

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΘΡΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ (FT-IR) ΚΑΙ ΤΗΣ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ RAMAN (FT-RAMAN) ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.
Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΑΦ, ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΗΣ ΜΟΥΡΙΑΣ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Ν. ΜΠΑΤΣΟΥΛΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μ. ΠΟΛΥΣΙΟΥ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΘΡΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ (FT-IR) ΚΑΙ ΤΗΣ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ RAMAN (FT-RAMAN) ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.
Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΑΦ, ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΗΣ ΜΟΥΡΙΑΣ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Ν. ΜΠΑΤΣΟΥΛΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μ. ΠΟΛΥΣΙΟΥ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΘΡΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ (FT-IR) ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΚΟΠΙΑΣ
RAMAN (FT-RAMAN) ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.
Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΑΦ, ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΗΣ ΜΟΥΡΙΑΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μ. ΠΟΛΥΣΙΟΥ

ΜΕΛΗ:

Κ.ΓΕΩΡΓΙΟΥ, Καθηγητής

Π. ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ, Αν. Καθηγητής

Β. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ-ΚΟΚΟΤΟΥ, Καθηγήτρια

Χ. ΠΑΠΠΑΣ, Επ. Καθηγητής

Π. ΧΑΡΙΖΑΝΗΣ, Καθηγητής

Α. ΚΥΜΠΑΡΗΣ, Επ. Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη είχε σαν στόχο να συνδυάσει σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης, όπως τα μικροκύματα καθώς και σύγχρονες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης (φασματοσκοπία FT-IR και FT-Raman) και να τις εφαρμόσει στην απομόνωση και μελέτη διαφόρων συστατικών από διάφορα φυσικά (φυτικά) προϊόντα.

Ως φυτικό υλικό επιλέχθηκε το κενάφ και το συστατικό που απομονώθηκε και προσδιορίστηκε ποσοτικά ήταν το ουρονικό οξύ των ημικυταρρινών του. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ημικυταρρινών σε ουρονικά οξέα έγινε σύμφωνα με τη φωτομετρική μέθοδο των Blumenkrantz and Asboe-Hanson (μέθοδος αναφοράς) και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR. Η προτεινόμενη μέθοδος (φασματοσκοπία FT-IR) προσδιορισμού της περιεκτικότητας των ημικυταρρινών σε ουρονικά οξέα συγκρίθηκε με την φωτομετρική μέθοδο (μέθοδος αναφοράς) ως προς την επαναληψιμότητα και την αξιοπιστία. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φανέρωσαν ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία της νέας μεθόδου.

Επιπλέον δυο διαδικασίες απομόνωσης με και χωρίς μικροκύματα εφαρμόστηκαν για την παραλαβή ημικυταρρινών από το φυτό κενάφ. Η κλασική μέθοδος χρήσης της απλής ανάδευσης σε αντιπαραβολή με την χρήση μικροκυμάτων έγινε με την ίδια μεθοδολογία, την ίδια αρχική ποσότητα δείγματος, οι ίδιες ποσότητες και συγκεντρώσεις διαλυμάτων, με την μόνη διαφορά ότι οι χρόνοι εκχύλισης ήταν πολύ μικρότεροι. Συγκεκριμένα, για την κλασική μέθοδο απαιτούνται περίπου 72 ώρες και 3,5 h για την μέθοδο με τα μικροκύματα.

Ως δεύτερο υλικό χρησιμοποιήθηκε το μέλι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης και φρουκτόζης που περιέχεται σε αυτό, με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-Raman. Η χρήση της φασματοσκοπίας FT-Raman για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης στο μέλι είναι μια καλή εναλλακτική μέθοδος, που προσφέρει μικρό χρόνο ανάλυσης και απλότητα στην επεξεργασία των δειγμάτων πριν την χρήση τους. Το γεγονός ότι τα φάσματα καταγράφονται χωρίς επιπλέον κατεργασία απλουστεύει ακόμη περισσότερο την μέθοδο ανάλυσης και της δίνει

άμεσο πλεονέκτημα αφού το δείγμα δεν καταστρέφεται και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί και σε άλλου είδους ανάλυση.

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-Raman και FT-IR επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης διαφορετικών ειδών μελιού. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίζεται σε ένα κοινό πρόγραμμα βάσης δεδομένων με φάσματα FT-Raman και FT-IR. Η ταχύτητα και η αξιοπιστία των παραπάνω μεθόδων, τις κάνουν μια καλή εναλλακτική και γρήγορη μέθοδο. Επιπλέον η απλότητα και η αντικειμενικότητα τους, τις κάνουν ένα εύκολο εργαλείο ανάλυσης για οποιονδήποτε, σε σύγκριση με την εξειδίκευση και εμπειρία που θα πρέπει να έχει ο αναλυτής που κάνει την γυροσκοπική ανάλυση.

Τέλος αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς με την μέθοδο Kjeldahl και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR. Φύλλα μουριάς αναλύθηκαν με την μέθοδο Kjeldahl για τον προσδιορισμό του ολικού τους αζώτου. Κάποια από αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως «πρότυπα» και τα υπόλοιπα ως «άγνωστα». Τα αποτελέσματα της μεθόδου Kjeldahl των «πρωτύπων» χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία βάσης δεδομένων στο λογισμικό TO analyst. Βρέθηκε ότι οι δυο μέθοδοι είναι στατιστικά παραπλήσιες στα πλαίσια της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας, όπου σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο ανάλυσης και την απλότητα στην επεξεργασία των δειγμάτων πριν την χρήση τους, την μη χρήση διαλυτών και ακριβών αντιδραστηρίων κάνει την μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR να υπερέχει.

Executive summary

This study aimed to combine modern techniques of extraction, such as microwaves and modern methods of instrumental analysis (spectroscopy FT-IR and FT-Raman) and implement them in the isolation and study of various ingredients from various natural products.

As a natural material selected kenaf and component isolated and quantified was the uronic acid of the hemicelluloses. Concentration of hemicelluloses to uronic acids was done according to the photometric method of Blumenkrantz and Asboe-Hanson (reference method) and the method Spectroscopy FT-IR. The proposed method (Spectroscopy FT-IR) determination of the levels of the hemicelluloses to uronic acids compared with the photometric method (reference method) on the repeatability and reliability. The measurement results revealed that there are no differences between the two methods which enhances the reliability of the new method.

Furthermore both isolation processes with and without microwave applied to receive hemicelluloses from kenaf plant. The classical method of use of simple stirring in comparison with the microwave was by the same methodology, the same initial quantity of sample, the same amounts and concentrations of the solutions, with the only difference that the extraction times were significantly smaller. Specifically, the conventional method takes about 72 hours for 3,5 h method to microwaves.

As a second material honey used for the quantitative determination of glucose and fructose contained therein, by the use of high performance liquid chromatography and the method of FT-Raman spectroscopy. Using FT-Raman spectroscopy for the quantitative determination of glucose and fructose in honey is a good alternative method, offering short analysis time and simplicity in processing the samples prior to their use. The fact that the spectra are recorded without additional treatment further simplifies the method of analysis and provides immediate advantage since the sample is not destroyed and can be reused in other types of analysis.

Using Spectroscopy FT-Raman and FT-IR was accomplished the determination of botanical origin of different kinds of honey. The method developed relies on a common database program with FT-Raman spectra and FT-IR. The speed and

reliability of the above methods, make them a good alternative and rapid method. Furthermore the simplicity and objectivity, to make an easy analysis tool for anyone, compared with the expertise and experience that the analyst should be doing the gyroscopic resolution.

Finally was developed method for determining total nitrogen in the leaves of mulberry by Kjeldahl method and the method Spectroscopy FT-IR. Mulberry leaves were analyzed by the Kjeldahl method for determination of the total nitrogen.

Some of these were used as "standards" and the rest as "unknown." The results of the Kjeldahl method of "standards" used to create the database in TQ analyst software. It was found that the two methods are statistically similar in accuracy and repeatability, which in combination with the short analysis time and simplicity in processing the samples prior to use, the non-solvent and expensive reagents make the process spectroscopy FT-IR be superior.

Επιστημονικό Πεδίο: Χημεία

Λέξεις Κλειδιά: Υπέρυθρη Φασματοσκοπία, Φασματοσκοπία RAMAN, Κεναφ, Μέλι, Μουρια

FT-IR, FT-RAMAN, kenaf, honey, morus

Στο Νίκο και το Γιάννη

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, της Σχολής Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στο χρονικό διάστημα 2002 έως 2007.

Η ανάθεση του θέματος έγινε από τον κ. Μ. Πολυσίου, Ομ. Καθηγητή του Γ.Π.Α., στον οποίο οφείλω τις θερμότερες ευχαριστίες για τη συνεχή και ακούραστη επίβλεψη της εργασίας και κυρίως για τον ζήλο του και τον ενθουσιασμό με τον οποίο με καθοδήγησε.

Επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω και στον Επ. Καθηγητή Χ. Παππά για τις εποικοδομητικές συζητήσεις που είχε μαζί μου τόσο σε θέματα επεξεργασίας αναλυτικών δεδομένων όσο και στη συγγραφή και παρουσίαση της εργασίας μου. Στον Αν. Καθηγητή Π. Ταραντίλη ο οποίος καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου με βοήθησε αποτελεσματικά. Οι παρατηρήσεις του ήταν πολύτιμες.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω όλους τους τότε συνυποψήφιους διδάκτορες και το προσωπικό του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας για τη συνεργασία τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	1
1.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ.....	1
Εκχύλιση με την χρήση μικροκυμάτων	1
1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	7
1.2.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC).....	13
1.2.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infra-Red, FT-IR)	25
1.2.3 Φασματοσκοπία σκέδασης Raman με μετασχηματισμό Fourier (FT-Raman).....	42
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	49
Ποσοτικός προσδιορισμός των ουρονικών οξέων με φασματοσκοπία FT-IR - Παραλαβή ημικυταρρινών από το κενάφ με μικροκύματα.....	49
2.1 Κενάφ.....	49
2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των ουρονικών οξέων στις ημικυταρρίνες από το φυτικό υλικό κενάφ με φασματοσκοπία FT-IR	53
2.2.2 Σύγκριση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού των ουρονικών οξέων με την κλασική μέθοδο Asboe-Hansen και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR	60
2.3.1 Σύγκριση μεθόδων παραλαβής ημικυταρρινών από το κενάφ με απλή ανάδευση και μικροκύματα	68
2.3.2 Σύγκριση μεθόδων παραλαβής ημικυταρρινών με απλή ανάδευση και μικροκύματα.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	78
Ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης και φρουκτόζης στο μέλι με φασματοσκοπία FT-Raman – Προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης των διαφόρων ειδών μελιού με φασματοσκοπία FT-Raman και FT-IR	78
3.1 Μέλι.....	78
3.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης και φρουκτόζης στο μέλι με φασματοσκοπία FT-Raman	88
3.2.2 Σύγκριση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού της γλυκόζης και φρουκτόζης στο μέλι με την υγρή χρωματογραφία και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-Raman .	90

3.3.1 Προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης των διαφόρων ειδών μελιού με φασματοσκοπία FT-Raman και FT-IR.....	98
3.3.2 Σύγκριση μεθόδων προσδιορισμού της βοτανικής προέλευσης των διαφόρων ειδών μελιού με φασματοσκοπία FT-Raman και FT-IR	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	111
Ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς με φασματοσκοπία FT-IR	111
4.1 Φύλλα μουριάς	111
4.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς με φασματοσκοπία FT-IR	113
4.2.2 Σύγκριση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς με την μέθοδο Kjeldahl και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR.....	116
Κατάλογος Πινάκων	123
Κατάλογος Εικόνων	125
Κατάλογος Σχημάτων	126
Βιβλιογραφία	128

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ

Εκχύλιση με την χρήση μικροκυμάτων

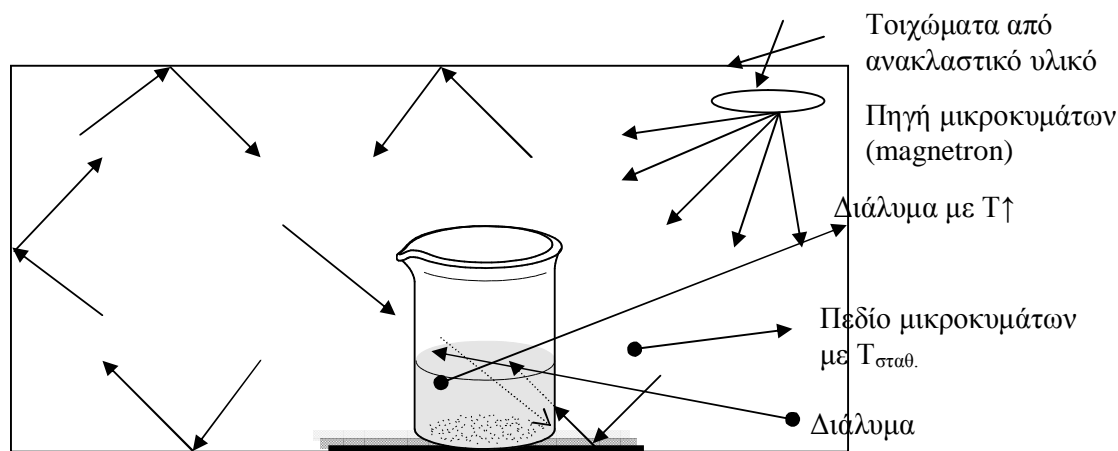
Η χρήση των μικροκυμάτων στην σύγχρονη χημεία έχει βρει πολλαπλές εφαρμογές, τόσο στην οργανική σύνθεση όσο και στην ανάλυση. Στην συνθετική χημεία η αξία τους βρίσκεται στην επιτάχυνση των αντιδράσεων λόγω της απευθείας μεταφοράς ενέργειας από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο στα αντιδρώντα (μόρια, ρίζες,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

Οι βασικές αρχές που διέπουν την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια και την καθιστούν ένα πολύτιμο εργαλείο είναι οι εξής:

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 ενέργεια για αυτές τις συχνότητες είναι αντίστοιχα από 100 έως 700 W. 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 επιθυμητός 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 χάρη 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 1.1.1**.



Σχήμα 1.1.1 Απεικόνιση εσωτερικού συσκευής μικροκυμάτων

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 υπέρυθρου, 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. Η 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 1.1.1.

Πίνακας 1.1.1 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
Εξάνιο	1,88	0,00019	0,10
Οξικός αιθυλεστέρας	6,02	3,2	5316

Στην περίπτωση των ιόντων, για παράδειγμα όταν ένα άλας είναι διαλυμένο σε νερό η επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας είναι διαφορετική και πιο πολύπλοκη. Αφ ενός ο διαλύτης είναι ένα ισχυρό δίπολο 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 να 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 1.1.2.

Πίνακας 1.1.2 Τιμές του σημείου ζέσεως, του ιξώδους και του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας για τους πιο κοινούς διαλύτες. (MERCK, 2008)

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

ii) αλληλεπίδραση με κύτταρα και ιστούς

Τοποθετώντας ένα φυτικό ιστό σε ένα πεδίο μικροκυμάτων υποβάλλουμε όλα τα συστατικά του στις παραπάνω διαδικασίες. Έτσι, το υδατοειδές 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 et al, 2010). Λεπτομερέστερη περιγραφή της χρησιμότητας αυτού του φαινομένου θα υπάρξει στις εφαρμογές των μεθόδων που βασίζονται στα μικροκύματα. Σε επίπεδο ιστού οι μεσοκυττάρια 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).

1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η φασματομετρία μάζας (MS) κατέχει κυρίαρχη θέση στην ανάλυση τροφίμων (βοτανική προέλευση, νοθεία κλπ). Οι μέθοδοι φασματομετρίας μάζας έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με τις τεχνικές φασματοσκοπίας NMR. Η ανάλυση βασίζεται στην χρήση προτύπων, οπότε απαιτείται να έχει γίνει προετοιμασία του δείγματος (π.χ. εκχύλιση, απόσταξη κλπ). Το MS συνδυαζόμενο με το LC, μπορεί να διαχωρίσει και ενώσεις με παραπλήσια πολικότητα, όπου με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού μπορεί να γίνει ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους. Ειδικότερα το LTQ-Orbitrap (Linear Trap Quadrupole- Orbitrap) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό πολυφαινολικών προφίλ μελιού, όπου 43 συστατικά ανιχνεύθηκαν σε λιγότερο από 5 min και τα δείγματα ταξινομήθηκαν με βάση την βοτανική τους προέλευση, αφού προηγουμένως είχε δημιουργηθεί μια βάση δεδομένων με πολυφαινολικές ενώσεις.

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι μια φασματοσκοπική τεχνική, η οποία επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων, παρέχοντας λεπτομερείς πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο. Η μη επεμβατική, με μεγάλη επαναληψιμότητα, σε μικρό χρόνο ανάλυση, χρησιμοποιείται και για την ανάλυση τροφίμων που βρίσκονται είτε σε στερεή, είτε σε υγρή φυσική κατάσταση. Αναλόγως την φυσική τους κατάσταση μπορούν να εφαρμοστούν διαφορετικές τεχνικές NMR, όπως στερεής φάσης (solid state) NMR, απεικόνισης (imaging) NMR και υγρής φάσης (liquid state) NMR. Το υψηλής ανάλυσης (HR) NMR επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση δειγμάτων. Πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία έχουν εστιάσει στον συνδυασμό φασματοσκοπίας NMR με την χημειομετρία για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης ή της ποιοτικής ανάλυσης αγροτικών προϊόντων, όπως ελαιόλαδο και κρασί. Στο φάσμα ^1H NMR του ελαιολάδου κυριαρχούν τα σήματα των λιπαρών οξέων. Στο πρώτο άρθρο που επιτεύχθηκε γεωγραφικός προσδιορισμός δειγμάτων ελαιολάδου, έγινε με τον συνδυασμό PCA (Principal component analysis) και HCA (Hierarchical cluster analysis) σε φάσματα ^1H NMR. Ακολούθησαν και άλλες μελέτες που εφάρμοσαν διαφορετικά στατιστικά πρωτόκολλα στο ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR και/ή στην αναλογία ισοτόπων στο ^{13}C και ^2H . Πλέον η φασματοσκοπία NMR εφαρμόζεται για την αξιολόγηση της αυθεντικότητας, της ποιότητας, της βοτανικής προέλευσης, της νοθείας για τρόφιμα

και ποτά όπως η μπύρα, χυμοί φρούτων, βαλσαμικό ξύδι, τσάι, κρέας, ψάρι, δημητριακά, λαχανικά, καφέ και μέλι.

Η φασματοσκοπία FT-IR επιτρέπει τη γρήγορη, με υψηλή απόδοση και μη καταστρεπτική ανάλυση για ένα μεγάλο εύρος δειγμάτων και στον ερευνητικό και τον βιομηχανικό τομέα. Αυτή η τεχνική βασίζεται στην αρχή ότι ένα δείγμα διεγείρεται με ακτίνα υπερύθρου ($4000-400\text{ cm}^{-1}$ MIR, $14000-4000\text{ cm}^{-1}$ NIR) και οι χαρακτηριστικές ομάδες του δείγματος απορροφούν την ακτινοβολία και στη συνέχεια δονούνται. Αυτές οι δονήσεις/απορροφήσεις μπορούν να συνδεθούν απευθείας με τις (βιο)χημικές ομάδες. Το φάσμα που προκύπτει μπορεί να περιγραφεί σαν το χημικό «αποτύπωμα» και είναι χαρακτηριστικό για το κάθε δείγμα. Οι περισσότεροι δεσμοί απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος, όμως όταν το δείγμα είναι μίγμα ενώσεων, υπάρχει περίπτωση να προκύψει ένα φάσμα όπου οι κορυφές θα επικαλύπτουν η μια την άλλη. Αυτό όμως είναι χαρακτηριστικό για κάθε δείγμα και θεωρείται σαν το «αποτύπωμα» του. Η εισαγωγή της τεχνικής FT-IR, αύξησε τη χρήση του στην ανάλυση τροφίμων, εξαιτίας της ικανότητας του να συμπεριλάβει πληροφορίες για πολλά συστατικά ταυτόχρονα σε ένα φάσμα. Με την χρήση της τεχνικής FT-IR μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός της βοτανικής προέλευσης διαφόρων δειγμάτων ελαιολάδου και στίγματα κρόκου. Το NIR συνδυάστηκε με τη φασματοσκοπία ορατού για την ταυτοποίηση της γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων κρασιού. Η ολιστική φύση της φασματοσκοπίας FT-IR έχει αναγνωριστεί σαν ένα πολύτιμο εργαλείο και για την ανάλυση υδατανθράκων, αμινοξέων, πολυσακχαριτών, λιπαρών οξέων, πρωτεϊνών γρήγορα, ταυτόχρονα και με ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της είναι η μεγάλη απορρόφηση του νερού στο MIR. Αυτό το πρόβλημα μπορεί με μειωθεί με την αφυδάτωση των δειγμάτων και αφαίρεση του σήματος του νερού.

Την τελευταία δεκαετία η φασματοσκοπία MIR χρησιμοποιείται και σε βιομηχανικές εφαρμογές, όπως στη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών. Αυτές οι εφαρμογές αφορούν κυρίως την αυθεντικότητα και τη νοθεία των τροφίμων. Για παράδειγμα ο χαρακτηρισμός και ο προσδιορισμός της νοθείας στα βρώσιμα έλαια και των ολικών trans λιπαρών συστατικών στα τρόφιμα. Ενώ τα trans λιπαρά οξέα είναι γνωστό ότι βρίσκονται σε μικρό ποσοστό σε διάφορα τρόφιμα, όπως τα γαλακτοκομικά και τα προϊόντα κρέατος, η μέγιστη πηγή ανησυχίας όσον αφορά την ανθρώπινη υγεία είναι τα υδρογονωμένα trans λιπαρά που περιέχονται σε

διάφορα τρόφιμα. Η υψηλή κατανάλωση τέτοιων trans λιπαρών μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης και να μειώσει τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης, οδηγώντας στην αύξηση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο. Έτσι ανίχνευση αυτής της τροποποίησης είναι απαραίτητη. Μελέτες με τη χρήση του ATR έχουν επιτύχει τη γρήγορη και αποδοτική ανάλυση των trans λιπαρών σε τρόφιμα (Mossoba et al, 2011). Σε συνδυασμό με την PLSR (Partial Least Squares Regression) για την δημιουργία ενός μοντέλου βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας το ύψος της 2^{ης} παραγωγού μιας συγκεκριμένης κορυφής στα 966 cm⁻¹, μπορούν να προσδιορίσουν ποσοτικά τα trans λιπαρά οξέα στα βρώσιμα έλαια.

Άλλες εφαρμογές της φασματοσκοπίας FT-IR μπορούν να προσδιορίσουν την ταυτότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων, την βακτηριδιακή αλλοίωση του γάλακτος και την αλληλεπίδραση της βακτηριδιακής τους ανάπτυξης. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει γίνει στο κρέας και στα προϊόντα κρέατος, με πολλές από αυτές να εστιάζουν στην αυθεντικότητα και τη νοθεία και πολλές άλλες στην βακτηριδιακή αλλοίωση/μόλυνση. Με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR μπορεί να γίνει άμεση ανίχνευση της βακτηριδιακής αλλοίωσης (Ammor et al, 2009), χωρίς προηγουμένως να έχει γίνει ο διαχωρισμός των μικροοργανισμών από το υπόστρωμα (μια μέθοδος που απαιτεί ώρες και εξειδίκευση). Η χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR έχει ενισχύσει και επιταχύνει την ανίχνευση της μικροβιακής αλλοίωσης και θεωρητικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό και άλλων μορφών μολυσματικών ουσιών και βακτηρίων. Επιπλέον αυτή η άμεση ανάλυση είναι πολύ χρήσιμη στην αλυσίδα παραγωγής των τροφίμων, ώστε σε λίγα λεπτά να έχουμε επαρκή έλεγχο.

Όσον αφορά τη φασματοσκοπία Raman, τα δείγματα εκτίθενται σε μια πηγής μονοχρωματικής ακτινοβολίας η οποία μπορεί να είναι στο ορατό (Vis) ή στο (NIR) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Ενώ το φάσμα IR ανιχνεύει δονήσεις κατά τη διάρκεια που αλλάζει το ηλεκτρικό δίπολο, η φασματοσκοπία Raman βασίζεται στην ανίχνευση δονήσεων κατά τη διάρκεια μεταβολής της πόλωσης. Δεσμοί που συνδέουν δυο μέρη ενός μορίου (C=C, C-C) είναι πιο ενεργοί στην φασματοσκοπία Raman. Από την άλλη, ομάδες όπως C=O, N-H και O-H παρουσιάζουν μικρές δονήσεις σε σχέση με το MIR. Επιπλέον το νερό είναι πρακτικά «αόρατο» στη φασματοσκοπία Raman, κάτι που είναι πολύ χρήσιμο για δείγματα με νερό. Αξιόλογες μελέτες έχουν γίνει για τη νοθεία του ελαιολάδου με ηλιέλαιο, σε

ποσοστό μικρότερο του 5%. Επιπλέον έχει γίνει συνδυασμός της φασματοσκοπίας Raman με την χημειομετρία με πολύ καλά αποτελέσματα για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του ελαιολάδου.

Η φασματοσκοπία Raman είναι μια ευέλικτη και μη καταστροφική αναλυτική τεχνική η οποία παρέχει ένα μοναδικό «αποτύπωμα» φάσμα, όπως και η φασματοσκοπία FT-IR. Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόζεται για την ανάλυση τροφίμων, λόγω της ποικιλομορφίας των συστατικών που μπορεί να ανιχνεύσει, από μακρο-συστατικά, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες μέχρι και συστατικά όπως χρωστικές και αρωματικές ουσίες. Επιπλέον, ενδιαφέρον υπάρχει και για την ανίχνευση μικροοργανισμών που παίζουν ρόλο στην αλλοίωση των τροφίμων. Η χρησιμότητα της φασματοσκοπίας Raman αυξήθηκε με την ικανότητα του να συνδεθεί με μικροσκόπιο ανάλυσης 1 μm το οποίο είναι ιδανικό για την ανίχνευση μικροβίων. Συγκεκριμένα όταν συνδεθεί με ανιχνευτές οπτικών ινών μπορεί να γίνει *insitu* ή απευθείας ανάλυση. Όπως και στην φασματοσκοπία FT-IR χρειάζεται ελάχιστη ή και καθόλου προετοιμασία το προς ανάλυση δείγμα. Ωστόσο η φασματοσκοπία Raman προσφέρει ένα διακριτό πλεονέκτημα σε σχέση με την φασματοσκοπία FT-IR γιατί επιτρέπει την ανάλυση ακόμη και σε δείγματα τροφίμων που βρίσκονται σε διαφανείς συσκευασίες (πλαστικό, γυαλί). Επιπλέον η φασματοσκοπία Raman μπορεί να ανιχνεύσει συστατικά ακόμη και σε υδατικά διαλύματα. Ο συνδυασμός αυτών των πλεονεκτημάτων σε συνδυασμό με το φορητό εξοπλισμό μπορεί να κάνει τη φασματοσκοπία Raman μια πολλά υποσχόμενη τεχνική ανάλυσης για την βιομηχανία των τροφίμων. Όπως αναφέρθηκε ήδη, η νοθεία είναι μια μεγάλη ανησυχία για την βιομηχανία τροφίμων και τους καταναλωτές για πολλούς λόγους. Ακόμη και σήμερα είναι δύσκολο να ανιχνευθούν τα συστατικά της νοθείας είναι σκοπίμως παραπλήσια με τα συστατικά του προϊόντος. Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα νοθείας είναι στην παραγωγή έξτρα παρθένου ελαιολάδου, όπου υψηλότερης οξύτητας ελαιολάδο αναμειγνύεται με το έξτρα παρθένο ελαιολάδο. Όταν η ανάμειξη γίνεται με σπορέλαια (ειδικότερα ακατέργαστο φουντουκέλαιο), τότε αυτό μπορεί να εγκυμονεί κινδύνους για ένα καταναλωτή που έχει ευαισθησία σε αυτό. Χρωματογραφικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την αυθεντικότητα των βρώσιμων ελαίων, δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν νοθείες σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5-20%) καθώς τα συστατικά είναι παρόμοια. Άλλες μέθοδοι όπως η φασματομετρία MS και η φασματοσκοπία NMR

είχαν καλύτερα αποτελέσματα, αλλά κανένα δεν είχε την απλότητα και την ταχύτητα της φασματοσκοπίας Raman, η οποία αποδείχθηκε πολύ χρήσιμη σε αυτό το τομέα. Βιβλιογραφικές αναφορές δείχνουν ότι ο συνδυασμός φασματοσκοπία FT-IR και Raman με τη μέθοδο ανάλυσης (SLDA- stepwise linear discriminant analysis) μπορούν να διακρίνουν το ελαιόλαδο από το φουντουκέλαιο (Baeten et al, 2005). Η διάκριση βασίστηκε κυρίως στην μετατόπιση του C=C από το 1670-1660 cm^{-1} . Μια άλλη εφαρμογή της φασματοσκοπίας Raman είναι στον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης ευρωπαϊκών δειγμάτων ελαιολάδου από διάφορες περιοχές με σφάλμα μόλις 5-7,5%. Πρόσφατα συνδυάστηκε η φασματοσκοπία Raman με το PLS και το PLS-DA για να διαπιστωθεί η νοθεία σε δείγματα γαλλικού έξιτρα παρθένου ελαιολάδου (Korifi, 2011). Σε αυτή τη μελέτη εστίασαν στον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων και της τριακυλογλυκερόλης στα δείγματα ελαιολάδου με ακρίβεια πρόβλεψης 92,3%.

Ένα τομέας στον οποίο χρησιμοποιείται κυρίως η φασματοσκοπία FT-IR και NIR είναι η νοθεία των χυμών φρούτων. Η εφαρμογές της φασματοσκοπίας Raman είναι ελάχιστες εξαιτίας της φθορίζουσας φύσης των συστατικών των χυμών. Αυτό βέβαια μπορεί να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας το SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy), που προκαλεί απόσβεση του φθορισμού. Παραδείγματα αυτής της εφαρμογής είναι η ανίχνευση ζυμών στο χυμό μήλου και της αξιολόγησης της ποιότητας του τοματοχυμού (Mizrach et al, 2007). Επιπλέον έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φυτοφαρμάκων όχι μόνο στους χυμούς, αλλά και στην φλούδα του φρούτου (Shende et al, 2004). Η φασματοσκοπία Raman έχει πλούσια ιστορία σαν εργαλείο έρευνας της δομής των πρωτεϊνών, τόσο σε διαλύματα όσο και σε στερεή κατάσταση. Πολλές μελέτες εκμεταλλεύτηκαν την ευαισθησία της κορυφής του Αμιδίου I (1650-1680 cm^{-1}) και του Αμιδίου III (1200-1300 cm^{-1}). Αυτή η προσέγγιση εφαρμόστηκε σε αρκετές περιπτώσεις για την μελέτη των πρωτεϊνών των τροφίμων και κυρίως του κρέατος κατά την διάρκεια των διαφόρων διαδικασιών για την συντήρηση του, εξαιτίας των αλλαγών στον μυϊνικό και συνδετικό ιστό των πρωτεϊνών που συμβαίνουν κατά την ψύξη και απόψυξη τους (Herrero et al, 2008). Τέλος το SERS χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση της *Salmonella* spp και της *Escherichia Coli* και αρκετών άλλων παθογόνων των τροφίμων με αξιόλογα αποτελέσματα (Chu et al, 2008). Τα φορητά συστήματα SERS έχουν ξεκινήσει να εξελίσσονται για μια γρήγορη ταυτοποίηση βακτηρίων στα τρόφιμα.

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, ο αριθμός των αναφορών της χρήσης NIR, Raman και κυρίως MIR φασματοσκοπίας για θέματα γνησιότητας των τροφίμων (π.χ. νοθεία, βοτανική προέλευση, διαδικασία παραγωγής και ανιχνευσιμότητα) έχουν αυξηθεί σημαντικά. Το εύρος των εφαρμογών αφορά διάφορα είδη τροφίμων και ποτών όπως δημητριακά, καφέ, γαλακτοκομικά, ελαιόλαδο, ψάρια, φρούτα, μέλι, κρέας και κρασί. Η ενσωμάτωση της φασματοσκοπίας με την πολυμετάβλητη ανάλυση δεδομένων έχει αναπτυχθεί και στην βιομηχανία. Οι μέθοδοι αυτοί έχουν πολύ μικρό χρόνο ανάλυσης, απαιτούν ελάχιστη ή και καθόλου προετοιμασία του δείγματος και επιτρέπουν την αποδοτική ανάλυση των δειγμάτων στον ποιοτικό έλεγχο. Η φασματοσκοπία IR και Raman μπορεί να μην εξαλείφει την ανάγκη για πιο εξελιγμένες αναλύσεις, όμως συγκρίνεται με τις τυπικές μεθόδους στις οποίες γίνεται μεγάλη χρήση οργανικών διαλυτών και μπορεί να παρέχει μεθόδους πιο φιλικές για το περιβάλλον.

1.2.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Περιγραφή χρωματογραφικού διαχωρισμού: Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ανοργάνων ή οργανικών ή οργανομεταλλικών ουσιών, που βασίζονται στις διαφορές φυσικοχημικής συγγένειας των ουσιών ως προς δυο φάσεις, τη στατική, που αποτελείται από ένα ακίνητο στρώμα μεγάλου εμβαδού επιφάνειας και την κινητή, ένα ρευστό, που κινείται διαμέσου και κατά μήκος της στατικής φάσεως. Το δείγμα εισάγεται στο σημείο ή κοντά στο σημείο, όπου συμβαίνει η πρώτη επαφή των δυο φάσεων. Τα συστατικά του δείγματος εν συνεχεία μεταφέρονται κατά μήκος της διαδρομής της κινητής φάσεως, με διάφορη ταχύτητα, που εξαρτάται από τις σχετικές συγγένειες των ουσιών ως προς τις δυο φάσεις και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των ουσιών.

Μηχανισμοί: οι παρατηρούμενες διαφορές φυσικοχημικής συγγένειας στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς είναι δυνατό να οφείλονται, κυρίως, σε μηχανισμούς προσρόφησης ή μηχανισμό κατανομής. Ο διαχωρισμός με προσρόφηση βασίζεται στην προσκόλληση μιας ουσίας πάνω στην επιφάνεια ενός στερεού με δυνάμεις μοριακής φύσεως. Παράδειγμα, ο καθαρισμός μιας ουσίας σε διάλυμα οργανικού διαλύτη με ενεργό άνθρακα εξαρτάται από το γεγονός ότι οι προσμίξεις προσροφούνται κατά προτίμηση από τον ενεργό άνθρακα. Ο διαχωρισμός με κατανομή βασίζεται στην διαφορά διαλυτότητας της ουσίας στις δυο φάσεις, με αποτέλεσμα η ουσία να κατανέμεται διαφοροτρόπως στις δυο φάσεις. Παράδειγμα, η εκχύλιση μιας οργανικής ουσίας από υδατικό διάλυμα αιθέρα, βασίζεται στο γεγονός ότι η οργανική ουσία διαλύεται περισσότερο στον αιθέρα.

Ταξινόμηση: για μεν την κινητή φάση μόνο δυο καταστάσεις της ύλης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, η υγρή και η αέρια, για δε την στατική φάση, μόνο η υγρή και η στερεά.

Με τον όρο Υγρή Χρωματογραφία συμπεριλαμβάνονται όλα εκείνα τα είδη υγρής χρωματογραφίας, που χρησιμοποιούν ως κινητή φάση ένα υγρό, ένα διαλύτη (και όχι αέριο). Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή ακινητοποιημένη επάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Οι μηχανισμοί κατανομής μεταξύ των δυο φάσεων μπορεί να είναι προσρόφηση, ιονανταλλαγή, σχετική διαλυτότητα, στερεο-

παρεμπόδιση κτλ. Ο διαχωρισμός των ουσιών γίνεται σε φυσικές συνθήκες, σαν αυτές που βρίσκονται οι ουσίες στην φύση. Ο διαχωρισμός με την υγρή χρωματογραφία βασίζεται στις διαφορές των ουσιών που οφείλονται στο διαφορετικό μέγεθος, σχήμα, πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων σε διαλύματα.

Συγκεκριμένα τα είδη του χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι:

i) Χρωματογραφία προσρόφησης: οι βασικές αρχές είναι γνωστές από την κλασική χρωματογραφία στήλης και την TLC.

Στατική φάση: σχετικώς πολική (SiO_2 , Al_2O_3 , MgO)

Κινητή φάση: σχετικώς μη πολική (επτάνιο έως THF)

ii) Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

Στατική φάση: σχετικώς μη πολική

Κινητή φάση: σχετικώς πολική (νερό έως διοξάνιο)

iii) Χρωματογραφία υγρού-υγρού διαχωρισμού

Το πορώδες στερεό υπόστρωμα διαβρέχεται με υγρό που είναι αδιάλυτο στην κινητή φάση. Τα μόρια του δείγματος κατανέμονται μεταξύ των φάσεων με τον ίδιο τρόπο όπως κατά την εκχύλιση σε διαχωριστική χοάνη. Όσο περισσότερο διαλυτή είναι μια ένωση στην στατική φάση, τόσο μεγαλύτερο χρόνο θέλει για να εκλουσθεί.

iv) Χρωματογραφία χημικώς διασυνδεδεμένων φάσεων

Η στατική φάση δεν είναι υγρό υμένιο που διαβρέχει ένα πορώδες υπόστρωμα, όπως προηγουμένως, αλλά είναι ομοιοπολικά ενωμένη με το υπόστρωμα (με χημική αντίδραση). Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι η πιο σημαντική της εφαρμογή της.

v) Ιονανταλλακτική χρωματογραφία

Η στατική φάση περιέχει ομάδες ιόντων (πχ NR_3^+ , SO_3^-) που αλληλεπιδρούν με ιοντικές ομάδες των μορίων του δείγματος. Η μέθοδος είναι χρήσιμη για τον διαχωρισμό πχ αμινοξέων, ιοντικών προϊόντων μεταβολισμού και οργανικών ιόντων.

vi) Χρωματογραφία ιοντικών ζευγών

Και αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων και ξεπερνά εγγενή προβλήματα της ιονανταλλακτικής χρωματογραφίας. Τα μόρια του ιοντικού δείγματος καλύπτονται με ένα κατάλληλο αντισταθμιστικό ιόν. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα είναι, πρώτον ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί η υγρή

χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και έτσι δεν απαιτείται ιοναντάλλακτης και δεύτερον, οξέα, βάσεις και ουδέτερα προϊόντα μπορούν να αναλυθούν συγχρόνως.

vii) Ιοντική χρωματογραφία

Αναπτύχθηκε ως μέσο διαχωρισμού ιόντων ισχυρών οξέων και βάσεων (πχ Cl^- , NO_3^- , Na^+ , K^+). Είναι ουσιαστικά μια ειδική περίπτωση της ιονανταλλακτικής χρωματογραφίας αλλά η οργανολογία που χρησιμοποιείται σε αυτή είναι διαφορετική.

viii) Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους

Αυτή μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δυο είδη, στη χρωματογραφία Διήθησης με Πηκτή (με υδατικό διάλυμα) και στη χρωματογραφία Διαπερατότητας Πηκτής (με οργανικούς διαλύτες). Η χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους διαχωρίζει μόρια σύμφωνα με το μέγεθος τους (πχ βάσει της μοριακής τους μάζας) τα μεγάλα μόρια εκλούνται πρώτα και τελευταία τα μικρότερα. Είναι η καλύτερη μέθοδος διαχωρισμού όταν το μίγμα περιέχει ενώσεις διαφορά στη μοριακή μάζα, τουλάχιστον κατά 10%

ix) Χρωματογραφία συγγένειας

Πολύ εξειδικευμένες βιοχημικές αλληλεπιδράσεις προκαλούν το διαχωρισμό. Η στατική φάση περιέχει ειδικές ομάδες μορίων, οι οποίες μπορούν να απορροφήσουν το δείγμα μόνο όταν ικανοποιούνται πολύ συγκεκριμένες στερεοχημικές ή σχετιζόμενες με το φορτίο συνθήκες (πχ αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων). Η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση πρωτεϊνών (πχ ενζύμων), λιπιδίων κλπ από πολύπλοκα μίγματα χωρίς καμία μεγαλύτερη διαδικασία.

Από τις μεθόδους της υγρής χρωματογραφίας, από την άποψη της ποσοτικής ανάλυσης, μεγαλύτερη σημασία παρουσιάζει η υγρή χρωματογραφία επί στήλης (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και χρωματογραφία ιονανταλλαγής), ενώ η χρωματογραφία επί χάρτου και λεπτής στιβάδας βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στους απλούς διαχωρισμούς ουσιών και την ταυτοποίηση αυτών και περιορισμένη εφαρμογή στην ποσοτική ανάλυση.

Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC): Η υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε παλαιότερα για την απομόνωση ουσιών από φυσικά προϊόντα (απομόνωση χρωστικών υλών από φυτά), εγκαταλείφτηκε όμως

εξαιτίας της τεράστιας ανάπτυξης της αέριας χρωματογραφίας. Στις παλαιότερες διατάξεις υγρής χρωματογραφίας, από μια γυάλινη στήλη, γεμάτη με κατάλληλο κοκκώδες στερεό, με ή χωρίς υγρή στιβάδα υγρού διαλύτη, περνούσε με τη δύναμη της βαρύτητας ο υγρός φορέας (κινητή φάση) μαζί με το δείγμα. Η κυριότερη δυσκολία ήταν η μικρή ταχύτητα εκλούσεως των κλασμάτων του δείγματος. Έτσι, εάν οι κόκκοι της στήλης ήταν πολύ μικροί, ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός, η παροχή του υγρού φορέα με τη βαρύτητα ήταν λίγες σταγόνες ανά λεπτό. Για την αύξηση της ταχύτητας ροής δεν ήταν δυνατόν να εφαρμοσθούν υψηλές πιέσεις, διότι οι παλαιότερες στήλες δεν ήταν ανθεκτικές.

Οι χρήσεις της HPLC είναι:

1) Αναλυτική HPLC

- Ποιοτική ανάλυση
- Ποσοτική ανάλυση
- Ανάλυση ιχνοποσοτήτων

2) Παρασκευαστική HPLC

- Συγκέντρωση διαφορετικών συστατικών
- Ανακύκλωση δείγματος

3) Διαχωρισμός εναντιομερών

- Χειραλικές στατικές φάσεις

4) Νέες προοπτικές

- Μικρό-HPLC
- High-Speed, Super-Speed HPLC
- HPLC με «υπερκρίσιμες» κινητές φάσεις

Είναι προφανές ότι για την λειτουργία στηλών με τόσο υψηλές πιέσεις, χρειάζονται διατάξεις με εξειδικευμένα τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Έτσι, σήμερα αναπτύχθηκε και έχει τεράστια εφαρμογή η HPLC. Επειδή η HPLC χρησιμοποιεί κυρίως χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως του φυσικού περιβάλλοντος (τα όρια θερμοκρασίας θέτονται μόνο από το σημείο ζέσεως και το σημείο πήξεως των χρησιμοποιούμενων διαλυτών) βρήκε ευρεία χρήση στο διαχωρισμό ουσιών ευπαθών σε υψηλές θερμοκρασίες. Η συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη: δύο δοχεία (Α και Β) για την αποθήκευση των διαλυτών, που συνδέονται με απαερωτές για την απομάκρυνση του διαλυμένου αέρα. Τα δυο υγρά αναμιγνύονται (ή λαμβάνεται το καθένα ξεχωριστά) με κατάλληλη βαλβίδα

αναμίξεως. Η ανάμιξη των δυο διαλυτών μπορεί να προγραμματισθεί, αλλάζοντας προοδευτικά κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, τις αναλογίες αναμίξεως με τον κατάλληλο κινητήρα ελέγχου της βαλβίδας αναμίξεως. Κατόπιν το μίγμα των διαλυτών αντλείται με μεγάλη πίεση και οδηγείται στον θάλαμο διαχωρισμού, που έχει σταθερή θερμοκρασία. Ο υγρός φορέας πρώτα περνά μέσα από ένα ελικοειδή σωλήνα για να αποκτήσει τη θερμοκρασία του θαλάμου και κατόπιν μέσα από την προστήλη, που έχει ακριβώς τα ίδια υλικά με την κυρίως στήλη. Ο κυριότερος σκοπός της προστήλης είναι ότι δρα ως ένα χημικό φίλτρο και έτσι απομακρύνονται ισχυρώς κατακρατούμενες ενώσεις που είναι δυνατό να κορέσουν την αναλυτική στήλη και να ελαττώσουν την διάρκεια ζωής της. Το μήκος τους είναι μεταξύ 1-5 cm και διατίθενται ως φυσίγγια μιας χρήσεως. Το δείγμα εισάγεται στην κυρίως στήλη με σύριγγα και το έκλουσμα της στήλης οδηγείται από την μια πλευρά ενός διαφορικού ανιχνευτή προς τον συλλέκτη κλασμάτων ή στο δοχείο απορρίψεως των δειγμάτων. Το διάλυμα αναφοράς για τον ανιχνευτή είναι ένα μέρος του υγρού φορέα, ακριβώς ίδιο πριν αναμιχθεί με το δείγμα. Τα σπουδαιότερα μέρη της παραπάνω διατάξεως περιγράφονται παρακάτω, δηλαδή οι αντλίες, στήλες, σύστημα βαθμιαίας εκλούσεως και ανιχνευτές.

Αντλίες: Η υψηλή πίεση, που πρέπει να εφαρμοσθεί στην υγρή κινητή φάση για να διέλθει από τη στήλη με ικανοποιητική ταχύτητα, μπορεί να ληφθεί είτε με αντλία είτε με κύλινδρο πεπιεσμένου αζώτου, αντλίες μεμβράνης, ασυνεχούς εκτόπισης ή πνευματικού ενισχυτή. Περισσότερο χρησιμοποιούνται οι αντλίες με κινητήρα, που παρέχουν σταθερή ροή και χωρίς διακυμάνσεις. Η απαίτηση αυτή είναι απαραίτητη για τις περιπτώσεις εκείνες που χρησιμοποιούνται ανιχνευτές συγκεντρώσεως, των οποίων η ακρίβεια της μέτρησης εξαρτάται από την ταχύτητα ροής του υγρού φορέα.

Οι αντλίες πρέπει:

- να παρέχουν σταθερή ταχύτητα ροής, χωρίς παλμούς
- να έχουν λίγα κινητά μέρη, που είναι επικίνδυνο να εκτοξευθούν
- λειτουργούν με υψηλές πιέσεις
- να είναι ανθεκτικές και εύκολες στη χρήση και συντήρηση
- να είναι περισσότερες της μια για βαθμιδωτή έκλυση

Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος: Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος περιέχει ένα βαθμονομημένο βρόγχο, έτσι ώστε να εισάγεται σταθερός και επαναλήψιμος όγκος δείγματος κάθε φορά. Ο βρόγχος μπορεί να γεμισθεί με χρήση μιας συνηθισμένης σύριγγας και ακολούθως το δείγμα θα πρέπει να εκχυθεί (όσο το δυνατόν ακαριαία) στην κινητή φάση. Η έκχυση γίνεται συνήθως με χειροκίνητη περιστροφή του μοχλού της βαλβίδας.

Στήλες: Η ισχύς της μεθόδου της HPLC πηγάζει από την πληθώρα των διαχωρισμών που διεκπεραιώνονται με ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Οι στήλες της HPLC συχνά αναφέρονται ως η καρδιά του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Επίτευξη ενός διαχωρισμού σημαίνει πλήρη κατανόηση των φυσικών και χημικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα μέσα στη χρωματογραφική στήλη. Για να γίνει αυτό απαιτείται γνώση της παρασκευής των πληρωτικών υλικών και του τρόπου πλήρωσης των στηλών. Γενικότερα, η επιτυχία μιας ανάλυσης καθορίζεται από την επιλογή της στήλης, το συνδυασμό της στατικής με την κινητή φάση και τις συνθήκες λειτουργίας του χρωματογραφικού συστήματος. Υπάρχουν δυο κατηγορίες στηλών, οι αναλυτικές και οι παρασκευαστικές. Οι στήλες είναι κατασκευασμένες από χάλυβα ή γυαλί, έχουν συνήθως 1-6 mm εσωτερική διάμετρο και 10-100 cm μήκος. Οι μικρού μήκους στήλες είναι ευθύγραμμες, ενώ του μεγάλου μήκους (μέχρι και 600 mm) είναι ελικοειδείς. Το εσωτερικό των στηλών δεν πρέπει να παρουσιάζει ανώμαλες επιφάνειες, ραβδώσεις ή μικροπορώδεις σχηματισμούς για αυτό και οι σωληνώσεις πρέπει να γυαλίζονται και να λειαινούνται κατά την κατασκευή τους. Οι τραχιές επιφάνειες μπορούν να οδηγήσουν σε δέκα φορές μικρότερο αριθμό θεωρητικών πλακών. Η χρήση των στηλών με μικρή διάμετρο (2 mm) παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις μεγαλύτερης διαμέτρου στήλες, τα οποία είναι:

- 1) Όταν η διάμετρος της στήλης μειώνεται δυο φορές, το σήμα του ανιχνευτή ενός συστατικού του δείγματος αυξάνει περίπου τέσσερις φορές. Η κατανάλωση του διαλύτη μειώνεται κατά τέσσερις φορές, επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο υψηλής καθαρότητας διαλύτες.
- 2) Η πυκνότητα πληρώσεως είναι πιο ομοιογενής
- 3) Είναι δυνατό να χρησιμοποιήσουμε μικρότερα σωματίδια υλικού πληρώσεως χωρίς να υπερβούμε τις συνήθεις πιέσεις που χρησιμοποιούνται

- 4) Είναι δυνατό να ενώσουμε πολλές μικρού μήκους στήλες για να αυξήσουμε το συνολικό μήκος της στήλης χωρίς να υπάρχει απώλεια αποδοτικότητας και οι βαθμιδώσεις στην στήλη να είναι μικρότερες

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας λειτουργούν στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, σπανιότερα σε υψηλές θερμοκρασίες. Η ταχύτητα διαχύσεως και συνεπώς η ταχύτητα διαχωρισμού αυξάνεται κατά κάποιο τρόπο με τη θερμοκρασία της στήλης.

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι: η διαχωριστικότητα, η ταχύτητα και η χωρητικότητα. Η διαχωριστικότητα αυξάνει σε βάρος της ταχύτητας και της χωρητικότητας. Η ταχύτητα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη ώστε να επιτυγχάνεται ο ελάχιστος χρόνος ανάλυσης, ενώ η χωρητικότητα της στήλης είναι σημαντική στην περίπτωση που ο αναλυτής επιθυμεί να συλλέξει υλικό για περαιτέρω ανάλυση. Τα όρια ανίχνευσης που καθορίζονται από τον ανιχνευτή θέτουν περιορισμούς στο ελάχιστο μέγεθος του χρησιμοποιούμενου δείγματος.

Άλλη μια σημαντική παράμετρος είναι το μήκος της στήλης. Διπλασιάζοντας το μήκος διπλασιάζεται η συγκράτηση των ουσιών και ο διαχωρισμός των ζωνών. Είναι γνωστό ότι η διαχωριστικότητα είναι ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του μήκους της στήλης. Οι στήλες της HPLC έχουν μήκος 25-100 cm. Αυτό καθορίζεται από την επιζητούμενη διαχωριστικότητα, το χρόνο, την πίεση και το μέγεθος του δείγματος. Στήλες χαμηλής χωρητικότητας συχνά υπερφορτώνονται προκειμένου να αποκριθεί ο ανιχνευτής. Σε αυτή την περίπτωση απαιτείται αύξηση του μήκους της στήλης ούτως ώστε να επιτυγχάνεται η αναγκαία διαχωριστικότητα. Μεγάλη ταχύτητα διαχωρισμού είναι εφικτή με στήλες μικρού μήκους, αρκεί να λαμβάνεται η απαιτούμενη διαχωριστικότητα κορυφών και να εξασφαλίζεται η ομαλή λειτουργία του συστήματος.

Η διάμετρος της στήλης είναι 2-4 mm για αναλυτικούς σκοπούς και 8-10 mm για παρασκευαστική χρωματογραφία με δείγματα της τάξης των 10-1000mg. Η χωρητικότητα της στήλης σε δείγμα είναι ανάλογη του τετραγώνου της διαμέτρου της. Ανώτατο όριο της εσωτερικής διαμέτρου των αναλυτικών στηλών είναι τα 12 mm.

Οι στήλες της HPLC πληρούνται με μικρά σωματίδια της στατικής φάσης, παρόμοιου κατά το δυνατόν μέγεθος. Με τη χρήση μικροσωματιδιακού υλικού επιτυγχάνεται η άντληση της φάσης μέσα από την στήλη κάτω από συνθήκες υψηλής πίεσης. Η συμπεριφορά μιας στήλης εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την επιλογή του μεγέθους των σωματιδίων πλήρωσης και του μήκους της. Η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο στενή (με μια αναλογία διαμέτρων μεταξύ των μικρότερων και μεγαλύτερων σωματιδίων της τάξης του 1:1,5 ή 1:2) Αυτό οφείλεται στο ότι τα μικρά μόρια καθορίζουν το διαπερατό της στήλης, ενώ τα μεγάλα τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Τα μικρά παράγουν μια υψηλή αντίσταση ροής και τα μεγάλα είναι υπεύθυνα σε μεγάλο βαθμό για τη διεύρυνση της ζώνης της εν διαλύσει ουσίας.

Τα χρωματογραφικά υλικά πλήρωσης διατίθενται σε δυο σχήματα σωματιδίων, τα ακανόνιστα και τα σφαιρικά. Η πλειοψηφία των πληρωτικών υλικών που χρησιμοποιούνται για αναλυτικές εφαρμογές, αποτελούνται από σφαιρικά σωματίδια. Η υψηλή απόδοση, η καλή σταθερότητα της στήλης και η χαμηλή πίεση που δημιουργούν επιτυγχάνονται με επαναλήψιμο τρόπο. Τα πληρωτικά υλικά βασίζονται είτε σε ανόργανα κεραμικά είτε σε οργανικά πολυμερή υποστρώματα. Τα ανόργανα κεραμικά είναι κατεξοχήν το διοξείδιο του πυριτίου και του αργιλίου. Τα ανόργανα πληρωτικά υλικά είναι άκαμπτα και δεν παραμορφώνονται με την χρήση διαλυτών. Τα πολυμερή πληρωτικά υλικά που είναι κατάλληλα για την χρήση στην HPLC βασίζονται σε διασταυρούμενα στυρόλιο-διβινυλοβενζόλιο ή μεθακρυλικούς εστέρες. Αυτά δεν είναι άκαμπτα όπως τα ανόργανα πληρωτικά υλικά, αλλά συμπιεστά και διαβρέχονται από τους διαλύτες και τις προσδιοριζόμενες ουσίες, αποτέλεσμα να παραμορφώνονται και να προκαλούν μικρή απόδοση στις στήλες. Τα κυριότερα υλικά πλήρωσης είναι:

- Διοξείδιο του πυριτίου. Είναι το βασικό υλικό πλήρωσης για τις περισσότερες χρωματογραφικές στήλες. Εκτός της φυσικής του αντοχής, παρέχει κατάλληλη επιφάνεια πάνω στην οποία προσδένεται πληθώρα υποκαταστατών χρησιμοποιώντας την διαδικασία της σιλανοποίησης. Η αδυναμία τους είναι είναι η μειωμένη σταθερότητα σε υδατικές αλκαλικές φάσεις.
- Οξείδιο του αργιλίου. Έχει παρόμοιες ιδιότητες με το διοξείδιο του πυριτίου με επιπρόσθετο πλεονέκτημα τη συμβατικότητα του με κινητές φάσεις

ευρύτερης περιοχής τιμών pH. Η διαφορά του είναι ότι δεν μπορούν να προσδεθούν υποκαταστάτες.

- Οξείδιο του ζirkονίου. Είναι πολύ ανθεκτικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλους τους προσδιορισμούς σε περιοχή pH από 1-14 και θερμοκρασίες μέχρι και 100^o C, με την προϋπόθεση ότι τα σφαιρικά του μικροσωματίδια είναι επικαλυμμένα με πολυμερη για την αποφυγή προσρόφησης του διοξειδίου του άνθρακα, των φωσφορικών, των καρβονυλικών και των σουλφονικών οξέων.

- Άνθρακας με δομή γραφίτη. Έχει εξαιρετική σταθερότητα σε ευρεία περιοχή τιμών pH και θερμοκρασίας. Χρησιμοποιείται κατεξοχήν στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως. Μειονέκτημα του είναι η μικρότερη του απόδοση και η μεγαλύτερη του ευπάθεια. Επίσης απαιτεί τη χρήση διαλυτών υψηλής καθαρότητας λόγω της μεγάλης προσροφητικότητας του.

- Πυριτικό άλας του μαγνησίου. Πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή διότι οξείες αρωματικές, αμίνες, εστέρες κ.α. μπορεί να αντιδράσουν χημικά με αυτή τη στατική φάση

- Ύαλος ελεγχόμενου πόρου. Σχηματίζεται με απομάκρυνση των συστατικών της βοροπυριτικής υάλου. Αυτό το υλικό έχει σταθερή πίεση, εξαιρετική χημική σταθερότητα και μπορεί να αποστειρωθεί.

- Υδροξυαπατίτης. Είναι το εξαγωνικό κρυσταλλούμενο φωσφορικό ασβέστιο. Παρασκευάζεται σε μορφή που είναι σταθερή στην πίεση και είναι κατάλληλο για διαχωρισμούς πρωτεϊνών.

- Πολυμερή . Προϊόντα πολυμερισμού βασισμένα στο στυρόλιο-διβινυλοβενζόλιο και σε μεθακρυλικούς εστέρες είναι συμβατά με τις πιέσεις που αναπτύσσονται στην HPLC. Το ανώτατο όριο πίεσης που αντέχουν είναι μικρότερο από αυτό των περισσότερων ανόργανων πληρωτικών υλικών. Υπόκεινται σε παραμορφώσεις κατά την αλλαγή της κινητής φάσης, λόγω της διείσδυσης των διαλυτών και των μικρών μορίων μέσα στη μάζα του. Η μεταφορά των μικρών μορίων είναι βραδύτερη, αυτό οδηγεί σε μικρότερη απόδοση διαχωρισμού. Για μεγάλα μόρια όμως η συμπεριφορά των πολυμερών είναι συγκρίσιμη με αυτή των ανοργάνων.

- Πηκτή από πολυμερισμένο υδροξυαλκυλμεθακρυλικό εστέρα. Ο μεγάλος αριθμός -OH, καθιστά το προϊόν πολύ πολικό και μπορεί να

χρησιμοποιηθεί όπως είναι για διήθηση πηκτής και κάποια παράγωγα του στη χρωματογραφία συγγένειας.

- Αγαρόζη . Είναι ένας διασταυρούμενος πολυσακχαρίτης και είναι σταθερός σε όλη την περιοχή των τιμών pH (1-14)
- Στατικές φάσεις με επιφάνειες περιορισμένης προσέγγισης. Είναι κατάλληλες για αναλύσεις φαρμάκων και μεταβολιτών σε πλάσμα αίματος ή άλλα βιολογικά υγρά. Εάν επιλεγούν καταλλήλως το pH και η ιοντική ισχύς της κινητής φάσης, δεν κατακρατούν τις πρωτεΐνες και εμφανίζουν καλή εκλεκτικότητα για μικρά και μεσαίας πολικότητας μόρια.

Οι απαιτήσεις ενός συγκεκριμένου διαχωρισμού καθορίζουν συνήθως τον τύπο και τα χαρακτηριστικά της στήλης που θα χρησιμοποιηθεί (το μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού, το μήκος, την εσωτερική διάμετρο της στήλης κ.α.). Οι κυριότερες πληροφορίες για μια στήλη που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είναι:

- Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών N
- Ο συντελεστής ασυμμετρίας της χρωματογραφικής κορυφής
- Η τιμή της εκλεκτικότητας για δυο προσδιοριζόμενες ουσίες
- Η πίεση της στήλης
- Η επαναληψιμότητα της συγκράτησης
- Η συγκέντρωση της χημικά διασυνδεδεμένης φάσης
- Η σταθερότητα της στήλης

Γενικά επιλέγεται στήλη, το υλικό της οποίας να είναι χημικά παρόμοιο με εκείνα τα τμήματα των προς διαχωρισμό ουσιών τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους. Εάν είναι γνωστά κάποια στοιχεία σχετικά με την συμπεριφορά του δείγματος, η επιλογή της στήλης γίνεται με βάση το διαλύτη στον οποίο έχει διαλυτοποιηθεί το δείγμα

Σύστημα βαθμιαίας έκλουσης: Η μεταβολή της συστάσεως του διαλύτη προκαλεί μεταβολή στους συντελεστές κατανομής μάζας των ουσιών και συνεπώς βελτιώνει τη διαχωριστικότητα. Έτσι, οι κορυφές είναι καλύτερα διαχωρισμένες, ενώ οι τελευταίες εξ αυτών στο χρωματογράφημα δεν έχουν μεγάλη διεύρυνση. Η σύσταση του διαλύτη αλλάζει προοδευτικά κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, με

τη βοήθεια μιας προγραμματιζόμενης βαλβίδας αναμίξεως. Οι μιγνυόμενοι διαλύτες μπορεί να έχουν διαφορετική πολικότητα ή ιοντική ισχύ ή pH.

Ανιχνευτές: Οι σπουδαιότεροι ανιχνευτές είναι οι φωτομετρικοί, δείκτη διαθλάσεως, ηλεκτροχημικοί, ραδιενέργειας κ.α. Τα κυριότερα είδη ανιχνευτών είναι:

- Φασματομετρικός ανιχνευτής (ορατού-υπεριώδους)
- Φθορισμομετρικός ανιχνευτής
- Ανιχνευτής του δείκτη διάθλασης
- Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής
- Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών
- Αγωγιμομετρικός
- Φωτο-αγωγιμομετρικός
- IR
- Ραδιοενεργοί
- Σκέδασης του φωτός

Ο χρόνος αποκρίσεως του ανιχνευτή είναι μια κριτική παράμετρος του και θα πρέπει να είναι τουλάχιστον δέκα φορές μικρότερο του εύρους της κορυφής μιας ουσίας (σε μονάδες χρόνου), αλλιώς είναι δυνατό να γίνει παραμόρφωση της κορυφής. Η χρονοσταθερά του ανιχνευτή είναι επιθυμητό να είναι μικρότερη των 0,3 sec για στήλες με μικρά σωματίδια και μεγάλης αποδοτικότητας.

Άλλα επιθυμητά χαρακτηριστικά των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία, όταν πρόκειται να γίνει ποσοτική ανάλυση των συστατικών του δείγματος είναι η ύπαρξη γραμμικότητας μεταξύ σήματος και συγκεντρώσεως ή μάζας (για ανιχνευτές συγκεντρώσεως ή μάζας, αντίστοιχα) και η γραμμική δυναμική περιοχή του πρέπει να είναι ευρεία, έτσι ώστε, κύρια και ευρισκόμενα σε ίχνη συστατικά να προσδιοριστούν με μια μόνο ανάλυση. Επίσης κατά την εκλογή του ανιχνευτή το όριο ανιχνεύσεως του είναι μια σημαντική παράμετρος του, καθόσον το δείγμα υφίσταται σημαντική αραιώση κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό.

Τα επιθυμητά (βασικά) χαρακτηριστικά των ανιχνευτών είναι τα εξής:

- Ευαισθησία στην συγκέντρωση ή τη μάζα

- Ειδικευση
- Μειωμένο θόρυβο
- Ευαισθησία
- Ολίσθηση μικρή
- Μεγάλη γραμμική περιοχή
- Μικρός όγκος της κυψελίδας ανίχνευσης (για να μη συνεισφέρει στη διεύρυνση των κορυφών)
- Εύκολος στο χειρισμό

Οι φωτομετρικοί ανιχνευτές, βασίζονται στη μέτρηση της απορροφήσεως του διαλύματος στο ορατό ή υπεριώδες μέρος του φάσματος και είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι. Η κυριότερη δυσκολία είναι η κατασκευή του οπτικού συστήματος, ώστε να είναι κατάλληλο να περνά αρκετή ακτινοβολούσα ενέργεια μέσα από τις στενές κυψελίδες απορροφήσεως. Η διάμετρος της κυψελίδας είναι συνήθως, 1 mm, για να αποφεύγονται κενά διαστήματα που έχουν ως συνέπεια να ελαττώσουν την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού. Ενδιαφέροντα μήκη κύματος είναι το 254 ή 280 nm, όπου απορροφούν όλες οι αρωματικές ενώσεις, οι δε συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας είναι μεγάλοι, ώστε να μπορούν να ανιχνεύονται μικροποσότητες ουσιών, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας.

Οι φθορισμομετρικοί ανιχνευτές χρησιμοποιούν ως μήκος διεγέρσεως των φθοριζουσών ουσιών, συνήθως, το 280 ή 290 nm. Γενικώς οι ανιχνευτές αυτοί είναι πιο ευαίσθητοι και εκλεκτικοί των φωτομετρικών. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην εκλογή της κινητής φάσης ώστε να μην προκαλεί απόσβεση φθορισμού. Οι ανιχνευτές αυτού του είδους χρησιμοποιούν έναν ανιχνευτή αντιδράσεως και βρίσκουν εφαρμογή στο διαχωρισμό και ανάλυση των πρωτεϊνών και αμινοξέων. Δηλαδή το έκλουσμα από την στήλη αναμειγνύεται με ένα αντιδραστήριο και δίδει ένα προϊόν, που φθορίζει ισχυρώς στα 475 nm, όταν διεγείρεται στα 390 nm.

Από τους ανιχνευτές που προαναφέρθηκαν ενδιαφέρον για την παρούσα εργασία παρουσιάζει ο ανιχνευτής του δείκτη διάθλασης. Αυτός ο ανιχνευτής συγκρίνει το δείκτη διάθλασης του εκλούσματος της στήλης με το δείκτη διάθλασης του καθαρού υγρού φορέα. Όταν μια ουσία είναι στο έκλουσμα, προκαλεί μεταβολή στο δείκτη διαθλάσεως και το προκαλούμενο σήμα καταγράφεται. Οι

ανιχνευτές του δείκτη διάθλασης είναι λιγότερο ευαίσθητοι από τους φωτομετρικούς ανιχνευτές και απαιτούν καλύτερο έλεγχο της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ροής.

1.2.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infra-Red, FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infra Red 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 υπέρυθρη 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) (Πολυσιού, 1989). 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 υπερύθρου. 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:

ταχύτητα = c (ταχύτητα του φωτός) = 3×10^8 m/sec

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).

Μερικοί κυματαριθμοί με το αντίστοιχο μήκος κύματος, τη συχνότητα και την ενέργεια τους φαίνονται στον Πίνακα 1.2.2.1.

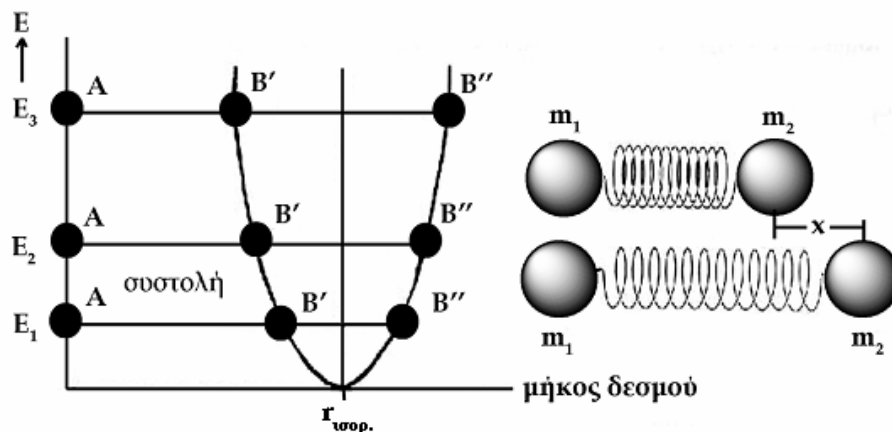
Πίνακας 1.2.2.1 Κυματαριθμοί, μήκη κύματος, συχνότητες και ενέργεια σε σημεία του υπέρυθρου φάσματος.

$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	λ (nm)	ν (10^{12} Hz)	E (eV)
200	50	5.996	0.02479
500	20	14.99	0.06199
1000	10	29.98	0.12398
2000	5	59.96	0.24797
5000	2	149.9	0.61922
10,000	1	299.8	1.23984

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 $r_{ισορ.}$ για να μεταφερθεί ο δεσμός σε συστολή ή διαστολή σε μήκος δεσμού r' πρέπει να προσφερθεί ενέργεια ίση με

$$E = \frac{1}{2} f (r - r_{ισορ.})^2 \quad \text{Εξίσωση 1 Νόμος του Hooke}$$

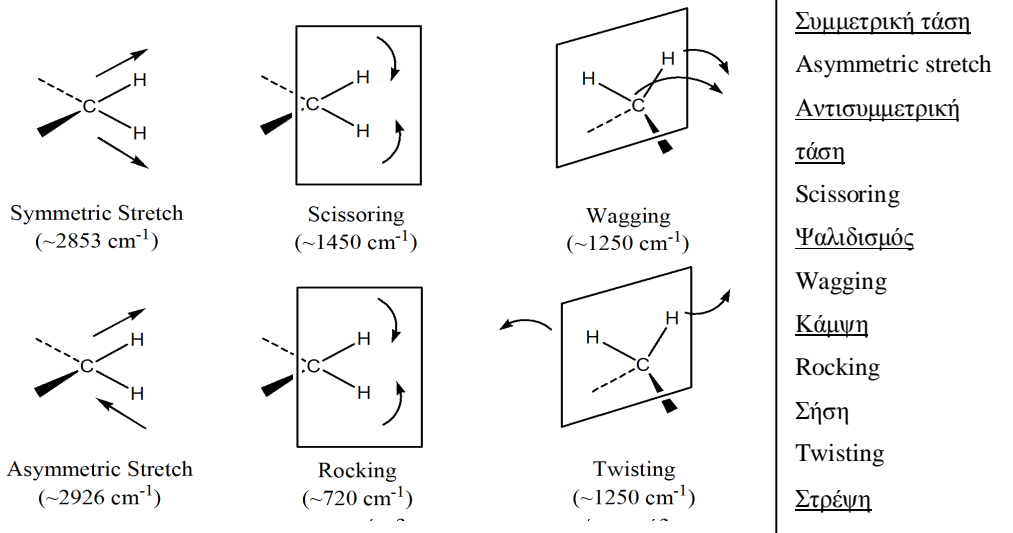
Η ενέργεια αυτή προσφέρεται από το περιβάλλον στο δεσμό μέσω της υπέρυθρης ακτινοβολίας και αναγκάζει το δεσμό σε ταλάντωση. Η ενέργεια που απορροφά ο δεσμός εξαρτάται από την συχνότητα της ακτινοβολίας (κάθε δεσμός δεν απορροφά σε όλα τα μήκη κύματος) και από την διπολική ροπή του μορίου.



Σχήμα 1.2.2.1 Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης μεταξύ του μήκους του δεσμού και της περιεχόμενης δυναμικής ενέργειας στον απλό αρμονικό ταλαντωτή

Στο Σχήμα 1.2.2.1 παρουσιάζεται σχηματικά η σύνδεση μεταξύ του μήκους του δεσμού και της περιεχόμενης δυναμικής ενέργειας στον απλό αρμονικό ταλαντωτή. Βέβαια, στο επίπεδο των δονήσεων των μορίων δεν ισχύουν οι απλές αυτές σχέσεις αλλά πιο πολύπλοκες που αφορούν διαμοριακές μαγνητικές και ηλεκτροστατικές επιδράσεις καθώς και δονήσεις που δεν είναι απλές συσπειρώσεις και επιμηκύνσεις δεσμών αλλά περισσότερα είδη δονήσεων που συμβαίνουν στα μόρια που δέχονται υπέρυθη ακτινοβολία.

Είδη δονήσεων είναι:



Σχήμα 1.2.2.2 Σχηματική απεικόνιση δονήσεων μεταξύ ατόμων άνθρακα υδρογόνου με τους αντίστοιχούς κυματαριθμούς

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 διαφορετικά 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).

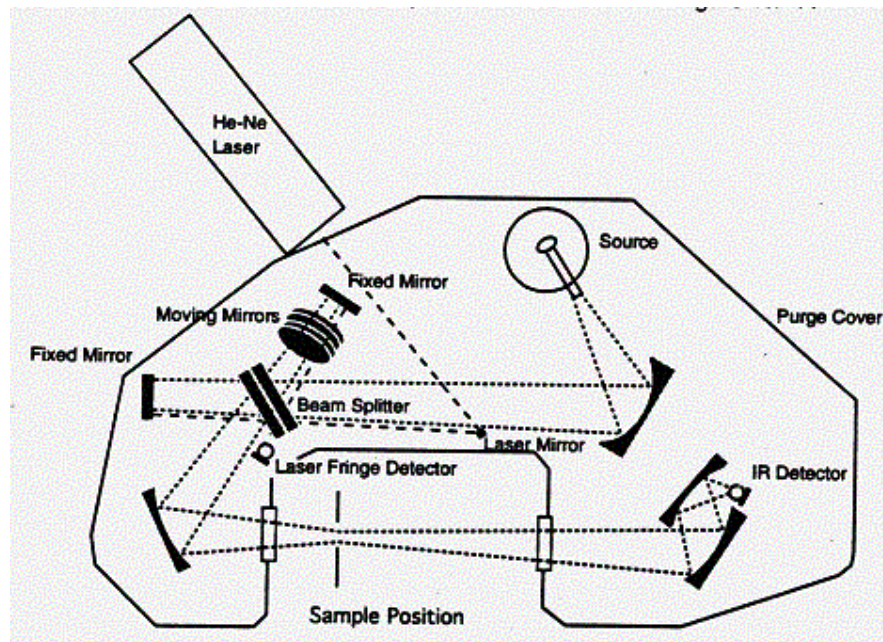
Όπως θα δούμε παρακάτω, στην πρακτική εφαρμογή της λήψης φάσματος IR παρουσιάζονται ζητήματα που περιλαμβάνουν την ουσία των ιδιοτήτων που εκμεταλλευόμαστε από την υπέρυθρη φασματοσκοπία. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε η χρήση μαθηματικής μετατροπής των ψηφιακών δεδομένων γνωστή και σαν μετατροπή βασισμένη 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. Το όργανο αυτό περιγράφεται παρακάτω.

Οργανολογία φασματοφωτομέτρου FT-IR Nicolet 750 Magna series

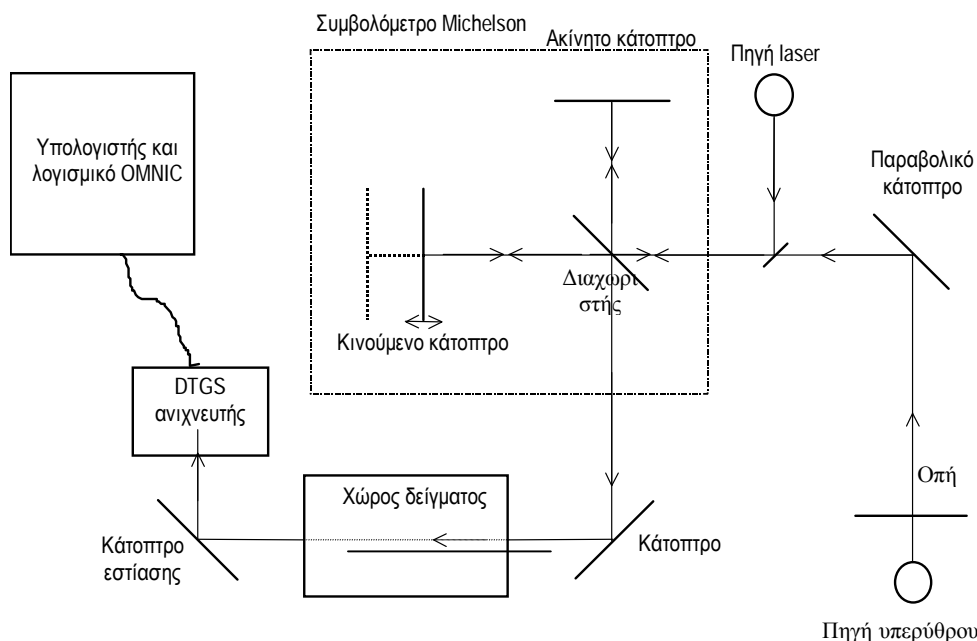
Το φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα:

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

Στο Σχήμα 1.2.2.4 φαίνεται το σχηματικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου FT-IR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series).



Σχήμα 1.2.2.3 Σχηματική απεικόνιση του φασματοφωτομέτρου FT-IR



Σχήμα 1.2.2.4 Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series).

Πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας

Η λυχνία νικελίου - χρωμίου (Nicrome) 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 - υπερύθρου. Τα 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

συμβολόμετρου Michelson. Ονομάστηκε έτσι προς τιμή του ανθρώπου που το κατασκεύασε (1891) και ασχολήθηκε με τη διαίρεση μιας φωτεινής δέσμης σε δύο.

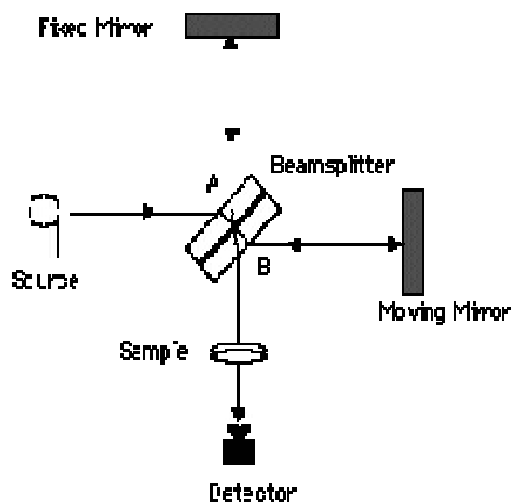
Το συμβολόμετρο αποτελείται από μία ημιδιαφανή πλάκα (το διαχωριστή δέσμης) κατασκευασμένη από βρωμιούχο κάλιο, που δεν απορροφά στο υπέρυθρο, και δύο κάτοπτρα. Το ένα είναι σταθερό και το άλλο κινείται με σταθερή ταχύτητα (Βαλαβανίδης, 2006).

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).

Τρόπος λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου FTIR.



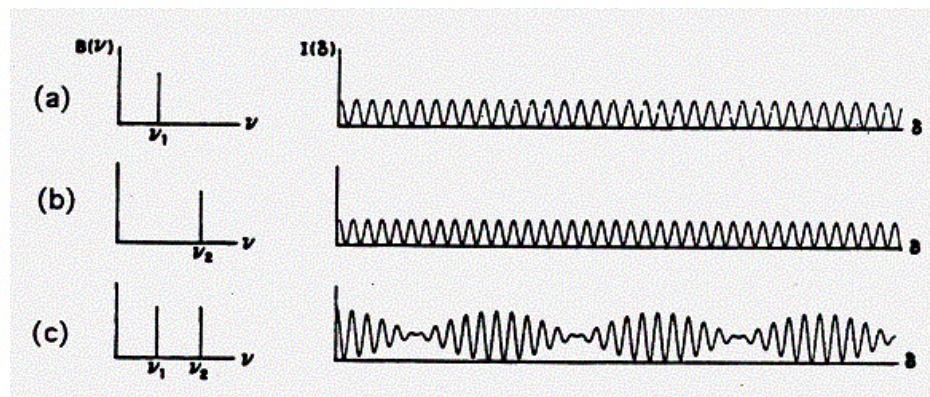
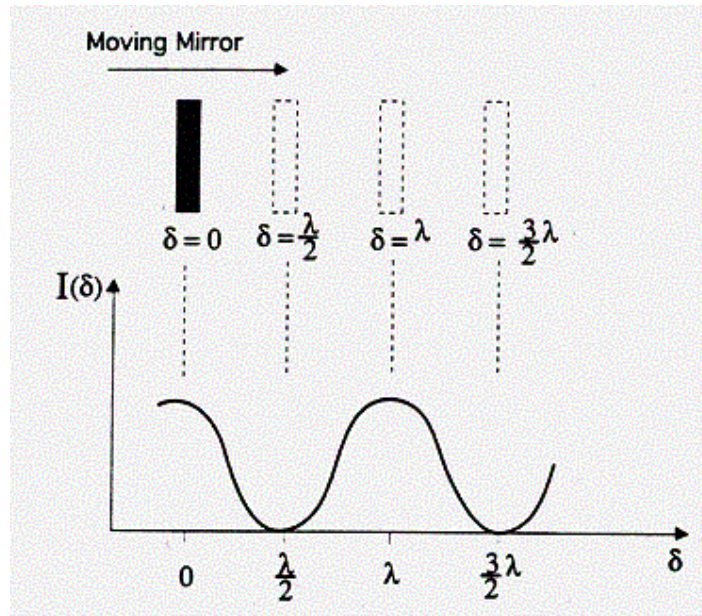
Σχήμα 1.2.2.5 Λεπτομέρεια του Michelson Interferometer

Απο την πηγή εκπέμπεται μια λεπτή δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας μέσω του διαφράγματος. Το διάφραγμα είναι διαφόρων διαβαθμίσεων και μεταβλητού ανοίγματος ώστε να επιτρέπει την διέλευση μιας ακτίνας φωτός και ανοιγοκλείνει σε τακτά χρονικά διαστήματα που ορίζονται από το πρόγραμμα χειρισμού σαν “aperture”.

Η ακτίνα αυτή διερχόμενη από τον διαχωριστή δέσμης χωρίζεται σε δύο ίσης έντασης και συχνότητας ακτίνες μιας και το υλικό από το οποίο αποτελείται ο διαχωριστή δέσμης (KBr) δεν απορροφά στο υπέρυθρο. Τα δύο τμήματα της ακτινοβολίας προσπίπτουν το ένα (A) στο σταθερό και το άλλο (B) στο κινητό κάτοπτρο. Όταν ξαναενωθούν οι δύο ακτίνες, στο σημείο συμβολής τους δημιουργείται μια νέα ακτίνα με ανασυνδυασμένη συχνότητα και ένταση. Ο συνδυασμός αυτός ορίζεται σαν Διαφορά της Οπτικής Διαδρομής (Optical Path Difference, OPD) και η καθυστέρηση δ υπολογίζεται σαν το διπλάσιο της μετατόπισης του κινητού κατόπτρου.

Όταν η θέση του κατόπτρου είναι τέτοια ώστε οι δύο ακτίνες να διανύουν την ίδια ακριβώς διαδρομή από τον διαχωριστή δέσμης στο κάτοπτρο και πίσω, τότε συγχρονίζονται και αλληλοενισχύονται. Αυτό συμβαίνει και όταν η καθυστέρηση δ είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος ($\delta = n\lambda$). Έτσι, η συνάρτηση της ενέργειας που φτάνει στον ανιχνευτή με την καθυστέρηση δ , $I(\delta)$ παρουσιάζει τοπικό μέγιστο. Αντίθετα, όταν υπάρχει διαφορά φάσης κατά 180° ή αλλιώς η οπτική διαδρομή της ακτίνας A από την ακτίνα B διαφέρουν κατά ακέραιο

σύν μισό του μήκους κύματος $\left(n + \frac{1}{2}\right)\lambda$, όπου n ακέραιος αριθμός και εκμηδενίζουν η μία την άλλη. Αντίστοιχα, η μετρούμενη από τον ανιχνευτή ενέργεια είναι η ελάχιστη. Η κίνηση του κινητού κατόπτρου σε όλη τη διαδρομή δίνει σαν αποτέλεσμα το ιντερφερόγραμμα όπως φαίνεται σχηματικά και στις παρακάτω εικόνες. Άρα, η συνάρτηση της έντασης που φτάνει στον ανιχνευτή, $I(\delta)$, με την καθυστέρηση είναι συνεχής (Βαλαβανίδης, 2006)

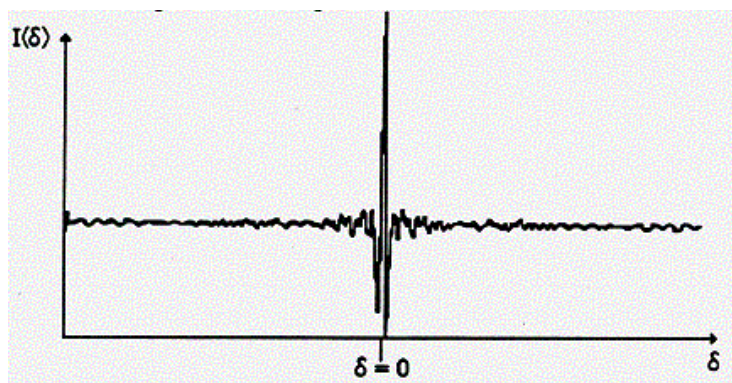
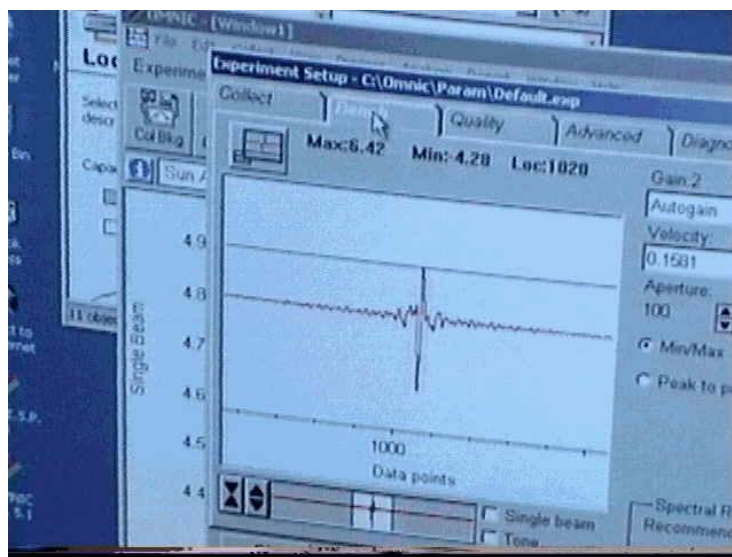


Σχήμα 1.2.2.6 Σχηματική απεικόνιση συμβολής μονοχρωματικών ακτινοβολιών

Με την κίνηση του κινητού κατόπτρου, τα κύματα δίνουν ενισχυτικές και καταστροφικές συζεύξεις σε όλο το μήκος της διαδρομής και αποτέλεσμα αυτού

του γεγονότος είναι η δημιουργία του ιντερφερογραφήματος το οποίο είναι ουσιαστικά η γραφική παράσταση της συνάρτησης της ενέργειας που φτάνει στον ανιχνευτή εκφρασμένη σε volt τάσης όπως αυτή δημιουργείται, σε συνάρτηση με την μετακίνηση του κατόπτρου σε cm. Το μετρήσιμο μέγεθος για την μετακίνηση είναι η καθυστέρηση δ .

Βέβαια η πηγή του IR είναι πολυχρωματική και εκπέμπει ένα ορισμένο αλλά άπειρο πλήθος μηκών κύματος που συμβάλουν και αντισυμβάλλουν με άπειρους αλλά προβλέψιμους συνδυασμούς. Αποτέλεσμα της συμβολής πολυχρωματικής ακτινοβολίας είναι το ιντερφερογράμμα που παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.2.2.7



Σχήμα 1.2.2.7 Τυπικά ιντερφερογράμματα υπερύθρου

Το ιντερφερογράφημα μετρείται με την καταγραφή του σήματος του ανιχνευτή σε συνάρτηση με την διαφορά στη διαδρομή που διανύουν οι δύο

ακτίνες. Το σήμα που καταγράφεται πρέπει να έχει κάποια σημεία αναφοράς στα οποία να είναι γνωστή η θέση του κινητού κατόπτρου και εκεί να λαμβάνονται μετρήσεις. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση ενός λέιζερ που χρησιμεύει σαν αναφορά, και ακολουθεί την ακτίνα Β που προσπίπτει στο κινητό κάτοπτρο. Η μονοχρωματική ακτίνα του λέιζερ δημιουργεί και αυτή ένα ιντερφερογράφημα που ανιχνεύεται από άλλο ανιχνευτή. Το σήμα του ανιχνευτή αυτού είναι ημιτονοειδές και στα μέγιστα του καταγράφεται το ιντερφερόγραμμα του IR με μεγάλη επαναληψιμότητα κάθε φορά σε σταθερά σημεία του κατόπτρου. Αλλιώς μπορεί κανείς να συνδέσει τα μέγιστα του σήματος του ανιχνευτή λέιζερ με δεδομένες θέσεις του κατόπτρου.

Το ιντερφερόγραμμα περιέχει όλες τις πληροφορίες που ζητάμε από το φάσμα υπερύθρου, όμως δεν είναι κατανοητές με την μορφή αυτή. Για να μετατραπούν οι πληροφορίες σε πιο επεξεργάσιμη και κατανοητή μορφή χρησιμοποιείται ο μαθηματικός τρόπος του μετασχηματισμού κατά Fourier. Με το μετασχηματισμό αυτό, που γίνεται με την εξίσωση

$$B(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d\delta$$

ή στην μορφή που εφαρμόζεται στην φασματοσκοπία και αποδίδεται στους Cooley και Tukey

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) e^{-i2\pi\bar{\nu}\delta} d\delta$$

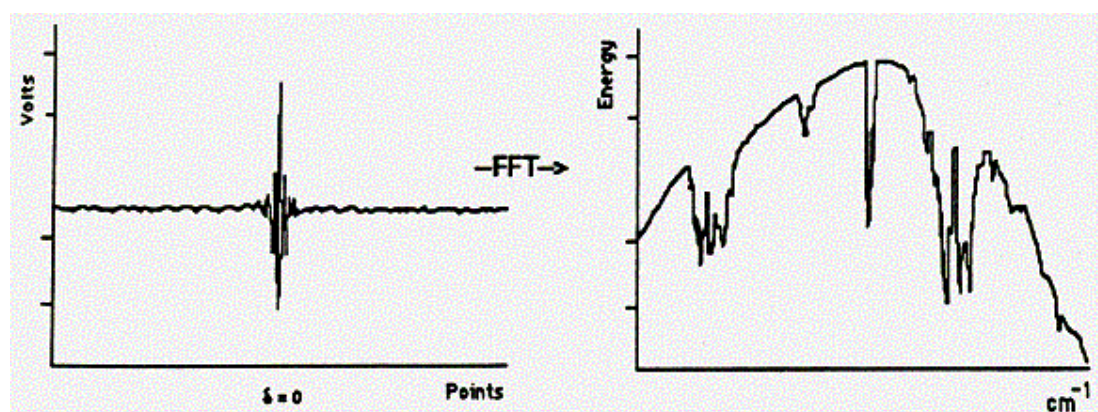
όπου $B(\bar{\nu})$ η συνάρτηση των κυματαριθμών, όπως αυτοί εκπέμπονται από την πηγή, και $I(\delta)$ η συνάρτηση καθυστέρησης. Ο δεύτερος τύπος είναι μέρος του πρώτου για περιορισμένη καθυστέρηση όπως μπορεί να υπάρξει μέσα στο πεδίο στο οποίο κινείται το κινούμενο κάτοπτρο. Η χρήση του δεύτερου τύπου επιταχύνει σημαντικά τους υπολογισμούς χωρίς να επηρεάζει την ακρίβεια και αξιοπιστία των μετρήσεων.

Με τον μετασχηματισμό δεδομένα του ιντερφερογράμματος μετατρέπονται σε δεδομένα του φάσματος ένα προς ένα. Σχηματικά η μετατροπή αυτή φαίνεται στο Σχήμα 1.2.2.8.

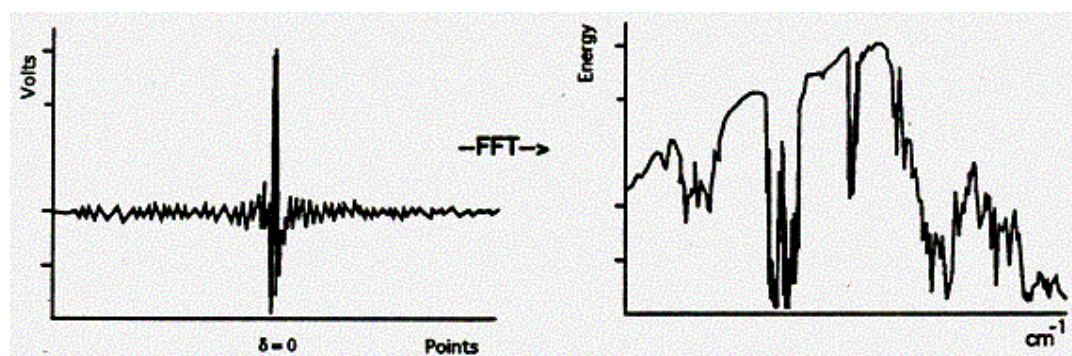
Η δέσμη που έχει δημιουργηθεί από την συμβολή των δύο δεσμών οδηγείται στο χώρο του δείγματος όπου το δείγμα απορροφά όπως φάνηκε στην

πρώτη παράγραφο και η εναπομείνουσα ακτινοβολία καταγράφεται από τον ανιχνευτή.

Για τη δημιουργία του φάσματος μετατρέπεται κάθε σημείο του ιντερφερογράμματος σε σημείο φάσματος, όμως το πρώτο φάσμα που καταγράφεται πρέπει να είναι το φάσμα της πηγής και όποιων μορίων τυχόν παρεμβάλλονται ανάμεσα στην πηγή και τον ανιχνευτή. Στη συνέχεια το φάσμα παράγεται σαν πηλίκο των δεδομένων του πρώτου φάσματος και των δεδομένων του δευτέρου ώστε να εκμηδενίζεται η παρουσία αέρα, διοξειδίου κ.τ.λ. που μπορεί να βρίσκονται στο πρώτο φάσμα. Το φάσμα αυτό ονομάζεται υπόβαθρο ή φάσμα αναφοράς ή background.



Σχήμα 1.2.2.8 Φάσμα πολυστυρενίου με το παραπάνω background



Σχήμα 1.2.2.9 Μετατροπή του ιντερφερογράμματος σε φάσμα FT-IR

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 (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 εκφράζει 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 (Βαλαβανίδης, 2006, Leonard et al, 1995).

- Διακριτική ικανότητα (Resolution): Το μέγεθος αυτό υποδεικνύει 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 επί πλέον 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 πραγματοποιούνται με έτοιμους αλγορίθμους στο λογισμικό λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου FT-IR (στην περίπτωση των πειραμάτων το λογισμικό OMNIC ver. 3.1, αλλά και σε κάθε φασματοφωτόμετρο).

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 χάρην επαναληψιμότητας και συντομίας.

Πιο εξειδικευμένη και απαιτητική είναι η αξιοποίηση των φασμάτων με την μέθοδο της αποσυνέλιξης (deconvolution), που μπορεί να εφαρμοστεί εκτός της

υπερύθρης 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.

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 User's Manual, Pappas et al, 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. Με την πρώτη ματιά η διατύπωση της έκφρασης «δεύτερη παράγωγος φάσματος» ακούγεται αδόκιμη, καθώς δεν πρόκειται για μια γραφική παράσταση συνάρτησης της οποίας μπορούμε να υπολογίσουμε την δεύτερη ή άλλης τάξεως παραγώγους. Βέβαια, κάθε κομμάτι του φάσματος που είναι απλό άθροισμα διαδικών συνόλων του τύπου (χ, ψ) , μπορεί να προσεγγιστεί από μια συνάρτηση. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα να υπολογιστούν και μεγέθη όπως η δεύτερη παράγωγος. 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 et al, 1998).

Με μαθηματικό τρόπο αφού εντοπιστούν τα πιθανά σημεία ύπαρξης κορυφών, προσαρμόζονται οι επιλεγμένες κορυφές και γίνεται μαθηματική άθροιση των εντάσεων ανά κυματαριθμό 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 αλληλεπικαλύπτονται. 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 κυματαριθμό (TQ Analyst users manual).

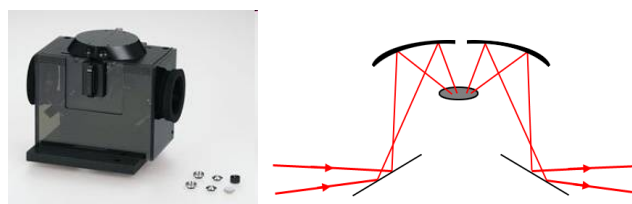
Ο νόμος Bouguer–Beer–Lambert υποδεικνύει ότι υπάρχει ανάλογη σχέση ανάμεσα στην συγκέντρωση ενός συστατικού και την απορρόφηση του στο φάσμα. Φυσικά, υπάρχουν περιορισμοί, που αφορούν την επικάλυψη των κορυφών, το εύρος των συγκεντρώσεων μέσα στο οποίο η σχέση απορρόφησης – συγκέντρωσης είναι γραμμική 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 σκοπούς πάντως χρήσιμη φάνηκε η μέθοδος λήψης φάσματος υγρών μιγμάτων και ουσιών με παράθυρα ZnSe και την τεχνική των DRIFTS.



Εικόνα 1.2.2.1 Παράθυρα από ZnSe



Εικόνα 1.2.2.2 Τεχνική των DRIFTS

Τα παράθυρα από ZnSe σχηματίζουν ένα φιλμ από το υγρό δείγμα ανάμεσά τους, και η ακτίνα του υπερύθρου 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 υπερύθρου 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 υπέρυθρη 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).

Νεότερη εξέλιξη στο χώρο της υπέρυθρης φασματοσκοπίας είναι η φασματοσκοπία απεικόνισης υπέρυθρου (FT-IR imaging) που είναι συνδυασμός οπτικής και φασματοσκοπικής καταγραφής δειγμάτων.

1.2.3 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 στις αρχές του εικοστού αιώνα. Η σκέδαση του φωτός είχε μελετηθεί επί 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 σε περιοχές του φάσματος των ακτίνων Χ. Η παρατήρηση και δημοσίευση της εργασίας του Raman με τον συνεργάτη του στην Καλκούτα Krishnan, 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. Η οριοθέτηση έγινε πλέον σαν προ 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 πριν, 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.

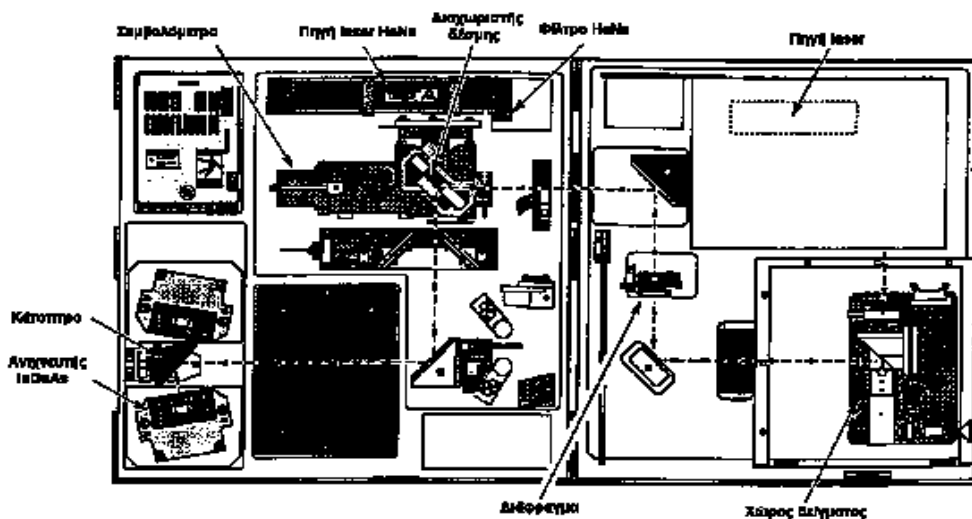
Από την αρχή της ιστορικής πορείας της φασματοσκοπίας Raman μέχρι σήμερα, έχουν υπάρξει σημαντικότερες εξελίξεις με νεότερα επιτεύγματα την φασματοσκοπία Raman SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) και την micro Raman φασματοσκοπία που αξιοποιεί ένα συνδυασμό μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας.

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 1.2.3.1. Οι πηγές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι

λείζερ 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 1.2.3.1 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.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη είχε σαν στόχο να συνδυάσει σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης, όπως τα μικροκύματα καθώς και σύγχρονες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης (φασματοσκοπία FT-IR και FT-Raman) και να τις εφαρμόσει στην απομόνωση και μελέτη διαφόρων συστατικών από διάφορα φυσιικά (φυτικά) προϊόντα. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητο να αξιοποιηθούν οι ήδη γνωστές και δοκιμασμένες μέθοδοι και να αναπτυχθούν νέες τεχνικές. 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.

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 περισσοτέρων από τις παραπάνω παραμέτρους έχει άμεσο όφελος για την εξοικονόμηση πόρων κατά την διενέργεια ποσοτικών ή και ποιοτικών προσδιορισμών. Η συνήθης εφαρμογή των αναλυτικών μεθόδων είναι για τον έλεγχο ποιότητας στη 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, η γρήγορη κατεργασία του δείγματος προς ανάλυση και η ταχύτητα λήψης των μετρήσεων. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι είναι πιο ευαίσθητες γενικότερα και εντοπίζουν και απρόβλεπτες αλλαγές στη σύσταση με μεγαλύτερη ευκολία από τις φασματοσκοπικές. Σκοπός είναι η εξέλιξη συγκεκριμένων φασματοσκοπικών μεθόδων σαν εναλλακτικές διαφόρων χρωματογραφικών.

Ειδικότερα ο σκοπός της διατριβής αυτής ήταν:

1. Η ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού της περιεκτικότητας της ημικυτταρίνης σε ουρονικό οξύ χρησιμοποιώντας την τεχνική DRIFTS, η οποία θα είναι απλούστερη και ταχύτερη όλων των μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενων τεχνικών.

2. Ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης και φρουκτόζης στο μέλι με νέα μέθοδο που να βασίζεται στην φασματοσκοπία FT-Raman, διότι οι μέχρι τώρα μέθοδοι είναι αρκετά πολύπλοκοι, χρονοβόροι και καταστρεπτικοί για τα δείγματα.

3. Η απομόνωση ημικυτταρίνης με χρήση συνήθων μεθόδων σε ήπιες συνθήκες καθώς και με χρήση των μικροκυμάτων με σκοπό τη μείωση του χρόνου της συνολικής κατεργασίας και στη συνέχεια φασματοσκοπική μελέτη της.

4. Η ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού της βοτανικής προέλευσης των διαφόρων ειδών μελιού με φασματοσκοπία FT-Raman και FT-IR, η οποία θα την κάνει ένα εύκολο εργαλείο ανάλυσης για οποιονδήποτε, σε σύγκριση με την εξειδίκευση και εμπειρία που θα πρέπει να έχει ο αναλυτής που κάνει την γυροσκοπική ανάλυση.

5. Την άμεση και ασφαλή πρόβλεψη της περιεκτικότητας του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς με φασματοσκοπία FT-IR, σε σχέση την κλασσική μέθοδο Kjeldahl

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Ποσοτικός προσδιορισμός των ουρονικών οξέων με φασματοσκοπία FT-IR - Παραλαβή ημικυταρρινών από το κενάφ με μικροκύματα

2.1 Κενάφ

Το κενάφ (*Hibiscus cannabinus* L.), ετήσιο φυλλώδες φυτό, ανήκει στην οικογένεια Malvaceae, στην οποία ανήκουν επίσης το βαμβάκι και η μπάμια κ.α. Καλλιεργείται σε διάφορες χώρες όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Η.Π.Α.), στη Κεντρική Αμερική, Αυστραλία, Ιταλία, Πορτογαλία, Αργεντινή, σε χώρες της Δυτικής Ασίας (Ινδία, Πακιστάν), της Ανατολικής Ευρώπης (Ουζμπεκιστάν) και της Αφρικής (Σενεγάλη).



Εικόνα 2.1.1 Φυτεία κενάφ

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την παραγωγή σχοινιών σε χώρες της Ασίας και της Κεντρικής Αμερικής καθώς και για την κατασκευή σάκων και υφασμάτων συσκευασίας αγροτικών προϊόντων. Αργότερα χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη παραγωγής υφασμάτων, επίπλων και χαλιών, με πλεονεκτήματα στην αντοχή και στη διατήρηση των χρωμάτων τους. Γρήγορα εκτιμήθηκε η δυνατότητα

να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή χαρτοπολτού κυρίως στη βιομηχανία “δημοσιογραφικού χάρτου” καθώς και για την κατασκευή θερμομονωτικών και ηχομονωτικών πλακών.

Γενικότερα στην Ευρωπαϊκή Ένωση κατατάσσεται στα φυτά τα οποία μπορούν να καλλιεργηθούν σε αγρούς οι οποίοι βρίσκονται σε επιδοτούμενη αγρανάπαυση, επειδή εμπλουτίζει το έδαφος με άζωτο.

Το ριζικό σύστημα του κενάφ αποτελείται από την κύρια πασσαλώδη ρίζα και από τις δευτερεύουσες πλευρικές ρίζες. Από τις δευτερεύουσες σχηματίζονται τριτεύουσες και με αυτό τον τρόπο το ριζικό πλέγμα καταλήγει στα ριζίδια και αυτά στα ριζικά τριχίδια, τα οποία είναι μονοκύτταρα και προέρχονται από την επιμήκυνση των επιδερμικών κυττάρων, με τη βοήθεια των οποίων το φυτό προσροφά νερό και θρεπτικά συστατικά (Πασχαλίδης, 1997).



Εικόνα 2.1.2 Σχηματική παράσταση του κενάφ. 1. Άνθος, 2. Φύλλα, 3. Στέλεχος

Τα στελέχη αποτελούν, το κυρίως, οικονομικά εκμεταλλεύσιμο τμήμα του φυτού και κατέχει περίπου το 60 % του βάρους του (Πασχαλίδης, 1997) . Το ύψος τους κυμαίνεται συνήθως από 1,5 – 4 m (Siepe et al,1997), ενώ σε εξαιρετικές περιπτώσεις φθάνει τα 5 - 6 m (Kaldor, 1989) (Εικόνα 2.1.2). Έχουν κυλινδρικό σχήμα με μέση διάμετρο 25 – 35 mm και διαθέτουν πλευρικούς κλάδους. Το χρώμα των στελεχών είναι ανάλογα με την ποικιλία πράσινο (π.χ. Cuba 108 και 2032),

πορφυρό (π.χ. ΤΑΥ 977-044) ή κόκκινο (π.χ. ΚΚ 60). Κάθε στέλεχος αποτελείται από τρία τμήματα, το φλοιό, το κύριο ξύλο και την ψίχα (Εικόνα 2.1.3).



Εικόνα 2.1.3 Φλοιός και ξύλο κενάφ.

Ο φλοιός αποτελεί το 30 – 40 % w/w, το ξυλώδες τμήμα το 60 - 70 % w/w και η ψίχα 3 – 4 % w/w (McMillin et al, 1998). Το μήκος των ινών για μεν τον φλοιό κυμαίνεται από 3 έως 4 mm ενώ για το ξύλινο τμήμα από 0,5 έως 0,7 mm. Η διαφορά αυτή οδηγεί στο σχηματισμό υψηλής ποιότητας χαρτοπολτό διότι οι ίνες του ξύλου προσδίνουν ελαστικότητα στο παραγόμενο χαρτί χάρη στους δεσμούς που αναπτύσσουν με τις ίνες του φλοιού.



Εικόνα 2.1.4 Φύλλο κενάφ.

Από όλο σχεδόν το τμήμα του στελέχους εκφύονται φύλλα (Εικόνες 2.1.2, 2.1.4) των οποίων το σχήμα ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία του κενάφ. Αποτελούνται από το έλασμα και το μίσχο. Τα φύλλα της ποικιλίας Cuba 108 και 2032 είναι τοξοειδή και έλλοβα. Το έλασμα αποτελείται από πέντε συνήθως λοβούς. Οι ποικιλίες TAY 977 – 044 και KK 60 διαθέτουν φύλλα απλά και έχουν σχήμα ωοειδές.

Τα άνθη είναι τυπικά της οικογένειας των Malvaceae. Είναι διγενή, ακτινόμορφα, με διπλό πενταμερές περιάνθιο με επικαλύκειο. Έχουν πολυάριθμους στήμονες, συμφυείς στο σωλήνα (στύλο). Έχουν πέντε πέταλα, με διάμετρο 7 – 12 cm. Η ωοθήκη είναι επιφυής, αποτελούμενη από πέντε σπερμοφόρα καρπόφυλλα. Τα άνθη είναι μεγάλα, βγαίνουν στις μασχάλες των φύλλων και έχουν χρώμα άσπρο ή υποκίτρινο ενώ στο σημείο επαφής με τον κάλυκα είναι μοβ - κόκκινο (Εικόνες 2.1.2, 2.1.5).



Εικόνα 2.1.5 Άνθος κενάφ.

Ο καρπός είναι πεντάχωρη κάψα. Έχει σχήμα ωοειδές, μήκος περίπου 2,5 cm και μέσο πλάτος περίπου 1-2 cm. Είναι σκεπασμένος με πολύ μικρά σκληρά τριχίδια. Αποτελείται από πέντε καρπίδια και σε κάθε καρπίδιο περιέχονται πέντε σπόροι από τους οποίους βλαστάνουν 2 –3.

Ο σπόρος είναι σφηνοειδούς σχήματος και χρώματος γκρι προς μαύρο. Το βάρος χιλίων σπόρων είναι 20 – 30 g. Το μήκος του κυμαίνεται από 3 έως 5 mm , το πλάτος 2,5 – 4 mm και το πάχος 2-3 mm. Στο ίδιο φυτό, οι πιο ώριμοι και με κανονικό βάρος σπόροι βρίσκονται στην τέταρτη έως και την όγδοη κάψα. Οι κάψες μεγαλώνουν μέχρι το κανονικό μέγεθος και σε κάθε μια ξεχωριστά υπάρχουν 25

σπόροι. Οι σπόροι του κενάφ έχουν την ικανότητα να ωριμάζουν στα κομμένα στελέχη, που στοιβάζονται σε θημωνιές. Επομένως δεν πρέπει να αναμένουμε πότε θα ωριμάσουν όλες οι κάψες, διότι θα καθυστερήσει η συγκομιδή και μπορεί να στερηθούμε τους καλύτερους ποιοτικά σπόρους που βρίσκονται στις κάτω κάψες. Η συγκομιδή πρέπει να αρχίσει με την ωρίμανση των σπόρων στις δύο πρώτες κάψες. Με την ωρίμανση, σε ορισμένες ποικιλίες, τα καρπόφυλλα αποχωρίζονται μεταξύ τους, με αποτέλεσμα οι σπόροι πέφτουν στο έδαφος.

Το κενάφ αποτελεί θερινή καλλιέργεια και για το λόγο αυτό η ιδανικότερη εποχή της σποράς του είναι η άνοιξη. Ο χρόνος ανάπτυξης του φυτού διαρκεί 150 – 200 ημέρες ανάλογα με τις εδαφολογικές και κλιματολογικές συνθήκες (Cook et al, 1999). Η στρεμματική απόδοση, όταν είναι ξηρό, φθάνει τους 2 – 2,5 tn/στρέμα.

Οι εδαφολογικές και κλιματολογικές συνθήκες επιδρούν σημαντικά στην ευδοκίμηση του κενάφ. Έτσι η ιδανική θερμοκρασία του εδάφους, στη διάρκεια της σποράς, για τις περισσότερες ποικιλίες είναι από 8 έως 12 °C. Για το λόγο αυτό η σπορά πρέπει να γίνεται από τα μέσα Απριλίου έως τα μέσα Μαΐου. Τα αλατούχα εδάφη αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη του φυτού. Έτσι εδάφη με περιεκτικότητα πάνω από 0,3 % σε ανόργανα άλατα είναι ακατάλληλα, ενώ επίσης ακατάλληλα είναι όταν η περιεκτικότητά τους σε ιόντα χλωρίου υπερβεί το 0,020 %, διότι η πυκνότητα των φυτών μειώνεται πάνω από δύο φορές σε σχέση με τις καλλιέργειες σε μη αλατούχα εδάφη. Η υγρασία του εδάφους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και πρέπει να είναι κανονική. Η ξηρασία όπως και η υπερβολική υγρασία αναστέλλουν το φύτευμα. Όταν φυτρώσει το κενάφ η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή του είναι 23 – 25 °C, ενώ κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των σπόρων θερμοκρασία των 16 – 18 °C είναι αρκετή.

Το φως επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανοποιητική ανάπτυξη του φυτού. Είναι φυτό “μικρής διάρκειας ημέρας” (12 h). Με μεγαλύτερη διάρκεια ηλιοφάνειας η ανάπτυξη επιβραδύνεται ενώ με μικρότερη γίνεται νάνος. Επιπλέον και η ένταση του φωτός επηρεάζει την ανάπτυξή του. Μικρή ένταση μειώνει το ύψος του και επιβραδύνει την ανάπτυξή του.

2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των ουρονικών οξέων στις ημικυταρρίνες από το φυτικό υλικό κενάφ με φασματοσκοπία FT-IR

Φυτικό υλικό:

Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά δείγματα κενάφ (*Hibiscus cannabinus* L.), από την ποικιλία Cuba 108 η οποία καλλιεργήθηκε για 170 ημέρες, συλλέχθηκε και ξηράνθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 ημέρες. Τα στελέχη του κενάφ διαχωρίστηκαν από τον φλοιό και την ψίχα και το ξυλώδες τμήμα λιοτριβήθηκε σε σφαιρόμυλο τύπου Retsch MM 2000 για 30 min και λυοφιλιώθηκε για 24 h.

Συσκευές:

- Αναδευτήρας
- Λυοφιλωτής της εταιρείας Vir Tis 25EL
- Φυγόκεντρος της εταιρείας Sigma (μοντέλο 3K 18).
- Φασματοφωτόμετρο FT-IR της εταιρείας Nicolet (μοντέλο 750 Magna series). Το φασματοφωτόμετρο ήταν εξοπλισμένο με αερόψυκτη πηγή εφοδιασμένη με νήμα από κράμα Ni – Cr (Nicochrome), πυροηλεκτρικό ανιχνευτή κατασκευασμένο από δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (Deuteriated TriGlycine Sulphate – DTGS) και μικρό υποδοχέα (microcup) δείγματος διαμέτρου 3 mm και ύψους 2 mm.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής εφοδιασμένος με το λογισμικό OMNIC (ver.3.1) το οποίο χρησιμοποιείται στη λήψη και επεξεργασία φασμάτων FT-IR. Ο υπολογιστής είναι συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο
- Φωτόμετρο UV-Vis HACH DR/2010

Αντιδραστήρια:

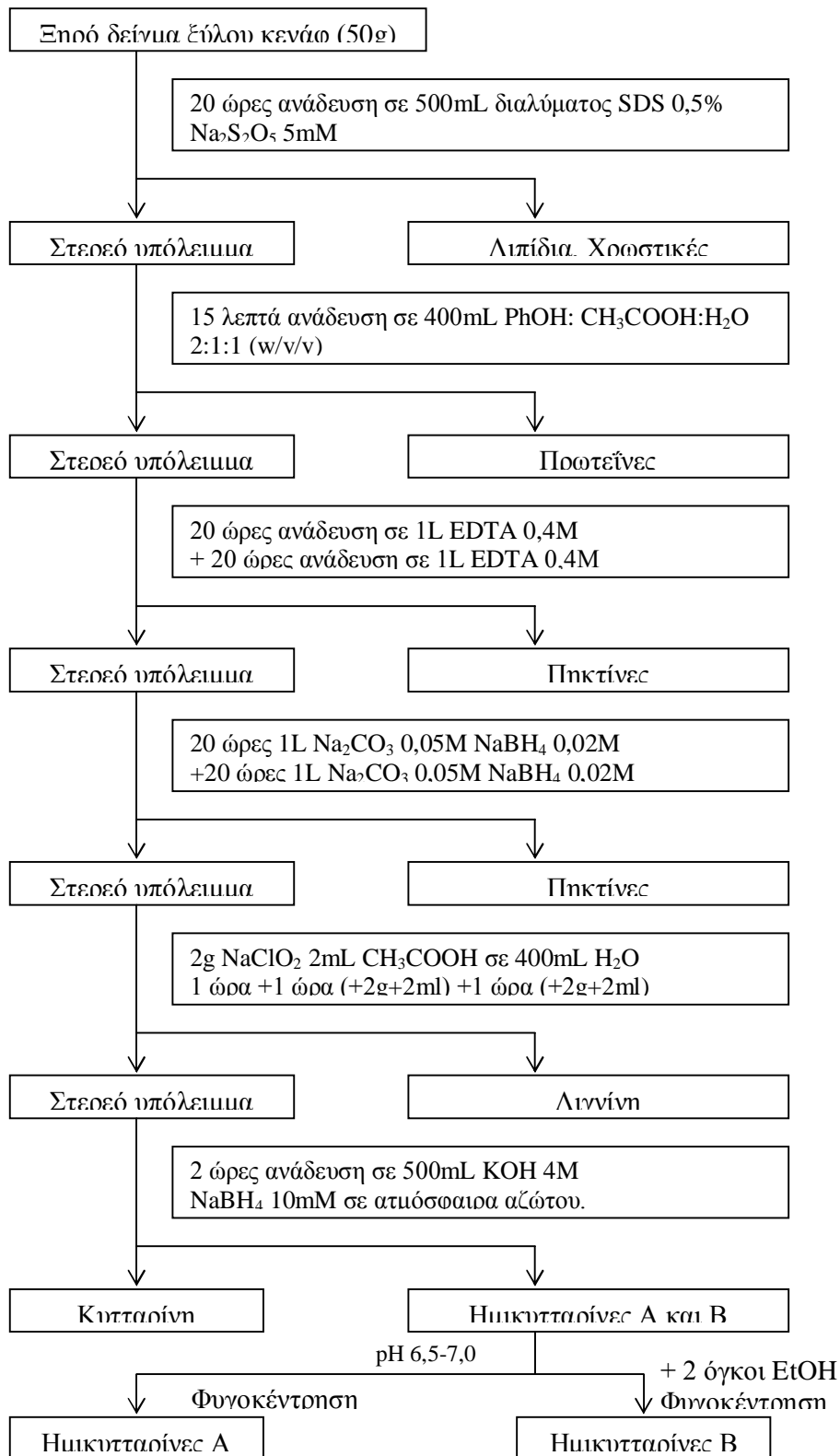
- Διαλύματα δωδεκυλο-σουλφονικού νατρίου (SDS) 1,5 % (w/v) και 0,5 % (w/v)
- Οκτανόλη
- Διάλυμα φαινόλης – οξικού οξέος – διασπασταγμένου ύδατος (PAW) 2:1:1 (w/v/v)
- Διάλυμα trans-1,2-κυκλοεξανοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) 0,05 M
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου 0,05 M
- Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 4M
- Χλωριώδες νάτριο
- Παγόμορφο οξικό οξύ
- Απόλυτη αιθανόλη

- Θειικό οξύ 98% (w/w)
- Διαλύμα βορικού νατρίου (0,476% κ.ο. σε πυκνό θειικό οξύ)
- Διάλυμα 3-φαινυλοφαινόλης (150% κ.ο. σε διάλυμα NaOH 0,125M)
- Άλατα του γαλακτουρονικού οξέος

Απομόνωση ημικυταρρινών (Pappas et al, 1999, Selvendran 1987):

Απομόνωση κυτταρικών τοιχωμάτων. Σε 50 g ξηρών και τριμμένων στελεχών του κενάφ προστέθηκαν 300 mL του μετά νατρίου άλατος του δωδεκυλο-θειικού εστέρα (SDS) 1,5 % που περιείχε 5mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ και το μίγμα ομογενοποιήθηκε σε blender για 10 min. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό, ώστε να απομακρυνθεί όσο το δυνατό περισσότερο υγρό και το στερεό υπόλειμμα ξεπλύθηκε δύο φορές με 300 mL SDS 0,5 % που περιείχε 5mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Στη συνέχεια το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με 500 mL διαλύματος SDS 0,5 % που περιείχε 5mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ και το όλο μίγμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα για 20 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και το υπόλειμμα το ξεπλύθηκε δύο φορές με 500 mL απιονισμένου νερού κάθε φορά. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με 400 mL φαινόλης - οξικού οξέος - απιονισμένου νερού (Phenol - Acetic acid - Water - PAW) (2:1:1 w/v/v) και το όλο μίγμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα για 20 min. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα ξεπλύθηκε με 200 mL απιονισμένου νερού για να απομακρυνθεί το PAW και το νερό απομακρύνθηκε με διήθηση υπό κενό. Η έκπλυση με νερό επαναλήφθηκε άλλες εννέα φορές. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό.

Απομάκρυνση πηκτινών. Το στερεό υπόλειμμα (κυτταρικό τοίχωμα) αναμείχθηκε με 1 L διαλύματος EDTA 0,4M (116,9 g EDTA διαλύονται σε 1 L διαλύματος NaOH 1N). Το μίγμα αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία διάλυσης στο EDTA επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά και μετά τις διηθήσεις το κυτταρικό τοίχωμα αναμείχθηκε με 1L διαλύματος 0,05M ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 παρουσία (0,02 M υδριδίου νατρίου-βορίου) και αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και η κατεργασία με το ανθρακικό νάτριο επαναλήφθηκε μία



Φωτομετρικός προσδιορισμός ουρονικών οξέων:

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ημικυτταρινών σε ουρονικά οξέα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Blumenkrantz and Asboe-Hanson (Blumenkrantz, 1973, Filisetti-Cozzi, 1991).

Κάθε δείγμα διαλύθηκε σε 0,4 mL απιονισμένου νερού. Μετά τη πρόσθεση 2,4 mL διαλύματος βορικού νατρίου (0,476% w/v σε πυκνό θειικό οξύ) το διάλυμα θερμάνθηκε στους 100 °C για 5 min. Μετά την ψύξη και ανάδευση του μίγματος προσθέσαμε 40 μL διαλύματος 3-φαινυλοφαινόλης (150% w/v σε διάλυμα NaOH 0,125 M) και μετά από 10 min μετρήσαμε την απορρόφηση που παρουσιάζει το μίγμα στα 520 nm σε σχέση με μάρτυρα που προετοιμάστηκε κατ' αντίστοιχο τρόπο δίχως την προσθήκη της 3-φαινυλοφαινόλης.

Η τιμές απορρόφησης που σημειώθηκαν μετατράπηκαν σε τιμές συγκέντρωσης των ουρονικών οξέων σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε από διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος.

Προσδιορισμός των ουρονικών οξέων με τη μέθοδο φασματοφωτομετρίας FT-IR

Άλατα του πολυγαλακτουρονικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία της κατασκευής των προτύπων διαφορετικών συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων κυμάνθηκαν από 1,5% έως 15% και δημιουργήθηκαν από την ανάμειξη κατάλληλης ποσότητας πολυγαλακτουρονικού οξέος και βρωμιούχου καλίου. Τελικά προετοιμάστηκαν οκτώ τριπλέτες για την κάθε συγκέντρωση (συνολικά είκοσι τέσσερα δείγματα) τα οποία λυοφιλιώθηκαν για 24 h.

Το φάσμα υπερύθρου του κάθε δείγματος καταγράφηκε από το φασματοφωτόμετρο Nicolet 750 series με την τεχνική των DRIFTS. 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 έγινε πριν από κάθε παρτίδα μετρήσεων.

Εστιάστηκε η περιοχή 1900 –1500 cm⁻¹ και μετρήθηκε ο λόγος σήματος - θορύβου των φασμάτων, ο οποίος χρειάστηκε για την αποσυνέλιξη, με ειδική

εντολή του λογισμικού. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του λογισμικού ελήφθη η δεύτερη παράγωγος της καμπύλης της απορρόφησης. Από τα ελάχιστα της δεύτερης παραγώγου επτά εκτιμήθηκαν ότι ήταν πραγματικές απορροφήσεις για τα πρότυπα και επομένως επτά και οι κορυφές οι οποίες αλληλεπικαλύπτονταν. Για τα δείγματα ημικυτταρίνης που απομονώθηκαν όπως φαίνεται και στον επόμενο Πίνακα οι κορυφές ήταν έξι ή επτά.

Πίνακας 2.2.1.1 Κυματαριθμοί από τις κύριες κορυφές για την περιοχή 1900-1500cm⁻¹

Πρότυπο δείγμα	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3α	Δείγμα 3β	Αποδόσεις
1744	–	–	1740	1745	C=O δόνηση των αλκυλεστέρων
1715	–	–	–	–	C=O δόνηση των –COOH
1679	1677	1672	1675	1677	C=O δόνηση των κετονών
1658	1652	1653	1656	1655	Αμίδιο Ι (πρωτείνες)
1626	1640	1640	1632	–	Δόνηση νερού
1600	1603	1604	1603	1601	C=O, αντισυμμετρική δόνηση του –COO ⁻
1547	1545	1547	1563	1550	Αμίδιο ΙΙ (πρωτείνες)
–	1507	1507	1505	1506	Δόνηση του αρωματικού σκελετού της λιγνίνης

Για να αναδειχτούν οι κορυφές αυτές έγινε αποσυνέλιξη της περιοχής 1900 – 1500 cm⁻¹ με χρήση του λογισμικού PEAKSOLVE (ver. 1.05). Για την επεξεργασία αυτή δόθηκε σαν δεδομένο στο λογισμικό η τιμή του λόγου σήματος-θορύβου κάθε φάσματος, η οποία προηγούμενα είχε υπολογιστεί. Επίσης δόθηκε ο κυματαριθμός κάθε ενός από τα επτά ελάχιστα που παρατηρήθηκαν με τη χρήση της δεύτερας παραγώγου. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι κυματαριθμοί δόθηκαν σαν “οδηγοί” και

ότι το λογισμικό έχει τη δυνατότητα να τους μεταβάλλει. Επιλέχθηκε ο αλγόριθμος του Lorentzian για την εξομοίωση της καμπύλης απορρόφησης. Το πρόγραμμα έκανε την αποσυνέλιξη της καμπύλης και έδωσε τις τιμές των εμβαδών τα οποία περικλειόταν μεταξύ της καμπύλης απορρόφησης και της γραμμής βάσης κάθε συνιστώσας κορυφής καθώς και τον κυματαριθμό της μέγιστης απορρόφησης της. Καταγράφηκαν τα εμβαδά της κορυφής, η οποία εμφανίστηκε στα περιοχή 1745 cm^{-1} (E_1), 1715 cm^{-1} (E_2) και αυτής στα 1600 cm^{-1} (E_3) τα οποία αντιστοιχούν στα εστεροποιημένα και μη καρβοξύλια και υπολογίστηκε το άθροισμα $A=E_1+E_2+E_3$

Πίνακας 2.2.1.2 Περιεκτικότητα πρότυπου πολυγαλακτουρονικού οξέος (%w/w) συναρτήσει του αθροίσματος του εμβαδού των κορυφών στα 1745 , 1715 και 1600cm^{-1}

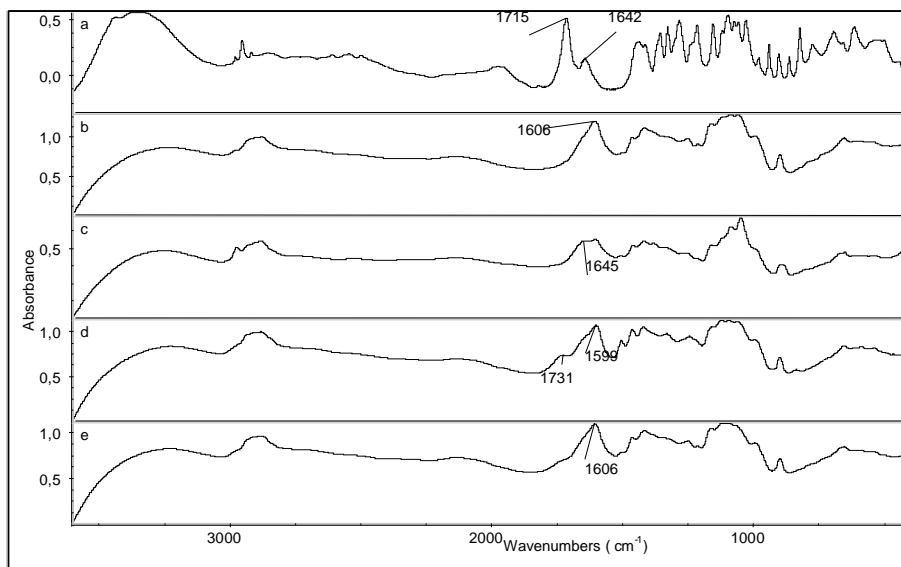
A	Πολυγαλακτουρονικό οξύ (% w/w)
3,81±0,011	1,5
7,39±0,084	4,0
10,0±0,1	6,5
11,0±0,2	8,0
12,0±0,2	9,0
13,5±0,2	11,5
14,9±0,3	13,0
17,0±0,3	15,0

2.2.2 Σύγκριση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού των ουρονικών οξέων με την κλασική μέθοδο Asboe-Hansen και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR

Τέσσερα δείγματα ημικυτταρινών απομονώθηκαν από το φυτό κενάφ. Δύο από αυτά τα δείγματα περιείχαν τις ημικυτταρίνες A και B (δείγμα 1 και 2), ενώ ένα

δείγμα περιείχε μόνο τις ημικυτταρίνες Α (δείγμα 3α) και το τέταρτο δείγμα αποτελούνταν μόνο από τις ημικυτταρίνες Β (δείγμα 3β).

Το φάσμα FT-IR από τα πρότυπο δείγμα το οποίο περιέχει 8% πολυγαλακτουρονικό οξύ και τα φάσματα από τα τέσσερα δείγματα των απομονωμένων ημικυτταρινών φαίνονται στο παρακάτω Σχήμα 2.2.2.1.



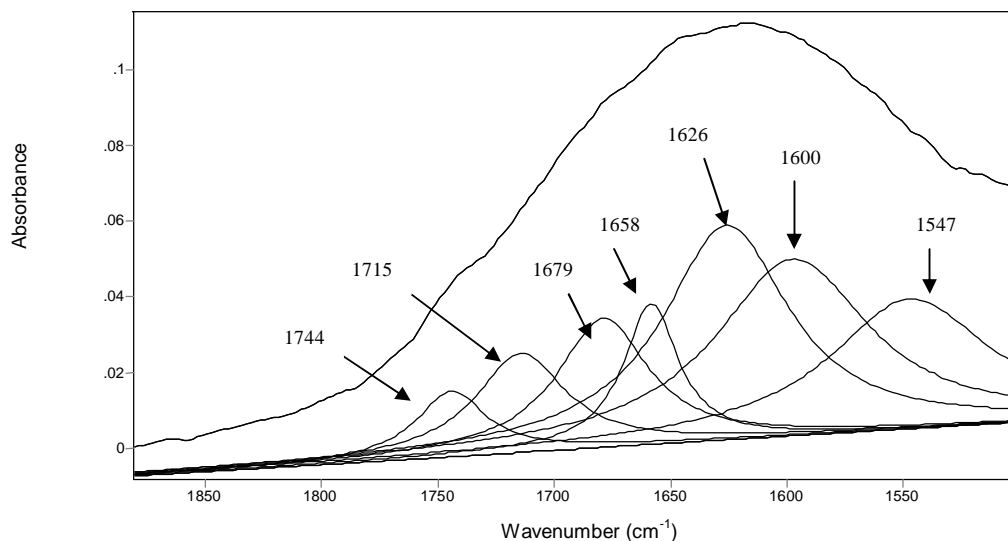
Σχήμα 2.2.2.1 Φάσμα FT-IR : (a) δείγμα προτύπου περιεκτικότητας 8 % σε αλάτι πολυγαλακτουρονικού οξέος, (b) δείγμα 1, (c) δείγμα 2, (d) δείγμα 3α και (e) δείγμα 3β.

Η περιοχή μεταξύ 3600 και 1850 cm^{-1} περιέχει δυο κύριες κορυφές. Η μια κορυφή είναι στα 3450 cm^{-1} και αποδίδεται στην δόνηση της τάσης της ομάδας των υδροξυλίων ενώ στα 2920 cm^{-1} οφείλεται στην τάση του C-H της ομάδας των CH_2 . Μια δεύτερη περιοχή γύρω στα 1500 cm^{-1} θεωρείται σαν δακτυλικό αποτύπωμα για μια καθαρή ουσία, η οποία όμως στα δείγματα των ημικυτταρινών που απομονώθηκαν δεν δίνει καμία ξεκάθαρη πληροφορία λόγω της αλληλεπικάλυψης (Sene et al, 1994, Pappas et al, 1999).

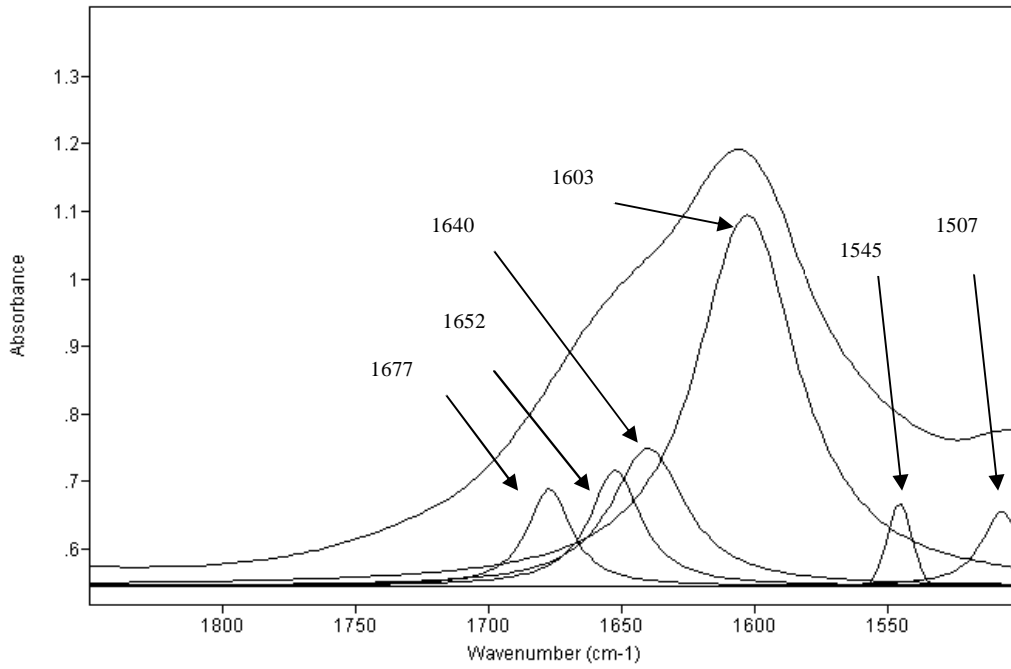
Η τρίτη περιοχή μεταξύ 1900 - 1500 cm^{-1} επιτρέπει την παρατήρηση της υπέρυθρης απορρόφησης των καρβονυλικών ομάδων. Σε αυτήν την περιοχή επίσης απορροφούν επίσης τα καρβοξυλικά των εστέρων, τα καρβοξυλικά οξέα και τα ιονισμένα καρβοξυλικά. Η παρουσία αυτών των ομάδων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη των ουρονικών οξέων. Κατά την εξέταση αυτής της περιοχής

παρατηρούμε δύο ζώνες απορρόφησης, η μια στα $1731\text{-}1715\text{ cm}^{-1}$ και η άλλη στα $1645\text{-}1599\text{ cm}^{-1}$. Επειδή όμως στην συγκεκριμένη περιοχή απορροφούν και άλλα συστατικά που περιέχονται στις ημικυτταρίνες όπως το νερό, οι κετόνες, οι πρωτεΐνες κ.α. είναι απαραίτητη η ανάλυση του φάσματος με την διαδικασία της αποσυνέλιξης.

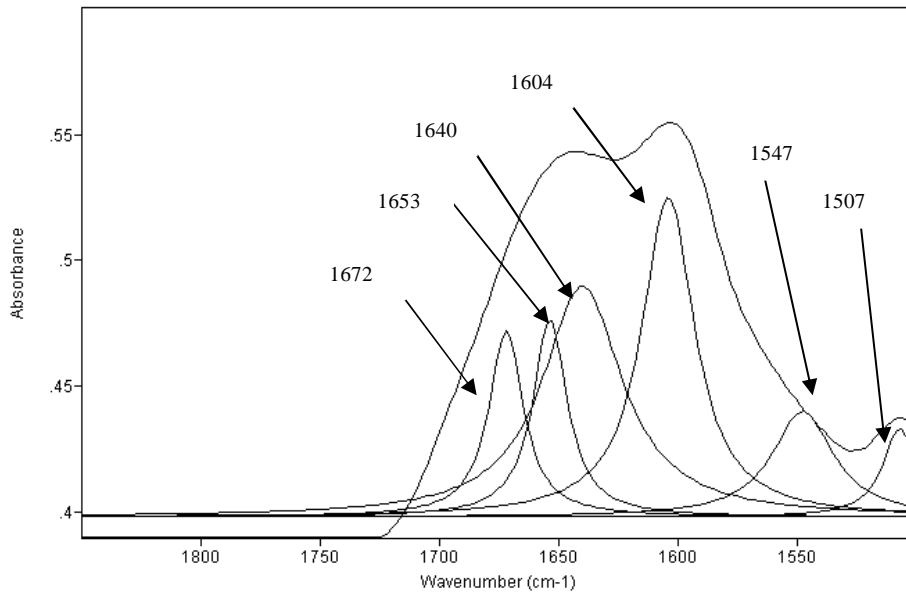
Η χρήση της $2^{\text{ης}}$ παραγώγου και η ανάλυση με τη βοήθεια της αποσυνέλιξης στην περιοχή από $1900\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, αποκαλύπτει επτά κύριες κορυφές για τα πρότυπα δείγματα πολυγαλακτουρονικού οξέος (Σχήμα 2.2.2.2), έξι κύριες κορυφές για το δείγμα 1 και 2 (Σχήματα 2.2.2.3, 2.2.2.4), επτά για το δείγμα 3α (Σχήμα 2.2.2.5) και έξι για το δείγμα 3β (Σχήμα 2.2.2.6).



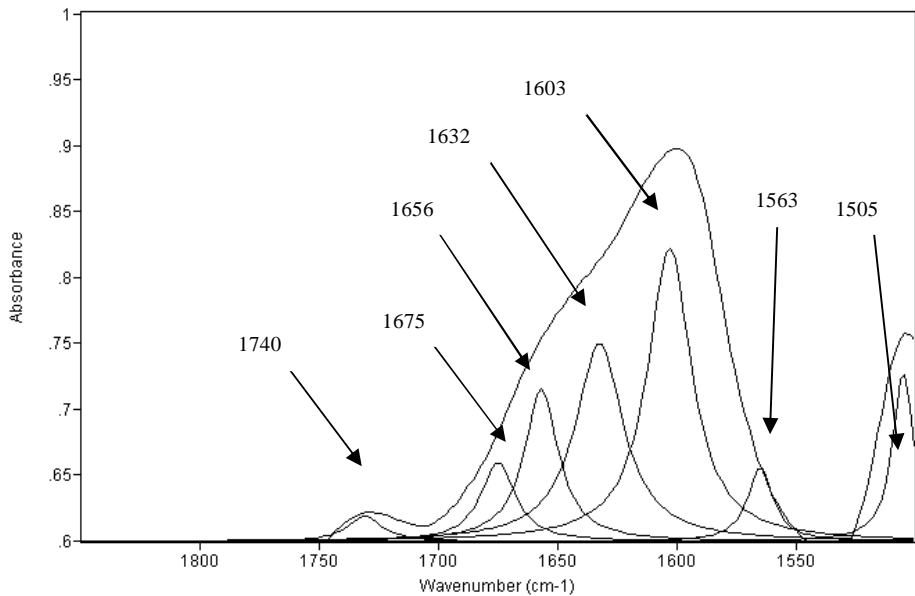
Σχήμα 2.2.2.2 Αποσυνελεγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} ενός προτύπου δείγματος περιεκτικότητας 8 % σε αλάτι πολυγαλακτουρονικού οξέος



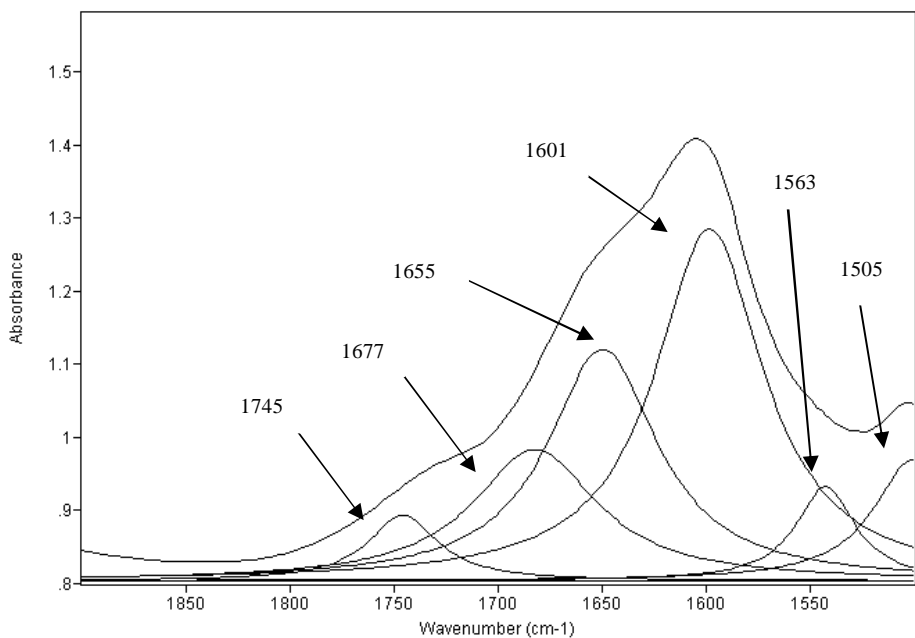
Σχήμα 2.2.2.3 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} του δείγματος 1.



Σχήμα 2.2.2.4 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} του δείγματος 2.



Σχήμα 2.2.2.5 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} του δείγματος 3a.



Σχήμα 2.2.2.6 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} του δείγματος 3b.

Οι παραπάνω κορυφές αναλύθηκαν για το ακριβές σχήμα και εμβαδό με πληθώρα συναρτήσεων όπως η Gaussian, η Voight, συνδυασμός Gaussian and Lorentzian, η Pearson VII and η Lorentzian. Το κριτήριο για την επιλογή του κατάλληλου σχήματος ήταν ο συντελεστής συσχέτισης. Οι συντελεστές συσχέτισης της εξομοίωσης

της καμπύλης απορρόφησης ήταν 0,97 – 0,98 – 0,98 – 0,98 – 0,97 και 0,99 αντίστοιχα. Επιλέχθηκε έτσι η αποσυνέλιξη να γίνει κατά Lorentzian διότι παρουσίασε τον υψηλότερο βαθμό συσχέτισης. Οι αποδόσεις των κορυφών φαίνονται στον Πίνακα 2.2.2.1.

Πίνακας 2.2.2.1 Κυματारιθμοί από τις κύριες κορυφές για την περιοχή 1900-1500cm⁻¹ (Sene et al, 1994, Pappas et al, 1999).

Πρότυπο δείγμα	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3α	Δείγμα 3β	Αποδόσεις
1744	–	–	1740	1745	C=O δόνηση των αλκυλεστέρων
1715	–	–	–	–	C=O δόνηση του –COOH
1679	1677	1672	1675	1677	C=O δόνηση των κετονών
1658	1652	1653	1656	1655	Αμίδιο I (πρωτεΐνες)
1626	1640	1640	1632	–	Δόνηση του νερού
1600	1603	1604	1603	1601	C=O, αντισυμμετρική δόνηση του –COO ⁻
1547	1545	1547	1563	1550	Αμίδιο II (πρωτεΐνες)
–	1507	1507	1505	1506	Δόνηση του αρωματικού σκελετού της λιγνίνης

Η κορυφή στα 1715 cm⁻¹ που υπάρχει στα φάσματα των προτύπων απουσιάζει από κάθε φάσμα των δειγμάτων. Η κορυφή στα 1745 cm⁻¹ απουσιάζει από τα δείγματα 1 και 2. Τέλος η κορυφή στα 1630 cm⁻¹ περιέχεται σε όλα τα φάσματα πλην του δείγματος 3β. Η απουσία της κορυφής στα 1715 cm⁻¹ οφείλεται στην εξουδετέρωση των καρβοξυλομάδων και στην μετατροπή τους σε ομάδες ιονισμένων καρβοξυλίων, κατά την επεξεργασία του δείγματος με KOH. Στα 1745 cm⁻¹ απουσιάζει η κορυφή εξαιτίας της μη αλκαλικής υδρόλυσης των εστερικών ομάδων κατά την επεξεργασία των

δειγμάτων με ΚΟΗ. Τέλος, η απουσία της κορυφής στα 1630 cm^{-1} δείχνει ότι το δείγμα 3β ήταν απολύτως ξηρό.

Οι κορυφές στα 1745 , 1715 και 1600 cm^{-1} οι οποίες αποδίδονται στις ομάδες των εστέρων, των καρβοξυλίων και των ιονισμένων καρβοξυλίων αντίστοιχα, μπορούν να συνδεθούν με την περιεκτικότητα σε ουρονικό οξύ (Sene et al, 1994).

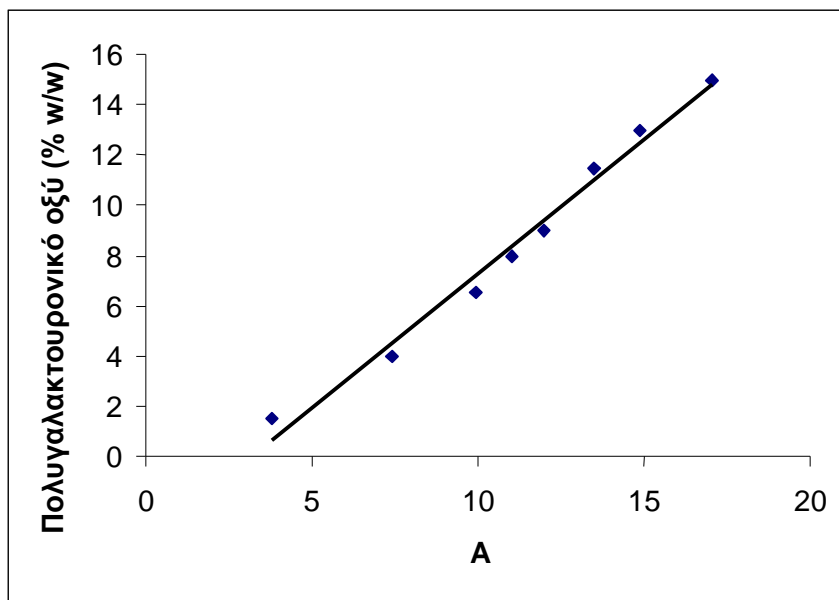
Λαμβανομένων υπόψη των απορροφήσεων των κορυφών αυτών σχηματίστηκε το άθροισμα A των εμβαδών των προτύπων και των δειγμάτων, τα οποία υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της αποσυνέλιξης και της εξομοίωσης της καμπύλης της απορρόφησης.

Συσχετίστηκε έτσι το άθροισμα A των προτύπων δειγμάτων με το βαθμό της συγκέντρωσης τους και βρέθηκε ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ τους, οπότε κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς με τη βοήθεια του Πίνακα 2.2.1.2.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι:

$$\text{Ουρονικό οξύ (\%)} = (-3,4 \pm 0,7) + (1,1 \pm 0,1) A; R=0,98, n=3$$

Η γραμμική σχέση μεταξύ των δεδομένων του παραπάνω Πίνακα φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 2.2.2.7 Εξίσωση καμπύλης βασισμένη στην αποσυνελιγμένη ανάλυση των φασμάτων FT-IR των προτύπων με αλάτι του πολυγαλακτουρονικού οξέος.

$$A = \text{Άθροισμα των εμβαδών των κορυφών (1745 cm}^{-1} + 1715\text{ cm}^{-1} + 1600\text{ cm}^{-1}).$$

Με τη βοήθεια αυτής της καμπύλης αναφοράς και την εξίσωση που συνδέει το εμβαδό των συγκεκριμένων κορυφών ($1745, 1715$ και 1600 cm^{-1}) με την συγκέντρωση σε ουρονικό οξύ (εκφρασμένο σε πολυγαλακτοουρονικό οξύ), υπολογίστηκε η συγκέντρωση σε ουρονικό οξύ κάθε δείγματος ημικυτταρίνης.

Το εύρος των συγκεντρώσεων κυμαίνεται από $2,1 \pm 0,2$ έως $15,1 \pm 0,4\%$ (Πίνακας 2.2.2.2). Η συγκέντρωση των ημικυτταρινών σύμφωνα με την φωτομετρική μέθοδο (μέθοδος αναφοράς) υπολογίστηκε να είναι από $1,7 \pm 0,1$ – $14,3 \pm 0,2\%$ (Πίνακας 2.2.2.2).

Πίνακας 2.2.2.2 Η συγκέντρωση του ουρονικού οξέος των απομονομένων ημικυτταρινών από κενάφ με την φωτομετρική μέθοδο και την μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR της αποσυνελιγμένης περιοχής.

Δείγμα	Περιεκτικότητα ουρονικού οξέος (%) (εκφρασμένη σε πολυγαλακτοουρονικό οξύ)			
	Φωτομετρική μέθοδος ^a	DRIFTS ^a	F _{experimental} ^b	t _{experimental} ^b
1	13,3±0,3	12,4±0,4	1,78	2,545
2	1,7±0,1	2,1±0,2	2,25	2,530
3	6,7±0,2	7,4±0,3	2,25	2,745
4	14,3±0,2	15,1±0,4	4,00	2,529

^an=3; ^bΕπίπεδο εμπιστοσύνης 95 %

Συμπερασματικά:

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού της περιεκτικότητας των ημικυτταρινών σε ουρονικά οξέα συγκρίθηκε με την φωτομετρική μέθοδο (μέθοδος αναφοράς) ως προς την επαναληψιμότητα και την αξιοπιστία με την βοήθεια του F-test και t-test αντίστοιχα για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Οι πειραματικές τιμές από το F-test ήταν μεταξύ 1,78 και 4 ενώ η θεωρητική τιμή είναι 19 (Πίνακας 2.2.2.2). Και οι δύο μέθοδοι ήταν παρόμοιες ως προς την επαναληψιμότητα σύμφωνα σύμφωνα με το t-test. Συγκεκριμένα οι πειραματικές τιμές του t-test κυμαίνονταν μεταξύ 2,529 και

2,745, ενώ η αντίστοιχη θεωρητική τιμή ήταν 2,766 (Πίνακας 2.2.2.2). Συμπερασματικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ των δύο μεθόδων γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία της νέας μεθόδου.

2.3.1 Σύγκριση μεθόδων παραλαβής ημικυταρρινών από το κενάφ με απλή ανάδευση και μικροκύματα

Φυτικό υλικό:

Χρησιμοποιήθηκε δείγμα κενάφ (*Hibiscus cannabinus* L.), από την ποικιλία Cuba 108 η οποία καλλιεργήθηκε για 170 ημέρες, συλλέχθηκε και ξηράνθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 ημέρες. Τα στελέχη του κενάφ διαχωρίστηκαν από τον φλοιό και την ψίχα και το ξυλώδες τμήμα λιοτριβήθηκε σε σφαιρόμυλο τύπου Retsch MM 2000 για 30 min και λυοφιλιώθηκε για 24 h.

Συσκευές:

- Αναδευτήρας
- Λυοφιλιωτής
- Φυγόκεντρος της εταιρείας Sigma (μοντέλο 3K 18).
- Φασματοφωτόμετρο FT-IR της εταιρείας Nicolet (μοντέλο 750 Magna series). Το φασματοφωτόμετρο ήταν εξοπλισμένο με αερόψυκτη πηγή εφοδιασμένη με νήμα από κράμα Ni – Cr (Nicochrome), πυροηλεκτρικό ανιχνευτή κατασκευασμένο από δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (Deuteriated TriGlycine Sulphate – DTGS) και μικρό υποδοχέα (microcup) δείγματος διαμέτρου 3 mm και ύψους 2 mm.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής εφοδιασμένος με το λογισμικό OMNIC (ver.3.1) το οποίο χρησιμοποιείται στη λήψη και επεξεργασία φασμάτων FT-IR. Ο υπολογιστής είναι συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο
- Φούρνος μικροκυμάτων

Αντιδραστήρια:

- Διαλύματα δωδεκυλο-σουλφονικού νατρίου (SDS) 1,5 % (w/v) και 0,5 % (w/v)
- Οκτανόλη
- Διάλυμα φαινόλης – οξικού οξέος – διασπασταγμένου ύδατος (PAW) 2:1:1 (w/v/v)
- Διάλυμα trans-1,2-κυκλοεξανοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) 0,05 M
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου 0,05 M
- Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 4 M
- Χλωριώδες νάτριο
- Παγόμορφο οξικό οξύ
- Απόλυτη αιθανόλη
- Θεϊκό οξύ 98% (w/w)
- Διαλύμα βορικού νατρίου (0,476% w/v σε πυκνό θεϊκό οξύ)
- Διάλυμα 3-φαίνυλο-φαινόλης (15% w/v σε διάλυμα NaOH 0,125 M)
- Άλατα γαλακτουρονικού οξέος

Απομόνωση ημικυτταρινών

Δυο διαδικασίες απομόνωσης με και χωρίς μικροκύματα εφαρμόστηκαν για την παραλαβή ημικυτταρινών από το φυτό κενάφ. Η κλασική μέθοδος χρήσης της απλής ανάδευσης για την απομόνωση των ημικυτταρινών περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.1. Για την απομόνωση των ημικυτταρινών με την χρήση μικροκυμάτων χρησιμοποιήθηκε η ίδια μεθοδολογία, η ίδια αρχική ποσότητα δείγματος, οι ίδιες ποσότητες και συγκεντρώσεις διαλυμάτων, με την μόνη διαφορά ότι οι χρόνοι εκχύλισης ήταν πολύ μικρότεροι. Συγκεκριμένα, για την κλασική μέθοδο απαιτούνται περίπου 72 h και 3,5 h για την μέθοδο με τα μικροκύματα.

Αναλυτικά φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα η μεθοδολογία και ο χρόνος της κάθε διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παραλαβή του τελικού προϊόντος.

Πίνακας 2.3.1.1. Μέθοδος απομόνωσης ημικυτταρινών με την κλασική μέθοδο ανάδευσης και την μέθοδο των μικροκυμάτων

Βήμα	Κλασική εκχύλιση	Εκχύλιση μικροκύματα	Φυτικό υλικό	Διάλυμα	Απομάκρυνση υλικού
1	Λειοτρίβιση 30 min	Λειοτρίβιση 30 min	50 g κενάφ		
2	Ομογενοποίηση 10 min	Ομογενοποίησ η 10 min	50 g ξηρών και τριμμένων στελεχών του κενάφ	300 mL SDS 1,5% (w/v)	Πρωτείνες, λιπίδια, πηκτίνες και υδατοδιαλυτά σάκχαρα
3	Διήθηση- Ξέπλυμα	Διήθηση- Ξέπλυμα		300 mL SDS 0,5% (w/v)	
4	Ανάδευση, 20 h	Ανάδευση, 30 min		300 mL SDS 0,5% (w/v)	
5	Διήθηση- Ξέπλυμα	Διήθηση- Ξέπλυμα		Απιονισμένο νερό	
6	Ανάδευση, 20 min	Ανάδευση, 10 min		2 x 400 mL PAW (2:1:1, w/v/v)	
7	Διήθηση- ξέπλυμα	Διήθηση- ξέπλυμα		Απιονισμένο νερό	
8	Ανάδευση, 24 h	Ανάδευση, 30 min	Κυτταρικά τοιχώματα	2 x 1 L EDTA 0,4M	Πηκτίνες
9	Ανάδευση, 24 h	Ανάδευση, 30 min		2 x 1L Na ₂ CO ₃ 0,02M	
10	Διήθηση- ξέπλυμα	Διήθηση- ξέπλυμα		Απιονισμένο νερό	
11	Ανάδευση, 1 h	Ανάδευση, 20 min	Κυτταρικά τοιχώματα ελεύθερα	2 x 400 mL H ₂ O, 2g NaClO ₂ και	Λιγνίνη

			πηκτινών	2mL παγόμορφο CH ₃ COOH	
12	Διήθηση- ξέπλυμα	Διήθηση- ξέπλυμα		Απιονισμένο νερό	
13	Ανάδευση, 2 h	Ανάδευση, 30 min	Κυτταρικά τοιχώματα	1L KOH 4 M - NaBH ₄ 10 mM	Ημικυτταρίνες
14	Εξουδετέρωση	Εξουδετέρωση		π. H ₂ SO ₄	
15	Φυγοκέντριση, 10 min	Φυγοκέντριση, 10 min	Ημικυτταρίνες		
16	Λειοφιλίωση, 24 h	Λειοφιλίωση, 24 h			

Στην περίπτωση της κλασσικής μεθόδου η ποσότητα των ημικυτταρινών που παρελήφθησαν ήταν 1,5 g , ενώ με την μέθοδο των μικροκυμάτων η ποσότητα των ημικυτταρινών ήταν 1,3 g. Για την ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων επιλέχθηκε η μέθοδος της φασματοσκοπίας FT-IR.

Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων FT-IR

Λήφθηκαν τα φάσματα FT-IR κάθε δείγματος απομονωμένης ημικυτταρίνης, του πολυγαλακτουρονικού οξέος. Πριν από τη λήψη των φασμάτων FT-IR ελήφθη το φάσμα FT-IR του βρωμιούχου καλίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόβαθρο. Όλα τα δείγματα προηγούμενα είχαν λυοφιλιωθεί επί 24 h. Τα φάσματα λήφθηκαν με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης. Για τη λήψη των φασμάτων έγιναν 100 “σαρώσεις” του δείγματος. Η διαχωριστική ικανότητα ήταν 4 cm⁻¹, η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολομέτρου 0,3165 cm.s⁻¹.

Τα φάσματα FT-IR εξομαλύνθηκαν και έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής των φασμάτων. Οι επεξεργασίες αυτές έγιναν με τη βοήθεια των λειτουργιών “αυτόματης εξομάλυνσης” και “αυτόματης διόρθωσης της βασικής γραμμής” του λογισμικού.

2.3.2 Σύγκριση μεθόδων παραλαβής ημικυτταρινών με απλή ανάδευση και μικροκύματα.

Η απομόνωση των ημικυτταρινών έγινε χρησιμοποιώντας μία βασική μεθοδολογία αλλά εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές. Η μεθοδολογία στηρίχθηκε στη σταδιακή απομάκρυνση, από τα δείγματα, όλων των άλλων συστατικών πλην της ημικυτταρίνης. Τα κυριότερα συστατικά που πρέπει να απομακρυνθούν είναι οι πηκτίνες, οι πρωτεΐνες και η λιγνίνη (Han-Yin Li et al, 2015).

Σύμφωνα με τη πρώτη τεχνική η απομόνωση έγινε κάτω από ήπιες συνθήκες ενώ στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκαν μικροκύματα με σκοπό τη μείωση του συνολικού χρόνου κατεργασίας των δειγμάτων. Οι χρόνοι που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κατεργασία των δειγμάτων με τη χρήση υπερήχων ήταν το 5-10 % του χρόνου του αντίστοιχου σταδίου σε ήπιες συνθήκες.

Πριν από την εκχύλιση των πηκτινών απομακρύνονται διάφορα μεσοκυτταρικά συστατικά, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, οι χρωστικές, το άμυλο, τα ελεύθερα σάκχαρα και τα ανόργανα άλατα. Για το σκοπό αυτό γίνονται διαδοχικές εκχυλίσεις του φυτικού ιστού με υδατικά διαλύματα SDS. Ακολουθεί κατεργασία του αποσυντιθέμενου ιστού με διάλυμα PAW, η οποία οδηγεί στην απομάκρυνση από το δείγμα όσων πρωτεϊνών, λιπιδίων και χρωστικών ουσιών έχουν παραμείνει στον φυτικό ιστό καθώς και του SDS. Το στερεό υπόλειμμα που απομένει αποκαλείται “υλικό κυτταρικών τοιχωμάτων” (CWM).

Στη συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση των πηκτινών. Το διάλυμα EDTA είναι συμπλεκτικό αντιδραστήριο το οποίο αντιδρώντας με τα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου συντελεί στην κατάρρευση της δομής των πηκτινών καθιστώντας έτσι τις πηκτίνες περισσότερο υδατοδιαλυτές.

Οι πηκτίνες όμως οι οποίες δεν είναι συνδεδεμένες με ιόντα ασβεστίου ή μαγνησίου, παρουσιάζουν υψηλό βαθμό εστεροποίησης και έχουν σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος δεν μπορούν να εκχυλιστούν από τα συμπλεκτικά αντιδραστήρια. Απαιτείται να υδρολυθούν σε βασικό περιβάλλον, οπότε τα καρβοξυλικά ιόντα του α-D-γαλακτουρονικού οξέος που θα προκύψουν καθιστούν τις πηκτίνες αυτές πολικές και επομένως δυνατή την εκχύλισή τους με ήπια αλκαλικά υδατικά διαλύματα (Han-Yin Li

et al, 2015). Για το λόγο αυτό στη συνέχεια έγινε κατεργασία των δειγμάτων με διάλυμα ανθρακικού νατρίου 0,05 M.

Ακολουθεί η απομάκρυνση της λιγνίνης που είχε παραμείνει στο δείγμα. Το θερμό και όξινο διάλυμα (pH=3–4) χλωριώδους νατρίου οξειδώνει και αποικοδομεί τη λιγνίνη καθώς και τα υπολείμματα των ημικυτταρινών, καθιστώντας τα έτσι διαλυτά στο νερό.

Στη συνέχεια απομακρύνονται οι ημικυτταρίνες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 4 M το οποίο δημιουργεί ισχυρό αλκαλικό περιβάλλον και οδηγεί αφ' ενός στη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου με τους οποίους είναι συνδεδεμένες οι ημικυτταρίνες με την κυτταρίνη και αφ' ετέρου στην αποικοδόμηση, μέσω του μηχανισμού της β-απόσπασης, των ημικυτταρινών.

Αποδόσεις σε ημικυτταρίνη

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η ημικυτταρίνη στα φυτά κυμαίνεται από 2 έως 5%. Όμως το ποσοστό αυτό μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού, την ηλικία του καθώς και από τη μέθοδο προσδιορισμού.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση του κενάφ σε ημικυτταρίνη όταν η απομόνωση έγινε σε ήπιες συνθήκες ήταν 3 % και 2,6 % χρησιμοποιώντας μικροκύματα (Πίνακας 2.3.2.1). Από τις αποδόσεις προκύπτει ότι τα μικροκύματα ήταν εξίσου αποτελεσματικά στη διαδικασία απομόνωσης της ημικυτταρίνης από το κενάφ, επιταχύνοντας ταυτόχρονα σημαντικά την όλη διαδικασία από τις 72 στις 3,5h.

Πίνακας 2.3.2.1 Συνοπτική παρουσίαση των αποδόσεων για κάθε δείγμα ημικυτταρινών που απομονώθηκε.

Μέθοδος	Κλασσική μέθοδος	Μέθοδος μικροκυμάτων
Πρώτη ύλη	50 g	50 g
Ημικυτταρίνες	1,5 g	1,3 g
Απόδοση	3,0 %	2,6 %

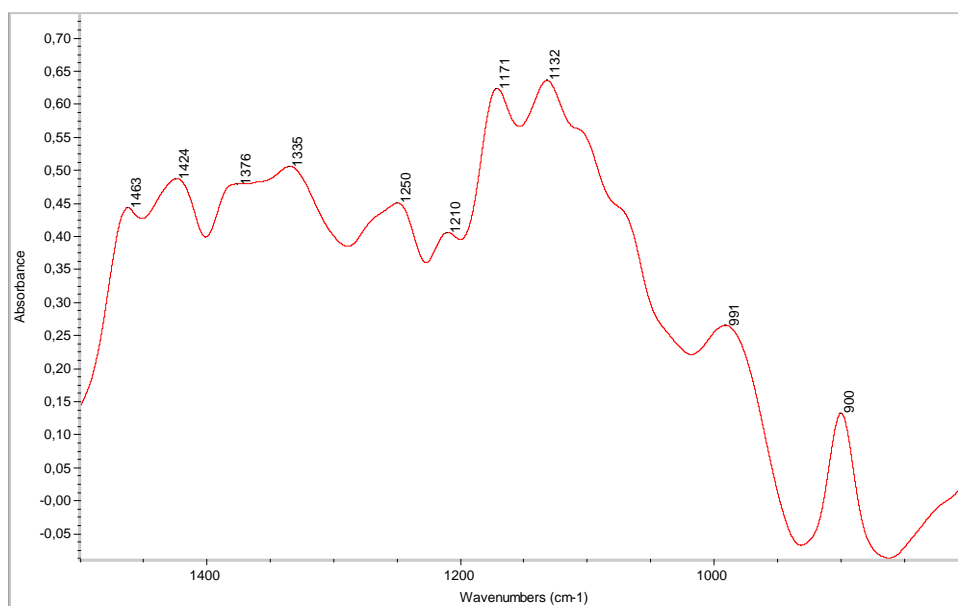
Φασματοσκοπική μελέτη FT-IR

Στα παρακάτω σχήματα φαίνονται τα φάσματα στην περιοχή $1500-800\text{cm}^{-1}$ της ξυλόζης και των ημικυτταρινών που απομονώθηκαν με την κλασσική μέθοδο και με την μέθοδο των μικροκυμάτων. Η παραπάνω περιοχή επιλέχτηκε γιατί συνδέεται με τη δομή των μορίων (περιοχή δακτυλικών αποτυπωμάτων).

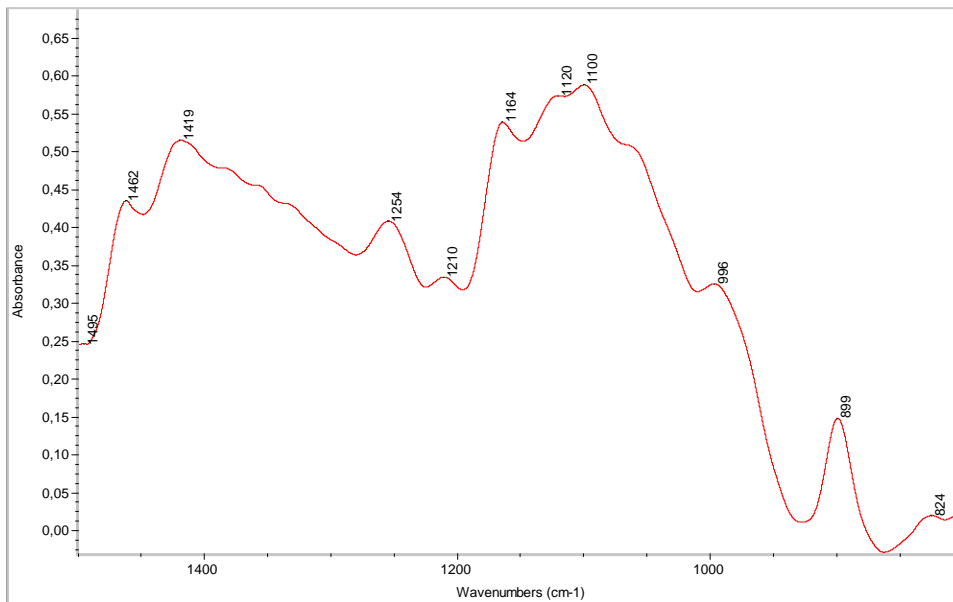
Στα φάσματα γίνεται εμφανής η ομοιότητα του φάσματος των ημικυτταρινών του κενάφ από την κλασσική μέθοδο και την μέθοδο των μικροκυμάτων, με το φάσμα της γλυκόζης.

Οι κορυφές που εμφανίζονται αντιστοιχούν στα $1465-1460\text{cm}^{-1}$, $1431-1413\text{cm}^{-1}$, $1350-1332\text{cm}^{-1}$, $1254-1248\text{cm}^{-1}$, $1172-1158\text{cm}^{-1}$, $1135-1132\text{cm}^{-1}$, $1122-1120\text{cm}^{-1}$, $1100-1090\text{cm}^{-1}$, $1070-1069\text{cm}^{-1}$, 1046cm^{-1} , $1003-993\text{cm}^{-1}$, $900-898\text{cm}^{-1}$, $831-824\text{cm}^{-1}$ (Pappas et al, 1999, Sene et al, 1994).

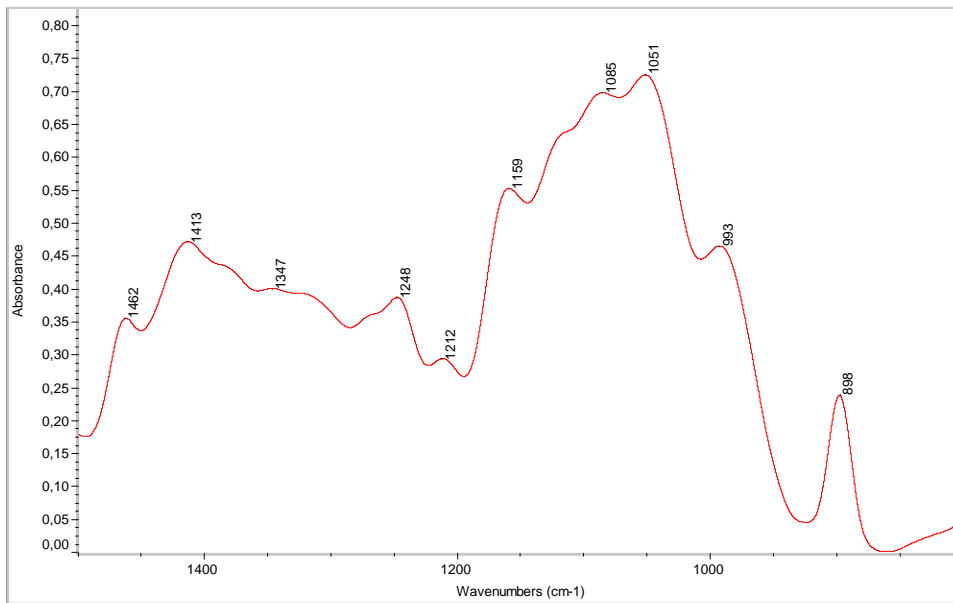
Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στο $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$ και σε αρωματικό δακτύλιο. Η δεύτερη στο $-\text{CH}_2-$. Η τρίτη οφείλεται στο δεσμό C-C και C-O. Η τέταρτη οφείλεται στο $-\text{OH}$. Η πέμπτη, η έκτη και η έβδομη κορυφή έχουν αποδοθεί στους δεσμούς C-O-C και C-C των ξυλανών. Η όγδοη, ένατη και δέκατη κορυφή αποδίδονται στο C-O και C-C των ξυλανών. Η ενδέκατη κορυφή οφείλεται στους δεσμούς C-C, C-OH, C-O των ξυλανών. Η δωδέκατη κορυφή αντιστοιχεί στο β-γλυκοζιτικό δεσμό. Η τελευταία κορυφή οφείλεται στη παραμόρφωση του δακτυλίου των σακχάρων (Pappas et al, 1999, Sene et al, 1994, Carmen-Mihaela Popescu et al, 2011).



Σχήμα 2.3.2.1 Περιοχή $1500-800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR της ξυλάνης



Σχήμα 2.3.2.2 Περιοχή $1500-800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR της ημικυτταρίνης με την κλασσική μέθοδο



Σχήμα 2.3.2.3 Περιοχή $1500-800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR της ημικυτταρίνης με την μέθοδο των μικροκυμάτων

Από τη φασματοσκοπική μελέτη προκύπτει ότι οι ημικυτταρίνες που απομονώθηκαν από το κενάφ μοιάζουν σχεδόν απόλυτα με την ξυλάνη.

Πίνακας 2.3.2.2 Απορροφήσεις των FT-IR φασμάτων της ξυλάνης και της ημικυτταρίνης που απομονώθηκε με ήπιες μεθόδους και την μέθοδο των μικροκυμάτων.

Ξυλάνη (cm ⁻¹)	Ημικυτταρίνη από κενάφ	
	Ήπιες συνθήκες (cm ⁻¹)	Μικροκύματα (cm ⁻¹)
3100 –3600	3100 -3600	3100 -3600
2800 –3000	2800 -3000	2800 -3000
1463	1462	1462
1424	1419	1413
1376	1370	1372
1335	1350	1347
1250	1254	1248
1210	1210	1212
1171	1164	1158
1131	1120	1115
1091	1100	1071
991	996	990
900	899	898
829	824	827

Τα φάσματα της ημικυτταρίνης από το κενάφ τα οποία απομονώθηκαν με χρήση της ήπιας μεθόδου και της μεθόδου με τα μικροκύματα παρουσιάζουν ομοιότητες ως προς το πλήθος των κορυφών, οι οποίες μπορεί απλά να έχουν μια μικρή μετατόπιση, και μια μικρή διαφορά ως το σχήμα και την υφή τους, τόσο μεταξύ τους όσο και το φάσμα της ξυλάνης

Συμπερασματικά:

Η απομόνωση της ημικυτταρίνης έγινε από το ετήσιο φυτό (κενάφ). Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε μία βασική μεθοδολογία με δύο όμως διαφορετικές τεχνικές. Η μία τεχνική ήταν αυτή των ήπιων συνθηκών και η άλλη η χρήση μικροκυμάτων. Η χρήση της τεχνικής DRIFTS καθώς μας επέτρεψε να συγκρίνουμε την ημικυτταρίνη που απομονώθηκε από την κλασσική μέθοδο και την μέθοδο των μικροκυμάτων ως προς την ομοιότητά τους.

Η χρήση της τεχνικής των μικροκυμάτων είναι εξίσου αποτελεσματική με τη χρήση ήπιων συνθηκών, έχοντας επιπλέον το πλεονέκτημα ότι μειώνουν το συνολικό χρόνο που απαιτείται για την απομόνωση της κυτταρίνης από τις 72 στις 3,5 h.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης και φρουκτόζης στο μέλι με φασματοσκοπία FT-Raman – Προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης των διαφόρων ειδών μελιού με φασματοσκοπία FT-Raman και FT-IR

3.1 Μέλι

Το μέλι σύμφωνα και με την Κοινοτική Νομοθεσία (Οδηγία 2001/110/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου), είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν.

Η φυτική και γεωγραφική προέλευση και οι συνθήκες ωρίμανσης του μελιού, είναι οι κύριοι παράγοντες που ευθύνονται για τον μεγάλο αριθμό συστατικών του μελιού και κατά συνέπεια, για τις φυσικοχημικές ιδιότητες που παρουσιάζει το τελικό προϊόν. Έτσι, το μέλι μπορεί να περιέχει πλήθος ουσιών από 14 διαφορετικές κατηγορίες συστατικών: σάκχαρα, οργανικά οξέα, νερό, πρωτεΐνες, αμινοξέα, βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, ένζυμα, φλαβονοειδή, παράγωγα του φουρανίου, πτητικές-αρωματικές ουσίες, αλκαλοειδή, κολλοειδή, γυρεοκκόκκους.

Το σύνολο των ουσιών αυτών αποτελούν τα κύρια συστατικά του μελιού και είναι οι ουσίες που συναντούμε σε όλα τα μέλια σε μεγαλύτερες ή μικρότερες συγκεντρώσεις. Η μέση σύσταση του ελληνικού μελιού φαίνεται στον Πίνακα 3.1.1:



Εικόνα 3.1.1 Δείγμα μελιού

Πίνακας 3.1.1 Μέση σύσταση του ελληνικού μελιού, με βάση 144 δείγματα από μέλια ανθέων και 30 μελιτωμάτων (Thrasynoulou and Manikis, 1995).

Συστατικό	Μέλι ανθέων		Μέλι από μελιτώματα	
	Μέση τιμή	Διακύμανση	Μέση τιμή	Διακύμανση
Υγρασία (%)	17,2	14,9-23,0	15,9	13,0-18,9
Φρουκτόζη (%)	38,52	28,0-46,1	28,35	22,2-33,9
Γλυκόζη (%)	31,98	23,4-39,2	22,5	13,4-31,9
Σακχαρόζη (%)	3,29	0,0-7,0	3,68	0,01-12,0
Μαλτόζη (%)	-	-	6,24	0,5-11,2
pH	4,0	3,3-5,4	4,9	4,5-5,9
Αγωγιμότητα (mS/cm)	0,64	0,15-2,06	1,33	1,01-1,69
Τέφρα (%)	0,32	0,1-1,2	0,75	0,4-1,1
HMF (mg/Kg)	5,1	0,0-11,9	2,4	0,0-8,2
Διαστάση (DU)	22,92	8,6-51,0	23,45	10,4-37,2
Προλίνη (mg/Kg)	550	264-1205	452	290-673

Η ποιότητα και η ποσότητα που κάθε συστατικό από τα παραπάνω βρίσκεται σε ένα μέλι, επηρεάζει όλες τις φυσικές του ιδιότητες: το χρώμα, το άρωμα, τη γεύση, την τάση του για κρυστάλλωση ή για ζύμωση, την πυκνότητα, το ιξώδες και τη ρευστότητά του, την υγροσκοπικότητα του, αλλά και την αντιοξειδωτική και την αντιβακτηριδιακή δράση που παρουσιάζει.

Μελετώντας το σύνολο των φυσικοχημικών, οργανοληπτικών και μικροσκοπικών χαρακτηριστικών που ορίζουν μία συγκεκριμένη κατηγορία αμιγούς μελιού, μπορούμε να δώσουμε ταυτότητα στο μέλι μας και να το αξιολογήσουμε ποιοτικά σύμφωνα με τους κανόνες της Διεθνούς Νομοθεσίας.

3.1.1 Σάκχαρα

Το μέλι αποτελείται κατά 83% περίπου από σάκχαρα (Πίν. 3.1.2.). Τα σάκχαρα είναι οργανικές ενώσεις μικρού μέχρι μεγάλου μοριακού βάρους, που παρέχουν σημαντικό ποσοστό της ενέργειας που χρειάζονται οι ζωντανοί οργανισμοί για την εκτέλεση ζωτικών λειτουργιών, ενώ αποτελούν δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και των κυττάρων σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Σε αναλύσεις στο μέλι, έχουν βρεθεί τουλάχιστον 22 διαφορετικά σάκχαρα.

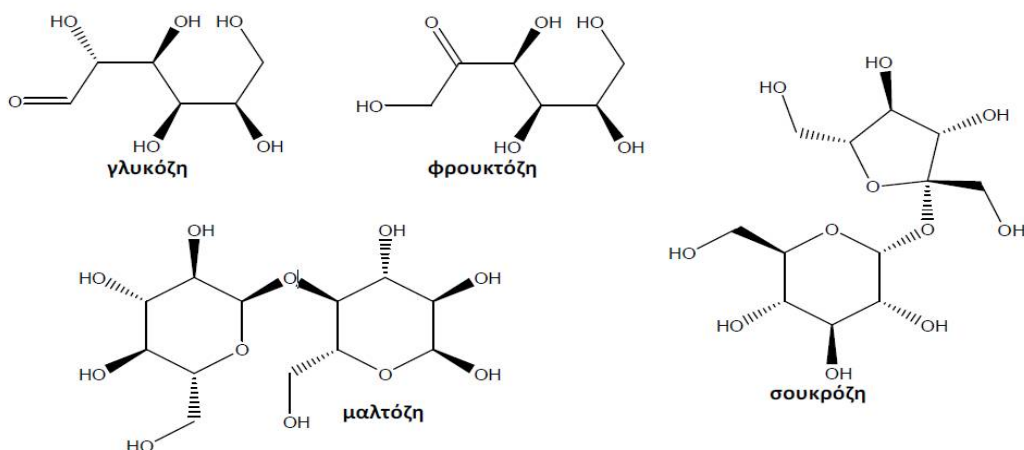
Τα σάκχαρα που συναντάμε σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις στο μέλι είναι οι μονοσακχαρίτες φρουκτόζη και γλυκόζη, σάκχαρα που δεν υπάρχουν στο νέκταρ ή τα μελιτώματα των φυτών, αλλά προέχονται από την ιμβερτοποίηση (υδρόλυση) της σακχαρόζη στον πρόλοβο των μελισσών. Κατά την διαδικασία παραγωγής του μελιού, οι μέλισσες εκκρίνουν το ένζυμο ιμβερτάση (invertase) από τους υποφαρυγγικούς τους αδένες, το οποίο διασπά τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Λόγω της υψηλότερης διαλυτότητας της γλυκόζης από τη σακχαρόζη στη θερμοκρασία κυψέλης, παράγεται ένα διάλυμα σακχάρων μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε φρουκτόζη (Crane, 1990). Στο Σχήμα 3.1.1 φαίνεται η χημική δομή των σημαντικότερων σακχάρων του μελιού.

Πίνακας 3.1.2 Τα κυριότερα σάκχαρα του μελιού.

Σάκχαρα	Μέση περιεκτικότητα (%)	Διακύμανση (%)
Φρουκτόζη	39,3	21,7-53,9
Γλυκόζη	32,9	20,4-44,4
Φρουκτόζη/Γλυκόζη	1,19	1,06-1,21
Σακχαρόζη	2,3	2,7-16
Μαλτόζη και άλλοι ολιγοσακχαρίτες	7,3	
Άλλα ανώτερα σάκχαρα	1,5	
Σύνολο	83,3	

Η σακχαρόζη (δισακχαρίτης) είναι το βασικότερο σάκχαρο που περιέχεται στο νέκταρ και τα μελιτώματα των φυτών, ενώ αποτελεί και συστατικό του μελιού σε μικρή συγκέντρωση (2,5%). Η μαλτόζη, η μελεζιτόζη και άλλοι δισακχαρίτες, βρίσκονται στο μέλι σε ποσοστό 7,3%.

Το μέλι περιέχει επίσης πολλά σε αριθμό άλλα σάκχαρα, γνωστά ως ολιγοσακχαρίτες. Οι ολιγοσακχαρίτες είναι μέσου μεγέθους σύνθετα σάκχαρα, που περιέχουν πάνω από τρία απλά σάκχαρα, ενώ συχνά απαρτίζονται από μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες. Ενίοτε αναφέρονται και ως ανώτερα σάκχαρα. Η ισομαλτόζη, η ραφινόζη, η τρεχαλόζη, η καλοβιόζη, η νιγερόζη, η τυρανόζη, η κεστόζη, η κεντοβιόζη, η τρεαλόζη, η δεξτρίνη είναι κάποια από τα περιεχόμενα στο μέλι σάκχαρα που αναφέρονται ενδεικτικά.



Σχήμα 3.1.1 Χημική δομή των σημαντικότερων σακχάρων του μελιού.

Συγκριτικά με τα άλλα σάκχαρα, η γλυκόζη είναι σχετικά αδιάλυτη και το ποσοστό της στο μέλι, καθορίζει την τάση του μελιού για κρυστάλλωση. Η φρουκτόζη είναι ένα πολύ γλυκό σάκχαρο, καθώς επίσης και υγροσκοπικό, απορροφώντας υγρασία από την ατμόσφαιρα. Αντίθετα η γλυκόζη και η σακχαρόζη είναι κατά πολύ λιγότερο υγροσκοπικά σάκχαρα, συνεπώς οι υγροσκοπικές ιδιότητες του μελιού οφείλονται εξ ολοκλήρου στη φρουκτόζη. Πολύ λίγα μέλια είναι πλουσιότερα σε γλυκόζη παρά σε φρουκτόζη σύμφωνα με την μέση σύσταση του μελιού. Η μέση σύσταση των σακχάρων σε ένα μέλι διαφέρει ανάλογα με το αν αυτό είναι ανθόμελο, ή είναι μέλι από μελιτώματα (Thrasynoulou and Manikis, 1995). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1.2, τα μέλια ανθέων είναι πλουσιότερα σε απλά σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) απ' ό,τι τα μέλια από μελιτώματα, αλλά φτωχότερα σε γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, σακχαρόζη, δισακχαρίτες και ανώτερα σάκχαρα. Η μαλτόζη, ως συστατικό των μελιτωμάτων παρουσιάζεται μόνο στα μέλια μελιτωμάτων και μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με τη σακχαρόζη. Στα αμιγή μέλια ανθέων η μαλτόζη δεν αποτελεί συστατικό.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων στο μέλι του προσδίδουν χαρακτηριστικές φυσικές ιδιότητες, όπως υψηλό ιξώδες, υψηλή πυκνότητα, τάση για κρυστάλλωση, υγροσκοπικότητα και αντιβακτηριακές ιδιότητες.

Στη μεγάλη ποικιλία, αλλά και το είδος των σακχάρων του μελιού οφείλεται το γεγονός ότι δεν πρόκειται απλά για μια γλυκαντική τροφή. Η ικανότητά του να κρατά χαμηλή την υγρασία και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής σχετίζεται με τους υδατάνθρακες, ενώ είναι καταλυτική και η συνεισφορά αυτών στο χρώμα και τη γεύση.

3.1.2. Οργανικά οξέα

Το μέλι περιέχει έναν αριθμό 20 περίπου οργανικά οξέα, σε μέση συγκέντρωση 0,57% (διακύμανση 0,17-1,17%). Μερικά από αυτά είναι το γλυκονικό οξύ, το κιτρικό, το οξικό, το βουτυρικό, το ταρταρικό, το οξαλικό, το μαλεϊκό, το μηλικό, το μυρμηκικό κ.α. Τα οργανικά οξέα, παίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην όξινη αντίδρασή του και στη γεύση του μελιού, όσο και στην αντιβακτηριακή του δράση. Το μέσο pH του μελιού

κυμαίνεται μεταξύ 3,3 και 5,9 (Πιν. 3.1.1). Η ολική οξύτητα του μελιού είναι 29,12 meq/Kg, με την τιμή να κυμαίνεται μεταξύ 8,68 και 59,49 meq/kg και την τυπική απόκλιση να έχει τιμή 10,33 meq/Kg.

Από τα οργανικά οξέα που περιέχονται στο μέλι, το σημαντικότερο είναι το γλυκονικό οξύ, το οποίο παράγεται στο μέλι από την επίδραση του ενζύμου οξειδάση στη γλυκόζη στη γλυκόζη, αντίδραση κατά την οποία σχηματίζεται και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Στο υπεροξειδίο του υδρογόνου και σε άλλες ενώσεις, όπως κάποια καρβοξυλικά οξέα, οφείλεται μεγάλο μέρος της αντιβακτηριακής δράσης που έχει το μέλι. Το γλυκονικό οξύ, επίσης, ανάλογα με την συγκέντρωσή του σε ένα μέλι, έχει την ιδιότητα να εντείνει τη γεύση του.

3.1.3. Πρωτεΐνες και αμινοξέα

Το μέλι διαθέτει περίπου 20 πρωτεΐνες και 18 αμινοξέα, συστατικά που ανιχνεύονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο μέλι. Οι πρωτεΐνες αποτελούν το 0,2% της μέσης σύστασης του μελιού. Είναι φυτικής προέλευσης, προέρχονται δηλαδή αποκλειστικά από τη γύρη, το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις των φυτών από τα οποία τρέφονται οι μέλισσες.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες του μελιού είναι πεπτόνες, αλβουμίνες, γλοβουλίνες και νουκλεοπρωτεΐνες με κυριότερη την αλβουμίνη.

Το ολικό N που περιέχουν οι πρωτεΐνες του μελιού, ανέρχεται σε 0,04%, από το οποίο το 40-65% είναι πρωτεϊνικό, ενώ το υπόλοιπο υπάρχει στα ελεύθερα αμινοξέα. Λόγω της προέλευσης των πρωτεϊνών, είναι δυνατόν να συναντάμε διαφορετικές πρωτεΐνες σε κάθε μέλι. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι από τις 20 συνολικά που έχουν βρεθεί, μόνο οι 4 συναντώνται σε όλα τα μέλια.

Τα ελεύθερα αμινοξέα υπάρχουν στο μέλι επίσης σε μικρές ποσότητες (0,05-0,1%). Μερικά είναι η προλίνη, η λυσίνη, η βαλίνη, η αλανίνη, η φαινοαλανίνη, η τυροσίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, το γλουταμινικό το ασπαραγινικό, κ.α.

Το σημαντικότερο από τα αμινοξέα είναι η προλίνη, η οποία βρίσκεται και σε μεγαλύτερη αφθονία. Η προλίνη κατέχει το 50-85% του συνόλου των αμινοξέων του μελιού. Εκκρίνεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών και έχει ως σκοπό τη ρύθμιση της προσθήκης ιμπερτάσης στο νέκταρ (Χαριζάνης, 1996).

Τα ελεύθερα αμινοξέα βρίσκονται σε μεγαλύτερες συνολικές συγκεντρώσεις στο μέλι απ' ό τι τα πρωτεϊνικά αμινοξέα (Bosi & Battaglini, 1978). Όσον αφορά δε, την ποσότητα και την ποιότητα των αμινοξέων ανάλογα με την φυτική προέλευση των μελιών, τα μέλια ανθέων περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε πρωτεϊνικά αμινοξέα, έναντι των μελιών μελιτωμάτων, ενώ συμβαίνει το αντίθετο για τα ελεύθερα αμινοξέα, με εξαίρεση την φαινυλαλανίνη, που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα ανθόμελα.

3.1.4. Ένζυμα

Τα κύρια ένζυμα που περιέχονται στο μέλι είναι, η ιμπερτάση, η γλυκοξειδάση και η διαστάση, που προέρχονται από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών και η καταλάση και η οξική φωσφατάση που είναι φυτικής προέλευσης (Crape, 1990). Είναι από τα πιο ενδιαφέροντα και συνάμα τα πιο σημαντικά από τα συστατικά του μελιού, επειδή παίζουν ζωτικό ρόλο στην παραγωγή του ώριμου μελιού από το αρχικό ανώριμο υλικό, τον φυτικό χυμό. Κάθε ένα από αυτά λαμβάνει μέρος ως καταλύτης σε μία σειρά χημικών αντιδράσεων μεταξύ των συστατικών της τροφής της μέλισσας και των ουσιών που εκκρίνονται από αυτή και λαμβάνουν χώρα από την πρώτη στιγμή που η μέλισσα συλλέξει την τροφή τη, μέχρι τη στιγμή που το ώριμο μέλι σφραγιστεί στις κηρήθρες. Κάποιες χημικές αντιδράσεις δε, εξακολουθούν να πραγματοποιούνται και μετά την συλλογή του μελιού, κατά την αποθήκευσή του, επιδρώντας στις φυσικοχημικές ιδιότητές του.

3.1.5. Νερό

Η φυσική υγρασία του μελιού αποτελεί το «υπόλειμμα» του νερού που υπήρχε στο νέκταρ προ της έναρξης της διαδικασίας της ωρίμασης. Το ποσό αυτής είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ανθεκτικότητα του μελιού στις ζυμώσεις. Το μέλι περιέχει νερό σε ποσοστό 17% (κυμαίνεται από 13-25%). Οι μέλισσες, άλλωστε, σφραγίζουν το μέλι στις κηρήθρες όταν η υγρασία του φτάσει το 15-17%.

Η υγρασία (νερό) στο μέλι είναι καθοριστικός παράγοντας που επηρεάζει πολλά από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού και παίζει σημαντικό ρόλο στις

φυσικοχημικές του ιδιότητες και την «συμπεριφορά» του μελιού μετά την συγκομιδή και τη συσκευασία του. Ιδιότητες όπως το χρώμα, η κρυστάλλωση, η ζύμωση, το ιξώδες, εξαρτώνται άμεσα από το νερό που περιέχεται στο μέλι .

3.1.6. Μέταλλα και ιχνοστοιχεία, τέφρα του μελιού

Το μη πτητικό, ανόργανο υπόλειμμα του μελιού, έπειτα από καύση αυτού, καλείται τέφρα (ash) και αποτελείται από μέταλλα, μακροστοιχεία, ή ιχνοστοιχεία. Η ολική τέφρα στο μέλι κυμαίνεται από 0,02-1%, συνήθως δε βρίσκεται μεταξύ 0,1% και 0,3% .

Το στοιχείο που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο μέλι είναι το Κάλιο (K) και ακολουθεί το Θείο (S), το Χλώριο (Cl), το Ασβέστιο (Ca) και ο Φώσφορος (P). Τα υπόλοιπα ανόργανα συστατικά του μελιού βρίσκονται σε πολύ μικρότερες ποσότητες.(Crane, 1990).

Τα μέταλλα αρχικά βρίσκονται στο έδαφος, προσλαμβάνονται από τα φυτά και καταλήγουν στο μέλι μέσω του νέκταρος ή των μελιτωμάτων, που οι μέλισσες συλλέγουν από αυτό. Το ποσοστό των ανόργανων συστατικών που περιέχει ένα μέλι, μπορεί να επηρεάσει το χρώμα του μελιού, και εξαρτάται από τη βοτανική προέλευση του φυτού από το οποίο τράφηκαν οι μέλισσες.

3.1.7. Πτητικά συστατικά

Τα πτητικά συστατικά είναι οι ουσίες αυτές που συνθέτουν το άρωμα του εκάστοτε μελιού. Από χημικής απόψεως, οι διάφορες ουσίες που συναντάμε στα μέλια ανήκουν σε πολλές ομάδες: τερπενοειδή, νορισοπρενοειδή, φαινολικά συστατικά, αζωτούχες ενώσεις, προϊόντα της αντίδρασης 'Maillard', υδρογονάνθρακες, λιπαρά οξέα και εστέρες αυτών, αλειφατικές αλκοόλες και αλδεΐδες, εστέρες κλπ.

Εκτός από τον καθορισμό της εμπορικής αξίας του μελιού, τα πτητικά συστατικά έχουν και άλλη μια μεγάλη χρησιμότητα. Αποτελούν δείκτες της βοτανικής και (κάποιες φορές) της γεωγραφικής προέλευσης του μελιού, καθώς η σύνθεσή τους διαφέρει σημαντικά από μέλι σε μέλι. Δεκάδες είναι οι ουσίες που έχουν αναγνωρισθεί ως πιθανοί βοτανικοί δείκτες για πολλούς διαφορετικούς τύπους μελιών (Anklam, 1998, Cuevas-Glory *et al*, 2007).

3.1.8. Κολλοειδή

Τα κολλοειδή του μελιού αποτελούν το 0,1 έως και 1% του μελιού, με τα σκούρα μέλια να έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα από τα ανοιχτόχρωμα. Δε φιλτράρονται εύκολα, ενώ έχουν σημαντική συνεισφορά στη γεύση του μελιού. Αποτελούνται από πρωτεΐνες (κατά 55-65%), κομμάτια κεριού, πεντοζάνες και ανόργανα συστατικά.

Φαίνεται να προέρχονται τόσο από τις μέλισσες, όσο και από τη βοτανική πηγή προέλευσης του μελιού. Τα συστατικά του μελιού που βρίσκονται σε κολλοειδή φάση επηρεάζουν κάποιες ιδιότητες αυτού, όπως το χρώμα, τη γεύση, τη διαύγεια και την κρυστάλλωση (Lothrop and Paine, 1931).

3.1.9. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φυτικών ουσιών. Αποτελούν το 0,5% της γύρης, το 10% της πρόπολης, ενώ το μέλι περιέχει κατά μέσο όρο 6000 µg/Kg. Το σημαντικότερο φλαβονοειδές του μελιού είναι η πινοκεμπρίνη, η οποία βρίσκεται σε όλα σχεδόν τα δείγματα, σε συγκέντρωση 2-3 µg/mL. Άλλα σημαντικά φλαβονοειδή είναι η χρυσίνη, η γκαλανγκίνη και η πινομπανκσίνη. Τα φλαβονοειδή του μελιού μπορεί να προέρχονται από την πρόπολη, τη γύρη, αλλά και το νέκταρ ή το μελίτωμα που οι μέλισσες συλλέγουν (Tomas-Barberan *et al.*, 2001). Στην πρώτη περίπτωση ανήκουν τα μείζονα φλαβονοειδή του μελιού που βρίσκονται σε όλα τα μέλια, όπως πινομπανκσίνη, πινοκεμπρίνη, χρυσίνη, γκαλανγκίνη, τεκτοχρυσίνη, απιγενίνη, καθώς επίσης και μεθυλεστέρες της καμφερόλης. Από την πρόπολη προέρχονται και πολλά παράγωγα του καφεϊκού οξέος. Τα φλαβονοειδή που προέρχονται από την πρόπολη δε μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες για τη βοτανική προέλευση των μελιών, σε αντίθεση με κάποια από αυτά που προέρχονται από τη γύρη ή το νέκταρ ή το μελίτωμα που συλλέγει η μέλισσα. Έτσι, η εσπερετίνη αποτελεί δείκτη του μελιού από εσπεριδοειδή, ενώ πολλά άλλα φαινολικά παράγωγα μπορούν να καθορίζουν την προέλευση διαφόρων μελιών.

3.1.10. HMF

Η HMF (5-υδροξυμεθυλο-2-φουρανοκαρβοξαλδεΐδη) είναι η σημαντι-κότερη και αφθονότερη ουσία από αυτές που ανήκουν στα παράγωγα του φουρανίου και που υπάρχουν στο μέλι. Οι ουσίες αυτές παράγονται κατά τη θέρμανση των σακχάρων του μελιού ή από την επίδραση της παρατεταμένης αποθήκευσης αυτού. Οι ουσίες αυτές σχηματίζονται θερμαίνοντας το μέλι ακόμη και στους 50°C.

Η HMF υπάρχει σε όλα τα μέλια, σε ποικίλες συγκεντρώσεις. Αποτελεί κριτήριο ποιότητας του μελιού. Μάλιστα, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία, η συγκέντρωσή της δεν πρέπει να ξεπερνά τα 40 mg/Kg, με εξαίρεση μέλια με χαμηλή περιεκτικότητα σε διαστάση, για τα οποία το όριο της HMF είναι 15 mg/Kg (π.χ. μέλι πορτοκαλιάς).

3.1.11. Γυρεόκοκκοι του μελιού

Το μέλι περιέχει ένα σημαντικό αριθμό γυρεοκόκκων οι οποίοι προέρχονται από τα φυτά που επισκέπτεται η μέλισσα προκειμένου να συλλέξει την πρώτη ύλη για την παραγωγή του μελιού. Ανάλογα με την αναλογία των γυρεοκόκκων μες στο μέλι, αλλά και τον συνολικό αριθμό αυτών, τα μέλια κατηγοριοποιούνται ως προς την προέλευσή τους σε αμιγή μέλια, ανθόμελα ή μέλια μελιτώματος. Για να χαρακτηριστεί ένα μέλι ως αμιγές ενός φυτού θα πρέπει να περιέχει γυρεόκοκκους από αυτό το φυτό σε ποσοστιαία αναλογία, αλλά και σε συνολικό αριθμό πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο που έχει θεσπιστεί έπειτα από αναλύσεις πολλών ετών. Για παράδειγμα, το μέλι από καστανιά για να χαρακτηριστεί αμιγές θα πρέπει να περιέχει περισσότερους από 87% γυρεόκοκκους καστανιάς, ενώ ο συνολικός αριθμός γυρεοκόκκων στο μέλι να είναι πάνω από 100.000/10γρ. Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι αυτοί οι αριθμοί διαφέρουν πολύ μεταξύ των μελιών επειδή τα διάφορα φυτά παράγουν ποικίλες ποσότητες γύρης. Έτσι, στο αμιγές μέλι πορτοκαλιάς, το ποσοστό γυρεοκόκκων από εσπεριδοειδή θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 3%, ενώ ο συνολικός αριθμός των γυρεοκόκκων δε θα πρέπει να ξεπερνά τους 70.000/10γρ.

Στην περίπτωση που το παραγόμενο μέλι χαρακτηριστεί ως ανθόμελο, περιέχει γυρεόκοκκους από πολλά φυτά σε ποικίλες αναλογίες. Κανένας τύπος γυρεόκοκκου δεν ξεπερνά το όριο πάνω από το οποίο θα μπορούσε να δώσει αμιγή χαρακτήρα στο εν λόγω μέλι. Τέλος, στα μέλια μελιτώματος βρίσκονται γυρεόκοκκοι από διάφορα φυτά,

όχι όμως από το ίδιο το φυτό προέλευσης. Για τον καθορισμό της προέλευσης του μελιού αναλύονται τα δείγματα μελιών για άλλα χαρακτηριστικά, όπως η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η περιεκτικότητα σε νερό και σάκχαρα κλπ. Επίσης, στο ίζημα του μελιού που προκύπτει έπειτα από φυγοκέντριση υδατικού διαλύματος βρίσκονται σπόρια από μικροοργανισμούς, χαρακτηριστικό των μελιών από μελιτώματα.

Η γυρεοσκοπική ανάλυση του μελιού είναι μια διαδικασία πολύ σημαντική για τον καθορισμό της βοτανικής προέλευσης των μελιών, βοηθά ωστόσο και στον προσδιορισμό της νοθείας από εισαγόμενα μέλια (Καραμπουρνιώτη, 2002). Μέσω της ανάλυσης αυτής προσδιορίζονται γυρεόκοκκοι που είτε δεν υπάρχουν στις περιοχές προέλευσης των ελληνικών μελιών, είτε βρίσκονται σε πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις.

3.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης και φρουκτόζης στο μέλι με φασματοσκοπία FT-Raman

Φυτικό υλικό:

21 δείγματα μελιού (αποτελούμενα από ένα είδος άνθους το καθένα) αναλύθηκαν τρεις φορές το καθένα με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης που περιέχονται σε αυτά. Τα φάσματα FT-Raman καταγράφηκαν επίσης σε τριπλέτες. Στη συνέχεια αυτά τα δείγματα μελιού χωρίστηκαν σε δυο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από 11 δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της βιβλιοθήκης με την μέθοδο PLS, τα οποία θεωρήθηκαν «πρότυπα» και πήραν τους κωδικούς (St1-St11). Η δεύτερη ομάδα χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η μέθοδος (PLS) των «προτύπων» και τα οποία χαρακτηρίστηκαν σαν «άγνωστα», με τους κωδικούς (S1-S10).

Συσκευές:

- HPLC Agilent 1100
- FT-Raman
- Αναδευτήρας

Αντιδραστήρια:

- Μεθανόλη
- Ακετονιτρίλιο
- Φρουκτόζη
- Γλυκόζη

Προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) στα δείγματα του μελιού με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία του Bogdanov (Bogdanov et al, 1997). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σαν μέθοδος αναφοράς και δεν έγινε καμία μετατροπή της. Συγκεκριμένα πέντε (5) g δείγματος μελιού διαλύθηκαν σε 40 mL δισαπεσταγμένου νερού. 25 mL μεθανόλης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστεθηκε σε αυτό το διάλυμα του μελιού. Στη συνέχεια η φιάλη συμπληρώθηκε με δισαπεσταγμένο νερό με της χαραγής της. Το διάλυμα που δημιουργήθηκε πέρασε από φίλτρο μεμβράνης και αποθηκεύτηκε στους 4 °C μέχρι την χρήση του.

Το οργανό υγρής χρωματογραφίας (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από δυο αντλίες και ένα διαθλασίμετρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία της κολώνας και του ανιχνευτή σταθεροποιήθηκε στους 30 °C. Μια αναλυτική αμινο κολώνα 5 μm, μεγέθους 250×4.6 mm, τοποθετήθηκε στην συσκευή υγρής χρωματογραφίας και η ροή του συστήματος διαλυτών (ακετονιτρίλιο/νερό 80:20 (v/v)) ρυθμίστηκε στα 1.3 mL/min. Ο ενέσιμος όγκος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν 20 μL.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων υπολογίστηκε με ένα εξωτερικό πρότυπο γλυκόζης και φρουκτόζης γνωστής κάθε φορά ποσότητας, βάση του οποίου γίνονταν η σύγκριση του εμβαδού των κορυφών του με το εμβαδό των κορυφών των δειγμάτων, σύμφωνα με τον τύπο $w = A_1 \times V_1 \times m_1 \times 100 / A_2 \times V_2 \times m_0$, όπου A_1 είναι το εμβαδό της κορυφής του σακχάρου του δείγματος, A_2 είναι το εμβαδό της κορυφής του σακχάρου του εξωτερικού προτύπου, V_1 είναι ο ολικός όγκος του δείγματος εκφρασμένος σε mL, V_2 είναι ο ολικός του εξωτερικού προτύπου εκφρασμένος σε mL,

μη είναι η μάζα του σακχάρου σε g του εξωτερικού προτύπου σε ολικό όγκο (V_2), και m_0 είναι η μάζα του δείγματος εκφρασμένη σε g (Bogdanov et al, 1997).

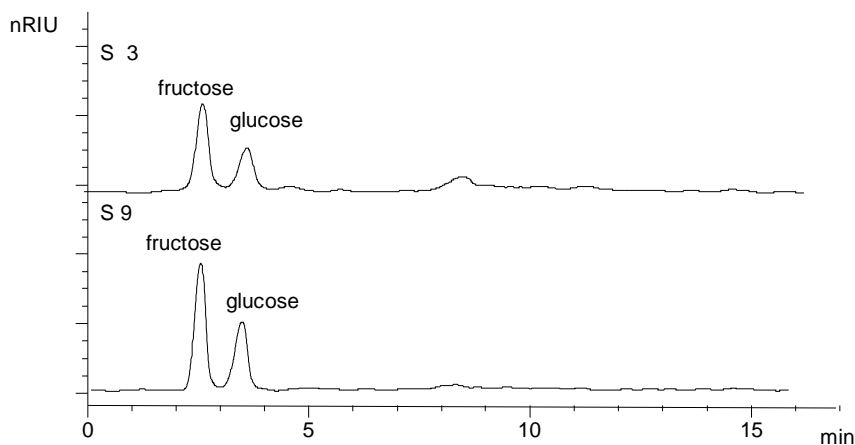
Για να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα της διαδικασίας, πριν από κάθε ένεση οποιουδήποτε δείγματος, γίνονταν ένεση με το εξωτερικό πρότυπο. Κάθε δείγμα αναλύθηκε την παραπάνω διαδικασία τρεις φορές, ώστε να μετρηθεί η σταθερή απόκλιση για να μπορέσει να συμπεριληφθεί στην στατιστική ανάλυση.

Φασματοσκοπία 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 CaF_2 και ο ανιχνευτής ινδίου – γαλλίου-αρσενικού (InGaAs). Φάσματα όλων των δειγμάτων καταγράφηκαν τρεις φορές με τις ρυθμίσεις του φασματοφωτομέτρου να παραμένουν σταθερές στις 200 σαρώσεις, με διακριτική ικανότητα 8 cm^{-1} . Για την ανάλυση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες δειγμάτων Wimaad 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.

3.2.2 Σύγκριση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού της γλυκόζης και φρουκτόζης στο μέλι με την υγρή χρωματογραφία και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-Raman

Όλα τα δείγματα μελιού που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα αναλύθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας. Από τα 21 δείγματα τα 11 χρησιμοποιήθηκαν σαν «πρότυπα» δείγματα για την δημιουργία μιας βιβλιοθήκης με κωδικούς St1-St11, ενώ τα υπόλοιπα θεωρήθηκαν ως «άγνωστα» δείγματα με κωδικούς από S1-S9. Στο Σχήμα 3.2.2.1 φαίνονται δύο τυπικά χρωματογραφήματα από τα «άγνωστα» δείγματα S3 and S9 όπως αναλύθηκαν από το HPLC.



Σχήμα 3.2.2.1 Τυπικό χρωματογράφημα HPLC από δύο δείγματα μελιού S3 (φρουκτόζη 24.0 % - γλυκόζη 21.1 %) και S9 (φρουκτόζη 39.4 % - γλυκόζη 32.1 %).

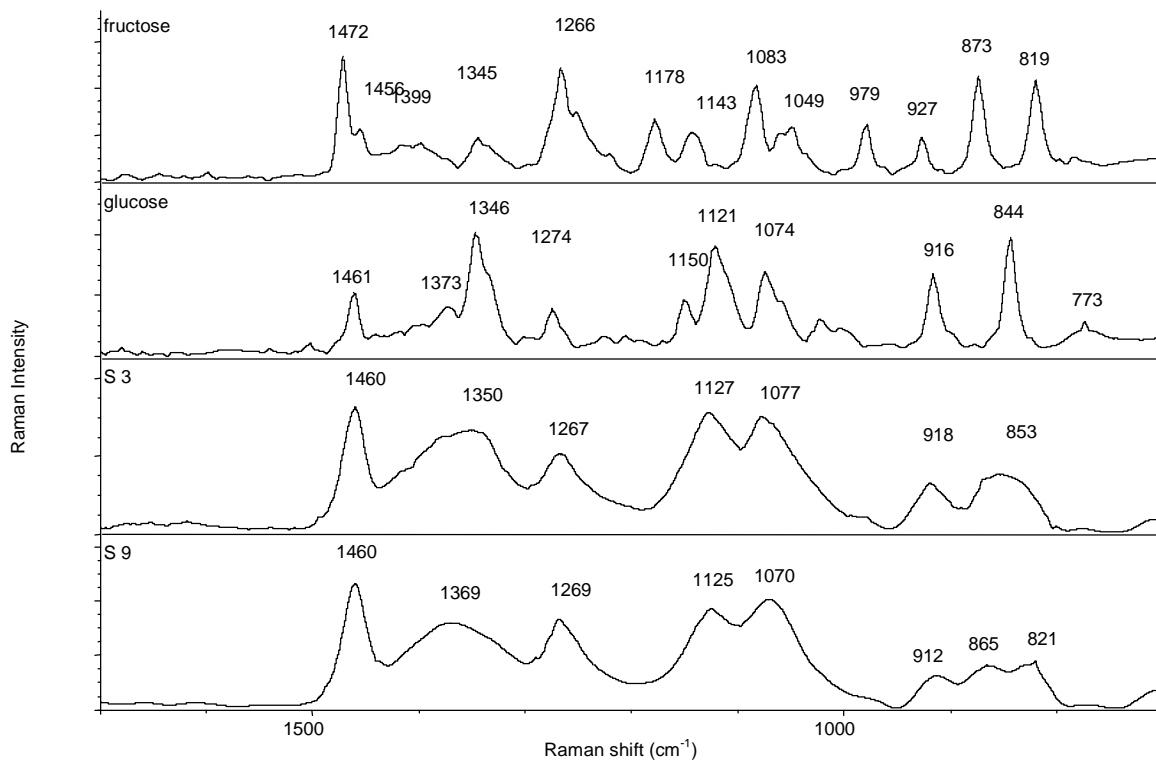
Ο χρόνος έκλουσης της φρουκτόζης είναι περίπου στα 6 min, ενώ της γλυκόζης στα 6,8 min (Πίνακας 3.2.2.2). Σύμφωνα με τον ποσοτικό προσδιορισμό γλυκόζης και φρουκτόζης που προέκυψε με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας, η περιεκτικότητα των 11 «προτύπων» κυμάνθηκε μεταξύ 26,7 – 44,9 % and 14,8 – 35,3 % για την φρουκτόζη και την γλυκόζη, αντίστοιχα. Τα 10 «άγνωστα» δείγματα υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωσή τους σε φρουκτόζη και γλυκόζη είναι αντίστοιχα 24,1 – 42,9 % and 16,2 – 33 %. Η τυπική απόκλιση των τιμών ήταν 0,3-3 και 0,2-4 για την φρουκτόζη και την γλυκόζη, αντίστοιχα.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των φασμάτων με το πρόγραμμα TQ Analyst ήταν το PLS, το οποίο σύμφωνα με την θεωρία είναι το προτεινόμενο για τον ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών των οποίων οι κορυφές είναι είτε μετατοπισμένες είτε αλληλεπικαλύπτει η μια την άλλη όταν είναι μίγματα. Ο μόνος περιορισμός για την χρήση του συγκεκριμένου προγράμματος ήταν ο αριθμός των «προτύπων» δειγμάτων να είναι ≥ 3 του αριθμού των συστατικών από το οποίο αποτελείται. Αυτός όμως ο περιορισμός άρθηκε από την στιγμή που χρησιμοποιήσαμε

11 «πρότυπα» δείγματα για προσδιορίσουμε ποσοτικά δύο κύρια συστατικά (γλυκόζη και φρουκτόζη) του μελιού, όπως προκύπτει και από τον ποσοτικό προσδιορισμό με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας.

Για να μπορέσουμε να έχουμε μεγαλύτερη προσομοίωση και καλύτερα αποτελέσματα αποφασίσαμε να εισάγουμε αντί για φάσματα γλυκόζης, φρουκτόζης ή μίγματα αυτών με γνωστή συγκέντρωση, φάσματα δειγμάτων μελιού των οποίων η συγκέντρωση σε γλυκόζη και φρουκτόζη ήταν ήδη γνωστή από την ανάλυση τους με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2.2.2 καταγράψαμε φάσματα γλυκόζης, φρουκτόζης και πρότυπα μίγματα αυτών. Όπως φαίνεται και από το σχήμα υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην υφή και στις μετατοπίσεις των κορυφών μεταξύ των φασμάτων των καθαρών σακχάρων, των μιγμάτων τους και του μελιού. Αυτός ήταν και ο λόγος που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν φάσματα δειγμάτων μελιού γνωστής συγκέντρωσης σε γλυκόζη και φρουκτόζη σαν βιβλιοθήκη στο πρόγραμμα TQ Analyst.

Η πιο σημαντική περιοχή του φάσματος βρίσκεται μεταξύ $1700 - 700 \text{ cm}^{-1}$, διότι σε εκείνη την περιοχή απορροφούν οι περισσότερες χαρακτηριστικές ομάδες και τα σάκχαρα (Σχήμα 3.2.2.2)



Σχήμα 3.2.2.2 Φάσματα FT-Raman στερεής φρουκτόζης και γλυκόζης και δυο δειγμάτων μελιού S 3 (φρουκτόζη 24,0 % - γλυκόζη 21,1 %) and S 9 (φρουκτόζη 39,4 % - γλυκόζη 32,1 %).

Σε αυτή την περιοχή η φρουκτόζη και η γλυκόζη έχουν χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες συνδέονται άμεσα με την συγκέντρωσή τους στο μέλι. Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για να συμπληρωθεί η βιβλιοθήκη του προγράμματος TQ Analyst, είναι μεταξύ των $1700-700\text{ cm}^{-1}$ και έχει εννέα χαρακτηριστικές κορυφές παρόμοιες με της γλυκόζης και της φρουκτόζης (Beril et al, 2013, Ofélia, 2015).

Οι κορυφές που φαίνονται στην περιοχή $1700-700\text{ cm}^{-1}$ στο φάσμα του μελιού θα αναλυθούν παρακάτω. Η πρώτη κορυφή στα 1460 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης του $-\text{CH}_2-$ (Goodacre, 2002). Στην περιοχή από $1430-1300\text{ cm}^{-1}$ υπάρχουν δυο κορυφές η μια στα 1372 cm^{-1} εξαιτίας της κάμψης του CH και OH (Goodacre, 2002) και η άλλη στα 1349 cm^{-1} που αποδίδεται στην δόνηση τάσης CH_2 (Oliveira, 2002,

Kacurakova, 1996). Μια έντονη και αιχμηρή κορυφή στα $1268-1267\text{ cm}^{-1}$ αναφέρεται εξαιτίας της δόνησης του C(6)-OH και C(1)-OH (Paradkar, 2001). Στη δόνηση κάμψης του C-O οφείλεται η κορυφή στα $1126-1124\text{ cm}^{-1}$ (Kacurakova, 1996). Μια ισχυρή κορυφή στα $1077-1070\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στη δόνηση κάμψης του C(1)-H και COH (Paradkar, 2001, Oliveira, 2002). Μια μικρή κορυφή στα $922-918\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στην απορρόφηση επίσης στη δόνηση κάμψης των C(1)-H και COH (Corbett, 1991). Δυο κορυφές στα 865 και 821 cm^{-1} οφείλονται στην απορρόφηση της δόνησης του CH, C(1)H, CH₂ το οποίο φαίνεται σαν ταινία απορρόφησης στο φάσμα του δείγματος S3. Τέλος στα $707-706\text{ cm}^{-1}$ υπάρχει μια κορυφή που οφείλεται στην απορρόφηση της κάμψης των CO and CCO, OCO (Corbett, 1991). Όλες οι παραπάνω κορυφές βρίσκονται στα φάσματα της γλυκόζης, της φρουκτόζης και οι οποίες στα φάσματα των δειγμάτων μελιού είτε είναι λίγο μετατοπισμένες είτε αλληλεπικαλύπτει η μια την άλλη.

Στην δική μας περίπτωση 11 δείγματα μελιού επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν σαν «πρότυπα» ώστε να μπορέσουμε να συμπεριλάβουμε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων των σακχάρων που βρίσκονται στο μέλι. Αυτά τα 11 δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας και η συγκέντρωση τους σε φρουκτόζη (26,7 – 44,9 %) και γλυκόζη (14,8 – 35,3 %) (Πίνακας 3.2.2.1) αφού προσδιορίσθηκε χρησιμοποιήθηκε σαν δεδομένο για το πρόγραμμα TO Analyst με την μέθοδο PLS.

Πίνακας 3.2.2.1 Περιεκτικότητες των προτύπων σε φρουκτόζη και γλυκόζη όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο HPLC

Πρότυπο	Φρουκτόζη (%)	Γλυκόζη (%)
St 1	26,70±0,07	17,3±0,8
St 2	35±1	30,3±0,9
St 3	41±1	32,9±0,3
St 4	36±1	17,5±0,2
St 5	32,5±0,6	14,8±0,7
St 6	31±1	22,1±0,8
St 7	40±1	35,3±0,4
St 8	40,1±0,2	31±1
St 9	45±1	24,6±0,3
St 10	29±1	19,5±0,2
St 11	31,2±0,3	22,6±0,6

Στα δέκα «άγνωστα» δείγματα μελιού προσδιορίστηκε επίσης η συγκέντρωση τους σε φρουκτόζη και γλυκόζη με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας. Αφού καταγράφηκαν τα φάσματα τους στο FT-Raman, τα εισάγαμε στο πρόγραμμα TQ Analyst και επαναπροσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους σε φρουκτόζη και γλυκόζη. Σύμφωνα το συγκεκριμένο πρόγραμμα TQ Analyst οι συγκεντρώσεις φρουκτόζης και γλυκόζης φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 3.2.2.2 σε αντιπαραβολή με τις συγκεντρώσεις που υπολογιστήκαν με την μέθοδο του HPLC. Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν σε τριπλέτες και η σταθερή διαφορά των τιμών των συγκεντρώσεων κυμάνθηκε από 0,4-4 και 0,8-4 για την φρουκτόζη και την γλυκόζη, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2.2.2 Περιεκτικότητες (%) «αγνώστων» δειγμάτων μελιού σε γλυκόζη και φρουκτόζη

«Άγνωστο» δείγμα	RT* φρουκτόζη	HPLC φρουκτόζη (%)	FT-RAMAN φρουκτόζη (%)	F-test	t-test	RT* γλυκόζη	HPLC γλυκόζη (%)	FT-RAMAN γλυκόζη (%)	F-test	t-test
S1	6,079±0,003	38±1	37±2	4	1	6,971±0,002	22,9±0,8	24±2	4	1
S2	6,11±0,01	29,3±0,3	31±3	9	1	7,02±0,01	24,2±0,2	23±4	16	1
S3	6,103±0,004	24,1±0,8	24,0±0,4	0,6	0,2	7,005±0,005	16,2±0,2	21,1±0,9	0,8	9,2
S4	6,036±0,005	40±3	36±3	1	2	6,94±0,01	33±2	28,1±0,8	4	4
S5	6,047±0,004	33±1	34±4	16	0	6,940±0,006	24,3±0,2	26±4	16	1
S6	6,06±0,03	37,3±0,8	37,1±0,7	0,6	0,3	6,97±0,04	32±4	31±2	16	0
S7	5,991±0,005	37,6±0,9	41±2	4	3	6,874±0,004	31,0±0,9	32±3	9	1
S8	6,09±0,01	38,3±0,6	41±3	9	2	7,01±0,01	32,4±0,9	31,3±0,9	1	1,5
S9	6,000±0,006	42,9±0,9	39±1	1	5	6,88±0,01	31±3	32±1	9	1
S10	6,03±0,04	41,2±0,9	39,3±0,8	0,8	2,7	6,92±0,06	29±1	32,1±0,9	1	4

*RT χρόνος έκλουσης

Για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τις δυο αυτές μεθόδους προσδιορισμού της γλυκόζης και της φρουκτόζης στο μέλι, ως προς την επαναληψιμότητα και την αξιοπιστία τους, χρησιμοποιήσαμε δυο στατιστικά εργαλεία το F-test και το t-test. Σε όλες τις μετρήσεις και οι δυο μέθοδοι αποκτούσαν την στατιστικά την θεωρητική τιμή του 19.00 για το F-test και μόνο σε τέσσερις από τις 20 μετρήσεις η τιμή για το t-test ήταν μεγαλύτερη από την θεωρητική τιμή 2.776 (Πίνακας 3.2.2.2) . Σε αντίθεση, η αποτελεσματικότητα της σχετικής τυπικής απόκλισης μετρήθηκε και για τις δυο μεθόδους (Πίνακας 3.2.2.3).

Πίνακας 3.2.2.3 Σχετική τυπική απόκλιση «αγνώστων» δειγμάτων μελιού

«Άγνωστο» δείγμα	RSD* φρουκτόζη ¹	RSD φρουκτόζη ²	RSD γλυκόζη ¹	RSD γλυκόζη ²
S1	3,850	5,226	3,474	8,318
S2	0,926	11,078	0,923	16,100
S3	3,214	1,725	1,266	4,314
S4	6,357	8,805	4,612	2,918
S5	2,913	10,385	0,968	16,414
S6	2,126	1,743	10,787	6,855
S7	3,051	5,224	2,757	10,012
S8	1,515	7,153	2,771	2,889
S9	2,037	3,852	8,964	3,799
S10	2,228	2,056	3,952	3,096

*RSD: Σχετική τυπική απόκλιση

1 HPLC μέθοδος

2 FT-Raman μέθοδος

Συμπερασματικά:

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ των δύο μεθόδων γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία της νέας μεθόδου. Η χρήση της φασματοσκοπίας FT-Raman για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης και της

φρουκτόζης στο μέλι είναι μια καλή εναλλακτική μέθοδος, που προσφέρει μικρό χρόνο ανάλυσης και απλότητα στην επεξεργασία των δειγμάτων πριν την χρήση τους. Το γεγονός ότι τα φάσματα καταγράφονται χωρίς επιπλέον κατεργασία απλουστεύει ακόμη περισσότερο την μέθοδο ανάλυσης και της δίνει άμεσο πλεονέκτημα αφού το δείγμα δεν καταστρέφεται και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί και σε άλλου είδους ανάλυση. Το κόστος της ανάλυσης με την φασματοσκοπία FT Raman είναι πολύ μικρότερο σε σύγκριση με την χρήση υγρής χρωματογραφίας αφού δεν χρειάζονται διαλύτες. Το μοναδικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η χρήση πολλών δειγμάτων σαν «πρότυπα» για την εισαγωγή τους στην βιβλιοθήκη τους προγράμματος TO Analyst ώστε να καταστεί εφικτή η λήψη αντιπροσωπευτικότερων αποτελεσμάτων με μικρότερη απόκλιση από τις πραγματικές τιμές συγκέντρωσης σε γλυκόζη και φρουκτόζη.

3.3.1 Προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης των διαφόρων ειδών μελιού με φασματοσκοπία FT-Raman και FT-IR

Φυτικό υλικό:

Δυο δείγματα μελιού συλλέχθηκαν από καθένα από τα παρακάτω είδη μελιού: βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*), θυμάρι (*Corydothymus capitatus*), πορτοκαλιά (*Citrus spp.*), ευκάλυπτο (*Eucalyptus sp.*), έλατο (*Abies cephalonica.*), πεύκο (*Pinus spp.*) και καστανιά (*Castanea sativa*). Τα δείγματα συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας για να είναι όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερη η βοτανική τους προέλευση. Για δείγματα όπως το βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*), την πορτοκαλιά (*Citrus spp.*), και το πεύκο (*Pinus spp.*), μια άδεια κυψέλη τοποθετήθηκε στην περιοχή τους ενδιαφέροντος την περίοδο της ανθοφορίας και μαζεύτηκε αμέσως μετά το κλείσιμο της. Όλα τα άλλα δείγματα προμηθεύτηκαν από μελισσοκόμους, αφού συλλέχθηκαν μετά τον δεύτερο τρύγο για να εξασφαλιστεί η μοναδικότητα του είδους τους. Γυροσκοπική ανάλυση έγινε για όλα τα είδη για να επικυρωθεί η βοτανική τους προέλευση. Από αυτά τα ζευγάρια που αποκτήθηκαν το ένα χρησιμοποιήθηκε σαν

«πρότυπο» και το άλλο ονομάστηκε «άγνωστο» για την δημιουργία αυτής της εργασίας.

Όργανα:

FT-IR φασματοφωτόμετρο

FT-Raman φασματοφωτόμετρο

Φασματοσκοπία 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 CaF_2 και ο ανιχνευτής ινδίου – γαλλίου-αρσενικού (InGaAs). Φάσματα όλων των δειγμάτων καταγράφηκαν τρεις φορές με τις ρυθμίσεις του φασματοφωτομέτρου να παραμένουν σταθερές στις 200 σαρώσεις, με διακριτική ικανότητα 8 cm^{-1} . Για την ανάλυση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες δειγμάτων Wimaad 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.

Φασματοσκοπία FT-IR:

Το φάσμα υπερύθρου του κάθε δείγματος καταγράφηκε από το φασματοφωτόμετρο 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 έγινε πριν από κάθε παρτίδα μετρήσεων.

Επεξεργασία φασμάτων και δημιουργία βιβλιοθηκών:

Τα φάσματα FT-Raman και FT-IR συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα OMNIC (ver. 3.1) που έχει προμηθεύσει ο κατασκευαστής του οργάνου. Όλα τα φάσματα εξομαλύνθηκαν αυτόματα από το παραπάνω πρόγραμμα, το οποίο χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο Savitsky-Golay (πολυωνυμική εξίσωση δευτέρου βαθμού πέντε σημείων). Μετά από αυτό διορθώθηκε η βασική γραμμή με την αυτόματη λειτουργία του προγράμματος. Την ίδια στιγμή υπολογίστηκε το μέσο φάσμα των τριών φασμάτων κάθε δείγματος (προτύπων και αγνώστων) με τη βοήθεια του κατάλληλου εργαλείου του προγράμματος.

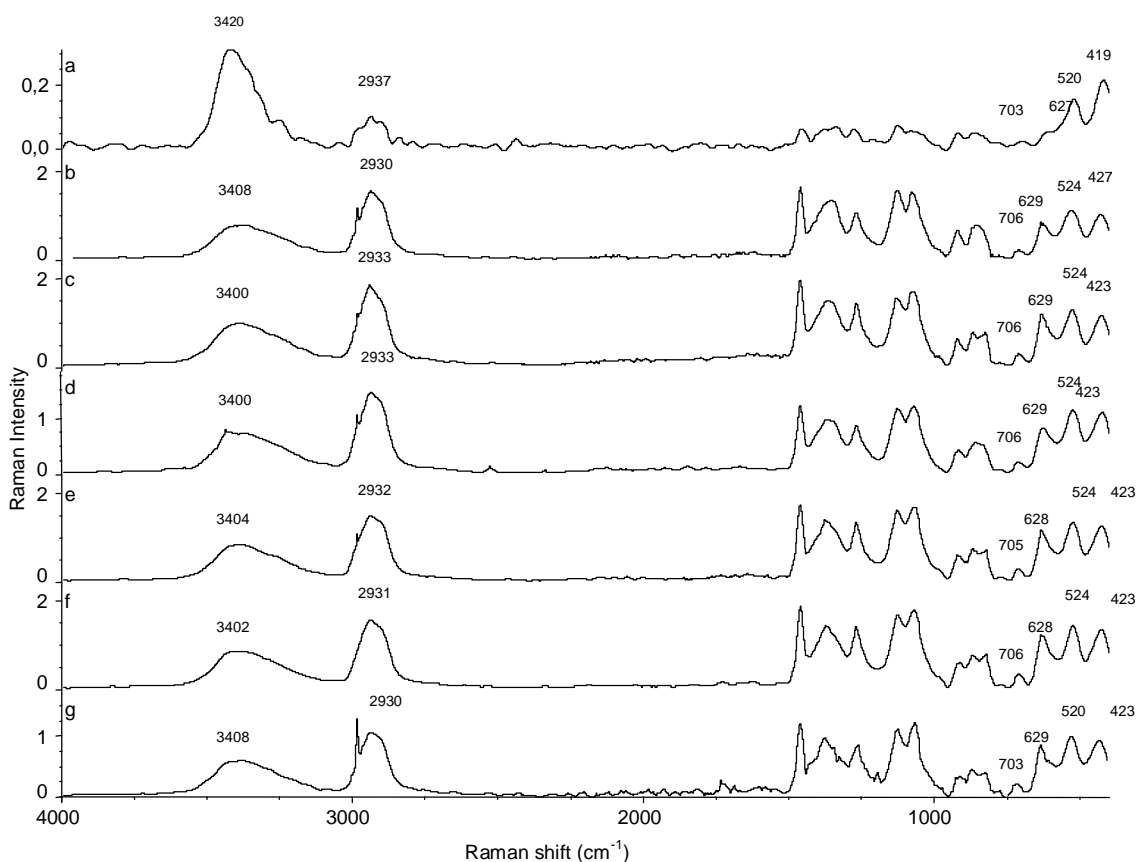
Δύο βιβλιοθήκες φασμάτων FT-IR και FT-Raman δημιουργήθηκαν βασισμένες σε βοτανικά κριτήρια που προέκυψαν από την γυροσκοπική ανάλυση. Στις δύο αυτές βιβλιοθήκες τοποθετήθηκαν τα φάσματα των «προτύπων» δειγμάτων δημιουργώντας μια βάση δεδομένων. Το πρόγραμμα είχε την δυνατότητα να συγκρίνει το φάσμα του «αγνώστου» δείγματος βρίσκοντας το φάσμα ή τα φάσματα των «προτύπων» στα οποία μοιάζει περισσότερο επιλέγοντας από την βάση δεδομένων που είχαμε δημιουργήσει.

Πιο συγκεκριμένα για την εύρεση ομοιότητας μεταξύ του «αγνώστου» και των «προτύπων» της βιβλιοθήκης, το πρόγραμμα συγκρίνει το «άγνωστο» με όλα τα «πρότυπα» της βάσης δεδομένων στην περιοχή $1500-750\text{ cm}^{-1}$ και βρίσκει τελικά το φάσμα του «προτύπου» στο οποίο ταιριάζει περισσότερο το «άγνωστο». Αυτό το καταφέρνει το συγκεκριμένο πρόγραμμα, αφού κατηγοριοποιεί τα φάσματα σύμφωνα όχι μόνο με τις κορυφές τους αλλά και το ύψος, το σχήμα και την μετατόπισή τους. Ακόμη και διαφοροποίηση να υπάρχει στα φάσματα, αυτή μπορεί να ανιχνευθεί. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης από το πρόγραμμα εκφράζονται σαν ομοιότητα (βαθμός ομοιότητας-%) του αγνώστου με το κάθε φάσμα της βιβλιοθήκης. Ο «βαθμός ομοιότητας» μπορεί να πάρει τις τιμές από 0 έως 100. Το μηδέν σημαίνει ότι τα φάσματα δεν έχουν καμία ομοιότητα, ενώ το 100 σημαίνει ταύτιση των φασμάτων. Επιπλέον το πρόγραμμα έχει την δυνατότητα να δώσει «βαθμό ομοιότητας» για όλα τα φάσματα της βιβλιοθήκης κατά φθίνοντα σειρά.

3.3.2 Σύγκριση μεθόδων προσδιορισμού της βοτανικής προέλευσης των διαφόρων ειδών μελιού με φασματοσκοπία FT-Raman και FT-IR

Μελέτη φασματοσκοπίας FT-Raman:

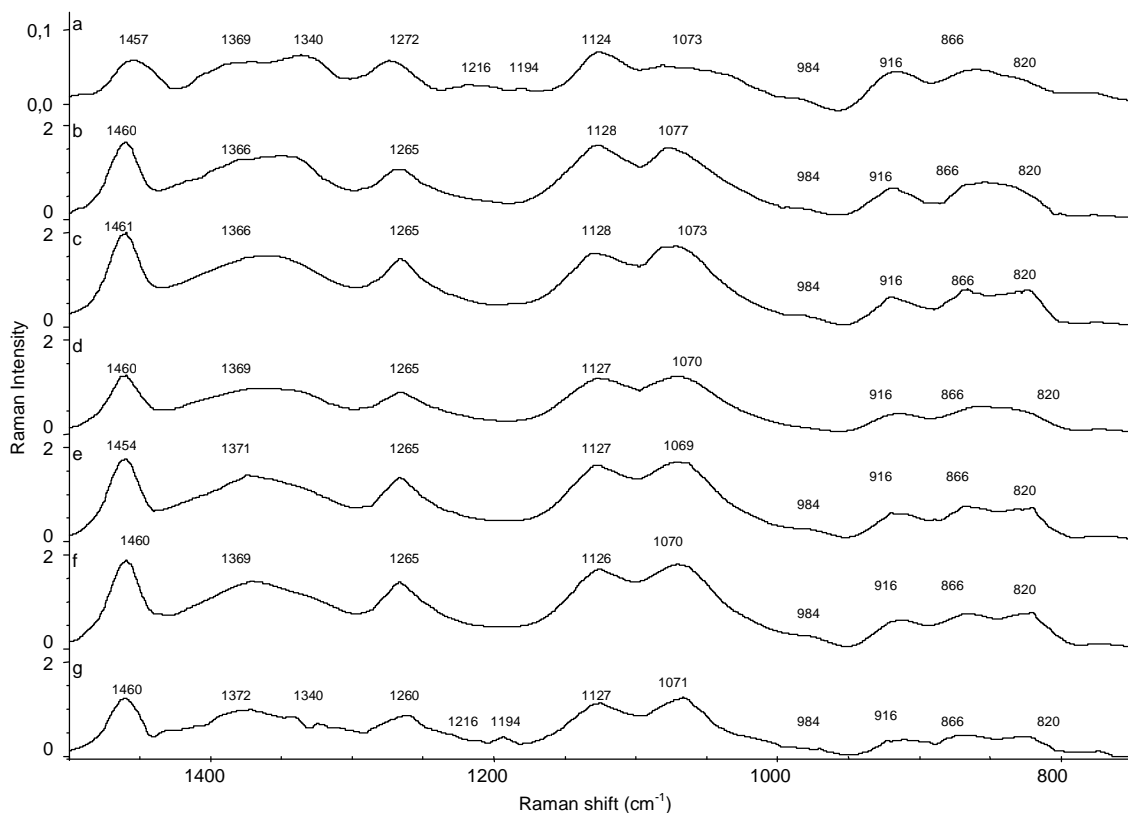
Το Σχήμα 3.3.2.1 δείχνει τυπικά φάσματα FT-Raman προτύπων δειγμάτων μελιού από βαμβάκι, έλατο, καστανιά, πεύκο, πορτοκαλιά, θυμάρι και ευκάλυπτο τα οποία κατεγράφησαν. Σε αυτά τα φάσματα FT-Raman φαίνονται τρεις περιοχές. Η πρώτη περιοχή βρίσκεται μεταξύ των $4000-1500\text{ cm}^{-1}$ και εμφανίζει μια μεγάλη ταινία στα $3420-3400\text{ cm}^{-1}$, η οποία οφείλεται στην τάση των $-OH$. Μια μεγάλη κορυφή στα $2937-2930\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στην τάση των CH . Η συγκεκριμένη περιοχή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύγκριση των φασμάτων διότι δεν υπάρχουν χαρακτηριστικές διαφορές μεταξύ τους και γιατί οι πληροφορίες που μπορούν να εξαχθούν από την μελέτη τους είναι ανεπαρκείς.



Σχήμα 3.3.2.1 Φάσματα FT-Raman δειγμάτων μελιού: (a) βαμβάκι, (b) έλατο, (c) καστανιά, (d) πεύκο, (e) πορτοκαλιά, (f) θυμάρι, (g) ευκάλυπτος.

Η δεύτερη περιοχή, μεταξύ $1500-750\text{ cm}^{-1}$ (Σχήμα 3.3.2.2) περιέχει 11 χαρακτηριστικές κορυφές. Η πρώτη στα $1461-1457\text{ cm}^{-1}$, οφείλεται στην κάμψη των CH_2 (Paradkar et al, 2001). Η περιοχή μεταξύ $1430-1300$ περιέχει δυο κορυφές, η μια στα $1372-1366\text{ cm}^{-1}$ αναφέρεται στην κάμψη των CH και OH (Paradkar et al, 2001) και η άλλη στα 1340 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση κάμψης του CH_2 (Kacurakova et al, 1996). Η κορυφή στα 1340 cm^{-1} εμφανίζεται μόνο στα φάσματα των δειγμάτων μελιού από βαμβάκι και ευκάλυπτο, ενώ στα υπόλοιπα φάσματα επικαλύπτεται από την κορυφή στα $1372-1366\text{ cm}^{-1}$. Μια έντονη και λεπτή κορυφή στα $1272-1260\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζεται εξαιτίας της δόνησης των χαρακτηριστικών ομάδων των σακχάρων $\text{C}(6)\text{-OH}$ και $\text{C}(1)\text{-OH}$ (Paradkar et al, 2001). Τα φάσματα των δειγμάτων του μελιού από βαμβάκι και ευκάλυπτο, στην περιοχή $1240-1160\text{ cm}^{-1}$ περιέχουν δυο πολύ μικρές κορυφές, η μια οφείλεται στην στρέψη του CH_2 της ομάδας CH_2OH (1216 cm^{-1}) και η άλλη στην τάση του C-O στα 1194 cm^{-1} , η οποία είναι χαρακτηριστική για την φρουκτόζη (Kacurakova et al, 1996). Ο δεσμός C-N (πρωτεϊνών ή αμινοξέων) απορροφά στα $1128-1124\text{ cm}^{-1}$. Μια ισχυρή κορυφή στα $1077-1069\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στην παραμόρφωση του $\text{C}(1)\text{-H}$, του C-N (πρωτεϊνών ή αμινοξέων) και του COH (Paradkar et al, 2001).

Η κορυφή στα 984 cm^{-1} , λείπει μόνο από το φάσμα του μελιού από πεύκο, και αποδίδεται στην κάμψη CCH της φρουκτόζης (Jandrić et al, 2015). Μια ασθενής κορυφή στα 916 cm^{-1} υπάρχει εξαιτίας δόνησης κάμψης των $\text{C}(1)\text{H}$ και COH . Δυο κορυφές στα 866 και 820 cm^{-1} εμφανίζονται εξαιτίας της αντισυμμετρικής τάσης των CH και $\text{C}(1)\text{H}$, CH_2 αντίστοιχα (Corbet et al, 1991).



Σχήμα 3.3.2.2 Φάσματα FT-Raman δειγμάτων μελιού στην περιοχή $1500-750\text{ cm}^{-1}$: (a) βαμβάκι, (b) έλατο, (c) καστανιά, (d) πεύκο, (e) πορτοκαλιά, (f) θυμάρι, (g) ευκάλυπτος.

Η τρίτη περιοχή, στα $750-400\text{ cm}^{-1}$ έχει τέσσερις χαρακτηριστικές κορυφές. Μια ασθενής κορυφή στα $706-703\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στην συμμετρική τάση των CO, CCO και OCO (Corbett et al, 1991, Ofélia et al, 2015). Μια ισχυρή κορυφή στα 628 cm^{-1} οφείλεται στην παραμόρφωση του δακτυλίου της φρουκτόζης (Goodacre et al, 2002, Ofélia et al, 2015) και στα $528-520\text{ cm}^{-1}$ εξαιτίας της δόνησης του σκελετού της φρουκτόζης και της γλυκόζης. Η τελευταία κορυφή στα 422 cm^{-1} αποδίδεται στα CCO και CCC εξαιτίας της δόνησης του σκελετού της φρουκτόζης και της γλυκόζης (Paradkar et al, 2001, Goodacre et al, 2002, Jandrić et al, 2015). Όλες οι αποδόσεις και οι θέσεις των κορυφών των φασμάτων FT-Raman φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 3.3.2.1.

Πίνακας 3.3.2.1 Αποδόσεις των κορυφών των φασμάτων FT-Raman για τα δείγματα μελιού

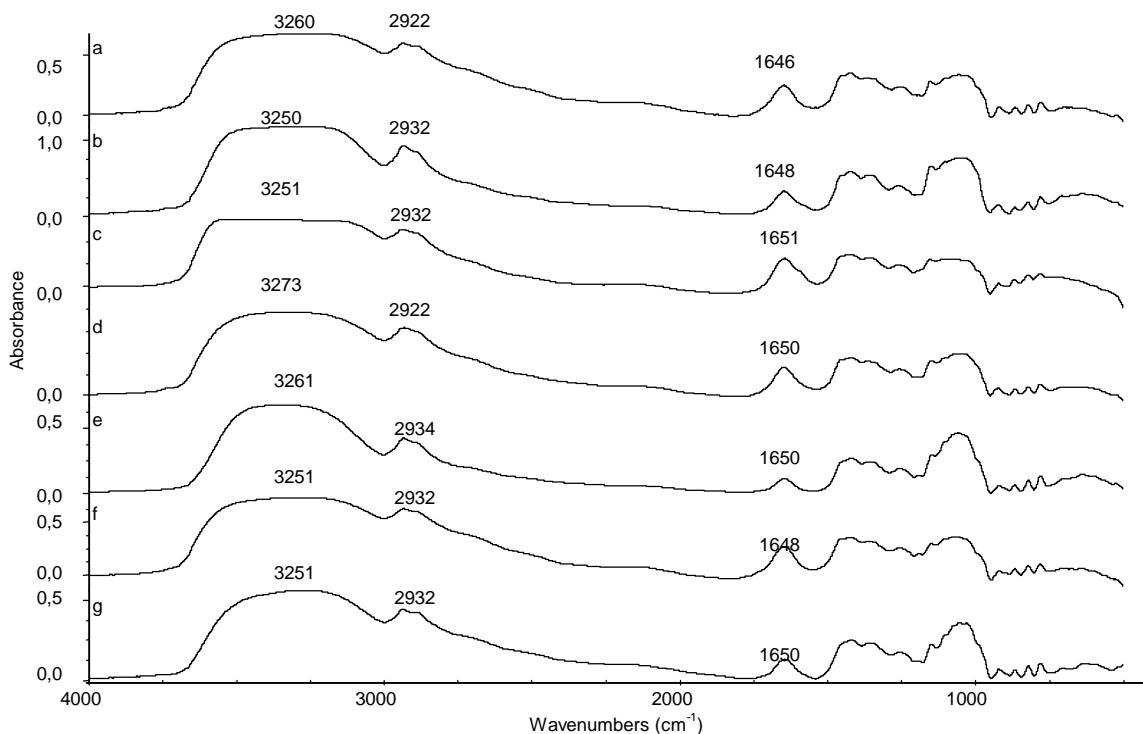
Κυματαριθμός του φάσματος FT-Raman (cm ⁻¹)	Απόδοση	Είδος δόνησης
3420-3400	OH	Τάση
2937-2930	CH	Τάση
1461-1457	CH ₂	Κάμψη
1372-1366	CH και OH	Κάμψη
1340	CH ₂	Κάμψη
1272-1260	C(6)-OH και C(1)-OH	-
1216	CH ₂ of CH ₂ OH	Στρέψη
1194	(C-O)endo	Τάση
1128-1124	C-N	-
1077-1064	C(1)-H, C-N και COH	Παραμόρφωση
984	CCH φρουκτόζης	Κάμψη
916	C(1)-H και COH	Κάμψη
866	CH	Παραμόρφωση
820	C(1)-H και CH ₂	Παραμόρφωση
706-703	CO, CCO* και OCO*	Τάση, * κάμψη
628	Φρουκτόζη	Παραμόρφωση δακτυλίου
528-520	CCO	Τάση
422	CCO και CCC	Κάμψη

Φασματοσκοπική μελέτη FT-IR:

Το Σχήμα 3.3.2.3 παρουσιάζει τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων μελιού από βαμβάκι, έλατο, καστανιά, πεύκο, πορτοκαλιά, θυμάρι και ευκάλυπτο.

Τα φάσματα FT-IR αποτελούνται από τρεις κύριες περιοχές. Η πρώτη περιοχή που κυμαίνεται μεταξύ 4000 και 1500 cm⁻¹, παρουσιάζει μια πλατιά ταινία στα 3695-2997 cm⁻¹ η οποία οφείλεται στην απορρόφηση εξαιτίας της τάσης του -OH (Chatjigakis et al, 1998, Pappas et al, 2003, Sivakesova et al, 2002). Μια διπλή κορυφή στα 2932 και

2897 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης των $-\text{CH}_2-$ και $-\text{CH}_3$ αντίστοιχα (Chatjigakis et al, 1998, Pappas et al, 2003, Sivakesova et al, 2002). Μια τρίτη ταινία μεταξύ 1760-1550 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης εξαιτίας της απορρόφησης του νερού. Οι υπόλοιπες ομάδες (διπλοί δεσμοί) που θα μπορούσαν να απορροφούν στην συγκεκριμένη περιοχή, επιβεβαιώθηκε από τα φάσματα FT-Raman ότι δεν υπάρχουν.

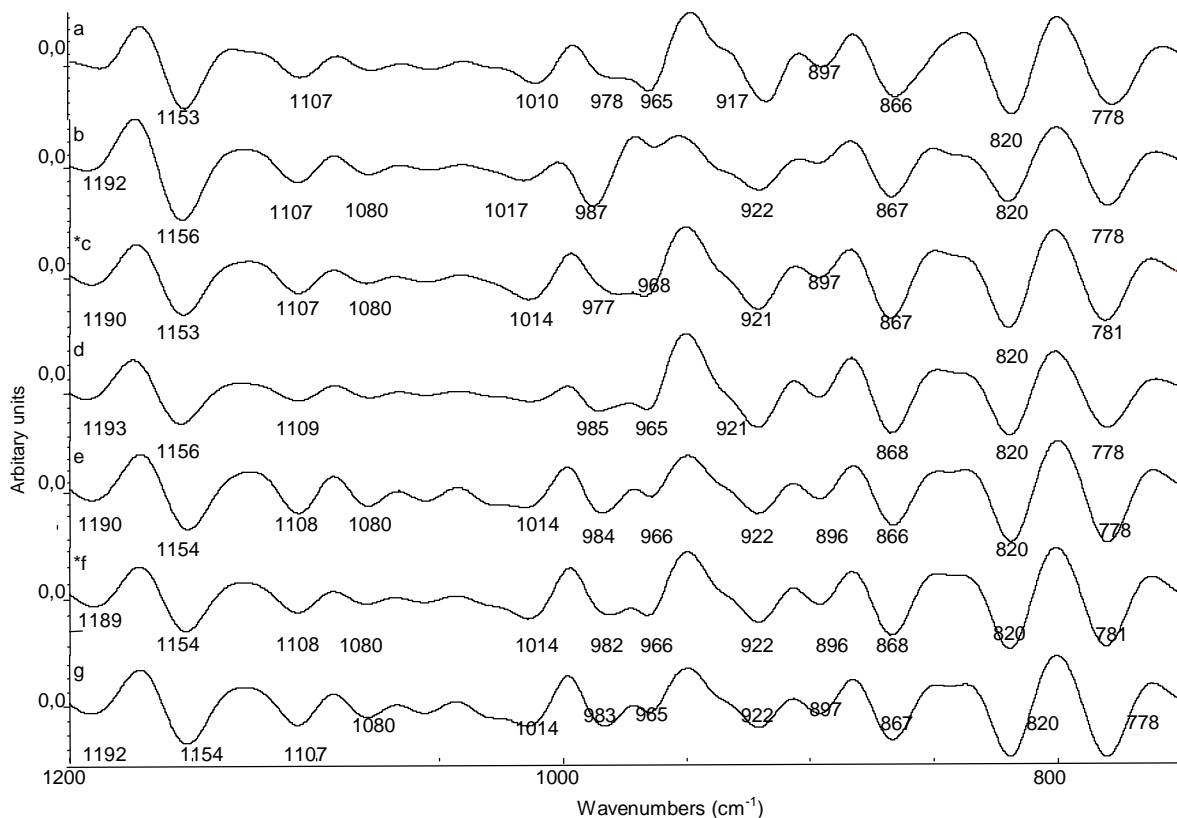


Σχήμα 3.3.2.3 Φάσματα FT-IR δειγμάτων μελιού: (a) βαμβάκι, (b) έλατο, (c) καστανιά, (d) πεύκο, (e) πορτοκαλιά, (f) θυμάρι, (g) ευκάλυπτος.

Η δεύτερη περιοχή μεταξύ 1500-750 cm^{-1} χαρακτηρίζεται σαν «δακτυλικό αποτύπωμα», αφού είναι η περιοχή στην οποία τα σάκχαρα εμφανίζουν την μεγαλύτερη απορρόφηση τους. Αυτή είναι μια περιοχή πλούσια σε πληροφορίες, στην οποία όμως πολλές κορυφές αλληλεπικαλύπτουν η μια την άλλη, δυσκολεύοντας έτσι την ανάλυση. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη παράγωγος του φάσματος η οποία αποκάλυψε 11 ελάχιστα τα οποία οφείλονται στην ύπαρξη 11 κορυφών οι οποίες αλληλεπικαλύπτονταν. Η ποικιλία μεταξύ των φασμάτων μπορεί κατά συνέπεια να διαχωριστεί και ομαδοποιηθεί σύμφωνα με την δεύτερη παράγωγο τους.

Η περιοχή μεταξύ $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ δείχνει δυο κορυφές, στα 1455 και 1420 cm^{-1} που αποδίδονται στην τάση του $-\text{CH}_2-$ και στην ασύμμετρη τάση των CH , OH αντίστοιχα (Kacurakova et al, 1996). Η μεγάλη κορυφή στα $1388-1286\text{ cm}^{-1}$, αποδίδεται στην δόνηση του $-\text{OH}$, στην συμμετρική δόνηση του $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ και $-\text{CH}_3$ και στην δόνηση κάμψης και στρέψης του $-\text{CH}_2-$ (Kacurakova et al, 1996, Pappas et al, 2003). Η κορυφή στα $1260-1250\text{ cm}^{-1}$, αναφέρεται ότι λείπει από την γλυκόζη, ενώ εμφανίζεται στην φρουκτόζη (Kacurakova et al, 1996), και αποδίδεται δόνηση τάσης του $\text{C}1-\text{H}$ και στην συμμετρική τάση του $-\text{OH}$ (Kacurakova et al, 1996).

Η περιοχή μεταξύ $1200-750\text{ cm}^{-1}$ παρουσιάζει απορρόφηση εξαιτίας των σακχάρων που υπάρχουν στο μέλι. Αυτή η περιοχή περιέχει μεγάλο αριθμό αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών. Για να μπορέσει να γίνει εξέταση αυτής της περιοχής, έγινε χρήση της δεύτερης παραγώγου σε κάθε φάσμα μελιού. Έντεκα ελάχιστα φαίνονται τα οποία οφείλονται σε έντεκα κορυφές (Σχήμα 3.3.2.4)



Σχήμα 3.3.2.4 2^η παραγώγος των φάσματος FT-IR δειγμάτων μελιού: (a) βαμβάκι, (b) έλατο, (c) καστανιά, (d) πεύκο, (e) πορτοκαλιά, (f) θυμάρι, (g) ευκάλυπτος.

Η πρώτη κορυφή στα 1192-1189 cm⁻¹ αποδίδεται στην δόνηση τάσης του C-O της φρουκτόζης (Kacurakova et al, 1996). Η δεύτερη κορυφή στα 1109-1107 cm⁻¹ αποδίδεται στην τάση του C-O των ομάδων C(4)-O και C(6)-O (Kacurakova et al, 1996). Εκτός από το πεύκο και το βαμβάκι, τα φάσματα των υπολοίπων δειγμάτων μελιού παρουσιάζουν μια κορυφή στα 1080 cm⁻¹ που οφείλεται στην τάση των C-O, C-C και στην δόνηση τάσης του COH του C(1)-H (Kacurakova et al, 1996). Η ίδια δόνηση της ομάδας των C(4)-O έδωσε την τέταρτη κορυφή στα 1017-1010 cm⁻¹. Η πέμπτη κορυφή αποδίδεται στην δόνηση τάσης του COH στα 985-977 cm⁻¹ (Kacurakova et al, 1996). Η τάση του CH₂OH στα 968-965 cm⁻¹ απουσιάζει μόνο από το φάσμα του ελάτου. Η συμμετρική κάμψη του C(1)-O και C(1)-H εμφανίζεται στα 922-917 cm⁻¹ και 897-896 cm⁻¹ (Etchverry et al, 1997) αντίστοιχα, με την τελευταία κορυφή να λείπει από τα φάσματα των δειγμάτων μελιού του πεύκου και του ελάτου. Η ένατη κορυφή στα 868-866 cm⁻¹ αποδίδεται στην β-φρουκτόζη. Οι τελευταίες δυο κορυφές στα 820 cm⁻¹ και 781-778 cm⁻¹ αποδίδονται στη δόνηση τάσης του C(1)-OH και στην παραμόρφωση του δακτυλίου, αντίστοιχα. Όλα τα φάσματα FT-IR με τις αποδόσεις και τις θέσεις των κορυφών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.2.2.

Πίνακας 3.3.2.2 Αποδόσεις των κορυφών των φασμάτων FT-IR όπως προέκυψαν από την 2^η παράγωγο για τα δείγματα μελιού

Κυματαριθμός της κορυφής του φάσματος FT-IR (cm ⁻¹)	Αποδόσεις	Είδος δόνησης
3695-2997	OH	Τάση
2932-2897	CH ₃ , CH ₂	Τάση
1760-1550	Water	Κάμψη
1455	CH ₂	Κάμψη
1420	CH, OH	Κάμψη
1388-1286	OH, COH, CH ₃ , CH ₂ *	Κάμψη, στρέψη*
1260-1250	C(1)-H, OH	Κάμψη
1192-1189	C-O	Κάμψη (φρουκτόζης)
1080	C-O, C-C, COH*	Τάση, Κάμψη*
1017-1010	C(4)-O	Τάση
985-977	COH	Κάμψη
968-965	CH ₂ OH	Κάμψη
922-917	C(1)-O	συμμετρική κάμψη
897-896	C(1)-H	συμμετρική κάμψη
868-866	β-φρουκτόζη	-
820	C(1)-OH	Κάμψη
781-778		Παραμόρφωση δακτυλίου

Οι απορροφήσεις στην περιοχή κάτω από τα 750 cm⁻¹ δεν μπορούν να αποδοθούν σε κάποια συγκεκριμένη δόνηση διότι αποδίδονται σε ένα περίπλοκο σύστημα δονήσεων.

Αποτελέσματα εφαρμογής της βάσης δεδομένων:

Τα φάσματα FT-IR και FT-Raman όλων των «αγνώστων» δειγμάτων μελιού κατεγράφησαν και στην συνέχεια συγκρίθηκαν με τα πρότυπα, με την βοήθεια του

κατάλληλου προγράμματος (OMNIC ver. 3.1). Η περιοχή του φάσματος μεταξύ 1500-750 cm^{-1} επιλέχθηκε, διότι θεωρείται ως «δακτυλικό αποτύπωμα» αφού είναι χαρακτηριστική και μοναδική για κάθε υλικό και ιδιαίτερα για το μέλι. Ο «βαθμός ομοιότητας» για τα φάσματα FT-IR και FT-Raman των «αγνώστων» ειδών μελιού φαίνονται στον Πίνακα 3.3.2.3.

Πίνακας 3.3.2.3 Σύγκριση των «βαθμών ομοιότητας» των φασμάτων, των «αγνώστων» βοτανικής προέλευσης δειγμάτων μελιού, τα οποία καταγράφηκαν με της τεχνικές IR και Raman, σύμφωνα με την βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε από γνωστής βοτανικής προέλευσης «πρότυπα»

Πρότυπα	Βαθμός ομοιότητας (%) (FT-Raman)	Βαθμός ομοιότητας (%) (FT-IR)
Βαμβάκι (<i>Gossypium hirsutum</i>)	69,0	99,7
Θυμάρι (<i>Corydanthus capitatus</i>)	97,9	99,6
Πορτοκαλιά (<i>Citrus spp.</i>)	96,8	98,7
Ευκάλυπτος (<i>Eucalyptus sp.</i>)	95,9	90,1
Έλατο (<i>Abies cephalonica.</i>)	97,1	98,1
Πεύκο (<i>Pinus spp.</i>)	90,1	99,2
Καστανιά (<i>Castanea sativa</i>)	92,8	96,4

Ο «βαθμός ομοιότητας» για τα φάσματα FT-Raman των επτά δειγμάτων μελιού κυμαίνεται από 69 έως 97,9 %. Η πλειοψηφία των περισσότερων «βαθμών ομοιότητας» είναι μεγαλύτερος του 90,0 %. Συγκεκριμένα, δύο από τα επτά «άγνωστα» έχουν «βαθμό ομοιότητας» 97,0-98,0 %, δύο 95,0-97,0 %, δύο 90,0-93,0 % και μόνο ένα δείγμα παρουσιάζει «βαθμό ομοιότητας» 69 %. Σε αντίθεση ο «βαθμός ομοιότητας» για τα φάσματα FT-IR των επτά «αγνώστων» δειγμάτων μελιού κυμάνθηκε μεταξύ των ορίων 90,1 και 99,7%. Η πλειοψηφία των φασμάτων έχει «βαθμό ομοιότητας» μεγαλύτερο του 98,0%. Πιο συγκεκριμένα, τρία από τα επτά

«άγνωστα» έχουν «βαθμό ομοιότητας» με κάποιο από τα φάσματα της βάσης δεδομένων από 99,0 έως 100,0%, τρία 96,0-99,0% και μόνο ένα 90,1 %.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι με τη βοήθεια της φασματοσκοπικής ανάλυσης, την δημιουργία μιας μεγάλης βάσης δεδομένων με τη βοήθεια του κατάλληλου προγράμματος (OMNIC ver. 3.1), μπορεί να επιτευχθεί η ανακάλυψη της βοτανικής προέλευσης όλων των δειγμάτων μελιού.

Συμπερασματικά:

Οι φασματοσκοπία FT-Raman και FT-IR μπορούν να αξιολογηθούν θετικά για την ικανότητα τους να προσδιορίσουν την βοτανική προέλευση των διαφόρων ειδών μελιού. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίζεται σε ένα κοινό πρόγραμμα βάσης δεδομένων με φάσματα FT-Raman και FT-IR. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράζονται σε «βαθμό ομοιότητας» των αγνώστων φασμάτων με τα φάσματα της βάσης δεδομένων που δημιουργήθηκε, προσδιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την βοτανική προέλευση του κάθε δείγματος. Η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης είναι μεγαλύτερη του 90,0% και 98,0 % για τις μεθόδους FT-Raman και FT-IR αντίστοιχα. Η ταχύτητα και η αξιοπιστία των παραπάνω μεθόδων, τις κάνουν μια καλή εναλλακτική και γρήγορη μέθοδο. Επιπλέον η απλότητα και η αντικειμενικότητα τους, τις κάνουν ένα εύκολο εργαλείο ανάλυσης για οποιονδήποτε, σε σύγκριση με την εξειδίκευση και εμπειρία που θα πρέπει να έχει ο αναλυτής που κάνει την γυροσκοπική ανάλυση. Οι δύο μέθοδοι προσδιορισμού της βοτανικής προέλευσης των διαφόρων ειδών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε σαν συνδυασμός, είτε η κάθε μια μόνη της.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς με φασματοσκοπία FT-IR

4.1 Φύλλα μουριάς

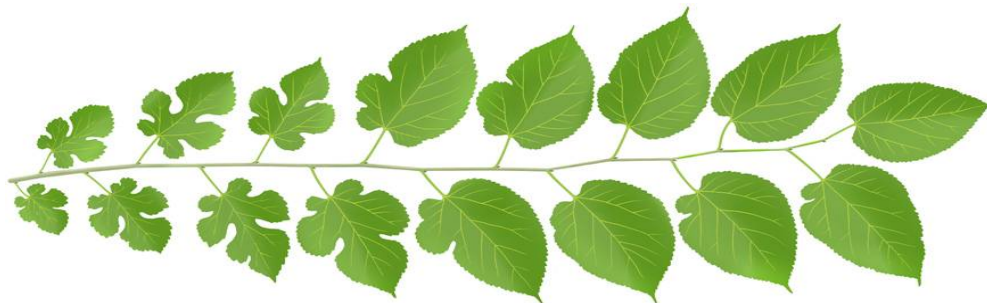
Η μουριά είναι ένα δικότυλο ανώτερο φυτό με μεγάλη προσαρμοστικότητα σε ένα μεγάλο εύρος κλιματικών συνθηκών. Φύεται σε μια ευρεία γεωγραφική περιοχή, ονομαζόμενη διεθνώς ως σηρική ζώνη. Απαντάται σε μεγάλη πυκνότητα κυρίως στην Κίνα, την Ιαπωνία, την ΝΑ Ασία, τη Μ. Ανατολή και τη Ν. Ευρώπη. Στις χώρες με εύκρατο κλίμα, η μουριά είναι φυλλοβόλο, ενώ στις χώρες με τροπικό κλίμα είναι αείφυλλο.

Το γένος *Morus* χωρίζεται σε 34 διαφορετικά είδη, άγρια και καλλιεργούμενα. Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται σήμερα ανήκουν στα είδη *M. latifolia* Poilet, *M. Alba* Linn και *M. Bombycis* Koidz. Τα είδη *M. latifolia* Poilet και *M. Alba* Linn κατάγονται από την Κίνα, μεταφέρθηκαν στην Ευρώπη και αντικατέστησαν το είδος *M. nigra* Linn.

Οι σύγχρονοι ταξινομιστές χωρίζουν το γένος *Morus* σε δυο μόνο είδη:

1) *M nigra* L κατάγεται από την περιοχή της Κασπίας Θάλασσας, που έχει εισαχθεί στη χώρα μας από τα αρχαία χρόνια. Τα φύλλα είναι χαρακτηριστικά, σκληρά, σε σχήμα καρδιάς στη βάση τους, με ανώμαλη την πάνω επιφάνεια και χνουδωτές και τις δυο επιφάνειες. Οι καρποί είναι άμισχοι, χρώματος μαύρου-μωβ.

2) *M alba* L κατάγεται από την Κίνα. Τα φύλλα είναι τρυφερά, σε σχήμα καρδιάς στη βάση, ακέραια ή λοβοειδή ειδικά στις άκρες, λεία στην πάνω επιφάνεια και χνουδωτά στην κάτω. Οι καρποί είναι άσπρου ή κοκκινωπού χρώματος, έμμισχοι, γλυκοί, άγευστοι ή υπόγλυκοι.



Εικόνα 4.1.1 Φύλλα μουριάς

Τα φύλλα αυτού του δέντρου αποτελούν τη μοναδική τροφή του μεταξοσκώληκα και το θέμα των πολλαπλών εκτροφών του είναι άμεσα συνδεδεμένο με τα χαρακτηριστικά των διαφόρων ποικιλιών της μουριάς, την ηλικία και την ποιότητα των μορεόφυλλων, καθώς και των άλλων ιδιοτήτων τους. Τα μορεόφυλλα επηρεάζουν την απόδοση κατά το μέγιστο βαθμό στην καλή ανάπτυξη των μεταξοσκωλήκων (Kumar et al,1994)

Η μουριά είναι δέντρο με μεγάλη προσαρμοστικότητα, αναπτύσσεται σε διάφορους τύπους κλίματος, αλλά καλύτερα στα εύκρατα κλίματα. Φύεται σε υψόμετρο έως 800-1000 m. Τα μορεόδεντρα που χρησιμοποιούνται για την σηριοτροφία, πρέπει να καλλιεργούνται μέχρι την ηλικία των 20-25 ετών, γιατί όσο αυξάνει η ηλικία τους μειώνεται η παραγωγικότητά τους σε φύλλα.

Η θρεπτική αξία των μορεόφυλλων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία των φύλλων, η καλλιεργούμενη ποικιλία, ο τρόπος και ο χρόνος κλαδέματος, το είδος του λιπάσματος, η περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό, ο τύπος του εδάφους, η εποχή του έτους, η ώρα και ο τρόπος συλλογής και ο χρόνος αποθήκευσης τους.

Μια τυπική ανάλυση δείχνει ότι τα μορεόφυλλα περιέχουν υγρασία 70%, ολικές πρωτεΐνες 19-20 %, υδατάνθρακες 9-10% και ανόργανα συστατικά 1%. Τα σημαντικότερα αμινοξέα των μορεόφυλλων είναι η αλανίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η βαλίνη, η τρυπτοφάνη, ασπαρτικό οξύ, το γλουταμινικό οξύ, η σερίνη, η γλουταμίνη, η λυσίνη και μερικά ακόμη σε πολύ μικρές ποσότητες. Τα τρυφερά μορεόφυλλα για

μεταξοσκώληκες I-III ηλικιών περιέχουν κατά μέσο όρο υγρασία 76%, ολικές πρωτεΐνες 21 %, υδατάνθρακες 11% (Mishra et al, 1993).

Έχει παρατηρηθεί, ότι η συχνότητα των κλαδεμάτων επηρεάζει την περιεκτικότητα των φύλλων σε θρεπτικά συστατικά. Τα δέντρα που κλαδεύονται τρεις φορές το χρόνο περιέχουν περισσότερες ολικές πρωτεΐνες, από αυτά που κλαδεύονται δυο φορές. Τα φύλλα της άνοιξης έχουν περισσότερες ολικές πρωτεΐνες, από τα φύλλα του καλοκαιριού και του φθινοπώρου. Επιπλέον, τα φύλλα της κορυφής είναι πλουσιότερα σε θρεπτικά συστατικά από τα φύλλα της βάσης (Basu et al, 1995). Τέλος έχει αναφερθεί ότι η ολιγόχρονη διατήρηση των φύλλων πριν την διάθεσή τους στους μεταξοσκώληκες, προκαλεί την μερική διάσπαση των πρωτεϊνών σε αμινοξέα και απελευθέρωση αμμωνίας.

4.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς με φασματοσκοπία FT-IR

Φυτικό υλικό:

Φύλλα από οκτώ ποικιλίες (Kairio, Proussis, Kokerka, Kokuso 21, Local 1, Heyebai, Tang 10 X Lang 109, Fengchisan) λευκής μουριάς, συλλέχθηκαν μια φορά το μήνα, για όλη τη διάρκεια του καλοκαιριού, δηλαδή συνολικά τρία σετ από δείγματα. 50 φύλλα από την κάθε ποικιλία επιλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Όλα τα δείγματα ξηράνθηκαν και χωρίστηκαν σε δυο σετ, το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για τον ολικό προσδιορισμό του αζώτου με την μέθοδο Kjeldahl και το δεύτερο για τον προσδιορισμό του αζώτου με φασματοσκοπία FT-IR. Καθένα από τα 24 δείγματα αναλύθηκε τρεις φορές με την μέθοδο Kjeldahl για τον ολικό προσδιορισμό του αζώτου. Τα φάσματα FT-IR καταγράφηκαν επίσης σε τριπλέτες. Αυτά τα δείγματα φύλλων μουριάς χωρίστηκαν σε δυο ομάδες: η πρώτη ομάδα χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία της βιβλιοθήκης της μεθόδου PLS, και για αυτό τον λόγο ονομάστηκαν ως «πρότυπα» (St1-St10), ενώ η δεύτερη ομάδα δημιουργήθηκε για την αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθόδου, και για αυτό το λόγο ονομάστηκαν ως «άγνωστα» (S1-S14).

Συσκευές:

- Αναδευτήρας
- Σφαιρόμυλος
- Λυοφιλωτής της εταιρείας Vir Tis 25 EL
- Συσκευή Kjeldahl
- Φασματοφωτόμετρο FT-IR της εταιρείας Nicolet (μοντέλο 750 Magna series). Το φασματοφωτόμετρο ήταν εξοπλισμένο με αερόψυκτη πηγή εφοδιασμένη με νήμα από κράμα Ni – Cr (Nicochrome), πυροηλεκτρικό ανιχνευτή κατασκευασμένο από δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (Deuteriated TriGlycine Sulphate – DTGS) και μικρό υποδοχέα (microcup) δείγματος διαμέτρου 3 mm και ύψους 2 mm.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής εφοδιασμένος με το λογισμικό OMNIC (ver.3.1) το οποίο χρησιμοποιείται στη λήψη και επεξεργασία φασμάτων FT-IR. Ο υπολογιστής είναι συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο

Αντιδραστήρια:

- Θειικό οξύ 98% (w/w)
- Θειικός χαλκός
- Θειικό κάλιο
- Σελήνιο
- Υδροξείδιο του νατρίου
- Αμμωνία
- Υδροχλωρικό οξύ 0,1 M
- Διάλυμα βορικού αμμωνίου

Μέθοδος Kjeldahl:

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας (%) σε ολικό άζωτο (N) με τη μέθοδο Kjeldahl έγινε χρήση της συσκευής Buechi, καθιστώντας ασφαλέστερη και ταχύτερη τη διαδικασία. Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά τα επιμέρους στάδια της μεθόδου για την εύρεση του ποσοστού (%) ολικού αζώτου για κάθε δείγμα.

α) Καύση (χώνευση) του δείγματος:

Μετά τη ζύγιση 0,5 g δείγματος φύλλων μουριάς σε μορφή σκόνης (προϊόν λειοτρίβησης του αποξηραμένου δείγματος), έγινε τοποθέτηση του δείγματος σε ειδική

φιάλη της συσκευής καύσης. Σε καθένα από τα δείγματα ακολούθησε προσθήκη 20 mL διαλύματος 2.5% (w/v) σαλικυλικού οξέος (C₇H₆O₃) σε πυκνό θειικό οξύ (H₂SO₄). Έπειτα, προστέθηκε 1 g άλατος Na₂S₂O₃ ώστε να αυξηθεί η θερμοκρασία της χώνευσης, καθώς και μία ταμπλέτα σεληνίου (Se) προκειμένου μέσω της κατάλυσης να ενισχυθεί η οξείδωση της οργανικής ουσίας (Bremner et al). Οι φιάλες, ύστερα, τοποθετήθηκαν στη συσκευή καύσης Bucchi, όπου και έγινε η χώνευση για μία ώρα. Το αποτέλεσμα που προκύπτει μετά την καύση είναι το τελικό διάλυμα θειικού αμμωνίου:



β) Απόσταξη: Αφού τέθηκε σε λειτουργία η συσκευή απόσταξης Bucchi, έγινε μεταφορά του κάθε δείγματος από τη φιάλη καύσης στη φιάλη απόσταξης. Ακολούθησε τοποθέτηση καθενός δείγματος στη συσκευή, όπου και έγινε προσθήκη 30 mL απιονισμένου νερού και 130 mL 8N NaOH.

Παράλληλα, σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 100 mL 2% βορικού οξέος (H₃BO₃) για την παραλαβή αμμωνίας κατά την απόσταξη, και ακολούθως η φιάλη τοποθετήθηκε στη συσκευή απόσταξης.

Η απόσταξη για κάθε δείγμα είχε διάρκεια 3 λεπτών.

γ) Τιτλοδότηση:

Στο δείγμα που συλλέχθηκε από την απόσταξη προστέθηκε δείκτης¹ και ακολούθησε τιτλοδότηση της αμμωνίας με 0,05N HCl. Η μεταβολή που παρατηρήθηκε στο χρώμα κατά την ολοκλήρωση της τιτλοδότησης, δηλ. το τελικό σημείο, ήταν από πράσινο σε ροζ (pH = 5.4).

δ) Υπολογισμός της (%) περιεκτικότητας σε ολικό N:

Η % περιεκτικότητα σε ολικό N προσδιορίστηκε με βάση τη σχέση:

$$\text{Ολικό άζωτο (N) \%} = \frac{(V_{\text{HCl}} (\text{mL}) - 0.2) \times N \times 1.4007}{m (\text{g})}$$

Όπου N η κανονικότητα του διαλύματος HCl (0,05N) και m η μάζα του κάθε δείγματος σε g (0,5 g).

Φασματοσκοπία FT-IR:

Το φάσμα FT-IR από κάθε δείγμα (το οποίο προηγουμένος είχε λειοτριβηθεί και λυοφιλωθεί) καταγράφηκε τρεις φορές. Το φάσμα υπερύθρου του κάθε δείγματος καταγράφηκε από το φασματοφωτόμετρο Nicolet 750 series με την τεχνική των DRIFTS. Φάσματα όλων των δειγμάτων καταγράφηκαν 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 έγινε πριν από κάθε παρτίδα μετρήσεων.

4.2.2 Σύγκριση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς με την μέθοδο Kjeldahl και με τη μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR

Και τα 24 δείγματα μουριάς αναλύθηκαν με την μέθοδο Kjeldahl για τον προσδιορισμό του ολικού τους αζώτου. Το ποσοστό αζώτου για τα δέκα «πρότυπα» κυμάνθηκε από 1,87 – 4,61% και η επιλογή τους έγινε με το κριτήριο να μπορέσει να καλυφθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος της περιοχής των συγκεντρώσεων αζώτου και των 24 δειγμάτων μας. (Πίνακας 4.2.2.1)

Πίνακας 4.2.2.1 Περικεκτικότητα (%) σε ολικό άζωτο των προτύπων, όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο Kjeldahl

Πρότυπο	Ολικό άζωτο (%)
St1	1,87 ± 0,06
St2	4,56 ± 0,07
St3	2,33 ± 0,04
St4	3,48 ± 0,06
St5	3,9 ± 0,2
St6	3,6 ± 0,2

St7	4,0 ± 0,2
St8	4,61 ± 0,09
St9	2,10 ± 0,02
St10	3,59 ± 0,05

Στα 14 «άγνωστα» δείγματα υπολογίστηκε το ποσοστό τους σε άζωτο και βρέθηκε να είναι 3,31 – 4,16% (Πίνακας 4.2.2.2) σύμφωνα με την μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR. Σε αντίθεση, η αποτελεσματικότητα της σχετικής τυπικής απόκλισης μετρήθηκε και για τις δυο μεθόδους για όλα τα «άγνωστα».

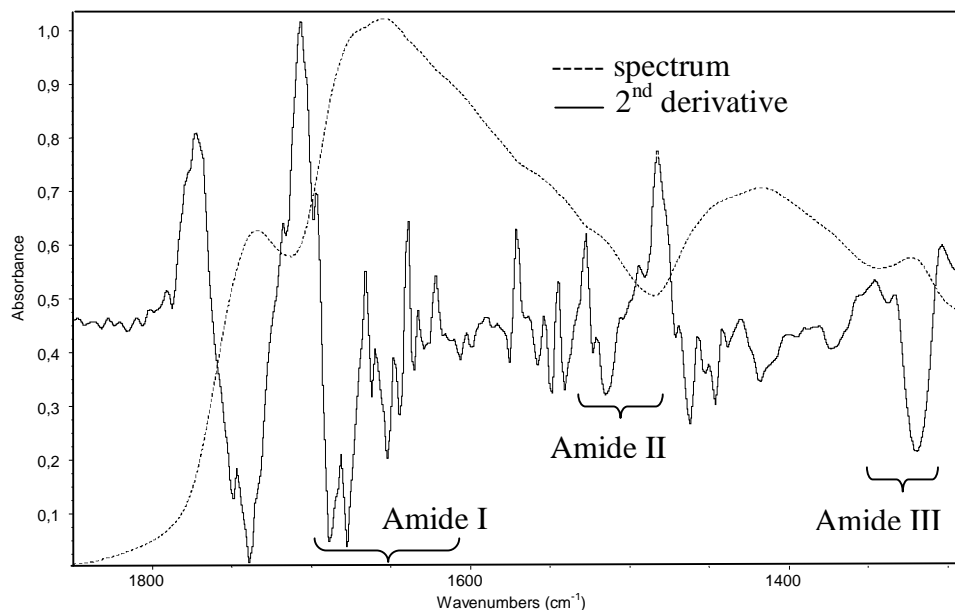
Πίνακας 4.2.2.2 Περιεκτικότητα (%) σε ολικό άζωτο των «αγνώστων» δειγμάτων φύλλων μουριάς, όπως προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Kjeldahl και FT-IR, οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) και οι στατιστικές τιμές των F-test και t-test

«Άγνωστο» δείγμα	Kjeldahl Ολικό άζωτο (%)	RSD Μέθοδος Kjeldahl	FT-IR Ολικό άζωτο (%)	RSD Μέθοδος FT-IR	F test	t test
S1	3,82 ± 0,04	1,047	3,80 ± 0,10	3,412	10,56	0,94
S2	3,40 ± 0,04	1,060	3,40 ± 0,20	4,704	19,26	1,06
S3	4,14 ± 0,04	0,975	4,16 ± 0,07	1,704	3,08	0,53
S4	4,09 ± 0,09	2,134	4,09 ± 0,07	1,801	1,40	0,17
S5	3,90 ± 0,05	1,175	4,30 ± 0,20	3,981	13,76	1,00
S6	3,85 ± 0,04	1,080	3,90 ± 0,20	4,761	19,38	1,07
S7	3,73 ± 0,03	0,929	3,67 ± 0,08	2,057	4,75	0,70
S8	3,73 ± 0,05	1,210	3,90 ± 0,10	3,587	9,46	0,91
S9	3,64 ± 0,07	1,986	3,80 ± 0,20	4,262	4,99	0,71
S10	3,38 ± 0,06	1,806	3,40 ± 0,20	4,441	6,11	0,78
S11	3,31 ± 0,03	0,906	3,50 ± 0,20	4,503	26,93	1,12
S12	3,59 ± 0,04	1,127	3,50 ± 0,10	3,558	9,69	0,91
S13	3,38 ± 0,04	1,038	3,50 ± 0,10	4,046	15,89	1,03
S14	3,42 ± 0,02	0,585	3,31 ± 0,08	2,417	16,00	1,03

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του ολικού αζώτου του κάθε φάσματος ήταν η «PLS μέθοδος» του λογισμικού TQ Analyst (Ver. 1.1a.1.1.6) διότι σύμφωνα με το εγχειρίδιο προτείνεται για τον προσδιορισμό ενός συστατικού σε πολύπλοκα μίγματα. Ο μόνος περιορισμός ήταν ότι ο αριθμός των προτύπων πρέπει να είναι $\geq 3 \times$ του αριθμού των συστατικών του μίγματος. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για να αναπτυχθεί η «μέθοδος PLS» απαιτούσε την εισαγωγή δεδομένων για την δημιουργία της βάσης δεδομένων. Έτσι ήταν απαραίτητη η εισαγωγή των καταγεγραμμένων φασμάτων, το

μήκος της διαδρομής της ακτίνας μέσα στο δείγμα και η εισαγωγή της συγκέντρωσης του υπό ανάλυση συστατικού. Η επιλογή της διαδρομής της ακτίνας επιλέχθηκε να είναι σταθερή διότι σε κάθε μέτρηση περνούσε από σταθερή ποσότητα δείγματος, αφού μήκος του κάθε κύπελου DRIFT που ήταν γεμάτο ήταν το ίδιο.

Το φάσμα των φύλλων της μουριάς χωρίζεται σε τρεις περιοχές. Η πρώτη περιοχή είναι από $4000-1850\text{ cm}^{-1}$, η δεύτερη περιοχή από 1850 έως 1290 cm^{-1} και η τρίτη περιοχή από $1290-400\text{ cm}^{-1}$. Η πιο σημαντική περιοχή των καταγεγραμμένων φασμάτων ήταν από τα 1850 έως 1290 cm^{-1} , διότι οι χαρακτηριστικές ομάδες και οι δεσμοί αζώτου βρίσκονται στην συγκεκριμένη περιοχή (Σχήμα 4.2.2.1).



Σχήμα 4.2.2.1 Φάσμα FT-IR φύλλου μουριάς και η 2^η παραγωγός του

Η περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για το λογισμικό TQ Analyst για την δημιουργία της βιβλιοθήκης του, ήταν από την προαναφερθείσα περιοχή με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από 1850 έως 1290 cm^{-1} . Η συγκεκριμένη περιοχή έχει 16 χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες δεν

μπορούν να διακριθούν διότι αλληλεπικαλύπτονται, εκτός και εάν χρησιμοποιηθεί η λειτουργία της δεύτερης παραγωγού.

Η δεύτερη παράγωγος του φάσματος FT-IR, του οποίου τα ελάχιστα φανερώνουν κορυφές οι οποίες «κρύβονται» στην περιοχή, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των κορυφών που αφορούν την παρουσία αζώτου στο δείγμα (Πίνακας 4.2.2.3).

Πίνακας 4.2.2.3 Συχνότητες και αποδόσεις των κορυφών στα φάσματα IR των φύλλων της μουριάς

Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Ομάδα
1738	Καρβονύλιο των εστέρων
1690-1620	Αμίδιο I
1558-1540	Αμίδιο II
1610, 1515	Λιγνίνη
1262	Αμίδιο III

Η πρώτη κορυφή στα 1738 cm⁻¹ είναι η χαρακτηριστική κορυφή των ομάδων των καρβονυλίων των εστέρων, η οποία εμφανίζεται ως επι το πλείστον σε φάσματα φυσικών προϊόντων (Dong-Yang Zhang et al, 2016, K. Thirugnanasambandham et al, 2015). Η χαρακτηριστική περιοχή του αμιδίου I στα 1652-1644 cm⁻¹, παρουσιάζει τρεις κορυφές εξαιτίας της διαμοριακής κατάστασης των δεσμών υδρογόνου, της β-δομής και της α-έλικας αντίστοιχα (Lasch et al, 2002, Maruyama et al, 2001). Η κορυφή του β-sheet είναι χαμηλότερα από το αμίδιο I και εμφανίζεται σαν διπλή κορυφή στα 1635 και 1629 cm⁻¹. Η περιοχή του αμιδίου II από 1558 έως 1540 cm⁻¹ δείχνει τρεις κορυφές μετά την χρήση της 2^{ης} παραγωγού, οι οποίες όμως είναι μετατοπισμένες σε σύγκριση με δομές άλλων πρωτεϊνών που έχουν μελετηθεί. Η τελευταία κορυφή η οποία εμπλέκεται με την παρουσία αζώτου στα

φύλλα μουριάς είναι μια πλατιά και ισχυρή δόνηση στα 1262 cm^{-1} . Οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται στην συγκεκριμένη περιοχή οφείλονται σε συστατικά του φύλλου, όπως η λιγνίνη στα 1610 και 1515 cm^{-1} (Jasmina M. et al, 2013) και διάφορα είδη σακχάρων και λιπιδίων των οποίων η παρουσία των $\text{CH}_{2,3}$ προκαλεί τη απορρόφηση στα 1461 , 1446 , 1418 και 1373 cm^{-1} (Degrave et al, 2002, Fabian et al, 2004)

Δέκα είδη φύλλων μουριάς επιλέχθηκαν ως «πρότυπα» για να συμπεριλάβουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων αζώτου. Αυτά τα δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο Kjeldahl και η περιεκτικότητά τους σε αζώτου κυμάνθηκε από $1,87$ έως $4,61\%$ (Πίνακας 4.2.2.1). Τα αποτελέσματα της μεθόδου Kjeldahl χρησιμοποιήθηκαν σαν εισερχόμενο για τη δημιουργία βάσης δεδομένων με το λογισμικό TQ analyst.

Η περιεκτικότητα σε άζωτο των 14 «άγνωστων» δειγμάτων φύλλων μουριάς προσδιορίστηκε με την μέθοδο FT-IR ($3,31 - 4,16\%$) σε τριπλέτες και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.2.2.2. Η σταθερή διαφορά των τιμών της συγκέντρωσης κυμάνθηκε μεταξύ $0,07$ και $0,18$.

Για να συγκρίνουμε τις δυο μεθόδους ως προς την επαναληψιμότητα και την ακριβειά τους, χρησιμοποιήσαμε δυο στατιστικά εργαλεία το F-test και t-test. Όλες οι μετρήσεις, και στις δυο μεθόδους βρίσκονταν κοντά στην θεωρητική τιμή $2,776$ για το t-test για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% , και μόνο σε τρεις από τις 14 περιπτώσεις οι τιμές ήταν μεγαλύτερες από την θεωρητική τιμή $19,00$ για το F-test για επίπεδο εμπιστοσύνης (Πίνακας 4.2.2.2). Συμπερασματικά, οι δυο μέθοδοι είναι στατιστικά παραπλήσιες στα πλαίσια της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας.

Συμπερασματικά:

Η χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ολικού αζώτου στα φύλλα της μουριάς, είναι μια καλή εναλλακτική μέθοδος, που προσφέρει μικρό χρόνο ανάλυσης και απλότητα στην επεξεργασία των δειγμάτων πριν την χρήση τους, σε σύγκριση με άλλες πολύπλοκες μεθόδους. Τα φάσματα καταγράφηκαν χωρίς προηγούμενη επεξεργασία τους, το οποίο απλουστεύει ακόμη περισσότερο τη μέθοδο. Η μη χρήση

διαλυτών, ακριβών αντιδραστηρίων και πολύπλοκων μηχανημάτων ελαττώνει το κόστος ανάλυσης. Το μοναδικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η χρήση πολλών δειγμάτων σαν «πρότυπα» για την εισαγωγή τους στην βιβλιοθήκη τους προγράμματος TQ Analyst ώστε να καταστεί εφικτή η λήψη αντιπροσωπευτικότερων αποτελεσμάτων με μικρότερη απόκλιση από τις πραγματικές τιμές συγκέντρωσης.

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1.1 Τιμές των φυσικών σταθερών που επηρεάζουν την συμπεριφορά των πιο κοινών διαλυτών σε πεδία μικροκυμάτων (Armstrong , 2000)

Πίνακας 1.1.2 Τιμές του σημείου ζέσεως, του ιξώδους και του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας για τους πιο κοινούς διαλύτες. (MERCCK, 2008)

Πίνακας 1.2.2.1 Κυματαριθμοί , μήκη κύματος, συχνότητες και ενέργεια σε σημεία του υπέρυθρου φάσματος.

Πίνακας 2.2.1.1 Κυματαριθμοί από τις κύριες κορυφές για την περιοχή $1900-1500\text{cm}^{-1}$

Πίνακας 2.2.1.2 Περιεκτικότητα πρότυπου πολυγαλακτουρονικού οξέος (%w/w) συναρτήσει του αθροίσματος του εμβαδού των κορυφών στα 1745 , 1715 και 1600cm^{-1}

Πίνακας 2.2.2.1 Κυματαριθμοί από τις κύριες κορυφές για την περιοχή $1900-1500\text{cm}^{-1}$ (Sene et al, 1994, Pappas et al, 1999).

Πίνακας 2.2.2.2 Η συγκέντρωση του ουρονικού οξέος των απομονομένων ημικυτταρινών από κενάφ με την φωτομετρική μέθοδο και την μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR της αποσυνελιγμένης περιοχής.

^an=3; ^bΕπίπεδο εμπιστοσύνης 95 %

Πίνακας 2.3.1.1 Μέθοδος απομόνωσης ημικυτταρινών με την κλασική μέθοδο ανάδευσης και την μέθοδο των μικροκυμάτων

Πίνακας 2.3.2.1 Συνοπτική παρουσίαση των αποδόσεων για κάθε δείγμα ημικυτταρινών που απομονώθηκε.

Πίνακας 2.3.2.2 Απορροφήσεις των FT-IR φασμάτων της ξυλάνης και της ημικυτταρίνης που απομονώθηκε με ήπιες μεθόδους και την μέθοδο των μικροκυμάτων.

Πίνακας 3.1.1 Μέση σύσταση του ελληνικού μελιού, με βάση 144 δείγματα από μέλια ανθέων και 30 μελιτωμάτων (Thrasynoulou and Manikis, 1995).

Πίνακας 3.1.2 Τα κυριότερα σάκχαρα του μελιού.

Πίνακας 3.2.2.1 Περιεκτικότητες των προτύπων σε φρουκτόζη και γλυκόζη όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο HPLC

Πίνακας 3.2.2.2 Περιεκτικότητες (%) «αγνώστων» δειγμάτων μελιού σε γλυκόζη και φρουκτόζη

Πίνακας 3.2.2.3 Σχετική τυπική απόκλιση «αγνώστων» δειγμάτων μελιού

Πίνακας 3.3.2.1 Αποδόσεις των κορυφών των φασμάτων FT-Raman για τα δείγματα μελιού

Πίνακας 3.3.2.2 Αποδόσεις των κορυφών των φασμάτων FT-IR όπως προέκυψαν από την 2^η παράγωγο για τα δείγματα μελιού

Πίνακας 3.3.2.3 Σύγκριση των «βαθμών ομοιότητας» των φασμάτων, των «αγνώστων» βοτανικής προέλευσης δειγμάτων μελιού, τα οποία καταγράφηκαν με της τεχνικές IR και Raman, σύμφωνα με την βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε από γνωστής βοτανικής προέλευσης «πρότυπα»

Πίνακας 4.2.2.1 Περιεκτικότητα (%) σε ολικό άζωτο των προτύπων, όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο Kjeldahl

Πίνακας 4.2.2.2 Περιεκτικότητα (%) σε ολικό άζωτο των «αγνώστων» δειγμάτων φύλλων μουριάς, όπως προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Kjeldahl και FT-IR, οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) και οι στατιστικές τιμές των F-test και t-test

Πίνακας 4.2.2.3 Συχνότητες και αποδόσεις των κορυφών στα φάσματα IR των φύλλων της μουριάς

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.2.2.1 Παράθυρα από ZnSe

Εικόνα 1.2.2.2 Τεχνική των DRIFTS

Εικόνα 2.1.1 Φυτεία κενάφ

Εικόνα 2.1.2 Σχηματική παράσταση του κενάφ. 1. Άνθος, 2. Φύλλα, 3. Στέλεχος

Εικόνα 2.1.3 Φλοιός και ξύλο κενάφ.

Εικόνα 2.1.4 Φύλλο κενάφ.

Εικόνα 2.1.5 Άνθος κενάφ.

Εικόνα 2.2.1.1 Τύπος ημικυτταρίνης

Εικόνα 3.1.1 Δείγμα μελιού

Εικόνα 4.1.1 Φύλλα μουριάς

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1.1 Απεικόνιση εσωτερικού συσκευής μικροκυμάτων

Σχήμα 1.2.2.1 Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης μεταξύ του μήκους του δεσμού και της περιεχόμενης δυναμικής ενέργειας στον απλό αρμονικό ταλαντωτή

Σχήμα 1.2.2.2 Σχηματική απεικόνιση δονήσεων μεταξύ ατόμων άνθρακα υδρογόνου με τους αντίστοιχούς κυματάρθμους

Σχήμα 1.2.2.3 Σχηματική απεικόνιση του φασματοφωτόμετρου FT-IR

Σχήμα 1.2.2.4 Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series).

Σχήμα 1.2.2.5 Λεπτομέρεια του Michelson Interferometer

Σχήμα 1.2.2.6 Σχηματική απεικόνιση συμβολής μονοχρωματικών ακτινοβολιών

Σχήμα 1.2.2.7 Τυπικά ιντερφερογράμματα υπερύθρου

Σχήμα 1.2.2.8 Φάσμα πολυστυρενίου με το παραπάνω background

Σχήμα 1.2.2.9 Μετατροπή του ιντερφερογράμματος σε φάσμα FT-IR

Σχήμα 1.2.3.1 Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-Raman

Σχήμα 2.2.2.1 Φάσμα FT-IR : (a) δείγμα προτύπου περιεκτικότητας 8 % σε αλάτι πολυγαλακτουρονικού οξέος, (b) δείγμα 1, (c) δείγμα 2, (d) δείγμα 3a και (e) δείγμα 3b.

Σχήμα 2.2.2.2 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} ενός προτύπου δείγματος περιεκτικότητας 8 % σε αλάτι πολυγαλακτουρονικού οξέος

Σχήμα 2.2.2.3 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} του δείγματος 1.

Σχήμα 2.2.2.4 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} του δείγματος 2.

Σχήμα 2.2.2.5 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} του δείγματος 3a.

Σχήμα 2.2.2.6 Αποσυνελιγμένη περιοχή από 1850 έως 1500 cm^{-1} του δείγματος 3b. **Σχήμα**

2.2.2.7 Εξίσωση καμπύλης βασισμένη στην αποσυνελιγμένη ανάλυση των φασμάτων FT-IR των προτύπων με αλάτι του πολυγαλακτουρονικού οξέος.

Σχήμα 2.3.2.1 Περιοχή 1500-800 cm^{-1} του φάσματος FT-IR της ξυλάνης

Σχήμα 2.3.2.2 Περιοχή 1500-800 cm^{-1} του φάσματος FT-IR της ημικυτταρίνης με την κλασσική μέθοδο

Σχήμα 2.3.2.3 Περιοχή $1500-800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR της ημικυτταρίνης με την μέθοδο των μικροκυμάτων

Σχήμα 3.1.1 Χημική δομή των σημαντικότερων σακχάρων του μελιού.

Σχήμα 3.2.2.1 Τυπικό χρωματογράφημα HPLC από δύο δείγματα μελιού S3 (φρουκτόζη 24.0 % - γλυκόζη 21.1 %) και S9 (φρουκτόζη 39.4 % - γλυκόζη 32.1 %).

Σχήμα 3.2.2.2 Φάσματα FT-Raman στερεής φρουκτόζης και γλυκόζης και δυο δειγμάτων μελιού S3 (φρουκτόζη 24,0 % - γλυκόζη 21,1 %) and S9 (φρουκτόζη 39,4 % - γλυκόζη 32,1 %).

Σχήμα 3.3.2.1 Φάσματα FT-Raman δειγμάτων μελιού: (a) βαμβάκι, (b) έλατο, (c) καστανιά, (d) πεύκο, (e) πορτοκαλιά, (f) θυμάρι, (g) ευκάλυπτος.

Σχήμα 3.3.2.2 Φάσματα FT-Raman δειγμάτων μελιού στην περιοχή $1500-750\text{ cm}^{-1}$: (a) βαμβάκι, (b) έλατο, (c) καστανιά, (d) πεύκο, (e) πορτοκαλιά, (f) θυμάρι, (g) ευκάλυπτος.

Σχήμα 3.3.2.3 Φάσματα FT-IR δειγμάτων μελιού: (a) βαμβάκι, (b) έλατο, (c) καστανιά, (d) πεύκο, (e) πορτοκαλιά, (f) θυμάρι, (g) ευκάλυπτος.

Σχήμα 3.3.2.4 2^η παραγώγος των φάσματος FT-Raman δειγμάτων μελιού: (a) βαμβάκι, (b) έλατο, (c) καστανιά, (d) πεύκο, (e) πορτοκαλιά, (f) θυμάρι, (g) ευκάλυπτος.

Σχήμα 4.2.2.1 Φάσμα FT-IR φύλλου μουριάς και η 2^η παραγωγός του

Βιβλιογραφία

- 1) Ammor M. S., Argyri A., and Nychas G.J.E., *Meta Sci.*,2009,81, 507-514
- 2) Anklam, E., *Food Chemistry*,1998, 63:549-562.
- 3) Armstrong, PhD thesis,2000
- 4) Baeten V.,Pierna J. A.F., Dardenne P., Meurens M., Garcia-Gonzalez D.L., Aparicio-Ruiz R., *J. Agric. Food Chem.*,2005,53,6201-6206
- 5) Basu R., N. Roychoudhury, M. Shamsuddin, S.K. Sen and S.S. Sinha, Effect of leaf quality on rearing and reproductive potentiality of *Bombyx mori* L Indian Silk, 1995, 33(12), 21-22
- 6) Beril Özbalci, İsmail Hakkı Boyacı, Ali Topcu, Cem Kadılar, Uğur Tamer, *Food Chem.*,2013, 136 1444–1452
- 7) Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G., *Anal. Biochem.*, 1973, 54, 484
- 8) Bogdanov, S., Martin, P., Lullmann, C., *Apidologie (extra issue)*: 1997, 1-59
- 9) Bosi, G. and Battaglini, M., *Journal of Apicultural Research*,1978, 17,152-166.
- 10) Bremner J. M., 1996. Nitrogen-Total. In: *Methods of Soil Analysis, Part 3 – Chemical Methods* (pp. 1085-1102). Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- 11) Βαλαβανίδης, Αθ. Π. Φασματοσκοπία οργανικών ενώσεων, Εκδ. Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, 2006
- 12) Carmen-Mihaela Popescu , Maria-Cristina Popescu, Cornelia Vasile, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 48, 667–675
- 13) Chatjigakis, A. K., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O., Rodis, P., Polissiou, M., *Carbohydr. Polym.*, 1998, 37, 395-408
- 14) Chu H.Y., Huang Y.W., Zhao Y.P., *Appl. Spectrosc.*, 2008,62,922-931
- 15) Cook C.G., Escobar D.E., Everiff J.H., Cavazos I., Robinson A.f., Davis M.R., *Ind. Crop. Prod.*, 1999, 9 (3), 205 - 210.
- 16) Corbett, E.C., Vichy, V., *Spectrochim. Acta*, 1991, 47A, 1399-1411
- 17) Crane, E., 1990, *The traditional hive products: honey and beeswax*, 13, 388-451

- 18) Degraeve, P., Rubens, P., Lemay, P., Heremans, K.. *Enzyme Microb. Technol.* 2002, 31, 673-684
- 19) Dong-Yang Zhang, Yi Wan, Jian-Yi Xu, Guo-Hua Wu, Long Li, Xiao-Hui Yao, *Carbohydrate Polymers*, 2016, 137, 473–479
- 20) Etchverry, S. B., Williams, P. A. M., Baran, E. J, *Carbohydr. Res.* ,1997, 302, 131-138
- 21) Fabian, H., Naumann, D. *Methods* , *Methods*, 2004, 34, 28-40
- 22) Filisetti-Cozzi T. M. C. C. and Carpita N. C., *Anal. Biochem.*, 1991, 197, 157
- 23) Goodacre, R., Radovic, B.S., Anklam, E., *Appl. Spectrosc.* 2002, 56, 521-527
- 24) Guevas-Glory, L. F., Pino, J. A., Santiago, L. S. and Sauri-Duch, E., *Food Chemistry*, 2007, 103, 1032-1043
- 25) Han-Yin Li, Shao-Ni Sun, Xia Zhou, Feng Peng, Run-Cang Sun, *Carbohydrate Polymers*, 2015, 123, 17–26
- 26) Herrero A.M., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2008,512-523
- 27) Jasmina M. Dimitrić Marković , Zoran S. Marković, Jugoslav B. Krstić, Dejan Milenković, Bono Lučić, Dragan Amić, *Vibrational Spectroscopy*, 2013, 64, 1–9
- 28) K. Thirugnanasambandham , V. Sivakumar , J. Prakash Maran, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72, 1–5
- 29) Kacurakova, M., Mathlouthi, M., *Carbohydr. Res.*, 1996, 284, 145-157
- 30) Kaldor A. F., *Tappi Journal*, 1989, September, 137 - 140
- 31) Korifi R., Le Dreau Y., Molinet J., Artaud J., Dupuy N., *J. Raman Spectrosc.*, 2011,42,1540-1547
- 32) Kumar V, M.T. Himanthharaj, R.K. Rajan, V.B. Mathur, C.K. Kamble and R.K. Datta, *Simple leaf preservation for young age silkworm rearing Indian Silk*, 1994,32(9), 20-21
- 33) Lasch, P., Boese, M., Pacifico, A., Diem, M. , *Vibrat. Spectrosc.* ,2002, 28, 147-157
- 34) Leonard, J., Lygo, B., Procter, G., *Advanced Practical organic chemistry*,1995, Chapman & Hall, Oxford, Great Britain
- 35) Lothrop, R. E. and Paine, H. S., *Industrial and Engineering Chemistry*, 1931, 23, 328-332.

- 36) Maruyama, T., Katoh, S., Nakajima, M., Nabetani, H., Abbott, T. P., Shono, A., Satoh, K. , J. Membr. Sci. ,2001, 192, 201-207
- 37) McMillin J.D., Wagner M.R., Webber C.L., Mann S.S., Nichols J. D., Jech L., Ind. Crop. Prod., 1998, 9 (1), 73 - 77.
- 38) Mizrach A., Schmilovitch Z., Korotic R., Shapira R., Trans ASABE, 2007, 50,2143-2149
- 39) Mossoba M. M., Seiler A., Steinhart H., Kramer J. K. G., J.Am. Oil Chem. Soc.,2011, 88, 39-46
- 40) Nicolet Instrument Corporation, Introduction to FT – IR, 1991.
- 41) Nicolet Magna series User’s guide-Instructions Manual
- 42) O.O.Okoh, A.P. Sadimenko, A.J. Afolayan, Food chem., 2010,120,308-312
- 43) Ofélia Anjos, Maria Graça Campos, Pablo Contreras Ruiz, Paulo Antunes, Food Chemistry, 2015, 169, 218–223
- 44) Oliveira, L.F.C., Colombara, R., Edwards, H.G.M., Appl. Spectrosc., 2002, 56, 306-311
- 45) Pappas C., Rodis P., Tarantilis P. A., and Polissiou M., Appl. Spectrosc., 1999, 53(7), 805
- 46) Pappas, C. S., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., Polissiou, M.G., Appl. Spectrosc., 2003, 57, 23-27
- 47) Pappas, C., Tarantilis, P.A.,Polissiou, M., Appl. spectrosc., 1998,11,1399-1402
- 48) Paradkar, M.M., Irudayaraj, J., Food Chem., 2001, 76, 231-239
- 49) Peaksolve Users Manual
- 50) Selvendran R.R., O’Neill M.A., Isolation and analysis of cell walls from plant material, in: D.Glick (Ed.), Methods of Biochemical Analysis (Academic Press, London, 1987), pp.27.
- 51) Sene C.F.B., McCann M.C., Wilson R.H., Grinter R., Plant Physiol., 1994, 106, 1623
- 52) Shende C., Inscore F., Gift A., Maksymiuk P. in Nondestructive Sensing for Food Safety, Quality and Natural Resources, 2004,5587,170-176
- 53) Siepe T., Ventrella D., Lapenta E., Ind. Crop. Prod. , 1997, 6 (3-4), 343 –352.
- 54) Sivakesava, S., Irudayaraj, J., Inter. J. Food Sci. Technol., 2002, 37, 351-360
- 55) THE MERCK INDEX.online version, MERCK Publishing, 2008
- 56) Thrasyvoulou, A. and Manikis, I., Apidologie, 1995, 26,441-452

- 57) Tomas-Berberan, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S. and Anklam, E. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81, 485-496.
- 58) TQ Analyst users manual
- 59) Z. Jandrić, S.A. Haughey, R.D. Frew, K. McComb, P. Galvin-King, C.T. Elliott, A. Cannavan, Food Chemistry, 2015, 189, 52–59
- 60) Καραμπουρνιώτη, Σ., Προσδιορισμός της νοθείας με εισαγόμενα μέλια μέσω της γυρεολογικής ανάλυσης. Πρακτικά του 1ο Επιστημονικού Συνέδριου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002, σελ. 327-332, 2002
- 61) Mishra R.K., P.C. Choudhury, A Ghosh, G.B. Singh and R.K. Datta, Indian Silk, 1993, 31(12), 11-13
- 62) Nicolet Magna 750 Series Users Manual-Technical Specifications
- 63) Πασχαλίδης Χ., ΤΟ ΚΕΝΑΦ. Μια νέα καλλιέργεια με προοπτική ανάπτυξης στη χώρα μας, Αγροτύπος ΑΕ, Αθήνα 1997.
- 64) Πολυσίου Μ.Γ., Μαθήματα Οργανικής Στερεοχημείας και Ενόργανης Ανάλυσης GC, UV – Vis, IR, NMR, Γ.Π.Α., Αθήνα 1989.
- 65) Χαριζάνης, Π. Χ., Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική. Β' Έκδοση του ιδίου, Θεσ/νίκη, 1996