



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *CAMPANULA VERSICOLOR*:
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΘΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ *IN SITU* ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ
ΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΣ**



ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΠΕΖΑ Ε. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΕΣ:
ΔΡΑΚΟΝΤΑΕΙΔΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ
ΚΑΦΕΤΖΟΓΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

DISSERTATION

**PROPERTIES OF THE PLANT *CAMPANULA VERSICOLOR*:
ANALYSIS OF ANTHICONIC PROPERTIES *IN SITU* WITH
THE AIM OF EXPLAINING THE APPEARANCE OF A
SPECIFIC COLOUR**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Παρασκευή Μπέζα, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΜΕΛΗ

Γεώργιος Πατακιούτας, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

Δημήτριος Κύρκας, ΕΔΙΠ, Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κωνσταντίνα Γ. Καφετζόγλου

Γνωρίζοντας τις κυρώσεις του Ν. 2121/1993 περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας και ότι έχω αναφέρει ή παραπέμψει σε αυτή, ρητά και συγκεκριμένα, όλες τις πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών, προτάσεων ή λέξεων, είτε αυτές μεταφέρονται επακριβώς (στο πρωτότυπο ή μεταφρασμένες) είτε παραφρασμένες. Επίσης βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά ειδικά για την συγκεκριμένη έρευνα.

© Copyright

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας οφείλεται στη συμβολή και υποστήριξη ορισμένων ανθρώπων, στους οποίους επιθυμώ να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες. Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο τον οποίο εκτιμώ ειλικρινά για το ήθος, την επιστημονική του αρτιότητα και τη διαχρονικά συνεπή διδακτική του παρουσία στο πλαίσιο του προγράμματος σπουδών. Η συνεργασία, το πρωτότυπο θέμα, η εμπιστοσύνη, η εποπτεία, η υπομονή και επιμονή του, αλλά και η επιστημονική καθοδήγησή του κατά την πειραματική διαδικασία, συντέλεσε στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ευχαριστώ, επίσης, θερμά την καθηγήτρια κα. Παρασκευή Μπέζα για την πολύτιμη συμβολή της στην οργάνωση, επίβλεψη και διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στο Εργαστήριο Χημείας, για την ευγενική παραχώρηση των υποδομών και των μέσων, που κατέστησαν εφικτή την πειραματική διερεύνηση. Εγκάρδιες ευχαριστίες στην συνεργάτιδά μου Αγγελική Δρακονταειδή, για την άψογη συνεργασία και αλληλοϋποστήριξη. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένειά μου, στην αδελφή μου, που με σταθερότητα και αγάπη στάθηκαν αρωγοί σε κάθε βήμα της πορείας μου και πολύ περισσότερο τους γονείς μου που με την στήριξη, την αγάπη και τις θυσίες τους, έπαιξαν πρωταρχικό ρόλο στην επιτυχία μου.

Πρόλογος

Τα λουλούδια είναι τα αναπαραγωγικά όργανα των αγγειόσπερμων φυτών. Χαρακτηρίζονται από την ομορφιά, τα διάφορα μεγέθη, χρώματα και αρώματα, και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην αναπαραγωγή μέσω της προσέλκυσης επικονιαστών όπως μέλισσες και πεταλούδες, ή μέσω της βοήθειας του ανέμου για τη μεταφορά της γύρης. Εκτός από τη βιολογική τους σημασία, τα λουλούδια έχουν μεγάλη αισθητική και συμβολική αξία για τους ανθρώπους, με κάθε είδος να φέρει διαφορετικά μηνύματα, ιδιαίτερα βάσει των χρωμάτων τους.

Τα χρώματα των λουλουδιών προέρχονται από διάφορες χρωστικές ουσίες, όπως οι ανθοκυανίνες (για μπλε, κόκκινο, ροζ, μωβ), η καροτίνη (για κόκκινο και κίτρινο) και η ξανθοφύλλη (για κίτρινο). Μπορούν να κυμαίνονται από έντονα έως απαλά, και τα άνθη μπορεί να είναι μονόχρωμα ή δίχρωμα.

Κύριες χρωστικές ουσίες

- **Ανθοκυανίνες:** Παράγουν τα χρώματα μπλε, κόκκινο, ροζ και μωβ.
- **Καροτίνη:** Παράγει τα χρώματα κόκκινο και κίτρινο.
- **Ξανθοφύλλη:** Παράγει το κίτρινο χρώμα.
- **Χλωροφύλλη:** Παράγει το πράσινο χρώμα στα πέταλα και τα φύλλα.

Χρώματα και συμβολισμοί

- **Κόκκινο:** Πάθος, έρωτας, ζωντάνια.
- **Ροζ:** Νεότητα, χαρά, κομψότητα.
- **Πορτοκαλί:** Ενθουσιασμός, θαυμασμός, έλξη.
- **Κίτρινο:** Μπορεί να συμβολίζει την πολυτέλεια και τον σεβασμό, ή σε κάποιες περιπτώσεις τη ζήλια.
- **Λευκό:** Αγνότητα, αθωότητα, συχνά συνδέεται με τους γάμους.
- **Πράσινο:** Ισορροπία, αισιοδοξία, ειρήνη, ευτυχία.
- **Μωβ/Λιλά:** Γενναιοδωρία, πίστη, σοφία.
- **Μπλε:** Αγάπη, αφοσίωση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Ευχαριστίες.....	5
Πρόλογος	6
Περιεχόμενα.....	7
Κατάλογος Εικόνων	9
Κατάλογος Σχημάτων	11
Κατάλογος Φασμάτων.....	12
Πίνακας Βραχυγραφιών	15
Περίληψη	16
<u>1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	20
1.1.1. Άνθος	20
1.2. CAMPANULAVERSICOLOR	21
1.3 ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΑΝΘΕΩΝ	23
1.3.1. Γενικά	23
1.3.2. Καροτενοειδή	24
1.3.3. Φλαβονοειδή	26
1.3.3.1 Χαλκόνες, ουρόνες και διυδροχαλκόνες	28
1.3.3.2.Ισοφλαβονοειδή	29
1.3.3.3. Ξανθόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες	30
1.3.4. Ανθοκυανίνες	31
1.3.4.1. Δομή και βιοσύνθεση των ανθοκυανινών	31
1.3.4.2. Επικονίαση	32
1.3.4.3. Τα χρώματα των ανθέων	33
1.4. ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ	34
1.4.1. Εκχύλιση	34
1.4.1.1. Απλή εκχύλιση	34
1.4.1.2. Εκχύλιση στερεών	35
1.4.2. Φασματοφωτομετρία	35
1.4.2.1. ΦασματοφωτομετρίαUV-VIS	37
1.4.2.2. Διαλύτες	39
1.4.2.3. Σφαίρα ολοκλήρωσης	39
1.4.2.4 Χαρακτηριστικά καμπύλης απορρόφησης	39

	Σελ.
1.4.3. Φθορισμός	40
1.4.3.1. Φθορισμός ακτίνων Χ	43
1.4.4. Κυκλικός διχρωϊσμός	43
1.4.4.1. Ηλεκτρομαγνητικά κύματα	44
1.4.4.2. Αλληλεπίδραση ύλης και φωτός	45
1.5 ΧΡΩΜΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΚΑΙ ΜΕΛΙΣΣΕΣ48	
1.5.1 Φάσμα ορατού φωτός, θεωρία χρώματος, αντίληψη χρωμάτων από τον άνθρωπο	48
1.5.2 Αντίληψη χρωμάτων από έντομα, ιδίως από μέλισσες. Σημασία για την επικοινωνία	51
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
2.1.ΣΚΕΥΗ, ΟΡΓΑΝΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	53
2.1.1. Σκεύη	53
2.1.2. Όργανα	53
2.1.3.Αντιδραστήρια	54
2.1.4. Διαλύματα	54
2.2.ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΝΘΕΩΝ	55
2.3.ΕΚΧΥΛΙΣΗ	56
2.4.ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ	57
2.5.ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	57
2.6.ΚΥΚΛΙΚΟΣ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΣ	58
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
A. Συλλογές ανθέων και εκχυλίσαις	60
B. Φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωισμού στο ορατό	62
B1. Φάσματα σε οξυνισμένη μεθανόλη	62
B2. Φάσματα απορρόφησης ανέπαφου πετάλου	87
B3. Φάσματα απορρόφησης σε κιτρικό νάτριο	94
Γ. Φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωισμού εκχυλισμάτων πετάλων καμπανούλας στο υπεριώδες	98
Γ1. Φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες	98
Γ2. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο υπεριώδες	101
Δ. Φάσματα φθορισμού εκχυλισμάτων καμπανούλας	103

	Σελ.
<i>Εικόνα 25:</i> Η σχέση μεταξύ απορροφητικότητας A , και ελλειπτικότητας θ	47
<i>Εικόνα 26:</i> Φασματοπολωσίμετρο για μέτρηση κυκλικού διχρωϊσμού	48
<i>Εικόνα 27:</i> Φάσματα απορρόφησης των χρωστικών των κωνιοφόρων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού που είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση των τριών κύριων χρωμάτων στην όραση	50
<i>Εικόνα 28:</i> Κανονικοποιημένα φάσματα (δηλ. μέγιστο = 1,00) φωτοευαισθησίας των τριών φωτο-υποδοχέων της μέλισσας	52
<i>Εικόνα 29:</i> Διαλύματα προς χρήση στο βιοχημικό εργαστήριο	54
<i>Εικόνα 30:</i> Ηλεκτρονικό πεχάμετρο στο βιοχημικό εργαστήριο	55
<i>Εικόνα 31:</i> Δείγματα ανθέων μωβ και λευκής καμπανούλας προς επεξεργασία ..	55
<i>Εικόνα 32:</i> Δείγματα ανθέων ροζ και λευκής τριανταφυλλιάς προς επεξεργασία..	56
<i>Εικόνα 33:</i> Καθαρισμένα πέταλα μωβ καμπανούλας, κέντρο και περιφέρεια	56

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελ.
Πίνακας 1: Τάξη και αριθμός γνωστών δομών και βιολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών...	27
Πίνακας 2: Είδη φυτών με κίτρινα άνθη που οφείλονται στις χαλκόνες αουρόνες	29
Πίνακας 3: Χημική βάση των χρωμάτων ανθέων	33
Πίνακας 4: Κοινοί διαλύτες στο UV σε σχέση με τα $\lambda_{\max}$ χρησιμοποίησής τους	37
Πίνακας 5: Αναλυτικός κατάλογος συλλογών ανθέων, επεξεργασίας των και περαιτέρω φασματοσκοπικών μετρήσεων	60
Πίνακας 6: Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σέπαλου καμπανούλας (κεντρικό τμήμα) με έντονη απορρόφηση, ταξινομημένα από $\lambda_{\min}$ (ελάχιστο) μέχρι $\lambda_{\max}$ (μέγιστο), Φάσματα 1β και 2	62
Πίνακας 7: Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό εκχυλίσματος σέπαλου καμπανούλας (κεντρικό τμήμα) με έντονη απορρόφηση, ταξινομημένα από $\lambda_{\min}$ (ελάχιστο) μέχρι $\lambda_{\max}$ (μέγιστο), Φάσματα 1β και 2β	64
Πίνακας 8: Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό ανέπαφου σέπαλου μωβ καμπανούλας, ταξινομημένα από $\lambda_{\min}$ (ελάχιστο) μέχρι $\lambda_{\max}$ (μέγιστο) όπως προκύπτουν από το Φάσμα 3 σε σφαίρα ολοκλήρωσης	67

	Σελ.
Πίνακας 9: Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό ανέπαφου σέπαλου μωβ καμπανούλας, ταξινομημένα από $\lambda_{\text{ελάχιστο}} (\lambda_{\text{min}})$ μέχρι $\lambda_{\text{μέγιστο}} (\lambda_{\text{max}})$ όπως προκύπτουν από το Φάσμα 4 σε σφαίρα ολοκλήρωσης	69
Πίνακας 10: Φασματοσκοπικές παράμετροι από διαδοχικές αραιώσεις εκχυλίσματος μωβ άνθους καμπανούλας (περιφέρεια) σε οξυνισμένη μεθανόλη (Φάσματα 1, και 5-9)	75
Πίνακας 11. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σέπαλου (περιφέρεια) καμπανούλας με έντονη απορρόφηση, ταξινομημένα από $\lambda_{\text{ελάχιστο}} (\lambda_{\text{min}})$ μέχρι $\lambda_{\text{μέγιστο}} (\lambda_{\text{max}})$ όπως προκύπτουν από το Φάσμα 10α	80
Πίνακας 12. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό εκχυλίσματος σέπαλου καμπανούλας με έντονη απορρόφηση, ταξινομημένα από $\lambda_{\text{ελάχιστο}} (\lambda_{\text{min}})$ μέχρι $\lambda_{\text{μέγιστο}} (\lambda_{\text{max}})$ όπως προκύπτουν από το Φάσμα 10β	81
Πίνακας 13. Φασματοσκοπικές παράμετροι μετά από διαδοχικές αραιώσεις εκχυλίσματος μωβ άνθους καμπανούλας (περιφέρεια) σε οξυνισμένη μεθανόλη (Φάσματα (Φ) 9-12)	85
Πίνακας 14. Κατάλογος φασμάτων ανέπαφου πετάλου καμπανούλας	87
Πίνακας 15. Λόγοι μέγιστης απορρόφησης UV/ορατό σε ανέπαφα σέπαλα καμπανούλας ..	93
Πίνακας 16. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο περιφέρειας σεπάλων μωβ καμπανούλας, ταξινομημένα από $\lambda_{\text{ελάχιστο}} (\lambda_{\text{min}})$ μέχρι $\lambda_{\text{μέγιστο}} (\lambda_{\text{max}})$ όπως προκύπτουν από τα Φάσματα 20 και 21 σε σφαίρα ολοκλήρωσης.....	96

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

	Σελ.
Σχήμα 1: Γραφική παράσταση απορροφητικότητας στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης, συλλογή 25/09/2006	76
Σχήμα 2: Γραφική παράσταση ελλειπτικότητας στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης συλλογή 25/09/2006 ...	76
Σχήμα 3: Γραφική παράσταση τιμής $\Delta\lambda/2$ της απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης, συλλογή 25/09/2006	77
Σχήμα 4: Γραφική παράσταση απορροφητικότητας στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης, συλλογή 02/10/2006	86
Σχήμα 5: Γραφική παράσταση ελλειπτικότητας στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης συλλογή 02/10/2006 ...	86
Σχήμα 6: Γραφική παράσταση τιμής $\Delta\lambda/2$ της απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων	

καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης, συλλογή 02/10/2006	Σελ. 86
---	------------

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

Φάσμα 1α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του <i>κεντρικού τμήματος</i> μωβ άνθους καμπανούλας, συλλογή 25/09/2006	63
Φάσμα 2α. Κυκλικός διχρωϊσμός, στο ορατό (800 – 400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερικού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας	65
Φάσμα 3. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) ανέπαφου σέπαλου μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης συλλογή 23/10/2006	66
Φάσμα 4. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) ανέπαφου σέπαλου μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης με διόρθωση γραμμής μηδενικής απορρόφησης, συλλογή 02/10/2006	68
Φάσμα 5α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800 – 400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, <i>αραιωμένου στο 1/2</i> , συλλογή 25/09/2006	70
Φάσμα 6α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800–400 nm) εκχυλίσματος του <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, <i>αραιωμένου στο 1/3</i> , συλλογή 25/09/2006	71
Φάσμα 7α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800–400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, <i>αραιωμένου στο 1/5</i> , συλλογή 25/9/2006.	72
Φάσμα 8α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800–400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, <i>αραιωμένου στο 1/10</i> , συλλογή 25/9/2006.	73
Φάσμα 9α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800–400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, <i>αραιωμένου στο 1/20</i> , συλλογή 25/9/2006.	74
Φάσμα 10α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800–400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, συλλογή 02/10/2006 ...	78
Φάσμα 11α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800–400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, <i>αραιωμένου 8/10</i> , συλλογή 02/10/2006	82
Φάσμα 12α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800–400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, <i>αραιωμένου 1/2</i> , συλλογή 02/10/2006	83

	Σελ.
Φάσμα 13α, β. Φάσμα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό (800–400 nm) εκχυλίσματος <i>περιφερειακού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/4, συλλογή 02/10/2006	84
Φάσμα 14αβ. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) α , και υπεριώδες (400-250 nm) β , περιφέρειας <i>ανέπαφου σέπαλου</i> λευκού άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης συλλογή 23/10/2006	88
Φάσμα 15αβ. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) α , και υπεριώδες (400-250 nm) β , περιφέρειας <i>ανέπαφου σέπαλου</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης συλλογή /10/2006	89
Φάσμα 16α. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) περιφέρειας <i>ανέπαφου σέπαλου</i> <i>αχνού μωβ άνθους</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης συλλογή 20/10/2006 ..	89
Φάσμα 3αβ. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) α , και υπεριώδες (400-250 nm) β , περιφέρειας <i>ανέπαφου σέπαλου έντονου μωβ άνθους</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 23/10/2006	90
Φάσμα 17. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm), περιφέρειας <i>ανέπαφου σέπαλου έντονου μωβ άνθους</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 23/10/2006	91
Φάσμα 18αβ. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) α , και υπεριώδες (400-250 nm) β , περιφέρειας <i>ανέπαφου σέπαλου αχνού μωβ άνθους</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 27/10/2006	91-92
Φάσμα 19α. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) περιφέρειας <i>ανέπαφου σέπαλου έντονου μωβ άνθους</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 02/12/2006	92
Φάσμα 20. Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο (pH = 6,0) από περιφέρεια μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, συλλογή, 3/10/26	94
Φάσμα 21. Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο (pH = 6,0), αραιωμένο 1/5, από περιφέρεια μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, συλλογή, 3/10/26	95
Φάσμα 22. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο (pH = 6,0) από <i>κέντρο μωβ ανθέων</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας. Συλλογή, 3/10/26	97
Φάσμα 23. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο (pH = 6,0) από την <i>περιφέρεια λευκών ανθέων</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας. Συλλογή, 3/10/26	97
Φάσμα 24. Φάσμα απορρόφησης σε ορατό και υπεριώδες εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από <i>περιφέρεια μωβ ανθέων</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/20, συλλογή 3/10/26	98
Φάσμα 25. Φάσμα απορρόφησης σε ορατό και υπεριώδες εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από <i>περιφέρεια μωβ ανθέων</i> ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/60, συλλογή, 3/10/26	99

	Σελ.
Φάσμα 26. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από κέντρο μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/5 , συλλογή, 3/10/26	99
Φάσμα 27. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από κέντρο μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/10 , συλλογή, 3/10/26..	100
Φάσμα 28. Φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από κέντρο μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/20 , συλλογή, 3/10/26	100
Φάσμα 29α, β. Φάσμα απορρόφησης (α , κάτω) και κυκλικού διχρωϊσμού (β , πάνω), στην περιοχή του υπεριώδους φωτός (400 – 250 nm) εκχυλίσματος του <i>κεντρικού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (<i>C. versicolor</i>), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης, αραιωμένου 1/20 , από συλλογή 25 ^{ης} Σεπτεμβρίου 2006.....	101
Φάσμα 30α, β. Φάσμα απορρόφησης (α , κάτω) και κυκλικού διχρωϊσμού (β , πάνω), στην περιοχή του υπεριώδους φωτός (400 – 250 nm) εκχυλίσματος του <i>περιφερικού τμήματος</i> μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (<i>C. versicolor</i>), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης, αραιωμένου 1/20 , από συλλογή 25 ^{ης} Σεπτεμβρίου 2006.....	102
Φάσμα 31. Φάσμα εκπομπής φθορισμού μη αραιωμένου εκχυλίσματος από πέταλα πορφυράς καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη.	103
Φάσμα 32. Φάσμα δράσης φθορισμού με βάση το μέγιστο φθορισμού στα 620 nm που έδειχνε το Φάσμα 31 , μετά από διέγερση στα 500 nm.	104

ΠΙΝΑΚΑΣ ΒΡΑΧΥΓΡΑΦΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

$A_{\text{μεγ}}$ (A_{max})	μέγιστη τιμή απορροφητικότητας
$A_{\text{ελ}}$ (A_{min})	ελάχιστη τιμή απορροφητικότητας
A , Abs (absorbance)	Απορροφητικότητα
CD (circular dichroism)	κυκλικός διχρωϊσμός
ΔA	διαφορά απορροφητικότητας*
$\Delta \epsilon$	διαφορά συντελεστών γραμμομοριακής απόσβεσης*
$\Delta \lambda/2$	ημι-πλάτος ζώνης απορρόφησης (ή κυκλικού διχρωισμού)
ϵ	συντελεστής γραμμομοριακής απόσβεσης
θ	ελλειπτικότητα
I_o	ένταση προσπίπτοντος φωτός
I	ένταση εξερχόμενου φωτός
ΚΔ	κυκλικός διχρωϊσμός
$\lambda_{\text{μεγ}}$ (λ_{max})	μέγιστη τιμή μήκους κύματος
$\lambda_{\text{ελ}}$ (λ_{min})	ελάχιστη τιμή μήκους κύματος
l	μήκος οπτικής διαδρομής

*Κατά κύριο λόγο μεταξύ αριστερόστροφα- και δεξιόστροφα-κυκλικά πολωμένου φωτός

Περίληψη

Σε αυτή την πτυχιακή μελετήσαμε εις βάθος τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), φυτού που είναι αυτοφυές στην Ήπειρο σε διάφορα σημεία και του οποίου τα ωραία πορφυρά άνθη είχαν προκαταρκτικά μελετηθεί σε δύο προηγούμενες πτυχιακές. Οι προηγούμενες πτυχιακές είχαν δείξει ότι οι χρωστικές της ποικιλόχρωμης καμπανούλας είναι τουλάχιστον δύο ειδών: μια λιπόφιλη καροτενοειδής κίτρινου χρώματος και μια υδρόφιλη κυανού χρώματος. Χρησιμοποιώντας την ίδια, κλασσική μέθοδο εκχύλισης των χρωστικών των πετάλων σε οξυνισμένη μεθανόλη, μελετήσαμε τις φασματοσκοπικές ιδιότητες του εκχυλίσματος με καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης, κυκλικού διχρωϊσμού και φθορισμού. Στην περίπτωση της απορρόφησης μελετήσαμε και φάσματα ολόκληρου πετάλου, τοποθετημένου σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συσκευή που επιτρέπει τέτοια προσέγγιση.

Τα φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού (ΚΔ) πυκνού εκχυλίσματος πετάλων (πορφυρό χρώμα) στο ορατό φως, ήταν αντίστοιχα μεταξύ των εμφανίζοντας μια τριπλή κορυφή στην περιοχή 480-620nm με δύο επιπλέον ώμους και μεγάλο ημι-εύρος ζώνης απορρόφησης. Διαδοχικές αραιώσεις έφεραν απώλεια αυτού του πολύπλοκου φάσματος και αντικατάστασής του με μια απλή σχεδόν κωδονοειδή καμπύλη (έντονο ροζ χρώμα), πάλι σε αντιστοιχία μεταξύ απορρόφησης και ΚΔ, με τις αραιώσεις να ακολουθούν τον νόμο των Lambert και Beer, από την πρώτη αραιώση και μετά. Όλα αυτά τα ευρήματα παραπέμπουν σε ύπαρξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των χρωστικών στο πυκνό εκχύλισμα. Το φάσμα απορρόφησης ανέπαφου πετάλου στο ορατό επιδεικνύει το ίδιο ακριβώς σχήμα (τριπλής κορυφής κλπ.), παράλληλα με αυξανόμενη απορρόφηση σε μικρότερα μήκη κύματος λόγω της σκέδασης του φωτός από το ίδιο το πέταλο. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση μεταξύ των χρωστικών πρέπει να υπάρχει και μέσα στα ίδια τα χυμοτόπια, όπου βρίσκονται οι χρωστικές. Το σχήμα του φάσματος είναι σχεδόν πανομοιότυπο είτε αφορά πέταλο με αχνό ή έντονο χρώμα στη περιφέρειά του, ή αφορά το κέντρο του, όπου το πορφυρό χρώμα είναι ακόμη πιο έντονο. Για προσομοίωση του περιβάλλοντος του χυμοτοπίου έγινε εκχύλιση των χρωστικών σε 0,1 M κιτρικό νάτριο, pH = 6,00, όπου τα χαρακτηριστικά του φάσματος ανέπαφου πετάλου διατηρούνται. Αυτά τα χαρακτηριστικά τόσο εκχυλισμάτων ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη όσο και ανέπαφων ανθέων διατηρήθηκαν σε συλλογές ανθέων καμπανούλας από συγκεκριμένες περιοχές της Ηπείρου από τέλη Σεπτεμβρίου μέχρι αρχές Δεκεμβρίου του 2006.

Στην υπεριώδη περιοχή του φωτός τα φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού δεν είναι αντίστοιχα μεταξύ των! Το φάσμα απορρόφησης στο εγγύς υπεριώδες έχει μόνον δύο ευδιάκριτες κορυφές γύρω στα 325 και 280 nm ενώ το αντίστοιχο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού δείχνει ασθενείς κορυφές με θετική (307 nm) και αρνητική ελλειπτικότητα (285 και 255 nm) με περισσότερες αλληλεπιδράσεις. Ο λόγος μέγιστης απορροφητικότητας υπεριώδους προς ορατό είναι περ. 4 σε μικρές αραιώσεις (1/20) ενώ φτάνει στην τιμή των 17 σε μεγαλύτερες αραιώσεις (1/60). Στο ανέπαφο πέταλο παρατηρείται ραγδαία αύξηση της απορροφητικότητας από τα 400 μέχρι τα 360 nm, όπου και μια πλατιά κορυφή, ενώ στην συνέχεια η απορροφητικότητα φθίνει με πολύ χαμηλό ρυθμό ($A_{260} \sim 0,95A_{360}$). Αντίθετα με τα εκχυλίσματα, ο λόγος μέγιστης απορροφητικότητας υπεριώδους προς ορατό είναι κατά πολύ μικρότερος, 1,19 για αχνά μωβ

πέταλα και 1,34 για έντονα μωβ πέταλα. Η τελευταία ιδιότητα προφανώς διευκολύνει την επικοινωνία διότι οι μέλισσες απορροφούν υπεριώδες φώς στη περιοχή 300 nm.

Επιπλέον, ο φθορισμός των εκχυλισμάτων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη (πορφυρό χρώμα) εμφανίζει αρκετές κορυφές, ακόμη και από δευτερεύουσες κορυφές απορρόφησης και «ώμους». Επειδή τα φάσματα δράσης των αντίστοιχων κορυφών φθορισμού έχουν αρκετές διαφορές από τα φάσματα απορρόφησης συμπεραίνουμε ότι υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των χρωστικών της καμπανούλας.

Η εκτεταμένη φασματοσκοπική έρευνα των εκχυλισμάτων ανθέων καμπανούλας έδειξε ότι πυκνά διαλύματα οξυνισμένης μεθανόλης, καθώς και διαλύματα κιτρικού νατρίου (pH = 6,0) διατηρούν το χρώμα και τα ιδιαίτερα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά στο ορατό τα οποία εμφανίζει το ανέπαφο πέταλο άνθους. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι συμβατά με την διάταξη των επί μέρους χρωστικών σε ένα οργανωμένο σύμπλεγμα, ενδεχόμενα με παρουσία συγκεκριμένων μεταλλικών κατιόντων, όπως έχει διαπιστωθεί και σε άλλες χρωστικές (Yoshidaetal., 2009). Μεταγενέστερες μελέτες από το εργαστήριο Βιοχημείας όπου εκπονήσαμε την πτυχιακή μας έδειξαν ότι τα άνθη καμπανούλας περιέχουν Mg^{2+} , Ca^{2+} και Na^{+} (Αδάμου, 2011· Magoula, 2022). Εξ όσων γνωρίζουμε, αυτή η πτυχιακή και τα αντίστοιχα ευρήματα της Παναγιώτας Γεωργάνου (2009) είναι τα πρώτα που δείχνουν αυτές τις δύο ιδιότητες, για οποιοδήποτε εκχύλισμα ανθέων. Την ίδια ιδιότητα πυκνών εκχυλισμάτων οξυνισμένης μεθανόλης θα διαπιστώσουμε αργότερα και στην περίπτωση των ανθέων της *Lunariaannua* (Βαενάς, 2022). Συνεπώς, αυτή η πτυχιακή αποτελεί ένα ουσιαστικό βήμα καταγραφής των ιδιοτήτων των χρωστικών στα πέταλα της ποικιλόχρωμης καμπανούλας, και προσδιορισμού της διάταξης εκείνης που δίνει από μια γαλάζια ανθοκυανίνη και ένα κίτρινο καροτενοειδές ένα ωραίο πορφυρό χρώμα.

Abstract

In this thesis we have studied in depth the spectroscopic characteristics of the multicolored bellflower (*Campanula versicolor*), a plant that is native to Epirus in various places, and whose beautiful purple flowers had been preliminarily studied in two previous undergraduate theses. Previous theses had shown that pigments of *C. versicolor* are of at least two types: a yellow lipophilic carotenoid and a blue hydrophilic one. Using the same, classical method of extracting the pigments of petals in acidified methanol, we studied the spectroscopic properties of the extract by recording the absorption, circular dichroism and fluorescence spectra. In the case of absorption, we also studied spectra of a whole petal, placed in an integrating sphere, a device that allows such an approach.

Absorption and circular dichroism (CD) spectra of concentrated petal extracts (purple color) in the visible light, had respective corresponding features, i.e. a triple peak in the 480-620 nm range with two additional shoulders and a large absorption half-bandwidth; the respective wavelengths for these features were the same. Successive dilutions resulted in a dark pink color of the extract, with loss of this complex spectrum and its replacement by a simple almost bell-shaped curve, again with complete correspondence between absorption and CD spectra, with dilutions following Lambert and Beer's law from the first dilution onwards. All these findings point to the existence of strong interactions between the pigments in the concentrated extract. The absorption spectrum of an intact petal in the visible region exhibits exactly the same shape (triple peak, etc.), along with increasing absorption at shorter wavelengths due to scattering of light by the petal itself. Therefore, the interaction between the pigments must also exist within the vacuoles themselves, where the pigments are located. The shape of the spectrum is almost identical whether it concerns a petal with a faint or intense color at its periphery, or concerns its center, where the purple color is even more intense. To simulate the environment of the vacuoles, the pigments were extracted in 0.1 M sodium citrate, pH = 6.00, yielding a very similar absorption spectrum to that of the intact petal. These spectroscopic characteristics of both extracts of *C. versicolor* petals in acidified methanol and of intact flowers were preserved in collections of petals from specific regions of Epirus from late September to early December 2006.

In the ultraviolet region of light, the absorption and circular dichroism spectra do not correspond to each other. The absorption spectrum in the near UV has only two distinct peaks around 325 and 280 nm while the respective circular dichroism spectrum shows weak peaks with positive (307 nm) and negative ellipticity (285 and 255 nm), evidence of more interactions. The ratio of maximum UV to visible absorbance is approx. 4 in small dilutions (1/20) while it reaches the value of 17 in larger dilutions (1/60). In the intact petal, a rapid increase in absorbance is observed from 400 to 360 nm, where there is also a broad peak, while afterwards the absorbance decreases at a very low rate ($A_{260} \sim 0.95 A_{360}$). In contrast to the extracts, the ratio of maximum UV to visible absorbance is much lower, 1.19 for pale purple petals and 1.34 for deep purple petals. The latter property apparently facilitates pollination because bees absorb UV light in the 300 nm range.

In addition, the fluorescence spectra of campanula extracts in acidified methanol (purple color) show several emission peaks, even from secondary absorption peaks and "shoulders". Because the action spectra of the corresponding fluorescence peaks have several differences from the

absorption spectra we conclude that there is a strong interaction between the campanula pigments.

Extensive spectroscopic investigation of *C. versicolor* flower petal extracts has shown that concentrated solutions of acidified methanol as well as sodium citrate solutions (pH = 6.0) retain the color and special visible spectroscopic features exhibited by the intact flower petal. These characteristics are compatible with the arrangement of individual pigments in an organized complex, possibly with the presence of specific metal cations, as has been found in other pigments (Yoshida et al., 2009). Later studies from the Biochemistry laboratory, where we prepared our thesis, showed that *C. versicolor* flower petals contain Mg^{2+} , Ca^{2+} and Na^{+} (Adamou, 2011; Magoula, 2022). As far as we know, this thesis and the corresponding findings by Panagiota Georganou (2009) are the first to show these two properties, for any flower extract. The same property of concentrated extracts of acidified methanol will be found later in the case of the flowers of *Lunaria annua* (Vaenas, 2022). Therefore, this thesis is an essential step in recording the properties of the pigments in the petals of *C. versicolor*, and determining the arrangement that gives a beautiful purple color from a blue anthocyanin and a yellow carotenoid.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1. Άνθος (Δρακονταειδή Αγγελική)

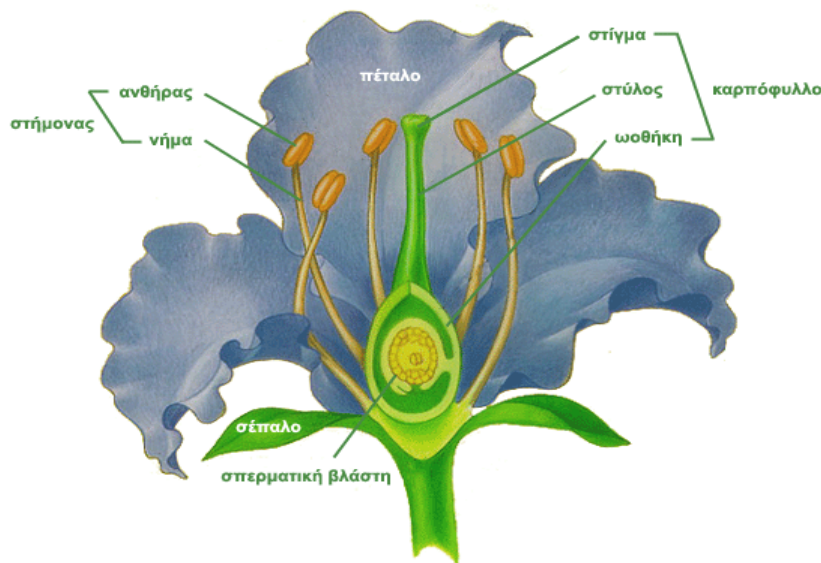
Αν θέλαμε να δώσουμε έναν ορισμό στο άνθος θα λέγαμε ότι αποτελεί το μέρος του φυτού που ευθύνεται για την αναπαραγωγή του και για την ανάπτυξη του καρπού του. Το άνθος (*flower*) αποτελείται από ένα μικρό αδιακλάδωτο βλαστό τον *ανθικό άξονα* (*floralaxis*) ή *ανθοδόχη* (*receptacle*) ή *υπάνθιο* (*hypanthium*), με περιορισμένα, υπανάπτυκτα μεσογονάτια διαστήματα και έναν αριθμό μεταμορφωμένων φύλλων (σποριόφυλλων) που εκφύονται είτε κατά σπονδύλους είτε, σπανιότερα, σπειροειδώς.

Εξετάζοντας ένα άνθος διακρίνουμε τους εξής σπονδύλους:

Κάλυκας. Είναι το εξωτερικό μέρος τους άνθους και αποτελείται από τα σέπαλα. Τα σέπαλα είναι συνήθως πράσινα και περιβάλλουν το άνθος όταν είναι κλειστό. Αν τα σέπαλα είναι ελεύθερα τότε ο κάλυκας λέγεται χωριστοσέπαλος ενώ αν είναι ενωμένα ονομάζεται συσσέπαλος. Ο αριθμός των σεπάλων σε κάθε άνθος διαφέρει αλλά συνήθως κυμαίνεται απο 3 – 5 σέπαλα ενώ σε μερικά μπορεί να λείπουν (*ασέπαλα*). Ο σκοπός των σεπάλων είναι η προστασία του άνθους, σε κάποια φυτά όμως τα σέπαλα είναι έγχρωμα και με χαρακτηριστική μυρωδιά, σε αυτά τα φυτά τα σέπαλα χρησιμεύουν και στο να προσελκύουν επικονιαστές.

Στεφάνη. Είναι το κομμάτι του άνθους που βρίσκεται εσωτερικά του κάλυκα. Αποτελείται από έγχρωμα φυλλάρια που ονομάζονται πέταλα. Τα πέταλα με τα διάφορα χρώματα τους και με την χαρακτηριστική οσμή τους προσελκύουν τους επικονιαστές.

Όταν τα σέπαλα έχουν διαφορετικό σχήμα και υφή από τα πέταλα τότε ο κάλυκας και η στεφάνη ονομάζονται *περιάνθιο*. Αντίθετα όταν τα σέπαλα και τα πέταλα δεν ξεχωρίζουν (*τέπαλα*) τότε ο κάλυκας και η στεφάνη λέγονται *περιγόνιο*.



Εικόνα 1: Απεικόνιση άνθους (www.kpe-kastor-kas.sch.gr 12/07/2012)

Ανδρείο. Είναι το αρσενικό τμήμα τους άνθους και αποτελείται από στήμονες. Οι στήμονες είναι τα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα. Κάθε στήμονας έχει ένα λεπτό άγονο στέλεχος, το νήμα, και ένα γόνιμο ανθήρα που βρίσκεται στην άκρη του νήματος. Κάθε ανθήρας χωρίζεται σε δύο τμήματα τις θήκες. Κάθε μια από τις θήκες περιέχει δύο γυρεόσακκους μέσα στους οποίους δημιουργούνται οι γυρεόκοκκοι.

Γυναικείο ή ύπερος. Είναι το θηλυκό τμήμα του άνθους και αποτελείται από καρπόφυλλα. Το κατώτερο τμήμα του ύπερου είναι διογκωμένο και αποτελεί την ωοθήκη. Η επιμήκυνση της ωοθήκης ονομάζεται στύλος ο οποίος καταλήγει στο στίγμα. Το στίγμα είναι το μέρος του άνθους που επικάθεται η γύρη κατά την επικονίαση ενώ ο στύλος καθοδηγεί τον γυρεοσωλήνα προς τις σπερμοβλάστες.

Τα άνθη μπορούν να είναι μονήρη ή να σχηματίζονται σε ταξιανθίες. Τα άνθη πάνω στις ταξιανθίες εκφύονται με ένα συγκεκριμένο σχέδιο πάνω σε έναν απλό ή διακλαδισμένο άξονα. Ανάλογα με την διακλάδωση των αξόνων διακρίνονται δύο βασικά είδη ταξιανθιών οι *μονοποδικές (monopodial)* και οι *συμποδικές (sympodial)*.

Τα άνθη μπορούν να εκφύονται από το βλαστό (*επιφυή*) ή να είναι έμμισχα και να συνδέονται με το βλαστό μέσω του ποδίσκου. Όταν το άνθος φέρει και γυναικείο και ανδρείο ονομάζεται τέλειο άνθος ενώ όταν φέρει ένα από τα δύο αναπαραγωγικά όργανα ονομάζεται ατελές. Στα ατελή φυτά τα αρσενικά και θηλυκά άνθη μπορούν να βρίσκονται στο ίδιο φυτό που ονομάζεται μόνικο ή σε διαφορετικά φυτά που ονομάζονται δίοικα.

1.2. CAMPANULA VERSICOLOR (Δρακονταειδή Αγγελική)



Εικόνα 2: Καμπανούλα των βράχων
(floraolympus. Blogspot 14/07/2012)

Εικόνα 3: Ταξιανθία καμπανούλας
(laspistasteria.com)

!

Το γένος του φυτού *campanula* αριθμεί εβδομήντα είδη στην Ελλάδα. Τα άνθη του φυτού είναι ιδιαίτερος όμορφα και εκφύονται σε μονοποδικές ταξιανθίες. Ο βλαστός είναι όρθιος και υψώνει φύλλα σαν λόγχες προς τον ουρανό. Το γένος περιλαμβάνει μονοετείς, διετείς καθώς και πολυετείς πόες με ύψος 5 – 40 cm.

Παρακάτω παρατίθενται πληροφορίες για ένα συγκεκριμένο είδος την *campanulaversicolor*.

ΚΛΑΣΗ: *Magnoliopsida* ή *Dicotyledones* (δικότυλα). Η κλάση αυτή χαρακτηρίζεται από φυτά που φέρουν στο έμβρυο τους δύο κοτυληδόνες. Τα κύρια γνωρίσματα της κλάσης είναι η μακρόβια ρίζα, η δικτυωτή νεύρωση των φύλλων και η πενταμελής ή τετραμελής σπόνδυλοι των ανθέων.

ΥΠΟΚΛΑΣΗ: *Asteridae*. Στην υποκλάση αυτή εντάσσονται οι πιο εξελιγμένες μορφές των δικότυλων. Οι στήμονες σε αυτά τα φυτά περιορίζονται σε έναν κύκλο. Οι κύκλοι του άνθους είναι συνήθως πενταμερείς και το γυναικείο αποτελείται από δύο καρπόφυλλα.

ΤΑΞΗ: *Campanulales*.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: *Campanulaceae*. Η οικογένεια περιλαμβάνει 60 – 70 γένη και 2.000 είδη ευρέως κατανομημένα σε εύκρατες και υποτροπικές περιοχές καθώς και τροπικά βουνά.

ΓΕΝΟΣ – ΕΙΔΟΣ: *Campanula versicolor* Andrews (καμπανούλα η ποικιλόχρωμη).

ΠΕΡΙΟΧΗ: Βαλκάνια, Ιταλία, Ελλάδα. Στην Ελλάδα έχει βρεθεί στο κάστρο των Ιωαννίνων, πάνω στην Εθνική Οδό Ιωαννίνων Αθηνών (στην τοποθεσία Κανέτα Ν. Ιωαννίνων, στον νομό Πρεβέζης πριν και μετά το φράγμα του Λούρου), στο Κιλκίς και στην Κυλλήνη Πελοποννήσου. (Τακ & Strid, , 2009, Παπιομύτογλου, 2012)

ΥΨΟΜΕΤΡΟ: Ορεινή γεωγραφική ζώνη, υπο-αλπική.

ΜΕΓΕΘΟΣ ΑΝΘΟΥΣ: 15 – 40 mm.

ΑΝΘΗ: Σκούρο και ανοιχτό μωβ (πορφυρό) καθώς και λευκό σπανιότερα. Είναι το μοναδικό είδος του γένους που τα άνθη του δεν μοιάζουν με καμπάνες. Έχει πέντε πέταλα αστεροειδούς σχηματισμού.

ΑΝΘΟΦΟΡΙΑ: Από αρχές καλοκαιριού έως και Δεκέμβριο.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: Θέλει ηλιόλουστες περιοχές, φτωχά ξηρά και βραχώδη εδάφη με καλή στράγγιση. Χρειάζεται προστασία ενάντια στους υγρούς χειμώνες.

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ: Το χειμώνα με σπόρο, το φθινόπωρο με διαίρεση ενώ την άνοιξη πολλαπλασιάζεται και με τους δύο τρόπους.



Εικόνα 4: Λευκή καμπανούλα από την Ήπειρο (Συλλογή 23/10/2006, φωτογραφία 24/10/2006)



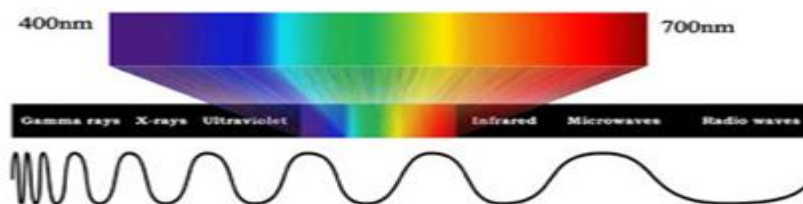
Εικόνα 5: Ανθοφορία πάνω στο βράχο (varbak.com 16/07/2012)

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΟΝΟΜΑΤΟΣ: *CAMPANULA*: από το λατινικό *campana* = καμπάνα. *VERSICOLOR*: Λατινικά αυτός που αλλάζει χρώμα, ποικιλόμορφος. Κοινή ονομασία καμπανούλα, κολλιτσίδα, γαλατόχορτο και καμπανούλα των βράχων (αρέσκεται να φυτρώνει σε βραχώδεις περιοχές).

1.3 ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΑΝΘΕΩΝ

1.3.1. Γενικά (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

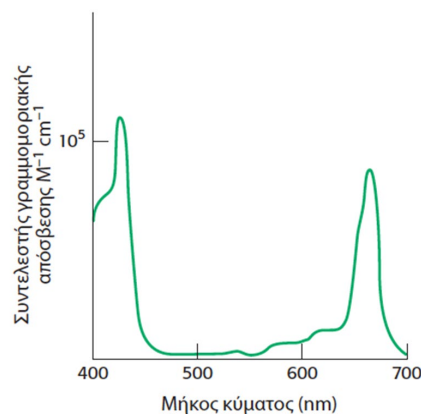
Το πρώτο βήμα για την μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική είναι η απορρόφηση του φωτός. Αυτή η διεργασία εκτελείται από τις *χρωστικές* των χρωματοφόρων ουσιών. Με τον όρο *χρωστική* περιγράφεται κάθε ουσία η οποία απορροφά φως. Κάποιες *χρωστικές* έχουν την ιδιότητα να απορροφούν όλα τα μήκη κύματος του φωτός οπότε και εμφανίζονται ως μαύρες ενώ κάποιες άλλες απορροφούν μερικά μήκη κύματος αντανακλώντας τα υπόλοιπα. Το φως που αντανακλάται είναι το χρώμα που βλέπουμε. Παραδείγματος χάριν η *χλωροφύλλη* απορροφά κυρίως μήκη κύματος του ορατού φωτός που αντιστοιχούν στο ιώδες/βαθύ μπλε και το ερυθρό και αντανακλά το πράσινο φως και γι' αυτό τα φύλλα φαίνονται πράσινα (Εικόνα 7).



Περιοχή	Εύρος μηκών κύματος	Το χρώμα
Κόκκινου (Red)	760 nm – 630 nm	Κόκκινο (R)
Πορτοκαλί (orange)	630 nm – 600 nm	700 nm Πορτοκαλί
Κίτρινου (Yellow)	600 nm – 570 nm	620 nm Κίτρινο
Πράσινου (Green)	570 nm – 490 nm	580 nm Πράσινο (G)
Μπλε (Blue)	490 nm – 450 nm	530 nm Μπλε (B)
Ιώδους (Violet)	400 nm – 440 nm	475 nm Ιώδες (μωβ)
*Ινδικό (idigo) του Νεύτωνα	450 nm – 440 nm	440 nm

Εικόνα 6: Το φάσμα της ορατής ακτινοβολίας (digitalimagetheory. Blogspot. Com 13/07/2012)

Εικόνα 7. Φάσμα απορρόφησης χλωροφύλλης α. Στον άξονα των ψ αντί για απορροφητικότητα έχουμε συντελεστή γραμμομοριακής απόσβεσης σε μονάδες $M^{-1}cm^{-1}$. Η μετατροπή προκύπτει από τον νόμο των Lambert και Beer. Από Bergκαι συν., Βιοχημεία, 5^η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005.



ΕΙΚΟΝΑ 19.6 Απορρόφηση φωτός από τη χλωροφύλλη α. Η χλωροφύλλη α απορροφά φως πολύ αποτελεσματικά, όπως φαίνεται από τους πολύ μεγάλους συντελεστές γραμμομοριακής απόσβεσης, περίπου $10^5 M^{-1} cm^{-1}$.

Οι χρωστικές στα άνθη χωρίζονται σε δύο είδη στα καροτενοειδή (*carotenoids*) και στα φλαβονοειδή (*flavonoids*)

1.3.2. Καροτενοειδή (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

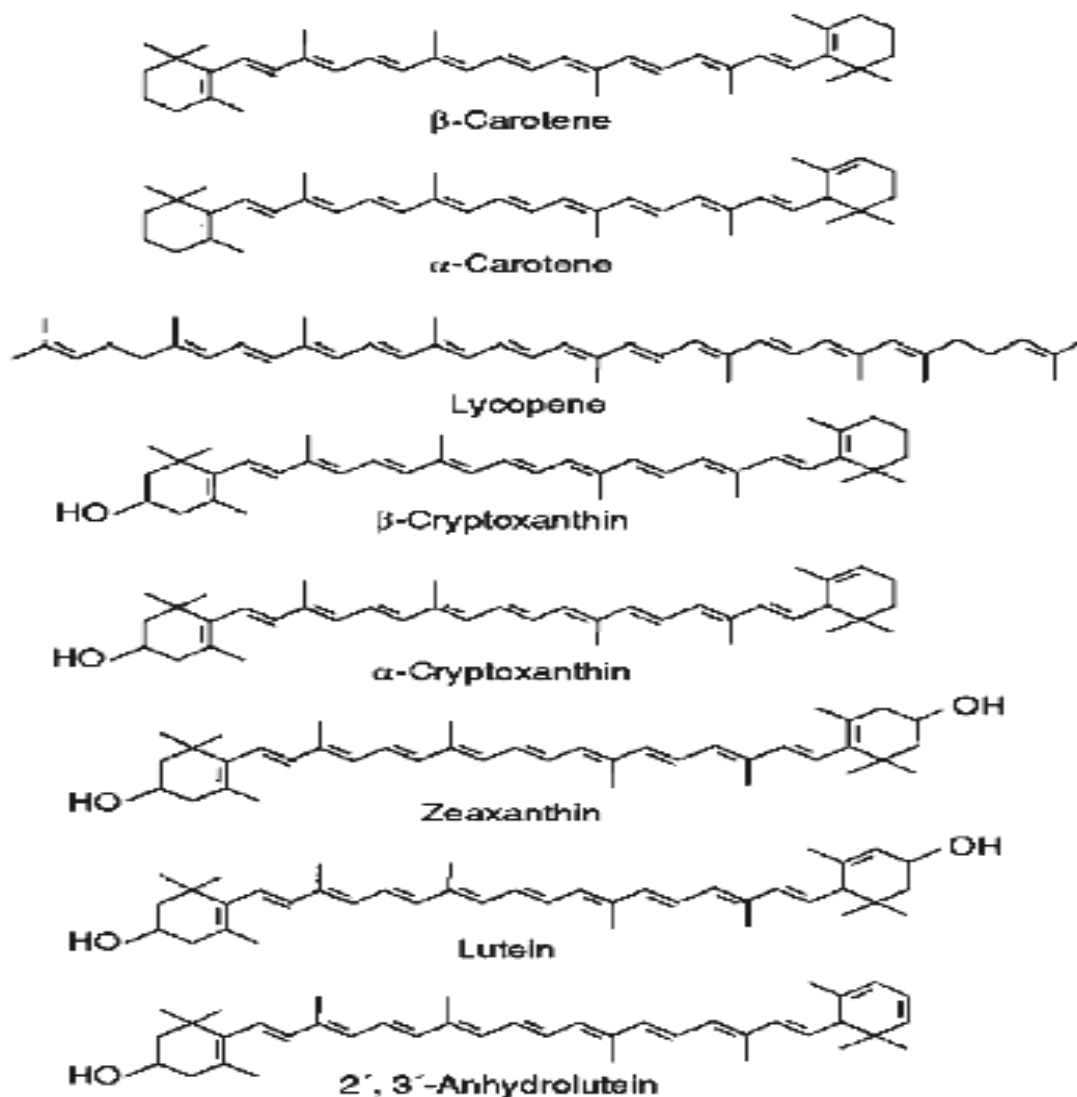
Τα καροτενοειδή αποτελούν μια ομάδα χρωστικών η οποία προσδίδει στα φυτά το κόκκινο, το πορτοκαλί καθώς και το κίτρινο χρώμα. Περιέχονται σε διάφορες τροφές, ιδιαίτερα της μεσογειακής διατροφής, όπως τα καρότα, τα βερίκοκα, οι ντομάτες και οι πιπεριές. Το β -καροτένιο είναι το βιοσυνθετικό πρόδρομο μόριο της Βιταμίνης Α.

Πλέον έχει αποδειχτεί επιστημονικά πως ο ρόλος των καροτενοειδών δεν είναι μόνο η απόδοση συγκεκριμένου χρώματος αλλά πως μαζί με τις βιταμίνες C και E αποτελούν βασικά αντιοξειδωτικά. Οι έρευνες που έχουν γίνει δείχνουν πως η λήψη αυτών των θρεπτικών συστατικών συμβάλλει στην αποτροπή εκδήλωσης καρκίνου, καρδιακών παθήσεων και άλλων ασθενειών (Toufailκαι συν., 2024).

Τα καροτενοειδή αν και συχνά θεωρούνται ως χρωστικές ουσίες φυτών συντίθεται και σε βακτήρια, άλγη και μύκητες, όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ταξινομικοί δείκτες. Η παραγωγή τους από φύκια είναι εκατοντάδες εκατομμύρια τόνοι το χρόνο. Οφείλουν το όνομά τους στην εργασία του *Wachenroder* ο οποίος απομόνωσε το β -καροτένιο (*β -carotene*) από τα καρότα το 1831. Το 1837 ο *Βιργίλιος* έδωσε το όνομα *ξανθοφύλλη* (*xanthophylls*) στις χρωστικές του κίτρινου τις οποίες εξήγαγε από τα φθινοπωρινά φύλλα των δέντρων. Ο *Richard Willstatter* το 1907 καθιέρωσε τον εμπειρικό τύπο των καροτενοειδών (C40) και ο *Tswett* το 1911 χρησιμοποιώντας πιο εξελιγμένες τεχνικές στη χρωματογραφία ξεχώρισε πολλές χρωστικές τις οποίες ονόμασε καροτενοειδή.

Τα πιο συνήθη καροτενοειδή είναι:

- Το *α-καροτένιο* (*α-carotene*). Προσδίδει πορτοκαλί χρώμα στα φυτά. Υπάρχει σε πάρα πολλά τρόφιμα. Οι έρευνες δείχνουν πως η χαμηλή λήψη τροφών με α-καροτένιο οδηγεί στην υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου των πνευμόνων στους καπνιστές. Καλύτερες πηγές στα τρόφιμα καρότα και νεροκολοκύθες.
- Το *β-καροτένιο* (*β-carotene*). Προσδίδει πορτοκαλί χρώμα στα φυτά. Είναι το βασικότερο καροτενοειδές και ο πρόδρομος της βιταμίνης Α. Συμπληρώματα με β-καροτένιο ενισχύουν σημαντικά την προστασία του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Καλύτερες πηγές στα τρόφιμα καρότα, ροδάκινα, βερίκοκα και σπανάκι.
- Το *λυκοπένιο* (*lycopene*). Προσδίδει το κόκκινο χρώμα στα φυτά. Είναι ο πιο ικανός εκκαθαριστής του μονήρους οξυγόνου. Καλύτερες πηγές στα τρόφιμα ντομάτες, καρπούζι, γκρέιπφρουτ. Στα φυτά, στα φύκια και σε άλλους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, το λυκοπένιο είναι ένα σημαντικό ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση πολλών καροτενοειδών, συμπεριλαμβανομένου του β-καροτένιου, υπεύθυνο για το κίτρινο, πορτοκαλί ή κόκκινο χρωματισμό, τη φωτοσύνθεση και τη φωτοπροστασία.
- Η *λουτεΐνη* και η *Ζεαξανθίνη* (*Lutein, Zeaxanthin*). Προσδίδουν το κίτρινο χρώμα στα φυτά. Καλύτερες πηγές στα τρόφιμα σπανάκι, κόκκινη πιπεριά, μπιζέλια, λαχανίδα,
- Η *κρυπτοξανθίνη* (*cryptoxanthin*). Είναι πιθανώς ένα από τα λιγότερο γνωστά βασικά καροτενοειδή που εντοπίζονται στις τροφές. Καλύτερες πηγές στα τρόφιμα πορτοκάλια, παπάγια, ροδάκινα και μανταρίνια.

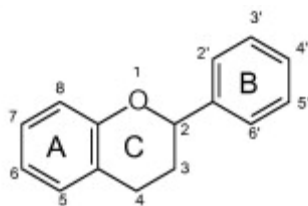


Εικόνα 8: Μοριακοί τύποι καροτενοειδών. (Wikipedia 20/07/2012)

Πολλές έρευνες δείχνουν το μεγάλο όφελος από τα διάφορα καροτενοειδή για την υγεία του άνθρωπου. Για παράδειγμα η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λυκοπένιο μπορούν να μειώσουν την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη ενώ η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λουτεΐνη και ζεαξανθίνη μειώνουν το κίνδυνο εμφάνισης της ωχράς κηλίδας (πηγή eufic.org).

1.3.3. Φλαβονοειδή (Δρακονταειδή Αγγελική)

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων, χρωστικών που βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα φυτά και αποτελούν τα δραστικά συστατικά πολλών φαρμάκων φυτικής προέλευσης. Το πιο συνηθισμένο χρώμα τους είναι το κίτρινο από το οποίο πήραν και το όνομά τους (*flavus* = κίτρινο).



Εικόνα 9: Βασική δομή φλαβονοειδών (πηγή: Ververidis et al. 2007)

Ο βασικός σκελετός των φλαβονοειδών περιέχει δεκαπέντε άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτύλιους (*A*, *B*) και έναν κεντρικό ετεροδακτύλιο (*C*) με τρία άτομα άνθρακα. Ο αρωματικός δακτύλιος *B* και ο ετεροκυκλικός δακτύλιος *C* είναι μία φαινυλοπροπανική μονάδα που προέρχεται από τη πορεία του σικιμικού οξέος ενώ ο αρωματικός δακτύλιος *A* προέρχεται από τη πορεία του μηλονικού οξέος.

Πίνακας 1: τάξη και αριθμός γνωστών δομών καθώς και βιολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών

τάξη	Αριθμός γνωστών δομών	Βιολογικές ιδιότητες
Ανθοκυανίνες	256	Κόκκινες έως μπλε χρωστικές
Χαλκόνες	197	Κίτρινες χρωστικές
Αρόνες	29	Κίτρινες χρωστικές
Φλαβόνες-φλαβονόλες και οι -γλυκοζίτες τους	1660	Ομοούσιες χρωστικές σε άνθη
C-γλυκοζοφλανοειδή	303	
Φλαβονόνες	319	
Διυδροχαλκόνες	71	Ορισμένα έχουν πικρή γεύση
Διυδροφλαβονόλες	110	Εμφανίζονται σε ξυλώδη ιστό
Φλαβάνες	309	Τονωτικές ουσίες με ιδιότητες τανίνης
Βιφλαβονοειδή	134	
ισοφλαβονοειδή	630	Μυκητοτοξικό
Νεοφλαβονοειδή	70	

Τα φλαβονοειδή συμμετέχουν σε μια σειρά από σημαντικές λειτουργίες στο φυτό κάποιες από τις οποίες παρατίθενται πιο κάτω:

- Συμβάλουν στην άμυνα των φυτών έναντι βακτηρίων και μυκήτων.
- Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την έλξη επικονιαστών.
- Παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αζώτου στα φυτά.
- Προστασία του φυτού από την υπεριώδη ακτινοβολία.
- Είναι αντιοξειδωτικοί παράγοντες.

➤ Λειτουργούν ως εξειδικευμένα σήματα για την εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων.

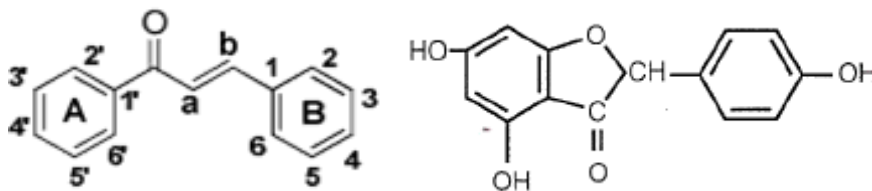
Τα φλαβονοειδή και οι γλυκοζίτες τους είναι γενικά σταθερές ενώσεις και μπορούν να εξαχθούν από τα φυτά με εκχύλιση με ψυχρούς ή θερμούς διαλύτες. Οι διαλύτες αυτοί μπορεί να είναι νερό, οργανικοί διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη και άλλα ή συνδυασμός αυτών. Βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων των πετάλων. Η ταξινόμηση τους βασίζεται στην οξειδωτική κατάσταση του δακτύλιου *C* και στην θέση του δακτύλιου *B*.

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται στις εξής κύριες κατηγορίες:

- Χαλκόνες, ουρόνες και διυδροχαλκόνες (chalcones, aurones, dihydrochalcones).
- Ισοφλαβονοειδή (isoflavonoids).
- Ξανθόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες (xanthones, flavones, flavonols)
- Ανθοκυανίνες (anthocyanins).

1.3.3.1. Χαλκόνες, ουρόνες και διυδροχαλκόνες (Δρακονταειδή Αγγελική)

Οι χαλκόνες είναι φυσικά προϊόντα και ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών. Ο δομικός σκελετός τους αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτύλιους (*A* και *B*) οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος α, β με 3 άτομα άνθρακα. Οι διυδροχαλκόνες είναι άχρωμα διυδρογονωμένα παράγωγα των χαλκονών.



Εικόνα 10: Βασική δομή χαλκονών (αριστερά) και ουρονών (δεξιά) (dspace.lib.ntua.gr 7/10/2012)

Οι ουρόνες είναι υποκατηγορία των φλαβονοειδών η οποία απαντάται σπάνια στη φύση. Προσδίδουν ένα φωτεινό κίτρινο χρώμα στα άνθη (*auro*= χρυσός στα Λατινικά) και βιοσυντίθενται από τις χαλκόνες. Το μόριο της ουρόνης περιέχει ένα ετεροκυκλικό σύστημα βενζοφουρανίου συνδεδεμένο με μια βενζυλιδενομάδα.

Οι χαλκόνες και οι ουρόνες έχουν βαθύ κίρινο χρώμα που μετατρέπεται σε κόκκινο ύστερα από επεξεργασία με αλκάλια. Παρόλο που τα καροτενοειδή συνήθως προσδίδουν το κίτρινο χρώμα στα άνθη οι κίτρινες χαλκόνες και αρόνες συνεισφέρουν στο χρωματισμό της στεφάνης ιδιαίτερα στην οικογένεια των *συνθετώδων* (*compositae*).

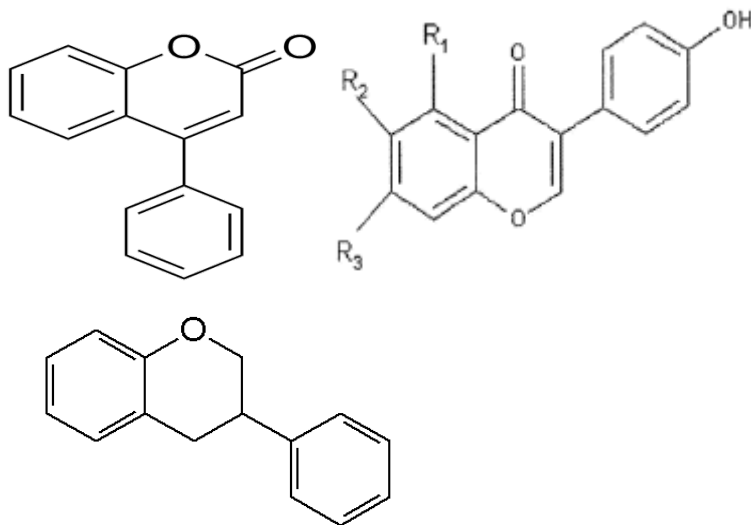
Πίνακας 2: Είδη φυτών με κίτρινα άνθη που οφείλονται στις χαλκόνες σουρόνες (ενδεικτικά)

ΕΙΔΟΣ ΦΥΤΟΥ	ΧΡΩΜΑ ΦΥΤΟΥ	ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ
<i>Aster cvs</i>	Κίτρινο	Χαλκόνες, σουρόνες
<i>Coreopsis bigelovii</i>	Κίτρινο	Χαλκόνες, καροτενοειδή
<i>Potentilla 24 sp</i>	Κίτρινο	Χαλκόνες, φλαβονόλες
<i>Dianthus caryophyllus</i>	Κίτρινο	Χαλκόνες
<i>Cosmos</i>	πορτοκαλί	Cy3-glu, cy 3-rha, με χαλκόνες, σουρόνες

ΠΗΓΗ: Boucherle και συν., 2017.

1.3.3.2.Ισοφλαβονοειδή (Δρακονταειδή Αγγελική)

Τα ισοφλαβονοειδή συναντώνται σε περιορισμένες περιπτώσεις και έχουν βρεθεί κυρίως στα αγγειόσπερμα φυτά καθώς και σε μια οικογένεια των ψυχανθών, την *Leguminosae*. Παρουσιάζουν μια άτακτη διανομή στα φυτά εξαιτίας της σποραδικής ύπαρξης του ενζύμου της συνθετάσης των ισοφλαβονών.



Εικόνα 11: μοριακοί τύποι ισοφλαβονοειδών (Ververidisetal. 2007).

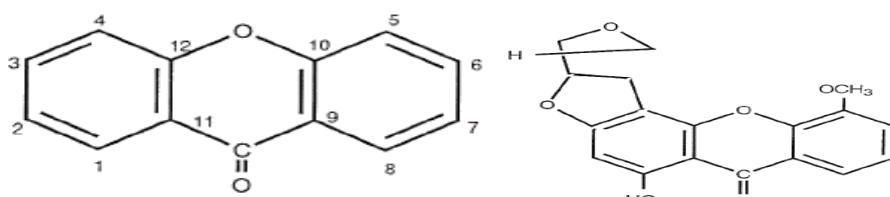
Οι χημικές δομές των φλαβονοειδών παρουσιάζουν μεγάλη δομική ποικιλία όπως και οι βιολογικές τους δραστηριότητες. Εξαιτίας αυτού χωρίζονται σε 2 κατηγορίες σε απλά και σύνθετα φλαβονοειδή. Απλά ονομάζονται τα φλαβονοειδή που αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα και σύνθετα εκείνα που αποτελούνται από περισσότερα άτομα άνθρακα.

Η τάξη των φλαβονοειδών δεν χρησιμεύει τόσο στο χρωματισμό των ανθέων αλλά έχει πολύ χρήσιμες ιδιότητες για τον άνθρωπο.

- Οιστρογονικές ιδιότητες: τα φλαβονοειδή θεωρούνται βασικοί εκπρόσωποι των φυτοοιστρογόνων (Duncatetal, 2003). Η ισοφλαβόνη φορμονετίνη που απομονώθηκε από το φυτό *trifoliumsulterraneum* προσδίδει στα πρόβατα που το τρώνε για αρκετό διάστημα οιστρογονικές ιδιότητες.
- Αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή δράση σε συνδυασμό με τις φυτοαλεξίνες: οι περοκαρπάνες που έχουν τέσσερις δακτύλιους έχουν έντονη αντιμυκητιακή και ανιμικροβιακή δράση.

1.3.3.3. Ξανθόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες (Δρακονταειδή Αγγελική)

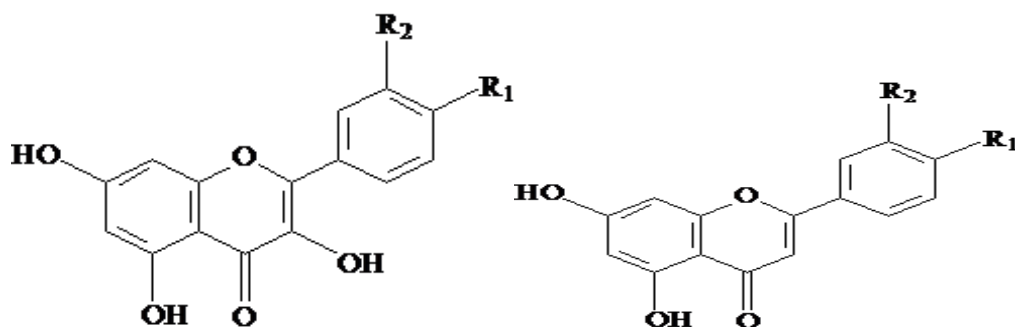
Οι ξανθόνες διαφέρουν από τις φλαβόνες και τις φλαβονόλες στο ότι ο φαινυλικός δακτύλιος είναι ενωμένος με το βενζοπυράνιο στη θέση 9 και 10. Συνήθως τις βρίσκουμε στις οικογένειες *Gentianaceae*, *Polygonaceae*, *leguminoseae* καθώς και σε φτέρες και κάποιους μύκητες.



Εικόνα 12: μοριακοί τύποι ξανθόνης (αριστερά) και ψωροσπερμίνης (δεξιά). (Dey P. Mand Harborne J. B., 1997)

Επιστημονικές μελέτες αποδίδουν στις ξανθόνες αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Για παράδειγμα η ψωροσπερμίνη έχει αντιλευχαιμικές ιδιότητες. (πηγή www.iam.gr).

Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες αποτελούν το πιο παραμελημένο είδος των φλαβονοειδών. Οι φυσικές φλαβόνες είναι συνήθως ολιγοϋδροξυλιωμένα παράγωγα. Ο βαθμός υδροξυλίωσης κυμαίνεται από 0 έως 7 και έχει βιογενετική σημασία γιατί σε χαμηλό βαθμό επικρατούν οι φλαβόνες ενώ οι πολυϋδροξυλιωμένες συνήθως είναι φλαβονόλες. Οι σπουδαιότερες είναι η κερκετίνη, η μυρικετίνη, η καιμφερόλη και οι γλυκοζίτες τους.



Εικόνα 13: μοριακοί τύποι φλαβονόλης (αριστερά) και φλαβόνης (δεξιά). (Dey P. Mand Harborne J. B., 1997)

1.3.4. Ανθοκυανίνες (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

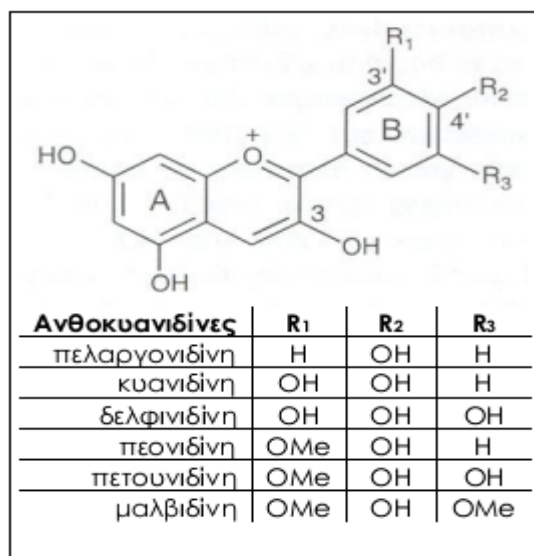
Οι ανθοκυανίνες υπάρχουν σε πολλά μέρη του φυτού όπως στα άνθη, στους στήμονες, στα φύλλα και στις ρίζες. Είναι υπεύθυνες για το πορτοκαλί, το κόκκινο, το βιολετί και κυρίως το μπλέ χρώμα στα φυτά. Αποτελούν τις πιο σημαντικές και ευρέως διαδεδομένες χρωστικές διαλυτές στο νερό και ανήκουν στην πιο διαδεδομένη τάξη των φαινολικών μειγμάτων.

Μέσα στα χυμοτόπια υπάρχουν κάποια σφαιρικά οργανίδια γνωστά ως ‘ανθοκυανοπλάστες’ τα οποία όμως μπορούν να βρεθούν και στο κυτταρόπλασμα ως μεμβρανώδη οργανίδια (DePascual&Sanchez – Ballesta 2008).

Οι ανθοκυανίνες διαμορφώνουν το χρώμα πολλών ανθέων και καρπών μέσω των οποίων προσελκύονται οι επικονιαστές, οι καταναλωτές και οι διασπορείς σπερμάτων. Οι ανθοκυανίνες που έχουν υδρολυθεί ονομάζονται ανθοκυανιδίνες (άγλυκα μόρια). Οι ανθοκυανιδίνες περιέχουν το κατιόν φλάβιο- μαζί με τις χαρακτηριστικές υποομάδες.

1.3.4.1. Δομή και βιοσύνθεση των ανθοκυανινών(Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Η βιοσύνθεση των ανθοκυανινών πιστεύεται πως πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Αν και συχνά απαντώνται στο χυμοτόπιο η βιοσύνθεση τους δεν γίνεται εκεί αφού το βέλτιστο pH για την λειτουργία των ενζύμων που εμπλέκονται είναι 7 η περισσότερο.



Εικόνα 14: Χημική δομή 6 ανθοκυανιδινών (Nemertis_Kytridis.upatras.gr 29/9/2012)

Έχουν αναφερθεί 18 διαφορετικές δομές των ανθοκυανιδινών έχουν αναφερθεί μεταξύ των οποίων οι πιο διαδεδομένες είναι η πελαργονιδίνη (πορτοκαλί, ροζ, κόκκινο), η κυανιδίνη (κόκκινο, πορφυρό), η δελφινιδίνη (μπλε), η πεονιδίνη, η πετουνιδίνη και η μαλβιδίνη. Οι παραπάνω διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά στο πρότυπο υδροξυλίωσης και μεθυλίωσης με

αποτέλεσμα να παράγονται διαφορετικές αποχρώσεις από πορτοκαλί – κόκκινο έως βιολετί – μπλε.

Οι ανθοκυανιδίνες με ελεύθερη υδροξυλομάδα στη θέση 3 του ετεροκυκλικού δακτύλιου αποτελούν χημικώς ασταθή προϊόντα πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα να μεταβολίζονται προς τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγά τους. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την γλυκοζυλίωση είναι η 3-O-γλυκοζυλομεταφοράση (3GT). Η 3GT είναι ένα απαραίτητο ένζυμο της βιοσυνθετικής πορείας των ανθοκυανινών διότι χωρίς αυτήν δεν θα λάμβανε μέρος η αντίδραση που είναι απαραίτητη για την σταθεροποίηση των μορίων ώστε να είναι δυνατή η συσσώρευση τους στο χυμοτόπιο ως υδατοδιαλυτές χρωστικές.

1.3.4.2. Επικονίαση (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Ο όρος *επικονίαση* (*pollination*) αναφέρεται στη διεργασία μεταφοράς της γύρης από τους ανθήρες στο στίγμα. Για την μεταφορά της γύρης είναι απαραίτητη η μεσολάβηση του αέρα και των ζώων. Με τον αέρα επικονιάζονται τα φυτά που έχουν αφανή άνθη όπως τα αγρωστώδη. Σε αυτά τα φυτά τα άνθη εκτός από το ότι είναι αφανή δεν παράγουν νέκταρ και δεν αναδύουν κανένα άρωμα.



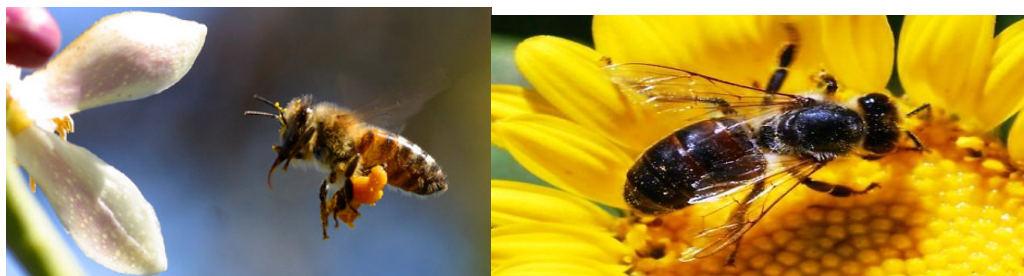
Εικόνα 15: αγρωστώδη που επικονιάζονται με τον αέρα. (digitalschool.gr15/10/2012)

Τα φυτά που επικονιάζονται με τα ζώα σχηματίζουν άνθη με έντονα χρώματα, δυνατά αρώματα και παράγουν σακχαρούχες ουσίες (νέκταρ) για να προσελκύσουν τους επικονιαστές. Το έγχρωμο των λουλουδιών είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων όπως:

- Χρωστικές.
- pH του χυμού που βρίσκεται στα χυμοτόπια των κυττάρων.
- Σύμπλοκα, πολυσθενή μεταλλικά ιόντα
- Γονίδια.
- Δομή ιστών και επιδερμικών κυττάρων.

Τα άνθη εκτός από τα υπέροχα χρώματά τους και την οσμή τους έχουν αναπτύξει και άλλους τρόπους προσέλκυσης εντόμων πουλιών και ζώων όπως το σχήμα τους. Κάποια είδη ορχιδέας έχουν δώσει στα άνθη τους σχήμα σάκου ώστε όταν τα έντομα μπαίνουν μέσα να δυσκολεύονται να βγουν με αποτέλεσμα να γεμίζουν γύρη.

Οι μέλισσες μπορούν να διακρίνουν ένα ευρύ φάσμα οσμών και χρωμάτων παρόλα αυτά το κόκκινο χρώμα το βλέπουν μαύρο (γιατί οι φωτοχρωστικές τους δεν απορροφούν τα αντίστοιχα μήκη κύματος) και αυτός είναι ο λόγος που τα κόκκινα άνθη είναι πιο σπάνια από τα άλλα χρώματα ανθέων. Επίσης οι μέλισσες είναι σε θέση να δουν πέρα από το φάσμα του ορατού φωτός. Χρησιμοποιούν την υπεριώδη ακτινοβολία και βρίσκουν λουλούδια φορτωμένα με νέκταρ. Πολλά έντομα επίσης μπορούν να ανιχνεύσουν πολωμένο φως.



Εικόνα 16: Επικονίαση ανθέων (coolweb.gr 20/10/2012)

1.3.4.3. Τα χρώματα των ανθέων (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Κάποια χρώματα στα άνθη εμφανίζονται από κάποιες χρωστικές ή από κάποια είδη χρωστικών. Γνωρίζοντας ποια χρώματα εμφανίζονται από τα διάφορα είδη χρωστικών μπορεί να γίνει ευκολότερα η αναγνώριση τους. Τα χρώματα που συνήθως εμφανίζονται είναι το λευκό, το κίτρινο, το κόκκινο, το μπλε και το πορφυρό.

Πίνακας 3: Χημική βάση των χρωμάτων των ανθέων.

ΧΡΩΜΑΤΑ	ΥΠΕΥΘΥΝΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ
Λευκό, κρεμ, κίτρινο	Φλαβόνες, φλαβονόλες, μόνο καροτενοειδή, μόνο κίτρινη φλαβονόλη, μόνο ανθοκυανίνη, καροτενοειδή και κίτρινα φλαβονοειδή.	95% των λευκών ανθέων, πλειονότητα των κίτρινων, πριμούλα, γοσήπιο, ντάλια, ρουντμπέκια.
πορτοκαλί	Μόνο καροτενοειδή, πελαργονιδίνη και αουρόνη	Ανθούριο, καλέντουλα, λίλιουμ.
κόκκινο	Καθαρή πελαργονιδίνη, κυανιδίνη και καροτενοειδή.	Σάλβια, τουλίπα.

Βαθύ κόκκινο, ροζ, βιολέ, μπλε.	Καθαρή κυανιδίνη, καθαρή πεονιδίνη, καθαρή δελφινιδίνη, κυανιδίνη και ομοούσια χρωστική.	Τα περισσότερα κόκκινα, πεόνια, βερβένα, ιπομέα.
Πορφυρό -μαύρο	Δελφινιδίνη σε υψηλή συγκέντρωση.	Μαύρη τουλίπα, μαύρος πανσές.
πράσινο	Χλωροφύλλη.	Όλα τα πράσινα φυτά

1.4. ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

1.4.1. Εκχύλιση (Δρακονταειδή Αγγελική)

Εκχύλιση ονομάζεται η μεταφορά μιας ουσίας από μια φάση στην οποία βρίσκεται με τη μορφή διαλύματος ή αιωρήματος σε μια άλλη υγρή φάση. Η μεταφορά αυτή είναι δυνατή επειδή η ουσία κατανέμεται στις δύο φάσεις με ορισμένη αναλογία. Η εκχύλιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό μίγματος υγρών ή στερεών ουσιών.

Η εκχύλιση είναι μια από τις παλαιότερες "χημικές" δραστηριότητες του ανθρώπου. Η παραλαβή ενός αρώματος, μιας χρωστικής ή μιας δραστικής φαρμακευτικής ουσίας από μια φυτική πρώτη ύλη είναι αρχέγονες διαδικασίες εκχύλισης, όπου το επιθυμητό συστατικό με τη χρήση συνήθως θερμού νερού μεταφέρεται από την φυτική πρώτη ύλη στην υδατική φάση.

Στην οργανική χημεία η εκχύλιση είναι μια από τις κυριότερες εργαστηριακές τεχνικές. Η επεξεργασία ενός ακατέργαστου μίγματος περιλαμβάνει και απλές εκχυλίσεις για την μεταφορά των οργανικών ενώσεων σε έναν οργανικό διαλύτη. Επίσης με την εκχύλιση μπορούν να διαχωριστούν τα όξινα, ουδέτερα και βασικά συστατικά ενός μείγματος.

Η εξαγωγή των ανθοκυανινών πραγματοποιείται συνήθως με εμβάπτιση σε μεθανόλη ή αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου. Η προσθήκη νερού είναι ενδεδειγμένη σε μερικές περιπτώσεις για την πλήρη εξαγωγή των ανθοκυανινών ανάλογα με τον φυτικό ιστό.

1.4.1.1. Απλή εκχύλιση (Δρακονταειδή Αγγελική)

Η παραλαβή των οργανικών ουσιών από διαλύματα και αιωρήματα γίνεται με ανάμιξη του υδατικού μείγματος με έναν μη μιγνύμενο με το νερό οργανικό διαλύτη, το προϊόν μεταφέρεται στην οργανική στοιβάδα και μπορεί να ανακτηθεί με την απομάκρυνση του διαλύτη.

Η γενική αρχή στην οποία στηρίζεται η εκχύλιση είναι ο νόμος κατανομής του *Nernst*, σύμφωνα με τον οποίο ο λόγος των συγκεντρώσεων μια ουσίας διαλυμένης σε δύο μη αναμειγνύμενες υγρές φάσεις Α και Β, στην κατάσταση ισορροπίας είναι σταθερός για μια δεδομένη θερμοκρασία.

$$C_a/C_b=K$$

1.4.1.2. Εκχύλιση στερεών (Δρακονταειδή Αγγελική)

Η εκχύλιση οργανικών στερεών από μίγματα στερεών αποτελεί τον κύριο τρόπο παραλαβής των διάφορων φυσικών προϊόντων από τις πρωτογενείς πηγές τους. Σημειώνεται ότι η εκχύλιση είναι συνήθως η κύρια διαδικασία παραλαβής των αλκαλοειδών από τα φυτά (*φύλλα, ρίζες, καρπούς κλπ*).

Μια απλή εκχύλιση ενός στερεού μπορεί να γίνει με θέρμανση της ουσίας με ένα διαλύτη και στη συνέχεια απόχυση ή διήθηση του θερμού μίγματος. Για μικρές ποσότητες ουσίας η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με προσαρμοσμένο ένα μακρύ γυάλινο σωλήνα σαν κάθετο ψυκτήρα και η εργασία αυτή να επαναληφθεί πολλές φορές. Ένας ακόμα απλούστερος τρόπος είναι να αφεθεί για εκχύλιση ένα στερεό σε επαφή με ένα κατάλληλο διαλύτη σε μια πωματισμένη φιάλη για κάποιο χρονικό διάστημα.

1.4.2 Φασματοφωτομετρία (Δρακονταειδή Αγγελική)



Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο στο εργαστήριο βιοχημείας του Τ.Ε.Ι, Τ.Α.Α.Τ.

Φασματοφωτομετρία είναι η μέθοδος της χημείας που χρησιμοποιείται για τη μελέτη διάφορων χημικών προβλημάτων τα οποία σχετίζονται με τη δομή των μορίων των χημικών ενώσεων. Βασίζεται στην επίδραση φωτεινής ακτινοβολίας πάνω στη χημική ουσία και την καταγραφή των εντάσεων απορρόφησης του φωτός σε συνάρτηση με το μήκος κύματος ή τη συχνότητα της φωτεινής ακτινοβολίας.

Οι περισσότερες από τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους βασίζονται στην αλληλεπίδραση κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μια ουσία που δεσμεύεται από τα άτομα της ύλης ώστε να προκαλούνται ηλεκτρονικές διεγέρσεις, ή διεγέρσεις πυρήνων, ή αλλαγές στην περιστροφή και την δόνηση των μορίων. Καθώς τα άτομα επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση αποβάλλουν το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας. Η καταγραφή της έντασης της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος αποτελεί το φάσμα απορρόφησης.

Γενικά όσον αφορά τη φασματοφωτομετρία η χρήση της είναι ευρέως γνωστή για την ανάλυση κάθε είδους χρωστικών. Τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της είναι ότι απαιτούνται μικρές ποσότητες υλικού και δεν απαιτείται πολύπλοκος εξοπλισμός για την μελέτη των χρωστικών.

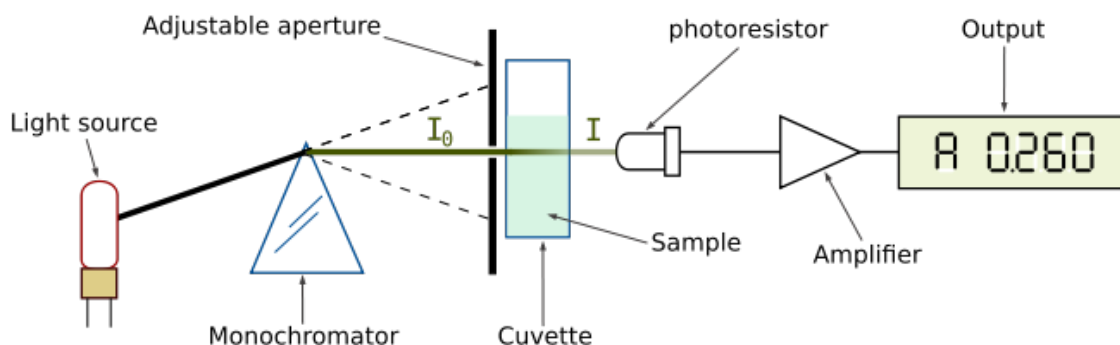
Οι κυριότερες φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι:

- Φασματοσκοπία ακτίνων X
- Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR
- Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού EPR
- Φασματοσκοπία ορατού VIS
- Φασματοσκοπία υπεριώδους UV
- Φασματοσκοπία υπέρυθρου IR

Το όργανο που μας βοηθά στην μελέτη της δομής των μορίων των χημικών ενώσεων είναι το φασματοφωτόμετρο. Η βασική αρχή λειτουργίας του είναι η εξής: Το φως που παράγεται από ένα λαμπτήρα κατευθύνεται με μία ορισμένη ένταση (I_0) προς ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει μία ουσία σε ορισμένη συγκέντρωση (C , g/l ή καλύτερα σε M, mM, μ M nM κλπ). Το υδατικό διάλυμα απορροφάει τμήμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και έτσι η ακτινοβολία που απομακρύνεται από αυτό έχει ισχύ P μικρότερη από την αρχική I_0 ($I < I_0$).

Γενικά το φασματοφωτόμετρο αποτελείται από:

- Μια πηγή ακτινοβολίας. Για την περιοχή 190-350 nm χρησιμοποιείται λυχνία υδρογόνου ή δευτερίου με τοιχώματα από χαλαζία, υλικό που δεν απορροφά το υπεριώδες φως. Για την περιοχή 300-2500 nm χρησιμοποιείται λυχνία πυρακτώσεως με νήμα από βολφράμιο.
- Έναν μονοχρωμάτορα. Είναι ένας επιλογέας μήκους κύματος στον οποίο το φως της πηγής αναλύεται σε διάφορα μήκη κύματος και επιλέγεται το επιθυμητό με ακρίβεια 1 nm.
- Μια σχισμή μεταβλητού εύρους
- Μια κυψελίδα από γυαλί ή πλαστικό για το ορατό φάσμα ακτινοβολίας και από χαλαζία για το υπεριώδες φάσμα.
- Έναν ανιχνευτή που αποτελείται από ένα φωτοκύτταρο που μετατρέπει την ακτινοβολία που εξέρχεται από το δείγμα σε ηλεκτρική ενέργεια.
- Έναν μετρητή



Φωτεινή πηγή Μονοχρωμάτορας Σχισμή Κυψελίδα Φωτοανιχνευτής Ενισχυτής Αποτέλεσμα μεταβλητού με δείγμα εύρους
Εικόνα 18: Λειτουργία φασματοφωτόμετρου (el.wikipedia.org. 22/04/2013)

1.4.2.1. Φασματοφωτομετρία UV-VIS (Δρακονταειδή Αγγελική)

Η απορρόφηση υπεριώδους (*UV*: 190 - 400 nm), ή ορατής ακτινοβολίας (*visible* 400-800 nm), προκαλεί μόνο ηλεκτρονικές διεγέρσεις, δηλαδή διεγέρσεις ηλεκτρονίων της στοιβάδας σθένους, που μεταβαίνουν από μια δεσμική σε μια αντιδεσμική κατάσταση, χωρίς όμως να αλλάζουν τον κύριο κβαντικό αριθμό. Η απορρόφηση σε δεδομένα μήκη κύματος είναι και χαρακτηριστικό συγκεκριμένων ουσιών.

Πίνακας 4: Κοινοί διαλύτες στο UV σε σχέση με το $\lambda_{\max}$ χρησιμοποίησής τους (όπου $\lambda_{\max}$ = μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης)

Διαλύτης	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	Διαλύτης	$\lambda_{\max}(\text{nm})$
Ακετόνη	330	Χλωροφόρμιο	245
Ακετονιτρίλιο	210	Μεθανόλη	205
Βενζόλιο*	280	Αιθέρας	220
Διθειάνθρακας*	380	Ισο-οκτάνιο	195
Τετραχλωράνθρακας*	265	Τολουόλιο	285

***ΠΡΟΣΟΧΗ!** Το βενζόλιο, ο διθειάνθρακας και ο τετραχλωράνθρακας είναι πολύ ισχυρά καρκινογόνα και καλό είναι να μην χρησιμοποιούνται ως διαλύτες

Νόμος Lambert-Beer

Ο νόμος του Lambert συνδέει την ένταση I_0 της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που προσπίπτει σε μια στοιβάδα ουσίας πάχους d με την ένταση I της εξερχόμενης από την στοιβάδα ακτινοβολίας

$$I = I_0 e^{-ad} \text{ [ή } I = I_0 \exp(-ad) \text{]} \quad (1)$$

όπου α είναι μια σταθερά που εξαρτάται από την φύση της ουσίας που απορροφά την ακτινοβολία και από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

Συνεπώς,
(2)
$$\ln I_0/I = \alpha d$$

Ορίζοντας $\alpha = 2,303K$, έχουμε
(3)
$$\ln I_0/I = 2,303 Kd \quad \text{ή} \quad \log I_0/I = Kd$$

Νόμος Beer

Όταν η ουσία βρίσκεται σε διάλυμα σε συγκέντρωση c (*moles/L, molarity*) τότε ισχύει η ανάλογη σχέση γνωστή ως νόμος του Beer, δηλ. ότι η απορροφητικότητα ενός διαλύματος εξαρτάται γραμμικά από την συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας σε αυτό. Ορίζουμε συνεπώς $K = \varepsilon \cdot c$, όπου ε είναι ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης ή απορρόφησης της ουσίας για ορισμένο μήκος κύματος,

$$I = I_0 10^{-\varepsilon cd} \quad (4)$$

c η συγκέντρωση σε M ή υποπολλαπλάσιά του, και d το μήκος οπτικής διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο δείγμα, κατά σύμβαση $d = 1 \text{ cm}$.

Με λογαρίθμηση της σχέσης (2) λαμβάνουμε:

$$\log I/I_0 = -\varepsilon cd \quad (5)$$

Το πηλίκο I/I_0 ονομάζεται διαπερατότητα, T , (*transmittance*) του φωτός και επομένως η σχέση (5) γίνεται

$$-\log T = \log I_0/I = \varepsilon cd \quad (6)$$

Το αντίθετο του δεκαδικού λογάριθμου ή ο δεκαδικός λογάριθμος του αντίστροφου της διαπερατότητας λέγεται *οπτική πυκνότητα OD (optical density)* ή *απορροφητικότητα A (absorbance)*:

$$OD = A = \log I_0/I = \log I/I_0 \quad (7)$$

οπότε η σχέση (4) γράφεται:

$$A = \varepsilon cd \quad (8)$$

Η σχέση αυτή, γνωστή ως νόμος *Lambert-Beer* αποτελεί την αρχή της φασματοφωτομετρίας:
Η οπτική πυκνότητα για σταθερό πάχος στοιβάδας και ορισμένο μήκος κύματος φωτός είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος της ουσίας που απορροφά.

1.4.2.2. Διαλύτες (Δρακονταειδή Αγγελική)

Ένας καλός διαλύτης δεν πρέπει να απορροφά στην ίδια θέση με την διαλυμένη ουσία. Οι πιο κοινοί διαλύτες είναι το νερό H_2O , 95% αιθανόλη CH_3CH_2OH , και το κανονικό εξάνιο $CH_3(CH_2)_4CH_3$.

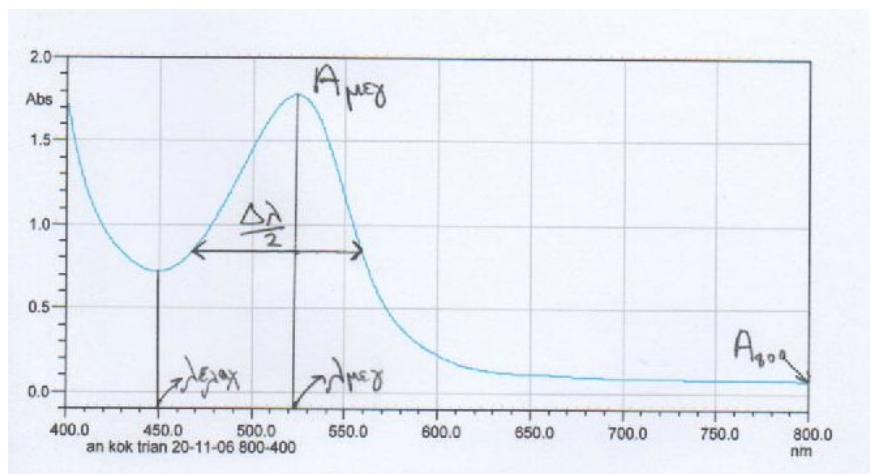
Η διαφορά μεταξύ πολικών και μη πολικών διαλυτών είναι ότι οι πολικοί διαλύτες δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη διαλυμένη ουσία και εξασθενίζουν την λεπτή υφή του φάσματος, ενώ με τους πολικούς διαλύτες η λεπτή υφή παραμένει, όπως στο φάσμα της ουσίας σε αέρια κατάσταση. Παράδειγμα το φάσμα της φαινόλης σε αιθανόλη (πολικός διαλύτης) και ισοοκτάνιο (μη πολικός).

1.4.2.3. Σφαίρα ολοκλήρωσης (Δρακονταειδή Αγγελική)

Η σφαίρα ολοκλήρωσης είναι μια οπτική διάταξη που αποτελείται από μια κοιλότητα της οποίας το εσωτερικό είναι ομοιόμορφα επικαλυμμένο με ένα υλικό υψηλής ανακλαστικότητας. Η σφαίρα διαθέτει μικρές οπές που λειτουργούν ως θύρες εισόδου και εξόδου ώστε η ακτινοβολία να εισέρχεται στο εσωτερικό, της να προσπίπτει στο εξεταζόμενο δείγμα και μετά να συλλέγεται από τον ανιχνευτή. Πιο αναλυτικά οι ακτίνες φωτός προσπίπτουν σε ένα σημείο του εσωτερικού τοιχώματος και ύστερα από πολλαπλές σκεδαζόμενες ανακλάσεις διαχέονται ομοιόμορφα σε όλα τα υπόλοιπα σημεία της σφαίρας. Με αυτόν τον τρόπο στον ανιχνευτή φτάνει ένα ολοκληρωμένο σήμα που όμως δεν περιέχει καμία χωρική πληροφορία. Η διάχυση της ακτινοβολίας εντός της κοιλότητας είναι πλήρης και συμμετρική εξαιτίας του γεωμετρικού σχήματος της σφαίρας και της ανακλαστικής επιφάνειας *Lambert* που καλύπτει το εσωτερικό της. Η επιφάνεια *Lambert* είναι πλήρως ανακλαστική, διασφαλίζει ομοιόμορφη γωνιακή εξάπλωση του φωτός και ταυτόχρονα ο συντελεστής ανακλαστικότητας της σφαίρας είναι ανεξάρτητος του μήκους κύματος.

1.4.2.4 Χαρακτηριστικά καμπύλης απορρόφησης (Δρακονταειδή Αγγελική)

Θα εξετάσουμε μια απλή καμπύλη απορρόφησης στο ορατό για να ορίσουμε μερικά χαρακτηριστικά της. Στην Εικόνα 18 έχουμε ένα φάσμα απορρόφησης από εκχύλισμα σεπάλου τριανταφυλλιάς σε οξυνισμένη μεθανόλη, όπου βλέπουμε μια κωδωνοειδή καμπύλη. Όπως φαίνεται πάνω σε αυτή την καμπύλη έχουμε σημειώσει το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, $\lambda_{μεγ}$ ή λ_{max} , το μήκος κύματος ελάχιστης απορρόφησης $\lambda_{ελαχ}$, ή λ_{min} , ή $\lambda_{κούλ}$, μια και το τελευταίο βρίσκεται σε κοιλάδα απορρόφησης, καθώς και τις αντίστοιχες τιμές μέγιστης και ελάχιστης απορρόφησης $A_{μεγ} = A_{max}$, $A_{ελαχ} = A_{min}$. Επιπλέον, σημειώνουμε την μεταβλητή $\Delta\lambda/2$, η οποία αφορά το ημι-εύρος ζώνης απορρόφησης δηλ. το εύρος της καμπύλης στο μισό της μέγιστης απορρόφησης. Αντίστοιχα, η απορρόφηση στα 800 nm, A_{800} , είναι ένας πολύ αξιόπιστος δείκτης για το αν ένα δείγμα σκεδάξει το φως, δηλ. είναι θολό. Επειδή τα περισσότερα βιολογικά δείγματα έχουν $\lambda_{μεγ} < 700$, η τιμή της $A_{800} \sim 0,00$. Κατά περίπτωση, θα δούμε στα αποτελέσματα τρόπους αντιμετώπισης περιπτώσεων έντονης σκέδασης του φωτός (π.χ. σε δείγματα πετάλων κλπ).



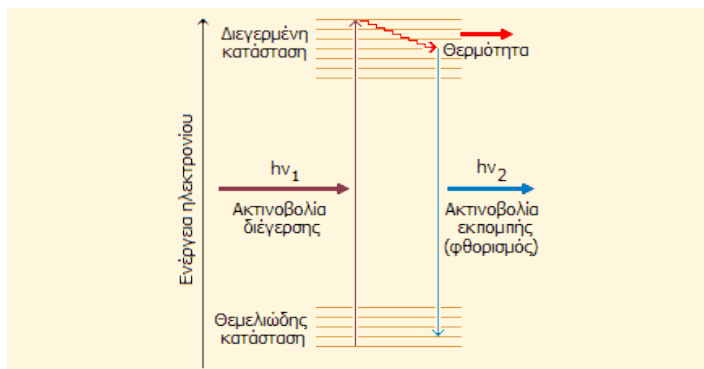
Εικόνα 19. Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος σεπάλων κόκκινης τριανταφυλλιάς σε οξυνισμένη μεθανόλη στο ορατό μέρος του φάσματος. Απεικονίζεται ο τρόπος προσδιορισμού των διαφορών παραμέτρων μιας καμπύλης απορρόφησης ή κυκλικού διχρωϊσμού, όταν η καμπύλη είναι κωδωνοειδής ή προσομοιάζει προς τέτοια.

1.4.3. Φθορισμός (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

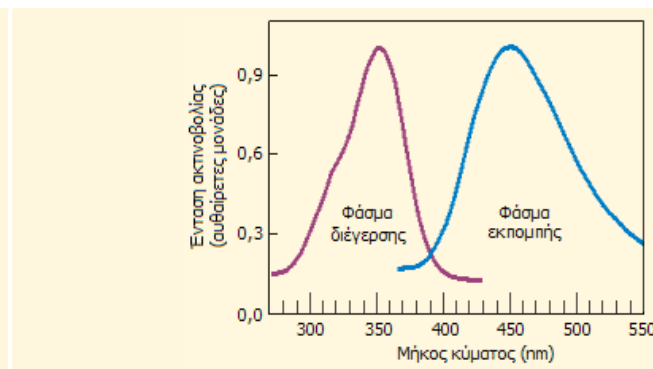
Ο φθορισμός και ο φωσφορισμός βασίζονται στην ίδια αρχή. Μετατρέπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή του υπεριώδους (*μη ορατή*) σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού φωτός. Η διάφορά τους είναι στο χρόνο που χρειάζεται για να εξελιχτεί το φαινόμενο.

Αν ο χρόνος στον οποίο εκτελείται το φαινόμενο είναι πάρα πολύ μικρός, δηλαδή λιγότερο από $1/100.000$ του δευτερολέπτου, τότε λέμε ότι έχουμε το φαινόμενο του φθορισμού. Αν ο χρόνος στον οποίο εκτελείται το φαινόμενο είναι πιο μεγάλος τότε μιλάμε για φωσφορισμό.

Υπάρχουν πολλά φθορίζοντα μόρια. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται ως βαφές σε κάποια υπό μελέτη συστήματα και από τον φθορισμό τους λαμβάνονται πληροφορίες για αυτά τα υπό μελέτη συστήματα. Οι τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή τέτοια μόρια ποικίλουν. Δύο από τους σημαντικότερους είναι σε βιολογικές εφαρμογές και σε περιβαλλοντικές μελέτες (*μόλυνση του περιβάλλοντος*). Οι πληροφορίες για τα υπό μελέτη συστήματα λαμβάνονται από τα φάσματα φθορισμού (*εκπομπής*) των φθορίζόντων μορίων. Τα φάσματα αυτά είναι ουσιαστικά οι γραφικές παραστάσεις της έντασης του φθορισμού ως προς το μήκος κύματος.



(α)

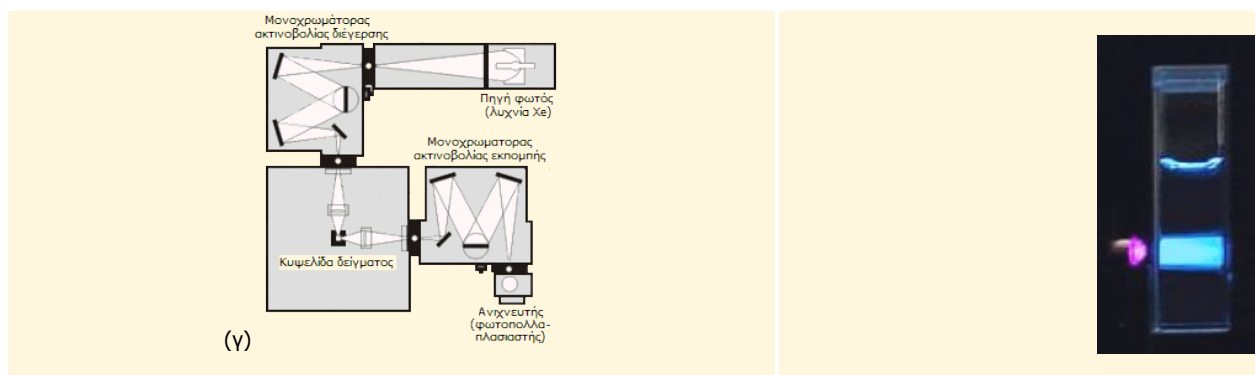


(β)

Εικόνα 20. Επεξήγηση φαινομένου φθορισμού (α) Απλουστευμένο ενεργειακό διάγραμμα που δείχνει τη διέγερση ενός ηλεκτρονίου υπό την επίδραση ενός φωτονίου ενέργειας $h\nu_1$ και την αποδιέγερση με εκπομπή φωτονίου ενέργειας $h\nu_2$ (φθορισμός) και παραγωγή θερμότητας (προφανώς θα είναι $\nu_2 < \nu_1$ ή $\lambda_2 > \lambda_1$). (β) Φάσμα διέγερσης (με παρακολούθηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα 450 nm) και φάσμα εκπομπής (με χρησιμοποίηση διεγείρουσας ακτινοβολίας 350 nm) διαλύματος 0,010 Μκινίνης σε H_2SO_4 . Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία (φθορισμός) θα βρίσκεται πάντοτε σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με τα μήκη κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης.



Εικόνα 21: Φθορισμόμετρο CaryEclipse στο εργαστήριο βιοχημείας του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, Τ.Α.Α.Τ.



Εικόνα 20 (συν.) (γ): Τυπική διάταξη φθορισμομέτρου με δύο μονοχρωμάτορες που παρέχουν τη δυνατότητα λήψης φασμάτων διέγερσης και εκπομπής. (φαίνεται υπό γωνία 90° ο φθορισμός όταν διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία [Αναφ. 13].

Από: http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_quinine.htm, πρόσβαση στις 27/09/2013

Ο φθορισμός διακρίνεται σε 3 είδη:

- Απλός φθορισμός ή φθορισμός συνήχησης. Μια ουσία φωτιζόμενη από μια φωτεινή δέσμη εκπέμπει ακτινοβολία ίδιου μήκους κύματος με την ακτινοβολία που απορροφά από τη δέσμη. Κατά τον φθορισμό συνήχησης τα άτομα μεταπίπτουν απ' ευθείας στην αρχική τους κατάσταση εκπέμποντας όλη την απορροφηθείσα φωτεινή ενέργεια πάλι υπό μορφή ακτινοβολίας του ίδιου μήκους κύματος. Σε πολλές όμως περιπτώσεις είναι δυνατόν να εμφανισθεί ολόκληρο φάσμα φθορισμού. Το 1852 ο Στόουκς (Stokes) είχε διατυπώσει την υπόθεση ότι η εκπεμπόμενη από φθορισμό ακτινοβολία έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος από την ακτινοβολία ερεθισμού. Σήμερα αυτό ερμηνεύεται με την θεωρία των κβάντων λαμβάνοντας υπ' όψη ότι το ηλεκτρόνιο του ερεθισμένου ατόμου ανυψούμενο αρχικά σε ψηλότερη στάθμη ενέργειας και στη συνέχεια επανέρχεται στην αρχική κατάσταση. Δηλαδή, δεν επανέρχεται απ' ευθείας όπως στον φθορισμό συνήχησης, αλλά μεταπίπτοντας από στάθμη σε στάθμη.
- Φθορισμός εξ ευαισθητοποίησης. Το 1923 οι, Φρανκ και Καρπ ανακάλυψαν μια ενδιαφέρουσα περίπτωση φθορισμού. Αυτοί κατά τα πειράματα που επιχειρούσαν φώτισαν μίγμα ατμών (υδραργύρου και θαλλίου ή και αργύρου, μολύβδου ή νατρίου) με ακτινοβολία μήκους κύματος 2537 Å (μονάδες άνγκστρομ, 1 Å = 0,1 nm) η οποία απορροφάται μόνο από τους ατμούς του υδραργύρου. Παρατήρησαν λοιπόν ότι κατά την σύγκρουση των ερεθισμένων ατόμων υδραργύρου με τα άτομα άλλων μεταλλικών ατμών πραγματοποιείται μια μεταβίβαση ενέργειας ερεθισμού με συνέπεια αμφότεροι οι ατμοί να καθίστανται φθορίζοντες και να εκπέμπουν όλες τις γραμμές του φάσματος σε μήκος κύματος μεγαλύτερο εκείνου της προσπίπτουσας αρχικά ακτινοβολίας. Ο Φρανκ ονόμασε τότε το φαινόμενο αυτό "Φθορισμό εξ ευαισθητοποίησης".
- Φθορισμός σύγκρουσης. Το 1921 οι Κλάιν και Ράσελαντ στηριζόμενοι σε θερμοδυναμικά δεδομένα, είχαν καταλήξει ότι κατά την ισχυρή θέρμανση αερίων πρέπει να δημιουργούνται αφενός συγκρούσεις μορίων, κατά τις οποίες η κινητική ενέργεια αυτών μετατρέπεται σε κβαντική ενέργεια (συγκρούσεις α' είδους) προκαλώντας έτσι την θερμική

ακτινοβολία των φλογών, και αφετέρου συγκρούσεις κατά τις οποίες αντίστροφα η κβαντική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμική διαταραχή (*συγκρούσεις χωρίς ακτινοβολία*) δηλαδή β' είδους. Έτσι η αύξηση της ταχύτητας ενός ατόμου νατρίου που συγκρούεται με ένα ερεθισμένο άτομο υδραργύρου και διατηρεί την ενέργειά του θεωρείται πως πρέπει να αποδοθεί στις συγκρούσεις αυτές β' είδους.

- Ο φθορισμός βιολογικών μορίων *in-situ* είναι γενικά περιορισμένος, σε σχέση με το τι εμφανίζουν τα μεμονωμένα βιολογικά μόρια σε διάλυμα (Ross&Calvin, 1967·Deisenhoferand Michel, 2004), γιατί στη φωτοαπορρόφηση σε διάφορες βιολογικές χρωστικές (π.χ. όραση, φωτοσύνθεση, χρώμα ανθέων) η ενέργεια από την αρχική απορρόφηση μετατρέπεται σε άλλου είδους μορφή (π.χ. οπτικό σήμα στον αμφιβληστροειδή των ζώων, χημική ενέργεια στην περίπτωση της φωτοσύνθεσης). Η χλωροφύλλη, π.χ., έχει ελάχιστο φθορισμό *in-situ*, φθορίζει όμως πολύ έντονα στο κόκκινο όταν απομονωθεί σε διάλυμα ακετόνης.

1.4.3.1. Φθορισμός ακτίνων X (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Κατά την ακτινοβολήση ενός ατόμου με φωτόνια κατάλληλης ενέργειας μπορούμε να απομακρύνουμε ένα ηλεκτρόνιο από την ατομική του τροχιά. Βασική προϋπόθεση: Η ενέργεια των φωτονίων ($h\nu$) πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια δεσμού του ηλεκτρονίου με τον πυρήνα. Όταν ένα εσωτερικό ηλεκτρόνιο απομακρύνεται από το άτομο, ένα ηλεκτρόνιο από ανώτερη στοιβάδα, υψηλότερης ενέργειας μεταφέρεται στην στοιβάδα του απομακρυσμένου ηλεκτρονίου και καλύπτει το κενό. Κατά την μετάβαση αυτή είναι πιθανή η εκπομπή ενός φωτονίου από το άτομο. Αυτό το φθορίζων φως καλείται χαρακτηριστική ακτίνα – X του στοιχείου. Έτσι με καθορισμό της ενέργειας της εκπεμπόμενης ακτίνας–X από ένα άγνωστο στοιχείο μπορούμε να βρούμε την ταυτότητα του.

Στη φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων-X υψηλής ενέργειας φωτόνια εκπέμπονται από μια πηγή και «χτυπάνε» τον στόχο (*δείγμα υπό εξέταση*). Μια τυπική διάταξη φασματοσκοπίας ακτίνων-X περιλαμβάνει μια πηγή πρωτογενούς ακτινοβολίας (*ραδιοϊσότοπο ή λυχνία ακτίνων-X*) και ένα σύστημα ανίχνευσης της δευτερεύουσας ακτινοβολίας του δείγματος. Τα πρωτογενή φωτόνια από την πηγή ακτίνων-X έχουν αρκετή ενέργεια ώστε να καταφέρουν να απομακρύνουν ηλεκτρόνια από τις εσωτερικές στοιβάδες του ατόμου του στόχου δείγματος. Όταν αυτό συμβεί τα άτομα του στόχου δείγματος γίνονται ιόντα τα οποία είναι ασταθή. Αυτό το φαινόμενο καλείται φωτοηλεκτρική απορρόφηση.

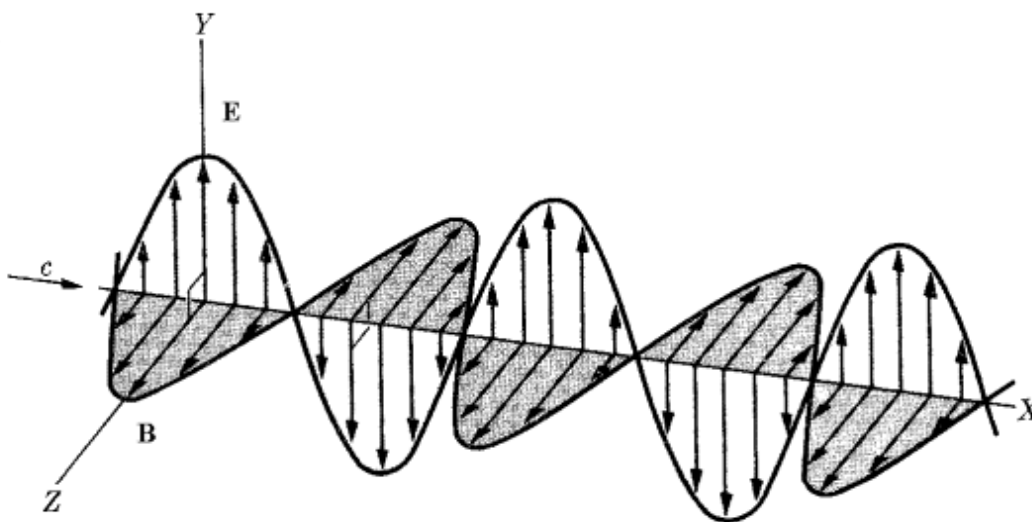
1.4.4. Κυκλικός διχρωϊσμός

Ο κυκλικός διχρωϊσμός στην ουσία είναι η διαφορική απορρόφηση από ένα δείγμα αριστερόστροφα και δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός. Σίγουρα ακούγεται ως κάτι το πολύπλοκο και εξειδικευμένο, και όπως θα δούμε προκύπτει είτε σε εγγενώς ασύμμετρα μόρια που απορροφούν φως (π.χ. έχουν τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες σε ένα ή περισσότερα από τα άτομα άνθρακα που περιέχουν), ή από μια συγκεκριμένη και ασύμμετρη διάταξη μορίων στον χώρο (διάταξη η οποία δεν ταυτίζεται με το είδωλό της σε επίπεδο κάτοπτρο). Η δεύτερη περίπτωση βρίσκει εφαρμογή στις πρωτεΐνες καθώς και σε διατάξεις χρωστικών σε πάρα πολλά άνη. Για να κατανοήσουμε το φαινόμενο, θα καταπιαστούμε πρώτα με το φως

(ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία) ως εγκάρσιο κύμα που πάλλεται κάθετα προς την κατεύθυνση διάδοσής του, θα δούμε τί σημαίνει πολωμένο φως, τί κυκλικά πολωμένο φως (δεξιόστροφα ή αριστερόστροφα), καθώς και πώς μετριέται η διαφορική απορρόφηση κυκλικά πολωμένου φωτός..

1.4.4.1. Ηλεκτρομαγνητικά κύματα (Καφετζόγλου Κωνσταντίνος)

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι περιοδικές μεταβολές ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων στο χώρο και το χρόνο, τα οποία διαδίδονται με την ταχύτητα του φωτός. Σε οποιοδήποτε σημείο μιας δέσμης φωτός, το μαγνητικό πεδίο είναι πάντα κάθετο ως προς το ηλεκτρικό και τα δύο μαζί ταλαντώνονται σε επίπεδο κάθετο ως προς την διεύθυνση διάδοσης του φωτός. Αν θεωρήσουμε ότι αυτή η δέσμη φωτός τέμνεται με ένα συγκεκριμένο σημείο στο χώρο, το οποίο βρίσκεται σε σημείο κάθετο ως προς την κατεύθυνση διάδοσης της, τότε το ηλεκτρικό και μαγνητικό της πεδίο μπορεί να αναπαρασταθεί με ένα διάνυσμα. Το μήκος και η διεύθυνση του διανύσματος αντιπροσωπεύουν την ισχύ και την διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου στο συγκεκριμένο σημείο. Αν το διάνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου ταλαντώνεται κατά μήκος μιας ευθείας γραμμής, τότε τα κύματα ονομάζονται επίπεδα πολωμένα ή γραμμικά πολωμένα κύματα.

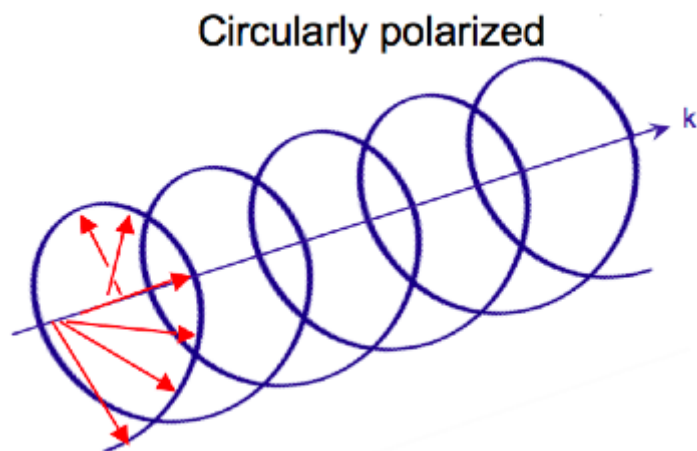


Εικόνα 22: Τρόπος διάδοσης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στον χώρο. Στο τρισσορθογώνιο σύστημα x, y, z, Ο άξονας των x αντιπροσωπεύει την κατεύθυνση διάδοσης του κύματος (π.χ. ορατού φωτός) και συμβολίζεται με τη ταχύτητα του φωτός c . Το κύμα του ηλεκτρικού πεδίου ταλαντώνεται στο επίπεδο x, y, και συμβολίζεται με το E , ενώ το αντίστοιχο του μαγνητικού πεδίου ταλαντώνεται στο επίπεδο x, z και συμβολίζεται με B . Αν διαλέγαμε ένα σταθερό σημείο και βλέπαμε πώς μεταβάλλεται το ηλεκτρομαγνητικό κύμα με τον χρόνο, θα βλέπαμε αντίστοιχες ημιτονοειδείς καμπύλες ως συνάρτηση του χρόνου.

Από: http://www.google.gr/imgres?imgurl=http://kyttariki.biol.uoa.gr/wwwroot2/mobile%2520phones/..%255Cmobile%2520phones/%25CF%2580%25CE%25B1%25CF%2581%25CE%25B1%25CF%2581%25CF%2584%25CE%25B7%25CE%25BC%25CE%25B1_%25CE%2599_files/image002.gif&imgrefurl=http://kyttariki.biol.uoa.gr/wwwroot2/mobile%2520phones/..%255Cmobile%2520phones/%25CF%2580%25CE%25B1%25CF%2581%25CE%25B1%25CF%2581%25CF%2584%25CE%25B7%25CE%25BC%25CE%25B1_%25CE%2599.htm&h=282&w=575&sz=17&tbnid=M9Qtp4LtpUc42M:&tbnh=64&tbn

[w=130&zoom=1&usg=__BQo8HV8WNh6HF8QnaUS9LnF1FEc=&docid=JltKILv496khnM&sa=X&ei=KTdFUoT4PIXPhAfA_oDICQ&sqi=2&ved=0CDQQ9QEwAQ](https://www.researchgate.net/publication/321111111/Circularly_polarized_light). Πρόσβαση τις 27-09-2013.

Όταν δύο γραμμικά πολωμένα κύματα εμφανίζουν μια διαφορά φάσης 90 μοιρών τότε προκύπτει ένα ειδικό ηλεκτρομαγνητικό κύμα, το κυκλικά πολωμένο. Σε μια τρισδιάστατη εικόνα το κύμα αυτό σχηματίζει σπειροειδή γραμμή και το διάνυσμα του ηλεκτρικού του πεδίου περιστρέφεται δεξιόστροφα διατηρώντας το μήκος κύματός του σταθερό (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Κυκλικά πολωμένο φως. Η κατεύθυνση διάδοσής του είναι το διάνυσμα k . Το κόκκινο βέλος δείχνει την διαρκώς μεταβαλλόμενη κατεύθυνση του ηλεκτρικού διανύσματος του φωτός (Wikipedia, 02/11/2024)

Κατά των ίδιο τρόπο όταν δύο κύματα εμφανίζουν διαφορά φάσης -90 μοιρών τότε προκύπτει ένα κυκλικά πολωμένο κύμα που σχηματίζει μια αριστερόστροφη σπείρα και το διάνυσμα του ηλεκτρικού του πεδίου περιστρέφεται αντίστροφα από τους δείκτες του ρολογιού.

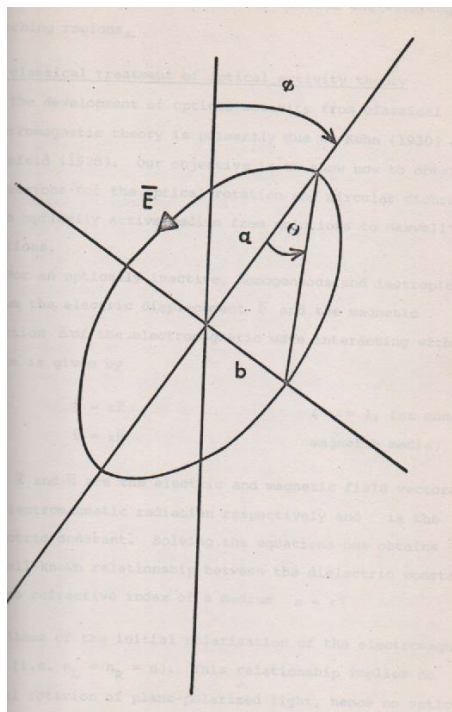
Έτσι λοιπόν μπορούμε να διαχωρίσουμε το δεξιόστροφο και το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Η υπέρθεση των δύο αυτών κυμάτων με το ίδιο πλάτος αιώρησης και ίδιο μήκος κύματος το ένα πάνω στο άλλο θα οδηγήσει σε ένα επίπεδα (γραμμικά) πολωμένο φως.

1.4.4.2. Αλληλεπίδραση ύλης και φωτός (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Όταν το φως διαπερνά την ύλη οι ιδιότητες του μεταβάλλονται. Δύο βασικά φαινόμενα που παρατηρούνται από την αλληλεπίδραση φωτός με ύλη είναι η *απορρόφηση* και η *μείωση της ταχύτητας*. Κατά την απορρόφηση η ένταση του φωτός ελαττώνεται γιατί η ύλη απορροφά ένα μέρος του, ενώ η μείωση της ταχύτητάς του οφείλεται στη διάθλαση που υφίσταται το φως από την ύλη.

Κάποια υλικά απορροφούν διαφορετικά το αριστερόστροφο πολωμένο φως σε σχέση με το δεξιόστροφο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται *κυκλικός διχρωϊσμός (circular dichroism CD)*. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω κάθε γραμμικά πολωμένο φως μπορεί να προκύψει από την εναπόθεση ενός αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός πάνω σε ένα δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένο φως. Επομένως αν ένα γραμμικά πολωμένο φως περάσει μέσα από ένα

υλικό που εμφανίζει κυκλικό διχρωϊσμό τότε οι ιδιότητες του θα αλλάξουν επειδή το υλικό αυτό απορροφά τα δύο κυκλικά πολωμένα συστατικά σε διαφορετικό βαθμό. Όταν συμβαίνει κάτι τέτοιο το προκύπτον κύμα δεν είναι πια γραμμικό και το διάνυσμα του ηλεκτρικού του πεδίου περιστρέφεται σε μια ελλειπτική τροχιά. Τέτοια κύματα χαρακτηρίζονται ελλειπτικώς πολωμένα (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Ελλειπτικά πολωμένο φως, που έχει προκύψει μετά από διαφορετική απορρόφηση σε ένα μέσον του δεξιόστροφα από το αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως. Η κατεύθυνση διάδοσης του φωτός είναι κάθετη προς το επίπεδο της οθόνης/χαρτιού. Η περιστροφή του ηλεκτρικού διανύσματος του φωτός ορίζεται από την γωνία φ , ενώ η ελλειπτικότητα του φωτός για κάθε μήκος κύματος είναι η γωνία θ (από George K. Papadopoulos, Ph.D. dissertation, The Ohio State University, Columbus Ohio, 1981).

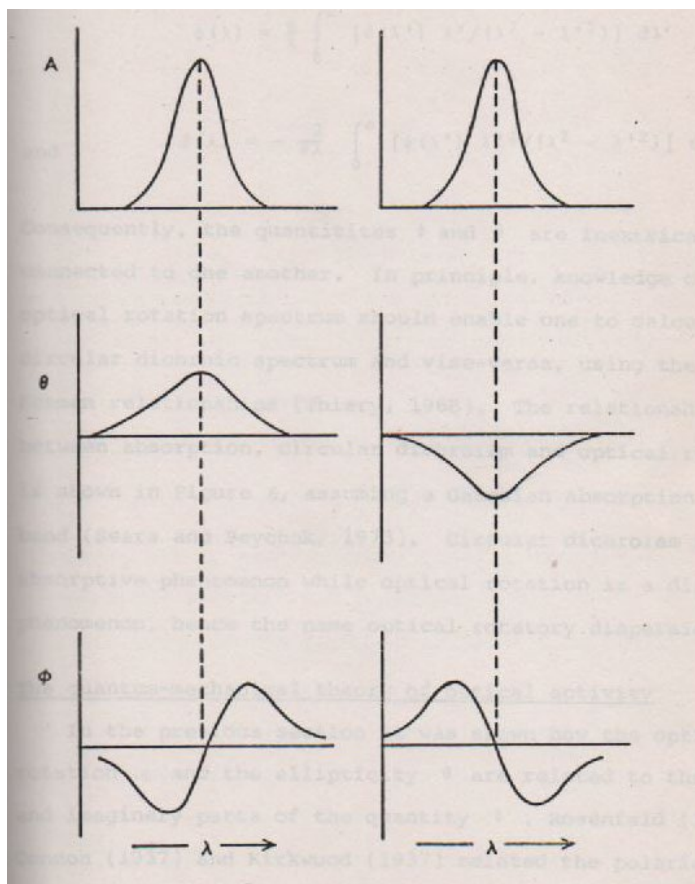
Ο κυκλικός διχρωϊσμός μετράται σε μονάδες απορροφητικότητας ή ελλειπτικότητας. Η ελλειπτικότητα θ (millidegrees) συνδέεται με την διαφορά απορροφητικότητας μεταξύ δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός, ΔA , με τη σχέση:

$$\theta = 32,98 \Delta A \quad (7)$$

Για να εξαλειφθούν οι επιδράσεις του μήκους της κυψελίδας και της συγκέντρωσης ορίζεται η μοριακή ελλειπτικότητα, $|\theta|$, όπου

$$|\theta| = 100 \theta / cd = 3298 \Delta \epsilon \quad (\Delta \epsilon = \Delta A / cd) \quad (8)$$

όπου c η συγκέντρωση, d το μήκος οπτικής διαδρομής και ϵ ο συντελεστής γραμμομοριακής απόσβεσης, όλα ήδη ορισμένα από προηγούμενως.



Εικόνα 25: Η σχέση μεταξύ

απορροφητικότητας A , και ελλειπτικότητας θ (δηλ. απορρόφησης και κυκλικού διχρωισμού) ενός διαλύματος δεν είναι μονοσήμαντη. Με την ίδια απορρόφηση μπορούμε να έχουμε είτε θετικό πρόσημο θ , ή αρνητικό. Στην πρώτη περίπτωση η απορρόφηση του αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός είναι μεγαλύτερη από την δεξιόστροφη, ενώ στην δεύτερη το αντίθετο. Η σχέση θ και φ δεν ενδιαφέρει σε αυτή την εργασία. (από George K. Papadopoulos, Ph.D. dissertation, The Ohio State University, Columbus Ohio, 1981).

Κάποιες από τις εφαρμογές του κυκλικού διχρωϊσμού είναι

- Ο καθορισμός της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών (Berg, 2004). Χρειάζεται λίγη ποσότητα πρωτεΐνης, μέχρι 200 μg , αλλά σε καθαρή μορφή.
- Η επίδραση ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη σε μια βιολογική δομή (vanHoldeetal., 2008). Επίσης πρωτεΐνη σε καθαρή μορφή.
- Η αλληλεπίδραση μεταξύ χρωμοφόρων ουσιών, όπως χρωστικών ανθέων, καθώς και φωτοσυλλεκτικών μορίων στα κέντρα φωτοσυνθετικής αντίδρασης (Yoshidaetal., 2009).
- Η μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος στη δομή των πρωτεϊνών. Επίσης πρωτεΐνη σε καθαρή μορφή.

Τα σύγχρονα όργανα προσδιορισμού του κυκλικού διχρωισμού επιτρέπουν την άμεση καταγραφή ενός φάσματος με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Όργανο μέτρησης κυκλικού διχρωϊσμού Jasco, στο βιοχημικό εργαστήριο του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, Τ.Α.Α.Τ.

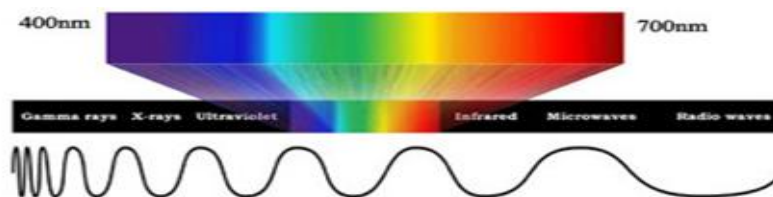
1.5 ΧΡΩΜΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΚΑΙ ΜΕΛΙΣΣΕΣ (Καφετζόγλου Κωνσταντίνος)

Πιο πάνω εξετάσαμε τον ρόλο των χρωμάτων ανθέων στην επικοινωνία των φυτών από έντομα όπως οι μέλισσες. Εδώ θα εξετάσουμε πρώτα το φάσμα του ορατού φωτός και πώς ο άνθρωπος αντιλαμβάνεται τα χρώματα, και μετά θα εξετάσουμε πως ο κύριος επικοινωνιστής φυτών, οι μέλισσες, αντιλαμβάνονται την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

1.5.1 Φάσμα ορατού φωτός, θεωρία χρώματος, αντίληψη χρωμάτων από τον άνθρωπο.

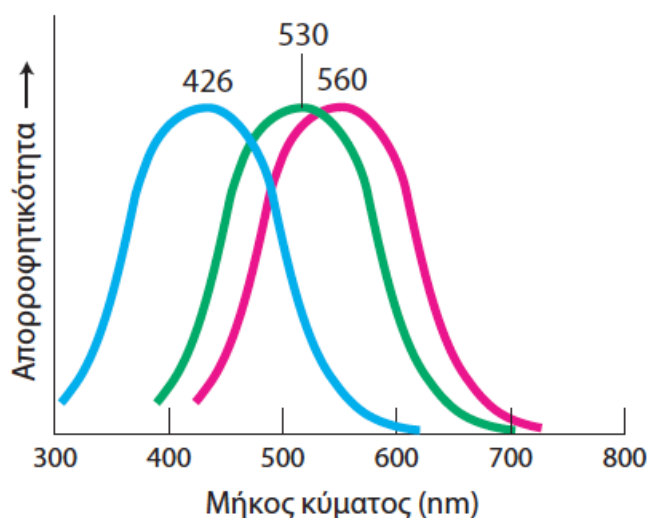
Αναπαράγουμε εδώ την Εικόνα 6, δηλ. το φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και τα χρώματα στην περιοχή του ορατού φωτός. Συνειδητοποιούμε ότι ο άνθρωπος μπορεί να δει την λεγόμενη ορατή ακτινοβολία ($\lambda = 390 - 750 \text{ nm}$), ενώ αντιλαμβάνεται ως θερμότητα την υπέρυθη (infrared, $750 - 1.000.000 \text{ nm}$, ή $1,0 \text{ mm}$) ακτινοβολία. Αντίθετα, μπορεί να «αντιληφθεί» την υπεριώδη ακτινοβολία και τις ακτίνες X, μόνον μέσα από τις βλαβερές των

ιδιότητες για τον οργανισμό (τύφλωση, διάφορες μορφές καρκίνου). Ο άνθρωπος μπορεί να δει τα διάφορα χρώματα (τα επτά χρώματα της ίριδας στο ουράνιο τόξο, και όλες τις άλλες αποχρώσεις των) επειδή διαθέτει τρεις ξεχωριστούς υποδοχείς του ορατού φωτός: έναν για το κόκκινο φως, έναν για το πράσινο και έναν για το μπλε φως (Εικόνα 27).



Περιοχή	Εύρος μηκών κύματος	Το χρώμα
Κόκκινου (Red)	760 nm – 630 nm	Κόκκινο (R)
Πορτοκαλί (orange)	630 nm – 600 nm	700 nm Πορτοκαλί
Κίτρινου (Yellow)	600 nm – 570 nm	620 nm Κίτρινο
Πράσινου (Green)	570 nm – 490 nm	580 nm Πράσινο (G)
Μπλε (Blue)	490 nm – 450 nm	530 nm Μπλε (B)
Ιώδους (Violet)	400 nm – 440 nm	475 nm Ιώδες (μωβ)
*Ινδικό (idigo) του Νεύτωνα	450 nm – 440 nm	440 nm

Εικόνα 6: Το φάσμα της ορατής ακτινοβολίας (digitalimagetheory. Blogspot. Com 13/07/2012)



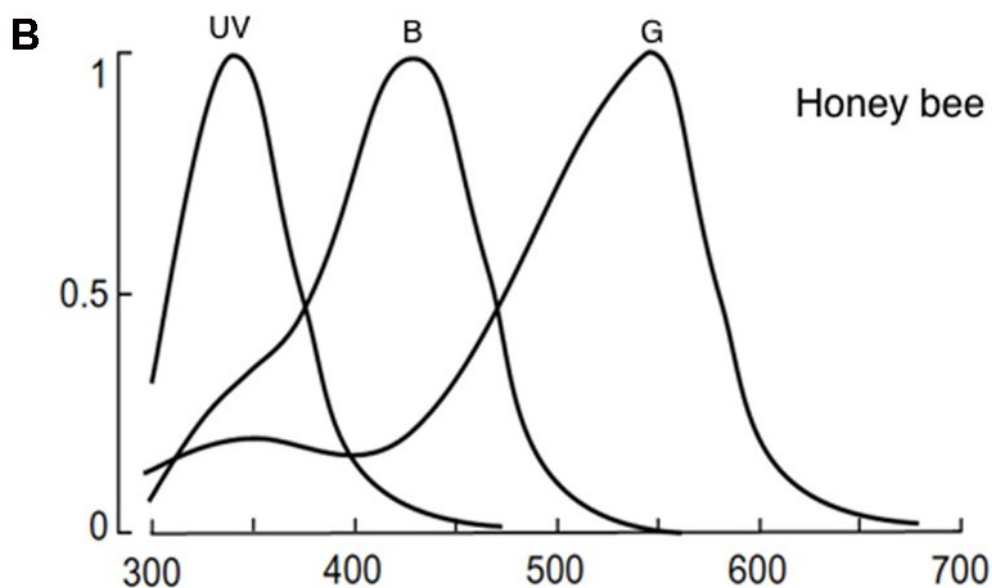
Εικόνα 27: Φάσματα απορρόφησης των χρωστικών των κωνιοφόρων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού που είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση των τριών κύριων χρωμάτων στην όραση (Πηγή: <https://www.cup.gr/book/viochimia-4i-elliniki-ekdosi/> , στις 03/05/20, 20.05 μ.μ). Η τρίτη χρωστική με μέγιστο απορρόφησης τα 560 nm δεν απορροφά ακριβώς στο κόκκινο αλλά στο πρασινο-κιτρινο-πορτοκαλί και λίγο κόκκινο και γαλάζιο! Συνεπώς, έχοντας τρεις διαφορετικούς φωτοϋποδοχείς στο ορατό, ο άνθρωπος μπορεί να διακρίνει πάρα πολλά και διαφορετικά χρώματα ως συνδυασμούς των τριών κύριων απορροφήσεων που διαθέτει.

Ένα πράγμα που δεν μπορούμε να κατανοήσουμε αυθόρμητα είναι το τί σημαίνει να έχει ένα αντικείμενο που βλέπουμε ένα συγκεκριμένο χρώμα, π.χ. κόκκινο. Αυτό σημαίνει ότι *το αντικείμενό μας απορροφά όλα τα άλλα χρώματα εκτός από το κόκκινο, το οποίο και αντανακλά!* Οπότε όποιο χρώμα φτάνει στα μάτια μας από ένα συγκεκριμένο αντικείμενο, είναι αυτό το οποίο το αντικείμενό μας δεν απορροφά! Τα φύλλα των φυτών, π.χ. είναι πράσινα, διότι η χλωροφύλλη που περιέχουν απορροφά πολύ έντονα στο μπλε και στο κόκκινο αλλά καθόλου στο πράσινο, το οποίο και αντανακλάται από τα φύλλα. Επίσης, όπως είδαμε και θα εξετάσουμε και πάλι, πολλές χρωστικές ανθέων απορροφούν κατά μικρό ή μεγάλο βαθμό και στο υπεριώδες. Αυτό εμείς δεν το αντιλαμβανόμαστε, γιατί δεν έχουμε αντίστοιχους αισθητήρες, μπορούμε όμως να το διαπιστώσουμε με το κατάλληλο όργανο, δηλ. το φασματοφωτόμετρο, και θα δείξουμε αντίστοιχα αποτελέσματα.

Σημειώνουμε, τέλος, ότι η έγχρωμη όραση είναι ιδιότητα λίγων συγκριτικά ζώων, κυρίως του ανθρώπου των πτηνώνκαιτων εντόμων. Η πολύ μεγάλη πλειοψηφία των ζώων βλέπει τα πάντα ως άσπρο ή μαύρο ή αποχρώσεις του γκριζου (Song and Lee, 2018). Το πλεονέκτημα των ζώων που έχουν έγχρωμη όραση προφανές και στο επόμενο υποκεφάλαιο θα εξετάσουμε το σύστημα όρασης των μελισσών.

1.5.2 Αντίληψη χρωμάτων από έντομα, ιδίως από μέλισσες. Σημασία για την επικοινωνία (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Η πολύ μεγάλη σημασία των μελισσών στην επικοινωνία πολλών φυτών, αναπόφευκτα οδήγησε και στην προσεκτική και εντατική μελέτη του αντίστοιχου συστήματος όρασης. Έτσι ανακαλύφθηκε ότι οι μέλισσες έχουν δύο φωτο-υποδοχείς στο ορατό, έναν που απορροφά στο πράσινο (G, Green, πράσινο), έναν δεύτερο στο μπλε (B, Blue) και έναν τρίτο που ονομάστηκε UV, επειδή απορροφά στο εγγύς υπεριώδες. Η φωτοευαισθησία στις συγκεκριμένες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος φαίνεται στην Εικόνα 28 (SongandLee, 2018). Πολλά άλλα έντομα έχουν την ίδια ιδιότητα, δηλαδή δύο ή περισσότερους φωτο-υποδοχείς στο ορατό φως και έναν στο υπεριώδες (SongandLee, 2018). Το εντυπωσιακό με την απορρόφηση φωτός από τα ομμάτια των μελισσών είναι ότι δεν απορροφούν καθόλου στο κόκκινο και απορροφούν αρκετά έντονα στο εγγύς υπεριώδες ($\lambda_{\text{μεγ}} \sim 350 \text{ nm}$). Φυσικά, ο συνδυασμός αυτών των δύο ιδιοτήτων σημαίνει ότι οι μέλισσες μπορούν να δουν και να επισκεφθούν για συλλογή νέκταρ κόκκινα άνθη τα οποία αντανακλούν αρκούντως και το εγγύς υπεριώδες φως.



Εικόνα 28. Κανονικοποιημένα φάσματα (δηλ. μέγιστο = 1,00) φωτοευαισθησίας των τριών φωτο-υποδοχέων της μέλισσας. Οι φωτο-υποδοχείς αυτοί ονομάστηκαν G (Green, πράσινο), B (Blue, μπλε) και UV (υπεριώδες), λόγω της μεγάλης τους ευαισθησίας στις συγκεκριμένες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Από Song and Lee, 2018.

Βλέπουμε λοιπόν, ότι η ιδιότητα που έχουν σχεδόν όλα τα κόκκινα άνθη φυτών να αντανακλούν και το εγγύς υπεριώδες, το οποίο και «βλέπουν» οι μέλισσες, επιτρέπει στις τελευταίες να αντιλαμβάνονται ακόμη και αυτά τα άνθη, με όσα περαιτέρω μπορεί να σημαίνει αυτό το γεγονός.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1.ΣΚΕΥΗ, ΟΡΓΑΝΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.

2.1.1. Σκεύη (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

- Σπαθίδα
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Στήριγμα δοκιμαστικών σωλήνων
- Βαθμολογημένο σιφώνιο
- Γουδί
- Γουδοχέρι
- Ογκομετρικοί φιάλη
- Χωνί
- Διηθητικό χαρτί
- Κοπίδι
- Πουάρ σιφωνίων
- Προχοΐδα
- Κυψελίδες χαλαζία, μήκος οπτικής διαδρομής 1 cm.
- Κωνική φιάλη
- Μικροσιφώνια (1-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 200-1000 μL , 1000-5000 μL)
- Κατάλληλα ρύγχη για μικροσιφώνια

2.1.2. Όργανα (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Πεχάμετρο
- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής (κάθε ένα από τα παρακάτω τρία όργανα έχει τον δικό του, με εγκατεστημένο το αντίστοιχο λογισμικό χρήσης)
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS, SHIMADZU 2501 UV-VIS με παρελκόμενη σφαίρα ολοκλήρωσης, για την μέτρηση πυκνών και συμπαγών δειγμάτων, όπως π.χ. ανέπαφων βιολογικών ιστών (φύλλα από φυτά και πέταλα από άνθη). Ο συνδεδεμένος ηλεκτρονικός υπολογιστής έχει εγκατεστημένο λογισμικό UVPC της Shimadzu, συμβατό με Windows 3.5.
- Φθορισμόμετρο, CaryEclipse, συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, που περιέχει το αντίστοιχο λογισμικό για επεξεργασία φασμάτων.
- Φασματοφωτόμετρο κυκλικού διχρωϊσμού (φασματοπολωσίμετρο) Jasco 801, συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, που περιέχει το αντίστοιχο λογισμικό για επεξεργασία φασμάτων.
- Φυγόκεντρος, Heraeus, με κεφαλές για δοκιμαστικούς σωλήνες μέχρι 50 mL, και σωληνάκια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5 mL.
- Παγομηχανή

2.1.3.Αντιδραστήρια (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

- Μεθανόλη
- Υδροχλωρικό οξύ (πυκνό, εμπορίου)
- Καυστικό νάτριο
- Κιτρικό οξύ (κρυσταλλικό, μονοϋδρικό)
- Αιθανόλη
- Υδροχλώριο
- Χλωριούχο κάλιο (κρυσταλλικό)

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν παραδεκτής ποιότητας για αναλυτική χημεία (analyticalgrade).

2.1.4. Διαλύματα (Δρακονταειδή Αγγελική)

- Οξυνισμένη μεθανόλη.

Στην αεραγωγό εστία σε μια κωνική φιάλη των 100 mL προσθέτουμε 100 mL μεθανόλη και με ένα σιφώνιο προσθέτουμε 0,1 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος.

- Υδροχλωρικό οξύ.

Σε ένα ποτήρι ζέσεως σε απαγωγό εστία βάζω διάλυμα χλωριούχου καλίου. Τοποθετούμε το ποτήρι στον αναδευτήρα, βάζουμε μέσα ένα ηλεκτρόδιο πεχάμετρου και στη συνέχεια προσθέτουμε υδροχλωρικό οξύ ώστε να φτάσει το διάλυμα στην τιμή $\text{pH} = 1$.



Εικόνα 29: διαλύματα προς χρήση στο βιοχημικό εργαστήριο του Τ.Ε.Ι.Ηπείρου, Α.Α.Τ.

- Κιτρικό οξύ.

Ζυγίζουμε στο ζυγό 2,10 g μονο-ϋδρικού κιτρικού οξέος (και το βάζουμε σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 mL νερό). Βάζουμε την κωνική φιάλη με ένα μικρό μαγνήτη πάνω στον μαγνητικό αναδευτήρα και αναδεύουμε. Έτσι έχουμε διάλυμα 0,1 M κιτρικού οξέος

- Καυστικό νάτριο.

Ζυγίζουμε 5,25 g καυστικού νατρίου και τα βάζουμε σε κωνική φιάλη του 1 λίτρου. Προσθέτουμε σιγά σιγά μέχρι τη χαραγή και μέχρι να αποκτήσουμε ομοιογενές διάλυμα

(συγκέντρωσης 0,131 N). Αναδεύουμε στον μαγνητικό αναδευτήρα, αφού έχουμε προσθέσει ένα μικρό μαγνήτη στην κωνική φιάλη με το διάλυμα



Εικόνα 30: Ηλεκτρονικό pH-μετρο στο βιοχημικό εργαστήριο του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, Α.Α.Τ.

➤ **Κιτρικό νάτριο**

Βάζουμε το κιτρικό οξύ σε ένα ποτήρι ζέσεως στην απαγωγό εστία και τοποθετήσαμε μέσα ένα ηλεκτρόδιου πεχάμετρου και προσθέσαμε σταγόνες από καυστικό νάτριο μέχρι το pH να φτάσει στο 6.

2.2.ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΝΘΕΩΝ (Δρακονταειδή Αγγελική)

Φρέσκα άνθη καμπανούλας είχαμε από την Εθνική Οδό Ιωαννίνων Αθηνών, απέναντι από το φράγμα του Λούρου του νομού Πρεβέζης καθώς και από την περιοχή της Κανέτας του νομού Ιωαννίνων. Η επεξεργασία τους γινόταν αμέσως ώστε να μπορέσουν να διατηρηθούν τα διαλύματα στο ψυγείο.

Εκτός από την καμπανούλα, μαζέψαμε από το χώρο του Τ.Ε.Ι. ιβίσκο (πορφυρός μωβ, λευκός) και τριαντάφυλλα (κόκκινα, κίτρινα, πορτοκαλί, λευκά) ώστε να έχουμε συγκριτικά αποτελέσματα.



Εικόνα 31: Δείγματα προς επεξεργασία πορφυρής καμπανούλας (αριστερά) και λευκής (δεξιά)



Εικόνα 32: Δείγματα προς επεξεργασία ροζ (αριστερά) και λευκής (δεξιά) τριανταφυλλιάς.

2.3.ΕΚΧΥΛΙΣΗ (Δρακονταειδή Αγγελική)

Ξεχωρίζουμε τα άνθη σύμφωνα με το χρώμα τους. Αφαιρούμε τους στήμονες και τους κάλυκες από το άνθος ώστε να μας μείνουν μόνο τα πέταλα και το κέντρο του. Πλένουμε καλά με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια πολύ προσεκτικά ξεχωρίζουμε το κέντρο του άνθους από τα πέταλα. Ζυγίζουμε ξεχωριστά το κέντρο του άνθους και τα πέταλα ώστε να έχουμε ακριβή γνώση της ποσότητας του καθαρού αρχικού προϊόντος.

Τοποθετούμε τα μέρη του άνθους που έχουμε ξεχωρίσει σε γουδί και προσθέτουμε διάλυμα (οξυνισμένη μεθανόλη ή κιτρικό νάτριο). Με το γουδοχέρι λειοτριβούμε ώστε να διαλυθούν τα άνθη και να εξαχθούν όλες οι χρωστικές τους. Εν συνεχεία διηθούμε το διάλυμα με τη βοήθεια ενός χωνιού και διηθητικού χαρτιού ώστε να πάρουμε το εκχύλισμα ελεύθερο ιζημάτων. Το καθαρό εκχύλισμα μπαίνει σε δοκιμαστικούς σωλήνες για περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 33: Καθαρισμένη μωβ (Πορφυρή) καμπανούλα κεντρικό μέρος (αριστερά), περιφέρεια πετάλων (δεξιά)

2.4. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Για να μελετήσουμε τα εκχυλίσματα φασματοσκοπικά χρησιμοποιήσαμε φασματοφωτόμετρο τύπου SHIMADZU 2501 UV-VIS. Οι μετρήσεις που πήραμε ήταν στα 800 -400 nm (ορατό) και στα 400 -200 nm (υπεριώδες).

Για να ξεκινήσουμε να παίρνουμε μετρήσεις για τα εκχυλίσματα μας πρώτα πήραμε φάσμα του διαλύτη μόνον, εξ' ορισμού μηδενικό. Για να γίνει αυτό βάλαμε οξυνισμένη μεθανόλη σε δύο κυψελίδες (από χαλαζία ή γυαλί, για μετρήσεις στου περιώδες 400-240 nm, ή ορατό 800-400 nm, αντίστοιχα) και τις τοποθετήσαμε στο μηχάνημα. Αφού πήραμε την βάση μηδενικής απορρόφησης (baseline) ξεκινήσαμε τα πειράματα στα δείγματά μας τα οποία αποτελούνταν από εκχύλισμα χρωστικών των πετάλων της καμπανούλας σε χρωματισμούς του μωβ, του ανοιχτού μωβ και του λευκού και του κέντρου της καμπανούλας στους αντίστοιχους χρωματισμούς, ανάλογα με το άνθος, τις συνθήκες εκχύλισης και την αραίωση του αρχικού εκχυλίσματος. Ορισμένα πειράματα έγιναν και με πέταλα ιβίσκου και τριανταφυλλιάς, από τον ανθώνα μπροστά στο Κτίριο Ανθοκομίας Αρχιτεκτονικής Τοπίου του ιδρύματος.

Επειδή τμήμα του προσπίπτοντος φωτός σε ένα πυκνό διάλυμα ή βιολογικό εναιώρημα απορροφάται, ενώ ένα άλλο τμήμα διαχέεται (σκεδαάζεται), χρησιμοποιήσαμε την σφαίρα ολοκλήρωσης ώστε να “μαζέψουμε” αυτό το σκεδαζόμενο φως. Χρησιμοποιήσαμε ολόκληρο πέταλο καμπανούλας και συμπεράναμε ότι τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα καθώς η σφαίρα ολοκλήρωσης δίνει μετρήσεις ολικής και διάχυτης ανακλαστικότητας και διαπερατότητας και δεν επεμβαίνει στη δομή του δείγματος, καταστρέφοντας το ζωντανό υλικό, επιτρέποντας έτσι την διατήρησή του για περαιτέρω μελέτες. Η διάταξη της σφαίρας ολοκλήρωσης επιτρέπει επίσης την λήψη φασμάτων απορρόφησης από διαλύματα εκχυλισμάτων, οπότε διατηρήσαμε αυτή τη διάταξη για όλες τις μετρήσεις.

2.5.ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Φθορισμός λέγεται η διεργασία κατά την οποία μια ουσία φωτιζόμενη από μια φωτεινή δέσμη εκπέμπει ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος από την ακτινοβολία που απορροφά από τη δέσμη. Η συσκευή στην οποία μετριέται ο φθορισμός ενός διαλύματος λέγεται φθορισμόμετρο. Στο εργαστήριο χρησιμοποιήσαμε φθορισμόμετρο ορατού-υπεριώδους Cary-Eclipse. Όπως εξηγήσαμε στην Εικόνα 20, το φθορίζον φως, ως ευαίσθητο και πολλές φορές υποπολλαπλάσιο σε ένταση του προσπίπτοντος μετρίεται με όλα τα όργανα συλλογής και ανάλυσης σε γωνία 90° από τον άξονα του προσπίπτοντος φωτός. Χρησιμοποιήσαμε ειδική κυψελίδα χαλαζία, διαφανή και στις 4 πλευρές της, ώστε απρόσκοπτα να προσπίπτει το διεγείρον φως, και να διαφεύγει προς τον καταγραφέα (φωτοπολλαπλασιαστή) το φθορίζον φως. Με βάση το φάσμα απορρόφησης των διαλυμάτων καμπανούλας, πήραμε φάσματα εκπομπής με μήκος κύματος διέγερσης κάθε μια από τις τρεις κορυφές στο φάσμα του ορατού φωτός του εκχυλίσματος. Επίσης, με βάση τα μέγιστα των φασμάτων εκπομπής φθορισμού, πήραμε φάσματα δράσης (actionspectra), δηλαδή καταγράψαμε ένα φάσμα με ανάλογα με την δυνατότητα του κάθε μήκους κύματος να παράγει φθορίζον φως στο συγκεκριμένο μέγιστο εκπομπής.

2.6.ΚΥΚΛΙΚΟΣ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΣ (Καφετζόγλου Κωνσταντίνα)

Για να μελετήσουμε τα εκχυλίσματα χρησιμοποιούμε το μηχάνημα του κυκλικού διχρωϊσμού. Αρχικά ανοίγουμε την φιάλη του αζώτου ώστε η πρώτη στρόφιγγα να δείχνει πίεση μέχρι 200 bar (μέγιστη) και η δεύτερη να καθορίζει την ροή αζώτου στα 4-6 L/min. Ανοίγουμε το όργανο, τον ρυθμιστή της θερμοκρασίας και την βρύση νερού η οποία θα πρέπει να τρέχει καθ' όλη την διάρκεια της χρήσης του μηχανήματος, ώστε να μην θερμαίνεται ο χώρος όπου τοποθετείται η κυψελίδα με το δείγμα να διατηρείται στην επιθυμητή θερμοκρασία (συνήθως δωματίου, 20°C). Περιμένουμε 170 sec ώστε να πλημυρίσει το όργανο με άζωτο και πυροδοτούμε τον λαμπτήρα υπεριώδους/ορατού. Το άζωτο πρέπει πάντα να ρέει μέσα στο μηχάνημα, όσο είναι αναμμένος ο λαμπτήρας υπεριώδους/ορατού ώστε να μην υπάρχει μέσα στο μηχάνημα ίχνος οξυγόνου. Το οξυγόνο αντιδρά με υπεριώδες φως $\lambda \sim 200$ nm *σχηματίζοντας το υπερδραστικό όζον*, το οποίο και μπορεί να αλλοιώσει τα πρίσματα χαλαζία μέσα στο όργανο! Πάντα παίρνουμε φάσμα βάσης (baseline) με κυψελίδα που περιέχει μόνον διαλύτη και καθόλου βιολογικό δείγμα, ή επιλέγουμε τέτοιο φάσμα από προηγούμενη τράπεζα φασμάτων βάσης. Τοποθετούμε στην συνέχεια την κυψελίδα με το δείγμα μέσα στο μηχάνημα. Εισάγουμε στον υπολογιστή τις παραμέτρους στις οποίες θέλουμε να δουλέψουμε και καταγράφουμε τα αντίστοιχα φάσματα με κατά προτίμηση τις πιο αργές ροές καταγραφής 100 nm/λεπτό. Το κλείσιμο του μηχανήματος γίνεται με ακριβώς την αντίθετη σειρά (κλείνουμε τον λαμπτήρα, την ροή νερού, το όργανο και μετά από 5 λεπτά την ροή αζώτου).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Συλλογές Ανθέων και Εκχυλίσαις

Έγιναν οι ακόλουθες συλλογές ανθέων όπως εμφανίζονται στον Πίνακα 5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 Αναλυτικός κατάλογος συλλογών ανθέων, επεξεργασίας των και περαιτέρω φασματοσκοπικών μετρήσεων

Ημερομηνία	Τόπος συλλογής, Φυτό	επεξεργασία-μάζα, Κέντρο άνθους (g)	επεξεργασία-μάζα, Περιφέρεια άνθους(g)	Περαιτέρω πειράματα
25/09/2006	Φράγμα Λούρου Καμπανούλα η ποικιλόχρους	2,91 g εκχυλίστηκαν σε 10mL οξυνισμένης μεθανόλης (H ⁺ -MetOH)	18,51 g εκχυλίστηκαν σε 20mL οξυνισμένης μεθανόλης (H ⁺ -MetOH)	Λήψη φασμάτων απορρόφησης, απλών, ή σε σφαίρα ολοκλήρωσης. Λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού και φθορισμού
28/09/2020	Τεχνόπολις Κωστακίων Ιβίσκος λευκός και πορφυρός	1,37 g μωβ ιβίσκος 1,13 g λευκός ιβίσκος	8,13 g μωβ ιβίσκος 4,14 g λευκός ιβίσκος	Λήψη φασμάτων απορρόφησης, απλών ή σε σφαίρα ολοκλήρωσης. Λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού και φθορισμού
02/10/2006	Φράγμα Λούρου Καμπανούλα η ποικιλόχρους	3,79 g μωβ ανθέων εκχυλίστηκαν σε 10mL οξυνισμένης μεθανόλης (H ⁺ -MetOH) 1,19 g λευκών ανθέων εκχυλίστηκαν σε 10mL οξυνισμένης μεθανόλης (H ⁺ -MetOH)	17,79 g μωβ ανθέων εκχυλίστηκαν σε 20mL οξυνισμένης μεθανόλης (H ⁺ -MetOH) Δεν εκχυλίστηκαν τμήματα περιφέρειας λευκών ανθέων σε οξυνισμένη μεθανόλη (H ⁺ -MetOH)	Λήψη φασμάτων απορρόφησης, απλών, ή σε σφαίρα ολοκλήρωσης. Λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού και φθορισμού
03/10/2006	Φράγμα Λούρου Καμπανούλα η ποικιλόχρους	2,5g μωβ ανθέων εκχυλίστηκαν σε 10mL κιτρικού νατρίου, pH = 6,0 1,1g λευκών ανθέων εκχυλίστηκαν σε 10mL κιτρικού νατρίου, pH = 6,0	16,4 g μωβ ανθέων εκχυλίστηκαν σε 20mL κιτρικού νατρίου, pH = 6,0 5,2g λευκών ανθέων εκχυλίστηκαν σε 10mL κιτρικού νατρίου, pH = 6,0	Λήψη φασμάτων απορρόφησης στο ορατό Λήψη φασμάτων απορρόφησης στο ορατό
11/10/2006	Τοποθεσία Κανέτα, ΕΟ Ιωαννίνων-Αθηνών, 22°-23°χλμ Καμπανούλα η	Συλλέχθηκαν μωβ και λευκές καμπανούλες. Τα πέταλα χωρίστηκαν σε κέντρο και περιφέρεια.	Συλλέχθηκαν μωβ και λευκές καμπανούλες. Τα πέταλα χωρίστηκαν σε κέντρο και περιφέρεια. 16,3g μωβ ανθέων εκχυλίστηκαν σε 20	Έγινε λήψη φασμάτων πετάλου (κέντρου ή περιφέρειας) από λευκά και μωβ άνθη καμπανούλας, σε σφαίρα ολοκλήρωσης, στο ορατό και στο υπεριώδες.

	ποικιλόχρους		mLoξυνισμένηςμεθανόλης (H ⁺ -MetOH)	Λήψη φασμάτων απορρόφησης εκχυλίσματος σε οξυνισμένημεθανόλη στο ορατό
Ημερομηνία	Τόπος συλλογής, Φυτό	επεξεργασία-μάζα, Κέντρο άνθους (g)	επεξεργασία-μάζα, Περιφέρεια άνθους(g)	Περαιτέρω πειράματα
20/10/2006	Τοποθεσία Κανέτα, ΕΟ Ιωαννίνων-Αθηνών, 22°-23°χλμ Καμπανούλα η ποικιλόχρους	Συλλέχθηκαν μωβ και λευκές καμπανούλες. Τα πέταλα χωρίστηκαν σε κέντρο και περιφέρεια.	Συλλέχθηκαν μωβ και λευκές καμπανούλες. Τα πέταλα χωρίστηκαν σε κέντρο και περιφέρεια. 16,3g μωβ ανθέων εκχυλίστηκαν σε 20 mLοξυνισμένηςμεθανόλης (H ⁺ -MetOH)	Έγινε λήψη φασμάτων πετάλου (κέντρου ή περιφέρειας) από λευκά και μωβ άνθη καμπανούλας, σε σφαίρα ολοκλήρωσης, στο ορατό και στο υπεριώδες. Λήψη φασμάτων απορρόφησης εκχυλίσματος σε οξυνισμένημεθανόλη στο ορατό
23/10/2006	Τοποθεσία Κανέτα, ΕΟ Ιωαννίνων-Αθηνών, 22°-23°χλμ Καμπανούλα η ποικιλόχρους	Συλλέχθηκαν μωβ και λευκές καμπανούλες. Τα πέταλα χωρίστηκαν σε κέντρο και περιφέρεια.	Συλλέχθηκαν μωβ και λευκές καμπανούλες. Τα πέταλα χωρίστηκαν σε κέντρο και περιφέρεια. 16,3g μωβ ανθέων εκχυλίστηκαν σε 20 mLοξυνισμένηςμεθανόλης (H ⁺ -MetOH)	Έγινε λήψη φασμάτων πετάλου (κέντρου ή περιφέρειας) από λευκά και μωβ άνθη καμπανούλας, σε σφαίρα ολοκλήρωσης, στο ορατό και στο υπεριώδες. Λήψη φασμάτων απορρόφησης εκχυλίσματος σε οξυνισμένημεθανόλη στο ορατό
01/12/2006	Φράγμα Λούρου Καμπανούλα η ποικιλόχρους	Συλλέχθηκαν μωβ καμπανούλες. Τα πέταλα χωρίστηκαν σε κέντρο και περιφέρεια.	Συλλέχθηκαν μωβ καμπανούλες. Τα πέταλα χωρίστηκαν σε κέντρο και περιφέρεια.	Έγινε λήψη φασμάτων πετάλου (κέντρου ή περιφέρειας) από μωβ άνθη καμπανούλας, σε σφαίρα ολοκλήρωσης, στο ορατό και στο υπεριώδες.

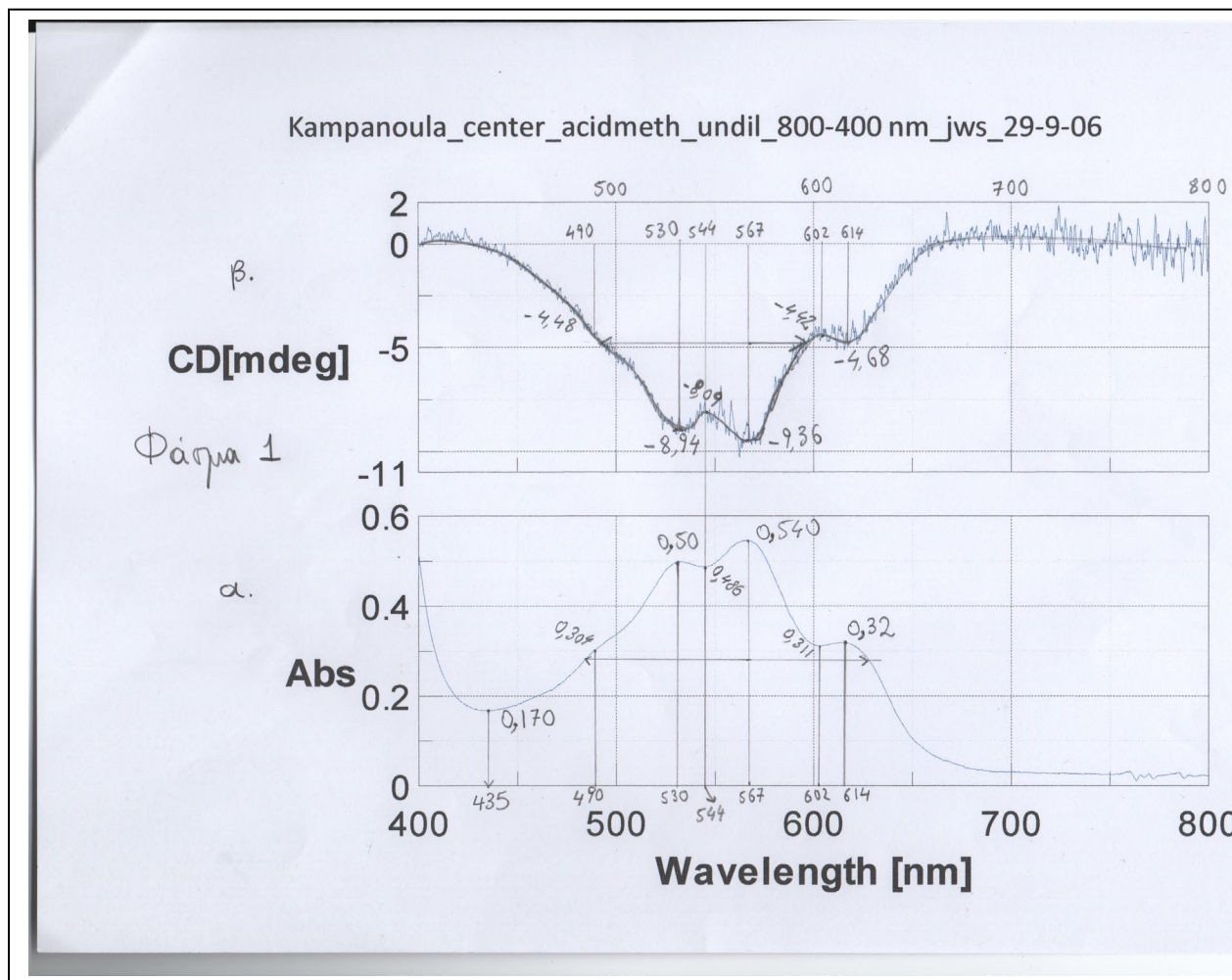
Β. Φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό

B1. Φάσματα σε οξυνισμένη μεθανόλη

Από τις πρώτες συλλογές ανθέων λάβαμε ξεχωριστά το κεντρικό και το περιφερειακό τμήμα του άνθους όπου το πρώτο είχε πολύ πιο έντονο μωβ χρώμα (Εικόνες 29 και 31). Τα αντίστοιχα εκχυλίσματα σε οξυνισμένη μεθανόλη υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπία απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού. Βασισμένοι σε προηγούμενες παρατηρήσεις κατά την διεξαγωγή της πτυχιακής της φοιτήτριας Παναγιώτας Γεωργάνου (2005-06), επιδιώξαμε να έχουμε κατ' αρχήν όσο το δυνατόν πιο πυκνά εκχυλίσματα (σε μωβ χρώμα, παρόμοιο με αυτό του ανέπαφου άνθους), τα οποία όμως να δίνουν τιμές απορρόφησης οι οποίες να βρίσκονται μέσα στα όρια αξιοπιστίας ($A_{\text{μεγ}} < 2,000$ για απορρόφηση, και $A_{\text{μεγ}} < 1,500$ για κυκλικό διχρωϊσμό). Στο συνδυασμένο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού και απορρόφησης (Φάσματα 1α, β, 2α) διαπιστώνουμε την ταύτιση των κορυφών και κοιλάδων απορρόφησης στη περιοχή 800-400 nm, για το εκχύλισμα από το περιφερικό και από το κεντρικό τμήμα του άνθους (Πίνακες 6 και 7):

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης από το Φάσμα 1β (κεντρικό τμήμα άνθους καμπανούλας)

	Κοιλ. 1 A_1 ($\lambda_{\text{κ1nm}}$)	Ωμος $A_{\omega\mu}$ ($\lambda_{\omega\mu\text{nm}}$)	Δευτερεύουσα κορυφή 1, $A_{\kappa1}$, ($\lambda_1 \text{ nm}$)	Κοιλάδα 2 A_2 ($\lambda_{\kappa2\text{nm}}$)	Κύρια κορυφή $A_{\kappa\upsilon\rho}$, ($\lambda_{\kappa\upsilon\rho} \text{ nm}$)	Κοιλάδα 3 A_3 ($\lambda_{\kappa3\text{nm}}$)	Δευτερεύουσα κορυφή 2, $A_{\kappa2}$, ($\lambda_2 \text{ nm}$)	$A_{\text{μεγ}}/A_{440}$
Κορυφές			0,50 (530)		0,540 (567) λ_{max}		0,32 (614)	0,32
$A_{\kappa\upsilon\rho}/A_{\kappa}$			1,08				1,69	
Κοιλάδες	0,170 (435) λ_{min}			0,486 (544)		0,31 (602)		
Ωμος		0,304 (490)						
Ημι-πλάτος ζώνης απορρόφησης, $\Delta\lambda/2$, nm	142							



Φάσμα 1α, β. Φάσμα απορρόφησης (β, κάτω) και κυκλικού διχρωϊσμού (α, πάνω), στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του *κεντρικού τμήματος* μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 25^{ης} Σεπτεμβρίου 2006. Η ταύτιση των κορυφών και κοιλάδων απορρόφησης με αντίστοιχες κορυφές και κοιλάδες στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού είναι εντυπωσιακή. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλiptικότητα), με μονάδες mdeg. Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Χαρακτηριστικά κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό εκχυλίσματος σέπαλου καμπανούλας (κεντρικό τμήμα μωβ άνθους) με έντονη απορρόφηση, ταξινομημένα από λ_{ελάχιστο} (λ_{min}) μέχρι λ_{μέγιστο} (λ_{max}) όπως προκύπτουν από το Φάσμα 1α

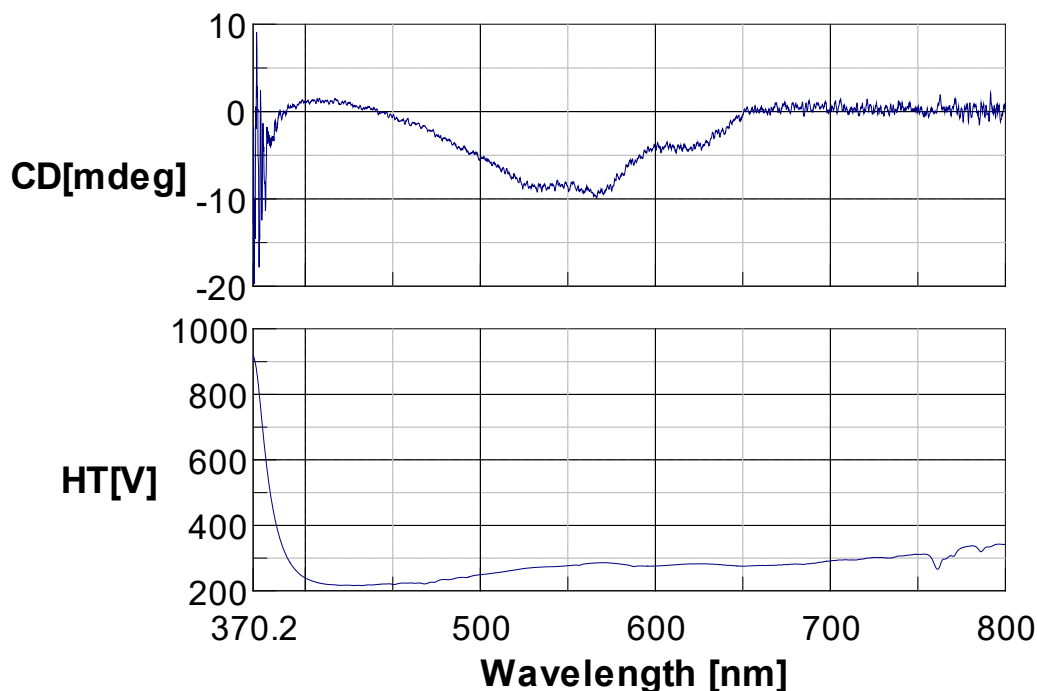
	Κοιλάδα 1 $\Theta^*(\lambda_{κ1} \text{ nm})$	Ωμος $\Theta^*(\lambda_{ωμ} \text{ nm})$	Δευτερεύ- ουσα κορυφή 1, $\Theta_{κ1}^*, (\lambda_1 \text{ nm})$	Κοιλάδα 2 [^] $\Theta_2^* (\lambda_{κ2} \text{ nm})$	Κύρια κορυφή $\Theta_{κυρ}^*, (\lambda_{κυρ} \text{ nm})$	Κοιλάδα 3 [^] $\Theta_3^* (\lambda_3 \text{ nm})$	Δευτερεύ- ουσα κορυφή 2, $\Theta_{κ2}^*, (\lambda_2 \text{ nm})$
Κορυφές			– 8,94 (530)		– 9,36 (567) λ _{max}		– 4,68 (614)
Θκυρ/Θκ			1,05				2,00
Κοιλάδες	ΔΥ			– 8,09 (544)**		– 4,42 (602)**	
Ωμος		– 4,48 (490)**					
Ημι-πλάτος ζώνης κυκλικού διχρωϊσμού, Δλ/2, nm	103						

*Τιμές ελλειπτικότητας, Θ, σε mdeg.

[^] Διατηρούνται οι όροι Κοιλάδα 2 και Κοιλάδα 3 ώστε να υπάρχει αντιστοίχιση με το φάσμα απορρόφησης, επειδή η διαφορά στο μήκος κύματος είναι μόνο λίγα νανόμετρα, ενώ το γενικό σχήμα του φάσματος είναι πολύ όμοιο με το αντίστοιχο του φάσματος απορρόφησης.

ΔΥ, δεν υπάρχει

**Σε πλάγια όλες οι τιμές μήκους κύματος για ώμους και κοιλάδες που διαφέρουν ελαφρώς από τις αντίστοιχες στο φάσμα απορρόφησης



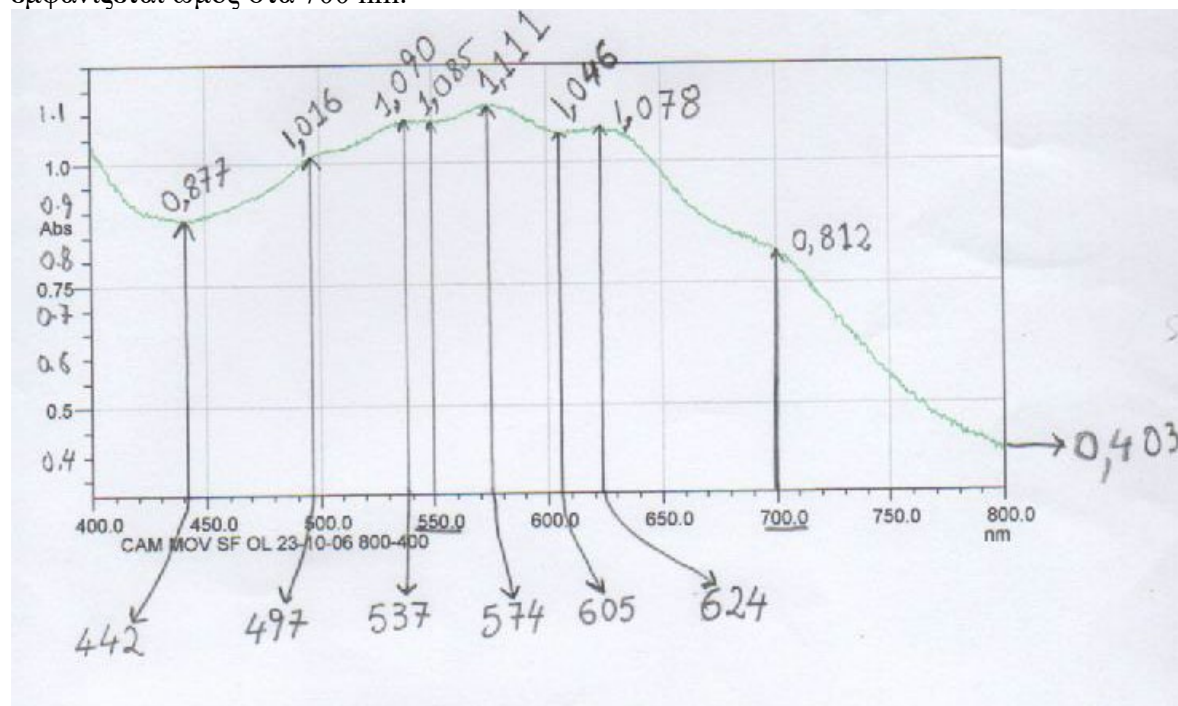
Φάσμα 2α. Κυκλικός διχρωϊσμός (πάνω), στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του περιφερικού τμήματος μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή στις 25 Σεπτεμβρίου 2006. Η ταύτιση των κορυφών και κοιλάδων απορρόφησης με αντίστοιχες κορυφές και κοιλάδες στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού είναι εντυπωσιακή. Οι κορυφές και οι κοιλάδες και η μεταξύ των ένταση είναι σχεδόν ταυτόσημες είτε από περιφερειακό είτε από κεντρικό σημείο. HT = τάση κρυστάλλου παραγωγής κυκλικώςπλωμένου φωτός, σε μονάδες Volt.

Παράλληλα, η σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης ανέπαφων ανθέων καμπανούλας που λήφθηκαν μέσω της σφαίρας ολοκλήρωσης του φασματοφωτομέτρου ShimadzuUV2501, έδειξαν παρόμοιο σχήμα του φάσματος με αυτό του πυκνού εκχυλίσματος (Φάσμα 3 και Πίνακας 8).

B1.1.2 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά εκχυλισμάτων καμπανούλας και ανέπαφου άνθους καμπανούλας

Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά πυκνού εκχυλίσματος άνθους καμπανούλας, από τη περιφέρεια και από το κέντρο του άνθους, σε οξυνισμένη μεθανόλη, που διατηρεί το μωβ χρώμα (απορρόφησης φωτός και κυκλικού διχρωϊσμού) στη περιοχή του ορατού (800 – 400 nm) φαίνονται στα Φάσματα 1α,β, και 2α, και συνοψίζονται στους Πίνακες 6-7. Επιβεβαιώνουμε προγενέστερες παρατηρήσεις της Παναγιώτας Γεωργάνου ότι τα πυκνά εκχυλίσματα σε οξυνισμένη μεθανόλη του άνθους της *C. Versicolor* διατηρούν το μωβ (πορφυρό) χρώμα που προσομοιάζει με αυτό του ανέπαφου άνθους, και έχουν παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, είτε προέρχονται από το κέντρο του άνθους είτε από τη περιφέρεια. Επιπλέον,

στο Φάσμα 3 φαίνεται η απορρόφηση άνθους μωβ καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, όπου ελαττώνονται πάρα πολύ οι όποιες αλλοιώσεις λόγω σκέδασης (διάχυσης) του φωτός, προσομοιάζει πάρα πολύ με το αντίστοιχο φάσμα του πυκνού εκχυλίσματος: χαρακτηριστική τριπλή κορυφή με μεσαία και μεγαλύτερη κορυφή περ. στα 570 nm, σε παραπλήσια μήκη κύματος οι κορυφές και οι κοιλάδες, ο ώμος των 488 να έχει μετατοπιστεί στα 497 nm και εμφανίζεται ώμος στα 700 nm.



Φάσμα 3. Φάσμα απορρόφησης στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) ανέπαφου σέπαλου μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε σφαίρα ολοκλήρωσης χωρίς διόρθωση σκέδασης φωτός στην γραμμή μηδενικής απορρόφησης, συλλογή 23^{ης} Οκτωβρίου 2006.

Μπορούμε από τώρα να συμπεράνουμε ότι χωρίς την ύπαρξη κάποιας αξιόπιστης γραμμής μηδενικής απορρόφησης (π.χ. από ένα άνθος λευκό σε χρώμα, παρόμοιας υφής όπως και αυτό της καμπανούλας, αλλά χωρίς την παραμικρή περιεκτικότητα σε χρωστική που να απορροφά στο ορατό), είναι αδύνατον να έχουμε ένα πραγματικό φάσμα του ανέπαφου πέταλου, λόγω της τεράστιας σκέδασης φωτός. Συγκεκριμένα, στο ανέπαφο πέταλο $A_{800} = 0,41$ και $A_{\text{μεγ}} = 1,1$, δηλαδή, σε σύγκριση με τις εκχυλισμένες χρωστικές σε οξυνισμένη μεθανόλη (Φάσμα 1β), $A_{800} = 0,02$ και $A_{\text{μεγ}} = 0,540$, έχει αυξηθεί υπέρμετρα λοιπόν, η A_{800} στο ανέπαφο πέταλο, που είναι ενδεικτικό της πολύ μεγάλης σκέδασης φωτός. Η μεγάλη απορροφητικότητα στα 800 στο φάσμα του ανέπαφου πέταλου δεν μας επιτρέπει καν να αποπειραθούμε να κατασκευάσουμε μια γραμμή μηδενικής απορρόφησης, ως προέκταση της απορρόφησης σε μεγάλο μήκος κύματος, μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για ανέπαφα πέταλα της στην πτυχιακή του Χρήστου Βαενά (Βαενάς 2022). Για να γίνει κάτι τέτοιο χρειάζεται σαφής ύπαρξη σκέδασης φωτός χωρίς ένδειξη απορροφητικότητας, ώστε η προέκταση της καμπύλης σκέδασης (που φαίνεται ως απορρόφηση) να αποτελέσει την γραμμή μηδενικής απορρόφησης για το ελεύθερο σέπαλο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό ανέπαφου σέπαλου μωβ καμπανούλας, ταξινομημένα από λ_{ελάχιστο} (λ_{min}) μέχρι λ_{μέγιστο} (λ_{max}) όπως προκύπτουν από το Φάσμα 3 σε σφαίρα ολοκλήρωσης

	Κοιλάδα 1 A ₁ (λ _{κ1} nm)	Ωμος 1 A _{ωμ1} (λ _{ωμ1} nm)	Δευτερεύουσα κορυφή 1, A _{κ1} , (λ ₁ nm)	Κοιλάδα 2 A ₂ (λ _{κ2} nm)	Κύρια κορυφή A _{κυρ} , (λ _{κυρ} nm)	Κοιλάδα 3 A ₃ (λ _{κ3} nm)	Δευτερεύουσα κορυφή 2, A _{κ2} , (λ ₂ nm)	Ωμος 2 A _{ωμ2} (λ _{ωμ2} , nm)	A ₄₄₀ /A _{μεγ}
Κορυφές			0,687 (537, <u>535</u>)		0,707 (574, <u>567</u>) λ _{max}		0,675 (624, <u>631</u>)	0,409 (700, <u>ΔΥ**</u>)	
Κοιλάδες	0,474 (442, <u>435</u> *) λ _{min}			0,682 (550, <u>542</u>)		0,643 (605, <u>600</u>)			
A_{κυρ}/A_κ			1,03						
Ωμος		0,613 (497, <u>488</u>)							
Ημι-πλάτος ζώνης απορρόφησης, Δλ/2, nm	Πολύ μεγάλο, δεν μπορεί να υπολογιστεί πειραματικά								

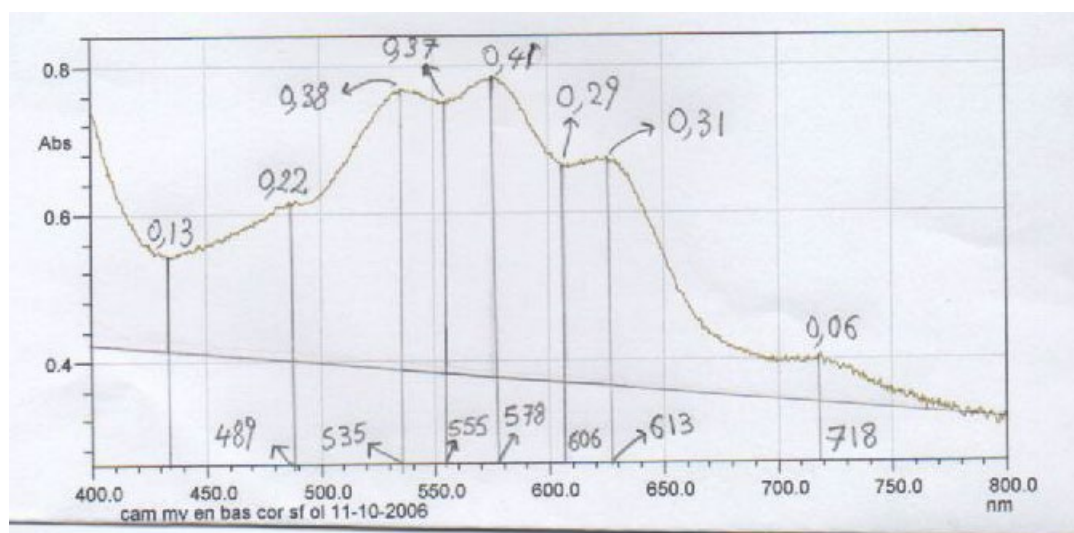
*Η δεύτερη και υπογραμμισμένη τιμή μήκους κύματος αφορά το εκχύλισμα περιφερειακού τμήματος ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, από τον Πίνακα 6.

** ΔΥ: δεν υπάρχει αντίστοιχος ώμος στο εκχύλισμα

Το φάσμα απορρόφησης ανέπαφου πετάλου σε σφαίρα ολοκλήρωσης έχει τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα φάσματος από αντικείμενο που διαχέει το φως: υπολογίσιμη απορρόφηση εκεί που δεν υπάρχει έστω και ουρά ζώνης απορρόφησης (π.χ. 800 nm), συγκεκριμένα, A₈₀₀ = 0,403, ενώ η αντίστοιχη τιμή από το εκχύλισμα στο Φάσμα 1β είναι A₈₀₀ ≈ 0,020, δηλ. 20 φορές μικρότερη με μέγιστο απορρόφησης στη μισή τιμή αυτής από το πέταλο.

Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η εκχύλιση ανθέων καμπανούλας είτε από τη περιφέρεια ή τη βάση του άνθους, σε πυκνό διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης μας δίνει φάσματα απορρόφησης στη περιοχή του ορατού που είναι σχεδόν ταυτόσημα με τα αντίστοιχα του ανέπαφου άνθους, όπως αυτά λαμβάνονται μέσω σφαίρας ολοκλήρωσης.

Επιπλέον, τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού τέτοιων εκχυλισμάτων, έχουν σχήμα που προσομοιάζει προς αυτό των φασμάτων απορρόφησης (κορυφές και κοιλάδες σχεδόν στα ίδια μήκη κύματος) με όλες τις κορυφές να έχουν ίδιας πολικότητας κυκλικό διχρωϊσμό (αρνητικό). Δοκιμάζοντας την ίδια ακριβώς προσέγγιση σε φάσμα περιφέρειας ολόκληρου πετάλου από άνθο καμπανούλας με έντονο χρώμα βλέπουμε ότι η κλίση του φάσματος στη περιοχή 780 – 800 nm που παραπέμπει σε σκέδαση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κατά προσέγγιση γραμμή μηδενικής απορρόφησης, και με βάση αυτή να υπολογιστούν όλες οι τιμές απορροφητικότητας των διάφορων κορυφών και κοιλάδων, καθώς και τα αντίστοιχα μήκη κύματος. Η συγκεκριμένη προσέγγιση μας αποδίδει τιμή $A_{440}/A_{\text{μεγΟρ}} = 0,34$ αρκετά κοντά στην τιμή 0,31 του εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη, που έχει παρόμοιο φάσμα, με παρόμοια αναλογία απορροφητικότητας κορυφών και με παραπλήσιες τιμές $\lambda_{\text{κορ}}$ και $\lambda_{\text{κο}}$ με αυτές του εκχυλίσματος.



Φάσμα 4. Φάσμα απορρόφησης στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) περιφέρειας ανέπαφου σέπαλου μωβ άνθους έντονου χρώματος, της ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε σφαίρα ολοκλήρωσης με διόρθωση σκέδασης φωτός στην γραμμή μηδενικής απορρόφησης, από συλλογή 11^{ης} Οκτωβρίου 2006.

Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της απορρόφησης του συγκεκριμένου πετάλου συνοψίζονται στον Πίνακα 9 και όπως βλέπουμε οι κοιλάδες και οι κορυφές έχουν μήκη κύματος και λόγο απορροφητικότητας που είναι παραπλήσιοι με αυτούς των εκχυλισμάτων. Συνεπώς, η συγκεκριμένη μας προσέγγιση είναι θεμιτή. Η δυνατότητα μετρήσεων στη περιοχή 800 – 900 (προφανώς σε άλλου είδους φασματοφωτόμετρο) θα επέτρεπε ακόμη καλύτερη προσέγγιση ως προς τον προσδιορισμό της γραμμής μηδενικής απορρόφησης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό ανέπαφου σέπαλου μωβ καμπανούλας, ταξινομημένα από λ_{ελάχιστο} (λ_{min}) μέχρι λ_{μέγιστο} (λ_{max}) όπως προκύπτουν από το Φάσμα 4 σε σφαίρα ολοκλήρωσης

	Κοιλάδα 1 $A_1(\lambda_{κ1}\text{nm})$	Ωμος 1 A ($\lambda_{ωμ}\text{nm}$)	Δευτερεύ- ουσα κορυφή 1, $A_{κ1}, (\lambda_1$ $\text{nm})$	Κοιλάδα 2 $A_2(\lambda_{κ2}\text{nm})$	Κύρια κορυφή $A_{κυρ}, (\lambda_{κυρ}$ $\text{nm})$	Κοιλάδα 3 $A_3(\lambda_{κ3}\text{nm})$	Δευτερεύ- ουσα κορυφή 2, $A_{κ2}, (\lambda_2$ $\text{nm})$	Ωμος 2 A ($\lambda_{ωμ2},$ $\text{nm})$	$A_{440}/A_{μεγ}$
Κορυφές			0,38 (535, <u>535</u>)		0,41 (578, <u>567</u>) λ_{max}		0,31 (613, <u>631</u>)	0,06 (718, <u>ΔΥ**</u>)	0,34
Κοιλάδες	0,13 (434, <u>435*</u>) λ_{min}			0,37 (555, <u>542</u>)		0,29 (606, <u>600</u>)			
$A_{κυρ}/A_{κ}$			1,08						
Ωμος		0,22 (489, <u>488</u>)							
Ημι-πλάτος ζώνης απορρόφησης, $\Delta\lambda/2, \text{nm}$	178								

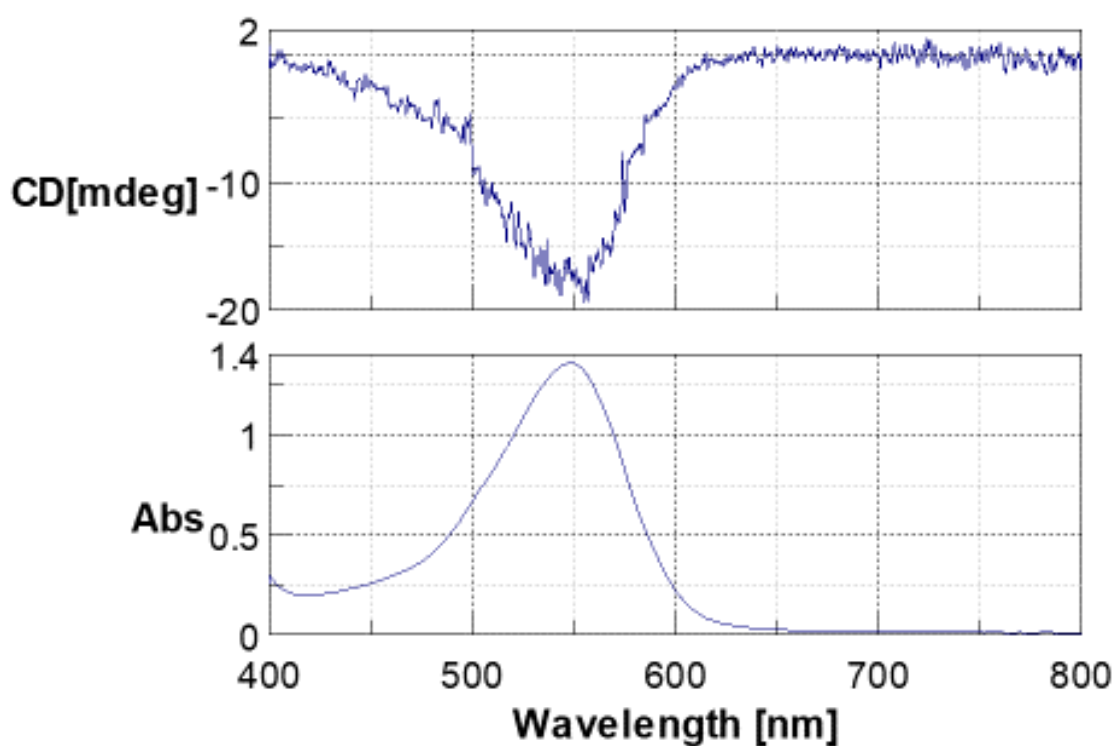
*Η δεύτερη και υπογραμμισμένη τιμή μήκους κύματος αφορά το εκχύλισμα περιφερειακού τμήματος ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, από τον Πίνακα 6.

** ΔΥ: δεν υπάρχει αντίστοιχος ώμος στο εκχύλισμα

B1.1.3 Φάσματα διαδοχικών αραιώσεων

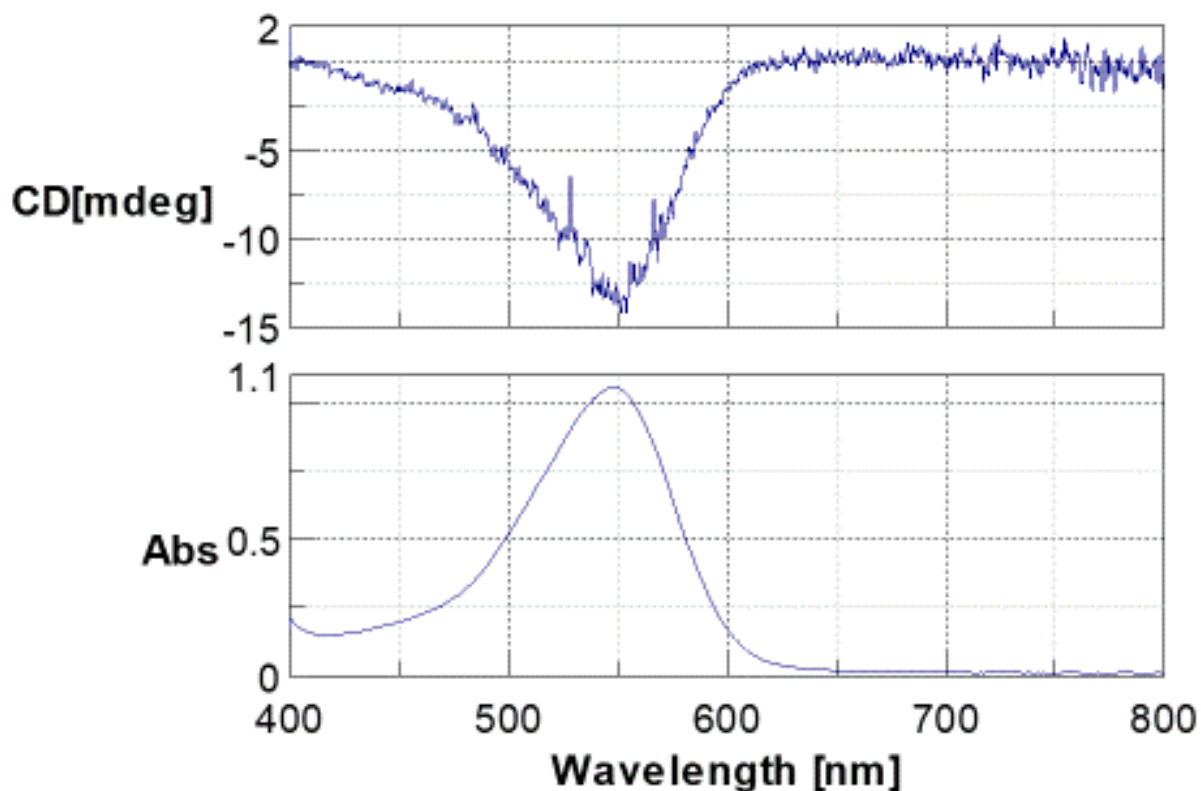
Προχωράμε στη μελέτη των εκχυλισμάτων κάτω από διάφορες συνθήκες αραιώσης, όπου γνωρίζουμε από προηγούμενες μελέτες ότι τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά και το χρώμα, αλλάζουν. Πράγματι, διαπιστώνουμε ότι οι διαδοχικές αραιώσεις εκχυλισμάτων σε οξυνισμένη μεθανόλη αλλάζουν και το χρώμα του εκχυλίσματος (κόκκινο αντί για μπλε-μωβ) και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά (μία κορυφή απορρόφησης περ. στα 550 nm, και αντίστοιχα μια αρνητική κορυφή κυκλικού διχρωϊσμού, με μέγιστο το μέγιστο της απορρόφησης (Φάσματα 4-8). Αυτό συμβαίνει, είτε το εκχύλισμα προέρχεται από την περιφέρεια του άνθους (Φάσματα 5α,β - 9α,β) είτε από το κέντρο (Φάσματα 1α,β, και μη εμφανιζόμενα).

Kampanoula_periphery_acidmeth_dil 1-2_800-400 nm_29-9-06

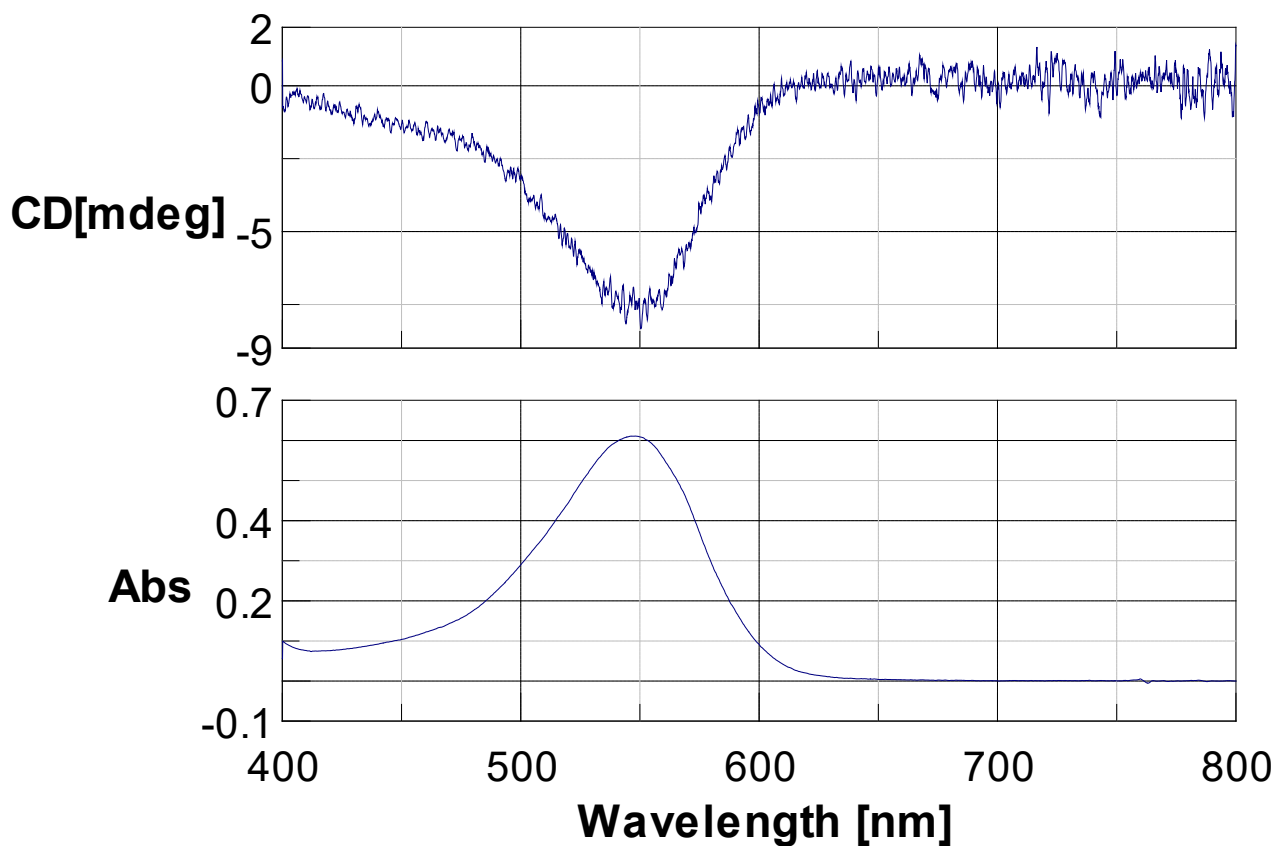


Φάσμα 5α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α, κάτω**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β, πάνω**), στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του περιφερειακού τμήματος μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), αραιωμένου στο 1/2 σε σχέση με το αρχικό διάλυμα, σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 25^{ης} Σεπτεμβρίου 2006. Παρατηρείται και πάλι ταύτιση της μοναδικής κορυφής απορρόφησης με την αντίστοιχη (αρνητική) κορυφή στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg·Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού

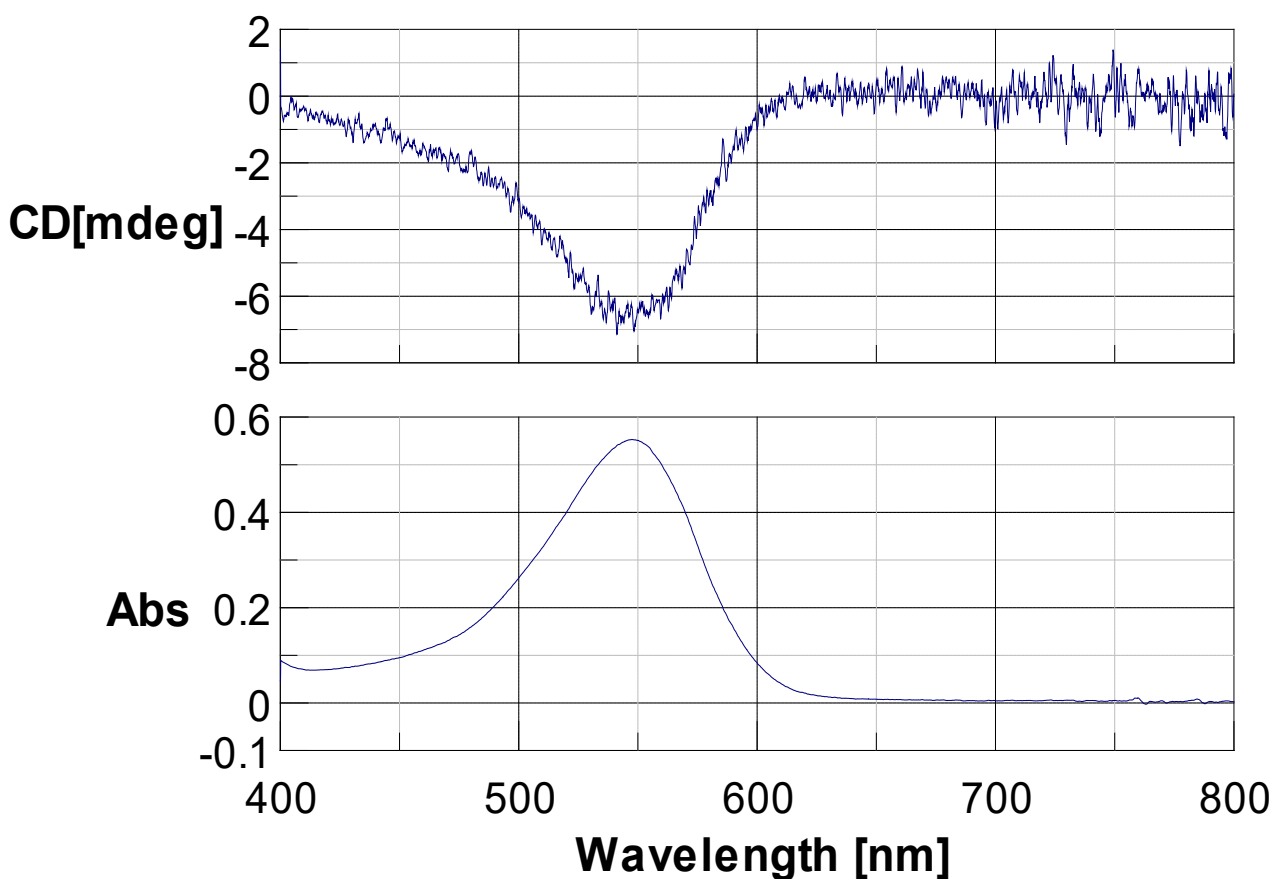
Kampanoula_periphery_acidmeth_dil 1-3_800-400 nm_29-9-06



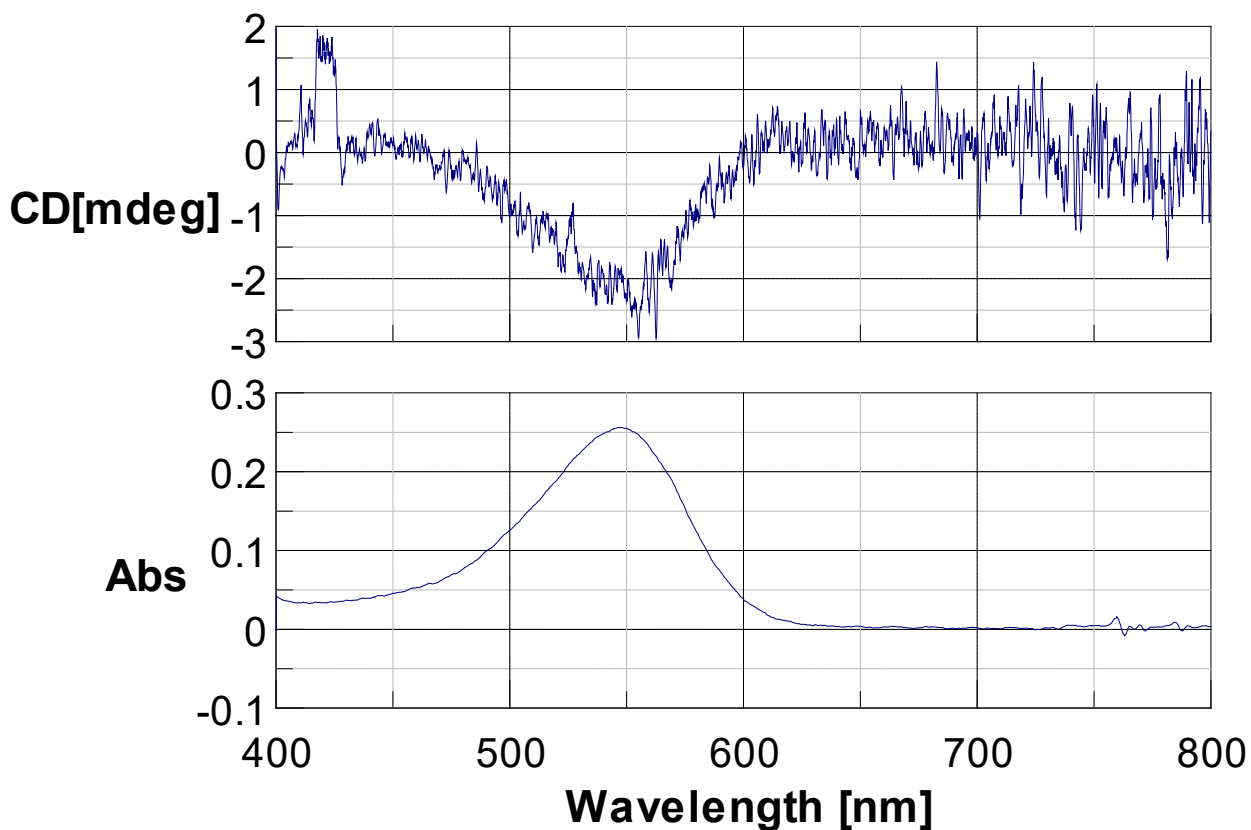
Φάσμα 6α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α, κάτω**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β, πάνω**), στην περιοχή του ορατού φωτός (800–400 nm) εκχυλίσματος του περιφερειακού τμήματος μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), αραιωμένου στο **1/3** σε σχέση με το αρχικό διάλυμα, σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 25^{ης} Σεπτεμβρίου 2006. Παρατηρείται και πάλι ταύτιση της μοναδικής κορυφής απορρόφησης με την αντίστοιχη (αρνητική) κορυφή στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg· Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.



Φάσμα 7α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α, κάτω**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β, πάνω**), στην περιοχή του ορατού φωτός (800–400 nm) εκχυλίσματος του περιφερειακού τμήματος μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), αραιωμένου στο **1/5** σε σχέση με το αρχικό διάλυμα, σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 25^{ης} Σεπτεμβρίου 2006. Παρατηρείται και πάλι ταύτιση της μοναδικής κορυφής απορρόφησης με την αντίστοιχη (αρνητική) κορυφή στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg· Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.



Φάσμα 8α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α, κάτω**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β, πάνω**), στην περιοχή του ορατού φωτός (800–400 nm) εκχυλίσματος του περιφερειακού τμήματος μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), αραιωμένου στο **1/10** σε σχέση με το αρχικό διάλυμα, σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 25^{ης} Σεπτεμβρίου 2006. Παρατηρείται και πάλι ταύτιση της μοναδικής κορυφής απορρόφησης με την αντίστοιχη (αρνητική) κορυφή στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg·Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.



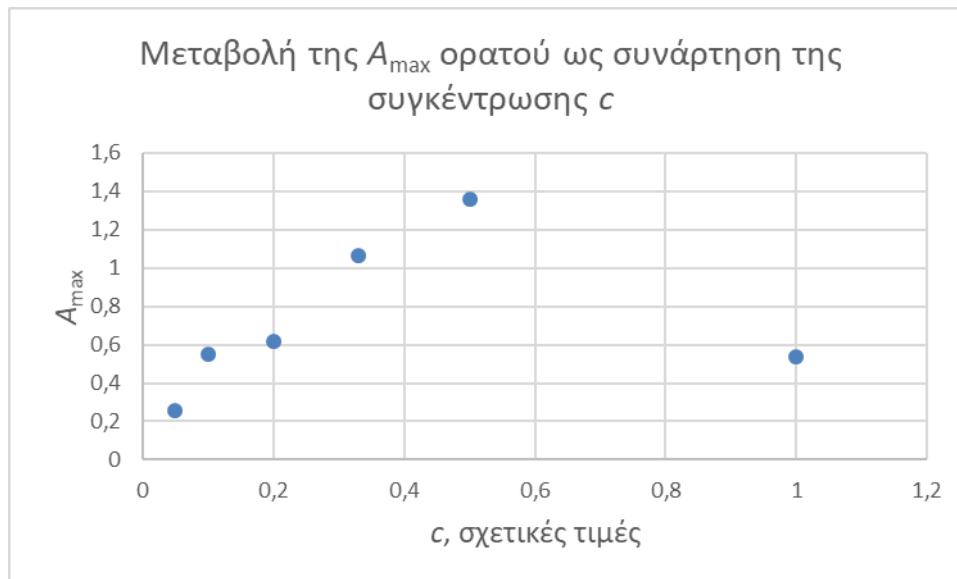
Φάσμα 9α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α, κάτω**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β, πάνω**), στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του περιφερειακού τμήματος μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), αραιωμένου στο **1/20** σε σχέση με το αρχικό διάλυμα, σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης, από συλλογή 25^{ης} Σεπτεμβρίου 2006. Παρατηρείται και πάλι ταύτιση της μοναδικής κορυφής απορρόφησης με την αντίστοιχη (αρνητική) κορυφή στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg· Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.

Συνογίζουμε τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης των διάφορων αραιώσεων του εκχυλίσματος της περιφέρειας του άνθους καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Φασματοσκοπικές παράμετροι μετά από διαδοχικές αραιώσεις εκχυλίσματος μωβ άνθους καμπανούλας (περιφέρεια) σε οξυνισμένη μεθανόλη (Φάσματα (Φ) 1, και 5-9)

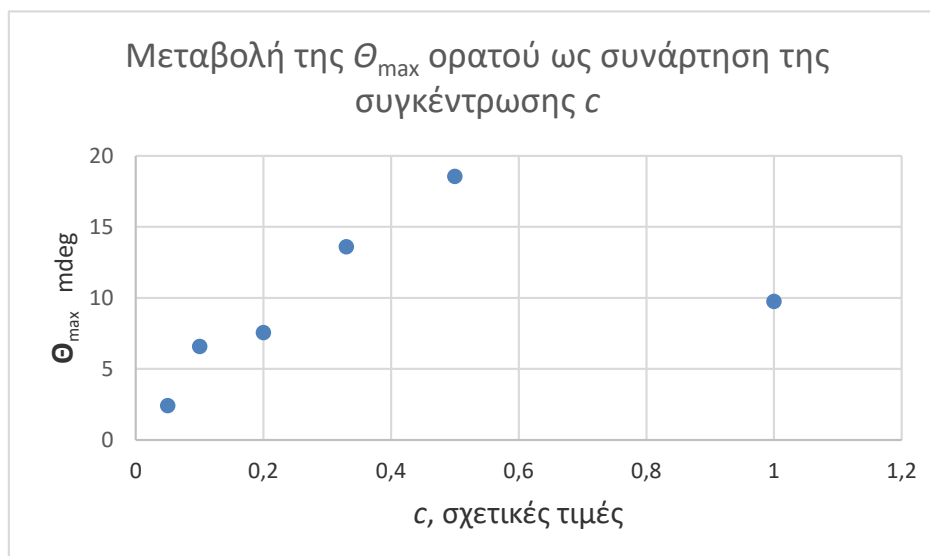
Αραίωση (c) αυθαίρετες τιμές	λ (nm)	$\Delta\lambda/2$ nm	θ, mdeg (nm)	$\Delta\lambda/2$ nm
Μη αραιωμένο (1,0) Φ2	0,50 (535), 0,540 (567), 0,320 (621)	142	-9,19 (535), - 9,75(566), -4,44(617)	103
Αραίωση 1:2 (0,50) Φ4	1,356 (550)	79	- 18,55 (550)	76
“ 1:3 (0,33) Φ5	1,064 (549)	77	- 13,60 (551)	67
« 1:5 (0,20) Φ6	0,620 (547)	74	- 7,56 (547)	73
« 1:10 (0,10) Φ7	0,552 (547)	76	- 6,57 (546)	67
« 1:20 (0.05) Φ8	0,255 (546)	77	- 2,41 (556)	67

Η σημασία των αποτελεσμάτων αυτών φαίνεται καλύτερα στις δύο επόμενες γραφικές παραστάσεις (**Σχήματα 1 και 2**) παρακάτω:



Σχήμα 1: Γραφική παράσταση απορροφητικότητας στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας (περιφέρεια πετάλου) σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης, σε σχετικές τιμές με την αρχική συγκέντρωση να έχει τιμή $c=1,0$. Σημειώνουμε ότι το μη αραιωμένο δείγμα έχει *τριπλή* κορυφή ενώ τα αραιωμένα δείγματα *μονή* κορυφή με πάντα το ίδιο $\lambda_{\text{μεγ}}$, και σχεδόν κωδωνοειδή καμπύλη απορρόφησης (**Φάσματα 1α, 5α – 9α**).

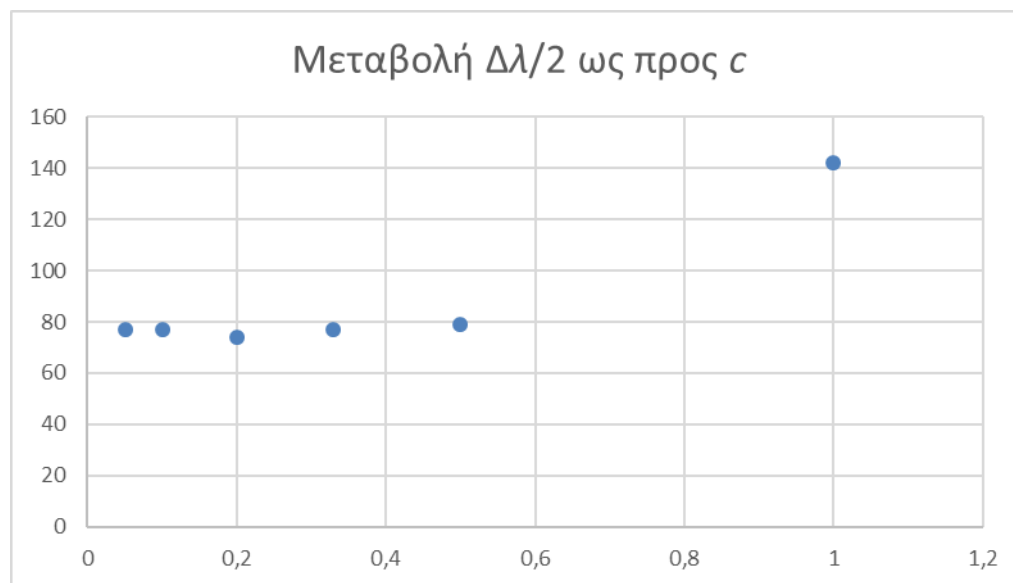
Αντίστοιχα και με την μέγιστη τιμή της ελλειπτικότητας,



Σχήμα 2: Γραφική παράσταση κυκλικού διχρωισμού, $\Theta_{\text{μεγ}}$ στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας (περιφέρεια πετάλου) σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης (**Φάσματα 1β, 5β – 9β**).

Αν στα **Σχήματα 1** και **2** φτιάξουμε την νοητή ευθεία που συνδέει όλα τα σημεία αραιώσης ($c = 0,5$ έως $c = 0,05$), διαπιστώνουμε ότι τα σημεία αυτά και στις δύο περιπτώσεις υπακούουν σε μια ευθεία γραμμή. Συγκεκριμένα, τόσο για την απορροφητικότητα όσο και για την ελλειπτικότητα για αυτές τις αραιώσεις ισχύει ο νόμος των Lambert και Beer. Μάλιστα, αν προεκτείνουμε την νοητή γραμμή της ευθείας αυτής μέχρι την τιμή $c = 1,00$, διαπιστώνουμε ότι αν το μη αραιωμένο δείγμα είχε αντίστοιχα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά (κωδωνοειδής καμπύλη απορρόφησης/κυκλικού διχρωισμού, $\lambda_{\text{μεγ}} = 550 \text{ nm}$), τότε η τιμή απορροφητικότητας και ελλειπτικότητας θα ήταν περίπου τετραπλάσια!

Αντίστοιχα, η μεταβολή του ημι-πλάτους ζώνης, $\Delta\lambda/2$, ως προς την συγκέντρωση c , στα φάσματα απορρόφησης μειώνεται από 142nm σε 74 – 79 nm (**Σχήμα 3**). Παρόμοια μείωση από 103nm σε 67 – 76 nm έχουμε και στο ημι-πλάτος ζώνης των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού (Πίνακας 9).



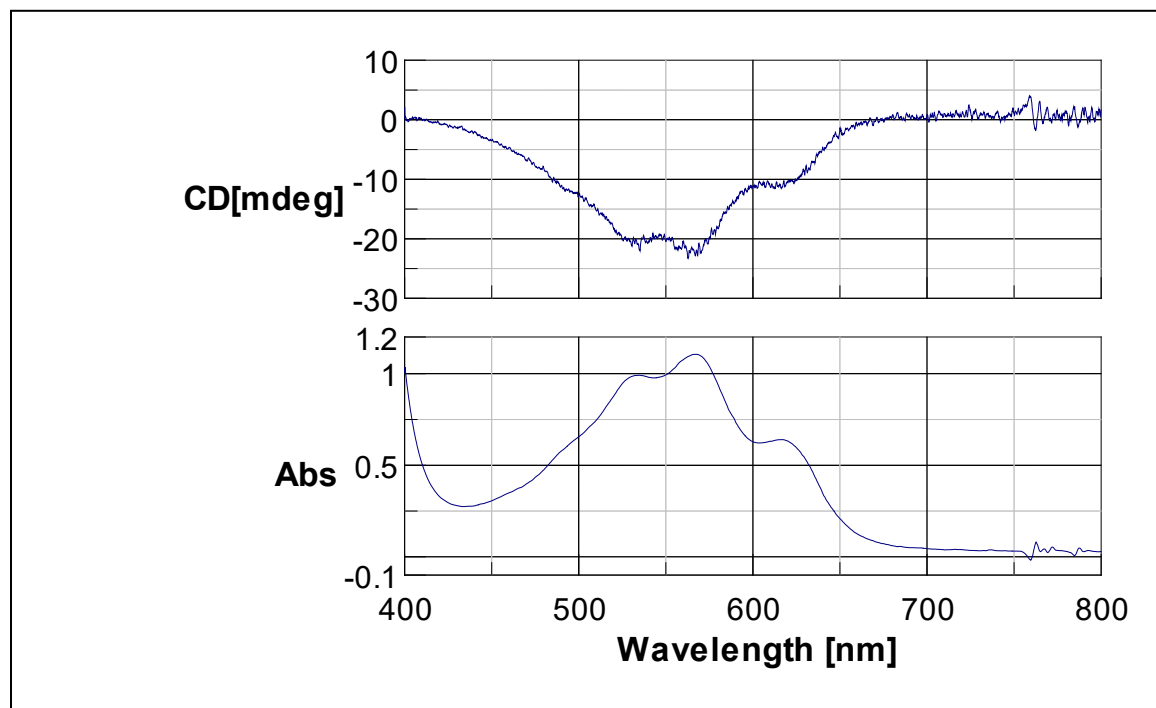
Σχήμα 3: Γραφική παράσταση μεταβολής ημι-πλάτους ζώνης απορρόφησης, $\Delta\lambda/2$, στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας (περιφέρεια πετάλου) σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι σχετικής συγκέντρωσης. Παράλληλη μεταβολή υπάρχει και στο ημι-πλάτος ζώνης κυκλικού διχρωισμού (δεδομένα από Πίνακα 10).

Τα τεκμήρια σε όλα τα φάσματα, τους πίνακες και τα σχήματα συνηγορούν προς ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ χρωστικών στο μη αραιωμένο δείγμα και απότομη απώλεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ των χρωστικών σε περιβάλλον οξυνισμένης μεθανόλης, από αραιώση 1/2 και χαμηλότερα, μέχρις 1/20. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις έχουμε και μετατόπιση του $\lambda_{\text{μεγ}}$ και κωδωνοειδή καμπύλη απορρόφησης, καλή έως πολύ

καλή συμφωνία με τον νόμο Lambert-Beer, με σχεδόν το ίδιο ημι-πλάτος της καμπύλης απορρόφησης/κυκλικού διχρωισμού. Ενώ αρχικά υπήρχε τριπλή κορυφή απορρόφησης/κυκλικού διχρωισμού η αραιώση επιφέρει μείωση/εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των χρωστικών

Συνεπώς, είναι εμφανές ότι στο πυκνό εκχύλισμα με το οποίο ξεκινήσαμε έχουμε ακόμη τις χρωστικές να είναι σε διάταξη τέτοια που επιτρέπει την αλληλεπίδραση και την εμφάνιση του μωβ χρώματος(τριπλή κορυφή, $\lambda_{\text{μεγ}} = 567 \text{ nm}$, Πίνακας 9, **Σχήμα 1**), ενώ οι διαδοχικές αραιώσεις οδηγούν σε μετατόπιση του μέγιστου (550 nm) της απορρόφησης με κόκκινο χρώμα και εμφάνιση μόνο μιας κωδωνοειδούς (Γκαουσσισιάνης) κορυφής, αντί της προηγούμενης τριπλής. Επιπλέον, από την αραιώση 1/2 και μετά (σχετική συγκέντρωση = 0,5) διαπιστώνεται ότι ακολουθείται σε γενικές γραμμές ο νόμος των Lambert-Beer για εξάρτηση της απορροφητικότητας από τη συγκέντρωση. Η ίδια εξάρτηση φαίνεται να ισχύει και στη περίπτωση του κυκλικού διχρωισμού στο ορατό (Πίνακας 9, Σχήμα 2).

Επαναλάβαμε τα συγκεκριμένα πειράματα και σε μια επόμενη συλλογή ανθέων (2 Οκτωβρίου, 2006) όπου και μας προέκυψαν σχεδόν ταυτόσημα αποτελέσματα (**Φάσμα 10α,β**, Πίνακες 10, 11).



Φάσμα 10α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β**), στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του *περιφερικού τμήματος* μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 2^{ας} Οκτωβρίου 2006. Η ταύτιση των κορυφών και κοιλάδων απορρόφησης με αντίστοιχες κορυφές και κοιλάδες στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού, καθώς και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων από διαφορετικές συλλογές ανθέων, είναι

εντυπωσιακή. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg· Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.

Συγκρίνοντας τα δεδομένα στα **Φάσματα 2a** και **9a,β** βλέπουμε ότι ακόμη και στην περίπτωση των αλληλεπιδρώντων χρωστικών (τριπλή κορυφή στα φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού) ισχύει ο νόμος των Lambert και Beer: το δεύτερο φάσμα έχει διπλάσια απορροφητικότητα και αντίστοιχα διπλάσια ελλειπτικότητα (επίσης, Πίνακες 11 και 12).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος
σέπαλου (περιφέρεια) καμπανούλας με έντονη απορρόφηση, ταξινομημένα από λ_{ελάχιστο}
(λ_{min}) μέχρι λ_{μέγιστο} (λ_{max}) όπως προκύπτουν από το Φάσμα 10α**

	Κοιλάδα 1 A ₁ (λ _{κ1} nm)	Ωμος A (λ _{ωμ} nm)	Δευτερεύ- ουσα κορυφή 1, A _{κ1} , (λ ₁ nm)	Κοιλάδα 2 A ₂ (λ _{κ2} nm)	Κύρια κορυφή A _{κυρ} , (λ _{κυρ} nm)	Κοιλάδα 3 A ₃ (λ _{κ3} nm)	Δευτερεύ- ουσα κορυφή 2, A _{κ2} , (λ ₂ nm)	A ₄₄₀ /A _{κυρ}
Κορυφές			0,98 (535)		1,085 (567) λ _{max}		0,53 (631)	0,35
Κοιλάδες	0,260 (435) λ _{min}			0,960 (542)		0,50 (600)		
A_{κυρ}/A_κ			1,11					
Ωμος		0,560 (488)						
Πλάτος ζώνης στο ήμισυ της μέγιστης απορρόφησης , Δλ/2, nm	140							

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό εκχυλίσματος σέπαλου καμπανούλας με έντονη απορρόφηση, ταξινομημένα από λελάχιστο ($\lambda_{\min}$) μέχρι $\lambda_{\max}$ όπως προκύπτουν από το Φάσμα 10β

	Κοιλάδα 1 Θ_1^a ($\lambda_{k1} \text{ nm}$)	Ωμος Θ^a ($\lambda_{\omega \mu} \text{ nm}$)	Δευτερεύ- ουσα κορυφή 1, Θ_{k1}^a , ($\lambda_1 \text{ nm}$)	Κοιλάδα 2 ^β Θ_2^a ($\lambda_{k2} \text{ nm}$)	Κύρια κορυφή $\Theta_{\text{κυρ}}^a$, ($\lambda_{\text{κυρ}} \text{ nm}$)	Κοιλάδα 3 ^β Θ_3^a ($\lambda_{k3} \text{ nm}$)	Δευτερεύ- ουσα κορυφή 2, Θ_{k2}^a , ($\lambda_2 \text{ nm}$)
Κορυφές			– 20,48 (535)		– 22,10 (567) $\lambda_{\max}$		– 7,80 (631)
Κοιλάδες	ΔΥ			– 18,85 (547) ^γ		– 7,48 (606) ^γ	
$\Theta_{\text{κυρ}}/\Theta_k$			1,08				2,83
Ωμος		– 11, 05 (492) ^γ					
Πλάτος ζώνης στο ήμισυ της κορυφής κυκλικού διχρωϊσμού, $\Delta\lambda/2$, nm	105						

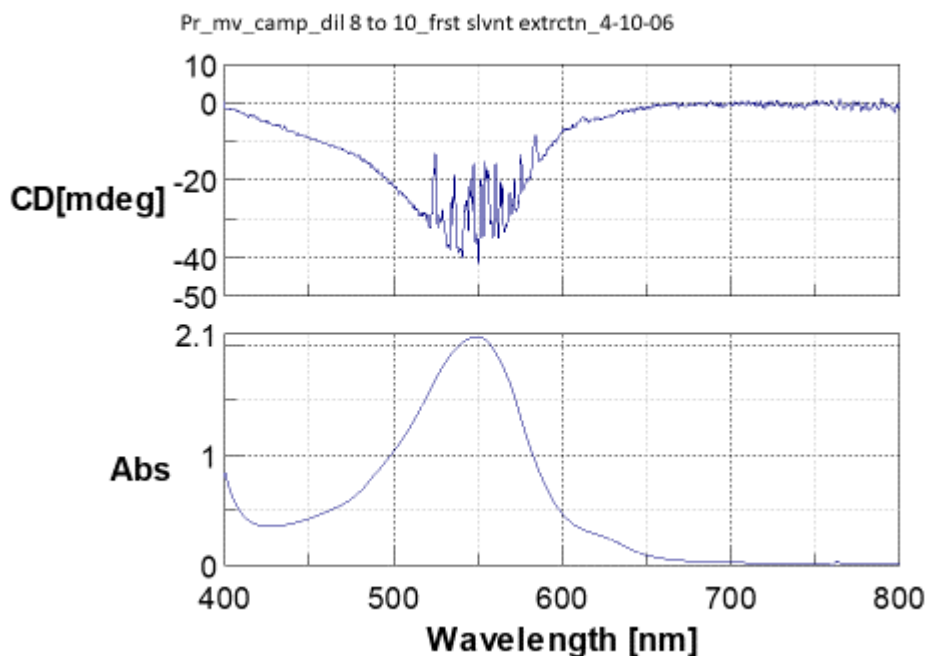
^αΤιμές Θ σε mdeg.

^β Διατηρούνται οι όροι Κοιλάδα 2 και Κοιλάδα 3 ώστε να υπάρχει αντιστοίχιση με το φάσμα απορρόφησης, μια και η διαφορά στο μήκος κύματος είναι μόνο λίγα νανόμετρα, ενώ το γενικό σχήμα του φάσματος είναι πολύ όμοιο με το αντίστοιχο του φάσματος απορρόφησης.

ΔΥ, δεν υπάρχει

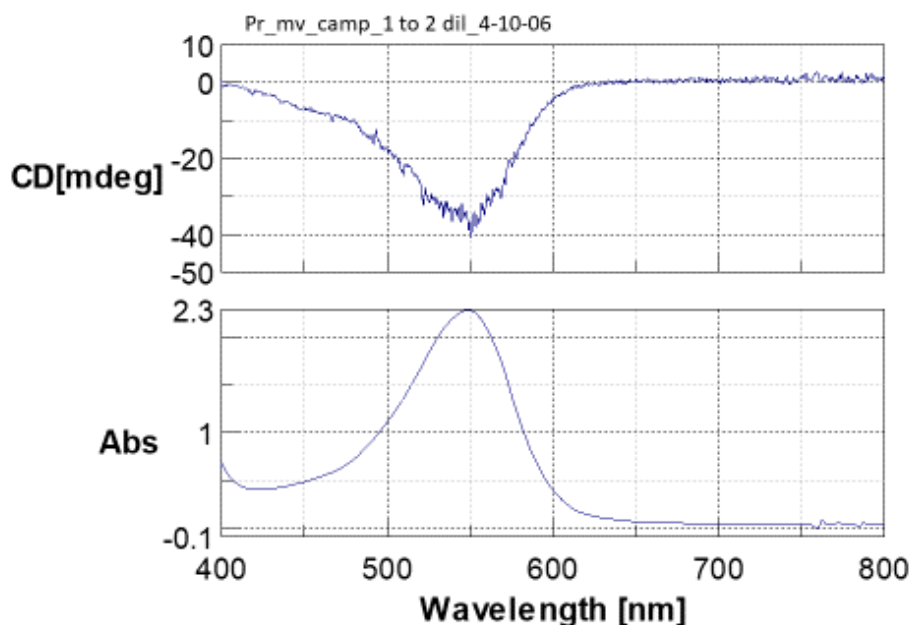
^γΣε πλάγια όλες οι τιμές μήκους κύματος για ώμους και κοιλάδες που διαφέρουν ελαφρώς από τις αντίστοιχες στο φάσμα απορρόφησης.

Η επανάληψη των μετρήσεων σε νέο σκεύασμα (συλλογή 2/10/2006, Πίνακας 5) έδειξε αφ' ενός επαναληψιμότητα στην περίπτωση των αλληλεπιδρώντων χρωστικών (πυκνά εκχυλίσματα). Οι διαδοχικές αραιώσεις 1/2 και 1/4 έδειξαν ότι σε αυτές τις περιπτώσεις οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χρωστικών μειώνονται στο ελάχιστο, αφού πια τα φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωισμού στο ορατό, εμφανίζουν μόνον μία κορυφή (θετική και αρνητική, αντίστοιχα) όπως φαίνεται παρακάτω:



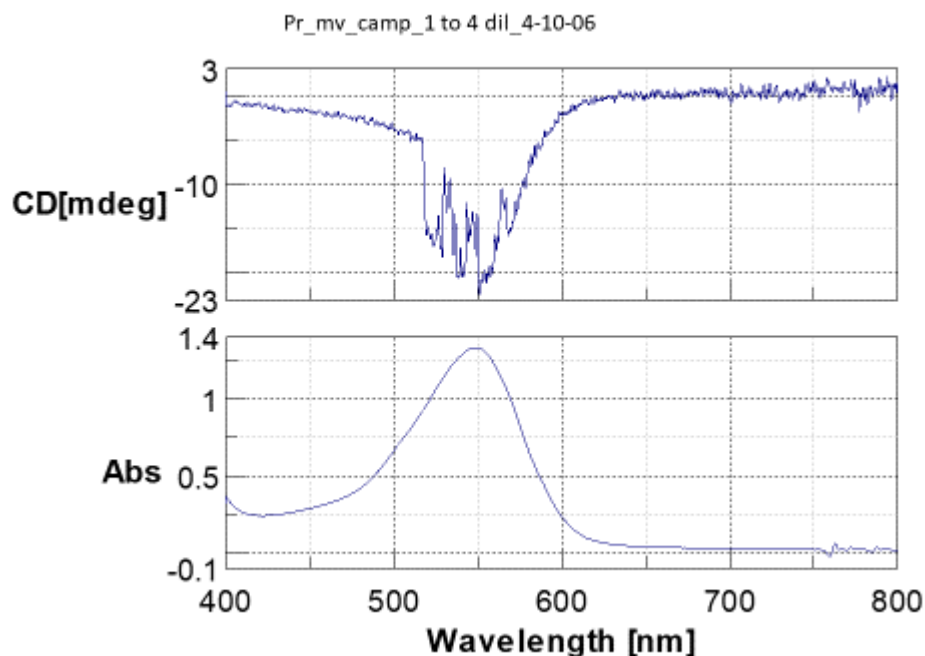
Φάσμα 11α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α, κάτω**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β, πάνω**), στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του *περιφερικού τμήματος* μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 2^{ας} Οκτωβρίου 2006, αραιωμένου **8/10**. Η μεγάλη απορροφητικότητα δεν επιτρέπει την ακριβή καταγραφή του κυκλικού διχρωϊσμού. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg· Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.

Το φάσμα επαναλήφθηκε άλλες τρεις φορές με τα ίδια ουσιαστικά αποτελέσματα. Προφανώς, είμαστε στο μεταίχμιο της μετάβασης από συγκροτημένα σύμπλοκα χρωστικών σε απλές μονάδες. Σε σύγκριση με το **Φάσμα 9α,β** διαπιστώνουμε ότι παρά την αραιώση αυξάνει και η απορροφητικότητα όπως και η ελλειπτικότητα (σχεδόν διπλασιάζονται!). Αυτό είναι συμβατό με την δραστική μείωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των χρωστικών, λόγω της αραιώσης, έστω και μικρής. Συνεχίζοντας με μεγαλύτερες αραιώσεις βλέπουμε την τάση να συνεχίζεται.



Φάσμα 12α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α, κάτω**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β, πάνω**), στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του *περιφερικού τμήματος* μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 2^{ας} Οκτωβρίου 2006, αραιωμένου 1/2. Παρά την μεγάλη απορροφητικότητα καταγραφή του κυκλικού διχρωϊσμού γίνεται με ακρίβεια και λίγο θόρυβο. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg· Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.

Η αραιώση στο 1/2 έφερε διπλασιασμό στην απορροφητικότητα, σε σχέση με το αρχικό δείγμα, και σχεδόν διπλασιασμό στην ελλειπτικότητα. Όμως, όπως και με την προηγούμενη αραιώση 8/10, βλέπουμε τόσο στο φάσμα απορρόφησης όσο σχεδόν και αυτό του κυκλικού διχρωϊσμού, μία και μόνον κωδωνοειδή καμπύλη με κορυφή στα 550 nm. Η ελλειπτικότητα παραμένει αρνητική, όπως και στην προηγούμενη σειρά αραιώσεων (**Φάσματα 4α – 8α**).



Φάσμα 13α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α, κάτω**) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β, πάνω**), στη περιοχή του ορατού φωτός (800 – 400 nm) εκχυλίσματος του *περιφερικού τμήματος* μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης από συλλογή 2^{ας} Οκτωβρίου 2006, αραιωμένου 1/4. Παρά την μεγάλη απορροφητικότητα καταγραφή του κυκλικού διχρωϊσμού γίνεται με ακρίβεια και λίγο θόρυβο. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg· Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.

Η αραιώση 1/4 έφερε περαιτέρω μείωση στην απορρόφηση και την ελλειπτικότητα του διαλύματος: βλέπουμε σαφή μείωση της απορροφητικότητας (όχι ακόμη κατά το πρότυπο των Lambert και Beer) όπως και της ελλειπτικότητας. Τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα απορροφητικότητας και κυκλικού διχρωϊσμού συνοψίζονται στον Πίνακα 12.

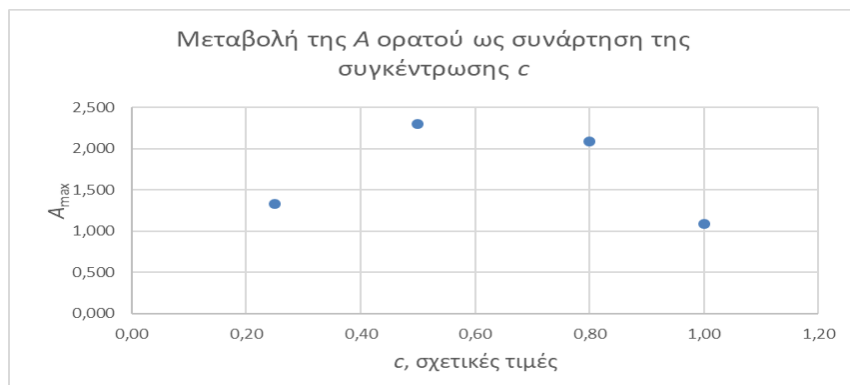
Πίνακας 13: Φασματοσκοπικές παράμετροι μετά από διαδοχικές αραιώσεις εκχυλίσματος μωβ άνθους καμπανούλας (περιφέρεια) σε οξυνισμένη μεθανόλη (Φάσματα (Φ) 9-12)

Αραίωση (c) αυθαίρετες τιμές, Φάσμα	Α _{κορυφών/ής} (λ nm)	Δλ/2 nm	Θ _{κορυφών/ής} mdeg (λnm)	Δλ/2 nm
Μη αραιωμένο (1,0) Φ9	0,98 (535), 1,085 (567), 0,63 (614)	142	-21,30 (535), - 22,70(567), -11,33(614)	103
Αραίωση 8:10 (0,80) Φ10	2,09(550)	82	- 34,60* (550)	93,3
“ 1:2 (0,50) Φ11	2,30 (547)	79	- 38,00 (550)	74
« 1:4 (0,25) Φ12	1,33 (550)	80	- 20,40* (550)	57,3

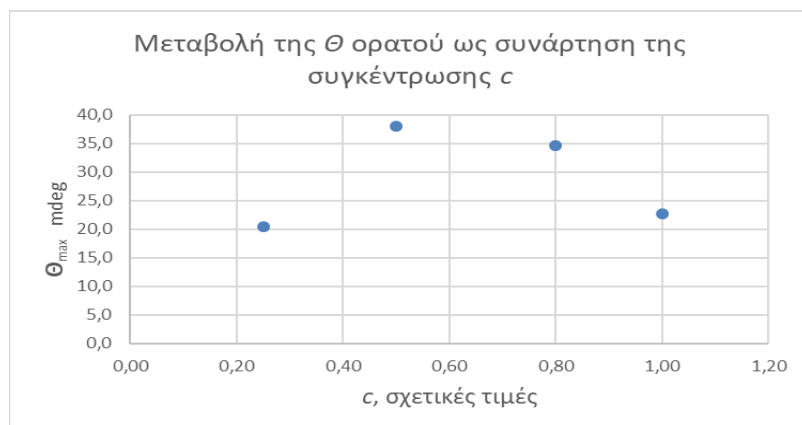
*Τα φάσματα έχουν πολύ θόρυβο, παρά τις επαναλήψεις (3 φορές για την αραιώση 8/10 και μία φορά για την αραιώση 1/4), και οι περισσότερες καμπύλες δεν έχουν κωδωνοειδές σχήμα.

Συνεπώς, και στην επανάληψη βλέπουμε ότι σε πυκνές συγκεντρώσεις τα εκχυλίσματα καμπανούλας διατηρούν τις μεταξύ των χρωστικών αλληλεπιδράσεις και τα φάσματα απορρόφησης (**Φάσματα 1α, 9α**) προσομοιάζουν με αυτό ανέπαφου πετάλου (Φάσματα 3, 4), τριπλή κορυφή στο ορατό κλπ, και το χρώμα του εκχυλίσματος μοιάζει πάρα πολύ με αυτό του ανέπαφου πετάλου (μωβ, πορφυρό). Με τις διαδοχικές αραιώσεις τα φάσματα μεταπίπτουν σε μονο-κωδωνοειδείς καμπύλες με μέγιστο απορρόφησης περί τα 550 nm και δυσανάλογη αύξηση του ε, παρά τις αραιώσεις. Αντίστοιχες μεταβολές παρατηρούνται και στα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού, όπου η τριπλή αρνητική κορυφή αντικαθίσταται από μια μοναδική αρνητική κορυφή, σχεδόν κωδωνοειδή.

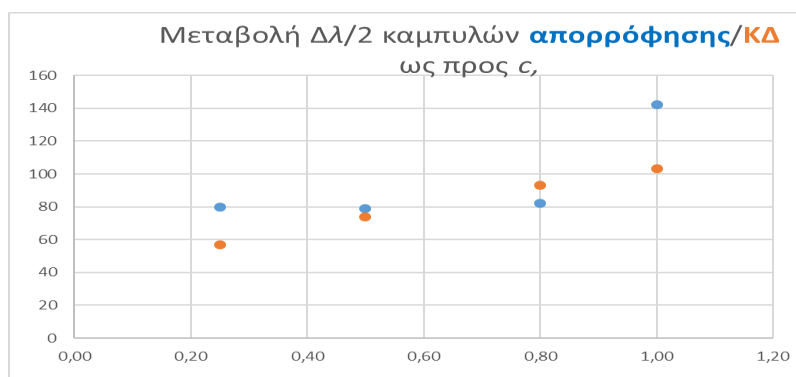
Το χρώμα του εκχυλίσματος μεταπίπτει από πορφυρό-μωβ σε ροζ, ως αντανάκλαση αυτών των μεταβολών που μειώνουν δραστικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χρωστικών. Οι γραφικές παραστάσεις A προς c , Θ προς c και $\Delta\lambda/2$ προς c απεικονίζουν γλαφυρά την ομοιότητα του φαινομένου της αραιώσης του εκχυλίσματος της δεύτερης συλλογής με αυτό της πρώτης. Επειδή έχουμε μια ενδιάμεση αραιώση (8/10), συνεπώς πιο πυκνό εκχύλισμα από την αραιώση 1/2, παρατηρούμε ότι τόσο στα χαρακτηριστικά της απορρόφησης και του κυκλικού διχρωϊσμού, η αραιώση 8/10 είναι ενδιάμεση, ούτε αλληλεπίδραση μεταξύ χρωστικών όπως στο μη αραιωμένο δείγμα, αλλά ούτε και απουσία αλληλεπίδρασης όπως στα δείγματα αραιώσης 1/2 και 1/4 (Σχήματα 4-6).



Σχήμα 4: Γραφική παράσταση απορροφητικότητας στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας (περιφέρεια πετάλου) σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης, σε σχετικές τιμές με την αρχική συγκέντρωση να έχει τιμή $c = 1,0$ (Συλλογή 02/10/2006). Σημειώνουμε ότι το μη αραιωμένο δείγμα έχει *τριπλή* κορυφή ενώ τα αραιωμένα δείγματα *μονή* κορυφή με πάντα το ίδιο $\lambda_{\text{μεγ}}$, και σχεδόν κωδωνοειδή καμπύλη απορρόφησης (**Φάσματα 10αβ – 13αβ**).



Σχήμα 5: Γραφική παράσταση κυκλικού διχρωισμού, $\theta_{\text{μεγ}}$ στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας (περιφέρεια πετάλου) σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης (Συλλογή 02/10/2006, **Φάσματα 1β, 5β – 9β**).



Σχήμα 6: Γραφική παράσταση μεταβολής ημι-πλάτους ζώνης **απορρόφησης** και **κυκλικού διχρωισμού**, $\Delta\lambda/2$, στο ορατό εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας (περιφέρεια πετάλου) σε οξυνισμένη μεθανόλη, έναντι συγκέντρωσης (Συλλογή 02/10/2006, δεδομένα από Πίνακα 13).

B2. Φάσματα ανέπαφου πετάλου

Στα **Φάσματα 3** και **4** είδαμε ήδη πώς είναι δύο φάσματα ανέπαφου πετάλου ποικιλόχρωμης καμπανούλας στο ορατό φως σε σφαίρα ολοκλήρωσης του φασματοφωτομέτρου. Τώρα θα εξετάσουμε συστηματικά αυτό το φαινόμενο, παραθέτοντας φάσματα τόσο από το κέντρο όσο και από την περιφέρεια του πετάλου, στο διάστημα των τριών σχεδόν μηνών παρακολούθησης ανθέων καμπανούλας (Πίνακας 14).

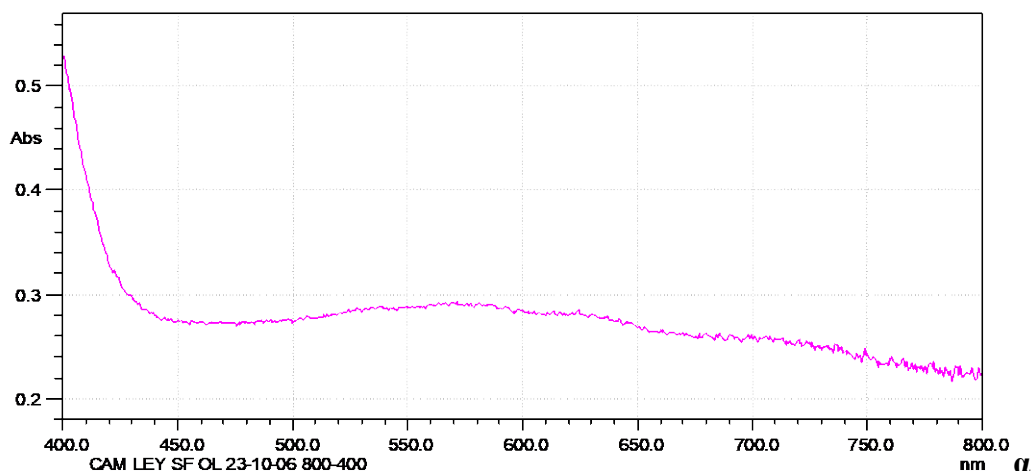
Πίνακας 14. Κατάλογος φασμάτων ανέπαφου πετάλου καμπανούλας

Ημερομηνία συλλογής/λήψης φάσματος	Κέντρο/περιφέρεια πετάλου, Φάσμα	Αχνό ή έντονο χρώμα πετάλου, μωβ/λευκό	Φάσμα ορατού, χαρακτηριστικά	Φάσμα υπεριώδους, χαρακτηριστικά
11-10-2006	Περιφέρεια, Φ4	Έντονο μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	ΔΕ ^α
20-10-2006	Περιφέρεια, Φ15	Έντονο μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	ΔΕ ^α
20-10-2006	Περιφέρεια, Φ16	Αχνό μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	ΔΕ ^α
23-10-2006	Περιφέρεια, Φ3	Έντονο μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	Υψηλή συνεχής απορρόφηση, 360-250 nm
23-10-2006/ 27-10-2006	Περιφέρεια, Φ17	Έντονο μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	ΔΕ ^α
23-10-2006/ 27-10-2006	Περιφέρεια, Φ18αβ	Αχνό μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	Υψηλή συνεχής απορρόφηση, 360-250 nm
29-11-2006	Περιφέρεια, ΔΠ^β	Έντονο μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	«
30-11-2006	Περιφέρεια, ΔΠ^β	Έντονο μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	«
01-12-2006	Περιφέρεια, ΔΠ^β	Έντονο μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	ΔΕ ^α
05-12-2006	Περιφέρεια, ΔΠ^β	Έντονο μωβ	Τριπλή κορυφή, σκέδαση	ΔΕ ^α
23-10-2006	Περιφέρεια, Φ14αβ	Λευκό	Πολύ μικρή απορρόφηση, τριπλή κορυφή σχεδόν αδιάκριτη, σκέδαση	Υψηλή συνεχής απορρόφηση, 360-250 nm

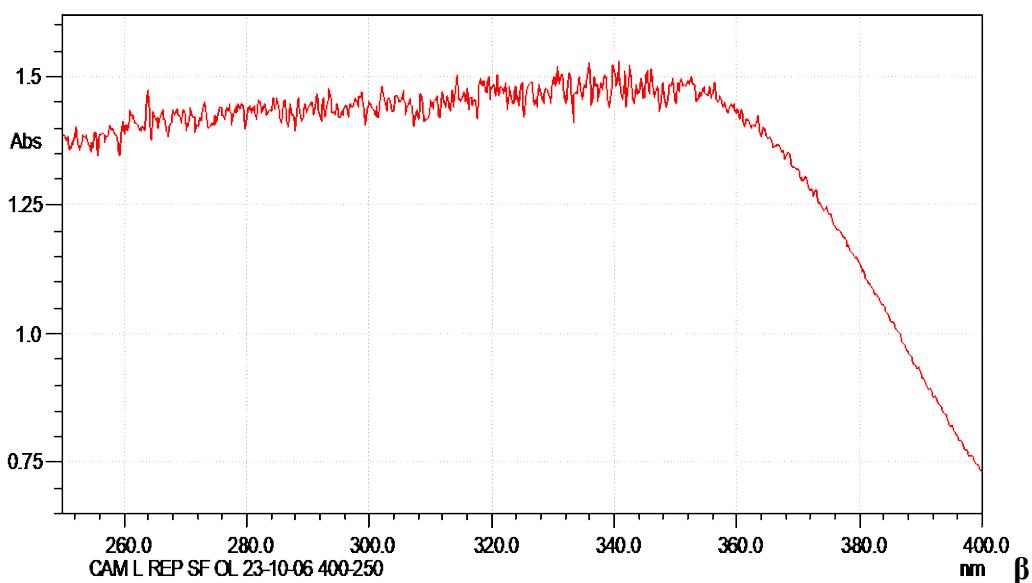
α: Δεν έγινε

β: Δεν παρουσιάζεται

Αρχίζουμε με τα φάσματα άνθους λευκής καμπανούλας, όπου τα άνθη είναι λευκά εκτός από μια μικρή βάση με έντονο μωβ χρώμα (Εικόνες 2 και 3).



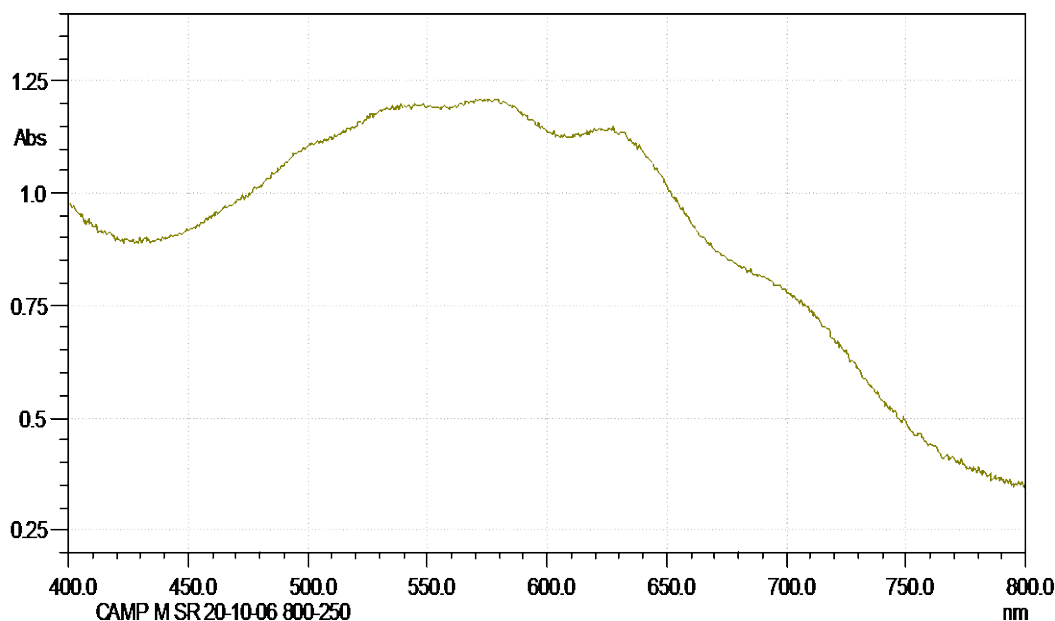
α



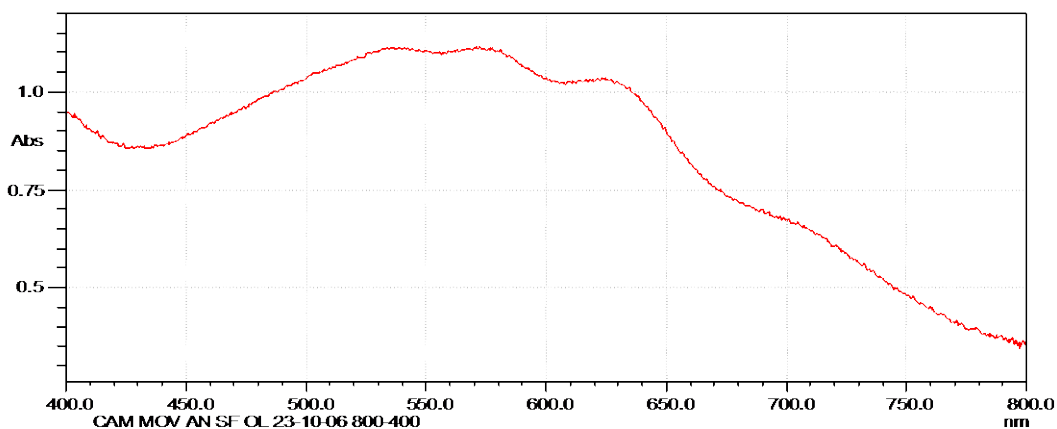
β.

Φάσμα 14αβ. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) α, και υπεριώδες (400-250 nm) β, περιφέρειας ανέπαφου πέταλου λευκού άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 23/10/2006.

Διαπιστώνουμε ότι η περιφέρεια του πετάλου της λευκής καμπανούλας έχει μια πολύ μικρή απορροφητικότητα στο ορατό, με το φάσμα να παραπέμπει στις τρεις κορυφές, όπως και στα φάσματα πετάλων μωβ ανθέων (Φάσματα 3, 4). Όμως αυτή η απορροφητικότητα προφανώς είναι πολύ μικρή ($A_{\text{μεγ}} \sim 0,05 = 0,29 - 0,24$), μια και η σκέδαση του φωτός είναι αξιοσημείωτη ($A_{800} = 0,23$). Αντίθετα, η απορροφητικότητα του πετάλου στο υπεριώδες είναι πολύ έντονη: σημειώνεται άνοδος από τα 440 nm μέχρι τα 360 nm και στη συνέχεια η απορροφητικότητα παραμένει υψηλή, χωρίς ευδιάκριτες κορυφές ή κοιλάδες (Φάσμα 14αβ). Η απορροφητικότητα στο υπεριώδες ανέπαφου πετάλου δεν οφείλεται μόνον στις χρωστικές, γιατί το ανέπαφο πέταλο είναι ιστός, δηλ. αποτελείται από κύτταρα, οπότε περιέχει και όλα τα άλλα κυτταρικά συστατικά, αρκετά εκ των οποίων έχουν αξιοσημείωτη απορρόφηση υπεριώδους φωτός, όπως το DNA των χρωμοσωμάτων, η κυτταρίνη του κυτταρικού τοιχώματος κ.α.



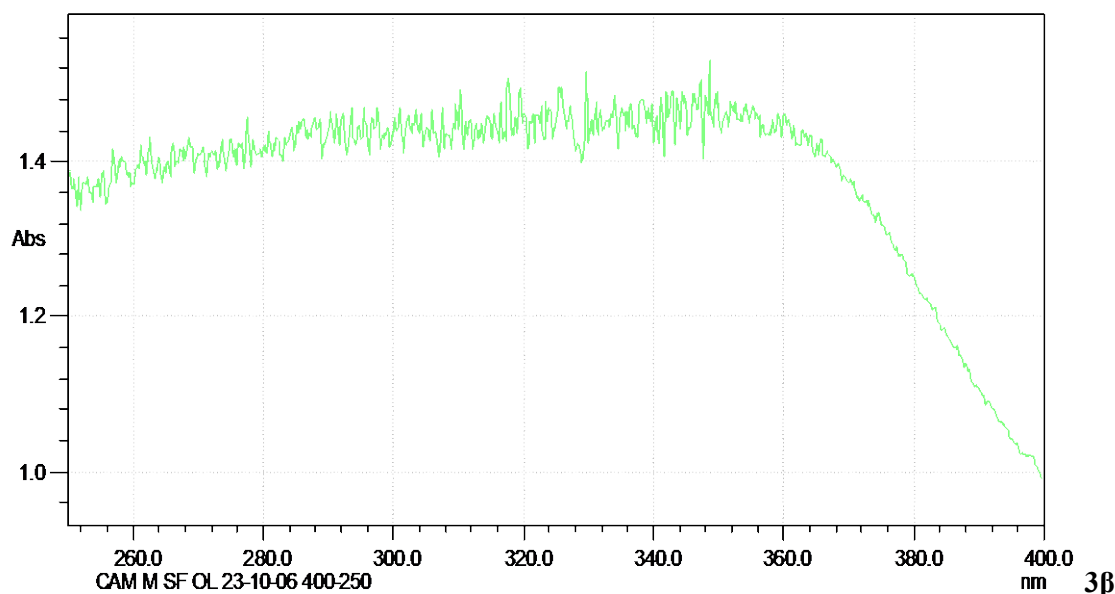
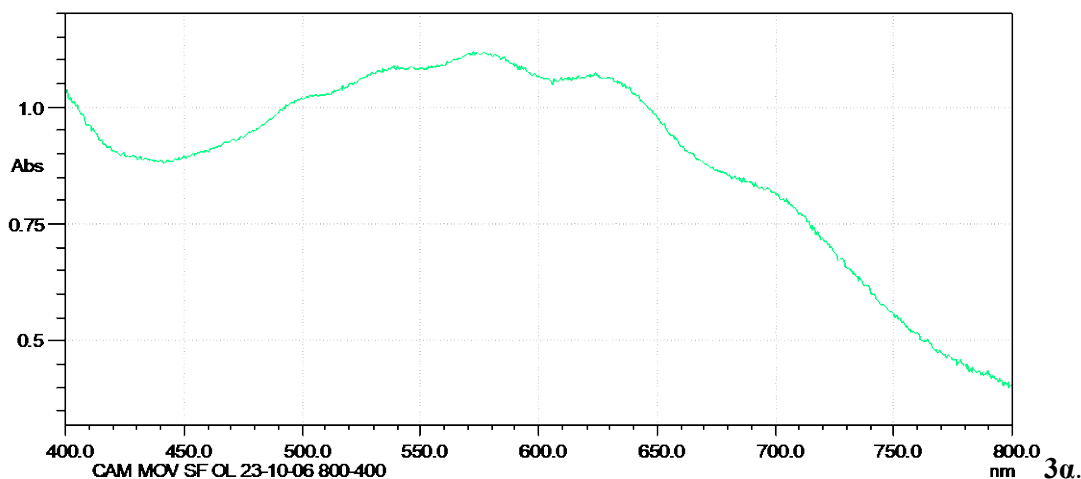
Φάσμα 15α. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) *α*, περιφέρειας *ανέπαφου σέπαλου έντονου* μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης συλλογή 20/10/2006. Τα χαρακτηριστικά της καμπύλης απορρόφησης διατηρούνται και είναι παρόμοια με αυτά πυκνών εκχυλισμάτων σε οξυνισμένη μεθανόλη.



Φάσμα 16α. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) *α*, περιφέρειας *ανέπαφου σέπαλου αχνού* μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης συλλογή 20/10/2006. Τα χαρακτηριστικά της καμπύλης απορρόφησης διατηρούνται και είναι παρόμοια με αυτά πυκνών εκχυλισμάτων σε οξυνισμένη μεθανόλη.

Η διαφορά στην απορρόφηση φωτός μεταξύ του έντονου και του αχνού σέπαλου φαίνεται απατηλά μικρή, αλλά πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν ότι στα έντονα πέταλα τα πολλά χυμοτόπια από στοιβάδες κυττάρων δημιουργούν φαινόμενο «σκίασης» αυτών που βρίσκονται στις τελευταίες στοιβάδες, δηλ. το προσπίπτον φως θα φτάσει σε αυτά αφού διαπεράσει όλα τα υπόλοιπα στρώματα κυττάρων με χυμοτόπια.

Εξετάζουμε τώρα ένα σέπαλο με έντονο χρώμα καταγράφοντας το φάσμα του στο ορατό και το υπεριώδες:

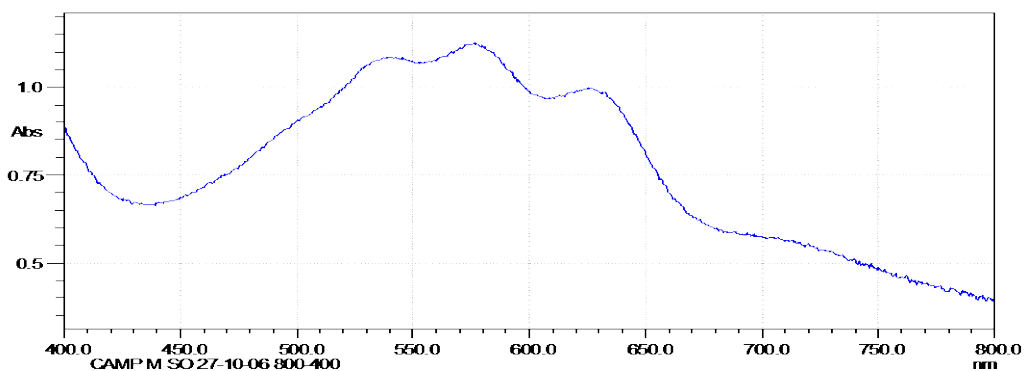


Φάσμα 3αβ. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) **α**, και υπεριώδες (400-250 nm) **β**, περιφέρειας *ανέπαφου σέπαλου έντονου μωβ άνθους* ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 23/10/2006. Τα χαρακτηριστικά της καμπύλης απορρόφησης στο ορατό διατηρούνται και είναι παρόμοια με αυτά πυκνών εκχυλισμάτων σε οξυνισμένη μεθανόλη.

Διαπιστώνουμε πάλι παρόμοιο φάσμα στο ορατό με αυτό άλλων έντονων και αχνά χρωματισμένων σεπάλων, αλλά και μεγάλη ομοιότητα στο φάσμα του υπεριώδους, με αυτό λευκού σέπαλου! Ο λόγος είναι η περιεκτικότητα και σε άλλες ουσίες πέρα από τις χρωστικές, οι οποίες και απορροφούν στο υπεριώδες, όπως DNA, κυτταρίνη κ.α.

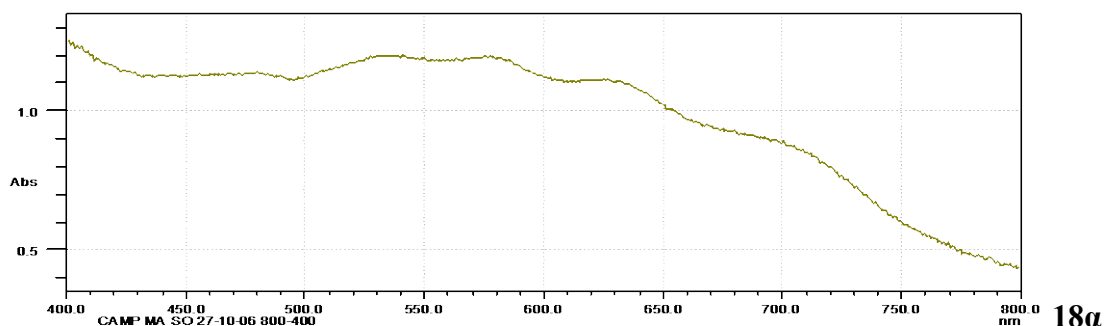
Θα συγκρίνουμε τώρα τα φάσματα, τα οποία καταγράφηκαν την ίδια ημέρα, από δύο σέπαλα το ένα με έντονο και το άλλο με αχνό μωβ χρώμα. Στο **Φάσμα 17** βλέπουμε τις πολύ ευδιάκριτες κορυφές και κοιλάδες, ακόμη και τον «ώμο» στα περ. 495 nm και το ελάχιστο στα

440 nm (η καμπύλη απορρόφησης δεν έχει διορθωθεί για την έντονη σκέδαση φωτός, $A_{800} \sim 0,390$). Οι ομοιότητες με το πυκνό εκχύλισμα μωβ ανθέων σε οξυνισμένη μεθανόλη, αναφορικά με τις κορυφές, κοιλάδες και ώμους είναι πάρα πολύ μεγάλες!

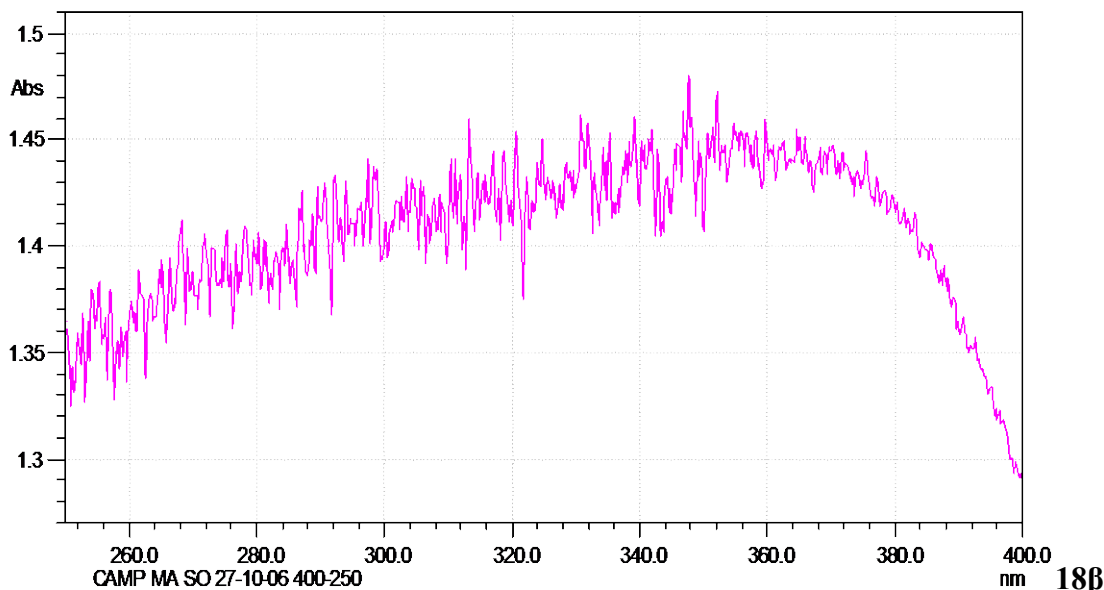


Φάσμα 17. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) περιφέρειας ανέπαφου σέπαλου έντονου μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης συλλογή 27/10/2006. Τα χαρακτηριστικά της καμπύλης απορρόφησης στο ορατό διατηρούνται και είναι παρόμοια με αυτά πυκνών εκχυλισμάτων σε οξυνισμένη μεθανόλη.

Εξετάζοντας στη συνέχεια το φάσμα αχνού μωβ σέπαλου, διαπιστώνουμε ότι όντως και πάλι στο ορατό μέρος διακρίνουμε τις κορυφές και κοιλάδες που είδαμε και στο πυκνό εκχύλισμα σε οξυνισμένη μεθανόλη (**Φάσματα 1, 2**). Με τη διαφορά ότι το μέγεθος των κορυφών (αφού διορθώσουμε έστω και νοητά για την σκέδαση του φωτός) είναι μικρότερο ($A_{800} \sim 0,43$, **Φάσμα 18α**). Στην υπεριώδη περιοχή βλέπουμε πάλι τα ίδια χαρακτηριστικά του φάσματος: άνοδο της απορροφητικότητας από τα 440 μέχρι τα 360 nm, και στη συνέχεια μια ελάχιστη πτώση στην ήδη υψηλή απορροφητικότητα (**Φάσμα 18β**).

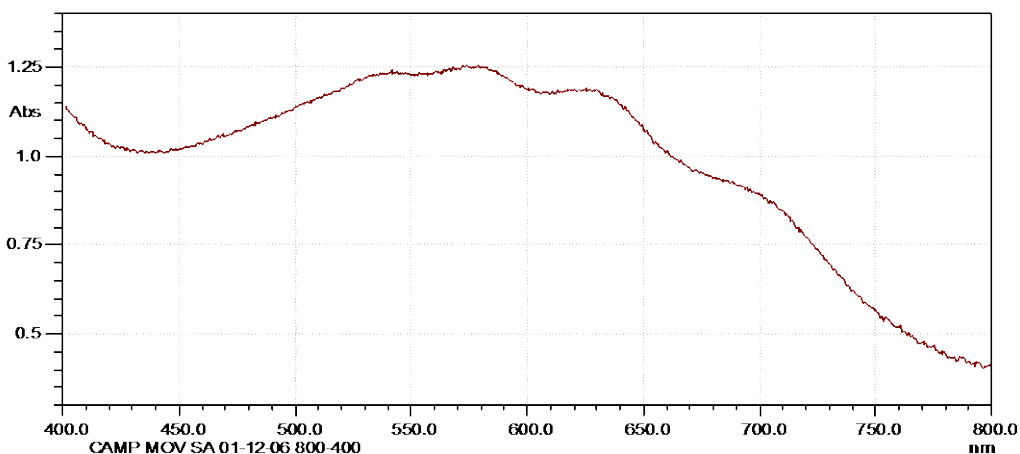


Φάσμα 18α. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) **α**, περιφέρειας ανέπαφου σέπαλου αχνού μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 27/10/2006.



Φάσμα 18β. Φάσμα απορρόφησης στο και υπεριώδες (400-250 nm) περιφέρειας ανέπαφου σέπαλου αχνού μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 27/10/2006.

Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του φάσματος στο ορατό διατηρούνται και στις τελευταίες συλλογές ανθέων που έγιναν στα τέλη Νοεμβρίου και αρχές Δεκεμβρίου (τελευταία περίοδος άνθησης καμπανούλας στις συγκεκριμένες περιοχές συλλογής). Παρουσιάζουμε ένα από τα φάσματα (19α) που λήφθηκαν στην περίοδο 29/11 έως 5/12/2006, το οποίο είναι και τυπικό όλων αυτών, ενώ παράλληλα τόσο αυτό όσο και τα υπόλοιπα μοιάζουν κατά πολύ με τα φάσματα ανέπαφων πετάλων από προηγούμενες συλλογές αυτής της περιόδου, όπως παρουσιάστηκαν στα πορηγούμενα φάσματα.



Φάσμα 19α. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό (800 – 400 nm) περιφέρειας ανέπαφου σέπαλου έντονου μωβ άνθους ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης, συλλογή 01/12/2006. Τα

χαρακτηριστικά της καμπύλης απορρόφησης στο ορατό διατηρούνται και είναι παρόμοια με αυτά πυκνών εκχυλισμάτων σε οξυνισμένη μεθανόλη.

Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι τα φάσματα ανέπαφων σεπάλων, είτε με αχνό είτε με έντονο μωβ χρώμα, στο μεν ορατό δείχνουν τις τρεις χαρακτηριστικές κορυφές, τις κοιλάδες και τους ώμους, που έχουμε ήδη παρατηρήσει στα πυκνά εκχυλίσματα οξυνισμένης μεθανόλης. Το σέπαλο λευκής καμπανούλας δείχνει μικρή παρουσία μωβ χρωστικής, που δεν φαίνεται με το γυμνό μάτι. Στην περιοχή του υπεριώδους όλα τα φάσματα δείχνουν το ίδιο βασικό μοτίβο: άνοδο της απορρόφησης 440 – 360 nm και στη συνέχεια ουσιαστικά διατήρηση της υψηλής απορροφητικότητας 360 – 250 nm με ελαφρώς φθίνουσες τιμές. Επειδή δεν υπάρχει αξιόπιστος τρόπος υπολογισμού της σκέδασης φωτός σε ανέπαφα σέπαλα στο υπεριώδες φως, αναφέρουμε τον λόγο των τιμών μέγιστης απορρόφησης ορατού και υπεριώδους χωρίς αυτή την διόρθωση (Πίνακας 15).

Πίνακας 15. Λόγοι μέγιστης απορρόφησης υπεριώδους/ορατό σε ανέπαφα σέπαλα καμπανούλας

Χρώμα πετάλου	Φάσμα, ημερομ.	$A_{\text{μεγUV}}/A_{\text{μεγOp}}$	Θόρυβος στην απορρόφηση UV
Λευκό, περιφέρειας	14αβ, 23-10-06	5,09	~ 6 %
Έντονο μωβ περιφέρειας	3αβ, 23-10-06	1,34	~ 5,7 %
Αχνό μωβ περιφέρειας	18αβ, 27-10-06	1,19	~ 5,1 %

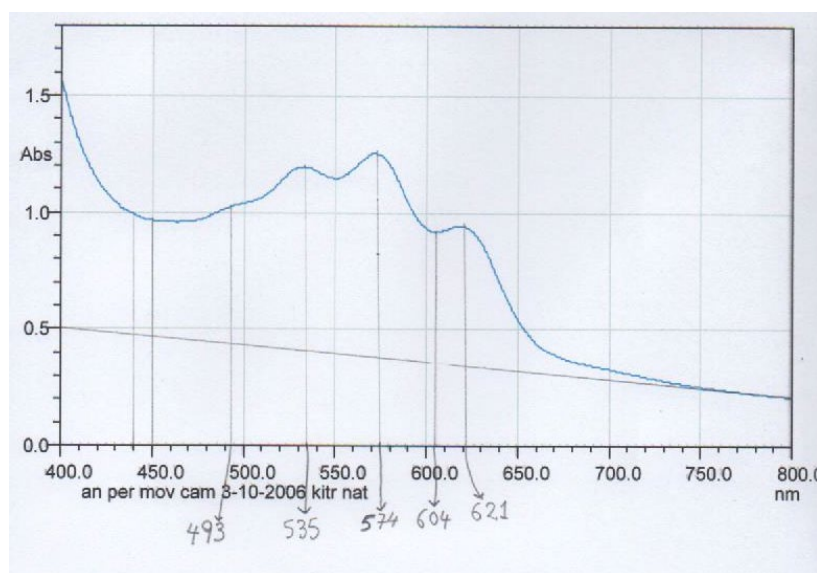
Οι τιμές ανέπαφων πετάλων θα πρέπει να συγκριθούν με αυτές εκχυλισμάτων μωβ και λευκών ανθέων καμπανούλας (βλ. 3Γ.), ώστε να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα.

Τα μέχρι τώρα φάσματα εκχυλισμάτων σεπάλων σε οξυνισμένη μεθανόλη καθώς και ολόκληρων ανέπαφων σεπάλων, μας οδήγησαν στο να εξετάσουμε εκχυλισμένα σέπαλα σε κάποιο υδατικό διάλυμα, και σε περιβάλλον ώστε να προσομοιάζουν προς αυτό του χυμοτοπίου.
B3. Φάσματα απορρόφησης σε κιτρικό νάτριο

Επιλέξαμε το διάλυμα κιτρικού νατρίου, pH = 6,0, επειδή είναι απλό στην παρασκευή και προσομοιάζει προς τις συνθήκες εντός του χυμοτοπίου (Yoshida και συν., 2009). Υπάρχει πάντα ο κίνδυνος το κιτρικό οξύ να μπορεί να αποδεσμεύσει τυχόν μεταλλικά κατιόντα που είναι προσδεδεμένα στο σύμπλοκο των χρωστικών. Αυτό όμως εκ των πραγμάτων αποδείχθηκε ότι δεν συμβαίνει γιατί η εκχύλιση σε κιτρικό νάτριο δεν αλλοίωσε το χρώμα του εκχυλίσματος, σε σχέση με αυτό του ανέπαφου σεπάλου. Έγιναν εκχυλίσσεις σε κιτρικό νάτριο, pH = 6,0, τόσο από την περιφέρεια όσο και από το κέντρο μωβ και λευκών ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας.

Ξεκινώντας με εκχυλίσματα περιφέρειας μωβ ανθέων σε κιτρικό νάτριο, διαπιστώνουμε ότι το φάσμα απορρόφησης ορατού διατηρεί σχεδόν όλα τα χαρακτηριστικά του φάσματος που παρατηρούνται σε ανέπαφο σέπαλο μωβ περιφέρειας άνθους καμπανούλας (**Φάσμα 20**,

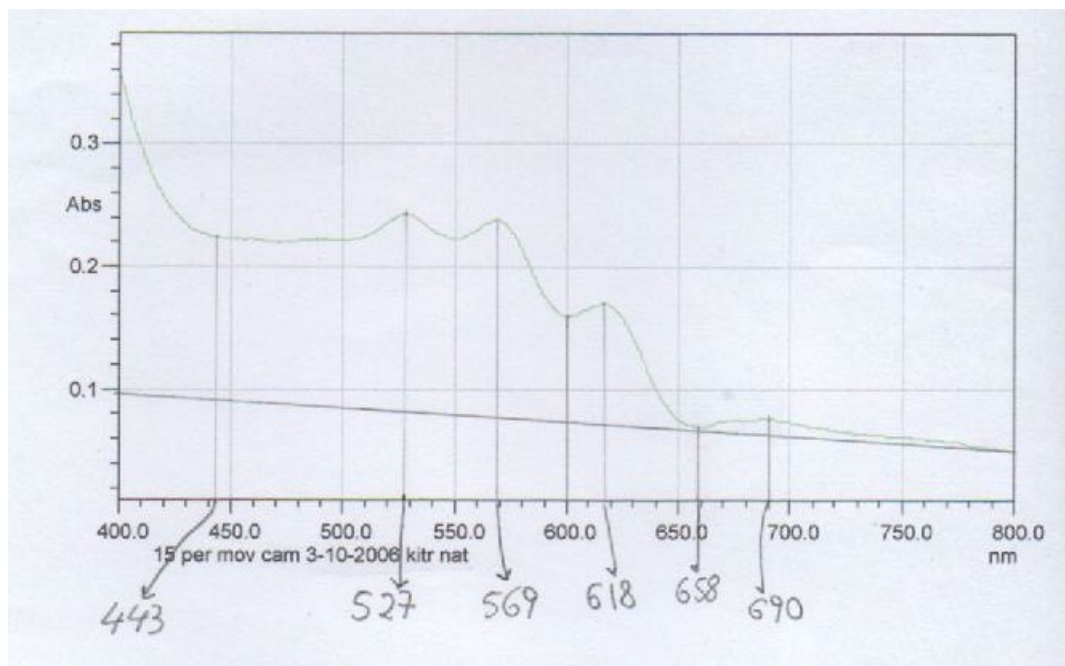
Φάσματα 3a, 15a, 16a, 17, 18a, 19a). Συγκεκριμένα, βλέπουμε στο φάσμα χωρίς διόρθωση για μηδενική απορρόφηση, την τριπλή κορυφή ($\lambda_{\text{κυρ}} \sim 570 \text{ nm}$, $\lambda_1 \sim 535 \text{ nm}$, $\lambda_2 \sim 625 \text{ nm}$, $\lambda_{\omega\mu 1} \sim 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\kappa 1} \sim 460 \text{ nm}$, $\lambda_{\kappa 2} \sim 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\kappa 3} \sim 605 \text{ nm}$, $\lambda_{\omega\mu 2}$ δεν φαίνεται στο μη αραιωμένο εκχύλισμα. Τα διάφορα μήκη κύματος, $\lambda_{\text{κυρ}}$, λ_1 , λ_2 , $\lambda_{\omega\mu 1}$, $\lambda_{\kappa 1}$, $\lambda_{\kappa 2}$, $\lambda_{\kappa 3}$, ορίζονται στους Πίνακες 6, 8, 9 και 11). Επιπλέον, παρατηρούμε ότι $A_{800} = 0,211$ και $0,046$ για το μη αραιωμένο και το 1/5 αραιωμένο εκχύλισμα σε κιτρικό νάτριο, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα επιδεικνύουν αξιοσημείωτη σκέδαση (διάχυση) του φωτός. Αυτό επιβεβαιώνεται στο μη αραιωμένο δείγμα και από την μικρή θολότητα η οποία και παρατηρείται σε αυτό. Η γραμμή μηδενικής απορρόφησης προκύπτει εύκολα στο **Φάσμα 20**, ως εφαπτομένη της καμπύλης απορροφητικότητας στην περιοχή $800 - 750 \text{ nm}$, όπως έγινε στο **Φάσμα 4**.



Φάσμα 20. Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο ($\text{pH} = 6,0$) από περιφέρεια μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας. Συλλογή, 3/10/26.

Εξετάζοντας το φάσμα του 1/5 αραιωμένου εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο (**Φάσμα 21**), διαπιστώνουμε την γενική συμφωνία με το φάσμα του μη αραιωμένου εκχυλίσματος, με μερικές αξιοσημείωτες όμως, διαφορές:

1. Απουσία στο φάσμα μη αραιωμένου εκχυλίσματος της πολύ μικρής κορυφής στα $\sim 670 \text{ nm}$
2. Αρκετά ψηλή απορροφητικότητα στα 450 nm , ιδιαίτερα στο 1/5 αραιωμένο εκχύλισμα, όπου και περίπου το ελάχιστο της απορροφητικότητας σχεδόν όλων των χρωστικών ανθέων (Day and Harborne, 1997).
3. Απουσία στο αραιωμένο εκχύλισμα του «ώμου» στα $\sim 490 \text{ nm}$.



Φάσμα 21. Φάσμα απορρόφησης εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο ($\text{pH} = 6,0$), αραιωμένο $1/5$, από περιφέρεια μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας. Συλλογή, 3/10/26.

Οι μετρήσεις των διαφόρων παραμέτρων στα **Φάσματα 20** και **21**, δείχνουν ότι ο νόμος των Lambert και Beer ακολουθείται στην περίπτωση της πρώτης δευτερεύουσας κορυφής, της δεύτερης κοιλάδας και της κύριας κορυφής, ενώ υπάρχουν αποκλίσεις για τις υπόλοιπες κορυφές, κοιλάδες και ώμους, με τους τελευταίους να μην εμφανίζονται στο ένα ή το άλλο φάσμα. Αναπόφευκτο, αφού η περιοχή του φάσματος πέρα από τα 650 nm είναι αρκετά αλλοιωμένη (ύπαρξη ή όχι μικρής ζώνης απορρόφησης). Από την άλλη υπάρχει αλλοίωση και στην ζώνη κάτω των 500 nm.

Για να κατανοήσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις ομοιότητες και διαφορές έχουμε βάλει στον Πίνακα 16 όλα τα δεδομένα από φάσματα απορρόφησης ανέπαφου πετάλου, εκχυλισμάτων σε οξυνισμένη μεθανόλη και κιτρικό νάτριο, καθώς και την $1/5$ αραιώση του τελευταίου εκχυλίσματος. Το ελάχιστο που μπορούμε να πούμε από αυτά τα λίγα δεδομένα είναι ότι υδατικά διαλύματα $\text{pH} = 6,0$, όπως αυτό του κιτρικού νατρίου, κατορθώνουν και προσομοιάζουν προς τις συνθήκες διατηρώντας το μεγαλύτερο και σημαντικότερο μέρος των χαρακτηριστικών του φάσματος απορρόφησης, ακόμη και σε αραιώση. Η αιτία των υπαρκτών διαφορών μεταξύ του μη αραιωμένου και του αραιωμένου εκχυλίσματος δεν είναι προφανής και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό εκχύλισματος σε κιτρικό νάτριο περιφέρειας σεπάλων μωβ καμπανούλας, ταξινομημένα από λ_{ελάχιστο} (λ_{min}) μέχρι λ_{μέγιστο} (λ_{max}) όπως προκύπτουν από τα Φάσματα **20 και **21** σε σφαίρα ολοκλήρωσης**

	Κουιάδα 1 A_1 (λ _{κ1} nm)	Ωμος 1 A (λ _{ωμ1} nm)	Δευτερεύουσα κορυφή 1, $A_{κ1}$, (λ ₁ nm)	Κουιάδα 2 A_2 (λ _{κ2} nm)	Κύρια κορυφή $A_{κυρ}$, (λ _{κυρ} nm)	Κουιάδα 3 A_3 (λ _{κ3} nm)	Δευτερεύουσα κορυφή 2, $A_{κ2}$, (λ ₂ nm)	Ωμος 2 A (λ _{ωμ2} , nm)	$A_{440}/A_{μεγ}$
Κορυφές			0,79, 0,16 (535,535) 535,527		0,87, 0,17 (578,567) 574,569 λ _{max}		0,59,0,10 (613,631) 621,618	ΔΥ,0,01 3 (718, ΔΥ^β) ΔΥ,690^γ	0,34, 0,60, 0,82
Κουιάδες	0,49,0,1 4 (434,43 5^α) 450, 443 λ _{min}			0,74, 0,15 (555,542) 550,550		0,55, 0,09 (606,600) 604,600			
$A_{κυρ}/A_κ$			1,08, 1.10,1,06						
Ωμος		0,59,ΔΥ (489,48 8) 493, ΔΥ							
Ημι-πλάτος ζώνης απορρόφησης , Δλ/2, nm	178 Δεν μπορεί να υπολογιστεί^δ Δεν μπορεί να υπολογιστεί^δ								

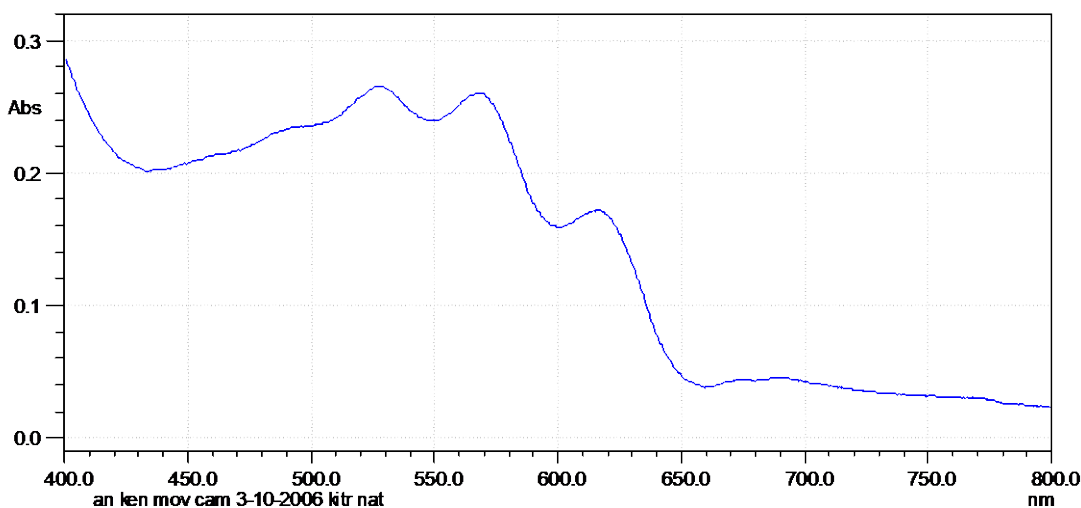
^α Η **πρώτη τιμή** αφορά σε ανέπαφο πέταλο, η **δεύτερη και υπογραμμισμένη τιμή** μήκους κύματος αφορά το εκχύλισμα περιφερειακού τμήματος ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, από τον Πίνακα 6 (και οι δύο τιμές στον Πίνακα 4), ενώ η **τρίτη** και η **τέταρτη** αφορούν τα **Φάσματα 21** και **22** αντίστοιχα.

^β ΔΥ: δεν υπάρχει αντίστοιχος ώμος στο εκχύλισμα

^γ Στο αραιωμένο εκχύλισμα σε κιτρικό νάτριο στο συγκεκριμένο μήκος κύματος υπάρχει ευδιάκριτη κορυφή (**Φάσμα 22**).

^δ Δεν μπορεί να υπολογιστεί λόγω της μεγάλης απορροφητικότητας στην περιοχή 450 – 470 nm.

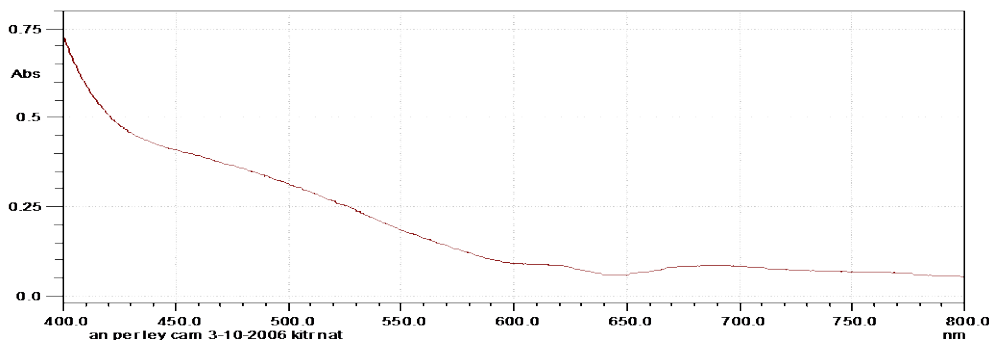
Η εξέταση του φάσματος εκχυλίσματος μωβ σεπάλων από το κέντρο ανθέων καμπανούλας αποδίδει φάσμα το οποίο επίσης προσομοιάζει πάρα



Φάσμα 22. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο (pH = 6,0) από κέντρο μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας. Συλλογή, 3/10/26.

πολύ με αυτό του ανέπαφου πετάλου (**Φάσμα 22**). Σε αυτό το μη αραιωμένο φάσμα, εμφανίζονται όλες οι κορυφές, κοιλάδες και ώμοι που διακρίναμε στα φάσματα ανέπαφων πετάλων (Πίνακας 10) και είναι προφανές ότι υπάρχει και σκέδαση φωτός, αλλά σε μικρότερη έκταση ($A_{800} = 0,03$, $A_{\text{μεγΟρ}} = 0,26$, και $A_{800} / A_{\text{μεγΟρ}} = 0,115$, ενώ η αντίστοιχες τιμές στα εκχυλίσματα της περιφέρειας των ανθέων σε κιτρικό νάτριο ήταν σαφώς μεγαλύτερες (**Φάσματα 20 και 21**).

Το εκχύλισμα περιφερικού τμήματος λευκών πετάλων καμπανούλας σε κιτρικό νάτριο, pH = 6,0, μας δίνει φάσμα με ουσιαστικά μηδενική απορροφητικότητα 800 – 600 nm και στη συνέχεια διαρκή άνοδο μέχρι τα 420 nm και πολύ πιο οξεία άνοδο στο διάστημα 420 – 400 nm.



Φάσμα 23. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε κιτρικό νάτριο (pH = 6,0) από την περιφέρεια λευκών ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας. Συλλογή, 3/10/26.

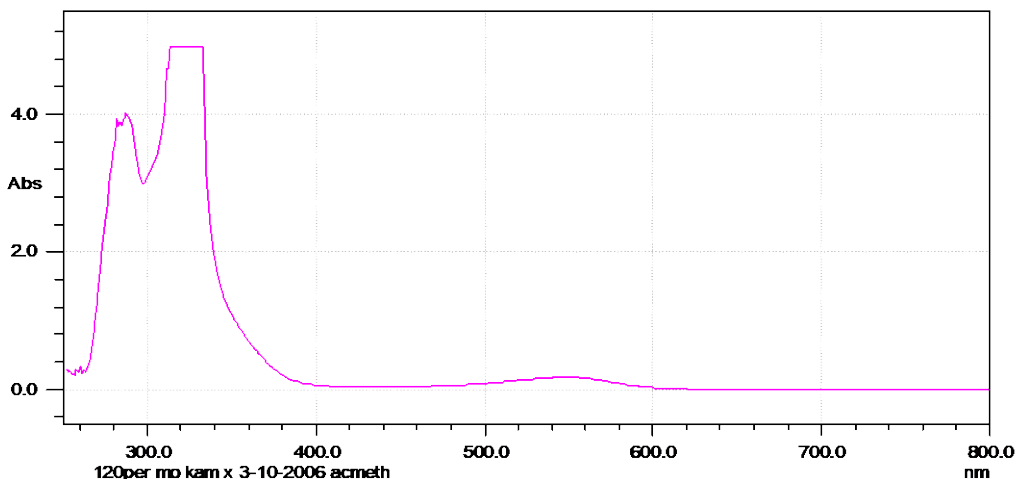
Συγκρίνοντας το **Φάσμα 23** με το **Φάσμα 14a** (απορρόφησης περιφέρειας λευκού πετάλου καμπανούλας), βλέπουμε την ουσιαστική απουσία τυπικών χρωστικών με τριπλή κορυφή στο εκχύλισμα μαζί με τον παράλληλο εντοπισμό απορροφητικότητας στην περιοχή 550 – 450 nm. Το θέμα σαφώς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Στρέφουμε τώρα την προσοχή μας στην απορρόφηση και τον κυκλικό διχρωϊσμό εκχυλισμάτων πετάλων καμπανούλας στο υπεριώδες φως, πάντα σε συνδυασμό με την απορρόφηση στο ορατό φως.

Γ. Φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού εκχυλισμάτων πετάλων καμπανούλας στο υπεριώδες

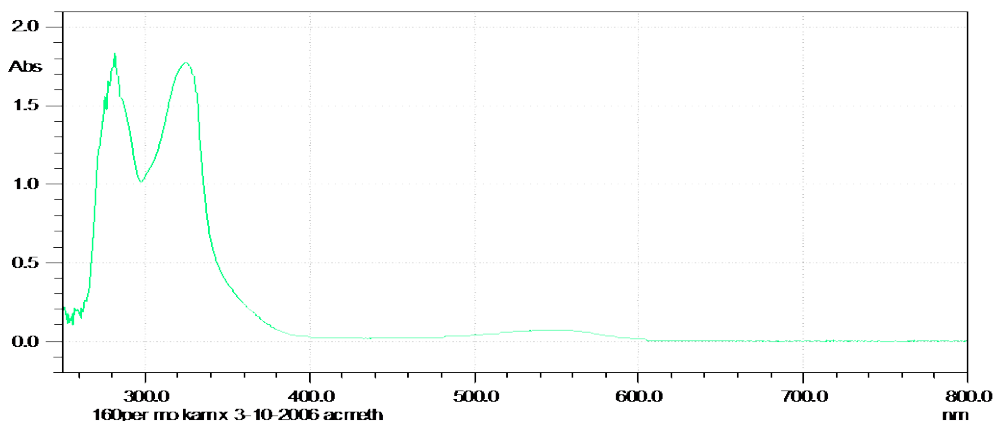
Γ1. Φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες

Η απορρόφηση στο ορατό και το υπεριώδες ανέπαφων πετάλων καμπανούλας (εξ όσων γνωρίζουμε, για πρώτη φορά σε οποιοδήποτε πέταλο άνθους) έδειξε για τα έγχρωμα άνθη περίπου ίδιες τιμές απορροφητικότητας στο ορατό και το υπεριώδες (Πίνακας 15, **Φάσματα 3αβ, 15αβ, 18αβ**). Θέλουμε να εξετάσουμε τώρα πώς απορροφούν στο ορατό και το υπεριώδες τα εκχυλίσματα μωβ ανθέων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη, και στη συνέχεια να εξετάσουμε τα αντίστοιχα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού. Έχουμε ήδη διαπιστώσει ότι τα πυκνά εκχυλίσματα μωβ ανθέων καμπανούλας διατηρούν τα πολύπλοκα χαρακτηριστικά απορρόφησης στο ορατό (τριπλή κορυφή γύρω στα ~ 570 nm με ώμους εκατέρωθεν και ελάχιστο στα ~450 nm), ενώ σε διαδοχικά μεγαλύτερες αραιώσεις χάνεται η πολυπλοκότητα και αντικαθίσταται από μια κορυφή σε ~ 550 nm, με σαφώς κοντά στη μισή τιμή $\Delta\epsilon/\lambda^2$ (**Φάσματα 1-13**, Σχήματα 1-6).



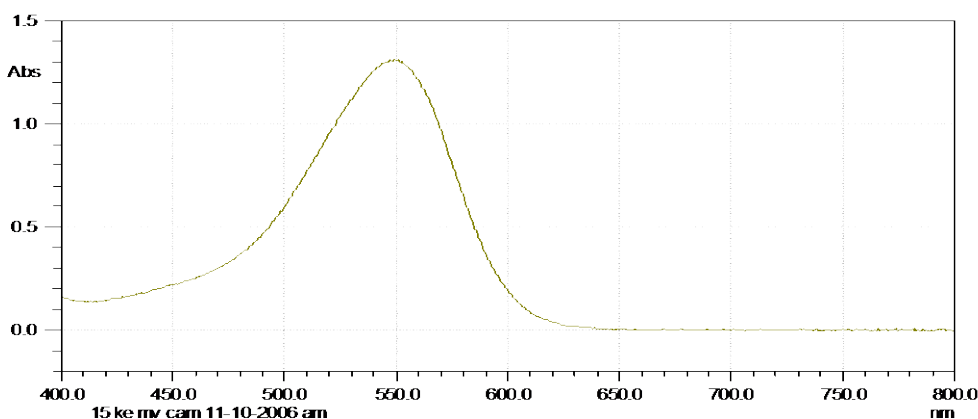
Φάσμα 24. Φάσμα απορρόφησης σε ορατό και υπεριώδες εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από περιφέρεια μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/20, συλλογή 3/10/26.

Το φάσμα απορρόφησης σε ορατό και υπεριώδες μαζί, εκχυλίσματος περιφέρειας ανθέων μωβ καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη και αραιώση 1/20 δείχνει πόσο έχουν αλλάξει πια οι συσχετισμοί απορρόφησης σε ορατό και υπεριώδες, σε σχέση και με το ανέπαφο πέταλο, αλλά και με το πυκνό εκχύλισμα: στο ορατό υπάρχει μόνον μια ζώνη απορρόφησης με $\lambda_{\text{μεγ}} = 550$ nm ενώ η απορρόφηση στο υπεριώδες είναι πολύ έντονη και εκτός ορίων πιστότητας ($A \gg 2,00$, **Φάσμα 24**). Παρ' όλα αυτά διακρίνονται μάλλον δύο ζώνες απορρόφησης στο υπεριώδες, οι οποίες είναι καταφανείς στο αντίστοιχο φάσμα απορρόφησης με αραιώση 1/60 (**Φάσμα 25**): δύο σχεδόν ίσες κορυφές στα **324** και στα **281nm**. Παρ' ότι οι δύο αυτές κορυφές είναι μερικώς επικαλυπτόμενες, οι αντίστοιχες τιμές του $\Delta\lambda/2$, αν θεωρήσουμε ότι οι δύο καμπύλες απορρόφησης είναι κωδωνοειδείς, δεν μπορεί να υπερβαίνουν τα 30 nm η κάθε μια.

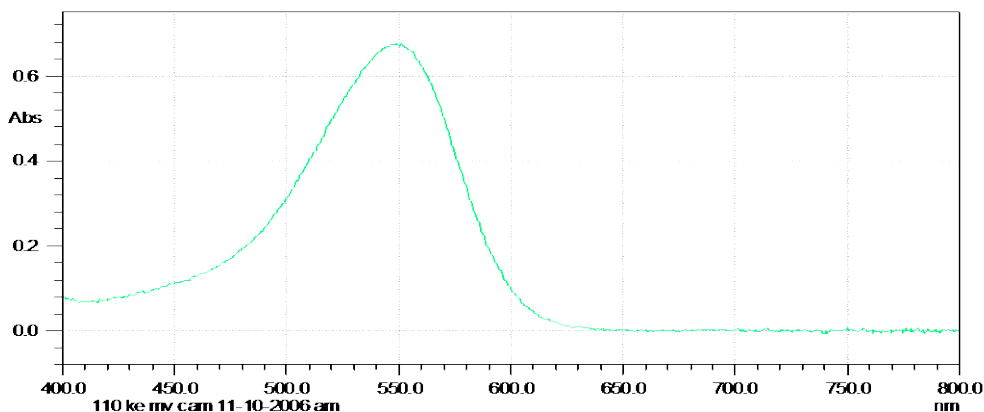


Φάσμα 25. Φάσμα απορρόφησης σε ορατό και υπεριώδες εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από περιφέρεια μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/60, συλλογή, 3/10/26.

Προχωρώντας σε εκχύλιση σε οξυνισμένη μεθανόλη από το κέντρο μωβ ανθέων βλέπουμε ότι οι αραιώσεις 1/5 και 1/10 τηρούν τον νόμο των Lambert και Beer, δηλ. κωδωνοειδείς καμπύλες απορρόφησης και $A_{\text{μεγOr}}$ του πρώτου είναι διπλάσιο του αντίστοιχου στο δεύτερο φάσμα (**Φάσματα 26, 27**).

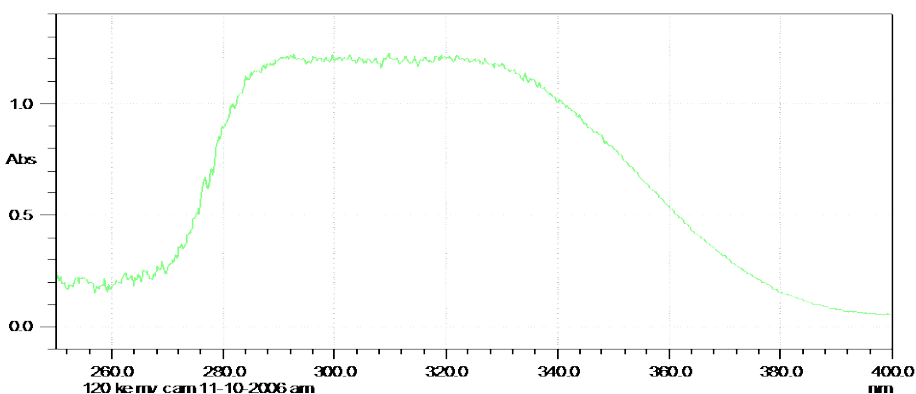


Φάσμα 26. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από κέντρο μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου 1/5, συλλογή, 3/10/26.



Φάσμα 27. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από κέντρο μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου **1/10**, συλλογή, 3/10/26.

Για να μπορέσουμε να έχουμε ακριβές φάσμα απορρόφησης ($A_{\text{μεγ}} < 2,0$) στο υπεριώδες ενός τέτοιου εκχυλίσματος, διαπιστώνουμε ότι απαιτείται άλλη μια αραιώση στα 1/20 (**Φάσμα 28**).



Φάσμα 28. Φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες εκχυλίσματος σε οξυνισμένη μεθανόλη από κέντρο μωβ ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας, αραιωμένου **1/20**, συλλογή, 3/10/26.

Διαπιστώνουμε ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα έχει φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες που προσομοιάζει με αυτό ανέπαφων πετάλων (**Φάσματα 3β, 15β, 18β**). Θα είχε ενδιαφέρον αν γινόταν περαιτέρω αραιώσεις ώστε να διαπιστώσουμε αν σε αυτές θα είχαμε φάσμα με δύο ευδιάκριτες κορυφές, όπως στο εκχύλισμα οξυνισμένης μεθανόλης από περιφέρεια σεπάλων ανθέων **Φάσμα 25**.

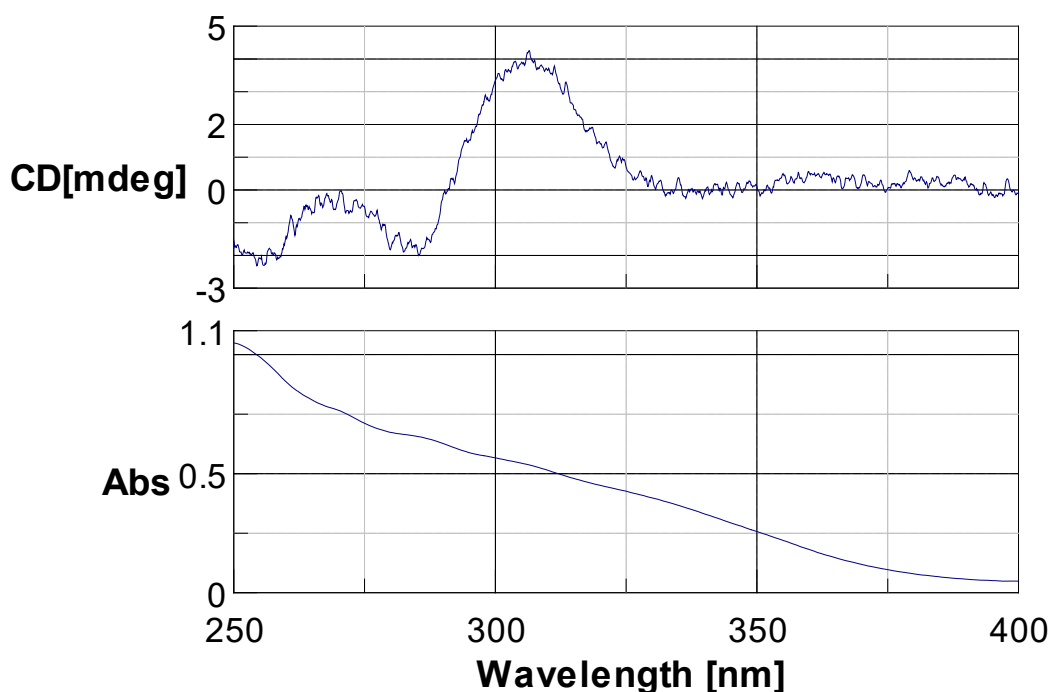
Τα συγκεκριμένα φάσματα εκχυλισμάτων, καθώς και προηγούμενα απορρόφησης/κυκλικού διχρωισμού, συγκρινόμενα με τα φάσματα ανέπαφων πετάλων, δείχνουν ότι στα μεν ανέπαφα πέταλα η απορρόφηση στο ορατό και στο εγγύς υπεριώδες (400 – 250 nm) είναι περίπου στα ίδια επίπεδα, ενώ στα εκχύλιστα οξυνισμένης μεθανόλης από τις πρώτες αραιώσεις κιάλας, η τριπλή απορρόφηση στο ορατό μεταπίπτει σε μια απλή ζώνη με μέγιστο στα 550 nm, η δε απορροφητικότητα στο υπεριώδες αυξάνεται ραγδαία. Αυτή η αύξηση απορροφητικότητας στο υπεριώδες λόγω των διαδοχικών αραιώσεων, αποτελεί ένδειξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ζωνών απορρόφησης στο ορατό και στο υπεριώδες στο ανέπαφο

πέταλο και στις μικρές αραιώσεις εκχυλισμάτων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προκαλούν *μεγάλο υποχρωισμό* στα ανέπαφα πέταλα και τις μικρές αραιώσεις εκχυλισμάτων σε οξυνισμένη μεθανόλη. Σε μεγαλύτερες αραιώσεις προφανώς υπάρχει μείωση έως εκμηδένιση των αλληλεπιδράσεων (μεγαλώνει η φυσική απόσταση μεταξύ των χρωστικών στα αραιωμένα εκχυλίσματα).

Γ2. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο υπεριώδες

Ως θέμα αρχής, διαχωρίσαμε κέντρο και περιφέρεια σεπάλων μωβ καμπανούλας, κάναμε εκχυλίσματα σε οξυνισμένη μεθανόλη και μελετήσαμε τα φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωισμού στην περιοχή του υπεριώδους φωτός.

β

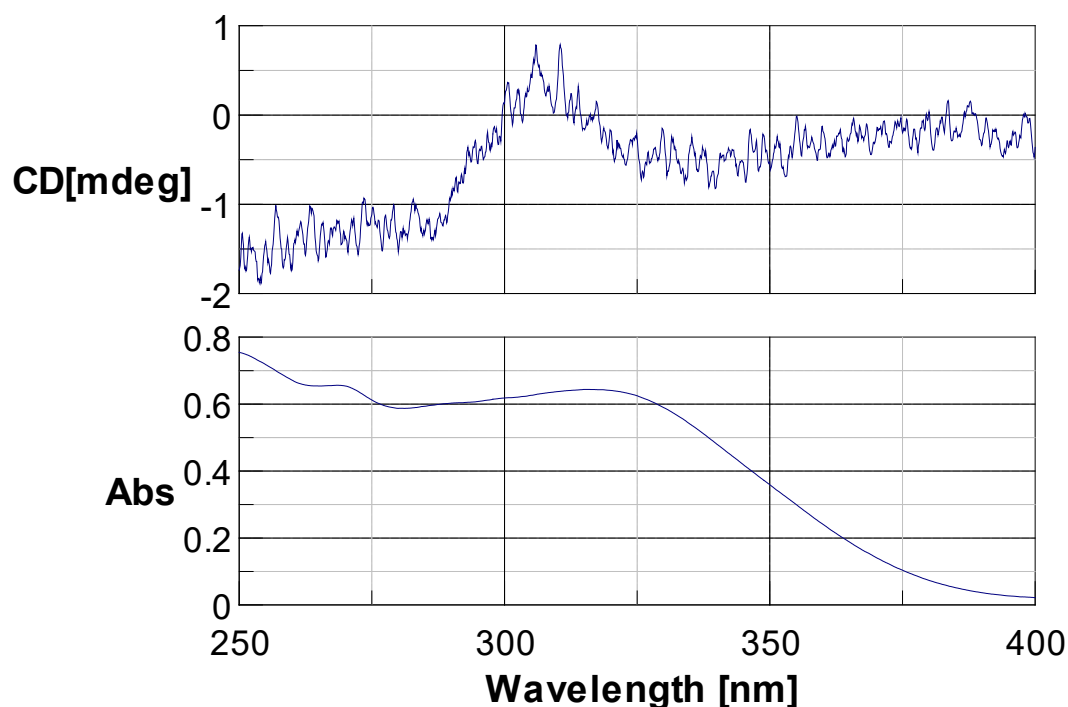


α

Φάσμα 29α, β. Φάσμα απορρόφησης (**α**, κάτω) και κυκλικού διχρωϊσμού (**β**, πάνω), στη περιοχή του υπεριώδους φωτός (400 – 250 nm) εκχυλίσματος του *κεντρικού τμήματος μωβ άνθους* ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης, αραιωμένου **1/20**, από συλλογή 25^{ης} Σεπτεμβρίου 2006. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg. Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.

Το φάσμα ΚΔ εδώ δεν έχει κάποια ταύτιση κορυφών, κοιλάδων κλπ με αυτό της απορροφητικότητας (βλ. και **Φάσμα 28**): εμφανίζει θετική κορυφή στα 307 nm, μηδενικά σημεία στα 290,5 και στα 269 nm, και μικρές αρνητικές κορυφές στα 285 και 255 nm. Θυμίζουμε ότι οι «κορυφές» της απορρόφησης στο υπεριώδες από εκχύλισμα κέντρου μωβ πετάλου καμπανούλας είναι 328 και 288 nm (**Φάσμα 28**).

Το αντίστοιχο φάσμα από εκχύλισμα περιφέρειας πετάλων, επίσης σε οξυνισμένη μεθανόλη, δείχνει μικρότερης έντασης κορυφές ελλειπτικότητας σε μέγιστα διαφοροποιημένα από αυτά εκχυλίσματος κεντρικού τμήματος πετάλων.



Φάσμα 30α, β. Φάσμα απορρόφησης (α, κάτω) και κυκλικού διχρωϊσμού (β, πάνω), στη περιοχή του υπεριώδους φωτός (400 – 250 nm) εκχυλίσματος του *περιφερικού τμήματος μωβ άνθους* ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), σε διάλυμα οξυνισμένης μεθανόλης, αραιωμένου 1/20, από συλλογή 25^{ης} Σεπτεμβρίου 2006. CD = κυκλικός διχρωϊσμός (ελλειπτικότητα), με μονάδες mdeg. Abs = απορροφητικότητα, μέγεθος με μονάδες καθαρού αριθμού.

Όπως και στα φάσματα απορρόφησης, έτσι και σε αυτά του κυκλικού διχρωϊσμού διαπιστώνουμε την διαφοροποίηση μεταξύ περιφέρειας και κέντρου του πετάλου της μωβ καμπανούλας, *μόνον* στην περιοχή του υπεριώδους. Ούτε σε αυτό το φάσμα υπάρχει κάποια ταύτιση των κορυφών απορρόφησης αραιωμένου εκχυλίσματος με αυτές σε φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (π.χ. **Φάσματα 25, 30β**). Ενδεχόμενα να έχουμε και εδώ να κάνουμε με κάποια επιπλέον αλληλεπίδραση ή χρωστική. Σαφώς χρειάζονται περισσότερα πειράματα εις βάθος στο μέλλον.

Δ. Φάσματα φθορισμού

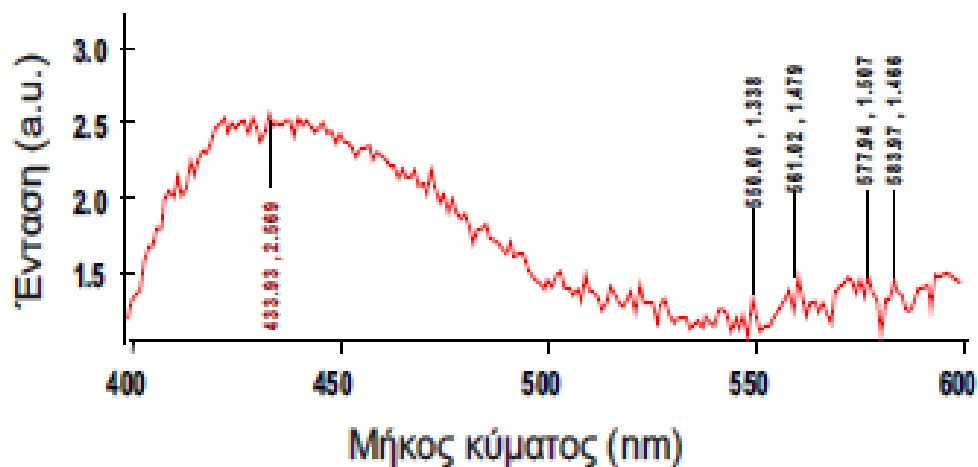
Ενδεικτικά φάσματα φθορισμού των εκχυλισμάτων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη παρατίθενται παρακάτω. Γενικά τα φάσματα εκπομπής με διέγερση στις τρεις κύριες κορυφές απορρόφησης του ορατού δείχνουν εκπομπή φθορίζοντος φωτός σε περιοχές $> 590 \text{ nm}$ (δεν εμφανίζονται τα δεδομένα). Στη συνέχεια, παίρνοντας το φάσμα δράσης για κάθε συγκεκριμένη κορυφή φθορισμού (δηλ. το αντίστοιχο φάσμα απορρόφησης μέσω του οποίου προκύπτει η κορυφή φθορισμού) διαπιστώνουμε ότι το φάσμα δράσης δεν ταυτίζεται καθόλου με το αρχικό φάσμα απορρόφησης. Η συγκεκριμένη ιδιότητα αποτελεί ισχυρή ένδειξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των χρωστικών.

Αυτό το φαινόμενο επεκτείνεται και σε φθορισμό από δευτερεύουσες κορυφές απορρόφησης, π.χ. στα 500 nm (**Φάσμα 31**).



Φάσμα 31. Φάσμα εκπομπής φθορισμού μη αραιωμένου εκχυλίσματος από πέταλα πορφυράς καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη. Η διέγερση του εκχυλίσματος έγινε στα 500 nm , που αντιπροσωπεύουν «ώμο» στο φάσμα απορρόφησης της καμπανούλας σε αυτό το μέσον (π.χ. **Φάσμα 3**). Είναι εντυπωσιακό ότι η απόσταση Stokes, δηλ. $\Delta\lambda = \lambda_{\text{μεγφθορ}} - \lambda_{\text{μεγαπορρ}}$ είναι 120 nm , από τις μεγαλύτερες που έχουν καταγραφεί.

Όντως το φάσμα εκπομπής φωτός μετά από διέγερση στα 500 nm έχει κωδωνοειδές σχήμα με κορυφή στα 620 nm και ένταση περ. 280 απόλυτες μονάδες φθορισμού (a.u.), μια αρκετά μεγάλη τιμή. Στοχεύοντας στο φάσμα δράσης του φθορισμού με διέγερση στα 500 nm και μέγιστο εκπομπής τα 620 nm , βλέπουμε ότι μας προκύπτει μια εκπλατυσμένη καμπύλη η οποία έχει μια μεγάλη ουρά που φτάνει από τα $500 - 600 \text{ nm}$ με μικρές εξάρσεις-κορυφές (**Φάσμα 32**).



Φάσμα 32. Φάσμα δράσης φθορισμού με βάση την εκπομπή στα 620 nm που έδειχνε το **Φάσμα 31**, μετά από διέγερση στα 500 nm. Το φάσμα δείχνει ότι το μέγιστο διέγερσης ώστε να υπάρχει εκπομπή φθορισμού στα 620 nm είναι τα 433,93 nm, πράγμα που τεκμηριώνει τις πολλαπλές αλληλεπιδράσεις και μεταφορές ενέργειας από απορροφήσεις στο υπεριώδες στις απορροφήσεις στο ορατό.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτή την πτυχιακή μελετήσαμε εις βάθος τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της ποικιλόχρωμης καμπανούλας (*C. versicolor*), φυτού που είναι αυτοφυές στην Ήπειρο σε διάφορα σημεία (Ράγγα, 2014) και του οποίου τα ωραία πορφυρά άνθη είχαν προκαταρκτικά μελετηθεί σε δύο προηγούμενες πτυχιακές (Σαβούρδου, 2006· Γεωργάνου, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Σε άλλες δύο μεταγενέστερες εργασίες μελετήθηκαν: περαιτέρω φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά καθώς και λεπτομερείς τομές ανθέων του φυτού με έντονο, και αχνό μωβ καθώς και με λευκό χρώμα (Θωμαΐδου και Σακαγιάννη, 2011), ενώ τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά σε άλλους υδατικούς διαλύτες μελετήθηκαν στην πτυχιακή των Κορομηλά και Στεφανίδου, (2010). Οι προηγούμενες και μια επόμενη πτυχιακές είχαν δείξει ότι οι χρωστικές της ποικιλόχρωμης καμπανούλας είναι τουλάχιστον δύο ειδών: μια λιπόφιλη καροτενοειδής κίτρινου χρώματος και μια υδρόφιλη κυανού χρώματος (Σαβούρδου 2003· Σαβούρδου και συν., 2006· Γεωργάνου, αδημοσίευτα αποτελέσματα· Θωμαΐδου και Σακαγιάννη, 2011). Μέρος των αποτελεσμάτων από την παρούσα πτυχιακή και τις τέσσερις άλλες παρουσιάστηκαν σε δύο συνέδρια (Γεωργάνου και συν., 2009· Δρακονταειδή και συν. 2009· Magoula et al., 2022). Εκχυλίσματα από τα άνθη του συγκεκριμένου φυτού έδειξαν να έχουν και ευεργετική δράση σε κύτταρα και σειρές νευρικού ιστού τα οποία είχαν υποστεί επεξεργασία για προσομοίωση εκφυλιστικών νοσημάτων (Μαγουλά, 2020).

Εξετάζουμε τα αποτελέσματα της πτυχιακής αυτής κατά μέρη:

1. Απορρόφηση και κυκλικός διχρωϊσμός στο ορατό φως

Από τα φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού στο ορατό φως αποδεικνύεται η ύπαρξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συνιστωσών χρωστικών σε μη αραιωμένα εκχυλίσματα οξυνισμένης μεθανόλης, όπως (πολλαπλές κορυφές και ώμοι σε απορρόφηση και κυκλικό διχρωϊσμό, μεγάλο ημι-εύρος ζώνης απορρόφησης κλπ). Μετά από διαδοχικές αραιώσεις, τόσο στο εκχύλισμα από το κεντρικό τμήμα του πετάλου όσο και σε αυτό από το αντίστοιχο περιφερικό, βλέπουμε απώλεια των αλληλεπιδράσεων όπως τεκμαίρεται από την απώλεια του χαρακτηριστικού φάσματος τριπλής κορυφής και ώμου, δηλωτικού αλληλεπιδράσεων, και αντικατάστασής του με φάσμα απλής κωδονοειδούς καμπύλης απορρόφησης. Σε κάθε περίπτωση ακολουθείται ο νόμος των Lambert και Beer τόσο σε απορρόφηση όσο και σε κυκλικό διχρωϊσμό. Τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν και με νέα συλλογή ανθέων καμπανούλας, όπου και αυτά τα φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωϊσμού έδειξαν μη αραιωμένο δείγμα με παρόντα τα πειστήρια της αλληλεπίδρασης μεταξύ των χρωστικών (τριπλή κορυφή κλπ στο ορατό), ενώ οι διαδοχικές αραιώσεις δείχνουν μεμονωμένες και μη αλληλεπιδράσεις χρωστικές. Αυτά τα χαρακτηριστικά εκχυλισμάτων ανθέων ποικιλόχρωμης καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη διατηρήθηκαν σε άνθη καμπανούλας από τέλη Σεπτεμβρίου μέχρι αρχές Δεκεμβρίου του 2006, όπου και έγιναν συλλογές από συγκεκριμένες περιοχές της Ηπείρου.

2. *Φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδες εκχυλίσματος ανθέων καμπανούλας*

Το φάσμα απορρόφησης στο εγγύς υπεριώδες είναι συγκριτικά φτωχότερο έχοντας μόνον δύο ευδιάκριτες σε κάποιες περιπτώσεις και δυσδιάκριτες σε άλλες περιπτώσεις, κορυφές γύρω στα 325 και 280 nm ενώ το αντίστοιχο φάσμα κυκλικού διχρωισμού δείχνει ασθενείς κορυφές με θετική (307 nm) και αρνητική ελλειπτικότητα (285 και 255 nm) με περισσότερες αλληλεπιδράσεις. Ο λόγος μέγιστης απορροφητικότητας υπεριώδους προς ορατό είναι περ. 4 σε μικρές αραιώσεις (1/20) ενώ φτάνει στην τιμή των 17 σε μεγαλύτερες αραιώσεις (1/60). Στο ανέπαφο πέταλο αυτός ο λόγος είναι κατά πολύ μικρότερος, 1,19 για αχνά μωβ πέταλα και 1,34 για έντονα μωβ πέταλα με τον θόρυβο στην απορροφητικότητα στο υπεριώδες να είναι $< 6,0 \%$.

3. *Φάσματα απορρόφησης ανέπαφων πετάλων καμπανούλας στις περιοχές του ορατού και του υπεριώδους φωτός*

Το φάσμα απορρόφησης στο ορατό ανέπαφων πετάλων καμπανούλας σε σφαίρα ολοκλήρωσης δείχνει όντως τριπλή κορυφή στην περιοχή 500 – 620 nm, όπως σχεδόν πανομοιότυπα και το πυκνό εκχύλισμα σε οξυνισμένη μεθανόλη, πράγμα συμβατό με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χρωστικών και το μωβ χρώμα του άνθους που βλέπουμε. Σε κάθε περίπτωση, αναφέρονται μικρές διαφορές στα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά κέντρου και περιφέρειας του άνθους μωβ καμπανούλας. Στο εγγύς υπεριώδες βλέπουμε την απορροφητικότητα των ανέπαφων πετάλων να αυξάνει ραγδαία από τα 400 μέχρι τα 360 nm, όπου και μια πλατιά κορυφή, ενώ στην συνέχεια η απορροφητικότητα φθίνει με πολύ χαμηλό ρυθμό ($A_{260} \sim 0,95A_{360}$). *Αυτά τα χαρακτηριστικά πετάλων ποικιλόχρωμης καμπανούλας διατηρήθηκαν από τέλη Σεπτεμβρίου μέχρι αρχές Δεκεμβρίου του 2006, όπου και έγιναν συλλογές από συγκεκριμένες περιοχές της Ηπείρου.*

4. *Διαφορές μεταξύ ανθέων καμπανούλας με έντονο και αχνό μωβ χρώμα*

Τα άνθη καμπανούλας με έντονο και αχνό χρώμα διαφέρουν μεταξύ τους μόνον ως προς την σχετική ένταση της απορρόφησης (είτε σε ανέπαφο άνθος είτε σε εκχύλισμα) αλλά όχι στην θέση των κορυφών ή των μεταξύ τους σχετικών εντάσεων απορρόφησης.

5. *Λευκή καμπανούλα φάσματα ορατού υπεριώδους*

Η λευκή καμπανούλα έχει γενικά πολύ ασθενή απορρόφηση ως ανέπαφο άνθος καθώς και το εκχύλισμά της είτε αφορά το κέντρο (έντονο μωβ χρώμα) ή την περιφέρειά του (λευκό χρώμα, αλλά με φασματοσκοπική ένδειξη ελάχιστης περιεκτικότητας σε μωβ χρωστική). Ο λόγος μέγιστης απορρόφησης υπεριώδους προς ορατό είναι 5,09.

6. *Φάσματα απορρόφησης σε κιτρικό νάτριο ($pH = 6,0$)*

Δοκιμάστηκε το κιτρικό νάτριο ($pH = 6,0$) ως μέσο εκχύλισης των χρωστικών της καμπανούλας και διαπιστώσαμε ότι λειτουργεί αρκετά ικανοποιητικά στο να διατηρεί το χρώμα και την μορφή του φάσματος στο ορατό όπως την τεκμηριώνουμε και στο ανέπαφο πέταλο, δηλ. την τριπλή κορυφή με ώμους στα συγκεκριμένα μήκη κύματος. Ακόμη πιο σημαντικό ότι αυτή η ιδιότητα διατηρείται και σε αραιώση 1/5 του εκχυλίσματος (δεν δοκιμάστηκαν μεγαλύτερες),

υπακούοντας στον νόμο των Lambert-Beer, κάτι που δεν συμβαίνει με τα εκχυλίσματα οξυνισμένης μεθανόλης. Ας σημειωθεί ότι εξ όσων μπορέσαμε να διαπιστώσουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που δοκιμάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου ($\text{pH} = 6,0$) για εκχύλιση χρωστικών. Μεταγενέστερες πτυχιакές (Κορομηλά και Στεφανίδη, 2010) πειραματίστηκαν περαιτέρω με την χρήση διαλύματος κιτρικού στην εκχύλιση χρωστικών καμπανούλας.

Η εκτεταμένη φασματοσκοπική έρευνα των εκχυλισμάτων ανθέων καμπανούλας έδειξε ότι πυκνά διαλύματα οξυνισμένης μεθανόλης, καθώς και διαλύματα κιτρικού νατρίου ($\text{pH} = 6,0$) διατηρούν το χρώμα και τα ιδιαίτερα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά στο ορατό τα οποία εμφανίζει το ανέπαφο πέταλο άνθους. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι συμβατά με την διάταξη των επί μέρους χρωστικών σε ένα οργανωμένο σύμπλεγμα, όπως έχει διαπιστωθεί και σε άλλες χρωστικές (Yoshida et al., 2009). Μεταγενέστερες μελέτες από το εργαστήριο Βιοχημείας όπου εκπονήσαμε την πτυχιакή μας έδειξαν ότι τα άνθη καμπανούλας περιέχουν Mg^{2+} , Ca^{2+} και Na^{+} (Αδάμου, 2011· Magoula, 2022). Εξ όσων γνωρίζουμε, αυτή η πτυχιакή και τα αντίστοιχα ευρήματα της Παναγιώτας Γεωργιάνας είναι τα πρώτα που δείχνουν αυτές τις δύο ιδιότητες, για οποιοδήποτε εκχύλισμα ανθέων. Σε αντίθεση δε με μεταγενέστερη δημοσίευση γενικά για ανθοκυανίνες, βρίσκουμε ότι το συγκεκριμένο διάλυμα κιτρικού νατρίου δεν επηρεάζει καθόλου το φάσμα ορατού του εκχυλίσματος καμπανούλας, που προφανώς περιέχει ανθοκυανίνες (Buchweitz et al., 2012). Την ίδια ιδιότητα πυκνών εκχυλισμάτων οξυνισμένης μεθανόλης θα διαπιστώσουμε αργότερα και στην περίπτωση των ανθέων της *Lunaria annua* (Βαενάς, 2022).

7. Φάσματα φθορισμού εκχυλισμάτων καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη

Τα φάσματα φθορισμού έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα της ποικιλόχρωμης καμπανούλας καμπανούλας σε οξυνισμένη μεθανόλη φθορίζουν στο ορατό μέρος του φωτός αν διεγερθούν στα μήκη κύματος της κύριας ή των δευτερευόντων κορυφών. Τα φάσματα δράσης με μήκος κύματος αναφοράς το μέγιστο του φθορισμού δεν ταυτίζονται με τα φάσματα απορρόφησης. Αυτό σημαίνει ότι οι αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν μεταξύ των χρωστικών της καμπανούλας και δίνουν τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις και φάσματα κυκλικού διχρωισμού, επηρεάζουν και την ικανότητα φθορισμού των συμπλεγμάτων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Μάριος Αδάμου. *Χρωστικές του Φυτού Καμπανούλα η Ποικιλόχρωμη*. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Ανθοκομίας Αρχιτεκτονικής Τοπίου, ΤΕΙ Ηπείρου, Άρτα, 2011.

Χρήστος Βαενάς. *Μελέτη εις βάθος των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων των κόκκινο-μωβ χρωστικών του φυτού Lunariaaannua*. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, κατεύθυνση Ανθοκομίας Αρχιτεκτονικής Τοπίου, ΤΕΙ Ηπείρου, Άρτα, 2022.

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, and Lubert Stryer, *Βιοχημεία*, 5^η έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2004. Κεφάλαιο 19, Φωτοσύνθεση.

B. Boucherle, M. Peuchmaur, A. Boumendjel, R. Haudecoeur. Occurrences, biosynthesis and properties of aurones as high-end evolutionary products. *Phytochemistry*. 142:92-111, 2017.

M. Buchweitz, R. Carle, D.R. Kammerer. Bathochromic and stabilising effects of sugar beet pectin and an isolated pectic fraction on anthocyanins exhibiting pyrogallol and catechol moieties. *Food Chemistry*, 135, 2012, 3010-3019.

Γεωργάνου Παναγιώτα, Θωμαΐδου Αγγελική, Σακαγιάννη Ανθή, Σαμαράς Ιωάννης, Καραγιάννη Βασιλική, Κύρκας Δημήτριος, Παπαδόπουλος Γεώργιος Κ. Το πορφυρό χρώμα των πετάλων στο φυτό *Campanula versicolor*: Μεταχρωματισμός λόγω συμπύκνωσης των χρωμοφώρων στα χυμοτόπια. *Παρουσιάστηκε στο 24^ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 20-24 Οκτωβρίου, 2009, Βέροια. Σελ. 185 του βιβλίου περιλήψεων.*

John M Clark, Jr., and Robert L Switzer, *Πειραματική Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992, σελ. 322.

Johan Deisenhofer, Hartmut Michel. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Biosci Rep*. 2004 Aug-Oct; 24(4-5):323-61.

P.M. Dey and J.B. Harborne (eds), *Plant Biochemistry*, Academic Press, New York, 1997

Δρακονταειδή Αγγελική, Καφετζόγλου Κωνσταντίνα, Κορομηλά Ισμήνη, Στεφανίδου Μαρία, Μουστάκας Κ Αντώνης, Καραγιάννη Βασιλική, Κύρκας Δημήτρης, Πατακιούτας Γεώργιος, Παπαδόπουλος Γεώργιος Κ. Μοριακά χαρακτηριστικά των χρωμοφώρων ουσιών στο φυτό *Campanula versicolor* μέσω φασματοφωτομετρικών τεχνικών. *Παρουσιάστηκε στο 24^ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 20-24 Οκτωβρίου, 2009, Βέροια. Σελ. 197 του βιβλίου περιλήψεων.*

Ellestad GA. Structure and chiroptical properties of supramolecular flower pigments. *Chirality* 18, 134-144, 2006.

Volodymyr S. Fedenko, Sergiy A. Shemet, Marco Landi. UV-vis spectroscopy and colorimetric models for detecting anthocyanin-metal complexes in plants: An overview of *in vitro* and *in vivo* techniques. *J. Plant Physiol.* 212, 13-28, 2017.

Alan Houghton, Ingo Appelhagen, Cathie Martin. Natural Blues: Structure Meets Function in Anthocyanins. *Plants* (Basel). 10(4):726,2021;

Θωμαΐδου Αγγελική, Σακαγιάννη Ανθή. *Μελέτη Χρωστικών των Ανθέων στο Φυτό CAMPANULA VERSICOLOR με Χρήση Βιοχημικών Μεθόδων*. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Ανθοκομίας Αρχιτεκτονικής Τοπίου, ΤΕΙ Ηπείρου, Άρτα, 2011.

Κορομηλά Ισμήνη, Στεφανίδου Μαρία. *Μελέτη Χρωστικών Ανθέων στο Φυτό CAMPANULA VERSICOLOR με Χρήση Εξειδικευμένων Βιοχημικών Τεχνικών*. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Ανθοκομίας Αρχιτεκτονικής Τοπίου, ΤΕΙ Ηπείρου, Άρτα, 2010.

Μαρίνα Μαγουλιά. *Η Επίδραση Εκχυλισμάτων από τα Φυτά των Οικογενειών Campanulaceae, Brassicaceae και Ranunculaceae στην Βιολογία των Κυττάρων του Νευρικού Συστήματος*. Μεταπτυχιακή διατριβή, ΠΜΣ, ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΖΩΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ/ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 2020.

Marina Magoula, Aggeliki Drakontaeidi, Konstantina Kafetzoglou, Vasiliki Karagianni, Dimitrios Kyrkas, Nikolaos Mantzos, George K. Papadopoulos, Paraskevi Beza. 2022. Flowercolor study of *Campanula versicolor* blue petal. 72^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα, Δεκέμβριος 2022.

M Mori, T Kondo, K Toki, Kumi Yoshida. Structure of anthocyanin from the blue petals of *Phacelia campanularia* and its blue flower color development. *Phytochemistry* 67, 622-629, 2006.

Βαγγέλης Παπιομήτογλου, *Τα αγριολούλουδα της Ελλάδας*. 3^η ανατύπωση, Εκδόσεις Mediterraneo, Αθήνα, 2023.

George K. Papadopoulos, Studies in the biosynthesis structure and function of the brown membrane of *Halobacterium halobium*. Ph.D. dissertation, The Ohio State University, Columbus Ohio, 1981.

Ζωή Ράγγα. Καταγραφή της *CAMPANULA VERSICOLOR* στην Ήπειρο. Πτυχιακή Εργασία, 2014. Κατεύθυνση Ανθοκομίας – Αρχιτεκτονικής Τοπίου ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΗΠΕΙΡΟΥ.

Robert T. Ross, Melvin Calvin. Thermodynamics of Light Emission and Free-Energy Storage in Photosynthesis. *Biophysical Journal*, 7:595-614, 1967.

Σαβούρδου Τριανταφυλλένια, Κύρκας Δημήτριος, Μάντζος Νικόλαος, Σάββας Δημήτριος, Παπαδόπουλος Γεώργιος Κ, Καραγιάννη Βασιλική. Μελέτη χρωστικών ανθέων στο φυτό *Campanula versicolor* με χρήση βιοχημικών τεχνικών. Παρουσιάστηκε στο 21^ο Ετήσιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Οπωροκηπευτικών, Ιωάννινα, 8-10 Οκτωβρίου 2003.

Τριανταφυλλένια Σαβούρδου, 2006. *Μελέτη Χρωστικών Ανθέων στο Φυτό Campanula versicolor με Χρήση Βιοχημικών Τεχνικών*. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Ανθοκομίας Αρχιτεκτονικής Τοπίου, ΤΕΙ Ηπείρου, Άρτα.

Masaaki Shiono, Naohiro Matsugaki, Kosaku Takeda. Structure of commelinin, a blue complex pigment from the blue flowers of *Commelina communis*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 84, 452-456, 2008.

Bo-Mi Song and Chi-Hon Lee. Toward a Mechanistic Understanding of Color Vision in Insects. *Front. Neural Circuits* 12:16, 2018. doi: 10.3389/fncir.2018.00016

George Gabriel Stokes. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142, 463-562, 1852. <https://www.jstor.org/stable/pdf/108550.pdf>

Arne Strid. *Mountain flora of Greece*. Vol. 2, (Oxalidaceae-Campanulaceae). Cambridge University Press, 1986.

Kosaku Takeda. Blue metal complex pigments involved in blue flower color. *Proc Jpn Acad, Ser. B, Phys Biol Sci.* 82, 142-154, 2006.

Tufail T, Bader Ul Ain H, Noreen S, Ikram A, Arshad MT, Abdullahi MA. Nutritional Benefits of Lycopene and Beta-Carotene: A Comprehensive Overview. *Food Sci Nutr.* 12:8715-8741,2024.

Emmanuil A Trantas, Matthaios A Koffas, Peng Xu, Filippos Ververidis. When plants produce not enough or at all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. *Front Plant Sci.* 2015;6 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00007>.

Kensal Van Holde, W. Curtis Johnson, P. Shing Ho. *Βιοφυσική*, 2008. Εκδόσεις Έμβρυο – Στυλιανός Βασιλειάδης, Αθήνα.

Filippos Ververidis, Emmanuil A Trantas, Carl Douglas, Guenter Vollmer, Georg Kretzschmar, Nickolas Panopoulos. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol J.* 2007 Oct;2(10):1214-34.

Kumi Yoshida, Mihoko Mori and Tadao Kondo. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat. Prod. Rep.*, 26: 884–915, 2009.