



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας II: Ανάλυσης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων  
Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς

Συγκριτική Ανάλυση και Μοντελοποίηση  
Υπερκρίσιμης Εκχύλισης έναντι Συμβατικών και  
άλλων “Πράσινων” Εκχυλιστικών Μεθόδων για  
την Ανάκτηση Βιοδραστικών Ενώσεων  
από *Salvia fruticosa*

Comparative Analysis and Modelling of Supercritical Extraction over  
Conventional and other “Green” Extraction Methods for the Recovery of  
Bioactive Compounds from *Salvia fruticosa*

**Δάφνη Κάβουρα**

Επιβλέπων Καθηγητής: Κωστής Μαγουλάς

Αθήνα, Ιούνιος 2016



## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν και με στήριξαν, ώστε να την φέρω εις πέρας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον υπεύθυνο καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Κωστή Μαγουλά, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το θέμα της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης. Καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη και υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω ακόμη στην Δρ Βασιλική Λούλη που με υπομονή και καλή διάθεση με βοήθησε πάνω σε όλες τις απορίες μου και σε πολλές από τις πτυχές της διπλωματικής εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την APIVITA AEBE, που από την αρχή με δέχτηκε τόσο ζεστά κατά την περίοδο της πρακτικής μου, αλλά και στη συνέχεια που για τις ανάγκες της διπλωματικής μου διέθεσε το φυτικό υλικό (*Salvia fruticosa*) και τον εκχυλιστήρα της (Timatic). Ωστόσο, ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω δύο πολύ ξεχωριστούς και ικανούς ανθρώπους από την ομάδα της APIVITA, τον Δρ Κωσταντίνο Γαρδίκη και την Ελένη Σπανίδη, τόσο για την αμέριστη υποστήριξή τους στις πρακτικές απαιτήσεις της διπλωματικής, όσο και για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς. Ευχαριστώ όλη την ομάδα, όχι μόνο για τα χαμόγελα και την όμορφη διάθεση, αλλά και για την βοήθεια σε τεχνικά θέματα. Δεν θα ξεχάσω τις 18/3 όπου αντιμετώπιζα κάποια δυσκολία, και με το σεβασμό και την βοήθεια όλων εκείνη τη μέρα κατάφερα να συνεχίσω το πείραμά μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα εργαστήρια Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών του ΕΜΠ και το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακευτικής σχολής του ΕΚΠΑ. Ιδιαίτερω, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Γεώργιο Παπαευσταθίου και Κωνσταντίνα Κυριακοπούλου, για όλη την υπομονή, βοήθειά και υποστήριξή τους.

Τέλος, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στον Γιώργο Πάμπαλη, των οποίων η αγάπη και βοήθεια ήταν καθοριστική ώστε να συνεχίσω, αλλά και στους πολύ κοντινούς μου φίλους και συμφοιτητές που με στήριξαν αδιάκοπα όλα αυτά τα χρόνια. Χαίρομαι που έχω τόσο όμορφους ανθρώπους στη ζωή μου, σας ευχαριστώ πολύ όλους που είστε δίπλα μου ♥



## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη, ανάλυση και μοντελοποίηση της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης, με απώτερο στόχο την βελτιστοποίηση εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για τις πειραματικές δοκιμές ήταν ένα είδος *Salvia* που φαίνεται να εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον για το αιθέριο έλαιο και το εκχύλισμά του, το *Salvia fruticosa*.

Με στόχο την ορθή και τεκμηριωμένη παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ΥΕ, ήταν επιτακτική και η ανάλυση και σύγκριση της μεθόδου με Συμβατικές, και άλλες «Πράσινες» τεχνικές εκχύλισης.

Οι Συμβατικές μέθοδοι που μελετήθηκαν ήταν: α) η Εκχύλιση Soxhlet και β) η Υδροαπόσταξη (ΥΑ), ενώ οι «Πράσινες» τεχνικές ήταν: α) η Υποβοηθούμενη Εκχύλιση από Μικροκύματα, β) η Εκχύλιση με Χρήση Υπέρηχων και γ) η Υποβοηθούμενη από πίεση Εκχύλιση. Επιπλέον, για τις «Πράσινες» τεχνικές χρησιμοποιήθηκε μίγμα αιθανόλης-νερού (70:30) ως πολικός διαλύτης και εξάνιο ως άπολος διαλύτης εκχύλισης. Αντίστοιχα και στις συμβατικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν νερό, αιθανόλη και εξάνιο. Αναφορικά με την Υπερκρίσιμη Εκχύλιση μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (40°C-50°C-60°C), της πίεσης εκχύλισης (100bar-190bar-280bar), καθώς και της ροής του διαλύτη (1kg/h-2kg/h-3kg/h) στην απόδοση της διεργασίας. Παράλληλα, εξετάστηκε σε προκαταρκτικό επίπεδο και η επιρροή της χρήσης συνδιαλύτη στα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τις χημικές ιδιότητες του εκχυλίσματος. Τέλος, επιχειρήθηκε η μαθηματική περιγραφή του συστήματος της απόκρισης, μελετώντας την επίδραση των παραμέτρων λειτουργίας στην απόδοση της ΥΕ, καθώς και η μαθηματική μοντελοποίηση της διεργασίας με χρήση του μοντέλου μεταφοράς μάζας της Sononά.

Από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων της ΥΕ προέκυψε μια απλοποιημένη εξίσωση της επίδρασης, μεταξύ των παραμέτρων και της απόδοσης. Τα αποτελέσματά της προσομοιώνουν σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό τη διεργασία και η μορφή της επιτρέπει την εύκολη εξαγωγή των βέλτιστων συνθηκών για το σύστημα που μελετάται. Αντίστοιχα, καλή περιγραφή είχε και το μοντέλο Sononά για τα πειραματικά δεδομένα σε όλες τις συνθήκες υπερκρίσιμης εκχύλισης που εξετάστηκαν.

Όλα τα έλαια και εκχυλίσματα εξετάστηκαν ξεχωριστά: α) για τις χημικές ιδιότητές τους (αντιοξειδωτική δράση και το ολικό φαινολικό και φλαβονοειδές περιεχόμενο) και β) για τη σύστασή τους. Οι χημικές ιδιότητες μετρήθηκαν με τις μεθόδους των DPPH, Folin-Ciocalteu και Aluminum Chloride αντίστοιχα, και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά με την συνδυαστική μέθοδο GC-MS.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως το εκχύλισμα της ΥΕ είναι πολύ καλύτερο έναντι του ελαίου της ΥΑ, όχι μόνο σε επίπεδο ποιοτικών χαρακτηριστικών, αλλά και δραστηρότητας με σημαντικά καλύτερη αντιοξειδωτική δράση και ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Ταυτόχρονα και το εκχύλισμα της μεθόδου, με συνδιαλύτη την αιθανόλη έδωσε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των μεθόδων που αναπτύχθηκαν,

φτάνοντας τη δράση του δείγματος της Arivita -της μεθόδου Εκχύλισης υπό Πίεση- η οποία και ειδικεύεται στην ανάκτηση θερμοευαίσθητων συστατικών (όπως τα αντιοξειδωτικά). Τέλος, από τη χημική ανάλυση με GC-MS εντοπίστηκαν χαμηλά επίπεδα στις τοξικές  $\alpha$  &  $\beta$ -Thujone, με τα δείγματα ΥΕ να μην εμφανίζουν κανένα ποσοστό τους. Επιπλέον, στα δείγματα της ΥΕ παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό εκχύλισης σε Μαννόλη (50,9%), μιας βιοδραστικής ένωσης με καλή αντιμικροβιακή δράση αλλά και ζήτηση στη αρωματοποιία.

## Abstract

The primary purpose of this study is to investigate, analyze and model the Supercritical Extraction (SE) process, with a view of optimizing the extraction of bioactive compounds. The sample used for the experimental tests was one of the *Salvia* species exhibiting great interest in its essential oil and extract, *Salvia fruticosa*.

In order to present an accurate and factual approach about the effects of SE, it was imperative to analyze and compare the method with Conventional, and other “Green” Extraction techniques.

The Conventional methods studied were a) the Soxhlet Extraction and b) Hydrodistillation (HD), while the “Green” techniques were a) the Microwave Assisted Extraction, b) the Ultrasonic Extraction and c) the Pressure Assisted Extraction. Moreover, a mixture of ethanol-water (70:30) was used as a polar solvent on the “Green” extraction techniques, and hexane as a non-polar extraction solvent. In the conventional techniques the solvents used were also water, ethanol and hexane. With respect to the SE, the effect of temperature (40°C-50°C-60°C), extraction pressure (100bar-190bar-280bar) and solvent flow (1kg/h-2kg/h-3kg/h) was studied upon the process's yield. Also examined in the SE, but in a preliminary level, was the influence of a co-solvent on the qualitative characteristics and chemical properties of the extract. Lastly, a mathematical description of the system response was attempted, while studying the effect of operating parameters on SE efficiency, also attempted was a process modelling while using the Sovová mass transfer model.

The processing of the SE experimental data resulted in a simplified equation of the influence between the operating parameters and the extraction yield. The results simulate sufficiently the process and the equation's form allows to easily extract the optimum conditions for the defined system. A correspondingly good description, resulted the Sovová model on the experimental data in all the SE conditions tested.

All oils and extracts were examined separately a) on their chemical properties (antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content) and b) their chemical composition. The chemical properties were measured with the DPPH, Folin-Ciocalteu and Aluminum Chloride methods respectively, and the qualitative characteristics with a combinatorial analytical GC-MS method.

The research's results exhibit some superior qualities about the SE extract as opposed to the HD essential oil, this occurs not just in terms of quality characteristics, but also on the extraordinary antioxidant activity and the significant total phenolic content. Furthermore, the co-solvent SE extract resulted in the highest antioxidant activity among the developed methods, and also reaching the effect of the Apitiva PAE extract -a specialized method for the heat-sensitive components (such as antioxidants). Finally, the GC-MS chemical analysis detected extremely low levels of the toxic  $\alpha$  &  $\beta$ -Thujone, while the SE samples exhibited zero content. Also on the SE samples, a high level (50.9%) of Manool was detected -a bioactive compound known for its significant antimicrobial activity and demand in perfumery.

# Περιεχόμενα

<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ΥΛΙΚΑ, ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ.....</b>	<b>4</b>
<b>II-1 ΤΟ ΓΕΝΟΣ SALVIA.....</b>	<b>4</b>
<i>II-1.1 Το Πρόβλημα της Θουγιόνης (Thujone).....</i>	<i>5</i>
<i>II-1.2 Salvia fruticosa .....</i>	<i>6</i>
<b>II-2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ – ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....</b>	<b>6</b>
<i>II-2.1 Ανάκτηση Επιθυμητών Συστατικών .....</i>	<i>6</i>
<i>II-2.2 Ιδιότητες Διαλυτών .....</i>	<i>7</i>
<i>II-2.3 Μέτρηση Υγρασίας.....</i>	<i>8</i>
II-2.3.1 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός .....	8
II-2.3.2 Συνθήκες – Πειραματική Διαδικασία .....	8
<i>II-2.4 Τεχνικές Ανάκτησης.....</i>	<i>8</i>
I-2.4.1 Συμβατική Εκχύλιση (Soxhlet) .....	9
II-2.4.1.1 Αρχή Μεθόδου.....	9
II-2.4.1.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός.....	10
II-2.4.1.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία .....	10
II-2.4.2 Εκχύλιση με χρήση Υπέρηχων .....	10
II-2.4.2.1 Αρχή Μεθόδου .....	10
II-2.4.2.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός .....	12
II-2.4.2.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία .....	12
II-2.4.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Μικροκύματα.....	13
II-2.4.3.1 Αρχή Μεθόδου .....	13
II-2.4.3.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός .....	14
II-2.4.3.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία .....	14
II-2.4.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Πίεση (PAE) .....	15
II-2.4.4.1 Αρχή Μεθόδου .....	15
II-2.4.4.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός .....	15
II-2.4.4.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία .....	16
II-2.4.5 Υδροαπόσταξη (Hydrodistillation).....	16
II-2.4.5.1 Αρχή Μεθόδου .....	16
II-2.4.5.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός .....	17
II-2.4.5.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία .....	17
II-2.4.6 Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (ΥΕ) .....	18
II-2.4.6.1-1 Υπερκρίσιμα Ρευστά (ΥΡ) .....	18
II-2.4.6.1-2 Ιδιότητες .....	19
II-2.4.6.2 Αρχή Μεθόδου .....	19
II-2.4.6.3 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός .....	20
II-2.4.6.4 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία .....	22
<i>II-2.5 Χημικές Ιδιότητες Εκχυλισμάτων.....</i>	<i>23</i>
II-2.5.1 Αντιοξειδωτικές Ενώσεις.....	23
II-2.5.1.1 Ελεύθερες Ρίζες .....	24
II-2.5.1.2 Αντιοξειδωτική Δράση .....	24
II-2.5.1.2-1 Αρχή Μεθόδου.....	25
II-2.5.1.2-2 Πρωτόκολλο Μεθόδου .....	25



Π-2.5.2 Φαινολικές Ενώσεις .....	26
Π-2.5.2.1 Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο .....	27
Π-2.5.2.1-1 Αρχή Μεθόδου .....	27
Π-2.5.2.1-2 Πρωτόκολλο Μεθόδου .....	27
Π-2.5.3 Φλαβονοειδείς Ενώσεις .....	29
Π-2.5.3.1 Ολικό Φλαβονοειδές Περιεχόμενο .....	29
Π-2.5.3.1-1 Αρχή Μεθόδου .....	29
Π-2.5.3.1-2 Πρωτόκολλο Μεθόδου .....	30
<b>Π-3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....</b>	<b>31</b>
<b>Π-3.1 Χρωματογραφία .....</b>	<b>31</b>
Π-3.1.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC) .....	32
<b>Π-3.2 Φασματομετρία Μάζας (MS) .....</b>	<b>32</b>
<b>Π-3.3 Συνδυασμένη Τεχνική GC-MS .....</b>	<b>33</b>
Π-3.3.1 Συνθήκες - Πειραματική Διαδικασία .....	34
<b>Π-4 ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ .....</b>	<b>35</b>
<b>Π-4.1 Πειραματικός Σχεδιασμός - ANOVA .....</b>	<b>35</b>
<b>Π-4.2 Μοντέλο Sononά .....</b>	<b>37</b>
<b>III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΣΜΟΣ .....</b>	<b>41</b>
<b>III-1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΓΡΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>42</b>
<b>III-2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ .....</b>	<b>43</b>
<b>III-2.1 Συμβατική Εκχύλιση (Soxhlet) .....</b>	<b>43</b>
III-2.1.1 Σύγκριση - Αποδόσεις .....	44
III-2.1.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων .....	45
III-2.1.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων .....	45
<b>III-2.2 Εκχύλιση με Μικροκύματα (MAE) .....</b>	<b>48</b>
III-2.2.1 Σύγκριση - Αποδόσεις .....	48
III-2.2.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων .....	48
III-2.2.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων .....	49
<b>III-2.3 Εκχύλιση με Υπερήχους (USE) .....</b>	<b>50</b>
III-2.3.1 Σύγκριση - Αποδόσεις .....	50
III-2.3.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων .....	51
III-2.3.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων .....	52
<b>III-2.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Πίεση .....</b>	<b>53</b>
III-2.4.1 Σύγκριση - Αποδόσεις .....	53
III-2.4.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων .....	53
III-2.4.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων .....	54
<b>III-2.5 Συμβατική Υδροαπόσταξη (HD) .....</b>	<b>54</b>
III-2.5.1 Σύγκριση - Αποδόσεις .....	55
III-2.5.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων .....	56
III-2.5.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων .....	56
<b>III-2.6 Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (SFE) .....</b>	<b>56</b>
III-2.6.1 Σύγκριση - Αποδόσεις .....	57
III-2.6.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων .....	60
III-2.6.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων .....	62
<b>III-3 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ .....</b>	<b>64</b>
<b>III-3.1 Αποδόσεις Εκχυλίσεων .....</b>	<b>64</b>
<b>III-3.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων .....</b>	<b>65</b>

III-3.2.1 Αντιοξειδωτική Δράση .....	65
III-3.2.2 Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο.....	70
III-3.2.3 Ολικό Φλαβονοειδές Περιεχόμενο .....	73
III-3.3 Χημική Ανάλυση με GC-MS.....	74
<b>IV. ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ .....</b>	<b>76</b>
IV-1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ {Y}.....	76
IV-2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΟΝΟΝΑ.....	79
<b>V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>82</b>
<b>VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>84</b>
<b>VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ .....</b>	<b>87</b>
VII-1 ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΧΡΗΣΗΣ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ .....	87
VII-2 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ .....	90
VII-3 ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	92
VII-4 ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΥΕ .....	108
VII-5 ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ - ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΥΕ .....	109



# I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η έννοια «Πράσινη Χημεία» οφείλει τη δημιουργία, εξέλιξη και εδραίωσή της στην ανάγκη για προώθηση της έννοιας της «Αειφόρου Ανάπτυξης» στον βιομηχανικό τομέα.

Χημικές βιομηχανίες, όπως αυτές των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών αναζητούν και αναπτύσσουν νέες διεργασίες παραγωγής προϊόντων, οι οποίες είναι περισσότερο φιλικές προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Ακολουθώντας αυτήν τη λογική, ερευνούν, αναπτύσσουν και εφαρμόζουν εναλλακτικούς τρόπους εκχύλισης φυσικών προϊόντων (αιθερίων ελαίων, χρωστικών, αντιοξειδωτικών κ.ά.) από φυτικές πρώτες ύλες. Κατά κανόνα αυτό επιτυγχάνεται με αντικατάσταση των συμβατικών, βλαβερών προς το περιβάλλον, οργανικών διαλυτών από άλλους μη τοξικούς διαλύτες. Παράλληλα, οι νέες «Πράσινες» τεχνικές που αναπτύσσονται είναι σε αρκετές περιπτώσεις αποδοτικότερες, ταχύτερες και οικονομικότερες από τις συμβατικές.

Μεταξύ των μεθόδων αυτών, ευρεία εφαρμογή έχουν βρει οι ακόλουθες:

- ✓ Η Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα Εκχύλιση (Microwave Assisted Extraction - MAE)
- ✓ Η Εκχύλιση με Χρήση Υπέρηχων (UltraSonic Extraction - USE)
- ✓ Η Υποβοηθούμενη από Πίεση Εκχύλιση (Pressure Assisted Extraction - PAE)
- ✓ Η Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (Supercritical Fluid Extraction - SFE)

Οι παραπάνω μέθοδοι διαφέρουν από τις συμβατικές, δηλαδή τις θερμικές, μεθόδους ως προς: α) την αρχή λειτουργίας και β) τον τρόπο εκχύλισης των ουσιών. Κάθε μία από τις «Πράσινες» αυτές τεχνικές παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπόλοιπες και χρησιμοποιείται ως βέλτιστη ανάλογα με την περίπτωση της εκχύλισης.

Αναλυτικότερα, η Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα Εκχύλιση διαφοροποιείται από τις συμβατικές τεχνικές ως προς τον τρόπο μεταφοράς της θερμότητας, καθώς σε αυτήν η θερμότητα διαδίδεται κατευθείαν προς το δείγμα και το διαλύτη χωρίς το δοχείο να απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων. Η τεχνική αυτή, ωστόσο, είναι κατάλληλη μόνο για τους πολικούς διαλύτες, καθώς στους μη πολικούς διαλύτες δεν αναπτύσσεται θερμότητα κατά την εκχύλιση. Σημαντικά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι: α) οι υψηλές αποδόσεις, β) οι μικροί χρόνοι εκχύλισης και τέλος, οι μικρές ποσότητες διαλύτη. Η χρήση της ενδείκνυται για την εκχύλιση λιπαρών ουσιών και θρεπτικών συστατικών από φυτικά δείγματα.

Κατά την Εκχύλιση με Χρήση Υπέρηχων, λόγω εναλλαγής της πίεσης στο εσωτερικό του μείγματος έχουμε ανάπτυξη «φαινομένων σπηλαίωσης», με αποτέλεσμα: α) την εντονότερη διείδυση του διαλύτη στο δείγμα, β) τη διευκόλυνση των φαινομένων μεταφοράς μάζας και τέλος, γ) την αποδοτικότερη διαλυτοποίηση των εκχυλιζόμενων ενώσεων. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από: α) μικρή χρονική διάρκεια εκχύλισης, β) τη δυνατότητα εξέτασης διαφόρων δειγμάτων ταυτόχρονα και τέλος, γ) από τη χρήση μικρής ποσότητας διαλύτη. Θεωρείται κατάλληλη για την εκχύλιση θερμικά ευαίσθητων ουσιών, φαινολικών ενώσεων, καθώς και διαφόρων πρωτεϊνών και λιπιδίων.

Η πρόσφατα ανεπτυγμένη Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Πίεση (ΡΑΕ) είναι μία σχετικά απλή τεχνική που χρησιμοποιεί εναλλαγές πιέσεων για να ενισχύσει την εισχώρηση του διαλύτη στο εσωτερικό του δείγματος. Η μέθοδος προτιμάται για τις μικρές ποσότητες διαλύτη που χρησιμοποιεί και για τον σχετικά μικρό χρόνο της εκχύλισης. Χρησιμοποιείται συχνά για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών και άλλων θερμικά ευαίσθητων ουσιών, καθώς λειτουργεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος, η Υπερκρίσιμη Εκχύλιση διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες τεχνικές χάρη στην ικανότητα της να ανακτά όχι μόνο εκχυλίσματα, αλλά και αιθέριο έλαιο υψηλής ποιότητας. Η λειτουργία της μεθόδου βασίζεται στη χρήση υπερκρίσιμων ρευστών κατά την εκχύλιση. Τα ρευστά αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή διαλυτική ικανότητα, καθώς εμφανίζουν ταυτόχρονα χαρακτηριστικές ιδιότητες των υγρών (πυκνότητα) και αερίων (διαχυτότητα, ιξώδες και επιφανειακή τάση). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει τη δυνατότητα: α) εκχύλισης σε ήπιες θερμοκρασίες και β) πλήρους απομάκρυνσης του διαλύτη. Η χρήση της, ωστόσο, δεν περιορίζεται μόνο στην εκχύλιση ουσιών εγκλωβισμένων στο εσωτερικό κάποιου στερεού υποστρώματος αλλά, χάρη στη διαχωριστική της ικανότητα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε δύσκολες διεργασίες όπως είναι ο διαχωρισμός αζεότροπων. Θεωρείται ιδανική για περιπτώσεις εκχύλισης, όπου τα επιθυμητά συστατικά είναι ευαίσθητες θερμικά ενώσεις, και συνιστάται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που αποσκοπούν στην αποφυγή χημικών αλλοιώσεων του προϊόντος.

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την επιθυμητή ποιότητα και ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Όταν τα εκχυλίσματα/αιθέρια έλαια προορίζονται για χρήση σε χημικές βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων και φαρμάκων είναι σημαντικό η ποιότητά τους να προσεγγίζει την ποιότητα της φυσικής πρώτης ύλης. Έτσι, επιτυγχάνεται η πρόσδοση φυσικών χαρακτηριστικών στα προϊόντα εκχύλισης, όπως είναι το άρωμα και η γεύση, αλλά και σε κάποιες ειδικές περιπτώσεις, οι χημικές και βιοδραστικές ιδιότητες.

Μια εξαιρετική πηγή φυσικών βιοδραστικών ενώσεων είναι τα αρωματικά φυτά. Το γεγονός αυτό τεκμηριώνεται επιστημονικά από την τεράστια σχετική βιβλιογραφία, αλλά και τις παραδοσιακές ιατρικές διαφόρων εθνών ανά τον κόσμο οι οποίες αποτελούν σήμερα αντικείμενο της εθνο-βοτανολογίας και εθνο-ιατρικής. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν σημαντική δράση έναντι διαφόρων μικροοργανισμών αλλά και ευεργετικές χημικές ιδιότητες όπως, κατά κύριο λόγο, η αντιοξειδωτική δράση.

### ➤ Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί στη συγκριτική διερεύνηση των δυνατοτήτων της μεθόδου της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης έναντι α) των συμβατικών σχετικών μεθόδων και β) των υπόλοιπων «Πράσινων» τεχνικών εκχύλισης. Η σύγκριση έγινε με γνώμονα τις τελικές αποδόσεις των μεθόδων, καθώς και τις χημικές ιδιότητες και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αιθέριων ελαίων/ εκχυλισμάτων τους.

Επιπλέον, η μέθοδος της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης διερευνήθηκε βαθύτερα, με στόχο τη μαθηματική προσομοίωση και μοντελοποίηση της διεργασίας, ειδικότερα γύρω από την επίδραση των φαινομένων μεταφοράς μάζας στην απόκριση του συστήματος. Για τον ορισμό του συστήματος ήταν απαραίτητο να προσδιοριστούν κάποιες σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν την απόκριση (όπως η πίεση, η ροή και η θερμοκρασία), και να εξεταστούν οι οριακές τους συνθήκες με απώτερο στόχο την αριστοποίηση της διεργασίας.

Το δείγμα που επιλέχθηκε για την έρευνα αυτή ήταν ένα αρωματικό φυτό της οικογένειας *Lamiaceae*, το *Salvia fruticosa*, γνωστό στην ελληνική κοινωνία ως φασκόμηλο. Η επιλογή του στηρίχτηκε σε ενδείξεις για σημαντικές χημικές ιδιότητες, όπως η έντονη αντιοξειδωτική δράση και το σημαντικό ολικό φαινολικό του περιεχόμενο. Επίσης, προτιμήθηκε για την ποιοτική του ανωτερότητα σε σχέση με τα λοιπά είδη *Salvia*, κυρίως ως προς τη χαμηλή περιεκτικότητα σε μια κατηγορία τοξικών ενώσεων (θουγιόνες - Thujones) στο έλαιό της.

### **Διάρθρωση Κεφαλαίων**

Η διπλωματική εργασία ξεκινά με την περιγραφή του δείγματος και των ιδιοτήτων των διαλυτών. Στη συνέχεια, αναπτύσσονται οι αρχές των μεθόδων ανάκτησης των συστατικών, οι χημικές τους ιδιότητες και η εν γένει θεωρία γύρω από τις τεχνικές ποιοτικής ανάλυσης. Ακολουθεί η θεμελίωση που αφορά στη μοντελοποίηση της διεργασίας της υπερκρίσιμης εκχύλισης (κεφάλαιο II). Στο κεφάλαιο III, δίνονται τα αποτελέσματα και γίνεται ο σχολιασμός των τεχνικών ανάκτησης με τις αντίστοιχες χημικές ιδιότητες και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους, μέσα από μια συγκριτική βιβλιογραφική προσέγγιση. Ακολούθως, προσομοιώνεται μαθηματικά η διεργασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης και μοντελοποιείται η επίδραση των φαινομένων μεταφοράς μάζας με βάση τα πειραματικά δεδομένα (κεφάλαιο IV). Στο επόμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο V), παρουσιάζονται τα συμπεράσματα της διπλωματικής έρευνας και γίνονται ορισμένες προτάσεις για μελλοντική διερεύνηση και εφαρμογή. Η διπλωματική ολοκληρώνεται με τη βιβλιογραφία της έρευνας (Κεφάλαιο VI) και το Παράρτημα (Κεφάλαιο VII), όπου αναγράφονται λεπτομερώς οι μετρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

## II. ΥΛΙΚΑ, ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

### II-1 Το γένος *Salvia*

Το όνομα "Salvia" δόθηκε από τους Ρωμαίους, και προέρχεται από το λατινικό ρήμα "salvare" που σημαίνει: «σώζω, θεραπεύω».

Το γένος *Salvia*, της οικογένειας Lamiaceae, καταγράφει μέχρι στιγμής 900 περίπου είδη, στις θερμές και εύκρατες ζώνες, σε όλη τη γη. Στην Ελλάδα, έχουν εντοπισθεί γύρω στα 23 είδη εκ των οποίων είναι και το *Salvia fruticosa* που θα εξεταστεί στη συνέχεια.

Τυπικά συστατικά που περιέχονται στο φυτό είναι τα ακόλουθα:

- Πτητικό αιθέριο έλαιο (1,5-3,5%): α & β-thujone, 1,8-cineole, borneol, isobutylacetate, camphene, linalool, viridiflorol, β-myrcene, α & β-pinene, camphor, α & β-caryophyllene (humulene)
- Καφεϊκό οξύ και παράγωγα: rosmarinicacid, chlorogenicacid
- Διτερπένια: carnodolic acid, rosmanol, safficinolide
- Φλαβονοειδή: methoxylatedaglycones, luteolin-7-glucosides, apigenin, genkwanin, genkwanin-6-methylether
- Τριτερπένια: ursalic acid
- Ιχνοστοιχεία: Pb, Mg, Mn, Zn, Au, Ag, rosmarinic acid, labiatenic acid, oleanolic acid, ursolic acid, flavonoids, saponins [1]

Από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα το φυτό καταναλώνεται συνήθως ως ρόφημα και του αποδίδονται οι ακόλουθες ιδιότητες και θεραπευτικές δράσεις:

- ✓ Αντιβακτηριακό: *Diplococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Beta hemolytic streptococci*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*
- ✓ Μυκητοστατικό: *Candida albicans*
- ✓ Ιοστατικό: *influenza*, *Herpes zoster*, *ιογενής μηνιγγίτιδα*, *ιογενής νευρίτιδα*
- ✓ Στυπτικό: *δυσπεψία*
- ✓ Βλεννολυτικό: *βήχας*, *ιγμορίτιδα*
- ✓ Ρυθμίζει την εφίδρωση
- ✓ Αναλγητικό: *κυνάγχη*, *ρευματισμοί*, *πονόδοντο*
- ✓ Αντικαταρροϊκό: *άσθμα*, *βρογχίτις*, *βήχας*
- ✓ Αντισπασμωδικές ιδιότητες: *δυσμηνόρροια*
- ✓ Επουλωτικές ιδιότητες

- ✓ Εντομοκτόνο – παρασιτοκτόνο δράση
- ✓ Νευροτονωτικό: αλωπεκία, γενική αδυναμία, νευρική αδυναμία, τρόμος, ίλιγγος (vertigo)[1]

Ανάλογα με τη μορφή που αποθηκεύεται, το *Salvia* διατηρείται: 24h αν είναι σε μορφή σκόνης, 18 μήνες ως κομμένα φύλλα, και γύρω στα 2 χρόνια ως υγρό εκχύλισμα. Σε κάθε περίπτωση (και κυρίως στις 2 πρώτες), πρέπει να φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, χωρίς υγρασία [1].

## II-1.1 Το Πρόβλημα της Θουγιόνης (Thujone)

Η Θουγιόνη είναι μια μονοτερπενική κετόνη, που περιέχεται σε ένα ποσοστό σε τρόφιμα και φαρμακευτικά σκευάσματα, καθώς αποτελεί φυσικό συστατικό πολλών αιθέριων ελαίων. Συναντάται επίσης στο αφέντι (absinthe drink), όπου αποτελεί ένα από τα κύρια (ενεργά συστατικά) του, και σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι άκρως νευροτοξικό. Έχει αποδειχθεί ότι εξαιτίας του αναστέλλεται η λειτουργία των αισθητήρων του γ-αμινοβουτυρικού οξέος A (GABA<sub>A</sub>) και 5-HT<sub>3</sub> στον εγκέφαλο, προκαλώντας σπασμούς και υπερδιέγερση. Παρόλο που οι έρευνες έχουν γίνει κυρίως σε ζώα και όχι σε ανθρώπους (για ηθικούς λόγους), οι ενδείξεις από τις δοκιμές στους οργανισμούς θηλαστικών είναι πολύ ανησυχητικές.

Μεγάλα ποσοστά Θουγιόνης συναντώνται και στο φασκόμηλο (*Salvia*), τα οποία βέβαια ποικίλουν ανάλογα με το είδος [2]:

Scientific name	Origin	Plant part used	Oil yield % (v/w)	α-Thujone %	β-Thujone %
<i>Salvia fruticosa</i> <sup>b</sup>		Essential oil	-	43-46.9	0.0-6.3
<i>Salvia lavandulifolia</i>	Brazil	Flowering part	0.79	18.9 ± 7.7	19.9 ± 3.5
<i>Salvia officinalis</i>		Essential oil	-	28.3	14.5
	Brazil	Flowering part	1.99	42.9 ± 1.3	5.9 ± 0.7
	Brazil	Flowering part	1.99	40.4 ± 1.0	8.1 ± 1.1
	Brazil	Flowering part	1.99	13.3 ± 1.4	5.3 ± 0.6
<i>Salvia officinalis</i> <sup>b</sup>		Essential oil		7.7-67.9	0.0-12.0
<i>Salvia sclarea</i>	Brazil	Flowering part	0.25	0.45 ± 0.1	0.12 ± 0.01
<i>Salvia triloba</i>	Brazil	Flowering part	0.98	27.9 ± 0.6	7.35 ± 1.0

Παρόλο που η ιστορία έχει δείξει ότι η χρήση του δεν εμφανίζει προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου, είναι γεγονός ότι στο ρόφημα του φασκόμηλου καταναλώνεται κυρίως ο διαλύτης-που είναι το νερό- και σε ελάχιστη ποσότητα το καθαρό εκχύλισμα (1-5%). Στη χρήση του όμως, σε τρόφιμα και στην κοσμετολογία, χρησιμοποιείται συνήθως το καθαρό εκχύλισμα (100%), κάτι που σημαίνει σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά Θουγιόνης.

Γι' αυτό το λόγο, θα πρέπει να τηρούνται τα όρια ημερήσιας πρόσληψης όπως αυτά έχουν προσδιοριστεί από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency):

- 4-6gr φυτού
- 0,1-0,3gr αιθέριου ελαίου
- 1,5-3gr υγρού εκχυλίσματος



## II-1.2 *Salvia fruticosa*



Το *Salvia fruticosa* (αλλιώς *Salvia triloba*), είναι γνωστό και ως το ελληνικό φασκόμηλο (Greek Sage). Αποτελεί το πιο κοινό είδος του γένους του στην Ελλάδα, και έχει προέρθει από τις γύρω μεσογειακές και μεσο-ανατολικές χώρες. Είναι ένα βότανο-θάμνος με έντονη οσμή και γεύση, που ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae. Έχει γκριζοπράσινα χνουδωτά και λογχοειδή φύλλα, και εμφανίζει άνθη σε λευκά-ιώδη χρώματα. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για τις εκχυλίσεις προερχόταν από το βόρειο Αιγαίο –και συγκεκριμένα, την Κρήτη.

Η ουσιαστική διαφορά μεταξύ του *Salvia fruticosa* και των υπόλοιπων ειδών *Salvia* -πέρα από την εμφάνισή τους, σε μικρό βαθμό- είναι η σύσταση του αιθέριου ελαίου τους. Καθώς, στο *Salvia officinalis*, και στα περισσότερα είδη *Salvia*, χαρακτηριστική ουσία είναι η  $\alpha$  και  $\beta$ -θουγιόνη ( $\alpha$  &  $\beta$ -thujone), ενώ στο *S.fruticosa* το 90% του αιθέριου ελαίου αποτελείται από: 1,8 κινεόλη (1,8-cineole),  $\beta$ -μυρκένιο ( $\beta$ -myrcene),  $\alpha$  &  $\beta$ -πιπένιο ( $\alpha$  &  $\beta$ -pinene) και καμφορά (camphor), και σε ελάχιστο βαθμό θουγιόνη [3].

## II-2 Τεχνικές Ανάκτησης – Ιδιότητες Συστατικών

### II-2.1 Ανάκτηση Επιθυμητών Συστατικών

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την παραλαβή αιθέριων (πτητικών) ουσιών και εκχυλισμάτων από τους φυτικούς ιστούς, όπως είναι: η απόσταξη, η εκχύλιση και η μηχανική παραλαβή, καθώς και πιο νέες τεχνικές όπως η εκχύλιση με υπέρηχους και τα μικροκύματα. Στις κλασσικές ωστόσο τεχνικές, υπάρχει πάντα ο κίνδυνος υποβάθμισης των ευαίσθητων συστατικών αλλά και αλλοίωση στο άρωμα του φυτού.

Παρόλο που η απόσταξη είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος, στις περιπτώσεις εύθραυστου φυτικού υλικού, όπως τα άνθη και τα φύλλα, προτιμάται η εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη. Κατά την εκχύλιση λαμβάνουν χώρα φυσικά φαινόμενα με αποτέλεσμα τη διάλυση ευδιάλυτων τμημάτων της στερεάς φάσης στην υγρή. Ανάλογα λοιπόν με το χρησιμοποιούμενο εκχυλιστικό υλικό, η μέθοδος διακρίνεται σε: εκχύλιση με ψυχρό λίπος, εκχύλιση με θερμό λίπος και πτητικούς διαλύτες, και σε υπερκρίσιμη εκχύλιση[4].

## II-2.2 Ιδιότητες Διαλυτών

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για την εκχύλιση ή απόσταξη κάποιας επιθυμητής ουσίας είναι πολύ σημαντική.

Πριν επιλεγεί διαλύτης πρέπει πρώτα να εξεταστεί:

- Η εκλεκτικότητα του ως προς την επιθυμητή ουσία
- Το αν είναι εύφλεκτος ή τοξικός! (αποφεύγεται)
- Η ικανότητα του να απομακρύνεται εύκολα
- Τη δυνατότητα ανάκτησης και ανακύκλωσής του.

Η πολικότητα του διαλύτη συνδέεται άμεσα με την εκλεκτικότητα στην εκχύλιση οργανικών συστατικών από φυτικά δείγματα. Αυτό συμβαίνει διότι, όσο πιο συμβατά από άποψη πολικότητας είναι τα συστατικά με το διαλύτη τόσο ευκολότερα και εκχυλίζονται. Η σχέση μεταξύ των βιοδραστικών συστατικών του εκχυλίσματος και της πολικότητας του διαλύτη, μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την καταλληλότερη επιλογή διαλυτών. Αυτή είναι μία σημαντική παράμετρος σχεδιασμού στις βιομηχανικές διεργασίες.

Παραδείγματα **πολικών** διαλυτών:

- ✓ *Νερό (απιονισμένο)*  
Πολύ πολικός διαλύτης που εκχυλίζει βαριά και με υψηλή πολικότητα συστατικά όπως: υδατάνθρακες, γλυκοσίδες, φαινολικές ενώσεις και αμινοξέα.
- ✓ *Αιθανόλη*  
Αρκετά πολικός διαλύτης με την ικανότητα να «τραβάει» τα πολικά βιοδραστικά συστατικά του δείγματος. Χρησιμοποιείται συχνά σαν διαλύτης λόγω της τάσης ευρείας διαλυτότητας που την χαρακτηρίζει.

Παραδείγματα **μη πολικών** διαλυτών:

- ✓ *Εξάνιο*  
Μη πολικός διαλύτης που εκχυλίζει κεριά και άπολα όπως: καροτένια, τερπένια, και λιπίδια
- ✓ *Υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα*  
Μη πολικός, μη τοξικός διαλύτης, ο οποίος μπορεί να ανακυκλωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί. Εκχυλίζει και αυτός κεριά, αιθέρια έλαια και άπολα συστατικά όπως τα τερπένια.

Η επιλογή διαλύτη πρέπει επίσης να καθορίζεται από παράγοντες όπως: η λειτουργική ομάδα και πολικότητα της επιθυμητής ουσίας, καθώς και η δομή του κυτταρικού τοιχώματος.

## **II-2.3 Μέτρηση Υγρασίας**

### **II-2.3.1 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός**

Για την μέτρηση της υγρασίας του δείγματος, χρησιμοποιήθηκε μια απλή αδιαβατική μέθοδος ξήρανσης, σε φούρνο κενού Vacuum Oven (Sanyo Gallen kamp PLC, Leicester, England) του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών.

### **II-2.3.2 Συνθήκες – Πειραματική Διαδικασία**

Το δείγμα, χωρίς να υποστεί κάποια επεξεργασία, ζυγίστηκε και εισήχθη σε φούρνο κενού στα 800 mbar και στους 70°C ( $\pm 0,2^\circ\text{C}$ ) για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα ώστε να επανέλθει σταδιακά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς να απορροφήσει υγρασία από την ατμόσφαιρα. Μετά από μερικές ώρες σταθεροποίησης στον ξηραντήρα, ζυγίστηκε εκ νέου για να υπολογιστεί η απώλεια μάζας του. Για ελαχιστοποίηση του σφάλματος η μέτρηση υγρασίας έγινε σε τρία δείγματα μάζας περίπου ~1g.

## **II-2.4 Τεχνικές Ανάκτησης**

Είναι σημαντικό πλέον, ο σχεδιασμός των χημικών διεργασιών και των προϊόντων να γίνεται φιλικός προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον, καθώς γεννώνται νέες ανάγκες για «Πράσινη Χημεία». Με στόχο λοιπόν την προώθηση της αειφόρου ανάπτυξης επιδιώκεται ο περιορισμός στην χρήση διαλυτών ή η χρήση μη τοξικών διαλυτών (με δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης) όπως το νερό, οι υπερκρίσιμοι διαλύτες και οι ιοντικοί διαλύτες [5]. Πέρα από τις συμβατικές μεθόδους λοιπόν, γεννήθηκε η ανάγκη για νέες, ταχύτερες, οικονομικότερες και αποδοτικότερες «πράσινες» τεχνικές. Αυτές που βρήκαν την ευρύτερη εφαρμογή είναι:

- α) Η Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (Supercritical Fluid Extraction)
- β) Η Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα Εκχύλιση (Microwave Assisted Extraction)
- γ) Η Εκχύλιση με Χρήση Υπέρηχων (Ultrasonic Extraction)
- δ) Η Υποβοηθούμενη από Πίεση Εκχύλιση (Pressure Assisted Extraction)

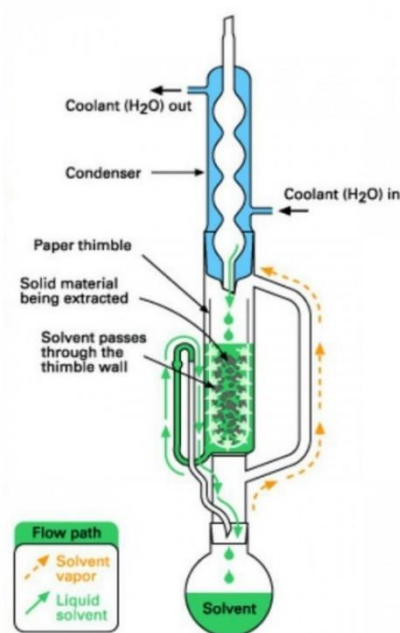
## I-2.4.1 Συμβατική Εκχύλιση (Soxhlet)

### II-2.4.1.1 Αρχή Μεθόδου

Η εκχύλιση από στερεά μίγματα σε εργαστηριακό επίπεδο, πραγματοποιείται συνήθως με την εκχυλιστική συσκευή Soxhlet, *Εικόνα\_1*. Το στερεό προς εκχύλιση τοποθετείται σε έναν ειδικό (πορώδη) χάρτινο υποδοχέα, εντός του κεντρικού υάλινου σωλήνα, όπως φαίνεται και στην εικόνα. Θερμαίνοντας τη σφαιρική φιάλη δημιουργούνται ατμοί από τον ζέοντα διαλύτη και διέρχονται από τον πλευρικό σωλήνα [Εικ.\_1: solvent vapor] στον ψυκτήρα, όπου συμπυκνώνονται και επαναρρέουν στον χάρτινο υποδοχέα [Εικ.\_1: liquid solvent]. Μόλις πληρωθεί ο κεντρικός υάλινος σωλήνας με διαλύτη, λόγω αυτόματου σιφωνισμού, ο διαλύτης με το εκχύλισμα επαναρρέουν στη σφαιρική φιάλη, εμπλουτίζοντας το διάλυμα με τα διαλυμένα συστατικά του στερεού, και ο κύκλος επαναλαμβάνεται [6].

Η εκχύλιση Soxhlet είναι μια συνεχής και παράλληλα διακριτή τεχνική, στην οποία ο εκχυλιστήρας δρα σαν μονάδα διαλείποντος έργου, χωρίς είσοδο και έξοδο. Ωστόσο, καθώς ο διαλύτης ανακυκλώνεται μέσα στον όγκο ελέγχου, το σύστημα δρα τελικά με τρόπο συνεχή.

Προφανές πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί μικρή ποσότητα διαλύτη, καθώς αυτός αναγεννάται συνεχώς και έρχεται σε επαφή εκ νέου με το δείγμα. Ωστόσο, έχουν προσδιοριστεί και πολλά μειονεκτήματα της μεθόδου. Για παράδειγμα, η παρατεταμένη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες (στο σ.ζέσης του διαλύτη) καταστρέφει τα θερμοευαίσθητα συστατικά του δείγματος. Επιπλέον η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως χρονοβόρα και δύσκολα αυτοματοποιήσιμη [7].



*Εικόνα\_1* : Εκχυλιστική συσκευή στερεών μιγμάτων Soxhlet.

### Π-2.4.1.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός

Στην εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα φύλλα του δείγματος, τα οποία αλέσθηκαν και κοκκομετρήθηκαν σε διάμετρο μικρότερη των 425 $\mu\text{m}$ . Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε υποδοχέα από διηθητικό χαρτί στον πάτο του κεντρικού γυάλινου σωλήνα. Οι διαλύτες που επιλέχθηκαν ήταν η αιθανόλη –πολικός διαλύτης- και το εξάνιο –μη πολικός διαλύτης-.

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση Soxhlet στήθηκε στο εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, *Εικόνα\_2*. Ωστόσο, η απομάκρυνση του διαλύτη έγινε σε περιστροφικό εξατμιστήρα με αντλία υψηλού κενού (Rotary Evaporator), στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, *Εικόνα\_2*.



*Εικόνα\_2: Διάταξη εκχύλισης Soxhlet (αριστερά) και Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (δεξιά)*

### Π-2.4.1.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία

Η εκχύλιση δοκιμάστηκε σε διάφορες συνθήκες, χρόνους και κοκκομετρίες. Οι τελικές συνθήκες για τα δύο πειράματα ήταν με χρήση ~15g δείγματος, σε κοκκομετρία <425 $\mu\text{m}$  και όμοια συχνότητα ανάδευση. Η εκχύλιση *διεκόπτετο*, όταν ήταν φανερό πως ο διαλύτης στον σωλήνα σιφωνισμού εμφανιζόταν πλέον άχρωμος. Ανεξάρτητα των κύκλων σιφωνισμού, και για τους δύο διαλύτες, το πέρας της εκχύλισης ήρθε λίγο μετά τις ~3,5 ώρες.

## Π-2.4.2 Εκχύλιση με χρήση Υπέρηχων

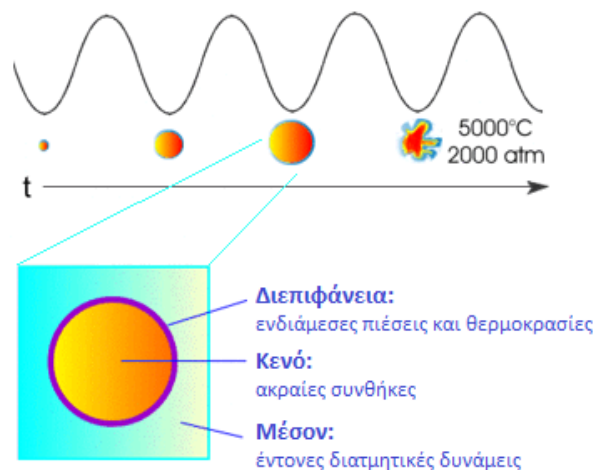
### Π-2.4.2.1 Αρχή Μεθόδου

Οι *υπέρηχοι* έχουν την ικανότητα να διαλύουν τα κυτταρικά τοιχώματα (lysis), προκαλώντας έτσι την απελευθέρωση διαφόρων κυτταρικών ενζύμων και πρωτεϊνών, καθώς και ορισμένα ενδοκυτταρικά οργανίδια. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του φαινομένου της *σπηλαιώσης*, που προκαλείται λόγω εναλλασσόμενης συμπύκνωσης–αραίωσης του υγρού διαλύτη κατά την επιβολή διαφόρων συχνοτήτων των κυμάτων. Κατά το φαινόμενο αυτό δημιουργούνται μικρές

φουσαλίδες κενού από τα κύματα υψηλής έντασης, οι οποίες αυξάνουν συνεχώς τον όγκο τους – κύκλος χαμηλής πίεσης (αραίωσης)– μέχρι το σημείο που δεν μπορούν πλέον να απορροφήσουν ενέργεια, και καταρρέουν βίαια σπάζοντας τα κυτταρικά τοιχώματα -κύκλος υψηλής πίεσης (συμπύκνωσης)–.

Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται καλύτερη διείσδυση του διαλύτη και μεταφορά μάζας, καθώς με τη διάσπαση των σωματιδίων δημιουργείται μεγαλύτερη διεπιφάνεια υγρού – στερεού [8]. Επιπλέον, κατά την συμπύκνωση δημιουργούνται τοπικά υψηλές πιέσεις (~ 2000 atm) και θερμοκρασίες (~ 5000 K), και με τη βοήθεια των τελευταίων διευκολύνονται τα φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης των εκχυλιζόμενων ενώσεων. [6].

Στη μέθοδο εκχύλισης με υπέρηχους χρησιμοποιούνται διαλύτες όπως το νερό, η αιθανόλη, μεθανόλη και το εξάνιο. Σύμφωνα όμως με τη βιβλιογραφία πολλές φορές αποδοτικότερος διαλύτης είναι ένας συνδυασμός αιθανόλης - νερού (αναλόγως την επιθυμητή ουσία) σε αναλογία περίπου 70:30. Με τη χρήση του μίγματος παρατηρήθηκε ενίσχυση του φαινομένου της σπηλαίωσης: άρα και αύξηση της επιφανειακής τάσης, αλλά και ταυτόχρονη μείωση του ιξώδους.



Εικόνα 3: Φαινόμενο Σπηλαίωσης [9]

Η εκχύλιση με υπέρηχους πραγματοποιείται σε συχνότητες μεγαλύτερες των 16 kHz, είτε σε λουτρό υπερήχων, είτε με τη χρήση καθετήρα υπερήχων [10]. Το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλο διαλύτη και βομβαρδίζεται με υπέρηχους- σε κύκλους: υψηλής έντασης και ηρεμίας. Καθώς πολλές φορές, λόγω των βίαιων φαινομένων στο εσωτερικό, έχουμε αύξηση της θερμοκρασίας, είναι απαραίτητη κάποια μορφή ψύξης για την προστασία των θερμικά ασταθών ενώσεων. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με τη χρήση κάποιου ψυκτικού, που έρχεται σε επαφή με το διαλύτη, για κατάλληλη εναλλαγή θερμότητας.

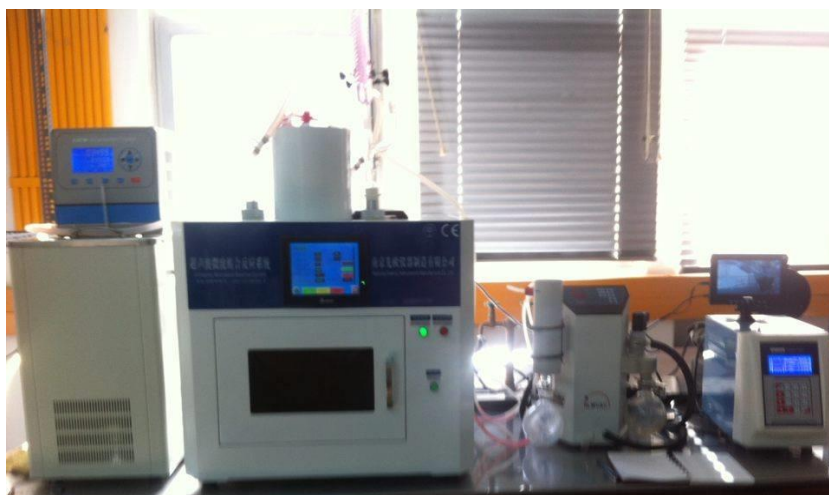
Τέλος, η μέθοδος εκχύλισης με υπέρηχους είναι ιδιαίτερα ωφέλιμη, όχι μόνο για θερμικά ευαίσθητες ουσίες, αλλά και για την ανάκτηση μεγάλων ποσοτήτων φαινολικών ενώσεων, καθώς και διαφόρων πρωτεϊνών και λιπιδίων [8]. Η διαδικασία της εκχύλισης αυτής έχει μικρή χρονική διάρκεια, και δυνατότητα ταυτόχρονης επεξεργασίας δειγμάτων, με τη χρήση κάθε φορά μικρής ποσότητας διαλυτών [6].



### Π-2.4.2.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός

Η εκχύλιση με υπέρηχους πραγματοποιήθηκε πάλι σε αλεσμένα φύλλα δείγματος κοκκομετρημένα στα 425μm. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πάλι πολικής και μη πολικής φύσης: ένα μίγμα απιονισμένου νερού και αιθανόλης (σε αναλογία 30:70) και εξάνιο, αντίστοιχα.

Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπέρηχων που ήταν συνδεδεμένη με φούρνο μικροκυμάτων XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China) ο οποίος διαθέτει υποδοχή για θερμομότρο, ψυκτικό και κεφαλή υπέρηχων. Ο φούρνος κατά τη χρήση υπέρηχων είχε τη δυνατότητα διακοπής χρήσης μικροκυμάτων και επιπλέον θερμότητας. Τον απαραίτητο εξοπλισμό διαθέτει το εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, με τη διάταξη που βλέπουμε στην *Εικόνα\_4*.

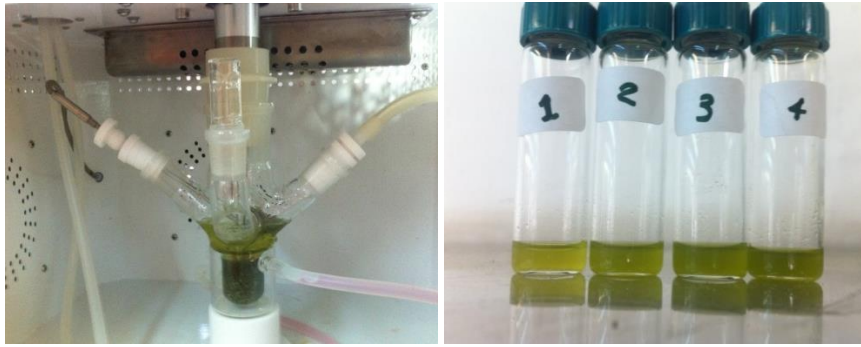


*Εικόνα\_4: Ψυκτικό, φούρνος μικροκυμάτων (από αριστερά) & συσκευή υπέρηχων (στην άκρη δεξιά)*

### Π-2.4.2.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία

Η εκχύλιση με υπέρηχους έγινε σε αλεσμένο δείγμα ~2g, και σε αναλογία δείγματος διαλύτη 1:25. Το ψυκτικό πάνω από το θάλαμο ρυθμίστηκε στους 35°C για αποτελεσματική εναλλαγή θερμότητας, και για να εξασφαλιστεί ότι δεν θα αναπτύσσονταν θερμοκρασίες άνω των 40°C στον υποδοχέα δείγματος, *Εικόνα\_5*.

Η ένταση των κυμάτων ήταν στα 25kHz και η ισχύς ρυθμίστηκε στα 450W (στο 50% της δυναμικής της συσκευής). Οι κύκλοι βομβαρδισμών – ηρεμίας ρυθμίστηκαν σε: 1,5sec - 1,5sec. Η εκχύλιση διήρκησε 45 λεπτά, κατά την διάρκεια των οποίων γινόταν συλλογή ~2ml δείγματος με σύριγγα, *Εικόνα\_5*, για τον προσδιορισμό μιας χρονικής απόδοσης της εκχύλισης στα: 5min-15min-30min-45min.

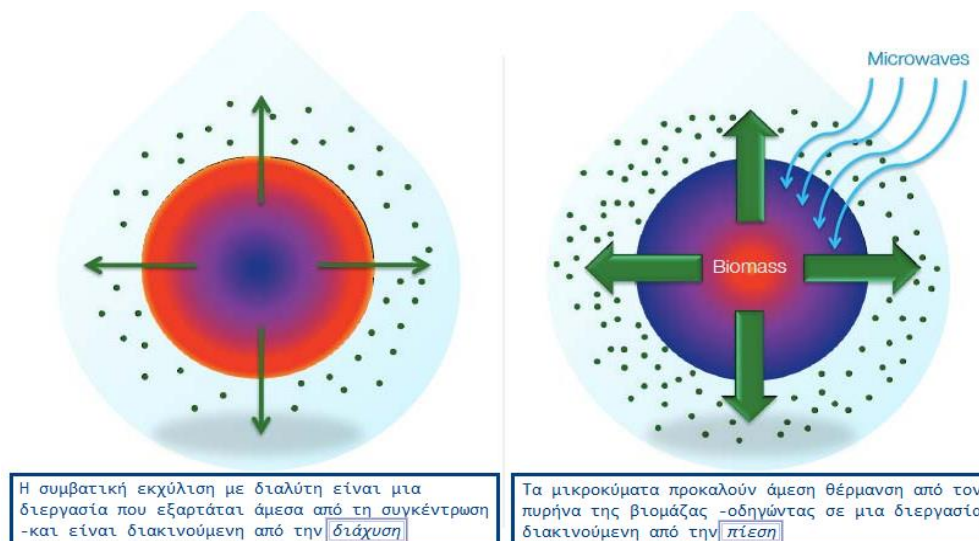


Εικόνα 5: Υποδοχέας δείγματος (beaker) με θερμόμετρο και καθετήρα υπερήχων [αριστερά] δείγματα εκχύλισης υπερήχων [δεξιά]

### Π-2.4.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Μικροκύματα

#### Π-2.4.3.1 Αρχή Μεθόδου

Κατά την εκχύλιση με μικροκύματα το δείγμα τοποθετείται μαζί με μικρή ποσότητα διαλύτη σε κλειστό περιέκτη, και στη συνέχεια σε φούρνο μικροκυμάτων. Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ της εκχύλισης με μικροκύματα και των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης είναι ο τρόπος μεταφοράς της θερμότητας. Στις συμβατικές τεχνικές διαπιστώνεται διάδοση θερμότητας από την θερμαντική πλάκα ή μανδύα στο δοχείο που περιέχει το δείγμα και στη συνέχεια στο διαλύτη και το δείγμα, Εικόνα 6. Ωστόσο, με τη χρήση μικροκυμάτων, η θερμότητα ξεκινά να διαδίδεται απευθείας από το δείγμα -καθώς το δοχείο δεν απορροφά την MW ακτινοβολία [6].



Εικόνα 6: Θερμική απεικόνιση συμβατικής εκχύλισης με διαλύτη [αριστερά], και εκχύλισης με μικροκύματα [δεξιά]



Ωστόσο, σημαντική είναι και η χρήση κατάλληλων διαλυτών, καθώς η θερμότητα που αναπτύσσεται από τα μικροκύματα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητά τους να απορροφούν την MW ακτινοβολία. Αυτό συμβαίνει καθώς: με την αύξηση της διηλεκτρικής σταθεράς και των διηλεκτρικών απωλειών, αυξάνεται και η ικανότητα του διαλύτη να απορροφά την ενέργεια των μικροκυμάτων. Για παράδειγμα, το εξάνιο (D.const:  $\epsilon=1.89$ ) είναι διαλύτης που δεν εμποδίζει σε μεγάλο βαθμό τη διάδοση της MW ακτινοβολίας, και επομένως δεν θερμαίνεται κατά την εκχύλιση. Αντίθετα η αιθανόλη (D.const:  $\epsilon=24.3$ ) που εμποδίζει την διάδοσή της απορροφά και ένα ποσό θερμότητας [11].

Αυτή η τεχνική δίνει υψηλές αποδόσεις για μικρούς χρόνους εκχύλισης, εξοικονομώντας έτσι ενέργεια και παράλληλα επιτρέποντας τη χρήση μικρότερων ποσοτήτων διαλύτη. Χρησιμοποιείται ευρύτατα για την εκχύλιση λιπαρών ουσιών και θρεπτικών συστατικών από φυτά, ενώ έχει και δυνατότητα ανάκτησης του αιθέριου ελαίου.

#### **Π-2.4.3.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός**

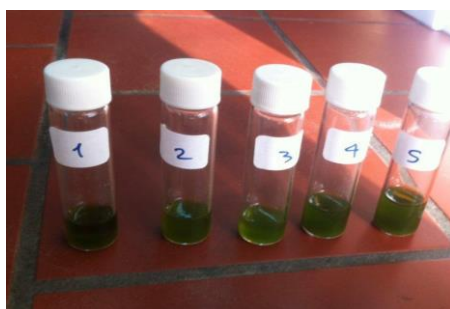
Για την εκχύλιση με μικροκύματα δεν χρησιμοποιήθηκε το εξάνιο ως διαλύτης, καθώς λόγω πολικότητας η εκχύλιση δεν θα ήταν αποδοτική. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν, μόνο σε μίγμα απιονισμένου νερού και αιθανόλης (σε αναλογία 30:70), με χρήση αλεσμένων φύλλων δείγματος (<425 $\mu$ m).

Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε μόνο ο φούρνος μικροκυμάτων φούρνο μικροκυμάτων XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China) του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, Εικόνα\_4.

#### **Π-2.4.3.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία**

Για την εκχύλιση μικροκυμάτων, ο φούρνος ρυθμίστηκε στα 250W και σε μέγιστη θερμοκρασία τους 40°C –με διακοπή εκπομπής ακτινοβολίας όταν πλησίαζε την οριακή θερμοκρασία. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μαγνητική ανάδευση για καλύτερη διασπορά, καθώς η εκχύλιση δεν ήταν ομοιόμορφη εξαιτίας της αμετάβλητης κατεύθυνσης της ακτινοβολίας.

Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αλεσμένο, και σε αναλογία δείγματος - διαλύτη 1:25. Αναλυτικότερα, ζυγίστηκαν 4,475g δείγματος σε 100ml μίγματος διαλύτη. Η εκχύλιση διήρκεσε 45 λεπτά, και με συλλογή πάλι ~2ml δείγματος με σύριγγα, Εικόνα\_7, σε χρόνους: 2min-5min-15min-30min-45min.



**Εικόνα\_7:** Δείγματα εκχύλισης μικροκυμάτων

## Π-2.4.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Πίεση (PAE)

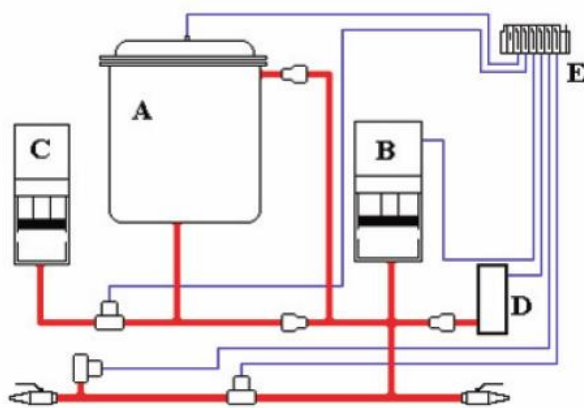
### Π-2.4.4.1 Αρχή Μεθόδου

Μια σχετικά νέα και «πράσινη» μέθοδος εκχύλισης είναι αυτή που χρησιμοποιεί υγρούς διαλύτες υπό πίεση – Pressure Assisted Extraction (PAE) ή Pressurized Liquid Extraction (PLE) [12]. Αρχικά, η χρήση της περιοριζόταν στην απομάκρυνση περιβαλλοντικών ρύπων από ιζήματα και λυματολάσπες. Τα τελευταία χρόνια όμως έχει βρει μεγάλη χρήση σε τομείς όπως η βιολογία, η φαρμακευτική και τα τρόφιμα, καθώς χρειάζεται μικρή ποσότητα διαλύτη και έχει μικρό χρόνο εκχύλισης [13].

Η διεργασία της μεθόδου είναι διαλείπωντος έργου (batch), και ημιαυτόματη (semi-automatic) σε κύκλους δυναμικής - στατικής φάσης. Η διαδικασία αυτή βοηθά τον διαλύτη να εισχωρήσει στο εσωτερικό του δείγματος και να παρασύρει τα συστατικά ανάλογα με την εκλεκτικότητά του [14]. Παρόλο που η μέθοδος έχει δυνατότητα χρήσης υψηλών πιέσεων και θερμοκρασιών, δεν προσεγγίζει το κρίσιμο σημείο των διαλυτών της. Επίσης, συχνά επιλέγεται η εκχύλιση να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος [13], [14].

### Π-2.4.4.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός

Η εκχύλιση υπό πίεση πραγματοποιήθηκε σε μια συσκευή Timatic Micro (Tecnolab, Italy) στην AΡΙVITA ΑΕΒΕ. Η οργανολογία της συσκευής φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα\_8.



Εικόνα 8: Διάγραμμα εκχυλιστήρα υπό πίεση (Timatic)

Η συσκευή αποτελείται από ένα δοχείο εκχύλισης (A), δύο έμβολα συμπίεσης (B,C), μία αντλία (D), και πνευματικές βαλβίδες (E) στα διάφορα σημεία της διάταξης.

### Π-2.4.4.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε από την Arivita στην συσκευή του Timatic, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με διαλύτη αιθανόλη – νερό (70:30). Οι κύκλοι ήταν προγραμματισμένοι να γίνονται κάθε 11 λεπτά, με τον φάση συμπίεσης να διαρκεί 5 λεπτά και την φάση ηρεμίας 6 λεπτά. Οι δυναμική της συσκευής ως προς την πίεση είναι 4 bar η ελάχιστη, και 9 bar η μέγιστη.

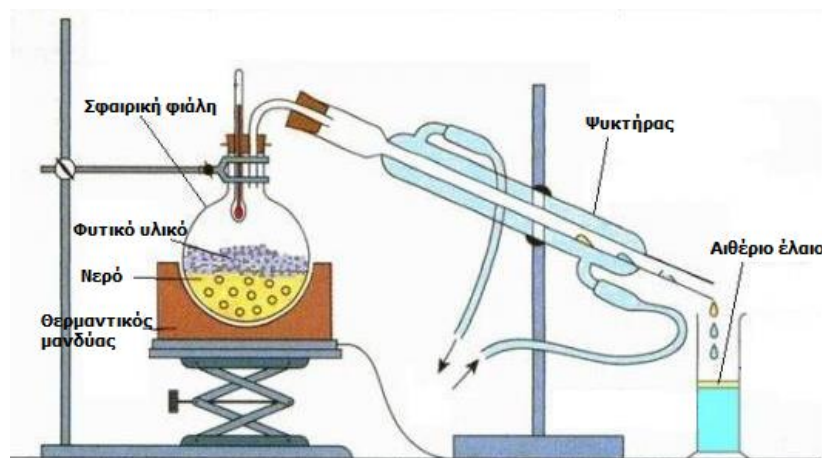
## Π-2.4.5 Υδροαπόσταξη (Hydrodistillation)

### Π-2.4.5.1 Αρχή Μεθόδου

Η υδροαπόσταξη εφαρμόζεται για τη συλλογή του η συλλογή του αιθέριου ελαίου. Είναι μια ευρέως διαδεδομένη και οικονομική μέθοδος, που απαιτεί όμως χρόνο και έχει πολύ μικρή απόδοση. Η διάταξη που φαίνεται και στην *Εικόνα\_9*, αποτελείται από μια σφαιρική φιάλη πάνω σε μια πηγή θέρμανσης (πχ. θερμαντικό μανδύα), στην οποία τοποθετείται το δείγμα μαζί με νερό, και η οποία συνδέεται με τον ψυκτήρα και ένα δοχείο συλλογής [6].

Κατά την λειτουργία της υδροαπόσταξης ατμοί του ζέοντος διαλύτη (νερό) παρασέρνουν τα πτητικά συστατικά του δείγματος. Το αέριο μίγμα φτάνει στον ψυκτήρα, όπου υγροποιείται και στη συνέχεια στάζει στο δοχείο συλλογής (για παράδειγμα μια ογκομετρική φιάλη). Στο δοχείο αυτό παρατηρείται μετά από ένα διάστημα, που έχει μαζευτεί το απόσταγμα, ο σχηματισμός δύο φάσεων: υδατική και ελαιώδης. Η υδατική φάση, τις περισσότερες φορές βρίσκεται κάτω από την ελαιώδη καθώς περιέχει τα βαριά πολικά συστατικά που εκχυλίζει το νερό.

Στη συνέχεια οι δύο φάσεις διαχωρίζονται (πχ. με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης) και παραλαμβάνεται η ελαιώδης φάση που αποτελεί το αιθέριο έλαιο. Σημειώνεται, πως στην υδροαπόσταξη σημαντικό είναι να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, έτσι ώστε να αποτρέπεται η διάσπαση σε θερμικά ασταθείς ενώσεις.



Εικόνα 9: Διάταξη υδροαπόσταξης

### **Π-2.4.5.2 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός**

Για την υδροαπόσταξη ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το απιονισμένο νερό –διαλύτης με μεγάλη πολικότητα- ο οποίος αναμένεται να παρασύρει με στους ατμούς του τα ελαιώδη πτητικά συστατικά του δείγματος. Το δείγμα που αποστάχθηκε ήταν μόνο φύλλα, μερικώς αλεσμένα.

Η διάταξη για την υδροαπόσταξη στήθηκε σε απαγωγό στο εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, *Εικόνα\_10*. Με τη σειρά που φαίνονται και στην εικόνα, αποτελείται: από ένα ψυκτικό (αριστερά), ένα θερμαντικό μανδύα (στο κέντρο) με ροοστάτη ρεύματος (δεξιά), και ένα σύνολο σωληνώσεων για τη διαδρομή των ατμών από τη σφαιρική φιάλη στη προχοΐδα.



*Εικόνα\_10: Πειραματική Διάταξη Υδροαπόσταξης*

### **Π-2.4.5.3 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία**

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετείται μερικώς αλεσμένο δείγμα, πυρήνες βρασμού, και απιονισμένο νερό. Πριν από την τοποθέτηση του δείγματος στη φιάλη, το τελευταίο διαβρέχεται με μέρος της αρχικής ποσότητας απιονισμένου νερού. Η διαδικασία αυτή επιλέχθηκε για λόγους ευκολίας και για να επιταχύνουμε τη διαδικασία διείσδυσης του διαλύτη στο δείγμα.

Η επιλογή της κοκκομετρίας ήταν καθοριστική ως προς την επιτυχία της απόσταξης και προέκυψε από ένα συνδυασμό βιβλιογραφικών δεδομένων και πειραματικών παρατηρήσεων. Παρόλο που η απόδοση θα έπρεπε να αυξάνει αντιστρόφως ανάλογα με την κοκκομετρία (σύμφωνα με τη βιβλιογραφία), μετά από δοκιμές στο εργαστήριο σε μικρότερες κοκκομετρίες, παραλήφθηκε μικρότερη ποσότητα ελαίου. Παρατηρήθηκε λοιπόν, πως σε πολύ μικρές κοκκομετρίες (όπως τα 425μm) το νωπό δείγμα γινόταν μια ομοιόμορφη και αδιαπέραστη «υδαρή μάζα» που εγκλωβίζει το έλαιο στο εσωτερικό του. Γι' αυτό το λόγο, επιλέχθηκε μια

ενδιάμεση κοκκομετρία [15], όπου το δείγμα ήταν μερικώς αλεσμένο (σε επίπεδο mm), και στην οποία τελικά συλλέχθηκε υπολογίσιμη ποσότητα ελαίου.

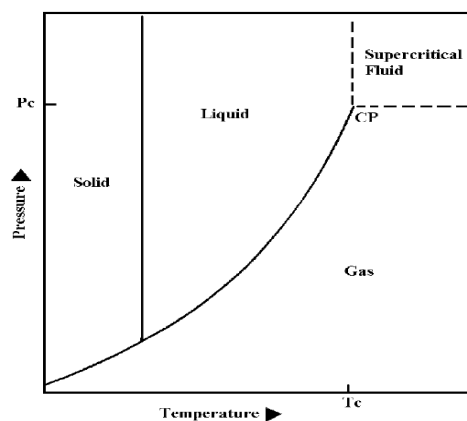
Κατά τη διάρκεια της απόσταξης προκειμένου να προσεγγιστούν οι συνθήκες συνεχούς λειτουργίας ανακυκλώναμε ένα μέρος του διαλύτη από το κάτω μέρος της προχοΐδας ανακυκλώνόταν πίσω στην σφαιρική φιάλη. Η διαδικασία γινόταν με κλείσιμο της στρόφιγγας στο μέσο της διάταξης, και στη συνέχεια με προσθήκη διαλύτη από την κορυφή του κατακόρυφου ψυκτήρα.

## II-2.4.6 Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (ΥΕ)

### II-2.4.6.1 Υπερκρίσιμα Ρευστά (ΥΡ)

Η υπερκρίσιμη κατάσταση εμφανίζεται σε συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης πάνω από τις κρίσιμες. Στις συνθήκες αυτές, ένα σώμα που ξεπερνά την κρίσιμη θερμοκρασία  $T_c$  δεν μπορεί να υγροποιηθεί όση συμπίεση και να υποστεί. Αντίστοιχα, ένα σώμα που θα ξεπεράσει την κρίσιμη πίεση  $P_c$ , δεν μπορεί να αεριοποιηθεί όσο και να θερμανθεί.

Σε ένα διάγραμμα φάσεων μιας καθαρής ουσίας, όπως αυτό στο Σχήμα\_1, διακρίνονται οι περιοχές αλλαγής των φάσεων της σε συνάρτηση με την πίεση και τη θερμοκρασία. Οι διαχωριστικές γραμμές οριοθετούν την έκταση της κάθε φάσης, και παράλληλα ορίζουν τον γεωμετρικό τόπο των σημείων συνύπαρξης των φάσεων σε ισορροπία. Στην περιοχή μεταξύ αέριας και υγρής φάσης διακρίνεται η καμπύλη τάσης ατμών, όπου συνυπάρχουν η υγρή με την αέρια φάση σε ισορροπία. Η καμπύλη αυτή εκτείνεται από το **τριπλό σημείο** (συνύπαρξης τριών φάσεων), μέχρι το σημείο της μέγιστης πίεσης και θερμοκρασίας που μπορούμε να έχουμε τις δύο φάσεις σε ισορροπία και το οποίο αντιστοιχεί στο **κρίσιμο σημείο** (CP). Η μέγιστη αυτή πίεση ονομάζεται **κρίσιμη πίεση** ( $P_c$ ), και η μέγιστη θερμοκρασία, **κρίσιμη θερμοκρασία** ( $T_c$ ). Για πιέσεις και θερμοκρασίες μεγαλύτερες των κρίσιμων η ουσία μεταβαίνει στην κατάσταση **υπερκρίσιμου ρευστού** [16], [17].



Σχήμα\_1: Χαρακτηριστικό διάγραμμα φάσεων καθαρής ουσίας

### II-2.4.6.1-2 Ιδιότητες

Τα ρευστά στις υπερκρίσιμες συνθήκες εμφανίζουν συνδυαστικές ιδιότητες των δύο φάσεων, όπως:

- ✓ *πυκνότητα* αντίστοιχη με αυτή των υγρών
- ✓ *διαχυτότητα* όμοια με των αερίων
- ✓ *χαμηλό ιξώδες* (αντίστοιχο των αερίων)
- ✓ *σχεδόν μηδενική επιφανειακή τάση*

Τα χαρακτηριστικά αυτά ενισχύουν και τη διαλυτική ικανότητα των ρευστών, η οποία αποτελεί άξουσα συνάρτηση της *πυκνότητας* και *διαχυτότητας*, και φθίνουσα συνάρτηση του *ιξώδους* και της *επιφανειακής τάσης* [17], [18].

### II-2.4.6.2 Αρχή Μεθόδου

Μία ραγδαία αναπτυσσόμενη μέθοδος διαχωρισμού είναι αυτή της **υπερκρίσιμης εκχύλισης**, η οποία χάρη στην αυξημένη διαλυτική ικανότητα των Υ.Ρ. προτιμάται για την εκχύλιση συστατικών σε σχέση με τις υπόλοιπες συμβατικές μεθόδους. Σε τέτοιου είδους εκχυλίσεις χρησιμοποιούνται ρευστοί διαλύτες σε υπερκρίσιμες συνθήκες, στις οποίες διατηρούνται παράλληλα οι ιδιότητες της υγρής και αέριας φάσης [4].

Υπάρχουν διάφοροι διαλύτες υπερκρίσιμης εκχύλισης όπως το αιθάνιο, το διοξείδιο του άνθρακα, το αιθυλένιο, το νερό το κυκλοεξάνιο, κα. Ο πιο συνηθισμένος ωστόσο διαλύτης κατά την υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι το **διοξείδιο του άνθρακα CO<sub>2</sub>**, το οποίο εμφανίζει **σειρά πλεονεκτημάτων**, όπως: είναι μη τοξικό και άφλεκτο, διαθέτει χαμηλό T<sub>c</sub> (κρίσιμη θερμοκρασία), είναι πτητικό, και πολύ φθινό. Επίσης, μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί από το εκχύλισμα, με μια απλή εκτόνωση σε ατμοσφαιρική πίεση. Πολλές φορές, μαζί με το διοξείδιο του άνθρακα για αύξηση της εκλεκτικότητάς του χρησιμοποιούνται και συνδιαλύτες, όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη.[17].

Αφορούν, κυρίως, στην εκχύλιση ουσιών εγκλωβισμένων στο εσωτερικό κάποιου δείγματος με στερεό υπόστρωμα, όπως για παράδειγμα οι εκχυλίσεις αιθέριων ελαίων από φυτικά δείγματα. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν και εφαρμογές που βασίζονται στη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου, όπου η επιθυμητή ουσία είναι συστατικό κάποιου υγρού μίγματος, όπως είναι ο διαχωρισμός δυαδικού μίγματος αιθανόλης - νερού (αζεότροπο). Επιπλέον, χρησιμοποιείται ευρύτατα για την έρευνα σε τομείς όπως η φαρμακευτική, το περιβάλλον, η τεχνολογία τροφίμων, και τα πολυμερή.

Είναι επίσης σημαντικό, να αναφερθούν και ορισμένα μειονεκτήματα της μεθόδου, τόσο *λειτουργικά* όσο και *οικονομικά*. Η μέθοδος της υπερκρίσιμης εκχύλισης δεν έχει πάντα τη δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας και το *πάγιο* κόστος της είναι πολύ *υψηλό* [19].



### Π-2.4.6.3 Πειραματική Διάταξη – Εξοπλισμός

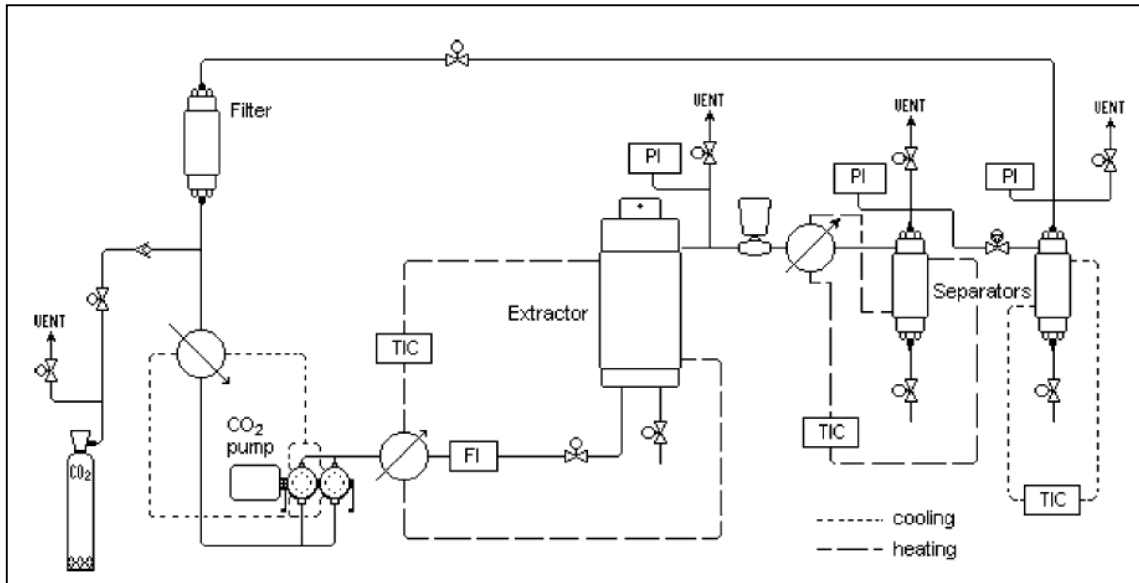
Ο βασικός διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα πειράματα στην υπερκρίσιμη εκχύλιση ήταν το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Συνδυαστικά με αυτόν έγιναν και δύο πειράματα με συνδιαλύτη την αιθανόλη σε ποσοστά 5% και 10%.

Η διάταξη της υπερκρίσιμης εκχύλισης βρίσκεται στο εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, και αποτελείται από μια συσκευή SFE-500 (SEPAREX), συνδεδεμένη με φιάλη διοξειδίου του άνθρακα, *Εικόνα\_11*.



*Εικόνα 11: Πειραματική διάταξη υπερκρίσιμης εκχύλισης*

Αναλυτικότερα, η συσκευή SFE-500 της υπερκρίσιμης εκχύλισης φαίνεται στο *Σχήμα\_2*. Το διάγραμμα αποτελείται (με σειρά ροής): από μια φιάλη διοξειδίου του άνθρακα, μια αντλία διαλύτη (δύο κεφαλές) με ψυκτικό, ένα θερμαντικό λουτρό, τον εκχυλιστήρα, ένα δεύτερο θερμαντικό λουτρό (για τους διαχωριστήρες) και δύο διαχωριστήρες.



Σχήμα\_2: Διάγραμμα ροής υπερκρίσιμης εκχύλισης [20]

Πίεση (P)	$P \leq 300 \text{ bar}$
Θερμοκρασία (T)	$T \leq 70 \text{ }^\circ\text{C}$
Παροχή διαλύτη ( $\dot{m}_{CO_2}$ )	$0.5 \text{ kg/h} \leq \dot{m}_{CO_2} < 5.0 \text{ kg/h}$
Όγκος κελιού ( $V_{extr}$ )	$\sim 400 \text{ ml}$
Όγκος Διαχωριστήρων ( $V_{sep}$ )	$\sim 18 \text{ ml}$

Πίνακας\_1: Τεχνικά χαρακτηριστικά της συσκευής υπερκρίσιμης εκχύλισης

Για την απομάκρυνση του συνδιαλύτη χρησιμοποιήθηκε ο φούρνος κενού του εργαστηρίου Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, Εικόνα\_12.



Εικόνα\_12: Φούρνος κενού (vacuum oven)



#### Π-2.4.6.4 Συνθήκες – Πειραματική διαδικασία

Για την κατανόηση της επίδρασης των βασικών παραμέτρων της διεργασίας, επιλέχθηκαν οι οριακές συνθήκες για τις οποίες πραγματοποιήθηκε η σειρά πειραμάτων που φαίνεται στον Πίνακα\_2. Ο σχεδιασμός προέκυψε από τη μέθοδο ANOVA (ANalysis Of VArience) για πλήρη παραγοντικά πειράματα  $2^3$  (2 επιπέδων και 3 παραγόντων) και τετραπλή επανάληψη του κεντρικού σημείου. Επιπλέον, εξετάστηκε και η χρήση συνδιαλύτη για τα πειράματα βάσης 11 και 12, μετά το πέρασ της εκχύλισης τους με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>.

A/A	Θερμοκρασία (°C)	Πίεση (bar)	Παροχή (kg/h)	Συνδιαλύτης (% w/w)
1	40	100	1	0 %
2	60	100	1	0 %
3	40	300	1	0 %
4	60	300	1	0 %
5	40	100	3	0 %
6	60	100	3	0 %
7	40	300	3	0 %
8	60	300	3	0 %
9	50	200	2	0 %
10	50	200	2	0 %
11	50	200	2	0 %
12	50	200	2	0 %
13	50	200	2	5 %
14	50	200	2	10 %

Πίνακας 2: Συνθήκες – πειραματικός σχεδιασμός υπερκρίσιμης εκχύλισης

Κατά την πειραματική διαδικασία, αρχικά το φυτό αφού αλεστεί σε μύλο άλεσης (mulinex) και περνούσε από κόσκινα Endecotts ltd. (London, England) των 425nm και 100nm. Ακολούθως, περίπου 40g του ενδιάμεσου κλάσματος τοποθετούνταν στο κελί εκχύλισης μαζί με πληρωτικό υλικό (γυάλινες σφαίρες), Εικόνα\_13, έτσι ώστε να δημιουργηθεί η σταθερή μας κλίση.

Αναλυτική περιγραφή της συσκευής και της διαδικασίας για την προετοιμασία, τη λειτουργία και το κλείσιμο της συσκευής παρουσιάζονται στο εγχειρίδιο χρήσης που συντάχθηκε και παρατίθεται στο Παράρτημα (Κεφάλαιο VII).



*Εικόνα 13: Πληρωτικό υλικό σταθερής κλίνης δείγματος*

Για τη μελέτη της διεργασίας και τη μοντελοποίησή της είναι απαραίτητη η συλλογή πειραματικών σημείων. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και σε συγκεκριμένες στιγμές, συλλέγεται δείγμα από τους δύο διαχωριστήρες (σε πιέσεις 80bar και 10bar) σε ξεχωριστά φιαλίδια. Ωστόσο, κατά τη συλλογή του εκχυλίσματος προκύπτουν αρκετές απώλειες, γι' αυτό το λόγο υπολογίζεται η απώλεια βάρους στον εκχυλιστήρα. Σε αυτή την περίπτωση, διακόπτεται η λειτουργία της συσκευής κα αφού σταθεροποιηθεί το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου (αλλά προστατευμένο από την υγρασία), ζυγίζεται και η συσκευή ξαναμπαίνει σε λειτουργία.

## **II-2.5 Χημικές Ιδιότητες Εκχυλισμάτων**

### **II-2.5.1 Αντιοξειδωτικές Ενώσεις**

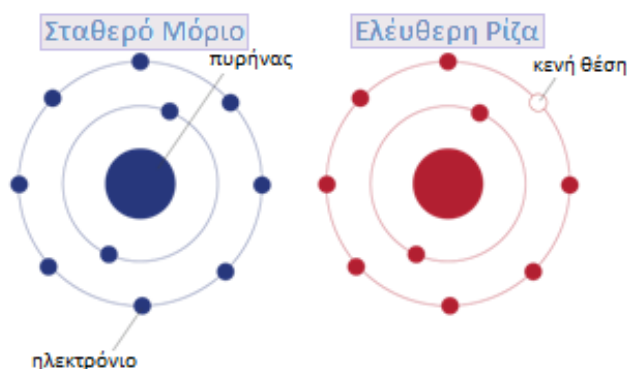
Η έννοια των αντιοξειδωτικών εισήχθη μαζί με την ανάγκη αντιμετώπισης της «απειλής» των ελευθέρων ριζών (free radicals). Για αρκετά χρόνια η ύπαρξη των ελευθέρων ριζών αποτελούσε ένα ήπιο φαινόμενο, χωρίς να συντρέχουν λόγοι για την άμεση αντιμετώπισή τους.

Μέσα στα τελευταία χρόνια ωστόσο, φαίνεται να αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών στο περιβάλλον, ενώ η δυνατότητα ρύθμισης τους είναι πολύ μικρή. Είναι πολύ πιθανό, το φαινόμενο αυτό να οφείλεται τόσο στην μόλυνση, όσο και σε παράγοντες όπως το κάπνισμα, τα παρασιτοκτόνα και η ακτινοβολία [21]. Τα αποτελέσματά της επίδρασής τους πάνω στον άνθρωπο, πέρα από την εμφανή γήρανση της επιδερμίδας, αποτελούν και οι διάφορες εκφυλιστικές παθήσεις όπως: η σκλήρυνση κατά πλάκας, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης, κ.α.[22].

Ωστόσο, αντιοξειδωτικές ενώσεις παράγονται και στο ανθρώπινο σώμα (σε μικρό βαθμό), κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού, αλλά και για την εξουδετέρωση ιών και βακτηρίων [21]. Η παραγωγή τους όμως δεν είναι πλέον αρκετή για να καλύψει τις ανάγκες αντιμετώπισης μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ελεύθερων ριζών.

### II-2.5.1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται με το σπάσιμο ασθενών δεσμών του μορίου, και αποκτώντας ένα μονήρες (αζευγάρωτο) ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα, το οποίο τις καθιστά πολύ ασταθείς και δραστικές ενώσεις, *Εικόνα\_14*. Για να αποκαταστήσουν την σταθερότητα, αντιδρούν ακαριαία με τις γειτονικές ενώσεις, 'κλέβοντας' ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους [21]. Οι γειτονικές ενώσεις με τη σειρά τους καθίστανται ασταθείς και αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο. Μια αλυσίδα αντιδράσεων αρχίζει να δημιουργείται, και σταματά μόνο όταν ένα μόριο αλλοιωθεί μόνιμα, ή καταρρεύσει λόγω μη λειτουργικότητας από την έλλειψη ηλεκτρονίου [23]. Αυτό συμβαίνει πολύ συχνά όταν οι ελεύθερες ρίζες έρχονται σε επαφή με ζωντανά κύτταρα, με αποτέλεσμα στο τέλος αυτής της αλυσίδας να μην είναι πλέον βιώσιμα.

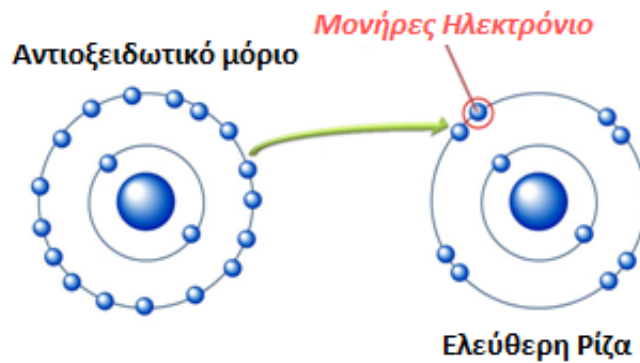


*Εικόνα 14:* Οι διαφορές στη δομή ενός σταθερού μορίου(stable molecule) και μιας ελεύθερης ρίζας

### II-2.5.1.2 Αντιοξειδωτική Δράση

Η συμβολή των αντιοξειδωτικών στην αναστολή της καταστρεπτικής δράσης των ελεύθερων ριζών γίνεται με την προσφορά των δικών τους ηλεκτρονίων, σταματώντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις, *Εικόνα\_15*. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις, όταν με τη σειρά τους χάνουν το ηλεκτρόνιό τους δεν αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο, καθώς παρουσιάζουν σταθερότητα και στις δύο καταστάσεις.

Ο οργανισμός του ανθρώπου έχει από μόνος του τη δυνατότητα να παράγει κάποια αντιοξειδωτικά, όπως ορισμένες βιταμίνες. Ωστόσο, κάποιες φορές η πρόσληψη ελεύθερων ριζών από το περιβάλλον υπερβαίνει τις προστατευτικές ικανότητες του οργανισμού και οδηγεί σε πιο μόνιμες βλάβες. Γι' αυτόν τον λόγο είναι σημαντικό να υπάρχουν αντιοξειδωτικά συμπληρώματα στην διατροφή, στα φάρμακα, και στην κοσμετολογία.



Εικόνα 15: Αντιοξειδωτικός Μηχανισμός

Υπάρχουν δύο είδη αντιοξειδωτικών: τα φυσικά –κυρίως φυτικής προέλευσης-, και τα συνθετικά. Καθώς για τα συνθετικά αντιοξειδωτικά υπάρχει μεγάλη διαμάχη ως προς την ασφάλεια χρήσης τους [24], προτιμάται στα περισσότερα προϊόντα η χρήση των φυσικών.

Η παραλαβή των φυσικών αντιοξειδωτικών γίνεται με τη μορφή αιθέριου ελαίου (*essential oil*) ή κάποιου εκχυλίσματος (*extract*). Και στις δύο περιπτώσεις η δράση τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες της εκχύλισης/ απόσταξης, όπως η θερμοκρασία, η πίεση και η φύση του διαλύτη.

#### Π-2.5.1.2-1 Αρχή Μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων έγινε με τη μέθοδο του DPPH [25]. Στη μέθοδο αυτή ο προσδιορισμός της δράσης γίνεται με τη χρήση μιας ελεύθερης ρίζας, την 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), η οποία μπορεί εύκολα να αναχθεί με τη πρόσληψη υδρογόνου σε 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine. Το DPPH παρουσιάζει έντονη απορρόφηση στα 515nm (όπου και φωτομετρείται), καθώς έχει ένα έντονο ιώδες χρώμα λόγω του μονήρους ηλεκτρονίου του. Η προσθήκη ποσότητας δείγματος με αντιοξειδωτική δράση οδηγεί την ρίζα σε αναγωγή, άρα και το διάλυμα αρχίζει σταδιακά να αποχρωματίζεται και η απορρόφηση του να μειώνεται. Με αυτό τον τρόπο μπορεί εύκολα να μετρηθεί το ποσοστό της ρίζας που δεν έχει αναχθεί με τη χρήση κάποιου φωτόμετρου.

#### Π-2.5.1.2-2 Πρωτόκολλο Μεθόδου

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 0,03mg/ml. Αφού ζυγιστούν με ακρίβεια 3mg σκόνης αντιδραστηρίου DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) προστίθενται σε δοχείο με χοντρό σκούρο γυαλί, μαζί με 100ml μεθανόλης. Το διάλυμα αφήνεται να αναδευτεί με μαγνητάκι ανάδευσης για 15 λεπτά (χωρίς θέρμανση), μέχρι να διαλυθεί πλήρως το DPPH.

Στη συνέχεια, οι ποσότητες των εκχυλισμάτων μεταφέρονται σε Eppendorf, όπου αραιώνονται κατάλληλα με τους διαλύτες εκχύλισής τους.

Αφού λοιπόν ρυθμιστεί το φασματοφωτόμετρο (UV-Vis) στα 515nm, μηδενίζεται η απορρόφηση με τυφλό διάλυμα που περιέχει μόνο μεθανόλη. Για την φωτομέτρηση των δειγμάτων ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- ✓ Προστίθενται 3,9 ml διαλύματος DPPH (0,03mg/ml) στην κυψελίδα

- ✓ Σημειώνεται η απορρόφηση.
- ✓ Συμπληρώνονται στην κυψελίδα **100μl** κατάλληλα αραιωμένου **δείγματος** (από τα Erpendorf).
- ✓ Σημειώνεται άμεσα η απορρόφηση
- ✓ Για τα επόμενα 5min - 10min - 20min - 30min σημειώνεται η μείωση της απορρόφησης για την ίδια κυψελίδα.

Με τη μέθοδο αυτή μετρείται το ποσοστό της ελεύθερης ρίζας που έχει αναχθεί, σε συνάρτηση με το χρόνο. Η μείωση απορρόφησης του διαλύματος, στις παραπάνω χρονικές στιγμές, υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ABS} = \frac{ABS_T - ABS_{\Delta}}{ABS_T} \times 100$$

Όπου  $ABS_T$ : απορρόφηση τυφλού

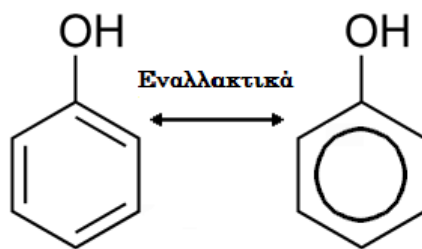
$ABS_{\Delta}$ : απορρόφηση δείγματος

Οι τιμές αυτές της απορρόφησης αναπαρίστανται σε συνάρτηση με το χρόνο (τη στιγμή μέτρησής τους) και δίνουν τις καμπύλες αναφοράς για κάθε ένα από τα εκχυλίσματα. Από τις καμπύλες αυτές υπολογίζεται η **συγκέντρωση  $IC_{50}$**  που προκύπτει από γραμμική παρεμβολή στο σημείο της απορρόφησης που έχουμε την **κατά 50% εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας**. Η τιμή αυτή θα έδινε ουσιαστικά στην φωτομέτρηση την ιδανική αραιώση του εκχυλίσματος για να πέσει η αρχική απορρόφηση ( $ABS_0$ ) του διαλύματος DPPH, ακριβώς στη μισή της τιμή:

$$ABS_{IC_{50}} = \frac{ABS_0}{2}$$

### **II-2.5.2 Φαινολικές Ενώσεις**

«Φαινολικές ενώσεις» ονομάζεται μια κατηγορία ενώσεων που περιέχουν στο μόριο τους μία ή περισσότερες φαινολικές ομάδες: μια ομάδα υδροξειδίου ενωμένη με έναν αρωματικό δακτύλιο, *Εικόνα\_16*[26]. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών (όπως τα αλκαλοειδή και τα τερπενοειδή), και βρίσκονται στο εσωτερικό τους ελεύθερα ή ενωμένα σε μόρια διαφόρων σακχάρων. Μπορούν να εντοπιστούν πολλά γραμμάρια φαινολικών που περιέχονται ανά χιλιόγραμμο υλικού στους φυτικούς ιστούς. Βασικός τους ρόλος είναι η προστασία των φυτών από τη φωτοσυνθετική και περιβαλλοντική καταπόνηση [26], [27].



*Εικόνα 16: Φαινολική ομάδα*

Ωστόσο, η επίδραση των φαινολικών ενώσεων και στον άνθρωπο φαίνεται πως είναι εξίσου ευεργετική. Σημαντικό παράδειγμα είναι οι διάφορες ιατρικές χρήσεις τους: όπως είναι οι αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις [28], [29], και παράλληλα, η αντιθρομβωτική καρδιοπροστατευτική και αγγειοδιασταλτική τους ικανότητα [30]. Καθώς επίσης και οι φαρμακευτικές τους χρήσεις: κυρίως για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η δράση της οποίας εξαρτάται από τη δομή των ενώσεων, και ειδικότερα την θέση και το πλήθος των υδροξυλίων τους [27], [29].

## **Π-2.5.2.1 Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο**

### **Π-2.5.2.1-1 Αρχή Μεθόδου**

Η μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου έγινε με χρήση της μεθόδου προσδιορισμού Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή είναι φωτομετρική και στηρίζεται στην οξείδωση φαινολών μέσα σε αλκαλικό περιβάλλον, με τη χρήση αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (μίγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος). Λόγω της οξείδωσης, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται σε μίγμα οξειδίων βολφραμίου και μολυβδαινίου, και εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό κυανό χρώμα. Η φωτομέτρηση λοιπόν πραγματοποιείται στα 750nm, όπου επιτυγχάνεται η μέγιστη απορρόφηση του μίγματος, και η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η μέτρηση φαινολικού περιεχομένου είναι ολική, και ανεξάρτητη της φύσης των φαινολικών συστατικών (μονομερών, διμερών, κτλ.). Συχνά εκφράζεται και σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, καθώς προτιμάται η χρήση πρότυπης καμπύλης σε γαλλικό οξύ. Τέλος, για τη ρύθμιση αλκαλικότητας στη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , σύμφωνα με το πρωτόκολλο [31].

### **Π-2.5.2.1-2 Πρωτόκολλο Μεθόδου**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 20ml προσθέτουμε με τη σειρά:

- ✓ 7,9ml απιονισμένο νερό
- ✓ 100ml κατάλληλα αραιωμένου δείγματος
- ✓ 500ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu
  - Ελαφριά ανάδευση δοκιμαστικού σωλήνα σε Vortex
- ✓ 1,5ml διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (άνυδρου  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%)
  - Έντονη ανάδευση δοκιμαστικού σωλήνα σε Vortex

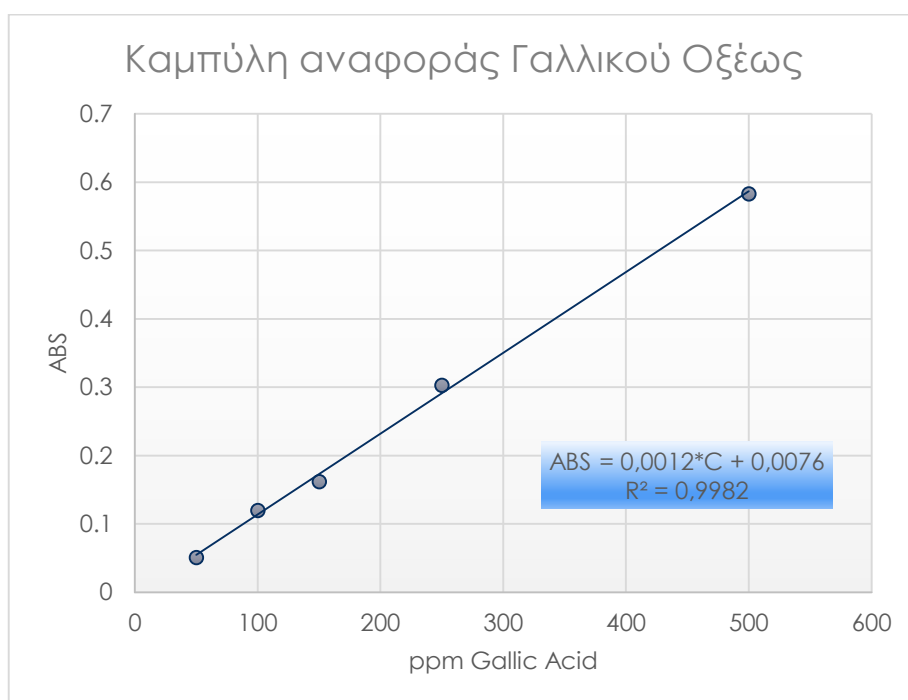
Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα και το τυφλό -στο οποίο αντί για 100ml δείγματος γίνεται προσθήκη διαλύτη της έκαστης εκχύλισης ή απιονισμένου νερού.

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τα μίγματα τοποθετούνται στο σκοτάδι για 2 ώρες ή σε υδατόλουτρο των 40°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε κυψελίδες πάχους 10mm για φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης, στα 765nm.

➤ Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Για την χάραξη της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται σαν δείγμα γαλλικό οξύ, σε συγκεντρώσεις διαλύματος {(50-100-150-250-500)ppm GAE} με γνωστή απορρόφηση. Αφού κατασκευαστεί η καμπύλη μπορεί να συγκριθεί με βιβλιογραφία, και τέλος με τη βοήθεια της να εκφραστούν τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος: mg GAE, προς ml εκχυλίσματος.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, όπως υπολογίστηκε από το εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Διεργασιών είναι:  $ABS = 0.0012 * C + 0.0076$ , όπου  $C$  η συγκέντρωση του διαλύματος σε ισοδύναμα mg/l γαλλικού οξέος και  $ABS$  η αντίστοιχη απορρόφηση, και με  $R^2 = 0,9982$ . Επιπλέον, η καμπύλη αναφοράς έχει ακρίβεια για απορροφήσεις μέσα στο ευθύγραμμο τμήμα, δηλαδή:  $ABS = [0,050 - 0,600]$ , Διάγραμμα\_1.



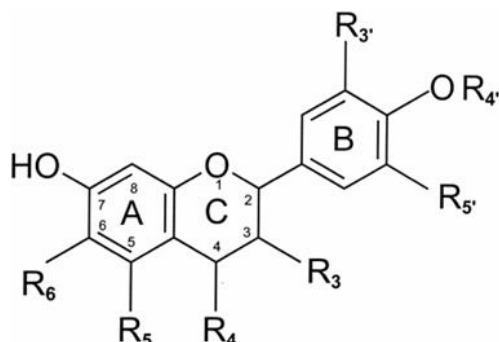
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Γαλλικού Οξέος (GAE)



### II-2.5.3 Φλαβονοειδείς Ενώσεις

Στην ευρύτερη οικογένεια των Φαινολικών Ενώσεων ανήκουν και τα φλαβονοειδή, ως πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες (μαζί με τα καροτενοειδή) για τα έντονα χρώματα των φυτών στα άνθη και τους καρπούς τους [32], [33].

Μεταξύ τους τα φλαβονοειδή έχουν ίδιο βασικό σκελετό (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), ο που αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτύλιους και έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο, *Εικόνα\_17*. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι για το σχηματισμό τους ακολουθούν τον ίδιο βιοσυνθετικό δρόμο, καθώς όλα προέρχονται από την συσσωμάτωση των δρόμων: σικιμικού και μαλονικού οξέος [33].



*Εικόνα 17:* Βασική δομή φλαβονοειδών- A,B: φαινολικοί δακτύλιοι, C:ετεροκυκλικός δακτύλιος [32]

Καθώς τα φλαβονοειδή περιέχονται στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά, υπολογίζεται προσεγγιστικά ότι ο άνθρωπος καταναλώνει περίπου 1g καθαρών φλαβονοειδών ενώσεων, ημερησίως [33]. Πέραν, όμως, από τη διατροφή αξιοποιούνται και για φαρμακευτικούς σκοπούς. Από το 1930 και μετά, άρχισαν να χρησιμοποιούνται και ως αντιφλεγμονώδη, αφού παρατηρήθηκε ότι μπορούν και αναστέλλουν ορισμένα ενζυμικά συστήματα υπεύθυνα για το σχηματισμό και την εξέλιξη των φλεγμονών [32]. Έχουν δράση κατά καρδιαγγειακών νόσων και εμφανίζουν αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Τέλος, τόσο διατροφικά, όσο και φαρμακευτικά παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαιτίας του αριθμού και της θέσης των ελεύθερων υδροξυλίων τους [32], [33].

#### II-2.5.3.1 Ολικό Φλαβονοειδές Περιεχόμενο

##### II-2.5.3.1.1 Αρχή Μεθόδου

Το ολικό φλαβονοειδές περιεχόμενο μετρήθηκε με τη μέθοδο Aluminum Chloride – Χλωριούχου Αργιλίου (AlCl<sub>3</sub>). Με τη μέθοδο αυτή δημιουργείται σχηματισμός σταθερών συμπλόκων: C-4 κετονομάδων, με την C-3 (ή C-5) υδροξυλομάδα των φλαβονών και φλαβονολών, και με τον χλωριούχο αργίλιο. Επιπλέον, ο χλωριούχος άργιλος μπορεί να σχηματίσει ασταθή σύμπλοκα οξέων με την όρθο-δι-υδροξυλομάδα των φαινολικών δακτυλίων A,B (*Εικόνα\_17*).



### Π-2.5.3.1-2 Πρωτόκολλο Μεθόδου

Για την παρασκευή των δειγμάτων και των διαλυμάτων χλωριούχου αργιλίου και οξικού νατρίου αραιώνονται:

- ✓ 1,8g χλωριούχου αργιλίου ( $\text{AlCl}_3$ ) διαλύονται σε 100ml απιονισμένο νερό.
- ✓ 82,03g οξικού νατρίου ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) διαλύονται σε 1000ml απιονισμένου νερού.
- ✓ 10mg δείγματος ξηρού εκχυλίσματος διαλύονται σε 1ml διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO)

→ προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 10mg/ml.

Στη συνέχεια, σε 96τρύπες πλάκες τοποθετούνται με τη σειρά στα “πηγάδια” (wells):

- ✓ 50 μl από κάθε αραιωμένο δείγμα [10mg/ml]
- ✓ 20 μl διαλύματος χλωριούχου αργιλίου ( $\text{AlCl}_3$ )
- ✓ 160 μl αιθανόλη (EtOH)
- ✓ 20 μl οξικού νατρίου ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ).

→ τελική συγκέντρωση δείγματος στο πηγάδι: 2 mg/ml

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα και το τυφλό -στο οποίο αντί για 50μl δείγματος γίνεται προσθήκη διαλύτη της έकाστης εκχύλισης ή αιθανόλη.

Για κάθε δείγμα ετοιμάζεται μια τριπλέτα πάνω στην πλάκα (τρεις μετρήσεις), για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Οι πλάκες επωάζονται για 40 λεπτά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, μεταφέρονται σε φασματοφωτόμετρο Infinite m200 pro, TECAN reader για φωτομέτρηση στα 415nm.

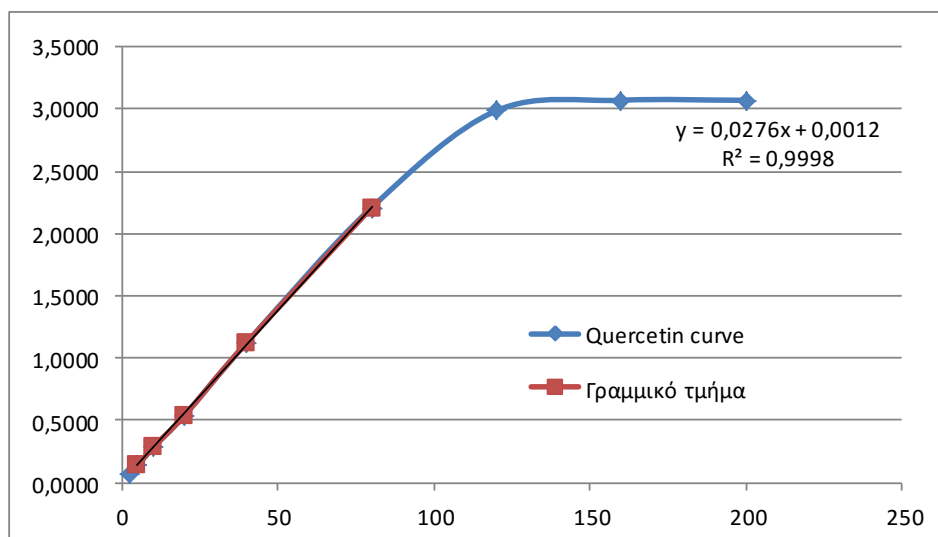
#### ➤ Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Όμοια με τον υπολογισμό της ποσότητας του φαινολικού φορτίου (TPC) που βασίστηκε στην καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος (GA), έτσι και εδώ χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης (Quercetin) προκειμένου να υπολογιστεί η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φλαβονοειδή.

Η καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης, η οποία χαρακτήθηκε με πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 200 μg/ml, 160 μg/ml, 120 μg/ml, 80 μg/ml, 40 μg/ml, 10 μg/ml, 5 μg/ml και 2,5 μg/ml, απεικονίζεται στο παρακάτω Διάγραμμα\_2.

Στη συνέχεια, από το γραμμικό τμήμα της πρότυπης καμπύλης (με όρια  $0,500 < A < 2,700$ ) υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση της κερκετίνης και εν συνεχεία η ισοδύναμη συγκέντρωση σε μg/ml.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της περιεκτικότητας σε ολικά φλαβονοειδή εκφράζονται στα δείγματα σε ισοδύναμα mg κερκετίνης ανά g ξηρού εκχυλίσματος:  $\text{mg}_{\text{Quer}}/\text{g}_{\text{εκχυλίσματος}}$ .



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης

## II-3 Μέθοδοι Ανάλυσης

### II-3.1 Χρωματογραφία

Η τεχνική της *Χρωματογραφίας* (Chromatography) περιλαμβάνει ένα πλήθος **αναλυτικών μεθόδων** και **τεχνικών διαχωρισμού**, που διαφοροποιούνται μεταξύ τους ανάλογα με την κινητή και στατική τους φάση, καθώς και την κατανομή των συστατικών που αναλύουν.

Ως τεχνικές διαχωρισμού παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον ως προς τον **καθαρισμό των δειγμάτων** και την **απομόνωση διαφόρων ουσιών** με μεγάλη φαρμακευτική ή βιολογική αξία.

Ως αναλυτικές μέθοδοι έχουν την ικανότητα τόσο **ποσοτικού**, όσο **ποιοτικού** προσδιορισμού – ακόμη και σε μίγματα με μικρή διαφοροποίηση μεταξύ των φυσικών χαρακτηριστικών τους.

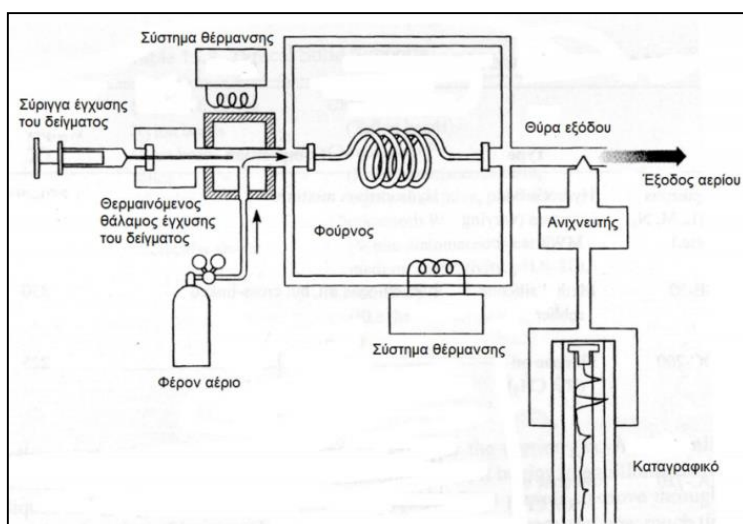
Ο **ποιοτικός** προσδιορισμός των ενώσεων γίνεται με τη βοήθεια του χρόνου ανάσχεσης (RT) - που είναι διαφορετικός για την κάθε ουσία. Η ταυτοποίηση των δειγμάτων επιτυγχάνεται με την βοήθεια πρότυπων ουσιών, που έχουν ήδη καταγραφεί και περιέχονται σε βιβλιοθήκες. Επιπλέον, ταυτοποίηση μπορεί να γίνει και με τη μέθοδο εμβολιασμού όταν μας ενδιαφέρει μια συγκεκριμένη ουσία, ή με τους δείκτες Kovats I (για την αέρια χρωματογραφία).

Ο **ποσοτικός** προσδιορισμός προκύπτει από την σύγκριση εμβαδού ή ύψους των κορυφών του δείγματος με κορυφές των πρότυπων ουσιών.

### II-3.1.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Η *Αέρια Χρωματογραφία* είναι μια αναλυτική μέθοδος που ανήκει στην κατηγορία των Χρωματογραφιών και διαφοροποιείται χάρη στην κινητή της φάση, που βρίσκεται σε **αέρια** φυσική κατάσταση. Επιπλέον, καθώς ο διαχωρισμός γίνεται στην αέρια φάση, τα δείγματα που αναλύονται με αυτή τη μέθοδο πρέπει να είναι αρκετά **πτητικά**, για να εξατμίζονται εύκολα.

Η διάταξη της μεθόδου αποτελείται από έναν εισαγωγέα δείγματος, τη στήλη διαχωρισμού, και τον ανιχνευτή που καταλήγει σε κάποιο σύστημα καταγραφής δεδομένων, Εικόνα\_18. Το δείγμα εισέρχεται στη διάταξη από τον εισαγωγέα -όπου επιτυγχάνεται η αεριοποίηση του δείγματος (από το σύστημα θέρμανσης) και η ομοιόμορφη ανάμιξή του με το φέρον αέριο. Στη συνέχεια, η κινητή φάση (φέρον αέριο) με το δείγμα εισέρχεται στη σπειροειδή στήλη (μήκους 1-100m) εντός του φούρνου, και καταλήγει στην ατμόσφαιρα, αφού πριν έχει περάσει από τον ανιχνευτή.



Εικόνα\_18: Διάταξη Αέριας Χρωματογραφίας

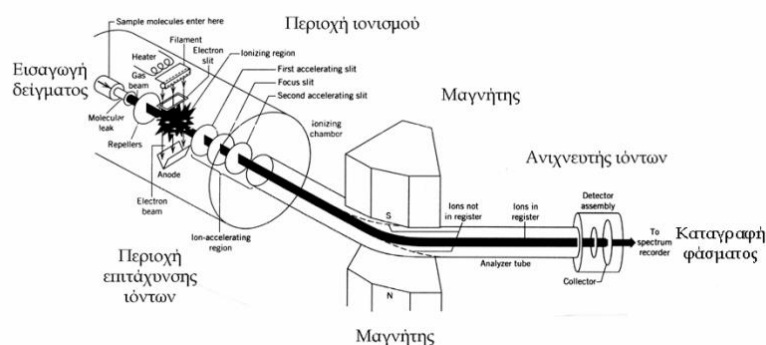
Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία, ταχύτητα, ευελιξία, και δυνατότητα αυτοματισμού και βρίσκει πολλές εφαρμογές σε βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και αρωμάτων, αλλά και τομείς όπως το περιβάλλον, η ιατρική και η εγκληματολογία.

### II-3.2 Φασματομετρία Μάζας (MS)

Η Φασματομετρία Μάζας είναι μια αναλυτική -μη οπτική- μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως για την **ποιοτική** ανάλυση αερίων, υγρών -και κάποιων στερεών- δειγμάτων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στη διερεύνηση **δομής των οργανικών ενώσεων**, αλλά και για την κινητική, και τους μηχανισμούς διερεύνησης μονομοριακών αντιδράσεων αποσύνθεσης.

Η διαδικασία της μεθόδου βασίζεται στη δημιουργία μοριακών ιόντων ή θραυσμάτων που εμφανίζουν μοναδικό λόγο μάζας – φορτίου ( $m/z$ ) και είναι εύκολο να διαχωριστούν.

Η διάταξη αποτελείται από ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος, την πηγή ιονισμού, τον επιταχυντή ιόντων, τον αναλυτή μαζών, έναν ανιχνευτή –σε σύστημα υψηλού κενού-, και τέλος έναν επεξεργαστή σημάτων και καταγραφέα, Εικόνα\_19.



Εικόνα\_19: Διάταξη Φασματογράφου Μαζών

Αρχικά, το δείγμα εισέρχεται στο σύστημα εισαγωγής και αεριοποιείται. Στη συνέχεια, περνά στην πηγή ιονισμού όπου τα μόρια ιοντίζονται –συνήθως με κάποια δέσμη ηλεκτρονίων. Έπειτα τα κατιόντα περνούν από τον επιταχυντή ιόντων που βρίσκεται σε ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο (400-4000 V), και καταλήγουν στον αναλυτή μαζών. Στον αναλυτή γίνεται ο διαχωρισμός μαζών, με βάση τον λόγο  $m/z$ , οι οποίες στη συνέχεια καταγράφονται από τον ανιχνευτή.

Τα **θραύσματα** που δημιουργούνται από το βομβαρδισμό του δείγματος με τη δέσμη ηλεκτρονίων δίνουν πληροφορίες σχετικά με τη δομή του αρχικού μορίου. Το υψηλό κενό κατά τη διάρκεια της μέτρησης βοηθά στην αποφυγή διαμοριακών συγκρούσεων.

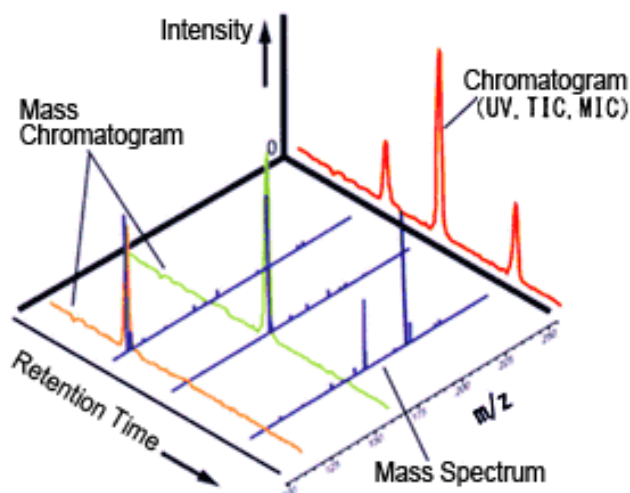
### II-3.3 Συνδυασμένη Τεχνική GC-MS

Με στόχο την καλύτερη ταυτοποίηση των διαχωρισμένων ουσιών έγινε μια προσπάθεια κατασκευής κάποιας ενιαίας διάταξης, μεταξύ Αέριων και Υγρών Χρωματογράφων με την Φασματομετρία Μάζας (GC-MS και LC-MS). Στις συνδυασμένες αυτές τεχνικές, το Φασματόμετρο Μάζας αποτελεί έναν εκλεκτικό ανιχνευτή στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης, βελτιώνοντας τη δυναμική ανίχνευσης της μεθόδου σε επίπεδο **pg**.

Σήμερα, η συνδυασμένη τεχνική GC-MS χρησιμοποιείται ευρύτατα καθώς εμφανίζει διάφορα **πλεονεκτήματα** σε σχέση με άλλες μεθόδους, όπως:

- ✓ Η ταυτόχρονη δυνατότητα για **ποιοτική** και **ποσοτική** ανάλυση του δείγματος.
- ✓ Η συνδυαστική ικανότητα **διαχωρισμού** και **ταυτοποίησης** των δύο προηγούμενων μεθόδων.
- ✓ Παροχή περισσότερων πληροφοριών σε πολλά και πολύπλοκα προβλήματα ανάλυσης.

Η αξιολόγηση των δεδομένων γίνεται με τη μορφή κανονικοποιημένων φασμάτων, που προκύπτουν από την επιλογή κάποιας συγκεκριμένης χρονικής στιγμής από το χρωματογράφημα, *Εικόνα\_20*. Μέσω της βιβλιοθήκης, από τα πλήρη φάσματα γίνεται και η ταυτοποίηση των αγνώστων συστατικών. Ενώ, οι χρόνοι ανάσχεσης των προτύπων ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση των συστατικών που ταυτοποιήθηκαν.



*Εικόνα\_20: Φάσματα μάζας σε συνάρτηση με τα χρωματογραφήματα (σε διάφορες χρονικές στιγμές)*

Η τεχνική χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό εκατοντάδων συστατικών φυσικών και βιολογικών δειγμάτων, π.χ. για τον προσδιορισμό αρωματικών συστατικών των τροφίμων, τον προσδιορισμό ρυπαντών του νερού, ή την μελέτη των μεταβολιτών δραστικών ουσιών φαρμάκων. Τέλος, έχει μεγάλη χρησιμότητα και ως αναλυτικό όργανο για doping control, με έλεγχο των ούρων των αθλητών για απαγορευμένες ουσίες.

### **II-3.3.1 Συνθήκες - Πειραματική Διαδικασία**

Η ανάλυση έγινε στο ΕΚΠΑ στη Φαρμακευτική Σχολή, και συγκεκριμένα στον τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας φυσικών προϊόντων.

Ο ανιχνευτής μάζας Hewlett-Packard (HP) 5973 με ιοντισμό πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) (70 eV), ήταν συνδεδεμένος με αέριο χρωματογράφο HP 6890 και εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη HP-5 MS (30m × 0.25mm; πάχος φιλμ, 0.25μ). Το πρόγραμμα θερμοκρασίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν 60°C (5min) με 280°C, και με ρυθμό 3 °C/min, το οποίο ακολουθούσε μια στατική φάση των 15 min στους 280°C. Η θερμοκρασία έγχυσης ήταν 200°C και η παροχή του φέροντος αερίου (ήλιο) ήταν 0.8 mL/min.

Τέλος, η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε με τη χρήση της βιβλιοθήκης Wiley και Adams.

## II-4 Μαθηματική Μοντελοποίηση Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

### II-4.1 Πειραματικός Σχεδιασμός - ANOVA

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων της υπερκρίσιμης εκχύλισης έγινε με την ανάπτυξη *μήτρας σχεδίασης* (design matrix) για πλήρη παραγοντικά πειράματα με τη μέθοδο ANOVA (Analysis Of Variance).

«Πλήρη παραγοντικά» ονομάζονται τα πειράματα που απαιτούν την υλοποίηση  $2^k$  πειραμάτων, χωρίς επαναλήψεις (combinatorics without repetition). Τα αποτελέσματα λοιπόν που θα προκύψουν θα περιλαμβάνουν όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των  $k$  παραγόντων σε  $2$  επίπεδα [34], Σχήμα\_3.

Οι  $k$  παράμετροι αποτελούν τις ανεξάρτητες μεταβλητές του συστήματος που θα μελετηθεί και επιλέγονται με βάση την επίδρασή τους (εμπειρικά) στο σύστημα. Η επίδρασή τους μπορεί να υπολογιστεί με δείκτη την **απόκριση** του συστήματος.

Η *απόκριση* (Y) του συστήματος αποτελεί μία εξαρτημένη μεταβλητή που επιλέγεται να μελετηθεί, έτσι ώστε να περιγραφεί η συμπεριφορά του συστήματος. Αναπτύσσεται λοιπόν μια εξίσωση μεταξύ των παραμέτρων που επιλέχθηκαν και της ίδιας της απόκρισης, η οποία θα παρουσιαστεί και θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Οι **παράγοντες** που αναφέρονται στο σχεδιασμό χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους *συνεχείς* και στους *ποιοτικούς* (ασυνεχείς) παράγοντες. Ο όρος «συνεχείς παράγοντες» αναφέρεται σε μεταβλητές όπως είναι η πίεση και η θερμοκρασία, δηλαδή μη διακριτές. Αντίθετα, ο όρος «ποιοτικοί παράγοντες» αναφέρεται στην ενδεχόμενη ύπαρξη/απουσία τους, καθώς αποτελούν διακριτές μεταβλητές (πχ. η παρουσία καταλύτη).

Τα «2-επίπεδα» που μελετώνται χωρίζονται σε *υψηλά* και *χαμηλά*. Τα *υψηλά επίπεδα* συμβολίζονται με +1 (ή 1) και αποτελούν την μέγιστη τιμή ή την παρουσία κάποιου παράγοντα. Ενώ, τα *χαμηλά επίπεδα* συμβολίζονται με -1 (ή 0) και αντιστοιχούν στην ελάχιστη τιμή ή την απουσία κάποιου παράγοντα [34].

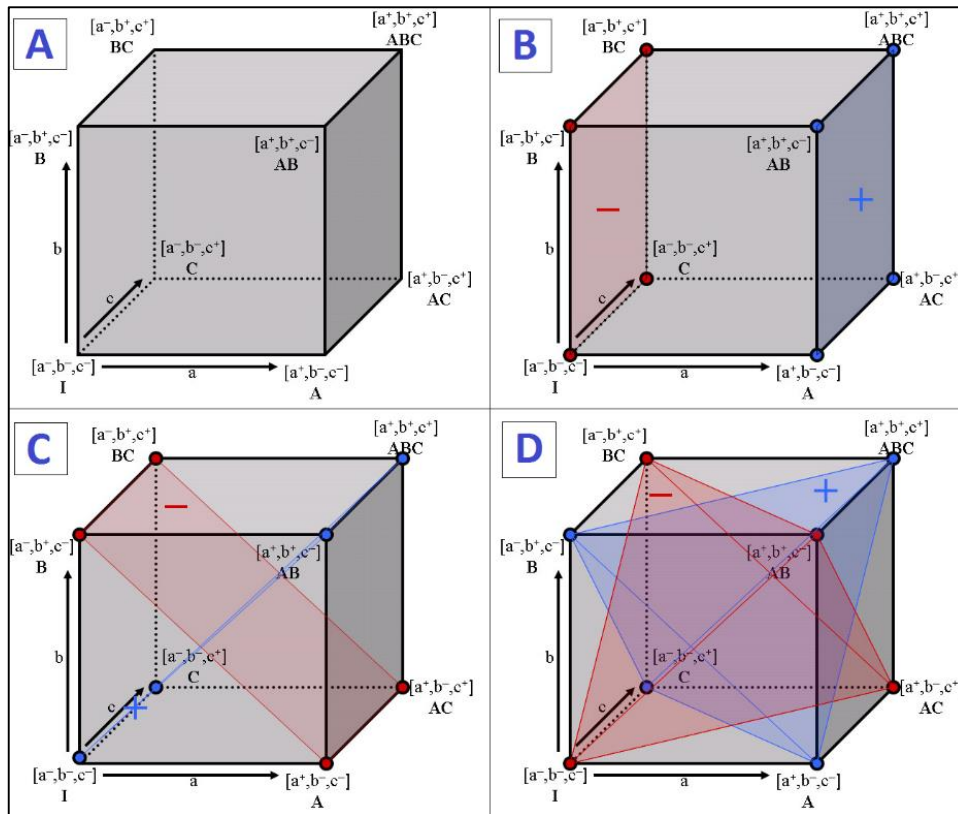
Στην ανάλυση αυτή σχεδιάστηκε ένα παραγοντικό πείραμα 2 επιπέδων και 3 παραγόντων:  $2^3$  (= 8 συνδυασμούς)

Γραφικά, το σύστημα αυτό ορίζεται από τον γεωμετρικό τόπο 6 επιπέδων - τριών ειδών, και ανά δύο παράλληλων και όμοιων μεταξύ τους, Σχήμα\_3Α.

Αναλυτικά, διακρίνονται:

3 μεταβλητές ( $a, b, c$ )  $\Rightarrow$  3 διαστάσεις (3D)  $\Rightarrow$  3 διαφορετικά διανύσματα ( $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$ )

Τα διανύσματα των 3ων παραγόντων είναι περιορισμένα από 2 πεπερασμένα επίπεδα ( $\pm$ ) για την κάθε μεταβλητή, που ως αποτέλεσμα ορίζουν τα  $3 \times 2 = 6$  επίπεδα του γεωμετρικού χώρου:  $a^\pm, b^\pm, c^\pm$ .



Σχήμα 3: Γραφική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων 3 παραμέτρων σε 2 επίπεδα

Στον παρακάτω Πίνακα\_3, φαίνεται η γενική μορφή μιας τυπικής μήτρας σχεδίασης για ένα  $2^3$  Πλήρες Παραγοντικό Πείραμα.

Αριθμός Πειραμάτων	Θέση Παραγόντων		
	1	2	3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Πίνακας 3: Μήτρα σχεδίασης ενός  $2^3$  Πλήρους Παραγοντικού Πειράματος



Οι 3 παράγοντες που ορίστηκαν στο σύστημα αυτό είναι η θερμοκρασία, η πίεση, και η μαζική παροχή διαλύτη. Οι παράγοντες αυτοί είναι συνεχείς, και οι τιμές τους χωρίστηκαν σε υψηλά και χαμηλά επίπεδα σύμφωνα με τα όρια του συστήματος που πρόκειται να μελετηθεί. Οι τιμές του πειραματικού σχεδιασμού δίνονται στον παρακάτω Πίνακα\_4:

Παράγοντες	Χαμηλό επίπεδο (-1)	Υψηλό επίπεδο (+1)
Θερμοκρασία $T$	40 °C	60 °C
Πίεση $P$	100 bar	280 bar
Παροχή διαλύτη $\dot{m}_{CO_2}$	1 kg/h	3 kg/h

Πίνακας 4: Τιμές των 2 επιπέδων του πειραματικού σχεδιασμού

Τέλος, η εξίσωση που περιγράφει την επίδραση των παραγόντων στο σύστημα, για  $2^3$  πειράματα, είναι:

$$Y = X_0 + C_1 \times X_1 + C_2 \times X_2 + C_3 \times X_3 + C_{12} \times X_{12} + C_{13} \times X_{13} + C_{23} \times X_{23} + C_{123} \times X_{123} \quad [I]$$

Όπου

{ $X_0$ } : ολική μέση τιμή (η μέση τιμή όλων των πειραμάτων)

{ $X_1, X_2, X_3$ } : κύριες επιδράσεις παραγόντων (main effects) - Σχήμα\_3B.

{ $X_{12}, X_{13}, X_{23}$ } : αλληλεπιδράσεις δύο παραγόντων (two-factor interactions) - Σχήμα\_3C.

{ $X_{123}$ } : αλληλεπιδράσεις τριών παραγόντων (three-factor interactions) - Σχήμα\_3D.

## II-4.2 Μοντέλο Sonová

Τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού της υπερκρίσιμης εκχύλισης που περιεγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με στόχο τη μαθηματική μοντελοποίηση της διεργασίας σύμφωνα με το μοντέλο της Helena Sonová. Το μαθηματικό αυτό μοντέλο, έχει βασιστεί σε προηγούμενα μοντέλα για τη μεταφορά μάζας με τη θεώρηση εμβολικής ροής διαλύτη σε σταθερή κλίση αλεσμένου δείγματος, *Εικόνα\_21*. Όπως φαίνεται και στη συνέχεια, το μοντέλο λαμβάνει υπόψη του τα φαινόμενα μεταφοράς τόσο στη φάση του ρευστού διαλύτη, όσο και του στερεού δείγματος.

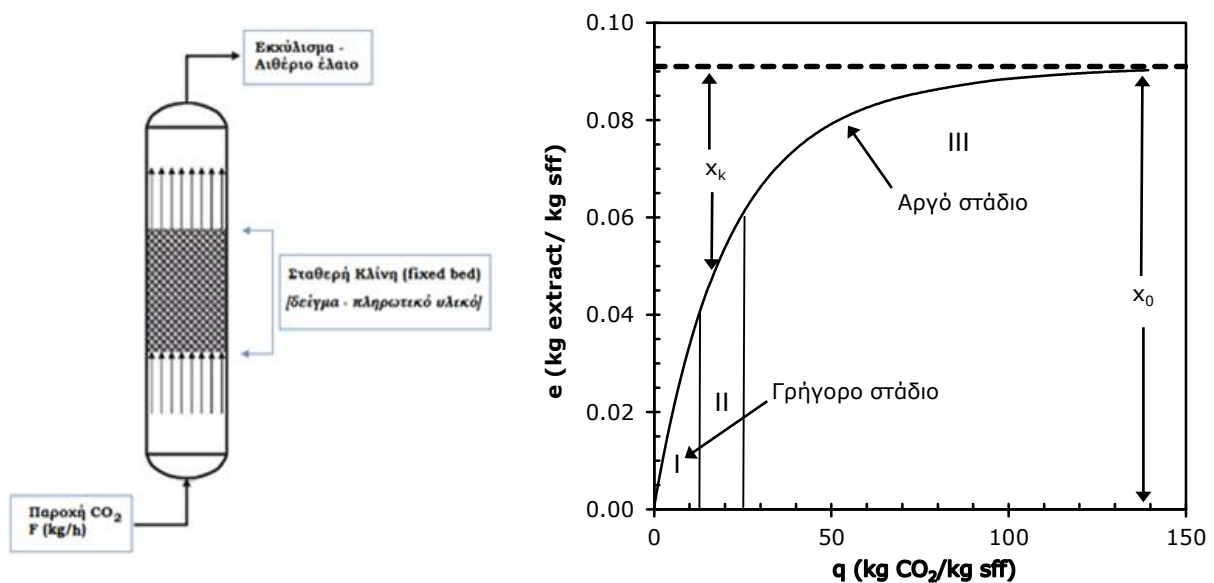
Τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας κατά την υπερκρίσιμη εκχύλιση έχουν περιγράψει ικανοποιητικά στο παρελθόν, από τη χρήση *συντελεστών* μεταφοράς μάζας είτε για την φάση του *διαλύτη* (Lack 1985, Lee et al. 1986, Cygnarowicz et al. 1992), ή για την φάση του *στερεού* δείγματος (Pekhon and Goncharenko 1968). Το παρόν μοντέλο στηριζόμενο στις προηγούμενες μελέτες έδωσε μια συνδυαστική εικόνα για τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα [35].



Αρχικά θα πρέπει να θεωρηθεί ότι η παρούσα σταθερή κλίνη αποτελείται από σωματίδια ενός φυσικού στερεού δείγματος. Επιπλέον, ότι εντός των κυτταρικών δομών των σωματιδίων, βρίσκεται εγκλωβισμένη η επιθυμητή προς διάλυση ουσία (έλαιο). Ωστόσο, κατά την άλεση του δείγματος επιτυγχάνεται διάρρηξη ορισμένων κυτταρικών δομών, οδηγώντας στην απελευθέρωση μέρους του ελαίου. Αυτό διευκολύνει το διαλύτη στο να έρθει σε επαφή με το έλαιο και να το παρασύρει μαζί του. Υπάρχει όμως και ένα ποσοστό άθικτων κυτταρικών δομών που εξακολουθεί να περιέχει εγκλωβισμένο μέρος του ελαίου. Αν θεωρηθεί ότι οι εγκλωβισμένες (K) και μη (P) ποσότητες διαλυμένης ουσίας, που λαμβάνονται μαζί στο εκχύλισμα δίνουν το σύνολο δ.ο. στο δείγμα (O), τότε προκύπτει:

$$O = P + K$$

Σύμφωνα με την προηγούμενη θεώρηση λοιπόν προέκυψε πως η μεταφορά μάζας στη διεργασία γίνεται σε τρία στάδια. Ένα γρήγορο στάδιο, που ελέγχεται από τη διεργασία μεταφοράς της αποδεσμευμένης διαλυμένης ουσίας. Ένα ενδιάμεσο μεταβατικό στάδιο, όπου εκχυλίζεται μέρος του ελεύθερου ελαίου ενώ έχει ξεκινήσει και η εκχύλιση του παγιδευμένου, και τέλος ένα αργό τρίτο στάδιο, που περιγράφει τη διάχυση της δεσμευμένης ποσότητας στα άθικτα κυτταρικά τοιχώματα. Το κάθε στάδιο έχει διαφορετικό συντελεστή μεταφοράς μάζας, ο οποίος είναι άμεσα συνδεδεμένος με την αντίσταση στη μεταφορά της διαλυμένης ουσίας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης [17], [35].



Εικόνα 21: Μοντέλο εμβολικής ροής εκχύλισης με υπερκρίσιμο διαλύτη

Οι παραδοχές για το μοντέλο είναι οι ακόλουθες:

- ✓ Ο διαλύτης κυκλοφορεί με εμβολική ροή (Plug Flow)
- ✓ Ο εκχυλιστήρας θεωρείται δοχείο ημιδιαλείποντος έργου (Semi-Batch Vessel)
- ✓ Η αξονική διασπορά θεωρείται αμελητέα.

- ✓ Η πίεση, η θερμοκρασία, η μαζική παροχή διαλύτη, και ως αποτέλεσμα και η πυκνότητα του διαλύτη, παραμένουν σταθερές σε όλο το μήκος της σταθερής κλίνης δείγματος.
- ✓ Η σταθερή κλίση θεωρείται ομοιογενής ως προς:
  - το μέγεθος των σωματιδίων, και την
  - αρχική κατανομή της διαλυμένης ουσίας
- ✓ Το σύνολο των ουσιών που εκχυλίζονται κατά την υπερκρίσιμη εκχύλιση αντιμετωπίζεται ως μια εκχυλιζόμενη ουσία.
- ✓ Ο διαλύτης που εισέρχεται στον εκχυλιστήρα θεωρείται καθαρός (σε σχέση με την εκχυλιζόμενη ουσία) [17], [35].

Ο ρυθμός μεταφοράς μάζας για τη διαλυμένη ουσία στις δύο φάσεις του στερεού και του διαλύτη (ρευστού) περιγράφονται από τις παρακάτω εξισώσεις [17], [35]:

$$\text{Φάση ρευστού διαλύτη: } \rho_f \varepsilon \left( \frac{\partial y}{\partial t} + u \frac{\partial y}{\partial h} \right) = \mathcal{J}(x, y) \quad [\text{II}]$$

$$\text{Φάση στερεού δείγματος: } -\rho_s (1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = \mathcal{J}(x, y) \quad [\text{III}]$$

Όπου:

$\rho_f$  πυκνότητα διαλύτη [ $\text{kg}_{\text{CO}_2}/\text{m}^3$ ]

$\varepsilon$  πορώδες σταθερής κλίνης

$y$  συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας (στη φάση του ρευστού διαλύτη) [ $\text{kg}_{\text{solute}}/\text{kg}_{\text{CO}_2}$ ]

$x$  συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας (δ.ο.) στη φάση του στερεού δείγματος ελεύθερου δ.ο. [ $\text{kg}_{\text{solute}}/\text{kg}_{\text{sff}}$ ]

$\text{sff}$  στερεό δείγμα ελεύθερο δ.ο. (solute free feed,  $\text{sff} = m_{\text{στερεάς πρώτης ύλης}} - m_{\text{δ.ο.}}$ )

$u$  ανηγμένη ταχύτητα διαλύτη ως προς το πορώδες της κλίνης

$\rho_s$  πυκνότητα στερεού [ $\text{kg}_{\text{solid}}/\text{m}^3$ ]

$h$  αξονική συντεταγμένη

$\mathcal{J}$  ρυθμός μεταφοράς της διαλυμένης ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων

Από τις παραπάνω εξισώσεις, για το μοντέλο της Σονονά προκύπτει [36]:

$$\mathcal{J}(x, y) = \begin{cases} k_f a_o \rho_f (y_r - y) & x > x_k \\ k_s a_o \rho_s x \left( 1 - \frac{y}{y_r} \right) & x \leq x_k \end{cases}, \quad [\text{IV}]$$

Όπου:

$y_r$  διαλυτότητα της διαλυμένης ουσίας (ελαίου) στο ρευστό [ $\text{kg}_{\text{solute}}/\text{kg}_{\text{CO}_2}$ ]

$x_k$  αρχική συγκέντρωση δεσμευμένης διαλυμένης ουσίας στο στερεό ελεύθερου δ.ο. [ $\text{kg}_{\text{solute}}/\text{kg}_{\text{sff}}$ ]

Αν θεωρηθεί πως δεν υπάρχει συσσώρευση της διαλυμένης ουσίας στο διαλύτη ( $\frac{\partial y}{\partial t} = 0$ ), τότε προκύπτει η παρακάτω αναλυτική λύση για τις διαφορικές εξισώσεις των δύο φάσεων (στερεού-ρυστού) [35], [36]:

$$e = \begin{cases} q y_r (1 - e^{-Z}) \\ y_r (q - q_m e^{z_w - Z}) \\ x_o - \frac{y_r}{W} \ln \left[ 1 + \left( e^{\frac{W x_o}{y_r}} - 1 \right) e^{\frac{W (q_m - q) x_k}{x_o}} \right] \end{cases}, \quad \begin{cases} q < q_m \\ q_m \leq q < q_n \\ q \geq q_n \end{cases} \quad [\text{V}]$$

$$\text{με } q_m = \frac{x_o - x_k}{y_r Z} \quad [\text{VI}] \quad \text{και} \quad q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \left[ \frac{x_k + (x_o - x_k) e^{\frac{W x_o}{y_r}}}{x_o} \right] \quad [\text{VII}]$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{y_r}{W x_o} \ln \left[ \frac{x_o e^{W(q - q_m) - x_k}}{x_o - x_k} \right] \quad [\text{VIII}]$$

$$Z = \frac{k_f a_o \rho_f}{\dot{q}(1 - \varepsilon) \rho_s} \quad [\text{IX}]$$

$$W = \frac{k_s a_o}{\dot{q}(1 - \varepsilon)} \quad [\text{X}]$$

Όπου:

- $e$  ανηγμένη ποσότητα εκχυλιζόμενης ουσίας  $[kg_{solute} / kg_{sff}]$
- $q$  ανηγμένη ποσότητα διαλύτη που έχει καταναλωθεί  $[kg_{solvent} / kg_{sff}]$
- $q_n$  η τιμή του  $q$  στη φάση που το αιθέριο έλαιο έχει πλήρως εκχυλιστεί  $[kg_{solvent} / kg_{sff}]$
- $q_m$  η τιμή του  $q$  κατά την έναρξη εκχύλισης στο εσωτερικό του στερεού  $[kg_{solvent} / kg_{sff}]$
- $Z$  αδιάστατος συντελεστής μεταφοράς μάζας (φάση ρυστού)
- $W$  αδιάστατος συντελεστής μεταφοράς μάζας (φάση στερεού)
- $\dot{q}$  ανηγμένη παροχή διαλύτη που έχει καταναλωθεί  $[kg_{solvent} / s / kg_{sff}]$
- $z_w$  αδιάστατη αξονική συντεταγμένη ορίου μεταξύ των σταδίων εκχύλισης

Από τις παραπάνω εξισώσεις του μοντέλου, οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι οι:

$x_o, x_k, y_r, Z$  και  $W$

- Η μεταβλητή  $x_o$  υπολογίζεται πειραματικά.
- Η  $y_r$  προκύπτει από την κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης εκχύλισης (του γρήγορου σταδίου). Η κλίση αυτή θεωρείται ότι προσεγγίζει τη διαλυτότητα καθώς το πρώτο στάδιο ελέγχεται από αυτή.
- Οι μεταβλητές  $x_k, Z$  και  $W$  θεωρούνται προσαρμόσιμες, με το  $x_k$  να επηρεάζεται από τη μέση διάμετρο του δείγματος και την τιμή του  $x_o$  [17].

### III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΣΜΟΣ

Μέθοδος	Συνθήκες	Κωδικός
Συμβατική Soxhlet	<i>αιθανόλη</i> T=78°C _ P=1bar	Sx-E
Συμβατική Soxhlet	<i>εξάνιο</i> T=68°C _ P=1bar	Sx-H
Εκχύλιση Υπέρηχων	<i>αιθανόλη - νερό (70:30)</i> T=40°C _ P=1bar	US-E.W
Εκχύλιση Υπέρηχων	<i>εξάνιο</i> T=40°C _ P=1bar	US-H
Εκχύλιση Μικροκυμάτων	<i>αιθανόλη - νερό (70:30)</i> T=68°C _ P=1bar	MW-E.W
Εκχύλιση υπό Πίεση	<i>αιθανόλη - νερό (70:30)</i> T=20°C _ P=9bar	NT-E.W
Υδροαπόσταξη	<i>νερό</i> T=99°C _ P=1bar	HD-W
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα</i> T=40°C _ P=100bar _ F=1kg/h _ Sep1=8obar	SC-40.100.1-1
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα</i> T=40°C _ P=100bar _ F=1kg/h _ Sep2=15bar	SC-40.100.1-2
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα</i> T=50°C _ P=190bar _ F=2kg/h _ Sep1=8obar	SC-50.190.2-1
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα</i> T=50°C _ P=190bar _ F=2kg/h _ Sep2=15bar	SC-50.190.2-2
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα - αιθανόλη (95:5)</i> T=50°C _ P=190bar _ F=2kg/h _ Sep1=7obar	SC-E.50.190.2-1
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα - αιθανόλη (95:5)</i> T=50°C _ P=190bar _ F=2kg/h _ Sep2=1bar	SC-5%E.50.190.2-2
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα - αιθανόλη (90:10)</i> T=50°C _ P=190bar _ F=2kg/h _ Sep1=7obar	SC-5%E.50.190.2-1
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα - αιθανόλη (90:10)</i> T=50°C _ P=190bar _ F=2kg/h _ Sep2=1bar	SC-10%E.50.190.2-2
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα</i> T=60°C _ P=28obar _ F=3kg/h _ Sep1=8obar	SC-60.280.3-1
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	<i>διοξείδιο του άνθρακα</i> T=60°C _ P=28obar _ F=3kg/h _ Sep2=15bar	SC-60.280.3-2

*Πίνακας 5: Μέθοδοι, συνθήκες και κωδικοί πειραμάτων εκχύλισης*

### III-1 Μέτρηση Υγρασίας

Το ποσοστό υγρασίας υπολογίστηκε από την απώλεια βάρους προς το αρχικό βάρος δείγματος που χρησιμοποιήθηκε, και εκφράζεται σε χιλιογράμματα νερού, προς χιλιογράμματα νωπού δείγματος:

	Αρχικό βάρος δείγματος	Τελικό βάρος δείγματος	Ποσοστό υγρασίας% [kg <sub>νερού</sub> /kg <sub>νωπού_δείγματος</sub> ]
Δείγμα (1)	1,6575 g	1,5402 g	7,08 %
Δείγμα (2)	1,6593 g	1,5330 g	7,61 %
Δείγμα (3)	1,6565 g	1,5377 g	7,17 %
			<b>(7,29 ± 0,28) %</b>

Πίνακας 6: Αποτελέσματα υπολογισμού υγρασίας δείγματος

Επομένως, η υγρασία δείγματος υπολογίστηκε στο **(7,29 ± 0,28)% w/w**.

Η παραπάνω μέτρηση είναι συγκρίσιμη με εκείνες της βιβλιογραφίας για τα διάφορα είδη *Salvia*:

- ✓ (6,9 ± 0,5)% w/w, για το *Salvia hispanica* L. από Μεξικό. [37]
- ✓ (13,6)% w/w, για το *Salvia officinalis* L. από Κροατία. [38], [39]

## III-2 Αποτελέσματα Μεθόδων Ανάκτησης

### III-2.1 Συμβατική Εκχύλιση (Soxhlet)

#### ➤ Πείραμα 1<sup>ο</sup>

Το πρώτο πείραμα έγινε με διαλύτη την αιθανόλη, με σκοπό να εκχυλιστεί το πολικό περιεχόμενο του δείγματος με τη χρήση μιας συμβατικής μεθόδου εκχύλισης. Χρησιμοποιήθηκαν 149,367g αιθανόλη και 15,223g δείγματος - με αναλογία Διαλύτη-δείγματος 10:1. Η εκχύλιση ολοκληρώθηκε μετά τον 10<sup>ο</sup> κύκλο, σε 3 ώρες και 43 λεπτά.

Σημείωση: Η ποσότητα διαλύτη δεν επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα της εκχύλισης, καθώς σε κάθε κύκλο σιφωνισμού ανακυκλώνεται ο ίδιος ακριβώς όγκος - του υποδοχέα. Είναι ωστόσο σημαντικό, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος να μην στεγνώσει η σφαιρική φιάλη, που είναι σε επαφή με την πηγή θερμότητας.



Παρατήρηση #1: Μετά την εκχύλιση και αφού έρθει το εκχύλισμα σε θερμοκρασία δωματίου παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος, όπως παρατηρήθηκε και σε κάποια πειράματα της βιβλιογραφίας [37], [39]. Πιθανώς, το ίζημα να αποτελείται από κερία ή βαριά αλκάνια που περιέχονται στο δείγμα, αλλά αυτό θα εξεταστεί στη συνέχεια κατά την ποιοτική ανάλυση με GC-MS.

Για το προσδιορισμό της απόδοσης της εκχύλισης, πρέπει να υπολογιστεί το βάρος του καθαρού εκχυλίσματος, οπότε το εκχύλισμα μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα υψηλού κενού (rotary evaporator) για την απομάκρυνση του διαλύτη. Η απομάκρυνση αιθανόλης σε 202mbar κενού έγινε στους 45°C και διήρκησε ~1,5 ώρα. Το καθαρό εκχύλισμα που μετρήθηκε ήταν 5,272g.

#### ➤ Πείραμα 2<sup>ο</sup>

Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκε εξάνιο, με στόχο την εκχύλιση των μη πολικών συστατικών του δείγματος. Μετρήθηκαν 153,863g εξανίου και 14,446g δείγματος - δηλαδή με αναλογία Διαλύτη-δείγματος 10:1. Η εκχύλιση ολοκληρώθηκε μετά τον 13<sup>ο</sup> κύκλο, σε 3 ώρες και 34 λεπτά.

Παρατήρηση #2: Όμοια με το προηγούμενο πείραμα, έχουμε σχηματισμό ιζήματος καθώς το εκχύλισμα έρχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα αυτό πρόκειται επίσης να εξεταστεί ως προς το ποιοτικό περιεχόμενό του στη συνέχεια.



Στη συνέχεια, το εκχύλισμα μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα υψηλού κενού, στα 225mbar κενού και στους 35°C. Η απομάκρυνση του εξάνιου διήρκησε 30 λεπτά και έδωσε καθαρό εκχύλισμα: 1,396g.

Μετά τους υπολογισμούς αποδόσεων τα εκχυλίσματα των δύο πειραμάτων επαναρευστοποιούνται χρησιμοποιώντας τον διαλύτη της εκάστοτε εκχύλισης, ανάδευση και ήπια παροχή θερμότητας. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε ψυγείο όπου έχουμε πάλι σχηματισμό του ίδιου ιζήματος και με τη χρήση διηθητικού χαρτιού διαχωρίζονται (solid-liquid) για να αναλυθούν ξεχωριστά.

### III-2.1.1 Σύγκριση - Αποδόσεις

Τα χαρακτηριστικά, οι αποδόσεις και τα αποτελέσματα της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα\_7.

Σημείωση: Οι κωδικοί των δειγμάτων αναφέρονται στα δύο πειράματα πριν τον διαχωρισμό, σύμφωνα με τον Πίνακα\_7.

	Αναλογία Δ:δ (w/w)	Χρόνος εκχύλισης	Κύκλοι σιφωνισμού	Συγκέντρωση εκχυλίσματος (g/ml)	Απόδοση (w/w)
Sx-E	10:1	223min	10	0,06265	30,60 %
Sx-H	10:1	214min	13	0,05225	5,90 %

Πίνακας\_7: Δεδομένα και αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης Soxhlet

Για το δείγμα **SX-E** με διαλύτη αιθανόλη η απόδοση ήταν ιδιαίτερα υψηλή στα 30,60% w/w σε σχέση και με την απόδοση της εκχύλισης με εξάνιο **Sx-H**. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το εξάνιο είναι μη πολικός διαλύτης και εκχυλίζει λιγότερα συστατικά.

### III-2.1.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων

Με τη δεδομένη απόδοση τα δείγματα παρουσίασαν τις παρακάτω ιδιότητες με βάση την αντιοξειδωτική τους δράση, και το ολικό φαινολικό και φλαβονοειδές τους περιεχόμενο (Πίνακας\_8).

	IC <sub>50</sub> mg <sub>εκχυλίσματος</sub> /ml <sub>διαλύτη</sub>	TPC mg <sub>GAE</sub> /g <sub>εκχυλίσματος</sub>	TFC mg <sub>Querc</sub> /g <sub>εκχυλίσματος</sub>
<b>Sx-E_liquid</b>	4,00	193,40	42,61
<b>Sx-H_liquid</b>	10,01	72,42	18,55

Πίνακας\_8: Ποσοτική ανάλυση ιδιοτήτων των δειγμάτων εκχύλισης Soxhlet

Η συμβατική εκχύλιση έδωσε υψηλή αντιοξειδωτική δράση τόσο στο δείγμα πολικού διαλύτη (αιθανόλη) **SX-E**, όσο και στο δείγμα μη πολικού διαλύτη (εξάνιο) **Sx-H**. Βέβαια το αιθανολικό δείγμα είχε μεγαλύτερη δράση, του οποίου ο διαλύτης όπως θα δούμε και στη συνέχεια φαίνεται να είναι πολύ αποδοτικός για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών ενώσεων.

Από την άλλη τα αποτελέσματα ολικού φαινολικού και φλαβονοειδούς περιεχομένου φαίνεται να αποδίδουν στο δείγμα **SX-E** με τις πολικότερες ενώσεις σημαντικά υψηλότερο φορτίο ενώσεων από ότι στο **Sx-H**.

### III-2.1.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων

Οι χημικές αναλύσεις που έγιναν στα δείγματα της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet έδωσαν τα παρακάτω συνοπτικά αποτελέσματα του Πίνακα\_9. Οι αναλυτικοί πίνακες βρίσκονται στο Παράρτημα του κεφαλαίου VI.

Σημείωση: Οι παρακάτω αναλύσεις των δειγμάτων **SX-E** και **Sx-H** θα εξεταστούν ξεχωριστά για το υγρό δείγμα (*liquid*) και στερεό ίζημα (*solid*) τους μετά τη διήθηση.



➤ Εκχύλιση Soxhlet με αιθανόλη – υγρό διήθημα

Sx-E_liquid	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	13.12 %
Camphor	5.41 %
β-Caryophyllene	11.98 %
Manool	12.48 %
Oleic acid (products)	10.93 %

Πίνακας\_9: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών υγρού δείγματος Sx-E

Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται το υγρό διήθημα να έχει συγκρατήσει υψηλά ποσοστά 1,8-Κινεόλης, β-Καρυοφιλενίου, Μανούλης και Ολεϊκού οξέος. Σε ένα βαθμό, η περιεκτικότητα του δείγματος σε β-Καρυοφιλαίνιο [40] και Ολεϊκό οξύ [41] δικαιολογεί και την καλή αντιοξειδωτική δράση του δείγματος **SX-E\_liquid**.

➤ Εκχύλιση Soxhlet με αιθανόλη – στερεό ίζημα

Sx-E_solid	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
Manool	11.31 %
Waxes - Higher Alkanes	65.06 %

Πίνακας\_10: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών στερεού δείγματος Sx-E

Στο ίζημα του **SX-E\_solid** παρατηρήθηκε μεγάλη περιεκτικότητα σε κεριά και βαριά αλκάνια (65,06%), ουσίες που εκχυλίζονται σε μεγάλες θερμοκρασίες προς το τέλος της εκχύλισης.

Το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο για αυτό το δείγμα, καθώς περιμέναμε το ίζημα να έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε κεριά, που με την αλλαγή της θερμοκρασίας από 78°C στους 20°C στερεοποιήθηκαν και μαζεύτηκαν στον πυθμένα. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε κεριά επίσης δικαιολογείται από την χρήση πολικού διαλύτη για την εκχύλιση όπως η αιθανόλη στο δείγμα **SX-E**, διότι λόγω πολικότητας εκχυλίζει και τις πιο βαριές ενώσεις.

➤ Εκχύλιση Soxhlet με εξάνιο – υγρό διήθημα

Sx-H_liquid	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	18.98 %
Camphor	7.40 %
β-Caryophyllene	8.83 %
Viridiflorol	5.16 %
Manool	14.44 %
Waxes - Higher Alkanes	21.14 %

Πίνακας\_11: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών υγρού δείγματος Sx-H με χρήση GC-MS

Ομοίως με το αιθανολικό διήθημα **SX-E\_liquid**, μεγαλύτερη περιεκτικότητα παρατηρούμε πάλι σε συστατικά όπως η 1,8-Κινεόλη, το β-Καρυοφιλένιο και η Μανούλη. Αντίστοιχα πιθανό, είναι πως και το διήθημα **Sx-H\_liquid** οφείλει σε ένα βαθμό την καλή αντιοξειδωτική του δράση στο β-Καρυοφιλένιο[40].

Παράλληλα, παρατηρείται ένα μεγάλο ποσοστό εκχύλισης κεριών και αλκανίων, το οποίο είναι αναμενόμενο για το δείγμα **Sx-H\_liquid**, καθώς χρησιμοποιήσαμε εξάνιο για την εκχύλισή του.

➤ Εκχύλιση Soxhlet με εξάνιο – στερεό ίζημα

Sx-H_solid	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	13.96 %
Camphor	10.25 %
β-Caryophyllene	27.69 %
Manool	21.19 %
Waxes - Higher Alkanes	10.51 %

Πίνακας\_12: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών στερεού δείγματος Sx-H με χρήση GC-MS

Στο ίζημα εξανίου **Sx-H\_solid** παρατηρείται η εμφάνιση των ίδιων βασικών ουσιών με το διήθημα **Sx-H\_liquid** αλλά σε διαφορετικά ποσοστά.

Θα ήταν αναμενόμενο τα αποτελέσματα του δείγματος **Sx-H\_solid** να περιείχαν μόνο κεριά και Μανούλη, όπως στο δείγμα **Sx-E\_solid**. Ωστόσο τα δύο δείγματα διέφεραν αρκετά στην μορφή. Το πρώτο δείγμα αποτελούταν από λεπτούς κόκκους σαν «πούδρα», ενώ το δεύτερο ήταν αρκετά κολλώδες. Πιθανώς και γι' αυτό τα συστατικά που παρέμειναν στο στερεό κλάσμα του ενός δείγματος ήταν διαφορετικά από αυτά του άλλου.

### III-2.2 Εκχύλιση με Μικροκύματα (ΜΑΕ)

Κατά την εκχύλιση με μικροκύματα τοποθετούνται 4,475g αλεσμένου δείγματος (425µm) σε υποδοχέα beaker με 100ml διαλύτη αιθανόλη – νερό (70:30). Ο υποδοχέας τοποθετείται στη συνέχεια σε φούρνο μικροκυμάτων (Microwave Oven) στους 40 °C, με ισχύ 250 W.

Η εκχύλιση διήρκησε 45 λεπτά, κατά τη διάρκεια των οποίων έγινε δειγματοληψία των ~2ml στα 2, 5, 15 και 30 λεπτά. Το υπόλοιπο εκχύλισμα των 45min λεπτών συλλέγεται και διηθείται υπό κενό. Από την ποσότητα του τελευταίου τοποθετούνται 5ml (4,396g) σε δισκίο και μέσα σε φούρνο κενού για 24 ώρες, έτσι ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση καθαρού εκχυλίσματος.



#### III-2.2.1 Σύγκριση - Αποδόσεις

Τα χαρακτηριστικά, οι αποδόσεις και τα αποτελέσματα της εκχύλισης με χρήση μικροκυμάτων φαίνονται στον Πίνακα\_13.

	Αναλογία Δ:δ (w/v)	Χρόνος εκχύλισης	Συγκέντρωση [gκαθαρού_εκχυλίσματος/ mlδιαλύτη]	Απόδοση εκχύλισης w/w
MW-E.W	25:1	45min	0,0122 g/ml	27,59 %

Πίνακας\_13: Συνθήκες και αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης μικροκυμάτων

Η απόδοση του δείγματος MW-E.W με διαλύτη αιθανόλη και νερό ήταν αρκετά υψηλή και προσέγγιζε αρκετά αυτή του δείγματος SX-E. Παρά το γεγονός ότι η συμβατική εκχύλιση Soxhlet διήρκησε τον πενταπλάσιο χρόνο σε σχέση με αυτή των μικροκυμάτων οι αποδόσεις τους είναι της ίδιας σχεδόν τάξης.

#### III-2.2.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων

Το εκχύλισμα των μικροκυμάτων εξετάστηκε ποσοτικά ως προς τις ιδιότητές του, Πίνακας\_14.

	IC <sub>50</sub> mgεκχυλίσματος/mlδιαλύτη	TPC mgGAE/gεκχυλίσματος	TFC mgQuer/gεκχυλίσματος
MW-E.W	4,26	300,89	70,01

Πίνακας\_14: Ποσοτική ανάλυση δειγμάτων εκχύλισης με χρήση μικροκυμάτων

Το νερό στον διαλύτη της εκχύλισης με μικροκύματα βοηθά έτσι ώστε να εκχυλιστούν βαριά συστατικά του φυτικού δείγματος, όπως είναι τα σάκχαρα και οι ταννίνες. Αυτό αποτυπώνεται και στα αποτελέσματα του Πίνακα\_14, όπου οι ταννίνες ως πολυφαινόλες έχουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση και το οποίο εξηγεί και την χαμηλή τιμή IC<sub>50</sub> (που υποδηλώνει καλή αντιοξειδωτική δράση).

Παράλληλα αναμενόμενο είναι οι πολυφαινόλες να έχουν και ιδιαίτερα υψηλό ολικό φαινολικό και φλαβονοειδές περιεχόμενο. Και μάλιστα, όπως θα διαπιστώσουμε στη συνέχεια το ολικό φαινολικό και φλαβονοειδές περιεχόμενο του δείγματος MW-E.W είναι το μεγαλύτερο μεταξύ όλων των δειγμάτων.

### III-2.2.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων

Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης του εκχυλίσματος μικροκυμάτων δίνεται παρακάτω στον Πίνακα\_15, όπου εμφανίζονται οι βασικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και η αντίστοιχη περιεκτικότητά τους.

MW-E.W	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	45.65 %
Camphor	15.71 %
β-Caryophyllene	6.77 %
γ-Gurjunene	8.59 %
Manool	18.58 %

Πίνακας15\_: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος MW-E.W με χρήση GC-MS

Από τον παραπάνω Πίνακα\_15 παρατηρούμε ότι εκχυλίζεται ένα μεγάλο ποσοστό 1,8-Κινεόλης και σημαντικά ποσοστά σε Καμφορά και Μανούλη. Οι περισσότερες από τις ενώσεις που εκχυλίζουν τα μικροκύματα έχουν φαινολικούς δακτυλίους και αυτό σε ένα βαθμό δικαιολογεί και το μεγάλο φαινολικό και φλαβονοειδές φορτίο του δείγματος.

### III-2.3 Εκχύλιση με Υπερήχους (USE)

#### ➤ Πείραμα 1

Για το πρώτο πείραμα τοποθετήθηκαν στον υποδοχέα 50ml μίγματος αιθανόλης - νερού σε αναλογία 70:30, και 2,0345g αλεσμένου δείγματος (425 $\mu$ m). Ο υποδοχέας στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο θάλαμο του φούρνου μικροκυμάτων (Microwave Oven) - στον οποίο ήταν απενεργοποιημένη η χρήση των μικροκυμάτων. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το ψυκτικό στους 40°C και οι υπέρηχοι σε ένταση 25kHz και ισχύ 450W).

Η εκχύλιση διήρκησε όπως και με χρήση μικροκυμάτων 45 λεπτά. Στο χρόνο αυτό γινόταν δειγματοληψία των ~2ml στα 5, 15 και 30 λεπτά. Τέλος το υπόλοιπο εκχύλισμα των 45 λεπτών διηθείτο υπό κενό και 5ml από αυτό (4,537g) τοποθετούνταν σε φούρνο κενού για 24 ώρες, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης καθαρού εκχυλίσματος.

#### ➤ Πείραμα 2

Στο δεύτερο τοποθετούνται σε υποδοχέα 50ml εξανίου και 2,017g αλεσμένου δείγματος (425 $\mu$ m). Ομοίως με το πρώτο πείραμα, ο υποδοχέας τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων (Microwave Oven) και ρυθμίζεται στους 40 °C, με ένταση και ισχύ και οι υπέρηχων, 25kHz και 450W αντίστοιχα.

Για άλλη μια φορά η εκχύλιση διήρκησε 45 λεπτά με δειγματοληψία ~2ml στα 5, 15 και 30 λεπτά. Το υπόλοιπο εκχύλισμα των 45 λεπτών πάλι διηθείται υπό κενό και 5ml (3,297g) του τοποθετούνται σε φούρνο κενού για 24 ώρες, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης καθαρού εκχυλίσματος.

#### III-2.3.1 Σύγκριση - Αποδόσεις

Τα χαρακτηριστικά, οι αποδόσεις και τα αποτελέσματα της εκχύλισης με υπέρηχους φαίνονται στον Πίνακα\_16.

	Αναλογία $\Delta$ : $\delta$ w/w	Χρόνος εκχύλισης	Συγκέντρωση [g <sub>καθαρού_εκχυλίσματος</sub> / ml <sub>διαλύτη</sub> ]	Απόδοση εκχύλισης w/w
U-E.W	25:1	45min	0,00980 g/ml	24,50 %
U-H	25:1	45min	0,00402 g/ml	10,05 %

Πίνακας\_16: Συνθήκες και αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης με υπέρηχους

Παρατηρούμε ότι για τον ίδιο ακριβώς χρόνο εκχύλισης με υπέρηχους τα αποτελέσματα αποδόσεων των δειγμάτων U-E.W και U-H διαφέρουν αισθητά. Όπως και στη συμβατική εκχύλιση Soxhlet, αυτό πιθανώς να οφείλεται στη διαφορά πολικότητας των διαλυτών των δύο δειγμάτων. Στην προκειμένη περίπτωση μάλιστα ο διαλύτης του δείγματος U-E.W είναι ακόμη πολικότερος καθώς περιέχει και 30% απιονισμένο νερό (αρκετά πολικότερο από την αιθανόλη). Αναμένεται λοιπόν πως και η τελική απόδοση θα είναι μεγαλύτερη, καθώς θα έχουμε και μεγαλύτερη απώλεια μάζας του δείγματος.

Ωστόσο, παρά το υψηλό ποσοστό της απόδοσης του δείγματος U-E.W, η αντίστοιχη απόδοση του δείγματος MW-E.W, με κοινό διαλύτη και συνθήκες εκχύλισης, φαίνεται να είναι υψηλότερη (27,59%). Αυτή η διαφορά προφανώς οφείλεται στην διαφορά του τρόπου εκχύλισης των δύο δειγμάτων.

### III-2.3.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων

Τα εκχυλίσματα με χρήση υπερήχων εξετάζονται ποσοτικά ως προς τις ιδιότητές τους, και αναγράφονται στον Πίνακα\_17.

	IC <sub>50</sub> mg <sub>εκχυλίσματος</sub> /ml <sub>διαλύτη</sub>	TPC mg <sub>GAE</sub> /g <sub>εκχυλίσματος</sub>	TFC mg <sub>Quef</sub> /g <sub>εκχυλίσματος</sub>
U-E.W	4,42	216,92	52,43
U-H	7,26	19,80	22,38

*Πίνακας 17: Ποσοτική ανάλυση ιδιοτήτων των δειγμάτων εκχύλισης με Υπέρηχους*

Τα εκχυλίσματα με τη χρήση υπερήχων παρουσίασαν καλή αντιοξειδωτική δράση και παραπλήσια με αυτή των εκχυλισμάτων της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet, και εκχύλισης μικροκυμάτων.

Καθώς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος U-E.W είναι αρκετά υψηλό, το τελευταίο φαίνεται να έχει μεγάλη απόκλιση σε σχέση το δείγμα U-H με διαλύτη το εξάνιο. Αυτό πάλι ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα U-E.W περιέχει στο διαλύτη του 30% περιεκτικότητα σε νερό που εκχυλίζει πολυφαινολικές ενώσεις (πολικότερες ενώσεις).

Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα του δείγματος MW-E.W, ομοίως το δείγμα U-E.W που χρησιμοποιεί τον ίδιο διαλύτη αιθανόλης-νερού φαίνεται να εκχύλισε βαριές ενώσεις, όπως οι ταννίνες και τα σάκχαρα. Η πολυφαινολική χρήση αυτών έδωσε στο δείγμα καλά αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης και πολύ υψηλό ολικό φαινολικό και φλαβονοειδές περιεχόμενο.

Η μέθοδος αυτή ωστόσο φαίνεται να είναι πιο ήπια προς το δείγμα καθώς και οι τρεις τιμές των ιδιοτήτων του εκχυλίσματος βγήκαν μικρότερες από αυτές των μικροκυμάτων. Το τελευταίο

δηλώνει ότι ήταν λιγότερο αποτελεσματική η εκχύλιση αλλά λιγότερο θερμικά επεμβατική ως προς το δείγμα.

### III-2.3.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων

Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης για τα δείγματα της εκχύλισης με υπέρηχους δίνονται στον Πίνακα\_18, στον οποίο αναφέρονται οι βασικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και η αντίστοιχη περιεκτικότητά τους. Οι λεπτομερείς πίνακες της ανάλυσης βρίσκονται στο Παράρτημα (κεφάλαιο VII).

U-E.W	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	39.28 %
Camphor	10.24 %
β-Caryophyllene	6.34 %
Viridiflorol	7.15 %
Manool	15.38 %
Waxes - Higher Alkanes	7.30 %

*Πίνακας 18: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος U-E.W με χρήση GC-MS*

Αντίστοιχα με το δείγμα U-E.W, από τον Πίνακα\_18 παρατηρείται ένα υψηλό ποσοστό εκχύλισης 1,8-Κινεόλης και σημαντικά ποσοστά Καμφοράς και Μανούλης. Όπως και με την περίπτωση των μικροκυμάτων, στην εκχύλιση με υπέρηχους οι περισσότερες από τις ενώσεις που εκχυλίζονται έχουν φαινολικούς δακτυλίους, αποδίδουν ένα σημαντικό φαινολικό και φλαβονοειδές φορτίο στο δείγμα.

U-H	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	12.41%
Camphor	7.29 %
γ-Gurjunene	7.38 %
Manool	29.19 %
Waxes - Higher Alkanes	43.37 %

*Πίνακας 19: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος U-H*

Το δείγμα U-H της εκχύλισης με διαλύτη εξάνιο φαίνεται να δίνει ένα μεγάλο ποσοστό σε άπολες ενώσεις, όπως τα κεριά και τα βαριά αλκάνια. Ταυτόχρονα, εκχυλίζονται και μερικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και σε προηγούμενα δείγματα, όπως η 1,8-Κινεόλη, η Καμφορά και η Μανούλη.

### III-2.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από Πίεση

Το πείραμα της εκχύλισης υπό πίεση εκτελέστηκε από το προσωπικό της Arivita στον τομέα βιομηχανικής παραγωγής.

Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν 1500g διαλύτη αιθανόλης – νερού (70:30) και 60g αλεσμένου δείγματος (425nm). Η διεργασία διήρκησε 363 λεπτά, δηλαδή 6 ώρες και 3 λεπτά.

#### III-2.4.1 Σύγκριση - Αποδόσεις

Τα χαρακτηριστικά της εκχύλισης υπό πίεση φαίνονται στον Πίνακα\_20.

	Αναλογία Δ:δ (w/w)	Κύκλοι	Χρόνος απόσταξης	Συγκέντρωση [gκαθαρού_εκχυλίσματος/mlδιαλύτη]
NT-E.W	25:1	33	363 min	0,0062 g/ml

*Πίνακας\_20: Συνθήκες και αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης υπό πίεση*

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε πως η αναλογία δείγματος-διαλύτη 25:1 είναι όμοια με αυτή της εκχύλισης των μικροκυμάτων και υπερήχων. Ωστόσο, παρατηρείται ότι ο χρόνος που απαιτήθηκε για την εκχύλιση ήταν οκταπλάσιος σε σχέση με τις δύο άλλες εκχυλίσεις (μικροκυμάτων και υπερήχων).

#### III-2.4.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων

Τα ποσοτικά αποτελέσματα των ιδιοτήτων της εκχύλισης υπό πίεση φαίνονται στον Πίνακα\_21.

	IC <sub>50</sub> mg <sub>εκχυλίσματος</sub> /ml <sub>διαλύτη</sub>	TPC mg <sub>GAE</sub> /g <sub>εκχυλίσματος</sub>	TFC mg <sub>Queri</sub> /g <sub>εκχυλίσματος</sub>
NT-E.W	0,31	133,60	47,52

*Πίνακας\_21: Ποσοτική ανάλυση δειγμάτων εκχύλισης υπό πίεση*

Από τον παραπάνω πίνακα γίνεται φανερό, ότι η αντιοξειδωτική δράση βρίσκεται σε πολύ υψηλό επίπεδο, καθώς το IC<sub>50</sub> έχει πολύ χαμηλή τιμή, τη χαμηλότερη από όλα τα δείγματα που έχουν προηγηθεί και από αυτά που θα ακολουθήσουν στη συνέχεια. Επιπλέον παρατηρείται ότι τα ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή παρουσιάζουν ένα αρκετά καλό περιεχόμενο.



### III-2.4.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων

Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης του δείγματος από την εκχύλιση υπό πίεση, δίνεται παρακάτω στον Πίνακα\_22, όπου εμφανίζονται οι βασικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και η αντίστοιχη περιεκτικότητά τους.

NT-E.W	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	31.20 %
Camphor	6.10 %
β-Caryophyllene	5.90 %
γ-Gurjunene	6.70 %
Manool	37.39 %

*Πίνακας 22: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος NT-E. W με χρήση GC-MS*

Στον ανωτέρω πίνακα παρατηρείται ένα πολύ μεγάλο ποσοστό εκχύλισης σε 1,8-Κινεόλη (γεγονός που είναι αναμενόμενο) και Μανούλη. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε Μανούλη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα πιθανώς να συνδέεται και με την ιδιαίτερα υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

### III-2.5 Συμβατική Υδροαπόσταξη (HD)

Για την υδροαπόσταξη χρησιμοποιήθηκαν 58g μερικώς αλεσμένου δείγματος (επίπεδο mm), και 600ml απιονισμένο νερό. Η επιθυμητή αναλογία δείγματος – Διαλύτη ήταν 1:10.

Η απόσταξη διήρκησε 245 λεπτά, δηλαδή περίπου 4 ώρες, μέχρι να σταματήσει να αυξάνεται ο όγκος του ελαίου στην προχοΐδα, *Εικόνα\_22*. Η θερμοκρασία των ατμών πάνω από τη σφαιρική φιάλη ήταν σταθερή στους 99 °C, καθ' όλη τη διάρκεια της απόσταξης.

Τέλος, μετρήθηκαν περίπου 0,3ml αιθέριου ελαίου, τα οποία συλλέχθηκαν με σύριγγα σε φιαλίδιο και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη.



*Εικόνα 22: Προχοΐδα με 0,25ml ελαίου κατά την διάρκεια της υδροαπόσταξης*

### III-2.5.1 Σύγκριση - Αποδόσεις

Για αναλογία δείγματος - διαλύτη 1:10 συλλέχθηκαν 3ml, επομένως η απόδοση ελαίου ως προς το δείγμα ήταν 0,5% v/w.

Επίσης η μάζα του ελαίου ήταν 2,43g άρα και η απόδοση της ανάκτησης αιθέριου ελαίου με υδροαπόσταξη ήταν 4,19% w/w.

	Αναλογία Δ:δ v/w	Χρόνος απόσταξης	Συγκέντρωση [gκαθαρού εκχυλίσματος /mlδιαλύτη]	Απόδοση απόσταξης w/w
HD-W	10:1	245min	0,00980 g/ml	4,19 %

*Πίνακας 23: Συνθήκες και αποτελέσματα πειραμάτων συμβατικής υδροαπόσταξης*

Η απόδοση της υδροαπόσταξης ήταν ιδιαίτερα χαμηλή γεγονός που ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με την βιβλιογραφία [39]. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς στην απόδοση συμπεριλάβαμε το βάρος του αιθέριου ελαίου που συλλέξαμε το οποίο αποτελείται από ελαφριές μη πολικές ενώσεις οι οποίες παρασύρθηκαν μαζί με τους πολικούς ατμούς του νερού.

### III-2.5.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων

Τα ποσοτικά αποτελέσματα των ιδιοτήτων της υδροαπόσταξης φαίνονται στον Πίνακα\_24.

	IC <sub>50</sub> mgεκχυλίσματος/mlδιαλύτη	TPC mgGAE/gεκχυλίσματος	TFC mgQuerc/gεκχυλίσματος
HD-W	143,13	2,57	0,02

Πίνακας\_24: Ποσοτική ανάλυση δειγμάτων συμβατικής Υδροαπόσταξης

Η ανάλυση του αιθέριου ελαίου της υδροαπόσταξης ως προς τις ιδιότητες του έδωσε πολύ φτωχά αποτελέσματα σε σχέση με τα δείγματα των υπολοίπων μεθόδων.

### III-2.5.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων

Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης του ελαίου της υδροαπόσταξης δίνεται παρακάτω στον Πίνακα\_, όπου εμφανίζονται οι βασικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και η αντίστοιχη περιεκτικότητά τους.

HD-W	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	31.65 %
Camphor	14.42 %
Viridiflorol	6.75 %

Πίνακας\_25: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος HD-W με χρήση GC-MS

Για μία ακόμα φορά, ένα πολύ μεγάλο ποσοστό 1,8-Κινεόλης εκχυλίζεται ενώ παράλληλα εμφανίζεται σημαντική ποσότητα σε Καμφορά και σε Viridiflorol.

### III-2.6 Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (SFE)

Για τα πειράματα της υπερκρίσιμης εκχύλισης τοποθετούνταν σε κελί εκχύλισης 40g αλεσμένου δείγματος (100nm-425nm) μαζί με πληρωτικό υλικό. Στη συνέχεια για κάθε ένα από τα πειράματα του Πίνακα\_26 γινόταν η κατάλληλη προθέρμανση της συσκευής (warm up) στις ενδεικνύμενες συνθήκες εκάστου πειράματος. Μετά την εκκίνηση της εκχύλισης και ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν παραλαβή δείγματος (αιθέριου ελαίου και κεριών) και προσωρινή διακοπή διαδικασίας εκχύλισης για να γίνει η μέτρηση απωλειών μάζας στο δείγμα. Οι πίνακες των μετρήσεων αυτών παρατίθενται αναλυτικά στο Παράρτημα (Κεφάλαιο VII). Τέλος, τα αιθέρια έλαια που προέκυψαν από κάθε εκχύλιση φυλάχθηκαν στην κατάψυξη σε αεροστεγές φιαλίδιο.

### III-2.6.1 Σύγκριση - Αποδόσεις

Τα πειράματα που διεξήχθησαν έδωσαν τις αποδόσεις του Πίνακα\_26 που ακολουθεί.

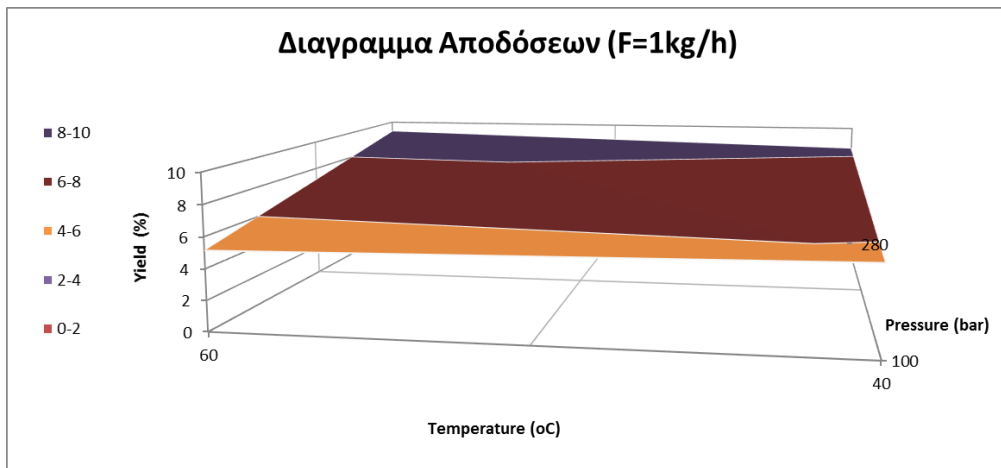
A/A	Κωδικός	T (°C)	P (bar)	F (kg/h)	Συνδιαλύτης [αιθανόλη]	Απόδοση (%) w/w
Πείραμα 1	<b>SC.40.100.1</b>	40	100	1	0 %	5,67
Πείραμα 2	<b>SC.60.100.1</b>	60	100	1	0 %	5,15
Πείραμα 3	<b>SC.40.280.1</b>	40	280	1	0 %	8,27
Πείραμα 4	<b>SC.60.280.1</b>	60	280	1	0 %	9,17
Πείραμα 5	<b>SC.40.100.3</b>	40	100	3	0 %	7,30
Πείραμα 6	<b>SC.60.100.3</b>	60	100	3	0 %	6,14
Πείραμα 7	<b>SC.40.280.3</b>	40	280	3	0 %	8,04
Πείραμα 8	<b>SC.60.280.3</b>	60	280	3	0 %	10,25
Πείραμα 9	<b>SC.50.190.2a</b>	50	190	2	0 %	8,25
Πείραμα 10	<b>SC.50.190.2b</b>	50	190	2	0 %	8,10
Πείραμα 11	<b>SC.50.190.2c</b>	50	190	2	0 %	7,79
Πείραμα 12	<b>SC.50.190.2d</b>	50	190	2	0 %	8,20
Πείραμα 13	<b>SC.5%E.50.190.2</b>	50	190	2	5 %	8,60
Πείραμα 14	<b>SC.10%E.50.190.2</b>	50	190	2	10 %	8,90

Πίνακας 26: Συνθήκες και αποδόσεις πειραμάτων υπερκρίσιμης εκχύλισης

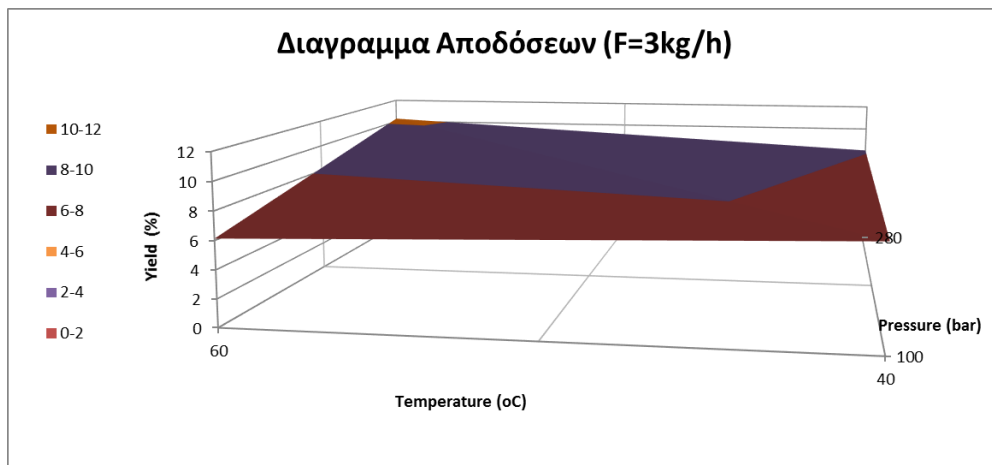
\* Τα πειράματα 13 και 14 πραγματοποιήθηκαν μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης με καθαρό CO<sub>2</sub> των πειραμάτων 11 και 12 αντίστοιχα, για 2 ακόμη ώρες. Οι αποδόσεις που προκύπτουν στα πειράματα 13 & 14 είναι οι ολικές αποδόσεις: των πειραμάτων 11 & 12 και των επόμενων 2 ωρών με συνδιαλύτη.

Με μία πρώτη ματιά παρατηρείται ότι με την αύξηση της πίεσης και σε ορισμένες περιπτώσεις με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται και η απόδοση (πχ. στα 100 bar μειώνεται, ενώ στα 280 αυξάνεται). Περισσότερο έχει να κάνει με το ποιος παράγοντας επικρατεί, η πυκνότητα του CO<sub>2</sub> ή η τάση ατμών των προς εκχύλιση ουσιών. Παράλληλα, στα πειράματα που συνεχίστηκαν με την προσθήκη συνδιαλύτη, παρά τη φαινομενικά ολοκληρωμένη εκχύλιση, συνεχίζουν οι απώλειες μάζας.

Για την καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων σχεδιάστηκαν τα ακόλουθα τρισδιάστατα διαγράμματα που περιγράφουν την εξάρτηση της απόδοσης από την πίεση και τη θερμοκρασία σε δεδομένη ροή.



Διάγραμμα\_3: Τρισδιάστατη απεικόνιση απόδοσης συναρτήσει πίεσης και θερμοκρασίας (σταθερή παροχή διαλύτη 1 kg/h)



Διάγραμμα\_4: Τρισδιάστατη απεικόνιση απόδοσης συναρτήσει πίεσης και θερμοκρασίας (σταθερή παροχή διαλύτη 3 kg/h)

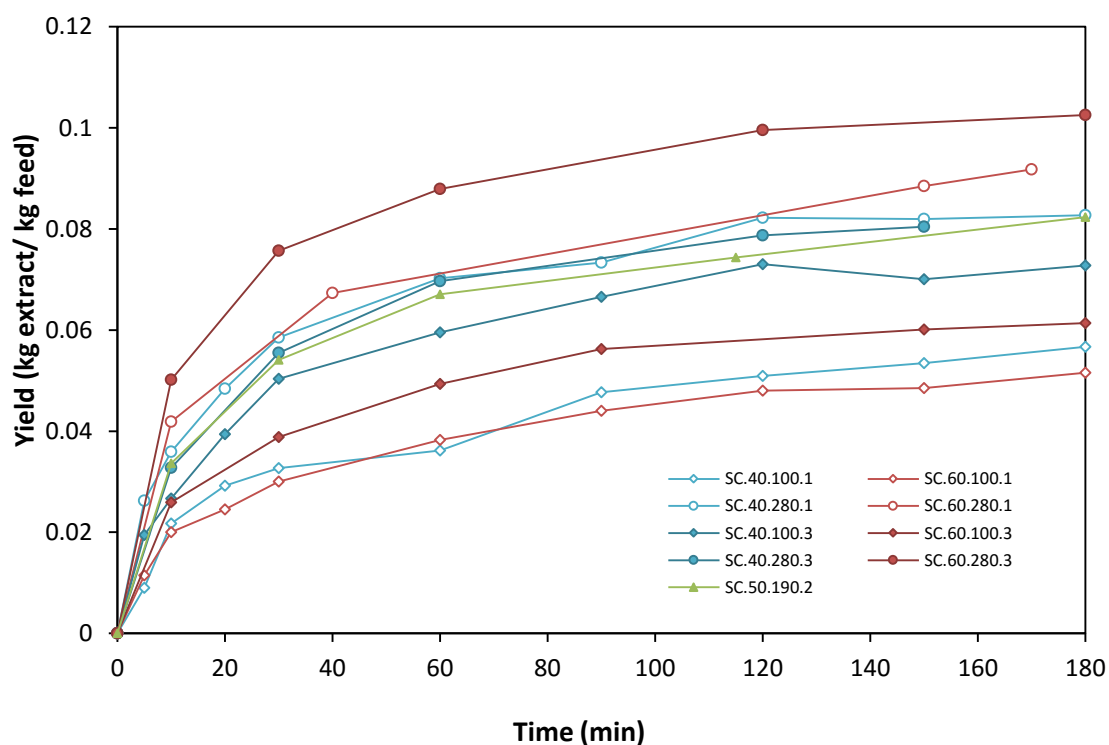
Στα ανωτέρω διαγράμματα η χρωματική διαβάθμιση απεικονίζει τα διαφορετικά επίπεδα τιμών για την απόδοση της εκχύλισης. Από αυτά μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα: η παροχή διαλύτη έχει μία επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης, όχι όμως τόσο μεγάλη όσο η πίεση και η θερμοκρασία. Μεταξύ πίεσης και θερμοκρασίας, ενώ η αύξηση της πίεσης έχει πάντα θετική επίδραση στην απόδοση, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, η αύξηση της θερμοκρασίας δε συνεπάγεται πάντα και αύξηση της απόδοσης. Για παράδειγμα, στο Διάγραμμα\_4 φαίνεται μία σημαντική καμπή μεταξύ των συνθηκών 40-50°C και 100-190 bar (καφέ και μπλε).

Σε αντίθεση με πριν, τα επόμενα δισδιάστατα διαγράμματα παρουσιάζουν την εξέλιξη εκχύλισης του κάθε πειράματος όπου οι πειραματικές συνθήκες του καθενός κωδικοποιούνται με διαφορετικό χρώμα και σήμανση κόμβων. Η κωδικοποίηση αυτή είναι η εξής:

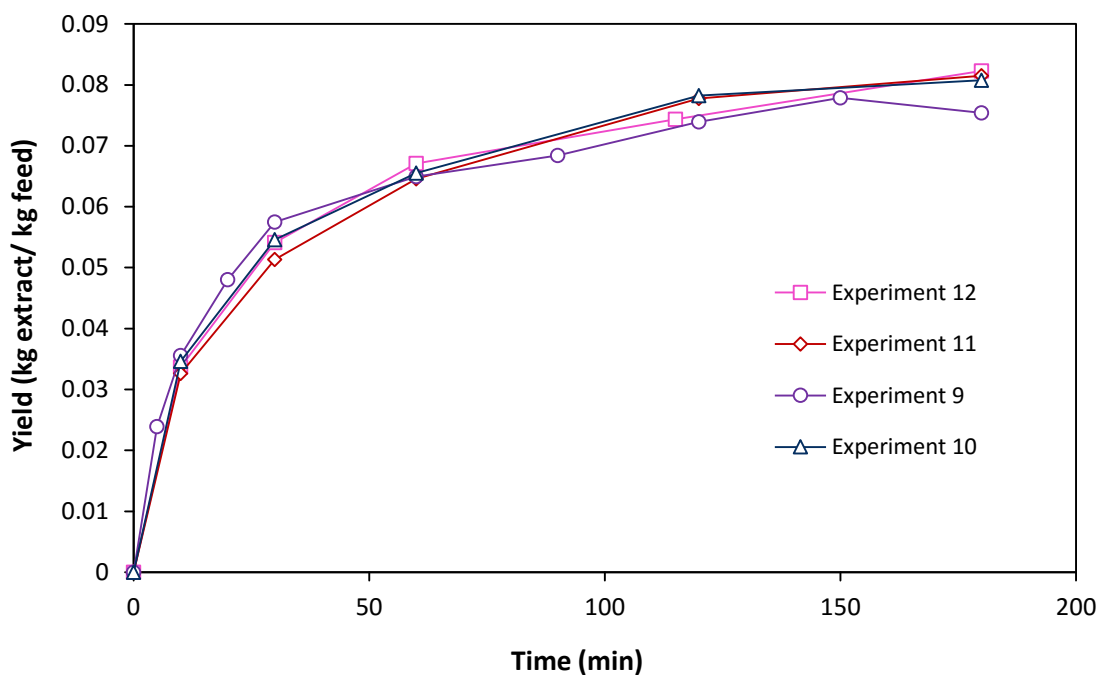
Κόμβος	Πίεση	Γέμισμα	Παροχή	Χρώμα	Θερμοκρασία
Κύκλος	100bar	OXI	1kg/h	Μπλε	40 °C
Τετράγωνο	280bar	NAI	3kg/h	Κόκκινο	60 °C
Τρίγωνο – NAI - Πράσινο			190bar – 2kg/h - 50 °C		

Πίνακας 27: Κωδικοποίηση κόμβων και καμπυλών των διαγραμμάτων υπερκρίσιμης εκχύλισης

Αρχικά, παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η εξέλιξη απόδοσης όλων των πειραμάτων μέχρι τη συμπλήρωση 180 λεπτών εκχύλισης (Διάγραμμα 5<sup>α</sup>). Πιο αναλυτικά, τα διαγράμματα παρατίθενται με ειδικότερες συγκρίσεις μεταξύ των καμπυλών στο Παράρτημα (Κεφάλαιο VII).



Διάγραμμα 5α: Συγκεντρωτική εξέλιξη απώλειας μάζας όλων των πειραμάτων



Διάγραμμα\_5β: Σύγκριση πειραμάτων βάσης για την οπτική διάκριση του σφάλματος

Το πείραμα βάσης **SC.50.190.2** επαναλήφθηκε συνολικά τέσσερις φορές (Experiments 9-12) για τον προσδιορισμό του πειραματικού σφάλματος (Διάγραμμα\_5β). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η τυπική απόκλιση των μετρήσεων ήταν  $\pm 0,18$ , που αντιστοιχεί σε μέσο σφάλμα  $\pm 2.2$  %.

### III-2.6.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων

Τα ποσοτικά αποτελέσματα των ιδιοτήτων της υπερκρίσιμης εκχύλισης φαίνονται στον Πίνακα\_28.

	IC <sub>50</sub> [mg <sub>εκεχυλίσματος</sub> / ml <sub>διαλύτη</sub> ]	TPC [mg <sub>GAE</sub> /g <sub>εκεχυλίσματος</sub> ]	TFC [mg <sub>Querc</sub> /g <sub>εκεχυλίσματος</sub> ]
SC.50.190.2-2	6,62	16,31	0,35
SC.5%E.50.190.2-1	0,43	145,59	15,59
SC.5%E.50.190.2-2	0,42	129,47	13,85
SC.10%E.50.190.2-1	0,54	144,88	-
SC.10%E.50.190.2-2	0,40	175,20	-

Πίνακας\_28: Ποσοτική ανάλυση δειγμάτων Υπερκρίσιμης εκχύλισης

\*Τα δείγματα **SC.10%E.50.190.2-1** και **SC.10%E.50.190.2-1** δεν εξετάστηκαν ως προς το φλαβονοειδές περιεχόμενο.

Αρχικά το δείγμα **SC.50.190.2-2** που αφορά το αιθέριο έλαιο της υπερκρίσιμης εκχύλισης έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης (6,62 mg<sub>εκχυλίσματος</sub>/ ml<sub>διαλύτη</sub>) ειδικά σε σχέση με αυτό του ελαίου της υδροαπόσταξης (143,13 mg<sub>εκχυλίσματος</sub>/ ml<sub>διαλύτη</sub>).

Παράλληλα τα δείγματα **SC.E.50.190.2-1**, **SC.E.50.190.2-2** της υπερκρίσιμης εκχύλισης προέκυψαν στη συνέχεια της εκχύλισης του δείγματος **SC.50.190.2-2**, με προσθήκη αιθανόλης ως συνδιαλύτη. Τα αποτελέσματα αντιοξειδωτικής τους δράσης έδωσαν υποδεκαπλασιασμό του IC<sub>50</sub>, άρα και πολύ μεγαλύτερη δράση από το δείγμα **SC.50.190.2-2**. Αντίστροφα, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο δεκαπλασιάστηκε σε σχέση με του **SC.50.190.2-2**.

Ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι κατά το Πείραμα II το δείγμα είχε ήδη «απογυμνωθεί» από τα άπολα συστατικά του (με μία ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση) και ότι για τα δείγματα **SC.5%E.50.190.2-1** και **SC.5%E.50.190.2-2** ακολούθησε εκχύλιση 2 ακόμα ωρών με συνδιαλύτη αιθανόλη (5%).

Αντίστοιχα, και τα δείγματα **SC.10%E.50.190.2-1** και **SC.10%E.50.190.2-2** με συνδιαλύτη αιθανόλη (10%) εμφανίζουν κοινά αποτελέσματα, γεγονός που σημαίνει ότι η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε συνδιαλύτη δε βελτιώνει τις χημικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων.



### III-2.6.3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων

Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης των δειγμάτων της υπερκρίσιμης εκχύλισης δίνεται παρακάτω στους Πίνακες\_29-34, όπου εμφανίζονται οι βασικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και η αντίστοιχη περιεκτικότητά τους.

➤ Υπερκρίσιμη εκχύλιση - Πείραμα 1 {40°C, 100bar, 1kg/h - (1): 80bar}

SC.40.100.1-1	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
Camphor	5.01 %
β-Caryophyllene	8.49 %
Viridiflorol	12.32 %
Manool	36.11 %
Waxes - Higher Alkanes	18.05 %

Πίνακας\_29: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος SC.40.100.1-1 με χρήση GC-MS

➤ Υπερκρίσιμη εκχύλιση - Πείραμα 1 {40°C, 100bar, 1kg/h - (2): 15bar}

SC.40.100.1-2	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	9.50 %
Camphor	7.54 %
β-Caryophyllene	8.28 %
Viridiflorol	9.53 %
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	8.21 %
Manool	33.18 %

Πίνακας\_30: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος SC.40.100.1-2 με χρήση GC-MS

➤ Υπερκρίσιμη εκχύλιση - Πείραμα 11 {50°C, 190bar, 2kg/h - (1): 80bar}

SC.50.190.1-1	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
Manool	25.51 %
Waxes - Higher Alkanes	54.98 %

Πίνακας\_31: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος SC.50.190.2-1 με χρήση GC-MS

➤ Υπερκρίσιμη εκχύλιση - Πείραμα 11 {50°C, 190bar, 2kg/h - (2): 15bar}

SC.50.190.1-2	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	32.36 %
Camphor	18.05 %
β-Caryophyllene	11.78 %
Viridiflorol	8.54 %
Manool	19.77 %

Πίνακας\_32: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος SC.50.190.2-2 με χρήση GC-MS

➤ Υπερκρίσιμη εκχύλιση - Πείραμα 8 {60°C, 280bar, 3kg/h - (1): 80bar}

SC.60.280.1-1	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
Viridiflorol	10.27 %
Manool	50.85 %
Waxes - Higher Alkanes	23.50 %

Πίνακας\_33: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος SC.60.280.3-1 με χρήση GC-MS

➤ Υπερκρίσιμη εκχύλιση - Πείραμα 8 {60°C, 280bar, 3kg/h - (2): 15bar}

SC.60.280.1-2	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	% Περιεκτικότητα
1,8-Cineole	15.37 %
Camphor	15.52 %
α-Terpineol	5.56 %
β-Caryophyllene	14.95 %
Viridiflorol	10.43 %
Manool	29.23 %

Πίνακας\_34: Ποιοτική ανάλυση βασικότερων συστατικών δείγματος SC.60.280.3-2 με χρήση GC-MS

Από τους παραπάνω πίνακες επιβεβαιώνεται η ύπαρξη κεριών στον πρώτο διαχωριστήρα και κλασμάτωσης αιθέριου ελαίου στο δεύτερο διαχωριστήρα. Συγκεκριμένα, στα δείγματα **SC.40.100.1-2**, **SC.50.190.2-2** και **SC.60.280.3-2** του δεύτερου διαχωριστήρα παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό κεριών σύμφωνα με τα ποιοτικά αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης.

Στα χαμηλά επίπεδα θερμοκρασίας, πίεσης και παροχής εκχυλίζεται μεγάλο ποσοστό Μανούλης, ενώ στα μεσαία, εκτός από Μανούλη, εκχυλίζεται και ένα μεγάλο ποσοστό 1,8-Κινεόλης. Στα υψηλά επίπεδα συνθηκών ενδιαφέρον παρουσιάζει το δείγμα **SC.60.280.3-2** που εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό Μανούλης και ανήκει στο κλάσμα κεριών.

## III-3 Σύνοψη Αποτελεσμάτων - Σχολιασμός

### III-3.1 Αποδόσεις Εκχυλίσεων

Ένα σημαντικό κριτήριο για την αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου εκχύλισης αποτελεί η επί τις % τελική απόδοση της - η μέγιστη δηλαδή απόδοση που μπορεί να επιτύχει. Τα αποτελέσματα τελικών αποδόσεων φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα\_35.

Σημείωση: Κάθε μέθοδος, από αυτές που εξετάστηκαν στηρίζεται και σε διαφορετική αρχή εκχύλισης, επομένως για να είναι συγκρίσιμα και τα αποτελέσματα έγινε η προσπάθεια στις μεθόδους να υπάρχουν ορισμένες σταθερές συνθήκες και όμοιες παραδοχές.

<i>Μέθοδος Εκχύλισης</i>	<i>Κωδικός</i>	<i>Απόδοση</i>
Συμβατική εκχύλιση Soxhlet	Sx-H	5,90% w/w
Εκχύλιση με υπέρηχους	U-H	10,05% w/w
Υδροαπόσταξη	HD-W	4,19% w/w
Υπερκρίσιμη εκχύλιση	SC.60.280.3	10,25% w/w
Συμβατική εκχύλιση Soxhlet	Sx-E	30,60% w/w
Εκχύλιση με υπέρηχους	U-E.W	24,50% w/w
Εκχύλιση με μικροκύματα	MW-E.W	27,59% w/w
Υπερκρίσιμη εκχύλιση	SC.5%E.50.190.2	8,60% w/w
Υπερκρίσιμη εκχύλιση	SC.10%E.50.190.2	8,90% w/w

*Πίνακας 35: Αποδόσεις εκχυλίσεων - w/w*

Όπως αναλύθηκε και προηγουμένως στα επιμέρους αποτελέσματα, μεγαλύτερη απόδοση φαίνεται να δίνει η *συμβατική εκχύλιση Soxhlet* και η «πράσινη» *εκχύλιση με μικροκύματα*, εμφανίζοντας αποδόσεις 30% w/w και 27,59% w/w αντίστοιχα.

Από την άλλη πλευρά τη μικρότερη απόδοση είχε, όπως αναμενόταν, η *υδροαπόσταξη* καθότι με την τεχνική αυτή ανακτάται μόνον το αιθέριο έλαιο.

### III-3.2 Χημικές Ιδιότητες Δειγμάτων

#### III-3.2.1 Αντιοξειδωτική Δράση

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα  $IC_{50}$  των φωτομετρήσεων, για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων (Πίνακας\_36).

Μέθοδος	Δείγμα	Δράση $IC_{50}$ [mg <sub>εκχυλίσματος</sub> /ml <sub>διαλύτη</sub> ]
Εκχύλιση Soxhlet	Sx-E_1	4,00
Εκχύλιση Soxhlet	Sx-H_1	10,01
Εκχύλιση Υπερήχων	US-E.W	4,42
Εκχύλιση Υπερήχων	US-H	7,25
Εκχύλιση Μικροκυμάτων	MW-E.W	4,26
Εκχύλιση υπό Πίεση	NT-E.W	0,31
Υδροαπόσταξη	HD-W	143,13
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-50.190.2-2	6,62
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-5%E.50.190.2-1	0,43
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-5%E.50.190.2-2	0,42
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-10%E.50.190.2-1	0,54
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-10%E.50.190.2-2	0,40

Πίνακας 36: Αντιοξειδωτική  $IC_{50}$  δράση των δειγμάτων σε mg<sub>εκχυλίσματος</sub>/ml<sub>διαλύτη</sub>

Για μικρές τιμές  $IC_{50}$  έχουμε μεγάλη αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα\_36 φαίνεται πως μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχουν τα δείγματα με χρήση διαλύτη αιθανόλης και αιθανόλης - νερού (70:30). Δραστικότερο είναι το δείγμα NT-E.W της εκχύλισης υπό πίεση, καθώς και τα δείγματα SC-5%E.50.190.2 και SC-10%E.50.190.2 της υπερκρίσιμης εκχύλισης με συνδιαλύτη.

Ακολουθούν με σειρά δραστικότητας (σε mg<sub>εκχυλίσματος</sub>/ml<sub>διαλύτη</sub>) τα εξής δείγματα:

- Η συμβατική εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη αιθανόλη: [SX-E\_1] = 4,00
- Η εκχύλιση μικροκυμάτων με διαλύτη αιθανόλη και νερό: [MW-E.W] = 4,26
- Η εκχύλιση με υπέρηχους και διαλύτη αιθανόλη και νερό: [US-E.W] = 4,42
- Η υπερκρίσιμη εκχύλιση με διοξείδιο του άνθρακα: [SC-50.190.2-2] = 6,62

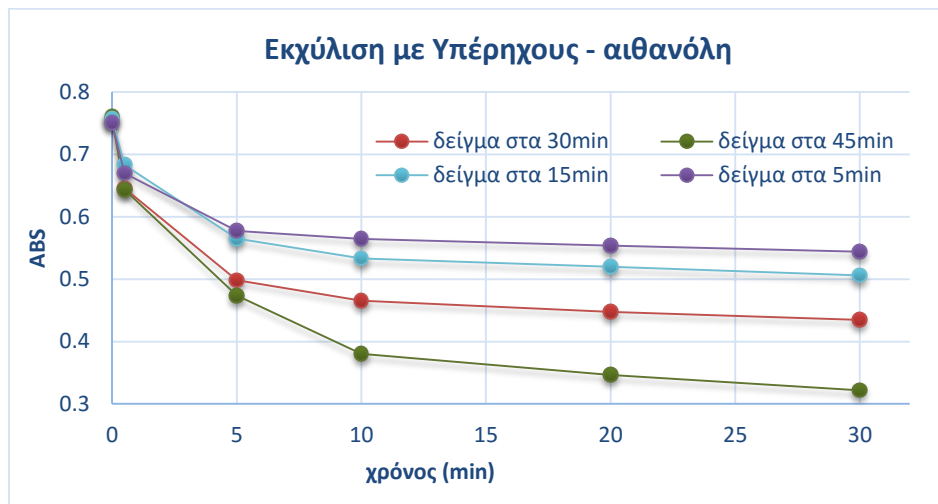
### ➤ Απόδοση Αντιοξειδωτικής Δράσης των δειγμάτων

Για κάποιες εκχυλίσεις είχε ενδιαφέρον να σημειωθεί και να συγκριθεί η πορεία της αντιοξειδωτικής δράσης. Εξετάστηκε λοιπόν η απορρόφηση των εκχυλισμάτων με το χρόνο - από 0 μέχρι 30 περίπου λεπτά. Η μέτρηση ξεκινούσε από τη στιγμή που έπεφτε η πρώτη σταγόνα δείγματος στο μίγματα με την ελεύθερη ρίζα (DPPH) μέχρι και την 50% εξουδετέρωση της.

Στη συνέχεια, ακολουθούν μερικές παρατηρήσεις που έγιναν κατά τη σύγκριση αυτή.

#### → Παρατήρηση #1:

Στο Διάγραμμα\_6 απεικονίζεται ένα κλασικό προφίλ της αντιοξειδωτικής δράσης από δειγμάτων που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Σ' αυτή τη περίπτωση εξετάζουμε τέσσερα δείγματα από τα πρώτα 5, 15, 30 και 45 λεπτά εκχύλισης με υπέρηχους.



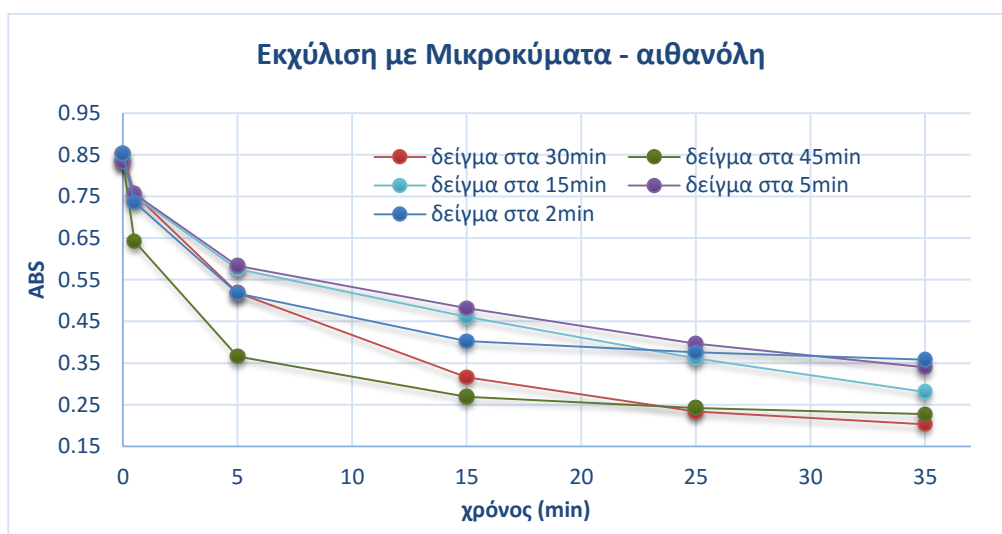
Διάγραμμα\_6: Απόδοση δράσης στα δείγματα της εκχύλισης με υπέρηχους και διαλύτη αιθανόλη

Δεδομένου ότι χρησιμοποιούμε ίδια ποσότητα και αραιώση στα δείγματα, μελετάμε τη διαφορετική δράση που δείχνουν πάνω στο διάλυμα ελεύθερης ρίζας. Όπως είναι και αναμενόμενο λοιπόν, καλύτερη δράση έχει το δείγμα στα 45 λεπτά εκχύλισης, στη συνέχεια αυτό στα 30, μετά στα 15 και τέλος στα 5 λεπτά.

Εύκολα συμπεραίνουμε, πως με το πέρας της εκχύλισης υπερήχων εκχυλίζεται και μεγαλύτερη ποσότητα αντιοξειδωτικών ενώσεων στον διαλύτη μας -αιθανόλη.

#### → Παρατήρηση #2:

Αντίστοιχα με το Διάγραμμα\_6, στο Διάγραμμα\_7 φαίνεται πως πάλι το εκχύλισμα αιθανόλης των 45 λεπτών ήταν το αποδοτικότερο στην αντιμετώπιση της ελεύθερης ρίζας.



Διάγραμμα 7: Απόδοση δράσης στα δείγματα της εκχύλισης με μικροκύματα και διαλύτη αιθανόλη

Εξίσου καλή δράση φαίνεται να παρουσιάζει το δείγμα από τα 30 λεπτά εκχύλισης -και με καλύτερη τελική απορρόφηση από αυτό των 45 λεπτών. Ακολουθούν με σειρά -ως προς την τελική απορρόφηση- τα εκχυλίσματα των 15, 5 και 2 λεπτών.

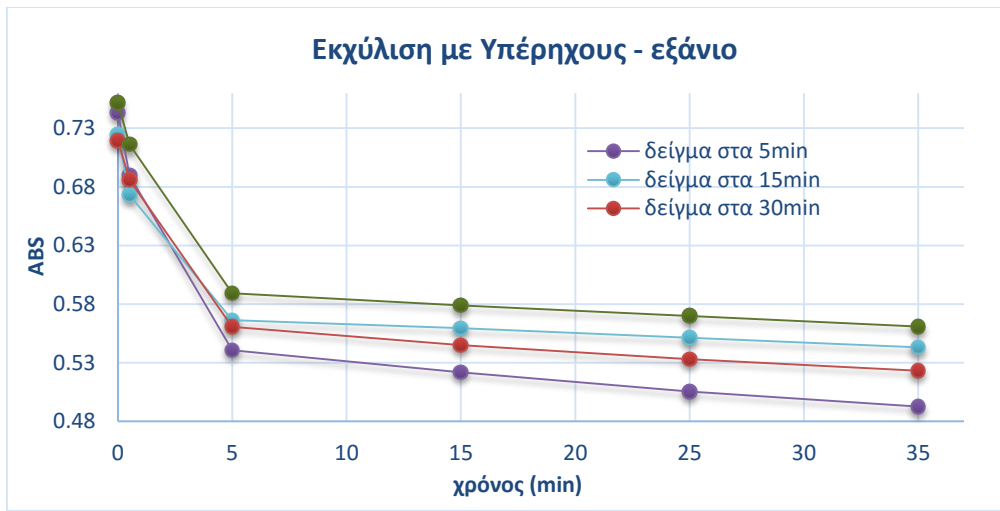
Ωστόσο, το δείγμα των 2 λεπτών εκχύλισης φαίνεται να έχει πιο απότομη καμπύλη απορρόφησης από τα δείγματα των 5 και 15 λεπτών. Αυτό σημαίνει πως το αντιοξειδωτικό της φορτίο δρα πιο άμεσα σε μια ελεύθερη ρίζα σε σχέση με το φορτίο αντιοξειδωτικών των δύο άλλων δειγμάτων.

Η καμπύλη των 2 λεπτών λοιπόν, είναι αυτή που διαφοροποιεί την συμπεριφορά των Διαγραμμάτων 10 & 11, και την κάνει να φαίνεται 'μη συμβατική'. Επίσης, η διαφορετική δράση των εκχυλισμάτων στα επόμενα λεπτά (>2min) πιθανώς να οφείλεται στο ότι κάποια πτητικά συστατικά των 2 λεπτών εκχύλισης είναι πιο ευαίσθητα, και καταστρέφονται στην πορεία της εκχύλισης -ίσως θερμικά-. Έτσι, τα εκχυλίσματα των επόμενων λεπτών (πχ. 15 και 30) δεν εμφανίζουν την ιδιότητα της άμεσης δράσης του αρχικού αντιοξειδωτικού φορτίου των 2 λεπτών.

### → Παρατήρηση #3:

Αντίστοιχα με τη προηγούμενη περίπτωση, και στο Διάγραμμα\_8 είναι εμφανές ότι εκχυλίζονται συστατικά με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση κατά τα πρώτα 5 λεπτά της εκχύλισης.

Στη συνέχεια, από την καμπύλη απορρόφησης των 15 λεπτών φαίνεται να προκύπτει μικρότερη εξουδετέρωση στο διάλυμα. Αυτό πάλι μπορεί να σημαίνει πως έχουμε απώλεια θερμοευαίσθητων αντιοξειδωτικών. Από την άλλη, ίσως η έντονη πτητικότητα του εξανίου να βοηθά στην απομάκρυνση των έντονα πτητικών συστατικών που εκχυλίστηκαν μέσα στα πρώτα 5 λεπτά, και που πιθανώς να είχαν καλή αντιοξειδωτική συμπεριφορά.

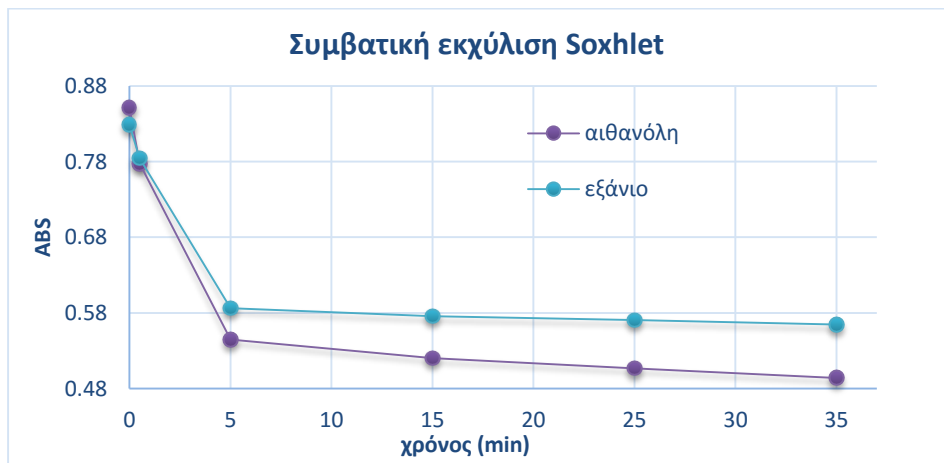


Διάγραμμα 8: Απόδοση δράσης στα δείγματα της εκχύλισης με υπέρηχους και διαλύτη εξάνιο

Παρόμοια είναι και η παρατήρηση για το δείγμα των 45 λεπτών εκχύλισης, που παραδόξως εμφανίζει την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση και από τα τέσσερα.

→ Παρατήρηση #4:

Ενδιαφέρον, αλλά αναμενόμενο αποτέλεσμα δείχνει και το Διάγραμμα\_9 για την αντιοξειδωτική δράση που δίνουν τα δύο εκχυλίσματα της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας.

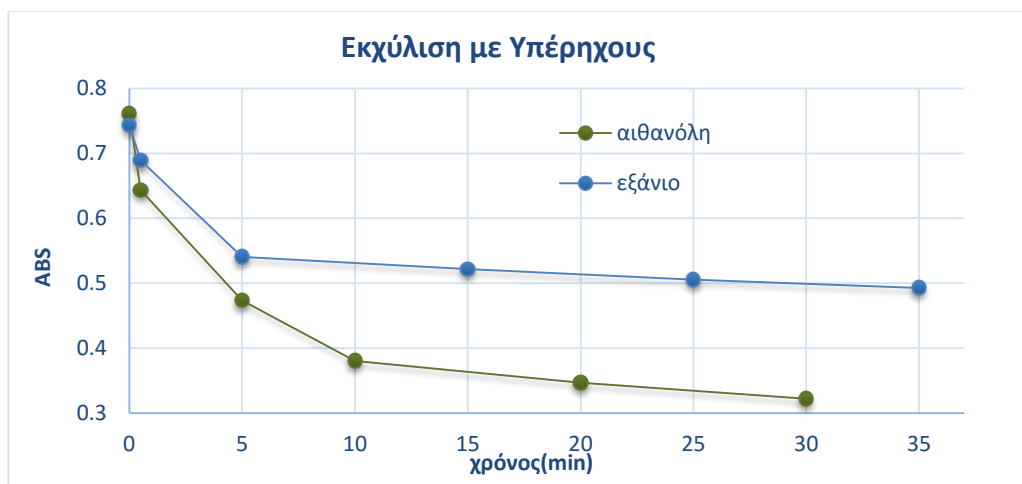


Διάγραμμα 9: Απόδοση δράσης των δύο διαλυτών στα δείγματα συμβατικής εκχύλισης Soxhlet

Παρόλο που στην αρχή δείχνουν να έχουν ίδιο ρυθμό εξουδετέρωσης, στην πορεία, η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος **Sx-E\_liquid** –με διαλύτη αιθανόλη- είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του **Sx-H\_liquid** –με διαλύτη το εξάνιο-.

→ Παρατήρηση #5:

Αντίστοιχα αναμενόμενο και όμοιο με το προηγούμενο είναι και το Διάγραμμα\_10, όπου έχουμε την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων με χρήση υπερήχων σε διαλύτες διαφορετικής πολικότητας.

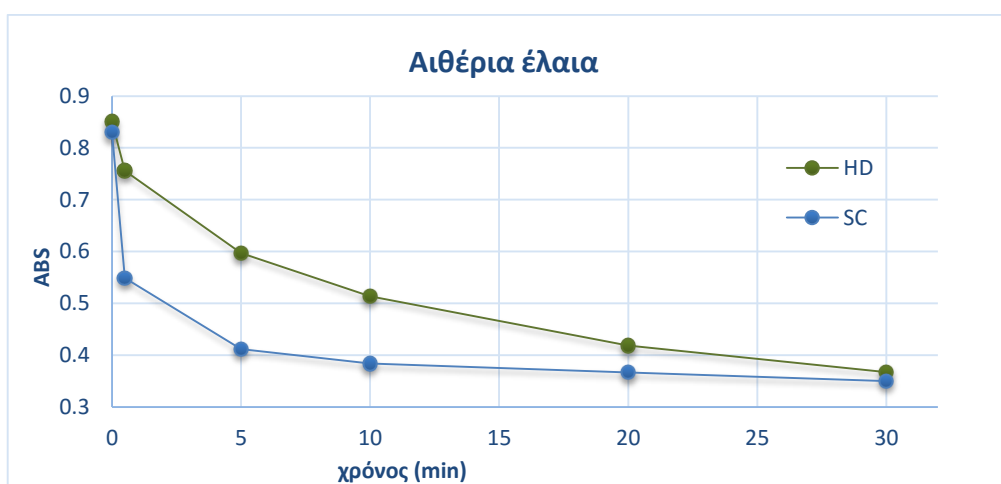


*Διάγραμμα 10: Απόδοση αντιοξειδωτικής δράσης των αιθέριων ελαίων*

Η διαφορά αντιοξειδωτικής εκχύλισης συστατικών με πολικότερο διαλύτη -όπως η αιθανόλη- είναι ακόμη πιο έντονη σ' αυτό το διάγραμμα.

→ Παρατήρηση #6:

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζουν και οι καμπύλες που προσεγγίζουν την τιμή  $IC_{50}$  για τα αιθέρια έλαια της υδροαπόσταξης και της υπερκρίσιμης εκχύλισης.



*Διάγραμμα 11: Απόδοση αντιοξειδωτικής δράσης των αιθέριων ελαίων*



Ενώ τα δείγματα εξουδετερώνουν στο ίδιο περίπου ποσοστό την ελεύθερη ρίζα, η αντιοξειδωτική δράση του αιθέριου ελαίου της υπερκρίσιμης εκχύλισης φαίνεται να έχει πολύ άμεση δράση και σε ένα μεγάλο ποσοστό

Η τελευταία παρατήρηση είναι σημαντική καθώς ένα τέτοιο εκχύλισμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε φάρμακα, στα οποία απαιτείται άμεση αντιοξειδωτική δράση.

### **III-3.2.2 Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο**

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων εκφράζεται παρακάτω σε  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{εκχυλίσματος}}$ , στον Πίνακα\_37.

Μέθοδος	Δείγμα	Δράση [ $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{εκχυλίσματος}}$ ]
Εκχύλιση Soxhlet	Sx-E_1	193,40
Εκχύλιση Soxhlet	Sx-H_1	72,42
Εκχύλιση Υπερήχων	U-E.W	216,92
Εκχύλιση Υπερήχων	U-H	19,80
Εκχύλιση Μικροκυμάτων	MW-E.W	300,89
Εκχύλιση υπό Πίεση	NT-E.W	133,60
Υδροαπόσταξη	HD-W	2,57
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-50.190.2-2	16,31
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-5%E.50.190.2-1	145,59
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-5%E.50.190.2-2	129,47
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-10%E.50.190.2-1	144,88
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-10%E.50.190.2-2	175,20

Πίνακας\_37: Αποτελέσματα Ολικού Φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων

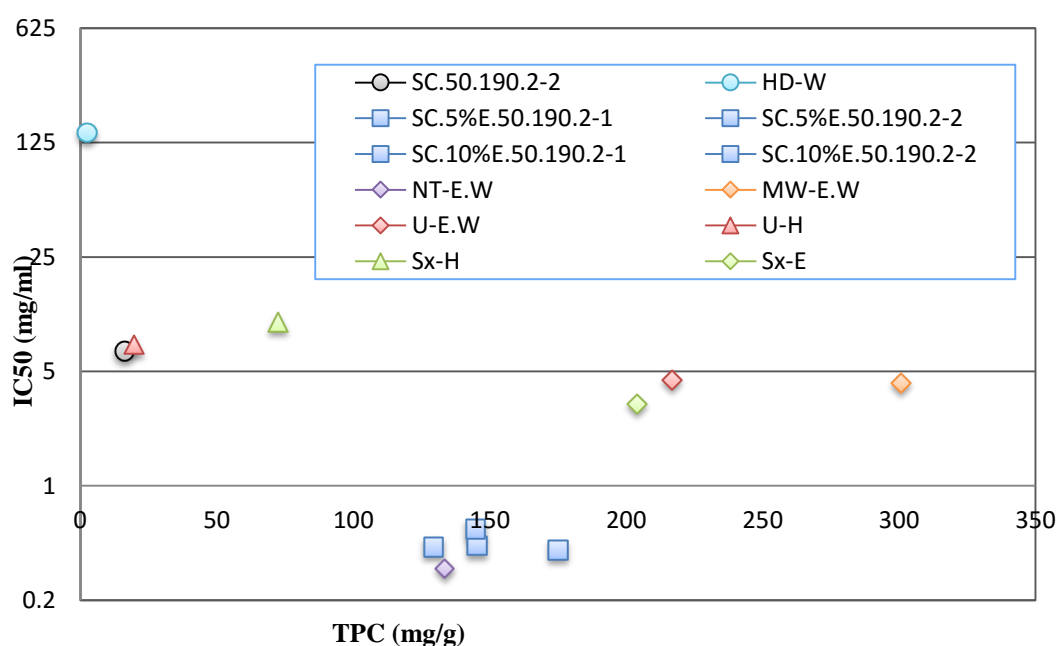
Τα καλύτερα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν (σε  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{εκχυλίσματος}}$ ):

- Η εκχύλιση μικροκυμάτων με διαλύτη αιθανόλη και νερό: [MW-E.W] = 300,89
- Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων και διαλύτη αιθανόλη και νερό: [US-E.W] = 216,92
- Η συμβατική εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη αιθανόλη: [SX-E\_1] = 193,40
- Η υπερκρίσιμη εκχύλιση με 10% συνδιαλύτη αιθανόλη: [SC-10%E.50.190.2-2] = 175,20
- Η εκχύλιση υπό πίεση με διαλύτη αιθανόλη και νερό: [NT-E.W] = 133,60

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η πολικότητα βοηθάει στην εκχύλιση των ολικών φαινολικών του δείγματος. Η αιθανόλη είναι από τους καλύτερους διαλύτες, και ο συνδυασμός της με το νερό δίνει το μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο.

### ➤ Συγκριτικά αποτελέσματα

Κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα τάσης, δηλαδή συγκριτικών χημικών ιδιοτήτων, αντιοξειδωτικής δράσης και ολικού φαινολικού περιεχομένου. Σκοπός του διαγράμματος αυτού ήταν η διευκόλυνση εξαγωγής αποτελεσμάτων για την σχέση αντιοξειδωτικής και βιολογικής (που στις βιβλιογραφίες αποδίδεται στις φαινολικές ενώσεις) δράσης σε συνδυασμό με την υπάρχουσα βιβλιογραφία [42]. Το διάγραμμα που προέκυψε παρουσιάζεται σε λογαριθμική κλίμακα (με βάση το 5) και βρίσκεται κατωτέρω.



Διάγραμμα 12: Τάση μεταξύ Αντιοξειδωτικής και Ολικής Φαινολικής δράσης

Διαπιστώθηκε ωστόσο ότι το Διάγραμμα\_12 δεν απέδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, ενώ παράλληλα δεν μπορούσαν να εξαχθούν ξεκάθαρα συμπεράσματα σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφία. Για το λόγο αυτό έγινε μία προσπάθεια ενσωμάτωσης ενός μαθηματικού εργαλείου, που με τη βοήθεια μαθηματικών συνθηκών προσδιορίζει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Το εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αρχή Ασθενούς Απόδοσης κατά Pareto (Weak Pareto Efficiency).

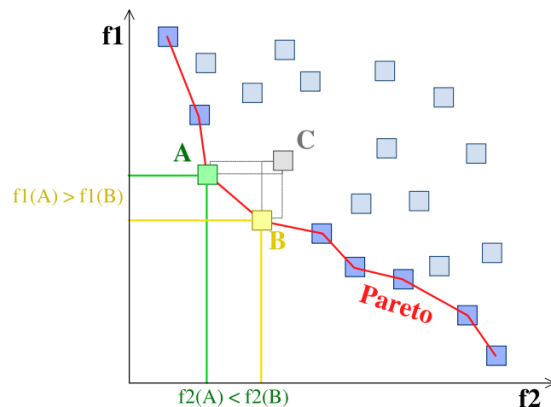
Σύμφωνα με αυτή την αρχή, σε μια κατανομή που το βέλτιστο (min ή max) δεν είναι ξεκάθαρο, γίνεται αποκλεισμός των σημείων που κυριαρχούνται από τα υπόλοιπα. Ανάλογα με το στόχο βελτιστοποίησης (μεγιστοποίηση – ελαχιστοποίηση) και για M πλήθος στόχων, έχουμε τις συνθήκες κυριαρχίας:

➤  $\vec{x}^{(i)} < \vec{x}^{(j)}$  , όταν  $\min \vec{F}(\vec{x})$ ,  $\vec{F}: \mathfrak{R}^N \rightarrow \mathfrak{R}^M$

➤  $\vec{x}^{(i)} > \vec{x}^{(j)}$  , όταν  $\max \vec{F}(\vec{x})$ ,  $\vec{F}: \mathfrak{R}^N \rightarrow \mathfrak{R}^M$

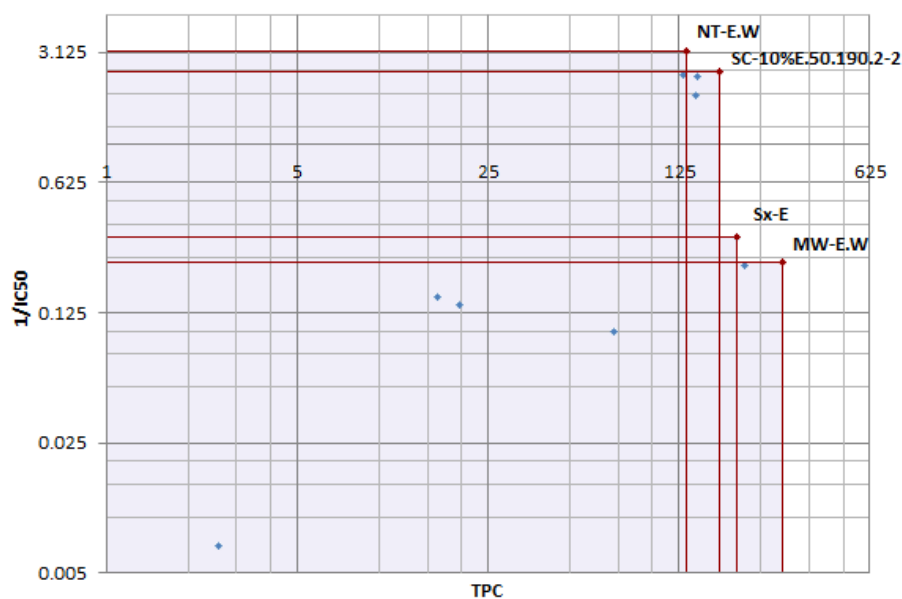
Σημείωση: οι δείκτες i και j προσδιορίζουν τις λύσεις και όχι τις επαναλήψεις.

Για παράδειγμα στο διπλανό σχήμα απαιτείται ταυτόχρονη δικριτηριακή ελαχιστοποίηση των παραμέτρων f1 και f2. Άρα, σύμφωνα και με τη συνθήκη  $\vec{x}^{(i)} < \vec{x}^{(j)}$ , τα επιθυμητά σημεία θα βρίσκονται κάτω αριστερά, καθώς η βελτιστοποίηση αυτής της διασποράς είναι και ελαχιστοποίηση. Με την επιλογή τέτοιων σημείων προκύπτει ένα (προσεγγιστικά) παραβολικό μέτωπο –μέτωπο Pareto- στο οποίο όλα τα σημεία είναι βέλτιστα, και κανένα δεν βρίσκεται σε καλύτερη (optimum) θέση σε σχέση με τα υπόλοιπα σημεία του μετώπου.[43]



Για τη διευκόλυνση καθορισμού των σημείων, κατασκευάζεται διάγραμμα όμοιο με το Διάγραμμα\_12, αλλά με άξονα y το:  $1/IC_{50}$ , καθώς βελτιστοποιούνται αντιστρόφως ανάλογα - καλή δράση στα υψηλά TPC και χαμηλά  $IC_{50}$ -. Επομένως τώρα ζητάμε δικριτηριακή μεγιστοποίηση (στα TPC και  $1/IC_{50}$ ), όπου τα δραστικότερα σημεία θα βρίσκονται προς την δεξιά και επάνω κατεύθυνση.

Η αρχή Ασθενούς Απόδοσης Pareto έρχεται να αποκλείσει όλα τα σημεία που βρίσκονται στην αντίθετη φορά (δηλ. κάτω και αριστερά), με αναφορά πάντα σημειακή. Για παράδειγμα, το σημείο NT-E.W αποκλείει όλα τα σημεία που βρίσκονται κάτω και αριστερά του. Αντίστοιχα και τα σημεία SC.10%E.50.190.2-2, Sx-E και MW-E.W. Μαζί τα τέσσερα αυτά σημεία αποτελούν το μέτωπο Pareto, και άρα τα τέσσερα βέλτιστα σημεία της διασποράς -εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και ολικό φαινολικό περιεχόμενο-. Τα αποτελέσματα της αρχής Pareto φαίνονται στο Διάγραμμα\_13, σε λογαριθμική κλίμακα για καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Διάγραμμα 13: Προσδιορισμός δείγματα με την καλύτερη ταυτόχρονα φαινολική και αντιοξειδωτική δράση (μέτωπο Pareto)

### III-3.2.3 Ολικό Φλαβονοειδές Περιεχόμενο

Τα αποτελέσματα του ολικού φλαβονοειδούς περιεχομένου των δειγμάτων, από τις φωτομετρήσεις δίνονται στον παρακάτω Πίνακα\_38.

Τα δείγματα που φαίνεται να είχαν την μεγαλύτερη φλαβονοειδή δράση ( $\text{mg}_{\text{Quer}}/\text{g}_{\text{εκχυλίσματος}}$ ) είναι:

- Η εκχύλιση μικροκυμάτων με διαλύτη αιθανόλη και νερό: [MW-E.W] = 70,01
- Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων και διαλύτη αιθανόλη και νερό: [U-E.W] = 52,43
- Η μη θερμική εκχύλιση με διαλύτη αιθανόλη: [NT-E.W] = 47,52
- Η συμβατική εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη αιθανόλη: [Sx-E\_1] = 42,61

Από τα αποτελέσματα πάλι, η αιθανόλη δείχνει να είναι καλός διαλύτης της εκχύλισης φλαβονοειδών ενώσεων.

Μέθοδος	Δείγμα	Δράση mg <sub>Querc</sub> /g <sub>εκχυλίσματος</sub>
Εκχύλιση Soxhlet	Sx-E_I	42,61
Εκχύλιση Soxhlet	Sx-H_I	18,55
Εκχύλιση Υπερήχων	U-E.W	52,43
Εκχύλιση Υπερήχων	U-H	22,38
Εκχύλιση Μικροκυμάτων	MW-E.W	70,01
Εκχύλιση υπό Πίεση	NT-E.W	47,52
Υδροαπόσταξη	HD-W	0,02
Υπερκρίσιμη	SC-50.190.2-2	0,35
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-5%E.50.190.2-1	15,59
Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	SC-5%E.50.190.2-2	13,85

Πίνακας\_38: Αποτελέσματα Ολικού Φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων

Επίσης, από τη σειρά δράσης των δειγμάτων, φαίνεται πως σημαντικό ρόλο παίζει και η πολικότητα των διαλυτών. Καθώς η πολικότητα αυξάνεται, αυξάνεται μαζί και η φλαβονοειδής δράση των εκχυλισμάτων. Ωστόσο, σε πολύ πολικούς διαλύτες, όπως το νερό, η δράση τους πέφτει σε πολύ μεγάλο βαθμό: [HD-W] = 0,02 mg<sub>Querc</sub>/g<sub>εκχυλίσματος</sub>

### III-3.3 Χημική Ανάλυση με GC-MS

Οι ενώσεις που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα στα δείγματα των πειραμάτων αυτής της έρευνας, δίνονται στον παρακάτω συνολικό πίνακα μαζί με την βιβλιογραφική αναφορά για το αιθέριο έλαιο του *Salvia fruticosa* [44]–[48].

Groups	Compounds	Bibliography HD	SK-E-I	SK-E-S	SK-H-I	SK-H-S	U-E-W	U-H	MW-E-W	NT-E	HD-W	SC.40.100.1-1	SC.40.100.1-2	SC.60.280.3-1	SC.60.280.3-2	SC.50.190.2-1	SC.50.190.2-2
Monoterpenes	$\alpha$ -Pinene	[1,38-5,80]			0.9		2.4			4.79	4.1						
	Camphene	[1,59-5,26]			0.6		1.9			4.01	3.9						
	$\beta$ -Pinene	[3,95-7,38]			1.4					1.89	2.6						
	Myrcene	[1,17-7,38]					2.3			2.2	4.0						2.4
	p-Cymene	[0,40-1,40]									2.4						
	$\gamma$ -Terpinene	[0,77-0,93]									0.4						
	1,8-Cineole	[15,70-58,89]	13.1		19.0	14.0	39.3	12.4	45.7	31.2	31.7	1.9	9.5	1.5	15.4		32.4
Oxygenated monoterpenes	Linalool	[0,00-0,58]			0.4						0.5						
	$\alpha$ -Thujone	[0,95-20,10]									1.6						
	$\beta$ -Thujone	[0,48-4,76]			7.4	10.3	10.2	7.3	15.7	6.1	14.4	5.0	7.5		15.5	0.3	18.1
	Camphor	[4,48-26,76]	5.4								2.1						
	Borneol	[1,64-8,91]									1.4	2.7	2.2				3.5
	L-Borneol										4.3	3.4	2.8		5.6		3.6
	$\alpha$ -Terpineol	[2,10-3,25]	1.0		2.0						1.0						
	Terpinen-4-ol	[0,00-0,63]									1.0						
	$\alpha$ -Terpinyl acetate		1.2		1.0						1.0	1.9	1.6				
	$\beta$ -Caryophyllene	[2,10-11,80]	12.0	2.7	8.8	27.7	6.3		6.8	5.9	4.7	8.5	8.3	2.3	15.0	1.0	11.8
Sesquiterpenes	$\delta$ -Cadinene		0.7		0.4												
	$\gamma$ -Gurjunene							7.4	8.6	6.7						5.0	
	Aromadendrene	[0,00-0,43]	2.0		1.3	2.0					0.7		1.8				
	Allo-Aromadendrene	[0,10-0,65]										1.7					
	$\alpha$ -Caryophyllene	[0,97-7,52]	2.4		1.4	1.8					1.0	1.8	1.8				
Oxygenated sesquiterpenes	Caryophyllene Oxide	[0,01-1,10]	1.4								1.6	1.9	1.9				8.5
	Viridiflorol	[1,10-6,34]	3.4	2.8	5.2	7.2					6.8	12.3	9.5	10.3	10.4		19.8
Diterpenes	Manool		12.5	11.3	14.4	21.2	15.4	29.2	18.6	37.39	2.5	36.1	33.2	50.9	29.2	25.5	
	Ferruginol				0.9											0.6	
Fatty acids	Palmitic acid (products)	[0,00-0,12]											8.2	4.1		2.1	
	Oleic acid (products)	[0,00-29,00]	10.9										1.91				
Waxes	Waxes-Higher Alkanes		3.4	65.1	21.1	10.5	7.3	43.4				18.1	1.5	23.5		55.0	
	<b>Total Content of the above %</b>		69.4	81.8	86.2	87.4	92.3	99.6	95.3	100.0	92.8	95.2	91.6	92.5	91.1	89.4	100.0
	<b>Total Identified Content %</b>		81.5	88.6	94.0	87.4	92.3	99.6	95.3	100.0	95.6	95.2	94.7	92.5	91.1	89.4	100.0

## IV. ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

### IV-1. Προσδιορισμός Απόκρισης Συστήματος {Y}

Η μεταβολή της απόκρισης ενός συστήματος ( $dY$ ) εξαρτάται άμεσα από την επιβολή νέων συνθηκών στην παρούσα κατάστασή του ( $ss \rightarrow dss$ ). Οι συνθήκες που εξετάζονται στο σύστημα της υπερκρίσιμης εκχύλισης είναι η μεταβολή της πίεσης ( $dP$ ), της θερμοκρασίας ( $dT$ ) και της μαζικής παροχής διαλύτη ( $d\dot{m}_{CO_2}$ ). Μελετάται λοιπόν η επίδραση των τριών αυτών παραμέτρων στην μεταβολή απόδοσης της εκχύλισης ( $dYield$ ), ως ένδειξη απόκρισης του συστήματός μας.  $\{Y \equiv Yield\}$

Η γενική μορφή απόκρισης του συστήματος (υπερκρίσιμης εκχύλισης) με βάση τις παραμέτρους που επιλέχθηκαν ( $T, P, \dot{m}_{CO_2}$ ) περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$Y = \mathbf{const} + \mathbf{a}_1 \times (T) + \mathbf{a}_2 \times (P) + \mathbf{a}_3 \times (\dot{m}_{CO_2}) + \mathbf{a}_4 \times (T \times P) + \mathbf{a}_5 \times (T \times \dot{m}_{CO_2}) + \mathbf{a}_6 \times (P \times \dot{m}_{CO_2}) + \mathbf{a}_7 \times (T \times P \times \dot{m}_{CO_2}) + \mathbf{a}_8 \times (T^2) + \mathbf{a}_9 \times (P^2) + \mathbf{a}_{10} \times (\dot{m}_{CO_2}^2) \quad [XI]$$

όπου: **const** = σταθερά του συστήματος

$\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \mathbf{a}_3$  = συντελεστές παραμέτρων

$\mathbf{a}_4, \mathbf{a}_5, \mathbf{a}_6, \mathbf{a}_7$  = συντελεστές συσχέτισης παραμέτρων

$\mathbf{a}_8, \mathbf{a}_9, \mathbf{a}_{10}$  = συντελεστές τετραγώνων των παραμέτρων

Με τη βοήθεια των αλγορίθμων του solver, στο περιβάλλον του Excel, υπολογίστηκαν οι συντελεστές που περιγράφουν με βέλτιστο τρόπο την απόκριση του συστήματος. Κριτήριο βελτιστοποίησης ήταν η ελαχιστοποίηση του αθροίσματος τετραγώνων της απόκρισης (δηλαδή ελαχιστοποίηση της διακύμανσης) διατηρώντας τον ελάχιστο δυνατό αριθμό παραμέτρων.

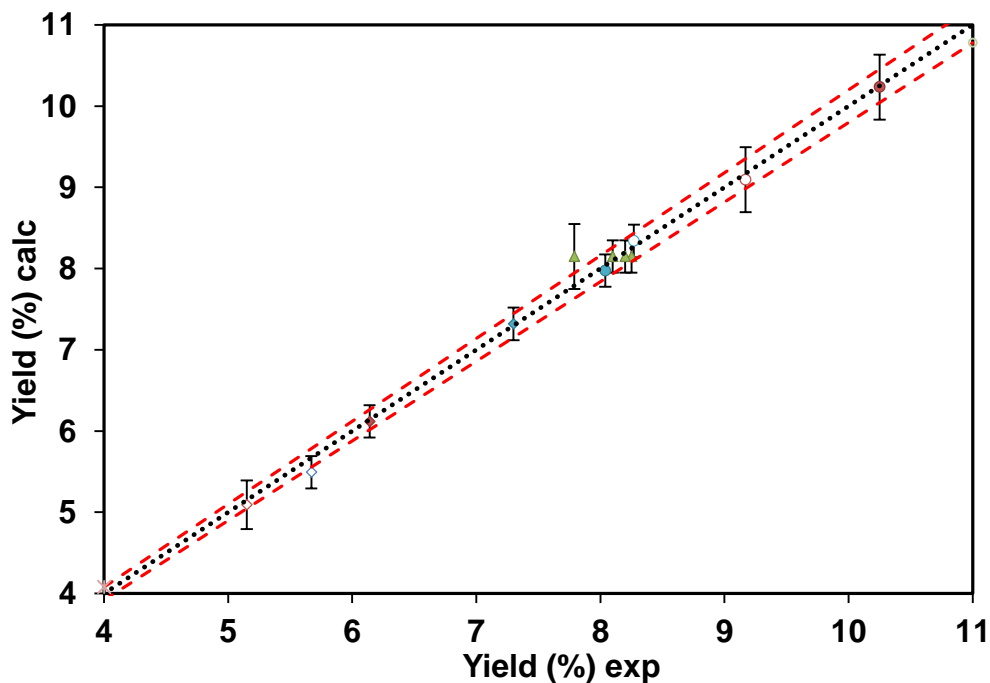
Στο Παράρτημα (κεφάλαιο VII) δίνονται τα αποτελέσματα των δοκιμών με διαφορετικούς συνδυασμούς παραμέτρων.

Από τη μελέτη αυτή προτείνεται ως βέλτιστος ο συνδυασμός που δίνεται στον παρακάτω Πίνακα\_39:

Συντελεστής Μεταβλητής	Τιμή
<i>constant</i>	-
$\alpha_1$	-
$\alpha_2$	0.05433000
$\alpha_3$	3.60300000
$\alpha_4$	-
$\alpha_5$	- 0.05203000
$\alpha_6$	- 0.01890000
$\alpha_7$	0.00032030
$\alpha_8$	-
$\alpha_9$	- 0.00008532
$\alpha_{10}$	-
$R^2$	0.9921
<i>ssq</i>	0.1951
<i>AAE%</i>	1.213

Πίνακας 39: Αποτελέσματα προσομοίωσης διεργασίας της ΥΕ

Επιπλέον, η συσχέτιση (correlation) των υπολογισμένων τιμών απόδοσης με τις πειραματικές φαίνεται στο παρακάτω Διάγραμμα\_14.



Διάγραμμα\_14: Συσχέτιση πειραματικών – υπολογισμένων τιμών απόδοσης της υπερκρίσιμης εκχύλισης

(\* ) Η περιοχή του διαγράμματος που περιγράφεται από τις κόκκινες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχεί σε σφάλματα  $\pm 2\%$ , ενώ με τη μορφή *error bars* δίνονται τα σφάλματα των πειραματικών μετρήσεων.



Η εξίσωση [XI] που περιγράφει την απόδοση του συστήματος, όπως αυτή εξαρτάται από την θερμοκρασία, πίεση και παροχή διαλύτη, μετασχηματίζεται σε:

$$\begin{aligned} \text{Yield} = & 0.05433 \times (P) + 3.6030 \times (\dot{m}_{CO_2}) - 0.05203 \times (T \times \dot{m}_{CO_2}) - 0.01890 \times (P \times \dot{m}_{CO_2}) \\ & + 32.03 \times e^{-5} \times (T \times P \times \dot{m}_{CO_2}) - 85.32 \times e^{-6} \times (P^2) \end{aligned}$$

Κρίνοντας από τους όρους που αποτελούν την εξίσωση απόκρισης της απόδοσης είναι δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα για τους παράγοντες που επηρεάζουν περισσότερο το σύστημα.

**Θετική** συμβολή στην απόκριση (απόδοση) φαίνεται να έχουν:

- Κυρίως η πίεση, τόσο μόνο της όσο και συνδυαστικά με την παροχή και τη θερμοκρασία.
- Η παροχή διαλύτη πάλι σε μεγάλο βαθμό μόνη της, αλλά και συνδυαστικά με την πίεση και τη θερμοκρασία.

Ενώ, **αρνητική** συμβολή φαίνεται να έχουν:

- Σε μεγάλο βαθμό η παροχή σε συνδυασμό με την πίεση (λόγω τάξης μεγέθους της πίεσης)
- Η θερμοκρασία σε συνδυασμό με την παροχή διαλύτη.

Τέλος, επειδή υπάρχει ο αρνητικός όρος του τετραγώνου της πίεσης, η επίδραση μεμονωμένα της πίεσης είναι αυξητική ως προς την απόδοση για πιέσεις έως περίπου τα 320 bar, μετά τα οποία η απόδοση αρχίζει να μειώνεται με περαιτέρω αύξηση της πίεσης.

## IV-2 Μοντέλο Σονονά

Για άλλη μια φορά, στο περιβάλλον του Excel και με τη βοήθεια του αλγόριθμου GRG του solver, για συνεχείς και μη γραμμικές εξισώσεις, υπολογίστηκαν οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα\_40 ενώ οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι στη θεωρία του κεφαλαίου II-4.2.

Πείραμα	Κωδικός	$y_r$	$x_o$	$x_k$	$(Z \times \dot{q})10^2$ [s <sup>-1</sup> ]	$(W \times \dot{q})10^4$ [s <sup>-1</sup> ]	AAD%
1	SC.40.100.1	0.0050	0.080	0.051	7.49	0.95	4.9
5	SC.40.100.3				2.02	4.29	3.7
2	SC.60.100.1	0.0040	0.067	0.041	7.42	1.16	6.9
6	SC.60.100.3				1.96	3.69	0.7
3	SC.40.280.1	0.0124	0.092	0.060	7.72	4.62	2.2
7	SC.40.280.3				0.79	4.21	2.2
4	SC.60.280.1	0.0100	0.120	0.062	7.75	1.32	1.4
8	SC.60.280.3				1.31	3.94	2.4
9	SC.50.190.2	0.0058	0.087	0.052	15.03	3.74	3.5

Πίνακας 40: Αποτελέσματα ανεξαρτήτων παραμέτρων του μοντέλου Σονονά

$$* \text{AAD}\% = \left\{ \frac{1}{NP} \times \sum \left| \frac{e_{exp} - e_{calc}}{e_{exp}} \right| \right\} \times 100 \quad ; \quad \text{NP: αριθμός πειραματικών σημείων}$$

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο II, η μεταβλητή  $y_r$  είναι η διαλυτότητα, και προκύπτει από την κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης εκχύλισης (του γρήγορου σταδίου). Η διαλυτότητα προκύπτει από τα δεδομένα για τη χαμηλή ροή ( $F=1\text{kg/h}$ ), καθώς ο χρόνος παραμονής του διαλύτη στον εκχυλιστήρα είναι μεγαλύτερος και επομένως η τιμή μπορεί να θεωρηθεί πιο κοντά σε αυτή της ισορροπίας. Παρατηρείται, πως όταν αυξάνεται η θερμοκρασία (60 °C) η τιμή του  $y_r$  πέφτει, άρα η διαλυτότητα μειώνεται. Αντίθετα, όταν αυξάνεται η πίεση (280 bar) αυξάνεται και η διαλυτότητα, κάτι που φαίνεται και από τις υψηλότερες τιμές του  $y_r$ .

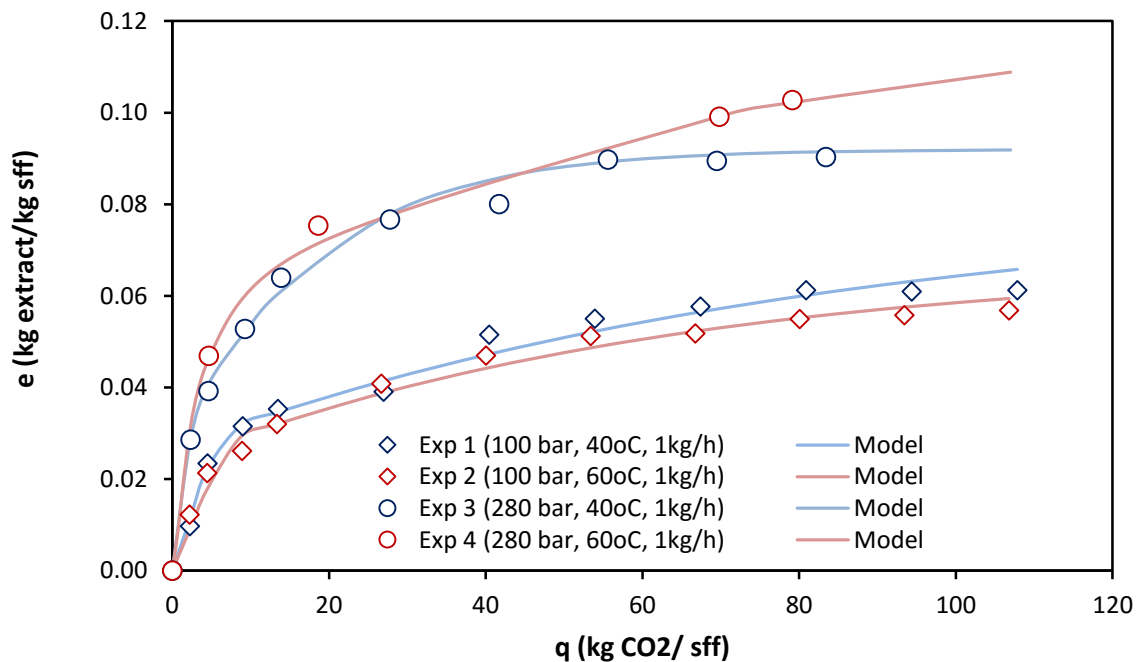
Στη συνέχεια, υπολογίζονται το  $x_o$  και  $x_k$  που επίσης εξαρτώνται από τις συνθήκες εκχύλισης. Το  $x_o$  είναι η μέγιστη δυνατή ποσότητα ελαίου που μπορεί να εκχυλιστεί στις δεδομένες συνθήκες και μπορεί να υπολογιστεί πειραματικά, ενώ το  $x_k$  εκφράζει την παγιδευμένη ποσότητα ελαίου στο δείγμα. Δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκε ίδια κοκκομετρία για όλα τα πειράματα (425-100μm), αναμένονται αποκλίσεις για τις τιμές  $x_k$  και  $x_o$  του μοντέλου ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης, το οποίο και επαληθεύεται στον Πίνακα\_40.

Από τον ίδιο πίνακα, το  $x_o$  φαίνεται να αυξάνεται με την αύξηση της πίεσης. Ωστόσο, με την άνοδο της θερμοκρασίας μειώνεται για μικρές πιέσεις και αυξάνεται για μεγάλες.

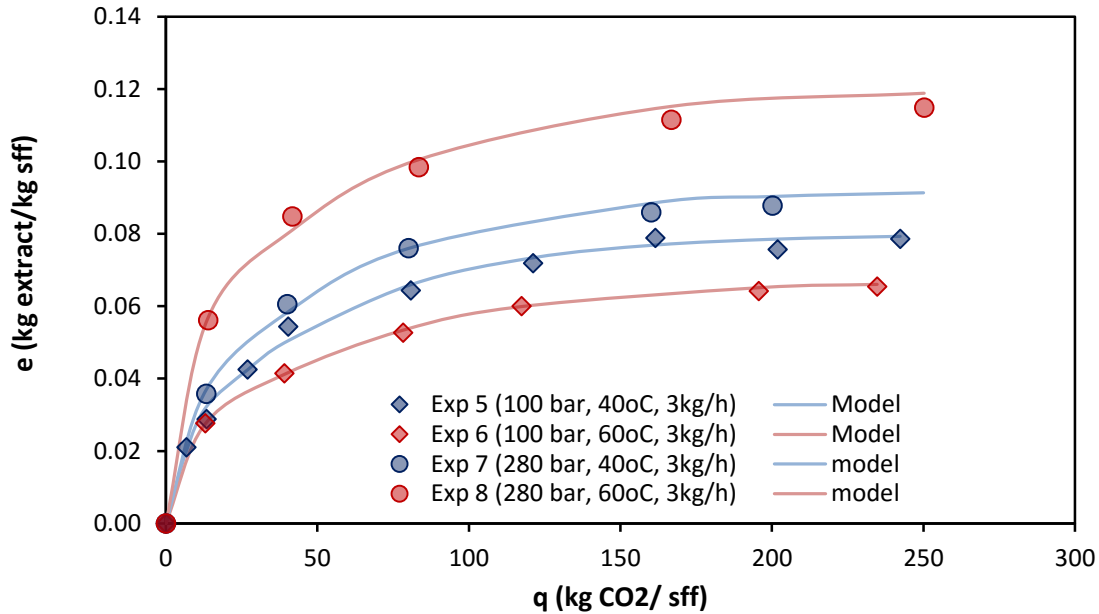
Τη μεταφορά μάζας στη φάση του στερεού περιγράφουν οι  $W \times \dot{q}$  που από τα αποτελέσματα του Πίνακα\_4ο φαίνεται να ελέγχουν το μεγαλύτερο κομμάτι της εκχύλισης. Τη φάση του ρευστού περιγράφουν οι συντελεστές  $Z \times \dot{q}$ , που επηρεάζουν και αυτοί τη διεργασία όσο αφορά στο πιο σύντομο πρώτο κομμάτι της εκχύλισης.

Γενικά το μοντέλο έδωσε πολύ καλή περιγραφή των πειραματικών δεδομένων, όπως φαίνεται και από το %AAD, αλλά και τα παρακάτω συγκριτικά διαγράμματα.

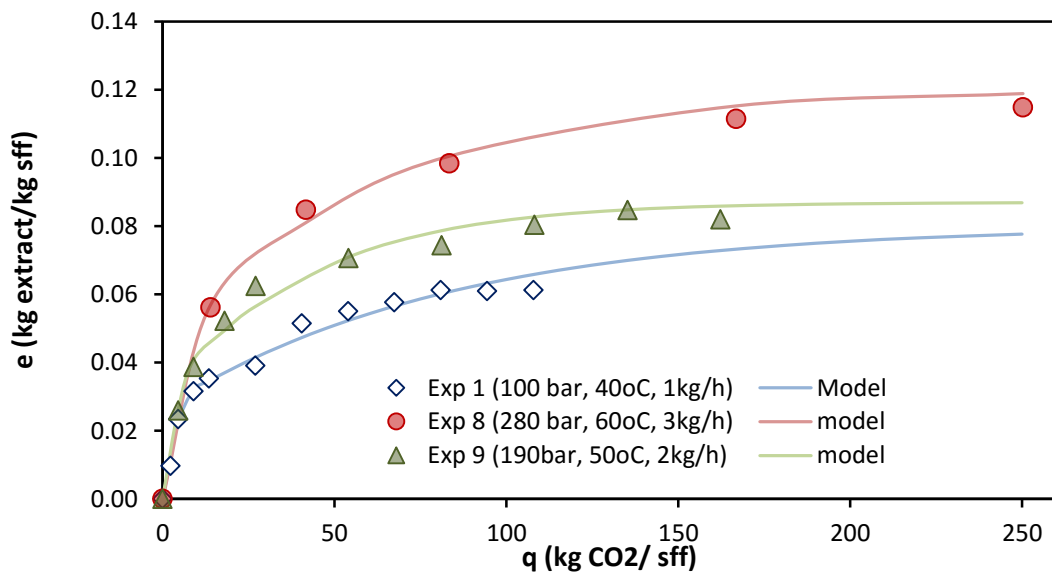
Αναλυτικότερα, το Διάγραμμα\_15α & β επαληθεύει την παρατήρηση για διαφορετική επίδραση των παραμέτρων της πίεσης και της θερμοκρασίας τόσο στην απόδοση της εκχύλισης, όσο και στην προσαρμογή του μοντέλου Sonová στα πειραματικά δεδομένα. Ενώ, το Διάγραμμα\_16 απεικονίζει την επίδραση τριών επιπέδων διαφορετικών συνθηκών στο σύστημα. Αναλυτικά τα αποτελέσματα προσαρμογής του μοντέλου απεικονίζονται γραφικά στο Παράρτημα (κεφάλαιο VII).



*Διάγραμμα 15α: Επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης στην απόδοση της ΥΕ και προσαρμογή των μετρήσεων με το μοντέλο Sonová (F=1kg/h)*



Διάγραμμα 15β: Επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης στην απόδοση της ΥΕ και προσαρμογή των μετρήσεων με το μοντέλο Σονονά ( $F=3kg/h$ )



Διάγραμμα 16: Επίδραση τριών επιπέδων συνθηκών στην απόδοση της ΥΕ και προσαρμογή μετρήσεων με το μοντέλο Σονονά

Τέλος, από τα αποτελέσματα προέκυψαν επίσης και οι τιμές των  $q_m$  και  $q_n$  που βοηθούν στον προσδιορισμό των σταδίων της διεργασίας. Το 1<sup>ο</sup> στάδιο της γρήγορης εκχύλισης λαμβάνει χώρα στα περισσότερα πειράματα μέσα στα 5 πρώτα λεπτά. Το 2<sup>ο</sup> στάδιο που περιλαμβάνει την αργή φάση εκχύλισης στον πυθμένα και την γρήγορη φάση στην κορυφή είναι στα διαστήματα μεταξύ των 5 και 20 λεπτών. Και τέλος το 3<sup>ο</sup> στάδιο περιγράφει μόνο την αργή φάση εκχύλισης και αφορά χρόνους από τα 20 λεπτά και μετά. Τα στάδια και οι τιμές  $q_m$  και  $q_n$  αναγράφονται αναλυτικά στο Παράρτημα (κεφάλαιο VII).

## V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε σε πολλά μέτωπα τις δυνατότητες της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης συγκριτικά με τις «Συμβατικές», δηλ. την υδροαπόσταξη και την υγρή εκχύλιση, και τις «Πράσινες» μεθόδους εκχύλισης, με χρήση υπερήχων, μικροκυμάτων και υψηλής πίεσης. Μια έρευνα που έγινε με γνώμονα τις τελικές αποδόσεις των μεθόδων, καθώς και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τις χημικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των εκχυλισμάτων τους.

Καταρχάς, η απόδοση της υπερκρίσιμης εκχύλισης (ΥΕ) δεν ξεπέρασε μόνο την απόδοση της συμβατικής υδραπόσταξης (ΥΑ) αλλά και όλων των εκχυλίσεων που χρησιμοποιούσαν άπολους διαλύτες.

Από πλευράς αντιοξειδωτικών το αιθέριο έλαιο της ΥΕ είχε μία σημαντική διαφορά ως προς τη δράση με το έλαιο της ΥΑ. Συγκεκριμένα, για την ΥΑ θα χρειαζόταν 22 φορές μεγαλύτερη ποσότητα ελαίου για να επιτευχθεί η ίδια δράση. Επιπλέον η ΥΕ με συνδιαλύτη, έδωσε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση όλων των μεθόδων φτάνοντας ακόμα και αυτήν της εξειδικευμένης τεχνικής Εκχύλισης υπό Πίεση, για θερμοευαίσθητες ενώσεις, όπως είναι τα αντιοξειδωτικά.

Παράλληλα, κατά την εξέταση της απόδοσης της αντιοξειδωτικής δράσης σε συνάρτηση με τον χρόνο, παρατηρήθηκε πως το αιθέριο έλαιο της ΥΕ, σε σύγκριση με αυτό της ΥΑ, εξουδετερώνει ακαριαία ένα μεγάλο ποσοστό της ελεύθερης ρίζας, γεγονός που καθιστά τη χρήση του αιθέριου ελαίου κατάλληλη για φάρμακα που στοχεύουν στην άμεση αντιμετώπιση απειλών για την υγεία και συνδέονται με τις ελεύθερες ρίζες.

Μία ακόμα σημαντική χημική ιδιότητα του αιθέριου ελαίου της ΥΕ σε σχέση με αυτό της ΥΑ ήταν το πλουσιότερο ολικό φαινολικό του περιεχόμενο.

Όσον αφορά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που έδωσε η χημική ανάλυση του GC-MS, πρώτα παρατηρήθηκε ότι το δείγμα είχε πολύ μικρή περιεκτικότητα σε  $\alpha$ -thujone και  $\beta$ -thujone, με 1,6% και 2,1% αντίστοιχα. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε πως το αιθέριο έλαιο της ΥΕ εμφάνιζε μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε συστατικά όπως: L-Borneol,  $\alpha$ -Humulene ( $\alpha$ -Terpineol), Caryophyllene Oxide σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ειδικότερα, σε μεγαλύτερο βαθμό φαίνεται να εκχυλίζει ενώσεις όπως: Camphor, Viridiflorol, Manool και παράγωγα του παλμιτικού οξέως (Palmitic acid). Από τις προαναφερθείσες ενώσεις ορισμένες παρουσιάζουν καλές χημικές ιδιότητες και βιολογική δράση. Εξ αυτών τα Viridiflorol και Palmitic acid, βάσει της βιβλιογραφίας, εμφανίζουν καλή αντιοξειδωτική δράση. Ενώ η Manool, είναι μία βιοδραστική ένωση, που χρησιμοποιείται τόσο στην αρωματοποιία, όσο και στη φαρμακοβιομηχανία, λόγω της αντιμικροβιακής δράσης που παρουσιάζει, ιδιαίτερα προς τον *staphylococcus aureus* και *candida albicans*.

Πραγματοποιήθηκε, επίσης, η προσομοίωση της διεργασίας της ΥΕ μέσω εξίσωσης που περιγράφει πολύ ικανοποιητικά την απόδοση της εκχύλισης συναρτήσει (κυρίως) της πίεσης, της ροής και της θερμοκρασίας. Η εξίσωση που προέκυψε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση των συνθηκών μεγιστοποίησης της απόδοσης της διεργασίας.

Τέλος, με χρήση του μοντέλου της Σονονά επιτεύχθηκε μια εξίσου καλή περιγραφή των πειραματικών δεδομένων σε όλες τις συνθήκες. Η προσομοίωση αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί για τη μελέτη των φαινομένων μεταφοράς μάζας και την κλιμάκωση μεγέθους κατά το σχεδιασμό της διεργασίας.

### Προτάσεις για Μελλοντική Μελέτη

Η μελέτη αυτή αποτελεί μια καλή βάση για νέες, περαιτέρω έρευνες όχι μόνο γύρω από το είδος *Salvia*, αλλά κυρίως γύρω από την (αποδοτικότερη) ανάκτηση αντιοξειδωτικών και άλλων βιοδραστικών θερμοευαίσθητων ενώσεων με ΥΕ από φυσικές πρώτες ύλες. Συγκεκριμένα, προτάσεις για περαιτέρω ανάλυση θα μπορούσαν να αποτελέσουν:

- ✓ Ο χαρακτηρισμός των πολικών εκχυλισμάτων και αιθέριου ελαίου της ΥΕ με τη χρωματογραφική μέθοδο HPLC, για την ταυτοποίηση των αντιοξειδωτικών, φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.
- ✓ Κλινικές μελέτες, ώστε τα εκχυλίσματα/ αιθέρια ελαία που παραλήφθηκαν να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προϊόντα όπως φάρμακα, καλλυντικά και τρόφιμα.
- ✓ Ανάλυση αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων της ΥΕ που παραλήφθηκαν στους 40°C (κυρίως των **SC.40.280.3-2** και **SC.40.100.3-2**). Εφόσον εμφανίσουν καλύτερα αποτελέσματα από αυτά του δείγματος **SC.50.190.2-2**, θα μπορούσε να δοκιμαστεί η υπερκρίσιμη εκχύλιση σε μικρότερες θερμοκρασίες.
- ✓ Μελέτη της εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> με χρήση διαφορετικής πολικότητας συνδιαλυτών (όπως οξικό αιθυλεστέρα) για την ανάκτηση των πολικών αντιοξειδωτικών και φαινολικών ενώσεων.
- ✓ Εφαρμογή συνδυασμού μεθόδων, όπως της εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> και μικροκυμάτων με αιθανόλη-νερό, για τη βέλτιστη ανάκτηση άπολου και πολικού κλάσματος του δείγματος.
- ✓ Μελέτη της χρήσης διαφορετικής αναλογίας αιθανόλης - νερού, που φάνηκε αποδοτικό σύστημα στην εκχύλιση αντιοξειδωτικών και φαινολικών ενώσεων, αλλά και διαλυτών ενδιάμεσης πολικότητας.
- ✓ Μελέτη της επίδρασης πίεσης - θερμοκρασίας στην εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων όπως η Μαννόλη (καταστρεπτική επίδραση θερμοκρασίας-ενισχυτική πίεσης).
- ✓ Κατασκευή εξίσωσης, αντίστοιχης με αυτή της επίδρασης των παραμέτρων πίεσης, θερμοκρασίας, ροής στην απόδοση, για το ποσοστό εκχύλισης σε κάποια επιθυμητή ουσία (όπως η Μαννόλη).

## VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] E. Dr Παπακωσταντίνου, “Το φασκόμηλο στην θεραπευτική σήμερα.” .
- [2] O. Pelkonen, K. Abass, and J. Wiesner, “Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: Toxicological assessment,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 1, pp. 100–107, 2013.
- [3] C. S. Koutsoulas A., Toth J., Boszormenyi A., “Analysis of the volatile oil compounds of *Salvia pomifera* and *S. fruticosa* I,II.pdf.” 2014.
- [4] X. Κόκκινος, “Παραλαβή αιθέριων ελαίων.” [Online]. Available: [http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2010/02/blog-post\\_12.html](http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2010/02/blog-post_12.html).
- [5] A. Valavanidis and V. Thomais, “Green chemistry and green engineering,” 2012.
- [6] “Εκχύλιση.” [Online]. Available: [http://www.chem.auth.gr/content/organic\\_lab/CHEM/EXTRACT.pdf](http://www.chem.auth.gr/content/organic_lab/CHEM/EXTRACT.pdf).
- [7] M. D. Luque de Castro and F. Priego-Capote, “Soxhlet extraction: Past and present panacea,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 16, pp. 2383–2389, 2010.
- [8] “Ultrasonic extraction and preservation.” [Online]. Available: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260320510>. [Accessed: 02-Jun-2016].
- [9] “Sonochemistry.” [Online]. Available: <http://xlink.rsc.org/?DOI=cs9972600443>.
- [10] G. R. B. Webster, “Soxhlet and Ultrasonic Extraction of Organics in Solids,” in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.
- [11] P. C. Veggi, J. Martinez, and M. A. a Meireles, *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds*. 2013.
- [12] Z. Dong, F. Gu, F. Xu, and Q. Wang, “Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews,” *Food Chem.*, vol. 149, pp. 54–61, 2014.
- [13] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, and J. Hernández-Méndez, “Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1089, no. 1–2, pp. 1–17, 2005.
- [14] I. Mourtzinos, S. E. Papadakis, P. Igoumenidis, and V. T. Karathanos, “Encapsulation of *Melissa Officinalis* leaf’s active compounds in  $\beta$ -cyclodextrin and modified starch,” *Procedia Food Sci.*, vol. 1, pp. 1679–1685, 2011.
- [15] E. Langa, G. Della Porta, A. M. F. Palavra, J. S. Urieta, and A. M. Mainar, “Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: Optimization of the process parameters and modelling,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 49, no. 2, pp. 174–181, 2009.
- [16] Σ. . Πολυμένης, “Συμπεριφορά pT καθαρών ουσιών,” *Φυσικοχημεία II*, vol. 1, 2011.
- [17] Β. Λούλη, “Ανάπτυξη της τεχνικής της υπερκρίσιμης εκχύλισης και εφαρμογές της στην ανάκτηση φυσικών προϊόντων.” Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ). Σχολή Χημικών Μηχανικών. Τομέας Ανάλυσης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων. Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, 2004.

- [18] E. Βουτσάς and K. Μαγουλάς, “Βασικές αρχές και εφαρμογές της υπερκρίσιμης εκχύλισης,” *Ειδικά κεφάλαια Θερμοδυναμικής*, 2003.
- [19] “Υπερκρίσιμη Εκχύλιση.” [Online]. Available: [http://www.chemeng.ntua.gr/courses/mad/files/MAD\\_SFE\\_final.pdf](http://www.chemeng.ntua.gr/courses/mad/files/MAD_SFE_final.pdf).
- [20] C. Perakis, V. Louli, and K. Magoulas, “Supercritical fluid extraction of black pepper oil,” *J. Food Eng.*, vol. 71, no. 4, pp. 386–393, 2005.
- [21] M. Erbas and H. Sekerci, “Importance of free radicals and occurring during food processing,” *GIDA-Journal Food*, vol. 36, pp. 349–356, 2011.
- [22] Δ. Μπόσκου, *Χημεία τροφίμων*, 4th ed. Γαρταγάνης, 1997.
- [23] H. Cui, Y. Kong, and H. Zhang, “Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging,” *J. Signal Transduct.*, vol. 2012, p. 646354, 2012.
- [24] W. Zheng and S. Y. Wang, “Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 5165–70, Nov. 2001.
- [25] S. K. Lee, Z. H. Mbwambo, H. Chung, L. Luyengi, E. J. Gamez, R. G. Mehta, A. D. Kinghorn, and J. M. Pezzuto, “Evaluation of the antioxidant potential of natural products,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 1, no. 1, pp. 35–46, Apr. 1998.
- [26] A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts, “Techniques for analysis of plant phenolic compounds,” *Molecules*, vol. 18, no. 2, pp. 2328–2375, 2013.
- [27] L. Bravo, “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance,” *Nutr. Rev.*, vol. 56, no. 11, pp. 317–33, Nov. 1998.
- [28] R. Puupponen-Pimiä, L. Nohynek, C. Meier, M. Kähkönen, M. Heinonen, A. Hopia, and K. M. Oksman-Caldentey, “Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 90, no. 4, pp. 494–507, Apr. 2001.
- [29] N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, “Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses,” *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, 2006.
- [30] C. Manach, A. Mazur, and A. Scalbert, “Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases.”
- [31] A. L. Waterhouse, “Determination of Total Phenolics,” in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [32] J. M. Patel, “A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids.” Lethbridge Undergraduate Research Journal, 2008.
- [33] X. Σουλελής, “Φλαβονοειδή και συγγενείς ομάδες φυτικών χρωστικών - χημική τους δομή και θεραπευτικές τους ιδιότητες.”
- [34] Δ. Π. Κομιλης, “Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση,” 2006.
- [35] H. Sovová, “Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> - I. Modelling of extraction curves,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 49, 1994.
- [36] H. Sovová, “Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> - II. Extraction of



- grape oil," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 49, no. 3, pp. 409–414, 1994.
- [37] S. B. Glisic, M. Ristic, and D. U. Skala, "The combined extraction of sage (*Salvia officinalis* L.): Ultrasound followed by supercritical CO<sub>2</sub> extraction," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 18, no. 1, pp. 318–326, 2011.
- [38] V. Y. Ixtaina, A. Vega, S. M. Nolasco, M. C. Tomas, M. Gimeno, E. Barzana, and A. Tecante, "Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 55, no. 1, pp. 192–199, 2010.
- [39] S. Glisic, J. Ivanovic, M. Ristic, and D. Skala, "Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO<sub>2</sub>: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 52, no. 1, pp. 62–70, 2010.
- [40] S. S. Dahham, Y. M. Tabana, M. A. Iqbal, M. B. K. Ahamed, M. O. Ezzat, A. S. A. Majid, and A. M. S. A. Majid, "The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*," *Molecules*, vol. 20, no. 7, pp. 11808–29, 2015.
- [41] Á. Perdonés, M. Vargas, L. Atarés, and A. Chiralt, "Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan–cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid," *Food Hydrocoll.*, vol. 36, pp. 256–264, 2014.
- [42] R. Boukhary, K. Raafat, A. I. Ghoneim, M. Aboul-ela, and A. El-lakany, "Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of *Salvia fruticosa* : An HPLC Determination of Phenolic Contents," vol. 2016, 2016.
- [43] K. X. Γιαννάκογλου, "Εξελικτικοί Αλγόριθμοι σε Προβλήματα Πολλών Στόχων," *Μέθοδοι Βελτιστοποίησης στην Αεροδυναμική*, 2006.
- [44] G. Topç U, M. Oz Urk, T. Kuman, A. Aslı, B. Dem, İrkoz, U. Kolak, and A. Ulubelen, "Turkish Journal of Chemistry," *Turk J Chem*, vol. 373906, pp. 619–632, 2013.
- [45] A. A. Giweli, A. M. Džamić, M. Soković, M. S. Ristić, P. Janačković, and P. D. Marin, "The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Salvia fruticosa* growing wild in Libya," *Arch. Biol. Sci.*, vol. 65, no. 1, pp. 321–329.
- [46] A. P. Longaray Delamare, I. T. Moschen-Pistorello, L. Artico, L. Atti-Serafini, and S. Echeverrigaray, "Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil," *Food Chem.*, vol. 100, no. 2, pp. 603–608, 2007.
- [47] T. Aşkun, K. Hüsnü, C. Başer, G. Tümen, and M. Kürkçüoğlu, "Characterization of essential oils of some *Salvia* species and their antimycobacterial activities," *Turk J Biol*, vol. 34, pp. 89–95, 2010.
- [48] M. M. Özcan, G. Figueredo, J. C. Chalchat, P. Chalard, F. A. Juhaimi, K. Ghafoor, and E. F. E. Babiker, "Chemical constituents in essential oils of *salvia officinalis* l. And *salvia fruticosa* mill.," *Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen*, vol. 20, no. 4, pp. 181–184, 2015.

## VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

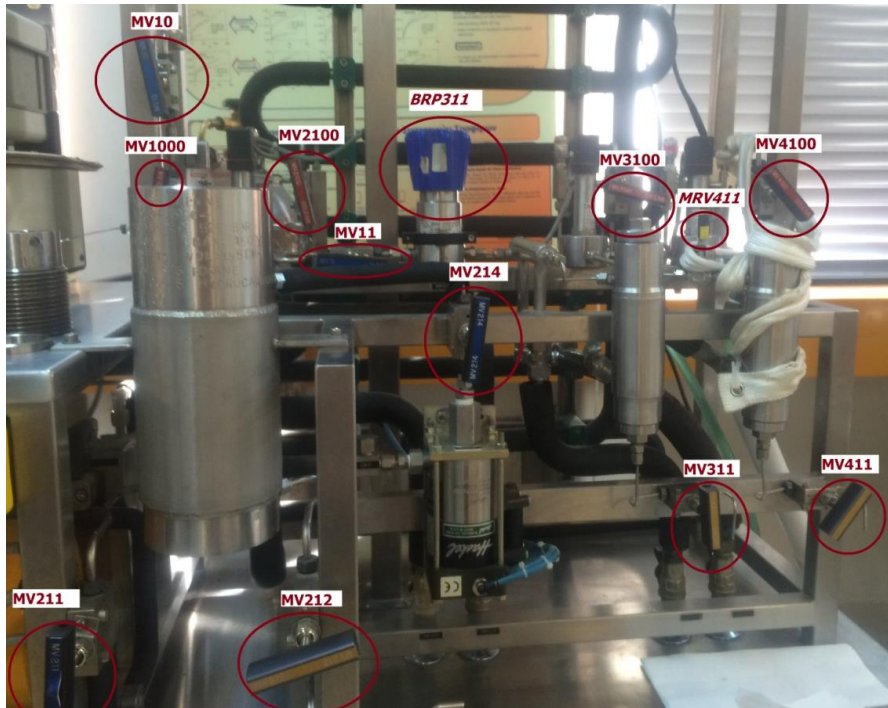
### VII-1 Εγχειρίδιο χρήσης Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Οι βάνες που ρυθμίζουν τη ροή και την πίεση του διαλύτη, αλλά και του σχηματιζόμενου εκχυλίσματος στη διάταξη, αναγράφονται στον Πίνακα\_41.

Βάνες ρύθμισης της κατεύθυνσης του διαλύτη			Βάνες ρύθμισης της πίεσης	
Κόκκινες	Μπλε	Κίτρινες	(Μεγάλη) Μπλε	(Μικρή) Μαύρη
MV1000	MV10	MV212	BPR311	MRV411
MV2100	MV11	MV311		
MV3100	MV211	MV411		
MV4100	MV214			

Πίνακας\_41: Συνολικός πίνακας ρυθμιστικών βανών

- Σημείωση #1: Οι **κόκκινες βάνες** εκτονώνουν τις ροές στην ατμόσφαιρα, στα διάφορα σημεία της διάταξης.
- Σημείωση #2: Οι **μπλε βάνες** διακόπτουν τη ροή στα διάφορα σημεία της διάταξης.
  - ➔ Κατά την διεξαγωγή πειράματος πρέπει σχεδόν πάντα να διατηρούνται ανοιχτές!!
  - ➔ Εξαιρείται η βάνα **MV214** που πρέπει να μένει πάντα κλειστή εκτός από την περίπτωση που χρησιμοποιείται η αναρροή στον εκχυλιστήρα.
- Σημείωση #3: Οι **κίτρινες βάνες** εκτονώνουν εντός του εργαστηρίου το περιεχόμενο των δοχείων εκχύλισης και διαχωρισμού, με τη δυνατότητα συλλογής του εκχυλίσματος σε κάποιο δοχείο ή φιαλίδιο.
- Σημείωση #4: Η **μεγάλη μπλε βάνα (back pressure valve)** «στραγγαλίζει» τη ροή μεταξύ εκχυλιστήρα και διαχωριστήρων. Κατά την πειραματική διαδικασία η βάνα αυτή χρησιμοποιείται για να ανεβάσει την πίεση στο δοχείο εκχύλισης.
- Σημείωση #5: Η **μικρή μαύρη βάνα** ρυθμίζει την πίεση μεταξύ των δύο διαχωριστών. Κατά την πειραματική διαδικασία έχει την δυνατότητα αύξησης της πίεσης του πρώτου Διαχωριστήρα (αριστερού separator).

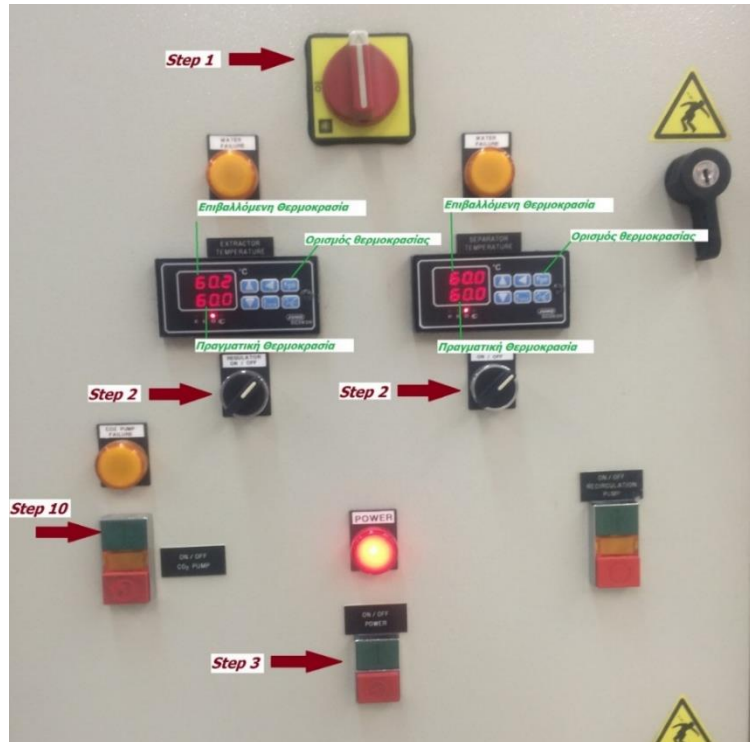


Εικόνα\_23: Προσδιορισμός ρυθμιστικών βανών

Πριν από κάθε πείραμα πραγματοποιείται μια προετοιμασία (WARM-UP) της συσκευής με τα ακόλουθα βήματα:

- Θέση του κεντρικού διακόπτη (κόκκινος περιστροφικός) της συσκευής στο ON, Εικ.\_24
- Έναρξη λειτουργίας και ρύθμιση των θερμαντικών λουτρών του εκχυλιστήρα και των διαχωριστήρων στις επιθυμητές τιμές (μαύροι περιστροφικοί διακόπτες ακριβώς από κάτω), Εικ.\_24
- Εκκίνηση της συσκευής (το πράσινο κουμπί) εκκίνησης (κάτω από το φωτάκι POWER), Εικ.\_24
- Έναρξη λειτουργίας και ρύθμιση της θερμοκρασίας του ψυκτικού των κεφαλών της αντλίας του CO<sub>2</sub>

Μετά την σταθεροποίηση της συσκευής στις επιθυμητές συνθήκες γίνεται η τοποθέτηση του κελιού στον εκχυλιστήρα, και αφού αυτός σφραγιστεί πολύ προσεκτικά, ξεκινά η εκχύλιση.



Εικόνα\_24: Πίνακας ελέγχου υπερκρίσιμης εκχύλισης

Αντίστοιχα βήματα ακολουθούνται και για την εκκίνηση (START-UP) κάθε πειράματος υπερκρίσιμης εκχύλισης:

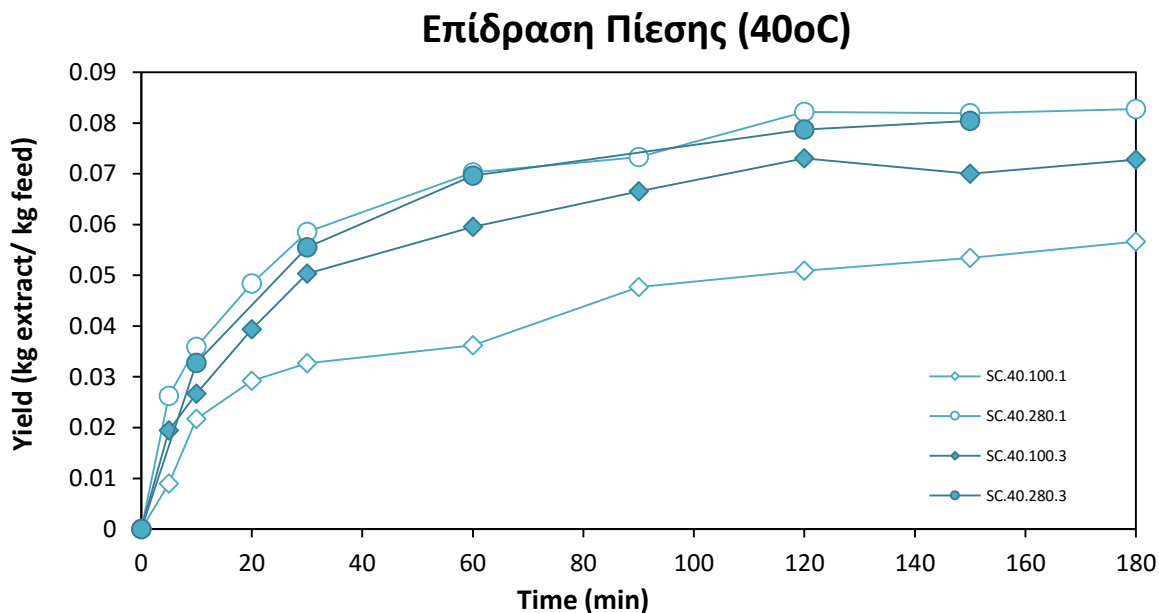
- Ανοίγεται η μπλε βάνα **MV11** μετά τον εκχυλιστήρα, και γίνεται έλεγχος ότι οι υπόλοιπες μπλε βάνες είναι κλειστές.
- Ανοίγεται το διοξείδιο του άνθρακα από τη φιάλη
- Ανοίγονται σταδιακά οι δύο πρώτες μπλε βάνες (**MV10** και **MV21**), αφήνοντας το διοξείδιο του άνθρακα να πληρώσει τη διάταξη.
- Ανοίγεται και η ένδειξη ροής στη διάταξη διαπιστώνοντας ότι η φιάλη διοξειδίου του άνθρακα ρέει και έχει φορτώσει τη συσκευή με ~50 bar.
- Τέλος, ανοίγεται η αντλία για το διοξείδιο του άνθρακα από τον πίνακα ελέγχου.
- Και ρυθμίζονται οι πιέσεις του εκχυλιστήρα και των διαχωριστήρων στις επιθυμητές τιμές.

Βήματα διακοπής λειτουργίας (SHUT-DOWN) πειραμάτων υπερκρίσιμης εκχύλισης:

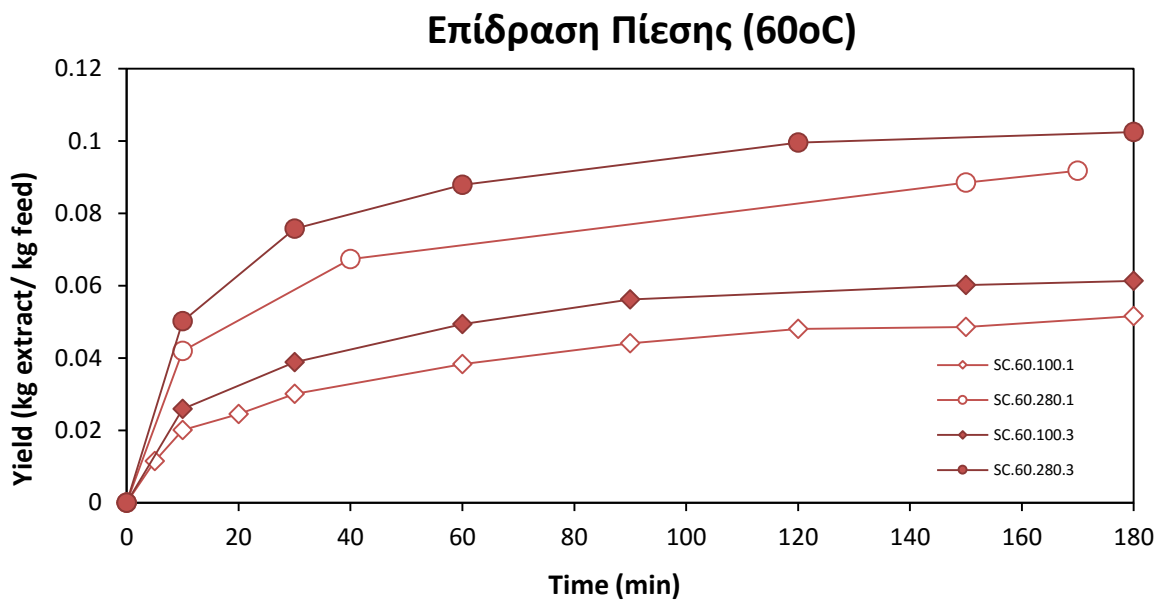
- Αρχικά κλείνει η αντλία από τον πίνακα ελέγχου.
- Στη συνέχεια, κλείνουν οι μπλε βάνες **MV10** και **MV21**, με αποτέλεσμα να απομονώνεται το σύστημα από την φιάλη CO<sub>2</sub> μέχρι τον εκχυλιστήρα.
- Κλείνει η φιάλη διοξειδίου του άνθρακα.
- Εκτονώνεται σιγά-σιγά το σύστημα από την βάνα **MV4100**
- Όταν το σύστημα φτάσει σε πίεση μικρότερη των 50 bar ανοίγονται και οι δύο μπλε βάνες **MV10** και **MV21** εκτονώνοντας τη διάταξη χωρίς να φύγουν προς τα πίσω τα πτητικά συστατικά της.

## VII-2 Καμπύλες Απόδοσης Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Η συγκριτική εξέλιξη των αποδόσεων με το χρόνο στην υπερκρίσιμη εκχύλιση φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα.

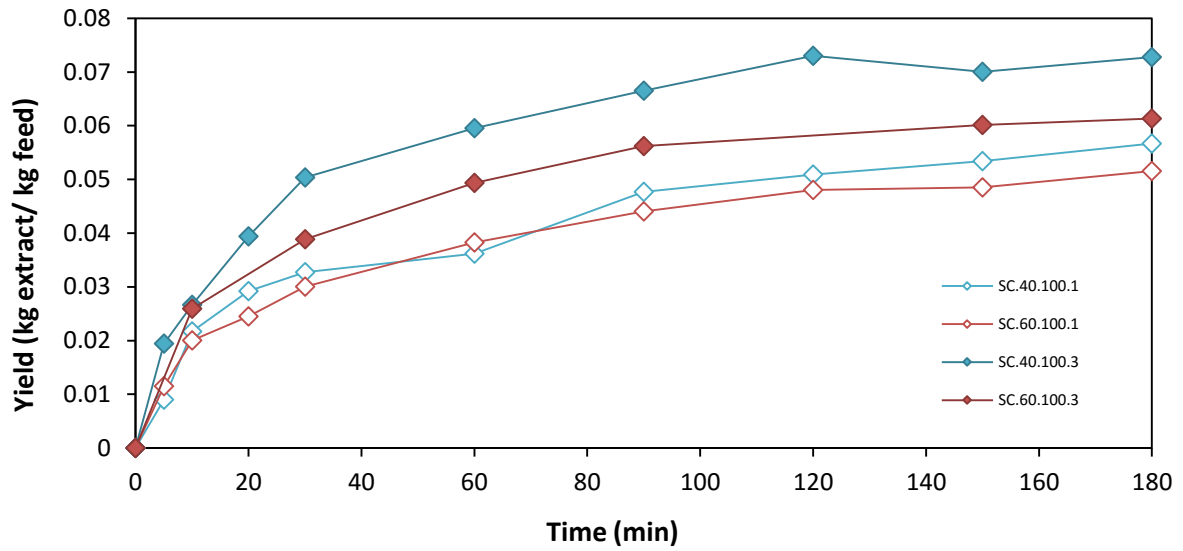


Διάγραμμα\_17α: Επίδραση πίεσης και ροής για σταθερή θερμοκρασία (40°C)



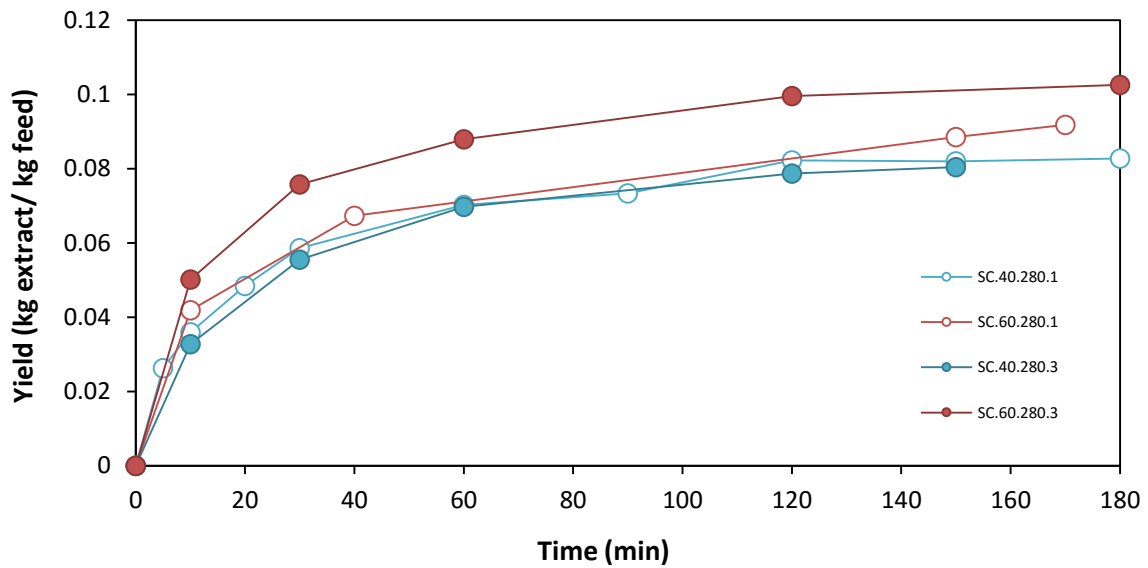
Διάγραμμα\_17β: Επίδραση πίεσης και ροής για σταθερή θερμοκρασία (60°C)

### Επίδραση Θερμοκρασίας (100 bar)



Διάγραμμα\_18α: Επίδραση θερμοκρασίας και ροής για σταθερή πίεση (100bar)

### Επίδραση Θερμοκρασίας (280 bar)



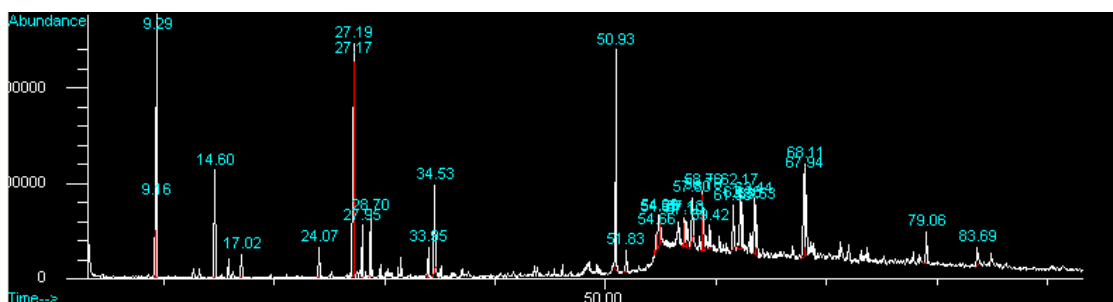
Διάγραμμα\_18β: Επίδραση θερμοκρασίας και ροής για σταθερή πίεση (280bar)

## VII-3 Χημική Ανάλυση Δειγμάτων

Ακολουθούν, ο συνολικός πίνακας ταυτοποιημένων ενώσεων με τη σειρά καταγραφής τους, σύμφωνα με τους χρόνους ανάσχεσης (Πίνακας\_42) και οι αναλυτικοί πίνακες όλων των δειγμάτων (Πίνακες\_43-57) με τα χρωματογραφήματά τους (Εικόνες\_25-39).

Ταυτοποιημένες ενώσεις	RT
α-Pinene	7.73
Camphene	8.41
β-Pinene	9.59
Myrcene	10.13
p-Cymene	11.83
1,8-Cineole	12.28
γ-Terpinene	13.37
Linalool	15.55
β-Thujone	15.80
α-Thujone	16.37
Camphor	17.97
L-Borneol	19.17
Terpinen-4-ol	19.52
α-Terpineol	20.34
Carvacrol	25.37
α-Terpinyl acetate	27.36
β-Caryophyllene	30.59
Aromadendrene	31.35
α-Caryophyllene	32.09
δ-Cadinene	34.88
Caryophyllene Oxide	37.38
γ-Gurjunene	37.89
Viridiflorol	38.00
Humulene epoxide II	38.51
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	53.91
Manool	54.15
5,7-Dimethoxy-1-naphthol	55.05
Oleic acid	58.04
2-Methoxy-3,8-dioxocephalotax-1-en	61.02
Ferruginol	62.33
Estra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-one	64.76
Oleic acid, 3-hydroxy propyl ester	65.39
Oleic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	65.58
9-Octadecenal	66.66
Cyclopentadecanone	66.85
Waxes - Higher Alkanes	[75,84 - 89.30]

Πίνακας 42: Ταυτοποιημένες ενώσεις με τους χρόνους ανάσχεσης τους

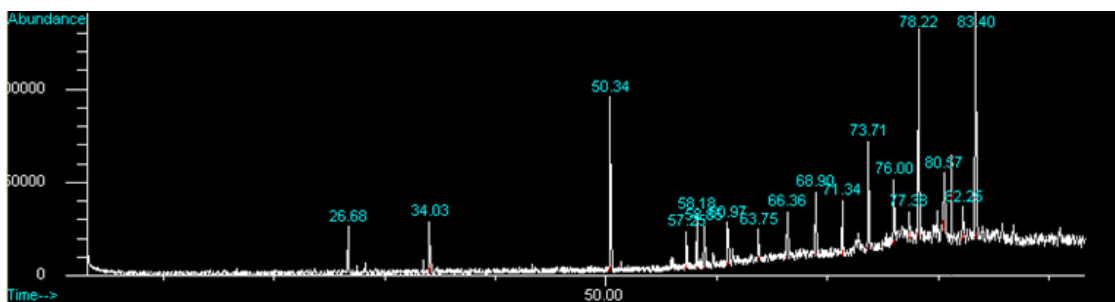


*Εικόνα 25: Χρωματογράφημα διηθήματος εκχύλισης Soxhlet με αιθανόλη*

Sx-E_liquid	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
1,8-Cineole	13.12
Camphor	5.41
α-Terpineol	0.98
α-Terpinyl acetate	1.22
β-Caryophyllene	11.98
Aromadendrene	2.04
α-Caryophyllene	2.42
δ-Cadinene	0.66
Caryophyllene Oxide	1.40
Viridiflorol	3.40
Manool	12.48
5,7-Dimethoxy-1-naphthol	1.20
Oleic acid	5.52
2-Methoxy-3,8-dioxocephalotax-1-en	2.58
Estra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-one	2.31
Oleic acid, 3-hydroxy propyl ester	3.14
Oleic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	2.27
9-Octadecenal	2.97
Cyclopentadecanone	2.87
Waxes - Higher Alkanes	3.57
	81.54

*Πίνακας 43: Ταυτοποιημένες ενώσεις διηθήματος εκχύλισης Soxhlet με αιθανόλη*

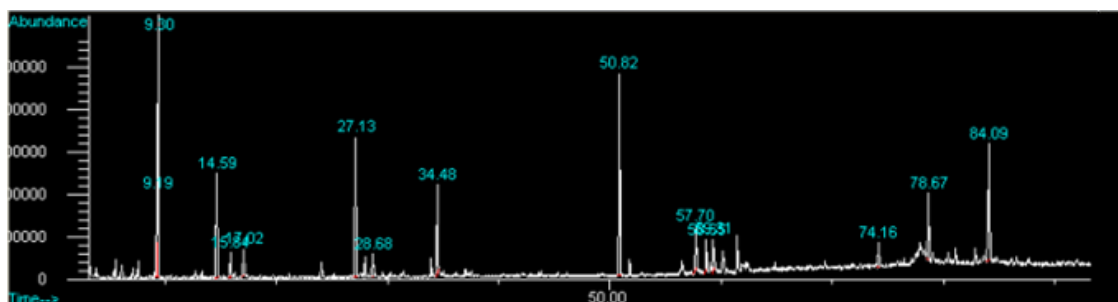




*Εικόνα 26: Χρωματογράφημα ιζήματος εκχύλισης Soxhlet με αιθανόλη*

Sx-E_solid	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
β-Caryophyllene	2.69
Viridiflorol	2.78
Manool	11.31
6,7-Bis(trimethylsilyl)-2,3-naphthalenedicarboxylic anhydride	3.02
Estra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-one	3.74
Waxes - Higher Alkanes	65.06
	88.60

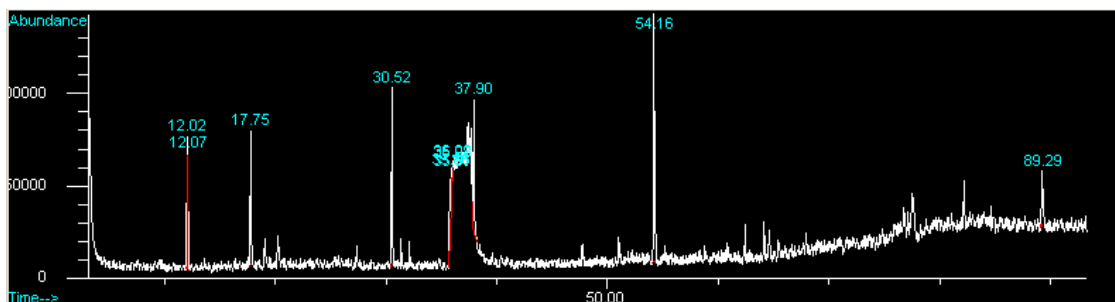
*Πίνακας 44: Ταυτοποιημένες ενώσεις ιζήματος εκχύλισης Soxhlet με αιθανόλη*



Εικόνα 27: Χρωματογράφημα διηθήματος εκχύλισης Soxhlet με εξάνιο

Sx-H_liquid	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
α-Pinene	0.85
Camphene	0.56
β-Pinene	1.44
1,8-Cineole	18.98
α-Thujone	0.38
Camphor	7.40
α-Terpineol	2.04
α-Terpinyl acetate	1.01
β-Caryophyllene	8.83
Aromadendrene	1.26
α-Caryophyllene	1.36
δ-Cadinene	0.40
Viridiflorol	5.16
Manool	14.44
2-Methoxy-3,8-dioxocephalotax-1-en	3.13
Ferruginol	0.94
5,6,7-trimethoxy-3-(4'-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	2.29
Estra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-one	2.41
Waxes - Higher Alkanes	21.14
	94.02

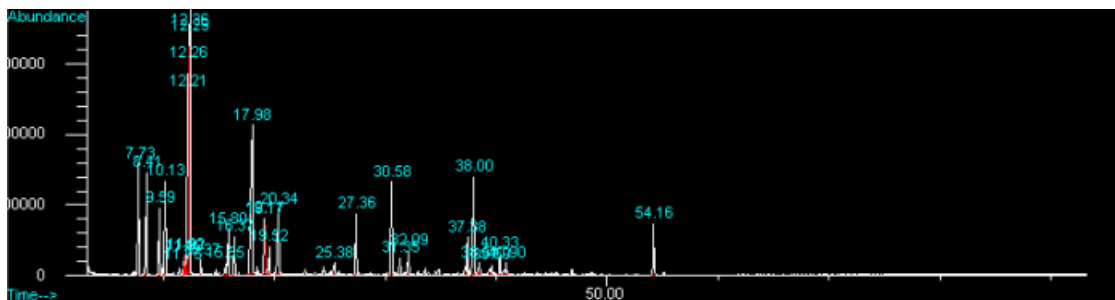
Πίνακας 45: Ταυτοποιημένες ενώσεις διηθήματος εκχύλισης Soxhlet με εξάνιο



*Εικόνα 28: Χρωματογράφημα ιζήματος εκχύλισης Soxhlet με αιθανόλη*

Sx-H_solid	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
1,8-Cineole	13.96
Camphor	10.25
$\beta$ -Caryophyllene	27.69
Aromadendrene	1.99
$\alpha$ -Caryophyllene	1.82
Manool	21.19
Waxes - Higher Alkanes	10.51
	87.41

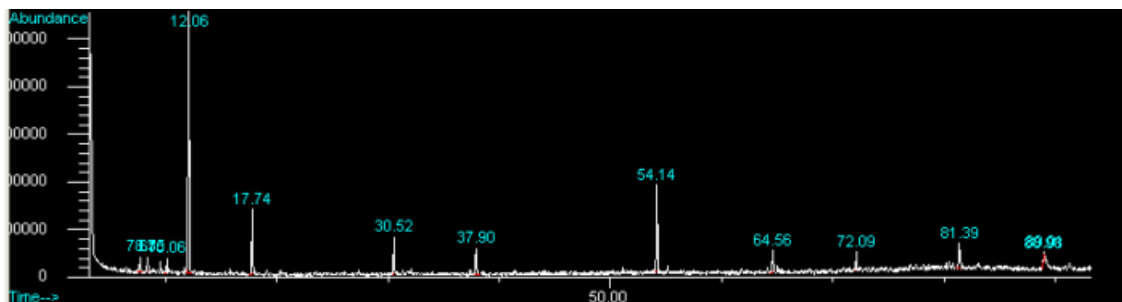
*Πίνακας 46: Ταυτοποιημένες ενώσεις ιζήματος εκχύλισης Soxhlet με αιθανόλη*



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου υδροαπόσταξης

HD-W	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
α-Pinene	4.08
Camphene	3.94
β-Pinene	2.62
Myrcene	4.03
p-Cymene	2.38
1,8-Cineole	31.65
γ-Terpinene	0.44
Linalool	0.54
β-Thujone	2.14
α-Thujone	1.62
Camphor	14.42
L-Borneol	1.36
Terpinen-4-ol	1.04
α-Terpineol	4.29
Carvacrol	0.59
α-Terpinyl acetate	2.64
β-Caryophyllene	4.71
Aromadendrene	0.72
α-Caryophyllene	0.97
Caryophyllene Oxide	1.59
Viridiflorol	6.75
Humulene epoxide II	0.55
Manool	2.48
	95.55

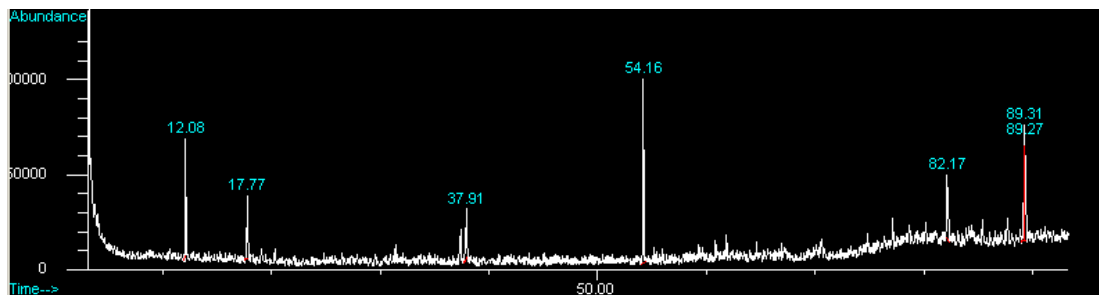
Πίνακας 47: Ταυτοποιημένες ενώσεις αιθέριου ελαίου υδροαπόσταξης



*Εικόνα 30: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος υπέρηχων με αιθανόλη-νερό*

U-E.W	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
α-Pinene	2.42
Camphene	1.91
Myrcene	2.27
1,8-Cineole	39.28
Camphor	10.24
β-Caryophyllene	6.34
Viridiflorol	7.15
Manool	15.38
Waxes - Higher Alkanes	7.30
	92.29

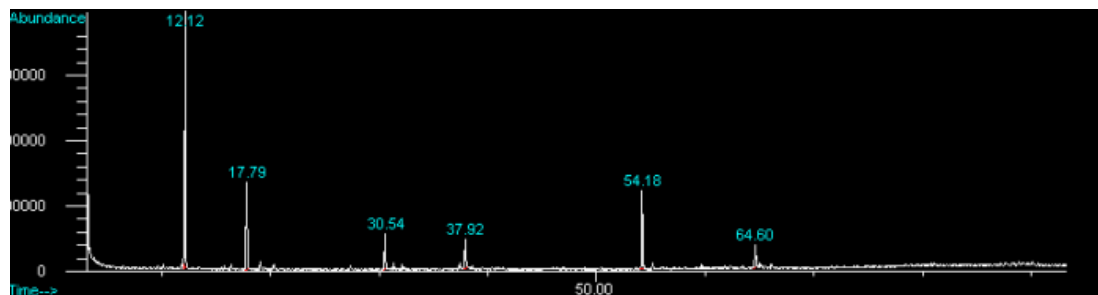
*Πίνακας 48: Ταυτοποιημένες ενώσεις εκχυλίσματος υπέρηχων με αιθανόλη-νερό*



*Εικόνα 31: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος υπέρηχων με εξάνιο*

U-H	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
1,8-Cineole	12.41
Camphor	7.29
γ-Gurjunene	7.38
Manool	29.19
Waxes - Higher Alkanes	43.37
	99.64

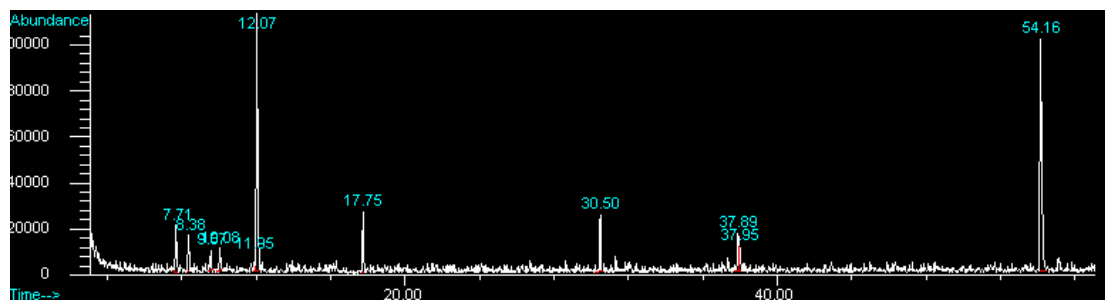
*Πίνακας 49: Ταυτοποιημένες ενώσεις εκχυλίσματος υπέρηχων με εξάνιο*



*Εικόνα 32: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος μικροκυμάτων με αιθανόλη-νερό*

MW-E.W	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
1,8-Cineole	45.65
Camphor	15.71
β-Caryophyllene	6.77
γ-Gurjunene	8.59
Manool	18.58
	95.30

*Πίνακας 50: Ταυτοποιημένες ενώσεις εκχυλίσματος μικροκυμάτων με αιθανόλη-νερό*

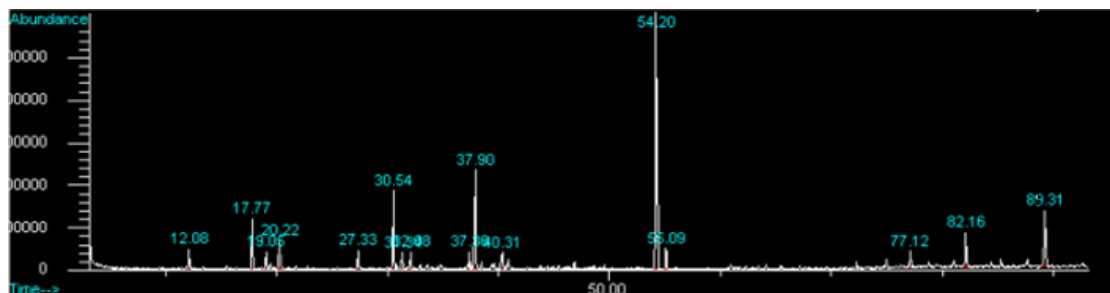


*Εικόνα 33: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος υπό πίεση με αιθανόλη-νερό*

NT-E.W	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
α-Pinene	4.79
Camphene	4.01
β-Pinene	1.89
Myrcene	2.20
1,8-Cineole	31.02
Camphor	6.10
β-Caryophyllene	5.90
γ-Gurjunene	6.70
Manool	37.39
	100.00

*Πίνακας 51: Ταυτοποιημένες ενώσεις εκχυλίσματος υπό πίεση με αιθανόλη-νερό*

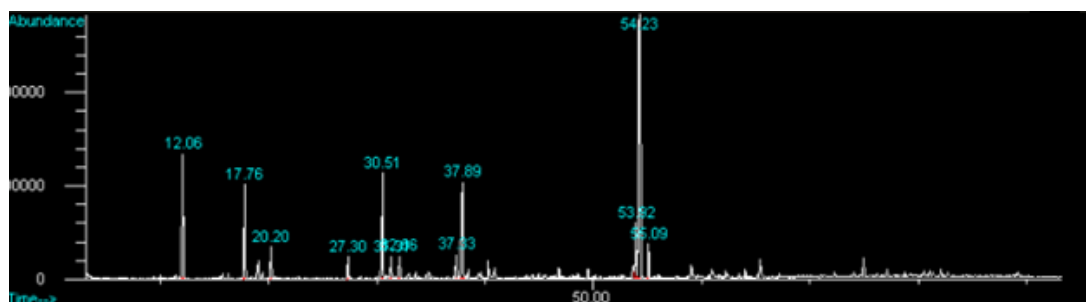




Εικόνα 34: Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης SC.40.100.1-1

SC.40.100.1-1	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
1,8-Cineole	1.90
Camphor	5.01
L-Borneol	2.67
α-Terpineol	3.40
α-Terpinyl acetate	1.90
β-Caryophyllene	8.49
Allo-Aromadendrene	1.67
α-Caryophyllene	1.78
Caryophyllene Oxide	1.87
Viridiflorol	12.32
Manool	36.11
Waxes - Higher Alkanes	18.05
	95.17

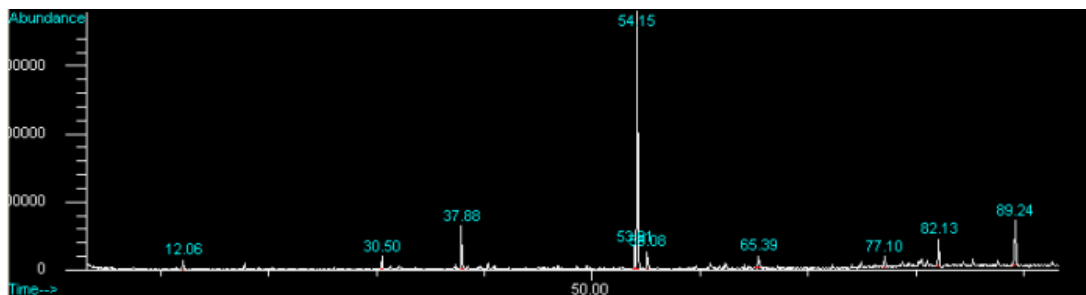
Πίνακας 52: Ταυτοποιημένες ενώσεις αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης



Εικόνα 35: Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης SC.40.100.1-2

SC.40.100.1-2	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
1,8-Cineole	9.50
Camphor	7.54
Borneol	2.17
$\alpha$ -Terpineol	2.77
$\alpha$ -Terpinyl acetate	1.62
$\beta$ -Caryophyllene	8.28
Aromadendrene	1.76
$\alpha$ -Caryophyllene	1.76
Caryophyllene Oxide	1.91
Viridiflorol	9.53
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	8.21
Manool	33.18
5,7-Dimethoxy-1-naphthol	3.03
Oleic acid, trimethylsilyl ester	1.91
Waxes - Higher Alkanes	1.48
	94.65

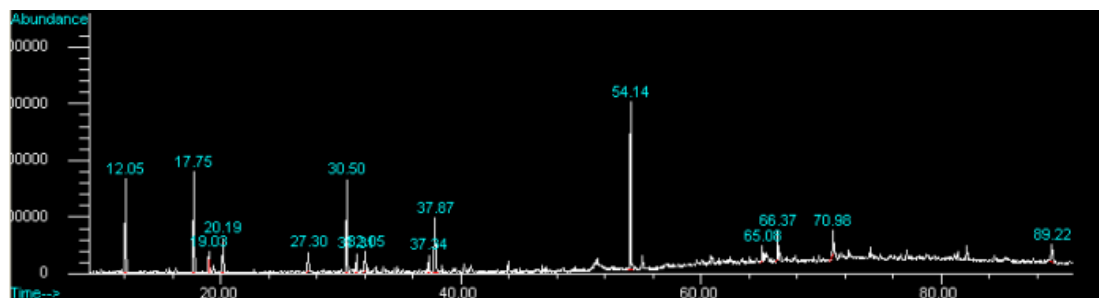
Πίνακας 53: Ταυτοποιημένες ενώσεις αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης



*Εικόνα 36: Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης SC.60.280.3-1*

SC.60.280.3-1	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
1,8-Cineole	1.48
β-Caryophyllene	2.30
Viridiflorol	10.27
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	4.06
Manool	50.85
Waxes - Higher Alkanes	23.50
	92.46

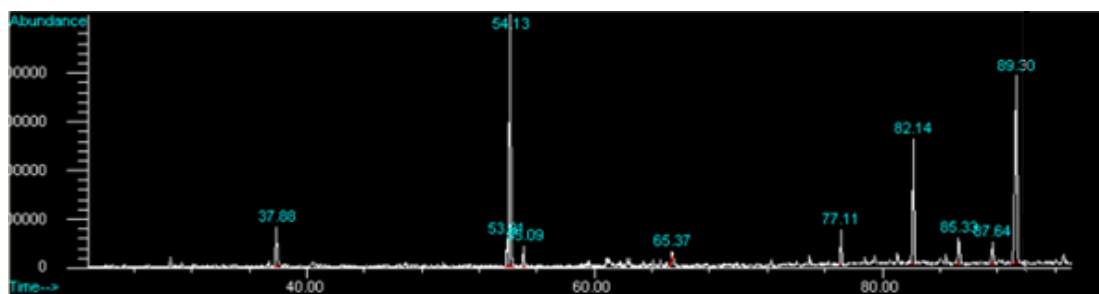
*Πίνακας 54: Ταυτοποιημένες αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης*



*Εικόνα 37: Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης SC.60.280.3-2*

SC.60.280.3-2	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
1,8-Cineole	15.37
Camphor	15.52
α-Terpineol	5.56
β-Caryophyllene	14.95
Viridiflorol	10.43
Manool	29.23
	91.06

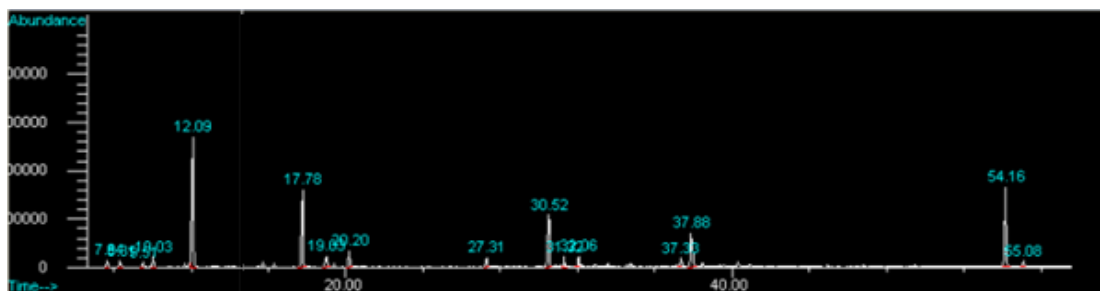
*Πίνακας 55: Ταυτοποιημένες ενώσεις αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης*



*Εικόνα 38:* Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης SC.50.190.2-1

SC.50.190.2-1	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
Camphor	0.25
β-Caryophyllene	1.00
γ-Gurjunene	4.96
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	2.10
Manool	25.51
cis-Ferruginol	0.61
Waxes - Higher Alkanes	54.98
	89.41

*Πίνακας 56:* Ταυτοποιημένες ενώσεις αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης



*Εικόνα 39: Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης SC.50.190.2-2*

SC.50.190.2-2	
Ταυτοποιημένες ενώσεις	%
Myrcene	2.36
1,8-Cineole	32.36
Camphor	18.05
L-Borneol	3.54
α-Terpineol	3.60
β-Caryophyllene	11.78
Viridiflorol	8.54
Manool	19.77
	100

*Πίνακας 57: Ταυτοποιημένες ενώσεις αιθέριου ελαίου υπερκρίσιμης εκχύλισης*

## VII-4 Μαθηματική Προσομοίωση ΥΕ

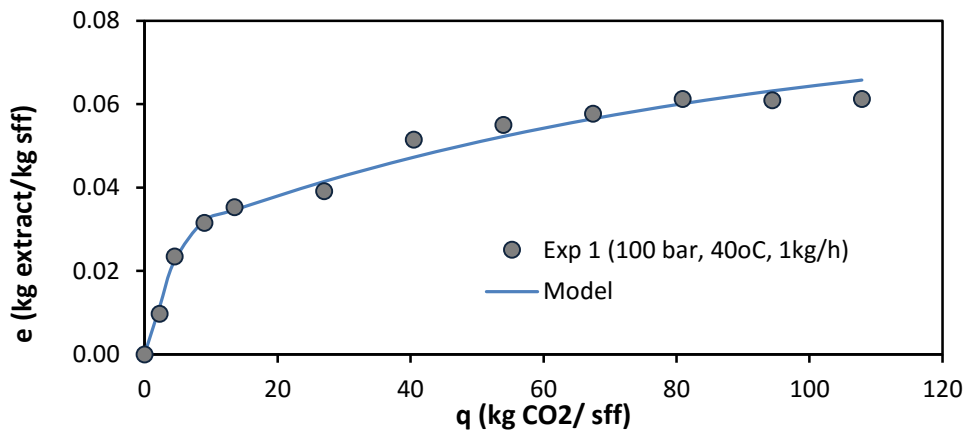
Στον παρακάτω Πίνακα\_58 μπορούμε να δούμε τις βέλτιστες τιμές, από κάποιες δοκιμές προσδιορισμού των συντελεστών που περιγράφουν απόκριση του συστήματος.

Συντελεστής Μεταβλητής	9 - Συντελεστές	7 - Συντελεστές	6 - Συντελεστές
<i>constant</i>	0,028403553	-	-
$\alpha_1$	0,04716861	0,053114807	0,05433000
$\alpha_2$	3,560160013	3,560779573	3,60300000
$\alpha_3$	-	-	-
$\alpha_4$	-0,053133468	-0,052211835	-0,05203000
$\alpha_5$	-0,018565339	-0,018136945	-0,01890000
$\alpha_6$	0,000321913	0,000309329	0,00032030
$\alpha_7$	-0,000266402	6,73493E-05	-
$\alpha_8$	-0,000069220	-8,33865E-05	-0,00008532
$\alpha_9$	-	-	-
$\alpha_{10}$	0,028403553	-	-
$R^2$	0,9936	0,9923	0,9921
<i>ssq</i>	0,1477	0,1807	0,1951
<i>AAE%</i>	1,0612	1,0964	1,2130

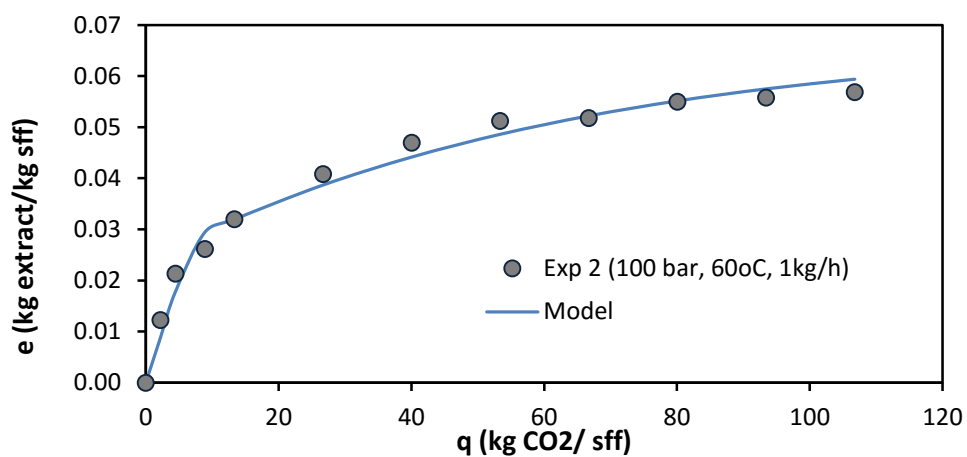
Πίνακας\_58: Δοκιμές επίδρασης και πλήθους των συντελεστών

## VII-5 Μαθηματική Μοντελοποίηση - Προσομοίωση ΥΕ

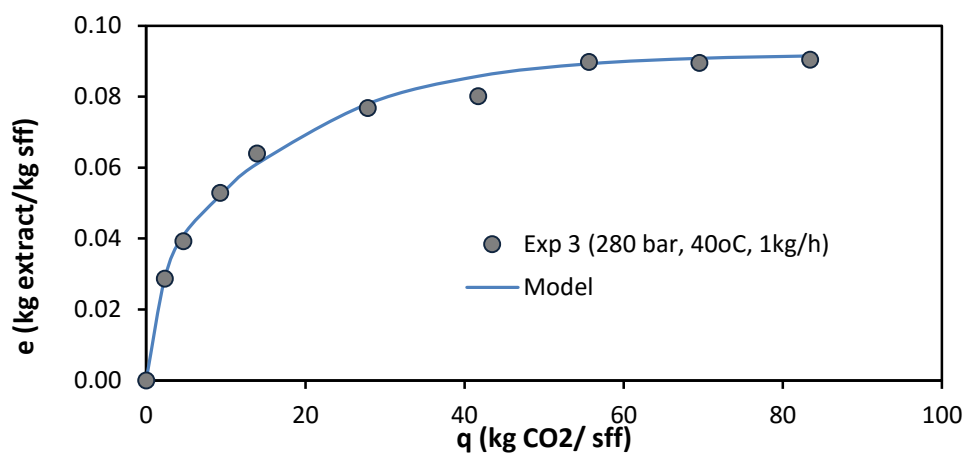
Στα παρακάτω Διαγράμματα\_20-28, διακρίνεται η περιγραφή των πειραματικών σημείων με το μοντέλο της Σονονά, για τα πειράματα της υπερκρίσιμης εκχύλισης.



*Διάγραμμα 19: Περιγραφή 1<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά*

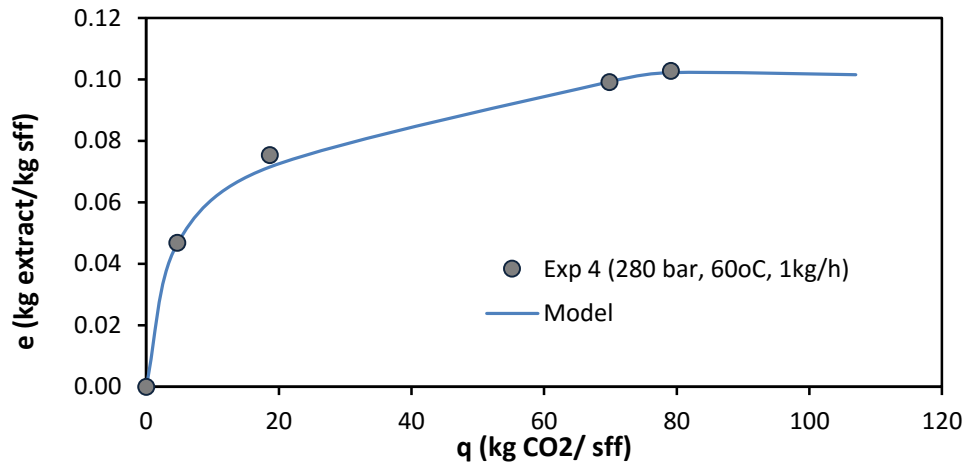


*Διάγραμμα 20: Περιγραφή 2<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά*

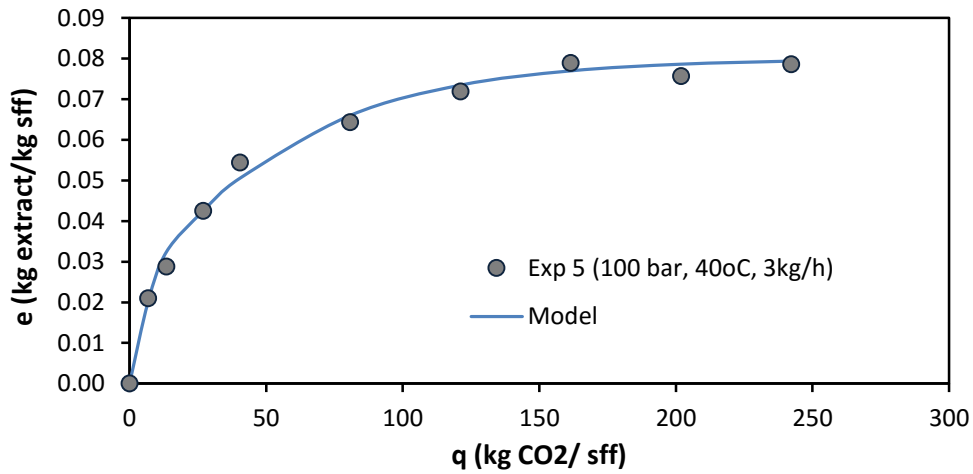




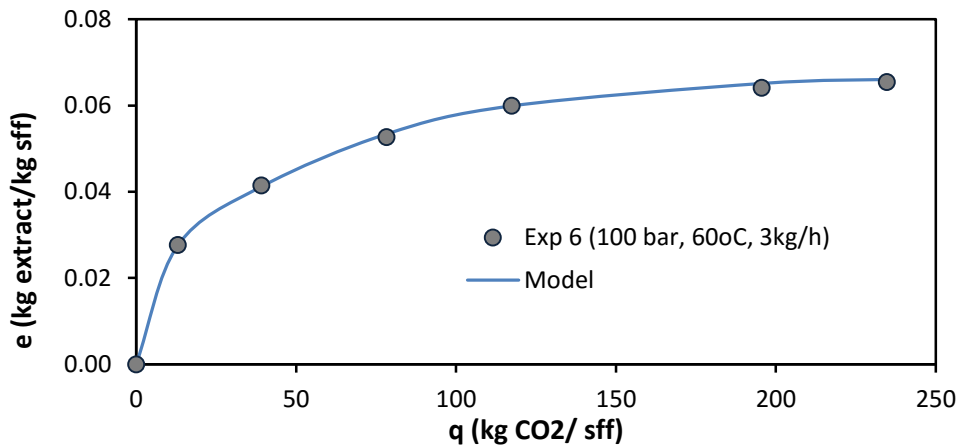
Διάγραμμα 21: Περιγραφή 3<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά



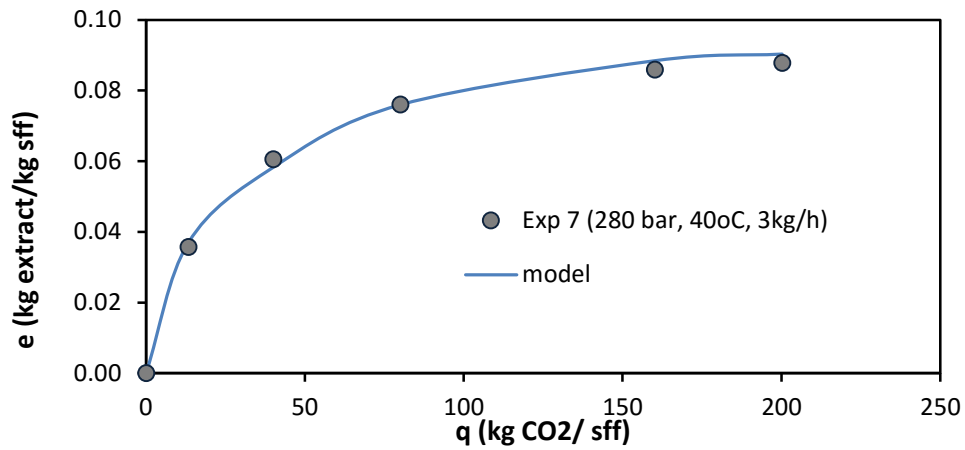
Διάγραμμα 22: Περιγραφή 4<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά



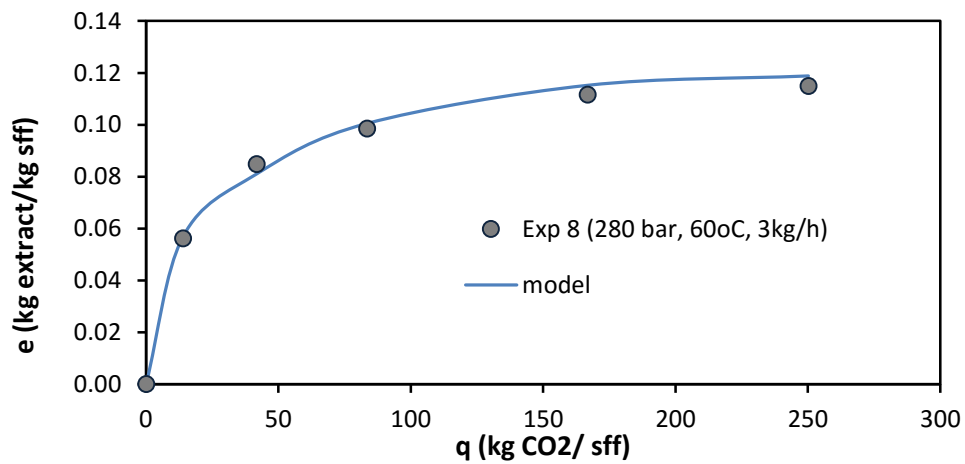
Διάγραμμα 23: Περιγραφή 5<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά



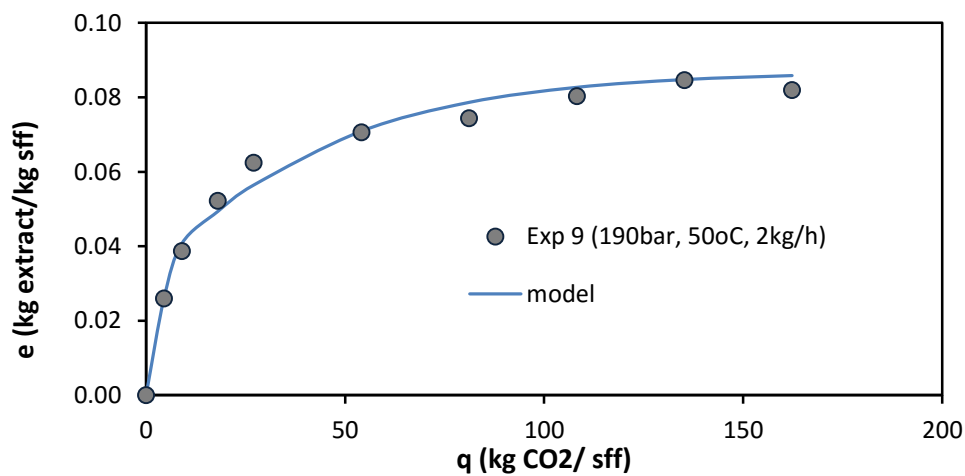
Διάγραμμα 24: Περιγραφή 6<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά



*Διάγραμμα 25: Περιγραφή 7<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά*



*Διάγραμμα 26: Περιγραφή 8<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά*



*Διάγραμμα 27: Περιγραφή 9<sup>ου</sup> πειράματος ΥΕ από το μοντέλο Σονονά*

Πειράματα	Κωδικοί	$q_m$	$q_n$
1	SC.40.100.1	3.7143	11.2547
2	SC.60.100.1	0.6915	8.4485
3	SC.40.280.1	2.0535	6.0050
4	SC.60.280.1	0.9265	7.8930
5	SC.40.100.3	10.9048	18.6855
6	SC.60.100.3	7.3316	15.0859
7	SC.40.280.3	14.7870	18.5310
8	SC.60.280.3	12.8052	19.7604
9	SC.50.190.2	2.3288	9.5214

Πίνακας 59: Οι τιμές των  $q_m$  και  $q_n$  για τον διαχωρισμό των σταδίων

Exp_1	Exp_2	Exp_3	Exp_4	Exp_5	Exp_6	Exp_7	Exp_8	Exp_9
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.00961	0.008453	0.023787	0.046075	0.016247	0.027647	0.036036	0.056261	0.024388
0.019161	0.016891	0.043222	0.076896	0.031888	0.041412	0.059678	0.082747	0.041626
0.034363	0.029742	0.054701	0.099036	0.044246	0.053517	0.075057	0.098719	0.050928
0.038649	0.032276	0.061599	0.101496	0.05158	0.059987	0.087401	0.111868	0.058141
0.043977	0.038953	0.075748		0.065734	0.065136	0.08961	0.11557	0.071674
0.048624	0.04441	0.083421		0.07267	0.066043			0.077938
0.052673	0.048849	0.087502		0.076				0.080758
0.056195	0.052444	0.08965		0.077583				0.082011
0.059256	0.055346	0.090775		0.078331				0.082564
0.061914	0.057681							
0.06422	0.059557							

Πίνακας 60: Τα 3 διαφορετικά στάδια των πειραμάτων