



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός
Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων»**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία
Προσδιορισμός της κερσιτρίνης και της συνολικής αντιοξειδωτικής
ικανότητας σε δείγματα τριαντάφυλλων.**

Της

ΚΙΟΥΜΟΥΡΤΖΟΓΛΟΥ ΒΑΡΒΑΡΑΣ ΒΕΡΑΣ

202116

Παρουσιάστηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του
Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

Επιβλέπουσα: Άννα Γιαννακουδάκη

ΑΘΗΝΑ, 2022



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**

**Master of Science in
Advanced Aesthetics and Cosmetic Science: Development-Quality
Control and Safety of new cosmetic products**

**Master Thesis
Determination of quercitrin and total antioxidant capacity in rose
samples.**

By

Kioumourtzoglou Varvara Vera

202116

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the
Master's Degree in the Department of Biomedical Sciences
of the University of West Attica

Supervisor: Anna Giannakoudaki

Athens, 2022

Προσδιορισμός της κερσιτρίνης και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα τριαντάφυλλων.

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
	Γιαννακουδάκη Άννα	Λέκτορας	
	Βαρβαρέσου Αθανασία	Καθηγήτρια	
	Παπαγεωργίου Σπύρος	Επ. Καθηγητής	

1.1 ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, Κιουμουρτζόγλου Βαρβάρα Βέρα του Θεοδοσίου, με αριθμό μητρώου 202116, φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη – Ποιοτικός έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

**Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου, μέχρι τη συμπλήρωση ενός έτους από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.*

Η Δηλούσα

*** Ονοματεπώνυμο /Ιδιότητα**

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα
(Υπογραφή)

Πνευματική ιδιοκτησία © 2022 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2022 University of West Attica

All rights reserved



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Προσδιορισμός της κερσιτρίνης και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα τριαντάφυλλων.

Βαρβάρα Βέρα Κιουμουρτζόγλου

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, 2022

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε ποσοτικά και ποιοτικά η φαινολική ένωση κερσιτρίνη σε πέταλα τριαντάφυλλων έξι διαφορετικών γονότυπων που προέρχονται από την Ελλάδα. Για τον προσδιορισμό αυτό αναπτύχθηκε μία νέα αναλυτική μέθοδος με την τεχνική της Υγροχρωματογραφίας υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματοσκοπία υπεριώδους (HPLC/UV). Η αναπτυχθείσα μέθοδος συνοδεύεται από σχέδιο επικύρωσης το οποίο βρίσκεται σε εξέλιξη. Στην παρούσα μελέτη ολοκληρώθηκε με επιτυχία ο προσδιορισμός της ακρίβειας, επαναληψιμότητας, γραμμικότητας, ανάκτησης και ευαισθησίας. Με τη νέα μέθοδο επιτεύχθηκε γρήγορος και ταυτόχρονα αξιόπιστος προσδιορισμός της κερσιτρίνης. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων των έξι γονότυπων με την *in vitro* μέθοδο DPPH ώστε να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική τους δράση. Τα αποτελέσματα τόσο του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της κερσιτρίνης όσο και της μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης, υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία Ανάλυσης Διακύμανσης μίας Κατεύθυνσης (ANOVA) ώστε να εντοπισθούν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους γονότυπους. Μέσα από την ανάλυση αυτή προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονότυπων ως προς την περιεκτικότητά τους σε κερσιτρίνη, ενώ αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ολική αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων των έξι γονότυπων.

Λέξεις κλειδιά: πέταλα τριαντάφυλλων, κερσιτρίνη, Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ανιχνευτής UV, ανάπτυξη μεθόδου, επικύρωση μεθόδου, αντιοξειδωτική δράση, μέθοδος DPPH.

ABSTRACT

Determination of quercitrin and total antioxidant capacity in rose samples.

Varvara Vera Kioumourtzoglou
Department of Biomedical Sciences
University of West Attica, 2022

In the present dissertation, the phenolic compound quercitrin in rose petals of six different genotypes originating from Greece was studied quantitatively and qualitatively. For this determination, a new analytical method was developed and using the technique of High-performance liquid chromatography with UV-spectroscopy (HPLC/UV). The development method is accompanied by a validation plan which is in progress. The determination of accuracy, repeatability, linearity, recovery and was successfully completed in the present study. With this new method, a rapid and at the same time reliable determination of quercetin was achieved. The total antioxidant activity of the samples of the six genotypes was then measured by the in vitro DPPH method to evaluate their antioxidant activity. The results of both qualitative and quantitative determination of quercitrin and measurement of antioxidant activity were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) to identify statistically significant differences between the genotypes. Through this analysis, statistically significant differences were found between the genotypes in terms of their quercitrin content, while on the contrary, no statistically significant differences were observed in the total antioxidant activity of the samples of the six genotypes.

Keywords: rose petals, quercetin, High performance liquid chromatography, UV detector, method development, method validation, antioxidant activity, DPPH method.

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη – Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων» του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών έγινε στο ερευνητικό εργαστήριο του τμήματος Διατροφής και Διαιτολογίας του Διεθνούς Πανεπιστημίου Ελλάδας.

Πριν την παρουσία της εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, οι οποίοι συνετέλεσαν με καθοριστικό τρόπο στην πραγματοποίηση αυτής.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας αυτής κα. Γιαννακουδάκη Άννα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την πολύτιμη στήριξη που μου προσέφερε.

Στη συνέχεια τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω και προς τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, κα. Βαρβαρέσου Αθανασία και κ. Παπαγεωργίου Σπύρο, οι οποίοι προσέφεραν τον πολύτιμο χρόνο τους για την μελέτη και αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Μητσικάρη Πέτρο, του οποίου η συμβολή, καθοδήγηση, στήριξη και εμπιστοσύνη από την αρχή έως και το τέλος της παρούσας μελέτης ήταν πολύτιμη.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στη οικογένειά και στους φίλους μου που πάντα στηρίζουν κάθε μου βήμα και πιστεύουν σε εμένα και στους στόχους μου.

Βιβλιογραφικό CV

Βαρβάρα Βέρα Κιουμουρτζόγλου

Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών

«Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων»

Τίτλος: Προσδιορισμός της κερσιτρίνης και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα τριαντάφυλλων.

Επιστημονικό Πεδίο: Χημική ανάλυση φυσικών πρώτων υλών

Βιογραφικά Στοιχεία:

Προσωπικά Στοιχεία:

Εκπαίδευση: (προηγούμενα πτυχία ή διπλώματα) Πτυχιούχος Αισθητικής και Κοσμητολογίας του πρώην Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος της Θεσσαλονίκης.

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων» στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, τον Ιούλιο, 2022.

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: Άννα Γιαννακουδάκη



Πίνακας περιεχομένων

1.1	ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	0
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
	ABSTRACT	3
	Ευχαριστίες.....	4
	Βιβλιογραφικό CV	5
	Κατάλογος Πινάκων	9
	Κατάλογος Σχημάτων	9
	Κατάλογος Εικόνων.....	10
1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	13
1.1	Τα τριαντάφυλλα και η θέση τους στην βιομηχανία	13
1.1.1	<i>Γενικές πληροφορίες</i>	<i>13</i>
1.1.2	<i>Χαρακτηριστικά τριαντάφυλλων.....</i>	<i>13</i>
1.1.3	<i>Ποικίλα εμπορικά παράγωγα από τριαντάφυλλα</i>	<i>15</i>
1.1.4	<i>Χημική σύσταση τριαντάφυλλων</i>	<i>16</i>
1.1.5	<i>Γενικοί μηχανισμοί δράσης.....</i>	<i>16</i>
1.1.6	<i>Αντιοξειδωτική δράση</i>	<i>16</i>
1.1.7	<i>Καλλυντικά προϊόντα</i>	<i>18</i>
1.2	Φαινολικά αντιοξειδωτικά στοιχεία.....	19
1.2.1	<i>Φαινολικές ενώσεις</i>	<i>19</i>
1.2.2	<i>Φλαβονοειδή</i>	<i>20</i>
1.2.3	<i>Σύσταση τριαντάφυλλων σε φαινόλες (Βιβλιογραφική Ανασκόπηση)</i>	<i>32</i>
1.3	Βασικές Αρχές Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC).....	34
1.3.1	<i>Υγροχρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC).....</i>	<i>34</i>
1.3.2	<i>Χρωματογραφία κατανομής (στήλη κατανομής)</i>	<i>34</i>
1.3.3	<i>Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας</i>	<i>36</i>
1.3.4	<i>Ανιχνευτής UV</i>	<i>37</i>
1.4	Μέθοδος DPPH.....	38
1.4.1	<i>Αρχή της μεθόδου</i>	<i>38</i>
1.4.2	<i>Λειτουργία της μεθόδου</i>	<i>38</i>
1.5	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	39
1.5.1	<i>Ανάλυση διακύμανσης μίας κατεύθυνσης (ANOVA)</i>	<i>39</i>
1.5.2	<i>Post-hoc ανάλυση, Tukey's Test.....</i>	<i>39</i>
2	ΣΚΟΠΟΣ.....	40

3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
3.1	Οργανολογία – Εξοπλισμός – Αντιδραστήρια.....	41
3.1.1	<i>Οργανολογία</i>	41
3.1.2	<i>Εξοπλισμός</i>	41
3.1.3	<i>Αντιδραστήρια</i>	41
3.2	Σχέδιο πειραματικής μελέτης.....	42
3.2.1	<i>Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου HPLC/UV</i>	42
3.2.2	<i>Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου HPLC/UV</i>	46
3.3	Προσδιορισμός αποτελεσματικότητας.....	52
3.3.1	<i>Προετοιμασία DPPH μεθόδου</i>	52
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
4.1	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός κερσιτρίνης	53
4.2	Καθορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με DPPH μέθοδο	59
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Αντιοξειδωτικές ενώσεις του οργανισμού	17
Πίνακας 2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	32
Πίνακας 3 Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	33
Πίνακας 4 Πρότυπα διαλύματα κερσιτρίνης (STD Quercitrin).....	43
Πίνακας 5 Χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου που επιλέχθηκε.....	44
Πίνακας 6 Το πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε.....	44
Πίνακας 7 Δοκιμαστικοί συνδυασμοί διαλυτών για την εκχύλιση των τριαντάφυλλων.....	45
Πίνακας 8 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς εννέα προτύπων	46
Πίνακας 9 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς τριών εκ' των εννέα προτύπων	47
Πίνακας 10 Επαναληψιμότητα των πρότυπων διαλυμάτων κερσιτρίνης	48
Πίνακας 11 Ακρίβεια των πρότυπων διαλυμάτων κερσιτρίνης	48
Πίνακας 12 mg Κερσιτρίνης ανά gr δείγματος	56
Πίνακας 13 τιμές p-value από τη δοκιμασία ANOVA, για τις διαφορές μεταξύ των γονότυπων.....	57
Πίνακας 14 μM Trolox με ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα όσο 1mg δείγματος.....	59

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1 Κατηγορίες φλαβονοειδών	21
---------------------------------------	----

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 Αγριοτριανταφυλλιά, <i>Rosa canina</i>	13
Εικόνα 2 Δαμασκηνή τριανταφυλλιά, <i>Rosa damascena</i>	14
Εικόνα 3 Λευκή τριανταφυλλιά, <i>Rosa alba</i> L.....	14
Εικόνα 4 Φλαβόνες, Flavones.....	21
Εικόνα 5 Φλαβονόλες, Flavonols	22
Εικόνα 6 Φλαβανόνες, Flavanones	22
Εικόνα 7 Ισοφλαβόνες, Isoflavones	22
Εικόνα 8 Φλαβανόλες, Flavanols.....	23
Εικόνα 9 Ανθοκυανιδίνες, Anthocyanidins	23
Εικόνα 10 Ταξιφολίνη, Taxifolin.....	23
Εικόνα 11 Μυρισιτρίνη, Myricitrin.....	24
Εικόνα 12 Κερσιτρίνη, Quercitrin	25
Εικόνα 13 Λουτεολίνη, Luteolin.....	26
Εικόνα 14 Ρουτίνη, Rutin	27
Εικόνα 15 Απιγενίνη, Apigenin	28
Εικόνα 16 Καμφερόλη, Kaempferol	29
Εικόνα 17 Κερκετίνη, Quercetin.....	29
Εικόνα 18 Μυρισετίνη, Myricetin.....	30
Εικόνα 19 Διοξειδίο του πυριτίου με δεκαοκτακυλική ανθρακική αλυσίδα στη στατική φάση .	35
Εικόνα 20 Small Footprint HPLC, 1220 Infinity II LC System, Agilent	36
Εικόνα 21 Αναγωγή της DPPH.....	38
Εικόνα 22 Spike χρωματογράφημα	51
Εικόνα 23 Control χρωματογράφημα	51
Εικόνα 24 Χρωματογράφημα, 16-5-2-1 γονότυπου	53
Εικόνα 25 Χρωματογράφημα, 16-5-3-2 γονότυπου	53
Εικόνα 26 Χρωματογράφημα, 16-5-1-1 γονότυπου	54
Εικόνα 27 Χρωματογράφημα, 16-5-8-2 γονότυπου	54
Εικόνα 28 Χρωματογράφημα, 16-5-9-1 γονότυπου	55
Εικόνα 29 Χρωματογράφημα, 16-5-13-1 γονότυπου	55
Εικόνα 30 Πρότυπο χρωματογράφημα κερσιτρίνης.....	56
Εικόνα 32 Ραβδόγραμμα αναπαράστασης της συνολικής συγκέντρωσης κερσιτρίνης στους γονότυπους.....	57
Εικόνα 33 Ραβδόγραμμα αναπαράστασης των μM Trolox με ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα όσο 1mg δείγματος.....	59

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
GSH	Glutathione
CAT	Catalase
UV	Ultra Violet
HPLC	High performance liquid chromatography
DAD	Diode-Array Detection
PAD	Pulsed Amperometric Detection
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
ESI/MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
QTOF	Quadrupole Time of Flight
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
MeOH	Methanol



1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 Τα τριαντάφυλλα και η θέση τους στην βιομηχανία

1.1.1 Γενικές πληροφορίες

Τα τριαντάφυλλα είναι γένος φυτών που ανήκει στην οικογένεια των Ροδοειδών. Αναφέρονται ως τα πιο σημαντικά καλλωπιστικά φυτά και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως βασίλισσες των λουλουδιών. Υπάρχουν πάνω από 150 είδη τριαντάφυλλων και περίπου στις 30.000 καλλιέργειες αυτών. Βάση αυτών των δεδομένων προκύπτει πως είναι από τις πιο κοινές καλλιέργειες καλλωπιστικών φυτών. Οι πρώτες καλλιέργειες τριαντάφυλλων χρονολογούνται στο 3000 π.Χ. στην Κίνα, την Δυτική Ασία και την Βόρεια Αφρική. Ωστόσο εξαιτίας των πολλών και διαφορετικών τεχνολογικών τους εφαρμογών και οφελών που παρουσιάζουν, υπάρχει μεγάλη ζήτηση για τα τριαντάφυλλα από τις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών, αρωμάτων και φαρμάκων και γι' αυτό υπάρχουν πλέον καλλιέργειες ανά τον κόσμο σε χώρες της Ευρώπης, της Βορείου Αμερικής, της Βορειοδυτικής Αφρικής, στην Ινδία, στην Κίνα, στην Κορέα καθώς και στην Ιαπωνία.

1.1.2 Χαρακτηριστικά τριαντάφυλλων

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες τριαντάφυλλων, κάποιες από τις οποίες είναι οι: *Rosa damascena* Mill, *Rosa alba* L, *Rosa gallica* L, *Rosa centifolia* L, *Rosa canina*, *Rosa rugosa*, *Rosa chinensis* κ.α. Ως προς το φαινότυπό τους, οι τριανταφυλλιές έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όπως είναι: η ύπαρξη ρίζας, κεντρικού στελέχους το οποίο παρουσιάζει διακλαδώσεις, ανθέων, μπουμπουκιών και φύλλων. Ταυτόχρονα, η κάθε ποικιλία έχει τα δικά της ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία τη διαφοροποιούν από τις άλλες όπως είναι: το ύψος και η αρχιτεκτονική διάπλαση του φυτού, το χρώμα και το σχήμα του άνθους, ο αριθμός των πετάλων, η ποιότητα και η ένταση της μυρωδιάς, η ευκολία στην αναπαραγωγή του φυτού καθώς και η ικανότητα επιβίωσής του σε αντίξοες συνθήκες. [1]



Εικόνα 1 Αγριοτριανταφυλλιά, *Rosa canina*



Εικόνα 2 Δαμασκήνη τριανταφυλλιά, *Rosa damascena*



Εικόνα 3 Λευκή τριανταφυλλιά, *Rosa alba L.*

Οι τριανταφυλλιές θεωρούνται πολυετείς θάμνοι, οι οποίοι ανθίζουν την άνοιξη λόγω των ευνοϊκών καιρικών συνθηκών. Θεωρείται ότι για να ευδοκιμήσει η ανάπτυξή τους χρειάζεται εύκρατο κλίμα. Όσον αφορά την άνθισή τους, χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Κάποιες ποικιλίες ανθίζουν μία φορά το χρόνο, την περίοδο της άνοιξης, και αφού μαραθούν τα άνθη τους θα ξανανθίσουν την επόμενη άνοιξη, ενώ κάποιες άλλες, θα ανθίσουν την άνοιξη και θα συνεχίσουν την ανθοφορία και κατά την περίοδο του καλοκαιριού, φθινοπώρου μέχρι τα πρώτα κρύα του χειμώνα. Για την άνθιση των μπουμπουκιών και την ευδοκίμηση του φυτού χρειάζεται φως και σακχαρόζη. [1]

Τα άνθη των τριαντάφυλλων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία σε χρώματα και τόνους της κάθε απόχρωσης. Γι' αυτή τη ποικιλομορφία υπεύθυνες είναι ορισμένες χημικές ενώσεις όπως για παράδειγμα τα καροτενοειδή που προσφέρουν κίτρινες και πορτοκαλί αποχρώσεις και οι ανθοκυανίνες κόκκινες και ροζ.

1.1.3 Ποικίλα εμπορικά παράγωγα από τριαντάφυλλα

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, χάρη στις πολλές τεχνολογικές εφαρμογές που έχουν τα τριαντάφυλλα, υπάρχει αυξημένη ζήτηση από τον χώρο της βιομηχανίας τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων, γι' αυτό υπάρχουν και διαφορετικά παράγωγα για να καλυφθεί κάθε ανάγκη. Έτσι λοιπόν τα κυριότερα προϊόντα που προκύπτουν από τα τριαντάφυλλα είναι:

i. Το αιθέριο έλαιο τριαντάφυλλου

Είναι ένα έλαιο με χαρακτηριστικό υποκίτρινο χρώμα το οποίο μπορεί να ληφθεί από διάφορες ποικιλίες τριαντάφυλλων. Ο τόπος προέλευσης, οι περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. κλίμα, ποιότητα εδάφους, κ.α.), η περίοδος συγκομιδής των ανθέων, οι τεχνολογικές εφαρμογές που εφαρμόζονται στην κάθε καλλιέργεια, ακόμα και οι συνθήκες αποθήκευσης που επιλέγονται για τα άνθη, επηρεάζουν άμεσα και καθοριστικά την ποιότητα της πρώτης ύλης και τη χημική σύνθεση του αιθέριου ελαίου. Η κύρια χρήση του αφορά το χώρο της αρωματοποιίας και κοσμητολογίας.

ii. Το ροδόνερο

Μπορεί να ληφθεί από φρέσκα ή/και αποξηραμένα άνθη, καθώς και μετά από επεξεργασία αιθέριου ελαίου στο οποίο προστίθεται νερό και σύστημα συντήρησης. [2] Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και παρουσιάζει πολλές εφαρμογές στην Ινδία ως θεραπευτικό μέσο και κομμάτι θρησκευτικών τελετουργιών.

iii. Τα αποξηραμένα άνθη

Μπορεί να είναι είτε μπουμπούκια είτε πέταλα άνθους. Χρησιμοποιούνται αρκετά στη γαστρονομία γιατί προσδίδουν άρωμα και γεύση.

iv. Οι καρποί

Είναι πλούσιοι σε βιταμίνες, ορυκτά έλαια, λιπαρά οξέα, πολυφαινόλες, καροτενοειδή και τανίνες. Αξιοσημείωτο είναι πως παρουσιάζουν, στην ακατέργαστη μορφή τους, υψηλά ποσοστά ασκορβικού οξέος. Καθώς παρουσιάζουν πληθώρα δραστικών συστατικών χρησιμοποιούνται ευρέως στο κρυολόγημα, σε επιμολυσμένες καταστάσεις ακόμα και στην οστεοαρθρίτιδα. [3]

v. Κηρώδης πάστα

Προκύπτει από φρέσκα πέταλα, τα οποία αναμειγνύονται με μη πολικό διαλύτη (πχ. εξάνιο). Ο διαλύτης βοηθάει στην εκχύλιση του αιθέριου ελαίου και στη συνέχεια απομακρύνεται. Από την πάστα που προκύπτει, τουλάχιστον το 60% είναι καθαρό εκχύλισμα τριαντάφυλλου και το υπόλοιπο είναι φυσικό κερί. Χρησιμοποιείται στα καλλυντικά με στόχο την αναζωογόνηση και τη θρέψη. Στην περίπτωση που γίνει διαχωρισμός του καθαρού εκχυλίσματος από την κηρώδη ουσία, τότε η δεύτερη χρησιμοποιείται σε κεριά και σαπούνια χάρη στην έντονη μυρωδιά της.

vi. Καθαρό εκχύλισμα

Λαμβάνεται από την κηρώδη πάστα όταν αυτή επεξεργάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Το έλαιο που προκύπτει έχει σκούρο κεχριμπαρένιο χρώμα, έντονη μυρωδιά και αρκετά πιο παχύρρευστη υφή από το αιθέριο έλαιο. Χρησιμοποιείται αρκετά στην αρωματοποιία.[4]

1.1.4 Χημική σύσταση τριαντάφυλλων

Τα τριαντάφυλλα περιέχουν πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών όπως φαινολικά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, γλωρογενικό οξύ κ.α.), φλαβονοειδή (π.χ. φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες κ.α.), αρωματικές ενώσεις (π.χ. τερπένια) και τανίνες. Πιο συγκεκριμένα, οι παρακάτω χημικές ενώσεις ενώ ταυτοποιούνται στα τριαντάφυλλα ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης, διαφέρουν στα ποσοστά συγκέντρωσής τους, τα οποία, όπως ειπώθηκε παραπάνω, επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες. [5] Επίσης διαφέρουν ποσοστιαία, ανάλογα και με την εμπορική μορφή, διότι για παράδειγμα ορισμένες προ-κατεργασίες μπορεί να καταστρέψουν ορισμένες ενώσεις. Κάποιες από τις ενώσεις που ταυτοποιούνται στα τριαντάφυλλα είναι η σιτρονελλόλη, γερανιόλη, νερόλη, εικοσάνιο, φαιναιθυλική αλκοόλη, λιναλλόλη, ευγενόλη, οξικός γερανυλεστέρας κ.α. [6]

1.1.5 Γενικοί μηχανισμοί δράσης

Τα προϊόντα που παίρνουμε από τα τριαντάφυλλα, χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των πολλών και διαφορετικών μηχανισμών στους οποίους επεμβαίνουν καταλυτικά, έχοντας αρκετές φορές προστατευτικά και θεραπευτικά αποτελέσματα. Η σημασία τους οφείλεται στο σύνολο των δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίζονται σε αυτά. Πολλές μελέτες έχουν γίνει, αποδεικνύοντας τις ποικίλες δράσεις μεταξύ των οποίων είναι η αντιμικροβιακή[7], [8] η αντιαλλεργική[9], η αντιφλεγμονώδης και αναλγητική[10] και η αντικαρκινογόνος[11].

1.1.6 Αντιοξειδωτική δράση

Το οξυγόνο είναι μόριο σημαντικό για την αερόβια ζωή και απαραίτητο για τη διαδικασία της αναπνοής και το μεταβολισμό της ενέργειας. Κάτω όμως από συγκεκριμένες συνθήκες το καθοριστικό αυτό μόριο για την ύπαρξη ζωής μπορεί να έχει βλαβερή δράση, αφού έχει την δυνατότητα να σχηματίσει δραστικά είδη οξυγόνου. Τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) είναι οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες, μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, τα οποία έχουν κέντρο το οξυγόνο και κάποιες φορές μπορεί το άζωτο ή τον άνθρακα. Έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα γειτονικών μορίων, αλλά ταυτόχρονα, μπορούν να μεταβιβάσουν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο προκαλώντας και άλλες ελεύθερες ρίζες μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων.

Η παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου, αποτελεί αναπόφευκτο ακόλουθο της λειτουργίας των κυττάρων αφού συγκεκριμένα σχηματίζονται στο πλαίσιο του αερόβιου μεταβολισμού ως προϊόντα και υποπροϊόντα. Συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως είναι οι ενζυμικές αντιδράσεις, η μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων κ.α., έχοντας έτσι θετικές επιδράσεις στον οργανισμό.

Για να διατηρεί τα ποσοστά των δραστικών ειδών οξυγόνου σε χαμηλά και φυσιολογικά επίπεδα, ο οργανισμός έχει το δικό του αντιοξειδωτικό σύστημα αποτελούμενο από διάφορες ουσίες. Ως αντιοξειδωτική ουσία χαρακτηρίζεται κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις του οργανισμού μας χωρίζονται στις ενζυμικές και στις μη ενζυμικές.

Πίνακας 1 Αντιοξειδωτικές ενώσεις του οργανισμού

Ενζυμικά	Μη ενζυμικά
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	Γλουταθειόνη (GSH)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH peroxidase)	α-λιποϊκό οξύ
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GSH reductase)	Συνένζυμο Q-10
Καταλάση (CAT)	

Το πρόβλημα συνίσταται όταν λόγω διάφορων εξωγενών παραγόντων, όπως είναι οι υπεριώδεις ακτινοβολίες Α και Β, το άγχος, το κάπνισμα, οι ρυπογόνοι παράγοντες της ατμόσφαιρας, το μπλε φως και διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (κρύο, θερμότητα, νέφος κ.α.), αυξάνονται τα ποσοστά των ROS και το αντιοξειδωτικό σύστημα δεν δύναται να λειτουργήσει αποτελεσματικά ελέγχοντας την υπερπαραγωγή. Αυτή η ανισορροπία οδηγεί σε μία κατάσταση που λέγεται οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες, έχει πολυπαραγοντικές επιβλαβείς συνέπειες στα κύτταρα του οργανισμού. Συγκεκριμένα προσβάλλει μεγάλη ποικιλία μορίων όπως είναι: οι πρωτεΐνες, τα σάκχαρα, τα φωσφολιπίδια, άρα και τις κυτταρικές μεμβράνες, γενικά τα λιπίδια, το DNA κ.α. Η προσβολή και επακόλουθη δυσλειτουργία των μορίων αυτών οδηγεί στην εμφάνιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων μεταξύ των οποίων είναι η πρόωρη γήρανση (φωτογήρανση), φλεγμονώδεις καταστάσεις, καρκίνος κ.α.

Η φωτογήρανση είναι η παθολογική κατάσταση που προκαλείται από εξωγενείς παράγοντες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την υπερπαραγωγή ROS. Από όλους τους βλαβερούς παράγοντες μεγαλύτερη βλάβη προκαλούν η υπεριώδης Α και η υπεριώδης Β ακτινοβολίες. Η διάκριση της φωτογήρανσης από την χρονολογική γήρανση, η οποία είναι αποτέλεσμα ενδογενών βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα φυσιολογικά στον οργανισμό μας με το πέρασμα του χρόνου, μπορεί να γίνει αντιληπτή μέσα από διάφορα κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά που εμφανίζει το δέρμα. Το πιο εμφανές από τα οποία είναι ότι στη φωτογήρανση υπάρχει αύξηση του πάχους της κεράτινης στιβάδας ενώ αντίθετα στη χρονολογική γήρανση υπάρχει λεπύτωση του πάχους της.

Για την ενίσχυση του οργανισμού με σκοπό να αυξήσει την άμυνά του έναντι στην υπερπαραγωγή των ROS, υπάρχουν αντιοξειδωτικά συστήματα τα οποία προέρχονται εξωγενώς κυρίως από το φυτικό βασίλειο. Μερικά από αυτά είναι βιταμίνες (Α, C, E κ.α.), πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού, φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα (καφεϊκό, ροσμαρινικό οξύ κ.α.), το συνένζυμο Q10, τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρον είτε σε συμπληρώματα διατροφής είτε σε καλλυντικά προϊόντα. Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης που έχουν είναι: α) η δέσμευση ασύζευκτων ηλεκτρονίων ή/και ελευθέρων ριζών, β) η αποτροπή της λιπιδικής υπεροξειδωσης, γ) η ενίσχυση της δραστηριότητας των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων του οργανισμού.

1.1.7 Καλλυντικά προϊόντα

Στην εποχή που διανύουμε το ενδιαφέρον στρέφεται όλο και περισσότερο σε βιώσιμες και οικολογικές πρακτικές. Προς αυτή την κατεύθυνση στρέφονται και οι βιομηχανίες παραγωγής καλλυντικών, οι οποίες στην προσπάθειά τους να σεβαστούν την επιθυμία των καταναλωτών για έναν πιο «πράσινο κόσμο», υιοθετούν όλο και περισσότερο την ιδέα των «πράσινων καλλυντικών». Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζονται προϊόντα που περιέχουν ενεργά δραστικά συστατικά προερχόμενα από το φυτικό βασίλειο. Τα δραστικά μόρια που προέρχονται από φυτά και χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά είναι φαινολικά οξέα (φερουλικό, καφεϊκό, ροσμαρινικό οξύ)[12], [13], πολυφαινόλες[14], φλαβονοειδή, τερπένια (λιμονένιο, καροτενοειδή[15], ασταξανθίνη κ.α.)[16]–[18], λιπαρά οξέα (ελαϊκό, παλμιτικό οξύ κ.α.), πολυσακχαρίτες[19]–[21], σιλβένια, στεροειδή, στερόλες, πεπτίδια κ.α. Καλλυντικά προϊόντα που περιέχουν τα παραπάνω δραστικά συστατικά παρουσιάζουν, αναλόγως το συστατικό, κάποιες από τις παρακάτω δράσεις όπως: αντι-γηραντική δράση (αντι-ρυτιδική, εμπόδιση αλλοίωσης ελαστίνης και κολλαγόνου)[22], [23], ενυδατική (ενίσχυση του δερματικού φραγμού, αύξηση υδάτωσης επιδερμίδας), αντιφλεγμονώδη[24], αντιοξειδωτική[25], αντιμικροβιακή, φωτοπροστατευτική (δέσμευση υπεριώδους ακτινοβολίας Α και Β με αποτέλεσμα να μη διαπερνά το δέρμα)[22], [23] κ.α.

1.2 Φαινολικά αντιοξειδωτικά στοιχεία

1.2.1 Φαινολικές ενώσεις

Τα φυτικά προϊόντα, βάσει της βιοσύνθεσής τους, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα τερπενοειδή, τα αλκανοειδή, τα φαινυλοπροπανοειδή-τις φαινολικές ενώσεις. Τα φυτά μέσω μεταβολικών διεργασιών παράγουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών οργανικών προϊόντων. Ο μεταβολισμός στα φυτά διαχωρίζεται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Τα προϊόντα που παράγονται μέσω των μεταβολικών διεργασιών δεν μπορούν να διαχωριστούν εύκολα ούτε με βάση τα αρχικά τους μόρια, ούτε τη χημική τους δομή καθώς και ούτε με βάση τη βιοχημεία τους. Για το λόγο αυτό τα διαχωρίζουμε περιγράφοντας τις λειτουργίες τους. Οι ουσίες οι οποίες είναι κοινές στους ζωντανούς οργανισμούς και απαραίτητες για τη διατήρηση, την ανάπτυξη καθώς και την εξέλιξή τους, είναι προϊόντα που προέρχονται από τον πρωτογενή μεταβολισμό όπως τα σάκχαρα, τα αμινοξέα, οι βάσεις, οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεοτίδια, λειτουργούν ως θρεπτικά συστατικά για τις μεταβολικές διαδικασίες του φυτού. Από την άλλη πλευρά τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού επηρεάζουν ενεργά διαδικασίες αλληλεπίδρασης του φυτού με το εξωτερικό του περιβάλλον. Οι κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά είναι τα τερπενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις και οι αζωτούχες ενώσεις.[26]–[28]

Συγκεκριμένα, οι φαινολικές ενώσεις και κυρίως τα φλαβονοειδή είναι η πολυπληθέστερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά. Έχουν εντοπιστεί περίπου 8000 διαφορετικές δομές φαινολικών ενώσεων, αριθμός που συνέχεια μεγαλώνει. Οι ενώσεις αυτές παράγονται στα φυτικά κύτταρα και προστατεύουν τα φυτά από το οξειδωτικό στρες, παθογόνα(ιούς, βακτήρια, μύκητες), φυτοφάγα, μολύνσεις και τραυματισμό. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι, κατά τη φάση μόλυνσης ή οποιασδήποτε άλλης επίθεσης, τα ποσοστά των φαινολικών ενώσεων αυξάνονται για να καλύψουν τις ανάγκες του φυτού. Εκτός όμως από μέσο προστασίας, συμβάλλουν στην διαμόρφωση του χρώματος καθώς και της γεύσης των φυτών. Η περιεκτικότητά τους μπορεί να διαφέρει από φυτό σε φυτό καθώς η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται και εξαρτάται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.[26], [29]

Στα φυτά οι φαινολικές ενώσεις προκύπτουν είτε από το σικιμικό μονοπάτι είτε από το μηλονικό μονοπάτι, υπάρχει όμως και η περίπτωση να προκύψουν και από τα δύο. Δομικά αποτελούνται από έναν ή περισσότερους πολυυδροξυλιωμένους βενζολικούς δακτυλίους.[29], [30] Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει του αριθμού των φαινολικών δακτυλίων καθώς και της δομής των στοιχείων που συναντώνται στους δακτυλίους. Έτσι μπορούμε να πούμε πως χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα φλαβονοειδή (φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανίνες) και τα μη-φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα, υδροξυκιναμικό οξύ, λιγνάνες, στυλβένια και ταννίνες).

Οι φαινολικές ενώσεις συναντώνται στην ελεύθερη μορφή τους στα φυτά, καθώς και ως ένωση στα σάκχαρα και τις πρωτεΐνες. Ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή βρίσκονται σε αφθονία σε φυτά, φρούτα και λαχανικά. Επίσης συναντώνται και σε πολλές άλλες τροφές, κάποιες κύριες είναι: το τσάι, το κακάο και το κόκκινο κρασί. Από την άλλη, υπάρχουν φαινολικές ενώσεις που συναντώνται σε συγκεκριμένα είδη.

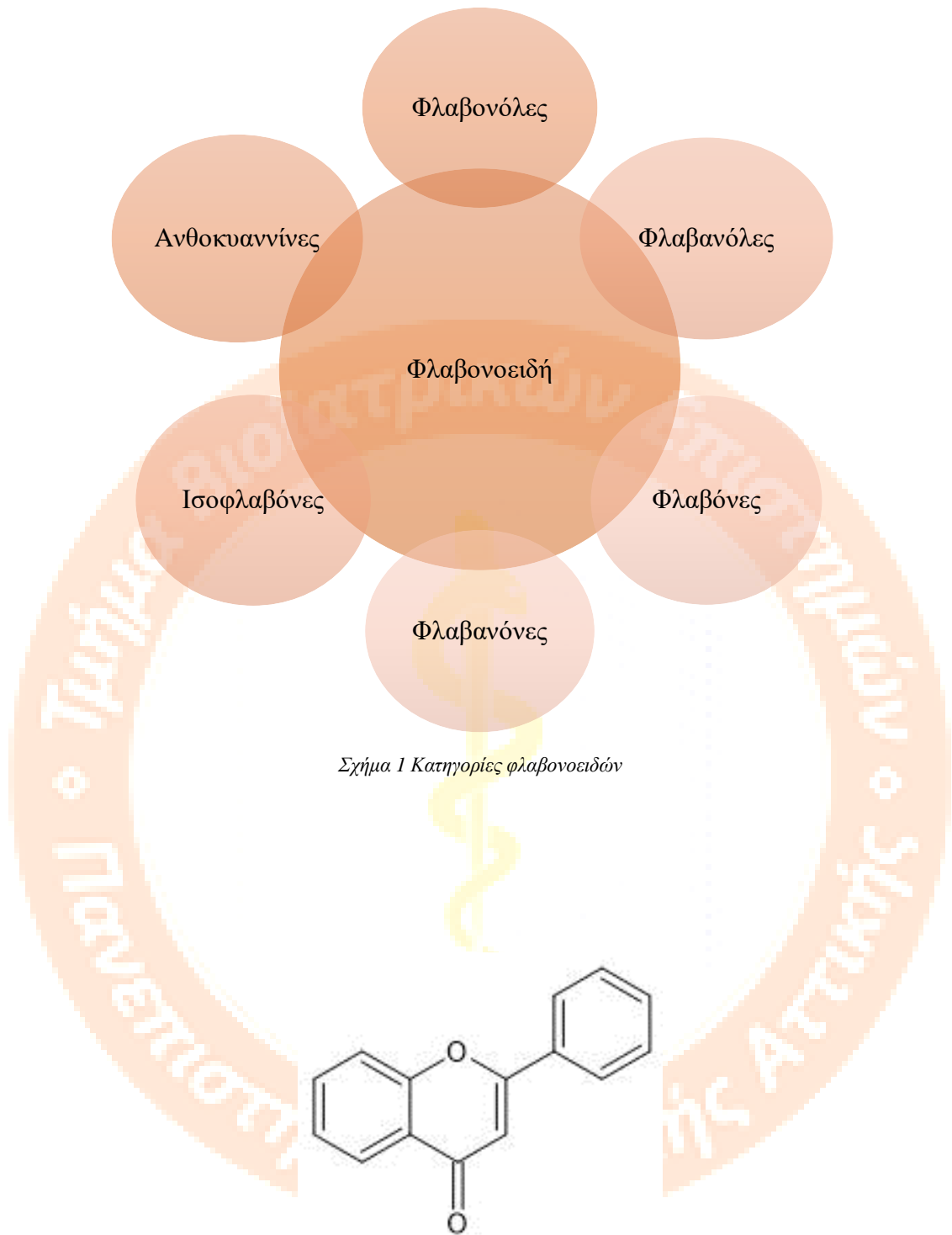
Σημαντικό είναι ότι η περιεκτικότητα και η δραστικότητα των ενώσεων αυτών επηρεάζεται άμεσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες, το στάδιο ωρίμανσης φυτών και καρπών, τον τρόπο αποθήκευσης, τον τρόπο μαγειρέματος, τις βιομηχανικές επεξεργασίες στις οποίες τυχόν υποβλήθηκαν (για την δημιουργία τυποποιημένων προϊόντων) καθώς και την οξείδωσή τους.

Ο άνθρωπος προσλαμβάνει τις ενώσεις αυτές μέσω της διατροφής του. Έχει διαπιστωθεί πως τα οφέλη των πολυφαινόλων είναι πολλά για την υγεία μας. Συγκεκριμένα οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση η οποία φαίνεται πως συμβάλλει ενεργά τόσο στη μείωση περιστατικών όσο και στη μείωση της θνησιμότητας από διάφορες εκφυλιστικές παθήσεις, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, το άσθμα, διάφοροι τύποι καρκίνου, διαβήτη τύπου II, Alzheimer και Parkinson. [31]–[33]

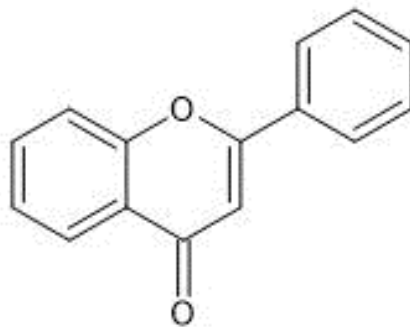
Επιπλέον οι πολυφαινόλες δρουν και ως δραστικά αντιοξειδωτικά στοιχεία, περιορίζοντας την καταστροφή του ανθρώπινου ιστού σε διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Οι τραυματισμένοι ιστοί παράγουν ελεύθερες ρίζες όπως είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), που όπως προαναφέρθηκε είναι δυνητικά επιβλαβείς για την λειτουργία των κυττάρων. Οι πολυφαινόλες λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης αναστέλλουν τη δράση των ελευθέρων ριζών καθώς και τις αλυσιδωτές αντιδράσεις τους. Η δράση τους αυτή προκύπτει από την δομή τους, έχουν υποκαταστάτες οι οποίοι μπορούν να δώσουν ένα άτομο υδρογόνου ανάγοντας τις ελεύθερες ρίζες και καθιστώντας τις αδρανείς.

1.2.2 Φλαβονοειδή

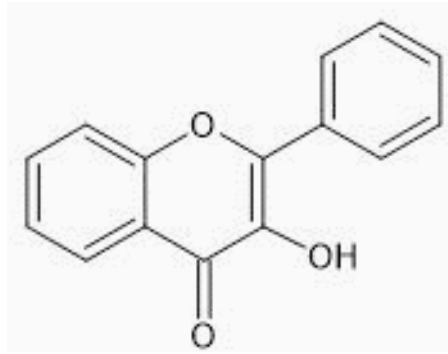
Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα υπάρχουν γύρω στους 8000 διαφορετικούς τύπους φαινολικών ενώσεων. Από αυτούς περίπου οι 4500 έχουν κατηγοριοποιηθεί ως φλαβονοειδή. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι τα φλαβονοειδή είναι οι επικρατέστερες πολυφαινόλες και δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά. Αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα τα οποία βρίσκονται στο σκελετό C₆-C₃-C₆. Ο 1^{ος} και ο 2^{ος} δακτύλιος είναι και οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι, ενώ ο 3^{ος} είναι μία αλυσίδα τριών ανθράκων. Ανάλογα με το βαθμό κορεσμού και τους υποκαταστάτες που φέρει ο 3^{ος} δακτύλιος τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε έξι υποομάδες. Η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από την παρουσία και τη θέση των υδροξυλομάδων στο μόριό τους.



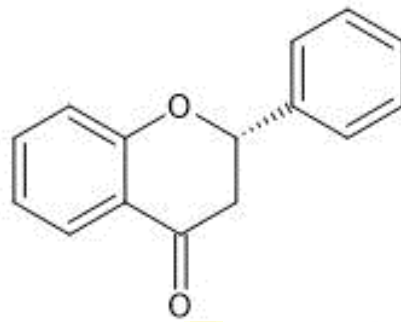
Σχήμα 1 Κατηγορίες φλαβονοειδών



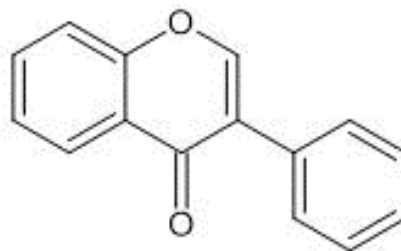
Εικόνα 4 Φλαβόνες, Flavones



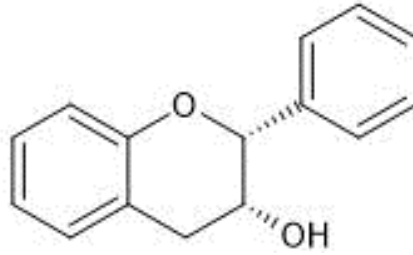
Εικόνα 5 Φλαβονόλες, Flavonols



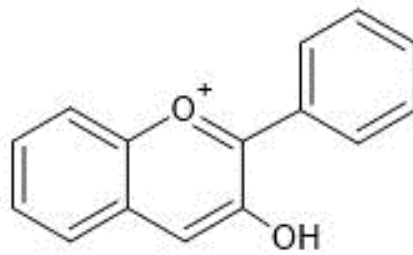
Εικόνα 6 Φλαβανόνες, Flavanones



Εικόνα 7 Ισοφλαβόνες, Isoflavones



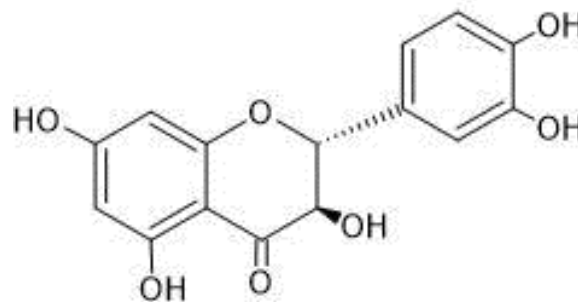
Εικόνα 8 Φλαβανόλες, Flavanols



Εικόνα 9 Ανθοκυανιδίνες, Anthocyanidins

Ταξιφολίνη

Η ταξιφολίνη (3,5,7,3,4-πενταυδρόξυ φλαβανόνη ή διυδροκερκετίνη) είναι μία χημική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και στην υποκατηγορία των φλαβανονολών. Αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) οι οποίοι περιλαμβάνουν δύο φαινολικές ομάδες. Οι δακτύλιοι Α και Β συνδέονται μεταξύ τους χάρη στην ύπαρξη ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου (C).



Εικόνα 10 Ταξιφολίνη, Taxifolin

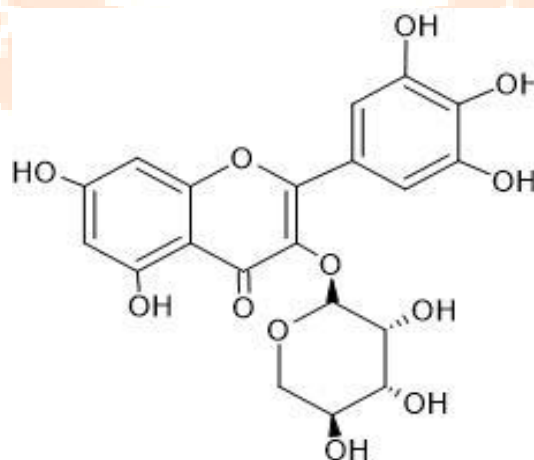
Η σημαντική αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται σε διάφορα χαρακτηριστικά που παρουσιάζει το μόριό της, συγκεκριμένα στην ύπαρξη: 1. Φαινολικών ομάδων 2. Υδροξυλομάδων που βρίσκονται στους φαινολικούς δακτύλιους και 3. Δομών σύζευξης και σταθερότητας συντονισμού που παρουσιάζουν οι φαινολικοί δακτύλιοι στο μόριό της. Έχει αποδειχθεί ότι η αποτελεσματικότητά της ως αντιοξειδωτικό είναι μεγαλύτερη από αυτή της κερκετίνης 3,4 φορές σε δοσολογία 100mg/kg και 4,9 φορές σε δοσολογία 300mg/kg. Μελέτες *in vivo* σε αρουραίους έδειξαν τόσο την αντιοξειδωτική της δράση όσο και την λειτουργία της ως προστατευτικού παράγοντα των τριχοειδών αγγείων[34], [35]. Επίσης φάνηκε η μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε μελέτη που έγινε σε νεφρά και σε ορό αίματος[36].

Ωστόσο, η σημαντικότητά της δεν περιορίζεται στην αντιοξειδωτική της δράση αφού παρουσιάζει μία πληθώρα μηχανισμών που υποστηρίζονται από *in vivo*, *in vitro* και *ex vivo* μελέτες. Παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη[37], [38], αντιμικροβιακή[39], [40], αντιμυκητιασική[41], αντι-ψωριασική[42], αντι-Alzheimer[43] και αντι-υπεργλυκαιμική δράση. Επίσης, προστατεύει την καλή λειτουργία του ήπατος[44], συμβάλλει στην ομοιόσταση της γλυκόζης *in vivo* και *in vitro*[45] καθώς και στην εύρυθμη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος *ex vivo*, *in vivo*, *in vitro*[46], [47].

Η ταξιφολίνη συναντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο φλοιό του έλατου Ντάγκλας (Douglas fir bark) από όπου και απομονώθηκε για πρώτη φορά[48], στα κρεμμύδια[49], στα σταφύλια[50], στο ελαιόλαδο[51], στο κινέζικο πουρνάρι (*Taxus Chinensis* var. *mairei*)[52], στο εκχύλισμα σιλιμαρίνης από τους σπόρους γαϊδουράγκαθων, στο παλαιωμένο ξύδι από ξύλο κερασιάς[53] καθώς και σε πολλά άλλα φυτά.

Μυρισιτρίνη

Η μυρισιτρίνη (3-O-α-L-ραμνοπυρανοσίδη της μυρικετίνης) είναι μία χημική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και ειδικότερα στην υποκατηγορία των φλαβονολών.



Εικόνα 11 Μυρισιτρίνη, Myricitrin

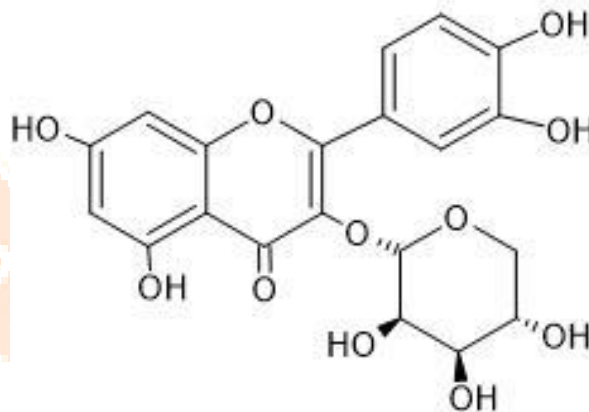
Η παρουσία πολλών υδροξυλομάδων στο μόριό της είναι ο λόγος που παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και έχει την ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες.[54] Επιπλέον συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες[55] και της κυτταροτοξικότητας που προσβάλλει ιστούς και κύτταρα[56], [57]. Μπορεί να μειώσει τη δράση των AGE's που προκαλούν φλεγμονώδεις καταστάσεις, βλάβες στα μιτοχόνδρια και κυτταρική απόπτωση [58], [59]καθώς επίσης και την λιπιδική υπεροξείδωση αυξάνοντας παράλληλα την ενζυμική έκφραση (CAT, SOD)[59].

Εκτός όμως από τη σημαντική και πολυεπίπεδη αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζει, συγκεντρώνει αρκετούς εξίσου σημαντικούς μηχανισμούς δράσης όπως, αντιφλεγμονώδη[54] δράση σε μελέτες in vivo και in vitro, αντι-ερεθιστική δράση σε μελέτες in vivo σε ποντίκια[60], βελτιώνει την λειτουργία της καρδιάς καθώς και τις αλλοιώσεις που μπορούν να προκληθούν από το διαβήτη[58], παρέχει προστατευτική δράση έναντι της οστεοπόρωσης[61] καθώς και νευροπροστατευτική δράση[57].

Η μυρισιτρίνη, εντοπίζεται σε αφθονία σε φρούτα, φυτά [61]και πιο συγκεκριμένα σε κλαδιά, κορμούς και φύλλα δέντρων όπως στο φυτό Μυρική η κηροφόρος (*Myrica cerifera*)[62].

Κερσιτρίνη

Η κερσιτρίνη (3-O-β-γλυκοσίδη της κερκετίνης) είναι μία από τις γλυκοζυλιωμένες μορφές της κερκετίνης, και συγκριτικά με την κερκετίνη είναι πιο εύκολα απορροφήσιμη από τον οργανισμό[63], [64]. Η χημική ένωση αυτή ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και στην υποκατηγορία των φλαβονολών.



Εικόνα 12 Κερσιτρίνη, *Quercitrin*

Η αντιοξειδωτική της δράση αποδεικνύεται μέσα από in vivo και in vitro μελέτες, όπου φάνηκε πως μειώνει την κυτταρική απόπτωση, καθώς και τις επιβλαβείς επιδράσεις της υπεριώδους Β ακτινοβολίας στον οργανισμό και το δέρμα, όπως είναι η φλεγμονή, τις οξειδωτικές βλάβες του DNA και την δημιουργία ελευθέρων ριζών. Παράλληλα συμβάλλει στην αύξηση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων του οργανισμού.[65]

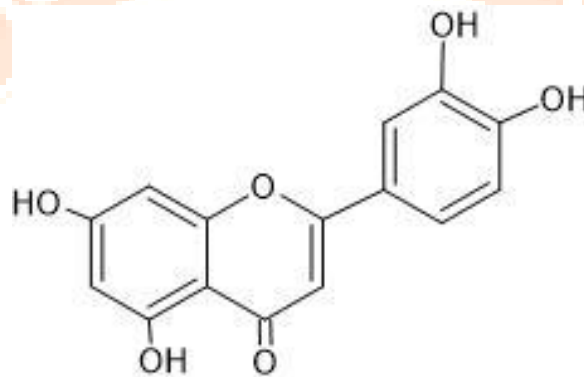
Επιπλέον, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων[66], μειώνει τα αλλεργικά επεισόδια (αναφυλακτικό σοκ)[67] και τις θρομβώσεις[68]. Τέλος, αυξάνει

την έκφραση της δεκορίνης και του κολλαγόνου βοηθώντας στην καλή επούλωση ουλών και ιστών[69].

Η κερσιτρίνη εντοπίζεται σε φυτά όπως το μπλε αγιόκλημα (*Lonicera edulis*)[70], σε διάφορα είδη τριαντάφυλλων [6]όπως το κινέζικο τριαντάφυλλο (*Rosa Chinensis*) κ.α.

Λουτεολίνη

Η λουτεολίνη (3', 4', 5, 7-τετραυδροξυφλαβόνη) είναι μία χημική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των φλαβόνων. Δομικά, η ύπαρξη υδροξυλομάδων στις θέσεις 5, 7, 3', 4' καθώς και ο διπλός δεσμός C2-C3 την καθιστούν εξαιρετικά δραστική[71].



Εικόνα 13 Λουτεολίνη, Luteolin

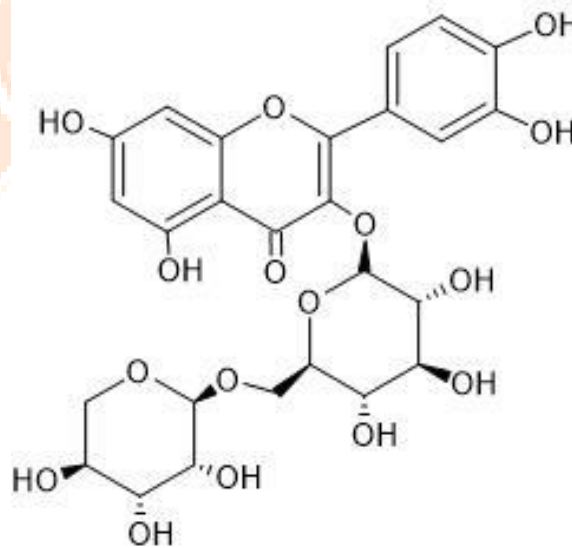
Παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση η οποία συνεπάγεται και την αντιφλεγμονώδη δράση[72], [73]. Συγκεκριμένα, μέσα από μελέτες *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* προκύπτει ότι απορροφά τις υπεριώδεις ακτινοβολίες Α και Β εμποδίζοντας έτσι την μετάδοσή τους. Επίσης προστατεύει το DNA από οξειδωτικές βλάβες, δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, μειώνει τα προ οξειδωτικά ένζυμα καθώς και ένζυμα όπως η υαλουρονιδάση και η μάρτιξ μεταλλοπρωτεϊνάση (MMP's) ενώ παράλληλα αυξάνει τα αντιοξειδωτικά ένζυμα στο δέρμα[74]. Έτσι επιτυγχάνει αντι-γηραντική δράση και προστασία από τη φωτογήρανση[75]. Επιπλέον έχει αντιφλεγμονώδη δράση προστατεύοντάς μας από φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλεί η υπεριώδης Β ακτινοβολία, αλλά και γενικότερα από φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος όπως είναι η ψωρίαση, η δερματίτιδα εξ' επαφής και η ατοπική δερματίτιδα[75]. Έχει αντικαρκινογόνο δράση[76] καθώς και προστατεύει τον οργανισμό μας από ισχαιμικά επεισόδια[77]. Τέλος έχει επουλωτικές ιδιότητες αφού συμβάλλει στην γρηγορότερη επούλωση τραυμάτων ενισχύοντας τη μηχανική αντοχή της περιοχής, δημιουργώντας βελτιωμένο επιθηλιακό ιστό και αυξάνοντας την περιεκτικότητά του σε κολλαγόνο[78].

Η λουτεολίνη εντοπίζεται σε αφθονία σε βρώσιμα φυτά όπως η ρίγανη το σέλινο, ο μαϊντανός, η μέντα, το φασκόμηλο και το δεντρολίβανο[79]. Παράλληλα βρίσκεται και σε πολλά φυτά όπως η Βερόνικα (*Veronica Plantaginaceae*)[80], τα

χρυσάνθεμα (*Chrysanthemum sinense*), τα τριαντάφυλλα (π.χ. *Rosa banksiae*, Taif Rose)[81], [82].

Ρουτίνη

Η ρουτίνη (κερκετίνη-3-O-ρουτινοσίδη, Βιταμίνη Ρ), είναι μία χημική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των φλαβονολών. Η ύπαρξη υδροξυλομάδων στους δακτυλίους Α και Β, ο διπλός δεσμός στη θέση C2-C3 καθώς και η ύπαρξη κέτο-ομάδας στην θέση 4 είναι οι λόγοι στους οποίους οφείλεται η δραστηριότητά της.



Εικόνα 14 Ρουτίνη, Rutin

Η ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση έχει αποδειχθεί μέσα από *in vivo* και *in vitro* μελέτες στις οποίες φάνηκε η ικανότητά της να μειώνει τα ποσοστά της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA) ως προϊόν λιπιδικής υπεροξειδωσης καθώς και τη διαδικασία γήρανσης των κυττάρων δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες. Επίσης, αυξάνει τα ποσοστά της γλουταθειόνης, της καταλάσης[83], [84] και της υπεροξειδικής δισμουτάσης, παρουσιάζει κυτταροπροστατευτική δράση, αυξάνοντας την βιωσιμότητα των ινοβλαστών που εκτέθηκαν σε ελεύθερες ρίζες και σε υπεριώδη ακτινοβολία [83]καθώς και αυξάνει το κολλαγόνο τύπου 1 έναντι της επίδρασης ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, μειώνει τα ποσοστά μεταλλοπρωτεϊνών ενισχύοντας την έκφραση των πρωτεϊνών του δέρματος και επομένως την πυκνότητά και την ελαστικότητά του[85].

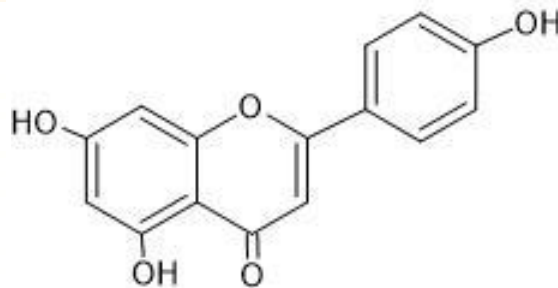
Πέρα όμως από την αντιοξειδωτική της δράση, η ρουτίνη έχει και άλλους μηχανισμούς. Φαίνεται πως ενισχύει την αποτελεσματικότητα του δείκτη ηλιακής προστασίας για την υπεριώδη Β ακτινοβολία[86], μέσα από μία σειρά μηχανισμών έχει αντι-διαβητογόνο δράση βελτιώνοντας την ανοχή στην γλυκόζη, μειώνει το σάκχαρο νηστείας και τα λιπίδια στον ορό του αίματος. Μέσω των μηχανισμών αυτών μειώνει την εκδήλωση παρενεργειών λόγω του διαβήτη στη μάκρο και μικρο κυκλοφορία. Επιπλέον έχει αντι-φλεγμονώδη[87], αντι-μικροβιακή και νευροπροστατευτική δράση

καθώς επίσης συμβάλλει στη μείωση θρομβώσεων, και επομένως στην καλή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος.

Η ρουτίνη εντοπίζεται σε πλήθος φυτικών προϊόντων, φρούτων, λαχανικών όπως για παράδειγμα στο γλυκάνισο, στη μέντα, στα κρεμμύδια[79] και στα τριαντάφυλλα[88].

Απιγενίνη

Η απιγενίνη (4', 5, 7 – τριυδροξυφλαβόνη) είναι μία χημική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των φλαβόνων. Λόγω της δομής της, η οποία αποτελείται από μεγάλο αριθμό υδροξυλομάδων στον δακτύλιο Α και ομάδα κατεχόλης στον δακτύλιο Β, είναι εξαιρετικά δραστική. Η δραστικότητα της ωστόσο αυξάνεται και λόγω της αυξημένης απορρόφησης που έχει από τον οργανισμό μας.



Εικόνα 15 Απιγενίνη, Apigenin

Η αντιοξειδωτική της δράση εκδηλώνεται μέσα από την ικανότητά της να δεσμεύει αποτελεσματικά ελεύθερες ρίζες, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία των μελανοκυττάρων[89]. Παράλληλα αυξάνει τα ποσοστά των αντιοξειδωτικών ενζύμων του οργανισμού μας όπως είναι η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση και η γλουταθειόνη και εμποδίζει τη λιπιδική υπεροξείδωση. Επιπλέον, παρουσιάζει φωτοπροστατευτική δράση προστατεύοντας τα κερατινοκύτταρα από τη βλαβερή επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας[90].

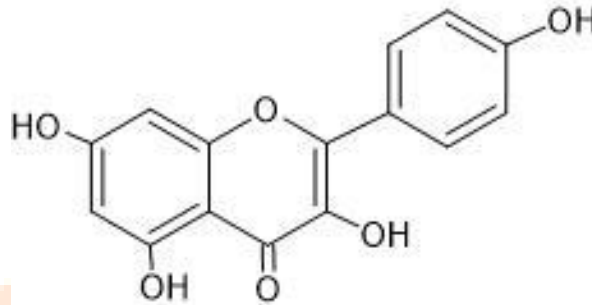
Ωστόσο πέρα από τους μηχανισμούς αυτούς έχει αποδειχθεί η αντι-καρκινογόνος, η νευροπροστατευτική και η αντι-φλεγμονώδης δράση της[91].

Η απιγενίνη εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε φυτά και λαχανικά όπως είναι ο μαϊντανός, η λεβάντα, το φασκόμηλο, η μαντζουράνα και ο βασιλικός[79]. Ως γλυκοσίτης εντοπίζεται και στα τριαντάφυλλα.

Καμφερόλη

Η καμφερόλη (3, 3', 5, 7 – τετραυδροξυφλαβόνη) είναι μία χημική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των φλαβονολών. Η χαρακτηριστική δομή της και συγκεκριμένα η ύπαρξη τεσσάρων υδροξυλομάδων στο μόριό της, δύο στον δακτύλιο Α και από μία στον κάθε δακτύλιο

B και C την καθιστούν ισχυρή αντιοξειδωτική ένωση. Είναι μία ένωση με υψηλή απορρόφηση από τον οργανισμό μας.



Εικόνα 16 Καμπερόλη, *Kaempferol*

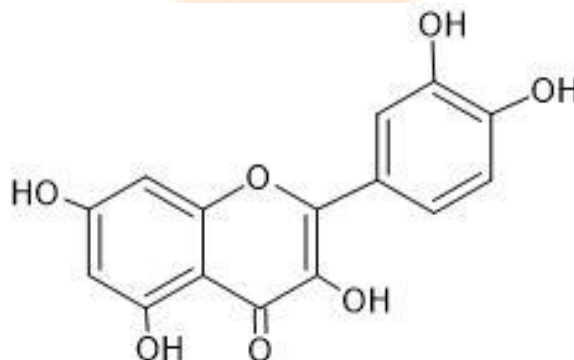
Μπορεί και δεσμεύει αποτελεσματικά ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας έτσι την κυτταροτοξικότητα και τις βλάβες στο DNA των κυττάρων. Επίσης, αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την δράση πρωτεασών. Τέλος, αποτρέπει την λιπιδική υπεροξειδωση αφού μέσα από μελέτες φαίνεται πως μειώνει τα ποσοστά της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA)[92].

Πέραν όμως των παραπάνω μηχανισμών παρουσιάζει και άλλες εξειδικευμένες δράσεις όπως είναι η αντι-φλεγμονώδης[93], η αντι-μυκητιστακή, η αντι-καρκινογόνος και η καρδιοπροστατευτική.

Η καμπερόλη εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε φυτά και λαχανικά όπως η κάπαρη, άνηθος, ο βασιλικός, η λεβάντα, η κολοκύθα, το καρότο, το κουνουπίδι[79] κ.α. Επίσης εντοπίζεται είτε στην απλή της μορφή είτε στις γλυκοσιτικές της μορφές στα τριαντάφυλλα.

Κερκετίνη

Η κερκετίνη (3, 5, 7, 3', 4' – πενταυδροξυφλαβόνη) είναι μία χημική ένωση η οποία ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των φλαβονολών. Η ύπαρξη υδροξυλομάδων στους φαινολικούς δακτυλίους και ο διπλός δεσμός στη θέση C2-C3 είναι ο λόγος που έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση[94].



Εικόνα 17 Κερκετίνη, *Quercetin*

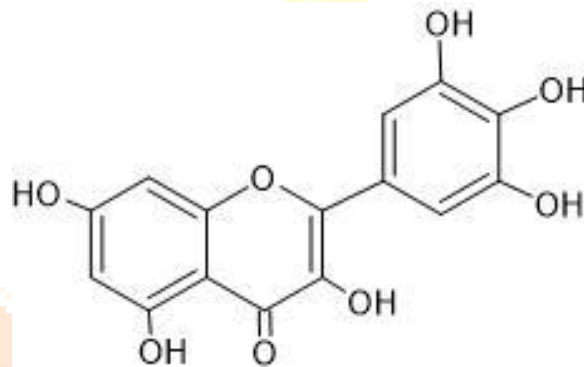
Μέσα από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, προστατεύει τα δερματικά κύτταρα από τις επιβλαβείς επιδράσεις της υπεριώδους Β ακτινοβολίας, περιορίζει την δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου στα κύτταρα, διαδικασία που ευνοεί και προκαλεί η υπεριώδης Β ακτινοβολία, εμποδίζοντας παράλληλα, τη λιπιδική υπεροξειδωση και προστατεύοντας την κυτταρική μεμβράνη[95]. Σε άλλες μελέτες φάνηκε η ικανότητά της να αυξάνει την έκφραση της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της καταλάσης και της γλουταθειόνης[96].

Πέραν όμως από αυτούς τους μηχανισμούς έχει φανεί μέσα από μελέτες ότι συμβάλλει ενεργά σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Έχει αντι-καρκινογόνο, αντι-φλεγμονώδη[97], αντι-διαβητογόνο και αντι-καταθλιπτική δράση.

Η κερκετίνη, εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε φυτά, φρούτα και λαχανικά όπως είναι τα μούρα, τα κεράσια, τα μήλα, τα κόκκινα κρεμμύδια, τα μαρούλια, τα σπαράγγια, τα δαμάσκηνα, το σέλινο, η Καμέλια η σινική (*Camellia sinensis*), το βάλαμο[79] και τα τριαντάφυλλα.

Μυρισετίνη

Η μυρισετίνη (3, 3', 4', 5, 5', 7 – εξαυδροξυφλαβόνη) είναι μία χημική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των φλαβονολών.



Εικόνα 18 Μυρισετίνη, Myricetin

Παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς μέσα από μελέτες έχει αποδειχθεί πως δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, αυξάνει την έκφραση των πρωτεϊνών και τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων του οργανισμού μας (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης), εμποδίζει τις βλάβες στο DNA των κυττάρων καθώς και την λιπιδική υπεροξειδωση οργανιδίων της κυτταρικής μεμβράνης[98]. Επιπλέον, δρα κατά των καταστροφικών επιδράσεων που έχει η υπεριώδης Β ακτινοβολία στο δέρμα. Μέσα από *in vitro* μελέτες φάνηκε πως αποτρέπει την δημιουργία ρυτίδων, την πάχυνση της επιδερμίδας, κατάσταση που αποτελεί χαρακτηριστική αλλοίωση της φωτογήρανσης στο δέρμα, μειώνει τα ποσοστά των μάρτιξ μεταλλοπρωτεϊνών (MMP9), η αύξηση των οποίων προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία. Μέσω όλων αυτών των μηχανισμών αποδεικνύεται πως έχει δράση κατά της φωτογήρανσης. Τέλος, έχει αποδειχθεί η ικανότητά της να αποτρέπει

τον κυτταρικό θάνατο κερατινοκυττάρων και τη δημιουργία ελευθέρων ριζών στα κύτταρα[99].

Εκτός όμως από τους παραπάνω μηχανισμούς, έχει αποδειχθεί μέσα από μελέτες ότι έχει μία μεγάλη πληθώρα δράσεων μερικές από τις οποίες είναι η αντι-διαβητογόνος[100], η αντι-καρκινογόνος, η καρδιοπροστατευτική και η αντι-μικροβιακή[101].

Η μυρισετίνη, εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε φυτά, λαχανικά, φρούτα, μερικά από τα οποία είναι τα μούρα, τα λεμόνια, οι πιπεριές, τα κράνμπερι, το ρούμεξ (Dock) και το σκόρδο[79].



1.2.3 Σύσταση τριαντάφυλλων σε φαινόλες (Βιβλιογραφική Ανασκόπηση)

Μέθοδος παραλαβής	Μέθοδος Ανάλυσης	Ροή	Κινητές φάσεις	Στήλη	Ουσίες	B.A.
MeOH, απόσταξη σε κενό αέρος στους 40°C, λυοφιλίωση, για ESI(+)-MS: ACN/H ₂ O(80/20v/v), φιλτράρισμα και για ESI(-)-MS/MS: υδατικό διάλυμα αμμωνίας + δείγμα	UPLC-ESI-MS	0,3 ml/min ⁻¹	A: 0,05% τριφθοροξικό οξύ B: ακετονιτρίλιο	ACQUITY UPLC BEH C18 στήλη (100mm, 2.1mm i.d., 1.7μm Waters)	Γαλλικό, καφεϊκό, L-ασκορβικό οξύ, κερκετίνη, καμφερόλη, (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, κερσιτρίνη, κερκετίνη, μυρισετίνη, ρουτίνη	[102]
MeOH 70%, 30' υπέρηχοι, φιλτράρισμα επανάληψη 3 φορές με εκ' νέου προσθήκη διαλύτη, περιστροφικός εξατμιστής σε χαμηλή πίεση	HPLC/ESI-QTOF-MS	0,2 ml/min	A: νερό με 0,1 φορμικό οξύ B: ακετονιτρίλιο με 0,1 φορμικό οξύ	Gemini 3μm NX-C18 110 Å, LC στήλη 100 × 2 mm	31 φαινολικές ενώσεις μεταξύ των οποίων: φαινολικά οξέα καμφερόλη, ρουτίνη, ισομερή και γλυκοσίδες της κερκετίνης	[103]
EtOH:H ₂ O (20ml, 50:50 v/v), υπέρηχοι 30', φυγοκέντριση, φιλτράρισμα	UPLC/PDA	0,2 ml/min	A: ακετονιτρίλιο/νερό (2,5/97,5% v/v) με 0,1% v/v μεθανικό οξύ B: ακετονιτρίλιο με 0,1% μεθανικό οξύ	Acquity UPLC BEH C18 στήλη (2.1 i.d. × 100 mm, 1.7 μm)	7 γλυκοσίδες της κερκετίνης, καμφερόλη και 6 γλυκοσίδες της,	[104]
EtOH με ή χωρίς κιτρικό οξύ για 18 ημέρες, φιλτράρισμα υπό κενό αέρος, ανάλογα με το βάρος του κάθε εκχυλίσματος προστέθηκε νερό και κιτρικό οξύ	UPLC-PDA-ESI-QTOF-MS	0,45 ml/min	A: 2.0% φορμικό οξύ v/v B: 100% ακετονιτρίλιο	UPLC BEH C18 στήλη (1.7μm, 2.1mm x 100mm)	Κατεχίνη, ελλαγικό οξύ, καμφερόλη-3-O-γλυκοσίδης, Μυρισετίνη-3-O-γλυκοσίδης, Κερκετίνη-3-O-γλυκοσίδης κ.α.	[105]

Πίνακας 2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Μέθοδος παραλαβής	Μέθοδος Ανάλυσης	Ροή	Κινητές φάσεις	Στήλη	Ουσίες	B.A.
MeOH, κενό αέρος στους 40°C, ακετονιτρίλιο	HPLC/DAD	1 ml/min	A: νερό B: 0,02% τριφθοροξικό οξύ σε ακετονιτρίλιο	Luna C18 στήλη (250mm x 4.6mm, 5μm)	Γαλλικό οξύ, ρουτίνη, κερσιτρίνη, κερκετίνη, μυρισετίνη, καμφερόλη	[106]
3 εκχυλίσαις: 1. Νερό για 4h, φιλτράρισμα 2. Οξικός αιθυλεστέρας για 2h 3. Βουτανόλη για 2h Λυοφιλίωση, διατήρηση στους -20°C	HPLC/UV-Vis DAD	0,5 ml/min	A: υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 0,15% v/v B: 0,1% οξικό οξύ σε ακετονιτρίλιο	C18 αντίστροφη φάση στήλη (5μm, 150mm x 4,6mm)	Ρουτίνη, λουτεολίνη, κερκετίνη, απιγενίνη, λουτεολίνη-4'-Ο-γλυκοσίδης, απιγενίνη-7-Ο-γλυκοσίδης	[82]
Αποξηραμένα άνθη μετατράπηκαν σε λεπτή σκόνη και κοσκινίστηκαν. Εκχύλιση με MeOH, υπέρηχοι, φιλτράρισμα υπό κενό αέρος, και διατήρηση στους 4°C	LC-UV/MS	0,2 ml/min	A: 0,1% φορμικό οξύ B: MeOH με 0,1% φορμικό οξύ	250x2.0mm ODS-VP C18, 5μm στήλη	36 φαινολικές ενώσεις μεταξύ των οποίων η κερκετίνη, η κερσιτρίνη, γαλλικό οξύ, γλυκοσίδες της καμφερόλης	[6]
Εκχύλιση με μείγμα νερού/αιθανόλης/γλυκερόλης, φυγοκέντριση, αραιώση σε 1:2 v/v οξιμισμένο νερό/αιθανόλη/γλυκερόλη σε αναλογία 1:1:1	HPLC-DAD-MS	0,4 ml/min	A: οξιμισμένο νερό με φορμικό οξύ B: ακετονιτρίλιο	Poroshell 120 EC-C1, 3x150mm, 2.7μm (Aligent Technologies)	33 φαινολικές ενώσεις μεταξύ των οποίων γλυκοσίδες της καμφερόλης, της κερκετίνης, γαλακτοσίδες της κερκετίνης κ.α.	[107]
Υδατικό διάλυμα 70% EtOH, υπέρηχοι	UPLC-PAD	0,25 ml/min	A: 0,1% φορμικό οξύ B: ακετονιτρίλιο	X Bridge BEH Shield RP C18 (2.5μm, 2.1mm x 100mm) στήλη	28 φαινολικές ενώσεις μεταξύ των οποίων οξέα, γλυκοσίδες κ.α.	[108]

Πίνακας 3 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.3 Βασικές Αρχές Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC)

1.3.1 Υγροχρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Ως χρωματογραφικές τεχνικές ορίζονται οι τεχνικές ανάλυσης και διαχωρισμού ουσιών που υπάρχουν σε μείγματα. Τα μείγματα αυτά μπορεί να είναι από εκχυλίσματα ανθέων μέχρι καλλυντικά προϊόντα και φάρμακα. Η ταξινόμηση των χρωματογραφικών μεθόδων μπορεί να γίνει ανάλογα με τη φύση των φάσεων, με το φαινόμενο που λαμβάνει χώρα, με τον τρόπο λειτουργίας της χρωματογραφικής στήλης και με το είδος μετακίνησης της κινητής φάσης.

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), αποτελεί μία αναλυτική τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ενώσεων και το διαχωρισμό ουσιών μειγμάτων. Η ταχύτητα που παρουσιάζει η τεχνική αυτή, το ευρύ φάσμα στο οποίο μπορεί να εφαρμοστεί καθώς και η απόδοσή της την καθιστούν ένα εξαιρετικά χρήσιμο και επιλέξιμο εργαλείο για ποιοτική ανάλυση και ποσοτικό προσδιορισμό. Όλα τα παραπάνω την κάνουν τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική, σύμφωνα με την οποία επιτυγχάνεται διαχωρισμός μείγματος ουσιών με βάση τη διαφορά κατανομής των ενώσεων μεταξύ δύο φάσεων μη μειγνυόμενων μεταξύ τους, εκ των οποίων η μία είναι στατική και η άλλη είναι κινητή.

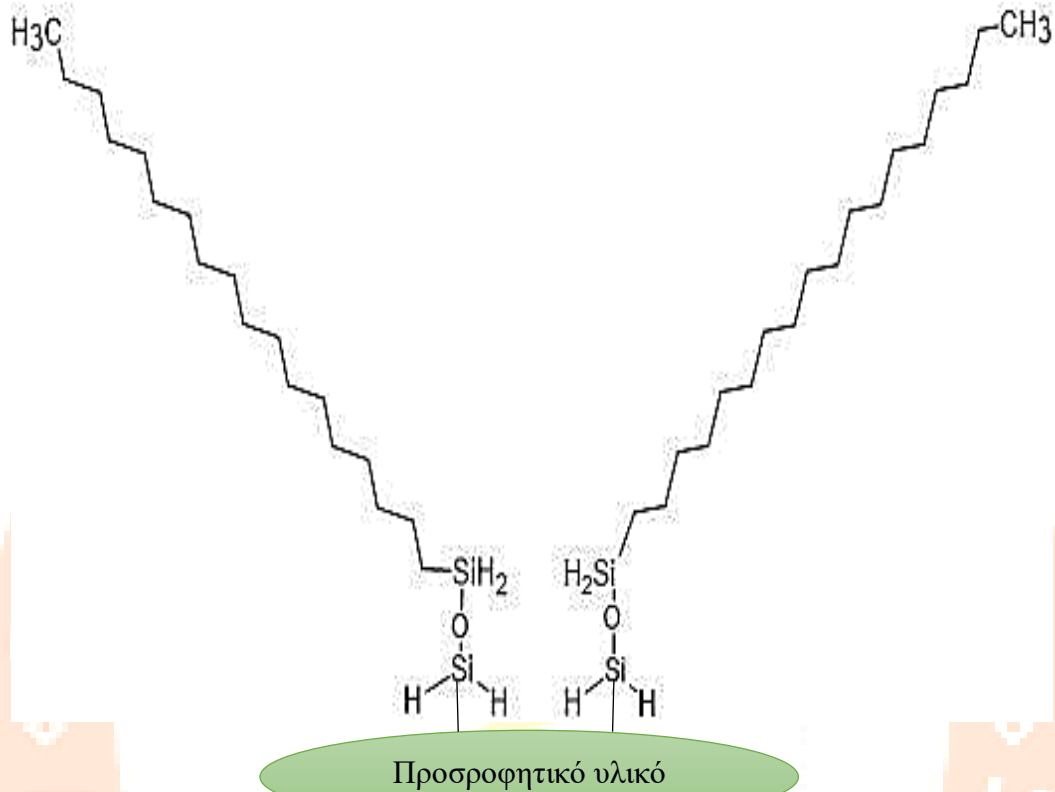
Η κατάσταση της ύλης των δύο αυτών φάσεων ποικίλει ανάλογα με το διαχωρισμό που θέλουμε να πετύχουμε και το όργανο που διαθέτουμε. Στην περίπτωση της υγροχρωματογραφίας οι φάσεις μπορεί να είναι: υγρό-υγρό ή υγρό-στερεό. Ωστόσο προϋπόθεση για να έχουμε υγροχρωματογραφία είναι η κινητή φάση να είναι υγρή, και η στατική φάση, ή αλλιώς πληρωτικό, μπορεί να είναι υγρό ή στερεό. Ο διαχωρισμός των ενώσεων ανεξάρτητα με τη φύση των δύο φάσεων γίνεται ανάλογα με την ταχύτητα μετακίνησης των ενώσεων μέσα στο σύστημα των δύο μη μειγνυόμενων φάσεων. Η ταχύτητα αυτή εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις και τις σχέσεις που δημιουργούνται μεταξύ των συστατικών που θέλουμε να αναλύσουμε και των δύο φάσεων (κινητής και στατικής). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εξαρτώνται από τη χημική δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών (ενώσεις που θέλουμε να προσδιορίσουμε), της κινητής και της στατικής φάσης.

1.3.2 Χρωματογραφία κατανομής (στήλη κατανομής)

Σε αυτόν τον τύπο χρωματογραφίας η στατική φάση (πληρωτικό υλικό) είναι υγρή και βρίσκεται πάνω σε ένα στερεό υλικό στήριξης (πηκτή SiO_2) και η κινητή φάση είναι υγρή. Επομένως οι χημικές ενώσεις που αναλύονται, κατανέμονται ανάμεσα σε δύο υγρές φάσεις. Ο τύπος αυτός χωρίζεται σε δύο κατηγορίες:

- i. Τη χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης: όπου η κινητή φάση είναι χαμηλότερης πολικότητας (επτάνιο, οκτάνιο) και η στατική φάση είναι μεγαλύτερης πολικότητας (πηκτή διοξειδίου πυριτία/ SiO_2) και άρα οι αναλύτες εκλύονται με σειρά αυξανόμενης πολικότητας, δηλαδή πρώτα εκλύονται οι λιγότερο πολικές ενώσεις.
- ii. Τη χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης: όπου η κινητή φάση είναι μεγαλύτερης πολικότητας (μεθανόλη, αιθανόλη, υδατικά διαλύματα αυτών, σκέτο νερό κ.α.) και η στατική φάση είναι χαμηλότερης πολικότητας (πηκτή

διοξειδίου πυριτία με συζευγμένες ομάδες όπως C18, C8, Ph, NH₂ κ.α.) και άρα οι προς ανάλυση ενώσεις εκλούνται με σειρά μειούμενης πολικότητας, δηλαδή πρώτα εκλούνται οι περισσότερο πολικές ενώσεις.



Εικόνα 19 Διοξείδιο του πυριτίου με δεκαοκταλκή ανθρακική αλυσίδα στη στατική φάση

Έτσι, καθώς η κινητή φάση παρασύρει τους αναλύτες μέσα στη χρωματογραφική στήλη τους φέρνει σε επαφή με τη στατική φάση. Σε αυτό το σημείο αναπτύσσονται χημικοί δεσμοί και ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των αναλυτών και των δύο φάσεων. Οι ενώσεις που παρουσιάζουν μεγαλύτερη σχέση με τη στατική φάση είναι και αυτές που θα εκλουστούν αργότερα διότι προσροφώνται στα σωματίδια του πληρωτικού υλικού και καθώς ρέει η κινητή φάση γίνεται η εκρόφησή τους ώστε να εκλουστούν. Επομένως, πρώτα εκλούνται οι αναλύτες που παρουσιάζουν μεγαλύτερη σχέση με την κινητή φάση.

1.3.3 Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας

- Φιάλες διαλυτών
- Θάλαμος ανάμειξης διαλυτών
- Απαερωτές
- Αντλία (υψηλής πίεσης)
- Βαλβίδα έγχυσης
- Βρόγχος
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτής
- Υπολογιστικό σύστημα καταγραφής δεδομένων
- Δοχείο αποβλήτων



Εικόνα 20 Small Footprint HPLC, 1220 Infinity II LC System, Agilent

Περιγραφή μίας χρωματογραφικής ανάλυσης

Στα δοχεία υποδοχής διαλυτών είναι αποθηκευμένοι οι διαλύτες που αποτελούν το υγρό έκλυσης δηλαδή την κινητή φάση. Η αντλία φροντίζει να τραβήξει με συγκεκριμένη ροή το υγρό από τα δύο δοχεία. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η υψηλή καθαρότητα του υγρού έκλυσης και γι' αυτό το υγρό φιλτράρεται για να απομακρυνθούν τυχόν σωματίδια και απαερώνεται για να μην αυξηθεί πολύ η πίεση εντός της χρωματογραφικής στήλης (διήθηση υπό κενό με ειδικά φίλτρα). Παράλληλα υπάρχει και ο θάλαμος ανάμειξης των διαλυτών όπου τα υγρά από τα δύο δοχεία Α και Β γίνονται ένα. Η αντλία που τραβάει την κινητή φάση την κατευθύνει στο σύστημα εισαγωγής δείγματος και στο βρόγχο όπου με την περιστροφή και το άνοιγμα της βαλβίδας η κινητή φάση περνάει διαμέσου του βρόγχου και παρασύρει το δείγμα

κατευθύνοντάς το στη χρωματογραφική στήλη όπου βρίσκεται η στατική φάση. Σε αυτό το σημείο πρέπει να ειπωθεί ότι πριν το άνοιγμα της βαλβίδας και της διάθεσης του δείγματος προς ανάλυση η κινητή φάση για τουλάχιστον 30' ρέει συνεχώς μέσα από τη χρωματογραφική στήλη με σκοπό να εξισορροπήσει η κινητή φάση με τη στατική και να μην καταγράφεται μέτρηση στο σύστημα καταγραφής. Φτάνοντας το δείγμα παρασυρόμενο από την κινητή φάση στην χρωματογραφική στήλη, γίνεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός βάσει των ηλεκτροστατικών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ των αναλυτών και του πληρωτικού υλικού και εκλύονται διαχωρισμένες οι ενώσεις του δείγματος. Με τη διέλευσή τους από την αναλυτική στήλη, διαχωρισμένα συστατικά περνούν από τον ανιχνευτή του συστήματος, και καταλήγουν στη συνέχεια στο δοχείο αποβλήτων.

Ένα χρωματογράφημα δίνει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες, δηλαδή μέσω αυτού ταυτοποιούνται χημικές ενώσεις καθώς και υπολογίζεται η ποσότητά τους στο δείγμα που αναλύεται.

Σύστημα παροχής κινητής φάσης, μπορεί να είναι δύο κατηγοριών:

- i. Ισοκρατικής έκλουσης (Isocratic elution): όπου η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή σε όλη την διάρκεια του χρωματογραφήματος.
- ii. Βαθμιδωτής έκλουσης (Gradient elution): όπου η σύσταση της κινητής φάσης αλλάζει βαθμιδωτά και κατά τακτά χρονικά διαστήματα όπως έχει οριστεί από το υπολογιστικό σύστημα.

1.3.4 Ανιχνευτής UV

Οι ανιχνευτές είναι πολύ σημαντικά όργανα στην HPLC αφού μέσω αυτών γίνεται ορατός ο διαχωρισμός που πραγματοποιείται στη χρωματογραφική στήλη και έτσι γίνεται η αξιοποίησή του στην ανάλυση. Υπάρχουν διάφοροι ανιχνευτές όπως ο UV/Vis, Φθορισμόμετρο, Διαθλασίμετρο, Ηλεκτροχημικός, Σκεδασμού ακτινοβολίας, Αγωγιμότητας, Φασματόμετρο μαζών.

Ειδικότερα, υπάρχουν δύο τύποι ανιχνευτών UV:

- A. Ο Ανιχνευτής UV/Vis ενός μήκους κύματος. Σε αυτόν τον τύπο ανιχνευτή ορίζεται ένα συγκεκριμένο μήκος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας η οποία θα ακτινοβολεί τις διερχόμενες χημικές ενώσεις.
- B. Ο Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων DAD/PDA. Αυτός ο τύπος ανιχνευτή UV είναι προηγμένης τεχνολογίας, διότι δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης της απορρόφησης των χημικών ενώσεων, σε όλο το εύρος της περιοχής UV. Αυτό το γεγονός δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης πολύπλοκων συστημάτων, δειγμάτων που περιέχουν ενώσεις με διαφορετικές περιοχές απορρόφησης καθώς και μειγμάτων που οι κορυφές τους αλληλοκαλύπτονται χρωματογραφικά αλλά μπορούν να διαχωριστούν βάσει της απορρόφησης στην UV περιοχή.

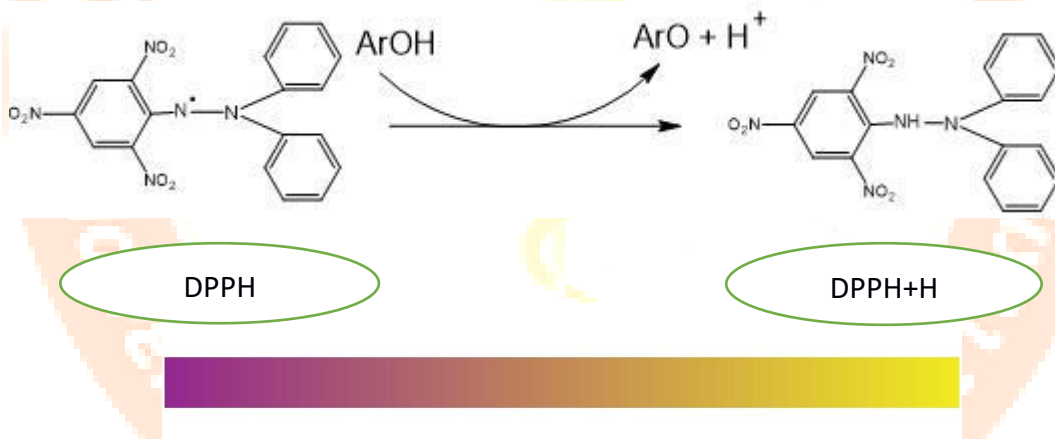
1.4 Μέθοδος DPPH·

1.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος DPPH· ή αλλιώς 2,2 -διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζίνη·, είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης, *in vitro*, συστατικών μετρώντας την ικανότητά τους στη δέσμευση ελευθέρων ριζών. Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά απλή στην εφαρμογή της και γι' αυτό χρησιμοποιείται κατά κόρον για την υποστήριξη ισχυρισμών και την απόδειξη της αντιοξειδωτικής δράσης συστατικών όπως είναι για παράδειγμα τα κοσμητικά συστατικά. Βασίζεται στο φασματομετρικό προσδιορισμό της μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου (HAT), από το υπό εξέταση αντιοξειδωτικό στην ρίζα DPPH·.

1.4.2 Λειτουργία της μεθόδου

Η ρίζα DPPH· βρίσκεται σε αλκοολικό διάλυμα (πχ. μεθανολικό, αιθανολικό) το οποίο παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο μήκος απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας $\lambda=515-520\text{nm}$. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται το αντιοξειδωτικό, το οποίο και αλληλεπιδρά με την DPPH· και μεταφέροντας άτομο υδρογόνου στην ρίζα την ανάγει. Λαμβάνεται εκ νέου η απορρόφηση η οποία πλέον με την αναγωγή της DPPH· έχει μεταβληθεί σε $\lambda=515-520\text{nm}$. Εκτός της απορρόφησης έχει μεταβληθεί και το αρχικό χρώμα του διαλύματος σε απαλό κίτρινο.



Εικόνα 21 Αναγωγή της DPPH·

Χρήσιμα δεδομένα είναι ότι η μέθοδος DPPH· ενδείκνυται για φαινολικά παράγωγα, μπορούν να αξιολογηθούν αντιοξειδωτικές ενώσεις που δύναται να υπάρξουν σε αλκοολικό διάλυμα, η μέθοδος επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (πχ. φως, οξυγόνο, pH) και στην περίπτωση που πρόκειται να χαρακτηριστεί κάποιο συστατικό τελικού προϊόντος θα πρέπει να γίνει καλή απομάκρυνση όλων των υπόλοιπων ουσιών πριν την εφαρμογή της μεθόδου.

1.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη γραφική αναπαράστασή τους χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης μίας κατεύθυνσης ANOVA και θυκόγραμμα.

1.5.1 Ανάλυση διακύμανσης μίας κατεύθυνσης (ANOVA)

Η εφαρμογή της δοκιμασίας στατιστικής ανάλυσης ANOVA έχει σκοπό να ελεγχθούν οι διαφορές μιας εξαρτημένης μεταβλητής μεταξύ τριών ή και περισσότερων δειγματοληπτικών μέσων τιμών. Η υπόθεση H_0 (μηδενική υπόθεση) είναι ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών π.χ. $\mu_1=\mu_2=\mu_3$, ενώ η υπόθεση H_1 (εναλλακτική υπόθεση), ότι υπάρχει διαφορά στις μέσες τιμές των μετρήσεων ή τουλάχιστον σε μία από αυτές π.χ. $\mu_1\neq\mu_2$, $\mu_1\neq\mu_3$, $\mu_2\neq\mu_3$, δεν ισχύει.

Για να μπορέσουμε να διαπιστώσουμε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα ή όχι, θα συγκρίνουμε την τιμή p και το επίπεδο σημαντικότητας α .

Κατά κύριο λόγο η τιμή α (επίπεδο σημαντικότητας) που επιλέγεται είναι $\alpha=0,05$. Αυτό μεταφράζεται ως το ότι υπάρχει 5% πιθανότητα να καταλήξουμε πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματά μας ενώ αυτή δεν υπάρχει. Στη συνέχεια η τιμή p που θα προκύψει από την στατιστική δοκιμασία θα συγκριθεί με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α . Σε περίπτωση που είναι μεγαλύτερη αυτό σημαίνει πως δεν μπορούμε να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση H_0 και άρα οι πληθυσμοί δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ αντίθετα αν είναι μικρότερη σημαίνει πως απορρίπτουμε τη μηδενική υπόθεση H_0 και επομένως οι πληθυσμοί έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

1.5.2 Post-hoc ανάλυση, Tukey's Test

Παρότι η δοκιμασία στατιστικής ανάλυσης ANOVA είναι ιδιαίτερα χρήσιμη παραμετρική προσέγγιση για την ανάλυση κατανεμημένων δεδομένων με περισσότερες από δύο ομάδες, δεν παρέχει αναλυτικές πληροφορίες για μοτίβα ή συγκρίσεις μεταξύ συγκεκριμένων ομάδων, ώστε να διαπιστώσουμε που υπάρχουν οι στατιστικές διαφορές. Ύστερα λοιπόν από ένα τεστ στο οποίο εξετάζονται όλες οι μεταβλητές μαζί, αν διαπιστωθεί ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, συνήθίζεται να πραγματοποιείται η δοκιμασία 'post-hoc ανάλυση' στην οποία μελετώνται συγκεκριμένες ομάδες, ώστε να διαπιστωθεί αν είναι στατιστικά όμοιες ή διαφορετικές. Μία αρκετά συνήθης μέθοδος post-hoc ανάλυσης είναι το Tukey's Test, το οποίο συγκρίνει τους μέσους όρους όλων των θεραπειών με τον μέσο όρο κάθε άλλης θεραπείας.

2 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και ο σχεδιασμός της επικύρωσης μίας νέας αναλυτικής μεθόδου που θα επιτρέπει το γρήγορο και αξιόπιστο ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό της φαινολικής ένωσης κερσιτρίνης σε δείγματα από πέταλα τριαντάφυλλων έξι διαφορετικών γονότυπων με την τεχνική της Υγροχρωματογραφίας υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματοσκοπία υπεριώδους (HPLC/UV). Για τον σκοπό αυτό ύστερα από την βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών ακολούθησε σχέδιο επικύρωσης της νέας αναλυτικής μεθόδου στο πλαίσιο του οποίου εξετάστηκε η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα, η ευαισθησία, γραμμικότητα και ανάκτηση. Επίσης πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του κάθε γονότυπου με την in vitro μέθοδο DPPH.

Στόχος μέσα από την ανάλυση αυτή είναι να προσδιοριστούν οι διαφορές των γονότυπων τόσο ως προς τα ποσοστά περιεκτικότητάς τους σε κερσιτρίνη, όσο και ως προς την ολική αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματός τους. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συγκριτική αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του κάθε γονότυπου, με σκοπό την περαιτέρω εφαρμογή τους μεταξύ άλλων και σε καλλυντικά προϊόντα.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Οργανολογία – Εξοπλισμός – Αντιδραστήρια

3.1.1 Οργανολογία

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων των τριαντάφυλλων χρησιμοποιήθηκε σύστημα Υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης με ανιχνευτή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο μήκος κύματος του υπεριώδους HPLC/UV, αποτελούμενο από τα εξής τμήματα:

- i. Αντλία με μονάδα απαέρωσης δύο καναλιών για την κινητή φάση.
- ii. Σύστημα εισαγωγής δείγματος.
- iii. Αναλυτική στήλη CC 125/4.6 Kromasil C18, 5μm MACHEREY – NAGEL (Dueren, Germany)
- iv. Ανιχνευτής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους ενός μήκους κύματος.

3.1.2 Εξοπλισμός

- i. Συσκευή ανάδευσης: Heiddph Reax top
- ii. Ζυγός: Kern ABJ (Kern & Sohn GmbH)
- iii. Φυγόκεντρος: SIGMA 3-18K Laborzentrifugen
- iv. Συσκευή παραγωγής υπερήχων: mcr Laboratory Equipment MODEL: DC – 150 H
- v. DPPH: Thermo ELECTRON CORPORATION, NICOLET evolution 100
- vi. Συσκευή λυοφιλίωσης: cool vacuum TECHNOLOGIES
- vii. Πιπέτες των 100-1000μl και 10-100μl Optipette
- viii. Eppendorf 2ml, 1,5ml

3.1.3 Αντιδραστήρια

- i. Μεθανόλη: METHANOL for HPLC (LAB – SCAN analytical sciences)
- ii. Ακετονιτρίλιο: Acetonitrile for UV, IR, HPLC, ACS (PanReac AppliChem)
- iii. Αιθανόλη: Ethanol Absolute, analytical grade, ACS, Reag. Ph Eur (Scharlau)
- iv. Οξικό οξύ: Acetic acid glacial ACS – for analysis Reag. Ph Eur (CARIO ERRA)
- v. Πρότυπη κερσιτρίνη πιστοποιημένης καθαρότητας >99% SIGMA Analytical grade
- vi. Πρότυπη DPPH, Sigma – Aldrich (Steinheim, Germany), 2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
- vii. Υπερκάθαρο νερό: ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. HYDROLAB R10 UF

3.2 Σχέδιο πειραματικής μελέτης

Η διαδικασία ανάπτυξης μίας αναλυτικής μεθόδου είναι μία διαδικασία δύσκολη καθώς και εξαιρετικά προκλητική. Η μετέπειτα επικύρωσή της είναι ιδιαίτερα σημαντική και καθοριστική για την απόδειξη ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα. Η αρχή για την ανάπτυξη μίας μεθόδου συνήθως βασίζεται σε βιβλιογραφικά δεδομένα, τα οποία επεξεργάζονται από τους ειδικούς αρκετές φορές, για να προσαρμοστούν και για να διαμορφωθούν όπως αρμόζει με σκοπό την ανάπτυξη μίας νέας αναλυτικής μεθόδου η οποία θα εκπληρώνει το σκοπό για τον οποίο σχεδιάστηκε εξ αρχής. Η δυσκολία έγκειται στο γεγονός ότι πλήθος παραμέτρων πρέπει να ληφθούν υπόψη για να αναπτυχθεί μία μέθοδος η οποία κατά την διάρκεια των διαδικασιών επικύρωσης δεν θα παρουσιάζει έντονα προβλήματα. Κατά την διαδικασία επεξεργασίας της νέας μεθόδου σημαντικό σκέλος είναι και η όσο το δυνατόν βελτιστοποίησή της, η οποία στοχεύει στην εύρεση όλων των πειραματικών συνθηκών οι οποίες καθιστούν την αναλυτική μέθοδο ικανή να έχει τη βέλτιστη ανταπόκριση. Η ανταπόκριση έγκειται σε όλα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που συνοδεύουν την ανάλυση και επιτυγχάνεται με την προσεκτική εξέταση και μελέτη της αλληλεπίδρασης όλων των πειραματικών συνθηκών στο διαχωρισμό και την ανίχνευση των συστατικών του υπό μελέτη δείγματος. Αρκεί μία και μόνο μικρή αλλαγή κάποιου παράγοντα ή συνθήκης για να θεωρηθεί μία μέθοδος διαφορετική από την αρχική. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας που εξετάζονται κατά την επικύρωση μίας αναλυτικής μεθόδου είναι τα εξής:

- Ακρίβεια
- Πιστότητα
- Ανάκτηση
- Ειδικότητα
- Ευαισθησία
- Γραμμικότητα
- Όριο ανίχνευσης
- Επαναληψιμότητα
- Αναπαραγωγιμότητα
- Όριο ποσοτικοποίησης

3.2.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου HPLC/UV

3.2.1.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα της προς ανάλυση ένωσης, κερσιτρίνης, με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς. Ειδικότερα, τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από πρότυπη ένωση κερσιτρίνης σε μορφή σκόνης. Ζυγίστηκε κατάλληλη ποσότητα πρότυπης ουσίας η οποία διαλύθηκε στον απαιτούμενο όγκο διαλύτη (MeOH) και προέκυψε πυκνό διάλυμα των 1000 μl/mL (stock solution). Από αυτό το διάλυμα και με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν όλα τα πρότυπα διαλύματα κερσιτρίνης.

Πίνακας 4 Πρότυπα διαλύματα κερσιτρίνης (STD Quercitrin)

Πρότυπο διάλυμα Κερσιτρίνης (STD Quercitrin)	Διαλύτης	Συγκέντρωση μl/mL
STD ₁	MeOH	2 ppm
STD ₂	MeOH	4 ppm
STD ₃	MeOH	6 ppm
STD ₄	MeOH	8 ppm
STD ₅	MeOH	10 ppm
STD ₆	MeOH	20 ppm
STD ₇	MeOH	30 ppm
STD ₈	MeOH	40 ppm
STD ₉	MeOH	50 ppm

3.2.1.2 Επιλογή αναλυτικής στήλης

Η στήλη που επιλέχθηκε για την ανάλυση της κερσιτρίνης ήταν η CC 125/4.6 Kromasil C18, 5μm Macherey – Nagel (Dueren, Germany), αντίστροφης φάσης. Η στήλη στην αρχή των αναλύσεων εξισορροπούσε για 30 λεπτά με την κινητή φάση σε αναλογία A: 85% B:15%, ώστε κατά την ανάλυση να δίνει σήμα μόνο στο αναλύτη.

3.2.1.3 Επιλογή κινητής φάσης

Η επιλογή κινητής φάσης είναι ακόμη ένας καθοριστικός παράγοντας για την ανάλυση της κερσιτρίνης και τον καλύτερο χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων των υπό εξέταση διαλυμάτων. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών, ένας εκ των οποίων ήταν το υπερκάθαρο νερό και ο δεύτερος αρχικά ήταν η μεθανόλη, όμως τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά και έτσι εν τέλει χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο. Οι δύο διαλύτες με συνθήκες βαθμιδωτής έκλυσης λαμβάνονταν μέσω της αντλίας, έφταναν στο θάλαμο ανάδευσης και απαέρωσης διαλυτών και στην συνέχεια διοχετεύονταν στο σύστημα. Στο νερό προστέθηκε οξικό οξύ με στόχο την καλύτερη απόδοση των χρωματογραφικών κορυφών· οξειών και συμμετρικών. Επομένως η κινητή φάση στην παρούσα εργασία αποτελείται από το διαφασικό σύστημα A: 0,2% CH₃COOH (aq) και B: ACN.

3.2.1.4 Χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν

Οι χρωματογραφικές συνθήκες, που επιλέχθηκαν σε αυτή τη μέθοδο ανάλυσης εκχυλισμάτων από πέταλα τριαντάφυλλων για τον προσδιορισμό της κερσιτρίνης, όπως τελικά κατέληξαν να διαμορφωθούν συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5 Χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου που επιλέχθηκε.

Διαλύτες κινητής φάσης	A: 0,2% CH ₃ COOH (aq) και B: ACN
Αναλυτική στήλη	CC 125/4.6 Kromasil C18, 5μm Macherey – Nagel
Θερμοκρασία στήλης	35° C
Ταχύτητα ροής	1 ml/min
Όγκος έγχυσης δείγματος	20 μL
Διάρκεια χρωματογραφήματος	15'
Μήκος κύματος ανιχνευτή UV	360 nm

3.2.1.5 Επιλογή προγράμματος έκλουσης

Κατά την διάρκεια ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμάστηκαν αρκετά συστήματα έκλουσης ένα από τα οποία ήταν και αυτό που τελικά επιλέχθηκε χάρη στο σύντομο χρόνο στον οποίο επιτυγχάνεται πολύ καλός διαχωρισμός των ενώσεων των δειγμάτων.

Πίνακας 6 Το πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε.

Χρόνος (min.)	A%	B%	Ροή ml/min
0'	85	15	1 ml/min
10'	70	30	1 ml/min
15'	65	35	1 ml/min

3.2.1.6 Επιλογή διαλύτη εκχύλισης των τριαντάφυλλων

Η προκατεργασία του προς ανάλυση προϊόντος είναι μεγάλης σημασίας και είναι μία διαδικασία η οποία στοχεύει στην τροποποίηση υποστρώματος του δείγματος με σκοπό αυτό να προετοιμαστεί για την ανάλυση. Με την εκχύλιση λοιπόν παραλαμβάνουμε τα συστατικά των τριαντάφυλλων μεταξύ των οποίων είναι και η υπό ανάλυση φαινολική ένωση κερσιτρίνη. Για να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης εκχύλισης εξετάστηκε η ανάκτηση. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν 10 δείγματα Spike και 10 δείγματα Control. Τα δείγματα είχαν 35mg ένα μίγμα όλων των γονότυπων. Δοκιμάστηκαν διάφοροι αναλύτες και σε διαφορετικές αναλογίες όπως παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 7 Δοκιμαστικοί συνδυασμοί διαλυτών για την εκχύλιση των τριαντάφυλλων

Sample	MeOH	EtOH	Isopropanol	Acetone	H ₂ O
1/1S	1000μl				
2/2S		1000μl			
3/3S	500μl				500μl
4/4S		500μl			500μl
5/5S			500μl		500μl
6/6S				500μl	500μl
7/7S	800μl				200μl
8/8S		800μl			200μl
9/9S			800μl		200μl
10/10S				800μl	200μl

Την καλύτερη ανάκτηση και απόδοση κορυφών την έδωσε η αναλογία H₂O + EtOH – 50 : 50 η οποία και επιλέχθηκε για τις εκχυλίσεις των πετάλων.

3.2.1.7 Προ-κατεργασία δειγμάτων τριαντάφυλλων

Τα τριαντάφυλλα που επιλέχθηκαν ήταν έξι διαφορετικών γονότυπων από την Ελλάδα. Συγκεκριμένα από τους έξι γονότυπους οι 16-5-8-2 και 16-5-9-1 ανήκουν στην ποικιλία της Δαμασκηνής τριανταφυλλιάς (*Rosa damascena*), ενώ οι υπόλοιπες 16-5-3-2, 16-5-2-1, 16-5-1-1 είναι συνεχούς ανθοφορίας, ενώ για την 16-5-13-1 δεν έχουμε αρκετά δεδομένα. Παραλήφθηκαν τα πέταλα από το κάθε λουλούδι τα οποία στην συνέχεια λυοφιλιώθηκαν στους -80°C. Τα λυοφιλωμένα πέταλα στην συνέχεια έγιναν σκόνη και διατηρήθηκαν μέχρι την εκχύλισή τους στην κατάψυξη στους -20°C. Ο κάθε ένας γονότυπος επεξεργάστηκε και αναλύθηκε ξεχωριστά. Ζυγίστηκε συγκεκριμένη ποσότητα από τον κάθε ένα γονότυπο βάρους 0,01gr σε erpendorf και προστέθηκε 2ml διαλύτη αναλογίας H₂O : EtOH / 50:50. Παρασκευάστηκαν έξι διαλύματα για τον κάθε γονότυπο. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 1 λεπτό και στη συνέχεια τα δείγματα παρέμειναν σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά, στους οποίους η ελάχιστη θερμοκρασία ξεκίνησε από 21°C και έφτασε μέχρι τους 30°C, με σκοπό την καλύτερη εκχύλισή τους. Τέλος, με τη λήξη του προγράμματος των υπερήχων τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 10.000 στροφές. Με πουάρ μεταφέρθηκε ποσότητα εκχυλίσματος σε νέο erpendorf. Τα δείγματα ήταν έτοιμα για ανάλυση.

3.2.2 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου HPLC/UV

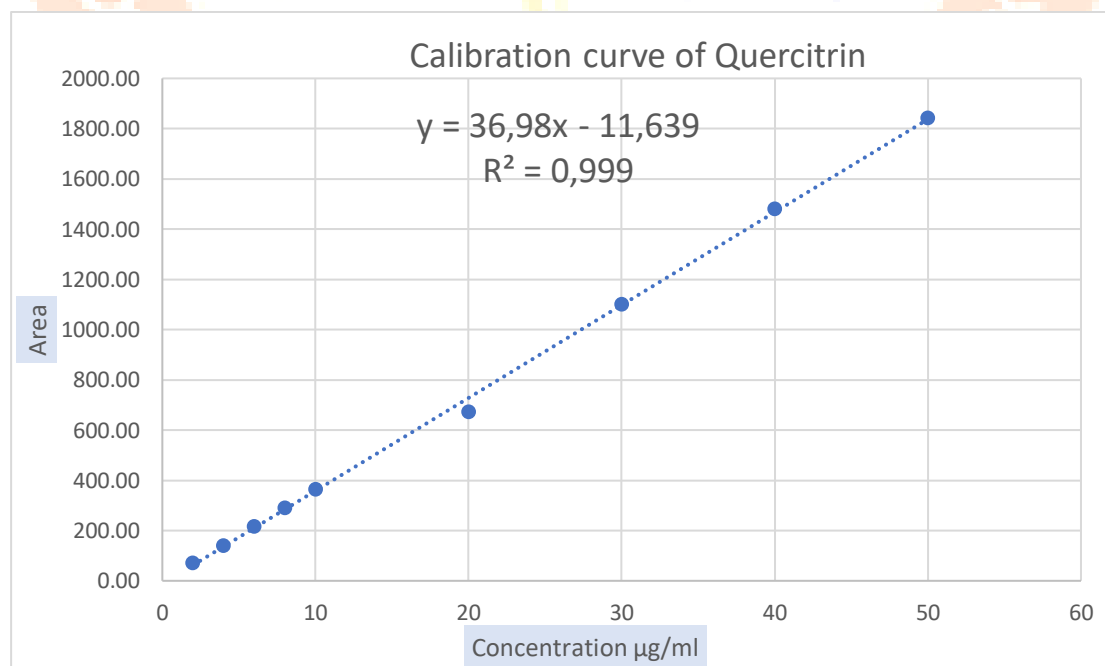
Η επικύρωση μίας νέας αναλυτικής μεθόδου περιλαμβάνει μία σειρά τυποποιημένων διαδικασιών και αριθμητικών πράξεων με σκοπό, μέσω των αποτελεσμάτων που προκύπτουν, να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία της μεθόδου που αναπτύχθηκε· επικυρώνοντας ταυτόχρονα και τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από την ανάλυση. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε ελέγχθηκε ως προς την επαναληψιμότητα, τη γραμμικότητα, την ανάκτηση, την ακρίβεια και την ευαισθησία.

3.2.2.1 Καμπύλη παλινδρόμησης

Κατασκευάστηκε μία καμπύλη παλινδρόμησης, η οποία προέκυψε από τα εννέα πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (STD: 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm). Για την κατασκευή της βασικής καμπύλης αναφοράς αναλύθηκαν την ίδια μέρα από μία φορά όλα τα πρότυπα δείγματα. Ωστόσο οι συγκεντρώσεις 2 ppm, 10 ppm και 20 ppm αναλύθηκαν από δύο φορές επιπλέον η κάθε μία, τρεις μέρες μετά την ανάλυση των υπολοίπων. Η δεύτερη σειρά μετρήσεων είχε ως στόχο την εξαγωγή τιμών που θα αναλυθούν παρακάτω αλλά ταυτόχρονα ήταν ένας επιπλέον τρόπος ώστε να επιβεβαιωθεί η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης της κερσιτρίνης.

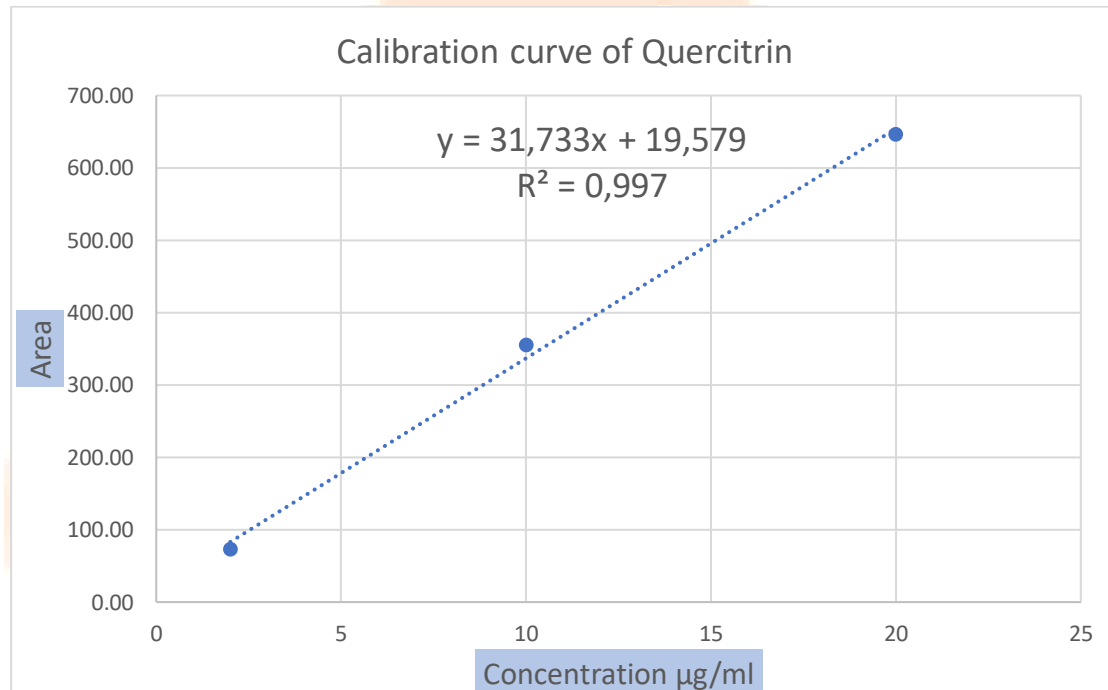
Από την πρώτη ανάλυση των εννέα προτύπων δειγμάτων προέκυψε πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Μετά από λήψη των εμβαδών των κορυφών έγινε γραφική παράσταση, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η εξίσωση της ευθείας ισούται με $y = 36,98x - 11,693$.

Πίνακας 8 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς εννέα προτύπων



Από τη δεύτερη ανάλυση των τριών εκ των εννέα προτύπων, τα οποία αναλύθηκαν συνολικά τρεις φορές, λήφθηκε το εμβαδόν κάθε κορυφής από κάθε ανάλυση για το κάθε πρότυπο και ανά πρότυπο προστέθηκαν οι τρεις μετρήσεις και διαιρέθηκαν διά του τρία με σκοπό να προκύψει μέση τιμή για την κάθε συγκέντρωση. Από τις μέσες τιμές προέκυψε η παρακάτω καμπύλη αναφοράς. Η εξίσωση της ευθείας ισούται με $y = 31,733x + 19,579$.

Πίνακας 9 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς τριών εκ των εννέα προτύπων



3.2.2.2 Επαναληψιμότητα μετρήσεων

Η επαναληψιμότητα (Repeatability) υπολογίστηκε από τα τρία εκ των εννέα πρότυπων δειγμάτων με συγκέντρωση STD₁: 2 ppm, STD₅: 10 ppm και STD₆: 20 ppm. Οι τρεις συνολικά αναλύσεις για την κάθε συγκέντρωση έγιναν σε διάστημα πέντε ημερών, με την πρώτη ανάλυση να γίνεται την ημέρα ένα και τις άλλες δύο την ημέρα πέντε. Σκοπός ήταν να εντοπιστούν οι διακυμάνσεις των αναλύσεων που διεξήχθησαν εντός αυτού του χρονικού διαστήματος κάτω από τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες λειτουργίας. Η παρακάτω σχέση εκφράζει εκατοστιαία την επαναληψιμότητα της μεθόδου:

$$\text{Συντελεστής διακύμανσης (CV\%)} = \frac{\text{Τυπική απόκλιση (SD)}}{\text{Μέσος όρος μετρήσεων}} \times 100$$

Οι τιμές CV% διακυμάνθηκαν από 2,30% μέχρι 3,72% μέσα στις μέρες που πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις. Οι τιμές της επαναληψιμότητας ήταν εντός των αποδεκτών τιμών δεδομένου ότι $CV\% \leq 5\%$. Παρατηρήθηκε πως οι δύο αναλύσεις P2-P3 που πραγματοποιήθηκαν την ημέρα πέντε ήταν εξαιρετικά κοντά μετά από εμβαδομέτρηση. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται αναλυτικά οι τιμές όπως προέκυψαν

μετά από τις αναλύσεις καθώς και ο συντελεστής διακύμανσης για την κάθε συγκέντρωση.

Πίνακας 10 Επαναληψιμότητα των πρότυπων διαλυμάτων κερσιτρίνης

<i>Quercitrin</i>						
Concentration ppm	P1	P2	P3	Average	SD	CV%
2	70,87	74,56	75,30	73,00	2,373	3,251
10	364,42	349,84	350,73	355,00	8,173	2,302
20	673,96	632,36	632,32	646,21	24,029	3,719

3.2.2.3 Ακρίβεια

Ως **ακρίβεια (Accuracy)** σε μία αναλυτική μέθοδο, ορίζεται ο βαθμός συμφωνίας των αποτελεσμάτων που εξάγονται από την μέθοδο αυτή με την πραγματική τιμή ή με μία αποδεκτή ως πραγματική τιμή. Για τον υπολογισμό της ακρίβειας αναλύθηκαν τα τρία εκ των εννέα πρότυπων δειγμάτων με συγκέντρωση STD₁: 2 ppm, STD₅: 10 ppm και STD₆: 20 ppm. Οι τρεις συνολικά αναλύσεις για την κάθε συγκέντρωση έγιναν σε διάστημα πέντε ημερών με την πρώτη ανάλυση να γίνεται την ημέρα ένα και τις άλλες δύο την ημέρα πέντε.

$$\text{Ακρίβεια \%} = \frac{\text{Μέση τιμή}}{\text{Πραγματική τιμή}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ακρίβεια της μεθόδου είναι καλή με τιμές που κυμαίνονται μεταξύ του 80,8% έως 108,7% στις πέντε μέρες που έγιναν οι αναλύσεις και από 84,2% έως 105,7% στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται αναλυτικά οι τιμές των αναλύσεων.

Πίνακας 11 Ακρίβεια των πρότυπων διαλυμάτων κερσιτρίνης

μl/mL	Intra-day						Mean	
	P1		P2		P3		One Repl.	Accuracy %
	One Repl.	Accuracy %	One Repl.	Accuracy %	One Repl.	Accuracy %		
2	1,62	80,8	1,73	86,6	1,76	87,8	1,68	84,2
10	10,87	108,7	10,41	104,1	10,44	104,4	10,57	105,7
20	20,62	103,1	19,31	96,6	19,30	96,5	19,74	98,7

3.2.2.4 Γραμμικότητα

Η **γραμμικότητα (Linearity)** εκφράζει την δυνατότητα να μπορεί να υπολογισθούν άμεσα τα αποτελέσματα των μετρήσεων ή με απλές μετατροπές. Η παράμετρος αυτή μελετήθηκε τόσο στα εννέα πρότυπα διαλύματα για τα οποία έγινε μία ανάλυση όσο και στα τρία εκ των εννέα διαλυμάτων για τα οποία έγιναν τρεις αναλύσεις, με την μέθοδο που αναπτύχθηκε. Τα αποτελέσματα προέκυψαν μέσα από τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων, η οποία αντιστοιχεί στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που δίνεται παρακάτω, όπου y είναι το εμβαδόν κορυφής (peak area), a είναι η κλίση της καμπύλης (slope), x είναι η προσδιοριζόμενη συγκεντρωση στο δείγμα και b είναι η τομή της καμπύλης παλινδρόμησης στον άξονα y (intercept).

$$y = ax + b$$

Η γραμμικότητα εκφράζεται ως R^2 (Correlation Coefficient), ως συντελεστής γραμμικής συσχέτισης που δίνει την απόκλιση τιμών από την καμπύλη παλινδρόμησης. Για να μπορεί μία μέθοδος να χαρακτηρίζεται από καλή γραμμικότητα θα πρέπει οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης να είναι $0,98 \leq R^2 \leq 1$ στις συγκεντρώσεις που αναλύονται.

Η μέθοδος παρουσίασε καλή γραμμικότητα με τον συντελεστή συσχέτισης να είναι $R^2 = 0,999$ για την καμπύλη αναφοράς που αντιστοιχεί στα εννέα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 2 ppm έως και 50 ppm καθώς και $R^2 = 0,996$ για την καμπύλη αναφοράς που αντιστοιχεί στις μέσες τιμές των τριών εκ των εννέα πρότυπων διαλυμάτων με συγκεντρώσεις 2 ppm 10 ppm και 20 ppm.

3.2.2.5 Ευαισθησία

Η **ευαισθησία (Sensitivity)** της μεθόδου εκφράζεται ως η ικανότητά της να παρουσιάζει αξιοπιστία σε μικρές συγκεντρώσεις του υπό ανάλυση συστατικού. Ως μεγέθη χρησιμοποιούνται το όριο ανίχνευσης (LOD, Limit of Detection) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ, Limit of Quantity).

Ως όριο ανίχνευσης ορίζεται το μικρότερο ανιχνεύσιμο σήμα το οποίο δεν μπορεί να είναι μικρότερο από το τριπλάσιο του σήματος του θορύβου. Αν είναι μικρότερο, τότε δεν μπορεί να διακριθεί από το σήμα του θορύβου και θεωρείται θόρυβος. Η σχέση αυτή εκφράζεται μέσα από τη παρακάτω σχέση:

$$LOD = 3 \times \frac{S}{N}$$

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται η χαμηλότερη ποσότητα προς ανάλυση συστατικού πάνω από το θόρυβο βασικής γραμμής, η οποία παρουσιάζει επαναληψιμότητα στις μετρήσεις και μπορεί να προσδιορισθεί ποσοτικά. Για να ισχύει αυτό, η τιμή θα πρέπει να είναι δέκα φορές πάνω από το σήμα του θορύβου αλλιώς δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί. Η σχέση αυτή εκφράζεται μέσα από την παρακάτω σχέση:

$$LOQ = 10 \times \frac{S}{N}$$

Όπου $\frac{S}{N}$ είναι ο λόγος σήμα προς θόρυβος (signal / noise ratio).

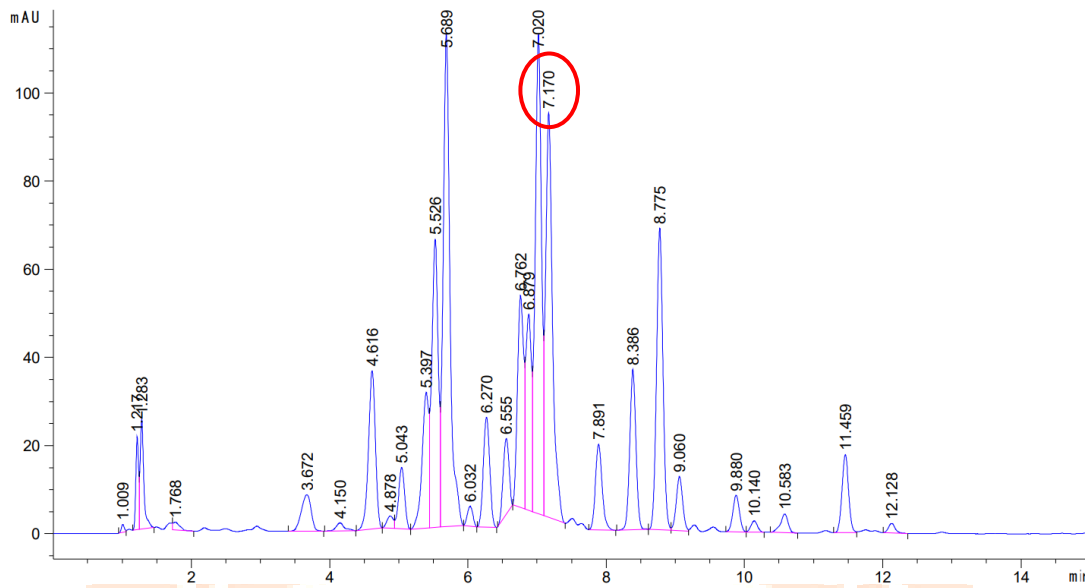
Μέσα από τις παραπάνω σχέσεις προέκυψαν οι τιμές για το όριο ανίχνευσης και για το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου που αναπτύχθηκε, όπου φαίνεται η καλή ευαισθησία της μεθόδου. Λαμβάνοντας τα δεδομένα όπως αυτά προέκυψαν από την καμπύλη αναφοράς των εννέα προτύπων διαλυμάτων, το όριο ανίχνευσης LOD υπολογίστηκε από την εξίσωση $3,3 \times SD - X1/SLOPE$ και βρέθηκε ίσο με 0,04 μl/ml και το όριο ποσοτικοποίησης LOQ υπολογίστηκε αντίστοιχα από την εξίσωση $10 \times SD - X1/SLOPE$ και βρέθηκε ίσο με 0,12 μl/ml. Όπου ο παράγοντας SD-X1 είναι η τυπική απόκλιση της καμπύλης παλινδρόμησης ενώ ο παράγοντας SLOPE αναφέρεται στην κλίση της καμπύλης παλινδρόμησης και στην εξίσωση $y = ax + b$ είναι το **a**.

3.2.2.6 Ανάκτηση

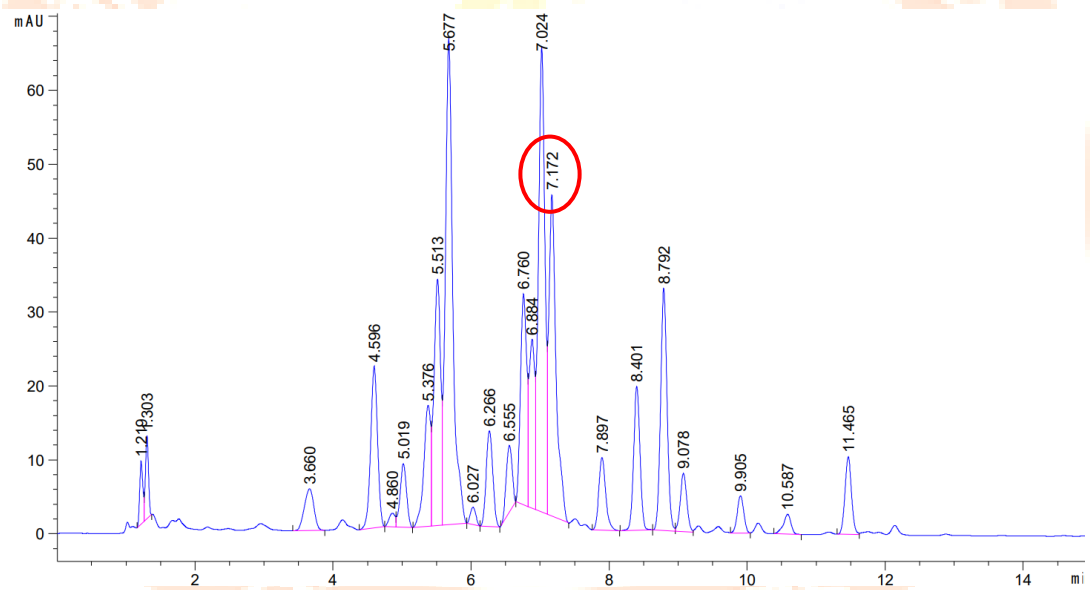
Η **ανάκτηση (Recovery)** σε μία αναλυτική μέθοδο υπολογίζεται μέσα από την σύγκριση δύο δειγμάτων. Το ένα δείγμα εμβολιάστηκε με πρότυπο διάλυμα πριν την εκχύλιση (Spike), ενώ το άλλο δεν εμβολιάστηκε με πρότυπο και είναι προϊόν που προέκυψε ύστερα από απλή εκχύλιση (Control). Συγκεκριμένα για την παρασκευή του Spike και Control δείγματος έγινε συνδυασμός τριών εκ των έξι γονότυπων (επιλέχθηκαν γονότυποι ένας από την κάθε ομάδα για καλύτερα αποτελέσματα) των 16-5-1-1, 16-5-9-1, 16-5-13-1 και ζυγίστηκε ίση ποσότητα πετάλων από τον καθένα γονότυπο βάρους 0,003 gr και τοποθετήθηκαν σε κοινό erpendorf. Το συνολικό βάρος από τις τρεις ζυγίσεις ήταν 0,009. Στη συνέχεια τόσο στο Spike όσο και στο Control προστέθηκε διαλύτης αναλογίας H₂O : EtOH – 50 : 50 και όγκου 1800 μl (1,8ml). Στο Spike δείγμα προστέθηκε, επιπλέον, πρότυπο διάλυμα κερσιτρίνης όγκου 1,8 μl. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 1 λεπτό και στη συνέχεια τα δείγματα παρέμειναν σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά, στους οποίους η ελάχιστη θερμοκρασία ξεκίνησε από 21°C και έφτασε μέχρι τους 30°C, με σκοπό την καλύτερη εκχύλισή τους. Τέλος, με τη λήξη του προγράμματος των υπερήχων τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές. Με πουάρ μεταφέρθηκε ποσότητα εκχυλίσματος σε νέο erpendorf. Τα δείγματα ήταν έτοιμα για ανάλυση. Η ανάκτηση προέκυψε από την παρακάτω εξίσωση, με χρήση του εμβადού των κορυφών.

$$\text{Ανάκτηση} = \frac{\text{Spike} - \text{Control}}{\text{STD } 10\text{ppm}}$$

Η ανάκτηση υπολογίστηκε στο 0,89, γεγονός που υποδηλώνει πως η μέθοδος επιτυγχάνει καλά ποσοστά ανάκτησης δεδομένου πως τα αποδεκτά όρια είναι περίπου από 0,7 έως 1,2.



Εικόνα 22 Spike χρωματογράφημα



Εικόνα 23 Control χρωματογράφημα

3.3 Προσδιορισμός αποτελεσματικότητας

Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος από τα πέταλα των έξι διαφορετικών γονότυπων πραγματοποιήθηκε με την *in vitro* μέθοδο DPPH. Το πρώτο βήμα ήταν να παρασκευαστούν διαλύματα από τα πέταλα τριαντάφυλλων των γονότυπων. Έτσι δημιουργήθηκαν διαλύματα ένα για τον κάθε γονότυπο. Ζυγίστηκε συγκεκριμένη ποσότητα από τον κάθε ένα γονότυπο βάρους 0,01gr σε erpendorf και προστέθηκε 2 ml διαλύτη αναλογίας H₂O : EtOH / 50:50. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 1 λεπτό και ακολούθως τα δείγματα παρέμειναν σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά, στους οποίους η ελάχιστη θερμοκρασία ξεκίνησε από 21°C και έφτασε μέχρι τους 30°C, με σκοπό την καλύτερη εκχύλισή τους. Τέλος, με τη λήξη του προγράμματος των υπερήχων, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές. Με πουάρ μεταφέρθηκε ποσότητα εκχυλίσματος σε νέο erpendorf. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αραιώση των δειγμάτων. Από το αρχικό δείγμα πήραμε 20μl σε νέο erpendorf και προσθέσαμε 480μl MeOH. Τα δείγματα ήταν έτοιμα για ανάλυση.

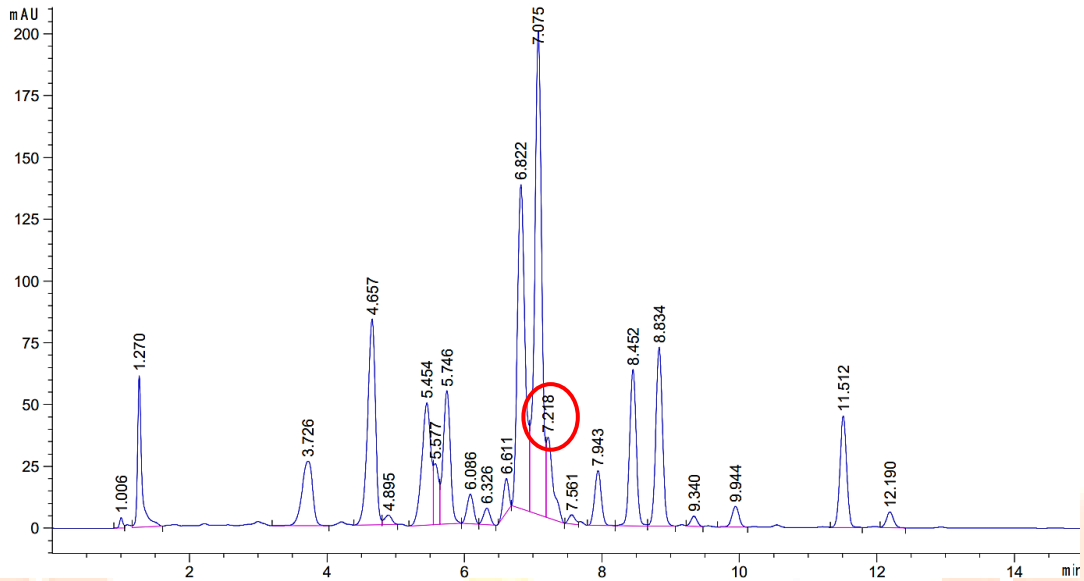
3.3.1 Προετοιμασία DPPH μεθόδου

Η προετοιμασία για την *in vitro* μέθοδο DPPH μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος, ξεκίνησε με την αραιώση των δειγμάτων τριαντάφυλλων όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Έπειτα, παρασκευάστηκε το διάλυμα της ρίζας DPPH. Ζυγίστηκε, σε ογκομετρικό σωλήνα των 100ml, πρότυπη ένωση DPPH σε μορφή σκόνης βάρους 19,7mg και προστέθηκαν 100ml MeOH. Το διάλυμα παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος για 60 λεπτά. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του αντιδραστήριου DPPH στο μηχάνημα της ανάλυσης με σκοπό να μετρηθεί η απορρόφηση που έδινε το αντιδραστήριο. Η επιθυμητή απορρόφηση που θέλουμε να δίνει στα 517nm είναι ~ 0,682. Επειδή η απορρόφηση που έδινε το αρχικό αντιδραστήριο ήταν μεγαλύτερη, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις ωσότου έφτασε σε τιμή απορρόφησης 0,685. Έπειτα για κάθε γονότυπο παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα από συνδυασμό δείγματος και αντιδραστήριου. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τρεις για κάθε γονότυπο, παραλήφθηκαν 100μl αραιωμένου δείγματος τριαντάφυλλων και προστέθηκαν 3900μl αραιωμένου αντιδραστήριου DPPH. Τα διαλύματα παρέμειναν στο σκοτάδι για 20 λεπτά και για 60 λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις του ίδιου διαλύματος μετά το πέρας των δύο χρονικών διαστημάτων. Επομένως, συνολικά για κάθε γονότυπο έγιναν τρεις αναλύσεις στα 20 λεπτά και τρεις αναλύσεις στα 60 λεπτά.

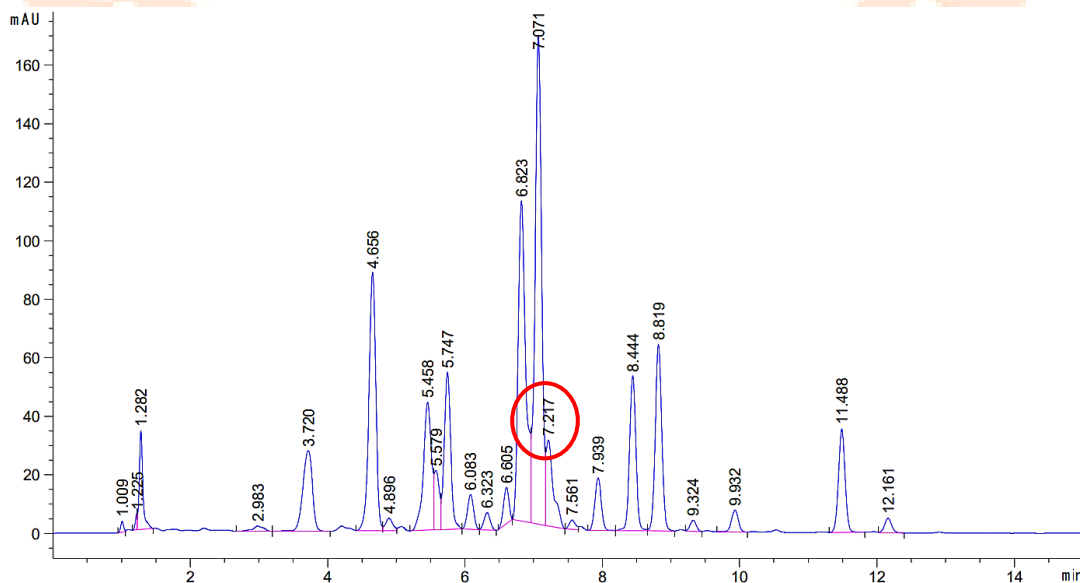
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός κερσιτρίνης

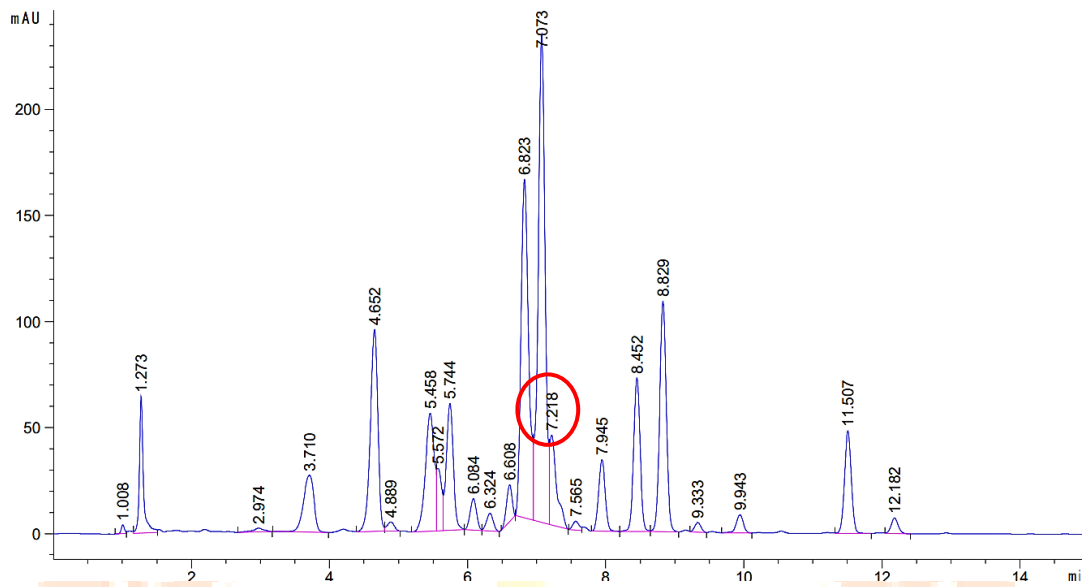
Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά χρωματογράφημα ένα για κάθε γονότυπο που αναλύθηκε με την αναπτυχθείσα μέθοδο, όπου απεικονίζεται μεταξύ των υπόλοιπων χημικών ενώσεων και η υπο διερεύνηση φαινολική ένωση κερσιτρίνη.



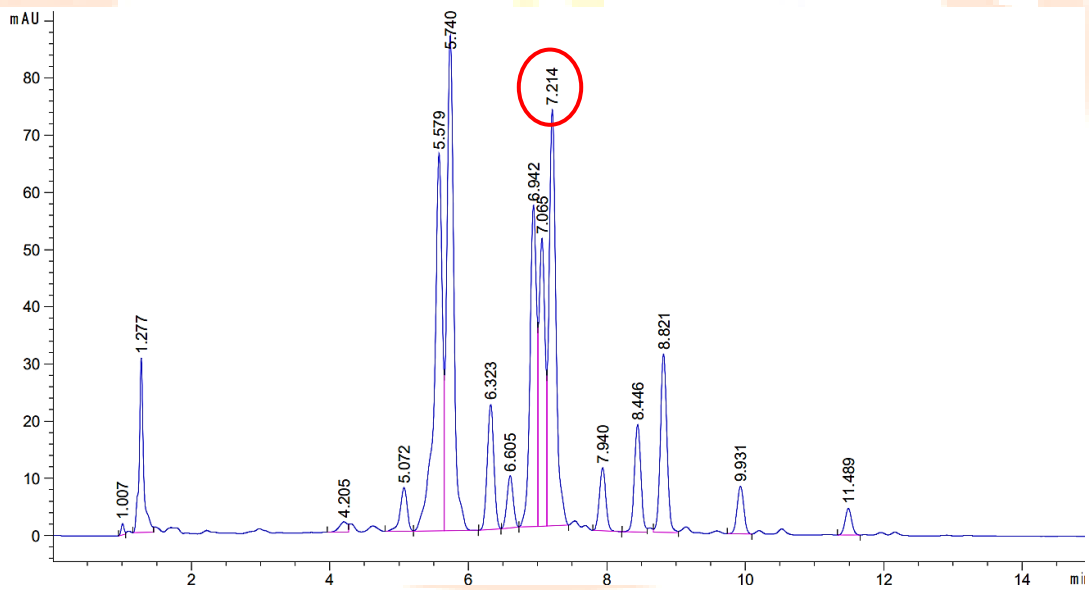
Εικόνα 24 Χρωματογράφημα, 16-5-2-1 γονότυπου



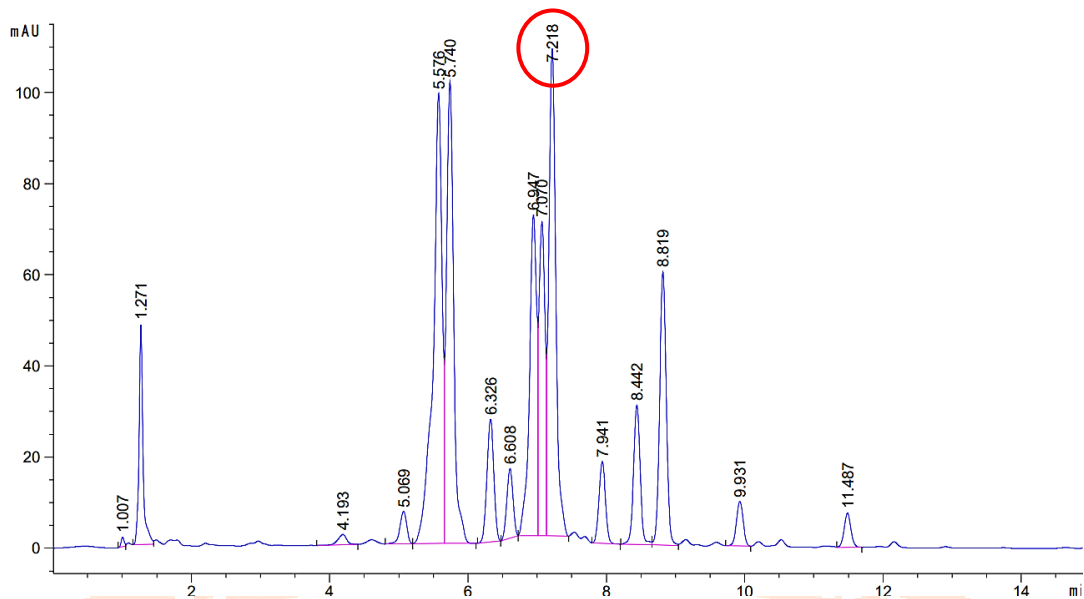
Εικόνα 25 Χρωματογράφημα, 16-5-3-2 γονότυπου



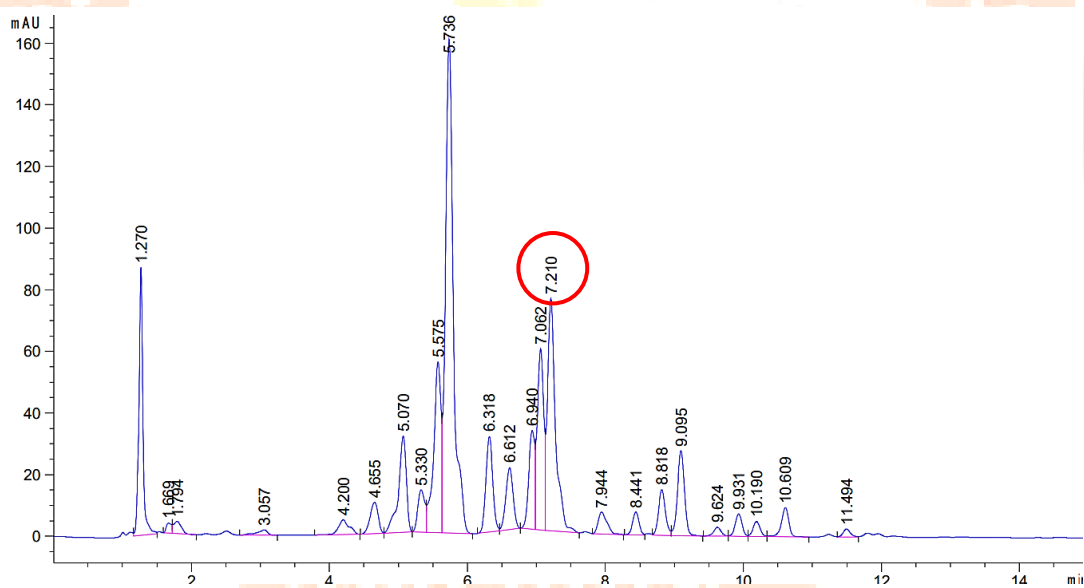
Εικόνα 26 Χρωματογράφημα, 16-5-1 γονότυπου



Εικόνα 27 Χρωματογράφημα, 16-5-8-2 γονότυπου



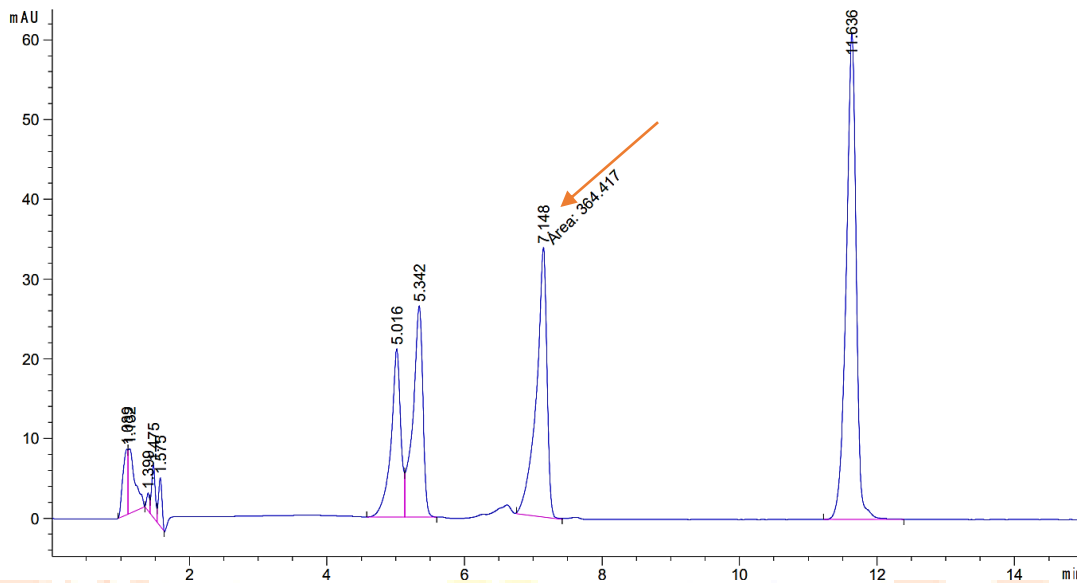
Εικόνα 28 Χρωματογράφημα, 16-5-9-1 γονότυπου



Εικόνα 29 Χρωματογράφημα, 16-5-13-1 γονότυπου

Στα δείγματα από πέταλα τριαντάφυλλων, εντοπίστηκε και ταυτοποιήθηκε και στους έξι γονότυπους η φαινολική ένωση κερσιτρίνη με χρόνο έκλουσης περίπου στα 7,2 λεπτά. Δεδομένης της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε και επικαιροποιήθηκε, η πρότυπη ένωση έδωσε τον παρακάτω χρόνο έκλουσης. Όπως φαίνεται στα χρωματογραφήματα των τριαντάφυλλων ο διαχωρισμός της κορυφής που θεωρητικά αντιστοιχεί στην κερσιτρίνη δεν είναι ικανοποιητικός. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι πρόκειται για φυσικό προϊόν και θα μπορούσε να βελτιωθεί

για παράδειγμα, είτε μεταβάλλοντας την αναλογία των διαλυτών είτε με την παράταση του χρόνου διάρκειας του χρωματογραφήματος. Επίσης λόγω του δεδομένου αυτού η κορυφή που εμφανίζεται στα 7,2 λεπτά ενδέχεται να μην είναι καθαρή κερσιτρίνη.



Εικόνα 30 Πρότυπο χρωματογράφημα κερσιτρίνης

Βάση των δεδομένων που λήφθηκαν από τις αναλύσεις, η κερσιτρίνη προσδιορίστηκε ποιοτικά και ποσοτικά στους έξι γονότυπους. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της έγιναν δύο επαναλαμβανόμενες αναλύσεις και μετά από εμβαδομέτρηση των κορυφών λήφθηκε ο μέσος όρος απ' όπου προέκυψε η συγκέντρωση της κερσιτρίνης στον κάθε γονότυπο. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά τα δεδομένα:

Πίνακας 12 mg Κερσιτρίνης ανά gr δείγματος

Γονότυπος	Συγκέντρωση στο δείγμα
16-5-9-1	4,49 mg/gr
16-5-8-2	6,02 mg/gr
16-5-1-1	1,54 mg/gr
16-5-2-1	1,42 mg/gr
16-5-3-2	0,99 mg/gr
16-5-13-1	6,32 mg/gr

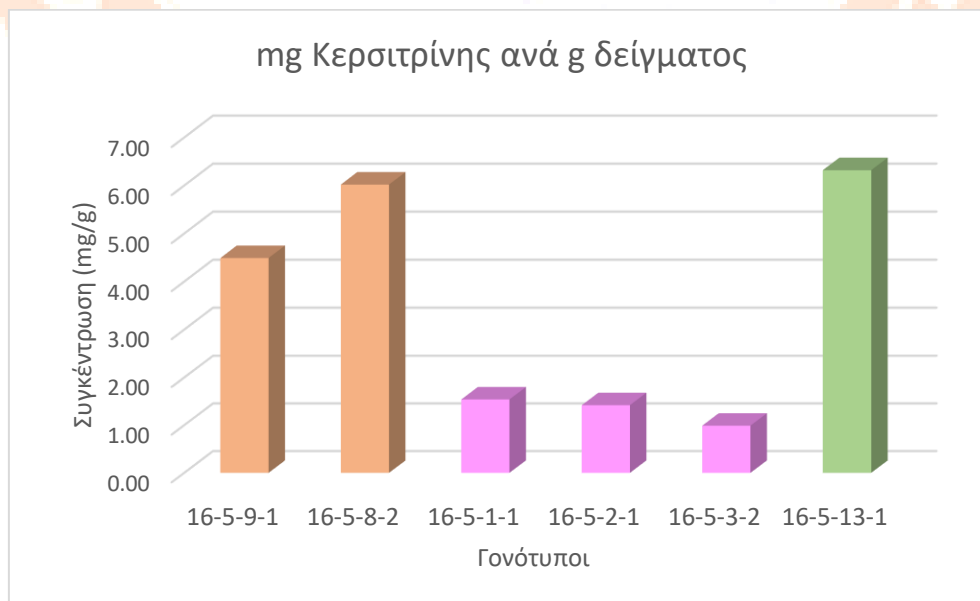
Στη συνέχεια, παρατηρώντας τις τιμές p-value όπως προέκυψαν από τη στατιστική δοκιμασία ANOVA, προκύπτει ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά κερσιτρίνης μεταξύ των έξι γονότυπων. Για να εντοπισθούν οι διαφορές οι γονότυποι συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Από τη σύγκριση αυτή, στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπήρχε μόνο μεταξύ των γονότυπων 8-2 με 13-1, 1-1 με 2-1, 1-1 με 3-2 και 2-1 με 3-2. Βάση των δεδομένων που είχαμε οι γονότυποι 2-1, 3-2 και 1-1 ανήκουν σε ποικιλία συνεχούς ανθοφορίας. Επίσης, για τους γονότυπους 8-2 και

13-1 δεν υπάρχει κάποιο δεδομένο που να τους συνδέει. Τέλος, οι γονότυποι 8-2 και 9-1 που ανήκουν στην ίδια ποικιλία τριανταφυλλιάς, τη Δαμασκήνη, είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους στην ποσότητα κερσιτρίνης. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται αναλυτικά τα δεδομένα.

Πίνακας 13 τιμές p-value από τη δοκιμασία ANOVA, για τις διαφορές μεταξύ των γονότυπων

Tukey HSD results			
treatments pair	Tukey HSD statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
Region 9-1 v 8-2	6,64	0,024	* p<0.05
Region 9-1 v 1-1	13,48	0,001	** p<0.01
Region 9-1 v 2-1	14,07	0,001	** p<0.01
Region 9-1 v 3-2	16,07	0,001	** p<0.01
Region 9-1 v 13-1	5,95	0,039	* p<0.05
Region 8-2 v 1-1	6,83	0,021	* p<0.05
Region 8-2 v 2-1	7,43	0,014	* p<0.05
Region 8-2 v 3-2	9,43	0,004	** p<0.01
Region 8-2 v 13-1	0,69	0,900	insignificant
Region 1-1 v 2-1	0,59	0,900	insignificant
Region 1-1 v 3-2	2,59	0,510	insignificant
Region 1-1 v 13-1	7,52	0,013	* p<0.05
Region 2-1 v 3-2	2,00	0,708	insignificant
Region 2-1 v 13-1	8,12	0,009	** p<0.01
Region 3-2 v 13-1	10,12	0,003	** p<0.01

Παρακάτω παρατίθεται το ραβδόγραμμα που απεικονίζει το εύρος τιμών της κερσιτρίνης στα δείγματα των τριαντάφυλλων.



Εικόνα 31 Ραβδόγραμμα αναπαράστασης της συνολικής συγκέντρωσης κερσιτρίνης στους γονότυπους

Όσον αφορά τη συνολική ποσότητα κερσιτρίνης που προσδιορίστηκε στους έξι διαφορετικούς γονότυπους φαίνεται πως οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται, με φθίνουσα σειρά, στους 13-1, 8-2, 9-1 γονότυπους και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις, με φθίνουσα σειρά, στους 1-1, 2-1, 3-2 γονότυπους. Σε αντίθεση με την ολική αντιοξειδωτική δράση του κάθε γονότυπου όπου δεν σημειώθηκαν ιδιαίτερες συσχετίσεις μεταξύ των γονότυπων, ακόμα και εκείνων που βάση δεδομένων ανήκαν στην ίδια ποικιλία, από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της κερσιτρίνης προκύπτει πως οι γονότυποι 9-1 και 8-2 έχουν σχετικά παρόμοια συγκέντρωση καθώς και οι γονότυποι 3-2, 1-1, 2-1 παρουσιάζουν και αυτοί παρόμοιες τιμές.

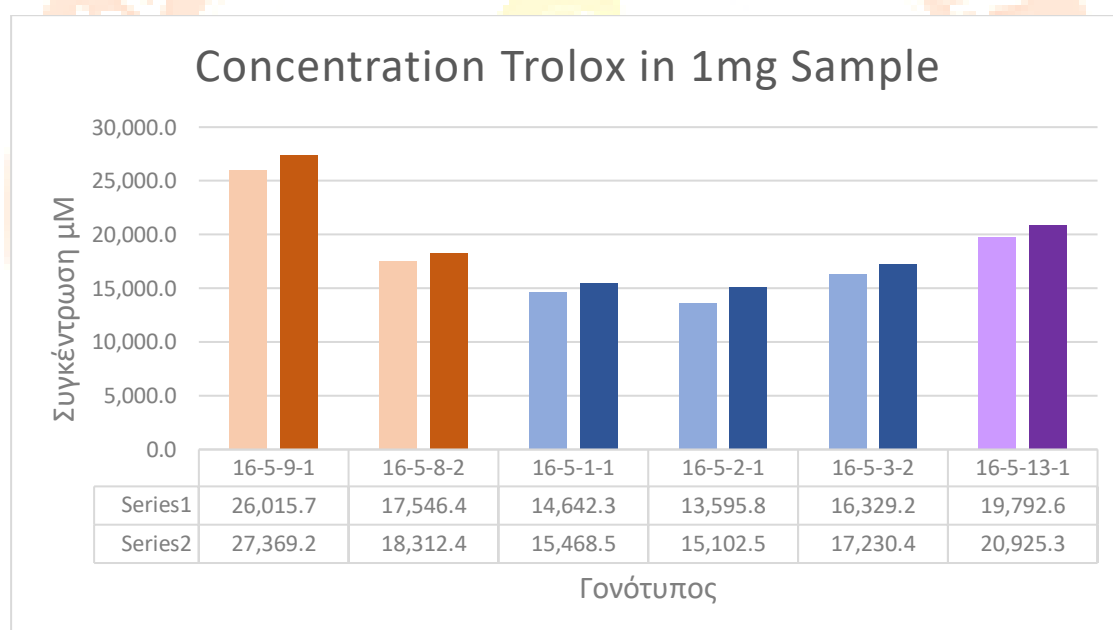


4.2 Καθορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με DPPH μέθοδο

Στη μελέτη αυτή, η αντιοξειδωτική δράση των έξι γονότυπων των τριαντάφυλλων αξιολογήθηκε με την μέθοδο DPPH. Στον παρακάτω πίνακα έχουν υπολογισθεί τα μM Trolox που έχουν την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα με 1mg δείγματος (εκχύλισμα από πέταλα τριαντάφυλλου). Εδώ να σημειωθεί ότι η Trolox είναι μία αντιοξειδωτική ουσία, την οποία το μηχάνημα χρησιμοποιεί με τον εξής τρόπο, κάθε φορά που γίνεται ανάλυση εισαγόμενου δείγματος και παίρνουμε μία τιμή απορρόφησης για τα 517 nm, δίνεται παράλληλα μία τιμή συγκέντρωσης Trolox σε μM που αντιστοιχεί στην τιμή απορρόφησης του δείγματος.

Πίνακας 14 μM Trolox με ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα όσο 1mg δείγματος

Trolox (μM) στο 1mg	16-5-2-1	16-5-9-1	16-5-1-1	16-5-8-2	16-5-13-1	16-5-3-2
20' Mean:	13.595,80	26.015,70	14.642,25	17.546,35	19.792,55	16.329,15
60' Mean:	15.102,45	27.369,20	15.468,50	18.312,35	20.925,30	17.230,35



Εικόνα 32 Ραβδόγραμμα αναπαράστασης των μM Trolox με ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα όσο 1mg δείγματος

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική δοκιμασία ANOVA, από την οποία δεν προέκυψαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των έξι διαφορετικών γονότυπων, ούτε στις τιμές απορρόφησης τους στα 517nm ούτε και στις τιμές Trolox που δόθηκαν για κάθε μέτρηση, αυτόματα σε αντιστοιχία με την απορρόφηση που είχαν τα δείγματα.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διαδικασία ανάπτυξης και βελτιστοποίησης των συνθηκών και παραμέτρων της μεθόδου με σκοπό τον γρήγορο και αξιόπιστο προσδιορισμό της κερσιτρίνης επιτεύχθηκε με επιτυχία. Η κερσιτρίνη με την αναπτυχθείσα μέθοδο στην οποία μία ανάλυση έχει διάρκεια 15 λεπτών εκλούεται περίπου στα 7,2 λεπτά, χρόνος που συγκριτικά με την βιβλιογραφία είναι σύντομος. Στο πλαίσιο του σχεδίου επικύρωσης της νέας αναλυτικής μεθόδου οι παράμετροι που προσδιορίστηκαν με επιτυχία είναι η ακρίβεια που κυμαινόταν από 84,2% μέχρι 105,7%, η γραμμικότητα με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,999$, η ανάκτηση είχε τιμή 0,89, η ευαισθησία ήταν ιδιαίτερα καλή αφού το όριο ανίχνευσης (LOD) = 0,04μl/ml και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) = 0,12μl/ml, η επαναληψιμότητα ήταν εντός ορίων με τον συντελεστή διακύμανσης CV% να κυμαίνεται από 2,30% μέχρι 3,72%.

Η κερσιτρίνη προσδιορίστηκε ποσοτικά και ποιοτικά και στους έξι γονότυπους με μέγιστη τιμή συγκέντρωσης 6,32mg/gr στο γονότυπο 13-1 και ελάχιστη τιμή συγκέντρωσης 0,99mg/gr στο γονότυπο 3-2. Από τη στατιστική ανάλυση (ANOVA) προέκυψε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητα κερσιτρίνης στους έξι γονότυπους. Καθώς και στη μετέπειτα σύγκριση των p-value των γονότυπων με σκοπό να εντοπισθούν που υπήρχαν οι στατιστικές διαφορές, μόνο μεταξύ των ζευγαριών 8-2 – 13-1, 1-1 – 2-1, 1-1 – 3-2 και 2-1 – 3-2 δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Η ολική αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων μετρήθηκε και αξιολογήθηκε με την μέθοδο DPPH, κρίθηκε καλή. Ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων έγινε σε αντιστοιχία με την συγκέντρωση Trolox (μM) η οποία υπολογίστηκε σε αναλογία του 1mg δείγματος. Από τη στατιστική ανάλυση (ANOVA) προέκυψε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονότυπων ως προς την ολική αντιοξειδωτική τους δράση.

Το σχέδιο επικύρωσης που συνοδεύει την προτεινόμενη αναπτυχθείσα μέθοδο βρίσκεται σε εξέλιξη. Επιπλέον, τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί από την παρούσα πειραματική εργασία, οδηγούν στο επόμενο στάδιο που είναι η εφαρμογή των εκχυλισμάτων των έξι γονότυπων σε δύο διαφορετικές καλλυντικοτεχνικές μορφές και η μετέπειτα αξιολόγηση των προϊόντων ως προς την αποτελεσματικότητά τους σε in vivo μελέτες.



6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. Rabot *et al.*, "Insight into the role of sugars in bud burst under light in the rose," *Plant and Cell Physiology*, vol. 53, no. 6, 2012, doi: 10.1093/pcp/pcs051.
- [2] S. G. Agarwal, A. Gupta, B. K. Kapahi, B. R. K. Thappa, and O. P. Suri, "Chemical composition of rose water volatiles," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 17, no. 3, 2005, doi: 10.1080/10412905.2005.9698897.
- [3] E. M. Wenzig *et al.*, "Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations," *Phytomedicine*, vol. 15, no. 10, 2008, doi: 10.1016/j.phymed.2008.06.012.
- [4] M. Aydinli and M. Tutaş, "Production of rose absolute from rose concrete," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 18, no. 1, 2003. doi: 10.1002/ffj.1138.
- [5] M. Mahboubi, "Rosa damascena as holy ancient herb with novel applications," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, vol. 6, no. 1, 2016. doi: 10.1016/j.jtcme.2015.09.005.
- [6] Y. Z. Cai, J. Xing, M. Sun, Z. Q. Zhan, and H. Corke, "Phenolic antioxidants (hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins) identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* flowers," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 26, 2005, doi: 10.1021/jf052137k.
- [7] M. Shokrzadeh, E. Habibi, and M. Modanloo, "Cytotoxic and genotoxic studies of essential oil from *Rosa damascena* Mill., Kashan, Iran," *Medicinski Glasnik*, vol. 14, no. 2, 2017, doi: 10.17392/901-17.
- [8] V. Gochev, A. Dobрева, T. Girova, and A. Stoyanova, "Antimicrobial activity of essential oil from *rosa alba*," *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 24, 2010, doi: 10.1080/13102818.2010.10817892.
- [9] N. Mahmood, S. Piacente, C. Pizza, A. Burke, A. I. Khan, and A. J. Hayt, "The anti-HIV activity and mechanisms of action of pure compounds isolated from *Rosa damascena*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 229, no. 1, 1996, doi: 10.1006/bbrc.1996.1759.
- [10] H. V., G. A., and H. M., "Analgesic and anti-inflammatory effects of *rosa damascena* hydroalcoholic extract and its essential oil in animal models," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 9, no. 2, 2010.
- [11] Y. Zu *et al.*, "Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells," *Molecules*, vol. 15, no. 5, 2010, doi: 10.3390/molecules15053200.
- [12] Neelam, A. Khatkar, and K. K. Sharma, "Phenylpropanoids and its derivatives: biological activities and its role in food, pharmaceutical and cosmetic industries,"

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 60, no. 16. 2020. doi: 10.1080/10408398.2019.1653822.
- [13] C. Bejenaru, G. Dan Mogoşanu, L. E. Bejenaru, A. Biţă, T. A. Bălşeanu, and F. E. Ionică, "Effect of Scutellariae herba extracts in experimental model of skin burns: Histological and immunohistochemical assessment," *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, vol. 57, no. 4, 2016.
- [14] O. v. Zillich, U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner, and M. Kerscher, "Polyphenols as active ingredients for cosmetic products," *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 37, no. 5. 2015. doi: 10.1111/ics.12218.
- [15] D. Zhuang, N. He, K. S. Khoo, E. P. Ng, K. W. Chew, and T. C. Ling, "Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics," *Chemosphere*, vol. 291, 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132932.
- [16] S. Mukherjee, A. Date, V. Patravale, H. C. Korting, A. Roeder, and G. Weindl, "Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety.," *Clinical interventions in aging*, vol. 1, no. 4. 2006. doi: 10.2147/cia.2006.1.4.327.
- [17] M. Zasada and E. Budzisz, "Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments," *Postepy Dermatologii i Alergologii*, vol. 36, no. 4. 2019. doi: 10.5114/ada.2019.87443.
- [18] K. Tominaga, N. Hongo, M. Karato, and E. Yamashita, "Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects," *Acta Biochimica Polonica*, vol. 59, no. 1, 2012, doi: 10.18388/abp.2012_2168.
- [19] M. S. Ferreira, D. I. S. P. Resende, J. M. Sousa Lobo, E. Sousa, and I. F. Almeida, "Marine ingredients for sensitive skin: Market overview," *Marine Drugs*, vol. 19, no. 8, 2021, doi: 10.3390/MD19080464.
- [20] L. Lopez-Hortas *et al.*, "Applying seaweed compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics," *Marine Drugs*, vol. 19, no. 10. 2021. doi: 10.3390/md19100552.
- [21] F. Hentati *et al.*, "Bioactive polysaccharides from seaweeds," *Molecules*, vol. 25, no. 14. 2020. doi: 10.3390/molecules25143152.
- [22] M. Cavinato, B. Waltenberger, G. Baraldo, C. V. C. Grade, H. Stuppner, and P. Jansen-Dürr, "Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging," *Biogerontology*, vol. 18, no. 4. 2017. doi: 10.1007/s10522-017-9715-7.
- [23] D. J. de Lima Cherubim, C. V. Buzanello Martins, L. Oliveira Fariña, and R. A. da Silva de Lucca, "Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications," *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 19, no. 1. 2020. doi: 10.1111/jocd.13093.
- [24] G. Özkan, O. Sağdıç, N. G. Baydar, and H. Baydar, "Note: Antioxidant and antibacterial activities of Rosa damascena flower extracts," *Food Science and Technology International*, vol. 10, no. 4, 2004, doi: 10.1177/1082013204045882.

- [25] T. B. Ng *et al.*, "A gallic acid derivative and polysaccharides with antioxidative activity from rose (*Rosa rugosa*) flowers ," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 56, no. 4, 2010, doi: 10.1211/0022357022944.
- [26] R. Croteau, T. M. Kutchan, and N. G. Lewis, "natural products (Secondary Metabolites)," in *biochemistry and molecular biology of plants*, 2000.
- [27] P. Cosme, A. B. Rodríguez, J. Espino, and M. Garrido, "Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications," *Antioxidants*, vol. 9, no. 12. 2020. doi: 10.3390/antiox9121263.
- [28] C. C. XU, B. WANG, Y. Q. PU, J. S. TAO, and T. ZHANG, "Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials," *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 15, no. 10, 2017, doi: 10.1016/S1875-5364(17)30103-6.
- [29] A. M. Višnjevec and M. Schwarzkopf, "Phenolic compounds in poorly represented mediterranean plants in Istria: Health impacts and food authentication," *Molecules*, vol. 25, no. 16. 2020. doi: 10.3390/molecules25163645.
- [30] A. Crozier, I. B. Jaganath, and M. N. Clifford, "Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health," *Natural Product Reports*, vol. 26, no. 8, 2009, doi: 10.1039/b802662a.
- [31] C. Santos-Buelga, A. M. González-Paramás, T. Oludemi, B. Ayuda-Durán, and S. González-Manzano, "Plant phenolics as functional food ingredients," in *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 90, 2019. doi: 10.1016/bs.afnr.2019.02.012.
- [32] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, "Polyphenols: Food sources and bioavailability," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, no. 5. 2004. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
- [33] S. J. Maleki, J. F. Crespo, and B. Cabanillas, "Anti-inflammatory effects of flavonoids," *Food Chemistry*, vol. 299. 2019. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125124.
- [34] Y. O. Teselkin *et al.*, "Dihydroquercetin as a means of antioxidative defence in rats with tetrachloromethane hepatitis," *Phytotherapy Research*, vol. 14, no. 3, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(200005)14:3<160::AID-PTR555>3.0.CO;2-Y.
- [35] V. K. Kolhir *et al.*, "Antioxidant activity of a dihydroquercetin isolated from *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. wood," *Phytotherapy Research*, vol. 10, no. 6, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199609)10:6<478::AID-PTR883>3.0.CO;2-S.
- [36] N. Salah, N. J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G. Paul Bolwell, and C. Riceevans, "Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 322, no. 2, 1995, doi: 10.1006/abbi.1995.1473.

- [37] Y. H. Wang *et al.*, "Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation," *Journal of Biomedical Science*, vol. 13, no. 1, 2006, doi: 10.1007/s11373-005-9031-0.
- [38] S. Pan *et al.*, "Inhibitory effect of taxifolin on mast cell activation and mast cell-mediated allergic inflammatory response," *International Immunopharmacology*, vol. 71, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.03.038.
- [39] H. Kuspradini, T. Mitsunaga, and H. Ohashi, "Antimicrobial activity against *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase inhibitory activity of taxifolin and some flavanone rhamnosides from kempas (*Koompassia malaccensis*) extracts," *Journal of Wood Science*, vol. 55, no. 4, 2009, doi: 10.1007/s10086-009-1026-4.
- [40] O. A. Artem'eva, D. A. Pereselkova, and Y. P. Fomichev, "Dihydroquercetin, the bioactive substance, to be used against pathogenic microorganisms as an alternative to antibiotics," *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, vol. 50, no. 4, 2015, doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.513eng.
- [41] Q. Kanwal, I. Hussain, H. Latif Siddiqui, and A. Javaid, "Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves," *Natural Product Research*, vol. 24, no. 20, 2010, doi: 10.1080/14786419.2010.488628.
- [42] X. Yuan *et al.*, "Taxifolin attenuates IMQ-induced murine psoriasis-like dermatitis by regulating T helper cell responses via Notch1 and JAK2/STAT3 signal pathways," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 123, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109747.
- [43] T. Inoue *et al.*, "Pleiotropic neuroprotective effects of taxifolin in cerebral amyloid angiopathy," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 116, no. 20, 2019, doi: 10.1073/pnas.1901659116.
- [44] J. S. Bednar, B. M. Galvin, B. E. Ashforth, and E. Hafermalz, "Putting identification in motion: A dynamic view of organizational identification," *Organization Science*, vol. 31, no. 1, 2020, doi: 10.1287/orsc.2018.1276.
- [45] L. Gao *et al.*, "Taxifolin improves disorders of glucose metabolism and water-salt metabolism in kidney via PI3K/AKT signaling pathway in metabolic syndrome rats," *Life Sciences*, vol. 263, 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118713.
- [46] A. Theriault, Q. Wang, S. C. van Iderstine, B. Chen, A. A. Franke, and K. Adeli, "Modulation of hepatic lipoprotein synthesis and secretion by taxifolin, a plant flavonoid," *Journal of Lipid Research*, vol. 41, no. 12, 2000, doi: 10.1016/s0022-2275(20)32358-0.
- [47] Z. Tang *et al.*, "Taxifolin protects rat against myocardial ischemia/reperfusion injury by modulating the mitochondrial apoptosis pathway," *PeerJ*, vol. 2019, no. 1, 2019, doi: 10.7717/peerj.6383.

- [48] E. Kiehlmann and E. P. M. Li, "Isomerization of dihydroquercetin," *Journal of Natural Products*, vol. 58, no. 3, 1995, doi: 10.1021/np50117a018.
- [49] R. Slimestad, T. Fossen, and I. M. Vågen, "Onions: A source of unique dietary flavonoids," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 25. 2007. doi: 10.1021/jf0712503.
- [50] M. de Rosso, A. Panighel, A. Dalla Vedova, and R. Flamini, "Elucidations on the structures of some putative flavonoids identified in postharvest withered grapes (*Vitis vinifera* L.) by quadrupole time-of-flight mass spectrometry," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 55, no. 11, 2020, doi: 10.1002/jms.4639.
- [51] S. Lamy, A. Ouanouki, R. Béliveau, and R. R. Desrosiers, "Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation," *Experimental Cell Research*, vol. 322, no. 1, 2014, doi: 10.1016/j.yexcr.2013.11.022.
- [52] C. Li, C. Huo, M. Zhang, and Q. Shi, "Chemistry of Chinese yew, *Taxus chinensis* var. *mairei*," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 36, no. 4. 2008. doi: 10.1016/j.bse.2007.08.002.
- [53] A. B. Cerezo *et al.*, "Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 23, no. 2, 2010, doi: 10.1016/j.jfca.2009.08.008.
- [54] R. Domitrović, K. Rashed, O. Cvijanović, S. Vladimir-Knežević, M. Škoda, and A. Višnić, "Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 230, 2015, doi: 10.1016/j.cbi.2015.01.030.
- [55] I. W. Hwang and S. K. Chung, "Isolation and identification of myricitrin, an antioxidant flavonoid, from Daebong persimmon peel," *Preventive Nutrition and Food Science*, vol. 23, no. 4, 2018, doi: 10.3746/pnf.2018.23.4.341.
- [56] W. Chen *et al.*, "Myricitrin inhibits acrylamide-mediated cytotoxicity in human caco-2 cells by preventing oxidative stress," *BioMed Research International*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/724183.
- [57] Y. H. Wang, Z. H. Xuan, S. Tian, G. R. He, and G. H. Du, "Myricitrin attenuates 6-hydroxydopamine-induced mitochondrial damage and apoptosis in PC12 cells via inhibition of mitochondrial oxidation," *Journal of Functional Foods*, vol. 5, no. 1, 2013, doi: 10.1016/j.jff.2012.11.004.
- [58] B. Zhang *et al.*, "Myricitrin alleviates oxidative stress-induced inflammation and apoptosis and protects mice against diabetic cardiomyopathy," *Scientific Reports*, vol. 7, 2017, doi: 10.1038/srep44239.
- [59] A. Ahangarpour, A. A. Oroojan, L. Khorsandi, M. Kouchak, and M. Badavi, "Antioxidant effect of myricitrin on hyperglycemia-induced oxidative stress in C2C12

- cell," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 23, no. 4, 2018, doi: 10.1007/s12192-018-0888-z.
- [60] F. C. Meotti, T. Posser, F. C. Missau, M. G. Pizzolatti, R. B. Leal, and A. R. S. Santos, "Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice," *Biochemical Pharmacology*, vol. 74, no. 6, 2007, doi: 10.1016/j.bcp.2007.06.024.
- [61] Q. Huang *et al.*, "Protective effects of myricitrin against osteoporosis via reducing reactive oxygen species and bone-resorbing cytokines," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 280, no. 3, 2014, doi: 10.1016/j.taap.2014.08.004.
- [62] J. Zhang *et al.*, "Biological Activities of Triterpenoids and Phenolic Compounds from *Myrica cerifera* Bark," *Chemistry and Biodiversity*, vol. 13, no. 11, 2016, doi: 10.1002/cbdv.201600247.
- [63] J. M. Gee, M. S. Dupont, M. J. C. Rhodes, and I. T. Johnson, "Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 25, no. 1, 1998, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00020-3.
- [64] C. Morand, C. Manach, V. Crespy, and C. Remesy, "Quercetin 3-o-β-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma," *Free Radical Research*, vol. 33, no. 5, 2000, doi: 10.1080/10715760000301181.
- [65] Y. Yin *et al.*, "Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 269, no. 2, 2013, doi: 10.1016/j.taap.2013.03.015.
- [66] J. R. Soberón, M. A. Sgariglia, D. A. Sampietro, E. N. Quiroga, and M. A. Vattuone, "Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 102, no. 6, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03229.x.
- [67] E. A. Cruz, S. A. G. Da-Silva, M. F. Muzitano, P. M. R. Silva, S. S. Costa, and B. Rossi-Bergmann, "Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock," *International Immunopharmacology*, vol. 8, no. 12, 2008, doi: 10.1016/j.intimp.2008.07.006.
- [68] T. W. Oh, H. J. Do, J. H. Jeon, and K. Kim, "Quercitrin inhibits platelet activation in arterial thrombosis," *Phytomedicine*, vol. 80, 2021, doi: 10.1016/j.phymed.2020.153363.
- [69] M. Gómez-Florit, M. Monjo, and J. M. Ramis, "Identification of Quercitrin as a Potential Therapeutic Agent for Periodontal Applications," *Journal of Periodontology*, vol. 85, no. 7, 2014, doi: 10.1902/jop.2014.130438.
- [70] T. Jurikova *et al.*, "Phenolic profile of edible honeysuckle berries (genus *Lonicera*) and their biological effects," *Molecules*, vol. 17, no. 1, 2012. doi: 10.3390/molecules17010061.

- [71] S. F. Nabavi *et al.*, "Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review," *Brain Research Bulletin*, vol. 119. 2015. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.09.002.
- [72] G. Seelinger, I. Merfort, and C. M. Schempp, "Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin," *Planta Medica*, vol. 74, no. 14. 2008. doi: 10.1055/s-0028-1088314.
- [73] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no. 10. 2002. doi: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5.
- [74] U. Wölfle, P. R. Esser, B. Simon-Haarhaus, S. F. Martin, J. Lademann, and C. M. Schempp, "UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 50, no. 9, 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.027.
- [75] F. Gendrisch, P. R. Esser, C. M. Schempp, and U. Wölfle, "Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation," *BioFactors*, vol. 47, no. 2. 2021. doi: 10.1002/biof.1699.
- [76] G. Seelinger, I. Merfort, U. Wölfle, and C. M. Schempp, "Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin," *Molecules*, vol. 13, no. 10. 2008. doi: 10.3390/molecules13102628.
- [77] H. Qiao *et al.*, "Luteolin downregulates TLR4, TLR5, NF-κB and p-p38MAPK expression, upregulates the p-ERK expression, and protects rat brains against focal ischemia," *Brain Research*, vol. 1448, 2012, doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.003.
- [78] Y. Ozay *et al.*, "Evaluation of the wound healing properties of luteolin ointments on excision and incision wound models in diabetic and non-diabetic rats," *Records of Natural Products*, vol. 12, no. 4, 2018, doi: 10.25135/rnp.38.17.08.135.
- [79] A. Yashin, Y. Yashin, X. Xia, and B. Nemzer, "Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A review," *Antioxidants*, vol. 6, no. 3. 2017. doi: 10.3390/antiox6030070.
- [80] J. C. M. Barreira *et al.*, "Phenolic profiling of Veronica spp. grown in mountain, urban and sandy soil environments," *Food Chemistry*, vol. 163, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.117.
- [81] T. M. Galal *et al.*, "Evaluation of the Phytochemical and Pharmacological Potential of Taif's Rose (*Rosa damascena* Mill var. *trigintipetala*) for Possible Recycling of Pruning Wastes," *Life*, vol. 12, no. 2, 2022, doi: 10.3390/life12020273.
- [82] C. Zeng *et al.*, "Phenolic Composition, Antioxidant and Anticancer Potentials of Extracts from *Rosa banksiae* Ait. Flowers," *Molecules*, vol. 25, no. 13, 2020, doi: 10.3390/molecules25133068.

- [83] A. Gęgotek, P. Rybałtowska-Kawałko, and E. Skrzydlewska, "Rutin as a Mediator of Lipid Metabolism and Cellular Signaling Pathways Interactions in Fibroblasts Altered by UVA and UVB Radiation," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/4721352.
- [84] G. M. Iova *et al.*, "The antioxidant effect of curcumin and rutin on oxidative stress biomarkers in experimentally induced periodontitis in hyperglycemic wistar rats," *Molecules*, vol. 26, no. 5, 2021, doi: 10.3390/molecules26051332.
- [85] S. J. Choi *et al.*, "Biological effects of rutin on skin aging," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 38, no. 1, 2016, doi: 10.3892/ijmm.2016.2604.
- [86] L. C. Tomazelli *et al.*, "SPF enhancement provided by rutin in a multifunctional sunscreen," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 552, no. 1–2, 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.015.
- [87] L. Selloum, H. Bouriche, C. Tigrine, and C. Boudoukha, "Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 54, no. 4, 2003, doi: 10.1078/0940-2993-00260.
- [88] E. Kerasioti *et al.*, "Polyphenolic composition of *Rosa canina*, *Rosa sempervivens* and *Pyrocantha coccinea* extracts and assessment of their antioxidant activity in human endothelial cells," *Antioxidants*, vol. 8, no. 4, 2019, doi: 10.3390/antiox8040092.
- [89] B. Zhang *et al.*, "Apigenin protects human melanocytes against oxidative damage by activation of the Nrf2 pathway," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 25, no. 2, 2020, doi: 10.1007/s12192-020-01071-7.
- [90] N. Sánchez-Marzo *et al.*, "Antioxidant and photoprotective activity of apigenin and its potassium salt derivative in human keratinocytes and absorption in Caco-2 cell monolayers," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 9, 2019, doi: 10.3390/ijms20092148.
- [91] M. Cicek, V. Unsal, A. Doganer, and M. Demir, "Investigation of oxidant/antioxidant and anti-inflammatory effects of apigenin on apoptosis in sepsis-induced rat lung," *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 35, no. 5, 2021, doi: 10.1002/jbt.22743.
- [92] P. Niering *et al.*, "Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: Implication of oxidative stress and apoptosis," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 209, no. 2, 2005, doi: 10.1016/j.taap.2005.04.004.
- [93] C. L. L. Saw *et al.*, "The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 72, 2014, doi: 10.1016/j.fct.2014.07.038.

- [94] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 20, no. 7. 1996. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
- [95] X. Zhu *et al.*, "Protective effects of quercetin on UVB irradiation-induced cytotoxicity through ROS clearance in keratinocyte cells," *Oncology Reports*, vol. 37, no. 1, 2017, doi: 10.3892/or.2016.5217.
- [96] D. Xu, M. J. Hu, Y. Q. Wang, and Y. L. Cui, "Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application," *Molecules*, vol. 24, no. 6. 2019. doi: 10.3390/molecules24061123.
- [97] D. D. Hou *et al.*, "Anti-inflammatory effects of quercetin in a mouse model of MC903-induced atopic dermatitis," *International Immunopharmacology*, vol. 74, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.105676.
- [98] Z. H. Wang *et al.*, "Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 29, no. 1, 2010, doi: 10.1016/j.etap.2009.08.007.
- [99] J. H. Huang *et al.*, "Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes," *Toxicology in Vitro*, vol. 24, no. 1, 2010, doi: 10.1016/j.tiv.2009.09.015.
- [100] K. C. Ong and H. E. Khoo, "Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats," *Life Sciences*, vol. 67, no. 14, 2000, doi: 10.1016/S0024-3205(00)00758-X.
- [101] H. Cetin-Karaca and M. C. Newman, "Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli," *Food Bioscience*, vol. 11, 2015, doi: 10.1016/j.fbio.2015.03.002.
- [102] N. Kumar, P. Bhandari, B. Singh, and S. S. Bari, "Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 2, 2009, doi: 10.1016/j.fct.2008.11.036.
- [103] A. Sabitov *et al.*, "*Rosa platyacantha schrenk* from kazakhstan—natural source of bioactive compounds with cosmetic significance," *Molecules*, vol. 26, no. 9, 2021, doi: 10.3390/molecules26092578.
- [104] O. Sarangowa, T. Kanazawa, M. Nishizawa, T. Myoda, C. Bai, and T. Yamagishi, "Flavonol glycosides in the petal of *Rosa* species as chemotaxonomic markers," *Phytochemistry*, vol. 107, 2014, doi: 10.1016/j.phytochem.2014.08.013.
- [105] A. Cendrowski, I. Scibisz, M. Kieliszek, J. Kolniak-Ostek, and M. Mitek, "UPLC-PDA-Q/TOF-MS Profile of polyphenolic compounds of liqueurs from rose petals (*Rosa rugosa*)," *Molecules*, vol. 22, no. 11, 2017, doi: 10.3390/molecules22111832.

- [106] N. Kumar, P. Bhandari, B. Singh, A. P. Gupta, and V. K. Kaul, "Reversed phase-HPLC for rapid determination of polyphenols in flowers of rose species," *Journal of Separation Science*, vol. 31, no. 2, 2008, doi: 10.1002/jssc.200700372.
- [107] F. Ieri, M. Innocenti, L. Possieri, S. Gallori, and N. Mulinacci, "Phenolic composition of 'bud extracts' of *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L. and *Tilia tomentosa* M.," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 115, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.06.004.
- [108] D. Nijat *et al.*, "Spectrum-effect relationship between UPLC fingerprints and antidiabetic and antioxidant activities of *Rosa rugosa*," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1179, 2021, doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122843.

