



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ - ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΙΧΑΛΗ ΗΛΙΑΝΑ

**ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΙΒΙΣΚΟΥ
ΕΡΥΘΡΑΙΑΣ (H. Sabdariffa) ΜΕ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ
ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΕ β -ΚΥΚΛΟΔΕΕΤΡΙΝΗ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2009

Επιβλέπων Καθηγητής

Καραθάνος Βάιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής,
Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

Εξεταστική Επιτροπή

Καλογερόπουλος Νικόλαος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής,
Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

Καραθάνος Βάιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής,
Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

Χίου Αντωνία

Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής,
Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

*Στο Βασίλη,
για την αμέριστη συμπαράσταση
και την πολύτιμη βοήθεια του
όλον αυτό τον καιρό.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και στο Εργαστήριο Σιτηρών του Τ.Ε.Ι. Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2007 – 2008 υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή κ. Β. Καραθάνου.

Με τη συγγραφή και την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου και Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής κ. Καραθάνο Βάιο και το Χημικό, Dr κ. Μουρτζίνο Ιωάννη για την πολύτιμη ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ με αυτό το τόσο ενδιαφέρον θέμα καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν. Η συνεχής παρακολούθηση και οι πολύτιμες συμβουλές τους συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της πρώτης μου ερευνητικής εργασίας. Οι επιστημονικές τους γνώσεις σε συνδυασμό με την εργαστηριακή τους εμπειρία καθοδήγησαν την προσπάθειά μου επιτυχώς.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Καλογερόπουλο Νικόλαο για την υποστήριξη και την ξεχωριστή συμμετοχή του στην εργαστηριακή μου πορεία. Οι εποικοδομητικές συζητήσεις, οι υποδείξεις του κατά την πειραματική διαδικασία, αλλά και κατά τη συγγραφή της εργασίας σε συνδυασμό με την κατανόηση και τη συμπαράστασή του, υπήρξαν καθοριστικά στοιχεία της συνεργασίας μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κα Χίου Αντωνία για την πολύτιμη βοήθειά της και για τη συμπαράστασή της στις δύσκολες στιγμές μου. Πολύτιμη ήταν και η συμβολή των Υποψήφιων Διδασκτόρων Α. Γκιοζάρη, Ε. Καρβέλα και Ε. Παραμέρα στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου και στην αδερφή μου για την αμέριστη υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου δείχνουν. Η μέχρι τώρα πορεία μου οφείλεται στην αγάπη και την καθοδήγησή τους. Είναι πάντα κοντά μου και στηρίζουν κάθε μου απόφαση ακόμη και όταν είναι μακριά.

ΗΛΙΑΝΑ ΜΙΧΑΛΗ

ΑΘΗΝΑ, 2009

Περίληψη.

Οι κόκκινες χρωστικές (ανθοκυανίνες) του κάλυκα του ιβίσκου της Ερυθραίας (H. Sabdariffa) χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία καλλυντικών και τροφίμων. Παράλληλα έχουν σημαντικές βιολογικές δράσεις για τον άνθρωπο. Ωστόσο, οι ανθοκυανίνες υποβιβάζονται εύκολα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης των τροφίμων, κάτι που μπορεί να έχει δραματική επίδραση στην ποιότητα του χρώματος και στη θρεπτική αξία του τροφίμου.

ΣΚΟΠΟΣ: Λόγω της μεγάλης ετερογένειας του ιβίσκου ως προς τη χημική του σύσταση, ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση και το χρόνο συγκομιδής του, η παρούσα μελέτη στοχεύει στον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου σε πολυφαινόλες και ανθοκυανίνες καθώς και στην ταυτοποίηση των κυριότερων ανθοκυανινών στο άγνωστο δείγμα ιβίσκου Ερυθραίας. Επιπλέον, σκοπεύει να εξετάσει αν οι ανθοκυανίνες του ιβίσκου μπορούν να ενθυλακωθούν σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) και αν με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η σταθερότητα τους παρουσία οξυγόνου. Τέλος, άλλος ένας στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της θερμικής υποβάθμισης των ανθοκυανινών παρουσία και απουσία β-κυκλοδεξτρίνης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: Το άγνωστο εκχύλισμα ιβίσκου χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα 1) για την ανίχνευση των περιεχόμενων ανθοκυανινών με τη μέθοδο LC- MS 2) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των περιεχόμενων ανθοκυανινών με τη διαφορική μέθοδο pH, 3) για την ανίχνευση των περιεχόμενων πολυφαινολών με τη μέθοδο GC/MS, 4) για την παρασκευή συμπλόκου ιβίσκου/β-κυκλοδεξτρίνης με λυοφιλίωση, 5) για τη μελέτη της θερμικής υποβάθμισης των ανθοκυανινών, 6) για τη μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας των συμπλόκων με τη μέθοδο DSC.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η θερμική υποβάθμιση των ανθοκυανινών ακολουθεί κινητική 1^{ης} τάξης. Η εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία υποβάθμιση περιγράφεται επαρκώς από την εξίσωση Arrhenius και η ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) για την υποβάθμιση των ανθοκυανινών του H. Sabdariffa κατά τη διάρκεια της θέρμανσης βρέθηκε ότι είναι ~54 kJ/mol. Παρουσία β-CD, οι ανθοκυανίνες υποβαθμίστηκαν με πιο αργό ρυθμό, προφανώς χάριν της συμπλοκοποίησής με τη β-CD, έχοντας όμως την ίδια E_a . Επιπλέον το DSC έδειξε ότι το σύμπλοκο ιβίσκου/ β-CD στη στερεή κατάσταση είναι πιο σταθερό απέναντι στην οξείδωση, συγκριτικά με το απλό

εκχύλισμα. Ειδικότερα το σύμπλοκο παρέμεινε άθικτο στις θερμοκρασίες 100-250°C, που το απλό εκχύλισμα είχε ήδη οξειδωθεί.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η παρουσία β-CD βελτιώνει τη θερμική σταθερότητα των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στον ιβίσκο, τόσο σε στερεή όσο και σε υγρή κατάσταση.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο. Η ΜΕΓΑΛΗ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ.	9
1. ΓΕΝΙΚΑ.	9
1.1. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.	9
1.2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ.	10
2. ΟΙ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ.	12
2.1. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ.	12
2.2. ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ.	13
2.3. ΑΚΥΛΙΩΣΗ.	14
2.4. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ.	15
2.4.1. ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ.	15
2.4.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΡΗ.	15
2.4.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ.	17
2.4.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ.	17
2.4.4. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ.	17
2.4.5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ.	18
3. ΟΙ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΦΥΤΑ.	19
4. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΣΕ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ.	20
5. ΟΙ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.	23
5.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ.	24
5.2. ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ.	25
5.3. ΑΠΟΒΟΛΗ.	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο. Ο ΙΒΙΣΚΟΣ.	27
1. ΓΕΝΙΚΑ.	27
2. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ.	28
3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο. Η ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΜΕ ΚΥΚΛΟΔΕΞΡΙΝΕΣ.	34
1. ΓΕΝΙΚΑ.	34
2. ΤΡΟΠΟΙ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ.	36
3. ΟΙ ΚΥΚΛΟΔΕΞΡΙΝΕΣ.	37
4. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ.	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΜΕΘΟΔΟΙ.	48

1. Η LC/ MS ESI (LIQUID CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY ELECTRON SPRAY IONIZATION).....	48
2. Η ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΡΗ ΣΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ.....	49
3. Η GC/ MS SIM (GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY SELECTIVE ION MONITORING).....	50
4. Η ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC).....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο . ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	53
1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ.....	53
1.1.ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	53
1.2. ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ	53
2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΙΒΙΣΚΟΥ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (LC- MS).....	54
3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΙΒΙΣΚΟΥ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΡΗ.....	54
4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΙΒΙΣΚΟΥ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (GC- MS).....	55
5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΒΙΣΚΟΥ/Β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΜΕ ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ.	55
6. ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ.....	56
7. ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (DSC).	57
7.1. ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ (DSC):.....	57
7.2. ΜΕΛΕΤΗ ΘΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΙΒΙΣΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ (DSC).	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΙΒΙΣΚΟΥ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (LC- MS).....	58
2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΙΒΙΣΚΟΥ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΡΗ.....	60
3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΙΒΙΣΚΟΥ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (GC- MS).....	60
4. ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ.....	63
5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (DSC).	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72
ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ.....	80
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	81

Κεφάλαιο 1^ο. Η μεγάλη οικογένεια των πολυφαινολών και οι ανθοκυανίνες.

1. Γενικά.

Με τον όρο πολυφαινόλες περιγράφεται μια πολύ μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Η δομή τους μπορεί να είναι από τελείως απλή (π.χ. φαινολικά οξέα) έως εξαιρετικά πολύπλοκη (π.χ. ταννίνες). Συνήθως απαντώνται στη φύση συζευγμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους (Χίου 2006). Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φυτικής προέλευσης τροφίμων και ποτών, όπως το χρώμα και η γεύση (Cheynier 2005). Πολλές μελέτες έχουν προτείνει ότι τα φλαβονοειδή επιδεικνύουν βιολογικές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδη, αγγειοδιασταλτική, αντιαλλεργική και αντιιική.

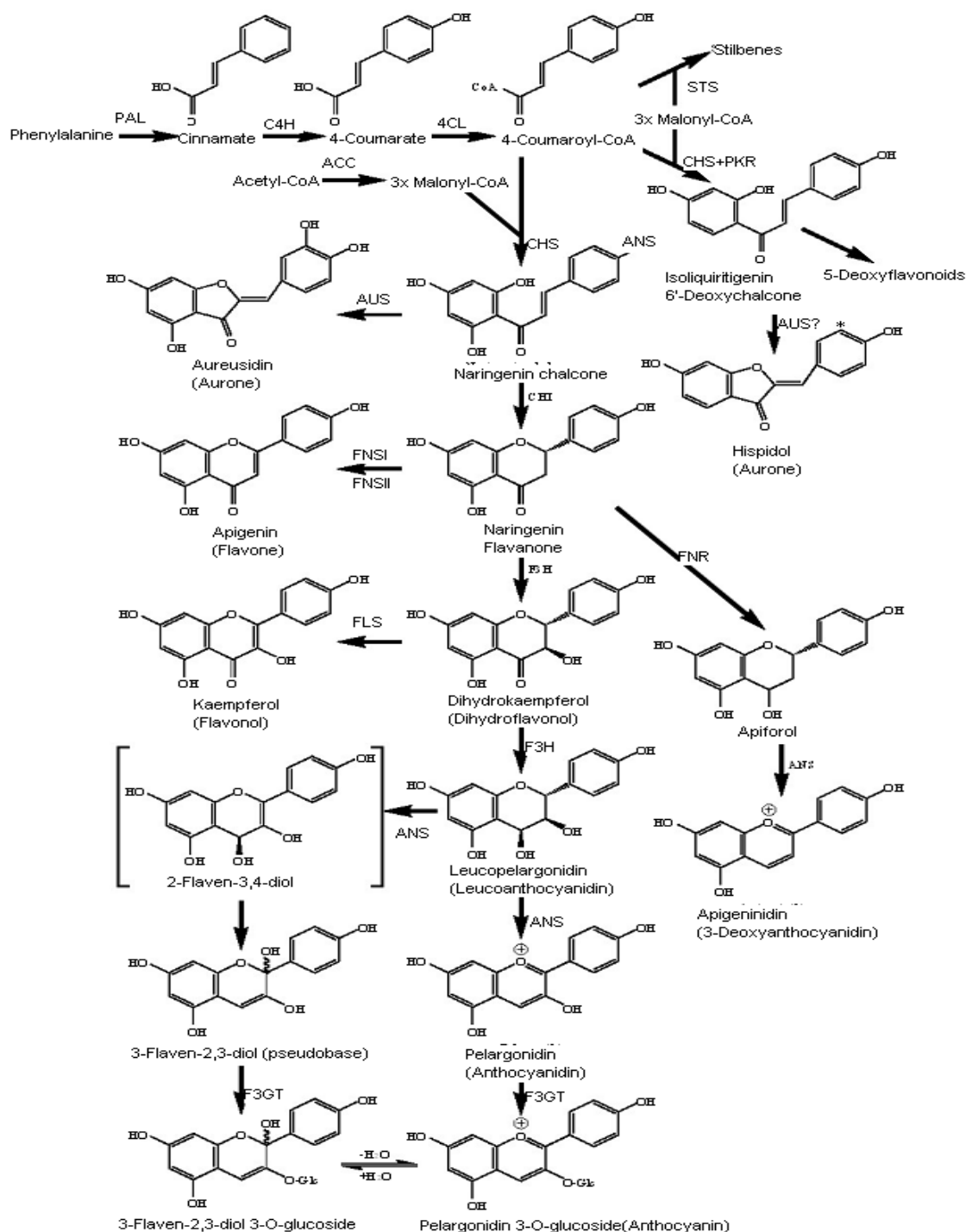
1.1. Κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων.

Βάσει της χημικής τους δομής οι πολυφαινόλες διακρίνονται σε: απλές φαινόλες, βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, (υδροξυ)κιναμμομικά οξέα, κουμαρίνες - ισοκουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες - νεολιγνάνες - λιγνίνες (Χίου 2006).

1.2 Βιοσυνθετικό μονοπάτι φλαβονοειδών.

Τα φλαβονοειδή, που αποτελούν ίσως την πιο διαδεδομένη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων στη φύση, διαχωρίζονται σε: χαλκόνες, διυδροξυχαλκόνες, χρυσόνες, φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, καμφερόλη, μυρισετίνη), διυδροξυφλαβονόλες, φλαβόνες (π.χ. λουτεολίνη, απιγενίνη), φλαβανόνες (π.χ. εσπερετίνη, ναγιγενίνη, εριοδικτυόλη), φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, γαλοκατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλοκατεχίνη, θειοφλαβίνη), φλαβανοδιόλες, ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη, μαλβιδίνη, πελαργονιδίνη), ισοφλαβονοειδή, διφλαβονοειδή-προανθοκυανιδίνες-συμπυκνωμένες ταννίνες (Χίου 2006). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 4.000 φλαβονοειδή, πολλά από τα οποία εμφανίζονται σε φρούτα, λαχανικά και ποτά όπως το τσάι, ο καφές, η μπύρα και το κρασί φρούτων (Buhler 2000, Nijveldt et al 2001).

Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών είναι πιθανώς το καλύτερα χαρακτηρισμένο μεταβολικό μονοπάτι όλου του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Αποτελεί μέρος της βιοσυνθετικής οδού του φαινυλπροπανοϊκού οξέος (*Διάγραμμα 1*), από την οποία παράγεται μια σειρά άλλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνίνες, οι λιγνάνες και τα στυλβένια. Πρόδρομες ενώσεις των φλαβονοειδών είναι η φαινυλαλανίνη, που λαμβάνεται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μηλόνυλο-CoA, που προέρχεται από τον κύκλο του Krebs (Andersen and Markham, 2006).



Διάγραμμα 1. Βιοσυνθετική οδός του φαινυλπροπανοϊκού οξέος και των φλαβονοειδών. Για το σχηματισμό των ανθοκυανινών από τις λευκοανθοκυανιδίνες δύο διαδρομές αναπαρίστανται: ένα απλουστευμένο σχέδιο μέσω της ανθοκυανιδίνης (πελαργονιδίνη) και το άλλο μέσω της ψευδοβάσης, που είναι και η πιθανή *in vivo* διαδρομή.

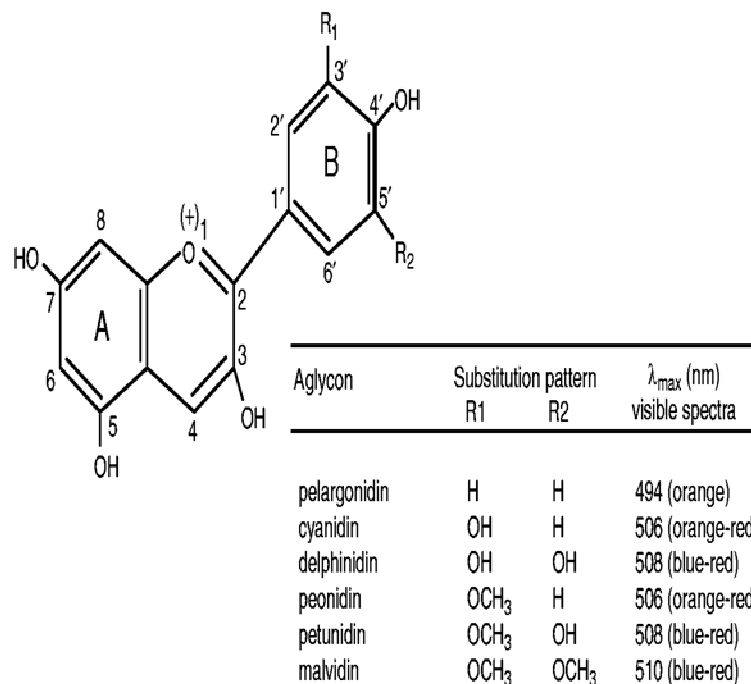
2. Οι Ανθοκυανίνες.

Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές που συντίθενται στο κυτοσόλιο και εντοπίζονται στα κενοτόπια πάρα πολλών φυτών. Είναι υπεύθυνες για το μπλε, μωβ και κόκκινο χρώμα πολλών φυτικών ιστών. Αποτελούνται από μία αγλυκόνη (ανθοκυανιδίνη), από σάκχαρα και σε πολλές περιπτώσεις από ακυλομάδες. Οι ανθοκυανιδίνες είναι παράγωγα του φλαβυλίου (κατιόν του άλατος 2-φαινυλο-βενζοπυρυλίου με NaCl).

2.1. Χημική δομή.

Παρόλο που έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 30 διαφορετικές ανθοκυανιδίνες, περίπου το 90% όλων των ανθοκυανινών είναι βασισμένο στις έξι πιο κοινές ανθοκυανιδίνες: την πελαργονιδίνη (Pg), την κυανιδίνη (Cy), την πεονιδίνη (Pn), τη δελφινιδίνη (Dp), την πετουνιδίνη (Pt), και τη μαλβιδιδίνη (Mv) , οι οποίες διαφέρουν μόνο σε ότι αφορά στο βαθμό υδροξυλίωσης και μεθυλίωσης του Β-δακτυλίου τους (**Πίνακας 1**). Η μέγιστη απορρόφηση στην ορατή περιοχή είναι συνήθως μεταξύ 465 και 550nm και στη UV μεταξύ 270 και 280 nm.

Οι ανθοκυανίνες διαφέρουν μεταξύ τους σε ότι αφορά 1) στη γλυκοζυλίωση των υδροξυλομάδων τους, 2) στη φύση των γλυκοζυλομάδων τους, 3) στο μοτίβο υποκατάστασης και 4) στην πιθανή ακυλίωση με αλειφατικές και αρωματικές ενώσεις (Andersen and Jordheim, 2006). Με δεδομένο, λοιπόν, ότι κάθε ανθοκυανιδίνη μπορεί να είναι γλυκοζυλιωμένη και ακυλιωμένη, σε διαφορετικές θέσεις, από διάφορα σάκχαρα και οξέα, μπορεί να υπάρξει ένας μεγάλος αριθμός συνδυασμών. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, στη φύση υπάρχουν περισσότερες από 600 διαφορετικές ανθοκυανίνες. Ο μεγάλος αυτός αριθμός των παραλλαγών μαζί με την εξαρτώμενη από το pH και το σχηματισμό χηλικών ενώσεων με μεταλλικά ιόντα αλλαγή χρώματος ευθύνονται για την τεράστια ποικιλία χρωμάτων που υπάρχουν στη φύση (He 2004).



Πίνακας 1. Οι κυριότερες ανθοκυανιδίνες και οι υποκαταστάτες τους. Το χρώμα επηρεάζεται από τον αριθμό των υδροξυλ- και μεθοξυλ-ομάδων.

2.2. Γλυκοζυλίωση.

Το 97% των ολικών ανθοκυανινών εμφανίζεται στη γλυκοζυλιωμένη του μορφή. Οι περισσότερες ανθοκυανίνες είναι γλυκοζυλιωμένες στο υδροξύλιο του C-3 με έναν μονοσακχαρίτη, ένα δισακχαρίτη ή ένα τρισακχαρίτη. Εκτός από τη θέση 3, οι ανθοκυανίνες μπορούν να είναι γλυκοζυλιωμένες στις θέσεις 5, 7, 3', 5" και σπανιότερα στη θέση 4" (Bjorøy et al., 2007). Τα σάκχαρα συνδέονται με τις ανθοκυανιδίνες συνήθως μέσω του οξυγόνου, αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις C - γλυκοζυλιωμένων ανθοκυανινών (Saito et al, 2003; Tatsuzawa et al, 2004).

Ο πιο κοινός μονοσακχαρίτης είναι η γλυκόζη (90%) και ακολουθούν η ραμνόζη, η αραβινόζη, η ξυλόζη και πολύ σπάνια το γλυκουρονικό οξύ. Αρκετά συχνή είναι και η σύζευξη των ανθοκυανιδών με δισακχαρίτες. Μερικοί από τους πιο κοινούς δισακχαρίτες, που συνδέονται με ανθοκυανιδίνες είναι οι: 2-

γλυκοζυλογλυκόζη(σοφορόζη), 6-ραμνοζυλογλυκόζη(ρουτινόζη), 2-ξυλόζυλογλυκόζη (σαμβιουβιόζη), 6-γλυκοζυλογλυκόζη (γεντιοβιόζη), 6-ραμνοζυλογαλακτόζη (ρομπινομπιόζη) κλπ. Σπάνια είναι η σύζευξη με τρισαχαρίτες (Andersen and Markham, 2006).

2.3. Ακυλίωση.

Περισσότερες από το 65% των αναφερόμενων στη βιβλιογραφία ανθοκυανινών είναι ακυλιωμένες. Η ποικιλομορφία της κάθε ανθοκυανίνης εξαρτάται από τη φύση, τον αριθμό, και τη θέση των συνδεδεμένων ακυλομάδων (Andersen και Jordheim, 2006). Τα σάκχαρα των ανθοκυανινών μπορούν να είναι ακυλιωμένα με αλειφατικές ή/και αρωματικές ακυλομάδες. Στις αρωματικές ακυλομάδες περιλαμβάνονται διάφορα υδροξυκινηματικά οξέα (π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερυλικό, σιναπικό, 3,5-διυδροξυκινηματικό οξύ) και δύο υδροξυβενζοϊκά οξέα (π-υδροξυβενζοϊκό και γαλλικό οξύ). Τα αλειφατικά οξέα, που συμμετέχουν στην ακυλίωση των σακχάρων είναι το μηλονικό οξύ, που είναι και το συχνότερο, το οξικό, το μηλικό, το τρυγικό και το οξαλικό οξύ (Andersen και Markham, 2006). Στην περίπτωση της ακυλίωσης με αλειφατικά οξέα, λόγω της ασταθούς φύσης του εστέρα, είναι πιθανή η υδρόλυση κατά την επεξεργασία ή την αποθήκευση σε όξινο pH. Οι ανθοκυανίνες που είναι ακυλιωμένες με δικαρβοξυλικά οξέα, σε όξινα αλκοολικά διαλύματα, υποβάλλονται σε υδρόλυση και σε εστεροποίηση της ελεύθερης καρβοξυλομάδας (Fossen et al, 2001, Takeoka and Dao, 2002, Andersen and Francis, 2004).

2.4. Σταθερότητα.

2.4.1. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα.

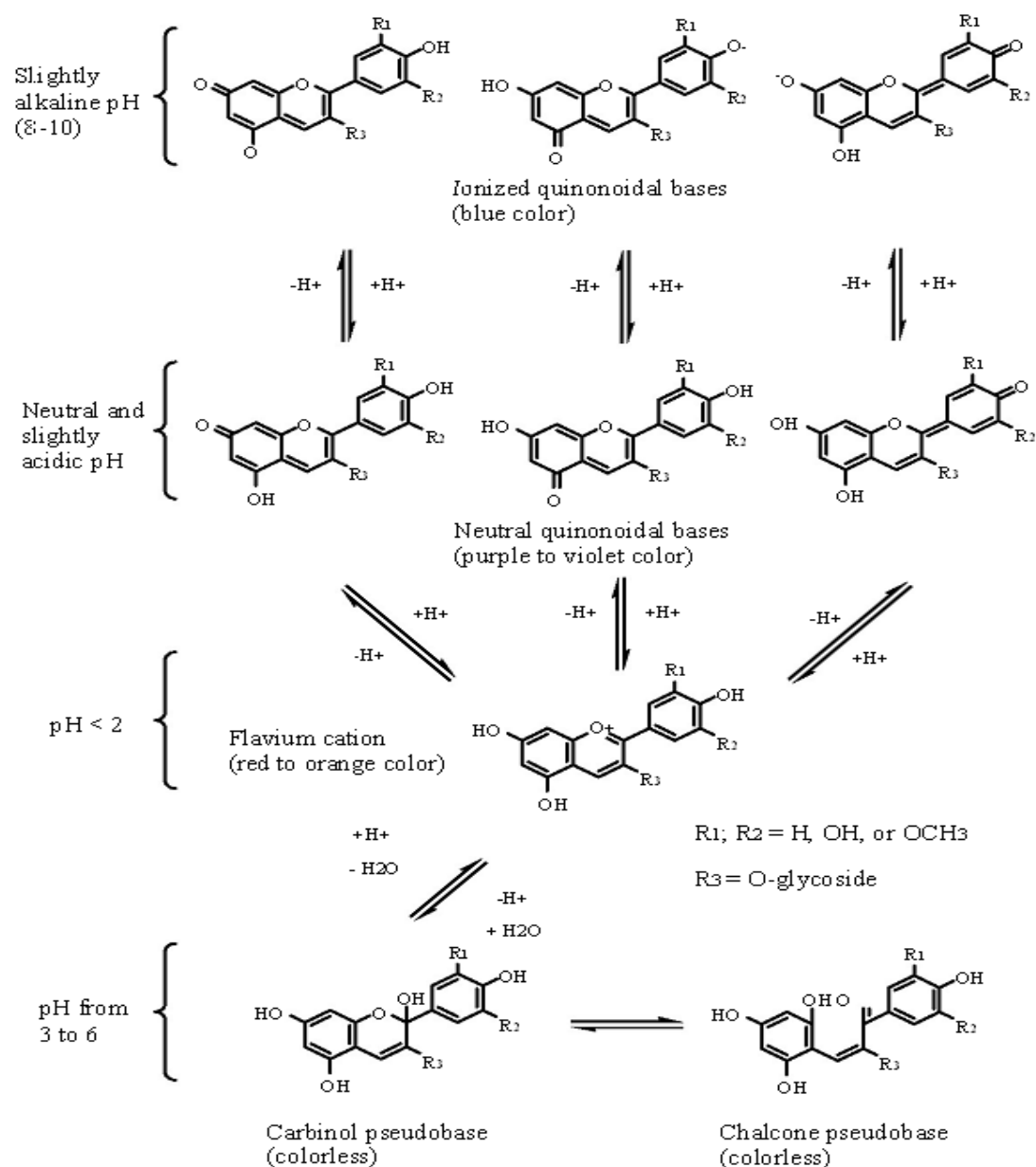
Το χρώμα των ανθοκυανινών οφείλεται πρωτίστως στα 10 π ηλεκτρόνια, που είναι πλήρως συντονισμένα στους φαινολικούς δακτυλίους Α και C και δευτερευόντως στα ηλεκτρόνια του δακτυλίου Β. Η παραπάνω δομή, ωστόσο, είναι ασταθής, γι' αυτό και όταν υδροξύλ-, μέθοξύλ-, γλυκοξύλ- ή άκυλ- ομάδες συνδέονται με το κατιόν φλαβυλίου, επηρεάζουν ουσιαστικά τη σταθερότητα του (Yang et al_2007).

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των ανθοκυανινών είναι: το pH, η θερμότητα, το φως, το οξυγόνο, η αιθανόλη, ο χρόνος αποθήκευσης, τα ένζυμα, η περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ, τα περιεχόμενα σάκχαρα και τα προϊόντα αποικοδόμησης τους, το θειικό οξύ ή τα σουλφιδικά άλατα, τα μεταλλικά ιόντα και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Ozkan et al. 2002, Tseng et al. 2006, Zhang et al. 2006, Wei-Dong et al. 2007). Ο αποσυντονισμός των ηλεκτρονίων οδηγεί σε αποχρωματισμό των ανθοκυανινών. Γενικά η υποβάθμιση των ανθοκυανινών ακολουθεί κινητική 1^{ης} τάξης (Zhang et al, 2006, Tseng et al, 2006, Ozkan et al, 2002).

2.4.2. Η επίδραση του pH.

Σε υδατικά διάλυματα, οι ανθοκυανίνες υφίστανται δομικούς μετασχηματισμούς, που εξαρτώνται από το pH (*Διάγραμμα 2*), οι οποίοι έχουν μελετηθεί και συνοψισθεί από τους Brouillard *et al* (1982). Έχει διαπιστωθεί ότι στην κατάσταση ισορροπίας υπάρχουν τέσσερεις σημαντικές δομές ανθοκυανίνης: 1) το κόκκινο κατιόν φλαβυλίου, 2) η μπλε κινονοειδής βάση, 3) η άχρωμη καρβινολική ψευδοβάση και 4) η άχρωμη χαλκόνη. Σε pH μικρότερο του 2, οι ανθοκυανίνες υπάρχουν κυρίως με τη μορφή του κόκκινου κατιόντος φλαβυλίου. Η διάλυση του άλατος του φλαβυλίου σε ελαφρώς όξινα ή ουδέτερα υδατικά διάλυματα έχει σαν αποτέλεσμα τον άμεσο σχηματισμό ουδέτερης ή/και ιονισμένης κινονοειδούς βάσης. Επισημαίνεται ότι το κατιόν φλαβυλίου λόγω του θετικού του φορτίου αντιστέκεται στις επιθέσεις ηλεκτρονιόφιλων όπως οι αλδεΐδες και οι κινόνες. Σε τιμές pH που κυμαίνονται από 3 έως 6, η υδάτωση του κατιόντος φλαβυλίου πραγματοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στον C-2 και δίνει άχρωμη καρβινολική ψευδοβάση. Στη

συνέχεια, η καρβινολική ψευδοβάση μπορεί να ισορροπήσει με την ανοικτή δομή της άχρωμης χαλκόνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ακυλιωμένες ανθοκυανίνες εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα στις αλλαγές της θερμοκρασίας και του pH (Reyes et al_2005).



Διάγραμμα 2. Πιθανές μετατροπές ανθοκυανινών σε υδατικά διαλύματα υπό την επίδραση διαφορετικών τιμών pH.

2.4.3. Η επίδραση της θέρμανσης.

Η επεξεργασία και η αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία μπορούν να βελτιώσουν τη σταθερότητα των ανθοκυανινών. Μάλιστα φαίνεται ότι ύστερα από θέρμανση σε σταθερή θερμοκρασία προκαλείται εκθετική καταστροφή της χρωστικής σε συνάρτηση με το χρόνο. Η υποβάθμιση πραγματοποιείται με ταχύτατους ρυθμούς κατά τη μακρά αποθήκευση σε υψηλές θερμοκρασίες προϊόντων πλούσιων σε ανθοκυανίνες, με το μεγαλύτερο πρόβλημα να παρουσιάζεται στους συμπυκνωμένους χυμούς φρούτων (Wei-Dong et al, 2007). Πάντως, γενικά, η θέρμανση είναι η κρισιμότερη παράμετρος για τον έλεγχο της υποβάθμισης των ανθοκυανινών, Ενδεικτικά αναφέρεται ότι κατά τη χυμοποίηση αποτελεί το πιο καταστροφικό, για τις ανθοκυανίνες, βήμα ολόκληρης της επεξεργασίας (Rubinskiene et al, 2005). Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία, ευνοείται η ασταθής δομή της χαλκόνης (*Διάγραμμα 2*)· η χαλκόνη, στη συνέχεια, υποβιβάζεται σε συστατικά καφέ χρώματος (He 2004).

2.4.4. Η επίδραση του φωτός.

Το φως είναι συνήθως επιβλαβές για τις ανθοκυανίνες. Το 1936 αναφέρθηκε, για πρώτη φορά, η δυσμενής επίδραση του φωτός στο χρώμα του εμφιαλωμένου χυμού από σταφύλι. Οι Παλαμίδης και Μαρκάκης (1975) παρατήρησαν ότι στο σκοτάδι οι χρωστικές ποτού σταφυλιών είχαν χρόνο ημιζωής ίσο με 416 ημερών έναντι 197 ημερών, που είχαν στο φως της μέρας και σε θερμοκρασία 20°C. Οι ακυλιωμένες ανθοκυανίνες επηρεάζονται λιγότερο από το φως, αφού παρατηρείται μικρή διαφορά στη σταθερότητα αυτών των χρωστικών ύστερα από έκθεση τους στο φως και στο σκοτάδι (He 2004).

2.4.4. Η επίδραση του οξυγόνου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Το οξυγόνο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορούν εύκολα να οξειδώσουν τις ανθοκυανίνες και αυτός ο μηχανισμός συχνά επιταχύνεται από την παρουσία του ασκορβικού οξέος. Η αλληλεπίδραση ασκορβικού οξέος και οξυγόνου μπορεί να μεσολαβεί από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, που παράγεται από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος και είναι γνωστό ότι αποχρωματίζει τις ανθοκυανίνες. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, επίσης, χρησιμοποιείται ως αποστειρωτικό σε πλαστικές συσκευασίες αποθήκευσης τροφίμων. Ο ρυθμός

αποικοδόμησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για παράδειγμα αποθήκευση του τροφίμου σε θερμοκρασία 5°C συνεπάγεται δεκαπλάσια αύξηση του $T_{1/2}$ συγκριτικά με αποθήκευση του ίδιου τροφίμου σε θερμοκρασία 20°C. Πάντως ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, αναφέρεται ότι ο ρυθμός υποβάθμισης είναι ταχύς ακόμα και σε συγκεντρώσεις H_2O_2 ίσες με το όριο του FDA (Ozkan et al, 2002). . Η αμοιβαία καταστροφή ασκορβικού οξέος και ανθοκυανίνης είναι ιδιαίτερα ανησυχητική λόγω της καθολικής παρουσίας του ασκορβικού οξέος στους χυμούς φρούτων.

2.4.5. Η επίδραση των σακχάρων.

Τα αυξημένα επίπεδα σακχάρων μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό αποικοδόμησης των ανθοκυανινών. Λίγο πιο αναλυτικά, οι Rubinskiene et al (2005) μελετώντας τη σταθερότητα των λυοφιλιωμένων χρωστικών του φραγκοστάφυλου, έδειξαν ότι η θερμοσταθερότητα τους παρουσία ασπαρτάμης και σουκρόζης μειώνεται, όταν τα δύο σάκχαρα προστίθενται σε ποσοστά 10% και 20%, αλλά αυξάνεται όταν προστίθενται σε ποσοστό 40%. Η προσθήκη φρουκτόζης έχει αρνητική επίδραση στη θερμοσταθερότητα των ανθοκυανινών, η οποία φαίνεται να μειώνεται γραμμικά. Ο μηχανισμός δράσης των σακχάρων θα μπορούσε να συνδεθεί με την παρεμπόδιση των αποικοδομητικών ενζυμικών δραστηριοτήτων της PPO (οξειδάση των πολυφαινολών) και των ενδογενών υπεροξειδάσων (He 2004).

3. Οι ανθοκυανίνες για τα φυτά.

Οι ανθοκυανίνες εντοπίζονται κυρίως στα άνθη και στους καρπούς και σε μικρότερο βαθμό στα φύλλα και τους μίσχους. Η σημασία των ανθοκυανινών για τα φυτά είναι πολύ μεγάλη γιατί αφενός μεν διευκολύνουν τη διασπορά των φυτικών σπερμάτων και τη γονιμοποίηση προσελκύοντας τα έντομα και τα πουλιά αφετέρου δε συμμετέχουν στους φυσιολογικούς μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Close et al, 2005, η συσσώρευση ανθοκυανινών:

- στους βλαστούς και στο αναπτυσσόμενο φύλλωμα των φυτών, τα προστατεύει από την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία και τις επιθέσεις των φυτοφάγων ζώων.
- στο φθινοπωρινό φύλλωμα των φυλλοβόλων δέντρων και στο φύλλωμα των φυτών με θρεπτική ανεπάρκεια, επιτρέπει την επαρκή επαναρρόφιση των θρεπτικών συστατικών των φύλλων.
- στους προσβεβλημένους από παθογόνα φυτικούς ιστούς, στους οποίους έχουν περιοριστεί άλλοι μηχανισμοί φωτοπροστασίας, παρέχει φωτοπροστασία.

4. Περιεκτικότητα τροφίμων σε ανθοκυανίνες.

Η περιεκτικότητα των διαφόρων φυτών αλλά και των κατά τόπους ποικιλιών τους σε ανθοκυανίνες είναι ανάλογη του γονότυπου και της εποχής συγκομιδής τους. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία τα διαθέσιμα στοιχεία παρουσιάζουν απόκλιση στο ακριβές περιεχόμενο των τροφίμων σε ανθοκυανίνες. Αυτή η απόκλιση οφείλεται λίγο ως πολύ και στην έλλειψη αξιόπιστων αναλυτικών προτύπων για τις περισσότερες από τις γλυκοζυλιωμένες ανθοκυανιδίνες (He 2004). Γενικά, ισχύει ότι όσο πιο έντονο είναι το χρώμα (βαθύ μωβ ή μαύρο) ενός τροφίμου, τόσο μεγαλύτερο είναι και το περιεχόμενό του σε ανθοκυανίνες (Meskin et al., 2004). Στον *Πίνακα 2* φαίνεται η περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες διαφόρων τροφίμων, που καταναλώνονται ευρέως στις Η.Π.Α. (Wu et al. , 2006). Ο πίνακας αυτός αποτελεί τμήμα της βάσης δεδομένων για τα φλαβονοειδή (Nutrient Database of flavonoids) που υλοποίησε το 2007 το Nutrient Data Laboratory του USDA.

Η κατανομή των έξι πιο κοινών ανθοκυανιδινών στα εδάδιμα μέρη των φυτών είναι: κυανιδίνη (50%), πελαργονιδίνη (12%), πεονιδίνη (12%), δελφινιδίνη (12%), πετουνιδίνη (7%), και μαλβιδίνη (7%). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι τρεις μη μεθυλιωμένες ανθοκυανιδίνες (Cy, Dp και Pg) είναι και οι πιο διαδεδομένες στη φύση. Συνολικά, η αγλυκόνη της κυανιδίνης εμφανίζεται στο 90% περίπου των φρούτων και είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη αγλυκόνη (He 2004).

Στην ανθρώπινη διατροφή, οι ανθοκυανίνες προέρχονται ως επί τω πλείστω από τα φρούτα και τα κόκκινα κρασιά. Ενδιαφέρον μάλιστα παρουσιάζει ότι από τις διάφορες τάξεις των φλαβονοειδών, η διαιτητική πρόσληψη των ανθοκυανινών είναι ίσως η μεγαλύτερη: $\geq 100\text{mg/ ημέρα/ άτομο}$ έναντι των $23\text{mg/ ημέρα/ άτομο}$ για άλλα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη, η καμφερόλη, η μυρισετίνη, η απιγενίνη και η λουτεολίνη. Στις ΗΠΑ, η μέση ημερήσια πρόσληψη ανά άτομο υπολογίστηκε στα 215mg κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και 180mg κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Τα άτομα που καταναλώνουν κόκκινα κρασιά είναι πιθανό να έχουν σημαντικά υψηλότερες προσλήψεις (He 2004).

food	moisture (%)	mg/100 g (of fresh wt or form consumed)						total ACN	total ACN/ serving ^d (mg)
		<i>Dp-ACN</i>	<i>Cy-ACN</i>	<i>Pt-ACN</i>	<i>Pg-ACN</i>	<i>Pn-ACN</i>	<i>Mv-ACN</i>		
fruits									
1. apple	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuji (<i>n</i> =4 ^e)	84.2	-	1.3 ±0.7	-	-	-	-	1.3 ±0.7	1.8
Gala (<i>n</i> = 3)	85.8	-	2.3 ±0.8	-	-	-	-	2.3 ±0.8	3.2
Red Delicious (<i>n</i> = 4)	85.5	-	12.1 ±1.8	-	-	0.2 ±0.1	-	12.3± 1.9	17.0
2. blackberry	-	-	-	-	-	-	-	-	-
blackberry (<i>n</i> =4)	86.9	—	244 ± 68.0	—	0.7 ±0.1	T'	—	245 ± 68.0	353
Marion blackberry (<i>n</i> =1)	86.9	-	297.7	-	1.7	1.1	-	300.5	433
3. blueberry	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cultivated (<i>n</i> =7)	85.0	120.7±27.9	28.6 ±19.8	71.9 ±14.0	—	34.2 ±11.9	131.3 + 16.5	386.6±77.7	529
wild (<i>n</i> = 1)	89.0	141.1	66.3	87.6	-	36.9	154.6	486.5	705
4. cherry, sweet (<i>n</i> =4)	80.2	-	113± 19.6	-	1.4±0.2	7.5 ±1.9	-	122 + 21.3	177
5. chokeberry (<i>n</i> =1)	71.8	-	1478	-	2.3	-	-	1480	21479
6. cranberry (<i>n</i> =3)	87.1	0.1 ±0.1	66.1 ±16.7	T	0.7 ±0.1	72.2 ±13.6	0.8 ±0.9	140 ±28.5	133
7. currant	—	—	—	—	—	—	—	—	—
black currant (<i>n</i> = 6)	77.5	333 ±78.1	133 ±38.6	7.3 ±5.6	1.9±0.5	1.0 ±0.5	-	476 ±115	533
red currant (<i>n</i> = 1)	78.1	0.1	12.7	-	-	-	-	12.8	14.3
8. elderberry (<i>n</i> =1)	82.5	-	1373	-	1.8	-	-	1375	19939
9. gooseberry* ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
group 1 (<i>n</i> = 2)	88.0	—	10.2 ±0.1	—	—	0.2 ±0.1	—	10.4 + 0.1	15.19
group 2 (<i>n</i> = 1)	88.0	-	2.1	-	-	0.1	-	2.2	3.29
group 3 (<i>n</i> = 1)	88.0	-	0.7	-	-	-	-	0.7	1.09
10. grape	-	-	-	-	-	-	-	-	-
red grape (<i>n</i> =5)	80.4	1.1 ±0.8	3.9 ±1.5	1.1 ±0.9	-	10.1 ±4.5	10.5 ±8.4	26.7 ±10.9	42.7
Concord grape (<i>n</i> = 1)	80.4	70.7	23.8	14.9	T	4.8	5.9	120.1	192
11. nectarine (<i>n</i> = 7)	86.8	-	6.8 ±1.5	-	-	-	-	6.8 ±1.5	9.2
12. peach (<i>n</i> =8)	88.3	-	4.8 ±1.2	-	-	-	-	4.8 ±1.2	4.7
13. plum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
plum (<i>n</i> = 8)	87.4	-	19.0 ±4.4	-	-	-	-	19.0 ±4.4	12.5
black plum (<i>n</i> = 2)	87.9	-	124.5±21.6	-	T	T	-	124.5±21.6	82.2
14. raspberry	-	-	-	-	-	-	-	-	-
black raspberry (<i>n</i> =1)	85.8	-	669	-	16.7	1.1	-	687	845
red raspberry (<i>n</i> = 5)	85.8	-	90.2 ±19.2	-	1.9 + 1.0	-	-	92.1 ±19.7	116
15. strawberry	-	-	-	-	-	-	-	-	-
strawberry (<i>n</i> =8)	91.1	-	1.2 ±0.4	-	19.8±3.1	-	-	21.2±3.3	35.0
strawberry OSC'(<i>n</i> =1)	91.1	-	9.4	1.0	31.4	-	-	41.7	69.2
vegetables									
1. black bean (<i>n</i> = 1)	—	18.5	—	15.4	—	—	10.6	44.5	23.1
2. eggplant (<i>n</i> = 1)	91.8	85.7	-	-	-	-	-	85.7	35.1
3. red cabbage (<i>n</i> =4)	91.0	-	322 ± 40.8	-	-	-	-	322 ± 40.8	113
4. red leaf lettuce (<i>n</i> =8)	95.6	-	2.2 ±1.5	-	-	-	-	2.2 ±1.5	1.5
5. red onion (<i>n</i> = 1)	87.7	-	46.4	-	-	2.1	-	48.5	38.8
6. red radish (<i>n</i> =9)	95.6	-	T	-	100.1±30.0	-	-	100.1±30.0	116
7. small red bean (<i>n</i> =1)	-	-	1.9	-	4.8	-	-	6.7	6.2
nuts									
1. pistachio (<i>n</i> = 7)	—	—	7.5 ±1.5	—	—	—	—	7.5 ±1.5	2.1

Πίνακας 2. Συγκέντρωση ανθοκυανινών, ομαδοποιημένων σε αγλυκόνες, σε ευρέως καταναλισκόμενα τρόφιμα στις Η.Π.Α.

Επιπλέον, η χρήση των ανθοκυανινών ως φυσικών χρωστικών των τροφίμων και των ποτών επιτρέπεται πλέον ευρέως στην Ευρωπαϊκή Ένωση (E163), στην Ιαπωνία, και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η μικτή επιτροπή ειδικών του FAO/ WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) κατέληξε σε αυτό: σύμφωνα με την τοξικολογική αξιολόγηση, τα εκχυλίσματα που περιέχουν ανθοκυανίνες είναι πολύ χαμηλής τοξικότητας για τον άνθρωπο. Η κατ' εκτίμηση επιτρεπόμενη ημερήσια πρόσληψη (ADI) για το άτομο υπολογίστηκε στα 2,5 mg/kg βάρους σώματος/ ημέρα (WHO Food Additives Series 17).

Οι κυριότερες ανθοκυανίνες, που διατίθενται εμπορικά ως χρωστικές τροφίμων, προέρχονται από σταφύλια (*Vitis* SSP), elderberry (*Sambucus nigra*), κόκκινο λάχανο (*Brassica oleracea*) και ιβίσκο (*Hibiscus sabdariffa*). Άλλα εμπορικά εκχυλίσματα ανθοκυανίνης μπορούν να ληφθούν από πορτοκάλι τύπο σαγκουίνι (*Citrus sinensis*), μαύρο chokeberry (*Aronia melanocarpa*) και γλυκιά πατάτα (*Ipomoea batatas*). Εντούτοις, ένα σημαντικό πρόβλημα με τις περισσότερες ανθοκυανίνες είναι η μειωμένη σταθερότητα σε υδατικά διαλύματα με pH>3. Γι' αυτό και σήμερα η χρήση των ανθοκυανινών ως χρωστικών των τροφίμων περιορίζεται στην ποτοποιία και στη ζαχαροπλαστική (Jordheim, 2007).

5. Οι ανθοκυανίνες για τον άνθρωπο.

Το ενδιαφέρον για τις ανθοκυανίνες έγινε εντονότερο, όταν επιδημιολογικές μελέτες συσχέτισαν την κατανάλωση κρασιών πλούσιων σε ανθοκυανίνες με την πρόληψη των στεφανιαίων καρδιαγγειακών νοσημάτων, κάτι που έμεινε γνωστό ως "γαλλικό παράδοξο". Από εκεί και μετά, ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός μελετών άρχισε να αναδεικνύει τα πιθανά οφέλη των ανθοκυανινών για την ανθρώπινη υγεία. Μέχρι σήμερα, στα οφέλη υγείας των ανθοκυανινών περιλαμβάνονται: η εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών, η παρεμπόδιση της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών και της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, η αντιφλεγμονώδης δράση, η μείωση της διαπερατότητας και του σπασίματος των τριχοειδών αγγείων, η προστασία έναντι της ηπατικής ισχαιμίας, η αντικαρκινική και ογκοκατασταλτική δράση, η βελτίωση της όρασης, ο έλεγχος του διαβήτη κ.ά. Όλα τα παραπάνω οφέλη συσχετίζονται λίγο ως πολύ με την αντιοξειδωτική δράση των ανθοκυανινών (He, 2004). Το μέγεθος της αντιοξειδωτικής δράσης των ανθοκυανινών στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και όλες οι παρατηρηθείσες θετικές επιπτώσεις για την υγεία από τα *in vitro* και τα *in vivo* πειράματα εξαρτώνται από την απορρόφηση, το μεταβολισμό και την αποβολή αυτών των ενώσεων από το σώμα.

Η συγκέντρωση των ανθοκυανινών στο πλάσμα προκύπτει από την ισορροπία μεταξύ της απορρόφησης και της αποβολής τους. Πιο αναλυτικά, η απορρόφηση εξαρτάται από την κινητικότητα του ΓΕΣ, τη ροή του αίματος και τη δραστηριότητα των μεμβρανικών μεταφορέων. Από την άλλη, το ποσοστό αποβολής των ανθοκυανινών από το πλάσμα εξαρτάται από την πρόσληψη και το μεταβολισμό τους από τους περιφερικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένης της έκκρισης τους στη χολή ή/και τα ούρα, και από τη μετατροπή τους σε διαφορετικές δομές (Διάγραμμα 2). Η παρουσία των ανθοκυανινών στο πλάσμα θα μπορούσε να σχετίζεται με τη σύνδεσή τους με πρωτεΐνες, κάτι που θα τους εξασφάλιζε χημική σταθερότητα. Ωστόσο, τα μεταβλητά επίπεδα τους στο πλάσμα ίσως να απεικονίζουν τις μεμονωμένες διαφορές στο περιεχόμενο των ενδογενών και εξωγενών ανταγωνιστών για τις συγκεκριμένες περιοχές πρωτεϊνικής σύνδεσης στο αίμα (Jordheim, 2007). Το ποσοστό αποβολής των ανθοκυανινών από το πλάσμα επηρεάζεται επίσης από την παρουσία διαφόρων ενεργών οξειδοαναγωγικών παραγόντων. Η μέση συγκέντρωση των ανθοκυανινών στο πλάσμα, αν και χαμηλή, φαίνεται να είναι επαρκής για την εκδήλωση αντιοξειδωτικής δράσης (Passamonti et al, 2005).

5.1. Μεταβολισμός.

Κατά τη μετάβαση τους από το γαστρεντερικό σωλήνα (ΓΕΣ), οι ανθοκυανίνες εκτίθενται σε περιβάλλοντα με διαφορετικό pH και επομένως έχουν διαφορετικές δομές (*Διάγραμμα 2*). Η μορφή των ανθοκυανινών στα διάφορα διαμερίσματα και ιστούς του ΓΕΣ, αλλά και κατά τη διάρκεια της απορρόφησης, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα. Είναι πιθανό, όμως, το κατιόν φλαβυλίου να υπάρχει μόνο στο σώμα του στομάχου, λόγω του χαμηλού pH, ενώ οι άλλες μορφές να υπάρχουν στα διαμερίσματα, που βρίσκονται χαμηλότερα στον ΓΕΣ (Jordheim, 2007).

Κατά την αξιολόγηση της σταθερότητας των ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο σε προσομοιωμένες συνθήκες γαστρεντερικής πέψης, οι McDougall και συνεργάτες (2007) διαπίστωσαν ότι οι ανθοκυανίνες παραμένουν σταθερές ύστερα από την όξινη γαστρική πέψη, αλλά η συνολική τους αποκατάσταση μετά την παγκρεατική πέψη είναι περίπου 25% έναντι περίπου 100% που είναι για τις άλλες φαινόλες. Ακόμα διαπίστωσαν ότι οι ακυλιωμένες ανθοκυανίνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην παγκρεατική πέψη σε σχέση με τις μη ακυλιωμένες δομές, ενώ οι ανθοκυανίνες με σιναπικό οξύ έχουν τη μικρότερη σταθερότητα μεταξύ των ακυλιωμένων ανθοκυανινών με υδροξυκιναμικά οξέα. Έτσι θεώρησαν απίθανο οι ανθοκυανίνες να φτάνουν στον ορό του αίματος ή να επιζούν πολύ κάτω από τις συνθήκες που επικρατούν στον ορό. Γι' αυτό και απέδωσαν τις βιολογικές δράσεις των ανθοκυανινών στους μεταβολίτες τους.

Οι μεταβολίτες των ανθοκυανινών ανιχνεύονται στα ούρα και στους ιστούς των νεφρών και του ήπατος. Γενικά, φαίνεται ότι η μεταβολική πορεία των ανθοκυανινών διαφέρει ανάλογα με τη δομή της αγλυκόνης τους. Για παράδειγμα, ο 3-γλυκοζίτης της κυανιδίνης μαζί με τα μεθυλιωμένα και γλυκουρονιωμένα παράγωγα του ανιχνεύονται στα ούρα και το πλάσμα της αορτής και της μεσεντέριας φλέβας. Επιπλέον, ο 3-γλυκοζίτης της κυανιδίνης και τα μεθυλιωμένα παράγωγα του αποβάλλονται από το συκώτι στη χολή σε διάστημα 25 λεπτών. Στα ούρα έχουν ακόμα προσδιοριστεί σουλφονιωμένα παράγωγα της κυανιδίνης. Η σουλφονίωση των ανθοκυανιδινών γίνεται από τις σουλφοτρασφεράσες των ιστών (π.χ. εντέρου και συκωτιού) και προϋποθέτει την υδρόλυση της ανθοκυανίνης σε αγλυκόνη.

5.2. Απορρόφηση.

Το γεγονός ότι ο 3-γλυκοζίτης και ο 3,5-διγλυκοζίτης της κυανιδίνης εντοπίζονται στο πλάσμα των αρουραίων και του ανθρώπου (σε χαμηλή συγκέντρωση), επιβεβαιώνει την ικανότητα των γλυκοζιτών να διασχίζουν το λεπτό έντερο. Ο Matuschek και συνεργάτες (2006) βρήκαν ότι ο 3-γλυκοζίτης της κυανιδίνης απορροφάται κυρίως στη νήστιδα του λεπτού εντέρου, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της συμμετοχής ενός μηχανισμού ενεργού μεταφοράς. Το κατά πόσο οι ανθοκυανίνες μπορούν να μεταφερθούν από τον SGLT1 (Na-εξαρτώμενος μεταφορέας της γλυκόζης στο λεπτό έντερο και τους νεφρούς), όπως ο 3-γλυκοζίτης της κερκετίνης ή απλώς εκτίθενται στη δράση των γλυκοσιδασών δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα, κυρίως λόγω της ταχείας υποβάθμισης των ασταθών δομών των ανθοκυανιδινών.

Άλλες μελέτες υποδεικνύουν τη δυνατότητα απορρόφησης των ανθοκυανινών στο στομάχι (Passamonti et al, 2002 ,2003). Μάλιστα στο μηχανισμό απορρόφησης θεωρείται ότι συμμετέχει η τρανσλοκάση της χολερυθρίνης, ένας μεμβρανικός μεταφορέας οργανικών ανιόντων που εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρικού μυός. Η απορρόφηση μέσω του γαστρικού τοιχώματος ίσως μπορέσει να δώσει εξήγηση στην ταχεία απορρόφηση των ανθοκυανινών ύστερα από την εκ του στόματος χορήγηση (Matuschek et al, 2006). Ενδιαφέρον, μάλιστα, παρουσιάζει το γεγονός ότι οι Passamonti και συνεργάτες (2005) βρήκαν άθικτες ανθοκυανίνες στον εγκέφαλο αρουραίων λίγα λεπτά μετά τη χορήγησή τους από το στομάχι. Το εύρημα αυτό ήταν απροσδόκητο λόγω της ύπαρξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, που υποτίθεται ότι είναι αδιαπέραστος σε ποσοστό > 98% στα μικρά, πολικά μόρια που κυκλοφορούν στο αίμα. Η περιοχή από την οποία διεισδύουν οι ανθοκυανίνες δεν ανιχνεύτηκε. Πάντως, η ύπαρξη ανθοκυανινών στον εγκέφαλο αρουραίων πιστοποιήθηκε και από τους Talavera και συνεργάτες (2006) ύστερα από την χορήγηση διατροφής πλούσιας σε ανθοκυανίνες.

5.3. Αποβολή.

Η αποβολή των ανθοκυανινών από το σώμα είναι αρκετά γρήγορη ($t_{1/2} = 1.5-3$ h για τις ανθοκυανίνες των μούρων έναντι $t_{1/2} = 11-28$ h για την κερκετίνη) ενώ η βιοσυσσωρευση τους, τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό, κρίνεται απίθανη σε κανονικές διαιτητικές προσλήψεις. Το γεγονός ότι σε κάποιες μελέτες,

προσδιορίστηκαν αποκλειστικά μη μεταβολισμένες ανθοκυανίνες μπορεί να οφείλεται 1) στον κορεσμό των μεταβολικών οδών, κάτι που συμβαίνει συχνά σε επεμβάσεις μέγα-δόσεων, 2) σε ανεπαρκείς διαδικασίες εξαγωγής και 3) σε λανθασμένη αναγνώριση ως αποτέλεσμα των ανεπαρκών μεθόδων ανίχνευσης (Kay, 2006). Οι He και συνεργάτες (2006) διεξήγαγαν μια μακροπρόθεσμη (3 μήνες) μελέτη σε αρουραίους, χορηγώντας τους δίαιτα πλούσια σε chokeberry, μύρτιλλο, και σταφύλι. Διαπίστωσαν, λοιπόν, μεγαλύτερη ουρική έκκριση μεθυλιωμένων ανθοκυανινών από αυτή που παρατηρήθηκε σε αρκετές, πιο σύντομες (< 8 ημέρες) μελέτες. Αυτή η διαφορά πιθανόν να οφείλεται στη συσσώρευση των ανθοκυανινών στους ιστούς ή στην επαγωγή της μεθυλοτρανσφεράσης. Αnéφεραν ακόμα, για πρώτη φορά, την παρουσία άθικτων ακυλιωμένων ανθοκυανινών στο πλάσμα και στα ούρα. Ωστόσο, συμφώνησαν με το εύρημα ότι οι ανθοκυανίνες έχουν πολύ χαμηλή απορρόφηση. Παρόλα αυτά υποστήριζαν ότι οι ανθοκυανίνες στο έντερο προάγουν την υγεία ακόμα και χωρίς να απορροφώνται.

Κεφάλαιο 2^ο. Ο ιβίσκος.

1. Γενικά.

Ο ιβίσκος της Ερυθραίας (*Hibiscus sabdariffa*) είναι ένα ποώδες μονοετές φυτό, που ανήκει στην οικογένεια των μαλβιδών. Καλλιεργείται σε πολλές τροπικές και υπό-τροπικές περιοχές κυρίως για τον κάλυκα του, αλλά ανά τόπους και για το μίσχο, τους σπόρους και τα φύλλα του.

Ο κάλυκας του ιβίσκου είναι πλούσιος σε κόκκινες χρωστικές, που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών. Ειδικότερα από αυτόν, παρασκευάζονται προϊόντα όπως μαρμελάδες, σάλτσες, σιρόπια, καθώς και το περίφημο κόκκινο τσάι (Ali et al, 2005). Στην Αφρική, οι κάλυκες του φυτού καταναλώνονται, επίσης, ωμοί σαν φρούτο, αλλά και μαγειρεμένοι, σαν δευτερεύον πιάτο (Morton, 1987). Όσον αφορά στα φύλλα και στον μίσχο του φυτού, όταν αυτά είναι τρυφερά καταναλώνονται σαν λαχανικό (Mansour et al, 1975). Ο χυμός των βρασμένων φύλλων και μίσχων χρησιμοποιείται στις Φιλιππίνες για τους ίδιους σκοπούς, που χρησιμοποιείται και ο χυμός του κάλυκα. Ακόμα χρησιμοποιούνται σαν καρύκευμα. Τέλος οι σπόροι, στην Αφρική έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του καφέ και ως συμπληρωματική πηγή πρωτεΐνης, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε αυτή (Omobuwajo et al, 2000). Στην Κίνα πάλι χρησιμοποιούνται για το έλαιό τους.

Γενικά, ο ιβίσκος κατέχει σημαντική θέση στην πρακτική ιατρική πολλών λαών. Μάλιστα του αποδίδονται πολλές φαρμακευτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα ιβίσκου θεωρείται πολύ αποτελεσματικό όσον αφορά στην αντιμετώπιση της υπέρτασης (Christian et al, 2006, Tseng et al, 1998). Ενδεδειγμένη είναι, επίσης, η χρήση του στην αντιμετώπιση της βρογχίτιδας και του βήχα (Omobuwajo et al, 2000), αλλά και στην αντιμετώπιση του πυρετού (Ali et al, 2005). Ακόμα, χρησιμοποιείται σαν φάρμακο αντιμικροβιακό, αντισπασμωδικό, μυοχαλαρωτικό (Ali et al, 1991), διουρητικό, ήπιο καθαρτικό, βοηθητικό σε παθήσεις της καρδιάς και των νεύρων (Wright et al, 2007). Τέλος, ο ιβίσκος στη Βραζιλία πιστεύεται ότι συμβάλλει στην απώλεια σωματικού βάρους (Dickel et al, 2007), ενώ στην Νιγηρία θεωρείται ότι συμβάλλει στη αντιμετώπιση της αναιμίας (Falade et al, 2005).

2. Χημική Σύσταση.

Η χημική σύσταση του ιβίσκου στα επιμέρους τμήματα του είναι διαφορετική. Ωστόσο μεταβολές παρατηρούνται , ανάλογα με την ποικιλία, την γεωγραφική προέλευση, το χρόνο συγκομιδής του φυτού και τη μετέπειτα επεξεργασία του. Σε γενικές γραμμές, πάντως, έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη περισσότερων από 37 διαφορετικών ουσιών, οι οποίες, κατηγοριοποιούνται σε 5 ομάδες: 1)παράγωγα λιπαρών οξέων, 2)παράγωγα υδατανθράκων, 3)παράγωγα φαινολών, 4)τερπενοειδή, 5)βιταμίνες και μέταλλα (Ali et al, 2005, Falade et al, 2005, Hirunpanich et al, 2006).

Πίνακας 1. Σύσταση ανάλογα με τα επιμέρους τμήματα του φυτού.

Τμήμα φυτού	Ομάδα – Κατηγορία συστατικών	Συστατικά	Παρατηρήσεις
Άνθος	Οργανικά οξέα	Κιτρικό οξύ, μαλικό οξύ	κύρια συστατικά
	Φουρανικά παράγωγα	Φουρφουράλη και 5-μέθυλο-2-φουρφουράλη	σε ίχνη
	Αλκοόλες	(Z)-3-εξανόλη, 2-εξανόλη, 1-εξανόλη	κύρια συστατικά
	Ανθοκυανίνες	3- σαμβουβιοζίτης της δελφινιδίνης ¹ και της κυανιδίνης,	¹ γνωστή και ως ιβισκίνη
	Άλλες πολυφαινόλες	Κερκετίνη, λουτεολίνη και γλυκοζίτες της, γοσυπετίνη, ιβισκιδίνη ¹ , χλωρογενικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ	¹ γλυκοζίτης της ιβισκετίνης
	Στερόλες	β-σιτοστερόλη και εργοστερόλη	

	Αλκαλοειδή	Γλυκινοβεταΐνη, τριγονελίνη	
Κάλυκας	Οργανικά οξέα	Κιτρικό οξύ ¹ , ιβισκικό οξύ, μαλικό οξύ, ταρταρικό οξύ ² , οξαλικό οξύ, αραχιδονικό οξύ, στεαρικό οξύ	¹ κύριο συστατικό, ² σε ίχνη Η συγκέντρωση των οξέων αυξάνεται κατά την ανάπτυξη του κάλυκα και αρχίζει να μειώνεται μετά την ωρίμανσή του.
	Τερπενοειδή	α-τερπινεόλη ¹ , ευγενόλη	¹ κύριο συστατικό
	Ανθοκυανίνες	κυανιδίνη-3-ρουτινοσίδη, δελφινιδίνη,	
	Άλλες πολυφαινόλες	Ταννίνες, κερκετίνη, ιβισκετίνη, γοσυπετίνη, πρωτοκατεχικό οξύ	σε ίχνη
	Βιταμίνες	ασκορβικό οξύ, β-καροτένιο	σε αξιοσημείωτο %
	Μέταλλα & ιχνοστοιχεία	Fe, Ca, Mg ¹ , Zn ²	^{1,2} σε σημαντική διαθεσιμότητα
	Πηκτίνες		
	Στερόλες	β-σιτοστερόλη	
Πέταλα	Υδατάνθρακες και παράγωγα υδατανθράκων	Γαλακτόζη, γαλακτορουνικό οξύ και ραμνόζη	
	Πολυφαινόλες	γοσυπιτρίνη	7-γλυκοσίτης γονυπετίνης
		ιβισκιτρίνη,	3-μονογλυκοσίτης ιβισκετίνης

		σαβδαριτρίνη,	σε οξεία υδρόλυση δίνει την υδροξυφλαβόνη σαβδαριτίνη
		γοσυτρίνη,	3-γλυκοζίτης της γοσυπετίνης
Έλαιο καρπού	Στερόλες	Χοληστερόλη, καμπαστερόλη, σιγμαστερόλη, β-σιτοστερόλη, α-σπιναστερόλη, εργοστερόλη	

Πίνακας 2. Χρωστικές που έχουν ταυτοποιηθεί ανάλογα με την ποικιλία του φυτού.

ποικιλία	χρωστικές	Παρατηρήσεις
H. Sabdariffa var. altissima	3,5-διγλυκοζίτης της κυανιδίνης 3-(2 ^G -γλυκοζυλορουτινοζιδο) κυανιδίνη	
H. Sabdariffa var. sabdariffa	3-σαμβουβιοσιδο-κυανιδίνη ¹ , 3-γλυκοζίτης της κυανιδίνης ² και γλυκοζίτης της κυανιδίνης ³	Τα δεδομένα αφορούν σε δείγμα από τον κάλυκα του φυτού. Το ¹ αποτελεί την κυριότερη χρωστική ενώ το ³ δεν υφίσταται στην ποικιλία που φύεται στη Σενεγάλη.

Πίνακας 3. Χρωστικές που έχουν ταυτοποιηθεί ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση του φυτού.

Γεωγραφική προέλευση	Χρωστική	Παρατηρήσεις
Τρίνταντ	Δελφινιδίνη, 3- σαμβουβιοζίτης της δελφινιδίνης ¹ , 3-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης Κυανιδίνη, 3-μογλυκοζίτης της κυανιδίνης, 3- σαμβουβιοζίτης της κυανιδίνης ²	H ¹ είναι η κυρίαρχη , ενώ η ² είναι η δεύτερη σε περιεκτικότητα χρωστική
Ταϊβάν	Δελφινιδίνη, 3- σαμβουβιοζίτης της δελφινιδίνης ¹ , 3-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, 3-μογλυκοζίτης της κυανιδίνης	H ¹ είναι η κυρίαρχη χρωστική, ενώ οι υπόλοιπες βρίσκονται σε μικρές ποσότητες.

Πίνακας 4. Συστατικά η ύπαρξη των οποίων έχει ταυτοποιηθεί ανάλογα με την επεξεργασία που έχει υποστεί το φυτό.

Επεξεργασία δείγματος	Συστατικά	Παρατηρήσεις
Φρέσκο/ κατεψυγμένο δείγμα	(Z)-3-εξανόλη, 2-εξανόλη, 1-εξανόλη ¹	¹ κύρια συστατικά
	Φουρφουράλη και 5-μέθυλο-2-φουρφουράλη ²	² σε ίχνη
	Ευγενόλη ³	³ σε ανάλογες ποσότητες και στα 4 δείγματα
Δείγμα αποξηραμένο σε αέρα στους 50°C/ 70°C	Φουρφουράλη και 5-μέθυλο-2-φουρφουράλη ¹	¹ σε μεγάλες ποσότητες
	ευγενόλη	

3. Βιολογικές και θεραπευτικές δράσεις.

Ο ιβίσκος και ορισμένα από τα συστατικά του έχουν πολλές βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις. Από αυτές ξεχωρίζει η ισχυρή αντιυπερτασική δράση σε ανθρώπους και αρουραίους. (Ali et al, 2005). Πλήθος μελετών έχει πραγματοποιηθεί προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου το εκχύλισμα ιβίσκου μειώνει την αρτηριακή πίεση. Κάποια από τα ευρήματα υποστηρίζουν ότι η μείωση είναι συνέπεια της μείωσης του ιξώδους του αίματος (Christian et al, 2006). Άλλα, ότι οφείλεται στη χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών (Ali et al, 2005, Ajay et al, 2007). Ανεξάρτητα από την εξήγηση, όμως, τα αποτελέσματα των μελετών παρέμβασης δείχνουν ότι η τακτική κατανάλωση μέτριων ποσοτήτων ροφήματος ιβίσκου έχει ως αποτέλεσμα μία αξιοσημείωτη μείωση στη διαστολική και συστολική πίεση υπερτασικών ανδρών και γυναικών (Haji Faraji et al, 1999) .

Άλλη μία σημαντική δράση του ιβίσκου είναι η αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας. Τα συστατικά του φυτού επιδεικνύουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Ali et al, 2005) με αποτέλεσμα να προλαμβάνουν την οξείδωση της LDL-C (Prenesti et al, 2005), να μειώνουν την ολική-CHOL ορού και κατά συνέπεια τον κίνδυνο για εμφάνιση αθηροσκλήρωσης (Lin et al, 2007). Επιπλέον εμποδίζουν τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων μέσα από τη τροποποίηση κάποιων μεταβολικών μονοπατιών, που διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο κατά τη διαδικασία της λιπογένεσης (Kim et al, 2007). Ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα πολλών μελετών παρέμβασης και δείχνουν ότι το εκχύλισμα ιβίσκου σε ζώα είναι περισσότερο αποτελεσματικό από τη λοβαστατίνη (Farombi et al, 2007) και σε ανθρώπους το ίδιο αποτελεσματικό με την ετοφιμπράτη (Lin et al, 2007).

Κλινικές μελέτες σε ζώα έδειξαν επίσης ότι τα συστατικά του ιβίσκου μειώνουν τα επίπεδα γλυκαιμίας και το ρυθμό αύξησης σωματικού βάρους σε παχύσαρκα ποντίκια (Ob/MSG) (Alarcon-Aguilar et al, 2007). Η μείωση στα επίπεδα γλυκαιμίας ενδεχομένως να οφείλεται στη δράση ενός συγκεκριμένου συστατικού του ιβίσκου, του 3-σαμβιοβιοζίτη της κυανιδίνης. Η ουσία αυτή εμποδίζει τη δράση της α-γλυκοζιδάσης. Άλλες δράσεις αυτής της ουσίας είναι η μείωση της οξείδωσης των τοκοφερολών, η βελτίωση του μεταβολισμού των λιπιδίων, η πυροδότηση της

αναγέννησης της ροδοψίνης και η προστασία από την εκδήλωση στομαχικών παθήσεων (Iwai et al, 2006).

Τα συστατικά του ιβίσκου επιδεικνύουν, ακόμα, αντικαρκινική δράση μέσα από τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, είναι δραστικά έναντι της λευχαιμίας (Chang et al, 2005), επάγουν την απόπτωση των γαστρικών καρκινικών κυττάρων σε ανθρώπους (Lin et al, 2007) και των κυττάρων HL-60 (Chang, 2005). Η ουσία που θεωρείται υπεύθυνη για την απόπτωση των κυττάρων HL-60 είναι ο 3-σαμβουβιοζίτης της δελφινιδίνης (Hou et al, 2005). Το πρωτοκατεχικό οξύ, ένα άλλο συστατικό του ιβίσκου, εμποδίζει την εξάπλωση του καρκίνου του δέρματος σε ποντίκια που έχουν εκτεθεί σε καρκινογόνους ουσίες του περιβάλλοντος (Tseng et al, 1998). Ο πιθανός μηχανισμός της γενικότερης ογκοκατασταλτικής δράσης ενδεχομένως να οφείλεται στους γλυκοζίτες της κυανιδίνης. Οι ουσίες αυτές εμποδίζουν την επαγόμενη από καρκινογόνους παράγοντες έκφραση κάποιων γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στην καρκινογένεση (Hecht et al, 2006).

Τέλος, ο ιβίσκος εμφανίζει ηπατοπροστατευτική δράση. Σε πειράματα που έγιναν σε αρουραίους που εκτέθηκαν σε κάποιο ηπατοτοξικό παράγοντα, η χορήγηση εκχυλίσματος ιβίσκου περιόρισε την προκαλούμενη διήθηση του ήπατος και προστατεύσε το ήπαρ των ζώων από την εμφάνιση ίνωσης (Liu et al, 2006). Επίσης, το πρωτοκατεχικό οξύ φαίνεται να παρέχει προστασία έναντι κάποιων ενδιάμεσων προϊόντων του μεταβολισμού των λιποειδών (Liu et al, 2002)

Κεφάλαιο 3^ο. Η Μικροενθυλάκωση με κυκλοδεξτρίνες.

1. Γενικά.

Μικροενθυλάκωση (microencapsulation) καλείται η διαδικασία εγκλεισμού μιας ουσίας σε ένα υπόστρωμα με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός προϊόντος, που χαρακτηρίζεται ως κάψουλα. Εναλλακτικά του όρου ενθυλάκωση χρησιμοποιούνται οι όροι επικάλυψη (coating) και προστασία (protection).

Στην τεχνολογία της μικροενθυλάκωσης, το ενθυλακώμενο συστατικό καλείται πυρηνικό υλικό, ενεργή φάση, ή εσωτερική φάση (internal phase), ενώ το υλικό που περιβάλλει το προς ενθυλάκωση συστατικό καλείται βάση εγκλεισμού, μεταφορέας ή κάλυμμα (crust, vehicle) (Gibbs *et al.*, 1999).

Η πρώτη διαδικασία επικάλυψης πραγματοποιήθηκε στα τέλη του 1800, όταν ο φαρμακοποιός Urjohn ψέκασε με υδατικό διάλυμα ζάχαρης (μέσο επικάλυψης) στερεά σωματίδια, τα οποία αναδεύονταν επί κυλινδρικού μέσου. Ο Urjohn άφησε το νερό να εξατμιστεί μέχρι που το στρώμα ζάχαρης, που εναποτίθετο επί των σωματιδίων πήρε το επιθυμητό πάχος και σχήμα. Η μέθοδος αυτή, στην πορεία, επιστρατεύτηκε, κυρίως, για την επικάλυψη της δυσάρεστης γεύσης των φαρμακευτικών ουσιών (Versic, 1988).

Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της ενθυλάκωσης επιτυγχάνουμε τα ακόλουθα (Betrolini, *et al.*, 2001, Schrooyen, *et al.*, 2001, Gouin, 2004):

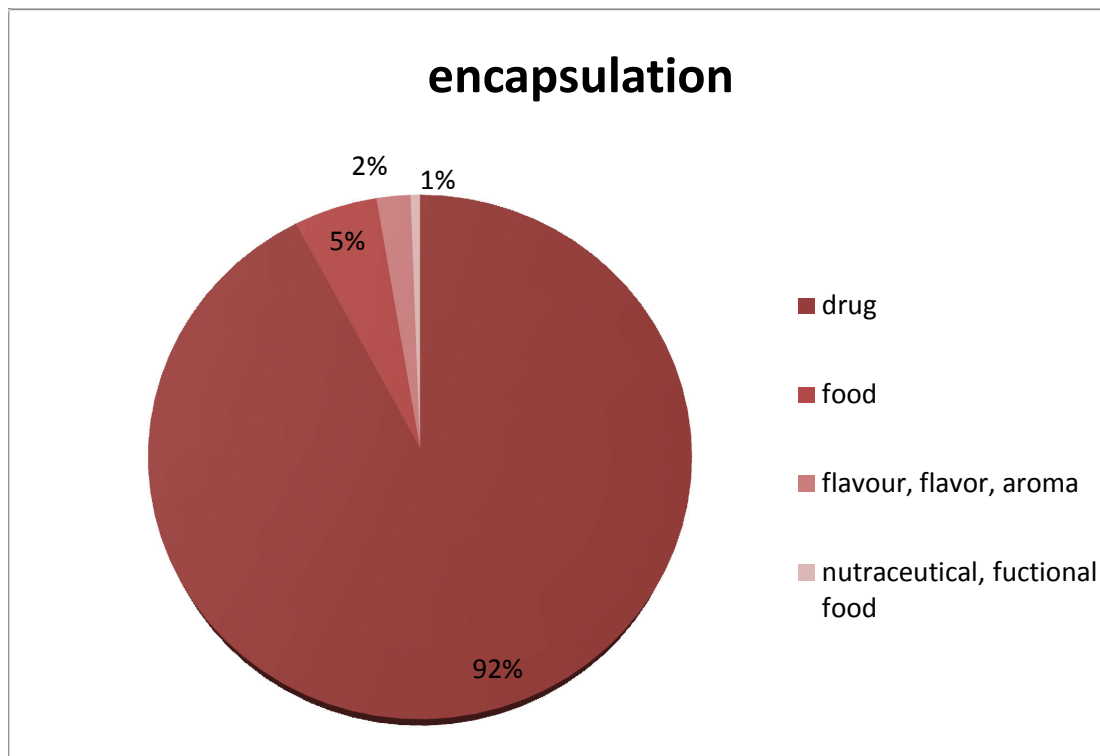
- α) Διαχωρισμό συστατικών
- β) Μείωση τοξικότητας υλικών
- γ) Αλλαγή επιφανειακών ιδιοτήτων υλικών
- δ) Μείωση ευφλεκτότητας υγρών
- ε) Αύξηση διάρκειας αποθήκευσης (χρόνου ζωής)
- στ) Επικάλυψη δυσάρεστης γεύσης συγκεκριμένων συστατικών
- ζ) Μείωση παραγωγής τοξικών προϊόντων λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων
- η) Αύξηση διαλυτότητας συστατικών σε συγκεκριμένο μέσο
- θ) Μετατροπή σε στερεή σκόνη, ουσιών που βρίσκονται σε υγρή κατάσταση, με αποτέλεσμα την εύκολη μεταφορά και προσθήκη τους σε μίγματα τροφίμων

ι) Ελεγχόμενη απελευθέρωση συστατικών σε συγκεκριμένο μέσο και συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

ια) Προστασία δραστικών συστατικών από αντιδράσεις που καταλύονται από το φως καθώς και αποικοδομήσεις λόγω υψηλών θερμοκρασιών (Szente and Szejtli, 2004).

Σήμερα, η ενθυλάκωση εφαρμόζεται τόσο στη φαρμακευτική βιομηχανία για τη μεταφορά φαρμάκων (Arias-Blanco *et al.*, 1998, Mavromoustakos *et al.*, 1998, Ventura *et al.*, 1998, Fatouros *et al.*, 2001, Manolikas and *et al.* 2003, Pinto *et al.*, 2004) όσο και στην τεχνολογία τροφίμων, κυρίως, για τη μεταφορά αρωματικών συστατικών, αλλά και για την απομόνωση συστατικών, όπως χοληστερόλης από αυγό (Williams III *et al.*, 1998). Χαρακτηριστικά του μεγέθους εφαρμογής της στη βιομηχανία φαρμάκων είναι τα αποτελέσματα από την αναζήτηση στη βιβλιογραφία (www.scopus.com) με τις λέξεις κλειδιά “encapsulation and drugs”. βρέθηκαν 7188 αναφορές (οι αριθμοί των βιβλιογραφικών πηγών παρουσιάζονται στο **Σχήμα 1**) Λιγότερο διαδεδομένη είναι η εφαρμογή της στην τεχνολογία τροφίμων (στην αναζήτηση με λέξεις κλειδιά τα “encapsulation and food” βρέθηκαν 401 βιβλιογραφικές πηγές). Περισσότερο μελετημένη είναι η δυνατότητα μεταφοράς αρωματικών συστατικών (162 βιβλιογραφικές πηγές ως αποτέλεσμα στην αναζήτηση με λέξεις κλειδιά τα “encapsulation and flavour or flavor or aroma”) μιας και ο εγκλεισμός αποτελεί μια αποδεκτή τεχνική για τη μεταφορά αρωματικών συστατικών λόγω του ότι οι περισσότερες αρωματικές ενώσεις είναι πτητικές και χημικώς ασταθείς παρουσία οξυγόνου, φωτός, νερού και θερμοκρασίας (Risch, 1995).

Ένας μικρός αριθμός βιβλιογραφικών πηγών βρέθηκε κατά την αναζήτηση σχετικά με την εφαρμογή της ενθυλάκωσης σε συστατικά ή πρόσθετα των τροφίμων με βιολειτουργικές ιδιότητες (αριθμός βιβλιογραφικών πηγών 45 ως αποτέλεσμα της αναζήτησης με τις λέξεις κλειδιά “encapsulation and nutraceutical or functional food”). Οι βιβλιογραφικές αναφορές, που βρέθηκαν ήταν λίγες, παρόλο που τα συστατικά αυτά αναφέρονται ως ευπαθή και υπάρχει ανάγκη προστασίας τους.



Σχήμα 1. Αριθμός αναφορών από τα αποτελέσματα αναζήτησης με λέξεις κλειδιά: α) “encapsulation and drug”, β) “encapsulation and food” γ) “encapsulation and flavour” or flavor or aroma”, δ) “encapsulation and nutraceutical or functional food” (www.scopus.com, Μάρτιος 2008).

2. Τρόποι ενθυλάκωσης.

Στη βιβλιογραφία περιγράφονται οι παρακάτω τρόποι ενθυλάκωσης:

- α) spray drying (ξηράνση με ψεκασμό)
- β) lyophilization or freeze-drying (λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη)
- γ) spray cooling ή spray chilling (ψύξη με ψεκασμό)
- δ) co-crystallization (συγκρυστάλλωση)
- ε) absorption (απορρόφηση)
- στ) spinning disk (περιστρεφόμενος δίσκος)
- ζ) rapid expansion of supercritical solution (ταχεία εκτόνωση υπερκρίσιμου διαλύματος)
- η) liposome entrapment (εγκλεισμός σε λιποσώματα)
- θ) fluidized bed (ρευστοποιημένη κλίνη)
- ι) extrusion (εξώθηση ή εκβολή)

ια) formation of inclusion complex (σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού)

ια) adsorption (προσρόφηση) (Szente and Szejtli, 2004).

Συνήθως ο εγκλεισμός οδηγεί στο σχηματισμό τελικού προϊόντος υπό μορφή στερεής σκόνης, αφού τις περισσότερες φορές, η μέθοδος περιλαμβάνει σύστημα απομάκρυνσης του νερού από το διάλυμα ή το αιώρημα του συμπλόκου (Beristain *et al*, 1996).

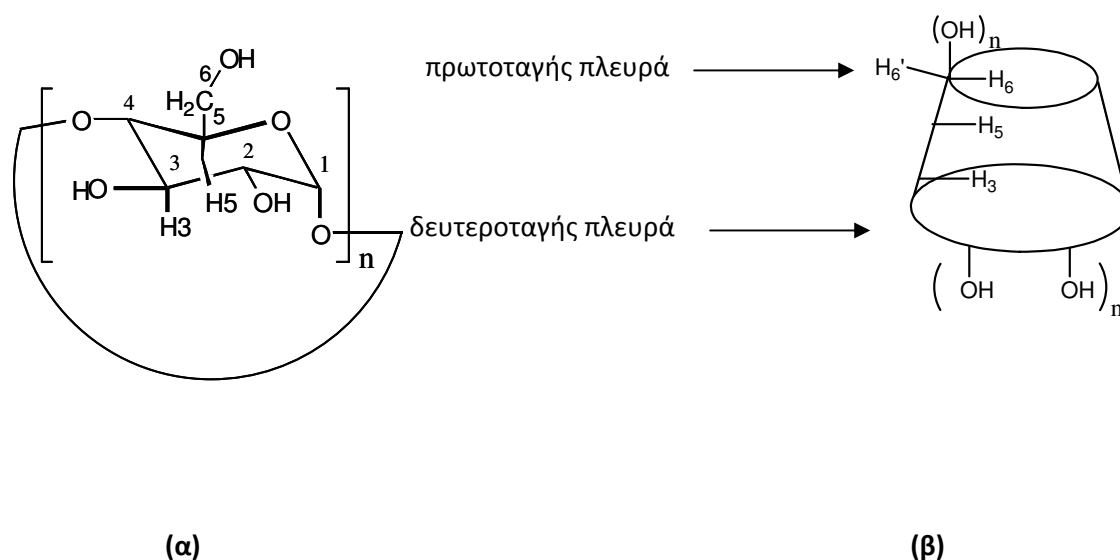
3. Οι Κυκλοδεξτρίνες.

Οι κυκλοδεξτρίνες προέρχονται από την ενζυμική υδρόλυση του αμύλου. Το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση, που προέρχεται από μικροοργανισμούς ή φυτά, αποικοδομεί το άμυλο με ενδομοριακό σπάσιμο της αλυσίδας. Οι κυκλοδεξτρίνες δεν είναι τοξικές, δεν απορροφώνται στην ανώτερη γαστρεντερική οδό, αλλά μεταβολίζονται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Επίσης, χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα λίπους σε προϊόντα χαμηλής θερμιδικής αξίας (κρέμες, εμβάσματα σαλάτας, μαργαρίνες) επειδή δίνουν στο στόμα μια αίσθηση υφής όμοια με εκείνη του λίπους. (Καλογερόπουλος, 2006).

Από χημική άποψη, οι κυκλοδεξτρίνες (CD's) είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες με δομική μονάδα την α-D-γλυκοκυρανόζη, η οποία έχει διαμόρφωση ανακλίντρου 4C_1 . Οι μονομερείς πυρανόζες ενώνονται μεταξύ τους με α-(1-4) γλυκοζιτικό δεσμό (**Σχήμα 2α**) και ανάλογα με τον αριθμό τους διακρίνονται στις α-, β-, γ-, δ-, ε-, ζ-, η- και θ- κυκλοδεξτρίνες, που περιέχουν 6, 7, 8, 9, 10, 11 12 και 13 γλυκοζιτικές μονάδες αντίστοιχα (Szente and Szejtli 2004, Dodziuk, 2006). Συγκεκριμένα για τις α-, β-, γ- κυκλοδεξτρίνες υπάρχει συστηματική ονομασία και είναι κυκλομαλτοεξαόζη για την α-, κυκλομαλτοεπταόζη για τη β- και κυκλομαλτοοκταόζη για τη γ-κυκλοδεξτρίνη. Δεν έχει αναφερθεί ποτέ στη βιβλιογραφία κυκλοδεξτρίνη με λιγότερες από 6 γλυκοζιτικές μονάδες, μάλλον λόγω ανάπτυξης γωνιακής τάσης.

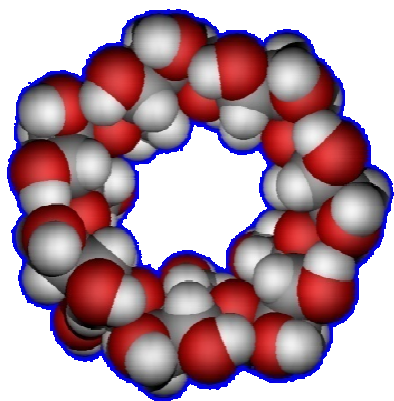
Υπάρχει πλήθος κρυσταλλογραφικών μελετών, από τις οποίες αντλείται πλήρης εικόνα της δομής των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων τους (Harata, 1998). Συγκεκριμένα, οι α-, β- και γ-CD έχουν σχήμα κόλουρου κώνου με δύο υδρόφιλες βάσεις -μία ευρύτερη και μία στενότερη. Η ευρύτερη βάση σχηματίζεται από τις δευτεροταγείς ομάδες -OH των C2, C3 και η στενότερη από τις πρωτοταγείς ομάδες -OH του C6 (**Σχήμα 2β**). Στο εσωτερικό του κώνου, σχηματίζεται μία

υδρόφοβη κοιλότητα, που ορίζεται από τα άτομα H3, H5, H6 και στην ύπαρξη της οποίας οφείλεται η σημαντικότερη ιδιότητα των κυκλοδεξτρινών: ο σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού με υδρόφοβα οργανικά μόρια. Στο **Σχήμα 3** φαίνεται η τρισδιάστατη απεικόνιση της β-κυκλοδεξτρίνης στην οποία διακρίνεται το μέγεθος και η σχετική θέση των ατόμων στην κοιλότητα.

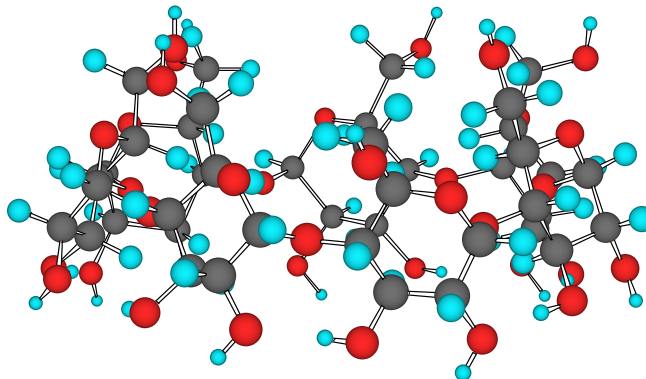


Σχήμα 2. (α) Δομική μονάδα α-D-γλυκοκυρανόζης των κυκλοδεξτρινών (α-CD n=6, βCD: n=7 γCD: n=8). (β) Σχηματική αναπαράσταση κυκλοδεξτρίνης υπό μορφή κώλου κώνου (κατά Dodziuk, 2006).

Ο σχηματισμός συμπλόκου διαφοροποιεί ορισμένες από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ενθυλακωμένου μορίου. Συγκεκριμένα επιδρά: (α) στην αύξηση της χημικής σταθερότητας έναντι του φωτός και της οξείδωσης, (β) στην ελάττωση της πτητικότητας, (γ) στην αύξηση της διαλυτότητας στο νερό, (δ) στην αλλαγή των φωτοχημικών ιδιοτήτων κ.α. (Szejtli, 1998, Botsi *et al.*, 1993, Szente and Szejtli, 2004).



(α)



(β)

Σχήμα 3. Τρισδιάστατη απεικόνιση της β-κυκλοδεξτρίνης, όπου φαίνεται (α) το μέγεθος της κοιλότητας σε αναπαράσταση και (β) η σχετική θέση των ατόμων σε αναπαράσταση.

Ο **Πίνακας 2.** παρουσιάζει τις διαστάσεις των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων κυκλοδεξτρινών, οι οποίες και δύνανται να συμπλοκοποιηθούν με μια μεγάλη ποικιλία οργανικών συστατικών. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνται ευρέως και σε τρόφιμα (σε επίπεδα έως 2%) κυρίως για την προστασία ευαίσθητων συστατικών. Το πλέον συνηθισμένο μέσο εγκλεισμού είναι η β-κυκλοδεξτρίνη. Η ευρεία χρήση της, έγκειται σε δύο λόγους: (α) στην ικανότητά της να σχηματίζει σύμπλοκα και (β) στο χαμηλό της κόστος, συγκριτικά με την α- και γ-κυκλοδεξτρίνη (Yuliani *et al.*, 2006). Σημειώνεται επίσης, ότι η β-κυκλοδεξτρίνη βρίσκεται, από το 1998, στη λίστα των GRAS. Όσον αφορά στην γ-κυκλοδεξτρίνη, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, αυτή θεωρείται πρόσθετο, ενώ για την α-κυκλοδεξτρίνη δεν έχει υπάρξει απόφαση (2005). Στην Ωκεανία η α-κυκλοδεξτρίνη χαρακτηρίζεται ως καινοφανές τρόφιμο (Καλογερόπουλος, 2006).

Πίνακας 2. Διαστάσεις α-, β-, γ-κυκλοδεξτρίνης.

Τύπος κυκλοδεξτρίνης	Εσωτ.διάμετρος Å	Εξωτ. διάμετρος Å	Ύψος κόλουρου κώνου Å
α-κυκλοδεξτρίνη	5.7	13.7	7.8
β-κυκλοδεξτρίνη	7.8	15.3	7.8
γ-κυκλοδεξτρίνη	9.5	16.9	7.8

Οι μεγαλύτερου μεγέθους κυκλοδεξτρίνες δεν έχουν κυλινδρική δομή και η κοιλότητα τους είναι μικρότερη από των γ-κυκλοδεξτρινών. τη ταξινόμηση τους γίνεται ανάλογα με το μέγεθος και το είδος του υποκατάστατη τους. Από αυτές ξεχωρίζει η δ-κυκλοδεξτρίνη, η οποία στο νερό είναι περισσότερο διαλυτή από τη β-κυκλοδεξτρίνη, αλλά λιγότερο από την α- και γ-κυκλοδεξτρίνη.

Με βάση το είδος του υποκαταστάτη τους ταξινομούνται και τα παράγωγα κυκλοδεξτρινών. Από το 1997 μέχρι σήμερα, έχουν συντεθεί περισσότερα από 1500 παράγωγα κυκλοδεξτρινών, τα πιο διαδεδομένα εκ των οποίων παρουσιάζονται στο **Πίνακα 3**. Το πιο γνωστό παράγωγο είναι η υδρόξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD). Τα παράγωγα κυκλοδεξτρινών, συνήθως, χρησιμοποιούνται επειδή είναι περισσότερο υδατοδιαλυτά και επειδή κάποια από αυτά εμφανίζουν μικρότερη τοξικότητα (Connors, 1997, Loftsson and Masson, 2001).

Πίνακας 3. Παράγωγα κυκλοδεξτρινών

Παράγωγα κυκλοδεξτρινών		
α-	β-	γ-
Μεθυλο-	Μεθυλο-	Μεθυλο-
	Αιθυλο-	
Βουτυλο-	Βουτυλο-	Βουτυλο-
	Υδροξυαιθυλο-	Υδροξυαιθυλο-
2-Υδροξυπροπυλο-	2-υδροξυπροπυλο-	2-υδροξυπροπυλο-
	2-υδροξυβουτυλο-	
Ακετυλο-	Ακετυλο-	Ακετυλο-
	Προπιονυλο-	
	Βουτυρυλο-	
Ηλεκτρυλο-	Ηλεκτρυλο-	Ηλεκτρυλο-
	Βενζοϋλο-	
	Παλμιτυλο-	

Για την κρυστάλλωση των κυκλοδεξτρινών απαιτείται η παρουσία μορίων νερού. Συγκεκριμένα, η α-κυκλοδεξτρίνη κρυσταλλώνει με έξι μόρια νερού ($\alpha\text{-CD}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) σχηματίζοντας δύο κρυσταλλικές μορφές I και II. Σε διάλυμα BaCl_2 σχηματίζεται και μια τρίτη μορφή $\alpha\text{-CD}7.57\cdot\text{H}_2\text{O}$. Η β-κυκλοδεξτρίνη κρυσταλλώνεται με έντεκα ($\beta\text{-CD}\cdot 11\text{H}_2\text{O}$) ή δώδεκα μόρια νερού ($\beta\text{-CD}\cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ανάλογα με τη σχετική υγρασία. Η γ-CD μπορεί να κρυσταλλωθεί με 7-28 μόρια νερού, αν και συνήθως κρυσταλλώνεται με οκτώ μόρια νερού. Η δ-CD μπορεί να κρυσταλλωθεί ως $\delta\text{-CD}13.75\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Connors, 1997).

Η διαλυτότητα των κυκλοδεξτρινών αυξάνει αυξανόμενης της θερμοκρασίας και του βαθμού μεθυλίωσης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η τυχαίως μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη παρουσιάζει υδατοδιαλυτότητα $>500\text{ mg/mL}$. Η μέγιστη διαλυτότητα παρατηρείται όταν τα 2/3 των υδροξυλομάδων είναι μεθυλιωμένα. Περαιτέρω μεθυλίωση επιδρά αρνητικά στη διαλυτότητα (Loftsson and Brewste, 1996). Η διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης μεταβάλλεται, επίσης, κατά το σχηματισμό συμπλόκου. Εάν το εγκλεισμένο μόριο είναι μη διαλυτό στο νερό, συχνά το

σχηματισθέν σύμπλοκο έχει μικρότερη διαλυτότητα από το μόριο της κυκλοδεξτρίνης, αλλά μεγαλύτερη από το μη εγκλεισμένο συστατικό.

Ο εγκλεισμός μορίων σε κυκλοδεξτρίνες μπορεί να μελετηθεί με την μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC), όπως αναφέρεται εκτεταμένα στο επόμενο κεφάλαιο. Οι κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν δυο κορυφές κατά τη σάρωση με την μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας. Η πρώτη είναι στους 100°C λόγω απομάκρυνσης του κρυσταλλικού νερού και η δεύτερη στους 300°C, λόγω τήξης των κρυστάλλων και θερμικής διάσπασής τους.

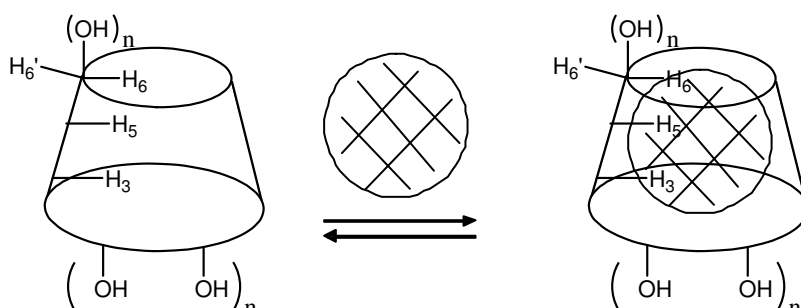
4. Σύμπλοκα Εγκλεισμού.

Σύμπλοκο εγκλεισμού (inclusion complex) καλείται το σύμπλοκο, που αποτελείται από δύο συστατικά: 1) τον υποδοχέα ή ξενιστή (host), μόριο το οποίο έχει ή μπορεί να σχηματίσει κοιλότητα, διάυλο ή σήραγγα και 2) το υπόστρωμα ή ξενιζόμενο μόριο (guest), που εγκλείεται στην κοιλότητα του ξενιστή. Το ξενιζόμενο μόριο είναι συνήθως το μικρότερο σε διαστάσεις συστατικό (Lehn, 1985). Απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό ενός συμπλόκου εγκλεισμού είναι οι στερεοδιατάξεις του ξενιστή και του ξενιζομένου μολιου να έχουν ή να δύνανται να αποκτήσουν σχέση “κλειδιού-κλειδαριάς”. Το προκύπτον σύμπλοκο έχει, τελικά, διαφορετικές ιδιότητες από αυτές των μορίων που το συνιστούν. Σύμπλοκα εγκλεισμού σχηματίζουν ανόργανοι υποδοχείς, όπως οι καολινίτες, οι ζεόλιθοι και ο γραφίτης, καθώς και οργανικοί, όπως οι κυκλοδεξτρίνες, τα κυκλοφάνια, τα κρυπτάνια, οι αιθέρες-στέμματα, κ.α.

Ειδικότερα για τις κυκλοδεξτρίνες, αξιοσημείωτη είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού τόσο με διαλύματα οργανικών όσο και ανόργανων μορίων όσο χωρίς να είναι απαραίτητο αυτά να βρίσκονται στη στερεή κατάσταση. Άλλη σημαντική ιδιότητα των κυκλοδεξτρινών είναι ότι στην κοιλότητα τους μπορεί να εγκλειστεί ολόκληρο το μόριο ή και μέρος αυτού. Η καθολικότητα του εγκλεισμού για το εκάστοτε ξενιζόμενο μόριο, εξαρτάται από την υδροφοβικότητα και τις διαστάσεις του, συγκριτικά με εκείνες της κυκλοδεξτρίνης.

Σε υδατικά διαλύματα, η κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών καταλαμβάνεται από μόρια ύδατος. Το νερό είναι σημαντικό στην αλληλεπίδραση μεταξύ του

εγκλεισμένου μορίου και της κυκλοδεξτρίνης (Saenger, 1980). Η ενυδάτωση των κυκλοδεξτρινών αποτελεί, μάλιστα πολύ σημαντική παράμετρο στη διαδικασία εγκλεισμού, αφού ο εγκλεισμός πραγματοποιείται μόνο όταν η κυκλοδεξτρίνη έχει συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε νερό. Όταν στο διάλυμα προστεθούν υδρόφοβα οργανικά μόρια, το νερό εκτοπίζεται και η κοιλότητα καταλαμβάνεται από το οργανικό μόριο σχηματίζοντας έτσι ένα ισχυρό σύμπλοκο εγκλεισμού (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Σχηματική τρισδιάστατη αναπαράσταση της συμπλοκοποίησης σε υδατικό διάλυμα όπου φαίνεται η αντικατάσταση μορίων νερού από ξενιζόμενα οργανικά μόρια (κατά Dodziuk, 2006).

Στην πραγματικότητα ο μοριακός εγκλεισμός είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης διαφόρων παραγόντων, που εξαρτώνται από τη φύση της κυκλοδεξτρίνης, του ξενιζόμενου μορίου και του διαλύτη στον οποίο πραγματοποιείται η συμπλοκοποίηση (αν πρόκειται για διάλυμα). Παρακάτω παρατίθενται οι σημαντικότεροι παράγοντες (Manor and Saenger, 1974, Rekharsky and Inoue, 1998):

- α) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.
- β) δεσμοί υδρογόνου.
- γ) ενεργειακό κέρδος από την απομάκρυνση μορίων ύδατος από την κοιλότητα, το περιβάλλον της οποίας δεν ευνοεί το σχηματισμό πλήρους δικτύου δεσμών υδρογόνου.
- δ) δυνάμεις διασποράς London.
- ε) αλληλεπιδράσεις μεταφοράς φορτίου.
- στ) στερεοχημική παρεμπόδιση.
- ζ) αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου.
- η) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

θ) αποδέσμευση της ενέργειας τάσεως του μακροκυκλίου στην περίπτωση της α-CD, η οποία ως συμπλοκοποιημένη έχει συμμετρικό σχήμα.

Οι στοιχειομετρίες ξενιστής/ξενιζόμενου μόριου, που απαντώνται στα σύμπλοκα είναι: = 1:1, 2:1, 1:2 και 2:2. Οι παράγοντες, που επηρεάζουν ως επί τω πλείστω τη σταθερότητα του συμπλόκου, είναι η μεταβολή του αριθμού των προσαρτημένων στην κυκλοδεξτρίνη μορίων ύδατος και ο βαθμός εισχώρησης του ξενιζόμενου μόριου στην κοιλότητα. Η δημιουργία δεσμών υδρογόνου ανάμεσα σε ξενιστή και ξενιζόμενο μόριο και οι αλλαγές στη διαμόρφωση της κυκλοδεξτρίνης και του ξενιζόμενου μόριου είναι ακόμη δύο παράγοντες, που συμβάλλουν σημαντικά στη σταθερότητα του συμπλόκου.

Η ισορροπία σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ κυκλοδεξτρίνης και συστατικού (G) περιγράφεται από την αντίδραση:



Η σταθερά σχηματισμού συμπλόκου περιγράφεται από την εξίσωση:

$$K_{nm} = [C_{nm}] / [G]^m [CD]^n \quad (1)$$

Σε περίσσεια νερού, το εγκλεισμένο μόριο απελευθερώνεται από το σύμπλοκο, με αποτέλεσμα την αντιστροφή της θερμοδυναμικής ισορροπίας (Kant *et al.*, 2004). Η απελευθέρωση του μόριου επηρεάζεται από άλλα μόρια, που ενδεχομένως υπάρχουν, αφού μπορεί να δεσμευθεί σε άλλες ουσίες λόγω του αυξανόμενου ρυθμού απελευθέρωσης.

Η συμπλοκοποίηση μεταξύ εγκλεισμένου συστατικού και κυκλοδεξτρίνης μπορεί να επιτευχθεί με τη στράτευση διαφόρων μεθόδων. Οι πιο ενδεικτικές από αυτές είναι: (1) ο σχηματισμός συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα με ή χωρίς ρύθμιση του pH, (2) η μέθοδος της συγκαταβύθισης και (3) η απευθείας ανάμιξη στερεής σκόνης παρουσία μικρής ποσότητας νερού (kneading) (Hedges, 1998).

Ο σχηματισμός συμπλόκου σε υδατικό διάλυμα είναι μια απλή διαδικασία, αφού για την πραγματοποίησή του απαιτείται μόνο ένα ποτήρι ζέσεως και μία θερμαινόμενη πλάκα με αναδευτήρα (Szente and Szejtli, 2004). Το συστατικό προστίθεται σε απιονισμένο/ απεσταγμένο νερό, στο οποίο έχει προηγουμένως

προστεθεί η κυκλοδεξτρίνη. Η μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης-διατροφοδραστικού συστατικού ποικίλει από 1:1, 2:1, 1:2 και εξαρτάται από την αναλογία, με την οποία τα δύο συστατικά προβλέπεται να περιέχονται στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Το υδατοδιαλυτό σύμπλοκο σχηματίζεται ύστερα από ανάμιξη των συστατικών για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία που περιγράφεται παραπάνω. Στη συνέχεια το συμπλόκο, που προκύπτει καθαρίζεται διηθούμενο σε φίλτρο συγκεκριμένης διαμέτρου.

Η συμπλοκοποίηση είναι επίσης δυνατή, ύστερα από ανάμιξη διαλύματος του συστατικού σε οργανικό διαλύτη και διαλύματος κυκλοδεξτρίνης σε πολικό διαλύτη (Polyakov *et al.*, 2004, Mele *et al.*, 1998). Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η πιθανότητα εγκλεισμού του οργανικού διαλύτη αντί του επιθυμητού συστατικού, στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.

Στην τρίτη διαδικασία το συστατικό και η κυκλοδεξτρίνη αμαμιγνούνται παρουσία μικρής ποσότητας νερού. Το νερό απομακρύνεται στη συνέχεια από το διάλυμα με διήθηση, φυγοκέντριση, λυοφιλίωση ή ξηρός ψεκασμός. Αυτή η μέθοδος μπορεί εύκολα να αξιοποιηθεί για εμπορική παραγωγή.

Εναλλακτικά, η συμπλοκοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε συγκεκριμένη τιμή pH παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα, με στόχο τη μετάπτωση των μορίων στη μη ιονισμένη κατάσταση. Στην μη ιονισμένη τους μορφή τα συστατικά αυτά είναι περισσότερο ικανά να αντικαταστήσουν τα ευρισκόμενα στην κοιλότητα υδατοδιαλυτά μόρια σχηματίζοντας έτσι πιο σταθερά προϊόντα (Zornoza *et al.*, 1998). Συγκεκριμένα ο εγκλεισμός του κινναμωμικού οξέος σε κυκλοδεξτρίνες διευκολύνεται σε pH 4 (Rodis *et al.*, 2004).

Ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες βρίσκει εφαρμογή στη φαρμακοβιομηχανία. Η συμπλοκοποίηση αυξάνει τη διαλυτότητα μορίων με μικρή διαλυτότητα στο νερό. Αυξάνει, επίσης, τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων μειώνοντας παράλληλα την τοξικότητά τους. Γενικά, πολλές από τις μεθόδους που εφαρμόζονται στον εγκλεισμό φαρμακευτικών ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στον τον εγκλεισμό διατροφο-δραστικών μορίων (Καλογερόπουλος, 2006).

Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν επίσης να μεταφέρουν διατροφοδραστικά μορία, και να αλλάξουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εγκλεισμένου συστατικού σε πολύ μεγάλο βαθμό (Clarot et al., 2000). Ειδικότερα η β-κυκλοδεξτρίνη, που δύναται να μεταφέρει φαινολικούς δακτυλίους, χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό του φαινολικού δακτυλίου πολλών συστατικών ή πρόσθετων τροφίμων, όπως οι βιταμίνες και τα αντιοξειδωτικά. Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν μικρή διαλυτότητα στο νερό, ακριβώς λόγω της παρουσίας των υδρόφοβων ομάδων φαινυλίου. Μικρή διαλυτότητα στο νερό παρουσιάζουν όλες οι σχετικά λιπόφιλες ουσίες. Ωστόσο μετά τον εγκλεισμό τους σε κυκλοδεξτρίνες, το σύμπλοκο, που προκύπτει είναι πιο υδατοδιαλυτό με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κόμα και για τον εμπλουτισμό τροφίμων με κύριο συστατικό το νερό.

Ακόμη ο εγκλεισμός μορίων μέσα στη κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών μπορεί να προσφέρει σε ευπαθή μόρια προστασία από την οξείδωση, από την φωτοαποικοδόμηση και από την αποικοδόμηση λόγω θέρμανσης. Ενδεικτικό της αντιοξειδωτικής προστασίας, που προσφέρει η β-κυκλοδεξτρίνη, είναι το παράδειγμα της βανιλίνης (Karathanos et al., 2006). Ένα πολύ καλό παράδειγμα φωτοευαίσθητου μορίου στο οποίο παρέχεται προστασία, ύστερα από συμπλοκοποίηση του με β-κυκλοδεξτρίνη είναι εκείνο της α-τοκοφερόλης.

Οι κυκλοδεξτρίνες, που κυκλοφορούν στο εμπόριο, είναι πολλές και διαφορετικές. Γι' αυτό και η επιλογή της κυκλοδεξτρίνης, που κρίνεται κάθε φορά ως καταλληλότερη, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως:

- α) Το μέγεθος του μορίου.
 - β) Τη διαλυτότητα του μορίου στο νερό.
 - γ) Το κόστος της κάθε κυκλοδεξτρίνης, συγκριτικά με το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα.
 - δ) Το τρόφιμο, που το εγκλεισμένο μόριο πρόκειται να εμπλουτίσει.
 - ε) Τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο συμπλοκοποίησης.
 - στ) Τη διαθέσιμη βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο μόριο ή και για συγγενή μόρια.
 - ζ) Το αν επιτρέπεται η χρήση τους σε συστήματα τροφίμων.
 - η) Τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την επιβεβαίωση της συμπλοκοποίησης.
- Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη σχηματίζει σύμπλοκο που δύσκολα μελετάται ως προς τη δομή του με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως για την επιβεβαίωση του εγκλεισμού.

Κεφάλαιο 4^ο: Μέθοδοι

1. Η LC/ MS ESI (Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry Electron Spray Ionization).

Η Φασματοσκοπία Μάζας (MS) χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση των φλαβονοειδών των φυτών και των τροφίμων καθώς και των *in vivo* μεταβολιτών τους. Αυτό συμβαίνει γιατί αποτελεί πλέον την πιο ευαίσθητη μέθοδο μοριακής ανάλυσης των φλαβονοειδών. Η MS μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την ακριβή μοριακή μάζα, όπως και για τη δομή και την ποσότητα των ενώσεων. Επιπλέον, λόγω του υψηλού δυναμικού διαχωρισμού των μαζών, επιτυγχάνει πολύ καλή επιλεκτικότητα. Στόχος της MS είναι να ανιχνεύσει τα φορτισμένα μοριακά ιόντα και θραύσματα με βάση τη μοριακή τους μάζα. Οι περισσότεροι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών είναι πολικοί, μη πτητικοί και συχνά θερμικά ασταθείς.

Η LC-MS χρησιμοποιείται συχνά για να επιβεβαιώσει την παρουσία μη ταυτοποιημένων ενώσεων ή για να απομονώσει νέες ενώσεις. Η LC-MS σπάνια χρησιμοποιείται για τον πλήρη χαρακτηρισμό της δομής, αλλά παρέχει τη μοριακή μάζα των διαφόρων συστατικών ένας δείγματος.

Η μέθοδος ESI πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τους Yamashita και Fenn το 1984 και το 2002 τιμήθηκε με το βραβείο του Νόμπελ Χημείας. Αυτή τη στιγμή η ESI αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανάλυση των πολικών και μη πτητικών φλαβονοειδών (από τις ανθοκυάνινες μέχρι τις συμπυκνωμένες τανίνες), κυρίως λόγω της ευκολίας με την οποία μπορεί να ιονίσει αυτές τις πολικές και μη πτητικών ενώσεις. Η τεχνική επιτρέπει την ανίχνευση του μοριακού ιόντος, είτε ως πρωτονιωμένου μορίου, $[M+H]^+$, είτε ως συμπλέγματος, $[M+Na]^+$, είτε ως αποπρωτονιωμένου μορίου, $[M-H]^-$, και προκαλεί μέτρια θραύση του μορίου όπως συμβαίνει και με άλλες τεχνικές ιονισμού υψηλής ενέργειας. Η MS έχει χρησιμοποιηθεί μαζί την ESI για την ανάλυση φλαβαν-3-ολών από εκχυλίσματα φυτών και από δείγματα πλάσματος με επίτευξη αποτελεσμάτων σε επίπεδα ανίχνευσης της τάξης των 20 ng. Επιπλέον, η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες για τη δομή ιδιαίτερα πολυμερισμένων ενώσεων, ερμηνεύοντας το προφίλ θραύσης και το φορτίο των σχηματισμένων ιόντων, που μπορούν να έχουν είτε το ίδιο ή διαφορετικό φορτίο (Andersen και Markham, 2006).

2. Η Διαφορική Μέθοδος pH στον Ποσοτικό Προσδιορισμό των Ανθοκυανινών.

Από τα χαρακτηριστικά φάσματα των ανθοκυανινών μπορούν να ληφθούν ουσιαστικές (ποσοτικές και ποιοτικές) πληροφορίες. Η διαφορική μέθοδος pH είναι μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία, που στηρίζεται στο δομικό μετασχηματισμό της ανθοκυανίνης σε συνάρτηση με το pH, γεγονός που μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας την οπτική φασματοσκοπία. Ειδικότερα, οι ανθοκυανίνες, όταν αλλάζει το pH, υποβάλλονται σε αντιστρέψιμες δομικές μετατροπές (Κεφάλαιο 1^ο, Διάγραμμα 2), οι οποίες αποτυπώνονται με διαφορετικά φάσματα απορρόφησης. Τέλος, η διαφορική μέθοδος pH επιτρέπει την ακριβή και γρήγορη μέτρηση των συνολικών ανθοκυανινών ακόμη και παρουσία πολυμερισμένων και υποβιβασμένων χρωστικών ουσιών.

Η συνολική περιεκτικότητα των ανθοκυανινών σε εκχυλίσματα που περιέχουν και άλλες φαινολικές ενώσεις προσδιορίζεται με τη μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε ένα μόνο μήκος κύματος. Αυτό είναι δυνατό επειδή οι ανθοκυανίνες έχουν μια χαρακτηριστική ζώνη απορρόφησης στην περιοχή του ορατού (490 έως 550 nm). Αυτή η ζώνη είναι μακριά από τις ζώνες απορρόφησης των άλλων φαινολικών ενώσεων, που παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στην UV περιοχή. Εντούτοις, αυτή η απλή μέθοδος κρίνεται ακατάλληλη όταν στο διάλυμα υπάρχουν προϊόντα υποβάθμισης των ανθοκυανινών ή μελανοϊδίνες (αντιδράσεις αμαύρωσης).

Η αφαιρετική μέθοδος προσδιορισμού των ανθοκυανινών βασίζονται στη χρήση παραγόντων λεύκανσης, που αποχρωματίζουν τις ανθοκυανίνες αλλά δεν έχουν επίπτωση στα άλλα υλικά που υπάρχουν στο διάλυμα. Το θειώδες νάτριο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι δύο από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους παράγοντες λεύκανσης. Πιο αναλυτικά, στη συγκεκριμένη μέθοδο γίνονται δύο φασματοφωτομετρήσεις: μία πριν την προσθήκη του παράγοντα λεύκανσης στο $\lambda_{vis-max}$ και μία μετά (απορρόφηση τυφλού). Η χρήση αυτών των δύο φασμάτων δίνει μια ακριβή μέτρηση της συνολικής περιεκτικότητας σε ανθοκυανίνες (μονομερείς χρωστικές ουσίες). Ταυτόχρονα αποτελεί δείκτη για τον πολυμερισμό και την πυκνότητα του χρώματος, την αμαύρωση και την υποβάθμιση. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανθοκυανινών, μετράται η απορρόφηση στο $\lambda_{vis-max}$ και στα 700nm σε pH 1,0 και 4,5, κάτι που επιτρέπει και μια αμυδρή συσχέτιση. Γενικά, η

αντίδραση με δισουλφίδιο χρησιμοποιείται για να ενεργοποιήσει τους διάφορους δείκτες υποβάθμισης (Whitaker, 2001).

3. Η GC/ MS SIM (Gas Chromatography/ Mass Spectrometry Selective Ion Monitoring).

Η GC/ MS έχει καθιερωθεί ως τεχνική ρουτίνας για την ανάλυση των αγλυκονών των φλαβονοειδών. Λόγω της περιορισμένης αστάθειας των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών, η ανάλυση τους από τη GC/ MS δεν προτιμάται. Ωστόσο, οι βελτιώσεις στην τεχνολογία των στηλών της GC έχει αυξήσει το εύρος των φλαβονοειδών που μπορούν να αναλυθούν με GC/ MS ως μη παραγωγοποιημένες ενώσεις (Andersen και Markham, 2006).

Στη SIM (Selective Ion Monitoring) η ανίχνευση των περιεχόμενων πολυφαινόλων στηρίζεται στην παρουσία στο δείγμα τριών χαρακτηριστικών για κάθε πολυφαινόλη ιόντων, με χρόνο κατακράτησης (RT) ± 0.05 min του αναμενόμενου χρόνου κατακράτησης τους στα πρότυπα διαλύματα. Ένα από τα τρία αυτά ιόντα ορίζεται ως ιόν στόχος (**target**), και στην παρουσία του στηρίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των περιεχόμενων πολυφαινόλων. Ο προσδιορισμός αυτός ορίζεται από το λόγο της έντασης απόκρισης των 2 άλλων ιόντων (**qualifiers**) προς την αντίστοιχη του ιόντος στόχου στο δείγμα.

4. Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry (DSC)).

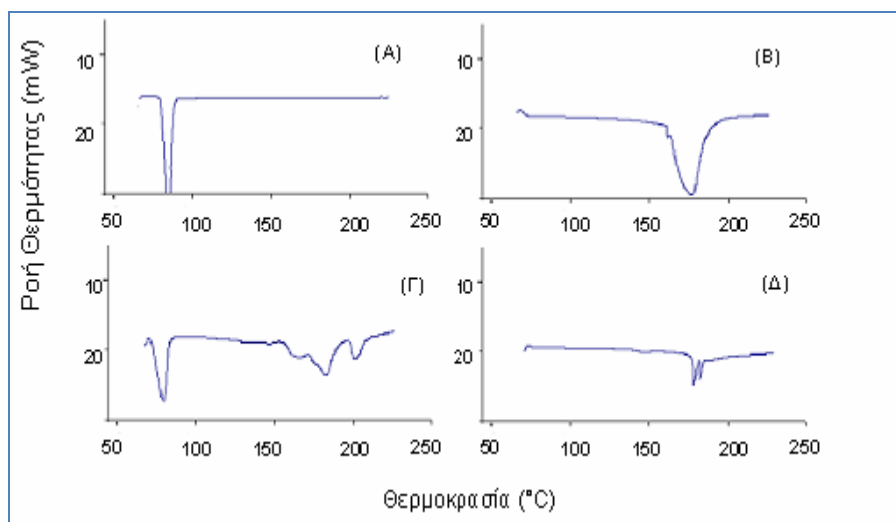
Με τη μέθοδο DSC μπορούν να μελετηθούν οι θερμικές ιδιότητες του συμπλόκου. Στην τεχνική αυτή η θερμότητα, που απαιτείται για τη διατήρηση του δείγματος και του δείγματος αναφοράς στην ίδια θερμοκρασία, καταγράφεται σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Έτσι παρέχονται ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τις εξώθερμες και ενδόθερμες αντιδράσεις αλλά και με τις αλλαγές στη θερμοχωρητικότητα. Οι αλλαγές αυτές είναι αποτέλεσμα της μεταβολής της θερμοκρασίας ή του χρόνου.

Τα συστατικά του δείγματος ενδέχεται, λοιπόν, να παρουσιάζουν κάποια από τις παρακάτω θερμικές συμπεριφορές: τήξη, κρυστάλλωση, βρασμό, εξάχνωση,

αφυδάτωση, μετάπτωση στερεού-στερεού και υαλώδη μετάπτωση. Για παράδειγμα όταν για την ξήρανση του δείγματος έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές όπως η λυοφιλίωση ή η ξήρανση με ψεκασμό, το τελικό προϊόν είναι άμορφο και χαρακτηρίζεται από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης. Στη θερμοκρασία αυτή (T_g), τα υλικά μαλακώνουν εξαιτίας του μεγάλου εύρους συντονισμένης μοριακής κίνησης (Soottiantawat *et al.*, 2004).

Η μέθοδος DSC μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για την επιβεβαίωση σχηματισμού του συμπλόκου εγκλεισμού. Ο εγκλεισμός είναι γεγονός όταν δεν υπάρχουν πια θερμικά συμβάντα ανάμεσα στα μόρια που συμπλοκοποιούνται. Συγκεκριμένα, από τη στιγμή που το εγκλεισμένο μόριο σύμπλοκοποιηθεί με την κυκλοδεξτρίνη, δεν δύναται να αλληλεπιδράσει με άλλα συστατικά, αφού πλέον δεν υφίσταται ξένη κρυσταλλική δομή για να απορροφήσει ενέργεια.

Μια τυπική πορεία, που ακολουθείται για την επιβεβαίωση των συμπλόκων εγκλεισμού, παρουσιάζεται στο **Σχήμα 5**, όπου το σύμπλοκο βανιλίνης/ β -CD μελετάται χρησιμοποιώντας σάρωση DSC (Karathanos *et al.*, 2006). Με τη μέθοδο αυτή λαμβάνονται 4 θερμογραφήματα: της β -CD, της ελεύθερης βανιλίνης, του φυσικού μίγματος και του συμπλόκου εγκλεισμού. Το θερμογράφημα της βανιλίνης παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή στους 84°C , η οποία και αντιστοιχεί στο σημείο τήξης της· το σημείο τήξης της καθαρής βανιλίνης είναι $81\text{--}83^\circ\text{C}$. Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για το μίγμα βανιλίνης και β -CD (**Σχήμα 5.γ**). Η σάρωση του φυσικού μίγματος με το DSC, ταυτιζόταν σχεδόν με αυτή της καθαρής βανιλίνης παρουσιάζοντας έντονη ενδόθερμη κορυφή ξανά στους 84°C , περίπου. Η ταύτιση αυτή αποδεικνύει ότι μέσω αυτής της διαδικασίας δεν επιτεύχθηκε εγκλεισμός. Τα θερμογραφήματα της β -CD και του συμπλόκου εγκλεισμού, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.β** και **5.δ**, δεν παρουσίασαν έντονη ενδόθερμη κορυφή στο διερευνώμενο εύρος θερμοκρασιών. Η εξαφάνιση της ενδόθερμης κορυφής (σ.τ. της βανιλίνης στους 84°C), (**Σχήμα 5.δ**) υποδηλώνει ότι με την τεχνική της λυοφιλίωσης, παράχθηκε σύμπλοκο εγκλεισμού μεταξύ βανιλίνης και β -CD, και όχι φυσικό μίγμα.



Σχήμα 5. Θερμογραφήματα: (α) βανιλίνη, (β) β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD), (γ) φυσικό μίγμα βανιλίνης/β-CD, (δ) σύμπλοκο εγκλεισμού βανιλίνης/β-CD

Η τεχνική της DSC μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της χημικής σταθερότητας των διατροφο-δραστικών συστατικών σε συνθήκες οξείδωσης, μέσω συνεχούς ροής οξυγόνου στο συστατικό (Clas *et al.*, 1999). Με τον εγκλεισμό τα μόρια, που προκύπτουν είναι πιο ανθεκτικά στην οξείδωση. Με τη μέθοδο DSC μπορεί να διαπιστωθεί εάν η κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης μπορεί να προστατέψει ένα μόριο από την οξείδωση ή ακόμη και να αυξήσει τη σταθερότητά του. Σύμφωνα με τη μέθοδο, τα δείγματα θερμαίνονται με γρήγορο ρυθμό, προσεγγίζοντας μια θερμοκρασία όπου η οξείδωση δύσκολα συμβαίνει (κάτω από την θερμοκρασία οξείδωσης του ελεύθερου μορίου). Όταν επιτευχθεί η υψηλή αυτή θερμοκρασία, η ουσία θερμαίνεται με χαμηλό ρυθμό ώστε να παρατηρηθεί οξείδωση (εξώθερμη αντίδραση). Η θερμοκρασία έναρξης της οξείδωσης είναι αυτή στην οποία παρατηρείται αποσύνθεση της ουσίας, που εξετάζεται, λόγω οξείδωσης (Gines *et al.*, 1996).

Χρησιμοποιώντας τη DSC σάρωση σε διαφορετικούς ρυθμούς οξείδωσης, μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες σχετικά με την κινητική της οξείδωσης (Cibulkoná *et al.*, 2005). Γι' αυτό το λόγο άλλωστε έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος παρακολούθησης της οξειδωτικής σταθερότητας από πολλούς ερευνητές.

Κεφάλαιο 5^ο. Πειραματικό μέρος

1. Αντιδραστήρια και όργανα.

1.1.Αντιδραστήρια

- β-κυκλοδεξτρίνη , Aldrich, M.B. 1135, Cat: 85.608-, Lot:S20642-054, Steinheim, Germany
- Δείγμα Hibiscus sabdariffa από Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (Γεωπονική Σχολή Θεσσαλονίκης)
- BSTFA , Aldrich, Steinheim, Germany
- MeOH, Merk, Darmstadt, Germany
- Απιονισμένο νερό

1.2. Συσκευές – όργανα

- Ζυγός OHAUS, Analytical Standard, Max. 1.20g, AS120
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης. HEIDOLPH INKUBATORHAUBE, No.549-90030-00-0, groί, 09/99, HEIDOLPH UNIMAX 1010, INKUBATOR 1000
- Διάταξη λυοφιλίωσης, TELSTAR, Cryodos-45, Spain, 2001, Nr 397, 220V, 50Hz, 0.525 KW
- Φασματοφωτόμετρο KONTRON INSTRUMENTS, UVIKON SPECTROPHOTOMETER 931, Serial No. 04941035, 100/240V, 50/60Hz, Main Fuses: 100/120V 4A, 220/240V 2A.
- Διάταξη Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA)
- Αέριος Χρωματογράφος /Φασματοσκοπία Μάζας Agilent (Wallborn, Germany) HP series GC 6890N /HP 5973 MS detector (EI, 70ev), split-splitless injector και HP 7683 autosampler
- Υγρός χρωματογράφος / Φασματοσκοπία Μάζας Finnigan MET Spectra System P4000 pump και UV6000LP diode array detector και Finnigan AQA MS

2. Ανίχνευση ανθοκυανινών δείγματος ιβίσκου με Υγρή Χρωματογραφία Φασματοσκοπίας Μάζας (LC- MS).

Ο προσδιορισμός των κύριων ανθοκυανινών ιβίσκου έγινε από το Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων.

Για την ανίχνευση των ανθοκυανινών του δείγματος χρειάστηκε να συνδυαστούν τα παρακάτω: ένας αγωγός Finnigan MAT Spectra System P4000, με έναν ανιχνευτή διόδου UV6000LP και με ένα φασματογράφο μάζας Finnigan AQA. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε στήλη Superspher RP-18, 125 2 mm, 4 lm (Macherey-Nagel, Germany), η οποία προστατεύονταν από μια πακεταρισμένη με το ίδιο υλικό στήλη. Η προστατευτική στήλη βρισκόταν σε θερμοκρασία 40°C. Τα δείγματα αναλύθηκαν προγραμματίζοντας το ESI ώστε να ανιχνεύει τα θετικά ιόντα με ενέργεια 12eV. Η τάση των τριχοειδών, της πηγής και του ανιχνευτή είχαν οριστεί στα 4,90kV, 50V και 650V αντίστοιχα. Ως θερμοκρασία ελέγχου είχαν ρυθμιστεί οι 450°C. Για την δημιουργία του χρωματογραφήματος χρησιμοποιήθηκαν κλιμακωτά οξικό οξύ (2%)- μεθανόλη για 45min.

3. Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανινών δείγματος ιβίσκου με διαφορική μέθοδο pH.

Το ολικό περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες προσδιορίστηκε, με τη μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας pH, έτσι όπως προσδιορίστηκε από τους Lee, Dust and Wrolstad. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ένα σύστημα buffer χλωριούχου καλίου με pH 1,0 (0,025M) και ένα σύστημα buffer οξικού νατρίου με pH 4,5 (0,4M). Υποπολλαπλάσια (0,2mL) των θερμικά επεξεργασμένων δειγμάτων αναμίχτηκαν με 0,8mL από καθένα από τα δύο buffer. Η απορρόφηση στα δείγματα, που προέκυψαν, μετρήθηκε στα 510 και 700nm. Ο υπολογισμός των ολικών ανθοκυανινών στηρίχθηκε στην παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Ολικές Ανθοκυανίνες(mg/L)} = (A \times MW \times DF \times 10^3) \times 1000 / \varepsilon \times l$$

όπου για το συγκεκριμένο δείγμα: $A = (A_{510} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5}$, MW είναι το Μοριακό Βάρος, DF είναι ο παράγοντας διαλυτότητας, ε είναι ο μοριακός συντελεστής εξάλειψης, που για τον 3-γλυκοζίτη της κυανιδίνης είναι 26.900L/mol και l είναι το μήκος της κυψελίδας σε cm.

4. Ανίχνευση πολυφαινολών δείγματος ιβίσκου με Αέρια Χρωματογραφία Φασματοσκοπίας Μάζας (GC- MS).

Με στόχο την ποσοτική ανίχνευση των φαινολικών συστατικών του άγνωστου δείγματος ιβίσκου, διεξήχθη μελέτη ανάλυσης με τη μέθοδο GC- MS. Πιο συγκεκριμένα, σε πρώτη φάση παρασκευάστηκε διάλυμα ιβίσκου- μεθανόλης, αναλογίας 1:1 v/v. 0,05mL από το παραπάνω διάλυμα αναμιγνύθησαν με 20μL εσωτερικού προτύπου, την 3-(4-υδροξυ-φαίνυλο)-1-προπανόλη (19,2μg/mL). Το προκύπτον εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και παραγωγοποιήθηκε, ύστερα από προσθήκη 250μL συλλιωτικού μέσου (BSTFA) και θέρμανση σε υδατόλουτρο των 70°C για 20min. Σε επόμενη φάση, 1 μL από το διάλυμα εισήχθει στον αεριοχρωματογράφο με αναλογία δείγματος προς φέρον μέσο (split ratio) ίση με 1:20.

5. Παρασκευή συμπλόκου ιβίσκου/β-κυκλοδεξτρίνης με λυοφιλίωση.

Η συμπλοκοποίηση του ιβίσκου με την β-CD έγινε ύστερα από ανάμιξή τους σε υδατικό διάλυμα και απομάκρυνση του νερού, με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Ειδικότερα, σε υδατικό διάλυμα β- CD, που προέκυψε ύστερα από διαλυτοποίηση 0.091gr β-CD σε 10ml νερού, προστέθηκε ποσότητα ιβίσκου ίση με 0.0473gr σε μοριακή αναλογία 1:1. Το προκύπτον μίγμα, στο οποίο είχε προηγουμένως προστεθεί κάψα πορσελάνης, αναμίχθηκε περαιτέρω με τη βοήθεια αναδευτήρα για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ψύχθηκε στους -40°C για 24 h και τοποθετήθηκε στη διάταξη της λυοφιλίωσης. Ύστερα από 48 h παραμονής του δείγματος στη διάταξη, εξασφαλίστηκε η απομάκρυνση όλου του περιεχόμενου νερού.

6. Μελέτη θερμικής υποβάθμισης ανθοκυανινών.

Η θερμική υποβάθμιση των ανθοκυανινών του ιβίσκου μελετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος ($\text{pH} = 4$) στις θερμοκρασίες 60° , 70° , 80° , 90° C. Συγκεκριμένα, σε σωληνάκια erpendof, που επωάζονται σε υδατόλουτρο των 60° , 70° , 80° , 90° C, τοποθετήθηκαν δείγματα του 1mL από το ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα αφαιρείται από το υδατόλουτρο σε δεδομένη χρονική στιγμή (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 min) και ψύχεται γρήγορα στους -40° C. Η θερμική υποβάθμιση των ανθοκυανινών παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης μελετήθηκε, ύστερα από αραίωση της β-κυκλοδεξτρίνης στο αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα στη μοριακή αναλογία ανθοκυανίνης/ β-κυκλοδεξτρίνης, 1:1.

7. Μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας των συμπλόκων με τη μέθοδο Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC).

7.1. Μελέτη σχηματισμού συμπλόκου με τη μέθοδο (DSC):

Στοχεύοντας στην επιβεβαίωση της συμπλοκοποίησης ανάμεσα στην β-κυκλοδεξτρίνη και στον ιβίσκο μελετήσαμε σε διάταξη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Perkin Elmer, DSC-6, Boston, MA, USA), τέσσερα δείγματα. Τα δείγματα αυτά ήταν τα εξής : β-κυκλοδεξτρίνη, ιβίσκος, φυσικό μίγμα ιβίσκου/β-κυκλοδεξτρίνης, σύμπλοκο εγκλεισμού ιβίσκου /β-κυκλοδεξτρίνης. Αναλυτικότερα, τυχαία ποσότητα από καθένα από τα παραπάνω δείγματα τοποθετείται σε κλειστό καψίδιο αλουμινίου μεγέθους 40μL. Στη συνέχεια, παρούσα αζώτου το περιέχον το δείγμα καψίδιο σαρώνεται στη θερμοκρασιακή περιοχή μεταξύ 40°C και 210°C με ταχύτητα σάρωσης τους 10 C°/min. Η επιβεβαίωση του εγκλεισμού προκύπτει ύστερα από την παρατήρηση διαφοράς ανάμεσα στα θερμογραφήματα που δίνουν το φυσικό μίγμα ιβίσκου/β-κυκλοδεξτρίνης και το σύμπλοκο εγκλεισμού ιβίσκου /β-κυκλοδεξτρίνης.

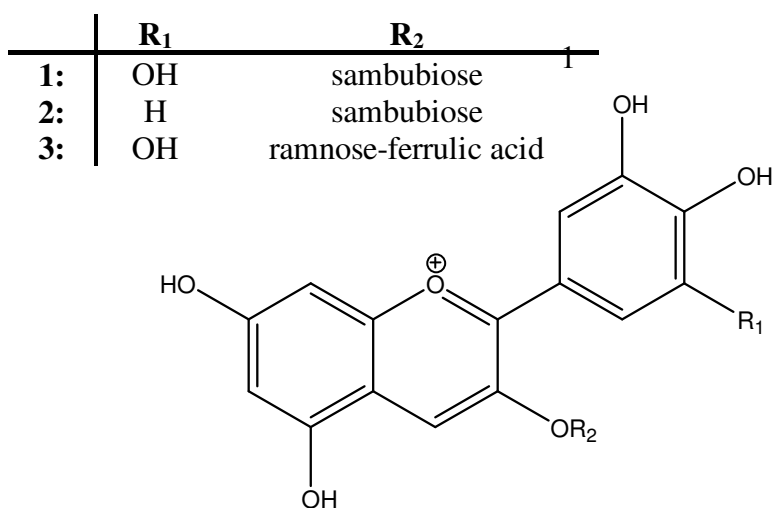
7.2. Μελέτη οξείδωσης του ιβίσκου και του συμπλόκου του με τη μέθοδο (DSC).

Για τη μελέτη της οξείδωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DSC υπό συνθήκες διαβίβασης αερίου οξυγόνου. Τυχαία ποσότητα από τα δείγματα ιβίσκου και συμπλόκου ιβίσκου /β-κυκλοδεξτρίνης τοποθετείται σε καψίδια από αλουμίνιο με ανοιχτή οπή στο πάνω μέρος. Η οπή διευκολύνει τη διαβίβαση οξυγόνου στο δείγμα. Τα δείγματα θερμαίνονται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 40°C με ρυθμό σάρωσης 10 C°/min και παραμένουν στην θερμοκρασία αυτή για 1min, προκειμένου να κατανεμηθεί ομοιόμορφα η θερμοκρασία στο δείγμα. Στη συνέχεια, θερμαίνονται έως τους 360°C με ταχύτητα ίση με 10 C°/min.

Κεφάλαιο 6^ο: Αποτελέσματα.

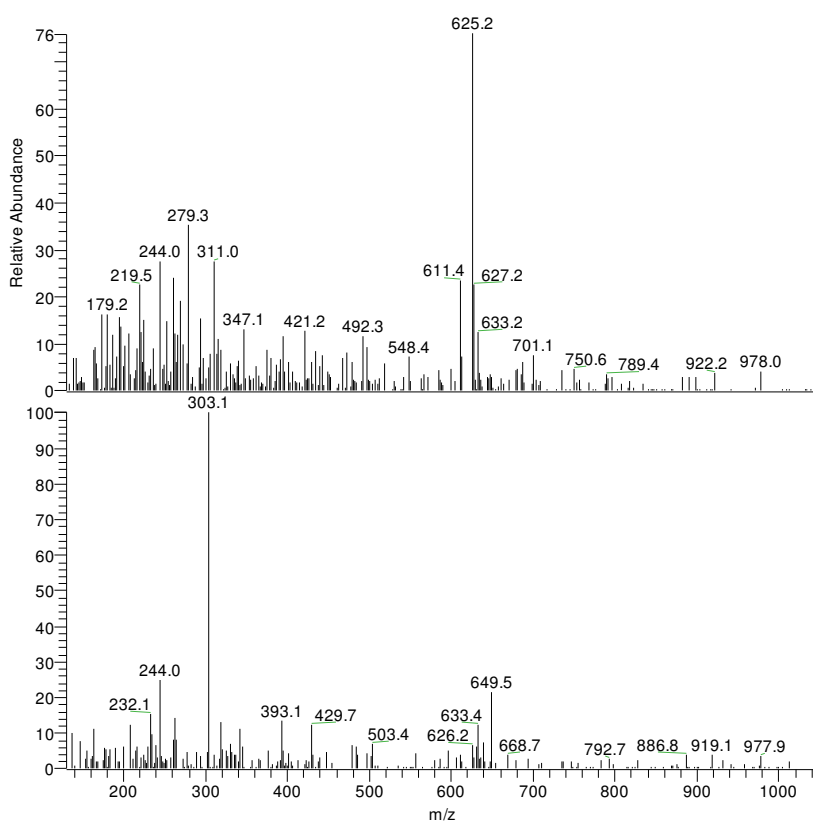
1. Ανίχνευση ανθοκυανινών δείγματος ιβίσκου με Υγρή Χρωματογραφία Φασματοσκοπίας Μάζας (LC- MS).

Με την ανάλυση LC MS ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι κυριότερες ανθοκυανίνες του δείγματος. Αναλυτικότερα επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη δύο ποσοτικά κυρίαρχων στο εκχύλισμα ανθοκυανινών: του 3 - σαμβουβιοζίτη της δελφινιδίνης και του 3 - σαμβουβιοζίτη της κυανιδίνης με χρόνους κατακράτησης 10,39min και 11,67min αντίστοιχα. Το μοριακό βάρος των δύο ανθοκυανινών βρέθηκε ίσο με 597,3 και 581,2 αντίστοιχα. Το παραπάνω αποτέλεσμα, έρχεται σε πλήρη συμφωνία με παλαιότερες αναλύσεις φασματοσκοπίας μάζας (Du & Francis, 1973). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ακόμα μίας ανθοκυανίνης με χρόνο κατακράτησης τα 13,32 min και μοριακό βάρος ίσο με 625,2. Η ανθοκυανίνη αυτή, που σύμφωνα με τη φασματοσκοπική ανάλυση είναι ο 3-φερρυλοϋλραμνοζίτης της δελφινιδίνης, βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα στο δείγμα. Το αξιοσημείωτο, ωστόσο, είναι ότι η ύπαρξη της αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.



Σχήμα1. Οι δομές των ανθοκυανινών του εκχυλίσματος ιβίσκου.

Παρατηρώντας τη φασματοσκοπική ανάλυση της τρίτης ανθοκυανίνης, βλέπουμε ότι περιέχει το θραύσμα με m/z 303,1, όπως επίσης και το θετικό θραύσμα $[M^+]=625, 2$ (Σχήμα 2). Το πρώτο θραύσμα αντιστοιχεί ξεκάθαρα στην αγλυκόνη της δελφινιδίνης. Όσον αφορά τώρα στο σάκχαρο που είναι συνδεδεμένο με τη δελφινιδίνη, εικάζεται ότι αυτό θα μπορούσε να είναι μια ακυλιωμένη με φερρυλικό οξύ ραμνόζη. Η εικασία αυτή στηρίζεται, αφενός μεν, στο δεδομένο ότι το μοριακό βάρος της συνδεδεμένης με το οξύ πεντόζης είναι 322· αφετέρου δε, στις έρευνες που υποστηρίζουν ότι τόσο το φερρυλικό οξύ όσο και η ραμνόζη είναι δύο από τις πιο κοινές ουσίες που ανιχνεύονται στις ανθοκυανίνες των φυτών (Wu & Prior, 2005).



Σχήμα 2. Φασματοσκοπία μάζας του 3-φερρυλοϋλραμνοζίτη της δελφινιδίνης.

2. Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανινών δείγματος ιβίσκου με διαφορική μέθοδο pH.

Σύμφωνα με την απορρόφηση, που σημειώθηκε στα 510nm, η μέση συγκέντρωση ανθοκυανινών στο εκχύλισμα ιβίσκου βρέθηκε ίση με 275mg/g εκχυλίσματος. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι ο 3 - σαμβουβιοζίτης της δελφινιδίνης αποτελεί το 64% (176mg/g εκχυλίσματος) των ανθοκυανινών του εκχυλίσματος. Επίσης, βρέθηκε ότι ο 3 - σαμβουβιοζίτης της κυανιδίνης και ο 3-φερρυλοϋλραμνοζίτης της δελφινιδίνης συμμετέχουν σε ποσοστό 25% (68 mg/g εκχυλίσματος) και 7% αντίστοιχα (19 mg/g εκχυλίσματος). Η παρουσία άλλων συστατικών στο εκχύλισμα, σύμφωνα με τον Gradinaru (2003), δεν επηρεάζει την ένταση του χρώματος.

3. Ανίχνευση πολυφαινολών δείγματος ιβίσκου με Αέρια Χρωματογραφία Φασματοσκοπίας Μάζας (GC- MS).

Το πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με ανάλυση GC/MS (*Πίνακας 1*). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι στο εκχύλισμα περιέχεται χλωρογενικό οξύ, κερκετίνη, μυρικετίνη, καφεϊκό οξύ, συρινγικό οξύ, καμφερόλη, γαλλικό οξύ, σιναπικό οξύ, ουρσολικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, επικατεχίνη. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μελέτες που ακολούθησαν.

	Χρόνος έκλουσης Rt	Εκχύλισμα ιβίσκου ng/mg (mg/kg)
Απλές πολυφαινόλες		
I.S.	21,73	
Βανιλίνη	17,26	ίχνη
Κιναμμικό οξύ	17,51	
τυροσόλη	18,28	
ρ-υδροξυ βενζοϊκό οξύ	19,66	20,38
ρ-υδροξυ φαινυλακετικό οξύ	20,12	17,41
ομοβανιλλική αλκοόλη	23,03	1,26
φλορετικό οξύ	25,55	27,25
βανιλλικό οξύ	25,94	74,65
ομοβανιλλικό οξύ	27,25	
ο-κουμαρικό οξύ	28,74	39,84
πρωτοκατεχικό οξύ	29,96	137,78
3-4,διυδροξυ-φαινυλοξικό	30,84	28,25
συρινγικό οξύ	34,43	1619,57
P-COUM	35,42	155,75
γαλλικό οξύ	36,39	706,56
φερυλλικό οξύ	38,57	194,6
καφεϊκό οξύ	39,28	1794,18
σιναπικό οξύ	40,58	491,48
ρεσβερατρόλη	44,9	42,74
κρυσίνη	45,3	88,79
επικατεχίνη	46,08	126,05
ναριγενίνη	46,13	55,83

κατεχίνη	46,26	77,55
γενιστεΐνη	46,73	55,73
καμφερόλη	48	1438,65
χλωρογενικό οξύ	48,6	45995,27
κερκετίνη	49,27	8709,64
μερικετίνη	49,97	5209,39
ολεανικό οξύ	56,38	44,22
ουρσολικό οξύ	57,43	201,25

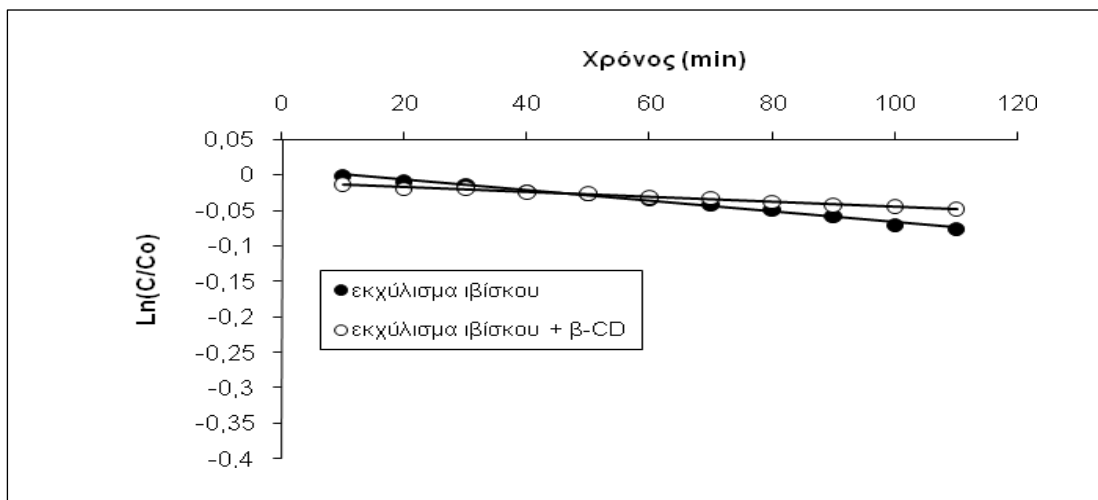
***Πίνακας 1.** Πολυφαινόλες που ανιχνεύτηκαν στο εκχύλισμα ιβίσκου με βάση την ανάλυση GC/MC.*

4. Μελέτη θερμικής υποβάθμισης ανθοκυανινών.

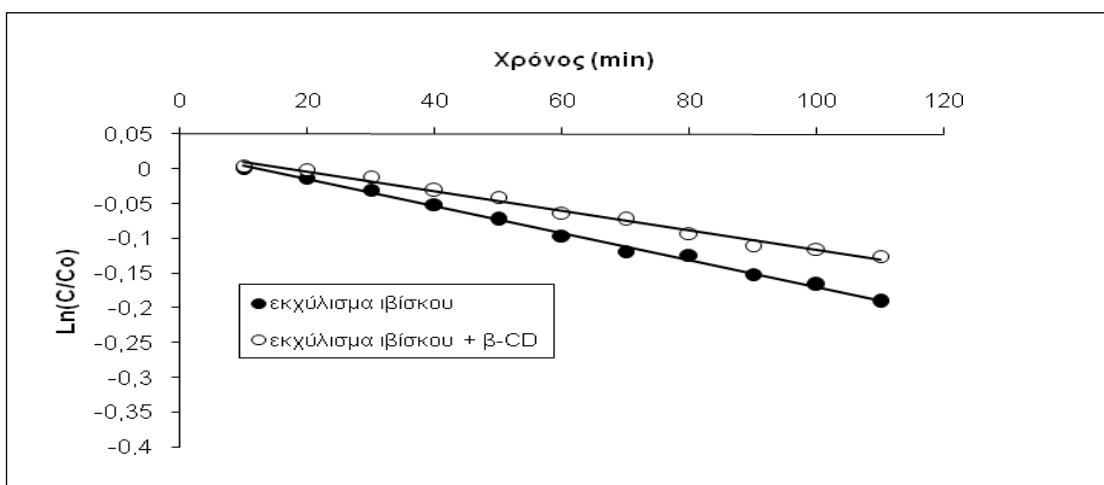
Οι ανθοκυανίνες είναι ασταθείς ενώσεις και μπορούν εύκολα να υποβαθμιστούν κάτω από την παρουσία και τη δράση παραγόντων όπως: θερμότητα, φως, οξυγόνο, χρόνος αποθήκευσης, pH, ένζυμα. Στο παρελθόν, όσες μελέτες πραγματοποιήθηκαν πάνω στο ρυθμό υποβάθμισης των ανθοκυανινών επικεντρώνονταν, ως επί το πλείστον, στην επίδραση της θέρμανσης σε συνάρτηση με το χρόνο. Ποτέ, ωστόσο, μέχρι τώρα, δε μελετήθηκε η κινητική υποβάθμισης των ανθοκυανινών του ιβίσκου παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης.

Στην παρούσα μελέτη παρασκευάσαμε δύο τύπους δειγμάτων: το ένα με καθαρό εκχύλισμα ιβίσκου και το άλλο με μίγμα ιβίσκου / β-κυκλοδεξτρίνης σε μοριακή αναλογία 1:1. Οι υπολογισμοί για την παρασκευή του δεύτερου δείγματος βασίστηκαν στο μοριακό βάρος του 3-σαμβουβιοζίτη της δελφινιδίνης και του 3-σαμβουβιοζίτη της κυανιδίνης, μιας και οι δύο αυτές ανθοκυανίνες είναι τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος. Επιπλέον, το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε γύρω στο 4, με αφορμή ότι το pH των περισσότερων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των ροφημάτων κυμαίνεται σε αυτήν την τιμή.

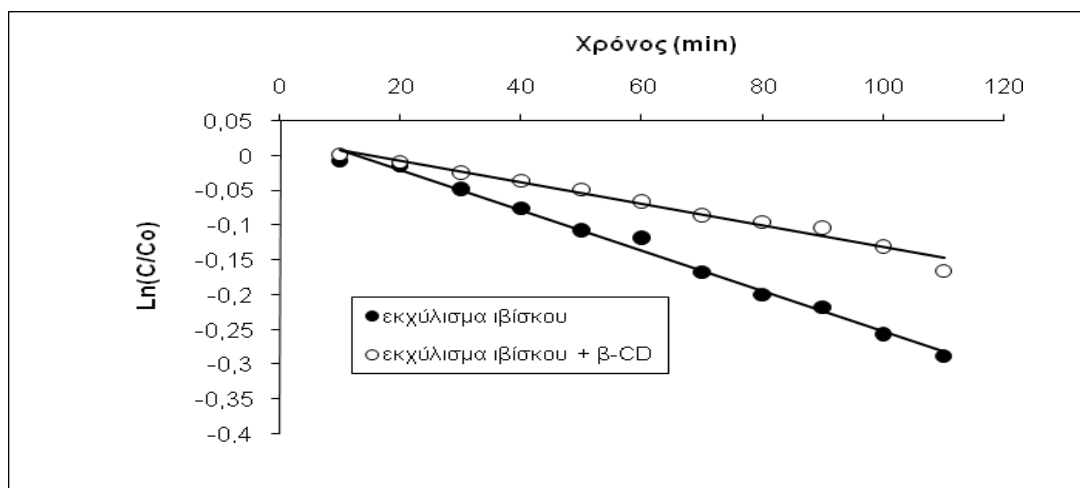
Στα *Διαγράμματα 1, 2, 3 και 4*, τα οποία αντιστοιχούν σε θερμική επεξεργασία στους 60°, 70°, 80° και 90°C φαίνεται ο ρυθμός υποβάθμισης των ανθοκυανινών των δύο δειγμάτων σε συνάρτηση με το χρόνο, όταν η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή. Ως ρυθμός υποβάθμισης ορίζεται το πηλίκο $(C/C_0)/t$, όπου C_0 η αρχική συγκέντρωση των ανθοκυανινών του δείγματος και C η συγκέντρωση τους μετά από θέρμανση για t min. Η γραμμικότητα της σχέσης υποδηλώνει ότι η υποβάθμιση των ανθοκυανινών ακολουθεί κινητική 1^{ης} τάξης. Κινητική 1^{ης} τάξης ακολουθεί και η υποβάθμιση των ανθοκυανινών σε υδατικό διάλυμα (Kirca and Cemeroglu, 2003; Tseng et al. 2006, Zhang et al,2007).



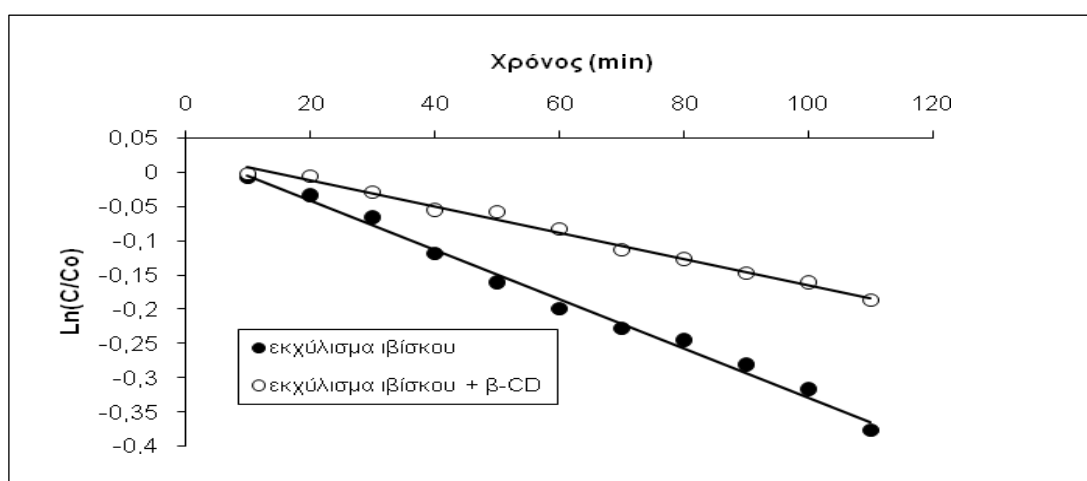
Διάγραμμα 1. Στους 60°C το δείγμα ιβίσκου/ β-CD υποβαθμίζεται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με το δείγμα ιβίσκου. Μάλιστα ο φαίνεται πως στο τέλος της επεξεργασίας η ποσότητα από το δείγμα ιβίσκου/ β-CD είναι σχεδόν διπλάσια από εκείνη του δείγματος ιβίσκου.



Διάγραμμα 2. Στους 70°C το δείγμα ιβίσκου/ β-CD εξακολουθεί να υποβαθμίζεται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με το δείγμα ιβίσκου. Ομοίως με παραπάνω, στο τέλος της επεξεργασίας η ποσότητα του συμπλόκου ιβίσκου/ β-CD φαίνεται να είναι διπλάσια του ελεύθερου ιβίσκου.



Διάγραμμα 3. Στους 80° C το δείγμα ιβίσκου/ β-CD εξακολουθεί να υποβαθμίζεται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με το δείγμα ιβίσκου. Και σε αυτή την περίπτωση, όταν το $t=120\text{min}$, η ποσότητα του συμπλόκου ιβίσκου/ β-CD αναμένεται να είναι σχεδόν η διπλάσια του ελεύθερου ιβίσκου



Διάγραμμα 4. Στους 90° C το δείγμα ιβίσκου/ β-CD εξακολουθεί να υποβαθμίζεται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με το δείγμα ιβίσκου. Ομοίως με παραπάνω και εδώ.

Η σταθερά υποβάθμισης (k) και ο χρόνος ημιζωής ($T_{1/2}$) υπολογίστηκαν από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\ln (C / C_0) = -kt \quad (2)$$

$$T_{1/2} = \ln 0.5 / k \quad (3)$$

Όπου $C / C_0 = A / A_0$, με A_0 να είναι η αρχική απορρόφηση του αραιωμένου εκχυλίσματος και A να είναι η απορρόφηση του μετά από επώαση για t min σε μια δεδομένη θερμοκρασία (Ozkan et al, 2002).

Όπως ήταν αναμενόμενο, αυξανόμενης της θερμοκρασίας και του χρόνου η υποβάθμιση των ανθοκυανινών αυξήθηκε. Όμως στο δείγμα με τη β-κυκλοδεξτρίνη ο ρυθμός υποβάθμισης των ανθοκυανινών ήταν μικρότερος συγκριτικά με εκείνο του αραιωμένου εκχυλίσματος (**Πίνακας 2**). Φαίνεται λοιπόν ότι η β-κυκλοδεξτρίνη μπορεί να προστατέψει τις ανθοκυανίνες του ιβίσκου από την οξείδωση εξίσου καλά με αλλά διατροφολογικά μόρια με φαινολικό δακτύλιο (Karathanos et al, 2007, Mourtzinis et al, 2007).

Γενικά η β-κυκλοδεξτρίνη προστατεύει τα ευαίσθητα μόρια από την υποβάθμιση προσφέροντάς τους ένα βασικό ή ένα υδρόφοβο περιβάλλον. Σε υδρόφοβα περιβάλλοντα, τα φορτισμένα μόρια είναι ενεργειακώς ασταθή. Έτσι η συμπλοκοποίηση επιβραδύνει τη χημική υποβάθμιση, κατά την οποία ένα ενδιάμεσο υψηλής ενεργειακής στάθμης μεταβαίνει στην κατάσταση μετάπτωσης (Uckama et al., 2006). Στη δεδομένη μελέτη, η υποβάθμιση πραγματοποιήθηκε σε όξινο pH. Συνεπώς η προστασία προήλθε από την υδρόφοβη κοιλότητα της β-CD.

Άλλη μια παράμετρος με τη βοήθεια της οποίας μπορεί να χαρακτηριστεί η κινητική υποβάθμισης των ανθοκυανινών του ιβίσκου είναι ο χρόνος ημιζωής ($T_{1/2}$). Ως $T_{1/2}$ ορίζεται ο χρόνος που χρειάζεται για να υποβαθμιστεί το 50% των ανθοκυανινών και η μεταβολή του για τα δύο δείγματα, ανάλογα με τη θερμοκρασία, απεικονίζεται στον **Πίνακα 2**. Συγκρίνοντας λοιπόν τους $T_{1/2}$ των δύο δειγμάτων, παρατηρούμε ότι οι ανθοκυανίνες (ACN) παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης είναι πιο ανθεκτικές στην επαγόμενη από τη θέρμανση υποβάθμιση σε σχέση με τις ανθοκυανίνες του αραιωμένου εκχυλίσματος. Μάλιστα φαίνεται ότι η β-CD σχεδόν διπλασίασε τον χρόνο ημίσειας ζωής.

T	k 10 ⁻³ (min ⁻¹)		T _{1/2} (h)		R ²	
	ACN ιβίσκου	ACN ιβίσκου + β- CD	ACN ιβίσκου	ACN ιβίσκου+ β-CD	ACN ιβίσκου	ACN ιβίσκου + β-CD
60 ^o	0.7	0.3	16.50	38.51	0.9893	0.9877
70 ^o	1.9	1.4	6.08	8.25	0.9957	0.9896
80 ^o	2.9	1.6	3.98	7.22	0.9918	0.9770
90 ^o	3.6	1.9	3.21	6.08	0.9915	0.9905

Πίνακας 2. Σε όλες τις θερμοκρασίες, ο ρυθμός υποβάθμισης των ανθοκυανινών (ACN) του υδατικού διαλύματος ιβίσκου-β-CD είναι μικρότερος συγκριτικά με εκείνο των ανθοκυανινών του υδατικού διαλύματος ιβίσκου. Το αντίθετο συμβαίνει με τους T_{1/2}.

Για να περιγράψουμε την εξάρτηση της υποβάθμισης των ανθοκυανινών από τη θερμοκρασία, εφαρμόζουμε την εξίσωση Arrhenius:

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT$$

όπου k η σταθερά του ρυθμού υποβάθμισης σε min⁻¹

k_0 ο συντελεστής συχνότητας σε min⁻¹

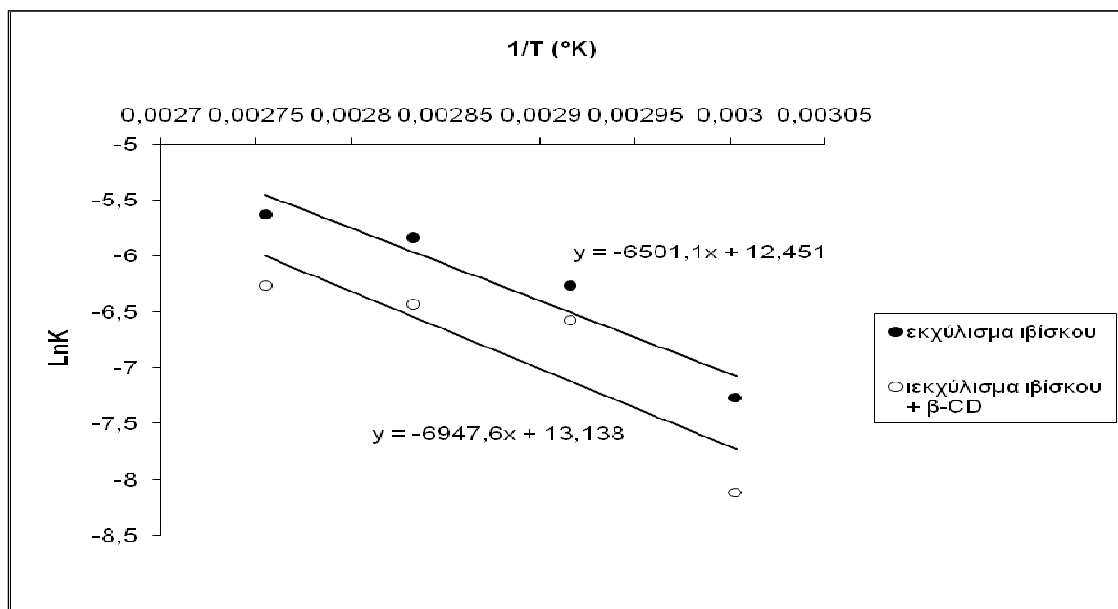
E_a η ενέργεια ενεργοποίησης σε kJ/mol

$R(=8,314\text{KJ/mol})$ η παγκόσμια σταθερά των αερίων

T η απόλυτη θερμοκρασία σε K

Οι ενέργειες ενεργοποίησης της υποβάθμισης απουσία και παρουσία β-CD, όπως υπολογίστηκαν από την εξίσωση του Arrhenius, ήταν σχεδόν ίδιες: 54,05 kJ mole⁻¹ και 54,02 kJ mole⁻¹ αντίστοιχα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ομοιότητα με την οποία υποβαθμίζονται οι ανθοκυανίνες όντας τόσο στο εσωτερικό της β-CD όσο και στην ελεύθερη μορφή τους. Πάντως οι τιμές αυτές είναι χαμηλότερες συγκριτικά με εκείνες που έχουν αναφερθεί για χυμούς ή συμπυκνώματα που περιέχουν ανθοκυανίνες. Η εξήγηση που κρύβεται πίσω από αυτή τη διαφορά δίνεται από το γεγονός ότι στα συμπυκνωμένα προϊόντα τα αντιδρώντα μόρια είναι πολύ κοντά

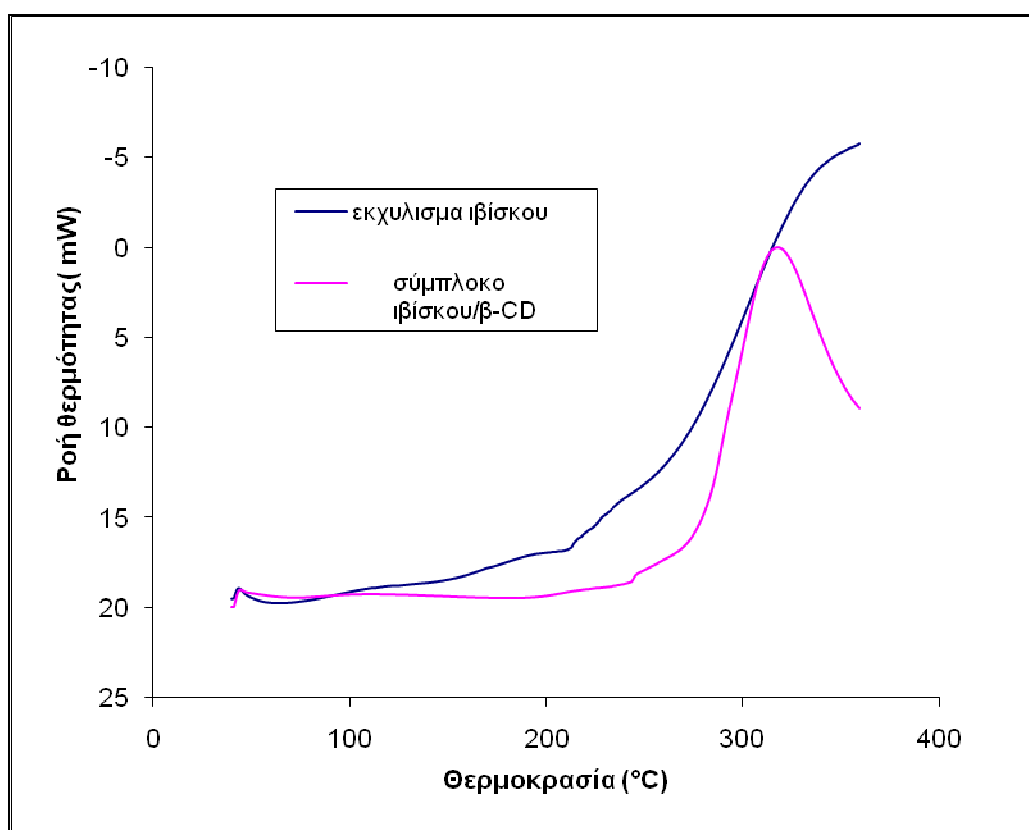
μεταξύ τους με αποτέλεσμα να επιταχύνονται οι χημικές αντιδράσεις (Kirka et al. 2003)



Σχήμα 5. Το διάγραμμα Arrhenius για τα δείγματα ιβίσκου και β-CD/ ιβίσκου. Αυξανόμενης της θερμοκρασίας, η σταθερά υποβάθμισης μειώνεται. Σε όλες τις περιπτώσεις η σταθερά υποβάθμισης του συμπλόκου είναι μικρότερη εκείνης του εκχυλίσματος ιβίσκου.

5. Μελέτη σχηματισμού και σταθερότητας των συμπλόκων με τη μέθοδο Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC).

Στο *Διάγραμμα 6* παρατίθεται το συγκριτικό διάγραμμα θερμικής υποβάθμισης εκχυλίσματος ιβίσκου και συμπλόκου ιβίσκου/ β -CD σε δοσμένο χρόνο (θέρμανση από 40°-360°C με ρυθμό 10°C/min). Στη σάρωση DSC, παρατηρείται μια εξώθερμη κορυφή στους 80° C για το εκχύλισμα ιβίσκου. Η κορυφή αυτή σχετίζεται με την οξείδωση των ανθοκυανινών. Ωστόσο για το σύμπλοκο ιβίσκου/ β -CD, δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο. Συνεπώς η διαδικασία της μικροενθυλάκωσης προστατεύει τα συστατικά του εκχυλίσματος ιβίσκου από την οξείδωση.



Διάγραμμα 6. Καμπύλες οξειδωτικής υποβάθμισης εκχυλίσματος ιβίσκου και συμπλόκου ιβίσκου/ β -CD.

Κεφάλαιο 7^ο: Συμπεράσματα και Συζήτηση.

Από τα παραπάνω πειράματα φάνηκε ότι η προσθήκη β-CD σε υδατικό διάλυμα ανθοκυανινών ελαττώνει την επαγόμενη από την υψηλή θερμοκρασία υποβάθμιση. Μάλιστα, βρέθηκε ότι παρουσία β-CD ο χρόνος ημιζωής των ανθοκυανινών του εκχυλίσματος σχεδόν διπλασιάζεται. Τέλος, αποδείχτηκε ότι το υδατικό εκχύλισμα ιβίσκου είναι περισσότερο ανθεκτικό στην οξείδωση, όταν σχηματίζει σύμπλοκο με τη β-CD παρά όταν είναι μόνο του.

Τον τελευταίο καιρό το ενδιαφέρον των βιομηχανιών τροφίμων για τη δημιουργία προϊόντων, με ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία του καταναλωτή είναι αυξημένο. Τα παραπάνω ευρήματα μπορεί να έχουν πρακτική αξία στην παραγωγή λειτουργικών και εμπλουτισμένων τροφίμων. Ο λόγος έγκειται στη δυνατότητά του συγκεκριμένου συμπλόκου να παρέχει όλες τις ευεργετικές δράσεις, που αποδίδονται στον ιβίσκο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με το εκχύλισμα ιβίσκου μεμονωμένα. Κατά συνέπεια, ο εμπλουτισμός ενός τροφίμου με αυτό, συνεπάγεται μεγαλύτερη διάρκεια αποθήκευσης του προϊόντος.

Όπως ήδη αναφέρθηκε οι ανθοκυανίνες του ιβίσκου διατίθενται εμπορικά ως χρωστικές τροφίμων. Ωστόσο η μειωμένη σταθερότητα τους σε υδατικά διαλύματα με $pH > 3$ περιορίζει τη χρήση τους στην ποτοποιία και στη ζαχαροπλαστική. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης ίσως μπορέσουν να διευρύνουν τη χρήση των εν λόγω χρωστικών και σε άλλους τομείς της βιομηχανίας τροφίμων.

Ειδικότερα, για τη βιομηχανία αλλαντικών, η αξία των παραπάνω ευρημάτων ίσως είναι μεγαλύτερη. Η δημοσίευση πολλών επιδημιολογικών μελετών (Tappel, 2007), που συσχετίζουν την αυξημένη κατανάλωση αλλαντικών με την εκδήλωση:

- καρκίνου στο κόλον, στο ορθό, στο έντερο, στο στομάχι, στο πάγκρεας, στην ουροδόχο κύστη, στο ενδομήτριο, στις ωοθήκες, στον προστάτη, στο στήθος και στους πνεύμονες,
- καρδιακών παθήσεων,
- ρευματοειδούς αρθρίτιδας,
- διαβήτη τύπου 2
- νόσου Alzheimer

έκανε απλά επιτακτική την ανάγκη σχεδιασμού προϊόντων με λιγότερα συντηρητικά. Το 2008, έγινε μια προσπάθεια προς αυτή την κατεύθυνση, όταν οι Karabacak και Bozkurt χρησιμοποίησαν υδατικό εκχύλισμα ιβίσκου, σαν συντηρητικό σε λουκάνικα. Το αποτέλεσμα της μελέτης τους έδειξε ότι το υδατικό εκχύλισμα ιβίσκου είναι περισσότερο αποτελεσματικό στη διατήρηση του pH και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του λουκάνικου συγκριτικά με τα νιτρώδη/ νιτρικά και το BHT. Άρα η χρήση του συμπλόκου ιβίσκου- β -CD στην βιομηχανία αλλαντικών μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή ασφαλέστερων και ποιοτικά ανώτερων προϊόντων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajay, M. Chai, H.J.; Mustafa, A.M.; Gilani, A.H.; Mustafa, M.R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of Hibiscus sabdariffa L. Calyces. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 109, 388-393.
- Alarcon-Aguilar, F. J.; Zamilpa, A.; Perez-Garcia, M. D.; Almanza-Perez, J.C.; Romero-Nuñez, E.; Campos-Sepulveda, E. A.; Vazquez-Carrillo, L. I.; Roman-Ramos, R. Effect of Hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 114, 66-71.
- Ali, B.H.; Al Wabel, N.; Blunden, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: A review . *Phytotherapy Research*. **2005** , 19, 369-375
- Ali, M. B.; Salih, W. M.; Mohamed, A. H.; Homeida, A. M. Investigation of the antispasmodic potential of Hibiscus sabdariffa calyces. *Journal of Ethnopharmacology*. **1991**, 31, 249-257
- Andersen, Ø. M.; Jordheim, M. The Anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Andersen, Ø. M., Markham, K. R., Eds., CRC Press: Boca Raton, **2006**; pp 471–553.
- Arias-Blanco, M.J.; Moyano, J.R.; Perez-Martinez, J. I.; Gines, J.M. Study of the inclusion of gliclazide in α -cyclodextrin. *J. Pharmaceut. Biomed*. **1998**, 18, 275-279.
- Aurelio, D.-L.; Edgardo, R.G.; Navarro-Galindo, S. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (Hibiscus sabdariffa L. cv. 'Criollo') infusion . *International Journal of Food Science and Technology*. **2008**, 43, 322-325
- Beristain, C.; Vazquez, A.; Garcia, H.; Vernon-Carter, E. Encapsulation of orange peel oil by co-crystallization. *Lebensm. Wiss. Techn.* **1996**, 29, 645-647.
- Betrolini, A.C.; Siani, A.C.; Grosso, R.F. Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray–drying. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 69, 780-785.
- Bjorøy, Ø.; Fossen, T.; Andersen, Ø. M. Anthocyanin 3-galactosides from *Cornus alba* ‘Sibirica’ with glucosidation of the B-ring. *Phytochemistry* **2007**, 68, 640–645.
- Botsi, A.; Yannakopoulou, K.; Hadjoudis, E. Inclusion complexes of cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin) and its methylated derivatives with the main components of the pheromone of the olive fruit fly. *Carbohydr. Res.* **1993**, 241, 37-46.
- Brouillard, R.; Dangles, O. Flavonoids and Flower Colour. In *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Harborne, J. B., Ed., Chapman & Hall: London, **1994**; pp 565–588.

- Buhler, R. D.; Miranda, C. Antioxidant Activities of Flavonoids. The Linus Pauling Institute. **2000**.
- Chang, Y.-C.; Huang, H.-P.; Hsu, J.-D.; Yang, S.-F.; Wang, C.-J. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2005**, 205, 201-212
- Christian, K. R.; Nair, M.G.; Jackson, J.C. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of Food Composition and Analysis*. **2006**, 19, 778-783.
- Cibulková, Z.; Šimon, P.; Lehocký, P.; Balko, J. Antioxidant activity of p-phenylenediamines studied by DSC. *Polymer Degradation and Stability*. **2005**, 87, 479-486.
- Clarot, I.; Clédat, D.; Battu, S.; Cardot, P.J.P. Chromatographic study of terpene derivatives on porous graphitic carbon stationary phase with β -cyclodextrin as mobile phase modifier. *J. Chromatogr. A*. **2000**, 903, 67-76.
- Clas, S. D.; Dalton, C. R.; Hancock, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *PSTT*. **1999**, 8, 311-320.
- Cleyvier V. Polyphenols in food are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 223-9.
- Close, C. D.; Beadle, L. C. The Botanical review. *The N. Y. Botanical Garden*. **2003**, 69, 149-161.
- Connors, K.A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1325-1357.
- Dickel, M. L.; Rates, S. M. K.; Plants, M. R. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 109, 60-71.
- Dodziuk, H. Cyclodextrins and their complexes. Chemistry, analytical methods and application. Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- Du, C. T.; Francis, F. J. Anthocyanins of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Food Sci.* **1973**, 38, 810-812.
- Falade, O.S.; Otemuyiwa, I.O.; Oladipo, A.; Oyedapo, O.O.; Akinpelu, B.A.; Adewusi, S.R.A. The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anemia. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005** 102, pp. 15-22
- Farombi, E.O.; Ige, O.O. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. **2007**, 21, 601-609
- Fatouros, D.G.; Hatzidimitriou, K.; Antimisiaris, S.G. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, 13, 287-296.

- Fossen, T.; Slimestad, R.; Andersen, Ø. M. Anthocyanins from (*Zea mays*) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2318–2321.
- Gibbs, B. F.; Kermasha, S.; Alli, I.; Mulligan, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **1999**, *50*, 213-224.
- Gines, J. M.; Perez-Martinez, J. I.; Arias, M. J.; Moyano, J. R.; Morillo, E.; Ruiz-Conde, A.; Sanchz-Soto, P. J. Inclusion of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) with β -cyclodextrin by different processing methods. **1996**.
- Gouin, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Tech.* **2004**, *15*, 330-347.
- Gradinaru, G.; Biliaderis, C. G.; Kallithraka, S.; Kefalas, P.; Garcia-Viguera C. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition *Food Chem.* **2003**, *83*, 423-436.
- Haji Faraji, M.; Haji Tarkhani, A. H. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**, *65*, 231-236
- Harata, K. Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1803-1827.
- He, J. Absorption, excretion and transformation of individual anthocyanins in rats. University of Maryland. **2004**
- He, J.; Magnuson, B. A.; Lala, G.; Tian, Q.; Schwartz, S. J.; Giusti, M. M. Intact anthocyanins and metabolites in rat urine and plasma after 3 months of anthocyanin supplementation. *Nutr. Cancer* **2006**, *54*, 3–12.
- Hecht, S.S.; Huang, C.; Stoner, G.D.; Li, J.; Kenney, P.M.J.; Sturla, S.J.; Carmella, S.G. Identification of cyanidin glycosides as constituents of freeze-dried black raspberries which inhibit anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induced NF κ B and AP-1 activity. *Carcinogenesis*. **2006**, *27*, 1617-1626
- Hedges, A.R. Industrial applications of cyclodextrines. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2035-2044.
- Higuchi, T.; Connors, K.A. Phase solubility technique. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **1965**, *4*, 117-212.
- Hirunpanich, V.; Utaipat, A.; Morales, N.P.; Bunyaphatsara, N.; Sato, H.; Herunsale, A.; Suthisisang, C. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, *103*, 252-260
- Hou, D-X.; Tong, X.; Terahara, N.; Luo, D.; Fujii, M. Delphinidin 3-sambubioside, a *Hibiscus* anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2005**, *440*, 101-109.

- Iwai, K.; Kim, M.-Y.; Onodera, A.; Matsue, H. α -Glucosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* thunb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 4588-459.
- Jordheim, M. Isolation, Identification and Properties of Pyranthocyanins and Anthocyanins Forms. University of Bergen. **2007**.
- Kalogeropoulos, N.; Chiou, A.; Mylona, A.; Ioannou, M.S.; Andrikopoulos, N.K. Recovery and distribution of natural antioxidants (a-tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after pan-frying of Mediterranean finfish in virgin olive oil. *Food Chem*. **2007**, 100, 509-517.
- Kant, A.; Linforth, R.S.T.; Hort, J.; Taylor, A.J. Effect of β -cyclodextrin on aroma release and flavor perception. *J. Agr. Food Chem*. **2004**, 52, 2028-2035.
- Karabacak, S.; Bozkurt, H. Effects of *Urtica dioica* and *Hibiscus sabdariffa* on the quality and safety of sucuk (Turkish dry-fermented sausage). *Meat Science*. **2008**, 78, 288-296.
- Karathanos, V. T.; Mourtzinou, I.; Yannakopoulou, K.; Andrikopoulos, N. K. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*. **2007**, 101, 652–658.
- Kay, C. D. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutr. Res. Rev*. **2006**, 19, 137–146.
- Kim, J.-K.; So, H.; Youn, M.-J.; Kim, H.-J.; Kim, Y.; Park, C.; Kim, S.-Ji.; Ha, Y.-A.; Chai, K.-Y.; Kim, S.-M.; Kim, K.-Y.; Park, R. Hibiscus sabdariffa L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 114, 260-267.
- Kırca, A.; Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem*. **2003**, 81, 583-587.
- Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E.; Barnes, K. W.; Eisele, T.; Giusti, M. M.; Haché, J.; Wightman, J.D. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Int*. **2005**, 88, 1269-1278.
- Lehn, J.M. Supramolecular chemistry: Receptors, catalysts, and carriers. *Science* **1985**, 227, 849-856.
- Lin, H.-H.; Chen, J.-H.; Kuo, W.-H.; Wang, C.-J. Chemopreventive properties of Hibiscus sabdariffa L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chemico-Biological Interactions*. **2007**, 165, 59-75.

- Lin, T.-L.; Lin, H.-H.; Chen, C.-C.; Lin, M.-C.; Chou, M.-C.; Wang, C.-J. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research*.**2007**, 27, 140-145.
- Liu, C.-L.; Wang, J.-M.; Chu, C.-Y.; Cheng, M.-T. ; Tseng, T.-H. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*.**2002**, 40, 635-641.
- Liu, J.-Y.; Chen, C.-C.; Wang, W.-H.; Hsu, J.-D.; Yang, M.-Y.; Wang, C.-J. The protective effects of Hibiscus sabdariffa extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology*,**2006**, 44, 336-343.
- Loftsson, T.; Brewster, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 1017-1025
- Loftsson, T.; Masson, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, **2001**, 225, 15-30.
- Magnusdottir, A.; Masson, M.; Loftsson T. Self association and cyclodextrin solubilization of NSAIDs. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* **2002**, 44, 213-218.
- Manolikas, M.K.; Sawant, M.R. Study of solubility of isoproturon by its complexation with β -cyclodextrin. *Chemosphere*. **2003**, 51, 811-816.
- Manor, P.C.; Saenger, W. J. Topography of cyclodextrin inclusion complexes. III. Crystal and molecular structure of cyclohexaamylose hexahydrate, the (H₂O)₂ inclusion complex. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 3630-3639.
- Mansour, B.M.M. Effects of temperature and daylength on growth and flowering of roselle, Hibiscus sabdariffa L. *Scientia Horticulturae*. **1975**, 3, 129-130.
- Mavromoustakos, T.; Papadopoulos, A.; Theodoropoulou, E.; Dimitriou, C.; Antoniadou-Vyza, E. Thermal properties of adamantanol derivatives and their β -cyclodextrin complexes in phosphatidylcholine bilayers. *Life Sci.* **1998**, 62, 1901-1910.
- McDougall, G. J.; Fyffe, S.; Dobson, P.; Stewart, D. Anthocyanins from red cabbage-stability to stimulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* **2007**, 68, 1285–1294.
- Mele, A., Mendichi, R. & Selva, A. (1998). Non-covalent associations of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with trans- β -carotene in water: evidence for the formation of large aggregates by light scattering and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 310, 261-267.
- Meskin, S. M.; Bidlack, R. W.; Davies, J. A.; Lewis, S.D.; Randolph, K. R. Phytochemicals mechanisms of action. *CRC PRESS*. **2004**
- Mourtzinis, I.; Salta, F.; Yannakopoulou, K.; Chiou, A.; Karathanos, V.T. Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 8088-8094
- Nerdal, W.; Andersen, Ø. M. Evidence for self-association of the anthocyanin petanin in acidified, methanolic solution using two-dimensional nuclear overhauser

- enhancement NMR experiments and distance geometry calculations. *Phytochem. Anal.* **1991**, 2, 263–70.
- Omobuwajo, T. O.; Sanni, L. A.; Balami, Y. A. Physical properties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) seeds. *Journal of Food Engineering*. **2000**, 45, 37-41
- Ozkan, M.; Yemenicioglu, A.; Asefi, N.; Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins from sour cherry, pomegranate, and strawberry juices by hydrogen peroxide. *J. Food Sci.* **2002**, 67, 525-529.
- Palamidis, N.; Markakis, P. Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. *J. Food Sci.* **1975**, 40, 1047.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 296, 631–636.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Vanzo, A.; Mattivi, F. Fast access of some grape pigments to the brain. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7029–7034.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Vanzo, A.; Mattivi, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett.* **2003**, 544, 210–213.
- Pina, F. Thermodynamics and kinetics of flavylum salts. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, 94, 2109–2116.
- Pinto, Luciana, M.A.; Marcelo B. de Jesusa; Eneida de Paulaa; Antonio C.S.; Linob. Joel B. Alderotec; Helio A. Duarted; Yuji Takahata. Elucidation of inclusion compounds between b-cyclodextrin/local anaesthetics structure: a theoretical and experimental study using differential scanning calorimetry and molecular mechanics. *J. Mol. Struc.* **2004**, 678, 63–66.
- Prenesti, E.; Berto, S.; Daniele, P. G. ; Toso, S.. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry*. **2007**, 100, 433-438.
- Rekharsky, M.; Inoue, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875-1917.
- Reyes, L.F.; Cisneros-Zevallos, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L. *Food Chemistry*. **2007**, 100, 885-894
- Risch, S. **1995**. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. In *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (Eds.). New York: ACS. pp. 2-7.
- Rodis, P.; Efmorfopoulou, E. Complexation of oleuropein and trans-cinnamic acid with cyclodextrins. *Chem. Nat. Comp.* **2004**, 40, 362-366.

- Rubinskiene, M.; Viskelis, P.; Jasutiene, I.; Viskeliene, R.; Bobinas, C. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International*. **2005**, 38, 867–871.
- Saenger, W. Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 344–362.
- Saito, N.; Tatsuzawa, F.; Miyoshi, K.; Shigihara, A.; Honda, T. The first isolation of Cglycosylanthocyanin from the flowers of *Tricyrtis formosana*. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 6821–6823.
- Schrooyen, P.M.; van der Meer, R.; De Kruif C.G. Microencapsulation: its application in nutrition. *Pro. Nutr. Soc.* **2001**, 60, 475–479.
- Sootiantawat, A.; Yoshii, H.; Furuta, T.; Ohgawara, M.; Forssell, P.; Partanen, R.; Poutanen, K.; Linko, P. Effect of Water Activity on the Release Characteristics and Oxidative Stability of D-Limonene Encapsulated by Spray-Drying. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. **2004**, 52, 1269–1276.
- Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743–1753.
- Szente, L.; Szejtli, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Tech.* **2004**, 15, 137–142.
- Takeoka, G.; Dao, L. Anthocyanins. In *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, Hurst, W. J., Ed., CRC Press: Boca Raton, **2002**, 219–241.
- Talavera, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Mazur, A.; Lamaison, J. L.; Remesy, C. Bioavailability of a bilberry anthocyanin extract and its impact on plasma antioxidant capacity in rats. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 86, 90–97.
- Tappel, A. Heme of consumed red meat can act as a catalyst of oxidative damage and could initiate colon, breast and prostate cancers, heart disease and other diseases *Medical Hypotheses*. **2007**, 68, 562–564
- Tatsuzawa, F.; Saito, N.; Miyoshi, K.; Shinoda, K.; Shigihara, A.; Honda, T. Diacylated 8-Cglucosylcyanidin 3-glucoside from the flowers of *Tricyrtis formosana*. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 631–633.
- Tseng, K.-C.; Chang, H.-M.; Wu, J.S.-B. Degradation Kinetics of Anthocyanins in Ethanolic Solutions. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2006, 30, 503–514.
- Tseng, T.-H.; Hsu, J.-D.; Lo, M.-H.; Chu, C.-Y.; Chou, F.-P.; Huang, C.-L.; Wang, C.-J. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Letters*. **1998**, 126, 199–207.
- Tseng, T.-H.; Kao, E.-S.; Chu, C.-Y.; Chou, F.-P.; Lin Wu, H.-W.; Wang, C.-J. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, 35, 1159–1164.

- Uekama, K.; Hirayama, F.; Arima, H. Pharmaceutical applications of cyclodextrins and their derivatives. In *Cyclodextrins and their complexes*; Dodziuk, H, Ed.; Wiley-VCH: Warsaw, 2006, pp 381-421.
- Ventura, C.A.; Puglisi, G.; Zappalà, M.; Mazzone, G. A physico-chemical study on the interaction between papaverine and natural and modified β -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **1998**, *160*, 163-172.
- Versic, R.J. Flavor Encapsulation, An Overview. *ACS Symposium Flavor Encapsulation, Series 370*, ACS, Washington, D.C., 1988, Chap. 1, p. 5.
- Wang, Wei-Dong; Xu, Shi-Ying. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food engineering*. 2007, 82, 271-275.
- Whitaker, J. Current Protocols In Food Analytical Chemistry. *John Wiley & Sons, Inc.* **2001**.
- Williams III, R.O.; Mahaguna, V.; Sriwongjanya, M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 355-360.
- Wright, C.I.; Van-Buren, L.; Kroner, C.I.; Koning, M.M.G. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, *114*, 1-31
- Wu, X.; Prior, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3101-3113
- Yang, Z.; Han, Y.; Gu, Z.; Fan, G.; Chen, Z. Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2007
- Yuliani, S.; Torley, J.P.; D'Arcy, B.; Nicholson, T.; Bhandari, B. Extrusion of mixtures of starch and D-limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food. Res. Int.* **2006**, *39*, 318-331.
- Zhang, Y.; Liao, X.; Ni, Y.; Wu, J.; Hu, X.; Wang, Z.; Chen, F. Kinetic analysis of the degradation and its color change of cyanidin-3-glucoside exposed to pulsed electric field. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 597-603.
- Zornoza, A.; Martin, C.; Sanchez, M.; Velaz, I.; Piquer, A. Inclusion complexation of glisentide with α -, β - and γ -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **1998**, *169*, 239-244.
- Καλογερόπουλος, Ν. Α. Καινοτομικά (Καινοφανή και Λειτουργικά) Τρόφιμα. **2006**.
- Χίου, Α. Φυτικοχημεία τροφίμων: σημειώσεις φροντιστηρίου. **2006**.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

<https://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/monographs/en/index.html>

<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Thermal Stability of Anthocyanin Extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the Presence of β -CyclodextrinIOANNIS MOURTZINOS,[†] DIMITRIS P. MAKRIS,[‡] KONSTANTINA YANNAKOPOULOU,[§]
NICK KALOGEROPOULOS,[†] ILIANA MICHALI,[†] AND VAIOS T. KARATHANOS^{*,†}

Laboratory of Chemistry-Biochemistry-Physical Chemistry of Foods, Department of Nutrition & Dietetics, Harokopio University, El. Venizelou 70, Kallithea, 17671 Athens, Department of Food Quality and Chemistry of Natural Products, Mediterranean Agronomic Institute of Chania (M.A.I.Ch.), P.O. Box 85, 73100 Chania, and Institute of Physical Chemistry, National Center for Scientific Research 'Demokritos', Aghia Paraskevi, 15310 Athens, Greece

The thermal stability of anthocyanin extract isolated from the dry calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. was studied over the temperature range 60–90 °C in aqueous solutions in the presence or absence of β -cyclodextrin (β -CD). The results indicated that the thermal degradation of anthocyanins followed first-order reaction kinetics. The temperature-dependent degradation was adequately modeled by the Arrhenius equation, and the activation energy for the degradation of *H. sabdariffa* L. anthocyanins during heating was found to be ~54 kJ/mol. In the presence of β -CD, anthocyanins degraded at a decreased rate, evidently due to their complexation with β -CD, having the same activation energy. The formation of complexes in solution was confirmed by nuclear magnetic resonance studies of β -CD solutions in the presence of the extract. Moreover, differential scanning calorimetry revealed that the inclusion complex of *H. sabdariffa* L. extract with β -CD in the solid state was more stable against oxidation as compared to the free extract, as the complex remained intact at temperatures 100–250 °C where the free extract was oxidized. The results obtained clearly indicated that the presence of β -CD improved the thermal stability of nutraceutical antioxidants present in *H. sabdariffa* L. extract, both in solution and in solid state.

KEYWORDS: Hibiscus extract; cyclodextrin; nuclear magnetic resonance; inclusion complex; natural antioxidants; anthocyanins

INTRODUCTION

Hibiscus sabdariffa L. (roselle) is an annual shrub cultivated in most cases to consume its aqueous calyx extract tea for therapeutic reasons. A roselle infusion, commonly mixed with some sweetener, is an intensely red transparent liquid that exhibits a very low pH and an astringent flavor (1). The importance of the roselle calyx resides mainly in its anthocyanin content (2.52 g/100 g) (2). The extract of red calyx mainly contains two anthocyanins, delphinidin-3-sambubioside and cyanidin-3-sambubioside (Figure 1) (3).

The pharmacological actions of the calyx extracts include strong in vitro and in vivo antioxidant activities (4, 5). On the basis of animal models, it has been suggested that the extract from the dried calyx of roselle can be used to inhibit the oxidation of low-density lipoproteins and to prevent various types of hyperlipidemia (6, 7). It also exhibits antihypertensive and antipyretic activities as well as cardioprotective effects (8),

reduces serum cholesterol (4, 8), and protects the primary hepatocytes against oxidative stress (9). A strong antihypertensive action has been demonstrated in humans (10). Therefore, the roselle calyx could be considered as a functional food or as

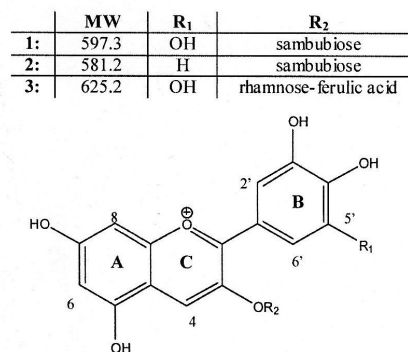


Figure 1. Anthocyanins of *H. sabdariffa* L. identified by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS).

* To whom correspondence should be addressed. Tel: ++30-210-9549224. Fax: ++30-210-9577050. E-mail: vkarath@hua.gr.

[†] Harokopio University.

[‡] Mediterranean Agronomic Institute of Chania (M.A.I.Ch.).

[§] National Center for Scientific Research 'Demokritos'.

a source of nutraceutical constituents, as daily consumption of its extract can be beneficial to human health (1).

Anthocyanins are not stable, and their degradation can be affected by many factors, such as temperature, oxygen, enzyme, light, and time, during processing and storage (9). Previous investigations emphasized the effect of temperature and time on anthocyanin degradation (9, 11, 12). However, the degradation kinetics of the roselle extract in the presence of β -cyclodextrin (β -CD) has not been previously reported.

Cyclodextrins (CDs), formed by the enzymic modification of starch (13), are cyclic D-glucopyranose oligomers having six, seven, or eight glucose units linked by 1,4- α -glucosidic bonds, termed as α -, β -, and γ -CDs, respectively. The hollow molecular shape allows them to form inclusion complexes with a wide variety of organic compounds, which enter partly or entirely into their relatively hydrophobic cavities, simultaneously expelling the few high-energy water molecules from the interior. The cavity size of the CDs offers selectivity for the complexation of guest molecules (14). The physical, chemical, and biological properties of molecules, which are encapsulated by CDs, may be thus modified drastically (14, 15). The encapsulation may lead to dissolution rate enhancement, increased membrane permeability, and bioavailability of low solubility nutraceuticals. CDs may also act as flavor carriers and provide protection against oxidation, light-induced decompositions, and heat-induced changes. Moreover, CDs may prolong the shelf life of food products and mask or reduce undesired taste and odor (16).

During the cooking process, the chemical composition of the calyx and consequently its antioxidant properties may change. However, until now, no methods of general application have been proposed to increase the stability of anthocyanins during thermal treatment. In this study, the stability of anthocyanins of *H. sabdariffa* L. extract was increased in aqueous solutions in the presence of β -CD due to complexation. In the solid state, the constituents of roselle were protected against oxidation as determined by oxidative differential scanning calorimetry (DSC). The encapsulated *H. sabdariffa* L. extract in β -CD could result in a product that can be used readily as a food ingredient, in a better way than *H. sabdariffa* L. extract alone, due to its protection from heat and oxidation.

MATERIALS AND METHODS

Samples, Standards, and Solvents. β -CD was purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). *H. sabdariffa* L. extract was provided by the Department of Food Quality and Chemistry of Natural Products, Mediterranean Agronomic Institute of Chania (M.A.I.Ch.), using a previously published extraction procedure (3). Bis-(trimethylsilyl)tri-fluoroacetamide (BSTFA) was obtained from Aldrich. Methanol, high-performance liquid chromatography (HPLC) grade, was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

LC-MS. A Finnigan MAT Spectra System P4000 pump coupled with a UV6000LP diode array detector and a Finnigan AQA mass spectrometer were used. Analyses were carried out on a Superspher RP-18, 125 mm $\times$ 2 mm, 4 mm column (Macherey-Nagel, Germany), protected by a guard column packed with the same material, and maintained at 40 °C. Samples were analyzed by employing electrospray ionization (ESI) at the positive mode, with acquisition set at 12 eV, capillary voltage of 4.90 kV, source voltage of 50 V, detector voltage of 650 V, and probe temperature of 450 °C. For the development of the chromatograms, an acetic acid (2.5%) (A)–MeOH (B) gradient was used for 45 min. The gradient used was as follows: 0–5 min, isocratically 100% A; 5–40 min, gradient from 100 to 0% A (100% B); 40–45 min, isocratically 100% B. The flow rate was 0.33 mL/min, and monitoring of the eluent was performed at 520 nm.

Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) of *H. sabdariffa* L. Extract. An Agilent HP series GC 6890N (Wallborn,

Germany), coupled with a HP 5973 MS detector (EI, 70 eV), split-splitless injector, and an HP 7683 autosampler were used. Prior to GC analysis, the hibiscus extract was diluted 1:100 v/v in methanol, and 0.05 mL was mixed with internal standard 3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol (50 μ L, 19.2 μ g/mL), evaporated to dryness under nitrogen, and derivatized by the addition of 250 μ L of BSTFA at 70 °C for 20 min. An aliquot (1 μ L) of derivatized sample was injected into the gas chromatograph at a split ratio 1:20. Analysis of the sample was achieved using an HP-5 MS capillary column (5% phenyl–95% methyl siloxane, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 250 μ m). The chromatographic conditions applied are described elsewhere (17). A selective ion monitoring (SIM) GC-MS method was applied for detection of 25 target polyphenolic compounds. Detection of polyphenols was based on the $\pm$ 0.05 RT presence of target and qualifier ions of the standard polyphenols at the predetermined ratios. Target and qualifier ions for 25 polyphenolic compounds and the internal standard are described elsewhere (17). Linearity was obtained for all target compounds detected in samples in the range of quantitation limit and up to 20 times higher concentrations of each compound.

Thermal Degradation Studies. The thermal degradation of anthocyanins extracted from *H. sabdariffa* was studied in a citrate buffer solution (pH 4, which is typical to products that contain anthocyanins) at temperatures of 60–90 °C. Aliquots of 1 mL of the solution (0.01% w/v, prepared by 5 mg of extract dissolved in 50 mL of deionized water) were placed into Eppendorf tubes already equilibrated in a thermostatic water bath at 60, 70, 80, and 90 °C. The concentration of anthocyanins in the solution was about 45 μ M. At predetermined intervals, sample tubes were removed from the water bath and rapidly cooled at –40 °C. Before analysis, each sample was allowed to come to room temperature (23–25 °C). The anthocyanin content of the samples was measured spectrophotometrically (Specord 20, Analytikjena, Jena, Germany). The thermal degradation of anthocyanins in the presence of β -CD was studied by diluting β -CD, at a molar ratio of hibiscus anthocyanins/ β -CD 1:1, in the initial buffer solution, followed by the same thermal treatment and analysis as previously described.

Determination of Anthocyanins. The total anthocyanin content was determined by using the pH-differential method described by Lee, Durst, and Wrolstad (18), using two buffer systems: potassium chloride buffer, pH 1.0 (0.025 M), and sodium acetate buffer, pH 4.5 (0.4 M). Aliquots (0.2 mL) of the thermally treated samples were mixed with 0.8 mL of the corresponding buffer, and the absorbance was measured at 510 and 700 nm. Total anthocyanins were calculated using the following equation:

$$\text{total anthocyanins (mg/L)} = A \cdot \text{MW} \cdot \text{DF} \cdot 1000 / (\epsilon \cdot l) \quad (1)$$

where $A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4.5}$, MW = molecular weight, DF = dilution factor, l = path length in cm, ϵ = 26900 molar extinction coefficient in L/mol/cm for cyanidin-3-glucoside, and 1000 = conversion from g to mg.

Complexation with β -CD. The hibiscus extract (0.037 g) was dissolved in 10 mL of aqueous solution of β -CD (16 mM) at an approximate molar ratio of 1:2 (calculations were based on the molecular weight of two major anthocyanins, since these compounds were the main constituents of the hibiscus extract) and left under stirring for 24 h at room temperature. Subsequently, the mixture was frozen at –40 °C for 24 h and then lyophilized in a freeze dryer (Telstar, Cryodos, Terrassa, Spain).

Study of the Decomposition of Hibiscus Extract and Its β -CD Complex by DSC. DSC studies using DSC equipment (DSC-6, Perkin-Elmer, Boston, MA) were performed to evaluate the stability against thermal oxidation of the samples. Approximately 2 mg of extract or a quantity of the complex of hibiscus extract with β -CD containing the same amount of extract was placed in aluminum pans with a hole in their lid. The specimens were heated from room temperature to 40 °C in oxygen atmosphere at a heating rate of 90 °C/min. Samples remained at 40 °C for 1 min, to ensure an homogeneous temperature distribution within the sample, and then were heated up to 360 °C at a heating rate of 10 °C/min.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. ^1H NMR spectra were acquired on a Bruker Avance DRX spectrometer at 500

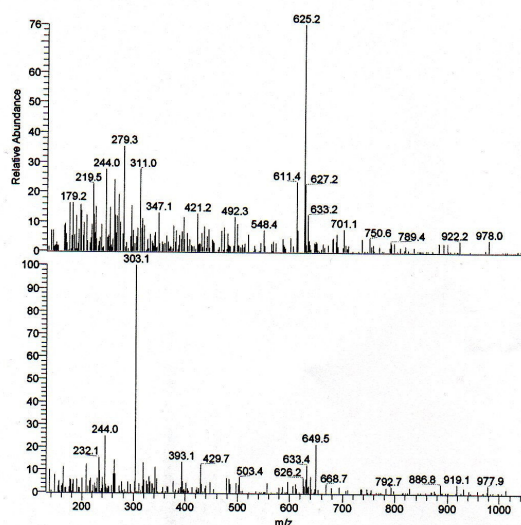


Figure 2. Positive mode ESI mass spectrum of the newly identified minor (7%) anthocyanin component. Upper and lower spectra were obtained at 12 and 50 eV, respectively.

Table 1. Polyphenolic and Terpenic Acids Species in the *H. sabdariffa* L. Extract Identified and Quantified by GC-MS

compound	(mg/g <i>H. sabdariffa</i> L. extract)
chlorogenic acid (1)	46.00
quercetin (2)	8.71
myricetin (3)	5.21
caffeic acid (4)	1.79
syringic acid (5)	1.61
campherol (6)	1.44
gallic acid	0.71
sinapic acid	0.49
ursolic acid	0.20
ferulic acid	0.19
p-coumaric acid	0.16
protocatechuic acid	0.14
epicatechin	0.13

MHz in unbuffered D₂O solutions at 298 K. For the analysis of the dry extract alone, extract (3 mg) was dissolved in D₂O (1 mL), resulting in a completely clear dark red solution (pH 3.1). For the complexation studies, 5 mg of dry extract was added (roughly calculated 1 equiv) to a solution (1 mL) of β -CD in D₂O (10 mM), without change of color. The one-dimensional spectra of both solutions were run with FID resolution of 0.18 Hz/point. The residual HDO line had a line width at half-height of 2.59 Hz. Two-dimensional (2D) ROESY spectra were acquired at 298 K with presaturation of the residual water resonance

and a mixing (spin-lock) time of 350 ms at a field of ~ 2 kHz, using the TPPI method, using a 1024 K time domain in F2 (FID resolution 5.87 Hz) and 460 experiments in F1. Processing was carried out with zero-filling to 2K in both dimensions using sine (F2) and q-sine (F1) window functions, respectively.

Statistical Analysis. All DSC experiments were duplicated. All analyses were performed in triplicate ($n = 3$). The results presented are the average of the obtained values. Data analysis was carried out using Microsoft Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

Anthocyanins and Polyphenols in *H. sabdariffa* L. Extracts. Based upon the absorbance at 510 nm, the average concentration of anthocyanins in hibiscus extract was found 275 mg per gram of extract. The presence of chlorogenic acid in the extract (copigmentation) is not anticipated to affect the stability, as was shown recently in copigmentation studies (19). LC-MS analysis was used in order to determine anthocyanins, the major constituents that are present in *H. Sabdariffa* L. extract. Identification and quantification of anthocyanins by LC-MS showed the existence of two major anthocyanins with retention times of 10.39 and 11.67 min respectively. Based on mass spectrometric data these anthocyanins were identified as delphinidin 3-O-(2''-xylosyl)-glucoside **1** (Figure 1) and cyanidin 3-O-(2''-xylosyl)-glucoside **2** (Figure 1) with molecular weights 597.3 and 581.2, respectively. These results were in agreement with those previously reported (3). The two predominant anthocyanins comprise 64% (176 mg/g extract) and 25% (68 mg/g extract), respectively, of the total anthocyanins in *H. Sabdariffa* L. extract. Moreover, a third anthocyanin with a retention time of 13.32 min, comprising 7% of the total anthocyanins of the extract was identified. The mass spectrum of this minor component showed the base peak at $m/z=625.2$, when the ESI MS spectrum was measured at low voltage (Figure 2). This peak was not observed at high voltage, whereas the base peak appeared at $m/z=303.1$. The latter corresponds to the delphinidin aglycon. The peak at $m/z=625.2$ can thus be the molecular ion peak and can be tentative assigned to delphinidin-3-(feruloyl)rhannoside. Wu and Prior (20) reported that ferulic acid is one of the five aromatic acids that can be found in plant anthocyanins. Furthermore rhamnose is one of the most common sugars that can be present in the chemical structure of a plant anthocyanin. The polyphenol content of the extract was also determined by GC/MS (Table 1). Based on the results of GC/MS analysis the *H. Sabdariffa* L. extract was found to contain chlorogenic acid, quercetin, myricetin, caffeic acid, syringic acid, campherol, gallic acid, sinapic acid, ursolic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid and epicatechin.

Thermal Degradation Kinetics. The relative concentrations of anthocyanins in solutions during incubation at 60°, 70°, 80°, 90 °C and in solutions containing β -CD at a mole ratio 1:1 (calculations were based on the molecular weight of delphinidin-3-sambubioside and cyanidin-3-sambubioside, since these compounds were the main constituents of the roselle extract) are plotted versus time (Figure 3). The linear relations apparently indicate that the degradation of anthocyanins follows a first-order reaction kinetics both in aqueous solutions and in aqueous solutions containing the β -CD. Previous studies showed that the degradation of anthocyanins in aqueous solutions (9, 11, 12, 19) as well as during dry heating (21) also follows a first order degradation kinetics (9, 11, 12, 19). The reaction rate constants (k) and half-lives ($t_{1/2}$, the time needed for 50% degradation of anthocyanins), were calculated by the following equations:

$$\ln(C/C_0) = -kt \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \ln 0.5/k \quad (3)$$

Where $C/C_0 = A/A_0$, A_0 is the initial absorbance of diluted extract and A is the absorbance value after t min incubation at a given temperature (22).

As expected, the degradation of anthocyanins increased with increased heating temperature and time. The rate of degradation decreased in the presence of β -CD as it can be seen by the values of the degradation rate constant in **Table 2**. Stabilization of anthocyanins was possible due to the complexation with β -CD, as CDs may protect nutraceutical molecules containing phenolic groups (23, 24). β -CD protects sensitive molecules either by providing a basic or hydrophobic environment. The degradation studies were carried out in acidic pH, so the protection was offered by the hydrophobic cavity of β -CD. Charged species are energetically unstable in hydrophobic environments so complexation generally decelerates chemical degradations, in which a highly charged intermediate is involved in the transition state (25). Comparison of $t_{1/2}$ values (**Table 2**) revealed that anthocyanins were more resistant in the presence of β -CD, as the presence of β -CD nearly doubled the half-time values.

The Arrhenius model was applied to describe the temperature dependence of anthocyanins degradation.

$$k = k_0 \cdot e^{-E_a/RT} \quad (4)$$

The activation energies of degradation in the absence or in the presence of β -CD, as calculated by the Arrhenius plot, were

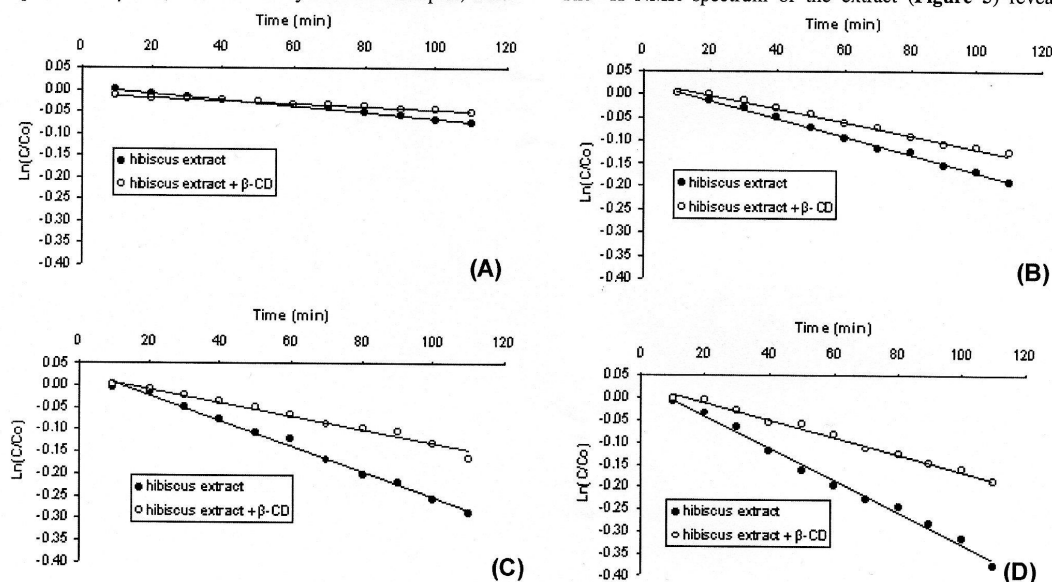


Figure 3. Degradation of anthocyanins in aqueous solutions and in aqueous solutions containing β -CD at temperatures of (A) 60, (B) 70, (C) 80, and (D) 90 °C.

Table 2. Degradation Kinetics Parameters of Anthocyanins Extract or Anthocyanins Extract + β -CD

temperature (°C)	$k (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$		$t_{1/2} \text{ (h)}$		R^2	
	free anthocyanins	anthocyanins + β -CD	free anthocyanins	anthocyanins + β -CD	free anthocyanins	anthocyanins + β -CD
60	0.7	0.3	16.50	38.51	0.9893	0.9877
70	1.9	1.4	6.08	8.25	0.9957	0.9896
80	2.9	1.6	3.98	7.22	0.9918	0.9770
90	3.6	1.9	3.21	6.08	0.9915	0.9905

nearly the same 54.05 and 54.02 $\text{kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$, respectively. Similar values have been reported for the degradation of pure anthocyanins during dry heating (21). It is possible that the degradation mechanism of anthocyanins inside the β -CD and that of the free anthocyanins are the same. These E_a values were lower than values reported for juices or concentrates containing anthocyanins (11). The degradation of anthocyanins occurred at a faster rate in a concentrate than in a buffer solution. Evidently, when a product is concentrated, the reacting molecules become closer, thus the rate of the chemical reaction accelerates (11).

In **Figure 4** the DSC oxidation curves of hibiscus extract and of the inclusion complex of hibiscus extract with β -CD as a function of temperature and time are given. An exotherm was initiated at 210 °C for hibiscus extract related to the oxidation anthocyanins. The exothermic peak was not present in the DSC scan of the complex hibiscus extract/ β -CD, which means that the anthocyanins, the major constituents of hibiscus extract, were protected from oxidation due to complexation with β -CD.

NMR Studies on the *H. sabdariffa* L. Extract and Evidence for Complexation in Solution via Inclusion and External Interactions. The clear dark red solution of the extract in deuterated water was mildly acidic (pH 3.1), similar to the solution used for the thermal degradation studies (pH 4), therefore citrate or acetate buffers were not used to avoid undesired residual signals. The ^1H spectra, examined after the completion of the 2D experiments (15–24 h) were unchanged. The ^1H NMR spectrum of the extract (**Figure 5**) revealed

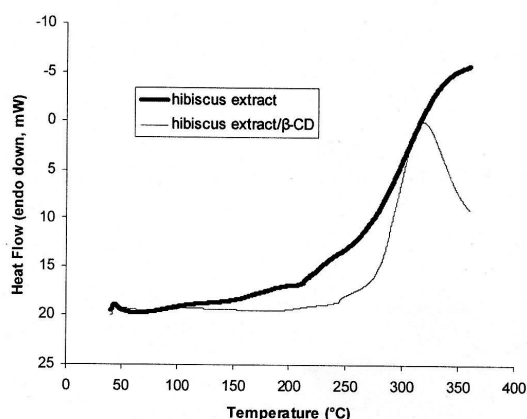


Figure 4. DSC thermograms of *H. sabdariffa* L. extract and its complex with β -CD under oxidative conditions.

resonances in the entire ppm range, i.e. aromatic and double bond area of (8.5–6.0 ppm), carbohydrate area (5.4–3.0 ppm), and aliphatic area (2.5–0.5 ppm). Aromatic signals were expected for the LC-identified delphinidin and cyanidin cores as well as the GC-identified hydroxylated cinnamic acid derivatives (chlorogenic, caffeic, ferulic, e.t.c acids) and polyphenols (quercetin, myricetin, e.t.c.). Carbohydrate signals were expected from the results of LC analysis (sambubiose of **1** and **2**, proposed rhamnose for **3**), whereas the presence of free mono- or disaccharides cannot be excluded. Among the various monosaccharides reported (20) as associated with anthocyanins, the only one that displays signals in the aliphatic region is rhamnose (CH_3 group at ~ 1.2 ppm). The equilibrium forms of anthocyanins present (26) at this pH are the flavylium cation red form, the hydrated hemiacetals and the colorless chalcone forms, and the blue quinonoidal base form. The vast majority of the reported NMR spectra of anthocyanins are in trifluoroacetic acid/methanol (27–29) and trifluoroacetic acid/DMSO (30) or trifluoroacetic acid/ D_2O (31). Apparently at very low pH the flavylium cation prevails in the equilibrium mixture and the spectra are simplified. On the other hand, it is known that in natural aqueous solutions additional association phenomena are encountered (32) such as self-association of anthocyanins (usually at concentrations 10^{-2} or 10^{-3} M), formation of molecular complexes with other natural components (e.g., the molecular complex malvidin/chlorogenic acid, $K_{\text{assoc}} = 350 \text{ M}^{-1}$) or complexes with metal ions. It follows, therefore, that the present solution with a 6.1 mM concentration of extract, intermediate pH and existence of all components identified in LC- and GC-MS analyses as well as free sugars or other hydroxyphenols, constitute a very complicated condition. Based on a previously shown trend (31) of pelargonidin aromatic protons to significantly shift to lower frequencies on going from TFA/methanol to TFA/ D_2O , and specifically the H4 peak to move from 9.10 ppm to 8.31 ppm, a rough assignment of the observed peaks to types of structures is attempted. Thus, the high frequency signal at 8.48 ppm, attached to a carbon atom at 132.5 ppm (via HSQC 2D correlation) can be attributed to H4 (30) of ring C (**Figure 1**) of the flavylium cation of the two delphinidin components. The H4 of the cyanidin core also appears at high frequency (28) and is apparently hidden under the delphinidin H4 signal at 8.48 ppm, revealing itself only in the presence of excess of β -CD, as observed in **Figure 8B** below. The ratio $\text{H4}_{\text{delphinidines}}:\text{H4}_{\text{cyanidine}}$ is ~ 2.9 by integration [the LC ratio of $([\mathbf{1}]+[\mathbf{3}])/[\mathbf{2}] = 2.84$]. In the 2D ROESY

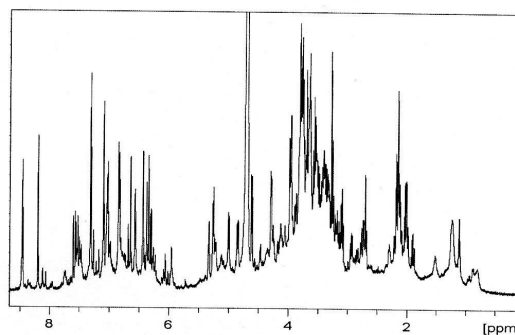


Figure 5. Full ^1H NMR spectrum (500 MHz) of *H. sabdariffa* L. extract in D_2O (pH 3.1).

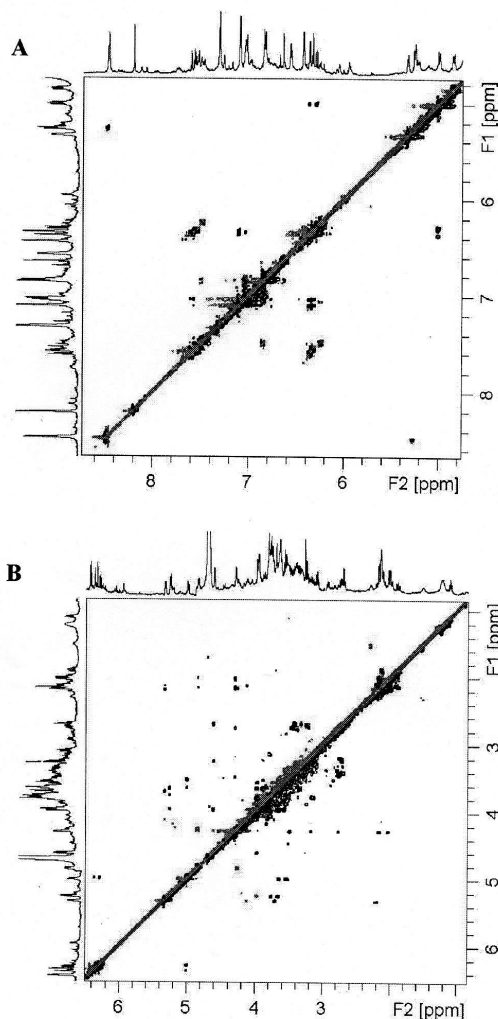


Figure 6. 2D ROESY spectra of the *H. sabdariffa* L. extract in D_2O at 298 K: (A) aromatic region and (B) aliphatic region.

spectrum the signal of H4 displays noe cross-peak with a presumably sugar-type anomeric $\text{H1}''$ doublet ($J = 8 \text{ Hz}$, **Figure**

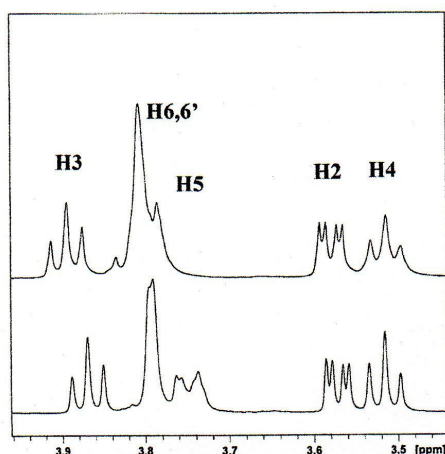


Figure 7. Partial ^1H NMR spectra (500 MHz) of (a) β -CD alone (10 mM) and (b) in the presence of *H. sabdariffa* L. extract (5 mg/mL, ~ 1 equiv) in D_2O at 300 K.

6A) at 5.26 ppm, verifying the presence of a sugar at position 3 of ring C, this type of interaction indeed observed in similar systems (e.g. flavylum cation of malvidin 3- O - β -glucopyranoside (27). No exchange cross peaks (of same phase as the diagonal) was observed between the H4 of flavylum ion and the assumed hemiacetal forms at 7.0–6.0 ppm, opposite to previously observed in malvidin 3- O - β -glucopyranoside methanolic solution (27). However, exchange peaks do exist between signals in the region 5.2–4.8 ppm with signals in the region 4.2–3.9 ppm (**Figure 6B**). Exchange of H1'' (glucose anomeric proton) between flavylum and hemiacetal forms (27), could account for this observation, however this is not supported by observation of exchange in other peaks, therefore they could arise from α - to β - anomeric exchange, possibly of free sugars. The signal at 8.20 ppm could arise from H6' of ring B, however it could not be correlated with any carbon [expected C6' between 120 and 105 ppm] (30) in a 2D HSQC experiment. The region 8.0–6.0 ppm is filled by the signals of protons of all hydroxy-phenolic components as well as double bonds (**Figure 6A**). Next, signals characteristic of chlorogenic acid (2.3–1.8 ppm) are observed at a ratio chlorogenic acid: anthocyanins greater than 2:1. Finally, signals in the region 2.5–0.7 ppm (**Figure 6B**) indicate the presence of at least two rhamnose residues (two nearly overlapped triplets, α - and β -anomers, at 1.23 and 1.10 ppm), verifying the presence of delphinidin 3, maybe along with free rhamnose.

Addition of dry hibiscus extract to a solution of β -CD in D_2O , at a molar ratio 1:1, at 298 K immediately induced chemical shift changes of the cyclodextrin cavity hydrogens ($\Delta\delta_{\text{H}_3}=10.0$ Hz, $\Delta\delta_{\text{H}_{6,6'}}=5.1$ Hz, $\Delta\delta_{\text{H}_5}=18.5$ Hz) (**Figure 7**) but not of the outer protons H2, H4, a direct evidence of molecular inclusion of one or more of the components of the extract. Regarding the extract's signals, many were differentiated from their initial positions thus again signifying interactions with β -CD. No loss of the red color was observed. Analysis of the 2D ROESY spectrum of the extract alone (**Figure 8A**) and in the presence of β -CD (**Figure 8B**) confirms the presence of many cross-peaks due to intermolecular interactions of the cavity with the aromatic and double bond hydrogens (7.8–6.0 ppm). However, the protons at ~ 8.5 attributed to the flavylum part do not display any interactions; thus, ring A is not included. It is reported in the literature (33) that whereas γ -CD can include

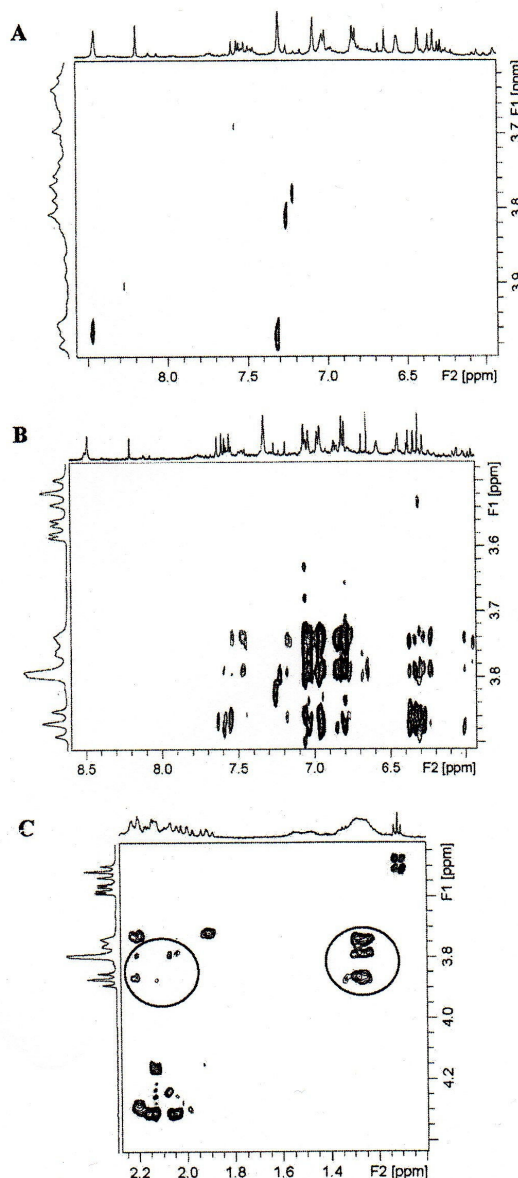


Figure 8. Selected interactions of 2D ROESY spectra in D_2O at 298 K (A) of the *H. sabdariffa* L. extract alone, (B) of the *H. sabdariffa* L. extract (aromatic region) with β -CD, and (C) of the *H. sabdariffa* L. extract (aliphatic region) with β -CD.

the flavylum part of pelargonidin, β -CD cannot, readily engulfing only the p -hydroxyphenyl part (ring B), and both CDs protect pelargonidin from discoloration at pH 1–4. Therefore, only rings B of the components in the present extract can be considered for inclusion. We have previously shown that oleuropein (24) readily inserts its 3,4-dihydroxyphenylethyl part in the β -CD cavity, whereas others have shown that epigallocatechin gallate forms an inclusion complex via its dihydroxybenzopyran A/C rings (34), whereas the trihydroxy B and B' rings do not seem to be included inside the β -CD cavity. On

the other hand, it is known (35) that ferulic acid forms an inclusion complex with γ -CD, whereas chlorogenic acid, quercetin, and rutin form complexes with β -CD (36–38). Furthermore, the inclusion of the noncolored forms of several anthocyanins ($R_1=R_2=H$ or $R_1=H$, $R_2=OH$) in β -CD has been evoked to account for the observed loss of color (anti-copigmentation) in slightly neutral aqueous solutions (26). During the current experiments, no change of color was observed (in the extract alone or in the presence of β -CD); thus, the participation of the hemiacetal forms in the inclusion cannot be concluded. The dihydroxyphenyl moiety that is prone to inclusion, that is, of cyanidine 2, is the only part able to form an inclusion complex. Thus, the interactions that we observe must primarily arise from inclusion of the aromatic part of chlorogenic acid (abundant in the extract solution, as shown by the NMR integration), quercetin, and similar molecules (Table 1) and, to a small extent, from inclusion of ring B of 2, which constitutes only a 25% of the anthocyanin mixture. Interestingly, the interactions between the β -CD peak area and the aliphatic signal area show (Figure 8C) inclusion of rhamnose methyl groups (~ 1.3 ppm) and also inclusion of the H2,2' (weak, 2.2–2.0 ppm) of chlorogenic acid. This last observation shows clearly that the CD host is located close and interacts externally with the anthocyanins via nonspecific interactions, including in the cavity whatever small part is available in the surroundings. Inclusion, external association, and accruing beneficial effects (protection from hydrolysis, increase of solubility) have been reported previously (39–41). This explains the significant protection toward degradation observed in the present study, in spite of the fact that inclusion of the anthocyanin aglycon parts does not seem to be the dominating event. Therefore, oxidation involving dihydroxyphenyl rings or degradation of the anthocyanins can be minimized by both inclusion and external interactions, as shown by the result of UV–vis spectroscopy and the DSC results. Anthocyanin degradation is generally accepted to be initiated by hydration at the 2-position (ring C) and subsequent cleavage of the flavonoid skeleton. Although the interactions of β -CD with the anthocyanin molecule might be neither strong nor direct, steric phenomena could be implicated in preventing extended hydration and thus degradation (42).

Conclusions. Anthocyanins are protected from thermal degradation by the presence of β -CD as shown by thermal stability studies. The addition of β -CD in aqueous solutions of anthocyanins is recommended to minimize anthocyanin degradation due to temperature when consuming hot beverages or in the production of functional foods containing anthocyanins. Moreover, the solid complex of roselle extract/ β -CD can be used either to fortify foods or as a food supplement.

ABBREVIATIONS USED

CD, cyclodextrin; β -CD, β -cyclodextrin; NMR, nuclear magnetic resonance; BSTFA, bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; LC-MS, liquid chromatography–mass spectrometry; DSC, differential scanning calorimetry.

LITERATURE CITED

- (1) Aurelio, D.-L.; Edgardo, R. G.; Navarro-Galindo, S. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 322–325.
- (2) Wong, P. K.; Yusof, S.; Ghazali, H. M.; Che-Man, Y. B. Physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutr. Food Sci.* **2002**, *32*, 68–73.
- (3) Du, C. T.; Francis, F. J. Anthocyanins of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 810–812.
- (4) Ali, B. H.; Wabel, N.; Blunden, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytother. Res.* **2005**, *5*, 369–375.
- (5) Prenesti, E.; Berto, S.; Daniele, P. G.; Toso, S. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chem.* **2007**, *2*, 433–438.
- (6) Chen, C. C.; Chou, F. P.; Ho, Y. C.; Lin, W. L.; Wang, C.-P.; Kao, E. S.; Huang, A. C.; Wang, C.-J. Inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L. extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 1989–1996.
- (7) Hirunpanich, V.; Utaipat, A.; Morales, N. P.; Bunyaphatsara, N.; Sato, H.; Herunsale, A.; Suthisang, C. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *103*, 252–260.
- (8) Odigie, I. P.; Ettarh, R. R.; Adigun, S. A. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *86*, 181–185.
- (9) Tseng, T.-H.; Kao, E.-S.; Chu, C.-Y.; Chou, F.-P.; Lin Wu, H.-W.; Wang, C.-J. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 1159–1164.
- (10) Mojiminiyi, F. B. O.; Dikko, M.; Muhammad, B. Y.; Ojobor, P. D.; Ajagbonna, O. P.; Okolo, R. U.; Igboke, U. V.; Anga, T. J. Antihypertensive effect of an aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa*. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 292–297.
- (11) Kirca, A.; Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem.* **2003**, *81*, 583–587.
- (12) Zhang, Y.; Liao, X.; Ni, Y.; Wu, J.; Hu, X.; Wang, Z.; Chen, F. Kinetic analysis of the degradation and its color change of cyanidin-3-glucoside exposed to pulsed electric field. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 597–603.
- (13) Hedges, A. R.; Shieh, W. J.; Sikorski, C. T. Use of cyclodextrins for encapsulation in the use and treatment of food products. In *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*; Risch, S. J., Reineccius, G. A., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; Chapter 6, pp 60–71.
- (14) Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1753.
- (15) Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045–2076.
- (16) Sente, L.; Szejtli, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 137–142.
- (17) Kalogeropoulos, N.; Chiou, A.; Mylona, A.; Ioannou, M. S.; Andrikopoulos, N. K. Recovery and distribution of natural antioxidants (a-tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after pan-frying of Mediterranean finfish in virgin olive oil. *Food Chem.* **2007**, *100*, 509–517.
- (18) Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E.; Barnes, K. W.; Eisele, T.; Giusti, M. M.; Hachee, J.; Wightman, J. D. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1269–1278.
- (19) Gradinaru, G.; Biliaderis, C. G.; Kallithraka, S.; Kefalas, P.; Garcia-Viguera, C. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: Effects of copigmentation and glass transition. *Food Chem.* **2003**, *83*, 423–436.
- (20) Wu, X.; Prior, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3101–3113.
- (21) Yue, X.; Xu, Z. Changes of anthocyanins, anthocyanidins and antioxidant activity in bilberry extract during drying heating. *J. Food Sci.* **2008**, *73* (6), C494–C499.

- (22) Ozkan, M.; Yemenicioglu, A.; Asefi, N.; Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins from sour cherry, pomegranate, and strawberry juices by hydrogen peroxide. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 525–529.
- (23) Karathanos, V. T.; Mourtzinou, I.; Yannakopoulou, K.; Andrikopoulos, N. K. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chem.* **2007**, *101*, 652–658.
- (24) Mourtzinou, I.; Salta, F.; Yannakopoulou, K.; Chiou, A.; Karathanos, V. T. Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8088–8094.
- (25) Uekama, K.; Hirayama, F.; Arima, H. Pharmaceutical applications of cyclodextrins and their derivatives. In *Cyclodextrins and Their Complexes*; Dodziuk, H., Ed.; Wiley-VCH: Warsaw, 2006; pp 381–421.
- (26) Dangles, O.; Stoeckel, C.; Wingand, M. C.; Brouillard, R. Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5227–5230.
- (27) Jordheim, M.; Fossen, T.; Andersen, Ø. M. Characterization of hemiacetal forms of anthocyanidin 3-O- β -glycopyranosides. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9340–9346.
- (28) Tulio, A. Z.; Reese, R. N.; Wyzgoski, F. J.; Rinaldi, P. L.; Fu, R.; Scheerens, J. C.; Miller, A. R. Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1880–1888.
- (29) Andersen, Ø. M.; Aksnes, D. W.; Nerdal, W.; Johansen, O.-P. Structure elucidation of cyanidin-3-sambubioside and assignments of the ^1H and ^{13}C NMR resonances through two-dimensional shift-correlated NMR techniques. *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 175–183.
- (30) Takeoka, G. R.; Dao, L. T.; Tamura, H.; Harden, L. A. Delphinidin 3-O-(2-O- β -glucopyranosyl- α -arabinopyranoside): A novel anthocyanin identified in Beluga black lentils. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4932–4937.
- (31) Pedersen, A. T.; Andersen, Ø. M.; Aksnes, D. W.; Nerdal, W. NMR of anthocyanins: assignments and effects of exchanging aromatic protons. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 972–976.
- (32) Brouillard, R.; Dangles, O. In *The Flavonoids, Advances in Research Since 1986*; Harborne, J. B., Ed.; Chapman & Hall: London, 1994; pp 576–579.
- (33) Matsui, Y.; Sunouchi, A.; Yamamoto, T. Inhibitory effects of cyclodextrins on the discoloration reaction of an anthocyanidin, pelargonidin chloride, in acidic media. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, *32*, 57–67.
- (34) Ishizu, T.; Hirata, C.; Yamamoto, H.; Harano, K. Structure and intermolecular flexibility of β -cyclodextrin complex with (–)-epigallocatechin gallate in aqueous solvent. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 776–783.
- (35) Anselmi, C.; Centini, M.; Ricci, M.; Buonocore, A.; Granata, P.; Tsuno, T.; Maffei Facino, R. Analytical characterisation of a ferulic acid/ γ -cyclodextrin inclusion complex. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 875–881.
- (36) Irwin, P.; Brouillette, J.; Giampa, A.; Hicks, K.; Gehring, A.; Tu, S.-I.; Cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid: hydration enthalpy, the solvent entropy (hydrophobic) effect, and enthalpy-entropy compensation. *Carbohydr. Res.* **1999**, *322*, 67–76.
- (37) Alvarez-Parrilla, E.; De La Rosa, L. A.; Torres-Rivas, F.; Rodrigo-Garcia, J.; González-Aguilar, G. A. Complexation of apple antioxidants: Chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD). *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, *53*, 121–129.
- (38) Zheng, Y.; Haworth, I. S.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S. A.; Chow, H. L. Physicochemical and structural characterization of quercetin- β -cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1079–1089.
- (39) Maffeo, D.; Leondiadis, L.; Mavridis, I. M.; Yannakopoulou, K. Positive effect of natural and negatively charged cyclodextrins on the stabilization of penicillins towards β -lactamase degradation due to inclusion and external guest-host association. An NMR and MS study. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1297–1304.
- (40) Loftsson, T.; Masson, M.; Brewster, M. E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *93*, 1091–1099.
- (41) Magnusdottir, A.; Masson, M.; Loftsson, T. Self association and cyclodextrin solubilization of NSAIDs. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2002**, *44*, 213–218.
- (42) Sadilova, E.; Carle, R.; Stintzing, F. C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *12*, 1461–1471.

Received for review May 5, 2008. Revised manuscript received September 1, 2008. Accepted September 4, 2008.

JF801389J