



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Φυτοχημική Μελέτη του Φυτού *Hyssopus officinalis* και  
Ανάλυση Συστατικών του Ενδημικού Φυτού της Κρήτης  
*Phlomis lanata*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΑΝΕΣΗ ΜΑΡΙΑΝΝΑ**  
**(AM 1558)**

Επιβλέπων Καθηγητής  
Χαράλαμπος Ε. Κατερινόπουλος  
Καθηγητής Τμήματος Χημείας  
Πανεπιστημίου Κρήτης

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2016



UNIVERSITY OF CRETE  
SCHOOL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Phytochemical Study of Cretan Plants: *Hyssopus officinalis*  
and Component Analysis of the Endemic Plant *Phlomis lanata*

DIPLOMA THESIS

**MANESI MARIANNA**  
(RN 1558)

**Supervisor:** Professor Haralambos E. Katerinopoulos  
Department of Chemistry  
University of Crete

Heraklion, February 2016

*Στην οικογένειά μου...*

## Ευχαριστίες

Με μεγάλη ευγνωμοσύνη και χαρά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων η βοήθεια και οι υποδείξεις υπήρξαν πολύτιμες κατά τη διεξαγωγή και τη συγγραφή αυτής της διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή κύριο Χαράλαμπο Κατερινόπουλο και τον Επιβλέποντα Υποψήφιο Διδάκτορα Στεφανάκη Μιχάλη για τη συνεργασία, τη βοήθεια, τις υποδείξεις και τις γνώσεις που με μεγάλη προθυμία μου μετέδωσαν. Επιπλέον για την άψογη συνεργασία και βοήθεια, ευχαριστώ θερμά τους: Δρ. Γεωργιλαδάκη Σοφία, Χριστοφόρου Γωγώ, Φίλιππα Ιωάννα, Δρ. Τσικαλά Γιώργο και Τσικριτζή Αθανασία.

*M. Μάνεση*

## Περιεχόμενα

<b>1. Περίληψη / Abstract</b> .....	6
<b>2. Εισαγωγή</b>	
<b>2.1. Ονομασία και Ιστορία του Φυτού</b> .....	8
<b>2.2. Βοτανική Περιγραφή και Χρήσεις</b>	
<b>2.2.1. Οικογένεια Lamiaceae</b> .....	8
<b>2.2.2. Το φυτό <i>Hyssopus officinalis</i></b> .....	9
<b>2.2.3. Φαρμακευτική δράση – Χρήσεις</b> .....	10
<b>2.3. Αιθέρια Έλαια</b>	
<b>2.3.1. Γενικά</b> .....	11
<b>2.3.2. Χημεία Αιθέριων Ελαίων</b> .....	11
<b>2.4. Προσδιορισμός Συστατικών Αιθέριων Ελαίων</b>	
<b>2.4.1. Μέθοδοι απομόνωσης και διαχωρισμού Αιθέριων Ελαίων</b> .....	15
<b>2.4.2. Μεθοδολογία GC-MS</b> .....	17
<b>3. Σκοπός</b> .....	19
<b>4. Πειραματική Διαδικασία</b> .....	20
<b>5. Αποτελέσματα</b> .....	22
<b>6. Βιοχημικές δοκιμές αιθέριων ελαίων</b> .....	33
<b>7. Συζήτηση αποτελεσμάτων</b> .....	35
<b>8. Βιβλιογραφία</b> .....	41
<b>9. Παράρτημα</b> .....	44

## 1. Περίληψη

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η πιθανή πορεία βιοσύνθεσης των πτητικών συστατικών του φυτού Ύσσωπος (*Hyssopus officinalis*) μέσω του αιθέριου ελαίου και της μελέτης της ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης του. Συλλέχθηκαν τα υπέργεια μέρη του φυτού ανά μήνα για ένα έτος και αφού υπέστησαν ξήρανση σε σκιά, εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε η παραλαβή των αιθέριων ελαίων με υδροαπόσταξη. Η ανάλυση των αιθέριων ελαίων έγινε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας (GC-MS). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση GC-MS σε δείγμα αλκανίων για τη μετατροπή των χρόνων κατακράτησης των συστατικών σε σταθερές ανεξάρτητες από τη μέθοδο ανάλυσης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης για τον Ύσσωπο έδειξαν ότι το κύριο συστατικό του ήταν η Ισοπινokaμφώνη με ποσοστά στο αιθέριο έλαιο από 37.73%, έως 64.85%. Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα που συλλέχθηκε το Φεβρουάριο, όπου κύριο συστατικό είναι η Elemol (21.02%) ενώ η Ισοπινokaμφώνη έχει ποσοστό μόνο 6.19%. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 76 ενώσεις. Μέγιστη παραγωγή αιθέριου ελαίου για το φυτό παρατηρήθηκε στα άνθη του φυτού κατά την περίοδο άνθησης και συγκεκριμένα το μήνα Αύγουστο.

## 1. Abstract

In this diploma thesis, a study of the possible biosynthetic pathway on the biosynthesis of volatile constituents of *Hyssopus officinalis*, was carried out, based on the qualitative and quantitative analysis of its essential oil. The aerial parts of the plants were harvested and dried, each month, in one year period. The essential oils were obtained by hydrodistillation of plant material in a Clevenger-type apparatus. GC-MS analyses of the oil samples as well alkane standard samples were carried out. The alkane standards were used to convert retention times into method-independent constants.

The results showed that the major component in Hyssop oil was Isopinocampone (37.73 – 64.58%) with the exception of the sample collected in February. The latter analysis indicated that Elemol was the major compound (21.02%), while the Isopinocampone content was reduced to 6.19% of the essential oil. The analysis enabled the identification of 76 constituents. The maximum yield in the essential oil was observed in the Hyssop flower samples during the blooming stage in August.

## 2. Εισαγωγή

### 2.1. Ονομασία και Ιστορία του Φυτού

Η ονομασία «Ύσσωπος» του φυτού *Hyssopus officinalis*, προέρχεται από τη λέξη ezob, που στα Εβραϊκά σημαίνει «αερό βότανο». <sup>1</sup>

Για τη χρήση του Ύσσωπου ως φαρμακευτικό φυτό υπάρχουν αναφορές από τους αρχαίους ακόμα χρόνους. Ο Ιπποκράτης το χρησιμοποιούσε για την θεραπεία της πλευρίτιδας και ο Διοσκουρίδης για τη δύσπνοια, το άσθμα, τις παθήσεις του θώρακος, την βρογχίτιδα ή τα κρυολογήματα του στήθους. Στον Ύσσωπο αποδίδονταν εξαγνιστικές ιδιότητες, γι' αυτό και τον χρησιμοποιούσαν σε τελετουργίες με σκοπό την κάθαρση. Οι Εβραίοι τον θεωρούσαν ιερό φυτό, όπως φαίνεται και από την ετυμολογία του.

Σπουδαίος ρόλος φαίνεται να του αποδίδεται και στον Χριστιανισμό. Στον 50<sup>ο</sup> Ψαλμό ή Ψαλμό της Μετανοίας που έγραψε ο Δαβίδ, αναφέρεται στον 9<sup>ο</sup> στίχο: «*ραντιεῖς με ὑσσώπω, καὶ καθαρισθήσομαι, πλυνεῖς με, καὶ ὑπὲρ χιόνα λευκανθήσομαι*», που σημαίνει «θα με ραντίσεις Εσύ με το έλεος και την χάριν σου, με κλώνους Ύσσωπου και θα καθαρισθώ, θα με πλύνεις και θα λευκανθώ γινόμενος λευκότερος και από την χιόνα». Στην Παλαιά Διαθήκη, αναφέρεται ότι ο Θεός διέταξε τους Εβραίους (όταν θα γινότανε η σφαγή των πρωτότοκων παιδιών των Αιγυπτίων λόγω τιμωρίας τους, Έξοδος 12:22,23), να σφάζουν από ένα πρόβατο και να βάψουν τις θύρες των οικιών των Εβραίων με το αίμα των προβάτων χρησιμοποιώντας κλαδιά Ύσσωπου, ώστε να μην συμβεί θανατικό στα σπίτια τους. Αργότερα ο προφήτης Μωυσής διατάσσει, με τον Μωσαϊκό Νόμο, να ραντίζονται άνθρωποι και οικίες με ένα καθαρικό ύδωρ με κλαδί του Ύσσωπου. Επίσης στο κατά Ιωάννη Ευαγγέλιο (19:29) αναφέρεται ότι σε κλωνάρι από Ύσσωπο οι Ρωμαίοι στρατιώτες στήριξαν το σφουγγάρι με το ξύδι, το οποίον έβαλαν στο στόμα του Ιησού κατά τη διάρκεια του μαρτυρίου Του επάνω στο σταυρό.<sup>2</sup>

### 2.2. Βοτανική περιγραφή και χρήσεις

#### 2.2.1. Οικογένεια Lamiaceae

Η οικογένεια Lamiaceae (Labiatae, Χειλανθή) αντιπροσωπεύεται από 3.000 περίπου φυτικά είδη, που εξαπλώνονται σε όλο τον κόσμο. Περιλαμβάνει ποώδη η θαμνώδη φυτά, τα οποία παράγουν αιθέρια έλαια και αναγνωρίζονται συνήθως από τον τετράγωνο βλαστό, τα συνήθως αντίθετα φύλλα, το ευχάριστο άρωμα τους που οφείλεται στην ύπαρξη πολυάριθμων αδένων με αιθέρια έλαια, και τα ζυγόμορφα αρρενοθήλεια άνθη τους με δίχειλη



στεφάνη, που εκφύονται πολλά μαζί από τις μασχάλες των φύλλων σε μικρές κυματοειδείς ταξιανθίες που δίνουν την εντύπωση σπονδύλων.

Στην Ελλάδα αντιπροσωπεύεται από 320 taxa (35 γένη), τα οποία παρουσιάζουν ποικίλη εξάπλωση. Πολλά μέλη της οικογένειας Lamiaceae καλλιεργούνται για να χρησιμοποιηθούν ως βότανα και ως πηγή αιθέριων ελαίων. Τα περισσότερα αιθέρια έλαια αυτής της οικογένειας αποτελούνται από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια.<sup>3</sup>

Γενικά, τα αρωματικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae, είναι πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις και εμφανίζουν διάφορες φαρμακολογικές δράσεις και χαμηλή τοξικότητα.<sup>4</sup> Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ευρέως σε φάρμακα και καλλυντικά, καθώς είναι εμπλουτισμένα με αιθέρια έλαια.<sup>5</sup>

### 2.2.2. Το φυτό *Hyssopus officinalis*

Ο Ύσσωπος (*Hyssopus officinalis*) είναι ένας άγριος πολυετής χαμηλός θάμνος της οικογένειας Lamiaceae, που ευδοκμεί από τη Νότια Ευρώπη μέχρι την εγγύς Ανατολή και έως την περιοχή γύρω από την Κασπία Θάλασσα.<sup>6</sup> Απαντάται σε



μεγάλο υψόμετρο και σε αλκαλικά εδάφη. Το ύψος του θάμνου φτάνει τα 70 εκατοστά και διακρίνεται για την κυανή ή ρόδινη (σπανίως λευκή) ανθοφορία του. Στο άρωμά του διακρίνονται νότες που θυμίζουν δεντρολίβανο ή θρούμπι, ενώ έχει γεύση έντονη και πικρή.<sup>7</sup> Στη συνέχεια παρατίθενται στοιχεία του φυτού που αφορούν τη συστηματική του ταξινόμηση.

**Πίνακας 1:** Συστηματική Ταξινόμηση του φυτού.<sup>8</sup>

<b>Βασίλειο (Regnum)</b>	Plantae
<b>Φύλο (Phylum)</b>	Angiosperms
<b>Τάξη (Ordo)</b>	Lamiales
<b>Οικογένεια (Familia)</b>	Lamiaceae
<b>Γένος (Genus)</b>	<i>Hyssopus</i>
<b>Είδος (Species)</b>	<i>officinalis</i>

### 2.2.3. Φαρμακευτική Δράση – Χρήσεις

Το φυτό *Hyssopus officinalis* βρίσκεται στην καθημερινότητα εφαρμογή για να δώσει γεύση στα φαγητά αλλά και ως συντηρητικό, ενώ χρησιμοποιείται παραδοσιακά για ιατρικούς σκοπούς, όπως για παράδειγμα σε αντισπασμωδικές, στομαχικές, αντιμικροβιακές θεραπείες, σαν φάρμακο για το βήχα<sup>4</sup> και για την καταρροή.<sup>9</sup> Το εκχύλισμα και το αιθέριο έλαιο, έχουν δείξει μέτρια αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση και παράλληλα αντιμικροβιακές, εντομοκτόνες και αντικές ιδιότητες *in vitro*. Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει μυοχαλαρωτική δράση και αναστολή της α-γλυκοσιδάσης.<sup>4</sup> Το αιθέριο έλαιο του φυτού δρα έναντι των μυκήτων του γένους *Candida*, ενώ έχει και αντικές ιδιότητες κατά του απλού έρπητα. Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι κάποια κλάσματα του φυτού, μπορούν να αναστείλουν τον ιό HIV.<sup>10</sup> Μία πρόσφατη εφαρμογή αρωματικών φυτών, συμπεριλαμβανομένου του Ύσσωπου, που αφορά τις βιομηχανίες τροφίμων, είναι η χρήση βιοφίλμ και επιστρώσεων που βελτιώνουν την ποιότητα των τροφίμων και μειώνουν τις μικροβιακές μολύνσεις.<sup>11</sup>

## 2.3. Αιθέρια Έλαια

### 2.3.1. Γενικά

Ο όρος αιθέρια έλαια χρησιμοποιείται για μίγματα πτητικών ουσιών που προσδίδουν στο φυτό που τα παράγει την χαρακτηριστική οσμή του.<sup>3</sup> Παρά τη χρήση της λέξης «έλαια», δεν πρόκειται για μείγματα γλυκεριδίων, αλλά για μίγματα υδρογονανθράκων (τερπενίων ή κυκλικών/άκυκλων ισοπρενοειδών, σεσκιτερπενίων) και οξυγονούχων ενώσεων όπως γερανιόλη, νερόλη, νεράλη, λιναλκοόλη, κ.α.<sup>12</sup> Τα αιθέρια έλαια είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έχουν μικρή διαλυτότητα σε νερό και διαλύονται εύκολα σε οργανικούς διαλύτες.<sup>3</sup> Παραλαμβάνονται με φυσικές μεθόδους (έκθλιψη ή απόσταξη με ατμό), από φύλλα, ρίζες, φρούτα, κ.α.<sup>12</sup> και βρίσκονται σε ειδικούς αδένες εκκρίσεως που είναι είτε εσωτερικοί, είτε εξωτερικοί και η κατανομή τους είναι ακανόνιστη στα διάφορα φυτικά όργανα. Για παράδειγμα, στα φύλλα της ρίγανης, η κάτω επιφάνεια περιέχει 10 – 25 και η πάνω 1 – 6 αδένες, ανά τετραγωνικό χιλιοστό.<sup>13</sup>

Λόγω της χαρακτηριστικής ευχάριστης οσμής τους, η χρήση τους βρίσκει εφαρμογή στην αρωματοποιία καθώς και στη βιομηχανία καλλυντικών και τροφίμων ως φυσικά αρώματα. Πολλά από αυτά εμφανίζουν επιπλέον αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση και βρίσκουν εφαρμογή στην φαρμακευτική. Μίγματα αιθερίων ελαίων σε καθορισμένη αναλογία χρησιμοποιούνται τοπικά για ανακούφιση ή και θεραπεία δερματοπαθειών και ρευματικών προβλημάτων αλλά και ως αφεψήματα σε περίπτωση μολύνσεων του αναπνευστικού. Δεν προκαλούν εθισμό και δεν έχουν παρενέργειες. Είναι επιπλέον γνωστή τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη της αρωματοθεραπείας.<sup>14</sup>

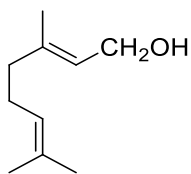
### 2.3.2. Χημεία Αιθερίων Ελαίων

Τα τερπενοειδή, ισοπρενοειδή ή τερπένια, είναι μια κατηγορία ενώσεων με μεγάλη ποικιλία και κοινή βιοσυνθετική προέλευση. Πρόκειται για ενώσεις που αποτελούνται από δομικές μονάδες πέντε ατόμων άνθρακα (μονάδες ισοπρενίου κατά τον Wallach), οι οποίες με κατάλληλο συνδυασμό οδηγούν σε σκελετούς με C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub>, ..., C<sub>40</sub>. Βρίσκονται σε όλα τα μέρη των ανώτερων φυτών (ρίζες, λουλούδια, φύλλα, σπέρματα, κορμός) και χρησιμοποιούνται σε προϊόντα ευρείας κατανάλωσης όπως καλλυντικά, φάρμακα, απορρυπαντικά και τρόφιμα. Ανάλογα με τον αριθμό μονάδων ισοπρενίου που περιέχουν στο μόριό τους, τα τερπενοειδή ταξινομούνται σε κατηγορίες. Έτσι, τερπενοειδή με δύο μονάδες ισοπρενίου (C<sub>10</sub>) λέγονται μονοτερπένια, με τρεις μονάδες ισοπρενίου (C<sub>15</sub>) σεσκιτερπένια, με τέσσερις μονάδες ισοπρενίου (C<sub>20</sub>) διτερπένια, κτλ. Σε καθεμία από τις ομάδες αυτές

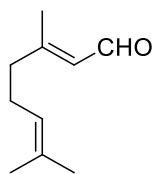
υπάρχει μία μόνο μητρική ένωση, από την οποία προκύπτουν όλα τα μέλη. Οι μητρικές ενώσεις όλων των ομάδων έχουν μεταξύ τους σχέση ομόλογων ενώσεων. Έτσι, όλα τα σεσκιτερπένια προκύπτουν από τον πυροφωσφορικό εστέρα της φαρνεσόλης με μία σειρά ενζυματικών μετατροπών που αφορούν δραστικές ομάδες, κυκλοποιήσεις ή μεταθέσεις και ακολουθούν γνωστές μηχανιστικές πορείες. Το ίδιο ισχύει και για όλα τα διτερπένια των οποίων μητρική ένωση είναι ο πυροφωσφορικός εστέρας της γερανυλογερανιόλης, ένωση ομόλογης του εστέρα της φαρνεσόλης. Στην περίπτωση των μονοτερπενίων, πρόδρομη ένωση είναι ο πυροφωσφορικός εστέρας της γερανιόλης, μέσω του Z – γεωμετρικού ισομερούς του, που είναι ο πυροφωσφορικός εστέρας της νερόλης. Στα αιθέρια έλαια των φυτών βρίσκονται κυρίως μονοτερπένια και σεσκιτερπένια,<sup>15</sup> ενώ στο υπό μελέτη φυτό τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων είναι μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, οξυγονούχα μονοτερπένια και οξυγονούχα σεσκιτερπένια. Η σύσταση των αιθερίων ελαίων καθώς και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά για το είδος *Hyssopus officinalis*, παρουσιάζουν σημαντική μεταβλητότητα.<sup>16</sup> Σε κάποιες περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι συστατικά όπως η β-φελανδρίνη (β-phellandrene), η 1,8-σινεόλη (1,8-cineole), το λεμονένιο (limonene) και η μεθυλική ευγενόλη (methyl eugenol), εμφανίζονται ως τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου, έναντι της πινοκαμφόνης (pinocamphone) και της ισοπινοκαμφόνης (isopinocamphone).<sup>17,18</sup>

Στη συνέχεια φαίνονται παραδείγματα τερπενικών ενώσεων:

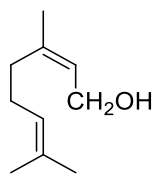
**α) Ακυκλα μονοτερπένια**



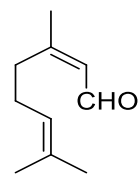
γερανόλη



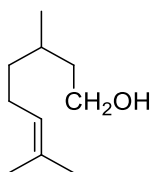
α-κιτράλη



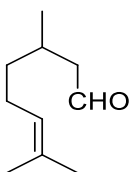
νερόλη



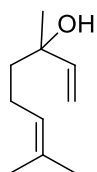
β-κιτράλη



κιτρονελόλη

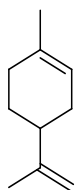


κιτρονελάλη

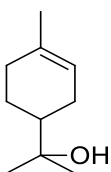


λιναλοόλη

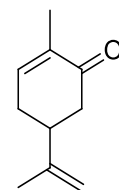
**β) Μονοκυκλικά μονοτερπένια**



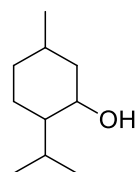
λιμονένιο



α-τερπινεόλη

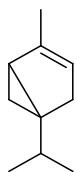


καρβόνη

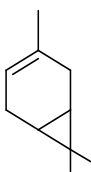


μενθόλη

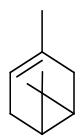
**γ) Δικυκλικά μονοτερπένια**



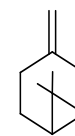
3-θουγένιο



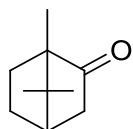
3-καρένιο



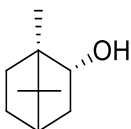
α-πινένιο



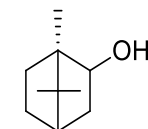
β-πινένιο



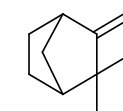
καμφορά



βορνεόλη

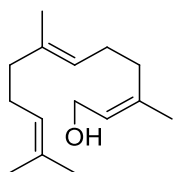


ισοβορνεόλη

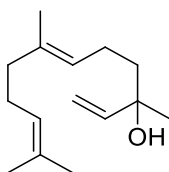


καμφένιο

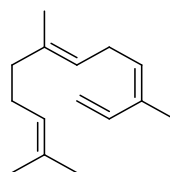
**α) Άκυκλα σесκιτερπένια**



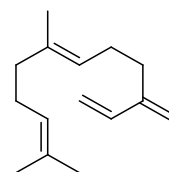
(Z,E)-φαρνεσόλη



νερολιδόλη

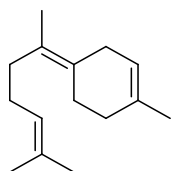


α-φαρνεσένιο

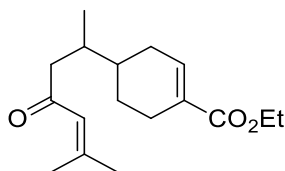


β-φαρνεσένιο

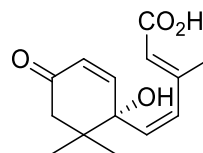
**β) Μονοκυκλικά σесκιτερπένια**



γ-μπιζαμπολένιο

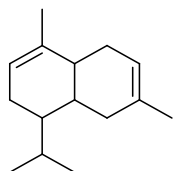


ζουβαμπιόνη

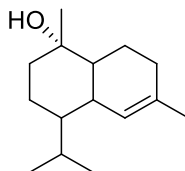


αμπισικικό οξύ

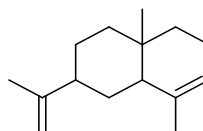
**γ) Δικυκλικά σесκιτερπένια**



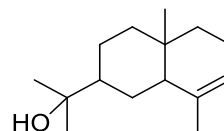
α-καδινένιο



α-καδινόλη

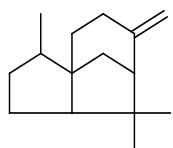


α-σελινένιο

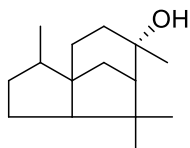


α-ευδεσμόλη

**δ) Τρικυκλικά σесκιτερπένια**



κεδρένιο



κεδρόλη

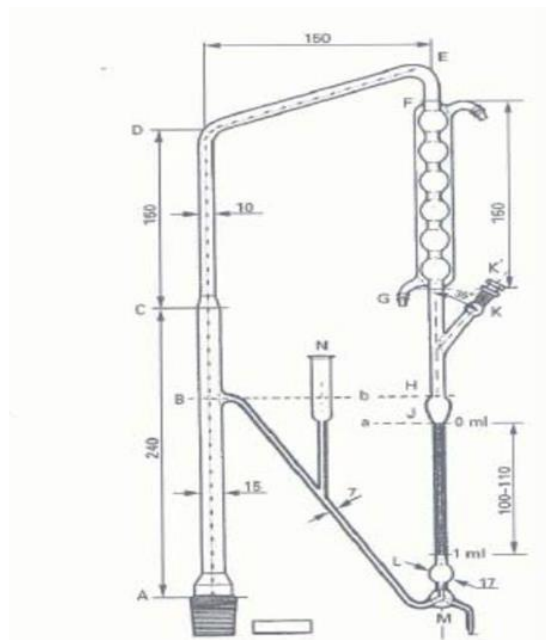
## 2.4. Προσδιορισμός Συστατικών Αιθέριων Ελαίων

### 2.4.1. Μέθοδοι απομόνωσης και διαχωρισμού Αιθέριων Ελαίων

Τα αιθέρια έλαια απομονώνονται από τα φυτά και κατόπιν διαχωρίζονται στα συστατικά τους εκείνα, τα οποία ενδιαφέρουν για μελέτη ή εκμετάλλευση. Για την απομόνωση των αιθέριων ελαίων από το φυτικό υλικό προτείνονται στη βιβλιογραφία τρεις βασικοί τρόποι: α) απόσταξη με υδρατμούς, β) εκχύλιση με πτητικούς διαλύτες, γ) ψυχρή συμπίεση.

Η απόσταξη με υδρατμούς εφαρμόζεται για την παραλαβή αιθέριων ελαίων, των οποίων τα συστατικά είναι ενώσεις σχετικά σταθερές, όπως για παράδειγμα το έλαιο της λεβάντας, της δάφνης και της μέντας. Αυτή η μέθοδος δεν είναι επιτυχής στις περιπτώσεις όπου η παραμονή του φυτικού υλικού σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για αρκετή ώρα, μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές στη δομή των περιεχόμενων ευπαθών ενώσεων, όπως πχ. υδρόλυση, οξείδωση, αφυδάτωση τριτοταγών αλκοολών, μετάθεση ή πολυμερισμό. Οι μεταβολές αυτές αλλοιώνουν την ποιότητα του αιθέριου ελαίου. Γενικά είναι επιθυμητό να εφαρμόζονται υψηλές θερμοκρασίες για πολύ μικρό χρονικό διάστημα ή χαμηλές θερμοκρασίες υπό ελαττωμένη πίεση.

Η συσκευή απόσταξης που χρησιμοποιείται εργαστηριακά, είναι τύπου Clevenger. Στη συσκευή αυτή, το προς απόσταξη φυτικό υλικό τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό. Όταν αρχίσει ο βρασμός, οι σχηματιζόμενοι υδρατμοί οι οποίοι αποτελούν ένα ομογενές μίγμα αιθέριου ελαίου και ατμού, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα (F-G). Το αιθέριο έλαιο και το νερό συλλέγονται στο διαβαθμισμένο σωλήνα J-L και η κατώτερη υδατική στιβάδα ανακυκλώνεται μέσω της διαδρομής M-B.<sup>19</sup>



**Εικόνα 1:** Συσκευή Clevenger για την παραλαβή αιθερίων ελαίων από αρωματικά φυτά (European Pharmacopoeia (2000) 3rd edn, Copyright Council of Europe).<sup>19</sup>

Η μέθοδος της εκχύλισης με πτητικούς αδρανείς διαλύτες εφαρμόζεται κυρίως στα ευαίσθητα αρώματα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε αυτή την περίπτωση είναι κυρίως ο πετρελαϊκός αιθέρας, σπανιότερα ο αιθέρας, ενώ για ευαίσθητα και μεγάλης αξίας αιθέρια έλαια χρησιμοποιείται το υγροποιημένο βουτάνιο ή ακόμα και το υγροποιημένο διοξείδιο του άνθρακα. Μετά την εκχύλιση και την απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση, παραμένει μια ημιστερεή ελαιώδης μάζα, που ονομάζεται concrete. Το concrete περιέχει εκτός από αρωματικές ύλες, σημαντικές ποσότητες κηρών, χρωστικών και πηκτικών και είναι μερικώς διαλυτό στην αιθανόλη. Κατεργασία της μάζας αυτής με θερμή αιθανόλη, ψύξη και διήθηση, δίνει ένα διαυγές αλκοολικό διάλυμα. Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης υπό ελαττωμένη πίεση, λαμβάνεται το λεγόμενο απόλυτο αιθέριο έλαιο (absolute), το οποίο χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία. Με τη μέθοδο αυτή παραλαμβάνονται τα αρώματα των λουλουδιών όπως πχ. του γιασεμιού, του υάκινθου, της γαρδένιας, κλπ.

Τέλος, με την ψυχρή συμπίεση παραλαμβάνονται τα αιθέρια έλαια των φυτικών ιστών, οι οποίοι περιέχουν ελαιώδεις θύλακες, όπως για παράδειγμα ο φλοιός των καρπών των εσπεριδοειδών (πορτοκαλέλαιο, λεμονέλαιο, κλπ.). Το έλαιο που λαμβάνεται με την μέθοδο αυτή, περιέχει μεγάλα ποσά κηρών, που απομακρύνονται με κατεργασία με αιθανόλη.

Μετά την απομόνωση του αιθέριου ελαίου, ο διαχωρισμός των μονοτερπενίων από το μίγμα ενώσεων καθώς και ο καθαρισμός τους, γίνεται συνήθως με κλασματική απόσταξη, δεδομένου ότι οι ενώσεις αυτές είναι μικρού μοριακού βάρους και χαμηλού σημείου ζέσεως. Στις περιπτώσεις όπου μία ή δύο ενώσεις αποτελούν τα κύρια συστατικά ενός αιθέριου ελαίου, αρκεί μόνο μία απόσταξη για την απομόνωση του κάθε συστατικού. Αρκετά συχνά



όμως απαιτούνται χειρισμοί μεγάλης ακρίβειας με συσκευές υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και τότε λαμβάνονται καθαρά προϊόντα, μόνο αν το ποσοστό τους στο αιθέριο έλαιο ξεπερνά το 5 – 7%. Με την ανάπτυξη της αέριας χρωματογραφίας, έγινε δυνατός ο διαχωρισμός ενώσεων που βρίσκονται στα αιθέρια έλαια σε πολύ μικρότερα ποσοστά (<0,1%). Σε πολλές περιπτώσεις, καλά αποτελέσματα διαχωρισμού δίνει και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας καθώς επίσης και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Σήμερα ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (GC-MS) δίνει τη δυνατότητα καταγραφής με ακρίβεια του φάσματος μάζας μιας ένωσης και οδηγεί στην πιστοποίηση της δομής χωρίς να προηγηθεί η απομόνωσή της.<sup>15</sup>

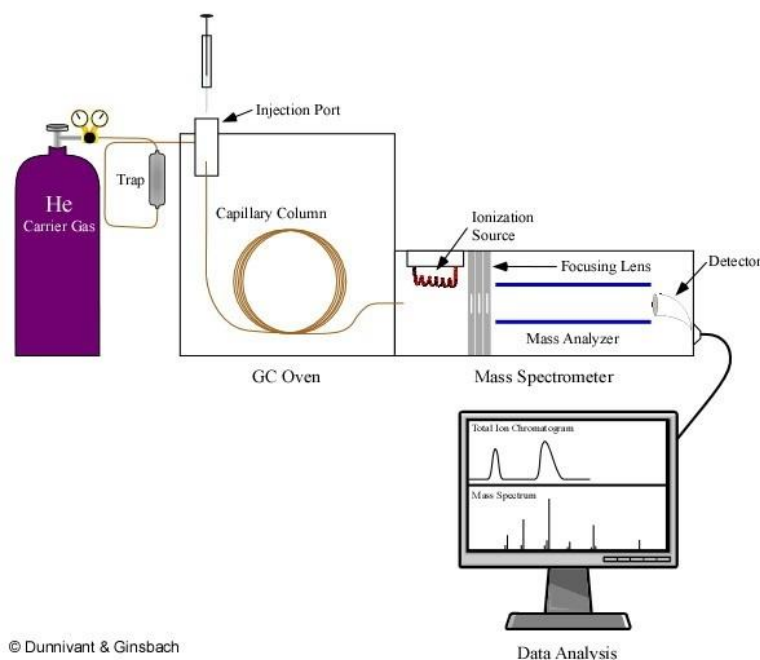
#### 2.4.2. Μεθοδολογία GC-MS

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες διεργασίες διαχωρισμού μιγμάτων στην αναλυτική χημεία. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με κριτήριο την πτητικότητα των συστατικών του μίγματος. Τα συστατικά διαχωρίζονται λόγω εκλεκτικών προσροφήσεων μεταξύ μιας υγρής ή στερεάς στατικής φάσης και μιας αέριας κινούμενης φάσης μέσα στη στήλη της χρωματογραφίας. Μέσα στη στήλη ρέει φέρον αέριο. Ανάλογα με τις ανάγκες της ανάλυσης το φέρον αέριο μπορεί να είναι είτε ήλιο, είτε υδρογόνο, είτε αργό, είτε άζωτο. Στην παρούσα μελέτη το φέρον αέριο είναι He. Η επιλογή του αερίου εξαρτάται από το πλαίσιο λειτουργίας του ανιχνευτή (πιθανότητα συνδυασμού GC-MS), από το πλαίσιο των συνθηκών ασφαλείας αφού το υδρογόνο είναι πολύ εύφλεκτο και από οικονομικούς παράγοντες. Παρακάτω παρατίθεται σκαρίφημα με τα βασικά στοιχεία που αποτελούν τον αέριο χρωματογράφο.

Στον εισαγωγέα δείγματος (injection port) ο οποίος βρίσκεται σε υψηλή θερμοκρασία, το μίγμα εγχέεται είτε μέσω σύριγγας είτε μέσω αυτόματης δειγματοληπτικής διάταξης και μεταφέρεται μέσω του φέροντος αερίου στην υπόλοιπη διάταξη. Για την ευκολότερη μετακίνηση του δείγματος, το εξωτερικό τμήμα του χρωματογράφου είναι ειδικός φούρνος, ο οποίος μπορεί να επιτύχει θερμοκρασίες από 40 έως 320°C. Εσωτερικά του φούρνου βρίσκεται η στήλη η οποία έχει αρκετά μέτρα μήκος σε αντίθεση με τη διάμετρό της, η οποία περιορίζεται σε κάποια μm.<sup>20</sup>

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια τεχνική για τη μελέτη των μαζών ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων. Για να ληφθεί ένα φάσμα μάζας, ουσίες στην αέρια φάση οι οποίες έχουν εκροφηθεί από μια συμπυκνωμένη φάση ιοντίζονται, τα ιόντα επιταχύνονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο και κατόπιν διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζα-προς-φορτίο, m/z. Το φάσμα μάζας δείχνει την απόκριση του ανιχνευτή ως προς το m/z. Το εμβαδόν κάτω από κάθε κορυφή είναι ανάλογο της αφθονίας κάθε ισοτόπου. Το φάσμα μάζας είναι ευαίσθητο και παρέχει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες.

Ο συνδυασμός φασματομετρίας μάζας και αέριας χρωματογραφίας GC-MS, αποτελεί ένα πολύ ισχυρό μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων μιγμάτων. Ο αέριος χρωματογράφος (GC) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ουσιών, ενώ το φασματόμετρο μάζας (MS) χρησιμεύει στην ταυτοποίησή τους. Η τεχνική GC-MS αποτελεί ίσως το καλύτερο αναλυτικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πτητικών ουσιών.<sup>21</sup> Παρακάτω φαίνεται διαγραμματικά η λειτουργία της αναλυτικής τεχνικής GC-MS.



**Εικόνα 2:** Αρχή λειτουργίας ανάλυσης του συστήματος GC-MS.

Για τον πλήρη προσδιορισμό μιας ουσίας που δίνει κορυφή σε φάσμα GC-MS είναι απαραίτητη η λήψη φάσματος σειράς αλκανίων και ο υπολογισμός των δεικτών κατακράτησης Kovats. Ο δείκτης κατακράτησης Kovats, KI, για ένα αλκάνιο με ευθύγραμμη αλυσίδα, είναι 100 φορές ο αριθμός των ατόμων άνθρακα. Έτσι για το οκτάνιο KI=800 και για το εννεάνιο KI=900. Μια ουσία που εκλούεται μεταξύ οκτανίου και εννεανίου, έχει KI μεταξύ 800 και 900.<sup>22</sup> Για τον υπολογισμό του KI μιας ουσίας A, χρησιμοποιούμε τη σχέση:

$$KI_A = 100n + 100 \frac{Rt_A - Rt_{Cn}}{Rt_{C_{n+1}} - Rt_{Cn}}$$

όπου n ο αριθμός των ατόμων άνθρακα του αλκανίου που προηγείται της ουσίας A,  $Rt_A$  ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας A,  $Rt_{Cn}$  ο χρόνος κατακράτησης του αλκανίου πριν από την ουσία A και  $Rt_{C_{n+1}}$  ο χρόνος κατακράτησης του αλκανίου μετά την ουσία A.

### 3. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των δευτερογενών μεταβολιτών της δρόγης των αρωματικών φυτών καθορίζεται από το γενότυπο και επηρεάζεται από το περιβάλλον καθώς και από διάφορες επεμβάσεις όπως η εποχή συγκομιδής. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η πορεία βιοσύνθεσης των πτητικών συστατικών του φυτού Ύσσωπος (*Hyssopus officinalis*) μέσω του αιθέριου ελαίου και της μελέτης της ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης του.

Πιο συγκεκριμένα, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι:

1. ο προσδιορισμός της εποχιακής διακύμανσης των συστατικών του αιθέριου ελαίου
2. ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του αιθέριου ελαίου του φυτού
3. ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του φυτού σε αιθέριο έλαιο
4. η μελέτη της βιολογικής του δραστηρότητας σε *in vitro* πειράματα με το βακτήριο *E. coli* και το μύκητα *S. cerevisiae*.

#### 4. Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά το είδος *H. officinalis*, συλλέχθηκε από την περιοχή του Αμπελούζου Μεσσαράς (35° 3'47.76"B, 24°56'16.43"A), δήμου Γόρτυνας όπου και καλλιεργείται (Μάιος 2014-2015).

Τα αιθέρια έλαια παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη σε συσκευή τύπου Clevenger, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Hellenic Pharmacopoeia. Η μέθοδος αυτή είναι η πιο γνωστή και η πιο διαδεδομένη για την απομόνωση των αιθέριων ελαίων από αρωματικά φυτά. Η συσκευή αποτελείται από α) ένα κύριο μέρος που περιλαμβάνει κάθετο ψυκτήρα, προχοΐδα συλλογής του ελαίου και σύστημα επαναρροής και β) μια σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 500 mL. Το ξηρό δείγμα (7 έως 50 g περίπου) τοποθετήθηκε με 250 mL απιονισμένου νερού στη σφαιρική φιάλη η οποία θερμάνθηκε με την χρήση θερμομανδύα. Οι υδρατμοί που σχηματίζονται μαζί με τα πτητικά συστατικά υγροποιούνται στον ψυκτήρα. Το νερό ανακυκλώνεται, ενώ η φάση του αιθέριου ελαίου βρίσκεται υπερκείμενα της υδατικής στοιβάδας στην και σταδιακά συγκεντρώνεται στο διαβαθμισμένο σωλήνα (προχοΐδα) του κυρίου μέρους της συσκευής. Η διαδικασία της απόσταξης διήρκεσε 2 ώρες. Το αιθέριο έλαιο, το οποίο μετρείται άμεσα σε mL και εκφράζεται σε mL/100g ξηρού δείγματος, συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 4°C μέχρι την ανάλυση. Για την αφαίρεση της υγρασίας από τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιήθηκε άνυδρο θειικό νάτριο (Merk, USA). Η απομόνωση και παραλαβή του κάθε δείγματος επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των συστατικών των αιθέριων ελαίων έγινε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας. Ο αέριος χρωματογράφος (Shimadzu GC-17A), ήταν ενωμένος με μία τριχοειδή άπολη στήλη (στατική φάση 5% supelco, SBP-5, διαστάσεων 30m × 0,25 mm × 0,25 μm film thickness). Ο φασματογράφος μάζας ήταν τύπου Shimadzu GCMS-QP 5050 και η μέθοδος παραγωγής ιόντων ήταν ηλεκτρονιακός ιονισμός (E.I) ενέργειας 70 eV, ενώ ο αναλυτής μαζών ήταν τετράπολος. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο ήλιο (1.0 mL min<sup>-1</sup>). Ο ενέσιμος όγκος ήταν 1 μL. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θερμοπρογραμματιζόμενης χρωματογραφίας. Για την ανίχνευση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε επιπλέον βάση δεδομένων, όπως η NIST21 (21.250 διαφορετικά συστατικά) NIST107 (107.866) και PMW\_TOX2 (4.367).

Για την ταυτοποίηση των χημικών συστατικών των φυτών χρησιμοποιήθηκε το θερμικό πρόγραμμα (που ονομάστηκε Diphlo), με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

##### Αέρια Χρωματογραφία:

- *Sample time:* 0min
- *Injection Temperature:* 230°C
- *Interface Time:* 250°C

	Rate	Temperature	Hold Time
1	-	50.0	5.00
2	5.0	150.0	10.00
3	5.0	280.0	20.00

→ *Control Mode: Split*

→ *Program Time: 81,00min*

→ *Carrier Gas:*

Column Inlet Pressure: 41,2

Split Ratio: 27

Column Flow: 0,9ml/min

Total Flow: 25,3ml/min

Linear Velocity: 33,5cm/sec

Carrier Flow: 25,3ml/min

#### Φασματομετρία Μάζας:

Start Time (min)	End Time (min)	Start m/z	End m/z
4.00	81.00	40.00	700.00

Η λήψη χρωματογραφημάτων με το πρόγραμμα Diphlo δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα και εγκαταλείφθηκε.

Στη συνέχεια, αφού μελετήθηκε η βιβλιογραφία<sup>10</sup> για την ανάλυση του φυτού *Hyssopus officinalis* με GC-MS, χρησιμοποιήθηκε νέο θερμικό πρόγραμμα (phyto\_new) με τα εξής χαρακτηριστικά: Η θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος ρυθμίστηκε στους 230 °C και η θερμοκρασία του φούρνου στους 40 °C αρχικά, με αύξηση 3 °C/min μέχρι τους 250 °C. Η θερμοκρασία ανίχνευσης ρυθμίστηκε στους 250 °C και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης στα 81min.

## 5. Αποτελέσματα

Για την ανάδειξη των συστατικών του φυτού *Hyssopus officinalis*, χρησιμοποιήθηκαν από τα παρακάτω δείγματα που είχαν συλλεχθεί, εκείνα με γκρι επισήμανση, προκειμένου να καλυφθούν όλοι οι μήνες του έτους στην περίπτωση των φύλλων και όλοι οι μήνες της περιόδου άνθησης στην περίπτωση των ανθέων.

**Πίνακας 2:** Δείγματα φύλλων προς ανάλυση του *Hyssopus officinalis*

Μήνας	Βιολογικό στάδιο	Ποσότητα φυτικού υλικού (gr)	Ποσότητα E.O. (ml)	E.O.C.% (v/w)
Μάιος ('14)	φύλλα	6.75	0.04	0.59
Ιούνιος	φύλλα	23.40	0.20	0.86
	φύλλα	20.00	0.15	0.75
Ιούλιος	φύλλα	30.00	0.20	0.67
	φύλλα	50.00	0.50	1.00
Αύγουστος	φύλλα	24.45	0.45	1.84
Σεπτέμβριος	φύλλα/άνθη		0.42	
	φύλλα	14.00	0.10	0.71
Οκτώβριος	φύλλα			
Νοέμβριος	φύλλα	16.78	0.10	0.60
	αναβλάστησης			
	φύλλα παλαιάς βλάστησης	16.89	0.10	0.59
Δεκέμβριος	φύλλα αναβλ.	11.00	0.03	0.27
	φύλλα παλαιάς βλαστ.	14.00	0.10	0.71
Ιανουάριος ('15)	φύλλα	15.00	ίχνη	
Φεβρουάριος	φύλλα	20.61	0.02	0.10
Μάρτιος	φύλλα	13.50	0.11	0.82
Απρίλιος	φύλλα	17.27	0.11	0.64
Μάιος	φύλλα	15.60	0.19	1.22
	φύλλα	26.80	0.43	1.60
Ιούνιος	φύλλα	41.77	0.34	0.81

**Πίνακας 3:** Δείγματα ανθέων του φυτού *Hyssopus officinalis*

Μήνας	Βιολογικό στάδιο	Ποσότητα φυτικού υλικού (gr)	Ποσότητα E.O. (ml)	E.O.C.% (v/w)
Μάιος ('15)	άνθη	10.00	0.21	2.10
Ιούνιος ('14)	άνθη	31.73	0.65	2.50
Ιούλιος ('14)	άνθη	30.00	0.50	1.67
Αύγουστος ('14)	άνθη	16.13	0.25	1.55
	άνθη	7.67	0.20	2.61
Σεπτέμβριος ('14)	φύλλα/άνθη		0.42	
Οκτώβριος ('14)	άνθη	5.00	0.10	2.00

Τα αποτελέσματα εξήχθησαν σύμφωνα με την αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας, η οποία περιγράφηκε παραπάνω. Στο παράρτημα παρατίθενται τα φάσματα, στα οποία φαίνεται η διακύμανση των συστατικών, καθώς και το φάσμα των αλκανίων που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίησή τους.

Η ταυτοποίηση της δομής των συστατικών των δειγμάτων, έγινε συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης (Rt) και τα φάσματα μάζας με τις τιμές και τα φάσματα της βιβλιογραφίας και με βάση τη βιβλιοθήκη πληροφοριών του λογισμικού του οργάνου. Επιπλέον, σύμφωνα με την παράγραφο 2.4.2, που αναφέρεται στους δείκτες κατακράτησης, υπολογίστηκαν οι δείκτες αυτοί για τις ουσίες των δειγμάτων. Για καλύτερη ταυτοποίηση των ενώσεων, οι δείκτες αυτοί συγκρίθηκαν με εκείνους που δίνονται από τον Adams<sup>23</sup> και σε κάποιες περιπτώσεις από την ηλεκτρονική βιβλιοθήκη του NIST.<sup>24</sup>

Εξαιτίας προβλημάτων που εμφανίζονταν στο GC-MS, η στήλη κόπηκε 30cm μετά από τη λήψη των 8 πρώτων δειγμάτων και 1,5m επιπλέον, πριν πραγματοποιηθούν τα 3 τελευταία πειράματα. Το δείγμα των αλκανίων μελετήθηκε αφού η στήλη κόπηκε 30cm. Το πρώτο κομμάτι που αφαιρέθηκε από τη στήλη, δε δημιουργεί σημαντική απόκλιση, καθώς το συνολικό μήκος της στήλης ήταν 30m, άρα η απόκλιση είναι 0,01%. Το δεύτερο κομμάτι ωστόσο, του 1,50m, δημιουργεί απόκλιση 5,05% στους δείκτες κατακράτησης. Η απόκλιση ήταν σταθερή, αλλά παρολαυτά κρίθηκε αναγκαία η επανάληψη του πειράματος με το πρότυπο δείγμα αλκανίων, για να επιβεβαιωθεί και ο δείκτης Kovats των συστατικών. Για τα 3 τελευταία πειράματα ωστόσο, δεν θα συνυπολογιστούν οι χρόνοι κατακράτησης στη μέση τιμή των χρόνων αυτών.

**Πίνακας 4:** Ποσοστιαία περιεκτικότητα των συστατικών των φύλλων και μέσοι χρόνοι κατακράτησης κάθε συστατικού.

	M.O. Rt	R.I. <sup>a</sup>	R.I. <sup>b</sup>	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	Ιούνιος	Ιούλιος	Αύγουστος*	Σεπτέμβριος	Οκτώβριος	Νοέμβριος	Δεκέμβριος
α-Thujene		930	930	n.d. <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α -Pinene	7.399	931	939	n.d.	n.d.	0.37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(+)-Sabinene	8.864	971	975	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.14	n.d.	n.d.	n.d.	0.69	n.d.	0.96	n.d.
β-Pinene	8.954	973	979	5.27	n.d.	13.02	n.d.	0.89	15.80	9.46	19.52	8.61	13.93	10.64	n.d.
β-Myrcene	9.590	990	990	n.d.	n.d.	1.03	n.d.	1.35	2.25	0.88	n.d.	n.d.	0.25	0.54	n.d.
Pseudolimonene	9.902	999	1003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	n.d.	n.d.
o-Cymene	10.740	1023	1026	1.39	n.d.	n.d.	n.d.	0.26	0.22	0.24	n.d.	n.d.	0.67	0.60	n.d.
Limonene	10.827	1026	1029	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.30	n.d.	1.90	n.d.	n.d.
β-Phellandrene	10.880	1027	1029	n.d.	n.d.	3.73	0.33	8.66	n.d.	3.16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Isopropenyl-5,5-dimethylcyclopentene	10.883	1027	1028	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.03	0.19
Eucalyptol (1.8-Cineole)	10.960	1029	1031	n.d.	n.d.	1.33	n.d.	n.d.	0.37	n.d.	n.d.	n.d.	0.24	0.34	n.d.
(E)-β-Ocimene	11.710	1050	1050	n.d.	n.d.	0.31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ-Terpinene	11.972	1057	1059	1.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



(Z)-Sabinene hydroxide	12.284	1066	1070	0.81	0.26	n.d.	n.d.	0.54	0.07	n.d.	n.d.	0.56	0.69	1.37	0.26
(Z)-Linalool oxide (furanoid)	12.463	1071	1072	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.14	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Terpinolene	13.004	1086	1088	0.17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Linalool	13.516	1100	1096	n.d.	n.d.	n.d.	0.92	1.82	1.64	n.d.	n.d.	0.62	1.19	0.51	0.75
(Z)-Thujone	13.577	1103	1102	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.21	n.d.	0.20
$\beta$ -Thujone	13.987	1115	1114	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(-)-(E)-Pinocarveol	14.726	1137	1139	1.02	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	0.12	n.d.	n.d.	n.d.	1.68	n.d.	1.06
trans-Verbenol	14.958	1144	1144	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(E)-Pinocamphone	15.468	1160	1162	2.39	0.31	n.d.	7.79	n.d.	12.01	15.46	15.32	11.38	0.62	1.93	15.56
Pinocarvone	15.523	1162	1164	1.61	n.d.	4.31	n.d.	0.14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.48	2.24	1.29
Isopinocamphone (Z)-Pinocamphone)	15.990	1176	1175	37.73	6.19	41.17	52.46	55.67	46.39	58.15	53.34	42.74	32.38	56.46	42.66
Terpinen-4-ol	16.018	1177	1177	1.46	0.70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.71	n.d.
Cryptone	16.339	1186	1185	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.23	0.23	n.d.	n.d.	n.d.	4.19	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Terpineol	16.466	1190	1188	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.34	0.28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.18
Myrtenal	16.626	1195	1195	1.70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.25	0.74	0.38	1.97	1.23	2.56
Myrtenol	16.630	1195	1195	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.76	1.38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Estragole (Methyl chavicol)	16.744	1199	1196	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Cumal	17.975	1239	1241	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.89	n.d.	n.d.
Pinocamphone <trans-2-hydroxy>	18.291	1249	1250	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.17	0.16	2.81	n.d.	n.d.
p-Cymen-7-ol	19.596	1292	1290	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.47	n.d.	n.d.
Carvacrol	19.728	1297	1299	n.d.	0.61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phenol, 2-ethyl-4,5- dimethyl-	20.014	1307	1313	n.d.	1.09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(-)-Myrtenyl acetate	20.531	1325	1326	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Neryl acetate	21.643	1364	1361	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.32	n.d.	n.d.
(-)- $\beta$ -Bourbonene	22.224	1385	1388	2.51	0.40	0.51	0.83	0.88	0.45	1.09	0.35	1.63	0.66	1.29	1.44
Methyleugenol	22.819	1406	1403	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Isocaryophyllene	22.866	1408	1408	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.08	n.d.	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Gurjunene	22.890	1409	1409	n.d.	n.d.	n.d.	0.27	0.11	0.08	n.d.	n.d.	0.43	n.d.	n.d.	0.13
Caryophyllene	23.194	1420	1419	n.d.	0.16	3.00	4.14	1.97	n.d.	0.73	0.20	3.38	n.d.	1.52	2.27
$\beta$ -Gurjunene	23.441	1430	1433	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	n.d.	n.d.	0.09
Aromadendrene	23.821	1444	1441	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.09
$\alpha$ -Caryophyllene	24.100	1454	1454	n.d.	n.d.	n.d.	0.56	0.31	n.d.	n.d.	n.d.	0.58	n.d.	0.28	0.42
Alloaromadendrene	24.313	1462	1460	n.d.	0.53	1.52	1.37	0.81	n.d.	0.44	0.38	1.82	n.d.	0.65	1.43
Germacrene D	24.860	1482	1485	0.75	4.61	13.56	7.35	1.81	0.45	0.25	n.d.	2.86	n.d.	1.31	4.10
$\beta$ -Ionone	25.016	1489	1488	0.20	0.62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\beta$ -Selinene	25.038	1489	1490	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	n.d.	n.d.	0.24

Viridiflorene	25.268	1498	1496	n.d.	2.19	4.88	3.88	1.82	n.d.	n.d.	n.d.	3.79	n.d.	0.40	2.35
Butylated Hydroxytoluene	25.689	1511	1515	0.76	2.30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.32
trans-Calamenene	26.048	1522	1522	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.15	n.d.	n.d.	n.d.
Elemol	26.875	1547	1549	5.2	21.02	6.45	7.95	9.62	1.90	3.03	1.97	5.27	5.70	5.11	7.40
Norbourbonanone	27.243	1563	1559	n.d.	1.79	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Spathulenol	27.846	1577	1578	3.54	5.76	n.d.	n.d.	0.53	0.54	n.d.	0.57	0.90	1.92	1.63	1.59
Caryophyllene oxide	28.013	1582	1583	16.15	18.57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.55	0.90	3.33	2.14	3.36
Not Identified	28.701			0.56	4.36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.45	0.74	n.d.	0.82
Isoaromadendrene epoxide	28.958	1608	1612	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.37	n.d.	n.d.
$\gamma$ -Eudesmol	29.884	1627	1632	n.d.	1.45	n.d.	3.00	n.d.	0.22	n.d.	n.d.	n.d.	0.08	n.d.	0.38
$\tau$ -Cadinol	30.305	1635	1640	0.32	n.d.	n.d.	0.76	n.d.	0.29	n.d.	n.d.	0.58	0.83	n.d.	0.62
Cubenol	30.715	1644	1646	0.70	1.97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.41
$\beta$ -Eudesmol	30.847	1647	1650	n.d.	n.d.	n.d.	1.30	0.64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pogostol	31.265	1655	1653	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12	n.d.	n.d.
Nerolidyl acetate	32.372	1678	1677	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	n.d.	n.d.
iso-Longifolol	34.833	1727	1729	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.21	n.d.	n.d.
Vetivenic acid (Zizanoic acid)	39.418	1815	1811	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.23	n.d.	n.d.
Heptacosane	58.785	2693	2700	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	n.d.	n.d.

Nonacosane	61.827	2892	2900	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	n.d.	n.d.
<b>Ποσοστό ταυτοποίησης δείγματος</b>				<b>85.32%</b>	<b>75.08%</b>	<b>95.19%</b>	<b>92.91%</b>	<b>90.41%</b>	<b>85.60%</b>	<b>93.69%</b>	<b>96.27%</b>	<b>88.23%</b>	<b>80.79%</b>	<b>94.89%</b>	<b>92.17%</b>
Σύνολο ταυτοποιημένων ουσιών**				21/42	21/49	14/20	15/25	23/42	23/64	13/20	13/15	24/35	34/73	22/27	28/42
Μονοτερπένια				7.91%	n.d.	18.46%	0.33%	11.30%	18.27%	13.74%	21.68%	9.30%	16.91%	14.77%	0.19%
Οξυγονούχα μονοτερπένια				46.72%	9.35%	46.81%	61.17%	60.50%	63.20%	74.41%	70.57%	55.84%	47.96%	65.79%	64.52%
Σεσκιτερπένια				3.56%	7.89%	23.47%	18.40%	7.71%	0.98%	2.51%	0.93%	14.99%	0.66%	5.45%	12.56%
Οξυγονούχα σεσκιτερπένια				26.37%	51.07%	6.45%	13.01%	10.79%	2.95%	3.03%	3.09%	7.65%	13.79%	8.88%	14.08%
Μη τερπενικά συστατικά				0.20%	2.41%	n.d.	n.d.	0.11%	0.20%	n.d.	n.d.	n.d.	0.73%	n.d.	n.d.

<sup>a</sup>R.I. (Retention Indices) από πειραματικά αποτελέσματα

<sup>b</sup>R.I. (Retention Indices) από βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>23,24</sup>

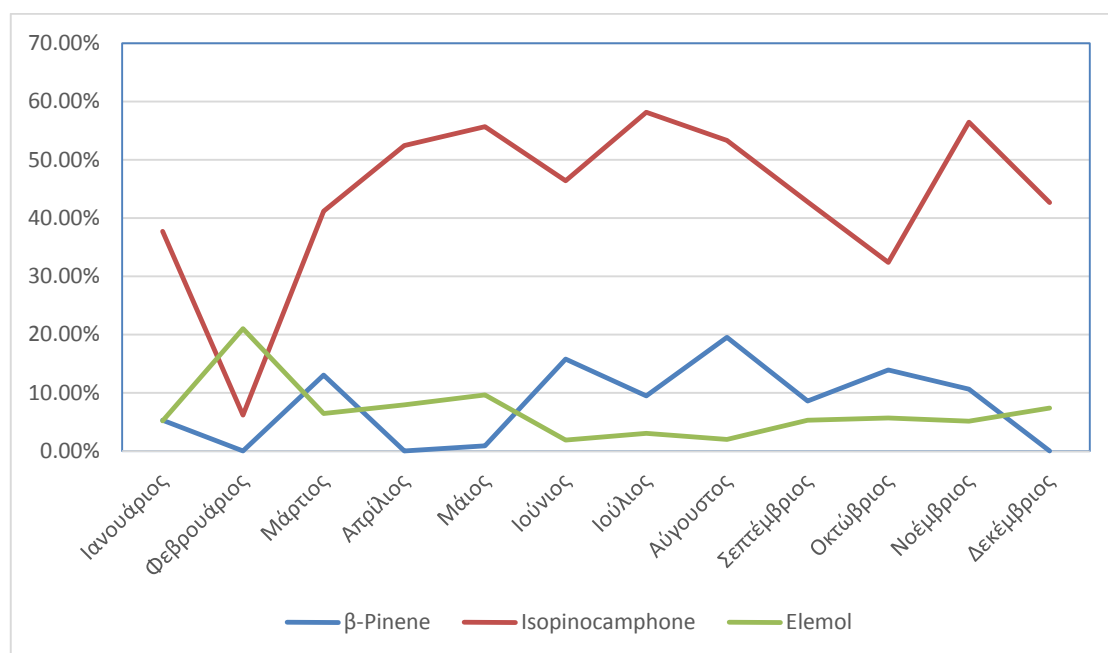
<sup>c</sup> not detected, η δομή του συγκεκριμένου συστατικού δεν ταυτοποιήθηκε είτε από το φάσμα μάζας είτε από τον δείκτη Kovats

\* Οι τιμές από το δείγμα του Αυγούστου δε συμπεριλήφθηκαν στους μέσους χρόνους κατακράτησης (M.O. Rt).

\*\*Κορυφές που ταυτοποιήθηκαν / Κορυφές που ολοκληρώθηκαν.

**Διάγραμμα 1:** Διακύμανση τριών συστατικών των δειγμάτων των φύλλων, ως ποσοστιαία περιεκτικότητα επί του συνολικού αιθερίου ελαίου.

Μήνας	$\beta$ -Pinene	Isopinocampnone	Elemol
Ιανουάριος	5.27%	37.73%	5.20%
Φεβρουάριος	n.d.	6.19%	21.02%
Μάρτιος	13.02%	41.17%	6.45%
Απρίλιος	n.d.	52.46%	7.95%
Μάιος	0.89%	55.67%	9.62%
Ιούνιος	15.80%	46.39%	1.90%
Ιούλιος	9.46%	58.15%	3.03%
Αύγουστος	19.52%	53.34%	1.97%
Σεπτέμβριος	8.61%	42.74%	5.27%
Οκτώβριος	13.93%	32.38%	5.70%
Νοέμβριος	10.64%	56.46%	5.11%
Δεκέμβριος	n.d.	42.66%	7.40%



**Πίνακας 5:** Ποσοστιαία περιεκτικότητα των συστατικών των ανθέων και μέσοι χρόνοι κατακράτησης κάθε συστατικού.

	M.O. Rt	R.I. <sup>a</sup>	R.I. <sup>b</sup>	Μάιος	Ιούνιος*	Ιούλιος	Αύγουστος*	Σεπτέμβριος	Οκτώβριος
α-Thujene	7.272	928	930	0.09	n.d. <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	0.42	n.d.
α-Pinene	7.356	930	939	0.27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(+)-Sabinene	8.846	971	975	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.41	0.19
β-Pinene	8.937	973	979	6.55	0.80	4.11	0.54	11.02	0.75
β-Myrcene	9.597	991	990	4.92	n.d.	n.d.	n.d.	2.73	0.42
o-Cymene	10.774	1024	1026	n.d.	n.d.	0.48	n.d.	0.23	n.d.
Limonene	10.903	1027	1029	n.d.	n.d.	0.34	n.d.	n.d.	n.d.
β-Phellandrene	10.916	1027	1029	27.72	n.d.	n.d.	n.d.	9.87	1.94
Eucalyptol (1.8-Cineole)	10.973	1029	1031	n.d.	0.32	0.35	0.33	n.d.	n.d.
(E)-β-Ocimene	11.672	1049	1050	0.80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ-Terpinene	11.984	1057	1059	0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(Z)-Sabinene hydroxide	12.242	1065	1070	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.73
(Z)-Linalool oxide (furanoid)		1073	1072	n.d.	0.32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(E)-Linalool oxide (furanoid)		1089	1086	n.d.	0.22	n.d.	0.26	n.d.	n.d.
Linalool	13.510	1100	1096	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.06	0.78
Sabina ketone <dehydro>		1118	1120	n.d.	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(-)-(E)-Pinocarveol	14.679	1136	1139	n.d.	n.d.	n.d.	0.62	n.d.	0.19
Nopinone		1136	1140	n.d.	0.60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(E)-Pinocamphone ((E)-3-Pinanone)	15.441	1159	1162	n.d.	10.55	24.04	2.32	1.99	6.00
Pinocarvone	15.513	1161	1164	n.d.	0.64	n.d.	0.52	1.09	2.36
Isopinocamphone ((Z)-Pinocamphone)	16.032	1176	1175	41.88	52.55	64.85	52.77	54.31	64.57
Cryptone	16.376	1188	1185	n.d.	n.d.	0.41	0.70	0.49	0.44

$\alpha$ -Terpineol	16.501	1191	1188	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.36	0.34
Myrtenol	16.643	1196	1195	0.58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.94
Myrtenal	16.667	1196	1195	n.d.	0.64	0.66	1.57	0.28	n.d.
Pinocamphone <trans-2-hydroxy>	18.299	1250	1250	n.d.	7.75	1.50	13.48	0.27	0.89
Methyl myrtenate	19.748	1298	1294	n.d.	0.45	n.d.	0.64	0.16	0.50
(-)-Myrtenyl acetate	20.579	1327	1326	0.22	0.33	0.33	0.86	0.26	0.83
(-)- $\beta$ -Bourbonene	22.246	1385	1388	n.d.	0.32	0.71	n.d.	0.27	0.43
Caryophyllene	23.119	1420	1419	0.87	n.d.	n.d.	n.d.	0.54	0.54
Pinonic acid		1440	1442	n.d.	9.98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Caryophyllene	24.147	1456	1454	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	n.d.
Not identified			1459	n.d.	n.d.	n.d.	16.20	n.d.	n.d.
Alloaromadendrene	24.331	1462	1460	0.85	n.d.	n.d.	n.d.	0.34	0.76
Germacrene D	24.898	1484	1485	3.15	n.d.	n.d.	n.d.	0.31	n.d.
Virdiflorene	25.335	1500	1496	4.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Butylated Hydroxytoluene	25.708	1512	1515	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.22	0.30
Elemol	26.910	1548	1549	4.71	1.52	0.62	1.81	3.36	5.14
Spathulenol	27.825	1577	1578	n.d.	0.62	n.d.	1.41	1.03	2.46
Caryophyllene oxide	28.024	1583	1583	n.d.	0.50	n.d.	n.d.	0.46	0.83
Ledol		1607	1602	n.d.	0.30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eudesmol <10-epi- $\gamma$ >	29.863	1626	1623	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.28
gamma-Eudesmol	30.135	1632	1632	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.26	0.35
Cubenol	30.693	1646	1646	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.21
$\beta$ -Eudesmol		1647	1650	n.d.	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Ποσοστό ταυτοποίησης δείγματος** **96.86%** **88.79%** **98.40%** **94.03%** **92.81%** **94.17%**

Σύνολο ταυτοποιημένων ουσιών\*\* 15/19 20/30 12/18 15/23 26/37 26/31

Μονοτερπένια	40.53%	0.8%	4.93%	0.54%	25.68%	3,3%
Οξυγονούχα μονοτερπένια	42.46%	82.97%	91.81%	72.57%	59.85%	78,24%
Σεσκιτερπένια	8.94%	0.32%	0.71%	n.d.	1.53%	1,73%
Οξυγονούχα σεσκιτερπένια	4.71%	3.13%	0.62%	3.22%	5.33%	9,57%
Μη τερπενικά συστατικά	0.22%	1.57%	0.33%	1.50%	0.42%	1.33%

<sup>a</sup>R.I. (Retention Indices) από πειραματικά αποτελέσματα

<sup>b</sup>R.I. (Retention Indices) από βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>23,24</sup>

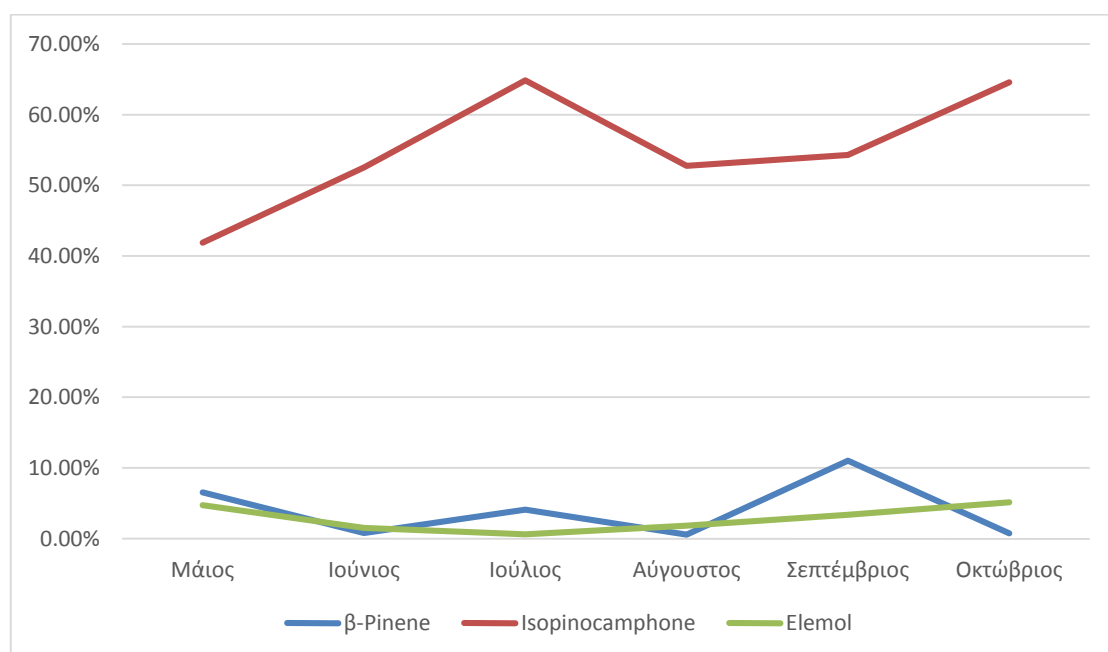
<sup>c</sup> not detected, η δομή του συγκεκριμένου συστατικού δεν ταυτοποιήθηκε είτε από το φάσμα μάζας είτε από τον δείκτη Kovats

\*Οι τιμές από τα δείγματα του Ιουνίου και του Αυγούστου δεν συμπεριλήφθηκαν στους μέσους χρόνους κατακράτησης (M.O. Rt).

\*\*Κορυφές που ταυτοποιήθηκαν / Κορυφές που ολοκληρώθηκαν.

**Διάγραμμα 2:** Διακύμανση τριών συστατικών των δειγμάτων των ανθέων, ως ποσοστιαία περιεκτικότητα επί του συνολικού αιθέριου ελαίου.

Μήνας	β-Pinene	Isopinocampnone	Elemol
Μάιος	6.55%	41.88%	4.71%
Ιούνιος	0.80%	52.55%	1.52%
Ιούλιος	4.11%	64.85%	0.62%
Αύγουστος	0.54%	52.77%	1.81%
Σεπτέμβριος	11.02%	54.31%	3.36%
Οκτώβριος	0.75%	64.57%	5.14%





## 6. Βιοχημικές δοκιμές αιθέριων ελαίων

Σε βιοχημικές δοκιμές για τη μελέτη αντιμικροβιακής και αντιμυκητιασικής δραστηριότητας, υποβλήθηκαν 10 από τα υπό μελέτη δείγματα. Για τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν το βακτήριο *E. coli* (αντιμικροβιακές δοκιμές) και ο μύκητας *S. cerevisiae* (αντιμυκητιασικές δοκιμές).

Ο μύκητας *S. cerevisiae* αναπτύχθηκε σε τριβλία με άγαρ YPD (Yeast Extract- Peptone-Dextrose) και το βακτήριο *E. coli* σε τριβλία με άγαρ LB. Το LB (Lysogeny broth) έχει σύσταση 10g/L πεπτόνη, 5g/L εκχύλισμα ζυμομύκητα και 5g/L NaCl. Το YPD έχει κατά μέσο όρο σύσταση 1% w/v εκχύλισμα ζυμομύκητα, 2% w/v πεπτόνη και 2% w/v δεξτρόζη.

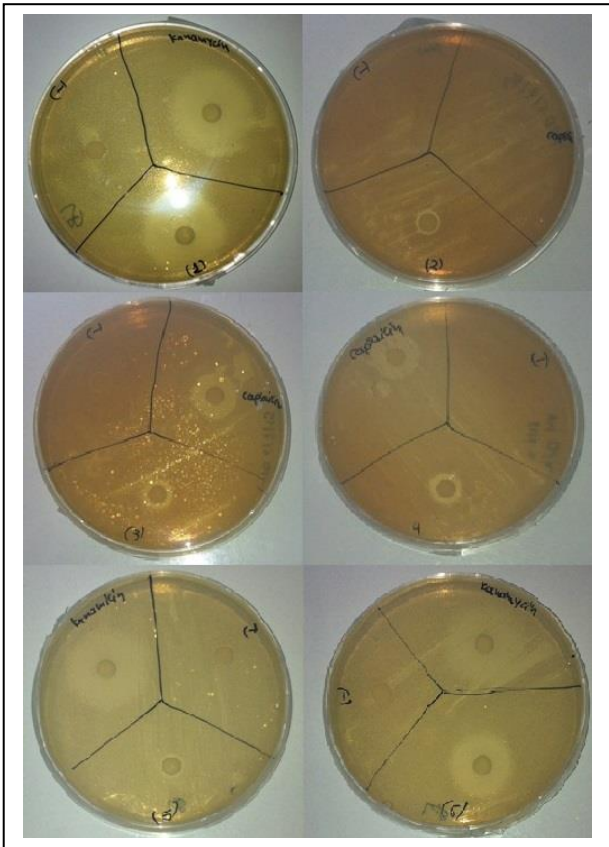
Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δραστηριότητας του αιθέριου ελαίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε δίσκο με άγαρ. Για το λόγο αυτό, χάρτινοι δίσκοι Watmann νούμερο 1. με διάμετρο 6mm, τοποθετήθηκαν στην κορυφή μεσαίου μεγέθους δίσκου καλλιέργειας άγαρ. Προηγουμένως, ο δίσκος με το άγαρ εμβολιάστηκε με αποστειρωμένο εμποτισμένο βαμβάκι (swab) ( $1 \times 10^5$  CFU/mL) σύμφωνα με το Mc Farland No 5 (0.5mL 0.048M BaCl<sub>2</sub> and 99.5mL 1% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) με τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία. Επιπλέον, ένας χάρτινος δίσκος χωρίς ουσία, χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικό control. Ένας τρίτος δίσκος με καναμυκίνη και καψαϊκίνη χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός δείκτης για τα *E. coli* και *S. cerevisiae*, αντίστοιχα. Για κάθε κατεργασία, κάθε τριβλίο χωρίστηκε σε τρία μέρη και χρησιμοποιήθηκαν τρεις χάρτινοι δίσκοι. Τέλος, οι καλλιέργειες *E. coli* και *S. cerevisiae* επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, στους 37°C. Οι διάμετροι των περιοχών αναστολής μετρήθηκαν σε εκατοστά.

Στη συνέχεια φαίνονται τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών.

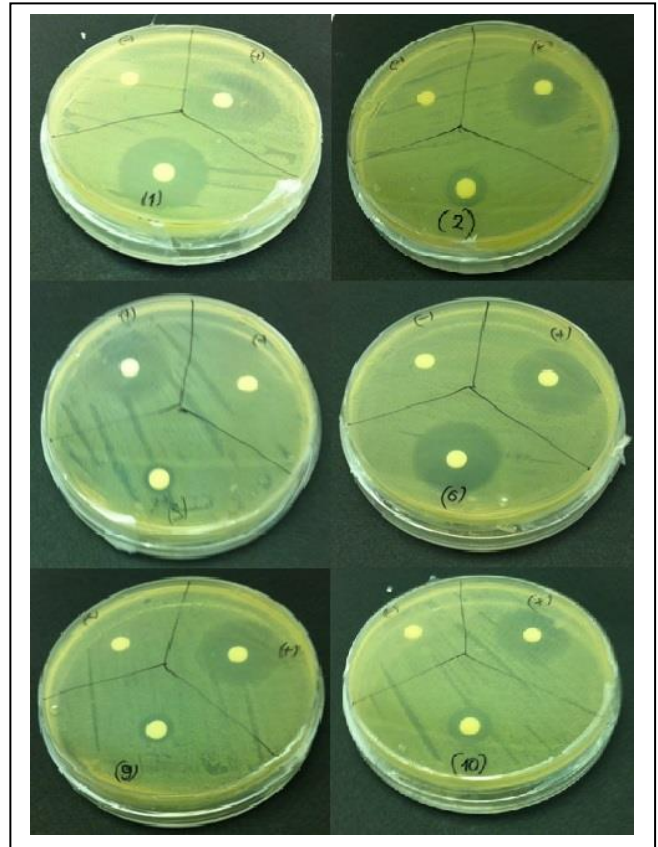
**Πίνακας 6:** Ακτίνα αναστολής σε cm (Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση).

Δείγμα	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Άνθη Μαΐου (Δείγμα 2)	2.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2
Άνθη Ιουνίου (Δείγμα 1)	2.5 ± 0.1	3.1 ± 0.3
Άνθη Ιουλίου (Δείγμα 6)	2.4 ± 0.4	2.8 ± 0.0
Άνθη Αυγούστου (Δείγμα 10)	1.4 ± 0.05	2.3 ± 0.1
Άνθη Σεπτεμβρίου (Δείγμα 3)	1.3 ± 0.2	1.7 ± 0.2
Φύλλα Μαΐου (Δείγμα 9)	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.07
Φύλλα Ιουνίου (Δείγμα 5)	1 ± 0.05	1 ± 0.2
Φύλλα Ιουλίου (Δείγμα 4)	1 ± 0.1	1.4 ± 0.07
Φύλλα Αυγούστου (Δείγμα 7)	1.4 ± 0.0	1.8 ± 0.3
Φύλλα Σεπτεμβρίου (Δείγμα 8)	0.8 ± 0.05	1 ± 0.1

Για τα πειράματα βιολογικής δραστηκότητας παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες φωτογραφίες.



**Εικόνα 3:** Αντιμικροβιακή δράση των δειγμάτων 1, 2, 3, 4, 5, 6, ενάντια στο βακτήριο *E.coli*.



**Εικόνα 4:** Αντιμυκητιστακή δράση των δειγμάτων 1, 2, 5, 6, 9, 10, ενάντια στο μύκητα *S. cerevisiae*.

## 7. Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Στο φυτό *Hyssopus officinalis*, παρατηρήθηκε μία μεγάλη διακύμανση στη βιοσύνθεση των συστατικών του αιθέριου ελαίου των φύλλων, το οποίο κυμαίνονταν από 0.10% (v/w) το Φεβρουάριο, μέχρι 1.84% τον Αύγουστο. Κατά την περίοδο άνθησης, η μέγιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου υπολογίστηκε στα 2.61% (τον Αύγουστο), ενώ επίσης τον Αύγουστο μετρήθηκε το ελάχιστο ποσοστό στα 1.55% (τα δύο δηλαδή δείγματα άνθεων του Αυγούστου έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα). Ωστόσο, κοιτώντας τα αποτελέσματα συνολικά, ο μέσος όρος συγκέντρωσης για τα άνθη καθ' όλη την περίοδο άνθησης ήταν 2.07%, κάτι που καταδεικνύει μεγαλύτερη παραγωγή ελαίου στα άνθη σε σχέση με τα φύλλα. Η ανάπτυξη του φυτού και ο σχηματισμός ανθέων, πιθανότατα πυροδοτεί και τη βιοσύνθεση και μεγαλύτερη παραγωγή των αιθέριων ελαίων. Επιπλέον, το μεγαλύτερο ποσοστό ηλιοφάνειας και η αύξηση της θερμοκρασίας, πιθανόν να ευθύνονται για την αύξηση του ελαίου και τη διακύμανση των συστατικών.

Επίσης μεγάλη διακύμανση φαίνεται στον αριθμό των συστατικών του αιθέριου ελαίου. Στα φάσματα των δειγμάτων των φύλλων ανιχνεύθηκαν από 15 το ελάχιστο (τον Αύγουστο) έως 73 το μέγιστο (τον Οκτώβριο) κορυφές, που αντιστοιχούν σε συστατικά του αιθέριου ελαίου. Στα φάσματα των δειγμάτων των ανθέων, ο αριθμός των κορυφών εμφανίζει στενότερο εύρος, από 18 τον Ιούλιο έως 37 κορυφές το Σεπτέμβριο. Είναι πιθανό τα λιγότερα συστατικά των ανθέων να οφείλονται σε διαφορετικές λειτουργίες που αυτά εξυπηρετούν, καθώς πρέπει να διατηρήσουν τη δομή τους σε καλύτερες συνθήκες θερμοκρασίας, σε σχέση με τα φύλλα που προσαρμόζουν τη βιοσύνθεσή τους στις καιρικές συνθήκες όλο το χρόνο.

Κύριο συστατικό σε όλα τα δείγματα είναι η Ισοπιννοκαμφόνη (Isopinocampnone) (με μοναδική εξαίρεση το δείγμα των φύλλων του Φεβρουαρίου όπου βρίσκεται σε δεύτερο χαμηλότερο ποσοστό), ενώ σημαντικά ποσοστά σε άνθη και φύλλα, έχουν το β-πινένιο (β-pinene), η Πινοκαμφόνη (Pinocampnone) και η Elemol. Η τελευταία, είναι το κύριο συστατικό του δείγματος φύλλων του Φεβρουαρίου. Είναι επίσης απαραίτητο να αναφερθούν κάποιες ενώσεις, τα ποσοστά των οποίων δεν είναι σταθερά υψηλά κατά τη διάρκεια όλου του έτους, αλλά σε κάποιους μήνες βρίσκονται δεύτερα ή τρίτα σε αφθονία στο αιθέριο έλαιο. Για τους μήνες Ιανουάριο και Φεβρουάριο, δεύτερο σε αφθονία συστατικό σε δείγματα φύλλων, είναι το Caryophyllene oxide. Για το Μάρτιο, δεύτερο συστατικό είναι το Germacrene D, ενώ για το Μάιο, τρίτο συστατικό σε αφθονία η β-Phellandrene. Όσον αφορά τα άνθη, δεύτερο συστατικό σε αφθονία για το μήνα Μάιο, είναι η β-Phellandrene και για το Ιούνιο τρίτο το Pinonic acid. Για τον Αύγουστο, η δομή του δεύτερου σε αφθονία συστατικού δεν ταυτοποιήθηκε ενώ το τρίτο ήταν η trans-2-Hydroxy pinocampnone, και για το

Σεπτέμβριο τρίτο συστατικό η  $\beta$ -Phellandrene. Για τον Οκτώβριο, δεύτερο συστατικό σε αφθονία είναι η (E)-Pinocamphone.

Τέλος, όσον αφορά τις βιοχημικές δοκιμές, τα δείγματα ανθέων Μαΐου και Ιουνίου και το δείγμα ανθέων Ιουνίου, εμφανίζουν τη μέγιστη ακτίνα αναστολής για αντιμικροβιακή και αντιμυκητιστακή δράση, αντίστοιχα. Επιπλέον, όσον αφορά τα φύλλα, μέγιστη αντιμικροβιακή και αντιμυκητιστακή δράση εμφανίζουν τα φύλλα Αυγούστου. Συνολικά, τα δείγματα των φύλλων, έχουν σταθερά χαμηλότερα ποσοστά δραστηριότητας σε σχέση με τα δείγματα των ανθέων.

Το είδος *Hyssopus officinalis*, λόγω της μεγάλης έκτασης στην οποία ευδοκιμεί, μελετήθηκε βιβλιογραφικά για διάφορες περιοχές. Οι διαφορές στη σύσταση του αιθέριου ελαίου στις περιοχές αυτές, αν και είχε κοινά στοιχεία, παρουσίαζε έντονες διαφορές. Για το λόγο αυτό παρατίθεται πίνακας στον οποίο καταγράφονται τα κύρια συστατικά κάθε περιοχής, καθώς και τα ποσοστά τους στα δείγματα.<sup>17</sup>

**Πίνακας 7:** Κύρια συστατικά του *Hyssopus officinalis*, σε διάφορες χώρες.

Χώρα	Κύρια συστατικά
Αίγυπτος	$\beta$ -Pinene (19.60%), pinocamphone (19.20%), camphor (16.3%)
Βουλγαρία	1,8-Cineole (39.6–48.2%), isopinocamphone (16.3–29.2%), $\beta$ -pinene (11.4–39.6%)
Βουλγαρία	Isopinocamphone (40.2%), pinocamphone (10.3%), $\beta$ -pinene (14.2%)
Γαλλία	Linalool (49.6%), 1,8-cineole (13.3%), limonene (5.4%), $\beta$ -pinene (3.0%), $\beta$ -caryophyllene (2.8%)
Γερμανία	Pinocamphone (31.8–60.2%), camphor (3.4–16.4%), $\beta$ -pinene (11.6–13.9%)
Γιουγκοσλαβία	Pinocamphone (1.3–64.9%), isopinocamphone (9.1–59.9%), pinocarvone (0.1–16.9%)
Ινδία	Pinocamphone (49.1%), $\beta$ -pinene (18.4%), isopinocamphone (9.7%)
Ινδία	Pinocamphone (53.54%), $\beta$ -pinene (9.91%), limonene (7.19%), elemol (3.43%)
Ιράν	Myrtenyl acetate (74.08%), camphor (6.76%)

Ιράν	Thymol (18.95%), $\beta$ -bisabolol (16.62%), carvacrol (7.73%), n-dodecane (5.23%)
Ισπανία	1,8-Cineole (52.89%), $\beta$ -pinene (16.82%)
Ιταλία	Isopinocamphone (43.3%), limonene (12.2%), $\beta$ -pinene (11.1%)
Ιταλία	Myrtenol (32.6%), $\beta$ -pinene (19.3%), isopinocamphone (10.0%)
Ιταλία	$\beta$ -Pinene (24.7%), 1,8-cineole (23.1%), methyleugenol (12.2%)
Ιταλία	Methyleugenol (43.9%), limonene (15.9%), 1,8-cineole (12.1%)
Ιταλία	Pinocamphone (18.5–34%), isopinocamphone (3.2–29%), $\beta$ -pinene (10.5–10.8%)
Μαυροβούνιο	Methyleugenol (38.3%), limonene (37.4%), $\beta$ -pinene (9.6%)
Πολωνία	Isopinocamphone (41.97%), elemol (17.21%), $\alpha$ -eudesmol (4.23%), $\gamma$ -eudesmol (3.70%)
Σερβία	Isopinocamphone (46.1%), pinocamphone (15.3%), germacrene-D-11-ol (6.1%)
Τουρκία	Pinocarvone (36.3%), pinocamphone (19.6%), $\beta$ -pinene (10.6%), 1,8-cineole (7.2%), isopinocamphone (5.3%)
Τουρκία	Isopinocamphone (57.27%), (-)- $\beta$ -pinene (7.23%), (-)-terpinen-4-ol (7.13%), pinocarvone (6.49%), carvacrol (3.02%)

Στα Δυτικά Ιμαλάια, από την πεδιάδα Kashmir μέχρι το Kumaon και σε υψόμετρο 8.000 με 11.000 πόδια, συλλέχθηκαν δείγματα του φυτού *Hyssopus officinalis*, για την παρακάτω μελέτη εποχιακής διακύμανσης.<sup>10</sup> Μελετήθηκαν τα υπέργεια μέρη του φυτού, το οποίο καλλιεργούνταν στο IHM-Srinagar. Η εποχιακή διακύμανση αναφέρεται στους μήνες Μάρτιο με Οκτώβριο. Η ανάλυση GC-MS έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Compound	Area, %							
	March (0.02)	April (0.05)	May (0.14)	June (0.1)	July (0.4)	August (0.4)	September (0.26)	October (0.22)
$\alpha$ -Thujene	0.18	0.01	0.21	0.10	0.28	0.33	0.34	0.52
$\alpha$ -Pinene	0.44	1.58	0.97	0.21	0.46	0.37	0.46	0.52
Camphene	0.08	0.01	–	–	0.07	0.07	0.08	0.12
Sabinene	1.00	–	–	0.82	1.45	1.69	1.66	2.38
$\beta$ -Pinene	7.18	32.38	25.77	6.29	9.91	7.91	7.69	6.91
Myrcene	0.75	2.78	2.55	1.58	2.24	2.21	1.95	2.90
$\alpha$ -Phellandrene	–	0.05	0.06	–	0.06	0.06	0.05	–
$\alpha$ -Terpinene	–	–	0.37	0.22	0.45	0.55	0.35	0.70
<i>p</i> -Cymene	1.81	0.14	0.09	0.13	0.07	0.11	0.18	0.12
Limonene	0.89	0.01	9.81	5.98	7.19	6.60	5.46	7.69
1,8-Cineole	–	11.85	0.28	0.33	0.40	0.33	0.31	0.42
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimene	–	0.82	0.21	0.20	0.37	–	–	0.40
$\gamma$ -Terpinene	–	0.33	0.78	0.82	1.03	1.19	0.86	1.39
( <i>Z</i> )-Sabinene hydrate	–	0.24	1.07	3.76	2.02	3.45	5.41	2.18
Terpinolene	–	0.13	0.21	0.18	0.25	0.28	0.20	0.33
Linalool	0.05	–	1.52	0.97	1.04	0.60	0.58	0.48
( <i>E</i> )-Thujone	0.25	0.01	0.11	0.31	0.32	0.38	0.36	0.45
Pinocamphone	64.88	10.90	29.59	50.94	53.54	55.02	55.16	60.88
( <i>Z</i> )-Pinocamphone	–	0.49	–	2.35	2.55	–	–	–
Terpinen-4-ol	8.15	0.71	6.31	2.66	2.55	7.71	8.33	3.87
$\alpha$ -Terpineol	1.16	0.14	0.24	0.26	0.26	0.31	0.29	0.20
Myrtenol	–	–	1.34	2.46	2.59	2.51	2.45	1.69
Methyl eugenol	0.15	0.53	0.39	0.55	0.39	0.30	0.26	–
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllene	0.22	2.81	1.03	0.65	0.39	0.20	0.17	0.09
$\alpha$ -Humulene	0.70	0.64	0.22	0.14	0.08	–	–	–
<i>allo</i> -Aromadendrene	–	0.98	0.87	0.63	0.50	0.49	0.35	0.18
Germacrene-D	–	11.27	4.50	2.48	1.61	0.89	0.71	0.50
Bicyclogermacrene	–	3.77	1.89	1.46	1.20	1.04	0.83	0.44
$\gamma$ -Cadinene	–	–	0.12	–	0.05	0.05	–	–
Elemol	–	7.28	4.96	7.53	3.43	1.78	2.40	1.56
Spathulenol	0.51	0.53	0.04	0.15	0.08	0.10	0.16	–
10- <i>epi</i> - $\gamma$ -Eudesmol	–	0.54	0.57	0.31	0.31	0.11	0.08	–
$\alpha$ -Cadinol	–	0.63	–	0.30	0.81	0.11	–	–

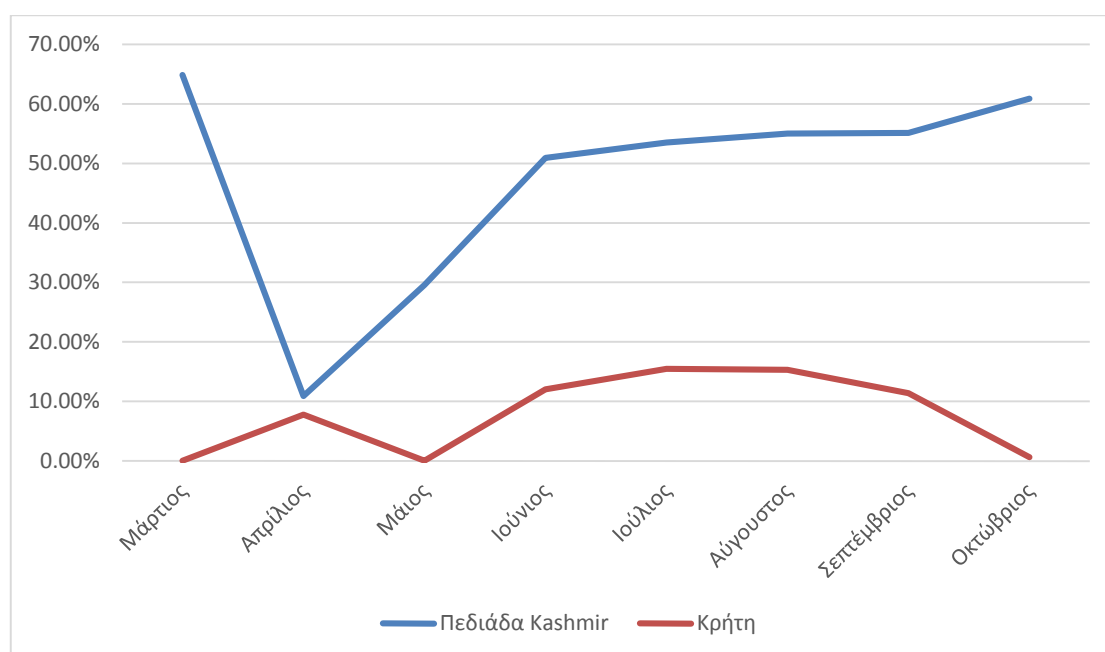
Πρώτο σε αφθονία συστατικό είναι η Pinocamphone, δεύτερο το  $\beta$ -Pinene, ενώ σημαντικά ποσοστά έχουν τα Limonene, Germacrene-D και Elemol. Επιπλέον, το κύριο συστατικό παίρνει τη μέγιστη τιμή του το Μάρτιο, πριν δηλαδή την περίοδο άνθησης.

Στα δείγματα του Κρητικού φυτού, κύριο συστατικό είναι η Isopinocamphone, που δεν υπάρχει καθόλου στο φυτό της παραπάνω μελέτης. Η Pinocamphone, το κύριο συστατικό της μελέτης του φυτού στην πεδιάδα Kashmir, εμφανίζεται στα δείγματα του Κρητικού φυτού με μικρότερα ποσοστά (0.31-15.56% στα φύλλα και 1.99-24.04% στα άνθη). Επιπλέον, το Limonene που στην παραπάνω μελέτη έχει σημαντικά ποσοστά, στην παρούσα μελέτη εμφανίζεται μέχρι 1.90% του αιθερίου ελαίου, όπως και το Germacrene-D, όπου στην παρούσα μελέτη έχει μέγιστο ποσοστό 4.10% ενώ στη μελέτη της βιβλιογραφίας 11.27%. Τέλος, η  $\beta$ -phellandrene που εμφανίζει σημαντικά ποσοστά στην παρούσα μελέτη, δεν υπάρχει στα συστατικά του παραπάνω φυτού.

Αξίζει να αναφερθεί επίσης η διαφορά στην ποσότητα του κύριου συστατικού, το οποίο έχει μέγιστη τιμή το Μάρτιο για την παραπάνω μελέτη, και τον Ιούλιο για το υπό μελέτη φυτό. Όσον αφορά τα ομαδοποιημένα συστατικά των αιθερίων ελαίων, είναι εμφανής η σταθερά χαμηλότερη ποσότητα μονοτερπενίων του Κρητικού φυτού, σε σχέση με εκείνη του φυτού στα Ιμαλάια.

Για την καλύτερη κατανόηση των διαφορών ανάμεσα στα συστατικά των δύο φυτών, παρατίθεται διάγραμμα στο οποίο φαίνεται η διακύμανση της Pinocamphone από την πεδιάδα Kashmir όλους τους μήνες της μελέτης, και των φύλλων του Κρητικού φυτού για το ίδιο διάστημα.

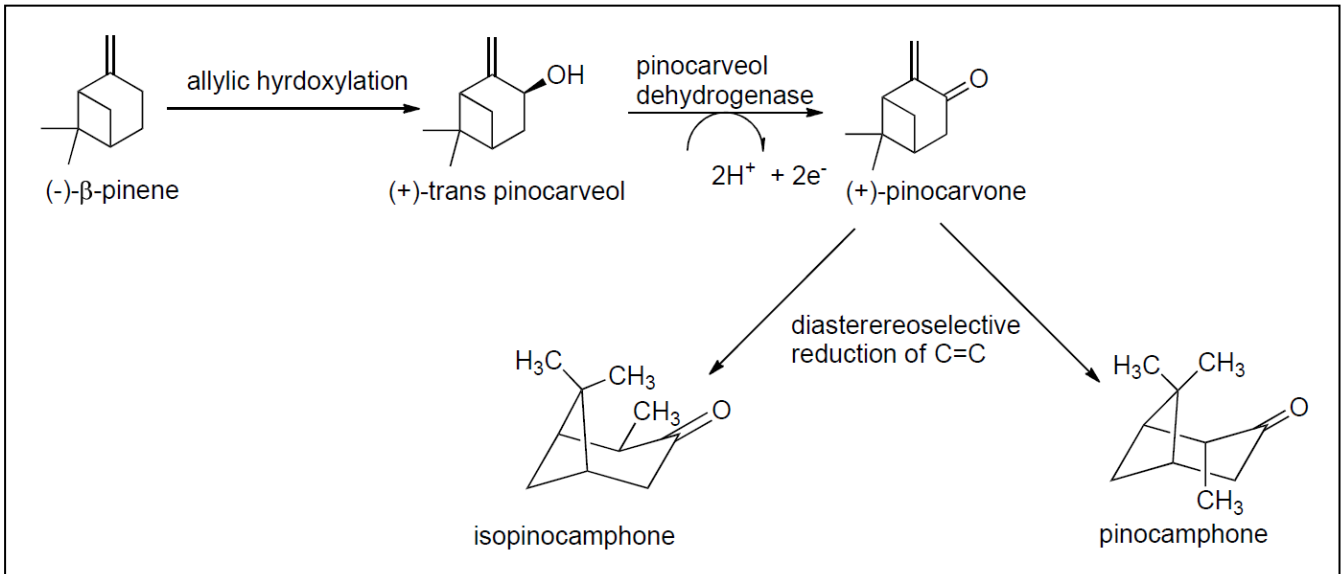
**Διάγραμμα 3:** Εποχιακή διακύμανση της Pinocamphone για το *Hyssopus officinalis* στην Πεδιάδα Kashmir και στην περιοχή της Κρήτης.



Οι διαφορές στην ποσότητα ή/και την ποιότητα των συστατικών από τις δύο περιοχές, οφείλεται πιθανόν στο διαφορετικό κλίμα, στο ποσό ήλιοφάνειας που είναι διαθέσιμο σε διάφορους μήνες, στα θρεπτικά συστατικά του εδάφους, στη διαθεσιμότητα νερού, κ.α.

Ο *Hyssopus officinalis* παράγει αιθέριο έλαιο το οποίο περιέχει τις δικυκλικές μονοτερπενικές κετόνες πινοκαμφόνη και ισοπινοκαμφόνη καθώς και μικρά ποσά μυρτενόλης. Παρασκεύασμα μικροσωματίων από epidermal oil glands του φυτού μετατρέπει την μητρική δικυκλική ένωση (-)-β-πινένιο στην αλλυλική αλκοολη (+)-trans πινοκαρβεόλη η οποία

μπορεί να δώσει (-)- πινोκαμφόνη και (-)- ισοπινοκαμφόνη με διαδοχική οξείδωση της στην (+)-πινοκαρβόνη συνοδευόμενη από δύο στερεοχημικά εναλλακτικές αναγωγές του συζυγιακού διπλού δεσμού. Το ίδιο μεμβρανικό παρασκεύασμα καταλύει τη μετατροπή του (-)-α-πινενίου σε (-)-μυρτενόλη.<sup>25</sup> Τα δεδομένα αυτά ερμηνεύουν εν μέρει την παρουσία των συγκεκριμένων συστατικών στο μίγμα των αιθερίων ελαίων. Μία πιο συστηματική έρευνα στη βιοσύνθεση των συστατικών αυτών θα μπορούσε να εξηγήσει την μηνιαία τους διακύμανση.





## 8. Βιβλιογραφία

- <sup>1</sup>[http://www.ellinikabaharika.gr/%CF%84%CE%B1-%CF%80%CF%81%CE%BF%CF%8A%CF%8C%CE%BD%CF%84%CE%B1-%CE%BC%CE%B1%CF%82/40-%CE%A6%CE%B1%CF%81%CE%BC%CE%B1%CE%BA%CE%B5%CF%85%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AC-%CF%86%CF%85%CF%84%CE%AC-Medicinal-plants/935-%CE%A5%CF%83%CF%83%CF%89%CF%80%CE%BF%CF%82-%CF%86%CF%85%CF%84%CF%8C-\(-Hyssopii-herba-conc-\)-\(-Hyssop-herb-cut-\)](http://www.ellinikabaharika.gr/%CF%84%CE%B1-%CF%80%CF%81%CE%BF%CF%8A%CF%8C%CE%BD%CF%84%CE%B1-%CE%BC%CE%B1%CF%82/40-%CE%A6%CE%B1%CF%81%CE%BC%CE%B1%CE%BA%CE%B5%CF%85%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AC-%CF%86%CF%85%CF%84%CE%AC-Medicinal-plants/935-%CE%A5%CF%83%CF%83%CF%89%CF%80%CE%BF%CF%82-%CF%86%CF%85%CF%84%CF%8C-(-Hyssopii-herba-conc-)-(-Hyssop-herb-cut-)) πρόσβαση στις 22/02/2016
- <sup>2</sup> [http://www.patris.gr/articles/249778?PHPSESSID=#.Vsb\\_xLSLTGg](http://www.patris.gr/articles/249778?PHPSESSID=#.Vsb_xLSLTGg) πρόσβαση στις 22/02/2016
- <sup>3</sup> Στεφανάκης Μιχαήλ, *Ανάλυση, μελέτη και βιολογική δραστικότητα δευτερογενών μεταβολιτών αρωματικών φυτών: είδη του γένους origanum και του γένους phlomis*, Μεταπτυχιακή εργασία, Αρχείο Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, **2010**
- <sup>4</sup> Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillag I., Sevastre, B., Mot A. C., Silaghi-Dumitrescu, R., Tilea, I., *Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for Hyssopus officinalis, Ocimum basilicum and Teucrium chamaedrys*, **2014**, *Molecules*, , 19, 5490-5507
- <sup>5</sup> Myadelets, M.A., Domrachev, D.V., Cheremushkina, V.A., *A Study of the Chemical Composition of Essential Oils of Some Species from the Lamiaceae L. Family Cultivated in the Western Siberian Region*, **2013**, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39, 733–738
- <sup>6</sup> Hatipoğlu, G., Sökmen, M., Bektaş, E., Daferera, D., Sökmen, A., Demir, E., Şahin, H., *Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of Hyssopus officinalis L. ssp. angustifolius*, **2013**, *Industrial Crops and Products*, 43, 427– 433
- <sup>7</sup> <http://www.realfarm.gr/farmakeutika-arwmatika-fita/isswpos.html> πρόσβαση στις 26/02/2016
- <sup>8</sup> [https://en.wikipedia.org/wiki/Hyssopus\\_officinalis](https://en.wikipedia.org/wiki/Hyssopus_officinalis) πρόσβαση στις 22/02/2016
- <sup>9</sup> Alinezhad, H., Azimi, R., Zare, M., Ebrahimzadeh, M. A., Eslami, S., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., *Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and*

---

*stems of Hyssopus officinalis L. Var. Angustifolius*, **2013**, *International Journal of Food Properties*, , 16, 1169–1178

<sup>10</sup> Khan, R., Shawl, A.S., Tantry, M.A., *Determination and seasonal variation of chemical constituents of essential oil of Hyssopus officinalis growing in Kashmir Valley as incorporated species of Western Himalaya*, **2012**, *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 502-505

<sup>11</sup> Moro, A., Librán, C.M., Berruga, M.I., Zalacain, A., Carmona, M., *Mycotoxigenic fungal inhibition by innovative cheese cover with aromatic plants*, **2013**, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1112–1118

<sup>12</sup> Κωνσταντίνος Κοτροκόης, Εμμανουήλ Παπαδογιαννάκης, *Διατροφή & χημεία τροφίμων στη δημόσια υγεία*, Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, **2009**

<sup>13</sup> Μανούσος Πεδιαδίτης, *Ανάλυση και προσδιορισμός της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων των φυτών Origanum onites και Satureja thymbra*, Διπλωματική εργασία, Αρχαία Τμήματος Χημείας, Ηράκλειο, Κρήτη, **2004**

<sup>14</sup> Αφράτης Αθανάσιος, *Ανάλυση και προσδιορισμός της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων των φυτών Laurus nobilis L. και Lavandula stoechas L.*, Διπλωματική εργασία, Αρχαία Τμήματος Χημείας, Ηράκλειο, Κρήτη, **2002**

<sup>15</sup> Παγώνα Γεωργία, *Ανάλυση και προσδιορισμός της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων των φυτών Salvia fruticose Miller και Rosmarinus officinalis L.*, Διπλωματική εργασία, Αρχαία Τμήματος Χημείας, Ηράκλειο, Κρήτη, **2001**

<sup>16</sup> Garg, S.N., Naqvi, A.A., Singh, A., Ram, G., Kumar, S., *Composition of essential oil from an annual crop of Hyssopus officinalis grown in Indian plains*, **1999**, *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 170-172

<sup>17</sup> Pandey, V., Verma, R.S., Chauhan, A., Tiwari, R., κλπ. *Compositional variation in the leaf, flower and stem essential oils of Hyssop (Hyssopus officinalis L.) from Western-Himalaya*, **2014**, *Journal of Herbal Medicine*, 4, 89–95

<sup>18</sup> Brian M. Lawrence, *Essential Oils*, Wheaton: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, **1979**

---

<sup>19</sup> Ανδρεόπουλος Η., *Μελέτη αιθέριων ελαίων Ελληνικών αρωματικών φαρμακευτικών φυτών*, Πτυχιακή εργασία, Θεσσαλονίκη, **2014**

<sup>20</sup> Κακαρας Ε., Καρέλλας Σ., *Αντιρρυπαντική τεχνολογία θερμικών σταθμών*, Εκδόσεις Τσότρας, Αθήνα, **2014**

<sup>21</sup> Κατσιμπίρη Κ. Φωτεινή, *Εγκλεισμός συστατικών αιθέριου ελαίου λεβάντας σε β-κυκλοδεξτρίνη*, Μεταπτυχιακή Εργασία, Αρχαία Γεωπονικού Πανεπιστήμιου Αθηνών, Αθήνα, **2010**

<sup>22</sup> Harris, D. C., *Ποσοτική χημική ανάλυση*, Τόμος Β, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, **2009-2010**

<sup>23</sup> Adams, R., *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy*, Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, **2007**

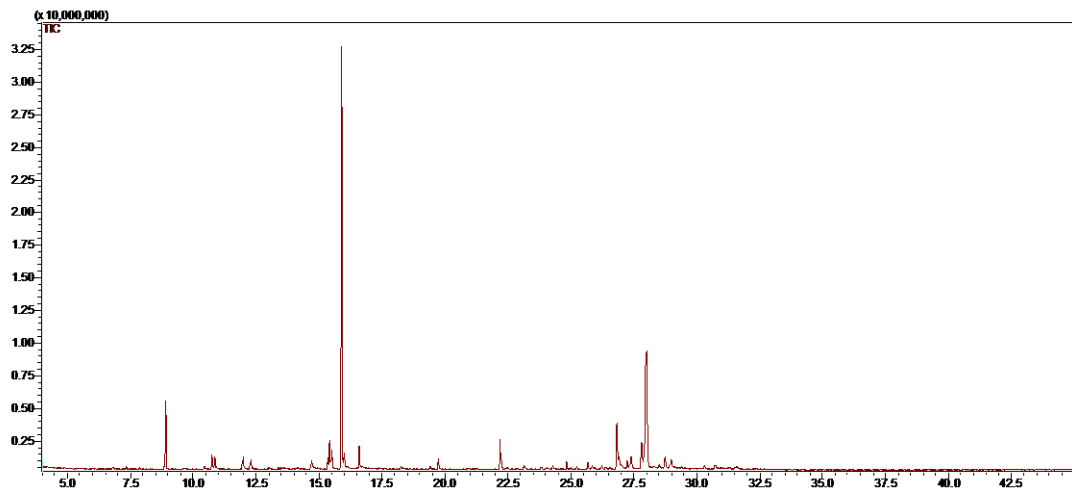
<sup>24</sup> <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html> πρόσβαση στις 26/02/2016

<sup>25</sup> Petroski, R. J., McCormick, S. P. *Secondary-Metabolite Biosynthesis and Metabolism* Springer, Berlin, **1992**

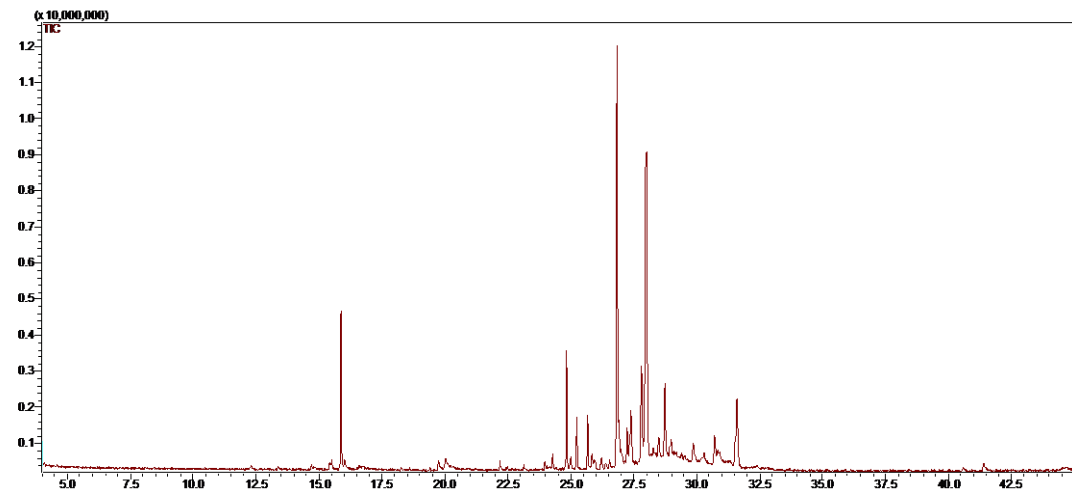
-----ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-----

# ΕΝΟΤΗΤΑ 1 - Φάσματα από την ανάλυση του φυτού *Hyssopus officinalis*.

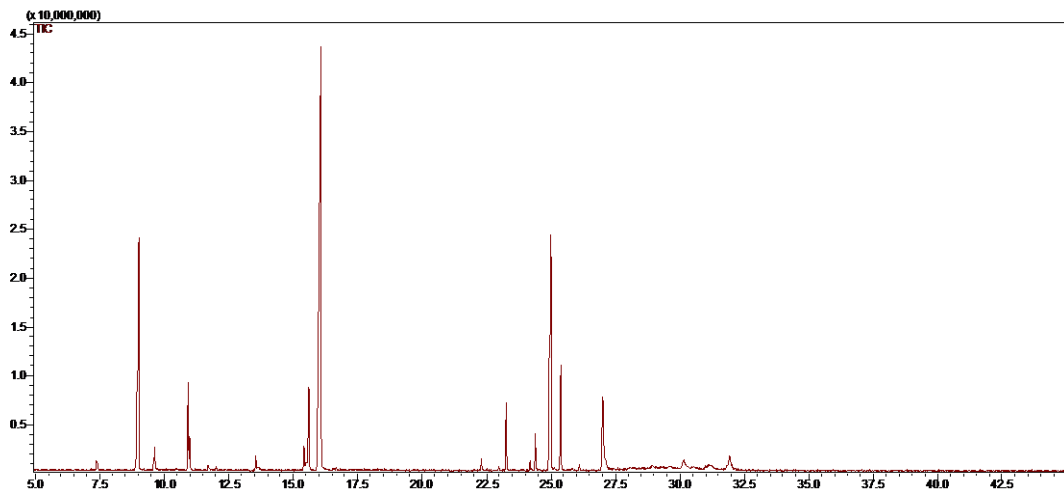
## Φύλλα Ιανουαρίου



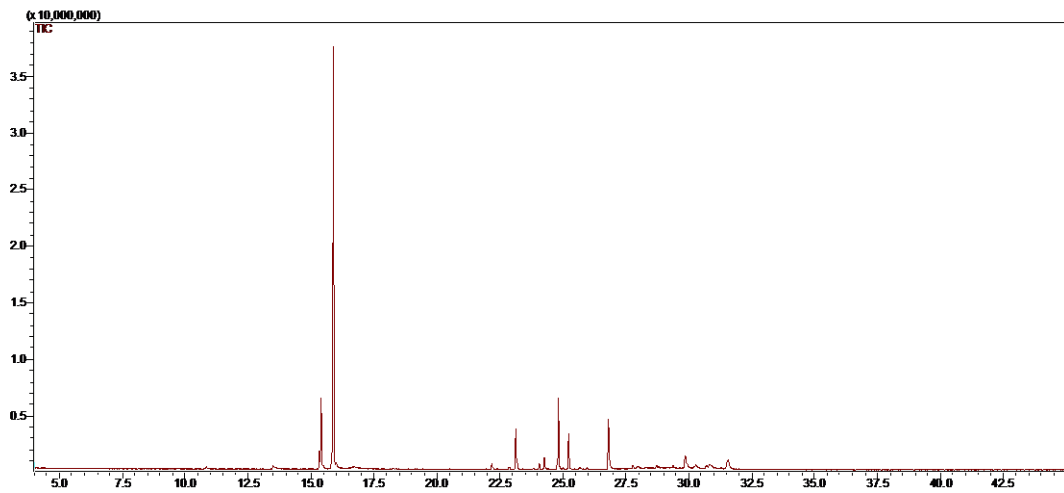
## Φύλλα Φεβρουαρίου



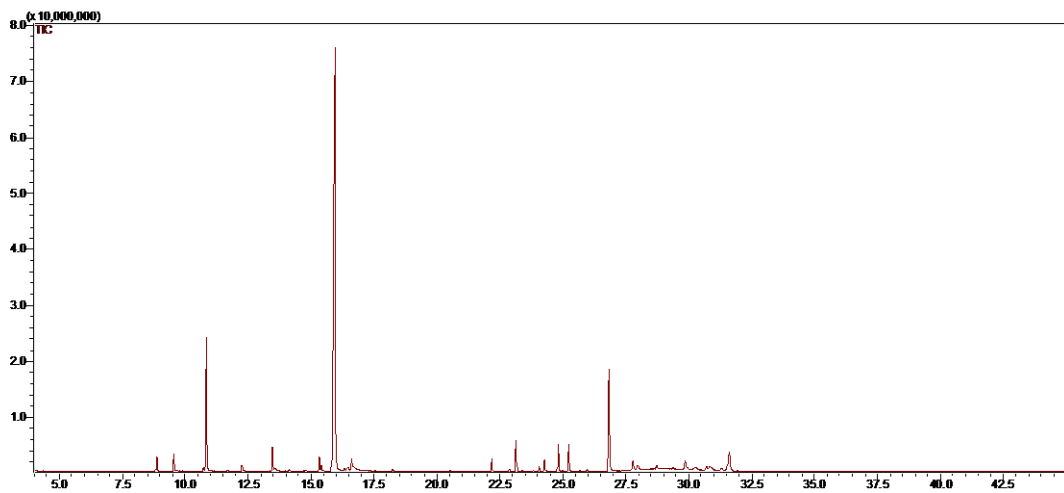
Φύλλα Μαρτίου



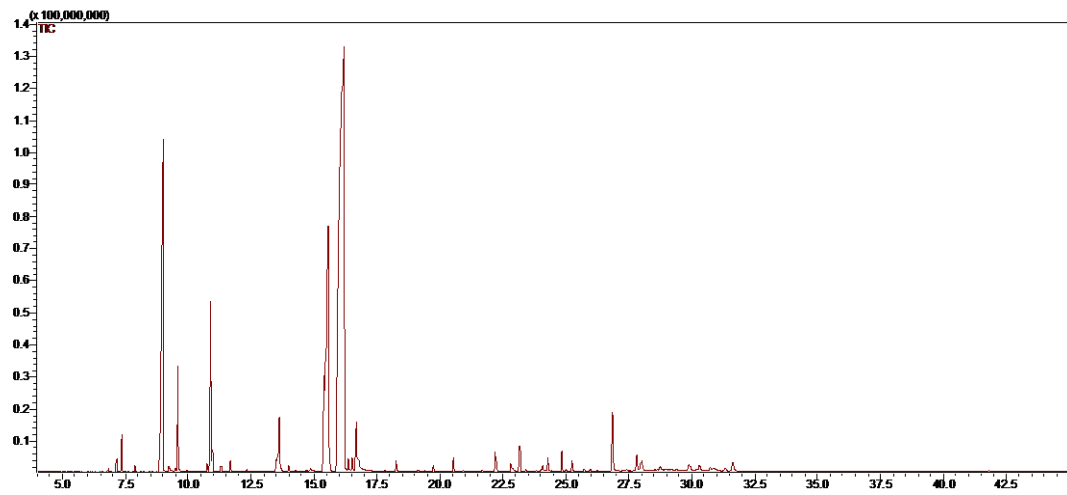
Φύλλα Απριλίου



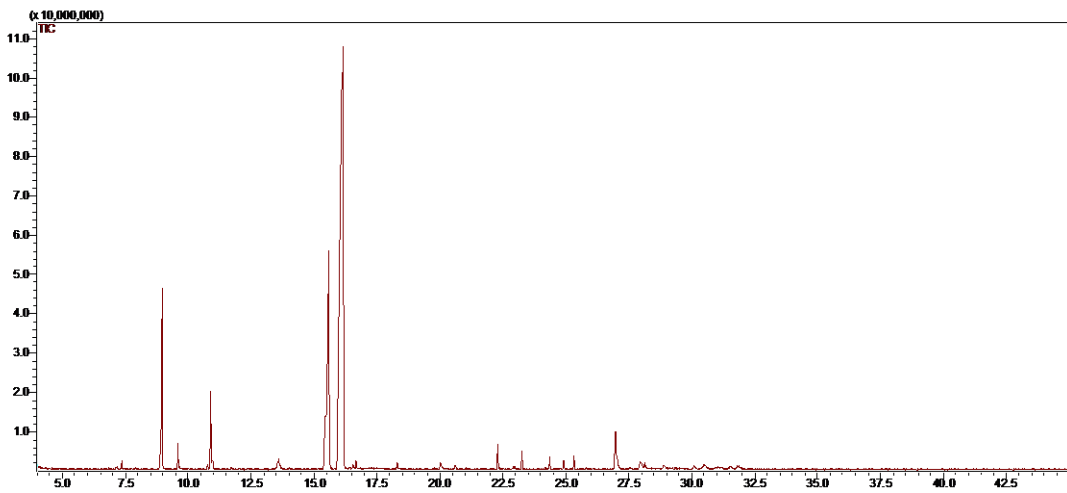
Φύλλα Μαΐου



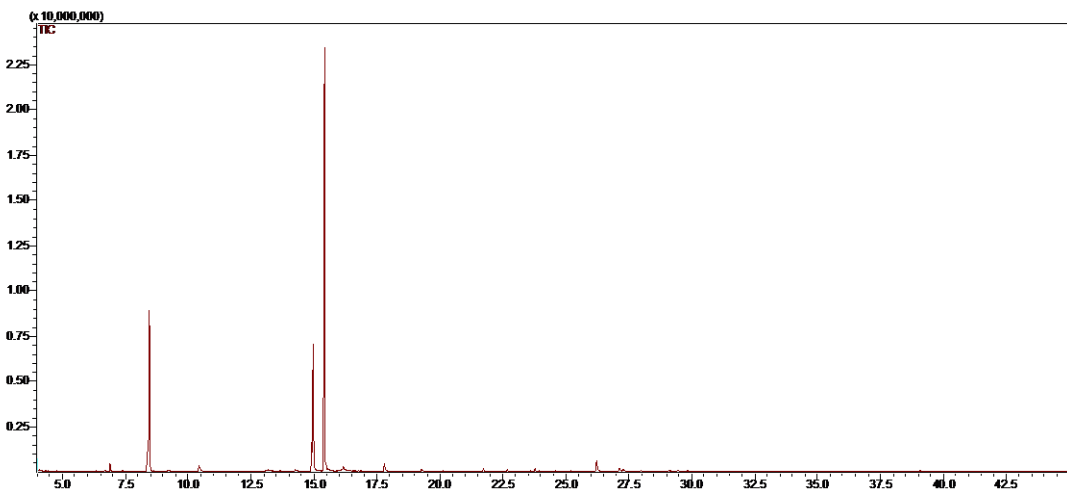
Φύλλα Ιουνίου



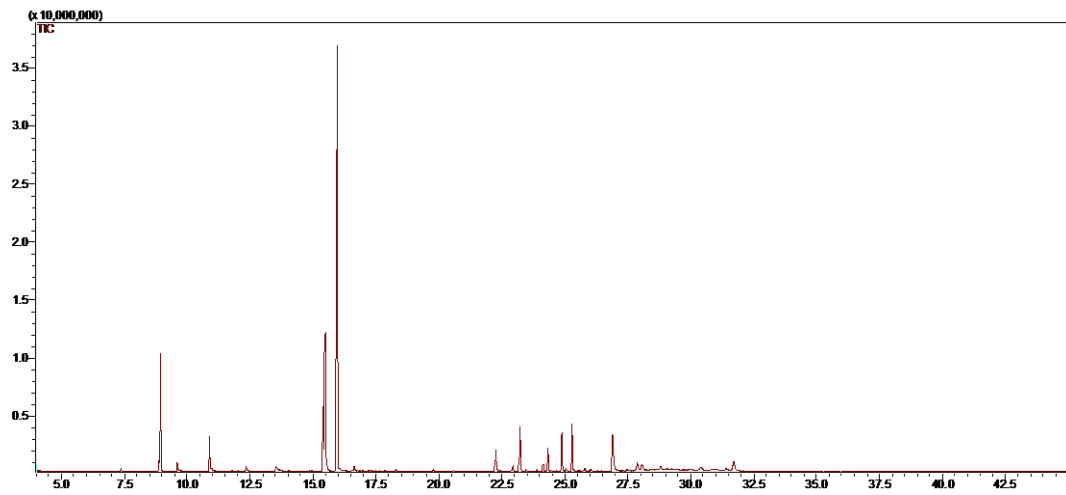
Φύλλα Ιουλίου



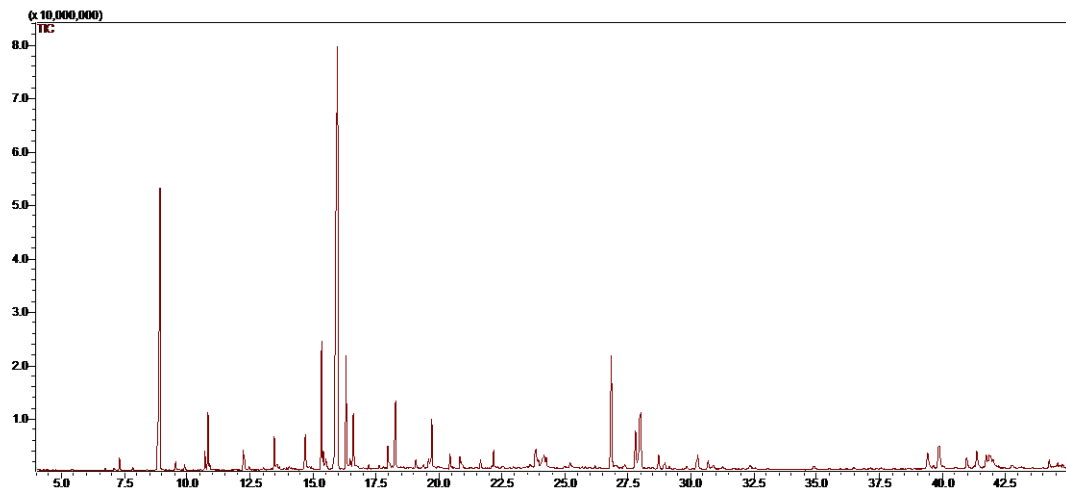
Φύλλα Αυγούστου



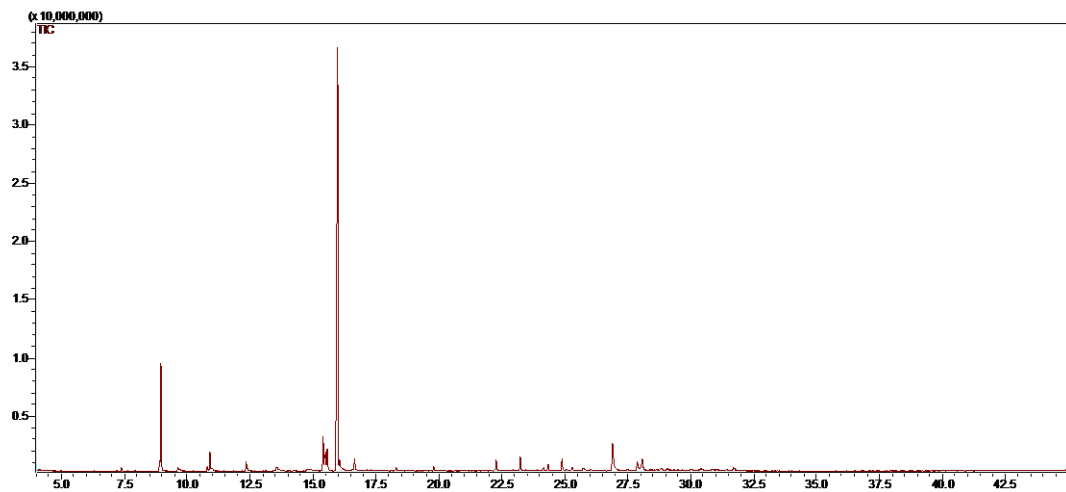
Φύλλα Σεπτεμβρίου



Φύλλα Οκτωβρίου

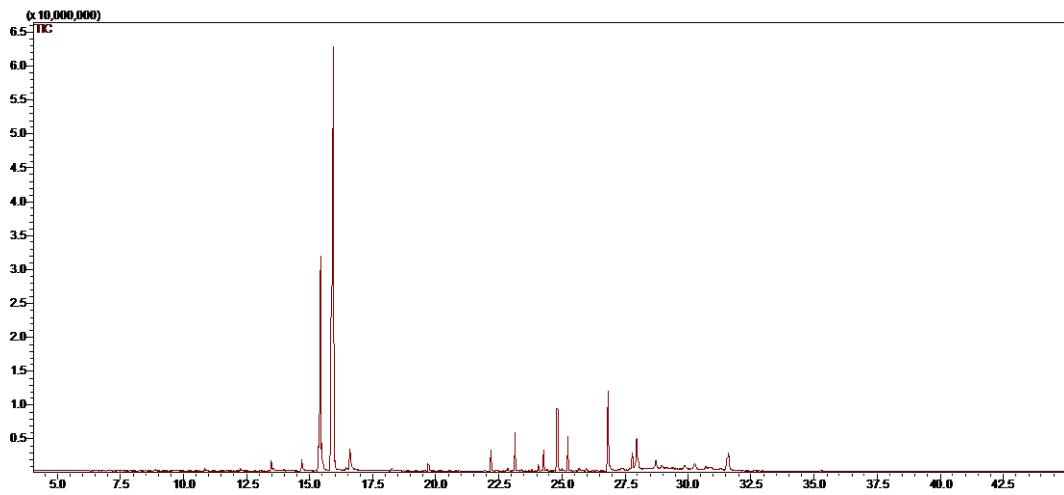


Φύλλα Νοεμβρίου

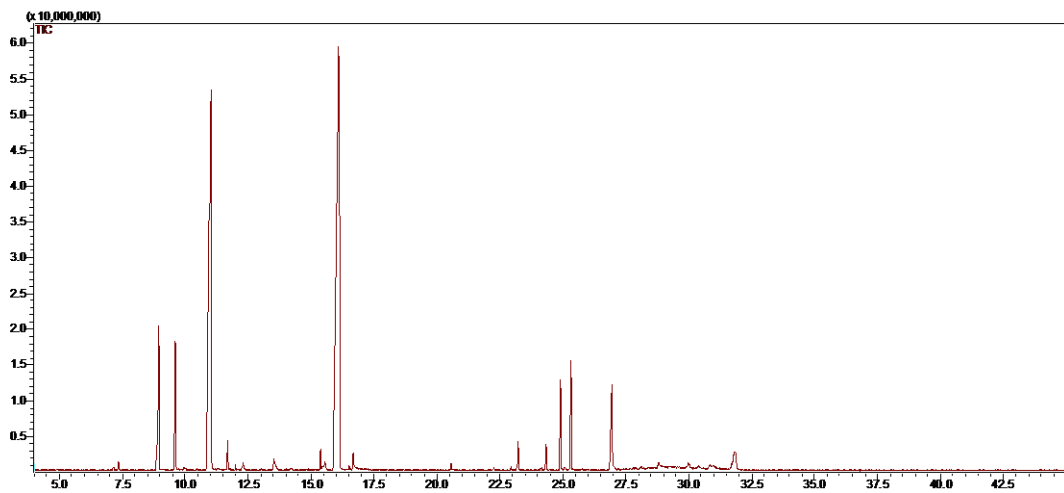




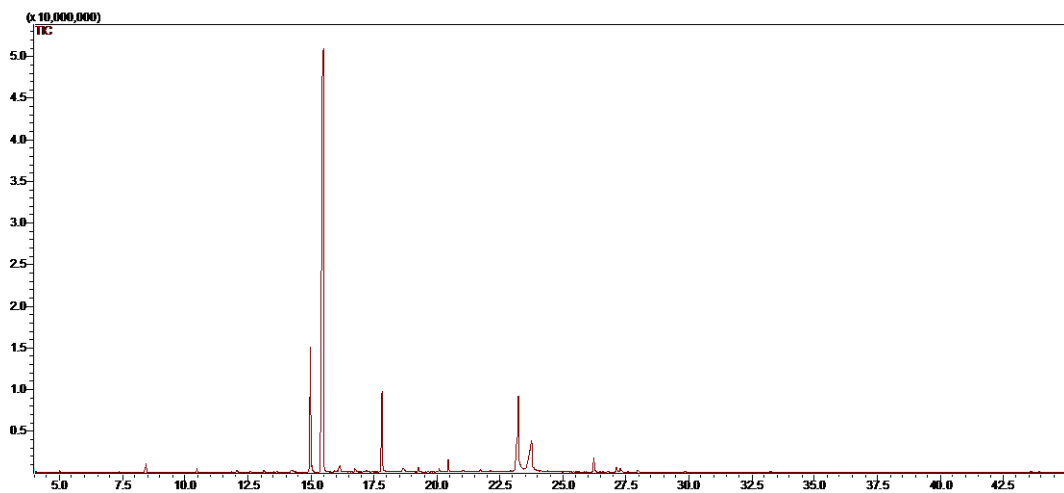
Φύλλα Δεκεμβρίου



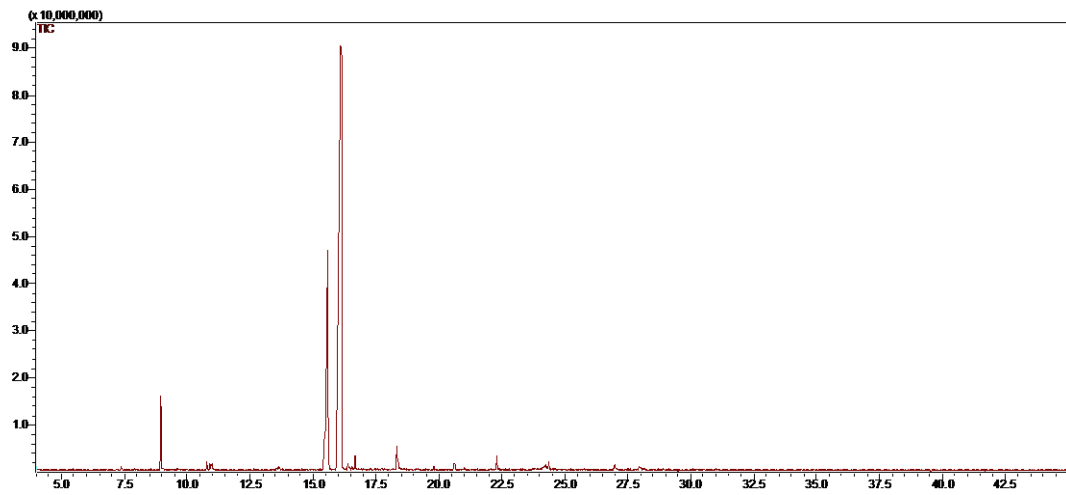
Άνθη Μαΐου



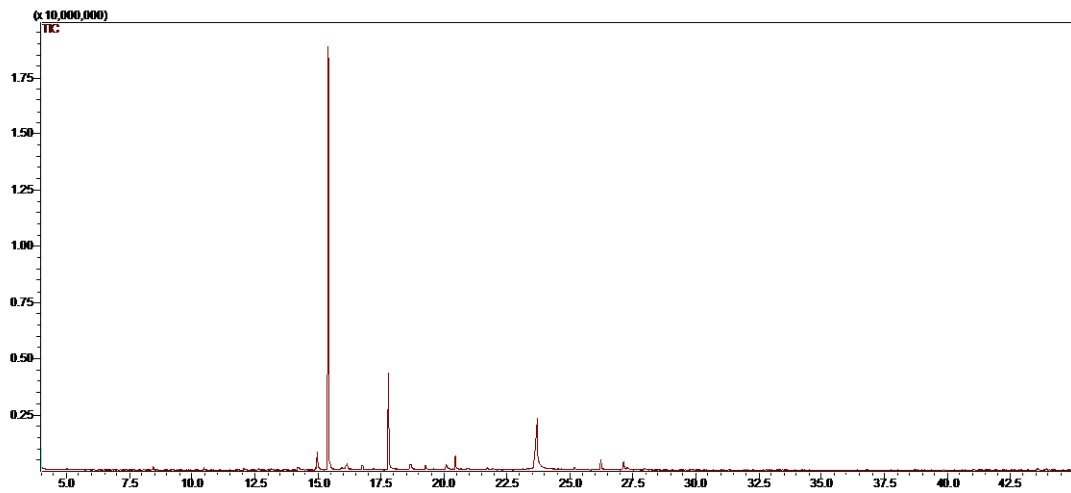
Άνθη Ιουνίου



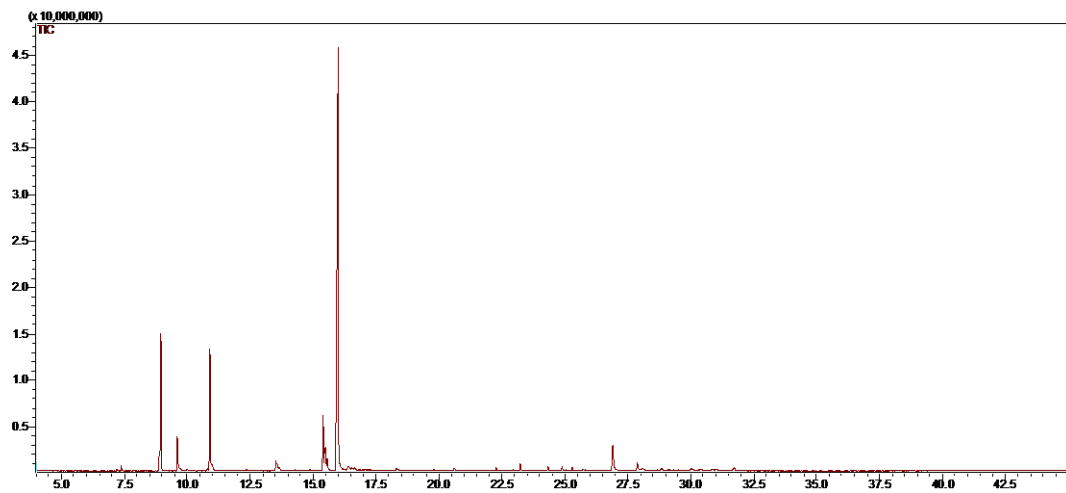
Άνθη Ιουλίου



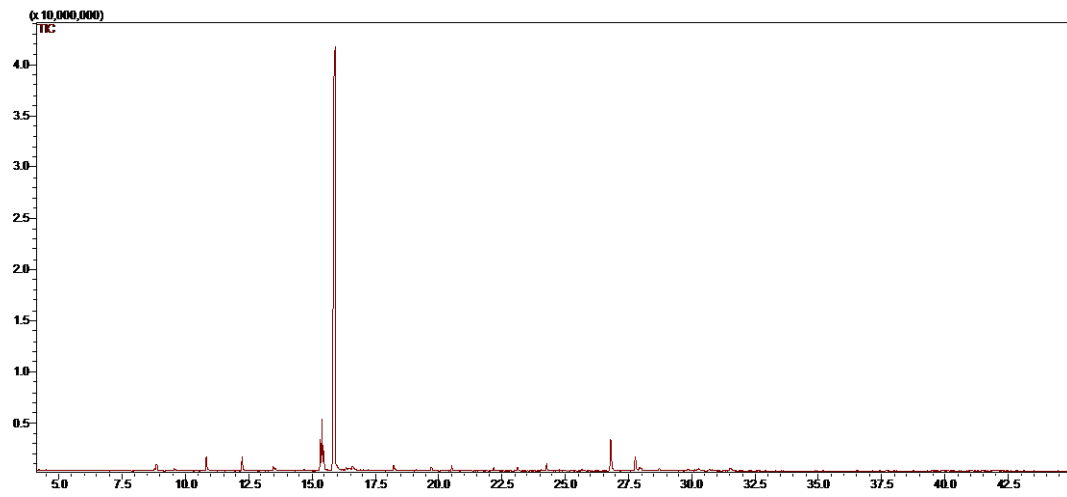
Άνθη Αυγούστου



Φύλλα - Άνθη Σεπτεμβρίου



Άνθη Οκτωβρίου



## ΕΝΟΤΗΤΑ 2 – Αποτελέσματα από την ανάλυση του φυτού *Phlomis lanata*.

### Περίληψη

Σκοπός αυτού του παραρτήματος είναι η σύντομη παρουσίαση των πειραματικών αποτελεσμάτων για το ενδημικό φυτό *Phlomis lanata*, από την ανάλυση των αιθέριων ελαίων του οποίου, φάνηκε η πιθανή αλλοίωση των δειγμάτων που είχαν συλλεχθεί και αποσταχθεί κατά τα έτη 2011-2012. Οι αποστάξεις και οι πειραματικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν όπως ακριβώς και στην περίπτωση του φυτού *Hyssopus officinalis*. Το σύνολο των συστατικών που ταυτοποιήθηκαν ήταν 19.

### Βοτανική περιγραφή, χρήσεις και χημεία αιθέριου ελαίου

Το γένος *Phlomis* s.l. είναι ένα από τα μεγαλύτερα μέλη της υπο-οικογένειας Lamioideae (Lamiaceae) και περιλαμβάνει πάνω από 100 είδη. Αντιπροσωπευτική περιοχή για το γένος *Phlomis* είναι η Κρήτη με τρία είδη, τα *P. cretica*, *C. Presl.*, *P. fruticosa* L., και το ενδημικό του νησιού, το *P. lanata* Willd. καθώς και τα υβρίδιά τους *P. × cytherea* (*P. cretica* × *P. fruticosa*), *P. × commixta* (*P. cretica* × *P. lanata*) and *P. × sieberi* (*P. fruticosa* × *P. lanata*).

Τα είδη του *Phlomis* αναφέρονται από τον Διοσκουρίδη ως φυτικά φάρμακα και χρησιμοποιούνται στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων όπως ο διαβήτης, το

γαστρικό έλκος, οι αιμορροΐδες, οι φλεγμονές και οι πληγές. Τα αιθέρια ελαία τους αποτελούνται από μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, αλιφατικές ενώσεις, λιπαρά οξέα και άλλα συστατικά, ενώ οι κύριες ενώσεις που απομονώνονται από τα εκχυλίσματα είναι φλαβονοειδή, ιριδοειδή και



φαινυλαιθυλική αλκοόλη. Το *P. lanata* είναι ενδημικό της Κρήτης. Απαντάται από το επίπεδο της θάλασσας και μέχρι 1200m υψόμετρο. Το συναντάμε εκτενώς στην Κεντρική και Ανατολική Κρήτη, ενώ στη Δυτική Κρήτη έχει σημειωθεί μόνο ένας πληθυσμός βόρεια των Σφακιών.<sup>1</sup> Στην κρητική διάλεκτο αναφέρεται ως αγκάραθος ή αγκαραθιά, από την αρχαία ελληνική λέξη κάρα που σημαίνει

κεφαλή. Είναι ένας πολυετής χαμηλός θάμνος παρόμοιος με τη φασκομηλιά. Στις κορφές των κλαδιών του αναπτύσσονται κίτρινα άνθη, που μοιάζουν με μικρές κεφαλές και είναι πλούσιες σε νέκταρ. Τα παιδιά ονόμαζαν τα άνθη του φυτού «πιπιλιές», καθώς συνήθιζαν να τα κόβουν από την πίσω πλευρά και να ρουφάνε το γλυκό νέκταρ.<sup>2,3</sup>

Το *P. lanata* ξεχωρίζει από τα άλλα δύο της οικογένειας στην Κρήτη, λόγω των μικρότερων και πιο στρογγυλών φύλλων του. Η περίοδος άνθισης του είναι από το Μάρτιο μέχρι το Μάιο. Τα άνθη τότε, παράγουν μία σκόνη, που ενοχλεί τα μάτια.<sup>2,4</sup>

Πρόσφατα μελετήθηκε *in vitro* η αντιοξειδωτική δραστηριότητα αιθανολικών εκχυλισμάτων από τα φυτά *P. fruticosa* και *P. lanata*. Τα εκχυλίσματα από το *P. lanata* έδειξαν την ίδια δραστηριότητα με την α-τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε), ενώ εκείνα από το *P. fruticosa* έδειξαν ελαφρώς μικρότερη δραστηριότητα από την α-τοκοφερόλη.<sup>5</sup> Αυτό προσδίδει ιδιαίτερη σημασία στο αιθέριο έλαιο του φυτού για πιθανές μελλοντικές χρήσεις.

Στο *Phlomis lanata* έχουν ταυτοποιηθεί 48 ουσίες<sup>5,6</sup> με κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου να είναι το α-πινένιο (α-pinene) σε ποσοστό 25,41%, το λιμονένιο (limonene) σε ποσοστό 15,67% και το (Ε)-καρυοφυλλένιο ((E)-caryophyllene) σε ποσοστό 8,76%.<sup>1</sup>

## Πειραματική διαδικασία

Το είδος *P. lanata*, (Ιανουάριος 2011-2012) συλλέχθηκε από την ευρύτερη περιοχή της Τυλίσου, δήμου Μαλεβιζίου στο νομό Ηρακλείου.

Για την υδροαπόσταξη των φύλλων και των ανθέων, ακολουθήθηκε το ίδιο ακριβώς πρωτόκολλο με εκείνο για το *Hyssopus officinalis*. Η GC-MS ανάλυση πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά με το θερμικό πρόγραμμα Diphlo που περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος 4.).

## Αποτελέσματα

Για την ανάλυση του φυτού *Phlomis lanata*, χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα που παρατίθενται στον πίνακα:

**Πίνακας 1.** Σύνολο δειγμάτων προς ανάλυση του *Phlomis lanata*.

Μήνας	Όνομα πειράματος	Βιολογικό στάδιο	Ποσότητα φυτικού υλικού (gr)	Ποσότητα Ε.Ο.*(mgr)
Ιανουάριος	73Α	φύλλα	25,00	ίχνη
Φεβρουάριος	4Α	φύλλα	20,00	38
	5Β	φύλλα	20,00	9
	6Γ	φύλλα	20,00	11

	26A	φύλλα	20,00	5
	27B	φύλλα	20,00	6
	28Γ	φύλλα	20,00	5
Μάρτιος	29A	φύλλα	20,095	5
	30B	φύλλα	20,00	6
	31Γ	φύλλα	20,00	2
	45A	ανθικά στελέχη	32,00	7
Απρίλιος	32A	φύλλα	19,50	1
	33B	φύλλα	20,35	ίχνη
	34A	φύλλα	20,10	2
	35B	φύλλα	20,04	ίχνη (1mgr)
	36Γ	φύλλα	20,25	4
	52A	άνθη μόνο	7,82	1
Μάιος	8A	νέα φύλλα	21,00	9
	11B	φύλλα	20,00	14
	12Γ	φύλλα	20,00	10
	13A	ταξιανθίες	3,869	3
	biochem67	ανθικά στελέχη	50,000	19
	biochem68	ανθικά στελέχη	60,000	19
Ιούνιος	19A	φύλλα	20,00	5
	20B	φύλλα	20,00	2
	21Γ	φύλλα	20,00	6
	22A	φύλλα	20,00	3
	23B	φύλλα	20,00	7
	24Γ	φύλλα	20,00	2
	25Δ test	φύλλα	6,380	2
Ιούλιος	14A	φύλλα	20,00	8
	15B	φύλλα	20,00	7
	16Γ	φύλλα	20,00	13
	17A	φύλλα	20,00	7
	18B	φύλλα	20,00	5
Αύγουστος	7A	φύλλα	20,00	9
	9B	φύλλα	20,00	13
	10Γ	φύλλα	20,00	9
	39A	φύλλα	20,50	5
	40B	φύλλα	20,50	6
	41Γ	φύλλα	20,50	1
Σεπτέμβριος	37A	φύλλα	20,50	2
	38B	φύλλα	20,50	2
	42A	φύλλα	20,00	1
	43B	φύλλα	20,00	3
	44Γ	φύλλα	20,00	5
Οκτώβριος	46A	φύλλα	20,00	6
	47B	φύλλα	20,00	25
	48Γ	φύλλα	20,00	1

Νοέμβριος	49A	φύλλα	20,00	1
	50B	φύλλα	20,00	3
	51Γ	φύλλα	20,00	1
	53A	φύλλα	20,00	2
	54B	φύλλα	20,00	2
Δεκέμβριος	55Γ	φύλλα	20,00	2
	56Δ	φύλλα	20,00	2
	69	φύλλα	30,00	10
	70	φύλλα	30,00	13
	biochem71	φύλλα	79,86	8
	72	φύλλα	30,00	17

\*E.O. : Essential Oil

Από αυτά, αναλύθηκαν με GC-MS εκείνα με τη μεγαλύτερη ποσότητα φυτικού υλικού (25 φάσματα συνολικά). Από την ανάλυση, τα κύρια συστατικά του φυτού που εμφανίζουν στα φάσματα ποσοστό ομοιότητας μεγαλύτερο του 90% με τα αντίστοιχα φάσματα των βιβλιοθηκών του οργάνου είναι:

**Πίνακας 2.** Σύνολο ενώσεων του *Phlomis lanata* με σημαντικό ποσοστό ταυτοποίησης.

	Ένωση
1	$\alpha$ -Pinene
2	m-Cymene
3	Limonene
4	4,5-Dimethyl-2-ethyl-phenol
5	Cedrene
6	Alpha-caryophyllene
7	$\alpha$ -Curcumene
8	Butylated Hydroxytoluene
9	(+)-Ledene
10	Patchulane
11	Tetradecanoic acid
12	6,10-Dimethyl-2-Undecanone
13	n-Hexadecanoic acid
14	Tricosane
15	Diisooctyl Phthalate
16	7-Hexyleicosane
17	Eicosane
18	Triacontane
19	n-Heptadecane

Ωστόσο, η ποσοτική ανάλυση του φυτού δεν προχώρησε, διότι τα φάσματα εμφάνιζαν μη ικανοποιητικό αριθμό κορυφών που μπορούσαν να ταυτοποιηθούν (από καμία έως 11 κορυφές). Οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι τα δείγματα είτε είχαν αλλοιωθεί λόγω του μεγάλου διαστήματος που βρίσκονταν στο ψυγείο, είτε απαιτούσαν διαφορετικό θερμικό πρόγραμμα για GC-MS ανάλυση.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

<sup>1</sup> Georgescu, L., Stefanakis, M.K., Kokkini, S., Katerinopoulos, H.E., Pirintsos, S.A., *Chemical and genetic characterization of Phlomis species and wild hybrids in Crete*, **2016**, *Phytochemistry*, 122, 91-102

<sup>2</sup> <http://www.cretanlexiko.gr/dictionary/agkasthia-agkarathia-pipilia-i/> πρόσβαση στις 26/02/2016

<sup>3</sup> <http://ventemakreta.blogspot.gr/2010/04/2.html> πρόσβαση στις 26/02/2016

<sup>4</sup> <http://www.first-nature.com/flowers/phlomis-lanata.php> πρόσβαση στις 26/02/2016

<sup>5</sup> Li, M.-X., Shang, X.-F., Jia, Z.-P., Zhang, R.-X., *Phytochemical and Biological Studies of Plants from the Genus Phlomis*, **2010**, *Chemistry and Biodiversity*, 7, 283–301

<sup>6</sup> Liolios, C., Laouer, H., Boulaacheb, N., Gortzi, O., Chinou, I., *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Algerian Phlomis bovei De Noé subsp. bovei*, **2007**, *Molecules*, 12, 772-781