

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΚΑΙ
ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ
ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΑ ΦΥΤΑ**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΣΙΑΤΗΣ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ

Αθήνα
2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΑΙ
ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΑ ΦΥΤΑ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΣΙΑΤΗΣ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΑΘ. Μ. ΠΟΛΥΣΙΟΥ

ΜΕΛΗ:

Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ, Καθηγητής

Β. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ-ΚΟΚΟΤΟΥ, Καθηγήτρια

Μ. ΚΩΜΑΙΤΗΣ, Καθηγητής

Π. ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ, Επ. Καθηγητής

Γ. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ, Επ. Καθηγήτρια

Α. ΚΥΜΠΑΡΗΣ, Επ. Καθηγητής

Αθήνα
2013

«...όπως ψηλά, έτσι και χαμηλά

ως εν ουρανών και επί της γης»

ORDO AB CHAO

Η διαδικασία κατάκτησης κάθε στόχου, μικρού ή μεγαλύτερου αποτελεί πάντοτε αποτέλεσμα κοινής προσπάθειας. Είναι αναληθές ότι μπορεί κανείς ουσιαστικά μόνος να πετύχει σημαντικά πράγματα. Ακόμη και οι καλύτεροι σύγχρονοι επιστήμονες, στέκονται στους ώμους γιγάντων της σκέψης, που με λιγότερα μέσα και τεχνολογία έκαναν ανακαλύψεις που πραγματικά άλλαξαν τον κόσμο μέσα σε λιγότερα από εκατό χρόνια.

Υπό κλίμακα, σε κάθε εργαστηριακό και ερευνητικό χώρο, το έργο ενός εκάστου ερευνητή αποτελεί συνέχεια δουλειάς προηγουμένων από αυτόν και υποδομή για την εργασία των επομένων. Στην προσπάθεια καθενός, η βοήθεια, πολλές φορές και η απλή παρουσία των συναδέλφων ή συνεργατών είναι εποικοδομητική. Όλοι με τον τρόπο τους μπορούν να καταστούν αρωγοί στην προσπάθεια και κανενός η βοήθεια δεν είναι περιττή.

Στο επίπεδο αυτό, πρώτη φορά σε εργασιακό χώρο, γνώρισα μια πραγματικά φιλική κοινότητα ανθρώπων, χωρίς την βοήθεια των οποίων θα ήταν αδύνατη και η έναρξη ακόμα οποιασδήποτε εργασίας.

Στο προσωπικό του εργαστηρίου και τους συναδέλφους υποψήφιους διδάκτορες που συνέπεσαν χρονικά με την δική μου παρουσία εκεί έχω μόνο να καταθέσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου και την φιλία μου εφεξής. Είμαι περήφανος να μπορώ να πω ότι έχω φίλους όλους τους ανθρώπους με τους οποίους δούλεψα μαζί.

Ειδικότερα δε, πρέπει να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Χρήστο Παππά για την διαρκή αφύπνιση και τις πολλές γνώσεις που μου μετέδωσε και τον αναπληρωτή καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη, που κατηύθυνε την πολλές φορές πελαγοδρομούσα διάθεσή μου.

Ξεχωριστά θα αναφέρω τον επίκουρο καθηγητή σήμερα, Αθανάσιο Κυμπάρη με τον οποίο πέρασα το μεγαλύτερο μέρος του ερευνητικού μου έργου. Σε αυτόν και στις συζητήσεις που είχαμε σχεδόν καθημερινά οφείλονται οι περισσότερες ιδέες για τα επιμέρους τμήματα της μελέτης και τον ευχαριστώ για αυτό.

Μέγιστη τιμή όμως ανάμεσα στα μέλη του εργαστηρίου αξίζει στον επικεφαλής της ερευνητικής ομάδας, Καθηγητή κύριο Μόσχο Πολυσιού, οποίος με περιέβαλε με εμπιστοσύνη και που έκανε τα αδύνατα δυνατά για να φτάσει αυτή η μελέτη στο τέλος της. Η υποστήριξή του ήταν τόση και συγκινητική.

Νικόλαος Γ. Σιατής

Αθήνα 6^{ος} 2013

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη είχε σαν στόχο την ανάπτυξη νέων μεθόδων για την παραλαβή και ανάλυση πολύτιμων συστατικών από φυτικό υλικό. Στα επόμενα κεφάλαια παρουσιάζονται οι συνειρμοί που ακολουθήθηκαν και τα προβλήματα τα οποία ετέθησαν ώστε να γίνει δυνατή η πρόοδος στην εργασία.

Η γενική εντύπωση είναι ότι οι νέες μέθοδοι παραλαβής και ανάλυσης γενικά αλλά και αυτές που περιγράφονται παρακάτω, αποτελούν πρόκριμα για την περαιτέρω αξιοποίηση αφ' ενός των φασματοσκοπικών τεχνικών στην ανάλυση των φυσικών προϊόντων και αφ' ετερου την αξιοποίηση των μεθόδων υπερήχων και μικροκυμάτων στην παραλαβή τους.

Στα μετρήσιμα αποτελέσματα συμπεριλαμβάνονται η μείωση του χρόνου που απαιτείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τεσσάρων κύριων συστατικών του αιθερίου ελαίου ρίγανης και θυμαριού, καρβακρόλης, θυμόλης, π-κυμένου και γ-τερπινένιου από 60 λεπτά με την καλασική μέθοδο αναφοράς με αέρια χρωματογραφία σε μόλις τρία λεπτά με την νέα μέθοδο με χρήση φασματοσκοπίας Raman. Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της νέας μεθόδου επιβεβαιώθηκαν στατιστικά.

Επίσης, έγινε δυνατή η προσαρμογή στο εργαστήριο συσκευής παραλαβής αιθερίων ελαίων με χρήση μικροκυμάτων. Με την συσκευή αυτή έγιναν παραλαβές αιθερίων ελαίων από αρωματικά φυτά αλλά και παραλαβές ασταθών θειούχων πτητικών ενώσεων από σκόρδο.

Στην περίπτωση των αιθερίων ελαίων ο χρόνος παραλαβής μειώθηκε σημαντικά από 3-4 ώρες σε 40 λεπτά για την ίδια ποσότητα αιθερίου ελαίου. Το παραλαμβανόμενο προϊόν παρουσιάζει μικρές διαφορές σε σχέση με αυτό της μεθόδου που εφαρμόζει απλή θέρμανση.

Στην περίπτωση όπου παρελήφθησαν συστατικά του σκόρδου η μέθοδος παραλαβής τους αποτέλεσε αντικείμενο διεξοδικής μελέτης καθώς η παρουσία ενός πολύ δραστικού ατόμου θείου στα περισσότερα από τα συστατικά, τα κάνει εξαιρετικά ασταθή. Η μέθοδος που προσδιορίστηκε σαν πιο κατάλληλη ήταν η μέθοδος των υπερήχων με δεύτερη αυτή των μικροκυμάτων και τρίτη την μέθοδο Likens-Nickerson.

Οι ουσίες που απομονώθηκαν από το σκόρδο αποτελούσαν μίγμα που αναλύθηκε σε αέριο χρωματογράφο και προσδιορίστηκε η σύστασή του. Η μέθοδος αυτή είναι βιβλιογραφικά η μοναδική διαθέσιμη παρόλο που δεν κρίνεται η πιο κατάλληλη. Αναπτύχθηκε μέθοδος βασισμένη στην φασματοσκοπία FT-RAMAN για τον προσδιορισμό ομάδας ενώσεων που απαντούν στο εκχύλισμα του σκόρδου. Η μέθοδος είναι ακριβής, γρήγορη, μη καταστροφική και πιο κατάλληλη για το εξαιρετικά ευαίσθητο δείγμα.

Στη συνέχεια με φασματοσκοπία υπερύθρου παρακολούθηθηκε η διάσπαση της αλλυσίνης σε θερμοκρασία δωματίου για την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης της θερμότητας στην παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται στο σκόρδο.

Στον τομέα των ενεργειακών φυτών, έγινε προσπάθεια τόσο στον τομέα της απομόνωσης αλλά και στον τομέα της μετατροπής των φυτικών ελαίων σε βιοκαύσιμα. Τέλος, σημαντική εξέλιξη ήταν η ανάπτυξη της μεθόδου σύγχρονης εκχύλισης μετεστεροποίησης όπου η παραλαβή σε λουτρό υπερήχων και η αντίδραση μετεστεροποίησης με μεθανόλη συμβαίνουν ταυτόχρονα εξοικονομώντας χρόνο και αναλώσιμα.

Τέλος, για την παρατήρηση της διαδικασίας και τον προσδιορισμό του τέλους της αντίδρασης αναπτύχθηκε νέα μέθοδος παρακολούθησης με φασματοσκοπία FT-IR χρησιμοποιώντας παράθυρα σεληνιούχου ψευδαργύρου.

Executive summary

In the course of this study, the possibility of developing new methods to obtain and analysis of valuable natural products was explored. The fulfillment of this work demanded several obstacles to be overcome and innovative techniques to be applied.

As a general conclusion, new methods of obtaining and analyzing like those described further in the text, are a promising field for further research. In this course of research the exploitation of spectroscopic techniques for the analysis of natural products and of the ultrasound and microwave techniques, is to be discussed.

The reduction of the time needed for the quantitative determination of four key components in oregano and thyme essential oil (carvacrol, thymol, π -cymene and γ -terpinene), from 60 minutes using gas chromatography to just three minutes with Raman spectroscopy, was achieved. The new method's accuracy and reproducibility was statistically confirmed.

It was also possible to adapt a microwave assisted device for the distillation of essential oils in the laboratory. The device was used to obtain essential oils from aromatic plants and highly unstable sulfur containing volatiles from garlic.

With this method, the time needed to obtain the essential oil was significantly reduced from 3-4 h to 40 minutes, yielding the same amount of product. The distillate shows some variations regarding that obtained through conventional heating.

In the case of garlic components, the obtaining methods was scrutinized, since the presence of the highly reactive sulfur atom in most of the substances, makes the essential oil components very unstable. The method that was found to be more appropriate for the isolation of those compounds was ultrasonic extraction, followed by microwave heating and last was the conventional method of microdistillation-extraction Likens-Nickerson.

The isolated mixture was analyzed with gas chromatography and its composition was determined. Gas chromatography is the only method generally available but there are a lot of references in the literature that criticize it as inadequate for heat sensitive compounds. An alternative method based on FT-Raman spectroscopy was developed. The new method proved to be fast, accurate and non destructive to the sample.

Ultimately, Fourier Transform Infrared spectroscopy was used to monitor the degradation of allicin (a key component in garlic metabolism) in room temperature. This was a great help in understanding the effect of heat in the production of secondary metabolites produced by garlic.

In the field of biofuel producing plants, an effort was made to extract and transform vegetable oils into biodiesel finally, an important breakthrough was the development of a method that simultaneously extracts and trans-esterifies the vegetable oil, directly from the plant tissue into biodiesel. This caused a drastic decrease in time and consumables usage.

To monitor the above procedure, and determine the end of the trans-esterification reaction, an FT-IR method with zinc selenide windows was also developed.

Πίνακας Περιεχομένων

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	1
<u>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΘΕΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ</u>	2
<u>1.1 Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά</u>	2
<u>1.2 Καύσιμα για κινητήρες εσωτερικής καύσης από ελαιούχους σπόρους</u>	4
<u>Εισαγωγή</u>	4
<u>1.2.1 Η έννοια, η χρησιμότητα, και τα πλεονεκτήματα του βιοντίζελ</u>	5
<u>1.2.2 Κανονισμοί που διέπουν την ποιότητα του βιοντίζελ διεθνώς</u>	7
<u>1.2.3 Φυτικά έλαια - τριγλυκερίδια</u>	10
<u>1.2.4 Μετατροπή τριγλυκεριδίων σε βιοντίζελ σε βιομηχανική κλίμακα</u>	12
<u>1.2.5 Μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες</u>	14
<u>1.2.6 Σύγχρονη εκχύλιση μετεστεροποίηση</u>	17
<u>1.2.7 Φυτικό υλικό</u>	18
<u>1.2.7 i Ρίγανη</u>	18
<u>1.2.7 ii Θυμάρι</u>	19
<u>1.2.7 iii Λεβάντα</u>	20
<u>1.2.7 iv Δενδρολίβανο</u>	22
<u>1.2.7 v Φλυσκούνι</u>	23
<u>1.2.7 vi Σκόρδο</u>	24
<u>1.2.7 vii Σουσάμι</u>	30
<u>1.2.7 viii Ηλίανθος</u>	31
<u>1.2.7 ix Βαμβάκι</u>	32
<u>1.2.7 x Ελαιοκράμβη</u>	35
<u>1.2.7 xi Αγριαγκινάρα</u>	37
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ</u>	39
<u>2.1 Υδρο-απόσταξη</u>	39
<u>2.2 Μικρό-απόσταξη εκχύλιση (Lickens – Nickerson)</u>	42
<u>2.3 Εκχύλιση Soxhlet</u>	44
<u>2.4 Εκχύλιση με την χρήση υπερήχων</u>	45
<u>2.5 Η εφαρμογή των μικροκυμάτων στην απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από αρωματικά φυτά μέσω απόσταξης ή εκχύλισης</u>	47

<u>2.6 Αντίδραση μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίων σε εστέρες λιπαρών οξέων για την παραγωγή βιοκανσίων</u>	54
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ</u>	56
<u>3.1 Αέρια χρωματογραφία</u>	56
<u>3.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)</u>	60
<u>3.3 Φασματοσκοπία σκέδασης Raman με μετασχηματισμό Fourier (FT-Raman)</u>	69
<u>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</u>	73
<u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	77
<u>4.1. Σύγκριση μεθόδων υδροαπόσταξης του πτητικού κλάσματος ρίγανης, θυμαριού, δεντρολίβανου, φλυσκουνιού και λεβάντας με απλή θέρμανση και μικροκύματα</u>	77
<u>4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των κυρίων συστατικών αιθερίου ελαίου ρίγανης και θυμαριού με φασματοσκοπία FT-Raman</u>	79
<u>4.3. Σύγκριση μεθόδων παραλαβής βιοδραστικών θειούχων ενώσεων του σκόρδου με Lickens – Nickerson, υπερήχους και μικροκύματα</u>	82
<u>4.3.1 Παραλαβή με μικρο απόσταξη εκχύλιση Lickens – Nickerson</u>	83
<u>4.3.2 Απόσταξη με τη χρήση μικροκυμάτων</u>	84
<u>4.3.3 Παραλαβή με μικρο απόσταξη εκχύλιση Lickens – Nickerson</u>	84
<u>4.4. Ανάλυση των πτητικών συστατικών του σκόρδου με αέρια χρωματογραφία</u>	85
<u>4.5. Ανάλυση των πτητικών συστατικών του σκόρδου με φασματοσκοπία FT-Raman</u> ...	85
<u>4.6. Ανάλυση των πτητικών συστατικών του σκόρδου με φασματοσκοπία FT-IR</u>	86
<u>4.7. Παραλαβή τριγλυκεριδίων από ελαιούχους σπόρους και υποπροϊόντα σπορελαιουργίας (πίττες) με υπερήχους</u>	86
<u>4.8. Μετεστεροποίηση τριγλυκεριδίων</u>	88
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	92
<u>5.1. Σύγκριση μεθόδων υδροαπόσταξης του πτητικού κλάσματος ρίγανης, θυμαριού, δεντρολίβανου, φλυσκουνιού και λεβάντας με απλή θέρμανση και μικροκύματα</u>	92
<u>5.1.1 Σύγκριση μεταξύ των μεθόδων παραλαβής</u>	92
<u>5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των κυρίων συστατικών αιθερίου ελαίου ρίγανης και θυμαριού με φασματοσκοπία FT-Raman</u>	109

<u>5.3. Σύγκριση μεθόδων παραλαβής βιοδραστικών θειούχων ενώσεων του σκόρδου με Lickens – Nickerson, υπερήχους και μικροκύματα</u>	116
<u>5.3.1 Αποτελέσματα</u>	119
<u>5.3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων</u>	121
<u>5.4. Παρακολούθηση διάσπασης της αλλυσίνης με φασματοσκοπία FT-IR</u>	131
<u>5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός κυκλικών και άκυκλων θειούχων συστατικών του σκόρδου με φασματοσκοπία FT-Raman</u>	137
<u>5.6. Παραλαβή τριγλυκεριδίων από ελαιούχους σπόρους και υποπροϊόντα σπορελαιουργίας (πίττες) με υπερήχους</u>	154
<u>5.7. Μεθεστεροποίηση τριγλυκεριδίων με την κλασική μέθοδο, με την χρήση υπερήχων</u>	155
<u>5.7.1 Μετεστεροποίηση με χρήση υπερήχων</u>	155
<u>5.7.2 Ταυτόχρονη εκχύλιση – μεθεστεροποίηση</u>	157
<u>5.8 Παρακολούθηση αντίδρασης μεθεστεροποίησης με φασματοσκοπία FT-IR</u>	162
<u>5.8.1 Μεθοδολογία</u>	162
<u>5.8.2 Φασματοσκοπική ανάλυση τριγλυκεριδίων</u>	162
<u>5.8.3 Φασματοσκοπική ανάλυση εστέρων</u>	165
<u>5.8.4 Ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς</u>	167
<u>Κατάλογος πινάκων</u>	173
<u>Κατάλογος εικόνων</u>	175
<u>Κατάλογος σχημάτων</u>	175
<u>Βιβλιογραφία</u>	176

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα πλαίσια της ανάπτυξης της γνώσης η οποία θα υπηρετήσει την επιστήμη στο σύνολό της, η βασική έρευνα είναι αυτή πάνω στην οποία θεμελιώνονται οι εφαρμογές που δημιουργούν τα τεχνολογικά επιτεύγματα της εποχής μας.

Βασική έρευνα είναι και η υπό κλίμακα προκαταρκτική αξιολόγηση μεθόδων και διαδικασιών που σκοπό έχουν την πρόοδό τους στην βιομηχανική παραγωγή. Με βάση αυτή την παραδοχή δοκιμάστηκαν πειραματικά κάποιες πολλά υποσχόμενες μέθοδοι ώστε να διαπιστωθεί και να τεκμηριωθεί η πιθανότητα εφαρμογής τους σε βιομηχανική κλίμακα.

Οι νέες μέθοδοι κινούνται σε δύο άξονες: πρώτα την απομόνωση από φυτικό υλικό προϊόντων μεταβολισμού που για κάποιο λόγο έχουν αξία (ανταλλακτική ή άλλη), και που ενδιαφέρει την οικονομία και την έρευνα να παραλαμβάνονται γρήγορα, φθηνά και χωρίς να υποβαθμίζονται, και στη συνέχεια τον χαρακτηρισμό τους με αναλυτικές μεθόδους που συνιστούν ελέγχους ρουτίνας για γρήγορο και ακριβή ποιοτικό έλεγχο μέσω ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης.

Για την απομόνωση των προϊόντων μεταβολισμού ασχοληθήκαμε αποκλειστικά με λιπόφιλες ουσίες, και οι μέθοδοι παραλαβής επιλέχθηκαν να είναι γρήγορες και μη καταστρεπτικές για τις ουσίες – στόχους. Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν αφορούν κυρίως εφαρμογές μικροκυμάτων και υπερήχων για την απομόνωση συστατικών από φυτικούς ιστούς.

Για την ανάλυση τους επιλέχθηκαν φασματοσκοπικές μέθοδοι (υπέρυθρη φασματοσκοπία και φασματοσκοπία Raman) για πιο γρήγορη ανάλυση. Οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπό έρευνα συστατικών συγκρίθηκαν κάθε φορά με αποδεκτές και συνήθως χρησιμοποιούμενες μεθόδους αναφοράς.

Τα υλικά τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης ήταν τα αρωματικά φυτά που απαντούν στην Ελλάδα, και των οποίων τα αιθέρια έλαια έλκουν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον σε εφαρμογές που ποικίλουν από την φαρμακευτική μέχρι την διατροφή και την φυτοπροστασία.

Επιπλέον σημαντικό μέρος της έρευνας κατευθύνθηκε σε ένα αναπτυσσόμενο κλάδο, αυτό των φυτικών ελαίων και συγκεκριμένα στην χρήση τους ως βιοκαύσιμα.

Τέλος, πιο απαιτητικοί αποδείχθηκαν στην παραλαβή και ανάλυσή τους οι θειούχοι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από το σκόρδο και χαρακτηρίζονται από υψηλή πτητικότητα και πολύ εύκολη διάσπαση παρουσία νερού, οξυγόνου και θερμότητας.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΘΕΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

1.1 Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά

Τα *Lamiaceae* είναι τα πιο γνωστά αρωματικά φυτά που απαντούν στην χώρα μας και όπως είναι επόμενο, έχουν και παραδοσιακή θέση στην ελληνική διατροφή και βοτανοθεραπεία. Στα φυτά αυτά συγκαταλέγονται φυτά περίπου 210 γενών και περίπου 3500 είδη. Συγγενής οικογένεια των [Verbenaceae](#) με την οποία συγγέεται πολύ εύκολα. Έχουν αντίθετα φύλλα που φύονται σε ζεύγη εναλλασσόμενα σε διαδοχικές ορθές γωνίες επι του βλαστού. Τα άνθη τους είναι ερμαφρόδιτα με 5 συνενωμένα πέταλα και 5 σέπαλα επίσης συνενωμένα. Στην πλειοψηφία τα φυτά αυτά είναι αρωματικά σε όλο το σώμα τους και είναι χαμηλοί θάμνοι ή πόες. Σπάνια δε είναι δένδρα ή ξυλώδεις θάμνοι. Με τον τρόπο αυτό άλλωστε έχουν προσαρμοστεί απόλυτα στο ξηροθερμικό κλίμα της Ελλάδας. Κοινότερα φυτά της οικογένειας αυτής είναι η ρίγανη, το θυμάρι, η λεβάντα, η σατουρέγια, το δενδρολίβανο, η μέντα, ο βασιλικός κ.α. (Βαρδαβάκης, 1996)

Εκτός των *Lamiaceae* σημαντική θέση στην Ελληνική διατροφή έχει και μια άλλη οικογένεια φυτών με σημαντική διατροφική αξιοποίηση τα *Liliaceae*. Κυριότεροι εκπρόσωποι της οικογένειας αυτής είναι το κρεμμύδι και το σκόρδο, ενώ και ο κρόκος ανήκει στην οικογένεια αυτή (Βαρδαβάκης, 1996).

Οι σημαντικές θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών αυτών αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στην ύπαρξη συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών με χαμηλό σημείο ζέσεως που αποτελούν το πτητικό κλάσμα. Το άθροισμα αυτών των ουσιών επίσης αναφέρεται ως αιθέριο έλαιο. Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, οι δύο έννοιες είναι ουσιαστικά ταυτόσημες.

Οι σκοποί της μελέτης πάνω σε αυτό το αντικείμενο περιγράφονται παρακάτω και περιλαμβάνουν την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου ανάλυσης του αιθερίου ελαίου ρίγανης και θυμαριού, δύο μεθόδους απομόνωσης πτητικών ουσιών με την βοήθεια μικροκυμάτων για την εφαρμογή σε *Lamiaceae* και το σκόρδο και τέλος μεθόδους παρακολούθησης της διάσπασης ουσιών του σκόρδου με φασματοσκοπικές μεθόδους.

Όπως έγινε σαφές και πιο πάνω η ανάλυση των αιθερίων ελαίων είναι πολύ σημαντική για την κατάταξή τους. Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των μεθόδων παραλαβής με απόσταξη ή με μικροκύματα έχει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα και είναι η πλέον αναγνωρισμένη μέθοδος αυτού του είδους. Παρ' όλα αυτά, η βιβλιογραφία περιέχει αναφορές εναλλακτικών τρόπων ανάλυσης αιθερίων ελαίων (Daferera, Tarantilis & Polissiou, 2002), πράγμα που υποδηλώνει ότι υπάρχει ανάγκη για

γρήγορες ποσοτικές μεθόδους που θα βρουν εύκολα και γρήγορα θέση στην αγορά και την βιομηχανία σαν εργαλεία γρήγορου ποιοτικού ελέγχου.

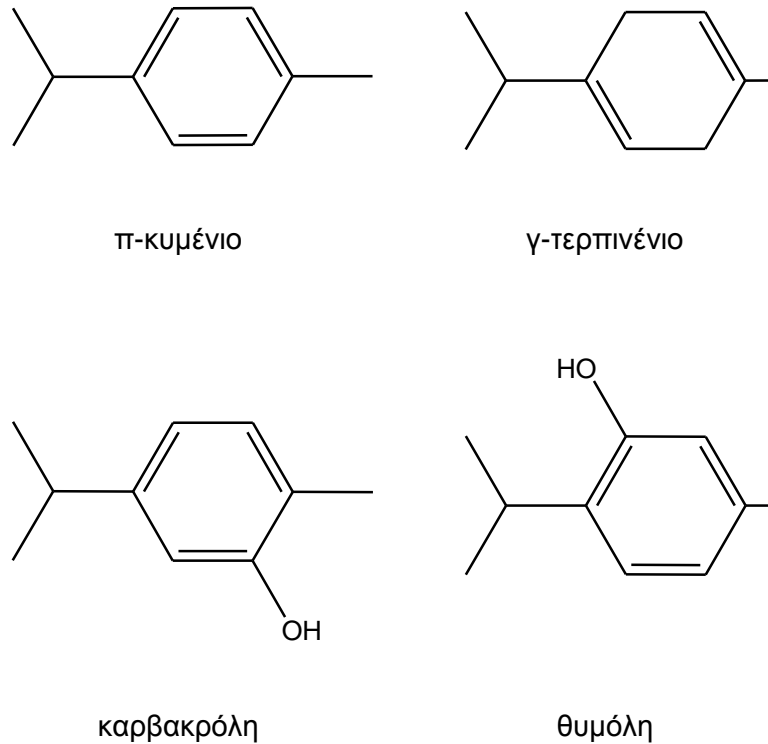
Μια γρήγορη και ακριβής μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού συστατικών σε μίγματα φυσικών προϊόντων μπορεί να βασίζεται σε φασματοσκοπικές τεχνικές. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι FT-IR και FT-Raman μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών αιθερίου ελαίου με κάποιες προϋποθέσεις. Συνοπτικά οι προϋποθέσεις αυτές είναι η γνώση του φάσματος των συστατικών που θα ποσοτικοποιηθούν, η ύπαρξη διακριτών χαρακτηριστικών κορυφών και η καταγραφή φασμάτων φυσικώς παραγόμενων αιθερίων ελαίων γνωστής συγκέντρωσης για την επαλήθευση (Pappas, Tarantilis, & Polissiou, 1998).

Προκειμένου για την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθείται μια λογική ακολουθία αποφάσεων. Έτσι, ανάμεσα στα φυτά που είναι γνωστά για το αιθέριο έλαιό τους επιλέγονται η ρίγανη που συγκεντρώνει την πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών σχετικά με τα αιθέρια έλαια κυρίως λόγω των βιοδραστικών χαρακτηριστικών της, και το θυμάρι που είναι συγγενές είδος και δίνει παρόμοιο αιθέριο έλαιο. Ένα άλλο κρίσιμο κριτήριο για την επιλογή είναι η σύσταση του αιθερίου ελαίου. Τα δύο φυτά αυτά έχουν σύσταση που αποτελείται από 4 κύρια συστατικά και μερικές δεκάδες δευτερεύοντα. Αυτό διευκολύνει αρκετά την νέα μέθοδο απλοποιώντας την μαθηματική ανάλυση της διασποράς 4 διαφορετικών συστατικών και ταυτόχρονα με τον ποσοτικό προσδιορισμό των κυρίων συστατικών έχει προσδιοριστεί ένα μεγάλο ποσοστό της σύστασης του αιθερίου ελαίου. Τέλος, για την επιλογή των φυτών αυτών είναι σημαντικό ότι τα συστατικά του αιθερίου ελαίου που μπορεί να ποσοτικοποιηθούν πρέπει να δίνουν ικανοποιητικής ποιότητας φάσματα, στην μέθοδο που θα επιλεγεί. Έτσι, και στην παράμετρο αυτή το θυμάρι και η ρίγανη έχουν συστατικά που δίνουν καλής ποιότητας φάσματα IR και Raman (Daferera, Pappas, Tarantilis & Polissiou, 2002).

Βέβαια, τα φυτά αυτά είναι γηγενή της Ελληνικής χλωρίδας και αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν διαφορετικές ποικιλίες και άρα αναμένονται και αιθέρια έλαια διαφορετικής σύστασης μεταξύ των φυτών. Άλλωστε έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να διαφέρουν ποσοστά και σύσταση αιθερίου ελαίου μεταξύ ποικιλιών (Loz'iene, Vaic'iu'niene, & Venskutonis, 2003), τόπου καταγωγής και ακόμη και μεταξύ περιόδου του κύκλου ζωής και της μέρας που συλλέγονται τα δείγματα (SaHez, 2001, Salgueiro et al, 1997, Garcia & Sanz, 2001, Kokkini, Karousou, Pardioti, Krigas & Lanaras, 1997)

Έτσι, ενώ μπορεί ένα αιθέριο έλαιο να έχει δεδομένη σύσταση μπορεί άλλο αιθέριο π.χ. διαφορετικής μέρας συγκομιδής να έχει ελαφρώς διαφορετική σύσταση. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη την ανάπτυξη μιας μεθόδου που να μπορεί γρήγορα και φθηνά να προσδιορίζει τα βασικά χαρακτηριστικά του αιθερίου ελαίου.

Τα συστατικά αυτά είναι το π-κυμένιο, γ-τερπινένιο, η θυμόλη και η καρβακρόλη. Τα συστατικά αυτά συνήθως αθροιστικά περιλαμβάνουν το 90% του αιθερίου ελαίου (SaHez, 2001, Salgueiro et al, 1997, Kokkini, Karousou, Pardioti, Krigas & Lanaras, 1997), ενώ οι συντακτικοί τύποι τους φαίνονται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1 Συντακτικοί τύποι σημαντικών συστατικών αιθερίων ελαίων

1.2 Καύσιμα για κινητήρες εσωτερικής καύσης από ελαιούχους σπόρους

Εισαγωγή

Ίσως μια από τις πιο σημαντικές εξελίξεις στην πράσινη χημεία και την συνέργειά της με τις γεωπονικές επιστήμες είναι και οι εφαρμογές των βιοκαυσίμων. Με τον όρο βιοκαύσιμα εννοούμε καύσιμα για κινητήρες εσωτερικής καύσης που αντί να προέρχονται από συμβατικά ορυκτά πετρελαιοειδή προέρχονται από φυτικά προϊόντα. Τα βιοκαύσιμα χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες που εξυπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς και υποκαθιστούν με διαφορετικό τρόπο τα προϊόντα πετρελαίου. Έτσι το βιοαέριο που προέρχεται από την διάσπαση απορριμμάτων υπό πίεση και θερμοκρασία σε χώρους ταφής και είναι σε μεγάλο ποσοστό μεθάνιο υποκαθιστά το φυσικό αέριο ενώ δύο είδη υγρών καυσίμων είναι το βιοντίζελ και η βιοαιθανόλη που κερδίζουν έδαφος έναντι του ντίζελ και της βενζίνης αντίστοιχα.

Από τα υγρά καύσιμα ευρύτερη απήχηση βρίσκει το βιοντίζελ, ποσότητες του οποίου βρίσκονται ήδη σε πρατήρια καυσίμων σε πολλές χώρες ενώ πιο πίσω βρίσκεται η εξάπλωση της βιοαιθανόλης.

Τα δύο είδη βιοκαυσίμων παράγονται από φυτικούς ιστούς με διαφορετικό τρόπο. Η μεν βιοαιθανόλη προέρχεται από φυτικούς ιστούς με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα ενώ το βιοντίζελ από ελαιούχους σπόρους.

1.2.1 Η έννοια, η χρησιμότητα, και τα πλεονεκτήματα του βιοντίζελ

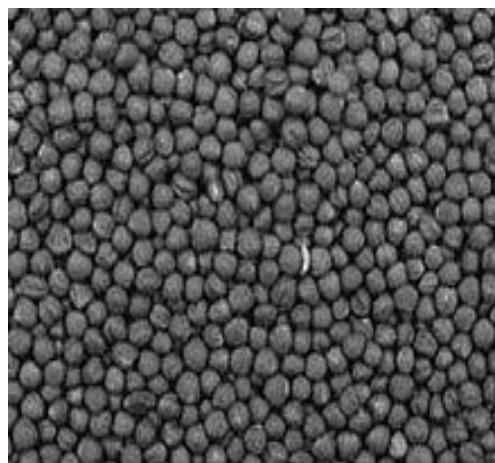
Το βιοντίζελ ορίζεται σαν μίγμα εστέρων λιπαρών οξέων με αλκοόλες μικρής αλυσίδας μέχρι τέσσερα το πολύ άτομα άνθρακα. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα λιπαρά οξέα να προέρχονται από προϊόντα φυτικής ή ζωικής προέλευσης και όχι από συνθετικές πετροχημικές διαδικασίες.

Ως γνωστό τα φυτά απορροφούν από την ατμόσφαιρα διοξείδιο του άνθρακα και μέσω της φωτοσύνθεσης και του μεταβολισμού τους μπορούν να παράγουν ανώτερα οργανικά μόρια. Τα φυτά προκειμένου να αποθηκεύουν ενέργεια σε μικρό όγκο συνθέτουν τριγλυκερίδια από λιπαρά οξέα με διάφορα μήκη ανθρακικής αλυσίδας. Τα τριγλυκερίδια αυτά αποθηκεύονται στους ιστούς και αποτελούν την αποθήκη ενέργειας του φυτού. Ειδικά κάποια φυτά αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες από τα τριγλυκερίδια αυτά στους σπόρους τους για να υπάρχουν διαθέσιμα αποθέματα ενέργειας κατά την βλάστηση (Srivastava & Prasad, 2000, Ma & Hanna, 1999). Τα φυτά αυτά παράγουν ελαιούχους σπόρους, πιο γνωστά δε είναι ο ηλιάνθος, η σόγια, το σουσάμι, η ελαιοκράμβη, το βαμβάκι και τελευταία αναπτύσσεται και η καλλιέργεια της αγριαγκινάρας.

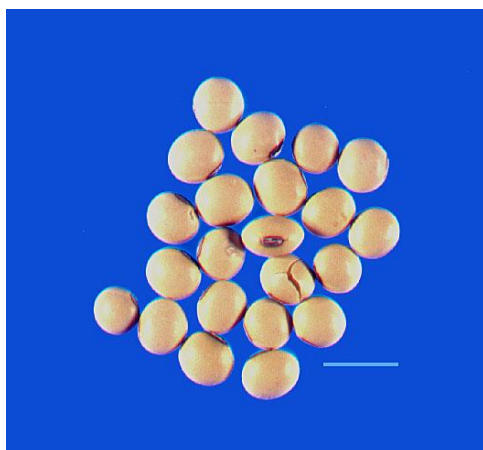
Σημαντικός λόγος για την προώθηση των βιοκαυσίμων είναι η αποφυγή με την χρήση τους της ρύπανσης που προκαλείται από την καύση πετρελαιοειδών. Ο λόγος για τον οποίο τα βιοκαύσιμα δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον είναι ότι για κάθε μόριο διοξειδίου του άνθρακα που εκπέμπεται κατά την καύση ενός μορίου βιοκαυσίμου, ένα άτομο άνθρακα είχε δεσμευθεί κατά την αναπνοή του φυτού με τη μορφή διοξειδίου. Έτσι το ισοζύγιο είναι μηδενικό (όσο διοξείδιο εκπέμπεται τόσο απορροφάται) και η ενέργεια που έχει απαιτηθεί είναι ηλιακή μέσω της φωτοσύνθεσης.



Σπόροι Ηλίανθου



Σπόροι Ελαιοκράμβης



Σποροι Σογιας



Σποροι Αγριαγκιναρς



Σπόροι Βαρβακιού



Σουσάμι

Εικόνα 1 Σπόροι από ενεργειακά φυτά

1.2.2 Κανονισμοί που διέπουν την ποιότητα του βιοντίζελ διεθνώς

Σαν φυσικό προϊόν το βιοντίζελ είναι πολύ δύσκολο να έχει σταθερή σύνθεση. Το είδος και η σύνθεση των τριγλυκεριδίων μπορεί να διαφέρουν πάρα πολύ μεταξύ των φυτικών ειδών από τα οποία προέρχονται, και κατά συνέπεια είναι λογικό να είναι δύσκολο να προσδιοριστούν μίγματα αποδεκτά για χρήση σαν βιοκαύσιμο.

Είναι λογικό, όταν τα καύσιμα που προέρχονται από πετρέλαιο παρέχουν μεγάλο βαθμό πιστότητας και τυποποίησης να είναι απαίτηση των καταναλωτών να υπάρχει ο ίδιος βαθμός τυποποίησης και στα βιοκαύσιμα. Για το λόγο αυτό, εκπονήθηκαν πρότυπα εμπορίας ώστε να μην χαρακτηρίζεται βιοντίζελ οποιοδήποτε μίγμα εστέρων λιπαρών οξέων αλλά μόνο όποιο πληροί κάποια standards (ASTM D6751-08, EN 14214:2003 , DIN V 51606).

Τα βασικότερα από τα κριτήρια συμμόρφωσης φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1 Κριτήρια συμμόρφωσης του βιοντίζελ με τα διεθνή πρότυπα

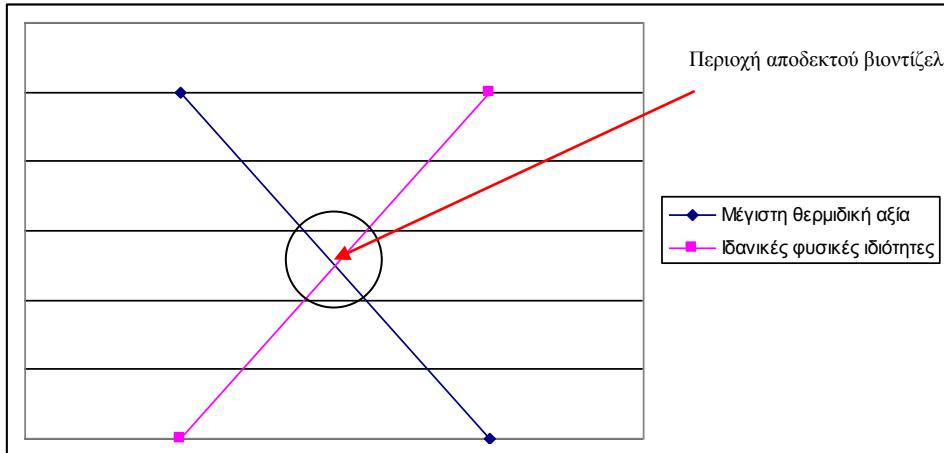
		Ευρωπαϊκή Ένωση	Γερμανία	Η.Π.Α.
Προδιαγραφή		EN 14214:2003	DIN V 51606	ASTM D6751
Σχετικά με		FAME	FAME	FAME
Πυκνότητα 15°C	g/cm ³	0.86-0.90	0.875-0.90	
Ιξώδες 40°C	mm ² /s	3.5-5.0	3.5-5.0	1.9-6.0
Απόσταξη	% @ °C			90%,360°C
Σημείο ανάφλεξης	°C	120 min	110 min	130 min
CFPP (cold filter plugging point, σημείο απόφραξης φίλτρων εν ψυχρώ)	°C	* όπως προσδιορίζεται σε κάθε κράτος	καλοκαίρι 0 άνοιξη/φθινόπωρο - 10 χειμώνας -20	-
Σημείο θόλωσης	°C	-	-	* εκρεμμεί
Θείο	mg/kg	10 max	10 max	15 max
CCR (conradson carbon residue, ανθρακικό υπόλειμμα)100%	% μάζας		0.05 max	0.05 max
Ανθρακικό υπόλειμμα (10% απεσταγμένου υπολείματος)	% μάζας	0.3 max	0.3 max	
Θειούχος τέφρα	% μάζας	0.02 max	0.03 max	0.02 max
Τέφρα	% μάζας			
Νερό	mg/kg	500 max	300 max	500 max
Συνολικές προσμίξεις	mg/kg	24 max	20 max	
Μέγιστη διάβρωση σε χαλκό	3h/50°C	1	1	3
Σταθερότητα οξείδωση	σε hrs;110°C	6 hours min		
Αριθμός κετανίου		51 min	49 min	47 min
Όξινος δείκτης	mgKOH /g	0.5 max	0.5 max	0.8 max
Μεθανόλη	% μάζας	0.20 max	0.3 max	

		Ευρωπαϊκή Ένωση	Γερμανία	Η.Π.Α.
Εστέρες	% μάζας	96.5 min		
Μονογλυκερίδια	% μάζας	0.8 max	0.8 max	
Διγλυκερίδια	% μάζας	0.2 max	0.4 max	
Triglyceride	% μάζας	0.2 max	0.4 max	
Ελεύθερη γλυκερόλη	% μάζας	0.02 max	0.02 max	0.02 max
Συνολική γλυκερόλη	% μάζας	0.25 max	0.25 max	0.24 max
Αριθμός ιωδίου		120 max	115 max	
ΜΕ λινολεϊκού οξέος	% μάζας	12 max		
C(x:4)	& % μάζας	1 max		
μεγαλύτερης αλυσίδας ακόρεστοι εστέρες				
Φώσφορος	mg/kg	10 max	10 max	10 max
Αλκαλικότητα	mg/kg		5 max	
Gr I (Na,K)	mg/kg	5 max		
GrII (Ca,Mg)	mg/kg	5 max		
PAHs (πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες)	% mass			

Όπως φαίνεται από τα κριτήρια που περιλαμβάνονται στις διεθνείς προδιαγραφές για το βιοντίζελ, τα προβλήματα που αντιμετωπίζει η εφαρμογή του σχετίζεται με δύο κυρίως γενικές παραμέτρους: οι φυσικές ιδιότητες του βιοκαυσίμου και η θερμιδική απόδοση του σαν καύσιμο. Το δεύτερο αυτό μέγεθος εκφράζεται κατ' αναλογία με το ορυκτό ντίζελ σε βαθμούς κετανίου.

Η επίτευξη ιδανικής σύνθεσης στο μίγμα εστέρων λιπαρών οξέων οδηγεί σε καλής ποιότητας βιοκαύσιμο ενώ αντίθετα σύνθεση μίγματος εστέρων χωρίς να οδηγεί σε κατάλληλες φυσικές ιδιότητες ή θερμιδική απόδοση δεν μπορεί να χαρακτηριστεί σαν βιοντίζελ, είναι δηλαδή εκτός προδιαγραφών. Στο Σχήμα 2 φαίνεται η σχέση μεταξύ φυσικών ιδιοτήτων του βιοντίζελ και θερμιδικής απόδοσης (βαθμού κετανίου) καθώς και μια οπτική απεικόνιση της περιοχής αποδεκτού βιοκαυσίμου. Ο λόγος για τον οποίο παρατηρείται το φαινόμενο αυτό είναι η αντίθεση που παρουσιάζουν τα μόρια που αποτελούν το βιοντίζελ ως προς τις ιδιότητές τους. Έτσι, μόρια υψηλής θερμιδικής αξίας (κατά την καύση τους σε κινητήρες) είναι οι εστέρες λιπαρών οξέων που προέρχονται από

κορεσμένα λιπαρά οξέα. Αντίθετα, τα μόρια αυτά είναι μειονεκτικά όταν λάβουμε υπ' όψη ότι τα μίγματα που χρησιμοποιούνται σαν καύσιμα πρέπει να είναι λεπτόρευστα για να μπορούν να ψεκαστούν στον κύλινδρο της μηχανής (Korbitz, 1999, Knothe, 2005).



Σχήμα 2 Γραφική απεικόνιση ιδιοτήτων του βιοντίζελ.

Ολοκληρώνοντας την συζήτηση πάνω στις προδιαγραφές του βιοντίζελ, μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

- 1) η αξιοποίηση, παραγωγή, χρήση και διάθεση βιοντίζελ είναι ευεργετική για το περιβάλλον και το ισοζύγιο CO₂ που είναι το σημαντικότερο από τα αέρια του θερμοκηπίου.
- 2) Η προέλευση του βιοντίζελ από φυτικά έλαια τους δίνει τη δυνατότητα να παραχθούν στον τόπο κατανάλωσης μειώνοντας σημαντικά τα διάφορα κόστη.
- 3) Οι ιδιότητες του παραγόμενου βιοντίζελ είναι αυστηρά καθορισμένες και δεν είναι κάθε μίγμα εστέρων λιπαρών οξέων βιοντίζελ.
- 4) η μετατροπή του βιοντίζελ είναι μια απλή χημική διαδικασία όπως θα παρουσιαστεί πιο αναλυτικά παρακάτω.
- 5) Τρόποι για τον προσδιορισμό της ποιοτικής σύστασης του βιοντίζελ είναι απαραίτητοι ώστε να χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα

1.2.3 Φυτικά έλαια - τριγλυκερίδια

Συνοπτικά παρατίθεται η διαδικασία με την οποία, από τους ελαιούχους σπόρους που αναφέρθηκαν πιο πάνω, παραλαμβάνονται φυτικά έλαια σε βιομηχανική κλίμακα σήμερα.

Ο σπόρος μεταφέρεται σε εργοστάσιο σπορελαιουργίας με σιλό αυτοκινούμενα ή σε μεγαλύτερες ποσότητες με φορτηγά πλοία. Στη συνέχεια ο σπόρος αποθηκεύεται στην αποθήκη του σπορελαιουργείου μέχρι την επεξεργασία του. Κλασικά η εξαγωγή του σπορelaiού γίνεται με πίεση σε μεγάλες πρέσες όπως αυτή στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2 Πρέσα παραλαβής φυτικών ελαίων σε βιομηχανική κλίμακα



Εικόνα 3. Εκχυλιστής ελαιούχων σπόρων σε βιομηχανική κλίμακα

Μετά από την πρώτη πίεση και την παραλαβή του πρώτου λαδιού και αφού όλοι οι σπόροι έχουν σπάσει, το μεν λάδι οδηγείται για ραφινάρισμα, ενώ το στερεό μέρος οδηγείται σε δεύτερη πίεση όπου γίνεται πλήρης πίεση (με πιο ισχυρή πρέσα και για πιο πολύ χρόνο) για να εξαχθεί το υπόλοιπο λάδι. Κατά την δεύτερη αυτή πίεση, η θερμοκρασία στο εσωτερικό της πρέσας φτάνει τους 100 – 120 °C με αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά του λαδιού να αλλοιώνονται σημαντικά. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι και η δημιουργία ενός υποπροϊόντος που περιλαμβάνει τα στερεά του σπόρου, της λεγόμενης «πίττας». Οι ιδιότητες της πίττας διαφέρουν ανάλογα με το είδος του σπόρου που χρησιμοποιήθηκε. Περιέχει διάφορα θρεπτικά συστατικά που είναι αξιοποιήσιμα σαν ζωοτροφή. Επίσης, η πίττα μπορεί να περιέχει υψηλά ποσοστά από το περιεχόμενο αρχικά λάδι στο σπόρο (έως και 40%), δηλαδή μπορεί η πίεση να είναι 60% αποτελεσματική.

Εναλλακτικά, σε εργοστάσιο που λειτουργεί με εκχύλιση μετά την πρώτη πίεση η «πίττα» οδηγείται σε εκχυλιστή (Εικόνα 3) όπου αναδεύεται παρουσία εξανίου. Στην περίπτωση αυτή, το ποσοστό του λαδιού που μένει στο σπόρο μπορεί να πέσει στο 1% και αντίστοιχα η απόδοση της διαδικασίας να φτάσει το 99%. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ χρονοβόρα, ακριβή και αφήνει ένα ποσοστό εξανίου στο λάδι που μπορεί να είναι ανεπιθύμητο, αν το λάδι προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση και όχι σαν καύσιμο..

Ο διαχωρισμός της πίττας από το λάδι γίνεται στη συνέχεια με μηχανικά μέσα. Το λάδι και στις δύο περιπτώσεις οδηγείται σε ραφινάρισμα και στη συνέχεια σε ξεχωριστό τμήμα όπου γίνεται η μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων με αλκοόλες χαμηλού μήκους ανθρακικής αλυσίδας από μεθανόλη μέχρι βουτανόλη. Αναλυτικότερα οι διαδικασίες και οι προτεινόμενες αλλαγές θα παρουσιαστούν αργότερα.

1.2.4 Μετατροπή τριγλυκεριδίων σε βιοντίζελ σε βιομηχανική κλίμακα

Οι δύο βασικές μέθοδοι στην βιομηχανία των βιοκαυσίμων είναι οι εξής: η παραγωγή σε παρτίδες (batch process) και η παραγωγή σε συνεχή ροή (flow process) (Εικόνες 4 και 5).



Εικόνα 4 Παραγωγή βιοντίζελ σε παρτίδες (Batch process)



Εικόνα 5 Παραγωγή βιοντίζελ υπο ροή (flow process)

Οι δύο τεχνικές βασίζονται σε διαφορετικές προσεγγίσεις του τρόπου που διαχειρίζονται τον χρόνο παραμονής για την εκτέλεση της αντίδρασης. Έτσι ενώ στην παραγωγή ανά παρτίδα ο χρόνος παραμονής είναι και ο χρόνος εκτέλεσης της αντίδρασης. Αντίθετα, στην παραγωγή υπό ροή, ο χρόνος παραγωγής είναι ο χρόνος που χρειάζεται για να διανύσει το μίγμα της αντίδρασης όλο το μήκος του σωλήνα όπου εκτελείται η αντίδραση. Έτσι, για την παραγωγή υπο ροή απαιτούνται μεγάλες εγκαταστάσεις που καλύπτονται με σωλήνες. Και στις δύο περιπτώσεις ο χρόνος παραμονής του διαλύματος στην διαδικασία και ο τρόπος προσδιορισμού του πέρατος της αντίδρασης έχουν σημαντική οικονομική επίδραση στην παραγωγή (Knothe, 2005 Chu & Kung, 1998, Fukuda, Kondo & Noda, 2001, Akoh & Mussata, 1998).

1.2.5 Μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες

Η μετεστεροποίηση είναι μια πολύ ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην χημεία που είναι σχετικά απλή και γρήγορη και παρουσιάζει μεγάλα ποσοστά μετατροπής. Η μετεστεροποίηση συνίσταται στην αντικατάσταση του αλκοολικού τμήματος ενός εστέρα από ένα άλλο. Στην περίπτωση των τριγλυκεριδίων υπάρχουν εστερικοί δεσμοί μεταξύ και των τριών υδροξυλίων μιας τριόλης και τριών λιπαρών οξέων. Η μετεστεροποίηση αυτού του τριγλυκεριδίου προκειμένου να παραχθούν οι αντίστοιχοι εστέρες που είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν σαν βιοκαύσιμα πρέπει να γίνει με αντικατάσταση του τριεστέρα με τρεις μόνοεστέρες. Η αντικατάσταση γίνεται με μεθανόλη προκειμένου να προκύψουν οι επιθυμητοί μεθυλεστέρες. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή στους χημικούς ήδη από το 1853 οπότε και διατυπώθηκε από τους Duffy και Patrick.

Η παρουσία καταλύτη είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της μετεστεροποίησης. Κατά καιρούς έχουν προταθεί πολλοί τρόποι κατάλυσης όπως η αλκαλική, η όξινη και η ενζυμική. Οι μέθοδοι κατάλυσης παρουσιάζουν διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, για την περίπτωση όμως της σκοπούμενης εφαρμογής ο συνδυασμός κόστους, χρόνου αντίδρασης και η παρουσία παραπροϊόντων της αντίδρασης οδηγούν στην επιλογή της αλκαλικής κατάλυσης.

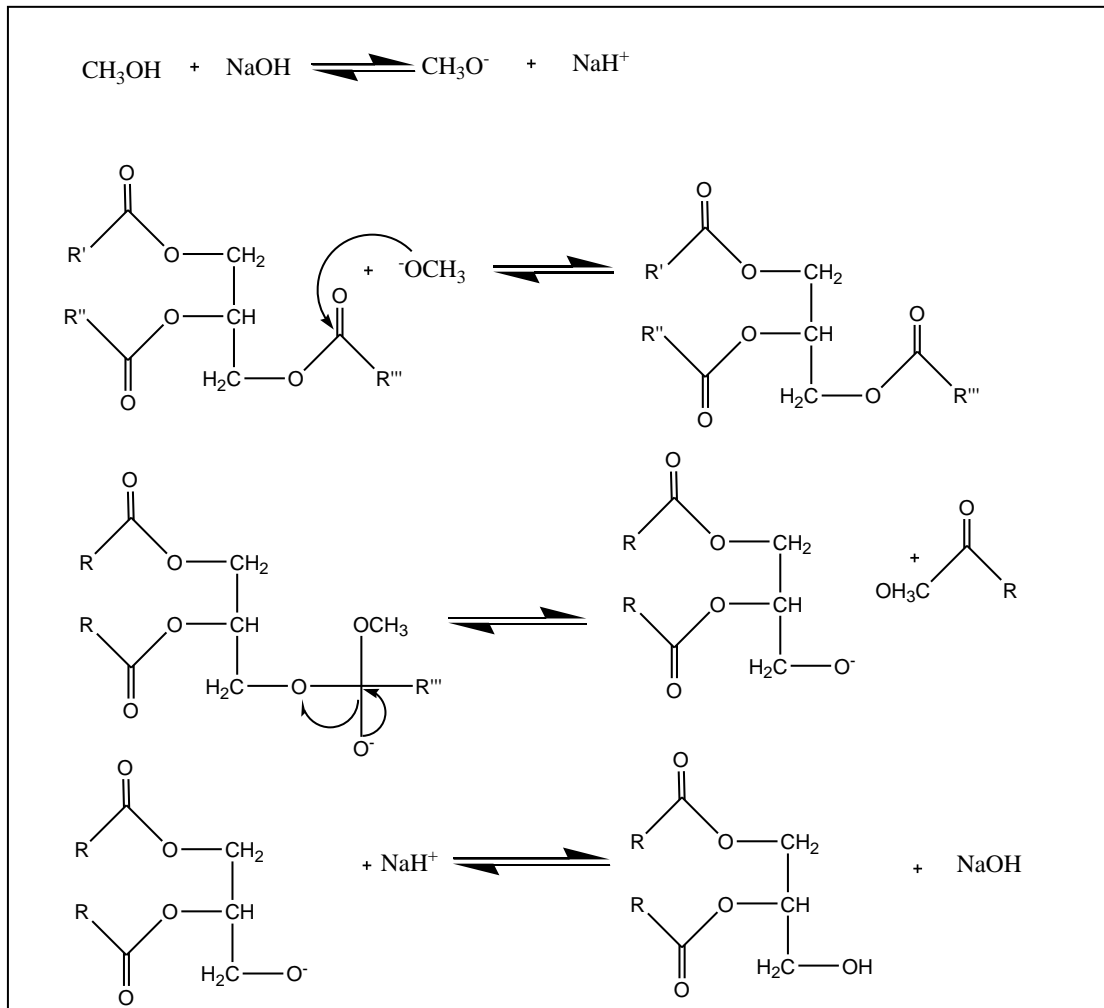
Η ενζυμική κατάλυση έχει την καλύτερη απόδοση και ταυτόχρονα δεν οδηγεί σε παράπλευρες αντιδράσεις. Με δεδομένο όμως το υψηλό κόστος των αναλώσιμων που απαιτούνται, η εφαρμογή της είναι απαγορευτική για την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπου το τελικό κόστος του προϊόντος είναι κρίσιμος παράγοντας.

Η όξινη κατάλυση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και κρίνεται απαραίτητη όταν το φυτικό έλαιο που πρόκειται να μετεστεροποιηθεί παρουσιάζει μεγάλη οξύτητα. Στην περίπτωση αυτή θα ήταν αδύνατο να χρησιμοποιηθεί η αλκαλική κατάλυση γιατί θα επέρχονταν εξουδετέρωση του αλκαλικού καταλύτη από τα οξέα του φυτικού ελαίου. Εκτός από αυτό οι χρόνοι κατάλυσης είναι πολύ μεγάλοι (48-96 ώρες) ακόμα και αν η αντίδραση γίνει σε θερμοκρασία βρασμού της αλκοόλης.

Στην αλκαλική κατάλυση υπάρχει περίπτωση να δημιουργηθούν παραπροϊόντα και κυρίως σάπωνες. Η παρουσία βάσης σε φυτικό έλαιο μπορεί να δημιουργήσει ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις και να επηρεάσει τελικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, η αλκαλική κατάλυση παρά τα φαινομενικά προβλήματα έχει καθιερωθεί από την βιομηχανία παγκοσμίως. Στην αλκαλική κατάλυση, ακόμα και η μικρή δημιουργία σαπώνων θεωρείται πλεονέκτημα καθώς με την παρουσία τους αναμιγνύονται πιο αποτελεσματικά οι δύο φάσεις της αλκοόλης (μεθανόλη) και του φυτικού ελαίου που πρόκειται να μετεστεροποιηθεί.

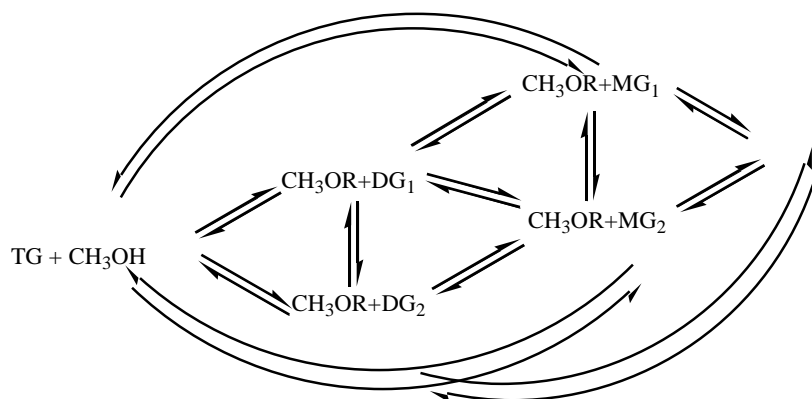
Στοιχειομετρικά, η μοριακή αναλογία μεταξύ αντιδρώντων πρέπει να είναι 3:1 w/w σε αλκοόλη: φυτικό έλαιο. Στην πράξη χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες αναλογίες μέχρι και 20:1 w/w στην περίπτωση της όξινης κατάλυσης ενώ αναλογίες πιο κοντά στις θεωρητικές απαιτούνται για την αλκαλική κατάλυση (Stavarace, Vinatoru, Nishimura, & Maeda, 2005).

Σχήμα 3 Μηχανισμός μετατροπής των τριγλυκεριδίων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.



Άλλωστε στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγονται και η ταχύτητα και η οικονομία σε αντιδραστήρια. Κατ' ελάχιστο, απαιτούνται οριακά τριπλάσια mol μεθανόλης έναντι τριγλυκεριδίων και ελάχιστη ποσότητα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ή υδροξειδίου του καλίου (KOH) (μέχρι 0,5% w/w) διαλυμένου σε αυτή. Πρακτικά, τόσο η ποσότητα της μεθανόλης όσο και η ποσότητα του καταλύτη (CH_3O^-) είναι τουλάχιστον σε διπλάσια περίσσια. Αυτό συμβαίνει καθώς σε κάθε φυτικό έλαιο υπάρχει πάντα η περίπτωση να υπάρχουν ελεύθερα οξέα που εξουδετερώνουν μέρος του καταλύτη. Κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν παρουσιάζονται φαινόμενα σαπωνοποίησης και κατά συνέπεια θα μπορούσε να ειπωθεί ότι αποτελούν ιδανικές συνθήκες μετεστεροποίησης.

Έχει προταθεί μηχανισμός της αντίδρασης της μετατροπής των τριγλυκεριδίων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων που περιλαμβάνει τρία στάδια μετατροπής όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.



TG - τριγλυκερίδιο, *DG* - διγλυκερίδιο, *MG* - μονογλυκερίδιο

Σχήμα 4 Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής σε τρία στάδια των τριγλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες

Κατά τον προτεινόμενο μηχανισμό (Stavarace et al, 2005), η μετατροπή συνίσταται σε σταδιακή μετατροπή των τριγλυκεριδίων σε διγλυκερίδια με απόσπαση ενός λιπαρού οξέος σε μορφή μεθυλεστέρα, στη συνέχεια απόσπαση και δεύτερου λιπαρού οξέος και πάλι με την μορφή μεθυλεστέρα και το αντίστοιχο μονογλυκερίδιο, και τέλος απόσπαση και του τελευταίου λιπαρού οξέος και απελευθέρωση της γλυκερόλης. Όπως θα παρουσιαστεί λεπτομερέστερα παρακάτω, η παρουσία ενός ή δυο υδροξυλίων κατά τα ενδιάμεσα στάδια αποτελούν τρόπο προσδιορισμού του πέρατος της αντίδρασης είτε αυτό γίνει με τη χρήση TLC είτε χρησιμοποιηθεί η προτεινόμενη μέθοδος που βασίζεται στην υπέρυθρη φασματοσκοπία (FT-IR) (Stavarace et al, 2005).

Η μοριακή αναλογία (molar ratio) μεταξύ των αντιδρώντων, μεθανόλης και τριγλυκεριδίων είναι κάτι που χρήζει σχολιασμού. Ενώ η προμήθεια μεθανόλης υψηλής καθαρότητας (99,9%) μπορεί να εξασφαλίσει ικανοποιητική αξιοπιστία στον ακριβή προσδιορισμό των mol που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση, δεν συμβαίνει το ίδιο και για τα χρησιμοποιούμενα τριγλυκερίδια. Παρότι τα τριγλυκερίδια των φυτικών ελαίων αποτελούνται κατά κύριο λόγο από πέντε βασικά λιπαρά οξέα (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3) με μοριακά βάρη από 256 μέχρι 284 είναι δυνατό να σχηματιστούν θεωρητικά τριγλυκερίδια με μοριακά βάρη από 835 μέχρι 919. Κατ' αναλογία, σε ένα γραμμάριο μπορεί να περιέχονται από ~0,001197 mol μέχρι ~0,001088 mol. Βιβλιογραφικά, αλλά και από ίδια δεδομένα προκύπτει ότι ένα αποδεκτό μέσο μοριακό βάρος είναι 878 (Stavarace et al, 2005). Βάση αυτού του μοριακού βάρους για τα τριγλυκερίδια υπολογίστηκαν τα mol ($\text{mol}_{TG} \times 3$)

της μεθανόλης που απαιτούνται. Επίσης, για τους λόγους που αναφέρθηκαν πιο πάνω η τελική χρησιμοποιούμενη αναλογία διπλασιάζεται για να γίνει 6:1 (mol MeOH/mol TG).

Σε κάθε περίπτωση από τις παρακάτω θα θεωρείται ότι πρώτη ύλη για όλες τις αντιδράσεις με οποιαδήποτε μέθοδο, απέτελεσαν όλα τα έλαια που παρελήφθησαν με την τεχνική Soxhlet και την χρήση υπερήχων εκτός και αν δηλώνεται διαφορετικά.

1.2.6 Σύγχρονη εκχύλιση μετεστεροποίηση

Είναι λογική εξέλιξη των δεδομένων όπως αναπτύχθηκαν μέχρι τώρα η δοκιμή σε περιβάλλον υπερήχων της εκτέλεσης συγχρόνως της εκχύλισης και της αντίδρασης μετεστεροποίησης. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίστηκε στην πρόθεση της διερεύνησης της πλήρους εκμετάλλευσης των πλεονεκτημάτων που συνεπάγεται η εφαρμογή των υπερήχων με καταρχήν μείωση του συνολικού χρόνου που απαιτείται για την διαδοχική εφαρμογή των δύο σταδίων. Η αποσκοπούμενη μείωση του χρόνου είναι αρχικά κατά το ήμισυ αφού, θεωρητικά τουλάχιστον, δεν υπάρχει λόγος να διαρκεί περισσότερο κάποιο από τα δύο στάδια επειδή συγχρόνως λαμβάνει χώρα και μια ακόμη διεργασία.

Όσο και αυτό να αντικρούει λογικές προτάσεις που διατυπώθηκαν και κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, η δοκιμή υπό πραγματικές συνθήκες ήταν όπως πάντα ο μόνος τρόπος για να επιβεβαιωθούν ή να απορριφθούν υποθέσεις. Αρχικά, έπρεπε να εξασφαλιστεί η ύπαρξη των συνθηκών για την εκχύλιση, αφού η ύπαρξη των τριγλυκεριδίων στο εξάνιο αποτελεί προϋπόθεση για να προχωρήσει η αντίδραση. Από το σημείο αυτό και μετά η αντίδραση μετεστεροποίησης θα προσομοίωνε αυτή που περιγράφηκε παραπάνω παρουσία διαλύτη σε αναλογία 1:25 w/w. Άρα η παρουσία του εκχυλιστή διαλύτη που χρειάζεται για την εκχύλιση να μπορεί να αποτελέσει και το μέσο που απαιτείται για να γίνει και η αντίδραση διπλής φάσης.

Φυσικά, η παρουσία ενός αστάθμιστου μέσου όπως το φυτικό υλικό στον χώρο που διενεργείται μία χημική αντίδραση είναι πάντα πιθανό να προκαλέσει ανεπιθύμητες αντιδράσεις.

Σημασία της αντίδρασης

Όπως είναι σαφές, με όρους καθαρά μετρήσιμους δυο πλεονεκτήματα της σύγχρονης εκχύλισης – μετεστεροποίησης είναι η οικονομία χρόνου και διαλύτη που μειώνονται άμεσα στο μισό. Άλλωστε και η παράλειψη των ενδιάμεσων σταδίων της συμύκνωσης και του καθαρισμού του ελαίου προκειμένου αυτό να αποτελέσει πρώτη ύλη για την αντίδραση μετεστεροποίησης εξοικονομεί επιπλέον χρόνο, που για μεν τις εργαστηριακές συνθήκες εξαρτώνται από την δυναμικότητα του εργαστηρίου, για δε την βιομηχανία όμως αποτελεί σημαντικό κόστος σε χρόνο, αναλώσιμα και υποδομές.

Άλλωστε όπως κατέστη σαφές η μέθοδος παραλαβής με την συνήθη μέχρι τώρα παραλαβή με μηχανική πίεση των ελαιούχων σπόρων οδηγεί σε μεγάλες απώλειες ελαίου που παραμένει στο υποπροϊόν, την πίττα του σπόρου. Λογικό είναι η πιο αποτελεσματική παραλαβή μέσω εκχύλισης του φυτικού ελαίου και η σύγχρονη μετατροπή του σε βιοκαύσιμο να οδηγεί σε καθετοποίηση της διαδικασίας.

1.2.7 Φυτικό υλικό

1.2.7 i Ρίγανη

Η ρίγανη είναι αρωματικό ποώδες, πολυετές, ιθαγενές και θαμνώδες φυτό της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας. Ανήκει στο γένος Ορίγανο της τάξης των αγγειόσπερμων δικότυλων φυτών λαμιώδη.

Στην Ελλάδα, η ρίγανη είναι αυτοφυής και βρίσκεται σε ορεινές και βραχώδεις περιοχές είναι δε εξαιρετικής ποιότητας ως προς το παραλαμβανόμενο αιθέριο έλαιο και τα άλλα συστατικά της.

Χρησιμοποιείται σαν καρύκευμα κυρίως στην μαγειρική αλλά και σπανιότερα ως αφέψημα, το οποίο αναφέρεται ως εξαιρετικό κατά του βήχα. Η συλλογή της ρίγανης γίνεται κατά την ανθοφορία του φυτού, τα άνθη αυτά ξεραίνονται σε ειδικά υπόστεγα ή ξηραντήρια και στη συνέχεια τρίβονται και κοσκινίζονται. Είναι το βασικό καρύκευμα των χωρών της Μεσογείου και βασικό συστατικό της Ελληνικής, αλλά και της Ιταλικής κουζίνας.

Φυσιολογικά, το φυτό της ρίγανης είναι φρυγανώδης πόα, που φθάνει σε ύψος τα 20 έως 80 cm. Τα αντίθετα φυόμενα φύλλα του μπορεί να φθάσουν σε μήκος τα τέσσερα cm με πιο σύνηθες μήκος το ένα cm. Τα άνθη είναι μικρά, ιώδη, φερόμενα σε ταξιανθίες στην κορυφή των βλαστών και έχουν μέγεθος από ένα έως τέσσερα mm (Βαρδαβάκης· 1996).

Στις μέρες μας η ρίγανη καλλιεργείται μεθοδικά σε χωράφια που μέχρι πρότινος καλλιεργούνταν καπνός. Είναι από τα φυτά που μπορούν να υποκαταστήσουν την σημαντική για την οικονομία καλλιέργεια του καπνού, αξιοποιώντας παράλληλα και τις υποδομές που είχαν αναπτυχθεί τα προηγούμενα χρόνια (www.minagric.gr). Η ρίγανη στην Ελλάδα είναι μεταφυτευόμενο φυτό που καλλιεργείται κυρίως για τους βλαστούς και τα άνθη τα οποία πωλούνται τριμμένα για χρήση στην κουζίνα.

Μεγάλο μέρος της παραγωγής απορροφάται από επιχειρήσεις μεταποίησης που παράγουν αιθέριο έλαιο ρίγανης για χρήση στην βιομηχανία αρωμάτων. Μεγάλο ποσοστό αυτής της παραγωγής εξάγεται και τυγχάνει μεγάλης αποδοχής.

Κύριο χαρακτηριστικό της ρίγανης είναι το άρωμά της που οφείλεται στις πτητικές ουσίες που απαντούν στο φύλλωμα και το στέλεχος του φυτού. Στις πτητικές αυτές ουσίες οφείλονται και οι ιδιότητες που αποδίδονται στην ρίγανη. Είναι από τα σημαντικότερα

αρωματικά φυτά παγκοσμίως έχοντας προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων.



Ταξιανθία ρίγανης σε πλήρη άνθιση



Βλαστοί αποξηραμένης ρίγανης



Ρίγανη καλλιεργούμενη σε γλάστρα για οικιακή χρήση

Εικόνα 6 Εικόνες ρίγανης

1.2.7 ii Θυμάρι

Αγγειόσπερμο, δικότυλο φυτό το θυμάρι ή θύμιο ανήκει στην τάξη των σωληνανθών και στην οικογένεια των χειλανθών, την ίδια οικογένεια με την ρίγανη. Θάμνος μικρού ύψους έως 30 cm, με όρθιους βλαστούς, εξαιρετικά ανθεκτικός, με χαρακτηριστικό άρωμα.

Βρίσκεται στις νότιες και μεσογειακές περιοχές της Ευρώπης σε διάφορες περιοχές της Ασίας και καλλιεργείται στη βόρεια Αμερική.

Τα φύλλα του θυμαριού όταν ξεραθούν αποκτούν καφεπράσινο χρώμα και αναδύουν το άρωμα τους όταν θρυμματιστούν. Η γεύση τους είναι πολύ δυνατή, ελαφρώς καυστική και πλούσια. Μαζί με τους αποξηραμένους ανθούς χρησιμοποιούνται σαν μπαχαρικό για τον

αρωματισμό διαφόρων φαγητών, σε ψάρια, κρέατα, σε διάφορες σάλτσες, σούπες κ.λ.π. Το θυμάρι είναι ιδιαίτερα αγαπητό στις μέλισσες και το θυμαρίσιο μέλι είναι εξαιρετικής ποιότητας (Βαρδαβάκης, 1996).

Περιέχει αιθέριο έλαιο σε ποσοστό 1-4 % και κύριο συστατικό του είναι η **θυμόλη**. Έχει αντιμικροβιακή δράση και χρησιμοποιείται στην παρασκευή αλοιφών κατά των βακτηρίων των πληγών. Στη φαρμακευτική επίσης χρησιμοποιείται στη παρασκευή φαρμάκων κατά του βήχα και παθήσεων του αναπνευστικού. Το θυμάρι στην θεραπευτική του χρήση είναι τονωτικό και δυναμωτικό. Χρησιμοποιείται κατά της ατονίας του πεπτικού συστήματος, στον χρόνιο κατάρρου, κατά της λευκόρροιας και της αμηνόρροιας. Είναι ακόμη αντισπασμωδικό, ενώ καπνισμοί θυμαριού κατευνάζουν το λουμπάγκο. Χρησιμοποιείται κατά της δυσπεψίας και των αερίων. Αντισηπτικό, απολυμαντικό, κατευναστικό στη βρογχίτιδα, τον κοκκύτη και του επίμονου βήχα.

Στην Ελλάδα υπάρχουν 23 αυτοφυή είδη. Ενδεικτικό της πολυποικιλότητας του γένους *thymus* είναι ο κατάλογος των επιμέρους ειδών που το αποτελούν και που αριθμεί πάνω από 350 είδη(Βαρδαβάκης, 1996).

Το φυτό του θυμαριού είναι φρυγανώδεις πόα μέχρι 40 cm ύψους, με μικρά φύλλα και άνθη. Φύεται σε άγονα εδάφη όπου δεν χρειάζεται να ανταγωνίζεται με άλλα φυτά. Είναι χαρακτηριστικό του θυμαριού ότι δεν έχει σχεδόν καθόλου φυσικούς εχθρούς ζωικής ή μικροβιολογικής προέλευσης. Η πραγματικότητα αυτή αποδίδεται στην παρουσία των συστατικών του αιθερίου ελαίου που απαντούν σε όλα τα φυτικά μέρη.

Οι χρήσεις του θυμαριού εκτός της μαγειρικής επεκτείνονται σε παραδοσιακές θεραπευτικές μεθόδους αλλά και σε σύγχρονα τυποποιημένα σκευάσματα βιομηχανικής παραγωγής. Γίνονται συστηματικές προσπάθειες αξιοποίησης των ιδιοτήτων του θυμαριού, και προωθείται σημαντικά η καλλιέργειά του. Στο εξωτερικό το θυμάρι είναι πιο διαδεδομένο στην κουζίνα λόγω της πιο ήπιας μυρωδιάς του έναντι της ρίγανης.

1.2.7 iii Λεβάντα

Η λεβάντα είναι γένος φυτών που ανήκει στην οικογένεια *Χειλανθή (Lamiaceae)*. Το γνωστότερο γένος είναι η λαβαντούλα (*Lavandula vera L.*), που περιλαμβάνει γύρω στα 25 είδη. Είναι ιθαγενές των παραμεσόγειων περιοχών. Επίσης, απαντάται στα Κανάρια Νησιά, στην Ινδία και σε άλλες ασιατικές χώρες. Το αιθέριο έλαιο που περιέχουν τα φύλλα της χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία και επίσης για τη θεραπεία νευρασθενειών. Έχει επίσης αντισηπτικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται στην επούλωση τραυμάτων. Σε μεγάλες δόσεις η λεβάντα δρα ως υπνωτικό και ναρκωτικό. Οι ιαματικές της ιδιότητες ήταν γνωστές από την αρχαιότητα και αναφέρονται στο Διοσκουρίδη, τον Πλίνιο και το Γαληνό (Βαρδαβάκης, 1996).

Πρόκειται για φυτό φρυγανώδες και πολύκλαδο, με όρθιους βλαστούς που φύονται από τη βάση. Έχει γκριζοπράσινα φύλλα, στενά ως λογχοειδή. Οι ανθοφόροι βλαστοί καταλήγουν σε ταξιανθία τύπου στάχυ. Τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου αναφέρονται εκτενώς παρακάτω. Η λεβάντα απαντά με πλήθος κοινά ονόματα που φανερώνουν την σημαντική θέση της στην Ελληνική παράδοση. Το κοινό όνομα λεβάντα αναφέρεται κυρίως στο άλλο αυτοφυές αλλά και καλλιεργούμενο είδος *Λαβαντούλα η στενόφυλλος* (*Lavandula angustifolia*). Στην Ελλάδα καλλιεργείται πιο πολύ το είδος *Λαβαντούλα η στοιχάς* (*Lavandula stoechas*). Αυτή είναι γνωστή και με τα ονόματα: αγριολεβάντα, λαμπρή, λαβαντή, χαμολίβανο, μυροφόρα, καραμπάσι



Άνθη λεβάντας



Στελέχη λεβάντας



Λεβάντα του είδους *Lavandula stoechas*

Εικόνα 7 Εικόνες λεβάντας

Η λεβάντα έχει σημαντική θέση στην ανάπτυξη της βοτανοθεραπείας και είναι από τα πιο χρησιμοποιούμενα φυτά, ακριβώς λόγω των χαλαρωτικών ιδιοτήτων που αποδίδονται στο άρωμά της. Πριν από αυτές όμως τις εφαρμογές της, η λεβάντα ήταν σημαντικό αρωματικό φυτό που χρησιμοποιούνταν για την απολύμανση των χώρων των νοσοκομείων κατά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Ακόμη και σήμερα βιολογικά απορρυπαντικά

διαθέτουν απολυμαντικούς παράγοντες βασισμένους στο αιθέριο έλαιο της λεβάντας. Επίσης πολύ γνωστή είναι η χρήση της λεβάντας σαν εντοποαπωθητικό που χρησιμοποιείται ευρύτατα για την απομάκρυνση του σκόρου από τα συρτάρια.

Η έντονη δραστηριότητα των συστατικών της λεβάντας την κατατάσσουν στην μερίδα των αρωματικών φυτών που είναι αρκετά επισφαλής για αλόγιστη χρήση λόγω των πιθανών αλλεργικών αντιδράσεων που μπορεί να προξενήσει. Τέλος, τα συστατικά της λεβάντας έχουν κατηγορηθεί για την εμφάνιση γυναιοκομαστίας σε αγόρια. Εικάζεται ότι οι ουσίες που περιέχει ίσως είναι παρόμοιες δομικά με κάποια κοινά οιστρογόνα.

1.2.7 iv Δενδρολίβανο

Αρωματικός αιθαλής θάμνος το δενδρολίβανο ανήκει στο γένος *Rosmarinus* (*Rosmarinus*) και στην οικογένεια των *Χειλανθών* (*Lamiaceae*).

Γνωστό φυτό στην αρχαιότητα όταν οι Αρχαίοι Έλληνες το χρησιμοποιούσαν σε διάφορες θρησκευτικές τελετές και γιορτές, σε στολισμούς κτηρίων, ναών και το έκαigan και ως θυμίαμα. Το όνομα του φυτού προέρχεται από την λατινική λέξη *Rosmarinus* που στην κυριολεξία σημαίνει δροσιά από τη θάλασσα.

Η καταγωγή του είναι από τις περιοχές της Μεσογείου αλλά σήμερα εκτός από τις περιοχές αυτές καλλιεργείται σαν καλλωπιστικό σε όλη σχεδόν την Ευρώπη και τις εύκρατες περιοχές της Αμερικής.

Είναι πυκνόφυλλος και πολύκλαδος θάμνος με ύψος που δε ξεπερνά τα 2 m. Τα φύλλα του είναι δερματώδη, μικρά, γραμμοειδή και μοιάζουν με πευκοβελόνες. Η πάνω επιφάνεια των φύλλων έχει χρώμα σκούρο πράσινο και η κάτω επιφάνεια είναι ελαφρώς χνουδωτή με χρώμα λευκό ή αγνά γκριζωπό. Τα άνθη βρίσκονται κατά ομάδες και βγαίνουν στις μασχάλες των φύλλων. Το χρώμα τους είναι μοβ, κυανόλευκο ή και λευκό. Δεν έχει ιδιαίτερη ανάγκη από πότισμα και μπορεί να φυτρώσει και σε βραχώδεις ορεινές περιοχές (Βαρδαβάκης, 1996).

Οι τρυφεροί βλαστοί και τα φύλλα του δενδρολίβανου χρησιμοποιούνται σαν αρωματικό σε πολλά φαγητά. Έχουν ένα ευχάριστο άρωμα που μοιάζει με αυτό του τσαγιού και η γεύση του είναι ελαφρώς πικρή και λίγο καυτερή.

Το φυτό είναι πλούσιο σε αιθέριο έλαιο και για το λόγο αυτό συμπεριλαμβάνεται στην λίστα των φυτών που μελετήθηκαν. Ειδικά για το δενδρολίβανο είναι πολύ σημαντικές και οι ουσίες που δεν περιλαμβάνονται στο αιθέριο έλαιο αλλά είναι φαινολικές και έχει βρεθεί να παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Η διρευνησή τους δεν είναι στο ερευνητικό πεδίο της παρούσης μελέτης.



Εικόνα 8 Ανθισμένο δενδρολίβανο

Το δενδρολίβανο έχει σημαντική θέση στην βοτανοθεραπεία και μάλιστα πολλές από τις παραδοσιακές χρήσεις του έχουν επιβεβαιωθεί και αιτιολογηθεί από συστηματικές έρευνες. Χρησιμοποιείται με πολλές μορφές, όπως χλωρό, αποξηραμένο, σε φύλλα, στη μορφή αιθερίου ελαίου αλλά και ως αφέψημα δηλαδή υδατικό εκχύλισμα δενδρολίβανου. Τα συστατικά του αιθερίου ελαίου αναφέρονται λεπτομερώς παρακάτω.

1.2.7 ν Φλυσκούνι

Το φλυσκούνι είναι από τα πιο άγνωστα φυτά της ελληνικής χλωρίδας με συγγενή φυτά την μέντα και τον δυόσμο. Ανήκει όπως και τα περισσότερα αρωματικά φυτά στην οικογένεια *Lamiaceae* και ειδικότερα στο γένος *Mentha Pulegoides*. Το αιθέριο έλαιό του έχει διαφορετική σύσταση από αυτό της ρίγανης και του θυμαριού. Στην παρούσα μελέτη, αντικείμενο έρευνας για το φλυσκούνι αποτέλεσε μόνο το θέμα της απομόνωσης του αιθερίου ελαίου. Χρησιμοποιείται γιατί το άρωμα του μοιάζει πολύ με της μέντας αλλά είναι πιο έντονο. Ανήκει στα φυτά που χρησιμοποιούνται από την παραδοσιακή ιατρική με ιδιαίτερη προσοχή εξ αιτίας της πουλεγόνης που εικάζεται ότι είναι τοξικό σε μεγάλες ποσότητες (Βαρδαβάκης, 1996).

Οι εισπνοές και μόνο του αρώματος του φλυσκουνιού θεωρείται ότι έχουν ευεργετική επίδραση σε παθήσεις των πνευμόνων, ενώ επίσης απωθούν τα έντομα σε κλειστούς χώρους.



Εικόνα 9 Ανθισμένο φλυσκούνι

1.2.7 νι Σκόρδο

Η διατροφική αξία του σκόρδου και η σύνδεσή του με τις πτητικές ουσίες που περιέχει

Το σκόρδο ανήκει στο είδος *sativum* του γένους *allium* της οικογένειας *Liliaceae* που συμπεριλαμβάνει και άλλα πολύ σημαντικά διατροφικά φυτά που απαντούν στην μεσογειακή διατροφή, όπως το κρεμμύδι. Σαν τρόφιμο το σκόρδο είναι γνωστό ότι παρουσιάζει ευεργετικές ιδιότητες τόσο στην πρόληψη όσο και στην θεραπεία ασθενειών (Βαρδαβάκης, 1996). Πιο συγκεκριμένα, δρά σαν αντι-υπερτασικό που αποτελεί και την ευρύτερα γνωστή εφαρμογή του, αλλά και ως αντίαρτηριοσκληρωτικό, αντί-μικροβιακό, ηπατοπροστατευτικό καθώς και ως αντίδοτο κατά της έκθεσης σε μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων. Επίσης έχουν αναφερθεί σημαντικές δράσεις του έναντι της ταινίας των εντέρων (παρασιτικός έλμινθας) και της αμοιβάδας που προκαλεί την δυσεντερία (Block, 1992).

Οι δράσεις του αυτές που δεν αποτελούν διατροφολογικές παρατηρήσεις άλλα τεκμηριωμένες διαπιστώσεις μετά από συστηματική έρευνα, έχουν προκαλέσει παγκόσμια το ενδιαφέρον για την σύσταση του σκόρδου και το αιθερίου ελαίου του.

Το κυριότερο άρθρο όπου παρουσιάζονται αναλυτικά προτεινόμενες συνθετικές πορείες για τα περισσότερα από τα ευεργετικά συστατικά του σκόρδου και κάποιες ιδιότητες των συστατικών του, είναι πιθανότατα αυτό του E.Block από το 1992 (Block, 1992). Εκεί περιγράφονται οι ενώσεις που κατά τον συγγραφέα παρουσιάζουν συνδυαστικά την πολυδιάστατη δράση του σκόρδου σαν τρόφιμο συνολικά. Ο συγγραφέας υποστηρίζει πως για την δράση αυτή ευθύνονται κατά κύριο λόγο πτητικές θειο-ενώσεις που συνιστούν το πτητικό κλάσμα που δίνει την πολύ χαρακτηριστική οσμή στο σκόρδο.

Η έννοια του πτητικού κλάσματος εισάγεται εξ ανάγκης στην περίπτωση της μελέτης του σκόρδου, καθώς ο ορισμός του αιθερίου ελαίου δεν ανταποκρίνεται απόλυτα για να περιγράψει το άθροισμα των ουσιών που αποτελούν τις πτητικές ουσίες του σκόρδου. Ενώ το αιθέριο έλαιο σχηματίζεται σαν τελικό προϊόν του μεταβολικού συστήματος του φυτού από αδένες με κύρια λειτουργία την δημιουργία των συστατικών του, στην περίπτωση του σκόρδου οι ουσίες που αποτελούν το πτητικό κλάσμα δεν υπάρχουν στην μορφή που τις ανιχνεύουμε αλλά υπάρχουν μόνο πρόδρομες ουσίες που δίνουν τις ουσίες του πτητικού κλάσματος μέσω μηχανισμών.

Οι μηχανισμοί που ακολουθούν οι πρόδρομες ουσίες του σκόρδου έχουν διερευνηθεί και τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα πως η έναρξη της διαδικασίας προκαλείται από τον τραυματισμό του φυτικού ιστού και συγκεκριμένα του βολβού που αποτελεί την εμπορική μορφή του φυτού. Η ρήξη των ιστών και η καταστροφή των κυττάρων προκαλούν και ρήξη των εσωτερικών θυλάκων που βρίσκονται οι πρόδρομες ουσίες του πτητικού κλάσματος και η αλλυσίνη. Είναι η επαφή των ουσιών αυτών με το νερό του ιστού και το οξυγόνο που δρομολογεί την δημιουργία των πτητικών ουσιών και την οσμή του σκόρδου.

Το σύστημα αυτό αποτελεί μέρος του προστατευτικού συστήματος του φυτού, που με τον τρόπο αυτό προφυλάσσει το αναπαραγωγικό του μερίστωμα. Η παραγόμενες ουσίες απωθούν τα φυτοφάγα λόγω της οσμής τους και τους μικροβιολογικούς εχθρούς με τις βακτηριοκτόνες και μυκητοκτόνες ιδιότητες τους.

Η διαφορά μεταξύ αιθερίου ελαίου και πτητικού κλάσματος είναι αποκλειστικά θέμα ορισμού καθώς και στις δύο περιπτώσεις η σκοπούμενη από το φυτό χρήση καθώς και τα χαρακτηριστικά των ουσιών έχουν πολλές ομοιότητες. Οποσδήποτε διαφορές στην βοτανική προέλευση και τις διαφορές που αυτές συνεπάγονται στο βιοχημικό σύστημα του φυτού οδηγούν στην σύνθεση ολότελα διαφορετικών ουσιών. Η κυριότερη διαφορά οφείλεται στο γεγονός πως το σκόρδο είναι μονοκότυλο φυτό ενώ τα πιο γνωστά αρωματικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae είναι δικότυλα. Η διαφορά αυτή που είναι η κυριότερη που απαντά στο φυτικό βασίλειο, αιτιολογεί θεμελιώδεις διαφορές στο μεταβολικό σύστημα. Στην προκειμένη περίπτωση η σημαντικότερη διαφορά είναι η απουσία ετεροατόμων θείου στον ανθρακοσκελετό των συστατικών των αιθερίων ελαίων ενώ το θείο είναι παρόν σε κάθε σχεδόν συστατικό του πτητικού κλάσματος του σκόρδου (Block, Ahmad, Catalfamo, Jain, & Castrozd, 1986).

Σύνθεση και ιδιότητες διάσπασης των πτητικών συστατικών του σκόρδου

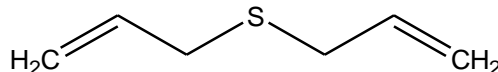
Το πτητικό κλάσμα του σκόρδου παραλήφθηκε για πρώτη φορά με απόσταξη μεθ' υδρατμών από τον Γερμανό χημικό W. Semmler το 1892. Η έντονη οσμή του προϊόντος αποδόθηκε νωρίς σε ενώσεις που περιέχουν θείο αλλά πολύ αργότερα μπόρεσαν να

προσδιοριστούν επιμέρους συγκεκριμένα συστατικά. Τα κυριότερα συστατικά του πτητικού κλάσματος παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2 Κυριότερα συστατικά του πτητικού κλάσματος του σκόρδου.

Μονοσουλφίδιο

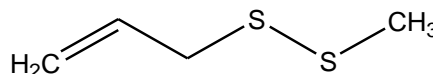
Διαλύλοσουλφίδιο, Diallyl sulfide (DAS)



Δισουλφίδια

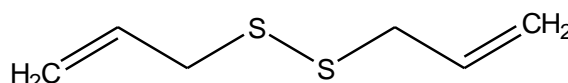
Αλύλ μεθύλ δισουλφίδιο

Allyl methyl disulfide (AMDS)



Διαλυλοδισουλφίδιο

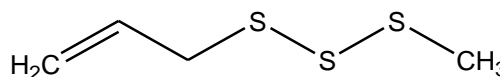
Diallyl disulfide (DADS)



Τρισουλφίδια

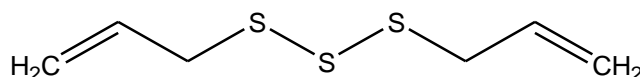
Αλυλ μεθυλ τρισουλφίδιο

Allyl methyl tri-sulfide (AMTS)



Διαλυλ τρισουλφίδιο

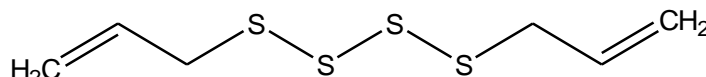
Diallyl tri-sulfide (DATS)



Τετρασουλφίδιο

Διαλυλοτετρασουλφίδιο

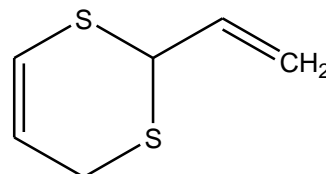
Diallyl tetra sulfide (DATTS)



Κυκλικές βινύλ-διθειίνες

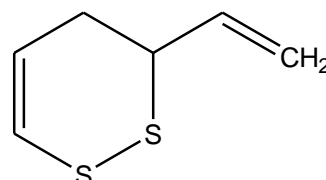
2 βινυλ [4H] 1,3 διθειίνη

2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin(2-VDT)



3 βινυλ [4H]1,2 διθειίνη

3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin (3-VDT)

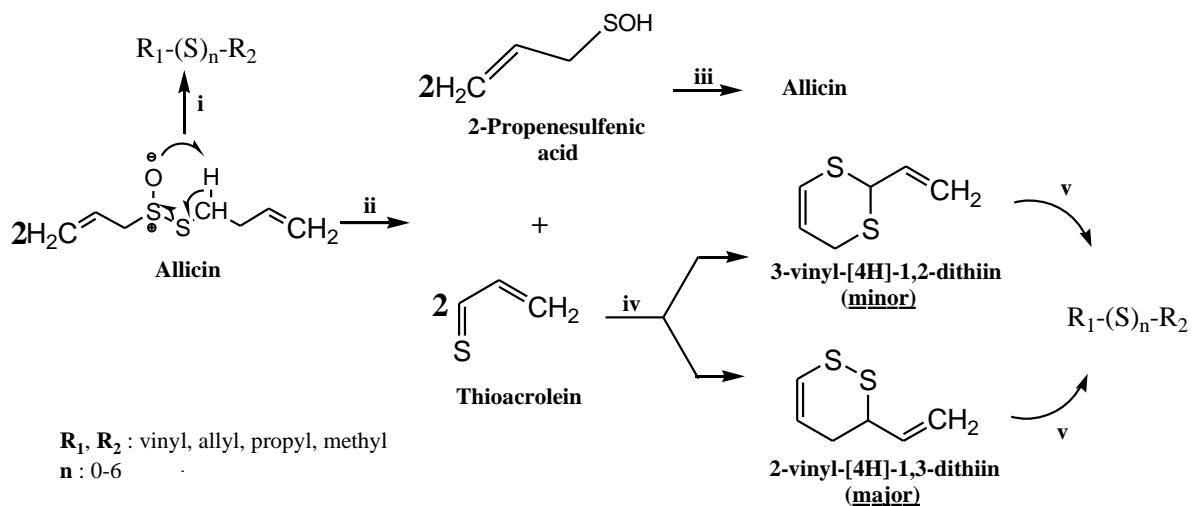


Στον πίνακα δεν παρουσιάζονται όλες οι ουσίες καθώς μπορεί να δημιουργηθούν μέχρι και εξα-σουλφίδια με τους ίδιους υποκαταστάτες. Πάντως οι ουσίες που εμφανίζονται στον πίνακα κατά γενικό κανόνα αποτελούν περισσότερο από το 95% του πτητικού κλάσματος.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως οι παραπάνω ουσίες δεν βρίσκονται στο σκόρδο αλλά δημιουργούνται κατά την προσβολή του βολβού του παρουσία νερού. Τα ποσοστά των

ουσιών που απαντούν στο πτητικό κλάσμα εξαρτώνται πάρα πολύ από την μέθοδο παραλαβής. Στο στάδιο στο οποίο αυτές οι ουσίες έχουν σχηματιστεί δεν είναι πλέον ασταθείς, πάντως ο χρόνος αποθήκευσης δεν είναι πολύ μεγάλος χωρίς να υπάρξει αλλοίωση της σύστασης ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.

Οι πρόδρομες ουσίες αυτών του πίνακα 2 που είναι πολύ πιο ευαίσθητες και βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Η παραλαβή των ουσιών αυτών αποτελεί πρόκληση καθώς πρέπει να ρυθμιστούν πολλές παράμετροι θερμοκρασίας και τεχνικής. Κύρια πρόδρομη ουσία των παραπάνω είναι η αλλυσίνη (αλύλ 2 προπενεθειοσουλφοξείδιο, allyl 2-propenethiosulfinate). Και η ίδια η αλλυσίνη πάντως αποτελεί προϊόν σειράς αντιδράσεων που συμβαίνουν ακαριαία με την επαφή των ουσιών με το νερό και παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5 Η διάσπαση της αλλυσίνης παρουσία νερού

Η ασταθής συμπεριφορά των ουσιών αυτών ενισχύεται και με την μεγάλη ευαισθησία που παρουσιάζουν στη θερμοκρασία. Η σημασία της αστάθειας τους έγκειται στην παραγωγή ή μη των κυκλικών ή των άκυκλων παραγώγων τους ανάλογα με τις συνθήκες υπο τις οποίες παράγονται. Μελέτες σε συνθετικά προϊόντα κατέδειξαν πως τα άκυκλα παράγωγα της αλλυσίνης είναι αυτά στα οποία κυρίως οφείλεται η εκτεταμένη βιολογική δράση του σκόρδου. Τα παράγωγα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί από τις φαρμακοβιομηχανίες.

Αξίζει να σημειωθεί πως στην βιομηχανία παραγωγής φαρμακευτικών σκευασμάτων από σκόρδο χρησιμοποιείται μια εκχύλιση σε μεθανόλη όπου οι βολβοί παραμένουν επί 24 μήνες (aged garlic). Το εκχύλισμα στη συνέχεια συμπυκνώνεται για να απομακρυνθεί η μεθανόλη και το στερεό υπόλειμμα που αποτελείται κυρίως από S-αλύλ κυστεΐνη φορμουλάρεται με ημικυτταρίνη. Η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα και δυσκολεύει αρκετά την παραλαβή χωρίς να παρουσιάζει ιδανικά αποτελέσματα ως προς την παραλαμβανόμενη ποσότητα.

Στην βιβλιογραφία απαντά και η μέθοδος ομογενοποίησης σκόρδου με νερό και παραλαβή δείγματος προς ανάλυση από το υδατικό εκχύλισμα που προκύπτει. Η μέθοδος αυτή είναι δύσκολο να σταθμιστεί αναφέρεται όμως ως απλή και γρήγορη. Χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ομογενοποιηθούν οι βολβοί του σκόρδου και να κατεργαστούν παραπέρα όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για να επιτευχθεί το φορμουλάρισμα σε κάψουλες για εμπορική χρήση από αυτές τις ουσίες είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί μόνο η πιο σταθερή που είναι και στην αρχή του μεταβολικού μονοπατιού, η *S* αλυλοκυστεΐνη. Με την χορήγηση του φαρμακευτικού σκευάσματος το μεταβολικό μονοπάτι ενεργοποιείται στο πεπτικό και οι παράγωγες ουσίες σχηματίζονται μέσα στον οργανισμό. Έχει αποδειχθεί πως τα παράγωγα της *S* αλυλοκυστεΐνης που δημιουργούνται στις συνθήκες του πεπτικού συστήματος είναι κυρίως τα κυκλικά παράγωγα και η ευεργετική δράση του φαρμάκου περιορίζεται στο μικρό ποσοστό άκυκλων παραγώγων που σχηματίζονται.

Τα προβλήματα που δημιουργεί η θερμότητα στον προσδιορισμό των πτητικών συστατικών δεν επιτρέπουν την προσέγγιση στην πραγματικότητα και τις πραγματικές ουσίες που βρίσκονται στην σκελίδα του σκόρδου. Συστηματικές μελέτες έχουν πρώτα συνδέσει τις πολύτιμες θεραπευτικές ιδιότητες του σκόρδου με τα πτητικά συστατικά του (Vitranen, 1962, Agarwal, 1996) και στη συνέχεια οι Block et al, (Block, 1992) αποφάνθηκαν πως από τις πτητικές ενώσεις οι πιο δραστικές είναι οι μη κυκλικές θειούχες ενώσεις. Στη συνέχεια οι ίδιοι προσδιόρισαν τις κυριότερες ενώσεις που απαντούν στο πτητικό κλάσμα του σκόρδου και τις κατέταξαν σε ομάδες με βάση τη δομή τους. Τέλος, άλλοι ερευνητές (Banerjee, Maulic, & Pulok, 2000, Benkeblia, 2004, Ho, Koh, Ma, Huang, & Sim, 1996,) απέδωσαν τις κυριότερες ιδιότητες του αιθερίου ελαίου στις άκυκλες, ακόρεστες θειούχες ενώσεις.

Στην προσπάθεια ανάπτυξης μιας «ψυχρής» και γρήγορης μεθόδου ανάλυσης του αιθερίου ελαίου του σκόρδου αναζητήθηκαν από την βιβλιογραφία προηγούμενες αναφορές. Έτσι, προκύπτει ότι η πιο εξεζητημένη είναι αυτή του “cryogenic” GC-MS (Abu-Lafi, Dembicki, Goldshlag, Hanus, & Dembitsky, 2004). Στις πιο κλασικές κατατάσσονται οι GC-MS, GC-FID, HPLC, και UV. Από όλες αυτές μόνο η UV μέθοδος είναι σύντομη ενώ οι άλλες είναι χρονοβόρες.

Ως προς τον τρόπο ανάλυσης, επιλέγεται η φασματοσκοπία FT-Raman η οποία στο παρελθόν έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να δώσει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα σε αναλύσεις ποσοτικού προσδιορισμού (Daferera et al. 2002, Hancewicz & Petty, 1995, Skoulika, Georgiou, & Polissiou, 2000, Sun, Ibrahim, Oldam, Schultz, & Connors, 1997). Η φασματοσκοπία Raman δίνει εύκολα τις ποιοτικές διαφορές μεταξύ φασμάτων διαφορετικών υσίων, ενώ οι σχετικές εντάσεις των κορυφών χρησιμεύουν για τον ποσοτικό προσδιορισμό επιμέρους συστατικών στο προς ανάλυση δείγμα. Εκτός από γρήγορη μέθοδο, η

φασματοσκοπία Raman είναι και λιγότερο παρεμβατική στα ευαίσθητα δείγματα που είναι αντικείμενο του παρόντος, σε σχέση με την επίδραση της θερμότητας στο GC ή του διαλύτη έκλουσης στο HPLC.

Θερμική διάσπαση της αλλυσίνης.

Το θέμα της ανάλυσης, ποιοτικής και ποσοτικής, των συστατικών του αιθερίου ελαίου του σκόρδου είναι περισσότερο σύνθετο από ότι των αντίστοιχων προϊόντων άλλων φυτών. Έτσι και μετά την παρατήρηση αυτή προκύπτει ότι σημαντικό ρόλο για το φαινόμενο αυτό παίζει η αλλυσίνη η οποία είναι η πρόδρομη ένωση όλων των ουσιών που τελικά ανιχνεύονται με τις ενόργανες μεθόδους. Οι μέθοδοι ανάλυσης που στην θεωρία προσδιορίζονται σαν φυσικοχημικές μέθοδοι ανάλυσης δεν είναι αρκετές για να δώσουν αξιόπιστες πληροφορίες στην περίπτωση που το δείγμα δεν είναι σταθεροποιημένο. Η χημική διάσπαση που λαμβάνει χώρα μέσα το όργανο που χρησιμοποιείται δημιουργεί σημαντικά προβλήματα. Ακόμα και η προτεινόμενη μέθοδος ανάλυσης με φασματοσκοπία FT-Raman μπορεί να προκαλεί κάποια διάσπαση για δύο λόγους που μπορεί να έχουν μικρή αλλά ίσως μετρίσιμη επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης.

Οι λόγοι που μπορεί να επηρεαστεί η μέθοδος προσδιορισμού των ακόρεστων άκυκλων συστατικών με την μέθοδο FT-Raman από το περιβάλλον είναι:

α) Η θερμότητα που μεταδίδεται από το laser του οργάνου στο δείγμα και μπορεί να επηρεάζει την ταχύτητα των διενεργούμενων διασπάσεων αλλοιώνοντας συγχρόνως τα αποτελέσματα.

β) Η παρουσία αέρα και οξυγόνου πάνω από το δείγμα και στο εσωτερικό του σωλήνα που περιέχει το δείγμα μπορεί να επιβαρύνει επί πλέον τις παραμέτρους που επηρεάζουν την ακρίβεια των μετρήσεων.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν στη σκέψη ότι προκειμένου να γίνει συστηματική βελτίωση της μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται για την λήψη φασμάτων Raman, είναι προτιμότερο να γίνει πρώτα μια στροφή σε άλλη μέθοδο προσδιορισμού και στη συνέχεια να προσδιοριστεί ο τρόπος και ο ρυθμός με τον οποίο καταστρέφεται η αλλυσίνη που δημιουργεί τις υπόλοιπες ουσίες του αιθερίου ελαίου του σκόρδου. Με τον τρόπο αυτό θα φανεί η επίδραση που έχει το περιβάλλον στην σύσταση του αιθερίου ελαίου του σκόρδου κατά την αποθήκευσή του και θα προκύψουν πολύτιμα δεδομένα για την πορεία της αντίδρασης διάσπασης όπως αυτή λαμβάνει χώρα σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Ακόμα, είναι αυτός ο τρόπος με τον οποίο λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις στο εσωτερικό του βολβού του σκόρδου όταν αυτός τραυματιστεί ή προσβληθεί από κάποια ασθένεια. Η αλλίνη καταλύει την αντίδραση παραγωγής αλλυσίνης η οποία διασπάται με την επαφή της με το νερό και τον αέρα στα συστατικά που δίνουν το αιθέριο έλαιο όπως

αυτό παραλαμβάνεται με διάφορες μεθόδους. Η απομόνωση της αλλυσίνης πριν προλάβει να δώσει παράγωγα, είναι ο πρώτος στόχος.

Ο δεύτερος στόχος είναι η επιλογή μιάς μεθόδου ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού που να μπορεί να είναι μη καταστρεπτική για το δείγμα σε βαθμό μεγαλύτερο από το FT-Raman. Και ο τρόπος καταγραφής πρέπει να έχει τα ίδια χαρακτηριστικά.

Ενεργειακά φυτά

1.2.7 vii Σουσάμι

Μέλος της οικογενείας Pedaliaceae, το σουσάμι (*Sesamum Indicum*) είναι το πιο σημαντικό για την παραγωγή ποιοτικού φυτικού ελαίου, φυτό μεγάλης καλλιέργειας στον κόσμο. Η ποιότητα του σησαμελαίου το κατατάσσει κατώτερο μόνο του ελαιολάδου για την διατροφή του ανθρώπου (Βαρδαβάκης, 1996).

Παραδοσιακά το σουσάμι στην Ελλάδα ήρθε από την Ανατολή και είναι σημαντικό στην κουζίνα των περιοχών της Μικράς Ασίας, της Κωνσταντινούπολης και των περιοχών της Μέσης Ανατολής. Στην κουζίνα πολλών χωρών είναι συστατικό σχεδόν όλων των φαγητών.

Το σουσάμι είναι το πιο πλούσιο ελαιούχο φυτό από αυτά που θα μελετηθούν. Το ποσοστό ελαίου στο σπόρο του σουσαμιού δεν είναι σπάνιο να υπερβεί το 60 % σε εξαιρετικής διατροφικής αξίας τριγλυκερίδια. Το σουσάμι καλλιεργείται κυρίως στην Ινδία, και χωρίς να χρησιμοποιείται για την παραγωγή αυτούσιου βιοντίζελ από σησαμέλαιο λόγω υψηλού κόστους, χρησιμοποιείται σαν βελτιωτικό του βιοντίζελ από άλλα φυτικά είδη. Αυτό οφείλεται και στο χαμηλό ιξώδες που χαρακτηρίζει το βιοντίζελ που προέρχεται από σουσάμι.



Εικόνα 10 Φυτό και σπόροι σουσαμιού

1.2.7 viii Ηλίανθος

Ο ηλιάνθος ανήκει στο γένος *Helianthus* της οικογένειας *Asteraceae* και συγκεκριμένα στο είδος *H. Annuus*. Το όνομα του είδους προέρχεται από το γεγονός ότι το φυτό είναι ετήσιο. Το ύψος του φυτού μπορεί να φθάσει τα 3 μέτρα. Ωστόσο τα καλλιεργούμενα υβρίδια είναι πολύ πιο χαμηλά. Άλλωστε, ο ηλιάνθος όπως και το βαμβάκι αλλά και πολλά ακόμη φυτά είναι πλέον προϊόντα σημαντικής γενετικής βελτίωσης μέσω της φυσικής επιλογής.

Παραδοσιακό κέντρο καλλιέργειας του ηλιάνθου είναι η περιοχή της πρώην Σοβιετικής Ένωσης και ειδικότερη η Ουκρανία. Το φυτό καλλιεργείται για τους σπόρους του που περιέχουν μεγάλο ποσοστό ελαίου αποτελούμενου από καλής ποιότητας τριγλυκερίδια για την διατροφή του ανθρώπου. Στην παραγωγή του ελαίου αυτού βασίζεται ακόμη και σήμερα η αγροτική παραγωγή αρκετών περιοχών του πλανήτη. Το υπόλειμμα της κατεργασίας του ηλιόσπορου για την παραγωγή ηλιελαίου καλείται ηλιόπιττα και είναι χαμηλής ποιότητας ζωοτροφή καθώς περιέχει μικρά ποσοστά πρωτεϊνών (Βαρδαβάκης, 1996).

Ο ηλιάνθος σήμερα καλλιεργείται και ως καλλωπιστικό ενώ για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης θα μελετηθεί μόνο η δυνατότητα παραγωγής βιοκαυσίμων από τον ηλιάνθο μέσω της μετεστεροποίησης του ηλιελαίου. Οι σπόροι του ηλιάνθου φέρονται σε ταξιανθία τύπου κεφαλής. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διάταξη των σπόρων στην κεφαλή, που όμως δεν αποτελεί για τους σκοπούς της μελέτης ενδιαφέρουσες πληροφορίες.



Άνθος ηλιάνθου



Ταξικαρπίες ηλιάνθου

Εικόνα 11 Άνθη, ταξιανθίες και καλλιέργεια ηλιάνθου

1.2.7 ix Βαμβάκι



Αγγειόσπερμο, δικότυλο φυτό το βαμβάκι ανήκει στην τάξη στυλοφόρα και στην οικογένεια Μαλβίδες. Ιθαγενές των τροπικών περιοχών της Αφρικής και της Ασίας είναι γνωστό από τα πανάρχαια χρόνια και καλλιεργείται για τις ίνες του.

Η επιστημονική του ονομασία είναι *γossύπιo* (*Gossypium sp.*) και οι βλαστοί του διακλαδώνονται φτάνοντας σε ύψος το 1,5 μέτρο αλλά και τα 6 μέτρα στις δενδροειδείς ποικιλίες. Έχει φύλλα με μακρύ μίσχο, μεγάλα και με έλασμα. Στη βάση του μίσχου βρίσκονται δύο μικρά παράφυλλα συνήθως οδοντωτά. Τα άνθη βγαίνουν από τις μασχάλες των φύλλων και είναι μεγάλα, μοναχικά και παράγονται από ανθοφόρους οφθαλμούς. Οι ανθοφόροι οφθαλμοί στην αρχή τους μοιάζουν με μικρές πυραμίδες και στο στάδιο αυτό τα άνθη του λέγονται χτένια. Ο καρπός του είναι κάψα και έχει 8-10 σπόρια που περιβάλλονται από λευκές ίνες. Οι ώριμες ίνες αποτελούνται κατά μεγάλο ποσοστό από κυτταρίνη. Σήμερα το βαμβάκι καλλιεργείται σε πολλές χώρες της γης αλλά το μεγαλύτερο τμήμα της παραγωγής προέρχεται από το βόρειο ημισφαίριο (Βαρδαβάκης, 1996).

Τα είδη που καλλιεργούνται σήμερα είναι τέσσερα.

1-Χνουδωτό βαμβάκι Το πιο κοινά καλλιεργούμενο δίνει πάνω από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής. Είναι και το μοναδικό είδος που καλλιεργείται στην Ελλάδα. Το είδος αυτό είναι πολυετές αλλά στην Ελλάδα καλλιεργείται σαν μονοετές γιατί δεν επιβιώνει σε κρύο χειμώνα. Οι ίνες που παράγει φτάνουν τα 45 χιλιοστόμετρα μήκος και χαρακτηριστικό του είναι το χνουδί που περικλείει τα σπόρια του. Τα άνθη του είναι λευκά όταν ανοίξουν αλλά στη πορεία αλλάζουν χρώμα και γίνονται κόκκινα ή μοβ. Είναι βαμβάκι υψηλής ποιότητας με μεγάλη αντοχή, ελαστικότητα, πολύ καλή στιλπνότητα και ομοιομορφία.

2-Ποώδες βαμβάκι Βρίσκεται αυτοφυές στο Πακιστάν στην Ινδία και σε ορισμένες περιοχές της Αφρικής. Παλαιότερα η καλλιέργεια του ήταν πολύ διαδεδομένη αλλά σήμερα

οι καλλιέργειες του αντικαταστάθηκαν από το χνουδωτό βαμβάκι που είναι πολύ καλλίτερης ποιότητας. Στην Ελλάδα το καλλιεργούσαν μέχρι το 1950 στη Λιβαδειά όπου ήταν γνωστό με την ονομασία Δαδιώτικο και στις Σέρρες.

3-Βαρβαδεινό βαμβάκι Πολυετή και ετήσια φυτά που τα περισσότερα είναι δενδροειδή και φτάνουν σε ύψος και τα 6 μέτρα. Η καταγωγή του είδους αυτού είναι η λατινική Αμερική και σήμερα καλλιεργείται στην Αίγυπτο, το Σουδάν, σε πρώην Σοβιετικές χώρες, στις Η.Π.Α., στη Βραζιλία και το Περού. Τα κλαδιά του βαμβακιού αυτού είναι πλάγια και τα φύλλα του έχουν μεγάλες σχισμές Τα σπόρια του είναι κυανού χρώματος και τα άνθη είναι κιτρινωπά με μία κηλίδα στη βάση του κάθε πέταλου. Οι ίνες του είναι οι μακρύτερες από όλα τα είδη και φτάνουν και τα 50 χιλιοστόμετρα είναι καλής ποιότητας , λεπτές και μαλακές.

4-Δενδροειδές βαμβάκι. Βρίσκεται αυτοφυές στο Πακιστάν , τη Σρι Λάνκα και την Ινδία όπου θεωρείται ιερό φυτό γι αυτό βρίσκεται έξω από πολλούς ναούς. Οι ίνες του είναι πολύ κοντές και όχι τόσο καλής ποιότητας γι αυτό η καλλιέργεια του είναι πολύ περιορισμένη.

Συγκομιδή-Εκκόκκιση



Εικόνα 12 Συγκεντρωμένο καθαρό βαμβάκι έτοιμο για το εμπόριο

Για να ωριμάσει το βαμβάκι πρέπει να περάσουν περίπου 2 μήνες από τη σπορά Η συλλογή του γίνεται με ειδικές μηχανές , που είναι πιο σύνηθες ή με το χέρι που είναι πιο δαπανηρό και επίπονο αλλά το βαμβάκι είναι πιο καθαρό και έτσι έχει και καλλίτερη τιμή στο εμπόριο. Μετά τη συγκομιδή το βαμβάκι μεταφέρεται σε ειδικούς χώρους που λέγονται εκκοκκιστήρια. Εκεί γίνεται ο αποχωρισμός των ινών από το σπόρο. Ο χρόνος που γίνεται η εκκόκκιση είναι περίπου 3 μήνες μετά τη συλλογή. Τα περισσότερα εκκοκκιστήρια διαθέτουν μηχανισμούς που απομακρύνουν τα διάφορα ξένα σώματα όπως χώμα, φύλλα , σπόρους καθώς και την περιττή υγρασία. Μετά από τις διαδικασίες αυτές τα βαμβάκια, καθαρά πλέον , συσκευάζονται σε μεγάλες μπάλες ή τετράγωνες παλέτες, δένονται, καταγράφεται η ποιότητα και προωθούνται στο εμπόριο.

Εμπόριο, Χρήσεις

Η κατασκευή υφασμάτων είναι η βασικότερη από τις διάφορες χρήσεις του βαμβακιού. Στην υφαντουργία οι ίνες του αποτελούν την κυριότερη ύλη. Τα βαμβακερά υφάσματα είναι πολύ καλής ποιότητας αν και σήμερα τα αντικαθιστούν με συνθετικά που στοιχίζουν λιγότερο. Η Κίνα έχει τη μεγαλύτερη παραγωγή στον κόσμο. Ακολουθούν η Ινδία, οι Η.Π.Α., η Ρωσία, το Πακιστάν και η Βραζιλία.

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται περίπου 1,300,000 στρέμματα και η ετήσια παραγωγή φτάνει τους 39,000 τόνους. Το μεγαλύτερο μέρος του Ελληνικού βαμβακιού καταναλώνεται εγχώρια ενώ το υπόλοιπο εξάγεται κυρίως σε μορφή νημάτων. Από το σπόρο του βαμβακιού βγαίνει λάδι που χρησιμοποιείται σαν επιτραπέζιο αλλά περιορισμένα. Επίσης από τα υπολείμματα του βαμβακιού παρασκευάζεται η **βαμβακόπιτα** που χρησιμοποιείται σαν ζωοτροφή.

Στην παρούσα εργασία είναι πολύ σημαντική ακριβώς αυτή η τελευταία ιδιότητα του βαμβακιού να παράγει δύο μέχρι πρότινος θεωρούμενα παραπροϊόντα, αλλά με αυξανόμενη οικονομική σημασία παράγωγα.

Με την παγκόσμια ενεργειακή κρίση που παρατηρείται περιοδικά το βαμβακέλαιο και η βαμβακόπιτα αποκτούν μεγάλη οικονομική σημασία ενώ ειδικά για την περίπτωση της Ελλάδας όπου η καλλιέργεια του βαμβακιού δέχεται μεγάλες πιέσεις από την υπερπροσφορά βαμβακιού από τρίτες χώρες. Η αξιοποίηση του βαμβακελαίου είναι δυνατό να δώσει συμπληρωματικό εισόδημα στους παραγωγούς. Για να συμβεί αυτό πρέπει το βαμβακέλαιο να οδηγηθεί σε μια βιομηχανία με μεγάλη ζήτηση ώστε να μπορεί να απορροφήσει όλη την ποσότητα και να παράγει σημαντική προστιθέμενη αξία. Η βιομηχανία αυτή είναι η βιομηχανία των βιοκαυσίμων που αποτελεί την πιο οικονομικά εφικτή και οικολογικά ωφέλιμη λύση.

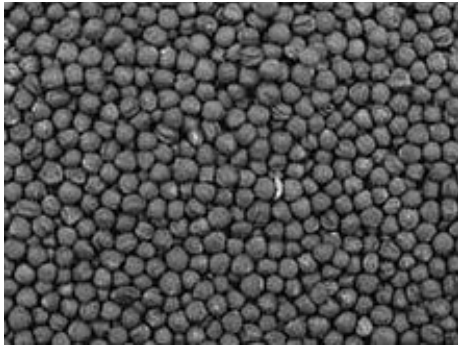
1.2.7 x Ελαιοκράμβη



Εικόνα 13 Ελαιοκράμβη

Η ελαιοκράμβη ανήκει στην οικογένεια *Brassicaceae* και το λατινικό της όνομα είναι *Brassica napus*. Είναι ίσως το μόνο φυτό που πλέον καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο με πρωταρχικό σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμου. Όλα τα άλλα φυτά καλλιεργούνται πρωτίστως ως τρόφιμα και δευτερευόντως παράγονται από αυτά βιοκαύσιμα. Η ελαιοκράμβη είναι κυρίως φυτό που ευδοκimeί στην Κεντρική Ευρώπη. Παροδοσιακά καλλιεργείται σε μεγάλες εκτάσεις στην Αγγλία και την Γαλλία (Βαρδαβάκης, 1996). Το ποσοστό του ελαίου που περιέχεται στον καρπό ποικίλει φθάνοντας και μέχρι το 20%. Το έλαιο αυτό είναι κατάλληλο για την παραγωγή εξαιρετικής ποιότητας βιοκαυσίμου. Είναι φυτό ανταγωνιστικό της σόγιας στην παραγωγή φυτικών ελαίων με σημαντικό πλεονέκτημα έναντι της το γεγονός ότι επιτρέπεται η καλλιέργειά της στην Ευρώπη καθώς δεν είναι γενετικά τροποποιημένη.

Ο καρπός του φυτού είναι μικρός σφαιρικός και με σκούρο χρώμα. Το υπόλειμμα της κατεργασίας της εξαγωγής του ελαίου από τον καρπό της ελαιοκράμβης είναι χαμηλής ποιότητας ζωοτροφή. Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης εξετάζεται η ελαιοκράμβη αποκλειστικά σαν ενεργειακό φυτό.



Σπόροι ελαιοκράμβης



Άνθος ελαιοκράμβης

Εικόνα 14 Σπόροι, καλλιέργεια και άνθος ελαιοκράμβης

1.2.7 xi Αγριαγκινάρα

Η αγριαγκινάρα είναι φυτό συγγενές της καλλιεργούμενης αγκινάρας, τα άνθη της οποίας είναι γνωστό ελληνικό έδεσμα. Ο άγριος τύπος της είναι παραλλαγή γνωστή σαν γαϊδουράγκαθο. Το είδος αυτό παράγει ένα σπόρο πολύ πλούσιο σε έλαιο κατάλληλο για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Το γένος *Cynara* ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae*, και το είδος *C. Cardunculus* (Βαρδαβάκης, 1996) είναι πλέον προωθούμενο είδος για την καλλιέργεια στην Ελλάδα με σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Το φυτό της αγριαγκινάρας δεν υπάρχει σε βιομηχανική παραγωγή στην Ελλάδα αλλά έχουν γίνει πιλοτικά προγράμματα καλλιέργειας με καλά αποτελέσματα. Συμπεριελήφθη στα ενεργειακά φυτά των οποίων οι ιδιότητες εξετάστηκαν για την παραγωγή βιοκαυσίμου παρακάτω στην μελέτη.



Εικόνα 15 Ανθισμένο φυτό αγριαγκινάρας

Γενική επισκόπηση:

- 1) Η ελληνική γλωρίδα διαθέτει γηγενή φυτά με μοναδικά χαρακτηριστικά που μπορούν να αποτελέσουν υλικό μελέτης. Ειδικά χαρακτηριστικά των ελληνικών αρωματικών φυτών είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο αλλά και η ύπαρξη χημειότυπων που είναι χαρακτηριστικοί και χρήζουν διερεύνησης.
- 2) Η μελέτη των αρωματικών και ενεργειακών φυτών πρέπει να ενταθεί καθώς και οι δύο αυτές εναλλακτικές στην παραδοσιακή ελληνική γεωργία εφαρμόζονται εδώ και χρόνια και είναι πολλά υποσχόμενες στην οικονομική αξιοποίησή τους.
- 3) Τα φυτά που απασχολούν την παρούσα μελέτη καλλιεργούνται είτε είναι ιθαγενή της ελληνικής γλωρίδας είτε μπορούν να προσαρμοστούν άνετα στις εδαφοκλιματικές συνθήκες, και άρα όποια πρόοδος γίνει θα μπορεί να βρει άμεσα εφαρμογή. Όλα τα φυτά είναι ετήσια ή ολιγοετή και μπορούν άμεσα να παραχθούν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ

Για την παραλαβή των επιθυμητών συστατικών από τα φυτά, χρησιμοποιούνται τυποποιημένες μέθοδοι που βασίζονται σε φυσικοχημικές ιδιότητες των προς απομόνωση χαρακτηριστικών και τις κάθε φορά ιδιαιτερότητες του φυτικού υλικού. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης είναι:

Η υδρο-απόσταξη σε συσκευή Clevenger

Η μικρο-απόσταξη εκχύλιση σε συσκευή Lickens Nickerson

Η εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση με την βοήθεια υπερήχων

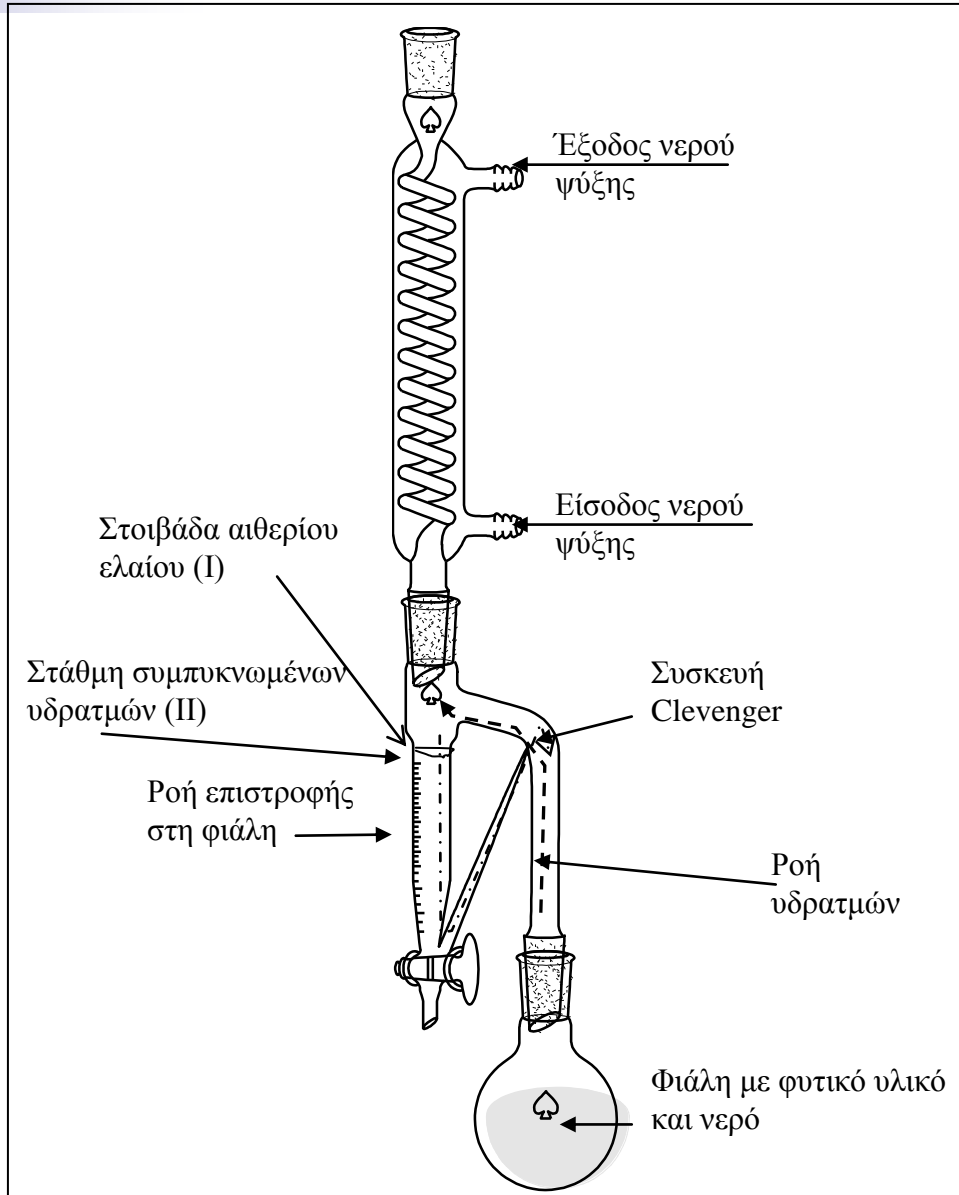
Η απόσταξη με την βοήθεια μικροκυμάτων

Η εκχύλιση με την βοήθεια μικροκυμάτων

Το θεωρητικό υπόβαθρο και οι αρχές λειτουργίας των μεθόδων όπως αυτές χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται πιο κάτω.

2.1 Υδρο-απόσταξη σε θερμομανδύα (heating mantle)

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη μέθοδο απόσταξης, κατά την οποία από το φυτικό υλικό απομακρύνονται σε ικανοποιητικό βαθμό οι πτητικές ουσίες. Η υδρο-απόσταξη αποτελεί την επίσημη μέθοδο παγκοσμίως για την ανάλυση των αιθερίων ελαίων διεθνώς. Στην πορεία αποτελεί κατά κύριο λόγο την μέθοδο αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αιθερίου ελαίου στο φυτικό υλικό. Η υδρο-απόσταξη (hydro-distillation) λαμβάνει χώρα με την χρήση ειδικής υάλινης συσκευής τύπου Clevenger η οποία περιγράφεται στο Σχήμα 6.



Σχήμα 6 Σχηματική απεικόνιση συσκευής υδρο-απόσταξης τύπου Clevenger

Κατά την θέρμανση της φιάλης, το νερό και οι πτητικές ουσίες που αποτελούν το αιθέριο έλαιο περνούν στην αέρια φάση και υγροποιούνται στον κατακόρυφο ψυκτήρα που βρίσκεται στο πάνω άκρο του σώματος της συσκευής. Οι υγροποιημένοι υδρατμοί και το αιθέριο έλαιο σχηματίζουν δύο στοιβάδες μέσα στον βαθμονομημένο σωλήνα. Η υπερκείμενη στοιβάδα (Σχήμα 6 I) είναι το αιθέριο έλαιο ενώ η υποκείμενη είναι ως επί το πλείστον υδατική, περιέχουσα και μικρή ποσότητα ουσιών του αιθερίου ελαίου με κάποια διαλυτότητα στο νερό (Σχήμα 6 II). Η υδατική στοιβάδα επιστρέφει ατέρμονα στην φιάλη ώστε να συνεχίζεται η απόσταξη για όσο χρόνο κριθεί απαραίτητο. Προκειμένου να γίνει αξιόπιστος ποσοτικός προσδιορισμός του περιεχόμενου σε ένα φυτό αιθερίου ελαίου, η απόσταξη συνεχίζεται μέχρι να σταθεροποιηθεί η ποσότητα του ελαίου στην κορυφή του βαθμονομημένου σωλήνα.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η απλότητα και η αξιοπιστία, ενώ σοβαρό της μειονέκτημα είναι ο μεγάλος χρόνος μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Ως μειονέκτημα επίσης μπορεί να αναφερθεί και η απώλεια μικροποσότητας πτητικών ουσιών που παρουσιάζουν κάποια διαλυτότητα στο νερό (συναρτήσει μάλιστα της σχετικά υψηλής θερμοκρασίας που επικρατεί στον βαθμονομημένο σωλήνα). Οι ουσίες αυτές καθιστούν την υδατική στοιβάδα ένα πολύ ενδιαφέρον παραπροϊόν της διαδικασίας με το οποίο θα ασχοληθούμε στη συνέχεια. Οπωσδήποτε, η χρησιμότητα της μεθόδου ως αναφορά είναι μεγάλη, αφού η εξαντλητική εφαρμογή της για τουλάχιστον 4 ώρες σε κάθε δείγμα δίνει πολύ αξιόπιστη ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση του αιθερίου ελαίου (Ταραντίλης, Γ.Π.Α. 2004).

Η μέθοδος αυτή μεταφερόμενη σε βιομηχανική κλίμακα (μεθ' υδρατμών απόσταξη υπο πίεση) αποτελεί και την βάση για την εμπορική εκμετάλλευση των αιθερίων ελαίων. Στη βιομηχανία απαιτούνται άλλωστε απλές και αποδοτικές διατάξεις.

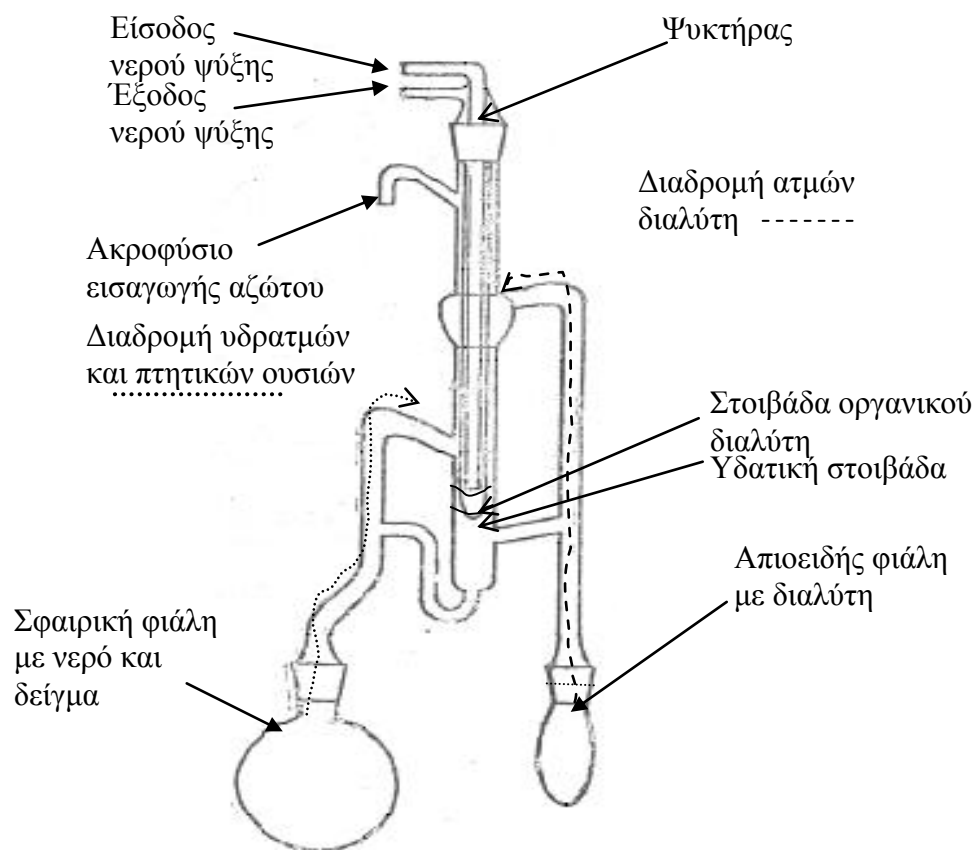
Η αξία της μεθόδου δεν περιορίζεται ωστόσο μόνο στην απομάκρυνση των πτητικών συστατικών από τα αρωματικά φυτά όπως είναι και ο λόγος για τον οποίο αναπτύχθηκε. Στην παρούσα εργασία, η υδρο-απόσταξη αποτελεί και προ-εργασία, απαραίτητη για την περαιτέρω απομόνωση και ανάλυση άλλων δευτερογενών μεταβολιτών. Η a priori αφαίρεση από το δείγμα των πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών που αποτελούν το πτητικό κλάσμα ή το αιθέριο έλαιο καθιστούν όπως είναι φυσικό απλούστερη την ανάλυση των υπολοίπων μη πτητικών ή/και υδατοδιαλυτών ουσιών.

Πιο αναλυτικά, μετά την υδρο-απόσταξη ενός δείγματος προκύπτουν δύο «θυγατρικά» θα μπορούσαμε να πούμε δείγματα, το μεν ένα αποτελούμενο από το από-οσμισμένο (deodorized) φυτικό υλικό, το δε αποτελούμενο από το εναπομείναν υδατικό περιεχόμενο της φιάλης. Αθροιστικά με το αιθέριο έλαιο (I) και την υδατική στοιβάδα της απόσταξης (II) αποτελούν την πρώτη κλασματοποίηση των προς ανάλυση δευτερογενών μεταβολιτών ενός φυτού.

Φυσικά, δεν μπορούμε να παραβλέψουμε την ζημιογόνο επίδραση στην ποιοτική τουλάχιστον σύσταση των δειγμάτων από την θερμότητα η οποία μπορεί να προκαλέσει αστάθμητες μεταβολές. Η μεγάλη χρονική διάρκεια της υδρο-απόσταξης επιτείνει τον κίνδυνο μεταβολών στην σύσταση αν όχι τόσο στις σχετικά σταθερές ουσίες του πτητικού κλάσματος, σίγουρα όμως σε θερμοευαίσθητες ουσίες ή το ίδιο το φυτικό υλικό. Η χρήση αυτής της μεθόδου παρουσιάζει, όπως θα δούμε και στην περίπτωση του σκόρδου, σημαντικές δυσχέρειες στην εφαρμογή της για τον παραπάνω λόγο.

2.2 Μικρό-απόσταξη εκχύλιση (Lickens – Nickerson)

Ένας πολύ αξιόπιστος τρόπος παραλαβής του πτητικού κλάσματος των ουσιών που περιέχονται σε ένα αρωματικό φυτό, είναι η τεχνική της σύγχρονης μικρό- απόσταξης εκχύλισης σε οργανικό διαλύτη. Για την εφαρμογή της μεθόδου είναι απαραίτητη μια υάλινη συσκευή όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 7. Η λογική της μεθόδου είναι παρόμοια με αυτή της υδρο-απόσταξης Clevenger μόνο που για την εφαρμογή της χρειάζονται περίπου πέντε ή λιγότερα γραμμάρια φυτικού υλικού έναντι 50 έως 100 γραμμαρίων που απαιτεί η μέθοδος της υδρο-απόσταξης. Μια άλλη διαφορά είναι στον χρόνο που απαιτείτε για την ολοκλήρωση της παραλαβής που είναι μία – δύο ώρες για την Lickens-Nickerson έναντι τεσσάρων ωρών πλήρους βρασμού της υδρο-απόσταξης (Ταραντίλης, Γ.Π.Α. 2004).



Σχήμα 7 Σχηματική απεικόνιση της συσκευής μικρό-απόσταξης εκχύλισης Lickens-Nickerson

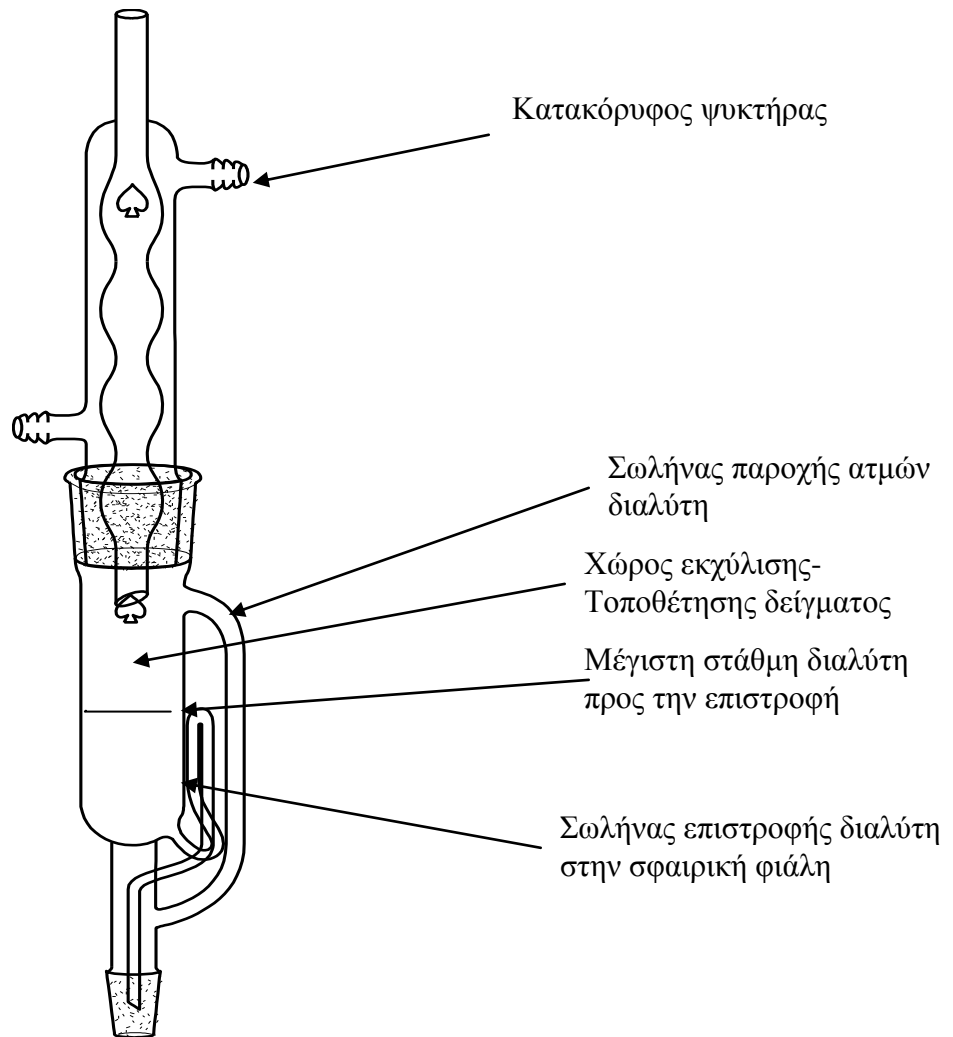
Η μικρή σχετικά διάρκεια της παραλαβής, καθιστά την μέθοδο πολύτιμη όταν πρόκειται για την παραλαβή θερμοευαίσθητων ουσιών. Ακόμα, η φύση της μεθόδου της δίνει και την δυνατότητα να παρουσιάσει και μια σχετική εκλεκτικότητα στην παραλαβή.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου περίπου 5 γραμμάρια φυτικού υλικού μεταφέρονται στην σφαιρική φιάλη μαζί με νερό ενώ η απιοειδής φιάλη περιέχει τον διαλύτη στον οποίο θα εκχυλιστούν οι συμπυκνωμένοι υδρατμοί. Οι δύο φιάλες θερμαίνονται ξεχωριστά η μεν σφαιρική μέχρι του βρασμού (100° C) η δε απιοειδής, ανάλογα με το διαλύτη, με υδατόλουτρο μέχρι της ομαλής και συνεχούς εξαέρωσης του διαλύτη. Οι υδρατμοί που προέρχονται από τις δύο φιάλες συναποστάζουν πάνω σε ένα ψυκτήρα με παγωμένο νερό (η ψύξη μπορεί να γίνει πιο αποτελεσματική στους -5° C με χρήση πάγου και αλατιού ή -10° C με γλυκερόλη νερό). Οι συμπυκνωμένοι υδρατμοί σχηματίζουν δύο στοιβάδες στον θάλαμο συμπύκνωσης ακριβώς κάτω από τον ψυκτήρα, με την υπερκείμενη να είναι η οργανική αν ο χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης είναι ελαφρύτερος από το νερό. Είναι λογικό ότι οι ουσίες που αποστάζουν αναγκάζονται να διέλθουν την ανώτερη στοιβάδα και αν έχουν καλή διαλυτότητα στον οργανικό διαλύτη παραμένουν εκεί και ακολουθούν την ροή επιστροφής του διαλύτη προς την απιοειδή φιάλη. Εκεί παραμένουν εφόσον η θερμοκρασία που επικρατεί προκειμένου να αποστάζει ο διαλύτης δεν αρκεί για να περάσουν εκ νέου στην αέρια φάση.

Καταλήγοντας, θα μπορούσαμε να πούμε πως οι δύο παραπάνω μέθοδοι παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες ωστόσο παρουσιάζουν και ποιοτικές διαφορές. Κυρίως στην περίπτωση της Lickens-Nickerson ελαχιστοποιείται η περίπτωση να χαθούν κάποια από τα συστατικά του αιθερίου ελαίου λόγω της απευθείας επαφής του αιθερίου ελαίου που επιπλέει πάνω στο νερό. Στην περίπτωση αυτή, και δεδομένης της υψηλής θερμοκρασίας που επικρατεί, κάποια από τα συστατικά του αιθερίου ελαίου που παρουσιάζουν κάποια διαλυτότητα στις συνθήκες αυτές χάνονται στην υδατική στοιβάδα και επιστρέφουν στην φιάλη με το φυτικό υλικό. Από εκεί αποστάζουν εκ νέου, όμως μια ποσότητα παραμένει σταθερά διαλυμένη στο υποκείμενο υδατικό διάλυμα. Το γεγονός αυτό προκαλεί μια απώλεια συστατικών που αλλοιώνει κατά τι το συνολικό προφίλ του υπό ανάλυση δείγματος. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή της μεθόδου Lickens-Nickerson δεν αποτελεί τόσο καθιερωμένη μέθοδο για την ανάλυση των αρωματικών φυτών όσο η υδρο-απόσταξη. Εξάλλου και το γαλακτόμορφο διάλυμα που συγκεντρώνεται στον βαθμονομημένο σωλήνα της συσκευής Clevenger αποτελεί ένα χρήσιμο παραπροϊόν που αναλύεται παρακάτω.

2.3 Εκχύλιση Soxhlet

Μια ακόμη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την παραλαβή ουσιών από διάφορα φυτικά υλικά είναι η μέθοδος εκχύλισης Soxhlet. Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται ειδική υάλινη συσκευή που φαίνεται στο Σχήμα 8.



Σχήμα 8 Σχηματική αναπαράσταση συσκευής εκχύλισης Soxhlet

Η συσκευή αποτελείται από τον χώρο τοποθέτησης του δείγματος μέσα σε ειδική «κάψα» από πεπιεσμένο χαρτί. Στο κάτω μέρος της συσκευής τοποθετείται σφαιρική φιάλη με τον εκχυλιστή διαλύτη και εφαρμόζεται θέρμανση. Οι ατμοί του διαλύτη διέρχονται από τον σωλήνα που βρίσκεται εξωτερικά της συσκευής και συμπυκνώνονται στον κατακόρυφο ψυκτήρα. Ο συμπυκνωμένος διαλύτης έρχεται σε επαφή με το φυτικό υλικό εκχυλίζοντάς το. Μόλις η στάθμη του διαλύτη ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο σημείο, δημιουργείται σιφωνισμός με αποτέλεσμα το εκχύλισμα να επιστρέφει στην σφαιρική φιάλη. Το φυτικό υλικό όντας μέσα στην κάψα δεν μετακινείται. Στην σφαιρική φιάλη το εκχύλισμα θερμαίνεται, ο

διαλύτης εξατμίζεται εκ νέου ενώ οι εκχυλισμένες ουσίες παραμένουν. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου εξασφαλίζεται ατέρμονη παροχή απεσταγμένου διαλύτη στο φυτικό υλικό, με αποτέλεσμα να γίνεται εξαντλητική απομάκρυνση των ουσιών από το δείγμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται αποτελεσματικά με την επιλογή κατάλληλου διαλύτη και εξασφαλίζοντας επαρκή διάρκεια εκχύλισης, ώστε να επαναληφθεί αρκετές φορές ο σιφονισμός. Η συνήθης αυτή διάρκεια είναι περίπου 3 ώρες (Ταραντίλης, Γ.Π.Α. 2004).

Η εφαρμογή της μεθόδου αυτής δεν ενδείκνυται στην περίπτωση που πρόκειται να παραληφθούν αιθέρια έλαια, καθώς η διαλυτότητά τους σε ένα διαλύτη ποικίλει σημαντικά. Άλλωστε τα αιθέρια έλαια αποτελούνται από ομάδες ουσιών εξαιρετικά διαφορετικών μεταξύ τους. Ένας άλλος λόγος για τον οποίο δεν χρησιμοποιείται η μέθοδος αυτή για την παραλαβή αιθερίων ελαίων είναι ότι ακόμα και αν βρεθεί ένας διαλύτης που να παραλαμβάνει όλα τα επιθυμητά συστατικά, είναι βέβαιο ότι θα παραλάβει και άλλα συστατικά από το φυτικό υλικό, καθιστώντας έτσι δυσχερέστερη την ανάλυση του δείγματος. Άλλωστε είναι απλούστερο να εκμεταλλευθεί κανείς την πτητικότητα των ουσιών παρά να αναλάβει το ρίσκο να παραλάβει ανεπιθύμητες ουσίες.

Αντίθετα, η εφαρμογή της μεθόδου είναι απαραίτητη όταν πρόκειται να παραληφθούν άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες, μη πτητικοί που παρουσιάζουν καλή διαλυτότητα σε συγκεκριμένους διαλύτες. Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα που βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή η εκχύλιση Soxhlet είναι η παραλαβή λιπών και ελαίων. Για παράδειγμα η μέθοδος Soxhlet αποτελεί διακριβωμένη μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό του ποσοστού του ελαίου που περιέχεται σε ελαιούχους σπόρους και θα παρουσιαστεί λεπτομερώς η χρήση της για το λόγο αυτό στο δεύτερο μέρος της εργασίας.

2.4 Εκχύλιση με την χρήση υπερήχων

Η εκχύλιση με την χρήση υπερήχων είναι μια σύγχρονη τεχνική που έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια βασισμένη στην προϋπάρχουσα τεχνολογία, που αναπτύχθηκε αρχικά για εφαρμογές σε εμπορική κλίμακα κυρίως για καθαρισμούς ιατρικών εργαλείων και σε πειραματικό επίπεδο για την επιτάχυνση ή εκτέλεση συνθετικών αντιδράσεων. Προκειμένου για την παραλαβή με την χρήση υπερήχων απαιτείται ειδικός εξοπλισμός, που ονομάζεται στο σύνολο του λουτρό υπερήχων. Η Εικόνα 16 παρουσιάζει ένα λουτρό υπερήχων παρόμοιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Το λουτρό υπερήχων αποτελείται από ένα κάδο ο οποίος είναι κατασκευασμένος από ανελαστικό υλικό (συνήθως ανοιξείδωτο ατσάλι). Στην βάση του κάδου και σε επαφή με αυτόν βρίσκονται οι πηγές υπερήχων. Στο απλό λουτρό υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω οι πηγές ήταν 3 και η συχνότητά τους 36 kHz.

Ο κάδος πληρώνεται με υγρό που χρησιμεύει σαν μέσο διάδοσης των υπερήχων προς το υλικό που θέλουμε να δεχθεί την επίδρασή τους, στην δική μας περίπτωση το υλικό είναι ο φυτικός ιστός που θέλουμε να εκχυλίσουμε.



Εικόνα 16 Λουτρό υπερήχων

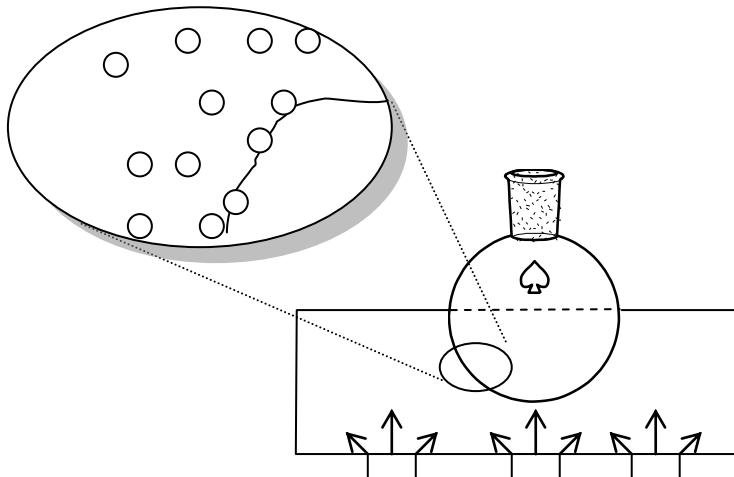
Το φυτικό υλικό πρέπει επίσης να βρίσκεται τοποθετημένο μέσα σε γυάλινο περιέκτη και μέσα σε υλικό που θα μεταδώσει τους υπερήχους στους ιστούς. Ενώ στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το λουτρό υπερήχων γεμίζεται με νερό, η φιάλη που περιέχει το φυτικό υλικό μπορεί να περιέχει σχεδόν κάθε γνωστό διαλύτη.

Η λειτουργία του λουτρού υπερήχων ελέγχεται από ηλεκτρικά εξαρτήματα, ενώ οι παράμετροι που μπορούν να ρυθμιστούν είναι ο χρόνος και η μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας.

Οι υπέρηχοι που παράγονται από τις πηγές, μεταδίδονται μέσω του υγρού το οποίο τους μεταδίδει προς όλες τις κατευθύνσεις. Στα σημεία συμβολής διαφορετικών κυμάτων που είτε προέρχονται από τις πηγές είτε από αντανάκλαση στα τοιχώματα του λουτρού, δημιουργούνται λόγω αντίθετα κατευθυνόμενων κυμάτων φυσαλίδες υψηλού κενού οι οποίες καταρρέουν πολύ σύντομα μετά την δημιουργία τους.

Η παρουσία των φυσαλίδων αυτών κοντά στους φυτικούς ιστούς προκαλούν ρήξη των ιστών καθώς τα κύτταρα έχουν στο εσωτερικό τους μεγαλύτερη πίεση κατά την στιγμή εκείνη από το περιβάλλον τους. Η ρήξη αυτή είναι το ζητούμενο καθώς με την διαρραγή των κυττάρων το περιεχόμενό τους έρχεται σε επαφή με το υγρό μέσο που τα περιβάλλει με αποτέλεσμα να διαλύεται μια ποσότητα εφόσον υπάρχει διαλυτότητα (

Porto, Decorti, Kikic, 2009, Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, Chemat, 2010).



Εικόνα 17 Απεικόνιση λειτουργίας των υπερήχων κατά την εκχύλιση

2.5 Η εφαρμογή των μικροκυμάτων στην απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από αρωματικά φυτά μέσω απόσταξης ή εκχύλισης.

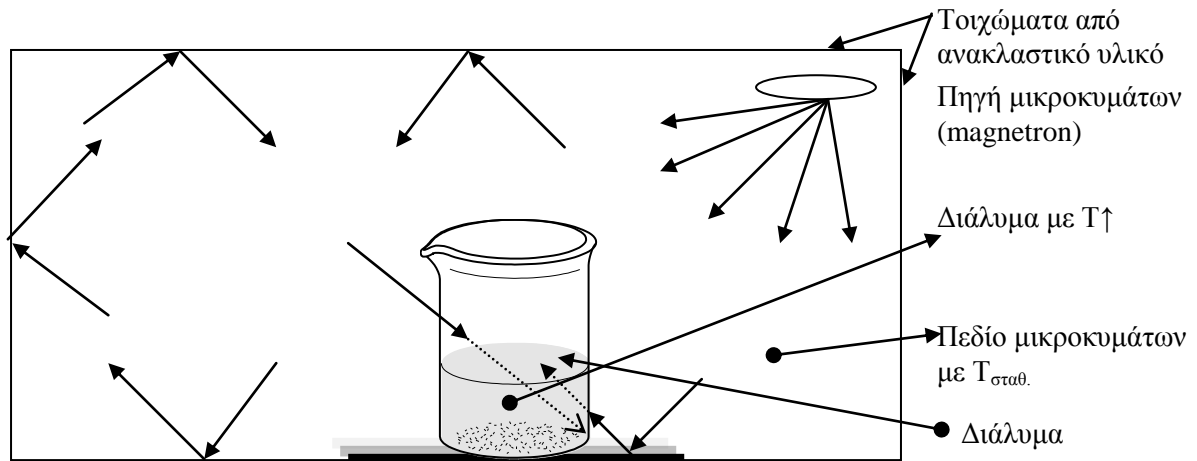
Η χρήση των μικροκυμάτων στην σύγχρονη χημεία έχει βρει πολλαπλές εφαρμογές, τόσο στην οργανική σύνθεση όσο και στην ανάλυση. Στην συνθετική χημεία η αξία τους βρίσκεται στην επιτάχυνση των αντιδράσεων λόγω της απευθείας μεταφοράς ενέργειας από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο στα αντιδρώντα (μόρια, ρίζες, ιόντα). Στον τομέα της ανάλυσης τα μικροκύματα βρίσκουν εφαρμογή κυρίως στην επεξεργασία του δείγματος και ειδικότερα στην εκχύλιση των προς προσδιορισμό ουσιών από δύσκολα υποστρώματα όπως είναι φυτικοί ιστοί, ορυκτά κ.α (Armstrong, 2000).

Η παρούσα αναφορά περιλαμβάνει την εφαρμογή των μικροκυμάτων σαν μέσο προσφοράς ενέργειας για την απόσταξη και παραλαβή των αιθερίων ελαίων καθώς και την ποιοτική διαφοροποίηση μεταξύ των παραλαμβανόμενων υλικών. Κάποια πολύ χρήσιμα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν από αυτή τη μελέτη αλλά πρώτα είναι απαραίτητο να περιγραφούν κάποιες βασικές αρχές που διέπουν την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια και την καθιστούν ένα πολύτιμο εργαλείο.

α) Αλληλεπίδραση μικροκυμάτων και ύλης

Τα μικροκύματα δημιουργούνται από μια ηλεκτρονική συσκευή, την πηγή ή magnetron, όπου παράγονται ηλεκτρομαγνητικά κύματα με μήκος κύματος από 1-10cm. Οι συχνότητες στις οποίες λειτουργούν οι σύγχρονες πηγές έχουν οριστεί από διεθνείς κανονισμούς προκειμένου να μην υπάρχουν ηλεκτρονικές παρεμβολές με άλλες συσκευές που λειτουργούν σε παρόμοιες συχνότητες, όπως κινητά τηλέφωνα και τηλεοράσεις. Οι επιτρεπόμενες συχνότητες είναι από 700 έως 2450 MHz. Η αποδιδόμενη ισχύς για αυτές τις συχνότητες είναι αντίστοιχα από 100 έως 700 watt. Ενώ θεωρητικά θα έπρεπε τα μικροκύματα να κινούνται στο χώρο προς όλες τις δυνατές διευθύνσεις, για τις συσκευές πέψης (microwave digestion) ή τις οικιακές συσκευές, είναι επιθυμητή ο κατά το δυνατόν προσανατολισμός της ενέργειας. Για να επιτευχθεί αυτό είναι απαραίτητη η χρήση συνδυασμού υλικών για τον σχηματισμό ενός «πεδίου». Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό και την χρήση του πεδίου είναι αυτά που ανακλούν τα μικροκύματα χωρίς να απορροφούν την ενέργειά τους ή να αλλάζουν τη συχνότητά τους. Τέτοιο υλικό είναι για παράδειγμα το αλουμίνιο που επενδύει το εσωτερικό κάθε συσκευής μικροκυμάτων.

Μια άλλη κατηγορία υλικών είναι αυτά που επιτρέπουν στην ενέργεια να τα διαπερνά και χρησιμοποιούνται σαν περιέκτες των υλικών που τελικά θα απορροφήσουν την ενέργεια. Τέτοια υλικά είναι το γυαλί και η πορσελάνη. Η χρήση του όρου πεδίο δεν είναι ακριβής προκειμένου να περιγραφεί το εσωτερικό μιας συσκευής μικροκυμάτων. Αυτό συμβαίνει επειδή τα μικροκύματα δεν έχουν ορισμένη κατεύθυνση η ενέργεια (ένταση του πεδίου) σε δεδομένο σημείο του χώρου αλλά τα εκάστοτε χαρακτηριστικά σε δεδομένο σημείο στο εσωτερικό του χώρου που δέχεται τα μικροκύματα είναι συνάρτηση των συνθηκών λειτουργίας της πηγής, της παρουσίας απορροφητικών υλικών ή μη και των χαρακτηριστικών αυτών. Στη συνέχεια και χάρι απλότητας θα χρησιμοποιείται ο όρος πεδίο για να περιγράψει το εσωτερικό μιας συσκευής μικροκυμάτων, όπως κατά σύμβαση και με τις παραπάνω παραδοχές χρησιμοποιείται και στην βιβλιογραφία. Μια γραφική απεικόνιση ενός πεδίου μικροκυμάτων παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.



Σχήμα 9 Απεικόνιση εσωτερικού συσκευής μικροκυμάτων

Όπου: $T \uparrow$ Αυξανόμενη θερμοκρασία και $T_{σταθ.}$ Σταθερή θερμοκρασία

Η χρήση του όρου πεδίο με την παραδοχή ότι τα φαινόμενα παρουσιάζουν μικρή (αμελητέα) παραλλακτικότητα από σημείο σε σημείο του χώρου εξυπηρετεί και μια άλλη σκοπιμότητα που θα παρουσιαστεί πιο καλά όταν εξεταστεί η αλληλεπίδραση των μικροκυμάτων με στερεές ουσίες, μίγματα, διαλύματα και ακόμα πιο πολύπλοκα συστήματα όπως φυτικά κύτταρα ή ιστοί (Armstrong, 2000).

Η μακροσκοπική αντίληψη της αλληλεπίδρασης της ύλης με τα μικροκύματα είναι η αύξηση της θερμοκρασίας της, αφού η απορροφούμενη ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα. Σύμφωνα με αυτό, μπορούμε να αποφανθούμε για το αν ένα υλικό απορροφά την ενέργεια από ένα πεδίο μικροκυμάτων μετρώντας την μεταβολή της θερμοκρασίας του μετά από παραμονή του σε ένα πεδίο.

i) αλληλεπίδραση με μόρια, ιόντα και διαλύματα

Ένα μόριο για να αλληλεπιδράσει με την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια πρέπει στο σύνολο ή σε μέρος του να έχει πολικό χαρακτήρα. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε με το εξωτερικό νέφος ηλεκτρονίων, οπότε αλληλεπιδρά με ακτινοβολίες υπεριώδους ορατού, είτε μεταξύ των ατόμων που σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς (ακτινοβολία υπερώδου, σκέδαση Raman) είτε μέσω του φορτίου του πυρήνα των ατόμων που το αποτελούν (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR). Προκειμένου ένα μόριο να αλληλεπιδράσει με ακτινοβολία μεγάλου μήκους κύματος όπως τα μικροκύματα αρκεί να εμφανίσει πολικό χαρακτήρα σε απόσταση αρκετών δεσμών και να σχηματίσει δίπολο οποιασδήποτε μορφής. Οι πολωμένοι δεσμοί δεν απορροφούν από μόνοι τους ενέργεια από ένα πεδίο μικροκυμάτων, η παρουσία

τους όμως σε ένα μόριο επηρεάζει την τάση του μορίου να πολωθεί. Ο όρος κλειδί προκειμένου να κατανοηθεί επαρκώς η αλληλεπίδραση των μικροκυμάτων με ένα μόριο είναι η διηλεκτρική σταθερά (ϵ'). Πρόκειται για μια φυσικοχημική σταθερά που εκφράζει την δυνατότητα του μορίου να σχηματίζει στιγμιαία δίπολο και κατά άσκηση ηλεκτρομαγνητικών δυνάμεων. Ανάλογα, το μέτρο μετατροπής της ενέργειας αυτής σε θερμότητα ονομάζεται συντελεστής διηλεκτρικής απώλειας (dielectric loss factor) ϵ'' . Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, αλλά και γενικότερα για τις ερευνητικές εφαρμογές των μικροκυμάτων, το πηλίκο των δυο μεγεθών εκφράζει μονοσήμαντα την τάση προς εξαέρωση ενός διαλύτη ή μιας ουσίας

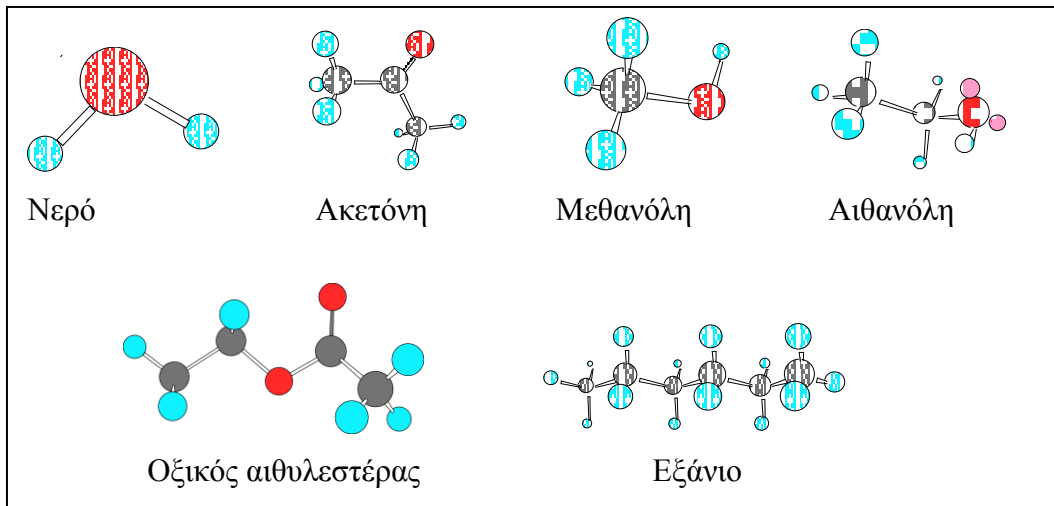
$$\delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \text{ (συντελεστής εξαέρωσης)}$$

Λογικά, άλλωστε προκύπτει η παραπάνω σχέση αν σκεφτούμε ότι το μέτρο του ρυθμού εξαέρωσης δ πρέπει να είναι ευθέως ανάλογο προς τον ρυθμό απορρόφησης της ενέργειας από το μόριο, και αντιστρόφως ανάλογο προς την διηλεκτρική σταθερά, η οποία είναι το μέτρο της δυνατότητας πόλωσης του μορίου εκφράζει και την δυνατότητα ανάπτυξης διαμοριακών δεσμών, μειώνοντας την δυνατότητα εξαέρωσης (Armstrong, 2000).

Ενώ λοιπόν τα μόρια σαν δίπολα λαμβάνουν την ενέργεια από το πεδίο αναγκάζονται σε περιστροφή. Αυτή η μεταβολή της κινητικής κατάστασής τους οδηγεί σε μακροσκοπική αύξηση της θερμοκρασίας του υλικού. Η σύνδεση της αύξησης της θερμοκρασίας με την τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς σε κοινούς διαλύτες φαίνεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3 Τιμές των φυσικών σταθερών που επηρεάζουν την συμπεριφορά των πιο κοινών διαλυτών σε πεδία μικροκυμάτων (Armstrong, 2000).

Διαλύτης	Διηλεκτρική σταθερά (ϵ')	Συντελεστής διηλεκτρικής απώλειας (ϵ'')	$\delta \times 10^4$
Νερό	80	12	1500
Ακετόνη	20,7	11,5	5555
Μεθανόλη	23,9	15,2	6400
Αιθανόλη	7	1,6	2286
Οξικός αιθυλεστέρας	6,02	3,2	5316
Εξάνιο	1,88	0,00019	0,10



Στην περίπτωση των ιόντων, για παράδειγμα όταν ένα άλας είναι διαλυμένο σε νερό η επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας είναι διαφορετική και πιο πολύπλοκη. Αφενός ο διαλύτης είναι ένα ισχυρό πολικό μόριο το οποίο απορροφά ενέργεια από το πεδίο. Τα ιόντα κινούνται μέσα στο διαλύτη υπό την επίδραση του πεδίου προς διάφορες διευθύνσεις αφού και τα μικροκύματα μέσα σε μια συσκευή μικροκυμάτων δεν κινούνται προς μια κατεύθυνση. Η κίνηση αυτή μέσω των κρούσεων με τα μόρια του νερού αυξάνει και το ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας του διαλύματος έναντι του καθαρού νερού. Το νερό άλλωστε αποτελεί ένα μέσο που απορροφά πολύ έντονα την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία λόγω και της διάστασης του. Η παρουσία ενός άλατος απλά κάνει πιο έντονη την αύξηση του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας (Armstrong, 2000).

Δύο συμπεράσματα μπορούν άμεσα να εξαχθούν από αυτό το παράδειγμα. Πρώτον, ότι τα ιόντα κινούνται με την επίδραση των μικροκυμάτων σε αντίθεση με τα πολωμένα μόρια που περιστρέφονται, και δεύτερον ότι και μη πολωμένα μόρια που βρίσκονται διαλυμένα σε πολωμένο διαλύτη ή παρουσία ιόντων αυξάνουν την κινητική τους ενέργεια μέσω των αυξημένων κρούσεων που λαμβάνουν χώρα.

Η συμπεριφορά των ριζών σε σχέση με τα μικροκύματα δεν έχει μελετηθεί λόγω δυσκολιών που παρουσιάζει, έχει όμως αποδειχθεί από το πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών που παρουσιάζουν την εφαρμογή των μικροκυμάτων για να επιταχύνουν χρονοβόρες αντιδράσεις, ότι κάποια επίδραση δέχονται.

Τα διαλύματα θερμαίνονται υπό την επίδραση των μικροκυμάτων είτε λόγω περιστροφής των διπόλων, είτε λόγω της κίνησης των ιόντων είτε τέλος λόγω της αύξησης των κρούσεων μεταξύ των μορίων και της αύξησης της κινητικής ενέργειας. Σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας του διαλύματος εξαρτάται από την διηλεκτρική σταθερά κάθε ενός από τα συστατικά του και ακολουθεί τους νόμους της θερμοδυναμικής ενώ ένας τελευταίος παράγοντας που επηρεάζει την τελική μακροσκοπική αύξηση της θερμοκρασίας

είναι και το ιξώδες του διαλύματος, σαν μέτρο της ελευθερίας της κίνησης ενός εκάστου μορίου στο διάλυμα. Ο συσχετισμός του ιξώδους, του σημείου ζέσεως και του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας φαίνεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4 Τιμές του σημείου ζέσεως, του ιξώδους και του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας για τους πιο κοινούς διαλύτες. (MERCCK, 2008)

Διαλύτης	Σημείο Ζέσεως (°C)	Ιξώδες (cP, 25°C)	Ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας (K/sec)
Εξάνιο	69	0,30	0,05
Νερό	100	0,89	1,01
Αιθανόλη	78	0,69	1,20
Οξικός αιθυλεστέρας	77	0,43	1,78
Μεθανόλη	65	0,54	2,11
Ακετόνη	56	0,30	2,20

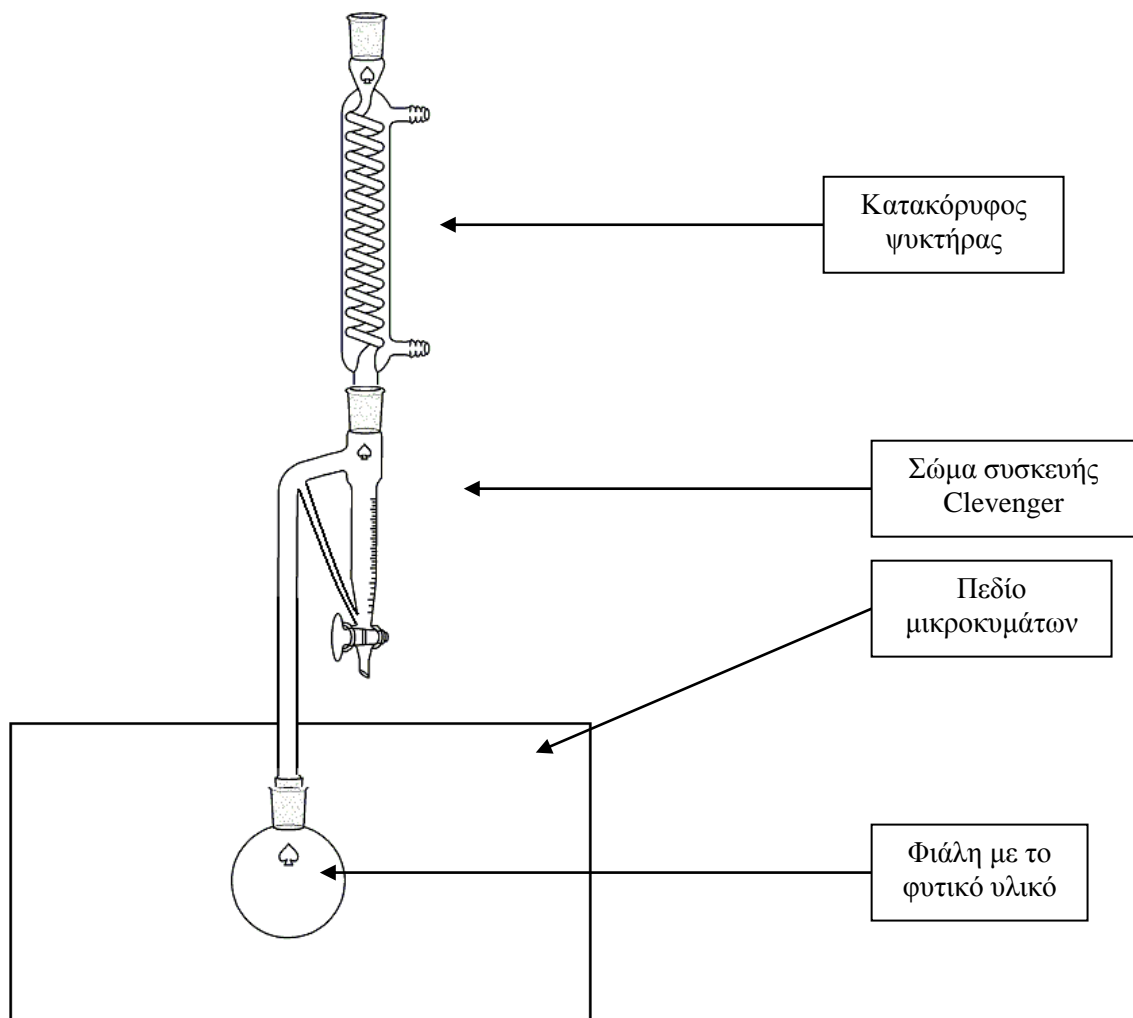
ii) Αλληλεπίδραση με κύτταρα και ιστούς

Τοποθετώντας ένα φυτικό ιστό σε ένα πεδίο μικροκυμάτων υποβάλλουμε όλα τα συστατικά του στις παραπάνω διαδικασίες. Έτσι, το υδαρές εσωτερικό του κυττάρου συμπεριφέρεται σαν ένα διάλυμα που θερμαίνεται σύμφωνα με τα συστατικά του. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελούμενη από μακρομόρια διατεταγμένα σε ορισμένες θέσεις αδυνατεί να απορροφήσει την ενέργεια με το ρυθμό που την απορροφά το εσωτερικό του κυττάρου, θερμαίνεται όμως από την θέρμανση του εσωτερικού. Η άνιση αυτή θερμοκρασιακή αύξηση προκαλεί διαστολή και ρήξη κάποιων οργανιδίων πράγμα που μπορεί να αξιοποιηθεί προκειμένου να εκχυλιστούν περαιτέρω κάποια συστατικά (Okoh, Sadimenko, Afolayan, 2010, Farhat, Fabiano-Tixier, Maataoui, Maingonnat, Romdhane, Chemat, 2011). Λεπτομερέστερη περιγραφή της χρησιμότητας αυτού του φαινομένου θα υπάρξει στις εφαρμογές των μεθόδων που βασίζονται στα μικροκύματα. Σε επίπεδο ιστού οι μεσοκυττάριοι χώροι αποτελούνται κατά μεγάλο ποσοστό από νερό και κατά συνέπεια η αύξηση της θερμοκρασίας των μεσοκυττάρων χώρων προκαλεί και μερική αποδόμηση του, με ευνοϊκή επίδραση στην απόδοση και ταχύτητα της εκχύλισης όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω.

Στην περίπτωση ύπαρξης άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος, όπως συμβαίνει στους στηρικτικούς ιστούς (σόμφο και μεσοκάρδιο ξύλο), η άνιση κατανομή της θερμότητας προκαλεί πλήρη ρήξη της δομής με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται και να εκχυλίζονται πιο αποτελεσματικά τα συστατικά του ιστού (Armstrong, 2000).

β) Μέθοδοι απομόνωσης και εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών από αρωματικά φυτά με τη χρήση μικροκυμάτων

Προκειμένου να παραληφθεί αιθέριο έλαιο από αρωματικά φυτά χρησιμοποιείται διάταξη τύπου Clevenger με ιδιοκατασκευή που επιτρέπει την εισαγωγή σφαιρικής φιάλης κατακόρυφα μέσα σε απλό φούρνο μικροκυμάτων. Η χρησιμοποιούμενη διάταξη εμφανίζεται στο Σχήμα 10.



Σχήμα 10 Απεικόνιση διάταξης απόσταξης Clevenger με χρήση θέρμανσης από μικροκύματα.

2.6 Αντίδραση μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίων σε εστέρες λιπαρών οξέων για την παραγωγή βιοκαυσίμων

Είναι γνωστό ότι τα τριγλυκερίδια απαντούν στους φυτικούς ιστούς σαν το κύριο μέσω αποθήκευσης ενέργειας. Οι τριεστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα αποτελούν τα τριγλυκερίδια τα οποία ποικίλουν ανάλογα με το είδος των λιπαρών οξέων αλλά και ανάλογα με την παρουσία ή όχι διπλών δεσμών στην αλειφατική αλυσίδα. Επίσης είναι δυνατό να διαφέρουν και οι θέσεις που καταλαμβάνουν τα λιπαρά οξέα στην γλυκερόλη. Στην φύση τα λιπαρά οξέα υδρολύονται από τις λιπάσες, τα ένζυμα δηλαδή που έχουν δομή τέτοια ώστε παρουσία νερού να υδρολύουν τα τριγλυκερίδια σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα (Stryer L. 1995).

Η αντίδραση μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων αποσκοπεί στην αντικατάσταση της γλυκερόλης, με άλλη αλκοόλη προς εστέρες των λιπαρών οξέων που αποτελούσαν το τριγλυκερίδιο με κατώτερης τάξης αλκοόλες (συνήθως μεθανόλη ή αιθανόλη). Στην περίπτωση των βιοκαυσίμων η αλκοόλη που χρησιμοποιείται είναι η μεθανόλη.

Για την εκτέλεση της αντίδρασης σε εργαστηριακές συνθήκες απαιτείται η παραγωγή μεθοξειδίου με προσθήκη ισχυρής βάσης στην αλκοόλη (υδροξείδιο του νατρίου). Το μίγμα μεθοξειδίου και τριγλυκεριδίων (συνήθως μίγμα τριγλυκεριδίων όπως απαντούν σε φυτικά έλαια χωρίς περαιτέρω καθαρισμό) τοποθετείται υπο ανάδευση σε θερμοκρασία 40 °C για 1h. Με τον ίδιο τρόπο γίνεται και η παραγωγή βιοκαυσίμων σε εργοστάσια παραγωγής υπο μεγαλύτερη κλίμακα.

Για την εκτέλεση της αντίδρασης όπως έχει προταθεί από τους Vinatoru et. al.. Σύμφωνα με τους ερευνητές αυτούς μια μοριακή αναλογία 6:1 (αλκοόλης (μεθανόλης) που περιέχει 1% NaOH):(ελαίου) δίνει 95% μετατροπή των τριγλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες μετά από 10 λεπτά σε λουτρό υπερήχων. Μακροσκοπικά η αναλογία αυτή προϋποθέτει γνώση του μοριακού βάρους των τριγλυκεριδίων. Για το σκοπό αυτό γίνεται προσέγγιση του μοριακού βάρους και όχι ακριβής υπολογισμός του, γεγονός που θα απαιτούσε πολύπλοκες αναλύσεις χωρίς αυτό να σημαίνει ότι η χρήση του μέσου μοριακού βάρους αλλοιώνει την ακρίβεια της διενεργούμενης αντίδρασης.

Το μέσο μοριακό βάρος τριγλυκεριδίων προερχόμενων από φυτικά έλαια υπολογίζεται με χρήση των μοριακών βαρών των λιπαρών οξέων με δεκαέξι έως δεκαοκτώ άτομα άνθρακα που απαντούν συχνότερα σε φυτικά έλαια. Η επίδραση της παρουσίας διπλών δεσμών (1-3) έχει πολύ μικρή επίδραση στο μέσο μοριακό βάρος το οποίο υπολογίζεται σε 830.

Με βάση τα παραπάνω, ένα γραμμάριο φυτικού ελαίου περιέχει περίπου 0,0012 mole τριγλυκεριδίων. Για να επιτευχθεί η αναλογία 6: 1 πρέπει να χρησιμοποιηθούν $6 \times 0,0012 = 0,0072$ mole μεθανόλης. Άρα σε κάθε γραμμάριο λαδιού που προορίζεται για μετεστεροποίηση προσθέτουμε και $0,0072 \times 32 = 0,2304$ g αλκοόλης.

Γενική επισκόπηση:

- 1) Οι μέθοδοι παραλαβής είναι αντικείμενο μελέτης και διαρκώς βελτιώνονται. Οι συμβατικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρύτατα και είναι πολύ καλά και πολλάκις τεκμηριωμένες με πολλούς ερευνητές να τις αποδέχονται και να τις χρησιμοποιούν.
- 2) Υπάρχει ενδιαφέρον και περιθώρια βελτίωσης των διαδεδομένων μεθόδων παραλαβής δευτερογενών μεταβολιτών από αρωματικά και ενεργειακά φυτά. Από τους δευτερογενείς μεταβολίτες, αυτοί με την σημαντικότερη δράση και την καλύτερη συμπεριφορά όταν γίνεται παραλαβή τους από φυτικό υλικό, είναι οι οργανικές ενώσεις με λιπόφιλο χαρακτήρα.
- 3) Η τάση προς διερεύνηση αφορά μεθόδους με γρηγορότερα, πιο οικονομικά και εκλεκτικά αποτελέσματα. Οι μέθοδοι των υπερήχων και των μικροκυμάτων είναι οι πιο ενδιαφέρουσες στους τομείς αυτούς.
- 4) Η εκλεκτική ως ένα βαθμό διαλυτότητα ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών σε μη πολικούς διαλύτες αποτελεί κύριο κριτήριο επιλογής της μεθόδου παραλαβής τους.
- 5) Οι καθιερωμένες μέθοδοι παραλαβής είναι κοινές για τα φυτά που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης, είτε αυτά είναι αρωματικά φυτά είτε ενεργειακά.
- 6) Κάποιες απλές χημικές αντιδράσεις όπως η αλκαλική μετεστεροποίηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε από κοινά φυτικά προϊόντα (π.χ. φυτικά έλαια), να ληφθούν υψηλής αξίας βιομηχανικά προϊόντα (όπως τα βιοκάυσιμα)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Κατά την παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών από τα φυτά προκύπτουν μίγματα φυσικών προϊόντων. Τα πολύπλοκα αυτά μίγματα χρήζουν ανάλυσης προκειμένου να αξιολογηθεί η χρήση του περαιτέρω. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί με την βοήθεια της τεχνολογίας διάφορες μέθοδοι. Είναι απαραίτητο να γίνει μια σύντομη περιγραφή των μεθόδων στις οποίες θα γίνει παρακάτω αναφορά, ώστε να γίνει μια πρώτη αιτιολόγηση για την επιλογή τους μεταξύ άλλων, σαν τις καταλληλότερες για την ανάλυση των φυσικών προϊόντων.

3.1 Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανάλυσης ενώσεων με σχετικά μικρό σημείο ζέσεως που απαντούν στα φυσικά προϊόντα. Η μέθοδος αυτή είναι ακριβής και με την εξέλιξη της τεχνολογίας έχει γίνει αρκετά απλή, ενώ και το κόστος ανα ανάλυση έχει μειωθεί σημαντικά.

Ένα σύστημα αέριου χρωματογράφου αποτελείται από:

- 1) εισαγωγή του δείγματος
- 2) στήλη αέριας χρωματογραφίας
- 3) χώρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (φούρνο)
- 4) ανιχνευτή
- 5) Η/Υ για την καταγραφή αποτελεσμάτων και αποθήκευση δεδομένων
- 6) αέρια χρωματογραφίας σε οβίδες

Αρχές λειτουργίας

Η μέθοδος ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία βασίζεται σε δύο κυρίως αρχές. Την αρχή του διαχωρισμού με την προσρόφιση ενώσεων συγγενούς πολικότητας όταν το περιβάλλον είναι παρόμοιας πολικότητας (την στήλη της χρωματογραφίας), και την αρχή του διαχωρισμού των ενώσεων με την σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας ώστε οι ενώσεις του μίγματος να φτάνουν στο σημείο εξάτμισης τους και να κινούνται στην στήλη χρωματογραφίας κατά ομάδες. Έτσι με την μέθοδο αέριας χρωματογραφίας ένα δείγμα προς ανάλυση που αποτελείται από ουσίες διαφορετικής πολικότητας και σημείου ζέσεως μπορεί να αναλυθεί με την σωστή εφαρμογή των παραπάνω αρχών (Leonard, Lygo & Procter, 1995).

Έστω λοιπόν δείγμα με ποικιλία ενώσεων που διαφέρουν μεταξύ τους σε πολικότητα, χαρακτηριζόμενες ως πολικές ή άπολες, και σημείο ζέσεως. Κατά την εισαγωγή στο εισαγωγέα δείγματος όλες οι ουσίες πρέπει να περάσουν από την υγρή κατάσταση στην οποία γίνεται η εισαγωγή στην αέρια. Αυτό επιτυγχάνεται με εφαρμογή στον εισαγωγές

δείγματος υψηλής θερμοκρασίας (συνήθως 220 °C). Ουσίες που κατά την παραμονή τους στον εισαγωγέα δεν μετατρέπονται σε αέρια, δεν είναι κατάλληλες για ανάλυση με την μέθοδο αυτή. Επιπλέον αν κάποιες ουσίες εισέλθουν στον εισαγωγέα δείγματος και δεν εξατμιστούν, μετά από παραμονή τους στο χώρο αυτό θα αποδομηθούν δημιουργώντας πρόβλημα σε μετέπειτα αναλύσεις (Leonard, Lygo & Procter, 1995).

Για την αποτροπή της καύσης των ουσιών αυτών στον χώρο εισαγωγής δείγματος επικρατεί απουσία οξυγόνου με συνεχές ρεύμα αδρανούς αερίου, που παράλληλα ωθεί τις ουσίες μέσα στην στήλη χρωματογραφίας. Το αδρανές αυτό αέριο λέγεται φέρον αέριο και χορηγείται διαρκώς σε όλο το μήκος της διαδρομής που σκοπεύουμε να διανύσει το δείγμα.

Στην στήλη χρωματογραφίας επικρατεί χαμηλότερη θερμοκρασία από ότι στον εισαγωγέα (συνήθως 50 °C) με συνέπεια να επανέρχονται οι προς ανάλυση ουσίες στην φυσική κατάσταση που έχουν στην θερμοκρασία αυτή (συνήθως στερεά ή υγρή). Με την μετάβαση αυτή οι ουσίες επικάθονται στα τοιχώματα της στήλης χρωματογραφίας.

Η στήλη χρωματογραφίας βρίσκεται σε χώρο όπου η θερμοκρασία ελέγχεται και ρυθμίζεται με ακρίβεια 1°C. Η θερμοκρασία της στήλης αυξάνεται σταδιακά με σκοπό οι ουσίες που βρίσκονται μέσα στην στήλη να φθάνουν όσο το δυνατόν πιο μεμονωμένα το σημείο ζέσεώς τους. Με τον τρόπο αυτό κάποιες ουσίες εξατμίζονται νωρίτερα από κάποιες άλλες, και με την επίδραση του φέροντος αερίου κινούνται μέσα στην στήλη χρωματογραφίας.

Αφού επιτευχθεί ο πρώτος διαχωρισμός με βάση το σημείο ζέσεως των διαφόρων ουσιών, ακολουθεί ένας δεύτερος τύπος διαχωρισμού με βάση την συγγένεια πολικότητας μεταξύ της ουσίας και του περιβάλλοντος, δηλαδή το εσωτερικού της στήλης χρωματογραφίας. Ακόμα δηλαδή και αν δύο ουσίες έχουν παρόμοια σημεία ζέσεως, η διαφορά της μεταξύ τους πολικότητας οδηγεί κάποια σε καθυστέρηση κατά την κίνηση δια μέσου της στήλης χρωματογραφίας. Το μήκος της στήλης είναι περίπου 30 m και αυτό διευκολύνει την έκφραση και μικρών διαφορών στην συμπεριφορά των ουσιών κατά την κίνηση μέσα στην στήλη.

Το πλάτος της στήλης είναι πολύ μικρό και αυτό εξυπηρετεί δύο σκοπούς. Την αύξηση της επίδρασης της διαφορετικής πολικότητας μέσω των ουσιών και την μείωση της ελάχιστης ποσότητας δείγματος προς ανάλυση.

Σκοπός όλης της διαδικασίας είναι η άφιξη σε διαφορετικό χρόνο των ουσιών στο τέλος της στήλης όπου βρίσκεται ο ανιχνευτής. Αν παρά τα παραπάνω δεν γίνει αυτό εφικτό (συνέκλουση) τότε η μέθοδος ανάλυσης δεν είναι κατάλληλη και πρέπει να αναθεωρηθεί ο ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας ή / και ο τύπος της στήλης χρωματογραφίας.

Η στήλη ενώνεται με τον ανιχνευτή με σύνδεσμο. Ο σύνδεσμος αυτός είναι πολύ σημαντικός στην περίπτωση που ο ανιχνευτής είναι τύπου φασματομετρίας μάζας και θα

συζητηθεί παρακάτω. Σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικό να έχει μεγαλύτερη θερμοκρασία από τον εισαγωγέα για να αποφευχθεί να περάσουν στη στήλη ουσίες και να μην εξαχθούν από την άλλη άκρη προς τον ανιχνευτή. Το ίδιο ισχύει και για την στήλη η οποία πρέπει να φτάσει τουλάχιστον για μικρό χρονικό διάστημα την θερμοκρασία του εισαγωγέα (Leonard, Lygo, & Procter, 1995).

Τύποι ανιχνευτών

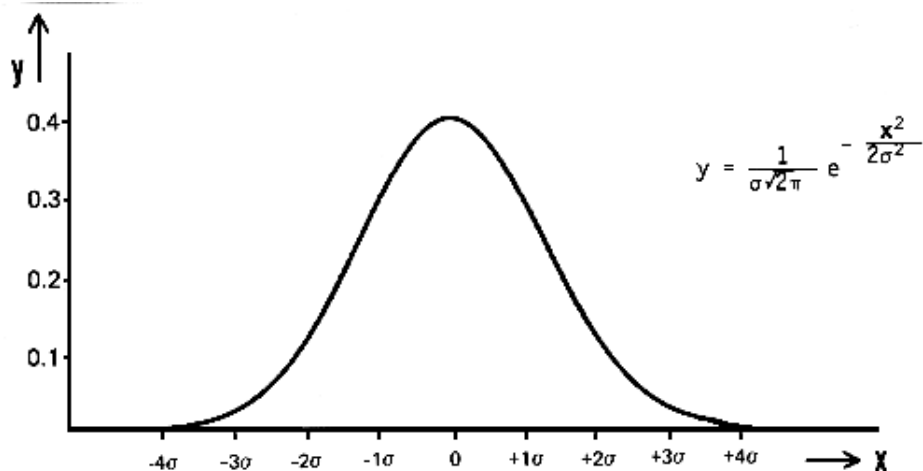
Υπάρχει μεγάλη εξέλιξη στον τομέα των ανιχνευτών καθώς η τεχνολογία προχωρά και δίνει την δυνατότητα για πιο ειδικές αναλύσεις και καθώς οι απαιτήσεις για ακρίβεια αυξάνονται συνεχώς. Δύο κύριοι τύποι ανιχνευτών θα συζητηθούν παρακάτω και είναι αυτοί που χρησιμοποιούνται κυρίως στην ανάλυση των φυσικών προϊόντων.

Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector – FID)

Η αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή αυτού είναι η δημιουργία ιόντων κατά την καύση μορίων σε υψηλή θερμοκρασία. Για την καύση απαιτείται δημιουργία φλόγας που πετυχαίνεται με την ροή αερίου οξυγόνου και υδρογόνου στον ανιχνευτή.

Τα διαχωρισμένα μόρια εξέρχονται από την στήλη και οδηγούνται στην φλόγα όπου καίγονται. Η φλόγα καίει μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από ηλεκτρικές πλάκες εκατέρωθεν του ανιχνευτή. Τα δημιουργούμενα ιόντα υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου κινούνται και προσκρούουν δημιουργώντας δυναμικό, η ένταση του οποίου καταγράφεται. Η ένταση δε αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας των ιόντων που προσπίπτουν.

Ο ρυθμός άφιξης των μορίων στον ανιχνευτή είναι αυτός με τον οποίο τα μόρια έχουν κατανεμηθεί μέσα στην στήλη κατά την κίνησή τους. Η κατανομή αυτή είναι κανονική κατανομή και η καμπύλη της ποσοτικής κατανομής έχει μορφή καμπύλης Gauss όπως στο Σχήμα 11.



Σχήμα 11 Κατανομή Gauss

Είναι εύκολο να συμπεράνει κανείς ότι με ανάλογο τρόπο μεταβάλλεται και το δυναμικό που παράγεται και ανιχνεύεται και κατά συνέπεια μια κορυφή αυτής της μορφής σχηματίζεται από το λογισμικό. Στην περίπτωση καλού διαχωρισμού, κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια ουσία (Leonard, Lygo & Procter, 1995).

Ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry – MS)

Το εσωτερικό του ανιχνευτή αυτού είναι επίσης ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο όπου παράλληλα επικρατεί και υψηλό κενό. Η σύνδεση του ανιχνευτή με τη στήλη γίνεται με ένα εξάρτημα που φροντίζει την μονόδρομη ροή αερίου και ουσιών από την στήλη προς τον ανιχνευτή (transfer line). Η θερμοκρασία και του εξαρτήματος αυτού είναι υψηλή ώστε και κατά τη διέλευση από αυτό τα μόρια που κατευθύνονται στον ανιχνευτή να διατηρούνται στην αέρια φάση.

Κατά την άφιξη των μορίων στο χώρο του ανιχνευτή, υπο την επίδραση του ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, τα μόρια θραύονται σε μικρότερα φορτισμένα σωματίδια με τρόπο χαρακτηριστικό και μοναδικό για κάθε μόριο. Τα ιόντα αυτά κατευθύνονται προς ένα χώρο όπου ανιχνεύεται η κρούση τους και με βάση την κινητική τους ενέργεια σε δεδομένο ηλεκτρικό πεδίο, προσδιορίζεται το μοριακό τους βάρος (Leonard, Lygo & Procter, 1995).

Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

Με βάση τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται κατά την ανάλυση δειγμάτων είναι σκόπιμο να προσδιοριστούν ποιοτικά και ποσοτικά στοιχεία για τα μίγματα αυτά. Ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή ακολουθούνται διαφορετικά βήματα για την επίτευξη των παραπάνω στόχων.

Στην περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί ο ανιχνευτής FID έχουμε στη διάθεσή μας μία μόνο παράμετρο για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό μιας ουσίας. Η παράμετρος αυτή είναι ο χρόνος έκλουσης και ο τρόπος επικύρωσης της ταυτότητας μιας ουσίας είναι η ανάλυση με τις ίδιες συνθήκες πρότυπης ουσίας γνωστής καθαρότητας. Αν οι δύο ουσίες με τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης έχουν τον ίδιο χρόνο έκλουσης τότε μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι πρόκειται για την ίδια ουσία. Φυσικά, πρέπει να υπάρχει ένδειξη για την φύση της ουσίας και δεν είναι δυνατό να προσδιοριστούν έτσι τελείως άγνωστες ουσίες.

Αντίστοιχα, για ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών ενός μίγματος με την χρήση του ανιχνευτή FID γίνεται μαθηματική επεξεργασία. Το άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών θεωρείται ότι εκπροσωπεί το σύνολο των ποσοτήτων των ουσιών που απαρτίζουν το δείγμα. Για την καλύτερη προσέγγιση παραλείπεται η κορυφή που αντιστοιχεί στον διαλύτη αραίωσης που γίνεται για την ανάλυση. Μια και τα δείγματα αραιώνονται περίπου 100 φορές δεν είναι απαραίτητος ο υπολογισμός της ποσότητας του διαλύτη, που θα μείωνε και την ακρίβεια των μετρήσεων.

Τα εμβαδά των υπολοίπων κορυφών αθροίζονται, και η επί τοις εκατό σύσταση του δείγματος στις επί μέρους ουσίες υπολογίζεται με απλή διαίρεση του εμβαδού κάθε κορυφής δια το σύνολο και πολλαπλασιασμό με το 100.

$$\%ουσίαςA = \frac{\text{ΕμβαδόΚορυφήςA}}{\text{ΣυνολικόΕμβαδόΧρωματογραφήματος}} \times 100$$

Υπάρχουν διάφοροι μαθηματικοί και χημικοί τρόποι για βελτίωση της ακρίβειας που όμως όλοι βασίζονται στην αρχή αυτή.

Με τον ίδιο τρόπο γίνεται και ο ποσοτικός προσδιορισμός στην περίπτωση χρήσης του ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας, με την διαφορά ότι εδώ ο διαλύτης εκτρέπεται κατά τα πρώτα λεπτά της ανάλυσης από τον ανιχνευτή προκειμένου να μην φθείρεται ο ανιχνευτής χωρίς λόγο. Έτσι, το χρωματογράφημα του GC-MS δεν περιλαμβάνει την κορυφή του διαλύτη. Επίσης, η υφή των παραγόμενων κορυφών είναι υποδεέστερη αυτής του FID καθώς το υψηλό κενό στο τέλος της στήλης, αλλάζει την ομαλή ροή των μορίων προς τον ανιχνευτή.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ουσιών που αποτελούν το δείγμα και την απόδοση των αντίστοιχων κορυφών έχουμε ένα επιπλέον δεδομένο, αυτό του φάσματος μάζας. Με ηλεκτρονικό ή έντυπο τρόπο είναι δυνατό να συγκριθούν τα φάσματα μάζας σε διάφορες κορυφές του χρωματογραφήματος με φάσματα μάζας προτύπων που έχουν καταγραφεί για το σκοπό αυτό. Έτσι, η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας γίνονται ένα αναντικατάστατο εργαλείο στην ανάλυση των φυσικών προϊόντων (Leonard, Lygo & Procter, 1995).

3.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (**I**nfra **R**ed spectroscopy, **IR**) είναι μια από τις πλέον σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές και μαζί και με την φασματοσκοπία υπεριώδους έχουν βρει τις περισσότερες εφαρμογές. Η διαδικασία λήψης του φάσματος είναι σχετικά εύκολη έναντι χρωματογραφικών εφαρμογών ενώ και η μετέπειτα σύγκριση και ανάλυση του φάσματος είναι εύκολη. Η τεχνική της σύγκρισης ολόκληρων ή περιοχών φασμάτων με φάσματα γνωστών ουσιών είναι η πιο συνήθης. Με την απλή αυτή τεχνική λαμβάνονται πολύ γρήγορα πληροφορίες για την δομή μορίων και ειδικά επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ή μη χαρακτηριστικών ομάδων. Πολλές τέτοιου είδους εφαρμογές έχουν βρεθεί και χρησιμοποιούνται στην οργανική σύνθεση, την ανάλυση φυσικών προϊόντων αλλά και σε τρόφιμα, πολυμερή και παράγωγα πετρελαίου.

Το όνομα της μεθόδου προέρχεται από την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που ονομάζεται υπέρυθη και βρίσκεται μεταξύ του ορατού και της περιοχής των μικροκυμάτων (0,75-1000 μm). Η περιοχή του υπερύθρου χωρίζεται περαιτέρω σε τρεις

υπο-περιοχές και χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: Άπω υπέρυθρη (**Far IR**, **FIR**) (50-1000 μm), μέσο υπέρυθρη (**Mid IR**, **MIR**) (2,5-50 μm) και εγγύς υπέρυθρη (**Near IR**, **NIR**) (0,75-2,5 μm). Έχει επικρατήσει στην ορολογία της φασματοσκοπίας αντί να αναφερόμαστε στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με το μήκος κύματος ή τη συχνότητα, να χρησιμοποιούμε τους κυματαριθμούς ($\bar{\nu}$). Οι κυματαριθμοί είναι ένα πιο εύχρηστο μέγεθος για κύματα που κινούνται με την ταχύτητα του φωτός όπως η ακτινοβολία υπέρυθρου. Οι κυματαριθμοί εκφράζουν με απλό τρόπο συγκεκριμένες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος προσδιορίζοντας μόνο το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Από το δεδομένο αυτό εύκολα προκύπτει και η συχνότητα του κύματος αν χρειαστεί. Έτσι για να την πιο κοινή περιοχή που χρησιμοποιούμε στην υπέρυθρη φασματοσκοπία, την μέσο υπέρυθρη περιοχή (**Mid IR**) ισχύουν τα εξής:

$$\text{ταχύτητα} = c \text{ (ταχύτητα του φωτός)} = 3 \times 10^8 \text{ m/sec}$$

$$\text{μήκος κύματος} = \lambda = 2,5 - 50 \mu\text{m}$$

και οι κυματαριθμοί $\bar{\nu} = \nu/c = 1/\lambda$ κυμαίνονται μεταξύ 400 και 4000 cm^{-1} με απλή αντικατάσταση στους τύπους (Βαλαβανίδης, 2006).

Η επίδραση της υπέρυθρης ακτινοβολίας επί των μορίων της ύλης είναι γνωστό ότι προκαλεί διεγέρσεις των δεσμών των ατόμων σε ανώτερες ενεργειακές στάθμες από αυτές της ισορροπίας, κατά το πρότυπο του αρμονικού ταλαντωτή. Από την κατάσταση ισορροπίας όπου το μήκος του δεσμού είναι $r_{\text{ισορ.}}$ για να μεταφερθεί ο δεσμός σε συστολή ή διαστολή σε μήκος δεσμού r' πρέπει να προσφερθεί ενέργεια ίση με

$$E = \frac{1}{2} f (r - r_{\text{ισορ.}})^2$$

Εξίσωση 1: Νόμος του Hooke

Οι δονήσεις είναι δονήσεις τάσης, στις οποίες μεταβάλλεται μόνο το μήκος του δεσμού, και δονήσεις κάμψης στις οποίες μεταβάλλεται μόνον η γωνία μεταξύ των δεσμών. Όπως κατέστη σαφές, οι διαφορετικοί δεσμοί απορροφούν διαφορετικά μήκη ακτινοβολίας αλλά συγχρόνως ο ίδιος δεσμός σε διαφορετικά μήκη κύματος απορροφά ενέργεια για διαφορετικές είδη δόνησης.

Απαραίτητη όμως προϋπόθεση για την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής του κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργός. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι τα πολύ συμμετρικά μόρια δεν απορροφούν στη περιοχή αυτή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ενώ για την περίπτωση αυτή εξετάζεται η φασματοσκοπία RAMAN παρακάτω.

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας διακρίνουμε δύο κυρίως περιοχές. Τη περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων (O-H, NH₂, C≡N, C=O κλπ) και αυτή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η μεν πρώτη εκτείνεται στη περιοχή 4000-1400 cm⁻¹ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων, η δε δεύτερη στην περιοχή 1400-600 cm⁻¹ στην οποία οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολοκλήρου του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» finger print κάθε ένωσης (Βαλαβανίδης, 2006).

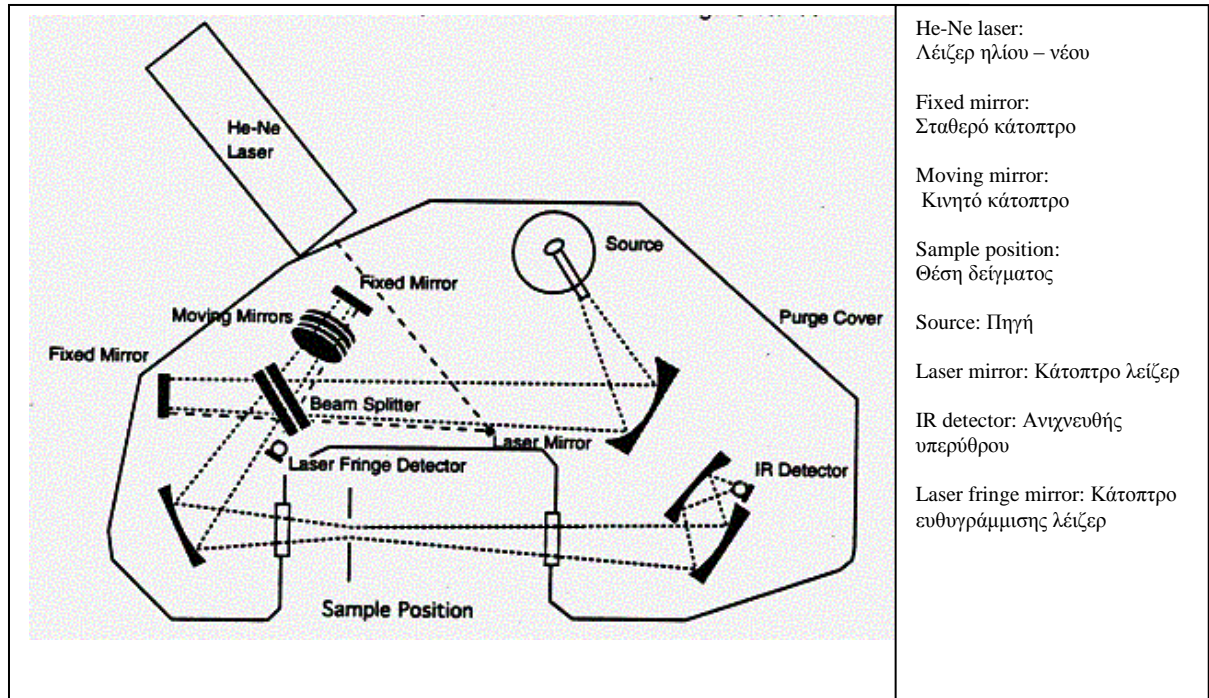
Όπως θα δούμε παρακάτω, στην πρακτική εφαρμογή της λήψης φάσματος IR παρουσιάζονται ζητήματα που περιλαμβάνουν την ουσία των ιδιοτήτων που εκμεταλλευόμαστε από την υπέρυθρη φασματοσκοπία. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε η χρήση μαθηματικής μετατροπής των ψηφιακών δεδομένων γνωστή και σαν μετατροπή βασισμένη σε αλγόριθμους του Fourier. Η μετατροπή των δεδομένων με τον τρόπο αυτό έδωσε το όνομά της στην μοντέρνα τεχνική λήψης φασμάτων, Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR). Το όργανο που χρησιμοποιείται για την λήψη των φασμάτων αυτών λέγεται φασματοφωτόμετρο FT-IR. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη όλων των φασμάτων στη συνέχεια της εργασίας είναι της εταιρείας Nicolet μοντέλο 750 Magna series εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Το όργανο αυτό περιγράφεται παρακάτω.

Οργανολογία φασματοφωτομέτρου FT-IR Nicolet 750 Magna series

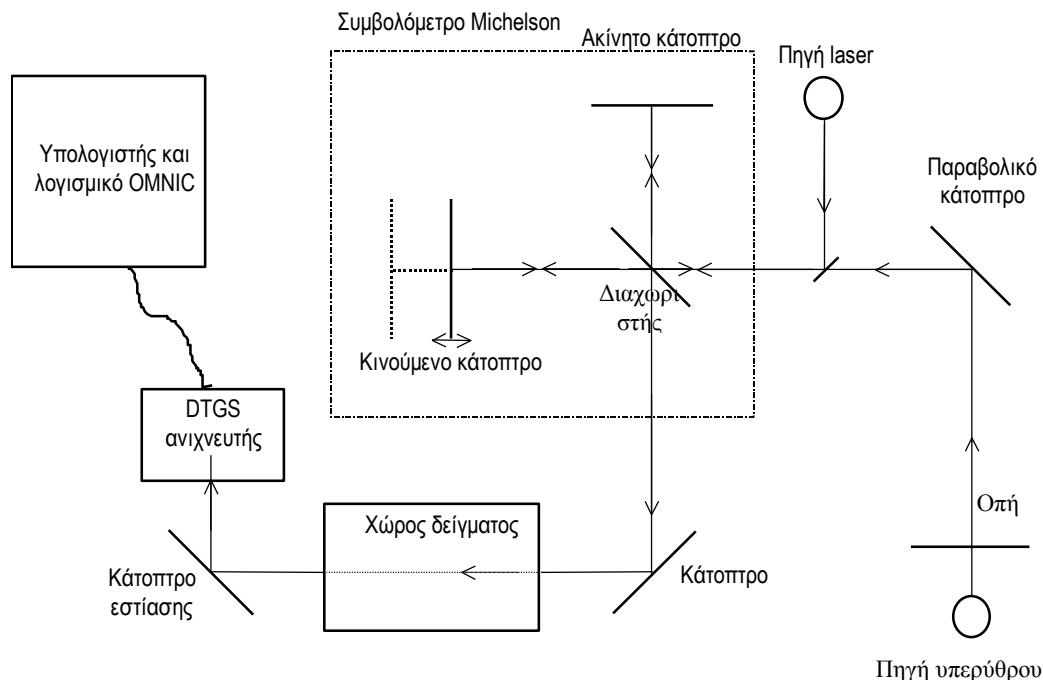
Το φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα:

- την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας,
- την πηγή λείζερ,
- το συμβολόμετρο Michelson και fringe
- τον ανιχνευτή.

Στο Σχήμα 14 φαίνεται το σχηματικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου FT-IR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series).



Σχήμα 13 Σχηματική απεικόνιση του φασματοφωτόμετρου FT-IR



Σχήμα 14 Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series).

Πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας

Η λυχνία νικελίου – χρωμίου (Nicolme) είναι η πλέον γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα μικρού κόστους. Είναι μικρής ισχύος και αερόψυκτη. Η θερμοκρασία που αναπτύσσει είναι 1200 – 1250 °C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή του μέσο - υπέρυθρου. Το μειονεκτήματα της πηγής αυτής είναι ότι έχει μικρή σταθερότητα και σχετικά μικρή περίοδο ζωής (Nicolet, 2000).

Πηγή λέιζερ

Η παραγωγή της ακτίνας λέιζερ γίνεται με τη διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (HeNe).

Συμβολόμετρο Michelson

Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR είναι χωρίς επιλογή μήκους κύματος αλλά η λειτουργία τους στηρίζεται στο φαινόμενο της συμβολής με τη βοήθεια ενός συμβολομέτρου Michelson. Ονομάστηκε έτσι προς τιμή του ανθρώπου που το κατασκεύασε (1891) και ασχολήθηκε με τη διαίρεση μιας φωτεινής δέσμης σε δύο.

Το συμβολόμετρο αποτελείται από μία ημιδιαφανή πλάκα (το διαχωριστή δέσμης) κατασκευασμένη από βρωμιούχο κάλιο, που δεν απορροφά στο υπέρυθρο, και δύο κάτοπτρα. Το ένα είναι σταθερό και το άλλο κινείται με σταθερή ταχύτητα (Βαλαβανίδης, 2006).

Ανιχνευτής

Ο σκοπός του ανιχνευτή είναι να «αισθανθεί» την υπέρυθρη ακτινοβολία, που έχει διέλθει μέσα από το δείγμα. Ένας από τους πιο συνηθισμένους τύπους ανιχνευτή, τον οποίο διαθέτει και το φασματοφωτόμετρο FT-IR της Nicolet (750 Magna series), είναι ο θερμικός, κατασκευασμένος από δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (Deuterated TriGlycine Sulfate, DTGS). Η λειτουργία του ανιχνευτή αυτού στηρίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του, όταν δέχεται υπέρυθρη ακτινοβολία. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού. Οποιαδήποτε διακύμανση της ενέργειας της υπέρυθρης ακτινοβολίας, λόγω απορρόφησης από το δείγμα, εκφράζεται από τον ανιχνευτή σαν μεταβολή τάσης και σαν τέτοια την στέλνει στη συνέχεια στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Ανιχνευτές αυτού του είδους έχουν τα πλεονεκτήματα ότι ανταποκρίνονται σε μεγάλη περιοχή του υπέρυθρου, παράγουν μικρό «θόρυβο» και δεν χρειάζονται ψύξη. Τα μειονεκτήματά τους είναι η σχετικά μικρή ευαισθησία τους και ο σχετικά μεγάλος χρόνος απόκρισής τους (Nicolet, 2000).

Το φάσμα αναφοράς μπορεί να είναι απλά μια ουσία που δεν απορροφά στο υπέρυθρο για τον εκμηδενισμό της επίδρασης της ατμόσφαιρας ή ο διαλύτης του δείγματος που δεν θέλουμε να καταγραφεί στο φάσμα του δείγματος (Βαλαβανίδης, 2006).

Παράμετροι που αφορούν την λήψη φασμάτων με την μέθοδο FT-IR

Όπως και με κάθε μέθοδο έτσι και με την παρούσα υπάρχουν παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση και ευαισθησία της μεθόδου. Για παράδειγμα:

➤ Χρόνος που απαιτείται για την σάρωση του δείγματος: Μια πλήρης σάρωση θεωρείται ότι έχει γίνει στο δείγμα όταν το κινούμενο κάτοπτρο κάνει μια πλήρη μετατόπιση από την αρχική του θέση και επιστρέψει στην αρχική. Η μετατόπιση αυτή λέγεται Optical Path Difference (OPD) ή καθυστέρηση, και προσδιορίζει την διαφορά μεταξύ των διαδρομών του φωτός από το κινούμενο και το κινητό κάτοπτρο και τον ανασυνδυασμό τους όπως αναφέρθηκε πιο πάνω. Η ευαισθησία της ανάλυσης είναι ευθέως ανάλογη με την μετατόπιση, και καθώς η μετατόπιση χρειάζεται χρόνο η ευαισθησία της ανάλυσης είναι ανάλογη και με τον χρόνο που απαιτείται να γίνει η σάρωση (Leonard, Lygo & Procter, 1995, Βαλαβανίδης, 2006).

➤ Πηλίκιο Σήματος προς Θόρυβο, (Signal to Noise Ratio) (SNR): το μέγεθος αυτό εκφράζει την ποιότητα της βασικής γραμμής στο φάσμα ενός δείγματος. Στη μαθηματική του έκφραση το SNR είναι ένα μέγεθος για την σύγκριση του μεγέθους (ύψος κορυφής) του θορύβου με το μέγεθος (ύψος κορυφής) του σήματος που εκφραζει την απορρόφηση. Ένας τρόπος για την βελτίωση του SNR είναι να αυξήσουμε τον αριθμό των σαρώσεων (scans) που κάνουμε στο δείγμα. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι το σήμα της απορρόφησης έχει επαναληψιμότητα ενώ ο θόρυβος όχι. Έτσι, όταν βγαίνει ο μέσος όρος των σημάτων απο πολλές σαρώσεις, τότε ο θόρυβος μειώνεται ενώ το σήμα της απορρόφησης παραμένει σταθερό. Εμπειρικά ο βέλτιστος αριθμός σαρώσεων που πρέπει να γίνουν για να εξαλειφθεί η επίδραση του θορύβου και να ληφθεί φάσμα με καλή βασική γραμμή πρέπει για στερεά δείγματα να γίνουν τουλάχιστον 4 σαρώσεις ενώ για αέρια τουλάχιστον 16, ενώ για άλλες τεχνικές όπως η DRIFTS απαιτούνται τουλάχιστον 64 σαρώσεις. Προκειμένου για αναλύσεις ποσοτικές σε δείγματα ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος αριθμός σαρώσεων είναι οι 100 (Leonard, Lygo & Procter, 1995, Βαλαβανίδης, 2006, Nicolet, 2000).

➤ Διακριτική ικανότητα (Resolution): Το μέγεθος αυτό υποδυναμίζει την ικανότητα του φασματοφωτομέτρου να διακρίνει δύο κοντινές απορροφήσεις (δονήσεις που απορροφούν σε

κοντινούς κυματαριθμούς). Η διακριτική ικανότητα αυξάνεται όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω από την απόσταση d που διανύει το κινητό κάτοπτρο. Για την ανάλυση στερεών ή υγρών δειγμάτων μια ανάλυση 8 cm^{-1} είναι αρκετή για να διακριθούν κορυφές των οποίων το πλάτος στο μέσο ύψος είναι 10 cm^{-1} . Και πάλι σε ποσοτικές μετρήσεις που είναι πιο απαιτητικές η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διακριτική ικανότητα είναι τα 4 cm^{-1} . Με αυτή την διακριτική ικανότητα το φάσμα είναι πολύ ακριβές και επιτυγχάνεται και γρήγορη λήψη του φάσματος ώστε να γίνουν και 100 σαρώσεις για βελτίωση του SNR.

Η μαθηματικοποίηση και ψηφιοποίηση των φασμάτων υπερύθρου δίνει κάποιες επιπλέον δυνατότητες που κάνουν πιο αποτελεσματική την χρήση της μεθόδου γενικά. Δύο από τις δυνατότητες αυτές γίνονται σε κάθε φάσμα με επαναλήψιμο τρόπο ώστε να είναι πιο εύκολη η «ανάγνωση» του φάσματος αργότερα. Έτσι οι δύο βασικές αυτοματοποιημένες επεξεργασίες που γίνονται είναι η αυτόματη εξομάλυνση (automatic smooth) και η διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct). Και οι δύο διαδικασίες προσφέρονται σε έτοιμους αλγορίθμους στο λογισμικό λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου FT-IR (στην περίπτωση των πειραμάτων το λογισμικό OMNIC ver. 3.1, αλλά και σε κάθε φασματοφωτόμετρο) (OMNIC ver. 3.1 Users manual – Spectra interpretation).

Με την πρώτη διαδικασία μειώνεται περισσότερο ο θόρυβος (έχει ήδη μειωθεί αρκετά αν ο αριθμός των σαρώσεων είναι αρκετά μεγάλος) ενώ με την δεύτερη αποσκοπείται η δημιουργία τεχνητής βασικής γραμμής. Η ύπαρξη σημείων όπου η ένταση (η απορρόφηση) είναι μηδέν είναι ουσιαστική προκειμένου κυρίως για την αξιοποίηση των φασμάτων για ποσοτική ανάλυση. Στην μορφή που καταγράφεται το φάσμα τα σημεία ελάχιστης έντασης δεν αντιστοιχούν σε μηδέν αλλά σε μεγαλύτερους αριθμούς. Ο μηδενισμός των εντάσεων στα σημεία αυτά με μαθηματικό τρόπο χωρίς την αλλοίωση της υφής και των πληροφοριών που περιέχονται στο φάσμα γίνεται με αυτοματοποιημένο αλγόριθμο χάρη επαναληψιμότητας και συντομίας.

Πιο εξειδικευμένη και απαιτητική είναι η αξιοποίηση των φασμάτων με την μέθοδο της αποσυνέλιξης (deconvolution), που μπορεί να εφαρμοστεί εκτός της υπερύθρου και σε άλλα είδη φασματοσκοπίας και χρωματογραφίας. Η αρχή πάντως της ανάπτυξης της μεθόδου έγινε για χρήση με την φασματοσκοπία FT- IR.

Για την αποσυνέλιξη θεωρούμε ότι κάθε κορυφή αποδίδεται σε μοναδική δόνηση δεσμού και ότι είναι ικανοποιητική η προσέγγιση του Σχήματος μιας κορυφής με μαθηματικά περιγραφόμενες καμπύλες κατανομών στατιστικών μεγεθών όπως οι κατανομές Gauss και Lorenz. Με τα δεδομένα αυτά το φάσμα υπερύθρου πρέπει να είναι δυνατό να αναλυθεί σε επί μέρους κορυφές οι οποίες παράγονται ανεξάρτητα από κάθε δεσμό. Οι κορυφές των απορροφήσεων δεν είναι ευθείες γραμμές που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους

κυματάριθμους. Είναι καμπύλες που περιλαμβάνουν αρκετούς γειτονικούς κυματάριθμους και έχουν μεταβλητή απορρόφηση από κυματάριθμο σε κυματάριθμο. Η μέγιστη απορρόφηση είναι αυτή που δίνει και την απόδοση της κορυφής και την ονομάζει. Φυσικά το γεγονός αυτό ερμηνεύεται απλά καθώς από το σύνολο των συχνοτήτων ένας δεσμός κατά την δόνησή του απορροφά το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας με συχνότητα ιδανική για την δόνηση που εκτελεί το μόριο, όμως απορροφά σε μικρότερο βαθμό και ακτινοβολία με συχνότητα κοντινή στην ιδανική. Το αποτέλεσμα της φυσικής ερμηνείας είναι παρόμοιο με αυτό της κατανομής στατιστικών μεγεθών γύρω από το μέσο όρο. Ο δε τρόπος και ο προσανατολισμός των καμπυλών που προσεγγίζουν την φυσική απορρόφηση περιγράφονται από τις εξισώσεις Gauss ή Lorenz ή και συνδυασμό των δύο ή άλλες μορφές.

Για την αποσυνέλιξη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό λογισμικό σε συνάρτηση πάντα με την γνώση για την πραγματική ύπαρξη κορυφής σε δεδομένες θέσεις ανάλογα με το είδος του δείγματος και την φασματοσκοπική άποψη για την θέση όπου αναμένουμε δονήσεις (Peaksolve Users manual, Pappas, Tarantilis, & Polissiou, 1998).

Ο εντοπισμός των πιθανών θέσεων όπου αναμένουμε να δούμε κορυφές που καλύπτονται κάτω από ισχυρότερες μπορεί να γίνει με χρήση της δεύτερης παραγώγου του φάσματος. Η δεύτερη παράγωγος υποδηλώνει τα σημεία όπου μπορεί να παρουσιάζονται τοπικά ακρότατα της συνάρτησης, και πιο συγκεκριμένα όπου η δεύτερη παράγωγος έχει ελάχιστο αλλάζουν τα κοίλα της συνάρτησης, δηλαδή μπορεί να καλύπτεται μια κορυφή κάτω από το φάσμα (Pappas, Tarantilis, & Polissiou, 1998, Peaksolve Users manual).

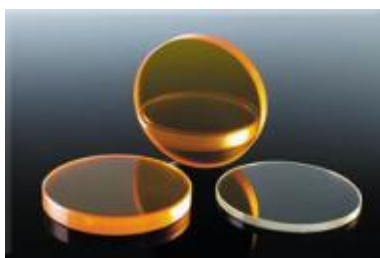
Με μαθηματικό τρόπο αφού εντοπιστούν τα πιθανά σημεία ύπαρξης κορυφών, προσαρμόζονται οι επιλεγμένες κορυφές και γίνεται μαθηματική άθροιση των εντάσεων ανά κυματάριθμο ώστε να προκύψει νέο συνθετικό φάσμα που να επικαλύπτει ακριβώς το πραγματικό. Όταν συμβεί αυτό έχει γίνει αποσυνέλιξη του φάσματος στις θεμελιώδεις κορυφές που το δημιούργησαν. Η χρησιμότητα της μεθόδου είναι για θεωρητική ανάλυση φασμάτων και πιο σημαντικά για την ποσοτική ανάλυση συστατικών σε μίγματα, των οποίων τα φάσματα αλληλοεπικαλύπτονται. Ο τρόπος που εφαρμόζεται η μέθοδος αυτή στην πράξη παρουσιάζεται παρακάτω σε επόμενη παράγραφο.

Η εφαρμογή της μεθόδου FT-IR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών μιγμάτων είναι σχετικά πρόσφατη και έχει αναπτυχθεί και λόγω της ανάπτυξης των υπολογιστών και των αυξανόμενων εφαρμογών τους στην φασματοσκοπία και την οργανολογία. Η αρχή του ποσοτικού προσδιορισμού είναι ο νόμος των Bouguer–Beer–Lambert που βρίσκει εφαρμογή με την προϋπόθεση ότι σε κάθε περιοχή απορροφά μόνο μία ουσία σε κάθε κυματάριθμο (TQ Analyst users manual).

Ο νόμος Bouguer–Beer–Lambert υποδεικνύει ότι υπάρχει ανάλογη σχέση ανάμεσα στην συγκέντρωση ενός συστατικού και την απορρόφηση του στο φάσμα. Φυσικά, υπάρχουν

περιορισμοί, που αφορούν την επικάλυψη των κορυφών, το εύρος των συγκεντρώσεων μέσα στο οποίο η σχέση απορρόφησης – συγκέντρωσης είναι γραμμική και το μέγεθος του φάσματος που θα θεωρήσουμε ότι αντιπροσωπεύει το μέγεθος της απορρόφησης. Για παράδειγμα, είναι απαραίτητο να καταγραφούν φάσματα μιγμάτων γνωστής συγκέντρωσης προκειμένου να προσδιοριστεί ο τρόπος σύνδεσης απορρόφησης – συγκέντρωσης και να επιλεγούν κατάλληλες αντιπροσωπευτικές κορυφές που δεν επικαλύπτονται ή επικαλύπτονται με σταθερό προβλέψιμο τρόπο. Το μέγεθος του φάσματος που θα χρησιμοποιηθεί είναι θεμελιώδους σημασίας γιατί πρέπει να είναι το κατάλληλο και αντιπροσωπευτικό για κάθε περίπτωση. Ενδεικτικά, αναφέρονται διάφορες περιοχές του φάσματος, ύψη ή εμβαδά κορυφών, πηλικά υψών/ εμβαδών κ.α. Πιο αναλυτικά, θα γίνει παρουσίαση της εφαρμογής παρακάτω για διάφορα υποστρώματα. Πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι υπάρχουν και ειδικά λογισμικά που αυτοματοποιούν τις διαδικασίες και κάνουν ανεξάρτητα και επαναλήψιμα τα αποτελέσματα.

Για την καταγραφή των φασμάτων υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τους παρόντες



Εικόνα 18 Παράθυρα σεληνιούχου ψευδαργύρου

σκοπούς πάντως χρήσιμη φάνηκε η μέθοδος λήψης φάσματος υγρών μιγμάτων και ουσιών με παράθυρα ZnSe. Τα παράθυρα από ZnSe σχηματίζουν ένα φιλμ από το υγρό δείγμα ανάμεσά τους, και η ακτίνα του υπερέθρου φωτός διέρχεται χωρίς να διαθλάται κάθετα από την επιφάνειά τους από το ιντερφερόμετρο προς τον ανιχνευτή. Είναι μια πολύ απλή και αξιόπιστη μέθοδος λήψης φασμάτων. Το κόστος είναι πολύ χαμηλό για την προμήθεια των παραθύρων χωρίς να απαιτούνται αναλώσιμα, ενώ αν τα παράθυρα καθαρίζονται προσεκτικά χωρίς νερό και λαμβάνεται τακτικά background τα φάσματα είναι καλής ποιότητας από τα 500 ως τα 4000 cm^{-1} .

Η φασματοσκοπία υπερέθρου και δη αυτή με μετασχηματισμό Fourier, έχει πολλά πλεονεκτήματα, η αξία των οποίων θα γίνει καλύτερα κατανοητή παρακάτω σε πειράματα σύγκρισης μεθόδων ανάλυσης. Συνοπτικά, τόσο η φασματοσκοπία IR αλλά και η Raman παρουσιάζουν πολλές δυνατότητες και διαρκώς βελτιούμενη διακριτική ικανότητα, συνδυασμένη με υψηλή ταχύτητα λήψης φάσματος και απλότητα. Επίσης, η σύγχρονη φασματοσκοπία, αξιοποιεί τις ικανότητες που προσφέρει η δυνατότητα μεγάλης υπολογιστικής ισχύος με πολλούς τρόπους. Αναφέρονται ενδεικτικά η δημιουργία

βιβλιοθηκών πρότυπων φασμάτων για ποιοτική και ποσοτική κατάταξη δειγμάτων, η σύγκριση πολλών φασμάτων ταυτόχρονα και η μέτρηση της ομοιότητάς τους καθώς και η «πράξεις» με φάσματα (πρόσθεση, αφαίρεση φασμάτων και πολλαπλασιασμός φάσματος με αριθμό). Τα εργαλεία αυτά δίνουν δυνατότητες που κανείς δεν φαντάζεται στις φασματοσκοπικές μεθόδους εν γένει και στην υπέρυθη φασματοσκοπία συγκεκριμένα (Βαλαβανίδης, 2006).

Στα αρνητικά της φασματοσκοπία υπέρυθρου συγκαταλέγονται η ευαισθησία σε εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να καταστήσουν άκυρη την λήψη κάποιων φασμάτων. Ειδικά, υγρασία και CO₂ έχουν πολλή μεγάλη απορρόφηση στο υπέρυθρο και μπορούν να καταστρέψουν το φάσμα. Υπάρχουν φυσικά τρόποι μείωσης των αρνητικών επιδράσεων αλλά περιπλέκεται η διαδικασία λήψης. Η καταγραφή φάσματος υποβάθρου ή αναφοράς (background) και η ευθυγράμμιση των οπτικών του οργάνου είναι δυο από τις διαδικασίες αυτές (Βαλαβανίδης, 2006, Nicolet Magna series User's guide – Instructions Manual).

3.3 Φασματοσκοπία σκέδασης Raman με μετασχηματισμό Fourier (FT-Raman)

Η φασματοσκοπία Raman έχει πάρει το όνομα της από τον Ινδό Chandrasekhra Venkata Raman, ο οποίος παρουσίασε το 1928 το φαινόμενο της ανελαστικής σκέδασης του φωτός. Η φασματοσκοπία Raman ανήκει στις φασματοσκοπικές μεθόδους που βασίζονται στην αλληλεπίδραση ύλης και ακτινοβολίας. Πιο συγκεκριμένα, βασίζεται στην ανελαστική σκέδαση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας από μόρια ύλης. Η περιγραφόμενη διαδικασία αφορά την ανταλλαγή ενέργειας μεταξύ του φωτονίου και του μορίου. Το σκεδαζόμενο φωτόνιο έχει χαμηλότερη ή υψηλότερη ενέργεια από το προσπίπτον. Η διαφορά στην ενέργεια που πρέπει να διατηρείται πάντα σταθερή, αναπληρώνεται ή δαπανάται από την αλλαγή στην ενέργεια του μορίου. Η αλλαγή στην ενέργεια εκφράζεται συνήθως σαν διαφορά στην περιστροφική ή δονητική ενέργεια του μορίου. Η ενέργεια του φωτονίου δίνει πληροφορίες για την κατάσταση και ενεργειακή κατάσταση του μορίου ή τμημάτων του. Όπως και η υπέρυθη φασματοσκοπία έτσι και η φασματοσκοπία Raman αναπτύσσεται συνεχώς υποβοηθούμενη και από τις περιφερειακές εξελίξεις στους Η/Υ και άλλες σχετικές τεχνικές.

Η φασματοσκοπία Raman μπορεί να θεμελιώθηκε από τον Chandrasekhra Venkata Raman είχε όμως προβλεφθεί θεωρητικά από τον Αυστριακό κβάντο – φυσικό A. Smekal (Smekal, 1923) στις αρχές του εικοστού αιώνα. Η σκέδαση του φωτός είχε μελετηθεί επι μακρόν προηγουμένως από τον Rayleigh το 1871 και τον Einstein το 1910 και από άλλους. Κανείς ωστόσο δεν είχε εντοπίσει αλλαγές στο μήκος κύματος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας με την εξαίρεση τις αλλαγές που παρατήρησε ο Compton (Compton, 1923) σε

περιοχές του φάσματος των ακτίνων Χ. Η παρατήρηση και δημοσίευση της εργασίας του Raman με τον συνεργάτη του στην Καλκούτα Krishnan (Raman, & Krishnan, 1928), του χάρισε και το βραβείο Νόμπελ Φυσικής και την τιμητική μνημόνευση του ονόματος του στην ανακάλυψή του το 1930.

Πρακτικά προβλήματα της φασματοσκοπίας Raman είναι η μικρή ένταση της σκέδασης Raman και η αντίστοιχη μεγάλη ένταση της σκέδασης Rayleigh. Με γνώμονα αυτά τα δύο προβλήματα κατασκευάζονταν για χρόνια τα όργανα που χρησιμοποιούνταν για την καταγραφή της σκέδασης Raman, πράγμα που εμπόδιζε την γρήγορη εξέλιξη της μεθόδου. Οι Raman και Krishnan προκειμένου να καταγράψουν την σκέδαση, ελλείψει πηγής φωτός με μικρό εύρος μήκους κύματος, χρησιμοποιούσαν φίλτρα για να αποκόπτουν κάποια μήκη κύματος από το ηλιακό φως. Με τον τρόπο αυτό κατέγραψαν περιοχές του φάσματος Raman για περίπου 60 υγρά και αέρια. Η πιστοποίηση της ύπαρξης ακτινοβολίας γινόταν οπτικά με ειδικά φίλτρα ενώ το πρώτο φάσμα τετραχλωράνθρακα καταγράφηκε και δημοσιεύθηκε το 1929. Στα πρώτα βήματά της η φασματοσκοπία Raman διαδόθηκε πιο γρήγορα και ήταν πιο απλή από την φασματοσκοπία υπέρυθρου. φυσικά η καταγραφή ενός φάσματος Raman έπαιρνε αρκετές ώρες.

Στην αρχή η φασματοσκοπία Raman δεν προχωρούσε σημαντικά αν δεν βελτιωνόταν πρώτα οι πηγές ακτινοβολίας. Την δεκαετία το 1930 χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα οι λάμπες υδραργύρου που με κατάλληλο φιλτράρισμα έδιναν σχετικά μονοχρωματική ακτινοβολία. Το ίδιο καθεστώς με μικρές παραλλαγές βελτίωσης εξακολούθησε για αρκετά χρόνια μέχρι την ανακάλυψη του λέιζερ το 1960. Σχεδόν αμέσως μετά, το 1962 η νέα ανακάλυψη εφαρμόστηκε στην φασματοσκοπία Raman σαν πηγή μονοχρωματικής ακτινοβολίας Porto and Wood (Porto & Wood, 1962). Η οριοθέτηση έγινε πλέον σαν πρό και μετά λέιζερ εποχή.

Με την είσοδο του λέιζερ στην φασματοσκοπία Raman άλλαξαν αρκετά πράγματα όπως η ποσότητα του δείγματος που απαιτούνταν για την λήψη φάσματος καθώς η ακτίνα λέιζερ μπορούσε να εστιάζει καλύτερα από πρίν, ενώ η ικανότητα του λέιζερ να μεταβάλλει το μήκος κύματος που εξέπεμπε, παρέκαμψε και κάποια προβλήματα φθορισμού που προέκυπταν σε πολλά δείγματα. Μόνο το 1986 εισήχθησαν στην φασματοσκοπία Raman τα Nd:YAG λέιζερ που εξέπεμπαν στα 1064 nm όπου ελαχιστοποιούνται τα φαινόμενα φθορισμού, ενώ μέχρι τότε είχε γίνει και μεγάλη πρόοδος στα οπτικά μέρη των φασματοφωτομέτρων χάρη στην ανάπτυξη άλλων φασματοσκοπικών τεχνικών και κυρίως της υπέρυθρης.

Η είσοδος του λέιζερ και η βελτίωση των οργάνων σε συνδυασμό με την ευρεία εφαρμογή των ηλεκτρονικών υπολογιστών έκαναν την φασματοσκοπία Raman ένα ισχυρό εργαλείο ανάλυσης για την χημεία.

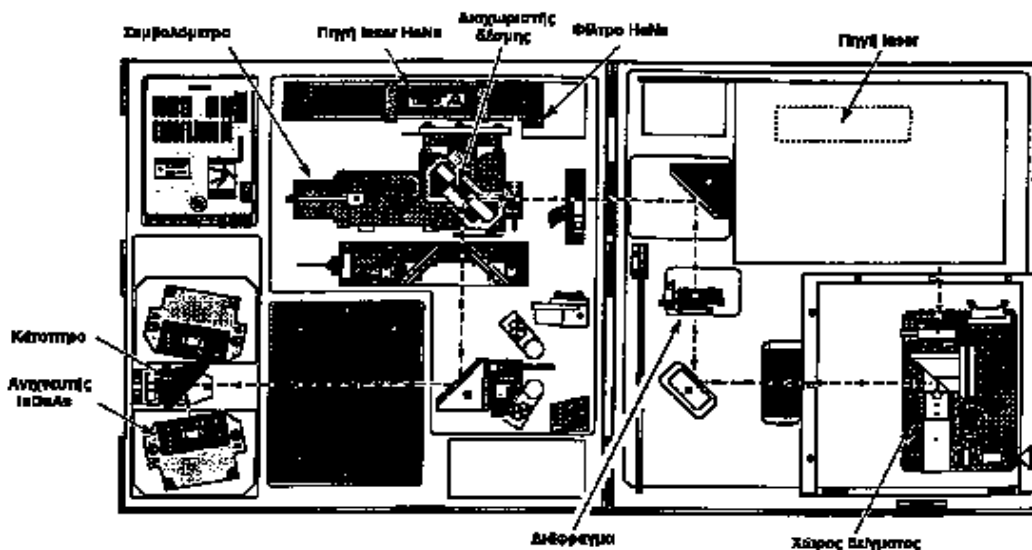
Ο πρώτος που αναγνώρισε την αναλυτική ικανότητα της φασματοσκοπίας Raman ήταν ο Kohlrausch που κατέγραψε πολλά φάσματα Raman οργανικών ουσιών από το 1931. Αργότερα βρίσκονται αναφορές για ποσοτικές αναλύσεις και παρακολούθηση προόδου αντιδράσεων. Οι πρώτες μέθοδοι βασιζόταν στην ανίχνευση χαρακτηριστικών ομάδων όπως νιτρίλια, συζυγείς ολεφίνες και αρωματικές ενώσεις.

Από την αρχή της ιστορικής πορείας της φασματοσκοπίας Raman μέχρι σήμερα, έχουν υπάρξει σημαντικότερες εξελίξεις με νεότερα επιτεύγματα την φασματοσκοπία Raman SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) και την micro Raman φασματοσκοπία που αξιοποιεί ένα συνδυασμό μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας.

Σύγχρονος τρόπος καταγραφής φάσματος FT-Raman

Το φασματοφωτόμετρο FT-Raman είναι ένα ηλεκτρονικό οπτικό όργανο μεγάλης ακρίβειας και υψηλής τεχνολογίας. Σχηματική αναπαράσταση του οργάνου παρουσιάζεται στο Σχήμα 20. Οι πηγές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι λέιζερ και δίνουν μια στενή, υψηλής ακρίβειας, μονοχρωματική ακτίνα φωτός. Η πηγή λέιζερ που χρησιμοποιεί το φασματόμετρο της εταιρείας Nicolet (μοντέλο Magna 750 series II) και αποτελεί εξάρτημα του αντίστοιχου φασματόμετρου FT-IR, είναι κατασκευασμένη από ιόντα νεοδυμίου και πυριτικά άλατα υτρίου-αργιλίου (Nd^{+3} /Yttrium-Aluminum Garnet, Nd/YAG) εκπέμπει συνεχώς στα 1064 nm, στο κοντινό υπέρυθρο (Near Infrared).

Στο φασματόμετρο της εταιρείας Nicolet, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ο διαχωριστής δέσμης είναι κατασκευασμένος από φθοριούχο ασβέστιο και ο ανιχνευτής είναι ινδίου-γάλλιου-αρσενικού (Indium-Gallium-Arsenic, InGaAs) (Nicolet Magna 750 Series Users manual – Technical Specifications).



Σχήμα 15 Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-Raman

Προετοιμασία και ποσότητα δείγματος

α) Υγρές ουσίες:

Ποσότητα 0,5-1 mL. Το δείγμα τοποθετείται σε λεπτούς δειγματοληπτικούς σωλήνες NMR. Το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένοι οι σωλήνες δεν εκπέμπουν στο Raman.

β) Στερεές ουσίες:

α) Σε μορφή διαλύματος χρησιμοποιώντας τους λεπτούς δειγματοληπτικούς σωλήνες NMR.

β) Σε στερεή μορφή χρησιμοποιώντας τους λεπτούς δειγματοληπτικούς σωλήνες NMR.

Ο συνδυασμός φασματοσκοπίας IR και Raman δίνει περισσότερες πληροφορίες για τη δομή των χημικών μορίων γιατί οι δύο αυτές φασματοσκοπίες είναι συμπληρωματικές κυρίως για μόρια τα οποία έχουν κέντρο συμμετρίας. Γενικά η φασματοσκοπία IR δίνει πληροφορίες για τις χαρακτηριστικές ομάδες των μορίων, ενώ η φασματοσκοπία Raman για το σκελετό του μορίου (C=C, C-C κλπ).

Η φασματοσκοπία Raman πλεονεκτεί σε σχέση με τις άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές, ιδιαίτερα στη μελέτη ουσιών σε υδατικά διαλύματα γιατί η ένταση του νερού στο φάσμα Raman είναι χαμηλή και επεμβαίνει ελάχιστα στο φάσμα της ουσίας που μελετάται (Nicolet Magna 750 Series Users manual – Technical Specifications).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης είναι να αναπτυχθούν νέες μέθοδοι παραλαβής και ανάλυσης δευτερογενών μεταβολιτών από αρωματικά – φαρμακευτικά και ενεργειακά φυτά. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητο να αξιοποιηθούν οι ήδη γνωστές και δοκιμασμένες μέθοδοι και να βελτιωθούν όπου αυτό είναι δυνατό, χωρίς να αποκλείεται και η ανάπτυξη εντελώς νέων τεχνικών. Το θέμα του ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού συστατικών που έχουν πιθανή βιολογική δράση ή οικονομική αξία, σε εκχυλίσματα ή άλλα προϊόντα φυτικού υλικού, είναι ουσιώδες για τον χαρακτηρισμό τόσο των φυτών όσο και των προϊόντων που προέρχονται από αυτά.

Για την παραλαβή οι σκοπούμενες βελτιώσεις αφορούν πρωτίστως την ταχύτητα της παραλαβής. Οι εφαρμογές που ελέγχονται ώστε να προκύψουν νέες μέθοδοι γρηγορότερης παραλαβής πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών από φυτικό υλικό είναι παραπλήσιες με αυτές που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία, ενώ και οι προτεινόμενες σχεδιάζονται με τρόπο ώστε να είναι εφικτή η υιοθέτησή τους από την βιομηχανία. Σημαντικότερος παράγοντας για την επιτυχία των μεθόδων παραλαβής είναι η κατά το δυνατόν επιλεκτική παραλαβή συγκεκριμένων συστατικών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες πρέπει να μένουν ανεπηρέαστοι από την μέθοδο παραλαβής γεγονός που περιορίζει σημαντικά τις επιλογές στις μεθόδους αλλά και στα χρησιμοποιούμενα υλικά.

Εντός των σκοπών της μελέτης είναι η δυνατότητα παραλαβής των δευτερογενών μεταβολιτών σε κατάσταση που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη χρήση. Έτσι όλα τα απαραίτητα αναλώσιμα πρέπει να είναι κατάλληλα για χρήση στην βιομηχανία τροφίμων όπου αυτό είναι δυνατό.

Η ταχύτερη παραλαβή των απαραίτητων συστατικών από τα φυτά συνεπάγεται μικρότερο βιομηχανικό κόστος και αν είναι δυνατό και μικρότερη κατανάλωση ενέργειας. Κάθε φορά τα αποτελέσματα της νέας ή βελτιωμένης μεθόδου είναι απαραίτητο να συγκρίνονται με την πιο συνήθη ή πιο αποδεκτή μέθοδο που χρησιμοποιείται σήμερα.

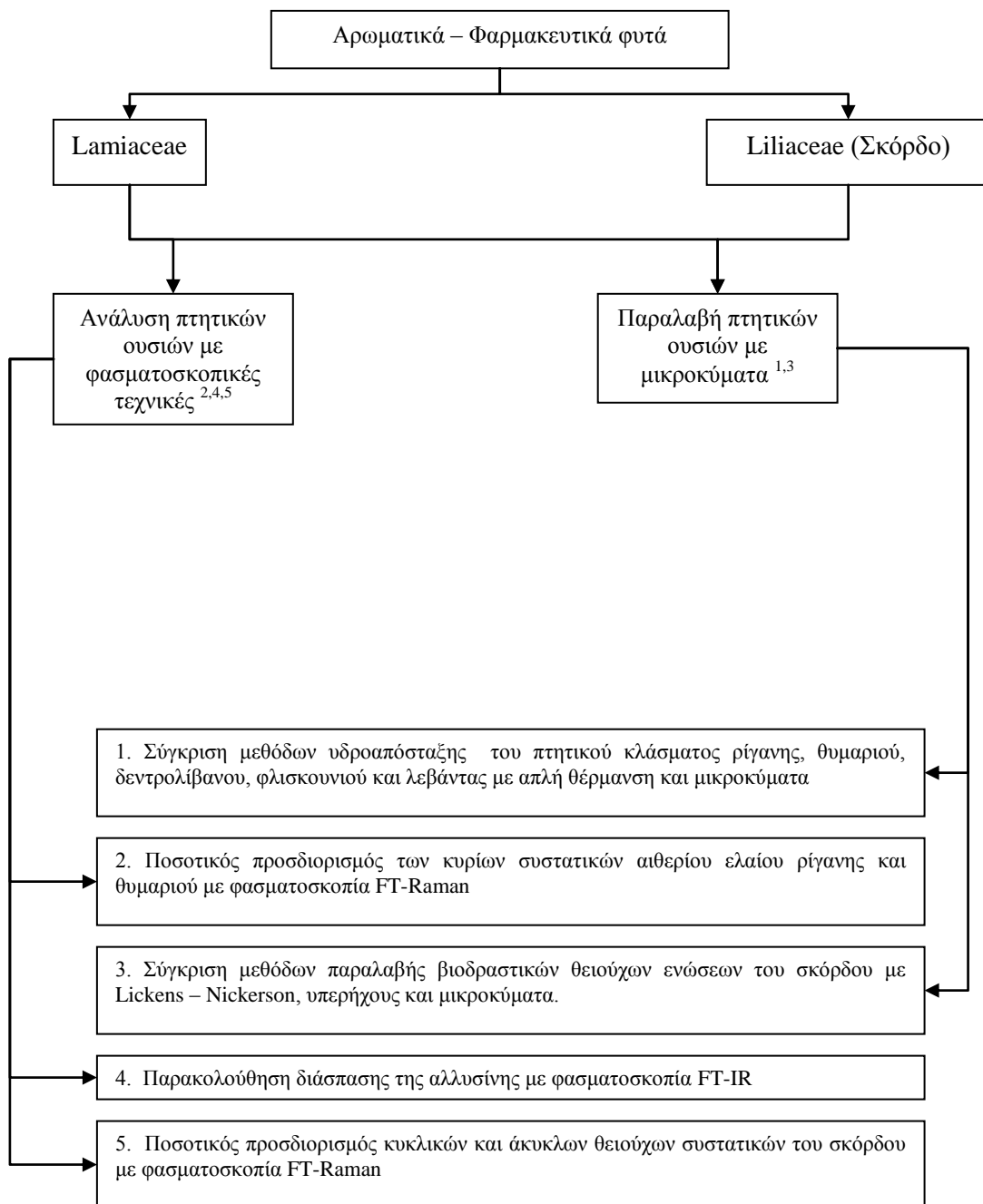
Μερικές φορές είναι σημαντικότερη από την ταχύτητα της παραλαβής, η διατήρηση των συστατικών του φυτού στην πρωτογενή κατάσταση στην οποία βρίσκονται στον φυτικό ιστό. Στην περίπτωση των θειούχων μεταβολιτών του σκόρδου αυτό έχει μεγαλύτερη σημασία από την ταχύτητα ή την απόδοση (ποσοτικά) της παραλαβής. Τα συστατικά του σκόρδου είναι εξαιρετικά ευαίσθητα και αποτελούν προϊόν μεγάλης αξίας στην φαρμακευτική αγορά, αλλά και σαν αγροτικό προϊόν είναι σε προτεραιότητα για την Ελλάδα. Ιδιαίτερος σκοπός είναι η ώθηση προς την καλύτερη εκμετάλλευση των συστατικών αυτών και ο χαρακτηρισμός της ελληνικής παραγωγής ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της.

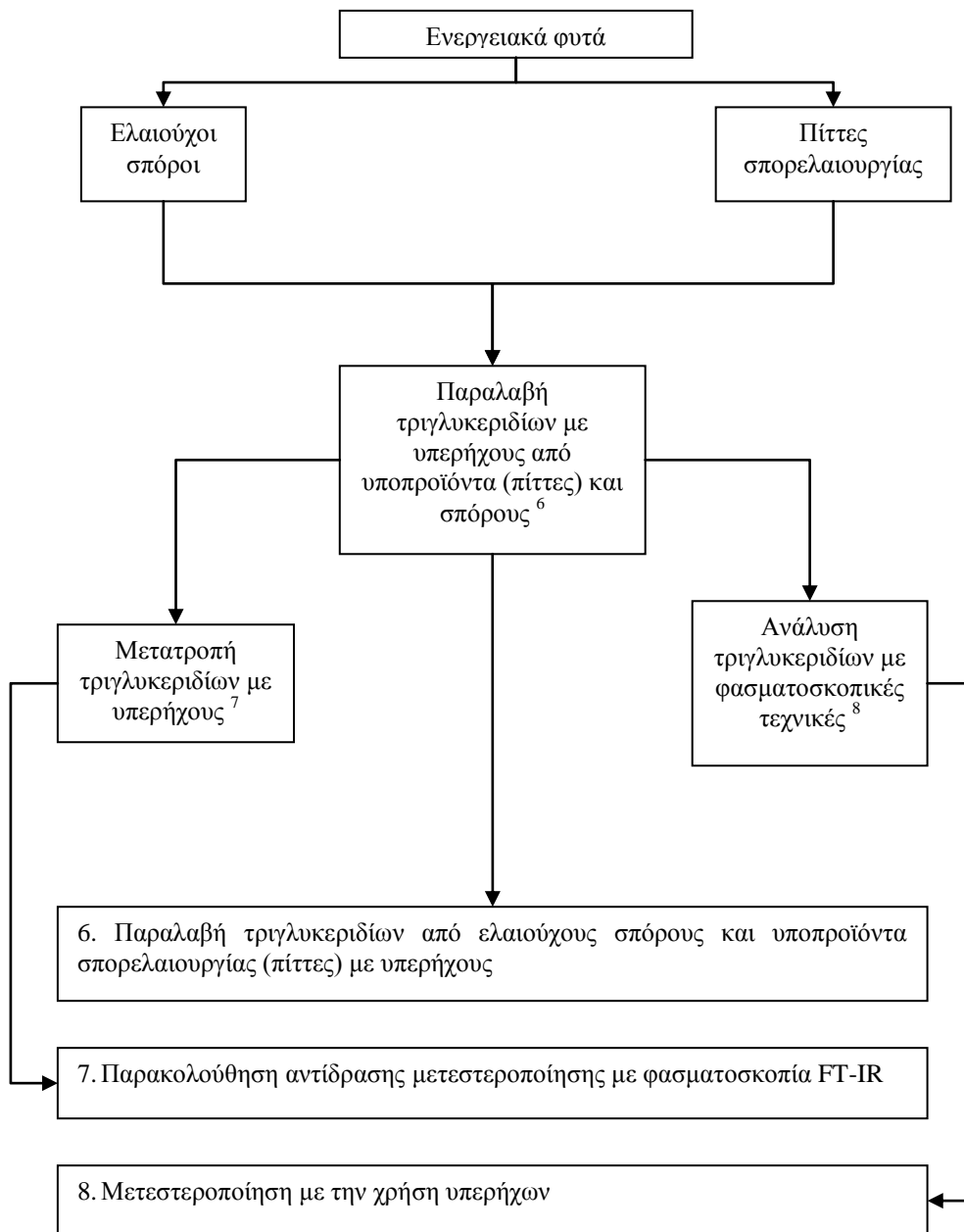
Οι μέθοδοι ανάλυσης γενικά απαιτούν προετοιμασία του δείγματος, υλικοτεχνική υποδομή και σημαντικό χρόνο για την εκτέλεση της ανάλυσης και της ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Βελτίωση μιας ή περισσότερων από τις παραπάνω παραμέτρους έχει άμεσο όφελος για την εξοικονόμηση πόρων κατά την διενέργεια των ποσοτικών ή/και ποιοτικών προσδιορισμών. Η συνήθης εφαρμογή των αναλυτικών μεθόδων είναι για το έλεγχο ποιότητας στην βιομηχανία και άρα οι μετρούμενες παράμετροι είναι εκ των πραγμάτων περιορισμένες για τις μετρήσεις ρουτίνας που διενεργούνται από τον ποιοτικό έλεγχο.

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι δυνατό να αποτελέσουν εναλλακτικές στις καθιερωμένες χρωματογραφικές μεθόδους. Χαρακτηριστικά τους είναι η μη καταστροφή του δείγματος, η γρήγορη και γενικά εύκολη κατεργασία του παρασκευάσματος προς ανάλυση και η ταχύτητα λήψης των μετρήσεων. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι είναι πιο ευαίσθητες γενικά και εντοπίζουν και απρόβλεπτες αλλαγές στην σύσταση με μεγαλύτερη ευκολία από τις φασματοσκοπικές. Σκοπός είναι η προώθηση συγκεκριμένων φασματοσκοπικών μεθόδων σαν εναλλακτικές διαφόρων χρωματογραφικών.

Τέλος, δοκιμάστηκε και η τεχνική της ταυτόχρονης εκτέλεσης δύο επεμβάσεων, μιας εκχύλισης για την παραλαβή από το φυτικό υλικό και μιας αντίδρασης για την παραλαβή παραγώγων χωρίς ενδιάμεσα στάδια. Η τεχνική αυτή παρά τις δυσκολίες που αντιμετωπίζει θεωρητικά, έχει προοπτικές να εξελιχθεί σε ευρύτατα χρησιμοποιούμενη εφαρμογή.

Σχηματικά η διάρθρωση των επιμέρους στόχων παρουσιάζεται στο Σχήμα 21.





Σχήμα 21 Διάγραμμα ροής εργασιών

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. Σύγκριση μεθόδων υδροαπόσταξης του πτητικού κλάσματος ρίγανης, θυμαριού, δεντρολίβανου, φλισκουνιού και λεβάντας με συμβατική θέρμανση και θέρμανση με μικροκύματα

Φυτικό υλικό

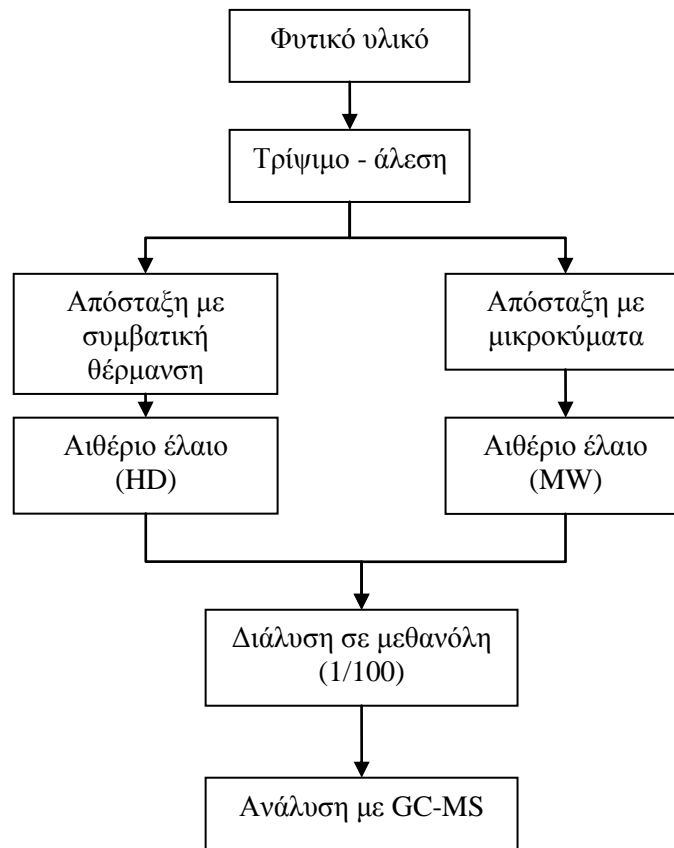
Χρησιμοποιήθηκαν, ρίγανη, θυμάρι, δενδρολίβανο, φλισκούνι και λεβάντα. Η ρίγανη προήλθε από έμπορο αρωματικών φυτών της βορείου Ελλάδας, το θυμάρι συλλέχθηκε από τον Υμηττό, το φλισκούνι αγοράστηκε από έμπορο αρωματικών φυτών, το δενδρολίβανο προήλθε από τον κήπο της γεωπονικής και η λεβάντα προήλθε από ορεινή περιοχή της Πελοποννήσου.

Συσκευές

- Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger
- Θερμομανδύας
- Τροποποιημένος οικιακός φούρνος μικροκυμάτων
- Αέριος χρωματογράφος GC-MS
- Πιπέτες και λοιπός υάλινος εξοπλισμός

Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- Μεθανόλη υψηλής καθαρότητας 99,9% (Residue level analysis)



Όλα τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα μετά από ξήρανση στον αέρα σε σκοτεινό χώρο. Παρελήφθησαν αιθέρια έλαια από ρίγανη, θυμάρι, δενδρολίβανο, φλισκούνι και λεβάντα με τις μεθόδους της υδρο-απόσταξης χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές πηγές θέρμανσης. Στην μία περίπτωση απλή θερμότητα από ηλεκτρικές αντιστάσεις με θερμομανδύα (δείγματα hd 1-5) και στην δεύτερη η θερμότητα παρασχέθηκε μέσω ακτινοβολήσης με μικροκύματα (δείγματα mw 1-5).

Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 25 g δείγματος από φυτικό υλικό και η διάρκεια της απόσταξης κρατήθηκε σταθερή στις 4 h για την απλή θέρμανση και στα 40 min για την θέρμανση με μικροκύματα. Όλη η διαδικασία της απόσταξης επαναλήφθηκε τρεις φορές με τα ίδια δείγματα και συνθήκες ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων επιλέχθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή μάζας. Οι συνθήκες λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου για την ανάλυση ήταν οι εξής: Ο αέριος χρωματογράφος HP-5890 II GC είναι εφοδιασμένος με μια στήλη αέριας χρωματογραφίας τύπου 30m x 0.25 mm id, 0.25 μm HP-5ms και ένα ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας HP 5972. Φέρων αέριο είναι το ήλιο. Η θερμοκρασία του χώρου εισαγωγής δείγματος και του συνδέσμου μεταφοράς του ανιχνευτή

μάζας ορίστηκε σε 220 και 290°C αντίστοιχα. Για τον διαχωρισμό των ουσιών η θερμοκρασία της στήλης ξεκινά από τους 55 °C, ανέρχεται σε 100 °C με ρυθμό μεταβολής 3 °C / min, παραμένει σταθερή για 5 min και ανέρχεται στους 220 °C με ρυθμό μεταβολής 5 °C/min. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν μετά από διάλυση σε μεθανόλη (1/100).

4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των κυρίων συστατικών αιθερίου ελαίου ρίγανης και θυμαριού με φασματοσκοπία FT-Raman

Προετοιμασία και παραλαβή αιθερίων ελαίων

Φυτικό υλικό

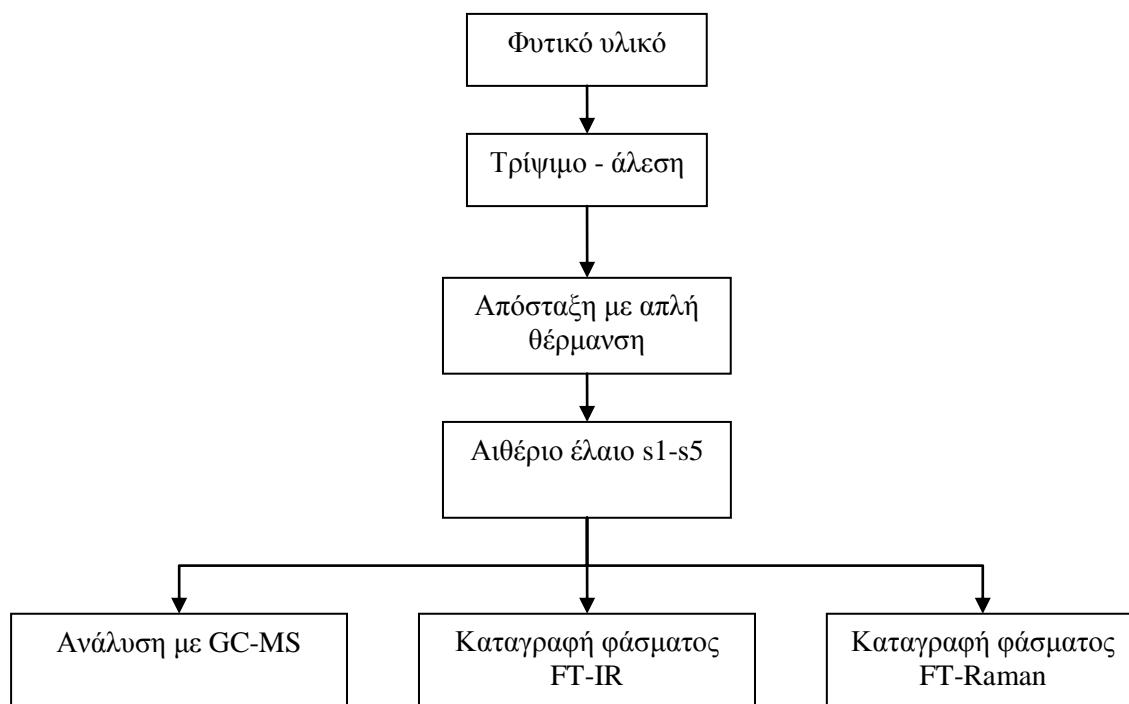
Χρησιμοποιήθηκαν ρίγανη και θυμάρι. Η ρίγανη προήλθε από έμπορο αρωματικών φυτών της βορείου Ελλάδας ενώ το θυμάρι συλλέχθηκε από τον Υμηττό.

Συσκευές

- Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger
- Θερμομανδύας
- Φασματοφωτόμετρο FT-Raman
- Φασματοφωτόμετρο FT-IR
- Αέριος χρωματογράφος GC-MS
- Πιπέτες και λοιπός υάλινος εξοπλισμός

Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- Ακετόνη (GC-MS grade) καθαρότητας 99,9%
- Πρότυπες ουσίες θυμόλη, καρβακρόλη, π-κυμένιο, γ-τερπινένιο



Τέσσερα δείγματα ρίγανης και ένα δείγμα θυμαριού ακολούθησαν την συνήθη διαδικασία αποξήρανσης και αποθήκευσης στο σκοτάδι μέχρι την ανάλυσή τους. Όλα τα δείγματα προερχόταν από συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας.

Η παραλαβή του αιθερίου ελαίου έγινε με την μέθοδο της υδροαπόσταξης σε θερμομανδύα. Το αιθέριο έλαιο μετά την παραλαβή και τον χαρακτηρισμό τους πήραν κωδικούς Δείγμα s1 έως s5 και αποθηκεύθηκαν στους -18°C μέχρι να γίνει η ανάλυσή τους.

Εκτός από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες θυμόλη, καρβακρόλη, γ-τερπινένιο και π-κυμένιο από την Sigma-Aldrich Co (St. Louis, Missouri).

Προετοιμασία μιγμάτων γνωστής συγκέντρωσης

Δέκα πρότυπα μίγματα των τεσσάρων συστατικών του αιθερίου ελαίου παρασκευάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα τέσσερα βασικά συστατικά θυμόλη, καρβακρόλη, γ-τερπινένιο και π-κυμένιο βρισκόταν σε συγκεντρώσεις μικρότερες από την μικρότερη και μεγαλύτερες από την μεγαλύτερη που απαντούν συχνά στα αιθέρια έλαια ρίγανης και θυμαριού. Για την ακρίβεια των μετρήσεων τα πρότυπα μίγματα παρασκευάστηκαν λίγα λεπτά πριν τις μετρήσεις. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων μιγμάτων βρίσκονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5 Σύσταση προτύπων μιγμάτων

Πρότυπο	Θυμόλη (%)	Καρβακρόλη (%)	π-κυμένιο (%)	γ-τερπινένιο (%)
1	85	3	7	5
2	70	10	6	14
3	55	20	5	20
4	45	30	15	10
5	35	40	14	11
6	30	50	4	16
7	25	60	9	6
8	15	70	12	3
9	10	80	3	7
10	3	85	8	4

Συνθήκες λειτουργίας αέριου χρωματογράφου

Ο αέριος χρωματογράφος HP-5890 II GC είναι εφοδιασμένος με μια στήλη αέριας χρωματογραφίας τύπου 30m x 0.25 mm id, 0.25 μm HP-5ms και δύο ανιχνευτές, έναν ιονισμού φλογός και ένα ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας HP 5972. Φέρων αέριο είναι το ήλιο. Η θερμοκρασία του χώρου εισαγωγής δείγματος και του συνδέσμου μεταφοράς του ανιχνευτή μάζας ορίστηκε σε 220 και 290°C αντίστοιχα. Για τον διαχωρισμό των ουσιών η θερμοκρασία της στήλης ξεκινά από τους 55 °C, ανέρχεται σε 100 °C με ρυθμό μεταβολής 3 °C / min, παραμένει σταθερή για 5 min και ανέρχεται στους 220 °C με ρυθμό μεταβολής 5 °C/min. Όλα τα δείγματα αναφοράς αναλύθηκαν μετά από διάλυση σε μεθανόλη (1/100), ενώ τα επιμέρους ποσοστά των συστατικών υπολογίστηκαν με την μέθοδο των εμβαδών των κορυφών του χρωματογραφήματος. Κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Συνθήκες λειτουργίας FT-Raman

Για την καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το όργανο Nicolet 750 FT-Raman, με πηγή λέιζερ Nd:YAG που εκπέμπει στα 1064 nm. Ο διαχωριστής δέσμης ήταν CaF₂ και ο ανιχνευτής ινδίου – γαλλίου-αρσενικού (InGaAs). Φάσματα όλων των δειγμάτων καταγράφηκαν τρεις φορές με τις ρυθμίσεις του φασματοφωτομέτρου να παραμένουν σταθερές στις 100 σαρώσεις, με διακριτική ικανότητα 4 cm⁻¹. Για την ανάλυση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες δειγμάτων Wimax WG-SM NMR tubes 4.97 mm, με πάχος τοιχώματος 0.38 mm. Κάθε φάσμα επεξεργάστηκε ψηφιακά με τις προεπιλεγμένες λειτουργίες του λογισμικού του φασματοφωτομέτρου Omnic 3.1 για την αυτόματη εξομάλυνση και διόρθωση της βασικής γραμμής. Ρύθμιση του οργάνου για ευθυγράμμιση των οπτικών μερών γίνεται πριν από κάθε παρτίδα μετρήσεων. Κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Συνθήκες λειτουργίας φασματοφωτομέτρου FT-IR

Για την καταγραφή των φασμάτων IR χρησιμοποιήθηκε όργανο Nicolet 750 series με προσαρμογέα δείγματος σε παράθυρα ZnSe. Φάσματα όλων των δειγμάτων καταγράφηκαν τρεις φορές με τις ρυθμίσεις του φασματοφωτομέτρου να παραμένουν σταθερές στις 100 σαρώσεις, με διακριτική ικανότητα 4 cm^{-1} . Κάθε φάσμα επεξεργάστηκε ψηφιακά με τις προεπιλεγμένες λειτουργίες του λογισμικού του φασματοφωτομέτρου Omnic 3.1 για την αυτόματη εξομάλυνση και διόρθωση της βασικής γραμμής. Ρύθμιση του οργάνου για ευθυγράμμιση των οπτικών μερών γίνεται πριν από κάθε παρτίδα μετρήσεων.

4.3. Σύγκριση παραλαβής θειούχων ενώσεων του σκόρδου με συμβατική υδροαπόσταξη – μικροεκχύλιση (Lickens – Nickerson), υπερήχους και μικροκύματα.

Φυτικό υλικό

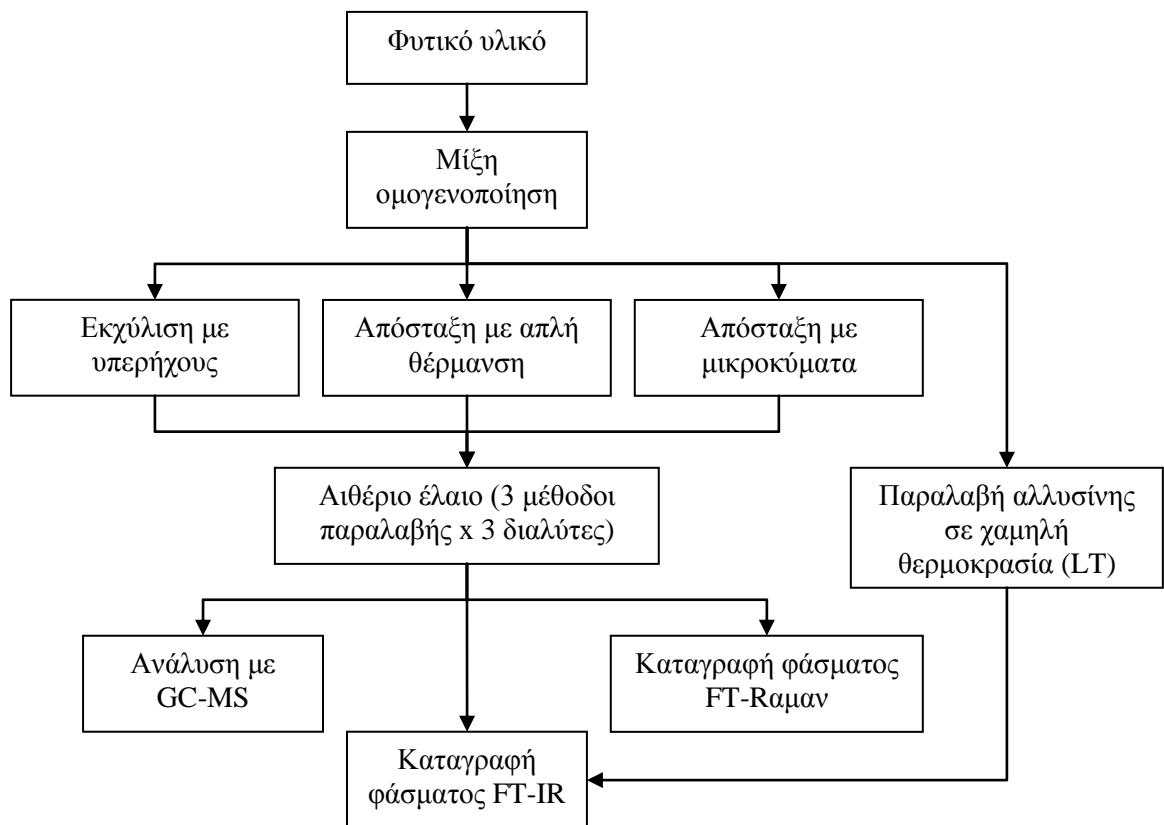
Βολβοί του φυτού *Allium sativum*, προερχόμενοι από την Ν. Βύσσα του νομού Έβρου.

Συσκευές

- Συσκευή υδροαπόσταξης μικροεκχύλισης Lickens - Nickerson
- Θερμομανδύας
- Λουτρό υπερήχων
- Τροποποιημένος φούρνος μικροκυμάτων οικιακής χρήσης
- Μπλέντερ οικιακής χρήσης
- Φασματοφωτόμετρο FT-Raman
- Φασματοφωτόμετρο FT-IR
- Αέριος χρωματογράφος GC-MS
- Πιπέτες και λοιπός υάλινος εξοπλισμός

Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- Διαιθυλεθέρας (BHT free), εξάνιο και οξικός αιθυλεστέρας (HPLC grade)
- Ακετόνη (Residue level)
- Πρότυπες ουσίες diallyl disulfide
- Diallyl sulfide



Δείγμα σκόρδου παρελήφθη από παραγωγούς από την βόρεια Ελλάδα. Πριν από κάθε κατεργασία οι βολβοί αποφλοιώθηκαν προσεκτικά ώστε να μην τραυματιστούν οι ιστοί τους, γεγονός που θα προκαλούσε έναρξη της παραγωγής των ουσιών του πτητικού κλάσματος. Στη συνέχεια, 100g βολβών ζυγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε κοινό blender για 2 min με την προσθήκη 20 mL απιονισμένου νερού. Το δείγμα μετά κατεργάστηκε όπως φαίνεται στις επόμενες παραγράφους.

4.3.1 Παραλαβή με μικρο-απόσταξη εκχύλιση Lickens-Nickerson

Συντομογραφικά αυτή η μέθοδος αναφέρεται από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων Simultaneous Distillation Extraction – SDE (Σύγχρονη Απόσταξη Εκχύλιση).

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Lickens-Nickerson για διαλύτες μικρότερης πυκνότητας από το νερό. Διαλύτης εκχύλισης ήταν διαιθυλαιθέρας 10mL, ενώ εκτός από το ομογενοποιημένο δείγμα στην φιάλη τοποθέτησης φυτικού υλικού προστέθηκαν και 100mL απιονισμένου νερού.

Η διαδικασία μικρο-απόσταξης εκχύλισης διήρκεσε 2 ώρες. Για τη συμπύκνωση των ατμών χρησιμοποιήθηκε μίγμα νερού - γλυκόλης (- 10 °C). Για τον προσδιορισμό της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο σκόρδου, ο διαλύτης εξατμίστηκε κάτω από ένα ήπιο ρεύμα αζώτου. Για να αποτραπεί η εξάτμιση συστατικών του αιθερίου ελαίου του σκόρδου η διαδικασία συμπύκνωσης κρατήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία. Το παραλαμβανόμενο αιθέριο

έλαιο ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό και όλα τα αποτελέσματα διαδικασιών παρουσιάζονται στον πίνακα 16. Μετά από τη ζύγιση, το σύνολο του δείγματος ξαναδιαλύθηκε σε 10 mL του διαλύτη εκχύλισης. Η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε μια φορά με εξάνιο και μία φορά με το οξικό αιθυλεστέρα, ώστε να προκύψουν 3 δείγματα τα οποία αποθηκεύθηκαν στους -22°C .

4.3.2 Απόσταξη με την χρήση μικροκυμάτων

Η απόσταξη με την χρήση μικροκυμάτων πραγματοποιήθηκε σε ένα τροποποιημένο οικιακό φούρνο μικροκυμάτων με μέγιστη ισχύ 700 Watt (LG), χρησιμοποιώντας μια χοάνη ελεγχόμενης επιστροφής με το διαλύτη, με μια φιάλη 1L για το δείγμα και έναν κατακόρυφο ψυκτήρα. Αυτή η συσκευή χρησιμοποιήθηκε αντί της κλασσικής συσκευής Lickens-Nickerson λόγω του έντονου αφρισμού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Ο διαλύτης εκχύλισης ήταν διαιθυλ-αιθέρας. Η φιάλη δειγμάτων (1L) πληρώθηκε με δείγμα, 100 mL απιονισμένο νερό και διαιθυλ-αιθέρα (50mL). Ο χρόνος απόσταξης ήταν 30 λεπτά για την απομόνωση του αιθερίου ελαίου, στη μέγιστη ισχύ λειτουργίας της συσκευής. Μετά το πέρας της διαδικασίας διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις (οργανική και υδατική) με την χρήση διαχωριστικής χοάνης. Το οργανικό κλάσμα συμπυκνώθηκε σε ήπιο ρεύμα αζώτου σε 10 mL όγκου και ξηράνθηκε με προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου. Ακολούθησε διήθηση μέσω ενός φίλτρου σύριγγας για την απομάκρυνση τυχόν στερεών υπολειμμάτων. Ο προσδιορισμός της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο έγινε στη συνέχεια όπως και στην κλασσική μικρο- απόσταξη εκχύλιση. Η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε μια φορά με το εξάνιο και μια φορά με τον οξικό αιθυλεστέρα. Προέκυψαν 3 δείγματα τα οποία αποθηκεύθηκαν στους -22°C μέχρι την περαιτέρω κατεργασία τους. Συντομογραφικά αυτή η μέθοδος αναφέρεται από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων Micro Wave Hydro Distillation – MWHD.

4.3.3 Παραλαβή με τη χρήση υπερήχων σε θερμοκρασία 25°C και 0°C .

Η παραλαβή με την χρήση υπερήχων έγινε με εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων (Sonorex, Super RK 255H, με εσωτερικές διαστάσεις 300 × 150 × 150 mm) με σταθερή συχνότητα 35 KHz. Το λουτρό πληρώθηκε με νερό, ενώ η θερμοκρασία του διατηρήθηκε στους 25°C . Στη σφαιρική φιάλη με το δείγμα (500mL) προστέθηκαν 50mL διεθυλοαιθέρα και ακολούθησε εκχύλιση για 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, η οργανική στοιβάδα αποχύθηκε σε μια χοάνη διαχωρισμού και ξεπλύθηκε με 20 mL κορεσμένου διαλύματος NaCl. Η οργανική φάση μεταφέρθηκε σε χωριστό περιέκτη. Η ενοποιημένη υδατική φάση ξεπλύθηκε πάλι με τον διαλύτη εκχύλισης (20 mL). Τα δύο μέρη της οργανικής φάσης ενώθηκαν στον ίδιο περιέκτη και πάλι στη διαχωριστική χοάνη όπου και πλύθηκε με άλλα 20 mL κορεσμένου διαλύματος NaCl. Η διαδικασία εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων επαναλήφθηκε τρεις φορές, με την προσθήκη 50 mL διαλύτη κάθε φορά. Στο τέλος έγινε ενοποίηση των κλασμάτων και

στη συνέχεια ακολουθήθηκαν τα βήματα της συμπύκνωσης και της ανάλυσης όπως στα μικροκύματα και την Lickens Nickerson. Η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε μία φορά με το εξάνιο και μια φορά με το οξικό αιθυλεστέρα. Προέκυψαν 3 δείγματα τα οποία αποθηκεύθηκαν στους -22°C μέχρι την περαιτέρω κατεργασία. Συντομογραφικά αυτή η μέθοδος θα αναφέρεται στη συνέχεια από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων Ultra Sound Extraction – USE.

Για την παραλαβή δείγματος των πτητικών συστατικών υπο συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όμως αυτή τη φορά έγινε με προσθήκη πάγου στο λουτρό υπερήχων ώστε να διατηρηθεί σταθερά η θερμοκρασία στους $1-2^{\circ}\text{C}$ ενώ χρησιμοποιήθηκε μόνο ο διαιθυλεθέρας σαν διαλύτης εκχύλισης. Το δείγμα που προέκυψε αποθηκεύθηκε στους -22°C μέχρι την χρησιμοποίησή του.

4.4. Ανάλυση των πτητικών συστατικών του σκόρδου με αέρια χρωματογραφία

Όλα τα δείγματα πτητικών συστατικών που προέκυψαν αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ένα αέριο χρωματογράφο Hewlett Packard 5890 II, εξοπλισμένο με έναν ανιχνευτή FID και HP-5ms τριχοειδή στήλη (30 m X 0.25 mm). Επίσης, το όργανο διαθέτει και ανιχνευτή μάζας (GC/MS) του οποίου ενέργεια ιονισμού είναι 70 eV. Οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα δείγματος και ανιχνευτών τέθηκαν σε 220°C και 290°C , αντίστοιχα. Η θερμοκρασία της στήλης κρατήθηκε αρχικά στους 50°C για 3 min., κατόπιν που αυξήθηκε βαθμιαία σε 240°C με ένα ρυθμό $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Το ήλιο ήταν το φέρον αέριο, σε ροή 1 mL/min. Αραιωμένα δείγματα (1/100 στην ακετόνη, v/v) ενός μL αναλύθηκαν με την splitless ρύθμιση του αέριου χρωματογράφου. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των ενώσεων βασίστηκε στη σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με εκείνα των βιβλιοθηκών του GC/MS, NIST 98 και Wiley 275. Τα ποσοτικά στοιχεία λήφθηκαν ηλεκτρονικά από τα στοιχεία του επί τοις εκατό εμβαδού του χρωματογραφήματος FID χωρίς τη χρήση διορθώσεων.

4.5. Ανάλυση των πτητικών συστατικών του σκόρδου με φασματοσκοπία FT-Raman

Όλα τα φάσματα των προτύπων st1-st10, και των αγνώστων δειγμάτων $\sigma_1 - \sigma_{10}$, καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Nicolet 750 FT-Raman spectrometer εφοδιασμένο με πηγή εκπομπής Nd:YAG στα 1064 nm, διαχωριστή δέσμης CaF_2 (beam splitter) και ανιχνευτή Ινδίου, Γαλλίου, Αρσενικού (indium-gallium-arsenide (InGaAs) detector).

Κάθε φάσμα δείγματος αγνώστου ή πρότυπης συγκέντρωσης καταγράφηκε τρεις φορές σε Wimad WG-SM NMR tubes με εξωτερική διάμετρο 4,97 mm και πάχος 0,38 mm. Τα φάσματα λήφθηκαν σε διάρκεια 3 min, όσο διαρκούν 100 scans με ανάλυση 4 cm^{-1} . Στις

ρυθμίσεις αυτές προσδιορίστηκε ότι είναι ικανοποιητική η υφή του φάσματος και ο χρόνος λήψης του για τον σκοπό του ποσοτικού προσδιορισμού που θα αναλυθεί πιο κάτω.

Τέλος, πριν από κάθε παρτίδα αναλύσεων γινόταν οι κατάλληλες ενέργειες για την σωστή λειτουργία του οργάνου (ευθυγράμμιση κ.τ.λ.), ενώ η εξομάλυνση των φασμάτων και η βασική γραμμή διορθώθηκε αυτόματα με τη χρήση του λογισμικού του οργάνου (Omnisc 3.1). Ειδικά για την μέτρηση του ύψους συγκεκριμένων κορυφών του φάσματος (στα 1636 και 1606 cm^{-1}), ο προσδιορισμός έγινε με αυτόματη λειτουργία του παραπάνω λογισμικού για την εξασφάλιση της ακρίβειας της μέτρησης σε κάθε δείγμα άγνωστου αιθερίου ελαίου και προτύπου.

4.6 Ανάλυση των πτητικών συστατικών του σκόρδου με φασματοσκοπία FT-IR

Για την καταγραφή των φασμάτων του δείγματος πτητικών συστατικών σκόρδου που παρελήφθει σε χαμηλή θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκε το όργανο Nicolet FT-IR 750 series με προσαρμογέα δείγματος σε παράθυρα ZnSe. Οι ρυθμίσεις του φασματοφωτομέτρου παρέμειναν σταθερές στις 100 σαρώσεις, με διακριτική ικανότητα 4 cm^{-1} . Κάθε φάσμα επεξεργάστηκε ψηφιακά με τις προεπιλεγμένες λειτουργίες του λογισμικού του φασματοφωτομέτρου Omnisc 3.1 για την αυτόματη εξομάλυνση και διόρθωση της βασικής γραμμής. Ρύθμιση του οργάνου για ευθυγράμμιση των οπτικών μερών γίνεται πριν από κάθε παρτίδα μετρήσεων.

4.7. Παραλαβή τριγλυκεριδίων από ελαιούχους σπόρους και υποπροϊόντα σπορελαιουργίας (πίττες) με τη μέθοδο sohxlet

Φυτικό υλικό

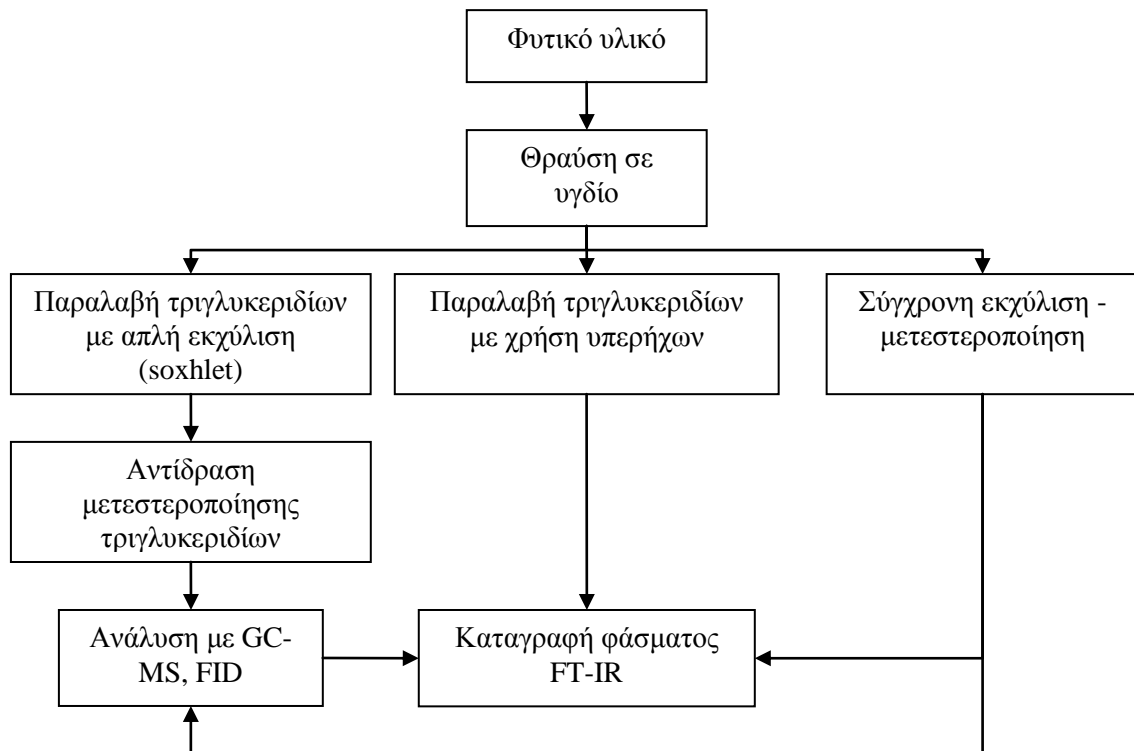
Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από αγριαγκινάρα, βαμβάκι, ηλίανθο και σουσάμι. Όλοι οι σπόροι ήταν Ελληνικής προέλευσης. Οι πίτες σπορελαιουργίας προήλθαν από βιομηχανίες παραγωγής φυτικών ελαίων στην βόρεια Ελλάδα και προερχόταν από κατεργασία βαμβακιού, ηλίανθου και σουσαμιού.

Συσκευές – Σκεύη

- Υγδίο πορσελάνης
- Θερμομανδύας
- Λουτρό υπερήχων
- Συσκευή Soxhlet
- Φασματοφωτόμετρο FT-IR
- Αέριος χρωματογράφος GC-MS, FID
- Πιπέτες και λοιπός υάλινος εξοπλισμός
- Περιστροφικός εξατμιστής

Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο νερό
- Κανονικό εξάνιο, χλωροφόρμιο, πετρελαϊκός αιθέρας, μεθανόλη (HPLC grade)
- Άνυδρο θειικό μαγνήσιο
- Υδροξείδιο του νατρίου
- Κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου



Πρωτογενές υλικό για την παραλαβή τριγλυκεριδίων από ελαιούχους σπόρους αποτέλεσαν 4 είδη σπόρων των *Cynara cardulus*, κοινώς αγριαγκινάρα, βαμβάκι, ηλιάνθος και σουσάμι. Όλα είναι γνωστοί ελαιούχοι σπόροι με μεγάλη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην παραγωγή φυτικών ελαίων. Όλοι οι καρποί προήλθαν από το εργαστήριο γεωργίας του Γ.Π.Α. Ο καρπός της αγριαγκινάρας είναι ένα πολλά υποσχόμενο ελαιούχο φυτό που δυστυχώς δεν καλλιεργείται συστηματικά στην Ελλάδα. Οι άλλοι καρποί καλλιεργούνται σε διάφορες περιοχές της χώρας και χρησιμοποιούνται ήδη για την παραγωγή φυτικών ελαίων. Το γεγονός αυτό κατέστησε εφικτή την ανεύρεση υπολειμμάτων της βιομηχανικής επεξεργασίας τους και τη μελέτη τους, πράγμα που δεν ήταν δυνατό στην περίπτωση της αγριαγκινάρας. Μοναδική κατεργασία των

σπόρων πριν την χρήση τους ήταν το σπασίμο τους σε ένα υγδίο προκειμένου στη συνέχεια να μπορεί να έλθει σε επαφή ο εκχυλιστής με τις εκχυλιζόμενες ουσίες (Armstrong, 2000).

Παραλαβή με εκχύλιση Soxhlet

Η μέθοδος εκχύλισης Soxhlet εφαρμόστηκε σε επτά συνολικά δείγματα, 4 εκ των οποίων σπόροι και 3 πάστες ή πίτες, προϊόντα της βιομηχανικής παραλαβής των σπορελαίων. Σε όλα τα δείγματα ο εκχυλιστής διαλύτης ήταν το κανονικό εξάνιο και η διάρκεια της εκχύλισης τουλάχιστον 4 ώρες, ενώ η ποσότητα του διαλύτη που απαιτούνταν ώστε να εξασφαλίζεται ο ατέρμονος σιφωνισμός προσδιορίστηκε στα 300 mL. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 10 g υλικού τοποθετημένα σε κάψα εκχύλισης διαστάσεων 130 x 38 mm. Μετά το πέρας του τελευταίου σιφωνισμού η σφαιρική φιάλη που περιέχει το εκχύλισμα και το διαλύτη, απομακρύνθηκαν από τον θερμομανδύα, και ακολούθησε συμπύκνωση του διαλύματος σε περιστροφικό συμπυκνωτήρα (rotary evaporator) μέχρι του όγκου των 100 mL. Στην συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη κατάλληλου όγκου και απομακρύνθηκαν τα ίχνη υγρασίας με προσθήκη ικανής ποσότητας άνυδρου θειικού μαγνησίου. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτήρα. Το υλικό μεταφέρθηκε ποσοτικά σε προζυγισμένο περιέκτη των 20 mL και ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό. Με τον τρόπο αυτό παρελήφθησαν σπορέλαια και από τα επτά υλικά έγινε αναγωγή επί τοις εκατό τριγλυκεριδίων/100g υλικού και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 22.

Παραλαβή με υπερήχους

Για την παραλαβή των σπορελαίων με την μέθοδο των υπερήχων, χρησιμοποιήθηκε και πάλι κανονικό εξάνιο (100 mL), 10 g υλικού ενώ η διάρκεια της εκχύλισης ήταν 10 λεπτά. Η θερμοκρασία του λουτρού υπερήχων διατηρήθηκε στους 25° C. Η συχνότητα των υπερήχων ήταν 35 kHz. Μετά την πρώτη εκχύλιση απομακρύνθηκε η οργανική φάση και ακολούθησαν δύο ακόμη εκχυλίσεις. Το παρεληφθέν υλικό συνενώθηκε με τα προηγούμενα. Η απομάκρυνση του διαλύτη και η ζύγιση έγιναν όπως περιγράφηκε παραπάνω και κρίθηκε ικανοποιητική η παύση της εκχύλισης όταν ανακτήθηκε ποσότητα τριγλυκεριδίων ίση με το 98% αυτής που έδωσε η μέθοδος αναφοράς (Soxhlet).

4.8. Μετεστεροποίηση τριγλυκεριδίων

Μετεστεροποίηση με αλκαλική κατάλυση

Για την μετατροπή των τριγλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες, 1g φυτικού ελαίου αγριαγκινάρας μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και προστίθεται στοιχειομετρική αναλογία

μεθανόλης 6:1 περιέχουσα 1% (w/w) NaOH. Η σφαιρική τοποθετείται σε θερμαινόμενο αναδευτήρα μέσα σε ελαιόλουτρο στους 40° C. Στο πάνω άκρο της προσαρμόζεται κατακόρυφος ψυκτήρας και η αντίδραση περατώνεται σε 1h. Προκειμένου να προσδιοριστεί το πέρας της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με μίγμα διαλύτη ανάπτυξης χλωροφόρμιου : πετρελαϊκού αιθέρας - 1 : 3. Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται με ψεκασμό του πλακιδίου με αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδενικού οξέος (7,5% w/v σε αιθανόλη) και καύση στους 120°C.

Αμέσως μετά το πέρας της αντίδρασης, το προϊόν και η περίσσια του καταλύτη και της μεθανόλης αποτελούν ένα γαλακτόμορφο μίγμα που απαιτεί τουλάχιστον μία ώρα σε ηρεμία προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Στη συνέχεια προστίθεται υπέρκορο διάλυμα NaCl 10mL και το μίγμα εκχυλίζεται με 2 x 5 mL κανονικού εξανίου. Η οργανική φάση ξηραίνεται με προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου, διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή.

Το παραλαμβανόμενο προϊόν είναι διαυγές ή υποκίτρινο υγρό αποτελούμενο από τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (δείγμα **b1**).

Αντίδραση μετεστεροποίησης με χρήση υπερήχων (25°C)

α) Χωρίς διαλύτη

Ποσότητα ενός γραμμαρίου από το φυτικό έλαιο από αγριαγκινάρα το οποίο παρελήφθει με την μέθοδο soxhlet μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει 0,25 mL διάλυμα NaOH σε μεθανόλη (1M). Η φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων στους 25°C για 10 λεπτά. Προκειμένου να προσδιοριστεί το πέρας της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με μίγμα διαλύτη ανάπτυξης χλωροφόρμιου : πετρελαϊκού αιθέρας - 1 : 3. Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται με ψεκασμό του πλακιδίου με αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδενικού οξέος (7,5% w/v σε αιθανόλη) και καύση στους 120°C.

Αμέσως μετά το πέρας της αντίδρασης, το προϊόν και η περίσσια του καταλύτη και της μεθανόλης αποτελούν ένα γαλακτόμορφο μίγμα που απαιτεί τουλάχιστον μία ώρα σε ηρεμία προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Στη συνέχεια το μίγμα εκχυλίζεται με 2 x 5 mL κανονικού εξανίου. Η οργανική φάση ξηραίνεται με προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου, διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή.

Το παραλαμβανόμενο προϊόν είναι διαυγές ή υποκίτρινο υγρό αποτελούμενο από τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (δείγμα **b2**).

β) Με αναλογία διαλύτη (1 προς 25)

Φυτικό έλαιο από αγριαγκινάρα το οποίο παρελήφθει με την μέθοδο sohxlet μεταφέρεται σε ποσότητα ενός γραμμαρίου, σε σφαιρική φιάλη που περιέχει 0,25 mL διάλυμα NaOH σε μεθανόλη (1M). Στην φιάλη προστίθενται και 25 mL κανονικού εξανίου. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων στους 25°C για 10 λεπτά. Προκειμένου να προσδιοριστεί το πέρας της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με μίγμα διαλύτη ανάπτυξης χλωροφόρμιου : πετρελαϊκού αιθέρας - 1 : 3. Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται με ψεκασμό του πλακιδίου με αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδενικού οξέος (7,5% w/v σε αιθανόλη) και καύση στους 120°C.

Οι οργανική διαχωρίζεται από την μεθανολική φάση μετά από παραμονή σε ηρεμία για 5 λεπτά. Η υπερκείμενη φάση αποχύνεται και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με 2 x 5 mL κανονικού εξανίου. Η οργανική φάση αφού ενοποιηθεί, ξηραίνεται με προσθήκη άνυδρου θεικού μαγνησίου, διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή.

Το παραλαμβανόμενο προϊόν είναι διαυγές ή υποκίτρινο υγρό αποτελούμενο από τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (δείγμα **b3**).

γ) Με διαλύτη 1 προς 1

Φυτικό έλαιο από αγριαγκινάρα το οποίο παρελήφθει με την μέθοδο Soxhlet μεταφέρεται σε ποσότητα ενός γραμμαρίου, σε σφαιρική φιάλη που περιέχει 0,25 mL διάλυμα NaOH σε μεθανόλη (1M). Στην φιάλη προστίθεται και 1 mL κανονικού εξανίου. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων στους 25°C για 10 λεπτά. Προκειμένου να προσδιοριστεί το πέρας της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με μίγμα διαλύτη ανάπτυξης χλωροφόρμιου : πετρελαϊκού αιθέρας - 1 : 3. Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται με ψεκασμό του πλακιδίου με αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδενικού οξέος (7,5% w/v σε αιθανόλη) και καύση στους 120°C.

Το γαλακτόμορφο μίγμα διαχωρίζεται μετά από παραμονή σε ηρεμία για 10 λεπτά. Η υπερκείμενη φάση αποχύνεται, και το υπόλοιπο του μίγματος εκχυλίζεται με 2 x 5 mL κανονικού εξανίου. Οι φάσεις του εξανίου αφού ενοποιηθούν, ξηραίνονται με προσθήκη άνυδρου θεικού μαγνησίου, το προϊόν, διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή. Το παραλαμβανόμενο προϊόν είναι διαυγές ή υποκίτρινο υγρό αποτελούμενο από τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (δείγμα **b4**).

Ταυτόχρονη εκχύλιση μετεστεροποίηση

Σπόροι αγριαγκινάρας, σουσαμιού, βαμβακιού και ηλίανθου και πίττες σπορελαιουργίας προερχόμενες από κατεργασία ηλίανθου, σουσαμιού και βαμβακιού ζυγίστηκαν σε ποσότητες 10 g. Όσα από τα υλικά ήταν σπόροι λειοτριβήθηκαν σε υγδίο πορσελάνης. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 100 mL και προστίθενται 50 mL κανονικό εξάνιο και 3 mL μεθανόλης 1M NaOH. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και στη συνέχεια οι στιβάδες του εξανίου και της μεθανόλης – γλυκερόλης – καταλύτη διαχωρίζονται σε διαχωριστική φιάλη. Η παραλαβή των μεθυλεστέρων γίνεται από την στιβάδα του εξανίου μετά από ξήρανση διήθηση και συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Προκειμένου να προσδιοριστεί το πέρας της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) με μίγμα διαλύτη ανάπτυξης χλωροφόρμιου : πετρελαϊκού αιθέρας - 1 : 3. Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται με ψεκασμό του πλακιδίου με αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδενικού οξέος (7,5% w/v σε αιθανόλη) και καύση στους 120°C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Σύγκριση μεθόδων υδροαπόσταξης του πτητικού κλάσματος ρίγανης, θυμαριού, δεντρολίβανου, φλισκουριού και λεβάντας με απλή θέρμανση και μικροκύματα

5.1.1 Σύγκριση μεταξύ των μεθόδων απόσταξης.

α) Ποσότητα παραλαμβανόμενου αιθερίου ελαίου

Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι δεν παρουσιάζεται διαφοροποίηση στην ποσότητα μεταξύ του παραλαμβανόμενου αιθερίου ελαίου με την χρήση θέρμανσης με θερμομανδύα και με μικροκύματα, ίδια δείγματα ρίγανης, θυμαριού, λεβάντας, δενδρολίβανου και φλισκουριού μοιράστηκαν ισόποσα και αποστάχθηκαν με τις δύο μεθόδους. Τα ποσά αιθερίου ελαίου παρατίθενται στον πίνακα 7. Το ποσοστό του αιθερίου ελαίου ήταν 3,1% για την ρίγανη και στις δύο περιπτώσεις 4,7% στην συμβατική θέρμανση έναντι 4,8% στην θέρμανση με μικροκύματα για το θυμάρι, ενώ και για την λεβάντα δεν παρατηρήθηκε απόκλιση, μένοντας σταθερό στο 4,4%. Τέλος, και στο φλισκούρι το ποσοστό παραλαβής έμεινε σταθερό στο 0,4% ενώ η μεγαλύτερη διαφοροποίηση παρουσιάστηκε στο δενδρολίβανο όπου στα μικροκύματα το ποσοστό ήταν 3,3 % έναντι 3,1% στην συμβατική θέρμανση.

Πίνακας 6 Παραλαμβανόμενο αιθέριο έλαιο με μικροκύματα και συμβατική θέρμανση (mL αιθερίου ελαίου/ 100g ξηρού δείγματος)

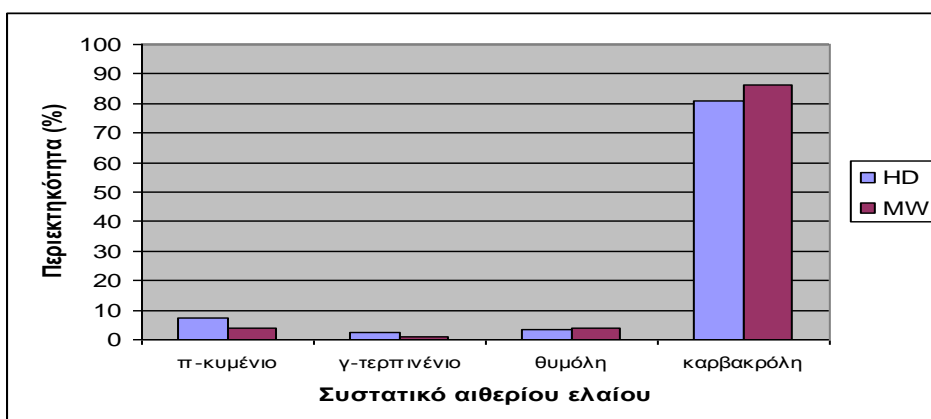
Δείγμα \ Μέθοδος παραλαβής	Μικροκύματα (%v/w)	Συμβατική θέρμανση (%v/w)
Ρίγανη	3,1	3,1
Θυμάρι	4,7	4,8
Λεβάντα	4,4	4,4
Δενδρολίβανο	3,1	3,3
Φλισκούρι	0,4	0,4

β) Ποιοτική διαφοροποίηση

Προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή ποιοτική διαφοροποίηση των προϊόντων των δυο μεθόδων, τα δείγματα που αποστάχθηκαν αναλύθηκαν με GC-MS και τα ποσοστά των επιμέρους συστατικών τους συγκρίνονται ανά μέθοδο για κάθε φυτό στους πίνακες 8, 9, 10, 11 και 12.

Πίνακας 7 Σύσταση αιθερίου ελαίου ρίγανης όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)

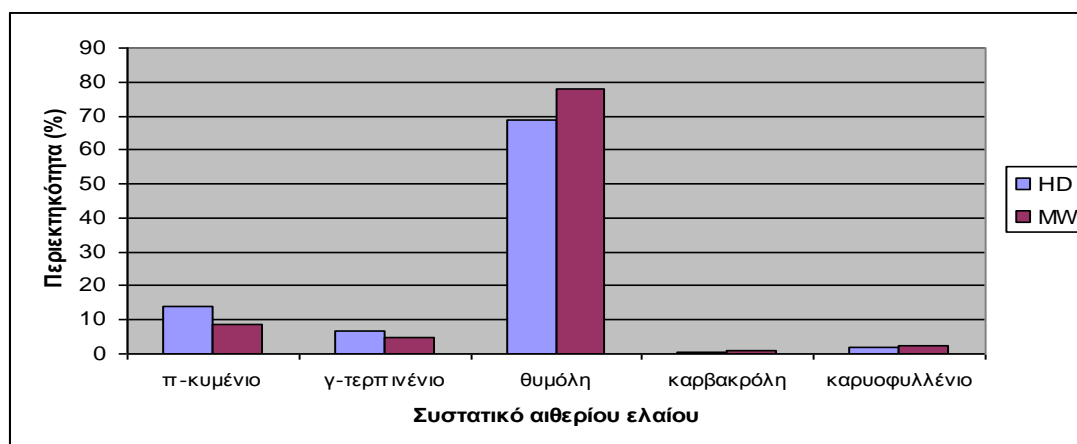
Α/Α	Συστατικό	Τρόπος θέρμανσης	
		Συμβατική (hd-1)	Μικροκύματα (mw-1)
1	4 υδρόξυ, 4 μεθύλ 2 πεντανόνη	0,9	0,8
2	1 οκτέν – 3 όλη	0,3	0,3
3	β μυρκένιο	0,6	0,2
4	α -τερπινένιο	-	0,2
5	π -κυμένιο	7,3	3,9
6	γ -τερπινένιο	2,6	1,1
7	μενθ-2-εν-1- όλη	-	0,4
8	μεθανικός εστέρας λιναλοόλης	0,1	0,3
9	Βορνεόλη	0,3	0,5
10	τερπινέν-4-όλη	0,6	0,6
11	1-ισοπροπύλ-2-μεθόξυ-4-μεθύλ βενζόλιο	0,3	0,4
12	Θυμόλη	3,5	3,4
13	καρβακρόλη	80,7	86,1
14	καρνοφυλλένιο	1,0	0,9
15	α καρνοφυλλένιο	0,1	0,1
16	β μπισαμπολένιο	0,4	0,4
17	οξείδιο του καρνοφυλλενίου	0,3	0,3
	Σύνολο	99,0	100,0



Σχήμα 16 Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου της ρίγανης.

Πίνακας 8 Σύσταση αιθερίου ελαίου θυμαριού όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)

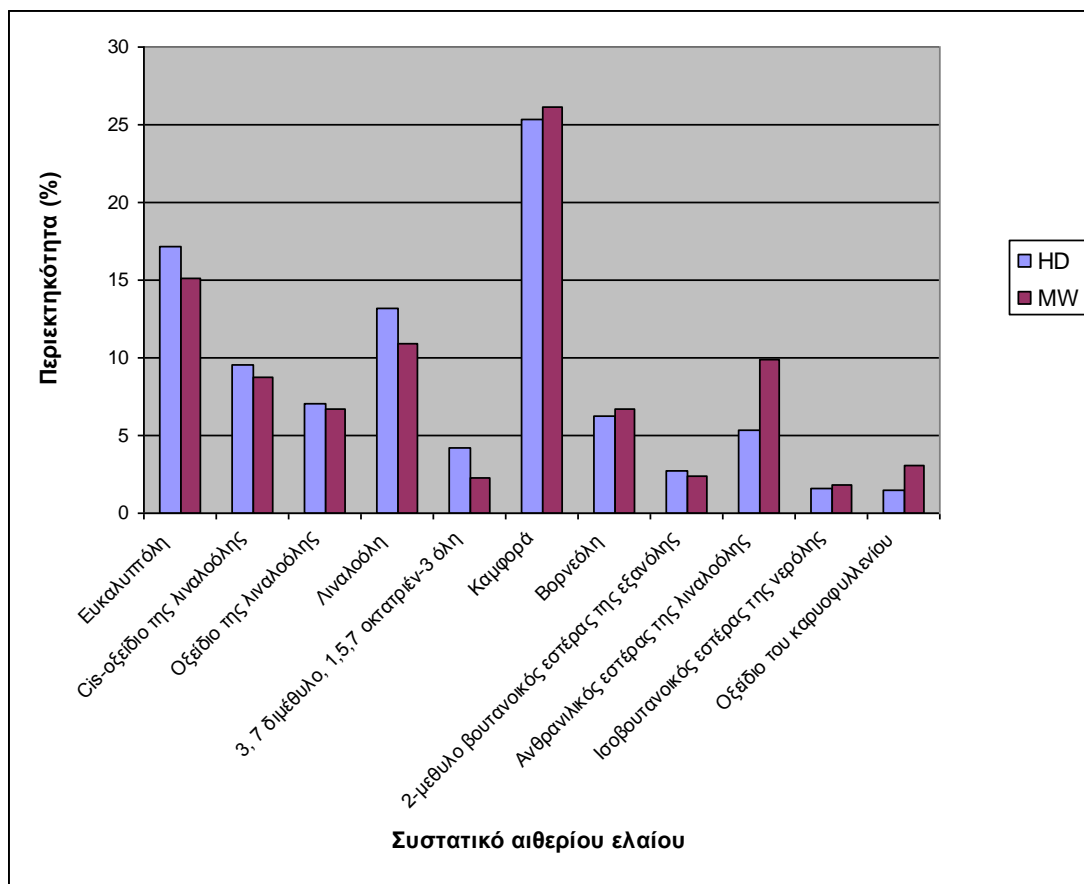
Α/Α	Συστατικό	Τρόπος θέρμανσης	
		Συμβατική (hd -2)	Μικροκύματα (mw-2)
1	4 υδρόξυ 4 μεθύλο 2 πεντανόνη	0,6	0,8
2	αιθανόνη, 1-(2-φουρανιο)	0,2	
3	α-πινένιο	0,7	
4	1- οκτέν – 3 όλη	0,2	
5	β-μυρκένιο	1,7	0,9
6	(+)-2-καρένιο	1,3	0,7
7	π-κυμένιο	14,2	8,6
8	γ-τερπινένιο	6,8	4,6
9	λιναλοόλη	1,3	1,3
10	4-(μεθύλο-1-(1-μεθύλαιθύλο) , 3-κυκλοεξέν-1-όλη	0,5	0,5
11	θυμόλη	68,9	77,9
12	καρβακρόλη	0,7	1,1
13	καρυοφυλλένιο	2,1	2,4
14	1-(1,4-διμεθύλο-3-κυκλοεξέν-1), Αιθανόνη	0,1	0,2
15	(1,1-διμέθυλαιθύλο), 1,2 βενζένδιόλη		0,2
16	1-μέθυλο-4-(5-μέθυλο-1-μεθυλένο-4-εξενύλο), Κυκλοεξένιο	0,2	0,2
17	α καρυοφυλλένιο		0,1
18	οξείδιο του καρυοφυλλενίου	0,3	0,5
	Σύνολο	99,7	100



Σχήμα 17 Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου του θυμαριού

Πίνακας 9 Σύσταση αιθερίου ελαίου λεβάντας όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)

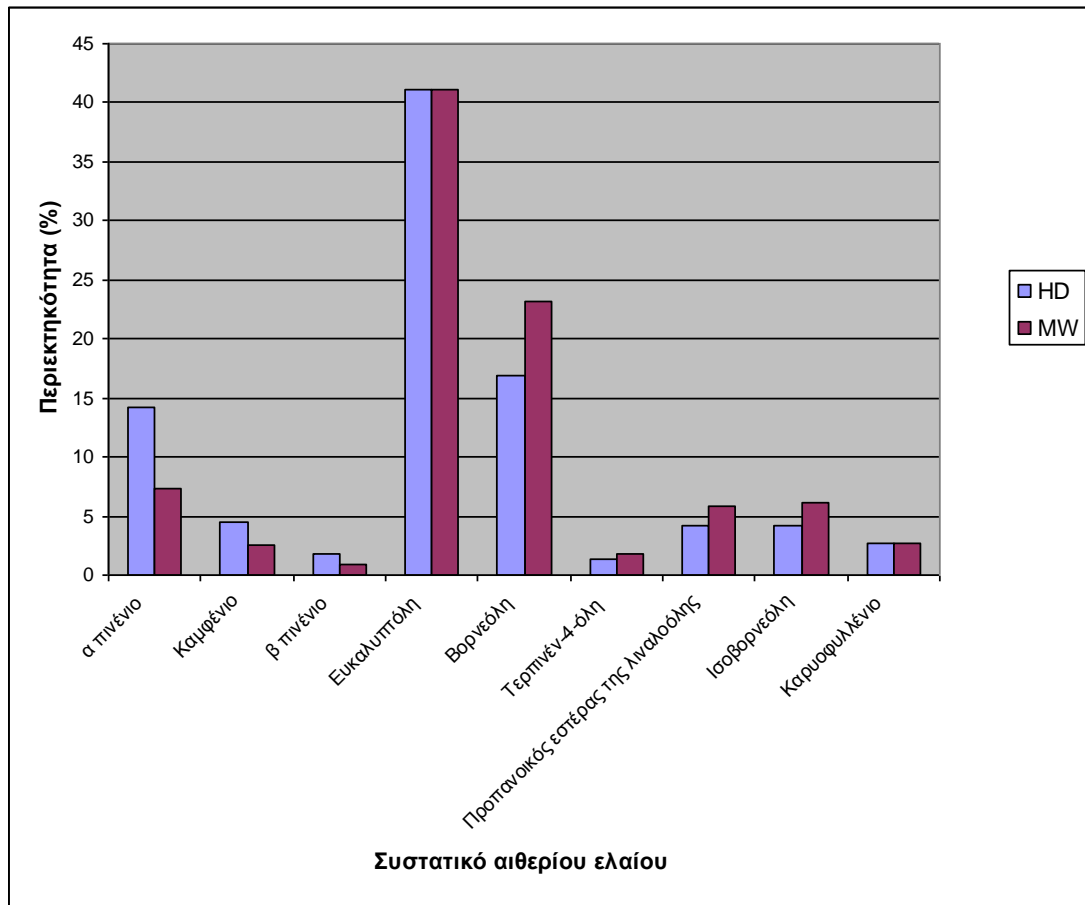
A/A	Συστατικό	Τρόπος θέρμανσης	
		Συμβατική (hd -3)	Μικροκύματα (mw-3)
1	2 πεντανόνη-4- υδρόξυ-4 μεθύλ	0,5	
2	ευκαλυπτόλη	17,1	15,1
3	Cis-οξείδιο της λιναλοόλης	9,5	8,7
4	Οξείδιο της λιναλοόλης	7,1	6,7
5	Λιναλοόλη	13,2	10,9
6	3, 7 διμέθυλο, 1,5,7 οκτατριέν-3 όλη	4,2	2,2
7	Καμφορά	25,4	26,2
8	3,4,4-τριμέθυλο κυκλοεξένιο	0,5	0,4
9	Βορνεόλη	6,2	6,7
10	Οξείδιο της λιναλοόλης	0,7	0,9
11	Απροσδιόριστο 1	1,0	1,3
12	Τερπινέν-4-όλη	0,6	0,6
13	2-(4-μεθυλο φαίνυλο) προπανόλη 2	0,4	0,4
14	2-μεθυλο βουτανικός εστέρας της εξανόλης	2,8	2,4
15	Απροσδιόριστο 2	0,3	0,4
16	Ισοβορνυλικός φορμιλεστέρας	0,6	0,3
17	Βαλερικός εστέρας της εξανόλης	0,2	-
18	Ανθρανιλικός εστέρας της λιναλοόλης	5,3	9,8
19	Ισοβουτανικός εστέρας της νερόλης	1,6	1,8
20	Απροσδιόριστο 3	0,3	
21	Οξικός εστέρας της λιναλοόλης	0,3	-
22	Απροσδιόριστο 4	0,6	0,5
23	Οξείδιο του καρυοφυλλενίου	1,4	3,1
	Σύνολο	99,7	98,4



Σχήμα 18 Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου της λεβάντας

Πίνακας 10 Σύσταση αιθερίου ελαίου δενδρολίβανου όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)

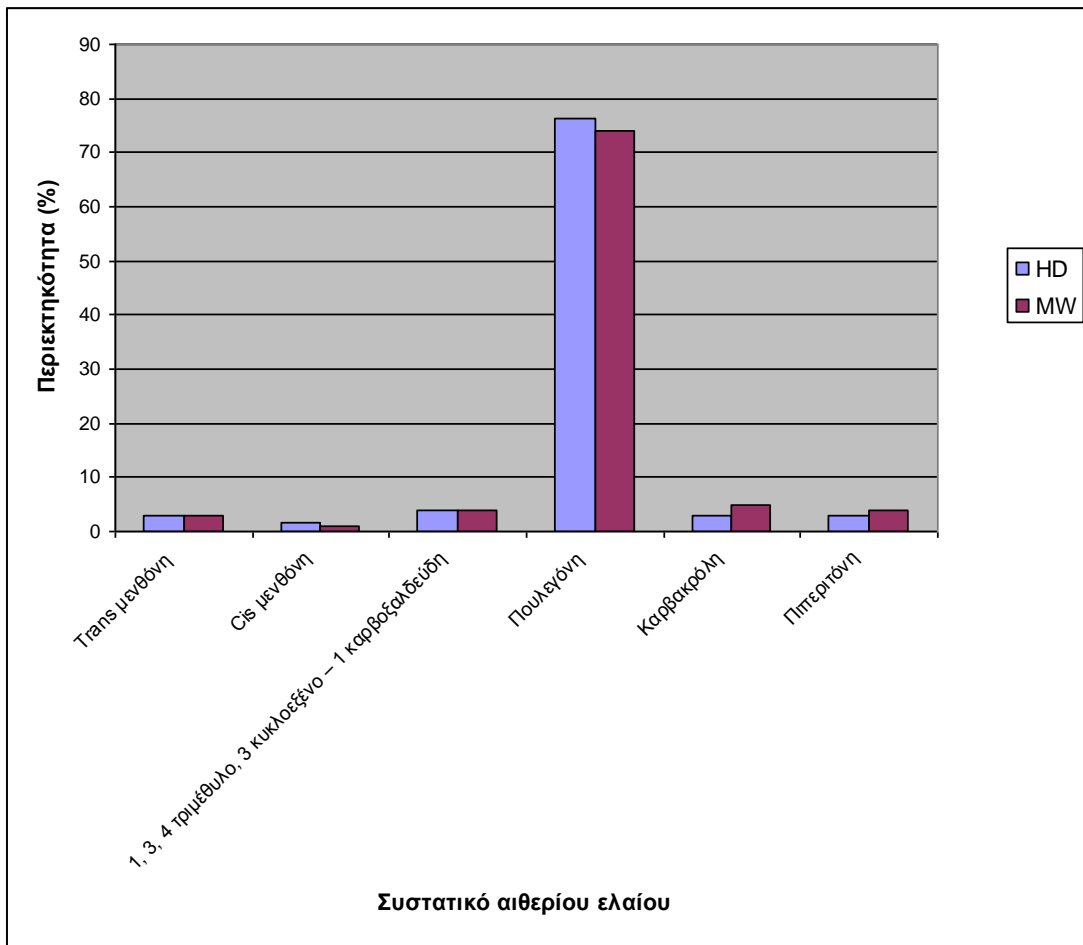
A/A	Συστατικό	Τρόπος θέρμανσης	
		Συμβατική (hd -4)	Μικροκύματα (mw-4)
1	α πινένιο	14,2	7,3
2	Καμφένιο	4,4	2,5
3	β πινένιο	1,7	0,9
4	1-οκτέν-3-όλη		0,2
5	β μυρκένιο	1,7	1,1
6	α φελανδρένιο	0,2	0,1
7	α -τερπινένιο	0,7	0,1
8	(+)-2-καρένιο		0,5
9	Ευκαλυπτόλη	41,1	41,1
10	Οκιμένιο	-	0,5
11	3-καρένιο	0,1	0,1
12	γ -τερπινένιο	0,9	0,8
13	Τερπινολένιο	0,3	0,3
14	Λιναλοόλη	0,7	0,9
15	Καμφορά	0,4	0,4
16	Βορνεόλη	16,9	23,2
17	Τερπινέν-4-όλη	1,4	1,8
18	Προπανοικός εστέρας της λιναλοόλης	4,2	5,8
19	Ισοβορνεόλη	4,2	6,1
20	Θυμόλη	0,2	0,2
21	Καρβακρόλη	1,4	1,2
22	Οξικός εστέρας της εξο-2-υδροξυκινεόλης	0,1	0,1
23	Μεθύλ ευγενόλη	0,7	0,1
24	Καρυοφυλλένιο	2,7	2,7
25	Γερανιόλη	0,1	0,1
26	α καρυοφυλλένιο	0,1	0,1
27	β βισαβολένιο	0,1	0,1
28	Οξείδιο του καρυοφυλλενίου	0,2	0,2
29	Γιασμινικός εστέρας της μεθανόλης	0,1	0,1
30	α βισαβολόλη	0,2	0,1
	Σύνολο	98,0	98,5



Σχήμα 19 Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου του δενδρολίβανου

Πίνακας 11 Σύσταση αιθερίου ελαίου δενδρολίβανου όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)

A/A	Συστατικό	Τρόπος θέρμανσης	
		Συμβατική (hd -5)	Μικροκύματα (mw-5)
1		1,0	-
2	α-τερπινένιο	0,5	0,4
3	οξικός εστέρας της ισοπροπανόλης	1,3	0,7
4	trans μενθόνη	2,8	3,0
5	cis μενθόνη	1,6	1,1
6	1, 3, 4 τριμέθυλο, 3 κυκλοεξένο – 1 καρβοξαλδεύδη	4,0	4,0
7	απροσδιόριστο 1	0,3	1,3
8	πουλεγόνη	76,2	74,1
9	pyrimidine 6-oxo-5-acetyl-4-hydroxy-1,6-dihydro	0,9	0,8
10	απροσδιόριστο 2	0,4	0,2
11	καρβακρόλη	2,9	4,9
12	απροσδιόριστο 3	0,2	0,3
13	πιπεριτόνη	2,9	3,8
14	απροσδιόριστο 4	0,5	1,3
15	2, 6, 6 τριμέθυλο, 2-κυκλοπεντέ -1-όνη	0,3	0,5
16	ανιθόλη	0,3	0,5
17	πιπεριτόνη	0,4	0,5
18	οξείδιο του καρυοφυλλενίου	-	0,3
19	εποξείδιο του χουμουλενίου	0,2	0,3
20	6, 10, 14 τριμέθυλο δεκαπέντανόνη-2	0,2	0,4
	Σύνολο	96,9	98,4



Σχήμα 20 Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου του φλυσκουνιού

Από ότι φαίνεται από τα δεδομένα των πινάκων πως υπάρχουν διαφορές στην χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων που παραλαμβάνονται με μόνη αλλαγή τον τρόπο προσφοράς της θερμότητας στο σύστημα. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να παρατηρηθεί πολύ μεγάλη διαφορά στην % σύσταση σε κάποια συστατικά όπως για παράδειγμα το α-πινένιο στο δενδρολίβανο (14% στην απλή θέρμανση, 7% στα μικροκύματα), το π-κυμένιο στην ρίγανη και το θυμάρι (7,3 % έναντι 3,9 % και 14,1 % έναντι 8,6 %, αντίστοιχα) , όπου στην παραλαβή με μικροκύματα το ποσοστό του είναι περίπου το μισό από αυτό της απλής θέρμανσης και τέλος τα ποσοστά της θυμόλης και της καρβακρόλης στα ίδια φυτά που αποτελούν τις κύριες ενώσεις και εμφανίζονται αυξημένα κατά σχεδόν 6% στην παραλαβή με μικροκύματα (80,1% έναντι 86 % για την καρβακρόλη στην ρίγανη, και 68,9% έναντι 77,9% για την θυμόλη στο θυμάρι).

Μια πρώτη πιθανή εξήγηση, με βάση και τα προηγούμενα είναι πως τα ποσοστά αυτά εμφανίζονται υπερτιμημένα για τους ίδιους λόγους που προκαλούν και την διαφοροποίηση

στα ποσά του αιθερίου ελαίου που παρατηρείται μεταξύ των μεθόδων. Έτσι θα ήταν δυνατό κατά την απόσταξη με μικροκύματα οι πιο πτητικές ουσίες να μην καταφέρνουν να συμπυκνωθούν αποτελεσματικά και ως εκ τούτου τα ποσοστά τους να εμφανίζονται κατά τι μειωμένα έναντι των λιγότερο πτητικών. Πραγματικά, οι ουσίες που εμφανίζονται μειούμενες (αυξανόμενες) είναι αυτές με άπολο (πολικό) χαρακτήρα γεγονός που θα μπορούσε να αιτιολογεί την διαφορά στο σημείο ζέσεως και να υποστηρίξει την παραπάνω υπόθεση.

Μια άλλη υπόθεση είναι πως κατά την απόσταξη με μικροκύματα το μεγάλο ποσό των ατμών που συμπυκνώνεται προκαλεί την διασπορά του αιθερίου ελαίου στο γαλάκτωμα που σχηματίζεται στο διαβαθμισμένο τμήμα της συσκευής clevenger, όπου κάποια συστατικά του παραμένουν εκλεκτικά διαλυμένα. Η υπόθεση αυτή αν και δεν αποκλείεται, είναι μάλλον απίθανη καθώς λογικά πιο ευδιάλυτες στο νερό θα έπρεπε να είναι οι ουσίες με πολικό χαρακτήρα (π.χ. αλκοόλες) των οποίων τα ποσοστά θα έπρεπε να μειώνονται σχετικά πράγμα που δεν επιβεβαιώνεται από τις παρατηρήσεις.

Η περίπτωση χημικής μεταβολής μέσω αντιδράσεων όπου συστατικά του αιθερίου ελαίου μετατρέπονται σε άλλα ή πρόδρομες μεταβολικές ενώσεις δίνουν υπό τις συνθήκες που επικρατούν κατά την απόσταξη (θερμοκρασία βρασμού και ελαφρώς όξινο περιβάλλον), τις ουσίες που αργότερα εμφανίζονται αυξημένες, δεν έχει μελετηθεί από την βιβλιογραφία για τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Παρόλα αυτά υπάρχουν αναφορές για μεταβολίτες που υπάρχουν σε άλλα φυτικά είδη με την περίπτωση του σκόρδου να είναι χαρακτηριστική και η οποία απετέλεσε ξεχωριστό πειραματικό.

Αν υποθεθεί λοιπόν, α) πως η πραγματική σύσταση του αιθερίου ελαίου δεν μπορεί να προσδιοριστεί αδιαμφισβήτητα και β) πως συστατικά του αιθερίου ελαίου δεν μπορεί να παράγονται σε χρόνο και συνθήκες που επικρατούν κατά την απόσταξη μελετούμε την χαρακτηριστική περίπτωση του αιθερίου ελαίου της ρίγανης.

Η ανάλυση του αιθερίου ελαίου δίνει ποσοστά π-κυμενίου 7,3 και 3,9% και καρβακρόλης 80,7 και 86,0% αντίστοιχα για την απλή θέρμανση και θέρμανση με μικροκύματα αντίστοιχα. Σημειώνεται πως και στις δύο περιπτώσεις παρελήφθη η ίδια ποσότητα αιθερίου ελαίου.

Είναι δυνατό η αύξηση του ποσοστού της καρβακρόλης και η αντίστοιχη μείωση του ποσοστού του π-κυμενίου να μπορούν να εξηγηθούν αν λάβουμε υπόψη την πολύ διαφορετική πολικότητα των δύο ουσιών. Έτσι, η καρβακρόλη με ένα πολύ πολικό άκρο στο υδροξύλιο έχει και ανάλογα υψηλότερο σημείο ζέσεως. Συγκεκριμένα η καρβακρόλη έχει σημείο ζέσεως 237,7°C έναντι 177°C του π-κυμενίου. Σε αντίθεση το π-κυμένιο ελλείπει πολωμένου δεσμού παρουσιάζει και σχετικά άπολο χαρακτήρα στο σύνολό του. Άρα, η αύξηση του ποσοστού της καρβακρόλης άρα μπορεί να αποδοθεί στην πιο αποτελεσματική

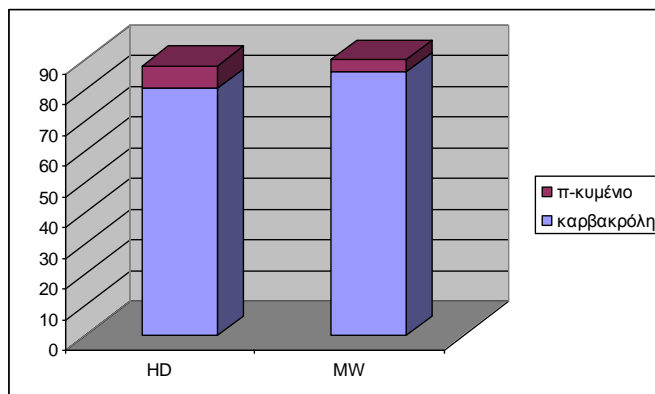
απόσταξή της από τα μικροκύματα. Στην περίπτωση αυτή συνειρμικά, μπορούμε να δεχθούμε δύο συνεπαγωγές: α) το ποσοστό της καρβακρόλης που προσδιορίζεται με την απλή απόσταξη είναι σταθερά υποτιμημένο έναντι του πραγματικού περιεχομένου του φυτικού υλικού, και β) αντίστοιχα υποτιμημένο είναι και το ποσοστό του π-κυμενίου στην απόσταξη με μικροκύματα αφού οι δύο ουσίες αθροίζουν μεταξύ τους σχεδόν ίδια ποσοστά (88 και 89,9%).



Καρβακρόλη

π-κυμενιο

Σχήμα 21 Συντακτικοί τύποι καρβακρόλης - π-κυμενίου



Σχήμα 22 Σχηματική απεικόνιση ποσοστών καρβακρόλης – π-κυμενίου στο αιθέριο έλαιο της ρίγανης με απόσταξη με συμβατική θέρμανση και μικροκύματα.

Μια εξήγηση του φαινομένου μπορεί να προκύψει και από την θεωρία λειτουργίας των μικροκυμάτων. Οι δύο ουσίες διαφέρουν σημαντικά λόγω της διαφοράς της πολικότητάς τους και στο μέτρο της διηλεκτρικής σταθεράς τους. Κατά συνέπεια διαφέρουν και στον τρόπο και την αποτελεσματικότητα αλληλεπίδρασής τους με τα μικροκύματα. Η καρβακρόλη απορροφά ενέργεια από τα μικροκύματα γρήγορα με αποτέλεσμα να αυξάνεται γρήγορα η θερμοκρασία της και να αποστάζει. Το π-κυμένιο δεν απορροφά ενέργεια από το πεδίο και κατά συνέπεια για να αποστάξει πρέπει επαγωγικά να απορροφήσει ενέργεια (θερμότητα) από το περιβάλλον προκειμένου να αποστάξει. Στην περίπτωση της απλής θέρμανσης και οι δύο ουσίες απορροφούν επαγωγικά θερμότητα από το περιβάλλον. Το δεύτερο γεγονός σε συνάρτηση με τον μεγάλο χρόνο έκθεσης σε μεγάλες θερμοκρασίες δίνει την ευκαιρία στο π-κυμένιο να αποστάζει πιο αποτελεσματικά στην περίπτωση της απλής θέρμανσης.

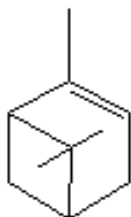
Άλλωστε, κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου των μικροκυμάτων αποτελεί ο μικρός χρόνος εφαρμογής της.

Καταλήγοντας δύο παρατηρήσεις αξίζει να γίνουν:

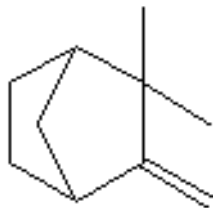
α) η διαφοροποίηση που προκύπτει από τις δύο μεθόδους μας δίνει ένα εύκολο τρόπο να παραλλάσσουμε το δείγμα του αιθερίου ελαίου από το ίδιο φυτό προκειμένου να προχωρήσουμε σε δοκιμές βιο-δραστηκότητας ή άλλες. Ο φαινόμενος εμπλουτισμός σε π.χ. καρβακρόλη ενός δείγματος που παρουσιάστηκε μπορεί να φανεί χρήσιμος όχι μόνο σε ερευνητικές αλλά και εμπορικές εφαρμογές της μεθόδου.

β) οι παραπάνω υποθέσεις δεν αφορούν αποκλειστικά δείγματα συμπεριφοράς των συγκεκριμένων ουσιών αλλά γενικότερα υποδεικνύουν ομαδοποίηση με βάση την πολικότητα των συστατικών των αιθερίων ελαίων και την αναμενόμενη συμπεριφορά τους. Στον πίνακα 14 φαίνονται οι συντακτικοί τύποι των συστατικών που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στα υπό εξέταση αιθέρια έλαια. Τα δεκαπέντε συστατικά των οποίων οι συντακτικοί τύποι απεικονίζονται μπορούν να διαχωριστούν με βάση την στοιχειομετρική τους σύσταση. Έτσι, έξι από αυτά είναι υδρογονάνθρακες, και στα υπόλοιπα εννέα περιέχονται δύο φαινόλες, τέσσερις αλκοόλες, δύο εποξειδία και μία κετόνη. Και οι έξι υδρογονάνθρακες που απεικονίζονται απαντούν στα αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν και μάλιστα με την εφαρμογή των μικροκυμάτων η συγκέντρωσή τους παρουσιάζεται μειωμένη.

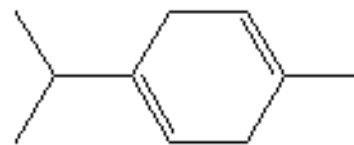
Πίνακας 12 Συντακτικοί τύποι συστατικών αιθερίων ελαίων



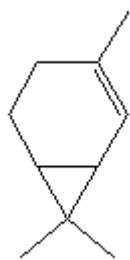
α-πινένιο



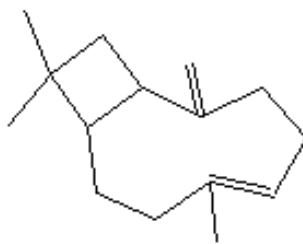
καμφένιο



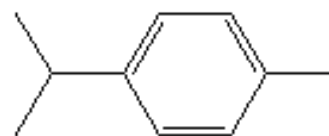
γ-τερπινένιο



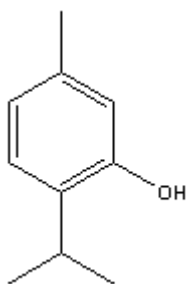
(+)-2-καρένιο



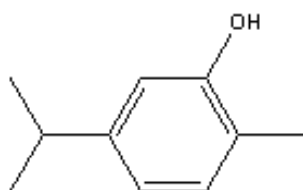
καροφυλλένιο



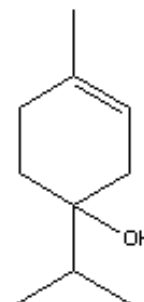
π-κυμένιο



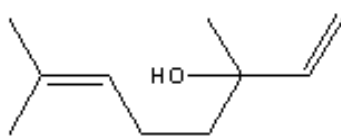
Θυμόλη



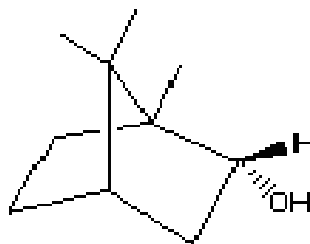
καρβακρόλη



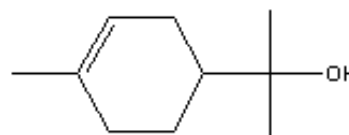
τερπινέν-4-όλη



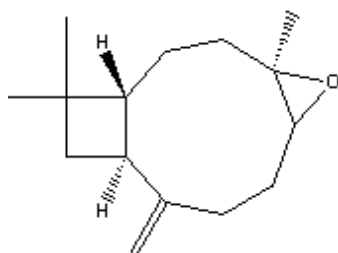
Λιναλοόλη



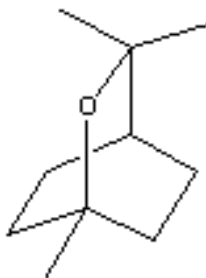
βορνεόλη



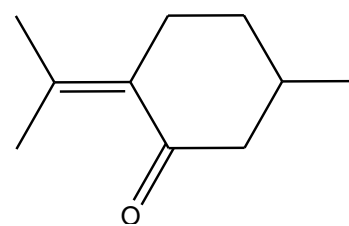
α-τερπινεδόλη



Οξείδιο του κροφυλλενίου



ευκαλυπτόλη



πουλεγόνη

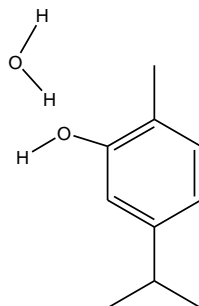
Οι ουσίες που έχουν μια χαρακτηριστική ομάδα που τους προσδίδει πολικό χαρακτήρα θα πρέπει σύμφωνα με την απλή ομαδοποίηση σαν πολικές και άπολες να παρουσιάζονται σταθερά σε μεγαλύτερα ποσοστά στην μέθοδο με τα μικροκύματα. Όπως φαίνεται αυτό δεν συμβαίνει πράγμα που μας αναγκάζει να καταλήξουμε σε διαφορετική ομαδοποίηση.

Μια λογική εξήγηση που θα δικαιολογούσε την συμπεριφορά των παραπάνω ουσιών με τη παρατηρούμενη συμπεριφορά τους είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μπορεί να εξηγήσει την συμπεριφορά των συστατικών των αιθερίων ελαίων ως εξής: ουσίες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μπορεί να εμφανίσουν αυξημένα ποσοστά στην μέθοδο των μικροκυμάτων με δύο τρόπους. Πρώτον, μπορεί η απόσταξή τους να μην γίνεται πλήρως κατά την απλή θέρμανση λόγω ακριβώς αυτών των δεσμών υδρογόνου που εμποδίζουν την ποσοτική παραλαβή τους. Αντίστοιχα, είναι δεδομένο ότι τα μικροκύματα πρέπει να καταστρέφουν το δεσμό υδρογόνου αφού εξαναγκάζουν τα μόρια του νερού σε έντονη περιστροφή, αποδεσμεύοντας με τον τρόπο αυτό τα μόρια που κατά την συμβατική θέρμανση θα εμποδίζονταν να αποστάξουν.

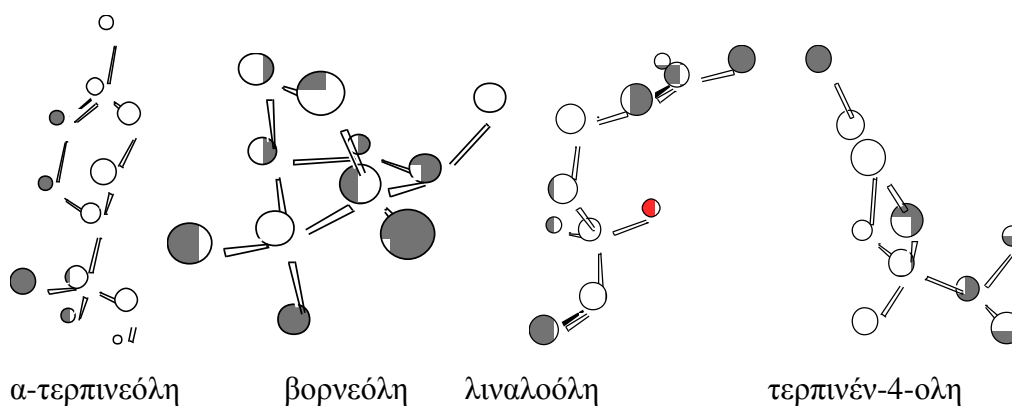
Δεύτερον, είναι δυνατόν να μην σπάνε οι εν λόγω δεσμοί αλλά να παραμένουν σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα νερού-μορίου το οποίο ενώ έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος και μεγαλύτερο σημείο ζέσεως και δεν αποστάζει με την απλή θέρμανση, έχει ταυτόχρονα μεγαλύτερη διηλεκτρική σταθερά και παραλαμβάνεται ποσοτικά υπό την επίδραση των μικροκυμάτων. Οι δύο αυτές υποθέσεις δεν αλληλοαναιρούνται αλλά το πιο πιθανό είναι να συμβαίνουν ταυτόχρονα, θα μπορούσαμε μάλιστα να υποθέσουμε πως η δεύτερη μάλλον θα συμβαίνει κατά τα πρώτα λεπτά της απόσταξης, ενώ υπό την επίδραση των μικροκυμάτων κατά την πρόοδο της απόσταξης σπάνε και οι δεσμοί υδρογόνου που προϋποθέτει η πρώτη υπόθεση.

Για τα παραπάνω δεκαπέντε συστατικά των αιθερίων ελαίων μπορούμε να ελέγξουμε την υπόθεση ότι η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων αυτών και του νερού επηρεάζει την ποσοτική παραλαβή τους κατά την διάρκεια της απόσταξης, με αποτέλεσμα οι ενώσεις που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου να εμφανίζουν μειωμένα ποσοστά στην απλή απόσταξη και αυξημένα στην απόσταξη με μικροκύματα.

Οι έξι υδρογονάνθρακες δεν μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου και κατ'επέκταση επιβεβαιώνουν την υπόθεσή μας. Η καρβακρόλη και η θυμόλη σχηματίζουν πολύ ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με το νερό χάρη στο υδροξύλιο που βρίσκεται πάνω στον αρωματικό δακτύλιο.



Οι τέσσερις αλκοόλες παρουσιάζουν διαφοροποίηση της συμπεριφοράς τους. Οι μεν βορνεόλη και α-τερπινεόλη παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση στην μέθοδο των μικροκυμάτων ενώ αντίθετα οι τερπινέν-4-ολη και η λιναλοόλη παρουσιάζονται σταθερές ή μειωμένες.

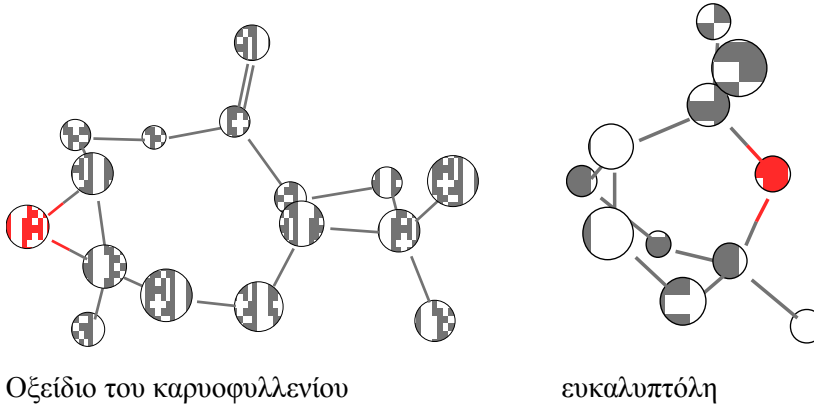


Σχήμα 23 Στερεοχημικές απεικονίσεις α-τερπινεόλης, βορνεόλης, λιναλοόλης και τερπινέν-4-όλης

Για να δικαιολογηθεί η συμπεριφορά των αλκοολών αυτών μπορούμε μόνο να επικαλεστούμε την στερεοχημική παρεμπόδιση του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Για το λόγο αυτό δίνονται στο Σχήμα οι τρισδιάστατες δομές τους μετά από ελαχιστοποίηση της ενέργειάς τους με το κατάλληλο λογισμικό. Πάντως πρέπει να σημειωθεί ότι ο υπολογισμός της ελάχιστης ενέργειας έγινε στο κενό και όχι σε ισχυρά πολικό περιβάλλον όπως το νερό και κατά συνέπεια μόνο κατά προσέγγιση μπορεί να γίνουν δεκτές οι δομές αυτές.

Για την πουλεγόνη όπου είναι αναμενόμενο να σχηματίζονται ισχυροί δεσμοί υδρογόνου, μπορεί να αποδοθεί η μείωση του ποσοστού της στα μικροκύματα στην αποδυνάμωση του πολικού χαρακτήρα του οξυγόνου λόγω του συζυγιακού φαινομένου μεταξύ του διπλού δεσμού του δακτυλίου και του καρβονυλίου.

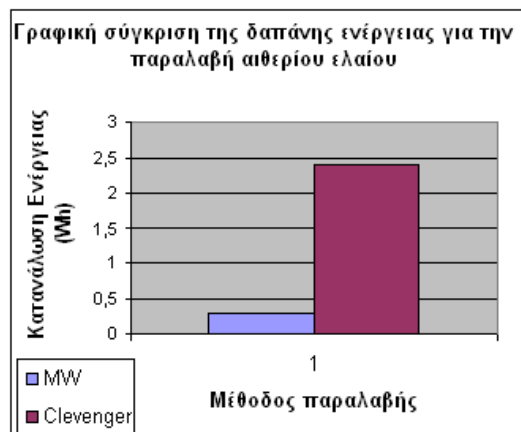
Για τις τελευταίες δύο ενώσεις που αποτελούν το οξείδιο του καρνοφυλλενίου και την ευκαλυπτόλη και πάλι η θέση του οξυγόνου πάνω στο μόριο που τις καθιστά εποξειδία ενισχύει τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το νερό. Το άτομο του οξυγόνου στην θέση αυτή έχει ισχυρά πολικό χαρακτήρα και αυτό εξηγεί το αυξημένο ποσοστό τους στην παραλαβή με μικροκύματα.



Σχήμα 24 Στερεοχημικές απεικονίσεις των παραπάνω μορίων μετα των υπολογισμό της διάταξης ελάχιστης ενέργειας

γ) Διάρκεια παραλαβής και ενεργειακή δαπάνη

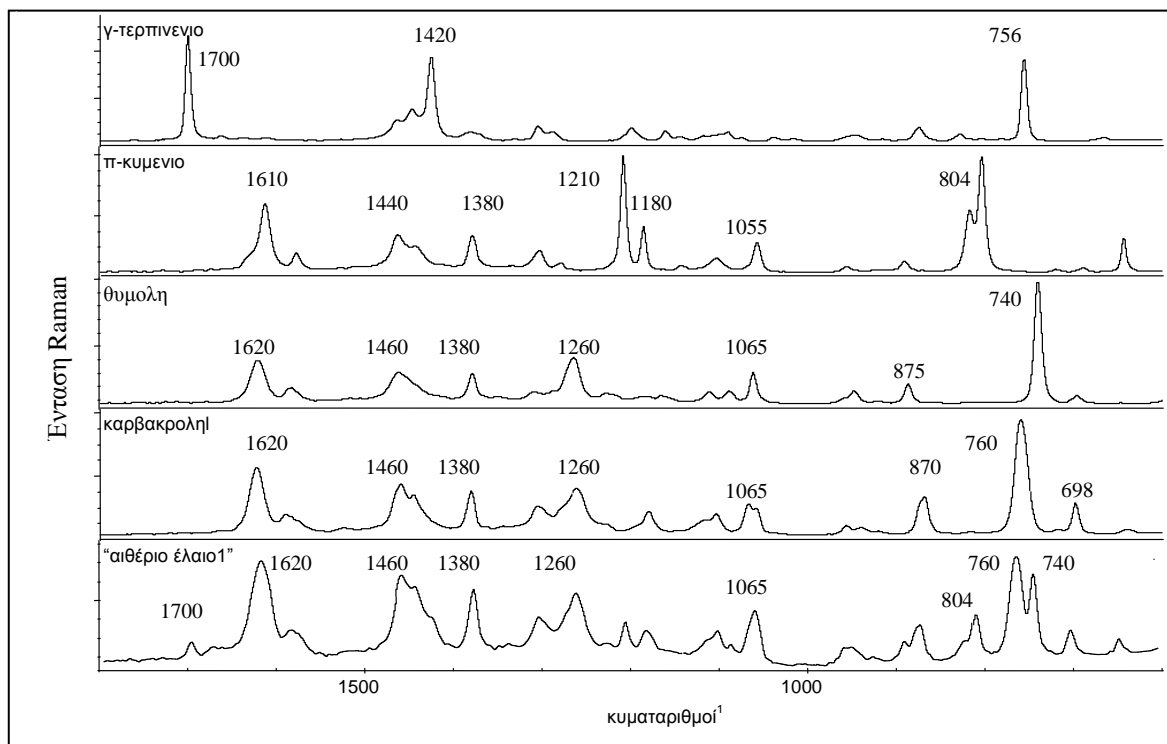
Η διαδικασία που ακολουθείται στην περίπτωση θέρμανσης με μικροκύματα είναι η ίδια με αυτή της συμβατικής θέρμανσης ενώ συγκριτικά η πρώτη υπερέχει σε χρόνο κατεργασίας όπου υπερέχει με 40 min έναντι 4h. Ενεργειακά επίσης μπορεί να συγκριθεί, καθώς το απαιτούμενο ποσό ηλεκτρικής ενέργειας λειτουργίας μιας ηλεκτρικής αντίστασης 1000Watt για 4 ώρες, όπως οι συνήθεις θερμομανδύες, είναι προφανώς κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή μιας συσκευής 700 Watt επί 40 λεπτά. Έχει μάλιστα επιχειρηθεί από τη βιβλιογραφία σύγκριση σε όρους εκπομπής διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα (Viro, Tomao, Colnagui, Visinoni & Chemat, 2007).



Σχήμα 25 Γραφική απεικόνιση της εξοικονόμησης ενέργειας με την χρήση μικροκυμάτων (Viro et al. 2007)

5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των κυρίων συστατικών αιθερίου ελαίου ρίγανης και θυμαριού με φασματοσκοπία FT-Raman

Η φασματοσκοπικές μέθοδοι έχουν αποδείξει την χρησιμότητά τους για την ποιοτική ανάλυση. Προκειμένου να επιδειχθεί η ικανότητά τους για τον ποσοτικό προσδιορισμό, χρειάζεται μια μέθοδος αναφοράς. Η μέθοδος αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό των συστατικών των αιθερίων ελαίων και στη συνέχεια η αέρια χρωματογραφία με ανίχνευση ιονισμού φλόγας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επί μέρους συστατικών, χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό.



Σχήμα 26 Φάσματα FT-Raman προτύπων ουσιών και ενός αιθερίου ελαίου (Δείγμα sΙρίγανης)όπως καταγράφηκαν κατά το πειραματικό

Συνολικά οι κορυφές των φασμάτων και οι αποδόσεις τους παρουσιάζονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 13 Αποδόσεις των κορυφών του φάσματος FT-Raman σε όλα τα δείγματα αιθερίων ελαίων και τα συνθετικά μίγματα γνωστής συγκέντρωσης

Θέση κορυφής	Απόδοση	Ένταση	γ-τερπινένιο	π-κυμένιο	θυμόλη	καρβακρόλη
1700	Τάση μη συζυγιακών C=C	<i>s</i>	+	-	-	-
1620-1590	Τάση συζυγιακών C=C	<i>s</i>	-	+	+	+
1460-1440	Συμμετρική κάμψη των μεθυλίων της ισοπροπυλομάδας	<i>ms</i>	+	+	+	+
1380	Ασύμετρη κάμψη των μεθυλίων της ισοπροπυλομάδας	<i>ms</i>	+	+	+	+
1260-1180	Τάση του φαινολικού πυρήνα	<i>w</i>	-	+	+	+
1080-1110	Τάση C-O	<i>w</i>	-	-	+	+
1060	$\delta_{(C-H)}$ Αρωματικών	<i>ms</i>	-	+	+	+
880	$\gamma_{(C-H)}$	<i>w, ms</i>	+	+	+	+
740-804	Ανασασμός (παραμόρφωση δακτυλίου)	<i>vs</i>	+	+	+	+

**w*: ασθενής, *ms*: μέτρια ισχυρή, *s*: ισχυρή; *v*: μεταβλητή, *vs*: πολύ ισχυρή

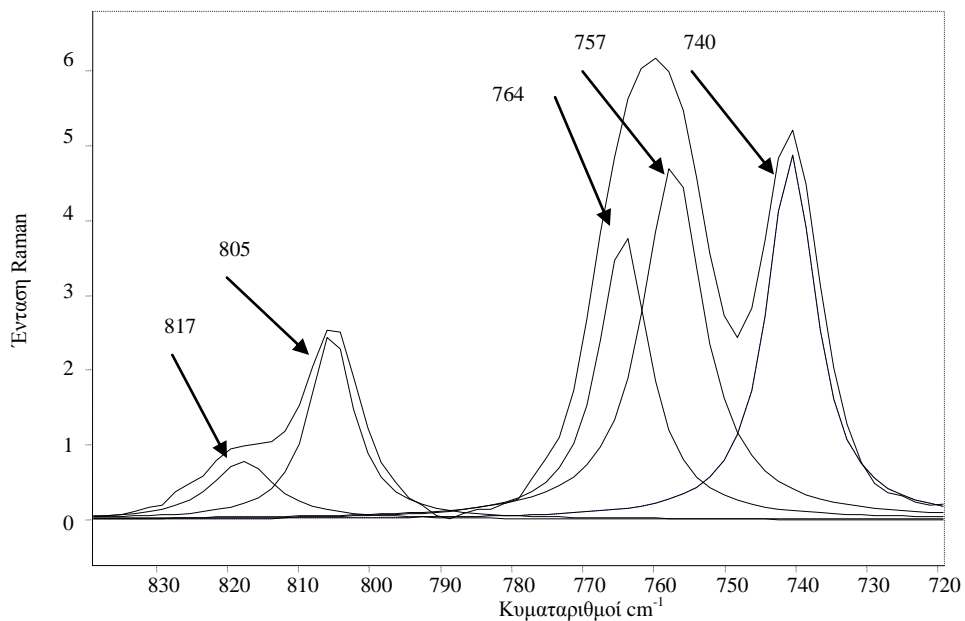
Ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τεσσάρων κυρίων συστατικών σε αιθέριο έλαιο ρίγανης και θυμαριού

Τα φάσματα FT-Raman υπερτερούν για τον ποσοτικό προσδιορισμό έναντι των αντιστοίχων φασμάτων FT-IR αφ' ενός λόγω της απλότητας τους καθώς περιέχουν πολύ λιγότερες κορυφές, και αφ' ετέρου λόγω των ψηλότερων και λεπτότερων κορυφών τους. Το μικρό πλήθος των κορυφών κάνει πιο εύκολο τον εντοπισμό των χαρακτηριστικών κορυφών που θα χρησιμοποιηθούν για τον ποσοτικό προσδιορισμό, ενώ συγχρόνως μειώνεται και η πιθανότητα στο φυσικό αιθέριο έλαιο να υπάρχουν ενώσεις με σημαντική αλληλοεπικάλυψη στο φάσμα Raman με τις ενώσεις που ποσοτικοποιούνται. Το μεγάλο ύψος των κορυφών μειώνει την επίδραση του θορύβου και ελαχιστοποιούνται τα σφάλματα στην γραμμικότητα των εξισώσεων ποσοτικού προσδιορισμού.

Χαρακτηριστικές κορυφές για ποσοτικό προσδιορισμό επιλέχθηκαν με βάση την αντιπροσωπευτικότητά τους και την έντασή τους ώστε να μπορούν να μετρηθούν και όταν το

συστατικό βρίσκεται σε μικρές ποσότητες. Έτσι, για το γ -τερπινένιο επιλέχθηκε η κορυφή στα 1701 cm^{-1} , καθώς είναι αντιπροσωπευτική της παρουσίας του συστατικού αυτού στο δείγμα μας. Το π -κυμένιο έχει αντίστοιχα μια κορυφή στα 804 cm^{-1} , ενώ οι χαρακτηριστικές κορυφές της θυμόλης στα 740 cm^{-1} και της καρβακρόλης στα 760 cm^{-1} μαζί με την κορυφή του γ -τερπινενίου στα 756 cm^{-1} αλληλεπικαλύπτονται με τρόπο που απαγορεύει την απευθείας ποσοτικοποίηση τους με την μέτρηση των υψών των εντάσεων και αντιστοίχησή τους με τα ποσοστά αφθονίας στα μίγματα γνωστής συγκέντρωσης που χρησιμοποιούνται για την βαθμονόμηση.

Το αποτέλεσμα της αποσυνέλιξης για το «αιθέριο έλαιο 1» από τα 720 ως τα 840 cm^{-1} παρουσιάζεται στο Σχήμα 32.



Σχήμα 27 Αποσυνελεγμένη περιοχή φάσματος του «αιθέρου ελαίου 1» από τα $720 - 840\text{ cm}^{-1}$.

Τα ύψη των αποσυνελεγμένων κορυφών παρουσιάζουν γραμμική συσχέτιση με τα ποσοστά στα οποία βρίσκονται μέσα στα πρότυπα δείγματα. Με την χρήση της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων για τον προσδιορισμό της γραμμικής συσχέτισης της έντασης της κορυφής του φάσματος και της περιεκτικότητας του αιθέρου ελαίου στο αντίστοιχο συστατικό παράγονται οι γραμμικές εξισώσεις πρώτου βαθμού για τον προσδιορισμό των ενδιάμεσων καταστάσεων. Οι εξισώσεις με τον αντίστοιχο συντελεστή r για $n = 3$ και όπου A το ύψος της αντίστοιχης κάθε φορά κορυφής.

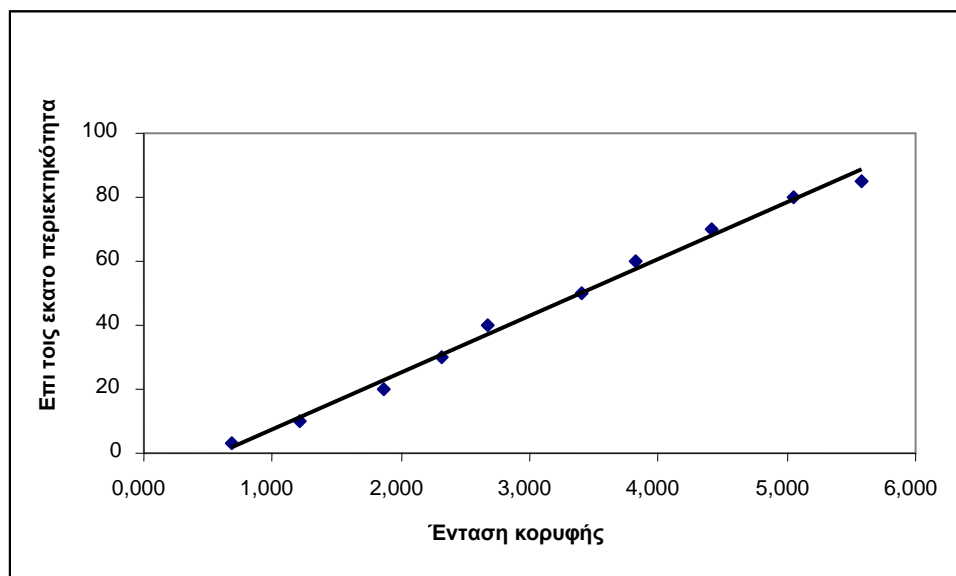
$$\pi\text{-κυμένιο (\%)} = (0.97 \pm 0.72) + (6.24 \pm 0.55) * A; r = 0.94, n = 3,$$

$$\gamma\text{-τερπινένιο (\%)} = (-0.18 \pm 0.33) + (6.31 \pm 0.19) * A; r = 0.99, n = 3,$$

$$\text{θυμόλη (\%)} = (3.34 \pm 0.85) + (5.31 \pm 0.11) * A; r = 0.99; n = 3,$$

$$\text{καρβακρόλη (\%)} = (-10.18 \pm 1.66) + (17.71 \pm 0.48) * A; r = 0.99; n = 3,$$

Η αποτύπωση των παραπάνω εξισώσεων σε καρτεσιανό επίπεδο συντεταγμένων παράγει την καμπύλη αναφοράς που είναι ένας ενδεικτικός τρόπος απεικόνισης της γραμμικής συσχέτισης. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς για την καρβακρόλη στο Σχήμα 33.



Σχήμα 28 Καμπύλη αναφοράς καρβακρόλης

Αποτελέσματα και συζήτηση

Ο χαρακτηρισμός και η φασματοσκοπική ανάλυση συστατικών αιθερίων ελαίων με μεθόδους FT-IR και FT-Raman έχουν δημοσιευθεί σε διάφορες περιπτώσεις (Daferera, Tarantilis, & Polissiou, 2002, Pappas, Tarantilis & Polissiou, 1998, Daferera, Pappas, Tarantilis & Polissiou, 2002, Schultz, Baranska, Belz, Rsch, Strehle & Popp 2004) με σκοπό την ποιοτική διαφοροποίηση. Φάσματα Raman των κυρίαρχων συστατικών παρουσιάζονται παραπάνω (Σχήμα 31).

Σε κάθε φάσμα διακρίνονται τέσσερις περιοχές που μπορούν να αναλυθούν από τα 1800 cm^{-1} ως τα 600 cm^{-1} . Συγκεκριμένα, η περιοχή των συζυγιακών και μη-συζυγιακών διπλών δεσμών C=C από τα 1800 cm^{-1} ως τα 1500 cm^{-1} , την περιοχή κάμψης μεθυλίου και ισοπροπυλίου από τα 1500 cm^{-1} ως τα 1300 cm^{-1} , την περιοχή τάσης απλών δεσμών C-C και C-O που ορίζεται από τα 1300 cm^{-1} και τα 1000 cm^{-1} , και τέλος την περιοχή «breathing mode» και των εκτός επιπέδου δονήσεων C-H από τα 1000 cm^{-1} ως τα 600 cm^{-1} .

Το φάσμα του γ-τερπινενίου δεν παρουσιάζει σημαντικές κορυφές στην περιοχή $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ όπως είναι αναμενόμενο και από την δομή του μορίου του. Όπως είναι φυσικό η πιο ισχυρή κορυφή εμφανίζεται στα 1700 cm^{-1} και αποδίδεται στους μη-συζυγιακούς διπλούς δεσμούς του δακτυλίου του 1,4 κυκλοεξαδιενίου. Η δόνηση του μεθυλίου και του

ισοπροπυλίου (κάμψη C-H) εμφανίζεται στα 1428 cm^{-1} σαν πλατιά κορυφή, και τέλος η δόνηση «breathing mode» εμφανίζεται στα 756 cm^{-1} .

Η τάση του δεσμού C=C του αρωματικού δακτυλίου του π-κυμενίου εμφανίζει την κορυφή στα 1610 cm^{-1} και η συμμετρική κάμψη του ισοπροπυλίου εμφανίζει την κορυφή στα 1440 cm^{-1} . η αντισυμμετρική δόνηση της ίδιας ομάδας δίνει την κορυφή στα 1380 cm^{-1} . Ο απλός δεσμός C-C δίνει μέσω της τάσης του τις κορυφές στα 1210 cm^{-1} και τα 1180 cm^{-1} . Τέλος, η ισχυρή διπλή κορυφή στα 804 cm^{-1} αποδίδεται στον αρωματικό δακτύλιο (ανασασμός ή breathing mode). Η κορυφή αυτή είναι πολύ σημαντική και θα συζητηθεί περαιτέρω καθώς το Σχήμα και το ύψος της επηρεάζεται από τους υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο (Nakanishi & Solomon,1997, Terpinski, 1987).

Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως για την καταγραφή φασμάτων από καθαρές ουσίες είναι επιθυμητό τα δείγματα να είναι στην ίδια φυσική κατάσταση, ώστε να μπορεί να είναι αξιόπιστη η μέθοδος. Το πρόβλημα εδώ εντοπίζεται στο γεγονός ότι η θυμόλη στην καθαρή μορφή της (99,9%) όπως προμηθεύεται είναι στερεή και κρυσταλλική. Προκειμένου να ληφθεί ένα φάσμα υπερύθρου από καθαρή θυμόλη μπορεί να επιλεγεί άλλη μέθοδος λήψης φάσματος για στερεές ουσίες, όπως η μέθοδος DRIFTS.

Δύο προβλήματα προκύπτουν αν παρακαμφθεί η δυσκολία αυτή: πρώτο ότι όπως επιδόθηκε και πιο πάνω, η μέθοδος καταγραφής φάσματος πρέπει να είναι η ίδια για κάθε πρότυπη ουσία αλλά και για τα άγνωστα δείγματα. Το δεύτερο είναι ότι για την λήψη φάσματος με την μέθοδο DRIFTS η θυμόλη έχει πρόβλημα με την κρυσταλλική της μορφή. Οι κρύσταλλοι της θυμόλης αντανακλούν την ακτινοβολία και δεν επιτρέπουν την λήψη αξιόπιστου φάσματος. Αν προσπαθήσουμε να λειοτριβήσουμε την θυμόλη για να καταστρέψουμε τους κρυστάλλους, τότε παρατηρείται αυξημένη απορρόφηση ατμοσφαιρικής υγρασίας και όλη η διαδικασία καθίσταται αναξιόπιστη.

Το πρόβλημα με την φυσική κατάσταση της θυμόλης μπορούσε να λυθεί απλά με διάλυση της ουσίας σε πτητικό διαλύτη και προσθήκη του διαλύματος πάνω στο παράθυρο ZnSe και μετά από λίγα λεπτά να γίνει λήψη του φάσματος αφού ο διαλύτης έχει εξατμιστεί υπο συνθήκες περιβάλλοντος. Η τεχνική αυτή έχει φανεί χρήσιμη σε άλλες περιπτώσεις και θα έλυne το πρόβλημα αν η θυμόλη με την απομάκρυνση του διαλύτη δεν σχημάτιζε αδιαπέραστη ομοιογενή κρούστα.

Τελικά, και προκειμένου να μην εγκαταλειφθεί το πείραμα ακολουθήθηκε η εξής πορεία: πρότυπη θυμόλη όταν θερμανθεί σε πεδίο μικροκυμάτων υγροποιείται πλήρως για να επανέλθει σε στερεή μορφή μετά από λίγα λεπτά όταν η θερμοκρασία της επανέλθει σε χαμηλότερα επίπεδα. Με την προσθήκη μικρής ποσότητας άνυδρου θειικού μαγνησίου αναστέλλεται η στερεοποίηση της θυμόλης για αρκετές μέρες. Το γεγονός υποδεικνύει προφανώς ότι ίχνη νερού μπορούν να δρουν σαν παράγοντες προώθησης της

κρυσταλλοποίησης της θυμόλης. Με τον τρόπο αυτό κατέσται δυνατή η καταγραφή του φάσματος και η παρασκευή μιγμάτων προτύπων γνωστής συγκέντρωσης.

Η ισομέρεια μεταξύ θυμόλης και καρβακρόλης συνεπάγεται πολύ παρόμοια φάσματα Raman μεταξύ των δύο ουσιών. Είναι φυσικό να υπάρχουν πολλές κοινές κορυφές, και αυτό συμβαίνει στα 1620 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} που έχουν αποδοθεί παραπάνω. Η κοινή κορυφή στα 1260 cm^{-1} που εμφανίζεται στα φάσματα θυμόλης και καρβακρόλης δεν υπάρχει στα φάσματα γ -τερπινένιου και π -κυμενίου. Αποδίδεται στον τρίςυποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο. Οι σημαντικότερες κορυφές για την θυμόλη και την καρβακρόλη είναι στα 740 cm^{-1} και 760 cm^{-1} αντίστοιχα και αποδίδονται φυσικά στην breathing mode δόνηση (δόνηση ανασασμού) όλου του μορίου.

Προκειμένου να διαπιστωθεί και η ακρίβεια της μεθόδου, τα ίδια άγνωστα αναλύθηκαν και με την μέθοδο GC-FID σαν μέθοδο αναφοράς και τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων ελέγχθηκαν με τα στατιστικά εργαλεία f-test και t-test για την επαναληψιμότητα και ακρίβεια των δύο μεθόδων και τα αποτελέσματα των ελέγχων παρουσιάζονται όλα μαζί και συγκριτικά στον πίνακα 15 μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους. Με τις μεθόδους των f-test και t-test ελέγχεται η στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση δεδομένων που προκύπτουν από διαφορετικές μεθόδους μέτρησης (στην συγκεκριμένη περίπτωση της μεθόδου FT-Raman και της μεθόδου αναφοράς). Με χρήση των δεδομένων συγκέντρωσης και των τυπικών αποκλίσεων προκύπτουν καθαρά μεγέθη που συγκρίνονται με πίνακες στους οποίους αναφέρονται τα όρια πάνω από τα οποία θεωρούνται στατιστικά σημαντικές οι διαφορές μεταξύ των υπο εξέταση μεγεθών. Η σύγκριση μεταξύ των μεθόδων τις κατατάσσει σε παρόμοια επίπεδα επαναληψιμότητας και ευαισθησίας όπως γίνεται κατανοητό από τις τιμές του F και t πειραματικού, όταν αυτές συγκριθούν με τις θεωρητικές τιμές για επίπεδο σιγουριάς 0,99 που είναι 99 για το f-test και 4,604 για το t-test. Στις περισσότερες των περιπτώσεων τα αποτελέσματα των μετρήσεων δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ των δύο μεθόδων γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία της νέας μεθόδου.

Τα ποσοστά για κάθε στοιχείο ήταν συνοπτικά, μεταξύ 4.2 και 15.5% για το π -κυμένιο με την μέθοδο GC και μεταξύ 5.1 και 16.9% με τη μέθοδο Raman. Για το γ -τερπινένιο τα ποσοστά κυμάνθηκαν μεταξύ 2.2 και 6.4%, και 2.1 και 7.7% για το GC και το Raman αντίστοιχα. Για τη θυμόλη όπως είναι αναμενόμενο όταν το ποσοστό της πέφτει κάτω από το 3% η μέθοδος Raman δεν μπορεί να την προσδιορίσει. Είναι γνωστός ο περιορισμός των φασματοσκοπικών μεθόδων λόγω θορύβου στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Τέλος, για την

καρβακρόλη, τα ποσοστά της κυμάνθηκαν μεταξύ 46.6 και 80.9% για το GC και 56.5 και 77.6% για το Raman.

Πίνακας 15 Σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις δύο μεθόδους GC-FID και φασματοσκοπία Raman

		GC-FID % ^a	Raman % ^a	F _{πειραματικό} ^b	t _{πειραματικό} ^b
“αιθέριο έλαιο s1” (ρίγανη)	π-κυμένιο	14,8±1,4	16,7±0,2	49,00	1,900
	γ-τερπινένιο	4,46±0,45	4,77±0,08	31,64	0,959
	θυμόλη	24,7±1,2	28,78±0,46	6,81	4,900
	καρβακρόλη	46,6±1,8	56,5±2,0	1,23	5,203
“αιθέριο έλαιο s2” (ρίγανη)	π-κυμένιο	4,17±0,76	5,078±0,010	5776,00	1,689
	γ-τερπινένιο	2,19±0,39	2,27±0,24	2,64	0,247
	θυμόλη	0,29±0,05			
	καρβακρόλη	80,9±2,1	74±10	22,68	0,955
“αιθέριο έλαιο s3” (ρίγανη)	π-κυμένιο	15,5±1,4	16,90±0,46	9,26	1,344
	γ-τερπινένιο	2,2±0,2	2,08±0,17	1,38	0,646
	θυμόλη	0,84±0,04			
	καρβακρόλη	73,20±1,9	77,57±0,30	40,11	3,213
“αιθέριο έλαιο s4” (ρίγανη)	π-κυμένιο	5,82±0,14	7,58±0,12	1,36	13,499
	γ-τερπινένιο	4,670±0,088	5,54±0,34	14,93	3,503
	θυμόλη	2,515±0,028	5,39±0,37	174,62	10,958
	καρβακρόλη	77,58±0,28	57,9±4,2	225,00	5,927
“αιθέριο έλαιο s5” (θυμάρι)	π-κυμένιο	7,88±0,58	9,68±0,26	4,98	4,005
	γ-τερπινένιο	6,41±0,45	7,73±0,16	7,91	3,909
	θυμόλη	0,28±0,03			
	καρβακρόλη	72,45±0,97	64±12	153,04	0,993

^a n=3

^b επίπεδο εμπιστοσύνης 0,99

5.3. Σύγκριση μεθόδων παραλαβής θειούχων ενώσεων του σκόρδου με Lickens – Nickerson, υπερήχους και μικροκύματα.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων τόσο ποιοτικά όσο και η % σχετική αναλογία τους παρουσιάζονται στον πίνακα 16.

Πίνακας 16 Χημική σύσταση των αιθέρων ελαίων του σκόρδου (*Allium sativum*) που παραλήφθη με τρεις διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης, (SDE, MWHHD, USE) χρησιμοποιώντας διαλυθαιθέρα, κανονικό εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα σαν διαλύτες συστατικά αναφέρονται με την σειρά έκλυσης τους από την στήλη *HP-5ms* του αέριου χρωματογράφου.

N/A	Ένωση	Διμεθυλοαιθέρας			Εξάνιο			Οξικός Αιθυλεστέρας		
		SDE	MWHHD	USE	SDE	MWHHD	USE	SDE	MWHHD	USE
1	Διμεθυλοδιοσουλφίδιο (DMMS)	2,2	2,1	- ^b	2,4	2,3	-	1,9	0,7	-
2	Αιθόλοβινύλοσουλφίδιο (EVS)	-	-	3,2	-	-	4,2	-	-	9,7
3	1,2-δισουλκωστενάνιο	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	-	0,3	0,2	-
4	Διαλδίοσουλφίδιο (DS)	2,3	0,9	0,3	2,2	0,8	0,4	1,9	0,1	0,4
5	2-βινύλοθειοφαινό	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
6	3-μεθυλοθειο προπανόλη	0,3	-	-	0,2	-	0,1	0,4	0,2	-
7	2-αιθύλοθειοφαινό	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
8	<i>cis</i> ή <i>trans</i> μεθύλοαλλυλοδιοσουλφίδιο (MADS) ^a	9,1	9,0	0,6	11,2	7,1	0,5	8,5	4,3	1,4
9	Μεθύλ προπύλ. διοσουλφίδιο	0,1	0,1	-	0,2	-	-	0,1	0,2	-
10	<i>cis</i> ή <i>trans</i> Μεθύλοαλλυλοδιοσουλφίδιο (MADS) ^a	0,2	0,1	-	0,1	-	0,1	0,2	0,2	-
11	Απροδιόριστο	2,4	1,8	0,7	1,4	1,3	0,9	1,6	1,5	2,0
12	Διμεθυλοστρισουλφίδιο (DMTS)	2,0	2,7	-	2,7	2,0	-	2,3	2,0	-
13	Αλλόλ 2,3-επιόξυπροπύλοσουλφίδιο	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	-	-
14	Διαλδίοδιοσουλφίδιο (DDS)	28,4	17,6	8,2	25,5	17,8	7,3	23,1	6,8	6,0
15	C ₆ H ₁₀ S ₂	0,5	0,3	0,1	0,5	0,3	0,2	0,4	0,5	-
16	C ₆ H ₁₀ S ₂	1,2	1,4	1,5	1,2	1,0	1,4	0,9	1,1	3,7
17	Μεθύλοβοουτυλοστρισουλφίδιο	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
18	Μεθύλοαλλυλοστρισουλφίδιο (MATS)	16,3	14,1	0,1	17,4	12,9	0,2	17,5	14,9	0,2
19	3-βινύλ-[4H]-1,2-διθεινή (3-VDT)	4,0	15,9	32,7	4,5	15,4	26,3	4,5	14,5	25,7
20	2-βινύλ-[4H]-1,3-διθεινή (2-VDT)	5,5	17,7	38,1	7,8	23,2	43,9	8,7	27,7	34,4
21	1,4-διμεθύλοστρασουλφίδιο (DMTTS)	0,4	-	-	-	-	-	0,4	-	-
22	Διαλδίοστρισουλφίδιο (DATS)	20,4	9,1	0,2	18,2	9,5	1,3	22,1	14,1	0,7

Πίνακας 16 (συνέχεια)

Α/Α	Ένωση	Διεθλολιθέρπος			Εξάνιο			Οξικός Αιθυλεστέρας		
		SDE	MWHD	USE	SDE	MWHD	USE	SDE	MWHD	USE
23	3,5-διαθύλο 1,2,4-τριθειοάληνη	0,2	0,2	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5
24	Δεκαπεντάνιο	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6
25	Δεκαεπτάνιο	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
26	1,2,3,4-τετροάθειο-5-μεθύλ κυκλοεξάνιο	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-
27	3-(2-θειό-4-πεντενύλ)-1-θειακυκλοεξ-5-ένιο	-	-	-	-	-	0,2	-	-	0,3
28	Διαλλυλοτετρασουλφίδιο (DATTS)	0,7	0,1		0,5	0,3	0,1	0,6	0,4	-
29	3-(2,3,4-τριθειο-5-πεντενύλ-1-θεια-κυκλοεξ-5-ένιο	0,1	0,2	0,1	-	-	0,4	-	0,2	-
30	2-(1-θειο-2-κυκλοεξέν-6-υλ)-1,3-διθειο-κυκλοεξ-5-εν	0,3	2,0	6,4	0,3	2,1	2,3	0,4	2,7	2,2
31	Δεκαοκτανόλη	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
	Σύνολο	97,0	95,8	92,5	96,7	96,6	91,1	96,0	92,8	88,3
	Απόδοση (g αιθερίου ελαίου/100 g σκόρδου)	0,23	0,22	0,13	0,22	0,21	0,12	0,24	0,23	0,17
	<i>Διαλλύλ σουλφίδια (μόνο, δι, τρι και τέτρα)</i>	51,8	27,7	8,7	46,4	28,4	9,1	47,7	21,4	7,1
	<i>Μεθύλ αλλύλ σουλφίδια (δι και τρι)</i>	25,6	23,2	0,7	28,7	20,0	0,2	26,2	19,4	1,6
	<i>Βηνύλ διεθίνες</i>	4,7	33,6	70,8	12,3	38,6	70,2	13,2	42,2	60,1

SDE: Simultaneous Distillation solvent Extraction

MWHD: Micro Wave-assisted Hydrodistillation Extraction

USE: UltraSound-assisted Extraction

a: δεν προσδιορίστηκε το ακριβές ποσοπές

b: δεν ανηχνεθθηκε

Φασματομετρικά δεδομένα των:

No 11: 103(100), 104(59), 45(30), 105(12), 71(11), 64(10), 68(3)

No 15: 41(100), 45(94), 146(58), 73(53), 81(38), 71(28), 105(26)

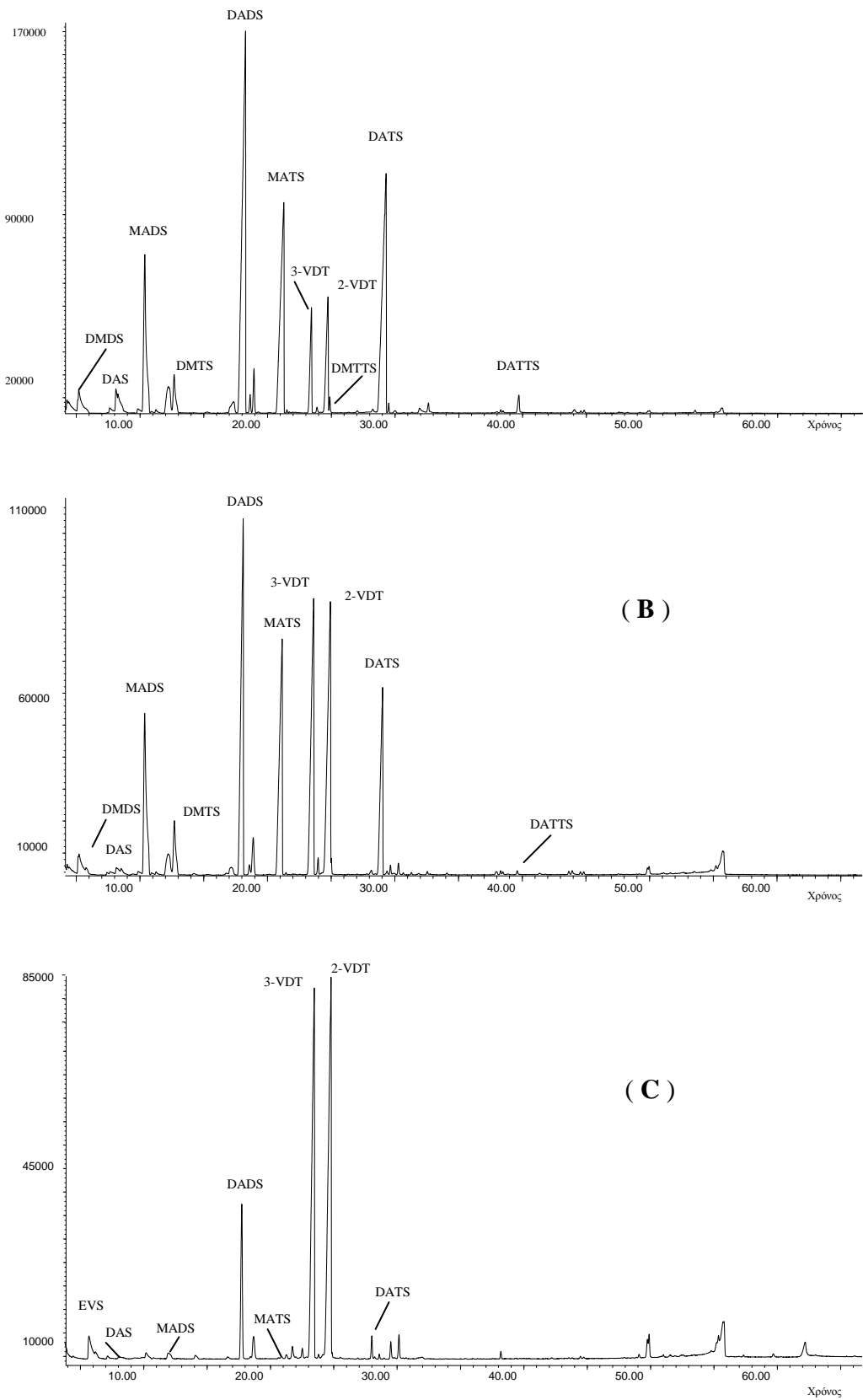
No 16: 45(100), 41(82), 73(52), 146(48), 81(39), 71(36), 105(27)

5.3.1. Αποτελέσματα

Το Σχήμα 34 παρουσιάζει τα χρωματογραφήματα των πτητικών κλασμάτων όπως απομονώνονται με τις μεθόδους SDE, MWHD και USE χρησιμοποιώντας το διαιθυλοαιθέρα. Τα αιθέρια έλαια που λαμβάνονται και με τις τρεις μεθόδους είναι σαφώς παρόμοια σε ποιοτική βάση αλλά παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στις επι τοις εκατό αναλογίες των συστατικών που τα αποτελούν.

Οι αποδόσεις των κορυφών καθώς και οι ποσοτικές αναφορές των ουσιών που απαντούν παρουσιάζονται στον πίνακα 16. Οι κορυφές στο Σχήμα 34 και τον πίνακα 16 αποδίδονται με ακρωνύμια όπως φαίνεται:

- Διμεθύλοδισουλφίδιο dimethyl disulfide (DMDS),
- Αιθύλοβινύλοσουλφίδιο ethyl vinyl sulfide (EVS),
- Διαλλύλοσουλφίδιο diallyl sulfide (DAS),
- Μεθύλοαλλύλοδισουλφίδιο methyl allyl disulfide (MADS),
- Διμεθύλοτρισουλφίδιο dimethyl trisulfide (DMTS),
- Διαλλύλοδισουλφίδιο diallyl disulfide (DADS),
- Μεθύλοαλλύλοτρισουλφίδιο methyl allyl trisulfide (MATS),
- 3-βίνυλο-[4H]-1,2-διθειίνη 3-vinyl-[4H]-1, 2-dithiin (3-VDT),
- 2-βίνυλο-[4H]-1,3-διθειίνη 2-vinyl-[4H]-1, 3-dithiin (2-VDT),
- 1,4-διμεθύλοτετρασουλφίδιο 1, 4-dimethyl tetrasulfide (DMTTS),
- Διαλλύλοτρισουλφίδιο diallyl trisulfide (DATS),
- Διαλλύλοτετρασουλφίδιο diallyl tetrasulfide (DATTS)



Σχήμα 30 Τυπικά χρωματογραφήματα του πτητικού κλάσματος από σκελίδες φρέσκου σκόρδου (*A. sativum*) που παραλήφθηκαν (A) Σύγχρονη απόσταξη μικρο - εκχύλιση (SDE) (B)

Υδροαπόσταξη με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MWH) και (C) Εκχύλιση με την χρήση υπερήχων (USE), και την χρήση διαιθυλιθέρα. Πλήρης ανάλυση των συστατικών όπως ταυτοποιήθηκαν φαίνεται στον πίνακα 16

5.3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Τα πρώτα συμπεράσματα μπορούν να βγουν από την μελέτη των τριών διαφορετικών τρόπων παραλαβής του αιθερίου ελαίου του σκόρδου. Είναι προφανές ότι ο τρόπος απομόνωσης παίζει κάποιο ρόλο στην διαφορετική ποσοτική σύσταση του προϊόντος. Για την διευκόλυνση στην εξαγωγή των συμπερασμάτων, οι θείο ενώσεις (μόνο έως τέτρα) του αιθερίου ελαίου ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τους υποκαταστάτες τους (Kimbaris et al. 2006):

Ομάδα 1^η: Διαλλύλοσουλφίδια

Ομάδα 2^η: μέθυλοάλλυλοσουλφίδια

Ομάδα 3^η: Κυκλικές βινύλοδιθειίνες (Πίνακας 16)

Τα αιθέρια έλαια που παρελήφθησαν με την SDE και διαλύτη το διαιθυλιθέρα, (Πίνακας 16), περιείχαν περισσότερα μόνο ή πολύ – σουλφίδια υποκατεστημένα με αλκύλια και λιγότερες βινύλ διθειίνες, από ότι τα αιθέρια έλαια που παρελήφθησαν με την μέθοδο των μικροκυμάτων ή των υπερήχων. Πιο συγκεκριμένα, το αιθέριο έλαιο είναι πλουσιότερο σε διάλλυλοδισουλφίδιο (DADS, 28.4%), διάλλυλοτρισουλφίδιο (DATS, 20.4%), μεθύλοαλλυλοτρισουλφίδιο (MATS, 16.3%), *cis* και *trans* μεθύλοαλλύλοδισουλφίδιο (MADS, 9.3%), διαλλυλοσουλφίδιο (DAS, 2.3%), διμεθυλοσουλφίδιο (DMDS, 2.2%), διμεθύλοτρισουλφίδιο (DMTS, 2.0%), διαλλύλοτετρασουλφίδιο (DATTS, 0.7%), 1,4-διμεθυλοτετρασουλφίδιο (DMTTS, 0.4%), και ίχνη αιθύλοβινύλοσουλφιδίου (EVS). Τέλος, η 2-βινύλ-[4H]-1, 3-διθειίνη εντοπίστηκε σε ελαφρώς μεγαλύτερη ποσότητα (5.5 %) από την 3-βινύλ -[4H]-1, 2-διθειίνη (4.0%).

Στην μέθοδο με τα μικροκύματα (MWH) (Πίνακας 16), παρουσιάζονται μεγάλες ποσοτικές διαφορές. Έτσι, ενώ οι ενώσεις που εντοπίζονται είναι οι ίδιες, μεταβάλλονται σημαντικά οι σχετικές συγκεντρώσεις τους. Στην περίπτωση που το αιθέριο έλαιο απομονώνεται με την μέθοδο των μικροκυμάτων, το κύριο συστατικό του είναι το δι-αλλύλ σουλφίδιο (17,6%) και το συστατικό με την αμέσως μικρότερη αφθονία είναι το δι-αλλύλ τρι-σουλφίδιο με 9.1%. Ακολουθούν τα *cis* και *trans* μεθύλ-αλλύλ-τρισουλφίδιο (14.1%), μεθύλ-αλλύλ δι-σουλφίδιο (9.1%), δι-αλλύλ σουλφίδιο (0.9%), δι-μέθυλ-σουλφίδιο (2.1%), διμεθύλ τρι-σουλφίδιο (2.7%), δι-αλλύλ τετρασουλφίδιο (0.1%), 1,4-διμεθυλ τετρασουλφίδιο (0.4%), και τέλος ίχνη αιθύλ-βινύλ-σουλφιδίου. Η αφθονία των διθειινών είναι σχετικά μεγάλη και παρόμοια με αυτή του κυρίαρχου συστατικού του δι-αλλύλ σουλφιδίου: 17.7% για την 2-βίνυλο-[4H]-1, 3-διθειίνη και 15.9% για την 3-βίνυλο-[4H]-1, 2-διθειίνη.

Στην περίπτωση της μεθόδου με την χρήση υπερήχων USE (Πίνακας 16), τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του σκόρδου που ανιχνεύθηκαν ήταν: 2-vinyl-[4H]-1, 3-dithiin (38.1%) και 3-vinyl-[4H]-1, 2-dithiin (32.7%). Τα σουλφίδια (μόνο μέχρι τέτρα) βρίσκονται στις ελάχιστες συγκεντρώσεις που τα απαντούμε σε όλες τις περιπτώσεις. Έτσι τα ποσοστά τους είναι: δι-αλλύλ δισουλφίδιο 8.2%, δι-αλλύλ τρί-σουλφίδιο 0.2%, μεθύλ-αλλύλ τρισουλφίδιο 0.1%, *cis* και *trans* μεθύλ αλλύλ-δισουλφίδιο 0.6%, διαλλύλ σουλφίδιο 0.3%, δι-μεθύλ δι-σουλφίδιο, δι-μεθύλ τρισουλφίδιο, δι-αλλύλ τετρασουλφίδιο και 1,4 – διμέθυλ τετρασουλφίδιο σε ίχνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των υπερήχων βρέθηκε το αιθύλ-βινύλ-σουλφίδιο σε μετρήσιμη ποσότητα (3.2%).

Τα πειραματικά δεδομένα και από τους δύο άλλους διαλύτες επιβεβαιώνουν την επίδραση του τρόπου παραλαβής στην σύσταση του αιθερίου ελαίου. Ενώ και με την χρήση του εξανίου και του οξικού αιθυλεστέρα το πτητικό κλάσμα που προκύπτει είναι παρόμοιο με το αντίστοιχο πτητικό κλάσμα του διαιθυλεθέρα, δεν συμβαίνει το ίδιο και με τα πτητικά κλάσματα που προκύπτουν με την χρήση του ίδιου διαλύτη αλλά με διαφορετική μέθοδο παραλαβής. Η ομοιότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαλυτών τονίζει περαιτέρω ότι χρειάζεται διερεύνηση των αιτιών που προκαλούν τις παραπάνω σημαντικές διαφορές μεταξύ των αιθερίων ελαίων στον τρόπο παραλαβής. Η επιβεβαίωση των τάσεων αύξησης ή μείωσης ουσιών του αιθερίου ελαίου, οδηγεί στην υπόθεση ότι ίσως η θερμότητα παίζει κάποιο ρόλο στην σύσταση του αιθερίου ελαίου.

Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των αιθερίων ελαίων μεταξύ των τριών μεθόδων SDE, MWHD και USE συνίστανται στην ποσότητα κάποιων ουσιών που μεταβάλλονται μέσα στο δείγμα, πάντα ανάλογα με την μέθοδο παραλαβής. Προκειμένου να κατανοήσουμε την σημασία του φαινομένου καλό είναι να γίνει μια μικρή επισκόπηση της «χημείας του σκόρδου». Οι επιστήμονες που έχουν ασχοληθεί με το θέμα έχουν καταλήξει σε κάποια θεμελιώδη συμπεράσματα. Το κόψιμο (ή πλήγωμα) του ιστού του βολβού του σκόρδου προκαλεί την έκλυση ενός αριθμού οργανικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (αυτές που αποτελούν το πτητικό κλάσμα), που περιέχουν στη δομή τους άτομα θείου που σπάνια απαντούν στη φύση. Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα: μπορούν να μεταβάλλονται αυθόρμητα σε άλλες οργανικές ενώσεις και να συμμετέχουν σε άλλες πιο πολύπλοκες μετατροπές (Block, 1992, Block, Ahmad, Catalfamo, Jain & Castrozd, 1986, Bock, Mohmand, Hirabayashi & Semkow, 1982, Block, 1985).

Σημαντικές βιβλιογραφικές αναφορές που θεμελίωσαν την χημεία του σκόρδου, όπως αυτές των Cavallito και Bailey (Cavallito & Bailey, 1994, Cavallito, Buck & Suter, 1944), θέτουν την αλλυσίνη (allyl 2-propenethiosulfinate) σαν τη σημαντικότερη ουσία στην οποία το σκόρδο οφείλει την γεύση και την οσμή του. Στη συνέχεια, οι πιο σπουδαίοι μελετητές της χημείας του σκόρδου, οι Block και συνεργάτες (Block, 1992), οι οποίοι απέδειξαν την

πολλαπλή πορεία της διάσπασης της αλλυσίνης. Σύμφωνα με αυτούς, η αλλυσίνη διασπάται από μόνη της, δίνοντας 2-προπενεσουλφενικό οξύ και θειοακρολείνη. Η αυτοσυμπύκνωση του 2-προπενεσουλφενικού οξέος επαναδημιουργεί ένα μόριο αλλυσίνης. Παρόμοια, μέσω αντίδρασης Diels-Alder, δύο μόρια θειοακρολείνης, δίνουν κυκλικές ενώσεις δύο τύπων. Η πρώτη ουσία που προκύπτει είναι η 2-βινύλ-[4H]-1, 3-διθειίνη (σε μεγαλύτερο ποσοστό) και η δεύτερη η 3-βινύλ-[4H]-1, 2-διθειίνη (σε μικρότερο ποσοστό) (Block, 1992, Block, Ahmad, Catalfamo, Jain & Castrozd, 1986, Bock, Shamster, Hirabayashi & Slemkon, 1982, Nishimoura, Wijaka & Mizoutani, 1988).

Σχετικά με την επίδραση της θερμότητας στην πορεία των επιγενόμενων αντιδράσεων υπάρχουν ενδείξεις από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα που καταδुकνεύουν τα εξής: με την χρήση της μεθόδου που υποβάλει το δείγμα στην μεγαλύτερη θερμική καταπόνηση, στην περίπτωση μας την απλή απόσταξη με σύγχρονη εκχύλιση (SDE), το προϊόν περιέχει κυρίως διάλλυλο, αλλυλομέθυλο και διμέθυλο μόνο- μέχρι και έξασουλφίδια και μικρές ποσότητες διθεινών. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει και την σχετική βιβλιογραφία με τον πλέον αδιάσπστο τρόπο (Yu, T., Wu, C., Liou, Y., J. Agric. Food Chem., 1989). Επιπλέον έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία η παρουσία των κυκλικών μορίων (βινύλοδιθειίνες) που αποτελούν αντικείμενο μελέτης μπορεί, όταν βρίσκονται σε ίχνη, να αποδίδεται σε μετατροπή ιχνών αλλυσίνης που μένουν μέσα στο έλαιο κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του με αέρια χρωματογραφία. (Brodnitz, Pascale & Van Derslice, 1971). Η μετατροπή αυτή αποδίδεται στις έντονες συνθήκες που επικρατούν στον εισαγωγέα του δείγματος του αέριου χρωματογράφου.

Αντίθετα με τον παραπάνω ισχυρισμό άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα δύο κυκλικά μόρια είναι παρόντα στο πτητικό κλάσμα, και ότι ο σχηματισμός τους δεν λαμβάνει χώρα εντός του αέριου χρωματογράφου (Abu Lafi et al., 2004). Για να υποστηρίξουν την άποψη αυτή χρησιμοποίησαν διάφορες μεθόδους, κατεργασίας του δείγματος από την παραλαβή μέχρι την ανάλυση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι μεταξύ άλλων χρησιμοποιήθηκε ψυχρή παραλαβή και ανάλυση που δεν υποβάλει το δείγμα σε θερμική καταπόνηση. Έφθασαν μάλιστα στο σημείο για τον προσδιορισμό των συστατικών αυτών χωρίς θερμική καταπόνηση να χρησιμοποιήσουν ειδική διάταξη (cryogenic) GC-MS, που δεν υποβάλει το δείγμα σε θερμική καταπόνηση, εκτός από το λογικά αναμενόμενο HPLC. Αποδίδουν την παρουσία των άλλων ουσιών του σκόρδου στην κατεργασία που συνήθως είναι ψήσιμο, βράσιμο, τηγάνισμα και γενικά μαγείρεμα υπό μεγάλη θερμοκρασία.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν είχε δοκιμαστεί η μέθοδος παραλαβής με την χρήση υπερήχων, που είναι μία μέθοδος που μπορεί να δώσει αποτελέσματα σε χαμηλή θερμοκρασία, (θερμοκρασία δωματίου ή χαμηλότερα). Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου στο συγκεκριμένο πειραματικό έδωσε την δυνατότητα να

αποδειχθεί η χρησιμότητά της προκειμένου για την παραλαβή πτητικών συστατικών χωρίς θερμική καταπόνηση.

Παρόλο που η SDE είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την παραλαβή των πτητικών ουσιών από αρωματικά φυτά, η θερμοκρασία που επικρατεί στον χώρο του δείγματος είναι αυτή του βρασμού του νερού δηλαδή κοντά στους 100°C (Yu, Wu, & Liou, 1989). Η μέθοδος των μικροκυμάτων MWHHD συγκριτικά με την απλή SDE πλεονεκτεί καθώς παρουσιάζει γρηγορότερη παραλαβή (και άρα λιγότερη θερμική καταπόνηση του δείγματος), σε συνδυασμό με μεγάλα ποσοστά παραλαβής (Hao, Han, Huang, Xue & Deng, 2002). Όπως αναλύθηκε στην § 2.5 η ενέργεια από τα μικροκύματα θερμαίνει πολύ γρήγορα ολόκληρη τη μάζα δείγματος-διαλύτη. Με τον τρόπο αυτό απαιτεί μόνο ένα ποσοστό του χρόνου που χρειάζεται η SDE για το ίδιο αποτέλεσμα. Οι χρόνοι είναι 30 min αντί 2 h (δηλαδή 75% λιγότερο) αλλά ούτε με τον τρόπο αυτό παραλαβής αποφεύγεται τελείως η θερμική καταπόνηση. Συγκριτικά τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα όσο αφορά την θερμική καταπόνηση, έχει η μέθοδος των υπερήχων, καθώς λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου (r.t.) αντί για 100 °C.

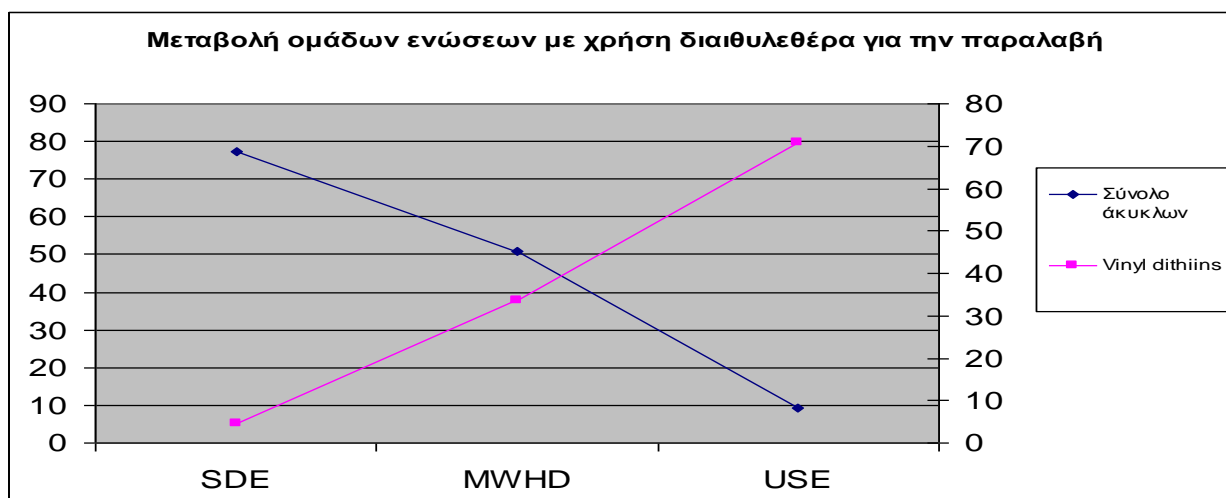
Η επίδραση της θερμότητας οδηγεί όπως είπαμε και πιο πάνω σε αύξηση συγκεκριμένων ουσιών στο αιθέριο έλαιο. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 17 η τάση της ολικής συγκέντρωσης σουλφιδίων μειώνεται με την μείωση της θέρμανσης που δέχεται το δείγμα κατά την παραλαβή του αιθερίου ελαίου, σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση όταν το δείγμα δέχεται μεγάλη ποσότητα θερμότητας.

Πίνακας 17 Σύγκριση σύστασης αιθερίων ελαίου σκόρδου με διαφορετικές μεθόδους παραλαβής και με διαφορετικούς διαλύτες.

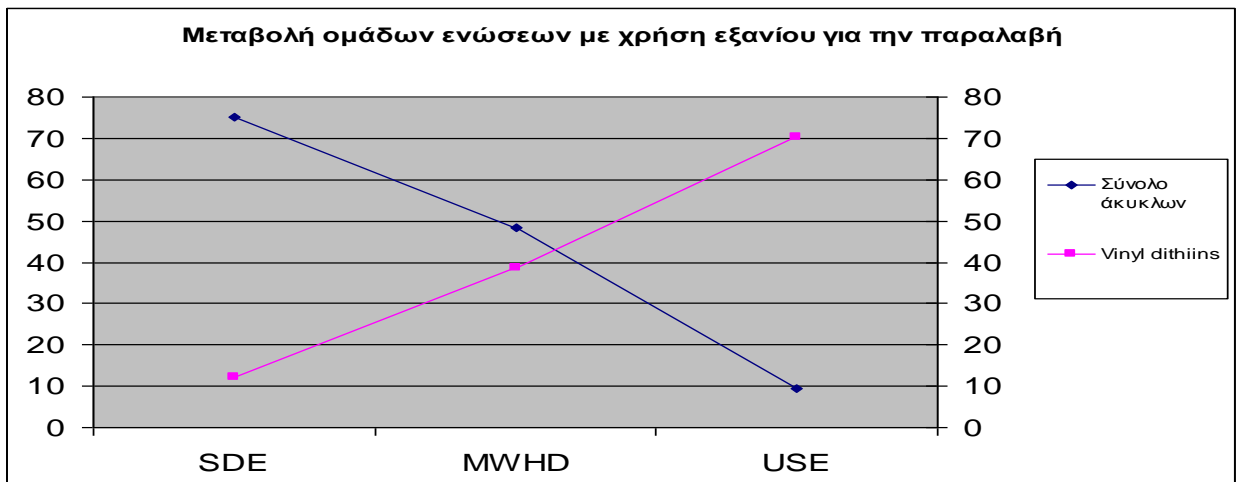
A/A	Κατηγορία Ενώσεων	SDE			MWHHD			USE		
		Διεθλαιθέρας	Εξάνιο	Οξικός Αιθυλεστέρας	Διεθλαιθέρας	Εξάνιο	Οξικός Αιθυλεστέρας	Διεθλαιθέρας	Εξάνιο	Οξικός Αιθυλεστέρας
1	Απόδοση (g αιθερίου ελαίου/100 g σκόρδου)	0.23	0.22	0.24	0,22	0.21	0.23	0.13	0.12	0.17
2	<i>Διαλλυλοσουλφίδια (μόνο, δι τρι και τέτρα)</i>	51.8	46.4	47.7	27,7	28.4	21.4	8.7	9.1	7.1
3	<i>Μεθυλο αλλυλο σουλφίδια (δι και τρι)</i>	25.6	28.7	26.2	23,2	20.0	19.4	0.7	0.2	1.6
4	<i>Βίνυλο διθειίνες</i>	4.7	12.3	13.2	33,6	38.6	42.2	70.8	70.2	60.1

Όπως είναι εμφανές και από τον Πίνακα 17 ενώ η ποσότητα του παραλαμβανόμενου αιθερίου ελαίου δεν μεταβάλλεται σημαντικά από την αλλαγή του διαλύτη, η αλλαγή μεθόδου παραλαβής επιφέρει σημαντική αλλαγή στην ποσότητα των ουσιών που παραλαμβάνονται (απόδοση) αλλά και στην ποιοτική του σύσταση. Οι ποσότητες % των θειοενώσεων που αναφέρονται και απαντούν στο αιθέριο έλαιο μειώνονται δραματικά με τον εξής τρόπο: (SDE → MWHD → USE) ακολουθώντας την επερχόμενη μείωση στη θερμότητα που χρησιμοποιείται για την παραλαβή. Αριθμητικά η μείωση είναι από 77,4% σε 50,9% για να φτάσει στο 9,4%, αντίστοιχα για τις παραπάνω μεθόδους. Αντίστοιχα και συμπληρωματικά οι κυκλικές διθειίνες εμφανίζουν αντίστοιχη αύξηση από 4,7% σε 33,6% και σε 70,8% ανάλογα. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται και για τους άλλους διαλύτες πλην του διεθυλαιθέρα και οι μεταβολές είναι για τα άκυκλα σουλφίδια από 73,9-75,1% σε 40,8-48,4% και σε 8,7-9,3% αντίστοιχα για οξικό αιθυλεστέρα και εξάνιο. Οι κυκλικές θειούχες ενώσεις αντίστοιχα μεταβάλλονται από 12,3-13,2% σε 38,6-42,2% και σε 60,1-70,2%.

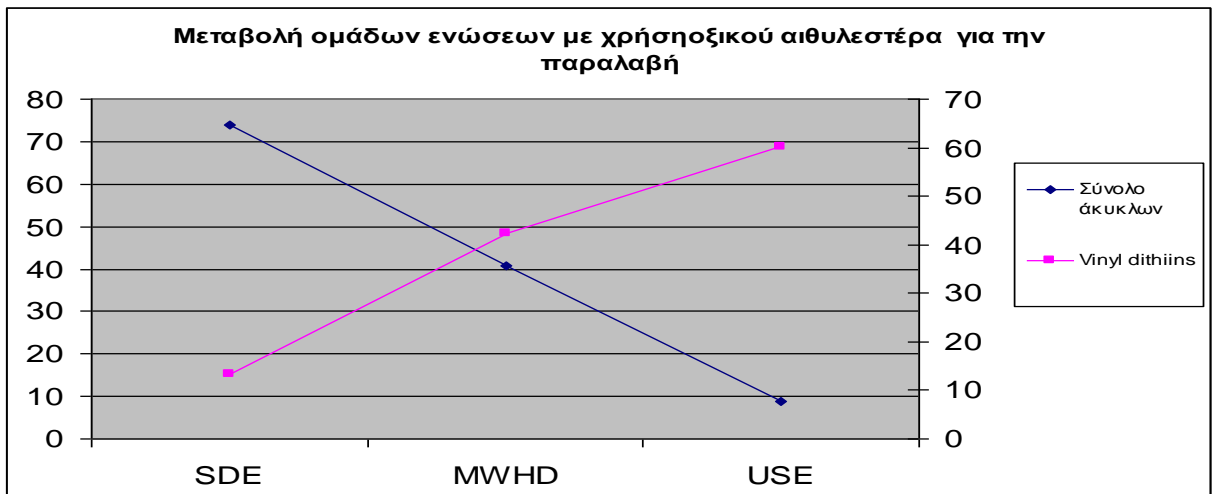
Στα Σχήματα 35 ως 37 παρουσιάζεται γραφικά η επίδραση της μεθόδου παραλαβής στο ποσοστό άκυκλων και κυκλικών (βινυλοδιθειίνες) συστατικών του πτητικού κλάσματος του σκόρδου.



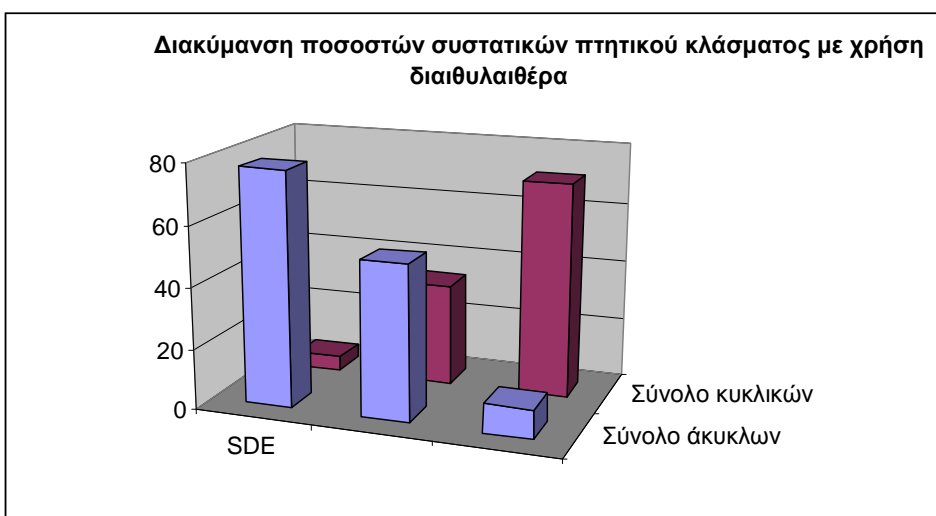
Σχήμα 31 Συσχετισμός μεταβολής ομάδων ουσιών ανάλογα με την θέρμανση που δέχονται κατά την παραλαβή με διαιθυλεθέρα.



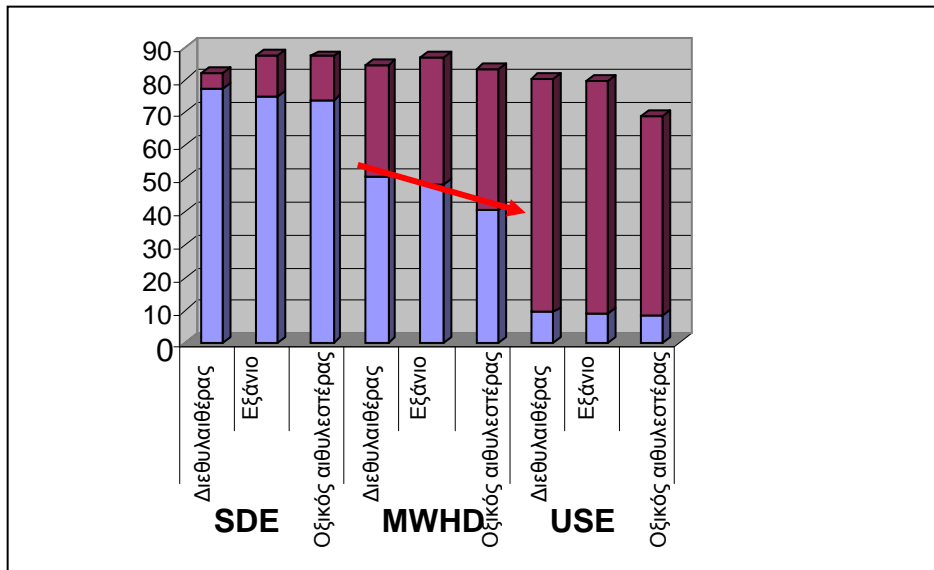
Σχήμα 32 Συσχετισμός μεταβολής ομάδων ουσιών ανάλογα με την θέρμανση που δέχονται κατά την παραλαβή με εξάνιο.



Σχήμα 33 Συσχετισμός μεταβολής ομάδων ουσιών ανάλογα με την θέρμανση που δέχονται κατά την παραλαβή με οξικό αιθυλεστέρα



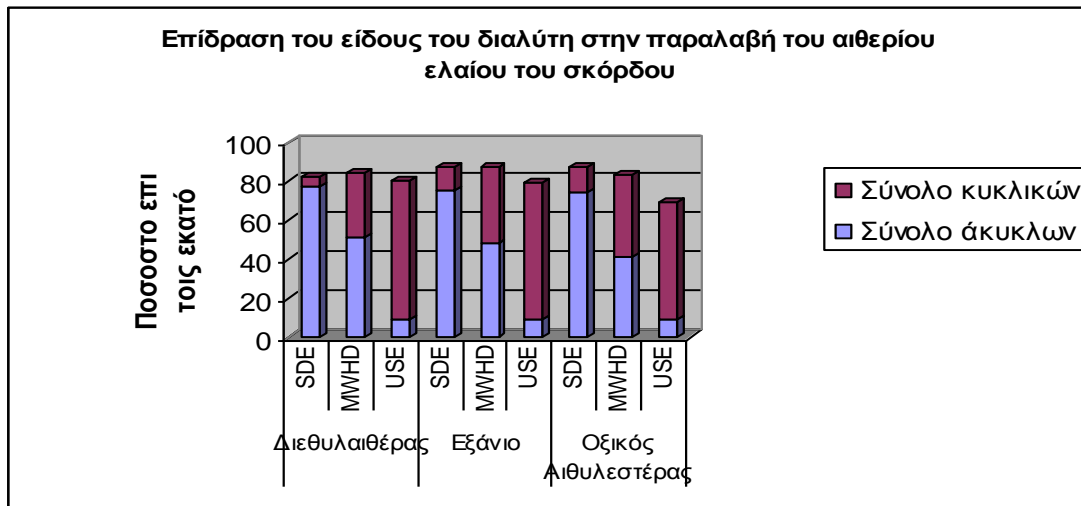
Σχήμα 34 Συγκεντρωτική απεικόνιση αποτελεσμάτων με χρήση διαιθυλεθέρα



Σχήμα 35 Ενισχυμένη απεικόνιση αποτελεσμάτων ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο παραλαβής

Όπως δείχνει το βέλος στο Σχήμα 39 υπάρχει μια τάση στην ίδια διαδικασία MWHD το είδος του διαλύτη να επηρεάζει την ποσότητα των παραγόμενων άκυκλων συστατικών. Η τάση υποδεικνύει μια μείωση της παραλαβής από τον διεθυλαιθέρα (μεγάλο ποσοστό) στο εξάνιο και τέλος το μικρότερο ποσοστό μετατροπής παρουσιάζει ο οξικός αιθυλεστέρας.

Ίσως η μεγαλύτερη θερμοχωρητικότητα του διαλύτη που ακολουθεί την αντιστροφή ανάλογη πορεία (οξικός αιθυλεστέρας → εξάνιο → διεθυλαιθέρας), να επηρεάζει..



Σχήμα 36 Επίδραση του είδους του διαλύτη στην παραλαβή αιθερίου ελαίου του σκόρδου

Για την περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε συμπληρωματικά, πείραμα παραλαβής αιθερίου ελαίου με υπερήχους και διατήρηση της θερμοκρασίας κοντά στους 0 °C. Η διαδικασία τηρείται ακριβώς όπως προηγούμενα με την

χρήση διεθλαιθέρα με διατήρηση όλων των διαδικασιών (εκχύλιση, συμπύκνωση κ.τ.λ.) κοντά στους 0-1 °C (low temperature, l.t.). Το συνολικό ποσοστό διθειίνης που βρέθηκε στο δείγμα του αιθερίου ελαίου (74.7%) ήταν ελαφρώς υψηλότερο από ότι στην περίπτωση της εκχύλισης με την ίδια μέθοδο σε θερμοκρασία δωματίου. Παρόλα αυτά, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση στο ποσοστό του αιθύλοβινύλοσουλφιδίου από 3.2% (r.t. USE) σε 14.2% (l.t. USE).

Η παραπάνω δοκιμή έγινε για να επαληθευτούν τα δεδομένα που έχει δημοσιεύσει παλιότερα ο Abu-Lafi et al. (2004). Υπάρχουν δύο κύριες διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων δεδομένων: που αφορούν στις δύο ισομερές βινύλοδιθειίνες. Η δοκιμή στο εργαστήριο έδειξε μέγιστη συγκέντρωση των δύο ουσιών συνολικά μέχρι και 74,7%, ενώ ο Abu-Lafi αναφέρει ποσοστά μέχρι και 84%. Ο μεταξύ των δύο ισομερών ποσοτικός συσχετισμός δείχνει μεγαλύτερη διαφορά. Έτσι, από τα πειραματικά δεδομένα, ο λόγος των συγκεντρώσεων κυμαίνεται μεταξύ 1 και 2, στην περίπτωση της βιβλιογραφίας η 2-βινύλ-[4H]-1, 3-διθειίνη παρουσιάζεται σε οκτώ φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η διαφοροποίηση αυτή αποδίδεται στην χρήση «κοινού» GC-MS σε αντίθεση με το “cryogenic GC-MS” όργανο που χρησιμοποιήθηκε στη βιβλιογραφία (Abu Lafi et al, 2004).

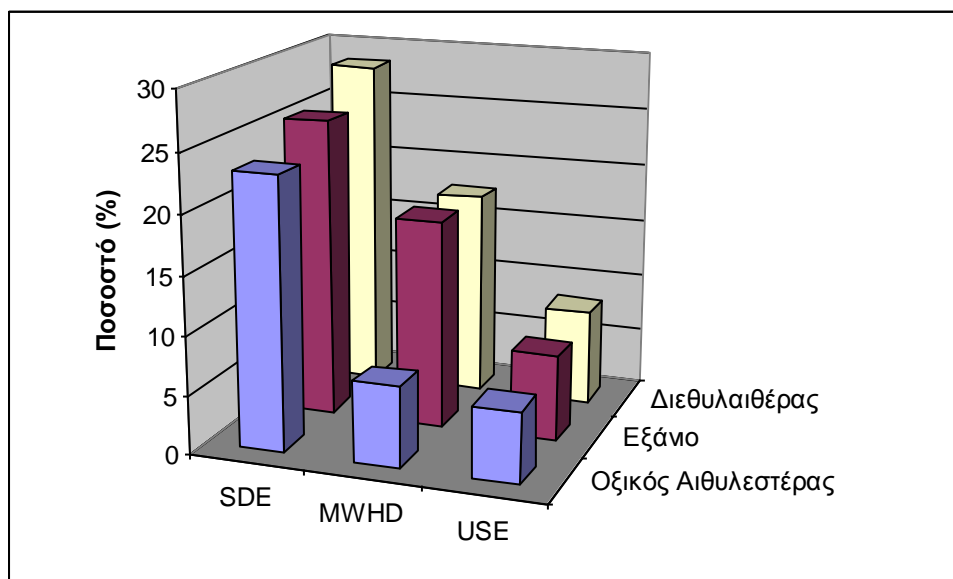
Συμπληρωματικές παρατηρήσεις

1. Πρώτα την προσοχή ελκύει η συμπεριφορά του αιθυλοβινύλοσουλφιδίου (ethyl vinyl sulphide) στα εκχυλίσματα που λαμβάνονται με την μέθοδο USE. Το συστατικό αυτό απουσιάζει εντελώς από τις κατεργασίες που περιλαμβάνουν θερμική καταπόνηση. Η παρουσία του δεν αναφέρεται από την βιβλιογραφία σαν συστατικό του αιθερίου ελαίου του σκόρδου. Μπορούμε με σχετική ασφάλεια να συμπεράνουμε ότι η θερμότητα έχει πολύ καταστροφική επίδραση πάνω στο συγκεκριμένο μόριο το οποίο διασπάται σε άλλα πιο ανθεκτικά κατά την διάρκεια της παραλαβής. Η άποψη αυτή ενισχύεται από την αύξηση που παρουσιάζεται στο ποσοστό του όταν χρησιμοποιείται ο οξικός αιθυλεστέρας για την παραλαβή του και στην κατεργασία με την χρήση USE ή όταν η θερμοκρασία διατηρηθεί κοντά στους 0 °C.

2. Παρατηρείται ότι παρά την μειωτική τάση που δείχνουν τα πολύ σουλφίδια ανάλογα με την μέθοδο παραλαβής (SDE → MWHD → USE), το διάλλυλοδισουλφίδιο (diallyl disulfide) φαίνεται να αποτελεί εξαίρεση στον κανόνα αυτό. Το συγκεκριμένο συστατικό βρίσκεται σε ποσοστά από 6.0-8.2% και στις δοκιμές με USE, ανάλογα από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί σε δύο πιθανές αιτίες: είτε στην απ' ευθείας παραγωγή του από την διάσπαση της αλλυσίνης είτε στην επιλεκτική παραγωγή του έναντι των άλλων πολυσουλφιδίων.

Πίνακας 17 Μείωση των πολυσουλφιδίων στο αιθέριο έλαιο ανάλογα με την επίδραση της θερμότητας (μονάδες %)

Διεθλαιθέρας			Εξάνιο			Οξικός Αιθυλεστέρας		
SDE	MWHD	USE	SDE	MWHD	USE	SDE	MWHD	USE
28.4	17.6	8.2	25.5	17.8	7.3	23.1	6.8	6.0



Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των τρόπων παραλαβής, με την έννοια ότι οι δύο μέθοδοι είναι μέθοδοι απόσταξης ενώ η τρίτη (USE) είναι μέθοδος εκχύλισης. Με τις δύο πρώτες, τα πτητικά συστατικά που αποτελούν το αιθέριο έλαιο απομακρύνονται ποσοτικά από το δείγμα (δηλαδή στο σύνολό τους).

Συμπεράσματα

Αποδείχθηκε η συσχέτιση του τρόπου παραλαβής και της σύστασης του παραλαμβανόμενου αιθερίου ελαίου. Από τις τρεις μεθόδους παραλαβής (SDE, MWHD και USE), που δοκιμάστηκαν προέκυψαν αιθέρια έλαια με διαφορετική ποσοτική και ποιοτική σύσταση. Για την παραπέρα υποστήριξη του συμπεράσματος αυτού έγιναν δοκιμές και με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας και θερμοχωρητικότητας και αποδείχθηκε ότι υπάρχει μικρή ή καθόλου επίδραση του είδους του διαλύτη. Από τις δοκιμασμένες μεθόδους, η USE επιφέρει την μικρότερη επίδραση στα θερμό-ευαίσθητα συστατικά του αιθερίου ελαίου του σκόρδου, με την MWHD να ακολουθεί και την SDE να επιφέρει τις μεγαλύτερες μεταβολές.

Η διαφοροποίηση των παραγόμενων μέσω διάσπασης μορίων οδηγεί στην κατηγοριοποίηση τους σε δύο ομάδες, τις κυκλικές και άκυκλες ενώσεις. Οι δυο ομάδες παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες και υπάρχει άμεσος συσχετισμός ανάμεσα στην

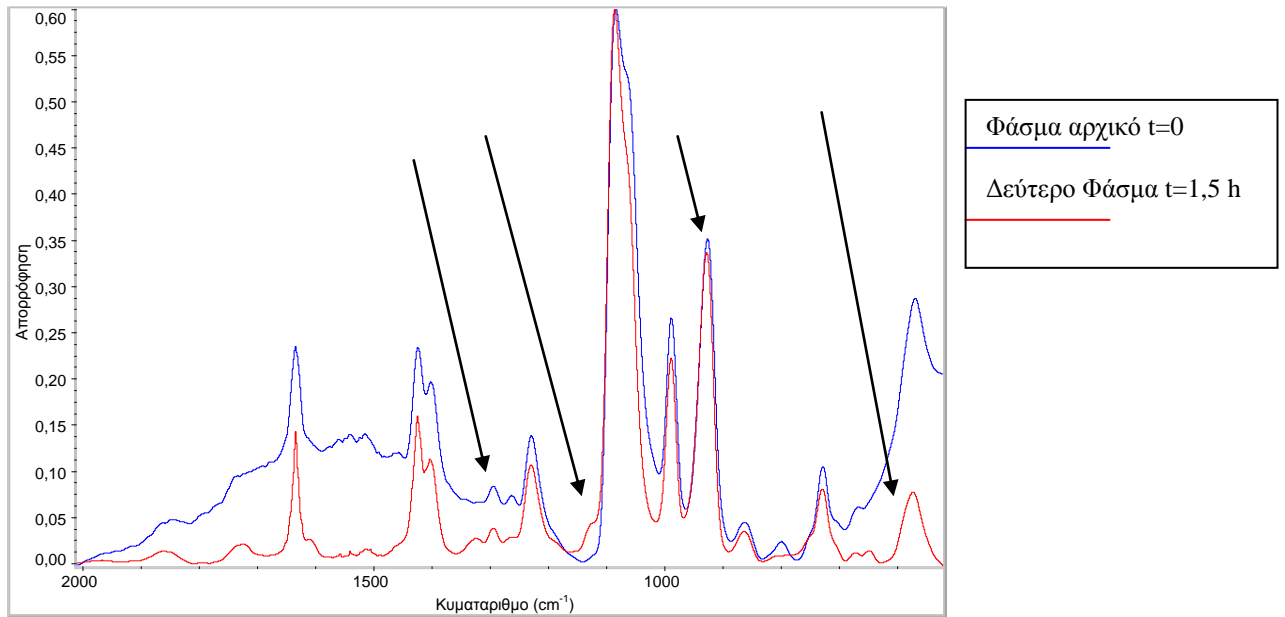
ποσότητα σχηματισμού και την θερμοκρασία που επικρατεί κατά την παραλαβή και τον χρόνο που διαρκεί η παραλαβή. Τα άκυκλα συστατικά μειώθηκαν από 77.4% σε 8.7%, ενώ οι κυκλικές (και τα δύο ισομερή) αυξήθηκαν από 4.7% σε 70.8%, όταν πήγαμε από έντονα θερμικές και μακρόχρονες (SDE, 2h) σε σύντομες και θερμικές (MWHF, 30 min) και σε απομόνωση σε θερμοκρασία δωματίου (USE). Συνεπάγεται από τα παραπάνω, ότι οι πρόδρομες ενώσεις που βρίσκονται στο σκόρδο παράγουν με την διάσπασή τους πρώτα τα κυκλικά και στη συνέχεια από την θερμική διάσπαση αυτών προέρχονται τα άκυκλα. Τα δεδομένα επιβεβαιώνουν αυτά της βιβλιογραφίας Abu-Lafi (Abu Lafi et al, 2004).

5.4. Παρακολούθηση διάσπασης της αλλυσίνης με φασματοσκοπία FT-IR

Η αλλυσίνη που απομονώθηκε με την μέθοδο των υπερήχων τοποθετείται σε μικρό περιέκτη ώστε να είναι σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C. Από το δείγμα λαμβάνεται με τριχοειδή σωλήνα μικρή ποσότητα για την καταγραφή του φάσματος. Μέσα στον περιέκτη λαμβάνει χώρα συνδυασμός αντιδράσεων που έχει αναφερθεί παραπάνω.

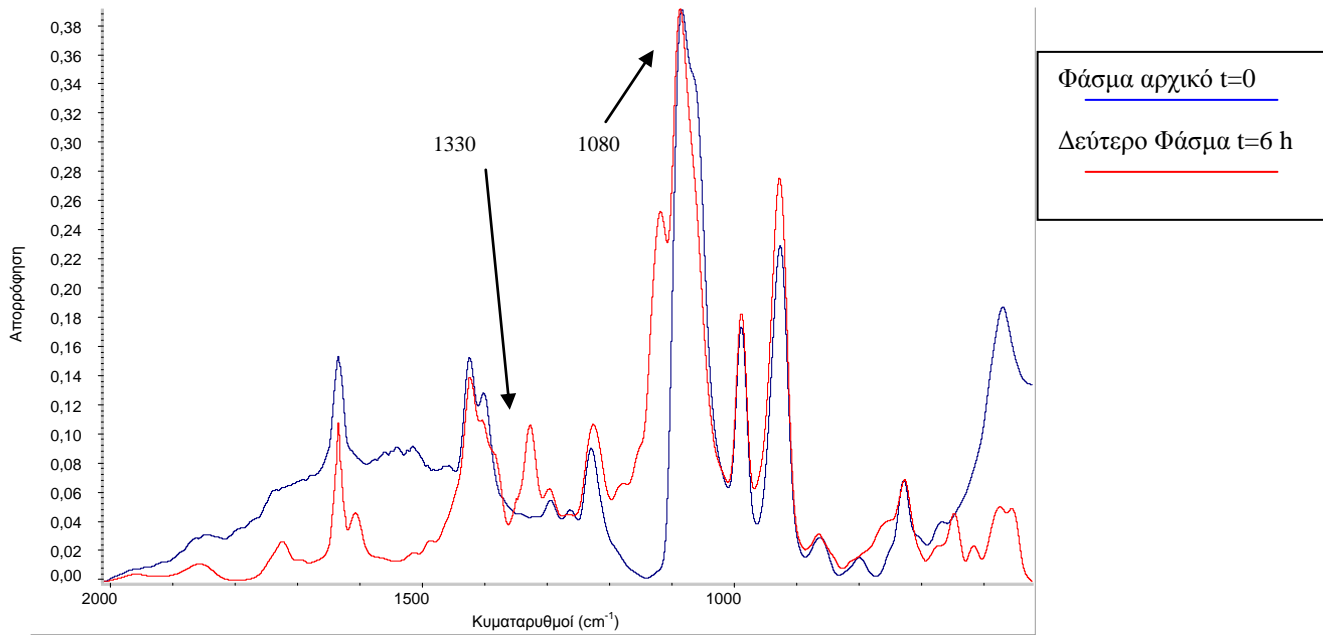
Για την ανάλυση επελέγη η μέθοδος του FT-IR με την καταγραφή του δείγματος να γίνεται σε παράθυρα ZnSe. Η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται για την ανάλυση είναι ελάχιστη (περίπου 1μL) γεγονός που μας δίνει την δυνατότητα να κάνουμε πολλές αναλύσεις από το ίδιο δείγμα χωρίς να επαναλάβουμε την διαδικασία της παραλαβής, και άρα μειώνοντας τις πηγες παραλλακτικότητας.

Για την πιστοποίηση της σταθερότητας του δείγματος μέσα στα παράθυρα του ZnSe ακολουθήθηκε η εξής απλή διαδικασία: προετοιμάστηκε ένα δείγμα και αναλύθηκε αμέσως μετά την παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τους υπερήχους. Το φάσμα FT-IR καταγράφηκε αμέσως μετά και χωρίς να διαχωριστούν τα παράθυρα το δείγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Για τις επόμενες ώρες καταγραφόταν φάσματα από το δείγμα αυτό το οποίο ούτε εξατμίστηκε, και όπως έδειξαν τα φάσματα ούτε και αλλοιώθηκε ως προς την σύστασή του. Η διαδικασία διήρκεσε τρεις μέρες και δεν καταγράφηκε κανένα διαφορετικό φάσμα. Με τον τρόπο αυτό έγινε σαφές ότι το δείγμα μέσα στο παράθυρο σταθεροποιείται και ότι η λήψη φάσματος IR δεν επιφέρει αλλαγές (με την παρούσα διάταξη του οργάνου). Στα παράθυρα ZnSe δεν περνάει αέρας καθώς το υγρό αιθέριο έλαιο σχηματίζει λόγω του τριχοειδούς φαινομένου ένα φιλμ εξωτερικά των παραθύρων από όπου δεν λαμβάνεται φάσμα και προστατεύει το δείγμα που βρίσκεται στο εσωτερικό.



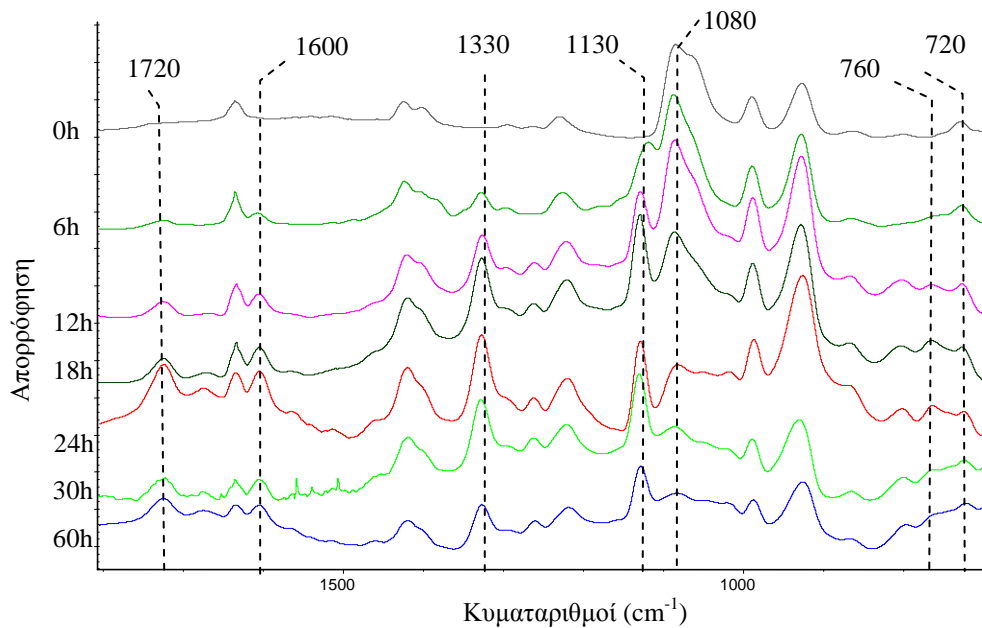
Σχήμα 37 Φάσματα υπέρυθρου αιθερίου ελαίου σκόρδου μετά από παραμονή 1,5 h για την διάσπαση της αλλυσίνης

Οι αλλαγές που παρατηρούνται οφείλονται μόνο στις αλλαγές που προκαλούνται από την διάσπαση της αλλυσίνης. Στην συνέχεια οι αλλαγές είναι πιο ουσιαστικές καθώς το δείγμα μετατρέπεται από σχεδόν καθαρή αλλυσίνη σε σουλφίδια και παίρνει τη σύσταση που αποτελείται από τα γνωστά πολύ – σουλφίδια και διθειίνες. Η πιο ουσιαστική αλλαγή που επέρχεται είναι η απουσία ατόμου οξυγόνου από τα συστατικά του αιθερίου ελαίου. Η απουσία ενός ατόμου που επιφέρει πολικό χαρακτήρα στις ενώσεις βελτιώνει την υφή του φάσματος και καθιστά ορατές τις αλλαγές. Έτσι, μετά από 6 ώρες οι αλλαγές είναι πιο ορατές (Σχήμα 38).



Σχήμα 38 Διαφορά φασμάτων μετά από 6h degradation σε θερμοκρασία δωματίου.

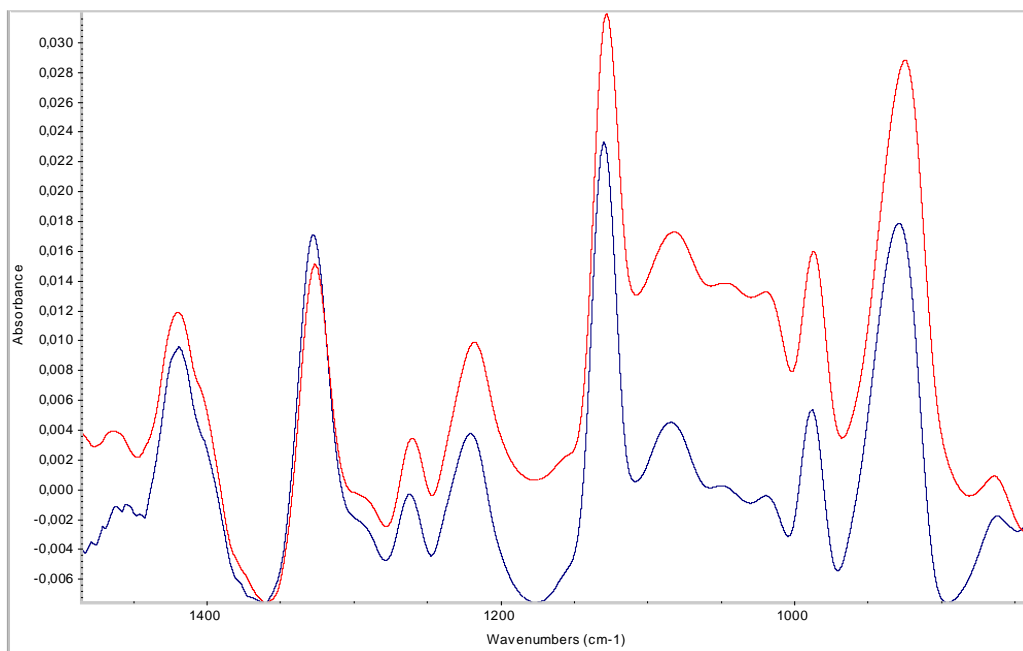
Η κορυφή που στο αρχικό φάσμα στα 1080cm^{-1} είναι διπλή και πλατιά αποκαλύπτεται να είναι διπλή, διαχωριζόμενη με την πάροδο του χρόνου. Η ισχυρότερη κορυφή αποδίδεται στη δόνηση S-O ενώ αντικαθίσταται από ασθενείς κορυφές αποδιδόμενες σε δονήσεις C-H. Παράλληλα, εμφανίζεται μια κορυφή στα 1330cm^{-1} που αποδίδεται στην συμμετρική τάση $\nu\text{S-CH}_{2,3}$.



Σχήμα 39 Πρόοδος αντίδρασης διάσπασης αλλυσίνης

Η διαδικασία παρακολούθηθηκε για 60 ώρες συνολικά όμως μετά τις 30 ώρες το φάσμα είχε σταθεροποιηθεί. Μέχρι τις 30 ώρες διάσπασης παρατηρούνται αλλαγές, όπως φαίνεται στο Σχήμα 43 ενώ η ολοκλήρωση της διαδικασίας πιστοποιείται από την σύγκριση μεταξύ των φασμάτων 30 και 60 ωρών που παρουσιάζονται ίδια (Σχήμα 43).

Αξίζει να σημειωθεί και ότι οι δύο ασθενείς κορυφές, στα 760 cm^{-1} που οφείλεται στην κάμψη C-S-S, και στα 720 cm^{-1} που οφείλεται στην κάμψη του C-S-O αρχίζουν να εμφανίζονται καθώς προχωρά η διάσπαση και παράγονται πολύσουλφίδια που περιέχουν τις χαρακτηριστικές αυτές ομάδες.



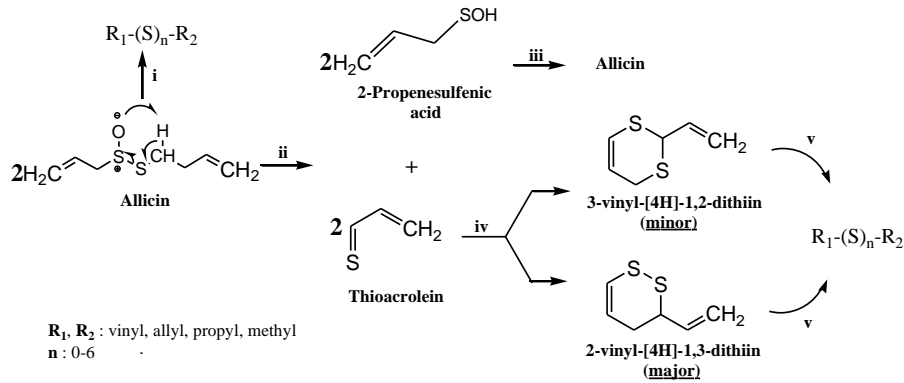
Σχήμα 40 Απόδειξη ολοκλήρωσης αντιδράσεων διάσπασης μετά τις 30 ώρες παραμονής

Συμπληρωματικά, κάποια από τα παραπάνω δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο του GC-MS στον ίδιο χρόνο με την λήψη του φάσματος. Διαπιστώθηκε ότι ανιχνευόταν μόνο συστατικά αιθερίου ελαίου, όπως ήταν αναμενόμενο και όχι σουλφοξίδια που καταστρέφονται από την θερμότητα του αέριου χρωματογράφου. Η αλλυσίνη που υπήρχε στο δείγμα καταστρέφεται.

Πρέπει να σημειωθεί ότι έχει ενδιαφέρον να διαπιστωθεί ποια από τα συστατικά παράγονται με την ήπια διάσπαση σε θερμοκρασία δωματίου καθώς αυτά καθορίζουν την βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου.

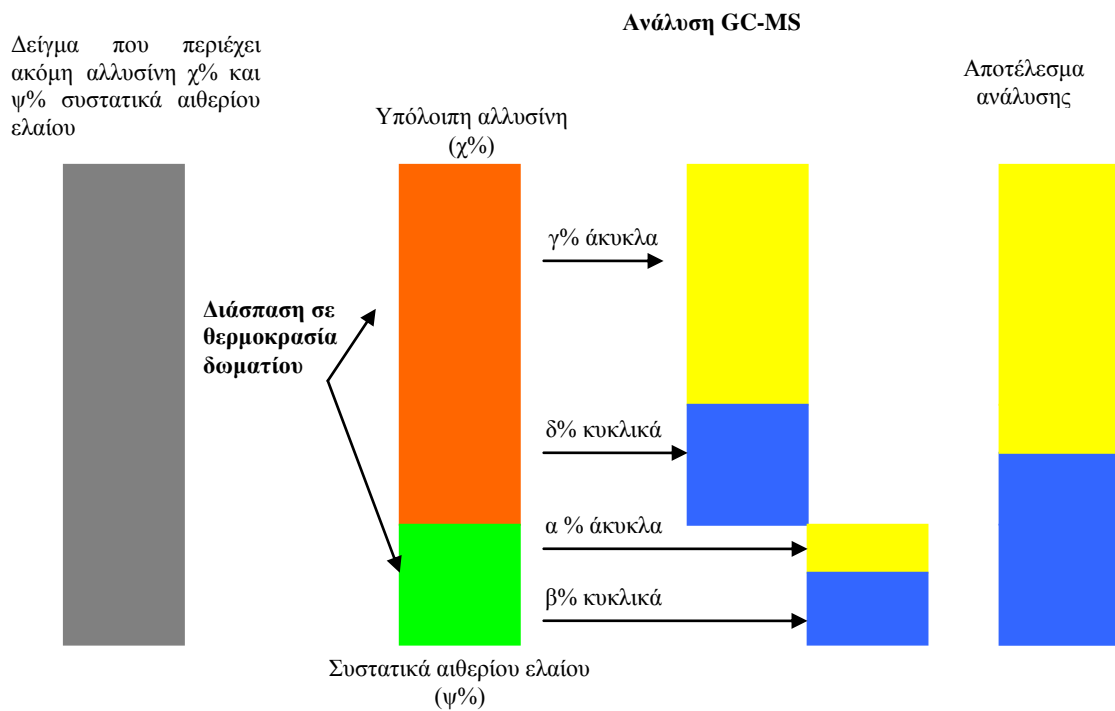
Κάθε δείγμα που εισαγόταν στον αέριο χρωματογράφο είχε όσο περνούσε η ώρα μικρότερη ποσότητα αλλυσίνης και μεγαλύτερη ποσότητα από τα συστατικά αιθερίου ελαίου. Το γεγονός αυτό μπορεί να συνδεθεί με την ασφαλή υπόθεση ότι εντός του εισαγωγέα του δείγματος επικρατούν σταθερές συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας και

θερμοκρασίας 290 °C. Έτσι η αλλυσίνη του δείγματος δέχεται κάθε φορά την ίδια επίδραση και διασπάται με τον ίδιο τρόπο σε συστατικά που είναι μεν ίδια με αυτά που παράγονται σε θερμοκρασία δωματίου όμως παράγονται σε διαφορετικές μεταξύ τους αναλογίες. Η σχηματική απεικόνιση των διαφόρων αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε περιέκτη που περιέχει αλλυσίνη σε θερμοκρασία δωματίου είναι όπως στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20 Μηχανισμός διάσπασης της αλλυσίνης

Σχηματικά αυτό μπορεί να γίνει κατανοητό ως εξής: Έστω ότι η αλλυσίνη διασπάται σε συνθήκες δωματίου δίνοντας α% άκυκλα συστατικά και β% κυκλικές διθειίνες. Αντίστοιχα, στον εισαγωγέα του δείγματος δίνει γ% άκυκλα και δ% κυκλικά συστατικά. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης για ένα δείγμα που περιέχει χ% αλλυσίνη, και ψ% προϊόντα διάσπασης σε θερμοκρασία δωματίου θα είναι ως εξής:



Σχήμα 45 Σχηματική απεικόνιση ανάλυσης δείγματος που περιέχει αλλυσίνη και συστατικά αιθερίου ελαίου ταυτόχρονα

Με τον τρόπο αυτό φαίνεται ότι είναι αμφίβολη η αξιοπιστία της ανάλυσης του δείγματος με τη μέθοδο GC-MS και ως εκ τούτου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος αναφοράς για να αναπτυχθεί νέα μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού αλλυσίνης με βάση την φασματοσκοπία υπεριώθρου.

5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός κυκλικών και άκυκλων θειούχων συστατικών του σκόρδου με φασματοσκοπία FT-Raman

Αποτελέσματα της μεθόδου αναφοράς

Όπως παρουσιάστηκε και στην προηγούμενη παράγραφο η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας είναι αποδεκτή σαν μέθοδος ανάλυσης για τα πτητικά του σκόρδου (Shaath A. N., Flores F. B., Osmanand M., Abd-El Aal M, 1995).

Πίνακας 18 Χημική σύσταση (% v/v) πτητικών συστατικών του σκόρδου που παρελήφθησαν με τρεις διαφορετικές μεθόδους (SDE, MWHD, USE) με διαιθυλαιθέρα και οξικό αιθυλεστέρα.

A/A	Συστατικό	s1 ^a	s2 ^a	s3 ^b	s4 ^b	s5 ^c	s6 ^c
1	Διμεθύλοδισουλφίδιο (DMS)	2,2	1,9	2,1	0,7		
2	Αιθύλοβινύλοσουλφίδιο (EVS)					3,2	9,7
3	1,2-διθειακυκλοπεντάνιο	0,4	0,3	0,4	0,2	0,2	
4	Διαλλύλοσουλφίδιο (DS)	2,3	1,9	0,9	0,1	0,3	0,4
5	2-βινύλοθειοφαίνιο (vinyl thiophene)				0,2		
6	3-μεθυλθειο προπανάλη	0,3	0,4		0,2		
7	<i>cis</i> ή <i>trans</i> Μεθύλοαλλύλ δισουλφίδιο (MADS)	9,1	8,5	9,0	4,3	0,6	1,4
8	Μεθύλοπροπύλοδισουλφίδιο	0,1	0,1	0,1	0,2		
9	<i>cis</i> ή <i>trans</i> μεθύλοαλλυλοδισουλφίδιο (MADS)	0,2	0,2	0,1	0,2		
10	Απροσδιόριστο (Yu et al)	2,4	1,6	1,8	1,5	0,7	2,0
11	Διμεθύλοτρισουλφίδιο (DMTS)	2,0	2,3	2,7	2,0		
12	Αλλύλ 2,3-επόξυπροπύλοσουλφίδιο			0,1		0,1	
13	Διαλλύλοδισουλφίδιο (DDS)	28,4	23,1	17,6	6,8	8,2	6,0
14	C ₆ H ₁₀ S ₂	0,5	0,4	0,3	0,5	0,1	
15	C ₆ H ₁₀ S ₂	1,2	0,9	1,4	1,1	1,5	3,7
16	Μεθύλοβουτύλοτρισουλφίδιο				0,1		
17	Μεθύλοαλλύλοτρισουλφίδιο (MATS)	16,3	17,5	14,1	14,9	0,1	0,2
18	3-βινύλ-[4H]-1,2-διθειίνη (3-VDT)	4,0	4,5	15,9	14,5	32,7	25,7
19	2-βινύλ-[4H]-1,3-διθειίνη (2-VDT)	5,5	8,7	17,7	27,7	38,1	34,4
20	1,4-διμεθύλοτετρασουλφίδιο (DMTTS)	0,4	0,4				
21	Διαλλήλοτρισουλφίδιο (DATS)	20,4	22,1	9,1	14,1	0,2	0,7

Πίνακας 19 (συνέχεια)

22	3,5-δισουλφολο1,2,4-τριθειολάνη	0,2	0,2	0,2	0,2		0,5
23	Δεκαπεντάνιο						0,6
24	Δεκαεπτάνιο						0,5
25	1,2,3,4-τετράθειο-5-μεθύλ κυκλοεξάνιο						0,3
26	Διαλλύλ τετρασουλφίδιο (DATTS)	0,7	0,6	0,1	0,4		
27	3-(2-θειό-4-πεντενύλ)-1-θειακυκλοεξ-5-ένιο	0,1		0,2	0,2	0,1	
28	3-(2,3,4-τριθειο-5-επτενύλ-1-θεια-κυκλοεξ-5-ένιο	0,3	0,4	2,0	2,7	6,4	2,2
	Απροσδιόριστα	3,0	4,0	4,2	7,2	7,5	11,7
Συνολική περιεκτικότητα σε ακόρεστα άκυκλα συστατικά		77,4	73,9	51,0	41,0	12,7	19,5

a: s1 δισουλφολο1,2,4-τριθειολάνη και s2 οξικός αιθυλεστέρας με την μέθοδο SDE

b: s3 δισουλφολο1,2,4-τριθειολάνη και s4 οξικός αιθυλεστέρας με την μέθοδο MWH

c: s5 δισουλφολο1,2,4-τριθειολάνη και s6 οξικός αιθυλεστέρας με την μέθοδο USE

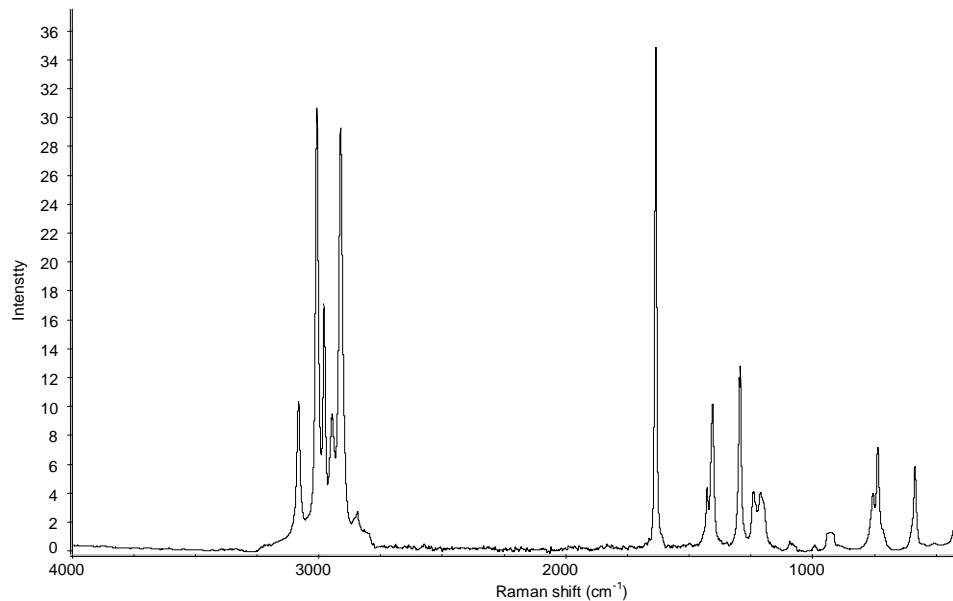
Όπως φαίνεται και από τον πίνακα τα συνολικά ακόρεστα άκυκλα ήταν στα δείγματα που αναλύθηκαν από 12,7 % μέχρι 77,4 %. Το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισε το δείγμα με την μέθοδο SDE σε διαλύτη δισουλφολο1,2,4-τριθειολάνη, ενώ το χαμηλότερο με την μέθοδο USE και διαλύτη δισουλφολο1,2,4-τριθειολάνη.

Αποτελέσματα με την μέθοδο FT-Raman

Προκειμένου να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός συστατικών του αιθερίου ελαίου του σκόρδου πρέπει να γίνει απευθείας συσχέτιση της έντασης συγκεκριμένων κορυφών στο φάσμα RAMAN, με την συγκέντρωση συγκεκριμένων συστατικών στο δείγμα. Στην περίπτωση που προσπαθούμε να διαχωρίσουμε ομάδες ουσιών όπως στην προκειμένη, αρκεί μια διαφορά στα φάσματα των συστατικών για να γίνει στη συνέχεια ο ποσοτικός προσδιορισμός. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε πολύπλοκο υπόστρωμα όπως ένα φυσικό αιθέριο έλαιο, όπου αναμένεται να υπάρχουν αλληλεπιδράσεις στις κορυφές του φάσματος, είναι προτιμότερο να μην γίνουν συνθετικά πρότυπα αλλά σε ήδη φυσικά μίγματα να γίνει προσθήκη πρότυπης ουσίας ώστε να μεταβληθεί μονοσήμαντα η περιεκτικότητα μόνο σε αυτό το συστατικό.

Για να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των ακόρεστων, άκυκλων συστατικών του αιθερίου ελαίου του σκόρδου με φασματοσκοπία Raman πρέπει να επιλεγεί το πιο χαρακτηριστικό μέλος της ομάδας αυτής των ενώσεων. Το συστατικό αυτό είναι το (δισουλφολο1,2,4-τριθειολάνη)

σουλφίδιο) diallyl sulfide καθώς είναι απλό σχετικά και βρίσκεται στο φυσικό αιθέριο έλαιο. Το φάσμα Raman του (διαλλύλ σουλφιδίου) diallyl sulfide φαίνεται στην Εικόνα 23.



Εικόνα 19 Φάσμα FT-Raman προτύπου διάλλυλο σουλφιδίου

Η προσθήκη γνωστής ποσότητας από το παραπάνω συστατικό σε αιθέριο έλαιο που περιέχει πολύ λίγα άκυκλα συστατικά λόγω της μεθόδου με την οποία έχει γίνει η παραλαβή του δημιουργεί δείγματα με γνωστή συγκέντρωση.

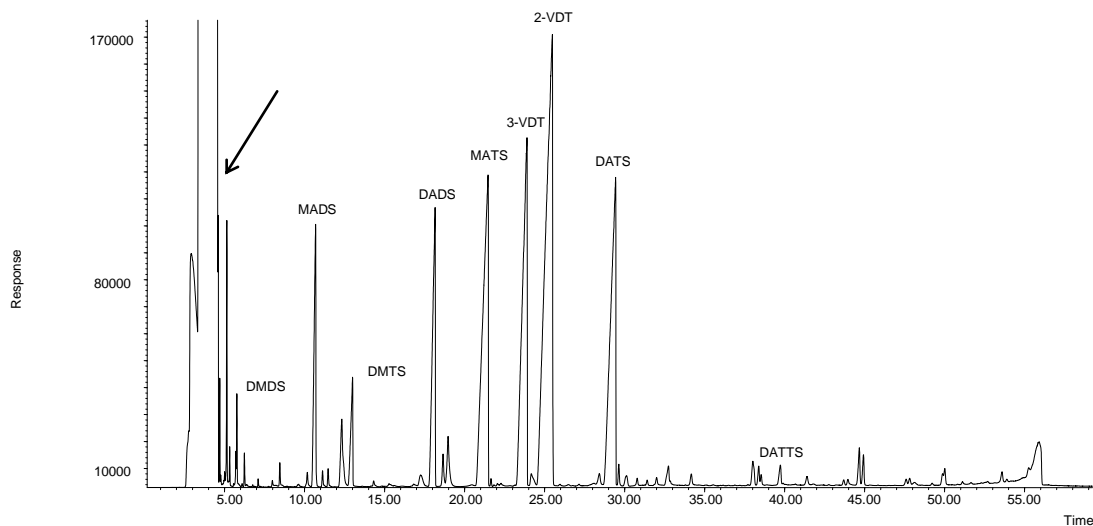
Το δείγμα αιθερίου ελαίου με την μικρότερη συγκέντρωση σε άκυκλα θειούχα συστατικά ήταν το δείγμα που παρελήφθη με διαιθυλαιθέρα και την μέθοδο των υπερήχων (s5). Το δείγμα αυτό περιείχε 12,7% σε άκυκλα συστατικά όπως αυτό προσδιορίστηκε από την ανάλυση με την μέθοδο αναφοράς (GC). Με προσθήκη προτύπου διάλλυλο σουλφιδίου η συγκέντρωσή του σε άκυκλα συστατικά μεταβάλλεται όμως επειδή η ποσότητα που προστίθεται είναι γνωστή, τότε μπορούμε να παράγουμε «πρότυπα» μίγματα γνωστής εκ των προτέρων συγκέντρωσης σε άκυκλα συστατικά. Έτσι προκύπτουν τα δείγματα st1-st10 τα οποία χρησιμοποιούνται για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς.

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων που προέκυψαν ήταν όπως φαίνεται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19 Συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη αναφοράς

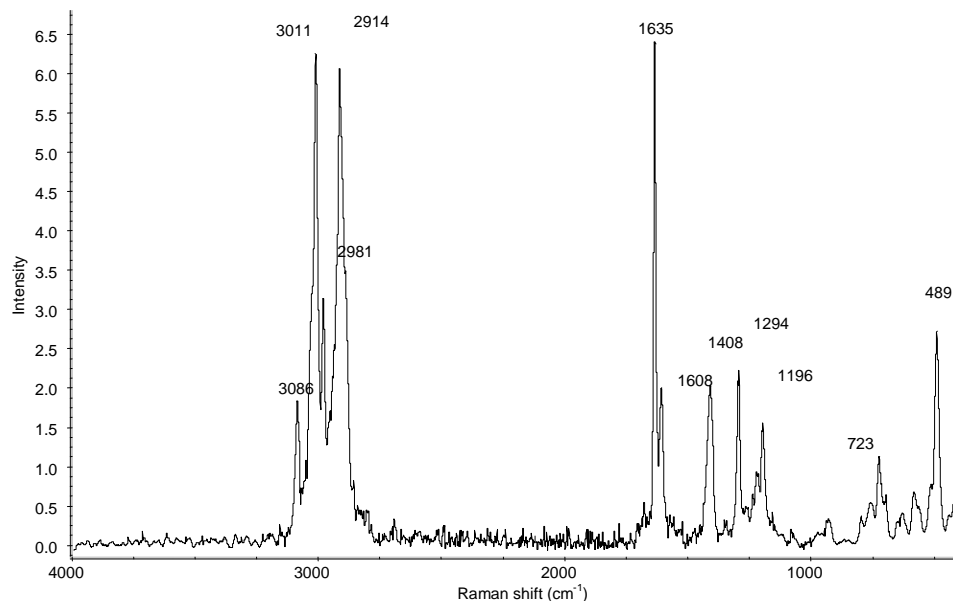
Όνομα προτύπου	Συγκέντρωση σε ακόρεστα άκυκλα συστατικά (%)
St1	16.7
St2	26.6
St3	37.5
St4	41.2
St5	47.7
St6	50.0
St7	54.5
St8	61.5
St9	66.7
St10	76.2

Τα άγνωστα δείγματα προέκυψαν από τις διάφορες κατεργασίες και ονομάστηκαν s1-s6 (Πίνακας 19), τα δε αποτελέσματα της ανάλυσης του με GC παρουσιάζονται στον πίνακα 16. Ένα από τα δείγματα με ενδιάμεση συγκέντρωση ήταν αυτό του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκαν με την μέθοδο MWHD, χρωματογράφημα του οποίου φαίνεται στο Σχήμα 42.



Σχήμα 42 Τυπικό χρωματογράφημα του πτητικού κλάσματος σκόρδου που παρελήφθη με τη μέθοδο MWHD σε οξικό αιθυλεστέρα.

Αντίστοιχα το φάσμα Raman του δείγματος αυτού φαίνεται στο Σχήμα 23.



Σχήμα 23 Φάσμα FT-Raman αιθερίου ελαίου από σκόρδο που παρελήφθη με την μέθοδο MWHD και χρήση οξικού αιθυλεστέρα.

Από τα φάσματα FT-Raman του διάλυτο σουλφιδίου και ενός τυπικού αιθερίου ελαίου προσδιορίζονται 4 κύριες κορυφές στην περιοχή μεταξύ 3100 και 2800 cm^{-1} . Η πρώτη στα 3086-3083 cm^{-1} οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης του $=\text{CH}_2$, η δεύτερη στα 3011-3010 cm^{-1} στην τάση του C-H, η τρίτη στα 2981-2980 cm^{-1} στην συμμετρική δόνηση τάσης του $=\text{CH}_2$ και η τέταρτη (2914-2912 cm^{-1}) στην τάση του $-\text{CH}_2-$. Η δεύτερη περιοχή από τα 1700 μέχρι τα 1000 περιέχει 4 κορυφές στο φάσμα του diallyl sulfide και 5 στο φάσμα του αιθερίου ελαίου. Η πολύ ισχυρή κορυφή στα 1636-1635 cm^{-1} αποδίδεται στην τάση του C=C της αλλυλ- ομάδας. Η κορυφή στα 1606 cm^{-1} που εμφανίζεται μόνο στο φάσμα του αιθερίου ελαίου, αποδίδεται στον συζυγιακό διπλό δεσμό της διθεινο-ομάδας. Η διπλή κορυφή μεταξύ 1428-1401 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στην τάση του $-\text{CH}_2-$, ενώ η τάση του $\text{CH}_2=\text{CH}-$ μετατοπίζεται στα 1294 cm^{-1} . η σκελετική δόνηση του μορίου diallyl sulfide προκαλεί την διπλή κορυφή στα 1220-1198 cm^{-1} . Τέλος η περιοχή από 1000- 400 παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς περιέχει τις δονήσεις των C-S και S-S. Πιο ειδικά, η διπλή κορυφή στα 755 και 723 cm^{-1} οφείλεται στην συμμετρική τάση του δεσμού C-S, ενώ η αντισυμμετρική τάση του ίδιου δεσμού είναι στα 585 cm^{-1} . Οι δυσουλφιδικές γέφυρες δίνουν κορυφές τάσης κοντά στα 489, με μετατόπιση όταν είναι παρόντα περισσότερα άτομα S. Η απόδοση των κορυφών έγινε σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Terpinski, 1987, Dean, 1999).

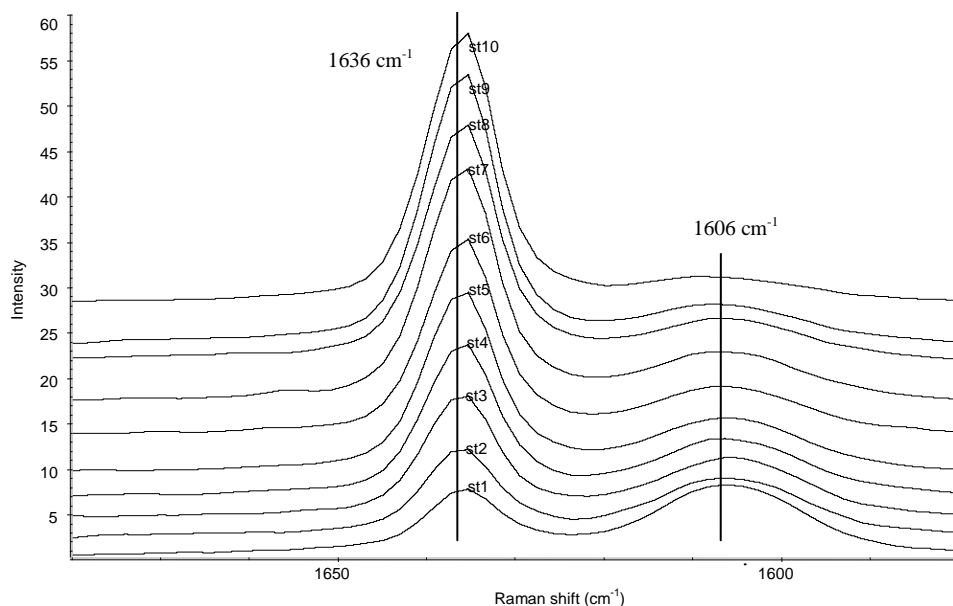
Οι πιο ενδιαφέρουσες κορυφές για το σκοπό μας είναι αυτές στα 1636 και 1606 cm^{-1} που συνδέονται με την παρουσία άκυκλων και κυκλικών συστατικών αντίστοιχα. Το αιθέριο έλαιο που παράγεται με την χρήση οξικού αιθυλεστέρα με τη μέθοδο MWHD (δείγμα s5)

είναι το πιο φτωχό σε άκυκλα συστατικά (Πίνακας 20). Όταν προστεθεί σε 100 μL αυτού του δείγματος, η κορυφή στα 1636 cm^{-1} του φάσματος Raman αυξανόταν. Άρα, υπάρχει μια σχέση μεταξύ της ποσότητας ακόρεστων άκυκλων συστατικών που προστίθενται στο δείγμα και το ύψος της κορυφής στο φάσμα του δείγματος. Επιπλέον, η περιεκτικότητα (% v/v) σε ακόρεστα άκυκλα συστατικά του αιθερίου ελαίου του σκόρδου, του οποίου η συγκέντρωση στα εν λόγω συστατικά είναι μεγαλύτερη από το δείγμα s5 μπορεί να συσχετιστεί με την αύξηση του ύψους της κορυφής στα 1636 cm^{-1} . Το μέσο ύψος της κορυφής στην τριάδα των φασμάτων του s5 στα 1636 cm^{-1} ήταν 5,660.

Η αύξηση του ύψους της κορυφής στα 1636 cm^{-1} κανονικοποιείται με το ύψος της κορυφής στα 1606 cm^{-1} , με τον εξής μαθηματικό τρόπο:

$$\frac{\text{Υψος}1636 - 5,660}{\text{Υψος}1606} = A$$

Το πηλίκο A για κάθε ένα από τα δέκα πρότυπα γνωστής συγκέντρωσης σε ακόρεστα άκυκλα συστατικά (% v/v), εμφανίζεται στον πίνακα 20. Διαπιστώνεται η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης μεταξύ του πηλίκου A των δέκα δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης και του ποσοστού ακόρεστων άκυκλων (% v/v). Σχηματικά, η συσχέτιση διαπιστώνεται και με την περιοχή του φάσματος του Σχήματος 44 όπου εμφανίζονται σε κοινό σύστημα αξόνων τα φάσματα όλων των δειγμάτων st1-10 και οι κορυφές 1636 και 1606 cm^{-1} .



Σχήμα 46 Συσχετισμός ύψους κορυφών των προτύπων δειγμάτων

Πίνακας 20 Περιεκτικότητα (%) σε άκυκλα συστατικά σε σχέση με το A.

Πρότυπο	1636	1606	H-H ₀ *	H-H ₀ /H ₁ -A	A±SD	Όγκος (μL) διαλυόμενου φιδίου που προστίθεται σε 100μL του S5	Συνολική περιεκτικότητα σε άκυκλα συστατικά(%v/v)
	Υψος στα cm ⁻¹ (H)	Υψος στα cm ⁻¹ (H ₁)					
st1	st1a	6,656	5,161	1,495	0,193	4,6	16,7
	st1b	6,671	5,156	1,515	0,196		
	st1c	6,613	5,157	0,954	0,185		
st2	st2a	11,425	5,041	5,766	1,144	18,9	26,6
	st2b	11,414	5,047	5,754	1,140		
	st2c	11,434	5,039	5,774	1,146		
st3	st3a	14,520	4,753	8,860	1,864	39,7	37,5
	st3b	14,478	4,751	8,818	1,856		
	st3c	14,484	4,749	8,824	1,858		
st4	st4a	15,616	4,150	9,956	2,399	48,5	41,2
	st4b	15,628	4,143	9,968	2,406		
	st4c	15,660	4,146	10,000	2,412		
st5	st5a	19,904	4,208	14,244	3,385	66,9	47,7
	st5b	19,848	4,205	14,188	3,374		
	st5c	19,858	4,203	14,198	3,378		

Πρότυπο	Υψος στα 1636 cm^{-1} (H_1)		$H-H_0^*$	$H-H_0/H_1=A$	A+SD	Όγκος (μL) διαλυοσουλφιδίου που προστίθεται σε 100μL του S5	Συνολική περιεκτικότητα σε άκωκλα συστατικά(%v/v)
	Υψος στα 1606 cm^{-1} (H_2)						
st6	st6a	21,668	4,206	16,008	3,806	74,6	50,0
	st6b	21,667	4,209	16,007	3,803		
	st6c	21,690	4,203	16,030	3,814		
st7	st7a	21,134	3,739	18,474	4,941	91,9	54,5
	st7b	24,139	3,743	18,479	4,937		
	st7c	24,201	3,748	18,541	4,947		
st8	st8a	28,590	3,670	22,930	6,248	126,8	61,5
	st8b	28,494	3,661	22,834	6,237		
	st8c	28,536	3,666	22,876	6,240		
st9	st9a	23,025	2,531	17,365	6,861	162,2	66,7
	st9b	22,976	2,529	17,316	6,847		
	st9c	23,022	2,535	17,362	6,849		
st10	st10a	17,219	1,438	11,559	8,038	266,8	76,2
	st10b	17,141	1,430	11,481	8,029		
	st10c	17,215	1,436	11,555	8,047		

* Ο μέσος όρος του ύψους της κορυφής στα 1636 cm^{-1} του προτύπου S5 ήταν 5,660

Από τα δεδομένα του πίνακα και απλές αριθμητικές πράξεις είναι εύκολο να προσδιοριστεί η συνάρτηση (εξίσωση ευθείας) που συνδέει τα δύο μεγέθη:

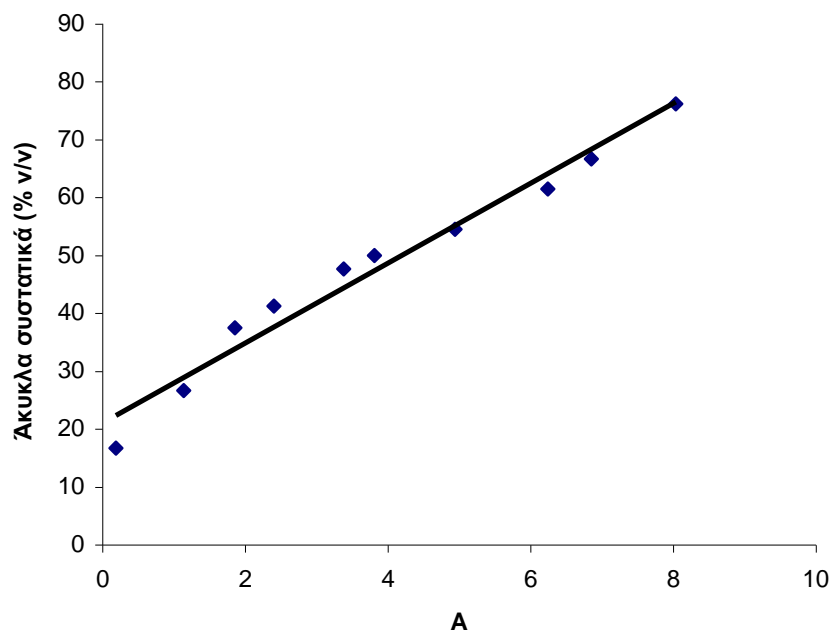
$$\text{Ποσοστό ακόρεστων άκυκλων συστατικών (\% v/v)} = (20.9 \pm 1.9) + (6.9 \pm 0.4) \times A$$

με $(r=0.97, n=3)$.

Η γραφική παράσταση της οποίας παρουσιάζεται στο Σχήμα 47.

Τα όρια ανίχνευσης είναι στην περιοχή από 16.7 - 76.2 % v/v και η % RSD κυμαίνεται από 0.1 έως 3.1 %.

Οι περιεκτικότητες (% v/v) των αιθερίων ελαίων του σκόρδου σε ακόρεστα άκυκλα συστατικά προσδιορίστηκαν με την παραπάνω εξίσωση και τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 21.



Σχήμα 47 Γραφική παράσταση της συνάρτησης προσδιορισμού

Πίνακας 21 Περιεκτικότητα (%) των αγνώστων σε άκυκλα συστατικά με την μέθοδο FT-Raman

Δείγματα	Υψος στα 1636 cm ⁻¹ (H)		Υψος στα 1606 cm ⁻¹ (H ₁)		H-H ₀ [*]	H-H ₀ /H ₁ =A	Ποσοστό άκυκλων συστατικών (% v/v)±SD
	s1a	s1b	s2a	s2b			
SDE- διαυδαλέρας (s1)	s1a	17,872	1,532	12,212	7,971	75,3±0,5	
	s1b	17,756	1,537	12,096	7,870		
	s1c	17,673	1,535	12,013	7,826		
SDE- οξικός αιθυλαστέρας (s2)	s2a	17,027	1,426	11,367	7,971	75,0±0,8	
	s2b	16,694	1,423	11,034	7,754		
	s2c	16,732	1,420	11,072	7,797		
MWHHD – διαυδαλέρας (s3)	s3a	23,536	3,698	12,786	5,508	58,6±0,9	
	s3b	25,419	3,705	19,759	5,333		
	s3c	26,278	3,695	20,618	5,580		
MWHHD–οξικός αιθυλαστέρας (s4)	s4a	22,669	4,207	17,009	4,043	48,4±0,5	
	s4b	22,464	4,201	16,804	4,000		
	s4c	22,110	4,204	16,450	3,913		
USE – οξικός αιθυλαστέρας (s6)	s6a	14,321	4,497	8,661	1,926	33,3±0,8	
	s6b	13,410	4,493	7,750	1,725		
	s6c	13,477	4,495	7,817	1,739		

* Ο μέσος όρος του ύψους της κορυφής στα 1636 cm⁻¹ του προτύπου s5 ήταν 5,660

Η περιεκτικότητα των αιθερίων ελαίων προσδιορίστηκε με την μέθοδο FT-Raman μεταξύ 33.3 % και 75.3 %. Στα δείγματα s1, s2 και s3 τα αποτελέσματα μεταξύ της προτεινόμενης μεθόδου και της μεθόδου αναφοράς είναι παρόμοια και το ποσοστό μη ταυτοποιημένων ουσιών μέσα στο αιθέριο έλαιο είναι μεταξύ 3-4.2 %. Αντίθετα το ίδιο δεν μπορεί να ειπωθεί και για τα δείγματα s4 και s6, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των μεθόδων ανάλυσης, GC και FT-Raman. Είναι πολύ πιθανό η παρέκκλιση αυτή να οφείλεται στο γεγονός ότι στα δείγματα αυτά υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό απροσδιόριστων ουσιών (7,2 και 11,7%) σύμφωνα με τον πίνακα 16. Το ποσοστό ακόρεστων, άκυκλων συστατικών στο απροσδιόριστο κομμάτι του αιθερίου ελαίου, είναι αυτό που ίσως προκαλεί την παρέκκλιση μεταξύ των μεθόδων. Υπενθυμίζεται, ότι για την σύγκριση μπορεί να ληφθεί υπ' όψη μόνο το ποσοστό που με βεβαιότητα ανήκει σε κυκλικά ακόρεστα συστατικά.

Τέλος, μπορεί να βγεί το συμπέρασμα ότι η φασματοσκοπία FT-Raman μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον γρήγορο και ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των πολύτιμων για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες ακόρεστων, άκυκλων συστατικών του αιθερίου ελαίου του σκόρδου. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτά του GC. Τα ζητούμενα συστατικά ποσοτικοποιήθηκαν μεταξύ 33,3 και 75,3 %.

Στα θετικά της παρούσας τοποθέτησης πρέπει να καταλογιστεί και η αποτελεσματική χρήση απλών μαθηματικών για τον ποσοτικό προσδιορισμό, που χωρίς αυτά θα ήταν αδύνατο να γίνει. Οι εφαρμογές της φασματοσκοπίας είναι πολύ στενά συνδεδεμένες με τέτοιου είδους μεθόδους και είναι νέα η προσέγγιση που έγινε με τη μέθοδο του σταθερού λόγου (A).

5.6. Παραλαβή τριγλυκεριδίων από ελαιούχους σπόρους και υποπροϊόντα σπορελαιουργίας (πίττες) με υπερήχους

Από την αντιπαραβολή των αποτελεσμάτων της εκχύλισης κάθε σπόρου με την αντίστοιχη «πίττα» μπορεί να προσδιοριστεί και η αποτελεσματικότητα της μηχανικής παραλαβής που προηγήθηκε, προκειμένου να προκύψει η «πίττα». Έτσι, εκτός από την περίπτωση της αγριαγκινάρας, μπορεί τεθεί και η βάση προκειμένου να είναι δυνατή η αξιολόγηση της παραλαβής με υπερήχους έναντι της μηχανικής και της παραλαβής με την μέθοδο Soxhlet.

Παρατηρήθηκε ότι η εκχυλιστική ικανότητα το κανονικού εξανίου αρκούσε ώστε να γίνει και μία μόνο εκχύλιση με διάρκεια 30 λεπτά.

Πίνακας 22 Αποδόσεις μεθόδων παραλαβής Soxhlet και υπερήχων σε τριγλυκερίδια ανά 100g υλικού

Δείγμα		Soxhlet (Τριγλυκερίδια %w/w)	Υπέρηχοι (Τριγλυκερίδια %w/w)
Αγριαγκινάρα	Σπόροι	24,2	23,4
Βαμβάκι	Σπόροι	17,5	16,1
	Πίττα	9,1	8,6
Ηλίανθος	Σπόροι	41,2	38,7
	Πίττα	12,7	11,4
Σουσάμι	Σπόροι	58,3	55,7
	Πίττα	32,4	31,1

Μια πρώτη αξιολόγηση της νέας μεθόδου παραλαβής, καθιστά προφανές ότι είναι συγκριτικά ανώτερη της μεθόδου αναφοράς σε όρους χρόνου εκχύλισης και κατανάλωσης διαλύτη ενώ δεν αποτελεί σημαντικά πιο πολύπλοκη μέθοδο στην εφαρμογή της ή στις απαιτήσεις της σε εξοπλισμό. Η διαφοροποίηση μεταξύ των παρεληφθέντων ποσοτήτων τριγλυκεριδίων όπως αυτή φαίνεται στο συγκριτικό πίνακα 22 αποδίδεται κυρίως στις μηχανικές ιδιότητες του κάθε υλικού. Πιο απλά, σκληρότεροι, πιο μεγάλοι (βαμβάκι) και με περιβλήματα (ηλίανθος) σπόροι δεν αποδίδουν στους υπερήχους το ίδιο καλά όσο στη Soxhlet, ενώ τα δείγματα που έχουν ήδη υποστεί μηχανική κατεργασία (πίττες), δείχνουν ποσοστά ανάκτησης σχεδόν 98%.

Όπως είναι εμφανές, η διαφοροποίηση μεταξύ των ποσοστών των τριγλυκεριδίων που περιέχει κάθε σπόρος είναι μεγάλη, πράγμα που καθιστά πολύ σημαντική την προσεκτική επιλογή των φυτών που θα καλλιεργηθούν με σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμων. Επίσης,

είναι πλέον και αξιολογήσιμη η αξία του παραπροϊόντος της σπορελαιουργίας, (της πίττας), η οποία μέχρι σήμερα έχει μοναδική εμπορική απορρόφηση από την κτηνοτροφία ενώ θα μπορούσε ενδεχομένως να αξιοποιηθεί και σαν πηγή παραγωγής βιοκαυσίμου. Εξάλλου, πέρα από την παραλλακτικότητα που παρουσιάζουν οι σπόροι ως προς τα ποσοστά του συνόλου των τριγλυκεριδίων που περιέχουν, παρουσιάζουν και διαφορές μεταξύ της περιεκτικότητας της αντίστοιχης «πίττας» σε τριγλυκερίδια. Από το γεγονός αυτό μπορεί να προκύψει το μέγεθος της απόδοσης της μηχανικής παραλαβής όπως φαίνεται στον πίνακα 23. Στις τρεις υπό εξέταση περιπτώσεις, τα ποσοστά τριγλυκεριδίων που «χάνονται» στην βιομηχανική παραλαβή των τριγλυκεριδίων διαφέρει δραματικά, όμως η γνώση της υφής του κάθε σπόρου ξεχωριστά δικαιολογεί αυτό το φαινόμενο. Έτσι ο κάθε σπόρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρώτα για την μηχανική παραλαβή του ελαίου του και στη συνέχεια μόνο η «πίττα» του να αξιοποιηθεί για συμπληρωματική παραλαβή και αξιοποίηση με υπερήχους. Άλλωστε η επίδοση της μεθόδου των υπερήχων είναι καλύτερη σε ήδη επεξεργασμένα δείγματα και ουσιαστικά εφάμιλλη αυτής της Soxhlet.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι η παραλαβή των τριγλυκεριδίων μπορεί να γίνει το ίδιο αποτελεσματικά με τη βοήθεια υπερήχων, όσο και με την μέθοδο Soxhlet, με παραλλακτικότητα μεταξύ των υλικών αποδιδόμενη κυρίως στην υφή του υλικού και όχι σε φυσικοχημικούς παράγοντες.

5.7. Σύγκριση μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίων με απλή ανάδευση και με την χρήση υπερήχων

5.7.1 Μετεστεροποίηση με χρήση υπερήχων

Η αντίδραση μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων με την χρήση υπερήχων δίνει τα ίδια ποιοτικά αποτελέσματα με την διενέργειά της με απλή θέρμανση σε ελαιόλουτρο. Αυτό επιβεβαιώνεται από την επιβεβαίωση του πέρατος της αντίδρασης με την μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Η εξοικονόμηση χρόνου είναι το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου των υπερήχων αφού το αποτέλεσμα των αντιδράσεων είναι το ίδιο και στις δύο περιπτώσεις.

Η εξοικονόμηση χρόνου μεταφράζεται ευθέως και σε εξοικονόμηση ενέργειας. Η μέθοδος των υπερήχων με χρήση διαλύτη είναι απλούστερη καθώς η παραλαβή των προϊόντων της αντίδρασης είναι ευκολότερη ενώ και η ανάκτηση του διαλύτη σε μεγάλο ποσοστό, δεν επιβαρύνει με σπατάλη διαλυτών.

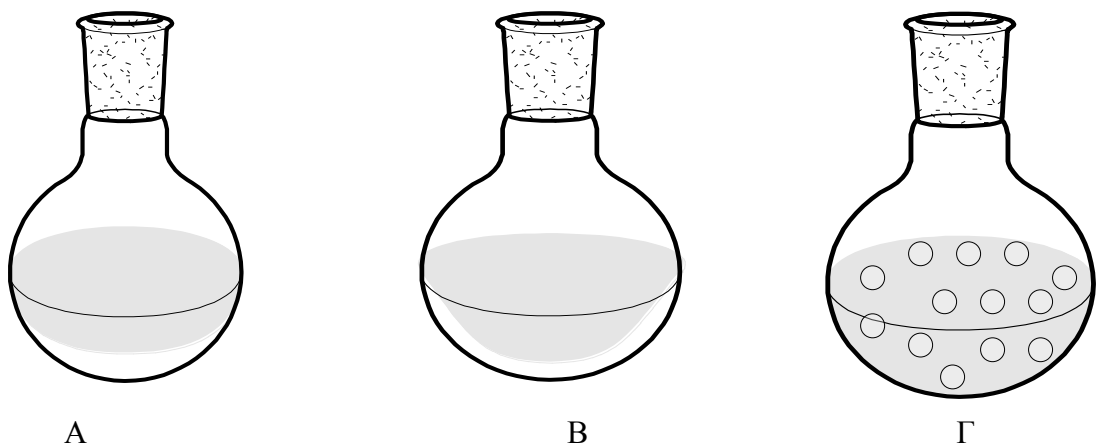
Βασικό πρόβλημα για την δοκιμή αυτή αναμενόταν να αποτελέσει η μείωση της συγκέντρωσης των αντιδρώντων αφού πλέον το ένα γραμμάριο φυτικού ελαίου θα είναι

διαλυμένο σε 25 mL διαλύτη προκειμένου να αντιδράσει και πάλι με ~ 0,25 g μεθανόλης με περιεκτικότητα 1M σε NaOH. Τα πειραματικά αποτελέσματα απέδειξαν ότι δεν επηρεάστηκε η απόδοση της αντίδρασης ενώ και ο διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης ήταν το ίδιο απλός όπως και στην περίπτωση της παρουσίας 1 mL διαλύτη.

Η επιβεβαίωση της ομαλής διεξαγωγής της αντίδρασης και παρουσία κανονικού εξανίου και μάλιστα σε σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα από τα αντιδρώντα αποτελεί προαπαιτούμενο για την εκτέλεση αντιδράσεων διπλής φάσης όπως αυτή της ταυτόχρονης εκχύλισης – μετεστεροποίησης που ακολούθησε. Η ιδέα της προθήκης ποσότητας διαλύτη για την πρακτική διευκόλυνση του διαχωρισμού των προϊόντων της αντίδρασης μετεστεροποίησης σε συνάρτηση και με την ήδη διαπιστωμένη αποτελεσματικότητα των υπερήχων για την παραλαβή των τριγλυκεριδίων οδήγησε λογικά στην υπόθεση ότι τα δύο φαινόμενα θα μπορούσαν να συμβούν ταυτόχρονα αν συνέτρεχαν κάποιοι παράγοντες.

Μετά την εκτέλεση των αντιδράσεων τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια με αυτά των προηγούμενων. Στην περίπτωση μιας αντίδρασης διπλής φάσης σε περιβάλλον υπερήχων κάποια φαινόμενα έχουν αξία να περιγραφούν προκειμένου να καταστεί σαφής η διαφορά και τα πλεονεκτήματα της μεθόδου.

Με την εισαγωγή των αντιδρώντων στην φιάλη, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται άμεσα. Στην περίπτωση της παρουσίας διαλύτη ο διαχωρισμός είναι καλύτερος και πιο σαφής. Η αντίδραση της μετεστεροποίησης λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια διαχωρισμού όπου τα μόρια πρέπει να διαταχθούν κατά τρόπο που να επιτρέπει την στερεοχημική προσβολή του τριγλυκεριδίου από το μεθόξυ (CH_3O). Η δραστική επιφάνεια μπορεί να αυξηθεί με την ανάδευση ή όπως παρουσιάζεται με την τοποθέτηση της φιάλης σε περιβάλλον υπερήχων. Στην περίπτωση της απουσίας του διαλύτη η δραστική επιφάνεια αυξάνεται με την δημιουργία γαλακτώματος, τη διασπορά δηλαδή «κηλίδων» μεθανόλης μέσα στο φυτικό έλαιο. Με τον τρόπο αυτό η δραστική επιφάνεια πολλαπλασιάζεται από το εμβαδό διατομής που είναι σε κατάσταση ηρεμίας, στο εμβαδό περιμέτρου κώνου της δίνης υπο ανάδευση και στο άθροισμα των εμβαδών της επιφάνειας των διεσπαρμένων σφαιρικών κηλίδων που υπάρχουν στο γαλάκτωμα.



Σχήμα 24 Σχηματική απεικόνιση της αύξησης της δραστηκής επιφάνειας με την διασπορά

Η διαφορά που προκύπτει με την χρήση διαλύτη είναι ουσιαστική γιατί επηρεάζει την σταθερότητα του γαλακτώματος, δηλαδή την εύκολη διάσπασή του με την συσσωμάτωση της διεσπαρμένης μεθανόλης στο μίγμα φυτικού ελαίου και εξανίου.

Εδώ πρέπει να γίνει αναφορά στον ρόλο της γλυκερόλης που παράγεται σαν προϊόν της αντίδρασης και που έχει ουσιαστική συνεισφορά στην δημιουργία σταθερού γαλακτώματος. Με την παρουσία του διαλύτη (εξανίου) η γλυκερόλη δεν βρίσκει περιβάλλον για να συνάψει δεσμούς υδρογόνου αφού οι μεθυλεστέρες είναι αναμεμιγμένοι με το εξάνιο. Έτσι, αναμιγνυόμενη με την περίσσια μεθανόλης διαχωρίζεται προς το χαμηλότερο μέρος της φιάλης.

5.7.2 Ταυτόχρονη εκχύλιση - μετεστεροποίηση

Η σκοπιμότητα της ανάπτυξης της μεθόδου μπορεί γίνει σαφέστερη γραφικά απεικονίζοντας περιπτώσεις της μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενης μεθόδου και των προτεινόμενων τροποποιήσεων σε όρους χρόνου, αντιδραστηρίων και αναλωσίμων. Η παρουσιαζόμενη μέθοδος έχει ονομαστεί Ταυτόχρονη Εκχύλιση – Μετεστεροποίηση με Αλκαλική κατάλυση, Simultaneous Extraction – Alkali Catalyzed Transesterification (SE-ACT).

Για την μετεστεροποίηση με την μέθοδο αυτή επελέγη ένας διαλύτης που να αναμιγνύεται με το φυτικό έλαιο αλλά όχι και με την μεθανόλη ώστε να είναι αποτελεσματικότερος ο διαχωρισμός μετά το πέρας της αντίδρασης. Πλέον η αντίδραση είναι δύο φάσεων με υπερκείμενη την φάση του διαλύτη και του φυτικού ελαίου και υποκείμενη αυτή της μεθανόλης και του καταλύτη. Και πάλι η διαδικασία ακολουθείται κατά το δυνατόν εγγύτερα στην κλασική μετεστεροποίηση και την προηγούμενη μετεστεροποίηση με υπερήχους ώστε να εξακριβωθεί αν μόνο η παρουσία του διαλύτη θα επηρεάσει την μετατροπή του φυτικού ελαίου σε βιοκαύσιμο.

Τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για την αντίδραση (CH_3OH - NaOH) είναι σε μεγάλη περίσσια σχετικά με τα θεωρητικά όμως η παρουσία του φυτικού υλικού στην κωνική δικαιολογεί την υπέρβαση αυτή με δύο τουλάχιστον τρόπους:

Πρώτον: Η παρουσία του φυτικού υλικού που παραμένει στο κάτω μέρος της φιάλης όπου βρίσκεται και η μεθανόλη, καθιστά αναγκαία την προσθήκη περισσότερης μεθανόλης προκειμένου η προσρόφηση της από το φυτικό υλικό να μην ματαιώσει την αντίδραση.

Δεύτερον: Η παρουσία του φυτικού υλικού δικαιολογεί την περίσσια του NaOH καθώς μέρος του εξουδετερώνεται από τα οξέα που βρίσκονται στους φυτικούς ιστούς.

Η ποσότητα του εξανίου είναι περισσότερη από την απαιτούμενη για την μετεστεροποίηση αφού όπως είπαμε και πιο πάνω η αποτελεσματικότητά της είναι η ίδια είτε χρησιμοποιηθούν αναλογίες 1:1 είτε 1:25. Χρησιμοποιείται η μεγαλύτερη αναλογία προκειμένου να γίνει πιο αποτελεσματική η εκχύλιση. Άλλωστε η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου εξανίου είναι ανακτήσιμη σε μεγάλο ποσοστό.

Προκειμένου να συγκριθούν οι μέθοδοι παραλαβής και μετεστεροποίησης με την μέθοδο σύγχρονης εκχύλισης-μετεστεροποίησης τα στοιχεία του πίνακα 23 θα χρησιμοποιηθούν σαν αναφορά του τρόπου βιομηχανικής παραλαβής. Βλέπουμε ότι οι αποδόσεις της βιομηχανίας φτάνουν στην καλύτερη περίπτωση το ~70%. Πρέπει να σημειωθεί ότι η διαδικασία μετεστεροποίησης ακολουθεί.

Στο εργαστήριο υπό κλίμακα για να ολοκληρωθούν οι δύο διαδικασίες χρειάζονται τα υλικά αναλώσιμα και ενέργεια που παρουσιάζονται στον πίνακα 23.

Πίνακας 23 Σύγκριση υλικών και αναλώσεων για τις δύο μεθόδους

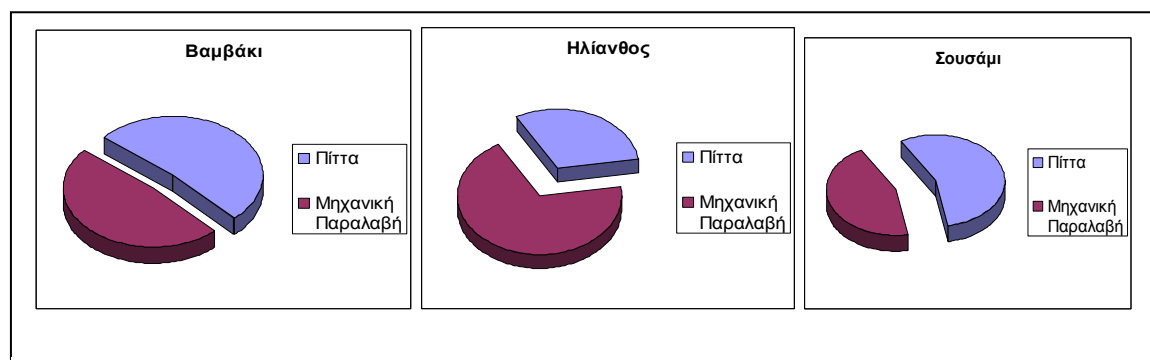
	Διαδοχική Εκχύλιση – Μετεστεροποίηση	Σύγχρονη Εκχύλιση μετεστεροποίηση
Χρόνος	Παραλαβή Soxhlet: 3h Μετεστεροποίηση: 1h	30 min
Ποσότητα Διαλύτη	Παραλαβή: 300 mL Ξέπλυμα: ~15 mL	Σύνολο: 50 mL Ξέπλυμα: ~15 mL
Ποσότητα Μεθανόλης	100 μL	3 mL
Ποσότητα NaOH	1 μg	120 mg
Ενέργεια	300Watt x 3h (Soxhlet) 500 Watt x 1h (Rotary Ev.) 150 Watt x 1h (Θέρμανση και ανάδευση)	200 Watt x 30min
Σύνολα	4h/315mL/100 μL /1,85 kWh	30min/65mL/3mL/120mg/100Wh

Για τους ελαιούχους σπόρους που μελετήθηκαν δηλαδή, αγριαγκινάρα, βαμβάκι, ηλίανθο και σουσάμι, με την μέθοδο εκχύλισης Soxhlet προσδιορίστηκε η ποσότητα των τριγλυκεριδίων που περιέχονται σε 100 γραμμάρια σπόρων. Με την εφαρμογή της ίδιας μεθόδου προσδιορίστηκε σε πίττες σπορελαιουργίας από τους ίδιους σπόρους και η απόδοση της μηχανικής σπορελαιουργίας.

Απόδοση παραλαβής με μηχανική πίεση (%)= $(100 \times \text{Ποσότητα τριγλυκεριδίων που παραλαμβάνεται}) / (\text{Συνολική ποσότητα όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Soxhlet})$.

Πίνακας 24 Αποδόσεις μεθόδου μηχανικής παραλαβής σε τριγλυκερίδια

Δείγμα		Περιεκτικότητα σε Τριγλυκερίδια (%w/w)	Απόδοση Μηχανικής Παραλαβής (%)
Αγριαγκινάρα	Σπόροι	24,2	-
Βαμβάκι	Σπόροι	17,5	48,00
	Πίττα	9,1	
Ηλίανθος	Σπόροι	41,2	69,17
	Πίττα	12,7	
Σουσάμι	Σπόροι	58,3	44,43
	Πίττα	32,4	



Εικόνα 21 Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού του ελαίου που περιέχεται στην πίττα σπορελαιουργίας

Συμπερασματικά, είναι εύκολο να αποδειχθεί πως τα οφέλη από την εφαρμογή της σύγχρονης εκχύλισης – μετεστεροποίησης είναι συγκριτικά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα μειονεκτήματα από την περίσσια αντιδραστηρίων NaOH και μεθανόλης.

Το τελικό υπόλειμμα της διαδικασίας δεν χάνει την χρήση του σαν ζωοτροφή αλλά αλλάζει στην διατροφική του αξία, χωρίς η χρήση του για οργανική λίπανση ή άλλο τρόπο αξιοποίησης βιομάζας να αποκλείονται.

Πίνακας 25 Αποδόσεις σύγχρονης εκχύλισης μετεστεροποίησης σε πίττες και σπόρους.

Δείγμα	Μέθοδος	Soxhlet	USE	SE-ACT	SE-ACT FAME/total
		(TG%)	(TG%)	(FAME/10g sample)	TG content (%)
Αγριαγκινάρα	Σπόροι	24,2	23,4	1,9	78.5
Βαμβάκι	Σπόροι	17,5	16,1	0,7	40
	Πίττα	9,1	8,6	0,7	76.9
Ηλίανθος	Σπόροι	41,2	38,7	1,8	43.7
	Πίττα	12,7	11,4	1,1	86.6
Σουσάμι	Σπόροι	58,3	55,7	3,6	61.7
	Πίττα	32,4	31,1	2,5	77.2

Στην περίπτωση της εφαρμογής SE-ACT στο βαμβάκι, τον ηλίανθο και τους σπόρους και πίττα σουσαμιού, μερικές ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν. Για τους σπόρους βαμβακιού, 40% των συνολικών τριγλυκεριδίων που περιλαμβάνεται αρχικά στο σπόρο μετεστεροποιείται με τη διαδικασία SE-ACT. Εάν η τυποποιημένη μέθοδος μηχανικής αφαίρεσης των από το σπόρο και έπειτα την εκτέλεση της μετατροπής σε μεθυλεστέρες εφαρμοζόταν, 48% του συνολικού TG θα αφαιρούταν και θα μετατρέποταν έπειτα στην καλύτερη περίπτωση κατά 96% σύμφωνα με τα στοιχεία μας. Ως εκ τούτου, οι συνολικοί μεθυλεστέρες που παράγονται με την τυποποιημένη μέθοδο από το βαμβάκι θα ήταν 46% που είναι συγκρίσιμο με την SE-ACT 40% άμεση μετατροπή.

Με τον ίδιο τρόπο, για τους σπόρους ηλίανθου, 70% των τριγλυκεριδίων αφαιρούνται μηχανικά, και εάν μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες κατά 96%, η συνολική παραγωγή τους θα ήταν 67.2% που είναι υψηλότερο από την SE-ACT (43.7%). Για τους σπόρους σουσαμιού 45% του λαδιού αφαιρείται μηχανικά στην παραγωγή και 43.2% μετατρέπεται σε μεθυλεστέρες που συγκρινόμενο με την SE-ACT (61.7%) είναι πολύ χαμηλή. Μπορεί να υποθεθεί ότι η σύσταση, το μέγεθος και η σκληρότητα κάθε μεμονωμένου σπόρου έχουν επιπτώσεις στη συμπεριφορά τους ως πιθανές πηγές biodiesel. Τα εντυπωσιακότερα αποτελέσματα παρουσιάζονται εάν η διαδικασία SE-ACT εφαρμόζεται στις πίττες, οπότε παίρνουμε για δεδομένο ότι οι σπόροι έχουν υποβληθεί στη μηχανική επεξεργασία για την αφαίρεση τριγλυκεριδίων. Για το βαμβάκι, όπως παρουσιάζεται παραπάνω, 46% του λαδιού του μετατρέπεται σε μεθυλεστέρες από την τυποποιημένη διαδικασία και τα τριγλυκερίδια της πίττας (52% του σπόρου) μετεστεροποιούνται από την σύγχρονη εκχύλιση μετεστεροποίηση (SE-ACT) κατά 76.9%. Κατά συνέπεια, από ένα αρχικό 46%, μπορεί να επιτευχθεί μια μετατροπή 85.5%. Για τον ηλίανθο, από την συνήθη πρακτική 67.2% του

περιλαμβανόμενου λαδιού μετατρέπεται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Με την εφαρμογή της SE-ACT στην πίττα ηλίανθων, η συνολική μετατροπή ανέρχεται σε 93%. Για το σουσάμι η μεταβολή είναι από 43.2% σε 83.5%.

Αν και η διαδικασία SE-ACT αναπτύσσεται πρώτιστα για τη χρησιμοποίηση των διαφόρων ειδών πίττας ως νέων πηγών βιοντίζελ, μπορεί επίσης να εφαρμοστεί επιτυχώς σε περίπτωση δειγμάτων σπόρου. Ο κύριος στόχος μας επιτυγχάνεται καθώς τα μετεστεροποιημένα τριγλυκερίδια από τις πίττες με τη διαδικασία SE-ACT κυμαίνεται από 76.7-86.6% (Πίνακας 26). Η έλλειψη μηχανικής επεξεργασίας στα δείγματα σπόρου μειώνει την αποδοτικότητα της διαδικασίας SE-ACT στο 40-61.7%.

5.8 Παρακολούθηση της εξέλιξης μετεστεροποίησης με φασματοσκοπία FT-IR

5.8.1 Μεθοδολογία

Σκοπός είναι να προσδιοριστεί με την ενόργανη μέθοδο της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier, το πέρας της μετεστεροποίησης. Με τον τρόπο αυτό θα εξυπηρετηθεί η ανάγκη του προσδιορισμού της διάρκειας της αντίδρασης για όσο ακριβώς χρόνο χρειάζεται να διατηρηθεί η αντίδραση. Σε βιομηχανική κλίμακα η διάρκεια της αντίδρασης είναι σταθερή και ανελαστική, με μεγαλύτερη πολλές φορές διάρκεια ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να διακοπεί πριν την ολοκλήρωσή της. Αυτό όμως σημαίνει ότι συχνά η αντίδραση διαρκεί περισσότερο από το απαιτούμενο με όλα τα κόστη που αυτό συνεπάγεται και που επιβαρύνουν οικονομικά την παραγωγή.

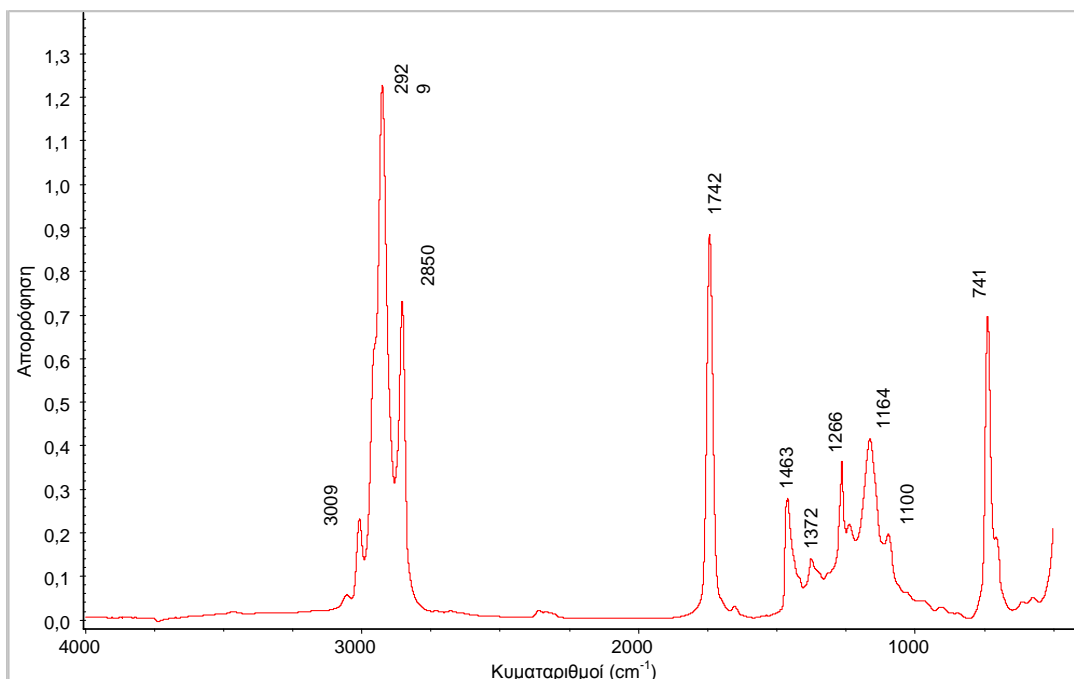
Με την φασματοσκοπία FT-IR είναι δυνατή λόγω του μικρού χρόνου ανάλυσης η κατά την διάρκεια της αντίδρασης παρακολούθησή της. Η εναλλακτική της αέριας χρωματογραφίας είναι μακράν πιο αργή, διαρκώντας τουλάχιστον 1h έναντι 4 min που διαρκεί η ανάλυση με FT-IR.

Σημαντικό επίσης πλεονέκτημα είναι και η δυνατότητα που υπάρχει για σύνδεση οργάνων ανάλυσης σε σειρά με το χώρο όπου γίνεται η αντίδραση. Τα φασματοφωτόμετρα συνδέονται με τον τρόπο αυτό εδώ και χρόνια ενώ μόνο σε πολύ εξελιγμένες μονάδες διύλισης συνδέονται σε σειρά αέριοι χρωματογράφοι.

Η μέθοδος βασίζεται στις διαφορές που παρουσιάζουν τα φάσματα τριγλυκεριδίων και εστέρων καθώς και η δυνατότητα που υπάρχει για ποσοτικοποίηση του συνόλου του ποσοστού μετατροπής.

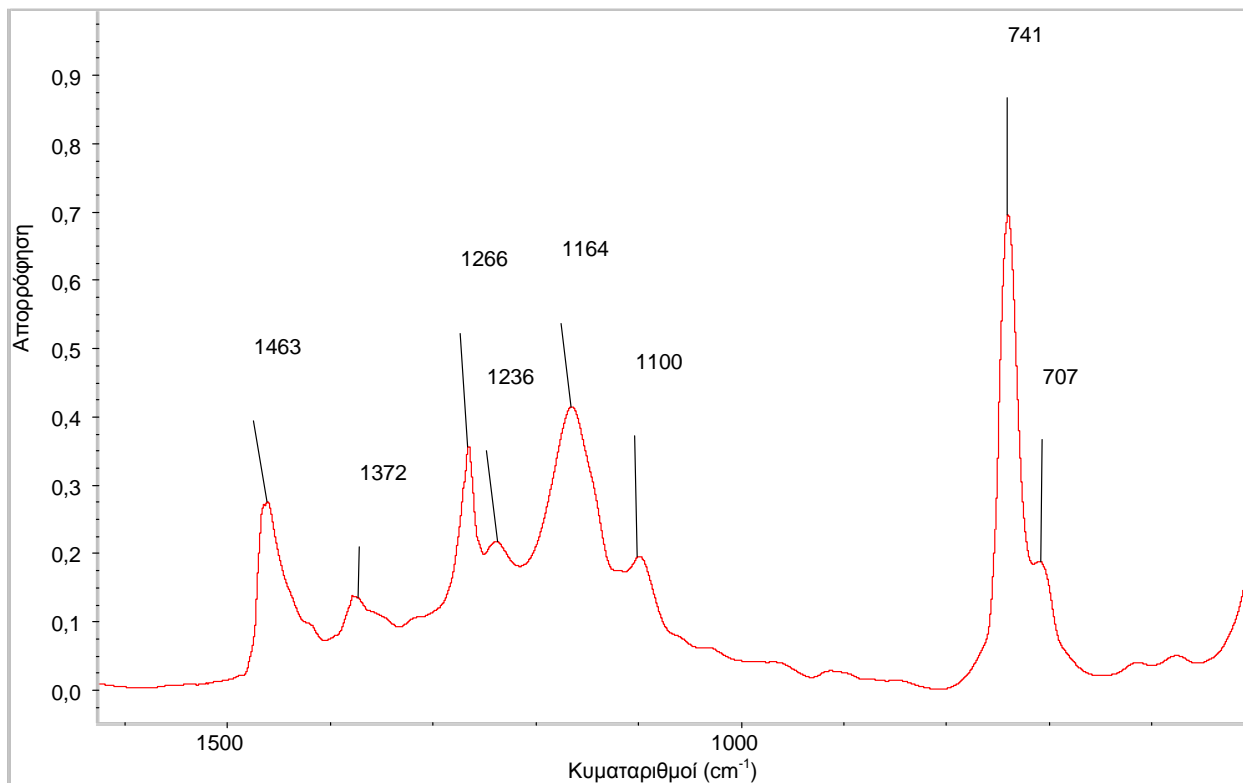
5.8.2 Φασματοσκοπική ανάλυση τριγλυκεριδίων

Ένα τυπικό φάσμα τριγλυκεριδίων από αγριαγκινάρα παρουσιάζεται παρακάτω στο Σχήμα 48.



Σχήμα 48 Τυπικό φάσμα τριγλυκεριδίων αγριαγκινάρας

Με την πρώτη ματιά η ποιότητα του φάσματος και η καλή υφή των κορυφών δίνουν την εντύπωση πως τα τριγλυκερίδια αναμένεται να παρουσιάζουν μικρές αλλά διακριτές διαφορές από τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Δεξιά από την περιοχή του εστερικού καρβονυλίου αναμένεται να εντοπιστούν οι πιο σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων των τριγλυκεριδίων και των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που τα αποτελούν. Είναι άλλωστε αυτή η περιοχή, κάτω από τα 1500 cm⁻¹ όπου παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές δονήσεις μεταξύ ατόμων οξυγόνου – άνθρακα. Στο παρακάτω Σχήμα (Σχήμα 46) παρουσιάζεται η μεγέθυνση της περιοχής που αφορά τις απορροφήσεις αυτές και οι αντίστοιχες αποδόσεις τους στον πίνακα 26.



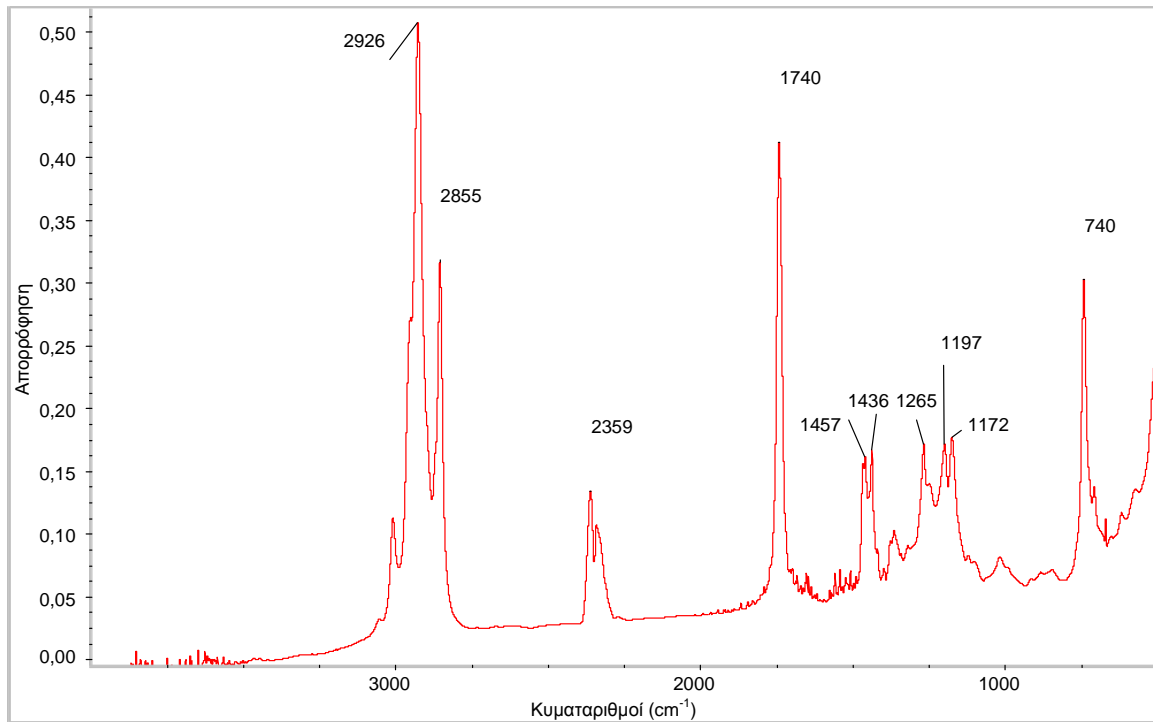
Σχήμα 49 Περιοχή φάσματος τριγλυκεριδίων

Πίνακας 26 Αποδόσεις χαρακτηριστικών δονήσεων του φάσματος του Σχήματος 48

Θέση (cm ⁻¹)	Απόδοση	Παρουσία σε	
		Τριγλυκερίδια	Μεθυλεστέρες
1465-1445	Ασύμμετρη κάμψη CH ₃	+	+
1238-1248	Παραμόρφωση O-H	+	+
1200	Τάση O-CH ₃	-	+
1170	Συμμετρική τάση C-O-C, τάση C-C	+	+
1100	Ασύμμετρη κάμψη O-CH ₂ -C, -CH ₂ -OH	+	-

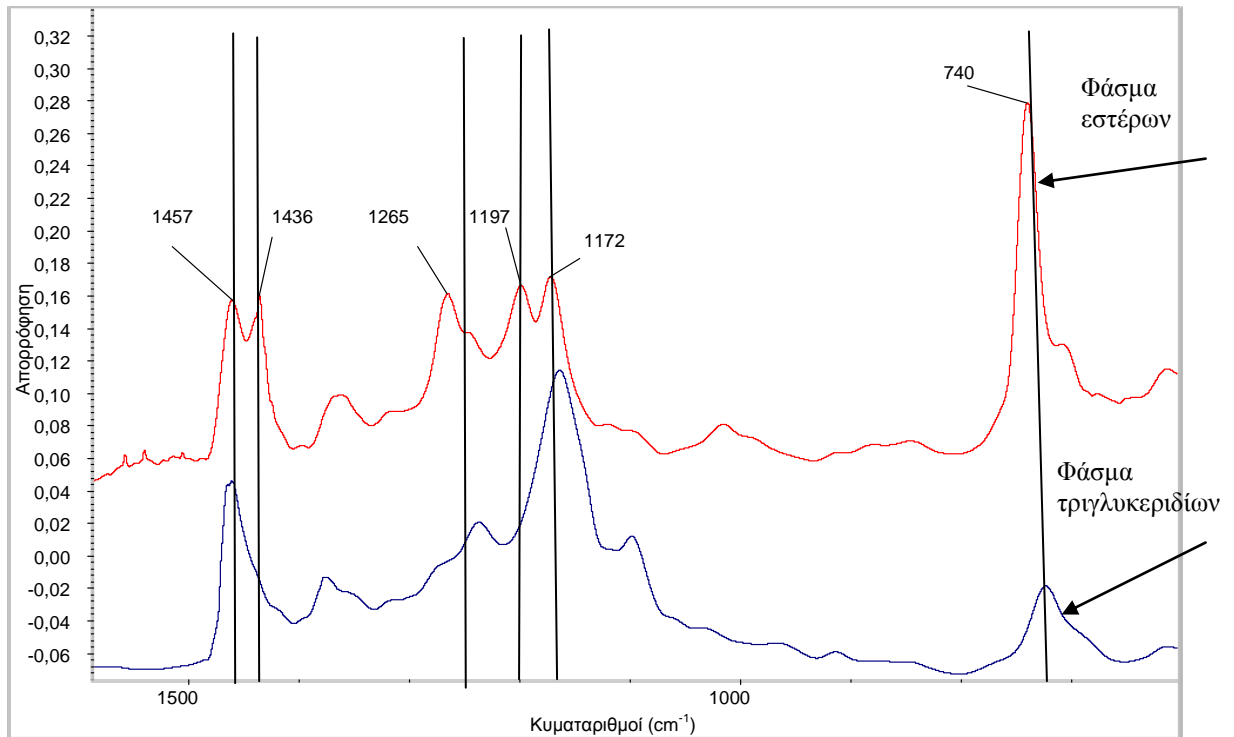
5.8.3 Φασματοσκοπική ανάλυση μεθυλεστέρων (Σύγκριση- διαφορές)

Είναι αναμενόμενο τα φάσματα των μεθυλεστέρων να μην διαφέρουν σημαντικά από αυτά των αντίστοιχων μεθυλεστέρων. Στο Σχήμα 48 παρουσιάζεται ένα φάσμα μεθυλεστέρων αγριαγκινάρας. Αξίζει να σημειωθεί πως για την αντικειμενικότητα της μεθόδου οι μεθυλεστέρες που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από αντίδραση με την «κλασική» μέθοδο μετεστεροποίησης.



Σχήμα 50 Φάσμα μεθυλεστέρων αγριαγκινάρας μετά από την ολοκλήρωση της μετεστεροποίησης

Για να καταστούν σαφέστερες οι διαφορές που προκύπτουν στην μορφή των φασμάτων με την αντίδραση μετεστεροποίησης παρατίθεται το Σχήμα 51 όπου παρουσιάζεται μεγέθυνση της περιοχής από τα 1500 μέχρι τα 600 cm⁻¹.



Σχήμα 51 Περιοχή από 1500 ως 600 cm^{-1} φάσματος τριγλυκεριδίων και μεθυλεστέρων

Είναι εμφανείς αρκετές διαφορές με πιο σημαντική όμως για τους σκοπούς του πειράματος είναι η εμφάνιση της νέας κορυφής στα 1436 cm^{-1} , στο φάσμα των μεθυλεστέρων. Οι άλλες εμφανιζόμενες διαφορές αποτελούν ουσιαστικά μετακίνηση κορυφών σε διαφορετικούς κυματάρηθμους και αλλαγή στην σχετική ένταση τους.

Η αιτία εμφάνισης αυτής της κύριας διαφοράς μεταξύ των δύο φασμάτων είναι ακριβώς η προσθήκη της ομάδας $-\text{CH}_3$ στο άκρο του καρβονυλίου στην θέση όπου προηγουμένως βρισκόταν υποκατεστημένο από μία πολύ μεγαλύτερη ομάδα. Η δόνηση αυτού του μεθυλίου διαφέρει σημαντικά από αυτή του άλλου τερματικού μεθυλίου στην άλλη άκρη της αλειφατικής αλυσίδας καθώς και από τις δονήσεις των $-\text{CH}_2-$. Με δύο τρόπους αυτή η κορυφή εξυπηρετεί το σκοπό της παρακολούθησης της προόδου της αντίδρασης μετεστεροποίησης: πρώτον είναι ενδεικτική της παρουσίας ενός ακόμη $-\text{CH}_3$ στα μόρια του δείγματος και δεύτερον είναι μια κορυφή που μπορεί να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της % αναλογίας σε μίγμα τριγλυκεριδίων – εστέρων λιπαρών οξέων. Όπως είναι ευνόητο, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης έχουμε ένα μίγμα τριγλυκεριδίων, δί-γλυκεριδίων, μόνο γλυκεριδίων και εστέρων λιπαρών οξέων. Η πρόοδος της αντίδρασης είναι δυνατό να παρακολουθηθεί με την μέθοδο καταγραφής φασμάτων σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Για τον σκοπό αυτό απαιτείται η ανάπτυξη μιάς καμπύλης αναφοράς όπως περιγράφεται παρακάτω.

5.8.4 Δημιουργία καμπύλης αναφοράς

α) Πρότυπα μίγματα

Πρώτο βήμα για την ανάπτυξη μιας καμπύλης αναφοράς είναι η επιλογή των συγκεντρώσεων που θα αποτελέσουν τα «γνωστά» δείγματα. Δείγμα από τριγλυκερίδια που παρελήφθησαν από σπόρους με την μέθοδο Soxhlet και μεθυλεστέρες που προέκυψαν από την διαδικασία της απλής μετεστεροποίησης. Προετοιμάστηκαν εννέα πρότυπα με τις συγκεντρώσεις που φαίνονται στον Πίνακα 27 προκειμένου να καλυφθεί όλο το εύρος των πιθανών συγκεντρώσεων από την αρχή ως το τέλος της αντίδρασης μετεστεροποίησης.

Πίνακας 27 Σύσταση προτύπων μιγμάτων

A/A Πρότυπου μίγματος	% Περιεκτικότητα Τριγλυκεριδίων	% Περιεκτικότητα Εστέρων
1	90	10
2	80	20
3	70	30
4	60	40
5	50	50
6	40	60
7	30	70
8	20	80
9	10	90

Φάσματα από όλα τα παραπάνω μίγματα λήφθηκαν τρεις φορές με τον τρόπο που περιγράφεται πιο πάνω. Τα φάσματα κατεργάστηκαν με τις αυτόματες λειτουργίες automatic smooth και automatic baseline correct του λογισμικού του IR.

β) Συνθήκες λειτουργίας λογισμικού

- Προκειμένου να οριστεί ο τρόπος λειτουργίας του λογισμικού TQ Analyst τίθενται οι εξής παράμετροι:
 - Μέθοδος στατιστικής επεξεργασίας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων PLS (Partial Least Squares)
 - Μήκος διαδρομής ακτίνας μέσα στο δείγμα Σταθερά (Constant)
 - Στην επιλογή συστατικών για κάθε δείγμα εισάγονται παράμετροι δύο συστατικών που είναι επί της ουσίας οι δύο ομάδες συστατικών που μας απασχολούν, τα τριγλυκερίδια και οι μεθυλεστέρες. Και τα δύο συστατικά υπολογίζονται σε επί τοις εκατό περιεκτικότητες με δύο δεκαδικά ψηφία για όλο το εύρος από 0 έως 100%.

- Γίνεται επιλογή των παραμέτρων που αφορούν τα όρια της ανάλυσης όπως είναι λογικό και επίσης κλειδώνεται το άθροισμα των επί τοις εκατό περιεκτικότητων που θα δίνονται να είναι 100%.
- Στην καρτέλα επιλογής προτύπων επιλέγονται πρότυπα που χρησιμοποιούνται όλα για την ποσοτικοποίηση χωρίς να επιλέγονται πρότυπα αξιολόγησης (Validation Standards).
- Η περιοχή του φάσματος που χρησιμοποιείται από το λογισμικό για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους ομάδων συστατικών του δείγματος είναι από 1300 έως 1060 cm^{-1} .
- Επιλέγεται να λαμβάνεται υπ' όψη το ίδιο το φάσμα και χωρίς τροποποίηση της βασικής γραμμής, καθώς η υφή των φασμάτων είναι ικανοποιητική.
- Στην καρτέλα επιλογών επιλέγεται μόνο για την κανονικοποίηση των δεδομένων η τεχνική της ενδιάμεσης κεντρικής τιμής.

γ) Καμπύλες αντίδρασης μετεστεροποίησης

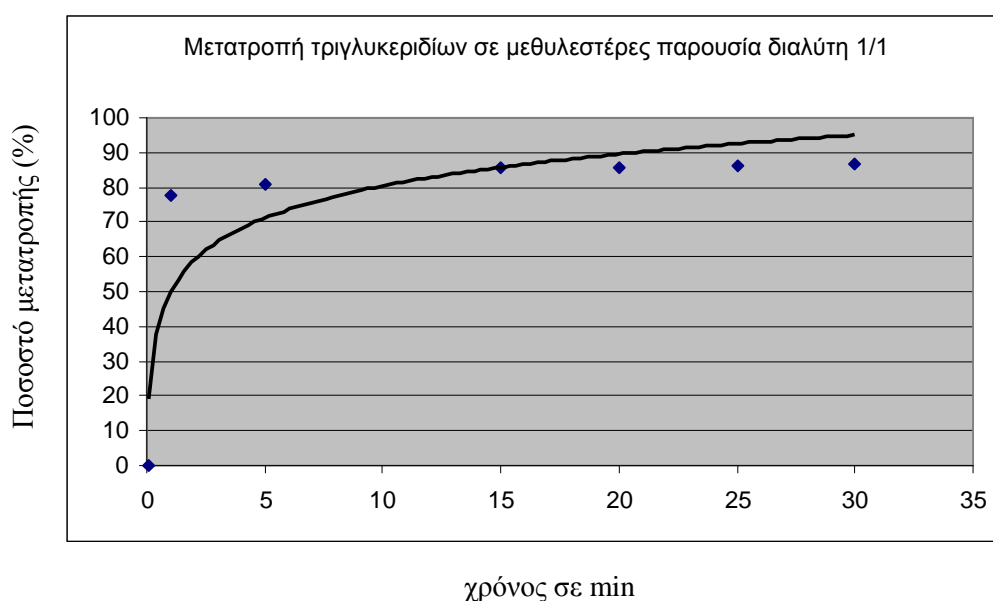
Με τα παραπάνω δεδομένα το λογισμικό είναι σε θέση να παράγει καμπύλες αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό των εστέρων και των τριγλυκεριδίων σε άγνωστα μίγματα. Τα χαρακτηριστικά είναι ικανοποιητικά αφού το r^2 είναι 0,946 και στις δύο περιπτώσεις. Για την ανάπτυξη καμπυλών προχωρούμε όπως έχει περιγραφεί παραπάνω στην λήψη φασμάτων. Πρώτα, λήφθηκαν φάσματα κατά την διάρκεια αντίδρασης λαδιού σε μεθυλεστέρες με παρουσία διαλύτη σε ποσότητα ίση με αυτή του λαδιού.

Η λήψη των φασμάτων έγινε σε χρονικά διαστήματα όπως φαίνεται στον πίνακα 28 και προέκυψαν οι μετρήσεις της προόδου της αντίδρασης εκφρασμένο σε ποσοστό εστέρων επί τοις εκατό στον δείγμα την συγκεκριμένη χρονική στιγμή της αντίδρασης.

Πίνακας 28 Ποσοστό μετατροπής τριγλυκεριδίων σε εστέρες σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαλύτη 1/1.

A/A Μέτρησης	Χρόνος	Εστέρες (%)
1	1	77,73
2	5	80,88
3	10	82,95
4	15	85,83
5	20	85,80
6	25	86,28
7	30	86,69

Κατά τον σχηματισμό της γραφικής παράστασης της αντίδρασης μετεστεροποίησης προκύπτει ένα ερώτημα που αφορά τον μαθηματικό τρόπο που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την προσέγγιση της καμπύλης της αντίδρασης. Είναι λογικό να επιλεγεί η λογαριθμική προσέγγιση καθώς οι χημικές αντιδράσεις σαν φαινόμενο ορίζονται από ανώτατο όριο (στην περίπτωσή μας το όριο αυτό είναι η 100% μετατροπή των τριγλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες). Ένας άλλος λόγος για τον οποίο είναι καταλληλότερη η επιλογή της λογαριθμικής συνάρτησης είναι ότι ο συσχετισμός αντιδρώντων - προϊόντων μεταβάλλεται προς όφελος των εστέρων, ταχύτερα στην αρχή και πιο αργά με την πρόοδο της αντίδρασης και την μείωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων. Η γραφική απεικόνιση της καμπύλης της αντίδρασης φαίνεται στο Σχήμα 52.

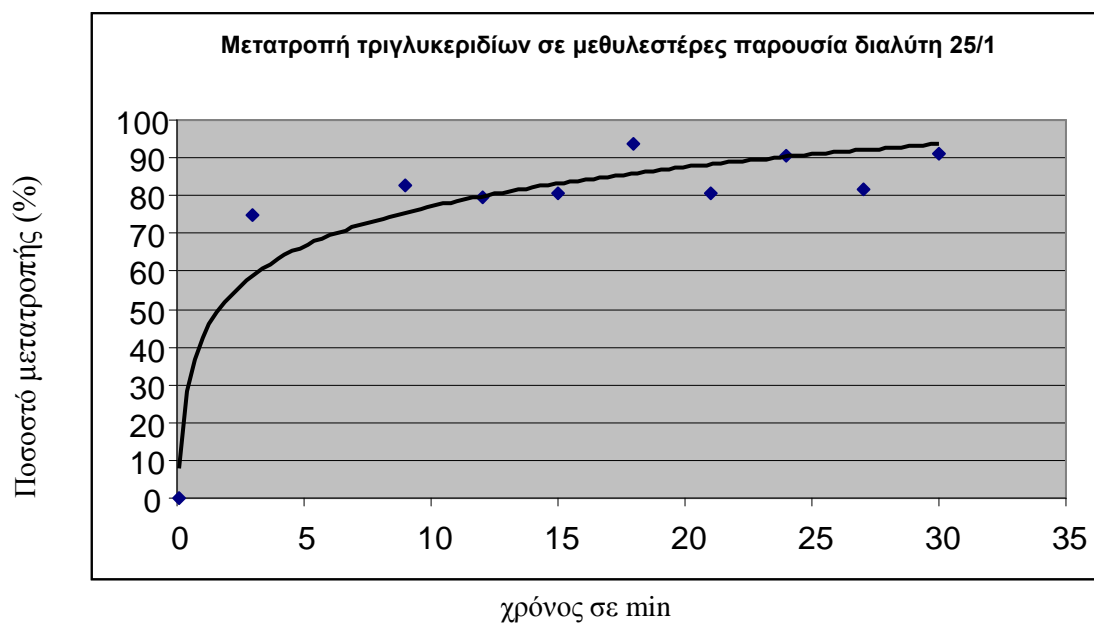


Σχήμα 52 Καμπύλη αντίδρασης μετεστεροποίησης παρουσία διαλύτη 1/1.

Παρόμοια προκύπτουν και τα δεδομένα για την καμπύλη αντίδρασης όταν υπάρχει μεγάλη περίσσια διαλύτη 25 ml/ 1 g λαδιού. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στον πίνακα 29 και το Σχήμα 53.

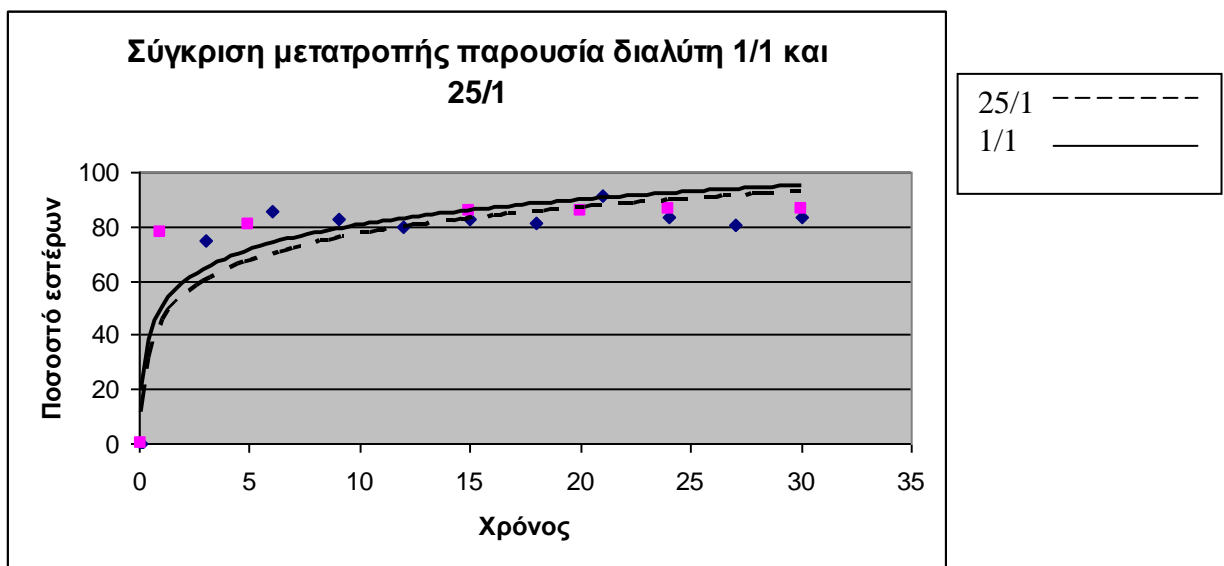
Πίνακας 29 Ποσοστό μετατροπής τριγλυκεριδίων σε εστέρες σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαλύτη 25/1.

A/A Μέτρησης	Χρόνος	Εστέρες (%)
1	3	74,97
2	9	82,94
3	12	79,35
4	15	80,80
5	18	93,96
6	21	80,58
7	24	90,45
8	27	81,51
9	30	90,88



Σχήμα 53 Καμπύλη αντίδρασης μετεστεροποίησης παρουσία διαλύτη 25/1.

Αντιπαραβαλλόμενα τα δύο γραφήματα (σχ. 54) οδηγούν στα πρώτα συμπεράσματα.



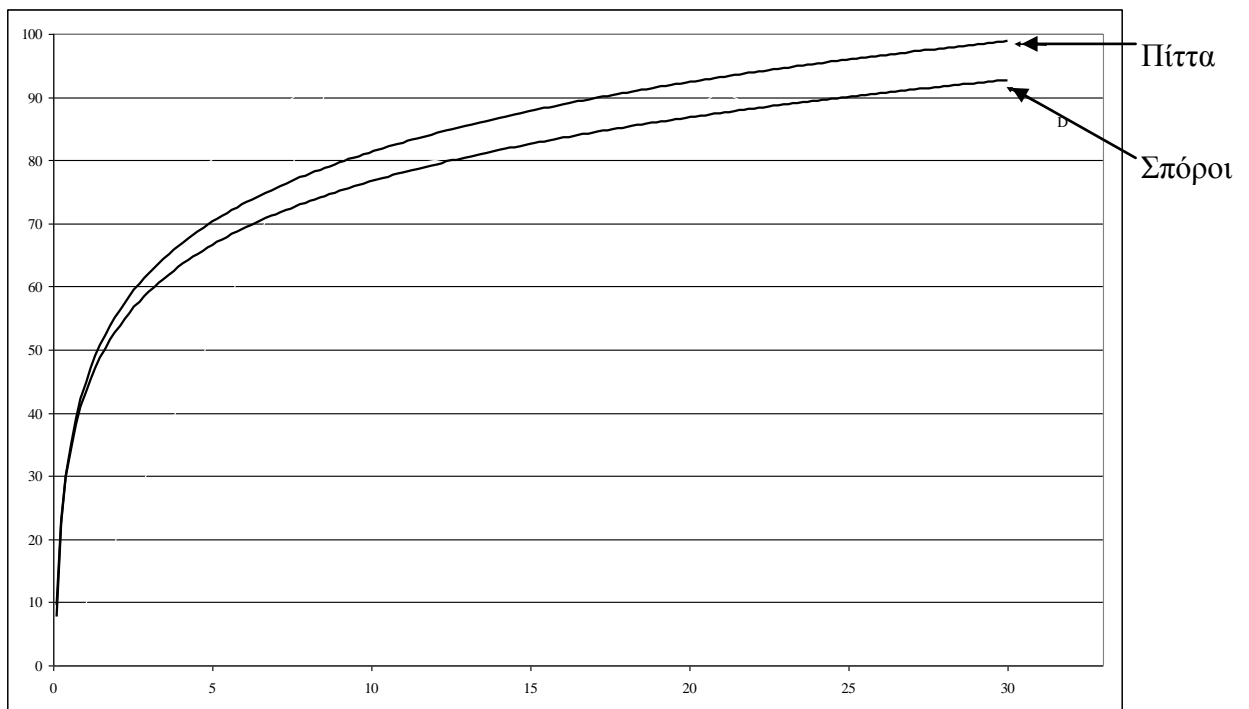
Σχήμα 54 Αντιπαραβολή προόδου αντίδρασης με διαφορετικές ποσότητες διαλύτη.

Όπως φαίνεται από τις δύο καμπύλες, η πρόοδος της αντίδρασης είναι σε γενικές γραμμές παρόμοια. Η αντίδραση και στις δύο περιπτώσεις προχωρά γρήγορα στα πρώτα στάδια και καταλήγει στο ίδιο αποτέλεσμα. Ο ρυθμός της προόδου είναι ελαφρά πιο αργός στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι 25/1. Ο λόγος για το φαινόμενο αυτό είναι η συγκέντρωση των αντιδρώντων που είναι πολύ χαμηλότερη στην περίπτωση που η παρουσία του διαλύτη είναι μεγάλη.

Το γεγονός αυτό γίνεται πιο έντονο εξ αιτίας της φύσεως της αντίδρασης που είναι διπλής φάσης και επηρεάζεται περισσότερο από την διασπορά του ενός αντιδρώντος στην μία φάση.

Εν κατακλείδι πάντως, για τους σκοπούς της μελέτης μπορούμε να θεωρήσουμε ότι δεν υπάρχουν διαφορές εφ' όσον δεν υπάρχουν διαφορές στο τελικό σημείο και στο συνολικό χρόνο της αντίδρασης. Αυτές είναι οι δύο παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν την παρακάτω μελέτη της σύγχρονης εκχύλισης μετεστεροποίησης.

Με τον ίδιο τρόπο ακριβώς παράχθηκαν και οι καμπύλες του Σχήματος 53 που αναπαριστούν την πρόοδο της σύγχρονης εκτέλεσης της εκχύλισης και μετεστεροποίησης σε διαφορετικά υποστρώματα από πίττα σπορελαιουργίας και σπόρους αντίστοιχα. Στην εκτέλεση της σύγχρονης εκχύλισης μετεστεροποίησης λήφθηκαν υπ' όψη τα δεδομένα της προηγούμενης παραγράφου σχετικά με την σύγχρονη εκχύλιση – μετεστεροποίηση, σχετικά με την ποσότητα καταλύτη κ.τ.λ.



Σχήμα 55 Σχετική πρόοδος σύγχρονης εκχύλισης – μετεστεροποίησης σε πίττα και σπόρο

Από το Σχήμα γίνεται σαφές ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην πρόοδο της εκχύλισης μετεστεροποίησης SE – ACT όταν αυτή εκτελείται σε σπόρους ή πίττες. Πάντως, το τελικό σημείο διαφέρει κατά μέσο όρο περίπου κατά 5%. Το γεγονός αυτό όπως έχουμε αναφέρει και αλλού οφείλεται προφανώς στην κατακράτηση ποσοστού του λαδιού στον μη σπασμένο σπόρο. Στην παράγραφο 1.1 έχει γίνει αναφορά στο πρώτο στάδιο πίεσης που εφαρμόζεται στην εκχύλιση βιομηχανικής κλίμακας. Με τον τρόπο αυτό έχει βρεθεί μια ενδιάμεση οδός για την αποτελεσματική διείδυση του διαλύτη στο εσωτερικό του σπόρου. Πάντως αυτή η πρώτη πίεση που ασκείται στην βιομηχανία δεν είναι δυνατό να αναπαρασταθεί σε εργαστηριακή κλίμακα ούτε είναι εύκολο να βρεθεί πίττα πρώτης πίεσης (το κύκλωμα μεταφοράς της πίττας είναι κλειστό για λόγους ασφαλείας).

Είναι πλέον σαφές ότι μπορεί να γίνει μέτρηση του ποσοστού προόδου της αντίδρασης με την χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου. Η αναλυτική αυτή μέθοδος βρίσκει ήδη μεγάλη εφαρμογή στην βιομηχανία χάρη στην απλότητα της, την μη καταστροφική ανάλυση, και την δυνατότητα να γίνεται μεγάλος αριθμός αναλύσεων ανα μονάδα χρόνου χάρη στον εξαιρετικά χαμηλό χρόνο που απαιτείται για την παραγωγή αποτελεσμάτων.

Στην βιομηχανία είναι απαραίτητες μέθοδοι τόσο γρήγορες στην χρήση τους που να μπορούν να παρέχουν στοιχεία παρακολούθησης της παραγωγής. Οι δύο βασικές μέθοδοι παραγωγής, η παραγωγή σε παρτίδες και η συνεχόμενη υπο ροή παραγωγή, μπορούν να εξυπηρετηθούν από τα παραπάνω στοιχεία ως εξής:

α) η μέθοδος προσδιορισμού με FT-IR του σημείου ολοκλήρωσης της αντίδρασης σε «πραγματικό» χρόνο είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο. Στην περίπτωση που η αντίδραση δεν γίνεται με «εμπειρικά» στοιχεία (π.χ. πάντα αφήνεται το μίγμα υπό ανάδευση για 1,5 ώρες) κερδίζεται πολύτιμος χρόνος αξιοποίησης του εξοπλισμού αν για κάθε παρτίδα μπορεί να εξοικονομηθεί έστω και λίγος χρόνος. Αντίθετα, στην περίπτωση που η αντίδραση πρέπει να αφηθεί λίγο επιπλέον χρόνο για να ολοκληρωθεί, τότε το κέρδος είναι σημαντικότερο, καθώς το παραγόμενο βιοντίζελ θα ήταν εκτός προδιαγραφών λόγω μεγάλου ποσοστού δι- και μόνο- γλυκεριδίων. Η επιλογή είναι ή να απορριφτεί η ποσότητα αυτή ή να επαναληφθεί η διαδικασία. Και στις δύο περιπτώσει το κόστος είναι πολύ μεγάλο.

β) Η αξιοποίηση της πίττας σαν υλικό για την παραγωγή βιοντίζελ είναι μια μεγάλη πρόκληση και η προοπτική αξιοποίησής της μπορεί να αποβεί κερδοφόρα. Η τιμή των ελαιούχων σπόρων έχει ανέβει κατακόρυφα τα τελευταία 5 χρόνια και η τιμή του λαδιού ακολουθεί σταθερά. Το πρόβλημα μπορεί να λυθεί με την χρήση βιομηχανικής εκχύλισης που παίρνει όλο το λάδι από το σπόρο, όμως αυτή τη στιγμή μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό του λαδιού προέρχεται από τέτοιες βιομηχανίες εξ' αιτίας του μεγάλου κόστους εγκατάστασης. Η αξιοποίηση της πίττας σαν πηγή βιοκαυσίμου θα γίνει επιτακτική τα επόμενα χρόνια, ενώ δεν χάνεται και η διατροφική της αξία σαν ζωοτροφή, καθώς οι πρωτεΐνες και τα σάκχαρα παραμένουν ανέπαφα από την κατεργασία.

γ) Ο συνδυασμός των δύο νέων τεχνικών θα έδινε μεγάλο πλεονέκτημα στις βιομηχανίες που θα διέθεταν τα απαραίτητα κεφάλαια για την ειδική εγκατάσταση που απαιτείται καθώς θα εξοικονομούσαν πολύτιμο χρόνο και εργατικά. Οπωσδήποτε μένουν πολλά τεχνικά προβλήματα να λυθούν για να περάσει η ταυτόχρονη εκχύλιση μετεστεροποίηση (SE-ACT) σε βιομηχανική κλίμακα.

5.9 Συμπεράσματα

Μετά από την ανασκόπηση των φυτών της ελληνικής χλωρίδας που ενδιαφέρουν προέκυψαν ενδείξεις που συντείνουν στην παραδοχή ότι καλλιεργούμενα τα αρωματικά και ενεργειακά φυτά της Ελλάδας μπορούν να δώσουν παρόμοια αν όχι καλύτερα αποτελέσματα παραλαβής δευτερογενών μεταβολιτών με τις αναφορές της βιβλιογραφίας. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη για την αποδοτική εμπορική γεωργική εκμετάλλευση των παραπάνω φυτών συνδυασμένη φυσικά με συστηματική μεταποίηση και τυποποίηση.

Για την επεξεργασία τους σε εργαστηριακή κλίμακα προτάθηκαν νέες μέθοδοι παραλαβής των δευτερογενών μεταβολιτών τους.

Οι μέθοδοι παραλαβής που αποδείχθηκαν το ίδιο ή σε κάποιες παραμέτρους πιο αποτελεσματικές από τις ήδη εμποδωμένες πρακτικές, είναι για μεν την παραλαβή θερμοευαίσθητων ουσιών η μέθοδος των υπερήχων ενώ για πιο ανθεκτικές ουσίες η μέθοδος των μικροκυμάτων. Ακόμη και όταν πρόκειται για πολύ ευαίσθητες ουσίες όπως αυτές που περιέχονται στο σκόρδο, η μέθοδος των υπερήχων αποδείχθηκε πιο κατάλληλη από τις δύο άλλες με τις οποίες συγκρίθηκε.

Στην σύγκριση μεταξύ των μεθόδων απόσταξης για αιθέρια έλαια από αρωματικά φυτά, η μέθοδος των μικροκυμάτων έδειξε να είναι σίγουρα πιο γρήγορη από την μέθοδο με απλή θέρμανση αλλά οι προκύπτουσες διαφορές στην σύσταση των παραλαμβανόμενων αιθερίων ελαίων χρειάζονται περισσότερη διερεύνηση. Η σύσταση των προϊόντων ήταν σχετική με αυτές των βιβλιογραφικών αναφορών.

Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η σύγκριση μεταξύ μεθόδων ανάλυσης με φασματοσκοπικές έναντι χρωματογραφικών μεθόδων. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι υπερείχαν στην απλότητα και ταχύτητα εφαρμογής τους δείχνοντας και συγκρίσιμα αποτελέσματα ευαισθησίας και επαναληψιμότητας με τις καθιερωμένες.

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι υπάρχει πεδίο εξέλιξης στην έρευνα που σχετίζεται με τις μεθόδους παραλαβής και μάλιστα οι όποιες εξελίξεις θα οδηγήσουν στην βελτίωση των διεργασιών της βιομηχανικής παραγωγής αν υιοθετηθούν γρήγορα, ενώ διαφαίνεται και η πιθανότητα παραγωγής καλύτερης ποιότητας προϊόντων. Με την βελτίωση των μεθόδων παραλαβής, αναμένεται και εξοικονόμηση πόρων (κεφαλαίου, εργασίας και χρόνου) και συγχρόνως μικρότερη κατανάλωση ενέργειας. Με την υιοθέτηση γρηγορότερων και σε σειρά με την γραμμή παραγωγής αναλυτικών μεθόδων επίσης προσδοκάται η μείωση του κόστους ανά ανάλυση και ο καλύτερος εντοπισμός του ιδανικού σημείου διάρκειας της αντίδρασης ώστε να αποφεύγονται αστοχίες.

Κατάλογος πινάκων

	Σελ.
Πίνακας 1 Κριτήρια συμμόρφωσης του βιοντίζελ με τα διεθνή πρότυπα	8
Πίνακας 2 Κυριότερα συστατικά του πτητικού κλάσματος του σκόρδου.	26
Πίνακας 3 Τιμές των φυσικών σταθερών που επηρεάζουν την συμπεριφορά των πιο κοινών διαλυτών σε πεδία μικροκυμάτων(Armstrong, 2000).	50
Πίνακας 4 Τιμές του σημείου ζέσεως, του ιξώδους και του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας για τους πιο κοινούς διαλύτες. (MERCCK, 2008)	52
Πίνακας 5 Σύσταση προτύπων μιγμάτων	86
Πίνακας 6 Συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη αναφοράς	94
Πίνακας 7 Παραλαμβανόμενο αιθέριο έλαιο με μικροκύματα και συμβατική θέρμανση (mL αιθερίου ελαίου/ 100g δείγματος)	104
Πίνακας 8 Σύσταση αιθερίου ελαίου ρίγανης όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)	106
Πίνακας 9 Σύσταση αιθερίου ελαίου θυμαριού όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)	107
Πίνακας 10 Σύσταση αιθερίου ελαίου λεβάντας όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)	108
Πίνακας 11 Σύσταση αιθερίου ελαίου δενδρολίβανου όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)	109
Πίνακας 12 Σύσταση αιθερίου ελαίου δενδρολίβανου όπως προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος σε GC-MS (ποσοστά %)	110
Πίνακας 13 Συντακτικοί τύποι συστατικών αιθερίων ελαίων	114
Πίνακας 14 Αποδώσεις των κορυφών του φάσματος FT-Raman	120
Πίνακας 14 Σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις δύο μεθόδους GC-FID και φασματοσκοπία Raman	115
Πίνακας 16 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων του σκόρδου(<i>Allium sativum</i>) που παρελήφθη με τρεις διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης, (SDE, MWHD, USE) χρησιμοποιώντας διαιθυλεθέρα, κανονικό εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα σαν διαλύτες. Τα συστατικά αναφέρονται με την σειρά έκλουσής τους από την στήλη HP-5ms του αέριου χρωματογράφου.	132
Πίνακας 17 Σύγκριση σύστασης αιθερίων ελαίου σκόρδου με διαφορετικές μεθόδους παραλαβής και με διαφορετικούς διαλύτες.	132
Πίνακας 18 Μείωση των πολυσουλφιδίων στο αιθέριο έλαιο ανάλογα με την επίδραση της	137

θερμότητας (μονάδες %)

Πίνακας 19 Χημική σύσταση (% v/v) πτητικών συστατικών του σκόρδου που παρελήφθησαν με τρεις διαφορετικές μεθόδους (SDE, MWHD, USE) με διαιθυλαιθέρα και οξικό αιθυλεστέρα.	144
Πίνακας 20 Περιεκτικότητα (%) σε άκυκλα συστατικά σε σχέση με το A.	149
Πίνακας 21 Περιεκτικότητα (%) των αγνώστων σε άκυκλα συστατικά με την μέθοδο FT-Raman	152
Πίνακας 22 Αποδόσεις μεθόδων παραλαβής Soxhlet και υπερήχων σε τριγλυκερίδια ανά 100g υλικού	155
Πίνακας 23 Σύγκριση υλικών και αναλώσεων για τις δύο μεθόδους	156
Πίνακας 24 Αποδόσεις μεθόδου μηχανικής παραλαβής σε τριγλυκερίδια	157
Πίνακας 25 Αποδόσεις σύγχρονης εκχύλισης μετεστεροποίησης σε πίττες και σπόρους.	158
Πίνακας 26 Αποδόσεις χαρακτηριστικών δονήσεων του φάσματος του σχήματος 47	162
Πίνακας 27 Σύσταση προτύπων μιγμάτων	165
Πίνακας 28 Ποσοστό μετατροπής τριγλυκεριδίων σε εστέρες σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαλύτη 1/1.	166
Πίνακας 29 Ποσοστό μετατροπής τριγλυκεριδίων σε εστέρες σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαλύτη 25/1.	168

Κατάλογος εικόνων

	Σελ.
<i>Εικόνα 1</i> Ενεργειακά φυτά	6
<i>Εικόνα 2</i> Πρέσα παραλαβής φυτικών ελαίωνσε βιομηχανική κλίμακα	11
<i>Εικόνα 3</i> Εκχυλιστής ελαιούχων σπόρων σε βιομηχανική κλίμακα	11
<i>Εικόνα 4</i> Παραγωγή βιοντίζελ σε παρτίδες (Batch process)	13
<i>Εικόνα 5</i> Παραγωγή βιοντίζελ υπο ροή (flow process)	13
<i>Εικόνα 6</i> Εικόνες ρίγανης	19
<i>Εικόνα 7</i> Εικόνες λεβάντας	21
<i>Εικόνα 8</i> Ανθισμένο δενδρολίβανο	23
<i>Εικόνα 9</i> Ανθισμένο φλισκούνι	24
<i>Εικόνα 10</i> Φυτό και σπόροι σουσαμιού	30
<i>Εικόνα 11</i> Άνθη, ταξιανθίες και καλλιέργεια ηλίανθου	31
<i>Εικόνα 12</i> Συγκεντρωμένο καθαρό βαμβάκι έτοιμο για το εμπόριο	33
<i>Εικόνα 13</i> Ελαιοκράμβη	35
<i>Εικόνα 14</i> Σπόροι, καλλιέργεια και άνθος ελαιοκράμβης	36
<i>Εικόνα 15</i> Ανθισμένο φυτό αγριαγκινάρας	37
<i>Εικόνα 16</i> Λουτρό υπερήχων	46
<i>Εικόνα 17</i> Απεικόνιση λειτουργίας των υπερήχων κατά την εκχύλιση	47
<i>Εικόνα 18</i> Παράθυρα σεληνιούχου ψευδαργύρου	74
<i>Εικόνα 19</i> Φάσμα FT-Raman του diallyl sulfide	93
<i>Εικόνα 20</i> Μηχανισμός διάσπασης της αλλυσίνης	139
<i>Εικόνα 21</i> Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού του ελαίου που περιέχεται στην πίτα σπορελαιοουργίας	157

Κατάλογος σχημάτων

<i>Σχήμα 1</i> Συντακτικοί τύποι σημαντικών συστατικών αιθερίων ελαίων	4
<i>Σχήμα 2</i> Γραφική απεικόνιση ιδιοτήτων του βιοντίζελ.	10
<i>Σχήμα 3</i> Μηχανισμός μετατροπής των τριγλυκεριδίων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.	15
<i>Σχήμα 4</i> Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής σε τρία στάδια των τριγλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες	16
<i>Σχήμα 5</i> Η διάσπαση της αλλυσίνης παρουσία νερού	27
<i>Σχήμα 6</i> Σχηματική απεικόνιση συσκευής υδρο-απόσταξης τύπου Clevenger	40
<i>Σχήμα 7</i> Σχηματική απεικόνιση της συσκευής μικρο – απόσταξης εκχύλιση Lickens -Nickerson	42
<i>Σχήμα 8</i> Σχηματική αναπαράσταση συσκευής εκχύλισης Soxhlet	44
<i>Σχήμα 9</i> Απεικόνιση εσωτερικού συσκευής μικροκυμάτων	49
<i>Σχήμα 10</i> Απεικόνιση διάταξης απόσταξης Clevenger με χρήση θέρμανσης από μικροκύματα	53
<i>Σχήμα 11</i> Κατανομή Gauss	57
<i>Σχήμα 12</i> Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης μεταξύ του μήκους του δεσμού και της περιεχόμενης δυναμικής ενέργειας στον απλό αρμονικό ταλαντωτή	61
<i>Σχήμα 13</i> Σχηματική απεικόνιση του φασματοφωτόμετρου FT-IR	62
<i>Σχήμα 14</i> Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series).	62
<i>Σχήμα 15</i> Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-Raman	71
<i>Σχήμα 16</i> Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου της ρίγανης.	94
<i>Σχήμα 17</i> Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου του θυμαριού	95
<i>Σχήμα 18</i> Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου της λεβάντας	97
<i>Σχήμα 19</i> Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου του δενδρολίβανου	99
<i>Σχήμα 20</i> Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης των κυρίων συστατικών του αιθερίου ελαίου του φλυσκουνιού	101
<i>Σχήμα 21</i> Συντακτικοί τύποι καρβακρόλης - π-κυμενίου	103
<i>Σχήμα 22</i> Σχηματική απεικόνιση ποσοστών καρβακρόλης – π-κυμενίου στο αιθέριο έλαιο της ρίγανης με απόσταξη με συμβατική θέρμανση και μικροκύματα.	103
<i>Σχήμα 23</i> Στερεοχημικές απεικονίσεις α-τερπινεόλης, βορνεόλης, λιναλοόλης και τερπινέν-4-όλης	107

Σχήμα 24 Στερεοχημικές απεικονίσεις των παραπάνω μορίων μετα των υπολογισμό της διάταξης ελάχιστης ενέργειας	108
Σχήμα 25 Γραφική απεικόνιση της εξοικονόμησης ενέργειας με την χρήση μικροκυμάτων (Virost et al. 2007)	108
Σχήμα 26 Φάσματα FT-Raman προτύπων ουσιών και ενός αιθερίου ελαίου (Δείγμα s1ρίγανης) όπως καταγράφηκαν κατά το πειραματικό	109
Σχήμα 27 Αποσυνελιγμένη περιοχή φάσματος του «αιθερίου ελαίου s1» από τα 720 – 840 cm^{-1} .	111
Σχήμα 28 Καμπύλη αναφοράς καρβακρόλης	112
Σχήμα 21 Διάγραμμα ροής εργασιών	80
Σχήμα 22 Τυπικό χρωματογράφημα του πτητικού κλάσματος σκόρδου που παρελήφθη με τη μέθοδο MWHD σε οξικό αιθυλεστέρα.	94
Σχήμα 23 Φάσμα FT-Raman αιθερίου ελαίου από σκόρδο που παρελήφθη με την μέθοδο MWHD και χρήση οξικού αιθυλεστέρα.	95
Σχήμα 24 Σχηματική απεικόνιση της αύξησης της δραστηκής επιφάνειας με την διασπορά	100
Σχήμα 25 Γραφική απεικόνιση της εξοικονόμησης ενέργειας με την χρήση μικροκυμάτων	103
Σχήμα 26 Χώρος σχηματισμού του γαλακτώματος	104
Σχήμα 27 Συντακτικοί τύποι καρβακρόλης - π-κυμενίου	118
Σχήμα 28 Δεσμός υδρογόνου	115
Σχήμα 29 Στερεοχημικές απεικονίσεις των παραπάνω μορίων	116
Σχήμα 30 Τυπικά χρωματογραφήματα του πτητικού κλάσματος από σκελίδες φρέσκου σκόρδου (<i>A. sativum</i>) που παραλήφθηκαν (A) Σύγχρονη απόσταξη μικρο - εκχύλιση (SDE) (B) Υδροαπόσπαξη με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MWHD) και (C) Εκχύλιση με την χρήση υπερήχων (USE), και την χρήση διαιθυλαιθέρα.	120
Σχήμα 31 Συσχετισμός μεταβολής ομάδων ουσιών ανάλογα με την θέρμανση που δέχονται κατά την παραλαβή με διαιθυλαιθέρα.	126
Σχήμα 32 Συσχετισμός μεταβολής ομάδων ουσιών ανάλογα με την θέρμανση που δέχονται κατά την παραλαβή με εξάνιο.	126
Σχήμα 33 Συσχετισμός μεταβολής ομάδων ουσιών ανάλογα με την θέρμανση που δέχονται κατά την παραλαβή με οξικό αιθυλεστέρα	127
Σχήμα 34 Συγκεντρική απεικόνιση αποτελεσμάτων με χρήση διαιθυλαιθέρα	127
Σχήμα 35 Ενυαίωτη απεικόνιση αποτελεσμάτων ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο παραλαβής	128
Σχήμα 36 Επίδραση του είδους του διαλύτη στην παραλαβή αιθερίου ελαίου του σκόρδου	128
Σχήμα 37 Φάσματα αιθερίου ελαίου σκόρδου μετά από παραμονή 1,5 h για την διάσπαση της	132

αλλυσίνης	
Σχήμα 38 Διαφορά φασμάτων μετά από 6h degradation σε θερμοκρασία δωματίου.	133
Σχήμα 39 Πρόοδος αντίδρασης διάσπασης αλλυσίνης	133
Σχήμα 40 Απόδειξη ολοκλήρωσης αντίδρασεων διάσπασης μετά τις 30 ώρες παραμονής	134
Σχήμα 41 Σχηματική απεικόνιση ανάλυσης δείγματος που περιέχει αλλυσίνη και συστατικά αιθερίου ελαίου ταυτόχρονα	136
Σχήμα 42 Τυπικό χρωματογράφημα του πτητικού κλάσματος σκόρδου που παρελήφθη με τη μέθοδο MWHD σε οξικό αιθυλεστέρα.	140
	134
	134
	135
Σχήμα 31 Φάσματα FT-Raman προτύπων ουσιών και ενός αιθερίου ελαίου	135
Σχήμα 32 Αποσυνελεγμένη περιοχή φάσματος του «αιθερίου ελαίου 1» από τα 720 – 840 cm-1.	139
	140
	141
	141
	143
Σχήμα 46 Συσχετισμός ύψους κορυφών των προτύπων δειγμάτων	147
Σχήμα 47 Γραφική παράσταση της συνάρτησης προσδιορισμού	151
Σχήμα 48 Τυπικό φάσμα τριγλυκεριδίων αγριαγκινάρας	161
Σχήμα 49 Περιοχή φάσματος τριγλυκεριδίων	162
Σχήμα 50 Φάσμα μεθυλεστέρων αγριαγκινάρας μετά από πλήρη μεθεστεροποίηση	163
Σχήμα 51 Περιοχή από 1500 ως 600 cm-1 φάσματος τριγλυκεριδίων και μεθυλεστέρων	164
Σχήμα 52 Καμπύλη αντίδρασης μεθεστεροποίησης παρουσία διαλύτη 1/1.	167
Σχήμα 53 Καμπύλη αντίδρασης μεθεστεροποίησης παρουσία διαλύτη 25/1.	168
Σχήμα 54 Αντιπαραβολή προόδου αντίδρασης με διαφορετικές ποσότητες διαλύτη.	169
Σχήμα 55 Σχετική πρόοδος σύγχρονης εκχύλισης – μετεστεροποίησης σε πίττα και σπόρο	170

Βιβλιογραφία

1. Abu-Lafi, S., Dembicki, J. W., Goldshlag, P., Hanus, L. O., Dembitsky, V. M., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2004, 17, 235–245.
2. Agarwal, K. C., *Medixal Research Reviews*, 1996, 16, 111-124
3. Akoh, C.C., Mussata, C. O., *JAOCs*, 1998, 75, 697-701
4. Armstrong, PhD thesis, 2000
5. ASTM D6751-08 Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels
6. Banerjee, S.K., Maulic, S.K., Pulok, K., *Phytother. Res.*, 2000, 17, 97.
7. Benkeblia, N. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 2004, 37, 263–268.
8. Block, E., *Scientific American*, 1985, 252, 94-99.
9. Block, E., Ahmad, S., Catalfamo, J. L., Jain, M. K., Castrozd, R. A., *J. Am. Chem. SOC.*, 1986, 108, 7045-1055.
10. Block, E., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1992, 31, 1135-1178.
11. Bock, H., Shamster, M., Hirabayashi, T., Slemkov, A., *Chem. Ber.* 1982, 115, 1339.
12. Bock, H., Mohmand, S., Hirabayashi, T., Semkow, A., *Chem. Ber.*, 1982, 115, 1339-1348.
13. Brodnitz, M. H., Pascale, J. V., Van Derslice, L., *J. Agr. Food Chem.*, 1971, 19, NO. 2, 273-275.
14. Cavalito, C. J., Bailey, J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 66, 1950.
15. Cavalito, C. J., Buck, J. S., Suter, C. M., *J. Am. Chem. Soc.* 1944, 66, 1952
16. Chu, Y.H., Kung, Y. L., *Food Chem.* 1998, 62, 191-195
17. Compton, A., *Phys. Rev.*, 1923, **21**, 483.
18. Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 5503-5507.
19. Daferera, D., Pappas, C., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., *Food Chemistry*, 2002, 77, 511–515.
20. Dean, J. A., *Lange's handbook of chemistry* (15th edition) Mc Graw Hill, New York, 1999.
21. DIN V 51606: Standard for fatty acid methyl esters (FAME).
22. EN 14214:2003 Automotive fuels – Fatty acid methyl esters (FAME for diesel engines –Requirements and test methods
23. Asma Farhat, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Mohamed El Maataoui, Jean-François Maingonnat, Mehrez Romdhane, Farid Chemat, *Food Chem.*, 2011, 125, 255-261
24. Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., *J. Biosc. Bioeng.*, 2001, 92, 405-416

25. Garcia, M.A., Sanz, J., *Journal of Chromatography A*, 2001, 918, 189–194.
26. Hancewicz, T. M., Petty, C., *Spectrochimica Acta Part A*, 1995, 51, 2193-2198.
27. Hao, J., Han, W., Huang, S., Xue, B., Deng, X., *Separation and Purification Technology*, 2002, 28, 191–196.
28. Ho, S.H., Koh, L., Ma, Y., Huang, Y., Sim, K.Y., *Postharvest Biology and Technology*, 1996, 9, 41-48.
29. Muhammad Kamran Khan, Maryline Abert-Vian, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Olivier Dangles, Farid Chemat, *Food Chem.* 2010, 119, 851-858
30. Knothe, G., *Fuel Process. Technol.*, 2005, 86, 1059-1070
31. Kokkini, S., Karousou, R., Pardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T., *Phytochemistry*, 1997, 44, 833-836
32. Korbitz, W., *Renew. Energ.*, 1999, 62, 1078-1083.
33. Leonard, J., Lygo, B., Procter, G., *Advanced Practical organic chemistry*, 1995, Chapman & Hall, Oxford, Great Britain.
34. Lož'iene, K., Vaic'iu'niene, J., Venskutonis, P. R., *Biochemical Systematics and Ecology*, -2003, 31, 249–259.
35. Ma, F., Hanna, M.A., *Bioresource Technol.*, 1999, 70, 1-15
36. Maeda, Y., Vinatoru, M., Stavarace, C. E., Iwai, K., Oshige, H., Japanese patent application 2003335154, JP/26.09.03
37. Nakanishi, K., Solomon, P. A., *Infrared Absorption spectroscopy*, 2nd Edition, Holden-Day, San Francisco, C.A., 1997.
38. Nicolet Magna 750 Series Users manual – Technical Specifications
39. Nicolet Magna series User's guide – Instructions Manual
40. Nishimoura, H., Wijaka, C. H., Mizoutani, J., *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 563.
41. Shaath A. N., Flores F. B., Osmanand M., Abd-El Aal M., *Developments in Food Science*, 1995, 37, Part 2, 2025-2037
42. O.O. Okoh, A.P. Sadimenko, A.J. Afolayan, *Food chem.*2010, 120, 308-312
43. OMNIC ver. 3.1 Users manual – Spectra interpretation
44. Pappas, C., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., *Applied spectroscopy*, 1998, 2, NO. 11, 1399-1402
45. Peaksolve Users manual
46. Porto, S.P.S., & Wood, D.L., *J. Opt. Soc. Am.*, **52**, 251 (1962).
47. Carla Da Porto, Deborha Decorti, Ireneo Kikic, *Food chem.* 2009,112, 1072-1078
48. Raman C.V., & Krishnan, K.S., *Nature*, **121**, 711 (1928).

49. SaHez, F., *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, 29, 189-198.
50. Salgueiro, L. R., Vila, R., Tomi, F., Figueiredo, C., Barroso, J. G., Canigueral, S., Casanova, J., Proenca Da Cunha, A., Adzet, T., *Phytochemistry*, 1997, 45, No. 2, 307-311.
51. Schultz, H., Baranska, M., Belz, H., Rsch, P., Strehle, M. A., Popp, J., *Vib. Spectrosc.* 2004, 35, 81-86
52. Skoulika, S. G., Georgiou, C. A., Polissiou, M. G., *Talanta*, 2000, 51, 599-604.
53. Smekal, A., *Naturwissenschaften*, 1923, 11, 873.
54. Srivastava, A., Prasad, R., *Renew. Sust. Energ. Re.*, 2000, 4, 11-133.
55. Stavarace, C.E., Vinatoru, M., Nishimura, R., Maeda, Y., 2005, 12, 367-372
56. Stryer L., *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα, 3^η έκδοση 1995
57. Sun, Z., Ibrahim, A., Oldam, P., Schultz, T., Connors, T., *Journal of agricultural and food chemistry*, 1997, 45, 3088-3091.
58. Terpinski, J., *Identification of organic compounds; In Laser Raman spectroscopy*, 1st Edition, Polish scientific publishers, Warsaw, Poland, 1987.
59. THE MERCK INDEX, online version, MERCK Publishing, 2008
60. TQ Analyst users manual -
61. Virost, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni F., Chemat, F., *J. Chrom. A.* 2007, 1174 Issues 1-2, 138-144
62. Vitranen, A. I., *Angewandte Chemie International Edition*, English, 1962, 1, 299-306
63. Yu, T., Wu, C., Liou, Y., *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 725-730.
64. Βαλαβανίδης, Αθ. Π. *Φασματοσκοπία οργανικών ενώσεων*, Εκδ. Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, 2006
65. Διαδικτυακός τόπος Υπ. Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, www.minagric.gr Η νέα κοινή αγροτική πολιτική.
66. Μ. Βαρδαβάκης, *Συστηματική βοτανική*, Εκδ. Δ. Κ. Σαλονικίδη, 4^η έκδοση, 1996
67. Ταραντίλης, Γ.Π.Α. 2004
68. Nabil Bousbia, Maryline Abert Vian, Mohamed A. Ferhat, Emmanuel Petitcolas, Brahim Y. Meklati, Farid Chemat, *Food Chem.*, 2009, 114, 355-362

Παράρτημα Ι

Επιστημονικές δημοσιεύσεις

Από την εκπόνηση της διατριβής προέκυψαν τα παρακάτω δημοσιεύματα:

*Rapid method for simultaneous quantitative determination of four major essential oil components from oregano (*Oreganum sp.*) and thyme (*Thymus sp.*) using FT-Raman spectroscopy*

NG Siatis, AC Kimbaris, CS Pappas, PA Tarantilis, DJ Daferera, MG Polissiou
Journal of agricultural and food chemistry 53 (2), 202-206

IF: 2.823 αναφορές 5

*Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*)*

AC Kimbaris, NG Siatis, DJ Daferera, PA Tarantilis, CS Pappas, MG Polissiou
Ultrasonics sonochemistry 13 (1), 54-60

IF: 3.567 αναφορές: 61

Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy

NG Siatis, AC Kimbaris, CS Pappas, PA Tarantilis, MG Polissiou
Journal of the American Oil Chemists' Society 83 (1), 53-57

IF: 1.73 αναφορές: 32

*Quantitative analysis of garlic (*Allium sativum*) oil unsaturated acyclic components using FT-Raman spectroscopy*

AC Kimbaris, NG Siatis, CS Pappas, PA Tarantilis, DJ Daferera, MG Polissiou
Food chemistry 94 (2), 287-295

IF: 3.665 αναφορές 10

“Monitoring of allicin transformation to garlic essential oil constituents by means of FT-IR Spectroscopy”, N. Siatis, A. Kimbaris, D. Daferera, Ch. Pappas, P. Tarantilis, M. Polissiou, IMA 2005 4th International Conference on Instrumental Analysis Modern Trends and Applications, 2-6 October 2005, Iraclion Crete Greece.

Rapid Method for Simultaneous Quantitative Determination of Four Major Essential Oil Components from Oregano (*Oreganum* sp.) and Thyme (*Thymus* sp.) Using FT-Raman Spectroscopy

NIKOLAOS G. SIATIS, ATHANASIOS C. KIMBARIS, CHRISTOS S. PAPPAS,
PETROS A. TARANTILIS, DIMITRA J. DAFERERA, AND MOSCHOS G. POLISSIOU*

Department of Science, Laboratory of Chemistry, Agricultural University of Athens,
75 Iera Odos, 118 55 Athens, Greece

A simple and rapid method for the quantitative determination of four major components found in oregano and thyme essential oils is presented. The method correlates the Raman peak intensity in the spectral region from 1800 to 600 cm^{-1} and the concentration percentage of each particular constituent in the sample. To achieve accurate quantification results and avoid the risk of overlapping peaks of unknown Raman-active substances in natural essential oils, the peaks must be analyzed. For this purpose, PEAKSOLVE software (Ver. 1.0.5) was used. Unknown samples were measured with the FT-Raman method, and the results were compared to those of the gas chromatographic (GC) analysis. The comparison was made at a confidence level of 99%, and the two methods scored equally in terms of repeatability and accuracy even at the edge of the method specifications. The new method can provide accurate results in very short times once the setup is complete and could be utilized in areas where vast amounts of samples must be analyzed.

KEYWORDS: FT-Raman; oregano; thyme; essential oil; quantitative; deconvolution

INTRODUCTION

Thyme and oregano are plants native to the Mediterranean region that have been used in traditional medicine and as spices in food for centuries. Their spice value and properties are due to the aromatic and other volatile compounds generally referred to as essential oils of these aromatic plants. Essential oils derived from these plants have valuable pharmacological properties that have been investigated by many scientists around the world (1–7).

The potential of application of these compounds as additives in foods is large, and their most common use is as preservatives for stored food (8). The industry has also taken serious interest in these applications and has launched a series of products based on essential oils as organic feed supplements for animals. The supporting arguments regarding the use of essential oils for animal stock dietary purposes are focused on their natural derivation and their medicinal properties.

Many different varieties of oregano and thyme appear to vary in their essential oil composition (9). Variability is observed among plants growing in different countries around the world (10–13) and also during the plant life cycle (14). All widely used varieties of thyme and oregano show a high content of four major constituents, *p*-cymene, γ -terpinene, thymol, and carvacrol. Those four elements usually add up to more than 90% of the essential oil (10, 11, 13).

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) is the most popular method for the determination of essential oil composition. Components existing in the essential oil can be identified by comparison of their relative retention times and their mass spectra. Fourier transform Raman spectroscopy (FT-Raman) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy are techniques mainly used for qualitative determination of compounds based on their unique spectrum. Raman spectroscopy has been used for quantitative determination in mixture samples by our team for simultaneous determination of two compounds in mastic gum oil (15), and the challenge is toward more with one single measurement. FT-IR spectroscopy has also been used for quantification of lignin in wood (16). Vibrational spectroscopy methods provide accurate results in a short time (15–17), and when combined with the appropriate software can prove to be valuable tools for routine checks.

In this Article, we present a method in which quantitative determination of the four basic essential oil components from the most important Lamiaceae plants can be achieved in a rapid, simple, nondestructive way by applying FT-Raman spectroscopy. The method focuses on simultaneous quantification of the constituents rather than on single compound measurements. The analysis results provide adequate information for commercial classification of the product. A GC method was also used as a reference to the results. The GC and spectral quantification results are shown further in this Article. The aim of this work is to demonstrate the capacity of FT-Raman

* Author to whom correspondence should be addressed [telephone +30 210 529 4241; fax +30 210 529 4265; e-mail mopol@aua.gr].

Table 1. Standard Solutions Composition

standard	thymol (%)	carvacrol (%)	<i>p</i> -cymene (%)	γ -terpinene (%)
1	85	3	7	5
2	70	10	6	14
3	55	20	5	20
4	45	30	15	10
5	35	40	14	11
6	30	50	4	16
7	25	60	9	6
8	15	70	12	3
9	10	80	3	7
10	3	85	8	4

spectroscopy in applications on the quantitative analysis field, with the use of the proper software tools where necessary.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. Cultivated oregano was provided by a commercial grower. Natural grown oregano (*Oreganum* sp.) and thyme (*Thymus* sp.) were collected from specific regions in Greece, air-dried, and kept in the dark until distillation.

Isolation of the Essential Oils. Five essential oils from thyme and oregano were isolated using the Clevenger apparatus for hydrodistillation for 4 h. Without any further treatment, essential oils were stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The five samples were randomly characterized as essential oil 1, essential oil 2, essential oil 3, essential oil 4, and essential oil 5.

Chemicals and Standards. Pure thymol, carvacrol, *p*-cymene, and γ -terpinene were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). Thymol is provided in solid phase by Sigma-Aldrich, and, to produce reliable calibration standard mixtures, it was necessary to further treat it to receive liquid-state thymol. The crystal state in which thymol was obtained does not allow good-quality spectra to be recorded. Liquid-state thymol is first obtained by fair heating in sealed vessel. When cooled, thymol will return to its solid-crystal form unless water molecules existing in traces are removed to inhibit crystal reformation. This is easily achieved with the addition of a few milligrams of anhydrous magnesium sulfate while in the liquid state. Liquid thymol can stay in this form for days at room temperature; however, for calibration standards and FT-RAMAN spectra, thymol was prepared minutes before measurement.

Ten standard mixtures were prepared containing the four basic essential oil components *p*-cymene, γ -terpinene, thymol, and carvacrol in different concentrations ranging between the lower and higher quantities most commonly found in oregano and thyme essential oils (Table 1). All standards were prepared minutes before measurement to ensure reliability.

GC Instrumentation and Conditions. The analysis of the essential oils was performed using a HP-5890 II GC equipped with a $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}, 0.25\text{ }\mu\text{m}$ HP-5 ms capillary column and flame ionization detector (FID). Helium was the carrier gas. Column temperature programming was as follows: starting temperature was $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ raised to $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, held for 5 min, and then raised to $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The GC-MS analyses were performed under the same

conditions with GC, using an HP 5972 mass selective detector. Injector and MS transfer line temperatures were set at 220 and $290\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. For GC-MS detection, an electron ionization system was used with an ionization energy of 70 eV. Each sample was then analyzed three times with GC-FID to obtain the percentage concentration of each constituent and standard deviations.

All samples were injected manually and splitless after dilution (1/100 in methanol). The percentage composition of each component was calculated with the 100% method using chromatogram peak areas.

FT-Raman Instrumentation and Conditions. All samples were measured in triplets using a Nicolet 750 FT-Raman spectrometer, equipped with a Nd:YAG laser source that emits at 1064 nm . In addition, a CaF_2 beam splitter, an indium-gallium-arsenide (InGaAs) detector, and 180° backscattering geometry were used in the spectrometer. Routine procedures such as bench alignment and fine-tuning of the spectrometer were held before each batch of measurements. Sample cells were Wimad WG-SM NMR tubes of 4.97 mm outer diameter and 0.38 mm wall thickness. Optimum time/spectra quality was determined at 100 scans (3 min) with a resolution of 4 cm^{-1} . Each Raman spectrum was automatically smoothed and baseline corrected using the proper functions from the built-in spectrometer software Omnic 3.1.

RESULTS AND DISCUSSION

As mentioned before, the standard method for qualitative analysis and quantification of essential oil components is the GC-FID, GC-MS method. Characterization of these or similar compounds in essential oils has been previously published (18, 19) on a qualitative analysis basis by FT-IR spectrometry. FT-Raman spectra of carvacrol, *p*-cymene, γ -terpinene, and treated thymol (as above) are shown (Figure 1) and discussed below.

In every spectrum, four regions can be analyzed from 1800 to 600 cm^{-1} (Table 2), the conjugated and nonconjugated double bond C=C vibrations from 1800 to 1500 cm^{-1} , the methyl and isopropyl bending region from 1500 to 1300 cm^{-1} , the stretching of the single C-C bond and C-O bonds between 1300 and 1000 cm^{-1} , and the breathing mode and out-of-plane C-H vibrations from 1000 to 600 cm^{-1} .

The spectrum of γ -terpinene shows no significant peak in the region 1300 – 1000 cm^{-1} as expected, and the strongest peak is at 1700 cm^{-1} assigned to nonconjugated double bonds of the 1,4-cyclohexadiene ring. The methyl and isopropyl C-H bending appears as a double broad band at 1428 cm^{-1} , and the ring-breathing mode shows at 756 cm^{-1} (19).

The C=C stretching vibration of the aromatic ring of *p*-cymene is shown at 1610 cm^{-1} , and the isopropyl methyl group symmetric bending vibration is shown at 1440 cm^{-1} . The asymmetric vibration of the same group appears at 1380 cm^{-1} . The single C-C bonds stretching are assigned to the peaks at 1210 and 1180 cm^{-1} , while the strong double peak at 804 cm^{-1} is assigned to the phenyl nucleus breathing mode. This peak's shape is probably affected by the different substituents of the para-substituted phenyl (19–21).

Table 2. FT-Raman Peak Positions, Assignments, and Observed Intensities in the Spectral Region of 1800 – 600 cm^{-1}

peak position	assignment	intensity ^a	γ -terpinene	<i>p</i> -cymene	thymol	carvacrol
1700	nonconjugated C=C stretching	s	+	–	–	–
1620–1590	conjugated C=C stretching vibration	s	–	–	+	+
1460–1440	isopropyl methyl (sym)	ms	+	+	+	+
1380	isopropyl methyl (as)	ms	+	+	+	+
1260–1180	stretching phenyl nucleus	w	–	+	+	+
1080–1110	C–O stretching	w	–	–	+	+
1060	$\gamma_{(\text{C-H})}$ aromatic	ms	–	+	+	+
880	$\gamma_{(\text{C-H})}$	w, ms	+	+	+	+
740–804	breathing mode (ring deformation)	vs	+	+	+	+

^a w, weak; ms, moderate strong; s, strong; v, variable; vs, very strong.

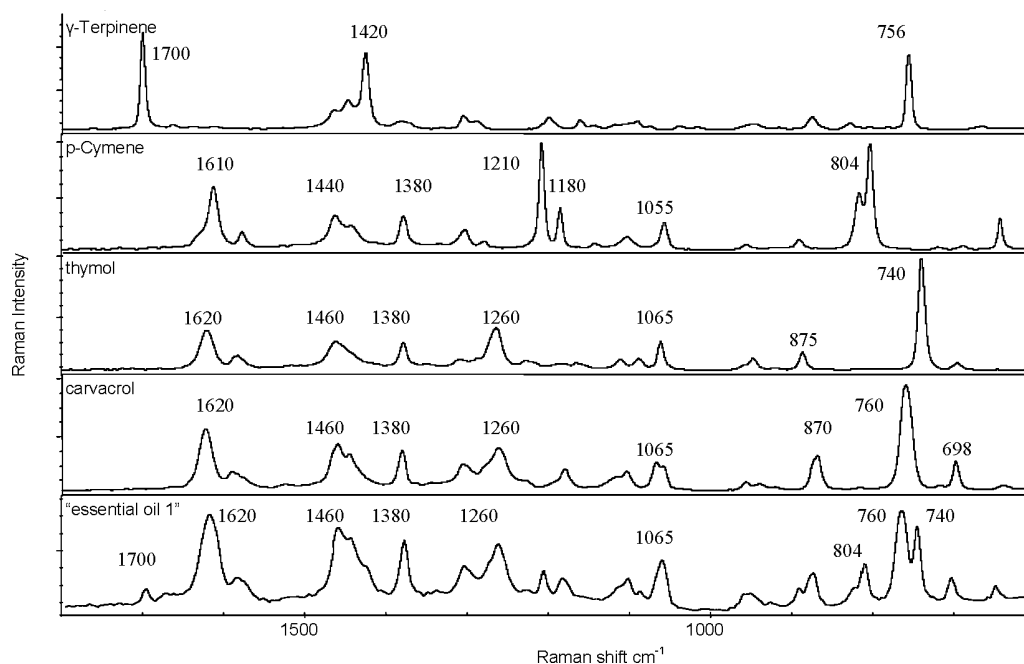


Figure 1. FT-Raman spectra of four pure individual compounds [carvacrol, thymol, γ -terpinene, *p*-cymene] and essential oil 1 [thymol 24.7%, carvacrol 46.6%, *p*-cymene 14.8%, γ -terpinene 4.46%].

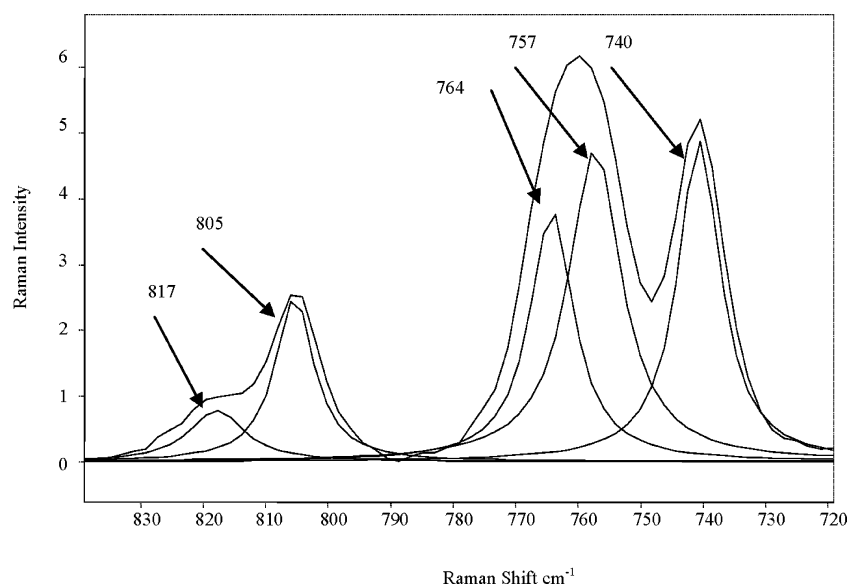


Figure 2. Deconvoluted FT-Raman spectrum region from 720 to 840 cm^{-1} of essential oil 1.

The FT-Raman spectra of carvacrol and thymol show the same peaks at 1620, 1460, and 1380 cm^{-1} assigned as above. The common peak at 1260 cm^{-1} not present in the spectra of *p*-cymene and γ -terpinene is assigned to the trisubstituted aromatic ring. The breathing mode vibrations for thymol and carvacrol appear at 740 and 760 cm^{-1} , respectively.

Quantitative Analysis. As mentioned above, quantification of essential oil compounds has been attempted on the basis of their infrared spectrum. By nature, the infrared spectra are more complex than Raman spectra (18) and involve a higher risk of overlapping peaks when natural essential oils are in question. The advantage of FT-Raman spectra in comparison to the infrared spectra is very clear as strong and sharp peaks result in lower mistakes in linearity. In such applications, FT-Raman spectroscopy is likely not be more reliable than FT-IR spectroscopy because overtones and combination bands are rarely

observed in Raman spectroscopy except in the unusual situation where a Fermi resonance occurs.

FT-Raman spectra peaks used in the quantification procedure were chosen to be representative of the compound and of sufficient intensity. Hence, the peak at 1701 cm^{-1} will be used to quantify γ -terpinene as it uniquely identifies this component in standard mixtures. The peaks at 804 and 740 cm^{-1} will be used to quantify *p*-cymene and thymol, respectively. In the case of carvacrol, the strongest peak is at 760 cm^{-1} , but the γ -terpinene peak at 756 cm^{-1} presents a resolution issue. That makes it necessary to analyze the peak to obtain accurate peak height measurements for quantification. A characteristic deconvoluted spectrum is shown in **Figure 2**. The resolved peaks' heights and percentage concentrations were used to produce three calibration curves for carvacrol, thymol, and *p*-cymene. The calibration curve for γ -terpinene was produced by the

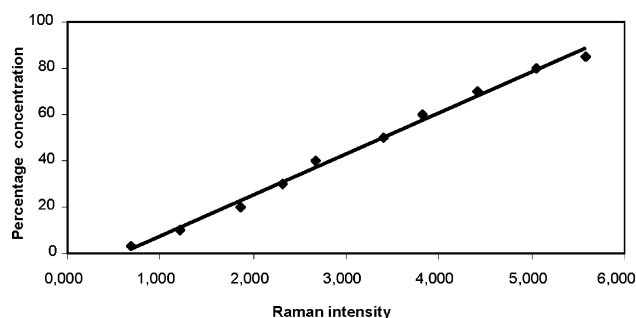


Figure 3. Calibration curve for carvacrol.

Table 3. Percentage Concentrations Obtained by GC–FID and Spectral Quantification

essential oil		GC–FID % ^a	Raman % ^a	F_{expt}^b	t_{expt}^b
1 (oregano)	<i>p</i> -cymene	14.8 ± 1.4	16.7 ± 0.2	49.00	1.900
	γ -terpinene	4.46 ± 0.45	4.77 ± 0.08	31.64	0.959
	thymol	24.7 ± 1.2	28.78 ± 0.46	6.81	4.900
	carvacrol	46.6 ± 1.8	56.5 ± 2.0	1.23	5.203
2 (oregano)	<i>p</i> -cymene	4.17 ± 0.76	5.078 ± 0.010	5776.00	1.689
	γ -terpinene	2.19 ± 0.39	2.27 ± 0.24	2.64	0.247
	thymol	0.29 ± 0.05			
	carvacrol	80.9 ± 2.1	74 ± 10	22.68	0.955
3 (oregano)	<i>p</i> -cymene	15.5 ± 1.4	16.90 ± 0.46	9.26	1.344
	γ -terpinene	2.2 ± 0.2	2.08 ± 0.17	1.38	0.646
	thymol	0.84 ± 0.04			
	carvacrol	73.20 ± 1.9	77.57 ± 0.30	40.11	3.213
4 (oregano)	<i>p</i> -cymene	5.82 ± 0.14	7.58 ± 0.12	1.36	13.499
	γ -terpinene	4.670 ± 0.088	5.54 ± 0.34	14.93	3.503
	thymol	2.515 ± 0.028	5.39 ± 0.37	174.62	10.958
	carvacrol	77.58 ± 0.28	57.9 ± 4.2	225.00	5.927
5 (thyme)	<i>p</i> -cymene	7.88 ± 0.58	9.68 ± 0.26	4.98	4.005
	γ -terpinene	6.41 ± 0.45	7.73 ± 0.16	7.91	3.909
	thymol	0.28 ± 0.03			
	carvacrol	72.45 ± 0.97	64 ± 12	153.04	0.993

^a $n = 3$. ^b Confidence level of 0.99.

measured height of the peak at 1701 cm^{-1} because it is unique in every observed spectrum. The calibration equations are shown below:

$$p\text{-cymene (\%)} = (0.97 \pm 0.72) + (6.24 \pm 0.55)A; \\ r = 0.94, n = 3$$

$$\gamma\text{-terpinene (\%)} = -(0.18 \pm 0.33) + (6.31 \pm 0.19)A; \\ r = 0.99, n = 3$$

$$\text{thymol (\%)} = (3.34 \pm 0.85) + (5.31 \pm 0.11)A; \\ r = 0.99; n = 3$$

$$\text{carvacrol (\%)} = (-10.18 \pm 1.66) + (17.71 \pm 0.48)A; \\ r = 0.99; n = 3$$

where A is the intensity of specific peaks for each compound. The characteristic calibration curve for carvacrol is shown in Figure 3.

The quantification results comparison with the GC–FID analysis results for five natural essential oils is shown in Table 3, along with their standard deviations. The percentage concentrations fluctuate between 4.2 and 15.5 for *p*-cymene with the GC method and 5.1 and 16.9 with the Raman method. For γ -terpinene, the percentages were between 2.2 and 6.4, and 2.1 and 7.7 for the GC and Raman, respectively. For thymol, it is expected that in the cases that the concentration is lower than 3% the Raman method cannot detect it. Finally, for carvacrol, the percentage concentrations range between 46.6 and 80.9 for

GC and 56.5 and 77.6 for Raman. The variation of the two methods is acceptable as shown by the F -test and t -test as follows.

The statistical tools of the F -test and t -test were used to determine the repeatability and sensitivity of the proposed methodology, respectively. The theoretical values for a confidence level of 0.99 are 99 for the F -test and 4.604 for the t -test. For the majority of the measurements, the percentage concentrations determined by the GC–FID method do not differ significantly from those calculated with the Raman method. It was shown that, even at the edge of the method limits, the spectral quantification is as accurate and reproducible as the standard method for the majority of the measurements.

LITERATURE CITED

- (1) Adam, K.; Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, Th.; Arsenakis, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1739–1745.
- (2) Youdim, K. A.; Deans, S. G. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech. Ageing Dev.* **1999**, *109*, 163–175.
- (3) Isman, M. B.; Wan, A. J.; Passreiter, C. M. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 65–68.
- (4) Karaman, S.; Digrak, M.; Ravid, U.; Ilcim, A. Antibacterial and antifungal activity of *Thymus revolutus* from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 183–186.
- (5) Rasooli, I.; Mirmostafa, S. A. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 244–250.
- (6) Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. GC–MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2576–2581.
- (7) Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. The Effectiveness of plant Essential Oils on *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Prot.* **2003**, *22*, 39–44.
- (8) Botsoglou, N. A.; Govaris, A.; Botsoglou, E. N.; Grigoropoulou, S. H.; Papageorgiou, G. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α -Tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2930–2936.
- (9) Loziene, K.; Vaiciuniene, J.; Venscutonis, P. R. Chemical composition of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 249–259.
- (10) Saez, F. Volatile oil variability in *Thymus serpylloides* ssp. *gadorenensis* growing wild in Southeastern Spain. *Biosyst. Ecol.* **2001**, *29*, 189–198.
- (11) Salgueiro, L. R.; Vila, R.; Tomi, F.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Canigual, S.; Cassanova, J.; Da Cunha, A. P.; Adzet, T. Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry* **1997**, *45* No. 2, 307–311.
- (12) Garcia, M. A.; Sanz, J. Analysis of *Oregano vulgare* volatiles by direct thermal desorption coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2001**, *918*, 189–194.
- (13) Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardiotti, A.; Krigas, N.; Lanaras, T. Autumn essential oils of greek oregano. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 833–836.
- (14) Hudaib, M.; Speroni, E.; Di Pietra, A. M.; Carvini, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 691–700.

- (15) Daferera, D.; Pappas, C.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. Quantitative analysis of α -pinene and β -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. *Food Chem.* **2002**, *77*, 511–515.
- (16) Pappas, C.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. Determination of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) lignin in crude plant material using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 1399–1402.
- (17) Rosch, P.; Popp, J.; Kiefer, W. Raman and surface enhanced Raman spectroscopic investigation on Lamiaceae plants. *J. Mol. Struct.* **1999**, *480–481*, 121–124.
- (18) Schulz, H.; Baranska, M.; Belz, H.; Rosch, P.; Strehle, M. A.; Popp, J. Chemotaxonomic characterization of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements. *Vib. Spectrosc.* **2004**, in press.
- (19) Daferera, D.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. Characterization of Essential oils from Lamiaceae Species by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 5503–5507.
- (20) Nakanishi, K.; Solomon, P. A. *Infrared Absorption Spectroscopy*, 2nd ed.; Holden-Day: San Francisco, CA, 1977.
- (21) Terpinski, J. Identification of organic compounds. In *Laser Raman Spectroscopy*, 1st ed.; Baranska, H., Labudzinska, A., Terpinski, J., Eds.; Polish Scientific Publishers: Warsaw, Poland, 1987.

Received for review June 30, 2004. Revised manuscript received October 19, 2004. Accepted October 27, 2004.

JF048930F



Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*)

Athanasios C. Kimbaris, Nikolaos G. Siatis, Dimitra J. Daferera, Petros A. Tarantilis, Christos S. Pappas, Moschos G. Polissiou *

Department of Science, Laboratory of Chemistry, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 118 55 Athens, Greece

Received 17 July 2004; accepted 11 December 2004

Available online 2 February 2005

Abstract

A comparative study of traditional simultaneous distillation extraction (SDE), microwave assisted hydrodistillation extraction (MWHD) and ultrasound-assisted extraction (USE) is presented, for the extraction of essential oils from fresh garlic (*Allium sativum*) cloves. Each method is evaluated in terms of qualitative and quantitative composition of the isolated essential oil. The highly reactive sulfur molecules of the garlic volatile fraction show variable response to the different isolation methods. The application of ultrasound for the extraction of the essential oil is considered to cause a lesser damage of thermal-sensitive molecules, thus, providing a better approach of the compounds primarily responsible for the characteristic odor and taste of freshly chopped garlic. All heat-involving isolation procedures have been shown to differentiate the volatile-fraction profile as analyzed by GC–MS. Especially when grouping the compounds into cyclic and acyclic, the percentage concentrations drop from 77.4% to 8.7% for the acyclic while that of the cyclic compounds increase from 4.7% to 70.8%. The observed fact may be attributed to the effect of the heat applied, which changes from harsh thermal treatment (SDE) to short time thermal (MWHD) and room-temperature isolation (USE). The use of USE proves to be crucial in order to provide reliable insight into garlic's chemistry.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Garlic; Sulfur compounds; Extraction; Distillation; Ultrasound; Microwave; SDE

1. Introduction

Garlic (*Allium sativum*) has played an important dietary as well as medicinal role for centuries [1]. Particularly today the medicinal use of garlic is widespread and growing. A wide array of therapeutic effects of garlic such as hypolipidaemic, antiatherosclerotic, hypoglaemic, anticoagulant, antihypertensive, antimicrobial, anticancer, antidote (for heavy metal poisoning), hepatoprotective and immunomodulation have been reported

[2]. In addition insect and animal repulsive effects have been mentioned [3–6].

Various preparation techniques of garlic have been used to isolate and finally identify its components that mainly consist of organosulfur compounds. Raw garlic homogenate is the major preparation of garlic that has been subjected to intensive scientific study, as it better resembles the way that garlic is consumed. Raw garlic homogenate is similar to aqueous extract of garlic (filtrate of blended garlic and water). Allicin (allyl 2-propenethiosulphinate or diallyl thiosulphinate) is the major thiosulphinate compound found in garlic homogenate and it is thought to be the principal bioactive compound present in aqueous garlic extract [7,8].

* Corresponding author. Tel.: +30 210 529 4241/152 94; fax: +30 210 529 4265.

E-mail address: mopol@aua.gr (M.G. Polissiou).

When garlic is chopped or crushed, allinase enzyme, present in garlic, is activated and acts on alliin (present in intact garlic) to produce allicin [9–12]. The water extract of heat-treated garlic contains mainly alliin due to allinase inactivation by heat. The major compounds present in aged garlic extract are S-allylcysteine and S-allylmercaptocysteine [13,14].

Medicinally used garlic oil is mostly prepared by hydro-distillation of raw garlic homogenate. The garlic oil is insoluble in water, therefore can be separated or extracted afterwards. Garlic oil consists of the diallyl, allyl methyl and dimethyl mono to hexa sulfides [15–17]. Garlic oil from oil-macerated or ether extracted garlic homogenate contains the 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin and 3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin, allyl sulfides and ajoenes (Z and E) [18–20].

The traditional methods for the isolation and purification of chemical constituents from plants tissues, present some disadvantages. Mainly they require long extraction time, big solvent amounts, and some times have low efficiency. Moreover, many natural products are thermally unstable and may degrade during thermal extraction and/or distillation [21,22].

The use an ultrasonic cleaning bath for the extraction of essential oil has shown to diminish the danger of thermal degradation and aid extraction by significantly reducing extraction times. The mechanical effect of ultrasound provides a greater penetration of solvent into cellular materials, via cavitation effects, and improves the release of cell contents into the bulk medium [23,24].

This work describes a comparative study of classical distillation solvent extractions and ultrasound-assisted extraction of garlic cloves, employing different extracting solvents.

2. Experimental

2.1. Plant material and reagents

Garlic cloves were purchased from local farmers, members of the Agriculture Union of N.Vissa. During the project, all the samples were maintained in our lab at appropriate conditions (dark, 25 °C). In each batch 100 g of garlic cloves were blended with 20 mL deionized water for 2 min in a commercial blender. Three different solvents were used for the distillations and the extractions of garlic samples, them being pure diethyl ether, hexane and ethyl acetate.

2.2. Isolation procedures

2.2.1. Simultaneous distillation solvent extraction (SDE)

Simultaneous distillation extraction was carried out using the Lickens–Nickerson apparatus (in low-density

solvent configuration). The extraction solvent was 10 mL of diethyl ether. The sample flask was charged with the batch in 100 mL of deionized water. The micro-simultaneous steam distillation extraction procedure was carried out for 2 h. For the condensation of steams, the condenser was cooled with a solution of glacial water-glycol (–10 °C). For the determination of the procedure yield in garlic oil the solvent was evaporated under a gentle nitrogen blowdown stream. To prevent volatile garlic oil constituents evaporation the concentration procedure was held at low temperature. The absence of solvent was determined by GC analysis. The remaining oil was weighed on an analytical scale and all the procedures results are shown in Table 1. After weighing the whole sample was re-diluted in 10 mL of the extraction solvent. The experimental procedure was repeated once with hexane and once with ethyl acetate.

2.2.2. Microwave-assisted hydrodistillation extraction (MWHHD)

The microwave-assisted distillation setup was performed in a modified LG 700 Watt max power household microwave oven, using a steam distillation solvent extraction apparatus equipped with a 1L sample flask, a pressure equalizing dropping funnel, and a steam condenser. This apparatus was used instead of the classical Lickens–Nickerson one because of the vigorous foaming phenomenon during the procedure. The extraction solvent was diethyl ether. The sample flask (1 L) was charged with the batch in 100 mL of deionized water and diethyl ether (50 mL). The distillation time was 30 min for the isolation of the essential oil at maximum power. The organic extract was concentrated by a gentle nitrogen blowdown stream to 10 mL volume and anhydrous magnesium sulfate was added. After filtration through a syringe filter the determination of the yield in garlic oil was held as in the SDE procedure. The experimental procedure was repeated once with hexane and once with ethyl acetate.

2.2.3. Ultrasound-assisted extraction (USE)

Ultrasound-assisted extraction was performed in an ultrasound cleaning bath (Sonorex, Super RK 255H type, 300 × 150 × 150 mm internal dimensions) by the mode of the indirect sonication, at the fixed-frequency of 35 kHz using as the working liquid. The temperature of the sonicated bath was 25 °C. The 500 mL sample flask was charged with the batch and 50 mL of diethyl ether was added. Sonication was held for 30 min. After sonication the organic layer was transferred into a separation funnel and 20 mL of a saturated solution of NaCl were added. The separated organic layer was collected. The water layer was washed with another 20 mL portion of the solvent. The whole organic extract was introduced again in the separation funnel and washed with 20 mL of a saturated solution of NaCl. The batch was

Table 1

Chemical composition of the essential oil of garlic (*A. sativum*) obtained by three different extraction techniques (SDE, MWHD, USE) using diethyl ether, hexane and ethyl acetate as solvents

Peak no.	Compound	Diethyl ether			Hexane			Ethyl acetate		
		SDE	MWHD	USE	SDE	MWHD	USE	SDE	MWHD	USE
1	Dimethyl disulfide (DMS)	2.2	2.1	– ^a	2.4	2.3	–	1.9	0.7	–
2	Ethyl vinyl sulfide (EVS)	–	–	3.2	–	–	4.2	–	–	9.7
3	1,2-dithiacyclopentane	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	–	0.3	0.2	–
4	Diallyl sulfide (DS)	2.3	0.9	0.3	2.2	0.8	0.4	1.9	0.1	0.4
5	2-vinyl thiophene	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–
6	3-methylthio propanal	0.3	–	–	0.2	–	0.1	0.4	0.2	–
7	2-ethyl thiophene	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–
8	<i>cis</i> or <i>trans</i> Methyl allyl disulfide (MADS) ^b	9.1	9.0	0.6	11.2	7.1	0.5	8.5	4.3	1.4
9	Methyl propyl disulfide	0.1	0.1	–	0.2	–	–	0.1	0.2	–
10	<i>cis</i> or <i>trans</i> Methyl allyl disulfide (MADS) ^b	0.2	0.1	–	0.1	–	0.1	0.2	0.2	–
11	Unknown	2.4	1.8	0.7	1.4	1.3	0.9	1.6	1.5	2.0
12	Dimethyl trisulfide (DMTS)	2.0	2.7	–	2.7	2.0	–	2.3	2.0	–
13	Allyl 2,3-epoxypropylsulfide	–	0.1	0.1	–	–	0.1	–	–	–
14	Diallyl disulfide (DDS)	28.4	17.6	8.2	25.5	17.8	7.3	23.1	6.8	6.0
15	C ₆ H ₁₀ S ₂	0.5	0.3	0.1	0.5	0.3	0.2	0.4	0.5	–
16	C ₆ H ₁₀ S ₂	1.2	1.4	1.5	1.2	1.0	1.4	0.9	1.1	3.7
17	Methyl butyl trisulfide	–	–	–	–	–	–	–	0.1	–
18	Methyl allyl trisulfide (MATS)	16.3	14.1	0.1	17.4	12.9	0.2	17.5	14.9	0.2
19	3-Vinyl-[4H]-1,2-dithiin (3-VDT)	4.0	15.9	32.7	4.5	15.4	26.3	4.5	14.5	25.7
20	2-Vinyl-[4H]-1,3-dithiin (2-VDT)	5.5	17.7	38.1	7.8	23.2	43.9	8.7	27.7	34.4
21	1,4-dimethyl tetrasulfide (DMTTS)	0.4	–	–	–	–	–	0.4	–	–
22	Diallyl trisulfide (DATS)	20.4	9.1	0.2	18.2	9.5	1.3	22.1	14.1	0.7
23	3,5-diethyl 1,2,4-trithiolane	0.2	0.2	–	–	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5
24	Pentadecene	–	–	–	–	–	–	–	–	0.6
25	Heptadecene	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5
26	1,2,3,4-tetrathia-5-methyl cyclohexane	–	–	–	–	–	0.4	–	–	–
27	3-(2-thia-4-pentenyl)-1-thiacyclohex-5-ene	–	–	–	–	–	0.2	–	–	0.3
28	Diallyl tetrasulfide (DATTS)	0.7	0.1	–	0.5	0.3	0.1	0.6	0.4	–
29	3-(2,3,4-trithia-5-heptenyl-1-thia-cyclohex-5-ene	0.1	0.2	0.1	–	–	0.4	–	0.2	–
30	2-(1-thia-2-cyclohexen-6-yl)-1,3-dithia-cyclohex-5-ene	0.3	2.0	6.4	0.3	2.1	2.3	0.4	2.7	2.2
31	Octadecanol	–	–	–	–	–	0.5	–	–	–
	Total	97.0	95.8	92.5	96.7	96.6	91.1	96.0	92.8	88.3
	Yield (g oil/100 g garlic)	0.23	0.22	0.13	0.22	0.21	0.12	0.24	0.23	0.17
	<i>Diallyl sulfides (mono, di, tri and tetra)</i>	51.8	27.7	8.7	46.4	28.4	9.1	47.7	21.4	7.1
	<i>Methyl allyl sulfides (di and tri)</i>	25.6	23.2	0.7	28.7	20.0	0.2	26.2	19.4	1.6
	<i>Vinyl dithiins</i>	4.7	33.6	70.8	12.3	38.6	70.2	13.2	42.2	60.1

Compounds are listed in order of their elution from the HP-5ms column.

SDE: Simultaneous distillation solvent extraction.

MWHD: Microwave-assisted hydrodistillation extraction.

USE: Ultrasound-assisted extraction.

Mass spectral data of No. 11: 103(100), 104(59), 45(30), 105(12), 71(11), 64(10), 68(3); No. 15: 41(100), 45(94), 146(58), 73(53), 81(38), 71(28), 105(26); No. 16: 45(100), 41(82), 73(52), 146(48), 81(39), 71(36), 105(27).

^a Not detected.

^b Correct isomer not identified.

sonicated three times, with the addition of 50 mL of solvent each time, yielding three fractions per garlic sample. The procedure yield was determined as in the MWHD procedure. The experimental procedure was repeated once with hexane and once with ethyl acetate.

2.3. Gas chromatography, gas chromatography–mass spectrometry (GC, GC–MS) analysis

The essential oil was analyzed using a Hewlett Packard 5890 II GC equipped with a FID detector and HP-

5ms capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 μm). For GC/MS detection an electron ionization system with ionization energy of 70 eV was used. Injector and detector temperatures were set at 220 °C and 290 °C, respectively. Column temperature was initially kept at 50 °C for 3 min, then gradually increased to 240 °C with a rate of 3 °C/min. Helium was the carrier gas, at a flow rate of 1 mL/min. Samples of 1 μL were injected manually and in the splitless mode. Tentative identification of the compounds was based on the comparison of their mass spectra with those of NIST 98 and

Wiley 275 library data of the GC/MS system. Quantitative data were obtained electronically from FID area percent data without the use of correction factors.

3. Results and discussion

Fig. 1 presents the chromatographic profiles of the volatile fractions isolated by the SDE, MWHD and USE methods using diethyl ether for extraction. The essential oils obtained by all three methods are clearly similar on a qualitative basis but show major quantitative differences.

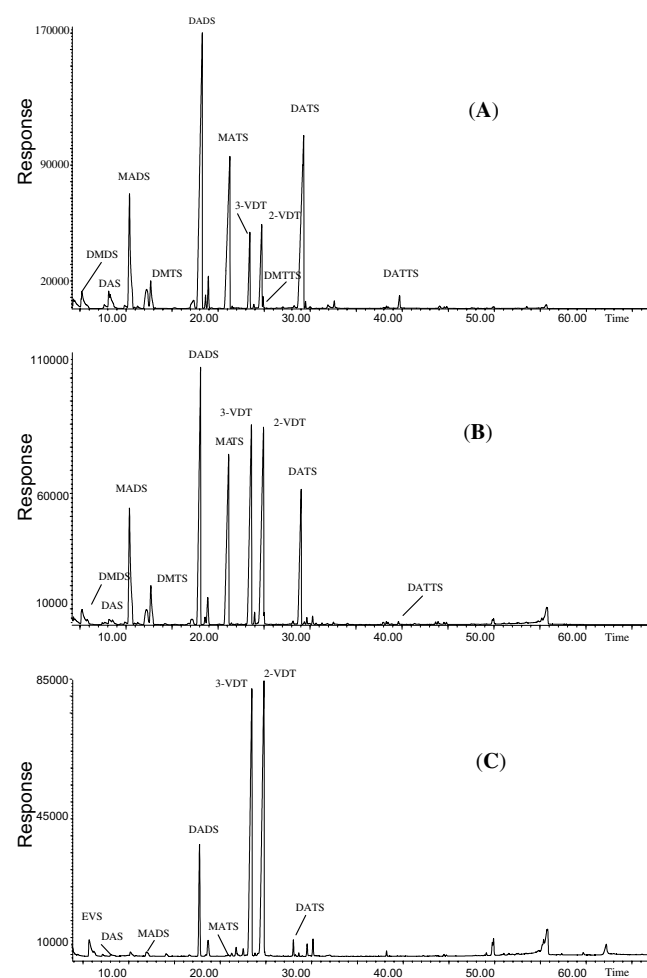


Fig. 1. Typical chromatograms of volatile fractions isolated from fresh garlic (*A. sativum*) cloves by (A) simultaneous distillation solvent extraction (SDE), (B) microwave-assisted hydrodistillation extraction (MWHD) and (C) ultrasound-assisted extraction (USE), in diethyl ether. Peak assignments and identification are reported in Table 1. The initial on the chromatograms indicates the compounds as below: dimethyl disulfide (DMDS), ethyl vinyl sulfide (EVS), diallyl sulfide (DAS), methyl allyl disulfide (MADS), dimethyl trisulfide (DMTS), diallyl disulfide (DADS), methyl allyl trisulfide (MATS), 3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin (3-VDT), 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin (2-VDT), 1,4-dimethyl tetrasulfide (DMTTS), diallyl trisulfide (DATS), diallyl tetrasulfide (DATTs).

Peak identification for the chromatograms (Fig. 1) is given in Table 1 along with the percentage concentrations of the organosulfur constituents of the garlic essential oil, as it was isolated from the three different methods. The S (mono to tetra) compounds can be further classified into three major groups according to their R- substitutes: the diallyl sulfides, the methyl allyl sulfides and finally the cyclic vinyl dithiins (Table 1).

The essential oils obtained by SDE (Table 1, column A), contained more R-substituted polysulfides and fewer vinyl dithiin components than those isolated by the MWHD and USE methods. In detail, garlic oil is richer in diallyl disulfide (DADS, 28.4%), followed by diallyl trisulfide (DATS, 20.4%), methyl allyl trisulfide (MATS, 16.3%), *cis* and *trans* methyl allyl disulfide (MADS, 9.3%), diallyl sulfide (DAS, 2.3%), dimethyl disulfide (DMDS, 2.2%), dimethyl trisulfide (DMTS, 2.0%), diallyl tetrasulfide (DATTs, 0.7%), 1,4-dimethyl tetrasulfide (DMTTS, 0.4%), and traces ethyl vinyl sulfide (EVS). As for the dithiins, 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin was detected in slightly increased abundance (5.5%) compared to 3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin (4.0%).

In MWHD (Table 1, column B), the relative percentages of the compounds are very different although, the same molecules were traced. Diallyl disulfide was the primary volatile (17.6%) followed by diallyl trisulfide (9.1%), *cis* and *trans* methyl allyl trisulfide (14.1%), methyl allyl disulfide (9.1%), diallyl sulfide (0.9%), dimethyl disulfide (2.1%), dimethyl trisulfide (2.7%), diallyl tetrasulfide (0.1%), 1,4-dimethyl tetrasulfide (0.4%), and traces of ethyl vinyl sulfide also. The dithiin amounts are comparable to those of diallyl disulfide's: 17.7% for 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin and 15.9% for 3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin.

In the case of USE (Table 1, column C), the major essential oil components were found to be 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin (38.1%) and 3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin (32.7%). The polysulfides present in minor amounts were: diallyl disulfide (8.2%), diallyl trisulfide (0.2%), methyl allyl trisulfide (0.1%), *cis* and *trans* methyl allyl disulfide (0.6%), diallyl sulfide (0.3%), dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, diallyl tetrasulfide, and traces of 1,4-dimethyl tetrasulfide. In this case, ethyl vinyl sulfide was found in measurable percentage (3.2%).

Experimental results obtained by the other two solvents, hexane and ethyl acetate, revealed similar decrease-increase trends of the essential oil components.

It is easy to observe the significant variations among the SDE, MWHD and USE methods, mainly in terms of the quantities of volatile compounds. In order to comprehend and interpret them, it is essential to make a short reference of the literature about garlic's chemistry. Research made by scientists for more than a century has established that cutting of garlic bulb releases a number of low-molecular weight organic molecules that incorporate sulfur atoms in bonding forms rarely

encountered in nature. These molecules are highly reactive: they change spontaneously into other organic sulfur compounds, which take part in further transformations [16,17,25,26].

Since the publications of Cavallito and Bailey [6,7], allicin (allyl 2-propenethiosulfinate) has been established as the olfactory and gustatory principle of fresh garlic. Continuing the investigations, Block and his coworkers [16] proved that the decomposition of the unstable allicin proceeds by several pathways. According to one of them, it self-decomposes, giving 2-propenesulfenic acid and thioacrolein. The self-condensation of 2-propenesulfenic acid regenerates a molecule of allicin; the self-condensation of two molecules of thioacrolein, yields two types of cyclic compounds by Diels–Alder reaction. They were identified as 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin (major) and 3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin (minor) [16,26,27] (Fig. 2). Using the harshest thermal technique, steam distillation, garlic oil contains mainly diallyl, allyl methyl and dimethyl mono to hexa sulfides and small amounts of the dithiin molecules [28]. It has been reported that the two sulfur cyclic compounds found in trace amounts, are formed via the above reaction mechanism, from allicin during thermal gas-chromatography analysis [29].

On the contrary, a more recent article reports that the above mentioned two products are present at the beginning in the freshly cut cloves of garlic as the major organosulfur components [30]. Also, during various procedures employing thermal strain, such as steam distillation, frying or blanching including also GC conditions [31–33], these compounds decompose and form different sulfur compounds as shown in Table 1. Low temperature extraction of fresh garlic followed by analysis by “cryogenic” GC–MS and HPLC have been used to support the above described results.

Considering all of these, the benefits of ultrasound-assisted extraction method are useful for further investigation of the garlic's chemistry.

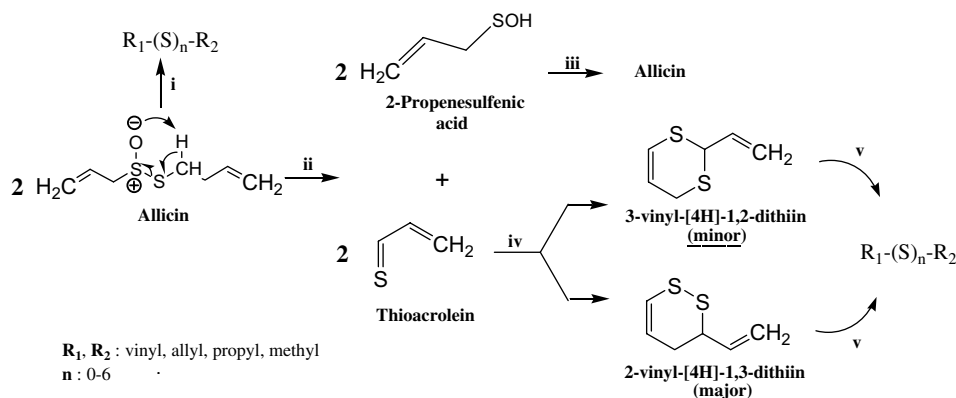


Fig. 2. Allicin's decomposition as postulated by Block and others [16]: (i) allicin's degradation to sulfur acyclic components found in garlic distilled oil, (ii) allicin's self-decompose to two molecules of 2-propenesulfenic acid and two molecules of thioacrolein, (iii) 2-propenesulfenic acid's self-condensation to allicin, (iv) thioacrolein's self-condensation to two isomer cyclic dithiins and (v) cyclic dithiins thermal decomposition to various acyclic molecules similar to those found in garlic distilled oil.

SDE is the most common method for the isolation of essential oils from plants. Nevertheless, it subjects the plant material to 2 h of thermal treatment in water at boiling temperatures [28]. Microwave-assisted extraction shows many advantages such as high extraction yield and low extraction time [34,35]. Microwave radiation that is emitted from a magnetron, transfers energy to the entire mass of the solvent-matrix system causing a rapid increase of its temperature. Comparing to the SDE method, it requires less time (30 min) but the sample still suffers from intense thermal strain. The main advantage of ultrasound-assisted extraction in comparison to the other techniques is that it takes place at room temperature (r.t.) instead of temperatures close to 100 °C required for distillation.

The results in Table 1 that changing the extraction method and reducing or even eliminating the thermal treatment (SDE → MWHD → USE) drastic quantitative changes can be observed on the percentage of the major sulfide compounds which decreased from 77% to 50.9% and to 9.4%, respectively. On the contrary cyclic dithiins showed significant rise from 9.5% to 33.6% and to 70.8%. The same trend can be followed also in the case of the rest solvents for the sulfides from 73.9–75.1% to 40.8–48.4% and to 8.7–9.3%, while for the dithiins from 12.3–13.2% to 38.6–42.2% and to 60.1–70.2%.

To further investigate the effect of heat on garlic essential oil, another USE experiment was carried out at very low temperature conditions (close to 0 °C). The same USE procedure was conducted using diethyl ether, keeping strictly the temperature of all processes (extraction, organic extract concentration) at 0–1 °C (low temperature, l.t.). The total dithiin amount (74.7%) was proved to be slightly higher when compared to the r.t. USE procedure (70.8%). Only the sulfur compound ethyl vinyl sulfide showed a significant increase from 3.2% (r.t. USE) to 14.2% (l.t. USE).

Abu-Lafi's data [30] show two major differences from our results, considering the two vinyl dithiins isomers. While the total percentage concentration of the two isomers reaches 74.7% in our work, Abu-Lafi reported concentration up to 84%. The ratio between the two isomers fluctuates from 1 to more than 2 in one case, very different from the reported eight times higher proportion of 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin. These two deviations may be explained by the fact that our volatile compounds analysis took place in a conventional GC–MS instrument in contrast to “cryogenic GC–MS” apparatus used by the authors [30]. The thermal factor has been already proved, by literature, to be crucial in the case of garlic's essential oil constituents.

Some other remarks can also be made. At first, the presence of ethyl vinyl sulfide in the USE extracts has drawn attention due to the total absence of this compound in thermal processes-derived products. It should be mentioned that in previous works, the presence of ethyl vinyl sulfide in garlic essential oil has not been reported. It may be concluded that the effect of heat on this particular molecule is strongly destructive, causing it to degrade to other volatiles. Its relative percentage concentrations appear to be higher when ethyl acetate was used as solvent or when the USE temperature is maintained close to 0 °C.

The second remark is that, although polysulfides tended to diminish (SDE → MWHD → USE), an exception is diallyl disulfide, which is present (6.0–8.2%) employing the USE procedures, regardless of the solvent used. These are two possible reasons for this observation: either it is a direct product of allicin degradation or it supersedes the synthesis of other polysulfides as mentioned in the literature for diallyl trisulfide [30].

Given that the two distillation procedures are considered to quantitatively separate the volatile components of garlic, whereas the USE procedure is restricted by the nature of an extraction technique, a difference in total yield is expected. Maybe the absence of heat during the procedure in order to avoid thermal degradation of unstable compounds further reduces the total garlic oil yield.

4. Conclusion

The present work indicates a very close relationship between the method used for the isolation of the garlic essential oil and the isolated product composition. The three procedures tested (SDE, MWHD and USE), with solvents of varying polarity (diethyl ether, hexane and ethyl acetate), resulted in the isolation of essential oil of different qualitative and quantitative profiles. Compared to SDE and MWHD, the USE procedure diminishes the danger of thermal degradation of sensitive aroma compounds from garlic. Moreover, the method is easy to carry out and could be applicable for large scale industrial use.

The effect of heat appears to be the crucial factor for the differentiation of the volatile fraction constituents, mainly via degradation reactions. The observed variation among sulfur containing molecules leads to their systematic grouping into cyclic and acyclic. The two groups have different properties and their formation is closely related to the temperature during the isolation process, as well as to the time spent for the isolation. Polysulfides percentage concentration decreased from 77.4% to 8.7%, whereas that of vinyl dithiin isomers increased from 4.7% to 70.8%, when the isolation techniques were changed from harsh thermal (SDE, 2 h) to short time thermal (MWHD, 30 min) and r.t. isolation (USE). This observation suggests that the garlic main precursor, allicin, produces the cyclic dithiins at first and in turn, the dithiin thermal degradation forms the acyclic compounds. From our point of view Abu-Lafi's results [30] have been confirmed by the presented results.

The controversy on the existence of cyclic compounds in freshly garlic cloves cannot be completely clarified due to questionable results affected by the GC analysis. Our observations suggest that the understanding of garlic's flavor and aroma chemistry should include low temperatures during the isolation as well as the analysis processes. In order to further examine spontaneous reactions of the same or similar nature in other plants, low temperature USE isolation and analysis techniques may be applied.

References

- [1] A.I. Vitranen, *Ang. Chem. Int. Edition, English* 1 (1962) 299.
- [2] S.K. Banerjee, S.K. Maulic, K. Pulok, *Phytother. Res.* 17 (2000) 97.
- [3] K.Y. Kim, S.H. Ho, L. Koh, Y. Ma, Y. Huang, *Postharv. Biol. Technol.* 9 (1996) 41.
- [4] J.R. Whitaker, *Adv. Food Res.* 22 (1976) 73.
- [5] S.V. Amonkar, A. Banerji, *Science* 174 (1971) 1343.
- [6] S.V. Amonkar, E.L. Reeves, *J. Econ. Entomol.* 63 (1970) 1172.
- [7] C.J. Cavalito, J.H. Bailey, *J. Am. Chem. Soc.* 66 (1944) 1950.
- [8] C.J. Cavalito, J.S. Buck, C.M. Suter, *J. Am. Chem. Soc.* 66 (1944) 1952.
- [9] A. Stoll, E. Seebeck, *Experientia* 3 (1947) 114.
- [10] A. Stoll, E. Seebeck, *Helv. Chim. Acta* 31 (1948) 189.
- [11] A. Stoll, E. Seebeck, *Helv. Chim. Acta* 32 (1949) 197.
- [12] A. Stoll, E. Seebeck, *Sc. Pharm.* 18 (1950) 61.
- [13] A. Rabinkov, T. Miron, L. Konstantinovski, M. Wilchek, D. Mirelman, L. Weiner, *Biophys. Acta* 1379 (1998) 233.
- [14] A. Rabinkov, T. Miron, D. Mirelman, M. Wilchek, S. Glozman, E. Yavin, L. Weiner, *Biochim. Biophys. Acta* 1499 (2000) 144.
- [15] F.W. Semmler, *Arch. Pharm.* 230 (1982) 434.
- [16] E. Block, *Scient. Amer.* (1985) 94.
- [17] E. Block, *Ang. Chem. Int. Edition, English* 31 (1992) 1135.
- [18] L.D. Lawson, S.G. Wood, B.G. Hughes, *Planta Med.* 57 (1991) 263.
- [19] L.D. Lawson, Z.-Y.J. Wang, B.G. Hughes, *Planta Med.* 51 (1991) 363.
- [20] L.D. Lawson, in: *Human Medicinal Agents from Plants*, American Chemical Society, Washington, DC, 1991, pp. 306–330.

- [21] M. Vinatoru, T.J. Mason, et al., *Ultrason. Sonochem.* 4 (1997) 135.
- [22] M. Vinatoru, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 303.
- [23] T.J. Mason, J.P. Lorimer, *Sonochemistry: Theory, Application and Uses of Ultrasound in Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1998, p. 252.
- [24] T.J. Mason, L. Paniwnyk, *Adv. Sonochem.* 4 (1998) 177.
- [25] E. Block, S. Ahmad, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 7045.
- [26] H. Bock, M. Shamsheer, T. Hirabayashi, A. Semkow, *Chem. Ber.* 115 (1982) 1339.
- [27] H. Nishimura, C.H. Wijaka, J. Mizoutani, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 563.
- [28] T.H. Yu, C.M. Wu, Y.C. Liou, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 725.
- [29] M.H. Brodnitz, J.V. Pscale, L. Van Derslice, *J. Agric. Food Chem.* 19 (1971) 273.
- [30] S. Abu-Lafi, V.M. Dembitsky, et al., *J. Food Comp. Anal.* 17 (2004) 235.
- [31] S.M. Kim, C.M. Wu, et al., *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2951.
- [32] T.H. Yu, L.Y. Lin, C.T. Ho, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1342.
- [33] T.H. Yu, C.M. Wu, C.T. Ho, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 800.
- [34] J. Hao, W. Han, S. Huang, B. Xue, X. Deng, *Separ. Pur. Techn.* 28 (2002) 191.
- [35] R.C. Prados-Rosales, J.L. Luque Garcia, M.D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A.* 993 (2003) 121.



Analytical, Nutritional and Clinical Methods

Quantitative analysis of garlic (*Allium sativum*) oil unsaturated acyclic components using FT-Raman spectroscopy

Athanasios C. Kimbaris, Nikolaos G. Siatis, Christos S. Pappas, Petros A. Tarantilis, Dimitra J. Daferera, Moschos G. Polissiou *

Department of Science, Laboratory of Chemistry, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 118 55, Athens, Greece

Received 14 July 2004; received in revised form 7 January 2005; accepted 30 January 2005

Abstract

A group of acyclic, unsaturated, sulfur containing, components present in garlic oil are quantitatively analyzed with FT-Raman spectroscopy. This group of components that may consist up to more than 70% of the garlic oil is responsible for some of the medicinal properties that are widely researched by scientists around the world. FT-Raman spectroscopy is evaluated against a gas-chromatography method. Band intensities at 1636 and 1606 cm^{-1} are used from untreated garlic oil spectra to determine the % content in acyclic, unsaturated sulfur containing compounds. The analyzed garlic oils were found to contain from 33.3% up to 75.3% of the targeted components. The proposed technique is simple, rapid and non-destructive for the sample.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Garlic oil; Microwaves; Ultrasounds; GC-FID; GC-MS; FT-Raman; Acyclic sulfides

1. Introduction

Garlic (*Allium sativum*) has been famous for its flavor and aroma as well as for its medicinal uses for centuries (Agarwal, 1996; Vitranen, 1962). Today, exploitation and understanding of all of the advantages of garlic in nutrition and medicine is still in progress. It is generally accepted that the volatile compounds of garlic are the main reason for its properties (Block, 1992).

It was in 1892, when a German chemist, by the name of W. Semmler, reported that garlic cloves could be steam distilled to produce strong smelling essential oil. The characteristic odor of this essential oil is mainly caused by the presence of sulfur containing volatiles (Block, 1985).

More detailed analysis of garlic's volatiles has thereafter determined the existence of mono to hexa diallyl sulfides and vinyl dithiin isomers as the major constitu-

ents of garlic oil (Block, 1992). The medicinal and bioactive properties of the garlic oil are connected to the unsaturated acyclic components (Banerjee, Mukherjee, & Maulic, 2000; Benkeblia, 2004; Ho, Koh, Ma, Huang, & Sim, 1996). The main unsaturated acyclic and cyclic components are shown in Fig. 1.

In order to clarify garlic's odor, various isolation techniques have been used. Among them simple solvent extraction of raw garlic homogenate by organic solvents (Brodnitz, Pscalle, & Van Derslice, 1971), aged garlic extracts (Dillon, Burmi, Lowe, Billington, & Rahman, 2003) and oil macerated garlic (Lawson, 1991). Also distillation setups such as simultaneous distillation extraction (SDE) (Yu, Wu, & Liou, 1989) and microwave-assisted hydrodistillation (MWHd) is been used (experimental data from our team have been submitted for publication). Experimental data from these techniques revealed the existence of highly reactive and thermally unstable organosulfur compounds. These molecules take part in spontaneous reactions that are very difficult to control (Block, 1992).

* Corresponding author. Tel.: +30 210 529 4241; fax: +30 210 529 4265.

E-mail addresses: ptara@aua.gr (P.A. Tarantilis), mopol@aua.gr (M.G. Polissiou).

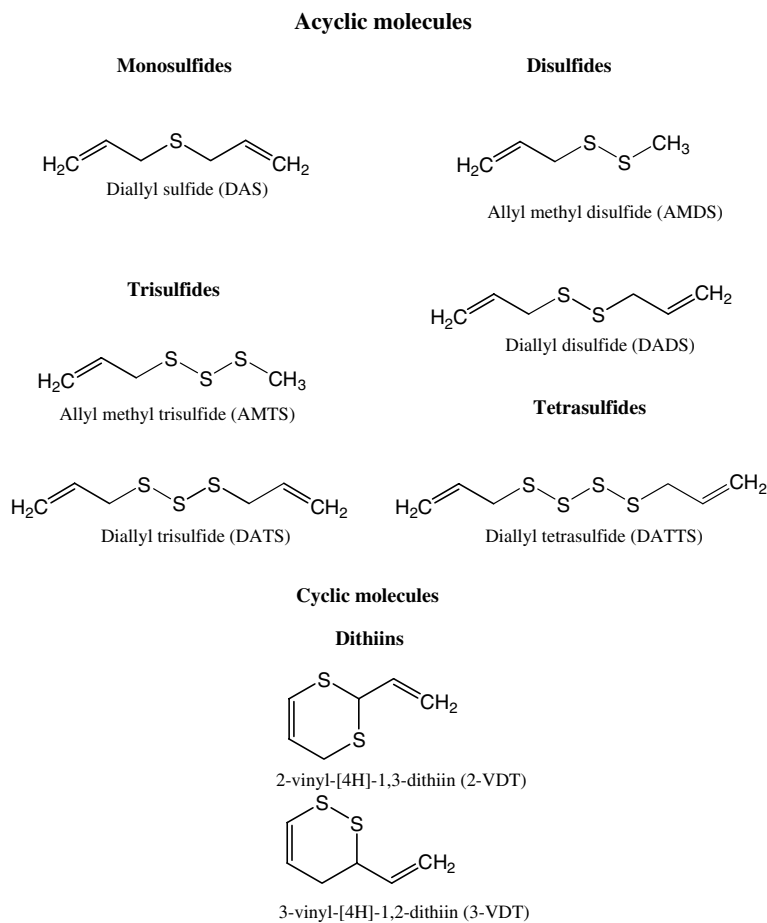


Fig. 1. The molecular structures of the main unsaturated acyclic and cyclic components of garlic oil.

The analytical methods for the qualitative and quantitative determination of garlic's composition are traditionally GC-MS, GC-FID, HPLC, and UV. Due to the unstable nature of such compounds, certain improvements on isolation and analytical methods to minimize the effect of heat are necessary.

The improvements proposed so far, regard the use of ultrasound-assisted extraction (USE) at room or even lower temperatures (experimental data from our team have been submitted for publication), and more sophisticated "cryogenic" GC-MS for the application of low temperatures during the analysis (Abu-Lafi, Dembitsky, Goldshlag, Hanus, & Dembitsky, 2004).

Taking into account the particular requirements of the studied sample, Raman spectroscopy appears to be a very promising technique. Indeed, FT-Raman spectroscopy is an analytical technique based on the interaction of an incident monochromatic radiation with vibrational energy levels of molecules. It is widely used for qualitative comparisons between molecular species of various samples. The concentration of a compound in a mixture may be related to the Raman intensities if an appropriate reference material is used to determine its value (Daferera, Pappas, Tarantilis, & Polissiou,

2002; Hancewicz & Petty, 1995; Skoulika, Georgiou, & Polissiou, 2000; Sun, Ibrahim, Oldam, Schultz, & Conners, 1997). The analysis time is very short and variation due to analysis temperature (GC) or solvent (HPLC) minimized.

This paper describes the development of a method for quantitative analysis of acyclic components in garlic oil by FT-Raman spectroscopy. The recorded FT-Raman spectra of the garlic oils, which were collected using simultaneous distillation solvent extraction or microwave-assisted hydrodistillation extraction or ultrasound-assisted extraction, are treated in order to measure the compositions in acyclic compounds of analyzed oils. The proposed method is simple and rapid.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Plant material and reagents

Garlic (*Allium sativum*) cloves were purchased from local farmers of N.Vissa a village near the North-East

borders of Greece. During the experiments, raw material was maintained in our lab with the appropriate conditions (dark, 25 °C). The garlic was milled and cut using a Moulinex cuisine blender. The used solvents were diethyl ether and ethyl acetate (purity 99.5%) supplied by BDH (Poole, England) and MERC (Darmstadt, Germany), respectively. Diallyl sulfide used as standard was purchased by ACROS ORGANICS (New Jersey, USA).

2.1.2. Preparation of standard samples

Garlic oil which was extracted by diethyl ether using ultrasounds contained the lowest percentage in acyclic compounds as it determined by GC-FID (12.7% v/v) (Table 1). Ten standards (st1–st10) were prepared by mixing appropriate amounts of the above garlic oil and diallyl sulfide. So the additional amounts in unsaturated acyclic components of standards were 16.7, 26.6, 37.5, 41.2, 47.7, 50.0, 54.5, 61.5, 66.7 and 76.2% v/v.

2.2. Simultaneous distillation solvent extraction (SDE)

Simultaneous distillation extraction was carried out on Lickens-Nickerson apparatus (in low-density solvent configuration). The extraction solvent was diethyl ether. In each batch 100 g of garlic cloves was blended with 20 ml of deionized water for 2 min. The sample flask was charged with the batch in 100 mL of deionized water. The micro-simultaneous steam distillation extraction procedure carried out for 2 h. For the condensation of steams the condenser was cooled with a solution of glacial water-glycol (−10 °C). The experimental procedure repeated with ethyl acetate. So, two garlic oil samples (s1 and s2) were collected.

2.3. Microwave-assisted hydrodistillation extraction (MWHD)

The microwave-assisted hydrodistillation setup performed in a modified LG 700 Watt max power

Table 1
Chemical composition (% v/v) of garlic (*Allium sativum*)

Peak no.	Compound	s1 ^a	s2 ^a	s3 ^b	s4 ^b	s5 ^c	s6 ^c
1	Dimethyl disulfide (DMS)	2.2	1.9	2.1	0.7		
2	Ethyl vinyl sulfide (EVS)					3.2	9.7
3	1,2-dithiacyclopentane	0.4	0.3	0.4	0.2	0.2	
4	Diallyl sulfide (DS)	2.3	1.9	0.9	0.1	0.3	0.4
5	2-Vinyl thiophene				0.2		
6	3-methylthio propanal	0.3	0.4		0.2		
7	Methyl allyl disulfide (cis or trans) (MADS)	9.1	8.5	9.0	4.3	0.6	1.4
8	Methyl propyl disulfide	0.1	0.1	0.1	0.2		
9	Methyl allyl disulfide (cis or trans) (MADS)	0.2	0.2	0.1	0.2		
10	Unknown (Yu et al)	2.4	1.6	1.8	1.5	0.7	2.0
11	Dimethyl trisulfide (DMTS)	2.0	2.3	2.7	2.0		
12	Allyl 2,3-epoxypropylsulfide			0.1		0.1	
13	Diallyl disulfide (DADS)	28.4	23.1	17.6	6.8	8.2	6.0
14	C ₆ H ₁₀ S ₂	0.5	0.4	0.3	0.5	0.1	
15	C ₆ H ₁₀ S ₂	1.2	0.9	1.4	1.1	1.5	3.7
16	Methyl butyl trisulfide				0.1		
17	Methyl allyl trisulfide (MATS)	16.3	17.5	14.1	14.9	0.1	0.2
18	3-Vinyl-[4H]-1,2-dithiin (3-VDT)	4.0	4.5	15.9	14.5	32.7	25.7
19	2-Vinyl-[4H]-1,3-dithiin (2-VDT)	5.5	8.7	17.7	27.7	38.1	34.4
20	1,4-dimethyl tetrasulfide (DMTTS)	0.4	0.4				
21	Diallyl trisulfide (DATS)	20.4	22.1	9.1	14.1	0.2	0.7
22	3,5-diethyl 1,2,4-trithiolane	0.2	0.2	0.2	0.2		0.5
23	Pentadecene						0.6
24	Heptadecene						0.5
25	3-(2-thia-4-pentenyl)-1-thiacyclohex-5-ene						0.3
26	Diallyl tetrasulfide (DATTS)	0.7	0.6	0.1	0.4		
27	3-(2,3,4-trithia-5-heptenyl)-1-thia-cyclohex-5-ene	0.1		0.2	0.2	0.1	
28	2-(1-thia-2-cyclohexen-6-yl)-1,3-dithia-cyclohex-5-ene	0.3	0.4	2.0	2.7	6.4	2.2
	Unidentified	3.0	4.0	4.2	7.2	7.5	11.7
	<i>Total unsaturated acyclic compounds content</i>	<i>77.4</i>	<i>73.9</i>	<i>51.0</i>	<i>41.0</i>	<i>12.7</i>	<i>19.5</i>

Volatile fractions obtained by three different extraction techniques (SDE, MWHD, USE) using diethyl ether and ethyl acetate.

^a s1 and s2 presents the percentage concentration of garlic's essential oil isolated by the SDE technique using diethyl ether and ethyl acetate, respectively.

^b s3 and s4 presents the percentage concentration of garlic's essential oil isolated by the MWHD technique using diethyl ether and ethyl acetate, respectively.

^c s5 and s6 presents the percentage concentration of garlic's essential oil isolated by the USE technique using diethyl ether and ethyl acetate, respectively.

household microwave oven, using a steam distillation solvent extraction apparatus equipped with a 1 L sample flask, a pressure equalizing dropping funnel and a steam condenser. This apparatus used instead the classical Licens-Nickerson due to the vigorous foaming phenomenon during the procedure. The extraction solvent was diethyl ether (50 mL). In each batch 100 g of garlic cloves was blended with 20 mL of deionized water for 2 min. The sample flask was charged with the batch in 100 mL of deionized water and diethyl ether. The distillation time was 30 min for the isolation of the essential oil at maximum power. The organic extract was concentrated by a gentle nitrogen blowdown stream to 10 mL volume and a minor quantity of magnesium sulfate anhydrous was added. The experimental procedure was repeated with ethyl acetate. So, two garlic oil samples (s3 and s4) were collected.

2.4. Ultrasound-assisted extraction (USE)

Ultrasound-assisted extraction was performed in an ultrasound water bath (Sonorex, Super RK 255H type, 300 × 150 × 150 mm internal dimensions) by the mode of the indirect sonication, at the fixed-frequency 35 kHz. The temperature of the sonicated water bath was 25 °C. The sample flask was charged with the same quantity garlic as in the micro-steam distillation procedure. The solvent system extractant was, respectively, the same as above, diethyl ether 50 mL. Each garlic sample was sonicated three times for 30 min (three fractions per garlic sample). After the end of each son-

ication the solvent system extractant was introduced in a separation funnel and 20 mL of a saturated solution of NaCl was added. The funnel was well shaken and then left to rest. When the two layers were separated the organic layer was collected. The water layer was washed with another 20 mL of the extractant solvent. The whole organic extract was introduced again in the separation funnel and washed with 20 mL of a saturated solution of NaCl. The organic extract was concentrated by a gentle nitrogen blowdown stream to 10 mL volume and a minor quantity of magnesium sulfate anhydrous was added, in order to remove any traces of water. The experimental procedure repeated with ethyl acetate. So, two garlic oil samples (s5 and s6) were collected.

2.5. Gas chromatography (GC) analysis conditions

The garlic oil samples (s1–s6) were analyzed using a Hewlett Packard 5890 II GC equipped with a FID detector and HP-5ms capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 µm). Injector and detector temperatures were set at 220 and 290 °C, respectively. Column temperature was raised from 50 to 220 °C with a rate of 3 °C/min, and held for 10 min. Helium was the carrier gas, at a flow rate of 1 mL/min. One microliter (1.0 µL) of the concentrate to 10 mL volume of each organic extract was injected manually and in the splitless mode. Quantitative data were obtained electronically from FID area percent data without the use of correction factors.

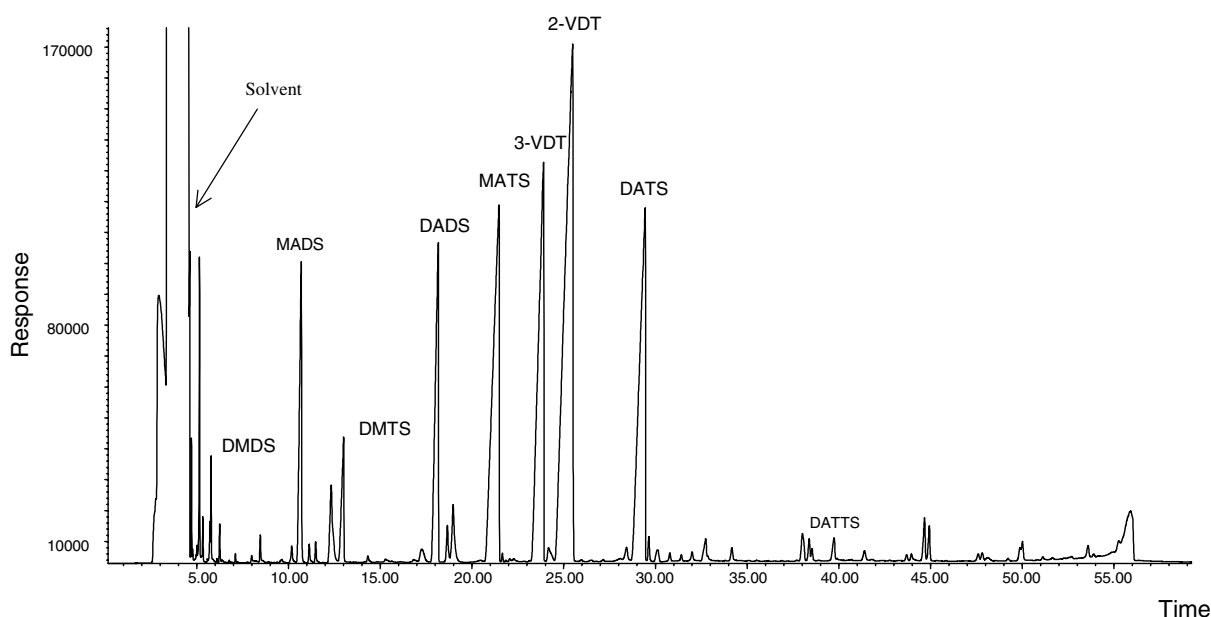


Fig. 2. Typical chromatograms of volatile fractions isolated from fresh garlic (*A. sativum*) cloves by microwave-assisted hydrodistillation extraction (MWH) in solvent ethyl acetate. The initial on the chromatograms indicates the compounds as below: dimethyl disulfide (DMDS), methyl allyl disulfide (MADS), dimethyl trisulfide (DMTS), diallyl disulfide (DADS), methyl allyl trisulfide (MATS), 3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin (3-VDT), 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin (2-VDT), diallyl trisulfide (DATS), diallyl tetrasulfide (DATTS).

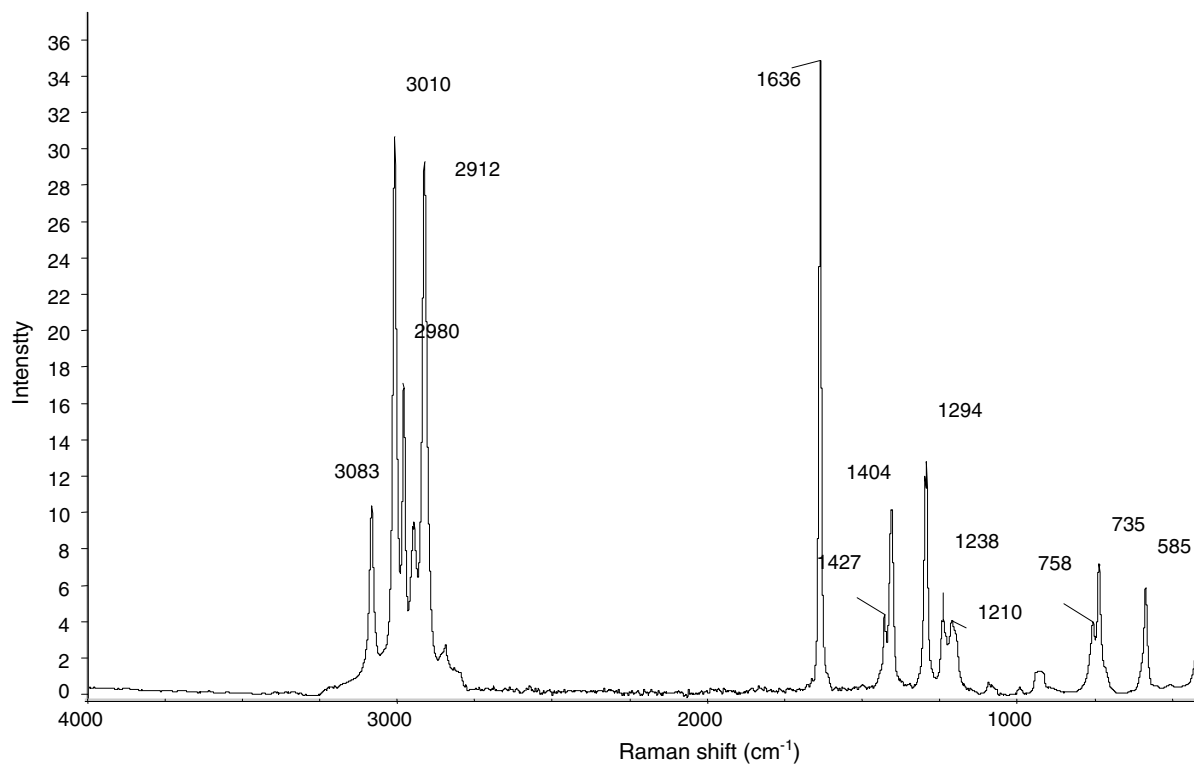


Fig. 3. FT-Raman spectrum of diallyl sulfide.

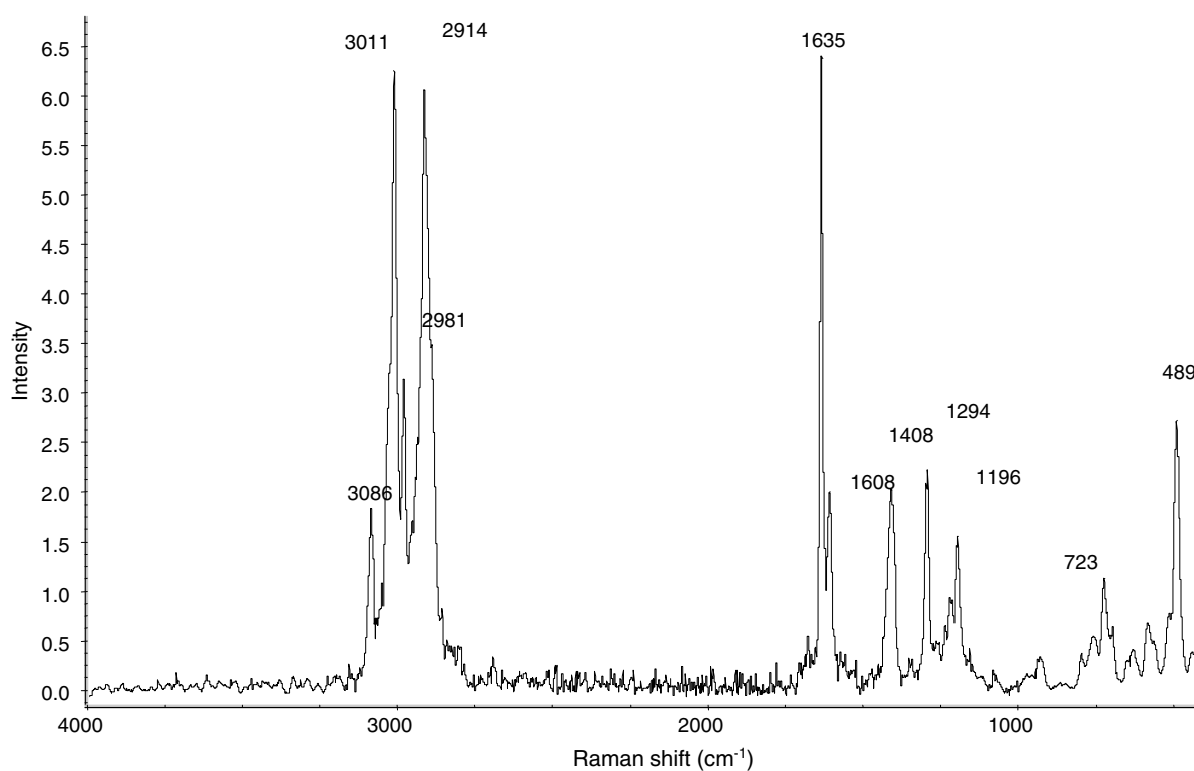


Fig. 4. FT-Raman spectrum of garlic oil extracted by ethyl acetate using microwave-assisted hydrodistillation extraction.

Table 2
Contents (% v/v) in acyclic components in standards correlated with A using FT-Raman method

Standard	Height at 1636 cm ⁻¹ (H)	Height at 1606 cm ⁻¹ (H ₁)	$H - H_0^a$	$H - H_0/H_1 = A$	$A \pm SD$	Volume (μL) of diallyl sulfide added to 100 μL of s5	Content in acyclic components (% v/v)
st1							
st1a	6.656	5.161	1.495	0.193	0.191 ± 0.006	4.6	16.7
st1b	6.671	5.156	1.515	0.196			
st1c	6.613	5.157	0.954	0.185			
st2							
st2a	11.425	5.041	5.766	1.144	1.143 ± 0.003	18.9	26.6
st2b	11.414	5.047	5.754	1.140			
st2c	11.434	5.039	5.774	1.146			
st3							
st3a	14.520	4.753	8.860	1.864	1.859 ± 0.004	39.7	37.5
st3b	14.478	4.751	8.818	1.856			
st3c	14.484	4.749	8.824	1.858			
st4							
st4a	15.616	4.150	9.956	2.399	2.406 ± 0.007	48.5	41.2
st4b	15.628	4.143	9.968	2.406			
st4c	15.660	4.146	10.000	2.412			
st5							
st5a	19.904	4.208	14.244	3.385	3.379 ± 0.006	66.9	47.7
st5b	19.848	4.205	14.188	3.374			
st5c	19.858	4.203	14.198	3.378			
st6							
st6a	21.668	4.206	16.008	3.806	3.808 ± 0.006	74.6	50.0
st6b	21.667	4.209	16.007	3.803			
st6c	21.690	4.203	16.030	3.814			
st7							
st7a	21.134	3.739	18.474	4.941	4.942 ± 0.005	91.9	54.5
st7b	24.139	3.743	18.479	4.937			
st7c	24.201	3.748	18.541	4.947			
st8							
st8a	28.590	3.670	22.930	6.248	6.242 ± 0.006	126.8	61.5
st8b	28.494	3.661	22.834	6.237			
st8c	28.536	3.666	22.876	6.240			
st9							
st9a	23.025	2.531	17.365	6.861	6.852 ± 0.008	162.2	66.7
st9b	22.976	2.529	17.316	6.847			
st9c	23.022	2.535	17.362	6.849			
st10							
st10a	17.219	1.438	11.559	8.038	8.038 ± 0.009	266.8	76.2
st10b	17.141	1.430	11.481	8.029			
st10c	17.215	1.436	11.555	8.047			

^a The height average of triplicate spectra of sample s5 at 1636 cm⁻¹ was 5.660.

2.6. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis conditions

Analysis of garlic oil samples (s1–s6) was performed under the same conditions with GC, using a Hewlett Packard 5890 II GC, equipped with a HP 5972 Mass selective detector and a HP-5ms capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 μm). For GC/MS detection an electron ionization system with ionization energy of 70 eV was used. Injector and MS transfer line temperatures were set at 220 and 290 °C, respectively.

Tentative identification of the compounds was based on the comparison of their mass spectra with those of NIST 98 and Wiley 275 library data of the GC-MS system.

2.7. FT-Raman spectroscopy

FT-Raman spectra of standards (st1–st10) and samples (s1–s6) were recorded in triplets using a Nicolet 750 FT-Raman spectrometer, equipped with a Nd:YAG laser source that emits at 1064 nm. In addition a CaF₂

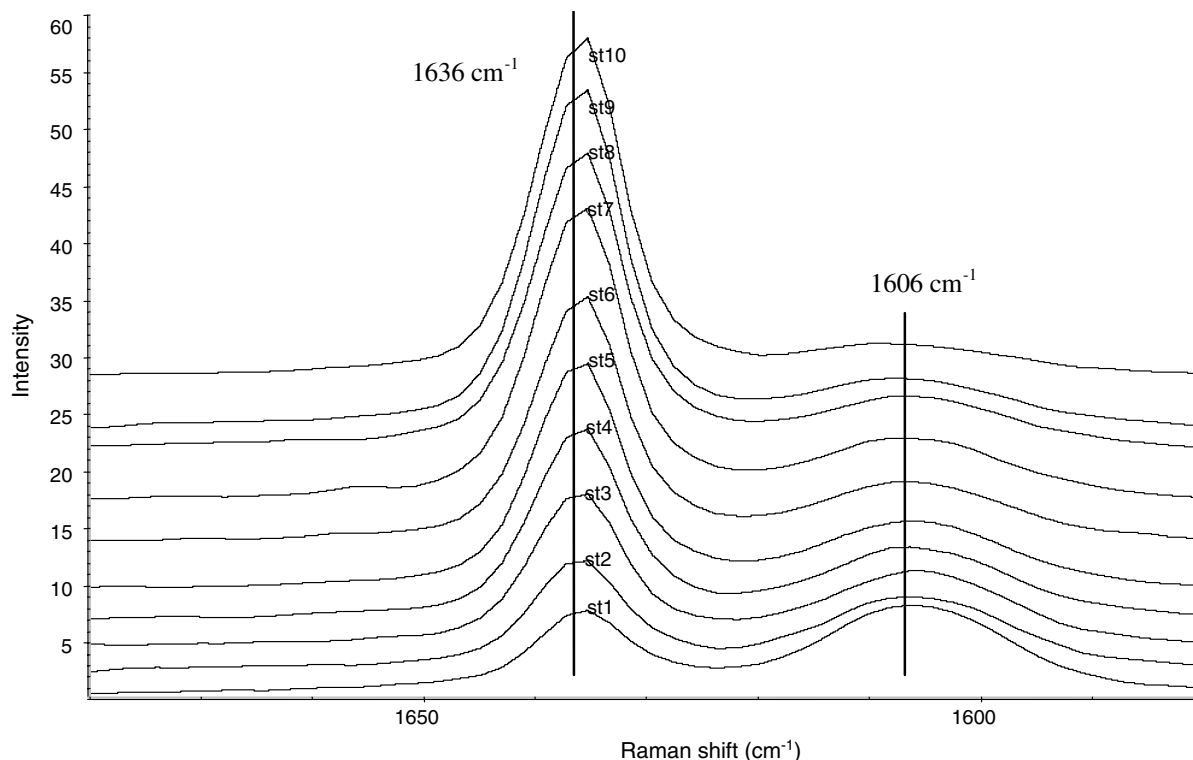


Fig. 5. Spectral region ($1750\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) of FT-Raman spectra of standards.

beam splitter, an indium–gallium–arsenide (InGaAs) detector and 180° backscattering geometry were used in the spectrometer. Routine procedures such as bench alignment and fine tuning of the spectrometer were held before each batch of measurements. Sample cells were Wimad WG-SM NMR tubes 4.97 mm outer diameter and 0.38 mm wall thickness. Optimal conditions (recording time, signal-to-noise ratio) were determined at 100 scans (3 min) with a resolution of 4 cm^{-1} . Each Raman spectrum was automatically smoothed and baseline corrected using the proper functions from the built-in spectrometer software Omnic 3.1. Then the peak heights at 1636 and 1606 cm^{-1} , from baseline, were measured and the height average of each one triplicate standard and sample was calculated.

3. Results and discussion

3.1. GC results

A typical total ion chromatogram (TIC) of the essential oil isolated from garlic (s5 sample) is shown in Fig. 2. The relative percentage contents of all components found in the garlic oil isolated with SDE, MWHD and USE with diethyl ether and ethyl acetate are shown in detail in Table 1. Compounds that could not be identified with the above GC libraries are referred to as unidentified and their total content is

shown separately. The sulfur compounds can be further classified into two major groups according to their cyclic or acyclic structure. The cyclic group contains the two vinyl dithiin isomers while the acyclic group consists of various mono to polysulfides (substituted by different R-). This group contains both saturated and unsaturated compounds but only the total relative percentage of the unsaturated compounds is considered.

Content of total unsaturated components fluctuated between 12.7% and 77.4%. The highest content was derived from the use of SDE with diethyl ether, while the lowest with USE and diethyl ether.

3.2. FT-Raman results

In Figs. 3 and 4 are presented the FT-Raman spectra of diallyl sulfide and typical garlic oil. In the region between 3100 and 2800 cm^{-1} four major peaks are present. The first at $3086\text{--}3083\text{ cm}^{-1}$ corresponds to asymmetric stretch vibration of $=\text{CH}_2$, the second at $3011\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$ to C–H stretching, the third at $2981\text{--}2980\text{ cm}^{-1}$ to symmetric stretch vibration of $=\text{CH}_2$ and the fourth at $2914\text{--}2912\text{ cm}^{-1}$ to $-\text{CH}_2-$ stretching. The second region from 1700 to 1000 presents four peaks in diallyl sulfide and five in garlic oil. The very intense peak at $1636\text{--}1635\text{ cm}^{-1}$ is assigned to C=C stretching vibration of the allyl group. The peak at 1606 cm^{-1} , which is present only in the FT-Raman

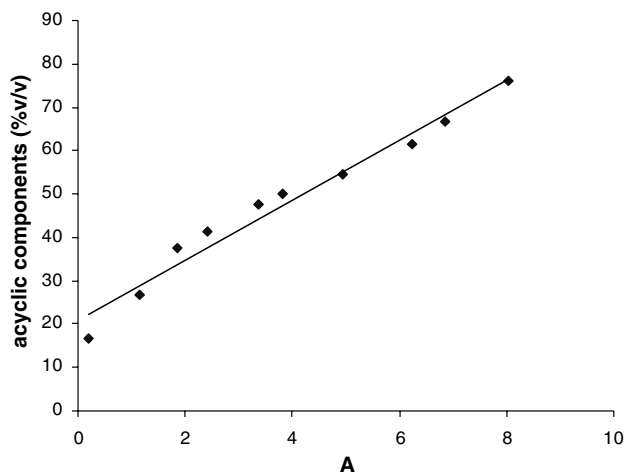


Fig. 6. The calibration curve of acyclic components.

spectrum of garlic oil, is assigned to the conjugated double bond of the dithiin ring. The double peak at 1428–1401 cm^{-1} may be assigned to stretching of $-\text{CH}_2-$ group while $\text{CH}_2=\text{CH}-$ stretching is shifted to 1294 cm^{-1} . The skeletal vibration of diallyl sulfide molecule causes the double peak at 1220–1198 cm^{-1} . The last region from 1000 to 400 is very interesting as it contains C–S and S–S vibrations. The double peak at 755 and 723 cm^{-1} is due to symmetric stretch of C–S bond while the asymmetric vibration of the same group is present at 585 cm^{-1} . The peaks near 489 are due to the disulfide bridge stretching, shifted when more S atoms are present. The above peaks have been assigned

according to Baranska, Labudzinska, and Terpinski (1987) and Dean (1999).

The most interesting peaks are at 1636 and 1606 cm^{-1} which are correlated with the unsaturated acyclic and cyclic components, respectively. The garlic oil which was extracted by ethyl acetate using MWHD (sample s5) is the poorest sample in acyclic components (Table 1). When diallyl sulfide was added in 100 μL of the above sample (Table 2) the peak height at 1636 cm^{-1} was increasing (Fig. 5). Therefore, the difference of the peak height between the standard and sample s5 can be attributed to the amount of acyclic components added. Furthermore, the content (% v/v) in unsaturated acyclic components of garlic oils, whose content is higher in acyclic components than sample s5, can be correlated with the increase of the peak height at 1636 cm^{-1} . The height average of triplicate spectra of sample s5 at 1636 cm^{-1} was 5.660. The above increase of the peak height at 1636 cm^{-1} was normalized using the peak height at 1606 cm^{-1} . Thus, the formula applied for this calculation is as follows:

$$\frac{\text{Height}_{1636} - 5.660}{\text{Height}_{1606}} = A.$$

Table 2 shows the ratios A of the 10 standards and the content (% v/v) in unsaturated acyclic components. There is a linear relationship between the ratios A of the 10 standards and the content (% v/v) in unsaturated acyclic components (Fig. 6). The empirical equation of calibration curve is:

Table 3
Contents (% v/v) of samples in acyclic components using FT-Raman method

Samples	Height at 1636 cm^{-1} (H)	Height at 1606 cm^{-1} (H_1)	$H - H_0^a$	$H - H_0/H_1 = A$	Content in acyclic components (% v/v) \pm SD
SDE-diethyl ether (s1)					
s1a	17.872	1.532	12.212	7.971	75.3 \pm 0.5
s1b	17.756	1.537	12.096	7.870	
s1c	17.673	1.535	12.013	7.826	
SDE-ethyl acetate (s2)					
s2a	17.027	1.426	11.367	7.971	75.0 \pm 0.8
s2b	16.694	1.423	11.034	7.754	
s2c	16.732	1.420	11.072	7.797	
MWHD-diethyl ether (s3)					
s3a	23.536	3.698	12.786	5.508	58.6 \pm 0.9
s3b	25.419	3.705	19.759	5.333	
s3c	26.278	3.695	20.618	5.580	
MWHD-ethyl acetate (s4)					
s4a	22.669	4.207	17.009	4.043	48.4 \pm 0.5
s4b	22.464	4.201	16.804	4.000	
s4c	22.110	4.204	16.450	3.913	
USE-ethyl acetate (s6)					
s6a	14.321	4.497	8.661	1.926	33.3 \pm 0.8
s6b	13.410	4.493	7.750	1.725	
s6c	13.477	4.495	7.817	1.739	

^a The height average of triplicate spectra of sample s5 at 1636 cm^{-1} was 5.660.

Content in unsaturated acyclic components (%v/v)

$$= (20.9 \pm 1.9) + (6.9 \pm 0.4) \times A \quad (r = 0.97, n = 3).$$

Detection limits are in the range 16.7–76.2% v/v and the % RSD fluctuated from 0.1% to 3.1%.

Contents (% v/v) of garlic oils in unsaturated acyclic components were measured by using the earlier empirical equation (Table 3). The % RSD fluctuated from 0.7% to 2.4%.

Content of total unsaturated components fluctuated between 33.3% and 75.3%. The highest content was derived from the use of SDE and diethyl ether (75.3%), while the lowest with USE and ethyl acetate (33.3%). In addition, the use of SDE and ethyl acetate, MWHD and diethyl ether and finally MWHD and ethyl acetate resulted 75.0%, 58.6% and 48.4%, respectively (Table 3).

In the case of s1, s2 and s3 samples the quantitative analysis results are considered similar, and the content of unidentified compounds is limited to 3–4.2%. On the contrary, samples s4 and s6 show considerable variation between the GC and the FT-Raman analysis. This may be the result of increased content in unidentified compounds of the garlic oil. It is ranging between 7.2% and 11.7% (Table 1), probably consisting mainly of unsaturated acyclic compounds.

In conclusion, the quantitative analysis of unsaturated acyclic components can be determined by FT-Raman spectroscopy. The analysis results come in agreement with the GC method results and the garlic oils were found to contain 33.3–75.3% of the components in question. The main advantage of this method over the existing GC method is its simplicity, immediacy, speed and being non-destructive to the sample. The perspectives of this technique are wide in the field of heat sensitive components analysis, where traditional methods fail to report accurate results. Garlic oil being a highly unstable molecular mixture demonstrates this property of the proposed method.

References

- Abu-Lafi, S., Dembitsky, J. W., Goldshlag, P., Hanus, L., & Dembitsky, V. M. (2004). The use of the 'Cryogenic' GC-MS and on-column injection for study of organosulfur compounds of the *Allium sativum*. *Journal of Food Composition and Analysis*, *17*, 235–245.
- Agarwal, K. C. (1996). Therapeutic actions of garlic constituents. *Medical Research Reviews*, *16*, 111–124.
- Banerjee, S. K., Mukherjee, P. K., & Maulic, S. K. (2000). Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research*, *17*, 97–106.
- Baranska, H., Labudzinska, A., & Terpinski, J. (1987). *Laser Raman spectrometry. Analytical applications*. New York: Wiley.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, *37*, 263–268.
- Block, E. (1985). The chemistry of garlic and onions. *Scientific American*, *252*, 94–99.
- Block, E. (1992). The organosulfur chemistry of the genus allium—implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie International Edition, English*, *1*(31), 1135–1178.
- Brodnitz, M. H., Pscale, J. V., & Van Derslice, L. (1971). Flavor components of garlic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *19*, 273–275.
- Daferera, D., Pappas, C., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. (2002). Quantitative analysis of α -pinene and β -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, *77*, 511–515.
- Dean, J. A. (1999). *Lange's handbook of chemistry* (15th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Dillon, S. A., Burmi, R. S., Lowe, G. M., Billington, D., & Rahman, K. (2003). Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sciences*, *72*, 1583–1594.
- Hancewicz, T., & Petty, C. (1995). Quantitative analysis of vitamin A using Fourier transform Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, *51*, 2193–2198.
- Ho, S. H., Koh, L., Ma Huang, Y., & Sim, K. Y. (1996). The oil of garlic, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), as a potential grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Postharvest Biology and Technology*, *9*, 41–48.
- Lawson, L. D. (1991). Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic product. In A. D. Kinghorn & M. F. Balandrin (Eds.), *Human medicinal agents from plants* (pp. 306–330). Washington, DC: American Chemical Society.
- Skoulika, S. G., Georgiou, C. A., & Polissiou, M. G. (2000). FT-Raman spectroscopy analytical tool for routine analysis of diazinon pesticide formulations. *Talanta*, *51*, 599–604.
- Sun, Z., Ibrahim, A., Oldam, P., Schultz, T., & Conners, T. (1997). Rapid lignin measurement in hardwood pulp samples by near-infrared transform Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3088–3091.
- Vitranen, A. I. (1962). Some organic sulfur compounds in vegetables and fodder plants and their significance in human nutrition. *Angewandte Chemie International Edition, English*, *1*, 299–306.
- Yu, T. H., Wu, C. M., & Liou, Y. C. (1989). Volatile compounds from garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*, 725–730.

Improvement of Biodiesel Production Based on the Application of Ultrasound: Monitoring of the Procedure by FTIR Spectroscopy

N.G. Siatis, A.C. Kimbaris, C.S. Pappas, P.A. Tarantilis, and M.G. Polissiou*

Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

ABSTRACT: A novel application of ultrasounds is presented for the improvement of the efficiency of the production of FAME (or biodiesel) from materials not used so far for this purpose, such as seed cakes. The novelty of this work is the introduction of *in situ* derivatization assisted by ultrasounds (ultrasonically assisted extraction transesterification) for biodiesel production. Thus, the TG contained in solid material are extracted and immediately transesterified in a methanolic solution of 1 M NaOH in an ultrasonic field. The total yield of FAME from seeds that contain TG is greatly increased in most instances. In the seeds used in this work, yields were increased from 46 to 85.5 % for cotton, 67.2 to 93 % for sunflower, and 43.2 to 83.5 % for sesame. An FTIR methodology was developed to determine the percentage of FAME in the *n*-hexane layer of the reaction and thus, to monitor the reaction process. Overall advantages of the proposed methodology include the elimination of saponification, low reaction time, milder reaction conditions, and higher FAME yields.

Paper no. J11175 in *JAOCs* 83, 53–57 (January 2006).

KEY WORDS: Alkali-catalyzed transesterification, biodiesel production monitoring, FAME, FTIR spectroscopy, *in situ* transesterification, seed cakes, simultaneous extraction transesterification, TG, ultrasounds.

Biodiesel has been defined as the FA methyl esters (FAME) or FA ethyl esters derived from vegetable oils or animal fats (TG) by transesterification with methanol or ethanol. Its main advantages over fossil fuel are that it is renewable, biodegradable, and nontoxic. Its contribution to greenhouse gases is minimal, since the emitted CO₂ is equal to the CO₂ absorbed by the plants to create the TG (1,2).

Many countries have issued standards and regulations (Deutsches Institut für Normung, DIN; Österreichisches Normungsinstitut, ÖNORM) describing the composition and physical properties of biodiesel (3). Attention is drawn to the maximum allowable content of saturated FAME, which depends on the plant from which the TG are derived and on the transesterification reaction conditions (4). The composition of plant-derived TG varies from one species to another. Therefore, plants that contain TG composed of out-of-standards FA can be used for biodiesel production provided their oil is mixed with that of

others. Also, the reaction and storage conditions must be controlled to avoid oxidation and isomerization of the FAME double bonds (5).

The two most common ways to remove TG from plant materials are organic solvent extraction (*n*-hexane, isohexane) and mechanical pressure (oil expellers). The latter process removes a large percentage of existing TG, but some are left in the remaining cake. The transesterification reaction may be performed through several methods such as acidic, alkali, or enzyme catalysis (6,7), the first two taking place at higher temperatures than the last one. Zeolite and metal catalysis also have been proposed (8). All of the proposed methods have disadvantages such as long reaction times, formation of soap, and a high cost of consumables or infrastructure. The *in situ* production of FAME with the use of supercritical fluids or microwaves also has been suggested as a way to bypass the separate TG extraction step (9,10).

The application of low-frequency ultrasound recently has been suggested for fast, cost-efficient alkali-catalyzed transesterification of TG to FAME. This method also requires less catalyst, and it uses a more efficient molar ratio of methanol/TG, down to 6:1. Issues may arise regarding the separation of biodiesel from the leftover methanol, catalyst, and glycerol (11–13).

The percentage of TG that seed cakes contain varies depending on the applied pressure as well as on the physical and mechanical properties of the seeds. Increased pressure results in a temperature increase that may affect the TG composition of the product. Not all TG can be removed by mechanical pressure; the cakes remaining can only be used only as feedstock.

A new way to perform *in situ* reactions on TG-containing materials has been suggested. The application of ultrasound is known, and this work further supports its use, to aid the extraction and the transesterification reaction. The use of alkali-catalyzed ultrasonically assisted extraction transesterification (USAET) is proposed to facilitate the use of seed cakes for biodiesel production and to preserve some of the nutritional value of the cake, which might yet be used as animal feed.

An FTIR method was developed to monitor the various stages of USEAT. It also allows one to determine which comes first: the transesterification reaction in the TG-containing material or the extraction step. Unlike other methods for the analysis of TG and FAME (14), which are not as simple, rapid and nondestructive, FTIR is used to determine the degree of con-

*To whom correspondence should be addressed at: Agricultural University of Athens, Department of Science, Laboratory of Chemistry, 75 Iera Odos, 118 55 Athens, Greece. E-mail: mopol@aua.gr

TABLE 1
Extraction and USAET Yields of Various Samples^a

Sample	Method	Soxhlet (TG%)	USE (TG%)	USAET (FAME g/10 g sample)	USAET FAME/total TG content (%)
Cynara	seeds	24.2	23.4	1.9	78.5
Cotton	seeds	17.5	16.1	0.7	40
	cake	9.1	8.6	0.7	76.9
Sunflower	seeds	41.2	38.7	1.8	43.7
	cake	12.7	11.4	1.1	86.6
Sesame	seeds	58.3	55.7	3.6	61.7
	cakes	32.4	31.1	2.5	77.2

^aUSAET, ultrasonically assisted extraction transesterification; USE, ultrasonically assisted extraction.

version of TG to FAME. Other FTIR-based methods previously reported have used fiber optic probes (15) and attenuated total reflectance FTIR (16) for reaction monitoring. The mid-IR spectra were recorded using ZnSe windows against a ZnSe background, and spectral manipulation was carried out by specialized software.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. *Cynara cardulus* seeds were kindly provided by the Laboratory of Crop Science (Agricultural University of Athens, Athens, Greece). Until use, the seeds were stored in a dark, dry room. Prior to use the seeds were milled in a cuisine blender. Seeds and seed cakes (cotton, sunflower, sesame) were obtained from a local oil producer in northern Greece once their oil had been mechanically removed. Cotton, sunflower, and sesame seeds are known for their oil content, and cynara seed is a promising new object for biodiesel production. The cakes were used as received for the extraction of TG. Solvents used were residue-level methanol (99.9%), NaOH pellets, and *n*-hexane (97%) purchased from BDH (Poole, England).

Isolation of TG from seeds and cakes. Soxhlet extraction was performed for each sample (10 g) as a reference method, with 300 mL of *n*-hexane for 4 h. Anhydrous MgSO₄ was then added to remove traces of water, and the solvent was removed with a rotary evaporator. The oil was then weighed on an analytical balance. The percent concentration of oil for each sample was then determined (Table 1).

All ultrasonic treatments were performed in an ultrasonic water bath operating at 35 kHz. Ten (10) grams of sample (seeds or cakes) was transferred to an Erlenmeyer flask with 50 mL of solvent (*n*-hexane). Extraction was performed for 10 min at 25°C. Two more consecutive extractions under the same conditions were performed to achieve 98% recovery of the total amount of oil, as was determined by the reference method.

Conversion of TG to FAME. USAET was performed for each sample (10 g of seeds and cakes with 50 mL of *n*-hexane and 3 mL of 1 M NaOH in methanol) in an ultrasonic water bath for 30 min at room temperature. The TG from cynara were transesterified to FAME with the application of ultrasound to either of two oil/solvent ratios, 1:1 and 1:25, with the same amount of catalyst as in the USAET with 1 g of oil. In all experiments, the methanol and hexane layers were separated

using a separatory funnel. The hexane layer was dried with anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated in a rotary evaporator. The remaining FAME was weighed on an analytical balance. TLC was used to determine the conversion of TG to FAME, together with the FTIR method described below. The conversion of pure oil was performed as reported previously (13).

TLC. TLC was performed on 0.2 mm silica gel plates (Merck, Darmstadt, Germany). The eluent solvents were chloroform/petroleum ether, 1:3 vol/vol. Spots were visualized by spraying with an ethanolic solution of phosphomolybdic acid (7.5% wt/vol in EtOH) and charring on a hot plate.

FTIR for process monitoring. TQ Analyst software (Thermo Electron Corp., Runcorn, United Kingdom) was used to develop a monitoring method for the quantitative simultaneous

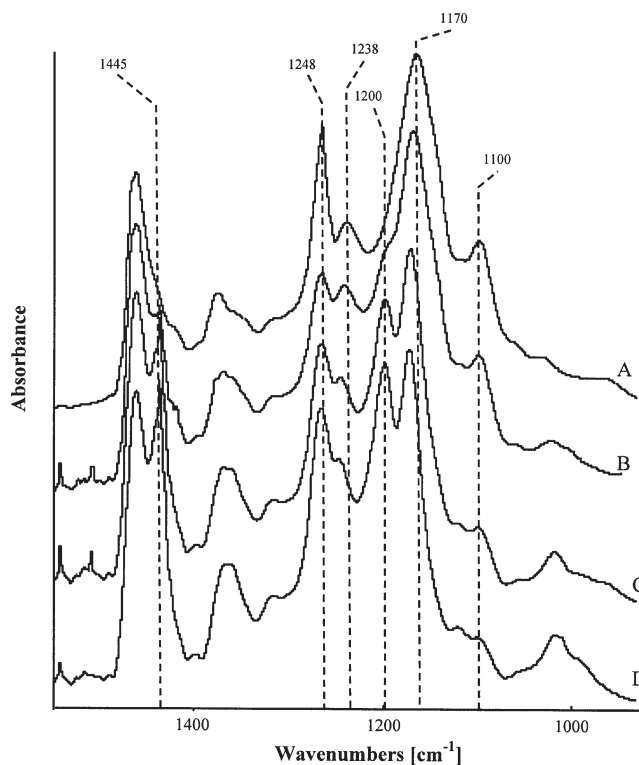


FIG. 1. FTIR spectral region 1500 to 900 cm⁻¹ of TG (A) and FAME (D) and their 70:30 TG/FAME (B) and 30:70 TG/FAME (C) mixtures.

TABLE 2
Characteristic Absorption Frequencies and Assignments
of the Spectral Region (1500–1060 cm⁻¹) Used for the
Determination of FAME in TG/FAME Mixtures

Band position (cm ⁻¹)	Assignment	TG	FAME
1445	CH ₃ - asym. bend	—	+
1238–1248	O–H deformation	+	+
1200	O–CH ₃ stretch	—	+
1170	C–O–C sym. stretch, C–C stretch	+	+
1100	O–CH ₂ –C asym., –CH ₂ –OH	+	—

determination of FAME and TG in their mixtures. By this means, it is possible to determine the conversion of TG to FAME instrumentally. TG oil and FAME were mixed in known concentrations to provide input spectra for the TQ Analyst reference. The software uses the partial least squares algorithm, with a constant path length, and uses the 1300 to 1060 cm⁻¹ spectral region to determine the percentage of FAME in the TG/FAME mixture. All spectra were automatically smoothed and baseline-corrected prior to treatment, while the mean centering technique was used to scale the absorbance axis automatically. Spectra of TG, FAME, and their mixture are shown in Figure 1. The spectral region comprises a number of peaks assigned to various vibrations as shown in Table 2 (17,18).

RESULTS AND DISCUSSION

The objectives of this work were to improve TG extraction, primarily from cakes and secondarily from seeds, as well as to optimize the conversion of TG to FAME. Both were achieved by the application of low-frequency ultrasounds (Table 1).

The experiments carried out for both seeds and cakes samples show that only a fraction of the original TG content of the seed, as determined by Soxhlet extraction, is removed by mechanical pressure. The amount of oil remaining in the cake is 52% for cotton, 30.8% for sunflower, and 55.5% for sesame. This variation may be caused by the texture of the seeds.

Ultrasonically assisted extraction of TG from our samples proved to be as efficient as Soxhlet extraction, reaching about 95% recovery of TG. At the same time it consumed less time and solvent and subjected the sample to less thermal stress. Thus, the use of ultrasonic treatment in the extraction process is the first principle on which the USAET procedure will be based, since the extracted TG will be the reactants for the transesterification reaction that will take place at the same time. This critical point to the USAET concept is also represented (Table 1) by the USAET yield, measured as FAME, as a proportion of the total TG content in the sample.

The second principle is the application of ultrasound in the transesterification procedure. This recently developed method presents advantages such as short reaction times, efficient molar ratio of methanol to TG, and simplicity. However, some complications may arise in separating FAME from the glycerol, the other reaction product, and from the remaining methanol and catalyst when pure oil is transesterified (11).

This difficulty may be overcome by using a solvent to conduct the two-phase reaction. Thus, FAME are dissolved in the upper *n*-hexane layer, while all other products and residues remain dissolved in the glycerol layer. Equal masses of TG (1 g) were dissolved in different volumes of solvent (1 and 25 mL) to determine whether the concentration of reactants affected the reaction time and yields. The reaction time in both experiments was comparable with those previously reported (11), but no soap formation was observed, and the separation was easily held in a separatory funnel. The experimental procedure was monitored by TLC and FTIR. The reaction yield was close to 96%, and no admixture of glycerol in the *n*-hexane layer was detected in the –OH region of the FTIR spectra.

The absence of glycerol was also observed in the IR region used for the quantitative determination of FAME. The peak attributed to the C–CH₂–O vibration (1100 cm⁻¹) is reduced in the FAME spectra but it is present in the TG spectra. The region from 1300 to 1060 cm⁻¹ includes absorption bands related directly to the presence of esters and, in our case, discriminates between glycerol esters and methyl esters mainly through the absorptions due to C–O vibrations. The most characteristic peak is that of the O–CH₃ (1200 cm⁻¹) initial methyl group that is added from the methesterification. The peak increases when the percentage of FAME is increased. Outside the region used for the quantitative determination, there is a very characteristic peak (1445 cm⁻¹) that is not quantitative, although it indicates the presence of the CH₃ group in mixtures of FAME.

The FTIR spectra recorded during the experiment can be used to determine the percentage of FAME quantitatively in the *n*-hexane layer. The data on percent FAME with time were used to construct logarithmic curves A and B in Figure 2 so as to represent the reaction process over the first 30 min. It can be seen that the reaction time for lower concentrations of cynara TG/*n*-hexane (1:25, line B) is the same as for higher concentrations (1:1, line A). This finding shows that the USAET procedure is advantageous when low concentrations of TG are

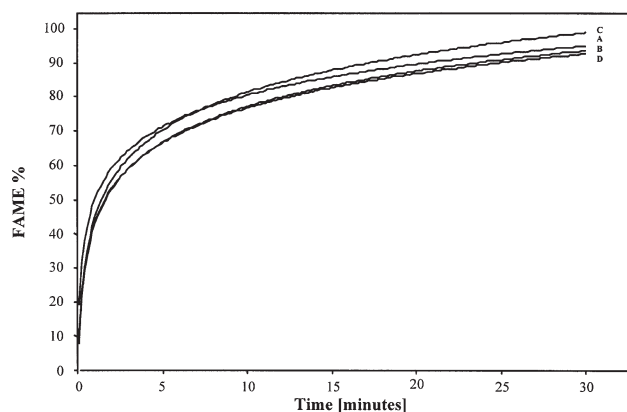


FIG. 2. Reaction curves for the monitoring of cynara TG conversion to FAME. (A) 1:1 oil/solvent, (B) 1:25 oil/solvent, and ultrasonically assisted extraction transesterification for sesame cake (C) and seeds (D).

transesterified in the process of their extraction from the sample (cakes, seeds).

In determining the optimal amount of methanol and catalyst, the USAET procedure was initially performed using 1 mL of 1 M MeOH/NaOH; in this instance, complete transesterification was not achieved, as indicated by TLC. The experiment was repeated several times, increasing the amount of catalyst by 0.5 mL of 1 M MeOH/NaOH at each step and performing the procedure with 10 g of sample. Thus, the minimum amount of catalyst needed to complete the USAET procedure was determined to be 3 mL. Molar ratios of 6:1 MeOH/TG, in the presence of 0.5–1.5% NaOH w/w of oil, previously have been reported for transesterification of pure TG oil to FAME (11). The amount of MeOH for the USAET procedure greatly exceeds the above levels, owing to the presence in the flask of a solid sample that absorbs some of the methanol, thus reducing the reaction efficiency. The increase in the amount of methanol does not necessarily mean that it is spent, as it can be easily recycled and at the same time it dissolves the glycerol. Regarding the high concentration of NaOH in methanol, it is assumed that the presence of various acids in the seeds or cakes will neutralize some of the catalyst. Also, the water present in the samples hydrolyzes some of the catalyst (the methoxy anion CH_3O^-). Finally the high concentration of catalyst will result in uncontrolled side reactions if the temperature is higher than 30°C (11,19).

The optimal conditions were applied in the USAET procedure for all samples. The USAET reaction, as monitored by FTIR, is shown in Figure 2 for sesame cake and seeds (lines C and D, respectively). Although the USAET procedure has been developed primarily to allow the use of cakes as a new source of biodiesel, it can also be successfully applied in the case of seed samples. The main objective was achieved, as the proportion of the transesterified TG from cakes with the USAET procedure was within 76.7 to 86.6% of the TG originally contained in the cakes (Table 1). The lack of mechanical treatment of the seed samples reduced the efficiency of the USAET procedure to 40–61.7% (Table 1).

For cotton seeds, 40% of the total TG originally contained in the seed was transesterified with the USAET procedure. If the standard method of mechanical removal of the TG from the seed with subsequent conversion to FAME were applied, 48% of the total TG would be removed and then converted at best by 96% according to our data. Hence, the total FAME derived by the standard method from cotton would be 46% which is comparable to the 40% direct conversion of USAET.

Similarly, for sunflower seeds, 70% of the TG is mechanically removed. If they are then converted to FAME 96%, the total FAME yield would be 67.2%, which is higher than the 43.7% of USAET. For sesame seeds, 45% of TG is mechanically removed, giving, at a 96% conversion rate, a total FAME yield of 43.2%, which is very low compared with the 61.7% of USAET. It can be assumed that the texture, size, and hardness of each individual seed affect their behavior as potential biodiesel sources.

More impressive results are observed if the USAET procedure is applied to cakes obtained from seeds after mechanical removal of some of the TG. For cotton, as shown above, 46% of their TG are converted to FAME by the standard procedure. The TG from cakes (52% of the amount initially contained in the seed) are 76.9% transesterified by using the USAET (Table 1). Thus, an addition 39.5% of the initial TG (which is 76.9% of the 52% TG from the seed) is converted to biodiesel, thus increasing the overall yield of FAME from 46 to 85.5%.

Accordingly, the application of USAET improved transesterification of TG from 67.2 to 93% for sunflower oil and from 43.2 to 83.5% for sesame oil.

The FTIR data also provide a deeper insight into the exact sequence of the extraction and reaction steps. The presence of TG in the hexane layer during the USAET procedure, as shown by FTIR, suggests that the extraction step precedes the reaction step by a short but measurable amount of time. However, a small degree of transesterification may actually occur in the plant tissue.

REFERENCES

1. Srivastava, A., and R. Prasad, Triglycerides-Based Biodiesel Fuels, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* 4:111–133 (2000).
2. Ma, F., and M.A. Hanna, Biodiesel Production: A Review, *Bioresource Technol.* 70:1–15 (1999).
3. Korbitz, W., Biodiesel Production in Europe and North America, an Encouraging Prospect, *Renew. Energ.* 16:1078–1083 (1999).
4. Knothe, G., Dependence of Biodiesel Fuel Properties on the Structure of Fatty Acid Alkyl Esters, *Fuel Process. Technol.* 86:1059–1070 (2005).
5. Chu, Y.H., and Y.L. Kung, A Study on Vegetable Oil Blends, *Food Chem.* 62:191–195 (1998).
6. Fukuda, H., A. Kondo, and H. Noda, Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils, *J. Biosci. Bioeng.* 92:405–416 (2001).
7. Akoh, C.C., and C.O. Mussata, Lipase-Catalyzed Modification of Borage Oil: Incorporation of Capric and Eicosapentaenoic Acids to Form Structured Lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:697–701 (1998).
8. Suppes, G.J., M.A. Dasari, A.J. Doskosal, P.J. Mankidi, and M.J. Goff, Transesterification of Soy Bean Oil with Zeolite and Metal Catalysts, *Appl. Catal. A Gen.* 257:213–223 (2004).
9. Carrapiso, A.I., and C. Garcia, Development in Lipid Analysis: Some New Extraction Techniques and *in situ* Transesterification, *Lipids* 35:1167–1177 (2000).
10. Haas, M.J., K.M. Scott, W.N. Marmer, and T.A. Foglia, *In situ* Alkaline Transesterification: An Effective Method for the Production of Fatty Acid Methyl Esters from Vegetable Oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81:83–89 (2004).
11. Stavarache, C., M. Vinatoru, R. Nishimura, and Y. Maeda, Fatty Acids Methyl Esters from Vegetable Oils by Means of Ultrasonic Energy, *Ultrason. Sonochem.* 12:367–372 (2005).
12. Maeda, Y., M. Vinatoru, C.E. Stavarache, K. Iwai, and H. Oshige, Method for Producing Fatty Acid Alcohol Ester, Japanese Patent Application 2003335154, JP/26.09.03.
13. Maeda, Y., M. Vinatoru, C.E. Stavarache, K. Iwai, and H. Oshige, Method for Producing Fatty Acid Alcohol Ester, European Patent Application 03023081.7, EP/12.09.03.
14. Ruiz-Gutiérrez, V., and L.J.R. Barron, Methods for the Analy-

- sis of Triacylglycerols, *J. Chromatogr. B* 671:133–168 (1995).
15. Knothe, G., Rapid Monitoring of Transesterification and Assessing Biodiesel Fuel Quality by Near-Infrared Spectroscopy Using a Fiber-Optic Probe, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76:795–800 (1999).
 16. Dube, M.E., S. Zheng, D.D. McLean, and M. Kates, A Comparison of Attenuated Total Reflectance–FTIR Spectroscopy and GPC for Monitoring Biodiesel Production, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81:599–603 (2004).
 17. Socrates, G., *Infrared Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts 2nd Edition*, John Wiley & Sons, New York, 1997.
 18. Silverstein, R.M., and F.X. Webster, *Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6th Edition.*, John Wiley & Sons, New York, 1997.
 19. Boocock, D.G.B., S.K. Konar, V. Mao, and H. Sidi, Fast One-Phase Oil-rich Processes for the Preparation of Vegetable Oil Methyl Esters, *Biomass Bioenerg.* 11:43–50 (1996).

[Received July 5, 2005; accepted October 31, 2005]