

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Διπλωματική Εργασία

**Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από βαλσαμόχορτο (*Hypericum perforatum* L.)**



**Φωστέρης Σπυρίδων**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια  
**Ωραιοπούλου Βασιλική**

**Αθήνα, 2021**

## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	i
Περίληψη.....	ii
1. Εισαγωγή .....	1
1.1. Το Βαλσαμόχορτο ( <i>Hypericum perforatum L.</i> ).....	1
1.1.1. Γενικά για το φυτό.....	1
1.1.2. Σύσταση.....	3
1.1.3. Φαρμακολογικές δράσεις .....	11
1.2. Εκχύλιση .....	15
1.2.1. Γενικά για την εκχύλιση.....	15
1.2.2. Μέθοδοι εκχύλισης .....	15
1.2.3. Εκχύλιση φαρμακευτικών φυτών .....	19
1.3. Αναλυτικές τεχνικές- Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση συστατικών.....	26
1.3.1. Ταυτοποίηση συστατικών .....	26
1.3.2. Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	28
1.3.3. Μέθοδος DPPH.....	29
1.4. Γαλακτώματα.....	30
2. Πειραματικό Μέρος .....	32
2.1. Σχεδιασμός πειραμάτων .....	32
2.2. Πρώτες ύλες – Αντιδραστήρια – Συσκευές .....	34
2.2.1. Πρώτες ύλες .....	34
2.2.2. Αντιδραστήρια.....	34
2.2.3. Όργανα – Συσκευές .....	35
2.3. Πειραματική διαδικασία .....	39
2.3.1. Εκχύλιση .....	39
2.3.2. Προσδιορισμός υγρασίας βαλσαμόχορτου .....	39
2.3.3. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση συστατικών με HPLC (High Performance Liquid Chromatography) .....	40
2.3.4. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων – Μέθοδος Folin – Ciocalteu .....	41
2.3.5. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης – Μέθοδος DPPH .....	42
2.3.6. Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος .....	43
2.3.7. Παρασκευή γαλακτώματος που περιέχει βιοδραστικά συστατικά βαλσαμόχορτου .....	44

2.3.8. Μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής των σωματιδίων .....	45
3. Αποτελέσματα και σχολιασμός .....	46
3.1 Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών βαλσαμόχορτου με διαφορετικούς διαλύτες ...	46
3.1.1. Απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά .....	46
3.1.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα.....	48
3.1.3. Ταυτοποίηση συστατικών βαλσαμόχορτου με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης .....	49
3.1.4. Ποσοτικοποίηση συστατικών βαλσαμόχορτου με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης .....	52
3.2 Διαδοχικές εκχυλίσεις .....	57
3.2.1. Διαδοχική εκχύλιση με ακετόνη και νερό .....	57
3.2.2. Διαδοχική εκχύλιση με νερό και ακετόνη .....	58
3.2.3. Διαδοχική εκχύλιση με εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, αιθανόλη και νερό.....	60
3.3 Κινητική μελέτη εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού .....	64
3.3.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο .....	64
3.3.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα.....	70
3.4. Γαλάκτωμα βιοδραστικών συστατικών βαλσαμόχορτου .....	77
3.4.1. Μέγεθος και κατανομή των σωματιδίων.....	77
3.4.2. Διατηρησιμότητα υπερκίνης και υπερφορίνης στο γαλάκτωμα .....	78
4. Συμπεράσματα και Προτάσεις .....	80
5. Παράρτημα.....	82
6. Βιβλιογραφία.....	89

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από τον Οκτώβριο του 2019 μέχρι τον Ιούλιο του 2020, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Βασιλικής Ωραιοπούλου.

Θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω θερμά την κα. Ωραιοπούλου για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και τις συμβουλές της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας, ειδικότερα εν μέσω των δύσκολων συνθηκών της πανδημίας.

Επίσης, ευχαριστώ τον διδάκτορα κ. Τσιμογιάννη που με συμβούλευε καθημερινά κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, μοιράστηκε την εμπειρία του στις αναλυτικές μεθόδους και με βοήθησε στην επίλυση προβλημάτων που προέκυπταν.

Εξαιρετικά σημαντική ήταν και η συνεισφορά από όλα τα μέλη του προσωπικού του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων. Η καλή διάθεση και η προθυμία τους να βοηθήσουν με τις γνώσεις τους στη χρήση του εργαστηριακού εξοπλισμού έκανε ομαλότερη την διεξαγωγή της εργασίας.

Ακόμη, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Ρέκκα του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών που μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω τη συσκευή Malvern στο εργαστήριο του, καθώς και την φοιτήτρια μεταπτυχιακού Λευκοθέα Αντωνάρα που με βοήθησε με τη χρήση του.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και τους φίλους μου που με υποστήριξαν στην υλοποίηση του στόχου μου.

## Περίληψη

Το βαλσαμόχορτο (*Hypericum perforatum* L.) είναι ένα φυτό πλούσιο σε βιοδραστικά φαινολικά φυτοχημικά. Οι κύριες δράσεις που του αποδίδονται είναι αντικαταθλιπτική, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή. Τα κύρια συστατικά του, στα οποία αποδίδονται και οι φαρμακολογικές του δράσεις, είναι οι ναφθοδιανθρόνες, οι φλορογλυκινόλες και τα φλαβονοειδή. Τα τελευταία μάλιστα είναι υπεύθυνα για την υψηλή αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων του βαλσαμόχορτου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ερευνάται η διεργασία της εκχύλισης σε δείγμα βαλσαμόχορτου, με σκοπό α) την αριστοποίηση της ανάκτησης όλων των φαινολικών ουσιών και β) τον διαχωρισμό των ναφθοδιανθρόνων από τις φλορογλυκινόλες. Ο διαχωρισμός αυτός είναι επιθυμητός, διότι τα σκευάσματα που περιέχουν υπερικίνη (κύρια ένωση στην κατηγορία των ναφθοδιανθρόνων που περιέχεται στο φυτό) εμφανίζουν ως παρενέργεια την φωτοευαισθησία, και επομένως η παρουσία τους σε ορισμένα δερματολογικά/καλλυντικά προϊόντα είναι ανεπιθύμητη.

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε δείγμα βαλσαμόχορτου από το Πήλιο, από την εταιρεία ChironKentauros Greek Organic Herbs. Η συγκομιδή του έγινε τον Αύγουστο του 2019 και για το αποξηραμένο και αλεσμένο δείγμα χρησιμοποιήθηκαν άνθη και φύλλα του φυτού. Οι εκχυλίσεις έγιναν σε ανοξείδωτο κυλινδρικό εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου, σταθερής κλίσης, ενώ η ροή του διαλύτη ρυθμίστηκε με την βοήθεια περισταλτικής αντλίας σε  $q=3,3$  mL/min για όλα τα πειράματα. Για την εύρεση της απόδοσης εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin – Ciocalteu), εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (gallic acid equivalent – GAE) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέθοδος DPPH), εκφρασμένη σε ισοδύναμα trolox (trolox equivalent – TE). Επίσης, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση (λόγω απουσίας προτύπου) της υπερικίνης και της υπερφορίνης στο βαλσαμόχορτο, υπολογισμένη σε μονάδες εμβαδού ανά ξηρή μάζα εκχυλίσματος ή φυτού.

Η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε είναι η επίδραση του διαλύτη στην ανάκτηση του συνόλου των φαινολικών συστατικών. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακετόνη, η αιθανόλη, το νερό και μίγματα αιθανόλης/νερού σε αναλογίες 70/30, 60/40, 50/50 και 40/60. Ο συνολικός όγκος του εκχυλίσματος που συλλέχθηκε με κάθε διαλύτη ήταν περίπου 200 mL. Οι αναλογίες μιγμάτων αιθανόλης/νερού 40/60, 50/50 και 60/40 στην εκχύλιση βαλσαμόχορτου οδήγησαν στην μεγαλύτερη ανάκτηση ολικών φαινολικών ουσιών. Με τις αναλογίες αυτές επιτεύχθηκε ανάκτηση περίπου 50 mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού, με το μίγμα αιθανόλης νερού 50/50 να εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή ( $51,7 \pm 1,0$  mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού). Όμως το μίγμα αναλογίας 40/60 εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού βάρους εκχυλίσματος,  $307,7 \pm 7,5$  mg GAE/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος, άρα τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν για την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, όπου το μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50 εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή ανά μάζα ξηρού βάρους φυτού,  $86,1 \pm 1,5$  mg TE/g ξηρού βάρους φυτού, και το μίγμα 40/60 τη μεγαλύτερη τιμή ανά ξηρή μάζα εκχυλίσματος,  $480,7 \pm 39,8$  mg TE/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος.

Με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης επιτεύχθηκε η ανίχνευση των εξής ουσιών, με τους αντίστοιχους μέσους χρόνους έκλουσης

να δίνονται στην παρένθεση: υπερφορίνη ( $58,88 \pm 0,67$  min), αδυπερφορίνη ( $61,85 \pm 0,48$  min), ψευδοϋπερικήνη ( $58,58 \pm 0,71$  min) και υπερικήνη ( $65,71 \pm 0,74$  min). Η υπερφορίνη ανακτήθηκε με όλους τους διαλύτες με εξαίρεση το νερό, ενώ το εξάνιο ήταν ο μόνος διαλύτης που είχε μηδενική ανάκτηση σε υπερικήνη. Η εκχύλιση με εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, ακετόνη και αιθανόλη οδήγησε στην ίδια περίπου ανάκτηση υπερφορίνης ανά ξηρή μάζα φυτού (περίπου 1100 μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού), ωστόσο με το εξάνιο η ανάκτηση υπερφορίνης ανά ξηρό βάρος εκχυλίσματος ήταν τουλάχιστον 2,5 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους άλλους διαλύτες. Ως προς την υπερικήνη η καλύτερη ανάκτηση επιτεύχθηκε από την εκχύλιση με μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40 ( $565 \pm 30$  μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της εκχύλισης βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού σε αναλογίες 100/0, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60 και 0/100. Για το σκοπό αυτό, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, τις χρονικές στιγμές 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 και 60 min συλλέγεται δείγμα 1,5 mL σε περιέκτες erpendorf, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών και τις αντιοξειδωτικής ικανότητας σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα αποτελέσματα προσαρμόστηκαν σε εκθετικές καμπύλες της μορφής  $C(t) = a \cdot e^{-bt}$ . Από την ολοκλήρωση της σχέσης  $\int_{V_1}^{V_2} C(t) dV = \int_{t_1}^{t_2} C(t) Q dt$  υπολογίζεται η μάζα των φαινολικών και αντιοξειδωτικών συστατικών που έχει ανακτηθεί σε χρόνο  $t$  της εκχύλισης, άρα και η συνολική μάζα τους στο τέλος της εκχύλισης. Η προσαρμογή του παραπάνω μοντέλου ήταν ικανοποιητική και δεν υπήρχαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των πειραματικών και θεωρητικών τιμών. Τα συμπεράσματα ήταν αντίστοιχα με αυτά που προέκυψαν από τη μελέτη της επίδρασης του διαλύτη με την καλύτερη ανάκτηση να προκύπτει για τα μίγματα αιθανόλης/νερού 40/60, 50/50 και 60/40, ενώ για την αντιοξειδωτική ικανότητα η βέλτιστη αναλογία ήταν 40/60.

Για τον διαχωρισμό των συστατικών, πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες με τη σειρά: α) ακετόνη και έπειτα νερό, β) νερό και έπειτα ακετόνη και γ) διαδοχική εκχύλιση με εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, αιθανόλη και τέλος νερό. Τα πειράματα αυτά είχαν σκοπό τον διαχωρισμό της υπερικήνης και της υπερφορίνης καθώς επίσης και την πιο εξαντλητική παραλαβή αυτών των συστατικών από τη μάζα του φυτού. Η διαδοχική εκχύλιση με ακετόνη και νερό έδωσε μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών, και επομένως αντιοξειδωτική δράση από ότι η εκχύλιση με τον κάθε διαλύτη χωριστά. Συγκεκριμένα, το νερό χρησιμοποιούμενο ως διαλύτης μετά την εκχύλιση με ακετόνη, εκχύλιζε σχεδόν ίδια ποσότητα με την εκχύλιση στην οποία δεν είχε προηγηθεί ακετόνη. Το αποτέλεσμα αυτό εν μέρει οφείλεται στο γεγονός ότι το νερό εκχυλίζει πιο πολικά συστατικά (φλαβονοειδείς γλυκοζίτες, φαινολικά οξέα), τα οποία δεν παραλαμβάνονται από την ακετόνη. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και από τη διαδοχική εκχύλιση με νερό και ακετόνη. Ενδιαφέρον, όμως, ήταν το γεγονός ότι το ακετονικό εκχύλισμα που προέκυψε από τη διαδοχική εκχύλιση είχε αυξημένη ποσότητα φαινολικών ουσιών και υπερικήνης, καθώς και αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την εκχύλιση απευθείας με ακετόνη. Η διέλευση του νερού είχε ως αποτέλεσμα το άνοιγμα της φυτικής μάζας και επέτρεψε στην ακετόνη την καλύτερη πρόσβαση στα συστατικά του βαλσαμόχορτου. Τέλος, από διαδοχική εκχύλιση με εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, αιθανόλη και νερό αποδείχθηκε ότι η υπερφορίνη έχει παραληφθεί σχεδόν ολοκληρωτικά από το φυτό ( $1442 \pm 123$  Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού). Το εξάνιο παραλαμβάνει το 78 % της υπερφορίνης που παραλήφθηκε αθροιστικά από τους τρεις διαλύτες, επομένως η

εκχύλιση με τους άλλους διαλύτες δεν συμφέρει οικονομικά, αλλά θα ήταν προτιμότερο η συνέχιση της εκχύλισης με εξάνιο, που εμφανίζει μεγάλη εκλεκτικότητα στην υπερφορίνη. Σε κανένα από τα παραπάνω πειράματα δεν επιτεύχθηκε ο επιθυμητός διαχωρισμός υπερφορίνης και υπερικίνης, ενώ η ποσότητα φαινολικών ουσιών και υπερικίνης, και η αντιοξειδωτική δράση στο σύνολο των εκχυλισμάτων ήταν μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν για τις εκχυλίσεις με υδραλκοολικά μίγματα περιεκτικότητας 40 έως 60 % σε αιθανόλη. Ο μόνος διαλύτης που παραλαμβάνει εκχύλισμα ελεύθερο υπερικίνης είναι το εξάνιο, αλλά παραμένει ποσότητα αυτής στο φυτό που περνά στα επόμενα εκχυλίσματα με οργανικούς διαλύτες.

Τέλος, αιθανολικό εκχύλισμα βαλσαμόχορτου χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή νανογαλακτώματος με σκοπό τον έλεγχο της διατηρησιμότητας της υπερικίνης και της υπερφορίνης στο γαλάκτωμα σε θερμοκρασία 15 και 37 °C. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής των σταγονιδίων της ασυνεχούς φάσης των γαλακτωμάτων με τη βοήθεια διάταξης μέτρησης μεγέθους σωματιδίων με σκεδασμό δέσμης laser (Malvern Mastersizer) και βρέθηκε μέση διάμετρος σωματιδίων  $0,43 \pm 0,02$  μm. Για τη θερμοκρασία των 15 °C στο διάστημα 11 ημερών, το γαλάκτωμα δεν είχε σημαντική μείωση στη συγκέντρωση υπερικίνης και υπερφορίνης (14,1 % και 14,8 %, αντίστοιχα). Αντίθετα, για τη θερμοκρασία των 37 °C στο ίδιο διάστημα, οι συγκεντρώσεις της υπερικίνης και της υπερφορίνης μειώθηκαν κατά 47,6 και 73,5 %, αντίστοιχα, και η μείωση της συγκέντρωσης ήταν εκθετική.

## **St. John's wort (*Hypericum Perforatum* L.) extraction and identification of bioactive compounds**

*Hypericum perforatum* (common St. John's Wort) is a plant rich in biologically functional phenolic phytochemicals. Several pharmacological activities, including antidepressant, antioxidant and antibacterial effects, have been documented for extracts of the herb. Its main components, to which its pharmacological effects are attributed, are naphthodianthrones, phloroglucinols and flavonoids. The latter are in fact responsible for the high antioxidant activity of St. John's Wort products. This diploma thesis is focused on the study of extraction of St. John's Wort in order to optimize the recovery of all phenolic substances and separate naphthodianthrones from phloroglucinols. This separation is desirable because the preparations containing hypericin (main naphodianthrone contained in the plant) exhibit photosensitivity as a side effect and, therefore, their presence in certain dermatological/cosmetic products is undesirable.

The plant material used in the experimental process was collected in Pelion, purchased from the company ChironKentauros Greek Organic Herbs. The sample was harvested in August 2019. Only flowers and leaves of the plant were used and after their collection, plants were dried and mechanically ground to obtain a homogenous drug powder. All extraction experiments were carried out in a vertical fixed-bed stainless steel cylindrical reactor for a semi-batch extraction. The solvent of the extraction was penetrating the extractor with the aid of a peristaltic pump at a flow of  $q=3,3$  mL/min. In order to test the effectiveness of each extraction, analyzes were performed to determine the total phenolic components (Folin – Ciocalteu method), expressed in gallic acid equivalents (GAE) and the antioxidant capacity (DPPH method), expressed in trolox equivalents (TE). Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) was used for the identification and quantification of hypericin and hyperforin in each extract. Since there were no reference standards available, total peak areas were used as a measure of the content of the separate compound classes.

The first parameter studied is the impact of solvent type on the recovery of total phenolic compounds. The solvents that were used were hexane, ethyl acetate, acetone, ethanol, water and ethanol/water mixtures with ratio of 70/30, 60/40, 50/50 and 40/60. The total volume of the extract collected with each solvent was 200 mL. St. John's wort extracts using ethanol/water mixtures with ratio of 40/60, 50/50 and 60/40 showed the highest total phenolic substances content. Approximately 50 mg GAE/g dry plant weight was recovered at these ratios, with the 50/50 ethanol/water mixture having the highest value ( $51,7 \pm 1,0$  mg GAE/g dry plant weight). However, the 40/60 ratio showed the highest selectivity ( $307,7 \pm 7,5$  mg GAE/g dry extract weight). Similar results were obtained for the antioxidant activity of the extracts, where the 50/50 ethanol/water mixture showed the highest value per dry plant weight ( $86,1 \pm 1,5$  mg TE/g dry plant weight) and the 40/60 mixture the highest value per dry extract weight ( $480,7 \pm 39,8$  mg TE/g dry extract weight).

The method used in the high performance liquid chromatography achieved the detection of the following substances, with the corresponding average elution times given in parentheses: hyperforin ( $58,88 \pm 0,67$  min), adhyperforin ( $61,85 \pm 0,48$  min), pseudohypericin ( $58,58 \pm 0,71$  min) and hypericin ( $65,71 \pm 0,74$  min). Hyperforin was



recovered with all solvents except water, while hexane was the only solvent that led to hypericin-free extract. Extractions with hexane, ethyl acetate, acetone and ethanol resulted in approximately the same recovery of hyperforin per dry plant weight (approximately 1100 area units/g dry plant weight), however with hexane the recovery of hyperforin per dry extract weight was at least 2.5 times higher compared to other solvents. The best hypericin recovery was achieved by extraction with ethanol/water mixture 60/40 ( $565 \pm 30$  area units/g dry plant weight).

Then, a kinetic study of St. John's wort extraction with ethanol/water mixtures with ratios of 100/0, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60 and 0/100 was performed. For this purpose, during the extraction, at 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60 min, a 1,5 mL sample is collected in eppendorf containers to determine the concentration of phenolic constituents and antioxidant capacity over time. The trendline that was adjusted to the experimental values was exponential for every experiment. The integral  $\int_{V_1}^{V_2} C(t)dV = \int_{t_1}^{t_2} C(t) Qdt$  was used to calculate the mass of the phenolic and antioxidant components recovered at any time of the extraction, hence their total mass at the end of extraction. The values of the components recovered predicted by the above model were adequate and there were no significant differences between the experimental and theoretical values. The results were similar to those obtained from the study of the effect of the solvent with the best recovery obtained using the ethanol/water mixtures 40/60, 50/50 and 60/40, while for the antioxidant capacity the optimal ratio was 40/60.

To separate hypericin from hyperforin, three consecutive extractions were performed and specifically the solvents used in order are: a) acetone and then water, b) water and then acetone and c) successive extraction with hexane, ethyl acetate, ethanol and finally water. These experiments were aimed at separating hypericin and hyperforin as well as the total recovery of these components from the plant material. Consecutive extraction with acetone and water yielded a greater amount of phenolic components, and therefore had greater antioxidant capacity, than the extraction with each solvent separately. In particular, water used as a solvent after extraction with acetone resulted in almost the same recovery as the extraction which had not been preceded by acetone. This effect is partly due to the fact that water extracts more polar components (flavonoid glycosides, phenolic acids), which are not recovered by acetone. The results from consecutive extraction with water and acetone were similar. Interestingly, however, the acetone extract resulting from this extraction had an increased amount of phenolics and hypericin, as well as antioxidant capacity compared to the direct acetone extraction. The passage of water resulted in the opening of the plant mass and allowed acetone to have better access to the components of the St. John's wort. Finally, consecutive extraction with hexane, ethyl acetate, ethanol and water showed that hyperforin was almost completely recovered from the plant ( $1442 \pm 123$  area units/g plant dry weight). Hexane was responsible for the 78 % of hyperforin recovered after the passage of the three solvents, so continuing the extraction with ethyl acetate and ethanol does not seem to increase the value of the product as further extraction with hexane would. In none of the above experiments was the desired separation of hyperforin and hypericin achieved, while the amount of phenolic substances and hypericin, and the antioxidant activity in all the extracts was less than the corresponding values obtained for extracts with ethanol/water mixtures containing 40 to 60 % ethanol. The only solvent to obtain a hypericin-free extract is

hexane, but a quantity of it remains in the plant which passes to subsequent extracts with organic solvents.

Finally, ethanolic extract of St. John's wort was used to prepare a nanoemulsion in order to test the viability of hypericin and hyperforin in the emulsion at 15 and 37 °C. The size and distribution of the particles of the emulsions were measured using a particle size measuring device with laser beam scattering (Malvern Mastersizer) and an average particle diameter of  $0,43 \pm 0,02 \mu\text{m}$  was found. At 15 °C for 11 days, the emulsion did not have a significant reduction in the concentration of hypericin and hyperforin (14,1% and 14,8%, respectively). In contrast, for 37 °C at the same period, the concentrations of hypericin and hyperforin decreased by 47,6 and 73,5%, respectively, and the decrease in concentration was exponential.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Το Βαλσαμόχορτο (*Hypericum perforatum* L.)

### 1.1.1. Γενικά για το φυτό

Το βαλσαμόχορτο, γνωστό επίσης και ως “υπερικό το διάτρητο” (St. John’s wort ή *Hypericum perforatum* L.), είναι ένα φαρμακευτικό φυτό που χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για διάφορους θεραπευτικούς σκοπούς (Barnes et al., 2007). Ήταν γνωστό στην αρχαία Ελλάδα για τα ιατρικά οφέλη του και στον μεσαίωνα είχε χρησιμοποιηθεί ως αντιφλεγμονώδες. Έγινε γνωστό για τις θεραπευτικές ιδιότητες του και εκτιμήθηκε ιδιαίτερα για την αντιμετώπιση ψυχικών ασθενειών. Πλέον η δρόγη του συμπεριλαμβάνεται σε αρκετές Ευρωπαϊκές Φαρμακοποιίες, στην Αμερικανική Φαρμακοποιία, ενώ είναι ταξινομημένο και ως συμπλήρωμα διατροφής (Evans et al., 2009).

Η ονομασία του γένους «Υπερικόν» (*Hypericum*), προέρχεται από τις λέξεις υπέρ (άνωθεν) και εικών (εικόνα), αναφορικά με την αρχαία παράδοση του να κρέμεται το φυτό πάνω από τις θρησκευτικές εικόνες για να απομακρύνει τα κακά πνεύματα. Η κοινή του αγγλική ονομασία *St John’s wort*, αποδίδεται, μεταξύ άλλων, στο γεγονός ότι η ανθοφορία του συμβαίνει περίπου στις 24 Ιουνίου, την ημέρα του Αγίου Ιωάννη (Evans et al., 2009; Zobayed et al., 2005).



Εικόνα 1. Άνθος βαλσαμόχορτου

Από βοτανολογική άποψη, το φυτό ανήκει στην οικογένεια των *Hypericaceae*, στην οποία ανήκουν περίπου 400 διαφορετικά είδη, και είναι πολυετές ποώδες φυτό που συνήθως εξαπλώνεται μέσω των ριζών του. Υπάρχει σε αφθονία στην Ευρώπη και έχει επεκταθεί μέχρι τα Ιμαλάια, την κεντρική και Ρωσική Ασία (με εξαίρεση τις περιοχές της Αρκτικής), ενώ μέσω του αποικισμού βρέθηκε στην Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία. Αποτελείται από πράσινα φύλλα και στελέχη, κλειστά μπουμπούκια και κίτρινα άνθη. Οι ελαιούχοι αδένες του είναι ορατοί στα φύλλα ως διαφανείς περιοχές, εξ ου και το όνομα “διάτρητο” (*perforatum*), και ως μικρές σκουρόχρωμες κουκίδες στο χαμηλότερο μέρος του φυτού. Η οσμή του είναι ξεχωριστή και η γεύση του ελαφρώς γλυκιά και στυπτική (Evans et al., 2009). Σε όλο το φυτό περιέχονται δραστικές ουσίες, αλλά ορισμένες βρίσκονται αποκλειστικά σε ορισμένα μέρη του, όπως τα διφλαβονοειδή που βρίσκονται στο άνθος του (Butterweck and Schmidt, 2007).

Στην Ελλάδα το βαλσαμόχορτο απαντάται σε πολλές περιοχές, σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της χώρας (Dimopoulos et al., 2016), και είναι γνωστό με πολλά ονόματα (μεταξύ άλλων σπαθόχορτο, λειχινόχορτο, περίκη). Στην κεντρική Μακεδονία, σε περιοχές όπως η Έδεσσα και η Νάουσα, αναφέρεται ότι γίνεται χρήση για επούλωση πληγών, αντιμετώπιση προβλημάτων στις αρθρώσεις, γαστρεντερικών διαταραχών, αϋπνίας και κατάθλιψης (Tsioutsiou et al., 2019).

Η χρήση φυσικών φαρμακευτικών προϊόντων συνδέεται με λιγότερους κινδύνους για την υγεία, για αυτό και έχει αυξηθεί η έρευνα για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών από φυσικές πρώτες ύλες (Milevskaya et al., 2019). Το γεγονός πως το βαλσαμόχορτο περιέχει μεγάλη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων σε σχέση με άλλα βότανα, σε συνδυασμό με τις ευεργετικές ιδιότητες που διαθέτει, αυξάνει δραματικά το ενδιαφέρον για την έρευνα του (Kalogeropoulos et al., 2014).

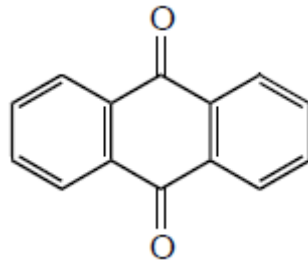
Όπως συμβαίνει με όλα τα φαρμακευτικά φυτά, η αξία του καθορίζεται από την συγκέντρωση των συστατικών του φυτού ανά ξηρή μάζα (Kirakosyan et al., 2004).

### 1.1.2. Σύσταση

Έρευνες για τα συστατικά του βαλσαμόχορτου έχουν ανιχνεύσει επτά βασικές κατηγορίες βιοδραστικών ουσιών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Οι πιο κοινές συμπεριλαμβάνουν τις ναφθοδιανθρόνες, τις φλορογλυκινόλες και τα φλαβονοειδή. Τα βασικά συστατικά, που αυξάνουν το ενδιαφέρον για το φυτό καθώς συναντώνται κυρίως σε αυτό, είναι η υπερικίνη και η υπερφορίνη.

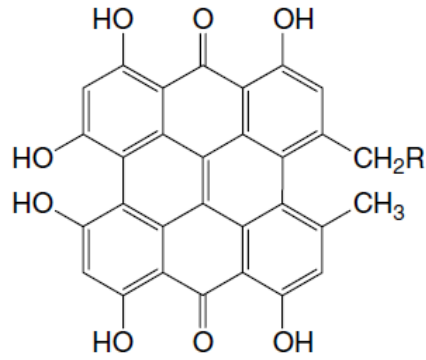
#### Ναφθοδιανθρόνες

Οι ναφθοδιανθρόνες προέρχονται από τις ανθρακινόνες, τρικυκλικές αρωματικές ενώσεις στις οποίες οι ομάδες της κετόνης βρίσκονται στον κεντρικό δακτύλιο (Εικόνα 2) (Bais et al., 2003; Falk, 1999; Karioti and Bilia, 2010). Κυρίως υπερικίνη και ψευδοπερικίνη (Εικόνα 3), καθώς και ισοπερικίνη, πρωτοπερικίνη και πρωτοψευδοπερικίνη (Εικόνα 4), είναι ουσίες που παρουσιάζονται στην μάζα του φυτού. Εμφανίζονται στις σκουρόχρωμες κουκίδες του φυτού και ιδιαίτερα στους στήμονες, όμως σημασία δεν έχει τόσο το μέρος του φυτού, όσο ο αριθμός ή το μέγεθος των κουκίδων. Σε αυτές συνθέεται και συσσωρεύεται η υπερικίνη και πληθαίνουν όσο αναπτύσσεται το φυτό, αλλά μειώνονται μετά από κάποιο στάδιο ανάπτυξης του (Zobayed et al., 2006). Αξιοσημείωτο είναι ότι οι ναφθοδιανθρόνες βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στο είδος *Hypericum* (Zeliou et al., 2020). Τα εκχυλίσματα του φυτού τυποποιούνται με βάση την υπερικίνη (Eggelkraut-Gottanka et al., 2002; Avato and Guglielmi, 2004), ενώ η περιεκτικότητα σε υπερικίνη (περίπου 0,1 έως 0,15 %) αναφέρεται στο σύνολο υπερικίνης και ψευδοπερικίνης (Barnes et al., 2007).



**Εικόνα 2.** Δομή ανθρακινόνης

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό καθιστώντας το βαλσαμόχορτο ενδιαφέρον για την συνεισφορά των συστατικών του στην αντικαταθλιπτική δράση του (Meruelo et al., 1988).

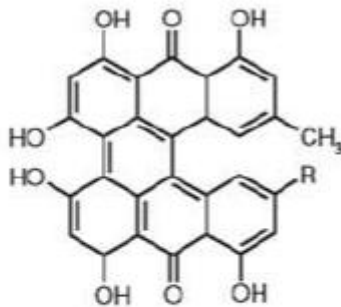


Hypericin, R = H

Pseudohypericin, R = OH

**Εικόνα 3.** Δομή υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης

Η υπερικίνη είναι υπεύθυνη για τις φωτοευαίσθητες αντιδράσεις που έχουν καταγραφεί σχετικά με το βαλσαμόχορτο και συγκεκριμένα με το φως η πρωτοϋπερικίνη και η πρωτοψευδοϋπερικίνη μετατρέπονται σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη αντίστοιχα (Poutaraud et al., 2001).



**Protoseudohypericin R=CH<sub>2</sub>OH**

**Protohypericin R=CH<sub>3</sub>**

**Εικόνα 4.** Δομή πρωτοϋπερικίνης και πρωτοψευδοϋπερικίνης

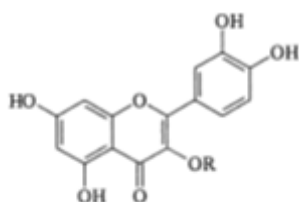
### Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή εμφανίζονται κυρίως στα σέπαλα, τα πέταλα και τους στήμονες (Beerhues, 2006). Είναι μια ευρέως κατανομημένη ομάδα πολυφαινολικών φυσικών ενώσεων με πυρήνα βενζοπυρόνης. Περισσότεροι από 4000 διαφορετικοί τύποι φλαβονοειδών έχουν περιγραφεί και ταξινομηθεί σε διαφορετικές ομάδες όπως φλαβόνες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβανόνες, κατεχίνες και ανθοκυανιδίνες. Στις ενώσεις αυτές οφείλονται πολλές θεραπευτικές ιδιότητες του βαλσαμόχορτου, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αναστολείς ενζύμων και λοιπές δράσεις. Στην βιομηχανία τροφίμων αποτελούν ελκυστικό υποψήφιο χρωστικό μέσο για λόγους ασφάλειας και για την ευεργετική επίδραση στην υγεία. Δεν συγκαταλέγονται στους

απαραίτητους διατροφικούς παράγοντες, παρόλο που αποτελούν σημαντικό μέρος της ανθρώπινης διατροφής, καθώς προσλαμβάνονται από φρούτα, λαχανικά, όσπρια, δημητριακά, ξηρούς καρπούς και άλλα προϊόντα που προέρχονται από φυτική ύλη όπως το τσάι, με αποτέλεσμα η κατανάλωση τους να φθάνει τα 1-2 g ημερησίως (Patel et al., 2018; Hamalainen et al., 2007).

Πλήθος από флаβονοειδή έχουν ανιχνευθεί στο φυτό. Παρακάτω δίνονται μερικές ενδεικτικές κατηγορίες που υπάρχουν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις:

- Φλαβονόλες (καμπφερόλη, κερκετίνη)
- Φλαβόνες (λουτεολίνη)
- Γλυκοζίτες (ρουτίνη)
- Διφλαβονοειδή (διαπιγενίνη, αμεντοφλαβόνη)
- Κατεχίνες



Rutin            R = Glu-Rha

Hyperoside     R = Gal

Isoquercitrin   R = Glu

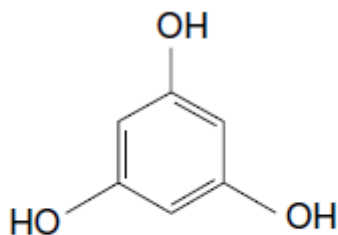
Quercitrin       R = Rha

Quercetin       R = H

**Εικόνα 5.** Δομή βασικών флаβονοειδών που απαντώνται στο βαλσαμόχορτο

### Φλορογλυκινόλες

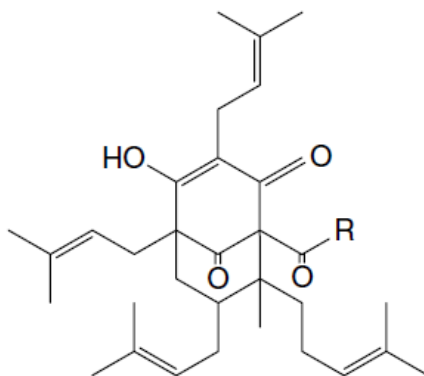
Οι φλορογλυκινόλες είναι βενζεντριόλες με τις ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 1,3 και 5 (Εικόνα 6) (Leuner et al., 2007). Υπερφορίνη (δικυκλικό πολυπρενυλιομένο παράγωγο φλορογλυκινόλης) και αδυπερφορίνη παρουσιάζονται στο βαλσαμόχορτο σε ποσοστά 2,0 έως 4,5 και 0,2 έως 1,9 % αντίστοιχα. Αυτές οι φλορογλυκινόλες αποτελούν τα κύρια συστατικά του λιπόφιλου εκχυλίσματος του φυτού και θεωρούνται ότι είναι τα σημαντικότερα δραστικά συστατικά όσον αφορά τις αντιβιοτικές και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες (Barnes et al., 2007; Evans et al., 2009). Το βαλσαμόχορτο είναι από τα μόνα είδη που περιέχουν υπερφορίνη (Εικόνα 7) ως ποσοτικά κύριο συστατικό και η σύσταση σε υπερφορίνη αυξάνεται κατά την πρόοδο της ανθοφορίας (Beerhues, 2006).



Phloroglucinol

Εικόνα 6. Δομή φλορογλυκινόλης

Η υπερφορίνη είναι ευαίσθητη στο φως, στη θερμότητα και σε οξειδωτικούς μετασχηματισμούς όταν βρίσκεται απομονωμένη και έχουν αναγνωριστεί πολλά τέτοια προϊόντα αποικοδόμησης, όμως είναι πιο σταθερή ως συστατικό στο φυτό ή σε παρασκευάσματα που περιέχουν εκχυλίσματα του φυτού (Gaid et al., 2016; Avato and Guglielmi, 2004; Eggelkraut-Gottanka et al., 2002). Η μετατροπή στο οξειδωμένο παράγωγό της, φυροϋπερφορίνη (Εικόνα 8) μπορεί να περιοριστεί από τις συνθήκες αποθήκευσης και εκχύλισης και ο λόγος της συγκέντρωσης της υπερφορίνης έναντι του παραγώγου της μπορεί να αποτελεί στοιχείο ποιοτικού ελέγχου για την πρώτη ύλη και τα παρασκευάσματα βαλσαμόχορτου (Milnevskaya et al., 2019). Ένα τρόπος σταθεροποίησης της είναι ως άλας δικυκλοεξυλαμμωνίου ή με προσθήκη ασκορβικού οξέος, κιτρικού οξέος ή παλμιτικού ασκορβυλεστέρα (Gaid et al., 2016; Beerhues, 2006).

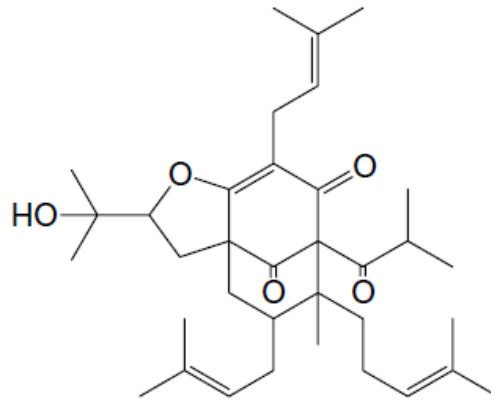


Hyperforin, R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Adhyperforin, R = CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

Εικόνα 7 Δομή υπερφορίνης και αδυπερφορίνης





Furohyperforin

**Εικόνα 8** Δομή φυροϋπερφορίνης

#### Λοιπά συστατικά

Αιθέρια έλαια βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 0,05 έως 0,9 %. Περιέχουν κυρίως μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, μεθυλ-2-οκτάνιο (πάνω από το 30 % των αιθέριων ελαίων) και άλλους κορεσμένους υδρογονάνθρακες με 16 έως 29 άτομα άνθρακα. Άλλες ενώσεις που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες συστατικών είναι οι ταννίνες (3 έως 16 %), οι ξανθόνες (1,28 mg/100 g), φαινολικές ενώσεις (χλωρογενικό, κουμαρικό οξύ), οξέα (παλμιτικό, στεαρικό), καροτενοειδή, αλκοόλες και άλλα. Αμινοξέα που έχουν απομονωθεί από το βότανο περιλαμβάνουν την γλουταμίνη και τη λυσίνη (Barnes et al., 2001; Brondz et al., 1983; Eggelkraut-Gottanka et al., 2002).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) δίνονται τα υπερικινοειδή, τα υπερφορινοειδή και τα φλαβονοειδή που αναφέρονται στη βιβλιογραφία με τις σχετικές συγκεντρώσεις όπου είναι διαθέσιμες.

**Πίνακας 1.** Ουσίες που έχουν ταυτοποιηθεί στο βαλσαμόχορτο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία

<b>Ουσία</b>	<b>Ποσότητα (mg/g dry weight)</b>	<b>Πηγή</b>
Υπερικίνη	0,08-0,35	(Kirakosyan et al., 2004)
	1,9-3,0 **	(Eggelkraut-Gottanka et al., 2002)
	1,1-2,1	(Avato and Guglielmi, 2004)
	0,9 *	(Greeson et al., 2001)
	2,66 **	(Zeliou et al., 2020)
	0,13-0,20 *	(Smelcerovic et al., 2006)
	0,09-0,25	(Milevskaya et al., 2016)
	0,28-0,65 *	(Williams et al., 2006)
Ψευδοϋπερικίνη	0,11-1,05	(Kirakosyan et al., 2004)
	0,2-1,8	(Avato and Guglielmi, 2004)
	2,3 *	(Greeson et al., 2001)
	3,01 **	(Zeliou et al., 2020)
	0,19-0,51 *	(Smelcerovic et al., 2006)
	0,24-0,51	(Milevskaya et al., 2016)
0,79-1,04 *	(Williams et al., 2006)	
Πρωτοϋπερικίνη	0,08-0,27	(Kirakosyan et al., 2004)
Συνολικά υπερικινοειδή	0,28-1,67	(Kirakosyan et al., 2004)
	0,3-30 *	(Greeson et al., 2001)
Χλωρογενικό οξύ	0,9-1,8	(Avato and Guglielmi, 2004)
	33,53 **	(Zeliou et al., 2020)
	1,36 **	(Kalogeropoulos et al., 2010)
	0,16	(Aybastier et al., 2013)
	6,21-6,80 *	(Williams et al., 2006)
Επικατεχίνη	118,9 **	(Kalogeropoulos et al., 2010)
	0,50-0,88	(Milevskaya et al., 2016)
Κατεχίνη	8,70 **	(Kalogeropoulos et al., 2010)
Κερκετίνη	2-14 **	(Eggelkraut-Gottanka et al., 2002)
	0,3-8,3	(Avato and Guglielmi, 2004)
	2 *	(Greeson et al., 2001)
	6,76 **	(Zeliou et al., 2020)
	5,81 **	(Kalogeropoulos et al., 2010)
	11,09	(Aybastier et al., 2013)
	1,13-3,30	(Milevskaya et al., 2016)
1,90-2,28 *	(Williams et al., 2006)	

Κερκιτρίνη	2-5 ** 0,5-2,6 1,10-1,48 0,34-0,75 * 2,66-3,58 * 5 * 7,73 **	(Eggelkraut-Gottanka et al., 2002) (Avato and Guglielmi, 2004) (Milevskaya et al., 2016) (Smelcerovic et al., 2006) (Williams et al., 2006) (Greeson et al., 2001) (Zeliou et al., 2020)
Ισοκερκιτρίνη	3-15 ** 0,4-3,9 3 * 1,9-2,6 5,19-5,62 * 20,40 **	(Eggelkraut-Gottanka et al., 2002) (Avato and Guglielmi, 2004) (Greeson et al., 2001) (Milevskaya et al., 2016) (Williams et al., 2006) (Zeliou et al., 2020)
Ρουτίνη	22-30 ** 1,3-7,8 9,9-13,9 1,78-2,95 * 16,66-21,38 * 3 *	(Eggelkraut-Gottanka et al., 2002) (Avato and Guglielmi, 2004) (Milevskaya et al., 2016) (Smelcerovic et al., 2006) (Williams et al., 2006) (Greeson et al., 2001)
Υπεροσίδιο	17-70 ** 6,5-15,4 5,4-7,3 1,62-2,79 * 14,75-16,30 * 7 * 38,84 ** 1,0-7,1	(Eggelkraut-Gottanka et al., 2002) (Avato and Guglielmi, 2004) (Milevskaya et al., 2016) (Smelcerovic et al., 2006) (Williams et al., 2006) (Greeson et al., 2001) (Zeliou et al., 2020) (Avato and Guglielmi, 2004)
Ι3,ΙΙ8 Διαπιγενίνη	0,085-0,10 1,0-5,0 * 8,82 **	(Milevskaya et al., 2016) (Greeson et al., 2001) (Zeliou et al., 2020)
Αμεντοφλαβόνη	0,1-0,5 * 0,32-0,60 *	(Greeson et al., 2001) (Williams et al., 2006)
Συνολικά Φλαβονοειδή	48-114 ** 20-120 *	(Eggelkraut-Gottanka et al., 2002) (Greeson et al., 2001)
Υπερφορίνη	1,57-3,80 13-39 ** 1,2-10,8 8-13 20-45 * 0,85-1,52 * 4,16 **	(Kirakosyan et al., 2004) (Eggelkraut-Gottanka et al., 2002) (Avato and Guglielmi, 2004) (Milevskaya et al., 2016) (Greeson et al., 2001) (Smelcerovic et al., 2006) (Zeliou et al., 2020)

Αδυπερφορίνη	0,4-00,5 1,3-1,97 2-18 *	(Avato and Guglielmi, 2004) (Milevskaya et al., 2016) (Greeson et al., 2001)
Φυροϋπερφορίνη	0,43-1,0	(Milevskaya et al., 2016)
Συνολικά υπερφορινοειδή	20-50 *	(Greeson et al., 2001)

---

\* Fresh plant

\*\* Στο εκχύλισμα (dry extract weight)

### 1.1.3. Φαρμακολογικές δράσεις

Η σύσταση του φυτού είναι ευρέως μελετημένη και οι καταγεγραμμένες φαρμακολογικές δράσεις παρέχουν αποδείξεις για την αποτελεσματικότητα της χρήσης του παραδοσιακά. Πολλές από αυτές τις δράσεις αποδίδονται στην περιεκτικότητα του φυτού σε υπερικίνη, υπερφορίνη και φλαβονοειδή. Το βαλσαμόχορτο αναφέρεται ότι δρα ως καταπραϋντικό και στυπτικό μέσο. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος ιατρικών περιπτώσεων όπως νευραλγία, ίνωση, ισχιαλγία, επούλωση πληγών, άγχος, κατάθλιψη (Barnes et al., 2007). Μάλιστα, η παραδοσιακή χρήση του για την θεραπεία πληγών φημολογείται ότι ευθύνεται και για την κοινώς γνωστή ονομασία του φυτού “σπαθόχορτο”.

Το φυτό χρησιμοποιείται ευρέως σε ομοιοπαθητικά παρασκευάσματα και άλλα φυτικά προϊόντα. Ελαιώδη παρασκευάσματα χρησιμοποιούνται για αιώνες για θεραπεία εγκαυμάτων, πληγών, φλεγμονές του δέρματος και νευρικό πόνο, ενώ η εσωτερική χρήση αφορά τη θεραπεία άγχους και κατάθλιψης. Πλέον, ως φαρμακολογική μορφή συναντάται σαν υγρό εκχύλισμα (αλκοολικό), κάψουλες ή δισκία που περιέχουν ξηρό εκχύλισμα, αλοιφές που περιέχουν συστατικά του, βάμμα και τέλος χρησιμοποιείται και το ίδιο το φυτό αποξηραμένο ως εκχύλισμα σε πόσιμο ρόφημα (τσάι) (Barnes et al., 2007; Greeson et al., 2001).

#### *Αντικαταθλιπτική δράση*

Το σύγχρονο ενδιαφέρον για το βότανο επικεντρώνεται στην αντικαταθλιπτική δράση του, για την οποία υπεύθυνη σε μεγαλύτερο βαθμό θεωρείται ότι είναι η υπερφορίνη και όχι η υπερικίνη όπως είχε θεωρηθεί αρχικά, ωστόσο η συνεισφορά των υπόλοιπων συστατικών σε αυτή είναι σημαντική (Barnes et al., 2007). Μάλιστα, αναφέρεται ότι περισσότερα από 10 συστατικά είναι υπεύθυνα για την αντικαταθλιπτική του δράση (Zou et al., 2004). Η αναστολή της μονοαμινο-οξειδάσης (MAO), παραδείγματος χάριν, που είναι ο κύριος αντικαταθλιπτικός μηχανισμός των εκχυλισμάτων βαλσαμόχορτου, αποδεικνύεται ότι οφείλεται σε φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, η καμπφερόλη και η λουτεολίνη, όμως η συγκέντρωσή τους δεν είναι αρκετή για να εξηγήσει την θεραπευτική αποτελεσματικότητα του φυτού (Butterweck and Schmidt, 2007). Από πλήθος μελετών έχει βρεθεί ότι παρασκευάσματα *H. perforatum* εμφανίζουν παρόμοια αποτελέσματα με πρότυπα αντικαταθλιπτικά. Σημαντικό όμως είναι το γεγονός ότι ενώ τα παρασκευάσματα του φυτού έχουν μεγάλα οφέλη για την ήπια και μέτρια κατάθλιψη, αντιθέτως, έχουν μικρά έναντι των placebo φαρμάκων για σοβαρές περιπτώσεις κατάθλιψης (Barnes et al., 2007). Στη σύγχρονη εποχή χρησιμοποιείται 20 φορές συχνότερα από την φλουοξετίνη (Prozac), ένα από τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα αντικαταθλιπτικά στις Ηνωμένες Πολιτείες (Greeson et al., 2001).

Ειδικότερα, δεδομένα δείχνουν ότι η μακροχρόνια και όχι η βραχυπρόθεσμη χορήγηση σκευασμάτων βαλσαμόχορτου και της δραστικής του ουσίας, υπερικίνης, τροποποιούν και αναστέλλουν τα επίπεδα νευροδιαβαστών στις περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης (σεροτονίνη, νορεπινεφρίνη και ντοπαμίνη). Τα αποτελέσματά τους ήταν αντίστοιχα με αυτά των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών, που χρησιμοποιούνται ευρέως για την καταπολέμηση της ασθένειας (Butterweck et al., 2002; Greeson et al., 2001). Επιπρόσθετα, έχει γίνει σύνδεση της δόσης με την

αποτελεσματικότητα του ως αντικαταθλιπτικό και συμπεραίνεται ότι παρουσιάζει βέλτιστη δράση μεταξύ κάποιων τιμών δόσης ενώ, για τιμές μεγαλύτερες ή μικρότερες δεν είχε σημαντική ή ακόμα και καθόλου δράση (Butterweck et al., 1999).

Συμπληρωματικά, άτομα που πάσχουν από τη νόσο Αλτσχάιμερ πάσχουν συχνά και από κατάθλιψη και μία από τις διεργασίες για την ανακούφιση των συμπτωμάτων είναι η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, το ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή, ακετυλοχολίνη. Το *H. perforatum* με αυτό τον τρόπο μπορεί να εμφανίσει διπλή δράση, δηλαδή την ανακούφιση συμπτωμάτων κατάθλιψης και ταυτόχρονα την αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, για τη θεραπεία της νόσου (Hernandez et al., 2010).

### Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να συνδεθεί με το οξειδωτικό στρες και με ασθένειες εξαρτώμενες από την ηλικία, και θεωρείται σημαντικός παράγοντας στην εμφάνιση και ανάπτυξη αρκετών χρόνιων ασθενειών. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά δρουν με πολύ καλό τρόπο ενάντια στο οξειδωτικό στρες, ενώ μπορεί να εμφανίζουν παράλληλα και άλλα οφέλη. Για παράδειγμα τα φλαβονοειδή, εκτός από την αντιοξειδωτική, έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και μεγάλη ικανότητα να αδρανοποιούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (Silva et al., 2008). Ερευνώνται εκτενώς καθώς έχουν μεγάλη ικανότητα διάσπασης ελευθέρων ριζών και είναι λιγότερο τοξικά και, συχνά, πιο δραστικά από συνθετικά αντιοξειδωτικά, για μερικά από τα οποία υπάρχουν υποψίες ότι είναι καρκινογόνα και προκαλούν ηπατικά προβλήματα. Η δράση του βαλσαμόχορτου ως αντιοξειδωτικό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα φλαβονοειδή και ο μηχανισμός μπορεί να αποδοθεί σε διάσπαση ελευθέρων ριζών, σχηματισμό συμπλόκων και δέσμευση ενεργού οξυγόνου (Zou et al., 2004; Silva et al., 2005).

Η αντιοξειδωτική ικανότητά του υποδεικνύει την ευεργετική προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες (Cossuta et al., 2009) και η ισχύς της το καθιστά καλή πρόταση για συμπλήρωμα διατροφής και φάρμακο για στεφανιαίες καρδιακές παθήσεις (Zou et al., 2004). Η αντιοξειδωτική δράση είναι επίσης σημαντική στη θεραπεία της νόσου Αλτσχλάιμερ. Από πειράματα σε ποντίκια βρέθηκε ότι η απουσία του φυσικού αντιοξειδωτικού, βιταμίνη Ε, επιτείνει τη νόσο (Hernandez et al., 2010).

### Αντιμικροβιακή δράση

Η αντιμικροβιακή δράση για το βαλσαμόχορτο, αλλά και η συνεισφορά των κύριων συστατικών του σε αυτή, έχει επιβεβαιωθεί ενάντια σε Gram-θετικά βακτήρια. Η επώασή τους παρουσία καθαρής υπερφορίνης και υπερικίνης είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, με τη δράση να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της υπερικίνης. Για αυτό, αλοιφές με βάση την υπερικίνη χρησιμοποιούνται για βακτηριακή δερματική μόλυνση. Τα φλαβονοειδή δεν είχαν παρόμοια δράση με τις άλλες δύο ουσίες (Avato et al., 2004).

Επιπλέον, σπουδαία είναι και η δράση του ενάντια σε ιούς. Συγκεκριμένα, η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη επηρεάζουν την ρετοϊκή μόλυνση και τον κύκλο αντιγραφής σε τουλάχιστον δύο σημεία: 1) Η υπερικίνη επιδρά στην σύνθεση και την επεξεργασία νέων ιών από τα μολυσμένα κύτταρα. Ως αποτέλεσμα οι νέοι ιοί που παράγονται στο κύτταρο

δεν περιέχουν την δραστηριότητα της αντίστροφης μεταγραφάσης. 2) Και οι δύο ενώσεις αναστέλλουν ρετροϊούς, συμπεριλαμβανομένου του HIV (Lavie et al., 1989). Παρεμβαίνουν στην ιογενή λοίμωξη και εξάπλωση απενεργοποιώντας τον ιό ή παρεμποδίζοντας τη μεταφορά και σύνθεση του στην κυτταρική μεμβράνη. Ταυτόχρονα, δεν εμφανίζουν σημαντική τοξικότητα στα επίπεδα της θεραπευτικής δόσης (Meruelo et al., 1988).

Παρόλα ταύτα, η απομόνωση κάθε ενός εξ αυτών των δραστικών ουσιών δεν εγγυάται ότι θα οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα. Στην συμβατική ιατρική είναι πλέον κοινή πρακτική η χρήση διαφορετικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση ενός νοσήματος λόγω της αλληλεπίδρασης των δραστικών ουσιών. Στα εκχυλίσματα υπάρχουν ήδη συνδυασμοί δραστικών συστατικών και ειδικά σε κάποια βότανα, όπως το βαλσαμόχορτο ή το τζινσενγκ, που ήδη για τη χρήση τους ως παραδοσιακά τυποποιημένα εκχυλίσματα υπάρχουν θετικά κλινικά δεδομένα, η απομόνωση των μεμονωμένων συστατικών μπορεί να υποβαθμίζει την θεραπευτική δράση τους (Evans et al., 2009).

Έτσι, σύμφωνα με την επιστημονική γνώση το συνολικό εκχύλισμα πρέπει να θεωρείται ως ενιαία δραστική ουσία και η απλοϊκή θεωρία που βασίζεται στο ότι από το φυτό προκύπτει μία δραστική ουσία και δρα με έναν συγκεκριμένο μηχανισμό φαίνεται να καταρρέει. Αντίθετα το σύνολο των βιοδραστικών συστατικών συμμετέχουν σε έναν πολύπλοκο μηχανισμό (Butterweck and Schmidt, 2007; Eggelkraut-Gottanka et al., 2002). Η πιθανότητα αλληλεπιδράσεων αναγνωρίζεται σε αναφορές της Επιτροπής της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (European Pharmacopoeia Commission), όπου ο πιο συνηθισμένος τύπος εκχυλίσματος, όπως το *Hypericum perforatum*, περιγράφεται ότι έχει συστατικά με γνωστή θεραπευτική ή φαρμακολογική δράση που δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνα για τη συνολική κλινική αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος (Evans et al., 2009). Για παράδειγμα, φλαβονοειδή, όπως το υπεροσίδιο και οι προκυανιδίνες, αυξάνουν τη διαλυτότητα των υπερικινών στο νερό, αυξάνοντας την βιοδιαθεσιμότητα (Butterweck and Schmidt, 2007).

### **Παρενέργειες και Τοξικότητα**

Η γνώση που υπάρχει για την τοξικότητα ως προς το είδος της, τη δόση που την προκαλεί και την ασφάλεια της μακροχρόνιας χρήσης προϊόντων βαλσαμόχορτου είναι περιορισμένη. Πολύ μικρά ποσοστά ανεπιθύμητων ενεργειών (2,4 %) παρατηρήθηκαν σε κλινική μελέτη για κατάθλιψη και παραμένουν μικρότερα σε σύγκριση με τα συμβατικά αντικαταθλιπτικά. Συγκεκριμένα, οι συχνότερες παρενέργειες είναι γαστρεντερικές ενοχλήσεις, αλλεργικές αντιδράσεις, κόπωση/καταστολή, ζάλη και αίσθημα ανησυχίας. Ωστόσο, όταν εμφανίζονται αναφέρονται ως ήπιες, παροδικές και αντίστοιχες με αυτές που εμφανίζουν τα φάρμακα placebo. Σε υψηλές δόσεις εμφανίζεται και μία σπάνια παρενέργεια, η φωτοευαισθησία, που εκδηλώνεται με συμπτώματα όπως το δερματικό ερύθημα, εξάνθημα και κνησμός και πιθανώς προκαλείται από αυξημένη συγκέντρωση υπερικίνης στο αίμα. Κατά την αντικαταθλιπτική θεραπεία, όμως, η υπερικίνη στο πλάσμα βρίσκεται συνήθως σε επίπεδα πολύ χαμηλά για να προκαλέσουν αυτή την φωτοτοξική δερματική αντίδραση. Άλλες παρενέργειες δεν έχουν συνδεθεί με την ποσότητα της δραστικής ουσίας (Greenson et al., 2001; Henderson et al., 2002).

Αντίστοιχα, ελάχιστες περιπτώσεις αναφέρονται για αλληλεπιδράσεις των φαρμακευτικών προϊόντων από το φυτό με άλλα φάρμακα. Έχει αναφερθεί ότι το βαλσαμόχορτο επιφέρει ηπατικές ενζυμικές δράσεις ικανές να επηρεάσουν την βιοδιαθεσιμότητα φαρμάκων που διασπώνται στο συκώτι, μειώνοντας την δράση των συγχωρηγούμενων φαρμάκων (Greeson et al., 2001).

Έχουν εντοπιστεί ορισμένες κλινικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις με συνταγογραφούμενα φάρμακα όπως η βαρφαρίνη, η φαινπροκουμόνη, η κυκλοσπορίνη, αναστολείς της πρωτεάσης HIV, θεοφυλλίνη, διγοξίνη και ορισμένα αντισυλληπτικά, μειώνοντας την συγκέντρωση ή την επίδραση τους. Πιθανές αιτίες για αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι η επαγωγή των ισοενζύμων του κυτοχρώματος P450 (CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2) και της πρωτεΐνης μεταφοράς, P-γλυκοπρωτεΐνη, από τα συστατικά του βαλσαμόχορτου. Άλλες πιθανές φαρμακοδυναμικές αλληλεπιδράσεις σχετίζονται με εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (5-HT) και με ανταγωνιστές υποδοχέων όπως οι τριπτάνες. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο παρενεργειών και ο βαθμός τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ποσότητα και η ποιότητα των συστατικών των παρασκευασμάτων βαλσαμόχορτου (Henderson et al., 2002).

Η δραματική άνοδος στη χρήση φυτικών θεραπευτικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένου του βαλσαμόχορτου, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκθεσης των ασθενών σε αυτές τις παρενέργειες. Πολλά άτομα θεωρούν ότι τα φυτικά προϊόντα, ως φυσικά, θα είναι και πιο ασφαλή, για αυτό το λόγο η χρήση τους, ειδικά ως μη συνταγογραφούμενα προϊόντα, σπάνια αναφέρεται στους ειδικούς, επομένως δεν υπάρχουν επαρκείς γνώσεις για τις ανεπιθύμητες δράσεις. Σε κάθε περίπτωση επιβάλλεται η προσοχή σε χρήστες του φυτικού εκχυλίσματος και συνιστάται η ενημέρωση των γιατρών, ψυχιάτρων και φαρμακοποιών για την χρήση προϊόντων του βαλσαμόχορτου ειδικά για ορισμένες ασθένειες (π.χ. διπολική διαταραχή, σύνδρομο σεροτονίνης, καρκίνο, AIDS) και κατηγορίες πληθυσμού (εγκύους, ηλικιωμένοι, άτομα που έχουν μεταμοσχευμένο όργανο) (Greeson et al., 2001; Henderson et al., 2002; Beerhues, 2006).

Γενικότερα, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ταξινομεί τα βότανα ως συμπληρώματα διατροφής, αλλά εφιστά την προσοχή για φαρμακευτική χρήση καθώς δεν γίνεται τόσο αυστηρός έλεγχος της ποιότητάς τους. Αντίθετα, στην Ευρώπη η χρήση βοτάνων ως φάρμακα βασίζεται σε εκτεταμένες έρευνες σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους. Ειδικότερα, στο Ηνωμένο Βασίλειο αναγράφεται στα παρασκευάσματα βαλσαμόχορτου: “Οι ασθενείς θα πρέπει να συμβουλευτούν το γιατρό ή το φαρμακοποιό τους πριν πάρουν ένα προϊόν βαλσαμόχορτου εάν λαμβάνουν οποιαδήποτε συνταγογραφούμενα φάρμακα, καθώς μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν”. Ευτυχώς, βήματα γίνονται για την αύξηση της γνώσης περί των παρενεργειών, καθώς τα τελευταία χρόνια αυξάνονται οι σχετικές αναφορές στην Κίτρινη Κάρτα (Greeson et al., 2001; Henderson et al., 2002). Όπως ορίζει και ο Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, η Κίτρινη Κάρτα είναι ένα μέσο για τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τις ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων. Οι επαγγελματίες υγείας (ιατροί, φαρμακοποιοί, νοσηλευτές) και οι ασθενείς έχουν καθήκον να συμπληρώνουν την Κίτρινη Κάρτα κάθε φορά που υποψιάζονται ότι ένα φάρμακο μπορεί να έχει προκαλέσει μια ανεπιθύμητη ενέργεια.



## 1.2. Εκχύλιση

### 1.2.1. Γενικά για την εκχύλιση

Στόχος της διεργασίας είναι η απομάκρυνση ενός συστατικού από ένα στερεό ή ένα υγρό μέσω ενός υγρού διαλύτη. Οι τεχνικές της εκχύλισης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη ονομάζεται έκπλυση ή εκχύλιση στερεού και χρησιμοποιείται για τη διάλυση διαλυτής ύλης από ένα μίγμα της με ένα αδιάλυτο στερεό. Η δεύτερη κατηγορία ονομάζεται εκχύλιση υγρών και χρησιμοποιείται για την ανάκτηση ενός ή περισσότερων προϊόντων από ένα διάλυμα συστατικών μέσω επαφής με έναν μη αναμίξιμο διαλύτη που έχει συγγένεια με το προϊόν. Η εκχύλιση υγρών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό υγρών με κοντινά σημεία ζέσεως, τα οποία είναι δύσκολο να διαχωριστούν με απόσταξη. (McCabe et al., 2005)

### 1.2.2. Μέθοδοι εκχύλισης

Παραδοσιακά η απλή διαβροχή (με ανάδευση ή χωρίς) και η μέθοδος Soxhlet χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των φυτών, ωστόσο, σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί με χρήση μοντέρνων μεθόδων εκχύλισης όπως με χρήση μικροκυμάτων, υπερήχων και υπερκρίσιμων υγρών. Στόχος είναι η αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης με ελαχιστοποίηση του κόστους, όμως απαιτείται σχολαστική αξιολόγηση του πλήθους των δυνητικών επιλογών (Azwanida, 2015). Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές τεχνικές εκχύλισης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για φυτικά δείγματα όπως το βαλσαμόχορτο.

#### **Διαβροχή**

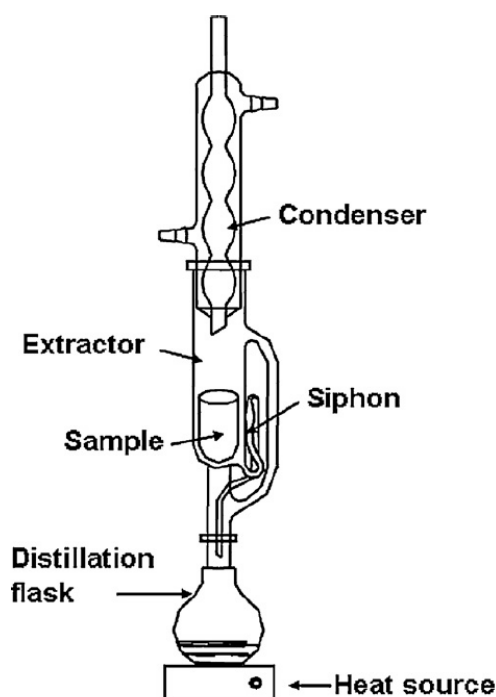
Η διαβροχή είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην οινοποιία και έχει υιοθετηθεί και ευρέως χρησιμοποιηθεί στην έρευνα των φαρμακευτικών φυτών. Το υλικό διαβρέχεται σε κλειστό δοχείο και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, συχνά και με ανάδευση. Η διεργασία κάνει πιο μαλακό και σπάει το κυτταρικό τοίχωμα ώστε να απελευθερωθούν τα διαλυτά συστατικά. Η επιλογή των διαλυτών καθορίζει τον τύπο των ενώσεων που λαμβάνονται στο εκχύλισμα. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η ίδια τεχνική με κρύο ή θερμό διαλύτη. Ο χρόνος εκχύλισης είναι μικρότερος για τον θερμό και με συγκεκριμένη αναλογία όγκου διαλύτη ανά μάζα δείγματος. Διάλυση σε θερμό διαλύτη χρησιμοποιείται μόνο για υλικά σταθερά στη θερμότητα και συνήθως έχει περισσότερες λιποδιαλυτές ενώσεις. Με ειδικό εξοπλισμό μπορεί η εκχύλιση να γίνει με συνεχή ροή διαλύτη. Το ξηρό κονιοποιημένο δείγμα τοποθετείται στον εκχυλιστήρα και διαλύτης διέρχεται από τη μάζα του δείγματος. Η διαδικασία αυτή γίνεται με μέτριο ρυθμό.

Πρόκειται για την πιο απλή και εύκολη τεχνική. Ωστόσο, τίθεται το ζήτημα των οργανικών αποβλήτων, καθώς χρησιμοποιείται μεγάλος όγκος διαλύτη και απαιτείται η σωστή διαχείριση των αποβλήτων (Azwanida, 2015).

## Εκχύλιση Soxhlet

Το 1987, ο von Soxhlet ανέπτυξε ένα νέο σύστημα εκχύλισης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πολύ καιρό κυρίως ως την πιο διαδεδομένη τεχνική έκπλυσης. Στην πραγματικότητα, η εκχύλιση Soxhlet υπήρξε για περισσότερο από έναν αιώνα πρότυπη τεχνική και οι μέθοδοι που βασίζονται σε αυτήν παραμένουν οι κύριες αναφορές για την αξιολόγηση των νέων μεθόδων έκπλυσης. Τροποποιήσεις της μεθόδου γίνονται με σκοπό την αυτοματοποίησή της και σε συνδυασμό της με άλλες τεχνικές (εκχύλιση με υπερήχους, με μικροκύματα ή υπό υψηλή πίεση) για την βελτίωση της.

Σε αυτή τη μέθοδο το αλεσμένο δείγμα τοποθετείται σε πορώδη θήκη από ισχυρό διηθητικό χαρτί ή κυτταρίνη που βρίσκεται μέσα στο θάλαμο της συσκευής εκχύλισης Soxhlet (Εικόνα 9). Ο διαλύτης θερμαίνεται στην φιάλη βρασμού, εξατμίζεται ώστε να φτάσει στο συμπυκνωτήρα και από εκεί πέφτει στάγδην στο δείγμα. Όταν η στάθμη του υγρού φθάσει στο ύψος του βραχίονα του σιφωνίου, ο διαλύτης αναρροφάται, απομακρύνεται από το χώρο του εκχυλιστήρα και αδειάζει στην κάτω φιάλη ξανά και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Συνεπώς, η διεργασία της εκχύλισης Soxhlet είναι συνεχής αλλά διακριτή, καθώς κάθε επανάληψη μπορεί να θεωρηθεί διαλείποντος έργου διεργασία, ωστόσο, με την ανακυκλοφορία του διαλύτη το σύστημα λειτουργεί με συνεχή τρόπο.



**Εικόνα 9.** Συσκευή συμβατικής εκχύλισης Soxhlet

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι το δείγμα έρχεται συνεχώς σε επαφή με παρτίδες φρέσκου διαλύτη, διατηρώντας υψηλό το δυναμικό μεταφοράς των εκχυλισίμων στερεών, απαιτώντας όμως μικρότερη ποσότητα διαλύτη σε σχέση με άλλες τεχνικές. Είναι μια απλή τεχνική που μπορεί να εκχυλίσει μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος συγκριτικά με άλλες μεθόδους (εκχύλιση με μικροκύματα, με υπερήχους κλπ) και η απόδοση της μπορεί να αυξηθεί εκτελώντας ταυτόχρονα παράλληλες εκχυλίσεις και με

χαμηλό κόστος εξοπλισμού. Επιπροσθέτως, δεν απαιτείται διήθηση στο τελικό εκχύλισμα και οι υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να αυξήσουν τη διαλυτότητα των συστατικών. Όμως, η λειτουργία σε θερμοκρασίες κοντά στο σημείο βρασμού του διαλύτη μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση θερμοευαίσθητων συστατικών. Άλλα μειονεκτήματα με τα οποία συνδέεται αφορούν τον μεγάλο χρόνο εκχύλισης και την έκθεση σε επικίνδυνους και εύφλεκτους οργανικούς διαλύτες, με την πιθανή απελευθέρωση τοξικών αερίων. Επίσης, δεν θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον και απαιτεί καλή προετοιμασία του δείγματος (μικρή κοκκομετρία, καλή ξήρανση) και μεγάλης καθαρότητας διαλύτες, αυξάνοντας έτσι και το κόστος της διεργασίας. (Azwanida, 2015; De Castro and Priego-Carote, 2010).

### ***Εκχύλιση με υπερήχους - Ultrasound-assisted extraction (UAE)***

Η εκχύλιση με υπερήχους έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για ταχεία εκχύλιση συγκρίσιμη σε απόδοση με τις άλλες κλασσικές τεχνικές εκχύλισης. Μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας στο δείγμα ή έμμεσα από τα τοιχώματα του δοχείου του δείγματος χρησιμοποιώντας υδατόλουτρο. Η χρήση της μεθόδου στο μέλλον αναμένεται να αυξηθεί, ειδικά λόγω του χαμηλού κόστους εξοπλισμού.

Πρόκειται μια απλή διαδικασία που περιλαμβάνει τη χρήση υπερήχων από 20 έως 2000 kHz. Η διαδικασία της εκχύλισης δραστικών ουσιών από ένα φυτικό υλικό περιλαμβάνει δύο κύρια στάδια, την διάλυση των συστατικών που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια (ταχύ στάδιο) και τη διάλυση των συστατικών και τη διάχυση αυτών προς την κύρια μάζα του διαλύτη (βραδύ στάδιο). Η χρήση υπερήχων μπορεί να ωφελήσει την διαδικασία επιταχύνοντας τη μεταφορά μάζας, αυξάνοντας την κυτταρική διάρρηξη και βελτιώνοντας την διείσδυση και τα τριχοειδή φαινόμενα. Η μηχανική επίδραση της ακουστικής σπηλαιώσης από τους υπέρηχους αυξάνει την επιφάνεια επαφής μεταξύ δείγματος και διαλύτη και την διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος, διευκολύνοντας την απελευθέρωση των ενώσεων και τη μεταφορά μάζας των διαλυτών στα φυτικά κύτταρα. Είναι σχετικά χαμηλού κόστους διεργασία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ευκολία τόσο σε μικρή όσο και μεγάλη κλίμακα. Μειώνει σημαντικά το χρόνο εκχύλισης και την κατανάλωση σε διαλύτη, όμως και αυτή ενέχει κίνδυνο, αφού οι υπέρηχοι σε αυτό το εύρος μπορεί να επιδράσουν στα φυτοχημικά σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες (Azwanida, 2015; Smelcerovic et al., 2006; Pico, 2013). Σε ορισμένες έρευνες για τη σύγκριση μεθόδων εκχύλισης σε δείγματα βαλσαμόχορτου, φαίνεται ότι οδηγεί σε μικρότερη υποβάθμιση των φαινολικών ενώσεων σε σχέση με άλλες μεθόδους (Aybastier et al., 2013). Ωστόσο, αυτό εξαρτάται από τις συνθήκες εκχύλισης. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι για να μην υποβαθμιστούν οι φαινολικές ενώσεις θα πρέπει η συχνότητα να είναι έως 40 kHz και η θερμοκρασία μικρότερη από 50 °C, επιτυγχάνοντας αυξημένη απόδοση σε πολυφαινόλες και ταυτόχρονα διατηρώντας την βιολογική τους δράση (Dzah et al., 2020).

### ***Εκχύλιση με μικροκύματα - Microwave assisted extraction (MAE)***

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί την ενέργεια των μικροκυμάτων για την διευκόλυνση της μεταφοράς των συστατικών από την μάζα του δείγματος στο διαλύτη. Η ακτινοβολία των μικροκυμάτων αλληλεπιδρά με δίπολα των πολικών και πολωμένων υλικών (το διαλύτη και το δείγμα) προκαλώντας θέρμανση κοντά στην επιφάνεια του υλικού και η θερμότητα

μεταφέρεται με αγωγή. Η διπολική περιστροφή των μορίων που προκαλείται από τα ηλεκτρομαγνητικά μικροκύματα διαταράσσει τους δεσμούς υδρογόνου ενισχύοντας την μετανάστευση των διαλυμένων ιόντων και τη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα. Σε μη πολικούς διαλύτες δεν γίνεται καλή θέρμανση καθώς η ενέργεια μεταφέρεται μόνο με διηλεκτρική απορρόφηση. Έτσι, η μέθοδος θεωρείται επιλεκτική και ευνοεί πολικά μόρια και διαλύτες με υψηλή διηλεκτρική σταθερά. Πιο συγκεκριμένα έχει παρουσιάσει καλά αποτελέσματα για την ανάκτηση ενώσεων όπως φαινολικά οξέα (γαλλικό οξύ και ελλαγικό οξύ) και κερκετίνη που ήταν σταθερές στη θέρμανση με μικροκύματα έως τους 100 °C για 20 λεπτά. Η τεχνική αυτή μειώνει το χρόνο εκχύλισης και τον απαιτούμενο όγκο διαλύτη σε σχέση με τις προηγούμενες δύο μεθόδους, αλλά απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στη χρήση των συνθηκών για την αποφυγή θερμικής υποβάθμισης του δείγματος (Azwanida, 2015).

### ***Εκχύλιση με πιεσιμένο υγρό - Pressurized liquid extraction (PLE) Accelerated solvent extraction (ASE)***

Η τεχνική αυτή είναι γνωστή και ως επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated solvent extraction, ASE). Σε αυτή την τεχνική το δείγμα συσκευάζεται με αδρανές υλικό, όπως η άμμος, σε κελί εκχύλισης από ανοξείδωτο χάλυβα. Στο κελί υπάρχουν στρώματα του δείγματος ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί κυτταρίνης και στρώματα άμμου. Η συσκευή εκχύλισης είναι ικανή να ελέγχει την θερμοκρασία και την πίεση. Η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών σε συνδυασμό με τον τύπο του διαλύτη οδηγεί στη βελτιστοποίηση της διεργασίας και σε μείωση του χρόνου εκχύλισης σε λιγότερο από τη μία ώρα. Η χρήση διαλυτών σε θερμοκρασίες υψηλότερες από το σημείο βρασμού τους σε αυξημένη πίεση αυξάνει τη διαλυτότητα και τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Η χρήση όμως υψηλών πιέσεων συνεπάγεται και υψηλό κόστος εξοπλισμού (Azwanida, 2015; Mustafa and Turner, 2011).

### ***Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό - Supercritical fluid extraction (SFE)***

Το υπερκρίσιμο ρευστό είναι μία ουσία που μοιράζεται τις φυσικές ιδιότητες του αερίου και του υγρού στο κρίσιμο σημείο της. Το υπερκρίσιμο ρευστό συμπεριφέρεται περισσότερο ως αέριο αλλά έχει τη διαλυτική ικανότητα ενός υγρού. Παράγοντες όπως η πίεση και η θερμοκρασία καθορίζουν την κρίσιμη περιοχή κάθε ουσίας και με την μεταβολή τους μπορεί να τροποποιηθεί και η διαλυτική ικανότητα του ρευστού. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι το πολύ υψηλό αρχικό κόστος του εξοπλισμού.

Ένα παράδειγμα είναι το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (SF-CO<sub>2</sub>) που μπορεί να γίνει υπερκρίσιμο σε θερμοκρασίες μεγαλύτερη των 31,1 °C και πίεση 7380 kPa. Παρόλο που η εξαιρετική διαλυτότητα περιορίζεται για μη πολικές ενώσεις, τροποποίηση με μικρή προσθήκη αιθανόλης ή μεθανόλης επιτρέπει την εκχύλιση πολικών συστατικών. Τέλος, επειδή εξατμίζεται σε συνθήκες περιβάλλοντος, η χρήση του οδηγεί σε πιο συμπυκνωμένα εκχυλίσματα (Azwanida, 2015).

### 1.2.3. Εκχύλιση φαρμακευτικών φυτών

Τα φαρμακευτικά φυτά εν γένει αποτελούν σημαντικό πεδίο ενδιαφέροντος λόγω των ιδιοτήτων τους και ως πηγές φυτοχημικών ικανών να οδηγήσουν στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Το ενδιαφέρον για τη χρήση φυσικών πηγών στην ανάπτυξη και διαμόρφωση προϊόντων ως εναλλακτική λύση στα συμβατικά φάρμακα και τα συνθετικά προϊόντα συμβάλλει στην αύξηση αυτού του ενδιαφέροντος για την έρευνα και την βιομηχανική εφαρμογή τους (Azwanida, 2015).

Η έλλειψη τυποποιημένων μεθόδων για την εξαγωγή βιοδραστικών από φαρμακευτικά βότανα και άλλες φαρμακευτικές πρώτες ύλες και η χρήση διάφορων επιλογών για την εκχύλισή τους καθιστά πολύ δύσκολη την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης και διαδικασίας προσδιορισμού της σύστασης σε δείγματα φυτών. Η ύπαρξη τέτοιων μεθόδων θα εξασφάλιζε ακόμη τον ποιοτικό έλεγχο των ακατέργαστων δειγμάτων, αλλά και των φαρμακευτικών προϊόντων τους, σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Προβλήματα επίσης υπάρχουν στην αναγνώριση των συστατικών λόγω της ποικιλίας τους και της ομοιότητας τους στις δομές και τις φυσικοχημικές ιδιότητες (Milevskaya et al., 2019).

Η εκχύλιση εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων της θερμοκρασίας, του χρόνου και του διαλύτη. Ο προσδιορισμός αυτών για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης είναι ακόμη πιο πολύπλοκος όταν αφορούν ένα πολυσύνθετο στόχο όπως είναι το βαλσαμόχορτο. Κάθε συνθήκη εκχύλισης ευνοεί την ύπαρξη διαφορετικών συστατικών στο μίγμα. Για παράδειγμα, υψηλή θερμοκρασία ευνοεί την απόδοση σε μάζα εκχυλίσματος αλλά οδηγεί σε αποσύνθεση της υπερικίνης (Liu et al., 2000).

Συγκεκριμένα για το βαλσαμόχορτο υπάρχουν ορισμένα προβλήματα στην εκχύλιση του, καθώς σε διάφορες αναφορές και Φαρμακοποιίες αναφέρονται διαφορετικές μέθοδοι. Βέβαια, η ίδια δυσκολία υπάρχει με την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μέσω διαφορετικών μεθόδων που δυσχεραίνουν τη σύγκριση των αποτελεσμάτων από διάφορα δείγματα (Avato and Guglielmi, 2004). Τα συστατικά του φυτού μπορεί να είναι ασταθή και να υποβαθμίζονται κατά την αποθήκευση ή την εκχύλιση υπό την επίδραση εξωτερικών παραγόντων, μειώνοντας την φαρμακολογική δράση του (Milevskaya et al., 2019). Για αυτό, η επίδραση όλων αυτών των παραγόντων πρέπει να ληφθεί υπόψη και να μελετηθεί με ακρίβεια για το σχεδιασμό της παραγωγικής διαδικασίας σε όλα τα στάδια.

Εύκολα συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει καθολική μέθοδος εκχύλισης ιδανική για κάθε φυτό. Η επιλογή των μεθόδων προετοιμασίας και εκχύλισης εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης, το δείγμα και τις ενώσεις στόχους (Azwanida, 2015).

#### *Χαρακτηριστικά του φυτού και προετοιμασία δείγματος*

Η έρευνα στα φαρμακευτικά φυτά ξεκινά πριν από το στάδιο της εκχύλισης, που είναι εξίσου κρίριο στην επεξεργασία των βιοδραστικών συστατικών με την ίδια την εκχύλιση (Azwanida, 2015). Τα ποσοτικά και ποιοτικά στοιχεία της σύνθεσης της πρώτης ύλης καθορίζουν την ποιότητα του φαρμακευτικού προϊόντος. Ο βióτοπος και οι κλιματολογικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται το φυτό επηρεάζουν τη σύσταση των βιοδραστικών του. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζουν και η φάση ανάπτυξης του φυτού κατά τη συγκομιδή, οι συνθήκες ξήρανσης και αποθήκευσης (Milevskaya et al., 2016). Συχνά εμφανίζονται

διαφορές μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων για λόγους όπως οι γενετικές μεταβολές, η προετοιμασία και η επεξεργασία του δείγματος και η έκθεση στον ήλιο (Greenson et al., 2001). Για παράδειγμα, σε μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στο φυτό, παρατηρήθηκε μείωση στην συγκέντρωση υπερικίνης για χαμηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης του (Zobayed et al., 2005).

Πρώτη ύλη μπορεί να αποτελέσει τόσο το άγριο φυτό όσο και αυτό που προέρχεται από καλλιέργεια, ωστόσο για το πρώτο υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με τις διαφορές στην ποιότητα της πρώτης ύλης, τις απώλειες στη βιοποικιλότητα και την πιθανότητα νοθείας και μόλυνσης όταν πρόκειται για εμπορική χρήση. Επίσης, έχει βρεθεί διαφορά στη φυτοχημική σύνθεση άγριων δειγμάτων του φυτού, χωρίς να έχει προσδιοριστεί αν αυτή οφείλεται αποκλειστικά σε παράγοντες περιβαλλοντικούς ή γενετικούς. Αντίθετα, από την καλλιέργεια *in vitro* είναι δυνατόν να γίνει παραλαβή των συστατικών-στόχων και έχουν αναφερθεί μέσα βελτιστοποίησης για την παραγωγή αυτών των βιοδραστικών συστατικών του φυτού (Kirakosyan et al., 2004). Μεγάλη προσοχή πρέπει επίσης να δίνεται στο είδος του φυτού. Άλλο βότανο της οικογένειας, το *Hypericum scabrum*, παρατηρήθηκε ότι δεν είχε παρόμοιες θεραπευτικές ιδιότητες (Suntar et al., 2010). Διαφορετικά είδη της οικογένειας *Hypericum* έχουν διαφορετική σύσταση, μεταβάλλοντας, αντίστοιχα, και τη θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα (Zeliou et al., 2020).

Σημαντικό, επίσης, ρόλο έχουν τόσο τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση, όσο και ο χρόνος που έγινε η συγκομιδή του και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σαν παράγοντες, ειδικά όταν ο στόχος είναι η ανάκτηση συγκεκριμένων συστατικών. Οι ναφθοδιανθρόνες εντοπίζονται στις μικρές σκουρόχρωμες κουκίδες του φυτού, ιδιαίτερα στα άνθη και τα μπουμπούκια (Routaud et al., 2001). Υπερφορίνη και αδυπερφορίνη εμφανίζονται αποκλειστικά στα αναπαραγωγικά μέρη του φυτού και η συγκέντρωσή τους αυξάνεται κατά την πρόοδο της ανθοφορίας. Κατά συνέπεια, φυτικό υλικό που συλλέγεται στο τέλος της περιόδου ανθοφορίας, θα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα σε φλορογλυκινόλες (Butterweck and Schmidt, 2007; Beerhues, 2006).

Το αρχικό στάδιο της προετοιμασίας του δείγματος αποσκοπεί στη διατήρηση των βιομορίων του φυτού πριν την εκχύλιση. Φύλλα, φλοιοί, ρίζες, φρούτα, λουλούδια και άλλα μέρη του φυτού μπορούν να οδηγηθούν προς εκχύλιση φρέσκου ή αποξηραμένου δείγματος. Μπορεί να μην υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ τους, όμως σίγουρα απαιτείται άμεση επεξεργασία των φρέσκων δειγμάτων, καθώς είναι πιο ευαίσθητα και έχουν την τάση να υποβαθμίζονται γρηγορότερα από τα αποξηραμένα δείγματα (Azwanida, 2015).

Η ξήρανση του δείγματος μπορεί να γίνει με αέρα, με μικροκύματα, σε φούρνο ή υπό κατάψυξη (λυοφιλοποίηση). Η ξήρανση με φυσικό αέρα προστατεύει τις θερμικά ασταθείς ενώσεις, καθώς δεν γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες, ωστόσο απαιτεί πολύ χρόνο (3 έως 12 μήνες ανάλογα με το δείγμα) και μπορεί να υποβάλει το δείγμα σε επιμόλυνση σε ασταθείς συνθήκες θερμοκρασίας. Η ξήρανση με μικροκύματα προκαλεί γρήγορη θέρμανση μειώνοντας τον χρόνο ξήρανσης, αλλά συχνά οδηγεί σε υποβάθμιση των συστατικών. Η χρήση φούρνου είναι ένας πολύ εύκολος και γρήγορος τρόπος απομάκρυνσης της υγρασίας, μολονότι παραμένει ακατάλληλος για ουσίες ευαίσθητες σε υψηλές θερμοκρασίες. Αντίθετα, στην ξήρανση με κατάψυξη, που βασίζεται στην αρχή της εξάχνωσης, διατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό φυτοχημικών (και ειδικά των φαινολικών

ενώσεων). Λόγω της πολυπλοκότητας και του κόστους όμως, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται μόνο σε θερμοευαίσθητα υλικά υψηλής αξίας (Azwanida, 2015).

Επιπρόσθετα, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αυξάνει την επιφάνεια επαφής με τον διαλύτη εκχύλισης. Παραδοσιακό γουδί, ηλεκτρικά μίξερ και μύλοι χρησιμοποιούνται συνήθως για την μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Η απλή άλεση οδηγεί σε μικρά αλλά χονδροειδή δείγματα, ενώ η κονιοποίηση σε πιο ομογενοποιημένα, που αποτελούνται από μικρότερα σωματίδια. Αυτή η προετοιμασία είναι σημαντική για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και ιδανικά ο διαλύτης θα πρέπει να έρχεται σε επαφή με σωματίδια μεγέθους μικρότερου από 0,5 mm για την επίτευξη υψηλής απόδοσης. Η διαφορά μεταξύ νανοσωματιδίων και μικροσωματιδίων μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης (Azwanida, 2015).

### Διαλύτης

Θεραπευτικά εκχυλίσματα συνηθίζεται να παρασκευάζονται με εκχύλιση του υπέργειου μέρους του φυτού με υδραλκοολικά μίγματα, κυρίως αιθανόλης/νερού ή μεθανόλης/νερού (Eggelkraut-Gottanka et al., 2002). Ωστόσο, όπως υποδηλώνουν οι πιο σύγχρονες αναφορές, αυτά τα μίγματα διαλυτών επιτυγχάνουν σε μεγαλύτερο βαθμό την ανάκτηση φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών. Σε μέτριας πολικότητας διαλύτες ανακτάται με αποτελεσματικότητα και η υπερικίνη. Αν το ενδιαφέρον όμως στρέφεται γύρω από τα λιγότερο πολικά συστατικά, όπως η υπερφορίνη, τότε πρέπει να χρησιμοποιηθούν αντίστοιχα διαλύτες με μικρή πολικότητα, όπως το εξάνιο, ο πετρελαϊκός αιθέρας, το χλωροφόρμιο, το μεθυλοχλωρίδιο ή ακόμα και το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Εξαιτίας όμως της αστάθειας της υπερφορίνης σε απρωτικούς διαλύτες, θα πρέπει, για παράδειγμα, μετά από εκχύλιση με εξάνιο να ακολουθήσει αντικατάσταση διαλύτη με μεθανόλη. Αναφορικά με τη χρήση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, πρόκειται για μία καλή λύση για μη πολικά συστατικά διότι δεν παρασύρει άλλες ανεπιθύμητες ενώσεις, δεν είναι τοξικό ούτε εκρηκτικό μέσο, βρίσκεται εύκολα και σε υψηλή καθαρότητα (food grade) και αφαιρείται εύκολα από το προϊόν χωρίς να αφήνει υπόλειμμα (Milevskaya et al., 2019; Cossuta et al., 2009; Gaid et al., 2016; Routaraud et al., 2001).

Γενικά, για τις φαινολικές ενώσεις η χρήση 70% υδατικού αλκοολικού μίγματος ως διαλύτη είναι αποδοτική. Κάθε διαλύτης έχει διαφορετική απόδοση ως προς κάποιο συστατικό ανάλογα με την πολικότητα του, αλλά η απόδοση ως ξηρό βάρος εκχυλίσματος είναι μεγαλύτερη για τους πιο πολικούς διαλύτες. Για την ανάκτηση όλων των κύριων κατηγοριών ενώσεων που υπάρχουν στο βαλσαμόχορτο μπορεί να γίνει ανάμιξη διαλυτών, ενώ κλασμάτωση και απομόνωση συστατικών μπορεί να επιτευχθεί με εκ νέου εκχύλιση υγρού-υγρού (Milevskaya et al., 2019; Cossuta et al., 2009; Gaid et al., 2016; Routaraud et al., 2001).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην εκχύλιση του βαλσαμόχορτου συχνά γίνεται μια προεργασία. Όπως προαναφέρθηκε, ουσίες με παρόμοια απορρόφηση με την υπερικίνη, όπως κάποιες φωτοσυνθετικές χρωστικές μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στον φασματομετρικό προσδιορισμό της. Συχνά μία εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα ή χλωροφόρμιο προηγείται της κύριας εκχύλισης για να απομακρυνθούν αυτές οι χρωστικές, όμως έτσι παρασύρονται και άλλα δραστικά συστατικά (Avato and Guglielmi, 2004; Cellarova et al., 1994).

Οι Avato και Guglielmi (2004) πραγματοποίησαν διαδοχική εκχύλιση Soxhlet με διαιθυλαιθέρα και αιθανόλη. Το τελικό εκχύλισμα είχε ανάκτηση επί ξηρού βάρους φυτού σε υπερικίνη 0,16 % από το οποίο μόλις το 0,01 % είχε ανακτηθεί από τη φάση του διαιθυλαιθέρα. Ως προς την υπερφορίνη, από τη διαδοχική εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα, τριχλωρομεθάνιο, οξικό αιθυλεστέρα και μεθανόλη επιβεβαιώνεται ότι ανακτάται σε μεγαλύτερο βαθμό από τους λιγότερο πολικούς διαλύτες. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα ανέκτησε 1,08 % επί ξηρού βάρους φυτού υπερφορίνη έναντι της μεθανόλης που ανέκτησε 0,56 %.

Σε άλλη έρευνα σχετικά με την ανάκτηση υπερικίνης και υπερφορίνης με διαφορετικούς διαλύτες με τη μέθοδο Soxhlet από τους Cossuta et al. (2009) χρησιμοποιήθηκε εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, ισοπροπανόλη και αιθανόλη. Μεταξύ των διαφορετικών διαλυτών το εξάνιο ήταν ο μόνος διαλύτης που δεν ανέκτησε την υπερικίνη. Στα εκχυλίσματα με ισοπροπανόλη και οξικό αιθυλεστέρα παρόλο που ανιχνεύεται υπερικίνη η ποσότητα της είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση του αιθανολικού εκχυλίσματος. Στην ίδια έρευνα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (θερμοκρασία 313 K και 45 MPa) και είχε ως αποτέλεσμα την εκχύλιση 38,43 g ολικών στερεών/kg ξηρού βάρους φυτού. Επιτεύχθηκε ανάκτηση 23,97 g υπερφορίνης/kg ξηρού βάρους φυτού, ενώ δεν ανιχνεύθηκε ποσότητα υπερικίνης στο εκχύλισμα.

Τέλος, σε μία προσπάθεια εύρεσης μιας πράσινης μεθόδου εκχύλισης για τις πολυφαινόλες, έχει γίνει δοκιμή διαλύτη μίγματος νερού/γλυκερόλης. Άλλοι διαλύτες (όπως η μεθανόλη), που δοκιμάζονται εργαστηριακά για να έχουν μεγάλη απόδοση εκχύλισης, ενέχουν και άλλους κινδύνους όπως τοξικότητα, ευφλεκτότητα ή υψηλό κόστος λόγω νομοθεσίας και για αυτό δεν είναι συμβατοί με μία πιθανή πράσινη βιομηχανική παραγωγή. Επίσης, η αφαίρεση τους από το εκχύλισμα συνεπάγεται αυστηρό έλεγχο ποιότητας, ανακύκλωση, προσεγμένο χειρισμό και αύξηση του κόστους όταν πρόκειται για τρόφιμα, καλλυντικά ή φαρμακευτικά σκευάσματα. Αντίθετα, με τη γλυκερόλη (μια φυσική, μη τοξική και φθηνή ουσία, που έχει την ιδιότητα να μεταβάλλει την πολικότητα του νερού) μπορεί να αυξηθεί η ανάκτηση σε πολυφαινόλες. Εν γένει, οι πολυφαινόλες μπορούν εύκολα να διαλυτοποιηθούν σε πολικά πρωτικά μέσα, όπως τα υδροαιθανολικά και πιθανώς τα υδρογλυκερολογικά, ενώ μπορούν να ληφθούν διαφορετικά κλάσματα μέσω τροποποίησης της πολικότητας του μέσου, με μεταβολή της συγκέντρωσης της αιθανόλης ή της γλυκερόλης αντίστοιχα. Παρά τις αναλογίες που δοκιμάστηκαν, το εκχύλισμα δεν περιείχε σημαντική ποσότητα υπερφορίνης, καθώς πρόκειται για λιγότερο πολική ένωση με μικρή διαλυτότητα στο νερό, ενώ ο διαλύτης γλυκερόλη/νερό δρα εκλεκτικά εκχυλίζοντας κυρίως πολικά φαινολικά (Karakashov et al., 2015).

### **Συνθήκες εκχύλισης**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το φως μετατρέπει την πρωτοϋπερικίνη και την πρωτοψευδοϋπερικίνη σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη, αντίστοιχα. Αυτή η μετατροπή μπορεί να ενισχυθεί με τη διεξαγωγή της εκχύλισης υπό φως (Cellarona et al., 1994) αλλά έχει επίδραση και σε άλλα συστατικά σαν την υπερφορίνη. Αυτή είναι ασταθής στο φως, τη θερμοκρασία και τον αέρα, ακόμη και αν βρίσκεται σε κάποιο διάλυμα, για αυτό ανακτάται σε μεγαλύτερο βαθμό σε χαμηλή θερμοκρασία (περιβάλλοντος), απουσία φωτός και υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Επίσης, ευαίσθητη στη θερμότητα είναι και η υπερικίνη. Από την



άλλη πλευρά, η ανάκτηση των φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων ευνοείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, όπως συμβαίνει στη μέθοδο Soxhlet (Avato and Guglielmi, 2004; Milevskaya et al., 2019; Cossuta et al., 2009; Gaid et al., 2016; Routaroud et al., 2001). Γενικότερα, σε δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης υπάρχουν τα εξής πλεονεκτήματα: μείωση της απαιτούμενης μάζας πρώτης ύλης, της κατανάλωσης διαλύτη και του χρόνου εκχύλισης (Milevskaya et al., 2016).

Σύμφωνα με τους Avato και Guglielmi (2004), συγκρίνοντας διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης με μεθανόλη (διαβροχή, Soxhlet, υπέρηχοι και εκχύλιση με θερμό διαλύτη) η ανάκτηση σε υπερικίνη ήταν μεγαλύτερη σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Με τη μέθοδο Soxhlet και την εκχύλιση με μεθανόλη σε υψηλή θερμοκρασία ανακτήθηκε εκχύλισμα με απόδοση 0,21 και 0,19 % επί ξηρού φυτού σε υπερικίνη, αντίστοιχα, ενώ για τις άλλες τεχνικές εκχύλισης η απόδοση κυμάνθηκε μεταξύ 0,11-0,12 %. Αντιθέτως, η τα εκχυλίσματα που προέκυψαν σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος είχαν περιείχαν μεγαλύτερη απόδοση υπερφορίνης (1,08 % έναντι 0,83 % από την εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet).

Ο χρόνος εκχύλισης είναι εξίσου σημαντικός με τους άλλους παράγοντες. Εξαρτάται από τη μέθοδο που έχει επιλεγεί, αλλά σε κάθε περίπτωση υπάρχει ένα βέλτιστο εύρος του ώστε να έχει πραγματοποιηθεί η μεταφορά των συστατικών στο διαλύτη αλλά να μην αρχίσουν να συμβαίνουν άλλα αρνητικά φαινόμενα, όπως η αποικοδόμηση τους (Liu et al., 2000).

Οι Aybastier et al. (2013) πραγματοποίησαν πειράματα εκχύλισης με υπερήχους (40 kHz) με μεθανόλη που περιέχει HCl σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (30 -70 °C), χρόνου εκχύλισης (20 – 80 min), αναλογίας μεθανόλης/νερού (20 – 80 %) και συγκέντρωσης HCl (0,8 – 2,0 M). Στόχος της έρευνας ήταν η αριστοποίηση της ανάκτησης της κερκετίνης. Στις βέλτιστες συνθήκες (θερμοκρασία 67 °C, χρόνος εκχύλισης 67 min, περιεκτικότητα μεθανόλης 77 % και συγκέντρωση HCl 1,2 M) επιτεύχθηκε ανάκτηση σε κερκετίνη  $11,09 \pm 0,40$  mg/g ξηρού βάρους φυτού. Το εκχύλισμα σε αυτές τις συνθήκες παρουσίασε επίσης την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (189,16 mg TE/g ξηρού βάρους φυτού) και τη μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολικών συστατικών (416,19 mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού).

**Πίνακας 2.** Μέθοδοι εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία για την εκχύλιση βαλσαμόχορτου καθώς και οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν

Μέθοδος εκχύλισης	Μέθοδος ποσοτικοποίησης	Πηγή
Ανάδευση με ακετόνη (100 mL) για 24 h	HPLC 590 nm υπερικίνη 278 nm υπερφορίνη	(Kirakosyan et al., 2004)
A) Soxhlet: με MeOH, 5 g δείγματος με 100 mL διαλύτη για 6 h (10 κύκλοι) ή με Et <sub>2</sub> O και EtOH για 4 και 6 h αντίστοιχα		
B) Υπέρηχοι: με πετρελαϊκό αιθέρα, CHCl <sub>3</sub> , EtOAc, MeOH, 1 g με 75 mL διαλύτη για 30 min	UV-HPLC Εύρος 200-700 nm Κορυφές σε 590 nm και 270 nm	(Avato and Guglielmi, 2004)
Γ) Διαβροχή: με MeOH, 1 g με 100 mL διαλύτη για 2 h υπό ανάδευση και με ακετόνη/νερό 90/10 με ανάδευση, 2 g με 300 mL διαλύτη για 30 min		
Δ) Χώνευση: με MeOH, 1 g με 100 mL		
Υπέρηχοι: με MeOH, 0,5 g με 30 mL σε ένα εύρος συνθηκών (T, pH) και 40 kHz	HPLC-DAD Folin-Ciocalteu	(Aybastier et al., 2013)
Soxhlet: με EtOH, 2-προπανόλη, EtOAc, εξάνιο, 20 g με 200 mL διαλύτη για 16 h	HPLC-UV	(Cossuta et al., 2009)
Με εξάνιο, πετρελαϊκό αιθέρα, μεθυλο-τερτ-βουτυλαιθέρα, χλωροφόρμιο, οξικός αιθυλεστέρα, ακετονιτρίλιο και αιθανόλη, 100 mg δείγματος με 3 mL διαλύτη υπό ανάδευση για 60 λεπτά στους 4 ° C	ESI-MS HPLC-DAD 272 nm υπερφορίνη 600 nm υπερικίνη	(Gaid et al., 2016)
Με μίγμα γλυκερόλη/νερό 10% w/v, 1 g δείγματος με 50 mL διαλύτη, υπό θέρμανση (50-70 °C) και ανάδευση	LC-DAD-MS	(Karakashov et al., 2015)

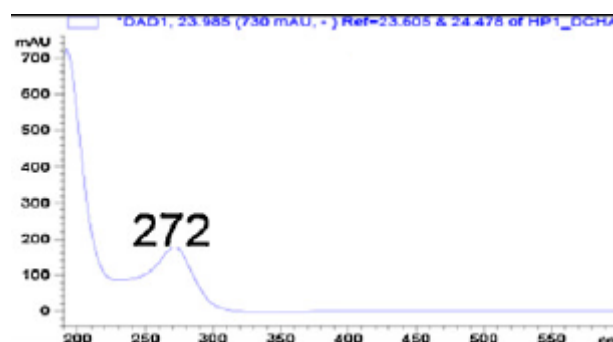
Με νερό, νερό/αιθανόλη 50/50, αιθανόλη, αιθανόλη/ακετόνη 50/50, ακετόνη, χλωροφόρμιο, εξάνιο, 2 g δείγματος με 50 mL διαλύτη, με θέρμανση σε σκιά (αλουμινόχαρτο) έπειτα άλλες 2 φορές με 20 mL ίδιου διαλύτη	HPLC-DAD 284 nm πλήθος στατικών 580 nm ναφθοδιανθρόνες	(Liu et al., 2000)
Με νερό/αιθανόλη (50/50 και 30/70) σε διαφορετικές θερμοκρασίες και πιέσεις με μικροκύματα και υπέρηχους, λόγος δείγματος/διαλύτη 1/100 και 1/50 g/mL	HPLC-DAD	(Milevskaya et al., 2016)
A) Υπέρηχοι: με MeOH, 5 g δείγματος με 100 mL διαλύτη B) Διαβροχή: με MeOH, 5 g δείγματος με 100 mL διαλύτη για 24 h Γ) Soxhlet: με MeOH, 5 g δείγματος με 150 mL διαλύτη για 24 h Δ) ASE: με MeOH, 5 g δείγματος με 120 mL διαλύτη, 40 °C, 100 bar, 4x 5 min	HPLC LC-MS	(Smelcerovic et al., 2006)
Υπέρηχοι: με MeOH, 300 mg δείγματος από εμπορικό προϊόν με 100 mL διαλύτη για 15 min	HPLC	(Eggelkraut- Gottanka et al., 2002)
Soxhlet: με MeOH, 1 g δείγματος με 100 mL διαλύτη για 6 h	HPLC-DAD-MS HPLC-UV	(Brolis et al., 1998)
Διαβροχή: με MeOH, 0,1-0,2 g δείγματος με 10-40 mL διαλύτη για 2 h υπό ανάδευση 300 rpm Ή 0,1-0,2 g με νερό/αιθανόλη 40/60 v/v για 1 h με θέρμανση (80 °C) ή για 5 min με υπέρηχους	HPLC 270 nm υπερφορίνη 590 nm υπερικίνη	(Poutaraud et al., 2001)
Διαβροχή με βραστό νερό, 3 g δείγματος σε 250 mL για 3 min	LC-DAD-MS GC-MS	(Kalogeropoulos et al., 2014)

### 1.3. Αναλυτικές τεχνικές- Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση συστατικών

#### 1.3.1. Ταυτοποίηση συστατικών

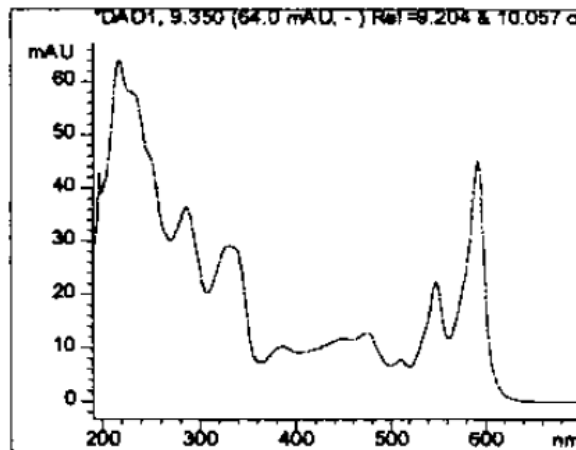
Φαινολικές ενώσεις ταυτοποιούνται έπειτα από διαχωρισμό με χρωματογραφία (TLC, χρωματογραφία στήλης, HPLC, GC), με την HPLC να παραμένει η πιο αποτελεσματική τεχνική. Ο συνδυασμός με άλλες τεχνικές αυξάνει την αξιοπιστία του προσδιορισμού και για αυτό το λόγο η υγρή χρωματογραφία συνδυάζεται συχνά με ανιχνευτές UV, IR, NMR ή MS για την ταυτοποίηση φαινολικών σε δείγματα όπως το βαλσαμόχορτο. Ωστόσο, προκύπτουν κάποια προβλήματα που αφορούν τις ναφθοδιανθρόνες, καθώς εμφανίζουν μια ειδική συγγένεια με στατικές φάσεις που έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά. Ειδική φάση (monolithic octadecyl phase) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του προβλήματος και ευκολότερο διαχωρισμό των συστατικών. Αυτή επιτρέπει την αύξηση της ταχύτητας της κινητής φάσης και μείωση, αντίστοιχα, του χρόνου έκλουσης των αναλυτών (Milevskaya et al., 2019).

Συγκεκριμένα στο βαλσαμόχορτο με την μέθοδο HPLC μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση της υπερφορίνης σε συγκεντρώσεις 0,5 µg/mL, με όριο ανίχνευσης 0,02 µg/mL (Barnes et al., 2007). Η ταυτοποίηση της γίνεται με το χαρακτηριστικό μέγιστο που δίνει το φάσμα της στα 272 nm (Εικόνα 10) (Gaid et al., 2016).



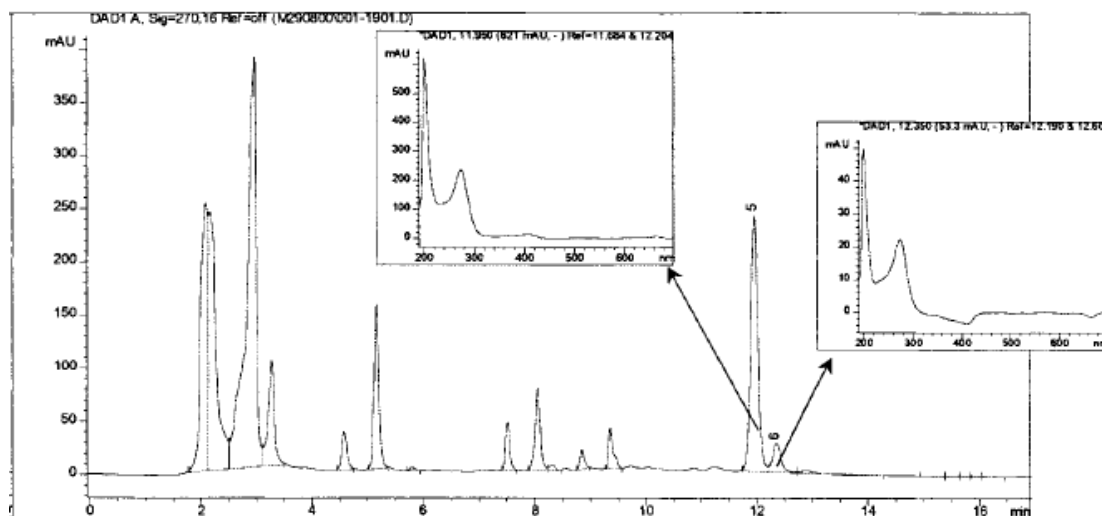
Εικόνα 10. Χαρακτηριστικό φάσμα ταυτοποίησης της υπερφορίνης

Σχετικά με την υπερικίνη, αυτή δίνει κόκκινο χρώμα στους οργανικούς διαλύτες ώστε να δίνει χαρακτηριστικό μέγιστο στα 590 nm (Εικόνα 11), κάτι που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της εκχυλιζόμενης υπερικίνης με μέτρηση της απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος (Avato and Guglielmi, 2004). Με την μέθοδο HPLC μπορεί να γίνει ποσοτικοποίησή της σε συγκεντρώσεις 2 µg/mL με όριο ανίχνευσης 0,1 µg/mL (Barnes et al., 2007; Evans et al., 2009). Ένα από τα προβλήματα στο φασματομετρικό προσδιορισμό της είναι η πιθανή παρεμβολή από άλλες ουσίες με παρόμοια απορρόφηση, όπως κάποιες φωτοσυνθετικές χρωστικές. Τα φάσματα αυτών φαίνεται να εμφανίζουν μια κορυφή περίπου στα 660 nm που οφείλεται σε χρωστικές χλωροφύλλης.



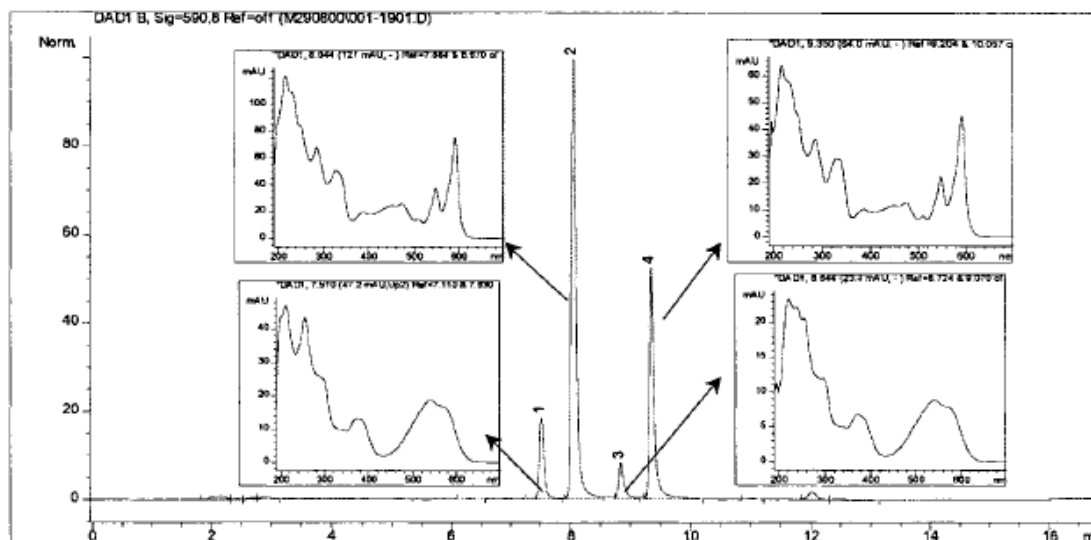
**Εικόνα 11.** Χαρακτηριστικό φάσμα ταυτοποίησης της υπερικίνης

Τα χρωματογράφημα για την ανίχνευση των παραπάνω ενώσεων υποδεικνύουν την ύπαρξη διάφορων παραγώγων τους στο φυτό. Ειδικότερα, στην ανίχνευση της υπερφορίνης παρατηρείται και άλλη μία κορυφή με παρόμοιο φάσμα UV που αντιστοιχεί στην αδυπερφορίνη (Εικόνα 12), με την υπερφορίνη να εκλούεται πριν την αδυπερφορίνη (Brolis et al., 1998; Eggelkraut-Gottanka et al., 2002; Poutaraud et al., 2001).



**Εικόνα 12.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος βαλσαμόχορτου από τη βιβλιογραφία σε μήκος κύματος 272 nm, στο οποίο εμφανίζεται η αδυπερφορίνη (6) να εκλούεται μετά την υπερφορίνη (5)

Ως προς την ανίχνευση υπερικίνης, το παράγωγο που εμφανίζεται πιο συχνά είναι η ψευδοϋπερικίνη και εκλούεται πριν από την υπερικίνη (Εικόνα 13) (Brolis et al., 1998; Eggelkraut-Gottanka et al., 2002; Poutaraud et al., 2001). Και στις δύο περιπτώσεις, η εμφάνιση των παραγώγων και ο βαθμός της εξαρτάται από πολλούς παράγοντες σχετικά με τις συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας τόσο του φυτού, όσο και των εκχυλισμάτων. Η ακριβής ταυτοποίηση και ο διαχωρισμός μεταξύ των παραγώγων των ουσιών δεν είναι εύκολος με οποιαδήποτε διάταξη χρωματογραφικής ανάλυσης. Για το λόγο αυτό, οι δύο ομάδες ενώσεων ταυτοποιούνται ως υπερφορινοειδή και υπερικινοειδή, αντίστοιχα.



**Εικόνα 13.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος βαλσαμόχορτου από τη βιβλιογραφία σε μήκος κύματος 590 nm, στο οποίο εμφανίζεται να εκλύονται με τη σειρά οι ενώσεις: πρωτοψευδοϋπερικίνη (1), ψευδοϋπερικίνη (2), πρωτοϋπερικίνη (3) και υπερικίνη (4)

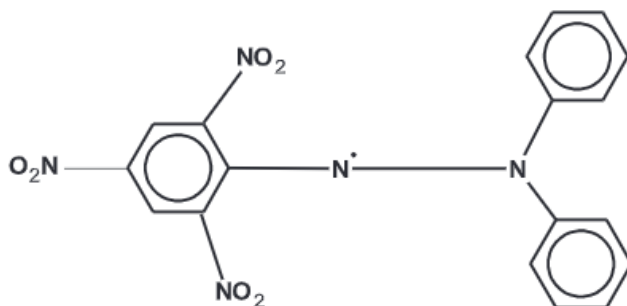
### 1.3.2. Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin – Ciocalteu (FC) είναι μία φωτομετρική τεχνική που εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε φυσικά προϊόντα και βασίζεται στην αναγωγική δράση παρουσία πολυφαινολικών ομάδων. Αναπτύχθηκε το 1927 από τους Otto Folin και Vintila Ciocalteu. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη και διεθνώς αποδεκτή αφού επιτρέπει την εκτίμηση του συνόλου των πολυφαινολικών συστατικών ενός φυσικού προϊόντος. Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδενικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Το χρώμα του είναι κίτρινο και αν παρατηρηθεί ότι έχει αλλάξει σε πράσινο απορρίπτεται. Σε αλκαλικό περιβάλλον, τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξένων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου βολφραμίου (Mo-W) με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που απορροφά στο ορατό (765 nm). Η ένταση της απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών. Η αλλαγή χρώματος είναι αργή και η διαδικασία μπορεί να επιταχυνθεί με την θέρμανση των δειγμάτων. Το αντιδραστήριο FC είναι εμπορικά διαθέσιμο αλλά μπορεί να παρασκευαστεί και στο εργαστήριο. Τα διαλύματα που προκύπτουν κατά την ανάλυση θεωρούνται επικίνδυνα απόβλητα και από τη μέθοδο, όπως αυτή προτάθηκε αρχικά, παράγεται μεγάλος όγκος αυτών. Η εξέλιξη της φωτομετρίας έχει μειώσει τον όγκο που απαιτείται για ανάλυση στο μέγεθος μιας κυψελίδας, μειώνοντας τα απόβλητα και το κόστος του αντιδραστηρίου. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  που δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης αφενός, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων. Γενικά, οι φαινόλες

που καθορίζονται από τον δείκτη FC εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος με την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς. (Waterhouse, 2002; Everette et al., 2010)

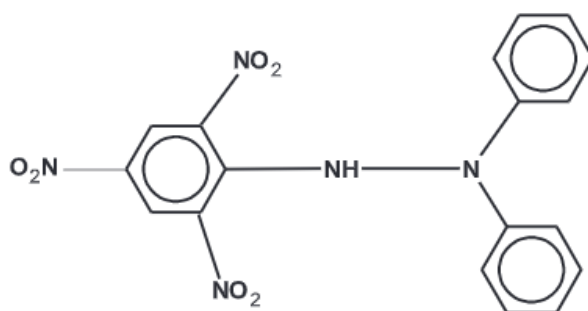
### 1.3.3. Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος DPPH, αναπτύχθηκε από τον Blois το 1958 και βασίζεται στην ιδιότητα του DPPH (Εικόνα 14) ως μια πολύ σταθερή ρίζα που δεν διμερίζεται καθώς το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του διασπείρεται σε όλο το μήκος του μορίου.



Εικόνα 14. Δομή της ελεύθερης ρίζας DPPH

Το αντιοξειδωτικό δίνει ένα άτομο υδρογόνου στην ελεύθερη ρίζα με αποτέλεσμα αυτή να αναχθεί (Εικόνα 15). (Kedare and Singh, 2011; Kandi and Charles, 2019).

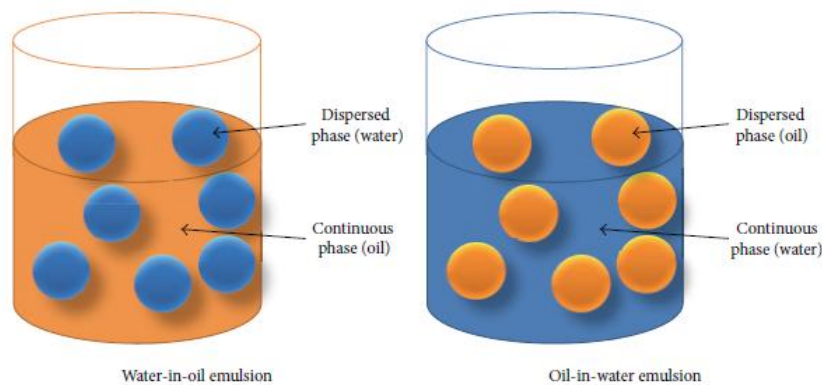


Εικόνα 15. Ανηγμένη μορφή του μορίου DPPH

Το DPPH (2,2, διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο) είναι μία οργανική ελεύθερη ρίζα που χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και έχει χαρακτηριστική απορρόφηση στα 515-528 nm. Χάνει την ικανότητα απορρόφησης σε αυτό το εύρος όταν δέχεται ένα πρωτόνιο ή κάποια ελεύθερη ρίζα, με αποτέλεσμα να αποχρωματίζεται από μωβ σε κίτρινο. Χαμηλότερη απορρόφηση υποδεικνύει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Είναι αρκετά ευαίσθητη ρίζα ώστε να ανιχνεύει τα συστατικά με δυνατότητα διάσπασης ελευθέρων ριζών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Η μέθοδος είναι ικανή να εξετάζει πολλά είδη δειγμάτων και σε μικρό χρόνο, για αυτό και χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση δράσεων διάσπασης ελευθέρων ριζών σε χυμούς ή εκχυλίσματα φρούτων και λαχανικών (Zou et al., 2004; Orcic et al., 2011).

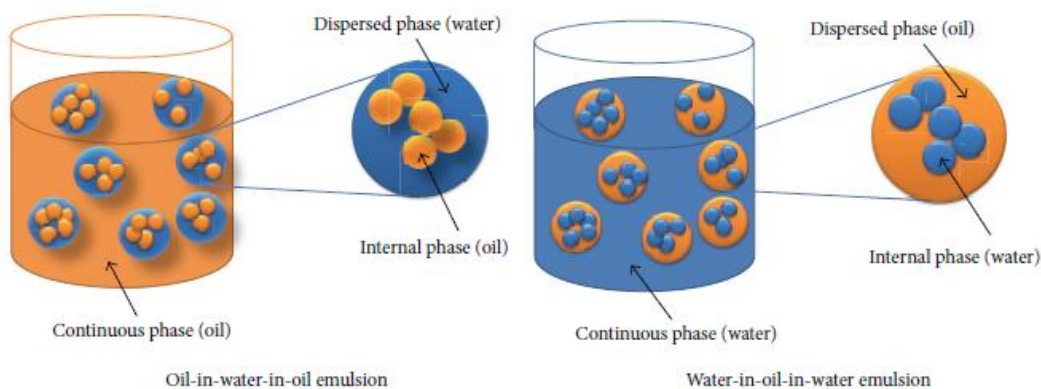
## 1.4. Γαλακτώματα

Τα γαλακτώματα είναι διεσπαρμένα συστήματα, συνήθως δύο μη αναμίξιμων υγρών. Το υγρό που υπάρχει σε περίσσεια καλείται εξωτερική ή συνεχής φάση, ενώ το υγρό που είναι διεσπαρμένο στη συνεχή φάση υπό μορφή μικρών σταγονιδίων καλείται εσωτερική ή διεσπαρμένη φάση. Όταν η εξωτερική φάση αποτελείται από νερό και η εσωτερική από λάδι, τότε θεωρείται ως γαλάκτωμα λάδι-σε-νερό (oil-in-water, o/w) και χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το γάλα και η μαγιονέζα. Όταν είναι αντίστροφη η κατάσταση, δηλαδή το νερό είναι διεσπαρμένο μέσα στο λάδι, τότε το γαλάκτωμα είναι τύπου νερό-σε-λάδι με χαρακτηριστικό παράδειγμα το βούτυρο (Belitz et al., 2018).



**Εικόνα 16.** Αναπαράσταση γαλακτωμάτων νερό-σε-λάδι και λάδι-σε-νερό

Επιπλέον, είναι δυνατή η παρασκευή πολλαπλών γαλακτωμάτων (ή αλλιώς γαλακτωμάτων πολλαπλών φάσεων), όπως γαλακτώματα ελαίου-σε-νερό-σε-έλαιο (oil-in-water-in-oil, o/w/o) ή νερού-σε-έλαιο-σε-νερό (water-in-oil-in-water, w/o/w). Για παράδειγμα, τα w/o/w γαλακτώματα περιέχουν σταγονίδια νερού διεσπαρμένα σε μεγαλύτερα σταγονίδια λιπαρής φάσης, τα οποία με τη σειρά τους είναι διεσπαρμένα σε συνεχή υδατική φάση. Τα πολλαπλά γαλακτώματα έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των απλών γαλακτωμάτων, καθώς μπορούν να ελέγξουν την αποδέσμευση ορισμένων συστατικών, να μειώσουν το συνολικό περιεχόμενο σε λιπαρά στα τρόφιμα (υπό τη μορφή γαλακτωμάτων), αλλά και να απομονώσουν ένα συστατικό από ένα άλλο και να παρεμποδίσουν τη φυσική τους αλληλεπίδραση (McClements, 2016).



**Εικόνα 17.** Αναπαράσταση πολλαπλών γαλακτωμάτων ελαίου-σε-νερό-σε-έλαιο και νερού-σε-έλαιο-σε-νερό



Η εμφάνιση ενός γαλακτώματος εξαρτάται από τη διάμετρο της σταγόνας. Εάν η διάμετρος είναι μεταξύ 0,15 και 100  $\mu\text{m}$  (γαλακτώματα και νανογαλακτώματα), τότε το γαλακτώμα έχει εμφάνιση θολή-γαλακτώδη. Σε αντίθεση, τα μικρογαλακτώματα (διάμετρος 0,0015-0,15  $\mu\text{m}$ ) είναι διαφανή και σημαντικά πιο σταθερά γιατί ο ρυθμός κατακάθισης εξαρτάται από την διάμετρο των σταγόνων.

Τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα. Η σταθερότητα του γαλακτώματος περιγράφει την ικανότητα του γαλακτώματος να αντιστέκεται στις αλλαγές των ιδιοτήτων του με την πάροδο του χρόνου. Τα γαλακτώματα παρασκευάζονται και σταθεροποιούνται με τη βοήθεια κατάλληλου τασενεργού παράγοντα που συνήθως ονομάζεται γαλακτωματοποιητής. Η δραστηριότητα του γαλακτωματοποιητή βασίζεται στη μοριακή του δομή. Υπάρχει ένα λιπόφιλο ή υδρόφοβο τμήμα με καλή διαλυτότητα σε μη υδατική φάση, όπως το λίπος ή το λάδι, και ένα πολικό ή υδρόφιλο τμήμα, που είναι διαλυτό στο νερό. Το υδρόφοβο τμήμα του μορίου είναι συνήθως μια αλκυλική ομάδα με μακριά αλυσίδα, ενώ το υδρόφιλο τμήμα αποτελείται από μια ομάδα που δίστανται ή από ένα αριθμό υδρόξυλο- ή πολυγλυκολοαιθερικών ομάδων.

Σε ένα μη αναμίξιμο σύστημα ο γαλακτωματοποιητής εντοπίζεται στη διεπιφάνεια όπου και μειώνει την επιφανειακή τάση. Επομένως, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις επιτρέπει μια ομοιόμορφη κατανομή της μιας φάσης μέσα στην άλλη. Επίσης, ο γαλακτωματοποιητής αποτρέπει τη συσσωμάτωση των σταγονιδίων που έχουν σχηματιστεί, αποτρέπει δηλαδή τη συνένωση τους σε μία μεγάλη σταγόνα.

Η διάσπαση του γαλακτώματος μπορεί να οφείλεται είτε σε φυσικές (αλλαγές στη σχετική θέση των συστατικών του), είτε σε χημικές μεταβολές (αλλαγές στη χημική σύσταση των συστατικών του). Η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει αρνητικά τη σταθερότητα του γαλακτώματος και μπορεί να εφαρμοστεί όταν είναι επιθυμητή η καταστροφή του. Σε τέτοια περίπτωση, πέρα από την αυξημένη θερμοκρασία χρησιμοποιείται και ανάδευση, ανακίνηση ή πίεση (μηχανική καταστροφή των διεπιφανειακών υμενίων). Άλλοι τρόποι για την καταστροφή της σταθερότητας ενός γαλακτώματος είναι η προσθήκη ιόντων τα οποία προκαλούν κατάρρευση της διπλής ηλεκτροστατικής στοιβάδας ή υδρόλυση προς καταστροφή του γαλακτωματοποιητή (Belitz et al., 2018).

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1. Σχεδιασμός πειραμάτων

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων εκχύλισης στην ανάκτηση των φαινολικών συστατικών του βαλσαμόχορτου ώστε να βελτιστοποιηθεί η απόδοση σε αυτά τα συστατικά. Επιπλέον διερευνήθηκε η δυνατότητα διαχωρισμού της υπερφορίνης από την υπερικίνη μέσω διαδοχικών εκχυλίσεων. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται διαλύτες διαφορετικής πολικότητας και αναμένεται η υπερφορίνη, ως άπολη, να ανακτηθεί από τους πιο άπολους διαλύτες και αντίστοιχα η υπερικίνη, ως πολική, από τους πιο πολικούς. Η επίτευξη αυτού του διαχωρισμού είναι χρήσιμη και επιθυμητή από τη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών γιατί προϊόντα βαλσαμόχορτου προκαλούν φωτοευαισθησία λόγω της ύπαρξης υπερικίνης, επομένως η παρασκευή εκχυλίσματος απουσία υπερικίνης είναι επιθυμητή.

Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου χρησιμοποιήθηκε βαλσαμόχορτο αποξηραμένο και αλεσμένο. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου, που αποτελείται από σταθερή κλίνη υλικού και διαβίβαση του διαλύτη δια μέσου της κλίνης, καθώς είναι μια πολύ εύχρηστη τεχνική που, σύμφωνα με παλαιότερες εργασίες (Γούσιας 2017), έχει παρόμοιες αποδόσεις με την εκχύλιση σε αντιδραστήρα πλήρους ανάδευσης αλλά απαιτεί μικρότερες ποσότητες διαλύτη. Η μάζα φυτού σε κάθε εκχύλιση ήταν σταθερή (20 g) και η ροή επιλέχθηκε 3,3 mL/min, γιατί για περεταίρω αύξηση της ροής παρατηρήθηκε ότι η αντλία που χρησιμοποιήθηκε δημιουργεί διακυμάνσεις στη ροή και δυσχεραίνει διαδικασίες όπως η δειγματοληψία.

Οι παράμετροι της εκχύλισης που εξετάστηκαν ήταν το είδος του διαλύτη και η αναλογία μίγματος σε σύστημα διαλυτών αιθανόλης/νερού. Η επιλογή της βέλτιστης συνθήκης σε κάθε πείραμα έγινε με βάση την απόδοση σε ολικά φαινολικά συστατικά, σε ολικά αντιοξειδωτικά συστατικά και στις συγκεντρώσεις υπερικίνης και υπερφορίνης.

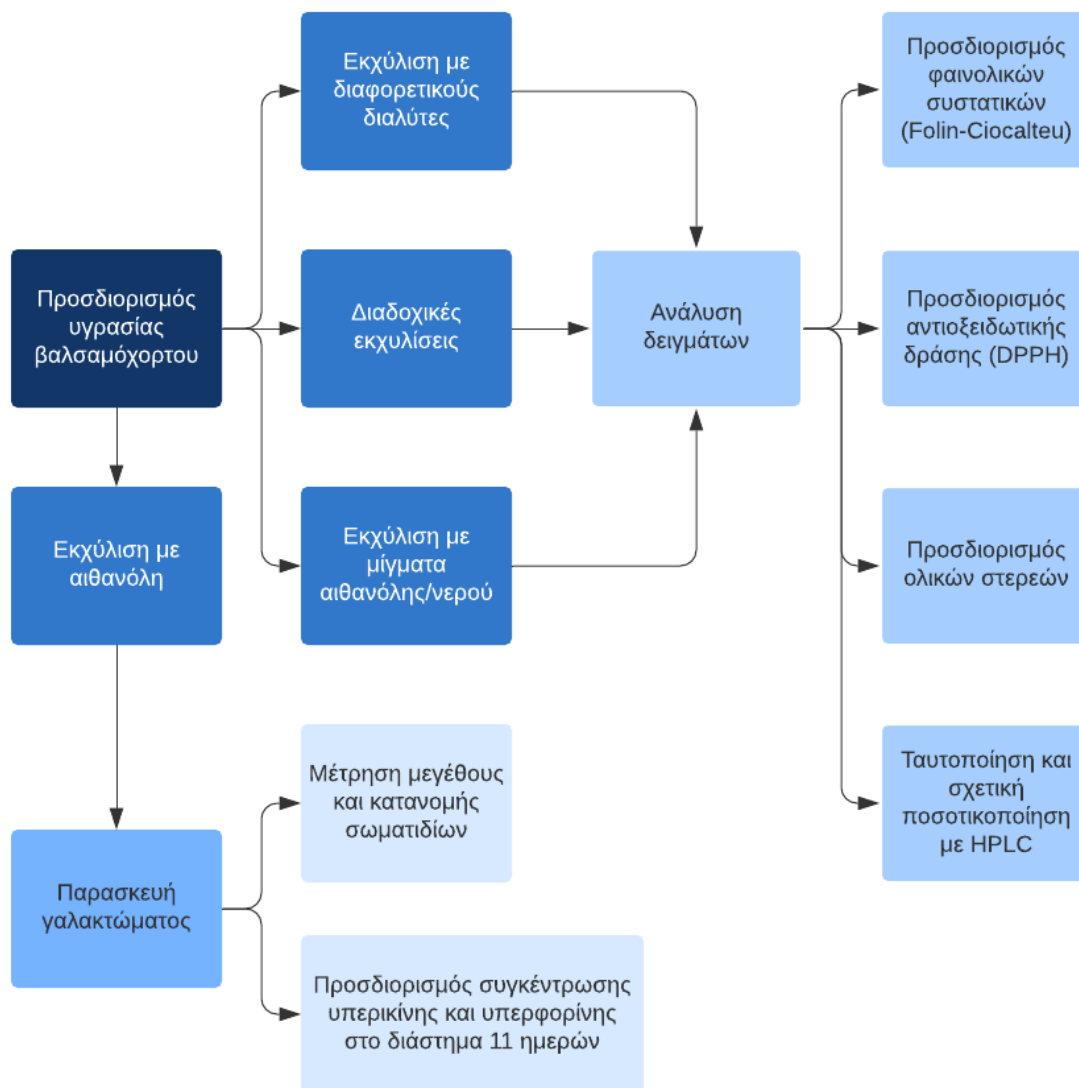
Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για την ανάκτηση των ολικών φαινολικών συστατικών, χρησιμοποιώντας διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη, αιθανόλη και νερό). Παράλληλα μελετήθηκε η εκλεκτικότητα με βάση ανάκτηση δύο σημαντικών συστατικών του βαλσαμόχορτου, της υπερικίνης και της υπερφορίνης, που έχουν διαφορετική πολικότητα. Επίσης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις νερού και ακετόνης, στο ίδιο δείγμα, και έπειτα το αντίστροφο. Η μελέτη αυτή επεκτάθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτες διαδοχικά το εξάνιο, τον οξικό αιθυλεστέρα, την αιθανόλη και το νερό στην ίδια εκχύλιση. Κάθε εκχύλισμα εξετάστηκε ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα, την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, υπερικίνη και υπερφορίνη.

Έπειτα, ακολούθησε μια νέα σειρά πειραμάτων στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μίγματα διαλυτών αιθανόλης/νερού, ώστε να προσδιορισθεί το βέλτιστο για την ποσοτική ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων. Σε αυτή τη μελέτη έγινε παρακολούθηση της εκχύλισης σε συνάρτηση με το χρόνο, λαμβάνοντας δείγμα εκχυλίσματος ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στόχος της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας είναι η κινητική μελέτη για την πρόβλεψη

των συνθηκών ποσοτικής παραλαβής των φαινολικών συστατικών με αντιοξειδωτική δράση.

Τέλος, αιθανολικό εκχύλισμα βαλσαμόχορτου χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία γαλακτώματος και μελετήθηκε η διατηρησιμότητα της υπερικίνης και της υπερφορίνης στο γαλάκτωμα σε συγκεκριμένη θερμοκρασία.

Το διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας δίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1.** Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, καθώς επίσης έγινε διπλή επανάληψη και για τις αναλύσεις υγρασίας, ολικών φαινολικών ενώσεων, αντιοξειδωτικής ικανότητας, στερεού υπολείμματος και ταυτοποίησης με χρήση HPLC.

## 2.2. Πρώτες ύλες – Αντιδραστήρια – Συσκευές

### 2.2.1. Πρώτες ύλες

Το βαλσαμόχορτο που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία καλλιεργήθηκε στο Πήλιο από την εταιρεία "ChironKentauros Greek Organic Herbs". Η συγκομιδή έγινε τον Αύγουστο του 2019 και για το δείγμα χρησιμοποιήθηκε μάζα φυτού που προέρχεται από άνθη και φύλλα. Το δείγμα ήταν αποξηραμένο και αλεσμένο, χωρίς να πραγματοποιηθεί επιπλέον άλεση καθώς η πούδρα είχε ήδη ικανοποιητική κοκομετρία.



Εικόνα 18. Αποξηραμένο και αλεσμένο δείγμα βαλσαμόχορτου

### 2.2.2. Αντιδραστήρια

Για την πειραματική διαδικασία και τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε πλήθος αντιδραστηρίων. Συγκεκριμένα για τις εκχυλίσεις του βαλσαμόχορτου χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες εξάνιο (CARLO ERBA Reagents S.A.S.), οξικός αιθυλεστέρας (Fisher Chemical UK), ακετόνη (BIOΡΥΛ Α.Ε.) αιθανόλη (BIOΡΥΛ Α.Ε.) και απιονισμένο νερό. Για την καμπύλη αναφοράς των φαινολών χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ (98 % w/w, Aros Organics, Fair Lawn, New Jersey) και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu (CARLO ERBA Reagents S.A.S.) και ανθρακικό νάτριο (Mallinckrodt, St.Louis, Missouri). Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη ρίζα 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany) και μεθανόλη (Fisher Chemical, Leicestershire, UK). Επίσης, για διαλυτοποίηση δυσδιάλυτων ουσιών, αραιώση ή αλλαγή διαλύτη σε περιπτώσεις που χρειαζόταν χρησιμοποιήθηκε ισοπροπανόλη (Fisher Chemical, Leicestershire, UK). Επιπλέον, για την ανάλυση των εκχυλισμάτων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες έκλουσης νερό, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και 1-βουτανόλη (HPLC grade, Fisher Chemical, Leicestershire, UK) και τριφθοροαιθανικό οξύ (TFA) (HPLC grade, Fisher Chemical, Leicestershire, UK). Τέλος, στην παρασκευή του γαλακτώματος χρησιμοποιήθηκε καπρυλικό τριγλυκερίδιο (medium chain triglyceride, Cosmochem), span 60 (Fisher Scientific) και Tween 80 (Fisher Scientific).

### 2.2.3. Όργανα - Συσκευές

Η πειραματική διάταξη της εκχύλισης αποτελείται από έναν ανοξείδωτο κυλινδρικό εκχυλιστήρα σταθερής κλίσης, εσωτερικής διαμέτρου 3 cm και ύψους 9 cm, και από μία περισταλτική αντλία (Millipore, Massachusetts) για τον καθορισμό της ροής του διαλύτη. Η έξοδος του αντιδραστήρα καταλήγει σε ογκομετρικό κύλινδρο, όπου συλλέγεται το τελικό εκχύλισμα.



**Εικόνα 19.** Πειραματική διάταξη εκχύλισης

Οι αναλύσεις των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια υγρού χρωματογράφου υψηλής απόδοσης (HPLC) που αποτελείται από αντλία βαθμωτής έκλουσης HP1100, ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων (Diode Array Detector, DAD, Hewlett – Packard, Germany) και στήλη ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5  $\mu$ m, 250x4,6 mm, Agilent, USA).



**Εικόνα 20.** Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH έλαβαν χώρα φωτομετρήσεις σε φωτόμετρο μονής δέσμης Hitachi U-2900. Ακόμη, για την εφαρμογή των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέτες 200 και 1000  $\mu\text{L}$ , σιφώνια μετρήσεως 10 mL και γυάλινη κυψελίδα.



**Εικόνα 21.** Φωτόμετρο μονής δέσμης Hitachi U-2900

Ο προσδιορισμός του στερεού υπολείμματος έγινε με χρήση φούρνου (Binder, Germany), ενώ όλες οι ζυγίσεις κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (XT 220A, Precisa).



**Εικόνα 22.** Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Τέλος, για τη δημιουργία του γαλακτώματος χρησιμοποιήθηκε διάταξη κάθετου ψυκτήρα, εστία θέρμανσης με μαγνητικό αναδευτήρα, θερμόμετρο και Rotary Evaporator της εταιρείας Heidolph.



**Εικόνα 23.** Πειραματική διάταξη για την παρασκευή του γαλακτώματος



**Εικόνα 24.** Rotary Evaporator (Heidolph)

Ενώ οι μετρήσεις για το μέγεθος των σωματιδίων του γαλακτώματος έγιναν με τη χρήση του οργάνου Malvern Mastersizer (Malvern Panalytical) με φακό 300RF που έχει εύρος 0,05 έως 880  $\mu\text{m}$ .



**Εικόνα 25.** Συσσκευή Malvern Mastersizer για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων του γαλακτώματος



## 2.3. Πειραματική διαδικασία

### 2.3.1. Εκχύλιση

Για την εκχύλιση στον κυλινδρικό εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου σταθερής κλίνης αρχικά τοποθετείται βαμβάκι στην είσοδο (κάτω μέρος) της κλίνης, ώστε να μην εισέρχεται δείγμα στους πλαστικούς σωλήνες που διαβιβάζουν τον διαλύτη στον εκχυλιστήρα. Ακολούθως, τοποθετούνται στην κλίνη 20 g από το αλεσμένο δείγμα και νέα ποσότητα από βαμβάκι για να αποκλείει, αντίστοιχα με την προηγούμενη περίπτωση, την έξοδο του δείγματος από τον πλαστικό σωλήνα στον οποίο ρέει το εκχύλισμα προς τον ογκομετρικό κύλινδρο. Πριν το κλείσιμο του εκχυλιστήρα τοποθετείται πλαστικός δακτύλιος που εξασφαλίζει την καλή στεγανοποίηση. Ρυθμίζεται η ροή και η περισταλτική αντλία τίθεται σε λειτουργία. Ο διαλύτης έχει ρυθμιστεί να ρέει από κάτω προς τα πάνω για να επιτυγχάνεται ομοιόμορφη διαβροχή του υλικού. Σημειώνεται ότι η αντλία παρουσιάζει κάποια αστάθεια στη ροή, για αυτό το λόγο η ροή παρακολουθείται και διορθώνεται, όταν αυτό χρειάζεται, με βάση τον όγκο εκχυλίσματος που συλλέγεται στον ογκομετρικό κύλινδρο ανά μονάδα χρόνου. Κατά τη διάρκεια του πειράματος ελέγχεται συχνά ότι δεν υπάρχουν διαρροές και ότι δεν έχουν δημιουργηθεί φυσαλίδες στους αγωγούς της διάταξης.

Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Επιπροσθέτως 1,5 mL δείγματος συλλέγεται σε περιέκτες erpendorf από την έξοδο του εκχυλιστήρα τις χρονικές στιγμές 5 ,10 ,15, 20, 30, 40, 50, 60 min.

Τα δείγματα οδηγούνται, έπειτα, προς ανάλυση και αποθηκεύονται στο ψυγείο (ή στην κατάψυξη για την περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος). Σημειώνεται, ότι για την εκχύλιση με διαλύτη το εξάνιο 15 mL δείγματος εισάγονται για εξάτμιση του διαλύτη σε Rotary Evaporator και επαναδιαλυτοποιούνται σε ίδιο όγκο ισοπροπανόλης.

### 2.3.2. Προσδιορισμός υγρασίας βαλσαμόχορτου

Σε προζυγισμένα φιαλίδια ζύγισης τοποθετούνται 5 g βαλσαμόχορτου και έπειτα αυτά τοποθετούνται σε φούρνο στους 100 °C για 24 h. Ακολουθεί νέα ζύγιση των δειγμάτων και η υγρασία υπολογίζεται από τη διαφορά μάζας προς την αρχική μάζα του δείγματος. Η υγρασία που προέκυψε ήταν  $9,73 \pm 0,20$  % w/w.

**Πίνακας 3.** Μετρήσεις για τον προσδιορισμό της υγρασίας του βαλσαμόχορτου

Κάψα και Δείγμα (g)	Δείγμα (g)	Απόβαρο (g)	Υγρασία % w/w
49,2078	5,0889	48,7200	9,59
48,2205	4,9650	47,7304	9,87

### 2.3.3. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση συστατικών με HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Η ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων και των γαλακτωμάτων έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα δείγματα ενσωματώθηκαν σε μία στήλη ανάστροφης φάσης ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 μm, 250x4,6 mm, Agilent, USA). Η μέθοδος αφορά τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών (Tsimogiannis et al., 2007) αλλά, λόγω απουσίας εξωτερικού προτύπου, η ποσοτικοποίηση της υπερικίνης και της υπερφορίνης είναι σχετική. Η ροή του διαλύτη έκλουσης στη στήλη ορίσθηκε 1 mL/min και η συνολική διάρκεια της ανάλυσης ήταν 70 min. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν το νερό (HPLC grade, 0,2 % TFA) (Διαλύτης Α), η μεθανόλη (HPLC grade, 0,2 % TFA) (Διαλύτης Β) και το ακετονιτρίλιο (HPLC grade, 0,2 % TFA) (Διαλύτης C). Η αρχική σύνθεση της κινητής φάσης ήταν 90 % Α, 6 % Β και 4 % C και άλλαζε με γραμμική κλίση όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4). Η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα 272 και στα 590 nm. Η μέθοδος αυτή θα αναφέρεται ως “flav hypericum”.

**Πίνακας 4.** Μεταβολή σύστασης διαλυτών με γραμμική κλίση σε συνάρτηση με το χρόνο ανάλυσης για τη μέθοδο “flav hypericum”

Χρόνος (min)	% Σύσταση Διαλύτη Α	% Σύσταση Διαλύτη Β	% Σύσταση Διαλύτη C
0	90	6	4
5	85	9	6
30	71	17,4	11,6
60	0	85	15
70	0	85	15

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, ανάλογα με την πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε. Η δεύτερη μέθοδος, η “flav hypericum - non polar”, χρησιμοποιήθηκε για τα εκχυλίσματα με μη πολικούς διαλύτες και για την ανάλυση των γαλακτωμάτων. Πρόκειται για μια παραλλαγή της πρώτης, με σκοπό να μην κατακρατούνται στη στήλη μη πολικές ενώσεις και έλαια. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται ένας επιπλέον διαλύτης, η 1-βουτανόλη (HPLC grade) (Διαλύτης D), για την πλύση της στήλης. Αντίστοιχα με την προηγούμενη μέθοδο, η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 mL/min σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης εκτός από το διάστημα 65 έως 75 min, στο οποίο η ροή ήταν 0,7 mL/min. Η αρχική σύνθεση της κινητής φάσης ήταν 90 % Α, 6 % Β και 4 % C και μεταβαλλόταν με γραμμική κλίση όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5). Η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα ίδια μήκη κύματος με την μέθοδο “flav hypericum”.

**Πίνακας 5.** Μεταβολή σύστασης διαλυτών με γραμμική κλίση σε συνάρτηση με το χρόνο ανάλυσης για τη μέθοδο “flav hypericum - non polar”

Χρόνος (min)	% Σύσταση Διαλύτη A	% Σύσταση Διαλύτη B	% Σύσταση Διαλύτη C	% Σύσταση Διαλύτη D
0	90	6	4	0
5	85	9	6	0
30	71	17,4	11,6	0
60	0	85	15	0
65	0	0	0	100
75	0	0	0	100
76	0	85	15	0
80	0	85	15	0

Ο όγκος της έγχυσης από το δείγμα μεταβαλλόταν ανάλογα με το δείγμα, από 5 mL για τα πιο πυκνά δείγματα έως 20 mL για τα πιο αραιά.

#### 2.3.4. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων – Μέθοδος Folin – Ciocalteu

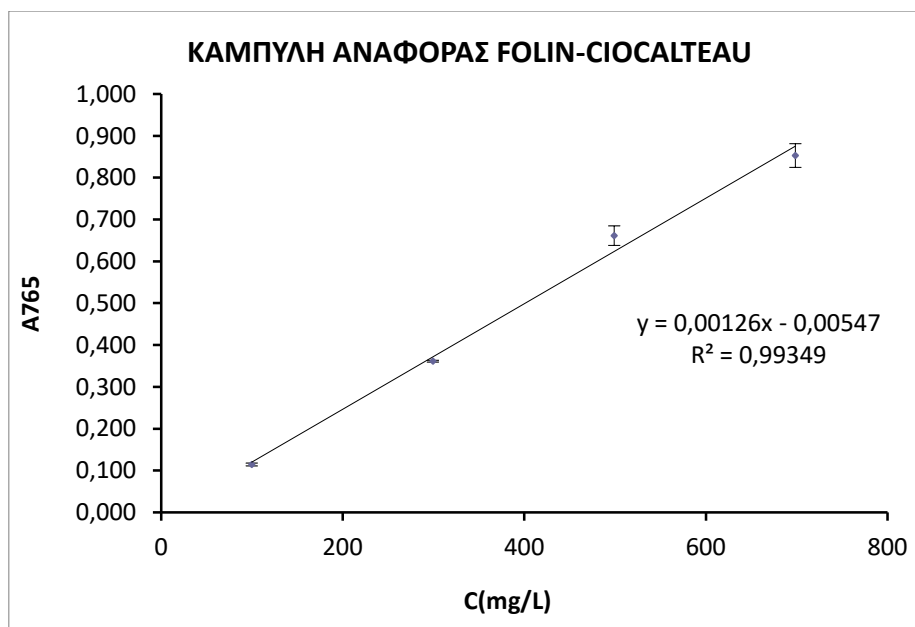
Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου έγινε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Αρχικά, παρασκευάζεται κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου. Σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 800 mL απιονισμένου νερού προστίθενται 200 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου. Το διάλυμα θερμαίνεται έως να φτάσει σε βρασμό σε θερμαντική πλάκα και αναδεύεται μέχρις ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το ανθρακικό νάτριο. Στη συνέχεια αφήνεται να ψυχθεί και φυλάσσεται στο ψυγείο για 24 ώρες. Έπειτα, ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου.

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών 7,9 mL νερού προστίθεται στο δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια, με πιπέτα προστίθεται 100 mL δείγματος και 500 mL αντιδραστηρίου Folin. Με την πάροδο μικρού χρονικού διαστήματος (30 s έως και 8 min) προστίθεται 1,5 mL κορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και τα δείγματα τοποθετούνται για δύο ώρες σε μέρος με απουσία φωτός. Έπειτα, ακολουθεί φωτομέτρηση σε φασματόμετρο μονής δέσμης στα 765 nm όπου γίνεται μηδενισμός με βάση το τυφλό (δεν περιέχει δείγμα αλλά 100 mL επιπλέον νερού). Σημειώνεται ότι για την ποσοτικοποίηση η απορρόφηση των δειγμάτων πρέπει να είναι εντός της καμπύλης αναφοράς. Για το λόγο αυτό, ποσότητα των εκχυλισμάτων έχει αραιωθεί κατάλληλα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6.** Αραιώσεις που έγιναν στα εκχυλίσματα με βάση τον διαλύτη εκχύλισης για να είναι οι απορροφήσεις εντός της καμπύλης αναφοράς. Οι αραιώσεις έγιναν με τον ίδιο τον διαλύτη εκτός από τις περιπτώσεις που αναγράφεται κάτι διαφορετικό.

Διαλύτης εκχύλισης	Αραίωση
Νερό	1/10
Ακετόνη (αραίωση με ισοπροπανόλη)	1/10
Εξάνιο	Δεν απαιτείται
Οξικός αιθυλεστέρας	Δεν απαιτείται
Αιθανόλη	Δεν απαιτείται

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας διάλυμα γαλλικού οξέος. Συγκεκριμένα, από διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 1000 mg/L, παρασκευάζονται αραιωμένα διαλύματα με συγκεντρώσεις 700, 500, 300 και 100 mg/L. Η μέθοδος εφαρμόζεται όπως παραπάνω για τα αραιωμένα διαλύματα και από την απορρόφηση στα 765 nm προκύπτει η καμπύλη αναφορά (Διάγραμμα 1). Έτσι, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών υπολογίζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (gallic acid equivalent – GAE).



**Διάγραμμα 1.** Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu

### 2.3.5. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης – Μέθοδος DPPH

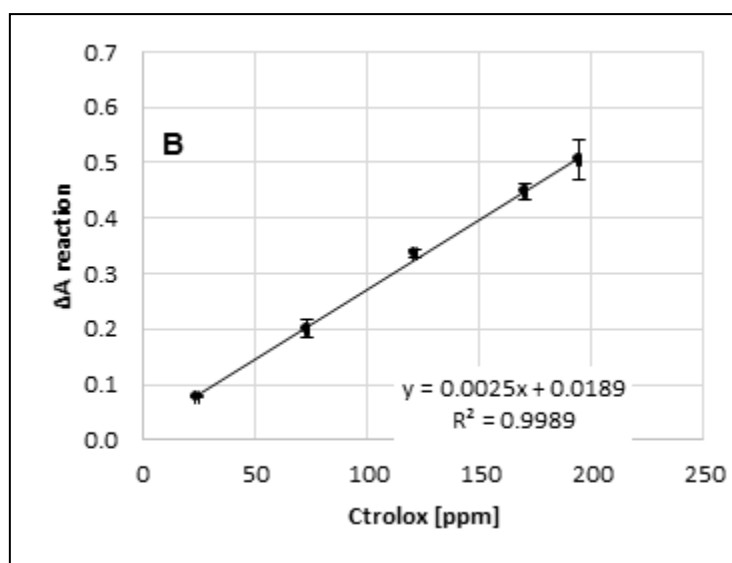
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH. Πριν από κάθε ανάλυση παρασκευάζεται διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 25 mg/L. Σε ογκομετρική φιάλη 100 mL τοποθετούνται 2,5 mg DPPH και προστίθεται μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Η μεθανόλη προστίθεται σταδιακά και γίνεται πολύ καλή ανάδευση ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως το αντιδραστήριο. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος και αν δεν χρησιμοποιηθεί άμεσα τοποθετείται στο ψυγείο.

Για την ανάλυση, 3,9 mL του παραπάνω διαλύματος τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται 100 μL δείγματος, ενώ στο τυφλό προστίθεται 100 μL διαλύτη. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται για 30 min σε μέρος με απουσία φωτός και τέλος γίνεται φωτομέτρηση στα 515 nm. Σε αυτή την περίπτωση, ο μηδενισμός γίνεται με καθαρή μεθανόλη. Και σε αυτή την περίπτωση πρέπει να γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις, καθώς για την ποσοτικοποίηση η απορρόφηση των δειγμάτων πρέπει να είναι εντός της καμπύλης αναφοράς (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7.** Αραιώσεις που έγιναν στα εκχυλίσματα με βάση τον διαλύτη εκχύλισης για να είναι οι απορροφήσεις εντός της καμπύλης αναφοράς. Οι αραιώσεις έγιναν με τον ίδιο τον διαλύτη εκτός από τις περιπτώσεις που αναγράφεται κάτι διαφορετικό.

Διαλύτης εκχύλισης	Αραίωση
Νερό	1/100
Ακετόνη (αραίωση με ισοπροπανόλη)	1/10
Εξάνιο	Δεν απαιτείται
Οξικός αιθυλεστέρας	Δεν απαιτείται
Αιθανόλη	1/10

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εκφράζεται σε ισοδύναμα trolox. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ζυγίζονται 0,01 g trolox (6-hydroxy2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) και αραιώνονται μέχρι τη χαραγή σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL με μεθανόλη. Με την προσθήκη 1, 2, 3, 4 και 5 mL από αυτό το διάλυμα σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL και τη συμπλήρωση με μεθανόλη έως τη χαραγή δημιουργούνται αραιώσεις 40, 80, 120, 160, και 200 ppm, αντίστοιχα. Ακολουθώντας την παραπάνω μέθοδο για αυτά τα δείγματα προκύπτει η καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 2). Έτσι, η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών συστατικών υπολογίζεται σε ισοδύναμα trolox (trolox equivalent – TE).



**Διάγραμμα 2.** Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των ολικών αντιοξειδωτικών συστατικών με τη μέθοδο DPPH

### 2.3.6. Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος

Η συνολική μάζα στερεών που ανακτήθηκε προσδιορίζεται ως εξής: Γυάλινα φιαλίδια που έχουν ξηρανθεί στο φούρνο στους 100 °C ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό. Στο τέλος της εκχύλισης λαμβάνεται καθορισμένος όγκος εκχυλίσματος (5 mL) με σιφόνιο πλήρωσης, τοποθετείται στα προζυγισμένα φιαλίδια και αφήνεται για 24 ώρες για ξήρανση στο φούρνο στους 100 °C. Έπειτα από νέα ζύγιση, υπολογίζεται η διαφορά μάζας των φιαλιδίων που είναι η μάζα των στερεών της εκχύλισης.

### 2.3.7. Παρασκευή γαλακτώματος που περιέχει βιοδραστικά συστατικά βαλσαμόχορτου

Το γαλάκτωμα παρασκευάστηκε με βάση την τεχνική που χρησιμοποιήθηκε από τους Almeida et al. (2010) για την παρασκευή τελικού όγκου 50 mL γαλακτώματος. Συγκεκριμένα, ένα οργανικό διάλυμα που περιέχει 1,7 mL ελαίου (καπρυλικό τριγλυκερίδιο), 0,388 g span 60 και 73,5 mL ακετόνη υποβλήθηκε σε μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία 40 °C. Μετά από μία ώρα, αιθανολικό εκχύλισμα που περιέχει τα βιοδραστικά (60 mL) προστέθηκε σε αυτή την οργανική φάση διατηρώντας το υπό ανάδευση για δέκα επιπλέον λεπτά. Έπειτα, η παραπάνω οργανική φάση αναμιγνύεται με 268,5 mL νερού που περιέχουν 0,388 g Tween 80. Σε συσκευή Rotary Evaporator, η ακετόνη απομακρύνεται και η υδατική φάση συμπυκνώνεται σε τελικό όγκο 50 mL στους 40 °C κάτω από μειωμένη πίεση. Το γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε αποθηκεύεται σε γυάλινους περιέκτες και δύο από αυτούς φυλάσσονται σε θερμοκρασία 37,5 °C και οι άλλοι δύο σε θερμοκρασία 15 °C.

Ποσότητα από το αρχικό γαλάκτωμα (2 mL) αραιώθηκε με ισοπροπανόλη σε τελικό όγκο 10 mL και έπειτα από διήθηση οδηγήθηκε προς ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο “flav hypericum - non polar”. Μετά από 3, 6 και 11 μέρες επαναλήφθηκε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, αφού προηγήθηκε κατάλληλη αραιώση με ισοπροπανόλη, λαμβάνοντας υπόψη τη μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών στο γαλάκτωμα με την πάροδο του χρόνου.



Εικόνα 26. Γαλάκτωμα

### 2.3.8. Μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής των σωματιδίων

Η μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής των σταγονιδίων της ασυνεχούς φάσης των γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια διάταξης μέτρησης μεγέθους σωματιδίων με σκεδασμό δέσμης laser (Malvern Mastersizer).

Το Mastersizer χρησιμοποιεί την τεχνική της περίθλασης λέιζερ για τη μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μέτρηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός καθώς μια δέσμη λέιζερ διέρχεται μέσω ενός δείγματος διεσπαρμένων σωματιδίων. Αυτά τα δεδομένα στη συνέχεια αναλύονται για να υπολογισθεί το μέγεθος των σωματιδίων. Ο τρόπος με τον οποίο σκεδάζεται το φως από τα σωματίδια εξαρτάται από το μέγεθος που έχει το καθένα από αυτά και είναι μοναδικός για κάθε μέγεθος σωματιδίου. Για τις μετρήσεις στο γαλάκτωμα, ποσότητα δείγματος εισέρχεται στη μονάδα (Small Dispersion Unit) μέχρι ο σκεδασμός (Obscuration) να φτάσει τουλάχιστον το 11%, αλλά να μην ξεπερνά το 30% για να είναι η μέτρηση αξιόπιστη. Η ποσότητα του δείγματος αναδεύεται συνεχώς στις 2000rpm για να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια του δείγματος. Λήφθηκαν πέντε μετρήσεις, ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των μετρήσεων και να εξαχθεί ο μέσος όρος.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων είναι η κατανομή των σωματιδίων η οποία υπολογίζεται από τα παρακάτω μεγέθη:

- $D(v, 0.1)$  – (εκφρασμένο σε  $\mu\text{m}$ )  
Συμβολίζει το μέγεθος του σωματιδίου για το οποίο το 10% των σωματιδίων του δείγματος βρίσκεται κάτω από το μέγεθος αυτό.
- $D(v, 0.5)$  – (εκφρασμένο σε  $\mu\text{m}$ )  
Συμβολίζει το μέγεθος του σωματιδίου για οποίο το 50% του δείγματος είναι μικρότερο και το 50% μεγαλύτερο από την τιμή αυτή.
- $D(v, 0.9)$  – (εκφρασμένο σε  $\mu\text{m}$ )  
Συμβολίζει το μέγεθος του σωματιδίου για το οποίο το 90% των σωματιδίων του δείγματος βρίσκεται κάτω από το μέγεθος αυτό.
- $Span$  – (αδιάστατο μέγεθος)  
Συμβολίζει το εύρος της κατανομής των σωματιδίων και δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$Span = \frac{D(v, 0.9) - D(v, 0.1)}{D(v, 0.5)}$$

Όσο μικρότερη είναι η τιμή του  $Span$  τόσο πιο στενή είναι η κατανομή.

- $D[4, 3]$  – (εκφρασμένο σε  $\mu\text{m}$ )  
Είναι η μέση διάμετρος των σωματιδίων λαμβάνοντας υπόψη την κατανομή του όγκου των σωματιδίων.
- $D[3.2]$  – (εκφρασμένο σε  $\mu\text{m}$ )  
Είναι η μέση διάμετρος των σωματιδίων λαμβάνοντας υπόψη την κατανομή της επιφάνειας των σωματιδίων.

### 3. Αποτελέσματα και σχολιασμός

#### 3.1 Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών βαλσαμόχορτου με διαφορετικούς διαλύτες

Η πρώτη μελέτη αφορά την επίδραση του διαλύτη στην εκχύλιση του βαλσαμόχορτου. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν αρχικά το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακετόνη, η αιθανόλη και το νερό. Έπειτα ακολούθησε νέα σειρά πειραμάτων με μίγματα αλκοόλης/νερού σε αναλογίες 70/30, 60/40, 50/50 και 40/60. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και για την αντιοξειδωτική ικανότητα τους με τη μέθοδο DPPH. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της υπερικίνης και της υπερφορίνης στα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου.

##### 3.1.1. Απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά

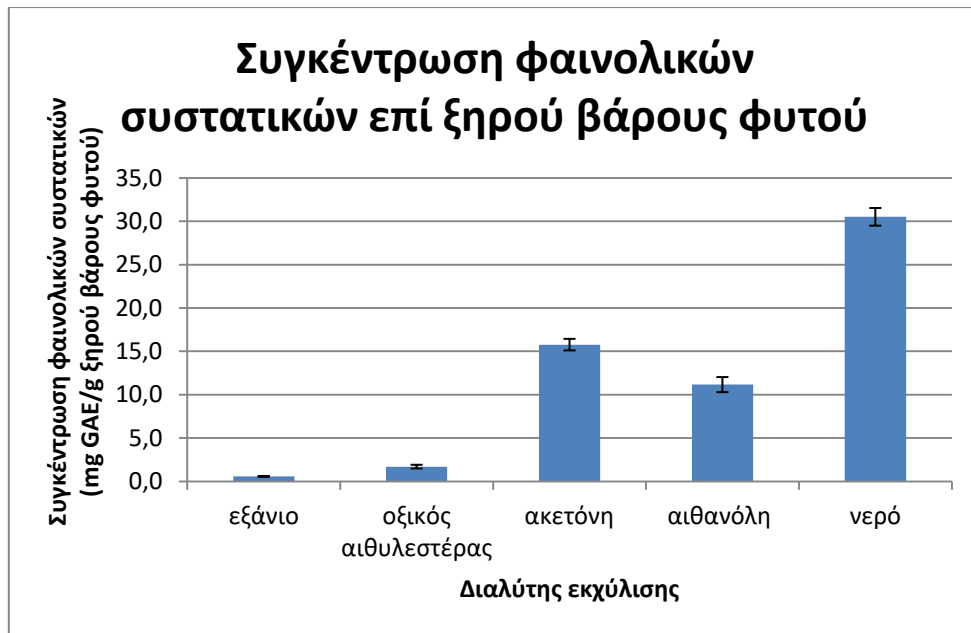
Σε κάθε εκχύλιση προσδιορίστηκε η απόδοση σε φαινολικά συστατικά μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu και από τον υπολογισμό των ολικών στερεών των εκχυλισμάτων. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω αναλύσεις στα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου.

**Πίνακας 8.** Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού εκχυλίσματος (σε mg GAE/g εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού), όπως υπολογίστηκε για τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu

Διαλύτης εκχύλισης	Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού εκχυλίσματος (mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού)
Εξάνιο	20,3 ± 1,8	0,57 ± 0,04
Οξικός αιθυλεστέρας	25,3 ± 2,4	1,7 ± 0,2
Ακετόνη	156,9 ± 13,1	15,8 ± 0,7
Αιθανόλη	152,7 ± 11,9	11,2 ± 0,9
Μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30	239,1 ± 1,4	43,9 ± 0,2
Μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40	252,8 ± 9,9	47,5 ± 1,9
Μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50	278,9 ± 5,0	51,7 ± 1,0
Μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60	307,7 ± 7,5	50,8 ± 1,2
Νερό	218,4 ± 7,1	30,5 ± 1,0

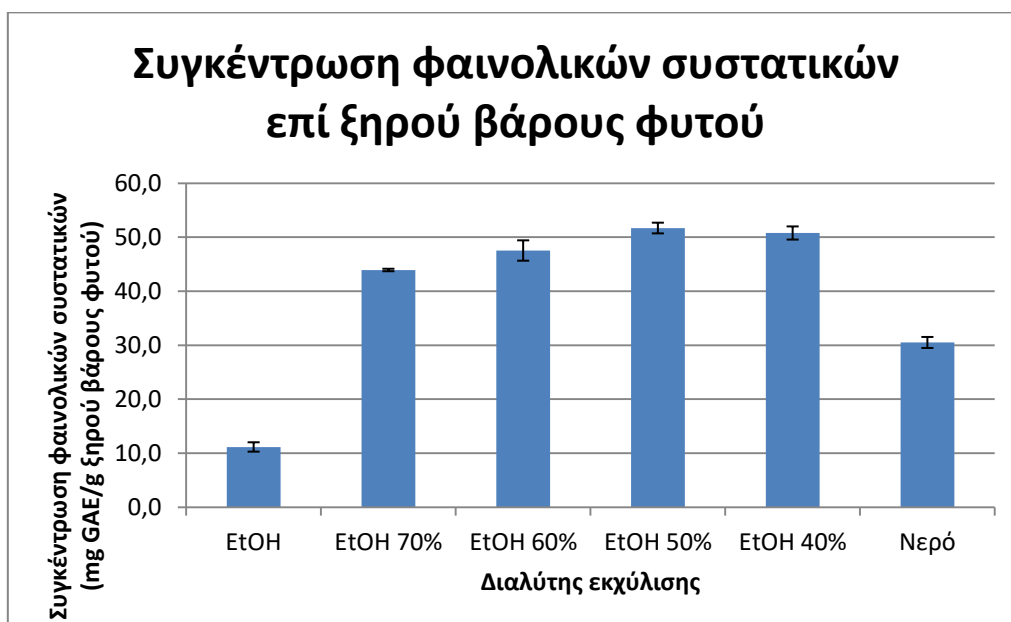
Για τις εκχυλίσεις με καθαρούς διαλύτες, μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά παρατηρείται για το νερό. Η ακετόνη και η αιθανόλη έχουν παρόμοια αποτελέσματα, με σημαντικά μεγαλύτερη απόδοση για την ακετόνη, ενώ οι λιγότερο πολικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται ότι δεν έχουν ικανοποιητική ικανότητα εκχύλισης φαινολικών συστατικών.





**Διάγραμμα 3.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού) μέσω της μεθόδου Folin – Cioclateu σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με καθαρούς διαλύτες

Μεταξύ των υδραλκοολικών μιγμάτων αιθανόλης νερού, όμως, παρατηρείται αύξηση της απόδοσης σε φαινολικά συστατικά σε σχέση με τους αντίστοιχους καθαρούς διαλύτες. Η μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά επί ξηρού εκχυλίσματος προέκυψε με τη χρήση μίγματος αιθανόλης/νερού 40/60 ως διαλύτη, που αποτελεί και τη μεγαλύτερη απόδοση στο σύνολο των εκχυλισμάτων. Η συγκέντρωση φαινολικών συστατικών επί ξηρού βάρους φυτού δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα για περιεκτικότητες αιθανόλης από 40 έως 60 % στο μίγμα (περίπου 50 mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού).



**Διάγραμμα 4.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού) μέσω της μεθόδου Folin – Cioclateu σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού σε διαφορετικές αναλογίες

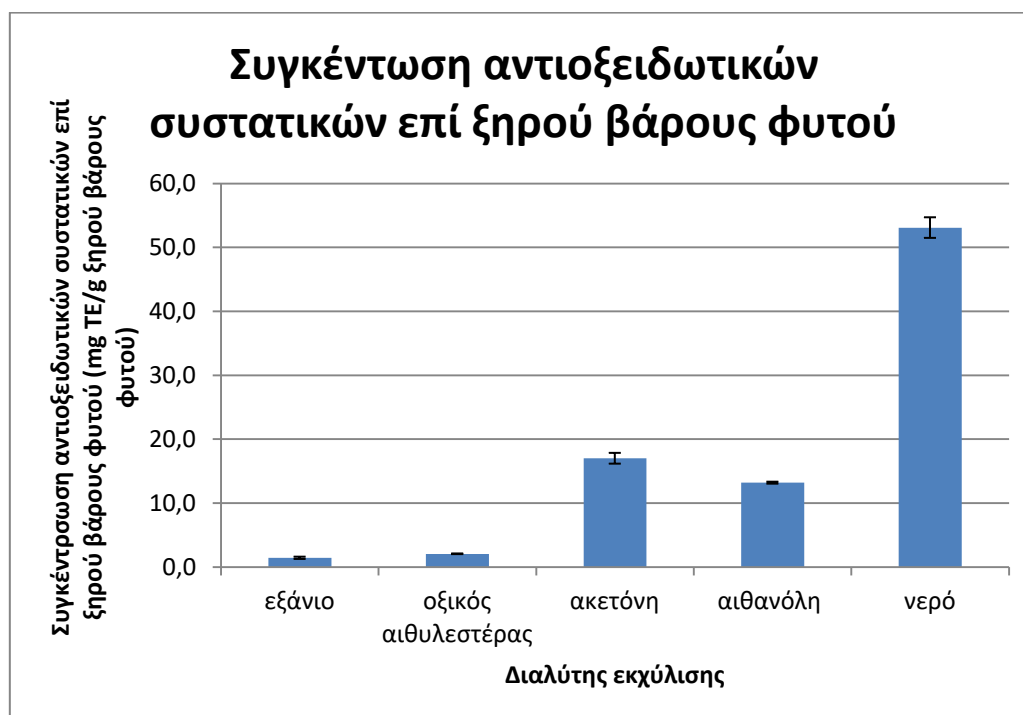
### 3.1.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω αναλύσεις στα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου.

**Πίνακας 9.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών επί ξηρού εκχυλίσματος (σε mg TE/g εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε mg TE/g ξηρού βάρους φυτού), όπως υπολογίστηκε για τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου μέσω της μεθόδου DPPH

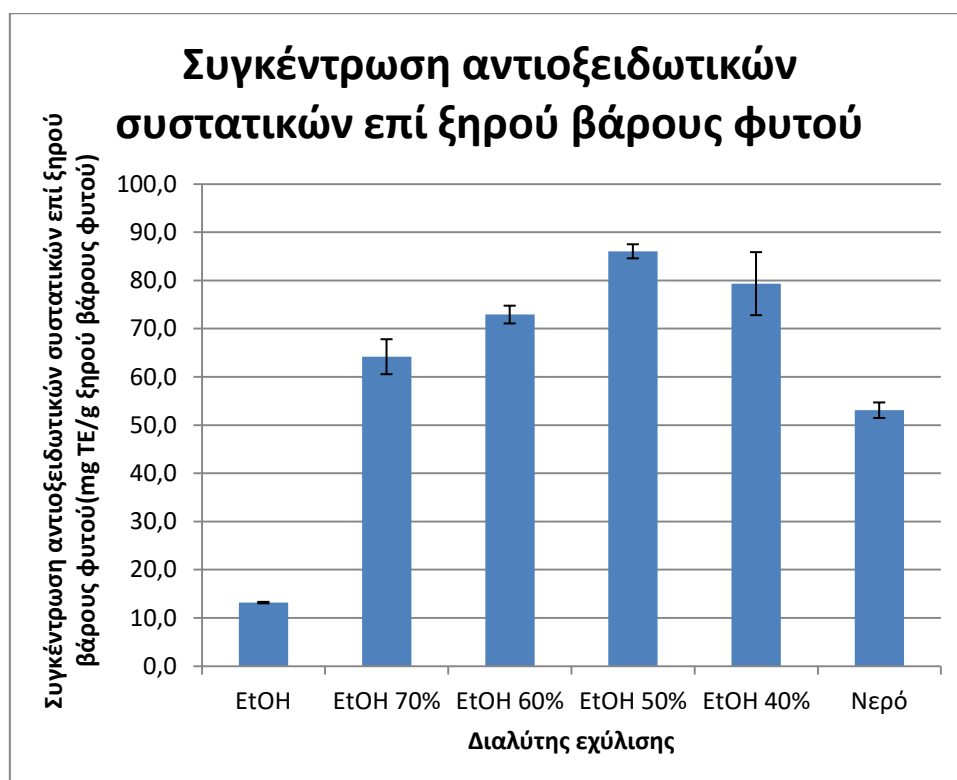
Διαλύτης εκχύλισης	Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών επί ξηρού εκχυλίσματος (mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg TE/g ξηρού βάρους φυτού)
Εξάνιο	50,7 ± 4,7	1,4 ± 0,2
Οξικός αιθυλεστέρας	30,6 ± 0,2	2,1 ± 0,1
Ακετόνη	169,1 ± 14,1	17,0 ± 0,8
Αιθανόλη	180,4 ± 11,2	13,2 ± 0,2
Μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30	349,3 ± 19,6	64,2 ± 3,6
Μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40	387,8 ± 10,0	72,9 ± 1,8
Μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50	464,1 ± 8,4	86,1 ± 1,5
Μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60	480,7 ± 39,8	79,4 ± 6,5
Νερό	380,1 ± 11,2	53,1 ± 1,6

Και σε αυτή την περίπτωση, το υδατικό εκχύλισμα παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόδοση μεταξύ των εκχυλισμάτων με καθαρούς διαλύτες. Τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν τα εκχυλίσματα με μη πολικούς διαλύτες.



**Διάγραμμα 5.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg TE/g ξηρού βάρους φυτού) μέσω της μεθόδου DPPH σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με καθαρούς διαλύτες

Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού, μεγαλύτερες ποσότητες αντιοξειδωτικών ενώσεων εκχυλίζονται με κάθε αναλογία σε σχέση με το νερό ή την αιθανόλη μεμονωμένα. Ανάμεσα τους, όμως, μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ανά ξηρή μάζα φυτού εμφανίζει το εκχύλισμα με μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50.



**Διάγραμμα 6.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg TE/g ξηρού βάρους φυτού) μέσω της μεθόδου DPPH σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού σε διαφορετικές αναλογίες

### 3.1.3. Ταυτοποίηση συστατικών βαλσαμόχορτου με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

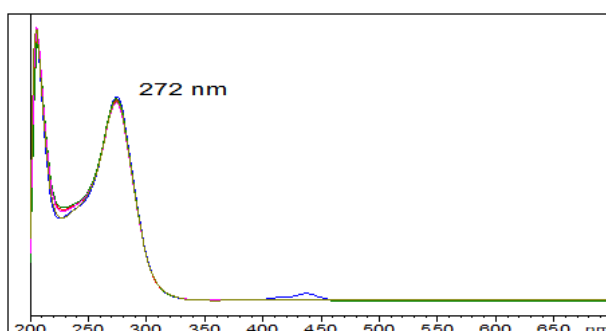
Στην παρούσα διπλωματική εργασία το ενδιαφέρον για την ταυτοποίηση των συστατικών του βαλσαμόχορτου εστιάστηκε γύρω από δύο ενώσεις, την υπερικίνη και την υπερφορίνη. Οι αναλύσεις φανερώνουν και την ύπαρξη λοιπών ενώσεων που περιέχει το φυτό χωρίς, όμως, αυτά τα δεδομένα να αξιοποιούνται για τη μελέτη τους.

Το χρώμα κάθε εκχυλίσματος αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για την ανάκτηση της υπερικίνης και των παραγώγων της. Τα εκχυλίσματα με ακετόνη, αιθανόλη, νερό και μίγματα αιθανόλης/νερού είχαν έντονο κόκκινο χρώμα που μαρτυρά την παρουσία της συγκεκριμένης ουσίας. Αντίθετα, η εκχύλιση με εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα είχαν ανοιχτό πράσινο και καφέ χρώμα, αντίστοιχα, και, όπως φαίνεται και παρακάτω από τα αποτελέσματα με υγρή χρωματογραφία, πράγματι δεν περιέχουν μεγάλη ποσότητα υπερικίνης ή δεν την έχουν παραλάβει καθόλου.

Από την ανάλυση των εκχυλισμάτων βαλσαμόχορτου με υγρή χρωματογραφία (HPLC) επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση της υπερφορίνης και της υπερικίνης. Οι χρόνοι έκλουσης των ενώσεων δεν συμπίπτουν με τη βιβλιογραφία, καθώς εξαρτώνται από τη μέθοδο που

χρησιμοποιείται σε κάθε έρευνα. Όμως, η σειρά έκλουσης των συστατικών και η μορφή του χρωματογραφήματος είναι ίδια με την βιβλιογραφία και παραμένει ίδια μεταξύ των πειραμάτων.

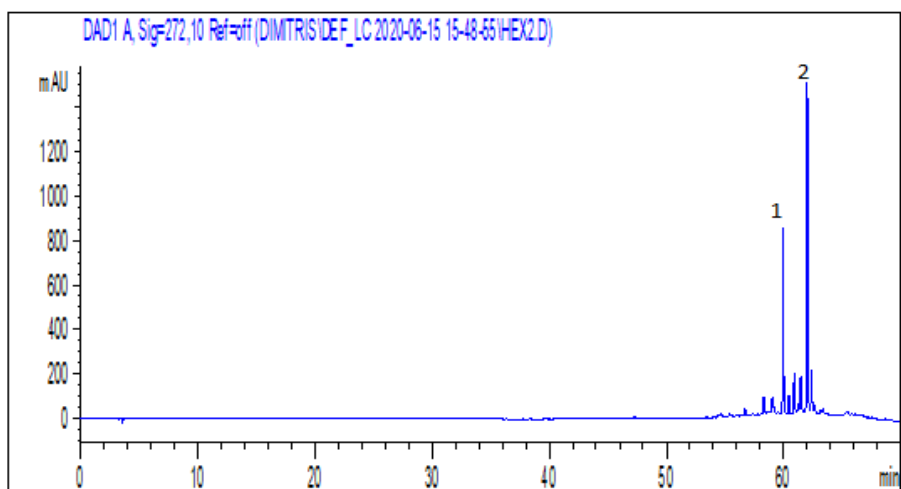
Στα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται στα 272 nm είναι εμφανής η παρουσία και άλλων ενώσεων που υπάρχουν στο βαλσαμόχορτο, όπως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Αυτές οι ενώσεις ταυτοποιούνται στα 280 nm για αυτό και εμφανίζονται και σε αυτή την ανάλυση. Η υπερφορίνη, εκλούεται στο τέλος της ανάλυσης στο εύρος χρόνου 58,88 έως 61,85 min και ταυτοποιείται με το χαρακτηριστικό φάσμα UV στα 272 nm (Εικόνα 27). Στην πραγματικότητα πρόκειται για τα παράγωγα της ουσίας που υπάρχουν στο βαλσαμόχορτο και έχουν παρόμοιο φάσμα UV. Έτσι, με βάση το σύνολο των αναλύσεων και σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές πηγές, οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είναι η υπερφορίνη και η αδυπερφορίνη με μέσους χρόνους έκλουσης  $58,88 \pm 0,67$  min και  $61,85 \pm 0,48$  min, αντίστοιχα.



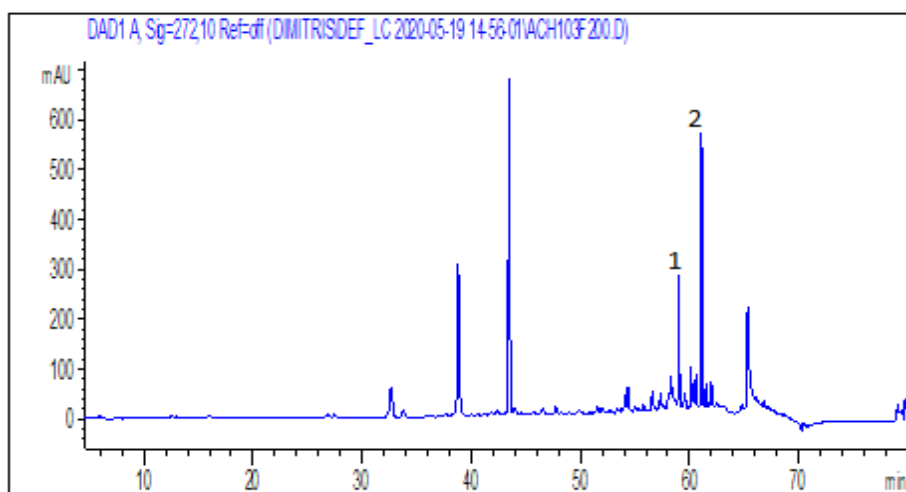
**Εικόνα 27.** Φάσμα υπεριώδους υπερφορίνης όπως προέκυψε από την ανάλυση με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης στα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου

Η υπερφορίνη ταυτοποιήθηκε σε όλα τα εκχυλίσματα, με εξαίρεση το υδατικό. Το νερό, λοιπόν, αποτελεί το μόνο διαλύτη από όσους χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία που δεν εκχυλίζει την υπερφορίνη. Επίσης, ανάμεσα στα υπερφορινοειδή, μεγαλύτερη είναι η κορυφή που σύμφωνα με την βιβλιογραφία ανήκει στην αδυπερφορίνη.

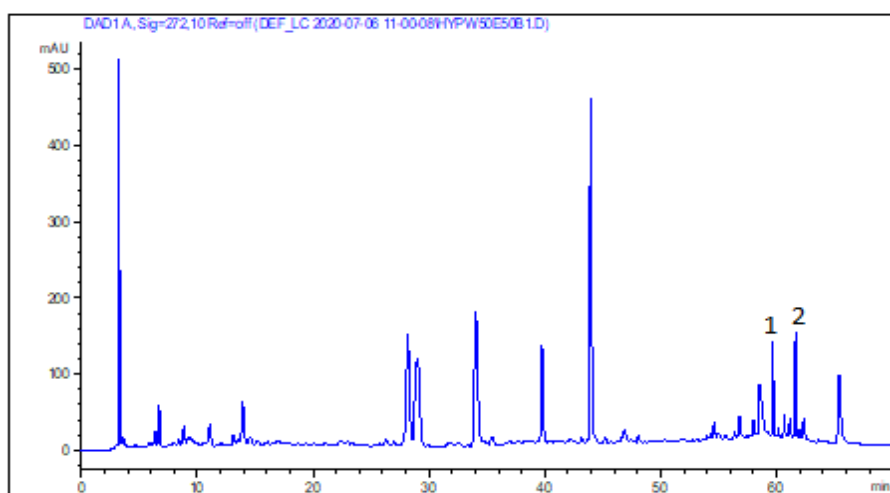
Τέλος, ως προς την εμφάνιση των υπόλοιπων ενώσεων στο χρωματογράφημα, αυτή εξαρτάται και από το διαλύτη εκχύλισης. Ειδικότερα, οι πιο άπολοι διαλύτες (εξάνιο και οξικός αιθυλεστέρας), που όπως φάνηκε και από τη δοκιμή Folin – Ciocalteu δεν περιέχουν μεγάλο φορτίου φαινολικών συστατικών, έδωσαν χρωματογραφήματα στα οποία οι κορυφές των υπερφορινοειδών ήταν πιο ξεκάθαρες (Εικόνα 28). Δηλαδή, με τους διαλύτες αυτούς εκχυλίστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό η υπερφορίνη και σε μικρότερο βαθμό οι λοιπές ουσίες (φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή), για αυτό και δεν εμφάνισαν κορυφές μεγάλου μεγέθους. Αντίθετα, στις εκχυλίσεις με ακετόνη και αιθανόλη, που ως διαλύτες έχουν την ικανότητα να εκχυλίσουν και αυτές τις ουσίες, παρατηρούνται και άλλες κορυφές που αντιστοιχούν στα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή (Εικόνα 29). Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, στην εκχύλιση με το νερό δεν ανακτάται υπερφορίνη. Στα μίγματα αιθανόλης/νερού όμως, λόγω της παρουσίας της αιθανόλης, ανακτάται υπερφορίνη και η μορφή του χρωματογραφήματος είναι παρόμοια με αυτή του ακετονικού και του αιθανολικού εκχυλίσματος (Εικόνα 30).



**Εικόνα 28.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου στα 272 nm όπου εμφανίζονται οι κορυφές τις υπερφορίνης (1) και της αδυπερφορίνης (2)

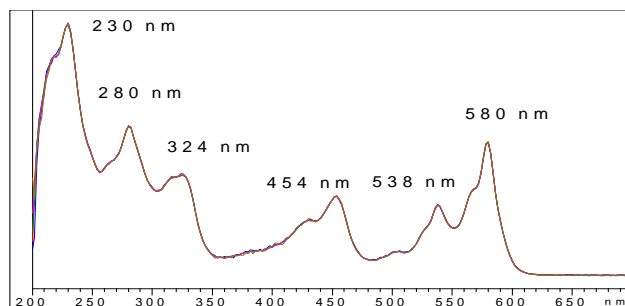


**Εικόνα 29.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ακετόνης στα 272 nm όπου εμφανίζονται οι κορυφές τις υπερφορίνης (1) και της αδυπερφορίνης (2)



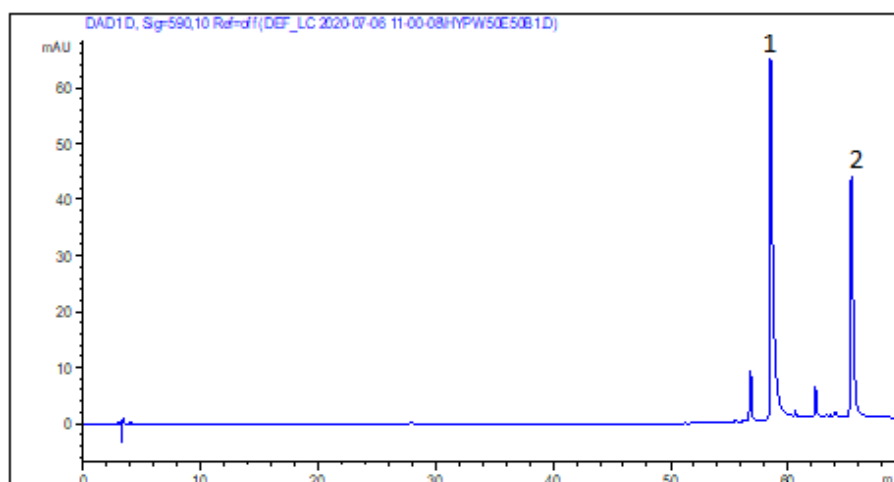
**Εικόνα 30.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50 στα 272 nm όπου εμφανίζονται οι κορυφές τις υπερφορίνης (1) και της αδυπερφορίνης (2)

Από την άλλη πλευρά, τα χρωματογραφήματα στα 590 nm, δεν εμφανίζουν κορυφές εκτός της υπερικίνης και των παραγώγων της. Οι κύριες ενώσεις που ταυτοποιούνται με βάση το χαρακτηριστικό φάσμα τους (Εικόνα 31) είναι η ψευδοϋπερικίνη και η υπερικίνη, με μέσους χρόνους έκλυσης  $58,58 \pm 0,71$  min και  $65,71 \pm 0,74$  min, αντίστοιχα.



**Εικόνα 31.** Φάσμα υπεριώδους υπερικίνης όπως προέκυψε από την ανάλυση με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης στα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου

Το εξάνιο ήταν ο μόνος διαλύτης από όσους χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία, ο οποίος δεν ανακτά την υπερικίνη και τα παράγωγα της. Τα χρωματογραφήματα για τα εκχυλίσματα με όλους τους υπόλοιπους διαλύτες είχαν παρόμοια μορφή (Εικόνα 32) και η κορυφή που αντιστοιχεί στην ψευδοϋπερικίνη ήταν μεγαλύτερη για όλα τα δείγματα.



**Εικόνα 32.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50 στα 590 nm όπου εμφανίζονται οι κορυφές τις ψευδοϋπερικίνης (1) και της υπερικίνης (2)

### 3.1.4. Ποσοτικοποίηση συστατικών βαλσαμόχορτου με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Λόγω απουσίας προτύπων υπερφορίνης και υπερικίνης για την κατασκευή κατάλληλων εξισώσεων ποσοτικοποίησης, η ποσοτικοποίηση των παραπάνω ουσιών είναι σχετική και υπολογίζεται σε μονάδες εμβαδού ανά g ξηρού βάρους εκχυλίσματος ή ανά g ξηρού βάρους φυτού. Το εμβαδό για την υπερφορίνη και την υπερικίνη σε κάθε ανάλυση είναι το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών των υπερφορινοειδών και υπερικινοειδών, αντίστοιχα.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 10 και Πίνακας 11) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης της υπερφορίνης και της υπερικίνης.

**Πίνακας 10.** Ποσότητα υπερφορίνης επί ξηρού εκχυλίσματος (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε Μονάδες εμβαδού /g ξηρού βάρους φυτού), όπως προέκυψε από την ανάλυση HPLC

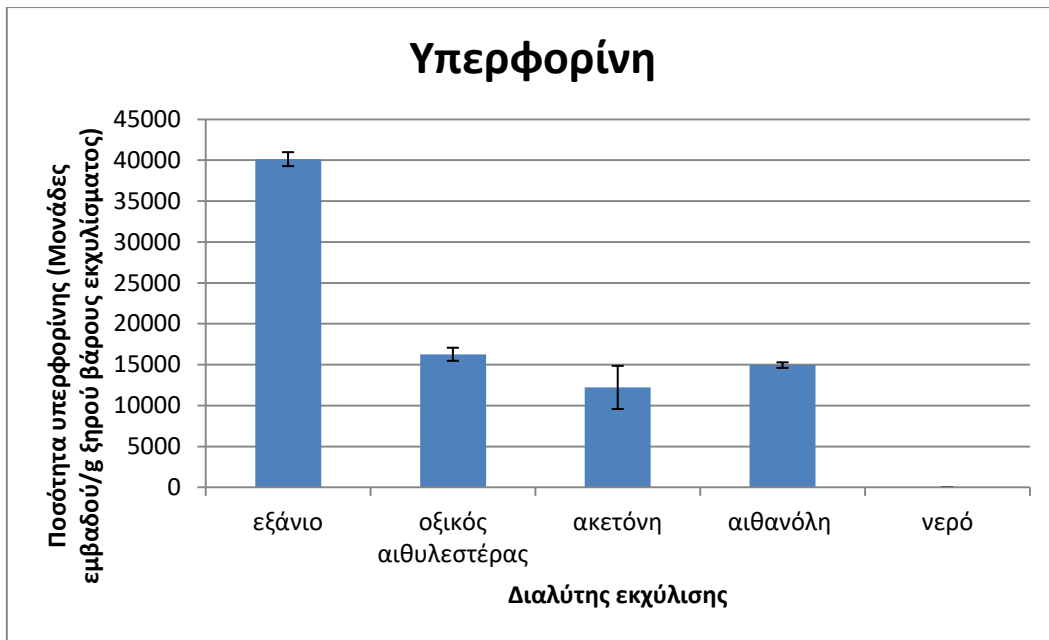
Διαλύτης εκχύλισης	Ποσότητα υπερφορίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)	Ποσότητα υπερφορίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού)
Εξάνιο	40131 ± 854	1123 ± 21
Οξικός αιθυλεστέρας	16272 ± 800	1090 ± 18
Ακετόνη	12217 ± 2639	1217 ± 77
Αιθανόλη	14946 ± 340	1092 ± 32
Μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30	5107 ± 114	938 ± 21
Μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40	4557 ± 679	857 ± 64
Μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50	2955 ± 330	548 ± 61
Μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60	644 ± 53	106 ± 9
Νερό	-	-

**Πίνακας 11.** Ποσότητα υπερικίνης επί ξηρού εκχυλίσματος (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε Μονάδες εμβαδού /g ξηρού βάρους φυτού), όπως προέκυψε από την ανάλυση HPLC

Διαλύτης εκχύλισης	Ποσότητα υπερικίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)	Ποσότητα υπερικίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού)
Εξάνιο	-	-
Οξικός αιθυλεστέρας	56 ± 13	3,7 ± 1,0
Ακετόνη	1231 ± 63	125 ± 26
Αιθανόλη	595 ± 12	44 ± 2
Μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30	2523 ± 17	464 ± 3
Μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40	3002 ± 243	565 ± 30
Μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50	2218 ± 158	411 ± 30
Μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60	2008 ± 28	332 ± 4
Νερό	755 ± 29	105 ± 4

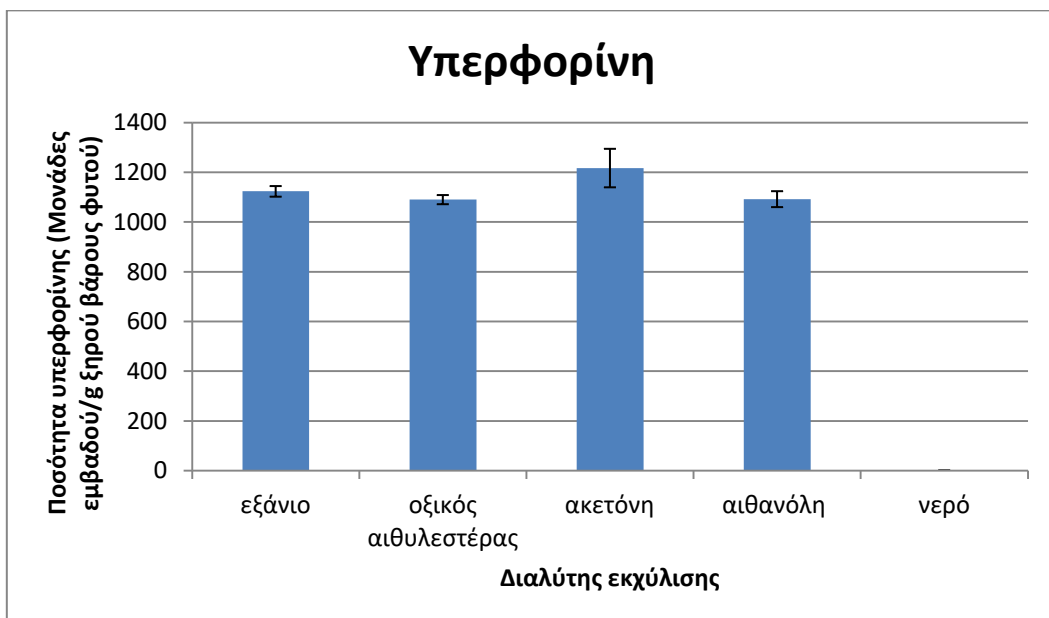
Όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία η υπερφορίνη εκχυλίζεται από τους πιο άπολους διαλύτες, ενώ η υπερικίνη από τους πιο πολικούς. Μάλιστα, ο λιγότερο πολικός διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία, το εξάνιο, είχε μηδενική ανάκτηση υπερικίνης και ο πιο πολικός διαλύτης, το νερό, είχε μηδενική ανάκτηση υπερφορίνης.

Μεταξύ των εκχυλίσεων με καθαρούς διαλύτες, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το εκχύλισμα με εξάνιο έχει τη μεγαλύτερη ποσότητα υπερφορίνης ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος, υπερδιπλάσια συγκριτικά με αυτή που περιέχουν τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, όπως δείχνει και η εικόνα των χρωματογραφημάτων, ότι το εξάνιο ανακτά σχεδόν αποκλειστικά υπερφορίνη και πολύ λιγότερο λοιπές φαινολικές ενώσεις.



**Διάγραμμα 7.** Ποσότητα υπερφορίνης (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με καθαρούς διαλύτες

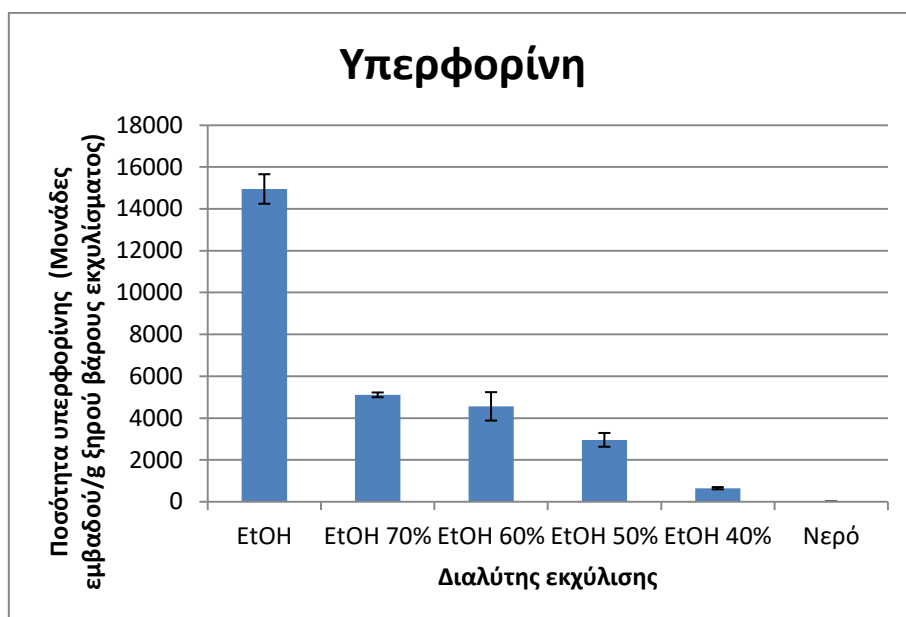
Ωστόσο, η ποσότητα υπερφορίνης ανά ξηρή μάζα φυτού είναι περίπου ίση για όλους τους διαλύτες με εξαίρεση το νερό. Επομένως, η ίδια ποσότητα υπερφορίνης ανακτάται με όλους τους διαλύτες χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Έτσι, για την ανάκτηση της υπερφορίνης σε κάποιο εκχύλισμα, οποιοσδήποτε από τους παραπάνω διαλύτες είναι κατάλληλος, αλλά αν ο στόχος της διεργασίας είναι η απομόνωση της υπερφορίνης, τότε ο πιο κατάλληλος διαλύτης είναι το εξάνιο.



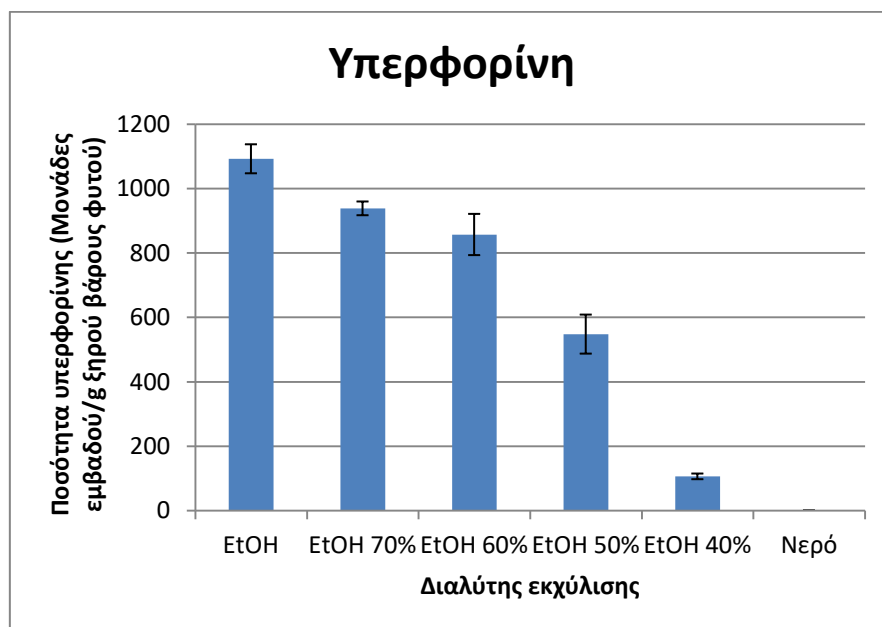
**Διάγραμμα 8.** Ποσότητα υπερφορίνης (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού)σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με καθαρούς διαλύτες



Σχετικά με τα μίγματα αιθανόλης/νερού, εφόσον το νερό δεν ανακτά την υπερφορίνη, η ποσότητα της υπερφορίνης που ανακτάται είναι ανάλογη της περιεκτικότητας του μίγματος σε αιθανόλη.



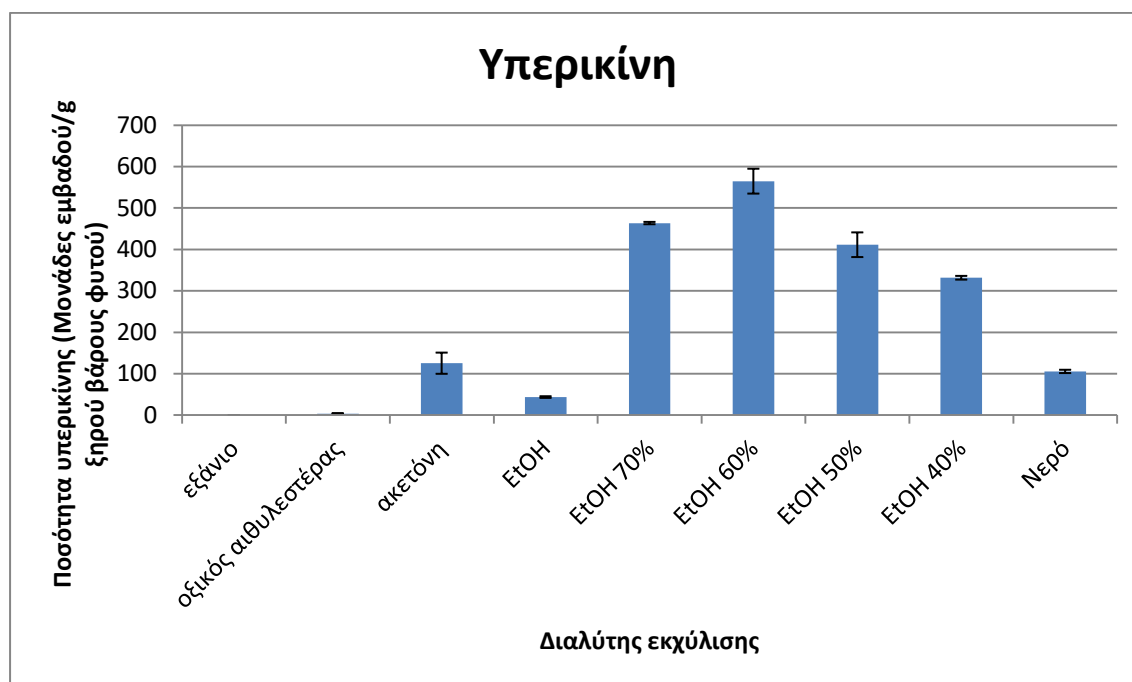
**Διάγραμμα 9.** Ποσότητα υπερφορίνης (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού σε διαφορετικές αναλογίες



**Διάγραμμα 10.** Ποσότητα υπερφορίνης (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού)σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού σε διαφορετικές αναλογίες

Στην ανάκτηση της υπερικίνης, πιο ικανός διαλύτης μεταξύ των καθαρών διαλυτών είναι η ακετόνη. Τα μίγματα αιθανόλης νερού, όμως, ανακτούν την υπερικίνη σε ακόμα μεγαλύτερες ποσότητες σε οποιαδήποτε αναλογία. Την καλύτερη απόδοση σε υπερικίνη ανά ξηρή μάζα φυτού παρουσιάζει το εκχύλισμα με μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40, το

οποίο παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, όπως φαίνεται από την ποσότητα υπερικίνης ανά ξηρή μάζα εκχυλίσματος (3002 μον. εμβαδού/g ξηρού εκχυλίσματος, Πίνακας 11).



**Διάγραμμα 11.** Ποσότητα υπερικίνης (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού)σε εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με καθαρούς διαλύτες και με μίγματα αιθανόλης/νερού σε διαφορετικές αναλογίες

## 3.2 Διαδοχικές εκχυλίσσεις

Τα επόμενα πειράματα αφορούν διαδοχικές εκχυλίσσεις στο βαλσαμόχορτο. Πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες με τη σειρά: ακετόνη και έπειτα νερό, νερό και έπειτα ακετόνη και τέλος διαδοχική εκχύλιση με εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, αιθανόλη και τέλος νερό. Τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την απόδοση σε φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, την αντιοξειδωτική δράση τους με τη μέθοδο DPPH και την περιεκτικότητά τους σε υπερφορίνη και υπερικίνη μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης.

### 3.2.1. Διαδοχική εκχύλιση με ακετόνη και νερό

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία παραλαμβάνονται 200 mL ακετονικού εκχυλίσματος βαλσαμόχορτου και έπειτα ίσος όγκος υδατικού. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 12 και Πίνακας 13) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών επί ξηρού βάρους εκχυλίσματος και επί ξηρού βάρους φυτού. Επίσης το υδατικό εκχύλισμα συγκρίνεται με το αντίστοιχο που προέκυψε από την εκχύλιση του βαλσαμόχορτου μόνο με νερό.

**Πίνακας 12.** Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού εκχυλίσματος (σε mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού), όπως υπολογίστηκε για τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu

Διαλύτης εκχύλισης	Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού εκχυλίσματος (mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού)
Ακετόνη	156,9 ± 13,1	15,8 ± 0,7
Νερό (διαδοχικά)	242,2 ± 8,8	35,8 ± 7,3
Νερό	218,4 ± 7,1	30,5 ± 1,0

**Πίνακας 13.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών επί ξηρού εκχυλίσματος (σε mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε mg TE/g ξηρού βάρους φυτού), όπως υπολογίστηκε για τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου μέσω της μεθόδου DPPH

Διαλύτης εκχύλισης	Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών επί ξηρού εκχυλίσματος (mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg TE/g ξηρού βάρους φυτού)
Ακετόνη	169,1 ± 14,1	17,0 ± 0,8
Νερό (διαδοχικά)	448,4 ± 57,4	65,3 ± 7,8
Νερό	380,1 ± 11,2	53,1 ± 1,6

Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι το υδατικό εκχύλισμα έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών όταν παραλαμβάνεται υδατικό εκχύλισμα έπειτα από εκχύλιση με ακετόνη σε σχέση με την εκχύλιση με νερό. Η διαφορά ανάμεσα τους δεν είναι σημαντική με βάση τις τυπικές αποκλίσεις και το συντελεστή μεταβλητότητας ανάμεσα στις τιμές που προέκυψαν από τα διαφορετικά πειράματα. Με τη διαδοχική εκχύλιση παραλαμβάνεται πολύ μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών από την

αντίστοιχη ποσότητα με κάθε διαλύτη χωριστά. Αυτή η αύξηση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η ακετόνη έχει πιθανώς ανακτήσει μεγάλη ποσότητα από συστατικά του βαλσαμόχορτου (όπως τα άγλυκα φλαβονοειδή) που δεν μπορούν να εκχυλιστούν με το νερό. Έτσι, όταν το νερό διέρχεται από τη μάζα του φυτού στον εκχυλιστήρα έχει την ικανότητα να διαλυτοποιήσει, άρα και να εκχυλίσει, μεγαλύτερη ποσότητα πολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικών.

Στα εκχυλίσματα έγινε σχετική ποσοτικοποίηση ως προς την υπερφορίνη και την υπερικίνη, με τον ίδιο τρόπο που αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα. Η ακετόνη ανακτά την υπερφορίνη ( $1217 \pm 77$  Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού) και την υπερικίνη ( $125 \pm 26$  Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού). Το νερό και στις δύο περιπτώσεις δεν ανακτά ποσότητα υπερφορίνης, επομένως σε αυτή την περίπτωση το ενδιαφέρον στρέφεται γύρω από την υπερικίνη. Ο Πίνακας 14 παρουσιάζει τα σχετικά αποτελέσματα.

**Πίνακας 14.** Ποσότητα υπερικίνης επί ξηρού εκχυλίσματος (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε Μονάδες εμβαδού /g ξηρού βάρους φυτού), όπως προέκυψε από την ανάλυση HPLC

Διαλύτης εκχύλισης	Ποσότητα υπερικίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)	Ποσότητα υπερικίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού)
Ακετόνη	$1231 \pm 63$	$125 \pm 26$
Νερό (διαδοχικά)	$532 \pm 109$	$74 \pm 19$
Νερό	$755 \pm 29$	$105 \pm 4$

Συγκριτικά με την εκχύλιση που έγινε με διαλύτη μόνο το νερό, το υδατικό εκχύλισμα από τη διαδοχική εκχύλιση έχει ανακτήσει μικρότερη ποσότητα υπερικίνης. Σε αυτή την περίπτωση φαίνεται ότι η ακετόνη παραλαμβάνει μεγάλη ποσότητα υπερικίνης από το φυτό και, παρόλο που δεν την εξαντλεί, μειώνει την ικανότητα ανάκτησης από το νερό, λόγω μικρότερου δυναμικού.

### 3.2.2. Διαδοχική εκχύλιση με νερό και ακετόνη

Στο πείραμα αυτό γίνεται μια προσπάθεια να ανακτηθούν εξαντλητικά τα πολικά συστατικά του βαλσαμόχορτου με νερό. Για αυτό το λόγο, παραλαμβάνονται 200 mL υδατικού εκχυλίσματος βαλσαμόχορτου, στη συνέχεια 200 mL επιπλέον υδατικού και τέλος 200 mL ακετονικού. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 15 και Πίνακας 16) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών επί ξηρού βάρους εκχυλίσματος και επί ξηρού βάρους φυτού. Επίσης το ακετονικό εκχύλισμα συγκρίνεται με το αντίστοιχο που προέκυψε από την εκχύλιση του βαλσαμόχορτου μόνο με ακετόνη.

**Πίνακας 15.** Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού εκχυλίσματος (σε mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού), όπως υπολογίστηκε για τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu

Διαλύτης εκχύλισης	Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού εκχυλίσματος (mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού)
Νερό	199,5 ± 4,0	29,9 ± 3,2
Ακετόνη (διαδοχικά)	203,9 ± 5,4	26,3 ± 4,7
Ακετόνη	156,9 ± 13,1	15,8 ± 0,7

**Πίνακας 16.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών επί ξηρού εκχυλίσματος (σε mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε mg TE/g ξηρού βάρους φυτού), όπως υπολογίστηκε για τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου μέσω της μεθόδου DPPH

Διαλύτης εκχύλισης	Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών επί ξηρού εκχυλίσματος (mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg TE/g ξηρού βάρους φυτού)
Νερό	516,6 ± 9,5	77,6 ± 10,2
Ακετόνη (διαδοχικά)	167,4 ± 23,7	21,2 ± 1,2
Ακετόνη	169,1 ± 14,1	17,0 ± 0,8

Το ενδιάμεσο υδατικό εκχύλισμα δεν παρουσίασε ενδιαφέρον καθώς είχε χαμηλή συγκέντρωση σε όλα τα συστατικά για αυτό και δεν παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ακετονικό εκχύλισμα στην διαδοχική εκχύλιση είχε κατά 30,0 % μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά επί ξηρού εκχυλίσματος και 66,5 % επί ξηρού βάρους φυτού. Το νερό, δηλαδή, όχι μόνο δεν έχει εξαντλήσει την ανάκτηση φαινολικών από το βαλσαμόχορτο, αλλά φαίνεται ότι η διαβροχή του φυτικού υλικού με νερό αυξάνει την απόδοση της μετέπειτα εκχύλισης με ακετόνη σε φαινολικά συστατικά. Η ακετόνη είναι ένας πολύ ισχυρός διαλύτης που έχει τη δυνατότητα να διεισδύει καλύτερα στους πόρους του φυτού ανακτώντας συστατικά από σημεία της φυτικής μάζας στον εκχυλιστήρα στα οποία το νερό φαίνεται να μην έχει πρόσβαση. Επιπροσθέτως, το νερό διαβρέχοντας το δείγμα έχει την τάση να το “φουσκώνει” με αποτέλεσμα η ανάκτηση των συστατικών με νερό να γίνεται όλο και πιο δύσκολη με την πάροδο του χρόνου. Αυτός είναι πιθανά και ο λόγος που το ενδιάμεσο υδατικό εκχύλισμα προέκυψε πολύ αραιό και με χαμηλή συγκέντρωση βιοδραστικών, ενώ στην πραγματικότητα έχει απομείνει ακόμα μεγάλη ποσότητα τους στο φυτό, την οποία φαίνεται να ανακτά η ακετόνη. Τέλος, αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της διαδοχικής εκχύλισης πρώτα με ακετόνη και έπειτα με νερό, ο πρώτος διαλύτης και σε αυτή την εκχύλιση φαίνεται να παραλαμβάνει συστατικά που παραλαμβάνει και ο επόμενος. Το νερό παραλαμβάνει κυρίως γλυκοζίτες φλαβονοειδών και φαινολικά οξέα, που η ακετόνη δεν παραλαμβάνει ποσοτικά. Ωστόσο, το γεγονός ότι αυτά τα συστατικά έχουν παραληφθεί με το νερό αυξάνει το δυναμικό για την ανάκτηση πιο άπολων φαινολικών ουσιών από την ακετόνη.

Ως προς την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, το ακετονικό εκχύλισμα έχει την ίδια περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά συστατικά ανεξάρτητα από το αν έχει προηγηθεί

εκχύλιση με νερό. Επομένως, η εκχύλιση με το νερό δεν έχει παραλάβει εξαντλητικά τις φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση από το βαλσαμόχορτο.

Η σχετική ποσοτικοποίηση της υπερφορίνης και της υπερικίνης στα εκχυλίσματα ήταν δυνατή μέσω της ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 17 και Πίνακας 18).

**Πίνακας 17.** Ποσότητα υπερφορίνης επί ξηρού εκχυλίσματος (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε Μονάδες εμβαδού /g ξηρού βάρους φυτού), όπως προέκυψε από την ανάλυση HPLC

Διαλύτης εκχύλισης	Ποσότητα υπερφορίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)	Ποσότητα υπερφορίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού)
Νερό	-	-
Ακετόνη (διαδοχικά)	10400 ± 1448	1321 ± 62
Ακετόνη	12217 ± 2639	1217 ± 77

**Πίνακας 18.** Ποσότητα υπερικίνης επί ξηρού εκχυλίσματος (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε Μονάδες εμβαδού /g ξηρού βάρους φυτού), όπως προέκυψε από την ανάλυση HPLC

Διαλύτης εκχύλισης	Ποσότητα υπερικίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)	Ποσότητα υπερικίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού)
Νερό	747 ± 8	112 ± 14
Ακετόνη (διαδοχικά)	5073 ± 1213	638 ± 35
Ακετόνη	1231 ± 63	125 ± 26

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων ακετόνης σε υπερφορίνη είναι η ίδια είτε έχουν προκύψει με απευθείας εκχύλιση με ακετόνη είτε μετά από εκχύλιση με νερό. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό, καθώς το νερό δεν ανακτά ποσότητα υπερφορίνης, επομένως η ακετόνη κατά τη διέλευση της από τη φυτική ύλη στον εκχυλιστήρα παραλαμβάνει την ίδιο ποσότητα και στις δύο περιπτώσεις.

Ως προς την υπερικίνη, τα αποτελέσματα είναι αντίστοιχα με αυτά για τις φαινολικές ενώσεις. Παρατηρείται, δηλαδή, σημαντική αύξηση στην ποσότητα ανακτώμενης υπερικίνης στο ακετονικό εκχύλισμα όταν έχει προηγηθεί εκχύλιση με νερό στο ίδιο δείγμα. Όπως εξηγείται και παραπάνω, το άνοιγμα της φυτικής μάζας από το νερό κάνει πιο εύκολη την πρόσβαση ακετόνη ώστε να παραλαμβάνει τελικά μεγαλύτερη ποσότητα συστατικών.

### 3.2.3. Διαδοχική εκχύλιση με εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, αιθανόλη και νερό

Στο τελευταίο πείραμα διαδοχικών εκχυλίσεων χρησιμοποιήθηκαν με τη σειρά οι εξής διαλύτες: εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, αιθανόλη και νερό. Από κάθε διαλύτη παραλαμβάνονται περίπου 200 mL εκχυλίσματος και η εκχύλιση συνεχίζεται με τον επόμενο. Σε αυτή την περίπτωση το ίδιο δείγμα εκχυλίζεται με διαλύτες χαμηλής έως υψηλής πολικότητας, που, όπως φάνηκε από την προηγούμενη ενότητα, κάθε ένας έχει εκλεκτικότητα σε διαφορετικά συστατικά. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 19 και

Πίνακας 20) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών επί ξηρού βάρους εκχυλίσματος και επί ξηρού βάρους φυτού. Επίσης, με εξαίρεση το εκχύλισμα με εξάνιο, τα υπόλοιπα εκχυλίσματα συγκρίνονται με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από την εκχύλιση με καθαρούς αντίστοιχους διαλύτες.

**Πίνακας 19.** Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού εκχυλίσματος (σε mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού), όπως υπολογίστηκε για τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu

Διαλύτης εκχύλισης	Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού εκχυλίσματος (mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση φαινολικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού)
Εξάνιο	20,3 ± 1,8	0,57 ± 0,04
Οξικός αιθυλεστέρας (διαδοχικά)	35,8 ± 7,3	1,3 ± 0,1
Οξικός αιθυλεστέρας	25,3 ± 2,4	1,7 ± 0,2
Αιθανόλη (διαδοχικά)	238,4 ± 1,9	8,1 ± 0,7
Αιθανόλη	152,7 ± 11,9	11,2 ± 0,9
Νερό (διαδοχικά)	235,9 ± 2,3	32,0 ± 0,8
Νερό	218,4 ± 7,1	30,5 ± 1,0

**Πίνακας 20.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών επί ξηρού εκχυλίσματος (σε mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε mg TE/g ξηρού βάρους φυτού), όπως υπολογίστηκε για τα εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου μέσω της μεθόδου DPPH

Διαλύτης εκχύλισης	Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών επί ξηρού εκχυλίσματος (mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος)	Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών επί ξηρού βάρους φυτού (mg TE/g ξηρού βάρους φυτού)
Εξάνιο	50,7 ± 4,7	1,4 ± 0,2
Οξικός αιθυλεστέρας (διαδοχικά)	32,0 ± 3,0	1,2 ± 0,1
Οξικός αιθυλεστέρας	30,6 ± 0,2	2,1 ± 0,1
Αιθανόλη (διαδοχικά)	387,8 ± 4,2	13,1 ± 1,2
Αιθανόλη	180,4 ± 2,1	13,2 ± 0,2
Νερό (διαδοχικά)	475,6 ± 47,3	64,5 ± 5,2
Νερό	380,1 ± 11,2	53,1 ± 1,6

Με τη σειρά που περνούν οι διαλύτες από τον εκχυλιστήρα ανακτώνται πρώτα τα πιο άπολα συστατικά και επόμενος διαλύτης κάθε φορά αναμένεται να έχει μεγαλύτερη δυνατότητα να ανακτήσει τις πιο πολικές ουσίες.

Ως προς την ποσότητα φαινολικών ουσιών επί ξηρού βάρους φυτού τα εκχυλίσματα φαίνεται να έχουν ανακτήσει μικρότερη ποσότητα από τις εκχυλίσεις με καθαρούς διαλύτες για τις περιπτώσεις του οξικού αιθυλεστέρα και της αιθανόλης και μεγαλύτερη για την περίπτωση του νερού, χωρίς η διαφορά να είναι σε όλες τις περιπτώσεις σημαντική. Από τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ανά ξηρό βάρος εκχυλίσματος, όμως, παρατηρείται ότι σημειώνεται αύξηση για τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τις διαδοχικές εκχυλίσεις. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι στο σύνολο των στερεών που εκχυλίζονται τα φαινολικά συστατικά αποτελούν μεγαλύτερο ποσοστό στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τις διαδοχικές εκχυλίσεις. Οι εκχυλίσεις γίνονται με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας, επομένως, το παραπάνω αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι αρχικοί διαλύτες απομακρύνουν τα πιο άπολα συστατικά

διευκολύνοντας έτσι την πρόσβαση στα πιο πολικά για τους διαλύτες που ακολουθούν. Συμπερασματικά, με τις διαδοχικές εκχυλίσεις ανακτάται από το σύνολο των διαλυτών μεγαλύτερο μέρος φαινολικών συστατικών του φυτού, ενώ και η καθαρότητα των εκχυλισμάτων είναι μεγαλύτερη.

Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και για την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Σε αυτή την περίπτωση, ωστόσο, είναι σημαντική η διαφορά ανάμεσα στο υδατικό εκχύλισμα που προέκυψε από τη διαδοχική εκχύλιση σε σχέση με την εκχύλιση με καθαρό νερό. Όπως αποδείχθηκε και από τη μελέτη σύγκρισης των διαφορετικών διαλυτών στην προηγούμενη ενότητα, το νερό έχει την καλύτερη απόδοση ανάμεσα στους καθαρούς διαλύτες και μάλιστα με σημαντική διαφορά. Το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας και η αιθανόλη έχουν παραλάβει ποσότητα λιγότερο πολικών ουσιών. Έτσι, όταν πλέον γίνεται διαδοχικά εκχύλιση με το νερό, αυτό έχει πιθανώς πιο εύκολη πρόσβαση και διαλυτοποίηση των πολικότερων φαινολικών συστατικών με αντιοξειδωτική δράση. Για αυτό το λόγο η απόδοση σε αντιοξειδωτικά αυξάνεται ακόμη περισσότερο στο υδατικό εκχύλισμα από τις διαδοχικές εκχυλίσεις.

Έπειτα, συγκρίνεται μεταξύ των εκχυλισμάτων η ικανότητα ανάκτησης υπερφορίνης και υπερικίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 21 και Πίνακας 22).

**Πίνακας 21.** Ποσότητα υπερφορίνης επί ξηρού εκχυλίσματος (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε Μονάδες εμβαδού /g ξηρού βάρους φυτού), όπως προέκυψε από την ανάλυση HPLC

Διαλύτης εκχύλισης	Ποσότητα υπερφορίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)	Ποσότητα υπερφορίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)
Εξάνιο	40131 ± 854	1123 ± 21
Οξικός αιθυλεστέρας (διαδοχικά)	5184 ± 1754	287 ± 97
Οξικός αιθυλεστέρας	16272 ± 800	1090 ± 18
Αιθανόλη (διαδοχικά)	580 ± 84	32 ± 5
Αιθανόλη	14946 ± 340	1092 ± 32
Νερό (διαδοχικά)	-	-
Νερό	-	-

**Πίνακας 22.** Ποσότητα υπερικίνης επί ξηρού εκχυλίσματος (σε Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος) και επί ξηρού βάρους φυτού (σε Μονάδες εμβαδού /g ξηρού βάρους φυτού), όπως προέκυψε από την ανάλυση HPLC

Διαλύτης εκχύλισης	Ποσότητα υπερικίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)	Ποσότητα υπερικίνης (Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)
Εξάνιο	-	-
Οξικός αιθυλεστέρας (διαδοχικά)	105 ± 1	4,0 ± 0,7
Οξικός αιθυλεστέρας	56 ± 13	3,7 ± 1,0
Αιθανόλη (διαδοχικά)	928 ± 100	32 ± 7
Αιθανόλη	595 ± 12	44 ± 2
Νερό (διαδοχικά)	617 ± 77	84 ± 12
Νερό	755 ± 29	105 ± 4



Η υπερφορίνη ανακτάται από λιγότερο πολικούς διαλύτες και το νερό είναι ο μόνος διαλύτης που δεν την παραλαμβάνει με την εκχύλιση. Στην εκχύλιση με καθαρούς διαλύτες, το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας και η αιθανόλη εμφάνισαν ίδιες αποδόσεις υπερφορίνης ανά ξηρή μάζα βαλσαμόχορτου. Στην διαδοχική εκχύλιση, μετά την εκχύλιση με εξάνιο φαίνεται ότι έχει απομείνει πολύ μικρότερη ποσότητα υπερφορίνης για να ανακτηθεί από τον οξικό αιθυλεστέρα και την αιθανόλη. Μάλιστα το γεγονός ότι η απόδοση υπερφορίνης ανά ξηρή μάζα βαλσαμόχορτου μειώνεται κατά 74 και 97 % στον οξικό αιθυλεστέρα και την αιθανόλη, αντίστοιχα, σε σχέση με τις αντίστοιχες εκχυλίσεις με καθαρό διαλύτη υποδεικνύει ότι η υπερφορίνη έχει παραληφθεί σχεδόν ολοκληρωτικά από την ποσότητα του φυτού στον εκχυλιστήρα (20 g). Επιπλέον, με βάση τις αποδόσεις των διαδοχικών εκχυλίσεων, προκύπτει ότι με την εκχύλιση με εξάνιο έχει παραληφθεί το 78 % της υπερφορίνης, ενώ η ακολουθούσα εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα παραλαμβάνει το 20 % της ουσίας από το φυτό, και επομένως δύο διαδοχικές εκχυλίσεις είναι επαρκείς.

Για την περίπτωση της υπερικίνης ακολουθείται η αντίστροφη πορεία. Το εξάνιο δεν την ανακτά καθόλου και οι υπόλοιποι διαλύτες έχουν αντίστοιχη ανάκτηση με αυτή των εκχυλίσεων με καθαρό διαλύτη. Διαφορά εντοπίζεται στην ποσότητα υπερικίνης ανά ξηρή μάζα εκχυλίσματος για τους λόγους που έχουν αναφερθεί και παραπάνω και σχετίζονται με την εκχύλιση λοιπών συστατικών. Τέλος, η συνολική ποσότητα της υπερικίνης που ανακτάται ανέρχεται σε  $120 \pm 20$  Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού. Αυτή η τιμή ανάκτησης είναι μεγαλύτερη από αυτή που επιτεύχθηκε με την αιθανόλη και το νερό ( $44 \pm 2$  και  $105 \pm 4$  Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού, αντίστοιχα), αλλά πολύ μικρότερη από αυτή που επιτεύχθηκε με οποιοδήποτε μίγμα αιθανόλης/ νερού. Σε αυτά τα μίγματα η μικρότερη ανάκτηση ήταν  $332 \pm 4$  Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού, για το μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60, και η μεγαλύτερη  $565 \pm 30$  Μονάδες εμβαδού/g ξηρού βάρους φυτού, για το αντίστοιχο μίγμα με αναλογία 60/40.

### 3.3 Κινητική μελέτη εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού

Η μεταβολή της συγκέντρωσης των φαινολικών και των αντιοξειδωτικών συστατικών με την πάροδο του χρόνου μελετήθηκε για εκχυλίσματα βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού σε αναλογίες 100/0, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60 και 0/100.

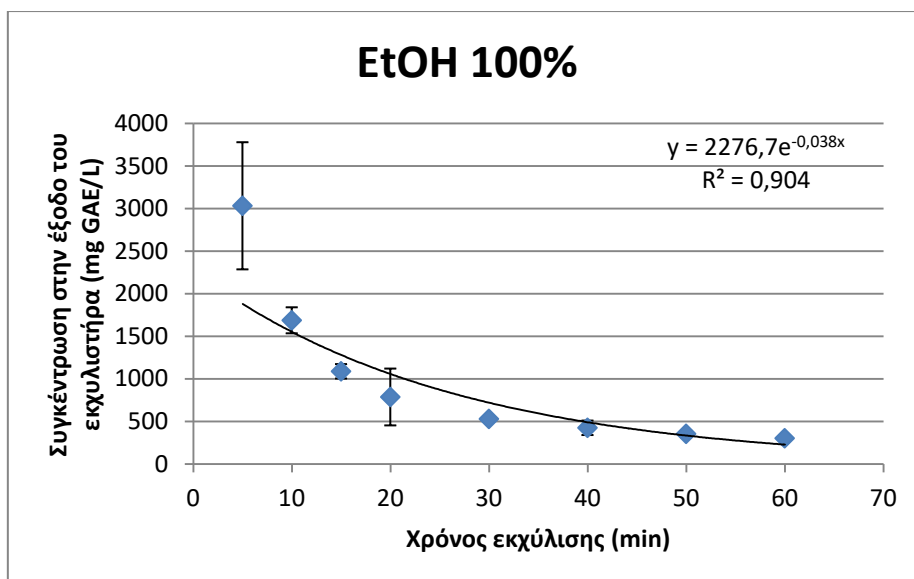
#### 3.3.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 23) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο Folin – Ciocalteu για την εύρεση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στην έξοδο του εκχυλιστήρα για τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

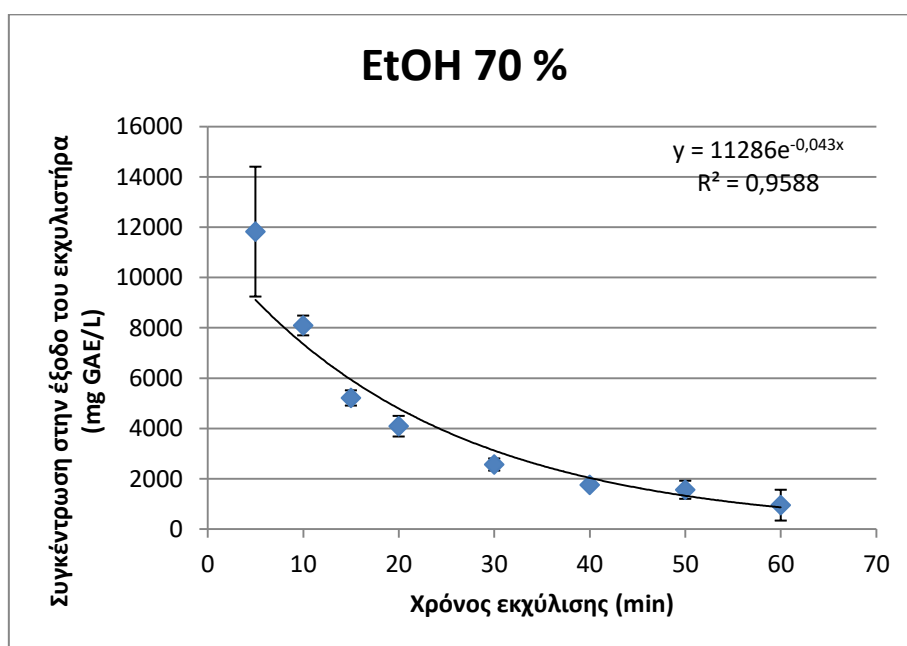
**Πίνακας 23.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (σε mg GAE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για κάθε αναλογία μίγματος αιθανόλης/νερού

Χρόνος (min)	Αναλογία μίγματος αιθανόλης/ νερού					
	100/0	70/30	60/40	50/50	40/60	0/100
5	3031 ± 713	11824 ± 2185	18016 ± 505	17147 ± 2867	17382 ± 3289	8901 ± 1501
10	1687 ± 157	8098 ± 393	9992 ± 1024	10738 ± 1854	9566 ± 1823	5410 ± 1164
15	1087 ± 196	5218 ± 303	5955 ± 202	7836 ± 1874	6455 ± 505	3385 ± 6773
20	786 ± 146	4095 ± 410	4567 ± 11	5265 ± 864	4472 ± 56	2456 ± 213
30	528 ± 6	2571 ± 241	2809 ± 365	2982 ± 126	2492 ± 252	1595 ± 126
40	424 ± 49	1762 ± 6	-	1845 ± 376	-	1155 ± 84
45	-	-	1423 ± 98	-	1490 ± 238	-
50	353 ± 27	1568 ± 359	-	1476 ± 34	-	887 ± 14
60	301 ± 1	957 ± 613	1177 ± 194	1080 ± 21	994 ± 8	662 ± 15

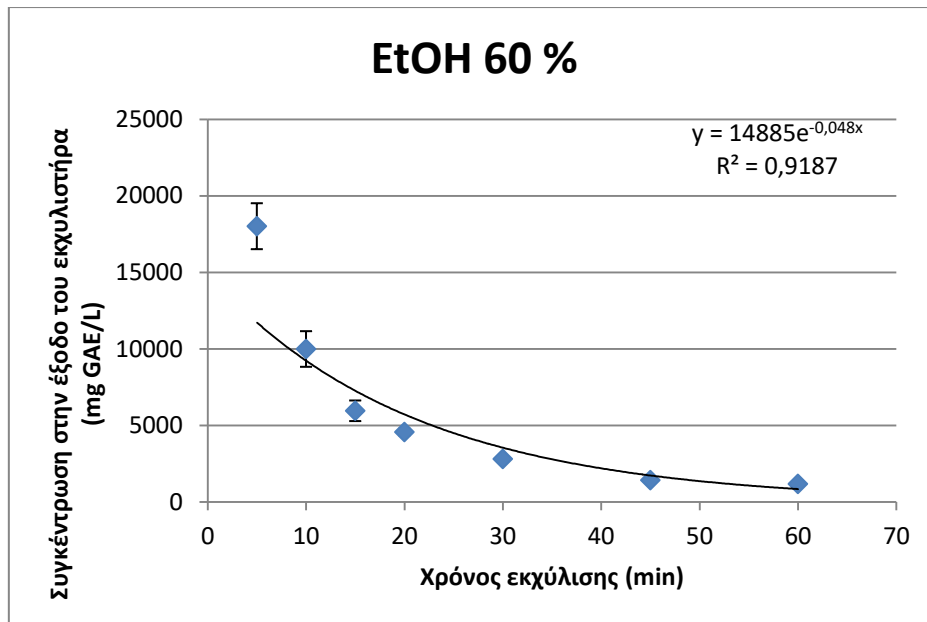
Όπως αναμένεται, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στην έξοδο του εκχυλιστήρα μειώνεται με την πάροδο του χρόνου και μάλιστα η μείωση είναι εκθετική. Το δυναμικό μεταφοράς των φαινολικών συστατικών από το φυτό στο διαλύτη είναι η διαφορά συγκέντρωσης. Κατά την εξέλιξη της διεργασίας, μειώνεται η συγκέντρωση του φυτικού υλικού σε φαινολικά συστατικά με αποτέλεσμα να ελαττώνεται παράλληλα ο ρυθμός της ανάκτησης τους από το διαλύτη. Στα πειραματικά σημεία συγκέντρωσης φαινολικών ουσιών στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου προσαρμόζονται εκθετικές καμπύλες της μορφής:  $f(t) = a \cdot e^{-bt}$ , με ικανοποιητικό συντελεστή συσχέτισης  $R^2 > 0,9$  (Διάγραμμα 12 έως Διάγραμμα 17). Οι σταθερές της εξίσωσης φανερώνουν δύο χαρακτηριστικά του φαινομένου που μελετάται. Ο συντελεστής  $a$  έχει μονάδες mg GAE/L και αντιπροσωπεύει τη θεωρητική συγκέντρωση στην έξοδο του εκχυλιστήρα την χρονική στιγμή  $t=0$ . Ο συντελεστής  $b$  έχει μονάδες  $\text{min}^{-1}$  και εκφράζει το ρυθμό μείωσης της ανάκτησης των φαινολικών συστατικών.



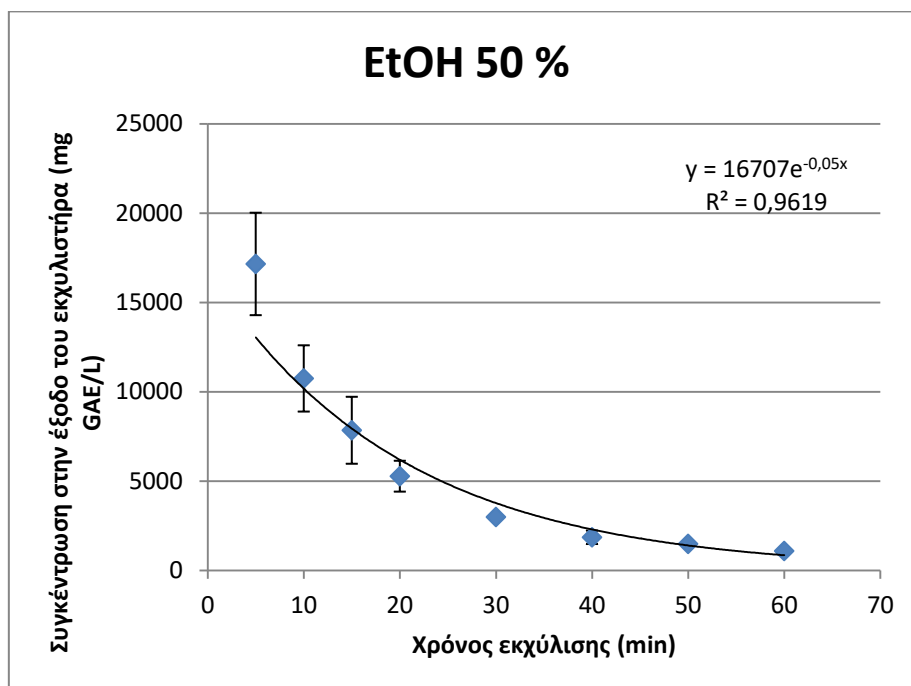
**Διάγραμμα 12.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (σε mg GAE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για καθαρή αιθανόλη



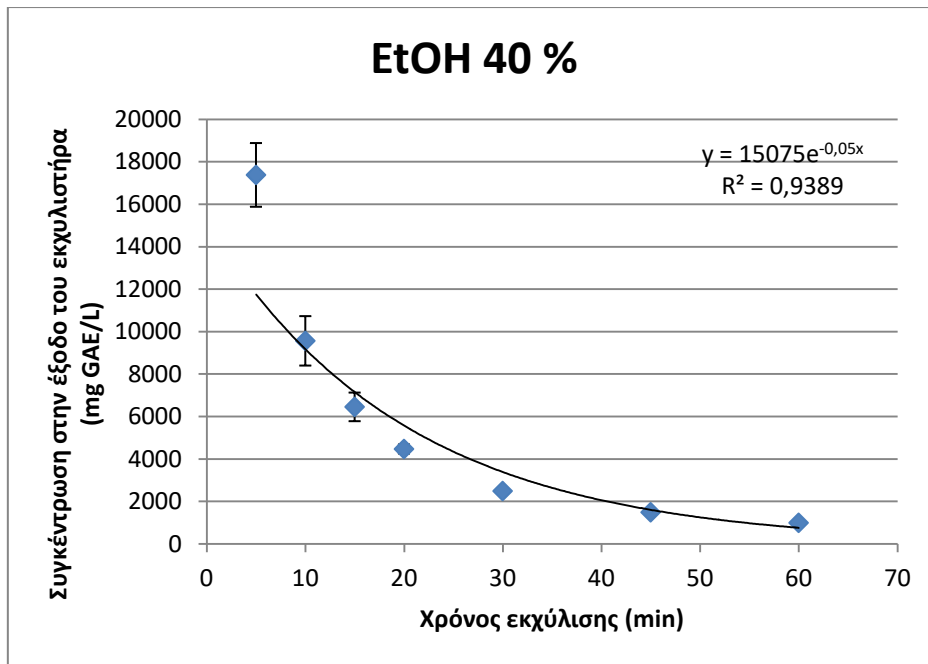
**Διάγραμμα 13.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (σε mg GAE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30



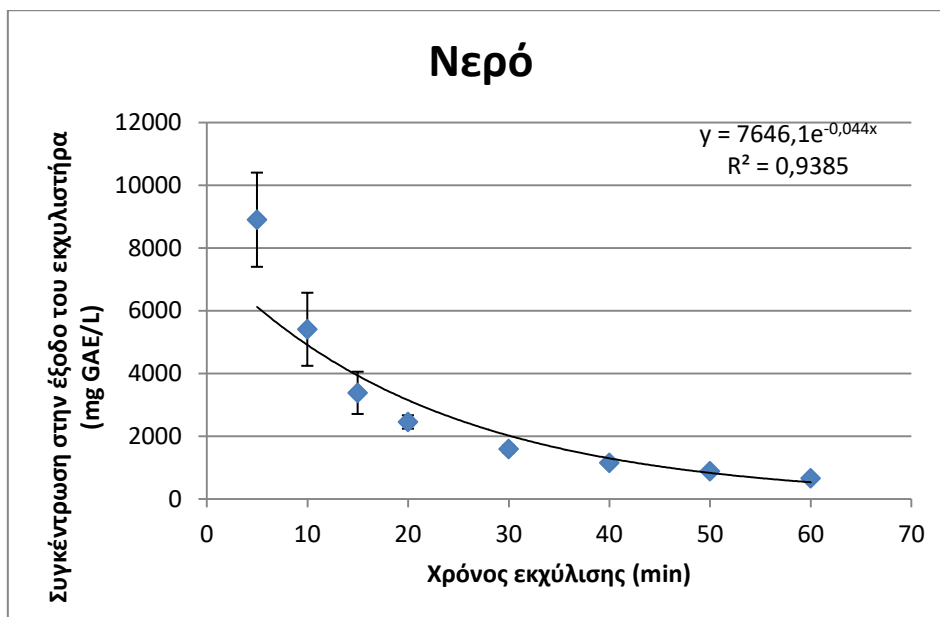
**Διάγραμμα 14.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (σε mg GAE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40



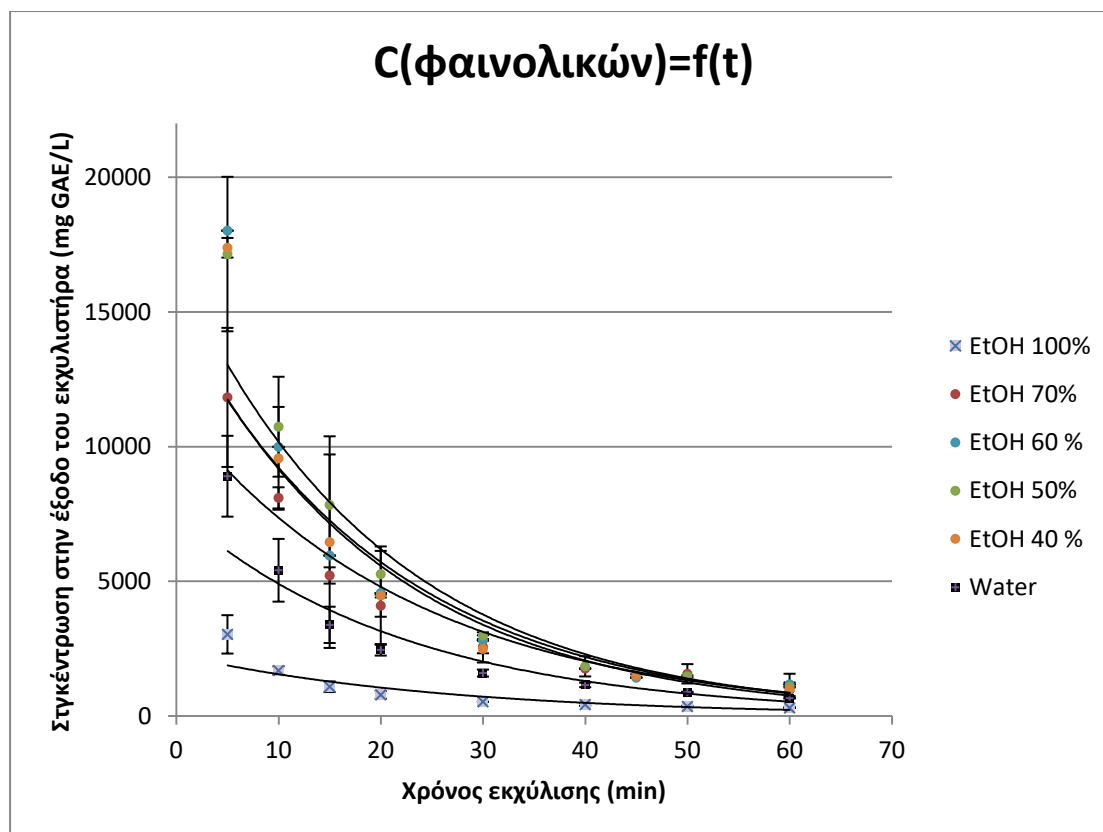
**Διάγραμμα 15.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (σε mg GAE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50



**Διάγραμμα 16.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (σε mg GAE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60



**Διάγραμμα 17.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (σε mg GAE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για καθαρό νερό



**Διάγραμμα 18.** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (σε mg GAE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για τα μίγματα αιθανόλης/νερού

Όπως φαίνεται από το συγκεντρωτικό διάγραμμα (Διάγραμμα 18), αλλά καλύτερα εκφράζουν οι τιμές των συντελεστών  $a$  και  $b$  (Πίνακας 24) η θεωρητική συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στην έναρξη της εκχύλισης και ο ρυθμός μείωσης της ανάκτησης τους εξαρτάται από την περιεκτικότητα του μίγματος σε αιθανόλη. Συγκεκριμένα, τα μίγματα αιθανόλης νερού 60/40, 50/50 και 40/60, που στην προηγούμενη μελέτη αποδείχθηκε ότι είναι τα συστήματα διαλυτών με την καλύτερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά, έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στην έναρξη της εκχύλισης, αλλά παρουσιάζουν και τους μεγαλύτερους ρυθμούς μείωσης της ανάκτησης.

**Πίνακας 24.** Συντελεστές  $a$  και  $b$  από την προσαρμογή γραμμών τάσης εκθετικής μορφής για τη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου για κάθε αναλογία μίγματος αιθανόλης/νερού

Διαλύτης εκχύλισης	Συντελεστής $a$ (mg GAE/L)	Συντελεστής $b$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Αιθανόλη	2276	0,038
Μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30	11286	0,043
Μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40	14885	0,048
Μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50	16707	0,050
Μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60	15075	0,050
Νερό	7646	0,044

Αξιοποιώντας τα παραπάνω δεδομένα μπορεί επίσης να υπολογιστεί η μάζα των φαινολικών συστατικών που ανακτάται κάθε χρονική στιγμή. Το ολοκλήρωμα που δίνει την αριθμητική τιμή των φαινολικών ουσιών είναι το εξής:

$$\int_{V_1}^{V_2} C(t)dV$$

Όμως, η ροή του διαλύτη κατά τη διάρκεια του πειράματος θεωρείται σταθερή και ίση με

$$Q = \frac{dV}{dt} \quad (1)$$

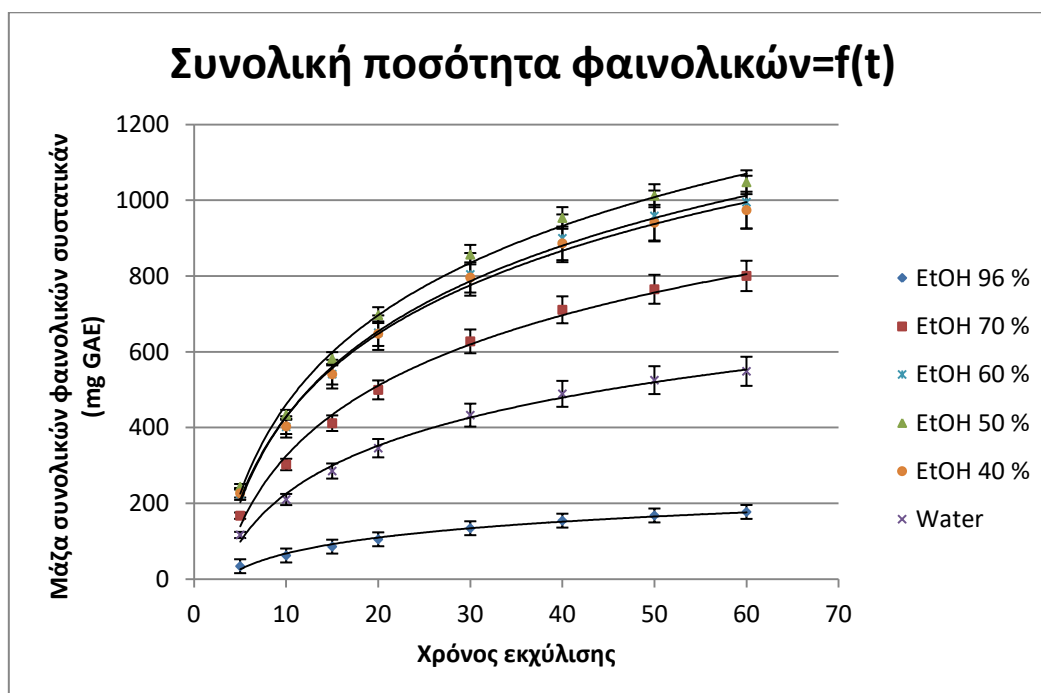
Ενώ η συνάρτηση της συγκέντρωσης συναρτήσει του χρόνου βρέθηκε ότι είναι εκθετική και έχει μορφή:

$$C(t) = ae^{-bt} \quad (2)$$

Έτσι, από τις σχέσεις (1) και (2) το ολοκλήρωμα υπολογίζεται ως εξής:

$$\int_{V_1}^{V_2} C(t)dV = Q \int_{t_1}^{t_2} C(t) dt = Q \int_{t_1}^{t_2} ae^{-bt} dt = -\frac{aQ}{b} \cdot (e^{-bt_2} - e^{-bt_1}) \quad (3)$$

Με βάση αυτή τη σχέση (3), υπολογίζονται τα ολικά φαινολικά συστατικά που εκχυλίζονται ανάμεσα στις χρονικές στιγμές της δειγματοληψίας και αθροίζοντας αυτά προκύπτει η συνολική ποσότητα φαινολικών ενώσεων που έχει ανακτηθεί έως τη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 19).



**Διάγραμμα 19.** Συνολική μάζα φαινολικών συστατικών που έχει ανακτηθεί (σε mg GAE) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (σε min) για όλα τα μίγματα αιθανόλης/νερού

Η αύξηση της συνολικής ποσότητας φαινολικών ενώσεων για τα μίγματα αιθανόλης/νερού 60/40, 50/50 και 40/60 γίνεται με τον ίδιο περίπου ρυθμό, ενώ ο μικρότερος ρυθμός παρατηρείται για την εκχύλιση με καθαρή αιθανόλη. Επίσης, μετά από 60 min εκχύλισης, η περαιτέρω αύξηση της συνολικής ποσότητας φαινολικών ουσιών φαίνεται να γίνεται με πολύ αργό ρυθμό. Έτσι, συμπεραίνεται ότι για τη ροή που επιλέχθηκε (3,3 mL/min) το διάστημα της μίας ώρας είναι ικανοποιητικό για την λήξη της εκχύλισης, καθώς με τη συνέχεια της διεργασίας αυξάνεται η σπατάλη του διαλύτη, καθώς ανακτάται μικρή ποσότητα φαινολών. Αυτό, θα είχε ως αποτέλεσμα να αραιώνεται όλο και περισσότερο το συνολικό εκχύλισμα, αν η διεργασία δεν διακοπεί στα 60 min.

Τέλος, στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 25), συγκρίνονται οι θεωρητικές τιμές συνολικής ποσότητας φαινολικών ουσιών επί ξηρού βάρους φυτού με τις πειραματικές τιμές που προέκυψαν από τη μέθοδο Folin –Ciocalteu για τα ολικά εκχυλίσματα με μίγματα αιθανόλης/νερού.

**Πίνακας 25.** Θεωρητική και πειραματική τιμή για τη συνολική ποσότητα φαινολικών ουσιών που ανακτήθηκε από δείγμα βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού

Διαλύτης εκχύλισης	Πειραματική τιμή (mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού)	Θεωρητική τιμή (mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού)
Αιθανόλη	11,2 ± 0,9	9,8 ± 0,7
Μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30	43,9 ± 0,2	44,2 ± 0,9
Μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40	47,5 ± 1,9	55,0 ± 1,3
Μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50	51,7 ± 1,0	57,9 ± 2,0
Μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60	50,8 ± 1,2	53,8 ± 0,9
Νερό	30,5 ± 1,0	30,3 ± 0,6

Οι διαφορές μεταξύ των θεωρητικών και πειραματικών τιμών είναι μικρές και όχι στατιστικά σημαντικές (συντελεστής μεταβλητότητας CV<10%). Επομένως, η προσομοίωση της διεργασίας με εκθετική συνάρτηση κρίνεται ικανοποιητική.

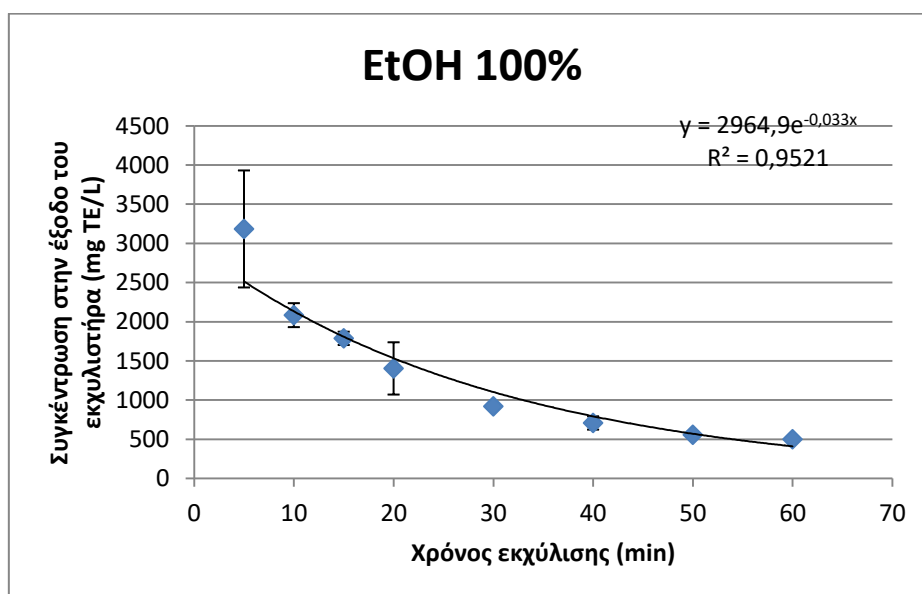
### 3.3.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα

**Πίνακας 26.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών (σε mg TE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου για κάθε αναλογία μίγματος αιθανόλης/νερού

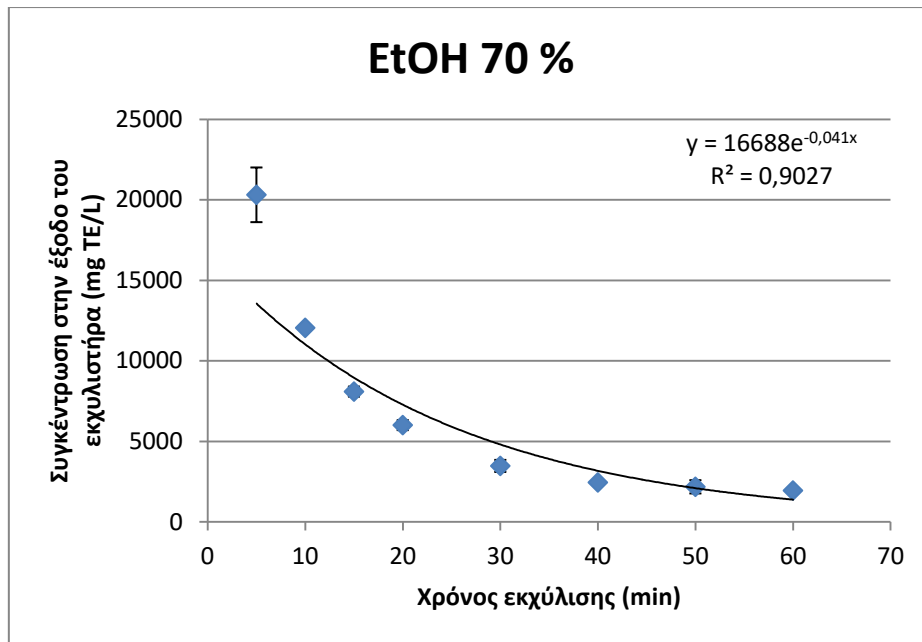
Χρόνος (min)	Αναλογία μίγματος αιθανόλης/ νερού					
	100/0	70/30	60/40	50/50	40/60	0/100
5	3184 ± 747	20312 ± 1697	27392 ± 962	23192 ± 3469	28832 ± 5994	15232 ± 2772
10	2084 ± 153	12052 ± 28	14632 ± 1414	14432 ± 2933	16412 ± 2346	9112 ± 2150
15	1788 ± 85	8092 ± 311	9712 ± 396	11072 ± 1896	11672 ± 2828	6012 ± 820
20	1404 ± 334	6012 ± 311	6692 ± 481	6412 ± 639	7312 ± 877	4322 ± 552
30	920 ± 28	3477 ± 375	4107 ± 912	3892 ± 296	4182 ± 806	3042 ± 410
40	708 ± 85	2452 ± 17	-	2962 ± 46	-	2032 ± 141
45	-	-	2108 ± 141	-	2224 ± 107	-
50	557 ± 41	2180 ± 413	-	1080 ± 106	-	1004 ± 673
60	500 ± 1	1948 ± 62	1772 ± 187	1612 ± 17	1636 ± 277	856 ± 503



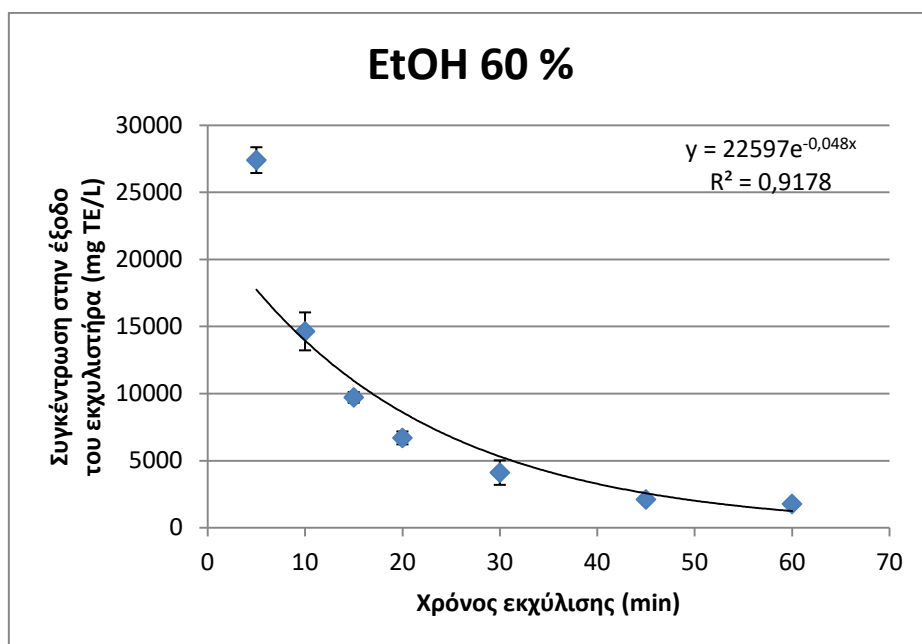
Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 26) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο DPPH για την εύρεση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών συστατικών στην έξοδο του εκχυλιστήρα για τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Σε αντιστοιχία με την προηγούμενη ενότητα, η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών συστατικών στην έξοδο του εκχυλιστήρα μειώνεται εκθετικά. Στα πειραματικά σημεία συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου γίνεται προσαρμογή εκθετικής συνάρτησης της μορφής:  $f(t) = a \cdot e^{-bt}$ , με ικανοποιητικό συντελεστή συσχέτισης  $R^2 > 0,9$  (Διάγραμμα 20 έως Διάγραμμα 25). Ο συντελεστής  $a$  έχει μονάδες mg TE/L και αντιπροσωπεύει τη θεωρητική συγκέντρωση στην έξοδο του εκχυλιστήρα την χρονική στιγμή  $t=0$ . Ο συντελεστής  $b$  έχει μονάδες  $\text{min}^{-1}$  και εκφράζει το ρυθμό μείωσης της ανάκτησης των φαινολικών συστατικών.



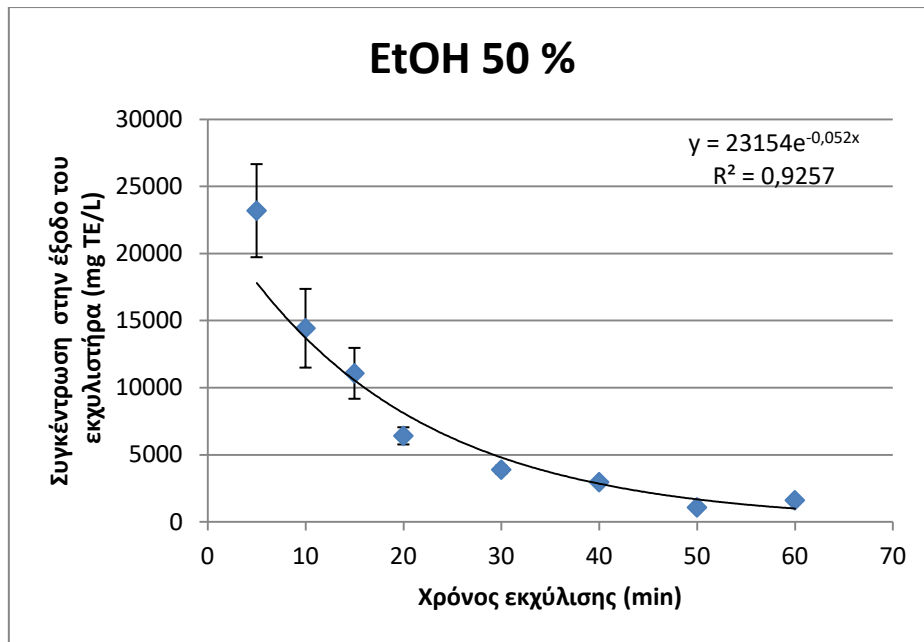
**Διάγραμμα 20.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών (σε mg TE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για καθαρή αιθανόλη



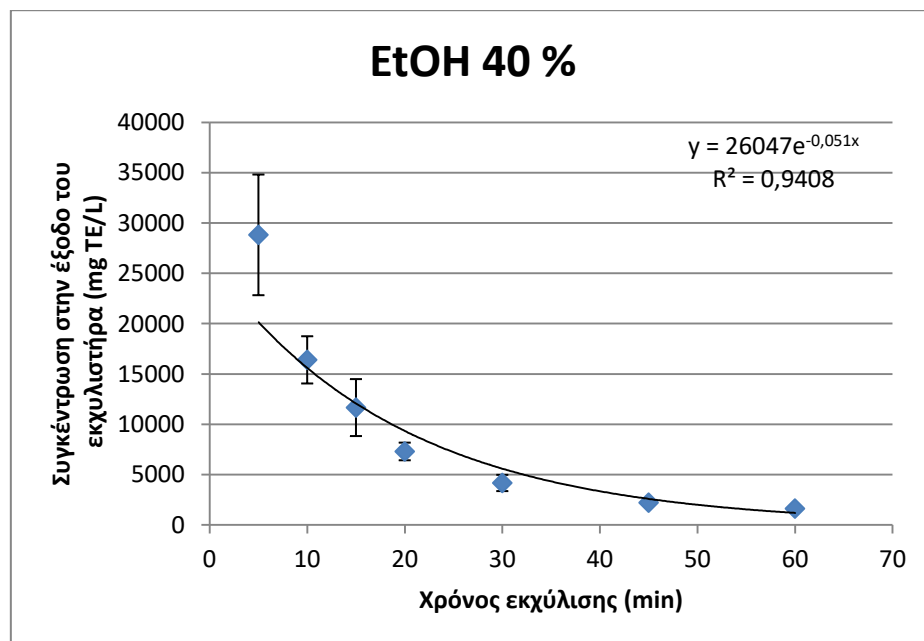
**Διάγραμμα 21.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών (σε mg TE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30



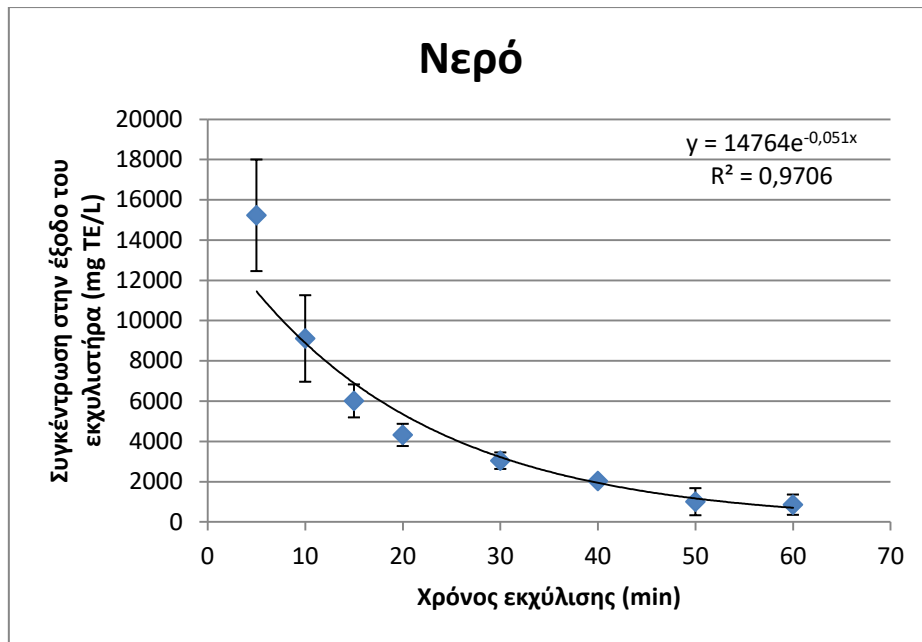
**Διάγραμμα 22.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών (σε mg TE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40



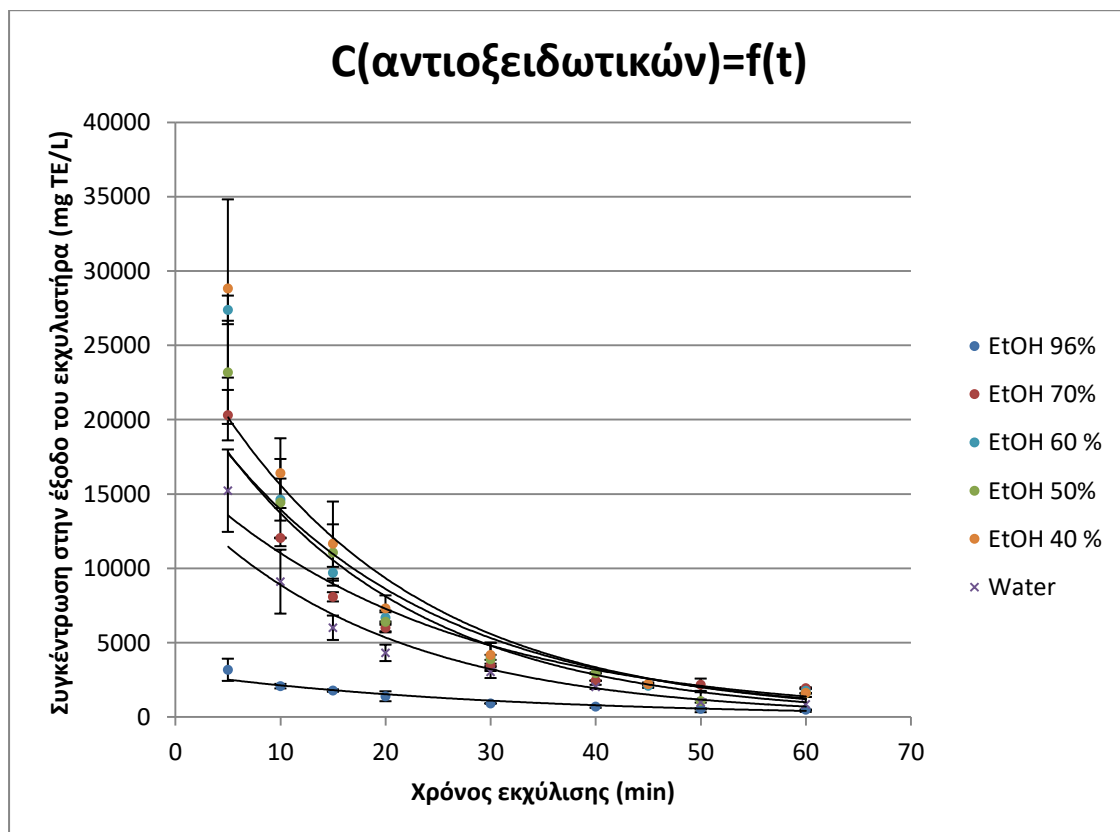
**Διάγραμμα 23.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών (σε mg TE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50



**Διάγραμμα 24.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών (σε mg TE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60



**Διάγραμμα 25.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών (σε mg TE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για καθαρό νερό



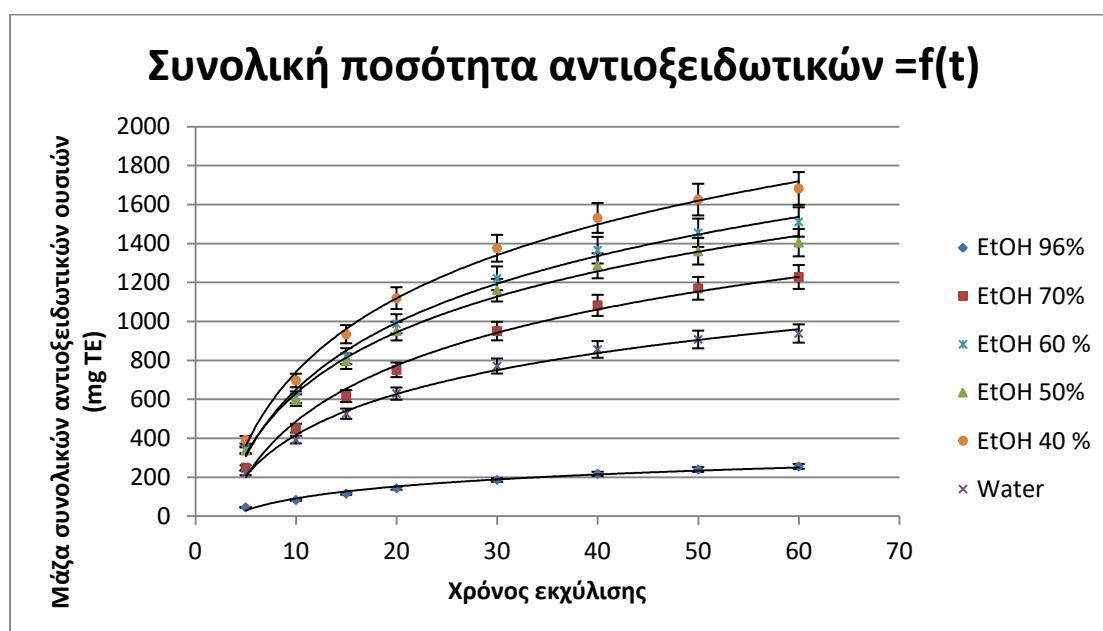
**Διάγραμμα 26.** Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών (σε mg TE/L) στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου (σε min) για τα μίγματα αιθανόλης/νερού

Από το συγκεντρωτικό διάγραμμα (Διάγραμμα 26) και από τις τιμές των συντελεστών  $a$  και  $b$  (Πίνακας 27) φαίνεται ότι τα μίγματα αιθανόλης/νερού 60/40, 50/50 και 40/60 έχουν τη μεγαλύτερη θεωρητική συγκέντρωση στην έναρξη της εκχύλισης. Τα αντίστοιχα μίγματα έδειξαν και στην προηγούμενη μελέτη ότι έχουν την μεγαλύτερη ανάκτηση σε αντιοξειδωτικά. Ως προς το ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών, η αιθανόλη έχει τον μικρότερο με διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα, που παρουσιάζουν παρόμοιους ρυθμούς μείωσης ανάκτησης αντιοξειδωτικών.

**Πίνακας 27.** Συντελεστές  $a$  και  $b$  από την προσαρμογή γραμμών τάσης εκθετικής μορφής για τη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου για κάθε αναλογία μίγματος αιθανόλης/νερού

Διαλύτης εκχύλισης	Συντελεστής $a$ (mg TE/L)	Συντελεστής $b$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Αιθανόλη	2965	0,033
Μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30	16688	0,041
Μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40	22597	0,048
Μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50	23154	0,052
Μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60	26047	0,050
Νερό	14764	0,051

Ακόμη, υπολογίζεται η συνολική μάζα αντιοξειδωτικών, ως ισοδύναμα trolox, που έχουν ανακτηθεί έως την στιγμή κάθε δειγματοληψίας. Για αυτό το σκοπό αξιοποιούνται οι εξισώσεις των συναρτήσεων που προέκυψαν από την προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών συστατικών στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου. Μέσω την εξίσωσης 3, που χρησιμοποιήθηκε και προηγουμένως, υπολογίζεται η συνολική ποσότητα αντιοξειδωτικών ουσιών που έχει ανακτηθεί έως τη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 27).



**Διάγραμμα 27.** Συνολική μάζα αντιοξειδωτικών συστατικών που έχει ανακτηθεί (σε mg TE) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (σε min) για όλα τα μίγματα αιθανόλης/νερού

Σε αυτό το διάγραμμα παρατηρείται ότι η μάζα των αντιοξειδωτικών μεταβάλλεται διαφορετικά για κάθε μίγμα αιθανόλης/νερού. Πιο αργή αύξηση φαίνεται να υπάρχει στους καθαρούς διαλύτες. Τα μίγματα αιθανόλης/νερού 60/40 και 50/50 ακολουθούν την ίδια πορεία, ενώ η ταχύτερη αύξηση επιτυγχάνεται με το μίγμα αιθανόλης νερού 40/60. Σε όλες τις εκχυλίσεις παρατηρείται ότι τα τελευταία λεπτά σημειώνεται μικρή αύξηση της συνολικής ποσότητας αντιοξειδωτικών. Επομένως, η συνέχεια της εκχύλιση δε θα οδηγούσε σε σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ολικού εκχυλίσματος.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 28), συγκρίνονται οι θεωρητικές τιμές συνολικής ποσότητας αντιοξειδωτικών επί ξηρού βάρους φυτού στο τέλος της εκχύλισης με τις πειραματικές τιμές που προέκυψαν από τη μέθοδο DPPH για τα ολικά εκχυλίσματα με μίγματα αιθανόλης/νερού. Οι πειραματικές και οι θεωρητικές τιμές για τους καθαρούς διαλύτες και το μίγμα αιθανόλης νερού 70/30 δεν εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις. Για τα υπόλοιπα μίγματα αιθανόλης/νερού, όμως, παρατηρούνται μεγαλύτερες διαφορές. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως δεν υπήρχε καλή προσομοίωση μέσω των εκθετικών συναρτήσεων. Ωστόσο, οι τρεις αναλογίες (60/40, 50/50 και 40/60) δίνουν θεωρητικά και πειραματικά τη μεγαλύτερη απόδοση σε αντιοξειδωτικά συστατικά.

**Πίνακας 28.** Θεωρητική και πειραματική τιμή για τη συνολική ποσότητα αντιοξειδωτικών ουσιών που ανακτήθηκε από δείγμα βαλσαμόχορτου με μίγματα αιθανόλης/νερού

Διαλύτης εκχύλισης	Πειραματική τιμή (mg TE/g ξηρού βάρους φυτού)	Θεωρητική τιμή (mg TE/g ξηρού βάρους φυτού)
Αιθανόλη	13,2 ± 0,2	14,1 ± 0,8
Μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30	64,2 ± 3,6	67,9 ± 4,5
Μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40	72,9 ± 1,8	83,5 ± 3,8
Μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50	86,1 ± 1,5	77,6 ± 3,5
Μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60	79,4 ± 6,5	93,0 ± 7,9
Νερό	53,1 ± 1,6	51,8 ± 2,2

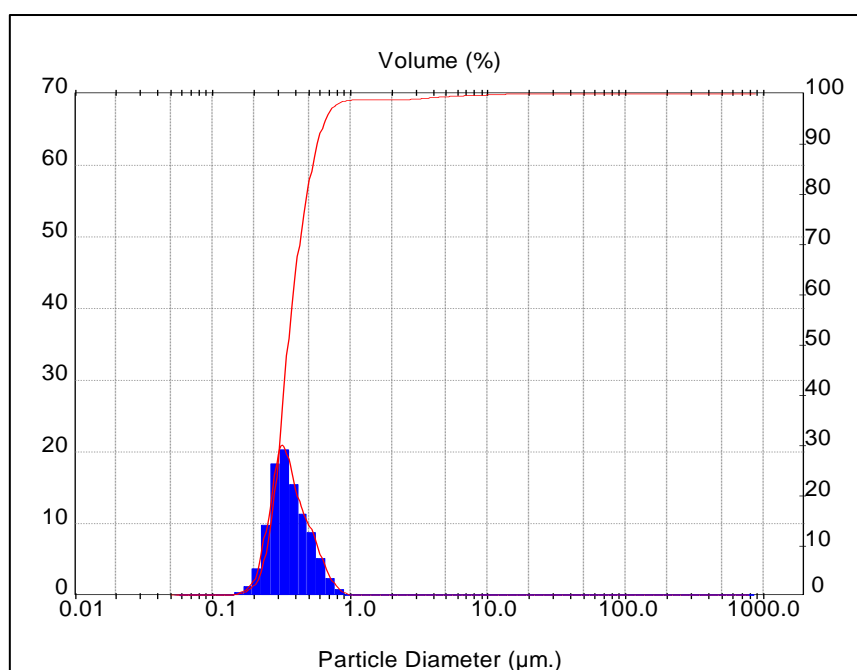
### 3.4. Γαλάκτωμα βιοδραστικών συστατικών βαλσαμόχορτου

#### 3.4.1. Μέγεθος και κατανομή των σωματιδίων

Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν προέκυψε ο παρακάτω πίνακας τιμών (Πίνακας 29). Όπως αυτές αποδεικνύουν, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νανογαλακτώματος (μέγεθος σωματιδίων <0,5 μm) με εξαιρετική κατανομή μεγέθους σωματιδίων. Η μέση τιμή του μεγέθους των σωματιδίων προκύπτει  $0,43 \pm 0,02$  μm και η τιμή Span υποδεικνύει ότι πρόκειται για μια πολύ στενή κατανομή μεγέθους. Πράγματι, από το διάγραμμα κατανομής μεγέθους (Διάγραμμα 28) επιβεβαιώνεται ότι δεν υπάρχει μεγάλο εύρος τιμών του μεγέθους των σωματιδίων, ακολουθείται μια κανονική κατανομή και παρατηρείται μόνο μια ομάδα σωματιδίων (μία κορυφή).

**Πίνακας 29.** Αποτελέσματα κατανομής μεγέθους σωματιδίων γαλακτώματος

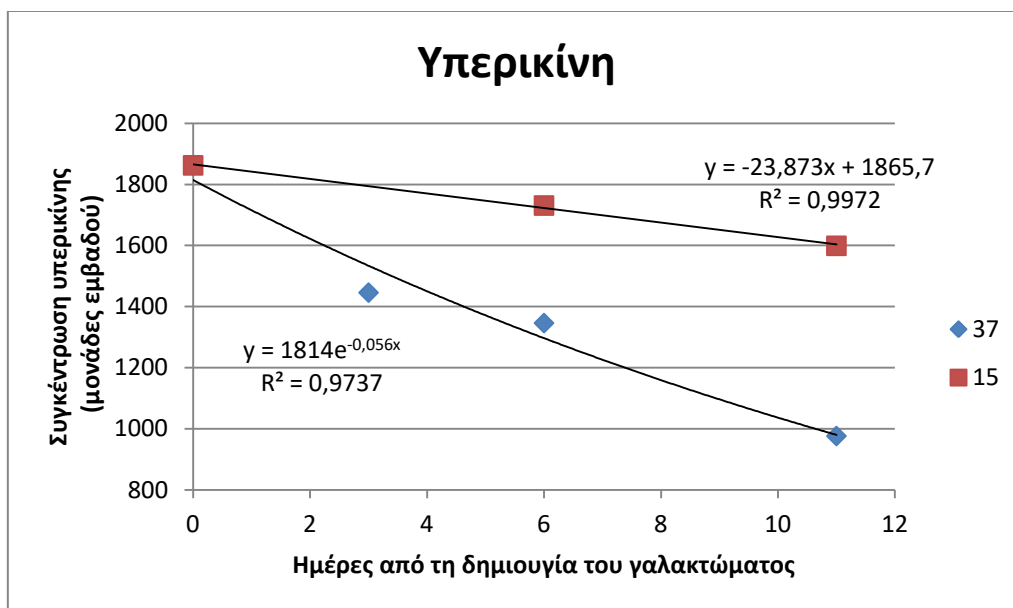
Μέτρηση	D(v, 0,1)	D(v, 0,5)	D(v, 0,9)	D[4, 3]	D[3, 2]	Span
1	0,25	0,35	0,58	0,46	0,35	0,9303
2	0,26	0,35	0,57	0,42	0,35	0,8940
3	0,25	0,35	0,57	0,44	0,35	0,9147
4	0,25	0,35	0,57	0,41	0,35	0,9022
5	0,25	0,35	0,57	0,41	0,35	0,8991
<b>Μέση τιμή</b>	0,25	0,35	0,57	0,43	0,35	0,9081
<b>Τυπική απόκλιση</b>	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,0146



**Διάγραμμα 28.** Κατανομή μεγέθους σωματιδίων του γαλακτώματος και αθροιστική σχετική συχνότητα επί τοις εκατό

### 3.4.2. Διατηρησιμότητα υπερικίνης και υπερφορίνης στο γαλάκτωμα

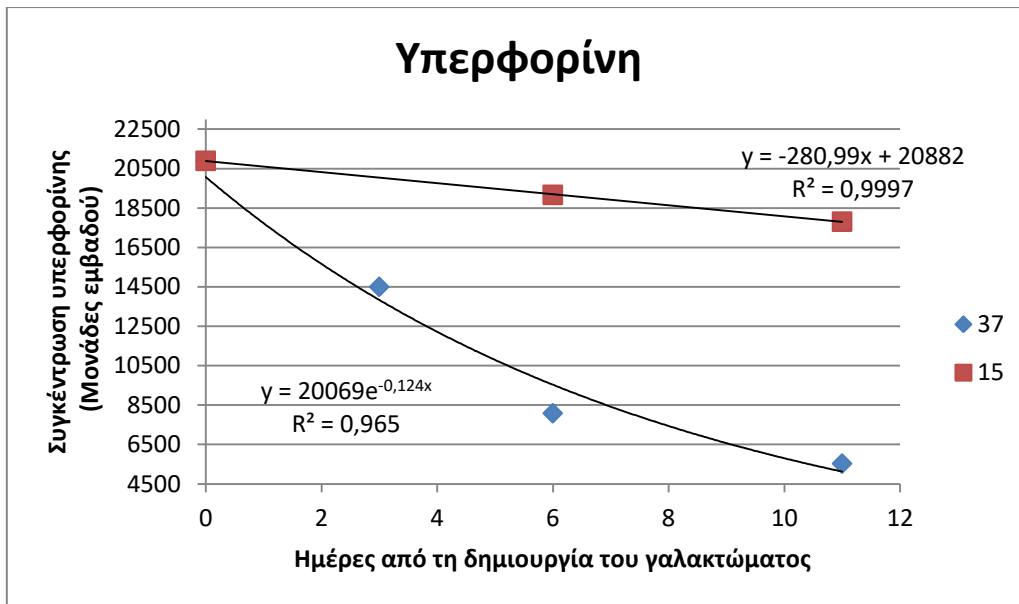
Τα πειράματα μελέτης της διατηρησιμότητας της υπερικίνης και της υπερφορίνης στο γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε χρειάστηκε να διακοπούν στις 11 μέρες, καθώς δεν υπήρχε δυνατότητα μετρήσεων κατά την καλοκαιρινή περίοδο. Ως αποτέλεσμα, η μείωση της συγκέντρωσης αυτών των συστατικών που παρατηρήθηκε για τη διάρκεια των μετρήσεων δεν είναι σημαντική για την πλήρη παρακολούθηση του φαινομένου. Επιπροσθέτως, η μετρήσεις για τους 15 °C την τρίτη μέρα από την παρασκευή του γαλακτώματος δεν πραγματοποιήθηκαν λόγω μεγάλου όγκου αναλύσεων στον χρωματογράφο, που είχε αποτέλεσμα την εξάντληση των διαλυτών για ανάλυση. Τέλος, αντίστοιχα με τα προηγούμενα κεφάλαια, η ποσοτικοποίηση που γίνεται είναι σχετική και υπολογίζεται σε μονάδες εμβαδού.



**Διάγραμμα 29.** Συγκέντρωση υπερικίνης (σε Μονάδες εμβαδού) στα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν συναρτήσει του χρόνου (σε ημέρες) έπειτα από αποθήκευση τους στους 15 και στους 37 °C όπως προέκυψε από ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Πιο συγκεκριμένα, τόσο για την υπερικίνη όσο και για την υπερφορίνη, η μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών για το γαλάκτωμα που φυλάσσεται στους 15 °C, για το διάστημα των πρώτων έντεκα ημερών είναι ακόμη γραμμική. Η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης για τις δύο ουσίες είναι η ίδια (14,1 % για την υπερικίνη και 14,8 % για την υπερφορίνη).





**Διάγραμμα 30.** Συγκέντρωση υπερφορίνης (σε Μονάδες εμβαδού) στα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν συναρτήσει του χρόνου (σε ημέρες) έπειτα από αποθήκευση τους στους 15 και στους 37 °C όπως προέκυψε από ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Όπως αναμένεται, η πρόοδος του φαινομένου για τα γαλακτώματα που αποθηκεύονται σε θερμότερο περιβάλλον (37 °C) είναι μεγαλύτερη. Με την πάροδο των έντεκα ημερών η συγκεντρώσεις της υπερικίνης και της υπερφορίνης έχουν μειωθεί κατά 47,6 και 73,5 %, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με το πείραμα στους 15 °C, η μείωση σε αυτή την περίπτωση είναι εκθετική και προσαρμόζοντας εκθετική συνάρτηση της μορφής  $f(t) = a \cdot e^{-bt}$ , παρατηρείται ότι και σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση της υπερφορίνης μειώνεται με μεγαλύτερο ρυθμό (συντελεστής  $b$  -0,124 για την υπερφορίνη και -0,056 για την υπερικίνη).

Συμπερασματικά, η υπερφορίνη βρέθηκε πιο ασταθής από την υπερικίνη στο γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε.

## 4. Συμπεράσματα και Προτάσεις

Το βαλσαμόχορτο (*St. John's wort* ή *Hypericum perforatum* L.) περιέχει πλήθος βιοδραστικών ουσιών. Μεταξύ άλλων, είναι πηγή φαινολικών ουσιών με αντιοξειδωτική, αντικαταθλιπτική και αντιμικροβιακή δράση. Οι σημαντικότερες κατηγορίες αυτών είναι οι ναφθοδιανθρόνες, οι φλορογλυκινόλες και τα φλαβονοειδή. Το ενδιαφέρον για το φυτό αυξάνεται έναντι των άλλων φυτών που είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, λόγω της παρουσίας της υπερικίνης και της υπερφορίνης που απαντώνται κυρίως στο βαλσαμόχορτο. Η μελέτη της δράσης όλων των παραπάνω βιοδραστικών και η βελτιστοποίηση της εκχύλισης τους από το φυτό είναι σημαντική για την εκμετάλλευση του βαλσαμόχορτου στη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών.

Για τη μελέτη της εκχύλισης των συστατικών έγινε χρήση εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου σταθερής κλίνης, ώστε να διατηρείται στο μέγιστο το δυναμικό της μεταφοράς ουσιών από το δείγμα βαλσαμόχορτου στον εκάστοτε διαλύτη, λόγω της συνεχούς κυκλοφορίας καθαρού διαλύτη. Η μέθοδος αποδείχθηκε εύκολη στη χρήση, πλεονεκτεί έναντι της συμβατικής διαβροχής, καθώς δεν απαιτείται διαχωρισμός φυτόμαζας και εκχυλίσματος, ενώ, τέλος, μελετώντας την κινητική της εκχύλισης μπορεί να ελαχιστοποιηθεί η σπατάλη διαλύτη, που αποτελεί το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου.

Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση του διαλύτη εκχύλισης. Η χρήση μίγματος αιθανόλης/νερού οδηγεί σε μεγαλύτερη ανάκτηση φαινολικών συστατικών και τα καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζονται για μίγματα περιεκτικότητας 40 έως 60 % σε αιθανόλη. Περιεκτικότητα σε αιθανόλη 60 % είχε την καλύτερη ανάκτηση σε υπερικίνη και υπερφορίνη μεταξύ των παραπάνω αλλά ελαφρώς μικρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Σχετικά με την ταυτοποίηση των συστατικών, σημαντική είναι η αξιοποίηση των δεδομένων που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία για την ποσοτικοποίηση του με τη χρήση εξωτερικού προτύπου. Επίσης, τα δεδομένα μπορούν να αξιοποιηθούν για την μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή, που επίσης συνεισφέρουν στις φαρμακολογικές δράσεις του φυτού.

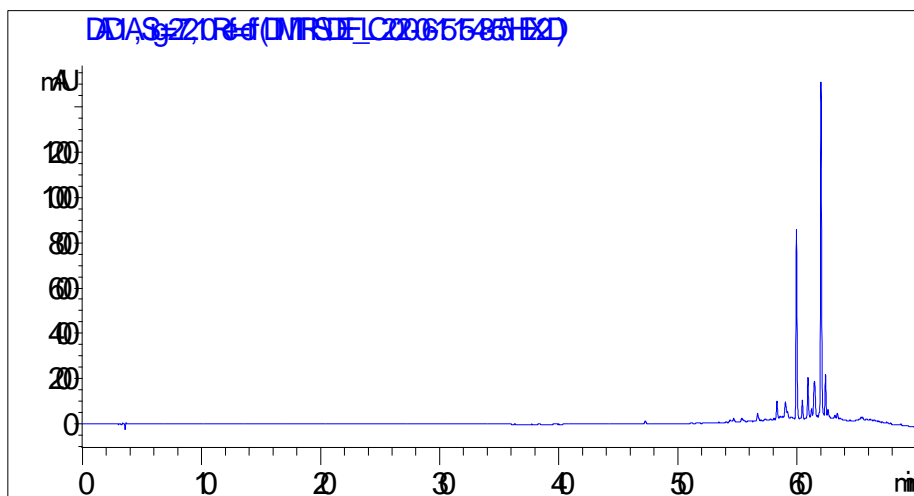
Ακολούθησε κινητική μελέτη για την πρόβλεψη των συνθηκών παραλαβής φαινολικών συστατικών με μίγματα αιθανόλης/νερού. Η προσαρμογή εκθετικής καμπύλης της μορφής  $f(t) = a \cdot e^{-bt}$  στα πειραματικά σημεία συγκέντρωσης φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών στην έξοδο του εκχυλιστήρα συναρτήσει του χρόνου φαίνεται να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην πρόβλεψη της τελικής ποσότητας των παραπάνω ουσιών στο εκχύλισμα. Από τα αποτελέσματα, επίσης, διαπιστώθηκε ότι για την ροή που επιλέχθηκε (3,3 mL/min) ο χρόνος εκχύλισης των 40 min είναι ικανοποιητικός, καθώς μετά από αυτό το χρονικό σημείο, η αύξηση της ποσότητας των φαινολικών και αντιοξειδωτικών συστατικών είναι μικρή (<10 %), με αποτέλεσμα να γίνεται σπατάλη διαλύτη και να αραιώνεται το τελικό εκχύλισμα. Η βελτίωση του μοντέλου μπορεί να επιτευχθεί χωρίζοντας την εκχύλιση σε ταχύ και βραδύ στάδιο για την καλύτερη προσαρμογή των πειραματικών σημείων.

Ως προς τη δυνατότητα διαχωρισμού της υπερφορίνης από την υπερικίνη, στόχος είναι η δημιουργία εκχυλίσματος απουσία υπερικίνης. Το μοναδικό εκχύλισμα στο οποίο δεν ανιχνεύθηκε υπερικίνη προέκυψε από την εκχύλιση με εξάνιο, που ανακτά σχεδόν αποκλειστικά υπερφορίνη και πολύ λιγότερο λοιπές φαινολικές ενώσεις. Το εκχύλισμα με διαλύτη το εξάνιο εμφάνισε επίσης πολύ μικρή αντιοξειδωτική δράση ( $1,4 \pm 0,2$  mg TE/g

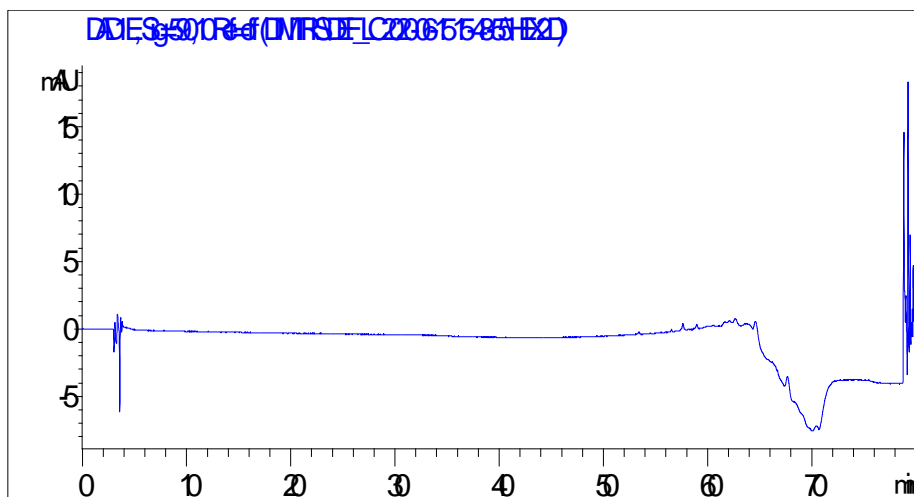
ξηρού βάρους φυτού). Άρα, συμπεραίνεται ότι η υπερφορίνη δεν έχει καλή αντιοξειδωτική ικανότητα και δεν συνεισφέρει στη συνολική αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων βαλσαμόχορτου.

Εκτός από τη μελέτη εκχύλισης, ιδιαίτερη σημασία έχει και η αξιοποίηση των ευρημάτων στη δημιουργία ενός προϊόντος βαλσαμόχορτου. Σε αυτή την προσπάθεια, παρασκευάστηκε γαλάκτωμα χρησιμοποιώντας αιθανολικό εκχύλισμα βαλσαμόχορτου. Το αποτέλεσμα από την εφαρμογή της μεθόδου των Almeida et al. (2010) ήταν ένα νανογαλάκτωμα με μέση διάμετρο σωματιδίων  $0,43 \pm 0,02$   $\mu\text{m}$  και στενή κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων. Η μέθοδος παρασκευής του γαλακτώματος είναι απλή και προτείνεται η περεταίρω μελέτη της για παρασκευή προϊόντων τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Η παρακολούθηση της διατηρησιμότητας της υπερικίνης και της υπερφορίνης στο παραπάνω γαλάκτωμα σε θερμοκρασίες 15 και 37 °C είχε διάρκεια 11 ημέρες. Σε αυτό το διάστημα στους 15 °C δε σημειώθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτώματος στα παραπάνω συστατικά. Στους 37 °C, όμως, το διάστημα αυτό ήταν αρκετό για την αποικοδόμηση τους σε μεγάλο βαθμό, με την υπερφορίνη να είναι πιο ασταθής από την υπερικίνη στο γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε. Επομένως, ένα προϊόν που παρασκευάζεται με την παραπάνω διαδικασία φαίνεται ότι θα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για την αύξηση της διατηρησιμότητας στο τελικό προϊόν πρέπει να γίνει χρήση κατάλληλων εκδόχων που να προστατεύουν τα συστατικά. Επίσης, προτείνεται η επέκταση της μελέτης για μεγαλύτερο διάστημα, μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών και η παρακολούθηση της συγκέντρωσης και άλλων βιοδραστικών στο γαλάκτωμα.

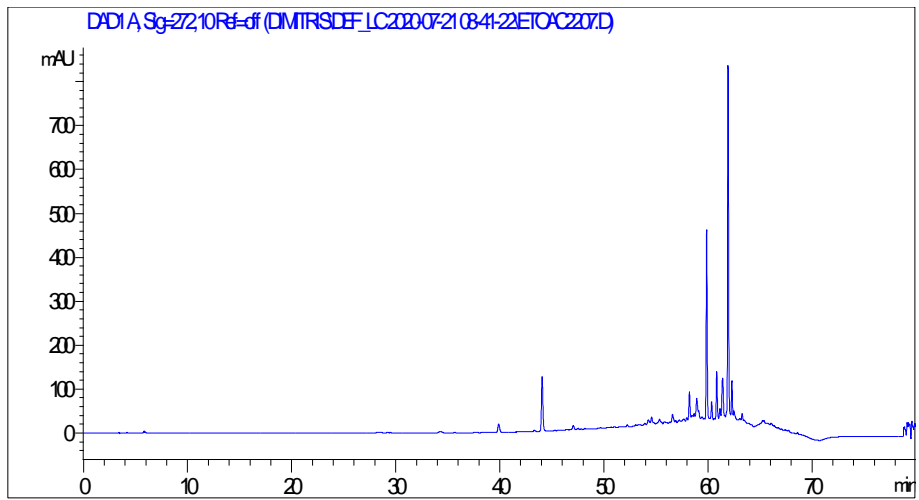
## 5. Παράρτημα



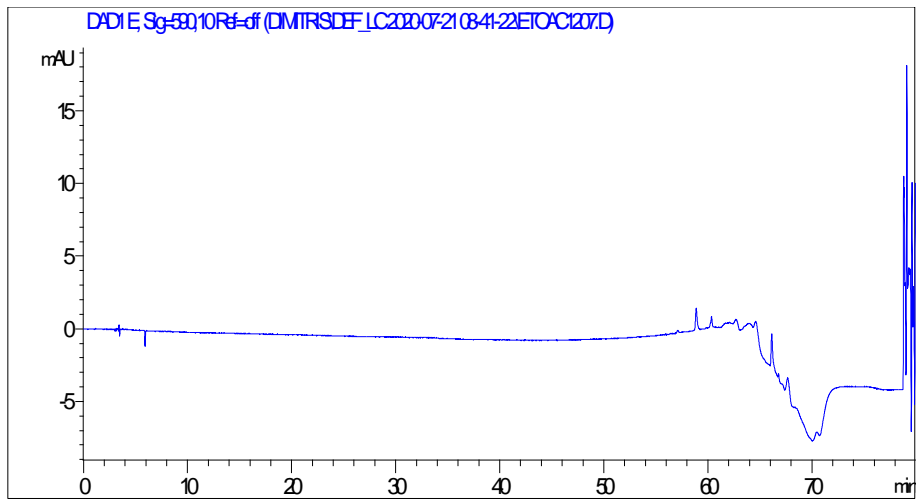
Εικόνα 33. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με εξάνιο στα 272 nm



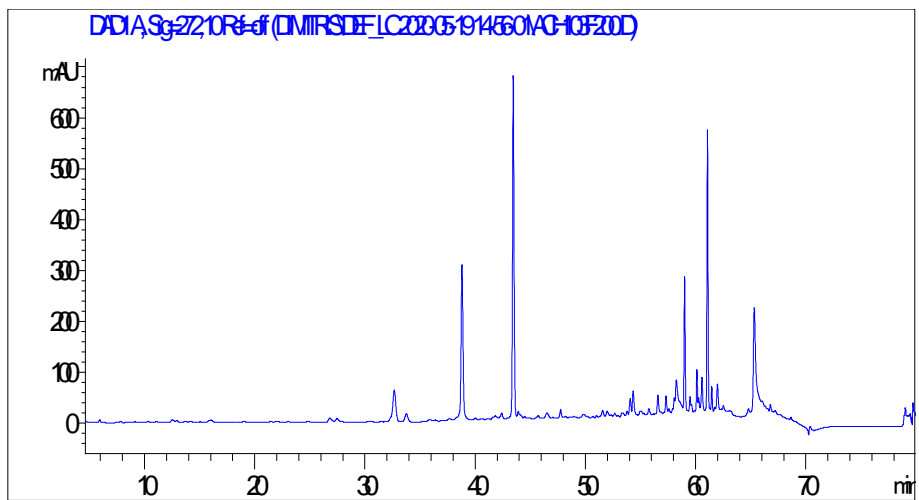
Εικόνα 34. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με εξάνιο στα 590 nm



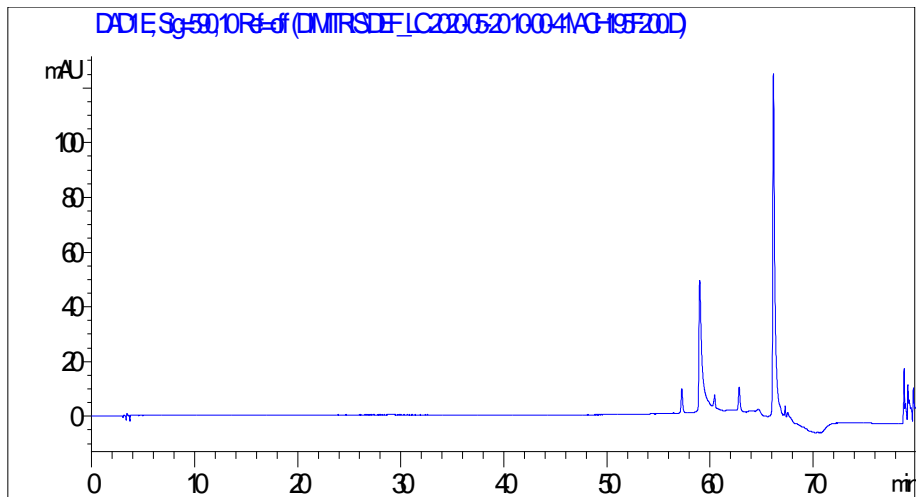
Εικόνα 35. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με οξικό αιθυλεστέρα στα 272 nm



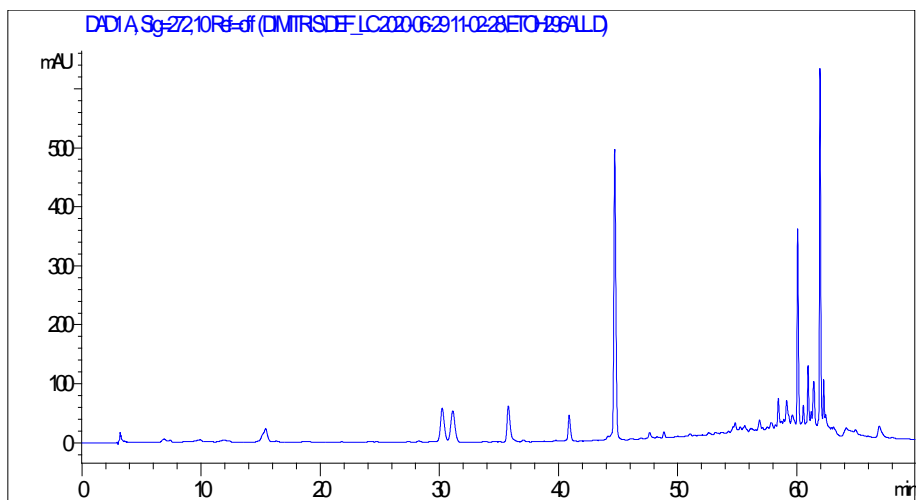
Εικόνα 36. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με οξικό αιθυλεστέρα στα 590 nm



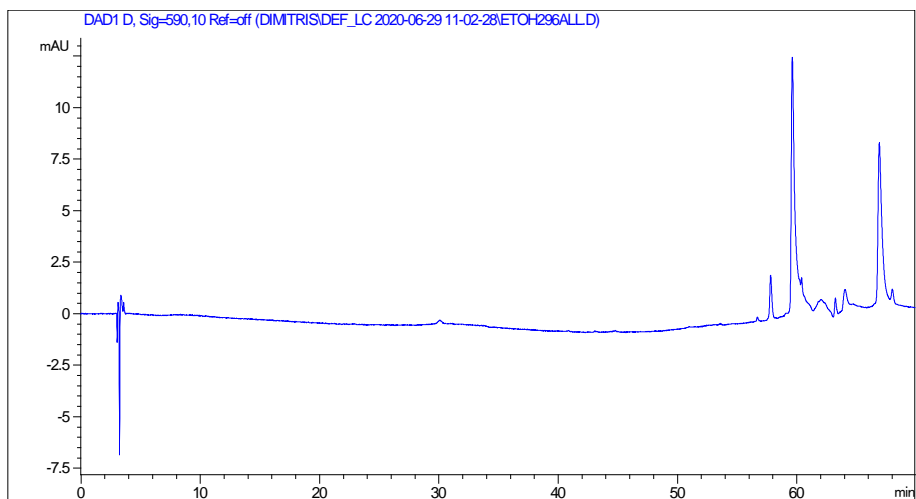
Εικόνα 37. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με ακετόνη στα 272 nm



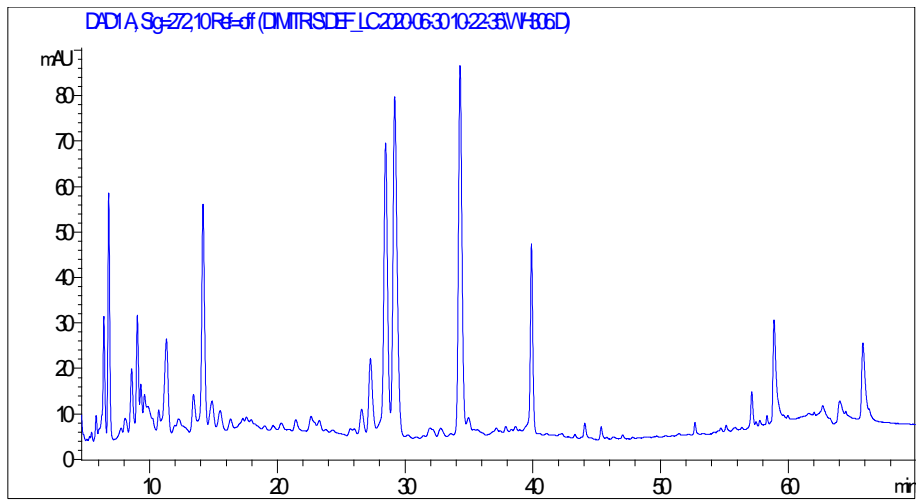
**Εικόνα 38.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με ακετόνη στα 590 nm



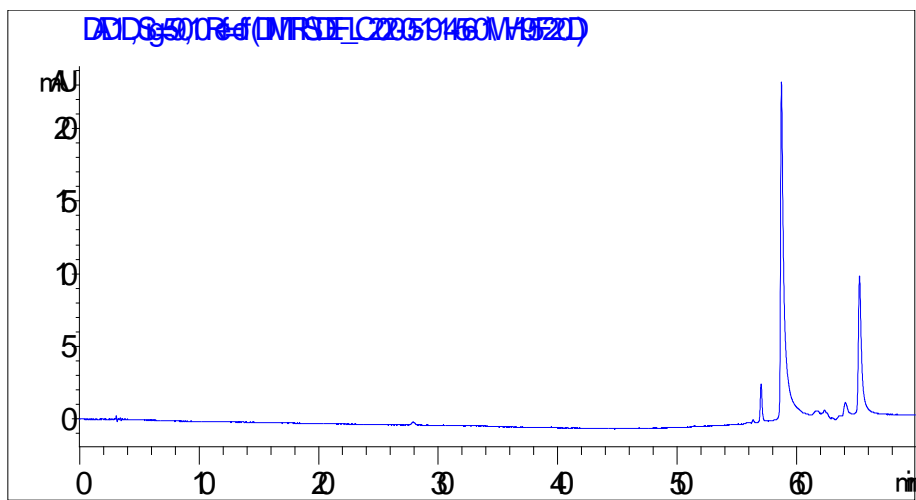
**Εικόνα 39.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με αιθανόλη στα 272 nm



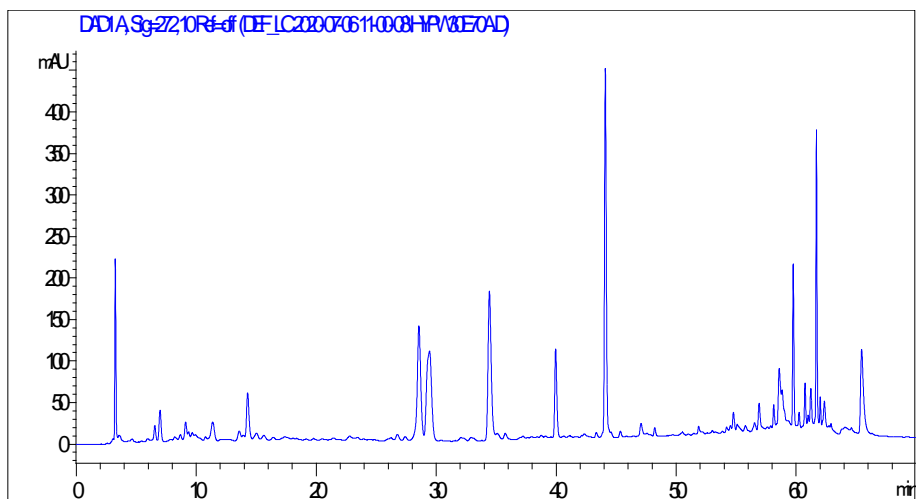
**Εικόνα 40.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με αιθανόλη στα 590 nm



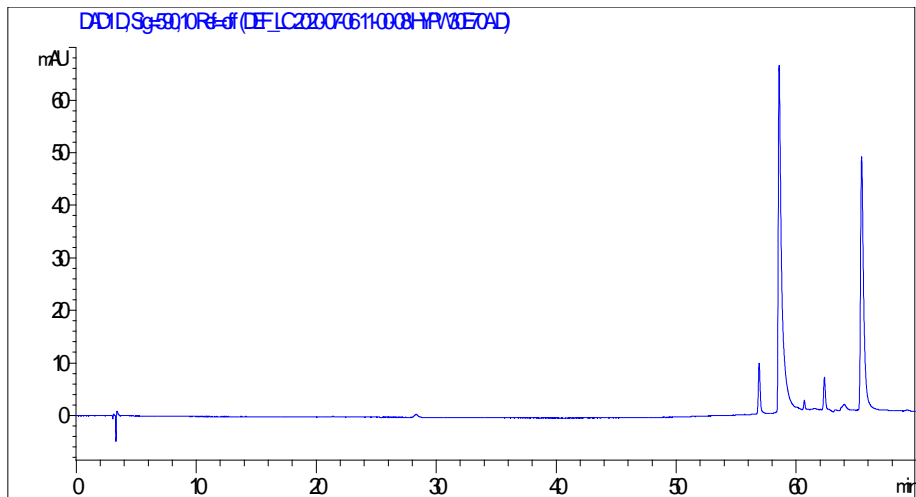
Εικόνα 41. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με νερό στα 272 nm



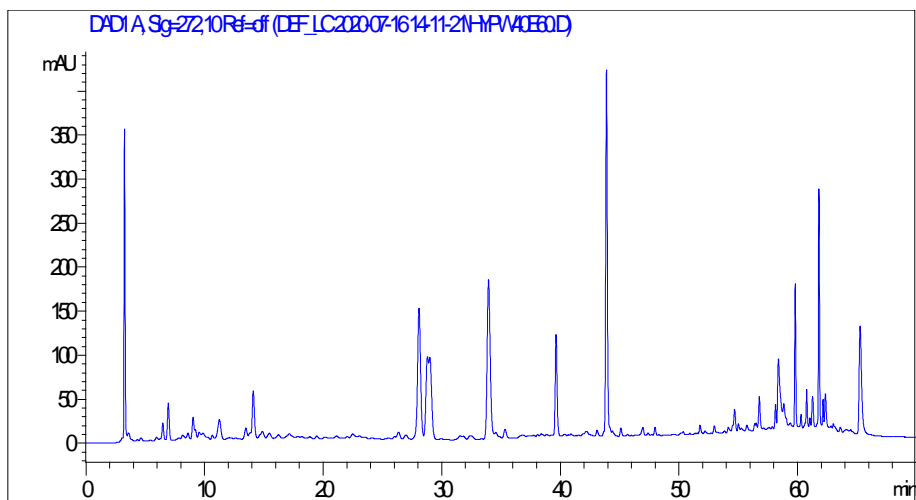
Εικόνα 42. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με νερό στα 590 nm



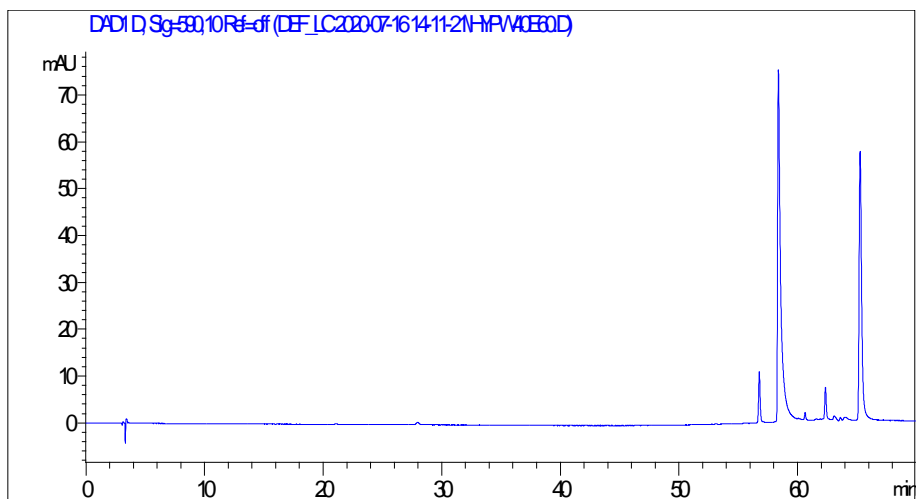
Εικόνα 43. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30 στα 272 nm



Εικόνα 44. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 70/30 στα 590 nm

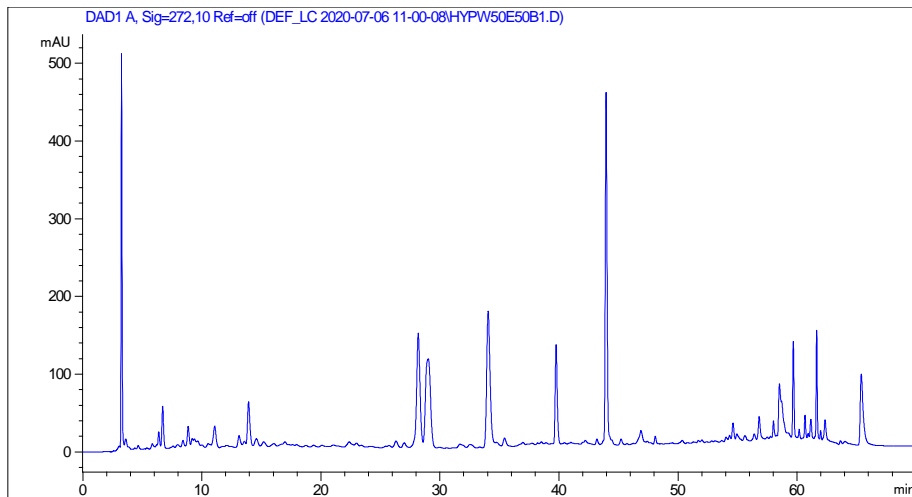


Εικόνα 45. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40 στα 272 nm

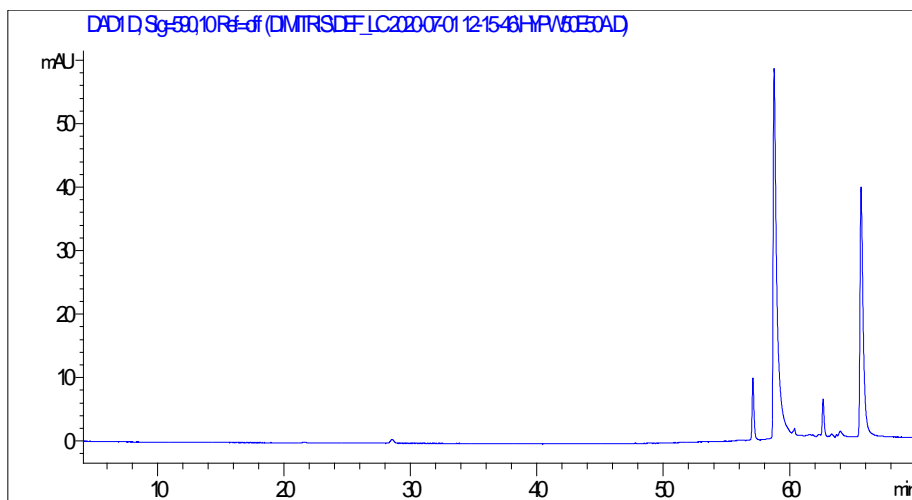


Εικόνα 46. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 60/40 στα 590 nm

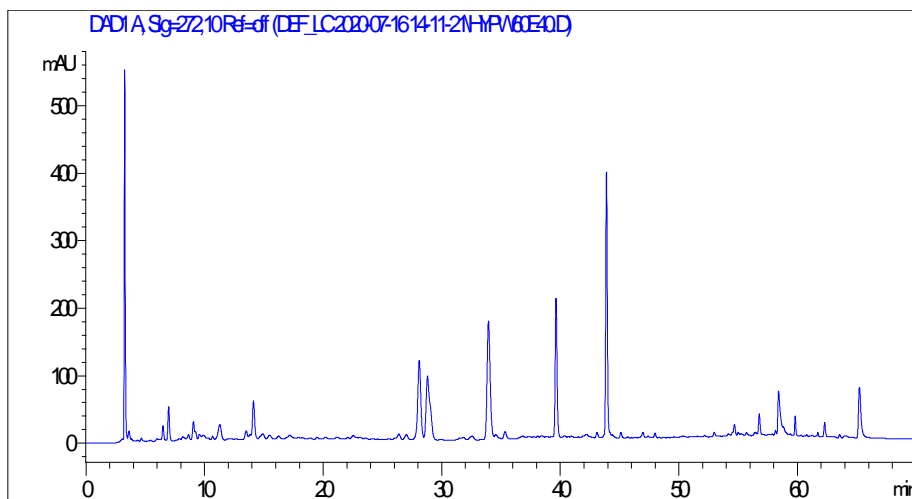




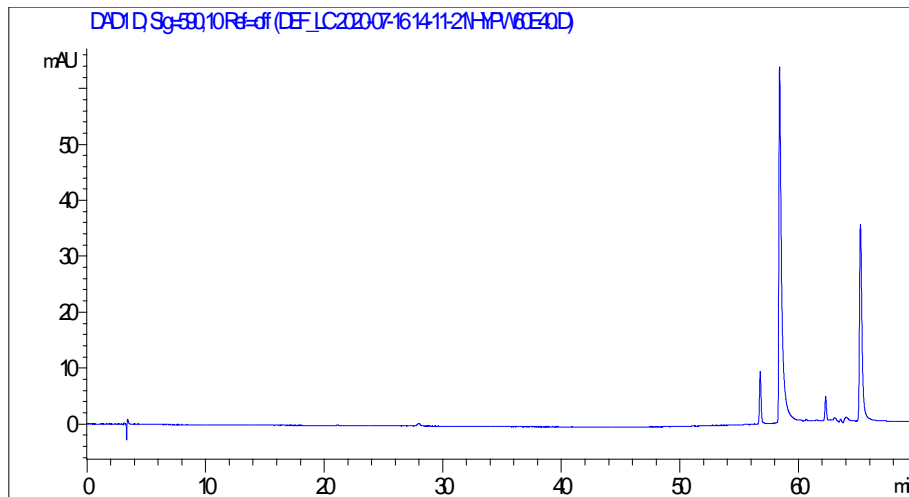
**Εικόνα 47.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50 στα 272 nm



**Εικόνα 48.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 50/50 στα 590 nm



**Εικόνα 49.** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60 στα 272 nm



Εικόνα 50. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με μίγμα αιθανόλης/νερού 40/60 στα 590 nm

Result: Analysis Table							
ID:		Run No: 3		Measured: 7/28/2020 12:20PM			
File: (Result Not Saved)				Analysed: 7/28/2020 12:20PM			
Path: C:\SIZERS\DATA\				Source: Analysed			
Range: 300RF mm		Beam: 2.40 mm		Sampler: MS1		Obs: 11.8 %	
Presentation: 3NAD		Analysis: Poly disperse				Residual: 1.230 %	
Modifications: None							
Conc. = 0.0136 %Vol		Density = 1.000 g/cm <sup>3</sup>		S.S.A. = 16.9995 m <sup>2</sup> /g			
Distribution: Volume		D[4, 3] = 0.42 um		D[3, 2] = 0.35 um			
D(v, 0.1) = 0.26 um		D(v, 0.5) = 0.35 um		D(v, 0.9) = 0.57 um			
Span = 8.940E-01		Uniformity = 3.764E-01					
Size (um)	Volume Under%	Size (um)	Volume Under%	Size (um)	Volume Under%	Size (um)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	95.60	9.00	99.97	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	98.02	10.48	100.00	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	98.85	12.21	100.00	163.77	100.00
0.08	0.01	1.06	99.00	14.22	100.00	190.80	100.00
0.09	0.01	1.24	99.00	16.57	100.00	222.28	100.00
0.11	0.03	1.44	99.00	19.31	100.00	258.95	100.00
0.13	0.06	1.68	99.00	22.49	100.00	301.68	100.00
0.15	0.15	1.95	99.00	26.20	100.00	351.46	100.00
0.17	0.41	2.28	99.02	30.53	100.00	409.45	100.00
0.20	1.26	2.65	99.12	35.56	100.00	477.01	100.00
0.23	4.25	3.09	99.27	41.43	100.00	555.71	100.00
0.27	13.42	3.60	99.44	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	32.23	4.19	99.61	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	53.72	4.88	99.75	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	69.74	5.69	99.85	76.32	100.00		
0.49	81.31	6.63	99.90	88.91	100.00		
0.58	90.34	7.72	99.94	103.58	100.00		

Εικόνα 51. Μορφή αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις για το μέγεθος των σωματιδίων του γαλακτώματος που παρασκευάστηκε στην πειραματική διαδικασία που έγιναν με τη χρήση του οργάνου Malvern Mastersizer

## 6. Βιβλιογραφία

- Almeida Juliana S., Lima Fernanda, Da Ros Simoni, Bulhoes Luis O. S., De Carvalho Leandro M., Beck Ruy C. R. (2010) Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies, *Nanoscale Research Letters* (2010) 5:1603–1610
- Avato P., Raffo F., Guglielmi G., Vitali C. and Rosato A. (2004) Extracts from St John's Wort and their antiMicrobial Activity, *Phytotherapy Research* 18, 230–232
- Avato Pinarosa and Guglielmi Gaspare (2004) Determination of Major Constituents in St. John's Wort Under Different Extraction Conditions, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 42, No. 1, pp. 83–89
- Aybastier Onder, Sahin Saliha and Demir Cevdet (2013) Response Surface Optimized Ultrasonic-Assisted Extraction of Quercetin and Isolation of Phenolic Compounds From *Hypericum perforatum* L. by Column Chromatography, *Separation Science and Technology* 48: 1665–1674
- Azwanida NN (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, *Medicinal & Aromatic Plants*, 4:3
- Bais Harsh Pal, Vepachedu Ramarao, Lawrence Christopher B., Stermitz Frank R. and Vivanco Jorge M. (2003) Molecular and Biochemical Characterization of an Enzyme Responsible for the Formation of Hypericin in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.), *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 34, pp. 32413–32422
- Barnes Joanne, Anderson Linda A. and Phillipson J. David (2001) St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53: 583-600
- Barnes Joanne, Anderson Linda A., Phillipson J. David, 2007, "Herbal Medicines", Third edition, Pharmaceutical Press, London
- Beerhues Ludger (2006) Hyperforin, *Phytochemistry* 67(20), 2201–2207
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P., "Χημεία Τροφίμων", 4<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, 2018
- Brolis M., Gabetta B., Fuzzati N., Pace R., Panzeri F., Peterlongo F. (1998) Identification by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and quantification by high performance liquid chromatography–UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*, *Journal of Chromatography A*, 825, 9–16
- Brondz Ilia, Greibrokk Tyge, Aasen Arne J. (1983) n-Alkanes of *Hypericum perforatum* :A revision, *Phytochemistry*, Vol 22, No 1, pp 295-296
- Butterweck Veronika and Schmidt Mathias (2007) St. John's wort: Role of active compounds for its mechanism of action and efficacy, *Wien Med Wochenschr* 157/13–14: 356–361
- Butterweck Veronika, Bockers Tobias, Korte Brigitte, Wittkowski Werner, Winterhoff Hilke (2002) Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus, *Brain Research* 930, 21–29
- Butterweck Veronika, Jurgenliemk Guido, Nahrstedt Adolf and Winterhoff Hilke (1999) Flavonoids from *Hypericum perforatum* Show Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test, *Planta Medica* 66, 3-6
- Cellarova E., Kimakova K., Haluskova J. , Daxnerova Z. (1994) The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum*, *Acta Biotechnologica* 14, 267-274

Cossuta Dániel, Vatai Tünde, Báthori Mária, Hohmann Judit, Keve Tibor, Simándi Béla (2009), Extraction of hyperforin and hypericin from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) with different solvents, Journal of Food Process Engineering, Vol. 35(2), pp. 222-235.

De Castro M.D. Luque , Priego-Capote F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea, Journal of Chromatography A, 1217, 2383–2389

Dimopoulos P., Raus Th., Bergmeier E., Constantinidis Th., Iatrou G., Kokkini S., Strid A. & Tzanoudakis D. (2016) Vascular plants of Greece: An annotated checklist. Supplement, Willdenowia 46: 301 – 347

Dzah Courage Sedem, Duan Yuqing, Zhang Haihui, Zhang Chaoting Wen Jixian, Chen Guangying, Ma Haile (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review, Food Bioscience 35, 100547

Eggelkraut-Gottanka S. G. , Abed S. Abu, Muller W. and Schmidt P. C. (2002) Quantitative Analysis of the Active Components and the By-products of Eight Dry Extracts of *Hypericum perforatum* L. (St John's Wort), Phytochemical Analysis 13, 170-176

Evans William Charles, Evans Daphne, Trease George Edward, "Trease and Evans Pharmacognosy", 16th ed, Edinburgh; New York: Saunders/Elsevier, 2009

Everette Jace D., Bryant Quinton M., Green Ashlee M., Abbey Yvonne A., Wangila Grant W. and Walker Richard B. (2010) Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 8139–8144

Falk Heinz (1999) From the Photosensitizer Hypericin to the Photoreceptor Stentorin-The Chemistry of Phenanthroperylene Quinones, Angewandte Chemie International Edition, 38, 3116-3136

Gaid Mariam, Haas Paul, Beuerle Till, Scholl Stephan, Beerhues Ludger (2016) Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures, Journal of Biotechnology 222, 47–55

Greeson Jeffrey M., Sanford Britt, Monti Daniel A. (2001) St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature, Psychopharmacology 153:402–414

Hamalainen Mari, Nieminen Riina, Vuorela Pia, Heinonen Marina and Moilanen Eeva (2007) Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-κB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-κB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages, Mediators of Inflammation; 2007:45673

Henderson L., Yue Q. Y., Bergquist C., Gerden B. & Arlett P. (2002) St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes, Blackwell Science Limited British Journal of Clinical Pharmacology 54, 349–356

Hernandez Maria Filipa, Fale Pedro L.V., Araujo Maria Eduarda M., Serralheiro Maria Luisa M. (2010) Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species, Food Chemistry 120, 1076–1082

Kaliora Andriana C., Kogiannou Dimitra A.A., Kefalas Panagiotis, Papassideri Issidora S., Kalogeropoulos Nick (2014) Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention?, Food Chemistry 142, 233–241

Kalogeropoulos Nick, Yannakopoulou Konstantina, Gioxari Aristeia, Chiou Antonia, Makris Dimitris P. (2010) Polyphenol characterization and encapsulation in  $\beta$ -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology* 4, 882–889

Kandi S. and Charles A. L. (2019) Statistical comparative study between the conventional DPPH spectrophotometric and dropping DPPH analytical method without spectrophotometer: Evaluation for the advancement of antioxidant activity analysis, *Food Chemistry* 287, 338-345

Karakashov Blagoj, Grigorakis Spyros, Loupassaki Sofia, Makris Dimitris P. (2015) Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2, 1–8

Karioti Anastasia and Bilia Anna Rita (2010) Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 562-594

Kedare Sagar B. and Singh R. P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology* 48(4):412–422

Khan Mohammed Yahaya, Karim Z. A. Abdul, Hagos Ftwi Yohannes, Aziz A. Rashid A. and Tan Isa M. (2014) Current Trends in Water-in-Diesel Emulsion as a Fuel, *The Scientific World Journal*

Kirakosyan Ara, Gibson Donna M. & Sirvent Tara (2004) A Comparative Study of *Hypericum perforatum* Plants as Sources of Hypericins and Hyperforins, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 10:4, 73-88

Lavie Gad, Valentine Fred, Levin Brandi, Mazur Yehuda, Gallo Gloria, Lavie David, Weiner David and Meruelo Daniel (1989) Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 86, pp. 5963-5967

Leuner Kristina, Kazanski Victor, Muller Margarethe, Essin Kirill, Henke Bettina, Gollasch Maik, Harteneck Christian and Muller Walter E. (2007) Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels, *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, Vol. 21, 4101-4111

Liu Frances F., Ang Catharina Y. W. and Springer Dietmar (2000) Optimization of Extraction Conditions for Active Components in *Hypericum perforatum* Using Response Surface Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3364–3371

McCabe Warren L., Smith Julian C., Harriott Peter, "Unit Operations of Chemical Engineering", 7th Edition, United States: McGraw-Hill, 2005

McClements D. J.. "Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques", 3rd Edition, CRC Press, 2016

Meruelo Daniel, Lavie Gad and Lavie David (1988) Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 85, pp. 5230-5234

Milevskaya V. V., Statkus M. A., Temerdashev Z. A., Kiseleva N. V., Butyl'skaya T. S. and Shil'ko E. A. (2016) Extraction and Determination of Biologically Active Components of St. John's Wort and Its Pharmaceutical Preparations, *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 71, No. 7, pp. 741–747

- Milevskaya V.V., Prasad Surendra, Temerdashev Z.A. (2019) Extraction and chromatographic determination of phenolic compounds from medicinal herbs in the *Lamiaceae* and *Hypericaceae* families: A review, *Microchemical Journal* 145, 1036-1049
- Mustafa Arwa, Turner Charlotta (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Analytica Chimica Acta* 703, 8-18
- Orčić Dejan Z, Mimica-Dukić Neda M, Francišković Marina M, Petrović Slobodan S and Jovin Emilija Đ (2011) Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L., *Chemistry Central Journal*, 5:34
- Patel Kanika, Kumar Vikas, Rahman Mahfoozur, Verma Amita, Patel Dinesh Kumar (2018) New insights into the medicinal importance, physiological functions and bioanalytical aspects of an important bioactive compound of foods 'Hyperin': Health benefits of the past, the present, the future, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 7, 31-42
- Pico Yolanda (2013) Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 43, 84-99
- Poutaraud Anne, Di Gregorio Francois, Chan Fook Tin Vicky, Girardin Philippe (2001) Effect of Light on Hypericins Contents in Fresh Flowering Top Parts and in an Extract of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), *Planta Medica* 67, 254-259
- Poutaraud Anne, Lobstein Annelise, Girardin Philippe and Weniger Bernard (2001) Improved Procedure for the Quality Control of *Hypericum perforatum* L., *Phytochemical Analysis* 12, 355-362
- Silva Bruno A., Ferreres Federico, Malva Joao O., Dias Alberto C.P. (2005) Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts, *Food Chemistry* 90, 157-167
- Silva Bruno A., Malva Joao O., Dias Alberto C.P. (2008) St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress, *Food Chemistry* 110, 611-619
- Smelcerovic Andrija, Spiteller Michael and Zuehlke Sebastian (2006) Comparison of Methods for the Exhaustive Extraction of Hypericins, Flavonoids, and Hyperforin from *Hypericum perforatum* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2750-2753
- Suntar Ipek Pesin, Akkol Esra Kupeli, Yilmazer Demet, Baykal Turhan, Kırmızıbekmez Hasan, Alper Murat, Yesilada Erdem (2010) Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L., *Journal of Ethnopharmacology* 127, 468-477
- Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G. and Oreopoulou V. (2007) Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS, *Molecules*, 12(3), 593-606
- Tsioutsiou Efthymia Eleni, Giordani Paolo, Hanlidou Effie, Biagi Marco, De Feo Vincenzo and Cornara Laura (2019) Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Used in Central Macedonia, Greece, *Hindawi, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*
- Waterhouse Andrew L. (2002) Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical, Chemistry*, 6, 11.1.1-11.1.8
- Williams Felicia B., Sander Lane C., Wise Stephen A., Girard James (2006) Development and evaluation of methods for determination of naphthodianthrones and flavonoids in StJohn's wort, *Journal of Chromatography A* 1115, 93-102
- Zeliou Konstantina, Kouli Eirini-Maria, Papaioannou Charikleia, Koulakiotis Nikolaos Stavros, Iatrou Gregoris, Tsarbopoulos Anthony, Papisotiropoulos Vassilis, Lamari Fotini N. (2020)

Metabolomic fingerprinting and genetic discrimination of four *Hypericum* taxa from Greece, *Phytochemistry*, Volume 174, 112290

Zobayed S.M.A., Afreen F., Goto E. and Kozai T. (2006) Plant–Environment Interactions: Accumulation of Hypericin in Dark Glands of *Hypericum perforatum*, *Annals of Botany* 98: 793–804

Zobayed S.M.A., Afreen F., Kozai T. (2005) Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John’s wort, *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 977–984

Zou Yanping, Lu Yanhua and Wei Dongzhi (2004) Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5032-5039