



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
«Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης  
συζευγμένης με ανιχνευτή φωτοδιόδων (HPLC-DAD) για τον  
προσδιορισμό επιλεγμένων φαινολικών ενώσεων που απαντώνται σε  
φυτικά εγχύματα»

MSc Thesis

«Development of a high-pressure liquid chromatography coupled with  
diode array detector method, for the determination of selected phenolic  
compounds found in herbal infusions»

Διευθυντής

Καθ. Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΠΑ.Δ.Α)

**Βασιλεία Σινάνογλου**

Όνομα φοιτητή: **Ελένη-Μυρτώ Καραγεωργίου**

Name of student: **Eleni-Myrto Karageorgiou**

Όνομα εισηγητή: **Δρ. Ειρήνη Στρατή**

Name of supervisor: **Dr. Eirini Strati**

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023



Faculty of Food Sciences

Department of Food Science and Technology

Master of Science

**FOOD INOVATION, QUALITY AND SAFETY**

MSc Thesis

**«Development of a high-pressure liquid chromatography coupled with diode array detector method, for the determination of selected phenolic compounds found in herbal infusions»**

**Eleni-Myrto Karageorgiou**

Registration number: 21014

Email: [fiqs21014@uniwa.gr](mailto:fiqs21014@uniwa.gr)

Supervisor: **Dr. Eirini Strati**

**Aigaleo 2023**

## **Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας**

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο “Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένης με ανιχνευτή φωτοδιόδων (HPLC-DAD) για τον προσδιορισμό επιλεγμένων φαινολικών ενώσεων που απαντώνται σε φυτικά εγχύματα” που παρουσιάστηκε από την Ελένη-Μυρτώ Καραγεωργίου, υποψήφια για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

31/08/2023

### **Όνομα επιβλέποντος**

Ειρήνη Στρατή  
Επίκουρη Καθηγήτρια

### **Όνομα μέλους επιτροπής**

Βασιλεία Σινάνογλου  
Καθηγήτρια  
Κοσμήτορας της Σχολής Επιστημών Τροφίμων

### **Όνομα μέλους επιτροπής**

Θάλεια Τσιάκα  
Διδάσκουσα στο πλαίσιο υλοποίησης της πράξης «Απόκτηση ακαδημαϊκής διδακτικής εμπειρίας σε νέους επιστήμονες κατόχους διδακτορικού 2022-2023 στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής»

### **Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright**

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

**Ελένη-Μυρτώ Καραγεωργίου**

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς την Δρ. Είρηνη Στρατή, Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του τμήματος, καθώς και για την αμέριστη και ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε .

Επίσης θα ήθελα να απαραιτήτως να ευχαριστήσω την Δρ. Θάλεια Τσιάκα, Διδάσκουσα στο πλαίσιο υλοποίησης της πράξης «Απόκτηση ακαδημαϊκής διδακτικής εμπειρίας σε νέους επιστήμονες κατόχους διδακτορικού 2022-2023 στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, για την σημαντική συμβολή της, καθώς ο χρόνος που αφιέρωσε, οι συμβουλές και η βοήθεια που μου έδωσε ήταν καθοριστικής σημασίας για την εξέλιξη της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου αλλά και τα άτομα του εργασιακού μου περιβάλλοντος για την στήριξη και την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα που χρειάστηκα για να ολοκληρώσω την εργασία αυτή.

## Περίληψη

Είναι ευρέως αποδεκτό πως ανάμεσα στις διάφορες τεχνικές διαχωρισμού, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συγκαταλέγεται στις πιο αξιόπιστες τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πολλών ενώσεων σε ένα μίγμα. Εκμεταλλευόμενη τις διαφορετικές χημικές ιδιότητες (π.χ μέγεθος, πολικότητα ή συγγένεια με τη στατική ή τη κινητή φάση) των προς ανάλυση ενώσεων, η HPLC είναι μια ιδανική τεχνική για τον διαχωρισμό μεγάλης ποικιλίας αναλυτών (π.χ. βιταμίνες, μυκοτοξίνες, βιοδραστικές ενώσεις κ.α). Παρόλα αυτά, ακόμη και στις περιπτώσεις που οι ενώσεις μιας μήτρας «μοιράζονται» παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, χάρη στην υψηλή εκλεκτικότητα της, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι σε θέση να διαχωρίσει τους αναλύτες διασφαλίζοντας μια ακριβή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση.

Η ανάπτυξη της μεθόδου HPLC διαδραματίζει ένα από τους σημαντικότερους ρόλους για την αξιοποίηση των δυνατοτήτων της αλλά και την αντιμετώπιση των περιορισμών της. Τα βασικότερα βήματα τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη της μεθόδου είναι τα ακόλουθα: Πλήρης κατανόηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της προς ανάλυση μήτρας ή των προς ανάλυση ενώσεων, Επιλογή αρχικών χρωματογραφικών συνθηκών (επιλογή στήλης, τύπος έκλουσης, βελτιστοποίηση σύνθεσης κινητής φάσης, επιλογή ανιχνευτή), Προκατεργασία δείγματος, Βελτιστοποίηση της μεθόδου και τέλος Επικύρωση της μεθόδου. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή φωτοδιόδων (HPLC-DAD) για τον προσδιορισμό επιλεγμένων ενώσεων όπως τα φαινολικά οξέα από δείγματα εγχυμάτων.

Τα φαινολικά οξέα είναι μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις με κοινό χαρακτηριστικό τους την ύπαρξη τουλάχιστον μιας καρβοξυλομάδας στον δακτύλιο του βενζολίου. Από βιοσυνθετικής απόψεως, προέρχονται από δυο κύριες φαινολικές ενώσεις, το βενζοϊκό και το κινναμικό οξύ. Παραδείγματα υδροξυ-βενζοϊκών παραγώγων αποτελούν το γαλλικό οξύ, το p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, το βανιλικό, το συριγγικό οξύ ενώ το καφεϊκό, το φερουλικό, το σιναπτικό και το p-κουμαρικό ανήκουν στα υδροξυ-κινναμικά οξέα. Αξιοσημείωτη είναι και η μεγάλη ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει τα φαινολικά οξέα καθώς τη τελευταία δεκαετία έχουν αναφερθεί πάνω 30 διαφορετικά οξέα με έντονη

βιολογική δράση, ενώ βρίσκονται σε αφθονία σε πάρα πολλά φρούτα, λαχανικά, αρωματικά φυτά αλλά και στον καφέ.

Συνολικά, η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν βαθμιδωτή χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση ένα σύστημα μεθανόλης-νερού-οξικού οξέος 2% με ρυθμό ροής 1mL ανά λεπτό, εγχύοντας 20μL δείγματος και σαρώνοντας για 53 λεπτά στα 280nm. Με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα 16 φαινολικά οξέα, ενώ η εφαρμογή της μεθόδου σε επιλεγμένα δείγματα καφέ και παραπροϊόντων αρωματικών φυτών όπως η ρίγανη, τα ρόδα και η λεβάντα φανέρωσε αξιοσημείωτες μεταβολές στο φαινολικό προφίλ. Πιο συγκεκριμένα, στο χλωρογενικό οξύ το οποίο βρίσκεται στη μεγαλύτερη αφθονία στον καφέ παρατηρήθηκε μείωση (από 6mg ανά g ξηρού δείγματος σε 0.5mg ανά g ξηρού δείγματος) ανάλογη με την ένταση του καβουρδίσματος. Όσον αφορά στα παραπροϊόντα αρωματικών φυτών, ανιχνεύθηκαν σε όλα ροσμαρινικό οξύ και 4-υδροξύ βενζοϊκό οξύ. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα δείγματα καφέδων, το προφίλ φαινολικών οξέων στα παραπροϊόντα χαρακτηρίστηκε από σημαντικές διακυμάνσεις οι οποίες πιθανόν να οφείλονται σε διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας και διαχείρισης. Η παρούσα μέθοδος μπορεί να βρει εφαρμογή στην ανάλυση τροφίμων ενώ με την επικύρωση της, την διεύρυνση του πεδίου εφαρμογής της και τον εμπλουτισμό των ενώσεων που μπορούν να προσδιοριστούν με αυτή μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο και αξιόπιστο αναλυτικό εργαλείο.

**Λέξεις-κλειδιά:** υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, φαινολικά οξέα, εγχύματα, χλωρογενικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, καφές, αρωματικά φυτά

## **Abstract**

It is widely accepted that among the separation methodologies, high-performance liquid chromatography is among the most reliable techniques for the detection and quantification of various compounds in a complex mixture. Taking advantage of chemical characteristics (polarity, affinity with stationary or mobile phase) of the analytes, HPLC offers the simultaneous determination of the studied compounds. Nevertheless, even in cases that the compounds of a given matrix “share” same chemical characteristics, thanks to its high selectivity, HPLC is able to separate them ensuring an accurate detection and quantification.

Meanwhile, the development of the HPLC method plays on of the most important roles in exploiting its potential but also addressing its limitations. The main steps involved in the development of such a method are: (a) complete understanding of the physicochemical properties of the matrix to be analyzed or the compounds to be analyzed, (b) selection of initial chromatographic conditions (column selection, elution type, composition of the mobile phase), (c) pre-treatment of sample, (d) optimization of the method and (e) validation of the developed method. The aim of this post-graduate study was to develop such an HPLC-DAD method for the determination of selected compounds such as phenolic acids from herbal infusions.

Phenolic acids are non-flavonoid phenolic compounds with a common characteristic of having at least one carboxyl group on the benzene ring. From a biosynthetic point of view, they are derived from two main phenolic compounds known as benzoic and cinnamic acid, while they are found in abundance in many fruits, vegetables, aromatic plants as well as coffee. Example of hydroxy-benzoic derivatives are gallic acid, p-hydroxy benzoic acid, vanillic acid, syringic acid while caffeic acid, ferulic acid, sinapic and p-coumaric belong to hydroxy-cinnamic acids. The great diversity that characterizes phenolic acids is also noteworthy, since over 30 different acids (with intense biological activity) have been reported in the last decade.

Overall, the developed method was stepwise using methanol-water-acetic acid 2% as mobile phase at a flow rate of 1mL per minute, injecting 20 microliters of sample and scanning for 53 in total at 280nm. The present method allows the simultaneous determination of 16 phenolic acids, while the application of the



method to selected samples of coffee and by-products of aromatics plants (oregano, rose, lavender) revealed remarkable changes in the phenolic profile. More specifically, chlorogenic acid, which was found to in greater abundance in most of the coffee samples, decreased (from 6mg per gr of dry sample to <1.0mg per gr dry sample) in proportion to the intensity of roasting (light-medium-dark). Regarding by-products of aromatic plants phenolic profile was dominated by rosmarinic and p-hydroxy benzoic acids.

However, in contrast to the coffee samples, the phenolic acid profile in the by-products was characterized by significant variations which may be related with the different processing and handling conditions. The present method can be applied in the sector of food analysis, while its validation as well as expansion of use by enriching the compound to be analyzed or type of samples, can transform it into a very useful and reliable analytical tool.

<b>Περιεχόμενα</b>	
<b>Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright</b> .....	4
<b>Ευχαριστίες</b> .....	5
<b>Περίληψη</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	8
<b>Κατάλογος Πινάκων</b> .....	12
<b>Κατάλογος Εικόνων</b> .....	13
<b>Κεφάλαιο 1° Υγρή χρωματογραφία</b> .....	15
<b>1.1. Από το παρελθόν στο μέλλον της υγρής χρωματογραφίας</b> .....	15
<b>1.2 Δυνατότητες και περιορισμοί υγρής χρωματογραφίας</b> .....	16
<b>1.3 Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης</b> .....	19
<b>1.3.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες</b> .....	19
<b>1.3.2 Επιλογή χρωματογραφικών συνθηκών</b> .....	20
<b>1.3.2.1 Επιλογή της κατάλληλης στήλης</b> .....	20
<b>1.3.2.2 Σύνθεση της κινητής φάσης</b> .....	21
<b>1.3.3 Προετοιμασία δειγμάτων</b> .....	22
<b>1.3.4 Βελτιστοποίηση της μεθόδου</b> .....	22
<b>1.3.5 Επικύρωση της μεθόδου</b> .....	23
<b>1.4 Προηγμένες εφαρμογές υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης</b> .....	24
<b>Κεφάλαιο 2° Φαινολικές ενώσεις</b> .....	25
<b>2.1 Εισαγωγή</b> .....	25
<b>2.2 Ταξινόμηση φαινολικών ενώσεων</b> .....	26
<b>2.3 Φαινολικά οξέα</b> .....	28
<b>2.3.1 Χλωρογενικό οξύ</b> .....	30
<b>2.3.2 Ροσμαρινικό οξύ</b> .....	31
<b>2.3.3 4-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ</b> .....	31
<b>2.4 Λειτουργικές ιδιότητες φαινολικών οξέων</b> .....	32
<b>2.5 Προσδιορισμός φαινολικών οξέων με τη χρήση HPLC</b> .....	35
<b>Κεφάλαιο 3° Φυτικά εγχύματα</b> .....	38
<b>3.1. Γενικά</b> .....	38
<b>3.2 Μελετώμενα βότανα</b> .....	39
<b>3.2.1 Ρίγανη</b> .....	39
<b>3.2.2 Λεβάντα</b> .....	40
<b>3.2.3 Ρόδα</b> .....	41

3.2.4 Καφές.....	43
3.3 Λειτουργικές ιδιότητες των επιλεγμένων αρωματικών φυτών .....	45
3.4 Απαντώμενα φυτοχημικά συστατικά στα μελετώμενα εγχύματα .....	49
Κεφάλαιο 4° Σκοπός πειραματικής εργασίας.....	55
Κεφάλαιο 5° Υλικά και μέθοδοι.....	56
5.1 Γενικό πλαίσιο - Περιγραφή εργασιών.....	56
5.2 Διαλύτες και οργανολογία.....	57
5.3 Ταυτοποίηση φαινολικών οξέων.....	57
5.4 Πειραματικό πρωτόκολλο-Υπολογισμοί περιεχομένου φαινολικών οξέων .....	59
Κεφάλαιο 6° Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	61
6.1 Επιλογή αρχικής μεθόδου και πρώτες δοκιμές.....	61
6.1.1 Βελτιστοποίηση μεθόδου .....	62
6.1.2 Γραμμικότητα τελικής μεθόδου προσδιορισμού.....	64
6.2 Ταυτοποίηση των ενώσεων .....	68
6.3 Περιεχόμενο των φαινολικών οξέων επιλεγμένων δειγμάτων .....	70
6.3.1 Επιλεγμένα δείγματα καφέ.....	70
6.3.2 Εφαρμογή μεθόδου σε επιλεγμένα δείγματα αρωματικών φυτών .....	72
6.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	74
6.4.1 Αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού .....	74
6.4.2 Εφαρμογή της μεθόδου σε επιλεγμένα δείγματα.....	77
6.4.2.1 Επιλεγμένα δείγματα καφέ.....	77
6.4.2.2 Εφαρμογή σε παραπροϊόντα αρωματικών φυτών.....	78
6.5 Συμπεράσματα.....	80
6.6 Μελλοντικές προοπτικές.....	81
Αναφορές.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Ξενόγλωσση.....	83
Ελληνική .....	94

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1-1 Δυνατότητες και περιορισμοί Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.....	19
Πίνακας 2-1 Θεραπευτικές ιδιότητες 4-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος .....	37
Πίνακας 2-2 Χαρακτηριστικά παραδείγματα χρήσης υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης για τον προσδιορισμό φαινολικών οξέων .....	39
Πίνακας 3-1 Βασικές φαινολικές ενώσεις που απαντώνται σε διάφορες ποικιλίες ρίγανης.....	53
Πίνακας 5-1 Φαινολικά οξέα που περιλαμβάνει η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας.....	61
Πίνακας 5-2 Εμβολιασμός δειγμάτων με αντιπροσωπευτικά μίγμα φαινολικών οξέων γνωστής συγκέντρωσης.....	63
Πίνακας 6-1 Αρχικές δοκιμαστικές παράμετροι υγρής χρωματογραφίας.....	67
Πίνακας 6-2 Χρωματογραφικές συνθήκες τελικής μεθόδου ανάπτυξης.....	68
Πίνακας 6-3 Εξισώσεις και συντελεστές συσχέτισης για τα επιλεγμένα προσδιοριζόμενα φαινολικά οξέα .....	70
Πίνακας 6-4 Αντιστοίχιση χρόνων έκλουσης πρότυπων διαλυμάτων με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης μίγματος φαινολικών οξέων.....	66
Πίνακας 6-5 Αντιστοίχιση χρόνων έκλουσης μη εμβολιασμένων και εμβολιασμένων δειγμάτων καφέ με επιλεγμένα οξέα.....	67
Πίνακας 6-6 Αντιστοίχιση χρόνων έκλουσης μη εμβολιασμένων και εμβολιασμένων δειγμάτων αρωματικών φυτών με επιλεγμένα οξέα.....	73
Πίνακας 6-7 Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) ήπια καβουρδισμένου καφέ - 107 σε φαινολικά οξέα.....	76
Πίνακας 6-8 Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) μέτρια καβουρδισμένου καφέ - 205 σε φαινολικά οξέα.....	77
Πίνακας 6-9 Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) σκούρου και πιο έντονα καβουρδισμένου καφέ - 302 σε φαινολικά οξέα.....	77
Πίνακας 6-10 Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) αρωματισμένου με κάρδαμο καφέ - 504 σε φαινολικά οξέα.....	78
Πίνακας 6-11 Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) αρωματικού φυτού ρίγανης.....	79
Πίνακας 6-12 Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) αρωματικού φυτού ρόδων.....	79
Πίνακας 6-13 Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) αρωματικού φυτού λεβάντας.....	79
Πίνακας 6-14 Αρχικές και τελικές παράμετροι της μεθόδου.....	80

Πίνακας 6-15 Συνολικό περιεχόμενο φαινολικών οξέων για κάθε επιλεγμένο δείγματα καφέ.....	82
Πίνακας 6-16 Συνολικό περιεχόμενο φαινολικών οξέων για κάθε επιλεγμένο δείγματα αρωματικού φυτού.....	84
<b>Κατάλογος Εικόνων</b>	
Εικόνα 1-1 Τυπική διάταξη χρωματογράφου υψηλής πίεσης.....	17
Εικόνα 1-2 Βασικά στάδια ανάπτυξης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας.....	25
Εικόνα 2-1 Ετήσιος αριθμός δημοσιεύσεων που περιλαμβάνει τον όρο φαινολικές ενώσεις.....	27
Εικόνα 2-2 Ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων σε φλαβονοειδή ή μη και οι επιμέρους κατηγορίες που αυτές περιλαμβάνουν.....	29
Εικόνα 2-3 Χημικές δομές των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών φαινολικών οξέων.....	31
Εικόνα 2-4 Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης φαινολικών οξέων μέσω του φαινυλ-προπανοειδούς μονοπατιού.....	32
Εικόνα 2-5 Χημική δομή του χλωρογενικού οξέος.....	32
Εικόνα 2-6 Χημική δομή ροσμαρινικού οξέος.....	33
Εικόνα 2-7 Χημική δομή του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος.....	34
Εικόνα 2-8 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης και εμπλεκόμενες ευεργετικές ιδιότητες του χλωρογενικού οξέος.....	35
Εικόνα 3-1 Κοινή ποικιλία ρίγανης <i>Oreganum vulgare</i> (a) και ελληνική ποικιλία ρίγανης <i>Oreganum hirtum</i> (b).....	42
Εικόνα 3-2 Αντιπροσωπευτική απεικόνιση του αρωματικού φυτού λεβάντας.....	44
Εικόνα 3-3 Ποικιλίες λευκών και μωβ τριανταφυλλιών.....	45
Εικόνα 3-4 Χαρακτηριστικές ποικιλίες καφέ <i>Arabica</i> και <i>Robusta</i> (καρπός, καφεόδεντρο και κόκκοι).....	47
Εικόνα 3-5 Κυριότερες κατηγορίες τερπενοειδών σε εκχυλίσματα ρόδων.....	57
Εικόνα 6-1 Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των 14 πρότυπων διαλυμάτων φαινολικών οξέων μέσω της χρήσης HPLC-DAD ανάλυσης (280nm).....	62
Εικόνα 6-2 Καμπύλες αναφοράς για τις φαινολικές ενώσεις γαλλικού οξέος A), πρωτοκατεχουϊκού οξέος B) και γεντιζικού οξέος C).....	71
Εικόνα 6-3 Καμπύλες αναφοράς για τις φαινολικές ενώσεις 4-υδροξυβενζοϊκό A), χλωρογενικό B) και Καφεϊκό οξύ C).....	71
Εικόνα 6-4 Καμπύλες αναφοράς για τις φαινολικές ενώσεις συριγγικό A), φερουλικό B) και κινναμικό οξύ C).....	72
Εικόνα 6-5 Καμπύλες αναφοράς για τις φαινολικές ενώσεις m-κουμαρικό A), σιναπικό B), και σαλικυλικό οξύ C).....	72

<i>Εικόνα 6-6 Καμπύλες αναφοράς για τις φαινολικές ενώσεις ο-κουμαρικό A), ροσμαρινικό B), βενζοϊκό C), και βανιλικό D).....</i>	<i>73</i>
<i>Εικόνα 6-7 Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα για τα 4 επιλεγμένα είδη καφέ: A: ήπια καβουρδισμένος -107, B: μέτρια καβουρδισμένος – 205, C) σκουρόχρωμος – 302, D) εμπλουτισμένος με κάρδαμο – 504.....</i>	<i>76</i>
<i>Εικόνα 6-8 Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα για τα 3 επιλεγμένα είδη αρωματικών φυτών: A: Ρίγανη, B: Ρόδα, Γ: Λεβάντα.....</i>	<i>78</i>

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> Υγρή χρωματογραφία

### 1.1. Από το παρελθόν στο μέλλον της υγρής χρωματογραφίας

Η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στον τομέα της ενόργανης ανάλυσης τροφίμων, επιτρέποντας το διαχωρισμό, τη ταυτοποίηση και τελικά τον ποσοτικό προσδιορισμό διάφορων ενώσεων που μπορεί να βρίσκονται σε ένα πιο σύνθετο σύστημα ή μήτρα (matrix) όπως είναι τα τρόφιμα. Με τη πρόοδο των τεχνολογικών εφαρμογών αλλά και λόγω της αυξανόμενης ανάγκης για την ανάπτυξη προηγμένων αναλυτικών τεχνικών, η υγρή χρωματογραφία έχει γνωρίσει σημαντική ανάπτυξη τις τελευταίες δεκαετίες. Τα κυριότερα ορόσημα που έπαιξαν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της θεωρούνται: (α) η εισαγωγή στην έννοια της χρωματογραφίας (αρχές 1900), (β) η ενσωμάτωση χρωματογραφικών στηλών (μέσα 1950), και τελικά (γ) η εισαγωγή του εμπορικά διαθέσιμου εξοπλισμού υψηλής πλέον απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), τη δεκαετία του 1970.

Τα βασικά θεμέλια στα οποία βασίστηκαν οι βασικές αρχές της LC, θεσπίστηκαν στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα από τον Mikhail Tsvet ο οποίος για πρώτη φορά διαχώρισε φυτικής προέλευσης χρωστικές χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές τεχνικές (Tswett, 1906) ενώ έως τα τέλη της δεκαετίας του 1930 είχε αναπτυχθεί η χρωματογραφική μέθοδος προσρόφησης στήλης. Στη συνέχεια (μέσα δεκαετίας 1940) ο Martin και οι ομάδα του προσπάθησαν να ελαχιστοποιήσουν τους περιορισμούς της μεθόδου εισάγοντας για πρώτη φορά έννοιες όπως η «τεχνική διαχωρισμού» ή η «υγρή-στατική φάση» (Martin and Synge, 1941).

Έπειτα από περίπου μια δεκαετία σημειώθηκε άλλη μια σημαντική πρόοδος η οποία αφορούσε τις στήλες που μέχρι τότε χρησιμοποιούνταν στην υγρή χρωματογραφία. Για πρώτη φορά βρίσκουν εφαρμογή στήλες που περιείχαν στερεά σωματίδια και μεγαλύτερο αριθμό πλακών, παρέχοντας βελτιωμένη ανάλυση και ταχύτερους διαχωρισμούς (Majors, 2015). Λίγο αργότερα, σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές που σχετίζονται αμιγώς με την οργανολογία της HPLC, νέα συστήματα χρωματογραφίας αλλά και βελτιωμένοι

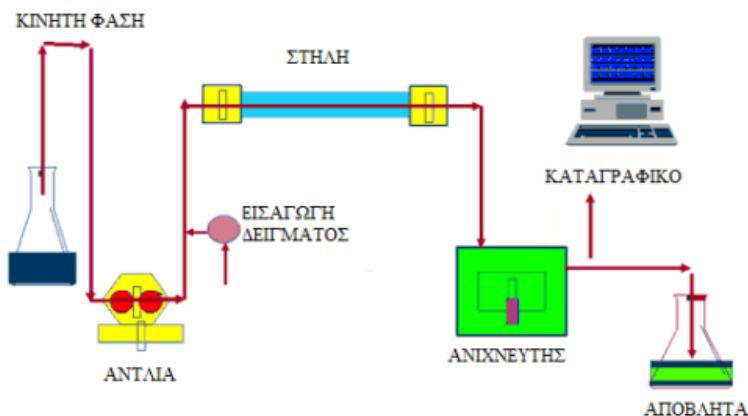
ανιχνευτές, οι οποίοι ενίσχυσαν την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα των μεθόδων προσδιορισμού (Marston and Hostettmann, 2009).

Έκτοτε, η περαιτέρω ανάπτυξη εξειδικευμένων εφαρμογών και στατικών φάσεων επέκτεινε ακόμη περισσότερο τις δυνατότητες της HPLC. Στις μέρες μας, η HPLC αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο ανάλυσης τροφίμων η οποία χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες δυνατότητες ή και περιορισμούς. Ωστόσο, οι συνεχείς εξελίξεις στοχεύουν στην υπέρβαση των όποιων περιορισμών, διασφαλίζοντας ότι η HPLC θα παραμείνει μια σημαντική αναλυτική τεχνική.

## **1.2 Δυνατότητες και περιορισμοί υγρής χρωματογραφίας**

Είναι ευρέως αποδεκτό πως ανάμεσα στις διάφορες τεχνικές διαχωρισμού, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συγκαταλέγεται στις πιο αξιόπιστες τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πολλών ενώσεων σε ένα μίγμα. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή ή πιο απλά στο διαφορετικό χρόνο διέλευσης των συστατικών από τη στατική φάση. Πρακτικά, τα συστατικά του μίγματος μετακινούνται εντός της στατικής φάσης (στήλης) με διαφορετική ταχύτητα. Σε αυτό διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο η πολικότητα τόσο της κινητής όσο και της στατικής φάσης. Έτσι, εφόσον μια ουσία συγκρατείται ισχυρά εντός της στήλης, μετακινείται με σημαντικά μικρότερη ταχύτητα από κάποια άλλη η οποία λόγω της διαφορετικής χημικής της συγγένειας συγκρατείται λιγότερο ισχυρά. Τα βασικά τμήματα μιας διάταξης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι: 1) Η αντλία παροχής διαλυτών (κινητή φάση), 2) ο εισαγωγέας του δείγματος, 3) η στατική φάση (στήλη), 4) ο ανιχνευτής και 5) ο καταγραφέας (Εικόνα 1).





**Εικόνα 1.** Τυπική διάταξη χρωματογράφου υψηλής πίεσης

Αδιαμφισβήτητα, η υγρή χρωματογραφία αποτελεί μια διαρκώς εξελισσόμενη και πολυδύναμη αναλυτική τεχνική με ένα ευρύ φάσμα δυνατοτήτων σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης και της ανάλυσης τροφίμων. Εκμεταλλευόμενη τις διαφορετικές χημικές ιδιότητες (π.χ μέγεθος, πολικότητα ή συγγένεια με τη στατική ή τη κινητή φάση) των προς ανάλυση ενώσεων, η HPLC είναι μια ιδανική τεχνική για τον διαχωρισμό μεγάλης ποικιλίας αναλυτών (π.χ. βιταμίνες, μυκοτοξίνες, βιοδραστικές ενώσεις κ.α). Παρόλα αυτά, ακόμη και στις περιπτώσεις που οι ενώσεις μιας μήτρας «μοιράζονται» παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, χάρη στην υψηλή εκλεκτικότητα της, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι σε θέση να διαχωρίσει τους αναλύτες διασφαλίζοντας μια ακριβή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση (Dong, 2012). Παράλληλα, με την υψηλή εκλεκτικότητα που προσφέρει η HPLC, επιτρέπεται η στοχευμένη (targeted analysis) ποσοτικοποίηση ενώσεων-στόχων σε πολύπλοκα συστήματα.

Ουσιαστικά η HPLC είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος η οποία είναι ικανή να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει ενώσεις ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Kromidas, 2016). Σε αυτές τις ενώσεις συμπεριλαμβάνονται οι περιβαλλοντικοί ρύποι αλλά και τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων, οι οποίες αποτελούν δυνητικούς κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου, των ζώων και του περιβάλλοντος. Επίσης, πρόκειται για μια ευέλικτη μέθοδο που μπορεί να προσαρμόζεται ανάλογα (αλλαγή κινητής ή στατικής φάσης, σύζευξη με κατάλληλο ανιχνευτή) με τη ποικιλομορφία των προς ανάλυση δειγμάτων, έτσι

ώστε να ανταποκρίνεται στις ιδιαιτερότητες της ανάλυσης (Καρκαλούσος και συνγγραφείς, 2015).

Από την άλλη μεριά, η HPLC χαρακτηρίζεται από κάποιους περιορισμούς ή συχνά έρχεται αντιμέτωπη με προκλήσεις που ενδεχομένως να επηρεάσουν την αποτελεσματική λειτουργία της (Parriot, 2012). Για παράδειγμα, ορισμένα δείγματα ή αναλύτες μπορεί να μην είναι συμβατά με ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας εξαιτίας των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων (διαλυτότητα, σταθερότητα). Πτητικές ή θερμικά ασταθείς ενώσεις διαχρονικά αναλύονται με άλλα συστήματα όπως η αέρια χρωματογραφία. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως κατά την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων ενδέχεται οι επικαλυπτόμενες κορυφές ή η συνέκλουση ενώσεων (με ίδιο χρόνο κατακράτησης), να δυσκολέψουν την ακριβή ταυτοποίηση ή και την ποσοτικοποίηση μεμονωμένων συστατικών (Akash, 2020).

Εκτός των άλλων, οι σύνθετες μήτρες δειγμάτων στην ανάλυση τροφίμων μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της υγρής χρωματογραφίας. Βιβλιογραφικά το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως “Matrix Effect” και ουσιαστικά αφορά την πιθανή αλληλεπίδραση συστατικών της μήτρας (π.χ. πρωτεϊνών, λιπιδίων ή υδατανθράκων) με τις προς διερεύνηση ενώσεις (Cortese et al., 2020). Όταν η επίδραση του φαινομένου της μήτρας είναι μεγάλη, τότε η μέθοδος χαρακτηρίζεται από μειωμένη απόδοση διαχωρισμού, ενώ ενδέχεται να παρατηρηθούν μειωμένης έντασης σήματα ανιχνευτή ή παραμόρφωση κορυφών. Σε κάθε περίπτωση το φαινόμενο μπορεί να αντιμετωπιστεί έπειτα από κατάλληλες παρεμβάσεις κατά τη διάρκεια προκατεργασίας ή εκχύλισης των δειγμάτων.

Ένας ακόμη περιορισμός που πρέπει να ληφθεί υπόψιν αφορά το χρόνο ανάλυσης, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις η HPLC απαιτεί συνήθως μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Ακόμη, μια παράμετρος που συνδέεται και με το χρόνο ανάλυσης αφορά τη πολυπλοκότητα ανάπτυξης μιας μεθόδου προσδιορισμού (Kromidas, 2017). Παρά το μεγάλο όγκο πληροφορίας που υπάρχει σχετικά με την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού για συγκεκριμένες κατηγορίες ενώσεων, τις περισσότερες φορές απαιτούνται πολλές δοκιμές μέχρι να βρεθεί ο βέλτιστος συνδυασμός παραμέτρων ανάλυσης για να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός, ευαισθησία και επιλεκτικότητα. Συγκεντρωτικά, οι δυνατότητες και

περιορισμοί της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί.

**Πίνακας 1.** Δυνατότητες και περιορισμοί Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης

Δυνατότητες	Περιορισμοί
Ταυτόχρονος προσδιορισμός πολλών ενώσεων	
Ακριβής ποσοτικοποίηση	Συμβατότητα (Μη ιδανική για πτητικές/θερμικά ασταθείς ενώσεις)
Αυξημένη ευαισθησία	Επίδραση της μήτρας
Στοχευμένη ανάλυση	Μεγάλη πολυπλοκότητα
Μεγάλη προσαρμοστικότητα	Κόστος συντήρησης
Αυτοματοποίηση διαδικασιών ανάλυσης	
Ευρύ πεδίο εφαρμογών	

### 1.3 Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Η ανάπτυξη της μεθόδου HPLC διαδραματίζει ένα από τους σημαντικότερους ρόλους για την αξιοποίηση των δυνατοτήτων της αλλά και την αντιμετώπιση των περιορισμών της που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα βασικότερα βήματα τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη της μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

1. Πλήρης κατανόηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της προς ανάλυση μήτρας ή των προς ανάλυση ενώσεων
2. Επιλογή αρχικών χρωματογραφικών συνθηκών (επιλογή στήλης, τύπος έκλουσης, βελτιστοποίηση σύνθεσης κινητής φάσης, επιλογή ανιχνευτή)
3. Προκατεργασία δείγματος
4. Βελτιστοποίηση της μεθόδου
5. Επικύρωση της μεθόδου

#### 1.3.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες μιας κατηγορίας ενώσεων ή μόνο ενός μορίου παίζουν σημαντικό ρόλο σε οποιαδήποτε ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού τους (Charde et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, απαιτείται ενδελεχής βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με ιδιότητες όπως η διαλυτότητα και η

πολικότητα. Η πολικότητα της ένωσης, για παράδειγμα, υποδεικνύει τη σύνθεση της στατικής φάσης η οποία συνδέεται τόσο με το πρόγραμμα έκλουσης όσο και με τη σύνθεση της κινητής φάσης. Οι στήλες αντίστροφης φάσης χρησιμοποιούνται συνήθως με υδρόφοβους ή μη πολικούς διαλύτες, ενώ οι στήλες κανονικής φάσης για πιο πολικούς διαλύτες.

Αντίστοιχα, η διαλυτότητα ή και οι συνθήκες διαλυτότητας της ένωσης (pKa και pH) επηρεάζουν την επιλογή τόσο της κινητής φάσης όσο και του διαλύτη εκχύλισης (Sood et al., 2014). Ακόμη, πληροφορίες που αφορούν πιθανές χρωμοφόρες ομάδες ή ιδιότητες φθορισμού της ένωσης συμβάλλουν στην επιλογή κατάλληλων τεχνικών ανίχνευσης, όπως για παράδειγμα ή σύζευξη της HPLC με ανιχνευτή UV-Vis ή φθορισμού. Τέλος, σημαντικό είναι να λαμβάνονται υπόψιν εξωτερικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η έκθεση στο φως ή η συνύπαρξη άλλων ενώσεων στη μήτρα, οι οποίες ενδέχεται να δημιουργήσουν προβλήματα κατά την ανάλυση (π.χ αποικοδόμηση της ένωσης, συνέκλουση κ.α).

### **1.3.2 Επιλογή χρωματογραφικών συνθηκών**

#### **1.3.2.1 Επιλογή της κατάλληλης στήλης**

Κατά την αρχική ανάπτυξη της μεθόδου και ενώ έχει μελετηθεί το προφίλ των προς ανάλυση ενώσεων, επιλέγεται ένα σύνολο αρχικών παραμέτρων (στήλη, σύνθεση κινητής φάσης, πρόγραμμα έκλουσης) για να υπάρξει μια πρώτη εκτίμηση της ποιότητας του χρωματογραφήματος. Είναι προφανές πως μια χρωματογραφική στήλη αποτελεί τη βάση στην οποία στηρίζεται η αρχή της υγρής χρωματογραφίας. Βασικό γνώρισμα μιας στήλης είναι το υλικό από το οποίο είναι φτιαγμένη ενώ η επιλογή της κατάλληλης στήλης βασίζεται κυρίως στο μέγεθος των σωματιδίων του υλικού και τις διαστάσεις της, αλλά και στις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού και την ικανότητα συγκράτησης της (Zuvela et al., 2019). Το πυρίτιο είναι το πιο κοινώς χρησιμοποιούμενο υλικό καθώς διαθέτει αρκετά πλεονεκτήματα όπως μεγάλη ανθεκτικότητα και χημική σταθερότητα, η κατασκευή του σε μέγεθος σφαίρας και η τάση του να μην παραμορφώνεται υπό πίεση. Τα μικρότερα σωματίδια του πυριτίου έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών και τελικά την επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού.

Γενικά, το υλικό της στήλης θα καθορίσει εάν μια στήλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χρωματογραφία κανονικής ή αντίστροφης φάσης. Πιο συγκεκριμένα, η χρωματογραφία κανονικής φάσης υποστηρίζει τη χρήση πολικών στατικών φάσεων με μια μη πολική κινητή φάση έτσι ώστε οι πολικές ενώσεις να εκλύονται αργότερα από τις μη πολικές ενώσεις (Bhardwaj et al., 2015). Αντίθετα, η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) χρησιμοποιεί μια μη πολική στήλη με μια περισσότερο πολική κινητή φάση κατακρατώντας ισχυρότερα τις μη πολικές ενώσεις και αφήνοντας τις πολικές να διέλθουν ευκολότερα κατά μήκος της. Στις μέρες μας, η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) προτιμάται έναντι της χρωματογραφίας κανονικής φάσης (NP-HPLC) καθώς επιτυγχάνει καλύτερους διαχωρισμούς.

### **1.3.2.2 Σύνθεση της κινητής φάσης**

Εξετάζοντας προσεκτικά την επιλογή του διαλύτη ή των διαλυτών της κινητής φάσης, τη πολικότητα του, το pH του, τη προσθήκη ρυθμιστικών διαλυμάτων, τον τρόπο έκλουσης, τον ρυθμό ροής και την συμβατότητα με τις προς ανάλυση ενώσεις, μπορούν να αναπτυχθούν πολύ αποτελεσματικές μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας (Snyder et al., 2012). Η επιλογή των κατάλληλων διαλυτών βασίζεται στις ιδιότητες των αναλυόμενων ουσιών, όπως η πολικότητα, η διαλυτότητα και η σταθερότητα τους αλλά και ο τρόπος λειτουργίας της υγρής χρωματογραφίας (κανονικής ή αντιστρόφου φάσης). Δεδομένου ότι η RP-HPLC είναι η πλέον διαδεδομένη τεχνική, οι κυριότεροι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι το νερό, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο ή μίγματα αυτών (Sharma et al., 2018).

Παράλληλα, η αναλογία των διαλυτών επηρεάζει τη συγκράτηση και τη σειρά έκλουσης των αναλυτών. Γενικά, η αύξηση της αναλογίας του οργανικού διαλύτη οδηγεί σε μειωμένη κατακράτηση και άρα ταχύτερη έκλουση. Αυτό ωστόσο αποτελεί τη μισή αλήθεια καθώς οι περισσότερες μήτρες τροφίμων περιέχουν τόσο πολικές όσο και μη πολικές ενώσεις και επομένως απαιτείται η δημιουργία προγραμμάτων στα οποία η αναλογία διαλυτών μπορεί να μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου για να ενισχυθεί ο διαχωρισμός. Ο συγκεκριμένος τύπος έκλουσης ονομάζεται βαθμιδωτός ενώ όταν η αναλογία του διαλύτη παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου ανάλυσης ονομάζεται ισοκρατικός (Kumar et al., 2013). Στις περισσότερες περιπτώσεις τα

βαθμιδωτά προγράμματα έκλουσης παρουσιάζουν καλύτερους διαχωρισμούς και ποιοτικότερα χρωματογραφήματα (έντονες και οξείες κορυφές με μικρό εύρος) συγκριτικά με τα αντίστοιχα ισοκρατικά.

### **1.3.3 Προετοιμασία δειγμάτων**

Η προετοιμασία του δείγματος είναι ένα κρίσιμο βήμα της ανάπτυξης μιας μεθόδου. Βασικό στόχο έχει την πλήρη ποσοτική παραλαβή των ενώσεων μέσα από τη πολύπλοκη μήτρα. Παράλληλα, μέσω της κατάλληλης προετοιμασίας πρέπει να διασφαλίζεται πως άλλες ενώσεις που περιέχονται στη μήτρα δεν επηρεάζουν τη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου (Sahu et al., 2018). Ακόμη, η προετοιμασία των δειγμάτων πρέπει να περιλαμβάνει ένα στάδιο «καθαρισμού» των δειγμάτων από στερεά ή ξένα σώματα έτσι ώστε να συντηρείται σωστά όλο το σύστημα χρωματογραφίας, να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις της στήλης ή δημιουργία ιζήματος στον ανιχνευτή.

Πρακτικά, η προετοιμασία των δειγμάτων μπορεί να περιλαμβάνει μια απλή φυγοκέντριση, ένα φιλτράρισμα, μια μέθοδο για την απομάκρυνση πρωτεϊνών, τη ρύθμιση του pH στη περίπτωση ιονιζόμενων ενώσεων ή ακόμη και μια λυοφιλίωση αν κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση της υγρασίας από τα δείγματα (Kataoka, 2017). Σε ορισμένες περιπτώσεις κατά τη προετοιμασία των δειγμάτων ίσως χρειαστεί αραίωση ή συμπύκνωση αυτών, έτσι ώστε η εκτιμώμενη συγκέντρωση των ουσιών να εμπίπτει εντός του γραμμικού εύρους όπως αυτό ορίζεται από τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

### **1.3.4 Βελτιστοποίηση της μεθόδου**

Η βελτιστοποίηση της μεθόδου λαμβάνει χώρα αφού πρώτα έχουν οριστεί όλες οι παράμετροι που αναφέρθηκαν έως τώρα και υπάρχει μια πρώτη εκτίμηση της ικανότητας διαχωρισμού των ενώσεων σε μια μήτρα. Οι παράμετροι που μπορεί να βελτιστοποιηθούν αφορούν αμιγώς τις χρωματογραφικές συνθήκες δηλαδή την επιλογή σε στατική και κινητή φάση και την επιλογή του σωστού ανιχνευτή. Ωστόσο, για να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των δοκιμών, πρέπει να δοκιμάζονται μόνο οι παράμετροι που πραγματικά ενδέχεται να επηρεάσουν την ποιότητα της μεθόδου. Κατά κάποιο τρόπο δίνεται η δυνατότητα «παρέμβασης» ανάλογα με την περίπτωση. Για παράδειγμα, κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου αν αυξηθεί ο ρυθμός ροής κατά 0.1 mL/min τότε ο

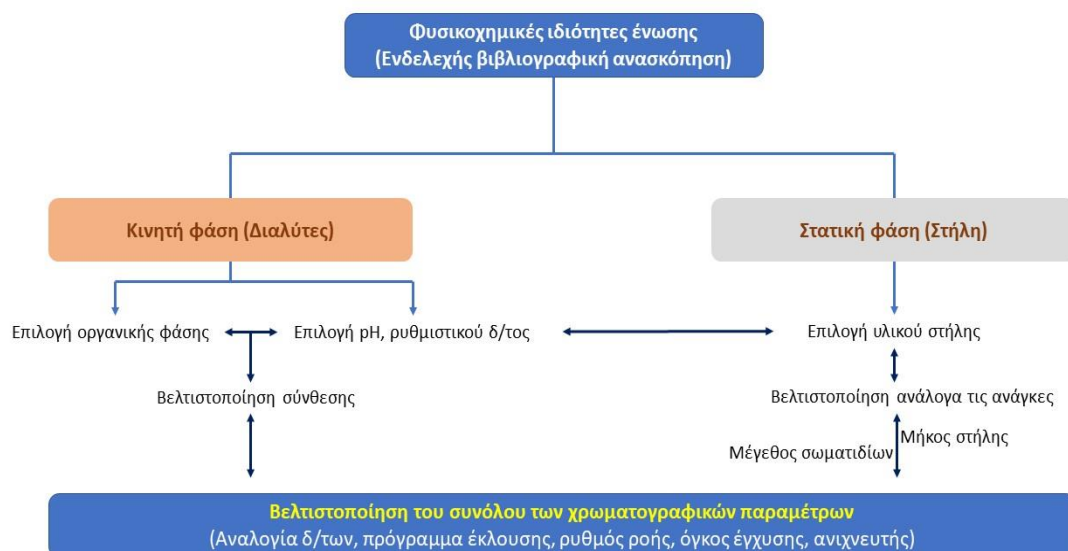
εκτιμώμενος χρόνος ανάλυσης θα μειωθεί κατά περίπου τρία με τέσσερα λεπτά αφού οι ενώσεις θα διέρχονται γρηγορότερα από τη στήλη (Zhu et al., 2022). Ομοίως, αν σε ένα βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης επιλεχθεί μια αρχική αναλογία 100% διαλύτη A και 0% διαλύτη B, τότε ενώσεις που «μοιράζονται» την ίδια πολικότητα με τον διαλύτη A ενδέχεται να εκλουσθούν πολύ νωρίς. Επομένως, η βελτιστοποίηση δεν αφορά μόνο τη τεχνική παρέμβαση σε περίπτωση που υπάρχει συγκεκριμένο πρόβλημα (π.χ σπάσιμο κορυφών ή συνέκλουση) αλλά και τη προσωπική εκτίμηση του χειριστή για το αποτέλεσμα.

### **1.3.5 Επικύρωση της μεθόδου**

Η επικύρωση μιας μεθόδου αναφέρεται στην επιβεβαίωση, μέσω της εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε ικανοποιεί τις ιδιαίτερες απαιτήσεις για τη συγκεκριμένη σκοπούμενη χρήση (Ψωμά, 2013). Πρόκειται ουσιαστικά για το τελευταίο στάδιο στην ανάπτυξη μιας μεθόδου (Εικόνα 2). Κατά την αξιολόγηση και τελικά επικύρωση εκτιμώνται συγκεκριμένες ποιοτικές παράμετροι όπως:

- Γραμμικότητα – Linearity (Αξιολόγηση του συντελεστή συσχέτισης  $R^2$ )
- Πιστότητα (Precision) υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας
- Ακρίβεια (Accuracy) και Ανάκτηση (Recovery)
- Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LOD – LOQ)
- Φαινόμενο επίδρασης μήτρας/υποστρώματος (Matrix Effect)

Κάθε ποιοτική παράμετρος πρέπει να πληρεί συγκεκριμένα κριτήρια τα οποία ανάλογα με τον κλάδο εφαρμογής (τρόφιμα ή βιοεπιστήμες) διαμορφώνονται από τις εκάστοτε οδηγίες είτε της ευρωπαϊκής αρχής φαρμάκων (EMA) είτε του αντίστοιχου οργανισμού των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (FDA).



**Εικόνα 2.** Βασικά στάδια ανάπτυξης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας

## 1.4 Προηγμένες εφαρμογές υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Η τεχνολογία της HPLC εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στην ανάλυση τροφίμων όσο και τις βιοεπιστήμες προσφέροντας πολλαπλές δυνατότητες στην ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων. Στην ανάλυση τροφίμων, η υγρή χρωματογραφία: (α) διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων από εκχυλίσματα ή φυσικά προϊόντα, (β) επιτρέπει την εκτίμηση της σύστασης των τροφίμων (βιταμίνες, αμινοξέα, σάκχαρα) και (γ) διασφαλίζει την ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων (Sankar et al.,2020). Όσον αφορά τη χρήση της στις βιοεπιστήμες αυτή σχετίζεται τόσο με τη φαρμακευτική ανάλυση (σύνθεση, ανακάλυψη και έλεγχος φαρμάκων) όσο και με τη μεταβολομική ανάλυση (προσδιορισμός μεταβολιτών) παρέχοντας πληροφορίες για τη έγκαιρη πρόληψη ή διάγνωση ασθενειών ή την επίδραση ενός φαρμάκου (Sankar et al., 2019).



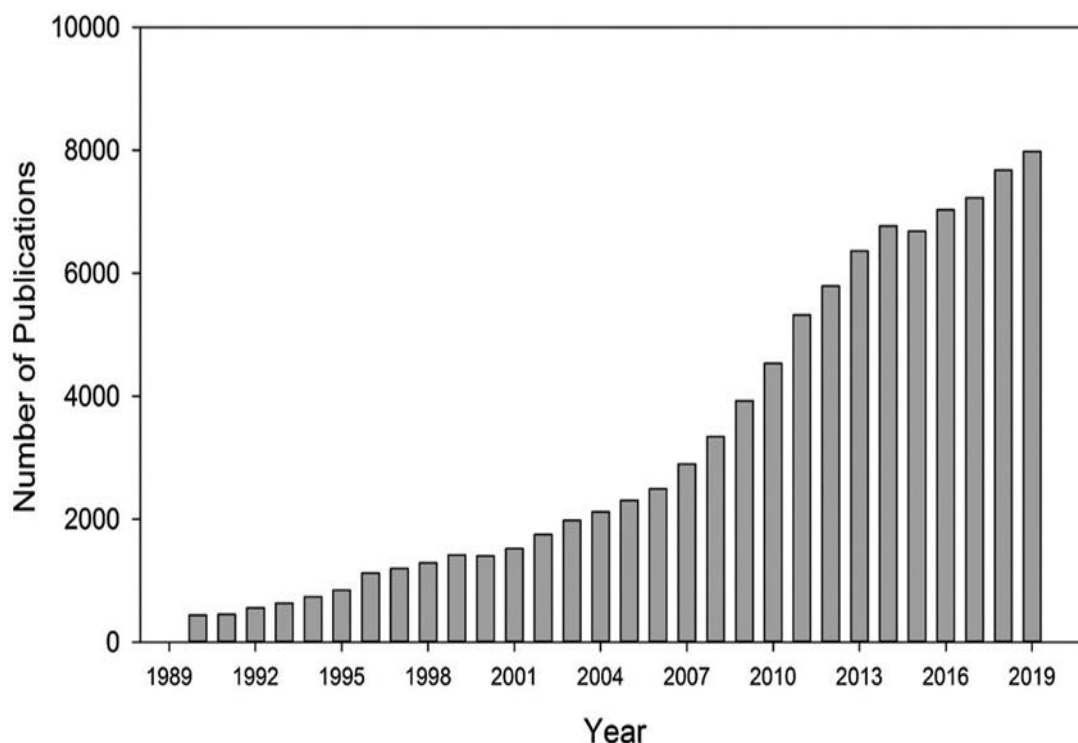
## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> Φαινολικές ενώσεις

### 2.1 Εισαγωγή

Ως βιοδραστικές ενώσεις ορίζονται οι φυσικώς απαντώμενες ενώσεις, οι οποίες έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν συγκεκριμένα οφέλη σε ζωντανούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, των ζώων και των φυτών. Τέτοιες είναι τα φυσικά προϊόντα (natural products), τα τροφο-δραστικά (nutraceuticals) και τα τροφο-φάρμακα (pharmaceuticals) (Daliu et al., 2019). Επί του παρόντος, περισσότερες από 18000 ενώσεις εντοπίζονται στο φυτικό βασίλειο και αντιπροσωπεύουν την πιο ευρέως διαδεδομένη κατηγορία φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών. Ανάμεσα σε αυτές βρίσκονται και οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία βιοδραστικών ενώσεων, η οποία χαρακτηρίζεται από τεράστια ποικιλομορφία. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις με περισσότερους ή μεμονωμένους αρωματικούς δακτυλίους συζευγμένους με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες ονομάζονται συνήθως φαινόλες. Πρόκειται για τους πιο κοινούς δευτερογενείς μεταβολίτες με περισσότερες από 8000 γνωστές ενώσεις οι οποίες συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών ενάντια στο έντονο στρες, την αντιμετώπιση παθογόνων ή άλλων «εισβολέων» (Alara et al., 2021).

Περιλαμβάνουν πολύ απλές δομές όπως τα φαινολικά οξέα ή και πιο σύνθετες όπως οι τανίνες. Βρίσκονται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά, στα αρωματικά φυτά, το κρασί και τον καφέ και λιγότερα στα όσπρια και τους ξηρούς καρπούς (Landete, 2012). Ομοίως, οι φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για την πικράδα των φρούτων λόγω της αλληλεπίδρασης τους με την γλυκοπρωτεΐνη του σάλιου. Παράλληλα, επηρεάζουν και άλλες οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων όπως η γεύση και το χρώμα και συμβάλλουν στη επίτευξη ισορροπίας γεύσεων πολλών προϊόντων φυτικής προέλευσης. Η συμβολή αυτή οφείλεται κυρίως στην παρουσία πτητικών φαινολικών ενώσεων (π.χ βανιλίνη, ευγενόλη, π-κρεσόλη), οι οποίες ενδεχομένως να παράγονται κατά την υδρόλυση τριτοταγών αλκοολών ή ως αποτέλεσμα της ενζυμικής δραστηριότητας μικροοργανισμών όπως οι ζυμο-μύκητες ή τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Munoz et al., 2020).

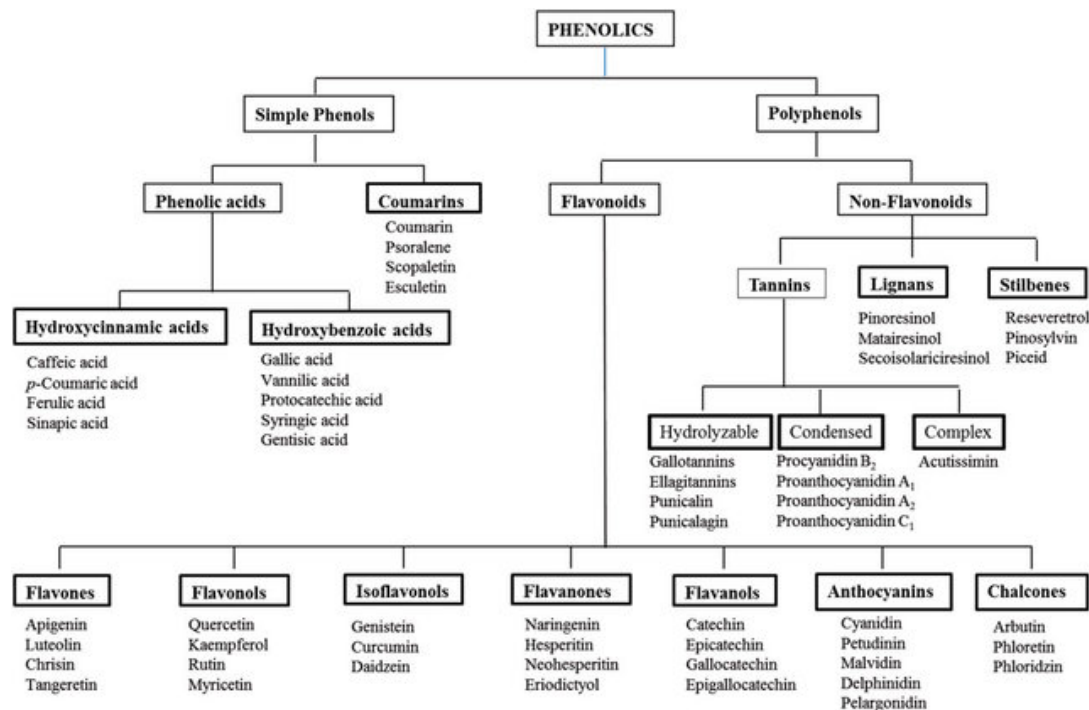
Με την ανάπτυξη καλύτερων και πιο ευαίσθητων αναλυτικών τεχνικών, ο χαρακτηρισμός, η ταξινόμηση, η διερεύνηση των λειτουργικών ιδιοτήτων αλλά και η συσχέτιση των φαινολικών ενώσεων με την υγεία του ανθρώπου γνώρισαν τεράστια ανάπτυξη. Αυτό αποτυπώνεται και από τα στατιστικά στοιχεία σχετικά με το πλήθος των δημοσιεύσεων που περιλαμβάνουν την έννοια «φαινολικές ενώσεις». Αξιοσημείωτο είναι πως ο όγκος της παραπάνω διαθέσιμης βιβλιογραφίας έχει διπλασιαστεί μέσα στα προηγούμενα 7 χρόνια, αναδεικνύοντας τη σημαντικότητα του θέματος (Εικόνα 3). Αυτό οφείλεται στις ευεργετικές ιδιότητες (*in vivo* και *in vitro*) που αυτές παρουσιάζουν όπως είναι η ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση, η προστασία έναντι διάφορων καταστάσεων που εμπλέκονται με το οξειδωτικό στρες, η ρύθμιση καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών δεικτών ή και άλλων ασθενειών όπως ο καρκίνος (Cory et al., 2018; Forni et al., 2019; Poti et al., 2019).



**Εικόνα 3.** Ετήσιος αριθμός δημοσιεύσεων που περιλαμβάνει τον όρο φαινολικές ενώσεις (Πηγή: Zeb, 2020)

## 2.2 Ταξινόμηση φαινολικών ενώσεων

Δεδομένης της δομής των φαινολικών, υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί που μπορεί να χαρακτηρίσουν μια ένωση ως φαινόλη και ως εκ τούτου η δομή τους χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία, η οποία ωστόσο δυσκολεύει την ταξινόμηση τους. Πράγματι, πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων όπως: (α) η κατανομή της κύριας ανθρακικής αλυσίδας (15 άτομα άνθρακα) πάνω στην οποία συνδέονται οι αρωματικοί δακτύλιοι, (β) οι θέσεις υποκατάστασης των υδροξυλομάδων πάνω στον αρωματικό δακτύλιο (όρθο, μέτα, πάρα), (γ) ο αριθμός των υδροξυλομάδων, (δ) η ύπαρξη άλλων χαρακτηριστικών ομάδων (μεθόξυ, γλυκοζίδια, εστέρες, καρβοξυλικά οξέα), και (ε) ο βαθμός πολυμερισμού (δυνατότητα σχηματισμού τόσο μονομερών όσο και πολυμερών) (Mrduljas et al., 2017; Lorenzo et al., 2021). Πράγματι, υπάρχει ασυμφωνία ως προς τον τρόπο ταξινόμησης των φαινολικών ενώσεων, με την πιο ευρέως αποδεκτή άποψη να θεωρείται η περαιτέρω υποδιαίρεση τους σε δυο κατηγορίες αυτές των φλαβονοειδών ή μη φλαβονοειδών, οι οποίες με τη σειρά τους περιλαμβάνουν επιμέρους υπο-ομάδες όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4 (Garcia et al., 2021).



**Εικόνα 4.** Ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων σε φλαβονοειδή ή μη και οι επιμέρους κατηγορίες που αυτές περιλαμβάνουν (Πηγή: Vardhan and Shukla, 2017)

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την κυριότερη διατροφική πηγή φαινολικών ενώσεων για τον άνθρωπο καθώς περιλαμβάνουν τουλάχιστον 7 υποκατηγορίες όπως οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι ισο-φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανόλες και οι ανθοκυανίνες. Δομικά, αποτελούνται από ένα σταθερό σκελετό 15 ατόμων άνθρακα διατεταγμένο (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) σε τουλάχιστον δυο δακτυλίους βενζολίου που συνδέονται με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο πυρανίου που περιέχει οξυγόνο (Dias et al., 2021). Βάσει της δομής τους αλλά και του βαθμού κορεσμού του κεντρικού ετεροκυκλικού δακτυλίου μπορούν να διακριθούν σε δυο επιμέρους κατηγορίες. Για παράδειγμα, οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβόνες και ισοφλαβόνες, παρουσιάζουν ακόρεστο C<sub>2</sub>=C<sub>3</sub>, ενώ οι φλαβανόνες, οι διυδροφλαβανόλες και οι φλαβανόλες αποτελούν παραδείγματα κορεσμένων φλαβονοειδών. Ανάμεσα τους ξεχωρίζουν ενώσεις όπως η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η κατεχίνη (Dias et al., 2020; Durazzo et al., 2019).

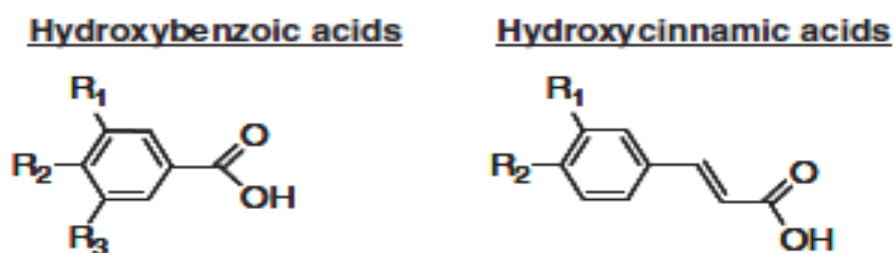
Αντίθετα, τα μη φλαβονοειδή περιλαμβάνουν απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, κουμαρίνες, ξανθόνες, σπιλβένια, λιγνίνες και λιγνάνες. Τα φαινολικά οξέα περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο, μια ομάδα καρβοξυλικού οξέος και μια ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου, ενώ μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος με βάση έναν σκελετό C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> και παράγωγα του κινναμικού οξέος τα οποία βασίζονται σε ένα σκελετό C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Durazzo et al., 2019). Συνεχίζοντας, οι κουμαρίνες είναι παράγωγα φαινολικών οξέων που αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο συντηγμένο με ένα ετεροκυκλικό οξυγόνο. Οι τανίνες μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε υδρολυόμενες, μη υδρολυόμενες ή συμπυκνωμένες (condensed) γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες. Οι υδρολυόμενες είναι εστέρες φαινολικών οξέων και σακχάρων ή των παραγώγων τους, που κατά την υδρόλυση τους δίνουν ένα σάκχαρο (στη πλειοψηφία των περιπτώσεων αφορά τη γλυκόζη) και ένα τμήμα φαινολικού οξέος (στη πλειοψηφία των περιπτώσεων το γαλλικό είτε το ελλαγικό). Οι προανθοκυανιδίνες είναι παράγωγα της όξινης υδρόλυσης της φλαβαν-3-όλης (Naumann et al., 2017).

### **2.3 Φαινολικά οξέα**

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα φαινολικά οξέα είναι μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις με κοινό χαρακτηριστικό τους την ύπαρξη τουλάχιστον μιας

καρβοξυλομάδας στον δακτύλιο του βενζολίου. Από βιοσυνθετικής απόψεως, προέρχονται από δυο κύριες φαινολικές ενώσεις, το βενζοϊκό και το κινναμικό οξύ. Παραδείγματα υδροξυ-βενζοϊκών παραγώγων αποτελούν το γαλλικό οξύ, το p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, το βανιλικό, το συριγγικό οξύ ενώ το καφεϊκό, το φερουλικό, το σιναπτικό και το p-κουμαρικό ανήκουν στα υδροξυ-κινναμικά οξέα (Εικόνα 5). Αξιοσημείωτη είναι και η μεγάλη ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει τα φαινολικά οξέα καθώς τη τελευταία δεκαετία έχουν αναφερθεί πάνω 30 διαφορετικά οξέα με έντονη βιολογική δράση (Khadem & Marles, 2010). Τα φρούτα και τα λαχανικά χαρακτηρίζονται κυρίως από τη παρουσία ελεύθερων φαινολικών οξέων, ενώ τα δημητριακά από δεσμευμένα φαινολικά οξέα.

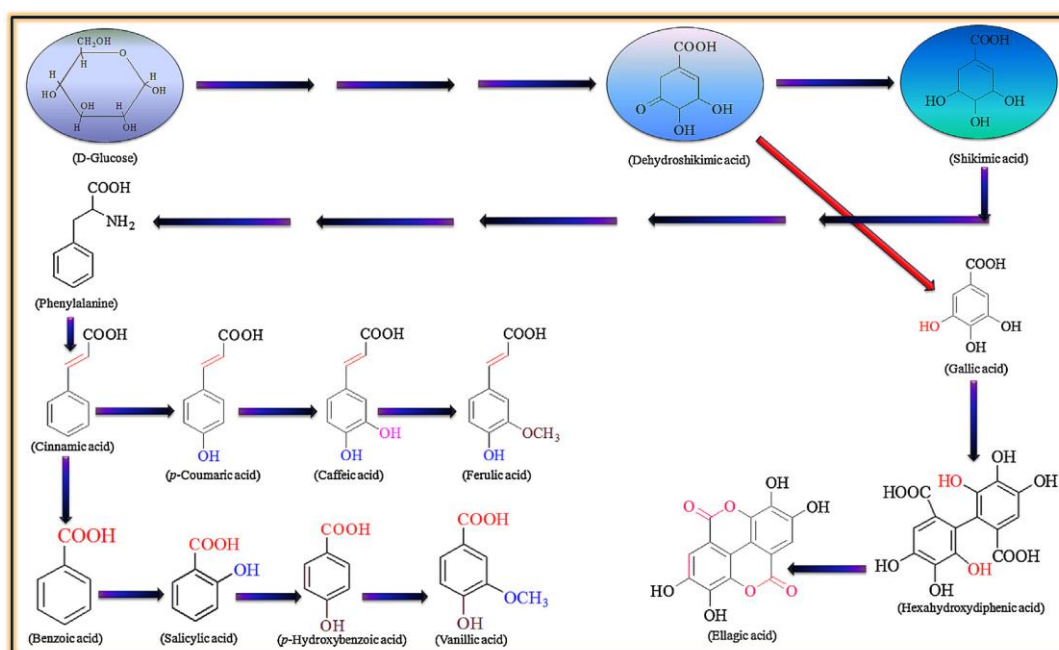
### Phenolic acids



**Εικόνα 5.** Χημικές δομές των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών φαινολικών οξέων (Πηγή: Kalili, 2011).

Βιοσυνθετικά, τα φαινολικά οξέα παράγονται: (α) ως παραπροϊόντα από το σικιμικό οξύ το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι του φαινυλπροπανοειδούς (Εικόνα 6), (β) κατά τη διάρκεια της σύνθεσης μονογλινόλης, (γ) κατά τη διάσπαση πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος όπως η λιγνίνη η ακόμη και (δ) από μικροβιακές αλληλεπιδράσεις (Kumar and Goel, 2019). Σε πρώτη φάση, μέσω αλληπάλληλων μεταβολικών διεργασιών πολλών σταδίων, μεγάλου μοριακού βάρους υδατάνθρακες αποικοδομούνται σε γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται αρχικά σε δεϋδρο-σικιμικό οξύ και σε δεύτερη φάση σε φαινυλαλανίνη. Τελικά, μέσω της δράσης συγκεκριμένων ενζύμων μετατρέπεται η φαινυλαλανίνη σε τρανσ-κινναμικό οξύ και απελευθερώνεται αμμωνία, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των φαινολικών οξέων. Τέλος, παρά τις αποδεδειγμένες ή εν δυνάμει ευεργετικές ιδιότητες των φαινολικών οξέων, πολλές φορές τίθεται το ζητούμενο

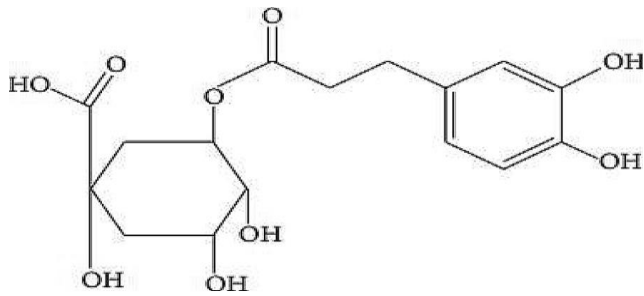
της βιοδιαθεσιμότητας τους. Πράγματι, φαίνεται πως η βιοδιαθεσιμότητα, ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την αναλογία της απορρόφησης, της πέψης και του μεταβολισμού των φαινολικών οξέων (Heleno et al., 2015). Μάλιστα, φαίνεται πως η πρόσληψη ελεύθερης μορφής υδροξυκινναμικών οξέων έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία απορρόφηση τους στο στομάχι και το λεπτό έντερο ενώ αντίθετα υπάρχει περιορισμένη βιβλιογραφία σχετικά με την βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση των υδροξυ-βενζοϊκών οξέων.



**Εικόνα 6.** Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης φαινολικών οξέων μέσω του φαινυλ-προπανοειδούς μονοπατιού (Πηγή: Kumar, N., 2019).

### 2.3.1 Χλωρογενικό οξύ

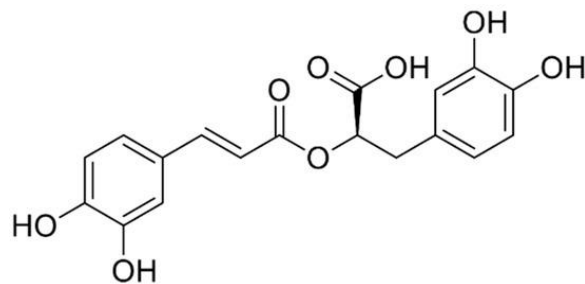
Το χλωρογενικό οξύ είναι μια από τις πιο διαθέσιμες ενώσεις φαινολικών οξέων σε τρόφιμα όπως ο καφές, το τσάι, το κακάο, τα εσπεριδοειδή και διάφορα φρούτα (Cliford, 1999). Για παράδειγμα, ο ακαβούρδιστος καφές περιέχει έως και 10 mg χλωρογενικού οξέος/g ξηρού βάρους ενώ ο καβουρδισμένος έως και 3 mg αντίστοιχα (Tsaï and Jioe, 2021). Είναι επίσης γνωστό ως 3-O-caffeoylquinic acid και ανήκει στα υδροξυ-κινναμικά οξέα, ενώ η δομή του αποτελείται από ένα μόριο κινικού οξέος εστεροποιημένο με τρία τμήματα καφεϊκού οξέος (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Χημική δομή του χλωρογενικού οξέος (Πηγή: Naveed et al., 2018)

### 2.3.2 Ροσμαρινικό οξύ

Το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί παράγωγο του καφεϊκού οξέος και πήρε το όνομα του από το δενδρολίβανο (rosemary), στο οποίο απαντάται σε μεγάλη ποσότητα (0.05 έως 26 g/kg ξηρού βάρους). Ωστόσο, αποτελεί το κύριο φαινολικό οξύ σε πολλά μέλη της οικογένειας *Lamiaceae*, συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων των *Rosmarinus officinalis*, *Origanum spp.*, *Perilla spp.*, and *Salvia officinalis* (Oreopoulou et al., 2018). Αν και λόγω της δομής του στερεογονικού του κέντρου συναντάται σε δυο μορφές (*R* και *S*), στη φύση υπάρχει μόνο το *R* εναντιομερές (Εικόνα 8).

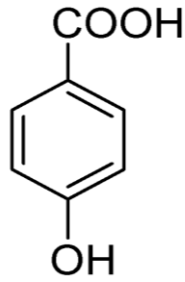


**Εικόνα 8.** Χημική δομή ροσμαρινικού οξέος (Πηγή: Nadeem et al., 2019)

### 2.3.3 4-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ

Το 4-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ γνωστό και ως *p*-υδροξυ βενζοϊκό οξύ (PHBA), είναι ένα μόνο-υδροξυβενζοϊκό οξύ και αποτελεί φαινολικό παράγωγο του βενζοϊκού οξέος (Εικόνα 9). Συγκεκριμένα, η δομή του PHBA, αποτελείται από ένα βενζοϊκό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα υδροξύλιο και ένα καρβοξύλιο σε θέση παρα. Αν και δεν αποτελεί χαρακτηριστική ένωση για κάποια συγκεκριμένη ομάδα τροφίμων, φαίνεται ότι απαντάται σε πολλά διαφορετικά είδη φρούτων, λαχανικών αλλά και αρωματικών φυτών σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Proestos et al., 2006).





**Εικόνα 9.** Χημική δομή του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Πηγή: *Khadem and Marles, 2010*)

#### 2.4 Λειτουργικές ιδιότητες φαινολικών οξέων

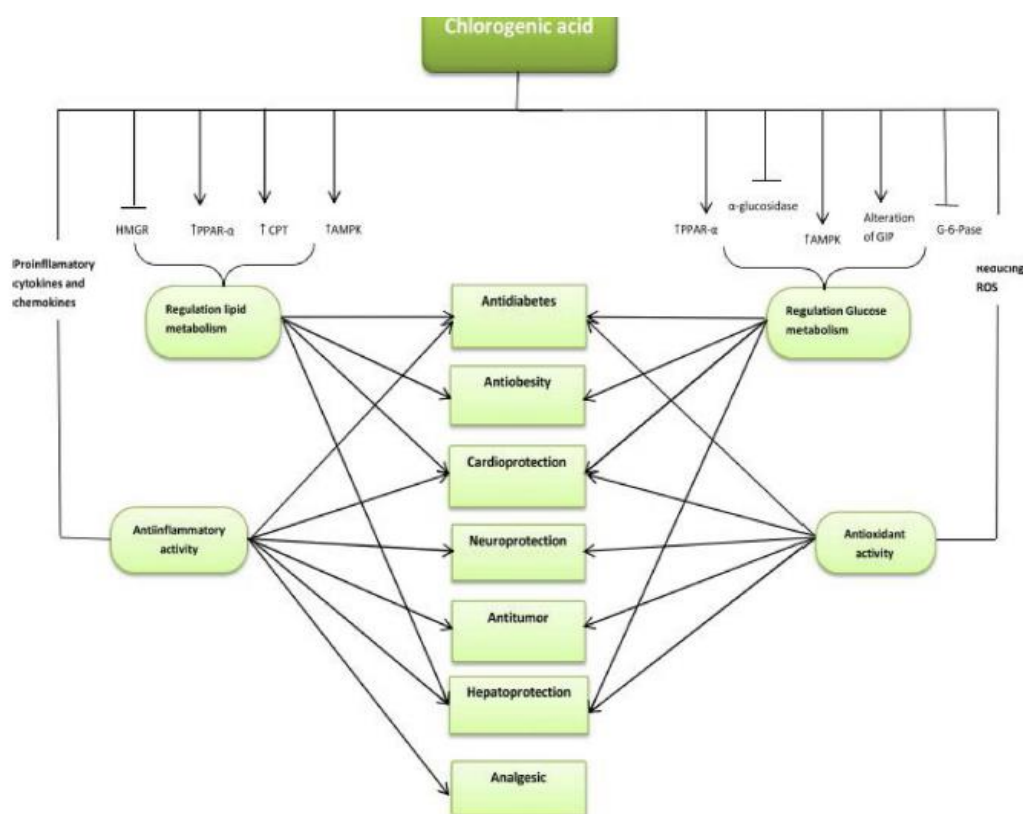
Είναι γεγονός πως όσο αυξάνεται η ανησυχία σχετικά με τη χρήση αμφιβόλου ποιότητας συντηρητικών στη βιομηχανία τροφίμων, τόσο αυξάνεται το ενδιαφέρον για την εύρεση φυσικών ουσιών φυτικής προέλευσης, οι οποίες να χαρακτηρίζονται από ευεργετικές ιδιότητες. Τελευταία, τα φαινολικά οξέα τυγχάνουν της προσοχής λόγω των πολλών υποσχόμενων θετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου. Αν και κατά κύριο λόγο οι δράσεις αυτές σχετίζονται με ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, μπορούν να υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις ανά φαινολική ομάδα (Zhang and Tsao, 2016).

Επί του παρόντος, το χλωρογενικό οξύ διαθέτει αρκετές αξιόλογες ευεργετικές ιδιότητες. Σημαντικότερη εξ' αυτών θεωρείται η δέσμευση των ελεύθερων ριζών, ενισχύοντας έτσι την «άμυνα» των κυττάρων έναντι της οξειδωτικής βλάβης (Rojas-González et al., 2022). Έχει διαπιστωθεί ότι οι υδροξυλομάδες (-OH) στα φαινολικά οξέα επιδρούν θετικά στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία εμφανίζει αναλογική τάση με τον αριθμό τους ως εξής τρι-υδροξυ > δι-υδροξυ > μονο-υροξυ.

Ταυτόχρονα, έχει προταθεί πως η φλεγμονή που δημιουργείται από το οξειδωτικό στρες και την έκκριση ιντερλευκίνης-8, αναστέλλεται από το χλωρογενικό οξύ. Παράλληλα, αυτή του η ικανότητα έχει κατά καιρούς συσχετιστεί με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων παθήσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις αλλά και ορισμένοι τύποι καρκίνου. Αξιοσημείωτο είναι πως το χλωρογενικό οξύ παρουσίασε αντι-διαβητικές ιδιότητες, οι οποίες σχετίζονταν με το μεταβολισμό



της γλυκόζης. Συνολικά, στην Εικόνα 10 παρουσιάζονται οι λειτουργικές ιδιότητες του χλωρογενικού οξέος καθώς και οι αντίστοιχοι μηχανισμοί δράσης.



**Εικόνα 10.** Πιθανοί μηχανισμοί δράσης και εμπλεκόμενες ευεργετικές ιδιότητες του χλωρογενικού οξέος (Πηγή: Tajik et al., 2017).

Από την άλλη, το ροσμαρινικό οξύ έχει συσχετιστεί με ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη και νευροπροστατευτική δράση, ειδικά όσον αφορά την νόσο του Alzheimer (Costa et al., 2013). Ταυτόχρονα, πρόκειται για μια ένωση με την ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών, η οποία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον αναφορικά με τη πειραματική θεραπεία διάφορων νευρολογικών παθήσεων. Πιο συγκεκριμένα, *in silico* δοκιμές μέσω υπολογιστικών τεχνικών (molecular docking), έδειξαν ότι το ροσμαρινικό οξύ σχηματίζει σταθερό σύμπλεγμα με το πεπτιδίο αμυλοειδούς βήτα, το οποίο αναστέλλει την περαιτέρω συσσώρευση ελεύθερων ριζών (Costa et al., 2013). Η περαιτέρω ανάλυση συσχέτισης της δομής με την δραστικότητα του ροσμαρινικού οξέος, έδειξε πως η φαινολική υδροξυλομάδα, ως βασικό δομικό χαρακτηριστικό, είναι υπεύθυνη για την παραπάνω παρατηρούμενη ιδιότητα. Παράλληλα, ένας άλλος προτεινόμενος μηχανισμός δράσης συσχετίζει το

ροσμαρινικό οξύ με την αναστολή της συσσώρευσης ενδοκυτταρικών δραστικών μορφών οξυγόνου.

Παραδόξως, σε ένα μοντέλο μη λιπώδους ηπατικής νόσου, το ροσμαρινικό οξύ έχει συνδεθεί με την ενεργοποίηση της ενεργειακής δαπάνης, τη μείωση της συσσώρευσης λιπιδίων και την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων υπεύθυνων για την κυτταρική οξειδοαναγωγική ομοιόσταση όπως η AMPK πρωτεϊνική κινάση (Wang et al., 2019). Ομοίως, μια άλλη πρόσφατη μελέτη υπέδειξε ότι το ροσμαρινικό οξύ ανέστειλε τη λευκή λιπογενή διαφοροποίηση, μείωσε τη συσσώρευση λιπιδίων και προκάλεσε λιπόλυση τους στα ανθρώπινα λιποκύτταρα, μέσω της τροποποίησης βασικών αδιπογενών παραγόντων μεταγραφής και μείωσης της έκφρασης των φλεγμονωδών κυτοκινών (Vasileva et al., 2021). Άλλες μελέτες, οι οποίες παρουσίασαν υποσχόμενα αποτελέσματα αλλά ωστόσο χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης αφορούσαν την αντιφλεγμονώδη δράση σε ένα τεχνικώς εγκατεστημένο μοντέλο εντερικής κολίτιδας και τη δυνατότητα πρόληψης και διαχείρισης φλεγμονωδών δερματικών παθήσεων.

Τέλος, το 4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ είναι γνωστό για μια σειρά από σημαντικές δράσεις ενάντια σε διάφορες ασθένειες. Ομοίως και με τα υπόλοιπα φαινολικά οξέα, η αντιοξειδωτική του ικανότητα του επιτρέπει να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η αντιφλεγμονώδης του δράση έχει αποδοθεί τόσο στην αναστολή παραγωγής όσο και μέσω της καταστολής σημάτων που ενεργοποιούν φλεγμονώδη μονοπάτια. Αυτοί οι μηχανισμοί δράσης του το καθιστούν δυνητικά ευεργετικό σε χρόνιες φλεγμονοπάθειες. Αξιοσημείωτο είναι πως το PHBA χαρακτηρίζεται και από έντονη (σε ορισμένες περιπτώσεις) αντιμικροβιακή δράση έναντι επιλεγμένων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων σημαντικών τροφιμογενών βακτηρίων. Συνοπτικά, οι θεραπευτικές ιδιότητες του 4-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος παρουσιάζονται στον πίνακα 2 που ακολουθεί.

**Πίνακας 2.** Θεραπευτικές ιδιότητες 4-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος

Πρόελευση	Οικογένεια	Χρήση	Δράση	Αναφορά
<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	Palmae	Φύλλα	Αντιμικροβιακή	Manjunatha 2006

		Μίσχος	Αντιδιαβητική	Manuja 2013
<i>Pterocarpus santalinus</i> L.	Fabaceae	Φύλλα	Αντιφλεγμονώδης	Chong 2008
		Φλοιός	Αντι-ική	Heinonen 1990

## 2.5 Προσδιορισμός φαινολικών οξέων με τη χρήση HPLC

Η απομόνωση, η αναγνώριση, ο καθαρισμός και η παρατήρηση των μοτίβων που παρουσιάζονται στα τρόφιμα έχει αποτελέσει ένα μεγάλο και πολύ έντονο από ερευνητικής άποψης πεδίο. Πράγματι, η ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού διάφορων πολυφαινολών, όπως τα φλαβονοειδή και οι τανίνες, έχει εκτενώς μελετηθεί και αξιολογηθεί. Αντίθετα, λιγότερες μελέτες επικεντρώνονται στην αποκλειστική αξιολόγηση των μεθόδων προσδιορισμού και ανάλυσης των φαινολικών οξέων. Όπως ήδη έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 1, αρκετές παράμετροι που αφορούν τις ενώσεις ή την οργανολογία ενδέχεται να επηρεάσουν τη διαδικασία προσδιορισμού των φαινολικών οξέων.

Υπό αυτό το πρίσμα, ξεκινώντας από την προετοιμασία του δείγματος, αυτή θεωρείται ένα πολύ βασικό στάδιο για μια πετυχημένη και ακριβή ανάλυση καθώς δεν πρόκειται για μια απόλυτη διαδικασία αλλά για μια δυναμική προσέγγιση χειρισμού. Για παράδειγμα, κατά τον προσδιορισμό φαινολικών οξέων σε δείγματα κρασιών, η αιθανόλη συνήθως απομακρύνεται μέσω συμπύκνωσης με εξάτμιση. Συνεχίζοντας, τα πιο μαλακά και ευαίσθητα φρούτα (φράουλες, σταφύλια κ.α) διαχειρίζονται διαφορετικά από τα αντίστοιχα αμιγώς στερεά (καρότα, μπρόκολο, κουνουπίδι κ.α). Τα πρώτα, απλώς συμπιέζονται και έπειτα διηθούνται, ενώ τα δεύτερα αλέθονται, ομογενοποιούνται και στη συνέχεια διηθούνται (Winter and Herrmann, 1986). Ωστόσο, σε μια προσπάθεια τυποποίησης και απλοποίησης της διαδικασίας έτσι ώστε να είναι εφαρμόσιμη σε όλα τα διαφορετικά είδη φυτικών ιστών, τις περισσότερες φορές εφαρμόζεται η μέθοδος της λυοφιλίωσης. Η λυοφιλίωση χαρακτηρίζεται από πολύ συγκεκριμένα πλεονεκτήματα όπως η απομάκρυνση του νερού, η προστασία ευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων που περιέχονται στη μήτρα αλλά και η

αυξημένη επαναληψιμότητα καθώς όλα τα δείγματα έχουν χειριστεί με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

Οι τεχνικές εκχύλισης πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τη θέση που απαντώνται τα φαινολικά οξέα εντός του φυτικού ιστού (Robbins, 2003). Έτσι, η πλειοψηφία των φαινολικών οξέων αποθηκεύονται στα κενοτόπια και συνήθως εκχυλίζονται με οργανικούς διαλύτες. Δεδομένης της μεγάλης ποικιλομορφίας των διαφορετικών φυτικών υποστρωμάτων, πολλοί διαφορετικοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση των φαινολικών οξέων ή των παραγώγων τους. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το ζεστό νερό, η μεθανόλη, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας (Robbins, 2003). Αν και οι μέθοδοι εκχύλισης για τα υδροξυκιναμωμικά οξέα βασίζονται κυρίως στη πολικότητα, την οξύτητα και το βαθμό πρόσδεσης του υδρογόνου των υδροξυλομάδων του αρωματικού δακτυλίου, συχνά η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης εξαρτάται από τις ιδιαιτερότητες της μήτρας. Παράλληλα, σημαντική θεωρείται και η ενίσχυση της απόδοσης της εκχύλισης, χρησιμοποιώντας μεθόδους υψηλής ενεργείας, όπως οι υπέρηχοι ή τα μικροκύματα.

Ενδιαφέρον αποτελεί πως οι ενζυμικές αντιδράσεις ενδεχομένως να απελευθερώνουν φαινολικά οξέα, όπως είναι το φερουλικό και το p-κουμαρικό οξύ. Αυτά τα ένζυμα (πεκτινάσες, σελουλάσες, αμυλάσες) «επιστρατεύονται» για την αποικοδόμηση σύνθετων υδατανθράκων. Πιο συγκεκριμένα, ο τρόπος δράσης με τον οποίο απελευθερώνονται αυτά τα οξέα είναι η διάσπαση ενός δεσμού ακετάλης που βρίσκεται μεταξύ των τμημάτων υδατανθράκων και των ομάδων υδροξυλίου από τον αρωματικό δακτύλιο (Landbo and Meyer, 2001). Αδιαμφισβήτητα, την τελευταία εικοσαετία η αναλυτική τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη για τον προσδιορισμό φαινολικών οξέων είναι η HPLC αντίστροφης φάσης. Συνοπτικά, στον πίνακα 3 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα χρήσης υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης για τον προσδιορισμό φαινολικών οξέων, συμπεριλαμβανομένων των σταδίων της προετοιμασίας και των επιμέρους χρωματογραφικών συνθηκών.

**Πίνακας 3.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα χρήσης υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης για τον προσδιορισμό φαινολικών οξέων

Υπόστρωμα	Φαινολικά οξέα	Μέθοδος Προετοιμασίας	Χρωματογραφικές συνθήκες	Ανιχνευτής	Αναφορά
Σταφύλι Μούρο	Gallic, PCA PHBA Vanillic Caffeic Syringic	Υδρόλυση	C18 (250X4, 5μm) A: Νερό 0.1 FA B: Μεθανόλη Ροή: 0,9mL/min Έγχυση: 30 μl	PDA	Gao, 1994
Γκρεπ φρουτ	PHBA PCA Gallic Vanillic Syringic	Υδρόλυση Οξίνιση Εκχύλιση με etOH	LiChrospher RP A: Νερό 0.1 FA B: Μεθανόλη 77% A - 23% B Ροή: 1mL/min Έγχυση: 10 μl	PDA (300nm)	Fernandez, 1992
Ρόδι	p-couaric Veratric Gentisic Caffeic Gallic	Άλεση Λυοφιλίωση Εκχύλιση με PLE	LiChrospher RP A 0.1 υδατικό PA B Ακετονιτρίλιο 20% A – 80% B Ροή: 1.5mL/min Έγχυση: 100 μl	PDA (320nm)	Palma, 2001
Λευκό Κόκκινο κρασί	Gallic PCA PHBA Vanillic Caffeic Syringic p-coumaric Ferulic	Εκχύλιση Φιλτράρισμα	Nova-Pak C18 (150X3.9, 4μm) A Νερό 1% FA B Νερό 5% FA C Ακετονιτρίλιο Ροή: 0.5mL/min Έγχυση: 20 μl	PDA	Salagoity, 1984

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> Φυτικά εγχύματα

### 3.1. Γενικά

Τα βότανα, από αρχαιοτάτων χρόνων, προσέλκυσαν το ενδιαφέρον του ανθρώπου, όχι μόνο λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας σε χρώματα, αρώματα και των μορφών τους αλλά και λόγω των ιδιαίτερων οργανοληπτικών και φαρμακευτικών τους ιδιοτήτων (Pan et al., 2014). Γενικά, η χρήση των αφεψημάτων έχει καταγραφεί σε διάφορους αρχαίους πολιτισμούς όπως των Αιγυπτίων και των Ελλήνων αλλά και σε πιο σύγχρονους, όπως των Ρωμαίων και των Κινέζων. Αξιοσημείωτο είναι πως διαφορετικοί πληθυσμοί έχουν τις δικές τους μοναδικές παραδόσεις έγχυσης βοτάνων. Για παράδειγμα η παραδοσιακή κινεζική ιατρική (TCM) ενσωματώνει αφεψήματα βοτάνων ως μέρος μιας ολιστικής προσέγγισης για την υγεία (Peng et al., 2022). Στην Ινδία, η αρχαία πρακτική χρησιμοποιεί τα εγχύματα βοτάνων για την εξισορρόπηση του σώματος, την εύρεση εσωτερικής γαλήνης και την προώθηση της ευεξίας.

Στις μέρες μας, ειδικά και μετά το ξέσπασμα της πανδημίας του κορονοϊού, τα παραδοσιακά αφεψήματα επαν-εισήλθαν δυναμικά στην παγκόσμια αγορά κερδίζοντας την αποδοχή των καταναλωτών εξαιτίας κυρίως των ιδιοτήτων που προάγουν στην υγεία τους. Αυτό επιβεβαιώνεται και από μια πρόσφατη μελέτη παρατήρησης η οποία αποτύπωσε πως πάνω από το 70% των καταναλωτών πίνουν τουλάχιστον ένα έγχυμα βοτάνων την εβδομάδα, ενώ η πλειοψηφία τους συσχετίζει τη πρόσληψη φυτικών προϊόντων γενικότερα με την καλύτερη ψυχική και σωματική υγεία (Rocha et al., 2020).

Πρακτικά, τα εγχύματα αναφέρονται στη διαδικασία όπου μέσω της χρήσης ζεστού νερού εξάγονται όλα αυτά τα έντονα αρώματα και γεύσεις αλλά και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων των βοτάνων. Ο χρόνος καταβύθισης αλλά και οι αναλογίες διαφέρουν από βότανο σε βότανο και επηρεάζονται από την ισχύ (ελαφρύ-δυνατό) του εγχύματος που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Κατά τη παρασκευή τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές διαφορετικές ποικιλίες βοτάνων (χαμομήλι, μέντα, τζίντζερ, ιβίσκος, λεβάντα, τσάι, ρίγανη, τσουκνίδα και πολλά άλλα). Ακόμη, στα βότανα που μπορούν να θεωρηθούν εγχύματα μπορεί να συγκαταλεχθεί και ο ζεστός καφές καθώς ουσιαστικά παράγεται από την ίδια ακριβώς διαδικασία. Βασικό τους πλεονέκτημα είναι

πως η κατανάλωση τους μπορεί να γίνει τόσο όταν το έγχυμα είναι ακόμη ζεστό όσο και κρύο, γεγονός που τα καθιστά μια ιδανική επιλογή για όλο το χρόνο. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των εγχυμάτων είναι πως είναι εντελώς φυσικά προϊόντα τα οποία εκτός από ντελικάτα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, μπορούν να παρασκευαστούν εύκολα και γρήγορα απ' όλους ενώ είναι και οικονομικά (Williamson et al., 2020).

## 3.2 Μελετώμενα βότανα

### 3.2.1 Ρίγανη

Η ρίγανη αποτελεί ένα από τα δημοφιλέστερα βότανα εξαιτίας των γνωστών γαστρονομικών (αρωματικό και γευστικό προφίλ) και φαρμακευτικών της ιδιοτήτων. Ανήκει στο γένος *Origanum* (*Origanum vulgare*) το οποίο αποτελεί μέλος της οικογένειας *Lamiaceae* (Εικόνα 11). Γενικά, υπάρχουν πολλές διαθέσιμες ποικιλίες ρίγανης που ανήκουν βοτανολογικά στο ίδιο γένος όπως η ελληνική (*Oreganum hirtum*), η ιταλική (*Origanum x majoricum*), η συριακή (*Origanum syriacum*) αλλά και η μεξικανική (*Oreganum graveolens*). Τα φύλλα της ρίγανης έχουν έντονο αλλά ευχάριστο άρωμα που περιγράφεται συχνά ως ένας συνδυασμός από γήινες, πιπεράτες, ελαφρώς πικρές νότες. Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι πως κάθε είδος ανάλογα τη γεωγραφική του προέλευση χαρακτηρίζεται από διαφορετικές γεύσεις και αρώματα. Για παράδειγμα, η ιταλική ρίγανη έχει πιο ήπια γεύση σε σχέση με τη συριακή, ενώ η μεξικανική ρίγανη προσδίδει αρώματα εσπεριδοειδών (Bonfanti et al., 2012).



**Εικόνα 11.** Κοινή ποικιλία ρίγανης *Origanum vulgare* (a) και ελληνική ποικιλία ρίγανης *Origanum hirtum* (b) (Πηγή Weglarz et al., 2020)

Διατροφικά η ρίγανη είναι άμεσα συνυφασμένη με μια μεσογειακού τύπου διατροφή ενώ αποτελεί και ένα από τα βασικότερα συστατικά σε πολλά ιταλικά πιάτα. Γευστικά μπορεί να συνδυαστεί αρμονικά και με άλλα βότανα όπως ο βασιλικός, ο δυόσμος, το θυμάρι και το δενδρολίβανο, έτσι ώστε να αποτελέσει τη βάση: (α) διάφορων καρυκευμάτων κρέατος ή ψητών λαχανικών και (β) διάφορων μιγμάτων μπαχαρικών για σάλτσες πίτσας ή ζυμαρικών. Τα φύλλα της μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο φρέσκα όσο και αποξηραμένα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, φαίνεται πως η αποξηραμένη ρίγανη προτιμάται της φρέσκιας τόσο για πρακτικούς λόγους (μεγαλύτερη σταθερότητα, καταλαμβάνει λιγότερο χώρο) όσο και γευστικούς (έχει έντονη γεύση που μπορεί να διαρκέσει για καιρό) (Rodriguez et al., 2016).

Παράλληλα η ρίγανη έχει μακρά ιστορία φαρμακευτικής χρήσης συμπεριλαμβανομένης και της παραδοσιακής ιατρικής. Περιέχει διάφορες ενώσεις όπως φαινόλες, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα τα οποία παρουσιάζουν πιθανά οφέλη για την υγεία (Gutiérrez et al., 2018). Εκτός των άλλων έχει χρησιμοποιηθεί για την υποστήριξη της πέψης, την ανακούφιση των αναπνευστικών παθήσεων (έντονος βήχας/συμφόρηση), την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και ως τοπική θεραπεία για δερματικές παθήσεις όπως η ακμή ή οι μυκητιάσεις (Franciosini et al., 2015; Delgado et al., 2021; Bauer et al., 2019). Ωστόσο, συμπυκνωμένες μορφές στις οποίες μπορεί να βρίσκεται η ρίγανη σε μεγάλες ποσότητες (όπως διάφορα έλαια ή συμπληρώματα) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή και αφού υπάρχει η έγκριση κάποιου επαγγελματία υγείας.

### 3.2.2 Λεβάντα

Η λεβάντα είναι ένα αειθαλές αρωματικό φυτό που ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* και περιλαμβάνει πολλά είδη με διαφορετικά χημικά χαρακτηριστικά όπως *Lavandula angustifolia*, *L. stoechas*, *L. latifolia*, and *Lavandula x intermedia* (Εικόνα 12). Αν και διαφέρουν από βοτανική άποψη, τα προαναφερθέντα είδη λεβάντας μοιράζονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό παρόμοια κύρια χαρακτηριστικά όπως τερπένια (λιναλοόλη και λιμονέλιο), τριτερπένια (οξικό λιναλύλιο) αλλά και αλκοόλες (περιλλυλική αλκοόλη) (Wells et al., 2018). Ωστόσο, η γεωγραφική προέλευση και τα μορφολογικά



χαρακτηριστικά του εδάφους ενδέχεται να επηρεάσουν τη παραπάνω κύρια σύσταση. Σε αντίθεση με τη ρίγανη η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη μαγειρική, η λεβάντα έχει περιορισμένες μαγειρικές χρήσεις εξαιτίας της έντονης και ιδιαίτερης γεύσης της. Έτσι, χρησιμοποιείται με φειδώ σε επιδόρπια.



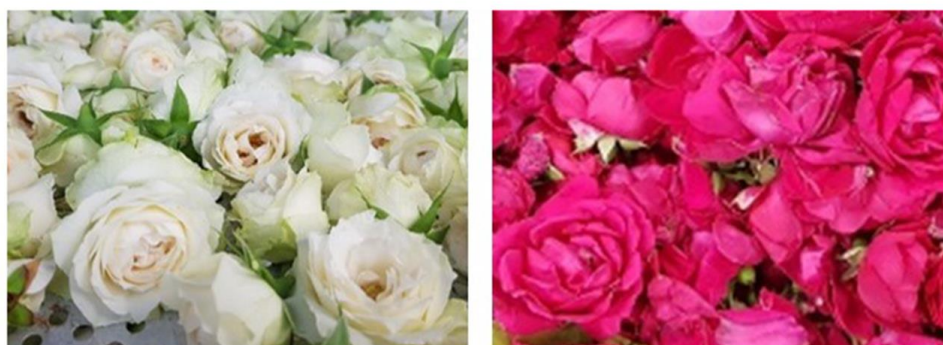
**Εικόνα 12.** Αντιπροσωπευτική απεικόνιση του αρωματικού φυτού λεβάντας (Πηγή: *Haban et al., 2023*)

Αντίθετα η λεβάντα υπό τη μορφή ελαίου (lavender essential oil) αποτελεί πιθανώς το δημοφιλέστερο συστατικό σε διάφορες αρωματοθεραπείες λόγω του ευχάριστου αρώματος αλλά και των ηρεμιστικών της ιδιοτήτων (Jafari-Koulaee et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι βοηθά στη μείωση του άγχους, προάγει τη χαλάρωση και ανακουφίζει συμπτώματα αϋπνίας (Luo and Jiang, 2022). Παράλληλα η λεβάντα αποτελεί συστατικό των περισσότερων προϊόντων ειδικής φροντίδας για διάφορες χρήσεις όπως η περιποίηση, η τόνωση και η ενυδάτωση της επιδερμίδας. Ακόμη, η λεβάντα έχει χρησιμοποιηθεί σε παραδοσιακά βότανα. Ιστορικά, υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν τα εγχύματα λεβάντας με την ανακούφιση πονοκεφάλων, την αντιμετώπιση τσιμπημάτων εντόμων, τη φυσική επούλωση πληγών, εγκαυμάτων ή ερεθισμών του δέρματος (Rafii et al., 2020).

### **3.2.3 Ρόδα**

Η ομορφιά και το άρωμα των άνθων της τριανταφυλλιάς (ρόδα) είναι γνωστά από την αρχαιότητα. Έχουν αναφερθεί σε αρχαία κινεζικά κείμενα, έργα τέχνης

αλλά και μυθολογικά γεγονότα, καθιστώντας τα ένα διαχρονικό σύμβολο ομορφιάς και αγάπης παγκοσμίως (Mileva et al., 2021). Η προέλευσή τους πιστεύεται ότι σχετίζεται με την Κεντρική Ασία (*Rosaceae* family) όπου μέχρι και σήμερα απαντώνται παραπάνω από τα μισά είδη τριανταφυλλιάς συνολικά (Εικόνα 13). Ανά τα χρόνια, ο υβριδισμός και η επιλεκτική αναπαραγωγή τους, οδήγησαν στην ανάδειξη μιας μεγάλης ποικιλίας άνθεων τριανταφυλλιάς. Έτσι, επί του παρόντος υπάρχουν πάνω από 1000 γονότυποι ρόδων οι οποίοι κατατάσσονται και ομαδοποιούνται με βάση τα βοτανικά τους χαρακτηριστικά σε: υβριδικά τσάγια, πολύ-άνθη, αναρριχητικά και θαμνώδη (Božanić Tanjga, B et al., 2022).



**Εικόνα 13.** Ποικιλίες λευκών και μωβ τριανταφυλλιών (Πηγή Wang et al., 2020)

Η γεωγραφική προέλευση των ειδών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ποιότητας των παραγόμενων εμπορικών προϊόντων όπως τα αιθέρια έλαια ρόδων, τα ροδόνερα (hydrolates), τα υπερ-συμπυκνωμένα και τα οينوπνευματώδη. Τα αιθέρια έλαια είναι προϊόντα απόσταξης, τα υπερ-συμπυκνωμένα είναι ένα εκχύλισμα με μη πολικό διαλύτη και τα οينوπνευματώδη είναι το προϊόν που σχηματίζεται κατά την εκχύλιση των υπερ-συμπυκνωμένων με αιθανόλη (Mileva et al., 2021). Ανάμεσα στις σημαντικότερες παραγωγούς ρόδων είναι χώρες όπως η Τουρκία, η Κίνα, το Μαρόκο και η Βουλγαρία. Ειδικά για τη Βουλγαρία, η ενασχόληση με τη καλλιέργεια αλλά και επεξεργασία τριαντάφυλλων αποτελεί παράδοση και βιοπορισμό μεγάλου μέρους του πληθυσμού και είναι πολύ σημαντική για την αγροτική οικονομία της χώρας (Akram et al., 2020).

Έως σήμερα, τα τριαντάφυλλα ή τα προϊόντα που προκύπτουν από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για διάφορους σκοπούς. Ένα τέτοιο προϊόν είναι και το ροδόνερο. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα υποπροϊόν που προκύπτει κατά τη διαδικασία της απόσταξης για τη παραγωγή του αιθέριου ελαίου. Χαρακτηρίζεται από μια απαλή νότα αρώματος λουλουδιών και χρησιμοποιείται συνήθως στη ζαχαροπλαστική όπως ο αρωματισμός επιδορπίων αλλά και στη βιομηχανία καλλυντικών για τη παρασκευή διάφορων προϊόντων ειδικής φροντίδας (Guimarães et al., 2010).

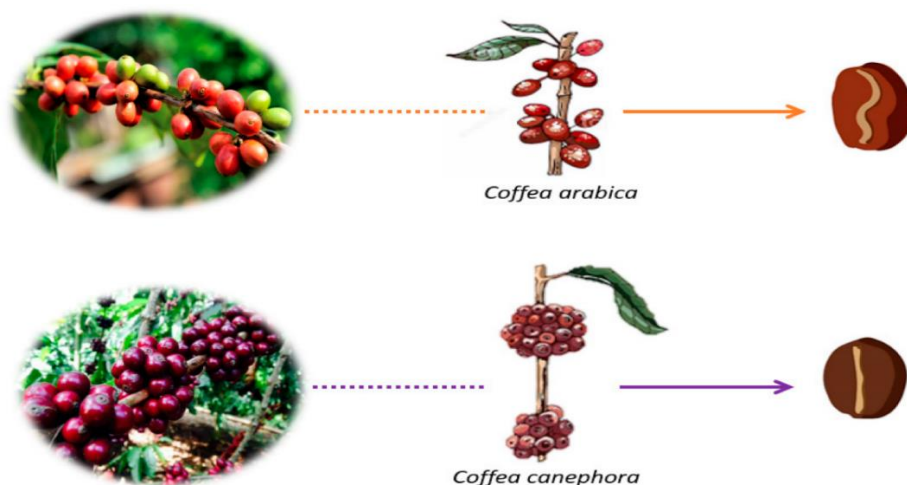
Τα αιθέρια έλαια τριαντάφυλλου, βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην αρωματοποιία αλλά και αρωματοθεραπεία. Ωστόσο, απαιτείται μεγάλη ποσότητα ροδοπέταλων για τη παραγωγή μιας μικρής μόνο ποσότητας ελαίου, καθιστώντας τα ένα από τα πιο ακριβά αιθέρια έλαια. Παράλληλα, τόσο τα αιθέρια έλαια όσο και τα ροδοπέταλα έχουν χρησιμοποιηθεί στη παραδοσιακή ιατρική και εθνοφαρμακολογία μέσω της παρασκευής εγχυμάτων ή αλοιφών καθώς πιστεύεται πως έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες, ενώ φαίνεται να χρησιμοποιούνται για διάφορες πεπτικές ή δερματικές παθήσεις (Herman, et al., 2019).

### **3.2.4 Καφές**

Ο καφές είναι ένα από τα πιο δημοφιλή ροφήματα παγκοσμίως, που απολαμβάνουν εκατομμύρια άνθρωποι για την πλούσια γεύση, το έντονο άρωμα και τα διεγερτικά του αποτελέσματα. Πρόκειται για ένα από τα πιο διαδεδομένα γεωργικά προϊόντα στον κόσμο, του οποίου το συνολικό δίκτυο στην παγκόσμια αγορά εκτιμάται ότι ξεπερνά τα 38 δισεκατομμύρια δολάρια. Αυτό αποτυπώνεται και στη πρόσφατη έκθεση του Διεθνούς Οργανισμού όπου εκτιμάται πως η παγκόσμια κατανάλωση καφέ ξεπέρασε τις 167 εκατομμύρια σακούλες (60 κιλά η καθεμιά) για το 2020 (<https://www.ico.org/>, τελευταία πρόσβαση, 2 Ιουνίου 2023). Παράλληλα, πρόσφατα στοιχεία υπογραμμίζουν πως η αγορά του καφέ προβλέπεται να αναπτυχθεί περαιτέρω με ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης άνω του 4,5% έως το 2028 (<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/coffee-market>, τελευταία πρόσβαση 2 Ιουνίου 2023). Φαίνεται πως τα στοιχεία που εκτίναξαν την αγορά του καφέ σχετίζονται με τη συνεχή αναζήτηση για καινοτομία καθώς και την

επιδίωξη της ικανοποίησης των ολοένα και αυξανόμενων απαιτήσεων των πελατών.

Ιστορικά, ο καφές προέρχεται από την Αιθιοπία όπου η πρώτη αξιόπιστη αναφορά κατανάλωσης του εμφανίζεται στα μέσα του 15<sup>ου</sup> αιώνα. Μέχρι και τους επόμενους δυο αιώνες ο καφές είχε ήδη διαδοθεί αρχικά στην Ευρώπη (μέσω των πολύ εμπορικά δραστήριων Βενετών), έπειτα στην Αμερική (μέσω των Γάλλων και των αποικιών τους) και τη Βραζιλία με τις δυο τελευταίες να αποτελούν τόσο τους μεγαλύτερους παραγωγούς όσο και τους μεγαλύτερους καταναλωτές (Montagnon et al., 2022). Επί του παρόντος, υπάρχουν δυο κύρια είδη κόκκων καφέ που καλλιεργούνται ευρέως για εμπορική κατανάλωση: η ποικιλία του καφέ Arabica (*Coffea arabica* L.) αλλά και ο καφές Robusta (*Coffea canephora* L.), με τον πρώτο να θεωρείται ως το ανώτερο είδος καφέ αντιπροσωπεύοντας έως και το 70-75% της παγκόσμιας παραγωγής καφέ (Εικόνα 14). Από τη μία, οι κόκκοι του καφέ Arabica χαρακτηρίζονται από ένα πιο περίπλοκο γευστικό και αρωματικό προφίλ, ενώ οι κόκκοι Robusta είναι γνωστοί για τα πιο έντονα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους καθώς και για τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και αντοχή τους στις ασθένειες. Γευστικά, οι κόκκοι Arabica προσδίδουν ένα πιο απαλό προφίλ γεύσης με νότες φρούτων, σοκολάτας και ξηρών καρπών, συγκριτικά με τους κόκκους Robusta οι οποίοι παρέχουν μια πιο πικρή και γήινη γεύση (Velásquez and Banchon, 2022).



**Εικόνα 14.** Χαρακτηριστικές ποικιλίες καφέ Arabica και Robusta (καρπός, καφεόδεντρο και κόκκοι) (Πηγή: Da Costa et al., 2023)

Το καβουρδισμα του καφέ αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια της παρασκευής διαφόρων τύπου καφέ. Σύμφωνα και με την ισχύουσα νομοθεσία του κανονισμού 2017/2158 της ευρωπαϊκής επιτροπής, «καβουρδισμένος καφές ορίζεται ως ο άφρυκτος καφές που έχει υποστεί φρύξη στους 200-250°C και κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το τελικό προϊόν να έχει χαρακτηριστικό ιδιάζον άρωμα και γεύση» (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R2158&from=ES>, τελευταία πρόσβαση 8 Ιουνίου 2023). Κατά τη διαδικασία του καβουρδίσματος λαμβάνουν χώρα σημαντικές μεταβολές οι οποίες τελικά θα οδηγήσουν στο σχηματισμό πτητικών ενώσεων που συμβάλλουν σημαντικά στα έντονα αρώματα του καφέ. Ανάλογα λοιπόν με τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, οι κόκκοι καφέ μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας (πράσινο χρώμα) ή να καβουρδιστούν χρησιμοποιώντας έναν από τους τρεις διαφορετικούς τύπους καβουρδίσματος: τον ελαφρύ, τον μεσαίο και το δυνατό (Allesina et al., 2017).

Παράλληλα, η κατανάλωση καφέ έχει επίσης συνδεθεί με διάφορα πιθανά οφέλη για την υγεία που αποδίδονται κυρίως στις φαινολικές ενώσεις του καφέ. Τα φαινολικά όπως το χλωρογενικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το p-κουμαρικό, το p-υδροξυ βενζοϊκό, το βανιλικό και το κινικό οξύ, είναι διαθέσιμα σε άφθονες ποσότητες στον καφέ (Tsiaka et al., 2023). Το χλωρογενικό οξύ, η πιο άφθονη φαινολική ένωση στον καφέ, έχει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, νευροπροστατευτική, αντι-ιική και αντικαρκινική δράση. Το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ είναι επίσης ισχυρά αντιοξειδωτικά που βοηθούν στη προστασία του σώματος από το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή (Rojas-González, A., 2022). Το κινικό οξύ υποδεικνύει αντιμικροβιακή δράση και μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη προστασία του οργανισμού από ορισμένες βακτηριακές λοιμώξεις. Ωστόσο, απαιτείται εκτεταμένη έρευνα για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών που κρύβονται πίσω από αυτές τις επιδράσεις. Τέλος, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν πως η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά του καφέ, μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον τύπο καβουρδίσματος, το μέγεθος των κόκκων αλλά και τη μέθοδο παρασκευής.

### **3.3 Λειτουργικές ιδιότητες των επιλεγμένων αρωματικών φυτών**



Ξεκινώντας, τα περισσότερα αρωματικά φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* στα οποία ανήκει και η ρίγανη έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιοξειδωτικές, αναγωγικές έναντι ελεύθερων ριζών, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, η ρίγανη περιέχει μεγάλες ποσότητες καρβακρόλης και θυμόλης, δυο φαινολικών παραγώγων στα οποία οφείλονται οι περισσότερες βιολογικές της ιδιότητες (Gavaric et al., 2015). Η αντιμικροβιακή δράση της ρίγανης αποδίδεται στην ικανότητα της καρβακρόλης να διαρρηγνύει τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των βακτηρίων επηρεάζοντας τις δομικές και λειτουργικές ιδιότητες τους. Εμβαθύνοντας, ο μηχανισμός δράσης της σχετίζεται με την υδρόφοβη φύση της, η οποία της επιτρέπει να μεσολαβεί ανάμεσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης των βακτηρίων, εκεί που βρίσκονται οι αλυσίδες λιπαρών οξέων προκαλώντας την αποσταθεροποίηση των τελευταίων (Nostro, A., and Papalia, T., 2012).

Πρόσφατες μελέτες φανερώνουν πως η ρίγανη, τα εγχύματα ή τα διάφορα αιθέρια έλαια ρίγανης μπορούν να παρουσιάσουν αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία σχετίζεται άμεσα με ενώσεις που αυτά περιέχουν όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα (Leyva-Lopez et al., 2017). Για παράδειγμα, σε μια μελέτη που χρησιμοποιήθηκε υδατικό εκχύλισμα *O. Vulgare*, παρατηρήθηκε εξαιρετικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως η ιντερλευκίνη-8 σε καρκινικά κύτταρα (Kogiannou et al., 2013).

Συνεχίζοντας, η λεβάντα έχει βρεθεί ότι έχει ηρεμιστικές, αντικαταθλιπτικές, αντιφλεγμονώδεις αλλά και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν τη χρήση εκχυλισμάτων λεβάντας για την καταπολέμηση του άγχους και των κρίσεων πανικού (Haban et al., 2023). Μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε πως η χορήγηση κάψουλας που περιείχε έλαιο λεβάντας μείωσε σημαντικά τα συμπτώματα άγχους σε ενήλικες με γενικευμένη αγχώδη διαταραχή αποδεικνύοντας την αγχολυτική της δράση (Donelli et al., 2019). Σε συνδυασμό με τις αγχολυτικές ικανότητες η λεβάντα χαρακτηρίζεται και από ηρεμιστική δράση η οποία συμβάλλει αισθητά στη βελτίωση της ποιότητας του ύπνου. Αυτές οι καταπραυντικές της ιδιότητες βρίσκουν εφαρμογή και σε άλλες νευρολογικής φύσεως παθήσεις, όπως οι συχνές ημικρανίες και η κατάθλιψη (Donelli., D. 2019).

Παράλληλα η λεβάντα χαρακτηρίζεται και από αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Αξιοσημείωτο είναι πως σε μια πρόσφατη μελέτη σε ζώα που έπασχαν από οξεία πνευμονοπάθεια, η χορήγηση εγχύματος λεβάντας μείωσε σημαντικά τη φλεγμονή, βελτιώνοντας τη λειτουργία των πνευμόνων. Εκτός των άλλων όμως, η λεβάντα έχει συσχετιστεί και με έντονη αντιβακτηριακή δράση. Για παράδειγμα, αποστάγματα λεβάντας ή αιθέριο έλαιο λεβάντας έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι διάφορων πολυανθεκτικών μικροοργανισμών, όπως του *Staphylococcus aureus* και της *Escherichia Coli* (Ciocarlan et al., 2021).

Όσον αφορά τα ρόδα, πολλές μελέτες έως τώρα υποδεικνύουν την ισχυρή αντιμικροβιακή τους δράση. Αυτή του η δράση πιστεύεται πως οφείλεται στη μεγάλη του περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή και τα τερπενοειδή. Η αντιμικροβιακή δράση των ρόδων αφορά κυρίως συμπυκνώματα αιθέριων ελαίων τα οποία έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι στελεχών όπως ο *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Fernades et al., 2017). Πλεονέκτημα των διάφορων εμπορικών προϊόντων ρόδων είναι ότι εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση τόσο σε Gram αρνητικά όσο και Gram θετικά βακτήρια. Πρόσφατα, ο Batool και η ομάδα του, παρατήρησαν πως η ποικιλία *R. Damascena* είχε έντονη αντιλισταεριακή δράση (Batool et al., 2018).

Εκτός της αντιμικροβιακής δράσης, τα ρόδα έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Πιο συγκεκριμένα, αρκετές ποικιλίες μπορούν να αναστείλουν τη δράση του ενζύμου α-γλυκοζιδάση με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της απορρόφησης των υδατανθράκων από το λεπτό έντερο, υποδεικνύοντας τις αντιδιαβητικές τους ιδιότητες. Παράλληλα, σε μια άλλη μελέτη με ζώα (ποντίκια), βρέθηκε πως η χορήγηση εκχυλίσματος ροδαλών μείωσε τη πίεση του αίματος, τα επίπεδα χοληστερόλης και επιβράδυνε το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών (Cavalera et al., 2017).

Ενδιαφέρον αποτελεί, πως κατά τη διάρκεια *in vitro* δοκιμών, η ανασταλτική δράση των ρόδων ενάντια στην οξείδωση των λιπιδίων καθώς και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα ήταν συγκρίσιμη και δεν διέφερε σημαντικά από ισχυρά αντιοξειδωτικά με αποδεδειγμένη δράση, όπως η α-τοκοφερόλη (Illieva et al., 2022). Ακόμη, όλα τα διάφορα προϊόντα ρόδων θεωρούνται ιδανικά για την καταπολέμηση των ανεπιθύμητων ενεργειών που προκαλούνται

από τις ελεύθερες ρίζες καθώς όλα παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, τα αμιγώς φυτικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με άλλων μορφών εκχυλίσματα.

Τέλος, ο καφές έχει μελετηθεί εκτενώς για τα πιθανά του οφέλη στην υγεία του ανθρώπου. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται στοχευμένη έρευνα καθώς τα έως τώρα επιστημονικά δεδομένα υποδεικνύουν αντικρουόμενα ευρήματα. Αν και το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας σχετικά με τις βιολογικές ιδιότητες του καφέ αρχικά είχε επικεντρωθεί στη καφεΐνη, στις μέρες μας δίνεται έμφαση στην αξιολόγηση και άλλων ενώσεων με πιθανά οφέλη όπως οι φαινόλες. Μια από τις ευεργετικές δράσεις του καφέ είναι η αποδεδειγμένη υψηλή περιεκτικότητα του σε αντιοξειδωτικά (Ali et al., 2022). Ο καφές περιέχει πληθώρα αντιοξειδωτικών ενώσεων που βοηθούν στη καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες αλλά και της μείωσης της φλεγμονής. Εκτός των άλλων, η καφεΐνη έχει χαρακτηριστεί ως ψυχοδραστικό φάρμακο που δρα διεγερτικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα (van Dam et al., 2020). Έτσι, η μέτρια πρόσληψη καφεΐνης επηρεάζει θετικά διάφορες εγκεφαλικές λειτουργίες ενισχύοντας τη συγκέντρωση, τη μνήμη αλλά και βελτιώνει τη διάθεση ή τους χρόνους απόκρισης σε διάφορα ερεθίσματα. Μάλιστα, φαίνεται πως ο καφές ίσως μπορεί να συνεισφέρει στη βελτίωση της ποιότητας ζωής ατόμων που πάσχουν από νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως οι νόσοι του Parkinson και του Alzheimer (van Dam et al., 2020).

Σημαντικά φαίνεται να είναι τα ευρήματα που συσχετίζουν τη κατανάλωση καφέ με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 και ό,τι αυτό συνεπάγεται όπως η βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη αλλά και η ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα (Shokouh et al., 2019). Άλλη μελέτη, φανέρωσε πως μια κούπα καφέ σε ημερήσια βάση μπορεί να μειώσει έως και 7% τον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, πιστεύεται πως εμπλέκεται τόσο η καφεΐνη όσο και τα χλωρογενικά οξέα. Ενδιαφέρον αποτελεί πως παρά τη γενική πεποίθηση πως ο καφές ενδέχεται να αναστατώσει τη πέψη, υπάρχουν ενδείξεις πως η κατανάλωση του ευνοεί τη ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιώματος (Dai et al., 2023).



### 3.4 Απαντώμενα φυτοχημικά συστατικά στα μελετώμενα εγχύματα

Μέχρι και σήμερα, τα φυτά θεωρούνται σημαντική πηγή φαρμακευτικών και θρεπτικών συστατικών, ενώ ιστορικά ευρήματα υποδεικνύουν τη χρήση τους για τη θεραπεία και καταπολέμηση πολλών ασθενειών. Είναι γνωστό ότι τα φυτά παράγουν μεγάλη ποικιλία μεταβολιτών. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες (δηλαδή πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες) εμπλέκονται άμεσα στις εγγενείς μεταβολικές διαδικασίες, όπως η φυσιολογική ανάπτυξη και αναπαραγωγή. Αντίθετα οι δευτερογενείς μεταβολίτες γνωστοί και ως φυτοχημικά προσδίδουν εκλεκτικό πλεονέκτημα παρόλο που δεν εμπλέκονται στις κύριες μεταβολικές οδούς τους (Christaki et al., 2012). Αν και οι απόψεις δίστανται σχετικά με το ποιες κατηγορίες ενώσεων μπορούν χαρακτηριστούν ως φυτοχημικά, οι βασικότερες κατηγορίες περιλαμβάνουν τα καροτενοειδή, τα φαινολικά, τα αλκαοειδή, τα οργανοσουλφίδια και τα τερπένια. Από αυτές, οι (πολύ)-φαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα που υποδιαιρείται σε επτά αντίστοιχες κατηγορίες όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο.

Όσον αφορά τη ρίγανη, κατά τον χημικό χαρακτηρισμό διάφορων προϊόντων της (εγχυμάτων ή αιθέρια έλαια), ο Moghonyan (2019) παρατήρησε πως οι μεγαλύτερες αναλογίες ενώσεων αφορούσαν διάφορα σεσκι-τερπένια (3 μονάδες ισορπενίου, 15 άτομα άνθρακα) όπως το εποξειδίο του καρυοφυλλενίου, το β-καρυοφυλλένιο και το ο-κυμένιο (Moghonyan et al, 2019). Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα από την άλλη, είναι οι κύριοι τύποι φαινολικών ενώσεων που ανιχνεύονται. Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη τουλάχιστον ενός αρωματικού δακτυλίου στο μόριο τους συνδεδεμένο με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Ανάλογα με τη διάταξη και τον αριθμό των ατόμων άνθρακα μπορούν να διακριθούν σε επιμέρους κατηγορίες. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημαντική βιολογική δραστηριότητα που έχουν αυτές οι ενώσεις, η ταυτοποίηση τους στη ρίγανη είναι σημαντική.

Από τα φλαβονοειδή, οι φλαβόνες βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στη ρίγανη, ακολουθούμενες από τις φλαβονόλες, τις φλαβανόνες και τις φλαβανόλες. Αντίστοιχα, μεταξύ των πιο κοινών φαινολικών οξέων της ρίγανης είναι το υδροξυκινναμωνικό, διάφορα παράγωγα του υδρο-βενζοϊκού και άλλα φαινολικά οξέα (Gutiérrez-Grijalva et al., 2017). Στα περισσότερα είδη

ρίγανης έχουν βρεθεί: το ροσμαρινικό οξύ, η απιγενίνη, η λουτεολίνη, η κερσετίνη, σκουτελλαρεΐνη και τα παράγωγα τους (Delgado et al., 2021). Ωστόσο, η περιεκτικότητα και η κατανομή των φυτοχημικών της ρίγανης ποικίλλουν ανάλογα με τη ποικιλία, τους γεωγραφικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και αναλυτικές παραμέτρους όπως η μέθοδος ανίχνευσης ή ο διαλύτης εκχύλισης. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε διάφορες ποικιλίες ρίγανης.

**Πίνακας 4.** Βασικές φαινολικές ενώσεις που απαντώνται σε διάφορες ποικιλίες ρίγανης (Πηγή: Gutiérrez-Grijalva et al., 2017)

Ποικιλία Ρίγανης	Γεωγραφική Προέλευση	Διαλύτης Εκχύλισης	Φαινολικές Ενώσεις	Αναφορά
<i>Hedeoma patens</i>	Μεξικό	Μεθανόλη/ Ακετόνη/Νερό (50:40:10)	3-O-caffeoylquinic acid, luteolin-7-O-glucuronide, scutellarein-7-O-hexoside, salvianolic acid A	Lopez, N., 2016
<i>O. dictamus</i>	Ελλάδα	Μεθανόλη 62%	Vanillic acid, syringic acid, gallic acid, cinnamic acid, o-coumaric acid, rosmarinic acid, p- coumaric acid, chlorogenic acid, epicatechin, naringenin, catechin, genistein, quercetin	Proestos, C., 2014
<i>O. dictamus</i>	Ελλάδα	Μεθανόλη	Caffeic acid, rosmarinic acid	Kaliora, A., 2014
<i>O. dictamus</i>	Ελλάδα	Νερό	Chlorogenic acid, rutin, rosmarinic acid, luteolin luteolin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoisde	Pizzale, L., 2002
<i>O. acutidens</i>	Τουρκία	Νερό	Gallic acid, caffeic acid, p- coumaric acid, rosmarinic acid	Kolda, 2015
<i>O. majoram</i>	Ελλάδα	Νερό	Vanillic acid, protocatechuic acid,	Kaliora, 2014

			syringic acid, gallic acid, cinnamic acid, o-coumaric acid, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, sinapic acid, rosmarinic acid, chrysin, epicatechin, naringenin, catechin, kaempferol, quercetin	
<i>O. majoram</i>	Τουρκία	Μεθανόλη 80%	Caffeic acid glucoside, epigallocatechin, arbutin, luteolin ruitinoside, luteolin rosmarinic acid, dihydroquercetin, dihydroluteolin, apigenin, quercetin,	Zgorka, 2001

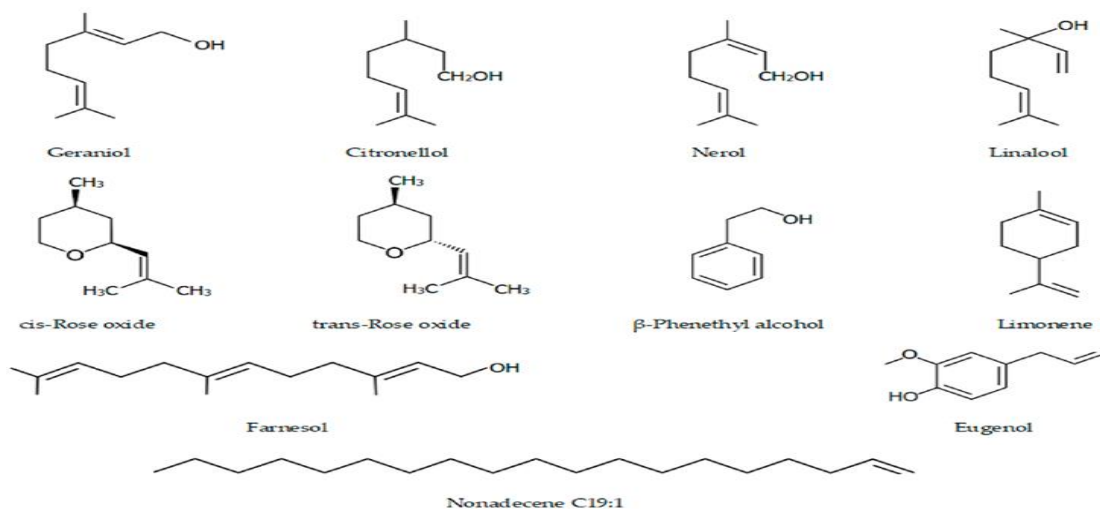
Συνεχίζοντας, σε μια συγκριτική μελέτη διάφορων ποικιλιών λεβάντας που πραγματοποιήθηκε από τον Areias, παρατηρήθηκε ένα κοινό μοτίβο ενώσεων που ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα (Areias et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα, το 2-O-γλυκοσιλκουμαρικό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ αποτελούσαν τα φαινολικά που βρίσκονταν σε μεγαλύτερη αφθονία, ενώ ακολουθούσαν και άλλες φαινολικές ενώσεις, όπως το κουμαρικό οξύ και η λουτεολίνη. Παράλληλα σε μικρότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν η κουμαρίνη, η απηγενίνη καθώς και κάποια γλυκοζυωμένα προϊόντα της τελευταίας (apigenin 7-O-glucoside). Μια άλλη μελέτη που διερευνούσε τη σύσταση των φαινολικών στο ίδιο είδος *Lavandula* παρουσίασε ως κυρίαρχες ενώσεις το φερουλικό, το ροσμαρινικό, το p-κουμαρικό, το καφεϊκό οξύ και το 2-O-γλυκοζυλοκουμαρικό οξύ. Επί του παρόντος, οι φαινολικές ενώσεις της λεβάντας έχουν κυρίως διερευνηθεί για την αντιοξειδωτική τους δράση, αποδεικνύοντας θετική συσχέτιση της περιεκτικότητας στα παραπάνω φαινολικά οξέα με τα επίπεδα αντιοξειδωτικών (Wells et al., 2018).

Ωστόσο στο φυτό της λεβάντας (*Lavandula angustifolia*) ή και σε άλλες μορφές αυτού (αιθέρια έλαια), ανιχνεύονται και άλλα φυτοχημικά όπως η λιναόλη (linalool) και ο οξικός της εστέρας (linalyl-acetate), τα οποία ανήκουν

στη κατηγορία των (μόνο)-τερπενοειδών και παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (Man et al, 2019). Από την άλλη μεριά, η γεωγραφική προέλευση, η εποχικότητα ή το στάδιο ανάπτυξης του φυτού ενδέχεται να επηρεάσει σημαντικά τη χημική του σύσταση και άρα των παραγόμενων εγχυμάτων ή αιθέριων ελαίων. Για παράδειγμα, η γαλλική λεβάντα (*Lavandula stoechas*) η οποία θεωρείται και ποιοτικά ανώτερη για την παρασκευή αρωμάτων, περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες μονο-τερπενοειδών (camphor, fenchone, 1,8-cineole) και μικρότερες ποσότητες φαινολικών (Ozogul et al., 2015).

Τα εγχύματα βοτάνων τριανταφυλλιάς που προέρχονται από την εκχύλιση των άνθων τους (ροδοπέταλα) με ζεστό νερό, είναι γνωστά για το έντονο και συνάμα μοναδικό άρωμα τους αλλά και τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Τόσο το άρωμα όσο και οι ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία έχουν συσχετιστεί με το πλούσιο φυτοχημικό τους προφίλ, το οποίο μεταξύ άλλων περιλαμβάνει διάφορα άκυκλα (σιπρονελόνη) ή κυκλικά (λιμονέλιο) μονοτερπενοειδή, καθώς και μονοτερπενοειδείς αλκοόλες όπως η γερανιόλη (Εικόνα 15).

Άλλες ομάδες φυτοχημικών που βρίσκονται σε αρκετά σημαντικές ποσότητες στα ρόδα αφορούν τις πολυφαινόλες, και πιο συγκεκριμένα ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες των φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων. Παρά τις διαφοροποιήσεις που μπορεί να υπάρχουν ανάλογα με την ποικιλία (π.χ λευκά με μωβ ρόδα), η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι το γαλλικό, το 4-υδρόξυ-βενζοϊκό, το καφταρικό, το χλωρογενικό και το φερουλικό ως τα φαινολικά οξέα που απαντώνται σχεδόν σε όλα τα εμπορικά διαθέσιμα είδη (Pires et al., 2018; Cunha et al., 2014, Koczka et al., 2018). Αντίθετα, σύμφωνα με μια άλλη έρευνα, η επιγαλλοκατεχίνη ανιχνεύεται επιλεκτικά σε ορισμένα μόνο είδη, όπως το *R. dumalis subsp. Boissieri* (Demir et al., 2014). Μια πιο πρόσφατη μελέτη, φανέρωσε πως διάφορες ταννίνες μπορούν να υδρολυθούν, παράγοντας τα δομικά οξέα από τα οποία συντίθενται όπως το γαλλικό οξύ. Αυτό σύμφωνα με τη μελέτη δικαιολογεί το γεγονός πως το γαλλικό οξύ βρίσκεται σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα προαναφερθέντα φαινολικά οξέα (Trinh et al., 2018).



**Εικόνα 15.** Κυριότερες κατηγορίες τερπενοειδών σε εκχυλίσματα ρόδων (Πηγή: Mileva et al., 2021)

Τέλος, τα κυριότερα φυτοχημικά που βρίσκονται στον καφέ είναι το αλκαλοειδές καφεΐνη, διάφορα διτερπένια όπως η καβεόλη και τα φαινολικά οξέα όπως το χλωρογενικό (Ali et al., 2022). Επίσης, στους κόκκους καφέ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και διάφορα φλαβονοειδή τα οποία ωστόσο μεταβάλλονται σημαντικά. Για παράδειγμα, τα επίπεδα κερκετίνης και της καμπφερόλης μειώνονται αναλογικά με τον χρόνο αποθήκευσης. Όσον αφορά το χλωρογενικό, πρόκειται για το πιο άφθονο υδροξυκινναμικό οξύ ενώ ακολουθούν και άλλα σε μικρότερες συγκεντρώσεις, όπως το καφεϊκό, το ρ-κουμαρικό, το φερουλικό και το σιναπικό. Αντίθετα, το γαλλικό οξύ απαντάται σε σημαντικές ποσότητες μόνο σε οργανικούς ή πολύ έντονα καβουρδισμένους καφέδες, γεγονός που ενδεχομένως σχετίζεται με την αποσύνθεση του χλωρογενικού οξέος (Krol et al., 2020). Αξιοσημείωτο είναι πως η μεμβράνη που προκύπτει κατά την επεξεργασία του καφέ περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες φλαβονοειδών, όπως η ρουτίνη, η κερσετίνη, η καμπφερόλη και η κερκετίνη και μικρότερες χλωρογενικού οξέος (Bondam et al., 2022).

Μια πρόσφατη μελέτη που αξιολογούσε ποιοτικά χαρακτηριστικά διαφόρων ειδών καφέ, ταυτοποίησε με ακρίβεια την παρουσία φαινολικών οξέων (βενζοϊκό, κουμαρικό, καφεϊκό και χλωρογενικό οξύ), οργανικών οξέων (κυννικό οξύ), υδροξυκινναμικών εστέρων και λακτονών (5 ενώσεις), διτερπενίων (5 ενώσεις), λιπαρών οξέων και παραγώγων (2 ενώσεις) και υδροξυ-κινναμοϋλοαμίδια (1 ένωση). Σύμφωνα με τη μελέτη, το επίπεδο και οι

συνθήκες καβουρδίσματος επηρέασαν σημαντικά τη περιεκτικότητα κινικού και χλωρογενικού οξέος, οι οποίοι είναι και οι κυριότεροι δείκτες παρασκευής καφέ αλλά και της οργανοληπτικής του ποιότητας (Tsiaka et al., 2023). Ωστόσο το φαινολικό προφίλ των κόκκων καφέ ή των τελικών εγχυμάτων μπορεί να ποικίλει σημαντικά καθώς επηρεάζεται από πάρα πολλές παραμέτρους (Wang et al., 2022; Liao et al., 2022; Yeager et al., 2022) όπως:

- η ποικιλία (οι κόκκοι του καφέ Arabica έχει βρεθεί ότι έχουν περισσότερα φαινολικά σε σχέση με του Robusta),
- οι συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης (οι κόκκοι καφέ που καλλιεργούνται σε μεγαλύτερα υψόμετρα ή και ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες τείνουν να έχουν υψηλότερα επίπεδα φαινολικών),
- οι μέθοδοι επεξεργασίας (οι τεχνικές ξήρανσης των κόκκων συχνά έχουν υψηλότερα επίπεδα φαινολικών εξαιτίας της παρατεταμένης επαφής/συνεκχύλισης μεταξύ των κόκκων και της πούλπας των φλούδων μετά το ξέπλυμα),
- Το καβούρδισμα καθώς τα φαινολικά μπορούν να υποστούν αλλαγές (αποικοδόμηση ή βιομετατροπή) κατά την έκθεση τους σε υψηλές θερμοκρασίες (το ήπιο καβούρδισμα μπορεί να διατηρήσει μεγαλύτερο μέρος του φαινολικού περιεχομένου των κόκκων σε σχέση με το πιο έντονο),
- Η μέθοδος παρασκευής του καφέ, ο χρόνος παρασκευής και η επιλογή της θερμοκρασίας μπορεί να επηρεάσει την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων.

## **Κεφάλαιο 4° Σκοπός πειραματικής εργασίας**

Τα αφεψήματα βοτάνων, καταναλώνονται ευρέως τόσο για οργανοληπτικούς λόγους όσο και για τα πιθανά οφέλη που φαίνεται να έχουν στην υγεία του ανθρώπου. Είναι γνωστό ότι περιέχουν διάφορες φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών οξέων, τα οποία διαθέτουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Έτσι, σημαντική είναι η απόκτηση μιας πλήρους εικόνας του φαινολικού προφίλ διάφορων αφεψημάτων βοτάνων και των πιθανών ιδιοτήτων που προάγουν την υγεία. Για να γίνει αυτό απαιτείται ο έγκυρος ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους. Ως εκ τούτου, στόχος της παρούσας έρευνας είναι η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου HPLC-DAD για την ανάλυση φαινολικών οξέων από εγχύματα βοτάνων. Η προς ανάπτυξη μέθοδος μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο αναλυτικό εργαλείο για τον ακριβή προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε φαινολικά οξέα σε άγνωστα δείγματα, επιτρέποντας την αξιολόγηση της ποιότητας και της δραστηριότητας των φυτικών προϊόντων.

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> Υλικά και μέθοδοι

### 5.1 Γενικό πλαίσιο - Περιγραφή εργασιών

Το πειραματικό σκέλος της παρούσας εργασίας χωρίστηκε σε δυο μέρη, ήτοι αυτό της ανάπτυξης της μεθόδου και αντίστοιχα αυτό της αξιολόγησής της μεθόδου για την ανάλυση του προφίλ φαινολικών οξέων επιλεγμένων δειγμάτων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση η οποία στόχευε αφενός στην επιλογή διαθέσιμων πρωτοκόλλων ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού των φαινολικών οξέων με την υπάρχουσα οργανολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης του εργαστηρίου Ενόργανης Ανάλυσης, και αφετέρου σε μια πρώτη εκτίμηση των φαινολικών οξέων που επρόκειτο να συμπεριληφθούν στη παρούσα εργασία. Στη συνέχεια, η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας συνολικά 16 φαινολικά οξέα τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 5 που ακολουθεί, ενώ για κάθε φαινολικό οξύ κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς. Σημειώνεται δε πως για τα φαινολικά οξέα βανιλλικό και βενζοϊκό χρειάστηκε να αναπτυχθεί χωριστή μέθοδος.

Στο τέλος, η βελτιστοποιημένη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε μέσω της ποσοτικοποίησης συγκεκριμένων φαινολικών οξέων που υπάρχουν σε επιλεγμένα δείγματα εγχυμάτων, τα οποία επί του παρόντος χρησιμοποιούνται σε άλλα ερευνητικά προγράμματα ή μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, τα προς ανάλυση εκχυλίσματα αφορούσαν:

- 4 δείγματα καφέ, Συγκεκριμένα δυο δείγματα καφέ είχαν διαφορετικό βαθμό καβουρδίσματος (ήπιο και μέτριο), ένα δείγμα ήταν σκουρόχρωμο της ποικιλίας Arabica και το τέταρτο δείγμα ήταν εμπλουτισμένο με κάρδαμο
- 1 δείγμα υποπροϊόντων ρόδων (τριαντάφυλλων)
- 1 δείγμα υποπροϊόντων ρίγανης
- 1 δείγμα υποπροϊόντων λεβάντας



**Πίνακας 5.** Πρότυπα φαινολικά οξέα που αναλύθηκαν με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας

A/A	Φαινολικό οξύ	Μοριακός Τύπος	Καθαρότητα
1	Γαλλικό οξύ	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	> 98%
2	Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	
3	Γεντιζικό οξύ	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	
4	4 υδρόξυ-βενζοϊκό	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	
5	Χλωρογενικό οξύ	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	
6	Καφεϊκό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
7	Συριγγικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	
8	Φερουλικό οξύ	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	
9	Κινναμικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	
10	m-κουμαρικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	
11	Σιναπτικό οξύ	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	
12	Σαλικυλικό οξύ	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	
13	ο-κουμαρικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	
14	Ροσμαρινικό οξύ	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	
15	Βανιλικό οξύ	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
16	Βενζοϊκό οξύ	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	

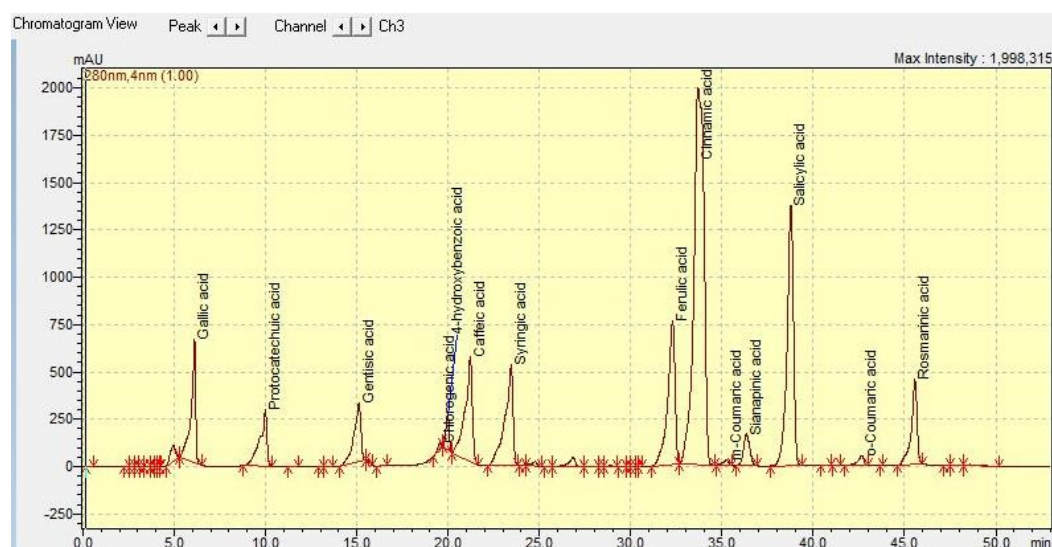
## 5.2 Διαλύτες και οργανολογία

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητή φάση της υγρής χρωματογραφίας ήταν όλοι υψηλού βαθμού καθαρότητας HPLC grade. Το νερό αγοράστηκε από την Sharlau (Barcelona, Spain), ενώ η μεθανόλη και το οξικό οξύ από την Fisher Scientific (Hampton, USA). Τα πρότυπα διαλύματα επίσης παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη, ενώ για την καλύτερη διασπορά του διαλύτη με τις προς διάλυση ουσίες, χρησιμοποιήθηκε μηχανή ανάδευσης (vortex). Τέλος, τόσο η ανάπτυξη της μεθόδου όσο η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένο με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων HPLC DAD.

## 5.3 Ταυτοποίηση φαινολικών οξέων

Η ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων πραγματοποιήθηκε με δυο τρόπους. Αρχικά, παρασκευάστηκαν πρότυπα μεθανολικά διαλύματα για κάθε ένα φαινολικό οξύ και αναλύθηκαν στο σύστημα HPLC-DAD έτσι ώστε να καταγραφεί ο χρόνος έκλουσης για κάθε ένωση. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε μίγμα (100 µg/mL) που περιείχε και τα 14 πρότυπα φαινολικά

οξέα (Εικόνα 15). Το εύρος συγκεντρώσεων τόσο για κάθε φαινολικό οξύ όσο και για τα μίγματα αυτών κυμάνθηκε από 2,5 έως και 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Εικόνα 15.** Χρωματογράφημα των 14 πρότυπων διαλυμάτων φαινολικών οξέων μέσω της χρήσης HPLC-DAD ανάλυσης (280nm)

Ακολούθως, έχοντας μια πρώτη εικόνα (βιβλιογραφικά) σχετικά με το προφίλ των φαινολικών οξέων που αναμένεται να ανιχνευθούν, κάθε δείγμα εμβολιάστηκε (spiked) με αντίστοιχα μίγματα πρότυπων φαινολικών οξέων, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται το εμβαδόν των ανιχνευθέντων φαινολικών οξέων και επιβεβαιώνεται η ύπαρξή τους στα δείγματα. Συμπληρωματικά, συγκρίθηκαν οι χρόνοι έκλουσης των φαινολικών οξέων των δειγμάτων με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης των δειγμάτων που είχαν εμβολιασθεί με τα πρότυπα διαλύματα φαινολικών οξέων.

**Πίνακας 6.** Εμβολιασμός δειγμάτων με αντιπροσωπευτικά μίγματα φαινολικών οξέων γνωστής συγκέντρωσης

Δείγμα	Προστιθέμενο μίγμα	Συγκέντρωση εμβολιασμού ( $\text{mg mL}^{-1}$ )
4 είδη καφέ	Καφεϊκό	100
	ο-κουμαρικό	
	Βενζοϊκό	
Ρίγανη	Χλωρογενικό	100
	Ροσμαρινικό	

	Καφεϊκό Χλωρογενικό 4-υδροξυ-βενζοϊκό ο-κουμαρικό	
<b>Ρόδα</b>	Γαλλικό Πρωτοκατεχουϊκό οξύ Χλωρογενικό 4-υδροξυ-βενζοϊκό Συριγγικό Βενζοϊκό ο-κουμαρικό Ροσμαρινικό	
<b>Λεβάντα</b>	Πρωτοκατεχουϊκό οξύ Γεντιζικό 4-υδροξυ-βενζοϊκό Καφεϊκό Συριγγικό Φερουλικό Βενζοϊκό Σαλικυλικό ο-κουμαρικό Ροσμαρινικό	

#### 5.4 Πειραματικό πρωτόκολλο-Υπολογισμοί περιεχομένου φαινολικών οξέων

Το πειραματικό πρωτόκολλο για τα δείγματα καφέδων ήταν διαφορετικό από εκείνο για τα υποπροϊόντα αρωματικών φυτών. Πιο συγκεκριμένα, 3 γραμμάρια καφέ διαλύθηκαν σε 50mL νερό και ομογενοποιήθηκαν πλήρως. Αφού το μίγμα έβρασε για 35 δευτερόλεπτα (παρατήρηση φυσαλίδων), κρύωσε και μεταφέρθηκε στο ψυγείο (4°C) για μια ώρα. Στη συνέχεια απομακρύνθηκαν τα σωματίδια (μούργα) του καφέ και έγινε παραλαβή 1mL εκχυλίσματος, το οποίο εξατμίστηκε μέχρις ξηρού. Δεδομένου ότι το εκχύλισμα ήταν υδατικό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ξήρανσης υπό κατάψυξη (freeze-drying).

Τελικά, το στερεό υπόλειμμα (25-30mg) επαναδιαλύθηκε σε 1000μL μεθανόλης και από αυτό πραγματοποιήθηκε η έγχυση στον εισαγωγέα της HPLC.

Όσον αφορά το πειραματικό πρωτόκολλο των υποπροϊόντων αρωματικών φυτών, ζυγίστηκε 1 γραμμάριο δείγματος και διαλύθηκε σε σύστημα αιθανόλης νερού ενώ ακολούθησε η ομογενοποίηση του. Η εκχύλιση των φαινολικών ήταν υποβοηθούμενη από υπερήχους ενώ ρυθμίστηκαν κατάλληλα σχετικές παράμετροι όπως η ισχύς και ο χρόνος εκχύλισης ανά περίπτωση. Ομοίως, έγινε παραλαβή 1mL εκχυλίσματος όπου και αυτό εξαιτίας της παρουσίας νερού, ξηράνθηκε υπό κατάψυξη και αφού το στερεό υπόλειμμα (9-15mg) επασυμπυκνώθηκε σε 1000μL μεθανόλης, εγχύθηκε στον εισαγωγέα της HPLC.

Όσον αφορά τον υπολογισμό του περιεχόμενου των δειγμάτων σε φαινολικά οξέα, δεδομένου ότι το  $C_{cal}$ , αντικατοπτρίζει τόσο τη συγκέντρωση στο dry residue όσο και στο ίδιο το δείγμα καφέ (για 1ml διαλύτη), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο παρακάτω πιο απλουστευμένος τύπος:

$$\text{Περιεκτικότητα} \left( \frac{mg}{kg} \text{ d. w.} \right) = \frac{C_{cal} * V_{extraction}}{W_{sample}} * 1000$$

Όπου  $C_{cal}$  η συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) που υπάρχει στο 1mL εκχυλίσματος και άρα και στο dry residue,  $V_{extraction}$  η ολική ποσότητα διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των φαινολικών οξέων και  $W_{sample}$  η ακριβής ποσότητα δείγματος που ζυγίστηκε.

## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> Αποτελέσματα – Συζήτηση

### 6.1 Επιλογή αρχικής μεθόδου και πρώτες δοκιμές

Η ανάπτυξη της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή παράταξης φωτοδίοδων περιελάμβανε έναν υγρό χρωματογράφο Shimadzu LC-20AD (Shimadzu Scientific Instruments, Somerset, USA) συζευγμένο με ανιχνευτή ευρέος μήκους κύματος Shimadzu SPD M40 (Shimadzu Scientific Instruments, Somerset, USA), ενώ για τον διαχωρισμό των φαινολικών οξέων χρησιμοποιήθηκε μια στήλη Discovery C18 (250mm x 4.6mm, 5μm, Supelco, Pennsylvania, USA) σε θερμοκρασία δωματίου. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίστηκε σε ήδη δημοσιευμένο πρωτόκολλο εργασίας τροποποιώντας το κατάλληλα (Cheng, 2022). Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7, κατά την διενέργεια των πρώτων δοκιμών αξιολογήθηκαν διαφορετικές παράμετροι έτσι ώστε να διερευνηθεί συνολικά η επίδραση τους στο διαχωρισμό των φαινολικών οξέων και τελικά να τροποποιηθεί κατάλληλα η αρχική μέθοδος.

Οι παράμετροι αυτοί αφορούσαν το πρόγραμμα έκλουσης (βαθμιδωτό ή ισοκρατικό), τη σύνθεση και αναλογία της κινητής φάσης, τη ροή, το μήκος κύματος λειτουργίας και τον ολικό χρόνο ανάλυσης. Παράλληλα, αξιολογήθηκαν και άλλες παράμετροι όπως η συγκέντρωση του οξέος που προστίθεται και στους δυο διαλύτες της κινητής φάσης. Τέλος, αξιολογήθηκε η επίδραση του μήκους κύματος στον προσδιορισμό των υπό μελέτη φαινολικών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν έξι διαφορετικά μήκη κύματος: 210, 230, 254, 280, 300 και 320nm. Σημειώνεται δε πως τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν έχουν χρησιμοποιηθεί σε άλλες μελέτες.

Συνολικά η αξιολόγηση των παραπάνω παραμέτρων πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τα ακόλουθα:

1. Το χρόνο έκλουσης των κορυφών για κάθε πρότυπο οξύ έτσι ώστε αυτός να διαφέρει τουλάχιστον 0.25min από το προηγούμενο ή επόμενο οξύ (αποφυγή αλληλοεπικάλυψης κορυφών – overlapping)
2. Την επαναληψιμότητα των χρόνων έκλουσης τόσο για τα πρότυπα διαλύματα οξέων όσο και για τα δείγματα

3. Την ποιότητα των κορυφών η οποία ιδανικά θα πρέπει να έχει μικρό εύρος (< 0,2 min), να είναι οξεία και χωρίς σπασίματα
4. Την καταπόνηση του οργάνου υπό συνθήκες κυρίως υψηλής πίεσης καθώς αυτές μπορεί να βλάψουν τη στήλη
5. Την αποφυγή της μεταφοράς υπολειμμάτων ενώσεων ή προσμίξεων μεταξύ διαδοχικών ενώσεων (αποφυγή φαινομένου carry-over)
6. Την γραμμικότητα των καμπυλών αναφοράς κατά την ανάλυση των προτύπων διαφορετικών συγκεντρώσεων

**Πίνακας 7.** Αρχικές δοκιμαστικές παράμετροι υγρής χρωματογραφίας

Παράμετρος τροποποίησης	Δοκιμή 1 <sup>η</sup> (Βιβλιογραφική)	Δοκιμή 2 <sup>η</sup> (Τροποποίηση 1 <sup>ης</sup> )
Τύπος έκλουσης	Βαθμιδωτή	Βαθμιδωτή
Σύνθεση κινητής φάσης	A: ακετονιτρίλιο B: Νερό Προσθήκη 0.5% AC*	A: μεθανόλη B: νερό Προσθήκη 2% AC*
Πρόγραμμα έκλουσης	0-5min: 5% A – 95% B 5-35min: 40% A – 60% B 35-45min: 5% A – 95% B	0-5min: 5% A – 95% B 5-45min: 40% A – 60% B 45-50min: 5% A – 95% B 50-53 min: 5% A – 95% B
Θερμοκρασία στήλης	30°C	30°C
Ροή (mL/min)	1	1
Όγκος έγχυσης (μL)	20	20
Μήκος κύματος ανίχνευσης (nm)	254-280-300-320	210-230-254-280-300-320
Τελικός χρόνος ανάλυσης (min)	45	48-53

\* AC: Acetic acid

### 6.1.1 Βελτιστοποίηση μεθόδου

Η βασικότερη παράμετρος που διαδραμάτισε καθοριστικό ρόλο για τον διαχωρισμό και προσδιορισμό των φαινολικών οξέων ήταν ο συνολικός χρόνος ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως ο αρχικός χρόνος ανάλυσης (48 min) δεν ήταν αρκετός έτσι ώστε να μην συνεκλούνται συγκεκριμένα φαινορικά οξέα όπως το ο-κουμαρικό, και το ροσμαρινικό. Αντίθετα, η επέκταση της μεθόδου κατά πέντε λεπτά ήταν αρκετή έτσι ώστε τα παραπάνω οξέα να εκκλούνται με διαφορά τριών λεπτών.

Ως προς την προσθήκη του οξικού οξέος στην κινητή φάση, σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,5 και 2%) οξικού οξέος, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στην κινητή φάση βελτίωσε την ποιότητα των κορυφών. Ο ρυθμός ροής παρέμεινε ίδιος με την αρχική τιμή καθώς ένας συνδυασμός αύξησης ή μείωσης της με την αύξηση του χρόνου της μεθόδου δεν θα ευνοούσε τον διαχωρισμό καθώς θα μετατοπίζονταν οι χρόνοι έκλουσης των ενώσεων. Επομένως διατηρήθηκε η αρχική τιμή ρυθμού ροής 1mL/min. Επιπροσθέτως, η θερμοκρασία της στήλης δεν φάνηκε να επηρεάζει ιδιαίτερα το διαχωρισμό των ενώσεων και επομένως προτιμήθηκε η θερμοκρασία δωματίου.

Η τελική σύνθεση της κινητής φάσης περιελάμβανε ένα σύστημα μεθανόλης (αντί του ακετονιτριλίου που βρέθηκε ότι χρησιμοποιήθηκε βιβλιογραφικά) και νερού, ενώ το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης τροποποιήθηκε μόνο ως προς το χρόνο έκλουσης και όχι ως προς την αναλογία των διαλυτών. Συγκεκριμένα, ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης επεκτάθηκε από 5-35 min σε 5-45 min, 45-50 min και 50-53 min, αντίστοιχα. Όσον αφορά τον όγκο έγχυσης, επιλέχθηκε να διατηρηθεί η αρχική τιμή δηλαδή τα 20  $\mu$ L, καθώς θεωρήθηκε πως μικρότερη ποσότητα ενδεχομένως δεν θα ήταν επαρκής για την ανίχνευση όλων των ενώσεων που περιέχονται στα δείγματα και αφετέρου μεγαλύτερη ποσότητα πιθανώς να ενίσχυε το φαινόμενο του carry over. Στο σύνολο τους, οι τελικές παράμετροι ανάπτυξης της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 που ακολουθεί.

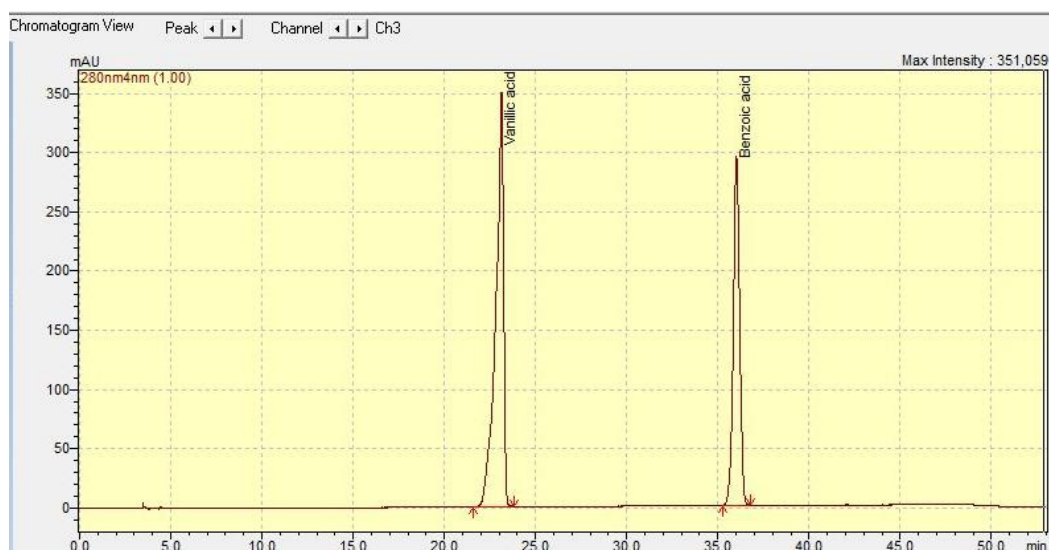
**Πίνακας 8.** Χρωματογραφικές συνθήκες τελικής μεθόδου υγρής χρωματογραφίας

Παράμετρος τροποποίησης	Τελική μέθοδος
Τύπος έκλουσης	Βαθμιδωτή
Σύνθεση κινητής φάσης	A: μεθανόλη B: νερό Προσθήκη 2% AC*
Πρόγραμμα έκλουσης	0-5min: 5% A – 95% B 5-45min: 40% A – 60% B 45-50min: 5% A – 95% B 50-53min: 5% A – 95% B

Θερμοκρασία στήλης	25°C
Ροή (mL/min)	1
Όγκος έγχυσης (μl)	20
Μήκος κύματος ανίχνευσης (nm)	280
Τελικός χρόνος ανάλυσης (min)	53

\*AC: Acetic acid

Παραδόξως, το βενζοϊκό και το βανιλικό οξύ δεν παρουσίασαν ικανοποιητικά ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως αυτά περιεγράφηκαν παραπάνω (βλ. ενότητα 6.1), οπότε ο προσδιορισμός τους πραγματοποιήθηκε σε χωριστή μέθοδο με τα ίδια ωστόσο χαρακτηριστικά όπως φαίνεται στην Εικόνα 17.



**Εικόνα 17.** Χρωματογράφημα προτύπων διαλυμάτων βανιλικού και βενζοϊκού οξέος μέσω της χρήσης HPLC-DAD (280nm)

### 6.1.2 Γραμμικότητα τελικής μεθόδου προσδιορισμού

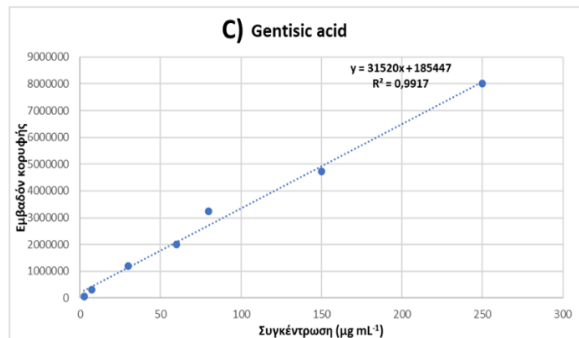
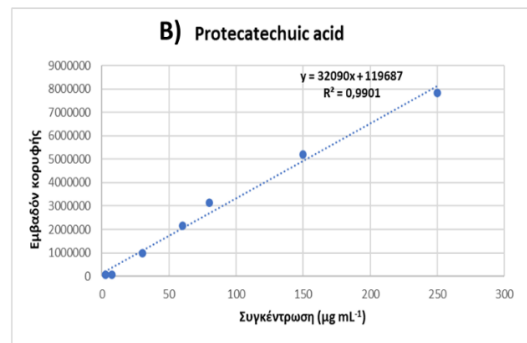
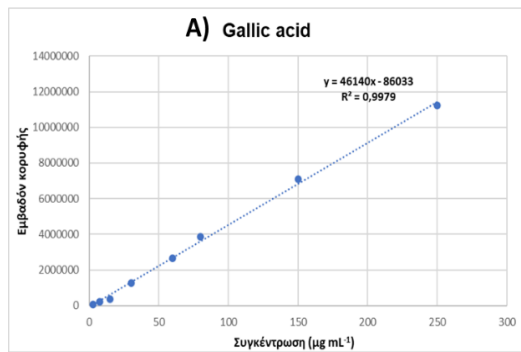
Ως γραμμικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται η ικανότητα της μεθόδου να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα δοκιμών που είναι ευθέως ανάλογα με τη συγκέντρωση (εντός ενός δεδομένου εύρους) της αναλυόμενης ουσίας σε άγνωστα δείγματα. Βασική παράμετρος μέσω της οποίας αξιολογείται η γραμμικότητα μιας μεθόδου για την εκάστοτε ένωση αποτελεί ο συντελεστής συσχέτισης (Coefficient factor –  $R^2$ ) ο οποίος μπορεί να λαμβάνει τιμές από 0 έως 1. Γενικά, όσο η τιμή του παραπάνω συντελεστή προσεγγίζει τη μονάδα, τόσο πιο αξιόπιστη θεωρείται η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων, ενώ για τιμές κάτω από 0,98 συνίσταται ισχυρά η διενέργεια επαναληπτικών



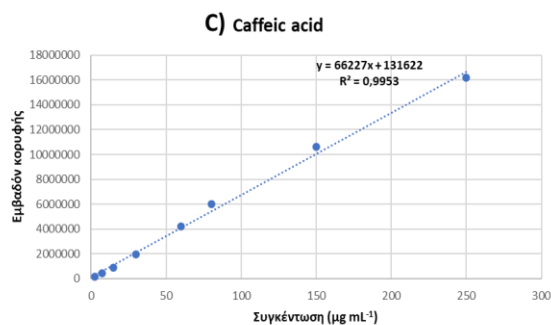
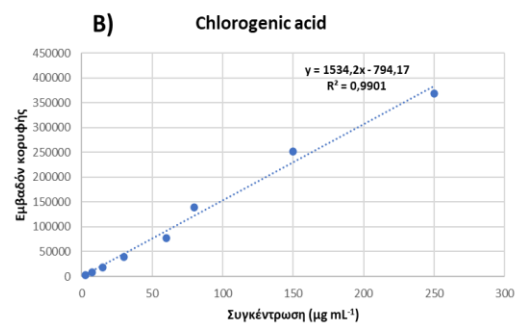
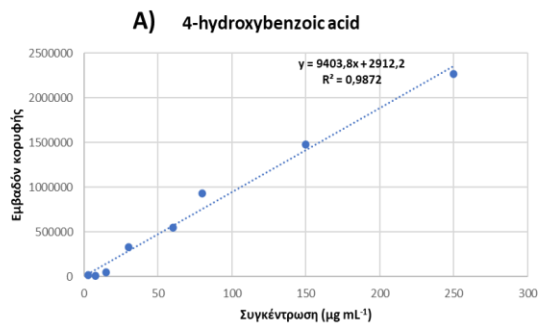
μετρήσεων προς βελτιστοποίηση της καμπύλης αναφοράς. Υπό αυτό το πρίσμα, κάθε φαινολικό οξύ έχει τη δική του καμπύλη αναφοράς και επομένως το δικό του συντελεστή συσχέτισης. Συνολικά, οι εξισώσεις και οι αντίστοιχοι συντελεστές συσχέτισης με τις πρότυπες καμπύλες αναφορές παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 και στις Εικόνες 18-22, αντίστοιχα.

**Πίνακας 9.** Εξισώσεις και συντελεστές συσχέτισης για τα επιλεγμένα προσδιοριζόμενα φαινολικά οξέα

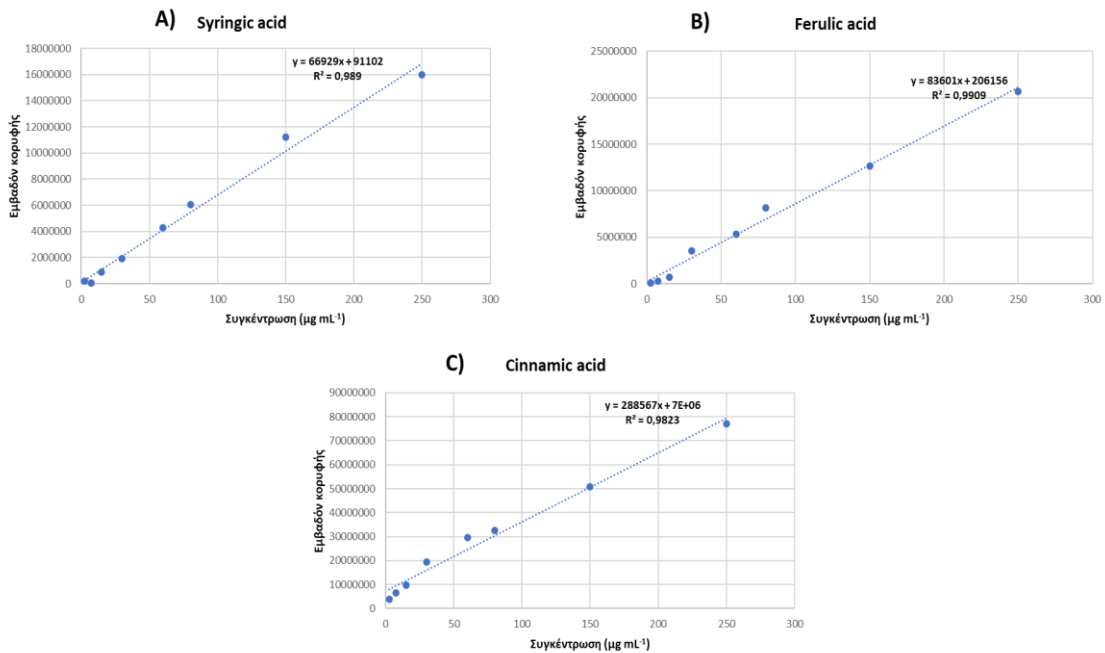
Φαινολικό οξύ	Εξίσωση	Συντελεστής συσχέτισης-R <sup>2</sup>
Γαλλικό οξύ	$y = 46140x - 86033$	0,9979
Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	$y = 32090x + 119687$	0,9917
Γεντισικό οξύ	$y = 31520x + 185447$	0,9917
4 υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	$y = 9403,8x + 2912,2$	0,9872
Χλωρογενικό οξύ	$y = 1534,2x - 794,7$	0,9901
Καφεϊκό οξύ	$y = 66227x + 131622$	0,9953
Συριγγικό οξύ	$y = 66929x + 91102$	0,989
Φερουλικό οξύ	$y = 83601x + 206156$	0,999
Κινναμικό οξύ	$y = 288567x + 700000$	0,9823
m-κουμαρικό οξύ	$y = 79597x + 71921$	0,9999
Σιναπτικό οξύ	$y = 4462,7x - 621662$	0,9786
Σαλικυλικό οξύ	$y = 136112x - 100000$	0,9976
ο-κουμαρικό οξύ	$y = 5034,5x - 15954$	0,9881
Ροσμαρινικό οξύ	$y = 39953x - 250211$	0,9948
Βανιλλικό οξύ	$y = 41432x + 15594$	0,9999
Βενζοϊκό οξύ	$y = 8875x - 84735$	0,9848



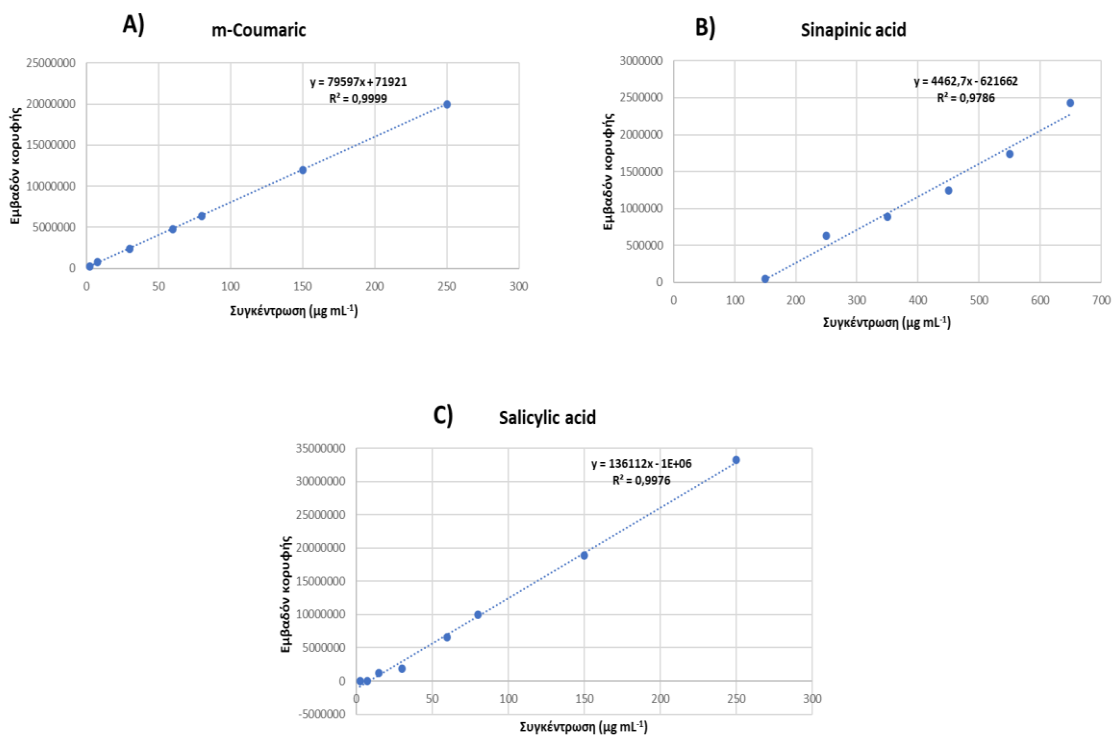
**Εικόνα 18.** Καμπύλες αναφοράς για τα φαινολικά οξέα A) γαλλικού οξέος, B) πρωτοκατεχουϊκού οξέος και C) γεντισικού οξέος.



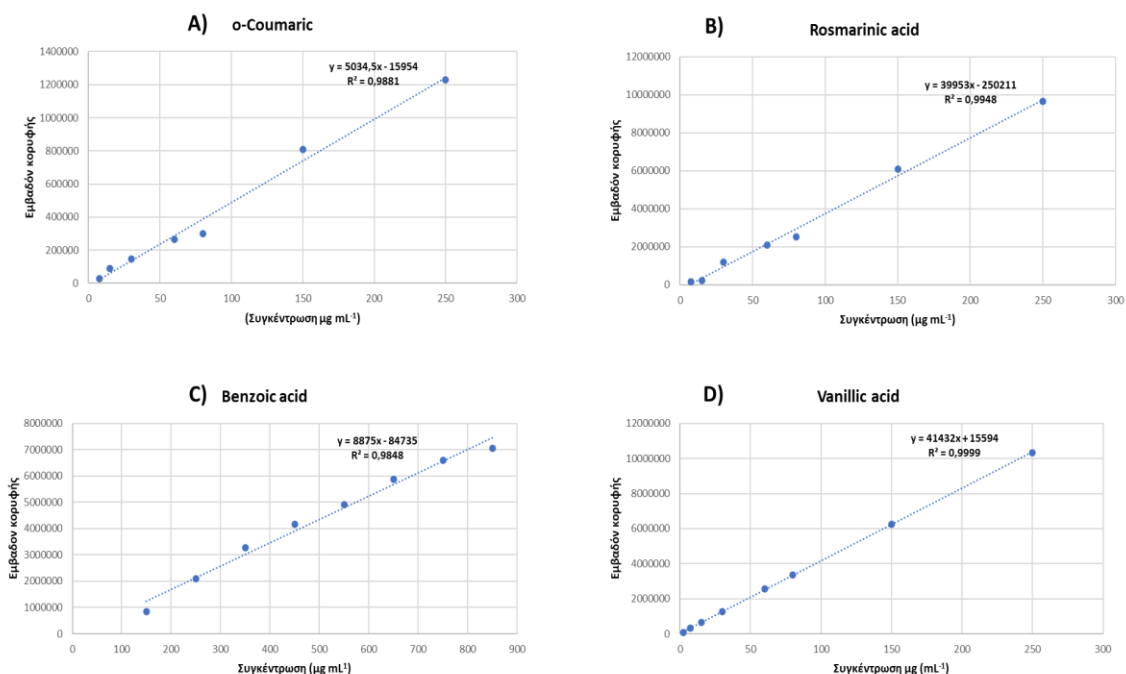
**Εικόνα 19.** Καμπύλες αναφοράς τα φαινολικά οξέα (A) 4-υδροξυβενζοϊκό (B) χλωρογενικό και (C) Καφεϊκό οξύ.



**Εικόνα 20.** Καμπύλες αναφοράς για τα φαινολικά οξέα A) συριγγικό B) φερουλικό και C) κινναμικό οξύ.



**Εικόνα 21.** Καμπύλες αναφοράς για τα φαινολικά οξέα A) *m*-κουμαρικό B) σιναπικό και C) σαλικυλικό οξύ.



**Εικόνα 22.** Καμπύλες αναφοράς τα φαινολικά οξέα A) ο-κουμαρικό B) ροσμαρινικό C) βενζοϊκό, και D) βανιλικό.

## 6.2 Ταυτοποίηση των ενώσεων

Αρχικά, χρησιμοποιώντας πλέον την τελική μέθοδο προσδιορισμού παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 100μg/mL έτσι ώστε να καταγραφεί μεμονωμένα ο χρόνος έκλουσης για κάθε οξύ και στη συνέχεια η διαδικασία επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας αντίστοιχης συγκέντρωσης διάλυμα που περιείχε και τα 14 φαινολικά οξέα. Η αντιστοίχιση των χρόνων έκλουσης κάθε οξέος με τον αντίστοιχο χρόνο για το μίγμα οξέων παρουσιάζεται στον Πίνακα 10, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές αποκλίσεις.

**Πίνακας 10.** Αντιστοίχιση χρόνων έκλουσης πρότυπων διαλυμάτων με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης μίγματος φαινολικών οξέων

A/A	Φαινολικό οξύ	Rt <sub>διάλυμα</sub>	Rt <sub>μίγμα</sub>
1	Γαλλικό	6,100	6,101
2	Πρωτοκατεχουϊκό	9,986	9,99
3	Γεντισικό	15,114	15,119
4	Χλωρογενικό	19,546	19,55
5	4-υδρόξυβενζοϊκό	19,964	19,972
6	Καφεϊκό	21,204	21,21
7	Συριγγικό	23,441	23,449

8	Φερουλικό	32,291	32,301
9	Κινναμικό	33,688	33,698
10	m-κουμαρικό	35,251	35,266
11	Σιναπτικό	36,328	36,333
12	Σαλικυλικό	38,768	38,779
13	ο-κουμαρικό	42,648	42,656
14	Ροσμαρινικό	45,558	45,564

Όσον αφορά την ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων που περιέχονταν στα διαφορετικά δείγματα καφέ η αρωματικών εγχυμάτων, αυτή πραγματοποιήθηκε αξιολογώντας το χρόνο έκλουσης τόσο εμβολιασμένων ή μη δειγμάτων όπως φαίνεται και στους Πίνακες 11 και 12, αντίστοιχα. Η αύξηση του εμβαδού ήδη υπάρχοντων κορυφών αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη της ύπαρξης τους στο καθαρό δείγμα.

**Πίνακας 11.** Αντιστοίχιση χρόνων έκλουσης μη εμβολιασμένων και εμβολιασμένων δειγμάτων καφέ με επιλεγμένα οξέα

Φαινολικό οξύ	Rt <sub>μη εμβολιασμένου</sub>	Rt <sub>εμβολιασμένου</sub>
<b>Καφές 107</b>		
Χλωρογενικό	19,527	19,854
4-υδρόξυβενζοϊκό	20,164	20,261
Καφεϊκό	23,970	24,112
m-κουμαρικό	31,794	32,169
ο-κουμαρικό	42,364	42,371
<b>Καφές 302</b>		
Χλωρογενικό	19,664	19,920
4-υδρόξυβενζοϊκό	20,240	20,409
Βενζοϊκό	36,457	36,579
<b>Καφές 205</b>		
Χλωρογενικό	19,374	19,828
4-υδρόξυβενζοϊκό	20,127	20,380
ο-κουμαρικό	42,651	42,857
Βενζοϊκό	36,225	36,707
<b>Καφές 504</b>		
Χλωρογενικό	19,518	19,608
4-υδρόξυβενζοϊκό	20,272	20,576
Κινναμικό	33,607	33,722
Βενζοϊκό	36,416	36,707

**Πίνακας 12.** Αντιστοίχιση χρόνων έκλουσης μη εμβολιασμένων και εμβολιασμένων δειγμάτων αρωματικών φυτών με επιλεγμένα οξέα

Φαινολικό οξύ	Rt <sub>μη εμβολιασμένου</sub>	Rt <sub>εμβολιασμένου</sub>
<b>Oregano3</b>		

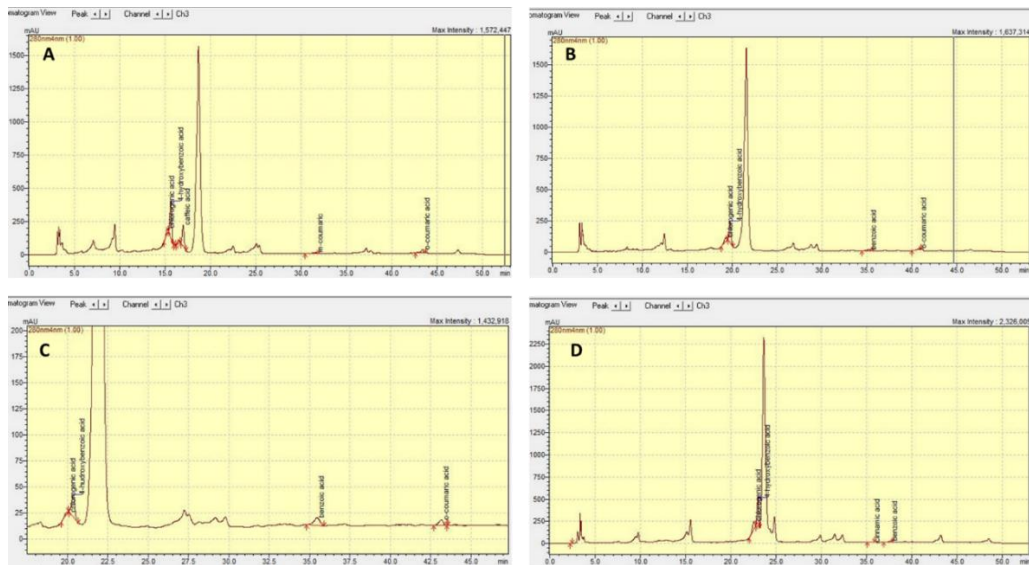
Χλωρογενικό	19,428	19,554
4-υδροξυβενζοϊκό	20,138	20,361
Καφεϊκό	23,970	24,312
Ροσμαρινικό	45,660	45,161
<b>Rose8</b>		
Γαλλικό	5,960	6,203
Πρωτοκατεχουϊκό	9,917	10,081
Χλωρογενικό	19,231	19,499
4-υδροξυβενζοϊκό	20,422	20,514
Συριγγικό	23,398	23,671
Ροσμαρινικό	45,165	45,668
<b>Lavener30</b>		
Πρωτοκατεχουϊκό	10,078	10,206
4-υδροξυβενζοϊκό	20,226	20,485
Καφεϊκό	24,124	24,201
Συριγγικό	23,441	23,652
Φερουλικό	33,005	33,209
Βενζοϊκό	36,152	36,429
ο-κουμαρικό	42,770	42,971
Ροσμαρινικό	45,693	45,902

### 6.3 Περιεχόμενο των φαινολικών οξέων επιλεγμένων δειγμάτων

Η εκτίμηση του περιεχομένου των φαινολικών οξέων στα επιλεγμένα δείγματα εφαρμόστηκε στα πλαίσια δοκιμής της μεθόδου. Λαμβάνοντας υπόψη το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε καθώς και την υπολογιστική προσέγγιση όπως αυτά παρουσιάστηκαν στην ενότητα 5.4 (Πειραματικό πρωτόκολλο-Υπολογισμοί περιεχομένου φαινολικών οξέων), υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις των ταυτοποιημένων οξέων για τα τέσσερα διαφορετικά είδη καφέ και τα τρία διαφορετικά είδη αρωματικών φυτών.

#### 6.3.1 Επιλεγμένα δείγματα καφέ

Η τελική μέθοδος HPLC-DAD εφαρμόστηκε σε δείγματα καφέ ποικιλίας Arabica robusta τα οποία είχαν υποστεί διαφορετικού τύπου επεξεργασία. Στο σύνολο τους, τα χρωματογραφήματα για κάθε δείγμα, παρουσιάζονται στην Εικόνα 23.



**Εικόνα 23.** Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα για τα 4 επιλεγμένα είδη καφέ: A) ήπια καβουρδισμένος -107, B) μέτρια καβουρδισμένος – 205, C) σκουρόχρωμος – 302, D) εμπλουτισμένος με κάρδαμο – 504.

Αντίστοιχα, η περιεκτικότητα των φαινολικών οξέων (εκφρασμένη σε mg/g ξηρού δείγματος) για τα δείγματα καφέ 107 (ήπια καβουρδισμένος), 205 (μέτρια καβουρδισμένος), 302 (σκουρόχρωμος – έντονα καβουρδισμένος Arabica) και 504 (εμπλουτισμένος με κάρδαμο) παρουσιάζεται στους Πίνακες 13-16.

**Πίνακας 13.** Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) ήπια καβουρδισμένου καφέ - 107 σε φαινολικά οξέα

Φαινολικό οξύ	Συγκέντρωση (mg/g dw)
Χλωρογενικό	6,42
4-υδρόξυβενζοϊκό	6,41
Καφεϊκό	0,54
m-κουμαρικό	0,88
o-κουμαρικό	2,06

**Πίνακας 14.** Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) μέτρια καβουρδισμένου καφέ - 205 σε φαινολικά οξέα

Φαινολικό οξύ	Συγκέντρωση (mg/g dw)
Χλωρογενικό	5,91
4-υδρόξυβενζοϊκό	4,2
o-κουμαρικό	0,69

Βενζοϊκό	0,8
----------	-----

**Πίνακας 15.** Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) σκούρου και πιο έντονα καβουρδισμένου καφέ - 302 σε φαινολικά οξέα

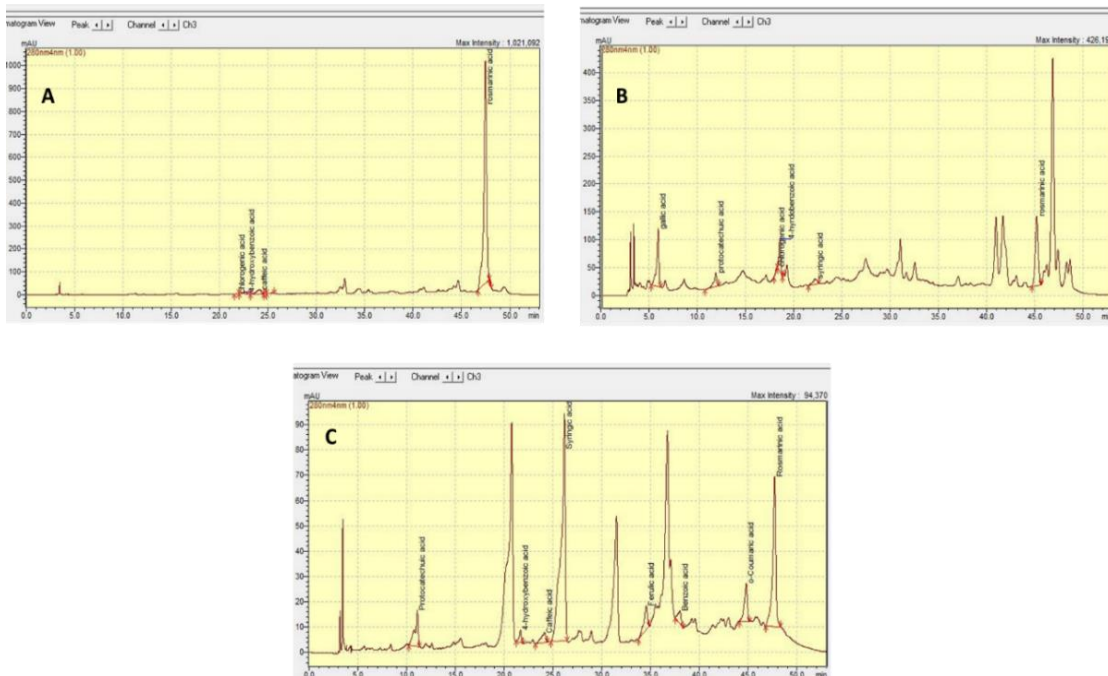
Φαινολικό οξύ	Συγκέντρωση (mg/g dw)
Χλωρογενικό	0,45
4-υδροξύβενζοϊκό	0,53
Βενζοϊκό	0,51

**Πίνακας 16.** Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) αρωματισμένου με κάρδαμο καφέ - 504 σε φαινολικά οξέα

Φαινολικό οξύ	Συγκέντρωση (mg/g dw)
Χλωρογενικό	14,54
4-υδροξύβενζοϊκό	7,12
Βενζοϊκό	0,82

### 6.3.2 Εφαρμογή μεθόδου σε επιλεγμένα δείγματα αρωματικών φυτών

Η παρούσα μέθοδος εφαρμόστηκε και σε επιλεγμένα δείγματα αρωματικών φυτών όπως η ρίγανη, τα ρόδα και η λεβάντα, τα οποία παρουσιάζουν υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο και ένα ιδιαίτερα πλούσιο προφίλ φυτοχημικών ενώσεων γενικότερα. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των δειγμάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα 24 που ακολουθεί.





**Εικόνα 24.** Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα για τα 3 επιλεγμένα είδη αρωματικών φυτών: Α: Ρίγανη, Β: Ρόδα, C: Λεβάντα

Αντίστοιχα, το περιεχόμενο για τα δείγματα αρωματικών φυτών ρίγανης, ρόδων και λεβάντας παρουσιάζεται στους Πίνακες 17-19.

**Πίνακας 17.** Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) αρωματικού φυτού ρίγανης

Φαινολικό οξύ	Συγκέντρωση (mg/g dw)
Χλωρογενικό	0,65
4-υδροξυβενζοϊκό	0,47
Καφεϊκό	0,13
Ροσμαρινικό	9,61

**Πίνακας 18.** Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) αρωματικού φυτού ρόδων

Φαινολικό οξύ	Συγκέντρωση (mg/g dw)
Γαλλικό	1,52
Πρωτοκατεχουϊκό	0,56
Χλωρογενικό	1,13
4-υδροξυβενζοϊκό	3,22
Συριγγικό	0,11
Ροσμαρινικό	2,80

**Πίνακας 19.** Περιεκτικότητα (mg ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος) αρωματικού φυτού λεβάντας

Φαινολικό οξύ	Συγκέντρωση (mg/g dw)
Πρωτοκατεχουϊκό	0,38
4-υδροξυβενζοϊκό	0,32
Καφεϊκό	0,0014
Συριγγικό	1,55
Φερουλικό	0,02
Βενζοϊκό	0,87
ο-κουμαρικό	2,54
Ροσμαρινικό	1,54

## 6.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων

### 6.4.1 Αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού

Συγκεντρωτικά, οι διαφοροποιήσεις που εμφάνισε η τελική μέθοδος σε σχέση με την αρχική βιβλιογραφική προσέγγιση αποτυπώνονται στον Πίνακα 20 που ακολουθεί. Αυτές οι διαφοροποιήσεις αφορούσαν: (α) τον ολικό χρόνο ανάλυσης, (β) τη σύσταση της κινητής φάσης (γ) τη συγκέντρωση του οξικού οξέος που προστέθηκε στη κινητή φάση και (δ) το βέλτιστο μήκος κύματος της ανάλυσης.

*Πίνακας 20. Αρχικές και τελικές παράμετροι της μεθόδου*

Παράμετρος τροποποίησης	Δοκιμή 1 <sup>η</sup> (Βιβλιογραφική)	Τελική μέθοδος
Πρόγραμμα έκλουσης	Βαθμιδωτή	Βαθμιδωτή
Σύνθεση κινητής φάσης	A ακετονιτρίλιο 0.5% AC* B Νερό 0.5% AC	A μεθανόλη 2% AC B νερό 2% AC
Αναλογίες κινητής φάσης	0-5min: 5% A – 95% B 5-35min: 40% A – 60% B 35-45min: 5% A – 95% B	0-5min: 5% A – 95% B 5-45min: 40% A – 60% B <b>45-50min: 5% A – 95% B</b> <b>50-53: 5% A – 95% B</b>
Θερμοκρασία στήλης	30°C	30°C
Ροή (mL/min)	1	1
Όγκος έγχυσης (μl)	20	20
Μήκος κύματος ανίχνευσης (nm)	254-280-300-320	<b>280</b>
Τελικός χρόνος ανάλυσης (min)	45	<b>53</b>

Όσον αφορά τη σύσταση της κινητής φάσης της HPLC, τόσο το ακετονιτρίλιο (αρχική επιλογή) όσο και η μεθανόλη (τελική επιλογή) αποτελούν δυο από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους οργανικούς διαλύτες για την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού φαινολικών οξέων. Και οι δυο αυτοί διαλύτες είναι πλήρως αναμίξιμοι με το νερό αλλά και συμβατοί με άλλα πρόσθετα, ρυθμιστικά ή τροποποιητικά διαλύματα κινητών φάσεων, όπως το οξικό οξύ. Κάθε ένας έχει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Για παράδειγμα, το κόστος του ακετονιτριλίου είναι αρκετά υψηλότερο από αυτό της μεθανόλης ενώ παράλληλα η δεύτερη είναι

επίσης λιγότερο τοξική. Συν τοις άλλοις, φαίνεται πως η μεθανόλη δρα προστατευτικά, καθαρίζοντας τη στήλη, συνεισφέροντας επομένως στη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής της (Stalikas 2007). Από την άλλη το ακετονιτρίλιο είναι πιο κατάλληλο για χρήση σε εφαρμογές που απαιτούν χαμηλά μήκη κύματος (190-210 nm). (Hopkins, 2019). Για την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω καθώς και το γεγονός πως ο προσδιορισμός των φαινολικών πραγματοποιήθηκε σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (280 nm), επιλέχθηκε η αντικατάσταση του ακετονιτρίλιου της αρχικής μεθόδου με τη μεθανόλη.

Δεδομένης της διαφοροποίησης στη δομή των φαινολικών οξέων (αριθμός συζυγών διπλών δεσμών, υποκαταστάσεις αρωματικού δακτυλίου), τα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν διαφορετικά φάσματα απορρόφησης και διαφορετικά βέλτιστα μήκη κύματος απορρόφησης. Από την άλλη, επειδή η παρούσα μέθοδος έχει ως στόχο της τον ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών οξέων σε δείγματα, απαιτείται η εύρεση του βέλτιστου μήκους κύματος ( $\lambda_{max}$ ). Κατά γενική ομολογία, τα περισσότερα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν μέγιστα μήκη κύματος από 200 έως και 290nm, με τη μόνη εξαίρεση να αποτελεί το γεντιζικό οξύ, το οποίο παρουσιάζει ένα μέγιστο μήκος κύματος στα 355nm (Stalikas, 2007). Αν και θεωρητικά, είναι πολύ δύσκολο με ένα μόνο μήκος κύματος να επιτευχθεί βέλτιστος διαχωρισμός και ακριβής ποσοτικοποίηση, οι περισσότερες μέθοδοι επιλέγουν ως βέλτιστο μήκος κύματος απορρόφησης των φαινολικών οξέων τα 280nm. Ανάλογα με την οργανολογία και αν υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης σε δυο (dual monitoring) ή περισσότερα μήκη κύματος, συνήθως επιλέγονται τα 254-280nm ή τα 280-320nm. Εμβαθύνοντας, σε μια εκτενή μελέτη της επίδρασης του μήκους κύματος στην ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού με HPLC-DAD, σε έρευνα των Zhang et al. (2013) αναφέρθηκε ότι το γαλλικό οξύ εμφάνισε  $\lambda_{max}$  στα 271nm, το πρωτοκατεχουϊκό στα 260nm και το συριγγικό στα 275nm. Αντίθετα, το κουμαρικό στα 309nm, το σαλικυλικό στα 304nm, το καφεϊκό στα 320nm. Έχοντας επομένως δοκιμάσει περισσότερα από 10 διαφορετικά μήκη κύματος, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως στο σύνολο τους τα παραπάνω φαινολικά οξέα προσδιορίζονται ταυτόχρονα στα 280nm. Ωστόσο, οι ερευνητές καταλήγουν πως πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα μέγιστα μήκη κύματος κάθε οξέος και να γίνονται επιπλέον πειράματα σε αυτά, καθώς για παράδειγμα η

συγκέντρωση του πρωτοκατεχουικού οξέος ήταν 1.2 φορές χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη στο  $\lambda_{\max}$  (260nm) της ένωσης (Zhang et al., 2013). Στη προκειμένη περίπτωση, όταν δοκιμάσθηκαν μήκη κύματος μικρότερα του 280nm (συγκεκριμένα 210, 230 και 254nm), τα οξέα που απορροφούσαν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος έδιναν ασθενή σήματα ακόμη και σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις ( $10\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Αντίθετα όταν δοκιμάσθηκαν μήκη κύματος μεγαλύτερα του 280nm, παρουσιάστηκε το ίδιο φαινόμενο για τα οξέα που απορροφούσαν σε μικρότερα. Επομένως, τα 280nm αποτέλεσαν τη βέλτιστη επιλογή μήκους κύματος, καθώς όλα τα φαινορικά οξέα ήταν ανιχνεύσιμα ακόμη και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις ( $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Σε μια μέθοδο υγρής χρωματογραφίας για την ανάλυση φαινολικών οξέων χρησιμοποιούνται τόσο ισοκρατικά όσο και βαθμιδωτά συστήματα έκλουσης. Η επιλογή εξαρτάται από τον αριθμό και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών που βρίσκονται στο υπόστρωμα. Για παράδειγμα, ελεύθερα φαινορικά οξέα όπως το χλωρογενικό, το καφεϊκό, το π-κουμαρικό θα μπορούσαν να διαχωρισθούν από αρωματικά ή φαρμακευτικά φυτά, χρησιμοποιώντας ένα απλό ισοκρατικό σύστημα όπως μεθανόλη-νερό-οξικό οξύ (Zgorka and Kawka, 2001). Κατά γενική ομολογία τα φαινορικά οξέα εκκλύονται από στήλες αντίστροφης φάσης με σειρά μειούμενης πολικότητας. Ωστόσο, κατά την περίπτωση που στο υπόστρωμα υπάρχουν φαινορικά οξέα διαφορετικών χημικών δομών ή πολικότητας και πρέπει να αναλυθούν ταυτόχρονα, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη ενός συστήματος βαθμιδωτής έκλουσης (Stalikas, 2007). Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τη βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με το αναμενόμενο περιεχόμενο σε φαινορικά οξέα, η ανάπτυξη της μεθόδου βασίστηκε σε ένα βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης.

Συνεχίζοντας, η κινητή φάση είναι ένας σημαντικός παράγοντας που σε συνδυασμό με τη στατική φάση, επηρεάζει τη διαχωριστική ικανότητα της HPLC ανάλυσης. Προς αυτή τη κατεύθυνση, χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι οξέος (φορμικό, οξικό ή άλατα οξέων) ως τροποποιητές για την ελαχιστοποίηση διάφορων φαινομένων που επηρεάζουν το διαχωρισμό και τη ποιότητα των χρωματογραφημάτων (peak tailing, ghost peaking κ.α). Αυτό έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της μεθόδου καθώς βρέθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του προστιθέμενου οξέος από 0.5% σε 2.0% βελτίωσε αισθητά όχι μόνο τη συνολική ποιότητα του χρωματογραφήματος αλλά και ευνόησε το

διαχωρισμό. Πράγματι, και ο Dalluge et al. (1998) χρησιμοποιώντας μια στήλη RP-C18 και προσθέτοντας οξικό οξύ στη κινητή φάση κατάφερε να βελτιώσει σημαντικά το σχήμα των ληφθέντων κορυφών και να αυξήσει την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων κατά τον προσδιορισμό διάφορων φαινολικών οξέων σε πράσινο τσάι.

## 6.4.2 Εφαρμογή της μεθόδου σε επιλεγμένα δείγματα

### 6.4.2.1 Επιλεγμένα δείγματα καφέ

Με την παρούσα μέθοδο προσδιορίστηκε το προφίλ φαινολικών οξέων 4 διαφορετικού τύπου καφέδων. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 21, το καβούρδισμα αποτέλεσε τον κυριότερο παράγοντα που επηρέασε τις σημαντικές διαφοροποιήσεις στα φαινολικά οξέα που παρατηρούνται.

**Πίνακας 21.** Περιεκτικότητα (mg/g dw) φαινολικών οξέων για τα επιλεγμένα δείγματα καφέ

Φαινολικά οξέα	Ξανθός Ελαφρύ καρβ. Arabica (107)	Μέτριο καρβ. Arabica (205)	Έντονο καρβ. Arabica (302)	Αρωματισμένος Κάρδαμο Arabica (504)
Χλωρογενικό	6.42 <sup>A</sup>	5.91 <sup>A</sup>	0.45 <sup>B</sup>	14.54 <sup>Γ</sup>
4-υδροξυ βενζοϊκό	6.41 <sup>A</sup>	4.2 <sup>B</sup>	0.53 <sup>Γ</sup>	7.12 <sup>A</sup>
Καφειικό	0.54			
m-κουμαρικό	0.88			
o-κουμαρικό	2.06 <sup>A</sup>	0.69 <sup>B</sup>		
Βενζοϊκό		0.8 <sup>A</sup>	0.51 <sup>B</sup>	0.82 <sup>A</sup>

<sup>A,B,Γ</sup> Διαφορετικά γράμματα στην ίδια γραμμή υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ( $p < 0.05$ )

Πιο συγκεκριμένα, η αναπτυγμένη μέθοδος αποτύπωσε με μεγάλη ακρίβεια τη στατιστικά σημαντική διαφορά που αναμενόταν να υπάρχει μεταξύ της περιεκτικότητας φαινολικών οξέων του έντονα καβουρδισμένου καφέ από

τα υπόλοιπα δείγματα. Σε ποιοτικό επίπεδο, η μέθοδος ανίχνευσε περισσότερα φαινορικά οξέα στον ήπια ή μέτρια καβουρδισμένο καφέ (5 και 4 φαινορικά οξέα αντίστοιχα) σε σχέση με τον πιο έντονα καβουρδισμένο (3 φαινορικά οξέα). Χρησιμοποιώντας τα ίδια δείγματα, οι Tsiaka et al. (2023) ανίχνευσαν βενζοϊκό, καφεϊκό και χλωρογενικό οξύ και στα 4 διαφορετικά είδη δειγμάτων καφέ με μεθοδολογία LC-MS/MS. Αντίστοιχα, η HPLC μέθοδος που αναπτύχθηκε, ανίχνευσε το χλωρογενικό και το βενζοϊκό οξύ σε όλα τα δείγματα. Αυτό ήταν αναμενόμενο μιας και ο καφές αποτελεί μια από τις κυριότερες πηγές πρόσληψης χλωρογενικού και βενζοϊκού οξέος (Krol, 2019; Ali, 2022).

Είναι γνωστό πως αυξανόμενου του χρόνου και της θερμοκρασίας του καβουρδίσματος, παρατηρείται μείωση των επιπέδων του χλωρογενικού οξέος στον καφέ (Farah and Lima, 2019). Συγκεκριμένα, ενώ οι ανεπεξέργαστοι πράσινοι κόκκοι καφέ μπορεί να περιέχουν από 10 έως και 25 mg χλωρογενικού ανά g ξηρής μάζας, ένας ελαφρώς καβουρδισμένος καφές μπορεί να περιέχει από 5 έως και 7.5 mg g<sup>-1</sup>, ένας μέτριος από 1.5 έως και 3.5 mg g<sup>-1</sup> και ένας πολύ έντονα καβουρδισμένος λιγότερο από 1.0 mg g<sup>-1</sup> (Farah and Lima, 2018). Ομοίως, μια άλλη μελέτη ανίχνευσε από 5.26 έως και 11.7 mg g<sup>-1</sup> χλωρογενικού οξέος συμπεριλαμβανομένων 9 παραγώγων του, χωρίς ωστόσο να διευκρινίζει το είδος του καβουρδίσματος (Fujioka and Shibamoto, 2008). Συνολικά, τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας των φαινολικών οξέων στα επιλεγμένα δείγματα καφέ, συνάδουν με αυτά των προαναφερθέντων μελετών, υποδεικνύοντας την αξιόπιστη χρήση της μεθόδου που αναπτύχθηκε.

#### **6.4.2.2 Εφαρμογή σε παραπροϊόντα αρωματικών φυτών**

Είναι γνωστό πως η αυξημένη βιομηχανική δραστηριότητα και κυρίως εκείνη που σχετίζεται με τον αγροδιατροφικό τομέα (ακόμη και σε τοπικό επίπεδο μικρο-παραγωγών), παράγει σημαντικές ποσότητες αποβλήτων και υποπροϊόντων, οι οποίες παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανεκμετάλλευτες. Είναι γεγονός πως απόβλητα από τέτοιες διεργασίες μπορεί να φτάσουν έως και το 20% του συνολικού όγκου παραγωγής, αυξάνοντας έτσι το ενδιαφέρον για άμεση ή έμμεση αξιοποίησή τους (Sonali, 2012).

Εκτός των άλλων, τα παραπροϊόντα όπως αυτά από διάφορα αρωματικά φυτά είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως τα φαινορικά οξέα γεγονός που μπορεί να αυξήσει τη προστιθέμενη αξία των τελικών

προϊόντων που ενδεχομένως μπορούν να ενσωματωθούν. Υπό αυτό το πρίσμα, η εφαρμογή της μεθόδου περιελάμβανε και 3 αρωματικά φυτά: τη ρίγανη, τη λεβάντα και τα ρόδα.

**Πίνακας 22.** Περιεκτικότητα (mg/g dw) φαινολικών οξέων στα δείγματα παραπροϊόντων αρωματικών φυτών

Οξύ	Ρίγανη	Ρόδα	Λεβάντα
Ροσμαρινικό	9.61 <sup>A</sup>	2.80 <sup>B</sup>	1.54 <sup>Γ</sup>
4-υδρόξυ βενζοϊκό	0.47 <sup>A</sup>	3.22 <sup>B</sup>	0.32 <sup>A</sup>
Πρωτοκατεχουϊκό		0.56 <sup>A</sup>	0.38 <sup>A</sup>
Γαλλικό		1.52	
Καφεϊκό	0.54		
Συριγγικό		0.11 <sup>A</sup>	1.55 <sup>B</sup>
ο-κουμαρικό			2.54
Βενζοϊκό			0.87
Φερουλικό			0.02
Χλωρογενικό	0.65 <sup>A</sup>	1.13 <sup>B</sup>	

<sup>A,B,Γ</sup> Διαφορετικά γράμματα στην ίδια γραμμή υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ )

Ξεκινώντας, οι Quelart et al. (2014) μελέτησαν (ποιοτικά) το φαινολικό προφίλ διάφορων αρωματικών φυτών συμπεριλαμβανομένης και της ρίγανης. Χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο μάζας LTQ Orbitrap Vellos μεταξύ άλλων βρήκε πως στη ρίγανη περιέχονταν γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, 4 υδρόξυ βενζοϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό και το ροσμαρινικό οξύ. Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη, η οποία χρησιμοποιούσε LC-MS μεθοδολογία, βρέθηκε πως παραπροϊόντα ρίγανης περιείχαν συριγγικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ και διάφορα άλλα παράγωγα (Dina, 2022). Σύμφωνα και με τον Πίνακα 22, το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί το κυριότερο φαινολικό οξύ που ανιχνεύθηκε σε σημαντική ποσότητα στο παραπροϊόν ρίγανης. Όσον αφορά τη περιεκτικότητα του ροσμαρινικού οξέος, αυτή μπορεί να κυμαίνεται από 10 έως και 100 mg g<sup>-1</sup> ξηρού δείγματος ανάλογα με την ποικιλία, ενώ σύμφωνα με τον Bower (2014) σε μια συγκριτική μελέτη που πραγματοποίησε, η ελληνική ρίγανη περιείχε έως και 30mg ροσμαρινικού g<sup>-1</sup> ξηρής μάζας.

Όσον αφορά το προφίλ φαινολικών οξέων σε παραπροϊόντα ρόδων μια πρόσφατη μελέτη ανίχνευσε αρκετά ελεύθερα φαινολικά οξέα όπως: το γαλλικό οξύ ( $2.08 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρού), το πρωτοκατεχουικό οξύ ( $4.00 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρού), το καφεϊκό οξύ ( $0.06 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρού), το συριγγικό οξύ ( $0.15 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρού), το 4-υδροξυ βενζοϊκό οξύ ( $1.4 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρού), το κουμαρικό οξύ ( $21.38 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρού) και το φερουλικό ( $2.2 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρού) (Olech et al., 2020). Μια άλλη μελέτη πάνω στο είδος *Rosa damascena*, φανέρωσε πως τα απόβλητα των ανθέων του ρόδου ήταν πλούσια σε γαλλικό οξύ ( $28.18 \text{mg g}^{-1}$  ξηρού), ενώ τα αντίστοιχα απόβλητα από τα φύλλα ήταν πλούσια σε κατεχίνη και φερουλικό οξύ (Baydar, 2013). Αν και η ύπαρξη ροσμαρινικού στο συγκεκριμένο είδος αρωματικού φυτού δε φαίνεται να υποστηρίζεται βιβλιογραφικά, ενδεχομένως να οφείλεται σε άλλες συνθήκες όπως η ποικιλία, η γεωγραφική προέλευση ή ακόμη και οι κλιματολογικές συνθήκες.

Τέλος, η σύσταση φαινολικών οξέων της λεβάντας φαίνεται να περιλαμβάνει: το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ (σε ίχνη), το ροσμαρινικό οξύ (ως το κυριότερο φαινολικό οξύ) και το φερουλικό οξύ (Spiridon, 2011). Μια ακόμη πολύ στοχευμένη μελέτη αξιολόγησε την επαναχρησιμοποίηση διάφορων τύπων παραπροϊόντων λεβάντας, όπως αυτά που προκύπτουν από υδατικά απόβλητα κατά την απόσταξη (υδατικά, φύλλα και ολικά). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην περιεκτικότητα φαινολικών οξέων ανά κατηγορία αποβλήτων. Για παράδειγμα, όταν η περιεκτικότητα των υδατικών αποβλήτων σε χλωρογενικό ήταν μόλις  $0.06 \mu\text{g g}^{-1}$ , η αντίστοιχη περιεκτικότητα στα ολικά απόβλητα ξεπερνούσε τα  $12.72 \mu\text{g g}^{-1}$ . Αντίθετα το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ ( $3.6 \mu\text{g g}^{-1}$ ) δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές (Turrini, 2021). Ομοίως, ο Truzzi μελέτησε και βρήκε πως τα απόβλητα από την επεξεργασία λεβάντας για την παραγωγή αιθέριου ελαίου ήταν πλούσια σε παράγωγα του ροσμαρινικού, του καφεϊκού και του φερουλικού οξέος, τα οποία ανιχνεύθηκαν και στη παρούσα μελέτη (Truzzi et al., 2022).

## 6.5 Συμπεράσματα

Τα κυριότερα συμπεράσματα τα οποία προκύπτουν από τη περάτωση της παρούσας εργασίας είναι τα ακόλουθα:



- Αναπτύχθηκε με επιτυχία μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή φωτοδιόδων HPLC-DAD για προσδιορισμό φαινολικών οξέων
- Κύρια χαρακτηριστικά της 53λεπτης μεθόδου είναι η βαθμιδωτή έκλυση χρησιμοποιώντας σύστημα μεθανόλη-νερό-οξικό 2% ως κινητή φάση με ροή 1mL/min εγχύοντας 20μL δείγματος και σαρώνοντας στα 280nm
- Η μέθοδος επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 16 συνολικά φαινολικών οξέων σε επιλεγμένα δείγματα καφέ και παραπροϊόντων αρωματικών φυτών
- Το χλωρογενικό οξύ ήταν το κυρίαρχο φαινολικό οξύ στα δείγματα καφέ
- Η συγκέντρωση χλωρογενικού μειώνεται αναλογικά με την ένταση του καβουρδίσματος των κόκκων
- Το ροσμαρινικό είναι το κατ' εξοχήν φαινολικό οξύ των περισσότερων αρωματικών φυτών
- Παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στο προφίλ φαινολικών οξέων των παραπροϊόντων ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας

## 6.6 Μελλοντικές προοπτικές

Αδιαμφισβήτητα, μελλοντικές κινήσεις ενδείκνυται έτσι ώστε να αυξήσουν τη δυναμική και τον αντίκτυπο της παρούσας μεθόδου προσδιορισμού φαινολικών οξέων. Αρχικά, η μέθοδος θα πρέπει πλήρως να επικυρωθεί λαμβάνοντας υπόψη την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα, την αναπαραγωγιμότητα, την ανάκτηση καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Σε δεύτερη φάση μπορούν να διευρυνθούν τόσο το πεδίο εφαρμογής όσο και οι προς προσδιορισμό ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, πολλές ακόμη κατηγορίες τροφίμων, όπως τα κόκκινα φρούτα και λαχανικά, περιέχουν σημαντικές ποσότητες φαινολικών οξέων ή και άλλων ενώσεων όπως φλαβονοειδή (κερσετίνη, απιγενίνη), ενώσεων οι οποίες ενδεχομένως με μικρές τροποποιήσεις της μεθόδου μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα με τα φαινολικά οξέα.

Μια ακόμη μελλοντική κατεύθυνση που μπορούν να προσφέρουν τα αποτελέσματα της παρούσας μεθόδου είναι εισαγωγή χημειομετρικών προσεγγίσεων, όπως αυτής της πολυμεταβλητής ανάλυσης κύριων συνιστωσών. Κοιτώντας πιο προσεκτικά τα αποτελέσματα του προφίλ

φαινολικών οξέων των καφέδων παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις γενικότερα και στατιστικά σημαντικές διαφορές στα περιεχόμενα φαινολικά οξέα, ειδικότερα στο περιεχόμενο χλωρογενικό οξύ. Αυτές οι διαφοροποιήσεις θα μπορούσαν πιθανόν να αποτελέσουν παράγοντα διάκρισης μεταξύ συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των δειγμάτων όπως για παράδειγμα ο βαθμός καβουρδίσματος.

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση

1. M.S. Tswett, *Physikalisch-Chemische Studien Uber das Chlorophyll* (**1906**). Die Adsorptionen, *Ber. Bot. Ges.*, 24, 316
2. Martin A JP, Synge R LM (**1941**). A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem J*, 35 1358-1368.
3. Majors, R. E. Historical developments in HPLC and UHPLC column technology: the past 25 years (**2015**). *LCGC North Am.* 33, 818–840
4. Marston, A. & Hostettmann K (**2009**). Natural product analysis over the last decades. *Planta Medica* 75: 672–682.
5. Dong M (**2013**) The essence of modern HPLC: advantages, limitations, fundamentals, and opportunities. *LCGC North Am* 31(6):472–479
6. Kromidas S. (**2016**). *The HPLC expert: possibilities and limitations of modern high performance liquid chromatography*. 1st ed. Weinheim: Wiley
7. Akash, M.S.H., Rehman, K. (**2020**). *High Performance Liquid Chromatography*. In: *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer, Singapore.
8. Cortese, M.; Gigliobianco, M. R.; Magnoni, F.; Censi, R.; Di Martino, P. (**2020**). Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules*, 25, No. 3047
9. Kromidas S (**2017**). *The HPLC expert II: find and optimize the benefits of your HPLC /UHPLC*. 1st ed. Weinheim: Wiley;
10. Charde, MS., Welankiwar, AS., and Kumar J. (**2014**). Method development by liquid chromatography with validation. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*; 4(2): 57-61
11. Sood, S., Bala, R., and Gill, NS (**2014**). Method development and validation using HPLC technique – A review, *Journal of Drug Discovery and Therapeutics* 2 (22), 18-24.
12. Bhardwaj SK, Dwivedi K, Agarwal DD. (**2015**) A review: HPLC method development and validation. *Int J Anal Bioanal Chem*; 5:76-1.
13. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. (**1997**). *Practical HPLC method development*; Wiley-Interscience Publication: New York.
14. Sharma, S.; Goyal, S.; Chauhan, K. (**2018**). A review on analytical method development and validation. *Int. J. Appl. Pharm.* 10, 8–15.
15. Kumar, A., S. Jawla and G. Yadav, (**2013**). Recent analytical method developed by RP-HPLC. *Global Journal of Pharmacology*, 7(3): 232-240.

16. Sahu, P.K.; Ramiseti, N.R.; Cecchi, T.; Swain, S.; Patro, C.S.; Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 590–611.
17. Kataoka, H (2017). Sample preparation for liquid chromatography. In *Liquid Chromatography: Applications*, 2nd ed.; Elsevier Science Publishing Co Inc.: New York, NY, USA; ISBN 9780128053928
18. Zhu X., Li P., Tang J., Su Y., Xiao M., Xue H., et al. (2022). A simple and practical solvent system selection strategy for high-speed countercurrent chromatography based on the HPLC polarity parameter model. *Anal. Methods* 14 (46), 4822–4831.
19. Ravi sankar, P., Madhuri, B., Naga Lakshmi, A., Pooja, A., Bhargava Sai, M., Suresh, K., Srinivasa Babu, P. (2020). Selected HPLC applications-Quick separation Guide: A Review, *Int. J. Pharm. Sci. Rev.Res*, 60,13-20.
20. Ravi Sankar P, Sai Snehalatha K, Tabassum Firdose Shaik, Srinivasa Babu P, (2019). Applications of HPLC in Pharmaceutical Analysis, *Int.J.Pharm.Sci.Rev.Res.*, 59117-124.
21. Daliu, P.; Santini, A.; Novellino, E. (2019). From pharmaceuticals to nutraceuticals: Bridging disease prevention and management. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 12, 1–7
22. Alara, O.R.; Abdurahman, N.H.; Ukaegbu, C.I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr. Res. Food Sci.*, 4, 200–214.
23. Landete, J.M. (2012). Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 52, 936–948.
24. Muñoz, A.E.; Hernández, S.S.; Tolosa, A.R.; Burillo, S.P.; Olalla Herrera, M. (2020). Evaluation of differences in the antioxidant capacity and phenolic compounds of green and roasted coffee and their relationship with sensory properties. *LWT Food Sci. Technol.*, 128, e109457.
25. Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.*, 5, 87.
26. Forni, C.; Facchiano, F.; Bartoli, M.; Pieretti, S.; Facchiano, A.; D’Arcangelo, D.; Norelli, S.; Valle, G.; Nisini, R.; Beninati, S.; et al. (2019). Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. *BioMed Res. Int.*, 2019, 8748253.
27. Potì, F.; Santi, D.; Spaggiari, G.; Zimetti, F.; Zanotti, I. (2019). Polyphenol Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders: A Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 351.
28. Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J. Food Biochem.*, 44

29. Mrduljaš, N.; Krešić, G.; Bilušić, T. (2017). *Polyphenols: Food Sources and Health Benefits in Functional Food-Improve Health through Adequate Food*; Hueda, M.C., Ed.; IntechOpen: London, UK.
30. Di Lorenzo, C.; Colombo, F.; Biella, S.; Stockley, C.; Restani, P. (2021). Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*, 13, 273.
31. Nicolás-García, M.; Perucini-Avenidaño, M.; Jiménez-Martínez, C.; Perea-Flores, M.J.; Gómez-Patiño, M.B.; Arrieta-Báez, D.; Dávila-Ortiz, G. (2021). Bean phenolic compound changes during processing: Chemical interactions and identification. *J. Food Sci.*, 86, 643–655.
32. Vardhan, P.V.; Shukla, L.I. (2017). Gamma Irradiation of Medicinally Important Plants and the Enhancement of Secondary Metabolite Production. *Int. J. Radiat. Biol.*, 93, 967–979.
33. Dias, M.C.; Pinto, D.C.G.A.; Silva, A.M.S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26, 5377.
34. Dias, R.; Oliveira, H.; Fernandes, I.; Simal-Gandara, J.; Perez-Gregorio, R. (2021). Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 61, 1130–1151.
35. Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, E.B.; Cicala, C.; Caiazzo, E.; Izzo, A.A.; Novellino, E.; Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother. Res.*, 33, 2221–2243.
36. Naumann, H.D.; Tedeschi, L.O.; Huntley, N.F. (2017). The role of condensed tannins in ruminant animal production: Advances, limitations and future directions. *Rev. Bras. Zootec.*, 46, 929–949.
37. Khadem, S.; Marles, R.J. (2010). Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*, 15, 7985-8005.
48. Kalili, K.M.; de Villiers, A. (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *J. Sep. Sci.*, 34, 854–876
39. Kumar, N.; Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol. Rep.*, 24, e00370.
40. Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem.*, 173, 501–513.
41. Clifford, M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 362–372.

42. Tsai, C.-F.; Jioe, I.P.J. (2021). The Analysis of Chlorogenic Acid and Caffeine Content and Its Correlation with Coffee Bean Color under Different Roasting Degree and Sources of Coffee (*Coffea arabica Typica*). *Processes*, 9, 2040
43. Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A.A.; Khan, G.J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; Xia, F.F.; Modarresi-Ghazani, F.; et al. (2018). Chlorogenic Acid (CGA): A Pharmacological Review and Call for Further Research. *Biomed. Pharm.*, 97, 67–74
44. Oreopoulou, A.; Papavassilopoulou, E.; Bardouki, H.; Vamvakias, M.; Bimpilas, A.; Oreopoulou, V. (2018). Antioxidant recovery from hydrodistillation residues of selected Lamiaceae species by alkaline extraction. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, 8, 83–89.
45. Nadeem, M.; Imran, M.; Aslam Gondal, T.; Imran, A.; Shahbaz, M.; Muhammad Amir, R.; Wasim Sajid, M.; Batool Qaisrani, T.; Atif, M.; Hussain, G.; et al. (2019). Therapeutic Potential of Rosmarinic Acid: A Comprehensive Review. *Appl. Sci.*, 9, 3139.
46. Proestos, C.; Sereli, D.; Komaitis, M. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.*, 95, 44–52.
47. Khadem, S.; Marles, R.J. (2010). Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*, 15, 7985-8005.
48. Zhang, H.; Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.*, 8, 33–42
49. Rojas-González, A.; Figueroa-Hernández, C.Y.; González-Rios, O.; Suárez-Quiroz, M.L.; González-Amaro, R.M.; Hernández- Estrada, Z.J.; Rayas-Duarte, P. (2022). Coffee Chlorogenic Acids Incorporation for Bioactivity Enhancement of Foods: A Review. *Molecules*, 27, 3400
50. Tajik, N.; Tajik, M.; Mack, I.; Enck, P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: A comprehensive review of the literature. *Eur. J. Nutr.*, 56, 2215–2244
51. Costa, P., Sarmiento, B., Gonçalves, S., & Romano, A. (2013). Protective effects of *Lavandula viridis* L'Hér extracts and rosmarinic acid against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line. *Industrial Crops and Products*, 50, 361–365
52. Wang, S.-J., Chen, Q., Liu, M.-Y., Yu, H.-Y., Xu, J.-Q., Wu, J.-Q., et al. (2019). Regulation effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) on hepatic lipid metabolism in OA induced NAFLD rats. *Food and Function*, 10, 7356–7365

53. Vasileva, L. V., Savova, M. S., Tews, D., Wabitsch, M., & Georgiev, M. I. (2021). Rosmarinic acid attenuates obesity and obesity-related inflammation in human adipocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 149, Article 112002
54. Manjunatha, B.K. (2006). Antibacterial activity of *Pterocarpus santalinus*. *Indian J. Pharm. Sci.*, 68, 115.
55. Manuja, R.; Sachdeva, S.; Jain, A.; Chaudhary, J. (2013). A comprehensive review on biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 22, 109–115
56. Chong, K.; Zuraini, Z.; Sasidharan, S.; Devi, P.K.; Latha, L.Y.; Ramanathan, S. (2008). Antimicrobial activity of *Elaeis guineensis* leaf. *Pharmacologyonline*, 3, 379–386.
57. Heinonen, M.I. (1990). Carotenoids and provitamin A activity of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 609–612.
58. Winter, M.; Herrmann, K. (1986). Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 616-620.
59. Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2866–2887.
60. Landbo, A.K.; Meyer, A.S. (2001). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3169–3177
61. Gao, L.; Mazza, G. (1994). Rapid method of complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by highperformance liquid chromatography and capillary gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 118-125
62. De Simón, F.B.; Pérez-Illarbe, J.; Hernández, T.; Gómez-Cordovés, C.; Estrella, I. (1992). Importance of Phenolic Compounds for the Characterization of Fruit Juices. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1531–1535.
63. Palma, M.; Pineiro, Z.; Barroso, C.G. (2001). Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *J. Chromatogr. A*, 921, 169–174.
64. Salagoity-Auguste, M.-H.; Bertrand, A. (1984). Wine phenolics- analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 1241-1247.
65. Pan, S.Y.; Litscher, G.; Gao, S.-H.; Zhou, S.-F.; Yu, Z.-L.; Chen, H.-Q.; Zhang, S.-F.; Tang, M.-K.; Sun, J.-N.; Ko, K.-M. (2014). Historical perspective of traditional indigenous medical practices: The current renaissance and conservation of herbal resources. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, 525340.

66. Peng, X.; Tang, F.; Yang, Y.; Li, T.; Hu, X.; Li, S.; Wu, W.; He, K. (2022). Bidirectional effects and mechanisms of traditional Chinese medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 298, 115578.
67. Rocha, C.; Moura, A.P.; Cunha, L.M (2020). Consumers' Associations with Herbal Infusions and Home Preparation Practices. *Food Qual. Prefer.*, 86, 104006.
68. Williamson, E.M.; Liu, X.; Izzo, A.A. (2020). Trends in Use, Pharmacology, and Clinical Applications of Emerging Herbal Nutraceuticals. *Br. J. Pharmacol.*, 177, 1227–1240.
69. Węglarz, Z.; Kosakowska, O.; Przybył, J.L.; Pióro-Jabrucka, E.; Bączek, K. (2020). The Quality of Greek Oregano (*O. vulgare* L. Subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart) and Common Oregano (*O. vulgare* L. Subsp. *vulgare*) Cultivated in the Temperate Climate of Central Europe. *Foods*, 9, 1671.
70. Bonfanti, C.; Ianni, R.; Mazzaglia, A.; Lanza, C.M.; Napoli, E.M.; Ruberto, G. (2012). Emerging cultivation of oregano in Sicily: Sensory evaluation of plants and chemical composition of essential oils. *Ind. Crop Prod.*, 35, 160–165.
71. Rodriguez-Garcia, I.; Silva-Espinoza, B.A.; Ortega-Ramirez, L.A.; Leyva, J.M.; Siddiqui, M.W.; Cruz-Valenzuela, M.R.; Gonzalez-Aguilar, G.A.; Ayala-Zavala, J.F. (2016). Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 56, 1717–1727.
72. Gutiérrez-Grijalva, E.P.; Picos-Salas, M.A.; Leyva-López, N.; Criollo-Mendoza, M.S.; Vazquez-Olivo, G.; Heredia, J.B. (2018). Flavonoids and phenolic acids from oregano: Occurrence, biological activity and health benefits. *Plants*, 7, 2.
73. Franciosini, M.P.; Casagrande-Proietti, P.; Forte, C.; Beghelli, D.; Acuti, G.; Zanichelli, D.; Dal Bosco, A.; Castellini, C.; Trabalza-Marinucci, M. (2015). Effects of oregano (*Origanum vulgare* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) aqueous extracts on broiler performance, immune function and intestinal microbial population. *J. Appl. Anim. Res.*, 44, 474–479.
74. Delgado, Y.; Cassé, C.; Ferrer-Acosta, Y.; Suárez-Arroyo, I.J.; Rodríguez-Zayas, J.; Torres, A.; Torres-Martínez, Z.; Pérez, D.; González, M.J.; Velázquez-Aponte, R.A.; et al. Biomedical Effects of the Phytonutrients Turmeric, Garlic, Cinnamon, Graviola, and Oregano: A Comprehensive Review. *Appl. Sci.* 2021, 11, 8477.
75. Bauer, B.W.; Radovanovic, A.; Willson, N.-L.; Bajagai, Y.S.; Van, T.T.H.; Moore, R.J.; Stanley, D. (2019). Oregano: A potential prophylactic treatment for the intestinal microbiota. *Heliyon*, 5, e02625.
76. Habán, M.; Korczyk-Szabó, J.; Čerteková, S.; Ražná, K. (2023). Lavandula Species, Their Bioactive Phytochemicals, and Their Biosynthetic Regulation. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 8831.



77. Wells, R.; Truong, F.; Adal, A.M.; Sarker, L.S.; Mahmoud, S.S. Lavandula Essential Oils: A Current Review of Applications in Medicinal, Food, and Cosmetic Industries of Lavender. *Nat. Prod. Commun.* **2018**, *13*, 1403–1417.
78. Jafari-Koulaee, A.; Elyasi, F.; Taraghi, Z.; Ilali, E.S.; Moosazadeh, M. A Systematic Review of the Effects of Aromatherapy with Lavender Essential Oil on Depression. *Central Asian J. Glob. Heal.* **2020**, *9*, 14.
79. Luo, J., and Jiang, W. (2022). A critical review on clinical evidence of the efficacy of lavender in sleep disorders. *Phytother Res.*, *36*, 2342–2351.
80. Rafii, F.; Ameri, F.; Haghani, H.; Ghobadi, A. (2020). The effect of aromatherapy massage with lavender and chamomile oil on anxiety and sleep quality of patients with burns. *Burns*, *46*, 164–171.
81. Mileva, M.; Ilieva, Y.; Jovtchev, G.; Gateva, S.; Zaharieva, M.M.; Georgieva, A.; Dimitrova, L.; Dobрева, A.; Angelova, T.; Vilhelmova-Ilieva, N.; et al. (2021). Rose Flowers—A Delicate Perfume or a Natural Healer? *Biomolecules*, *11*, 127.
82. Wang, C.; Kim, I.-J.; Seong, H.-R.; Noh, C.H.; Park, S.; Kim, T.M.; Jeong, H.S.; Kim, K.Y.; Kim, S.T.; Yuk, H.-G.; Kwon, S.-C.; Choi, E.-K.; Kim, Y.-B. (2023). Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities of Rosebud Extracts of Newly Crossbred Roses. *Nutrients*, *15*, 2376.
83. Božanić Tanjga, B.; Ljubojević, M.; Đukić, A.; Vukosavljev, M.; Ilić, O.; Narandžić, T. (2022). Selection of garden roses to improve the ecosystem services they provide. *Horticulturae*, *8*, 883.
84. Akram, M.; Riaz, M.; Munir, N.; Akhter, N.; Zafar, S.; Jabeen, F.; Ali Shariati, M.; Akhtar, N.; Riaz, Z.; Altaf, S.H.; et al. (2020). Chemical constituents, experimental and clinical pharmacology of *Rosa damascena*: A literature review. *J. Pharm. Pharm.*, *72*, 161–174
85. Guimarães, R.; Barros, L.; Carvalho, A.M.; Ferreira, I.C. (2010). Studies on chemical constituents and bioactivity of *Rosa micrantha*: An alternative antioxidants source for food, pharmaceutical, or cosmetic applications. *J. Agric. Food Chem.*, *58*, 6277–6284.
86. Herman, R.A.; Ayepa, E.; Shittu, S.; Senyo Fometu, S.; Wang, J. (2019). Essential oils and their applications -a mini review. *Adv. Nutr. Food Sci.*, *4*, 1–13.
87. International Coffee Organization (2021). The Future of Coffee; Coffee Development Report; International Coffee Organization: London, UK.
88. Montagnon, C.; Sheibani, F.; Benti, T.; Daniel, D.; Bote, A.D. (2022). Deciphering Early Movements and Domestication of *Coffea arabica* through a Comprehensive Genetic Diversity Study Covering Ethiopia and Yemen. *Agronomy*, *12*, 3203.

91. da Costa, D.S.; Albuquerque, T.G.; Costa, H.S.; Bragotto, A.P.A. (2023). Thermal Contaminants in Coffee Induced by Roasting: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 20, 5586.
92. Velásquez, S.; Banchón, C. (2022). Influence of Pre-and Post-Harvest Factors on the Organoleptic and Physicochemical Quality of Coffee: A Short Review. *J. Food Sci. Technol.*, 1–13.
93. Allesina, G.; Pedrazzi, S.; Allegretti, F.; Tartarini, P. Spent coffee grounds as heat source for coffee roasting plant: Experimental validation and case study. *Appl. Therm. Eng.* 2017, 126, 730–736.
94. Tsiaka, T.; Kritsi, E.; Bratakos, S.M.; Sotiroudis, G.; Petridi, P.; Savva, I.; Christodoulou, P.; Strati, I.F.; Zoumpoulakis, P.; Cavouras, D.; Sinanoglou, V.J. (2023). Quality Assessment of Ground Coffee Samples from Greek Market Using Various Instrumental Analytical Methods, In Silico Studies and Chemometrics. *Antioxidants*, 12, 1184.
95. Gavarić, N.; Mozina, S.S.; Kladar, N.; Bozin, B. (2015). Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils, thymol and carvacrol and their possible synergism. *J. Essent. Oil-Bear Plants*, 18, 1013–1021.
96. Nostro, A.; Papalia, T. (2012). Antimicrobial activity of carvacrol: Current progress and future perspectives. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 7, 28–35.
97. Leyva-López, N.; Gutiérrez-Grijalva, E.P.; Vázquez-Olivo, G.; Heredia, J.B. (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 22, 989.
98. Kogiannou, D.A.A.; Kalogeropoulos, N.; Kefalas, P.; Polissiou, M.G.; Kaliora, A.C. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 61, 152–159.
99. Donelli, D.; Antonelli, M.; Bellinazzi, C.; Gensini, G.F.; Firenzuoli, F. (2019). Effects of lavender on anxiety: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*, 65, 153099.
100. Ciocarlan, A.; Lupascu, L.; Aricu, A.; Dragalin, I.; Popescu, V.; Geana, E.-I.; Ionete, R.E.; Vornicu, N.; Dului, O.G.; Hristozova, G.; Zinicovscaia, I. (2021). Chemical Composition and Assessment of Antimicrobial Activity of Lavender Essential Oil and Some By-Products. *Plants*, 10, 1829.
101. Fernandes, L.; Casal, S.; Pereira, J.A.; Saraiva, J.A.; Ramalhosa, E. (2017). Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *J. Food Compos. Anal.*, 60, 38–50.

102. Batool, R.; Kalsoom, A.; Akbar, I.; Arshad, N.; Jamil, N. (2018). Antilisterial Effect of *Rosa damascena* and *Nymphaea alba* in *Mus musculus*. *BioMed Res. Int.*, 2018, 4543723.
103. Cavalera, M.; Axling, U.; Rippe, C.; Swärd, K.; Holm, C. (2017). Dietary rose hip exerts antiatherosclerotic effects and increases nitric oxide-mediated dilation in ApoE-null mice. *J. Nutr. Biochem.*, 44, 52–59.
104. Shokouh, P.; Jeppesen, P.B.; Christiansen, C.B.; Mellbye, F.B.; Hermansen, K.; Gregersen, S. (2019). Efficacy of Arabica Versus Robusta Coffee in Improving Weight, Insulin Resistance, and Liver Steatosis in a Rat Model of Type-2 Diabetes. *Nutrients*, 11, 2074
105. Dai, A.; Hoffman, K.; Xu, A.A.; Gurwara, S.; White, D.L.; Kanwal, F.; Jang, A.; El-Serag, H.B.; Petrosino, J.F.; Jiao, L. (2023). The Association between Caffeine Intake and the Colonic Mucosa-Associated Gut Microbiota in Humans—A Preliminary Investigation. *Nutrients*, 15, 1747.
106. Christaki, E.; Bonos, E.; Giannenas, I.; Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture*, 2, 228-243.
107. Delgado, Y.; Cassé, C.; Ferrer-Acosta, Y.; Suárez-Arroyo, I.J.; Rodríguez-Zayas, J.; Torres, A.; Torres-Martínez, Z.; Pérez, D.; González, M.J.; Velázquez-Aponte, R.A.; et al. (2021). Biomedical Effects of the Phytonutrients Turmeric, Garlic, Cinnamon, Graviola, and Oregano: A Comprehensive Review. *Appl. Sci.*, 11, 8477.
108. Leyva-López, N.; Nair, V.; Bang, W.Y.; Cisneros-Zevallos, L.; Heredia, J.B., (2016). Protective role of terpenes and polyphenols from three species of oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.*, 187, 302–312
109. Proestos, C.; Komaitis, M. (2013). Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC coupled to diode array detector (DAD) and GC-MS after silylation. *Foods*, 2, 90–99
110. Kaliora, A.C.; Kogiannou, D.A.A.; Kefalas, P.; Papassideri, I.S.; Kalogeropoulos, N. (2014). Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chem.*, 142, 233–241
111. Pizzale, L.; Bortolomeazzi, R.; Vichi, S.; Überegger, E.; Conte, L.S. (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Sci. Food Agric.*, 82, 1645–1651
112. Kolda, S.; Demirtas, I.; Ozen, T.; Demirci, M.A.; Behçet, L. (2015). Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L.

- ssp. viride (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J. Sci. Food Agric.*, 95, 786–798.
113. Zgórká, G.; Główniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26, 79–87
48. Areias, F.M.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Moreira, M.M.; Amaral, J.; Seabra, R.M. (2000). Hplc/Dad Analysis of Phenolic Compounds from Lavender and Its Application to Quality Control. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 23, 2563–2572.
114. Man, A.; Santacroce, L.; Iacob, R.; Mare, A.; Man, L. Erratum: Man, A., et al. (2019). Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. *Pathogens* 2019, 8, 15. *Pathogens*, 8, 108.
115. Ozogul, Y.; Kuley, E.; Ucar, Y.; Ozogul, F. (2015). Antimicrobial Impacts of Essential Oils on Food Borne-Pathogens. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.*, 7, 53–61.
116. Pires, T.C.S.P.; Dias, M.I.; Barros, L.; Calhelha, R.C.; Alves, M.J.; Oliveira, M.B.P.P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Res. Int.*, 105, 580–588.
117. Cunja, V.; Mikulic-Petkovsek, M.; Stampar, F.; Schmitzer, V. (2014). Compound identification of selected rose species and cultivars: An insight to petal and leaf phenolic profiles. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 139, 157–16
118. Koczka, N.; Stefanovits-Bányai, É.; Ombódi, A. (2018). Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some *Rosa* Species. *Medicines*, 5, 84.
119. Demir, N.; Yildiz, O.; Alpaslan, M.; Hayaloglu, A. (2014). Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa* L.) fruits in turkey. *LWT Food Sci. Technol.*, 57, 126–133.
120. Trinh, L.T.P.; Choi, Y.-S.; Bae, H.-J. (2018) Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes. *Ind. Crops Prod.*, 125, 261–268.
121. Król, K.; Gantner, M.; Tatarak, A.; Hallmann, E. (2020). The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *Eur. Food Res. Technol.*, 246, 33–39.
122. Bondam, A.F.; Da Silveira, D.D.; Dos Santos, J.P.; Hoffmann, J.F. (2022). Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends Food Sci. Technol.*, 123, 172–186.
123. Wang, X.; Wang, Y.; Hu, G.; Hong, D.; Guo, T.; Li, J.; Li, Z.; Qiu, M. (2022). Review on factors affecting coffee volatiles: From seed to cup. *J. Sci. Food Agric.*, 102, 1341–1352.

124. Liao, Y.-C.; Kim, T.; Silva, J.L.; Hu, W.-Y.; Chen, B.-Y. (2022). Effects of roasting degrees on phenolic compounds and antioxidant activity in coffee beans from different geographic origins. *LWT Food Sci. Technol.*, 168, 113965
125. Yeager, S.E.; Batali, M.E.; Lim, L.X.; Liang, J.; Han, J.; Thompson, A.N.; Guinard, J.; Ristenpart, W.D. (2022). Roast level and brew temperature significantly affect the color of brewed coffee. *J. Food Sci.*, 87, 1837–1850.
126. Cheng, J.; Zhou, C.; Xie, Y.; Wang, M.; Zhou, C.; Li, X.; Du, Y.; Lu, F (2022). A new method for simultaneous determination of 14 phenolic acids in agricultural soils by multiwavelength HPLC-PDA analysis. *RSC Adv.*, 12, 14939–14944.
127. Stalikas, C.D (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*, 30, 3268–3295
128. Hopkins, T (2019). The role of methanol and acetonitrile as organic modifiers in reversed-phase liquid chromatography. *Chromatogr. Today*, 26, 24–26
129. Zgórká, G.; Kawka, S (2001). Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 1065–1072
130. Dalluge, J.J.; Nelson, B.C.; Brown Thomas, J.; Sander, L.C (1998). Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 793, 265–274.
131. Farah, A.; de Paula Lima, J (2019). Consumption of Chlorogenic Acids through Coffee and Health Implications. *Beverages*, 5, 11.
132. Farah, A.; Lima, J.P (2018). Major chlorogenic acids' contents and distribution in coffees. In *Coffee: Production, Quality and Chemistry*; Royal Society of Chemistry: London, UK; in press
133. Fujioka, K.; Shibamoto, T (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chem.*, 106, 217–221
134. Sonali D. Randive (2012). Cultivation and study of growth of oyster mushroom on different agricultural waste substrate and its nutrient analysis". *Pelagia Research library* 3(4): p 1938-1942

135. Vallverdú-Queralt, A.; Regueiro, J.; Martínez-Huélamo, M.; Alvarenga, J.F.R.; Leal, L.N.; Lamuela-Raventos, R.M (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.*, 154, 299–307
136. Dina, E.; Vontzalidou, A.; Cheilari, A.; Bagatzounis, P.; Agapidou, E.; Giannenas, I.; Grigoriadou, K.; Aligiannis, N (2022). Sustainable Use of Greek Herbs By-Products, as an Alternative Source of Biologically Active Ingredients for Innovative Products. *Front. Nutr.*, 9, 867666
137. Bower, A.M.; Hernandez, L.M.R.; Berhow, M.A.; de Mejia, E.G (2014). Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase iv. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 6147–6158.
138. Olech, M.; Pietrzak, W.; Nowak, R (2020). Characterization of Free and Bound Phenolic Acids and Flavonoid Aglycones in *Rosa rugosa* Thunb. Leaves and Achenes Using LC–ESI–MS/MS–MRM Methods. *Molecules*, 25,
139. Baydar, N.G.; Baydar, H (2013). Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts. *Ind. Crops Prod.*, 41, 375–380.
140. Spiridon, I.; Colceru, S.; Anghel, N.; Teaca, C.A.; Bodirlau, R.; Armatu, A (2011). Antioxidant and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angus* and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Nat. Prod. Res.*, 25, 1657–1661
141. Turrini, F.; Beruto, M.; Mela, L.; Curir, P.; Triglia, G.; Boggia, R.; Zunin, P.; Monroy, F (2021). Ultrasound-Assisted Extraction of Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller, Cultivar Rosa) Solid By-Products Remaining after the Distillation of the Essential Oil. *Appl. Sci.*, 11, 5495
142. Truzzi, E.; Chaouch, M.A.; Rossi, G.; Tagliazucchi, L.; Bertelli, D.; Benvenuti, S (2022). Characterization and Valorization of the Agricultural Waste Obtained from *Lavandula* Steam Distillation for Its Reuse in the Food and Pharmaceutical Fields. *Molecules*, 27, 1613

## Ελληνική

1. Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Φουντζούλα, Χ. (2015). Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 8: 219-257.

2. Ψωμά Α. (2013). "Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών ουσιών σε μασίχα Χίου με υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματοφωτομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS)". Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών με τίτλο <<ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ>> του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.