός ιονισμός

Σε χρόνο ανάλυσης περίπου 24 λεπτά, προκύπτει η κορυφή που απεικονίζεται στο φάσμα 3.33 και αντιστοιχεί στο ιόν $m/z=255$. Το ιόν 255, πιθανόν ταυτίζεται με το ψευδομοριακό ιόν της κατεχίνης ή επικατεχίνης μετά την απώλεια ενός χλωρίου, στο θετικό ιονισμό, $[(M+H)-Cl] = 255$. Ωστόσο ο χρόνος ανάλυσης της κατεχίνης/επικατεχίνης είναι μικρότερος (φάσμα 3.19). Συμπεραίνεται επομένως, ότι πρόκειται για θραύσμα ένωσης που περιέχει κατεχίνη/ επικατεχίνη. Στον ίδιο χρόνο, απεικονίζεται κορυφή που αντιστοιχεί στο ιόν $m/z= 257$. Η κορυφή αυτή με ιόν 257, πιθανόν να ταυτίζεται με το σύμπλοκο βενζοϊκού οξέος και του φαινυλοξικού οξέος, στο θετικό ιονισμό, $[(M+H)+\text{βενζοϊκό οξύ}] = 257$



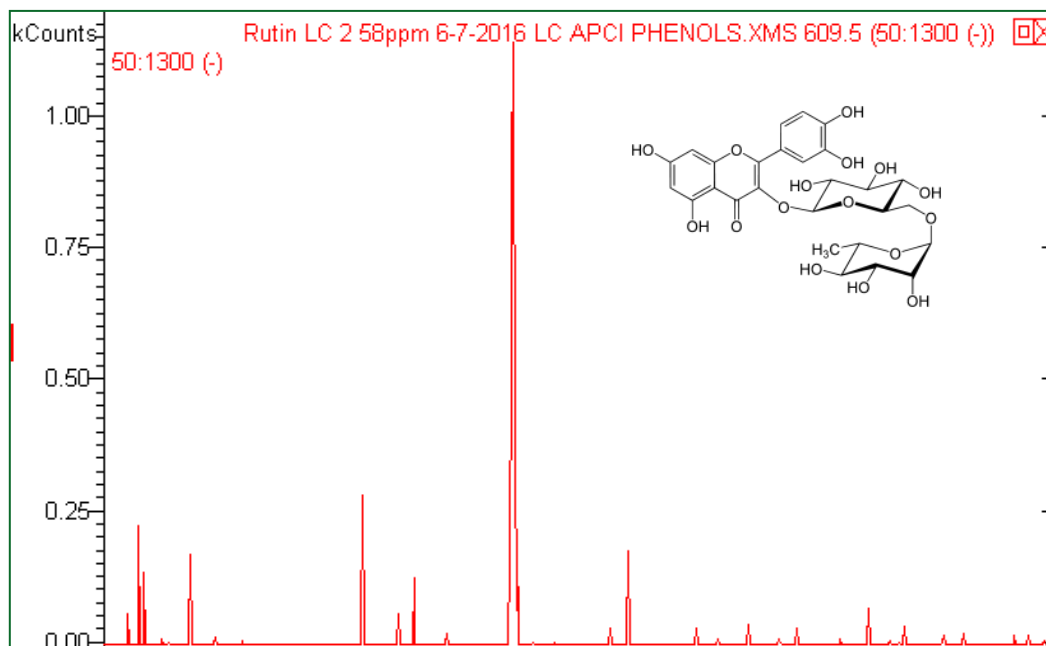
Φάσμα 3.33. Χρωματογραφήματα μοριακών ιόντων $m/z= 255$ $m/z=257$

Όσο αφορά τα φάσματα του αρνητικού ιονισμού, όπως απεικονίζεται παρακάτω (φάσμα 3.34), προκύπτει κορυφή με ιόν $m/z = 609$ σε χρόνο ανάσχεσης περίπου 25,5 λεπτά, το οποίο ταυτίζεται με το μοριακό ιόν της ρουτίνης, $[M-H] = 609$, καθώς και ιόν $m/z = 303$, στον αρνητικό ιονισμό, το οποίο μπορεί να ταυτίζεται είτε με το μοριακό ιόν της ταξιφολίνης είτε με το διμερές της βανιλίνης.



Φάσμα 3.34. Χρωματογραφήματα μοριακών ιόντων $m/z=609.5$ και $m/z=303$

Ωστόσο ο χρόνος ανάσχεσης της κορυφής του ιόντος $m/z=609$ δεν ταυτίζεται με το χρόνο ανάσχεσης, όταν η ρουτίνη αναλύεται μεμονωμένα σε υγρή χρωματογραφία (φάσμα 3.35). Προκύπτει επομένως, το συμπέρασμα, ότι δεν πρόκειται για καθαρή ένωση ρουτίνης αλλά κάποιο παράγωγο της συγκεκριμένης ουσίας με άλλη ένωση.



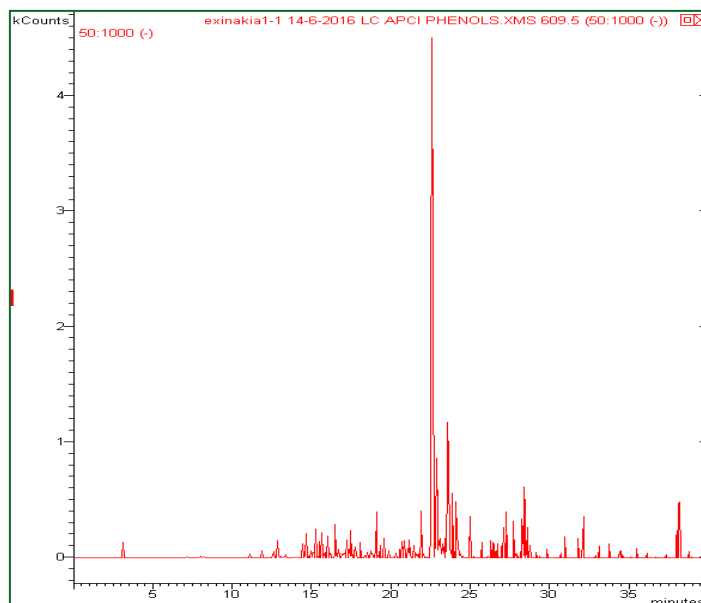
Φάσμα 3.35. Υγρή χρωματογραφία ρουτίνης

Επιπρόσθετα, οι χρόνοι ανάσχεσης για τις υποθέσεις ταύτισης του ιόντος $m/z = 303$ (φάσμα 3.30/3.31), δεν ταυτίζονται με τον συγκεκριμένο χρόνο ανάσχεσης (φάσμα 3.34). Επομένως δεν πρόκειται για καθαρή ουσία αλλά κάποια ένωση, ή θραύσμα της. Δεδομένου ότι δεν παρατηρείται το χαρακτηριστικό μοριακό ιόν $[M-H] = 151$ της βανιλίνης, η κορυφή αποδίδεται σε ένωση της ταξιφολίνης.

3.2.3 Εκχύλισμα Εχινάκεια

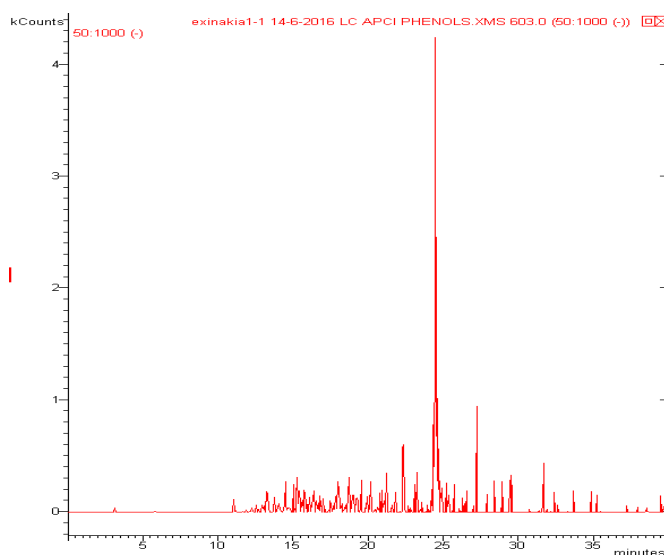
Μετά από την ανάλυση του εκχυλίσματος εχινάκεια, με χρήση υγρής χρωματογραφίας, προκύπτουν τα παρακάτω φάσματα:

Στο φάσμα 3.36 η κύρια κορυφή απεικονίζει το ιόν 609, το οποίο ταυτίζεται με το μοριακό ιόν της ρουτίνης στον αρνητικό ιονισμό, $[M-H] = 609$. Επιπρόσθετα, ικανοποιείται και η ταύτιση χρόνων ανάσχεσης, μεταξύ του φάσματος του εκχυλίσματος, και του φάσματος της ρουτίνης (φάσμα 3.35). Επομένως η κορυφή που απεικονίζεται στο φάσμα 3.36, αποδίδεται στην ένωση της ρουτίνης.



Φάσμα 3.36. Χρωματογράφημα μοριακού ιόντος $m/z=609.5$

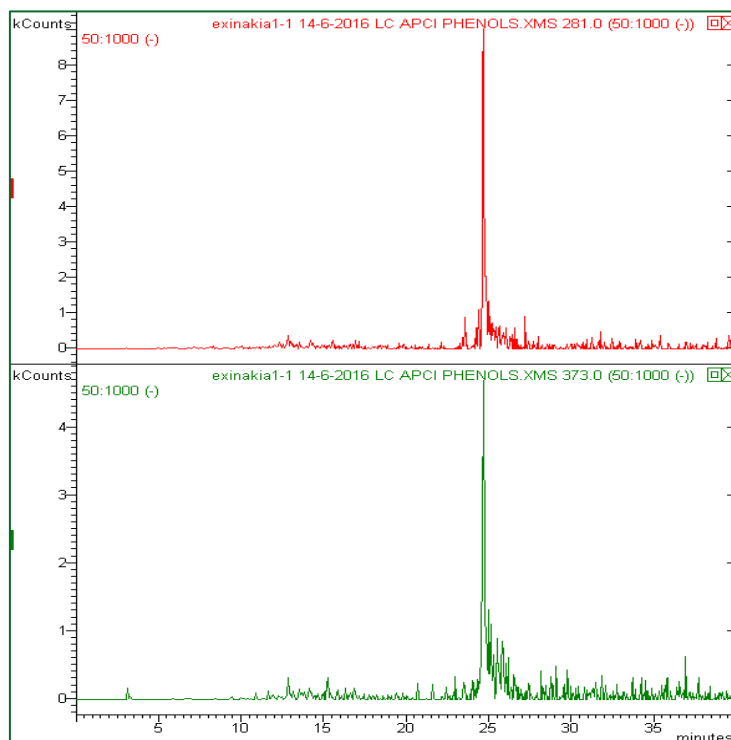
Στο φάσμα 3.37 απεικονίζεται κορυφή με ιόν 603, το οποίο ταυτίζεται με το ψευδομοριακό ιόν του διμερούς της κερκετίνης, στον αρνητικό ιονισμό, $[2M-H] = 603$. Επίσης, οι χρόνοι ανάσχεσης της κορυφής του εκχυλίσματος (φάσμα 3.37) και του πρότυπου της κερκετίνης (φάσμα 3.19), ταυτίζονται, επομένως η κορυφή αυτή, πιστοποιεί την παρουσία κερκετίνης στο εκχύλισμα εχινάκεια.



Φάσμα 3.37 Χρωματογράφημα μοριακού ιόντος $m/z=603$

Ολοκληρώνοντας την ανάλυση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος, τα φάσματα 3.38α και 3.38β, παρουσιάζουν το φαινόμενο της συνέκλουσης δύο ιόντων. Η κορυφή του φάσματος 3.38α που αντιστοιχεί στο ιόν $m/z = 281$, δεν ταυτίζεται

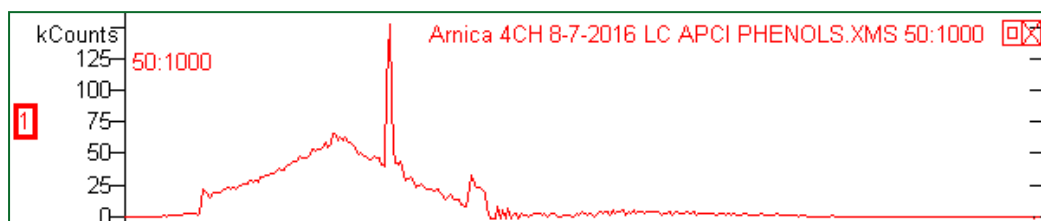
με κάποια από τις ουσίες τις βιβλιοθήκης. Το φάσμα 3.38β δίνει το ιόν $m/z = 373$, το οποίο μπορεί να αποδοθεί με το ψευδομοριακό ιόν της ένωσης του φερουλικού οξέος με καφεϊκό οξύ, στον αρνητικό ιονισμό, $[(M-H) \text{ φερουλικού οξέος} + (M-H) \text{ καφεϊκού οξέος}] = 373$.



Φάσματα Χρωματογραφήματα μοριακών ιόντων 3.38α $m/z=281$ // 3.38β $m/z=373$

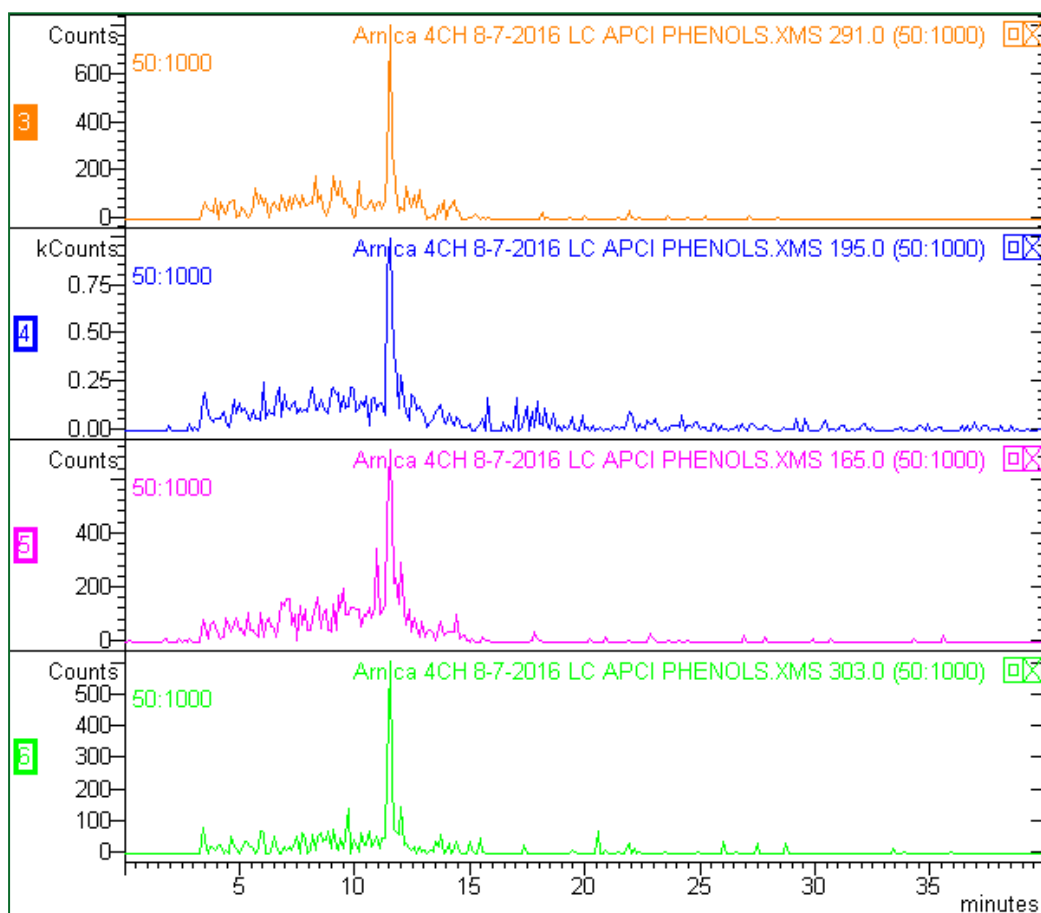
3.2.4 Εκχύλισμα Άρνικας

Το εκχύλισμα της Άρνικας, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στον θετικό ιονισμό. Το συνολικό φάσμα του εκχυλίσματος, παρατίθεται στο σχ. 3.39.



Φάσμα 3.39 Υγρή χρωματογραφία εκχυλίσματος Άρνικα

Από την ανάλυση του εκχυλίσματος, προέκυψε το φαινόμενο της συνέκλουσης 4 διαφορετικών ιόντων, στον ίδιο χρόνο ανάσχεσης. Συγκεκριμένα, τα τέσσερα φάσματα που παρατίθενται παρακάτω (φάσματα 3.40), έχουν αντίστοιχα: Το ιόν 291, το οποίο ταυτίζεται με το μοριακό ιόν της κατεχίνης στο θετικό ιονισμό, $[M+H] = 291$. Το ιόν 195, το οποίο ταυτίζεται με το μοριακό ιόν του φερουλικού οξέος στο θετικό ιονισμό, $[M+H] = 195$. Το ιόν 165, το οποίο ταυτίζεται με το μοριακό ιόν του p-κουμαρικού οξέος στο θετικό ιονισμό, $[M+H] = 165$. Το ιόν 303, το οποίο ταυτίζεται με το μοριακό ιόν της κερκετίνης στο θετικό ιονισμό, $[M+H] = 303$. Η συνέκλουση των ιόντων αποδίδεται στην παρουσία ενός πολυφαινολικού συμπλόκου στο εκχύλισμα της άρνικας.



Φάσματα 3.40 Φάσματα 4 συνεκλούμενων ιόντων.

3.3 Συμπεράσματα

- Η χρωματογραφική ανάλυση των προτύπων, παρέχει την δυνατότητα προσδιορισμού, όλων των καθαρών φαινολικών ενώσεων, βάση του χρόνου ανάσχεσης. Δεν επιτρέπει ωστόσο, τη διάκριση συνεκλούμενων ενώσεων, δυνατότητα η οποία παρέχεται από τα φάσματα μάζας.
- Η δημιουργία βιβλιοθήκης φασμάτων μάζας αποτελεί σημαντικό εργαλείο, όχι μόνο για την ταυτοποίηση των ιδίων καθαρών ενώσεων, αλλά κυρίως για την ανίχνευση και αναγνώριση, παραγώγων των ενώσεων αυτών. Η πιστοποίηση των πολυφαινολικών παραγώγων επιτυγχάνεται μόνο με τη χρήση βιβλιοθήκης φασμάτων μαζών, δεδομένου ότι η προμήθεια των αντίστοιχων όλων των προτύπων όλων των ενώσεων είναι πρακτικά αδύνατη.
- Στα εκχυλίσματα της μαύρης πεύκης αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι καθарές ουσίες, της κερκετίνης, του ρ-κουμαρικού οξέος και του βενζοϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα αυτά, προέκυψαν από τα φάσματα μάζας και την επιβεβαίωση χρωματογραφικών δεδομένων. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε η παρουσία πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες αποτελούν παράγωγα των πρότυπων ουσιών. Συγκεκριμένα, η παρουσία ενώσεων φερουλικού οξέος, κατεχίνης/επικατεχίνης, καφεϊκού οξέος και χλωροφαινόλης. Τα αποτελέσματα αυτά, προέκυψαν από τα φάσματα μάζας των επιμέρους πρότυπων ενώσεων της βιβλιοθήκης.
- Στο εκχύλισμα της πρόπολης, αναγνωρίστηκαν οι ουσίες της κατεχίνης, του βενζοϊκού οξέος, της ρουτίνης καθώς και αυτές του φαινυλοξικού οξέος και της ταξιφολίνης. Τα χρωματογραφικά δεδομένα, ωστόσο της κάθε ένωσης ξεχωριστά, μαρτυρούν ότι οι ενώσεις δεν βρίσκονται σε καθαρή μορφή, αλλά αποτελούν πολυφαινολικά παράγωγα των συγκεκριμένων ουσιών.

- Στο εκχύλισμα εχινάκεια, πιστοποιήθηκε η παρουσία ενώσεων κερκετίνης και ρουτίνης σε καθαρή μορφή, μετά την ταύτιση χρωματογραφικών και φασματομετρικών δεδομένων. Επιπρόσθετα από την ανάλυση των φασμάτων, προτείνεται η ύπαρξη παραγώγων φερουλικού και καφεϊκού οξέος.
- Τέλος στο εκχύλισμα της άρνικας, τα φασματομετρικά δεδομένα, οδηγούν στην ύπαρξη πολυφαινολικών ενώσεων, παραγώγων κατεχίνης, φερουλικού οξέος, κερκετίνης και p-κουμαρικού οξέος.

4. Δημιουργία Κρέμας Δοκιμή Σταθερότητας (Stability Test)

Με σκοπό την ολοκλήρωση της μελέτης του εκχυλίσματος της μαύρης πεύκης, αυτό ενσωματώθηκε, σε τελικό προϊόν, το οποίο είχε μορφή, κρεμώδους γέλης (cream gel). Το προϊόν αυτό, μελετάται με σκοπό την επέκταση της ήδη υπάρχουσας σειράς περιποίησης του δέρματος, της εταιρίας ΚΟΡΡΕΣ, της σειράς «Μαύρη Πεύκη». Στόχος είναι λοιπόν, η δημιουργία ενός προϊόντος για την περιποίηση της επιδερμίδας, βασισμένο στην ήδη πετυχημένη σειρά, αλλά με διαφορετική σύσταση.



Εικόνα 4.1. Σειρά Μαύρη Πεύκη Κορρές.

Αρχικά κατασκευάζεται, φόρμουλα κρέμας της εταιρίας, η οποία διαχωρίζεται σε δυο μέρη ίσης ποσότητας. Το ένα μέρος δεν περιέχει το εκχύλισμα μαύρης πεύκης (placebo), ενώ το άλλο μέρος περιέχει το εκχύλισμα. Στη συνέχεια διεξάγεται δοκιμή σταθερότητας μεταξύ των δύο παρασκευασμάτων. Στις συνθήκες της διπλωματικής οι δοκιμές, πραγματοποιούνται σε χρονική διάρκεια ενός μήνα. Σύμφωνα με την πολιτική της εταιρίας, ωστόσο, πριν προχωρήσει η πιλοτική παραγωγή μιας νέας φόρμουλας, διεξάγονται δοκιμές

σταθερότητας διάρκειας τουλάχιστον τριών μηνών. Η διαδικασία κατασκευής της κρέμας, αλλά και τα αποτελέσματα των δοκιμών, παρατίθενται παρακάτω.

4.1 Κατασκευή Κρέμας

Σκοπός είναι η κατασκευή κρέμας όγκου ενός κιλού. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, χρησιμοποιείται φόρμουλα της εταιρίας, τα συστατικά της οποίας προστατεύονται, ωστόσο αναφέρονται ο τύπος του συστατικού, καθώς και η χρησιμότητα του. Παρατίθεται η πειραματική διαδικασία:

Υδατική Φάση:

- Νερό (περίπου 760 γραμμάρια από το 1 κιλό κρέμας που κατασκευάζεται)
- Χηλικοί παράγοντες (chelating agents), [tetrasodium glutamate (1g)].
- Γλυκερίνη [glycerin(15g)], με σκοπό τη διατήρηση της υγρασίας.

Θέρμανση στους 75°C, και προσθήκη:

- Ένωση [pentylene glycol (15g)], με πολλαπλές δράσεις, όπως διατήρηση της υγρασίας και αντιμικροβιακή δράση.
- Διάλυμα υαλουρονικών (1g). Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι συγκεκριμένες ουσίες, με ιδιαίτερη συμπεριφορά, όπως μεγάλο ιξώδες, προστίθενται στην κεντρική φόρμουλα, αφού πρώτα, αναμειχθούν ξεχωριστά σε προδιαλύματα. Με αυτό τον τρόπο γίνεται καλύτερη ανάμειξη με τις υπόλοιπες ουσίες
- Φωσφορικό άμυλο [starch phosphate (20g)], ώστε να ομογενοποιηθεί η υφή.

Διατήρηση στους 75°C και ταυτόχρονη παρασκευή λιπαρής φάσης:



Εικόνα 4.2. Παρασκευή υδατικής φάσης

✚ Λιπαρή φάση:

- Διάφορα φυσικά έλαια, ευαίσθητα λιπαρά συστατικά και εστέρες [natural oils, sensitive oily ingredients and esters (135g)]
- Γαλακτωματοποιητής [όπως κιτρικό άλας (45g)]

Θέρμανση λιπαρής φάσης στους 75°C. Πολλά συστατικά της λιπαρής φάσης βρίσκονται σε στερεή κατάσταση και απαιτείται θέρμανση για να ομογενοποιηθούν (δες Κεφ. 6)



Εικόνα 4.3. Προετοιμασία Λιπαρής Φάσης

✚ Διαδικασία Ομογενοποίησης. Στη διαδικασία της ομογενοποίησης, οι δύο φάσεις βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία των 75°C. Για επιτυχή γαλακτωματοποίηση (ομογενοποίηση της υδατικής, με την λιπαρή φάση) απαιτείται ανάδευση με ταχύτητα 2800rpm, για χρονικό

διάστημα 10 λεπτών. Σταδιακά πραγματοποιείται μείωση της θερμοκρασίας και προστίθεται:

- Πολυμερές [xanthan gum], με σκοπό την σταθεροποίηση του υγρού (thickener agent) στους 65°C

Μείωση ταχύτητας στις 1600 στροφές (rpm), και ψύξη παρασκευάσματος μέχρι τους 30°C.



Εικόνα 4.4. Διαδικασία Ομογενοποίησης

✚ Προσθήκη ευαίσθητων συστατικών. Οι θερμοευαίσθητες ενώσεις προστίθενται αφότου η θερμοκρασία φτάσει στα επιθυμητά επίπεδα:

- Συντηρητικά [benzyl alcohol, phenoxyethanol, ethylhexy glycerin (28g)], με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος και την προστασία του από μούχλα, μύκητες κ.α.
- Αρωματικές ουσίες [fragrance (6g)]
- Εκχυλίσματα με αντιγηραντική και ενυδατική δράση [avena strigosa extract (10g)]
- Εκχυλίσματα με συσφικτική και λειαντική δράση [oat extract (10g)]



Εικόνα 4.5Α. Κρέμα πριν την προσθήκη εκχυλισμάτων με λειαντική δράση.

Β. Κρέμα μετά την προσθήκη εκχυλισμάτων με λειαντική δράση

- ✚ **Διαχωρισμός όγκου κρέμας.** Διαχωρίζεται το παρασκεύασμα σε δύο ίσα τμήματα. Το πρώτο λειτουργεί σαν τυφλό, χωρίς το εκχύλισμα (placebo), ενώ στο δεύτερο προστίθενται 5g εκχυλίσματος μαύρης πεύκης (Corsican black pine).



Εικόνα 4.6. Προσθήκη εκχυλίσματος μαύρης πεύκης (Corsican black pine)

- ✚ **Έλεγχος pH και φυγοκέντρηση.** Τα δύο παρασκευάσματα, περνούν έλεγχο, ώστε το pH να είναι μεταξύ των τιμών 5 και 5.5. Σε αντίθετη περίπτωση το pH ρυθμίζεται μέχρι τα επιθυμητά όρια. Πραγματοποιείται επίσης, δοκιμή φυγοκέντρησης, και εξετάζεται διαχωρισμός, υδατικής ή λιπαρής φάσης. Τέλος τα δείγματα συσκευάζονται και τοποθετούνται στις εκάστοτε θερμοκρασίες των δοκιμών σταθερότητας (stability tests).



Εικόνα 4.7. Διαχωρισμός όγκου κρέμας (with & without B.P. extract)

4.2 Δοκιμές Σταθερότητας - Stability Tests

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, διεξάγονται προκαταρκτικές δοκιμές σταθερότητας, διάρκειας ενός μήνα. Οι δοκιμές, αφορούν εξίσου τα δύο προϊόντα κρέμας, με το εκχύλισμα (with the extract) και χωρίς αυτό (without the extract). Δείγματα τοποθετούνται στις εξής θερμοκρασίες, στο σκοτάδι

- Υψηλή κατάψυξη (deep freeze), -20°C
- 5°C
- 25°C
- 40°C
- 50°C
- Κύκλοι ψύξης-θέρμανσης $5-45^{\circ}\text{C}$ (δύο μέρες 5°C , πέντε ημέρες 45°C). Μετρήσεις λαμβάνονται στις 7, 15, 21 και 29 ημέρες. Κάθε δείγμα χρησιμοποιείται μία φορά.



Εικόνα 4.8. Τα δείγματα κρέμας χωρίς εκχύλισμα για κάθε δοκιμασία θερμοκρασίας

Κάθε εβδομάδα, λαμβάνονται μετρήσεις, για παρατήρηση της συμπεριφοράς των παρασκευασμάτων στις ακραίες συνθήκες. Διεξάγονται τα παρακάτω, με εξαίρεση το δείγμα των -20°C το οποίο μετρήθηκε μία φορά, σε όλες τις παραμέτρους εκτός της φυγοκέντρωσης.

- Οπτική αξιολόγηση
- Μέτρηση pH
- Μέτρηση Ιξώδους
- Φυγοκέντρωση (5000 στροφές για 10 λεπτά, 7400 για άλλα 10 λεπτά)

Την ημέρα παρασκευής της, το αρχικό pH της κρέμας με το εκχύλισμα μαύρης πεύκης είναι 5.22 και 5.16 χωρίς αυτό. Επιπρόσθετα, και στα δύο παρασκευάσματα, ο έλεγχος φυγοκέντρωσης δεν δείχνει κανένα διαχωρισμό. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες:

Δείγματα 5°C στο σκοτάδι-διάρκεια ένας μήνας

Πίνακας 4.9. Δείγματα των 5°C

	1 ^η εβδομάδα		2 ^η εβδομάδα		3 ^η εβδομάδα		4 ^η εβδομάδα	
	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα
Οπτική Αξιολόγηση	ivory	ivory	yellowish	yellowish	yellowish	yellowish	yellowish	yellowish
pH (T=25°C)	5.17	5.16	5.13	5.15	5.21	5.22	5.15	5.14
Ιξώδες(cP)	27735 (35%)	28668 (37%)	29994 (38%)	30775 (39%)	29352 (38%)	32407 (41%)	25814 (33%)	27219 (35%)
Φυγοκέντρωση		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Το χρώμα της κρέμας την πρώτη εβδομάδα είναι ιβουάρ και αλλάζει μέχρι το πέρας των μετρήσεων σε κιτρινωπό. Οι ενδείξεις είναι ανεξάρτητες της παρουσίας ή μη του εκχυλίσματος όπως φαίνεται στον πίνακα 4.9. Επιπρόσθετα, το pH της κρέμας παραμένει εντός των επιθυμητών ορίων, καθ' όλη την διάρκεια των δοκιμών σταθερότητας, με μία μικρή άνοδο κατά την διάρκεια της τρίτης εβδομάδας. Το pH, φαίνεται επίσης να είναι ανεξάρτητο από την παρουσία του εκχυλίσματος της μαύρης πεύκης. Το ιξώδες, δεν

παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις κατά την διάρκεια του μήνα. Ωστόσο το ιξώδες του μίγματος κρέμας χωρίς εκχύλισμα, είναι λίγο μεγαλύτερο. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται, αφού η προσθήκη του εκχυλίσματος, το οποίο είναι υδαρές, κάνει την κρέμα πιο λεπτόρρευστη. Τέλος, ο έλεγχος κατά την φυγοκέντρηση δεν δείχνει διαχωρισμό, είτε υδατικής είτε λιπαρής φάσης, σε κανένα σημείο.



Εικόνα 4.10. Οπτικός Έλεγχος μεταξύ των δειγμάτων στις διάφορες θερμοκρασίες

Δείγματα 25°C στο σκοτάδι-διάρκεια ένας μήνας

Πίνακας 4.11. Δείγματα των 25°C

	1 ^η εβδομάδα		2 ^η εβδομάδα		3 ^η εβδομάδα		4 ^η εβδομάδα	
	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα
Οπτική Αξιολόγηση	yellowish	yellowish	ivory	yellowish	Ok(Whitish)	Ok(Whitish)	Ok(Whitish)	Ok(Whitish)
pH (T=25°C)	5.19	5.16	5.15	5.15	5.20	5.19	5.15	5.13
Ιξώδες(cP)	24995 (32%)	28119 (36%)	24838 (32%)	25463 (32%)	24217 (31%)	26088 (33%)	24321 (31%)	23412 (30%)
Φυγοκέντρηση		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Αρχικά, το χρώμα της κρέμας με, αλλά και χωρίς το εκχύλισμα, είναι κιτρινωπό. Κατά την δεύτερη εβδομάδα, η κρέμα με το εκχύλισμα

μεταχρωματίζεται σε ιβουάρ, για να καταλήξει την τρίτη εβδομάδα, σε λευκό χρώμα. Αντίθετα, το μίγμα της κρέμας χωρίς το εκχύλισμα, παραμένει κιτρινωπό μέχρι την 3^η εβδομάδα, όπου γίνεται λευκό. Το εκχύλισμα, φαίνεται να επηρεάζει το χρώμα της κρέμας, κατά την δεύτερη εβδομάδα. Το pH της κρέμας παραμένει εντός των επιθυμητών ορίων, ανεξάρτητα από την παρουσία του εκχυλίσματος, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 4.11. Το ιξώδες, δεν παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις κατά την διάρκεια του μήνα. Ο έλεγχος της φυγοκέντρωσης είναι επιτυχής.

Δείγματα 40°C στο σκοτάδι-διάρκεια ένας μήνας

Πίνακας 4.12. Δείγματα των 40°C

	1 ^η εβδομάδα		2 ^η εβδομάδα		3 ^η εβδομάδα		4 ^η εβδομάδα	
	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα
Οπτική Έλεγχος	Ok (whitish)	Ok (whitish)	½ tone darker	½ tone darker	½ tone darker	½ tone darker	½ tone darker	½ tone darker
pH (T=25°C)	5.12	5.12	5.12	5.12	5.10	5.07	4.95	4.95
Ιξώδες(cP)	33601 (30%)	28978 (37%)	24214 (31%)	26401 (33%)	24278 (31%)	24213 (31%)	29911 (38%)	24598 (31%)
Φυγοκέντρωση		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Τα δείγματα, έχουν εξίσου λευκό χρώμα την πρώτη εβδομάδα. Στη συνέχεια όμως, φαίνεται να αλλάζει ο τόνος του αρχικού χρώματος κατά μισό τόνο την εβδομάδα. Με αποτέλεσμα, τελικά οι κρέμες να έχουν ενάμισι τόνο σκουρότερο χρώμα από το αρχικό της πρώτης εβδομάδας. Η παρουσία του εκχυλίσματος είναι ανεξάρτητη της μεταβολής. Το pH, είναι σταθερό τις πρώτες τρεις εβδομάδες, ωστόσο την τελευταία, μετράται ελάχιστα εκτός των επιθυμητών ορίων. Στους 40°C, το ιξώδες δεν έχει την αναμενόμενη συμπεριφορά, δηλαδή η κρέμα χωρίς το εκχύλισμα να έχει υψηλότερες τιμές. Τέλος, ο έλεγχος στη φυγόκεντρο δεν δείχνει κανένα διαχωρισμό.

Δείγματα 50°C στο σκοτάδι-διάρκεια ένας μήνας

Πίνακας 4.13. Δείγματα των 50°C

	1 ^η εβδομάδα		2 ^η εβδομάδα		3 ^η εβδομάδα		4 ^η εβδομάδα	
	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα
Οπτική Αξιολόγηση	½ tone darker	½ tone darker	½ tone darker	stable	½ tone darker	½ tone darker	½ tone darker	½ tone darker
ρΗ (T=25°C)	5.08	5.06	4.99	4.91	4.90	4.91	4.72	4.73
Ιξώδες(cP)	28197 (36%)	29603 (37%)	25620 (33%)	26944 (34%)	26010 (33%)	29522 (37%)	27802 (35%)	27012 (34%)
Φυγοκέντρηση		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Στην δοκιμασία των 50°C, τα παρασκευάσματα, την πρώτη εβδομάδα, έχουν μισό τόνο πιο σκούρο χρώμα, από το λευκό. Στο δείγμα με το εκχύλισμα, η διακύμανση του χρώματος συνεχίζεται κατά μισό τόνο, ενώ το δείγμα χωρίς το εκχύλισμα παραμένει σταθερό. Συνολικά, η κρέμα με το εκχύλισμα είναι κατά δύο τόνους πιο σκούρα από λευκό χρώμα, ενώ η κρέμα χωρίς το εκχύλισμα, κατά ενάμισι τόνο. Στους 50 βαθμούς η παρουσία του εκχυλίσματος φαίνεται να επηρεάζει κατά μισό τόνο το χρώμα. Όσο αφορά το ρΗ, από την δεύτερη εβδομάδα και έπειτα, παρατηρείται μείωση κάτω από τα επιθυμητά όρια (5-5.5) ένδειξη ανεξάρτητη, από την παρουσία του εκχυλίσματος. Οι μετρήσεις του ιξώδους είναι σταθερές. Ο έλεγχος φυγοκέντρησης είναι επιτυχής.



Εικόνες 4.14. Παράμετροι ελέγχου. Αριστερά: Μέτρηση ρΗ, Στο κέντρο: Μέτρηση ιξώδους, Δεξιά: Φυγοκέντρος

Δοκιμασία ψύξης-θέρμανσης 5-45°C στο σκοτάδι-διάρκεια ένας μήνας

Πίνακας 4.15. Δοκιμασία των 5-45°C

	1 ^{ος} Κύκλος (7 ημέρες)		2 ^{ος} Κύκλος (15 ημέρες)		3 ^{ος} Κύκλος (21 ημέρες)		4 ^{ος} Κύκλος (29 ημέρες)	
	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα
Οπτική Αξιολόγηση	Ok (whitish)	Ok (whitish)	Ok (whitish)	Ok (whitish)	Ok (whitish)	Ok (whitish)	Ok (whitish)	Ok (whitish)
pH (T=25°C)	5.20	5.15	5.13	5.11	5.13	5.08	4.92	4.90
Ιξώδες(cP)	24917 (32%)	28862 (36%)	25385 (32%)	25307 (32%)	27381 (35%)	27104 (34%)	26372 (33%)	27014 (34%)
Φυγοκέντρηση		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Σε όλους τους κύκλους της δοκιμασίας ψύξης-θέρμανσης, το χρώμα παραμένει λευκό, χωρίς να επηρεάζεται από την παρουσία του εκχυλίσματος μαύρης πεύκης. Το pH, είναι σταθερό τις πρώτες τρεις εβδομάδες, ωστόσο την τελευταία, μετράται ελάχιστα εκτός των επιθυμητών ορίων. Σταθερότητα παρατηρείται και στις μετρήσεις του ιξώδους όπως αυτές παρατίθενται στον πίνακα 4.15. Τέλος, κατά την φυγοκέντρηση, δεν παρατηρείται κανένας διαχωρισμός, τόσο λιπαρής, όσο υδατικής φάσης.

Δοκιμασία κατάψυξης -20°C στο σκοτάδι

Πίνακας 4.16. Δοκιμασία των -20°C

	Με εκχύλισμα	Χωρίς εκχύλισμα
Οπτική Αξιολόγηση	ivory	ivory
pH (T=25°C)	5.17	5.20
Ιξώδες(cP)	27963 (36%)	29994 (38%)

Η δοκιμασία των -20°C, θεωρείται αρκετά επίπονη για το προϊόν καθώς οι συνθήκες αυτές θεωρούνται αρκετά ακραίες. Το χρώμα άλλαξε από λευκό, σε

ιβουάρ. Το pH παραμένει εντός των ορίων, όπως και οι μετρήσεις του ιξώδους παρουσιάζονται φυσιολογικές, σύμφωνα με τον πίνακα 4.16. Ο έλεγχος, μετά την φυγόκεντρο δεν έδειξε κανένα διαχωρισμό, αντίθετα στέφθηκε με επιτυχία.

4.2.1 Συμπεράσματα

- Κατά την διεξαγωγή των μετρήσεων των δοκιμών σταθερότητας παρατηρείται διακύμανση του χρώματος στις δοκιμές σταθερής θερμοκρασίας. Στις χαμηλές θερμοκρασίες εμφανίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις κιτρινωπό, ενώ στις υψηλότερες θερμοκρασίες το χρώμα γίνεται σκουρότερο από ενάμισι έως δύο τόνους. Η μεταβολή του χρώματος, είναι πιθανόν αποτέλεσμα οξείδωσης, στις ιδιαίτερες καταπονητικές δοκιμασίες. Στη δοκιμασία επαναλαμβανόμενων κύκλων ψύξης θέρμανσης, το χρώμα παραμένει λευκό. Οι κύκλοι ψύξης θέρμανσης αποτελούν δοκιμή που προσομοιάζει σε πραγματικές συνθήκες.
- Το pH, σε όλες σχεδόν τις συνθήκες παραμένει σταθερό και εντός των επιθυμητών ορίων. Στις περιπτώσεις που μετράται μικρότερο του 5 που αποτελεί το όριο για την συγκεκριμένη κρέμα, πιθανότατα κάποιο συστατικό προκάλεσε περισσότερο όξινο περιβάλλον κατά τις συνθήκες θέρμανσης.
- Το ιξώδες είναι επίσης σταθερό, χωρίς ακραίες μεταβολές. Ακόμα και οι μικρές διακυμάνσεις που αναφέρονται παραπάνω, ξεχωριστά για κάθε περίπτωση, δεν είναι σε καμία περίπτωση αντιληπτές στην δοκιμή υψής, στην χρήση στο χέρι ή με οπτικό έλεγχο. Επομένως μπορούν να θεωρηθούν αμελητέες.
- Ο κάθε φυγοκεντρικός έλεγχος είναι επιτυχής, εφόσον δεν παρατηρείται κανένας διαχωρισμός υδατικής ή λιπαρής φάσης σε καμία από τις δύο ταχύτητες τις δοκιμασίας.
- Συνοπτικά, το εκχύλισμα δεν φαίνεται να επηρεάζει την συμπεριφορά της κρέμας σε καμία μέτρηση και παράγοντα. Επομένως η νέα φόρμουλα θα μπορούσε να υποστηρίξει το εκχύλισμα μαύρης πεύκης. Ωστόσο για να

σχηματιστεί πληρέστερη εικόνα για την συμπεριφορά του παρασκευάσματος, θα πρέπει να διευρυνθούν οι δοκιμές σταθερότητας.

5. Γενικά Συμπεράσματα και Προοπτικές

- Στη μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων, εφαρμόστηκαν τρεις μέθοδοι, με ειδοποιό διαφορά, τους διαλύτες. Από την σύγκριση των μεθόδων προέκυψε:
 - Το νερό (H_2O) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για όλα τα πιθανά ισοδύναμα, λόγω της περιορισμένης διαλυτότητας των πρότυπων ουσιών σε αυτό, όπως στην περίπτωση του γαλλικού οξέος.
 - Οι απόλυτες τιμές περιεκτικότητας φαινολικών εξαρτώνται από το διαλύτη, (αιθανόλη ή μεθανόλη), χωρίς όμως να επηρεάζεται η κατηγοριοποίηση των ενώσεων.
 - Η σχετική απόκλιση ακόμα και για τον ίδιο διαλύτη και το ίδιο ισοδύναμο, είναι της τάξεως του 10%. Προτείνεται επομένως η χρήση καινούριας καμπύλης βαθμονόμησης πριν από κάθε μέτρηση σε αντίθεση με την χρήση μίας μόνο εξίσωσης.
 - Όσο αφορά την ευαισθησία των μεθόδων, αυτή εξαρτάται από την πρότυπη ένωση που χρησιμοποιείται ως ισοδύναμο. Συγκεκριμένα, για το γαλλικό οξύ, ο διαλύτης μεθανόλη εμφανίζει την μεγαλύτερη ευαισθησία και το νερό την μικρότερη. Αντίθετα, στην περίπτωση με ισοδύναμο το καφεϊκό οξύ, την μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζει ο διαλύτης αιθανόλη.
- Όσο αφορά τις περιεκτικότητες των ολικών φαινολικών, με αναγωγή των μετρήσεων ανά γραμμάριο ξηρής μάζας της πρώτης ύλης το διάλυμα της πρόπολης παρουσίασε την υψηλότερη, μάλιστα σε τριπλάσια συγκέντρωση από αυτά του εκχυλίσματος μαύρης πεύκης και εχινάκεια. Το εκχύλισμα της άρνικας, παρουσιάζει χαμηλή

συγκέντρωση φαινολικών, με αποκορύφωση την αδυναμία μέτρησής τους με διαλύτη το νερό.

- Τα ολικά φλαβονοειδή όλων των εκχυλισμάτων είναι πολύ χαμηλότερα από τα ολικά φαινολικά, γεγονός αναμενόμενο, εφόσον τα φλαβονοειδή είναι κατηγορία φαινολικών ενώσεων. Το εκχύλισμα μαύρης πεύκης παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση σε φλαβονοειδή, ενώ μάλιστα έχει την μικρότερη αναλογία (γραμμάρια ξηρής μάζας/ όγκο διαλύτη εκχυλίσματος). Το γεγονός ότι το εκχύλισμα της εταιρίας Κορρές, παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών, έρχεται να επιβεβαιώσει την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του, που προσδίδει συσφικτικές και αντιγηραντικές ιδιότητες.
- Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους ανάλυσης των αποτελεσμάτων, καθώς και τους δείκτες IC₅₀ προκύπτουν αντίστοιχα συμπεράσματα. Σε κάθε μέθοδο, οι ενώσεις με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση ήταν η πρόπολη, η κατεχίνη, το γαλλικό οξύ και το εκχύλισμα μαύρης πεύκης. Μέτρια συμπεριφορά έχουν το φερουλικό, το εκχύλισμα εχινάκεια και ακόμα χαμηλότερη το καφεϊκό. Τέλος χαμηλή, έως και μηδενική αντιοξειδωτική δράση έχουν, το εκχύλισμα της άρνικας, η 4-χλωροφαινόλη, η βανιλίνη και το βενζοϊκό οξύ.
 - Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος της μαύρης πεύκης, οφείλεται πιθανότατα στην υψηλή περιεκτικότητά του, σε φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, στις οποίες, αποδίδονται οι θετικές προς την υγεία ιδιότητες του εκχυλίσματος. Αντίθετα το φυτό άρνικα παρουσίασε μηδενικές αντιοξειδωτικές δράσεις καθώς και χαμηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, κάτι που δεν συνάδει με την βιβλιογραφία.
- Η δημιουργία βιβλιοθήκης φασμάτων μάζας αποτελεί σημαντικό εργαλείο, όχι μόνο για την ταυτοποίηση των ιδίων καθαρών ενώσεων, αλλά κυρίως για την ανίχνευση και αναγνώριση, παραγώγων των

ενώσεων αυτών. Η πιστοποίηση των πολυφαινολικών παραγώγων επιτυγχάνεται μόνο με τη χρήση βιβλιοθήκης φασμάτων μαζών, δεδομένου ότι η προμήθεια των αντίστοιχων όλων των προτύπων όλων των ενώσεων είναι πρακτικά αδύνατη.

- Η βιβλιοθήκη που κατασκευάζεται για πρώτη φορά στη Σχολή Χημικών Μηχανικών, πρόκειται να εμπλουτιστεί, με πλήθος άλλων πρότυπων ενώσεων και να χρησιμοποιηθεί, από άλλους τομείς της σχολής (π.χ. εργαστήριο Τροφίμων)
- Στην ανάλυση των εκχυλισμάτων με την χρήση υγρής χρωματογραφίας, η εξαγωγή των συμπερασμάτων μπορεί να γίνει μόνο στο πλαίσιο των πιθανών υποθέσεων. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να απαντηθούν σε καθαρή μορφή, ή σε πολυφαινολικά παράγωγα, μέσα στα φυτικά εκχυλίσματα. Αυτό οδηγεί σε χιλιάδες πιθανές περιπτώσεις εύρεσης ουσιών στα εκχυλίσματα. Με τον συνδυασμό χρωματογραφικών και φασματογραφικών δεδομένων, προέκυψε:
 - Στα εκχυλίσματα της μαύρης πεύκης αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι καθαρές ουσίες, της κερκετίνης, του ρ-κουμαρικού οξέος και του βενζοϊκού οξέος. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε η παρουσία πολυφαινολικών ενώσεων, φερουλικού οξέος, κατεχίνης/επικατεχίνης, καφεϊκού οξέος και χλωροφαινόλης. Στο εκχύλισμα της πρόπολης, αναγνωρίστηκαν οι ουσίες τις κατεχίνης, του βενζοϊκού οξέος, της ρουτίνης καθώς και αυτές των φαινυλοξικού οξέος και ταξιφολίνης, σε μορφή πολυφαινολικών παραγώγων των συγκεκριμένων ουσιών. Στο εκχύλισμα εχινάκεια, πιστοποιήθηκε η παρουσία ενώσεων κερκετίνης και ρουτίνης σε καθαρή μορφή, καθώς και ύπαρξη παραγώγων φερουλικού και καφεϊκού οξέος. Τέλος στο εκχύλισμα της άρνικας, τα φασματομετρικά δεδομένα, οδηγούν

στην ύπαρξη πολυφαινολικών ενώσεων, παραγώγων κατεχίνης, φερουλικού οξέος, κερκετίνης και p-κουμαρικού οξέος.

- Κατά την διεξαγωγή των δοκιμών σταθερότητας, το εκχύλισμα δεν φαίνεται να επηρεάζει την συμπεριφορά της κρέμας σε καμία μέτρηση και παράγοντα. Οι διαφοροποιήσεις του χρώματος παρατηρούνται μόνο σε ακραίες συνθήκες και πιθανότατα οφείλονται σε οξειδωτικούς παράγοντες. Στο γεγονός αυτό αποδίδονται και οι διακυμάνσεις στο pH. Η δοκιμή ιξώδους και ο έλεγχος φυγοκέντρωσης είναι απολύτως επιτυχείς. Επομένως η νέα φόρμουλα μπορεί να υποστηρίξει το εκχύλισμα μαύρης πεύκης.
- Για να σχηματιστεί πληρέστερη εικόνα για την συμπεριφορά του παρασκευάσματος, θα πρέπει να διευρυνθούν οι δοκιμές σταθερότητας. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση μεταβολής του χρώματος, θα πρέπει να γίνει ανάλυση, των πιθανών ουσιών που προκάλεσαν οξείδωση. Η ανάλυση αυτή, θα μπορούσε να γίνει με χρήση υγρής χρωματογραφίας. Σε κάθε περίπτωση, η συμπεριφορά του προϊόντος, θα πρέπει να παρατηρηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Βιβλιογραφία

1. Alya Maimoona, et al. "Analysis of total flavonoids and phenolics in different fractions of bark and needle extracts of *Pinus roxburghii* and *Pinus wallichiana*." *Journal of Medicinal Plants Research* 5.13 (2011): 2724-2728. and phenolic acids," *Free Rad. Biol. Med*, 1996, 20, 933-956
2. Antolovich M., Paul D. Prenzler, Emiliios Patsalides, Suzanne Mc Donald, Kevin Robards. *Methods for testing antioxidant activity. The Analyst*, Volume 127, Pagew 183-198, 2002
3. *Arnica Montana L.*, relevant European medical plant, Waizel-Bucay J., Cruz-Juarez M. de L. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, Vol. 5 Issue 25 p. 98-109, 2014
4. Bankova S. Vassya, Solange L. de Castro, Maria C. Marcucci *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, Apidologie* 31 (2000) 3-15
5. Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson JD (2005). "Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties". *J Pharm Pharmacol.* 57 (8): 929–54. doi:10.1211/0022357056127. PMID 16102249.
6. Biljana Bozin , Neda Mimica-Dukic, Natasa Simin, and Goran Anackov, *Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils, J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54 (5), pp 1822–1828
7. Braga P. C., M. Dal Sasso, M. Culici, T. Bianchi, L. Bordoni & L. Marabini (2006). "Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase". *Pharmacology* 77 (3): 130–6. doi:10.1159/000093790. PMID 16763380. Retrieved January 27, 2008.
8. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*; 28:25-30, 1995

9. Buchanan CJ, Wallace G, Fry SC, Eastwood MA. *In vivo* release of ¹⁴C-labeled phenolic groups from intact dietary spinach cell walls during passage through the rat intestine. *J Sci Food Agric* 1996; 71: 459-69

10. Chang C., M. Yang, H. Wen, J. Chern, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J. Food Drug Anal.* 10 (2002) 178–182.

11. Canlas J, Hudson JB, Sharma M, Nandan D., "Echinacea and trypanosomatid parasite interactions: Growth-inhibitory and anti-inflammatory effects of Echinacea". *Pharm Biol.*; 48(9):1047-52, Sep. 2010

Chapman, S.; *Physical Review*; 10, 1937, pp184-190

12. Christensen, K. I. Comments on the earliest validly published varietal name for the Corsican Pine. *Taxon* 42: 649-653, 1993

13. Cuvelier, M.E Richard, H. Berset C, "Comparison of the activity of some acid phenols, Structure-activity relationship", *Biosci. Biotech. Biochem*, 1992, 56,324-325

14. Cyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*, ch. 8, pages 397-423, 2006

15. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, «Χημεία Τροφίμων», Εκδόσεις Τζιόλα ISBN 978-960-418-367-8, ch. 3,6,18, 2015

16. Delilah Alonso, Melissa C. Lazarus & Leslie Baumann. "Effects of topical arnica gel on post-laser treatment bruises". *Dermatologic Surgery* 28 (8): 686–8. doi:10.1046/j.1524-4725.2002.02011.x. PMID 12174058. Retrieved January 27, 2008.

17. Dida, M., F. Ducci, and G. Zeneli. 2001. Black pine (*Pinus nigra* Arn.) resources in Albania, in *Forest Genetic Resources* No. 29. www.fao.org/DOCREP/004/Y2316E/y2316e0d.htm, accessed 2011.02.25.

18. Dieter Treutter, *Managing Phenol Contents in Crop Plants by Phytochemical Farming and Breeding—Visions and Constraints*, *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 807-857; doi:10.3390/ijms11030807

19. Dole, M.; Mack, L.L.; Hines, R.L.; *Journal of Chemical Physics*, 49, 1968, pp2240-2249 and Mack, L.L.; Kralik, P.; Rheude, A.; Dole, M.; *Journal of Chemical Physics*, 52, 1970, pp4977-4986
20. Farjon, A. *Pines Drawings and Descriptions of the Genus Pinus*, 2nd ed. Brill ISBN 90-04-13916-8, 2005
21. Fenn, J.B.; *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 4, 1993, pp524-535
22. G.P.Abdulla M., "Role of diet modification in cancer prevention. *BioFactors* (Oxford, England). 12 (1-4): 45 – 51, 2000
23. Gerard J. Niem ann, *Flavonoids and Related Compounds in Leaves of Pinaceae, III * Pinus jeffreyi*, Botanical Laboratory; University of Utrecht, The N etherlands, Z. Naturforsch. 33 c, 777-779, received August 7, 1978,
24. Ghisalberti E.L. *Propolis: a review. Bee World*, Page 59-84 31 Jul 2015
25. H.J. Vinson J.A., Su X., Zubik L., "Phenol Antioxidant Quantity And Quality In Foods: Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3630-3634.", 1998
26. Harborne J. B. (Auth.)-*Phytochemical Methods_ a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis-Springer Netherlands* (1984), ch. 2
27. Henríquez Carolina, Sergio Almonacid, Italo Chiffelle, Tania Valenzuela, Manuel Araya, Lorena Cabezas, Ricardo Simpson, and Hernán Speisky, DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY, TOTAL PHENOLIC CONTENT AND MINERAL COMPOSITION OF DIFFERENT FRUIT TISSUE OF FIVE APPLE CULTIVARS GROWN IN CHILE, *Chilean Journal of Agricultural Research* 70(4):523-536 (October - December 2010)
28. Huntley AL, Thompson Coon J, Ernst E (2005). "The safety of herbal medicinal products derived from *Echinacea* species: a systematic review". *Drug Saf.* 28 (5):

387–400. doi:10.2165/00002018-200528050-00003. ISSN 0114-5916.
PMID 15853441.

29. Jimenez-Ramsey Lilian M. , John C. Rogler, Tom L. Housley, Larry G. Butler, Robert G. Elkin Absorption and Distribution of ¹⁴C-Labeled Condensed Tannins and Related Sorghum Phenolics in Chickens, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42 (4), pp 963–967

30. Khorasgani EM, AH Karimi and MR Nazem, A comparison of healing effects of propolis and silver sulfadiazine on full thickness skin wounds in rats. *Pak Vet J*, 30(2): 72-74, 2010

31. Krel R., *Value-Added Products from beekeeping*, ch.5 p. 153-165, 1996

32. Kriengsak Thaipong, Unaroj Boonprakob, Kevin Crosby, Luis Cisneros-Zevallos, David Hawkins Byrne, Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (2006) 669–675

33. L.J.M. Yang C. S., Huang M. T., Newmark H. L., "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Reviews of Nutrition*. 21: 381 - 406.", 2001

34. Laura Bravo Ph.D, *Polyphenols : Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*, pages 317-333, November 1998

35. Lee, C. H. *Geographic variation in European Black Pine*. *Silvae Genetica* 17: 165-172, 1968.

36. Li-Ping Guan , Bing-Yu Liu, Antidepressant-like effects and mechanisms of flavonoids and related analogues, *European Journal of Medicinal Chemistry* 121 · May 2016

37. Lluvia Artega Figueroa, LETICIA BARBOSA NAVARRO, MARTIN PATINO VERA, VERA L. PETRICEVICH, ANTIOXIDANT ACTIVITY, TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENTS, AND CYTOTOXICITY EVALUATION OF BOUGAINVILLEA X BUTTIANA, *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 6, Issue 5, 497-502, 2014

38. M. P. Shumailova, *Naychnye Trudy Irkutskii Meditsinskii Institute* 113, 20 (1971).
39. Maria de Lourdes Reis Giada (2013). *Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, Dr. Jose Antonio Morales-Gonzalez (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/51687. Available from: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/food-phenolic-compounds-main-classes-sources-and-their-antioxidant-power>
40. MARINOVA, G. and V. BATCHVAROV. *Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. Bulg. J. Agric. Sci.*, 17: 11-24, 2011
41. McDonald Suzy, Paul D. Prenzler, Michael Antolovich, Kevin Robards, *Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts, Food chemistry* 73 (2001) 73-84
42. Mirarefin M (M.Sc.), Sharifi F (M.D.), Taheri E (Ph.D.), Saeednia S (Ph.D.), Larijani B(M.D.), Fakhrzadeh H (M.D.), *Determination of Phenolic Compounds in Pinus eldarica by HPLC, Journal of Medicinal Plants*, 13(49):22-33, January 2014
43. Nagendran Balasundram, Kalyana Sundram, Samir Samman, *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, Food Chemistry* 99(1):191-203 · December 2006
44. Natella, F, Nardini, M, De Felice, M. Scaccini C. , "Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants, Structure-activity relation.", *J. Agric Food Chem.* , 1999, 47, 1453-1459.
45. Nianbai Fang, SHANGGONG YU, AND RONALD L. PRIOR, *LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums, J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3579-3585 3579

46. Nijveldt J.Robert, Els van Nood, Danny EC van Hoorn, Petra G Boelens, Klaske van Norren, Paul AM van Leeuwen, *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*, *Am J Clin Nutr* vol. 74 no. 4 418-425, October 2001

47. P. K. Colic M., "Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *J Mol Med.* 78: 333 – 336'." , 2000

48. Pasqualini V, Robles C, Garzino S, Greff S, Bousquet- Melou A and Bonin G. *Phenolic compounds in Pinus halepensis Mill. Needles. a bioindicator of air pollution.* *J. Chemosphere*;52(1):239-48, Jul. 2003

49. R. Pescok, D. Shiels, T. Cairns and I.Mc. William in "Σύγχρονες Μέθοδοι στην Χημική Ανάλυση» (απόδοση στα Ελληνικά από Σ. Βολιώτη), εκδ. Γ.Α. Πνευματικός, Αθήνα 1980, κεφ.9.

50. Ralph Gordon Harry, *Harry's Cosmeticology* , April 1st 2000 by Chemical Publishing Company, Ch. 6,10,15,37, p.111-889

51. Rice-Evans C. A., Miller J. M., and Paganga G. (1996), *Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids.* *Free Radic. Biol. Med.*20, 933-956.

52. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga G, `` *Structure-antioxidant activity relationships of Flavonoid*

Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther*;40:158-68, 2002

53. S.M.K. Ames B.N., Hagen T.M. (1990)., "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 7915 –7922," 1990.

54. Sadeghi Afjeh M (M.Sc.), Fallah Huseini H (Ph.D.), Tajalizadekhoob Y (M.D.), Sagar B. Kedare & R. P. Singh, *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*, *J Food Sci Technol.*; 48(4): 412–422, Aug. 2011

55. Singleton, V., and J. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158.
56. SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-R AVENTOS, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
57. Stalikas D. Constantine, "Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids", *J. Sep. Sci.*, 30, 3268 – 3295, 2007
58. Stanković S. Milan, TOTAL PHENOLIC CONTENT, FLAVONOID CONCENTRATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Marrubium peregrinum* L. EXTRACTS, 2010, *Kragujevac J. Sci.* 33 (2011) 63-72.
59. Takahashi M., T. Ito, A. Mizutani, and K. Isoi, *J. Pharm. Soc. Japan* 80, 1488 (1960).
60. Touriño S, Selga A, Jiménez A, Juliá L, Lozano C, Lizárraga D, Cascante M, Torres JL. Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J Agric Food Chem*;53:4728-35, 2005
61. W.J.V. Young I.S., *Antioxidants in health and disease. Journal of Clinical Pathology*, 2006 54, 176 – 186.
62. Winkel-Shirley Brenda, *Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology*, vol. 126 no. 2 485-493, June 1, 2001
63. Yesil-Celiktas O., Ganzera M, Akgun I, Sevimli C, Korkmaz KS and Bedir E. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species, *J Sci Food Agric* 2009; 89: 1339–1345
64. Yu-Tang Tung , Jyh-Horng Wu , Yueh-Hsiung Kuo , Shang-Tzen Chang , *Antioxidant activities of natural phenolic compounds from Acacia confusa bark*, *Bioresource Technology* 98(5):1120-3 · April 2007

65. Δημακοπούλου Αγγελική, Διπλωματική εργασία, *ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΣΤΕΒΙΑΣ*, Αθήνα 2014

66. Ζερβόπουλος Δ. Σωτήρης, *Επίδραση των φαινολικών ουσιών στην αύξηση και στη φυσιολογική συμπεριφορά του ζυμομύκητα *Sccharomyces cerevisiae* X5, καλλιεργούμενου σε συνθετικά γλεύκη, Αθήνα, Ιούνιος 2010*

67. Κώστας Α. Θάνος, "Τα καμένα δάση της Ευρωσίνης", *Ευρωσινιακά Φύλλα. Περιοδική Έκδοση του Συλλόγου Ευρωσινίων Απτικής, Έτος ΙΔ', τχ. 14 (2000), σελ. 52-58. Ανακτήθηκε την 28 Μαΐου 2012*

68. Λίτου Ζωή, Σεμινάριο στα Πλαίσια του μαθήματος *Θέματα Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Σύγχρονες Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών με Φασματομετρία Μαζών. (Mass Spectrometry, MS), 2002-2003*

69. Μ. Οξενκιουν-Πετροπούλου, Α. Παππά, "Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης-εργαστηριακές ασκήσεις", *Εκδόσεις ΕΜΠ, 3η έκδοση, 2009.*

70. Σογομών Μπογοσιάν , Αλέξανδρος Κατσαούνης, Δ. Σωτηροπούλου, *Ανοικτά Ακαδημαϊκά πανεπιστήμια, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Σογομών Μπογοσιάν , Αλέξανδρος Κατσαούνης, Δ. Σωτηροπούλου, Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού*

71. Τσαμαντιώτη Λαμπρινή, Διπλωματική εργασία, *Σύνθεση και χαρακτηρισμός δομής νέων φλαβανονών και αρυλιδενοφλαβανονών με αντιοξειδωτική δράση, 2015*

72. Τσιμογιάννης Δημήτριος, *Διδακτορική Διατριβή, Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, Αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων, , Αθήνα 2008*

Ιστοσελίδες:

73. <http://www.treeandlandscape.ie/Tree-A-Z/corsican-pine-pinus-nigra.html>

74. <https://60gr.wordpress.com/%CE%AC%CF%81%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%B1-arnica-montana-%CF%84%CE%BF%CF%86%CE%B1%CF%81%CE%BC%CE%B1%CE%BA%CE%B5%CF%85%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8C-%CF%86%CF%85%CF%84%CF%8C-%CE%AC%CF%81%CE%BD%CE%B9%CE%BA/>

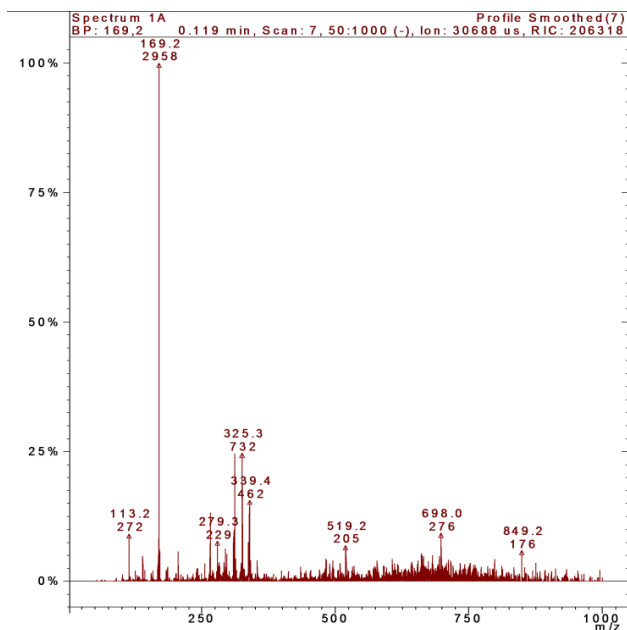
75. <http://www.livescience.com/52524-flavonoids.html>

76. <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>

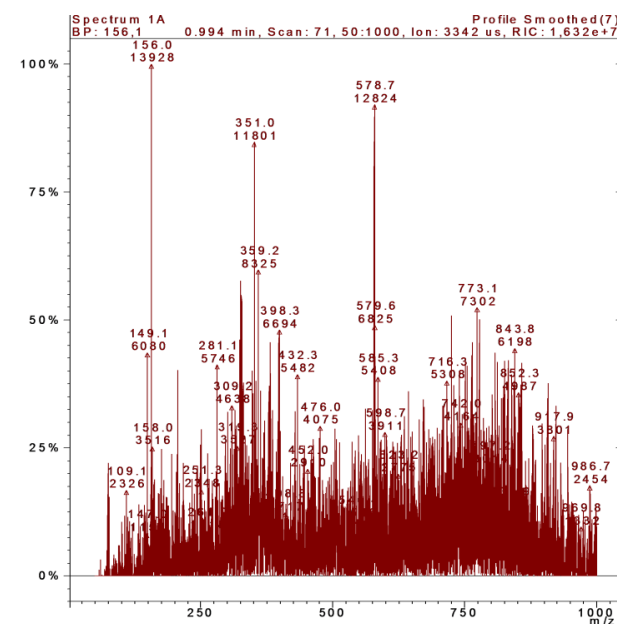
77. www.agilent.com/chem, Basics of LC/MS, 2001

Παράρτημα

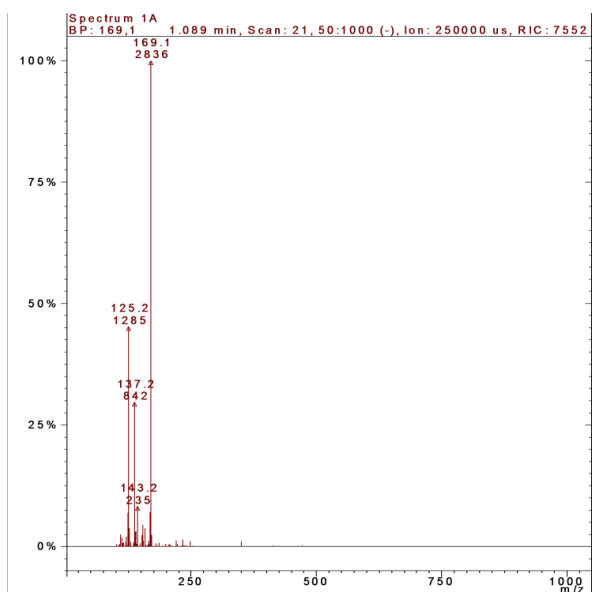
Παράρτημα 1. Φάσματα μάζας πρότυπων ενώσεων – Βιβλιοθήκη Φασμάτων



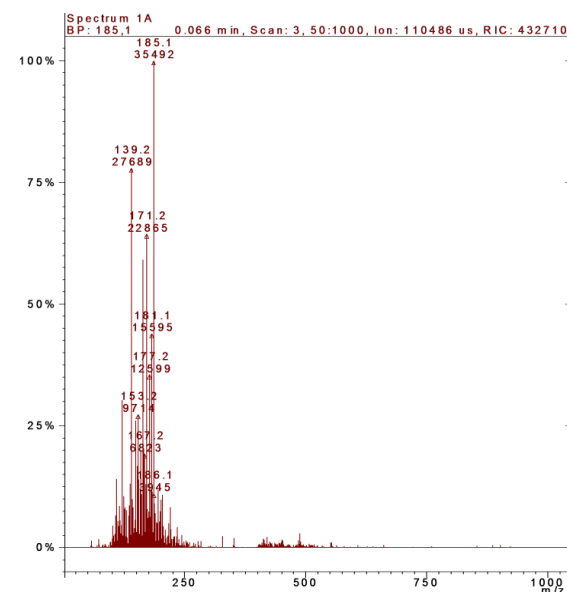
1. Gallic acid-ESI negative



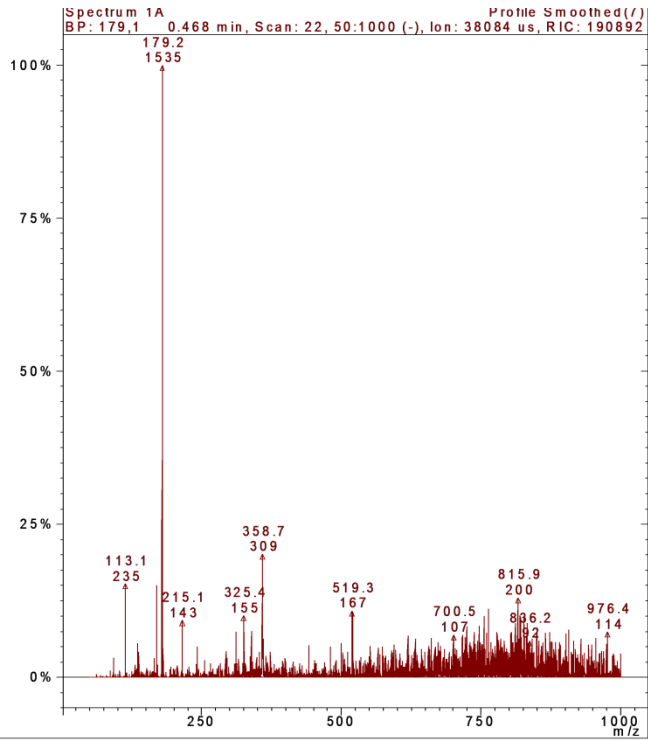
2. Gallic acid-ESI positive



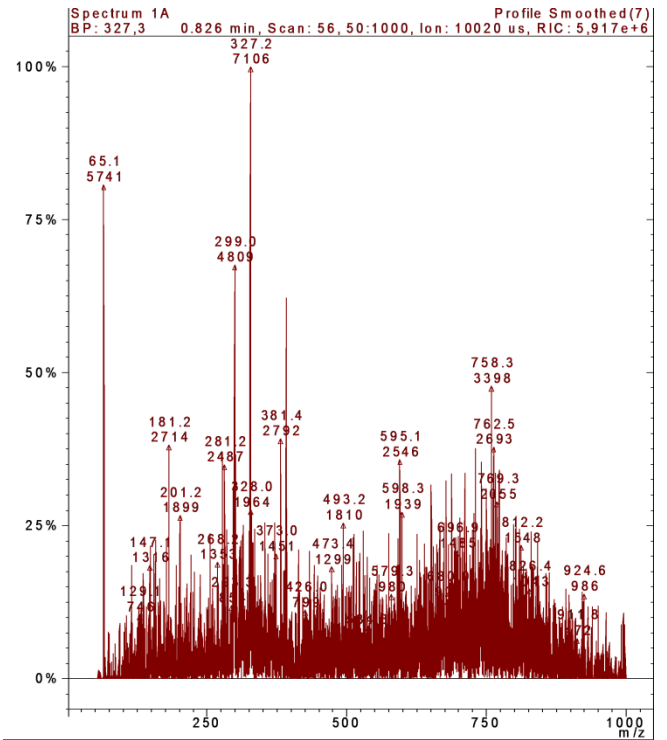
3. Gallic acid-APCI negative



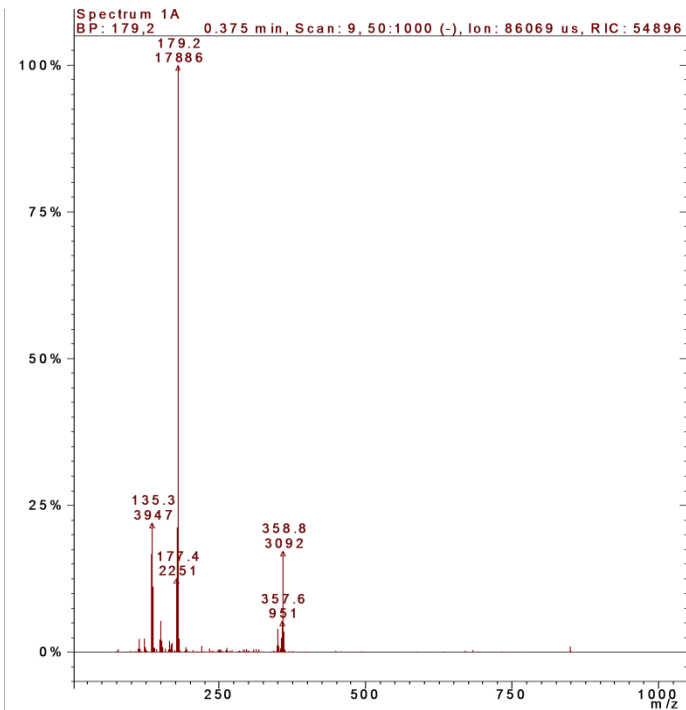
4. Gallic acid- APCI positive



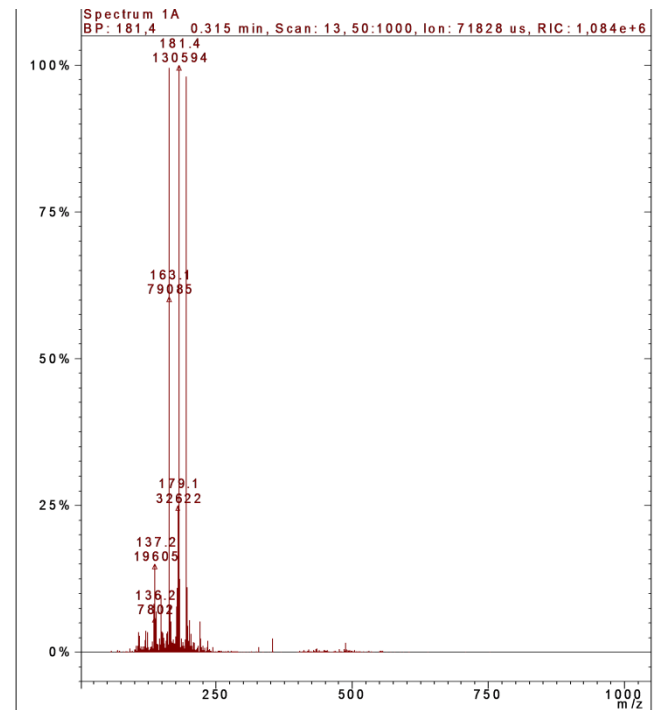
5. Caffeic acid-ESI negative



6. Caffeic acid-ESI positive

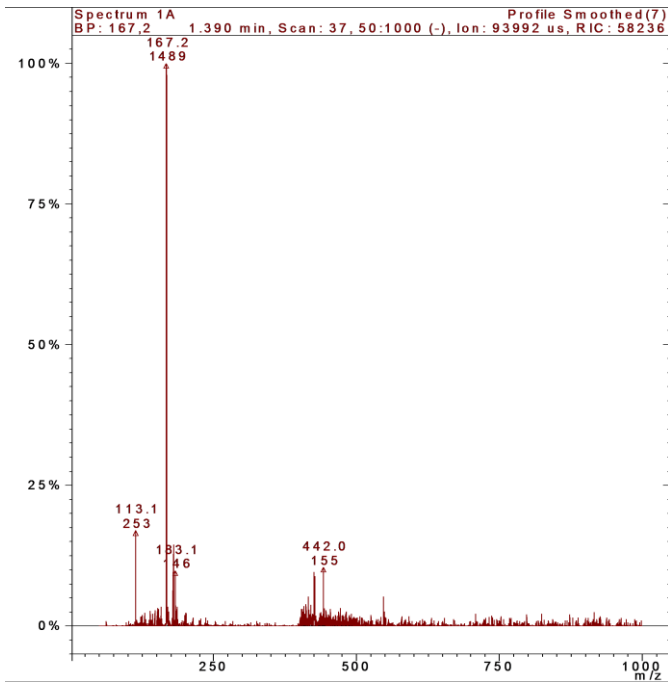


7. Caffeic acid-APCI negative

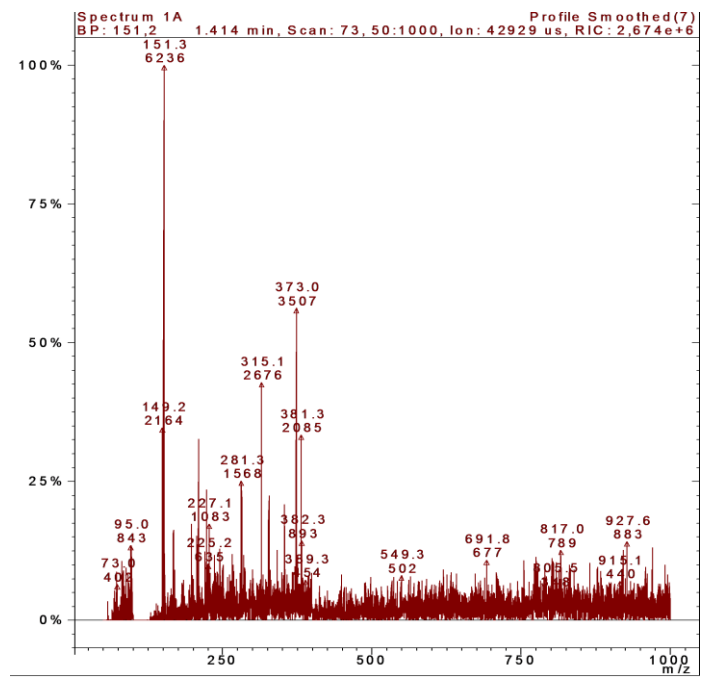


8. Caffeic acid-APCI positive

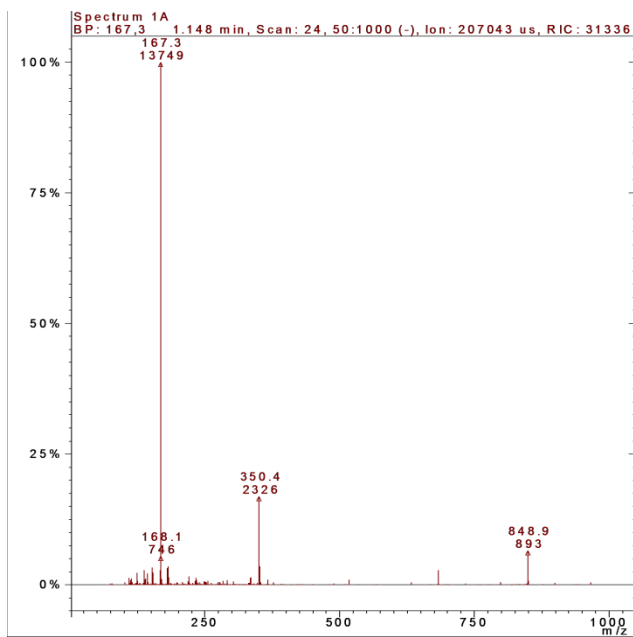
Χατζή Ευαγγελία, Διπλωματική Εργασία



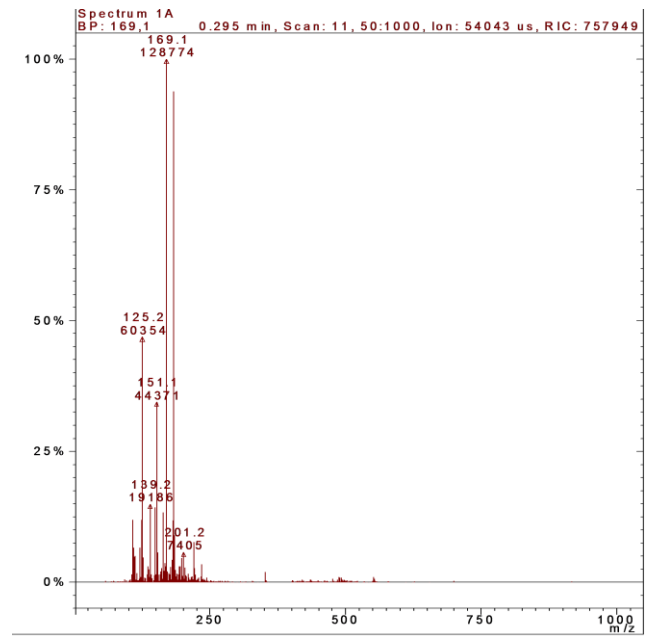
9. Vanillic acid-ESI negative



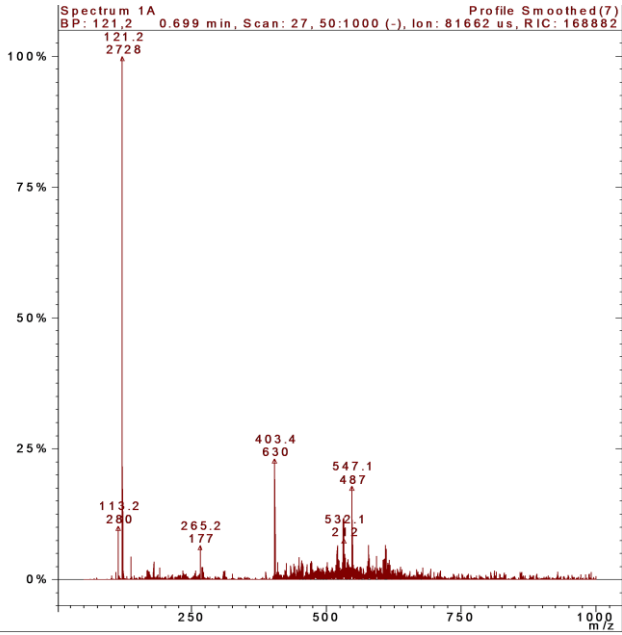
10. Vanillic acid-ESI positive



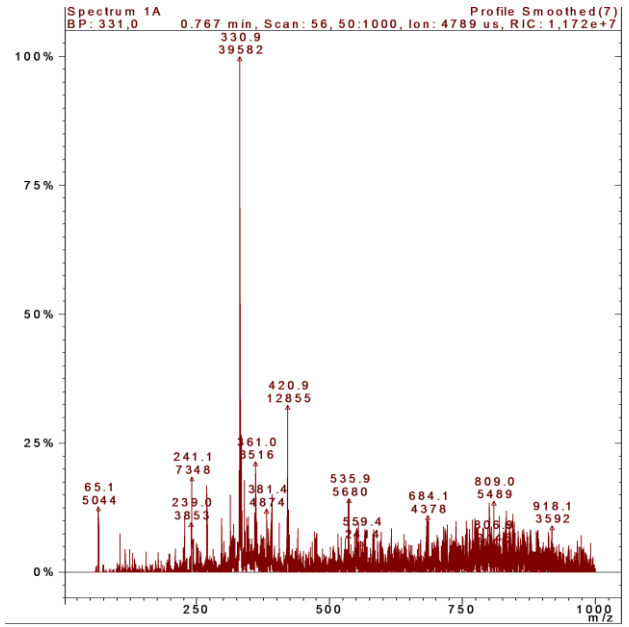
11. Vanillic acid-APCI negative



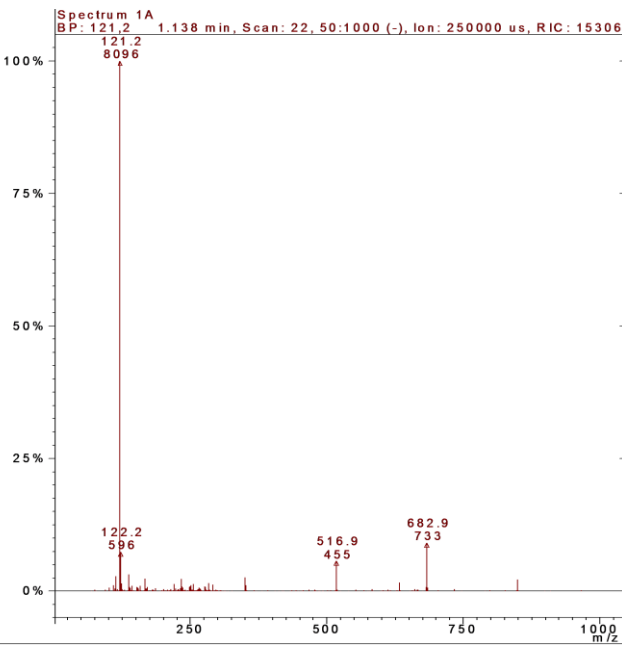
12. Vanillic acid-APCI positive



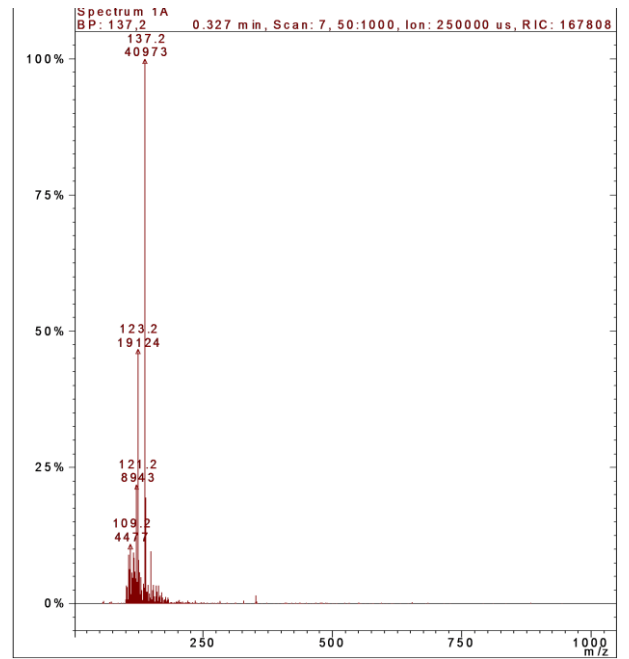
13. Benzoic acid-EI negative



14. Benzoic acid-EI positive

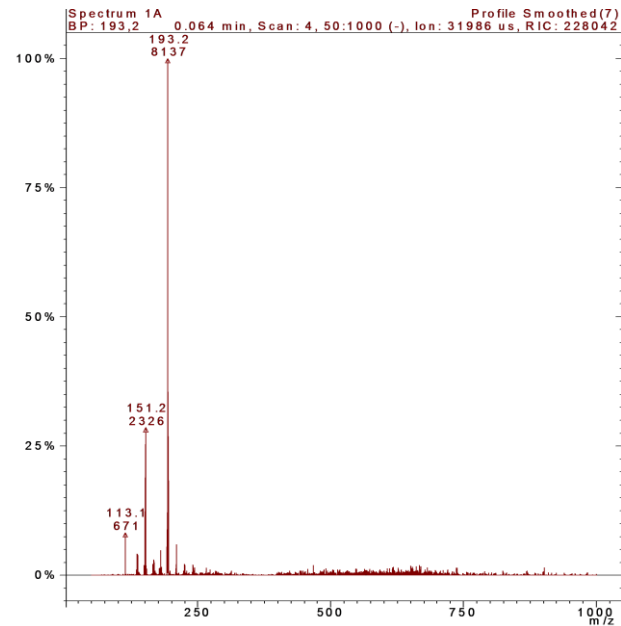


15. Benzoic acid-APCI negative

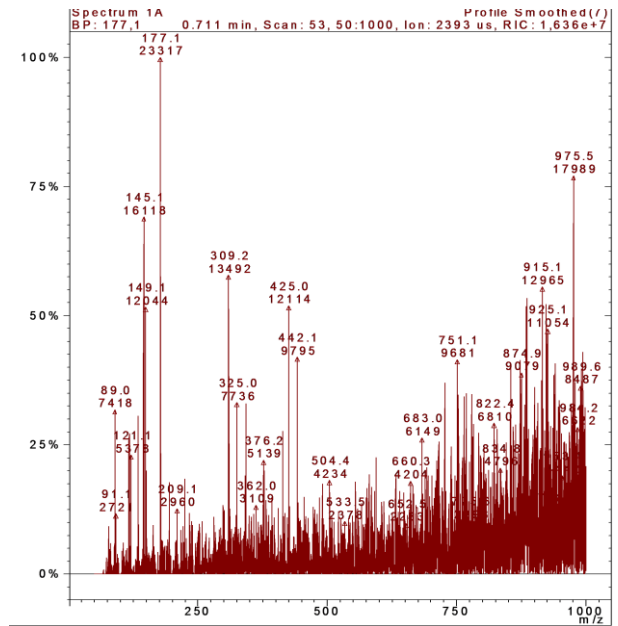


16. Benzoic acid-APCI positive

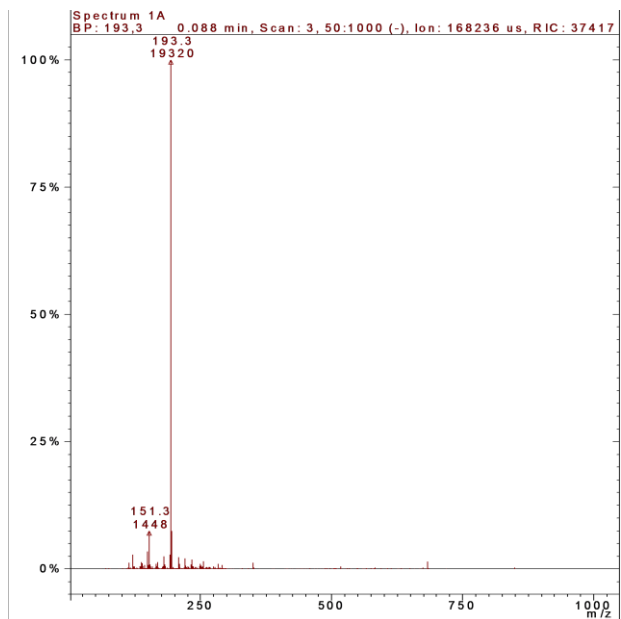
Χατζή Ευαγγελία, Διπλωματική Εργασία



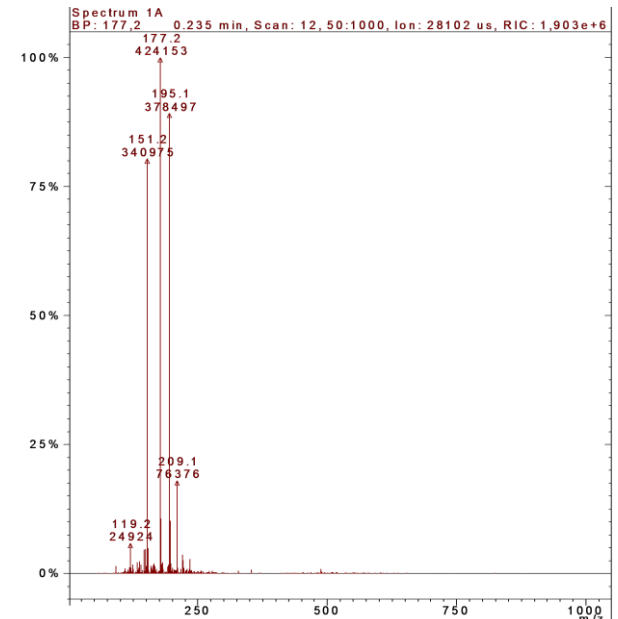
17. Ferulic acid-ESI negative



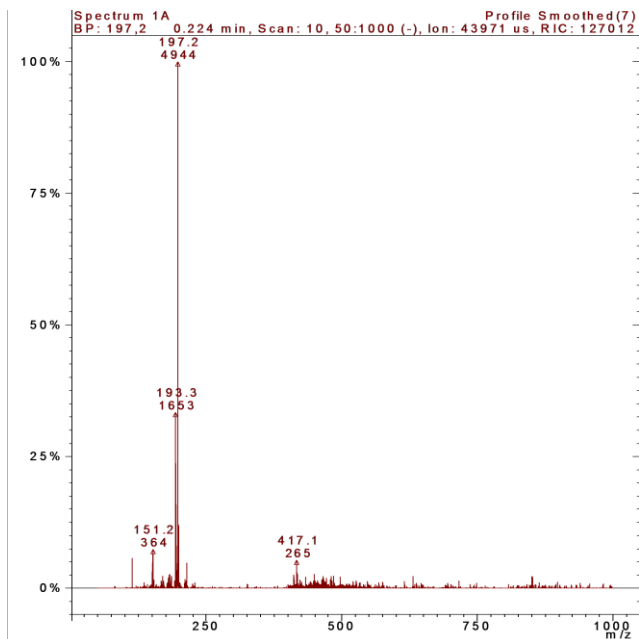
18. Ferulic acid-ESI positive



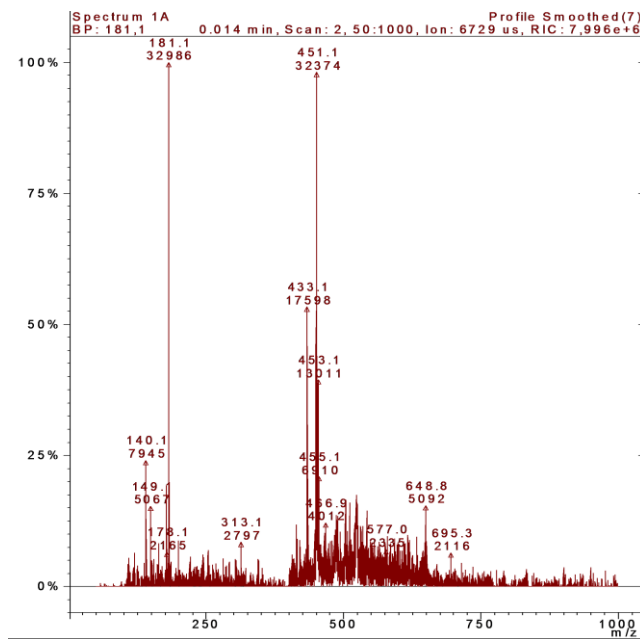
19. Ferulic acid-APCI negative



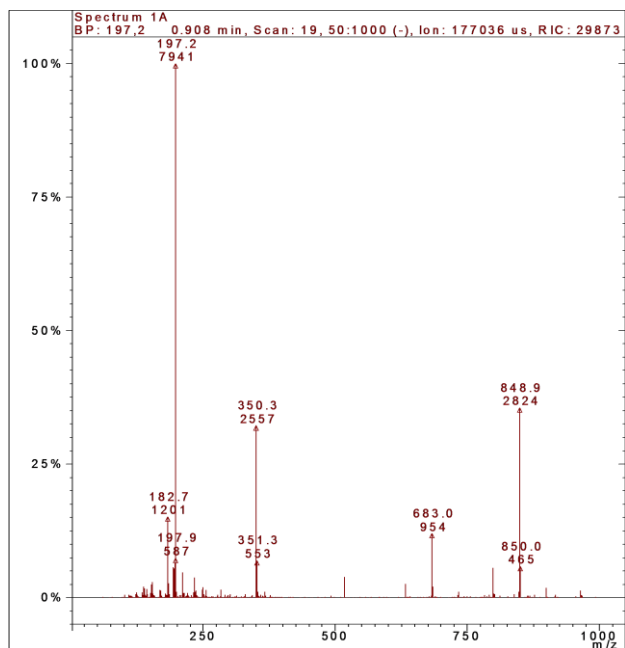
20. Ferulic acid-APCI positive



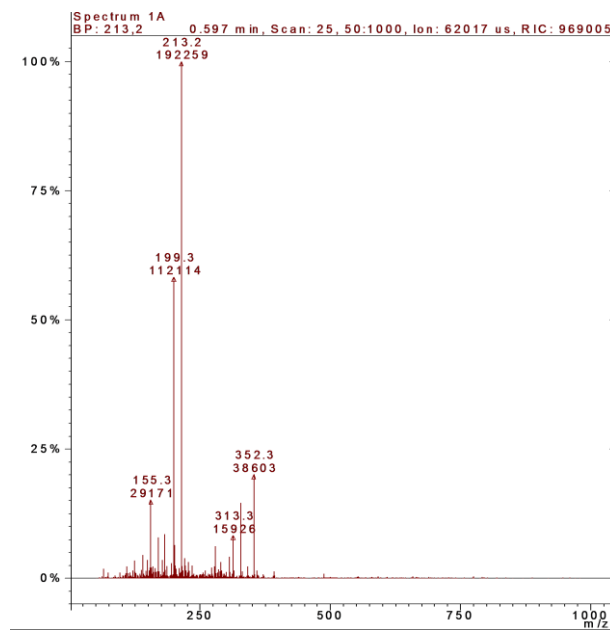
21. Syringic acid-ESI negative



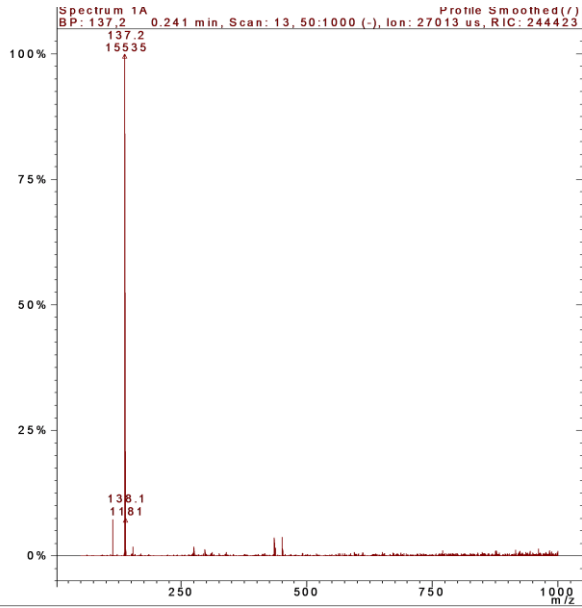
22. Syringic acid-ESI positive



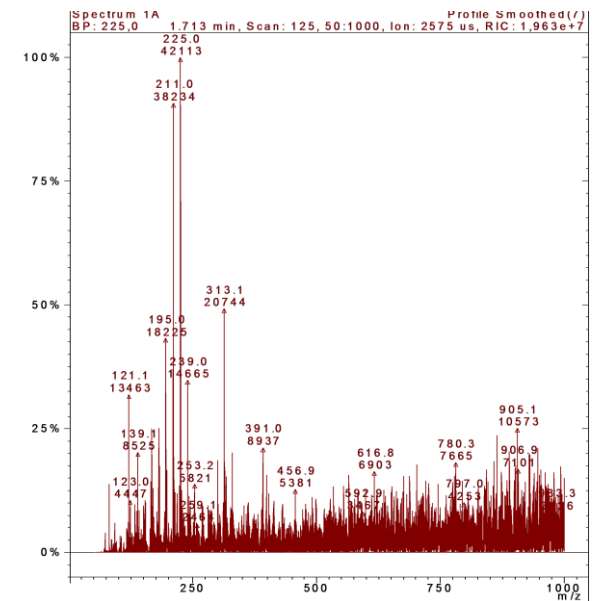
23. Syringic acid-APCI negative



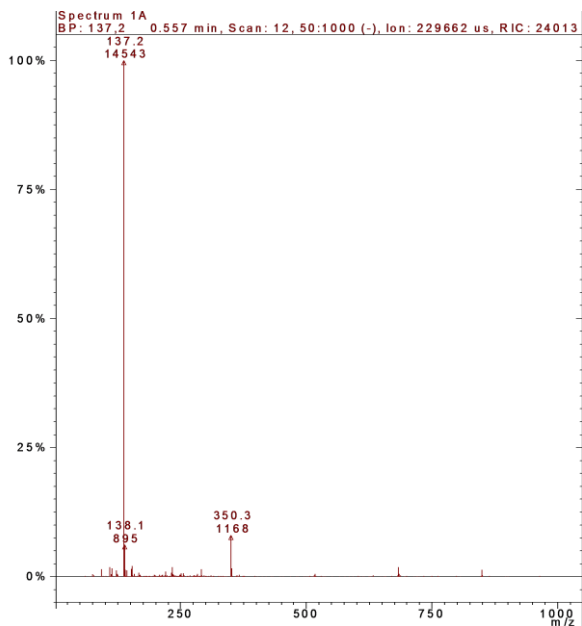
24. Syringic acid-APCI positive



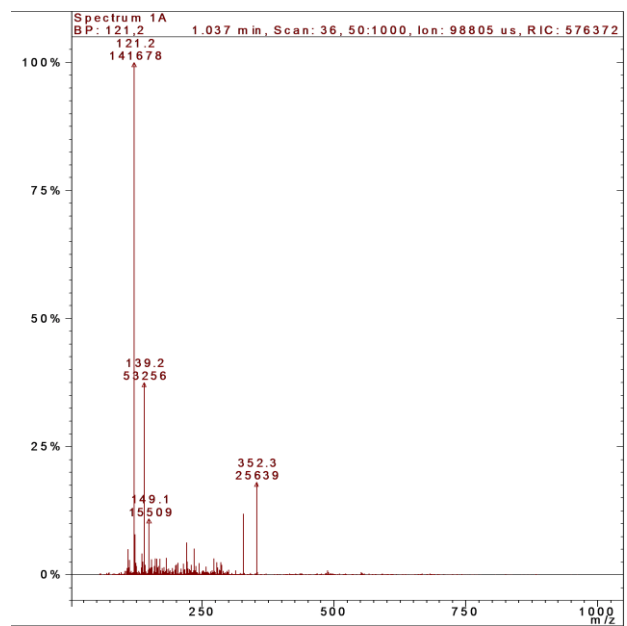
25. Salicylic acid-ESI negative



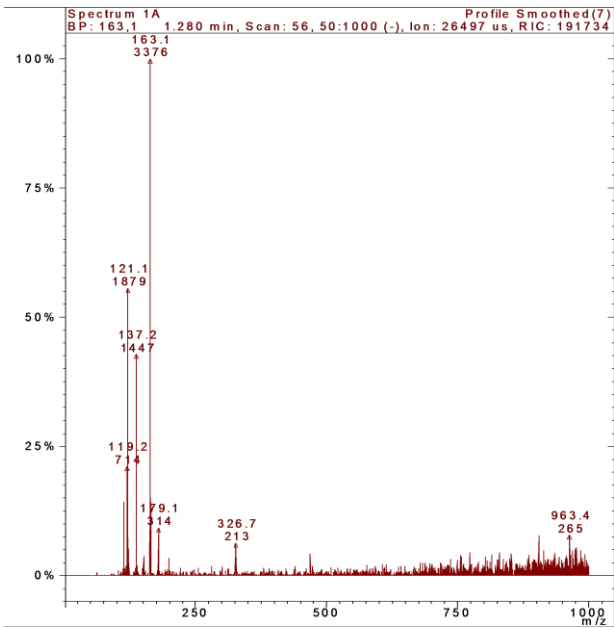
26. Salicylic acid-ESI positive



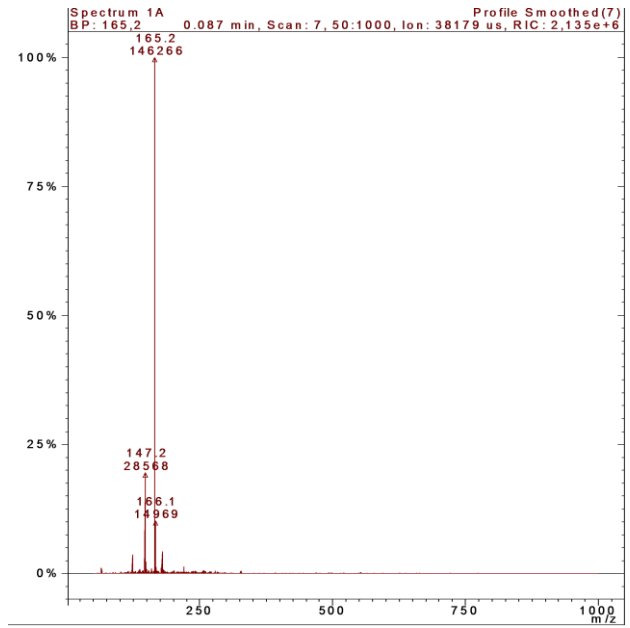
27. Salicylic acid-APCI negative



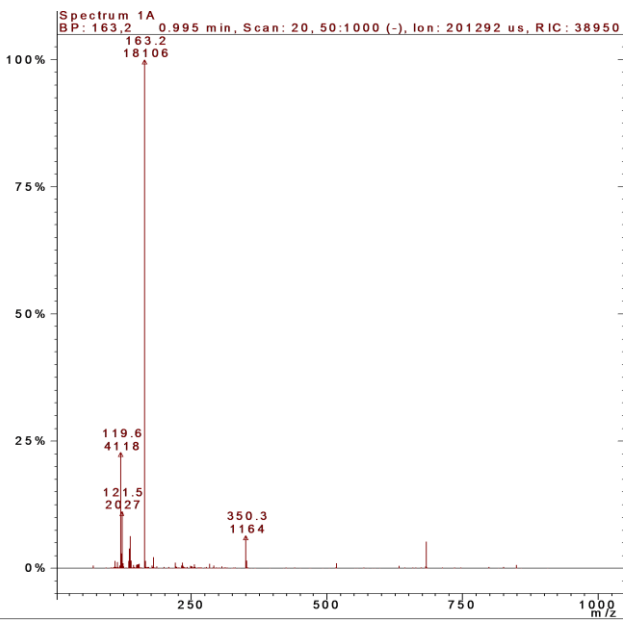
28. Salicylic acid-APCI positive



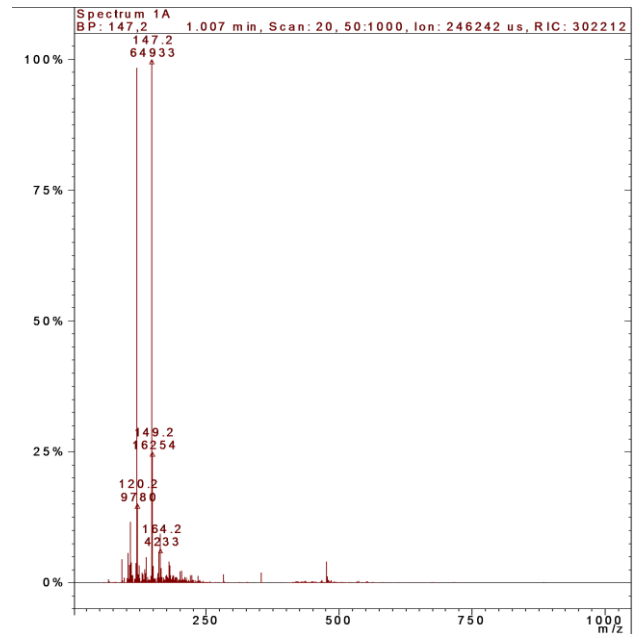
29. p-Coumaric acid-ESI negative



30. p-Coumaric acid-ESI positive

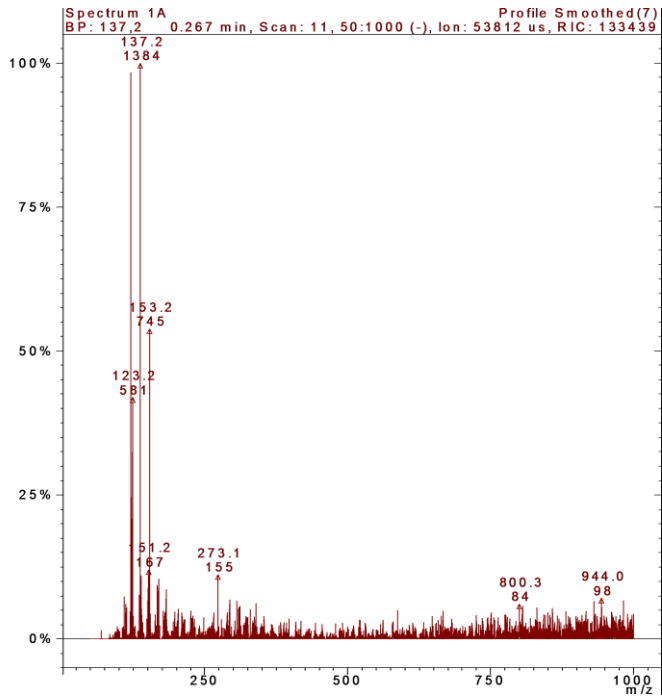


31. p-Coumaric acid-APCI negative

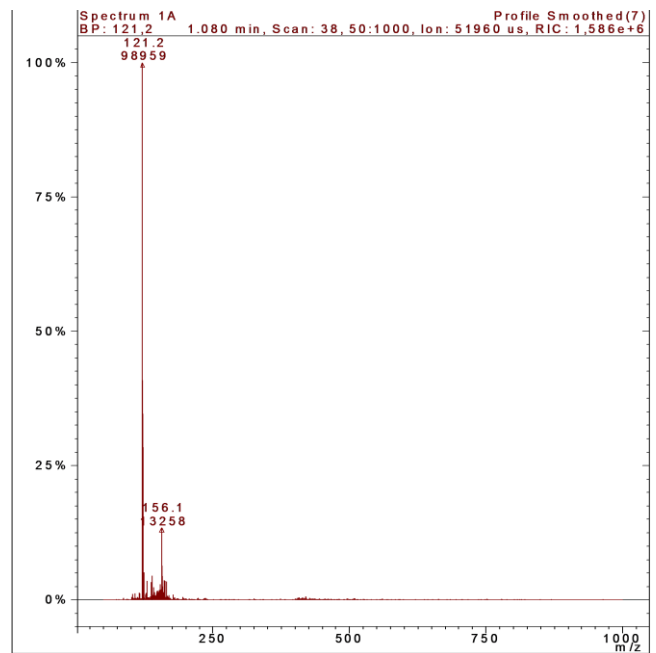


32. p-Coumaric acid-APCI positive

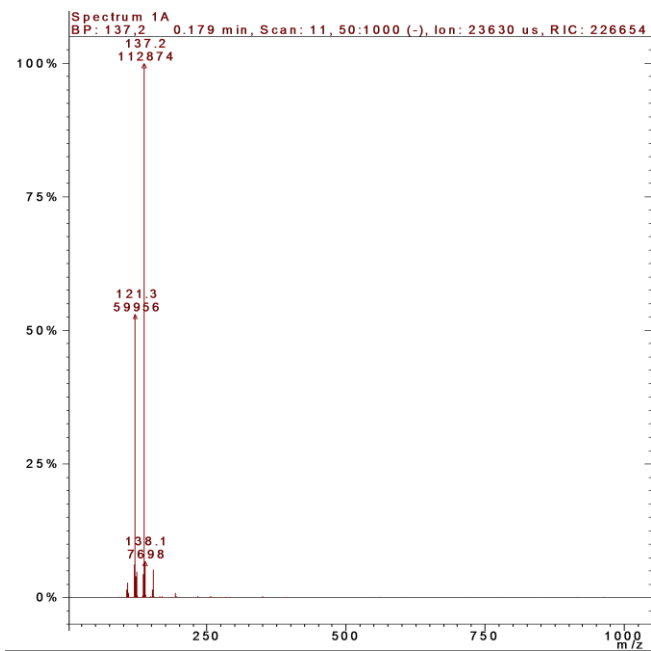
Χατζή Ευαγγελία, Διπλωματική Εργασία



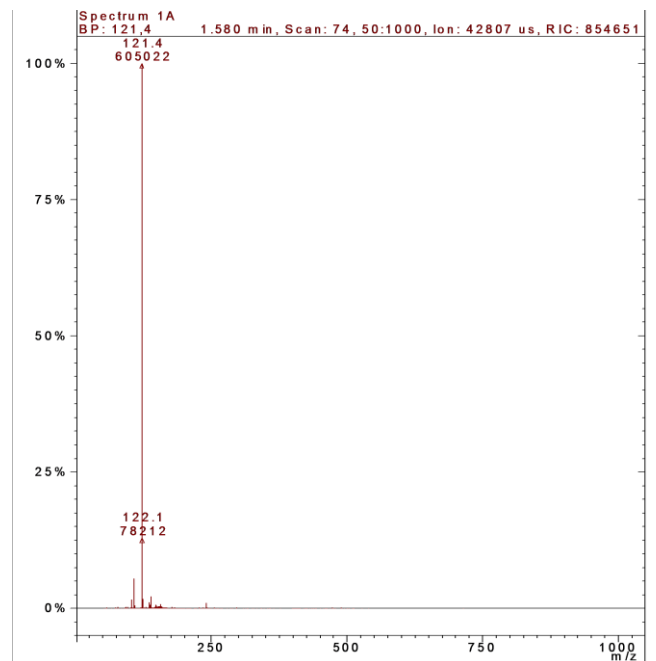
33. Tyrosol-ESI negative



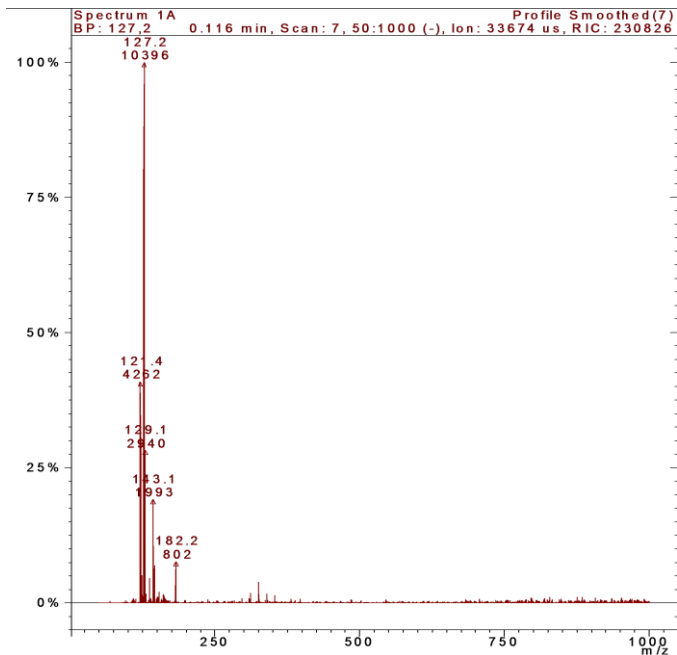
34. Tyrosol-ESI positive



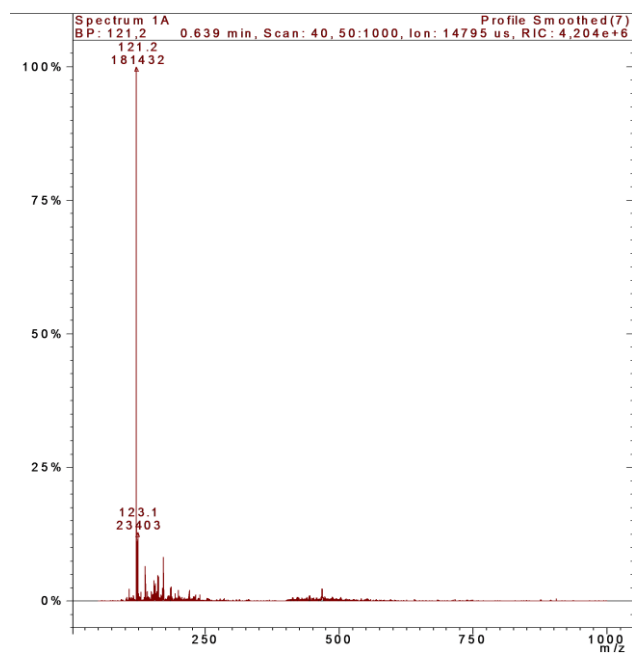
35. Tyrosol -APCI negative



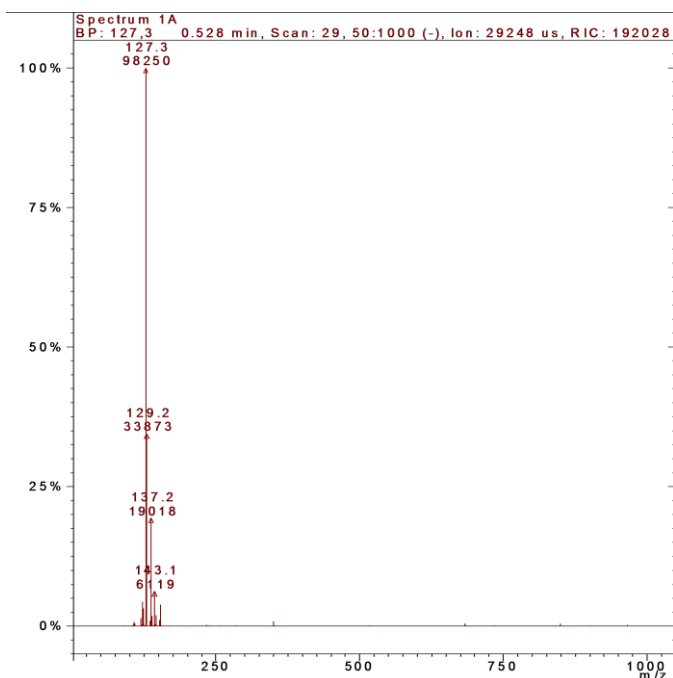
36. Tyrosol-APCI positive



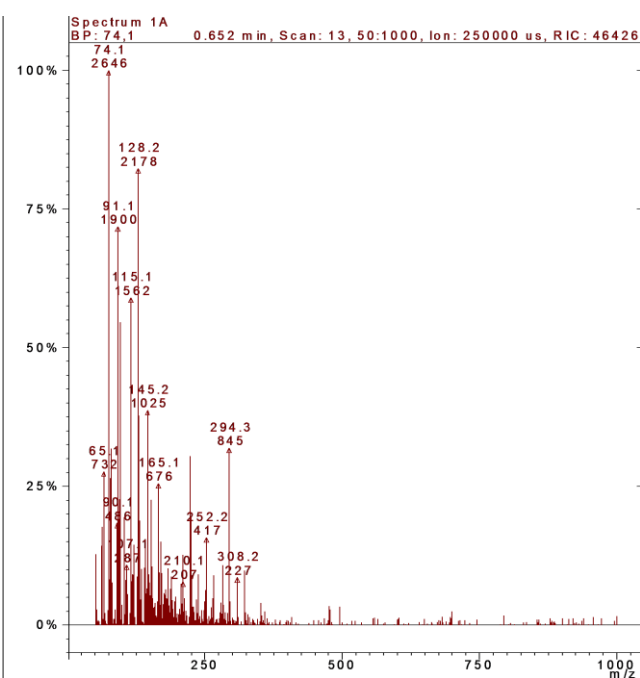
37. 4-Chlorophenol-ESI negative



38. 4-Chlorophenol-ESI positive

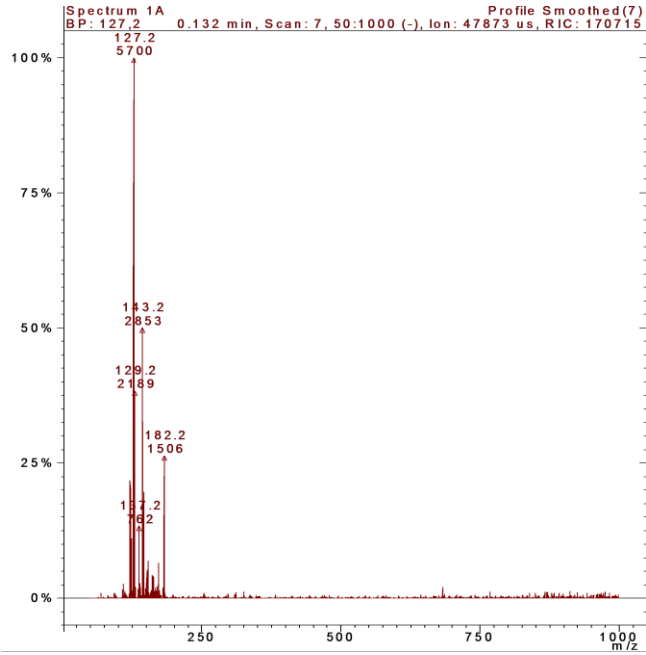


39. 4-Chlorophenol -APCI negative

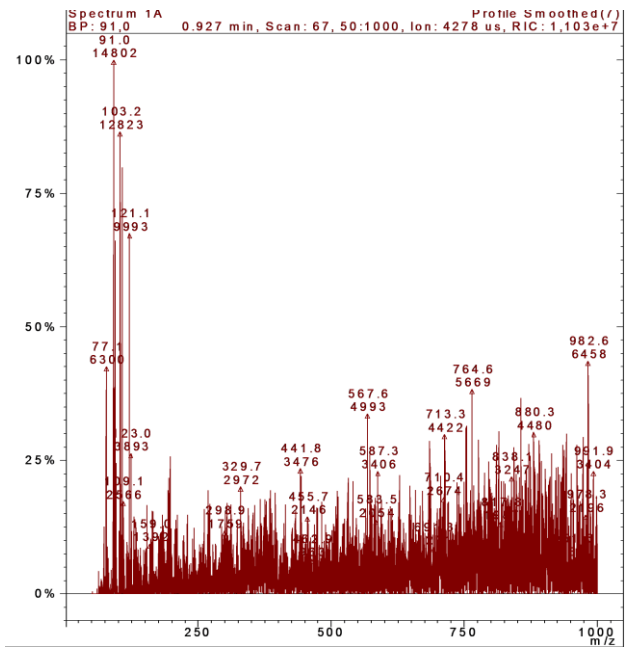


40. 4-Chlorophenol -APCI positive

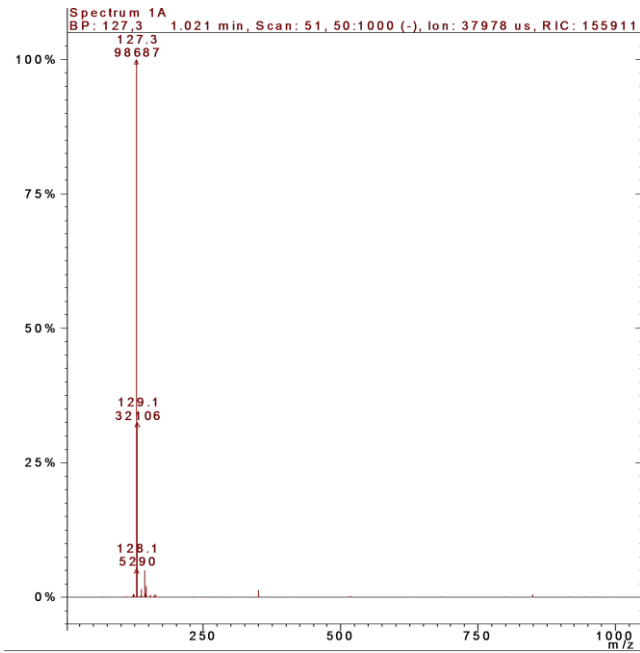
Χατζή Ευαγγελία, Διπλωματική Εργασία



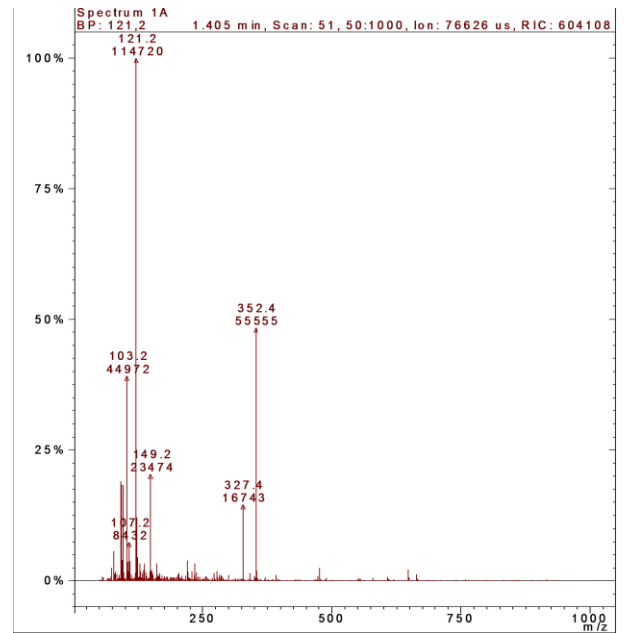
41. 2-Chlorophenol-ESI negative



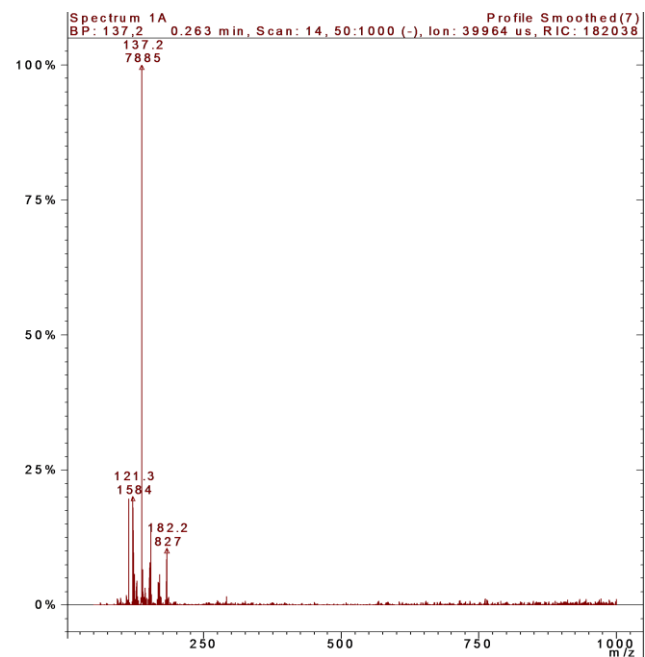
42. 2-Chlorophenol-ESI positive



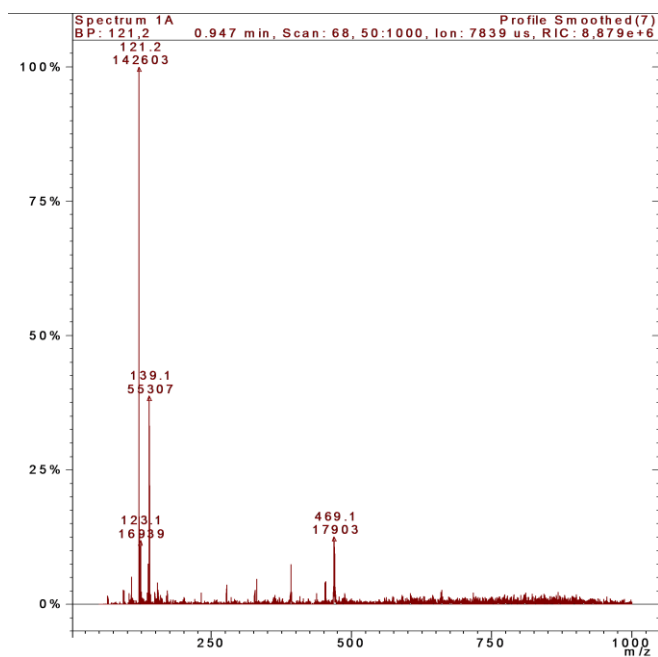
43. 2-Chlorophenol -APCI negative



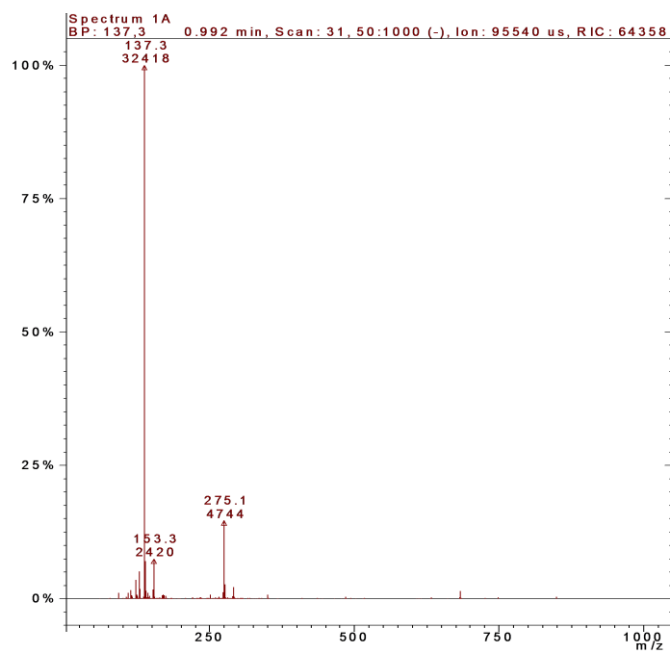
44. 2-Chlorophenol -APCI positive



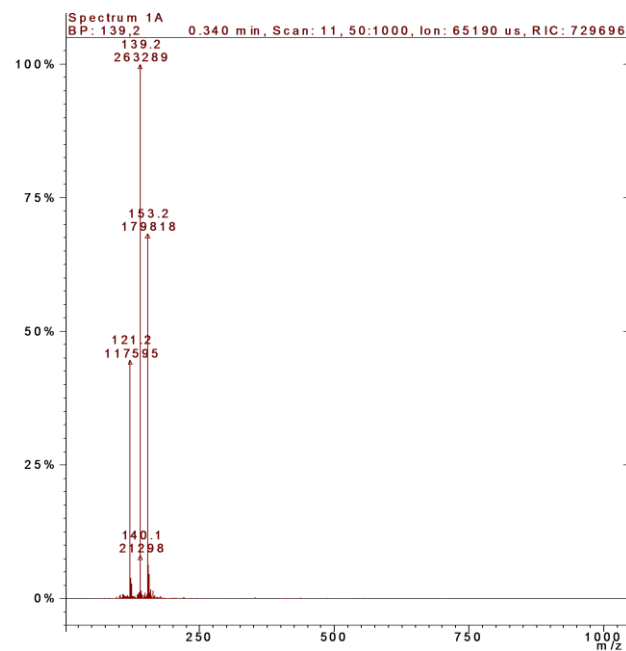
45. 4-Hydroxybenzoic acid-ESI negative



46. 4-Hydroxybenzoic acid-ESI positive

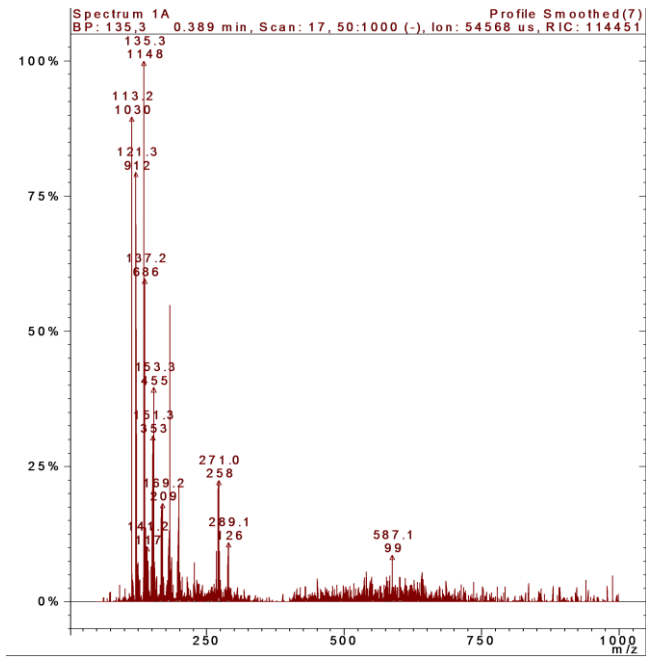


47. 4-Hydroxybenzoic acid -APCI negative

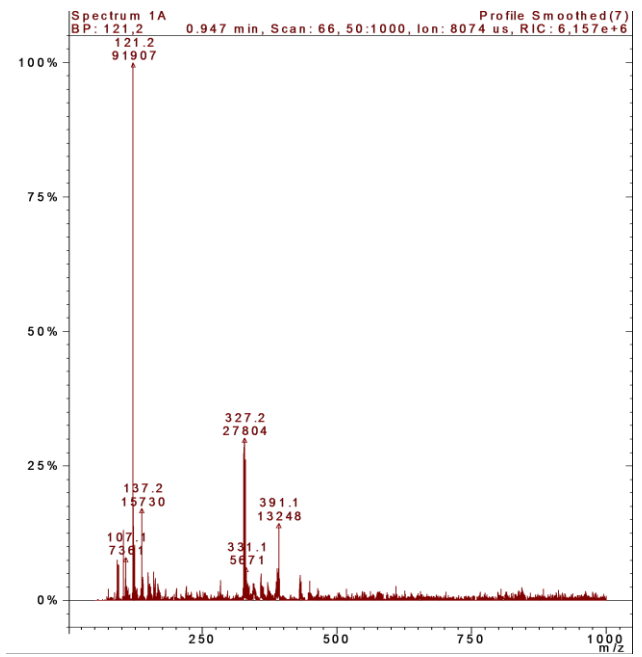


48. 4-Hydroxybenzoic acid -APCI positive

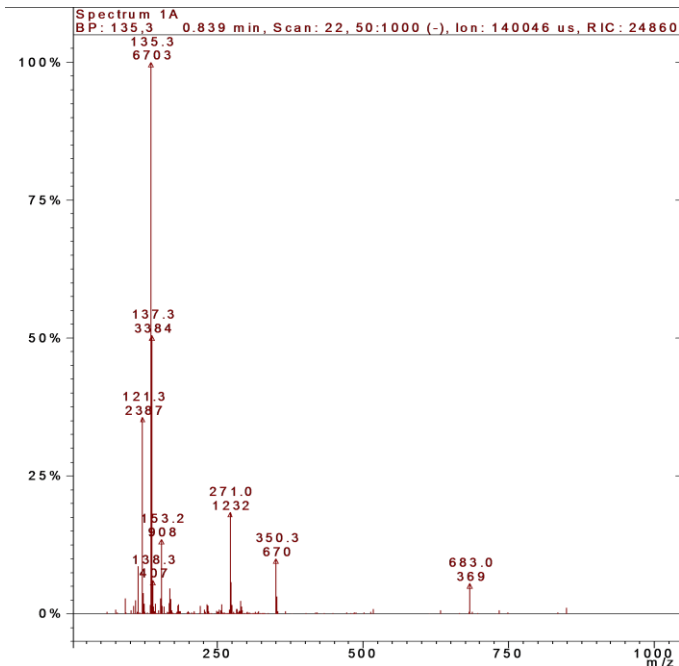
Χατζή Ευαγγελία, Διπλωματική Εργασία



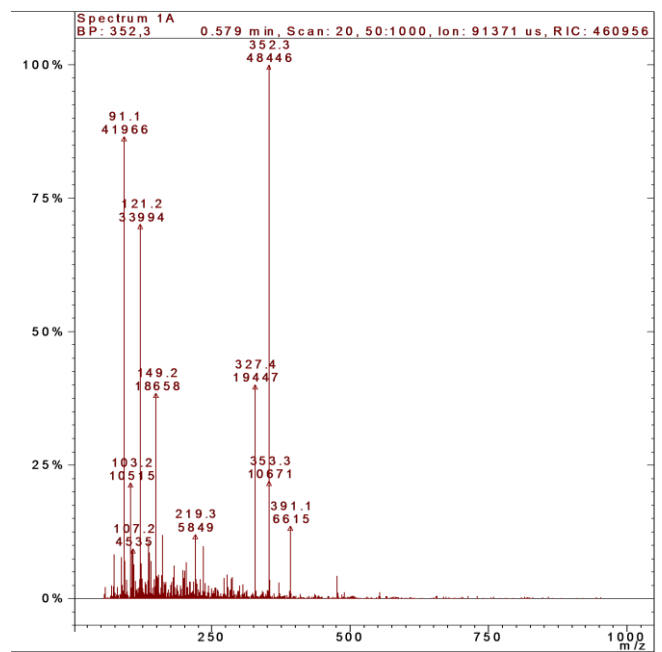
49. Phenylacetic acid-EESI negative



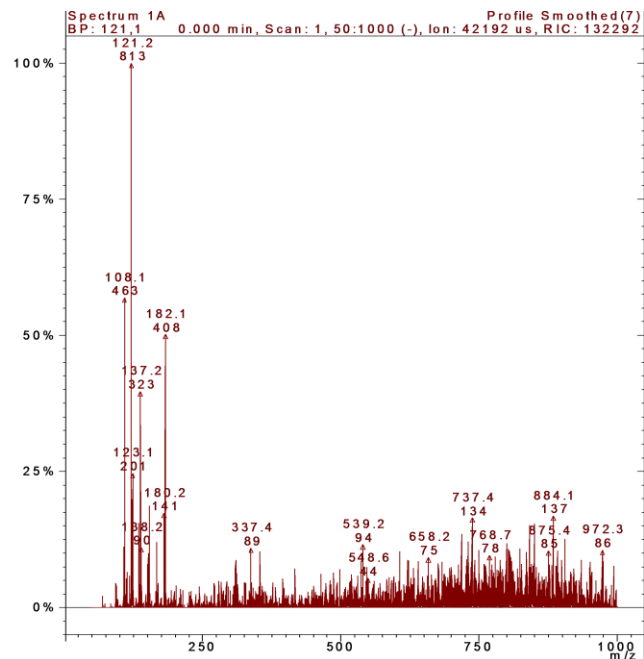
50. Phenylacetic acid -EESI positive



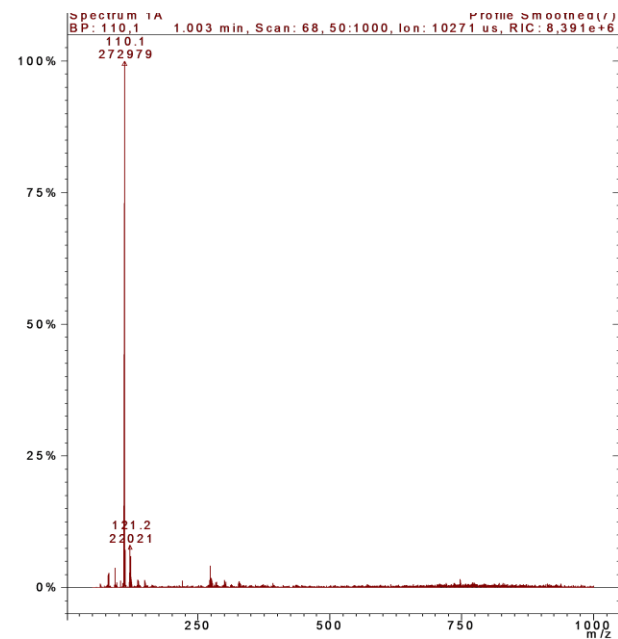
51. Phenylacetic acid -APCI negative



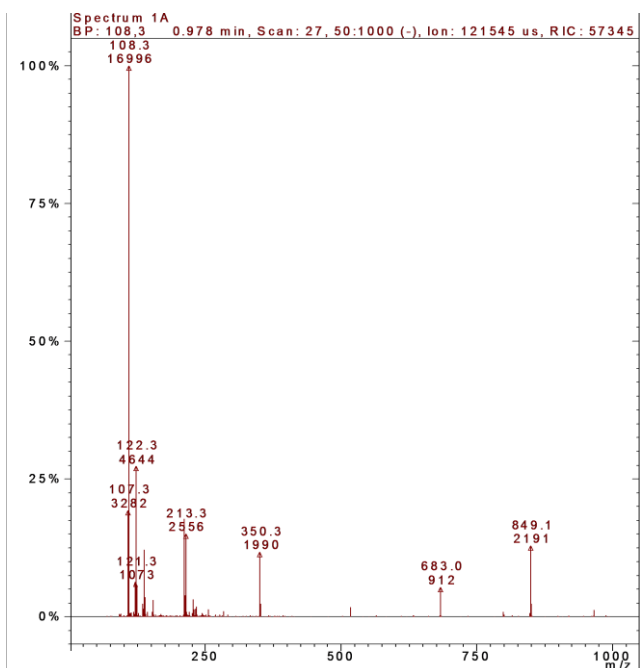
52. Phenylacetic acid -APCI positive



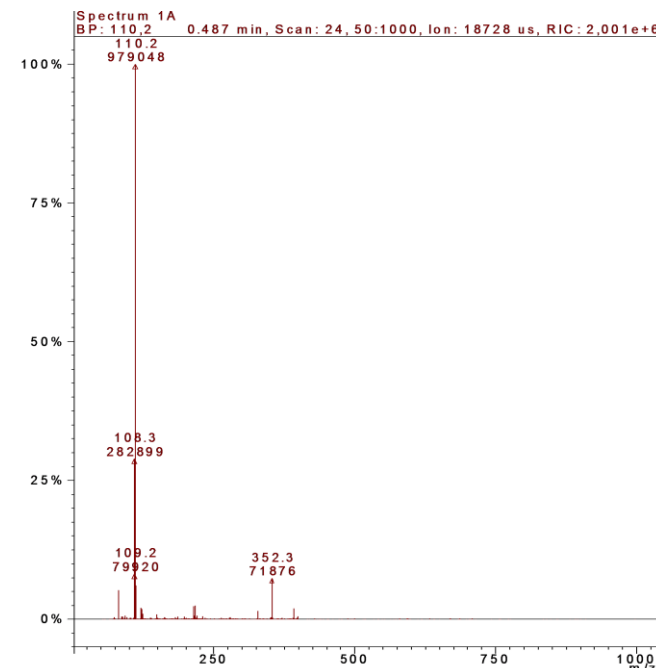
53. Aminophenol-ESI negative



54. Aminophenol-ESI positive

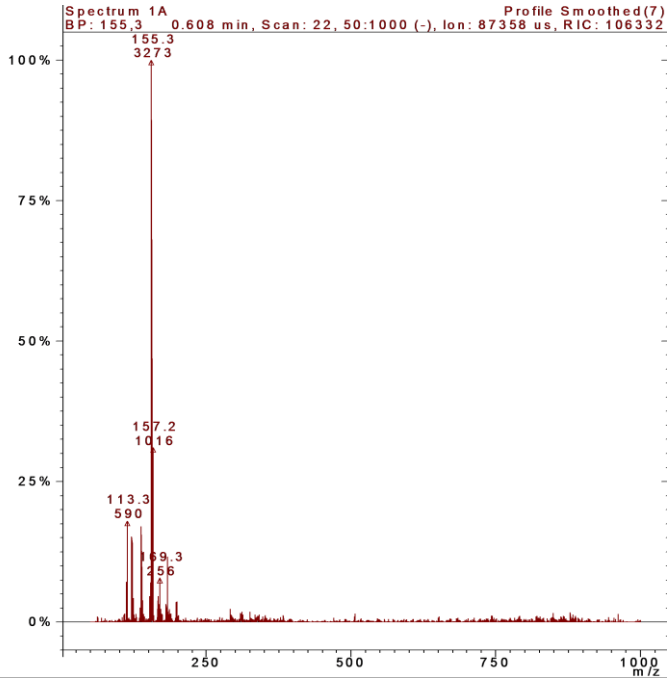


55. Aminophenol -APCI negative

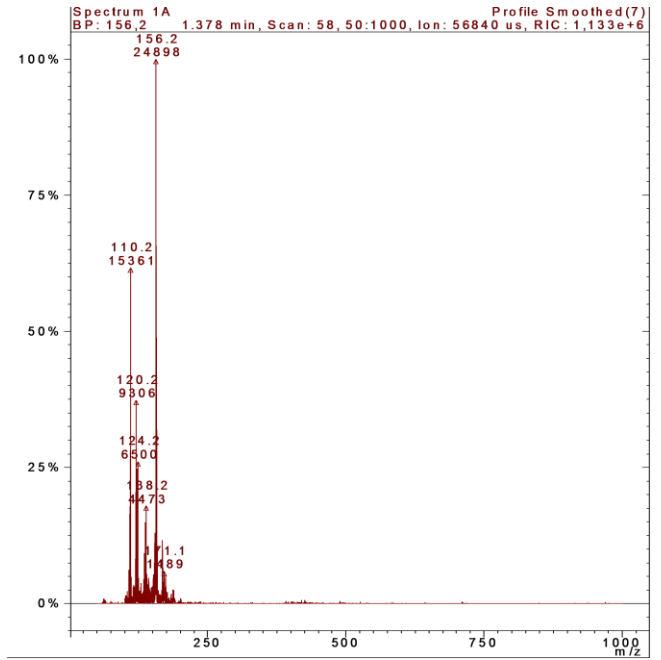


56. Aminophenol -APCI positive

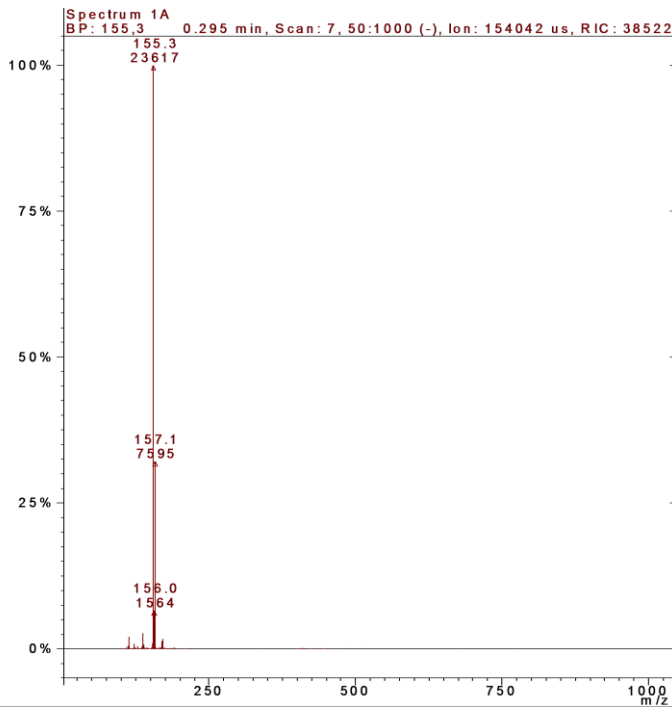
Χατζή Ευαγγελία, Διπλωματική Εργασία



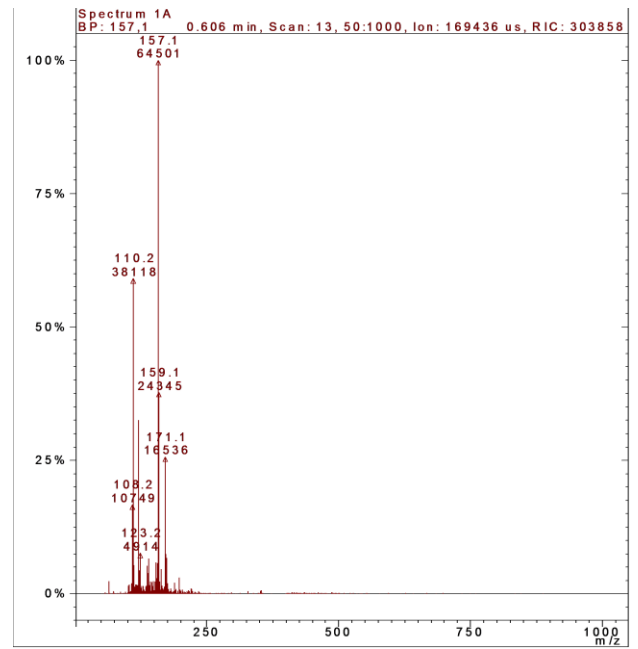
57. 2-Chlorobenzoic acid-ESI negative



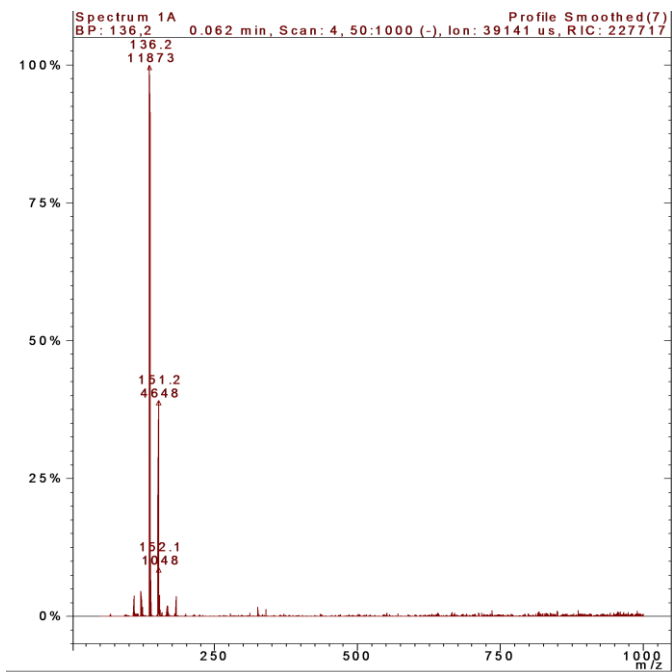
58. 2-Chlorobenzoic-ESI positive



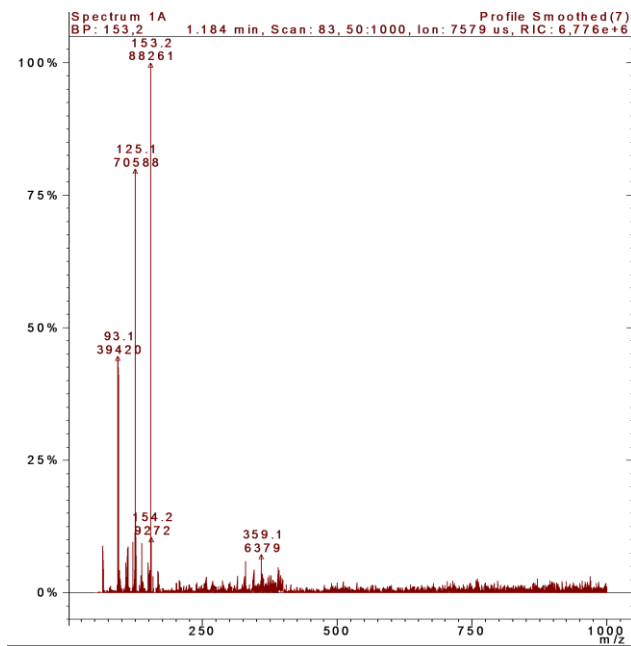
59. 2-Chlorobenzoic acid -APCI negative



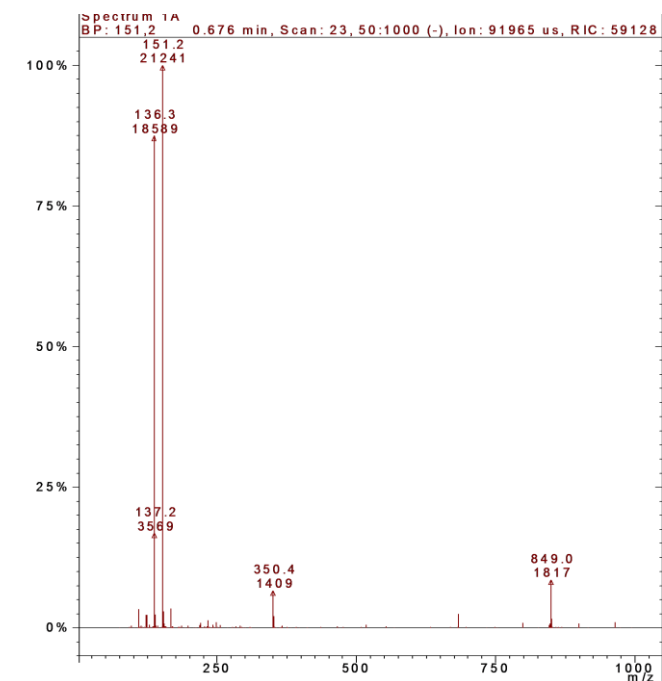
60. 2-Chlorobenzoic acid -APCI positive



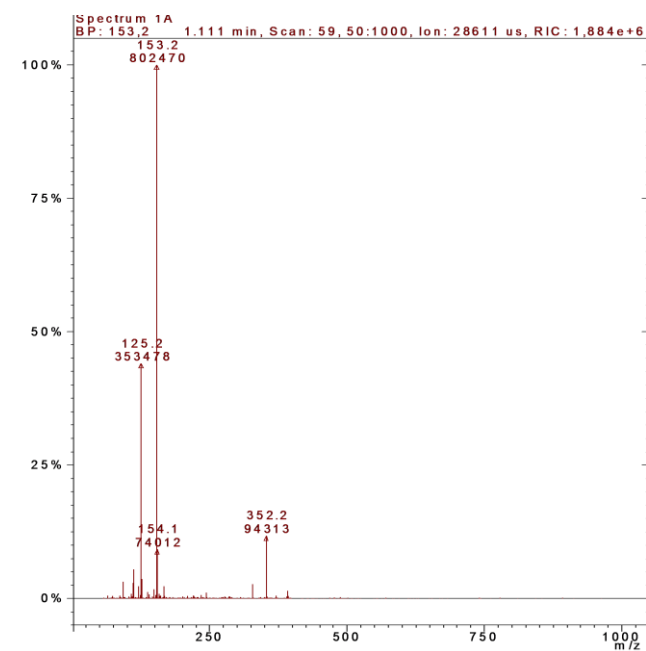
61. Vanillin-ESI negative



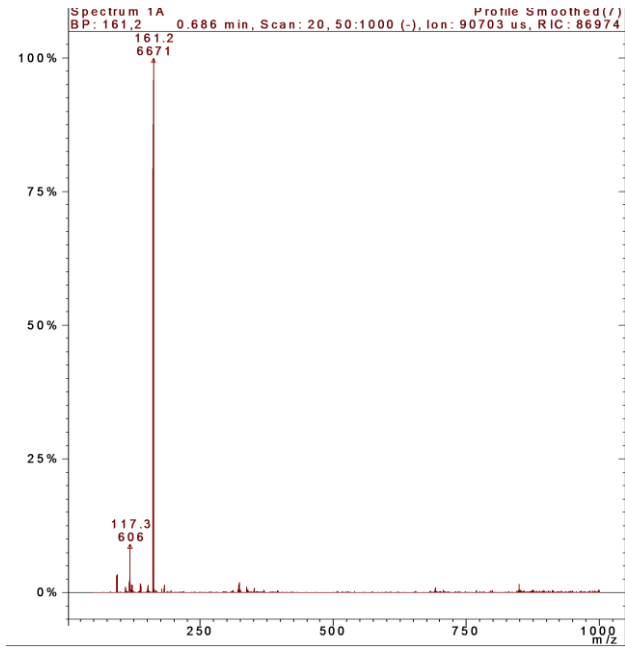
62. Vanillin -ESI positive



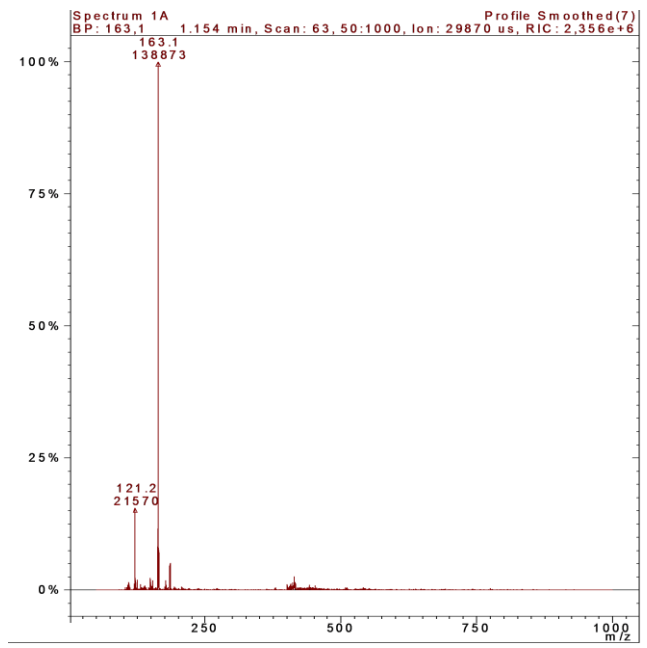
63. Vanillin -APCI negative



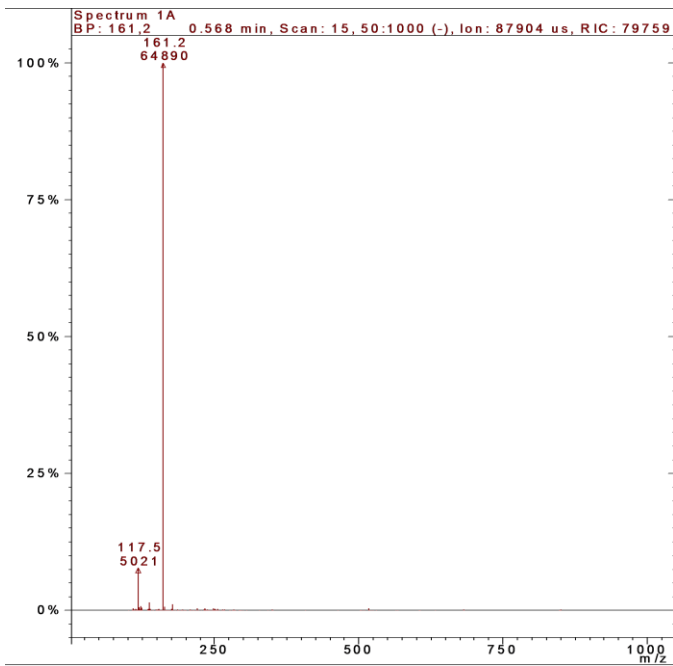
64. Vanillin -APCI positive



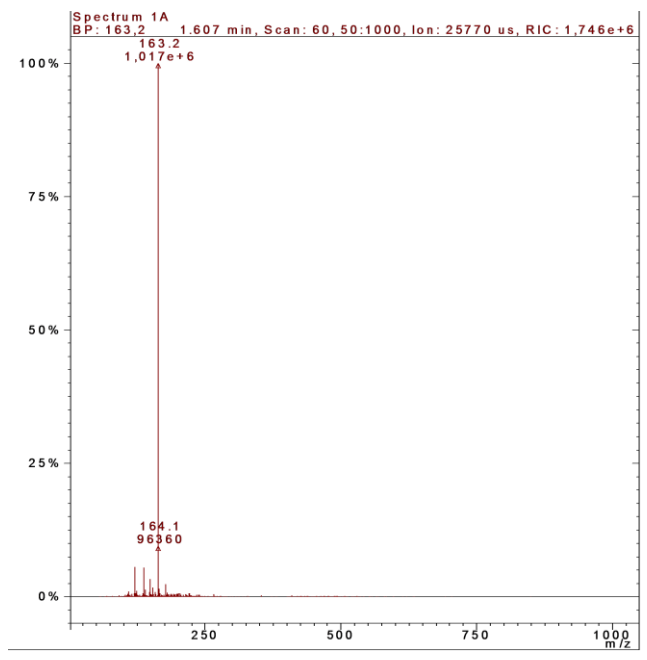
65. Hydroxycoumarin-ESI negative



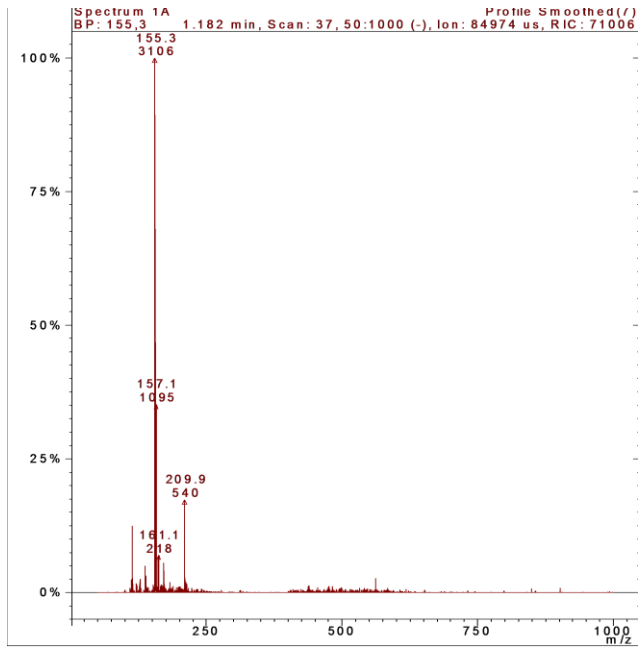
66. Hydroxycoumarin -ESI positive



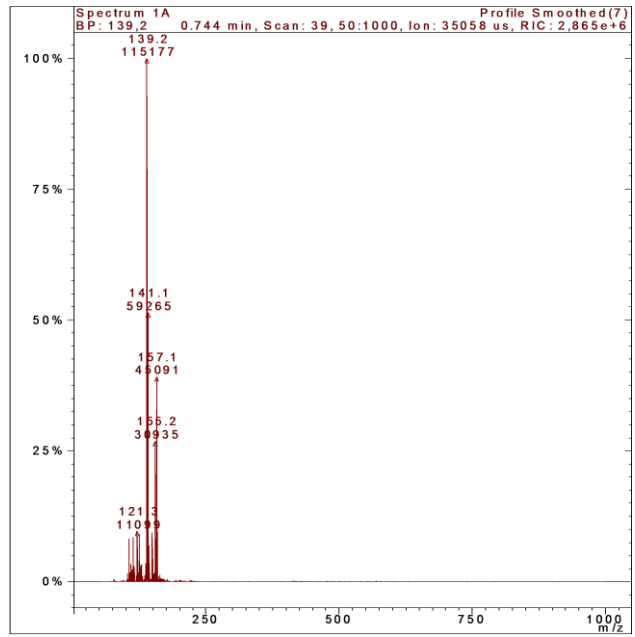
67. Hydroxycoumarin -APCI negative



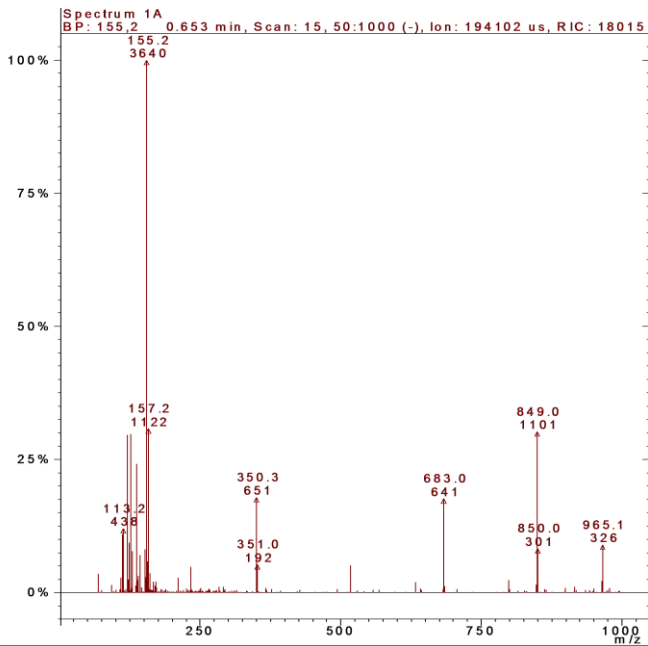
68. Hydroxycoumarin -APCI positive



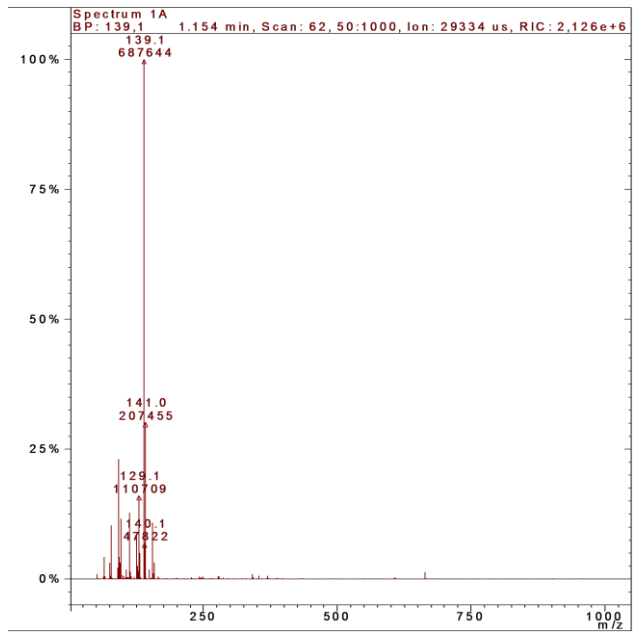
69. Chlorobenzaldehyde-ESI negative



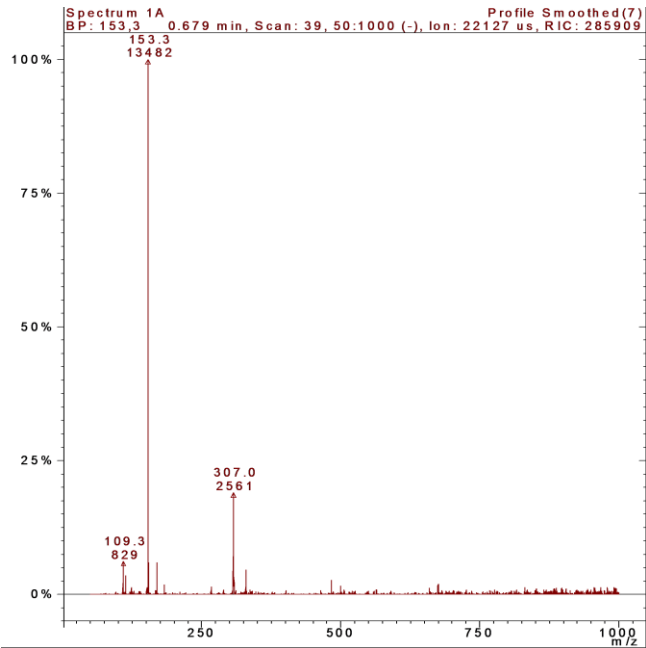
70. Chlorobenzaldehyde acid -ESI positive



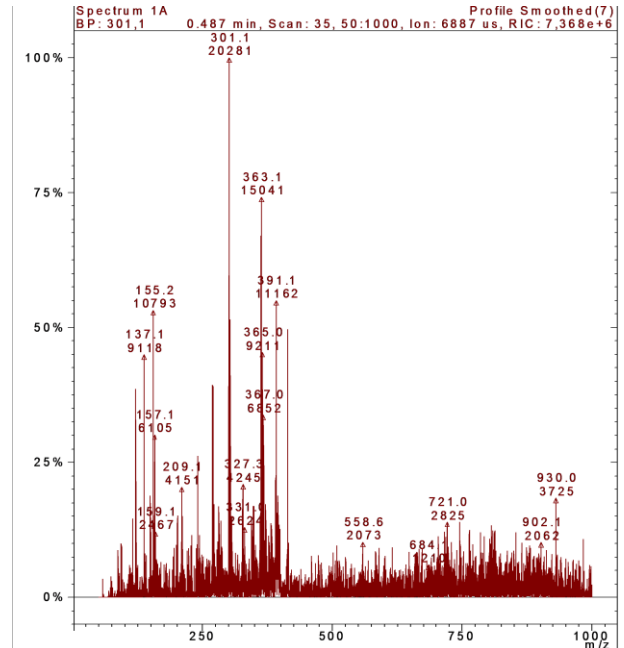
71. Chlorobenzaldehyde -APCI negative



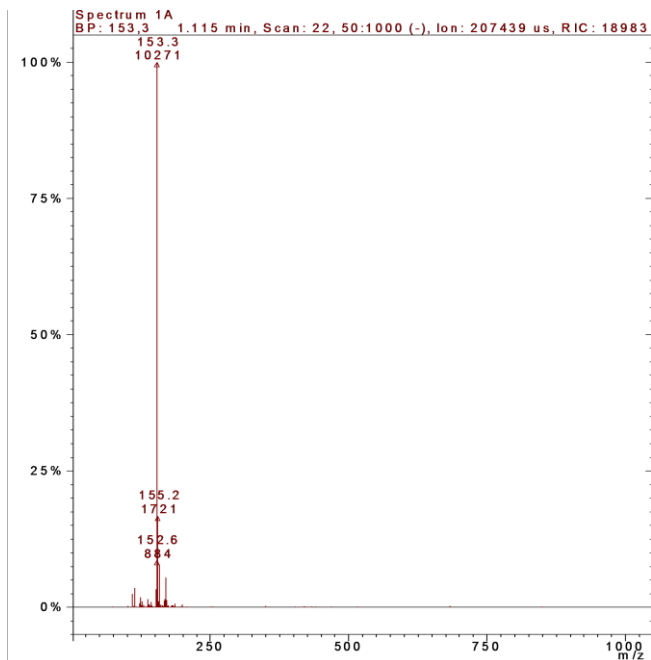
72. Chlorobenzaldehyde -APCI positive



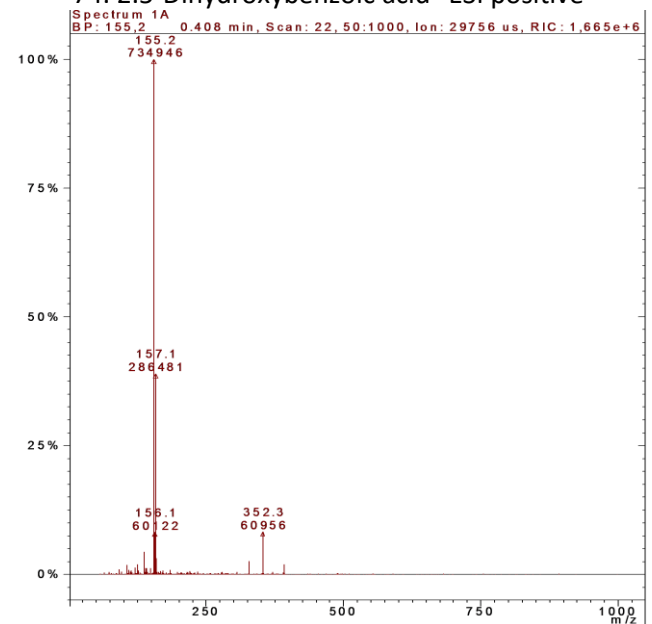
73. 2,5-Dihydroxybenzoic acid-ESI negative



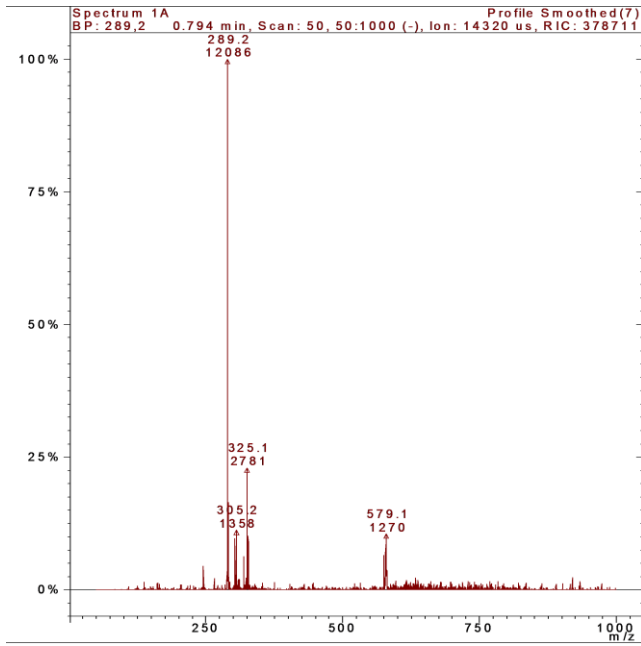
74. 2,5-Dihydroxybenzoic acid--ESI positive



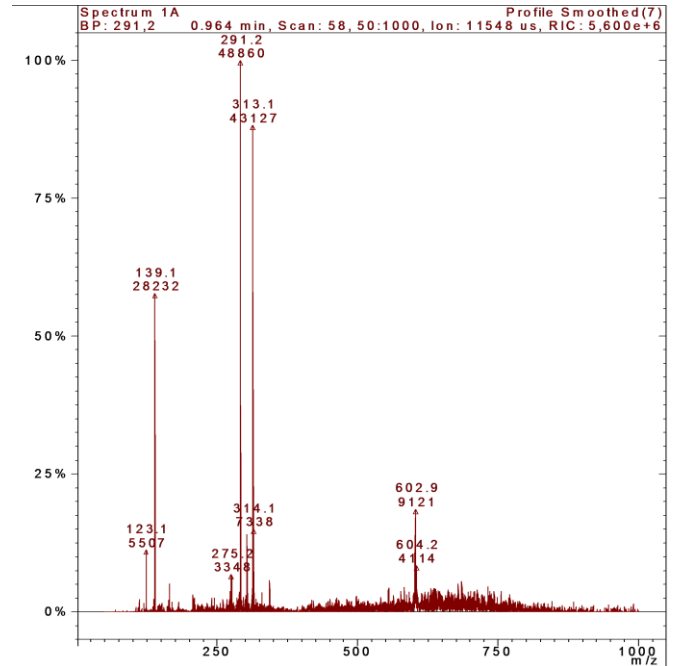
75. 2,5-Dihydroxybenzoic acid-APCI negative



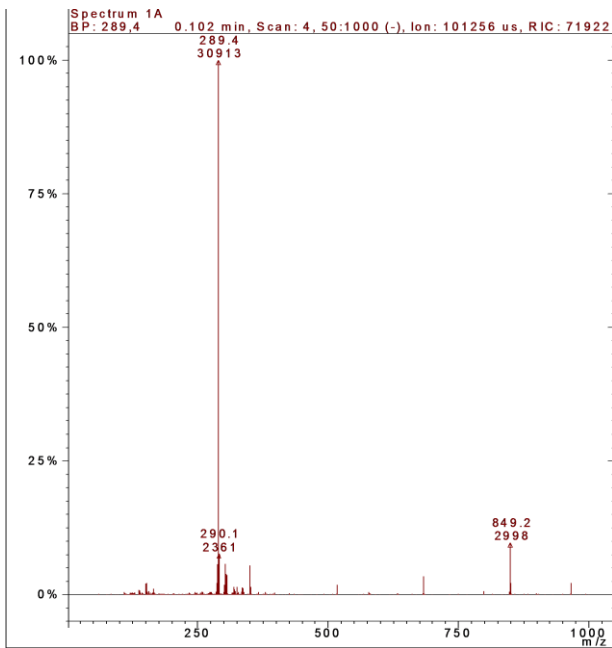
76. 2,5-Dihydroxybenzoic acid--APCI positive



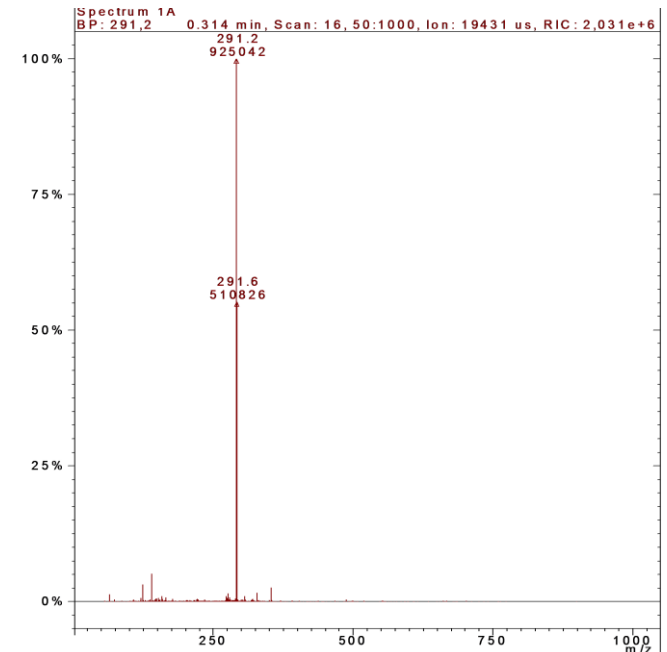
77. (-)-Epicatechin-ESI negative



78. (-)-Epicatechin-ESI positive

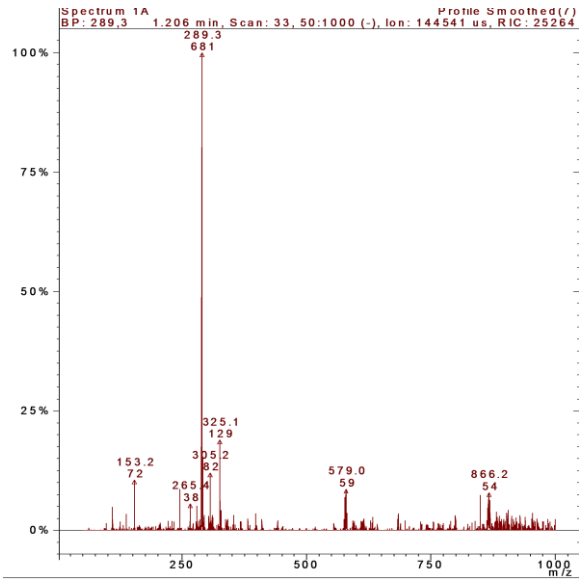


79. (-)-Epicatechin -APCI negative

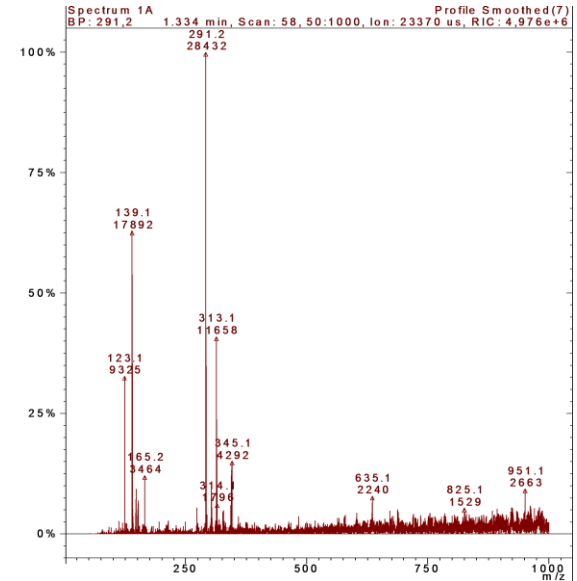


80. (-)-Epicatechin -APCI positive

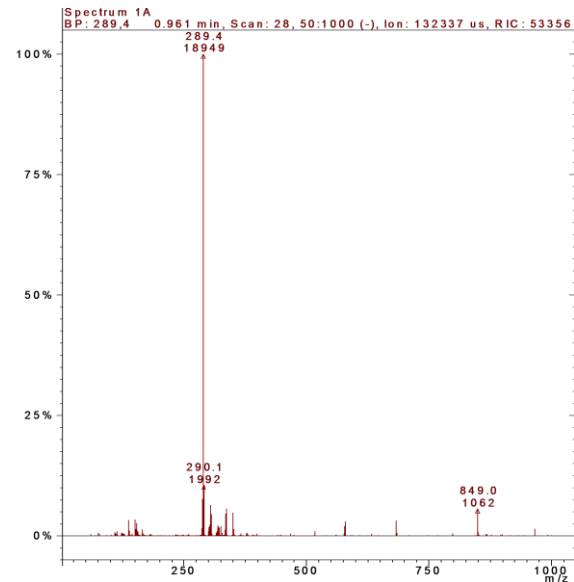
Χατζή Ευαγγελία, Διπλωματική Εργασία



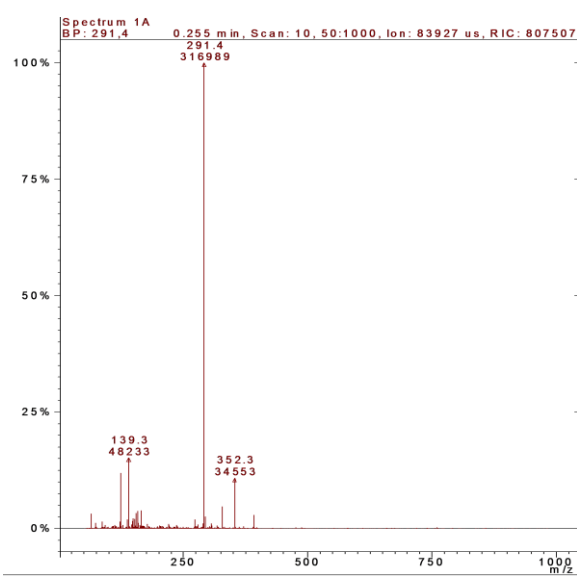
81. (+)Catechin-ESI negative



82. (+)Catechin -ESI positive



83. (+)Catechin -APCI negative



84. (+)Catechin -APCI positive

