



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

### ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<<Εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης σε εκχύλισμα διαφορετικών οικότυπων του *Hypericum Perforatum*, σε μεθανόλη και ελαιόλαδο>>



Γκόρτσου Γεωργία-Αργυρούλα

Επιβλέπων Καθηγητής: Λύκας Χρήστος

Βόλος, 2018

<<Εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης σε εκχύλισμα διαφορετικών οικότυπων του *Hypericum Perforatum*, σε μεθανόλη και ελαιόλαδο>>

Γκόρτσου Γεωργία-Αργυρούλα

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Χρήστος Λύκας** (Επιβλέπων), Επίκουρος Καθηγητής, Ανθοκομία και Αρχιτεκτονική Τοπίου, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

**Νικόλαος Τσιρόπουλος** (Μέλος), Καθηγητής, Αναλυτική Χημεία και Γεωργική Φαρμακολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

**Ανέστης Καρκάνης** (Μέλος), Ζιζανιολογία, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της πτυχιακής διατριβής μου Επίκουρο Καθηγητή Χρήστο Λύκα για την υποστήριξη και τη βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον Καθηγητή Νικόλαο Τσιρόπουλο και τον Επίκουρο Καθηγητή Ανέστη Καρκάνη για τη βοήθειά τους στην υλοποίηση του πειράματός μου. Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου που μου στάθηκαν με όποιο τρόπο μπορούσαν και ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στην οικογένειά μου που είναι πάντα δίπλα μου, για τη στήριξη, τόσο οικονομική αλλά κυρίως ψυχολογική, που μου παρείχε από την αρχή μέχρι το τέλος των σπουδών μου.

## Περίληψη

Το *Hypericum perforatum* αποτελεί ένα ευρέως γνωστό βότανο, το οποίο κέντρισε την προσοχή των ανθρώπων από αρχαιοτάτων χρόνων. Η επουλωτική δράση των εκχυλισμάτων του σε λάδι, καθώς και οι αντικαταθλιπτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα εκχυλίσματά του σε αλκοόλες, κέρδισαν το ενδιαφέρον των μελετητών. Η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη αποτελούν δύο από τις σημαντικότερες ουσίες του φυτού και θεωρούνται σε μεγάλο ποσοστό υπεύθυνες για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες.

Στην παρούσα έρευνα γίνεται μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών οικότυπων όπου φύεται το φυτό στη συγκέντρωση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης, σε εκχυλίσματα μεθανόλης και ελαιόλαδου. Ωστόσο, δεν υπήρξε συσχέτιση των διαφορετικών περιοχών συλλογής φυτικού υλικού ή του υψομέτρου στο οποίο τα φυτά φύονταν με την περιεκτικότητά τους σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη. Αντίθετα, ο χρόνος συλλογής του φυτού φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση των δύο ουσιών. Στα εκχυλίσματα μεθανόλης, η τεχνική εκτίμησης φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη. Στα εκχυλίσματα σε ελαιόλαδο, η μέθοδος και ο χρόνος εκχύλισης παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της περιεκτικότητας σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη.

## Summary

*Hypericum perforatum* is a well-known herb from the ancient time was used as a medical plant. The therapeutic effects of its extracts, as well as the antidepressant properties of its alcohols extracts, have earned the interest of scientists during the latest periods. Hypericin and pseudohypericin are two of the most important substances in the plant and are considered to be largely responsible for their medicinal properties.

In the present work we study the effect of the different *Hypericum perforatum* ecotypes, in the concentration of hypericin and pseudohypericin in methanolic and olive oil extracts. However, there was no correlation between the different geographical areas or altitude where plants grown with the content of plant material in hypericin and pseudohypericin. On the contrary, the harvesting period affects significantly the concentration of the two substances in plant material. In addition the analytical technique (HPLC or UV-VIS) used for the determination of hypericin and pseudohypericin in methanol extracts, may affect their estimated values. In olive oil extracts, the time and the method used for the extraction of the above mentioned substances from plant's flowers, may also affect their concentration in olive oil extracts.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	1
1.1 Ιστορική αναδρομή .....	1
1.2 Προέλευση ονομασίας .....	1
1.3 Οικονομική και εμπορική σημασία του φυτού.....	2
1.4 Παραδοσιακή τεχνική παρασκευής βαλσαμέλαιου και χρήση του .....	2
1.5 Παρασκευή βάμματος και χρήση του .....	3
1.6 Επίδραση του <i>Hypericum perforatum</i> στα ζώα.....	3
1.7 Συστηματική ταξινόμηση και βοτανική περιγραφή.....	3
1.8 Συνθήκες ανάπτυξης .....	5
1.9 Χαρακτηριστικά χημικών ουσιών του <i>Hypericum perforatum</i> .....	6
1.10 Υπερικήνη και ψευδοϋπερικήνη .....	6
1.11 Υπερφορίνη .....	7
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	9
<b>3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	10
3.1 Συλλογή υλικού και επεξεργασία.....	10
3.2 Εκχύλιση σε διάλυμα μεθανόλης (Παρασκευή βάμματος) .....	10
3.2.1 Επίδραση των οικότυπων στη συγκέντρωση υπερικήνης και ψευδοϋπερικήνης... 11	
3.2.2 Μελέτη της συγκέντρωσης της υπερικήνης και της ψευδοϋπερικήνης με βάση την ημερομηνία συλλογής του φυτικού υλικού.....	14
3.3 Παρασκευή εκχυλίσματος σε ελαιόλαδο.....	15
3.3.1 Με έκθεση στον ήλιο .....	15
3.3.2 Παρασκευή εκχυλίσματος με θέρμανση .....	16
3.4 Μέτρηση της υπερικήνης και της ψευδοϋπερικήνης.....	17
3.4.1 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	17
3.4.2 Φασματοφωτομετρία.....	19

<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	21
4.1 Περιεκτικότητα υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης σε εκχυλίσματα μεθανόλης (βάμματα).....	21
4.1.1 Επίδραση των διαφορετικών οικότυπων στη συγκέντρωση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης σε εκχυλίσματα μεθανόλης (βάμματα).....	22
4.1.2 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης με βάση την περίοδο συλλογής.....	22
4.1.3 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της ψευδοϋπερικίνης με βάση την περίοδο συλλογής .....	23
4.2 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης σε εκχυλίσματα του <i>H.perforatum</i> σε ελαιόλαδο .....	26
<b>5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	28
<b>6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	29

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Το *Hypericum perforatum* και τα σκευάσματα που προέρχονται από αυτό, είναι γνωστά για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες για περισσότερα από 2000 χρόνια.

Η πρώτη αναφορά στο υπέρικο, όπως αλλιώς ονομάζεται, γίνεται στους Ρωμαϊκούς χρόνους από τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο τον 1<sup>ο</sup> μ.Χ. αιώνα, όπου παρουσιάστηκε ως φάρμακο για προβλήματα της ουροδόχου κύστης. Την ίδια περίπου εποχή, ο Διοσκουρίδης θεμελιωτής της Φαρμακολογίας, παρουσιάζει τις αναλγητικές του δράσεις και τη χρήση του ως διουρητικό αλλά και επουλωτικό των πληγών από εγκαύματα. Αναφορά στη χρήση του φυτού γίνεται και από τον Ιπποκράτη, ως νευροτονωτικό και αναλγητικό για τους πόνους της εμμηνόρροιας.

Αργότερα οι Μεσαιωνικοί συγγραφείς στην ουσία αντιγράφουν τις παρατηρήσεις των Αρχαίων Ελλήνων και ενισχύουν τη θέση του φυτού στην αντιμετώπιση των ψυχικών παθήσεων. Ο Παράκελσος (16<sup>ος</sup> αιώνας μ.Χ.), διάσημος Γερμανός ιατρός και χημικός, ήταν από τους πρώτους που περιέγραψε τη χρήση του υπέρικου στη θεραπευτική αντιμετώπιση της ήπιας κατάθλιψης και άλλων ψυχιατρικών διαταραχών που ονόμαζε << φαντάσματα >>. Ωστόσο, η χρήση του φυτού ως αντικαταθλιπτικό φάρμακο, ή ως φυτικό παρασκεύασμα, είναι σχετικά πρόσφατη και έχει έρθει στο προσκήνιο μόνο τα τελευταία 20 χρόνια. (Müller, 2005 , Μαργιάννη, 2011)

Σήμερα, το βαλσαμόχορτο είναι καλύτερα γνωστό για τη χρήση του στη θεραπεία των ήπιων έως μέτρια σοβαρών καταθλιπτικών διαταραχών. (Barnes et al., 2001)

### 1.2 Προέλευση ονομασίας

Υπάρχουν διάφορες θεωρίες για την προέλευση του ονόματος υπέρικου, εκ των οποίων περισσότερη αποδεκτή είναι ότι προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις <<υπέρ>> και <<εικών>>, δηλαδή το φυτό είναι υπεράνω της εικόνας.

Άλλες λαϊκές ονομασίες είναι: βότανο του Αγίου Ιωάννη (το όνομα "Saint John Wort" λέγεται ότι είναι προς τιμήν των Ιπποτών του Αγίου Ιωάννη της Ιερουσαλήμ) που χρησιμοποίησε αυτό το βότανο για τη θεραπεία πληγών μάχης, η ελληνική ονομασία βάλσαμο ή βαλσαμόχορτο που προέρχεται από την επουλωτική δράση του



φυτού, σπαθόχορτο από το σχήμα των φύλλων του, λειχινόχορτο, περίκη. (Μαργιάννη, 2011, Μιτάκης, <http://www.valsamelaiο.gr/st-johns-wort/> )

### 1.3 Οικονομική και εμπορική σημασία του φυτού

Η καλλιέργεια του φυτού με σκοπό την κερδοσκοπική εκμετάλλευσή του εντοπίζεται στην Ευρώπη, στη Νότια και Βόρεια Αμερική, στην Αυστραλία και στην Κίνα. Η πώλησή του γίνεται κυρίως ως ξηρό βότανο, ως κάψουλες του εδαφικού φυτικού υλικού, ως βάμματα (προϊόν βασισμένο στην αλκοόλη), καθώς και σε δισκία. Στην Ευρώπη 2 δισεκατομμύρια ευρώ καταγράφονται ετησίως ως κέρδη από πωλήσεις υπέρικου. Στη Γερμανία η πόα υπέρικου είναι σήμερα από τα κύρια συνταγογραφούμενα αντικαταθλιπτικά, με περισσότερες από 2,7 εκατομμύρια συνταγές κάθε χρόνο (Brechner, 2008).

### 1.4 Παραδοσιακή τεχνική παρασκευής βαλσαμέλαιου και χρήση του

Το λάδι υπέρικου λαμβάνεται με τον εμποτισμό των φρέσκων ανθισμένων κορυφών του *Hypericum perforatum* σε ελαιόλαδο, ηλιέλαιο ή έλαιο σπέρματος σίτου και έπειτα έκθεση στο ηλιακό φως και παραμονή για 40 ημέρες (Εικόνα 1.1).

Το βαλσαμέλαιο έχει χρησιμοποιηθεί ως μια από τα παλαιότερες θεραπείες στην παραδοσιακή ιατρική των Βαλκανίων, με χρήση του στην αντιμετώπιση εγκαυμάτων, αιμορροΐδων ,ως αντισηπτικού για το ήπαρ και το στομάχι, καθώς και για διάρροια και γαστρικά έλκη. Ωστόσο το έλαιο υπέρικου μπορεί να προκαλέσει φωτοευαισθησία, εξαιτίας μιας ουσίας του, της υπερικίνης. (Arsić et al., 2010)



Εικόνα 1.1: Παραδοσιακή τεχνική παρασκευής βαλσαμέλαιου με έκθεση στον ήλιο

### 1.5 Παρασκευή βάμματος και χρήση του

Η βιομηχανία χρησιμοποιεί κυρίως την αιθανόλη και μερικές φορές τη μεθανόλη για την εκχύλιση μεταβολιτών, αλλά ο πιο δημοφιλής διαλύτης που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο είναι η μεθανόλη.

Τα αιθανολικά εκχυλίσματα του *H.perforatum* περιέχουν αρκετές φαινολικές ενώσεις, κυρίως φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα τα οποία έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Bruno et al., 2005). Σήμερα, τα εκχυλίσματα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές χώρες για τη θεραπεία της κατάθλιψης και αποτελούν μια εναλλακτική λύση έναντι των συνθετικών αντικαταθλιπτικών για τις ήπιες προς μέτριες διαταραχές. (Μαργιάννη, 2011)

### 1.6 Επίδραση του *Hypericum perforatum* στα ζώα

Η μεγάλη κατανάλωση του φυτού από τα ζώα βοσκής μπορούν να οδηγήσουν σε δηλητηρίαση, ενώ χαρακτηριστικά σημάδια δηλητηρίασης αποτελούν η γενική ανησυχία του ζώου και ο ερεθισμός του δέρματος. Η φωτοευαισθησία που προκαλείται από τις χημικές ουσίες που περιέχουν τα φυτά, θεωρείται η βασική αιτία των συμπτωμάτων που παρουσιάζουν τα ζώα.

Στα γαλακτοφόρα ζώα έχει παρατηρηθεί μειωμένη παραγωγή γάλακτος, στα πρόβατα δερματίτιδα και πτώση του μαλλιού, ενώ στα κνοφορούντα ζώα μπορεί να προκαλέσει αποβολή (Βικιπαίδεια: Βάλσαμο).

### 1.7 Συστηματική ταξινόμηση και βοτανική περιγραφή

Το *H.perforatum* ή κοινώς βάλσαμο, είναι ανθοφόρο φυτό του γένους Υπερικόν (*Hypericum*), της οικογένειας Υπερικίδες. Αναλυτικά η συστηματική ταξινόμηση του φυτού παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1 .

Πίνακας 1.1 Συστηματική ταξινόμηση

<b>Βασίλειο:</b>	<b>Φυτά (<i>Plantae</i>)</b>
<b>Συνομοταξία:</b>	Αγγειόσπερμα ( <i>Angiosperms</i> )
<b>Υφομοταξία:</b>	Ροδίδες ( <i>Rosids</i> )
<b>Τάξη:</b>	Μαλπιγειώδη ( <i>Malpighiales</i> )
<b>Οικογένεια:</b>	Υπερικήδες ( <i>Hypericaceae</i> )
<b>Γένος:</b>	Υπερικόν ( <i>Hypericum</i> )
<b>Είδος:</b>	Υ. το διάτρητον ( <i>H. perforatum</i> )

Το βαλσαμόχορτο είναι βραχύβια πολυετής πόα με διάρκεια ζωής περίπου 6 έτη. Αποτελείται από στελέχη όρθια διακλαδισμένα, τα φύλλα του είναι αντικριστά, άμισχα, επιμήκη με μήκος 1-2 cm (Εικόνα 1.2). Τα φύλλα του έχουν κιτρινο-πράσινο χρώμα, με ημιδιαφανή στίγματα του αδενικού ιστού. Τα άνθη του εμφανίζονται στα άκρα των άνω κλάδων, από τα τέλη της άνοιξης έως τα μέσα του καλοκαιριού, έχουν κίτρινα χρώμα με μαύρα στίγματα, πέντε πέταλα και το μήκος τους μπορεί να φτάσει τα 2,5 cm (Εικόνα 1.3). Τα σέπαλα είναι μυτερά και αποτελούνται από μαύρα αδενικά στίγματα, ενώ υπάρχουν πολλοί στήμονες που ενώνονται στη βάση σε τρεις δεσμίδες. Όταν συνθλίβονται οι ανθοφόροι οφθαλμοί παράγουν ένα ερυθρωπό υγρό, συστατικό του οποίου είναι η υπερικήνη. Ο καρπός του είναι τύπου κάψα (Βικιπαίδεια: Βάλσαμο).



Εικόνα 1.2 Φύλλο *H.perforatum*



Εικόνα 1.3 Άνθος *H.perforatum*

### 1.8 Συνθήκες ανάπτυξης

Το *Hypericum perforatum* αφθονεί σε ξηρούς βιότοπους, σε καλλιεργούμενες εκτάσεις, στις άκρες των δρόμων, σε λόφους, κοντά σε θάμνους και στα όρια των δασών κοντά σε ρυάκια. (Ξενοφώντος, 2005)

Το βαλσαμόχορτο, ευδοκιμεί στις περιοχές, όπου το μοτίβο της βροχόπτωσης, είναι κυρίαρχο είτε τον χειμώνα είτε το καλοκαίρι. Υψόμετρα άνω των 1500m, βροχοπτώσεις λιγότερες από 500 χιλ. και μια μέση ημερησία θερμοκρασία

Ιανουαρίου (στο Νότιο ημισφαίριο) άνω των 24°C, θεωρούνται περιοριστικά κατώτατα όρια. Οι θερινές βροχές, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στο να επιτρέψουν στο φυτό, να αναπτυχθεί βλαστικά, μετά την αποφύλλωση από τα έντομα ή τη βόσκηση (Βικιπαίδεια: Βάλσαμο).

### 1.9 Χαρακτηριστικά χημικών ουσιών του *Hypericum perforatum*

Υπάρχουν 5 κύριες ομάδες στις οποίες εντοπίζονται οι κυριότερες ουσίες που βρίσκονται στο εκχύλισμα του *Hypericum perforatum*:

1. Ναφθοδιανθρόνες = υπερικίνη, ψευδοϋπερικίνη, πρωτοϋπερικίνη και ψευδοπρωτοϋπερικίνη
2. Φλωρογλουκινόλες = υπερφορίνη, αντι-υπερφορίνη
3. Φλαβονοειδή = ρουτίνη, υπεροζίτης, κερσετίνη, ισοκερσετίνη, κερσιτρίνη
4. Διφλαβονοειδή = διαπιγενίνη και αμεντοφλαβόνη
5. Φαινολικά οξέα = χλωρογενικό οξύ

Άλλες ουσίες που ταυτοποιήθηκαν από μελέτες είναι οι ξανθόνες, οι ταννίνες, τα αμινοξέα, τα αιθέρια έλαια και άλλες υδατοδιαλυτές ουσίες. (Μαργιάννη, 2011)

Μελέτες έδειξαν ότι οι φλωρογλουκινόλες, οι ναφθοδιανθρόνες και τα φλαβονοειδή που βρίσκονται στο ιστό του *H.perforatum*, είναι οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην αντικαταθλιπτική δράση του φυτού (Karppinen, 2010)

### 1.10 Υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη

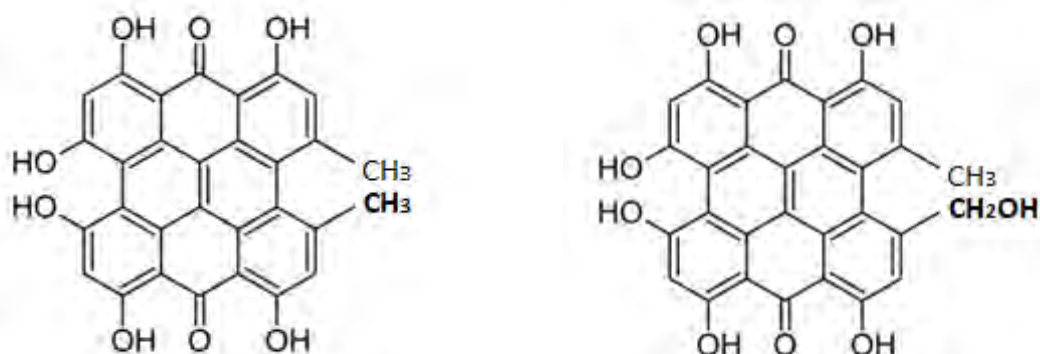
Η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη είναι κόκκινες χρωστικές ουσίες και αποτελούν τους σημαντικότερους δευτερογενείς μεταβολίτες του *H.perforatum*. Οι δύο ουσίες βρίσκονται στα σέπαλα, στα πέταλα, στους στήμονες και σε υψηλές ποσότητες στα φύλλα. Η παρουσία της ψευδοϋπερικίνης στο φυτό είναι 2-4 φορές μεγαλύτερη από αυτή της υπερικίνης.

Η διαφορά στα δύο μόρια βρίσκεται σε ένα άτομο άνθρακα, όπου η ψευδοϋπερικίνη με μία ομάδα υδροξυλίου αντικαθιστά το υδρογόνο της υπερικίνης (Εικόνα 1.4). Η υδροξυλική ομάδα της ψευδοϋπερικίνης καθιστά το μόριο πιο πολικό σε σχέση με την υπερικίνη. Οι υπερικίνες είναι πολυκυκλικές οργανικές ενώσεις, ο μοριακός τους τύπος είναι  $C_3H_{16}O_8$  και διαλύονται σε διμεθυλοξείδιο του θείου (DMSO), μεθανόλη, αιθανόλη, πυριδίνη, ακετονιτρίλιο και αλκαλικά υδατικά διαλύματα. Παρουσιάζουν μέγιστη απορροφητικότητα όταν διαλύονται σε

διμεθυλοξειδίο του θείου στα 590nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συνολικών υπερικινών γίνεται με το φασματοφωτόμετρο, ενώ για να προσδιοριστούν τα επιμέρους συστατικά εφαρμόζεται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC. Σε εκχυλίσματα των φυτών περιέχονται οι άμεσες πρόδρομες ενώσεις πρωτουπερικήνη και πρωτοψευδοϋπερικήνη, οι οποίες μετατρέπονται σε υπερικήνη και ψευδοϋπερικήνη αντίστοιχα.

Οι υπερικήνες προσφέρουν φαρμακευτικές ιδιότητες στο φυτό και λειτουργούν ως αμυντικοί προστατευτικοί παράγοντες απέναντι στους φυτικούς οργανισμούς.

Τέλος, παρουσιάζουν φωτεινό φθορισμό και έχουν ισχυρές φωτοαλλεργικές ιδιότητες, οι οποίες πιθανώς να είναι υπεύθυνες για τη βιολογική δράση των υπερικινών στο *H.perforatum*. (Ξενοφώντος, 2005)



Εικόνα 1.4 Διαφορά των μορίων της υπερικήνης και της ψευδοϋπερικήνης, στα αριστερά παρουσιάζεται η υπερικήνη και στα δεξιά η ψευδοϋπερικήνη.

### 1.11 Υπερφορίνη

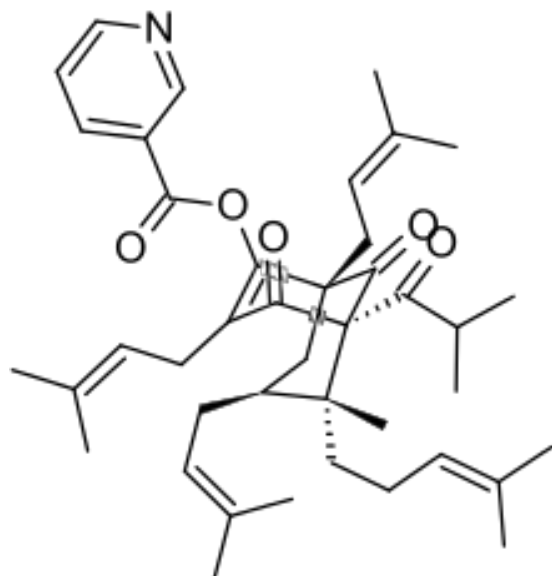
Η υπερφορίνη και το παράγωγό της η αντι-υπερφορίνη είναι ένα από τα βασικά ενεργά συστατικά του *H.perforatum* και θεωρείται υπεύθυνο για τις νευρολογικές δράσεις και τις αντικαταθλιπτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων υπερικού. Συγκεντρώνεται σε υψηλές ποσότητες στα άνθη, στους καρπούς και στα φύλλα.

Η υπερφορίνη ανήκει στις φλωρογλουκινόλες οι οποίες αποτελούν εύκολα αποικοδομήσιμες ενώσεις και είναι ευαίσθητες στην έκθεση στον αέρα, στο φως και ασταθείς στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, γεγονός που τις καθιστά δύσκολες στη μελέτη τους. Η υπερφορίνη είναι ένα (πρενυλιωμένο)

φλωρογλουκινολκό παράγωγο που αποτελείται από ένα φλωρογλουκινολικό σκελετό με 5 λιπόφιλες ισοπρενικές αλυσίδες και ο μοριακός του τύπος είναι  $C_{35}H_{52}O_4$  (Εικόνα 1.5).

Ένα φυσικό ομόλογο της υπερφορίνης είναι η αντι-υπερφορίνη, όπου η ισοπροπυλ-κετονική πλευρική αλυσίδα αντικαθίσταται από μία 2-μεθυλ-προπυλ-κετόνη. Στα εκχυλίσματα του *H.perforatum* η αναλογία υπερφορίνης – αντιυπερφορίνης φτάνει το 5-10:1.

Άλλες βιολογικές δράσεις που έχουν αναφερθεί για τις φλωρογλουκινόλες είναι η αντιβακτηριακή, κατά του *Staphylococcus aureus* και των Gram-θετικών βακτηρίων, μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις, η αντιφλεγμονώδης, ενώ μελετάται και η κυτταροτοξική δράση. Ενδείξεις τόσο από *in vitro* όσο και από *in vivo* πειράματα προτείνουν πως η υπερφορίνη μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων ανθρώπων και αρουραίων. (Wikipedia: Hyperforin)



Εικόνα 1.5: Δομή μορίου υπερφορίνης

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης και της ψευδοπερικίνης σε εκχύλισμα διαφορετικών οικότυπων του *Hypericum perforatum*, σε μεθανόλη και ελαιόλαδο. Το φυτικό υλικό συλλέχθηκε από ορεινές και πεδινές περιοχές της Θεσσαλίας και της Στερεάς Ελλάδας. Το πείραμα διεξήχθη στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Γεωπονικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και οι αναλύσεις για τον προσδιορισμό της υπερικίνης και της ψευδοπερικίνης πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Γεωπονικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



### 3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Συλλογή υλικού και επεξεργασία

Το φυτικό υλικό συλλέχθηκε το χρονικό διάστημα από 24/05/2015 έως 25/6/2015, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Εικόνα 3.1). Στη συνέχεια, το φυτό παρέμεινε για 24 ώρες στους 2°C και η επεξεργασία του ξεκίνησε την αμέσως επόμενη μέρα. Στη συνέχεια, έγινε διαχωρισμός του άνθους από το υπόλοιπο φυτικό μέρος.



Εικόνα 3.1 Οι περιοχές από τις οποίες συλλέχθηκε το φυτικό υλικό

#### 3.2 Εκχύλιση σε διάλυμα μεθανόλης (Παρασκευή βάμματος)

Έγινε εκχύλιση δεκαπέντε δειγμάτων, ένα από κάθε περιοχή, σε διάλυμα μεθανόλης (95%) και χρησιμοποιήθηκαν 2g χλωρού βάρους ανθέων και 100mL μεθανόλη. Η διαδικασία παρασκευής του βάμματος ήταν η ακόλουθη:

Αρχικά, μετρήθηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες του άνθους και της μεθανόλης και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη. Η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμομανδύα τύπου (Selecta, Fibroman-C) για 30 λεπτά, κατά τη

διάρκεια των οποίων το διάλυμα είχε φτάσει σε σημείο βρασμού (Εικόνα 3.2). Το διάλυμα διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώθηκε με μεθανόλη μέχρι την χαραγή των 100mL. Το βάμμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο έγχρωμο μπουκαλάκι και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 2<sup>0</sup>C μέχρι την πραγματοποίηση των μετρήσεων. (Gitea et al.,2010)



Εικόνα 3.2 Διάταξη εκχύλισης με θερμομανδύα

### 3.2.1 Επίδραση των οικότυπων στη συγκέντρωση υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης

Για τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των διαφορετικών οικότυπων στη συγκέντρωση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης στο άνθος των φυτών, οι περιοχές συλλογής χωρίστηκαν με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους και τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων ομαδοποιήθηκαν ανάλογα και αναλύθηκαν στατιστικά:

- i. Ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων με βάση το υψόμετρο συλλογής του φυτικού υλικού

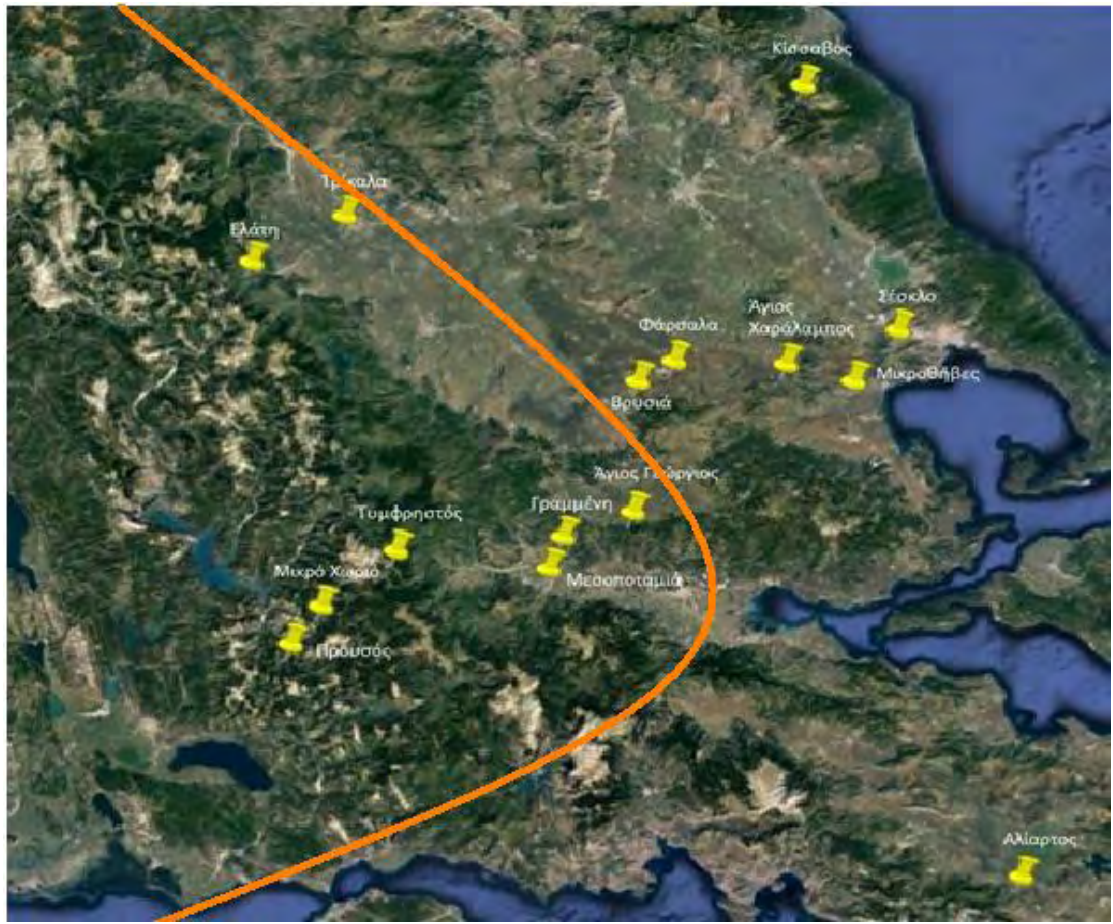
Δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες για το χαρακτηριστικό των περιοχών ως πεδινές (0-300m), ημιορεινές (300-600m) και ορεινές (>600m). Οι περιοχές

που εντάχθηκαν στην κάθε ομάδα φαίνονται στον Πίνακα 3.1 και η γεωγραφική χωροθέτησή τους φαίνεται στην Εικόνα 3.1 .

Πίνακας 3.1 Ταξινόμηση περιοχών με βάση το υψόμετρο συλλογής του φυτικού υλικού

Υψόμετρο	0-300m	300-600m	>600m
	Φάρσαλα	Άγιος Χαράλαμπος	Ελάτη
	Μεσοποταμιά	Άγιος Γεώργιος	Τυμφρηστός
	Βρυσιά		Προυσός
	Μικροθήβες		Μικρό Χωριό
	Γραμμένη		Κίσσαβος
	Σέσκλο		
	Τρίκαλα		
	Αλίαρτος		

- ii. Ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων με βάση την εγγύτητα στην παράκτια ζώνη. Στην περίπτωση αυτή ο διαχωρισμός έγινε με βάση την απόσταση του σημείου συλλογής από τη θάλασσα. Οι περιοχές που ομαδοποιήθηκαν φαίνονται στην Εικόνα 3.3 .



Εικόνα 3.3 Διαχωρισμός περιοχών βάση της απόστασης από τη θάλασσα

- iii. Ομαδοποίηση αποτελεσμάτων με βάση τη γεωγραφική τους θέση  
 Ο διαχωρισμός έγινε με βάση το γεωγραφικό διαμέρισμα , καθώς τα δείγματα που συλλέχθηκαν προήλθαν από τη Θεσσαλία και από τη Στερεά Ελλάδα. Στο πράσινο πλαίσιο βρίσκονται οι περιοχές των δειγμάτων που εντάσσονται στη Θεσσαλία, ενώ στο κόκκινο εκείνες που εντάσσονται στη Στερεά Ελλάδα. Οι περιοχές που ομαδοποιήθηκαν φαίνονται στην Εικόνα 3.4 .



Εικόνα 3.4 Ταξινόμηση περιοχών βάση γεωγραφικής θέσης

### 3.2.2 Μελέτη της συγκέντρωσης της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης με βάση την ημερομηνία συλλογής του φυτικού υλικού

Ένας άλλος παράγοντας που μελετήθηκε για το αν επηρεάζει τη συγκέντρωση των ουσιών στο φυτό ήταν η περίοδος συλλογής του φυτικού υλικού. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες με βάση την περίοδο συλλογής:

1<sup>η</sup> Περίοδος συλλογής: Περιλαμβάνει τα δείγματα με το φυτικό υλικό που συλλέχθηκαν κατά την πρώτη εβδομάδα του Ιουνίου (1-7 Ιουνίου).

2<sup>η</sup> Περίοδος συλλογής: Περιλαμβάνει τα δείγματα που συλλέχθηκαν τη δεύτερη εβδομάδα του Ιουνίου (8-14 Ιουνίου).

3<sup>η</sup> Περίοδος συλλογής: Περιλαμβάνει τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα τέλη Ιουνίου μέχρι τις αρχές Ιουλίου.

### 3.3 Παρασκευή εκχυλίσματος σε ελαιόλαδο

#### 3.3.1 Με έκθεση στον ήλιο

Παρασκευάστηκαν τέσσερα δείγματα βαλσαμέλαιου με τοποθέτηση 60g χλωρού άνθους σε διαφορετική ποσότητα ελαιόλαδου για το κάθε δείγμα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2. Τα κάθε παρασκεύασμα τοποθετήθηκε σε γυάλινο βάζο και τυλίχτηκε με λευκό ύφασμα τύπου γάζας, με ποσοστό σκίασης 30%. Έπειτα, όλα τα δείγματα παρέμειναν σε μέρος με έκθεση στον ήλιο και γινόταν μέτρηση της θερμοκρασίας τους δύο φορές την ημέρα, στις 2μμ και στις 10μμ (Εικόνα 3.5). Ο χρόνος παραμονής στον ήλιο ήταν διαφορετικός για το κάθε δείγμα .

Πίνακας 3.2 Τρόποι παρασκευής βαλσαμέλαιου

ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΕΛΑΙΟΥ (mL)	ΧΡΟΝΟΣ ΠΑΡΑΜΟΝΗΣ ΣΤΟΝ ΗΛΙΟ(ημέρες)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΦΥΤΟΥ/ΛΑΔΙ
1 <sup>η</sup>	300	60	1:5
2 <sup>η</sup>	420	60	1:7
3 <sup>η</sup>	300	40	1:5
4 <sup>η</sup>	300	20	1:5



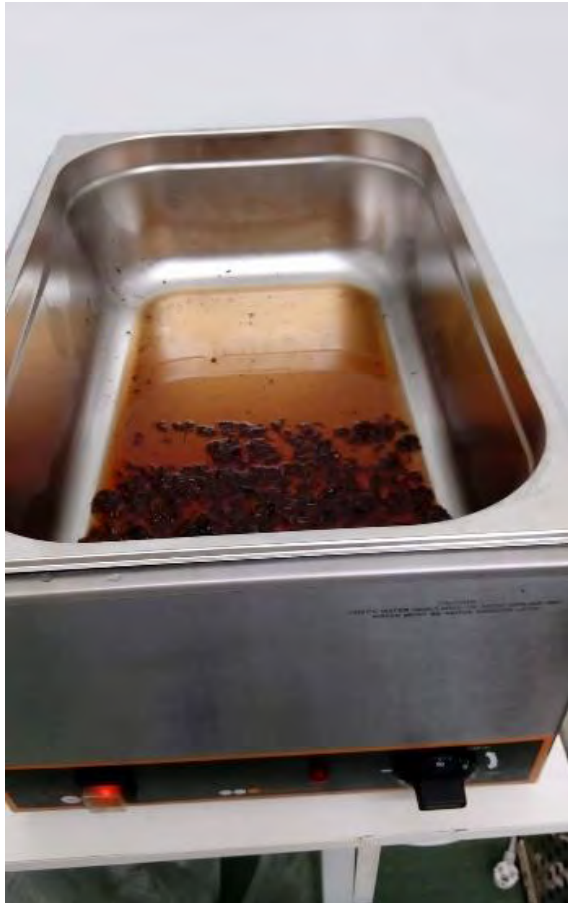
Εικόνα 3.5 Παραμονή των εκχυλισμάτων ελαιόλαδου σε μέρος με έκθεση στον ήλιο

### 3.3.2 Παρασκευή εκχυλίσματος με θέρμανση

Παρασκευάστηκαν δύο εκχυλίσματα με τοποθέτηση 60g χλωρού άνθους σε 300ml ελαιόλαδο έκαστο. Όλες οι εκχυλίσεις έγιναν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 50°C (Εικόνα 3.6).

Η πρώτη εκχύλιση έγινε με παραμονή του μείγματος (φυτικό υλικό και ελαιόλαδο) στο υδατόλουτρο για 3 ημέρες. Στη συνέχεια, έγινε αφαίρεση του φυτικού υλικού και παρέμεινε μόνο το λάδι το οποίο χωρίστηκε ισόποσα σε δυο γυάλινα δοχεία. Ένα από αυτά παρέμεινε στο ψυγείο στους 2°C ενώ το δεύτερο τυλίχτηκε με ύφασμα τύπου γάζας και παρέμεινε στον ήλιο, με καθημερινή μέτρηση της θερμοκρασίας του στις 2μμ και στις 10μμ, για 20 ημέρες.

Η δεύτερη εκχύλιση έγινε με παραμονή του μείγματος στο υδατόλουτρο για 5 ημέρες και αφού διαχωρίστηκε το άνθος από το λάδι, τοποθετήθηκε σε γυάλινο βάζο και παρέμεινε στο ψυγείο στους 2°C.



Εικόνα 3.6 Εκχύλιση σε υδατόλουτρο

### 3.4 Μέτρηση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης

Για τον προσδιορισμό της υπερικίνης, χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές, η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) και η φασματοφωτομετρία (UV-VIS). Με την τεχνική της HPLC είναι δυνατός και ο σύγχρονος προσδιορισμός της ψευδοϋπερικίνης. Οι μετρήσεις έγιναν στα μεθανολικά βάμματα και αποτελέσματα εκφράζονται σε % β/β (χλωρό άνθος), δηλαδή g υπερικίνης ή/και ψευδοϋπερικίνης ανά 100g φυτικού ιστού.

#### 3.4.1 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για τον προσδιορισμό της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης στα μεθανολικά βάμματα χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας τύπου Hewlett-Packard 1100 Series (Εικόνα 3.7) που αποτελείται:

- Σύστημα έγχυσης Reodyne με βρόγχο χωρητικότητας 20μL.
- Χρωματογραφική στήλη NOVA Pak C18, μήκους 15cm και διαμέτρου 3,9mm.



- Ανιχνευτή απορρόφησης UV-Vis με καταγραφή ορισμένη στα 587nm.
- Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε με H/Y με το πρόγραμμα Chem-Station της Hewlett Packard.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution), η οποία φαίνεται στον Πίνακα 3.3 . Οι δύο κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν A: MeOH/H<sub>2</sub>O 45/55 και B: MeOH/ACN 50/50. Η ροή του 1mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε σταθερή στους 40°C.

Πίνακας 3.3 Πρόγραμμα Χρωματογραφικής ανάλυσης

Χρόνος(min)	A %	B%
0	100%	0%
7	100%	0%
12	0%	100%
17	0%	100%
21	100%	0%
23	100%	0%

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της υπερίκινης και της ψευδοϋπερίκινης στα μεθανολικά βάμματα έγινε με την τεχνική του εξωτερικού προτύπου, ενώ η ταυτοποίηση των δύο ουσιών στα χρωματογραφήματα βασίστηκε στους χρόνους κατακράτησης ( $t_R$ ), όπως προέκυψαν από τις εκχύσεις προτύπων διαλυμάτων υπερίκινης και ψευδοϋπερίκινης.



Εικόνα 3.7 Διάταξη Χρωματογραφίας HPLC

### 3.4.2 Φασματοφωτομετρία

Για το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των υπερικινών (υπερικίνη+ψευδοϋπερικίνη) στα μεθανολικά βάμματα χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού τύπου OPTIZEN Pop της Mecacys (Εικόνα 3.8). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 587 nm και η ποσότητα υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο για ορισμένη απορρόφηση:

$$\text{Hyp g\%} = A \cdot 100 / 780 \cdot m$$

Όπου: Hyp = σύνολο υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης

A= η μετρηθείσα απορρόφηση

m= τα γραμμάρια του άνθους στα 100 mL εκχυλίσματος

780= η ειδική απορρόφηση της υπερικίνης στα 587nm

(Gitea et al., 2010)



Εικόνα 3.8 Φασματοφωτόμετρο UV-Vis

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

##### 4.1 Περιεκτικότητα υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης σε εκχυλίσματα μεθανόλης (βάμματα)

Τα ποσοστά της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης του κάθε δείγματος, όπως αυτά προέκυψαν από την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης και φασματοφωτομετρικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1 Συγκέντρωση (% β/β χλωρό άνθος) υπερικίνης (HYP) και της ψευδοϋπερικίνης (PSHYP), που προέκυψε από τις δύο τεχνικές μέτρησης (χρωματογραφικά -HPLC και φασματοφωτομετρικά- UV-Vis)

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜ/ΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	HYP % HPLC	HYP+PSHYP % UV-VIS	PSHYP % HPLC	HYP+PSHYP % HPLC
1	1/6/2015	Φάρσαλα	0,08	0,1	0,09	0,17
2	1/6/2015	Άγιος Χαράλαμπος, Λάρισα	0,09	0,14	0,2	0,29
3	1/6/2015	Βρυσιά, Λάρισα	0,07	0,11	0,1	0,17
4	1/6/2015	Μικροθήβες	0,1	0,14	0,14	0,25
5	3/6/2015	Άγιος Γεώργιος, Φθιώτιδα	0,09	0,11	0,11	0,19
6	3/6/2015	Γραμμένη, Φθιώτιδα	0,07	0,13	0,15	0,22
7	3/6/2015	Μεσοποταμιά, Φθιώτιδα	0,11	0,14	0,14	0,25
8	8/6/2015	Ελάτη, Τρίκαλα	0,08	0,14	0,13	0,2
9	8/6/2015	Τρίκαλα	0,08	0,14	0,13	0,2
10	10/6/2015	Σέσκλο, Μαγνησία	0,18	0,15	0,19	0,37
11	23/6/2015	Τυμφρηστός, Φθιώτιδα	0,02	0,06	0,07	0,09
12	23/6/2015	Αλίαρτος	0,03	0,07	0,05	0,09
13	23/6/2015	Μικρό Χωριό, Ευρυτανία	0,11	0,13	0,1	0,21
14	23/6/2015	Προυσός, Ευρυτανία	0,08	0,09	0,06	0,11
15	1/7/2015	Κίσσαβος	0,06	0,08	0,11	0,17

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά τη συγκέντρωση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης που κυμαίνεται από 0,01% έως 0,75%. (Gitea et al., 2010)

Στον πίνακα φαίνεται ότι το άθροισμα υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης που εκτιμήθηκε φασματοφωτομετρικά, παρουσιάζει μειωμένη τιμή σε σχέση με το άθροισμα υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης που εκτιμήθηκε χρωματογραφικά.

Επιπλέον, το μεγαλύτερο ποσοστό στο σύνολο των ουσιών παρατηρείται στο Σέσκλο (0,37%), ενώ τα μικρότερα ποσοστά εμφανίζονται στον Προυσό (0,09%), στην Αλίαρτο (0,09%) και στον Τυμφρηστό (0,11%).

Ακόμη, από την επεξεργασία των στοιχείων του πίνακα προκύπτει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό σε υπερικίνη εντοπίζεται στον Προυσό σε ποσοστό 72% του συνόλου των δύο ουσιών και η μικρότερη περιεκτικότητα σε υπερικίνη στον Τυμφρηστό σε ποσοστό 22%.

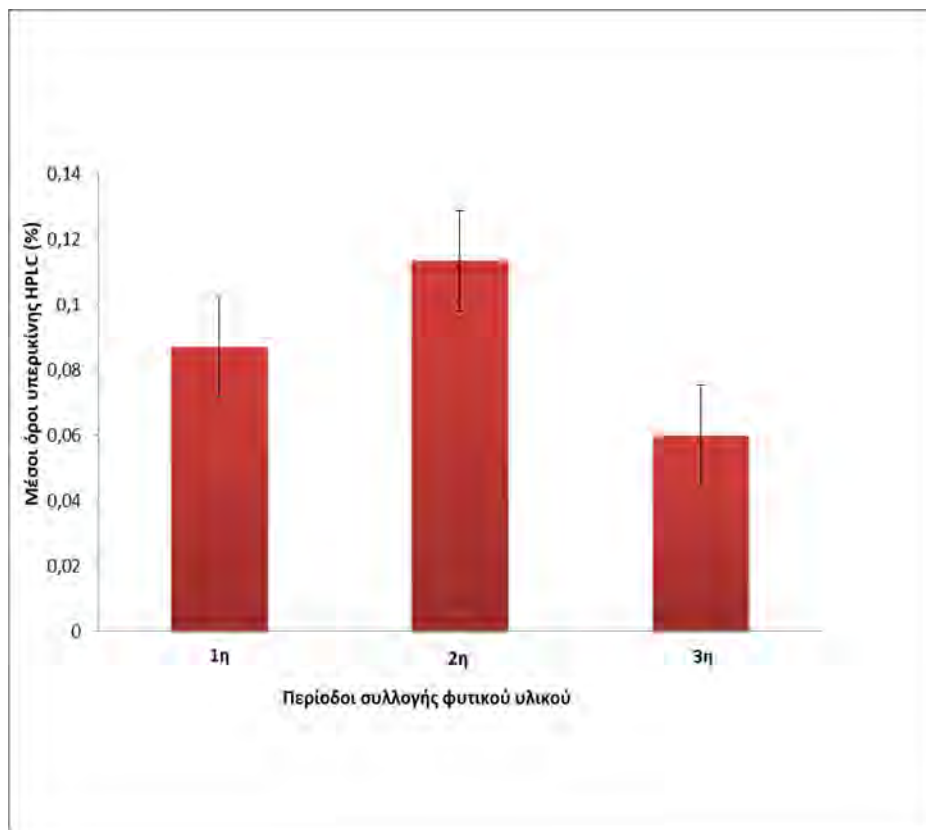
#### 4.1.1 Επίδραση των διαφορετικών οικότυπων στη συγκέντρωση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης σε εκχυλίσματα μεθανόλης (βάμματα)

Από την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν μετά την ομαδοποίηση των μετρήσεων ανάλογα με τη θέση των περιοχών όπου συλλέχθηκε το φυτικό υλικό προέκυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά όσον αφορά στη συγκέντρωση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης, είτε μεμονωμένες είτε ως άθροισμα, ανεξάρτητα από την περιοχή από την οποία συλλέχθηκε το φυτικό υλικό.

#### 4.1.2 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης με βάση την περίοδο συλλογής

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων που έγιναν με HPLC όσον αφορά της συγκέντρωση της υπερικίνης φαίνεται ότι φυτά που συλλέχθηκαν κατά τη 2<sup>η</sup> περίοδο είχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση υπερικίνης στα άνθη τους, ενώ τη μικρότερη παρουσίασαν τα φυτά που συλλέχθηκαν την 3<sup>η</sup> περίοδο. Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε σε δείγματα που είχαν συλλεχθεί την 2<sup>η</sup> και την 3<sup>η</sup> περίοδο.

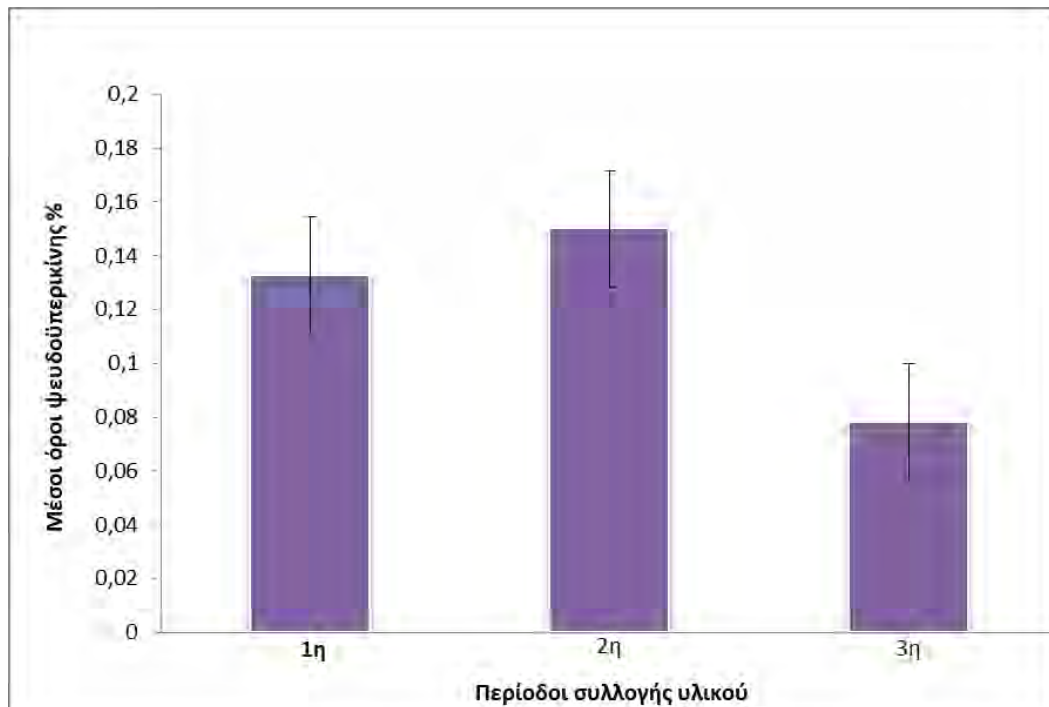
Δείγματα που συλλέχθηκαν την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> περίοδο καθώς και μεταξύ της 1<sup>ης</sup> και της 3<sup>ης</sup> περιόδου δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (Γράφημα 4.1)



Γράφημα 4.1 Μέσος όροι συγκέντρωσης της υπερικίνης, που προσδιορίστηκε χρωματογραφικά, κατά τις τρεις περιόδους συλλογής. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD).

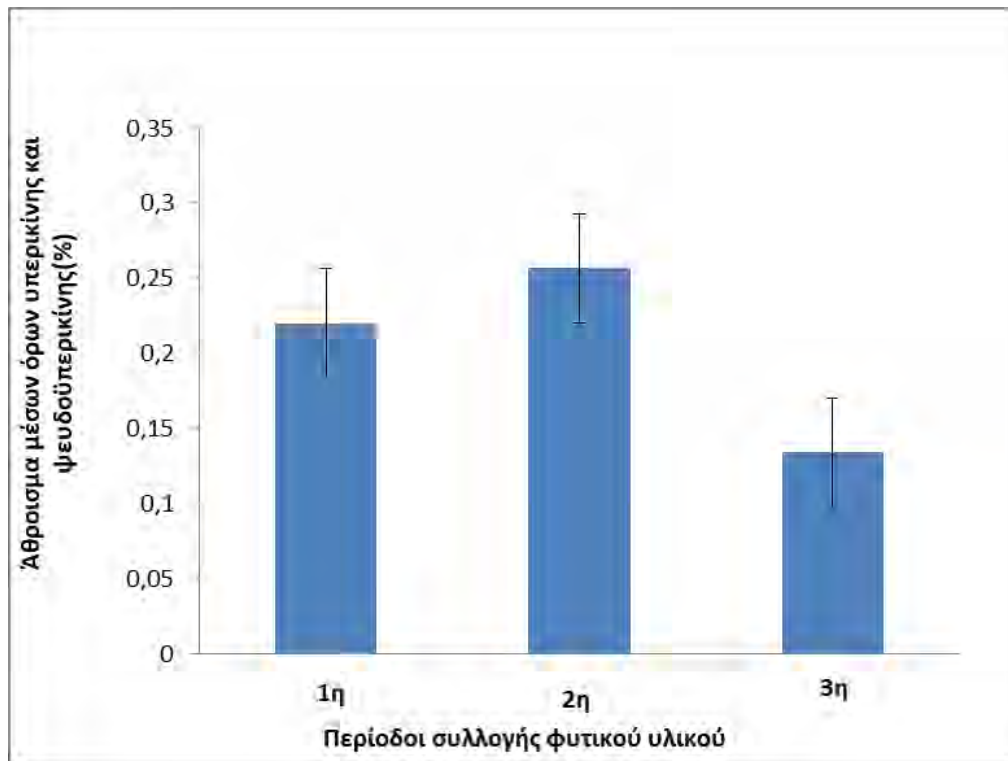
#### 4.1.3 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της ψευδοϋπερικίνης με βάση την περίοδο συλλογής

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων που έγιναν με HPLC προέκυψε ότι τα φυτά που συλλέχθηκαν κατά τη 2<sup>η</sup> περίοδο είχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ψευδοϋπερικίνης στα άνθη τους, ενώ τη μικρότερη παρουσίασαν τα φυτά που συλλέχθηκαν την 3<sup>η</sup> περίοδο. Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε ανάμεσα στην 1<sup>η</sup> με την 3<sup>η</sup> περίοδο, καθώς και στη 2<sup>η</sup> με την 3<sup>η</sup> περίοδο. Δείγματα που συλλέχθηκαν την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> περίοδο δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά (Γράφημα 4.2).



Γράφημα 4.2 Μέσος όρος συγκέντρωσης ψευδοϋπερικίνης κατά τις τρεις περιόδους συλλογής φυτικού υλικού. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD).

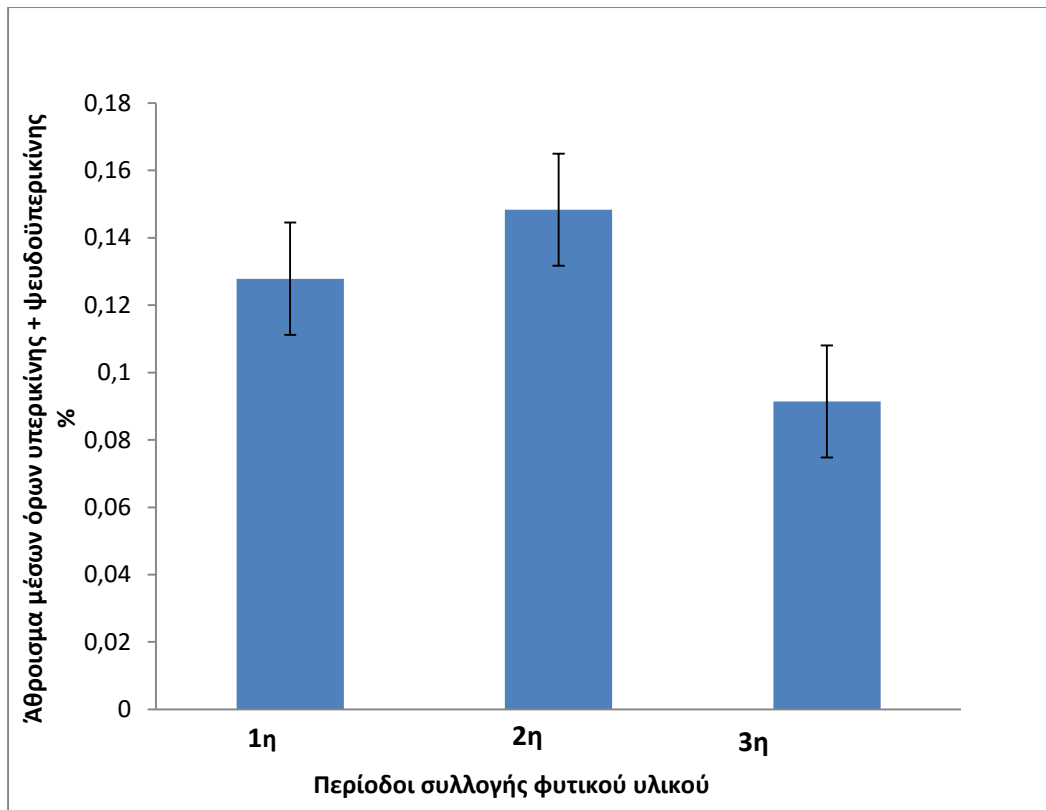
Παρόμοια εικόνα με την επίδραση του χρόνου συγκομιδής στη συγκέντρωση της ψευδοϋπερικίνης παρουσιάζει και η συγκέντρωση του αθροίσματος υπερικίνη+ψευδοϋπερικίνη στα άνθη των φυτών, που εκτιμήθηκε με HPLC. Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε σε δείγματα της 1<sup>ης</sup> και της 3<sup>ης</sup> περιόδου συλλογής, όπως ανάμεσα στη 2<sup>η</sup> και στην 3<sup>η</sup> περίοδο συλλογής του φυτού. Ανάμεσα στην 2<sup>η</sup> και στην 3<sup>η</sup> περίοδο δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 4.3).



Γράφημα 4.3 Μέσοι όροι της συγκέντρωσης του αθροίσματος της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης με HPLC στις τρεις περιόδους συλλογής. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων που έγιναν με UV-VIS, η συγκέντρωση του αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα άνθη από τα φυτά που συλλέχθηκαν κατά τη 2<sup>η</sup> περίοδο ήταν η μεγαλύτερη, ενώ τη μικρότερη συγκέντρωση παρουσίασαν τα φυτά που συλλέχθηκαν την 3<sup>η</sup> περίοδο. Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε σε δείγματα που είχαν συλλεχθεί την 1<sup>η</sup> και τη 3<sup>η</sup>, καθώς και την 2<sup>η</sup> με την 3<sup>η</sup> περίοδο συλλογής. Δείγματα που συλλέχθηκαν την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> περίοδο δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά (Γράφημα 4.2).





Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι με τη συλλογή των ανθέων του υπερικού κατά τη 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> εβδομάδα του Ιουνίου, για τις περιοχές απ' όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα στην παρούσα εργασία, παραλαμβάνεται υλικό με αυξημένη περιεκτικότητα σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η περιεκτικότητα των ανθέων και στις δύο προαναφερθείσες ουσίες μεγιστοποιείται περίπου τη 2<sup>η</sup> εβδομάδα του Ιουνίου.

#### 4.2 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης σε εκχυλίσματα του *H.perforatum* σε ελαιόλαδο

Από τα επτά δείγματα που μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο, αποτελέσματα όσον αφορά τη συγκέντρωση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης προέκυψαν μόνο για εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με την παραδοσιακή μέθοδο εκχύλισης με παραμονή στον ήλιο. Η θερμοκρασία των δειγμάτων που εκτέθηκαν στο ηλιακό φως κυμάνθηκε από 24<sup>0</sup>C μέχρι 55<sup>0</sup>C και όλα τα δείγματα παρουσίαζαν το ίδιο θερμοκρασιακό εύρος. Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνεται ότι ο χρόνος εκχύλισης παίζει σημαντικότερο ρόλο από την αναλογία φυτικού υλικού/ ελαιόλαδου.

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.2 η αύξηση του χρόνου εκχύλισης κατά 20 ημέρες (δείγματα 1 και 3), τριπλασίασε τη περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε υπερικίνη και διπλασίασε την περιεκτικότητά του σε ψευδοϋπερικίνη όταν εκχυλίστηκαν και στις δυο περιπτώσεις 60g ανθέων σε 300mL λαδιού (αναλογία 1:5). Αντίθετα, η αύξηση της ποσότητας του ελαιόλαδου και η επίτευξη μιας αναλογίας 1:7 (δείγματα 1 και 2), δεν επηρεάζει την ποσότητα των δύο ουσιών στο εκχυλιστικό μέσο, όταν ο χρόνος εκχύλισης είναι ο ίδιος (Πίνακας 4.2). σε δείγματα που αφορούσαν την εκχύλιση του φυτικού υλικού μόνο με θέρμανση δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων λόγω των πολύ χαμηλών τιμών (κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης του οργάνου).

Πίνακας 4.2 Ποσοστό συγκεντρώσεων υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης (% β/β χλωρού ιστού) σε σχέση με την ποσότητα ελαιόλαδου και τις ημέρες παραμονής στον ήλιο.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΕΛΑΙΟΥ (mL)	ΗΜΕΡΕΣ ΣΤΟΝ ΗΛΙΟ	% HYP	%PSHYP
1	300	60	0,0002	0,00006
2	420	60	0,0002	0,00006
3	300	40	0,00007	0,00003

Το εύρος της θερμοκρασίας των δειγμάτων που εκτέθηκαν στο ηλιακό φως, κυμάνθηκε από 24°C η μικρότερη θερμοκρασία μέχρι 55°C η μεγαλύτερη θερμοκρασία.

## 5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων δεν προέκυψε συσχέτιση των διαφορετικών περιοχών συλλογής φυτικού υλικού (ανθοκεφαλές) ή του υψομέτρου στο οποίο τα φυτά φύονταν με τη περιεκτικότητά τους σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη. Σε όλες τις περιπτώσεις η περιεκτικότητά τους ήταν παρόμοια και σύμφωνη με αυτή που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Αντίθετα ο χρόνος συλλογής του φυτικού υλικού φαίνεται να επηρεάζει την περιεκτικότητα του υλικού στις δυο προαναφερθείσες ουσίες. Η μέγιστη συγκέντρωσή τους στα άνθη (για τις περιοχές που μελετήθηκαν) παρουσιάστηκε το 2<sup>ο</sup> δεκαήμερο του Ιουνίου, ενώ στο τέλος του ίδιου μήνα φαίνεται ότι η περιεκτικότητά τους στα άνθη του φυτού μειώνεται σημαντικά.

Η μεθοδολογία μέτρησης φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά την εκτίμηση της περιεκτικότητας των ανθέων σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη, όταν αυτή γίνεται με εκχύλιση του φυτικού υλικού σε μεθανόλη. Με τη χρήση φασματοφωτομετρίας εμφανίζεται μειωμένη τιμή σε σχέση με τη συγκέντρωση που υπολογίζεται όταν για το ίδιο εκχύλισμα ο προσδιορισμός γίνεται με HPLC.

Η μεθοδολογία εκχύλισης των ανθέων υπέρικου σε ελαιόλαδο επηρεάζει τη περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε υπερικίνη, καθώς με εφαρμογή της παραδοσιακής μεθόδου έκθεσης του παρασκευάσματος στον ήλιο για 60 ημέρες παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση της ουσίας στο εκχύλισμα, εν συγκρίσει με την απλή θέρμανσή του.

Ο χρόνος εκχύλισης παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην παραλαβή της υπερικίνης, της ψευδοϋπερικίνης και συνεπώς στην περιεκτικότητά της στο εκχυλιστικό μέσο (ελαιόλαδο) απ' ό,τι η αναλογία ανθέων/λάδι, καθώς αύξηση του χρόνου εκχύλισης κατά 30% τριπλασίασε την περιεκτικότητα στο εκχύλισμα σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη, ενώ αύξηση του βάρους των ανθέων κατά 30% δεν επέφερε καμία αλλαγή.

## 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία:

1. Arsić I., Žugić A, Antić D.R., Zdunić G, Dekanski D, Marković G and Tadić V (2010). *Hypericum Perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae Sunflower, Olive and Palm Oil Extracts Attenuate Cold Restraint Stress – Induced Gastric Lesions. *Molecules* , 15, 6688-6698.
2. Barnes, J, Anderson A.L., Phillipson J.D. (2005) St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53: 583–600.
3. Brechner, L.M. (2008). Some effects of light quantity and quality on secondary metabolites hyperforin, pseudohypericin and hypericin, in *Hypericum perforatum*. Ανακτήθηκε από <https://docslide.com.br/documents/medicinal-and-aromatic-plants-vol-31-hypericum-the-genus-hypericum-245p.html> στις 20/05/2017.
4. Bruno A., Ferreres F., Malva J.O, Dias A.C.P (2005). Phytochemical antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry* 90 , 157-167.
5. Gitea D., Sipos M., Mircea T., Pasca B. (2010). The analysis of alcoholic extracts of *Hypericum* species by UV-VIS Spectrophotometry. Tom. XVII / 1, pp. 111-115, *Analele Universitatii din Oradea-Fasciula Biologie*.
6. Karppinen K., (2010). Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum Perforatum* L. (St John's Wort) - Precursors and genes involved. *Universitatis Ouluensis, Oulu, A* 564.
7. Müller, W.E. (2005). *St. John's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety*. Birkhäuser Verlag Basel · Boston · Berlin.

#### Ελληνική βιβλιογραφία:

1. Μαργιάννη Ε. (2011). Φυτοχημική ανάλυση εκχυλίσματος πόας υπέρικου. Ανακτήθηκε από [http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/5232/3/Nimertis\\_Margian\\_ni\(chem\).pdf](http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/5232/3/Nimertis_Margian_ni(chem).pdf) στις 20/05/2017.
2. Μιτάκης Μ. Η εθνοφαρμακολογία του υπέρικου. Ανακτήθηκε από <http://www.valsamelaio.gr/st-johns-wort/> στις 20/05/2017.
3. Ξενοφώντος Μ. (2005). Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός υπερίκινων από άγριους πληθυσμούς ειδών του γένους *Hypericum* στην Κρήτη σε σχέση με την ανάπτυξη τους και την υψομετρική διαβάθμιση. Ανακτήθηκε από [https://elocus.lib.uoc.gr/php/pdf\\_pager.php?filename=/var/www/dlib-portal//dlib/7/5/f/attached-metadata-dlib-2006xenofontos/2006xenofontos.pdf&lang=el&pageno=1&pagestart=1&width=&height=&maxpage](https://elocus.lib.uoc.gr/php/pdf_pager.php?filename=/var/www/dlib-portal//dlib/7/5/f/attached-metadata-dlib-2006xenofontos/2006xenofontos.pdf&lang=el&pageno=1&pagestart=1&width=&height=&maxpage).

#### Διαδίκτυο

1. Βικιπαίδεια, Βάλσαμο . Ανακτήθηκε από <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%AC%CE%BB%CF%83%CE%B1%CE%BC%CE%BF> στις 25/05/2017.
2. Wikipedia, *Hyperforin*. Ανακτήθηκε από <https://en.wikipedia.org/wiki/Hyperforin> στις 27/05/2017.
3. Aegean Herbs, Υπέρικο το διάτρητο. Ανακτήθηκε από <http://www.aegeanherbs.com/yperiko> στις 15/12/2017.
4. <http://www.zdravasrbija.com/lat/Dom/Basta/Zacinsko%20i%20lekovito%20bilje/247-Kantarion.php> Ανακτήθηκε στις 15/12/2017.