

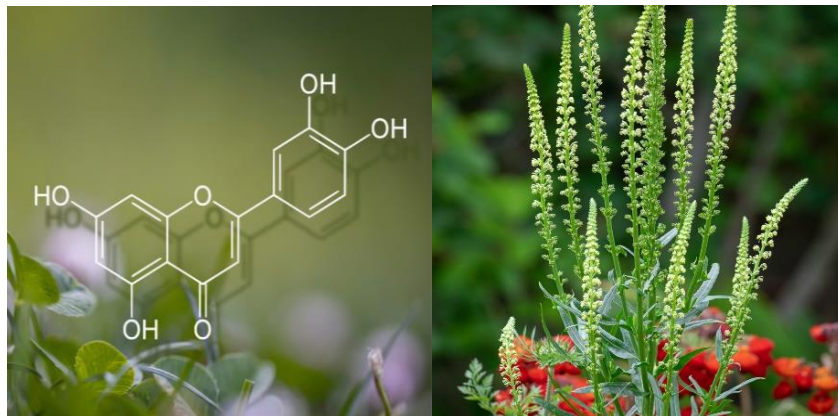


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών (IV)
Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

**Μελέτη της εκχύλισης λουτεολίνης από Ελληνικές
φυτικές πρώτες ύλες και ανάπτυξη
παρασκευασμάτων της για συμπληρώματα διατροφής**

Διπλωματική Εργασία



Επισκόπου Ευστράτιος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Γιαννακούρου Μαρία

Αθήνα

2023

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας καθηγήτριας Μαρίας Γιαννακούρου.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα κυρία Μαρία Γιαννακούρου για την εμπιστοσύνη κατά την ανάθεση του θέματος, καθώς και την επιστημονική καθοδήγηση και τις συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, όπως επίσης και τον Καθηγητή κύριο Πέτρο Ταούκη, για τη συμβολή του στην επιλογή του θέματος και τη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια εκπόνησης του.

Εν συνεχεία ευχαριστώ θερμά τον ΕΔΙΠ και διδάκτορα κύριο Δημήτρη Τσιμογιάννη για την καθοριστική και πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Η συμβολή του στην επίλυση των διάφορων δυσκολιών και προβλημάτων κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας ήταν πολύτιμη και συνέβαλε τα μέγιστα στην υπέρβαση τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στους συμφοιτητές και συναδέλφους μου που συνεργαστήκαμε τον τελευταίο χρόνο στο Εργαστήριο Τροφίμων για την υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν όταν την χρειάστηκα. Η συμβολή τους και η στήριξη σε διάφορες δυσκολίες που προέκυπταν κατά καιρούς, καθώς και οι στιγμές που περάσαμε κατά τη διάρκεια της κοινής μας πορείας θα μείνουν για πάντα χαραγμένες στη μνήμη μου, όσα χρόνια και αν περάσουν.

Τέλος, κλείνοντας τον πενταετή κύκλο σπουδών μου στο τμήμα Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, που στάθηκαν δίπλα μου σε αυτή την πορεία. Η βοήθεια και η στήριξη που μου παρείχατε ακόμα και στις πιο δύσκολες στιγμές αυτής της πορείας και η σημασία της για εμένα υπήρξε μεγαλύτερη από όσο φαντάζεστε. Σας ευχαριστώ από καρδιάς.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της εκχύλισης και της απομόνωσης της λουτεολίνης από Ελληνικές φυτικές πηγές προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής. Συγκεκριμένα δύο Ελληνικές φυτικές πηγές (*Reseda luteola* L. και κέλυφος φιστικιού *Arachis Hypogea*) αξιολογήθηκαν ως προς το περιεχόμενο τους σε λουτεολίνη και άλλα βιοδραστικά συστατικά, ώστε να βρεθεί η δυνατότητα ανάπτυξης διεργασίας εκχύλισης λουτεολίνης σε μεγάλη ποσότητα από τα φυτά αυτά. Έπειτα, αναπτύσσεται πρότυπη διεργασία εκχύλισης λουτεολίνης χρησιμοποιώντας ως βάση το φυτό *Reseda luteola* L., προκειμένου να αποτελέσει μια συμβατική ενεργειακά αποδοτική διεργασία εκχύλισης της λουτεολίνης από τα φυτά που την εμπεριέχουν. Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα απομόνωσης στερεού παρασκευάσματος πλούσιου σε λουτεολίνη από τα εκχυλίσματα του φυτού *Reseda luteola* L. προκειμένου να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη και την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής λουτεολίνης.

Η λουτεολίνη είναι μια χημική ένωση που ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών, που αποτελούν ομάδα ενώσεων που παράγονται στα φυτά και έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης αντιοξειδωτικών και άλλων βιολογικών δράσεων. Η λουτεολίνη αποτελεί ένα φλαβονοειδές της υποομάδας των φλαβονών με πλούσια βιολογική δράση σε πάρα πολλούς τομείς της ανθρώπινης υγείας. Συγκεκριμένα δημοσιεύσεις πάνω στη λουτεολίνη έχουν δείξει ότι αποτελεί χημική ένωση με ισχυρή αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση, προστατευτική δράση απέναντι σε διάφορα είδη μικροβίων, καθώς και αντιφλεγμονώδεις και άλλες χρήσιμες βιολογικές ιδιότητες που καθιστούν χρήσιμη την μελέτη των φυτικών πηγών που την περιέχουν καθώς και την ανάπτυξη διατροφικών σκευασμάτων πλούσιων σε λουτεολίνη από τις πηγές αυτές.

Για την μελέτη της διεργασίας εκχύλισης της λουτεολίνης χρησιμοποιήθηκαν δύο φυτικές πηγές: τα υπέργεια μέρη του φυτού *Reseda luteola* L. καθώς και το κέλυφος του αράπικου φιστικιού. Λόγω του ότι στην Ελλάδα το φυτό *Reseda luteola* L. ήταν εκτός εποχής κατά την περίοδο εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας προμηθεύτηκε Τουρκική ποικιλία υπέργειων ελαφρώς κατατμημένων μερών του φυτού, τα οποία διαχωρίστηκαν σε ένα λεπτό, κυρίως φυτώδες, κλάσμα και ένα ξυλώδες κλάσμα, για την σε βάθος μελέτη της περιεκτικότητας του φυτού σε λουτεολίνη, ενώ τα κελύφη αράπικου φιστικιού που προμηθεύτηκαν από την αγορά και τη βιομηχανία υπέστησαν επεξεργασία προκειμένου να καταστούν κατάλληλα για εκχύλιση. Ο προσδιορισμός της λουτεολίνης στα εκχυλίσματα έγινε με τη μέθοδο HPLC, μέσω της κατασκευής καμπύλης αναφοράς της λουτεολίνης από πρότυπο καθαρής ένωσης (Extrasynthese). Οι ολικές φαινόλες προσδιορίστηκαν με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) και ως ισοδύναμα λουτεολίνης (LUT), μέσω της παρασκευής καμπυλών αναφοράς με πρότυπα διαλυμάτων γαλλικού οξέος και λουτεολίνης από συμπλήρωμα διατροφής λουτεολίνης του εμπορίου το οποίο προηγουμένως ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο HPLC. Αντίστοιχα τα αντιοξειδωτικά εκφράστηκαν με τη μέθοδο DPPH ως ισοδύναμα Trolox (TE) και λουτεολίνης (LUT). Η περιεκτικότητα του συμπληρώματος διατροφής σε καθαρή λουτεολίνη ανέρχεται στο 91%. Οι εκχυλίσεις στο φυτό *Reseda luteola* πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μεθανόλης ως μέσου εκχύλισης, ενώ για το κέλυφος

της αραχίδας μελετήθηκαν μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα. Χρησιμοποιείται ο μέθοδος εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου σε σταθερή κλίνη με συνεχή είσοδο διαλύτη και συνεχή έξοδο εκχυλίσματος από τον εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης σε σταθερό ρυθμό ροής, υπό θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C).

Για την μελέτη του περιεχομένου των δύο φυτικών πηγών σε λουτεολίνη βρίσκεται ότι το λεπτό κλάσμα του φυτού *Reseda luteola* L. περιέχει 14 ± 3 mg LUT/g σε λουτεολίνη, ενώ το ξυλώδες κλάσμα $11 \pm 0,1$ mg LUT/g. Λαμβάνοντας υπόψη την αναλογία των δύο κλασμάτων στο εξεταζόμενο δείγμα (43:57 % w/w υπέρ του ξυλώδους κλάσματος) το συνολικά μετρούμενο περιεχόμενο των υπέργειων τμημάτων του *Reseda luteola* L. σε λουτεολίνη είναι ίσο με 12 mg LUT/g υλικού κατά μέσο όρο, για την εκχύλιση της ουσίας από το φυτό με μεθανόλη σε αναλογία g πρώτης ύλης/mL διαλύτη 1:20. Αντίστοιχα τα υπέργεια μέρη του φυτού περιέχουν στο σύνολο τους 17 mg LUT/g υλικού σε ολικές φαινόλες (TPC) και 17 mg LUT/g υλικού σε αντιοξειδωτικά, όπως υπολογίστηκε από τις αναλύσεις στα εκχυλίσματα του λεπτού και του ξυλώδους κλάσματος του φυτού. Για τις αντίστοιχες αναλύσεις στα εκχυλίσματα του κελύφους της αραχίδας το περιεχόμενο σε λουτεολίνη είναι ίσο με $1,4 \pm 0,5$ mg LUT/g, 8 φορές μικρότερο από το αντίστοιχο της *Reseda luteola*, το οποίο ισχύει και για τις περιεκτικότητες σε TPC και αντιοξειδωτικά που υπολογίζονται από την μελέτη των εκχυλισμάτων της πηγής, το οποίο αποδεικνύει την συγκριτική υπεροχή της *Reseda luteola* ως πηγή λουτεολίνης σε σύγκριση με το κέλυφος του φιστικιού και ωθεί στην περαιτέρω μελέτη των κλασμάτων της πηγής για την ανάπτυξη κινητικών μοντέλων. Η λουτεολίνη στα υπέργεια μέρη της *Reseda* συναντάται κυρίως ως λουτεολίνη-7-γλυκοζίτης και αγλυκόνη, ενώ στο κέλυφος του φιστικιού παρίσταται μόνο ως αγλυκόνη.

Ακόμη έγινε μελέτη της χρονικής εξέλιξης της εκχυλιζόμενης συγκέντρωσης λουτεολίνης και TPC από τα κλάσματα του φυτού *Reseda luteola* για να προσδιοριστεί η κινητική εξίσωση της εκχύλισης με βάση το 2^ο νόμο του Fick, λαμβάνοντας δείγματα 1 mL από την έξοδο του εκχυλιστήρα σε συγκεκριμένους χρόνους για την εκχύλιση όγκου 300 mL σε κάθε κλάσμα και εξετάζοντας τα δείγματα με Folin-Ciocalteu και HPLC για τον προσδιορισμό της εξέλιξης της συγκέντρωσης σε TPC και λουτεολίνη αντίστοιχα. Από τους υπολογισμούς και την κατασκευή των κινητικών διαγραμμάτων προκύπτει ότι η κινητική της εκχύλισης στα κλάσματα του φυτού ακολουθεί δύο στάδια: ένα στάδιο έκπλυσης των βιοδραστικών συστατικών από τη μάζα του εκχυλιζόμενου υλικού στα πρώτα 9-10 min της διεργασίας και ένα αργό στάδιο που επιδρά η διάχυση του διαλύτη στο εσωτερικό της μάζας του μητρικού υλικού που έπεται μέχρι το τέλος της κινητικής. Η αναλογία των ρυθμών γρήγορου και αργού σταδίου ανέρχεται στο 3:1 για την εκχύλιση λουτεολίνης και 4:1 για την εκχύλιση TPC για το λεπτό κλάσμα, με το ξυλώδες κλάσμα να έχει 7:2 και 4:1 αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται την εκχύλιση της πλειοψηφίας του περιεχομένου του φυτού σε λουτεολίνη και TPC κατά το αργό στάδιο.

Από την μελέτη της κινητικής εξίσωσης των δύο σταδίων επίσης προκύπτει ότι σε χρονικό διάστημα 105 min εκχυλίζεται το 83% της περιεχόμενης λουτεολίνης από το σύνολο των υπέργειων μερών του φυτού, με την αναλογία μάζας/διαλύτη να ανέρχεται σε 1:15, ενώ σε χρόνο μιας ώρας το ποσοστό γίνεται 67% και η αναλογία 1:9. Άρα η εκχύλιση λουτεολίνης από το φυτό με τη μέθοδο που ακολουθήθηκε δύναται να

αποτελέσει μια ικανοποιητική πρότυπη συμβατική διεργασία για την εκχύλιση λουτεολίνης από το φυτό *Reseda luteola L.*, συγκριτικά με τις άλλες συμβατικές τεχνικές που ακολουθούνται στη βιβλιογραφία.

Τέλος ακολουθείται διαδικασία κατεργασίας των εκχυλισμάτων του λεπτού και του ξυλώδους κλάσματος με στόχο την απομόνωση στερεού παρασκευάσματος πλούσιου σε λουτεολίνη από το φυτό *Reseda luteola L.*. Αυτό επιτυγχάνεται με την όξινη υδρόλυση των συμπυκνωμένων εκχυλισμάτων για κάθε κλάσμα του φυτού στους 70 °C με θειικό οξύ σε αναλογία 5:3 με τα στερεά του εκχυλίσματος που έχουν υπολογιστεί με σταθμική ανάλυση. Στη συνέχεια γίνεται κατεργασία με απιονισμένο νερό για καταβύθιση ιζήματος πλούσιου σε αγλυκόνη της λουτεολίνης το οποίο διαχωρίζεται με διήθηση και αφού απομακρυνθούν από αυτό τα ίχνη θειικού οξέος μέσω της έκπλυσης του με απιονισμένο νερό αναδιαλύεται σε μεθανόλη, ώστε να αναλυθεί με τη μέθοδο HPLC, παράλληλα με το διήθημα που συλλέγεται για να υπολογιστεί η περιεκτικότητα των στερεών σε λουτεολίνη και ο βαθμός απόδοσης της διεργασίας. Έπειτα ακολουθεί προσδιορισμό της % λουτεολίνης στο σκεύασμα. Κατά την διεργασία που ακολουθήθηκε απομονώθηκε στερεό προϊόν περιεκτικότητας 55% κατά βάρος σε λουτεολίνη και 75% κατά βάρος σε φλαβονοειδή, ενώ η απόδοση της υδρόλυσης του κύριου γλυκοζίτη είναι $71,5 \pm 0,1$ % w/w και η αύξηση της λουτεολίνης στα τελικά στερεά 250-280%. Συνεπώς η διεργασία που ακολουθείται δίνει στερεό παρασκεύασμα από το φυτό *Reseda luteola L.* το οποίο δύναται να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη καθαρών στερεών συμπληρωμάτων διατροφής λουτεολίνης.

Abstract

The purpose of the present diploma thesis was the study of luteolin extraction and isolation from Greek plant sources, to be used as a basis for the production of food supplements. More specifically, two Greek plant sources (*Reseda luteola L.* and shell of *Arachis Hypogea* peanuts) were examined at the basis of their content of luteolin and other bioactive compounds, with the intention of developing a process of luteolin extraction in large quantities from said plant sources. Furthermore, a standard process of luteolin extraction with the use of *Reseda luteola L.* as a base source was developed, with the purpose of becoming a conventional energy efficient extraction technique of the compound from the plants that contain it. Lastly, the ability to isolate a luteolin-rich solid product from the *Reseda luteola* extracts was studied in order to constitute as a base for the creation and development of luteolin food supplements.

Luteolin is a chemical compound that belongs to the category of flavonoids, a compound group produced in plants that is characterized by its ability to develop antioxidant and other biological activities. Luteolin belongs to the sub-group of flavones and has a rich biological activity in many sectors of human health. Papers studying the flavonoid has shown that it constitutes a compound with strong antioxidant and anticancer activity, protective action against various microbial types as well as anti-inflammatory and other useful bioactive abilities that make the study of the luteolin-containing plants and the development of luteolin-rich products significant for the food industry.

Two plant sources were used to examine the luteolin extraction process: the aerial parts of *Reseda luteola L.* and the shell of the *Arachis Hypogea* peanut. Due to the fact that *Reseda luteola* was out of season while the thesis was being composed, a Turkish variety of segmented aerial parts of the plant was utilized. They were separated into a fine segment, mostly composed of flowers and leaves, and a wooden segment, for a detailed study of the total amount of luteolin in the aerial parts of the plant and the peanut shells that were supplied by the market and the industry were processed to be deemed suitable for extraction. Determining the quantity of luteolin in the extracts became possible with the HPLC method, through the construction of a luteolin reference curve from a pure luteolin standard (Extrasynthese). The total phenolic content was determined with the Folin-Ciocalteu method and the results were expressed as Gallic acid (GAE), and luteolin equivalents (LUT), through the construction of reference curves by using standards of Gallic acid and market luteolin supplement which was previously quantified with the HPLC method. Respectively, the antioxidant content was determined with the DPPH method as Trolox (TE) and luteolin equivalents (LUT). The supplement has a 91% w/w of luteolin content. The extractions in the *Reseda luteola* plant used methanol as the extraction solvent, when in the peanut shells both methanolic and aquatic extracts were examined. The extraction used a semi-batch method in a fixed bed extractor, with a continuous solvent input in a constant flow rate, in room temperature (25 °C).

After studying the content of the plant sources with exhaustive extraction, it was found that the content of luteolin of the fine fraction of the plant is 14 ± 3 mg LUT/g material while the content of the wooden fraction was $11 \pm 0,1$ mg LUT/g material. Considering

the analogy of the two fractions in the examined plant sample (43:57 in favor of the wooden fraction) the total content of luteolin in the aerial parts of *Reseda luteola* is in average 12 mg LUT/g material for methanolic extraction of luteolin from the plant in a 1:20 analogy of g material/mL extraction solvent. Respectively, the aerial parts of the plants contain in total an average 17 mg LUT/g of material in total phenolic content (TPC) and 17 mg LUT/g of material in antioxidants as estimated from the analyses in the methanolic extracts of the fine and the wooden fractions. The respective analyses on the *Arachis Hypogea* peanut shells reveal that their content in luteolin is equal to $1,4 \pm 0,5$ mg LUT/g of material, 8 times less than the content of *Reseda luteola* aerial parts, which is also true for the TPC and antioxidants contents that were estimated from the study of the source extracts. This proves the superiority of *Reseda luteola* as a luteolin source compared to the peanut shells and leads to further observation of the plant fraction for the development of kinetic models. Luteolin in the aerial parts of *Reseda luteola* L. appears mostly as luteolin-7-glucoside and aglycone, while in peanut shells only the aglycone of luteolin is observed.

Furthermore, a study of the time process of the extracted concentration of luteolin and TPC from the *R. Luteola* fractions was conducted, intending to determine the kinetic equation of the extraction based on the second Fick law, by collecting 1 mL samples in specific times for the extraction of 300 mL of volume in each fraction and examining the samples with the Folin-Ciocalteu and HPLC methods to determine the TPC and luteolin concentration progress. The calculations and the construction of the kinetic diagrams reveal that the extraction kinetics in both fractions follows two phases, one that represents the leaching of the biodrastic compounds from the material mass in the first 9-10 min of the process and one slower phase representing the diffusion of the solvent in the material mass which lasts until the end of the process. The rate analogy of the fast and the slow phase of extraction is equal to 3:1 for luteolin extraction and 4:1 for TPC extraction in the fine parts of the plant, with the wooden parts having 7:2 and 4:1 respectively. This means that the majority of luteolin and the TPC of plant parts are extracted during the slow diffusion stage.

The study of the kinetic equations of both phases also shows that in the timespan of 105 min, 83% of the luteolin contained in the aerial parts of the plant was extracted, with the mass/solvent analogy reaching 1:15, while in the span of an hour the percentage is 67% and the analogy 1:9. This proves that the extraction method followed to obtain luteolin from the plant is potentially an adequate standard conventional process for luteolin extraction from the *Reseda luteola* L., compared to other conventional methods followed in other studies.

Lastly, a processing of methanolic extracts from the fine and the wooden fraction is followed in order to isolate a solid product rich in luteolin from the *R. Luteola*. This is achieved through acidic hydrolysis of condensed extracts of each fraction at 70 °C with sulfuric acid at a 5:3 analogy with the total solids of each extract previously calculated. Afterwards the mixture is processed with deionized water, in order to subduct a sediment rich in luteolin aglycone which can be separated through filtration. The sediment, after being washed with cold deionized water to remove sulfuric acid traces, is resolubilized with methanol in order to be analyzed with HPLC alongside the filtrate to find the concentration of luteolin in the solution and the efficiency of the process of

hydrolysis. Then follows the calculation of the % luteolin in the final product. The isolated product has a 55 % w/w content in the aglycone of luteolin and 75% in total flavonoids, while the efficiency of the acidic hydrolysis of the main glycoside was 71.5 ± 0.1 % and the increase of luteolin reaching 250-280%. Consequently, the process followed gives a solid product from the plant *R. Luteola L.*, which has the potential to become a base for the development of pure solid luteolin food supplements.

Περιεχόμενα

1. Η λουτεολίνη.....	14
1.1 Φλαβονοειδή-Δομή και δράση.....	14
1.2 Η λουτεολίνη και ο βιολογικός της ρόλος	16
1.2.1 Γενικά για τη λουτεολίνη.....	16
1.2.2 Η λουτεολίνη ως παράγοντας αντιοξειδωτικής δράσης	17
1.2.3 Η λουτεολίνη ως αντικαρκινικός παράγοντας.....	19
1.2.4 Άλλες βιολογικές δράσεις.....	20
1.3 Σύνοψη μορφών και πηγών λουτεολίνης στη φύση.....	22
1.4 Ρεζεντά η κίτρινη (<i>Reseda luteola</i>).....	25
1.4.1 Γενικά για το φυτό-Βιολογική δράση	25
1.4.2 Περιεχόμενο σε λουτεολίνη	26
1.4.3 Διαθεσιμότητα του φυτού	28
1.5 Αραχίδα (<i>Arachis Hypogea</i>).....	30
1.5.1-Γενικά για τον καρπό και το κέλυφος του φιστικιού	30
1.5.2 Περιεχόμενο του κελύφους σε λουτεολίνη	31
1.5.3 Διαθεσιμότητα της πηγής.....	33
2. Η εκχύλιση ως μέθοδος ανάκτησης βιοδραστικών συστατικών.....	35
2.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	35
2.1.1 Εκχύλιση Soxhlet	35
2.1.2 Διαβροχή	37
2.1.3 Εκχύλιση με αναρροή θερμότητας (Heat Reflux Extraction-HRE)	37
2.1.4 Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες-Σύγκριση συμβατικών τεχνικών και επιλογή διαλύτη.....	38
2.2 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	41
2.2.1 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων.....	42
2.2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)	44
2.2.3 Συνδυασμός UAE και MAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους (UMAE)	46
2.2.4 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE).....	47
2.2.5 Εκχύλιση με ιοντικά υγρά (ILE)	48
2.2.6 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (EAE)	49
2.2.7 Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (PLE).....	50

2.3 Αναγνώριση και απομόνωση των φλαβονοειδών μέσω της υδρόλυσης των γλυκοζιτών	51
3. Πειραματικό μέρος	53
3.1 Στόχος-Σχεδιασμός πειραμάτων	53
3.2 Πρώτες ύλες-Αντιδραστήρια-Συσκευές.....	56
3.2.1 Πρώτες ύλες.....	56
3.2.2 Αντιδραστήρια	57
3.2.3 Συσκευές και διατάξεις.....	58
3.3 Προκατεργασία πρώτων υλών	61
3.3.1 Κελύφη φιστικιού αραχίδιας.....	61
3.3.2 Προκατεργασία φυτού <i>Reseda luteola</i> L.....	62
3.4 Πειραματικές Μέθοδοι	63
3.4.1 Εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου	63
3.4.2 Όξινη υδρόλυση.....	64
3.5 Αναλυτικές μέθοδοι	66
3.5.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	66
3.5.2 Μέθοδος DPPH.....	67
3.5.3 Σταθμική ανάλυση	69
3.5.4 Προσδιορισμός υγρασίας.....	69
3.5.5 Αναλύσεις HPLC-DAD.....	70
4. Αποτελέσματα και Συζήτηση	72
4.1 Καμπύλες αναφοράς.....	72
4.1.1 Καμπύλες Folin-Ciocalteu και DPPH.....	72
4.1.2 Καμπύλες αναφοράς λουτεολίνης (HPLC).....	74
4.2 Εκχύλιση κελυφών φιστικιών με μεθανόλη-Προσδιορισμός περιεχομένου σε λουτεολίνη	76
4.2.1 Υγρασία κελύφους φιστικιού	76
4.2.2 Μέθοδοι σταθμικής ανάλυσης, Folin-Ciocalteu και DPPH.....	77
4.2.3 Ανάλυση με μέθοδο HPLC	79
4.3 Εκχύλιση υπέργειων μερών του φυτού <i>Reseda luteola</i> με μεθανόλη	81
4.3.1 Υγρασία της <i>Reseda luteola</i>	81
4.3.2 Αποτίμηση περιεχομένου του λεπτού κλάσματος του φυτού	81
4.3.3 Εξέταση του περιεχομένου των τελικών εκχυλισμάτων με HPLC	83
4.3.4 Αποτίμηση του περιεχομένου ξυλώδους κλάσματος του φυτού σε ολικές φαινόλες και αντιοξειδωτικά	86

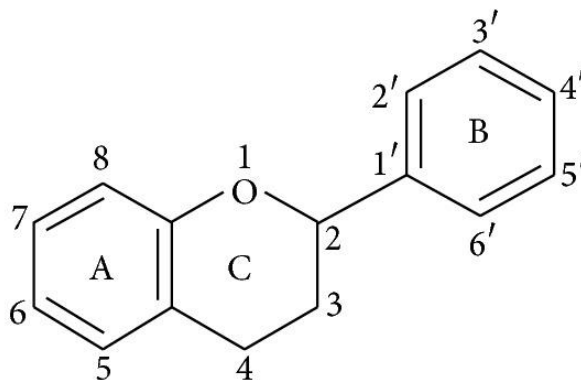
4.3.5 Αποτίμηση του περιεχομένου του ξυλώδους κλάσματος του φυτού σε λουτεολίνη-Συνολική αποτίμηση της πηγής σε λουτεολίνη	87
4.4 Μελέτη της κινητικής της εκχύλισης των κλασμάτων του φυτού <i>Reseda luteola</i> L.	90
4.4.1 Μελέτη της κινητικής της εκχύλισης του λεπτού κλάσματος.....	90
4.4.2 Μελέτη της κινητικής της εκχύλισης του ξυλώδους κλάσματος	96
4.5 Αποτελέσματα επεξεργασίας του φυτού με όξινη υδρόλυση με σκοπό την απομόνωση τελικού παρασκευάσματος	101
5. Συμπεράσματα-Προτάσεις για το μέλλον	108
5.1 Συμπεράσματα	108
5.2 Προτάσεις για το μέλλον	110
6. Βιβλιογραφία.....	112
Παράρτημα.....	120

1. Η λουτεολίνη

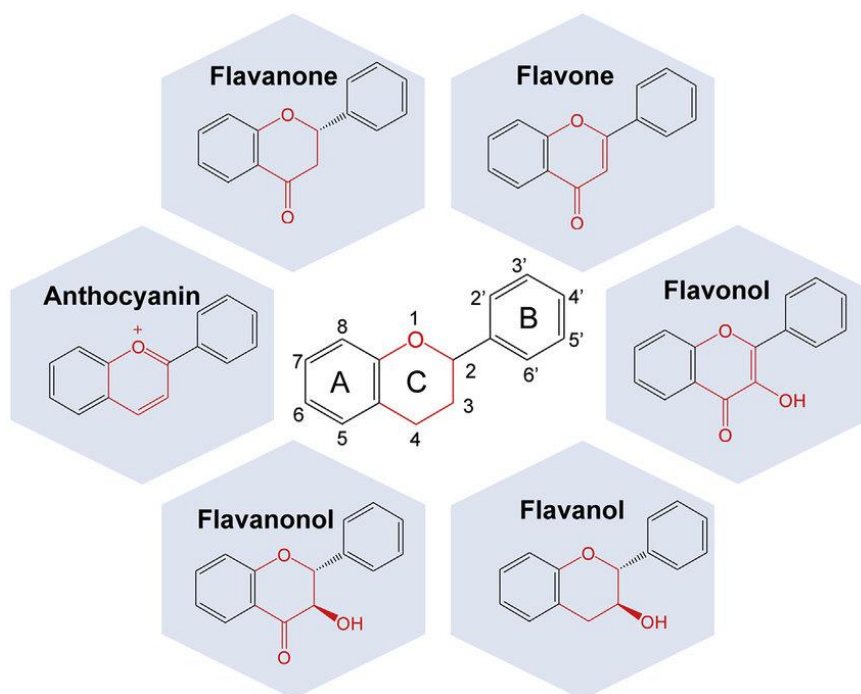
1.1 Φλαβονοειδή-Δομή και δράση

Ως φλαβονοειδή ονομάζεται μία ομάδα ενώσεων που απαντώνται στα φυτά και χαρακτηρίζονται για την έντονη παρουσία φαινολικών υδροξυλίων. Αποτελούν φυσικά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και είναι παρόντα ως συστατικά των φυτών, των φρούτων και των λαχανικών. Η δομή των φλαβονοειδών, με ποικιλία υδροξυ-υποκατάστασης, τα καθιστά αντικείμενο μελέτης ως προς τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, με σκοπό τον προσδιορισμό της βιολογικής και της βιοχημικής τους δράσης (Panche et al, 2016).

Η χημική δομή των φλαβονοειδών περιλαμβάνει ένα σκελετό 15 ατόμων άνθρακα που αποτελείται από δύο ενωμένους βενζολικούς δακτυλίους, συνδεδεμένους με έναν πυρανικό δακτύλιο. Ανάλογα με την υποκατάσταση των ομάδων του δακτυλίου C προκύπτουν οι διαφορετικές υποκατηγορίες των φλαβονοειδών, ενώ η διαφοροποίηση των φλαβονοειδών της ίδιας κατηγορίας προκύπτει από την υποκατάσταση διαφορετικών ομάδων στους δακτυλίους A και B (Kumar et al 2013, Panche et al 2016).



Εικόνα 1.1: Ο βασικός σκελετός των φλαβονοειδών.



Εικόνα 1.2 Οι ξεχωριστές δομές για κάθε υποκατηγορία φλαβονοειδούς (Zha et al, 2019).

Τα φλαβονοειδή, ανάλογα με την υποκατάσταση του C δακτυλίου, χωρίζονται σε έξι ξεχωριστές υποκατηγορίες: τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες, τις φλαβανόλες, τις φλαβανόνες, τις διϋδροφλαβονόλες ή φλαβανονόλες και τις ανθοκυανιδίνες. Γενικά απαντώνται στα τρόφιμα είτε σε μορφή αγλυκόνης, που αποτελούν την βασική μορφή φλαβονοειδούς, είτε σε σύνδεση με μόρια σακχάρων υπό τη μορφή γλυκοζιτών, είτε ως μεθυλιωμένα παράγωγα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβόνης είναι και η λουτεολίνη, η οποία αποτελεί το αντικείμενο αυτής της εργασίας, καθώς και άλλα φλαβονοειδή με έντονη παρουσία στα τρόφιμα, όπως η απιγενίνη (Safe et al, 2016). Από τις υπόλοιπες κατηγορίες φλαβονοειδών, οι πιο αξιοσημείωτες περιπτώσεις καθώς και μερικές συχνές πηγές της διατροφής που τα εμπεριέχουν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1.1: Βασικά είδη φλαβονοειδών ανά κατηγορία και ενδεικτικές διατροφικές πηγές (Kumar et al 2013).

Υποκατηγορία φλαβονοειδούς	Κύρια φλαβονοειδή	Ενδεικτικές διατροφικές πηγές
Φλαβόνες	Λουτεολίνη, απιγενίνη, χρυσίνη	Φλούδα τομάτας, κόκκινο κρασί, κόκκινη πιπεριά, φλούδες φρούτων
Φλαβονόλες	Καιμπερολόλη, κερκετίνη, μυρικετίνη	Κρεμμύδι, κόκκινο κρασί, ελαιόλαδο, γκρεϊπφρούτ
Φλαβαν-3-όλες	Κατεχίνη, επικατεχίνη	Φύλλα τσαγιού
Διϋδροφλαβονόλες	Ταξιφολίνη	Είδη ξιδιού
Ανθοκυανιδίνες	Κυανιδίνη, απιγενιδίνη	Κεράσια, φράουλες
Φλαβανόνες	Ναρινγκενίνη, εσπεριδίνη	Εσπεριδοειδή

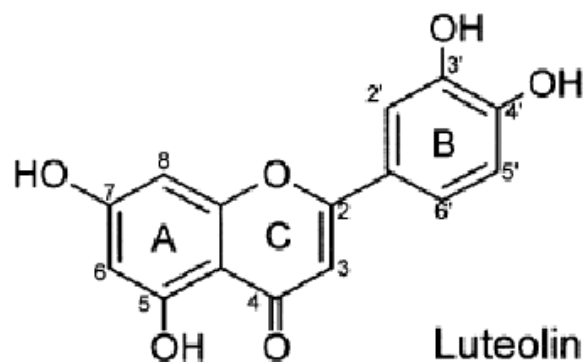
Η δομή των φλαβονοειδών, καθιστά πάρα πολύ σημαντικό τον βιολογικό ρόλο τους για τον άνθρωπο, τους φυτικούς και τους ζωικούς οργανισμούς καθώς και πολλά βακτήρια. Στα φυτά είναι υπεύθυνα για το χρώμα, ενώ η αντιοξειδωτική τους δράση προστατεύει το φυτό από τα μικρόβια και τις τοξίνες, καθώς και από το έντονο οξειδωτικό στρες και από την υπεριώδη ακτινοβολία. Ακόμη έχουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα του φυτού απέναντι στην ξηρασία και τον παγετό, καθώς και στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξή του.

Η βιολογική δράση των φλαβονοειδών επιφέρει σημαντικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία, όπως πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση, ενίσχυση της δράσης αντιβιοτικών μέσω της καταπολέμησης της αντίστασης των παθογόνων στα φάρμακα, αντικαρκινική δράση μέσω της καταστολής των καρκινικών κυττάρων, την αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με το κεντρικό νευρικό σύστημα (Alzheimer) καθώς και πιθανές αντικές ικανότητες, αυξάνοντας το ενδιαφέρον για την παρασκευή τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής πλούσιων σε διάφορα είδη φλαβονοειδών, τα οποία μπορούν να ωφελήσουν την υγεία και την ευεξία του καταναλωτή, καθώς και τις πηγές από τις οποίες αυτά μπορούν να απομονωθούν (Kumar et al 2013, Texeira et al 2005).

1.2 Η λουτεολίνη και ο βιολογικός της ρόλος

1.2.1 Γενικά για τη λουτεολίνη

Η λουτεολίνη, ή όπως είναι γνωστή κατά IUPAC 3',4',5,7 τετραϋδροξυφλαβόνη, αποτελεί σημαντικό φλαβονοειδές της κατηγορίας των φλαβονών. Έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, στο οποίο οφείλει και την ονομασία της (από την λατινική ονομασία Luteum για το κίτρινο χρώμα), και όπως και τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, αποτελεί προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, με ρόλο στην προστασία τους από την υπεριώδη ακτινοβολία και το οξειδωτικό στρες (Manzoor et al., 2017, Lopez Lazaro, 2009).



Εικόνα 1.3: Η δομή της καθαρής λουτεολίνης.



Εικόνα 1.4: Λουτεολίνη σε καθαρή μορφή.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.3, η λουτεολίνη αποτελείται από το βασικό δομικό σκελετό των φλαβονοειδών, ενώ ως μέλος της ομάδας των φλαβονών έχει έναν 2,3 διπλό δεσμό, καθώς και ένα καρβονύλιο στη θέση 4 στον δακτύλιο C, ενώ διαθέτει υδροξύλια στις θέσεις 5,7,3' και 4' της δομής της. Τα υδροξύλια αυτά σε συνδυασμό με τον διπλό δεσμό στον δακτύλιο C, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τις βιολογικές και τις βιοχημικές ιδιότητες του φλαβονοειδούς, το οποίο βρίσκεται στα φυτά ως αγλυκόνη ή υπό τη μορφή διάφορων γλυκοζιτών.

Ως χημική ουσία, η λουτεολίνη παρουσιάζει έντονη βιολογική δράση. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει μεγάλη συσχέτιση τροφίμων που εμπεριέχουν λουτεολίνη με την καταπολέμηση ορισμένων χρόνιων ασθενειών όπως η μείωση της πιθανότητας εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ηλικιωμένους 65-99 ετών, όπως και με την μείωση της πιθανότητας εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 (Lopez-Lazaro 2009, Song et al., 2005). Οι μελέτες αυτές σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα πληθώρας εργαστηριακών ερευνών καταδεικνύουν τη βιολογική δράση της λουτεολίνης σε διάφορους τομείς, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω.

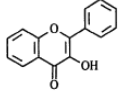
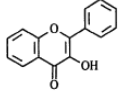
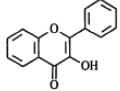
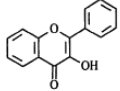
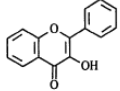
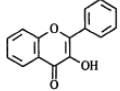
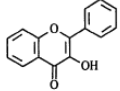
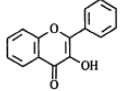
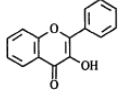
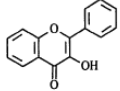
1.2.2 Η λουτεολίνη ως παράγοντας αντιοξειδωτικής δράσης

Η λουτεολίνη, όπως και όλα τα φλαβονοειδή, είναι αναγνωρισμένα ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στη σταθερότητα της ρίζας του φαινοξυλίου, η οποία γίνεται καλός δότης υδρογόνου σε δραστικές ρίζες, παρεμποδίζοντας έτσι την έναρξη και την διάδοση των αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών στον οργανισμό οφείλονται κυρίως σε είδη δραστικού οξυγόνου (ROS), όπως τα υπεροξειδία του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$), οι ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων και άλλα είδη, τα οποία έχουν μικρή διάρκεια ζωής. Η υπερβολική παραγωγή ROS οδηγεί στην καταστροφή του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων καθώς και στην επαγωγή του οξειδωτικού στρες, παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών και νευρολογικών παθήσεων (Manzoor et al., 2017).

Στην παρεμπόδιση της παραγωγής οξειδωμένων μορφών από τα ROS συμβάλλει η λουτεολίνη λόγω της δομής της, η οποία εμπεριέχει 3',4' υδροξύλια στον δακτύλιο B, έναν διπλό δεσμό στον δακτύλιο C καθώς και μια καρβονυλομάδα (θέση 4, δακτύλιος C), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.3. Η δομή συμβάλλει στην προσφορά πολλαπλών υδρογόνων σε ελεύθερες ρίζες, μέσω των αρωματικών υδροξυλίων, λειτουργώντας έτσι ως δεσμευτής των ελευθέρων ριζών (Lien et al 1999). Πιο συγκεκριμένα έχει

βρεθεί ότι η λουτεολίνη συμβάλλει στην πλήρη δέσμευση ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αναλογία συγκεντρώσεων 0,4-2 H₂O₂/λουτεολίνη σε σύστημα οξειδωσης ερυθρού της φαινόλης (PSP) καταλυόμενο από υπεροξειδάση του ραδικιού, το οποίο προσομοιάζει την δράση των ROS στον οργανισμό, ενώ μικρές συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού απαιτούνται τόσο για την αναστολή κατά 50% ελευθέρων ριζών που προέρχονται από O₂⁻ και υπεροξειδωση των λιπιδίων στο συκώτι του ποντικού-5.2 και 45 μM αντίστοιχα (Cai et al., 1998). Σε άλλη έρευνα, έχει υπολογιστεί ότι τόσο η λουτεολίνη, όσο και οι γλυκοζίτες της έχουν καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με άλλες φλαβόνες, ίση με 2,63 ισοδύναμης συγκέντρωσης Trolox για την αγκυρόνη και 1-1,8 για τους κύριους γλυκοζίτες που μελετήθηκαν (Lien et al., 1999).

Πίνακας 1.2: Η αντιοξειδωτική ικανότητα της λουτεολίνης και άλλων φλαβονών και φλαβονολών μετρούμενη σε ισοδύναμη συγκέντρωση Trolox (μM Trolox που απαιτείται για την ίδια δράση με 1 μM φλαβονοειδούς). (Lien et al 1999)

Flavonol	OH	OH				
11. quercetin		3,5,7,3',4'	5	3	4.70	(3.09) ^c
12. myricetin		3,5,7,3',4',5'	6	3	3.10	3.55
13. morin		3,5,7,2',4'	5	2	2.55	2.77
14. rutin		5,7,3',4'	4	3	3-rutinoside	2.40 2.63
15. kaempferol		3,5,7,4'	4	2		1.34 2.31
Flavone						
16. luteolin		5,7,3',4'	4	3		2.10 2.63
17. luteolin-4'-glucoside		5,7,3'	3	2	4'-glucose	1.74 1.85
18. apigenin		5,7,4'	3	2		1.45 1.85
19. chrysin		5,7	2	2		1.43 1.39
20. luteolin-3',7-diglucoside		5,4'	2	1	3',7-diglucose	0.79 1.07

Η δομή της λουτεολίνης (κατεχολικός Β-δακτύλιος) συνδέεται με τη δημιουργία χηλικών συμπλόκων με μεταβατικά μέταλλα που προκαλούν αντιδράσεις οξειδωσης μέσω της αντίδρασης Fenton, όπως τα ιόντα σιδήρου (Fe³⁺) και χαλκού. Τα μέταλλα αυτά σχετίζονται με την πρόκληση οξειδωτικού στρες και ασθενειών του ΚΝΣ (εγκεφαλοπάθειες), του περιφερικού νευρικού συστήματος και του μυελού των οστών. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως η λουτεολίνη μπορεί να ανάγει έως και 6,7 mol Cu²⁺/mol σε Cu⁺, επιδεικνύοντας μία από τις καλύτερες αναγωγικές δράσεις μετάλλων συγκριτικά με άλλες φλαβόνες που εξετάστηκαν ως προς την αναγωγή Cu²⁺, ενώ μικρή δράση παρουσιάζει ως προς την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου (0,1 mol Fe(3)/mol αντιοξειδωτικού) (Lurdes M. et al, 2002).

Πίνακας 1.3: Η αναγωγική δράση διάφορων φλαβονοειδών έναντι ιόντων Cu²⁺. (Lurdes M., 2002)

Classes	Compounds	Substituents	μmoles Cu ⁺ /μmole flavonoid
Flavones	Myricetin	3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH	12.5 ± 0.4
	Quercetin	3, 5, 7, 3', 4'-OH	9.2 ± 0.2
	Luteolin	5, 7, 3', 4'-OH	6.7 ± 0.5
	Kaempferol	3, 5, 7, 4'-OH	6.6 ± 0.6
	Rutin	3-rut, 5, 7, 3', 4'-OH	8.6 ± 0.3
	Apigenin	5, 7, 4'-OH	3.3 ± 0.9
Flavanol	Catechin	3, 5, 7, 3', 4'-OH	9.4 ± 1.0
	Genistein	5, 7, 4'-OH	4.0 ± 1.0
Isoflavones	Daidzein	7, 4'-OH	2.7 ± 0.5
	Taxifolin	3, 5, 7, 3', 4'-OH	9.4 ± 0.4
Flavanones	Naringenin	5, 7, 4'-OH	7.1 ± 1.1
	Naringin	7-ramn, 5, 4'-OH	2.4 ± 0.4

Τέλος, η αντιοξειδωτική δράση της λουτεολίνης εκδηλώνεται και με τον παρεμποδισμό της δράσης ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, καθώς και με την προστασία ενδογενών αντιοξειδωτικών. Ως προς το πρώτο σκέλος, έχει βρεθεί ότι η λουτεολίνη παρουσιάζει πολύ καλή δράση ως παρεμποδιστής του ενζύμου της ξανθοξειδάσης (XO), το οποίο καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ απελευθερώνοντας ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπεροξειδικού ανιόντος. Η συγκέντρωση IC₅₀ του φλαβονοειδούς για την αναστολή της ξανθοξειδάσης υπολογίστηκε ίση με 0,96 μm/50 μm XO (Nagao et al 1999). Ακόμη παρουσιάζει ανασταλτική δράση ως προς τα ένζυμα iNOS και COX-2, τα οποία καταλύουν αντιδράσεις παραγωγής ROS και δραστικών οξειδίων του αζώτου (Hu, Kitts 2004) και ως προς αρκετές λιποξυγενάσες παρεμποδίζοντας έτσι την κατάλυση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (Sadik et al, 2002). Ως προς το δεύτερο σκέλος, έχει βρεθεί ότι η λουτεολίνη προστατεύει ενδογενή αντιοξειδωτικά τα οποία σχετίζονται με την προστασία από καρκινογενέσεις (Manju, Nalini, 2005).

1.2.3 Η λουτεολίνη ως αντικαρκινικός παράγοντας

Η καρκινογένεση αποτελεί μια χρόνια και συνεχή διαδικασία η οποία είναι αποτέλεσμα της αναπαραγωγής μεταλλαγμένων κυττάρων και μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια: την έναρξη, την προώθηση και την εξέλιξη της δημιουργίας καρκινικών κυττάρων, που οδηγεί σε δημιουργία καρκινωμάτων. Κατά τη διάρκεια της έναρξης ένζυμα, όπως το κυτόχρωμα 450, καταλύουν τις αντιδράσεις δημιουργίας μεταλλαξιόγόνων παραγόντων, οι οποίοι επιτίθενται στο DNA δημιουργώντας καρκινικά κύτταρα τα οποία αναπαράγονται κατά το στάδιο της προώθησης. Η καρκινογένεση γίνεται μη αντιστρεπτή κατά το τελικό στάδιο, οδηγώντας στην αστάθεια του ανοσοποιητικού και την ανεξέλεγκτη γένεση καρκινικών κυττάρων. Ο καρκίνος είναι μια από τις πιο θανατηφόρες ασθένειες στον κόσμο, συνεπώς η αντιμετώπισή του είναι ζητούμενο για τη σύγχρονη ιατρική. Η λουτεολίνη, ως αντιοξειδωτικός παράγοντας έχει βρεθεί σε αρκετές έρευνες *in vivo* και *in vitro* ότι έχει προστατευτική δράση απέναντι στον καρκίνο, η οποία οφείλεται στην καταστολή των μηχανισμών της αναπαραγωγής και της δράσης των καρκινικών κυττάρων.

Η λουτεολίνη, ως συστατικό της διατροφής, λαμβάνεται σε ποσότητες 1 mg/ημέρα από τον άνθρωπο. Έρευνες τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* έχουν δείξει την συσχέτιση της δοσολογίας της λουτεολίνης με τον περιορισμό της πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου (Seelinger et al 2008). Η δράση και η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων αναστέλλεται ή επιβραδύνεται από την ημερήσια πρόσληψη του αντιοξειδωτικού, με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μέσω της μείωσης των επιπέδων ROS και κυτοχρώματος 450 στον οργανισμό, την πρόληψη του μεταβολισμού των καρκινογενέσεων που δημιουργούν μεταλλαξιόγόνους παράγοντες και την μείωση της ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση, δηλαδή την διαδικασία κυτταρικού θανάτου. Απέναντι στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, τα φλαβονοειδή παρεμποδίζουν την δημιουργία καρκινωμάτων μέσω του ελέγχου του κύκλου ζωής των κυττάρων, με την λουτεολίνη να αποτελεί ένα από τα πιο ισχυρούς ανασταλτικούς παράγοντες μεταξύ της κατηγορίας των φλαβονών απέναντι σε μια μεγάλη ομάδα καρκινικών κυττάρων, με ανασταλτική δράση IC₅₀ μεταξύ 3-50 μM. Επίσης η λουτεολίνη μπορεί να περιορίσει διάφορους τύπους καρκίνου, αναστέλλοντας το μεταβολισμό και την αιμάτωση των καρκινικών

κυττάρων σταματώντας την διαδικασία της κυτταρικής ανάπτυξης και επιταχύνοντας τον κυτταρικό θάνατο. Η αποτελεσματικότητα της έχει επιβεβαιωθεί και *in vivo* σε πειραματόζωα διαπιστώνοντας περιοριστικές ιδιότητες στην ανάπτυξη διάφορων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του ήπατος, του δέρματος και των ωοθηκών (Manzoor et al, 2017).

Μία ακόμη αντικαρκινική δράση της λουτεολίνης έγκειται στην προστασία του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι ένζυμα που καταλύουν τη δημιουργία καρκινικών κυττάρων και πολλαπλασιάζονται από την έκθεση του δέρματος σε υπεριώδεις-B περιορίζονται από την πρόσληψη λουτεολίνης, η οποία συνδέεται στους υποδοχείς των ενζύμων επιτελώντας το ρόλο του παρεμποδιστή. Σε όλα τα παραπάνω συμβάλλει η χαμηλή τοξικότητα του φλαβονοειδούς, το οποίο παραμένει ασφαλές για μακροχρόνια χορήγηση σε δόσεις 30 mg/kg ασθενούς (Manzoor et al, 2017).

1.2.4 Άλλες βιολογικές δράσεις

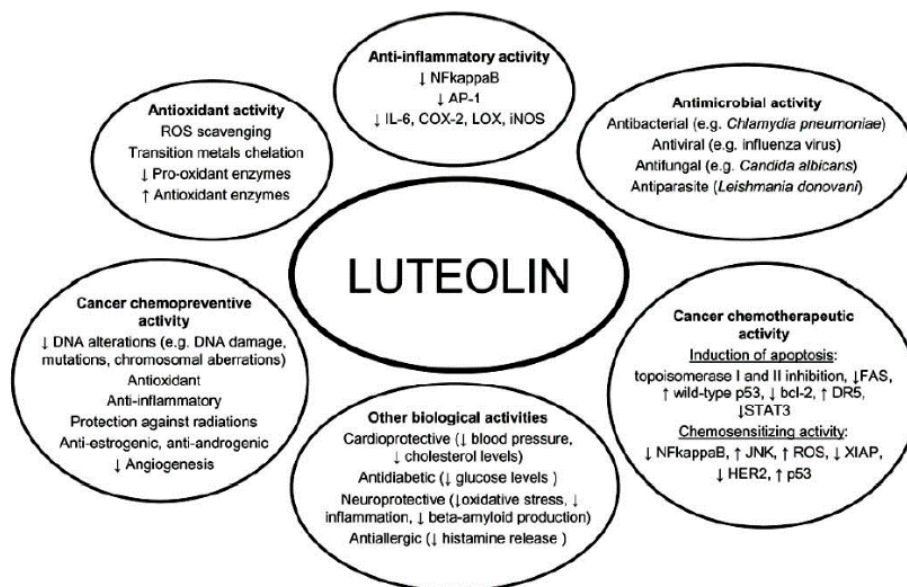
Εκτός από αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, η λουτεολίνη έχει επιδείξει βιολογική δράση και σε άλλους τομείς. Όπως πολλά φλαβονοειδή, έτσι και η λουτεολίνη έχει επιδείξει αντιφλεγμονώδη δράση σε έρευνες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η λουτεολίνη και οι γλυκοζίτες της μπορούν να καταστρέψουν ή να επιβραδύνουν την παραγωγή βακτηρίων και τοξινών που προκαλούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις, όπως τις λιποπολυσακχαριτικές τοξίνες οι οποίες επάγουν την ταχεία παραγωγή ενδολευκινών, ελευθέρων ριζών και παραγόντων νέκρωσης καρκινωμάτων οι οποίοι ευθύνονται για τον κυτταρικό θάνατο υγιών κυττάρων. Η μακροχρόνια παραγωγή των τοξινών αυτών μπορεί να οδηγήσει σε καρκινώματα. Με βάση έρευνες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα, η λουτεολίνη είναι ένα από τα πιο επιδραστικά φλαβονοειδή που δοκιμάστηκαν για την παρεμπόδιση της του παράγοντα καρκινικής νέκρωσης TNF α καθώς και την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης και του γενετικού πολλαπλασιασμού πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που ευθύνονται για την παραγωγή φλεγμονής στον οργανισμό. Επίσης ως αντιοξειδωτικό παρεμποδίζει τη δράση ενζύμων που ευθύνονται για την παραγωγή φλεγμονών, όπως τις λιποξυγενάσες, τις κυκλοοξυγενάσες και τις συνθάσες οξειδίων του αζώτου. Ακόμη έχει βρεθεί η συσχέτιση των γλυκοζιτών της λουτεολίνης με την αναστολή μεταβολιτών που προκαλούν φλεγμονή (Manzoor et al, 2017).

Η λουτεολίνη έχει επίσης επιδείξει αντιμικροβιακές ιδιότητες, καθώς ως φλαβονοειδές παίζει προστατευτικό ρόλο απέναντι στην μόλυνση των φυτών από μικρόβια. Πιο συγκεκριμένα, η λουτεολίνη έχει δείξει αντιμικροβιακή δράση απέναντι στο βακτήριο *Chlamydia pneumoniae* *in vivo* σε ποντίκια, με την ανάλυση στους πνεύμονες των πειραματόζωων να δείχνει την αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού καθώς και την πρόκληση φλεγμονής από το βακτήριο (Lopez-Lazaro, 2009). Ακόμη, έχει μελετηθεί η δράση της απέναντι στον ιό της γρίπης, όπου φάνηκε η καταστρεπτική της δράση ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις (Liu et al., 2008) ενώ οι ιδιότητες του μορίου της συνδέεται και με την καταπολέμηση ασθενειών σχετιζόμενων με τους πνεύμονες όπως η COVID-19, έχοντας δυνατότητα να αποτελέσει φυσικό ανασταλτικό του ιού Sars-COV-2 (Xie et al., 2021).

Τέλος, η λουτεολίνη επιδεικνύει δράση απέναντι στην πρόκληση ασθενειών από την έκθεση στην ακτινοβολία, όπως το μελάνωμα και η πρόωγη γήρανση. Η διαπερατότητα του δέρματος από το φλαβονοειδές οδηγεί στην επίδειξη ανασταλτικών και προστατευτικών ιδιοτήτων απέναντι σε ορισμένους ενζυμικούς παράγοντες κατάλυσης αντιδράσεων που ενεργοποιούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία. Έχει ακόμη εμφανίσει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής της φύσης, καθώς παρεμποδίζει το οξειδωτικό στρες που προκαλεί ισχαιμική ατροφία και οδηγεί σε αρρυθμίες και ατροφία του μυοκαρδίου (Lopez-Lazaro 2009, Manzoor et al., 2017).

Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί πως η λουτεολίνη μελετάται ήδη ως προς την ικανότητα της να ενισχύσει συγκεκριμένα τρόφιμα, τα οποία θα μπορούσαν να ενταχθούν στην κατηγορία των λειτουργικών τροφίμων. Η λουτεολίνη είναι μια ένωση λιποδιαλυτή, επομένως θα μπορούσε να προστεθεί στη λιπαρή φάση ορισμένων τροφίμων. Συγκεκριμένα, στην αγορά κυκλοφορεί το σκεύασμα Neuroprotek, το οποίο αποτελείται από κάψουλες πλούσιες σε λουτεολίνη και ρουτίνη (γλυκοζίτης της πρώτης) διαλυμένες σε λιπαρή φάση από πυρηνέλαιο, το οποίο επιβεβαιώνει την πιθανότητα ενίσχυσης ελαιωδών τροφίμων και παρασκευασμάτων από την λουτεολίνη (Bangar et al, 2023). Επίσης, έχει μελετηθεί η δυνατότητα της ενθυλάκωσης της λουτεολίνης σε διάφορα είδη νανοσωματιδίων, για την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητάς της, προκειμένου αυτά να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων για διαβητικούς (de Oliveira et al, 2022).

Οι συνολικές βιοδραστικές ιδιότητες της λουτεολίνης, όπως αυτές έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα τόσο in vitro όσο και σε πειραματόζωα, συνοψίζονται στο παρακάτω γράφημα.

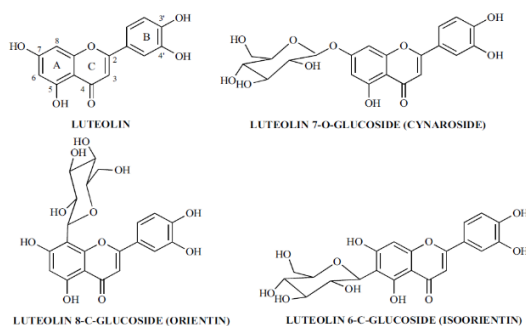


Εικόνα 1.5: Συνοπτικές βιολογικές δράσεις της λουτεολίνης (Lopez-Lazaro 2009).

1.3 Σύνοψη μορφών και πηγών λουτεολίνης στη φύση

Όπως έγινε αντιληπτό από τα παραπάνω η λουτεολίνη επιδεικνύει ευρεία βιολογική δράση σε διάφορους τομείς, έχοντας τη δυνατότητα ενίσχυσης του ανοσοποιητικού και πρόληψης πολλών τύπων ασθενειών, συνεπώς οι φυσικές πηγές του αντιοξειδωτικού αποτελούν ζητούμενο τόσο για την απομόνωση της λουτεολίνης, όσο και για την συμπερίληψη της στην διατροφή του ανθρώπου.

Η λουτεολίνη είναι ένα από τα πιο βασικά μέλη της οικογένειας των φλαβονοειδών. Βρίσκεται σε αρκετά είδη φυτών, όπως βότανα, φρούτα και λαχανικά καθώς και τους σπόρους τους, συνήθως σε σχετικά μικρές ποσότητες (~50 mg/kg) στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά. Ειδικά έχει ταυτοποιηθεί στα καρότα, τις πιπεριές, το ελαιόλαδο και τα φύλλα της ελιάς, τα κελύφη των φιστικιών, τις φλούδες των μήλων, την ρίγανη, την μέντα, το ρόδι και το θυμάρι, σύμφωνα με την βάση δεδομένων του USDA (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων Η.Π.Α). Ακόμη έχει αναγνωριστεί σε πάνω από 300 είδη φυτών και βοτάνων στη φύση και σε παραπάνω από 40 βοτανικές οικογένειες, είτε σε καθαρή μορφή είτε υπό μορφή γλυκοζιτών (Lopez Lazaro, 2009). Οι βασικοί γλυκοζίτες που σχηματίζει η λουτεολίνη στα φυτά που εντοπίζεται είναι της μορφής *O*-γλυκοζίτη, όπου το ή τα μόρια του σακχάρου που περιέχονται στον γλυκοζίτη συνδέονται με το κεντρικό μόριο μέσω αιθερικών δεσμών με τα ελεύθερα υδροξύλια, τα οποία βρίσκονται στις θέσεις 5,7,3',4' του μορίου (βλ. Εικόνα 1.3) ενώ γλυκοζίτες μπορούν να βρεθούν και υπό τη μορφή *C*-γλυκοζίτη, μέσω δεσμού της γλυκόζης με κάποιο μόριο του σκελετού. Η γλυκόζη αποτελεί το κύριο σάκχαρο που βρίσκεται στους γλυκοζίτες της λουτεολίνης, με ορισμένους να συνδέονται με άλλα σάκχαρα όπως η ξυλόζη και το γλυκουρονικό οξύ. Οι δομές τεσσάρων κοινών μορφών της λουτεολίνης που παρουσιάζονται στη φύση φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 1.6: Η αγλυκόνη και οι δομές κάποιων βασικών γλυκοζιτών της λουτεολίνης (Lopez-Lazaro 2009).

Μία σημαντική πηγή λουτεολίνης στα τρόφιμα, όπως φαίνεται και από σχετικές πηγές, είναι η ρίγανη. Το περιεχόμενο της λουτεολίνης φτάνει τα 1028 mg/100 g αποξηραμένης μεξικάνικης ρίγανης (*Lipia graveolens*) και τα 25,1 mg/100 g φρέσκου δείγματος μεξικανικής ρίγανης, σύμφωνα με το USDA. Ωστόσο σε δείγματα ειδών ρίγανης που ευδοκμοούν στην Ευρώπη, όπως το είδος *Origanum vulgare* από το οποίο προέρχεται η Ελληνική ρίγανη, δίνει πολύ χαμηλό περιεχόμενο σε λουτεολίνη ίσο με 1 mg/g φυτού σύμφωνα με την βάση δεδομένων αναλυτικού περιεχομένου φλαβονοειδών του USDA, μικρότερο από το 1% που απαιτείται ώστε να σχεδιαστεί

μια επικερδής διαδικασία αξιοποίησης του φυτού για την απομόνωση του φλαβονοειδούς.



Εικόνες 1.7 και 1.8: Αριστερά το άνθος της ρίγανης *Origanum vulgare* που ευδοκμεί στην Ελλάδα, δεξιά το βότανο της μεξικάνικης ρίγανης που είναι πλούσιο σε λουτεολίνη.

Ένα ακόμη είδος μπαχαρικού που θα μπορούσε να αποτελέσει πηγή λουτεολίνης είναι οι σπόροι του σέλινου. Το σέλινο (*Arium graveolens*) αποτελεί μέλος της οικογένειας των σκιαδοφόρων φυτών και είναι ένα από τα φυτά που ευδοκμούν στην Ευρώπη, όσο και στις τροπικές περιοχές της Αφρικής και της Ασίας, ενώ αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής. Τα φύλλα, οι ρίζες και οι σπόροι του σέλινου χρησιμοποιούνται για βοτανικές θεραπείες, ενώ έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τις αντιοξειδωτικές και τις φαρμακολογικές δράσεις των τμημάτων του φυτού. Οι σπόροι του σέλινου είναι ωοειδείς και καφέ χρώματος (Εικόνα 1.9) και έχουν έντονα αρωματικά χαρακτηριστικά (Powanda et al., 2015, Sowbhagya et al., 2010). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του USDA, η περιεκτικότητα των σπόρων σέλινου σε λουτεολίνη είναι κατά μέσο όρο ίση με 762 mg/100 g ή 0,76% w/w, κατατάσσοντας το μπαχαρικό ως μία πιθανή πηγή λουτεολίνης. Το σέλινο αντίθετα, παρουσιάζει χαμηλό περιεχόμενο σε λουτεολίνη (USDA Database, 2018). Επειδή οι σπόροι του σέλινου περιέχουν αιθέριο έλαιο, χρειάζεται να προηγηθεί διαδικασία απομάκρυνσης του με απόσταξη, κάτι που μπορεί να υποβαθμίσει ποιοτικά ορισμένες ευαίσθητες βιοδραστικές ουσίες του τελικού προϊόντος.



Εικόνα 1.9: Σπόροι σέλινου

Μια ακόμη εναλλακτική πηγή που θα μπορούσε να αποτελέσει πηγή λουτεολίνης είναι τα φύλλα της ελιάς (*Olea europaea*), τα οποία αποτελούν σημαντικό παραπροϊόν της συλλογής και της επεξεργασίας της ελιάς στη βιομηχανία. Συγκεκριμένα έχει μελετηθεί η εκχύλιση της λουτεολίνης και άλλων φλαβονοειδών από το φύλλωμα της

ελιάς με πολλές μεθόδους, βρίσκοντας την περιεκτικότητα της λουτεολίνης να κυμαίνεται από 1-3 mg/g ξηρού υλικού ή 0,1-0,3% w/w, με κυριότερες μορφές τους γλυκοζίτες κυναροσίδη (λουτεολίνη-7-*O*-γλυκοζίτης), λουτεολίνη-4'-*O*-γλυκοζίτης καθώς και της αγλυκόνης της λουτεολίνης, ενώ περιέχει ακόμη και γλυκοζίτες της απιγενίνης, καθώς και την πολυφαινόλη της ελευρωπαϊνης η οποία βρίσκεται στα φύλλα σε μεγάλη ποσότητα (6-9 % w/w) (Lama-Munoz et al., 2019a, Lama-Munoz et al 2019b, Cifa et al., 2018, Meirinhos et al., 2005). Η λουτεολίνη βρίσκεται σε μικρή περιεκτικότητα στα φύλλα της ελιάς με βάση τα αποτελέσματα που εξάγονται από τις υπάρχουσες δημοσιεύσεις, ως εκ τούτου απαιτούνται περισσότερες μελέτες για το πόσο βιώσιμη μπορεί να είναι η εκχύλιση της από το συγκεκριμένο παραπροϊόν.

Άλλο ένα φυτό που έχει μελετηθεί ως προς το περιεχόμενο του σε λουτεολίνη είναι το βότανο *Verbena officinalis* το οποίο στα Ελληνικά έχει την κοινή ονομασία Βερβένα η φαρμακευτική και ανήκει στην οικογένεια των βερβενίδων και το οποίο ανθίζει στις αρχές του καλοκαιριού, ενώ αποτελεί μέρος και της Ελληνικής χλωρίδας. Πιο συγκεκριμένα τα φύλλα του φυτού αποτελούνταν κατά 1% w/w σε γλυκοζίτες της λουτεολίνης με κύρια μορφή των γλυκοζίτη κυναροσίδη (λουτεολίνη-7-*O*-γλυκοζίτης) σε ποσοστό 0,85% w/w (Calvo et al., 1998, Calvo and Crespo, 2000), μετά από εκχύλιση με μίγμα μεθανόλης-νερού. Το περιεχόμενο του βοτάνου στο φλαβονοειδές είναι ικανοποιητικό, ωστόσο απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την αξιολόγηση του περιεχομένου του φυτού σε λουτεολίνη, καθώς και για την βελτιστοποίηση της απομόνωσής της από αυτό. Ακόμη, βότανα με αξιολογημένη περιεκτικότητα σε γλυκοζίτες της λουτεολίνης αποτελούν η μέντα (*Mentha piperita*) και το κοινό φασκόμηλο (*Sage officinalis*), με τα φύλλα των βοτάνων να περιέχουν κατά μέσο όρο 7 mg/g ξηρού υλικού (0,7% κατά βάρος) σε γλυκοζίτες της λουτεολίνης (λουτεολίνη-7-*O*-ρουτινοζίτης για την μέντα, λουτεολίνη-7-*O*-β-γλυκουρονίδιο για το κοινό φασκόμηλο) (Fecka, Turek 2008) σε μελέτες πάνω σε υδατικά εγχύματα.



Εικόνες 1.10-1.12: (από αριστερά προς τα δεξιά) Τα φύλλα των βοτάνων βερβένα, μέντα και κοινό φασκόμηλο, τα οποία περιέχουν ποσότητα λουτεολίνης.

Δύο ακόμη εναλλακτικές πηγές της ουσίας, οι οποίες έχουν μελετηθεί ως προς το περιεχόμενο τους σε μορφές της λουτεολίνης είναι το βότανο *Reseda luteola* (Ρεζεντά η κίτρινη) και το κέλυφος της αραχίδας (*Arachis Hypogea*) οι ιδιότητες και το περιεχόμενο των οποίων αναλύονται παρακάτω.

1.4 Ρεζεντά η κίτρινη (*Reseda luteola*)

1.4.1 Γενικά για το φυτό-Βιολογική δράση

Το βότανο με την ονομασία *Reseda luteola*, που είναι γνωστό με την κοινή ονομασία ρεζεντά η κιτρινωπή ή ώχρα του βαφείου (dyer's weld) είναι διετές φυτό που ανήκει στο γένος *Reseda* της οικογένειας φυτών *Resedaceae* (Εικόνα 1.13). Προέρχεται από την ευρύτερη περιοχή της Ευρασίας και αποτελεί μέρος της χλωρίδας της περιοχής της Μεσογείου, στην οποία έχει ιστορικά χρησιμοποιηθεί ως βαφή κίτρινου χρώματος για την κλωστοϋφαντουργία μέχρι την αντικατάστασή του από τα συνθετικά χρώματα. Όπως τα περισσότερα φυτά του γένους *Reseda* έχει ύψος 40-130 cm, είναι ερμαφρόδιτο και ανθίζει τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ έχει υψηλό βαθμό συγγένειας με το βότανο *Reseda lutea* (κίτρινη ώχρα), το οποίο επίσης έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσική βαφή για το χρώμα κίτρινο.



Εικόνα 1.13: Το φυτό *Reseda luteola*.

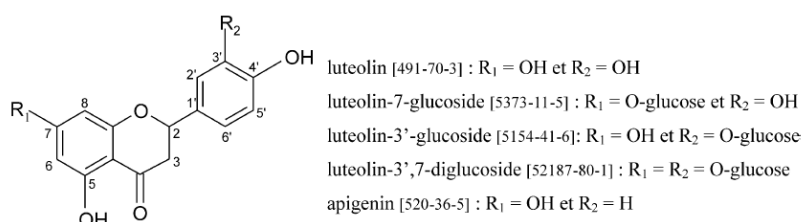
Όπως προαναφέρθηκε, το φυτό *Reseda luteola* έχει χρησιμοποιηθεί ως κίτρινη βαφή υφασμάτων σε πληθώρα εφαρμογών στο παρελθόν. Ωστόσο η χρήση εκχυλισμάτων του φυτού ως φυσική χρωστική τροφίμων με ταυτόχρονη προαγωγή της ανθρώπινης υγείας θα μπορούσε να αποτελέσει ένα προϊόν υψηλής καινοτομίας, συνδυάζοντας ταυτόχρονα και την απαίτηση των καταναλωτών για την αντικατάσταση των χημικά παρασκευασμένων χρωστικών των τροφίμων από νέα φυσικά προϊόντα με σκοπό την προστασία της ανθρώπινης υγείας (Kim et al, 2015). Το φυτό οφείλει τις ικανότητες βαφής του στην περιεκτικότητά του σε διάφορες μορφές λουτεολίνης. Η περιεκτικότητα των υπέργειων μερών του φυτού σε λουτεολίνη υπολογίζεται από 13,6-28,7 mg/g σε έξι ποικιλίες του φυτού που συναντώνται στην Κεντρική και την Νότια Ευρώπη (Angelini et al 2003).

Το φυτό παρουσιάζει επίσης και βιολογική δράση η οποία οφείλεται στα φλαβονοειδή που περιέχει, αποτελώντας πιθανή πρώτη ύλη για την παρασκευή φαρμάκων και συμπληρωμάτων διατροφής από τα συστατικά του. Συγκεκριμένα, τα αιθανολικά και τα υδατικά εκχυλίσματα του φυτού *Reseda luteola* έχουν επιδείξει αντικαρκινική δράση *in vitro* απέναντι σε καρκινικά κύτταρα, επάγοντας την ανάπτυξή τους κατά 41% (Yildirim et al 2008). Τα εκχυλίσματα του φυτού έχουν επίσης δείξει ισχυρή δράση απέναντι στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των περιφερειακών κυττάρων PMBC που ευθύνονται για την πρόκληση φλεγμονής στον οργανισμό η

οποία οφείλεται κυρίως στην περιεκτικότητα του εκχυλίσματος του φυτού σε διάφορες μορφές της λουτεολίνης (Woelfle et al 2009) καθώς και αντιβακτηριδιακή δράση απέναντι σε λοιμοξιογόνα βακτήρια όπως αυτά του σταφυλόκοκκου και της ψευδομονάδας (Raji et al, 2022). Ακόμη, η βιοδραστικότητα του φυτού έχει εξεταστεί και in vivo σε πειραματόζωα, έχοντας αποδείξει ότι το φυτό έχει προστατευτική δράση απέναντι στην προσβολή των νευρώνων του ποντικού από ROS λόγω του περιεχομένου του σε φλαβονοειδή. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται ότι η χρήση σκευασμάτων παραγόμενων από εκχυλίσματα του φυτού μπορεί να οδηγήσει στην πρόληψη και την καταπολέμηση ασθενειών που σχετίζονται με το νευρικό σύστημα, καθώς και στην πρόληψη απέναντι στην χημικά επαγόμενη καρκινογένεση στα πειραματόζωα.

1.4.2 Περιεχόμενο σε λουτεολίνη

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η *Reseda luteola* είναι ένα είδος φυτού το οποίο έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε λουτεολίνη, τόσο ως καθαρή μορφή, όσο και υπό μορφή γλυκοζιτών, ενώ παρούσα στα εκχυλίσματα του φυτού είναι και η απιγενίνη σε διάφορες μορφές της. Μια σύνοψη των βασικών φλαβονοειδών που έχουν αναγνωρισθεί στο φυτό, καθώς και της δομής τους φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

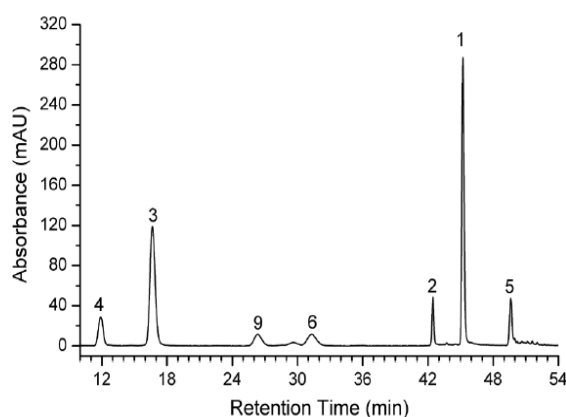


Εικόνα 1.14: Οι βασικές μορφές φλαβονοειδών στο φυτό *Reseda luteola* (Cristea et al 2002)

Η περιεκτικότητα της λουτεολίνης και των διάφορων γλυκοζιτών της στο φυτό διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία που μελετάται. Οι Angelini et al (2003) υπολόγισαν το περιεχόμενο λουτεολίνης στο φυτό σε 14-29 mg/g σε έξι γενότυπους του φυτού καλλιεργημένους σε διαφορετικές περιοχές της Κεντρικής και της Νότιας Ευρώπης. Ο μέσος όρος λουτεολίνης που υπολογίστηκε στο φυτό είναι 19 mg/g ή 1,9% w/w στα άνθη, τα φύλλα και τους καρπούς του φυτού, χωρίς ωστόσο να γίνει κάποια διάκριση μεταξύ της αγλυκόνης και των γλυκοζιτών. Ποσοτικοποίηση έγινε στην έρευνα των Cristea et al (2002) σχετικά με το περιεχόμενο των υπέργειων μερών του φυτού σε λουτεολίνη, χρησιμοποιώντας μέθοδο υγρής χρωματογραφίας (HPLC), ενώ εξετάστηκε η περιεκτικότητα του φυτού σε λουτεολίνη ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη εκχύλισης. Για την εκχύλιση με διαλύτη μίγμα μεθανόλης-νερού αναλογίας 80:20 v/v σε θερμοκρασία βρασμού και χρόνο εκχύλισης 15' εκχυλίζονται 11 mg ολικής λουτεολίνης/g υλικού σε ποικιλία του φυτού που καλλιεργήθηκε στη Νότια Γαλλία. Ως προς τις επιμέρους μορφές της λουτεολίνης, ο βαθμός ανάκτησης ανέρχεται σε 4,5 mg/g υλικού για την αγλυκόνη της λουτεολίνης, 3,6 mg/g υλικού για την κυναροσίδη και 2,3 mg/g υλικού για τον λουτεολίνη-3',7'-διγλυκοζίτη. Το συνολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος στις τρεις κύριες μορφές της λουτεολίνης μειώνεται ελαφρώς, όταν η εκχύλιση με τον ίδιο διαλύτη λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (0,84% αντί 1,04%), ενώ τα ολικά φλαβονοειδή

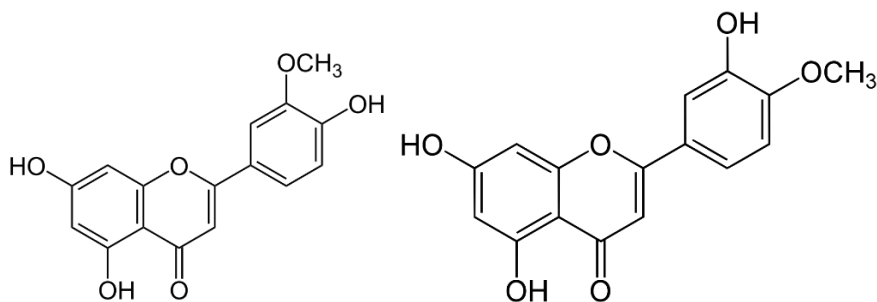
υπολογίζονται σε 19 mg/g (1,9% w/w). Παρόμοια αποτελέσματα για την εκχύλιση της λουτεολίνης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χρησιμοποιώντας καθαρή μεθανόλη ως διαλύτη δίνει και η έρευνα των Cerrato, De Santis και Moresi υπολογίζοντας την εκχυλιζόμενη λουτεολίνη σε 0,86% w/w, από υπέργεια τμήματα του φυτού που συλλέχθηκε από την Ιταλία (Cerrato et al, 2002).

Σε σύγκριση με την προαναφερθείσα έρευνα, η βιβλιογραφία αναφέρει παρόμοιες ή και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο φυτό. Για παράδειγμα, σε δείγματα *Reseda luteola* από την Πορτογαλία η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή βρέθηκε μεταξύ 14-91 mg/g ξηρής βάσης που εξετάστηκε για μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού. Από την μετέπειτα ανάλυση με HPLC-DAD, το μέσο περιεχόμενο των δειγμάτων σε λουτεολίνη ανέρχεται κατά μέσο όρο σε 2,9% w/w (29 mg/g), με κύριο γλυκοζίτη την κυναροσίδη με περιεκτικότητα 2% w/w, ενώ ακολουθούν η αγλυκόνη της λουτεολίνης με 0,7% w/w ξηρού φυτού και οι γλυκοζιωμένες μορφές λουτεολίνη-3',7-διγλυκοζίτης και λουτεολίνη-4'-*O*-γλυκοζίτης με μέσες περιεκτικότητες 0,46% w/w και 0,34% w/w αντίστοιχα. Άλλα φλαβονοειδή που αναγνωρίστηκαν στο εκχύλισμα είναι ο 3'-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η απιγενίνη και ο 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης. Ακόμη βιβλιογραφικά αναφέρεται η ύπαρξη γλυκοζιτών της καιμπερόλης και της κερκετίνης σε ίχνη (Moitero et al., 2008). Ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα HPLC-DAD για το περιεχόμενο της λουτεολίνης στην ρεζεντά φαίνεται παρακάτω:



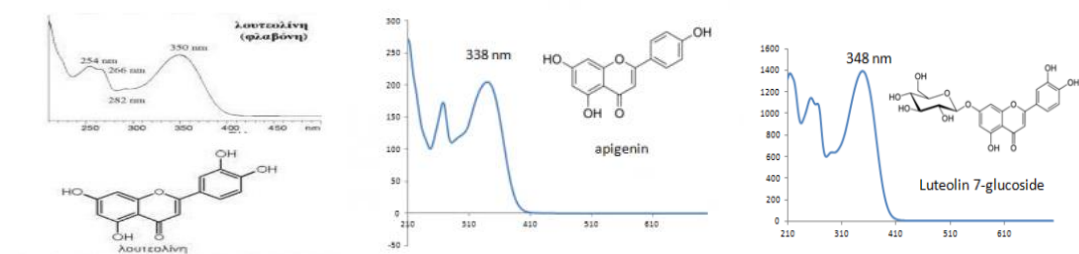
Εικόνα 1.15: Ανάλυση HPLC ενός εκχυλίσματος του φυτού *Reseda luteola* με μεθανόλη. Αριθμημένες οι κορυφές που αναγνωρίστηκαν. Με 1: η αγλυκόνη της λουτεολίνης, 2: ο 3'-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 3: η κυναροσίδη, 4: 3',7-*O*-διγλυκοζίτης της λουτεολίνης, 5 και 6: η αγλυκόνη και ο 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης αντίστοιχα και 9: ο 4'-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης.

Σε άλλες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα του φυτού που συλλέχθηκαν από την Ανατολική Μεσόγειο έχουν αναγνωρίσει και άλλους γλυκοζίτες της λουτεολίνης στα τμήματα του φυτού που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα σε φυσικές βαφές που προέρχονται από τμήματα του φυτού έχουν αναγνωριστεί ως κύρια συστατικά, εκτός από τα προαναφερθέντα φλαβονοειδή, και μεθυλιωμένες φλαβόνες όπως η χρυσοεριόλη (λουτεολίνη-3'-μεθυλαιθέρας) (Mantzouris et al., 2011, Deveoglou et al., 2010) και η διοσμετίνη (λουτεολίνη-4'-μεθυλαιθέρας) (Peggie et al 2008). Το περιεχόμενο της λουτεολίνης για την περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου στην οποία εντάσσεται και η Ελλάδα, θεωρείται ότι κυμαίνεται στα επίπεδα που αναφέρθηκαν παραπάνω, με βασικές μορφές την αγλυκόνη της λουτεολίνης και την κυναροσίδη.



Εικόνες 1.16 (α) και (β) : (α) Η χρυσοεριόλη και (β) η διοσμετίνη

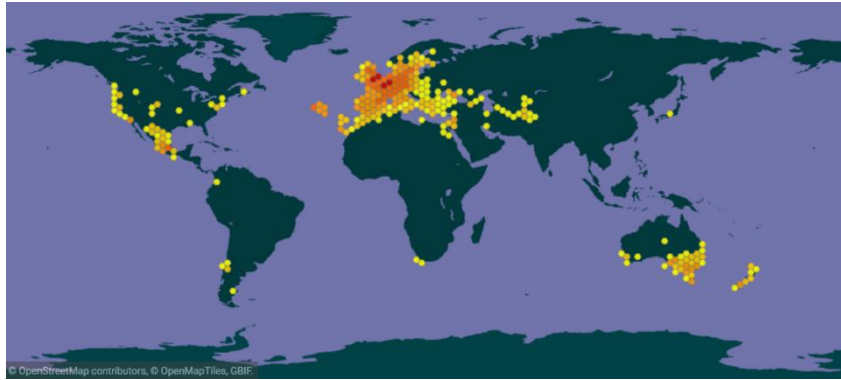
Όσον αφορά την ταυτοποίηση των ενώσεων που βρέθηκαν στα εκχυλίσματα, αυτή γίνεται με βάση την φασματοσκοπία UV-Vis. Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν δύο ζώνες απορρόφησης I και II, με την πρώτη να βρίσκεται μεταξύ 300-370 nm και να οφείλεται στη δομή των δακτυλίων B και C, και την δεύτερη να βρίσκεται μεταξύ 250-300 nm και να οφείλεται στη δομή του δακτυλίου A. Για τις φλαβόνες, η ζώνη I κυμαίνεται στα 310-350 nm και η ζώνη II στα 250-280 nm (Τσιμογιάννης, 2008). Τα φάσματα της λουτεολίνης και της απιγενίνης οι οποίες βρίσκονται στο φυτό *Reseda luteola* είναι τα παρακάτω:



Εικόνες 1.17 (α-γ): Τα φάσματα UV-Vis των δύο κύριων αγλυκονών (α) λουτεολίνη και (β) απιγενίνη καθώς και (γ) του κύριου γλυκοζίτη (λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης) που βρίσκονται στα μεθανολικά εκχυλίσματα του *Reseda luteola* L. (Τσιμογιάννης et al 2008, CAMEO 2019).

1.4.3 Διαθεσιμότητα του φυτού

Όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω, η *Reseda luteola* είναι ένα φυτό που ευδοκιμεί στην Ευρώπη και συγκεκριμένα σε περιοχές της Μεσογείου, αλλά και σε περιοχές της Κεντρικής και της Νότιας Ευρώπης. Διάφοροι γενότυποι του φυτού *Reseda luteola* έχουν βρεθεί τόσο στις περιοχές της Ευρώπης, της Νοτιοδυτικής και της Ανατολικής Μεσογείου (Μαρόκο, Τουρκία, Ισραήλ, Λίβανος) καθώς και σε περιοχές της Αυστραλίας, της Νέας Ζηλανδίας και του Μεξικού σύμφωνα με την βάση δεδομένων του Παγκόσμιου Μηχανισμού Πληροφοριών Βιοποικιλότητας (GBIF).



Εικόνα 1.18: Οι περιοχές όπου ευδοκμεί το φυτό *Reseda luteola*.

Η *Reseda luteola*, ως είδος φυτού που ευδοκμεί στην περιοχή της Μεσογείου, έχει αναγνωριστεί ως φυτό και της ελληνικής χλωρίδας. Η βάση δεδομένων της Ελληνικής Βοτανικής Εταιρείας και του Πανεπιστημίου Πατρών αναφέρει ότι το φυτό ευδοκμεί στη φύση στις περιοχές της Κρήτης, των νησιών του Βόρειου και του Ανατολικού Αιγαίου, της Κεντρικής Ελλάδας καθώς και στα βουνά της Πίνδου, του Βόρα και της Πελοποννήσου. Το φυτό ευδοκμεί κυρίως σε αγροτικά περιβάλλοντα, καθώς και ως αγριόχορτο στις περιοχές των βουνών. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων του GBIF, το φυτό παρατηρείται περισσότερο μεταξύ Ιουνίου και Σεπτεμβρίου κατά την περίοδο της ανθοφορίας, οπότε και πολλαπλασιάζεται στο φυσικό περιβάλλον, ενώ η χρήση του ως βαφή στο παρελθόν καθώς και το γεγονός ότι μπορεί να βρεθεί σε αγροτικά περιβάλλοντα δίνει την δυνατότητα καλλιέργειας και αξιοποίησης του φυτού ως πηγή λουτεολίνης και γενικότερα φλαβονοειδών για συμπληρώματα διατροφής, όπως και φυσικής χρωστικής τροφίμων.

Από την αξιολόγηση της βιβλιογραφίας, δεν έχει υπάρξει μέχρι στιγμής ολοκληρωμένη δημοσίευση που αφορά στην τοξικότητα του φυτού, ούτε έχει χρησιμοποιηθεί κάποιο από τα τμήματα του ως βρώσιμη ύλη στο παρελθόν. Ιστορικά, το φυτό έχει εμφανίσει ελαφρώς ναρκωτική δράση κατά την κατανάλωση του, , ενώ τα υδατικά εκχυλίσματά του δεν έχουν παρουσιάσει ερεθιστική δράση κατά την επαφή τους με το ανθρώπινο δέρμα. Ωστόσο απαιτείται να γίνουν περισσότερες μελέτες πάνω στον τομέα αυτό (GBIF Database, Casetti et al, 2009, Woelfle et al, 2010). Επίσης, δεν έχει αναφερθεί ολοκληρωμένη φυτοχημική μελέτη του φυτού, ώστε να ερευνηθεί η πιθανή ύπαρξη αιθέριου ελαίου, αν και έρευνες έχουν ταυτοποιήσει την ύπαρξη ταννινών και σαπωνινών στο φυτό (Shafaghat et al, 2017), καθώς και τεσσάρων αλκαλοειδών (ρεζεντίνη, ρεζεντινίνη, φαινυλ-β-ναφθυλαμίνη και β-υδροξυφαινυλαιθυλαμίνη) σε μικρή περιεκτικότητα για δείγματα που μελετήθηκαν στην περιοχή της Ασίας. Τα αλκαλοειδή αυτά πιθανώς να σχετίζονται με τοξικές επιπτώσεις στον άνθρωπο κατά τη βρώση, και θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω η περιεκτικότητα του φυτού σε αυτά, προκειμένου να αναπτυχθούν στρατηγικές απομάκρυνσής τους αν κριθεί η επίδραση της συγκέντρωσής τους σημαντική (Lutfullin et al, 1976).

Το πλούσιο περιεχόμενο του φυτού σε λουτεολίνη καθώς και η διαθεσιμότητα του στην Ελλάδα οδηγούν στην περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου είδους φυτών ως πηγή της λουτεολίνης από την παρούσα διπλωματική εργασία.



Εικόνα 1.19: Φωτογραφία του φυτού *Reseda luteola* από την περιοχή του Βόρα.

1.5 Αραχίδα (*Arachis Hypogea*)

1.5.1-Γενικά για τον καρπό και το κέλυφος του φιστικιού

Η αραχίδα είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα είδη ξηρών καρπών που καλλιεργείται στον κόσμο, αν και βοτανολογικά ανήκει στην κατηγορία των οσπρίων. Ξεκίνησε να καλλιεργείται στις περιοχές της Λατινικής Αμερικής από τους γηγενείς στις πεδιάδες της περιοχής Gran Chaco που καλύπτει τμήματα της Βολιβίας, της Παραγουάης, της Βραζιλίας, της Αργεντινής και της Χιλής και εξαπλώθηκε σε όλον τον υπόλοιπο κόσμο με την ανακάλυψη της Αμερικής από τους Ευρωπαίους. (R.O Hammonds, 1994). Το φυτό της αραχίδας ανήκει στην οικογένεια των Κυαμοειδών και περιλαμβάνει χαρακτηριστικά κίτρινα άνθη και σπέρματα τα οποία ωριμάζοντας υπόγεια δίνουν το σχήμα του καρπού του φιστικιού, με κάθε φυτό να μπορεί να αναπτύξει έως και 40 φιστίκια στις ρίζες του. Ο καρπός του φιστικιού αποτελείται από το κέλυφος, τον σπόρο του φιστικιού, ο οποίος είναι το τμήμα εκείνο που καταναλώνεται ως τρόφιμο και ένα φλοιό-προστατευτικό κάλυμμα γύρω από τον σπόρο το οποίο αποτελείται κυρίως από υδατάνθρακες. Ο καρπός του φιστικιού εκτός από την απευθείας κατανάλωση, χρησιμοποιείται και για την παραγωγή άλλων προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων όπως έλαια, φιστικοβούτυρο και άλευρα ενώ αποτελεί σημαντική πηγή φυτικών πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και ανόργανων αλάτων, όπως το ασβέστιο (Αλεβίζος 2017).



Εικόνες 1.20 (α,β): (α) Σχέδιο του φυτού *Arachis hypogaea*, (β) ο καρπός του φιστικιού.

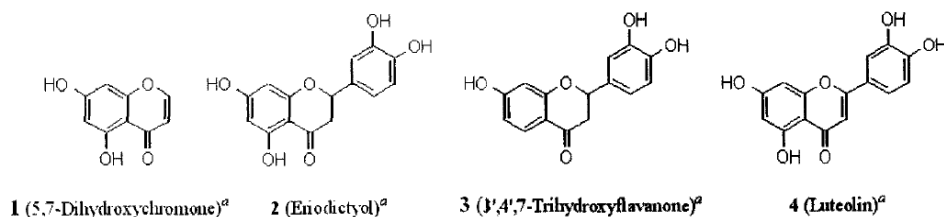
Από τα τμήματα του καρπού του φιστικιού που είναι διαθέσιμα στη βιομηχανία, το κέλυφος του φιστικιού αποτελεί σημαντικό παραπροϊόν, καθώς δεν είναι βρώσιμο. Στις περισσότερες περιπτώσεις καταλήγει ως απόβλητο, ζωοτροφή ή λίπασμα, ενώ έχει μελετηθεί και η επεξεργασία του ως βιοϋλικό πλήρωσης διαφόρων πολυμερών. Το κέλυφος του φιστικιού αποτελείται κυρίως από διαιτητικές ίνες, αλλά και φλαβονοειδή, τα οποία βρίσκονται στο κέλυφος ως δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι τα εκχυλίσματα του κελύφους του φιστικιού είναι δυνατόν να παρουσιάσουν αντιοξειδωτική δράση δίνοντας τη δυνατότητα επεξεργασίας τους για απομόνωση των περιεχόμενων φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι το κέλυφος της αραχίδας έχει ικανοποιητική δράση απέναντι στην υπεροξειδωση των λιπιδίων παρουσιάζοντας ποσοστό αναστολής της υπεροξειδωσης του λινολενικού οξέος έως και 96%, για μεθανολικά εκχυλίσματα κελυφών από τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες φιστικιών (Runner, Valencia, Spanish, Virginia), ενώ το ολικό φαινολικό περιεχόμενο ανέρχεται στα 5-10 mg/g υλικού, ή 0,5-1% w/w της μάζας του κελύφους (Yen et al, 1995).

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος του κελύφους αποδεικνύεται και από άλλες δημοσιεύσεις, στις οποίες οι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την εκχύλιση φλαβονοειδών από το κέλυφος του φιστικιού. Οι Peng et al, 2021 μελέτησαν την ικανότητα του εκχυλίσματος να παρεμποδίζει την οξείδωση των ερυθροκυττάρων μέσω της κατάλυσης αντιδράσεων ελευθέρων ριζών στο αίμα από τα ένζυμα της ξανθοξειδάσης και της υποξανθοξειδάσης, βρίσκοντας ότι η περιεχόμενη λουτεολίνη στο εκχύλισμα σε ποσότητα 0,32% w/w ξηρού υλικού μπορεί να παρεμποδίσει αποτελεσματικά τις αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών ROS. Ακόμη οι Wee et al, 2007 έχουν προσδιορίσει τέσσερα φαινολικά συστατικά, με κύριο είδος την λουτεολίνη ακολουθούμενη από την εριοδικτυόλη, την 5,7-διυδροξυχρωμόνη και την 3',4',7-τριυδροξυφλαβανόνη. Τα τέσσερα φαινολικά συστατικά έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να δράσουν απέναντι στις ελεύθερες ρίζες DPPH, με την λουτεολίνη να επιδεικνύει την ισχυρότερη αντιριζική ικανότητα (4 μόρια DPPH καταστρέφονται από ένα μόριο λουτεολίνης), ακολουθούμενη από την εριοδικτυόλη.

1.5.2 Περιεχόμενο του κελύφους σε λουτεολίνη

Το κέλυφος του καρπού της αραχίδας είναι ως φυτικής προέλευσης τμήμα του καρπού φορέας αντιοξειδωτικών πολυφαινολών, που ανήκουν στην κατηγορία των

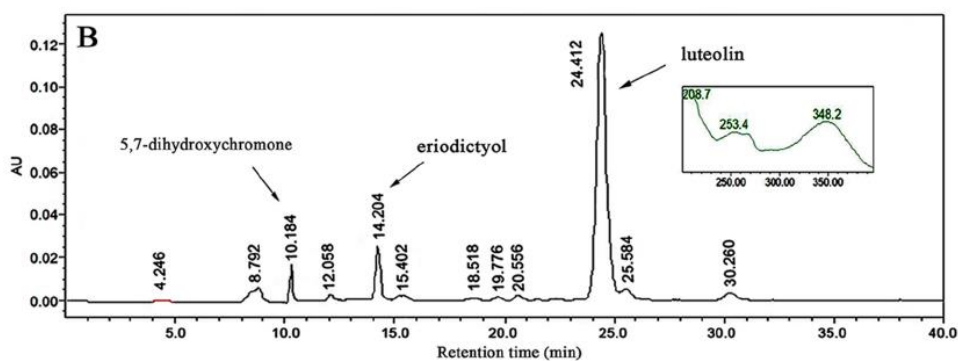
φλαβονοειδών. Όπως προαναφέρθηκε, το κύριο συστατικό του κελύφους είναι η λουτεολίνη, με την εριοδικτυόλη να ακολουθεί σε περιεκτικότητα. Οι κύριες πολυφαινόλες που έχουν αναγνωρισθεί στα εκχυλίσματα του κελύφους του φιστικιού φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 1.21: Τα τέσσερα κύρια φαινολικά συστατικά που έχουν αναγνωρισθεί στο κέλυφος του φιστικιού: λουτεολίνη, εριοδικτυόλη, 5,7-διδροξυχρωμόνη και 3',4',7-τριδροξυφλαβανόνη. Η λουτεολίνη, η εριοδικτυόλη και η 3',4',7-τριδροξυφλαβανόνη ανήκουν στα φλαβονοειδή (Wee et al, 2007).

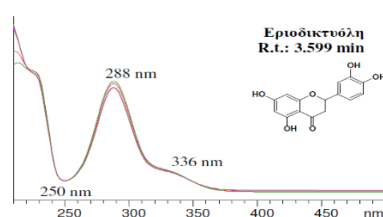
Το περιεχόμενο της λουτεολίνης που μελετήθηκε στα κέλυφη της αραχίδας διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία του φιστικιού, καθώς και τη μέθοδο που ακολουθείται για τον προσδιορισμό του περιεχομένου. Στην προαναφερθείσα δημοσίευση πάνω στην παρεμπόδιση των ROS από τα εκχυλίσματα του κελύφους φιστικιού βρέθηκε ότι το περιεχόμενο του κελύφους σε λουτεολίνη είναι ίσο με 3,2 mg/g υλικού, ή 0,32% w/w ως περιεκτικότητα, ακολουθούμενο από την εριοδικτυόλη και την 5,7-διδροξυχρωμόνη (0,02 και 0,01 % w/w αντίστοιχα), σε κέλυφη φιστικιών που καλλιεργήθηκαν στην Κίνα και εκχυλίστηκαν με μεθανόλη (Peng et al., 2008). Αντίστοιχα σε μεθανολικά εκχυλίσματα φιστικιών που εξετάστηκαν με τον ίδιο τρόπο, βρέθηκε παρόμοιο περιεχόμενο σε λουτεολίνη για τις ποικιλίες φιστικιών Spanish και Valencia, 0,32 και 0,28 % w/w υλικού σε λουτεολίνη αντίστοιχα. Το περιεχόμενο των φιστικιών σε λουτεολίνη αυξάνεται με την ωρίμανση του καρπού, όπως έχουν δείξει μελέτες σε φιστίκια που καλλιεργήθηκαν εργαστηριακά. Συγκεκριμένα σε εκχυλίσματα από φιστίκια τα οποία έχουν φτάσει στο ιδανικό σημείο ωρίμανσης (χαρακτηριστικό καφετί χρώμα του κελύφους), ή έχουν μαυρίσει, η περιεκτικότητα σε λουτεολίνη και ολικά φλαβονοειδή αυξάνεται, φτάνοντας το 0,60% w/w ξηρού υλικού για τη λουτεολίνη, ενώ ανάλογη συμπεριφορά παρουσιάζουν η εριοδικτυόλη και η 5,7 διδροξυχρωμόνη με περιεκτικότητες 0,43% και 0,15% αντίστοιχα (Daigle et al, 1988). Οι μορφές των φλαβονοειδών που συναντώνται στο κέλυφος της αραχίδας είναι σχεδόν αποκλειστικά αγλυκόνες, καθώς τα φλαβονοειδή του κελύφους παράγονται για να το προστατεύσουν από μικροοργανισμούς σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας (Wee et al, 2008).

Αντίθετα, σε δείγματα κελυφών αραχίδας από την Ανατολική Κίνα, η περιεκτικότητα σε λουτεολίνη βρίσκεται ελαφρώς αυξημένη. Σε δείγματα μεθανολικού εκχυλίσματος φιστικιού που λήφθηκε μετά από εκχύλιση με υπερήχους, η μέτρηση της λουτεολίνης με ηλεκτροχημικό αισθητήρα έδειξε περιεχόμενο κοντά στο 0,77% w/w υλικού, ενώ η ανάλυση με HPLC-DAD έδειξε παρόμοιο περιεχόμενο λουτεολίνης, κοντά στο 0,80% w/w του υλικού για τα φιστίκια που μελετήθηκαν (Meng et al, 2022). Ένα χαρακτηριστικό γράφημα HPLC-DAD για το μεθανολικό εκχύλισμα του φιστικιού, φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 1.22: Χαρακτηριστικό διάγραμμα HPLC-DAD σε εκχύλισμα κελύφους φιστικιού από μεθανόλη. Σημειώνονται οι κύριες κορυφές της λουτεολίνης (24.1 min), της εριοδικτυόλης (14.2 min) και της 5,7-δωδροξυχρωμόνης (10,2 min).

Το φάσμα UV-Vis της εριοδικτυόλης φαίνεται παρακάτω:

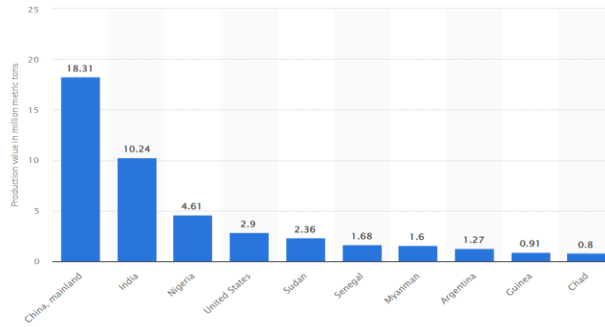


Εικόνα 1.23: Το φάσμα UV-Vis της εριοδικτυόλης.

Σύμφωνα με αναλύσεις που έχουν γίνει στον υπόλοιπο καρπό, δεν έχει βρεθεί ποσότητα λουτεολίνης στα υπόλοιπα μέρη. Στο κάλυμμα του καρπού κυριαρχούν ως φλαβονοειδή η κατεχίνη, η επικατεχίνη και διάφορες προκυανιδίνες, ενώ έχουν βρεθεί ακόμη μορφές της ισορχαμεντίνης, της ρουτίνης και της κερκετίνης (Lou et al., 2000), ενώ στους σπόρους του φιστικιού κυριαρχούν ως φλαβονοειδή η κερκετίνη και η καιμπερόλη, αλλά σε μικροποσότητες (Wang et al., 2013). Λουτεολίνη δεν έχει αναγνωριστεί ούτε στο τμήμα του καρπού που καταναλώνεται ως φιστίκι.

1.5.3 Διαθεσιμότητα της πηγής

Η αραχίδα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι ένα από τα πιο ευρέως καλλιεργούμενα είδη οσπρίων-και όχι ξηρών καρπών, όπως συχνά θεωρείται-στον κόσμο, με την παγκόσμια παραγωγή φιστικιών να αγγίζει τους 47000000 τόνους ετησίως και να εκτείνεται σε πάνω από 30 χώρες. Η Ινδία, η Κίνα, οι Η.Π.Α. και άλλες χώρες της Νότιας Αμερικής και της Αφρικής έχουν το σημαντικότερο μερίδιο στην παγκόσμια παραγωγή αραχίδας. Γνωρίζοντας ότι το κέλυφος του φιστικιού αποτελεί κατά μέσο όρο το 20-25% του βάρους του φιστικιού εξάγεται ότι η παγκόσμια παραγωγή κελύφους φιστικιού αγγίζει τα 10.000.000 τόνους παγκοσμίως. Το κέλυφος είτε παραμένει στο φιστίκι, είτε αποφλοιώνεται και καταλήγει ως λίπασμα, ζωοτροφή ή απόβλητο (Αλεβίζος 2017).



Εικόνα 1.24: Η ετήσια παραγωγή φιστικιών ανά χώρα, για τις 10 χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή αραχίδας (statista.com, 2021)

Η αραχίδα καλλιεργείται σε περιοχές με τροπικό ή εύκρατο κλίμα, επομένως η Ελλάδα είναι ευνοϊκή χώρα για την καλλιέργεια της αραχίδας λόγω του εύκρατου Μεσογειακού κλίματος που επικρατεί, αν αυτή καλλιεργηθεί σε κατάλληλο έδαφος με επαρκή άρδευση. Η καλλιέργεια του φυτού αναπτύσσεται διαρκώς και λαμβάνει χώρα σε περιοχές όπως οι Σέρρες, η Ηλεία, η Μεσσηνία και η Κρήτη αγγίζοντας τους 3800 τόνους το 2018 (statista.com), με το νομό Σερρών να καταλαμβάνει το 50% της Πανελληνίας παραγωγής αραχίδας. Επομένως στην Ελλάδα το κέλυφος που αφαιρείται από τους καρπούς της αραχίδας σε ετήσια βάση φτάνει τους 800 τόνους, με μεγάλο μέρος της ποσότητας αυτής να καταλήγει ως απόβλητο. Συγκεκριμένα, σε παγκόσμιο επίπεδο τα απόβλητα της βιομηχανίας επεξεργασία φιστικιών αγγίζουν τα 11 εκατομμύρια τόνους, με το μεγαλύτερο ποσοστό στα απόβλητα να καταλαμβάνει το κέλυφος του φιστικιού που απομακρύνεται κατά την αποφλοίωση (Moreno et al 2018).



Εικόνα 1.25: Η παραγωγή αραχίδας στην Ελλάδα. Με πράσινο, κίτρινο και πορτοκαλί οι νομοί της Ελλάδας που καλλιεργείται το φυτό.

Η μεγάλη διαθεσιμότητα του κελύφους του φιστικιού ως παραπροϊόν της βιομηχανίας επεξεργασίας της αραχίδας, καθώς και η πιθανότητα λήψης ικανοποιητικού περιεχομένου σε λουτεολίνη από το κέλυφος, οδήγησαν στην περαιτέρω μελέτη της αραχίδας για την εξέταση του περιεχομένου του κελύφους του σε λουτεολίνη, γεγονός στο οποίο συμβάλλει το ότι ήδη το κέλυφος του φιστικιού χρησιμοποιείται για την παραγωγή συμπληρωμάτων λουτεολίνης στην Ευρώπη από διάφορες εταιρίες παραγωγής συμπληρωμάτων διατροφής (Supersmart, natürlich lang leben UG).

2. Η εκχύλιση ως μέθοδος ανάκτησης βιοδραστικών συστατικών

Οι ποσοτικές και ποιοτικές μελέτες βιοδραστικών ουσιών που προέρχονται από φυτά, όπως τα φλαβονοειδή βασίζονται στην εύρεση και την ανάπτυξη μιας κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης, καθώς αποτελεί το πρώτο βήμα της απομόνωσης του επιθυμητού συστατικού από την πρώτη ύλη. Η ανάπτυξη σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών, όπως οι χρωματογραφικές και οι φωτομετρικές μέθοδοι έχει διευκολύνει στην ανάλυση και την ταυτοποίηση βιοδραστικών ουσιών, ακόμα και σε περιπτώσεις που η εκχυλιζόμενες βιοδραστικές ουσίες εντοπίζονται σε χαμηλές περιεκτικότητες στην πρώτη ύλη.

Οι πιο συνήθεις παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση ενός συστατικού είναι τα χαρακτηριστικά της στερεής μήτρας η οποία εκχυλίζεται, ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, η θερμοκρασία, η πίεση και ο χρόνος της διεργασίας. Συγκεκριμένα, η αφαίρεση της υγρασίας από ένα φυτικό υλικό και η κονιοποίηση του υλικού σε συγκεκριμένη κοκκομετρία είναι σημαντικά προκαταρκτικά βήματα για την εκχύλιση του μορίου-στόχου από τη μήτρα, ενώ σημαντικό ρόλο στην επιλογή διαλύτη για την διαδικασία της εκχύλισης παίζει η εκλεκτικότητα, το κόστος και η τοξικότητα του επιλεγόμενου διαλύτη. Ο σημαντικός βιολογικός ρόλος των φλαβονοειδών και η διαθεσιμότητα τους στη φύση έχουν αυξήσει το ενδιαφέρον για την χρήση τους από τις βιομηχανίες τροφίμων και τις φαρμακευτικές βιομηχανίες που παράγουν φυτικά συμπληρώματα διατροφής (Γούσιας, 2017, Κανακίδη, 2020, Manzoor et al., 2019).

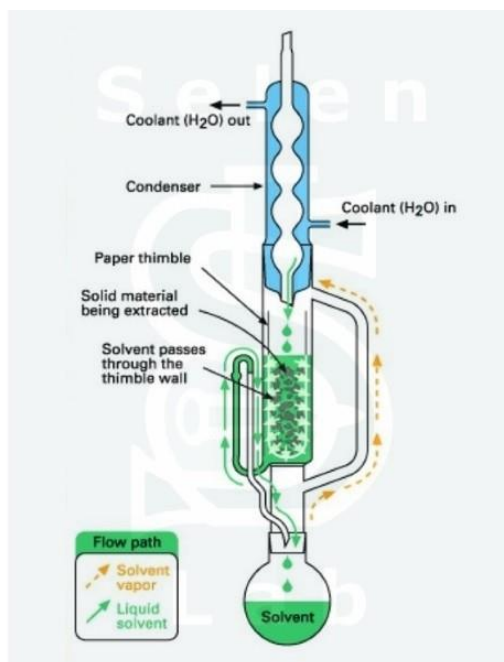
Η εκχύλιση των φυτικών υλικών για παραλαβή λουτεολίνης μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους. Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης, όπως η εκχύλιση διαβροχής, η εκχύλιση Soxhlet και η εκχύλιση με αναρροή του διαλύτη στη στήλη έχουν όλες χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή της λουτεολίνης από διάφορες πηγές, ενώ έχουν μελετηθεί ως μη συμβατικές τεχνικές η υποβοήθηση της εκχύλισης με χρήση υπερήχων και μικροκυμάτων, η υποβοήθηση της εκχύλισης από ενζυμικούς καταλύτες και η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά, καθώς και με ιοντικά υγρά, οι οποίες παρέχουν μικρότερους χρόνους εκχύλισης, υψηλότερη εκλεκτικότητα και μικρότερη κατανάλωση διαλύτη. Παρακάτω θα αναλυθούν οι κυριότερες μέθοδοι εκχύλισης για την παραλαβή λουτεολίνης από διάφορες πηγές που έχουν αναπτυχθεί ως σήμερα.

2.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

2.1.1 Εκχύλιση Soxhlet

Η τεχνική εκχύλισης Soxhlet είναι μια από τις πιο παλιές και ευρέως διαδεδομένες τεχνικές εκχύλισης ουσιών από στερεά υλικά. Ξεκίνησε το 1879, όταν ο Franz von Soxhlet, του οποίου το όνομα έλαβε η μέθοδος, ανέπτυξε τη μέθοδο για την εκχύλιση λιπιδίων από στερεά υλικά. Έκτοτε χρησιμοποιείται ευρέως στα αναλυτικά εργαστήρια σε πολλές περιπτώσεις, μεταξύ των οποίων και η εκχύλιση φλαβονοειδών και άλλων φαινολών από φυτά, παραμένοντας μια αξιόπιστη συμβατική τεχνική ως αναφορά ανάπτυξης σύγχρονων τεχνικών εκχύλισης που αποσκοπούν στη βελτίωση και την

εξέλιξη της μεθόδου διατηρώντας τα πλεονεκτήματα της. Στην κλασική της εφαρμογή, που ήταν ο προσδιορισμός λιπιδίων στο γάλα, το στερεό δείγμα τοποθετείται σε μια φύσιγγα και γεμίζει σταδιακά με το συμπύκνωμα φρέσκου διαλύτη, ο οποίος εισέρχεται από μια φιάλη σε κατάσταση βρασμού. Όταν ο διαλύτης υπερχειλίζει από τον εκχυλιστήρα, αναρροφάται με σιφονισμό, απομακρύνεται από τη φύσιγγα και συλλέγεται στη φιάλη βρασμού, μεταφέροντας στον αρχικό όγκο του διαλύτη τα στερεά συστατικά που εκχυλίστηκαν. Η διαδικασία πλήρωσης και αναρρόφησης επαναλαμβάνεται έως ότου αποχρωματιστεί ο διαλύτης που βρίσκεται εντός της φύσιγγας. Η διάταξη φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 2.1: Η διάταξη Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet, έχει σημαντικά πλεονεκτήματα ως τεχνική εκχύλισης. Συνδυάζει τα πλεονεκτήματα γνωστών συμβατικών τεχνικών, καθώς το δείγμα έρχεται συνεχώς σε επαφή με φρέσκο διαλύτη, άρα το δυναμικό μεταφοράς των εκχυλισμένων στερεών αυξάνεται. Επίσης το σύστημα παραμένει σε υψηλή θερμοκρασία, αυξάνοντας τη διαλυτότητα των στερεών στο σύστημα, ενώ δεν απαιτείται διήθηση των στερεών από το τελικό εκχύλισμα, καθώς αυτά παραμένουν στη φύσιγγα. Αποτελεί μια συνεχή διεργασία που μπορεί να επεξεργαστεί μεγάλη ποσότητα δείγματος, με μεγαλύτερη επιτυχία από ένα κλειστό σύστημα απλής ανάδευσης. Ωστόσο παρουσιάζει και σημαντικά μειονεκτήματα συγκριτικά με άλλες τεχνικές εκχύλισης, όπως η μεγάλη κατανάλωση διαλύτη και ο μεγάλος χρόνος εκχύλισης των ουσιών στόχων. Ακόμη, η πραγματοποίηση της διαδικασίας σε υψηλές θερμοκρασίες, που έχουν να κάνουν με το σημείο βρασμού κάθε διαλύτη, μπορεί να επιφέρει την υποβάθμιση των εκχυλιζόμενων ουσιών, σε συνδυασμό με την απαίτηση υψηλού χρονικού διαστήματος εκχύλισης, καθώς και σημαντική κατανάλωση ενέργειας.

2.1.2 Διαβροχή

Η εκχύλιση με διαβροχή είναι μια παλιά και σχετικά απλή τεχνική εκχύλισης, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή φαρμάκων, ιδιαίτερα σε μικρή κλίμακα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε και για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από τα φυτά, καθώς αποτελεί μια μέθοδο χαμηλού κόστους και εύκολη στην χρήση της, με τα μειονεκτήματα ότι απαιτεί μεγάλους χρόνους εκχύλισης και μικρότερη ανάκτηση εκχυλιζόμενου συστατικού από το στερεό προς εκχύλιση. Για εκχυλίσεις μικρής κλίμακας η μέθοδος αποτελείται από τρία βήματα, με το πρώτο να είναι η κονιοποίηση του εκχυλιζόμενου στερεού σε κατάλληλη κοκκομετρία έτσι ώστε να αυξηθεί το εμβαδό της διαβροχής του στερεού. Στη συνέχεια, επιλέγεται ο κατάλληλος διαλύτης ο οποίος προστίθεται μαζί με το στερεό σε κλειστό δοχείο, συνήθως υπό ανάδευση ώστε να αυξηθεί ο ρυθμός της διάχυσης. Τρίτον, ακολουθεί η διήθηση του υγρού και συμπύεση του στερεού υπολείμματος, ώστε να παραληφθεί το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλισμένων ουσιών και τα υγρά που συλλέχθηκαν από τη διήθηση και την συμπύεση αναμιγνύονται (Γούσιας, 2017, Κανακίδη, 2020). Η διαβροχή και η ανάδευση ρυθμίζουν τις δύο κύριες παραμέτρους που επηρεάζουν τη διεργασία:

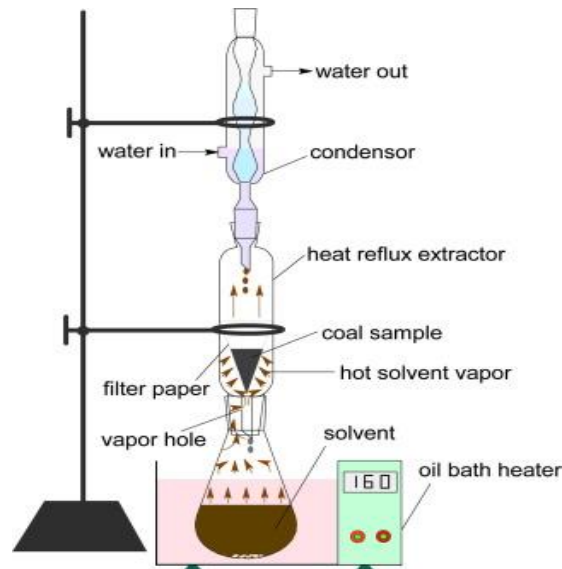
- την αύξηση της διάχυσης
- την απομάκρυνση του διαλύματος από την επιφάνεια και την συνεχή επαφή του φυτού με διαλύτη προς αύξηση της διαλυτότητας των δραστικών συστατικών και της απόδοσης της διεργασίας.

2.1.3 Εκχύλιση με αναρροή θερμότητας (Heat Reflux Extraction-HRE)

Η εκχύλιση με χρήση αναρροής θερμότητας είναι γενικά μια αποδοτική τεχνική εκχύλισης στερεού-υγρού η οποία χρησιμοποιείται για την εκχύλιση μη θερμικά ευαίσθητων συστατικών από φυτικά υλικά, καθώς είναι μια διαδικασία πιο εύκολη στο χειρισμό από άλλες συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. Η τεχνική της διαδικασίας αναρροής θερμότητας, εμπεριέχει την επαναλαμβανόμενη ανακύκλωση του διαλύτη στο σύστημα, μέσω του βρασμού και της συμπύκνωσής του μη επιτρέποντας την απώλεια διαλύτη, ενώ η στερεά μήτρα θερμαίνεται μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας. Η μέθοδος εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως την καλύτερη μεταφορά μάζας και επαφή μεταξύ του διαλύτη και της στερεάς μήτρας που εκχυλίζεται από αυτόν, ενώ ο ατμός κατευθύνεται προς τον συμπυκνωτήρα, ρυθμίζοντας την θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση. Για τους λόγους αυτούς απαιτείται λιγότερη ποσότητα διαλύτη και μικρότερο χρονικό διάστημα εκχύλισης από τις τεχνικές της διαβροχής και της εκχύλισης Soxhlet (Sridhar et al 2021, Manzoor et al 2019).

Ωστόσο, η μέθοδος αυτή εμφανίζει και σημαντικά μειονεκτήματα. Η εκχύλιση δραστικών συστατικών όπως η λουτεολίνη μπορεί να είναι σημαντικά χαμηλότερη καθώς μπορεί να εμφανιστούν αντιδράσεις υδρόλυσης, ιονισμού και οξείδωσης των μορίων της ουσίας, υποβαθμίζοντας την ποιότητα του εκχυλίσματος μετά από παρατεταμένη χρήση της διάταξης, λόγω του γεγονότος ότι λειτουργεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Επίσης, δεν θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον, λόγω της χρήσης οργανικών διαλυτών, καθώς και της μεγάλης κατανάλωσης ενέργειας. Οι δημοσιεύσεις που έχουν γίνει πάνω στην ανάκτηση φυτοχημικών ουσιών από φυτικές πηγές απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη/μάζα στερεής μήτρας για να δώσουν ικανοποιητικό

βαθμό απόδοσης, σε σχέση με τις σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης, ωστόσο αυτό εξαρτάται και από τον τύπο του φυτού που εκχυλίζεται.



Εικόνα 2.2: Διάταξη εκχύλισης αναρροής θερμότητας.

2.1.4 Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες-Σύγκριση συμβατικών τεχνικών και επιλογή διαλύτη

Η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, είναι μια διεργασία σχεδιασμένη για τον διαχωρισμό συστατικών από μια στερεή μήτρα τα οποία είναι διαλυτά σε αυτούς, μέσω ενός μηχανισμού διάχυσης από τη στερεή φάση του μητρικού υλικού στην υγρή φάση του διαλύτη. Οι οργανικοί διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον για την εκχύλιση φλαβονοειδών από διάφορα συστατικά με συμβατικές τεχνικές, όπως και της λουτεολίνης, όπως θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω. Η διεργασία της εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες ακολουθεί τα εξής στάδια:

- Αρχικά πραγματοποιείται διόγκωση των στερεών σωματιδίων του φυτού, λόγω της ρόφησης διαλύτη από τη στερεή μήτρα, η οποία προκαλείται από οσμωτικές δυνάμεις και τριχοειδή φαινόμενα. Σε αυτό το στάδιο ένα ποσοστό των πολυφαινολών, όπως τα φλαβονοειδή, εκχυλίζεται απευθείας με έκπλυση.
- Στη συνέχεια ακολουθεί η διάχυση, η οποία λαμβάνει χώρα σε δύο επιμέρους φάσεις: μια εντός της στερεής φάσης και μια εξωτερικά, μέσω των εξωτερικών στρωμάτων των στερεών σωματιδίων. Στην εκχύλιση έγχρωμων φαινολικών συστατικών, αυτό το στάδιο γίνεται αντιληπτό από τη χρωματική αλλαγή του διαλύματος.

Για την μεγιστοποίηση της απόδοσης μιας εκχύλισης φλαβονοειδών με οργανικούς διαλύτες, πρέπει να ληφθούν υπόψιν ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν την διεργασία, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω:

- **Διαλύτης:** Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από μία φυτική πηγή είναι η μεθανόλη, ακολουθούμενη από την αιθανόλη, ενώ σημαντική απόδοση δίνουν τα μίγματα των δύο ουσιών με το νερό. Αυτοί είναι και οι δύο επικρατέστεροι οργανικοί διαλύτες για την εκχύλιση της λουτεολίνης από φυτικές πηγές. Άλλοι διαλύτες

που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η ακετόνη, το χλωροφόρμιο και το διχλωρομεθάνιο.

- **Η οξίνιση του μέσου εκχύλισης:** Η οξίνιση του μέσου εκχύλισης μπορεί να μεταβάλλει τη διαλυτότητα των προς ανάκτηση συστατικών στον διαλύτη.
- **Θερμοκρασία:** Γενικά η αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, καθώς αυξάνει την διάχυση και την διάλυση των συστατικών που προορίζονται προς εκχύλιση στον διαλύτη. Ωστόσο οι υψηλές θερμοκρασίες υποβαθμίζουν κάποια θερμοευαίσθητα συστατικά που παραλαμβάνονται από τη διεργασία, ενώ συνεπάγονται και μεγαλύτερη κατανάλωση ενέργειας.
- **Κοκκομετρία του κονιοποιημένου φυτού:** Η ομογενοποίηση και η άλεση της πρώτης ύλης σε όσο το δυνατόν μικρότερο μέγεθος κόκκων δρα υπέρ της εκχύλισης μεγαλύτερης ποσότητας, καθώς αυξάνεται η επιφάνεια επαφής της στερεάς μήτρας με τον διαλύτη, άρα αυξάνεται η απόδοση της απομάκρυνσης των επιθυμητών συστατικών.
- **Αριθμός επαναλαμβανόμενων εκχυλίσεων και όγκος διαλύτη:** Ο αριθμός των εκχυλίσεων σε ένα υλικό παίζει σημαντικό ρόλο για την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών από αυτό, καθώς η επαναλαμβανόμενη εκχύλιση του μητρικού υλικού οδηγεί στην απομάκρυνση μεγαλύτερης ποσότητας της ουσίας στόχου, ενώ και η αύξηση του όγκου του διαλύτη επιτυγχάνει την καλύτερη επαφή του με τη στερεά μήτρα και την συνεπαγόμενη αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Ωστόσο και τα δύο πρέπει να γίνονται σε λογικά πλαίσια, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος ενεργειακής και περιβαλλοντικής επιβάρυνσης.

Η εκχύλιση της λουτεολίνης από τις διάφορες πηγές στις οποίες έχει βρεθεί, όπως και σε πολλές άλλες περιπτώσεις πολυφαινολικών συστατικών, εξαρτάται από τη διαλυτότητά της σε διάφορους διαλύτες που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλισή της. Οι κυριότεροι διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση της λουτεολίνης και των γλυκοζιτών της από φυτά είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, το νερό, το διχλωρομεθάνιο, το χλωροφόρμιο καθώς και μίγματα της μεθανόλης και της αιθανόλης με το νερό. Οι Abidin et al., 2014 μελέτησαν την εκχύλιση της λουτεολίνης από τα φύλλα του φυτού *Vitex negundo*, το οποίο ευδοκιμεί στην Ανατολική Ασία και την Αφρική και αποτελεί πηγή του φλαβονοειδούς, με τέσσερεις διαφορετικές μεθόδους (εκχύλιση Soxhlet, εκχύλιση με διαβροχή και ανάδευση, εκχύλιση με αναρροή θερμότητας, εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους-ως καινοτόμο τρόπο εκχύλισης), ως προς το βαθμό απόδοσης της διεργασίας και ως προς το περιεχόμενο σε λουτεολίνη (σε % w/w φυτόμαζας) που δίνει ο κάθε διαλύτης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.1: Σύγκριση τεχνικών εκχύλισης λουτεολίνης από *V. Negundo* (Abidin et al, 2014)

Μέθοδος	Διαλύτης	Βαθμός απόδοσης (%)	Περιεχόμενο εκχυλίσματος (% w/w υλικού)
Διαβροχή	Αιθανόλη	6,2	0,58
	Μεθανόλη	9,4	1,0
	Χλωροφόρμιο	5,2	0,58
	Διχλωρομεθάνιο	4,0	0,58
Soxhlet	Αιθανόλη	15	0,62
	Μεθανόλη	8,8	1,1
	Χλωροφόρμιο	8,6	0,58
	Διχλωρομεθάνιο	15	0,58
Αναρροή θερμότητας	Αιθανόλη	9,6	4,8
	Μεθανόλη	4,8	6,3
	Χλωροφόρμιο	15	0,58
	Διχλωρομεθάνιο	14	0,59
Υπέρηχοι	Αιθανόλη	5,2	0,64
	Μεθανόλη	12	0,66
	Χλωροφόρμιο	4,1	0,58
	Διχλωρομεθάνιο	3,2	0,59

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 2.1, η πιο αποδοτική συμβατική τεχνική είναι η εκχύλιση αναρροής θερμότητας, το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς οι διαλύτες βρίσκονται σε θερμοκρασία βρασμού, άρα η θερμοκρασία εκχύλισης είναι υψηλότερη από την απλή διαβροχή που γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, επομένως η διαλυτότητα της λουτεολίνης αυξάνεται. Το περιεχόμενο σε λουτεολίνη που βρίσκεται για κάθε εξεταζόμενο δείγμα είναι υψηλότερο με τη χρήση μεθανόλης και αιθανόλης ως διαλύτη, από ότι με τους άλλους δύο διαλύτες. Η εκχύλιση διαβροχής και Soxhlet δίνουν παρόμοιους βαθμούς απόδοσης, επομένως το ποια από τις δύο μεθόδους είναι η βέλτιστη καθορίζεται από τους άλλους παράγοντες, όπως τον χρόνο εκχύλισης, την θερμοευαισθησία του μητρικού υλικού και την ενεργειακή αποδοτικότητα της μεθόδου.

Για την εκχύλιση της λουτεολίνης από το φυτό *Reseda luteola*, έχει βρεθεί ότι σε μία διάταξη εκχύλισης απλής ανάδευσης, το περιεχόμενο σε λουτεολίνη ήταν μεγαλύτερο με χρήση μίγματος μεθανόλης/νερού σε θερμοκρασία βρασμού από ότι σε θερμοκρασία δωματίου, ωστόσο η διαφορά δεν ήταν μεγάλη (1,04% w/w για τη θερμοκρασία βρασμού έναντι 0,84% w/w για την θερμοκρασία δωματίου). Επιπλέον

το περιεχόμενο σε λουτεολίνη υπερಿಸχύει για μίγμα μεθανόλης-νερού 80/20 από ότι για μίγμα αιθανόλης-νερού ίδιας αναλογίας. Ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης επιτυγχάνεται στις 2 h για θερμοκρασία δωματίου, ενώ για την εκχύλιση σε θερμοκρασία βρασμού του μίγματος μειώνεται στα 15 λεπτά (Cristea et al., 2008). Αντίστοιχα, για την εκχύλιση λουτεολίνης με αναρροή θερμότητας, βρίσκεται ότι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης επιτυγχάνονται για μίγμα αιθανόλης-νερού 80/20, συγκριτικά με μίγματα καθαρής αιθανόλης και νερού, για εκχυλίσματα από τα υπέργεια μέρη του φυτού (Raji et al., 2023). Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν και για την εκχύλιση λουτεολίνης από τα φύλλα της ελιάς, όπου ο μέγιστος βαθμός απόδοσης της εκχύλισης σε λουτεολίνη (1 mg/g ξηρής μάζας) επιτυγχάνεται για θερμοκρασία 70° C, σε έξι ώρες για μίγμα αιθανόλης-νερού 60-40% (Lama-Munoz et al 2019).

Για την εκχύλιση της λουτεολίνης με τη μέθοδο Soxhlet, έχει βρεθεί ότι για το φυτό *Reseda luteola* οι βέλτιστες συνθήκες επιτυγχάνονται για μίγματα αιθανόλης/νερού συγκριτικά με άλλους διαλύτες (νερό, οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη, διχλωρομεθάνιο, κυκλοεξάνιο). Ο συνολικός χρόνος εκχύλισης κυμαίνεται στις 2 h, ενώ η αναλογία διαλύτη/μάζας υλικού είναι 30:1 (Burger et al, 2017). Παρόμοιες συνθήκες απαιτούνται και για την εκχύλιση της μέγιστης ποσότητας λουτεολίνης από τα φύλλα του δυόσμου, με την διάρκεια να ανέρχεται στις 6 h και τους διαλύτες της μεθανόλης και της αιθανόλης να υπερಿಸχύουν του πετρελαϊκού αιθέρα (Bimakt et al, 2011). Γενικά για τις περισσότερες εκχυλίσεις με τη μέθοδο Soxhlet απαιτείται μια αναλογία όγκου διαλύτη/μάζα φυτού πάνω από 10:1, ενώ η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 50 °C, κοντά στο σημείο βρασμού της μεθανόλης και της αιθανόλης (Manzoor et al, 2019).

Για την εκχύλιση λουτεολίνης από το κέλυφος του φιστικιού, οι διαλύτες της μεθανόλης και της αιθανόλης υπερτερούν, καθώς δίνουν μεγαλύτερο περιεχόμενο τόσο σε λουτεολίνη, όσο και σε ολικά φλαβονοειδή (Duh et al., 1992). Συγκεκριμένα για σύστημα διαβροχής, μέγιστη ανάκτηση επιτυγχάνεται με την ανάδευση του δοχείου που γίνεται η εκχύλιση για μίγμα μεθανόλης/νερού 80/20, το οποίο υπερಿಸχύει σε περιεχόμενο του δείγματος αιθανόλης-νερού ίδιας αναλογίας (2,1 mg/g υλικού έναντι 1,0 mg/g υλικού-Hussain et al, 2012).

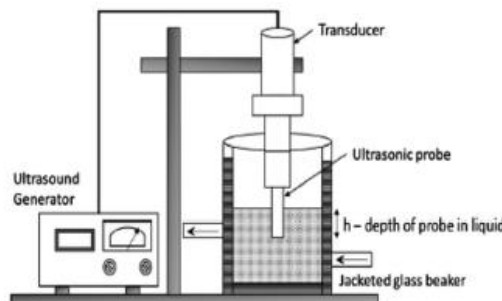
2.2 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Με τις περισσότερες συμβατικές τεχνικές εκχύλισης να παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η χρήση οργανικών διαλυτών, η υποβάθμιση θερμοευαίσθητων ενώσεων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, η μεγάλη διάρκεια εκχύλισης και το μεγάλο ενεργειακό κόστος, είναι σημαντική η ανάπτυξη νέων τεχνικών εκχύλισης που θεωρούνται φιλικότερες προς το περιβάλλον και αποδοτικότερες ως προς την εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών από την πρώτη ύλη καθώς και ως προς την κατανάλωση ενέργειας. Για την εκχύλιση της λουτεολίνης, έχουν δοκιμαστεί σε πειραματικό επίπεδο αρκετές μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

2.2.1 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων

Η χρήση της μεθόδου υποβοηθούμενης εκχύλισης από υπέρηχους (UAE-Ultrasound assisted extraction), είναι μια από τις τεχνικές που έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον στην εκχύλιση φλαβονοειδών από φυτά. Η χρήση υπερήχων αυξάνει τη διείσδυση του διαλύτη στα μόρια της στερεής μήτρας, με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταφοράς μάζας και την ευκολότερη απελευθέρωση των προς εκχύλιση διαλυτών συστατικών στην κύρια μάζα του διαλύτη. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω του φαινομένου της σπηλαίωσης που συμβαίνει κατά την διείσδυση ενός υπερηχητικού κύματος στην κύρια μάζα του υγρού, το οποίο είναι ικανό να προκαλέσει τον σχηματισμό εναλλασσόμενων κύκλων υψηλής και χαμηλής πίεσης, με ρυθμούς ανάλογα με τη συχνότητα των υπερήχων. Κατά τη διάρκεια του κύκλου χαμηλής πίεσης σχηματίζονται φυσαλίδες οι οποίες αυξάνουν το μέγεθος τους έως ορισμένου όγκου όπου η διόγκωση είναι τέτοια που τις αποτρέπει από το να απορροφούν άλλη ενέργεια. Έτσι με τον επόμενο κύκλο υψηλής πίεσης, οι φυσαλίδες αυτές διαρρηγνύονται, φαινόμενο το οποίο αποτελεί την σπηλαίωση. Κατά τη βίαιη διάρρηξη των φυσαλίδων εντός του διαλύτη εκχύλισης αυξάνεται ο βαθμός ανάμιξης του διαλύτη με τη μάζα της προς εκχύλιση πρώτης ύλης. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από την διάρρηξη των κυττάρων της φυτόμαζας και την ενίσχυση της μεταφοράς μάζας, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε αύξηση του βαθμού απόδοσης της εκχύλισης.

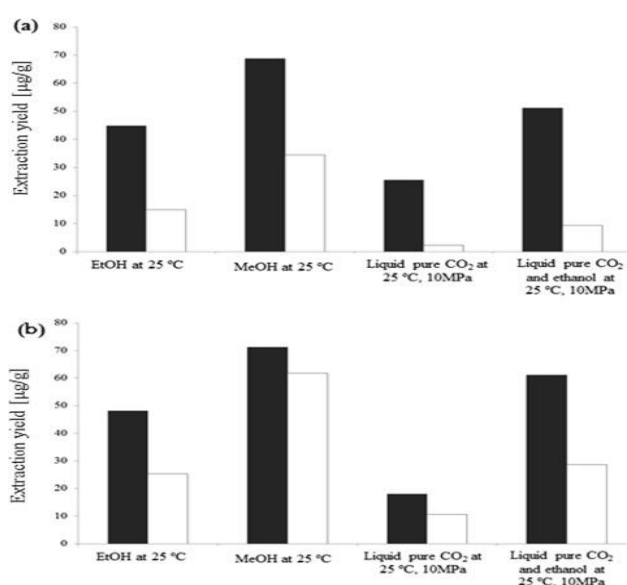
Η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως την ένταση του παλμού, τη θερμοκρασία, τη συχνότητα, τον διαλύτη και τη φύση του δείγματος. Οι ιδανικές συνθήκες για την επίτευξη μιας καλής εκχύλισης του υλικού είναι η χαμηλή συχνότητα των υπερήχων και η υψηλή θερμοκρασία-σε επίπεδο που δεν επηρεάζει την θερμική ευαισθησία του υλικού, ενώ και η ένταση του παλμού των κυμάτων των υπερήχων επιδρά θετικά στην εκχύλιση, καθώς επιτυγχάνεται η γρήγορη κατάρρευση των φυσαλίδων. Η εκχύλιση με υπερήχους αποτελεί μια μέθοδο με πολλά πλεονεκτήματα, όπως οι υψηλότερες αποδόσεις, η αύξηση του ρυθμού εκχύλισης και η μείωση της απαιτούμενης θερμοκρασίας για την επίτευξη ικανοποιητικού βαθμού απόδοσης (Manzoor et al, 2019). Η εκχύλιση με την υποβοήθηση υπερήχων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε λουτρό, είτε με τη βοήθεια στελέχους εκπομπής υπερήχων.



Εικόνα 2.3: Διάταξη εκχύλισης με υπερήχους

Η εκχύλιση της λουτεολίνης από φυτικές πηγές με υπερήχους έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές τα τελευταία χρόνια λόγω των πλεονεκτημάτων της μεθόδου και της απλής σχετικά εφαρμογής της. Οι Abidin et al, 2014 μελέτησαν την εκχύλιση της λουτεολίνης από το φυτό *Vitex negundo* με υπερήχους, ορίζοντας ως παραμέτρους τη θερμοκρασία στους 50°C για 20 λεπτά, με την αναλογία διαλύτη/πρώτης ύλης να είναι

ίση με 10 mL διαλύτη:1 g στερεής πρώτης ύλης για διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο και διχλωρομεθάνιο. Με την επεξεργασία αυτή, επιτεύχθηκε ίδιος βαθμός απόδοσης και συγκρίσιμο περιεχόμενο σε σχέση με την εκχύλιση της πρώτης ύλης με Soxhlet η οποία έγινε στην ίδια θερμοκρασία για χρόνο εκχύλισης 2 h, όσο και για την εκχύλιση με διαβροχή, η οποία πραγματοποιήθηκε στους 40 °C για 72 h. Αντίστοιχα με την παραπάνω έρευνα, οι Kawamura et al, 2016 μελέτησαν την εκχύλιση της λουτεολίνης και της απιγενίνης από τα φύλλα του φυτού *Perilla frutescens* με τη μέθοδο της εκχύλισης πεπιεσμένου υγρού υποβοηθούμενη από υπερήχους, χρησιμοποιώντας ως μίγμα διαλυτών υγρό διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη, βρίσκοντας ότι ο βαθμός απόδοσης της εκχύλισης σε λουτεολίνη διπλασιάζεται για πίεση 10 MPa και θερμοκρασία 25°C με τη χρήση υπερήχων σε σχέση με την εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού, με υπερήχους συχνότητας 20 kHz και έντασης 15,3 μm για χρόνο εκχύλισης 125 s και για μοριακό κλάσμα της αιθανόλης ίσο με 0,131 στο μίγμα των διαλυτών εκχύλισης. Διπλάσιος βαθμός απόδοσης παρατηρείται και για την εκχύλιση λουτεολίνης από τα φύλλα του συγκεκριμένου φυτού χρησιμοποιώντας ως διαλύτες καθαρή αιθανόλη και καθαρή μεθανόλη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Εικόνα 2.4: Εκχυλιζόμενο περιεχόμενο σε λουτεολίνη (a) και απιγενίνη (b) από τα φύλλα του φυτού *Perilla frutescens* με τη μέθοδο PLE και υποβοήθηση από υπερήχους (μαύρη ράβδος) και χωρίς υποβοήθηση (λευκή ράβδος) (Kawamura et al,2016).

Οι Lama-Munoz et al., 2019 προσδιόρισαν επίσης την λουτεολίνη και την ελευρωπαΐνη στα φύλλα της ελιάς με υποβοήθηση από υπερήχους, καθώς και με τη μέθοδο Soxhlet. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή ο βαθμός απόδοσης της εκχύλισης του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης από την πρώτη ύλη αυξάνεται από 0,13% w/w σε 0,18% w/w με εκχύλιση ανάδευσης υποβοηθούμενη από υπερήχους σε σχέση με τη μέθοδο Soxhlet, επιτυγχάνοντας αύξηση του τελικού περιεχομένου κατά 40%. Επίσης, αύξηση κατά 7% της απόδοσης για την υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση σε σχέση με τη μέθοδο Soxhlet παρατηρείται και για την εκχύλιση της ελευρωπαΐνης. Αντίστοιχη αύξηση του περιεχομένου παρατηρείται και σε σχέση με την συμβατική μέθοδο εκχύλισης των φύλλων ελιάς με διαβροχή, η οποία κυμαίνεται από 6 έως 80%

ανάλογα με τις συνθήκες διαβροχής του υλικού (Cifa et al, 2018), καθώς και σε σχέση με τη μέθοδο της εκχύλισης με αναρροή θερμότητας, η οποία αναφέρθηκε παραπάνω. Ο χρόνος εκχύλισης που επιτυγχάνεται ο μέγιστος βαθμός απόδοσης μειώνεται σε 18 λεπτά, από τις 4 ώρες που απαιτούνταν για την εκχύλιση Soxhlet, με συχνότητα υπερήχων 40 kHz και διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού 3:2 (Lama-Munoz et al., 2019).

Για την μελέτη της εκχύλισης του κελύφους του φιστικιού με υποβοήθηση από υπερήχους, βρέθηκε ότι για εκχύλιση με κλειστό σύστημα απλής ανάδευσης με υποβοήθηση από υπερήχους παρατηρείται αύξηση της απόδοσης των εκχυλιζόμενων φλαβονοειδών σε σχέση με την μέθοδο της διαβροχής για εκχύλιση με διαλύτες μεθανόλη/νερό και αιθανόλη/νερό αναλογίας 4:1. Συγκεκριμένα ο βαθμός απόδοσης της εκχύλισης σε ολικές φαινόλες βρέθηκε ίσος με 8,4 mg GAE/g υλικού για χρήση υπερήχων με διαλύτη μίγμα μεθανόλης/νερού, έναντι 3,0 mg GAE/g για εκχύλιση με διαβροχή, ενώ τα ολικά φλαβονοειδή αυξήθηκαν από 1,2 mg GAE/g για απλή διαβροχή σε 5,1 mg GAE/g με χρήση της μεθόδου UAE. Αντίστοιχη αύξηση παρατηρήθηκε και για την εκχύλιση με αιθανόλη (Hussain et al, 2012). Ακόμη, σε σύγκριση της μεθόδου εκχύλισης με υπερήχους με την μέθοδο της αναρροής θερμότητας, παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης σε λουτεολίνη στις δύο κύριες μορφές του φλαβονοειδούς που αναγνωρίστηκαν για την *Pteris cretica*, από 0,33% w/w υλικού για εκχύλιση με αναρροή θερμότητας σε 0,38% w/w για την υποβοήθηση με υπερήχους, ενώ αύξηση παρατηρήθηκε και στα ολικά εκχυλιζόμενα φλαβονοειδή (Hou et al, 2019).

2.2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)

Τα μικροκύματα αποτελούν ηλεκτρομαγνητικά κύματα, με ακτινοβολία της οποίας το εύρος εκτείνεται από τα 300 MHz έως τα 300 GHz, με τα μικροκύματα οικιακής χρήσης να εκπέμπουν στα 2450 MHz ώστε να αποφεύγουν την παρεμβολή στις συχνότητες των ραδιοεπικοινωνιών. Αποτελούνται από δύο είδη πεδίων, ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό τα οποία είναι ταλαντούμενα και κάθετα μεταξύ τους, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς πληροφορίας ή πηγές ενέργειας, με τη δεύτερη χρήση να οφείλεται στην ικανότητα απορρόφησης και μετατροπής τμήματος της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας των μικροκυμάτων σε θερμότητα. Η συχνότητα εκπομπής των μικροκυμάτων προκαλεί θερμική ενέργεια ίση με 0,94 J/mol και περιστροφή των μορίων του μέσου που θερμαίνεται με τα μικροκύματα (Destandau et al., 2013).

Η θέρμανση ενός συστήματος διαλύτη και στερεού προς εκχύλιση υλικού με τη χρήση μικροκυμάτων, όπως ήδη αναφέρθηκε και παραπάνω χρησιμοποιεί την μετατροπή της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας σε θερμική με δύο τρόπους: την ιοντική μεταφορά θερμότητας και την διπολική περιστροφή των μορίων σε διαλύτη και διαλυμένη ουσία. Η ιοντική επαγωγή θερμότητας οφείλεται στην ηλεκτροφορητική μετακίνηση των ιόντων όταν εφαρμοστεί ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και οδηγεί στην σύγκρουση των ιόντων μεταξύ τους παράγοντας θερμότητα μέσω της τριβής κατά την ροή των μορίων του πεδίου. Η θερμότητα που απελευθερώνεται αυξάνει την διαπερατότητα της μάζας του μητρικού υλικού από τον διαλύτη, άρα και την διάλυση των συστατικών εκείνων που παραλαμβάνονται από την εκχύλιση. Η περιστροφή του διπόλου οφείλεται στην ευθυγράμμιση του ηλεκτρικού πεδίου με τα ιόντα που παρουσιάζουν διπολική ροπή σε

διαλύτη και στερεό δείγμα, τα οποία συγκρούονται μεταξύ τους λόγω της ταλάντωσης που προκαλείται από την περιστροφή και απελευθερώνουν ραγδαία θερμότητα, καθώς η μεγάλη συχνότητα της ακτινοβολίας οδηγεί στην επανάληψη του φαινομένου $4,9 \times 10^9$ φορές το δευτερόλεπτο με αποτέλεσμα τη γρήγορη θέρμανση του υλικού. Η ικανότητα του μέσου να απορροφά ενέργεια και να τη μετατρέπει σε θερμότητα οφείλεται στον παράγοντα διάλυσης, ο οποίος δείχνει το πόσο γρήγορη είναι η θέρμανση ενός μέσου από τα μικροκύματα και δίνεται από την εξίσωση $\tan\delta = \frac{e''}{e'}$, με $\tan\delta$ ο παράγοντας διάλυσης, e'' η διηλεκτρική απώλεια που προσδιορίζει την επάρκεια μετατροπής σε μικροκύματα και e' η διηλεκτρική σταθερά του μέσου. Οι φυσικές σταθερές διάφορων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Destandau et al., 2013):

Πίνακας 2.2: Ο παράγοντας διάλυσης και οι διηλεκτρικές σταθερές για οργανικούς και άλλους διαλύτες στην μέθοδο υποβοηθούμενης με μικροκύματα εκχύλισης (MAE) (Destandau et al., 2013)

Διαλύτης	$e'(20\text{ }^\circ\text{C})$	$\tan\delta \times 10^{-4}$
Εξάνιο	1,9	
Επτάνιο	1,9	
Διχλωρομεθάνιο	8,9	
Ισοπροπανόλη	20	6700
Ακετόνη	21	
Μεθανόλη	33	6400
Αιθανόλη	24	2500
Ακετονιτρίλιο	38	
Νερό	78	1570

Η εκχύλιση με μικροκύματα παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Η ύπαρξη μικροσκοπικών μορίων υγρασίας εντός των στερεών υλικών συνεπάγεται την γρήγορη εξάτμιση και διόγκωση των μορίων αυτών στο κυτταρικό τοίχωμα από την ταχεία θέρμανση, οδηγώντας έτσι στην ρήξη του κυττάρου από υπερβολική εσωτερική πίεση, άρα στην αποδοτικότερη εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών που απελευθερώνονται από το κύτταρο (Manzoor et al., 2019). Επίσης παρουσιάζει μειωμένους χρόνους εκχύλισης για βιοδραστικά συστατικά σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, όπως η διαβροχή και η εκχύλιση Soxhlet (Azwanida, 2005), καθώς και μειωμένη ποσότητα απαιτούμενου διαλύτη. Στα μειονεκτήματα της εκχύλισης με μικροκύματα συμπεριλαμβάνεται εκτός από την πιθανότητα αλλοίωσης θερμοευαίσθητων συστατικών λόγω της ταχείας θέρμανσης, η χαμηλότερη απόδοση εκχύλισης αν ο διαλύτης είναι ιξώδης, ενώ απαιτείται επιπλέον στάδιο μετά την εκχύλιση όπου απαιτείται ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος από μη επιθυμητά συστατικά με διήθηση ή φυγοκέντριση. Τέλος το κόστος της εγκατάστασης είναι υψηλότερο σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, όπως η διαβροχή (Κανακίδη, 2020).

Όσον αφορά στην εκχύλιση της λουτεολίνης με μικροκύματα, ο βαθμός απόδοσης της διεργασίας επηρεάζεται καταρχάς από την ισχύ των μικροκυμάτων. Συγκεκριμένα οι Wang et al., 2014 βρίσκουν ότι για αύξηση των μικροκυμάτων ως τα 230 W, η απόδοση της διεργασίας εκχύλισης σε λουτεολίνη και απιγενίνη αυξάνεται συνεχώς, ενώ στη συνέχεια παρουσιάζει σημαντική μείωση, λόγω πιθανής οξειδωτικής υποβάθμισης των δύο φλαβονών από την θέρμανση στα μικροκύματα. Το περιεχόμενο του φυτού σε λουτεολίνη είναι υψηλότερο για τις βέλτιστες συνθήκες (230 W, 70% αιθανόλη σε μίγμα με απιονισμένο νερό) σε σύγκριση με τις μεθόδους της διαβροχής και της θερμικής αναρροής, για μελέτη της εκχύλισης από το φυτό της Κινεζικής παιωνίας. Όσον αφορά τους διαλύτες, έχει βρεθεί ότι η μεθανόλη παρουσιάζει καλές ιδιότητες απορρόφησης της ενέργειας των μικροκυμάτων, ωστόσο για επεξεργασία τροφίμων προτείνεται εναλλακτικά μείγμα της αιθανόλης με το νερό. Η εκχύλιση της λουτεολίνης ωστόσο μειώνεται σημαντικά με τη χρήση διαλυτών όπως η ακετόνη, το νερό και μίγματα οξικού αιθυλεστέρα/νερού σε σχέση με την αιθανόλη, ενώ ο μέγιστος βαθμός εκχύλισης της λουτεολίνης από την αιθανόλη φτάνει το 55-60% για την εκχύλιση με MAE που είναι μεγαλύτερο των βαθμών απόδοσης με συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (Manzoor et al., 2019).

2.2.3 Συνδυασμός UAE και MAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους (UMAE)

Ο συνδυασμός της τεχνικής υποβοήθησης με μικροκύματα και με υπερήχους είναι μια από τις πιο διαδεδομένες σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών. Η τεχνική αυτή (UMAE) εξασφαλίζει χαμηλό κόστος, υψηλότερες αποδόσεις σε εκχυλιζόμενα συστατικά σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, μικρότερους χρόνους εκχύλισης και υψηλότερη αποδοτικότητα. Η χρήση μικροκυμάτων αυξάνει την διαλυτότητα των διαλυμένων στερεών και την μεταφορά μάζας των διαλυμένων σωματιδίων λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας, ενώ οι υπέρηχοι αυξάνουν την διαπερατότητα της στερεής μήτρας από τον διαλύτη και την επιφάνεια επαφής με την διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι δύο τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα, ενώ οι ακτινοβολήσεις από τα μικροκύματα και τους υπερήχους γίνονται συνεχώς, ή διαδοχικά σε περίπτωση μεγάλης ενέργειας από τα μικροκύματα (Manzoor et al., 2019).

Από διάφορες δημοσιεύσεις έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός μικροκυμάτων και υπερήχων μπορεί να δώσει μεγαλύτερη απόδοση σε εκχυλίσματα φλαβονοειδών, ενώ τα θερμοευαίσθητα συστατικά προστατεύονται περισσότερο από την αποικοδόμηση και την υποβάθμιση τους. Οι Lou et al., 2012 μελέτησαν την εκχύλιση κερκετίνης και καφεϊκού οξέος από το φυτό κολλιτσίδα, βρίσκοντας ότι παρά το γεγονός ότι η απόδοση είναι παραπλήσια της απόδοσης εκχύλισης με αναρροή θερμότητας, ο χρόνος εκχύλισης μειώνεται σημαντικά, ενώ αυξάνεται και η ενεργειακή αποδοτικότητα. Όσον αφορά στην εκχύλιση της λουτεολίνης με UMAE, οι Manzoor et al., 2019 περιγράφουν τις βέλτιστες συνθήκες για την εκχύλιση του φλαβονοειδούς με συνδυασμό ισχύος 20 W, μίγμα αιθανόλης-νερού 80-20 και 6 λεπτά χρόνο εκχύλισης, με μέγιστο βαθμό ανάκτησης λουτεολίνης 32%. Οι Cheng et al., 2011 συγκρίνοντας την μέθοδο UMAE με άλλες συμβατικές και μη μεθόδους βρήκαν ότι η μέθοδος επιτυγχάνει τον μεγαλύτερο βαθμό απόδοσης σε λουτεολίνη σε σύγκριση με τις εκχυλίσματα με MAE, UAE, διαβροχή και εκχύλιση Soxhlet, για εκχύλιση της λουτεολίνης από το φυτό του

γένους *Sphatolobus*, ενώ παρουσιάζει και πολύ μικρότερο χρόνο εκχύλισης σε σχέση με την μέθοδο αναρροής θερμότητας, για διαλύτη μίγμα μεθανόλης-νερού 7:3.

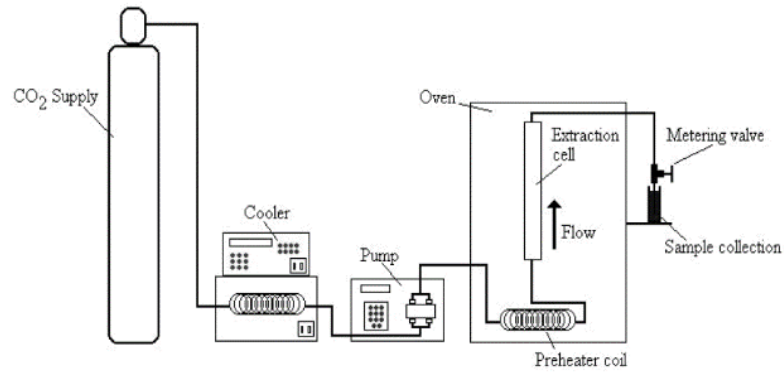
2.2.4 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE)

Ως υπερκρίσιμο ρευστό ορίζεται μια ουσία η οποία βρίσκεται σε κατάσταση πέραν του κρίσιμου σημείου της, δηλαδή η θερμοκρασία και η πίεσή της είναι μεγαλύτερες από τα αντίστοιχα κρίσιμα μεγέθη για την θερμοκρασία και την πίεση αντίστοιχα. Το κρίσιμο σημείο ανακαλύφθηκε το 1822 από τον Cagniard de la Tour και ορίζεται ως το μέγιστο σημείο όπου το υγρό και ο ατμός μπορούν να συνυπάρχουν σε ισορροπία. Πάνω από το κρίσιμο σημείο συναντάται η υπερκρίσιμη φάση, στην οποία το ρευστό δεν είναι σε υγρή ή αέρια φάση, αλλά σε μία ομοιογενή φάση που συνδυάζει ιδιότητες και των δύο. Συγκεκριμένα ένα υπερκρίσιμο ρευστό έχει την ίδια πυκνότητα και ικανότητα διάλυσης άλλων ουσιών με την υγρή φάση, ενώ παρουσιάζει ιδιότητες διάχυσης και ιξώδους ίδιες με την αέρια φάση. Το γεγονός αυτό δίνει στα υπερκρίσιμα ρευστά πολλά πλεονεκτήματα όπως χαμηλό κίνδυνο ανάφλεξης, χημική αδράνεια και χαμηλό κόστος όταν διατίθενται σε υψηλά επίπεδα καθαρότητας, αυξάνοντας το ενδιαφέρον της βιομηχανίας για την εφαρμογή τους σε πολλές διεργασίες, μεταξύ άλλων και η εκχύλιση (Fortunati et al., 2016).

Η ανακάλυψη των καλών διαλυτικών ικανοτήτων των περισσότερων υπερκρίσιμων ρευστών οδήγησε στην σταδιακή μελέτη τους ως διαλυτών για την εκχύλιση διάφορων συστατικών, μεταξύ των οποίων και συστατικών με υψηλή βιολογική δράση από διάφορα φυτά. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υπερκρίσιμο ρευστό είναι το CO₂ λόγω του ότι η κρίσιμη θερμοκρασία του βρίσκεται στους 31 °C, πολύ κοντά στη θερμοκρασία δωματίου, άρα ενδείκνυται για το σχεδιασμό διεργασιών με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας. Η κρίσιμη πίεση του αερίου βρίσκεται στις 73 atm, ενώ πληροί τις προϋποθέσεις που τέθηκαν παραπάνω, καθώς αποτελεί ένα αδρανές, μη τοξικό συστατικό υψηλής καθαρότητας (Hedrick et al, 1992). Μια διάταξη εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO₂ λειτουργεί με τις εξής παραμέτρους:

- Μετατροπή του υγρού CO₂ σε υπερκρίσιμο ρευστό με κατάλληλη ρύθμιση θερμοκρασίας και πίεσης πάνω από το κρίσιμο σημείο.
- Το υπερκρίσιμο ρευστό εκχυλίζει κυρίως τα λιπόφιλα και τα πτητικά συστατικά από το προς εκχύλιση υλικό.
- Αέριο διοξείδιο του άνθρακα ρέει στη δεξαμενή CO₂. Μετά από έναν πλήρη γύρο ανακυκλώνεται το CO₂ στο σύστημα.
- Μετά την εκχύλιση, το υπερκρίσιμο CO₂ εκτονώνεται μέσω μιας βαλβίδας σε άδειο φιαλίδιο, ενώ οι εκχυλιζόμενες ουσίες παγιδεύονται σε κάποιο υλικό με προσροφητική ικανότητα, ή σε κάποιον διαλύτη.

Μια διάταξη εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 2.5: Διάταξη εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό (Sapkale et al., 2010).

Για την εκχύλιση πολυφαινολικών συστατικών, συνήθως η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό δεν δίνει μεγάλο περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες, καθώς αποτελούν πολικές ενώσεις οι οποίες δεν μπορούν να απομονωθούν καλά από το υπερκρίσιμο CO₂, λόγω της χαμηλής πολικότητας του ρευστού. Για την εκχύλιση πολυφαινολικών συστατικών από τα φύλλα του δυόσμου, η απόδοση των ολικών εκχυλιζόμενων φαινολών με scCO₂ είναι μικρότερη από την απόδοση της εκχύλισης Soxhlet με διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη και μίγμα αιθανόλης-νερού (61 mg/g υλικού έναντι 218-267 mg/g υλικού για τους οργανικούς διαλύτες). Ωστόσο, η εκλεκτικότητα του εκχυλίσματος σε λουτεολίνη είναι μεγαλύτερη καθώς η λουτεολίνη στο οργανικό εκχύλισμα είναι ίση με 150 μg/g ξηρού εκχυλίσματος, ενώ στο εκχύλισμα με διαλύτη scCO₂ αυξάνεται στα 657 μg/g ξηρού εκχυλίσματος (Bimakar et al., 2011). Διαφορετική εικόνα δίνει η εκχύλιση λουτεολίνης από τα φύλλα του φυτού *A. Chica*, καθώς η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό δεν μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση του scCO₂ ως αποκλειστικού διαλύτη, καθώς απαιτείται και η χρήση αιθανόλης και νερού ως συνδιαλυτών, για να εκχυλιστεί το μέγιστο δυνατό σε λουτεολίνη. Επομένως η χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ως διαλύτη μπορεί να δώσει ικανοποιητικό περιεχόμενο σε συνδυασμό με άλλους διαλύτες όπως μίγματα αιθανόλης-νερού και μεθανόλης-νερού (Paula et al., 2014).

2.2.5 Εκχύλιση με ιοντικά υγρά (ILE)

Ως ιοντικά υγρά ορίζονται τα άλατα με σημείο τήξης κάτω των 100°C που αποτελούνται από ένα οργανικό κατιόν και ένα ανόργανο ανιόν, με το ανιόν σπανίως να μπορεί να είναι και οργανικής προέλευσης. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα κατιόντα είναι τα άλατα διαλκυλο-ιμιδαζολίου, N-αλκυλοπυραϊδίου ή τετρα-αλκυλο-αμμωνίου, ενώ τα ανόργανα ανιόντα είναι συνήθως μονοπυρηνικά όπως Cl⁻, Br⁻, BF₄⁻, HSO₄⁻ κλπ. Αποτελούν πράσινους διαλύτες οι οποίοι μπορούν να υποκαταστήσουν του οργανικούς διαλύτες λόγω των ιδιοτήτων τους, όπως η πολύ μικρή τάση ατμών, η μη αναφλεξιμότητα και η καλή διαλυτότητα με οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Η δομή των ιοντικών υγρών επιδρά στις φυσικοχημικές ιδιότητες του και επομένως επηρεάζει την πορεία της εκχύλισης, καθώς και την απόδοση της ως προς την ανάκτηση των επιθυμητών συστατικών από την εξεταζόμενη πρώτη ύλη. Τα ουδέτερα ιοντικά υγρά αποτελούν διαλύτες με μεγαλύτερο ιξώδες από τους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (Κανακίδη, 2020, Maroulis et al., 2012).

Τα ιοντικά υγρά αποτελούν σχετικά πρόσφατο αντικείμενο μελέτης, οπότε δεν υπάρχει ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την τοξικότητα και την περιβαλλοντική επιβάρυνση που μπορεί να προκαλούν, ενώ το κόστος τους σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες είναι αρκετά μεγάλο. Οι διαφορές αυτές θα μπορούσαν να εξισορροπηθούν από την δυνατότητα ανακύκλωσης των διαλυτών και από την αύξηση της απόδοσης της διεργασίας σε εκχυλιζόμενες δραστικές ουσίες. Τέλος ίσως να είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μη αναμίξιμου συνδιαλύτη με το ιονικό υγρό, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η απόδοση (Maroulis et al., 2012).

Μέσα στις διάφορες βιοδραστικές ενώσεις που μελετήθηκαν ως προς την εκχύλιση τους με διαλύτη τα ιοντικά υγρά είναι και η λουτεολίνη. Οι Han and Row., 2011 μελέτησαν την εκχύλιση της λουτεολίνης και της απιγενίνης από το σέλινο, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες ιονικά υγρά. Από την εξέταση των δειγμάτων, βρέθηκε ότι η απόδοση της διεργασίας σε λουτεολίνη και απιγενίνη αυξήθηκε κατά 50% σε σχέση με την εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες σε 0,66 mg λουτεολίνης/g ξηρού φυτού και 0,94 mg απιγενίνης/g ξηρού φυτού. Η διεργασία έγινε με υποβοήθηση από υπερήχους ισχύος 200 W και αναλογίας 1:10 γραμμάρια ξηρής πρώτης ύλης:mL διαλύτη που είναι μεγαλύτερη από τις αναλογίες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην εκχύλιση Soxhlet και στην εκχύλιση με διαβροχή.

2.2.6 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (EAE)

Τα περισσότερα βιοδραστικά συστατικά των φυτών βρίσκονται σε μορφές διαλυτών ή αδιάλυτων γλυκοζιτών εντός του κυτταροπλάσματος του μητρικού υλικού. Για παράδειγμα το 24% των ολικών φαινολικών συστατικών βρίσκεται δεσμευμένο στο κυτταρόπλασμα του μητρικού υλικού ή εντός του κυτταρικού τοιχώματος, εντός του δικτύου που σχηματίζουν η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η πηκτίνη και τα άλλα συστατικά του τοιχώματος. Η πρόσβαση ενός διαλύτη σε αυτά τα σημεία είναι σε αρκετές περιπτώσεις δύσκολη, επομένως για την ανάκτηση αυτών των συστατικών από το μητρικό υλικό επιστρατεύονται διάφορες μέθοδοι, όπως η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Enzyme Assisted Extraction-EAE). Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν την υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος σε ορισμένα σημεία με υψηλή εκλεκτικότητα σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Στην EAE το ένζυμο προσδένεται σε συγκεκριμένες θέσεις του κυτταρικού τοιχώματος μεταβάλλοντας το σχήμα του, ώστε να μπορεί το ένζυμο να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο, εξασφαλίζοντας τη μέγιστη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Τα συνήθη στάδια που ακολουθούνται είναι: η επιλογή, η ξήρανση και η άλεση της πρώτης ύλης, η προσαρμογή των βέλτιστων συνθηκών θερμοκρασίας και pH και η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης, η προσθήκη και η επώαση του ενζύμου, η αδρανοποίηση του ενζύμου πριν το τέλος της εκχύλισης και η φυγοκέντρωση για παραλαβή της υπερκείμενης υγρής φάσης του εκχυλίσματος (Τσόχα, 2022).

Οι μελέτες πάνω στη μέθοδο της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης έχουν δείξει υψηλότερη ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών, μικρότερη κατανάλωση ενέργειας και μικρότερη κατανάλωση διαλύτη σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους, με τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ένζυμα να είναι η πηκτινάση, η α-αμυλάση και η κυτταρινάση. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία της εκχύλισης με ενζυμική δράση όπως το PH, η συγκέντρωση του ενζύμου, η αναλογία του υποστρώματος καθώς

και η αναλογία διαλύτη/μητρικού υλικού, ο χρόνος εκχύλισης και η θερμοκρασία. Για την εκχύλιση της λουτεολίνης από τα φύλλα του *Cajanus cajan*, βρέθηκε ότι με ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση ο βαθμός απόδοσης ανήλθε στα 0,3 mg/g υλικού, σχεδόν 4 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με την συμβατική εκχύλιση. Οι παράμετροι βελτιστοποίησης της διεργασίας ήταν για 0,4 mg/mL πηκτινάση σε PH 3,5-4 και χρόνο επώασης 18 ώρες σε θερμοκρασία 30-35 °C (Manzoor et al., 2019).

2.2.7 Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (PLE)

Η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό, είναι μία ακόμη πολλά υποσχόμενη μη συμβατική μέθοδος για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από τα φυτά, όπως είναι τα φλαβονοειδή. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στη χρήση πεπιεσμένου διαλύτη κοντά στην υπερκρίσιμη περιοχή, όπου λόγω των υψηλών θερμοκρασιών επικρατούν ταχείς ρυθμοί διάχυσης και μεγάλες διαλυτότητες των προς εκχύλιση συστατικών στον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, ενώ συγχρόνως ο διαλύτης παραμένει σε υγρή μορφή λόγω των υψηλών πιέσεων, επιτρέποντας την αποτελεσματικότερη διείσδυσή του στο στερεό υλικό. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται συνήθως για πιέσεις 3,5-20,5 bar και θερμοκρασίες 50-200 °C για μικρές χρονικές περιόδους εκχύλισης, ενώ απαιτεί χαμηλότερη ποσότητα οργανικών διαλυτών και υψηλότερη ποσότητα νερού, εκχυλίζοντας σε μεγαλύτερες αποδόσεις και μειώνοντας τα απόβλητα, σε σχέση με τις άλλες μεθόδους εκχύλισης. Οι πιο κοινοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται με την συγκεκριμένη μέθοδο είναι το νερό, το εξάνιο, η ακετόνη και η μεθανόλη (Κανακίδη, 2020, Γούσιας, 2017).

Όσον αφορά την εκχύλιση της λουτεολίνης από τις φυτικές πηγές της με την συγκεκριμένη μέθοδο, οι Lama-Munoz et al (2019) μελέτησαν την εκχύλιση της λουτεολίνης και της ελευρωπαΐνης από τα φύλλα της ελιάς. Από την σύγκριση της μεθόδου εκχύλισης με την συμβατική εκχύλιση με διαβροχή και ανάδευση, βρέθηκε ότι ο βαθμός απόδοσης των δύο πολυφαινόλων αυξάνεται με την μέθοδο πεπιεσμένου υγρού από 19 mg/g ξηρού υλικού σε 63 mg/g ξηρού υλικού για την ελευρωπαΐνη και από 1 mg/g ξηρού υλικού σε 2,8 mg/g ξηρού υλικού για την λουτεολίνη. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για την περίπτωση της εκχύλισης με PLE στους 190 °C και μίγμα αιθανόλης/νερού ενώ η μέθοδος PLE έχει μικρότερη κατανάλωση διαλύτη και μικρότερο χρόνο εκχύλισης από την ανάδευση (5 λεπτά αντί για 6 ώρες). Αντίστοιχα οι Kamali et al., 2016 μελέτησαν την εκχύλιση φλαβονοειδών από τα υπέργεια μέρη του φυτού *D. Kotschyi* που ευδοκιμεί στην Ανατολική Ασία. Για την εκχύλιση της λουτεολίνης βρέθηκε ότι με την χρήση της μεθόδου PLE η απόδοση της διεργασίας ανέβηκε από 9,6 mg/g ξηρού εκχυλίσματος που είχαν επιτευχθεί με εκχύλιση διαβροχής και φιλτράρισμα σε 13 mg/g ξηρού εκχυλίσματος, με διαλύτη μεθανόλη και στις δύο περιπτώσεις. Τα ολικά φλαβονοειδή καθώς και οι ολικές φαινόλες παρουσίασαν επίσης αύξηση.

2.3 Αναγνώριση και απομόνωση των φλαβονοειδών μέσω της υδρόλυσης των γλυκοζιτών

Με τον όρο υδρόλυση χαρακτηρίζονται στη Χημεία και τη Βιοχημεία η αντίδραση διάσπασης των χημικών δεσμών μιας ένωσης υπό την επίδραση του νερού. Γενικά μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους: είτε υπό την επίδραση κάποιου οξέος (όξινη υδρόλυση), είτε υπό την επίδραση βάσης (αλκαλική υδρόλυση), είτε υπό την επίδραση κάποιου ενζύμου (ενζυμική υδρόλυση). Οι πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στα φυτικά υλικά, όπως τα φλαβονοειδή, βρίσκονται κυρίως υπό μορφή γλυκοζιτών, συνεπώς απαιτείται κάποια διαδικασία απομάκρυνσης των σακχάρων από το άγλυκο τμήμα του φλαβονοειδούς (Μερμήγκη, 2014).

Μια κοινή διαδικασία διαχωρισμού των σακχάρων από τα φλαβονοειδή είναι η όξινη υδρόλυση. Κατά τη διάρκεια της όξινης υδρόλυσης πραγματοποιείται κατεργασία του εκχυλίσματος με κάποιο ισχυρό οξύ, προκειμένου να διασπαστούν οι γλυκοζιτικοί δεσμοί που εμφανίζονται μεταξύ των σακχάρων και των καθαρών φαινολικών ενώσεων, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη νερού, προκειμένου να καταβυθιστούν ως στερεά οι αγλυκόνες που θα παραληφθούν στη συνέχεια με μία διαδικασία διαχωρισμού από το υπερκείμενο υγρό (όπως ή διήθηση και η φυγοκέντριση). Την όξινη υδρόλυση επηρεάζουν:

- Ο διαλύτης του εκχυλίσματος
- Το οξύ και η συγκέντρωσή του στο υδρολυόμενο εκχύλισμα
- Η θερμοκρασία και ο χρόνος υδρόλυσης
- Οι γλυκοζίτες που περιέχονται στο εκχύλισμα του φυτού

Ο διαλύτης που είναι πιο κοινός για την υδρόλυση φαινολικών συστατικών από εκχυλίσματα φυτικής προέλευσης είναι η μεθανόλη, ακολουθούμενη από την αιθανόλη, την ακετόνη, το ακετονιτρίλιο και το νερό. Συνήθως με το πέρας της θερμικής κατεργασίας του εκχυλίσματος με οξύ και αφού αυτό έχει υδρολυθεί, προστίθεται νερό για την καταβύθιση του άγλυκου φαινολικού τμήματος, το οποίο δεν είναι διαλυτό στο νερό, ενώ τα σάκχαρα όπως και τμήματα γλυκοζιτών είναι υδρόφιλα και συνεπώς παραμένουν στο υπερκείμενο υγρό. Τα οξέα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση είναι το θειικό οξύ, το υδροχλωρικό οξύ, το φωσφορικό οξύ και άλλα ανόργανα ισχυρά οξέα σε συγκεντρώσεις 0,3-2 N. Επιπλέον ρόλο στην ολοκλήρωση της υδρόλυσης παίζει και η θερμοκρασία η οποία μπορεί να κυμαίνεται από ήπιες συνθήκες (30-35 °C) έως και θερμοκρασίες βρασμού περίπου στους 70-90°C (Μερμήγκη, 2014). Στη δεύτερη περίπτωση οι χρόνοι που επιτυγχάνονται είναι μικρότεροι, ενώ απαιτείται και παράλληλη ψύξη του εξεταζόμενου διαλύτη κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης με κάθετο ψυκτήρα.

Οι οξυγονούχοι γλυκοζίτες οι οποίοι απαντώνται συχνότερα στα φυτά, είναι και αυτοί που υδρολύονται ευκολότερα κατά την όξινη υδρόλυση. Σχηματίζονται κατά την σύνδεση του μορίου σακχάρου με τις ελεύθερες υδροξυλομάδες του μορίου της αγλυκόνης (Lopez-Lazaro, 2009). Οι χρόνοι υδρόλυσης των O-γλυκοζιτών μιας ένωσης διαφέρουν ανάλογα με το μόριο του σακχάρου που προσδένεται στον

γλυκοζίτη ενώ και η θέση πρόσδεσης επηρεάζει αρκετά την υδρόλυση. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι για κατεργασία αιθανολικών εκχυλισμάτων σε μίγμα HCl: Αιθανόλης 1:1 οι γλυκοζίτες που υδρολύονται ευκολότερα από την κατεργασία σε 100°C με κάθετο ψυκτήρα είναι αυτοί που έχουν ως σάκχαρο την ραμνόζη (5 min), ενώ ακολουθούν οι γλυκοζίτες με γλυκόζη ως σάκχαρο (25 min). Ως πιο αργοί στην επίδραση της υδρόλυσης χαρακτηρίζονται οι γλυκοζίτες με γλυκουρονικό οξύ (180 min). Αντίστοιχα η αντίδραση της όξινης υδρόλυσης αποκόπτει πιο γρήγορα τα μόρια σακχάρων που συνδέονται σε οξυγόνο της θέσης 3', ακολουθούμενα από υποκατάσταση στην 4' και την 7 αντίστοιχα. Ως εκ τούτου οι 7-*O*-γλυκοζίτες είναι πιο δύσκολο να υδρολυθούν από τους υπόλοιπους (Harborne, 1965). Οι Hertog et al., 1998 εξέτασαν την όξινη υδρόλυση γλυκοζιτών φλαβονοειδών από διάφορες κατηγορίες, βρίσκοντας ότι οι γλυκουρονικοί γλυκοζίτες των φλαβονολών, απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση HCl για να υδρολυθούν (2.0 M σε διάστημα 2 ωρών), από τους γλυκοζίτες των φλαβονολών που περιέχουν γλυκόζη (1.2 M HCl για <2 h). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και για την κατεργασία με H₂SO₄ ως προς την ανθεκτικότητα στην υδρόλυση, με τους χρόνους ολοκλήρωσης που απαιτούνται να είναι μεγαλύτεροι για ίδιες συγκεντρώσεις οξέος. Η δομή της αγλυκόνης επηρεάζει λιγότερο τους γλυκοζίτες, καθώς οι ρυθμοί υδρόλυσης είναι της ίδιας τάξης και η αντίδραση ολοκληρώνεται σε παρόμοιους χρόνους, με εξαίρεση τους γλυκοζίτες των ανθοκυανινών οι οποίοι είναι σημαντικά πιο ανθεκτικοί από τους υπόλοιπους (Harborne, 1965).

Σε αντίθεση με τους *O*-γλυκοζίτες, οι *C*-γλυκοζίτες, οι οποίοι σχηματίζονται κατά την σύνδεση με το μόριο της αγλυκόνης με δεσμό C-C σε κάποιο από τους άνθρακες του σκελετού της. Η υδρόλυση γίνεται πολύ δύσκολα, καθώς με τις ίδιες συνθήκες που δοκιμάστηκαν για τους *O*-γλυκοζίτες, η απόδοση της διεργασίας για τους *C*-γλυκοζίτες ήταν πρακτικά μηδενική (Harborne, 1965, Markham, 1989), ενώ σε πιο έντονες συνθήκες συντελούνται αντιδράσεις υποβάθμισης της αγλυκόνης. Οι C-C δεσμοί συνεπώς υδρολύονται με εναλλακτικές διεργασίες υδρόλυσης, όπως η ενζυμική υδρόλυση (Wei et al., 2020).

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Στόχος-Σχεδιασμός πειραμάτων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της εκχύλισης λουτεολίνης από ελληνικές φυτικές πηγές με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη πρότυπης διεργασίας εκχύλισης της ένωσης καθώς και μελέτη της δυνατότητας απομόνωσης της από τις πηγές αυτές με σκοπό τη χρήση της σε φάρμακα και συμπληρώματα διατροφής. Για την επίτευξη του στόχου αυτού μελετήθηκαν ως προς το περιεχόμενο τους σε λουτεολίνη το φυτό *Reseda luteola* L., το οποίο έχει βρεθεί βιβλιογραφικά ότι περιέχει σημαντική ποσότητα του φλαβονοειδούς, και το κέλυφος του φιστικιού *Arachis Hyrogea*, το οποίο αποτελεί ένα παραπροϊόν της παραγωγής φιστικιών και στην ελληνική επικράτεια.

Αναλυτικότερα, όσον αφορά στο αρχικό στάδιο της μελέτης των δύο πηγών, στόχος ήταν ο προσδιορισμός της επάρκειας της πηγής σε περιεχόμενη λουτεολίνη με την ανάπτυξη μιας συμβατικής, ενεργειακά αποδοτικής, διεργασίας εκχύλισης η οποία θα χρησιμοποιείται για όλες τις υποψήφιες πηγές λουτεολίνης. Για το σκοπό αυτό, οι υποψήφιες πηγές αφού κονιοποιηθούν σε συγκεκριμένη κοκκομετρία εκχυλίζονταν με διαλύτη μεθανόλη ο οποίος έχει βρεθεί βιβλιογραφικά ότι δίνει το μεγαλύτερο βαθμό απόδοσης κατά την εκχύλιση των ολικών φαινολικών συστατικών καθώς και ειδικά κατά την εκχύλιση λουτεολίνης και γλυκοζιτών της με διεργασία εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου. Τα εκχυλίσματα εξετάζονταν ως προς την περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικά, ολικές φαινόλες και λουτεολίνη με τις μεθόδους DPPH, Folin-Ciocalteu και HPLC-DAD οι οποίες θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω. Ως στόχος της διεργασίας για να αξιολογηθεί το περιεχόμενο της εξεταζόμενης πρώτης ύλης ως επαρκές ορίζεται η ελάχιστη περιεκτικότητα σε λουτεολίνη να αποτελεί το 0.5% w/w της εξεταζόμενης πρώτης ύλης. Στη συνέχεια και με την προϋπόθεση να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη προδιαγραφή για το περιεχόμενο της λουτεολίνης ακολούθησε η εξέταση της κινητικής της εξέλιξης της διεργασίας εκχύλισης με το χρόνο και επιχειρήθηκε η απομόνωσή της ως καθαρή αγλυκόνη από το μητρικό υλικό.

Όσον αφορά στο κέλυφος του φιστικιού, εξετάστηκαν ως προς το περιεχόμενό τους δείγματα κελυφών τόσο από φιστίκια του εμπορίου, όσο και δείγματα κελυφών που λήφθηκαν ως παραπροϊόν της βιομηχανίας επεξεργασίας του καρπού της αραχίδας. Τα δείγματα των κελυφών της αραχίδας που αποτελούν βιομηχανικό παραπροϊόν, αφού υπεβλήθησαν σε προκατεργασία για τον διαχωρισμό των ξένων συστατικών και θέρμανση στους 40 °C για απομάκρυνση της υγρασίας, ώστε να καταστούν αξιοποιήσιμα, κονιοποιήθηκαν σε σταθερή κοκκομετρία <850 μm και εκχυλίζονται αρχικά με διαλύτη μεθανόλη και στη συνέχεια διαδοχικά απιονισμένο νερό, προκειμένου να παραληφθεί το σύνολο της λουτεολίνης από το υλικό, ακόμα και πιθανοί υδρόφιλοι γλυκοζίτες της. Ακολούθησε ο διαχωρισμός των κελυφών των φιστικιών του εμπορίου από τον υπόλοιπο καρπό και η εξαντλητική εκχύλιση του περιεχομένου του υλικού με μεθανόλη. Το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε αντιοξειδωτικά, ολικές φαινόλες και λουτεολίνη προσδιορίστηκε με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν και στη συνέχεια το δείγμα αξιολογήθηκε ως προς την επάρκειά του σε λουτεολίνη καθώς και ως προς το περιεχόμενό του σε άλλα φλαβονοειδή.

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας το φυτό *Reseda luteola* βρισκόταν εκτός περιόδου ανθοφορίας, οπότε δεν ήταν εφικτή η απευθείας συλλογή του, με τη βοήθεια βοτανολόγου. Αναζητήθηκε λοιπόν κάποιο εμπορικά διαθέσιμο δείγμα. Στην Ελλάδα δεν βρέθηκε κανείς έμπορος που να διαθέτει αποξηραμένο *Reseda luteola*, οπότε έγινε έρευνα αγοράς στο εξωτερικό. Βρέθηκε εμπορικός οίκος στη Γερμανία ο οποίος διέθετε *Reseda luteola*, καλλιέργειας Ανατολίας (Τουρκία). Το δείγμα που παραλήφθηκε περιείχε σε ένα ενιαίο μίγμα τόσο τα ξυλώδη μέρη του φυτού όσο και ανθούς και φύλλα. Για το λόγο αυτό η μάζα του συνολικού φυτού διαχωρίστηκε με κοσκίνιση σε κοινό οικιακό κόσκινο σε δύο κλάσματα: ένα λεπτό κλάσμα που εμπεριέχει τα φύλλα, τα άνθη και τα λεπτά ξυλώδη μέρη του υπέργειου τμήματος του φυτού και ένα αποκλειστικά ξυλώδες κλάσμα, το οποίο εμπεριέχει τα ξυλώδη υπέργεια τμήματα του φυτού (βλαστοί, κλαδιά κλπ.). Αφού τα δύο κλάσματα κονιοποιήθηκαν σε συγκεκριμένη κοκκομετρία <850 μm, ακολούθησε διπλό πείραμα εκχύλισης συγκεκριμένης μάζας του πρώτου «λεπτού» κλάσματος με διαλύτη μεθανόλη σε αναλογία μάζας πρώτης ύλης/διαλύτη 1:20, του οποίου το περιεχόμενο σε βιοδραστικές ουσίες αναμένεται σημαντικότερο, προκειμένου να προσδιοριστεί το συνολικό περιεχόμενο του φυτού σε ολικές φαινόλες, αντιοξειδωτικά και λουτεολίνη με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu, DPPH και HPLC και να αξιολογηθεί ως προς την επάρκεια του στο φλαβονοειδές. Στη συνέχεια, και αφού προσδιοριστεί αν υπάρχει επάρκεια της πηγής σε λουτεολίνη, ακολουθεί ο προσδιορισμός της κινητικής των δύο κλασμάτων με διπλό πείραμα μεθανολικής εκχύλισης, αρχικά στο «λεπτό» κλάσμα και στη συνέχεια στο ξυλώδες κλάσμα, με συλλογή δειγμάτων εκχυλισμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα προκειμένου να βρεθεί η εξέλιξη της εκχύλισης φαινολικών και λουτεολίνης συναρτήσει του χρόνου. Το περιεχόμενο των δειγμάτων που συλλέγονται από το κινητικό πείραμα εξετάζονται με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu και HPLC ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικές φαινόλες και λουτεολίνη και ακολουθεί ο προσδιορισμός των κινητικών σχέσεων για κάθε μέθοδο, σε κάθε ένα από τα κλάσματα του φυτού. Επίσης αξιολογούνται τα τελικά εκχυλίσματα που προκύπτουν από τις διεργασίες κινητικής εκχύλισης των δύο κλασμάτων ως προς το περιεχόμενό τους σε λουτεολίνη και ολικές φαινόλες, με στόχο την συνολική αξιολόγηση του φυτού *Reseda luteola* ως αξιοποιήσιμης βιομηχανικά πηγής λουτεολίνης και άλλων φαινολικών συστατικών. Το περιεχόμενο των ολικών στερεών των εκχυλισμάτων προσδιορίζεται με σταθμική ανάλυση.

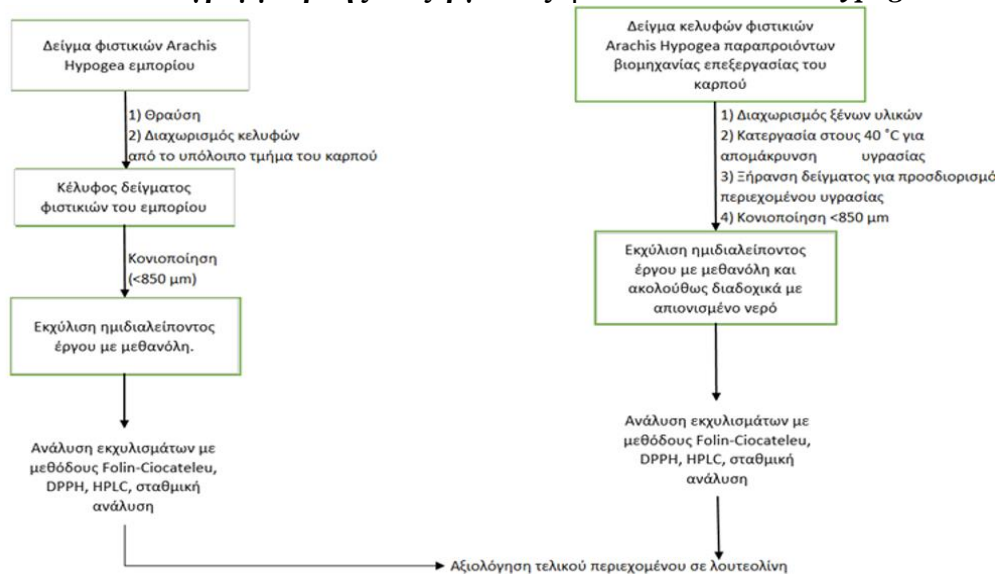
Έπειτα, απέμενε ο προσδιορισμός των μορφών της λουτεολίνης, αλλά και άλλων σημαντικών φλαβονοειδών που βρίσκονται στο εκχύλισμα του φυτού *Reseda luteola*, αλλά και η εξέταση της δυνατότητας απομόνωσης της λουτεολίνης από την πρώτη ύλη ως καθαρή αγλυκόνη σε μεγάλη περιεκτικότητα. Για το λόγο αυτό τα εκχυλίσματα του λεπτού και του ξυλώδους κλάσματος, αφού συμπυκνώθηκαν, υποβλήθηκαν σε διαδικασία όξινης υδρόλυσης υπό ανάδευση.

Τέλος, μετά τη διεργασία όξινης υδρόλυσης ακολούθησε αραίωση με νερό και ψύξη των ολικών συμπυκνωμάτων με σκοπό την καταβύθιση του ιζήματος των αγλυκονών, ο διαχωρισμός του ιζήματος με διήθηση από τον κύριο όγκο του μίγματος. Αφού απομακρύνθηκαν τα ίχνη θεικού οξέος από τα ανακτημένο ίζημα με τη διαδικασία της έκπλυσης με ψυχρό απιονισμένο νερό, εξετάστηκε η απόδοση της διεργασίας της όξινης υδρόλυσης με ανάλυση HPLC στα διαλύματα του διηθήματος και του

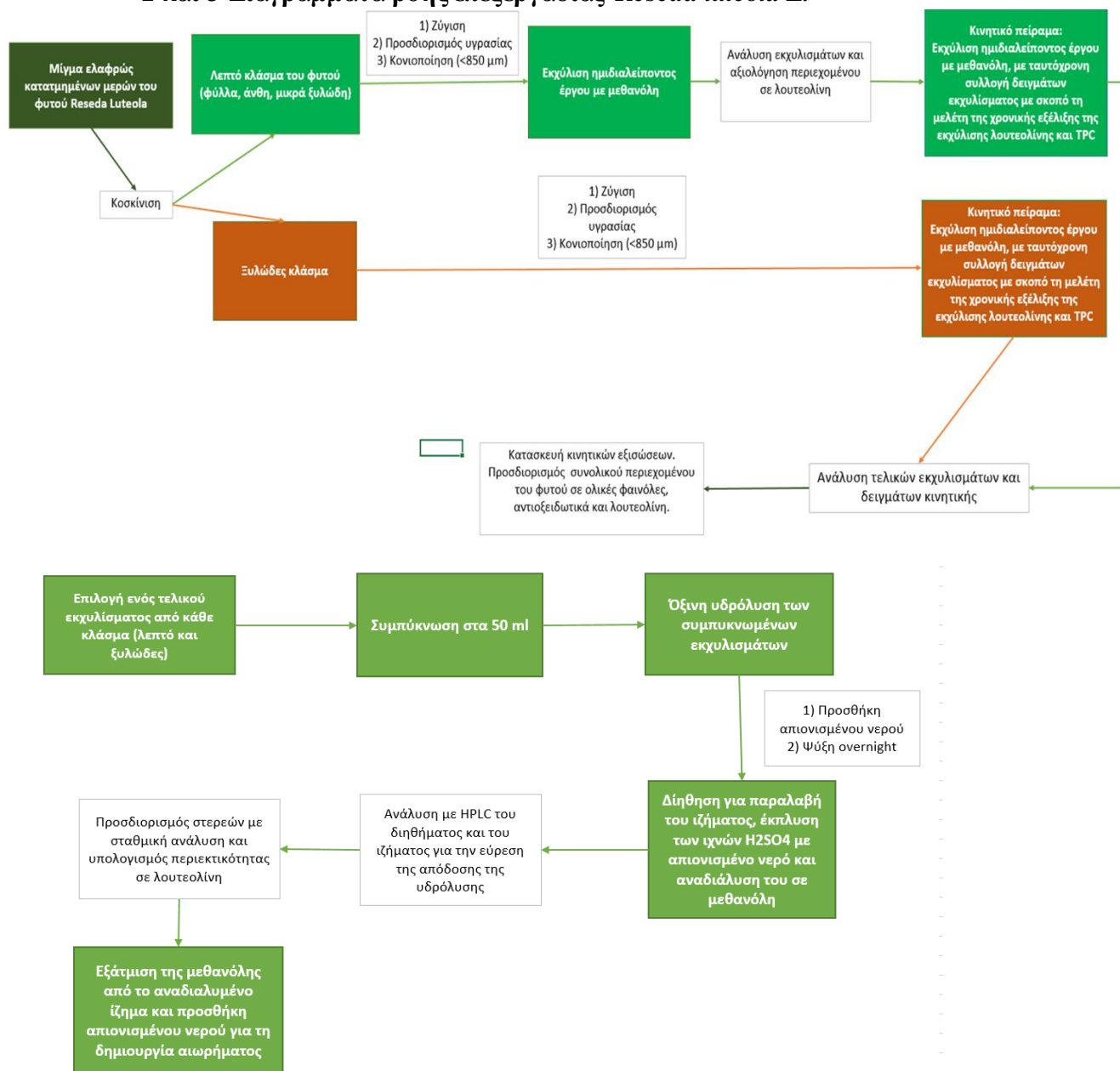
αναδιαλυμένου ιζήματος. Ακολούθησε μια σταθμική ανάλυση του μεθανολικού διαλύματος του ιζήματος προκειμένου να προσδιοριστεί η % κατά βάρος περιεκτικότητα του τελικού στερεού υπολείμματος σε λουτεολίνη και κύρια φλαβονοειδή, η οποία υποδηλώνει και την αποτελεσματικότητα της διεργασίας όξινης υδρόλυσης. Η μεθανόλη του αναδιαλυμένου ιζήματος απομακρύνεται μέσω μιας δεύτερης διεργασίας εξάτμισης στον περιστροφικό συμπυκνωτήρα, με προσθήκη 50 ml απιονισμένου νερού για την παραλαβή του παρασκευάσματος υπό τη μορφή αιωρήματος.

Το διάγραμμα ροής που ακολουθήθηκε για την συνολική επεξεργασία των πρώτων υλών με σκοπό την μελέτη και την απομόνωση της περιεχόμενης λουτεολίνης φαίνεται παρακάτω:

1. Διάγραμμα ροής επεξεργασίας φιστικιού *Arachis Hypogea*



2 και 3 Διαγράμματα ροής επεξεργασίας *Reseda luteola* L.



3.2 Πρώτες ύλες-Αντιδραστήρια-Συσκευές

3.2.1 Πρώτες ύλες

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία όσον αφορά τα κελύφη φιστικιού *Arachis Hypogea* ήταν αφενός μεν κελυφωτά φιστίκια *Arachis Hypogea* του εμπορίου (καφεκοπτείο το Κλασικόν), από τα οποία αφαιρέθηκε το περιεχόμενο που δεν αφορά την διπλωματική (καρπός, φλοιός), και αφετέρου δε κελύφη φιστικιών που είχαν θραυστεί και χρησιμοποιηθεί ως υλικό ζωοτροφής από την βιομηχανία επεξεργασίας της αραχίδιας στις Σέρρες, GrecianPeanuts (<https://grecianpeanuts.gr>). Ως *Reseda luteola* πραγματοποιήθηκε προμήθεια από

Γερμανική αποθήκη 1 kg υπέργειων μερών φυτού που καλλιεργήθηκε στην περιοχή της Τουρκίας, συνεπώς ίδιου είδους και ποικιλίας με το φυτό που ευδοκμεί στην Ελληνική επικράτεια.

3.2.2 Αντιδραστήρια

Για την εκχύλιση της λουτεολίνης από τα φιστίκια οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη και απιονισμένο νερό, ενώ για την εκχύλιση της λουτεολίνης από το φυτό *Reseda luteola* L. χρησιμοποιήθηκε επίσης ως διαλύτης μεθανόλη. Για την αραίωση των δειγμάτων της κινητικής χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη, καθώς αυτός ήταν και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μελέτης της κινητικής της εκχύλισης. Για τις διαδικασίες όξινης υδρόλυσης και απομόνωσης της λουτεολίνης από τα εκχυλίσματα του φυτού *Reseda luteola*, χρησιμοποιήθηκαν πυκνό διάλυμα θειικού οξέος (95% w/w) και απιονισμένο νερό, για την καταβύθιση και την επεξεργασία των στερεών. Για τις καμπύλες αναφοράς των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ (98% w/w) για την κατασκευή της καμπύλης ισοδύναμων γαλλικού οξέος. Για τις καμπύλες αναφοράς αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήριο Trolox για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς σε ισοδύναμα Trolox, για τη μέθοδο DPPH. Επίσης κατασκευάστηκαν με βάση πρότυπη ποσότητα λουτεολίνης, καμπύλες αναφοράς HPLC για την ποσοτικοποίηση των μορφών λουτεολίνης στα εκχυλίσματα από την ανάλυση HPLC. Ακόμη κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς Folin και DPPH για την ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολών και των αντιοξειδωτικών ως ισοδυνάμων της λουτεολίνης. Επειδή η ποσότητα του προτύπου λουτεολίνης ήταν πολύ μικρή για την επαρκή παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων προς ανάλυση με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu και DPPH, αντικαταστάθηκε για τις συγκεκριμένες μεθόδους με συμπλήρωμα διατροφής λουτεολίνης σε σκόνη (98% κβ καθαρότητα), το οποίο διαλύθηκε αρχικά σε DMSO και ακολούθως σε μεθανόλη για να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών στα εκχυλίσματα καθώς και στα δείγματα που αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της κινητικής χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου 20% w/w, ενώ στον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών έγινε χρήση στερεού αντιδραστηρίου ελεύθερης ρίζας 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) και μεθανόλης αναλυτικής καθαρότητας HPLC. Ως διαλύτες στη μέθοδο HPLC έγινε χρήση διαλυμάτων TFA 0,2% w/w με διαλύτες νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και βουτανόλη υψηλής καθαρότητας (99,9%).

Η προέλευση των αντιδραστηρίων φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1: Προέλευση των αντιδραστηρίων

Αντιδραστήρια	Προέλευση
Κάψουλες λουτεολίνης	Natürlich lang leben UG, Germany
DPPH	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Na ₂ CO ₃	Labbox Labware, Spain
Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-carboxylic acid)	Merck, Darmstadt, Germany
Μεθανόλη (για εκχυλίσεις)	1) Carlo Erba Reagents, Milan, Italy 2) Honeywell Riedel-de-Haen AG, Sielze, Germany
TFA	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
DMSO	Carlo Erba Reagents, Milan, Italy
Πυκνό θειικό οξύ (H ₂ SO ₄)	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
Γαλλικό οξύ	Merck, Darmstadt, Germany
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	Merck, Darmstadt, Germany
Διαλύτης μεθανόλης HPLC	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
Διαλύτης νερού HPLC	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
Διαλύτης ακετονιτρίλιο HPLC	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
Διαλύτης βουτανόλη HPLC	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
Πρότυπη λουτεολίνη	Extrasynthese, France

3.2.3 Συσκευές και διατάξεις

Για την εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου χρησιμοποιήθηκε ανοξείδωτος εκχυλιστήρας διαμέτρου 3 cm και ύψους 9 cm στον οποίο προσαρμίζονται πλαστικοί σωλήνες για την διέλευση του διαλύτη διαμέσου του εκχυλιστήρα και περισταλτική αντλία (Millipore, Bedford, MSH, USA). Η διάταξη φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 3.1: Η διάταξη της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου. Από αριστερά στα δεξιά: η αντλία μαζί με το σύστημα άντλησης (Millipore) και ο εκχυλιστήρας με τους σωλήνες εισόδου και εξόδου του διαλύτη.

Οι αναλύσεις HPLC των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν σε υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης, αποτελούμενο από HP 1100 σύστημα, αντλία βαθμωτής έκλουσης και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (DAD), (Hewlett-Packard, Germany),

συνδεδεμένα με στήλη Hypersil C18 column ODS 5 μm , 250x 4.6mm (MZ Analysentechnik, Mainz, Germany).



Εικόνα 3.2: Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή Diode Array (HPLC-DAD), που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των εκχυλισμάτων. Αριστερά φαίνεται ο υπολογιστής του προγράμματος και δεξιά η διάταξη της υγρής χρωματογραφίας.

Για τις φασματοφωτομετρικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Hitachi U29000.



Εικόνα 3.3: Το φασματοφωτόμετρο Hitachi

Η ξήρανση των εκχυλισμάτων για τη σταθμική ανάλυση έγινε στους 50 °C για την απομάκρυνση της μεθανόλης, ενώ για την ξήρανση υδατικών, εκχυλισμάτων και τον προσδιορισμό της υγρασίας χρησιμοποιήθηκε φούρνος Binder ρυθμισμένος στους 100 °C. Η κατεργασία για την απομάκρυνση ξένης υγρασίας από τα κελύφη φιστικιών έγινε σε φούρνο Hendif.



Εικόνες 3.4 και 3.5: Οι φούρνοι Hendi (αριστερά) και Binder (δεξιά).

Για την διεργασία της όξινης υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε διάταξη που περιλαμβάνει υδατόλουτρο πάνω σε θερμαινόμενο αναδευτήρα (VELP, Italy), κάθετο ψυκτήρα, μαγνητικό αναδευτήρα (Heidolph, Germany) και πλαστικούς σωλήνες από τους οποίους διέρχεται το νερό ψύξης και η οποία φαίνεται παρακάτω:



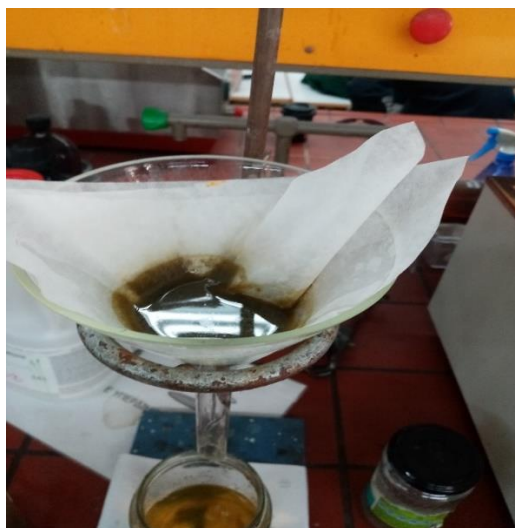
Εικόνα 3.6: Η διάταξη της όξινης υδρόλυσης.

Για την εξάτμιση της μεθανόλης και τη συμπύκνωση μεθανολικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Heidolph G1, Germany).



Εικόνα 3.7: Η διάταξη του περιστροφικού εξατμιστήρα

Για τις διηθήσεις που απαιτήθηκαν χρησιμοποιήθηκε διάταξη διήθησης με χάρτινο ηθμό, η οποία φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 3.8: Η διάταξη της διήθησης.

Τέλος οι ζυγίσεις των στερεών έγιναν σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών (XT 220A, Presica) και δύο δεκαδικών (620C, Presica), ενώ οι αναδεύσεις δοκιμαστικών σωλήνων στις μεθόδους Folin-Ciocalteu και DPPH έγιναν σε αναδευτήρα Vortex (ZX3, Velp). Η κατάτμηση των δειγμάτων έγινε με blender της εταιρείας Tefal.



Εικόνες 3.9 και 3.10: Ο ζυγός υψηλής ακρίβειας (αριστερά) και ο αναδευτήρας Vortex (δεξιά).

3.3 Προκατεργασία πρώτων υλών

3.3.1 Κελύφη φιστικιού αραχίδιας

Για τα κελύφη φιστικιού από την αραχίδα που παραλήφθηκαν από το εμπόριο (Το Κλασικόν, Νέα Σμύρνη) ο διαχωρισμός του κελύφους από το υπόλοιπο φιστίκι (καρπός, φλοιός) έγινε με άνοιγμα του κελύφους (μέσω μη έντονης θραύσης τμήματος του κελύφους) και συλλογή των ανοιγμένων κελυφών που προέκυψαν από τη διαδικασία. Τα κελύφη αυτά στη συνέχεια κονιοποιήθηκαν σε μπλέντερ Tefal και υπεβλήθησαν σε κοσκίνιση από κόσκινο κοκκομετρίας <math><850 \mu\text{m}</math>, για τη δημιουργία ομοιόμορφου προς εκχύλιση υλικού.

Για τα κελύφη της αραχίδας που παραλήφθηκαν από τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας επεξεργασίας του καρπού, αφού διαχωρίστηκαν από αυτά και απορρίφθηκαν τα ξένα υλικά (κλαριά, φλοιοί και καρποί που βρέθηκαν στα απόβλητα, ρίζες του φυτού κλπ) τα κελύφη υποβλήθηκαν σε μερική ξήρανση στους 40° C για 24 h, στον φούρνο Hendi προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία του παραπροϊόντος. Με το τέλος της διεργασίας τα κελύφη κονιοποιήθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο με αυτά του εμπορίου και προσδιορίστηκε η περιεχόμενη υπολειμματική υγρασία τους με ξήρανση στο φούρνο Binder στους 100° C, πριν οδηγηθούν σε εκχύλιση.

3.3.2 Προκατεργασία φυτού *Reseda luteola* L.

Το φυτό *Reseda luteola* L. που έφτασε στο εργαστήριο σε ποσότητα 1 kg, ήρθε σε αρκετά ανομοιογενή μορφή, με το παραληφθέν φυτό να αποτελείται από ένα μέρος λεπτών κατά βάση υλικών (φύλλα, άνθη, καρποί) και ένα μέρος ξυλώδων υλικών από τους βλαστούς του φυτού. Για να αντιμετωπιστεί αυτή η ανομοιογένεια της φύσης του υλικού και να διευκολυνθούν τα πειράματα προσδιορισμού της κινητικής της εκχύλισης που θα ακολουθήσουν, το σύνολο της μάζας του φυτού διαχωρίστηκε με κοινό οικιακό κόσκινο σε δύο κλάσματα: ένα που εμπεριέχει τα ξυλώδη τμήματα του φυτού και ένα άλλο λεπτότερο, που εμπεριέχει το σύνολο των φύλλων και ανθών του φυτού καθώς και λεπτά ξυλώδη που διήλθαν από το κόσκινο. Τα δύο κλάσματα αφού συλλέχθηκαν, ζυγίστηκαν για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του αρχικού υλικού στο καθένα από αυτά, κονιοποιήθηκαν όπως ακριβώς τα κελύφη του φιστικιού (σε μπλέντερ Tefal και ακολούθως με κόσκινο <850 nm για την δημιουργία ομοιόμορφων κόνεων λεπτού και ξυλώδους κλάσματος αντίστοιχα) και προσδιορίστηκε η υγρασία τους, πριν εκχυλιστούν για τον προσδιορισμό τους σε λουτεολίνη και άλλα φαινολικά συστατικά.

Πίνακας 3.2: Οι μάζες των κλασμάτων λεπτού και ξυλώδους φυτού

Κλάσμα	Μάζα (g)	Ποσοστό % επί του φυ- τού
Λεπτό	427	43
Ξυλώδες	573	57



Εικόνες 3.11-3.13: Τα στάδια προκατεργασίας του φυτού. Αριστερά τμήμα του φυτού όπως παραλήφθηκε από τον παραγωγό, στα δεξιά το λεπτό κλάσμα του φυτού και κάτω το ξυλώδες κλάσμα του φυτού.

3.4 Πειραματικές Μέθοδοι

3.4.1 Εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου

Σε εκχυλιστήρα εργαστηριακής κλίμακας και όγκου 70 mL, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με μεθανόλη για όλες τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά και με απιονισμένο νερό για τα κελύφη φιστικιών που προήλθαν από τις Σέρρες. Συγκεκριμένα ποσότητα κονιοποιημένης πρώτης ύλης σε κοκκομετρία <math><850\ \mu\text{m}</math> σε σταθερή μάζα για κάθε χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη, εισήλθε εντός του εκχυλιστήρα ο οποίος συνδέεται με πλαστικούς σωλήνες, έναν για την μεταφορά και την είσοδο του διαλύτη από την περισταλτική αντλία στην κάτω είσοδο του εκχυλιστήρα και έναν για την έξοδο του εκχυλίσματος από την πάνω είσοδο του εκχυλιστήρα και την συλλογή του σε ογκομετρικό κύλινδρο για την ακριβή μέτρηση της ροής του διαλύτη. Η ροή εντός του εκχυλιστήρα είναι από κάτω προς τα πάνω προκειμένου να εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη διαβροχή του υλικού, ενώ πριν την είσοδο και την έξοδο του εκχυλιστήρα τοποθετείται ποσότητα βαμβακιού για να εμποδιστεί η αποκόλληση και η εισχώρηση ποσότητας στερεού της μήτρας στην ροή του εκχυλίσματος. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη (κελύφη φιστικιών Σερρών και εμπορίου, λεπτό και ξυλώδες κλάσμα *Reseda luteola*) και απιονισμένο νερό (δοκιμαστικά για τα κελύφη φιστικιού που προέρχονται από την σεραϊκή βιομηχανία). Η εκχύλιση λαμβάνει τέλος στην διαφαινόμενη εξάντληση του

υλικού. Οι μάζες πρώτης ύλης και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.3: Οι μάζες, οι όγκοι και οι ροές των διεργασιών εκχύλισης

Υλικό	Μάζα(g)	Όγκος(mL)	Ροή(mL/min)
Κελύφη φιστικιών εμπορίου	14	560	3,3
Κελύφη φιστικιών Σέρρες (μεθανολική)	14 (1 ^ο και 2 ^ο πείραμα)	160 (1 ^ο πείραμα) 200 (2 ^ο πείραμα)	1,6 (μέση ροή)
Κελύφη φιστικιών Σέρρες (διαδοχική υδατική)	14 (1 ^ο και 2 ^ο πείραμα)	100 (1 ^ο πείραμα) 90 (2 ^ο πείραμα)	1,9 (μέση ροή)
Λεπτό κλάσμα <i>Reseda luteola</i> (Ποσοτικοί προσδιορισμοί)	20 (1 ^ο και 2 ^ο πείραμα)	400 (1 ^ο και 2 ^ο πείραμα)	1,2 (μέση ροή για 1 ^ο και 2 ^ο πείραμα)
Λεπτό κλάσμα <i>Reseda luteola</i> (Κινητικοί και ποσοτικοί προσδιορισμοί)	19 (3 ^ο και 4 ^ο πείραμα)	380 (3 ^ο και 4 ^ο πείραμα)	2,8 (μέση ροή για 3 ^ο και 4 ^ο πείραμα)
Ξυλώδες κλάσμα <i>Reseda luteola</i> (Κινητικοί και ποσοτικοί προσδιορισμοί)	18 (1 ^ο και 2 ^ο πείραμα)	400 (1 ^ο και 2 ^ο πείραμα)	2,5 (μέση ροή)

Ακόμη, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης έγινε συλλογή δειγμάτων για την κινητική μελέτη της πορείας εκχύλισης, και συγκεκριμένα στα δύο τελευταία επαναληπτικά πειράματα με λεπτό κλάσμα (3 και 4) καθώς και στα δύο πειράματα με ξυλώδες κλάσμα. Στους χρόνους εκχύλισης 0, 1,5, 3, 5, 9, 15, 25, 45, 60, 90, 105 (για λεπτό κλάσμα), 120 min (για ξυλώδες κλάσμα) συλλέχθηκε δείγμα 1 mL από την έξοδο του εκχυλιστήρα. Τα δείγματα των εκχυλίσεων αναλύθηκαν ως προς ολικές φαινόλες (TPC) και λουτεολίνη-γλυκοζίτες της με μεθόδους Folin-Ciocalteu και HPLC αντίστοιχα. Τα κινητικά πειράματα εξελίχθηκαν για τα πρώτα 300 mL και στις τέσσερις εκχυλίσεις καθώς στη συνέχεια η εκχύλιση είχε πρακτικά ολοκληρωθεί.

3.4.2 Όξινη υδρόλυση

Για τον ακριβή προσδιορισμό της λουτεολίνης στο φυτό, αλλά και για την επαρκή απομόνωση της ουσίας σε καθαρή μορφή αγλυκόνης απαιτείται η όξινη υδρόλυση των εκχυλισμάτων που παραλαμβάνονται από την μεθανολική εκχύλιση των κλασμάτων του φυτού *Reseda luteola*, προκειμένου να επιτευχθεί η το δυνατόν μεγαλύτερη καταβύθιση των φλαβονοειδών του εκχυλίσματος σε μορφή αγλυκόνης, προκειμένου να ακολουθήσει ο διαχωρισμός τους από την κύρια μάζα του εκχυλίσματος και η περαιτέρω κατεργασία τους. Η όξινη υδρόλυση είναι μια απλή διαδικασία επίτευξης αυτού του στόχου, καθώς δεν απαιτούνται πολύπλοκες διεργασίες για την υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών ή τον διαχωρισμό και την ανάλυση των αγλυκονών που προκύπτουν μετά τη διαδικασία, με κύριο μειονέκτημα την χρήση τοξικών ουσιών σε σημαντική ποσότητα.

Για την κατεργασία των εκχυλισμάτων με όξινη υδρόλυση αρχικά επιλέγεται ένα τελικό εκχύλισμα πειράματος εκχύλισης από κάθε κλάσμα του φυτού και ογκομετρείται ποσότητα του εκχυλίσματος σε ογκομετρικό κύλινδρο, η οποία και μεταφέρεται ποσοτικά σε σφαιρική φιάλη των 500 mL. Ακολουθεί συμπύκνωση του εκχυλίσματος σε περιστροφικό συμπυκνωτήρα κενού στους 40 °C ως τα 50 mL. Στη συνέχεια και αφού η περιεκτικότητα του κάθε εκχυλίσματος σε γραμμάρια ολικών στερεών ανά λίτρο είναι γνωστή από τις σταθμικές αναλύσεις των εκχυλισμάτων, προστίθεται στο εκχύλισμα πυκνό θειικό οξύ σε αναλογία 5 mL θειικού οξέος/3 g ολικών στερεών. Ακολουθεί η προσθήκη μαγνητικού αναδευτήρα και η τοποθέτηση της σφαιρικής φιάλης στη διάταξη, όπου θερμαίνεται σε υδατόλουτρο για 60 min στους 70 °C. Μετά την ολοκλήρωση της θερμικής κατεργασίας αφαιρείται ο μαγνήτης και το υδρολυμένο εκχύλισμα αραιώνεται με απιονισμένο νερό και τοποθετείται στο ψυγείο για 24 h με σκοπό την καταβύθιση του ιζήματος των αγλυκονών.

Μετά το πέρας της ψύξης το μίγμα απιονισμένου νερού-θειικού οξέος και εκχυλίσματος διηθείται με χάρτινο ηθμό για τον διαχωρισμό των καταβυθισμένων στερεών από τον όγκο του μίγματος. Το στερεό στον ηθμό εκπλύθηκε με ψυχρό απιονισμένο νερό για απομάκρυνση του θειικού οξέος. Το διήθημα συλλέγεται και αναλύεται στην HPLC για τον προσδιορισμό τυχόν ποσοτήτων των περιεχόμενων ενώσεων (αγλυκονών και μη) που διέφυγαν στον κύριο όγκο του. Το ίζημα αναδιαλυτοποιείται σε μεθανόλη ως πλήρους διάλυσης και στη συνέχεια προσδιορίζεται με HPLC η συγκέντρωση της καθαρής λουτεολίνης στον κύριο όγκο του, καθώς και η απόδοση της όξινης υδρόλυσης.

Τέλος, με ξήρανση στη διάταξη της εξάτμισης της μεθανόλης και ακολούθως για 12-15 h στο φούρνο Binder στους 100 °C (απομάκρυνση μεθανόλης και εγκλεισμένου νερού στα στερεά του διηθήματος) εκτιμάται η τελική εκλεκτικότητα του στερεού σε mg λουτεολίνης/g ξηρού προϊόντος μέσω σταθμικής ανάλυσης σε συνδυασμό με τα δεδομένα που προέκυψαν από την HPLC για το αναδιαλυτοποιημένο ίζημα. Η μεθανόλη του αναδιαλυμένου ιζήματος απομακρύνεται μέσω μιας δεύτερης διεργασίας εξάτμισης στον περιστροφικό συμπυκνωτήρα, με προσθήκη 20 mL απιονισμένου νερού για την παραλαβή του παρασκευάσματος υπό τη μορφή αιωρήματος.



Εικόνα 3.14: Τα δύο διαλύματα που προκύπτουν από την όξινη υδρόλυση. Αριστερά το μεθανολικό διάλυμα του ιζήματος της διεργασίας (πλούσιο σε αγλυκόνες), δεξιά το διήθημα (φτωχό σε ποσότητες φλαβονοειδών γενικά, περιέχει τα σάκχαρα που διαχωρίστηκαν από την υδρόλυση).

3.5 Αναλυτικές μέθοδοι

3.5.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Πολλές διαθέσιμες μέθοδοι αναγνώρισης και ποσοτικοποίησης των ολικών φαινολών σε ένα διάλυμα που προέρχεται από ένα τρόφιμο ή ένα βιοδραστικό συστατικό οφείλονται στην αντίδραση των φαινολικών συστατικών με ένα χρωματομετρικό αντιδραστήριο που καθιστά εφικτή την μέτρηση των φαινολικών στην περιοχή του ορατού. Αυτή είναι και η αρχή της μεθόδου Folin-Ciocalteu, βάσει της οποίας υφίσταται μεταφορά ηλεκτρονίων από τα φαινολικά συστατικά προς συμπλέγματα φωσφομολυβδικού/φωσφοβολφραμικού οξέος συντελώντας στη δημιουργία συμπλόκων μπλε χρώματος, τα οποία προσδιορίζονται στην φασματομετρική περιοχή των 765 nm.

Για την μέθοδο παρασκευάστηκε αρχικά κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 20% w/w. Αυτό επιτεύχθηκε με προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 200 g άλατος Na_2CO_3 και 800 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων ως τους 70 °C, και στη συνέχεια ψύχθηκε στο ψυγείο για 24 h, ως την εμφάνιση κρυστάλλων. Μετά το πέρας της ψύξης ακολούθησε διήθηση με ταυτόχρονη μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη 1 L, η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι πλήρωσης.

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης αναφοράς ισοδυνάμων γαλλικού οξέος, παρασκευάστηκε διάλυμα γαλλικού οξέος με συγκέντρωση 1013 mg/L, διαλύοντας ποσότητα 101,3 mg γαλλικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη 100 mL η οποία πληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή, αφού πρώτα προστεθεί μικρή ποσότητα αιθανόλης (10 mL) για την διάλυση του γαλλικού οξέος. Στη συνέχεια από το αρχικό πρότυπο διάλυμα παρασκευάζονται με λήψη 1, 3, 5 και 7 mL με σιφόνια πλήρωσης και την ποσοτική μεταφορά των ποσοτήτων προτύπου σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, όπου αραιώνονται μέχρι τη χαραγή, πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 0,1C, 0,3C, 0,5C και 0,7C αντίστοιχα όπου C=1013 mg/L, δύο για κάθε συγκέντρωση. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου ανά δείγμα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάζονται δείγματα με προσθήκη 7,9 mL απιονισμένου νερού, 0,1 mL από κάθε ένα πρότυπο διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (0,1C, 0,3C, 0,5C, 0,7C και C όπου C=1013 mg/L), 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin και 1,5 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου, καθώς και ένα τυφλό δείγμα με συγκέντρωση C=0, χωρίς χρήση ποσότητας πρότυπου διαλύματος. Τα δείγματα αναδεύονται με Vortex και επωάζονται για 2 h σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια ακολουθεί η φωτομέτρηση τους στο φωτόμετρο Hitachi σε μήκος κύματος 765 nm για τον προσδιορισμό του περιεχομένου τους και η κατασκευή της καμπύλης. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη χρήση του τυφλού δείγματος (0 mg TPC/L).

Για την παρασκευή της καμπύλης αναφοράς της λουτεολίνης παρασκευάστηκε stock διάλυμα λουτεολίνης με την προσθήκη 200,4 mg συμπληρώματος διατροφής λουτεολίνης 98% w/w (σύμφωνα με την ετικέτα) σε ογκομετρική φιάλη 10 mL και την πλήρωση της μέχρι τη χαραγή με DMSO, λόγω της έλλειψης σε πρότυπη ουσία υψηλής καθαρότητας, το οποίο επιβεβαιώθηκε με HPLC πως έχει υψηλή καθαρότητα σε λουτεολίνη. Εν συνεχεία 5 mL του αρχικού προτύπου αραιώθηκε έως όγκου 100 mL με μεθανόλη, το οποίο αποτέλεσε το πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1002 mg/L σε

λουτεολίνη. Με παρόμοιες διαδικασίες για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων συγκεντρώσεων 0.1-0.7 C και για τη διαδικασία προσδιορισμού του περιεχομένου σε ολικές φαινόλες, όπως και στην καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος, παρασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς ολικών φαινολών σε ισοδύναμα λουτεολίνης.

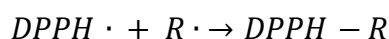
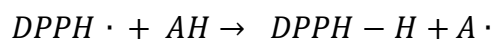
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης εκχυλισμάτων και δειγμάτων από την κινητική μελέτη της διεργασίας σε ολικές φαινόλες ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αφού πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις για κάθε εξεταζόμενο δείγμα εκχυλίσματος ή δείγματος κινητικής μελέτης όπου χρειάστηκε, ακολούθησε ο προσδιορισμός του περιεχομένου με την παρασκευή διαλυμάτων συμπλόκων Folin, όπως στις ανωτέρω περιπτώσεις, με προσθήκη κατά σειρά 7,9 mL απιονισμένου νερού, 0,1 mL από το δείγμα ή το εκχύλισμα καθ' αυτό ή σε κατάλληλη αραιώση, 0,5 mL αντιδραστήριου Folin και 1,5 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου, ενώ παράλληλα κατασκευάζονταν και τυφλό δείγμα. Το μίγμα αναδεύτηκε, επώαστηκε για 2 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φωτομετρήθηκε στο φωτόμετρο Hitachi από όπου υπολογίστηκε το περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες μέσω αναγωγών και προσαρμογής στα δεδομένα των καμπυλών αναφοράς GAE (ισοδυνάμων γαλλικού οξέος) και LUT (ισοδυνάμων λουτεολίνης).



Εικόνα 3.15: Τα δείγματα Folin για την καμπύλη αναφοράς σε ισοδύναμα λουτεολίνης, μετά από επώαση 2 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

3.5.2 Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιεί το μόριο του 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), το οποίο αποτελεί μια σταθερή ελεύθερη ρίζα, λόγω της δυνατότητας του ελεύθερου ηλεκτρονίου να μετακινείται στο μόριο προκειμένου αυτό να μην διμερίζεται. Η μετακίνηση του ηλεκτρονίου προσδίδει στη ρίζα ένα σκούρο βιολετί χρώμα το οποίο χαρακτηρίζεται από μέγιστη απορρόφηση σε διάλυμα μεθανόλης στα 515 nm. Ένα διάλυμα της ρίζας DPPH χάνει το βιολετί χρώμα κατά την αντίδραση του με μια χημική ένωση που αποτελεί δότη υδρογόνου, καθώς το μόριο του DPPH μετατρέπεται στο υδρογονωμένο παράγωγό του. Η αντίδραση υδρογόνωσης της ρίζας από μια ένωση AH που αποτελεί δότη υδρογόνου φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Brandt-Williams et al., 1995):



Η μέθοδος που χρησιμοποιείται εδώ για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών είναι η ίδια με τη μέθοδο των Brandt-Williams et al. και χρησιμοποιείται για την μέτρηση της ποσότητας αντιοξειδωτικών σε ένα διάλυμα, μέσω της μέτρησης της ικανότητας αποχρωματισμού της ρίζας DPPH από τα αντιοξειδωτικά του διαλύματος. Για την παρασκευή διαλύματος DPPH, ζυγίζονται 2,5 mg ρίζας DPPH (Sigma-Aldrich) και προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml, η οποία πληρώνεται ως τη χαραγή με μεθανόλη ποιότητας HPLC και αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης του DPPH στον διαλύτη. Στη συνέχεια ακολουθεί η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών ως ισοδύναμα Trolox και λουτεολίνης, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για την παρασκευή πρότυπου διαλύματος Trolox ζυγίζονται 20 mg αντιδραστηρίου Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) και προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml η οποία πληρώνεται με μεθανόλη ως τη χαραγή για τον σχηματισμό πρότυπου διαλύματος Trolox συγκέντρωσης 200 mg/L. Από αυτό το διάλυμα παρασκευάζονται διαλύματα αραιώσης συγκεντρώσεων 0,1C, 0,3C, 0,5C, 0,7C όπου C=200 mg/L με την προσθήκη 1,3,5 και 7 ml σε ογκομετρικές φιάλες των 10 ml και την πλήρωση τους ως τη χαραγή με μεθανόλη. Για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις παρασκευάζονται δύο διαλύματα της ίδιας συγκέντρωσης. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 3,9 ml διαλύματος ρίζας DPPH και 0,1 ml διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης Trolox (0 (καθαρή μεθανόλη), 20, 60, 100, 140 και 200 mg/L). Τα μίγματα αναδεύονται σε Vortex και αφήνονται να επωαστούν στους δοκιμαστικούς σωλήνες για διάστημα 30 λεπτών απουσία φωτός και στη συνέχεια φωτομετρούνται στο φωτόμετρο Hitachi στα 515 nm. Από εκεί λαμβάνονται οι απορροφήσεις κάθε δείγματος και σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς ισοδυνάμων Trolox (TE).

Για το πρότυπο διάλυμα της λουτεολίνης λαμβάνεται από το ίδιο διάλυμα λουτεολίνης συγκέντρωσης 200,4 mg συμπληρώματος λουτεολίνης/10 mL διαλύματος DMSO 1 mL και αραιώνεται σε ογκομετρική φιάλη 100 mL ως τη χαραγή με μεθανόλη, προκειμένου να προκύψει πρότυπο διάλυμα λουτεολίνης συγκέντρωσης 200,4 mg/L. Από εκεί και με παρόμοιο τρόπο όπως στα πρότυπα συγκεντρώσεων Trolox παρασκευάζονται διαλύματα συγκεντρώσεων 0,1C, 0,3C, 0,5C και 0,7C (C=200,4 mg λουτεολίνης/L). Τα δείγματα DPPH παρασκευάζονται βάζοντας σε δοκιμαστικούς σωλήνες 3,9 mL διαλύματος ρίζας DPPH και 0,1 mL πρότυπου διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης (0, 20.04, 60.12, 100.2, 140.3 και 200.4 mg λουτεολίνης/L) και αφού αναδευτούν σε Vortex αφήνονται να επωαστούν απουσία φωτός για 100 λεπτά (χρόνος πλήρους αντίδρασης ρίζας DPPH με λουτεολίνη-Τσιμογιάννης, 2008). Έπειτα φωτομετρούνται και με βάση τις απορροφήσεις στα 515 nm γίνεται η καμπύλη αναφοράς ισοδυνάμων LUT.

Η μέθοδος DPPH εφαρμόζεται στα συνολικά εκχυλίσματα, τα οποία είτε σε αραιώση, είτε χωρίς αραιώση εξετάζονται φωτομετρικά με την ίδια μέθοδο (0,1 mL σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 3,9 mL διαλύματος ρίζας DPPH, επώαση για 100 λεπτά, φωτομέτρηση στα 515 nm) και με βάση την απορρόφηση προσαρμόζονται στις καμπύλες αναφοράς TE (ισοδυνάμων Trolox) και LUT (ισοδυνάμων λουτεολίνης).

3.5.3 Σταθμική ανάλυση

Ο προσδιορισμός του στερεού υπολείμματος ενός εκχυλίσματος συμβάλλει στην εύρεση της εκλεκτικότητας μιας εκχύλισης, αλλά και στον προσδιορισμό της ποσότητας θεικού οξέος που πρέπει να προστεθεί για την όξινη υδρόλυση. Ο προσδιορισμός των στερεών υπολειμμάτων γίνεται ως εξής: σε πλαστικό φιαλίδιο, το οποίο έχει προζυγιστεί, προστίθεται ποσότητα 7 mL εκχυλίσματος και στη συνέχεια αυτό τοποθετείται στη διάταξη ξήρανσης για να απομακρυνθεί η μεθανόλη από το εκχύλισμα, σε θερμοκρασία κοντά στο σημείο βρασμού της μεθανόλης. Αν το εκχύλισμα είναι υδατικό, ή έχει υδατικές εγκλείσεις τότε τοποθετείται στον φούρνο Binder για 24 h στους 100 °C. Στη συνέχεια το φιαλίδιο και αφού τελειώσει η διαδικασία της εξάτμισης του διαλύτη, τοποθετείται σε ξηραντήρα κορεσμένου $Mg(NO_3)_2$ για 15-20 min προκειμένου να έρθει σε σταθερή θερμοκρασία. Αφού ξηρανθεί το φιαλίδιο, επαναζυγίζεται για την εύρεση της μάζας του, και με αφαίρεση από την αρχική μάζα προσδιορίζεται η μάζα των ολικών στερεών. Στη συνέχεια με αναγωγή στο 1 L βρίσκεται η συγκέντρωση σε g TS (Total Solids)/L (Total Solids Concentration) και ακολούθως η συγκέντρωση σε mg στερεών/g υλικού (Total Solids Yield) για τις ολικές φαινόλες, τα αντιοξειδωτικά και την λουτεολίνη.



Εικόνα 3.16: Ο ξηραντήρας $Mg(NO_3)_2$.

3.5.4 Προσδιορισμός υγρασίας

Ο προσδιορισμός της υγρασίας ενός υλικού γίνεται ως εξής: αφού το υλικό κονιοποιηθεί σε κοκκομετρία <850 μm , προστίθενται 5 g του υλικού σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως και στη συνέχεια το ποτήρι τοποθετείται για 24 h ώρες στο φούρνο Binder στους 100 °C. Αφού περάσει το χρονικό διάστημα ξήρανσης στο φούρνο, το ποτήρι αφαιρείται από το φούρνο, τοποθετείται στον ξηραντήρα για 15-20 λεπτά και επαναζυγίζεται. Η υγρασία προσδιορίζεται ως εξής:

$$\gamma = \frac{m_{\text{υλικού αρχικό}} - m_{\text{υλικού τελικό}}}{m_{\text{υλικού αρχικό}}} * 100\% \text{ και}$$

$$m_{\text{υλικού τελικό}} = m_{\text{ποτηριού ζέσεως}} + m_{\text{(υλικού αρχικό)}} - m_{\text{ποτηριού ζέσεως + υλικό μετά την ξήρανση}}$$

3.5.5 Αναλύσεις HPLC-DAD

Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των προτύπων και των εκχυλισμάτων έγινε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Συγκεκριμένα τα δείγματα ενσωματώθηκαν σε στήλη αντίστροφης φάσης ZORBAX Eclipse XDB-C18 μετά από μικροδιήθηση και αναλύθηκαν με βάση μέθοδο προσδιορισμού των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών σε μήκη κύματος 230, 280, 320 και 360 nm. Ως ροή διαλυτών μέσα στην στήλη επιλέχθηκε το 1 mL/min και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν περίπου στα 70 min. Οι διαλύτες A, B, C και D ήταν διαλύματα TFA 0,2 % w/w σε διαλύτες νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και βουτανόλη αντίστοιχα, όλα ποιότητας HPLC. Ο διαλύτης νερό-TFA 0,2 % w/w αποτελεί τον διαλύτη A, ο διαλύτης μεθανόλη-TFA 0,2% w/w τον διαλύτη B, ο διαλύτης ακετονιτρίλιο-TFA 0,2% w/w τον διαλύτη C και ο διαλύτης βουτανόλη-TFA 0,2% w/w τον διαλύτη D. Η αρχική σύνθεση της κινητής φάσης ήταν 90% A, 6% B και 4% C και με γραμμικές κλίσεις άλλαξε σε 85%A, 9% B και 6%C σε διάστημα 5 min. Στη συνέχεια σε 71% A, 17,4% B και 11,6% C στα 30 min της ανάλυσης και σε 0% A, 85% B και 15% C από τα 60 min ως το τέλος της ανάλυσης.

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης αναφοράς της λουτεολίνης, 2,3 mg πρότυπης λουτεολίνης (Extrasynthese, France) προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη η οποία πληρώθηκε με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Αφού ανακινήθηκε καλά προκειμένου να υπάρξει πλήρης διάλυση της λουτεολίνης, το διάλυμα πρότυπης συγκέντρωσης μετρήθηκε στα 230, 280, 320 και 360 nm σε αραιώσεις 0,1C, 0,2C, 0,5C, 0,75C και C με C=230 mg/L. Από την απορρόφηση της κύριας κορυφής της λουτεολίνης προσδιορίζεται η απορρόφηση της εκάστοτε συγκέντρωσης της ουσίας και κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς HPLC-DAD για κάθε μήκος κύματος, βάσει της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση της λουτεολίνης στα εκχυλίσματα και τα προϊόντα της όξινης υδρόλυσης.

Ακόμη αναλύεται το προϊόν συμπληρώματος διατροφής λουτεολίνης από τις κάψουλες με σκοπό την επιβεβαίωση της συγκέντρωσης της λουτεολίνης. Συγκεκριμένα 190,9 mg λουτεολίνης σε κάψουλα διαλύονται σε 10 mL DMSO σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και από το συγκεκριμένο διάλυμα λαμβάνεται με σιφόνιο πλήρωσης 1 mL, το οποίο αραιώνεται 1:100 σε μεθανόλη ποιότητας HPLC. Το πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 190,9 mg λουτεολίνης/L που προκύπτει αναλύεται κατά τον ίδιο τρόπο με το διάλυμα πρότυπης λουτεολίνης, και τα αποτελέσματα από τις καμπύλες αναφοράς συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της καμπύλης αναφοράς του κανονικού προτύπου. Ακολούθως εισάγεται συντελεστής διόρθωσης για κάθε καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται με βάση το συμπλήρωμα του εμπορίου προκειμένου οι συγκεντρώσεις που προκύπτουν από την καμπύλη του συμπληρώματος να ταυτίζονται με αυτής του προτύπου κατά τον πολλαπλασιασμό τους με τον συντελεστή.

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο γίνεται ακριβώς όπως στην πρώτη παράγραφο. Οι συγκεντρώσεις λαμβάνονται με εγχύσεις 5,10 ή 20 μl ανάλογα με την αραιώση που απαιτείται για την προσαρμογή των δεδομένων εντός των ορίων των καμπυλών αναφοράς. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της λουτεολίνης γίνεται με βάση τις καμπύλες αναφοράς της πρότυπης λουτεολίνης, ή τις διορθωμένες καμπύλες αναφοράς του συμπληρώματος διατροφής

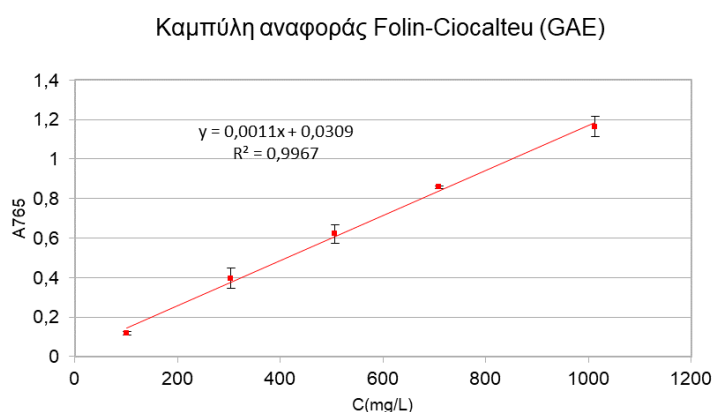
(καθώς οι μέθοδοι προσδιορισμού είναι ισοδύναμες). Επειδή η λουτεολίνη απορροφά στα 350 nm, η καμπύλη αναφοράς στα 360 nm θεωρείται η πιο ασφαλής προσέγγιση της συγκέντρωσης της ουσίας στο δείγμα.

4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

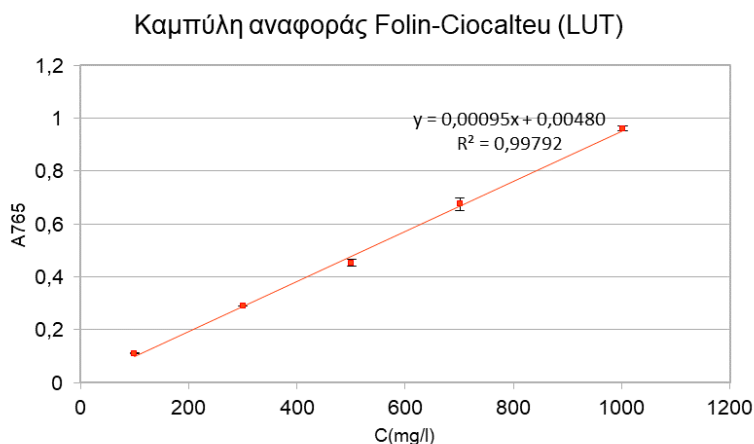
4.1 Καμπύλες αναφοράς

4.1.1 Καμπύλες Folin-Ciocalteu και DPPH

Παρακάτω φαίνονται όλες οι καμπύλες αναφοράς που υπολογίστηκαν από τις μεθόδους Folin-Ciocalteu και DPPH. Συγκεκριμένα στα διαγράμματα 4.1 και 4.2 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης για το γαλλικό οξύ και το συμπλήρωμα διατροφής της λουτεολίνης αντίστοιχα. Οι καμπύλες αναφοράς αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) και λουτεολίνης (LUT) αντίστοιχα.

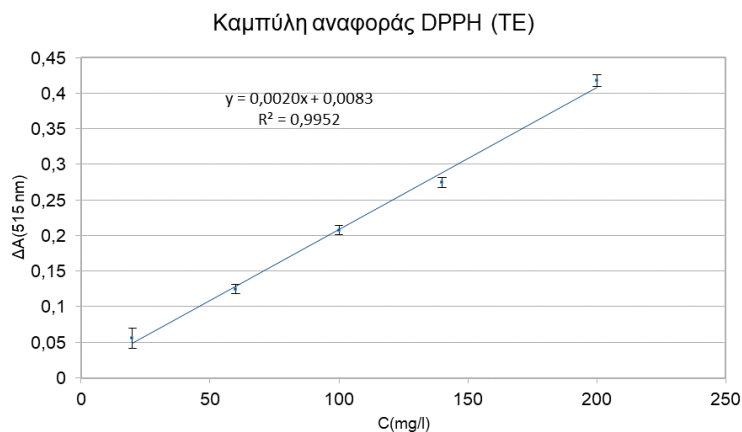


Διάγραμμα 4.1: Η καμπύλη αναφοράς της μεθόδου Folin-Ciocalteu για την εύρεση του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε GAE. Απορρόφηση στα 765 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος σε mg/L.

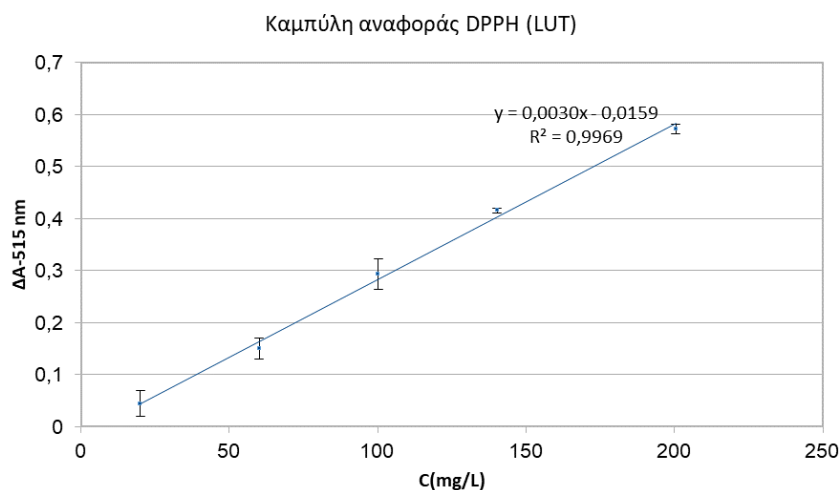


Διάγραμμα 4.2: Η καμπύλη αναφοράς της μεθόδου Folin-Ciocalteu για την εύρεση του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε LUT. Απορρόφηση στα 765 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης λουτεολίνης (από το συμπλήρωμα διατροφής) σε mg/L.

Στα διαγράμματα 4.3 και 4.4 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς της μεθόδου DPPH που απεικονίζουν τη μεταβολή της απορρόφησης της ρίζας ως προς τις διάφορες συγκεντρώσεις Trolox και συμπληρώματος λουτεολίνης 98%. Οι καμπύλες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των ουσιών που έχουν την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH και δρουν ως αντιοξειδωτικά.



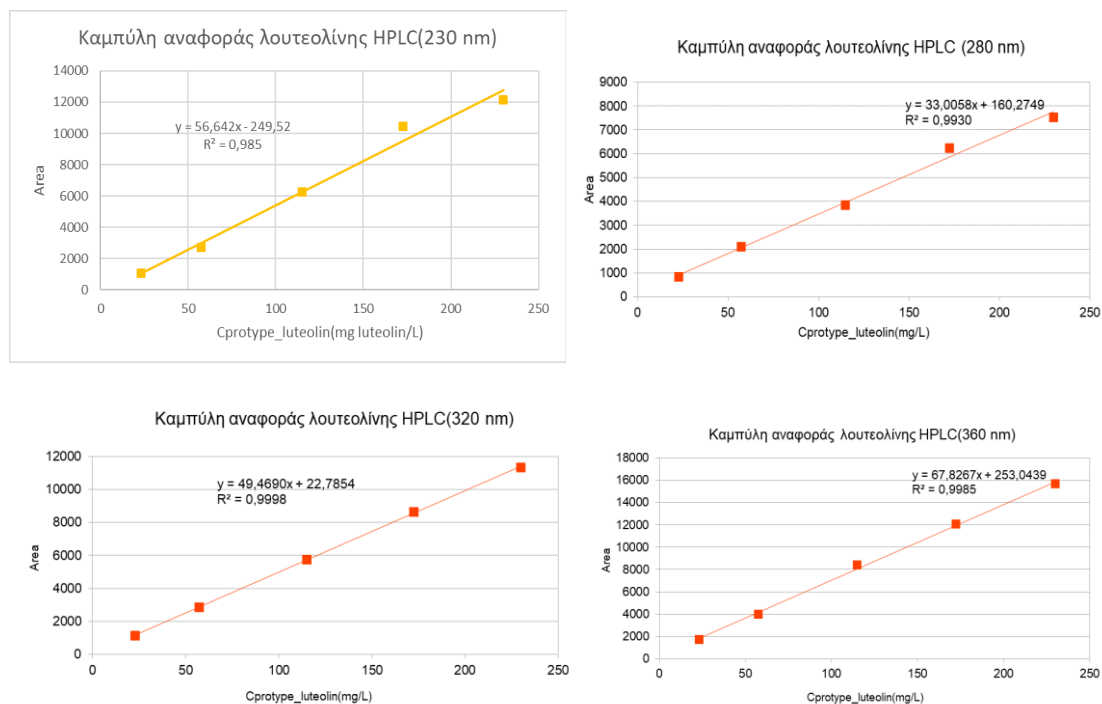
Διάγραμμα 4.3: Η καμπύλη αναφοράς της μεθόδου DPPH για την εύρεση του ολικού αντιοξειδωτικού περιεχομένου σε ισοδύναμα Trolox (TE). Διαφορά απορρόφησης από το τυφλό στα 515 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης Trolox σε mg/L.



Διάγραμμα 4.4: Η καμπύλη αναφοράς της μεθόδου DPPH για την εύρεση του ολικού αντιοξειδωτικού περιεχομένου σε ισοδύναμα λουτεολίνης (LUT). Διαφορά απορρόφησης από το τυφλό στα 515 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης λουτεολίνης σε mg/L.

4.1.2 Καμπύλες αναφοράς λουτεολίνης (HPLC)

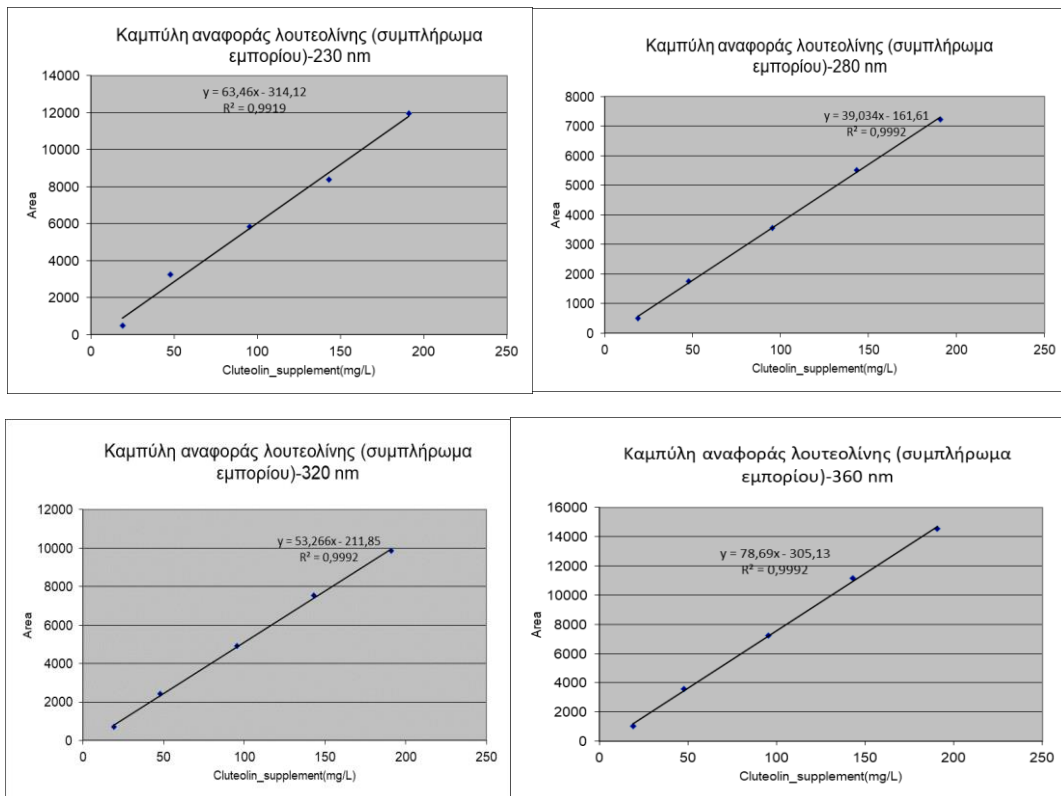
Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες αναφοράς της λουτεολίνης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ουσίας με τη μέθοδο HPLC και κατασκευάστηκαν από δείγμα πρότυπης λουτεολίνης (Extrasynthese, France).



Διαγράμματα 4.5 (α-δ): Οι καμπύλες αναφοράς της λουτεολίνης όπως προσδιορίστηκαν από τη μέθοδο HPLC ως προς τις συγκεντρώσεις πρότυπης λουτεολίνης. Οι καμπύλες απεικονίζουν τα εμβαδά της κορυφής πρότυπης λουτεολίνης συναρτήσει της συγκέντρωσής της α) στα 230 nm (πάνω αριστερά), β) στα 280 nm (πάνω δεξιά), γ) στα 320 nm (κάτω αριστερά) και δ) στα 360 nm (κάτω δεξιά).

Από τα ανωτέρω διαγράμματα γίνεται κυρίως χρήση της καμπύλης αναφοράς στα 360 nm, για τον προσδιορισμό της λουτεολίνης στα εξεταζόμενα δείγματα, επομένως η εξίσωση του διαγράμματος 4.8 είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο για την ποσοτικοποίηση στην μέθοδο HPLC.

Στη συνέχεια παρατίθενται οι καμπύλες αναφοράς της λουτεολίνης οι οποίες παρασκευάστηκαν με χρήση συμπληρώματος διατροφής λουτεολίνης του εμπορίου και αναλύθηκαν με τη μέθοδο HPLC.



Διαγράμματα 4.5 (α-δ): Οι καμπύλες αναφοράς της λουτεολίνης όπως προσδιορίστηκαν από τη μέθοδο HPLC ως προς τις συγκεντρώσεις του συμπληρώματος διατροφής της λουτεολίνης (Naturlich lang leben). Οι καμπύλες απεικονίζουν τα εμβαδά της κορυφής λουτεολίνης συναρτήσε της συγκέντρωσής της α) στα 230 nm (πάνω αριστερά), β) στα 280 nm (πάνω δεξιά), γ) στα 320 nm (κάτω αριστερά) και δ) στα 360 nm (κάτω δεξιά).

Παρατηρώντας τα διαγράμματα για το πρότυπο και το συμπλήρωμα, προκύπτει απόκλιση μεταξύ των καμπυλών του προτύπου και του συμπληρώματος. Επομένως για τον υπολογισμό της καθαρότητας του συμπληρώματος, εισάγεται αρχικά συντελεστής διόρθωσης σε κάθε μήκος κύματος στην καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήσε ως πρώτη ύλη το συμπλήρωμα προκειμένου αυτή να ταυτίζεται με την καμπύλη αναφοράς του προτύπου (υπολογισμοί στο Παράρτημα):

$$C_{d(230)} = 1,11 \text{ και } C_{luteolin(real)} = 1,11 * C_{luteolin(supplement curve)}$$

$$C_{d(280)} = 1,18 \text{ και } C_{luteolin(real)} = 1,18 * C_{luteolin(supplement curve)}$$

$$C_{d(320)} = 1,07 \text{ και } C_{luteolin(real)} = 1,07 * C_{luteolin(supplement curve)}$$

$$C_{d(360)} = 1,13 \text{ και } C_{luteolin(real)} = 1,13 * C_{luteolin(supplement curve)}$$

Όπου C_d ο συντελεστής διόρθωσης και $C_{luteolin(supplement curve)}$ η συγκέντρωση που υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς του συμπληρώματος διατροφής του εμπορίου.

Με βάση τις παραπάνω καμπύλες αναφοράς, γίνεται ποσοτικοποίηση της λουτεολίνης στο συμπλήρωμα διατροφής ως εξής:

$$C_{prototype} = 191 \text{ mg/L}$$

Η απορρόφηση στα 360 nm υπολογίζεται με την καμπύλη του προτύπου της Extrasynthese ως εξής:

$$Area = 67,8 * 191 + 253 = 13201$$

Η απορρόφηση του συμπληρώματος για το ίδιο C αντικαθιστώντας στην εξίσωση της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς για 360 nm ισούται με 14557.

Άρα η συγκέντρωση λουτεολίνης στο συμπλήρωμα διατροφής υπολογίζεται ως:
 $\left(\frac{13201}{14557}\right) * 100\% = 91\%$, μικρότερη από την αναγραφόμενη (98% w/w), το οποίο μπορεί να οφείλεται από κάποια αναμενόμενη υποβάθμιση κατά τη συντήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

4.2 Εκχύλιση κελυφών φιστικιών με μεθανόλη-Προσδιορισμός περιεχομένου σε λουτεολίνη

Τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων για τις διάφορες εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν πάνω στα κελύφη φιστικιού *Arachis Hypogea* φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 4.1: Τα συνοπτικά αποτελέσματα της μελέτης της του περιεχομένου των φιστικιών *Arachis Hypogea* σε mg/g επί του πρωτογενούς ξηρού υλικού.

Μέθοδος	Μονάδες μέτρησης	Κελύφη φιστικιών παραπροϊόντα εμπορίου	Κελύφη φιστικιών που αποτελούν παραπροϊόντα της βιομηχανίας
FOLIN-CIO-CALTEU	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mgGAE/g material)	6,4	5,3 ± 0,4
	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mgLUT/g material)	8,6	6,6 ± 0,5
DPPH	Ολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο (mgTE/g material)	5,6	4,9 ± 0,4
	Ολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο (mgLUT/g material)	4,1	3,5 ± 0,3
HPLC	Λουτεολίνη σε όλες τις μορφές (mgLUT/g material)	1,9	1,5 ± 0,5

Όπου φαίνεται το περιεχόμενο των κελυφών φιστικιών του εμπορίου σε ολικές φαινόλες, αντιοξειδωτικά, και λουτεολίνη, που αναλύθηκαν με τις τρεις μεθόδους. Τα αναλυτικά ποσοτικά αποτελέσματα της κάθε μεθόδου, καθώς και της μεθόδου της σταθμικής ανάλυσης παρατίθενται και σχολιάζονται παρακάτω.

4.2.1 Υγρασία κελύφους φιστικιού

Η υγρασία των κελυφών του φιστικιού που μετρήθηκε με την ξήρανση στο φούρνο Binder αντιστοιχεί και 8,5 ± 0,2 % υγρασίας (σε υγρή βάση) για τα κελύφη φιστικιών που εξετάστηκαν ως παραπροϊόντα από τη βιομηχανία και 8,4 ± 0,1 % για το εμπόριο. Επομένως αποδεικνύεται η θεωρητικά αναμενόμενη μικρή ποσότητα της πρώτης ύλης σε περιεχόμενη υγρασία, πράγμα που αποδεικνύει ότι η πρώτη ύλη είναι σταθερή μικροβιολογικά με και ασφαλής με υγρασία κάτω του 10% (υγρή βάση).

4.2.2 Μέθοδοι σταθμικής ανάλυσης, Folin-Ciocalteu και DPPH

Πίνακας 4.2: Η απόδοση των εκχυλισμάτων κελυφών του φιστικιού, ως προς τα ολικά στερεά που προσδιορίζονται με κάθε μέθοδο. (Αναλογία σε g πρώτης ύλης/mL διαλύτη). Όπου TSC η συγκέντρωση των ολικών στερεών σε mg/L στο εκχύλισμα, και TSY η απόδοση των ολικών Στερεών σε mg/g υλικού.

Μονάδα μέτρησης ολικών στερεών	Εκχύλισμα μεθανόλης κελυφών παραπροϊόντων εμπορίου (14 g:560 mL)	Εκχύλισμα μεθανόλης κελυφών φιστικιού παραπροϊόντος βιομηχανίας (14:180 mL)	Υδατικό Εκχύλισμα κελυφών φιστικιού παραπροϊόντος βιομηχανίας (14:95 mL)
Ολική συγκέντρωση στερεών (TSC) g TS/L extract	2,1	11 ± 5	7,3 ± 0,4
Απόδοση εκχύλισης σε στερεά (TSY) mg TS/g material	85	137 ± 37	49 ± 1

Πίνακας 4.3: Τα αποτελέσματα των αναλύσεων Folin-Ciocalteu για κάθε εκχύλισμα κελύφους φιστικιού (Αναλογία σε g πρώτης ύλης/mL διαλύτη).

Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες	Μεθανολική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντων εμπορίου 14 g:560 mL	Μεθανολική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντος βιομηχανίας 14 g:180 mL	Υδατική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντος 14 g:95 mL
Απόδοση σε ολικές φαινόλες (TPC) ως mg GAE/g υλικού	6,4	4,6 ± 0,6	0,63 ± 0,18
Απόδοση σε ολικές φαινόλες ως % κατά βάρος (ισοδύναμα GAE)	0,64	0,46 ± 0,06	0,063 ± 0,018
Εκλεκτικότητα (mg GAE/g TS)	76	36 ± 13	13 ± 4
Απόδοση σε ολικές φαινόλες (TPC) ως mg LUT/g υλικού	8,6	5,7 ± 0,8	0,92 ± 0,23
Απόδοση σε ολικές φαινόλες ως % κατά βάρος (ισοδύναμα LUT)	0,86	0,57 ± 0,08	0,092 ± 0,023
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	101	44 ± 17	19 ± 5

Από τα δεδομένα της ανάλυσης για τη μέθοδο Folin-Ciocalteu βρέθηκε ότι το ποσοτικό περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες του κελύφους του φιστικιού είναι σχετικά

χαμηλό, πλησιάζοντας κατά μέσο όρο τα 5,3 mg GAE/g υλικού (0,53% w/w) και 6,6 mg LUT/g υλικού (0,66 % w/w) στο κέλυφος που εξετάστηκε ως παραπροϊόν της βιομηχανίας, ενώ ελαφρώς μεγαλύτερο είναι στο κέλυφος του φιστικιού που συλλέχθηκε από αραχίδες του εμπορίου, φτάνοντας τα 6,4 mg/g και 8,6 mg/g για ισοδύναμα γαλλικού οξέος και λουτεολίνης ανά γραμμάριο υλικού αντίστοιχα. Το περιεχόμενο των κελυφών φιστικιών του εμπορίου σε ολικές φαινόλες είναι λίγο μεγαλύτερο, λόγω της καλύτερης εν γένει μεταχείρισης που έχει το κέλυφος σε προϊόντα ξηρού φιστικιού αραχίδας όπως αυτό που συλλέχθηκε από το εμπόριο, από ότι ως παραπροϊόν της βιομηχανίας επεξεργασίας του καρπού (απόρριψη χωρίς προστασία του υλικού, έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία, βροχή κλπ). Από την εξέταση των επιμέρους εκχυλισμάτων, βρίσκεται ότι το εκχύλισμα μεθανόλης είναι αυτό με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών εκχυλίζοντας το 88% του συνολικού περιεχομένου σε ολικές φαινόλες (TPC) που βρέθηκε από τις δύο διαδοχικές εκχυλίσεις του παραπροϊόντος κελύφους με δύο διαλύτες, ενώ το υδατικό εκχύλισμα απομόνωσε μόνο το 12% των ολικών φαινολών. Η παρατήρηση αυτή αναμενόταν και θεωρητικά, καθώς τα κέλυφη της αραχίδας δεν είναι πλούσια σε γλυκοζίτες της λουτεολίνης οι οποίοι θα μπορούσαν να εκχυλίζονται από το νερό, ενώ και το γεγονός ότι και η μεθανόλη που προηγήθηκε στην διαδικασία διαδοχικής εκχύλισης είναι καλό μέσο εκχύλισης γλυκοζιτών έπαιξε ρόλο στην εκχύλιση χαμηλού περιεχομένου σε φαινόλες από το νερό. Η εκλεκτικότητα των συστατικών που υπολογίζεται ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος είναι επίσης υψηλότερη για το προϊόν του εμπορίου συγκριτικά με τα κέλυφη-υποπροϊόντα της βιομηχανίας (101 mg LUT/g TS έναντι 63 ± 31 mg LUT/g TS σε ισοδύναμα λουτεολίνης) γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στις καλύτερες συνθήκες συντήρησης των κελυφών του ξηρού φιστικιού του εμπορίου.

Ανάλογα είναι και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την εξέταση των εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική δράση τους, μετρώντας τα αντιοξειδωτικά με βάση την αντιριζική ικανότητα (Antiradical capacity=AC).

Πίνακας 4.4: Τα αποτελέσματα των αναλύσεων της μεθόδου DPPH για τα εκχυλίσματα κελύφους φιστικιού. (Αναλογία σε g πρώτης ύλης/mL διαλύτη)

Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά	Μεθανολική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντων εμπορίου 14 g:560 mL	Μεθανολική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντος βιομηχανίας 14 g:180 mL	Υδατική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντος βιομηχανίας 14 g:95 mL
Απόδοση σε αντιοξειδωτικά (AC) ως mg TE/g υλικού	5,6	$4,6 \pm 0,1$	$0,33 \pm 0,23$
Απόδοση σε αντιοξειδωτικά ως % κατά βάρος (ισοδύναμα TE)	0,56	$0,46 \pm 0,01$	$0,033 \pm 0,023$
Εκλεκτικότητα (mg TE/g TS)	66	35 ± 10	$6,5 \pm 4,9$
Απόδοση σε αντιοξειδωτικά (AC) ως mg LUT/g υλικού	4,1	$3,2 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,16$
Απόδοση σε αντιοξειδωτικά ως % κατά βάρος (ισοδύναμα LUT)	0,41	$0,32 \pm 0,01$	$0,028 \pm 0,016$
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	48	24 ± 7	$5,5 \pm 3,9$

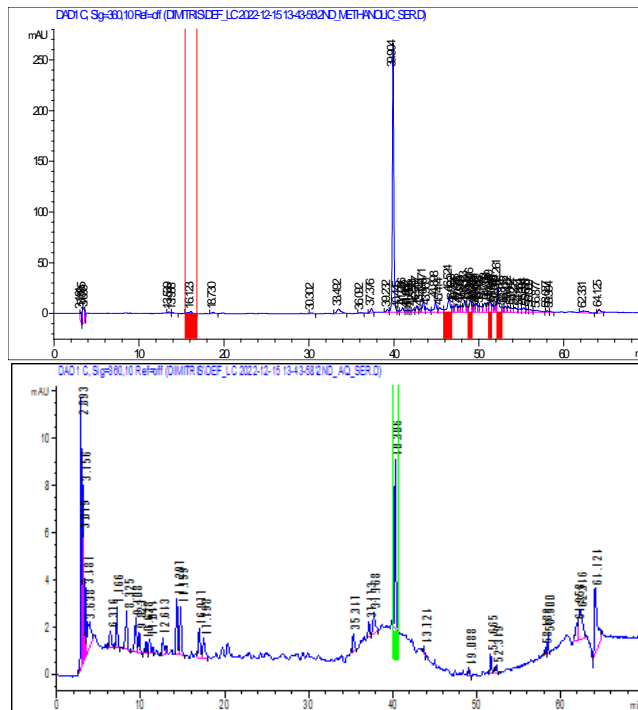
Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, και εδώ το περιεχόμενο σε ολικά αντιοξειδωτικά είναι σχετικά μικρό, με το περιεχόμενο των φιστικιών του εμπορίου σε αντιοξειδωτικές ουσίες να είναι μεγαλύτερο από το περιεχόμενο των κελυφών που προέκυψαν ως παραπροϊόντα (5,6 mg TE/g υλικού έναντι 4,9 mg TE/g υλικού και 4,1 mg LUT/g υλικού έναντι 3,5 mg LUT/g υλικού αντίστοιχα). Το ποσοτικό περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά είναι επίσης σχετικά μικρό και μικρότερο από το περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες, επομένως υπάρχει ήδη η ένδειξη ότι πιθανώς τα κελύφη φιστικιών να μην αποτελούν επαρκή πηγή λουτεολίνης. Αντίστοιχη εικόνα με αυτή των ολικών φαινολών επικρατεί για τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά στην εκχύλιση: το 88% των αντιοξειδωτικών εκχυλίζεται με την μεθανολική εκχύλιση ενώ το 12% εκχυλίζεται με την υδατική. Για τις εκλεκτικότητες ισχύει ότι είναι μειωμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες των ολικών φαινολών.

4.2.3 Ανάλυση με μέθοδο HPLC

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τη μελέτη του κελύφους φιστικιού με HPLC ως προς το περιεχόμενο του κελύφους σε λουτεολίνη φαίνονται παρακάτω:

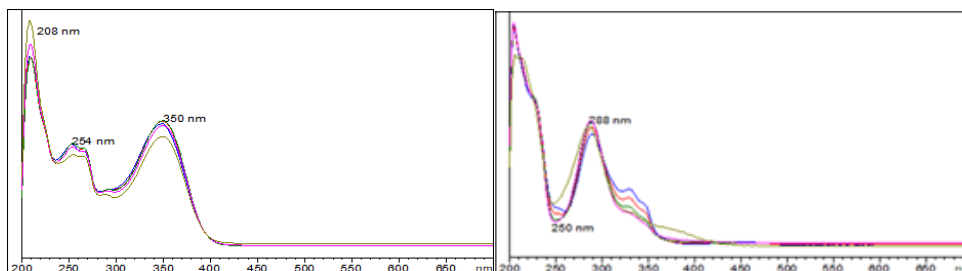
Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα ανάλυσης των εκχυλισμάτων από το κέλυφος του φιστικιού με τη μέθοδο HPLC (αναλογία σε g πρώτης ύλης:mL διαλύτη εκχύλισης).

Προσδιορισμός περιεκτικότητας εκχυλίσματος σε λουτεολίνη	Μεθανολική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντων εμπορίου 14 g:560 mL	Μεθανολική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντων βιομηχανίας 14 g:180 mL	Υδατική εκχύλιση κελυφών φιστικιού παραπροϊόντων βιομηχανίας 14 g:95 mL
Απόδοση σε λουτεολίνη (mg λουτεολίνης/g υλικού)	1,9	1,4 ± 0,5	0,07 ± 0,04
Απόδοση σε λουτεολίνη (% κατά βάρος υλικού)	0,19	0,14 ± 0,05	0,007 ± 0,004
Εκλεκτικότητα (mg λουτεολίνης/g TS)	23	24 ± 19	1,5 ± 0,5



Εικόνες 4.1 (α,β): Τυπικό χρωματογράφημα HPLC (α) για το μεθανολικό (πάνω) και (β) για το υδατικό εκχύλισμα του κελύφους φιστικιού (κάτω). Τα χρωματογραφήματα που απεικονίζονται εξήχθησαν στα 360 nm και απεικονίζουν την εκχύλιση των κελυφών της αραχίδας που προέρχονται από παραπροϊόντα (τα υπόλοιπα στο Παράρτημα).

Από τα μεθανολικά εκχυλίσματα, προκύπτει ότι το κύριο φλαβονοειδές που εκχυλίζεται είναι η λουτεολίνη, ενώ ακολουθεί σε περιεκτικότητα η εριοδικτυόλη. Τα δύο φλαβονοειδή εκλούνται σε χρόνους 40 min και 33 min αντίστοιχα για την ανάλυση των μεθανολικών εκχυλισμάτων και αναγνωρίζονται από το φάσμα της κορυφής τους συγκριτικά με την βιβλιογραφία, όπως φαίνεται παρακάτω. Η εριοδικτυόλη εμφανίζει τη μέγιστη κορυφή της στα 280 nm όπως φαίνεται και στο Παράρτημα. Από το φάσμα των κορυφών που εξήχθη από την HPLC προκύπτει ότι δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμοι σε επαρκείς ποσότητες γλυκοζίτες της λουτεολίνης που να εκχυλίζονται από το κέλυφος, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από τη θεωρία, καθώς οι συνθήκες χαμηλής υγρασίας που ευδοκμούν στο κέλυφος της λουτεολίνης οδηγούν στον σχηματισμό υδρόφοβων αγλυκονών (Wee et al, 2008). Επομένως του περιεχόμενο του κελύφους σε λουτεολίνη συνιστάται αποκλειστικά από την μορφή της αγλυκόνης, καθώς η κορυφή αυτή είναι η μόνη κύρια κορυφή του εκχυλίσματος, ενώ ταυτίζεται και με τον χρόνο έκλυσης του προτύπου της λουτεολίνης.



Εικόνες 4.2 (α,β): Τα φάσματα των κορυφών της λουτεολίνης (α) και της εριοδικτυόλης (β) όπως προέκυψαν για την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος του κελύφους της αραχίδας. Οι δύο κορυφές ταυτίζονται με τις αντίστοιχες που παρουσιάζονται στις εικόνες 1.17 (α) και 1.23.

Από την ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λουτεολίνη για το κέλυφος της αραχίδας, προκύπτει ότι τόσο για τα παραπροϊόντα του εμπορίου όσο και για τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας, το περιεχόμενο σε λουτεολίνη δεν υπερβαίνει το στόχο που τέθηκε αρχικά (0,5 % w/w υλικού), για να θεωρηθεί βιώσιμη η διεργασία. Η περιεκτικότητα σε λουτεολίνη για τις δύο πηγές είναι παραπλήσια με τα κέλυφη του εμπορίου να εμφανίζουν περιεκτικότητα σε λουτεολίνη ίση με 1,9 mg/g υλικού (0,19% w/w) και τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας $1,5 \pm 0,5$ mg LUT/g ($\approx 0,15 \pm 0,05$ % w/w). Το ίδιο ισχύει και για τις εκλεκτικότητες των εκχυλίσεων σε λουτεολίνη για τα εκχυλίσματα μεθανόλης, οι οποίες ωστόσο παραμένουν αισθητά μεγαλύτερες από τις περιεκτικότητες που υπολογίζονται. Το υδατικό εκχύλισμα όπως φαίνεται και από τα γραφήματα έχει αμελητέα ποσότητα τόσο σε λουτεολίνη, όσο και σε άλλα φλαβονοειδή, επομένως η διαδοχική εκχύλιση με νερό μπορεί να θεωρηθεί περιττή. Τα αναλυτικά αποτελέσματα για την περιεκτικότητα του κελύφους της αραχίδας σε λουτεολίνη φαίνονται στους Πίνακες 4.1 και 4.4 που παρουσιάστηκαν παραπάνω.

4.3 Εκχύλιση υπέργειων μερών του φυτού *Reseda luteola* με μεθανόλη

4.3.1 Υγρασία της *Reseda luteola*

Το περιεχόμενο του φυτού *Reseda luteola* βρίσκεται ίσο με 10,4% w/w (υγρή βάση) στο λεπτό κλάσμα και 9,2 % w/w στο ξυλώδες κλάσμα (υγρή βάση), Λαμβάνοντας υπόψιν την αναλογία των 2 κλασμάτων η συνολική υγρασία είναι ίση με 9,7% w/w σε υγρή βάση, που αποτελεί συνήθη τιμή για φυτικές πηγές.

4.3.2 Αποτίμηση περιεχομένου του λεπτού κλάσματος του φυτού

Το περιεχόμενο του λεπτού κλάσματος του φυτού, όπως αναφέρθηκε και στο Πειραματικό κομμάτι της Εργασίας, εξετάστηκε τέσσερις φορές. Τις πρώτες δύο έγινε εξαντλητική εκχύλιση με αργό ρυθμό προκειμένου να διαπιστωθεί αν η πηγή είναι επαρκής για την εκχύλιση λουτεολίνης σε μεγάλη ποσότητα, ενώ τις επόμενες έγινε μελέτη της κινητικής εκχύλισης.

Το περιεχόμενο του φυτού σε ολικές φαινόλες, αντιοξειδωτικά και ολικά στερεά για την εκχύλιση του λεπτού κλάσματος φαίνεται στους Πίνακες 4.5 και 4.6 που παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 4.5: Η απόδοση της εκχύλισης σε ολικά στερεά που προσδιορίστηκε με σταθμική ανάλυση.

Μονάδα μέτρησης ολικών στερεών	Λεπτό κλάσμα φυτού <i>Reseda luteola</i> L Αναλογία 1:20 (g πρώτης ύλης:mL διαλύτη)
Ολική συγκέντρωση στερεών (TSC) g TS/L extract	11 ± 1
Απόδοση εκχύλισης σε στερεά (TSY) mg TS/g material	210 ± 18

Πίνακας 4.6: Το περιεχόμενο του λεπτού κλάσματος σε ολικές φαινόλες.

Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες	Λεπτό κλάσμα του φυτού <i>Reseda luteola L</i> Αναλογία 1:20 (g πρώτης ύλης:mL διαλύτη)
Περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες (TPC) σε mg GAE/g υλικού	16 ± 3
Περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες σε % κατά βάρος (ισοδύναμα GAE)	1,6 ± 0,3
Εκλεκτικότητα (mg GAE/g TS)	77 ± 12
Περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες (TPC) σε mg LUT/g υλικού	20 ± 3
Περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες σε % κατά βάρος (ισοδύναμα LUT)	2,0 ± 0,3
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	98 ± 21

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων για την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινόλες (αναλυτικοί πίνακες στο Παράρτημα), προκύπτει ότι το φυτό *Reseda luteola* είναι σχετικά πλούσιο σε ολικές φαινόλες, έχοντας περιεκτικότητα σε TPC 1,6 % w/w ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) και 2,0 % w/w ως ισοδύναμα λουτεολίνης (LUT). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη επαρκούς ποσότητας λουτεολίνης καθώς και άλλων φλαβονοειδών στην εξεταζόμενη πρώτη ύλη, καθώς το λεπτό κλάσμα, το οποίο ποσοτικοποιείται πρώτο, αναμένεται να έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά από το ξυλώδες κλάσμα, το οποίο αντιστοιχεί στα φτωχότερα σε TPC και ολικά φλαβονοειδή υπέργεια μέρη του φυτού (κυρίως κλαδιά). Επίσης τα ολικά στερεά των εκχυλισμάτων παρουσιάζουν μεγαλύτερη μεν, αλλά συγκρίσιμη με το τελικό περιεχόμενο εκλεκτικότητα σε λουτεολίνη (77 mg GAE/g και 98 mg LUT/g). Αυτό οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη και άλλων χημικών ενώσεων στο φυτό, τα οποία δεν αποτελούν πολυφαινολικές ενώσεις όπως πολυσακχαρίτες και άλλα συστατικά που εμπεριέχονται στα φυτά. Παρόλα αυτά η εκλεκτικότητα του φυτού σε ολικές φαινόλες θεωρείται υψηλή, αγγίζοντας το 10% w/w των ολικών εκχυλιζόμενων στερεών μετρούμενη σε ισοδύναμα LUT.

Ανάλογη εικόνα λαμβάνεται και από την εξέταση του περιεχομένου του λεπτού φυτού σε αντιοξειδωτικά (αντιριζική ικανότητα) με τη μέθοδο DPPH, η οποία φαίνεται στον πίνακα 4.7, που παρατίθεται παρακάτω:

Πίνακας 4.7: Το περιεχόμενο του λεπτού κλάσματος σε αντιοξειδωτικά

Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά	Λεπτό κλάσμα του φυτού <i>Reseda luteola L</i> Αναλογία 1:20 (g πρώτης ύλης:mL διαλύτη)
Περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά (AC) σε mg TE/g υλικού	29 ± 4
Περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά σε % κατά βάρος (ισοδύναμα TE)	2,9 ± 0,4
Εκλεκτικότητα (mg TE/g TS)	148 ± 34
Περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά (AC) σε mg LUT/g υλικού	22 ± 3
Περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά σε % κατά βάρος (ισοδύναμα LUT)	2,2 ± 0,3
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	114 ± 22

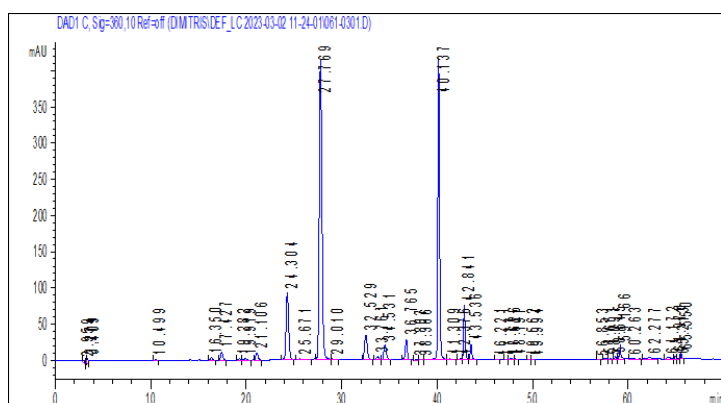
Παρατηρείται ότι τα αντιοξειδωτικά που μετρήθηκαν με τη μέθοδο DPPH στο φυτό είναι ελαφρώς περισσότερα από τις ολικές φαινόλες, το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχουν στο φυτό φαινολικές ενώσεις με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τη μέση δράση. Ως προς την περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά του φυτού, παρατηρείται ότι υπερβαίνει το 2 % κατά βάρος της συνολικής μάζας του, επομένως και αυτό αποτελεί σαφή ένδειξη ότι το περιεχόμενο σε λουτεολίνη αναμένεται να είναι υψηλότερο του ορίου που τέθηκε για να εξεταστεί το φυτό ως αξιόλογη πηγή του φλαβονοειδούς (0,5 % κατά βάρος). Η εκλεκτικότητα της εκχύλισης του λεπτού κλάσματος του φυτού σε αντιοξειδωτικά είναι επίσης ικανοποιητική, καθώς υπερβαίνει τα 100 mg/g ολικών στερεών, γεγονός το οποίο, όπως και για την περίπτωση των ολικών φαινολών, οφείλεται και στην μεγάλη απόδοση σε ολικά στερεά που προκύπτει από την εκχύλιση (192-228 mg TS/g πρώτης ύλης).

4.3.3 Εξέταση του περιεχομένου των τελικών εκχυλισμάτων με HPLC

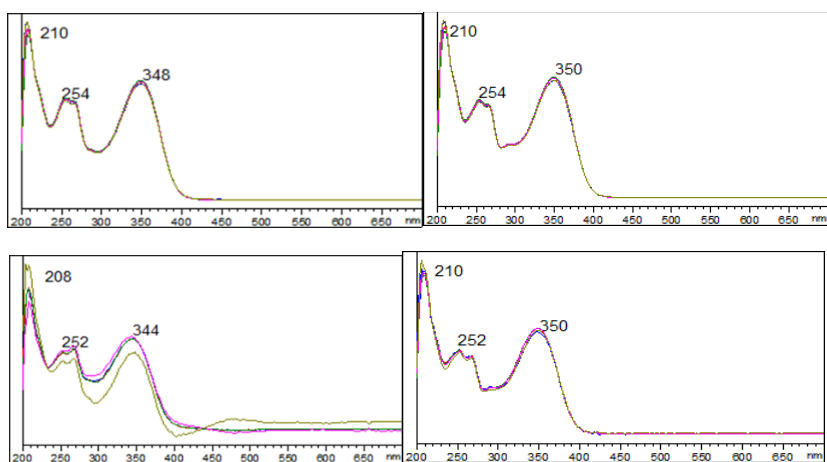
Η συνολική ποσότητα της λουτεολίνης αποτελεί το άθροισμα τεσσάρων παραγώγων της τα οποία αναγνωρίστηκαν από τα φάσματα των κορυφών τους που αναλύθηκαν με την μέθοδο HPLC-DAD. Τα παράγωγα που αναγνωρίστηκαν ήταν ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο οποίος αποτέλεσε την κύρια μορφή φλαβονοειδούς στο εκχύλισμα, η αγλυκόνη της λουτεολίνης, καθώς και άλλα δύο παράγωγα με φάσματα παρόμοια του φάσματος της λουτεολίνης, τα οποία αποτελούν πιθανώς παράγωγα της λουτεολίνης. Τα φάσματα και οι θέσεις τους στο χρωματογράφημα φαίνονται στον Πίνακα 4.8 και τις Εικόνες 4.3 και 4.4 που ακολουθούν.

Πίνακας 4.8: Οι μορφές της λουτεολίνης που ανιχνεύονται στο λεπτό κλάσμα του φυτού.

Μορφές της λουτεολίνης	Χρόνοι έκλυσης (min)
Λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης (Κυναροσίδη)	28
Λουτεολίνη	40
Παράγωγο 1	35
Παράγωγο 2	44



Εικόνα 4.3: Το χρωματογράφημα της μεθόδου HPLC για το εκχύλισμα του λεπτού κλάσματος του φυτού *Reseda luteola L.* σε μήκος κύματος 360 nm. Στο διάγραμμα φαίνονται οι δύο μεγαλύτερες κορυφές (27,8 min και 40,1 min) που αντιστοιχούν στην κυναροσίδη και την λουτεολίνη αντίστοιχα.



Εικόνες 4.4 (α-δ): Τα τέσσερα παράγωγα της λουτεολίνης: πάνω ο γλυκοζίτης κυναροσίδη (α) και η αγλυκόνη (β) και κάτω οι άλλοι δύο γλυκοζίτες, που επιδεικνύουν παρόμοια φάσματα.

Από τη σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (CAMEO Database), τα φάσματα και οι χρόνοι έκλυσης των δύο κύριων κορυφών ταυτίζονται με την κυναροσίδη και τη λουτεολίνη αντίστοιχα. Το δεύτερο παράγωγο που εμφανίζεται, σε χρόνο 44 min αντιστοιχεί στην χρυσοεριόλη, με βάση την το φάσμα και το χρόνο που εκλύεται. Το παράγωγο 1, θα μπορούσε να αντιστοιχεί στον 3'-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης, με βάση το χρόνο έκλυσής του (Moïtero et al, 2008). Στο φυτό περιέχεται ακόμη

απιγενίνη, τόσο ως αγλυκόνη (χρόνος έκλουσης 43 min), όσο και ως μορφή γλυκοζιτών (τα φάσματα και οι χρόνοι έκλουσης παρατίθενται στο Παράρτημα και στην Ενότητα 4.5).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με HPLC των εκχυλισμάτων του λεπτού κλάσματος του φυτού, αναδεικνύουν και την επάρκεια του σε λουτεολίνη, όπως φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 4.9:

Πίνακας 4.9: Τα ποσοτικά αποτελέσματα της ανάλυσης των εκχυλισμάτων του λεπτού κλάσματος του φυτού *Reseda luteola* ως προς την περιεκτικότητα του σε λουτεολίνη.

Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε λουτεολίνη	Λεπτό κλάσμα του φυτού <i>Reseda luteola</i>
Περιεκτικότητα σε λουτεολίνη (mgLUT/g υλικού)	14 ± 3
Περιεκτικότητα σε λουτεολίνη (% w/w LUT)	1,4 ± 0,3
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	69 ± 8

Από την μελέτη των ανωτέρω προκύπτει ότι το λεπτό κλάσμα είναι μια επαρκής πηγή λουτεολίνης υπερβαίνοντας κατά πολύ τον αρχικό στόχο που τέθηκε για την εξέταση του φυτού: 14 ± 3 mg LUT/g έναντι 5 mg LUT/g που ήταν ο αρχικός στόχος που είχε τεθεί, επιβεβαιώνοντας έτσι τη θεωρητική προσέγγιση της περιεκτικότητας των υπέργειων μερών σε μεγάλες ποσότητες λουτεολίνης. Επίσης το γεγονός ότι η διεργασία της εξαντλητικής εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου μπορεί να αποδώσει το αναμενόμενο περιεχόμενο σε λουτεολίνη ποσοτικά, οδηγεί στην επιβεβαίωση ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τεχνική εκχύλισης της λουτεολίνης αντί των τεχνικών της βιβλιογραφίας που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες όπως η μέθοδος Soxhlet. Η εκλεκτικότητα της εκχύλισης για την ανάκτηση της λουτεολίνης είναι επίσης υψηλή αγγίζοντας τα 70 mg LUT/g ξηρού τελικού εκχυλίσματος, δηλαδή το 7% της μάζας των ολικών στερεών του τελικού προϊόντος αποτελεί λουτεολίνη και γλυκοζίτες της. Διαπιστώνουμε δηλαδή ότι το φυτό *Reseda luteola* αποτελεί μια αξιόλογη πρώτη ύλη για παραλαβή λουτεολίνης, οπότε αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω ως προς την κινητική που διέπει τη διεργασία εκχύλισης.

Επιστρέφοντας στη μελέτη με HPLC, διαπιστώνεται ότι το κύριο παράγωγο της λουτεολίνης είναι ο γλυκοζίτης κυναροσίδη ακολουθούμενος από την αγλυκόνη της λουτεολίνης. Αυτές οι δύο μορφές αποτελούν και τα κύρια φλαβονοειδή στο φυτό. Ακόμη εντός του φυτού εκτός από τις μορφές αυτές αναγνωρίστηκαν ακόμη δύο παράγωγα λουτεολίνης, τα οποία συνυπολογίζονται στον προσδιορισμό περιεχομένου σε ολική λουτεολίνη, καθώς και αρκετά παράγωγα της απιγενίνης, τόσο ως αγλυκόνη, όσο και ως γλυκοζίτης. Ο γλυκοζίτης της κυναροσίδης ανέρχεται στο 55-60% της συνολικής περιεχόμενης λουτεολίνης στο φυτό (7,6-8,3 mg LUT/g υλικού) με την αγλυκόνη να αποτελεί το 33-38% (4,5-5,3 mg LUT/g υλικού). Συνεπώς για την παρασκευή συμπληρώματος διατροφής απαιτείται η υδρόλυση των γλυκοζιτών της λουτεολίνης.



Εικόνα 4.5: Το κονιοποιημένο λεπτό κλάσμα του φυτού *Reseda luteola L.*

4.3.4 Αποτίμηση του περιεχομένου ξυλώδους κλάσματος του φυτού σε ολικές φαινόλες και αντιοξειδωτικά

Η περιεκτικότητα των τμημάτων του φυτού που αντιστοιχεί στο ξυλώδες κλάσμα, σε ολικές φαινόλες, αντιοξειδωτικά και ολικά στερεά παρατίθεται στους πίνακες 4.10-4.12 που ακολουθούν.

Πίνακες 4.10-4.11: Η συνολική περιεκτικότητα του ξυλώδους κλάσματος σε ολικά στερεά και ολικές φαινόλες που υπολογίζεται από την ανάλυση των εκχυλισμάτων.

Μονάδα μέτρησης ολικών στερεών	Ξυλώδες κλάσμα φυτού <i>Reseda luteola L</i> Αναλογία 18:400 (g πρώτης ύλης:mL διαλύτη)
Ολική συγκέντρωση στερεών (TSC) g TS/L extract	6,6 ± 1,8
Απόδοση εκχύλισης σε στερεά (TSY) mg TS/g material	146 ± 39

Περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες	Ξυλώδες κλάσμα του φυτού <i>Reseda luteola L.</i> Αναλογία 18:400 (g material/mL μεθανόλης)
Περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες (TPC) σε mg GAE/g υλικού	12 ± 0,1
Περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες σε % κατά βάρος (ισοδύναμα GAE)	1,2 ± 0,01
Εκλεκτικότητα (mg GAE/g TS)	86 ± 23
Περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες (TPC) σε mg LUT/g υλικού	15 ± 0,1
Περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες σε % κατά βάρος (ισοδύναμα LUT)	1,5 ± 0,01
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	104 ± 27

Πίνακας 4.12: Η συνολική περιεκτικότητα του ξυλώδους κλάσματος σε αντιοξειδωτικά που υπολογίζεται από την ανάλυση των εκχυλισμάτων.

Περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά	Ξυλώδες κλάσμα του φυτού <i>Reseda luteola</i> L. 18:400 (g πρώτης ύλης:mL διαλύτη)
Περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά (TAC) σε mg TE/g υλικού	20 ± 1
Περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά σε % κατά βάρος (ισοδύναμα TE)	2,0 ± 0,1
Εκλεκτικότητα (mg TE/g TS)	148 ± 34
Περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά (TAC) σε mg LUT/g υλικού	14 ± 0,3
Περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά σε % κατά βάρος (ισοδύναμα LUT)	1,4 ± 0,03
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	81 ± 22

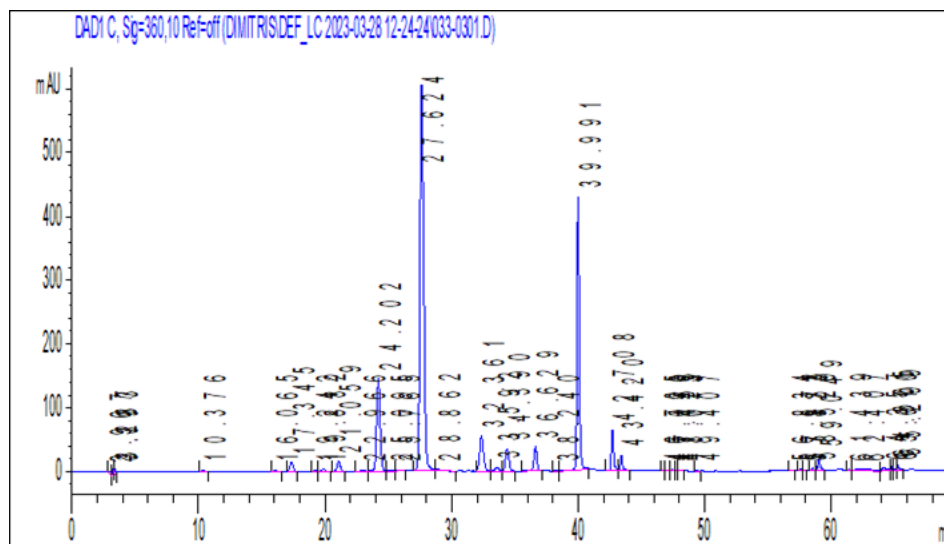
Από τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει ότι το περιεχόμενο του ξυλώδους κλάσματος τόσο σε ολικές φαινόλες, όσο και σε αντιοξειδωτικά είναι μικρότερο του περιεχομένου του λεπτού κλάσματος. Συγκεκριμένα, στο λεπτό κλάσμα η περιεκτικότητα σε TPC είναι ίση με 20 ± 3 mg LUT/g material έναντι $15 \pm 0,1$ mg LUT/g material για το ξυλώδες κλάσμα, ενώ για τα αντιοξειδωτικά το φυτώδες κλάσμα περιέχει 22 ± 3 mg LUT/g material έναντι 14 ± 1 mg LUT/g material για το ξυλώδες. Αυτό πρακτικά επιβεβαιώνει την αρχική εκτίμηση που προβλέπει ότι το λεπτό κλάσμα, στο οποίο εμπεριέχεται το φυτώδες των υπέργειων τμημάτων (φύλλα, άνθη κλπ) είναι πλουσιότερο σε βιοδραστικά συστατικά, χωρίς να σημαίνει ότι το ξυλώδες κλάσμα δεν αποτελεί αξιόπιστη πηγή βιοδραστικών συστατικών. Οι εκλεκτικότητες και για τα δύο εκχυλίσματα είναι περίπου οι ίδιες, τόσο ως προς την εκχύλιση σε αντιοξειδωτικά, όσο και ως προς την εκχύλιση TPC, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην περιεκτικότητα ολικών στερεών των δύο πηγών, η οποία για την εκχύλιση του λεπτού κλάσματος είναι σημαντικά μεγαλύτερη. Ωστόσο για να κριθεί αν τα υπέργεια ξυλώδη τμήματα του φυτού υστερούν σημαντικά των αντίστοιχων μη ξυλωδών τμημάτων, πρέπει να εξεταστεί και το περιεχόμενο σε λουτεολίνη.

4.3.5 Αποτίμηση του περιεχομένου του ξυλώδους κλάσματος του φυτού σε λουτεολίνη-Συνολική αποτίμηση της πηγής σε λουτεολίνη

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC για τα ξυλώδη μέρη του φυτού φαίνεται στον Πίνακα 4.13 που ακολουθεί:

Πίνακας 4.13: Τα ποσοτικά αποτελέσματα της ανάλυσης των εκχυλισμάτων του ξυλώδους κλάσματος του φυτού *Reseda luteola* ως προς την περιεκτικότητα του σε λουτεολίνη.

Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε λουτεολίνη	Ξυλώδες κλάσμα του φυτού <i>Reseda luteola</i> L.
Περιεκτικότητα σε λουτεολίνη (mgLUT/g υλικού)	11 ± 0,1
Περιεκτικότητα σε λουτεολίνη (% w/w LUT)	1,1 ± 0,01
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	67 ± 0,1



Εικόνα 4.6: Το χρωματογράφημα της μεθόδου HPLC για την ανάλυση του εκχυλίσματος του ξυλώδους κλάσματος στα 360 nm.

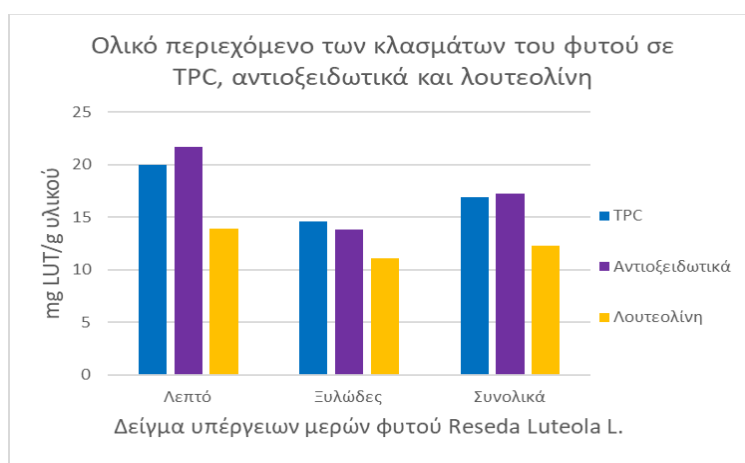
Από την εξέταση του εκχυλίσματος του ξυλώδους κλάσματος, παρατηρείται αρχικά ότι το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος τόσο για τα 360 nm, όσο και για τα υπόλοιπα μήκη κύματος εμφανίζει ίδιο προφίλ φλαβονοειδών με το λεπτό κλάσμα, επομένως μπορεί να εξαχθεί εύκολα ότι οι μορφές λουτεολίνης και γενικά φλαβονοειδών που απαντώνται στα δύο κλάσματα ταυτίζονται μεταξύ τους. Επίσης μελετώντας ποσοτικά το περιεχόμενο του ξυλώδους κλάσματος σε λουτεολίνη, αυτό προκύπτει ίσο με $11 \pm 0,1$ mg LUT/g υλικού, μικρότερο από το περιεχόμενο του λεπτού κλάσματος (14 ± 3 mg LUT/g material), αλλά όχι σημαντικά. Το ίδιο ισχύει και με την εκλεκτικότητα της εκχύλισης λουτεολίνης από το ξυλώδες κλάσμα, η οποία υπολογίζεται στο $67 \pm 0,1$ mg LUT/g TS παρόμοια με τα 69 ± 8 mg LUT/g TS του λεπτού κλάσματος. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί ότι και το ξυλώδες μέρος του φυτού αποτελεί μια αξιόλογη πηγή λουτεολίνης, συνεπώς θα μπορούσε να εκχυλιστεί από κοινού με το λεπτό μέρος.

Αποτιμώντας από κοινού το περιεχόμενο σε λουτεολίνη, TPC και αντιοξειδωτικά για τα 2 κλάσματα του φυτού *Reseda luteola* L., γνωρίζοντας και την αναλογία των δύο κλασμάτων στο φυτό (43-57 % κβ) υπολογίζεται το συνολικό περιεχόμενο σε λουτεολίνη ως εξής:

Πίνακας 4.14: Η περιεχόμενη λουτεολίνη στα υπέργεια μέρη του φυτού *Reseda luteola* L.

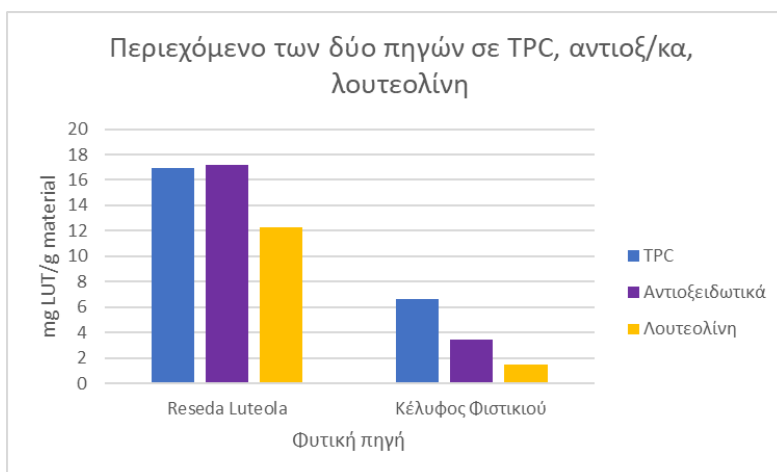
Ποσοτικοί προσδιορισμοί στο φυτό <i>Reseda luteola</i>	Λεπτό Κλάσμα (42,7%)	Ξυλώδες κλάσμα (57,3%)	Σύνολο υπέργειων μερών
TPC (mgGAE/g material)	16	12	14
TPC (mgLUT/g material)	20	15	17
AC (mgTE/g material)	29	20	24
AC (mgLUT/g material)	22	14	17
Λουτεολίνη (mgLUT/g material)	14	11	12

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι το περιεχόμενο των υπέργειων τμημάτων του φυτού σε λουτεολίνη είναι ίσο με 12 mg LUT/g υλικού (ή 1,2 % w/w σε LUT) μεγαλύτερο από το στόχο του 0,5 % w/w που είχε τεθεί εξαρχής. Το περιεχόμενο του φυτού σε βιοδραστικά συστατικά συνεπώς, αποτιμάται στο Διάγραμμα 4.1, τόσο συνολικά, όσο και για κάθε κλάσμα του φυτού ξεχωριστά:



Διάγραμμα 4.1: Το περιεχόμενου του λεπτού και του ξυλώδους κλάσματος, καθώς και του συνόλου τους ως προς TPC, αντιοξειδωτικά και λουτεολίνη σε mg LUT/g.

Ενώ στο διάγραμμα 4.2 συγκρίνεται το συνολικό αποτέλεσμα για τα υπέργεια μέρη του φυτού *Reseda luteola* L. με το περιεχόμενο του κελύφους φιστικιού που παράχθηκε ως παραπροϊόν της βιομηχανίας επεξεργασίας του καρπού της αραχίδας:



Διάγραμμα 4.2: Το περιεχόμενο των υπέργειων μερών του φυτού *Reseda luteola* L. και του κελύφους της αραχίδας ως προς TPC, αντιοξειδωτικά και λουτεολίνη σε mg LUT/g.

Από το διάγραμμα 4.2 φαίνεται η ξεκάθαρη υπεροχή του φυτού *Reseda luteola* ως προς το περιεχόμενο σε βιοδραστικά συστατικά έναντι του κελύφους του φιστικιού, το οποίο έχει το 8 φορές μικρότερο περιεχόμενο σε TPC, αντιοξειδωτικά και λουτεολίνη από την ρεζεντά.

4.4 Μελέτη της κινητικής της εκχύλισης των κλασμάτων του φυτού *Reseda luteola* L.

4.4.1 Μελέτη της κινητικής της εκχύλισης του λεπτού κλάσματος

Το κινητικό πείραμα για τα μέρη του λεπτού κλάσματος του φυτού *Reseda luteola* πραγματοποιήθηκε σε χρόνο από 0-105 min, όσο απαιτούνταν περίπου για να εκχυλιστούν τα πρώτα 300 mL από το φυτό, διάστημα στο οποίο εκτιμάται ότι έχει εξαντληθεί η περιεχόμενη ποσότητα σε λουτεολίνη. Η εξίσωση της κινητικής προσδιορίζεται με βάση τον απλοποιημένο δεύτερο νόμο του Fick:

$$\ln(C_{inf} - C_t) = k * t + b \quad (I)$$

Όπου C_{inf} η μέση απόδοση μιας βιοδραστικής ένωσης που εκχυλίζεται από το κλάσμα του φυτού και C_t η απόδοση της ίδιας βιοδραστικής ένωσης για χρόνο t . Το C_{inf} είναι το ίδιο για τα δύο εκχυλίσματα και αντιστοιχεί στην μέγιστη συγκέντρωση που εκχυλίζεται από ένα κλάσμα και έχει προσδιοριστεί από την εξαντλητική εκχύλιση, διορθωμένη ως εξής:

$$C_{inf} = \frac{(C_t * V_t + (\sum_1^n dc * V_{\text{δείγματος}}))}{V_t + n * V_{\text{δείγματος}}} * \frac{V_t}{m * 1000 \text{ ml}} \quad (II)$$

Όπου ισχύουν τα εξής:

C_t → Η μέση συγκέντρωση ενός εκχυλίσματος που προκύπτει από τους ποσοτικούς προσδιορισμούς μιας ένωσης σε mg/L.

V_t → Ο όγκος του τελικού εκχυλίσματος (400 mL για το ξυλώδες κλάσμα, 380 mL για το λεπτό κλάσμα)

$V_{\text{δείγματος}}$ → Σταθερό και ίσο με 1 mL.

$m \rightarrow$ Η μάζα της πρώτης ύλης σε g (18 g για το ξυλώδες κλάσμα, 19 g για το λεπτό κλάσμα).

$dc \rightarrow$ Η συγκέντρωση κάθε δείγματος της κινητικής ανάλυσης από την εξέταση σε TPC και λουτεολίνη εκφρασμένη σε mg LUT/L.

$n \rightarrow$ Ο αριθμός των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν (11 για τη μελέτη της κινητικής των TPC, 7 για τη μελέτη της κινητικής της λουτεολίνης).

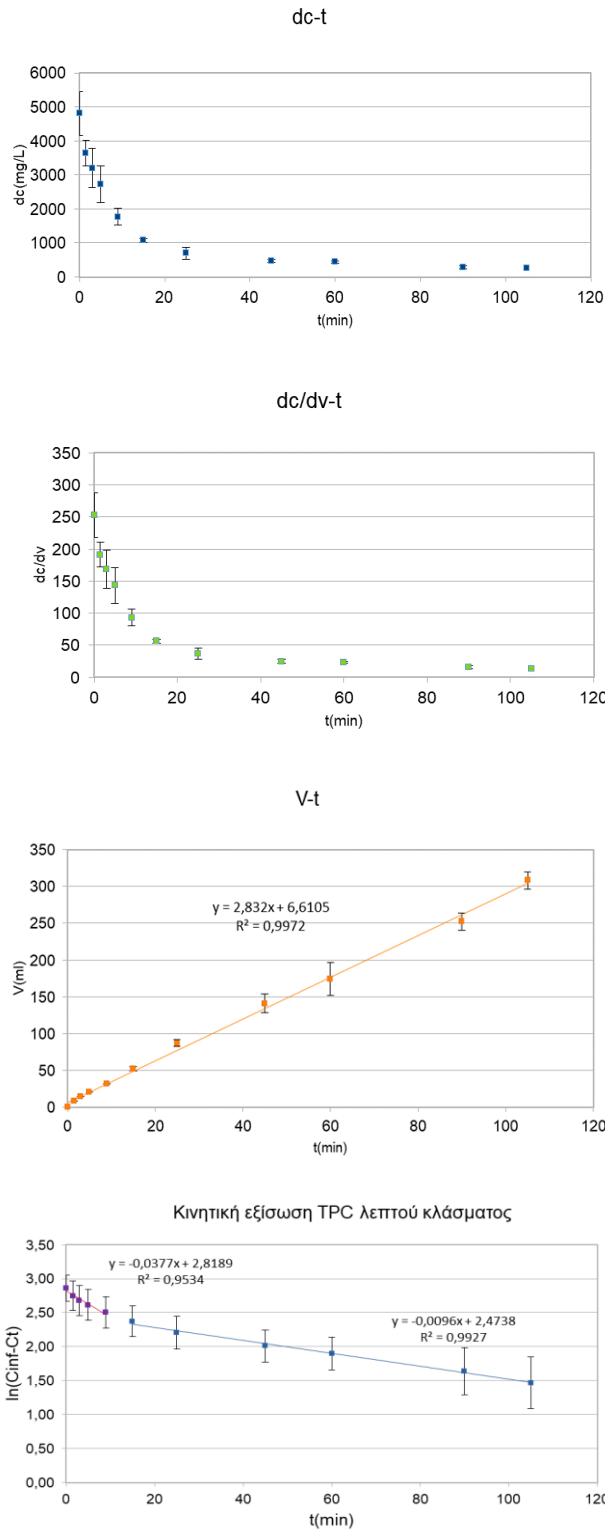
Για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυτικές πηγές εμφανίζονται δύο στάδια, το πρώτο στάδιο στο οποίο υπάρχει γρήγορη εκχύλιση των συστατικών από την φυτική πηγή (στάδιο έκπλυσης) και το δεύτερο στάδιο το οποίο ο διαλύτης διεισδύει στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων για να εκχυλίσει τα βιοδραστικά συστατικά, το οποίο είναι το αργό στάδιο της διεργασίας και κατά το οποίο το περιεχόμενο σε βιοδραστικά συστατικά εκχυλίζεται εξαντλητικά από την πρώτη ύλη (στάδιο διάχυσης). Η αναλογία των ρυθμών των 2 σταδίων ($k_1:k_2$) σε αντίστοιχες διεργασίες εκχύλισης TPC από φυτικές πηγές (ρίγανη και δεντρολίβανο) είναι από 3:1-8:1 και στις περισσότερες περιπτώσεις συνεπάγεται την εκχύλιση της πλειοψηφίας των περιεχομένων συστατικών κατά το στάδιο της έκπλυσης. Αυτό βέβαια μπορεί να εξαρτηθεί και από άλλους παράγοντες, όπως το κατά πόσο διαθέσιμα προς εκχύλιση είναι κατά το στάδιο της έκπλυσης τα βιοδραστικά συστατικά, καθώς τυχόν δέσμευση τους στο εσωτερικό της κυτταρικής δομής συνεπάγεται την μικρή επίδραση της έκπλυσης στην τελική εκχύλιση (Oreopoulou et al 2020, Psarrou et al, 2020).

Με βάση τη σχέση (II) για το λεπτό κλάσμα παρατίθενται τα αποτελέσματα που χρησιμοποιούνται στην μελέτη της κινητικής της εκχύλισης TPC από το λεπτό κλάσμα.

Πίνακας 4.15: Τα αποτελέσματα για την συγκέντρωση των δειγμάτων, την μεταβολή της συγκέντρωσης συναρτήσει του όγκου, τον όγκο του εκχυλίσματος και τον λογάριθμο της διαφοράς $C_{inf}-C_t$ για κάθε χρονική στιγμή από 0-105 min που εξετάστηκε για την μελέτη της κινητικής σε TPC του λεπτού κλάσματος.

t (min)	dc (mg LUT/L)	(dc/dv) (mg/g*L)	ln($C_{inf}-C_t$)	V (mL)
0	4804 ± 655	253 ± 35	2,9 ± 0,1	0
1,5	3635 ± 374	191 ± 20	2,8 ± 0,2	8
3	3203 ± 567	169 ± 30	2,7 ± 0,2	14
5	2724 ± 530	143 ± 28	2,6 ± 0,2	20
9	1765 ± 246	93 ± 13	2,5 ± 0,2	32
15	1070 ± 52	56 ± 3	2,4 ± 0,2	52 ± 3
25	698 ± 169	37 ± 9	2,2 ± 0,2	87 ± 4
45	472 ± 52	25 ± 3	2,0 ± 0,2	141 ± 13
60	439 ± 33	23 ± 2	1,9	174 ± 23
90	288 ± 48	15 ± 3	1,6	252 ± 11
105	260 ± 42	14 ± 2	1,4	308 ± 11

Τα διαγράμματα της μελέτης των κινητικών φαίνονται παρακάτω:

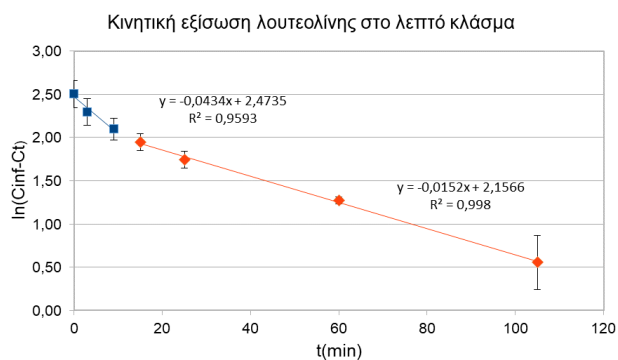
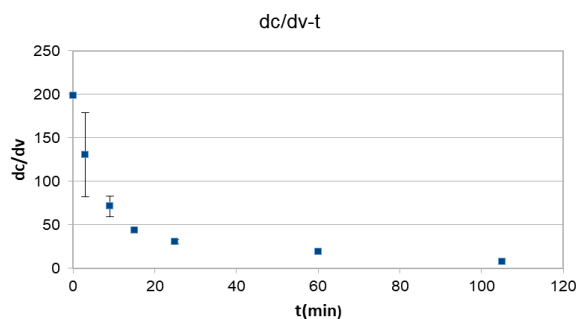
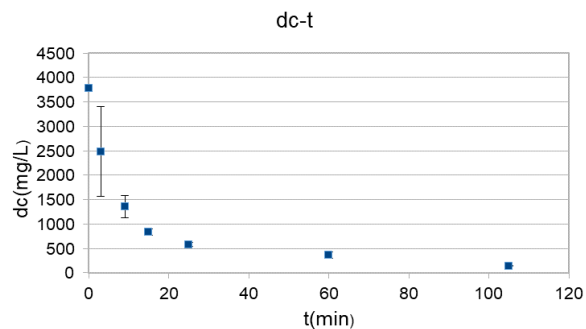


Διαγράμματα 4.3 (α-δ): Η κινητική μελέτη του φυτού *Reseda luteola L.* ως προς το λεπτό κλάσμα, για την εξέλιξη της συγκέντρωσης TPC με το χρόνο (σε mg LUT/L-α), του ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης ως προς τον όγκο (dc/dv-β), του όγκου εκχυλίσματος ως προς το χρόνο (γ), και της υπολειμματικής συγκέντρωσης του μητρικού υλικού ως προς το χρόνο (δ-Κινητική εξίσωση TPC). Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το εύρος της τιμής του κατακόρυφου άξονα για κάθε χρονική στιγμή.

Αντίστοιχα, για την κινητική εξίσωση της λουτεολίνης ως προς το χρόνο επιλέχθηκε η μελέτη των χρόνων 0,3,9,15,25,60,105 min και αναλύθηκε το περιεχόμενο των κινητικών δειγμάτων στην HPLC, για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση σε λουτεολίνη. Επιλύοντας με βάση τη σχέση (II) για το λεπτό κλάσμα υπολογίζονται τα δεδομένα υπολογισμού των κινητικών σχέσεων για την εκχύλιση της λουτεολίνης.

Πίνακας 4.16: Τα αποτελέσματα για την συγκέντρωση των δειγμάτων, την μεταβολή της συγκέντρωσης συναρτήσει του όγκου, τον όγκο του εκχυλίσματος και τον λογάριθμο της διαφοράς $C_{inf}-C_t$ για κάθε χρονική στιγμή από 0-105 min που εξετάστηκε με τη μέθοδο HPLC για την κινητική μελέτη της λουτεολίνης του λεπτού κλάσματος.

t (min)	dc (mg/L)	dc/dv (mg/g*L)	V (mL)	ln(C_{inf}-C_t)
0	3780 ± 68	199 ± 4	0	2,5 ± 0,2
3	2482 ± 917	131 ± 48	14	2,3 ± 0,2
9	1355 ± 229	71 ± 12	32	2,1 ± 0,1
15	829 ± 65	44 ± 3	52 ± 3	2,0 ± 0,1
25	582 ± 43	31 ± 2	87 ± 4	1,7 ± 0,1
60	360 ± 61	19 ± 3	174 ± 23	1,3 ± 0,0
105	144 ± 15	7,6 ± 0,8	308 ± 11	0,6 ± 0,3



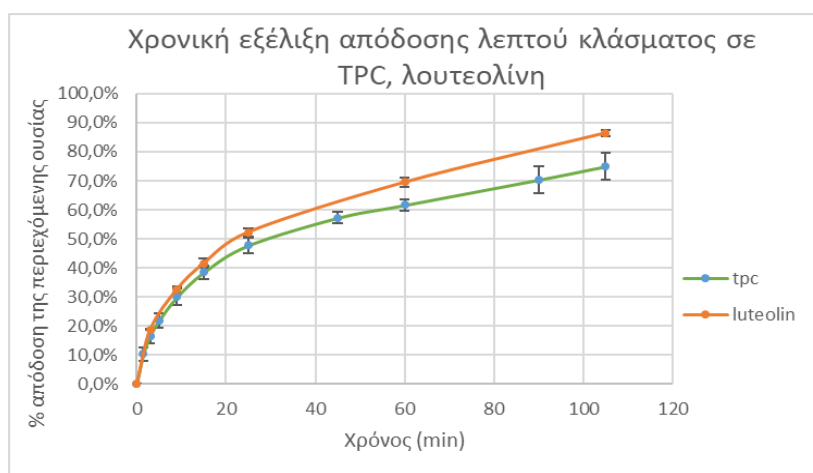
Διαγράμματα 4.4 (α-γ): Η κινητική μελέτη του φυτού *Reseda luteola L.* ως προς το λεπτό κλάσμα, για την εξέλιξη της συγκέντρωσης λουτεολίνης με το χρόνο (σε mg LUT/L-α), του ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης ως προς τον όγκο (dc/dv-β), και της υπολειμματικής συγκέντρωσης του μητρικού υλικού ως προς το χρόνο (γ-Κινητική εξίσωση λουτεολίνης). Οι γραμμικές σφάλματος υποδηλώνουν το εύρος της τιμής στον κατακόρυφο άξονα για κάθε χρονική στιγμή.

Από τα διαγράμματα 4.3 (δ) και 4.4 (γ) προκύπτει ότι για την κινητική του λεπτού κλάσματος του φυτού προκύπτουν δύο στάδια, το πρώτο στάδιο που αντιπροσωπεύει την έκπλυση και το δεύτερο στάδιο που αντιπροσωπεύει την διάχυση και τα άλλα φαινόμενα μεταφοράς. Το πρώτο στάδιο διαρκεί για χρόνο περίπου 11', με το δεύτερο να έπεται μέχρι το τέλος της κινητικής μελέτης της εκχύλισης. Οι αναλογίες k1:k2 των ρυθμών έκπλυσης και διάχυσης είναι περίπου ίσες με 4:1 για την εκχύλιση TPC και 3:1 για την εκχύλιση της λουτεολίνης, στα χαμηλά επίπεδα της βιβλιογραφικής αναλογίας για αντίστοιχες διεργασίες. Φαίνεται εδώ ότι η εκχύλιση των TPC και της λουτεολίνης από την ρεζεντά ενδέχεται να καθορίζεται από το 2ο στάδιο στο λεπτό κλάσμα και όχι από το 1ο. Η παραδοχή αυτή επιβεβαιώνεται μελετώντας το ποσοστό του ολικού περιεχομένου σε ολικές φαινόλες και λουτεολίνη στους χρόνους που μελετώνται με τις δύο μεθόδους.

Πίνακες 4.17-4.18: Η απόδοση σε % TPC και % λουτεολίνη που εκχυλίζονται κατά το κινητικό πείραμα του λεπτού κλάσματος.

t(min)	% απόδοση επί των TPC	% Τυπική απόκλιση
0	0,0	0,0
1,5	10	2,3
3	17	2,6
5	22	2,7
9	30	2,8
15	38	2,3
25	48	2,6
45	57	1,9
60	62	1,9
90	70	4,6
105	75	4,7

t(min)	% απόδοση λουτεολίνης	% Τυπική απόκλιση
0	0,04	0,00
3	19	0,01
9	33	1,1
15	42	1,6
25	52	1,4
60	70	1,8
105	87	1,1



Διάγραμμα 4.5: Η εξέλιξη της απόδοσης σε TPC, λουτεολίνη για την εκχύλιση του λεπτού κλάσματος. Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το εύρος της τιμής στον κατακόρυφο άξονα για κάθε χρονική στιγμή.

Από το Διάγραμμα 4.5 φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια της έκπλυσης, δηλαδή τα πρώτα 9 λεπτά της εκχύλισης, μόνο το 30% του περιεχομένου του λεπτού κλάσματος σε ολικές φαινόλες και το 33% σε λουτεολίνη έχει εκχυλιστεί, επομένως η έκπλυση δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση της λουτεολίνης από τη ρεζεντά καθώς αυτή βρίσκεται στο εσωτερικό της δομής των φυτικών κυττάρων. Διαφαίνεται άρα ότι το σημείο διακοπής της εκχύλισης για την ανάκτηση επαρκούς ποσοστού λουτεολίνης από το φυτό βρίσκεται εντός του σταδίου διάχυσης, κάτι που μένει να επιβεβαιωθεί και από την κινητική μελέτη του ξυλώδους κλάσματος.

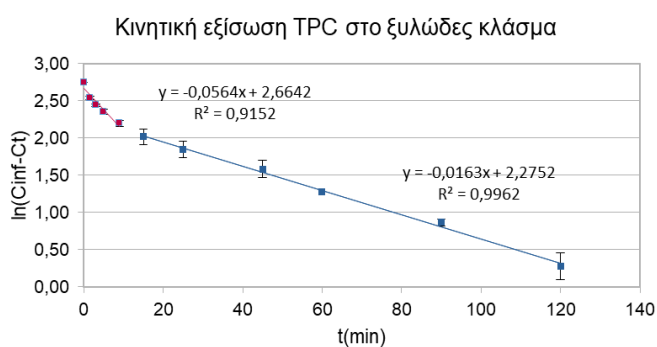
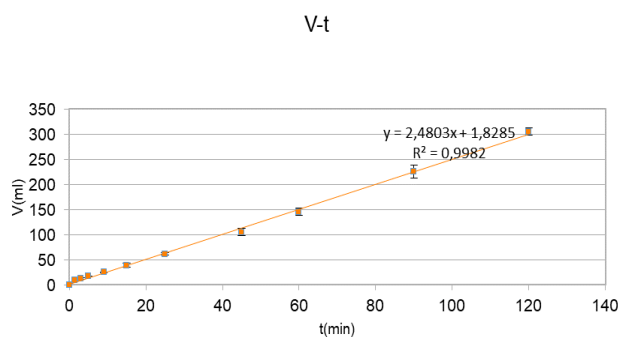
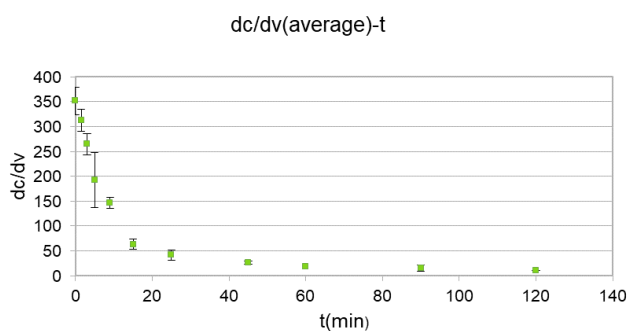
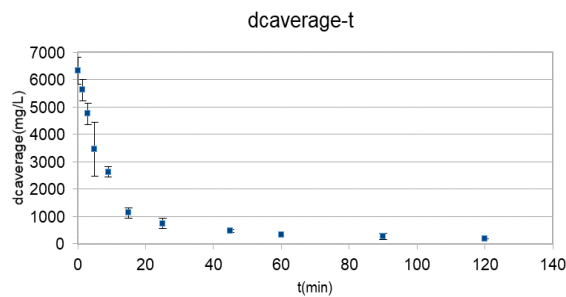
Το άλλο σημαντικό που παρατηρείται είναι ότι για χρόνο 105 min έχει εκχυλιστεί το 87% της λουτεολίνης και το 73% των ολικών φαινόλων. Επομένως η διεργασία εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου σταθερής κλίνης είναι μια επιτυχής συμβατική εναλλακτική σε σύγκριση με τις άλλες συμβατικές μεθόδους, εκχυλίζοντας εξαντλητικά το περιεχόμενο σε μικρότερο χρόνο και θερμοκρασία σε σύγκριση με τις μεθόδους εκχύλισης Soxhlet και διαβροχής, ενώ η αναλογία της μάζας της πρώτης ύλης προς τον όγκο του διαλύτη είναι ελαφρώς μεγαλύτερη της θεωρητικά υπολογιζόμενης για τη μέθοδο Soxhlet (Burger et al, 2017) σε διάρκεια 105 min, που συνεπάγεται μικρότερη κατανάλωση διαλύτη. Μια πιο αποδοτική διεργασία θα μπορούσε να σταματάει ακόμη και στη 1 h, όπου εκχυλίζεται το 70% της λουτεολίνης του λεπτού κλάσματος, ενώ η αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς διαλύτη προσεγγίζει το 1:9 (g πρώτης ύλης:mL διαλύτη).

4.4.2 Μελέτη της κινητικής της εκχύλισης του ξυλώδους κλάσματος

Αρχικά υπολογίζεται το C_{inf} για τα ξυλώδη τμήματα του φυτού από τη σχέση (II), αντικαθιστώντας στη σχέση (II) το C_t με 14,8 mg LUT/g υλικού για τις ολικές φαινόλες και 11 mg LUT/g υλικού για την λουτεολίνη που αντιστοιχεί με το μέσο όρο των συγκεντρώσεων των τελικών εκχυλισμάτων από τις εξαντλητικές εκχυλίσεις. Τα αποτελέσματα για την κατασκευή των κινητικών σχέσεων, για τις ολικές φαινόλες παρατίθενται παρακάτω, στον Πίνακα 4.19 και τα Διαγράμματα 4.6.

Πίνακας 4.19: Τα αποτελέσματα για την συγκέντρωση των δειγμάτων, την μεταβολή της συγκέντρωσης συναρτήσει του όγκου, τον όγκο του εκχυλίσματος και τον λογάριθμο της διαφοράς $C_{inf}-C_t$ για κάθε χρονική στιγμή που εξετάστηκε για την μελέτη της κινητικής σε TPC του ξυλώδους κλάσματος.

t(min)	dc (mg/L)	(dc/dv) (mg/g*L)	V (mL)	ln($C_{inf}-C_t$)
0	6331 ± 491	352 ± 27	0,00	2,8 ± 0,0
1,5	5625 ± 387	313 ± 22	9,0 ± 1,4	2,5 ± 0,02
3	4761 ± 389	265 ± 22	13 ± 1	2,4 ± 0,02
5	3465 ± 984	192 ± 55	18 ± 0,01	2,4 ± 0,03
9	2634 ± 194	146 ± 11	25 ± 1	2,2 ± 0,04
15	1135 ± 189	63 ± 11	39 ± 4	2,0 ± 0,1
25	748 ± 187	42 ± 10	61 ± 2	1,9 ± 0,1
45	481 ± 55	27 ± 2	105 ± 7	1,6 ± 0,1
60	344	19	146 ± 8	1,3
90	281 ± 112	16 ± 6	226 ± 13	0,9 ± 0,1
120	191 ± 9	11 ± 1	305 ± 7	0,3 ± 0,2

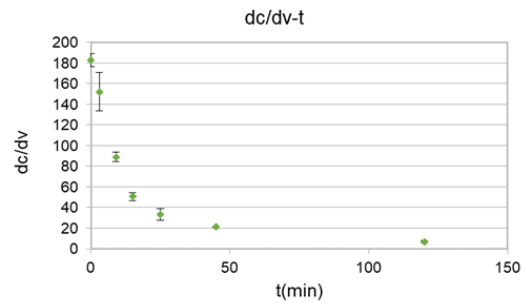
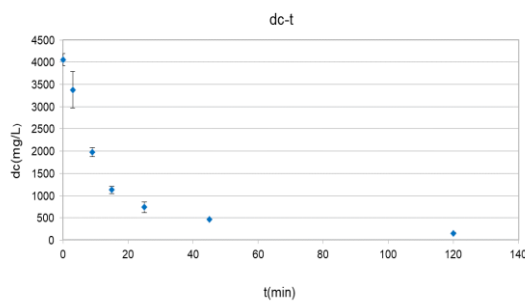


Διαγράμματα 4.6(α-δ): Η κινητική μελέτη του φυτού *Reseda luteola* L. ως προς το ξυλώδες κλάσμα για τον όγκο του τελικού εκχυλίσματος για τη μεταβολή της συγκέντρωσης με το χρόνο (α), τον ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης με τον όγκο ως προς το χρόνο (β), ως προς το χρόνο (γ), και της υπολειμματικής συγκέντρωσης του μητρικού υλικού ως προς το χρόνο (δ-Κινητική εξίσωση TPC). Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το εύρος της τιμής στον κατακόρυφο άξονα για κάθε χρονική στιγμή.

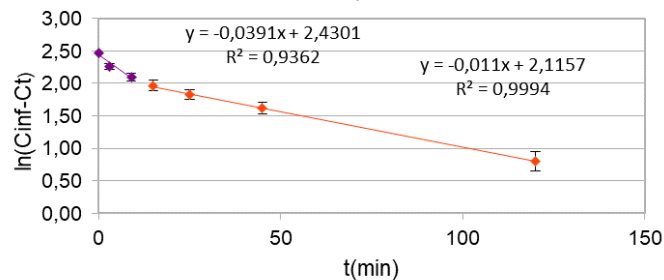
Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθείται και για τον υπολογισμό της κινητικής σχέσης της λουτεολίνης στο ξυλώδες κλάσμα:

Πίνακας 4.20: Τα αποτελέσματα για την συγκέντρωση των δειγμάτων, την μεταβολή της συγκέντρωσης συναρτήσει του όγκου, τον όγκο του εκχυλίσματος και τον λογάριθμο της διαφοράς C_{inf}-C_t για κάθε χρονική στιγμή από 0-120 min που εξετάστηκε με τη μέθοδο HPLC για την κινητική μελέτη της λουτεολίνης του ξυλώδους κλάσματος.

t(min)	dc (mgLUT/L)	dc/dv (mg/g*L)	V (mL)	ln(C _{inf} -C _t)
0	4061 ± 139	183 ± 6	0	2,5 ± 0,0
3	3378 ± 412	152 ± 19	13	2,3 ± 0,04
9	1977 ± 99	89 ± 5	25	2,1 ± 0,1
15	1128 ± 87	56 ± 4	39	2,0 ± 0,1
25	739 ± 119	36 ± 4	62	1,8 ± 0,1
45	469 ± 8	21 ± 0,4	105	1,6 ± 0,1
120	155 ± 17	7,0 ± 0,7	305	0,7 ± 0,2



Κινητική εξίσωση λουτεολίνης για το ξυλώδες κλάσμα



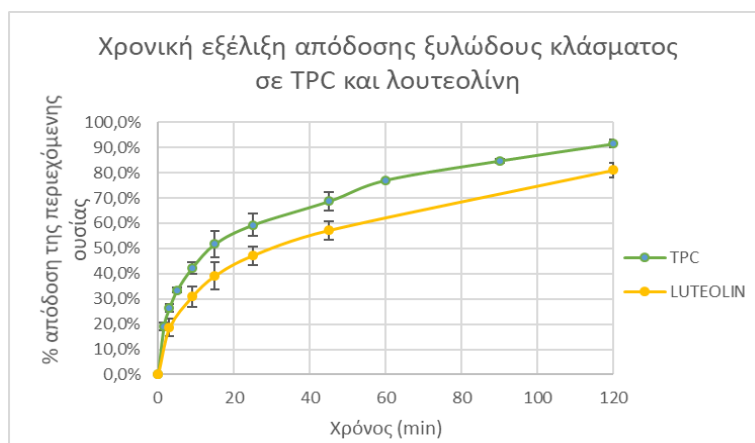
Διαγράμματα 4.7 (α-γ): Η κινητική μελέτη του φυτού *Reseda luteola* L. ως προς το ξυλώδες κλάσμα, για την εξέλιξη της συγκέντρωσης λουτεολίνης με το χρόνο (σε mg LUT/L-α), του ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης ως προς τον όγκο (dc/dv-β), και της υπολειμματικής συγκέντρωσης του μητρικού υλικού ως προς το χρόνο (γ-Κινητική εξίσωση λουτεολίνης). Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το εύρος της τιμής στον κατακόρυφο άξονα για κάθε χρονική στιγμή.

Αντίστοιχα παρατίθενται στους Πίνακες 4.21 και 4.22 τα δεδομένα της % ανάκτησης του συνολικού περιεχομένου σε TPC και λουτεολίνη από το ξυλώδες κλάσμα για τον χρόνο που μελετήθηκε η εκχύλιση.

Πίνακες 4.21-4.22: Η απόδοση σε % TPC και % λουτεολίνη που εκχυλίζονται κατά το κινητικό πείραμα του ξυλώδους κλάσματος.

t(min)	απόδοση επί των TPC	Τυπική απόκλιση
0	0,0%	0,0%
1,5	19%	1,6%
3	26%	1,6%
5	33%	1,0%
9	42%	2,4%
15	52%	5,2%
25	59%	4,5%
45	69%	3,7%
60	77%	0,0%
90	85%	0,7%
120	92%	1,5%

t(min)	% απόδοση επί της λουτεολίνης	% Τυπική απόκλιση
0	0%	0%
3	19%	3%
9	31%	4%
15	39%	5%
25	47%	4%
45	57%	4%
120	81%	3%



Διάγραμμα 4.8: Η εξέλιξη της απόδοσης σε TPC, λουτεολίνη για την εκχύλιση του ξυλώδους κλάσματος. Οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν το εύρος της τιμής στον κατακόρυφο άξονα για κάθε χρονική στιγμή.

Από τα διαγράμματα 4.6 (δ) και 4.7 (γ) προκύπτει ότι και στην εκχύλιση του ξυλώδους κλάσματος η κινητική της εκχύλισης TPC και λουτεολίνης εμφανίζει τα στάδια έκπλυσης και διάχυσης για το ίδιο ακριβώς χρονικό διάστημα με το λεπτό κλάσμα, δηλαδή η έκπλυση εμφανίζεται στα πρώτα 9 λεπτά της διεργασίας και έπεται το στάδιο της διάχυσης, που καθορίζεται από την σημαντική μεταφορά μάζας. Από την προσαρμογή των δεδομένων για την κατασκευή των κινητικών σχέσεων προκύπτει ότι η αναλογία των ρυθμών $k_1:k_2$ για τους ρυθμούς έκπλυσης και διάχυσης από την εκχύλιση TPC από το ξυλώδες κλάσμα ανέρχεται στο 4:1 που είναι η ίδια με την αναλογία εκχύλισης TPC από το λεπτό κλάσμα. Για την εκχύλιση της λουτεολίνης από τα ξυλώδη η αναλογία αυτή ανεβαίνει στο 7:2, ελάχιστα αυξημένη σε σχέση με την αναλογία στην εκχύλιση λουτεολίνης από το λεπτό κλάσμα (3:1). Συνεπώς παρατηρείται και εδώ ότι η αναλογία μεταξύ των δύο σταδίων είναι γενικά χαμηλή σε σχέση με τη συνήθη αναλογία για εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από άλλες φυτικές πηγές (3-8:1) που εμφανίζεται στη βιβλιογραφία (Oreopoulou et al 2020, Psarrou et al 2020), ενώ εμφανίζεται ελάχιστη διαφορά μεταξύ των αναλογιών των δύο σταδίων.

Επίσης και στο ξυλώδες κλάσμα εξάγεται ότι κατά το στάδιο της έκπλυσης ανακτάται μικρό ποσοστό της συνολικής λουτεολίνης (31%) και των ολικών φαινολών (42%), συνεπώς το στάδιο της έκπλυσης δεν παίζει ρόλο στην εκχύλιση της λουτεολίνης από τα υπέργεια μέρη του φυτού *Reseda luteola*, άρα μπορεί να υποθεθεί με ακρίβεια ότι η κύρια μάζα των βιοδραστικών συστατικών βρίσκεται εντός της κυτταρικής δομής του φυτού και για αυτό το σημείο ανάκτησης της πλειοψηφίας της περιεχόμενης λουτεολίνης από το φυτό βρίσκεται εντός του σταδίου διάχυσης. Παρατηρείται επίσης ότι σε χρόνο 120 min από την έναρξη της εκχύλισης ανακτάται το 81% της λουτεολίνης και το 91% των ολικών φαινολών, ενώ χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις των Διαγραμμάτων 4.6 (δ) και 4.7 (γ) για 105 λεπτά η ανάκτηση ισούται με το 79% της λουτεολίνης και το 87% των ολικών φαινολών, ενώ για μια αποδοτικότερη ως προς την κατανάλωση διαλύτη διεργασία ημιδιαλείποντος έργου 60 min τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 65% και 76% με την αναλογία μάζας προς όγκο διαλύτη διαλύτη να προσεγγίζει το 1:9. Συνεπώς η διεργασία εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου μπορεί να αποτελέσει συνολικά μια αξιόλογη εναλλακτική για την εκχύλιση λουτεολίνης και άλλων βιοδραστικών συστατικών από το φυτό *Reseda luteola*. Ένας πίνακας με την

αποτίμηση του αποτελέσματος της κινητικής της εκχύλισης των υπέργειων μερών του φυτού με μεθανόλη φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 4.22: Η συνολική % απόδοση ανάκτησης του συνολικού περιεχομένου σε TPC και λουτεολίνη από τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Reseda luteola* L.

Αποτελέσματα εκχύλισης	Λεπτό κλάσμα (Φύλλα, άνθη, μικρά ξυλώδη) 42,7 % w/w	Ξυλώδες κλάσμα 57,3 % w/w	Σύνολο υπέργειων τμημάτων του φυτού
% Ανάκτηση TPC στα 60 min	62	77	71
% Ανάκτηση λουτεολίνης στα 60 min	70	64	66
% Ανάκτηση TPC στα 105 min	75	87	82
% Ανάκτηση λουτεολίνης στα 105 min	87	78	82

Έχοντας υπολογίσει την περιεκτικότητα του συνολικού περιεχομένου του φυτού σε λουτεολίνη στα 12 mg LUT/g υλικού προκύπτει ότι βάσει των ποσοστών του Πίνακα 4.27 εκχυλίζονται 10 mg LUT/g σε λουτεολίνη σε χρόνο 105 min και 8,1 mg LUT/g σε λουτεολίνη αν η διεργασία σταματήσει στα 60 λεπτά. Οι αντίστοιχες αποδόσεις για τις ολικές φαινόλες είναι 14 mg LUT/g υλικού σε 105 min και 12 mg LUT/g υλικού σε 60 min.



Εικόνες 4.7-4.8: Τα δείγματα από την κινητική μελέτη των πειραμάτων για το λεπτό (αριστερά) και το ξυλώδες κλάσμα (δεξιά). Στα δείγματα φαίνεται η χρωματική μεταβολή με την πάροδο του χρόνου, που αποδεικνύει τη μείωση της συγκέντρωσης σε TPC και λουτεολίνη με το χρόνο.

4.5 Αποτελέσματα επεξεργασίας του φυτού με όξινη υδρόλυση με σκοπό την απομόνωση τελικού παρασκευάσματος

Τα πρωτογενή δεδομένα για την επεξεργασία των εκχυλισμάτων του λεπτού και του ξυλώδους κλάσματος που επιλέχθηκαν να υδρολυθούν υπό την επίδραση θειικού οξέος στους 70 °C, φαίνονται στον Πίνακα 4.23:

Πίνακας 4.23: Τα πρωτογενή δεδομένα για τα εκχυλίσματα που υδρολύονται.

Πρωτογενή δεδομένα εκχυλίσματος	Λεπτό κλάσμα	Ξυλώδες κλάσμα
Όγκος που χρησιμοποιήθηκε (mL)	335	360
TSC (g TS/L εκχυλίσματος)	8,1	5,3
Λουτεολίνη που εκχυλίζεται (mg/g)	12	11
Όγκος θεικού που προστίθεται (αναλογία mL θεικού : g TSS = 5:3)	4,5	3,2
Όγκος συμπυκνώματος που υδρολύεται (mL)	50	50
Όγκος απιονισμένου νερού που προστίθεται μετά την όξινη υδρόλυση (mL)	390	400

Μετά την ψύξη, την διήθηση και την αναδιάλυση του ιζήματος σε μεθανόλη, οι όγκοι των προκύπτων διαλυμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.24: Οι όγκοι των διαλυμάτων που προκύπτουν μετά την διήθηση.

Όγκος διαλύματος (mL)	Λεπτό κλάσμα	Ξυλώδες κλάσμα
Διήθημα	380	400
Αναδιαλυμένο ίζημα σε μεθανόλη	345	360

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων διηθήματος και εκχυλίσματος, εκτός από την αναγνώριση των μορφών λουτεολίνης και άλλων βασικών κορυφών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα του φυτού, υπολογίζεται και η απόδοση της διεργασίας όξινης υδρόλυσης ως εξής:

- Αρχικά από τις παρακάτω σχέσεις προσδιορίζονται τα κανονικοποιημένα εμβαδά των κορυφών για το διήθημα, το αναδιαλυμένο ίζημα και το αρχικό εκχύλισμα ως εξής:

$$A_{\text{αρχικού}} = 2 * A_{360\text{nm}} \quad (\text{το αρχικό και το αναδιαλυμένο ίζημα μετρούνται σε αραιώση 1:2}) \quad (4\text{I})$$

$$A_{\text{διηθήματος}} = A * \left(\frac{V_{\text{διηθήματος}}}{V_{\text{αρχικού}}} \right) \quad (4\text{II})$$

$$A_{\text{ιζήματος}} = 2 * A * \left(\frac{V_{\text{αν.ιζήματος}}}{V_{\text{αρχικού}}} \right) \quad (4\text{III})$$

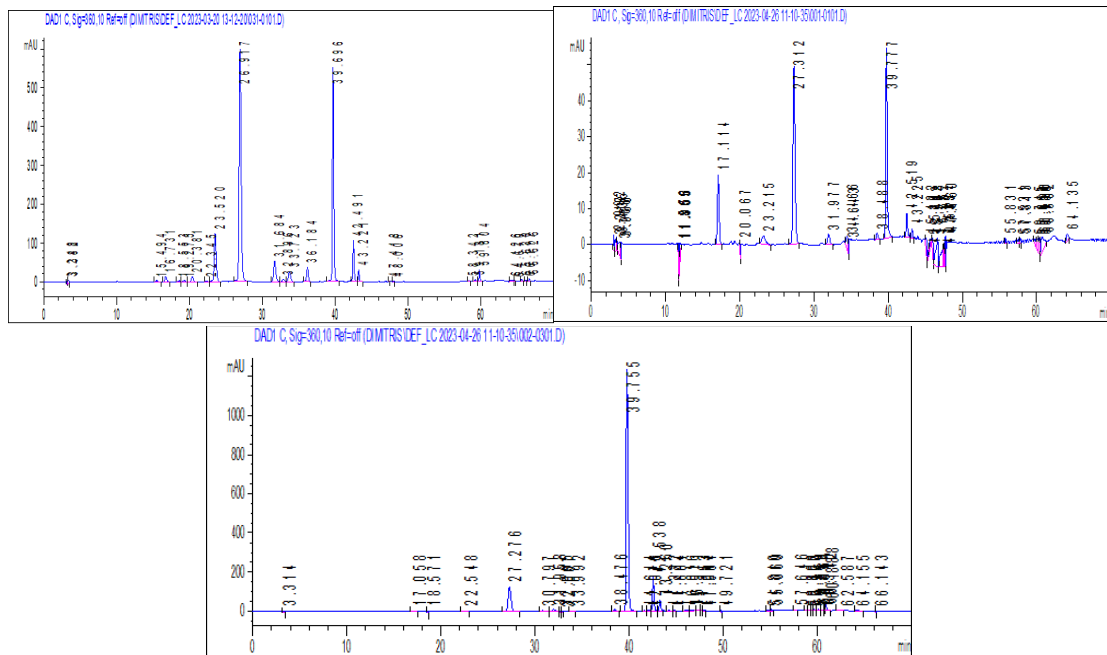
- Στη συνέχεια υπολογίζεται η απόδοση της μετατροπής ενός γλυκοζίτη σε αγλυκόνη για κάθε γλυκοζίτη που αναγνωρίζεται στο φάσμα των 360 nm, όπως και η % αύξηση του περιεχομένου της αγλυκόνης ως εξής:

$$\% \text{ απόδοση μετατροπής γλυκοζίτη} = \frac{A_{\text{αρχικού}} - (A_{\text{διηθήματος}} + A_{\text{ιζήματος}})}{A_{\text{αρχικού}}} * 100\% \quad (4\text{IV})$$

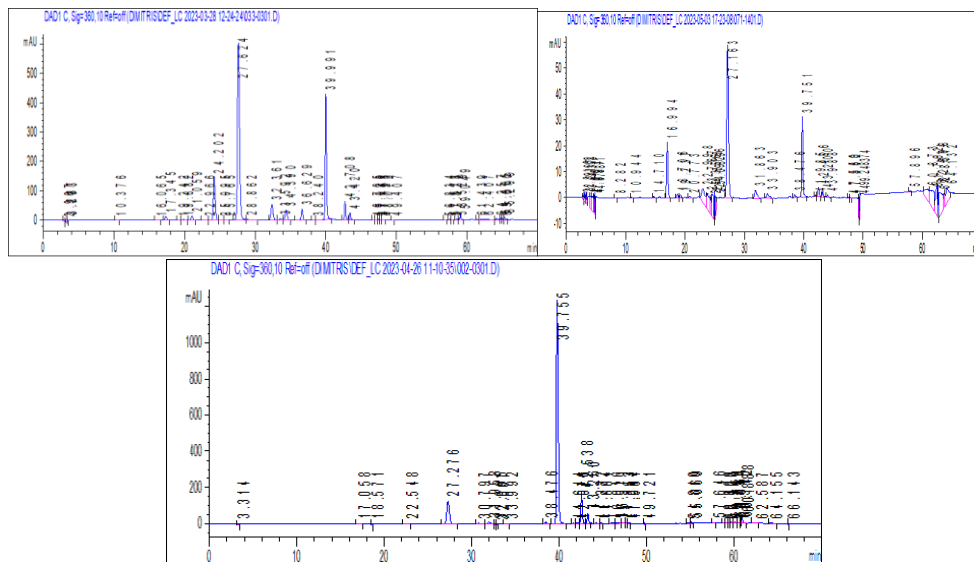
$$\% \text{ αύξηση της αγλυκόνης} = \frac{A_{\text{ιζήματος}}}{A_{\text{αρχικού}}} * 100\% \quad (4\text{V})$$

- Οι μορφές της λουτεολίνης και άλλες κύριες μορφές που εμφανίζονται αναγνωρίζονται με βάση τα φάσματα της Εικόνας 1.17 (α-γ) καθώς και με τα υπόλοιπα δεδομένα που αναφέρθηκαν στο Θεωρητικό Μέρος.

Τα χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση στην HPLC για το διήθημα και το διάλυμα του ιζήματος των δύο κλασμάτων, καθώς και για την εξέταση τους πριν την όξινη υδρόλυση φαίνονται στις Εικόνες που ακολουθούν.



Εικόνες 4.9: Τα χρωματογραφήματα της μεθόδου HPLC στα 360 nm για το εκχύλισμα του λεπτού κλάσματος πριν την υδρόλυση (α-πάνω αριστερά), το διήθημα (β-άνω δεξιά) και το αναδιαλυμένο ίζημα (γ-κάτω).



Εικόνες 4.10: Τα χρωματογραφήματα της μεθόδου HPLC στα 360 nm για το εκχύλισμα του ξυλώδους κλάσματος πριν την υδρόλυση (α-πάνω αριστερά), το διήθημα (β-άνω δεξιά) και το αναδιαλυμένο ίζημα (γ-κάτω).

Εκτός των τεσσάρων μορφών λουτεολίνης, που προσδιορίστηκαν στον Πίνακα 4.9, βρέθηκε ακόμα η αγλυκόνη της απιγενίνης (χρόνος έκλουσης 42-43 min) και τέσσερις γλυκοζίτες της απιγενίνης. Συνολικά οι αποδόσεις μετατροπής των γλυκοζιτών σε αγλυκόνες για το λεπτό και το ξυλώδες κλάσμα, όπως και η % αύξηση των της

συγκέντρωσης των αγλυκονών και άλλων μη υδρόλυμενων μορφών φαίνονται στον Πίνακα 4.25 που ακολουθεί:

Πίνακας 4.25: Τα δεδομένα για την απόδοση της διεργασίας ως προς την υδρόλυση γλυκοζιτών. Τα αναλυτικά αποτελέσματα (διορθωμένες απορροφήσεις, φάσματα κορυφών στα 360 nm παρατίθενται στο Παράρτημα).

Χρόνος έκλουσης (min)	% υδρόλυση στο λεπτό κλάσμα	% υδρόλυση στο ξυλώδες κλάσμα	Μορφή φλαβονοειδούς
17-18	5,7	5,2	Γλυκοζίτης απιγενίνης
24	98	95	Απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίτης
27-28	72	72	Λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης
32-33	33	69	Γλυκοζίτης απιγενίνης
34-35	66	80	Γλυκοζίτης λουτεολίνης
37	99	43	Γλυκοζίτης απιγενίνης
Χρόνος έκλουσης (min)	% αύξηση στο λεπτό κλάσμα	% αύξηση στο ξυλώδες κλάσμα	Μορφή φλαβονοειδούς
39,6-40,1	258	279	Λουτεολίνη
42,5-42,9	185	185	Απιγενίνη
43,4-43,5	189	200	Χρυσοεριόλη

Παρατηρείται ότι ο κύριος γλυκοζίτης της λουτεολίνης (λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης) υδρολύεται σε ποσοστό 72%, το οποίο οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της αγλυκόνης περίπου 2,5-3 φορές στο τέλος της διεργασίας της υδρόλυσης. Επίσης από τα δύο επιπλέον παράγωγα της λουτεολίνης που αναφέρονται στον Πίνακα 4.9, το πρώτο που εκλύεται από τη στήλη (35 min) υδρολύεται υπό την επίδραση θεικού οξέος κατά 66-80% στα δύο κλάσματα, συνεπώς αντιστοιχεί σε γλυκοζίτη της λουτεολίνης, πιθανώς τον 3'-Ο-γλυκοζίτη βάσει του χρόνου έκλουσης (Moitero et al 2008). Αντίθετα το δεύτερο παράγωγο, το οποίο εκλύεται από τη στήλη στα 44 min αυξάνει το περιεχόμενο του σε λουτεολίνη μετά την υδρόλυση. Συγκρίνοντας το φάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος με αντίστοιχο φάσμα HPLC (CAMEO Database, 2019), η κορυφή στα 44 min αντιστοιχεί στην χρυσοεριόλη (3'-μεθυλαιθέρας της λουτεολίνης), ενώ ο κύριος γλυκοζίτης της απιγενίνης (24 min) στο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στον 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης (Moitero et al, 2008). Τα υπόλοιπα παράγωγα αναγνωρίζονται ως φάσματα της λουτεολίνης ή της απιγενίνης, ανάλογα με το πόσο το φάσμα της κορυφής μοιάζει με τα φάσματα της αγλυκόνης (Εικόνα 1.17). Τα φάσματα όλων των κορυφών που αναγνωρίζονται παρατίθενται αναλυτικά στο Παράρτημα.

Όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα της διεργασίας όξινης υδρόλυσης, παρατηρείται ότι μετά την πραγματοποίησή της η αγλυκόνη της λουτεολίνης αποτελεί το 80-84% της συνολικής λουτεολίνης στο ίζημα της όξινης υδρόλυσης επομένως η διεργασία καταφέρει την μετατροπή μεγάλου μέρους των γλυκοζιτών της λουτεολίνης σε αγλυκόνη, πράγμα που αναμένεται να οδηγήσει σε μια ικανοποιητική ποσότητα λουτεολίνης στο τελικό προϊόν και η εξέταση του τελικού παρασκευάσματος μετά την συμπληρωματική επεξεργασία καθαρισμού και απομόνωσης.

Το στερεό προϊόν που προκύπτει από τη διεργασία, αφού εκπλυθεί με απιονισμένο νερό και λίγο πριν την αναδιάλυση του φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 4.11: Τμήμα του τελικού στερεού παρασκευάσματος μετά την διήθηση του απιονισμένου νερού από το αιώρημα. Το τελικό προϊόν δεν έχει αποχρωματιστεί πλήρως, λόγω της ύπαρξης χλωροφυλλών στα στερεά.

Όπως παρατηρείται και από την Εικόνα 4.11, το τελικό προϊόν είναι χρωματισμένο πράσινο και όχι κίτρινο, όπως είναι το χρώμα της λουτεολίνης. Αυτό είναι λογικό να συμβαίνει καθώς εντός των στερεών υπάρχει ποσότητα χλωροφύλλης που δεν έχει απομακρυνθεί και είναι επαρκής για να χρωματίσει τα στερεά του δείγματος.

Στη συνέχεια τα στερεά παρασκευάσματα αναδιαλύονται σε μεθανόλη, σε ίδιο όγκο με αυτόν που είχαν πριν τη συμπύκνωση και την προσθήκη του απιονισμένου (345 mL για το παρασκεύασμα λεπτού κλάσματος, 360 mL για του ξυλώδους) και εξετάζονται ως προς τα στερεά με σταθμική ανάλυση. Στη συνέχεια ακολουθεί ο προσδιορισμός των ολικών στερεών και η εκλεκτικότητα σε λουτεολίνη, από την συγκέντρωση της σε mg/g υλικού στο ίζημα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.26:

Πίνακας 4.26: Η περιεχόμενη λουτεολίνη στο τελικό παρασκεύασμα.

Περιεκτικότητα στερεού	Λεπτό κλάσμα (43 %)	Ξυλώδες κλάσμα (57 %)	Σύνολο
TSC(g/l)	1,1	1,1	1,1
TSY(mg/g)	19	22	21
Λουτεολίνη (όλες οι μορφές) (mg LUT/g)	14	14	14
Λουτεολίνη (αγλυκόνη) (mg LUT/g)	12	11	11
Φλαβονοειδή (mg LUT/g)	15	15	15
Εκλεκτικότητα (mg LUT/g TS)	721	635	672
% Λουτεολίνη (όλα τα παράγωγα)	72	64	67
% Λουτεολίνη (αγλυκόνη)	61	51	55
% Φλαβονοειδή (Μορφές λουτεολίνης + απιγενίνης που αναγνωρίστηκαν)	80	70	74

Από την εξέταση της συγκέντρωσης των τελικών παρασκευασμάτων σε % λουτεολίνη προκύπτει ότι το τελικό παρασκεύασμα που προκύπτει από το συνδυασμό των στερεών του λεπτού και του ξυλώδους κλάσματος έχει περιεκτικότητα 55 % σε λουτεολίνη ως μορφή αγλυκόνης. Η διαπίστωση αυτή συνδυάζεται τόσο με τα υψηλά ποσοστά της λουτεολίνης σε όλες τις μορφές στο παρασκεύασμα 67 % όσο και με την υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή (74 % σε ισοδύναμα LUT). Επομένως η διαδικασία επεξεργασίας του τελικού παρασκευάσματος με όξινη υδρόλυση, καθώς και οι κατεργασίες που ακολούθησαν απέδωσαν στην παραγωγή ενός τελικού προϊόντος πλούσιου σε λουτεολίνη και άλλα φλαβονοειδή, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής ή την ενίσχυση κατηγοριών τροφίμων με λουτεολίνη, όπως την λιπαρή φάση τροφίμων που προορίζονται ως λειτουργικά. Φυσικά για να χρησιμοποιηθεί το προϊόν χρειάζεται να κατεργαστεί περαιτέρω για την απομάκρυνση της χλωροφύλλης, καθώς και με άλλους τρόπους που διασφαλίζουν την ασφαλή χρήση του ως τρόφιμο ή συμπλήρωμα.

Επίσης παρατηρείται ότι το λεπτό κλάσμα δίνει μεγαλύτερο ποσοστό σε βιοδραστικά συστατικά από ότι το ξυλώδες, κάτι που σχετίζεται άμεσα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λουτεολίνη στο λεπτό κλάσμα, καθώς τα ολικά στερεά είναι ίδια και στις δύο περιπτώσεις.



Εικόνα 4.12: Το διάλυμα που προκύπτει μετά την όξινη υδρόλυση, την κατεργασία με απιονισμένο νερό και την ψύξη overnight, όπου διακρίνεται ξεκάθαρα η στερεή φάση (ίζημα πλούσιο σε αγλυκόνες) από την υγρή (διήθημα πλούσιο σε σάκχαρα). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται με διήθηση και η αναδιάλυση της δεύτερης μας δίνει το διήθημα και το αναδιαλυμένο ίζημα της Εικόνας 3.14.

5. Συμπεράσματα-Προτάσεις για το μέλλον

5.1 Συμπεράσματα

Η λουτεολίνη είναι μια χημική ένωση που παρουσιάζει έντονη βιολογική δράση σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης υγείας, εμφανίζοντας έντονη αντιοξειδωτική δράση, δράση εναντίον των καρκινικών κυττάρων και των παραγόντων που επάγουν την γένεση και τον πολλαπλασιασμό τους, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη και καρδιοπροστατευτική δράση. Επομένως αποτελεί καίριο αντικείμενο έρευνας η απομόνωση της από διάφορες φυτικές πηγές, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε συμπληρώματα διατροφής, ή και για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων. Οι φυτικές πηγές στην ελληνική επικράτεια που περιέχουν λουτεολίνη είναι σχετικά λίγες και αποτελούν είτε φυτά της Ελληνικής χλωρίδας (*Reseda luteola* L.) σε ορεινές περιοχές, είτε παραπροϊόντα, μικρής περιεκτικότητας (0,1-0,5 % w/w) σε λουτεολίνη, διάφορων βιομηχανιών όπως της αραχίδας (κέλυφος), που όμως είναι ευρέως διαθέσιμα λόγω της παραγωγής τους σε μεγάλες ποσότητες. Εξαιρέση αποτελούν οι σπόροι του σέλινου, η οποία αποτελεί επίσης πηγή λουτεολίνης (~0,8 % σύμφωνα με την βάση του USDA) που αποτελούν αρωματικό μπαχαρικό της ελληνικής αγροτικής παραγωγής. Οι δύο πηγές που μελετήθηκαν εν τέλει, επιλέχθηκαν είτε για τον λόγο, της αποδεδειγμένης από διάφορες δημοσιεύσεις, μεγάλης περιεκτικότητας σε λουτεολίνη (1-4% w/w βιβλιογραφικά) (υπέργεια *Reseda luteola* L.), είτε για να εξεταστεί η πιθανή αξιοποίηση ενός εγχώριου παραπροϊόντος, συγκεκριμένα του κελύφους των αραχίδων.

Από την ποσοτική μελέτη στα εκχυλίσματα του φυτού με τη διεργασία της εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου σε σταθερή κλίνη, η οποία τροφοδοτείται με φρέσκο διαλύτη συνεχώς, προκύπτει ότι με την εξαντλητική εκχύλιση των δύο φυτικών πηγών τα υπέργεια μέρη του φυτού *R. Luteola* είναι πράγματι μια αξιόλογη πηγή σε λουτεολίνη. Το δείγμα που εξετάστηκε (παραγωγής Ανατολίας λόγω έλλειψης του φυτού στην περίοδο εκπόνησης της διπλωματικής) το οποίο είναι δυνητικά παραπλήσιο του φυτού που θα ευδοκίμωσε και στην Ελληνική επικράτεια λόγω γεωγραφικής εγγύτητας έχει στο σύνολο των υπέργειων μερών του περιεκτικότητα 1,2 % w/w (12 mg LUT/g υλικού) σε ολική λουτεολίνη. Όπως φάνηκε από την ανάλυση του περιεχομένου της ολικής λουτεολίνης στα δύο ξεχωριστά κλάσματα του φυτού (των ελαφρώς κατατημένων μερών σε λεπτό και ξυλώδες κλάσμα) είναι παραπλήσιο (14 ± 3 mg LUT/g υλικού στο λεπτό κλάσμα έναντι 11 ± 0,1 mg LUT/g υλικού στο ξυλώδες κλάσμα). Το ξυλώδες κλάσμα υπολείπεται σαφέστερα του λεπτού όσον αφορά την εκχύλιση ολικών φαινολών και αντιοξειδωτικών (20 ± 3 mg TPC (LUT)/g υλικού και 22 ± 3 mg AC (LUT)/g υλικού αντίστοιχα για το λεπτό κλάσμα έναντι 15 ± 0,1 και 14 ± 0,1 αντίστοιχα για το ξυλώδες). Ωστόσο και τα δύο κλάσματα αποτελούν καλή πηγή λουτεολίνης και για αυτό το λόγο θα άξιζε να μελετηθεί περισσότερο το φυτό *Reseda luteola*.

Αντίθετα το κέλυφος της αραχίδας αποδείχτηκε φτωχή πηγή λουτεολίνης καθώς η ουσία δεν υπερβαίνει το 0,2 % w/w στη μάζα του κελύφους, ενώ αποτελεί επίσης φτωχή πηγή άλλων φαινολικών συστατικών. Άρα η αξιοποίηση αυτού του παραπροϊόντος της ελληνικής παραγωγής αραχίδων πιθανώς να μην είναι βιώσιμη με

την εφαρμογή μιας συμβατικής διεργασίας εκχύλισης , εάν οι ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα δεν περιέχουν λουτεολίνη σε μεγάλες ποσότητες.

Συγκρίνοντας τις δύο πηγές ως προς την εκλεκτικότητα της εκχύλισης σε λουτεολίνη, η ρεζεντά δίνει τριπλάσια εκλεκτικότητα από το κέλυφος της αραχίδας κατά την εκχύλιση με μεθανόλη (68 mg LUT/g TSS για τη ρεζεντά, έναντι 23 mg LUT/g TSS για το κέλυφος του φιστικιού). Επίσης και από τη σύγκριση της περιεκτικότητας των δύο πηγών σε λουτεολίνη, TPC και αντιοξειδωτικά, η ρεζεντά δίνει 8 φορές μεγαλύτερο περιεχόμενο σε όλες τις κατηγορίες συγκριτικά με το κέλυφος του φιστικιού.

Δεδομένου λοιπόν ότι η ρεζεντά αποτέλεσε σαφώς καλύτερη πηγή λουτεολίνης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της κινητικής της διεργασίας εκχύλισης η οποία εξετάστηκε για το κάθε κλάσμα ξεχωριστά. Από τα αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα αρχικά ότι αυτή αποτελεί μια επιτυχημένη συμβατική διεργασία, βρίσκοντας ότι για 105 min διάρκεια εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου και για τα δύο κλάσματα ανακτάται το 82% της συνολικής λουτεολίνης που περιέχεται στο φυτό, με την κατανάλωση μεθανόλης να προσεγγίζει τα 15 mL για 1 g πρώτης ύλης, αναλογία που παρατηρείται και στα δύο κλάσματα. Μειώνοντας το χρόνο της εκχύλισης στα 60 min, η ανάκτηση λουτεολίνης από το φυτό ανέρχεται στο 67% του φυτού και για τα δύο κλάσματα, ενώ η καταναλισκόμενη μεθανόλη ανέρχεται στα 9 mL/g πρώτης ύλης. Συνεπώς η διεργασία μπορεί να δώσει λουτεολίνη από τα υπέργεια μέρη του φυτού σε ικανοποιητικό περιεχόμενο (8-10 mg LUT/g υλικού) σε χρόνους 60-105 min, με την αναλογία όγκου απαιτούμενου διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης να κυμαίνεται μεταξύ 9-15 mL/g η οποία είναι ικανοποιητική για την εκχύλιση με συμβατικές τεχνικές. Συνδυάζοντας το γεγονός ότι η διεργασία εξοικονομεί ενέργεια, λόγω της πραγματοποίησης της σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και χρόνο σε σύγκριση με άλλες συμβατικές τεχνικές οι οποίες απαιτούν χρονικά διαστήματα περίπου 2 h, αποτελεί μια πιθανά αξιοποιήσιμη διεργασία ανάκτησης λουτεολίνης από το συγκεκριμένο φυτό.

Η κινητική της εκχύλισης όπως και στις περισσότερες περιπτώσεις φυτών που εκχυλίζονται με τη χρήση οργανικών διαλυτών, ακολουθεί το 2^ο νόμο του Fick εμφανίζοντας δύο στάδια: το γρήγορο στάδιο της έκπλυσης στα πρώτα 9 λεπτά της διεργασίας και το αργό στάδιο της διάχυσης που έπεται ως το τέλος της διεργασίας. Η αναλογία των ρυθμών των δύο σταδίων k_1/k_2 είναι και για τα δύο κλάσματα (λεπτό και ξυλώδες) περίπου 4/1 για την εκχύλιση ολικών φαινολών και 3/1 για την εκχύλιση λουτεολίνης, χαμηλή συγκριτικά με την αναλογία που εμφανίζεται συνήθως για την εκχύλιση από άλλες φυτικές πηγές, η οποία μπορεί να υπερβαίνει ακόμα και το 7/1. Ως άμεση συνέπεια της κινητικής αυτής στο στάδιο της έκπλυσης ανακτάται μόνο το 32% της συνολικής περιεχόμενης λουτεολίνης από τη ρεζεντά, όταν για άλλες φυτικές πηγές το ποσοστό αυτό υπερβαίνει το 50%, με αποτέλεσμα η εκχύλιση να πρέπει να συνεχίζεται και κατά τη διάρκεια του αργού σταδίου.

Από την όξινη υδρόλυση και την περαιτέρω κατεργασία του πλούσιου σε αγλυκόνες προϊόντος που προκύπτει από αυτήν, διαπιστώνεται ότι το τελικό στερεό παρασκεύασμα από τα υδρολυμένα εκχυλίσματα λεπτού και ξυλώδους κλάσματος των υπέργειων μερών του φυτού *Reseda luteola* L. έχει περιεκτικότητα 55% κατά βάρος στην αγλυκόνη της λουτεολίνης, ενώ το σύνολο των φλαβονοειδών (λουτεολίνη,

υπολειμματικοί γλυκοζίτες λουτεολίνης, άλλες αγλυκόνες φλαβονοειδών) ανέρχεται στο 74% κατά βάρος. Επίσης η όξινη υδρόλυση στις συγκεκριμένες αναλογίες υδρολύει το 75% της κυναροσίδης, που αποτελεί την κύρια μορφή της λουτεολίνης στο φυτό, αυξάνοντας παράλληλα 2,5 φορές την περιεκτικότητα της λουτεολίνης στο εκχύλισμα κατά 250-280%. Οι διαπιστώσεις αυτές αποδεικνύουν ότι η μέθοδος της όξινης υδρόλυσης συνδυαστικά με την διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο παρασκευής στερεού προϊόντος υψηλής περιεκτικότητας σε λουτεολίνη και φλαβονοειδή, αποτελώντας τη βάση για την ανάπτυξη συμπληρωμάτων διατροφής λουτεολίνης.

5.2 Προτάσεις για το μέλλον

Επειδή η μεθανόλη αποτελεί τοξικό διαλύτη, προτείνεται η περαιτέρω μελέτη της ίδιας διεργασίας με χρήση μίγματος αιθανόλης : νερού, το οποίο αποτελεί συνήθη διαλύτη στη βιβλιογραφία για την εκχύλιση λουτεολίνης από φυτικές πηγές σε μεγάλες αποδόσεις.

Για την επιτάχυνση της διεργασίας προτείνεται αρχικά η εξέταση της εκχύλισης με κάποια άλλη μη συμβατική μέθοδο, όπως την εκχύλιση με υποβοήθηση από μικροκύματα, υπερήχους ή συνδυασμό των δύο μεθόδων, που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αναλογίας k_1/k_2 . Αυτό θα οδηγούσε στην ανάκτηση της πλειοψηφίας της λουτεολίνης κατά την έκπλυση, λόγω της ευκολότερης διαπερατότητας της κυτταρικής δομής από το διαλύτη σε αυτές τις μεθόδους. Επίσης θα μπορούσε η διεργασία να μελετηθεί με μια πιο γρήγορη ροή (από τα 2,5-2,8 mL/min για την παρούσα διπλωματική), για να ελεγχθεί το κατά πόσο θα επιδράσει στην επιτάχυνση της.

Πέραν του αναλυτικού μέρους, για τη διεργασία της απομόνωσης προτείνεται η ανάπτυξη μεθόδου καθαρισμού του παρασκευάσματος από τις χλωροφύλλες, η οποία θα δώσει σε μεγάλο βαθμό ένα παρασκεύασμα που μοιάζει με αυτά που πωλούνται στο εμπόριο καθώς και η περαιτέρω επεξεργασία του για την ανάπτυξη συμπληρώματος σε μικρή κλίμακα. Ως προς τη βελτίωση της διεργασίας υδρόλυσης, θα μπορούσε να μελετηθεί η αντικατάσταση της όξινης υδρόλυσης με άλλες μεθόδους (ενζυμική υδρόλυση) που αποτελούν μορφές ηπιότερης και περισσότερο φιλικής προς το περιβάλλον κατεργασίας. Επίσης, θα μπορούσαν να αναπτυχθούν αναλυτικές φυτοχημικές μελέτες πάνω στο φυτό και τα εκχυλίσματά του για την ακριβή ποσοτικοποίηση πιθανώς τοξικών ουσιών σε αυτά, όπως τα αλκαλοειδή, την επίδραση της συγκέντρωσής τους στην καταλληλότητα παρασκευασμάτων που προέρχονται από το φυτό και την πιθανή εξέταση μεθόδων καθαρισμού των τελικών παρασκευασμάτων από αυτά, προκειμένου να καταστούν καταλληλότερα για κατανάλωση, αν η επίδραση αυτή βρεθεί σημαντική. Σημαντική είναι ακόμη και η μελέτη της ενίσχυσης τροφίμων μέσω της ενσωμάτωσης της λουτεολίνης στη λιπαρή φάση τους, προκειμένου αυτά να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικά.

Τέλος προτείνεται η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου για την ποσοτική μελέτη άλλων υποσχόμενων φυτικών πηγών της Ελληνικής χλωρίδας οι οποίες έχουν βιβλιογραφικά αξιοσημείωτη περιεκτικότητα σε λουτεολίνη, όπως οι σπόροι του σέλινου (0,7-0,8% κατά βάρος σε λουτεολίνη) και τα φύλλα της βερβένας (0,85-1,00% κατά βάρος σε λουτεολίνη) ή σημαντικών παραπροϊόντων της Ελληνικής βιομηχανίας

τροφίμων, όπως τα φύλλα της ελιάς καθώς και η κινητική μελέτη και η ανάπτυξη παρασκευάσματος για αυτές χρησιμοποιώντας τις μεθόδους κινητικής και όξινης υδρόλυσης που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διπλωματική, αν το περιεχόμενο τους σε λουτεολίνη κριθεί ως αξιόλογο στο πέρας της ποσοτικοποίησης.

6. Βιβλιογραφία

Αλεβίζος Γεώργιος, «ΠΡΟΦΙΛ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ ΚΑΡΠΟ ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ (ΑΡΑΧΙΔΑΣ) ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΞΗΡΑΝΣΗΣ», Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου, Καλαμάτα, 2017

Βάση Δεδομένων Ελληνικής χλωρίδας, «*Reseda luteola L.*», Ελληνική Βοτανολογική Εταιρεία-Πανεπιστήμιο Πατρών, https://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/taxon/a1e7b8cf-f4cf-42de-a729-11ef2d01382a , access 14-4-2023

Γούσιας Γεώργιος, «Μελέτη μεθόδων εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από αρωματικά φυτά», Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, 2017

Κανακίδη Λαμπρινή-Δανάη, «Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από δεντρολίβανο και επεξεργασία για χρήση σε καλλυντικά», Διπλωματική Εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, 2020

Μαρούλης Α.Ι., Χατζηαντωνίου Κ., Τσιτσιριδάκη Α., «Εναλλακτικοί Διαλύτες, Ιοντικοί Διαλύτες», Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2012, pages 8-9.

Μερμηγκη Π., «Ανάλυση συστατικών φύλλων *Vaccinium corymbosum*», Διπλωματική Εργασία, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2014

Μουρλίδης ΧΑ, «Καλλιέργεια Φιστικιού (Αραχίδα) στην Ελλάδα και τον Κόσμο», BIONOT, <https://www.bionot.gr/el/nea-blog/kalliergia-kai-proionta/item/38-world-map-groundnuts-cultivation-regions>, access 15-4-2023

Μουρλίδης ΧΑ, «Παγκόσμια παραγωγή φιστικιού (αραχίδα) 2017-2019», BIONOT, <https://www.bionot.gr/el/nea-blog/kalliergia-kai-proionta/item/36-global-groundnuts-production> , access 15-4-2023

Τσιμογιάννης Δημήτριος, «Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών: αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων», Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, 2008

Τσόχα Λυδία, «Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βιοδραστικών μορίων από τον καρπό του άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina L.*): Μελέτη της επίδρασης κυτταρινολυτικών και πηκτινολυτικών ενζύμων», Διπλωματική εργασία, ΕΜΠ, 2022

Abidin, L., Mujeeb, M., Mir, S. R., Khan, S. A., & Ahmad, A. ,“Comparative assessment of extraction methods and quantitative estimation of luteolin in the leaves of *Vitex negundo* Linn. by HPLC.”, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7, 2014, pages S289–S293.

Ainsworth E.A., Gillespie K.M., “Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent”, Nature Protocols 2, 2007, pages 875-877

- Angelini LG, Bertoli A, Rolandelli S., Pistelli L., “Agronomic potential of *Reseda luteola* L. as new crop for natural dyes in textiles production”, *Industrial Crops and Products*, Volume 17, Issue 3, 2003, Pages 199-207
- Azwaninda N.N., “A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation”, *Med Aromat Plants* 2015, 4:3
- Bangar, Priyanka, Vandana, Nitya, Fatih, “Luteolin: A flavone with myriads of bioactivities and food applications”, *Food Bioscience*, Volume 52, 2023
- Bimakr M., Rahman R.A, Taip F.S., Ganjloo A., Salleh L.M., Selamat J., Hamid A., Zaidul I.S.M, “Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves”, *Food and Bioproducts Processing*, Volume 89, Issue 1, 2011, pages 67-72
- Bhagwat Seema, Wu Xianli, Haytowitz David B., “USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.3 (March 2018)”, *Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, ARS, USDA*, 2022
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E. and Berset, C., “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *LWT-Food science and Technology*, 28, 1995, pages 25-30.
- Burger P., Monchot A., Bagarri O, Chiffolleau P., Azoulay S., Fernandez, X., Michel T., “Whitening Agents from *Reseda luteola* L. and Their Chemical Characterization Using Combination of CPC, UPLC-HRMS and NMR.”, *Cosmetics* 2017, 4, 51
- Cai Q, Rahn RO, Zhang R., “Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals.” *Cancer Lett.* 1997 Oct 28, pages 99-107
- CAMEO Database, “Weld (*Reseda luteola* L.)”, *CAMEO Materials Database, Museum of Fine Arts, Boston*, https://cameo.mfa.org/wiki/Weld_%28Reseda_luteola%29_LC , last access 21-4-2023 (Εικόνας 1.17).
- Calvo, M.I., Crespo, A. and Fernández, M. “SEASONAL VARIATIONS OF THE IRIDOIDS, FLAVONOIDS AND VERBASCOSIDE CONTENT FROM VERBENA OFFICINALIS L.”, *Acta Horticulturae*, 2000, pages 169-176
- Casetti, Jung, Wölfle, Reuter, Neumann, Gilb, Wähling, Wagner, Merfort, Schempp, “Topical application of solubilized *Reseda luteola* extract reduces ultraviolet B-induced inflammation in vivo”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 96, Issue 3, 2009, Pages 260-265
- Cerrato, A., De Santis, D. and Moresi, M, “Production of luteolin extracts from *Reseda luteola* and assessment of their dyeing properties.”, *J. Sci. Food Agric.*, 82, 2002, pages 1189-1199
- Cheng X.L., Wan Jin-Yi, Ping Li, Qi L.W., “Ultrasonic/microwave assisted extraction and diagnostic ion filtering strategy by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of flavonoids in *Spatholobus suberectus*”, *Journal of Chromatography A* 1218, 2011, 5774– 5786

- Cifá, D, Skrt, M, Pittia, P, Di Mattia, CD, Polkar Ulrich, N., “Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction.”, *Food Sci Nutr.* 6, 2018, pages 1128– 1137
- Cristea D., I. Bateau, G. Vilarem, “Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola L.*)”, *Dyes and Pigments*, Volume 57, Issue 3, 2003, Pages 267-272
- D. J. Daigle, E. J. Conkerton, T. H. Sanders, and A. C. Mixon, “Peanut Hull Flavonoids : Their Relationship with Peanut Maturity”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36 (6), pages 1179-1181
- Destandau E., Michel T., Elfakir C., “Chapter 4-Microwave-Assisted Extraction”, *Natural Product Extraction: Principles and Applications*, Royal Society of Chemistry, 2013, pages 113-118
- Deveoglu O., Sahinbaskan B Y, Torgan E., Karadag D, “Dyeing Properties and Analysis by RP-HPLC-DAD of Silk Fibers Dyed with Weld (*Reseda luteola L.*) and Walloon Oak (*Quercus ithaburensis Decaisne*)”, *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 23, No. 12, 2011, 5441-5446.
- Deveoğlu O, Torgan E. and Karadağ, R, “High-performance liquid chromatography of some natural dyes: analysis of plant extracts and dyed textiles.” *Coloration Technology*, 2012, pages 133-138.
- Fecka I., Turek S., “Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage”, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, pages 10908–10917
- Fortunati E., Luzi F., Puglia D., Torre E., “Multifunctional Polymeric Nanocomposites Based on Cellulosic Reinforcements”, Chapter 1, 2016, William Andrew Publishing, pages 1-38, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44248-0.00001-8>, last access 29-4-2023
- Global Biodiversity Information Family, “*Reseda luteola L.*”, <https://www.gbif.org/species/3040251/metrics> , Access 14-4-2023
- Hammons, R.O. “The origin and history of the groundnut.”, *The Groundnut Crop*, World Crop Series. Springer, 1988, Dordrecht, pages 24-25
- Han D. and Row K.H., “Determination of luteolin and apigenin in celery using ultrasonic-assisted extraction based on aqueous solution of ionic liquid coupled with HPLC quantification.”, *J. Sci. Food Agric.*, 91, 2011, pages:2888-2892
- Harborne J.B., “Plant polyphenols—XIV.: characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses”, *Phytochemistry*, 4, 1965, pages 107-120
- Hedrick, J.L., Mulcahey, L.J. & Taylor, L.T. “Supercritical fluid extraction.”, *Mikrochim Acta* 108, 1992, pages 115–132.

- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Venema, D. P. "Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in fruits and vegetables", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1992, pages 1591–1598
- Hou M, Hu W, Wang A, Xiu Z, Shi Y, Hao K, Sun X, Cao D, Lu R, Sun J., "Ultrasound-Assisted Extraction of Total Flavonoids from *Pteris cretica* L.: Process Optimization, HPLC Analysis, and Evaluation of Antioxidant Activity.", *Antioxidants*. 2019, 8-42
- Hu, C., Kitts, D.D., "Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells.", *Mol Cell Biochem* 265, 2004, pages 107–113.
- Hussain, A.I., Chatha, S.A.S., Noor, S. et al., "Effect of Extraction Techniques and Solvent Systems on the Extraction of Antioxidant Components from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Hulls.", *Food Anal. Methods* 5, 2012, pages 890–896
- Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, Nadeem M, Shariati MA, Khan IA, Imran A, Orhan IE, Rizwan M, Atif M, Gondal TA, Mubarak MS, "Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review.", *Biomed Pharmacother*. 2019.
- Kawamura H. et al, "Ultrasonically enhanced extraction of luteolin and apigenin from the leaves of *Perilla frutescens* (L.) Britt. using liquid carbon dioxide and ethanol.", *Ultrasonics Sonochemistry*, 29. pp. 19-26.
- Kamali, Khodaverdi, Hadizadeh, Ghaziaskar, "Optimization of phenolic and flavonoid content and antioxidants capacity of pressurized liquid extraction from *Dracocephalum kotschyi* via circumscribed central composite", *The Journal of Supercritical Fluids*, Volume 107, 2016, pages 307-314
- Kim, S.S., Seo, J.Y., Lim, S.S. et al., "Neuroprotective effect of *Reseda luteola* L. extract in a mouse neuronal cell model." *Food Sci Biotechnol* 24, 2015, pages 333–339
- Kumar, Pandey, "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview", *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 162750, 16 pages, 2013.
- Lama-Muñoz A, Del Mar Contreras M, Espínola F, Moya M, de Torres A, Romero I, Castro E., "Extraction of oleuropein and luteolin-7-O-glucoside from olive leaves: Optimization of technique and operating conditions.", *Food Chem*. 2019 Sep 30;293:161-168
- Lama-Muñoz A, Contreras MdM, Espínola F, Moya M, Romero I, Castro E. "Optimization of Oleuropein and Luteolin-7-O-Glucoside Extraction from Olive Leaves by Ultrasound-Assisted Technology.", *Energies*. 2019, 12:2486.
- Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R., "Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants.", *Free Radical Biol Med.*, 1999, pages 285-94
- Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. "Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy.", *Current Cancer Drug Targets*, 2008, pp 634-46

- Liu, A.L.; Liu, B.; Qin, H.L.; Lee, S.M.; Wang, Y.T.; Du, G.H., "Anti-Influenza Virus Activities of Flavonoids from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa*.", *Planta Med.*, 2008, 74, 847-51.
- López-Lázaro M., "Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin." *Mini Rev Med Chem.* 2009, pages 31-59
- Lou H, Yuan H, Yamazaki Y, Sasaki T, Oka S. "Alkaloids and flavonoids from peanut skins", *Planta Med*, 2001, pages 345-9.
- Lou Z., Wang H., Zhu S., Cheng S., Zhang M., Wang Z., "Ionic liquids based simultaneous ultrasonic and microwave assisted extraction of phenolic compounds from burdock leaves", *Analytica Chimica Acta* 716, 2012, pages 28– 33
- Lurdes Mira, M. Tereza Fernandez, Marta Santos, Rui Rocha, M. Helena Florêncio, Keith R. Jennings (2002) "Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity", *Free Radical Research*, 36:11, pages 1199-1208
- Lutfullin, K.L., Tadzhibaev, M.M., Abdullaev, U.A. et al., "Alkaloids of *Reseda luteola*.", *Chem Nat Compd* 12, 1976, pages 559–563
- Markham K., "Flavones, Flavonols and their Glycosides", Chapter 6, *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, Volume 1, 1989, Pages 197-235
- Manju, V & Nalini, N., "Protective role of luteolin in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis.", *Cell biochemistry and function*, 2007, 25, 189-194.
- Manzoor MF, Ahmad N., Mansoor A., Kalsoom A., "Food based phytochemical luteolin their derivatives, sources and medicinal benefits." ,2017, 195-207.
- Manzoor, MF, Ahmad, N, Ahmed, Z, et al. "Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives.", *J Food Biochemistry*, 2019, 1-19
- Mantzouris D, Karapanagiotis I, Valianou L, Panayiotou C, "HPLC-DAD-MS analysis of dyes identified in textiles from Mount Athos.", *Anal Bioanal Chem.* 2011, pages 3065-79
- Meirinhos J. , Silva B.M., Valentao S., Seabra R , Pereira J., Dias A., Andrade P. & Ferreres F., "Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea Europaea* L.) leaf cultivars", *Natural Product Research*, 19:2, 2005, pages 189-195
- Meng R. et al, "Overoxidized polypyrrole/overoxidized poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/graphene quantum dots-chitosan as enhanced electrochemical sensing platform for luteolin determination in peanut shells", *New J. Chem.*, 2022,46, 20610-20622

- Moiteiro C, Gaspar H, Rodrigues AI, Lopes JF, Carnide V, “HPLC quantification of dye flavonoids in *Reseda luteola L.* from Portugal.” J Sep Science, 2008, pages 3683-7.
- Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1999, pp 1787-90
- de Oliveira, Neri-Numa, Arruda, McClements, Pastore, “Encapsulation of flavonoids in foods for diabetics: The emerging paradigm for an effective therapy”, Trends in Food Science & Technology, Volume 127, 2022, Pages 198-206
- Oreopoulou A., Goussias G., Tsimogiannis D., Oreopoulou V., “Hydro-alcoholic extraction kinetics of phenolics from oregano: Optimization of the extraction parameters”, Food and Bioproducts Processing, Volume 123, 2020, Pages 378-389
- Panche, A., Diwan, A., & Chandra, S., “Flavonoids: An overview. Journal of Nutritional Science”, 5, E47, 2016
- Paula J., Paviani L., Foglio M., Oliveira S., Ilza D., Gustavo J., Michelle E., Marcos C., “Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents.”, The Journal of Supercritical Fluids. 86, 2013
- Peggie, D., Hulme, A., McNab, H. et al. “Towards the identification of characteristic minor components from textiles dyed with weld (*Reseda luteola L.*) and those dyed with Mexican cochineal (*Dactylopius coccus Costa.*)”, Microchim Acta 162, 2008, pages 371–380
- Perea-Moreno, Miguel-Angel, Francisco Manzano-Agugliaro, Quetzalcoatl Hernandez-Escobedo, and Alberto-Jesus Perea-Moreno. 2018. "Peanut Shell for Energy: Properties and Its Potential to Respect the Environment" Sustainability 10, no. 9: 3254
- Peng M., Chen Z., Deng Q., Zhu S., Wang G., “The roles of luteolin in peanut shell extract - Mediated protection of erythrocytes against hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity”, Food Bioscience, Volume 39, 2021
- Powanda, M.C., Whitehouse, M.W., Rainsford, K.D., “Celery Seed and Related Extracts with Antiarthritic, Antiulcer, and Antimicrobial Activities”, In: Rainsford, K., Powanda, M., Whitehouse, M. “Novel Natural Products: Therapeutic Effects in Pain, Arthritis and Gastro-intestinal Diseases. Progress in Drug Research”, vol 70. Springer, Basel, 2015
- Psarrou I., Oreopoulou A., Tsimogiannis D., Oreopoulou V., “Extraction Kinetics of Phenolic Antioxidants from the Hydro Distillation Residues of Rosemary and Effect of Pretreatment and Extraction Parameters.”, Molecules, 2020, 25, 4520
- Raji, Y., Nadi, A., Chemchame, Y. et al. “Eco-friendly Extraction of Flavonoids Dyes from Moroccan (*Reseda luteola L.*), Wool Dyeing, and Antibacterial Effectiveness.”, Fibers Polym 24, 2023, 1051–1065

- Sadik CD, Sies H., Schewe T., “Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action”, *Biochemical Pharmacology*, Volume 65, Issue 5, 2003, Pages 773-781
- Safe S., Jayaraman A., Chapkin R. et al. “Flavonoids: structure–function and mechanisms of action and opportunities for drug development.” *Toxicol Res.* 37, 2021, 147–162
- Sapkale, G., Patil, S.M., Surwase, U.S., & Bhatbhage, P.K., “SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION”, *Int. J. Chem. Sci.*: 8(2), 2010, pages 729-743
- Seelinger, G.; Merfort, I.; Wölflle, U.; Schempp, C.M. “Anti-carcinogenic Effects of the Flavonoid Luteolin.”, *Molecules* 2008, 13, 2628-2651.
- Shabandeh M., “Production share of peanuts in 2021 by leading country”, 2023, <https://www.statista.com/statistics/1030846/major-producers-of-peanut-worldwide/>, access 15-4-2023
- Shafaghat A., Morrabi P., Shafaghatlonbar M., Salimi F., “Synthesis of biodiesel from *Reseda luteola* L. seeds.”, *Trends in Phytochemical Research*, 2017, 1(2), pages 77-82.
- H.B. Sowbhagya, P. Srinivas, N. Krishnamurthy, “Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds”, *Food Chemistry*, Volume 120, Issue 1, 2010, Pages 230-234
- Sridhar A, Ponnuchamy M, Kumar PS, Kapoor A, Vo DN, Prabhakar S., “Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review.”, *Environ Chem Lett.* 19 2021, 3409-3443
- Sriti Eljazi, J., Selmi, S., Zarroug, Y., Wesleti, I., Aouini, B., Jallouli, S., Limam F., “Essential oil composition, phenolic compound, and antioxidant potential of *Inulaviscosa* as affected by extraction process.”, *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2018, 2309–2319.
- Teixeira , Siquet, Alves, Boal, Marques, Borges, Lima, Reis, “Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet”, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 39, Issue 8, 2005, Pages 1099-1108
- Wang ML, Chen CY, Tonnis B, Barkley NA, Pinnow DL, Pittman RN, Davis J, Holbrook CC, Stalker HT, Pederson GA, “Oil, fatty acid, flavonoid, and resveratrol content variability and FAD2A functional SNP genotypes in the U.S. peanut mini-core collection.”, *J Agric Food Chem.*, 2013, pages 2875-82
- Wang, H., Yang, L., Zu, Y., & Zhao, X. “Microwave-assisted simultaneous extraction of luteolin and apigenin from tree peony pod and evaluation of its antioxidant activity.”, *The Scientific World Journal*, 2014, pages 1–12.
- J.H. Wee, J.H. Moon, J.B. Eun, J.H. Chung, Y.G. Kim, K.H. Park, “Isolation and identification of antioxidants from peanut shells and the relationship between structure and antioxidant activity”, *Food Sci. Biotechnol.*, 16 (1), 2007, pp. 116-122

Wei, B., Wang, YK., Qiu, WH. et al. “Discovery and mechanism of intestinal bacteria in enzymatic cleavage of C–C glycosidic bonds.”, *Applied Microbiology and Biotechnology* 104, 2020, pages 1883–1890

Woelfle U, Simon-Haarhaus B, Merfort I, Schempp CM., “*Reseda luteola L.* extract displays antiproliferative and pro-apoptotic activities that are related to its major flavonoids”, *Phytother Res*, 2010, 1033-6

Xie Y-Z, Peng C-W, Su Z-Q, Huang H-T, Liu X-H, Zhan S-F and Huang X-F “A Practical Strategy for Exploring the Pharmacological Mechanism of Luteolin Against COVID-19/Asthma Comorbidity: Findings of System Pharmacology and Bioinformatics Analysis.” *Front. Immunology* 12, 2022

Yen, GC., Duh, PD. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *J Am Oil Chem Soc* 72, 1995, 1065–1067

Yildirim AB, Karakas FP, Turker AU., “In vitro antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey”, *Asian Pac J Trop Med.*, 2013

Zha, Jian & Wu, Xia & Gong, Guoli & Koffas, Mattheos., “Pathway enzyme engineering for flavonoid production in recombinant microbes”, *Metabolic Engineering Communications*, 9, 2019

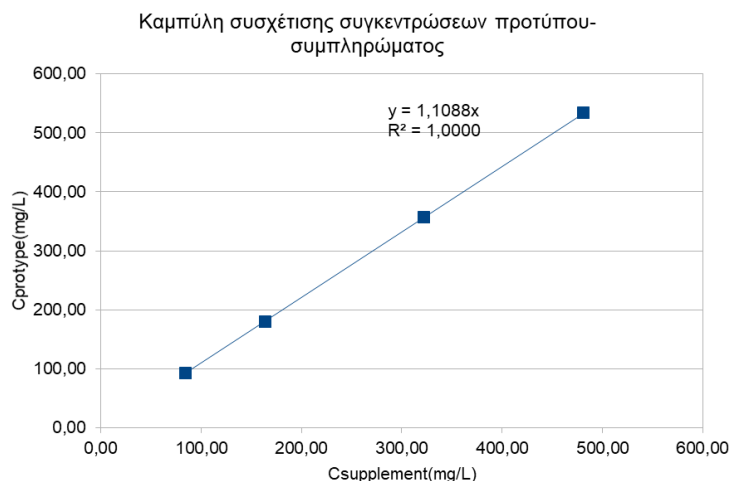
Παράρτημα

Π1. Διόρθωση των καμπυλών αναφοράς HPLC για το συμπλήρωμα διατροφής της λουτεολίνης

Για κάθε μήκος κύματος υπολογίζεται για τυχαίες τιμές εμβαδού κορυφής η αντίστοιχη συγκέντρωση σε mg λουτεολίνης/g α) με την καμπύλη αναφοράς του συμπληρώματος διατροφής και β) με την καμπύλη αναφοράς της πρότυπης λουτεολίνης. Στη συνέχεια συσχετίζονται με σχέση της μορφής $y=a \cdot x$ όπου y η τιμή της συγκέντρωσης για την καμπύλη της Extrasynthese για ένα από τα τέσσερα μήκη κύματος, x η τιμή της συγκέντρωσης για την καμπύλη του συμπληρώματος διατροφής λουτεολίνης στο ίδιο μήκος κύματος και a ο συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης που υπολογίζεται με το συμπλήρωμα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα μήκη κύματος (230,280,320 και 360 nm) μέχρι να προκύψουν τέσσερις συντελεστές διόρθωσης για κάθε ένα από τα μήκη κύματος.

Πίνακας Π1: Πίνακας δεδομένων για την εύρεση συντελεστή διόρθωσης στα 230 nm

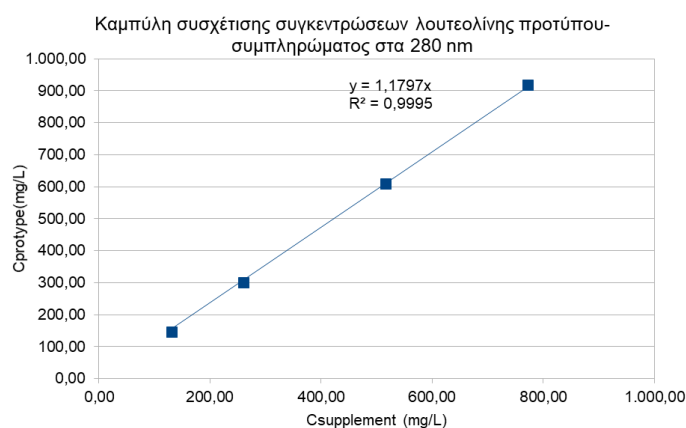
Area	C ₂₃₀ (mg/L) Καμπύλη αναφοράς συμπληρώματος	C ₂₃₀ (mg/L) Καμπύλη αναφοράς προτύπου
5000	84	92
10000	164	181
20000	322	357
30000	481	534



Διάγραμμα Π1: Η καμπύλη συσχέτισης των δεδομένων προτύπου-συμπληρώματος για μήκος κύματος 230 nm.

Πίνακας Π2: Ο πίνακας δεδομένων για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης της συγκέντρωσης συμπληρώματος κ προτύπου στα 280 nm.

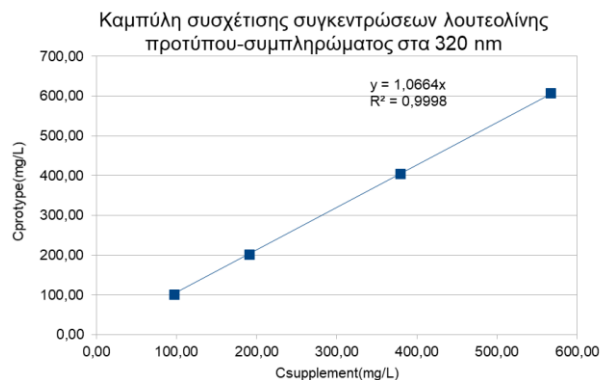
Area	C ₂₈₀ (mg/L) Καμπύλη αναφοράς συμπληρώματος	C ₂₈₀ (mg/L) Καμπύλη αναφοράς προτύπου
5000	132	146
10000	260	300
20000	517	608
30000	773	916



Διάγραμμα Π2: Η καμπύλη συσχέτισης συμπληρώματος-προτύπου για μήκος κύματος 280 nm.

Πίνακας Π3: Ο πίνακας δεδομένων για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης της συγκέντρωσης συμπληρώματος κ προτύπου στα 320 nm.

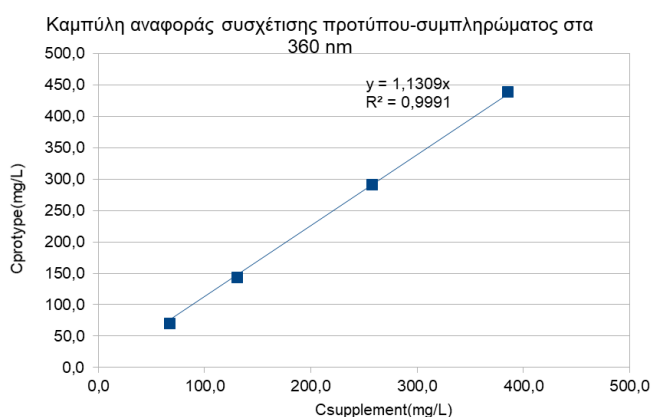
Area	C ₃₂₀ (mg/L) Καμπύλη αναφοράς συμπληρώματος	C ₃₂₀ (mg/L) Καμπύλη αναφοράς προτύπου
5000	98	101
10000	192	202
20000	380	404
30000	567	607



Διάγραμμα Π3: Η καμπύλη συσχέτισης συμπληρώματος-προτύπου για μήκος κύματος 320 nm.

Πίνακας Π4: Ο πίνακας δεδομένων για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης της συγκέντρωσης συμπληρώματος κ προτύπου στα 360 nm.

Area	C ₃₆₀ (mg/L) Καμπύλη αναφοράς συ- μπληρώματος	C ₃₆₀ (mg/L) Καμπύλη αναφοράς προτύπου
5000	67,4	70,0
10000	131	144
20000	258	291
30000	385	439

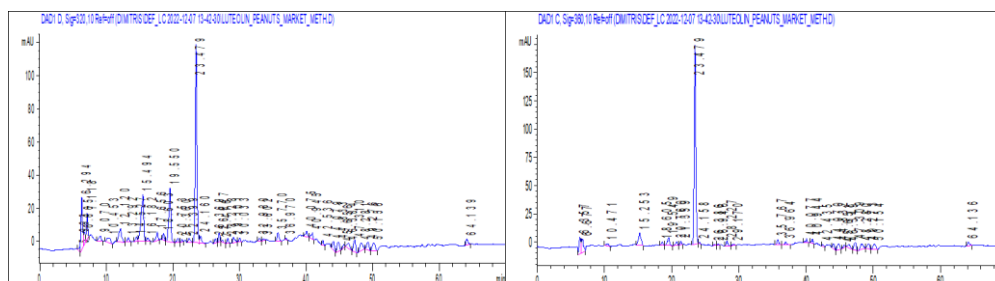


Διάγραμμα Π3: Η καμπύλη συσχέτισης συμπληρώματος-προτύπου για μήκος κύματος 360 nm

Π2. Τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα των κύριων κορυφών στην ανά- λυση HPLC

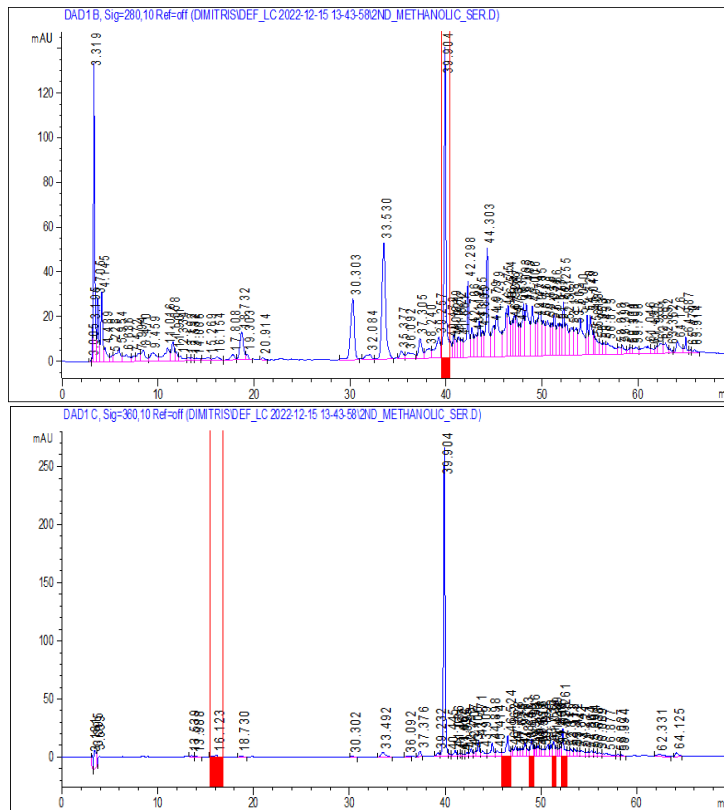
Π.2.1 Κέλφος Arachis Hypogea

Χρωματογραφήματα κορυφών εκχυλίσματος κελύφους φιστικιού από προϊόν εμπορίου.

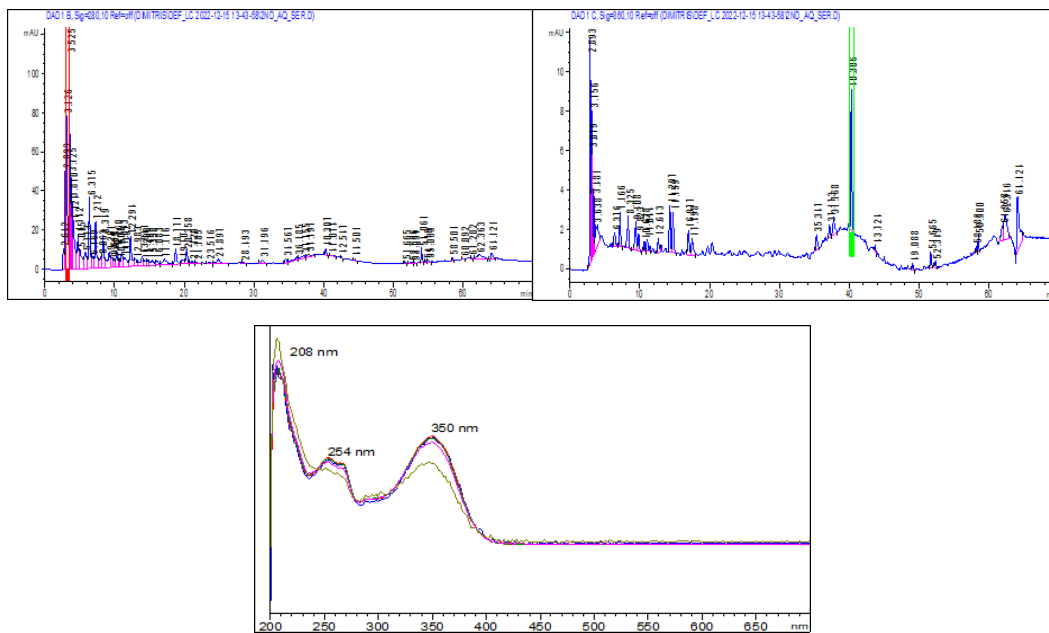


Εικόνες Π1 (α,β): Τα χρωματογραφήματα για την εξέταση με HPLC των μεθανολικών εκχυλισμάτων κελυφών φιστικιού του εμπορίου. Η λουτεολίνη εκλύεται στα 23,5 min και η εριοδικτυόλη στα 19,5 min.

Χρωματογραφήματα HPLC των μεθανολικών εκχυλισμάτων κελυφών φιστικιού παραπροϊόντων της βιομηχανίας.



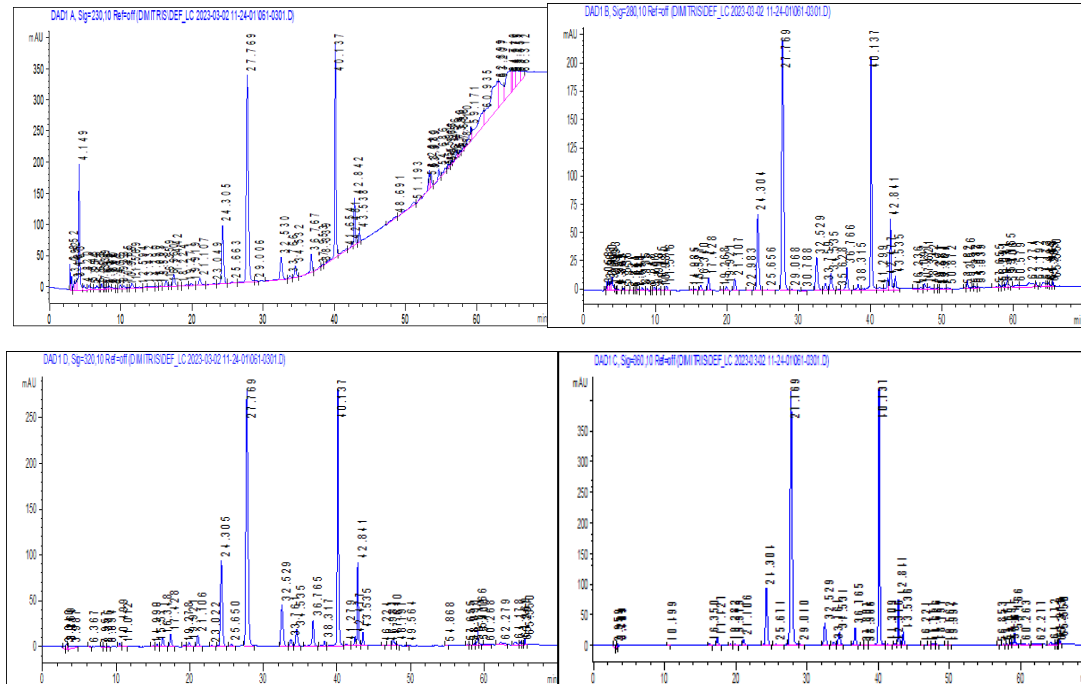
Εικόνες Π2 (α,β): Τα χρωματογραφήματα για την εξέταση με HPLC των μεθανολικών εκχυλισμάτων κελυφών φιστικιού της βιομηχανίας στα 280 nm και τα 360 nm. Η λουτεολίνη εκλύεται στα 39,9 min και η εριοδικτυόλη στα 33,5 min.



Εικόνες Π3 (α-γ): Τα χρωματογραφήματα για την εξέταση με HPLC των υδατικών εκχυλισμάτων κελυφών φιστικιού της βιομηχανίας στα 280 nm (α) και τα 360 nm (β). Η λουτεολίνη εκλύεται στα 40,2 min, και από το φάσμα της (γ), προκύπτει ότι είναι σε μορφή αγλυκόνης. Συνεπώς κύριοι γλυκοζίτες δεν υπάρχουν σε αναγνωρίσιμες ποσότητες στο υδατικό εκχύλισμα.

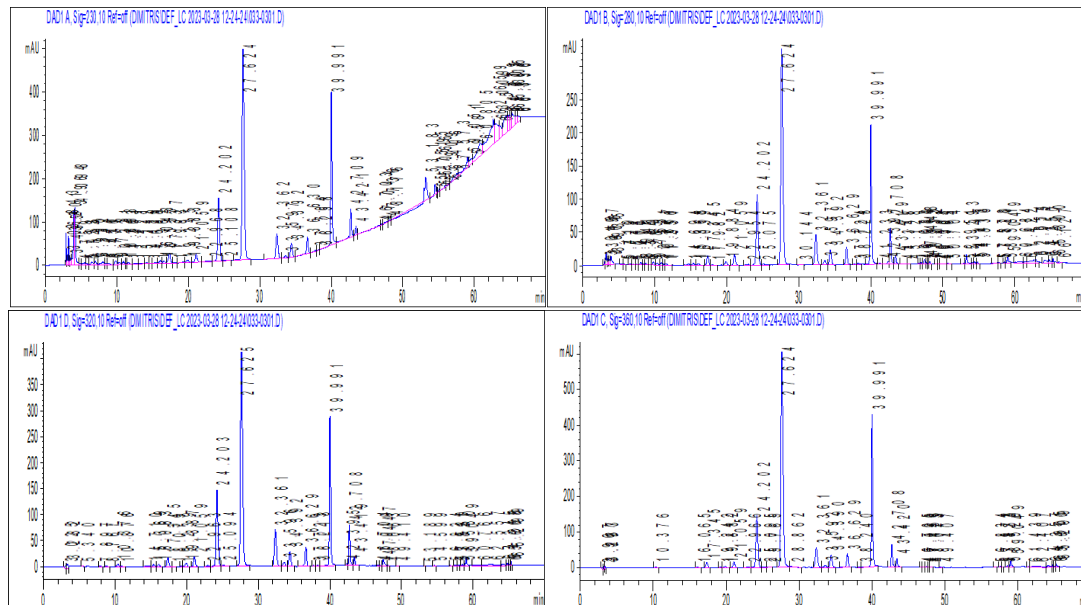
Π.2.2 *Reseda luteola*

Χρωματογραφήματα λεπτού κλάσματος



Εικόνες Π4 (α-δ): Τα χρωματογραφήματα του λεπτού κλάσματος για κάθε μήκος κύματος ανάλυσης στην HPLC. (Αραίωση 1:4).

Χρωματογραφήματα ξυλώδους κλάσματος



Εικόνες Π5 (α-δ): Τα χρωματογραφήματα του ξυλώδους κλάσματος για κάθε μήκος κύματος ανάλυσης στην HPLC (Αραίωση 1:2).

Αναλυτικά αποτελέσματα αναλύσεων στα εκχυλίσματα λεπτού κλάσματος

Πίνακας Π5: Τα αναλυτικά αποτελέσματα των αναλύσεων για το λεπτό κλάσμα του φυτού *R. Luteola* L.

Μέγεθος		1 st	2 nd	3 rd	4 th	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
material mass(g)		20	20	19	19	19,7	0,7
Volume of extract(mL)		400	400	380	380	393	14
TSY(mg/g material)		239	162	188	230	210	18
TSC(g/Lextract)		12	8,1	9,4	12	11	1
FOLIN	C(mgGAE/Lextract)	850	730	551	793	791	60
	C(mgLUT/Lextract)	1039	983	734	973	998	36
	TPC(mgGAE/g material)	17	15	11	16	16	1
	TPC(mgLUT/g material)	21	20	15	20	20	0,7
	TPC(% GAE)	1,7	1,5	1,1	1,6	1,6	0,1
	TPC(%LUT)	2,1	2,0	1,5	2,0	2,0	0,1
	E(mgGAE/g solids)	71	90	59	69	77	12
	E(mgLUT/g solids)	87	122	78	85	98	21
DPPH	C(mgtrollox/Lextract)	1618	1433	1123	1257	1278	181
	C(mgLUT/Lextract)	1235	1043	835	884	939	176
	TPC(mgtrollox/g material)	32	29	23	25	26	4
	TPC(mgLUT/g material)	25	21	19	20	20	3
	TPC(% TROLLOX)	3,2	2,9	2,3	2,5	2,6	0,4
	TPC(%LUT)	2,5	2,1	1,9	2,0	2,0	0,3
	E(mgtrollox/g solids)	136	177	119	109	148	34
	E(mgLUT/g solids)	103	129	99	85	114	22
HPLC	C(mgLUT/Lextract)	735	516	421	590	614	111
	C(mgLUT/g material)	17	12	11	13	14	3
	%LUTEOLIN	1,7	1,2	1,1	1,3	1,4	0,3
	E(mgLUT/g solids)	72	75	59	60	69	8

Αναλυτικά αποτελέσματα αναλύσεων στα εκχυλίσματα ξυλώδους κλάσματος

Πίνακας Π6: Τα αναλυτικά αποτελέσματα των αναλύσεων για το ξυλώδες κλάσμα του φυτού *R. Lute-ola L.*

Μέγεθος		1 st	2 nd	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
material mass(g)		18	18	18	0
Volume of extract(mL)		400	400	400	0
TSY(mg/g material)		173	118	146	39
TSC(g/Lextract)		7,8	5,3	6,6	1,8
FOLIN	C(mgGAE/Lextract)	543	541	542	1,6
	C(mgLUT/Lextract)	657	654	655	1,9
	TPC(mgGAE/g material)	12	12	12	0,1
	TPC(mgLUT/g material)	15	15	15	0,1
	TPC(% GAE)	1,2	1,2	1,2	0,01
	TPC(% LUT)	1,5	1,5	1,5	0,01
	E(mgGAE/g solids)	70	102	86	23
	E(mgLUT/g solids)	85	123	104	27
DPPH	C(mgtrollox/Lextract)	930	854	892	54
	C(mgLUT/Lextract)	628	614	621	10
	TPC(mgtrollox/g material)	21	19	20	1
	TPC(mgLUT/g material)	14	14	14	0,3
	TPC(% TROLLOX)	2,1	1,9	2,0	0,1
	TPC(% LUT)	1,4	1,4	1,4	0,0
	E(mgtrollox/g solids)	120	161	141	29
	E(mgLUT/g solids)	81	116	99	25
HPLC	C(mgLUT/Lextract)	576	529	552	33
	C(mgLUT/g material)	11	11	11	0,1
	% LUTEOLIN	1,1	1,1	1,1	0,01
	E(mgLUT/g solids)	67	67	67	0,1

Π3 Όξινη υδρόλυση και απομόνωση

Π.3.1 Υπολογισμοί

Πίνακες όξινης υδρόλυσης λεπτού και ξυλώδους κλάσματος

ΠΙΝΑΚΑΣ Π7: Αναλυτικός πίνακας υπολογισμών όξινης υδρόλυσης λεπτού κλάσματος.

Χρόνος έκλυσης (min)	Διορθωμένη απορρόφηση			% Υδρόλυση γλυκοζιτών	Μορφή φλαβονοειδών
	Εκχύλισμα πριν την υδρόλυση	Διήθημα υδρόλυσης	Αναδιαλυμένο ίζημα υδρόλυσης		
17,4	471	353	92	5,7%	Γλυκοζίτης απιγενίνης
24,3	4698	87	0,0	98%	Απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίτης
27,8	23639	1129	5598	72%	Λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης
32,5	257	140	32	33%	Γλυκοζίτης απιγενίνης
34,5	1086	67	298	66%	Γλυκοζίτης λουτεολίνης
36,8	1191	9,2	0,0	99%	Γλυκοζίτης απιγενίνης
Χρόνος έκλυσης (min)	Διορθωμένη απορρόφηση			% Υδρόλυση γλυκοζιτών	Μορφή φλαβονοειδών
	Εκχύλισμα πριν την υδρόλυση	Διήθημα υδρόλυσης	Αναδιαλυμένο ίζημα υδρόλυσης		
40,1	14110	845	36469	258%	Λουτεολίνη
42,8	2325	99,5	4293	185%	Απιγενίνη
43,5	674	32	1275	189%	Λουτεολίνη-3'-μεθυλαιθέρας

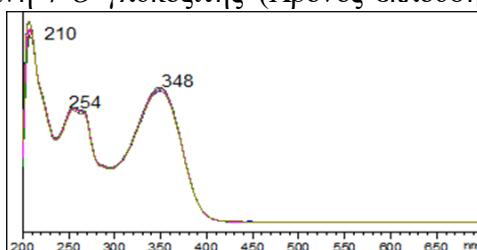
ΠΙΝΑΚΑΣ Π8: Αναλυτικός πίνακας υπολογισμών όξινης υδρόλυσης ξυλώδους κλάσματος

Χρόνος έκλυσης (min)	Διορθωμένη απορρόφηση			% Υδρόλυση γλυκοζιτών	Μορφή φλαβονοειδών
	Εκχύλισμα πριν την υδρόλυση	Διήθημα υδρόλυσης	Αναδιαλυμένο ίζημα υδρόλυσης		
17,4	494	391	78	5,2%	Γλυκοζίτης απιγενίνης
24,3	5838	234	35	95%	Απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίτης
27,8	24922	1359	5723	72%	Λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης
32,5	2088	102	555	69%	Γλυκοζίτης απιγενίνης
34,5	1497	61,4	244	80%	Γλυκοζίτης λουτεολίνης
36,8	1342	0,0	771	43%	Γλυκοζίτης απιγενίνης
Χρόνος έκλυσης (min)	Διορθωμένη απορρόφηση			% Υδρόλυση γλυκοζιτών	Μορφή φλαβονοειδών
	Εκχύλισμα πριν την υδρόλυση	Διήθημα υδρόλυσης	Αναδιαλυμένο ίζημα υδρόλυσης		
40,1	11063	495	30836	279%	Λουτεολίνη
42,8	1332	57	3192	240%	Απιγενίνη
43,5	573	37	1147	200%	Λουτεολίνη-3'-μεθυλαιθέρας

Π.3.2 Μορφές φλαβονοειδών

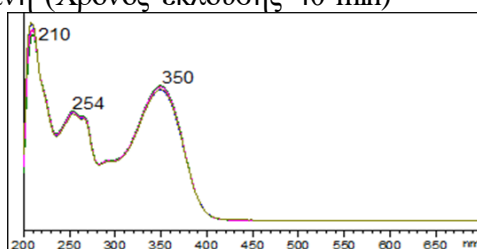
1) Μορφές λουτεολίνης

- Λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης (Χρόνος έκλυσης 27-28 min)



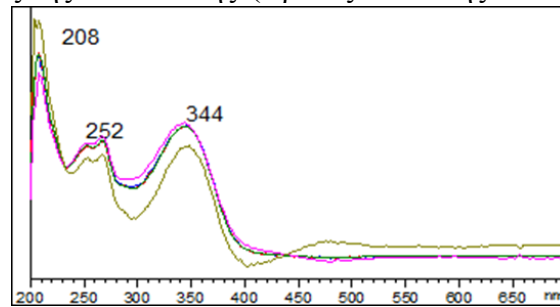
Εικόνα Π6: Το φάσμα του κύριου γλυκοζίτη λουτεολίνης όπως μετρείται στα 360 nm. Με βάση τη σύγκριση με τη βιβλιογραφία βρίσκεται ότι αντιστοιχεί στον λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτη.

- Λουτεολίνη (Χρόνος έκλυσης 40 min)



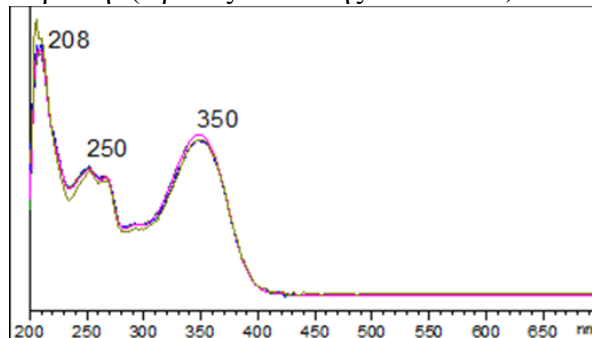
Εικόνα Π7: Το φάσμα της λουτεολίνης όπως μετρείται στα 360 nm. Και εδώ παρατηρείται ταύτιση με τις κορυφές της βιβλιογραφίας και της ανάλυσης πρότυπης λουτεολίνης.

- Γλυκοζίτης λουτεολίνης (Χρόνος έκλουσης 34-35 min)



Εικόνα Π8: Το φάσμα ενός γλυκοζίτη λουτεολίνης όπως μετριέται στα 360 nm. Με βάση την ομοιότητα με το φάσμα της εικόνας Π7 συμπεραίνεται ότι αντιστοιχεί σε γλυκοζίτη λουτεολίνης. Πιθανώς να είναι ο 3'-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, λόγω της ταύτισης του χρόνου έκλουσης με βιβλιογραφικά δεδομένα (Moitero et al 2008).

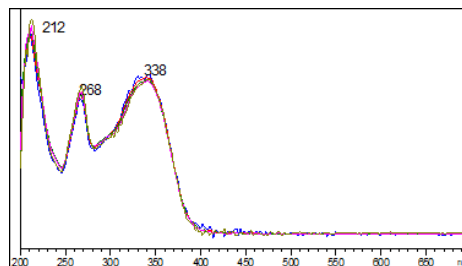
- Χρυσοεριόλη (Χρόνος έκλουσης 43-44 min)



Εικόνα Π9: Το φάσμα της μορφής λουτεολίνης που εκλύεται στα 43,5 min όπως μετριέται στα 360 nm. Με βάση τη σύγκριση με τη βιβλιογραφία και την συμπεριφορά κατά την όξινη υδρόλυση βρίσκεται ότι αντιστοιχεί στην χρυσοεριόλη.

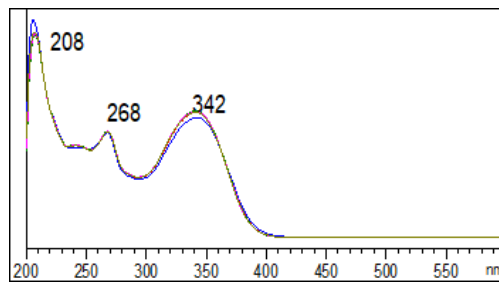
2) Μορφές απιγενίνης

Οι μορφές απιγενίνης που εμφανίζονται στις αναλύσεις του εκχυλίσματος με HPLC, αναγνωρίζονται με βάση την ομοιότητα τους με τις κορυφές φασμάτων της βιβλιογραφίας, καθώς και με την ομοιότητα τους με το φάσμα της αγλυκόνης της απιγενίνης, που παρατέθηκε στην Εικόνα 1.17 (γ). Στην παρούσα διπλωματική εργασία το φάσμα της κορυφής στα 42-43 min είναι το παρακάτω:



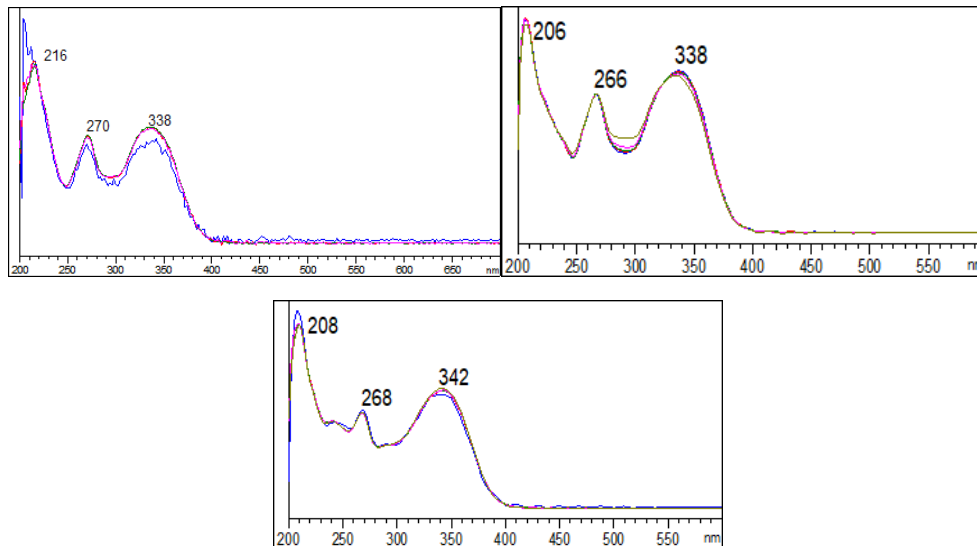
Εικόνα Π9: Το φάσμα της απιγενίνης που μετρήθηκε με την HPLC στα 360 nm.

Η βασική μορφή απιγενίνης στο εκχύλισμα και κατ' επέκτασιν στα υπέργεια μέρη του φυτού, είναι ο απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίτης, του οποίου το φάσμα φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα Π10: Το φάσμα του βασικού απιγενινικού γλυκοζίτη στο φυτό *Reseda luteola L.*

Ακόμη στα υπέργεια μέρη του φυτού συναντώνται ακόμα 3 μορφές φλαβονοειδών, που από τα φάσματα τους (Εικόνες Π11) εξάγεται ότι αποτελούν μορφές απιγενίνης σε χρόνους έκλουσης 17-18 min, 32-33 min και 37 min τα φάσματα των οποίων φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα Π11 (α-γ): Το φάσμα τριών απιγενινικών γλυκοζιτών που αναγνωρίστηκαν στα υπέργεια μέρη του φυτού: ο πρώτος στα 17 min (α), ο δεύτερος στα 32 min (β) και ο τρίτος στα 37 min (γ).

Π4. Υπολογισμοί και εξισώσεις κινητικής μελέτης

Για τον υπολογισμό των καμπυλών αναφοράς TPC ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Αρχικά υπολογίζεται η συγκέντρωση του δείγματος σε ολικές φαινόλες λαμβάνοντας υπόψιν το βαθμό αραίωσης που έχει υποστεί, μέσω της εξίσωσης της Εικόνας 4.2:

$$dc = B. \text{Αραίωσης} * \frac{A - 0,0048}{0,00095} \left(\frac{mg}{L} \right)$$

Οι πρωτογενείς μετρήσεις για κάθε πείραμα φαίνονται παρακάτω:

ΠΙΝΑΚΑΣ Π9: Οι πρωτογενείς μετρήσεις στο λεπτό κλάσμα

t (min)	Απορρόφηση		Βαθμός αραίωσης		dc(mg/L)		V(mL)	
	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πείραμα	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα
0	0,26	0,21	20	20	5267	4341	0	0
1,5	0,33	0,19	10	20	3371	3899	8	8
3	0,27	0,18	10	20	2802	3604	14	14
5	0,23	0,15	10	20	2349	3099	20	20
9	0,16	0,19	10	10	1592	1939	32	32
15	0,33	0,11	3	10	1033	1107	50	54
25	0,56	0,20	1	4	579	818	84	90
45	0,49	0,42	1	1	509	435	132	150
60	0,44	0,40	1	1	462	415	158	190
90	0,25	0,31	1	1	254	321	244	260
105	0,22	0,28	1	1	230	290	300	316

ΠΙΝΑΚΑΣ Π10: Οι πρωτογενείς μετρήσεις στο ξυλώδες κλάσμα

t (min)	Απορρόφηση		Βαθμός αραίωσης		dc(mg/L)		V(mL)	
	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πείραμα	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα
0	0,32	0,29	20	20	6678	5983	0	0
1,5	0,29	0,26	20	20	5899	5352	8	10
3	0,43	0,24	10	20	4486	5036	12	14
5	0,37	0,40	10	10	2769	4160	18	18
9	0,24	0,27	10	10	2497	2771	24	26
15	0,20	0,41	5	3,00	1001	1268	36	42
25	0,42	0,59	2	1	880	616	60	63
45	0,50	0,43	1	1	520	442	100	110
60		0,33		1		344	140	151
90	0,35	0,20	1	1	360	202	216	235
120	0,19	0,18	1	1	197	184	300	310

2. Από τα dc υπολογίζεται το dc/dv ως εξής:

$$\frac{dc}{dv} = \frac{dc \left(\frac{mg}{L} \right) * \frac{V_{sample} (L)}{m_{πρώτης\acute{\upsilon}λης} (g)}}{V_{sample} (L)}$$

3. Από το εμβαδόν της καμπύλης dc/dv-t, υπολογίζεται το Ct για κάθε χρονική στιγμή ως εξής:

$$Εμβαδόν = \frac{\left(\frac{dc}{dv} \right)_{i+1} - \left(\frac{dc}{dv} \right)_i}{(V_{i+1} - V_i)}$$

$$Ct = Ct_{i-1} + E_i \text{ (mg/g material)}$$

Ως Ct₀ ορίζεται το dc/dv(0) για κάθε διεργασία.

4. Από τα παραπάνω το διάγραμμα του 2^{ου} νόμου του Fick $\ln(C_{inf}-C_t)-t$ σχεδιάζεται βρίσκοντας το $\ln(C_{inf}-C_t)$ με τον τρόπο που αναφέρθηκε και στην Παράγραφο 4.4.

Για τον υπολογισμό της καμπύλης λουτεολίνης ακολουθείται η ίδια διαδικασία, με το dc της λουτεολίνης να υπολογίζεται από την εξίσωση του προτύπου στα 360 nm:

$dc \left(\frac{mg}{L} \right) = \text{Βαθμός αραίωσης} * \frac{\text{Area}-253}{67,8}$, όπου Area = Το συνολικό εμβαδό των κορυφών των τεσσάρων μορφών λουτεολίνης στα 360 nm.

ΠΙΝΑΚΕΣ Π11-Π12: Πρωτογενείς μετρήσεις για λεπτό (πάνω) και ξυλώδες (κάτω) κλάσμα για την κινητική μελέτη της λουτεολίνης.

t(min)	Area (360 nm)		Βαθμός αραίωσης		dc(mg/L)	
	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα	1 ^ο πείραμα	2 ^ο πεί- ραμα	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα
0	64616	66282	4	4	3732	3828
3	31589	54158	4	4	1833	3131
9	20461	29529	4	4	1194	1517
15	13318	14912	4	4	783	875
25	18846	10352	2	4	550	613
60	13724	21718	2	1	403	317
105	10445	8979	1	1	154	133

t(min)	Area (360 nm)		Βαθμός αραίωσης		dc(mg/L)	
	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα	1 ^ο πείραμα	2 ^ο πεί- ραμα	1 ^ο πεί- ραμα	2 ^ο πεί- ραμα
0	68625	72044	4	4	3963	4159
3	53401	63528	4	4	3087	3670
9	35308	37217	4	4	2047	1907
15	20375	18242	4	4	1189	1066
25	57012	11085	1	4	824	655
45	33722	15805	1	2	475	463
120	11310	9635	1	1	167	143

Τα υπόλοιπα βήματα για την εύρεση της κινητικής εξίσωσης της λουτεολίνης είναι παρόμοια με αυτά που ακολουθήθηκαν για την αντίστοιχη των ολικών φαινολών.