

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΤΑ**  
**ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *ORIGANUM***

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΠΕΤΡΟΥΛΑΚΗ ΧΑΡΑ**

**[AM 1795]**

Επιβλέπων Καθηγητής

**ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ**

**Ηράκλειο, Ιούνιος 2017**

**UNIVERSITY OF CRETE**  
**SCHOOL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**  
**DEPARTMENT OF CHEMISTRY**



**COMPONENT ANALYSIS OF ESSENTIAL OIL FROM PLANTS  
OF THE GENUS *ORIGANUM***

**PETROULAKI CHARA**

**[AM 1795]**

**Supervisor: Professor Haralambos E. Katerinopoulos**

**Heraklion, June 2017**

*Στην οικογένεια μου.....*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Με μεγάλη μου χαρά και ευγνωμοσύνη θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επιβλέποντα Καθηγητή κύριο Χαράλαμπο Κατερινόπουλο καθώς και τον Επιβλέποντα Υποψήφιο Διδάκτορα Στεφανάκη Μιχάλη για όλη τους την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές που μου πρόσφεραν καθ'όλη την πορεία μου μέσα σε αυτόν τον εργαστηριακό χώρο. Οι γνώσεις τους και η μεγάλη τους προθυμία για μετάδοση ήταν ότι σημαντικότερο για την διεξαγωγή και την συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω για την άψογη συνεργασία μας τους: Δρ Τσικαλά Γιώργο και την συμφοιτήτρια μου Δαμασκηνάκη Φωτεινή.*

*Χ.Πετρούλακη*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
2.Εισαγωγή	
2.1.Ονομασία και ιστορία φυτού.....	8
2.2.Φαρμακευτική δράση .....	10
2.3.Αιθέρια έλαια	
2.3.1.Γενικά .....	11
2.3.2.Απομόνωση αιθέριων ελαίων.....	16
2.3.3.Μεθοδολογία GC-MS.....	22
3.Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας.....	25
4.Πειραματική Διαδικασία	
4.1.Φυτικό Υλικό.....	26
4.2.Μεθοδολογία Προσδιορισμού Πτητικών Υλικών με GC-MS.....	28
5. Αποτελέσματα	
5.1.Περιεκτικότητα των δειγμάτων σε αιθέρια έλαια.....	30
5.2 Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του αιθέριου ελαίου ρίγανης.....	31
5.3.Συζήτηση Αποτελεσμάτων.....	39
6.Βιβλιογραφία.....	46
7.Παράρημα-Φάσματα GC-MS.....	48

## 1. Περίληψη

Η Ρίγανη είναι ένα από τα πιο σημαντικά καρυκεύματα και χρησιμοποιείται σε όλο τον κόσμο. Ένα από τα σημαντικότερα εμπορικά είδη που καλλιεργούνται είναι το *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, το οποίο είναι ενδημικό της περιοχής της Μεσογείου.

Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε ποιοτική και ποσοτική μελέτη των συστατικών από το αιθέριο έλαιο του φυτού ρίγανης. Αναλύθηκαν δείγματα διαφορετικού γενοτύπου. Πραγματοποιήθηκε η παραλαβή του αιθέριου ελαίου μέσω υδροαπόσταξης με συσκευή Clevenger. Η ανάλυση των αιθέριων ελαίων έγινε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας (GC/MS).

Συνολικά αναλύθηκαν 33 δείγματα, όπου χωρίστηκαν σε 3 ομάδες για μελέτη (δείγματα τύπου Α, τύπου Β και Γ). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου ήταν οι φαινολικές ενώσεις με κύριο εκπρόσωπο την θυμόλη και καρβακρόλη καθώς και τις πρόδρομες αυτών ενώσεις γ-τερπινένιο και p-κυμένιο. Οι τρεις διαφορετικοί τύποι δειγμάτων, παρουσίασαν διαφορετικές διακυμάνσεις στα ποσοστά των συστατικών τους, γεγονός που υποδηλώνει πως η ποιοτική και ποσοτική σύσταση επηρεάζεται από τον γενότυπο, τον τρόπο καλλιέργειας αλλά και από το περιβάλλον.

## 1. Abstract

The plant of oregano is amongst the most important spices, widely used worldwide. One of the most significant commercial species is the *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* that is cultivated in the Mediterranean region. This type of crop is well adjusted to dry conditions, also on limestone ground.

The goal of this project was the qualitative and quantitative analysis of the components of the essential oil of oregano. The analysis was conducted on specimens of different genotype. Collection of the essential oil was carried out through steam distillation with a Clevenger apparatus. Subsequently the analysis of the essential oils was performed viagas chromatography coupled to mass spectrometer (GC/MS).

The 33 specimens analyzed were divided in to 3 different groups (type A, type B and C). The results revealed that the main components of the essential oil were phenolic compounds such as thymol and carvacrol and also their precursors,  $\gamma$ -terpinene and p-cymene. The 3 different types of specimens, showed fluctuations in their percentages. This outcome suggests that their qualitative and quantitative composition is affected by the genotype, the type of cultivation and the environment of the plant.

## 2.Εισαγωγή

### 2.1.Ονομασία και ιστορία φυτού

Η ονομασία του φυτού της ρίγανης προέρχεται από μια σύνθετη λέξη(ορέων + γάνος) όπου το πρώτο συνθετικό της δηλώνει τον τόπο και συγκεκριμένα τα βουνά στα οποία ανθίζει ενώ το δεύτερο δηλώνει λαμπρότητα, κάλλος, στιλπνότητα και ευφροσύνη. Έτσι προκύπτει η λέξη **ορίγανος** προσδίδοντας στα όρη τη χαρά και την λαμπρότητα.<sup>1</sup>

Πρόκειται για ένα πολυετές, ποώδες φυτό γνωστό από την αρχαιότητα. Η ρίγανη αποτελεί από τα πιο γνωστά είδη βοτάνων σε όλο τον κόσμο με την Ελληνική να βρίσκεται στις πρώτες θέσεις παγκοσμίως λόγω υψηλής ποιότητας. Στην παγκόσμια αγορά κυριαρχούν η Ισπανική ρίγανη (*Coriodothymus capitatus*), η Μεξικάνικη ρίγανη (*Lippia graveolens*), η Τούρκικη ρίγανη (*Origanum onites*) και η Ελληνική ρίγανη (*Origanum vulgare*). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω ειδών είναι η χαρακτηριστική οσμή ρίγανης, που οφείλεται στην παρουσία της φαινόλης καρβακρόλης. Στο γένος *Origanum* γενικά περιέχονται 43 είδη ενώ στην Ελλάδα συγκεκριμένα εμφανίζονται δύο διαφορετικά είδη, το *O. vulgare* και το *O. onites*.<sup>2</sup>



Εικόνα 1: *Origanum Vulgare*



Εικόνα 2: *Origanum Onites*



Το είδος *O. vulgare* έχει την μεγαλύτερη εξάπλωση από όλα τα συγγενικά του είδη, ενώ στην Ελλάδα είναι το πιο κοινό και διαδεδομένο είδος από τα υπόλοιπα. Ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae) και το γένος Ορίγανον (*Origanum*). Είναι ένα αρωματικό, ποώδες, πολυετές, ιθαγενές και θαμνώδες φυτό της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας. Ανήκει στο ευρύ βασίλειο των φυτών (Plantae), στην συνομοταξία των Αγγειοσπερμών (Magnoliophyta), στην ομοταξία των Δικοτυλήδων (Magnoliopsida) και στην τάξη των Λμιωδών (Lamiales) (Πίνακας 1). Το χαρακτηριστικό του φυτού είναι ότι είναι άφθονο σε δευτερογενείς μεταβολίτες (αιθέριο έλαιο) με χαρακτηριστική οσμή και γεύση που αποκαλείται από το ευρύ κοινό ως Ριγανέλαιο.

<b>Βασίλειο</b>	<b>(Regnum)</b>	<b>Plantae</b>
<b>Φύλο</b>	<b>(Phylum)</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Τάξη</b>	<b>(Ordo)</b>	<b>Lamiales</b>
<b>Οικογένεια</b>	<b>(Familia)</b>	<b>Lamiaceae</b>
<b>Γένος</b>	<b>(Genus)</b>	<b>Origanum</b>
<b>Είδος</b>	<b>(Species)</b>	<b>Vulgare</b>

**Πίνακας 1:** Συστηματική ταξινόμηση του φυτού.

Πρόκειται για κοντό, θαμνώδες, τριχωτό φυτό με φρυγανώδη υφή με ύψος που φτάνει περίπου στα 60 cm. Ακολουθεί όρθια ανάπτυξη με ημιξυλώδη και μη ελαστικό κορμό καθώς και πολύκλαδους βλαστούς. Τα κλαδιά του είναι λεπτά και σχηματίζουν ανθοφόρες κεφαλές στις άκρες. Τα φύλλα του είναι πυκνά, έμμισχα μήκους 1-4 cm, πλατεία με καρδιοειδή βάση ή ωοειδή, τριχωτά και με σκούρο σταχτοπράσινο χρώμα. Έχουν πολύ έντονο άρωμα αρκεί απλά να τα τρίψουμε. Τα άνθη της προσδίδουν μια πολύ ευχάριστη πινελιά με λευκό-μωβ χρώμα ενώ σχηματίζουν επάκριες ταξιανθίες. Παρουσιάζει μεγάλη γεωγραφική ποικιλότητα στην Ελλάδα ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περιοχή. Αποτελεί ένα ξηροφυτικό φυτό το οποίο φυτρώνει σε βραχώδεις λόφους και γκρεμνά. Ευνοείται σε εδάφη με pH 6-9 που έχουν υψηλό υψόμετρο και πλούσια ηλιοφάνεια ενώ μπορεί να αναπτυχθεί και σε πιο ξηρά, πετρώδη και φτωχά εδάφη. Ανθίζει κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες από Ιούνιο μέχρι Αύγουστο ανάλογα το έδαφος και τις καιρικές συνθήκες τις περιοχής. Στην Ελλάδα οι περιοχές στις οποίες ευνοείται είναι η Νότια Ελλάδα λόγω του ξηρόθερμου κλίματος σε υψόμετρα από 0 έως 1500 m.<sup>3</sup>

Η συλλογή της γίνεται νωρίς το καλοκαίρι από Μάιο μέχρι Αύγουστο όπου ευνοείται η άνθηση της. Αφού συλλεχθεί, ξηραίνεται σε ειδικούς χώρους ή ξηραντήρια και στη συνέχεια τρίβεται με το χέρι και κοσκινίζεται. Για την διατήρηση της συνήθως αποθηκεύεται σε γυάλινα βάζα. Η διαδικασία αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα και απαιτεί πολύ προσοχή και εργατικά χέρια με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί έλλειψη σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, όπου και τελικά δημιουργήθηκαν οργανωμένες καλλιέργειες μιας και η ποιότητα της Ελληνικής ρίγανης είναι εξαιρετική και αναντικατάστατη.<sup>4</sup>

## **2.2 Φαρμακευτική Δράση<sup>5·6·8</sup>**

Η ρίγανη έχει ευρεία χρήση. Εμφανίζει συγκεκριμένα αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση, όπου λόγω των κύριων συστατικών της, θυμόλης και καρβακρόλης έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηριδίων της ψευδομονάδας ή αεριογόνος και του σταφυλόκοκκου. Εξετάζεται περαιτέρω η καρβακρόλη σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής παρουσιάζουν απόπτωση σε αυτά τα κύτταρα. Κάτι που επίσης έχει αποδειχθεί είναι ότι είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό, περισσότερο και από φρούτα όπως μήλα, πορτοκάλια και από τις πατάτες, αποτρέποντας το οξειδωτικό στρες σε όλο το σώμα και την εμφάνιση δυσλειτουργιών. Περιέχει ουσίες που προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες καθώς επιβραδύνει τη φθορά των κυττάρων και μ' αυτό τον τρόπο και τη διαδικασία της γήρανσης. Επιπλέον η ρίγανη καταπραΰνει στομαχικές διαταραχές, πόνους και διακόπτει την διάρροια και άλλες εντερικές ενοχλήσεις. Βοηθάει στην αρτηριοσκλήρυνση και στην υπέρταση ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται ως αποχρεμπτικό για το βήχα, για πόνους δοντιών και ρευματισμούς. Πολλές από αυτές της τις δράσεις ήταν γνωστές από την αρχαιότητα και χρησιμοποιούνταν από τους αρχαίους Έλληνες ως τσάι με θεραπευτικές δράσεις για το εσωτερικό του οργανισμού αλλά ακόμη και για πρηξίματα. Έχει αποδειχθεί ότι εξωτερικά ηρεμεί τον οργανισμό από δερματικές φαγούρες και πρηξίματα. Τέλος χρησιμοποιείται ευρέως για κρυολογήματα και βοηθάει το αναπνευστικό σύστημα.<sup>1</sup>

## 2.3.Αιθέρια έλαια<sup>1,8</sup>

### 2.3.1.Γενικά

Αιθέρια έλαια ονομάζονται μίγματα πτητικών ουσιών τα οποία προέρχονται από ορισμένα φυτά, προσδίδοντας τους χαρακτηριστική οσμή.<sup>6</sup>Ιδιαίτερη σημασία εμφανίζει το γεγονός ότι ενώ ονομάζονται έλαια δεν είναι μίγματα γλυκεριδίων αλλά πρόκειται για τερπένια μικρού μοριακού βάρους που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Αποτελούνται κυρίως από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια ενώ σε μικρότερο βαθμό από διτερπένια και άλλες ενώσεις όπως εστέρες και λιπαρά οξέα. Προέρχονται από την ένωση ισοπρενίων και συγκεκριμένα σύμφωνα με τον κανόνα ισοπρενίου που προτάθηκε από τον *LeopoldRuzicka* τα τερπένια προκύπτουν από την ένωση “κεφαλής-ουράς” υπομονάδων ισοπρενίου.<sup>7</sup> Έτσι με το μηχανισμό αυτό προκύπτουν εκατομμύρια ενώσεις όπως το μυρκένιο και το α-πινένιο.

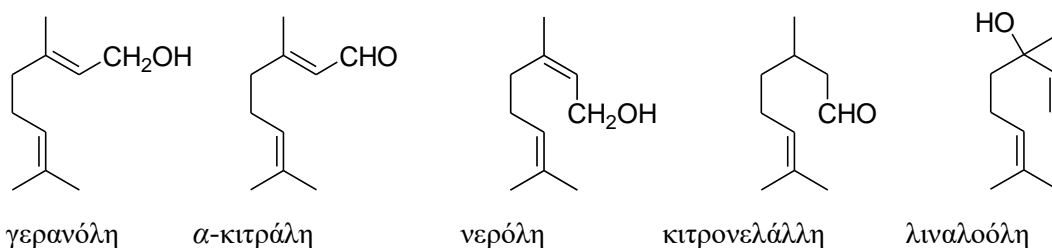
Σήμερα γνωρίζουμε τη δομή χιλιάδων τερπενίων, μερικά από αυτά είναι υδρογονάνθρακες ενώ άλλα περιέχουν οξυγόνο, άζωτο, θείο, δακτυλίους ή είναι και μόρια ανοιχτής αλυσίδας. Ανάλογα λοιπόν με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν τα τερπένια ταξινομούνται σε:

- Μονοτερπένια, με 10 άτομα άνθρακα και 2 μονάδες ισοπρενίου
- Σεσκιτερπένια, με 15 άτομα άνθρακα και 3 μονάδες ισοπρενίου
- Διτερπένια, με 20 άτομα άνθρακα και 4 μονάδες ισοπρενίου
- Σεστερτεπένια, με 25 άτομα άνθρακα και 5 μονάδες ισοπρενίου
- Τριτερπένια, με 30 άτομα άνθρακα και 6 μονάδες ισοπρενίου
- Τετρατερπένια, με 40 άτομα άνθρακα και 8 μονάδες ισοπρενίου

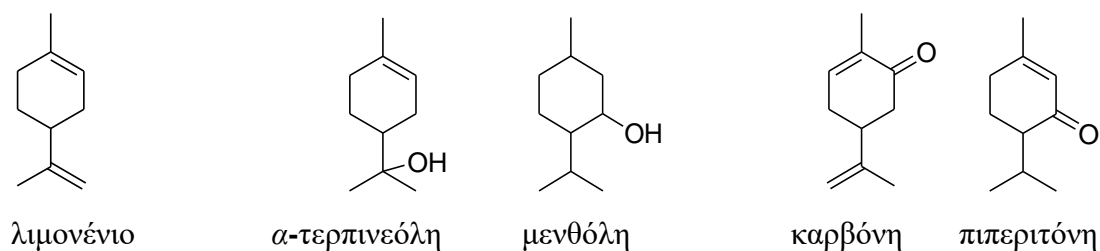
Σε καθεμία από τις ομάδες αυτές υπάρχει μία μόνο μητρική ένωση, από την οποία προκύπτουν όλα τα μέλη. Οι μητρικές ενώσεις όλων των ομάδων έχουν μεταξύ τους σχέση ομόλογων ενώσεων. Όλα για παράδειγμα τα σεσκιτερπένια προκύπτουν από τον πυροφωσφορικό εστέρα της φαρνεσόλης με μία σειρά ενζυματικών μετατροπών 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, ένωσης ομόλογης του εστέρα της φαρνεσόλης. Τα μονοτερπένια, όπου όπως προαναφέρθηκε

προκύπτουν από δυο μονάδες ισοπρενίου αποτελούν μαζί με τα σесκιτερπένια τα σημαντικότερα συστατικά των αιθέριων ελαίων με χιλιάδες εφαρμογές. Εδώ ο πυροφωφορικός εστέρας της γερανιόλης, μέσω του Z-γεωμετρικού ισομερούς του, που είναι ο πυροφωφορικός εστέρας της νερόλης είναι ο πρόδρομος όλων των μονοτερπενίων. Τα μονοτερπένια διακρίνονται σε άκυκλα, μονοκυκλικά και δικυκλικά ανάλογα με το χημικό τους τύπο. Παραδείγματα μονοτερπενίων και σесκιτερπενίων, που αποτελούν κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων που προέρχονται από φυτά φαίνονται παρακάτω:

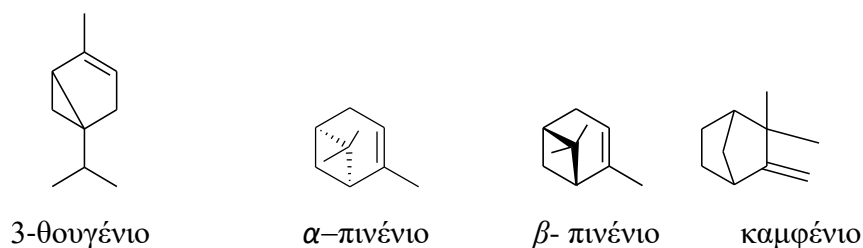
#### α) Άκυκλα μονοτερπένια

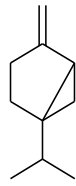


#### β) Μονοκυκλικά μονοτερπένια

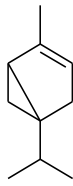


#### γ) Δικυκλικά μονοτερπένια

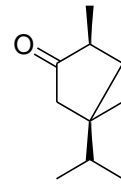




σαβινένιο

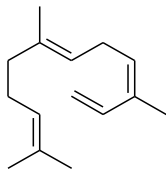


3-θουγένιο

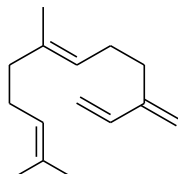


α-θουγιόνη

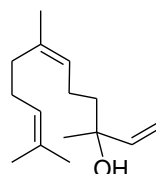
α) Άκυκλα σесκιτερπένια



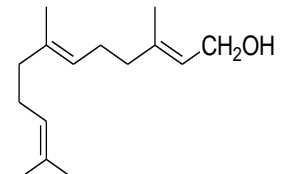
α-φαρνεσένιο



β-φαρνεσένιο

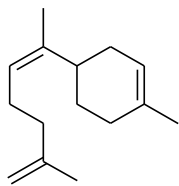


νερολιδόλη

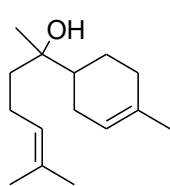


φαρνεσόλη

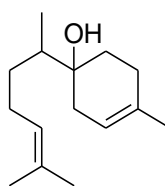
β) Μονοκυκλικά σесκιτερπένια



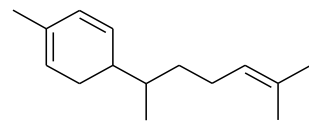
Μπιζαμπολένιο



α-μπισαμπολόλη

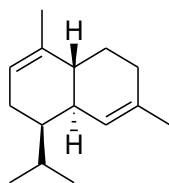


β-μπισαμπολόλη

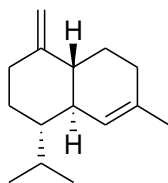


ζινγκιμπερένιο

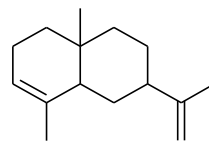
γ) Δικυκλικά σесκιτερπένια



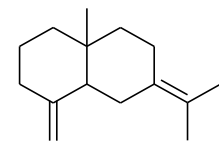
α-καδινένιο



γ-καδινένιο



α-σελινένιο



γ-σελινένιο

δ) Τρικυκλικά σесκιτερπένια

Όπως το καδρένιο και η καδρόλη που είναι πιο σπάνια.

Μονοτερπένια των οποίων η δομή περιέχει βενζολικό δακτύλιο όπως το p-κυμένιο, η θυμόλη, η καρβακρόλη και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη συναντώνται συχνά ως συστατικά αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών όπως τη ρίγανη (*Oregano*), το θυμάρι (*Thymus*), το θρούμπι (*Satureja*) κ.α. Αυτό επιβεβαιώθηκε, όπως θα δούμε στα αποτελέσματα των πειραμάτων, αφού τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου της *O. vulgare* είναι το p-κυμένιο, το γ-τερπινένιο, η θυμόλη και η καρβακρόλη.

Στα φυτά η παραγωγή των αιθερίων ελαίων γίνεται σε ειδικευμένους εκκριτικούς μηχανισμούς, όπως ελαιοφόρα δοχεία, αδενώδη τοιχώματα, ελαιοφόροι πόροι και ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα. Ο πραγματικός τους ρόλος στα φυτά δεν είναι απόλυτα γνωστός, το μόνο σίγουρο όμως είναι ότι βοηθούν στη μείωση της απώλειας νερού κατά τη διαπνοή του φυτού ενώ παράλληλα προσελκύουν τα έντομα και μέσω της μεταφοράς της γύρης πραγματοποιείται η αναπαραγωγή. Τέλος λόγω των συστατικών τους εμφανίζουν αντισηπτικές, αντιβακτηριακές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.<sup>4</sup>

Πολλά ονόματα τερπενίων έχουν προκύψει από το όνομα του φυτού από το οποίο απομονώνονται όπως για παράδειγμα η γερανιόλη από το έλαιο του γερανιού, το λιμονένιο από το έλαιο του λεμονιού, η μενθόλη από το έλαιο της μέντας και πολλά άλλα.

Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων χωρίζονται σε δύο ομάδες:

### **i) Στα οξυγονούχα :**

Τα κυριότερα οξυγονούχα είναι:

#### **αλκοόλες :**

Λιναλοόλη, γερανιόλη, κιτρονελλόλη, νερόλη, τερπινεόλη, πουλεγόλη, μενθόλη, πιπεριτόλη, κλπ

#### **αλδεΐδες :**

κιτράλη, κιτρονελλάλη, φελλανδραλη, μυρτενάλη, σαφρανάλη, κλπ

#### **κετόνες :**

μενθόνη, πουλεγόνη, καρβόνη, πιπεριτόνη, καμφορά, κλπ

#### **φαινόλες :**

θυμόλη, καρβακρόλη, ανηθόλη, ευγενόλη, κλπ

#### **οξέα :**

διάφορα οργανικά οξέα ενωμένα με αλκοόλες σε εστέρες.

#### **εστέρες:**

οξικός γερανυλεστέρας, οξικός λιναλυλεστέρας, οξικός κιτρονελλυστέρας, οξικός μενθυλεστέρας, κλπ. Εκείνα που συμβάλουν περισσότερο στο άρωμα των αιθέριων ελαίων είναι οι εστέρες.

**ii)Στα μη οξυγονούχα**

- **μονοκυκλικά τερπένια**
- **δικυκλικά τερπένια**

### **2.3.2. Απομόνωση αιθέριων ελαίων<sup>1</sup>·84**

Ιδιαίτερη σημασία και προσοχή δίνεται κατά την απομόνωση του αιθέριου ελαίου από το εκάστοτε φυτό και στη συνέχεια κατά τον διαχωρισμό του από τα υπόλοιπα συστατικά του. Για την διαδικασία αυτή προτείνονται διάφοροι μηχανισμοί από την βιβλιογραφία,<sup>8</sup> και η επιλογή τους εξαρτάται κάθε φορά από το φυτό και το αιθέριο έλαιο που προορίζεται για ανάλυση. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι κυρίως η απόσταξη και η εκχύλιση αλλά και άλλες τεχνικές όπως εκχύλιση με υπέρηχους και μικροκύματα. Το στάδιο ανάπτυξης των οργάνων του φυτού (φύλλα, ταξιανθίες, καρποί) είναι καθοριστικό για την σύσταση του αιθέριου ελαίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις η απόδοση σε αιθέριο έλαιο είναι αυξημένη την περίοδο της ανθοφορίας. Σημαντικό ρόλο όμως εκτός από τις τεχνικές απομόνωσης του αιθέριου ελαίου παίζουν και άλλοι παράγοντες, οι οποίοι μάλιστα δεν εξαρτώνται από τον ίδιο τον άνθρωπο αλλά καθορίζουν την απόδοση του φυτού σε έλαιο. Τέτοιοι παράγοντες είναι το κλίμα, η γεωγραφική θέση αλλά και γενετικοί παράγοντες του ίδιου του φυτού. Οι κλιματικές συνθήκες και το έδαφος ανάπτυξης του παίζουν πρωταρχικό ρόλο καθώς επηρεάζουν την φωτοσυνθετική του ικανότητα που χωρίς την απαραίτητη ηλιοφάνεια και υγρασία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί επαρκώς.<sup>1</sup>

### **ΑΠΟΣΤΑΞΗ**

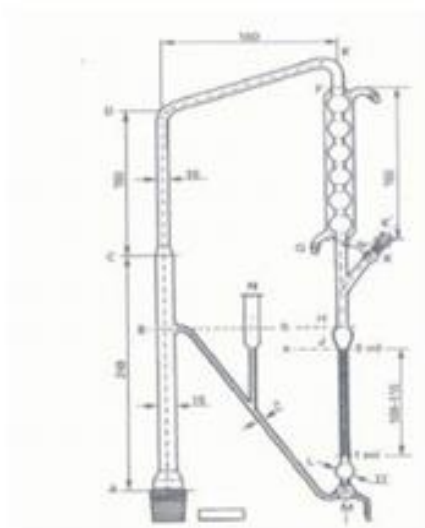
Η μέθοδος της απόσταξης είναι η πιο διαδεδομένη και οικονομική μέθοδος.

#### **Υδροαπόσταξη**

Στην υδροαπόσταξη το προς απόσταξη φυτικό υλικό τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό, η οποία συνδέεται με ψυκτήρα και με θερμαντική συσκευή. Το χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι το νερό και το φυτικό υλικό είναι σε άμεση επαφή. Στην υδροαπόσταξη πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, ώστε να μην συμβαίνει θερμική διάσπαση διαφόρων συστατικών του αιθέριου ελαίου. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι: μεγάλος χρόνος, μικρή απόδοση σε αιθέριο έλαιο, παραλαβή κατώτερης ποιότητας αιθέριου ελαίου. 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, της μέντας και της ρίγανης στην περίπτωση μας.



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.19



**Εικόνα 3:**Συσκευή Clevenger για την παραλαβή αιθερίων ελαίων από αρωματικά φυτά(European Pharmacopeia (2000) 3rd edn, Copyright Council of Europe)

### **Υδροατμοαπόσταξη (water and steam distillation)**

Στην υδροατμοαπόσταξη το φυτικό υλικό δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το νερό, αλλά τοποθετείται σε πλέγμα που βρίσκεται πιο ψηλά από την επιφάνεια του νερού. Ο ατμός που σχηματίζεται από την θέρμανση του νερού, έρχεται σε επαφή με τη μάζα του φυτικού υλικού και παρασύρει το αιθέριο έλαιο.

### **Απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation)**

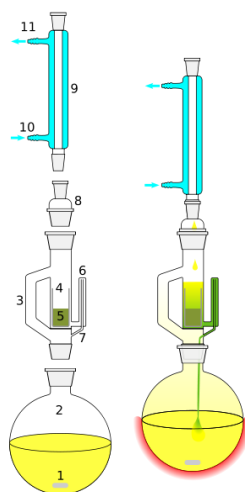
Στην απόσταξη με υδρατμούς εισάγεται ατμός, ο οποίος παράγεται σε ειδικό ατμολέβητα, που περιέχει το φυτικό υλικό και ο ατμός παρασύρει το αιθέριο έλαιο. Στην απόσταξη με υδρατμούς ανήκει η συσκευή μικροαπόσταξης- εκχύλισης *Likens-Nickerson*. Η συσκευή αποτελείται από το κύριο σώμα, διαμορφωμένο για

οργανικούς διαλύτες ελαφρύτερους του νερού, έναν ψυκτήρα και δύο φιάλες, μια σφαιρική και μια απιοειδή. Το δείγμα τοποθετείται μαζί με νερό (σε αναλογία 1/10) στη σφαιρική φιάλη και ο οργανικός διαλύτης (κυρίως διαιθυλαιθέρας) στην απιοειδή και θερμαίνεται με υδατόλουτρο. Οι σχηματιζόμενοι ατμοί από την σφαιρική φιάλη, που περιέχουν τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου, φθάνουν στο ψυκτήρα, υγροποιούνται και κυλούν στον κύριο χώρο της συσκευής, όπου υπάρχει σε ισορροπία η οργανική και η υδατική φάση. Εκεί τα πτητικά συστατικά εκχυλίζονται από τον οργανικό διαλύτη. Στο τέλος της διαδικασίας (μετά από 1 ώρα τουλάχιστον) όλα τα συστατικά του αιθερίου ελαίου έχουν συγκεντρωθεί στην απιοειδή φιάλη.

## ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η συνήθης περίπτωση διαχωρισμού με εκχύλιση, είναι η εκχύλιση υγρού-υγρού. Η εκχύλιση αυτή με υγρούς διαλύτες(συνήθως νερό – οργανικός διαλύτης) βασίζεται στην κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών, τα οποία είναι πρακτικώς μη αναμίξιμα ( υδατική – οργανική φάση). Στην υδατική φάση κατά κύριο λόγο συλλέγονται οι πολικές ουσίες και τα ανόργανα συστατικά, ενώ στην οργανική οι μη πολικές ουσίες.

Η μέθοδος της εκχύλισης χρησιμοποιείται για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου από φυτικά υλικά , τα οποία είναι ευπαθή στην απόσταξη, όπως άνθη και φύλλα. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο εκχυλιστικό υλικό, διακρίνεται σε εκχύλιση με ψυχρό λίπος, εκχύλιση με θερμό λίπος, με πτητικούς διαλύτες και σε υπερκρίσιμη εκχύλιση.



**Εικόνα 4:** Παραλαβή αιθερίου ελαίου μέσω εκχύλισης.

### **Εκχύλιση με πτητικούς διαλύτες**

Ως διαλύτες χρησιμοποιούνται κυρίως ο πετρελαϊκός αιθέρας, το βενζόλιο, η αιθυλική αλκοόλη. Το προϊόν που λαμβάνεται κατά την εκχύλιση, μετά την απομάκρυνση του πτητικού διαλύτη, εκτός από το αιθέριο έλαιο περιέχει και άλλες ουσίες, όπως κύρους και χρωστικές. Μετά από επεξεργασία με αιθυλική αλκοόλη λαμβάνεται τελικά το αιθέριο έλαιο.

### **Εκχύλιση με ψυχρό λίπος**

Η εκχύλιση με ψυχρό λίπος αποτελεί βελτίωση του τρόπου παρασκευής αρωματικών αλοιφών. Το λίπος που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι καθαρό και ημίσκληρο. Το λίπος έχει την ικανότητα να απορροφά και να συγκρατεί τις πτητικές ουσίες με τις οποίες έρχεται σε επαφή. Η εκχύλιση διαρκεί 24-30 h, ενώ το λαμβανόμενο λίπος μαζί με το αιθέριο έλαιο ή διατίθεται ως έχει ή επεξεργάζεται με αλκοόλη.

### **Εκχύλιση με θερμό λίπος**

Η εκχύλιση αυτή ομοιάζει με την εκχύλιση με ψυχρό λίπος, με τη διαφορά ότι τα άνθη και το λίπος τοποθετούνται σε δοχεία που θερμαίνονται στους 800°C. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων από εσπεριδοειδή και τριαντάφυλλα.

### **Εκχύλιση με υδρόφιλους διαλύτες**

Τελευταία χρησιμοποιούνται υδατοδιαλυτοί διαλύτες ως εκχυλιστικά μέσα ή σε ανάμιξη με το νερό, για την παραλαβή των περισσοτέρων φυτικών συστατικών, που χρησιμοποιούνται στην κοσμετολογία. Τέτοιοι διαλύτες είναι η αιθυλενογλυκόλη, προπυλενογλυκόλη, η βουτυλενογλυκόλη.

### **Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (SFE)**

Κάθε συστατικό σε θερμοκρασία και πίεση πάνω από το κρίσιμο σημείο (το σημείο που αλλάζει φάση) βρίσκεται σε υπερκρίσιμη κατάσταση. Πάνω από την κρίσιμη

θερμοκρασία ένα συστατικό που είναι αέριο δεν μπορεί να υγροποιηθεί παρ' όλη την εφαρμογή υψηλής πίεσης. Η κρίσιμη πίεση είναι αυτή των ατμών του αερίου σε κρίσιμη θερμοκρασία. Το ρευστό σε υπερκρίσιμο περιβάλλον διατηρεί τις ιδιότητες τόσο της υγρής όσο και της αέριας φάσης. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι μια ραγδαία αναπτυσσόμενη μέθοδος διαχωρισμού, χρησιμοποιώντας διαλύτες όπως το διοξείδιο του άνθρακα CO<sub>2</sub> σε υπερκρίσιμες συνθήκες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> από το εκχύλισμα, με μια απλή εκτόνωση σε ατμοσφαιρική πίεση. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλες πιέσεις λειτουργίας, που συνεπάγεται μεγάλο κόστος, καθώς επίσης και η πολυπλοκότητά της.

## **ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗ**

Εδώ τα αιθέρια έλαια παραλαμβάνονται με μηχανικά μέσα (πιεστήρια). Χρησιμοποιούνται στους ξηρούς καρπούς και στους φλοιούς των εσπεριδοειδών. Τα μηχανήματα για τους ξηρούς καρπούς είναι πιεστήρια, που μοιάζουν με αυτά που χρησιμοποιούνται στα ελαιοτριβεία. Τα μηχανήματα για τους φλοιούς των εσπεριδοειδών, είτε ξύνουν είτε τρυπούν τους φλοιούς με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των αιθερίων ελαίων, που στη συνέχεια διαχωρίζονται από το στερεό υπόλειμμα.

## **ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ**

Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η εκχύλιση με υπέρηχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς.

## **ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ (MAE: microwave assisted extraction)**

Τις τελευταίες δεκαετίες υπήρχε έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων τεχνικών παραλαβής των αιθερίων ελαίων, με την χρήση των οποίων έχει τελικά επέλθει σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης και στον όγκο δείγματος διαλύτη. Έτσι άρχισε η χρήση των μικροκυμάτων (MW) στην εκχύλιση. Με τα μικροκύματα υπάρχει σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης, σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους (Soxhlet). Με τις συμβατικές μεθόδους η θερμότητα μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα. Αντίθετα με τα μικροκύματα η θέρμανση ξεκινάει από το δείγμα, μιας και το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων. Όπως φαίνεται παρακάτω, η θερμότητα, που παράγεται από τα MW, είναι εξάρτηση του διαλύματος. Αυτό συμβαίνει μιας και υπάρχουν διαλύτες που απορροφούν τα MW (π.χ μεθανόλη) και άλλοι που δεν την απορροφούν και επομένως δεν θερμαίνονται (π.χ εξάνιο). Με την MAE υπάρχει επίσης και σημαντική μείωση στον όγκο δείγματος και διαλύτη, σε σχέση με την Soxhlet, λόγω της αποδοτικότερης εκχύλισης.

### **Solvent Free Microwave Extraction (SFME)**

Η SFME είναι μια τεχνική που συνδυάζει την ακτινοβολία των μικροκυμάτων και την ξηρή απόσταξη. Με την τεχνική αυτή το φυτικό μέρος τοποθετείται σε δοχείο, μέσα σε φούρνο μικροκυμάτων, χωρίς την προσθήκη νερού ή κάποιου οργανικού διαλύτη. Τα μικροκύματα αλληλεπιδρούν με το εγκλωβισμένο (εσωτερικό) νερό, που υπάρχει στο φυτό, προκαλώντας την θέρμανσή του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διαστολή των κυττάρων του φυτού, τη ρήξη των αδένων των ελαιοφόρων υποδοχέων και τελικά την απελευθέρωση του αιθέριου ελαίου. Το αιθέριο έλαιο, στη συνέχεια εξατμίζεται μαζί με το 'εσωτερικό' νερό και παραλαμβάνεται με την βοήθεια ψυκτήρα.

### 2.3.3. Μεθοδολογία GC-MS<sup>1,9</sup>

#### Αέρια χρωματογραφία/Φασματομετρία μάζας

Μια από τις πιο αποδοτικές και διαδομένες διεργασίες ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης πολύπλοκων οργανικών ενώσεων είναι αυτή η συνδυαστική τεχνική GC-MS. Συγκεκριμένα όταν δυο ή περισσότερες τεχνικές ή όργανα διαχωρισμού συνδέονται για την δημιουργία ενός νέου και αποτελεσματικότερου οργάνου, τότε η προκύπτουσα τεχνική συχνά αναφέρεται ως «συζευγμένη τεχνική» (hyphenated technique), με χαρακτηριστικό παράδειγμα την GC-MS τεχνική που χρησιμοποιήσαμε και εμείς στην ανάλυση μας. Στην αέρια χρωματογραφία ο διαχωρισμός στηρίζεται στην διαφορετική συγγένεια που εμφανίζουν οι ουσίες μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Συγκεκριμένα η κινητή φάση είναι ένα φέρον αέριο ενώ η στατική φάση ένα πτητικό υγρό, καθηλωμένο σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών. Αρχικά τα δείγματα εισάγονται στον αέριο χρωματογράφο, όπου το μίγμα των συστατικών εξαερώνεται και τα συστατικά ξεκινάνε να κινούνται μέσα στη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες. Αυτή η διαφοροποίηση στις ταχύτητες προκύπτει από την τάση των ατμών τους και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Οι διαχωριζόμενες ενώσεις κατόπιν εισέρχονται απευθείας στο φασματογράφο όπου ξεκινάει η παραγωγή ιόντων λόγω θραυσματοποίησης των ουσιών. Το έκλουσμα της χρωματογραφικής στήλης οδηγείται στην πηγή ιόντων αφού απαλλαχθεί από την περισσότερη ποσότητα του φέροντος αερίου. Εδώ τα θραύσματα πλέον βομβαρδίζονται από μία ακτίνα πολύ υψηλής ενέργειας με σκοπό να χάσουν ένα ηλεκτρόνιο τους και να προκύψουν θετικά ιόντα. Τα ιόντα που παράγονται στην πηγή των ιόντων ωθούνται στον αναλυτή μαζών, επιταχυνόμενα από μια σειρά ηλεκτροδίων. Το φασματόμετρο μαζών σε αυτές τις περιπτώσεις ανιχνεύει εξαιρετικά εκλεκτικά τα συστατικά του χρωματογραφικού συστήματος. Πριν ξεκινήσει η διαδικασία διαχωρισμού ρυθμίζεται ο ανιχνευτής από τον ίδιο το χρήστη ηλεκτρονικά να ανιχνεύει προκαθορισμένες τιμές μάζας προς φορτίου ( $m/z$ ). Έτσι το χρωματογράφημα που προκύπτει παρέχει κορυφές μόνο για τις ουσίες που παρέχουν το συγκεκριμένο ιόν. Η όλη διαδικασία μπορεί να ελέγχεται καθ'όλη τη διάρκεια από ηλεκτρονικό υπολογιστή για καλύτερη απόδοση και μάλιστα ο ανιχνευτής δεν ρυθμίζεται μόνο σε μία τιμή  $m/z$  αλλά προγραμματίζεται να αλλάζει ταχύτατα διαδοχικές τιμές  $m/z$  από το χρήστη. Για κάθε

νέα τιμή μάζας προς φορτίου καταχωρείται στον υπολογιστή το αντίστοιχο σήμα από τον ανιχνευτή που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο χρόνο κατακράτησης. Τελικά, αφού εκλουστούν όλα τα συστατικά του δείγματος προς ανάλυση, ο υπολογιστής μετατρέπει τις πληροφορίες αυτές σε ένα χρωματογράφημα που αντιστοιχεί σε κάθε τιμή  $m/z$ .

Για τον πλήρη προσδιορισμό μιας ουσίας που δίνει κορυφή σε φάσμα GC-MS και τον ποιοτικό προσδιορισμό είναι απαραίτητη η λήψη φάσματος σειράς αλκανίων και ο υπολογισμός των δεικτών κατακράτησης Kovats. Τα κανονικά αλκάνια μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πολύ καλά αποτελέσματα ως συστατικά αναφοράς καθώς βρίσκονται σε καθαρή μορφή, είναι εξαιρετικά σταθερά και εμφανίζουν τις λιγότερες ανωμαλίες. 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 εκλύεται μεταξύ οκτανίου και εννεανίου, έχει KI μεταξύ 800 και 900.22. Για τον υπολογισμό του KI μιας ουσίας A, χρησιμοποιούμε τη σχέση:

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

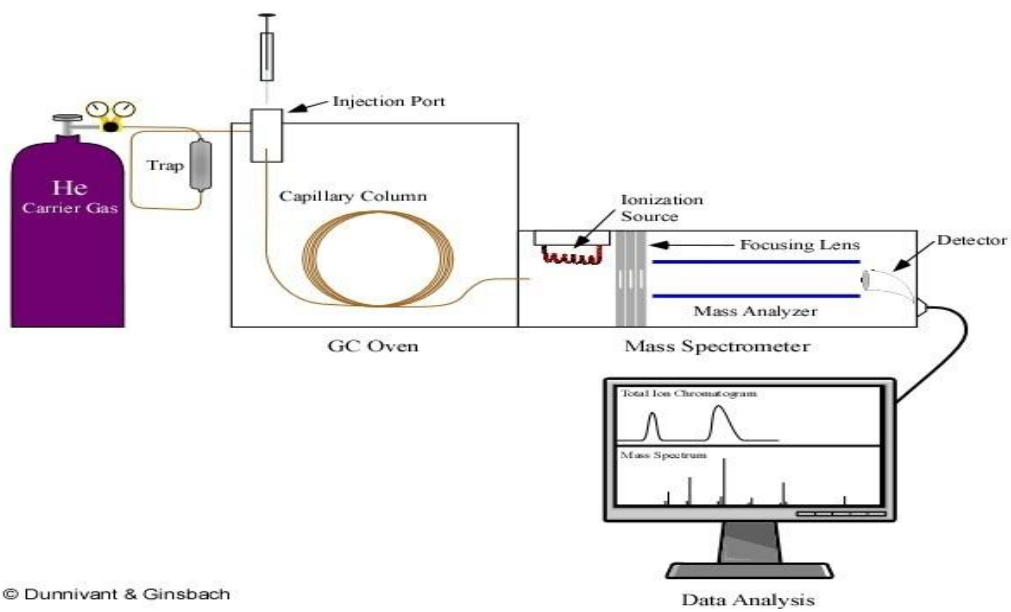
Όπου: n ο αριθμός των ατόμων άνθρακα του αλκανίου που προηγείται της ουσίας A,

$Rt_A$  ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας A,

$Rt_{Cn}$  ο χρόνος κατακράτησης του αλκανίου πριν από την ουσία A και

$Rt_{Cn+1}$  ο χρόνος κατακράτησης του αλκανίου μετά την ουσία A.

Έτσι με βάση τα πρότυπα δείγματα αλκανίων καθώς και τους διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης κάθε ουσίας στην κολώνα μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση και τελικά και ο ποιοτικός προσδιορισμός τους.



**Εικόνα 5:** Αρχή λειτουργίας ανάλυσης του συστήματος GC-MS.



### **3.ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:**

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. ***Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να διερευνηθεί η πορεία βιοσύνθεσης των πτητικών συστατικών του φυτού ρίγανης μέσω του αιθέριου ελαίου και της μελέτης της ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης του.***

Πιο συγκεκριμένα, στόχος της παρούσας μελέτης είναι:

1. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του αιθέριου ελαίου του φυτού
2. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του φυτού σε αιθέριο έλαιο

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 4.1 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν η ρίγανη (*O.vulgare hirtum*). Η συλλογή πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο 2016, από το Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλίας, Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπονίας (39°37'43"N 22°22'43"E), επιστημονικά υπεύθυνο τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αναστασόπουλο Ηλία. Αποξηραμένα δείγματα φυτών έχουν κατατεθεί και αποθηκευτεί στο *herbarium* του Ιδρύματος.

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων ξεκίνησε η προετοιμασία τους. Συγκεκριμένα, προς μελέτη ήταν 24 σε αριθμό διαφορετικά δείγματα, από φυτά των δυο ομάδων (Α και Β). Τα φυτά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον γενότυπο και τον γονότυπο τους. Οι καλλιεργητικές φροντίδες ήταν ίδιες για όλα τα δείγματα. Τα αποξηραμένα φυτά ρίγανης κονιοποιήθηκαν σε λεπτόκοκκη μορφή. (βλέπε εικόνα 6).



Εικόνες 5,6: Ρίγανη σε δύο διαφορετικές μορφές πριν την ανάλυση: μη επεξεργασμένη (αριστερά) και λεπτόκοκκη (δεξιά)

Το κάθε δείγμα εισήχθη σε σφαιρική φιάλη και ακολούθησε υδροαπόσταξη σε συσκευή τύπου Clevenger. Η συσκευή αποτελείται από ένα κύριο μέρος που περιλαμβάνει κάθετο ψυκτήρα, προχοϊδα συλλογής του ελαίου και σύστημα

επαναρροής και σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 3L ή 1L. Το ξηρό δείγμα από 45g έως 100g (αναλόγως το μέγεθος της σφαιρικής που προαναφέρθηκε) τοποθετήθηκε μαζί με απιονισμένο νερό στη σφαιρική φιάλη, ώστε το μείγμα των δύο να φτάσει μέχρι τη μέση της φιάλης. Η σφαιρική φιάλη καθ'όλη τη διάρκεια βρισκόταν σε θερμομανδύα για θέρμανση του δείγματος μας. Οι υδρατμοί που σχηματίζονταν μαζί με τα πτητικά συστατικά υγροποιούνταν στον ψυκτήρα. Το νερό συμπληρώνονταν συνεχώς, ενώ η φάση του αιθέριου ελαίου ήταν υπερκείμενο της υδατικής στοιβάδας και σταδιακά συγκεντρώνονταν στο διαβαθμισμένο σωλήνα (προχοίδα) του κυρίου μέρους της συσκευής. Η διαδικασία της απόσταξης διήρκεσε 3 ώρες. Για μεγαλύτερη εξοικονόμηση χρόνου, οι δύο αποστακτικές συσκευές Clevenger συνδέθηκαν με σύστημα ψύξης σε σειρά, ώστε να αποστάζουν δύο δείγματα συγχρόνως όπως φαίνεται παρακάτω :



**Εικόνα 7:** Απόσταξη αιθέριου ελαίου ρίγανης μέσω δύο αποστακτικών συσκευών τύπου Clevenger.

Έπειτα, το αιθέριο έλαιο από κάθε μια συσκευή συλλέχθηκε άμεσα από τις προχοίδες, αφού πρώτα μετρήθηκε ο όγκος του κάθε δείγματος με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια. Συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο εκφράστηκε σε ml ανά 100 g ξηρής δρόγης. Σε κάθε δείγμα καθαρού ελαίου προστέθηκε στη συνέχεια μικρή ποσότητα ξηραντικού ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) για να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη υγρασίας. Τέλος

η συσκευή και όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήσαμε εκπλύθηκαν με έναν μέτριας πολικότητας διαλύτη όπως ο διαιθυλαιθέρας για την συλλογή όλων των υπολειμμάτων ελαίου που μπορεί να μην μεταφέρθηκαν με την απόχυση. Το αιθέριο έλαιο από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε καθαρό vial και αφού αφέθηκε ανοιχτό για μερικές ώρες ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης, σφραγίστηκε και αποθηκεύθηκε στο ψυγείο στους 4°C.

#### **4.2.Μεθοδολογία Προσδιορισμού πτητικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία- φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)**

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 mLmin<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).<sup>10</sup> Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δυο θερμικά προγράμματα, που αναλύονται παρακάτω:

##### **Πρόγραμμα:**

Αρχική θερμοκρασία 40 °C (2 min)<sup>1</sup>, η οποία αυξανόταν με ρυθμό 2 °C/ min μέχρι τους 50 °C (2 min), εν συνεχεία με ρυθμό 10 °C/ min έφτανε τους 150 °C (5 min), και με ρυθμό 5 °C/ min έφτανε τους 280 °C (20 min). Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 70 min. Οι συνθήκες του χρωματογράφου ήταν οι ακόλουθες: θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος 230 °C και θερμοκρασία ανίχνευσης 250 °C.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών βασίστηκε στον ολικό αριθμό θραυσμάτων (total ion count) των μεταβολιτών, όπως αυτά ανιχνεύθηκαν από το

---

<sup>1</sup>Οι τιμές στις παρενθέσεις αναφέρονται στους χρόνους παραμονής στη συγκεκριμένη θερμοκρασία.

φασματογράφο μάζας. Η ταυτοποίηση των χημικών συστατικών έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης κάθε συστατικού (Retention Time-R.T) σε σχέση με τους χρόνους παρακράτησης πρότυπων ενώσεων και τη μελέτη των φασμάτων μάζας, με την βοήθεια των βιβλιοθηκών NIST21, NIST107 και PMW\_TOX2 και των δεδομένων της βιβλιογραφίας (Adams, 2007),<sup>11</sup> καθώς και με τον υπολογισμό των συντελεστών RI (retention indices) σύμφωνα με την εργασία των Van den Dool & Kratz (1963),<sup>12</sup> σε σχέση με τους χρόνους παρακράτησης πρότυπων υδρογονανθράκων (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>). Επίσης, όπου κρίθηκε αναγκαίο έγινε συγχρωματογράφιση με πρότυπες ουσίες.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1. Περιεκτικότητα των δειγμάτων σε αιθέρια έλαια

#### Ρίγανη (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum* L.)

Η μελέτη της περιεκτικότητας των φύλλων/ταξιανθιών της ρίγανης σε αιθέριο έλαιο για το συγκεκριμένο είδος έδειξε πως υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα. Η περιοδικότητα των τιμών της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο χαρακτηρίζει και άλλα φυτά της οικογένειας Lamiaceae.<sup>13</sup>

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τις περιεκτικότητας των προς μελέτη φυτών ρίγανης με την παραλαβή του αιθέριου ελαίου, όπως φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο της δρόγης της ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*)

Ημερομηνία Απόσταξης	Πειραματική Ονομασία Δείγματος	Δρόγη Βιολογικό Στάδιο	Ξηρή Δρόγη	ΠοσόΕΟ	ΕΟС% <sup>α</sup>
17/11/2016	A1	φύλλα-ταξιανθίες	100g	3,6ml	3,60%
29/11/2016	A2	φύλλα-ταξιανθίες	100g	3,2ml	3,20%
29/11/2016	A3	φύλλα-ταξιανθίες	44,43g	0,8ml	1,80%
30/11/2016	A4	φύλλα-ταξιανθίες	100g	2,3ml	2,30%
30/11/2016	A5	φύλλα-ταξιανθίες	41g	1,0ml	2,44%
1/12/2016	A6	φύλλα-ταξιανθίες	100g	3,1ml	3,10%
1/12/2016	A7	φύλλα-ταξιανθίες	45g	1,5ml	3,33%
2/12/2016	A8	φύλλα-ταξιανθίες	100g	3,8ml	3,80%
2/12/2016	A9	φύλλα-ταξιανθίες	45g	1,0ml	2,22%
5/12/2016	A10	φύλλα-ταξιανθίες	100g	4,1ml	4,10%
5/12/2016	A11	φύλλα-ταξιανθίες	44g	1,7ml	3,86%
7/12/2016	A12	φύλλα-ταξιανθίες	100g	3,2ml	3,20%
7/12/2016	B1	φύλλα-ταξιανθίες	44g	2,4ml	5,45%
13/12/2016	B2	φύλλα-ταξιανθίες	100g	3,4ml	3,40%
9/12/2016	B3	φύλλα-ταξιανθίες	44g	1,4ml	3,18%
12/12/2016	B4	φύλλα-ταξιανθίες	44g	1,2ml	2,73%
13/12/2016	B5	φύλλα-ταξιανθίες	100g	1,9ml	1,90%
13/12/2016	B6	φύλλα-ταξιανθίες	44g	2,0ml	4,54%
13/12/2016	B7	φύλλα-ταξιανθίες	44g	1,3ml	2,95%
14/12/2016	B8	φύλλα-ταξιανθίες	100g	4,4ml	4,40%
14/12/2016	B9	φύλλα-ταξιανθίες	44g	1,6ml	3,64%

15/12/2016	B10	φύλλα-ταξιανθίες	100g	3,3ml	3,30%
15/12/2016	B11	φύλλα-ταξιανθίες	44g	1,0ml	2,27%
7/2/2017	B12	φύλλα-ταξιανθίες	100g	2,0ml	2,00%

α: E.OC:Essential Oils Content

## 5.2 Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του αιθέριου ελαίου ρίγανης

Η κύρια χημική ομάδα ήταν οι φαινολικές ενώσεις που αποτελούσαν το 86,20% του συνολικού αιθέριου ελαίου σε όλα τα δείγματα με κύριο εκπρόσωπο την θυμόλη και καρβακρόλη (22,70% ο μέσος όρος θυμόλης + 63,50% ο μέσος όρος καρβακρόλης) καθώς και τις πρόδρομες τους ενώσεις γ-τερπινένιο και p-κυμένιο. Η καρβακρόλη, υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική έντονη οσμή ρίγανης των φυτών, βρίσκεται σε μεγάλα ποσοστά το καλοκαίρι, οπότε και συλλέχθηκαν τα δείγματα που εξετάσαμε (68.94%, για το Α, 60.25% για το Β και 61.32% για το Γ, του ολικού ελαίου), όταν το φυτό βρίσκεται στο στάδιο της καρποφορίας. Σε αντίθεση, η θυμόλη εμφανίζει χαμηλά ποσοστά την περίοδο της καρποφορίας (20.87% για το Α, 22.27% για το Β 4.95% για το Γ).

Η επόμενη βασική ομάδα ήταν οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες. Αξίζει να σημειωθεί, πως το p-κυμένιο έφτασε στα επίπεδα του 9,93% του ολικού ελαίου από όλα τα δείγματα (δείγμα Β7). Σε μικρότερο ποσοστό παρατηρήθηκαν τα σεσκιτερπένια (εμφάνισε μέγιστο 1,86%, στο δείγμα Α1) με κύριο εκπρόσωπο το β-καρνοφυλλένιο (1,38% στο δείγμα Β7).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και οι τρεις ομάδες φυτών ρίγανης που μελετήθηκαν δεν εμφάνισαν συστατικά των οξυγονούχων σεσκιτερπενίων, όπως το οξείδιο του καρνοφυλλενίου.

Όπως παρατηρήθηκε, η ανάλυση της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης του αιθέριου ελαίου ποικίλει. Το εύρος των τιμών μεταξύ του ίδιου είδους σε ένα συστατικό οφείλεται στο γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη *αναλύθηκαν φυτά από διαφορετικούς γενοτύπους*, παρόλο που είχαν τις ίδιες καλλιεργητικές φροντίδες και την ίδια περίοδο συγκομιδής των φυτών.

Στους παρακάτω πίνακες 3 ως 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με την χημική σύσταση των τριών γενοτύπων που μελετήθηκαν.

Πίνακας 3 Χημική σύσταση (% v/v) του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, σε 12 διαφορετικά δείγματα τύπου Α.

SAMPLES																
	compound	R.I <sup>a</sup>	R.I <sup>b</sup>	Ret. Time	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1	$\alpha$ -Thujene	930	930	7,901± 0.01	0,24	0,49	0,23	0,23	0,23	0,22	0,2	0,76	0,2	0,45	0,24	0,7
2	$\alpha$ -Pinene	939	937	8,114± 0.01	0,3	0,39	0,27	0,25	0,23	0,2	0,17	0,51	0,2	0,36	0,16	0,56
3	Camphene	954	951	8,643± 0.01	0,08	0,12	0,14	0,05	0,1	0,05	tr	0,08	0,07	0,07	tr	0,1
4	$\beta$ -Pinene	979	974	9,695± 0.01	0,05	0,07	0,04	n.d.	0,04	n.d.	tr	0,1	tr	0,07	tr	0,1
5	$\beta$ -Myrcene	990	991	10,350± 0.02	0,63	0,56	0,4	0,54	0,45	0,39	0,4	1,23	0,24	0,67	0,23	1,12
6	$\alpha$ -Phellandrene	1002	1.002	10,766± 0.01	0,08	0,08	n.d.	0,1	0,07	n.d.	0,06	0,14	n.d.	0,07	n.d.	0,13
7	3-Carene	1.011	1.008	10,955± 0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06
8	$\alpha$ -Terpinene	1.017	1015	11,215± 0.01	0,69	0,53	0,48	0,74	0,45	0,53	0,43	1,32	0,43	0,72	0,36	1,07
9	<b><math>p</math>-Cymene</b>	1024	1024	11,524± 0.01	<b>3,78</b>	<b>3,5</b>	<b>1,73</b>	<b>2,3</b>	<b>1,45</b>	<b>1,89</b>	<b>1,63</b>	<b>5,92</b>	<b>1,8</b>	<b>3,53</b>	<b>1,12</b>	<b>5,16</b>
10	Limonene	1.025	1027	11,656± 0.01	0,3	0,35	0,2	0,28	0,27	0,17	0,2	0,64	0,31	0,35	0,31	0,57
11	Eucalyptol	1031	1030	11,710± 0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	<b><math>\gamma</math>-Terpinene</b>	1059	1059	12,759± 0.01	<b>2,69</b>	<b>1,73</b>	<b>1,89</b>	<b>2,88</b>	<b>1,7</b>	<b>2,09</b>	<b>1,79</b>	<b>6,04</b>	<b>1,83</b>	<b>2,97</b>	<b>1,06</b>	<b>3,49</b>
14	Borneol	1.169	1165	15,106± 0.012	0,34	0,29	1,75	0,45	1,09	0,31	0,26	n.d.	0,26	0,19	0,23	0,18
15	Terpinen-4-ol	1.177	1177	16,838± 0.01	0,76	0,6	0,86	0,84	0,57	0,57	0,59	0,79	0,53	0,81	0,72	0,86
16	<b>Thymol</b>	1290	1288	20,559± 0.02	<b>22,82</b>	<b>24,46</b>	<b>12,16</b>	<b>36,27</b>	<b>8,63</b>	<b>13,23</b>	<b>22,47</b>	<b>39,22</b>	<b>36,1</b>	<b>7,28</b>	<b>0,92</b>	<b>26,86</b>
17	<b>Carvacrol</b>	1299	1299	20,932± 0.04	<b>65,38</b>	<b>65,11</b>	<b>78,54</b>	<b>54,00</b>	<b>83,45</b>	<b>79,35</b>	<b>70,45</b>	<b>41,42</b>	<b>56,97</b>	<b>80,95</b>	<b>93,49</b>	<b>58,16</b>
18	$\beta$ -Caryophyllene	1419	1422	24,026± 0.01	0,83	1,34	0,56	0,66	0,51	0,64	0,47	1,09	0,83	0,83	0,58	0,44
19	$\alpha$ -Humulene	1454	1456	24,884± 0.18	0,06	0,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,15	n.d.	0,06	n.d.	0,05
20	$\beta$ -Bisabolene	1505	1509	26,535± 0.01	0,97	0,24	0,75	0,41	0,76	0,36	0,5	0,59	0,19	0,62	0,51	0,39
	<b>Total%</b>				<b>93.85</b>	<b>93.91</b>	<b>96.51</b>	<b>95.51</b>	<b>96.71</b>	<b>96.55</b>	<b>96.53</b>	<b>83.30</b>	<b>96.71</b>	<b>93.71</b>	<b>97.51</b>	<b>90.43</b>

tr: ίχνη ουσιών <0,05%, a: R.I (Retentionindices) πειραματικό, σε στήλη SBP – 5, b: R.I βιβλιογραφίας και Adams (2007), σε στήλη DB – 5, n.d. :notdetected



Πίνακας 4: Χημική σύσταση (% v/v) του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, σε 12 διαφορετικά δείγματα τύπου Β.

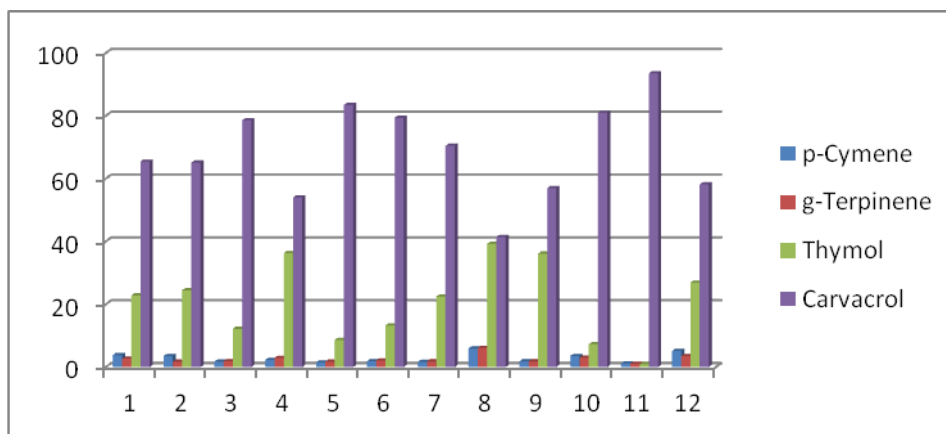
SAMPLES																
	compound	R.I. <sup>a</sup>	R.I. <sup>b</sup>	Ret.Time	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
1	$\alpha$ -Thujene	930	930	7,902 $\pm$ 0.01	0,70	0,93	1,08	0,44	0,29	0,82	1,29	0,58	0,28	0,83	0,28	0,67
2	$\alpha$ -Pinene	939	937	8,114 $\pm$ 0.01	0,50	0,66	0,85	0,36	0,26	0,59	0,85	0,52	0,35	0,63	0,35	0,31
3	Camphene	954	951	8,645 $\pm$ 0.01	0,09	0,11	0,15	0,07	0,06	0,11	0,11	0,07	0,07	0,09	0,11	0,04
4	$\beta$ -Pinene	979	974	9,691 $\pm$ 0.01	0,08	0,09	0,15	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,07	0,13	0,09	0,04	0,11	0,04	0,04
5	$\beta$ -Myrcene	990	991	10,352 $\pm$ 0.01	1,00	1,22	1,58	0,41	0,64	1,03	1,92	0,79	0,35	1,34	0,57	0,86
6	$\alpha$ -Phellandrene	1002	1002	10,775 $\pm$ 0.01	0,09	0,09	0,19	0,09	0,07	0,09	0,21	0,13	n.d.	0,15	0,09	0,09
7	3-Carene	1011	1008	10,930 $\pm$ 0.07	n.d.	0,06	0,08	n.d.	<i>tr</i>	n.d.	0,10	n.d.	0,07	0,06	n.d.	n.d.
8	$\alpha$ -Terpinene	1017	1015	11,216 $\pm$ 0.01	0,92	1,17	1,64	0,71	0,64	1,24	2,15	0,95	0,74	1,00	0,91	1,33
9	$\rho$ -Cymene	1024	1024	11,530 $\pm$ 0.01	<b>4,39</b>	<b>8,60</b>	<b>9,41</b>	<b>3,39</b>	<b>3,52</b>	<b>6,48</b>	<b>9,93</b>	<b>5,26</b>	<b>2,86</b>	<b>5,94</b>	<b>4,36</b>	<b>6,28</b>
10	Limonene	1025	1027	11,659 $\pm$ 0.01	0,44	0,69	0,96	0,37	0,48	0,55	1,10	0,51	0,40	0,73	0,59	0,55
11	$\gamma$ -Terpinene	1059	1059	12,765 $\pm$ 0.01	<b>4,60</b>	<b>5,02</b>	<b>8,42</b>	<b>2,22</b>	<b>2,38</b>	<b>5,20</b>	<b>12,14</b>	<b>4,53</b>	<b>4,10</b>	<b>4,39</b>	<b>3,89</b>	<b>7,69</b>
12	Borneol	1169	1165	16,456 $\pm$ 0.02	n.d.	n.d.	n.d.	0,34	0,28	n.d.	0,09	0,07	0,48	0,07	0,43	0,17
13	Terpinen -4-ol	1177	1177	16,857 $\pm$ 0.01	0,51	0,65	0,80	0,71	0,71	0,75	0,69	0,53	0,67	0,80	0,75	0,66
14	<b>Thymol</b>	1290	1288	20,547 $\pm$ 0.04	<b>6,81</b>	<b>20,70</b>	<b>15,45</b>	<b>4,76</b>	<b>36,00</b>	<b>62,20</b>	<b>41,50</b>	<b>37,02</b>	<b>14,51</b>	<b>5,50</b>	<b>21,77</b>	<b>0,96</b>
15	<b>Carvacrol</b>	1299	1299	20,832 $\pm$ 0.26	<b>78,60</b>	<b>58,51</b>	<b>57,36</b>	<b>85,32</b>	<b>53,88</b>	<b>19,40</b>	<b>25,99</b>	<b>47,41</b>	<b>74,43</b>	<b>77,01</b>	<b>65,25</b>	<b>79,83</b>
16	$\beta$ -Caryophyllene	1419	1422	24,027 $\pm$ 0.01	0,75	1,23	1,11	0,56	0,65	0,91	1,38	0,78	0,33	0,75	0,57	0,50
17	$\alpha$ -Humulene	1454	1456	24,966 $\pm$ 0.01	0,08	n.d.	n.d.	n.d.	<i>tr</i>	0,10	0,17	0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	$\beta$ -Bisabolene	1505	1509	26,565 $\pm$ 0.02	0,20	0,23	0,72	0,20	n.d.	0,08	0,19	0,59	0,26	0,44	n.d.	n.d.
	Total%				99.76	99.96	99.95	99.97	99.95	99.62	99.94	99.93	99.94	99.84	99.96	99.97

*tr*: ίχνη ουσιών <0,05%, a: R.I (Retentionindices) πειραματικό, σε στήλη SBP – 5, b: R.I βιβλιογραφίας και Adams (2007), σε στήλη DB – 5, n.d. :notdetected

Πίνακας 5: Χημική σύσταση (% v/v) του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, σε 9 διαφορετικά δείγματα.

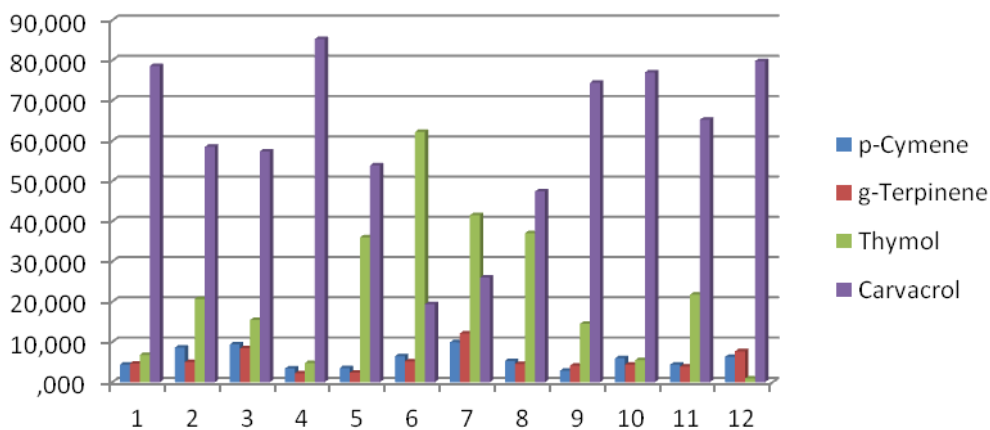
SAMPLES													
	compound	R.I. <sup>a</sup>	R.I. <sup>b</sup>	Ret.Time	A4'	A7'	A9'	A10'	A12'	B2'	B6'	B6''	B9'
1	<i>α</i> -Thujene	930	930	7,934 ± 0.01	0,51	0,77	0,75	0,72	0,68	0,63	0,99	1,03	0,70
2	<i>α</i> -Pinene	939	937	8,150 ± 0.01	0,50	0,47	0,56	0,36	0,53	0,39	0,58	0,61	0,56
3	Camphene	954	951	8,678 ± 0.01	0,18	0,06	0,16	0,12	0,10	0,09	0,07	0,09	0,07
4	<i>β</i> -Pinene	979	974	9,723 ± 0.01	0,07	0,17	0,08	0,05	0,06	0,07	0,10	0,11	0,08
5	<i>β</i> -Myrcene	990	991	10,385 ± 0.01	1,22	0,95	0,65	0,86	0,96	0,60	1,17	1,48	0,99
6	<i>α</i> -Phellandrene	1002	1002	10,809 ± 0.01	0,11	n.d.	n.d.	0,11	0,09	0,13	0,08	0,14	n.d.
7	3-Carene	1011	1008	11,013 ± 0.01	0,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	n.d.
8	<i>α</i> -Terpinene	1017	1015	11,252 ± 0.01	0,96	0,86	0,71	0,88	0,88	0,59	0,94	1,09	0,67
9	<i>p</i> -Cymene	<b>1024</b>	<b>1024</b>	11,557 ± 0.01	<b>3,99</b>	<b>3,23</b>	<b>3,66</b>	<b>3,11</b>	<b>4,23</b>	<b>3,47</b>	<b>4,44</b>	<b>5,03</b>	<b>3,92</b>
10	Limonene	1025	1027	11,699 ± 0.02	0,62	2,24	0,40	0,49	0,63	0,61	0,48	0,57	0,44
11	Ocimene	1050	1049	12,478 ± 0.00	n.d.	0,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	<i>γ</i> -Terpinene	<b>1059</b>	<b>1059</b>	12,794 ± 0.01	<b>3,34</b>	<b>3,30</b>	<b>2,49</b>	<b>4,28</b>	<b>3,15</b>	<b>2,14</b>	<b>4,24</b>	<b>4,79</b>	<b>3,10</b>
13	<i>β</i> -Sabinenehydrate	1070	1067	13,119 ± 0.001	n.d.	0,40	0,34	0,35	0,47	0,17	0,31	0,45	0,58
14	Borneol	1169	1165	16,530 ± 0.14	0,41	0,14	0,28	0,46	0,14	0,28	0,10	0,10	0,40
15	Terpinen -4-ol	1177	1177	16,903 ± 0.02	0,39	0,51	0,32	0,32	0,21	0,29	0,37	0,45	0,39
16	<i>α</i> -Terpineol	1189	1191	17,402 ± 0.00	n.d.	0,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	<b>Thymol</b>	<b>1290</b>	<b>1288</b>	20,577 ± 0.03	<b>22,57</b>	<b>17,50</b>	<b>39,03</b>	<b>24,81</b>	<b>25,35</b>	<b>22,03</b>	<b>33,95</b>	<b>33,81</b>	<b>5,50</b>
18	<b>Carvacrol</b>	<b>1299</b>	<b>1299</b>	20,925 ± 0.02	<b>63,98</b>	<b>66,85</b>	<b>49,02</b>	<b>61,62</b>	<b>61,62</b>	<b>67,17</b>	<b>51,27</b>	<b>49,14</b>	<b>81,23</b>
19	<i>α</i> -Caryophyllene	1419	1422	24,064 ± 0.01	0,62	0,64	1,04	0,75	0,54	1,10	0,72	0,84	0,35
20	<i>β</i> -Humulene	1454	1456	24,998 ± 0.01	n.d.	n.d.	0,09	0,07	n.d.	n.d.	0,13	0,14	n.d.
21	<i>β</i> -Bisabolene	1505	1509	26,590 ± 0.01	0,40	0,61	0,32	0,56	0,28	0,19	n.d.	n.d.	0,98
	Total%				99.95	99.96	99.90	99.92	99.92	99.95	99.94	99.92	99.9

a: R.I (Retentionindices) πειραματικό, σε στήλη SBP – 5, b: R.I βιβλιογραφίας και Adams (2007), σε στήλη DB – 5, n.d. :notdetected



**Γράφημα 1:** Διακύμανση των 4 κύριων συστατικών στα δείγματα τύπου Α.

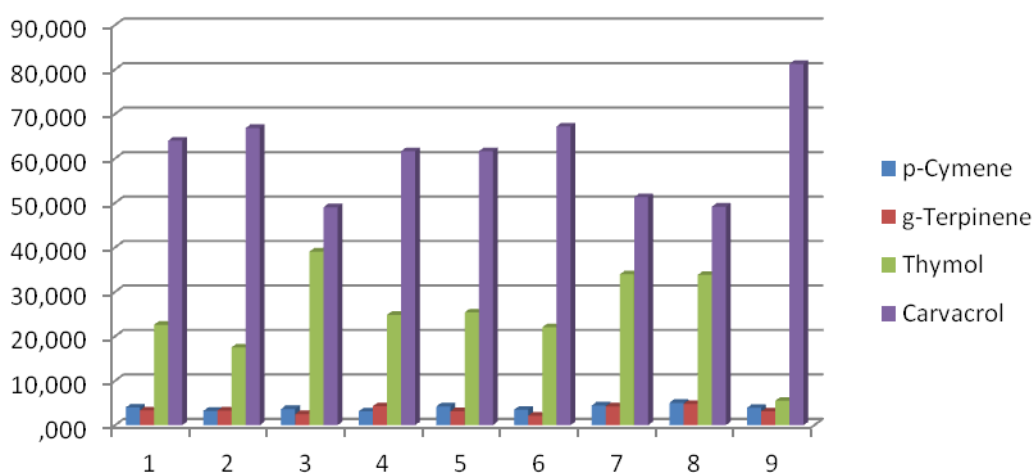
Με βάση τον Πίνακα 3 καθώς και τη διακύμανση των συστατικών στο παραπάνω γράφημα συμπεραίνουμε ότι το κύριο συστατικό σε όλα τα δείγματα τύπου Α, είναι η καρβακρόλη, η οποία μάλιστα φτάνει μέχρι και το 93,49%(δείγμα Α11). Στη συνέχεια ακολουθεί η θυμόλη με μεγαλύτερο ποσοστό 39,22% (δείγμα Α8). Τα άλλα δύο από τα κύρια συστατικά και συγκεκριμένα η το p- κυμένιο και το γ-τερπινένιο εμφανίζονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά (κάτω από 5%).



**Γράφημα2:** Διακύμανση των 4 κύριων συστατικών στα δείγματα τύπου Β.

Βασιζόμενοι στον πίνακα 4, όπου φαίνονται τα ακριβή αποτελέσματα για τα δείγματα τύπου Β, με μία πρώτη ματιά δεν παρατηρούμε μεγάλες αλλαγές από τα δείγματα τύπου Α. Συγκεκριμένα σε αυτόν τον τύπο δειγμάτων τα κύρια συστατικά,

δηλαδή τα *p*-Cymene,  $\gamma$ -Terpinene, Thymol και Carvacrol παραμένουν ίδια. Μάλιστα η καρβακρόλη βρίσκεται ξανά σε μεγαλύτερο ποσοστό από τα τέσσερα με την ιδιαιτερότητα ότι το μέγιστο ποσοστό που φτάνει είναι το 85,32%(δείγμα B4), δηλαδή μικρότερο από αυτό στα δείγματα A. Αντίθετα το αμέσως επόμενο κύριο συστατικό με το μεγαλύτερο ποσοστό είναι η θυμόλη που εμφανίζει μεγαλύτερη μέγιστη τιμή καθώς φτάνει το 62,20% (δείγμα B6). Κατά μέσο όρο σε όλα τα δείγματα B και το *p*-κυμένιο και το  $\gamma$ -τερπινένιο εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτά στα δείγματα A, με ποσοστά να φτάνουν το 9% και 12% αντίστοιχα.



**Γράφημα 3:** Διακύμανση των 4 κύριων συστατικών τύπου Γ (επιπλέον δείγματα).

Τέλος σε κάποια επιπλέον δείγματα που μας δόθηκαν για ανάλυση, όπως φαίνεται από τον αντίστοιχο πίνακα 5 παρατηρούνται τα ίδια 4 κύρια συστατικά με την καρβακρόλη να εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης της είναι 81,23% (δείγμα B9') ενώ η θυμόλη εμφανίζει μέγιστη τιμή 39% (δείγμα A9'), όπως και στα δείγματα A. Τέλος τα ποσοστά των *p*-κυμένιο και το  $\gamma$ -τερπινένιο είναι επίσης κοντά στις τιμές των δειγμάτων A, αφού δεν ξεπερνούν το 5%.

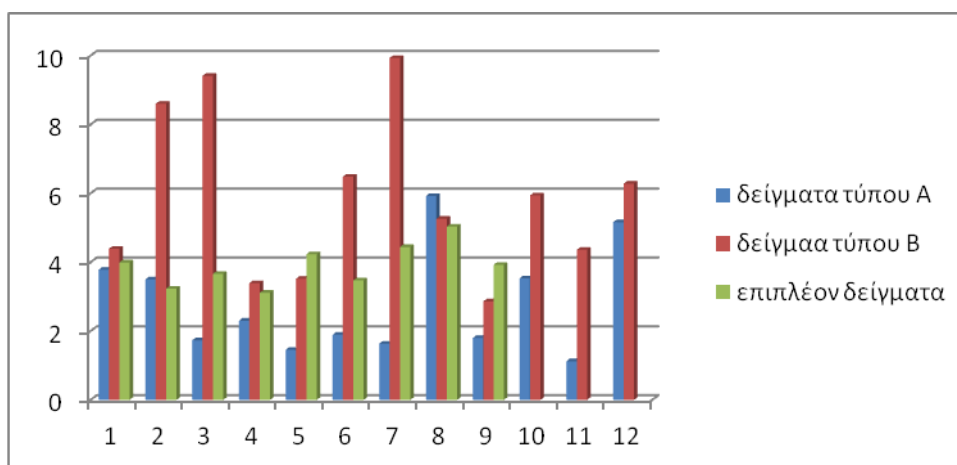
Τα τέσσερα παρακάτω γραφήματα (4-7) δείχνουν τη διακύμανση καθ' ενός από τα τέσσερα κύρια συστατικά ξεχωριστά σε όλους τους τύπους των δειγμάτων. Από τον γράφημα 4 βλέπουμε τη διακύμανση του *p*-κυμενίου σε όλους τους τύπους

των γενότυπων και παρατηρούμε ότι εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα δείγματα τύπου Β.

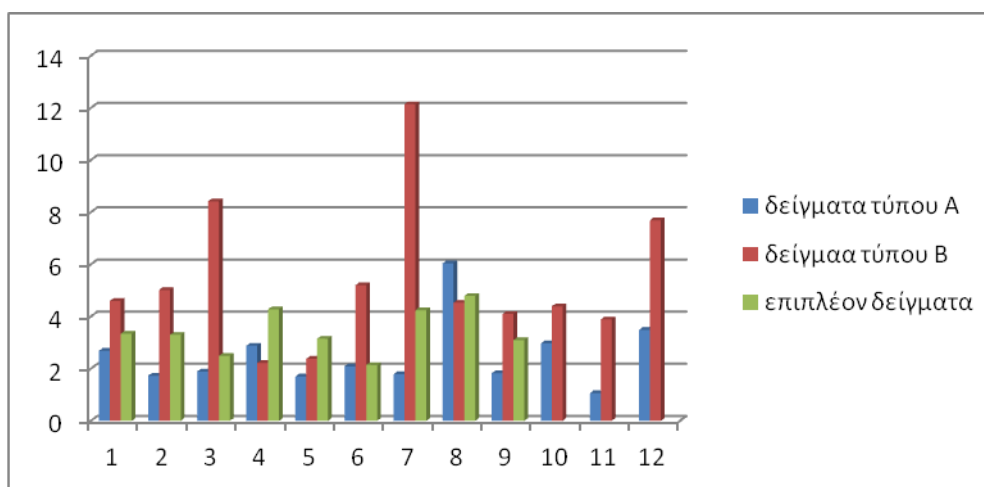
Συνεχίζοντας στο γράφημα 5 που αφορά το  $\gamma$ -τερπινένιο φαίνεται ότι και αυτό εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κατά μέσο όρο στα δείγματα τύπου Β.

Η θυμόλη αν και εμφανίζει μία μέγιστη τιμή στα δείγματα Β, όπως φαίνεται στον γράφημα 6, εμφανίζει κατά μέσο όρο μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα επιπλέον δείγματα.

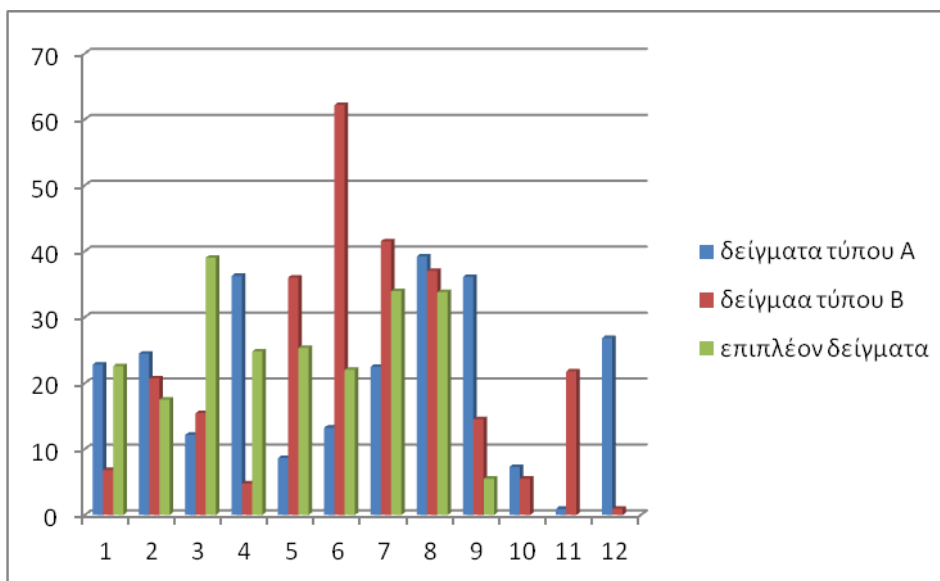
Τέλος από τον γράφημα 7, το οποίο αφορά την καρβακρόλη παρατηρούμε ότι εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων από τα άλλα τρία κύρια συστατικά με μία μικρή υπεροχή τα δείγματα Α.



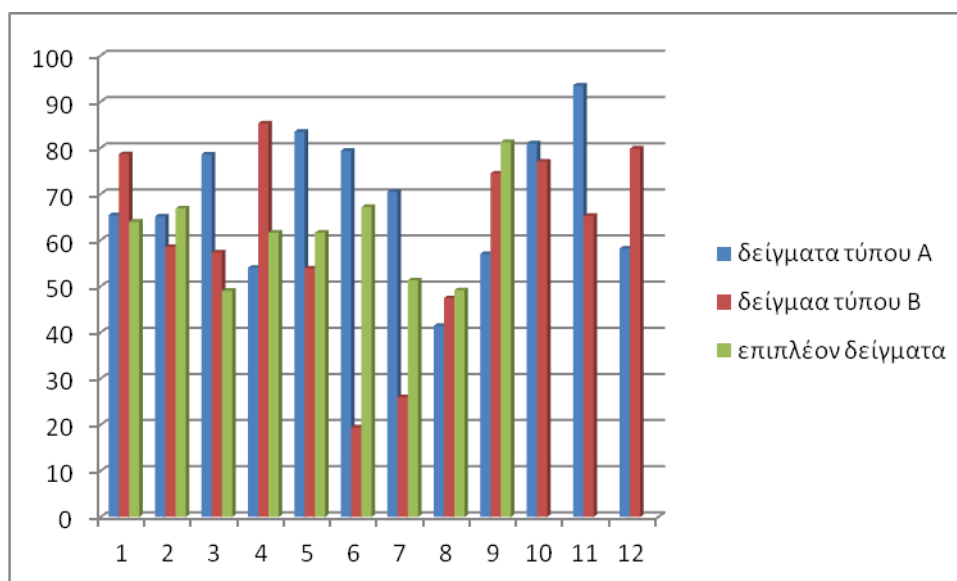
Γραφήμα 4: Διακύμανση του συστατικού *p-Cymene* σε όλους τους τύπους δειγμάτων.



Γραφήμα 5: Διακύμανση του συστατικού  $\gamma$ -Terpinene σε όλους τους τύπους δειγμάτων.



**Γράφημα6:** Διακύμανση του συστατικού **Thymol** σε όλους τους τύπους δειγμάτων.



**Γράφημα7:** Διακύμανση του συστατικού **Carnacrol** σε όλους τους τύπους δειγμάτων.

### 5.3.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω ειδών είναι η χαρακτηριστική οσμή ρίγανης, που οφείλεται στην παρουσία της φαινόλης καρβακρόλης. Μελέτες έχουν αναφέρει πως η περιεκτικότητα των προαναφερθέντων φυτών ποικίλλει. Το είδος *O. vulgare* subsp. *hirtum* είναι ασταθές τόσο στα μορφολογικά χαρακτηριστικά όσο και στη χημική έκφραση. Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των αιθέριων ελαίων εξαρτάται από την γενετική σύσταση του φυτού η οποία στην έκφραση της επηρεάζεται από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, τις εισροές ενέργειας αλλά και τις καλλιεργητικές τεχνικές.<sup>14</sup> Η εποχή συγκομιδής σε συνδυασμό με το στάδιο ανάπτυξης, τα διάφορα τμήματα του φυτού (φύλλα, βλαστοί, άνθη) και η ηλικία τους αποτελούν βασικό παράγοντα διαμόρφωσης του χημειότυπου.<sup>1</sup>

Η μελέτη της περιεκτικότητας στα αιθέρια έλαια των φύλλων παρουσίασε μεγάλο εύρος τιμών. Τα φυτά του *O. vulgare* subsp. *hirtum*, είχαν τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο. Οι *Vokou et al.*<sup>15</sup> διατύπωσαν την άποψη ότι το υψηλότερο ποσοστό της συγκέντρωσης σε αιθέριο έλαιο παρατηρείται κατά την περίοδο Ιουλίου-Αυγούστου. Η αύξηση ίσως οφείλεται στην συνέχιση της βιοσύνθεσης αιθέριου ελαίου, ενώ η μείωση της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο στο διάστημα των επόμενων πέντε μηνών, το οποίο θεωρείται ως αποτέλεσμα φυσικών και βιολογικών διαδικασιών που συμβαίνουν κατά την διάρκεια του βιολογικού κύκλου του φυτού. Αυτό δημιουργείται λόγω της υπερωρίμανσης της αδενικής τρίχας όπου διαρρηγνύεται η εφυμενίδα και το περιεχόμενο αιθέριο έλαιο του υπεφυμενιδικού χώρου διαχέεται στην ατμόσφαιρα.<sup>1</sup> Η πυκνότητα των αδενικών τριχωμάτων συνδέεται επίσης γραμμικά με την απόδοση των φυτών σε αιθέρια έλαια. Έτσι, όσο μεγαλύτερη είναι η πυκνότητα των αδενικών τριχωμάτων στα φύλλα, τόσο μεγαλύτερο είναι και το ποσό του αιθέριου ελαίου που σχηματίζεται και που μπορεί να παραληφθεί με απόσταξη. Απόρροια των παραπάνω είναι, ότι τα αδενικά τριχώματα είναι οι μόνες θέσεις στο φύλλο όπου βιοσυντίθενται τα αιθέρια έλαια.<sup>16</sup> Επομένως, η πυκνότητα των αδενικών τριχωμάτων θα μπορούσε πιθανόν να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο επιλογής ή/και εκτίμησης της απόδοσης σε αιθέρια έλαια.

Η ανάλυση της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης του αιθέριου ελαίου της ρίγανης όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία, έδειξε ότι τα κύρια συστατικά είναι η καρβακρόλη και /ή θυμόλη συνοδευόμενα από το p-κυμένιο και το γ-τερπινένιο. Η

ποσοτική του σύσταση ποικίλλει σημαντικά, με τα κύρια συστατικά - καρβακρόλη και θυμόλη - να συμμετέχουν το καθένα από ίχνη ως πάνω από 90% προσδίδοντας ανάλογες διαφορές στο άρωμα των φυτών. Οι ποσότητες καρβακρόλης και θυμόλης παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση. Το ίδιο ισχύει και ανάμεσα στο άθροισμα των δύο μονοτερπενικών υδρογονανθράκων.<sup>1</sup>

Στην παρούσα έρευνα η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των αιθερίων ελαίων, παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Οι δύο φαινόλες (καρβακρόλη και θυμόλη) και οι δύο πρόδρομες αυτών ουσίες ( $\gamma$ -τερπινένιο και  $\pi$ -κυμένιο) χαρακτηρίζουν τα αιθέρια έλαια του *O. vulgare* subsp. *hirtum*. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν παρουσίασαν εξαιρετικά υψηλά ποσοστά φαινολικών ουσιών. Η χημική σύσταση τους, η οποία προήλθε από φύλλα έδειξε ως κύριο συστατικό την καρβακρόλη για την Ελληνική ρίγανη. Το υποείδος *hirtum* εμφανίζεται αρκετά σταθερό ως προς τη σύσταση των αιθερίων ελαίων του. Συνήθως, μία από τις δύο φαινόλες υπερέχει αρκετά στο αιθέριο έλαιο έναντι της άλλης και με τον τρόπο αυτό τα φυτά είτε ανήκουν στον χημειότυπο καρβακρόλης (φυτά με οσμή ρίγανης) είτε στον χημειότυπο θυμόλης (φυτά με οσμή θυμαριού)<sup>1</sup>. Ενδεικτικό παράδειγμα έντονης υπεροχής εντοπίστηκε στο δείγμα A11, όπου το ποσοστό της καρβακρόλης (93,49%) εμφάνισε την μεγαλύτερη διαφορά σε σχέση με αυτό της θυμόλης (0,92%). Είναι δυνατόν όμως οι δύο φαινόλες να βρίσκονται σε παραπλήσια ποσοστά στο αιθέριο έλαιο, όπως παρατηρήθηκε παραπάνω στο δείγμα A8 όπου το ποσοστό της θυμόλης βρέθηκε 39,22% και της καρβακρόλης 41,22%.

Για τα αιθέρια έλαια της ρίγανης αναφέρεται ότι το άθροισμα των τεσσάρων αυτών βιοσυνθετικά συγγενικών ενώσεων από όλη τη χώρα εμφανίζει σταθερότητα ανεξάρτητα της γεωγραφικής προέλευσης και των διαφορετικών εποχών συλλογής των φυτών.<sup>17</sup> Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι οι τέσσερις αυτές ενώσεις είναι πολύ κοντά βιοσυνθετικά και υποστηρίζει το σχηματισμό θυμόλης και καρβακρόλης από  $\gamma$ -τερπινένιο μέσω της πρόδρομης ένωσης του  $\pi$ -κυμενίου<sup>1</sup>. (Γράφημα 1-3, σελ. 35-36).

Από τα μονοτερπένια που προσδιορίστηκαν, διαπιστώθηκε πως τα περισσότερα από αυτά όπως,  $\alpha$ -θουγένιο,  $\alpha$ -πινένιο,  $\beta$ -πινένιο, μυρκένιο,  $\alpha$ -φελλανδρένιο,  $\alpha$ -τερπινένιο,  $\rho$ -κυμένιο,  $\gamma$ -τερπινένιο, λιμονένιο, βορνεόλη, τερπινέν-4-όλη, τερπινολένιο, ταυτίζονται με τα συστατικά αιθερίων ελαίων φυτών *Origanum*



sp. όπως αυτά παρουσιάζονται σε άλλες έρευνες.<sup>18,19,20,21</sup> Βασική διαφορά με τις παραπάνω αναφορές είναι ότι η ποσοστιαία χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων διαφέρει σε κάθε περίπτωση και εξαρτάται από την τοποθεσία, τις κλιματικές αλλαγές και την εποχή συγκομιδής.

Για καλύτερη κατανόηση και περαιτέρω μελέτη των συστατικών που βρέθηκαν σε κάθε τύπο δείγματος έγινε ένας επιπλέον διαχωρισμός σε μονοτερπένια, οξυγονούχα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και οξυγονούχα σεσκετερπένια. Όπως φαίνεται και από τους τρεις παραπάνω Πίνακες 6 ως 8 σε όλους τους τύπους δειγμάτων τα οξυγονούχα μονοτερπένια εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν οξυγονούχα σεσκιτερπένια. Παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση των μονοτερπενικών συστατικών.

Τα ποσοστά των οξυγονούχων μονοτερπενίων κυμαίνονται από 73,61% έως 95,36%. Σεσκιτερπένια υπάρχουν στα δείγματα αλλά σε πολύ μικρό ποσοστό και συγκεκριμένα κάτω από 2%. Τέλος τα μονοτερπένια εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις, καθώς στα δείγματα Α περιέχονται σε πολύ μικρά ποσοστά έως 3,49% ενώ στα Β και στα επιπλέον δείγματα περιέχονται σε μεγαλύτερα ποσοστά από 8,08% έως 29,93%.

<b>Α ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A6</b>	<b>A7</b>	<b>A8</b>	<b>A9</b>	<b>A10</b>	<b>A11</b>	<b>A12</b>
<b>Μονοτερπένια</b>	2,69%	1,73%	1,89%	2,88%	1,70%	2,09%	1,62%	tr	1,83%	2,97%	1,06%	3,49%
<b>Οξυγονούχα Μονοτερπένια</b>	89,30%	90,46%	93,31%	91,56%	93,74%	93,46%	93,94%	81,43%	93,86%	89,23%	95,36%	86,06%
<b>Σεσκιτερπένια</b>	1,86%	1,72%	1,31%	1,07%	1,27%	1,00%	0,97%	1,83%	1,02%	1,51%	1,09%	0,88%
<b>Οξυγονούχα Σεσκιτερπένια</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

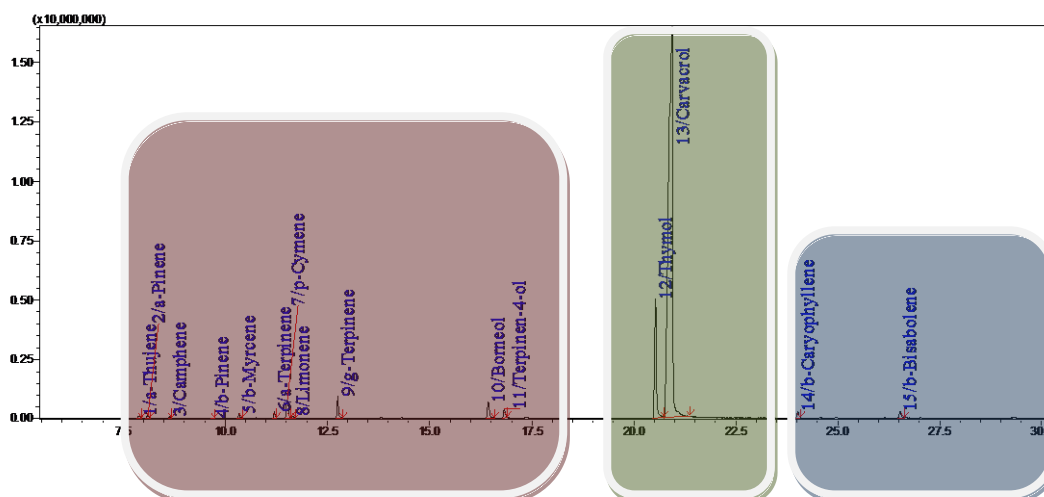
**Πίνακας 6:** Ταξινόμηση συστατικών του γενότυπου Α.

<b>Β ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>	<b>B5</b>	<b>B6</b>	<b>B7</b>	<b>B8</b>	<b>B9</b>	<b>B10</b>	<b>B11</b>	<b>B12</b>
<b>Μονοτερπένια</b>	12,81%	18,64%	24,51%	8,08%	8,39%	16,18%	29,93%	13,43%	9,26%	15,27%	11,19%	17,85%
<b>Οξυγονούχα Μονοτερπένια</b>	85,92%	79,86%	73,61%	91,13%	90,87%	82,35%	68,27%	85,03%	90,09%	83,38%	88,20%	81,62%
<b>Σεσκιτερπένια</b>	1,03%	1,46%	1,83%	0,76%	0,69%	1,09%	1,74%	1,47%	0,59%	1,19%	0,57%	0,50%
<b>Οξυγονούχα Σεσκιτερπένια</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Πίνακας 7:** Ταξινόμηση συστατικών του γενότυπου Β.

<b>Γ ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ</b>	<b>A4'</b>	<b>A7'</b>	<b>A9'</b>	<b>A10'</b>	<b>A12'</b>	<b>B2'</b>	<b>B6'</b>	<b>B6''</b>	<b>B9'</b>
<b>Μονοτερπένια</b>	11.58%	12.90%	9.46%	10.98%	11.31%	8.72%	13.09%	14.99%	10.56%
<b>Οξυγονούχα Μονοτερπένια</b>	87.35%	85.81%	88.99%	87.56%	87.79%	89.94%	86.00%	83.95%	88.10%
<b>Σεσκιτερπένια</b>	1.02%	1.25%	1.45%	1.38%	0.82%	1.29%	0.85%	0.98%	1.30%
<b>Οξυγονούχα Σεσκιτερπένια</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Πίνακας 8:** Ταξινόμηση συστατικών του γενότυπου Γ.



**Εικόνα8.** Χρωματογράφημα συστατικών αιθέριου ελαίου της ρίγανης που προσδιορίστηκαν με GC-MS. Στην Α περιοχή (κόκκινου χρώματος) ανιχνεύτηκαν μονοτερπένια και οξυγονούχα μονοτερπένια, στη Β περιοχή (πράσινου χρώματος) φαινολικές ενώσεις και στη Γ περιοχή (μπλέ χρώματος) σεσκιτερπένια.

Στην εικόνα 8, παρατίθεται ένα φάσμα GC-MS (A1\_OREPE) από την ενότητα-παράρτημα φασμάτων GC-MS προκειμένου να ερμηνευθούν οι θέσεις που εμφανίζονται τα συστατικά. Όπως μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί το χρωματογράφημα μπορεί να χωριστεί σε τρεις διακριτές περιοχές. Συγκεκριμένα, η πρώτη περιοχή από τα 7,5 έως τα 13 περίπου λεπτά, χαρακτηρίζεται από ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των μονοτερπενίων, όπως  $\alpha$ -θουγένιο,  $\alpha$ -πινένιο, καμφένιο,  $p$ -κυμένιο,  $\beta$ -μυρκένιο,  $\gamma$ -τερπινένιο και άλλα. Η δεύτερη χαρακτηριστική περιοχή περιλαμβάνει ενώσεις που συμπεριλαμβάνονται στα οξυγονούχα μονοτερπένια και εμφανίζουν χρόνους κατακράτησης από τα 16 έως τα 22,5 λεπτά περίπου. Τέτοιες ενώσεις είναι βορνεόλη, τερπινέν-4-όλη, θυμόλη και καρβακρόλη. Τέλος στην τρίτη περιοχή του χρωματογραφήματος, δηλαδή από τα 24 μέχρι τα 27 λεπτά περίπου όπου εμφανίζονταν συστατικά, κυριαρχούν τα σεκιτερπένια όπως το  $\beta$ -καρυοφυλλένιο,  $\alpha$ -χουμουλένιο και  $\beta$ -μπισαμπολένιο. Μετά τα 30 λεπτά και μέχρι τα 80 δεν εμφανίστηκαν κάποια συστατικά, παρά μόνο ίχνη ενώσεων που δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίησή τους.

Όπως αναφέραμε παραπάνω το υπό μελέτη είδος είναι χαρακτηριστικό στην μεσογειακή λεκάνη. Για το λόγο αυτό συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας με βιβλιογραφικές πηγές από διάφορες περιοχές της Ιταλίας.<sup>22</sup> Παρατηρήθηκαν

σημαντικές διακυμάνσεις των συστατικών του αιθέριου ελαίου από το φυτό σε κάθε περιοχή (25 δείγματα από 25 διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας). Διαφορές όμως εντοπίστηκαν και με τα δικά μας δείγματα που μελετήθηκαν παραπάνω. Για το λόγο αυτό παρατίθεται πίνακας στον οποίο καταγράφονται τα κύρια συστατικά κάθε περιοχής, καθώς και τα ποσοστά τους στα δείγματα. Ενδεικτικά φαίνονται τα αποτελέσματα από τα 10 διαφορετικές περιοχές.

**Πίνακας 9:**Συστατικά του αιθέριου ελαίου της *Origanum vulgare* από 10 διαφορετικούς πληθυσμούς της Ιταλίας.

**Table 2**  
Essentials oil compositions of the 25 wild populations of *Origanum vulgare* L.

No.	Components	LRI <sup>a</sup>	Accessions									
			Or1	Or2	Or3	Or4	Or5	Or6	Or7	Or8	Or9	Or10
<b>Monoterpenes hydrocarbons</b>			<b>23.15</b>	<b>31.61</b>	<b>25.99</b>	<b>32.74</b>	<b>23.83</b>	<b>22.10</b>	<b>16.45</b>	<b>25.70</b>	<b>24.44</b>	<b>32.05</b>
1	<u><math>\alpha</math>-thujene</u>	926	1.10	1.20	1.00	1.10	0.80	0.80	1.20	1.00	1.10	
2	<u><math>\alpha</math>-pinene</u>	932	0.46	0.53	–	0.46	0.49	–	–	0.45	0.51	
3	<u>Camphene</u>	947	0.09	–	–	0.16	–	–	–	0.09	–	
4	<u>Sabinene</u>	972	0.20	0.30	0.30	0.20	0.10	1.00	0.10	–	0.20	
5	<u>Myrcene</u>	989	1.20	1.40	1.20	1.30	1.00	1.10	1.00	1.30	1.10	
6	<u><math>\alpha</math>-phellandrene</u>	1005	0.22	–	–	0.22	–	–	–	–	0.16	
7	<u><math>\alpha</math>-terpinene</u>	1016	1.70	2.20	1.70	2.20	1.30	1.30	1.00	1.50	0.30	
8	<u>p-cymene</u>	1023	3.90	1.50	3.10	1.30	2.00	2.50	2.90	3.20	7.20	
9	<u><math>\beta</math>-phellandrene</u>	1028	0.32	0.97	0.27	0.30	0.64	–	–	–	0.24	
10	<u>cis-<math>\beta</math>-ocimene</u>	1035	0.20	0.80	0.80	2.40	0.70	0.50	0.30	1.80	2.90	
11	<u>trans-<math>\beta</math>-ocimene</u>	1046	0.16	3.31	1.12	–	–	0.60	0.55	–	–	
12	<u><math>\gamma</math>-terpinene</u>	1057	13.20	19.10	16.20	22.80	16.30	13.70	9.40	16.10	10.30	
13	<u>Neo-allo-ocimene</u>	1121	–	–	–	–	–	–	–	–	0.38	
14	<u>Carvone</u>	1237	0.40	0.30	0.30	0.30	0.60	0.60	0.40	0.60	0.50	
<b>Oxygenated monoterpenes</b>			<b>4.64</b>	<b>7.14</b>	<b>9.39</b>	<b>10.91</b>	<b>6.32</b>	<b>5.17</b>	<b>6.41</b>	<b>65.57</b>	<b>5.92</b>	<b>4.11</b>
15	<u>1-octen-3-ol</u>	976	0.09	–	–	0.16	–	–	–	–	0.09	
16	<u>trans-linalool oxide</u>	1088	–	2.10	2.10	4.40	1.80	1.10	3.40	0.20	0.20	
17	<u>cis-sabinene hydrate</u>	1066	0.29	–	–	–	0.67	–	–	–	0.31	
18	<u>Linalool<sup>b</sup></u>	1100	0.06	0.53	0.86	Tr	1.75	1.57	1.41	0.77	0.53	
19	<u>Borneol</u>	1164	–	–	–	–	–	–	–	–	0.28	
20	<u>Terpinen-4-ol</u>	1176	0.20	–	–	0.21	–	–	–	–	0.21	
21	<u><math>\alpha</math>-terpineol</u>	1190	1.70	0.10	0.10	0.30	0.10	0.10	0.10	–	0.10	
22	<u>Thymol methyl ether</u>	1234	–	1.31	2.43	2.84	–	–	–	–	1.50	
23	<u>Carvacrol methyl ether</u>	1243	2.30	3.10	3.90	3.00	2.00	2.40	1.50	3.10	4.30	
24	<u>Linalyl acetate</u>	1256	–	–	–	–	–	–	–	61.50	–	
<b>Phenolic monoterpenes</b>			<b>63.20</b>	<b>55.60</b>	<b>57.60</b>	<b>49.40</b>	<b>57.00</b>	<b>64.40</b>	<b>62.60</b>	<b>1.00</b>	<b>46.10</b>	<b>52.30</b>
25	<u>Thymol<sup>b</sup></u>	1292	61.50	0.40	0.40	0.20	55.20	62.40	60.10	–	1.70	
26	<u>Carvacrol<sup>b</sup></u>	1302	1.70	55.20	57.20	49.20	1.80	2.00	2.50	1.00	44.40	
<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>			<b>4.71</b>	<b>3.70</b>	<b>4.35</b>	<b>5.04</b>	<b>7.26</b>	<b>4.50</b>	<b>5.89</b>	<b>3.50</b>	<b>3.68</b>	<b>4.32</b>
27	<u><math>\delta</math>-elemene</u>	1337	0.24	–	–	0.26	–	–	–	–	0.65	
28	<u><math>\beta</math>-bosbonene</u>	1386	–	–	–	–	0.29	0.38	0.36	–	Tr	
29	<u><math>\beta</math>-caryophyllene</u>	1417	2.30	1.40	1.40	1.60	2.30	1.40	1.90	1.30	1.00	
30	<u><math>\alpha</math>-humulene</u>	1451	0.37	–	0.27	0.33	0.57	–	–	–	0.45	
31	<u>Allo-aromadendrene</u>	1458	–	–	0.28	–	–	0.62	0.53	–	–	
32	<u>Germacrene D</u>	1478	1.30	1.40	1.40	2.10	3.00	1.10	2.30	1.20	0.90	
33	<u><math>\beta</math>-bisabolene</u>	1507	0.50	0.90	1.00	0.60	1.10	1.00	0.80	1.00	0.40	
34	<u><math>\delta</math>-cadinene</u>	1522	–	–	–	0.15	–	–	–	–	0.28	
<b>Oxygenated sesquiterpene</b>			<b>0.11</b>	<b>0.00</b>	<b>1.90</b>	<b>0.21</b>	<b>1.18</b>	<b>1.58</b>	<b>4.73</b>	<b>1.64</b>	<b>0.00</b>	<b>2.25</b>
35	<u>Germacrene D-4-ol</u>	1573	–	–	1.90	–	1.18	1.58	–	–	–	
36	<u>caryophyllene oxide</u>	1580	0.11	–	–	0.21	–	–	4.73	1.64	–	
<b>Others</b>			<b>0.24</b>	<b>0.66</b>	<b>0.00</b>	<b>0.38</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
37	<u>octen-3-yl-acetate</u>	1112	0.24	0.66	–	0.38	–	–	–	–	–	
<b>Total (%)</b>			<b>96.05</b>	<b>98.71</b>	<b>99.23</b>	<b>98.68</b>	<b>95.59</b>	<b>97.75</b>	<b>96.08</b>	<b>97.41</b>	<b>80.14</b>	<b>95.03</b>

Στον παραπάνω πίνακα τα **κοινά συστατικά** που βρέθηκαν και στα δικά μας δείγματα είναι επισημασμένα με κόκκινη υπογράμμιση. Παρατηρούμε λοιπόν ότι, αν και στα δείγματα από τις περιοχές της Ιταλίας εντοπίστηκαν πολλά περισσότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, υπάρχουν πολλά κοινά με αυτά που μελετήθηκαν παραπάνω. Ιδιαίτερα σημαντικό να σχολιαστεί αποτελεί το γεγονός ότι και αυτά τα δείγματα, αν και από άλλη χώρα, εμφανίζουν τα ίδια 4 κύρια συστατικά.

Πιο συγκεκριμένα αυτά είναι το p-κυμένιο, γ-τερπινένιο, θυμόλη και καρβακρόλη, όπου και εδώ το τελευταίο εμφανίζεται ως κύριο συστατικό με τα μεγαλύτερα ποσοστά. Υπάρχουν συστατικά όπως το λιμονένιο (0,55% κατά μέσο όρο) και η ευκαλυπτόλη (0,17%), τα οποία εντοπίστηκαν μόνο στα Ελληνικά δείγματα. Από την άλλη στα δείγματα από την Ιταλία βρέθηκαν συστατικά που ανήκουν στην κατηγορία των οξυγονωμένων σεσκιτερπενίων που δεν εμφανίστηκαν στα δείγματα που μελετήσαμε εμείς.

Τέλος, φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα **ποσοστά** των κοινών συστατικών που βρέθηκαν, κάτι απόλυτα λογικό καθώς το έδαφος, οι συνθήκες καλλιέργειας και γενικότερα οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση του φυτού σε αιθέριο έλαιο διαφέρουν πολύ από χώρα σε χώρα και από περιοχή σε περιοχή.

Τελικά μπορούμε να καταλήξουμε στο **γενικό συμπέρασμα** ότι τα Ελληνικά αιθέρια έλαια που αναλύθηκαν ήταν πλούσια σε μονοτερπένια και οξυγονούχα μονοτερπένια. Ως κύρια χαρακτηρίστηκαν τα συστατικά που κατά μέσο όρο σε καθ' ένα από τους τρεις τύπους δειγμάτων εμφάνισαν ποσοστό πάνω από 2%. Η κύρια σύσταση του αιθέριου ελαίου από την ρίγανη χαρακτηρίζεται από τέσσερα κύρια συστατικά και συγκεκριμένα τα p-cymene, γ-terpinene, thymol και carvacrol.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

<sup>1</sup>Στεφανάκης Μ., Ανάλυση, μελέτη και βιολογική δραστηριότητα δευτερογενών μεταβολιτών αρωματικών φυτών: είδη του γένους *Origanum* και του γένους *Phlomis*, Μεταπτυχιακή εργασία, Αρχείο Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, **2010**

<sup>2</sup>Skoula, M.; Harborne, J. B. The taxonomy and chemistry of *Origanum*. In *Oregano-The Genera Origanum and Lippia*, S.E. Kintzios (ed.), London: Taylor & Francis, **2002**, 67–108.

<sup>3</sup>Ανδρεόπουλος, Η. Μελέτη αιθέριων ελαίων Ελληνικών αρωματικών φαρμακευτικών φυτών, Πτυχιακή εργασία, Αρχεία Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, **2014**.

<sup>4</sup>Πεδιαδίτης, Μ. Ανάλυση και προσδιορισμός της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων των φυτών *Origanum onites* και *Satureja thymbra*, Πτυχιακή εργασία, Αρχεία Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη, **2004**.

<sup>5</sup>Stefanakis, M. K.; Touloupakis, E.; Anastasopoulos, E.; Ghanotakis, D.; Katerinopoulos, H. E.; Makridis, P. *Food control* **2013**, *34*, 539-546.

<sup>6</sup>Marrelli, M.; Corforti, F. Formisano, F.; Rigano, D. Apostolides Arnold, N.; Menichini, F.; Senatore, F. *Nat. Prod. Res.*, **2015**, *30*, 1-5.

<sup>7</sup>Ružička, L. *Cell. Mol. Life Sci.* **1953** *9*, 357–367.

<sup>8</sup>Γαρδέλη Χρυσσαυγή, Μελέτη της χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων ορισμένων αρωματικών φυτών της ελληνικής χλωρίδας, Διδακτορική Διατριβή, Αρχείο Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, **2009**.

<sup>9</sup>Daniel C. Harris, Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, **2010**.

<sup>10</sup>Massada, Y. *Analysis of essential oil by gas chromatography and spectrometry*; John Wiley & Sons: New York, **1976**.

<sup>11</sup>Adams, R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; 4th Ed.; Allured Books: Carol Stream. **2007**.

<sup>12</sup>van Den Dool, H., Dec. Kratz, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography *Journal of Chromatography A* **1963**, *11*(C), 463-471.

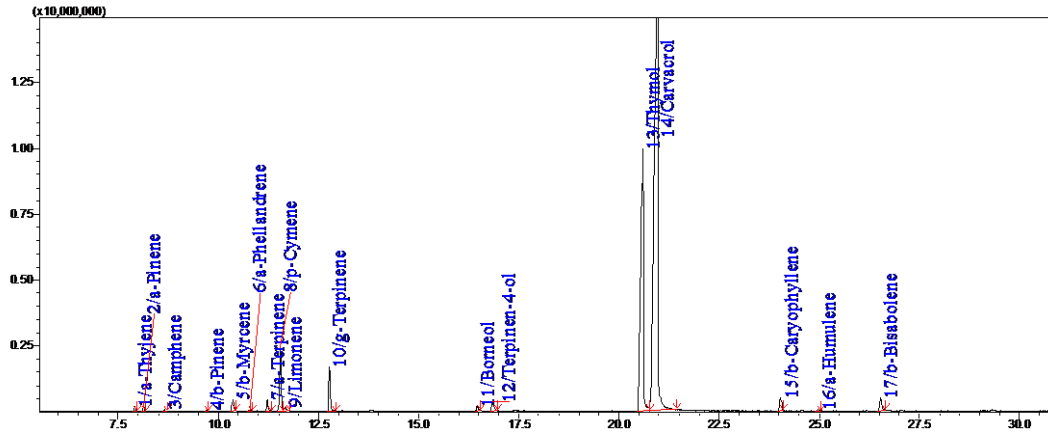
<sup>13</sup>Vokou, D.; Margaritis, N. S. *Int. J. Biometeorol.* **1986**, *30*, 147-155.

<sup>14</sup>Maars, H. Volatile oil of *Origanum vulgare subs. vulgare* L. III. Changes in composition during maturation. *The flavor industry* **1974**, *5*, 278.

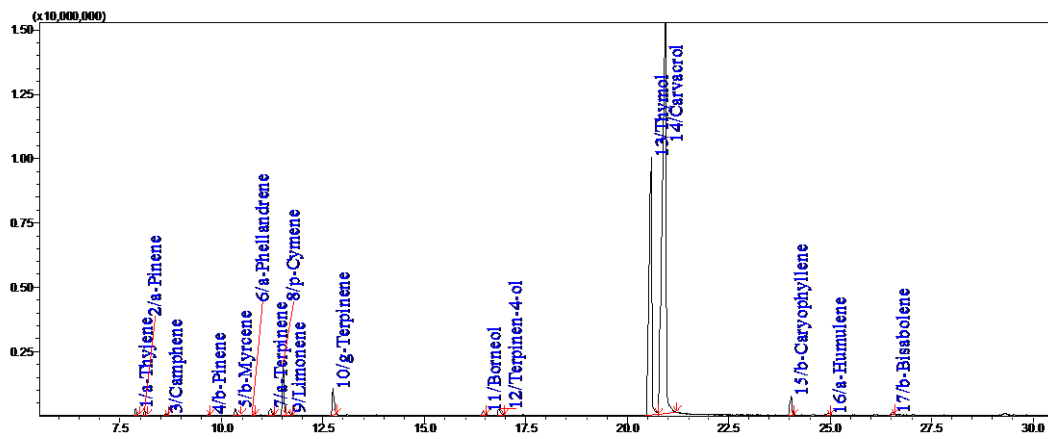
- 
- <sup>15</sup> Vokou, D.; Margaris, N. S.; Lynch, J. M. *Soil Biol. Biochem.* **1984**, *16*, 509-513.
- <sup>16</sup>Mc Caskill, D.; Croteau. R. *Planta* **1995**, *197*, 49-56.
- <sup>17</sup> Croteau, R.; Johnson, M. A. Biosynthesis of terpenoids in glandular trichomes. In: *Biology and chemistry of plant trichomes*; Rodriguez, E.; Healey, P. L.; Mehta, I., Eds.; Plenum Press: New York, **1984**, 133-185.
- <sup>18</sup> Cetin, H.; Erler, F.; Yanikoglu, A. *Pest Manag. Sci.* **2007**, *63*, 830-833.
- <sup>19</sup> Goze, I.; Alim, A.; Cetinus, S. A.; Çetin, A.; Durmus, N.; Atas, A. T.; Vural, N. *J. Med. Food.* **2010**, *13*, 705-709.
- <sup>20</sup> Vardar-Ünlü, G.; Ünlü, M.; Dönmez, E.; Vural, N. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 255-259.
- <sup>21</sup> Σωτηροπούλου, Δ. Ε. Κ. Μελέτη ανάπτυξης αποδόσεων και τεχνολογικών χαρακτηριστικών ρίγανης (*Origanum heracleoticum* = *O. vulgaresp. hirtum*) σε διαφορετικά επίπεδα αζώτου. Διδακτορική διατριβή, Αρχαία Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, **2008**.
- <sup>22</sup>Mastro, G. Tarraf, W. Verdini, L. Ruta, C.; *Food Chem.* 2017, 235.

## 7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ - ΦΑΣΜΑΤΑ GC-MS

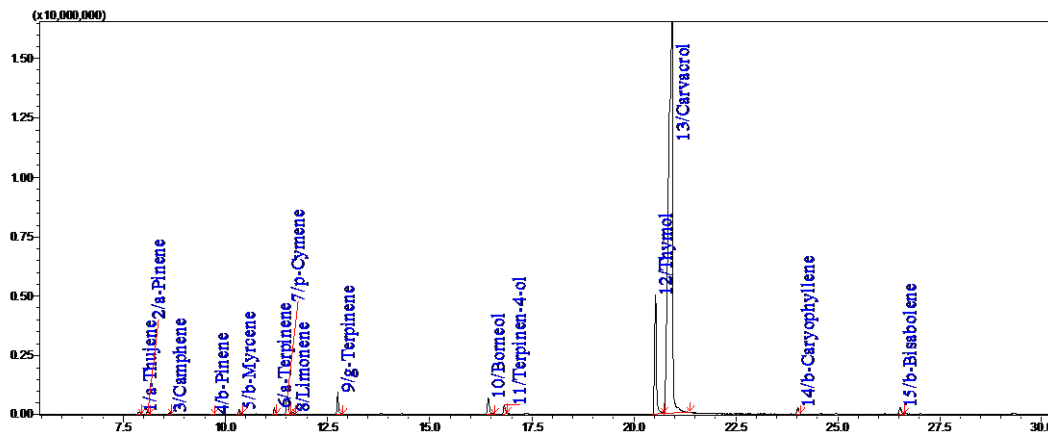
ΦΑΣΜΑ A1\_ OREPE



ΦΑΣΜΑ A2\_ OREPE

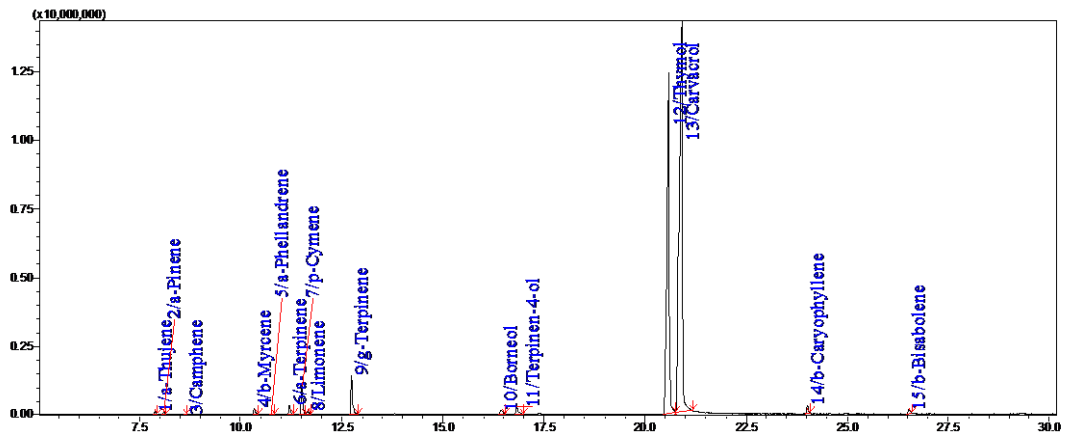


ΦΑΣΜΑ A3\_ OREPE

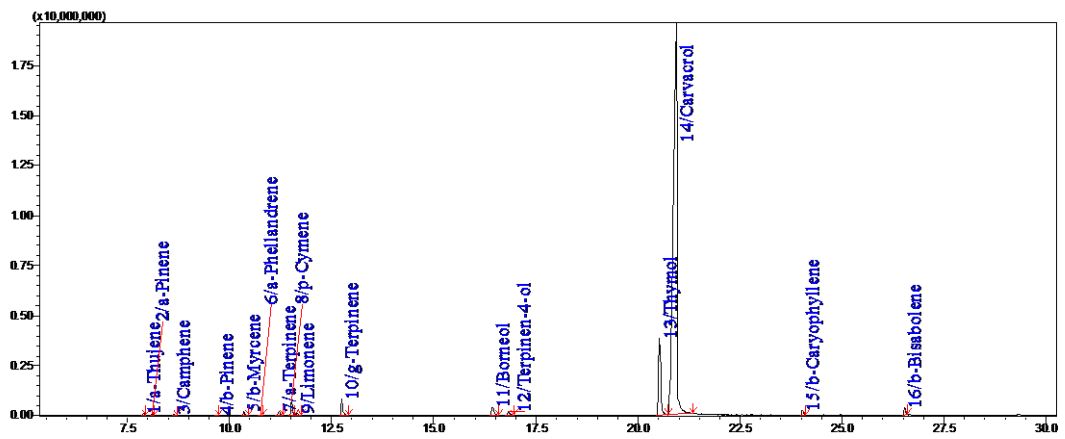




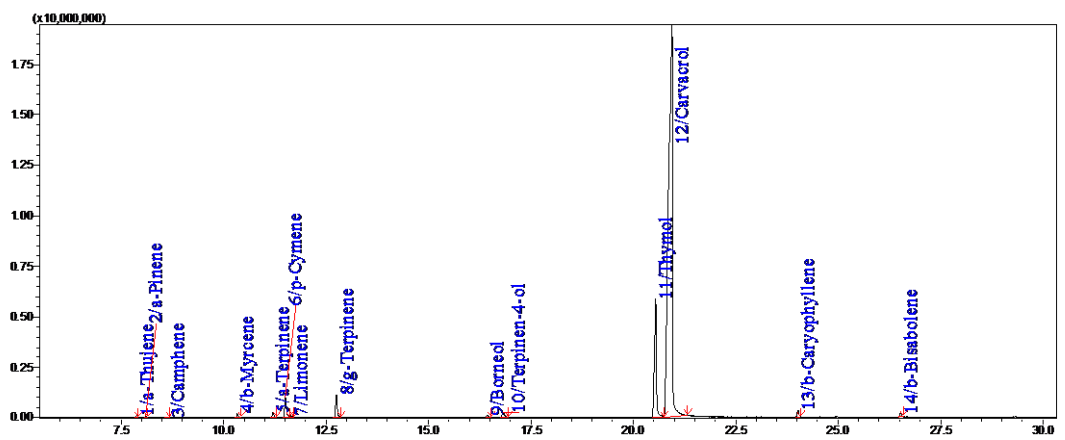
ΦΑΣΜΑ A4\_ OREPE



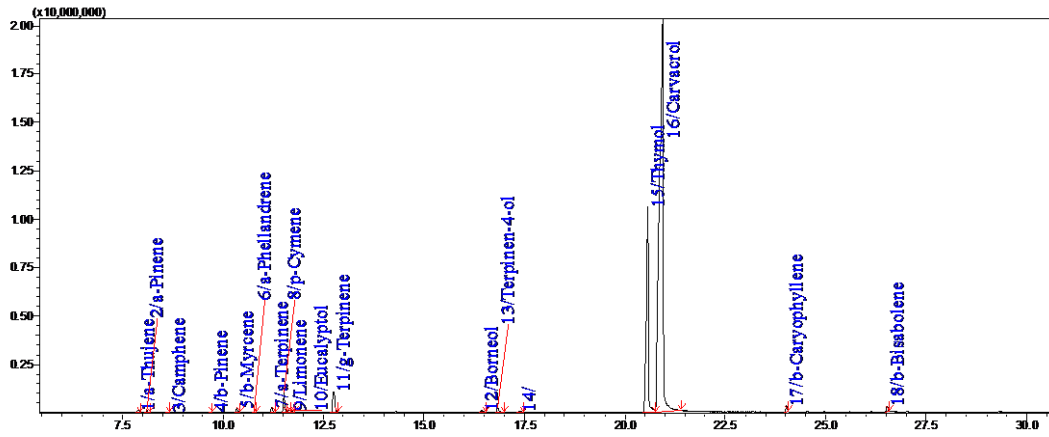
ΦΑΣΜΑ A5\_ OREPE



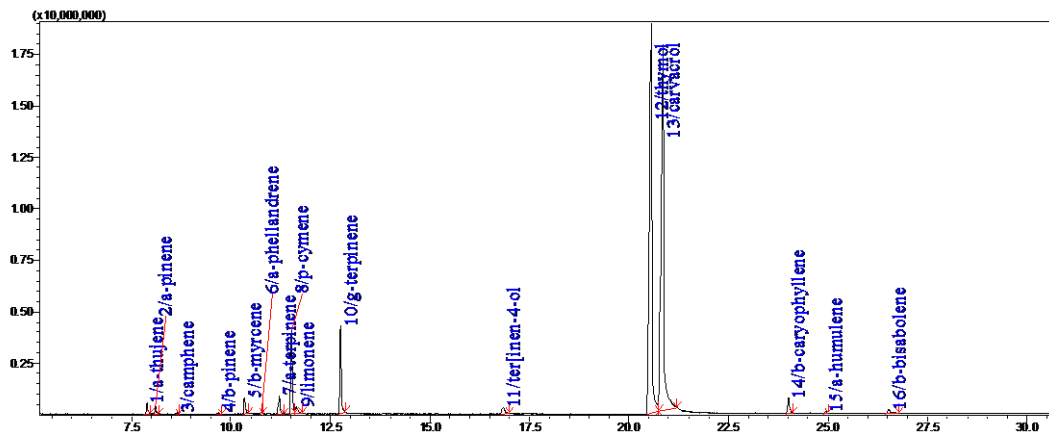
ΦΑΣΜΑ A6\_ OREPE



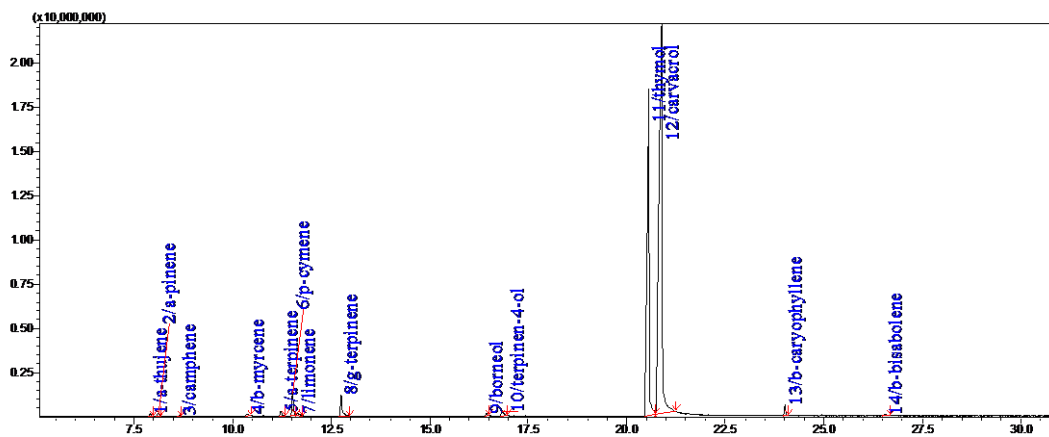
ΦΑΣΜΑ A7\_ OREPE



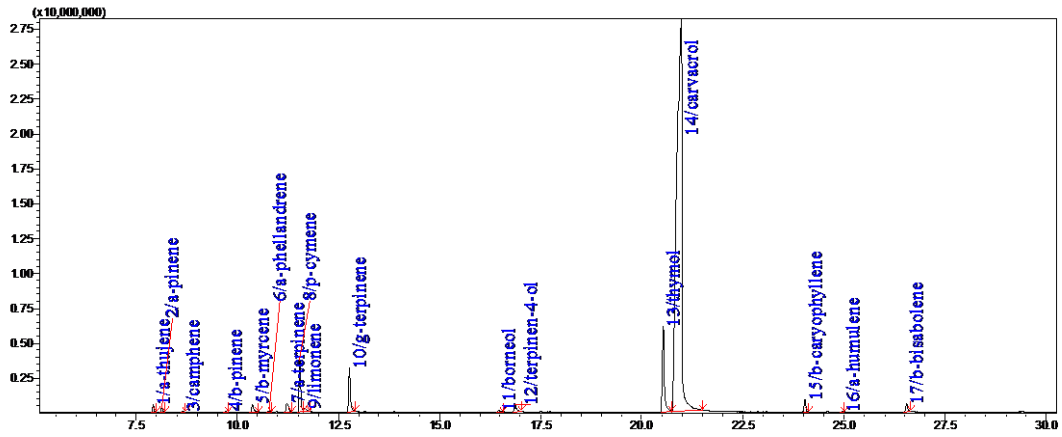
ΦΑΣΜΑ A8\_ OREPE



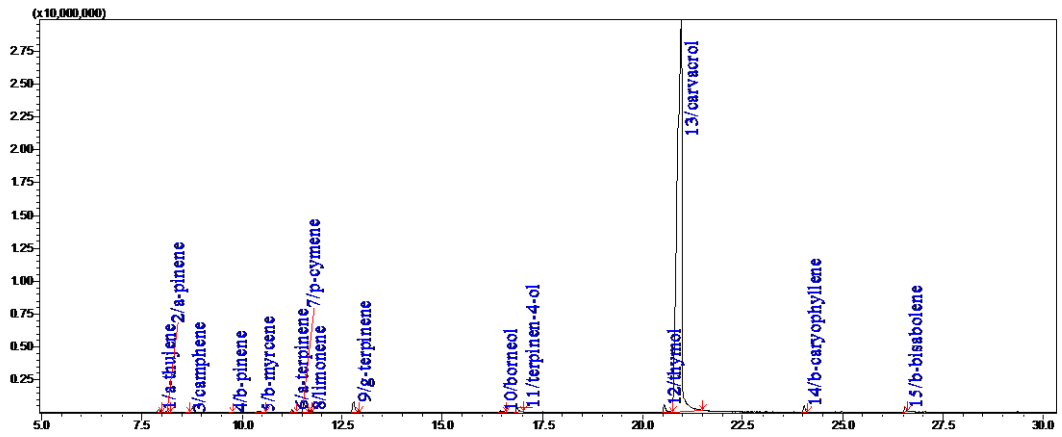
ΦΑΣΜΑ A9\_ OREPE



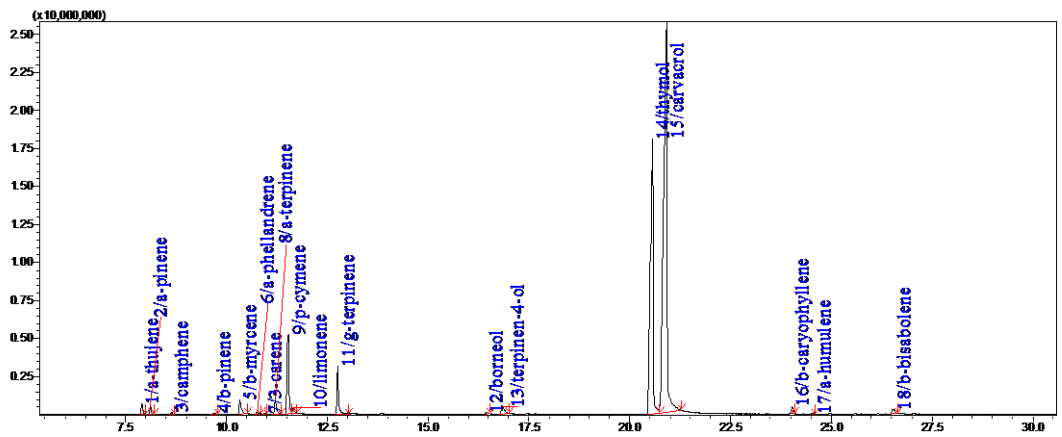
ΦΑΣΜΑ A10\_ OREPE



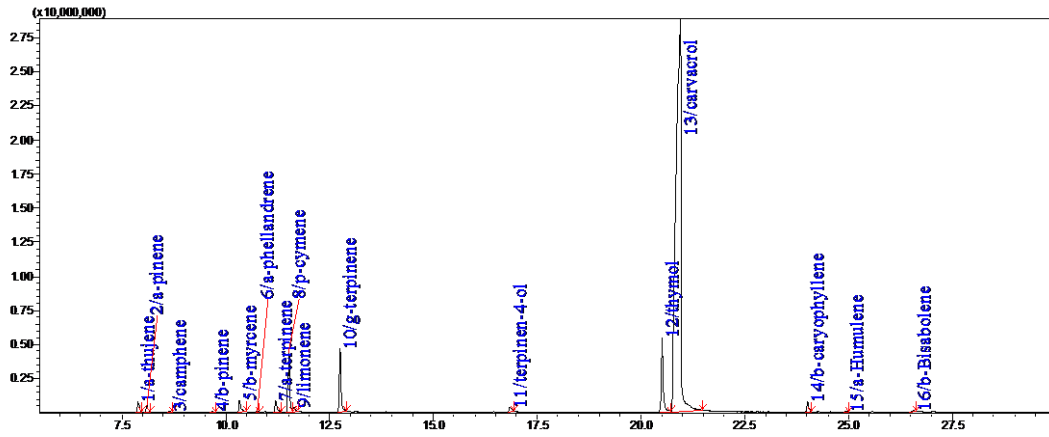
ΦΑΣΜΑ A11\_ OREPE



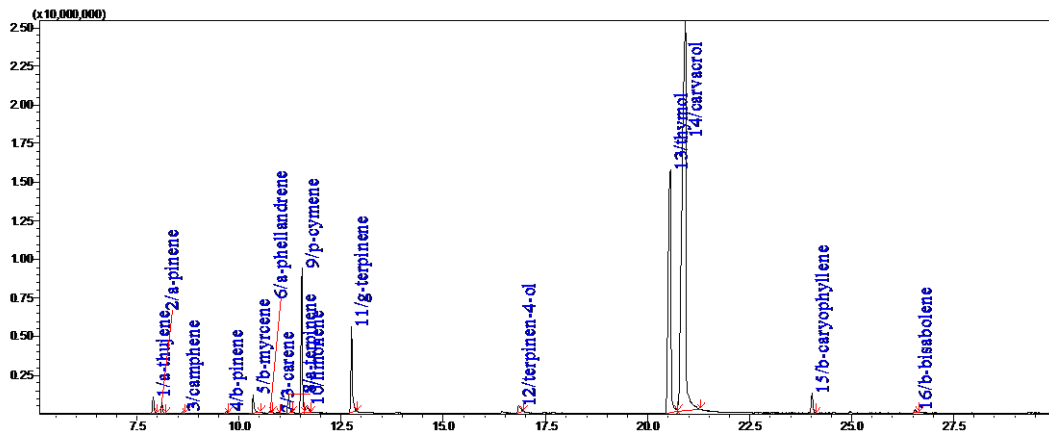
ΦΑΣΜΑ A12\_ OREPE



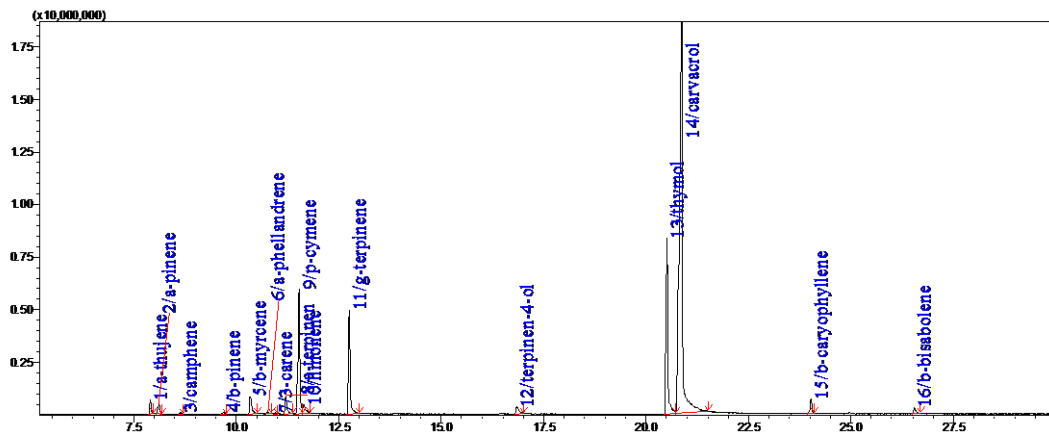
ΦΑΣΜΑ B1\_ OREPE



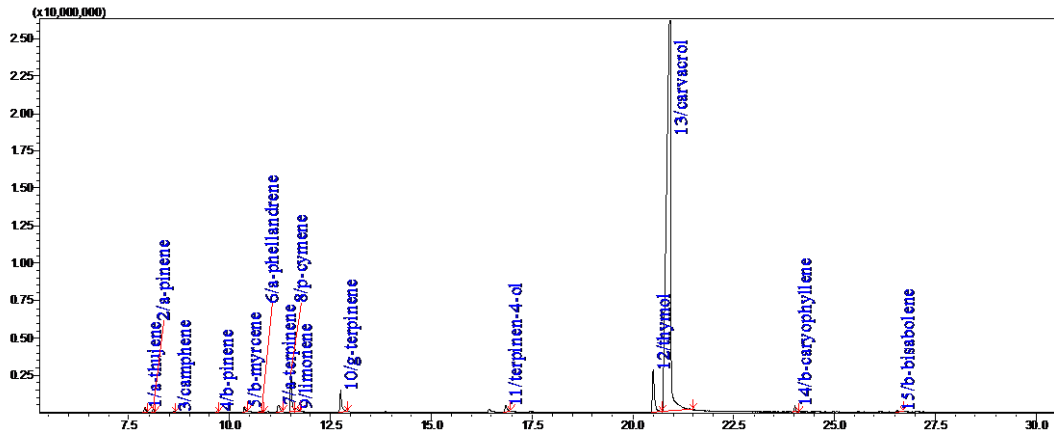
ΦΑΣΜΑ B2\_ OREPE



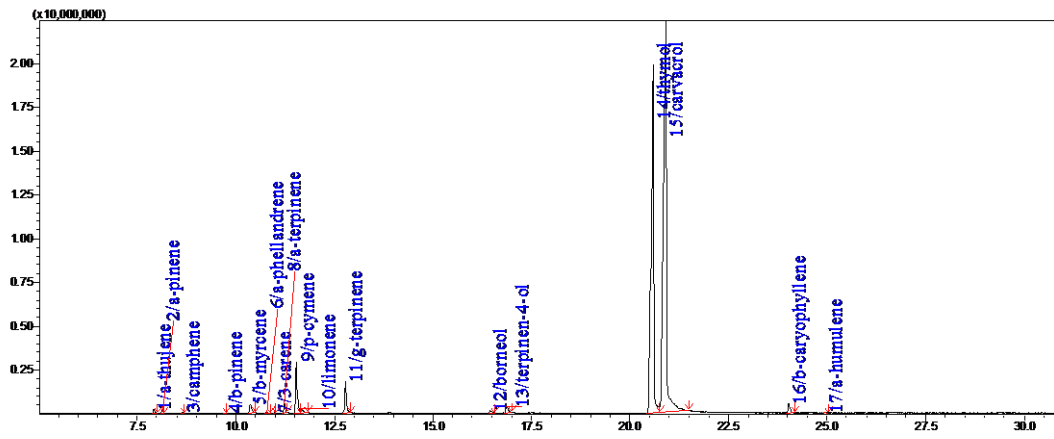
ΦΑΣΜΑ B3\_ OREPE



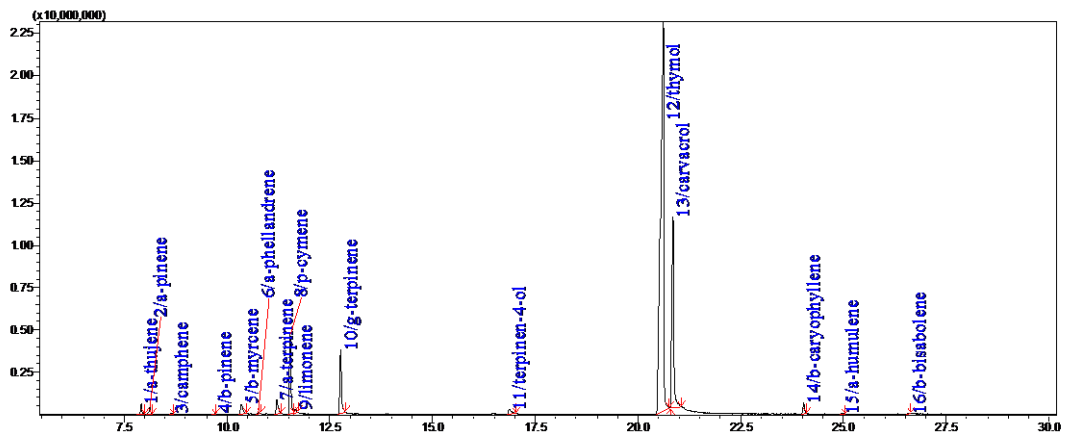
ΦΑΣΜΑ B4\_ OREPE



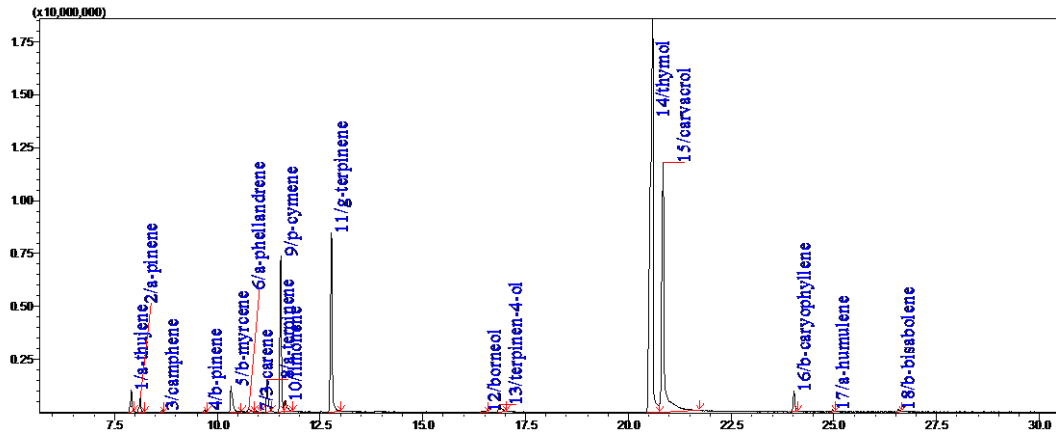
ΦΑΣΜΑ B5\_ OREPE



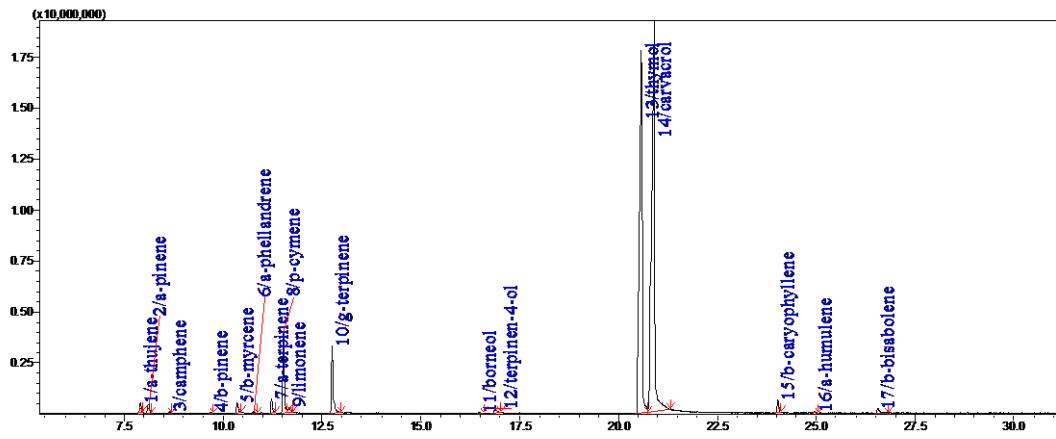
ΦΑΣΜΑ B6\_ OREPE



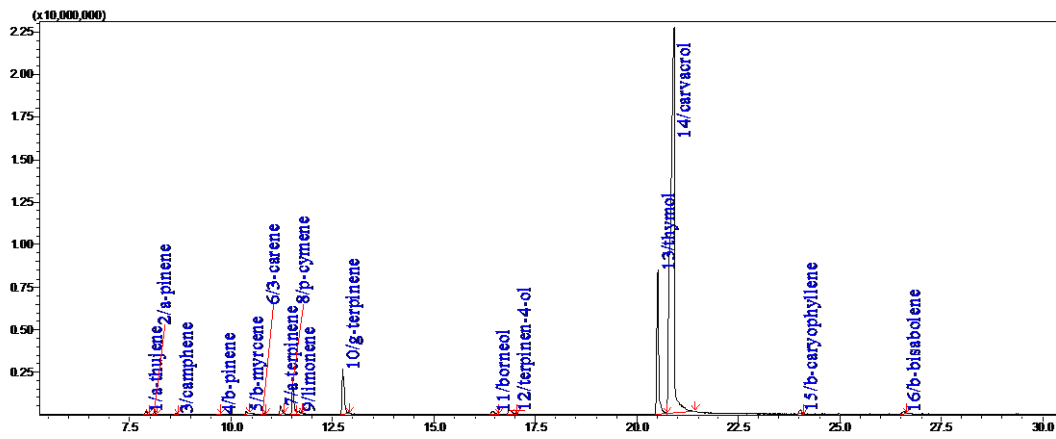
ΦΑΣΜΑ B7\_ OREPE



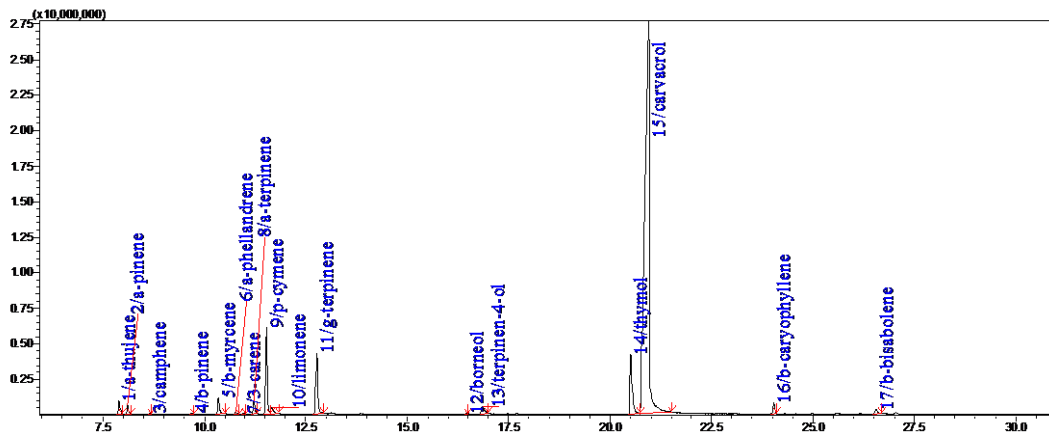
ΦΑΣΜΑ B8\_ OREPE



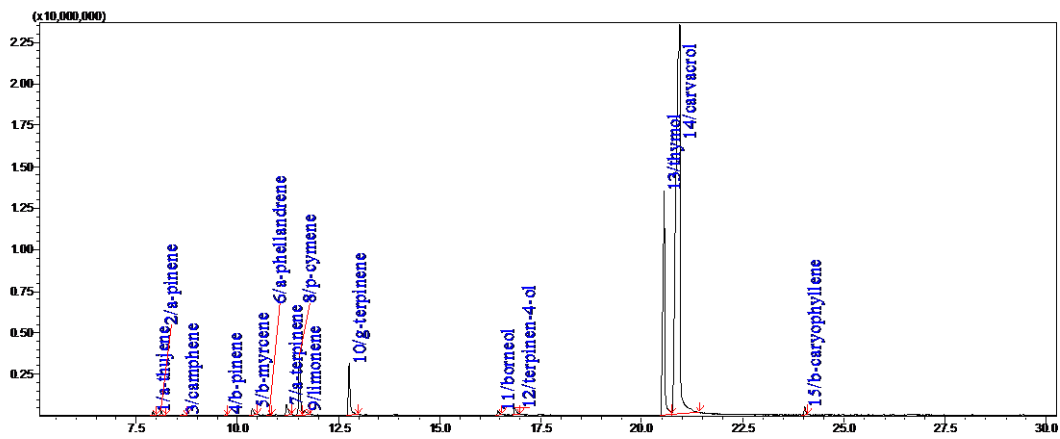
ΦΑΣΜΑ B9\_ OREPE



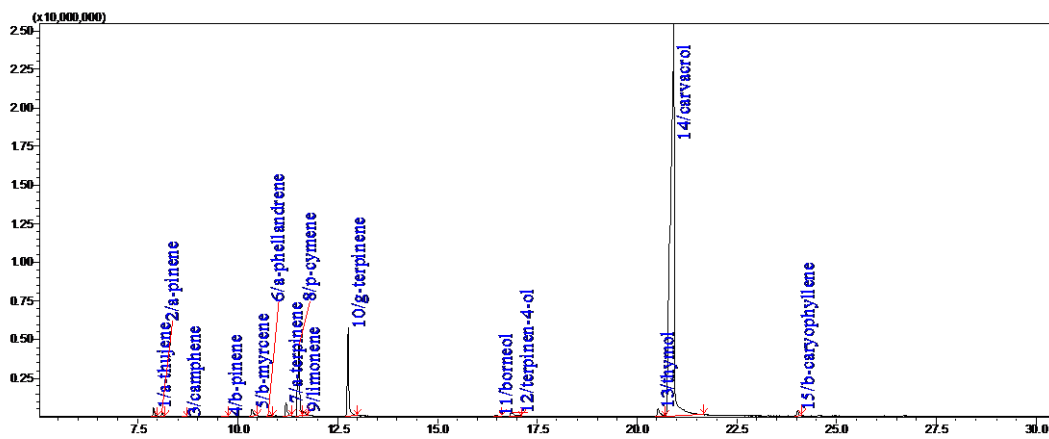
ΦΑΣΜΑ B10\_ OREPE



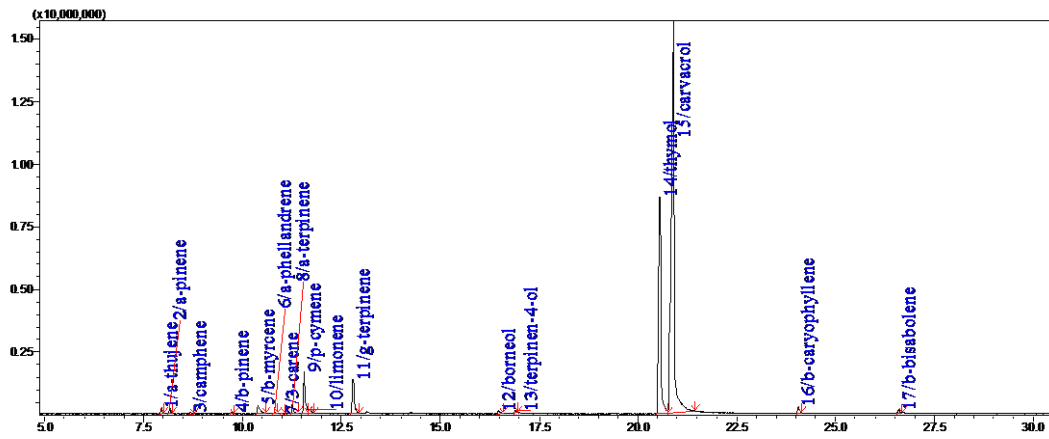
ΦΑΣΜΑ B11\_ OREPE



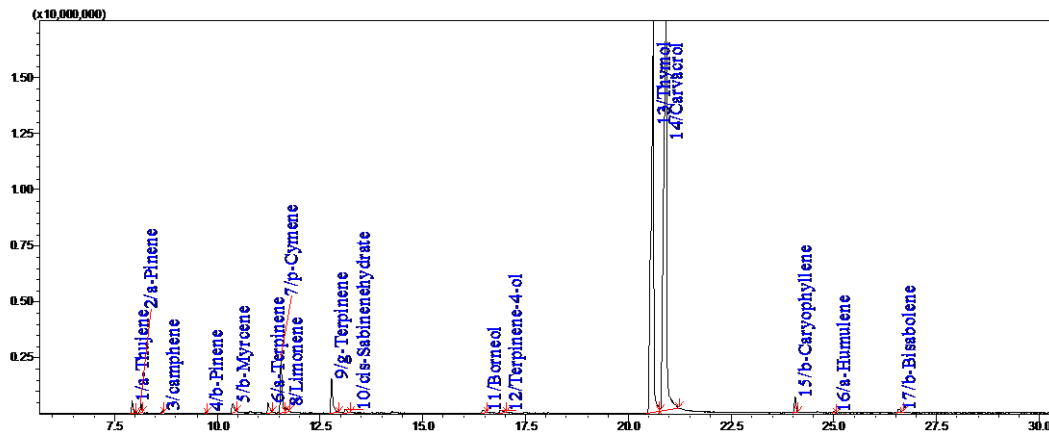
ΦΑΣΜΑ B12\_ OREPE



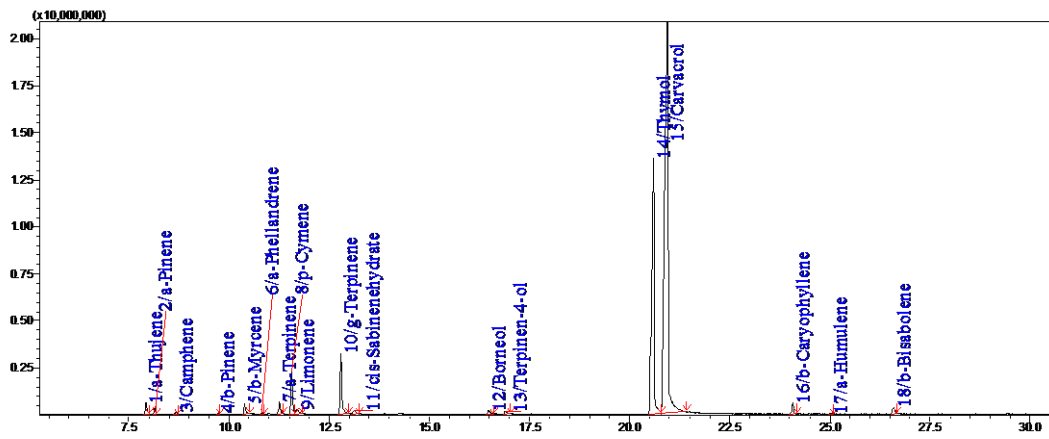
ΦΑΣΜΑ A4' \_OREPE



ΦΑΣΜΑ A9' \_OREPE

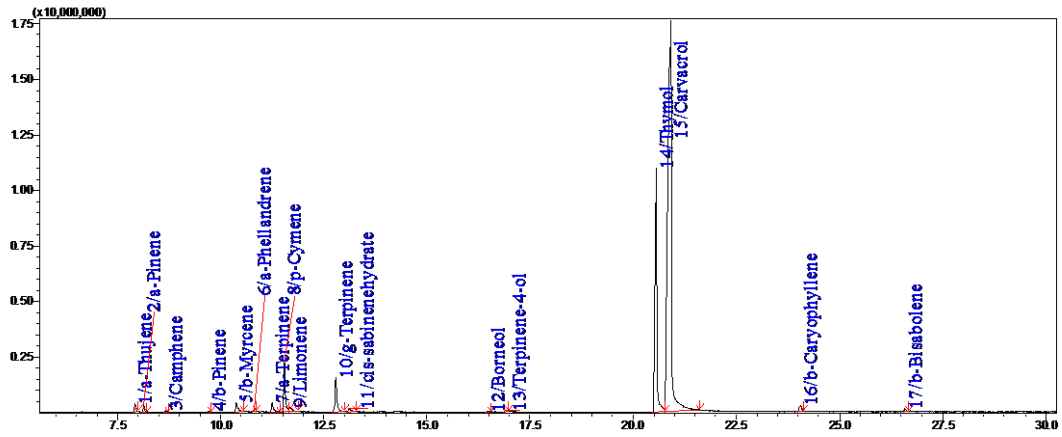


ΦΑΣΜΑ A10' \_OREPE

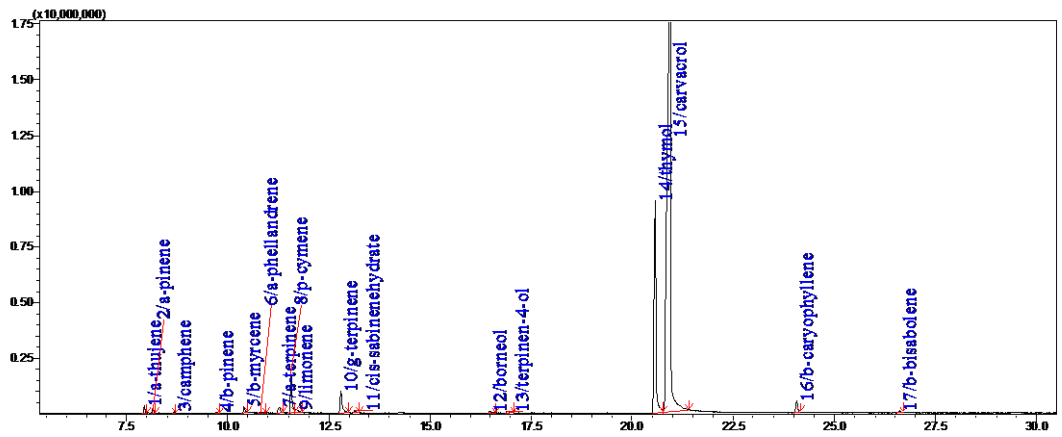




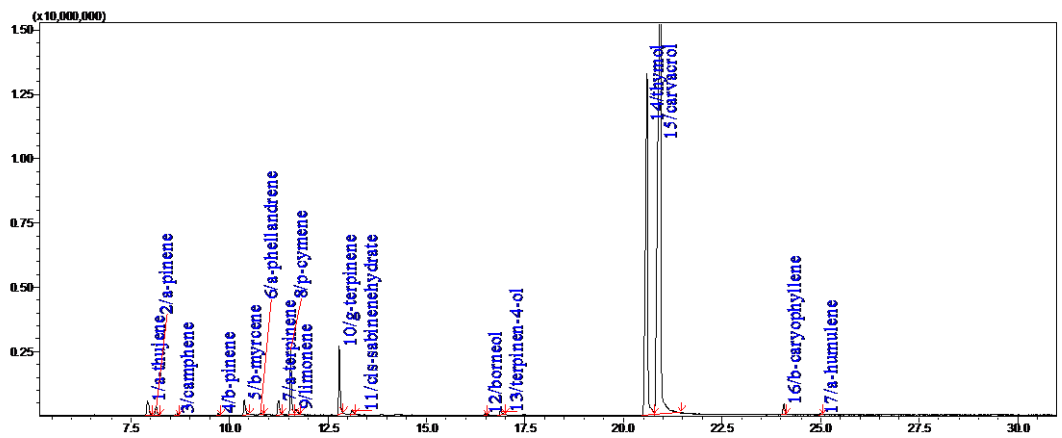
ΦΑΣΜΑΑ12' \_OREPE



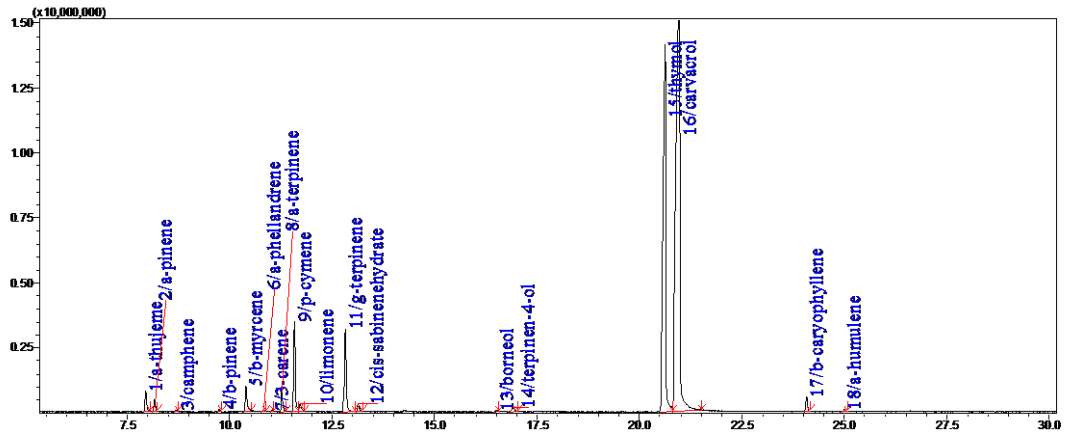
ΦΑΣΜΑΒ2' \_OREPE



ΦΑΣΜΑΒ6' \_OREPE



ΦΑΣΜΑΒ6''\_OREPE



ΦΑΣΜΑΒ9'\_OREPE

