

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΩΝ

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΧΑΛΑΜΠΑΛΑΚΗ

ΙΑΣΟΝΑ ΔΕΡΜΙΤΖΑΚΗ



Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Αργοστόλι Κεφαλληνίας, Ιανουάριος 2021

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ

ΡΙΓΑΝΗΣ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Ηρειώτου Ευφημία

Μέλος της επιτροπής

Γεωργία Λιοσάτου

Μέλος της επιτροπής

Αθηναΐδα Μουρελάτου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μολονότι έχουν υπάρξει αντικείμενο έρευνας για εκατοντάδες έτη, τα αιθέρια έλαια εξακολουθούν να προκαλούν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των πολλαπλών ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην υγεία του ανθρώπου. Η χημική τους σύσταση αποτελείται από 2 βασικές κατηγορίες, τους τερπενικούς και τους μη τερπενικούς υδρογονάνθρακες. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής ήταν η μελέτη και έρευνα της χημικής σύστασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης με προέλευση την Ιόνια νήσο, Κεφαλονιά. Προτού γίνει η ανάλυση του αιθέριου ελαίου το παραλάβαμε από το φυτό της ρίγανης με την μέθοδο της υδραπόσταξης. Επόμενο βήμα από την παραλαβή του αιθέριου ελαίου ήταν η ανάλυση του με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (GC-MS).

Εν συνεχεία της ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ταυτοποίηση των ουσιών που περιείχε το αιθέριο έλαιο ρίγανης και η σύσταση του συγκρίθηκε με αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Πιο συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν με επιτυχία και οι 16 ουσίες που ανιχνεύτηκαν μέσω της παραπάνω μεθόδου ανάλυσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι επικρατέστερες ενώσεις που προέκυψαν, με σειρά από τη μεγαλύτερη στην μικρότερη συγκέντρωση ήταν η Carvacrol, η p-Cymene, η γ-Terpinene, η Caryophellene και η Thymol.

ABSTRACT

Although essential oils have been researched for hundreds of years, EOs are still of interest to the scientific community due to their multiple beneficial properties in human health. Their chemical composition consists of 2 main categories, terpene and non-terpene hydrocarbons. Main purpose of this dissertation is to study and research the chemical composition of oregano essential oil originating from the territory of the Ionian Island of Kefalonia. The extraction of the oil was conducted with hydrodistillation of the actual oregano plant. Following the extraction of the EO, was its analysis by the method of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Following the analysis, the substances contained in oregano essential oil were detected and identified and its composition was compared with the results of the international literature. Specifically, all 16 substances detected through the analysis method were successfully identified. According to the results, the predominant compounds that emerged, in order from the highest to the lowest concentration, were Carvacrol, p-Cymene, γ -Terpinene, Caryophellene and Thymol.

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια, Ηρειώτου Ευφημία, για τις χρήσιμες συμβουλές, την επιστημονική καθοδήγηση και για το χρόνο της που αφιέρωσε, οποιαδήποτε στιγμή που προέκυπταν απορίες και ανάγκη για διευκρινήσεις, παρά τις πολλές της υποχρεώσεις. Επιπλέον, την ευχαριστούμε που παρακολούθησε με ενδιαφέρον την πρόοδο των σπουδών μας και για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε καθώς εργαζόμασταν στο χώρο του Εργαστηρίου της Μικροβιολογίας Τροφίμων. Επιπρόσθετα, την ευχαριστούμε που μας επιτράπηκε η χρήση του μηχανήματος της αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC-MS) για τη διεκπεραίωση του πειράματος. Επίσης, θα θέλαμε να την ευχαριστήσουμε για τη παροχή του υλικού, που χωρίς αυτό δεν θα μπορούσαμε να πραγματοποιήσουμε το πείραμα μας. Τέλος, την ευχαριστούμε πάρα πολύ, γιατί παρά το πιεστικό πρόγραμμα της, μας στήριξε, μας συμπαράσταθηκε και μας καθοδήγησε σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μας εργασίας. Θεωρούμε τους εαυτούς μας πολύ τυχερούς για αυτήν την συνεργασία.

Επίσης, ευχαριστούμε θερμά τον καθηγητή Νικόλαο Κοψαχείλη και την καθηγήτρια Αικατερίνη Παπαδάκη για την πολύτιμη συμβολή και βοήθεια τους στην εκτέλεση πειραματικών εργασιών και στις αναλυτικές διεργασίες της αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC-MS) της παρούσας μελέτης που εκπονήθηκαν. Θα ήταν σημαντική παράλειψη, να μην αναφέρουμε την συνάδελφο αλλά και φίλη Δήμητρα Κλεισιάρη για την στήριξη που μας προσέφερε μέχρι το πέρας των εργασιών αλλά και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, και ο καθένας από εμάς, ξεχωριστά θα θέλαμε να ευχαριστήσει τους δικούς του ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μας. Πιο συγκεκριμένα, εγώ ο Γεώργιος Χαλαμπαλάκης θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου η οποία έστω και από μακριά βρίσκονταν συνεχώς δίπλα μου

εμψυχώνοντας, αλλά και βοηθώντας με, να συνεχίσω να προσπαθώ όταν τα πράγματα δυσκόλευαν μέσω των πολύτιμων συμβουλών τους. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου, παλιούς και νέους, για τις στιγμές που έχουμε περάσει αλλά και για τις χρήσιμες συζητήσεις και συμβουλές που μου παρείχαν κάθε φορά που τους χρειάστηκα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και προσωπικά την κυρία Ηρειώτου, που από την πρώτη στιγμή, εξακολουθεί με την ίδια όρεξη και χαρά να μου προσφέρει τις γνώσεις και τις εμπειρίες της μέσα στο εργαστήριο, προκειμένου να εφοδιαστώ με όσο το δυνατόν περισσότερη εμπειρία και γνώσεις για το μέλλον.

Με τη σειρά μου λοιπόν, εγώ ο Ιάσωνας Δερμιτζάκης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με την ανιδιοτελή στήριξη τους κατάφερα να πετύχω τους στόχους μου, την οικογένεια μου. Η λέξη ευχαριστώ είναι λίγη για να εκφράσει την ευγνωμοσύνη μου για την αδιάκοπη πίστη που έχουν σε μένα, παρά τις δυσκολίες και την απόσταση. Θα ήταν αδύνατο να μην ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους, φίλους και γνωστούς, που ζήσαμε μαζί τα τέσσερα χρόνια της φοίτησης μας, για την συμπαράσταση, την βοήθεια στην μαθησιακή διαδικασία, και την ψυχολογική υποστήριξη που παρείχαμε ο ένας στον άλλο. Σημαντική παράλειψη θα ήταν να μην αναφέρω την καθηγήτρια Ευφημία Ηρειώτου, που μέσω της διδασκαλίας Μικροβιολογίας Τροφίμων με έκανε να αγαπήσω την Επιστήμη της Τεχνολογίας Τροφίμων . Η συνεργασία μας, τα χρόνια της φοίτησης μου στο Πανεπιστήμιο θα μου είναι αξέχαστη και θα με ακολουθεί , γεμάτη γνώσεις, εμπειρία και σκληρή δουλειά.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ</u> I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ</u> II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	2
2.1 Αρωματικά φυτά-Ρίγανη	2
2.2 Το γένος <i>Oreganum</i>	4
2.3 Το είδος <i>Origanum vulgare</i>	6
2.4 Το υποείδος <i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>Hirtum</i>	7
2.5 Αιθέρια έλαια.....	9
2.6 Χρήσεις αιθέριων ελαίων.	10
2.7 Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων.	11
2.8 Αντιμικροβιακές ιδιότητες αιθέριων ελαίων.	11
2.9 Αντιμικροβιακές ιδιότητες αιθέριων ελαίων σε τρόφιμα.....	12
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ</u> III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	13
3.1 Εισαγωγή στην Αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών (GC-MS).	13
3.2 Πειραματική Πορεία (GC-MS).....	14
3.3 Δείκτες κατακράτησης Kovats	15
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ</u> IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
4.1 Αιθέριο έλαιο ρίγανης	20
Πίνακας 2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα καταγραφής RT: Retention Time (Χρόνος Κατακράτησης) και KI: Kovats Retention Index (δείκτες συγκράτησης Kovats) της αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών (GC-MS) για το αιθέριο έλαιο ρίγανης Κεφαλλονιάς.	21
Πίνακας 3: Γράφημα απεικόνισης ποσοστών περιεκτικότητας ουσιών KI.....	23
Πίνακας 4: Γράφημα απειοκόνισης ποσοστών περιεκτικότητας ουσιών KI1	24

Πίνακας 5: Γράφημα απειοκόνισης ποσοστών περιεκτικότητας ουσιών KI ²	25
Πίνακας 6: Γράφημα απειοκόνισης ποσοστών περιεκτικότητας ουσιών KI ³	26
4.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ των μελετών όσον αφορά τις βασικότερες ουσίες που διαπιστώσαμε στην ανάλυση μας.....	27
p-Cymene	29
γ-Terpinene	31
Thymol	31
b-Caryophyllene	32
Carvacrol	33
Συμπέρασμα	35
Βιβλιογραφία.....	36
Ελληνική βιβλιογραφία (Διαδίκτυο).....	36
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία. (Διαδίκτυο).....	37
Εικόνες	39

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αιθέρια έλαια τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερο αποτελούν αντικείμενο διεξοδικής έρευνας, μελέτης και επεξεργασίας από πληθώρα ερευνητών ανά τον πλανήτη. Η αναφορά τους επαναλαμβάνεται συνεχώς για τις ευεργετικές ιδιότητες που προσφέρουν αλλά και την ποικιλία χρήσης τους.

Η παραγωγή των αιθέριων ελαίων πραγματοποιείται με υδροαπόσταξη αρωματικών φυτών. Οι καλλιέργειες των συγκεκριμένων φυτών ευνοούνται στα εδάφη της Ελλάδας λόγω των συμβατών βιοκλιματικών συνθηκών που επικρατούν. Η χρήση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών κατείχε διακεκριμένη θέση ανάμεσα στους πολιτισμούς πολυαρίθμων λαών αλλά και εποχών. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την καλλιέργεια, επεξεργασία και την εμπορία των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών.

Τη σημερινή εποχή τα πολυάριθμα αρωματικά φυτά και τα αιθέρια έλαια τους χρησιμοποιούνται σε μεγάλο ποσοστό από τον άνθρωπο ως καλλυντικά, αρώματα, σε εναλλακτικές και συμπληρωματικές θεραπείες αλλά και φαρμακευτικές εφαρμογές για την αντιμετώπιση σωματικών και ψυχικών παθήσεων. Παράλληλα χρησιμεύουν και στη βιομηχανία των τροφίμων ενώ ταυτόχρονα η χρήση τους εξαπλώνεται όλο και περισσότερο εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης που υπάρχει στην αγορά για φυτικά προϊόντα.

Σκοπός της ερευνητικής διατριβής είναι ο προσδιορισμός της χημικής σύστασης και κατ' επέκταση των ευεργετικών ουσιών που περιέχονται στο αρωματικό φυτό της ρίγανης και ειδικότερα στο αιθέριο έλαιο του.

II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1 Αρωματικά φυτά «Η ρίγανη».

Τα φυτά απαρτίζονται από μια αξιοσημείωτα μεγάλη ποικιλία ειδών η οποία ανέρχεται στα 350.000 είδη. Παρόλο που τα αρωματικά φυτά κατέχουν μόλις 18.000 είδη επί του συνόλου αποτελούν μια αρκετά εξελιγμένη ομάδα ειδών του φυτικού βασιλείου. Ο όρος «αρωματικά» (aromatics) είναι αποκλειστικά εμπειρικός και χαρακτηρίζει φυτά τα οποία έχουν ευχάριστη οσμή για τον άνθρωπο και οι χρήσεις των οποίων αφορούν την παρασκευή τόσο αρωμάτων αλλά και άλλων εύοσμων προϊόντων (fragrances). (Αναπτυξιακή εταιρία δυτικής Μακεδονίας (ΑΝ.ΚΟ.) 2000).



Εικόνα 1 Φωτογραφία φύλλων *Origanum Vulgare*.

Όροι όπως “oregano”, “origan” ή “origanum” χρησιμοποιούνται σε διεθνές επίπεδο αλλά η χρήση τους δεν είναι τόσο βοτανική όσο για εμπορικούς σκοπούς. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως πολλά από τα είδη που καλλιεργούνται και διατίθενται στο διεθνές εμπόριο ως “oregano” δεν ανήκουν καν στο είδος “Origanum”. Μερικά δε από αυτά δεν συναντώνται ούτε και στην οικογένεια

Lamiaceae. Εντύπωση προκαλεί ότι για τα πραγματικά είδη του γένους “*Origanum*” χρησιμοποιούνται διαφορετικές εμπορικές ονομασίες (Bejilali 1997)

Μία αναδρομή στην βιβλιογραφία μας υποδεικνύει ότι τουλάχιστον 61 είδη από 17 γένη που ανήκουν σε 6 βοτανικές οικογένειες αναφέρονται ως “Oregano”. Απο τις διάφορες οικογένειες εκείνη της Lamiaceae συγκαταλέγεται ως η πιο σπουδαία εξαιτίας του ότι περιέχει το γένος *Origanum*, από το οποίο προέρχονται ορισμένα από τα πιο γνωστά είδη αρτυμάτων ρίγανης όπως τα (*Origanum vulgare*, *Origanum majorana* και *Origanum onites* L.). Από την οικογένεια Verbenaceae τα γένη τα οποία χρησιμοποιούνται στην Αμερική για την παραγωγή ρίγανης είναι δύο (*Lanata* και *Lippia*) με πιο διαδεδομένο την *Lippia graveolens* H.B.K.(Mexican oregano).



Εικόνα 2 *Origanum onites* L.



Εικόνα 3 *Origanum majorana*

Η σημασία των λοιπών οικογενειών (Rubiaceae, Scrophulariaceae, Apiaceae και Asteraceae) είναι περιορισμένη (Bernath, 1997). Η ονομασία ρίγανη χρησιμοποιείται στην Ελλάδα για το χαρακτηρισμό 20 εντελώς διαφορετικών φυτών τα οποία δεν έχουν καμία συγγένεια και κανένα κοινό χαρακτηριστικό με μοναδική εξαίρεση την ύπαρξη καρβακρόλης στα αιθέρια έλαια που μπορούμε παραλάβουμε από αυτά. Από αυτά τέσσερα είναι τα βασικά είδη τα οποία χρησιμοποιούνται ως αρτύματα με την ονομασία ρίγανη.

1. Το *Coridothymus capitatus* (γνωστό διεθνώς ως Ισπανική ρίγανη)
2. Το *Satureja thymbra*
3. Το *Origanum onites* (γνωστό διεθνώς ως Τουρκική ρίγανη)
4. Το *Origanum vulgare*

Από τα παραπάνω τα 3 πρώτα είδη φύονται σε περιοχές που το υψόμετρο ανέρχεται από 0 έως και 600m και ευδοκимуούν σε βλάστηση φρυγανικού τύπου. Οι διαφορές που παρουσιάζουν όσον αφορά την μορφολογική και χημική τους ποικιλότητα είναι μικρές. Στην Ελλάδα το είδος με τη μεγαλύτερη εξάπλωση και ποικιλομορφία είναι το *O. vulgare* (Kokkini και Vokou 1989, Λαγούρη 1998).

2.2 Το γένος *Origanum*

Το όνομα του γένους *Origanum* προέρχεται από τις αρχαίες ελληνικές λέξεις *όρος*=βουνό και *γάνος-εος*=λάμψη, λαμπρότητα, λαμπρό κόσμημα, δηλώνοντας ένα φυτό κόσμημα των βουνών. Το φυτό μελέτης, πέρα από ορεινές περιοχές ευδοκимуεί και σε πεδινές περιοχές εξίσου. Η κυριότητα των ειδών του γένους *Origanum* απαντάται στη ζώνη της Μεσογείου, όπου επικρατεί το 70% των ειδών. Σχετικά με την χωρική κατανομή του είδους το 75% είναι στενοενδημικά, δηλαδή περιορισμένα σε μια οροσειρά ή ένα νησί.



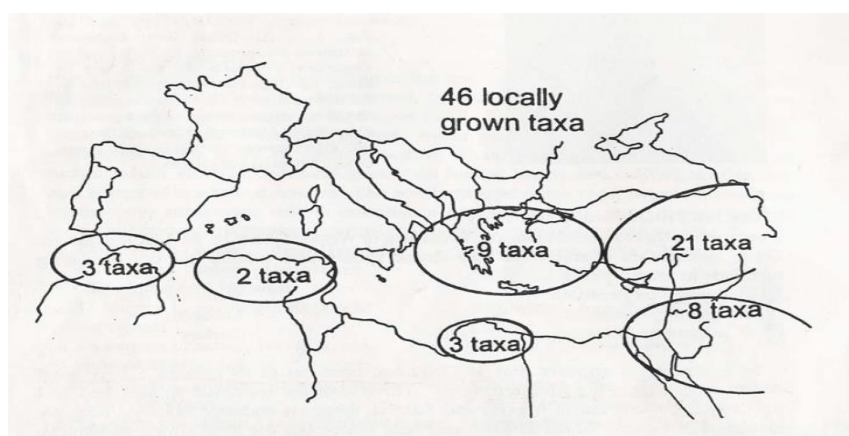
Εικόνα 4 Άγρια ρίγανη

Το γένος *Origanum* (tribe Menthae, οικογένεια Lamiaceae) χαρακτηρίζεται από μεγάλη μορφολογική και χημική ποικιλότητα. Η μορφολογική ποικιλότητα εντός του γένους οδηγεί στο διαχωρισμό 10 sections που αποτελούνται από 42 είδη ή 49 taxa (είδη, υποείδη, ποικιλίες) με τα περισσότερα από αυτά (46) να έχουν μια συγκεκριμένη τοπική κατανομή στο χώρο της Μεσογείου (Ietswaart 1980, Carlstrom 1984, Danin 1990, Danin και Kunne 1996).

Το γένος *Origanum*, διακρίνεται για τη σημαντική χημική και μορφολογική ποικιλότητα. Η ποικιλότητα εντός του γένους καταλήγει σε διαχωρισμό των ειδών σε υποείδη και ποικιλίες, με την πλειοψηφία των περισσότερων να έχουν μια συγκεκριμένη τοπική κατανομή.

Συγκεκριμένα:

- 3 taxa περιορίζονται στο Μαρόκο και στη νότια Ισπανία
- 2 taxa απαντώνται στην Αλγερία και στην Τυνησία
- 3 taxa είναι ενδημικά της Λιβύης
- 9 taxa βρίσκονται στην Ελλάδα, Νότια Βαλκάνια και Μικρά Ασία (τα 6 είναι ενδημικά της Ελλάδας)
- 21 taxa στην Τουρκία, Κύπρο, Συρία και Λίβανο (όλα ενδημικά της Τουρκίας),
- 8 taxa στο Ισραήλ, Ιορδανία και χερσόνησο του Σινά. (Σχήμα 2).



Πίνακας 1. Ταξινόμηση των ειδών στη Μεσόγειο.

Τα είδη του γένους *Origanum* είναι ημιθαμνώδη ή πολυετή ποώδη φυτά με πολλούς βλαστούς, όρθιους ή ανυψούμενους, ημιέμμισχα ή έμμισχα φύλλα και άνθη σε έλικες ομαδοποιημένα σε πυκνούς ή χαλαρούς βότρες οι οποίοι διατάσσονται σε κορυμβοειδή ή σύνθετη βοτρυοειδή ταξιανθία (Kokkini 1997)



Εικόνα 5 Μέρη φυτού ρίγανης

2.3 Το είδος *Origanum vulgare*.

Συγκριτικά με τα υπόλοιπα συγγενικά του είδη το *Origanum vulgare* παρουσιάζει την μεγαλύτερη εξάπλωση σε παγκόσμια κλίμακα. Η μορφολογική του ποικιλότητα μάλιστα είναι τόσο πλούσια που δημιουργήθηκαν πολλά και διαφορετικά ονόματα σε είδη και υποείδη από διάφορους συγγραφείς στο παρελθόν. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την σύγχυση λόγω του επικαλυπτόμενου χαρακτήρα των διακριτών γνωρισμάτων γεγονός που είχε σημαντικές επιπτώσεις μιας και το *Origanum vulgare* αποτελεί ένα σπουδαίο οικονομικά είδος. Πρόκειται για ένα είδος τα φυτά του οποίου είναι πολυετή, ξυλώδη οι βλαστοί των οποίων μπορούν να φτάσουν μέχρι και το 1 μέτρο. Οι αδένες τους μπορεί να είναι είτε εύκολα είτε δύσκολα διακριτοί ($10-2500/\text{cm}^2$) οι βότρες πυκνοί και ευδιάκριτοι από βλαστούς και κλαδιά. Αποτελούνται από επικαλυπτόμενα

βράκτια και δίχειλη στεφάνη (Kokkini κ.ά. 1991). Στην Ελλάδα βρέθηκαν 16 είδη από τα οποία διακρίθηκαν 3 υποείδη με βάση μορφολογικά χημικά και σε σημαντικό βαθμό γεωγραφικά κριτήρια, τα οποία είναι τα εξής:

- I. Πυκνότητα του τριχώματος.
- II. Παρουσία διακριτών ή μη άμμισχων αδένων σε φύλλα, βράκτια και κάλυκες.
- III. Αναλογία μήκους βρακτίων προς κάλυκα.
- IV. Χρώμα των βρακτίων και της στεφάνης.

2.4 Το υποείδος *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*

Το *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* ονομάζεται διεθνώς με τον ορό “Greek Oregano” και χρησιμοποιείται ως άρτυμα. Ανάμεσα στα taxa των οικογενειών Lamiaceae και Verbanaceae που χρησιμοποιούνται σε όλο τον κόσμο ως αρτύματα ρίγανης, κατά κοινή παραδοχή το Greek Oregano έχει την υψηλότερη ποιοτική κλίμακα. (Calprouzos 1954, Fleisher και Sneer 1982, Lawrence 1984, Fleisher και Fleisher 1988, Kokkini και Vokou 1989).

Το συγκεκριμένο taxon πρόκειται για ένα ποικιλόμορφο με αξιοσημείωτες διαφορές σε πολλά χαρακτηριστικά. Η μορφολογική ποικιλότητα του ξεχωρίζει κυρίως α) στην ποικιλότητα του τριχώματος, β) στον αριθμό των αδενικών τριχωμάτων, γ) στο μήκος των ταξιανθών, δ) στο μήκος των βρακτίων σε σχέση με τον κάλυκα και ε) στο χρώμα της στεφάνης. (Kokkini κ.ά. 1991).



Εικόνα 6 *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*

Η μελέτη των αιθέριων ελαίων διαφορετικών ελληνικών πληθυσμών του υποείδους αυτού σύμφωνα με την βιβλιογραφία έδειξε μεγάλη ποικιλότητα ως προς την περιεκτικότητα και τη σύσταση τους. Υπάρχουν εξαιρετικά υψηλές τιμές περιεκτικότητας του αιθέριου ελαίου (>7 ml / 100gr ξηρού βάρους), καταγράφηκαν στην νήσο Αμοργό, τη νήσο Κρήτη, το Γύθειο, και τη χερσόνησο του 'Αθω. (Vokou κ.ά. 1993)

Οι διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες όπου έχει προσαρμοστεί το φυτό παρατηρείται πως συνδέεται με την μεγάλη ποικιλότητα. Ένας σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την απόδοση του αιθέριου ελαίου, είναι το υψόμετρο. Υψηλότερες τιμές παρατηρούνται σε φυτά που ευδοκιμούν σε χαμηλότερα υψόμετρα και οικοσυστήματα με έδρα τη Μεσόγειο. Το εξής χαρακτηριστικό αποτελεί κανόνα για την πλειοψηφία των αρωματικών φυτών. Οι εξαιρετικά υψηλές τιμές και οι ποικιλότητα στις αποδόσεις των αιθέριων ελαίων του *Origanum vulgare*, δεν έχει αναφερθεί για κανένα άλλο είδος καθώς οφείλεται μόνο για τα φυτά του υποείδους *Hirtum*.

2.5 Αιθέρια έλαια.

Ως αιθέρια έλαια ορίζονται τα μείγματα πτητικών συστατικών (αλκοολών, αιθέρων, εστέρων, κετονών, αλδεϋδών) με χαρακτηριστική οσμή και γεύση. Παρότι ο όρος είναι πλέον καθιερωμένος μπορούμε να τον θεωρήσουμε ως παραπλανητικό καθώς η σύσταση τους δεν είναι χαρακτηριστική των ελαίων (δηλαδή μείγματα γλυκεριδίων) αλλά αποτελούνται από τερπενικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους. Επιπρόσθετα, περιέχονται και άλλες ενώσεις όπως εστέρες, αλκοόλες, οξέα, λακτόνες, ετεροκυκλικές ενώσεις κ.α.

Μεταξύ των μεθόδων παραλαβής των αιθέριων ελαίων από τα μέρη του φυτού είναι ο βρασμός και η απόσταξη και η ζύμωση παρόλο που η πρώτη μέθοδος είναι και η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την παραγωγή αιθέριων ελαίων που αποσκοπούν σε εμπορική χρήση. Όσον αφορά το σύνολο τους, έχουν καταφέρει να απομονωθούν 3.000 αιθέρια έλαια εκ των οποίων διαθέσιμα για εμπορική χρήση είναι 300 με κυριότερη χρήση στην παρασκευή αρωμάτων αλλά και στην ζαχαροπλαστική.



Εικόνα 7 Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Αρκετά χρόνια τώρα ένα πλήθος αιθέριων ελαίων έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστήμης καθώς θεωρείται ότι έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Αυτά σε συνδυασμό με την αύξηση της γοητείας για πράσινο καταναλωτισμό έχει οδηγήσει στην αναθέρμανση του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας

για τις δυνατότητες των ουσιών αυτών. Οι αντιβακτηριδιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων δεν είναι η μόνη ιδιότητα τους που διαπιστώθηκε καθώς παρατηρήθηκαν αντιικές, αντιμυκητιακές, αντιτοξικές, αντιπαρασιτικές αλλά και εντομοαπωθητικές ιδιότητες οι οποίες και συσχετίζονται με την χρησιμότητα των ουσιών αυτών στα φυτά.

Εκείνοι που πρωτοστάτησαν στην απόσταξη ως μέθοδο παραγωγής αιθέριων ελαίων ήταν οι Ινδοί, οι Πέρσες και οι Αιγύπτιοι πριν από 2000 χρόνια περίπου όμως τον 9^ο αιώνα οι Άραβες βελτίωσαν την μέχρι τότε μέθοδο απόσταξης. Η πρώτη επίσημη αναφορά στην απόσταξη έλαβε χώρα από το καταλανό φυσικό, Villanova. Η παραγωγή των αιθέριων ελαίων σε φαρμακεία τοποθετείται κατά τον 13^ο αιώνα, αλλά η χρήση τους γενικεύτηκε τον 16^ο αιώνα όπου και κάνουν την εμφάνισή τους στην αγορά του Λονδίνου.

Σύμφωνα με στοιχεία που δίνονται από το Γάλλο φυσικό Du Chesne, τον 17^ο αιώνα ήταν ήδη ευρέως διαδεδομένη η επεξεργασία και προετοιμασία των ελαίων και κάθε φαρμακείο «φιλοξενούσε» στα ράφια του 15-20 διαφορετικά είδη ελαίων. Η πρώτη προσπάθεια για μέτρηση της βακτηριακής ιδιότητας των ατμών των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε από τον De la Croix το 1881. Όμως κατά τον 19^ο και 20^ο αιώνα η ιατρική χρήση των αιθέριων ελαίων ήταν δευτερεύουσας σημασίας καθώς η χρήση τους αφορούσε κυρίως την χρήση τους στον τομέα της αρωματοποιίας αλλά και των τροφίμων (Burt, 2004).

2.6 Χρήσεις αιθέριων ελαίων.

Οι χρήσεις των αιθέριων ελαίων στην Ευρωπαϊκή Ένωση αφορούν 3 τομείς. Τον τομέα των τροφίμων όπου χρησιμοποιούνται ως γευστικά πρόσθετα, τον τομέα της αρωματοποιίας (σε κολώνιες και aftershaves) αλλά και τον τομέα της φαρμακευτικής λόγω των ιδιοτήτων των ουσιών τους. Στην πλέον γνωστή αρωματοθεραπεία γίνεται κατανάλωση λίγο παραπάνω από το 2% της συνολικής αγοράς. Σε ότι αφορά όμως τις αντιβακτηριδιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων η χρήση τους δεν σταματά σε αυτούς τους τομείς καθώς συμπεριλαμβάνονται σε

προϊόντα όπως οδοντικά νήματα και αντισηπτικά, μέχρι και ως συμπληρώματα διατροφής. Είναι γνωστή και η χρήση τους ως συντηρητικά σε διάφορα τρόφιμα τα οποία υπάρχουν ήδη στο εμπόριο.

2.7 Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων.

Η σύσταση των αιθέριων ελαίων κάποιων συγκεκριμένων ειδών φυτών παρουσιάζει αρκετές μεταβολές ανάλογα την εποχή κατά την οποία θα γίνει η συγκομιδή αλλά και η γεωγραφική θέση της χώρας από την οποία έχει γίνει η συλλογή. Αυτό εξηγεί μέχρι ένα βαθμό την επί τοις εκατό διαφοροποίηση της καρβακρόλης που είναι και η βασική αντιμικροβιακή ουσία της ρίγανης αλλά και των πρόδρομων ουσιών της σε διαφορετικούς τύπους ρίγανης ανά τον κόσμο.

2.8 Αντιμικροβιακές ιδιότητες αιθέριων ελαίων.

Η χρήση αιθέριων ελαίων ως φυσικά συντηρητικά είχε διαπιστωθεί μερικούς αιώνες πριν, εξαιτίας της ποικιλίας βοτάνων και μπαχαρικών που ο άνθρωπος παραδοσιακά χρησιμοποιούσε για την συντήρηση και γενικότερα για την παράταση ζωής των τροφίμων.

Ο συντελεστής φαινόλης μετρήθηκε το 1948 από τον Piacentini για το περγαμόντο, το πορτοκάλι και το λεμόνι και η αξία του ήταν 0,44 και για τα 3. Μια ακόμη ανακάλυψη σχετική με τα αιθέρια έλαια ήταν πως όταν έγινε η χρήση τους σε βακτήρια που πολλαπλασιάζονταν από σπόρια είχαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι της φαινόλης στην αναστολή της ανάπτυξης των συγκεκριμένων βακτηρίων.

Το 1967 ο Subba απέδειξε την δυνατότητα αναστολής των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού και του λεμονιού σε ένα αρκετά ευρύ φάσμα μικροοργανισμών που προκαλούν φθορά στα τρόφιμα και κυρίως στις ζύμες. Μερικές δεκαετίες πριν, αρκετοί ήταν οι ερευνητές οι οποίοι ανακάλυψαν ότι διάφορα αιθέρια έλαια

παρουσιάζουν αξιόλογη αναστολή σε αρκετά τροφοπαθογόνα. Εντύπωση προκαλεί όμως το ότι στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος ορισμένα αιθέρια έλαια είχαν ανασταλτική δράση υπήρχαν και κάποια η δράση των οποίων ήταν ευνοϊκή για την ανάπτυξη των εν λόγω βακτηρίων (Dean and Ritchie, 1987).

2.9 Αντιμικροβιακές ιδιότητες αιθέριων ελαίων σε τρόφιμα.

Δεν είναι λίγες οι μελέτες που καταγράφουν τον τρόπο με τον οποίο διάφορα τρόφιμα παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση εξαιτίας των αιθέριων ελαίων. Καμία όμως δεν έχει καταφέρει να καλύψει πλήρως τον μηχανισμό στον οποίο στηρίζεται αυτή η δράση παρά τις προτάσεις και υποθέσεις που έχουν γίνει αναφορικά με τις πιθανές αιτίες. Πιθανολογείται πως η μεγάλη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών στα τρόφιμα είναι υπεύθυνη για την γρηγορότερη αποκατάσταση των κατεστραμμένων κυττάρων.

Γενικότερα παρατηρείται αύξηση της ευαισθησίας των βακτηρίων έναντι των αιθέριων ελαίων όταν μειωθεί το pH, η θερμοκρασία αποθήκευσης και το ποσοστό οξυγόνου στην συσκευασία. Εικάζεται ότι σε χαμηλό pH η υδροφοβικότητα του αιθέριου ελαίου είναι υπεύθυνη για την ευκολότερη διάλυση των λιπιδίων της μεμβράνης του κυττάρου των βακτηρίων. Δηλαδή υπάρχει η εντύπωση ότι η ύπαρξη υψηλών επιπέδων λίπους και/ή πρωτεϊνών στα τρόφιμα δρουν προστατευτικά για τα βακτήρια έναντι της δράσης των αιθέριων ελαίων.

III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Εισαγωγή στην Αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών (GC-MS).

Στην αέρια χρωματογραφία GC, ο διαχωρισμός των πτητικών συστατικών βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ δυο φάσεων την στατική και την κινητή φάση. Στατική φάση είναι ένα στερεό ή ημίρρευστο υλικό διαμέσου του οποίου περνά η κινητή φάση και τα υπό ανάλυση συστατικά και αναφέρεται ως στήλη. Κινητή φάση είναι ένα αέριο στο οποίο διοχετεύεται το υπό ανάλυση μίγμα και εισάγεται στη στατική φάση για να αρχίσει ο διαχωρισμός. (Αικατερίνη Καραμανώλη Τμήμα Γεωπονίας). Η αέρια χρωματογραφία συνδυάζει την ταχύτητα της ανάλυσης, το διαχωρισμό, την ευκολία κατά τη λειτουργία της και τα άριστα ποιοτικά αποτελέσματα και τις μέτριες δαπάνες. Αξίζει να σημειωθεί πως τα συστήματα GC δεν δύνανται να επιβεβαιώσουν την ταυτότητα ή τη δομή οποιασδήποτε κορυφής

Φασματομετρία μαζών MS ονομάζεται η τεχνική που παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών και παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, ανόργανων οργανικών και βιολογικών μορίων καθώς και την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων. Το Φασματόμετρο μάζας αποτελεί έναν από τους πιο πλούσιους σε πληροφορίες ανιχνευτές. Η εξειδικευμένη κατασκευή του το καθιστά ικανό να απαιτεί μόνο μικρογραμμάρια του δείγματος για να παρέχει στοιχεία αλλά και τον ποιοτικό προσδιορισμό των άγνωστων ενώσεων όπως τη δομή, τη στοιχειώδη σύνθεση και το μοριακό βάρος. Παράλληλα εμφανίζει στοιχεία σχετικά με τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών μέσα στο κάθε δείγμα. Ο συνδυασμός GC-MS χρησιμοποιείται ευρέως με θετικές κριτικές παγκοσμίως για την λειτουργία του. Τα πλεονεκτήματα της σύζευξης είναι ότι συνδυάζει τα θετικά στοιχεία και των δυο τεχνικών, α) τον υψηλό διαχωρισμό και τη ταχύτητα ανάλυσης που διατηρείται στο GC, ενώ το

MS παρέχει και τον προσδιορισμό και τις ποσοτικές αναλύσεις κάτω του $\mu\text{g mL}^{-1}$. Απο την μεριά των μειονεκτημάτων που παρουσιάζει το GC-MS είναι η τιμή μιας μονάδας αλλά και η πολυπλοκότητα του χειρισμού σε σχέση με μια απλή GC.

Λειτουργία της Αέριας χρωματογραφίας- φασματοσκοπίας (GC-MS) Αρχικά, γίνεται εισαγωγή του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο, όπου το μίγμα των συστατικών εξαερώνεται. Τα συστατικά κινούνται μέσα στη στήλη (column) με διαφορετικές ταχύτητες που εξαερώνονται από τη τάση των ατμών τους και τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Ο διαχωρισμός τους οφείλεται στις διαφορετικές δυνάμεις συγκράτησης και έκλυσης μεταξύ των συστατικών του μείγματος και του υλικού πλήρωσης της στήλης κατά τη ροή του φέροντος αερίου. Οι ενώσεις που έχουν διαχωριστεί εισέρχονται στον φασματογράφο μάζας. Οι ουσίες που εισέρχονται στον φασματογράφο θραυσματοποιούνται παράγοντας ιόντα. Το πρωταρχικό προϊόν της διαδικασίας που λαμβάνει χώρα στο φασματογράφο είναι μονοφορτισμένα θετικά ιόντα.

3.2 Πειραματική Πορεία (GC-MS)

Η ανάλυση των αιθέριων ελαίων του *Oreganum vulgare* πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας (GC: Agilent 7890A; MS: Agilent 5977A; AS: Agilent 7693). Το κάθε δείγμα περιείχε 10 μL αιθέριου ελαίου και 240 μL εξάνιο. Ποσότητα 1 μL εκχύθηκε από κάθε δείγμα στον εισαγωγέα σε λειτουργία split (split ratio 1/50). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 280°C και του φούρνου 60°C. Κατά την ανάλυση η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 60°C για 5 min ανέβηκε στους 220 °C με ρυθμό 4 °C/min και στη συνέχεια στους 280 °C με ρυθμό 11 °C/min, όπου και παρέμεινε για 15min. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He υψηλής καθαρότητας με ροή 1ml/min. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε στην τριχοειδή στήλη HP-5MS (30*0,25*0,25). Ο τρόπος λειτουργίας βασιζόταν στον ιοντισμό πρόσκρουσης ηλεκτρονίων(70eV) και ο

ανιχνευτής ήταν ρυθμισμένος να σαρώνει σε επιλεγμένο εύρος μαζών (29-400 m/z).



Εικόνα 8 GC: Agilent 7980A & MS: Agilent 5977A & AS: Agilent 7693

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση των συστατικών πραγματοποιήθηκε καταρχήν υπολογισμός των γραμμικών δεικτών κατακράτησης, χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα υδρογονανθράκων. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των γραμμικών δεικτών κατακράτησης με αυτούς της διεθνούς βιβλιογραφίας και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασμάτων μάζας των συστατικών του δείγματος με τα φάσματα μάζας προτύπων ενώσεων και των βιβλιοθηκών φασμάτων (NIST) που υπήρχαν αποθηκευμένες στο όργανο.

3.3 Δείκτες κατακράτησης Kovats

Όταν αναλύεται το ίδιο δείγμα υπό τις ίδιες συνθήκες χρωματογραφίας, είναι λογικό να αναμένεται το ίδιο αποτέλεσμα στο χρωματογράφημα. Επομένως, όταν ένα άγνωστο δείγμα αναλυθεί με τις ίδιες συνθήκες που θα αναλυθεί ένα μίγμα

πρότυπων ουσιών, οι ουσίες στόχοι στο άγνωστο δείγμα θα είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν μετά από σύγκριση των χρόνων κατακράτησης τους με τους αντίστοιχους των προτύπων. Αξίζει να σημειωθεί πως, όταν ο χρόνος κατακράτησης μιας ουσίας σε ένα άγνωστο δείγμα με τον αντίστοιχο χρόνο μιας γνωστής συμπίπτουν, δεν είναι εφικτό να αποτελέσει ορθό κριτήριο για την ταυτοποίηση της ουσίας, παρά μόνο να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη. Δεν είναι δυνατό να ληφθεί ως τεκμήριο καθώς σε αυτό τον χρόνο εκκλουνται και άλλες ουσίες. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για την ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών που συνιστούν το προς ανάλυση δείγμα, μια σημαντική παράμετρος που μελετάται είναι ο χρόνος κατακράτησης (Retention Time - RT) της κάθε αναλυμένης ουσίας στη χρωματογραφική στήλη. Οι συνθήκες διαφέρουν από το ένα εργαστηριακό περιβάλλον στο άλλο.

Έτσι, συχνά συναντάμε αποκλίσεις και σφάλματα κατά την χρήση των απλών χρόνων παραμονής των ουσιών στη χρωματογραφική στήλη. Ενδεικτικά, στην αέριο χρωματογραφία οι συνθήκες που μπορεί να διαφέρουν είναι η θερμοκρασία, ο τύπος της στατικής φάσης, το μήκος της χρωματογραφικής στήλης, η ροή του φέροντος αερίου και άλλοι παράγοντες.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την χρήση μιας διαφορετικής παραμέτρου η οποία έχει άμεση συσχέτιση με το χρόνο παραμονής (RT) της ουσίας η οποία κατακρατήθηκε στη στήλη συγκριτικά με τον χρόνο παραμονής n-αλκανίων. Η παράμετρος αυτή δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες που επικρατούν στο εργαστήριο με αποτέλεσμα την εξάλειψη των αποκλίσεων και την παροχή σταθερών και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Η δυνατότητα τροποποίησης αυτού του συστήματος σε συνθήκες μη σταθερής θερμοκρασίας, επιτρέπει τη χρήση των αποτελεσμάτων που έχουν μετρηθεί σε κάποιο εργαστήριο και από κάποιο άλλο. Αυτό το σύστημα συνδυάζει δυο βασικότερες ιδιότητες της αέριας χρωματογραφίας και αυτές δεν είναι άλλες από το σχετικό χρόνο κατακράτησης και τον ειδικό όγκο κατακράτησης. Θα μπορούσαμε να πούμε μεταφορικά πως ο Kovats πρότεινε ένα χημικό κανόνα με σκοπό να χαρακτηρίσει τις διαφορετικές

χημικές ενώσεις με βάση μια κλίμακα ειδικού χρόνου στοχεύοντας την ταυτοποίηση των ενώσεων (Καραστέργιου Ελένη Αστ, 2015). Ο δείκτης κατακράτησης Kovats για τα κανονικά αλκάνια παίρνει την τιμή του γινομένου του αριθμού ατόμων άνθρακα επί 100. Δηλαδή το επτάνιο θα έχει 700, κ.ο.κ. (ανεξάρτητα από τον τύπο της στήλης και τη θερμοκρασία της). Μια ουσία, η ταυτότητα της οποίας είναι άγνωστη και εκλύεται ανάμεσα σε δύο διαδοχικά αλκάνια, θα έχει και δείκτη κατακράτησης μεταξύ των δύο δεικτών κατακράτησης αλκανίων (οι δείκτες κατακράτησης των υπολοίπων ουσιών—εκτός των κ. αλκανίων—εξαρτώνται από τον τύπο της στήλης και τη θερμοκρασία).

Έτσι γίνεται χρήση μιας άλλης παραμέτρου, η οποία σχετίζεται με το χρόνο παραμονής (RT) της ουσίας στη στήλη σε σχέση με τον χρόνο παραμονής n-αλκανίων, αλλά είναι ανεξάρτητη των εργαστηριακών συνθηκών, εξαλείφοντας τις αποκλίσεις και παρέχοντας σταθερά κι επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Πρώτος ο Kovats πρότεινε το Σύστημα Δεικτών Κατακράτησης (Kovats' Retention Index System) και η τροποποίηση του σε συνθήκες θερμοκρασίας που δεν είναι σταθερή, επιτρέπει τα αποτελέσματα που έχουν μετρηθεί σε κάποιο εργαστήριο να χρησιμοποιηθούν από κάποιο άλλο. Το σύστημα αυτό συνδυάζει δύο θεμελιώδεις ιδιότητες της αέριου χρωματογραφίας: το σχετικό χρόνο κατακράτησης και τον ειδικό όγκο κατακράτησης. Μεταφορικά θα λέγαμε, ότι ο Kovats πρότεινε ένα χημικό κανόνα για να χαρακτηρίσει διαφορετικές χημικές ενώσεις με βάση μια κλίμακα ειδικού χρόνου με στόχο την ταυτοποίηση των ενώσεων (Καραστέργιου Ελένη Αστ, 2015).

Ο δείκτης κατακράτησης Kovats για τα κανονικά αλκάνια παίρνει την τιμή του γινομένου του αριθμού ατόμων άνθρακα επί 100. Δηλαδή το επτάνιο θα έχει 700, κ.ο.κ. (ανεξάρτητα από τον τύπο της στήλης και τη θερμοκρασία της). Μια άγνωστη ουσία η οποία εκλύεται μεταξύ δύο διαδοχικών αλκανίων, θα έχει δείκτη κατακράτησης ανάμεσα στους δυο δείκτες κατακράτησης των αλκανίων

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην Κεφαλονιά όπου και έγινε η ξήρανση τους. Ύστερα ακλούθησε η υδραπόσταξη για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων από το φυτικό υλικό.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην συγκεκριμένη ενότητα θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα που αφορούν την χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου που απομονώθηκε από το αρωματικό φυτό της *Oreganum vulgare*, στην Ιόνιο νήσο, την Κεφαλονιά.

Η απομόνωση του αιθέριου ελαίου από το αρωματικό φυτό της ρίγανης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υδραποσταξης. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας φασματομετρίας μαζών, ώστε με αυτό τον τρόπο να εξαχθεί ένα σύνολο κορυφών, γνωστό ως χρωματογράφημα. Η ταυτοποίηση των κορυφών κάθε χρωματογραφήματος (δηλαδή η απεικόνιση της απόδοσης των κορυφών σε γνωστές οργανικές χημικές ενώσεις) επετεύχθητε ύστερα από σύγκριση των αέριων χρωματογραφημάτων μιας σειράς προτύπων ενώσεων ή “standards”. Αξίζει να αναφερθεί ότι ταυτοποιήθηκε επιτυχώς η πλειοψηφία των κορυφών σε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό 99,99% για το δείγμα αιθέριου ελαίου ρίγανης από την Κεφαλονιά.

Η σημασία της ταυτοποίησης της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς πρόκειται να αναδείξει πιθανές ιδιαιτερότητες του αγνού
ελαίου.

4.1 Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Ο παρακάτω Πίνακας απεικονίζει συγκεντρωτικά αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μαζών (GC-MS) για το αιθέριο έλαιο ρίγανης Κεφαλονιάς. Γίνεται εύκολα αντιληπτό από τον παρακάτω πίνακα ότι από τις 16 ουσίες που βρεθήκαν στο δείγμα ρίγανης, οι 16 ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς. Οι ταυτοποιήσεις έγιναν συγκρίνοντας το RI των ουσιών σε σχέση με την διεθνή βιβλιογραφία και κυρίως σε σχέση με τον Adams, 2001.

Στον Πίνακα 2 μπορεί να παρατηρηθεί η σύγκριση των ουσιών που βρεθήκαν σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία. Η διαδικασία αυτή έχει ως σκοπό την εξακρίβωση των αποτελεσμάτων. Όπως είναι φανερό, κατά την ανάλυση οι πιο γνωστές ουσίες όπως Carvacrol, p-Cymene, gamma-Terpinene, b-Caryophyllene, Thymol εντοπίστηκαν σχεδόν από όλους. Αξίζει να αναφερθεί πως παρά το γεγονός ότι όλα τα επιστημονικά άρθρα είχαν κοινές κάποιες ουσίες δεν παρουσιάζουν απόλυτη ταύτιση ούτε τα ίδια μεταξύ τους αλλά ούτε και με την παρούσα διατριβή.

Πιο συγκεκριμένα ουσίες που βρέθηκαν στις υπόλοιπες μελέτες δεν ανιχνεύτηκαν και από την διεξαχθείσα μελέτη. Η χημική ουσία Carvacrol, αποτέλεσε το κορυφαίο αποτέλεσμα στο δείγμα με διαφορά έναντι στις υπόλοιπες 15 ουσίες που περιέχονται στο δείγμα ρίγανης. Το αποτέλεσμα της αέριας χρωματογραφίας 57,34% για την Carvacrol ήταν πάνω από το μισό δείγμα. Δεύτερη σε περιεκτικότητα ουσία που εντοπίζεται στο δείγμα αιθέριου ελαίου είναι η p-Cymene, με αρκετή διαφορά από την Carvacrol, μόλις 8,45%, ενώ Τρίτη είναι η γ-Terpinene με ποσοστό 6,85%. Τέταρτη σε φθίνουσα σειρά βρέθηκε η Caryophyllene με 5,58% και η Thymol 5,4%.

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα καταγραφής RT: Retention Time (Χρόνος Κατακράτησης) και KI: Kovats Retention Index (δείκτες συγκράτησης Kovats) της αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών (GC-MS) για το αιθέριο έλαιο ρίγανης Κεφαλλονιάς.

Ουσίες	RT	KI	KI ¹	KI ²	KI ³	KI ⁴	Ποσοστό %
1. β-Pinene	6.670	-	979	912	-	974	1,17
2. α-Terpinene	7.865	1015	1018	961	1019	1014	1,34
3. p-Cymene	8.122	1022	-	-	1028	1020	8,45
4. Limonene	8.258	1025	1030	-	1031	1024	1,04
5. Eucalyptol	8.530	1028	1034	988	-	1026	1,94
6. γ-Terpinene	9.302	1053	1059	1016	1062	1054	6,85
7. Linalool	10.790	1093	1101	1076	1099	1095	3,73
8. Camphor	12.554	1139	-	-	-	1141	1,56
9. Borneol	13.389	1162	1176	1154	1168	1165	1,65
10. Terpinen-4-ol	13.882	1175	1183	1171	1179	1174	1,15
11. α-Terpineol	14.451	1190	1198	1118	1191	1186	1,37
12. Carvacrol, methyl ether	16.657	1244	-	1253	1246	1241	0,59
13. Thymol	18.691	1292	1294	1316	1294	1289	5,4
14. Carvacrol	19.290	1307	1302	1330	1309	1298	57,34
15. Caryophyllene	23.945	1419	1426	1467	1419	1417	5,58
16. α-Humulene	25.308	1454	1462	-	-	1452	0,83
Total identified							99,99

Προέλευση:

KI¹: Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan

H.Y.Gong, W.H.Liu G.Y.Lv, Xiaoying Zhou

KI²: Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil

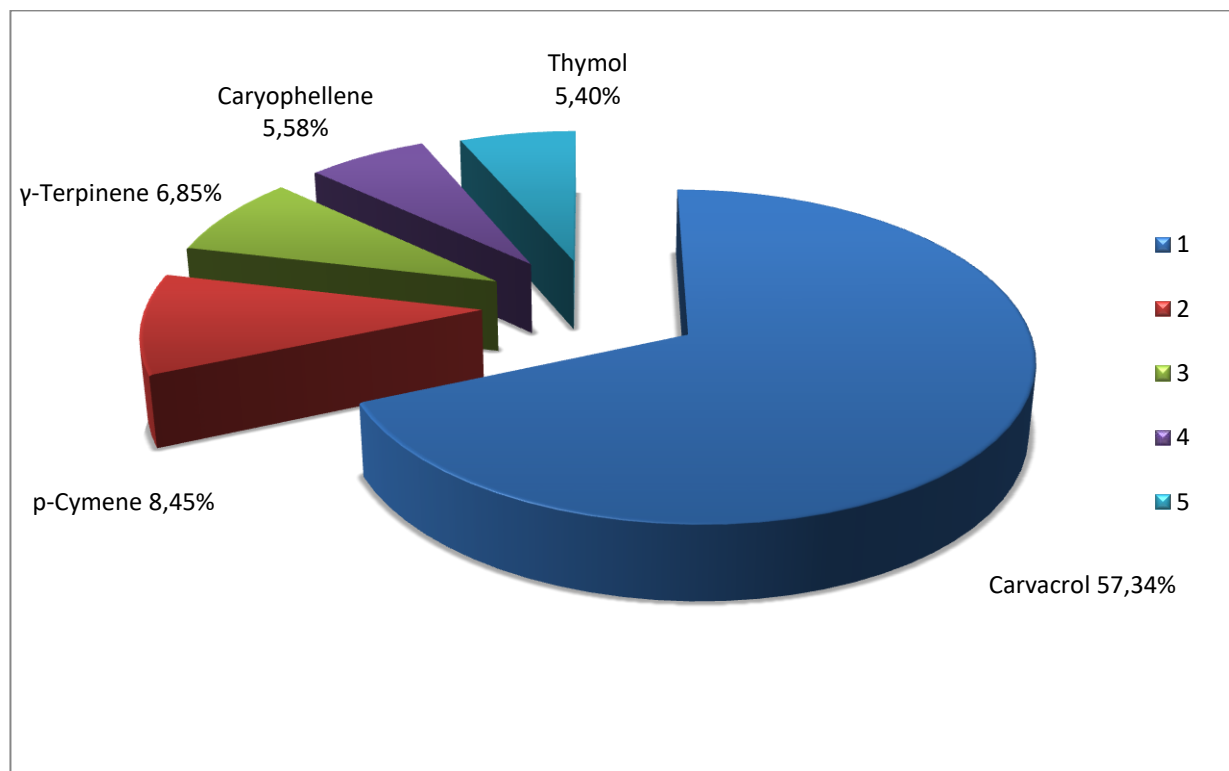
Bárbara Teixeira António Marques Cristina Ramos Carmo Serrano Olívia Matos Nuno R Neng José M F Nogueira Jorge Alexandre Saraiva Maria Leonor Nunes

KI³: EVALUATION OF A GC-MS METHOD FOR THE ANALYSIS OF OREGANO ESSENTIAL OIL COMPOSITION

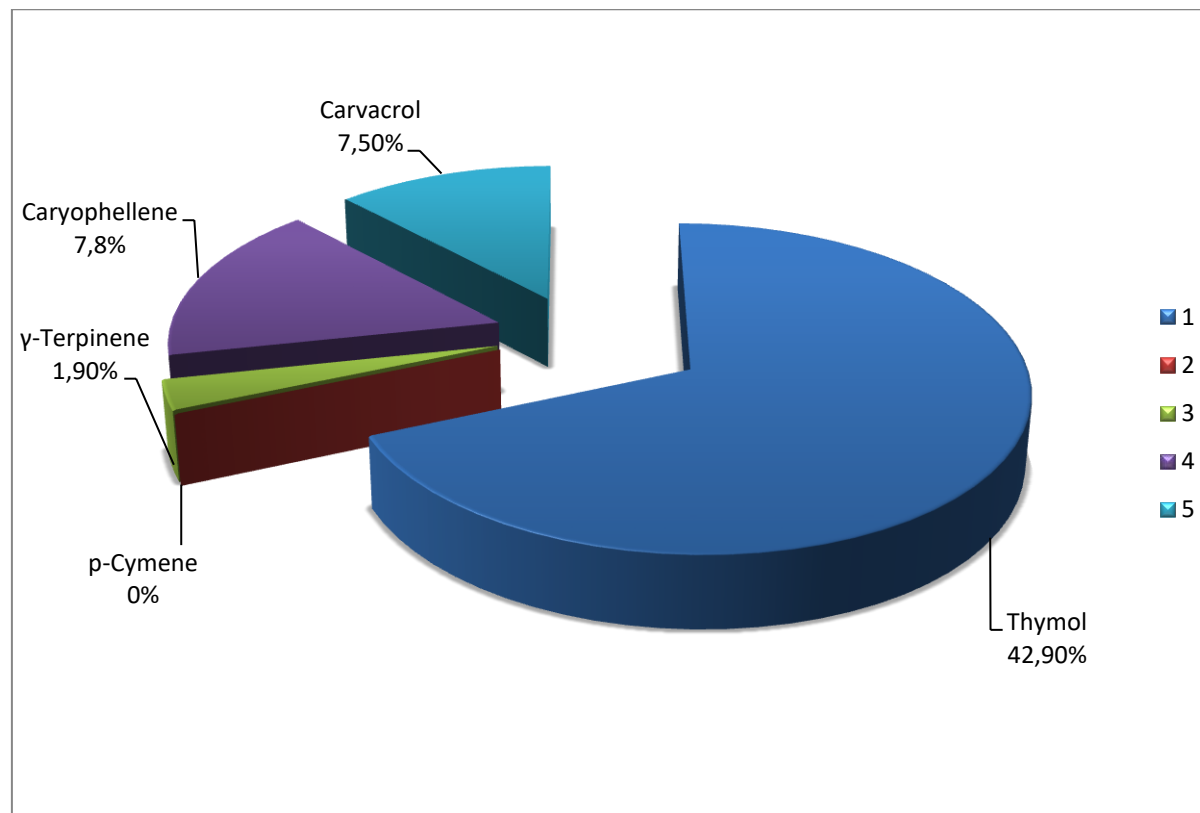
Ivan LJ. Milovanović, Aleksandra Č. Mišan , Marijana B. Sakač , Ivana S. Čabarkapa, Bojana M. Šarić , Jovana J. Matić, Pavle T. Jovano

KI⁴: Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, 4th Edition Robert P. Adam

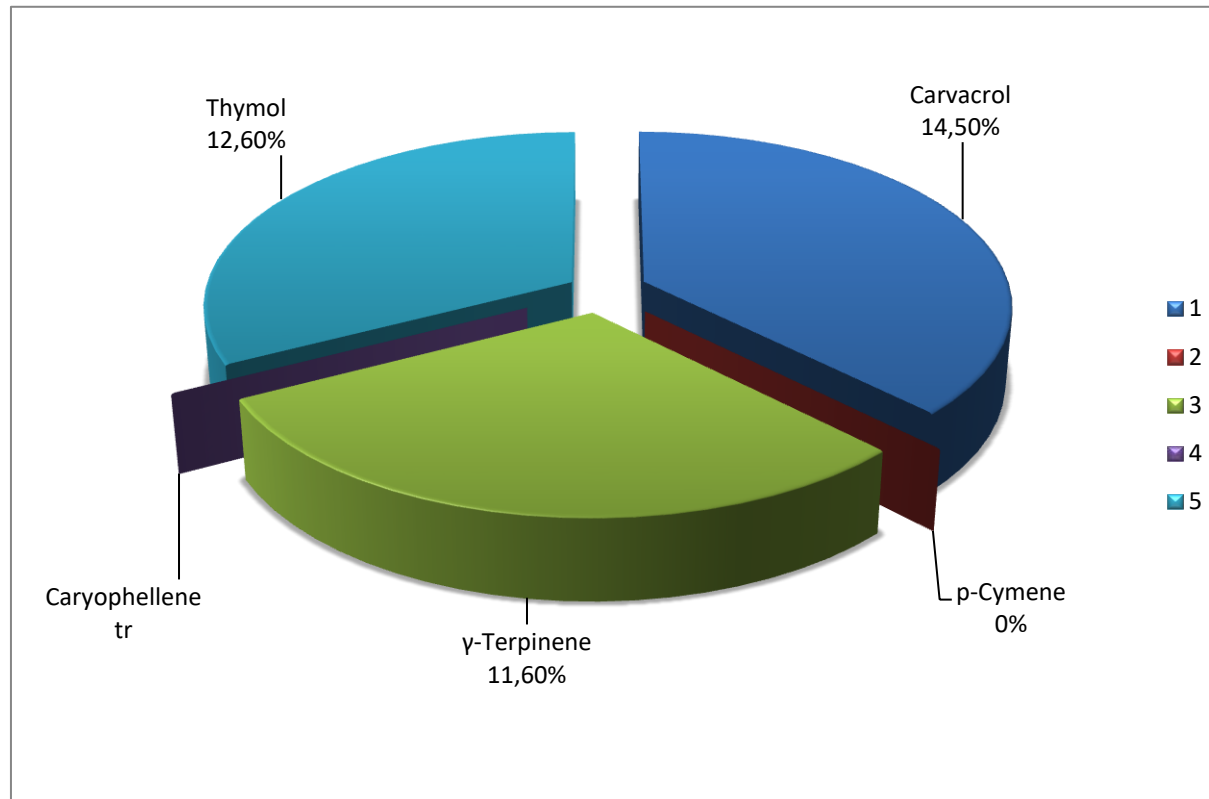
Πίνακας 2: Γράφημα απεικόνισης ποσοστών περιεκτικότητας ουσιών ΚΙ



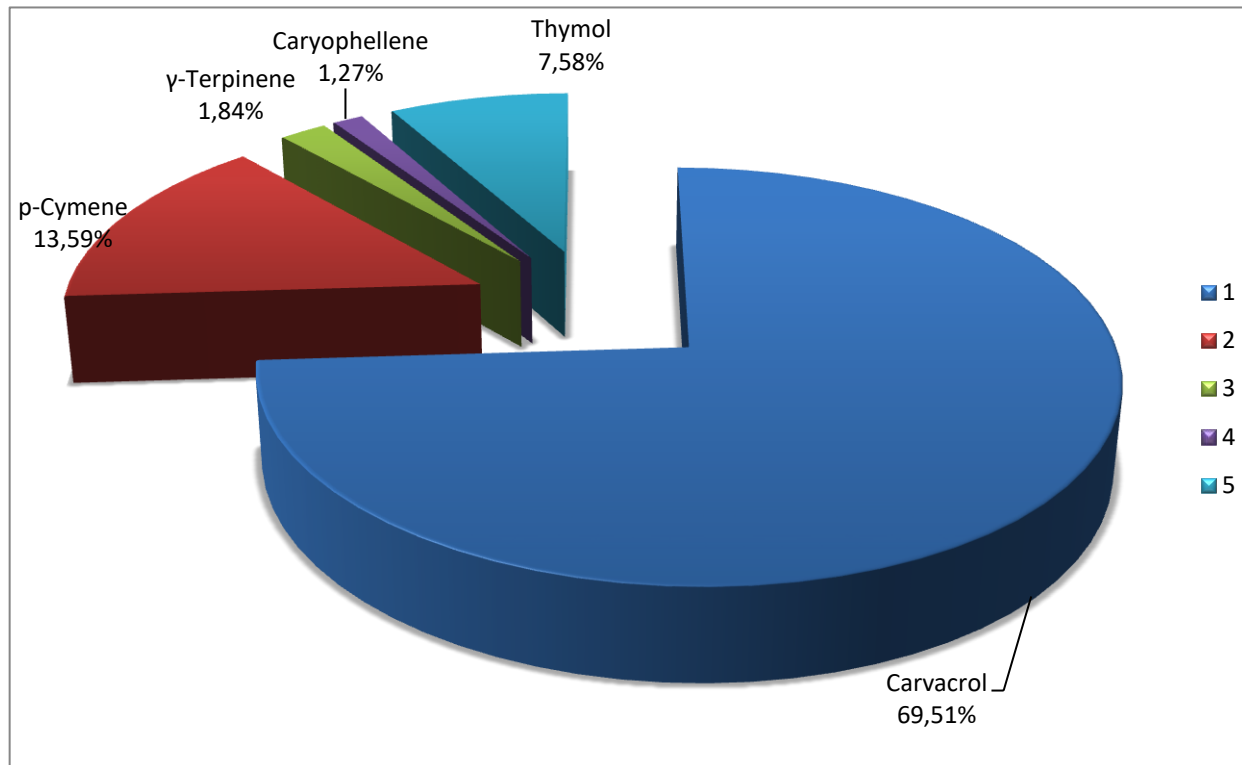
Πίνακας 3: Γράφημα απεικόνισης ποσοστών περιεκτικότητας ουσιών ΚΙ¹



Πίνακας 5: Γράφημα απεικόνισης ποσοστών περιεκτικότητας ουσιών ΚΙ²



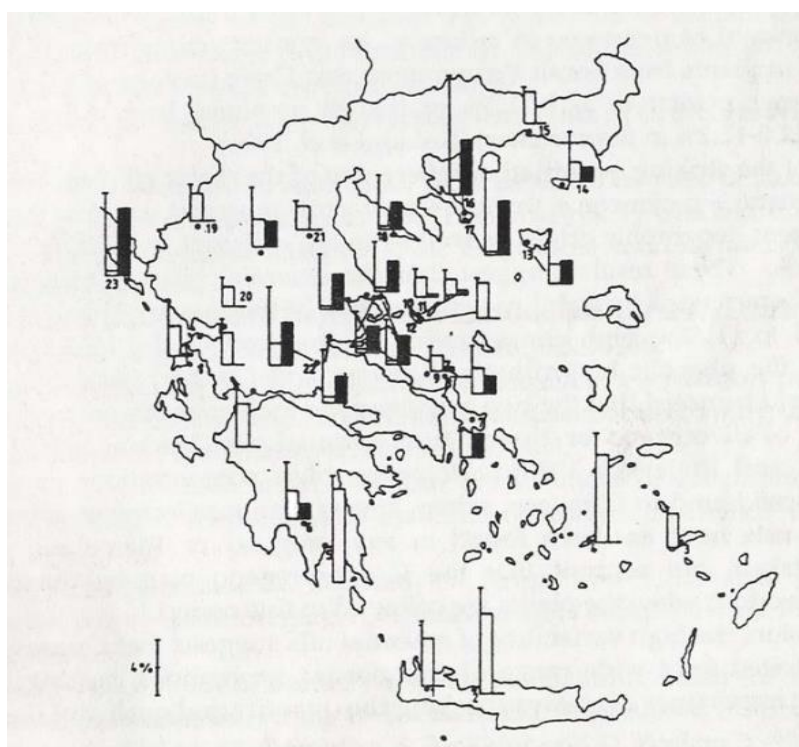
Πίνακας 6: Γράφημα απεικόνισης ποσοτών περιεκτικότητας ουσιών ΚΙ³



4.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ των μελετών όσον αφορά τις βασικότερες ουσίες που διαπιστώσαμε στην ανάλυση μας.

Στην μελέτη της πηγής ΚΙ 1 τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσίασαν διαφορές συγκριτικά με τις περιεκτικότητες των αποτελεσμάτων της δικής μας ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, οι επιστήμονες της συγκεκριμένης μελέτης σύμφωνα με τα δεδομένα τους διαπίστωσαν ότι η βασική ουσία στο έλαιο τους ήταν η θυμόλη με ποσοστό 42,9%. Η Caryophellene ταυτοποιήθηκε ως η δεύτερη σε περιεκτικότητα ουσία με ποσοστό 7,8%. Τρίτη σε σειρά ουσία είναι η Carvacrol όπου η μεγαλύτερη τιμή της ήταν στο 7,5%. Όσον αφορά τις ουσίες p-Cymene & γ-Terpinene η πρώτη δεν ταυτοποιήθηκε από την παρούσα μελέτη στο συγκεκριμένο δείγμα και η δεύτερη βρέθηκε σε ποσοστό 1,9%.

Εικόνα 9 Περιεκτικότητα και σύσταση των αιθέριων ελαίων του *O. vulgare hirtum* σε καρβακρολη (ασπρες μπάρες) και θυμόλη [μαύρες μπάρες (Vokou κ.ά.1993)]



Σύμφωνα με το παραπάνω πίνακα μπορούμε να διακρίνουμε ότι όσον αφορά την περιεκτικότητα της καρβακρόλης στο έλαιο το οποίο αναλύσαμε, στις νοτιότερες περιοχές της χώρας είναι αρκετά μεγαλύτερη τις θυμόλης ενώ μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις ήταν και η μοναδική βασική ένωση. Αντίθετα αν κοιτάξουμε βορειότερα θα διαπιστώσουμε ότι η βασική ένωση είναι η θυμόλη και όχι η καρβακρόλη. Παρά τις μελέτες που έγιναν στους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες δεν βρέθηκε κάποιος ο οποίος να εξηγεί αυτή την τόσο μεγάλη διαφορά στην κυριαρχία είτε της θυμόλης είτε της καρβακρόλης. Όσον αφορά την πηγή KI 1 η οποία ασχολήθηκε με την ανάλυση αιθέριου ελαίου από περιοχές της Κίνας η οποία γεωγραφικά βρίσκεται βορειότερα της Ελλάδας γεγονός το οποίο με βάση την παραπάνω εικόνα μπορεί να εξηγήσει και την επικράτηση της θυμόλης ως της κύριας ένωσης του ελαίου που ανέλυσε η συγκεκριμένη επιστημονική ομάδα.

Όπως και με την πηγή KI 1 έτσι και με την πηγή KI 2 εμφανίζονται αρκετές διαφορές συγκριτικά με τα αποτελέσματα της μελέτης μας. Συγκεκριμένα στο παρόν έλαιο η επικρατέστερη ουσία ήταν η καρβακρόλη όμως σε ποσοστό αναλογικά πολύ μικρότερο με την μελέτης μας και περισσότερο θα λέγαμε ότι δεν πρόκειται για μία επικρατέστερη ουσία αλλά για 3. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί και από τα στατιστικά στοιχεία της γραφικής παράστασης στην εικόνα 11. Δηλαδή οι τρεις αυτές ουσίες είναι η Carvacrol, η Thymol και η γ -Terpinene η οποίες ανιχνεύτηκαν σε ποσοστά 14,5%, 12,6% και 11,6% αντίστοιχα. Όπως και στο ακριβώς παραπάνω η p-Cymene δεν ταυτοποιήθηκε με μοναδική διαφορά ότι υπήρξε ταυτοποίηση της Caryophellene αλλά σε ποσότητα μερικών ιχνών.

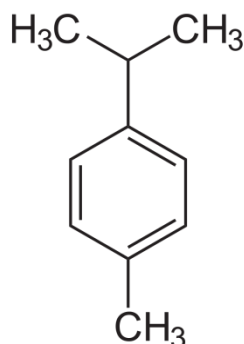
Τέλος τα αποτελέσματα που παρουσίασε η συγκεκριμένη μελέτη είναι τα εκείνα με την μεγαλύτερη συνάφεια με εκείνα της δικής μας. Συγκεκριμένα η Carvacrol ήταν η επικρατέστερη ουσία, όμοια δηλαδή με την μελέτη μας σε ποσοστό 69,51%. Το ίδιο ισχύει και για τις ουσίες p-Cymene και Thymol όπου βρέθηκαν δεύτερη και τρίτη σε περιεκτικότητα με ποσοστά 13,59% και 7,58%

αντίστοιχα. Τέλος οι ουσίες γ-Terpinene και p-Cymene ήταν εκείνες με την μικρότερη περιεκτικότητα με ποσοστά 1,84% για την γ-Terpinene και 1,27% για την Caryophellene.

p-Cymene

Τα αποστάγματα φυτών και οι δευτερογενείς μεταβολίτες τους είναι πλούσιες πηγές αντιμικροβιακών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των “coumarins”, “psoralens”, acetylenes, φλαβονοϊδών και μη φλαβονοϊδών τερπενίων. Τα μονοτερπένια είναι τα πιο σημαντικά συστατικά των αιθέριων ελαίων που παράγονται μέσω της υδραπόσταξης βρώσιμων αρωματικών φυτών. Η p-Cymene είναι ένας αλκυλ-υποκατεστημένος αρωματικός υδρογονάνθρακας που βρίσκεται στη φύση. Ο βενζοϊκός δακτύλιος του διαθέτει το υποκατάστατο ενός μεθυλίου και μίας ισοπροπυλομάδας, η οποία θεωρείται η πιο σημαντική ένωση μονοτερπενίου που εμφανίζεται στα αρωματικά φυτά, όπως το θυμάρι και τη ρίγανη. Η συγκεκριμένη ένωση παρουσιάζει μια ποικιλία βιοδραστηριοτήτων που περιλαμβάνουν, αντιοξειδωτικές, αντιαλγαισθητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξυλυτικές, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Πιο αναλυτικά, η p-Cymene είναι μια αρωματική ένωση που ανήκει στα μονοτερπένια. Είναι ένα προϊόν ιδιαίτερης σημασίας με μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί θεμελιώδες συστατικό πολλών καλλυντικών, αρωμάτων, και φαρμακευτικών προϊόντων. Παράλληλα, είναι γνωστό συστατικό πολλών αιθέριων ελαίων στα οποία συμπεριλαμβάνεται και το έλαιο ρίγανη



Εικόνα 10 Συντακτικός τύπος p-Cymene

(Πηγή:<https://en.wikipedia.org/wiki/P-Cymene>)

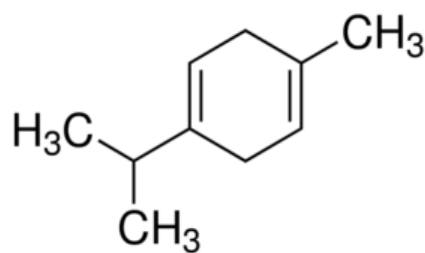
Η p-Cymene έχει σημαντική βιομηχανική αξία. Η εφαρμογή της ως διαλυτικό βαφών και βερνικιών και ως μέσο μεταφοράς θερμότητας αποτελεί ένα παράδειγμα. Επίσης, χρησιμοποιείται ενδιάμεσο συστατικό για την παρασκευή ζιζανιοκτόνων, μυκητοκτόνων, αρωμάτων, καρυκευμάτων, φαρμακευτικών προϊόντων, κ.λ.π. Επιπλέον, αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση της π-κρεσόλης, η οποία μετασχηματίζεται περαιτέρω στη 2,6-δι-*t*-βουτυλο-π-κρεσόλη που χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιοξειδωτικό συστατικό. Επιπροσθέτως, η p-Cymene χρησιμοποιείται στη σύνθεση πολλών πολυμερών (συνθετικών ινών, αντισηπτικών, κ.α.), όπως για παράδειγμα το πολυαιθυλοτερεφθαλικό οξύ, το οποίο παράγεται από την οξείδωση της p-Cymene. Αξίζει να σημειωθεί, ότι λαμβάνει μέρος και στη σύνθεση πολυκυκλικών ενώσεων οι οποίες χρησιμοποιούνται στην αρωματοβιομηχανία. Τέλος, η p-Cymene χρησιμοποιείται και ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση μη-νιτρικών αρωμάτων, τα οποία έχουν αντικαταστήσει τα περισσότερα, αντίστοιχα νιτρικά αρώματα (Καμίτσου Μαρία Δ., 2013).

Όσον αφορά στις ευεργετικές ιδιότητες της στον άνθρωπο, η p-Cymene έχει αντιβακτηριακή δράση και είναι αποτελεσματική έναντι των παθογόνων

βακτηρίων. Επίσης, έχει αντιμυκητιακή δράση και είναι γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρωματικό συστατικό (ayurvedicoils).

γ-Terpinene

Τα τερπενένια είναι μια ομάδα ισομερών υδρογονανθράκων που ταξινομούνται ως μονοτερπένια. Καθένας έχει τον ίδιο μοριακό τύπο και πλαίσιο άνθρακα, αλλά διαφέρουν στη θέση των διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα. Τα γ-Terpinene και δ-terpinene (επίσης γνωστά ως terpinolene) έχουν απομονωθεί από μια ποικιλία φυτικών πηγών. Είναι όλα άχρωμα υγρά με οσμή τύπου τερεβινθίνης.

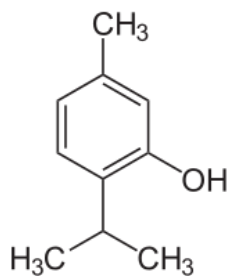


Εικόνα 11 Συντακτικός τύπος γ-Terpinene

(Πηγή: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/223190?lang=en®ion=GR>)

Thymol

Η θυμόλη αποτελεί ένα οξυγονωμένο μονοτερπένιο, το οποίο είναι φαινολικό παράγωγο του κυμένιου. Ο χημικός της τύπος είναι C₁₀H₁₄O και η χημική της δομή η εξής:



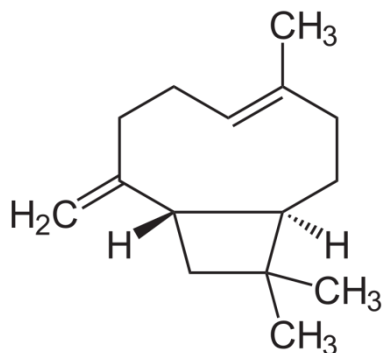
Εικόνα 12 Συντακτικός τύπος Thymol.

(Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Thymol>)

Έχει αποδεδειγμένα ισχυρή αντιμυκητιακή δράση. Πιο συγκεκριμένα μερικοί από τους μύκητες που μπορεί να αναστείλει αποτελεσματικά είναι εκείνοι των γενών *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* και *Epidermophyton*. Επιπλέον έχει αποδειχθεί πως έχει και αντιβακτηριδιακή δράση. Μερικά από τα βακτήρια που αναστέλλει με τη δράση της είναι τα ευρέως γνωστά, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Μέσα στις λειτουργίες της θυμόλης συμπεριλαμβάνεται και η αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο (σε ποντίκια) έδειξε αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και επουλωτική δράση στα τραύματα. Τέλος, οι ιδιότητες της θυμόλης είναι εκκριματολυτικές, αποχρεμπτικές και αντιβηχικές.

b-Caryophyllene

Η καρνοφυλίνη ή το β-καρνοφυλένιο όπως είναι διαδεδομένη είναι ένα φυσικό δικυκλικό σεσκιτερπένιο το οποίο συναντάται σε αρκετά αιθέρια έλαια και κυρίως σε εκείνο του γαρύφαλλου το έλαιο του οποίου προέρχεται από τα άνθη και τους στήμονες του *Syzygium aromaticum*.



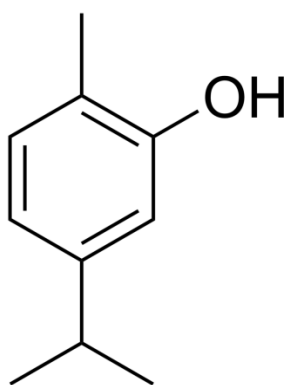
Εικόνα 13 Συντακτικός τύπος b-Caryophyllene.
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Caryophyllene>)

Επιπλέον συναντάται στο αιθέριο έλαιο της κάνναβης, του λυκίσκου αλλά και του δενδρολίβανου. Συνήθως συναντάται ως ένα δείγμα ισοκαρυοφυλίνης και α-χουμουλενίου. Η καρυοφυλίνη είναι γνωστή για το ότι έχει ένα κυκλοβουτανικό δακτύλιο. Είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική μυρωδιά του μαύρου πιπεριού και βοηθάει στην ανάπτυξη αντοχής έναντι των χαμηλών θερμοκρασιών.

Carvacrol

Η καρβακρόλη είναι μια ισοπροπυλενική φαινόλη η αντιμικροβιακή ιδιότητα της οποίας έχει μελετηθεί από πολλούς επιστήμονες. (Kim *et al.*, 1995; Karatzas *et al.*, 2001; Roller and Seedhar, 2002; Kisko and Roller, 2005; Ait-Ouazzou *et al.*, 2011). Όπως και τα υπόλοιπα συστατικά των αιθέριων ελαίων έτσι και η καρβακρόλη παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλει την ανάπτυξη αρκετών στελεχών βακτηρίων (π.χ. *Escherichia coli* και *Bacillus cereus*). Η χαμηλή του τοξικότητα, μαζί με την ευχάριστη γεύση και τη μυρωδιά του, υποδηλώνει τη χρήση του ως πρόσθετου τροφίμων για την πρόληψη της βακτηριακής μόλυνσης. Επίσης, έχει αντιμυκητιακή και αντιφλεγμονώδη

δράση, βοηθάει στην χοληστερόλη, θέτει υπό έλεγχο τα επίπεδα του αίματος. Παράλληλα, σε μια διεθνή μελέτη, έχει αναφερθεί πως η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης προς το *Clostridium perfringens*, *P. aeruginosa*, και του *S. Aureus* σχετίζεται με την παρουσία της ουσίας Καρβακρόλης. (Andreou et al., 2011; Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001)



Εικόνα 14 Συντακτικός τύπος Carvacrol.
(Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carvacrol>)

Το κυτταρικό τοίχωμα θεωρείται ως ο κύριος “στόχος” της καρβακρόλης. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τις ιδιότητες της εξωτερικής στοιβάδας. Προκαλεί μετατροπές στη μορφολογία το κυττάρου, το καθιστά διαπερατό και εξαλείφει τις βαθμίδες του pH. Προκαλεί επίσης τη διαρροή των ανόργανων ιόντων αλλά και την απώλεια του δυναμικού μεμβράνης. Τέλος, είναι υπεύθυνη για την διατάραξη των λιπιδικών κλασμάτων των βακτηριακών κυτταροπλασματικών μεμβρανών.

Συμπέρασμα

Η χρήση των αιθέριων ελαίων που περιλαμβάνονται από την πλυθώρα αρωματικών φυτών ήταν άρικτα συνδεδεμένη με την καθημερινή ζωή πολλών πολιτισμών της αρχαιότητας. Τη σημερινή εποχή, όλο και πιο συχνά χρησιμοποιούνται και διεξάγονται έρευνες για αυτά. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, προσπαθήσαμε να γνωστοποιήσουμε και να αναλύσουμε την χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου με την αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) του δείγματος ρίγανης *Oreganum vulgare* από τη Κεφαλονιά. Αφού ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση του, ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με διεθνή βιβλιογραφία και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει βιολειτουργικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, στο αιθέριο έλαιο της ρίγανης από την Κεφαλονιά ταυτοποιήθηκαν 16 ουσίες, με κυριότερες τις p-Cymene, gamma-Terpinene, b-Caryophyllene, και Thymol. Σε σύγκριση με την διεθνή βιβλιογραφία, οι ουσίες αυτές βρέθηκαν κοινές και σε παρόμοιες αναλύσεις του αιθέριου ελαίου της ρίγανης με ελάχιστες διαφορές σε συγκέντρωση, και σχεδόν πάντα κυριότερη την ουσία Carvacrol. Η χημική σύσταση των ελαίων εμφανίζει κάποιες εξατομικευμένες διαφορές μεταξύ τους η οποία οφείλεται στο χημειότυπο. Υπάρχουν πάρα πολλοί χημειότυποι που επηρεάζονται από άλλους, επίσης πολλούς παράγοντες οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν τις διαφορές στη σύσταση μεταξύ των ελαίων που παρατηρήσαμε στην σύγκριση των αποτελεσμάτων των μας με την διεθνή βιβλιογραφία. Μερικοί από αυτούς είναι ο γενετικός παράγοντας, η εποχή και η ώρα συγκομιδής του φυτού, η γεωγραφική κλιματική ποικιλότητα, η θερμοκρασία, το διαθέσιμο νερό και διάφορες χημικές και μηχανικές βλάβες.

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία (Διαδίκτυο)

- Δήμητρα Ευτέρπη Κ. Σωτηροπούλου..Μελέτη ανάπτυξης αποδόσεων και τεχνολογικών χαρακτηριστικών ρίγανης (*Origanum heracleoticum* = *O. Vulgare* ssp *hirtum*) σε διαφορετικά επίπεδα αζώτου. Διδακτορική διατριβή Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
<https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/22041#page/1/mode/2up>
- Καμίτσου Μαρία Δ., 2013. Ανάπτυξη Στερεών Καταλυτών για την Παραγωγή π-Κυμενίου από Λεμονένιο. Διπλωματική εργασία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών. [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση Πρόσβασης:
<http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/6357/1/%CE%9C.%CE%9A%CE%B1%CE%BC%CE%AF%CF%84%CF%83%CE%BF%CF%85%20-%20%CE%91%CE%BD%CE%AC%CF%80%CF%84%CF%85%CE%BE%CE%B7%20%CE%A3%CF%84%CE%B5%CF%81%CE%B5%CF%8E%CE%BD%20%CE%9A%CE%B1%CF%84%CE%B1%CE%BB%CF%85%CF%84%CF%8E%CE%BD%20%CE%B3%CE%B9%CE%B1%20%CF%84%CE%B7%CE%BD%20%CE%A0%CE%B1%CF%81%CE%B1%CE%B3%CF%89%CE%B3%CE%AE%20%CF%80-%CE%9A%CF%85%CE%BC%CE%B5%CE%BD%CE%AF%CE%BF%CF%85%20%CE%B1%CF%80%CF%8C%20%CE%9B%CE%B5%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AD%CE%BD%CE%B9%CE%BF.pdf>
- Καραστέργιου Ελένη Αστ., 2015. Χημική ανάλυση αιθέριων ελαίων στο κύκλο βλάστησης του φυτού *Dittrichia viscosa* ssp. *Viscosa*. Ματεπτυχιακή διατριβή, Τμήμα φαρμακευτικής. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
<http://ikee.lib.auth.gr/record/282795/files/GRI-2016-16463.pdf>

- Καψημαλή Δήμητρα, 2008. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου μορφοειδικού προσδιορισμού μονομεθυλο και ανόργανου υδραργυρου σε βιολογικά υγρά με μικροεκχύλιση στερεής φάσης από υπερκείμενη αέρια φάση (HS-SPME) και αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματόμετρο μάζας (GC-MS). Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης [Διαδίκτυο].
<http://ikee.lib.auth.gr/record/126358/files/GRI-2011-6559.pdf>
- ΝΙΚΟΛΑΟΥ Π. ΓΑΒΑΛΑ .ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΡΙΓΑΝΗΣ (ORIGANUM VULGARE L.) ΣΤΗ ΒΟΡΕΙΑ ΚΑΙ ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΒΙΟΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥΣ. ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
<https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/14975#page/1/mode/2up>

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία. (Διαδίκτυο)

- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. Intern. J Food Microbiol. 94:223-253
[https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1118829](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1118829)
- Bosabalidis, A. M ., and S. Kokkini. 1997. Intraspecific variation of leaf anatomy in *Origanum vulgare* grown wild in Greece. Bot. J. Linn. Soc. 123: 353-362..
<https://academic.oup.com/botlinnean/article/123/4/353/2630956>
- Calpouzoz, L. 1954. Botanical aspects of oregano. Econ. Bot. 8: 222-233.
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02984891>

- Deans, S.G. and G. Ritchi. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. Intern. J. Food Microbiol. 5:165-180.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160587900341>
- Fleisher, A., and N. Sneer. 1982. Oregano spices and Origanum chem otypes. J. Sci. Food Agric. 33: 441-446.
<https://pillbuys.com/research/Oregano/18.pdf>
- Fleisher, A., and Z. Fleisher. 1988. Identification of Biblical hyssop and origin of the traditional use of oregano group herbs in the M editerranean region. Econ. Bot. 42: 232-241.
<https://www.jstor.org/stable/4255069?seq=1>
- Ietswaart, J. H. 1980. A taxonom ic revision of the genus Origanum (Labiatae). PhD thesis. Leiden Botanical Series 4. Leiden University Press, The Hague.
<https://repository.naturalis.nl/document/551101>
- Kokkini, S., D. Vokou, and R. K arousou. 1989. Essential oil yield of Lamiaceae plants in Greece. In: Biosciences (S.C. Hatacharyya, N. Sen and K.L. Sethi,eds.). Proceedings of the 11th Int. Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours. Vol. 3. pp. 5-12, Oxford and IBH, New Delhi.
<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9122518>
- Vokou κ.ά. 1988, Kokkini κ.ά. 1991, Vokou κ.ά. 1993 .Τα «πλούσια» με απόδοση μεγαλύτερη από 2 % , όπως τα δυο πιο εμπορικά γνωστά είδη *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietsw aart (Greek oregano) και *O.onites*.

Εικόνες

- Εικόνα 1: https://www.google.com/search?hl=en-GR&tbs=simg:CAQSSAIJ4Fb2nRki7O0apAILELCMPwgaYQpfCAMSJ9YWadUW2RbXFtgW2gPiC84W2haNIuI32TegPps3nDfhN9ch2jfDKBow34J6zfFr-bjuMkoRPEvuF-eUNYSO42IU3x_1DEtiuZmUx6hC3ifjurOYtWWDpmekTIAQMCxCOrv4IGgoKCAgBEgRsJynZDAsQne3BCRqdAQoiCg9wbGFudCBwYXRob2xvZ3napYj2AwsKCS9tLzAxMnZ6egodCgpzcGVlZHdlbGxz2qWI9gMLCgkvbS8wOTh4OWMKGQoHc3B1cmdlc9qliPYDCgoIL20vMGdyYzgKHgoLY29jYSBmYW1pbHnapYj2AwsKCS9tLzBiN2h0awodCgpwaXB1cmFjZWFl2qWI9gMLCgkvbS8wMXN5bjkM&sxsrf=ALeKk00lSAbJQ6mxYyCYWCerKtRT5bQhFA:1611247255687&q=oregano+oil+in+sri+lanka&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjA7sfu63uAhUxuqQKHdiFDS8Qwg4oAHoECBAQMQ&biw=958&bih=937
- Εικόνα 2: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiufkHl1Smvuw2pMnqs4jJKEeKC1Uf2eoofVl-lLoswLxos-yPPvxsIKHLonNdQfEAkm3OJVtmlGAgMOlWlg9eq6QqM5xWGGakdDVf4YEErDMm3yl0xyq_1y_1P5KE9wsaWJ6YDxM1zDsWvV556d1JSbueTkhBdlldh7cQionZeeHb_1TcvpnWlrw52JljkRHla-MfIWd-Pu5FyBnCoQSRKpaqA5fRKUh1V9VGUTcpzaXG5tUcx4d_12mmDpDoeCkGO8VSCO4PrFF_1a7ZyC6VD4Ifpjc5cWi3RIWhWY_14MMMxOmY73636f_1-e9unXu9YNHNW_1XKt_1LwVt&btnG=Search%20by%20image&hl=en_GB
- Εικόνα 3: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZit-whWlrkXxif5Lph-EMmHjYlOg5Tz9E3jPv8ldKIL07DkVPTKCDDi2qRF1_1S20LPCoIaVJpE7kxdNhq_19SNw4fxVj7F_1iAUL3qJTT945v1UGdzna68hojQBqvWfO9LmIsKBIEbZnjyO8MyvqTW7-bN_1r8uoommruXkCVZ77KPOE95LHK6rmDc2tTxE7Z-QK350ChQi4CIMFbjyAiBC9TRzwTxslE1ypf3fu8XrdQP00rNTlF48JmmXrmDNtIIJWlXdqu6LaIZb5P6GDb2jaGcm4KcO8IQQotcI7ykRPYA1g3aQz0KOXKo-nME2CYFAU7OToL4qkpsK9oLNRxaUYQ97W4NTIw&btnG=Search%20by%20image&hl=en-GR
- Εικόνα 4: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivaGQA92awqL6FvVOTgMOYWbZ5DgO1gGXs7iiHe9DeEpviQIBntQIEW06iVABm5uO9Rm4UtfZDQtNrdGFMJDBu13dbbWuPrxj6UCTvE4retb8wHKbaaHXpvOsxvLRC-RVSzm8LZxy4NLPMTxL_1NgQ2A8Dt9kgp6sthWtRCN7UBaMknhGN7qJqa8zoMmxUoutYTQjwn5VUc3-P2-x0ursJ-FU9oOetpSRYyH1ISqyBo1uGOYjQo8-oE4wZnAhoPOmjm4sFDQIfQpOUjatB_14f0L-

[_1dJmpJVsvrHji5Sx6DrZfkuTscfpEwZmQ8rwCGTsmuIAeNp7Sph8HWD62g7j5F6QHmgiA&btnG=Search%20by%20image&hl=en-GR](https://www.google.com/search?btnG=Search%20by%20image&hl=en-GR)

- Εικόνα 5:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiuNzhCCih01Xj8TdHTqqVmCBJg1cI4PWgX0iljpIF9OgSjnqiJO11aoGrnx-r2v66F5Cmsi8Ik_1P_11Wxi8mcy3RbTBgtnQm-r1hYFpDI2GlowJyJZ7uboOVM85aDbD9nG1I6prmTalwatGmDoXvphbUXJjIaqXQPYOThtd8mbSXbAjDNwtNcbwM0XdOYWN2erF4bv5SVobGp-JXPYBZ4F70z5FDFo9z9HW4ik6adRuluPQIkmbaAhq7TjEUc11K8mm5hnve3OhWku8qKYvb8B-Rk_1CN5WyeyZnYY6gu68Kw5MmuPjzdWlg-Vl-Damjd0ZjPaemW_1c1TLZjzypcFhzdrOFJ5A&hl=en-GR
- Εικόνα 6:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZisIYD1frzO5gfHtU-LNhsAjC3pXvn-Xm-BAj7QgOK94JxeQSHwXtRuP5QExuFkwLnYG5nK654FOV3hALTdXVTLZslmuBG0MgPLXjzN_1q4Uuc2d2mCJ39YfUO-cp-meRplefMDQHypysKjAmmwML2lG304Kde2ZneeF3iZ8UAnffypwM3cB1v3wuDLw5E_L-vjuDiwFsjDYH5QTatodJ2tVc8PdNj6UAARUkhL7TUSAFSvrrarQd3LLPY6UaM9ruxPuBlUPjSpSVQFSjn9x51_184ZFyU215hwm4FRiQNodx761hHMHQDGUbMVRAqXpuZaH2sQXcOTYoxpEHj8VUzLlvP65zb03l0A&btnG=Search%20by%20image&hl=en-GR
- Εικόνα 7:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZithwCHScpn3Fthl1nBFS5dfujjXlT6sTFcQcBxGLE24SakpDiUrccrB-nsNtJD55hDhDqmmIdxf8BqtLWL7lNzWYpTKEWWcqvnB6mnRwqwLH8d8nfCUy5zEG0TJvzRB5CAQTPK61uY_1BuLzXJNOPO_1b3t5oMVR3_1nDxHDSysPsLJr6ZWVSaeWeEZ44nMdLX-5I86d-GI943y1hVEBXdbMsOSVtjaLirFJi6_1BBOZ_1aMyi9qLdzzFzHCr3OSQq_1ATrvvwTjMMXEuUPW17iTgnr5hNz6E_1YgXaER3aRh-52_1rewBCAZCVbhcHuh33FR3J-D09JS3Wkq-Uc1JL9f4QbUSAmBplg&btnG=Search%20by%20image&hl=en-GR
- Εικόνα 8:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivvdjlu8ycbxnYpyhujkqhYf1CpTGeKR CihavSs9D3K7mZKGuSLIjzB5QZRIrOurpN-DLZA6kQ4E6qv-f0MvZiA240QtjuGlgrvALG82TbLVlIjLA-ea6nYdUTGy4cNByaFTN5wW7liLuqqzLI8AE2CXyExaO7d0yPhTYa3RDMG7UCXOQhjszUQJ7WR4vcaAxua3Q6RySwh_1rudnwT0y6NzCHUIDHo05Q2v5YWEe8jy6XRYxe6091duSw_1TOH9_1W_1pe2cQxZDdiSxC2bKF5Hmrmn1h6uJcb-44SQzgp5MEfjCfIIgkGn9JUDbxOSYxB8tvNI0ZsDyCrek3kTJSEG7ZyvQhuNw&btnG=Search%20by%20image&hl=en-GR
- Εικόνα 9:
(Vokou κ.ά.1993)]

- Εικόνα 10
(Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/P-Cymene>)

- Εικόνα 11:

(Πηγή: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/223190?lang=en®ion=GR>)

- Εικόνα 12:
(Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Thymol>)

- Εικόνα 13:
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Caryophyllene>)

- Εικόνα 14:
(Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carvacrol>)