



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΚΑΙ ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ



“Απομόνωση Ανάλυση και Χαρακτηρισμός των Δραστικών Συστατικών του Σκόρδου (*Allium Sativum*) Προέλευσης Βορείου Έβρου – Περιοχή Ν. Βύσσας με σκοπό την Μελέτη και Ανάδειξη των Ιδιαίτερων Χαρακτηριστικών του”

ΟΡΕΣΤΙΑΔΑ 2014

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ Αθανάσιος Κυμπάρης

<b>ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΡΓΟΥ</b>	81188
<b>ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΟΥ</b>	Απομόνωση, Ανάλυση και Χαρακτηρισμός των Δραστικών Συστατικών του Σκόρδου προέλευσης Βορείου Έβρου (Περιοχή Ν. Βύσσας) με σκοπό την Ανάδειξη των Ιδιαίτερων Χαρακτηριστικών του
<b>ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ</b>	Αθανάσιος Κυμπάρης, Επίκουρος Καθηγητής
<b>ΤΜΗΜΑ</b>	Αγροτικής Ανάπτυξης
<b>ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ</b>	Χημείας & Βιοχημείας
<b>ΦΟΡΕΑΣ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ</b>	Περιφέρεια Ανατολικής Μακεδονίας & Θράκης
<b>ΠΡΟΫΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ</b>	16.000,00 ευρώ
<b>ΔΙΑΡΚΕΙΑ</b>	2013 – 2014 (ένα έτος)

## Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

<b>A.</b>	<b>Υπάρχουσα γνώση (state of the art)</b>	4
<b>B.</b>	<b>Αναλυτική πορεία του έργου - Μεθοδολογία</b>	12
<b>B.1.</b>	<b>Προμήθεια και Συντήρηση Φυτικού Υλικού</b>	12
<b>B.2.</b>	<b>Ανάλυση Πτητικών Συστατικών</b>	12
B.2.1.	Παραλαβή αιθερίου ελαίου.	12
B.2.2.	Χημικά αντιδραστήρια.	14
B.2.3.	Οργανολογία Ανάλυσης Αιθερίων Ελαίων	15
B.2.4.	Αποτελέσματα και Συζήτηση της Παραλαβής και Ανάλυσης των Αιθερίων Ελαίων του Σκόρδου.	17
B.2.5.	Συμπεράσματα της Μελέτης των Πτητικών Συστατικών	30
<b>B.3.</b>	<b>Ανάλυση Μη Πτητικών Συστατικών</b>	31
B.3.1.	Παραλαβή μη πτητικών συστατικών (Αλλιίνης & Μεθίνης).	31
B.3.2.	Χημικά αντιδραστήρια.	32
B.3.3.	Οργανολογία Ανάλυσης μη πτητικών συστατικών (Αλλιίνης & Μεθίνης)	32
B.3.4.	Αποτελέσματα και Συζήτηση της Παραλαβής και Ανάλυσης των μη πτητικών συστατικών του Σκόρδου	33
<b>B.4.</b>	<b>Ανάλυση Μη Επεξεργασμένων Εκχυλισμάτων</b>	42
B.4.1.	Παραλαβή μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων του σκόρδου.	42
B.4.2.	Χημικά αντιδραστήρια.	43
B.4.3.	Οργανολογία & Μεθοδολογία Ανάλυσης μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων σκόρδου	43
B.4.4.	Αποτελέσματα και Συζήτηση της Ανάλυσης των μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων του Σκόρδου.	44
<b>Γ.</b>	<b>Γενικά Συμπεράσματα</b>	52

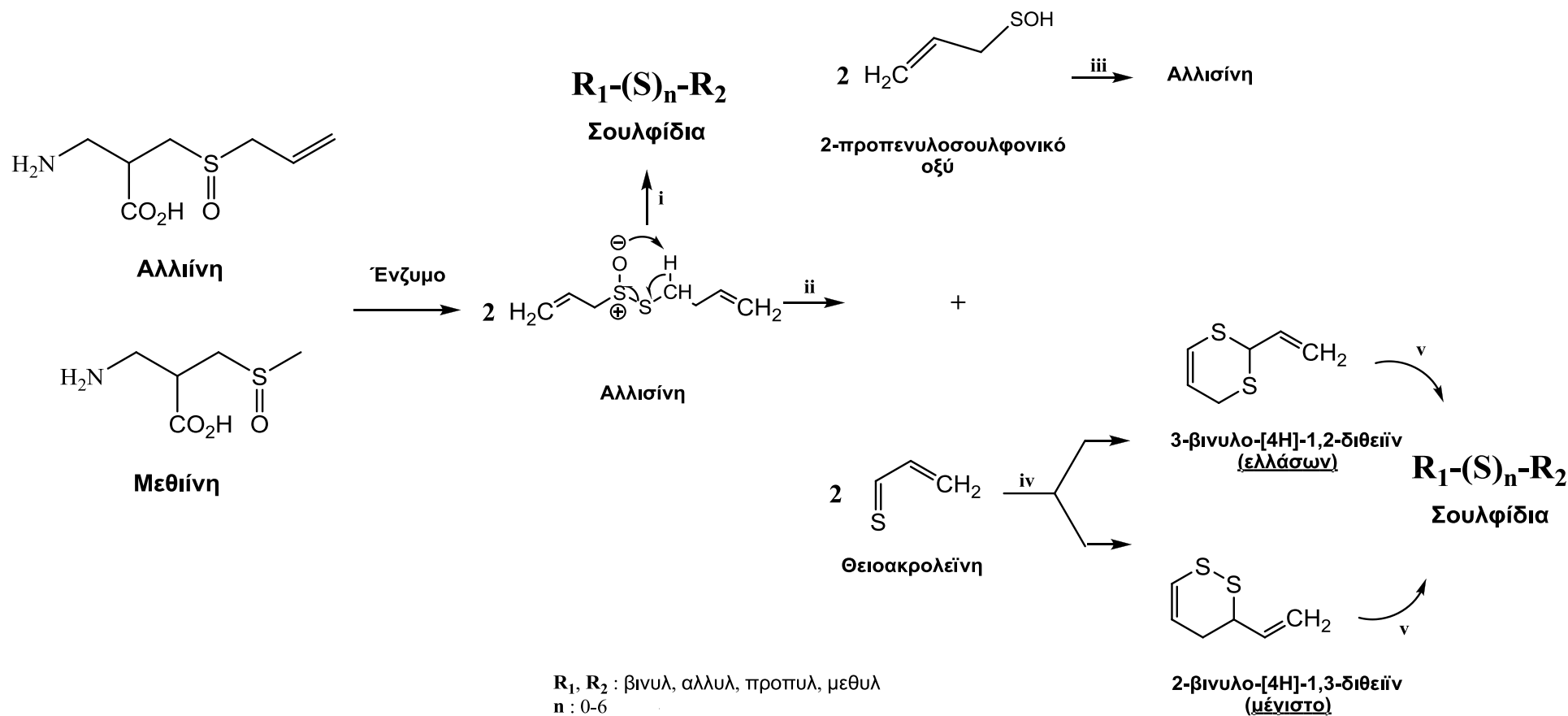
# ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΕΡΓΟΥ

---

## A) Υπάρχουσα γνώση (state of the art)

Το σκόρδο χρησιμοποιείται ευρέως στη μαγειρική για το άρωμα και τη γεύση που προσδίνει. Επίσης, το σκόρδο καλλιεργείται για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες, μια χρήση η οποία αυξάνεται με το πέρασμα των χρόνων. Ως εκ τούτου αυτή τη στιγμή στο εμπόριο διατίθεται μια μεγάλη ποικιλία από συμπληρώματα διατροφής και φαρμακευτικά σκευάσματα. Διαφοροποιείται όμως σε σχέση με άλλα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά ως προς το ότι τα πτητικά του συστατικά δεν υπάρχουν στον βολβό του αλλά αντίθετα δημιουργούνται με την διαδικασία που ακολουθεί.

Με την σύνθλιψη ή την κοπή μιας σκελίδας απελευθερώνονται μια σειρά από άοσμα σουλφόξυ παράγωγα του αμινοξέος κυστεΐνη με κυριότερους αντιπροσώπους την **Αλιΐνη** και **Μεθίνη**, τα οποία μεταβολίζονται ταχύτατα από το ένζυμο αλλινάση (τα αμινοξέα και το ένζυμο βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία της σκελίδας) ώστε να παράγουν την αλλισΐνη και άλλες οργανικές ενώσεις του θείου, που είναι η πηγή της χαρακτηριστικής μυρωδιάς του σκόρδου. Η αλλισΐνη, οργανική ένωση του θείου και εξαιρετικά θερμοευαΐσθητη, μετατρέπεται επίσης ταχύτατα σε μια σειρά από **Σουλφίδια**, ενώσεις οι οποίες περιέχουν από ένα (1) έως έξι (6) άτομα θείου (Σχήμα 1). Αυτά μαζί με τους υπόλοιπους δευτερογενείς μεταβολίτες του σκόρδου (σκορδινίνες, στεροειδή, τερπενοειδή, φλαβονοειδή και άλλες φαινόλες) ευθύνονται για όλο το φάσμα των θεραπευτικών του δράσεων όπως αυτές παρουσιάζονται και έχουν διερευνηθεί.



**Σχήμα 1.** Σχηματισμός Συστατικών Σκορδελαίου

Πειραματικά δεδομένα έχουν αποδείξει την πολύ ισχυρή αντιβιοτική δράση της ένωσης αλλισίνη. Αυτό σε συνδυασμό με τον μικρό χρόνο «ζωής» της αποσαφηνίζει τη χρήση της από το ίδιο το φυτό, ως μέρος του χημικού του οπλοστασίου σε περίπτωση προσβολής του ιστού. Έτσι το φυτό μπορεί να αμυνθεί από εξωτερικές επιμολύνσεις χωρίς την ίδια στιγμή να αυτοκαταστρέφεται ο ιστός του από τον ίδιο τον αμυντικό του μηχανισμό.

Εκτός από την αλλισίνη, μεγάλη βαρύτητα έχει δοθεί και στην μελέτη των ιδιοτήτων των σουλφιδίων, τα οποία άλλωστε στην πραγματικότητα καταναλώνονται με την μαγειρευμένη τροφή. Ως αποτέλεσμα, έχει αποδειχθεί ερευνητικά τόσο η ευεργετική τους δράση ως μέσο πρόληψης αλλά και καταπολέμησης διαφόρων ανθρώπινων νοσημάτων όσο και η δραστηριότητα τους στην καταπολέμηση εντόμων, όπως για παράδειγμα το κουνούπι (έντομο υγειονομικής σημασίας).

Οι ευεργετικές ιδιότητες του σκόρδου συνοψίζονται στα εξής:

#### **α) Γενική Αντιμικροβιακή Δράση**

- Διαθέτει ευρύ αντιβιοτικό φάσμα έναντι gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων
- Παρεμπόδιση των εντεροτοξικών στελεχών της E. Coli όπως και άλλων παθογόνων εντερικών βακτηριδίων, υπεύθυνων για διαρροϊκά σύνδρομα στον άνθρωπο και στα ζώα.
- Συνδυασμός εκχυλισμάτων σκόρδου με αντιβιοτικά σε μερικώς ή πλήρως συνεργικό αποτέλεσμα.
- Ικανοποιητική δραστηριότητα κατά της φυματίωσης
- Προστατευτική δράση κατά του καρκίνου του στομάχου χάρη στην παρεμπόδιση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για αυτή την πάθηση. Αποτελεσματική δοσολογία : 5 mg/ml από υδατικό εκχύλισμα σκόρδου δηλαδή μια (1) σκελίδα σκόρδου ανά ημέρα.

#### **β) Πρόσθετα Τροφίμων**

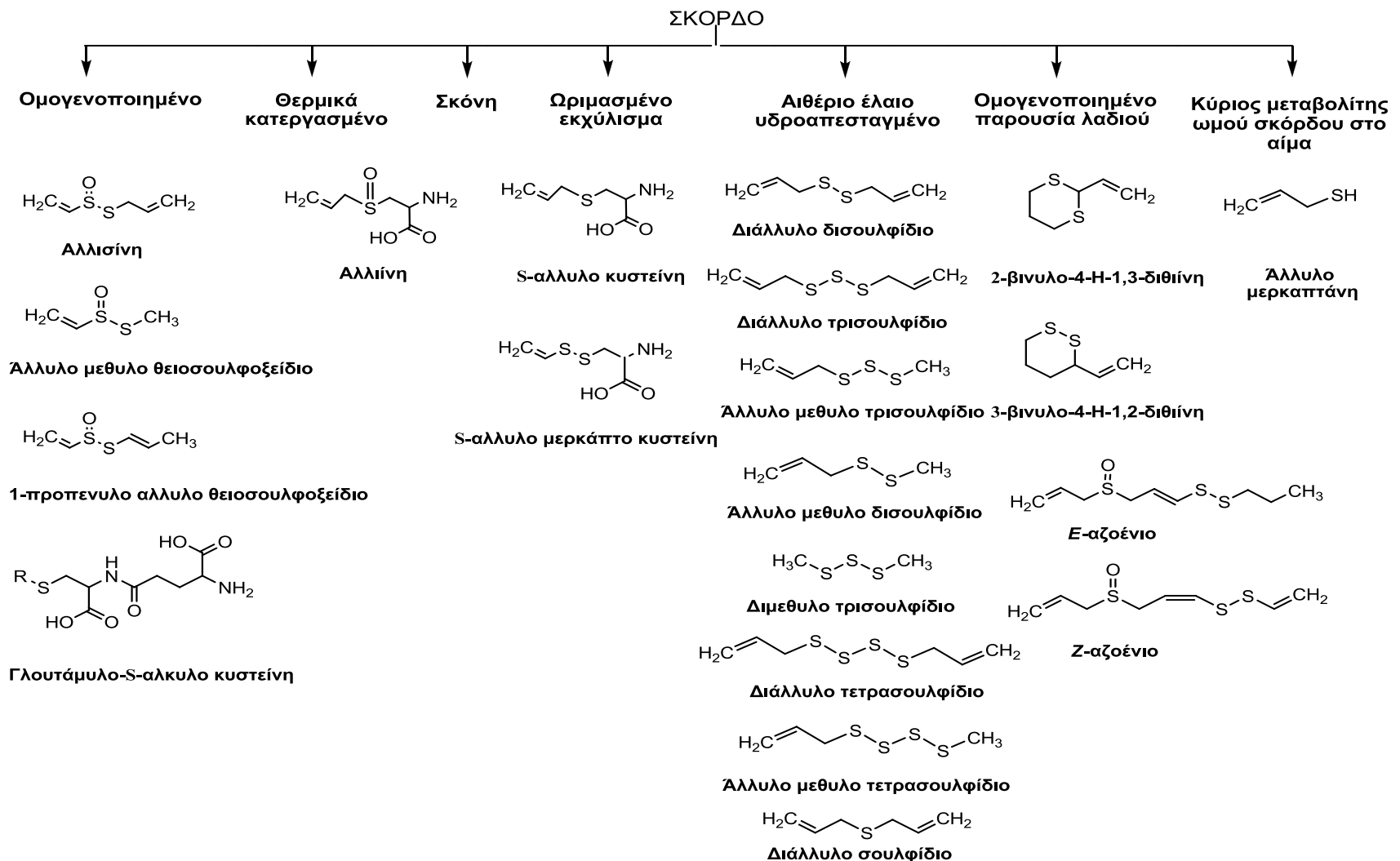
- Προτείνεται ως εναλλακτική στρατηγική στην αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα μικρόβια στα κλασικά αντιβιοτικά λειτουργώντας συνεργιστικά με αυτά στα σιτηρέσια των ζώων

- Εφαρμόζεται στην συντήρηση των τροφίμων (εμποδίζει την αύξηση των μικροοργανισμών όπως και των τοξινών που παράγονται από αυτά) στον αντίποδα των χημικών συντηρητικών

Οι μορφές με τις οποίες καταναλώνεται ή διατίθεται είναι οι εξής:

- Σκελίδες σκόρδου
- Φρέσκος χυμός
- Φρέσκα υδατικά και αλκοολικά εκχυλίσματα
- Λυοφιλοποιημένες σκόνες (αφυδατωμένο προϊόν σε χαμηλή θερμοκρασία)
- Απεσταγμένα έλαια (Σκορδέλαιο)
- Αλκοολικό εκχύλισμα σκόρδου με την τεχνική της βραδείας ωρίμανσης (περίπου 20 μήνες, Kyolic ή Aged Garlic)
- Αλκοολικά εκχυλίσματα με χρήση υπερήχων

Στο Σχήμα 2 δίνονται οι κυριότεροι τρόποι επεξεργασίας άρα και κατανάλωσης του σκόρδου σε σχέση με τα κυριότερα συστατικά που περιέχονται σε αυτά. Σε κάθε περίπτωση, βιβλιογραφικά, η ευεργετική δράση των προϊόντων επεξεργασίας του σκόρδου έχει συνδεθεί άμεσα με την ύπαρξη των συστατικών όπως αυτά παρουσιάζονται.



**Σχήμα 2.** Οι κυριότερες οργανοθειικές ενώσεις όπως αυτές εμφανίζονται στα διάφορα προϊόντα κατεργασίας του Σκόρδου



Σε κάθε περίπτωση χρήσης και εφαρμογής του σκόρδου ή των προϊόντων κατεργασίας αυτού είναι ξεκάθαρο γεγονός ότι η εμπορική τους αξία είναι συνάρτηση της γνώσης της περιεκτικότητας τους (χημικής σύστασης). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η διαφοροποίηση δειγμάτων σκόρδου σχετίζεται κυρίως με το συνολικό τους περιεχόμενο σε **Αλίνη** και **Μεθίνη** από τις οποίες στη συνέχεια προέρχονται όλες οι υπόλοιπες θειοενώσεις. Προκειμένου να υπολογισθεί η περιεκτικότητα του σκόρδου σε αυτά τα σουλφόξυ άμινο παράγωγα όλες οι βιβλιογραφικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την αδρανοποίηση της ακαριαίας ενζυμικής αντίδρασης μετατροπής αυτών στην ασταθή αλλισίνη (Σχήμα 1).

Η επιθυμητή διαφοροποίηση μπορεί επίσης να εκφραστεί στις ενώσεις που είναι τα τελικά παράγωγα θερμικής διάσπασης της αλλισίνης (σουλφίδια). Τα σουλφίδια περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του σκόρδου το οποίο και παράγεται με την τεχνική της απόσταξης. Το έλαιο του σκόρδου περιέχει κατά βάση ενώσεις του θείου, με κυριότερες το διαλλυλο δι- και τρισουλφίδιο όπως και το μεθυλοαλλυλο τρισουλφίδιο (Σχήμα 2). Η μεγάλη απόδοση του σκόρδου σε αιθέριο έλαιο, όπως και η υψηλή περιεκτικότητα του αιθερίου ελαίου σε αυτές τις ενώσεις είναι ένας άλλος δείκτης της αξίας του σκόρδου, δεδομένης της μεγάλης δραστηρότητας αυτών των ουσιών.

## Περίληψη σκοπού και σημασίας

---

Αντικείμενο της προτεινόμενης έρευνας αποτέλεσε η απομόνωση, η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός συστατικών του σκόρδου (πητικών και μη πητικών δευτερογενών μεταβολιτών) που παράγεται στον Β. Έβρο και ειδικότερα στην περιοχή της Ν. Βύσσας και χαρακτηρίζεται ως **Σκόρδο Βύσσας** σε σύγκριση με σκόρδα που παράγονται σε άλλες περιοχές της Ελλάδας όπως και σκόρδου που εισάγεται από άλλες χώρες.

Η παραλαβή των συστατικών των δειγμάτων του σκόρδου πραγματοποιήθηκε με μεθόδους απόσταξης και εκχύλισης, ενώ η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός τους επιτεύχθηκε με σύγχρονες τεχνικές ενόργανης χημικής ανάλυσης όπως Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC-MS) και Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (High Performance Liquid Chromatography, HPLC-MS).

Το σκόρδο είναι ένα από τα πρώτα στην ιστορία φυτά που χρησιμοποιήθηκαν εκτός από διατροφικό και με θεραπευτικό σκοπό τόσο στην Ελλάδα όσο και σε άλλες χώρες. Εμφανίζει αποδεδειγμένη εργαστηριακά δράση στην βελτιστοποίηση του καρδιαγγειακού συστήματος, δράση κατά των λοιμώξεων και του καρκίνου, εφαρμογή ως αντιοξειδωτικό, ανοσοτροποποιητικό, αντιφλεγμονώδες, αντιδιαβητικό και ορμονορρυθμιστικό. Επίσης, τα τελευταία χρόνια η επιβαλλόμενη κατάργηση ενός μεγάλου αριθμού συνθετικών εντομοκτόνων, είτε για λόγους τοξικότητας είτε για λόγους ανάπτυξης ανθεκτικότητας, οδήγησε στην προσπάθεια εύρεσης προϊόντων με φιλικότερη συμπεριφορά προς το περιβάλλον. Προς αυτήν την κατεύθυνση ήδη διατίθενται στο εμπόριο, σε χώρες όπως η Μ. Βρετανία και οι Η.Π.Α., σκευάσματα που περιέχουν είτε εκχυλίσματα, είτε αποστάγματα, είτε συστατικά αιθέριου ελαίου του σκόρδου. Τα προϊόντα αυτά, πολλές φορές σε συνδυασμό με συστατικά αιθέριων ελαίων και άλλων φυτών, παρουσιάζουν ισχυρή εντομοκτόνα δράση με σύγχρονη χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά και υψηλή ταχύτητα βιοδιάσπασης.

Στον Ελλαδικό χώρο το σκόρδο καλλιεργείται **Συστηματικά** κυρίως στην περιοχή του Έβρου και δευτερεύοντος της Εύβοιας, Στόχος της παρούσας πρότασης ήταν η πρωτοποριακή μελέτη, με επιστημονικούς όρους, του **Σκόρδου Βύσσας** ενώ συγχρόνως έγινε και η σύγκριση του με δείγματα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης τόσο της ημεδαπής όσο και της αλλοδαπής. Η σύγκριση συντελέστηκε

στα δραστικά συστατικά που περιέχονται σε εκχυλίσματα και αποστάγματα του σκόρδου.

**Απώτερος στόχος ήταν η ανάδειξη του τοπικού σκόρδου (Σκόρδο Βύσσας) ως προϊόντος υψηλής αξίας. Αυτό μπορεί να οδηγήσει αφενός μεν στην επέκταση και βελτιστοποίηση της καλλιέργειας και παραγωγής του προσφέροντας διεξόδους και αυξάνοντας το εισόδημα των αγροτών αφετέρου δε στην άντληση πληροφοριών που μπορούν να οδηγήσουν στην αναβάθμιση και χρήση του ως πρώτης ύλης για την παραγωγή πλήθους άλλων εμπορικών προϊόντων με υψηλή προστιθέμενη αξία.**

## **B) Αναλυτική πορεία του έργου - Μεθοδολογία**

### **B.1. Προμήθεια και Συντήρηση Φυτικού Υλικού**

Η προμήθεια του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε από:

- ❖ παραγωγούς της Ν. Βύσσας
- ❖ παραγωγούς ημεδαπής και συγκεκριμένα από την περιοχή της Εύβοιας (Χαλκίδας) και Βοιωτίας (Θήβα).
- ❖ εισαγόμενα από λαϊκές αγορές και συγκεκριμένα Κίνας και Αργεντινής

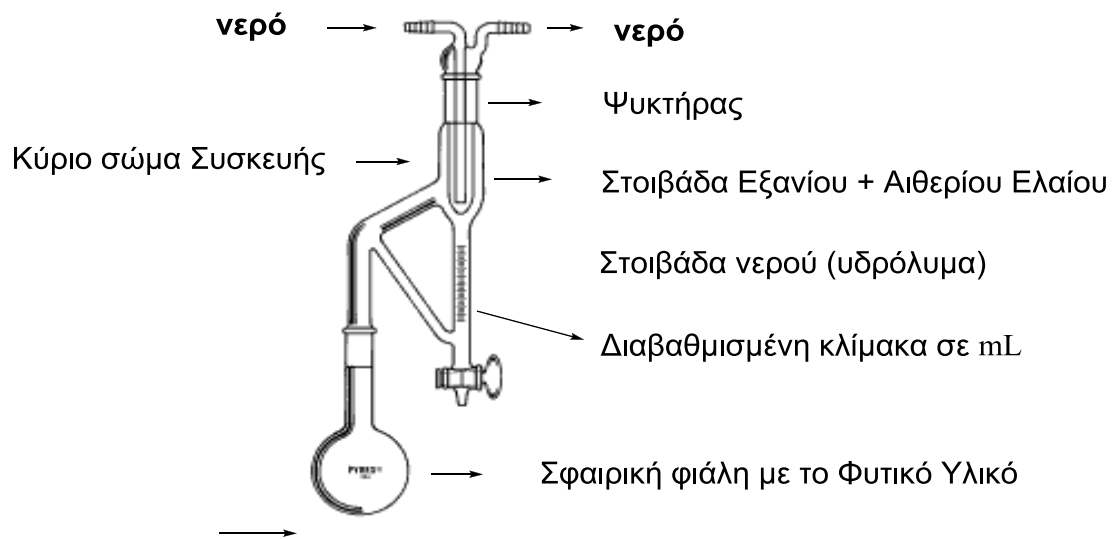
Ειδικότερα, έγινε η προμήθεια τουλάχιστον ενός κιλού φρέσκου σκόρδου σε κεφάλια. Από την περιοχή Ν. Βύσσας παραλήφθηκαν δεκατρία (13) δείγματα από τους αντίστοιχους παραγωγούς και θα αναφέρονται πλέον ως **Π1, Π2, Π3**...έως και **Π13**. Όσο αναφορά τα υπόλοιπα παραλήφθηκαν τρία (3) δείγματα από τη Θήβα (**Π14-Π16**), τρία (3) δείγματα από τη Χαλκίδα (**Π17-19**), τρία (3) εισαγόμενα δείγματα Κίνας (**Π20-Π22**) και τρία (3) δείγματα Αργεντινής (**Π23-Π25**).

Το φυτικό υλικό παραλήφθηκε ξηραμένο από τους παραγωγούς, σύμφωνα με τη διαδικασία φυσικής ξήρανσης που εφαρμόζουν. Στη συνέχεια η ξήρανση συνεχίστηκε για άλλες επτά ημέρες εντός εργαστηρίου, σε ελεγχόμενης συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, ώστε τα επίπεδα υγρασίας των βολβών να είναι συγκρίσιμα. Αφού τα δείγματα ξηράθηκαν, αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες ψύξης έως ότου αναλυθούν.

### **B.2. Ανάλυση Πτητικών Συστατικών**

#### **B.2.1. Παραλαβή αιθερίου ελαίου.**

Η παραλαβή του αιθερίου ελαίου, αφορούσαν στη μέθοδο της υδροαπόσταξης σε συσκευή τύπου Clevenger (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3.** Τροποποιημένη Συσκευή Υδροαπόσταξης *Clevenger*



Συγκεκριμένα, για τον κάθε ένα δείγμα (Π1 έως και Π25) οι σκελίδες του σκόρδου αφού αποφλοιώθηκαν με προσοχή, ζυγίστηκαν 100 g, τεμαχίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε μπλέντερ κουζίνας και τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 5 L με τη χρήση ενός λίτρου απιονισμένου νερού. Το σώμα της συσκευής Clevenger πληρώθηκε με νερό και επιπρόσθετα τοποθετήθηκαν 10 mL άπολου οργανικού διαλύτη (εξάνιο 99.0 %), με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί διπλή φάση. Το εξάνιο τοποθετείται εξαιτίας της μικρής απόδοσης σε πτητικά συστατικά από το σκόρδο, ώστε να μη χαθεί αιθέριο έλαιο στα τοιχώματα της συσκευής. Η διαδικασία της υδροαπόσταξης διήρκεσε 3 ώρες. Τα σταγονίδια του αιθερίου ελαίου διαλυτοποιούνται στην στοιβάδα του εξανίου ενώ το συναποσταζόμενο νερό επαναρέει στην σφαιρική. Ακολούθησε ψύξη του υδρολύματος και της οργανικής φάσης, συλλογή της φάσης του εξανίου, ξήρανση με άνυδρο θεικό μαγνήσιο, τοποθέτηση σε προζυγισμένο φιαλίδιο και απομάκρυνση του εξανίου (συμπύκνωση) κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου. Υπολογίστηκε η καθαρή μάζα του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκε από 100 g σκόρδου και εκφράστηκε και σε g αιθερίου ελαίου ανά 100 g νωπού σκόρδου. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε άλλες δυο φορές άρα συνολικά τρεις. Έτσι, για παράδειγμα για τον παραγωγό Π1 απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν, σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-22 °C), τρία δείγματα αιθερίου ελαίου με τους κωδικούς G1D1, G1D2 και G1D3 και η απόδοση για κάθε παραγωγό καταγράφηκε και εκτιμήθηκε ως μέσος όρος των τριών. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε πανομοιότυπα για όλους τους παραγωγούς αποδίδοντας συνολικά εβδομήντα πέντε (75) αποστάγματα, τα οποία αποθηκεύτηκαν έως ότου αναλυθούν.

### **B.2.2. Χημικά αντιδραστήρια.**

Χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ουσίες τα πτητικά σουλφίδια: διάλλυλο δισουλφίδιο, διάλλυλο τρισουλφίδιο, διάλλυλο μονοσουλφίδιο, διμεθυλο δισουλφίδιο, διμεθυλο τρισουλφίδιο.

### **B.2.3. Οργανολογία Ανάλυσης Αιθερίων Ελαίων.**

#### α) Ποιοτική ανάλυση με αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μαζών.

Για τον ανάλυση των παραληφθέντων αιθερίων ελαίων εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας ενώ για την ταυτοποίηση των συστατικών τους χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία μαζών. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας αέριος χρωματογράφος της εταιρίας Hewlett Packard 5890 σειράς II εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm πάχος στήλης) συνδεδεμένο με ανιχνευτή χρωματογράφο μαζών (GC-MS) της Hewlett Packard 5972, ο οποίος λειτουργεί σε πεδίο ιονισμού EI 70 eV. Η θερμοκρασία θαλάμου εισαγωγής του δείγματος όπως και του ανιχνευτή αντίστοιχα ήταν στους 220 και 290 °C. Το πρόγραμμα ανάλυσης περιλάμβανε άνοδο της θερμοκρασίας από τους 60 και 240 °C με ρυθμό 3 °C/λεπτό και μετά ισόθερμα στους 240 °C για 120 λεπτά. Το φέρον αέριο ήταν He με ροή 1 mL/λεπτό. Όγκος 1 μL των δειγμάτων συγκέντρωσης 1/100 v/v σε ακετόνη, εισαχθήκανε χειρονακτικά με την τεχνική splitless mode. Η αναγνώριση των συστατικών των αιθερίων ελαίων έγινε με σύγκριση των χρόνων έκλυσης όπως και των φασμάτων μάζας τους με αυτά προτύπων ουσιών. Επίσης έγινε σύγκριση με τα φάσματα μαζών ουσιών από ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες όπως NIST 98, Willey 275 και Adams 2007.

**Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 x 25 = 75 αναλύσεις.**

#### β) Ποσοτική ανάλυση με αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με ανιχνευτή φλόγας.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών του αιθερίου ελαίου του σκόρδου (εκφρασμένο σε εμβαδόν κορυφών, peak area), πραγματοποιήθηκε μέσω αέριου χρωματογράφου συνδεδεμένου με ανιχνευτή φλόγας (GC-FID) της εταιρίας Hewlett Packard 5890 σειράς II, εφοδιασμένο με ανιχνευτή φλόγας FID και τριχοειδή στήλη HP-5ms. Η θερμοκρασία θαλάμου εισαγωγής του δείγματος όπως και του ανιχνευτή αντίστοιχα ήταν στους 220 και 290 °C. Το πρόγραμμα ανάλυσης περιλάμβανε άνοδο της θερμοκρασίας από τους 60 και 240 °C με ρυθμό 3 °C/λεπτό και μετά ισόθερμα στους 240 °C για 120 λεπτά. Το φέρον αέριο ήταν He με ροή 1 mL/λεπτό. Όγκος 1 μL των δειγμάτων συγκέντρωσης 1/100 v/v σε ακετόνη, εισαχθήκανε χειρονακτικά με την τεχνική splitless mode. Για τη δημιουργία των

εναίσιμων δειγμάτων αναμίχθηκαν 10  $\mu\text{L}$  δείγματος ελαίου (γνωστής με ζύγιση μάζας) με 0,990 mL ακετόνης. Επίσης διαλύματα προτύπων ουσιών γνωστής συγκέντρωσης αναλύθηκαν με τις ίδιες συνθήκες. Η μάζα των επιμέρους συστατικών στο μίγμα πραγματοποιήθηκε είτε με σύγκριση του εμβαδού των κορυφών των προτύπων με αυτές των αγνώστων δειγμάτων είτε με εφαρμογή της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ουσιών (απουσία εμπορικών προτύπων) γνωστή ως παράγοντα απόκρισης (response factor).

**Συνολικά πραγματοποιήθηκαν  $3 \times 25 = 75$  αναλύσεις.**



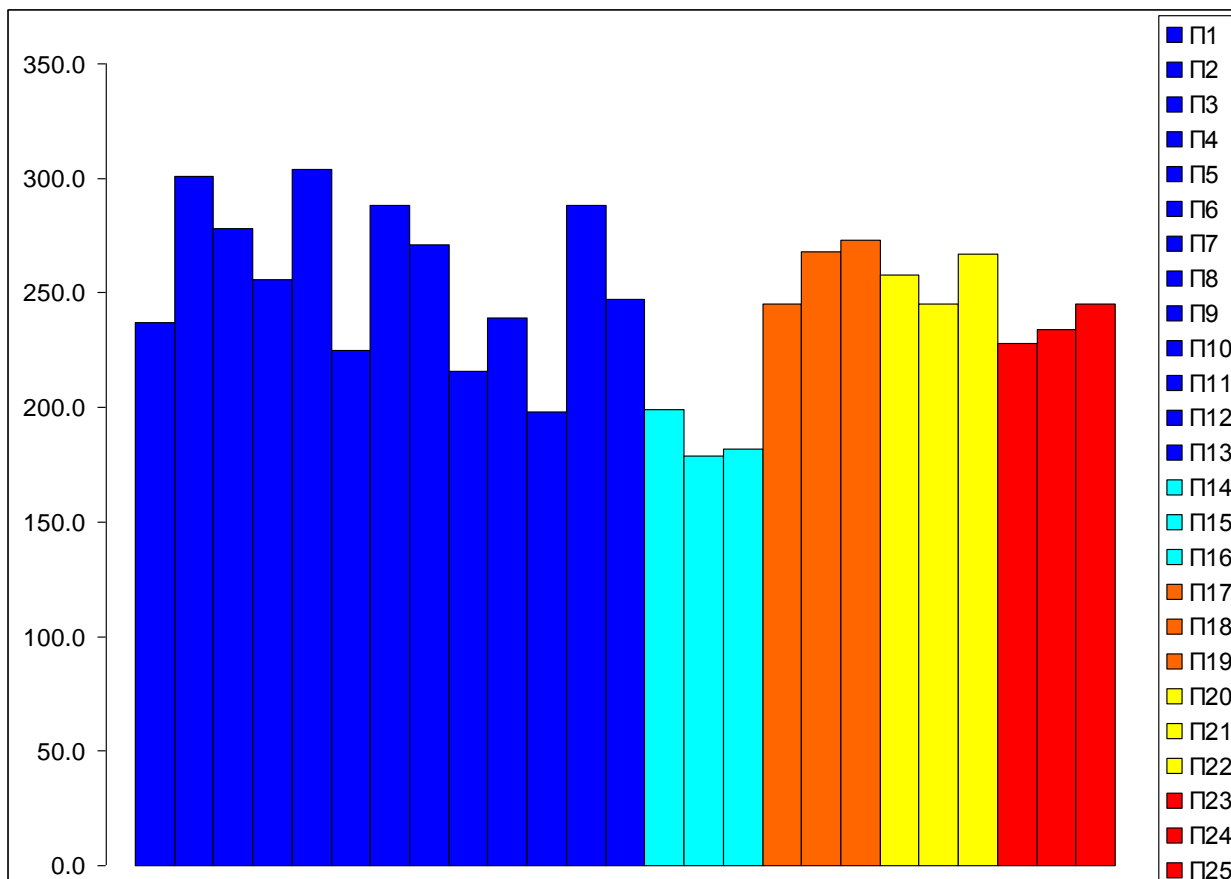
#### **B.2.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση της Παραλαβής και Ανάλυσης των Αιθερίων Ελαίων του Σκόρδου.**

α) Απόδοση παραλαμβανόμενων αιθερίων ελαίων.

Τα αποτελέσματα της παραλαβής των αιθερίων ελαίων προερχόμενα από σκόρδα διαφορετικών παραγωγών-δειγμάτων δίνονται στον **Πίνακα 1** και αναγράφονται ως μέσος τριών αποστάξεων ανα παραγωγό (n=3) εκφραζόμενα ως mg λαδιού ανά 100 g σκόρδου. Στη συνέχεια αποδίδονται και γραφικά οι μέση όροι στο **Διάγραμμα 1**.

<b>Παραγωγό</b>	<i>Απόδοση αιθερίου ελαίου (mg) / 100 φρέσκου σκόρδου</i>	
	<i>Μέσος όρος τριπλέτας αποστάξεων</i>	<i>Συντελεστής απόκλισης (<math>\pm</math> mg)</i>
<b>Π1</b> (Βύσσα)	237	17
<b>Π2</b> (Βύσσα)	301	22
<b>Π3</b> (Βύσσα)	278	21
<b>Π4</b> (Βύσσα)	256	11
<b>Π5</b> (Βύσσα)	304	16
<b>Π6</b> (Βύσσα)	225	17
<b>Π7</b> (Βύσσα)	288	24
<b>Π8</b> (Βύσσα)	271	23
<b>Π9</b> (Βύσσα)	216	31
<b>Π10</b> (Βύσσα)	239	25
<b>Π11</b> (Βύσσα)	198	11
<b>Π12</b> (Βύσσα)	288	31
<b>Π13</b> (Βύσσα)	247	25
<b>Π14</b> (Θήβα)	199	22
<b>Π15</b> (Θήβα)	179	19
<b>Π16</b> (Θήβα)	182	33
<b>Π17</b> (Χαλκίδα)	245	27
<b>Π18</b> (Χαλκίδα)	268	19
<b>Π19</b> (Χαλκίδα)	273	31
<b>Π20</b> (Κίνα)	258	8
<b>Π21</b> (Κίνα)	245	13
<b>Π22</b> (Κίνα)	267	17
<b>Π23</b> (Αργεντινή)	228	22
<b>Π24</b> (Αργεντινή)	234	17
<b>Π25</b> (Αργεντινή)	245	12

*Πίνακας 1. Μάζα των αιθερίων ελαίων (τριών επαναλήψεων και μέσοι όροι ανά παραγωγό) των σκόρδων όπως απομονώθηκαν από 100 g φυτικού υλικού εκφρασμένη σε mg αιθερίου ελαίου ανά 100g φυτικού υλικού.*

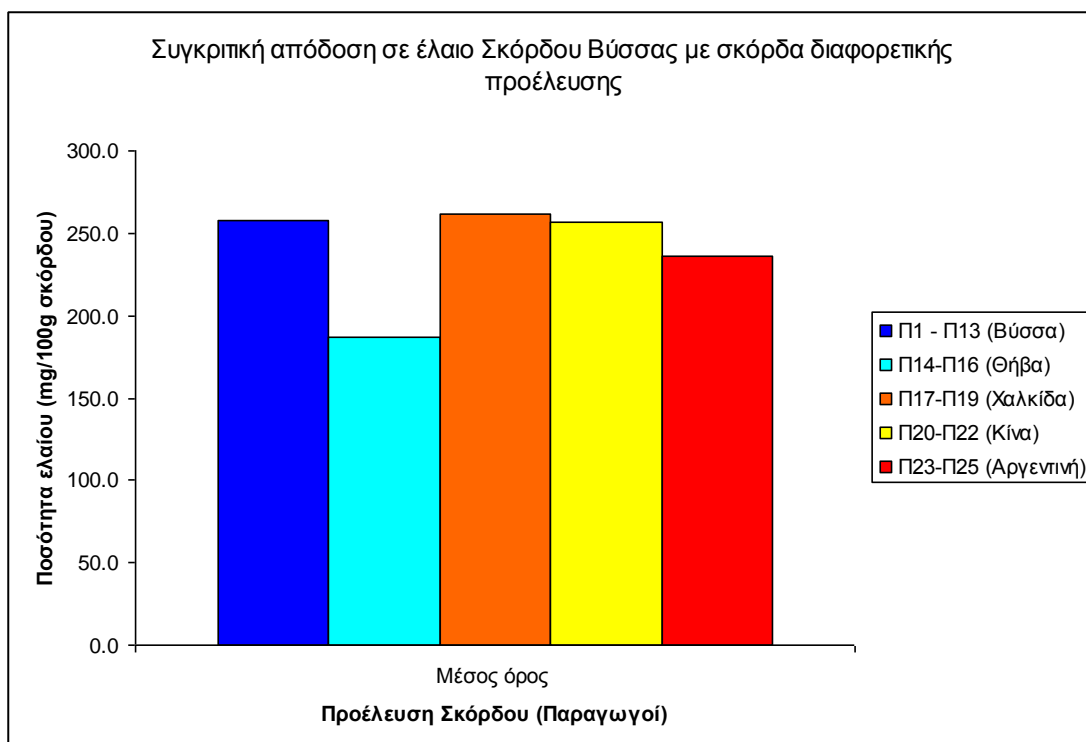


*Διάγραμμα 1. Μάζα των αιθερίων ελαίων (ως μέσοι όροι) σε mg από 100 g σκόρδου σχετιζόμενα ανά παραγωγό.*

Στο **Διάγραμμα 1** οι παραγωγοί Σκόρδου Βύσσας απεικονίζονται ως μπλε μπάρρες, της Θήβας με γαλάζιο, της Χαλκίδας με πορτοκαλί, της Κίνας με κίτρινο και της Αργεντινής με κόκκινο.

Στο **Διάγραμμα 2** απεικονίζονται συγκεντρωτικά οι μέσοι όροι απόδοσης αιθερίου ελαίου \ 100 g σκόρδου ανα ομάδα παραγωγών (Π1-Π13 Βύσσα), (Π14-Π16 Θήβα), (Π17-Π19 Χαλκίδα), (Π20-Π22 Κίνα) και (Π23-Π25 Αργεντινή) από τις πέντε περιοχές διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Είναι εμφανές ότι ποσοτικά το Σκόρδο Βύσσας εμφανίζει υψηλά ποσοστά απόδοσης σε έλαιο με το έλαιο Χαλκίδας και Κίνας να εμφανίζονται ανταγωνιστικά. Ακολουθεί, το έλαιο Αργεντινής ενώ τα σκόρδα Θήβας εμφανίζουν χαμηλές αποδόσεις.

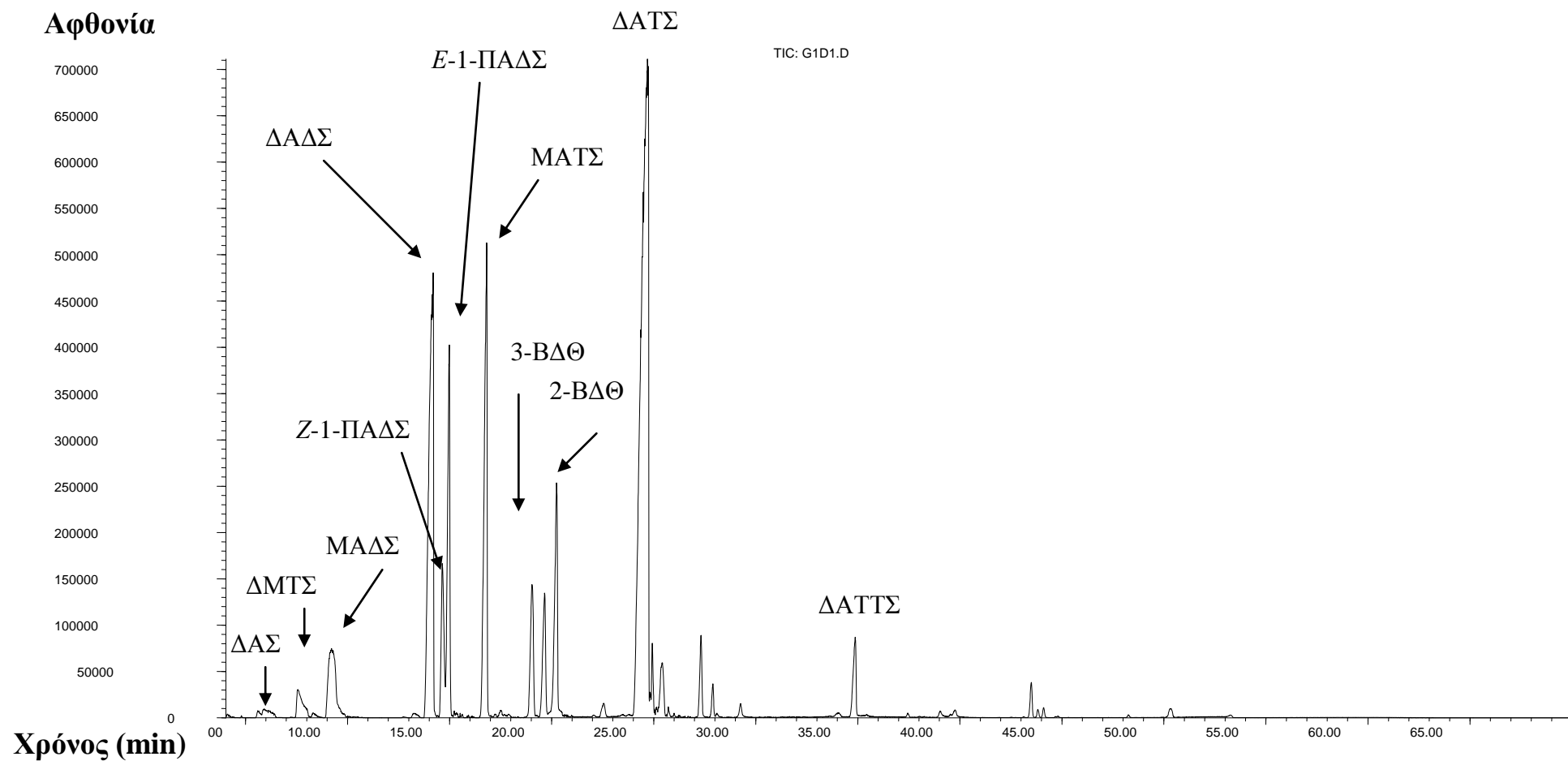


*Διάγραμμα 2. Μάζα των αιθερίων ελαίων (ως μέσοι όροι) σε mg από 100 g σκόρδου σχετιζόμενα σε περιοχές διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.*

*β) Ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραλαμβανόμενων ελαίων.*

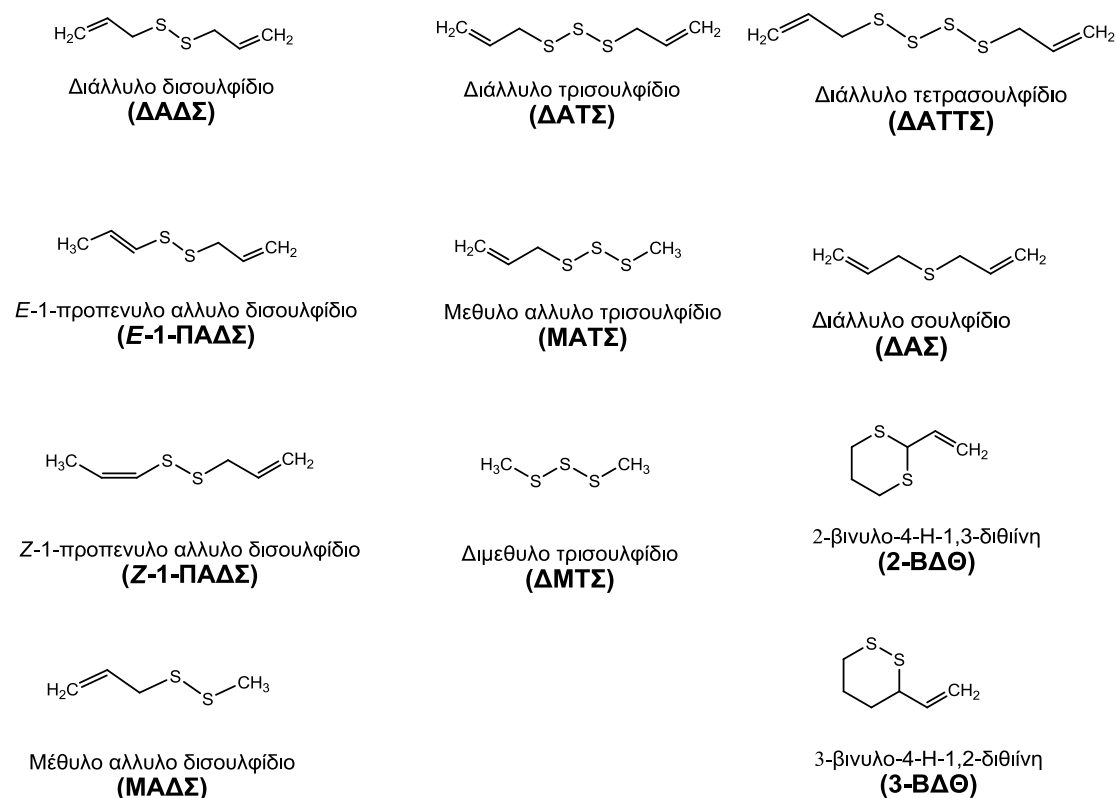
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μαζών (GC-MS) όλων των αιθερίων ελαίων που προέκυψαν από την απόσταξη των δειγμάτων σκόρδου διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, κατέληξε στην αναγνώριση των ίδιων περίπου συστατικών τα οποία ανήκουν στην τάξη των σουλφιδίων. Έτσι προέκυψαν εβδομήντα πέντε χρωματογραφήματα της μορφής του **Σχήματος 4**, όπου και εμφανίζονται τα αναγνωρισμένα κύρια συστατικά των ελαίων.

Σε ότι αφορά στην πειραματική πορεία των αναλύσεων, οι κωδικοί που δόθηκαν ακολούθησαν την εξής διαδικασία. : για παράδειγμα για τον παραγωγό Π1 δόθηκε ο κωδικός G1, οπότε για κάθε έλαιο που προέκυψε από την τριπλέτα απόσταξης, προέκυψαν όπως ειπώθηκε παραπάνω τριπλέτα ελαίων τα οποία αντιστοιχούν σε τριπλέτα χρωματογραφήματων με τους κωδικούς G1D1 (Garlic 1 Distillation 1), G2D2 και G3D3. Το υπόδειγμα του Σχήματος 4 αντιστοιχεί στο έλαιο της πρώτης απόσταξης του παραγωγού Π1.



**Σχήμα 4.** Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου Σκόρδου Βύσσας (G1D1) με τα κυριότερα σουλφίδια να παριστάνονται με τις συντομογραφίες τους.

Η επί τοις εκατό σύσταση των ελαίων απέδωσε, σε κατά κύριο λόγο, έντεκα συστατικά τα οποία συνιστούν πάνω από το 90% του συνόλου. Οι ουσίες αυτές σε σειρά αφθονίας ήταν το: διάλλυλο δισουλφίδιο (ΔΑΔΣ), διάλλυλο τρισουλφίδιο (ΔΑΤΣ), μεθυλο άλλυλο τρισουλφίδιο (ΜΑΤΣ), *E*-1-προπένυλο άλλυλο δισουλφίδιο (*E*-1-ΠΑΔΣ), *Z*-1-προπένυλο άλλυλο δισουλφίδιο (*Z*-1-ΠΑΔΣ), μέθυλο άλλυλο δισουλφίδιο (ΜΑΔΣ), διμέθυλο τρισουλφίδιο (ΔΜΤΣ), 2-βινυλο διθειίνη (2-ΒΔΘ), 3-βινυλο διθειίνη (3-ΒΔΘ), διάλλυλο σουλφίδιο (ΔΑΣ) και διαλλυλο τετρασουλφίδιο (ΔΑΤΤΣ). Λεπτομερείς απεικόνιση δίνεται στο Σχήμα 5. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προς μελέτη δειγμάτων είναι σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.



**Σχήμα 5.** Κυριότερα συστατικά των αιθερίων ελαίων που απομονώθηκαν

γ) Ποσοτικά χαρακτηριστικά των παραλαμβανόμενων ελαίων.

Για τον καθορισμό της ποσοτικής σύστασης των αιθερίων ελαίων του σκόρδου στα συστατικά τους χρησιμοποιήθηκαν δυο μέθοδοι:

- Μέθοδος εξωτερικού προτύπου (External Standard)

Σύμφωνα με αυτή, για όσα από τα συστατικά διατίθενται στο εμπόριο πρότυπες ουσίες, λήφθηκαν χρωματογραφήματα (GC-FID) διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων αυτών, στις ίδιες συνθήκες προγράμματος με αυτές των ελαίων. Στη συνέχεια, μετά την ολοκλήρωση, έγινε σύγκριση των εμβαδών των προτύπων (peak area) με αυτά των συστατικών των δειγμάτων.

- Μέθοδος συντελεστή απόκρισης (Responsive Factor)

Σύμφωνα με αυτή, για όσα από τα συστατικά δεν διατίθενται στο εμπόριο πρότυπες ουσίες, λήφθηκαν χρωματογραφήματα (GC-FID) διαλυμάτων συγγενικών δομικά ενώσεων γνωστών συγκεντρώσεων, στις ίδιες συνθήκες προγράμματος με αυτές των ελαίων. Στη συνέχεια, μετά την ολοκλήρωση, έγινε σύγκριση των εμβαδών των «ανάλογων» προτύπων (peak area) με αυτά των συστατικών των δειγμάτων.

### ***Παράθεση των Πειραματικών Αποτελεσμάτων και Συζήτηση αυτών***

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των δειγμάτων σκόρδου εκφράζεται σε mg συστατικού / 1 g ελαίου αξιολογώντας έτσι τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των κατά περίπτωση ελαίων αναδεικνύοντας τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του φυτικού υλικού από το οποίο προέκυψε το έλαιο.

 Σε mg συστατικού / 1 g ελαίου

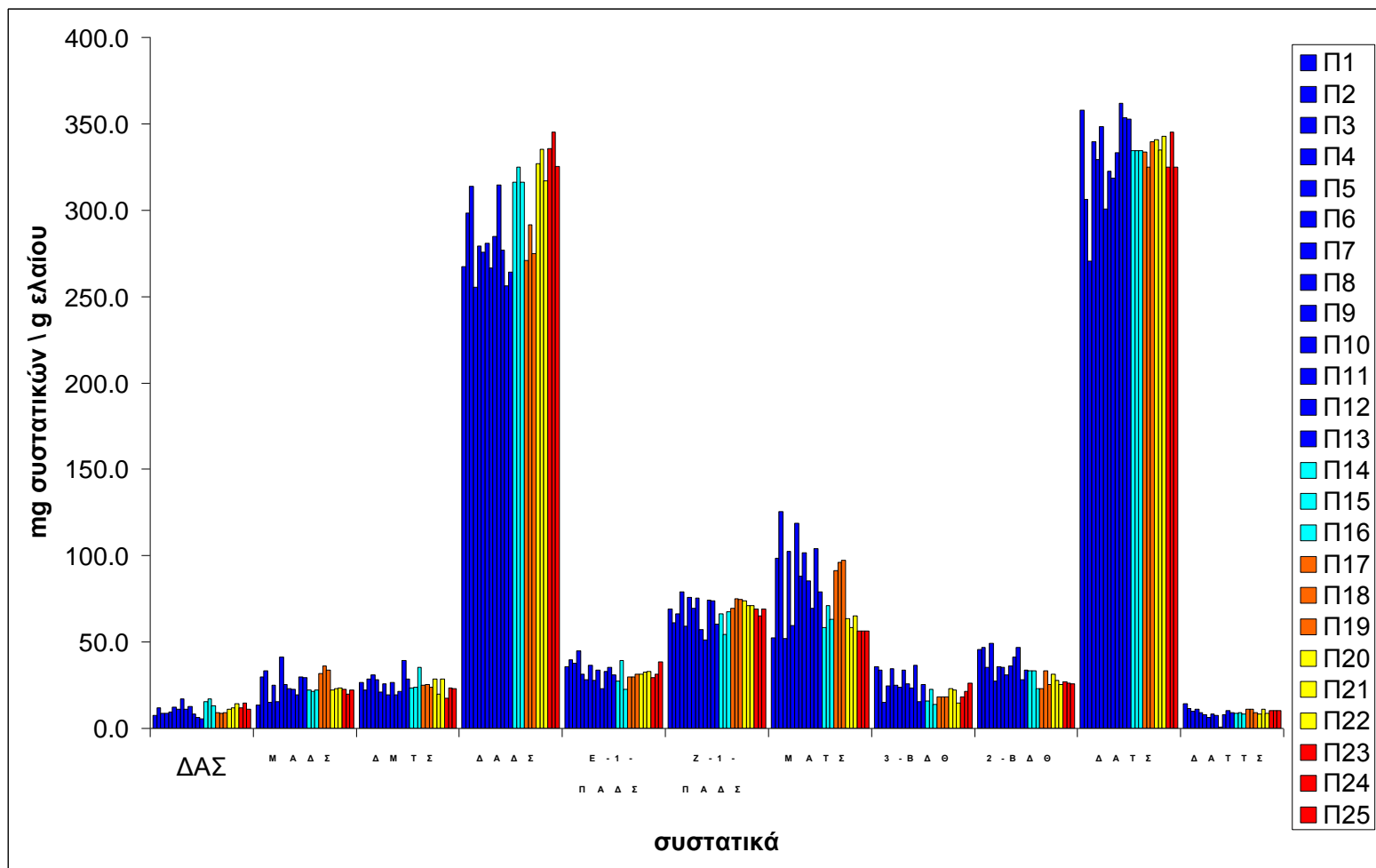
Πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός ένδεκα συστατικών των δειγμάτων, εκφρασμένος ως mg συστατικού / 1 g ελαίου (**Πίνακας 2, Διάγραμμα 3**) ανά κάθε παραγωγό ξεχωριστά.

Συστατικά	Παραγωγοί									
	Π1	Π2	Π3	Π4	Π5	Π6	Π7	Π8	Π9	Π10
ΔΑΣ	7.5	11.8	8.8	8.6	9.4	12.3	11.3	17.1	11.3	12.8
ΜΑΔΣ	13.4	29.6	33.4	15.1	24.9	15.4	41.3	25.5	23.2	22.7
ΔΜΤΣ	26.6	22.2	28.7	31.1	28.3	21.2	25.8	19.4	26.6	19.3
ΔΑΔΣ	267.5	298.4	313.7	255.3	279.1	275.6	280.8	266.6	285.0	314.6
Ε-1-ΠΑΔΣ	35.8	39.8	37.7	44.7	31.3	28.3	36.5	27.9	33.6	23.0
Ζ-1-ΠΑΔΣ	69.0	61.3	66.4	79.2	59.2	75.8	69.7	75.6	57.1	51.2
ΜΑΤΣ	52.6	98.5	125.6	52	102.5	59.5	118.8	88.2	101.7	85.4
3-ΒΔΘ	35.7	33.6	14.9	24.5	34.5	25.1	23.8	33.9	25.8	23.5
2-ΒΔΘ	45.8	46.8	35.5	49.4	27.3	35.6	35.4	30.8	36.3	41.3
ΔΑΤΣ	357.9	306.2	270.6	339.6	329.4	348.4	300.6	322.6	318.5	333.3
ΔΑΤΤΣ	14.4	11.5	9.8	11.2	9.3	8.1	6.4	8.3	7.4	1.0

Συστατικά	Παραγωγοί									
	Π11	Π12	Π13	Π14	Π15	Π16	Π17	Π18	Π19	Π20
ΔΑΣ	8.3	6.2	5.7	15.6	17.2	13.3	9.3	8.8	9.1	11.3
ΜΑΔΣ	19.6	29.6	29.4	22.3	21.3	22.1	31.8	36.2	33.6	22.1
ΔΜΤΣ	21.5	39.5	28.5	23.5	23.9	35.3	25.0	25.3	23.8	28.6
ΔΑΔΣ	276.8	256.2	264.3	316.0	325.0	316.0	271.0	291.5	275.0	327.0
Ε-1-ΠΑΔΣ	33.0	35.2	31.1	27.3	39.5	22.5	29.8	29.6	31.2	31.5
Ζ-1-ΠΑΔΣ	74.1	74.0	60.3	66.5	54.4	67.4	69.6	75.0	74.5	74.0
ΜΑΤΣ	69.4	104.1	79.1	58.3	71.3	63.3	91.3	96.3	97.3	63.5
3-ΒΔΘ	36.7	15.3	25.5	15.9	22.6	13.9	18.3	18.1	18.3	22.9
2-ΒΔΘ	46.7	28.1	33.8	33.4	33.2	23.2	22.9	33.2	25.6	31.2
ΔΑΤΣ	361.8	353.4	352.6	334.5	334.5	334.5	333.6	325.0	339.6	341.0
ΔΑΤΤΣ	7.8	10.5	9.3	8.6	9.3	8.3	11.3	11.3	9.2	8.3

Συστατικά	Παραγωγοί					
	Π20	Π21	Π22	Π23	Π24	Π25
ΔΑΣ	11.3	12.0	14.3	11.8	14.5	11.0
ΜΑΔΣ	22.1	23.1	23.5	22.8	19.8	22.1
ΔΜΤΣ	28.6	19.9	28.6	17.6	23.5	22.9
ΔΑΔΣ	327.0	335.3	316.8	335.8	345.3	325.3
Ε-1-ΠΑΔΣ	31.5	32.5	32.8	29.3	31.5	38.5
Ζ-1-ΠΑΔΣ	74.0	71.2	71.2	69.2	65.2	69.2
ΜΑΤΣ	63.5	58.3	65.3	56.3	56.3	56.3
3-ΒΔΘ	22.9	22.3	14.6	18.3	21.3	26.3
2-ΒΔΘ	31.2	28.0	25.3	27.0	26.2	26.0
ΔΑΤΣ	341.0	335.0	342.8	325.0	345.0	325.0
ΔΑΤΤΣ	8.3	11.3	8.8	10.3	10.3	10.3

*Πίνακας 2. Ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων συστατικών των αιθερίων ελαίων των υπό εξέταση δειγμάτων σκόρδου εκφρασμένα σε mg συστατικού ανά 1 g αιθερίου ελαίου ανά παραγωγό.*



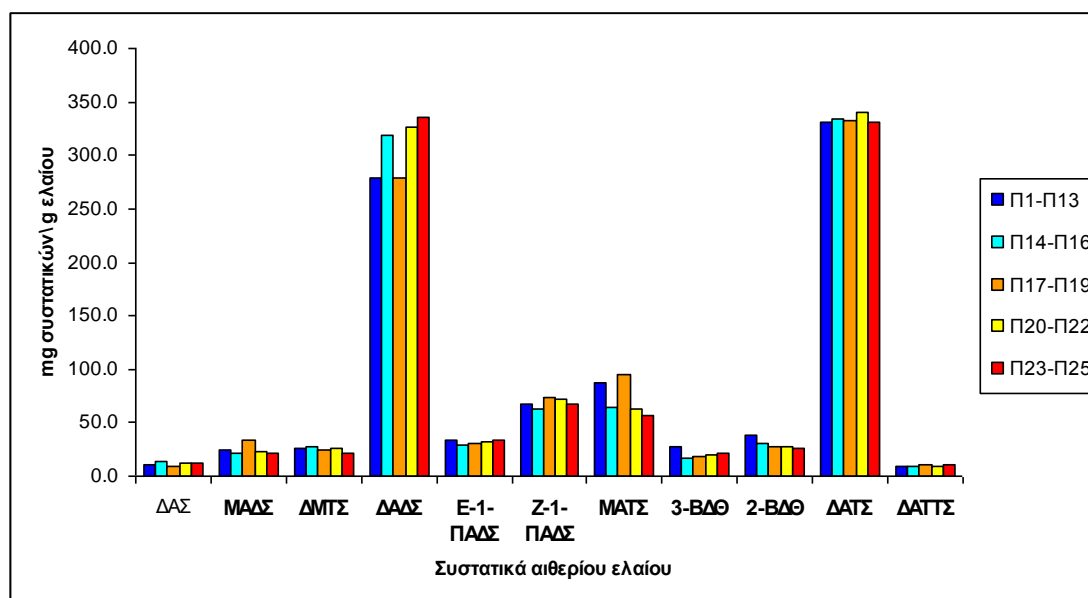
Διάγραμμα 3. Ποσοτική σύγκριση συστατικών αιθερίων ελαίων σκόρδου, εκφρασμένη σε mg συστατικού ανά 1 g αιθερίου ελαίου ανά παραγωγό.



Ειδικότερα στον Πίνακα 3 και στο Διάγραμμα 4 γίνεται συνολικά η ποσοτική αποτίμηση-σύγκριση των συστατικών των ελαίων παραγωγών Σκόρδου Βύσσας, ως μέσου όρου, με αυτά των ελαίων παραγωγών άλλων περιοχών.

Συστατικά	Παραγωγοί - Προέλευση				
	Π1 - Π13 (Βύσσα)	Π14-Π16 (Θήβα)	Π17-Π19 (Χαλκίδα)	Π20-Π22 (Κίνα)	Π23-Π25 (Αργεντινή)
<b>ΔΑΣ</b>	10.1	13.5	9.1	12.5	12.4
<b>ΜΑΔΣ</b>	24.9	21.9	33.9	22.9	21.6
<b>ΔΜΤΣ</b>	26.1	27.6	24.7	25.7	21.3
<b>ΔΑΔΣ</b>	279.5	319.0	279.2	236.4	335.5
<b>Ε-1-ΠΑΔΣ</b>	33.7	29.8	30.2	32.3	33.1
<b>Ζ-1-ΠΑΔΣ</b>	67.1	62.8	73.0	72.1	67.9
<b>ΜΑΤΣ</b>	87.5	64.3	95.0	62.4	56.3
<b>3-ΒΔΘ</b>	27.1	17.5	18.2	19.9	22.0
<b>2-ΒΔΘ</b>	37.9	29.9	27.2	28.2	26.4
<b>ΔΑΤΣ</b>	330.4	334.5	332.7	339.6	331.7
<b>ΔΑΤΤΣ</b>	8.8	8.7	10.6	9.5	10.3

*Πίνακας 3. Ποσοτική σύγκριση του μέσου όρου (σε mg / g λαδιού) των συστατικών των ελαίων παραγωγών Σκόρδου Βύσσας με τα συστατικά ελαίων παραγωγών διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.*



*Διάγραμμα 4. Ποσοτική σύγκριση του μέσου όρου (σε mg / g λαδιού) των συστατικών των ελαίων παραγωγών σκόρδου Βύσσας με τα συστατικά ελαίων παραγωγών διαφορετικής προέλευσης.*

Όπως φαίνεται από τους πίνακες και τα διαγράμματα που παρατίθενται παραπάνω τα κυρίαρχα συστατικά σε όλα τα δείγματα είναι το διάλλυλο τρισουλφίδιο και το διάλλυλο δισουλφίδιο με ποσοστά που κυμαίνονται από 255 – 345 mg το πρώτο και 270 – 361 το δεύτερο. Τα υπόλοιπα συστατικά ακολουθούν σε εμφανώς χαμηλότερες τιμές με το μεθυλο άλλυλο τρισουλφίδιο (52 – 125 mg) και το Z-1-προπένυλο άλλυλο δισουλφίδιο (23 – 75 mg) να ξεχωρίζουν. Τα σουλφίδια E-1-προπένυλο άλλυλο δισουλφίδιο, μέθυλο άλλυλο δισουλφίδιο, διμέθυλο τρισουλφίδιο, 2-βινυλο διθειίνη, 3-βινυλο διθειίνη, διάλλυλο σουλφίδιο και διαλλυλο τετρασουλφίδιο παρουσιάζονται σε ακόμη χαμηλότερα ποσοστά.

Ειδικότερα σε ότι αφορά στη σύγκριση αιθερίων ελαίων διαφορετικής προέλευσης, το Σκόρδο Βύσσας υπολείπεται ελαφρά των σκόρδων προέλευσης Χαλκίδας και Κίνας. στο συστατικό διάλλυλο δισουλφίδιο, ενώ υπερτερεί επίσης ελαφρά αυτών στο συστατικό διάλλυλο τρισουλφίδιο. Στα υπόλοιπα συστατικά, φαίνεται πως και πάλι στις περισσότερες των περιπτώσεων τα έλαια προέλευσης Βύσσας εμφανίζουν υψηλότερες τιμές.

*Στο παρόν Ερευνητικό Πρόγραμμα ιδιαίτερη μνεία γίνεται στα συστατικά διάλλυλο τρισουλφίδιο και δισουλφίδιο για δύο λόγους*

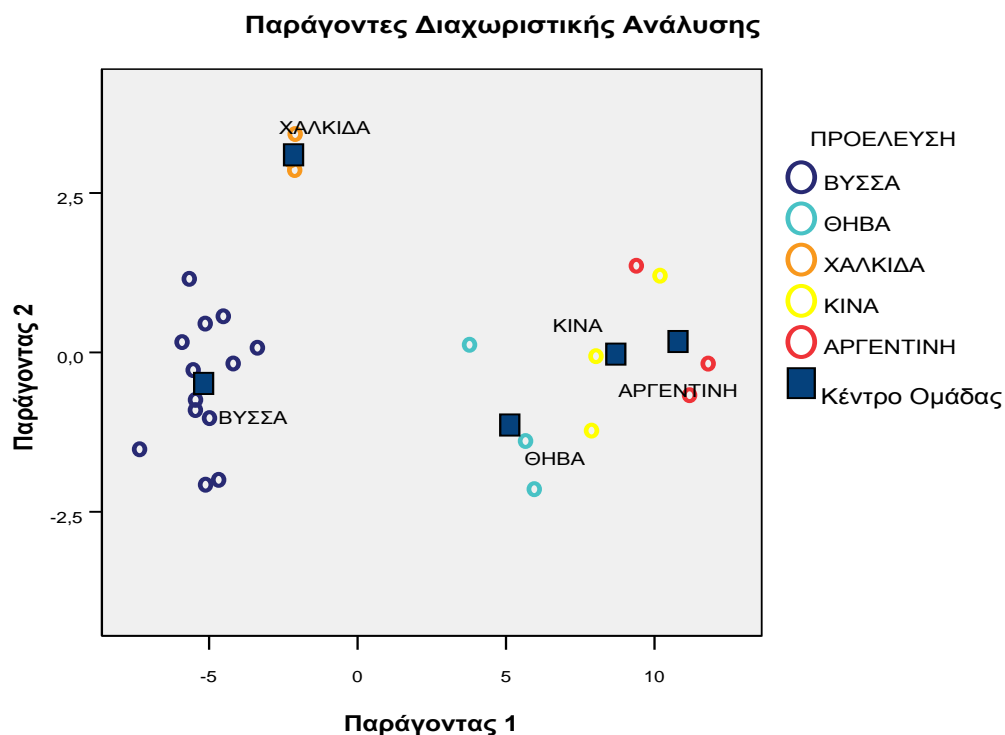
- ❖ **βιβλιογραφικά είναι τα συστατικά τα οποία βρίσκονται στην υψηλότερη αφθονία στα αιθέρια έλαια του σκόρδου άρα είναι ένας δείκτης της ποιότητας των ελαίων.**
- ❖ **από όλα τα σουλφίδια τα οποία συμμετέχουν ως συστατικά των ελαίων του σκόρδου, αυτά τα δύο έχουν μελετηθεί εκτενώς σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών εφαρμογών αποδεικνύοντας αφενός μεν τη δραστηκότητα τους ανεξάρτητα ως ουσίες αλλά και δείχνοντας ότι συνολικά η δραστηκότητα του ελαίου οφείλεται σε αυτές.**

δ) Στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων.

Με στόχο τη διαφοροποίηση των δειγμάτων σκόρδου διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης εφαρμόστηκε η διαχωριστική στατιστική μέθοδος discriminant analysis του στατιστικού πακέτου SPSS 14 για περιβάλλον Windows. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα ένδεκα συστατικά των αιθερίων ελαίων τα οποία αναγνωρίστηκαν τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Το στατιστικό πακέτο προσανατολίστηκε σε δύο άξονες, με κοινό χαρακτηριστικό τη σύγκριση αιθερίων ελαίων άρα και σκόρδων Βύσσας με σκόρδα των υπολοίπων περιοχών.

ι) Κανονικοποιημένη Διαχωριστική Ανάλυση σκόρδων Βύσσας με όλων των υπολοίπων περιοχών διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Παρατηρείται καθαρά αφενός μεν η ομαδοποίηση των παραγωγών Σκόρδου Βύσσας μεταξύ τους, αφετέρου δε η διαφοροποίηση των παραγωγών Σκόρδου Βύσσας σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους παραγωγούς της ημεδαπής αλλά και της αλλοδαπής. Εξαιρέση αποτελεί η μη ικανοποιητική διάκριση μεταξύ των εισαγόμενων δειγμάτων σκόρδου από Κίνα και Αργεντινή.



### Αποτελέσματα Ταξινόμησης

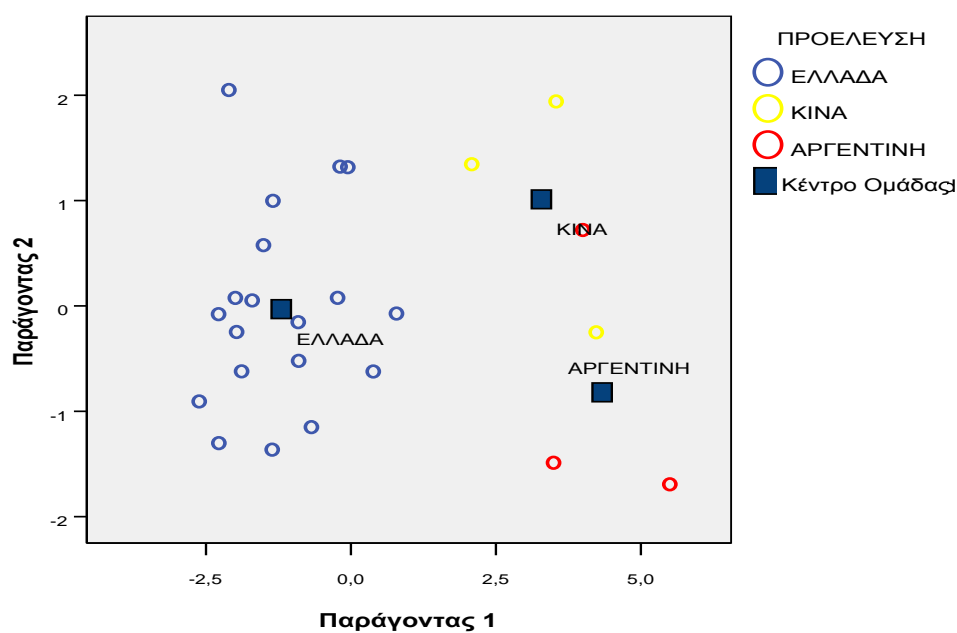
	Προέλευση	Προβλεπόμενη Ομάδα					Σύνολο
		ΒΥΣΣΑ	ΘΗΒΑ	ΧΑΛΚΙΔΑ	ΚΙΝΑ	ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	
Αρχικά Μέτρηση	ΒΥΣΣΑ	13	0	0	0	0	13
	ΘΗΒΑ	0	3	0	0	0	3
	ΧΑΛΚΙΔΑ	0	0	3	0	0	3
	ΚΙΝΑ	0	0	0	2	1	3
	ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	0	0	0	0	3	3
%	ΒΥΣΣΑ	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
	ΘΗΒΑ	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
	ΧΑΛΚΙΔΑ	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
	ΚΙΝΑ	,0	,0	,0	66,7	33,3	100,0
	ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0

Το 96,0% των αρχικά ομαδοποιημένων δειγμάτων ταξινομήθηκαν σωστά.

ii) Κανονικοποιημένη Διαχωριστική Ανάλυση σκόρδων ημεδαπής και αλλοδαπής.

Παρατηρείται καθαρά η ομαδοποίηση των παραγωγών κόρδου Ελληνικής προέλευσης (Βύσσας, Θήβας και Χαλκίδας) και των παραγωγών της αλλοδαπής (Κίνας και Αργεντινής).

### Παράγοντες Διαχωριστικής Ανάλυσης



### Αποτελέσματα Ταξινόμησης

		Προέλευση	Προβλεπόμενη Ομάδα			Σύνολο
			ΕΛΛΑΔΑ	ΚΙΝΑ	ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	
Αρχικά	Μέτρηση	ΕΛΛΑΔΑ	19	0	0	19
		ΚΙΝΑ	0	2	1	3
		ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	0	1	2	3
%		ΕΛΛΑΔΑ	100,0	,0	,0	100,0
		ΚΙΝΑ	,0	66,7	33,3	100,0
		ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	,0	33,3	66,7	100,0

Το 92,0% των αρχικά ομαδοποιημένων δειγμάτων ταξινομήθηκαν σωστά.

### **B.2.5. Συμπεράσματα της Μελέτης των Πτητικών Συστατικών**

Συνολικά τα συμπεράσματα τα οποία εξάγονται από το πρώτο μέρος του παρόντος Ερευνητικού Έργου συγκρίνοντας τα Σκόρδα Βύσσας με σκόρδα τα οποία προέρχονται από άλλες περιοχές της ημεδαπής (Θήβα και Χαλκίδα) αλλά και της αλλοδαπής (Κίνα και Αργεντινή) συνοψίζονται στα εξής:

#### Μελέτη των πτητικών συστατικών

Τα Σκόρδα Βύσσας συγκρινόμενα ως προς τα πτητικά τους συστατικά παρουσιάζουν:

- 1) **Υψηλές** αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο
- 2) **Υψηλές** αποδόσεις σε συγκεκριμένα σουλφίδια (διαλλυλο δι και τρισουλφίδιο), τα οποία είναι δείκτες ποιότητας για το αιθέριο έλαιο που τα περιέχει άρα και για το είδος του φυτικού υλικού (γεωγραφική προέλευση) από τα οποία προέρχεται.
- 3) **Υψηλή** διαχωριστική ικανότητα βάση του στατιστικού πακέτου SPSS 14. Συγκεκριμένα η στατιστική επεξεργασία του συνόλου των συστατικών των αιθερίων ελαίων απέδωσε για τα Σκόρδα Βύσσας υψηλή ομαδοποίηση άρα και διαφοροποίηση σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους παραγωγούς της ημεδαπής αλλά και της αλλοδαπής. Με λίγα λόγια, είναι δυνατό να παρατηρηθεί διάκριση των Σκόρδων Βύσσας από σκόρδα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης με έλεγχο των πτητικών συστατικών που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο τους.

### **B.3. Ανάλυση Μη Πτητικών Συστατικών**

#### **B.3.1. Παραλαβή μη πτητικών συστατικών (Αλλιλίνης & Μεθιλίνης).**

Για την παραλαβή των μη πτητικών συστατικών του σκόρδου, κυρίως αιλίνη και μεθιλίνη, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία. Σκελίδες σκόρδου από τα δείγματα Π1 έως και Π25 αποφλοιώθηκαν με προσοχή, ζυγίστηκαν 20 g, και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε μεθανόλη που περιείχε 10 mM υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (Acros Organics, Geel, Belgium). Ακολούθησε παραμονή των εξεταζόμενων δειγμάτων στους 4 °C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας, προκειμένου η μεθανόλη να διεισδύσει στους κυτταρικούς ιστούς και η υδροχλωρική υδροξυλαμίνη να παρεμποδίσει τη δράση του ενζύμου αλλινάση. Τα δείγματα, έπειτα, τεμαχίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε μπλέντερ κουζίνας. Το κάθε ομογενοποίημα εκχυλίστηκε με 4×100 ml μεθανόλης σε θερμοκρασία βρασμού. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους δείγμα συνδυάστηκαν και μετά συμπυκνώθηκαν μέχρι όγκου 15 mL με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτή στους 45 °C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση κάνοντας χρήση πτυχωτού ηθμού και ακολούθησε οξίνιση με προσθήκη 10 mL διαλύματος 3% υδροχλωρικού οξέος στο διήθημα. Εκ του συνολικού όγκου (25 mL) λήφθηκαν 6 mL, τα οποία ακολούθως διαβιβάστηκαν μέσω στήλης (1×10) πληρωμένη με κατιοανταλλακτική ρητίνη Dowex 50WX4-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA), που είχε προηγουμένως ενεργοποιηθεί με 20 mL 3% HCl. Στο υλικό πλήρωσης, στη συνέχεια, έγινε έκπλυση πρώτα με 20 mL 3% HCl και μετά με 40 mL απιονισμένου νερού ούτως ώστε να απομακρυνθούν οι όποιες μη κατιονικές ουσίες υφίστανται στο μεθανολικό εκχύλισμα σκόρδου. Τα προαναφερόμενα κλάσματα απορρίφθηκαν. Τα μη πτητικά συστατικά, εν τέλει, εκλούσθηκαν από τη στήλη με 120 mL διαλύματος 1M υδροξειδίου του αμμωνίου. Ακολούθησε η προσθήκη της μεθυλο-κυστεΐνης (0.5 mg/mL) με ρόλο εσωτερικού μάρτυρα στις μετέπειτα αναλύσεις. Η κινητή φάση απομακρύνθηκε με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτή (45-50 °C) και τα απομονωθέντα μη πτητικά συστατικά τοποθετήθηκαν εντός ξηραντήρα κενού υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου για 24 h. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές για κάθε παραγωγό. Έτσι, για παράδειγμα για τον παραγωγό Π1 απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν, σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-22 °C), τρία δείγματα με τους κωδικούς G1E1, G1E2 και G1E3.

Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε πανομοιότυπα για όλους τους παραγωγούς αποδίδοντας συνολικά εβδομήντα πέντε ( $25 \times 3 = 75$ ) δείγματα προς ανάλυση, τα οποία συντηρήθηκαν στους  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι την αξιολόγηση τους με Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (High Performance Liquid Chromatography, HPLC-MS).

### **B.3.2. Χημικά αντιδραστήρια.**

Χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ουσίες τα μη πτητικά μόρια αλλιίνη, μεθίνη και μεθυλο-κυστεΐνη. Διαλύτες υψηλής καθαρότητας για υγρό χρωματογράφο (LC) όπως: μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό. Ανόργανα οξέα και βάσεις, όπως επίσης και άλατα για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων.

### **B.3.3. Οργανολογία Ανάλυσης μη πτητικών συστατικών (Αλλιίνης & Μεθίνης).**

Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με υγρό χρωματογράφο σε σύζευξη με φασματογράφο μαζών.

Για την ανάλυση των παραληφθέντων μη πτητικών συστατικών του σκόρδου, αλλιίνη και μεθίνη, εφαρμόστηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Χρησιμοποιήθηκε το όργανο LC-MS 2010A της εταιρίας Shimadzu, το οποίο είναι εξοπλισμένο με μονάδα degasser τύπου DGU-14A, σύστημα ανάμιξης διαλυτών FQV-10ALVP, αντλία LC10ADVP, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADVP, φούρνο στήλης CTO-10AVP, controller SCL-10AVP, ενώ επίσης είναι εφοδιασμένο με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-MD10AVP. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς ήταν η  $150 \times 4.6\text{ mm}$  ZIC®-HILIC ( $100\text{ \AA}$ ,  $3.5\text{ }\mu\text{m}$  μέγεθος σωματιδίου) της εταιρείας Merck-Seqant (Umeå, Sweden). Πρόκειται για σύγχρονη στήλη ειδική για υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, γεγονός που επιτρέπει την γρήγορη και αποτελεσματική ανάλυση πολικών ουσιών χωρίς απαραίτητως να έχει προηγηθεί παραγωγοποίησή τους. Η θερμοκρασία στο φούρνο της στήλης ήταν  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Όγκος  $5\text{ }\mu\text{L}$  των δειγμάτων συγκέντρωσης  $2\text{ mg/mL}$  κινητής φάσης εισήχθη σε κάθε περίπτωση και αναλύθηκε ισοκρατικά στις ακόλουθες χρωματογραφικές συνθήκες: 75:25 (v/v) ακετονιτρίλιο / 10 mM οξικό αμμώνιο (pH 6.0), σε ροή  $0.5\text{ mL/min}$ . Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε



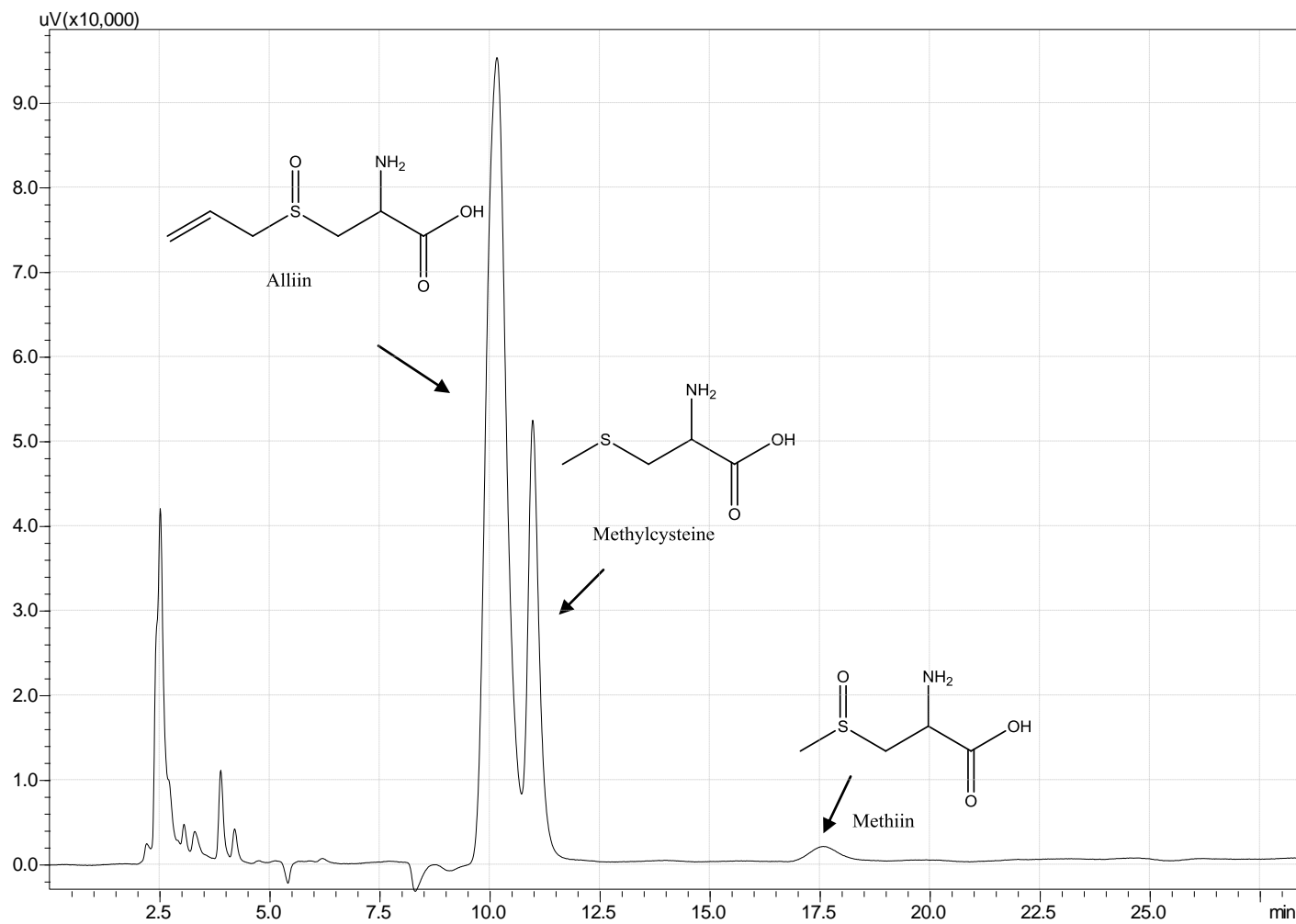
σε μήκος κύματος 215 nm, ενώ ο χρόνος ανάλυσης ήταν 30 min. Η ταυτοποίηση των υπό εξέταση μη πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης, των UV φασμάτων όπως και των φασμάτων μάζας τους με αυτά των αντίστοιχων προτύπων ουσιών.

#### **B.3.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση της Παραλαβής και Ανάλυσης των μη πτητικών συστατικών του Σκόρδου, Αλλιλίνη και Μεθίνη.**

##### *α) Ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων.*

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία – φασματοσκοπία μαζών (LC-MS) όλων των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την κατεργασία των δειγμάτων σκόρδου διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, κατέληξε στην αναγνώριση των ίδιων μη πτητικών συστατικών τα οποία ανήκουν στην τάξη των S-αλκ(εν)υλοκουστεϊνο σουλφοξειδίων. Έτσι προέκυψαν εβδομήντα πέντε χρωματογραφήματα της μορφής του Σχήματος 6, όπου και εμφανίζονται τα αναγνωρισμένα κύρια συστατικά των εκχυλισμάτων, αλλιλίνη και μεθίνη.

Σε ότι αφορά στην πειραματική πορεία των αναλύσεων, οι κωδικοί που δόθηκαν ακολούθησαν την εξής διαδικασία: για παράδειγμα για τον παραγωγό Π1 δόθηκε ο κωδικός G1, οπότε για κάθε εκχύλισμα που προέκυψε από την τριπλέτα εκχύλισης, προέκυψαν όπως ειπώθηκε παραπάνω τριπλέτα δειγμάτων τα οποία αντιστοιχούν σε τριπλέτα χρωματογραφήματα με τους κωδικούς G1E1, G2E2 και G3E3. Το υπόδειγμα του Σχήματος 6 αντιστοιχεί στο εκχύλισμα της πρώτης κατεργασίας του παραγωγού Π1.



**Σχήμα 6.** Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εκχυλισμάτων Σκόρδου Βύσσας (GIE1) με τα κυριότερα σουλφοξείδια (Αλιίνη, Μεθίνη και μεθυλοκυστείνη ως εσωτερικός μάρτυρας) να παριστάνονται και με τις συντακτικούς τους τύπους.

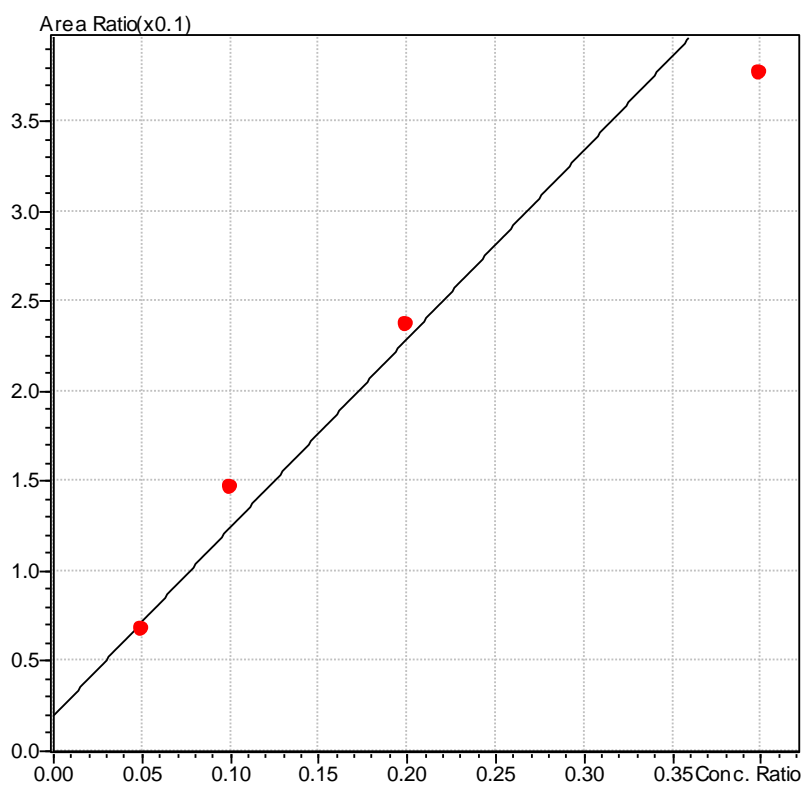
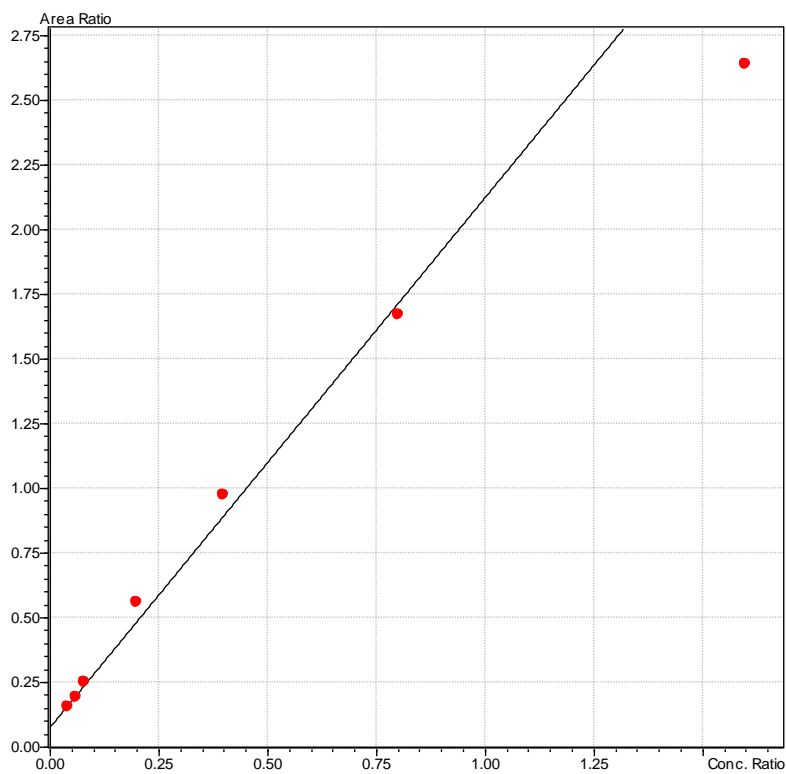
β) Ποσοτικά χαρακτηριστικά των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων.

Για τον καθορισμό της ποσοτικής σύστασης των εκχυλισμάτων του σκόρδου στα μη πτητικά συστατικά τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πρότυπης καμπύλης με εσωτερικό μάρτυρα (probit curve with internal standard).

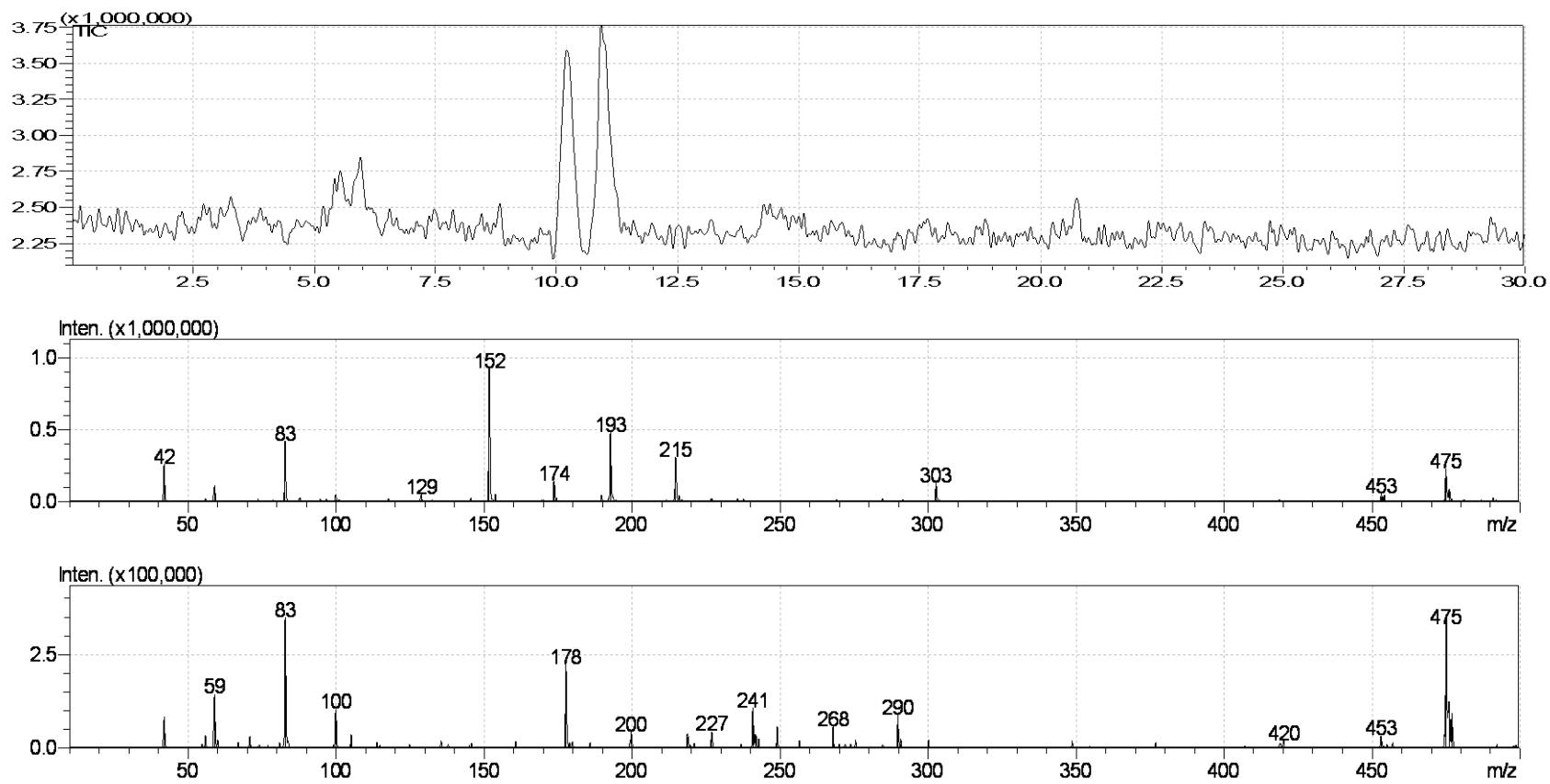
Σύμφωνα με αυτή, για τα συστατικά αλλεΐνη και μεθΐνη για τα οποία διατίθενται στο εμπόριο πρότυπες ουσίες, λήφθηκαν χρωματογραφήματα διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων αυτών (Πίνακας 7), στις ίδιες συνθήκες προγράμματος με αυτές της ανάλυσης των εκχυλισμάτων, έτσι ώστε να δημιουργηθούν πρότυπες καμπύλες με τη βοήθεια εσωτερικού προτύπου μέθυλο κυστεΐνης. Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν οι καμπύλες του Διαγράμματος 7 στο οποίο συσχετίζονται συγκεντρώσεις με εμβαδά ουσιών. Στη συνέχεια μετά την ανάλυση των αγνώστων εκχυλισμάτων και την ανάγνωση και ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων, έγινε συσχέτιση, των εμβαδών (peak area) των συστατικών των δειγμάτων, με αυτών των προτύπων καμπυλών ώστε να υπολογιστούν οι άγνωστες περιεκτικότητες. Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν και με τη μέθοδο SIM η οποία προέκυψε από την ανάλυση των φασμάτων μάζας των αγνώστων εκχυλισμάτων. Στο Σχήμα 7 δίνονται αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα εκχυλίσματος σκόρδου (7α) στον LC-MS όπως και φάσματα μαζών των προτύπων ουσιών αλλεΐνης (7β) και μεθΐνης (7γ).

	<i>Πρότυπα Διαλύματα</i>						
<i>(μg/mL)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>Αλλεΐνη</i>	20	30	40	100	200	400	800
<i>Μεθΐνη</i>	5	7,5	10	25	50	100	200
<i>Μεθυλο-κυστεΐνη</i>	500	500	500	500	500	500	500

*Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις προτύπων ουσιών (αλλεΐνη και μεθΐνη) όπως και του εσωτερικού μάρτυρα (μέθυλο κυστεΐνη) που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των προτύπων καμπυλών.*



*Διάγραμμα 7. α) Πρότυπη καμπύλη αλίνης με χρήση UV (επάνω) β Πρότυπη καμπύλη μεθιίνης με χρήση UV (κάτω).*



*Σχήμα 7. Απεικονίζονται: α) αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα εκχυλίσματος σκόρδου στον LC-MS (επάνω), β) φάσμα μαζών της πρότυπης ουσίας αλλίνη (μέση) και γ) και φάσμα μαζών της πρότυπης ουσίας μεθίνης (κάτω).*

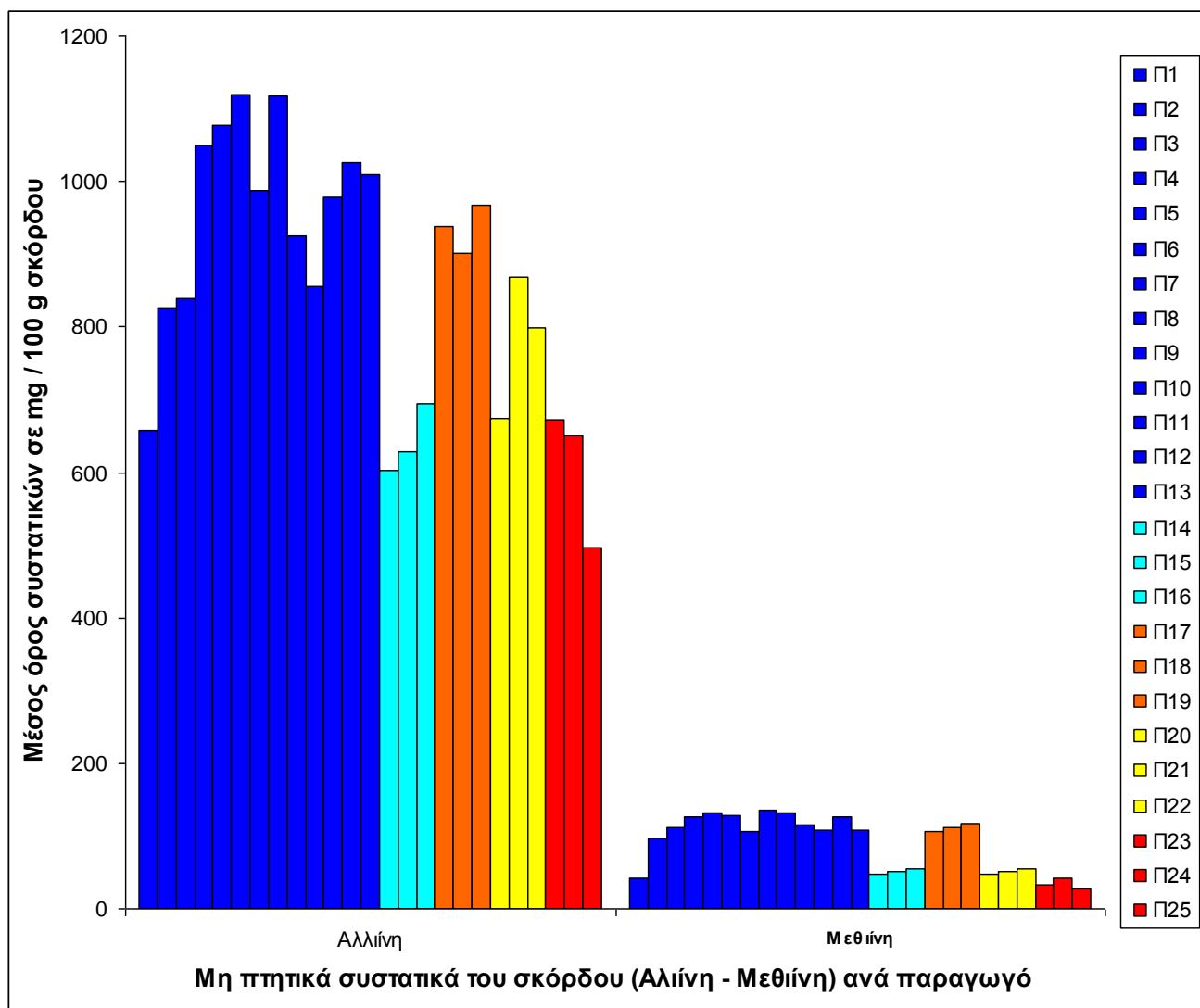
## Παράθεση των Πειραματικών Αποτελεσμάτων και Συζήτηση αυτών

Τα αποτελέσματα της παραλαβής των μη πτητικών συστατικών του Σκόρδου, Αλλιίνης και Μεθιίνης προερχόμενα από σκόρδα διαφορετικών παραγωγών δίνονται στον Πίνακα 8 και αναγράφονται ως μέσος όρος της τριπλέτας αν ανά παραγωγό εκφραζόμενα ως mg *S*-αλκ(εν)υλοκυστεϊνο σουλφοξειδίων ανά 100 g σκόρδου.

Παραγωγοί	mg <i>S</i> -αλκ(εν)υλοκυστεϊνο σουλφοξειδίων / 100 g σκόρδου			
	Προσδιορισμός με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)		Προσδιορισμός με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (MS)	
	Αλλίνη	Μεθίνη	Αλλίνη	Μεθίνη
Π1 (Βύσσα)	658 ± 71	42 ± 11	651 ± 69	39 ± 10
Π2 (Βύσσα)	826 ± 52	98 ± 10	833 ± 48	88 ± 12
Π3 (Βύσσα)	840 ± 76	112 ± 21	848 ± 77	111 ± 19
Π4 (Βύσσα)	1050 ± 172	126 ± 33	1040 ± 172	116 ± 23
Π5 (Βύσσα)	1078 ± 189	131 ± 35	1086 ± 175	122 ± 28
Π6 (Βύσσα)	1120 ± 98	128 ± 28	1126 ± 86	135 ± 31
Π7 (Βύσσα)	988 ± 65	107 ± 25	996 ± 75	116 ± 21
Π8 (Βύσσα)	1118 ± 110	135 ± 37	1112 ± 99	124 ± 33
Π9 (Βύσσα)	926 ± 78	132 ± 18	914 ± 67	137 ± 16
Π10 (Βύσσα)	856 ± 49	115 ± 22	863 ± 51	118 ± 19
Π11 (Βύσσα)	978 ± 68	108 ± 18	991 ± 69	115 ± 14
Π12 (Βύσσα)	1026 ± 54	126 ± 24	1019 ± 51	128 ± 22
Π13 (Βύσσα)	1009 ± 86	109 ± 26	1018 ± 82	115 ± 16
Π14 (Θήβα)	602 ± 40	48 ± 10	612 ± 38	49 ± 11
Π15 (Θήβα)	628 ± 52	51 ± 12	615 ± 55	54 ± 13
Π16 (Θήβα)	695 ± 61	55 ± 16	705 ± 68	51 ± 17
Π17 (Χαλκίδα)	938 ± 50	106 ± 30	926 ± 47	116 ± 20
Π18 (Χαλκίδα)	901 ± 45	111 ± 25	921 ± 41	121 ± 21
Π19 (Χαλκίδα)	968 ± 67	118 ± 27	952 ± 64	117 ± 22
Π20 (Κίνα)	674 ± 63	48 ± 13	654 ± 45	43 ± 11
Π21 (Κίνα)	868 ± 91	52 ± 15	881 ± 84	51 ± 12
Π22 (Κίνα)	798 ± 82	55 ± 12	814 ± 69	50 ± 11
Π23 (Αργεντινή)	672 ± 83	33 ± 13	688 ± 72	39 ± 10
Π24 (Αργεντινή)	651 ± 75	42 ± 19	665 ± 67	48 ± 15
Π25 (Αργεντινή)	497 ± 42	28 ± 9	512 ± 51	33 ± 10

**Πίνακας 8.** Ποσοτικός προσδιορισμός των μη πτητικών συστατικών αλλίνη και μεθίνη (μέσοι όροι τριών επαναλήψεων ανά παραγωγό) των σκόρδων εκφρασμένα σε mg / 100 g φυτικού υλικού με εφαρμογή δυο διαφορετικών ανιχνευτών (UV και MS).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μη πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με χρήση δυο διαφορετικών ανιχνευτών κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού τους με υγρή χρωματογραφία. Στον Πίνακα 8 δίνεται η αποτίμηση της ποσοτικής ανάλυσης με ανιχνευτή υπεριώδους (Ultra Violet) και ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (Mass Spectrometry). Από τη σύγκριση των στοιχείων του Πίνακα 8 για την ποσοτική αποτίμηση με τη χρήση των δυο τεχνικών (UV και MS) φαίνεται ότι δεν υφίσταται διαφοροποίηση και ως εκ τούτου στα διαγράμματα που ακολουθούν αποδίδονται τιμές που παραλαμβάνονται με την τεχνική εφαρμογής ανιχνευτή υπεριώδους.



**Διάγραμμα 8.** Ποσοτική απόδοση σε mg / 100 g φυτικού υλικού των κυριότερων μη πτητικών συστατικών (Αλλιλίνη & Μεθιλίνη) του σκόρδου με εφαρμογή ανιχνευτή υπεριώδους.

Στο Διάγραμμα 8 παρατίθενται τα στοιχεία του Πίνακα 8 όπου οι παραγωγοί Σκόρδου Βύσσας απεικονίζονται και πάλι ως μπλε μπάρες, της Θήβας με τουρκουάζ, της Χαλκίδας με πορτοκαλί, της Κίνας με κίτρινο και της Αργεντινής με κόκκινο.

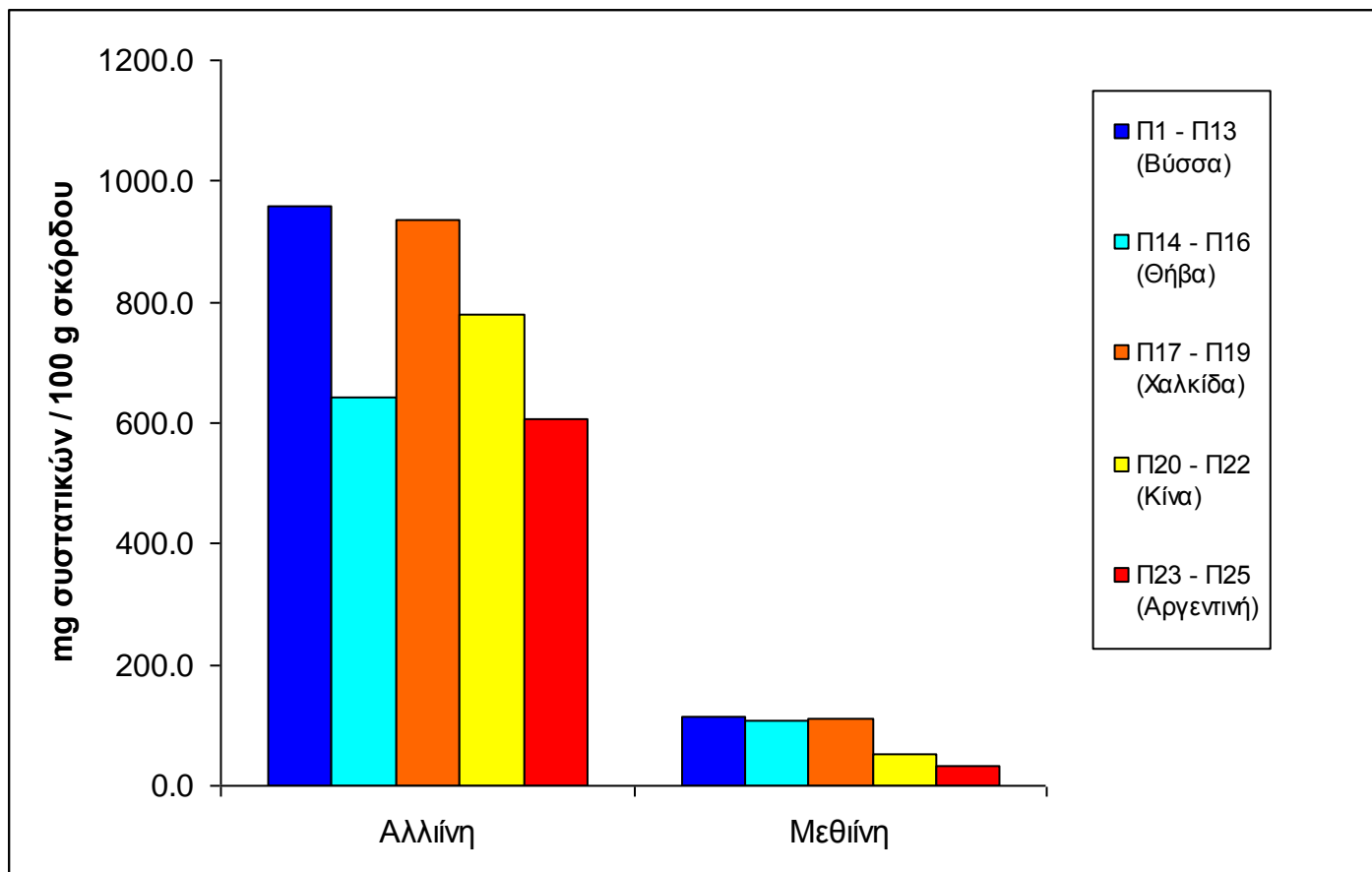
Στον Πίνακα 9 και στο Διάγραμμα 9 απεικονίζονται συγκεντρωτικά οι παραγωγοί Σκόρδου Βύσσας ως μέσος όρος απόδοσης σε αλλιλίνη και μεθίνη, συγκρινόμενοι με τους υπόλοιπους παραγωγούς.

	Π1 - Π13 (Βύσσα)	Π14 - Π16 (Θήβα)	Π17 - Π19 (Χαλκίδα)	Π20 – Π22 (Κίνα)	Π23 – Π25 (Αργεντινή)
<b>Αλλιλίνη</b>	959	642	935	780	607
<b>Μεθίνη</b>	113	51	112	52	34

*Πίνακας 9. Ποσοτική σύγκριση του μέσου όρου (σε mg / 100 g σκόρδου) των συστατικών αλλιλίνη και μεθίνη μεταξύ των παραγωγών Σκόρδου Βύσσας και των παραγωγών διαφορετικής προέλευσης.*

Είναι εμφανές ότι ποσοτικά το Σκόρδο Βύσσας εμφανίζει υψηλή απόδοση και στα δυο S-αλκ(εν)υλοκυστεΐνο σουλφοξείδια. Συγκεκριμένα, στην αλλιλίνη ανέρχεται σε ποσοστά που κυμαίνονται από 658 έως 1120 mg ανά 100 g φρέσκου σκόρδου, με της Χαλκίδας να εμφανίζει τιμές από 901 έως 968 mg. Ακολουθεί το σκόρδο Κίνας (674 - 868 mg) ενώ τα σκόρδα Θήβας και Αργεντινής εμφανίζουν σχετικά χαμηλές αποδόσεις (602 - 695 και 497 - 672 mg αντίστοιχα). Αντίστοιχα, η μεθίνη για τα σκόρδα Βύσσας ανέρχεται σε ποσοστά που κυμαίνονται από 42 έως 131 mg ανά 100 g φρέσκου σκόρδου, με το σκόρδο Χαλκίδας να εμφανίζει παραπλήσιες τιμές (106 - 118 mg αντίστοιχα). Ακολουθεί το σκόρδο Κίνας και Θήβας με τιμές (48 – 55 mg) ενώ τα σκόρδα Αργεντινής εμφανίζουν χαμηλότερες αποδόσεις (28 - 42 mg).





*Διάγραμμα 9. Συγκριτική απεικόνιση του μέσου όρου των συστατικών αλλιλίνη και μεθεινίνη παραγωγών Σκόρδου Βύσσας και παραγωγών διαφορετικής προέλευσης.*

## **B.4. Ανάλυση Μη Επεξεργασμένων Εκχυλισμάτων**

### **B.4.1. Παραλαβή μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων του σκόρδου.**

Για την παραλαβή των μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων του σκόρδου, χρησιμοποιήθηκε παρόμοια τεχνική με αυτή που εφαρμόστηκε στην πειραματική πορεία **B.3.** Σκελίδες σκόρδου από τα δείγματα Π1 έως και Π25 αποφλοιώθηκαν με προσοχή, ζυγίστηκαν 20 g, και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε μεθανόλη που περιείχε 10 mM υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (Acros Organics, Geel, Belgium). Ακολούθησε παραμονή των εξεταζόμενων δειγμάτων στους 4 °C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας, προκειμένου η μεθανόλη να διεισδύσει στους κυτταρικούς ιστούς και η υδροχλωρική υδροξυλαμίνη να παρεμποδίσει τη δράση του ενζύμου αλλινάση. Τα δείγματα, έπειτα, τεμαχίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε μπλέντερ κουζίνας. Το κάθε ομογενοποίημα εκχυλίστηκε με 4×100 ml μεθανόλης σε θερμοκρασία βρασμού. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν για κάθε επιμέρους δείγμα συνδυάστηκαν και μετά συμπυκνώθηκαν μέχρι όγκου 30 mL με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτή στους 45 °C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση κάνοντας χρήση πτυχωτού ηθμού και ακολούθησε πλήρης συμπύκνωση έως στερεού (λευκού έως και υποκίτρινου χρώματος κατά περίπτωση) και πάλι με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτή στους 45 °C. Τα απομονωθέντα στερεά τοποθετήθηκαν εντός ξηραντήρα κενού υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου για 24 ώρες έως ότου απομακρυνθούν και ίχνη υγρασίας. Στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν σε γουδί και τέλος αποθηκεύτηκαν σε ξεχωριστά δοχεία ανά εκχύλισμα εντός ξηραντήρα κενού. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές για κάθε παραγωγό. Έτσι, για παράδειγμα για τον παραγωγό Π1 απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν τρία δείγματα με τους κωδικούς G1CE1, G1CE2 και G1CE3. Τα παρόντα εκχυλίσματα διαφοροποιούνται από τα εκχυλίσματα της πειραματικής διαδικασίας **B.3.** δεδομένου ότι δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία (καθαρισμό) οπότε και θα χαρακτηρίζονται στο εφεξής ως **μη επεξεργασμένα εκχυλίσματα σκόρδου (Garlic Crude Extracts π.χ. G1CE1)**. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε πανομοιότυπα για όλους τους παραγωγούς αποδίδοντας συνολικά εβδομήντα πέντε ( $25 \times 3 = 75$ ) δείγματα προς ανάλυση, τα οποία συντηρήθηκαν υπό κενό μέχρι την αξιολόγησή τους με τις φασματοσκοπικές τεχνικές υπερύθρου (FT-IR) και σκέδασης (Raman).

#### **B.4.2. Χημικά αντιδραστήρια.**

Χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ουσίες τα μη πτητικά μόρια αλλίνη και μεθίνη. Διαλύτες υψηλής καθαρότητας όπως: μεθανόλη, διμέθυλο σουλφοξείδιο και νερό. Τέλος για την δημιουργία δισκίων χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο κάλιο σε υπερκαθαρή μορφή.

#### **B.4.3. Οργανολογία & Μεθοδολογία Ανάλυσης μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων σκόρδου.**

Για την ανάλυση των παραληφθέντων μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων του σκόρδου εφαρμόστηκαν οι τεχνικές της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR) και σκέδασης (Raman).

##### *❖ Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR)*

Για τις αναλύσεις των μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων σκόρδου χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο Nicolet 6700 FT-IR με εύρος μετρήσεων στην φασματοσκοπική περιοχή από 4000 έως 400  $\text{cm}^{-1}$ , συνδεδεμένο με ανιχνευτή δευτεριομένης θεικής γλυκίνης, πηγή ακτινοβολίας Nichrome και διαχωριστή ακτινοβολίας KBr με 100 αθροιστικές σαρώσεις ανά φάσμα και διαχωριστική ικανότητα 4  $\text{cm}^{-1}$  μηκών κύματος.

Τα φάσματα καταγράφηκαν σε δισκία βρωμιούχου καλίου. Συγκεκριμένα 2 (δύο) mg από κάθε δείγμα αναμίχθηκαν με 148 mg στερεού βρωμιούχου καλίου, ομογενοποιήθηκαν σε γουδί και μετατράπηκαν σε δισκίο με χρήση πρέσας (υψηλής πίεσης) με σύγχρονη εφαρμογή κενού για εκδίωξη ιχνών υγρασίας και αποθηκεύτηκαν υπό κενό σε ξηραντήρα έως ότου αναλυθούν. Από κάθε εκχύλισμα κατασκευάστηκαν τρία δισκία, οπότε ανά παραγωγό στο σύνολο των τριών εκχυλίσεων κατασκευάστηκαν εννέα δισκία και συνολικά στο σύνολο των όλων των παραγωγών διακόσια είκοσι πέντε ( $25 \times 3 \times 3 = 225$  δισκία). Το φάσμα κάθε δισκίου καταγράφηκε συνολικά τρεις φορές αποδίδοντας τελικά προς στατιστική επεξεργασία 675 φάσματα. Τα φάσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με το λογισμικό OMNIC (έκδοση 7.3).

❖ *Φασματοσκοπία σκέδασης (Raman)*

Για τις αναλύσεις των μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων σκόρδου χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο DeltaNu Advantage 785 Near-Infrared dispersive Raman Spectrometer. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε μορφή υδατικών διαλυμάτων. Συγκεκριμένα 2 mg απο το κάθε δείγμα διαλύθηκαν σε 5 mL απεσταγμένου νερού και τοποθετήθηκαν σε ειδική κυψελίδα. Από κάθε εκχύλιση κατασκευάστηκαν τρία διαλύματα, οπότε ανά παραγωγό στο σύνολο των τριών εκχυλίσεων κατασκευάστηκαν εννέα διαλύματα και συνολικά στο σύνολο των όλων των παραγωγών διακόσια είκοσι πέντε ( $25 \times 3 \times 3 = 225$  διαλύματα). Το φάσμα κάθε διαλύματος καταγράφηκε συνολικά τρεις φορές αποδίδοντας τελικά προς στατιστική επεξεργασία 675 φάσματα. Τα φάσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με το λογισμικό OMNIC (έκδοση 7.3).

**B.4.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση της Ανάλυσης των μη επεξεργασμένων εκχυλισμάτων του Σκόρδου.**

❖ *Επεξεργασία FT-IR Φασμάτων - Χημειομετρική Ανάλυση*

Για τη γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων σκόρδου Ν. Βύσσας από άλλα δείγματα με προέλευση από άλλες περιοχές της Ελλάδας (Θήβα, Νεάπολη Λακωνίας, Τεγέα Αρκαδίας, Χαλκίδα) ή άλλες χώρες του εξωτερικού (Αργεντινή, Κίνα), πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων όπως αυτά προέκυψαν από την καταγραφή και επεξεργασία των φασμάτων FT-IR στο σύνολο των δειγμάτων. Επισημάνεται ότι, για την εξαγωγή όσο το δυνατό αξιόπιστων στατιστικά συμπερασμάτων, στο συγκεκριμένο έργο χρησιμοποιήθηκαν και εκχύλιση σκόρδου τα οποία αφορούσαν και σε άλλες δυο γεωγραφικές προελεύσεις της ημεδαπής (Νεάπολη Λακωνίας και Τεγέα Αρκαδίας) και τα οποία προερχόταν απο παρόμοια μελέτη που είχε προηγηθεί και χρηματοδοτηθεί απο την Περιφέρεια στο παρελθόν (2010-2011).

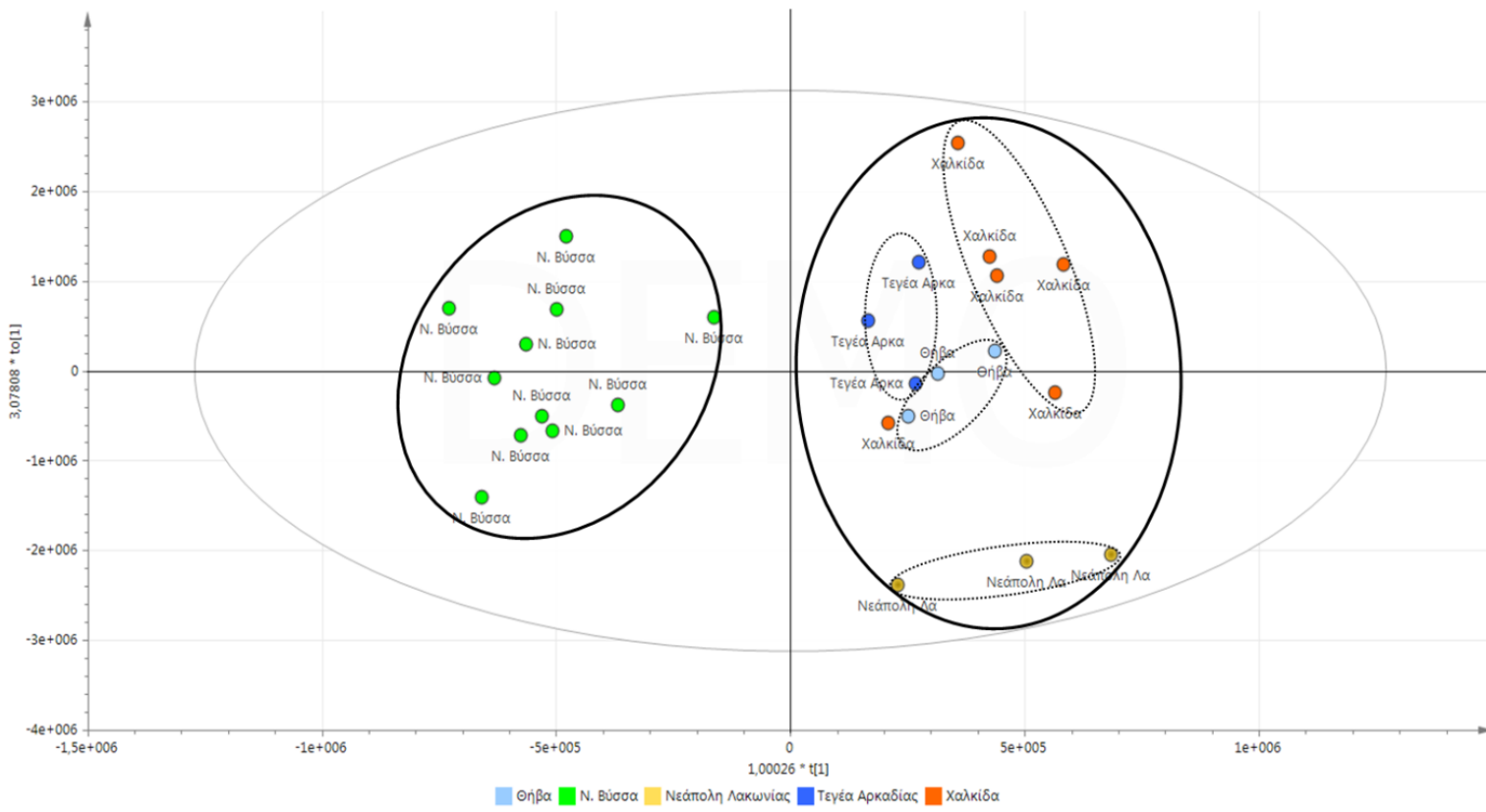
Η φασματική περιοχή που χρησιμοποιήθηκε ήταν από  $4000$  έως  $450 \text{ cm}^{-1}$ . Για την επεξεργασία των φασμάτων έγινε αρχικά εξομάλυνση των φασμάτων με το φίλτρο των Savitzky - Golay, κάνοντας χρήση 15 σημείων. Ακολούθησε διόρθωση της βασικής γραμμής πολυωνμικά και κανονικοποίηση βάσει ίδιας κλίμακας. Επιπλέον, για κάθε δείγμα λήφθηκε ο μέσος όρος από 9 συνολικά φάσματα. Η καταγραφή και επεξεργασία των φασμάτων έγιναν με το λογισμικό OMNIC 8.2 (Thermo Electron Corp.). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα στη συνέχεια εισήχθησαν με τη μορφή

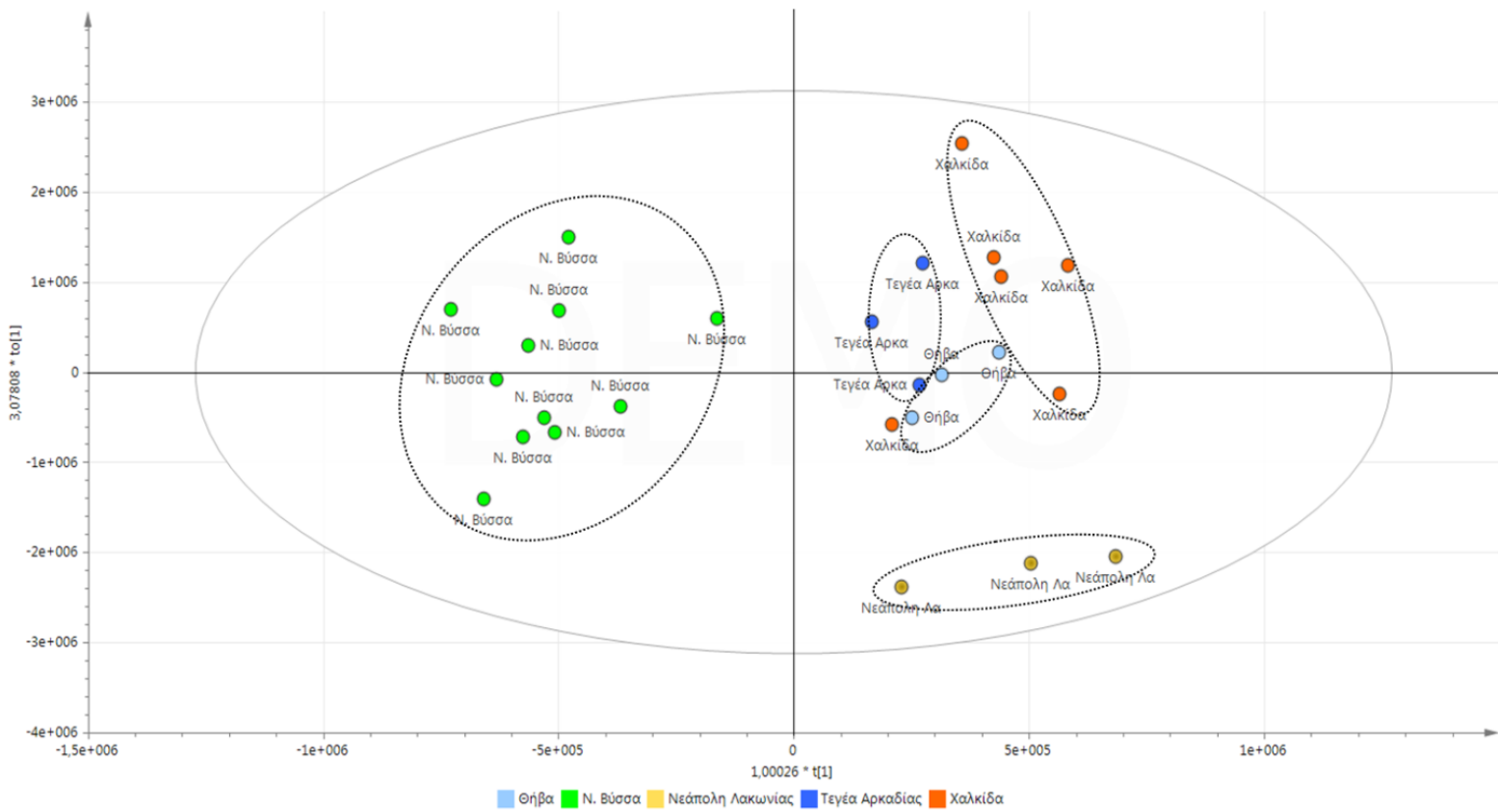
αριθμητικών δεδομένων στο Microsoft Excel 2007, όπου και δημιουργήθηκε ο πίνακας (μήτρα) με το πλήθος μεταβλητών να ανέρχεται στις 1843. Ο πίνακας στη συνέχεια επεξεργάστηκε με το λογισμικό πολυμεταβλητής ανάλυσης SIMCA-P+ 13 (Umetrics, Umea, Sweden). Για το σύνολο των μεταβλητών έγινε κλιμάκωση με mean-centering και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν αλγόριθμοι μη επιβλεπόμενης αναγνώρισης προτύπων (Principal Component Analysis, PCA) και επιβλεπόμενης ταξινόμησης (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA και Orthogonal Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis, OPLS-DA, O2PLS-DA).

Τα μοντέλα OPLS-DA και O2PLS-DA που αναπτύχθηκαν δείχνουν πως είναι εφικτός ο διαχωρισμός των δειγμάτων Σκόρδου Ν. Βύσσας από τα Ελληνικά δείγματα άλλων περιοχών που ελέγχθηκαν, ενώ επίσης είναι δυνατό να διαχωριστούν ταυτόχρονα κι από τα δείγματα προέλευσης Κίνας και Αργεντινής. Η επικύρωση των παραπάνω μοντέλων έγινε με χρήση των αντίστοιχων PLS-DA μοντέλων και έλεγχο 200 μεταθέσεων (permutation test), λαμβάνοντας τιμές κοντά στο 0 και αρνητικές τιμές για τις παραμέτρους  $R^2$  και  $Q^2$ , αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δίνονται στα plots που ακολουθούν όπως και αντιπροσωπευτικά φάσματα εκχυλισμάτων με τις υπο μελέτη φασματικές περιοχές σε κυμματαριθμούς.

# 1. Διαφοροποίηση δειγμάτων Σκόρδου Ν. Βύσσης από άλλα Ελληνικά δείγματα (2 Κατηγορίες)





**Σχήμα 8.** Διάγραμμα OPLS-DA όπου γίνεται ταξινόμηση των 26 Ελληνικών δειγμάτων σκόρδου μεταξύ παράλληλης και κύριας ορθογώνιας συνιστώσας σε δύο κατηγορίες: α) Ν. Βύσσας ( $n = 11$ ) και β) άλλων περιοχών ( $n=15$ ).  $R^2X = 98.1\%$ ,  $R^2Y = 90\%$ ,  $Q^2 = 69.1\%$ .

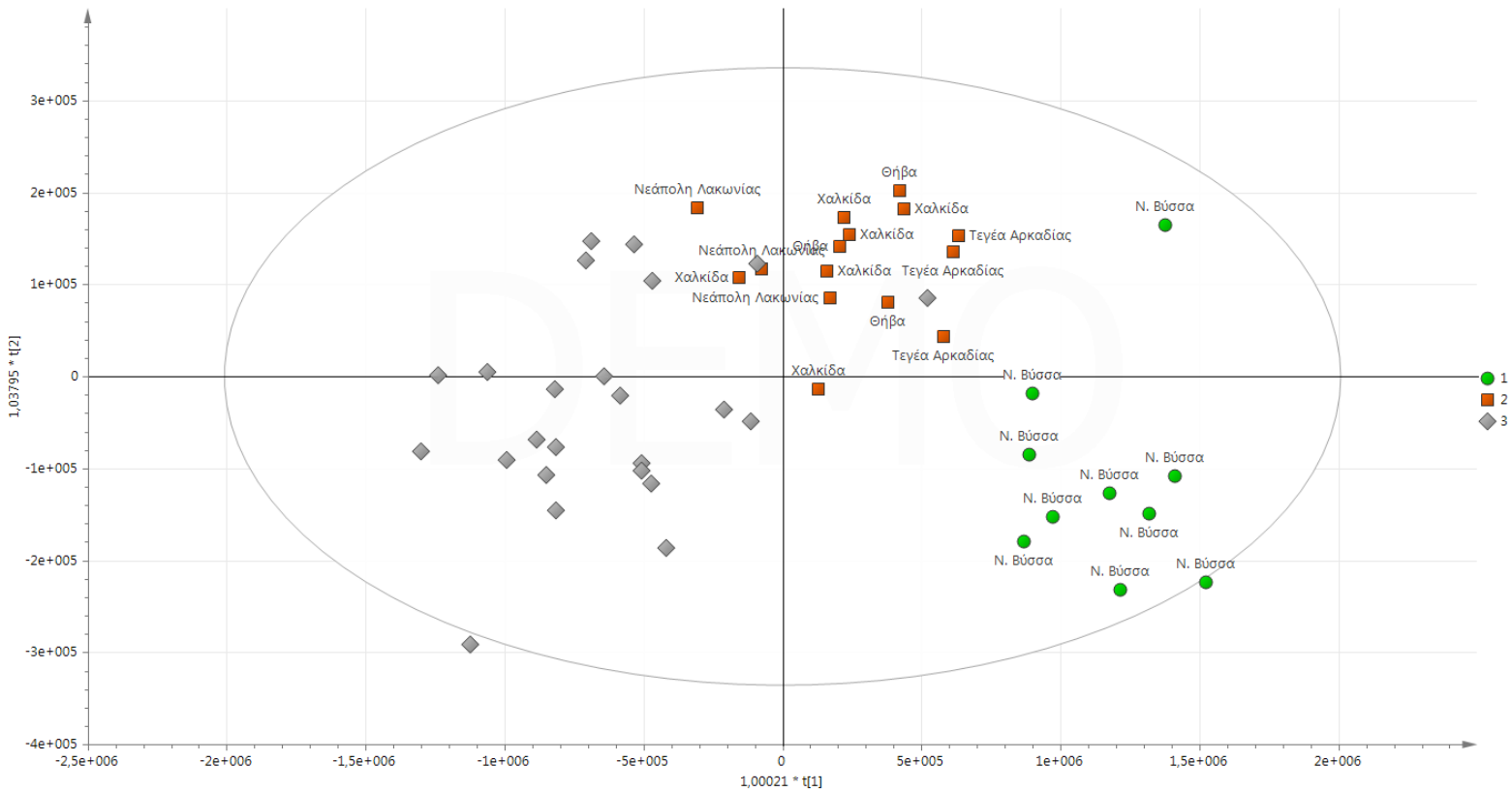
## 2. Διαφοροποίηση Ελληνικών δειγμάτων Σκόρδου (5 Κατηγορίες)



**Σχήμα 9.** Διάγραμμα O2PLS-DA όπου γίνεται ταξινόμηση των 26 Ελληνικών δειγμάτων σκόρδου μεταξύ πρώτης και τρίτης παράλληλης συνιστώσας σε πέντε διαφορετικές κατηγορίες.  $R^2X = 99.9\%$ ,  $R^2Y = 86.7\%$ ,  $Q^2 = 55.5\%$ .

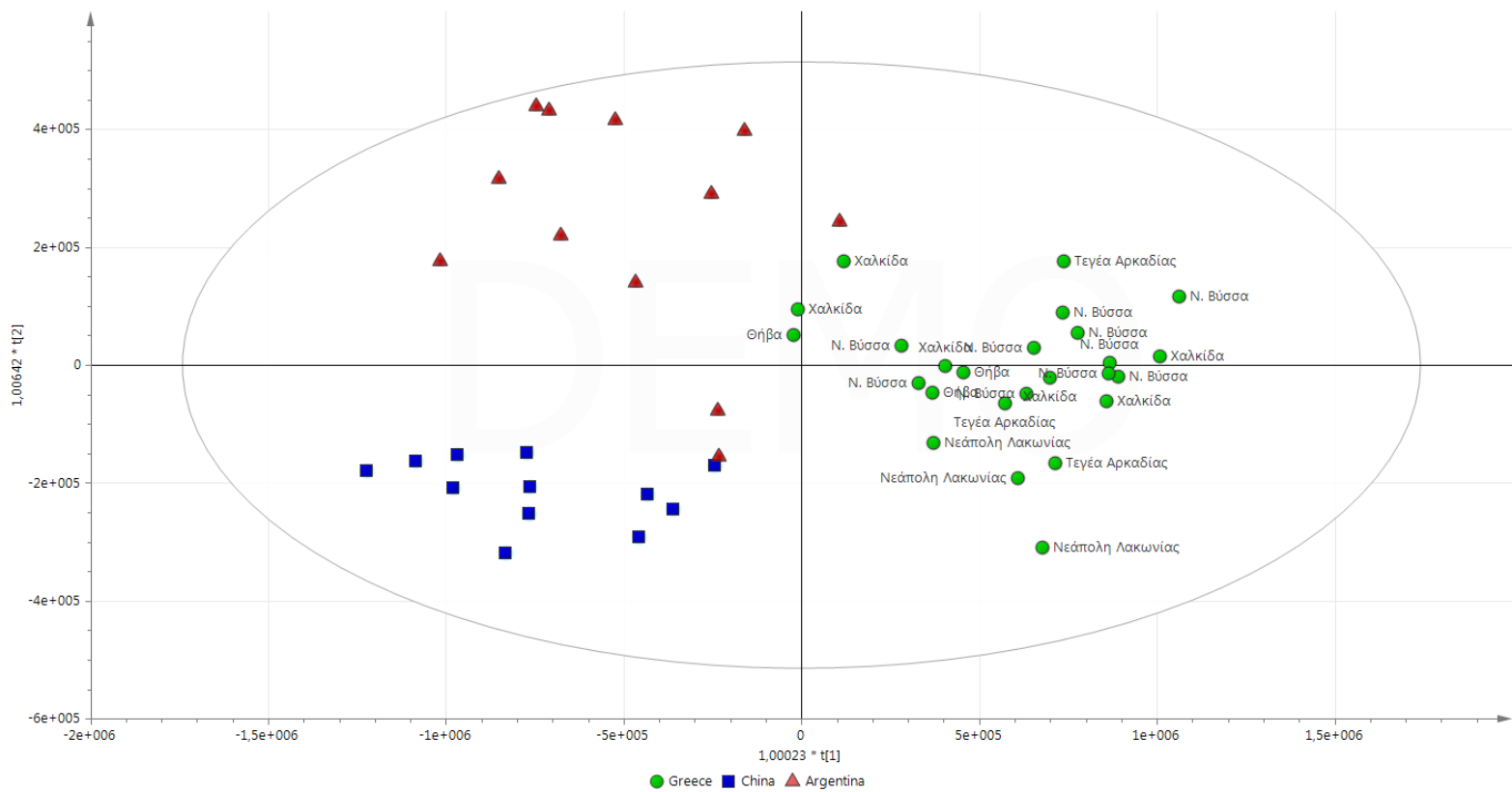


### 3. Διαφοροποίηση δειγμάτων Σκόρδου Ν. Βύσσας από άλλα δείγματα Ελλάδας και εξωτερικού (3 Κατηγορίες)

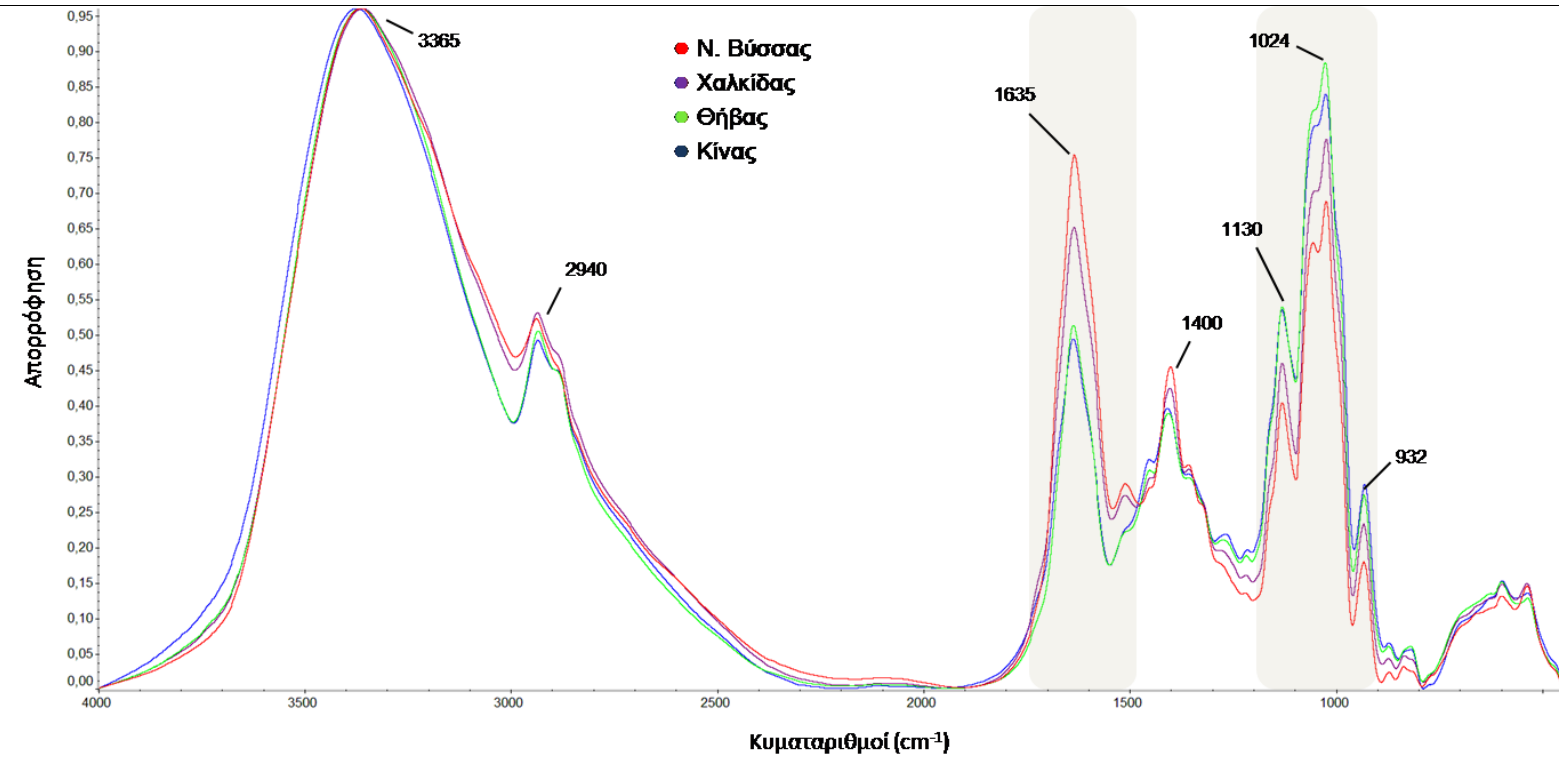


**Σχήμα 10.** Διάγραμμα O2PLS-DA όπου γίνεται ταξινόμηση 49 δειγμάτων σκόρδου μεταξύ πρώτης και δεύτερης παράλληλης συνιστώσας σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες: 1) Ν. Βύσσας ( $n = 10$ ), 2) Υπόλοιπα Ελληνικά ( $n = 15$ ) και 3) Εξωτερικού (Κίνας & Αργεντινής,  $n = 24$ ).  $R^2X = 99.9\%$ ,  $R^2Y = 63.6\%$ ,  $Q^2 = 43.5\%$ .

#### 4. Διαφοροποίηση δειγμάτων Σκόρδου σύμφωνα με τη χώρα προέλευσης (3 Κατηγορίες)



**Σχήμα 11.** Διάγραμμα O2PLS-DA όπου γίνεται ταξινόμηση 49 δειγμάτων σκόρδου μεταξύ πρώτης και δεύτερης παράλληλης συνιστώσας σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες: 1) Ελλάδα ( $n = 25$ ), 2) Κίνας ( $n = 12$ ) και 3) Αργεντινής ( $n = 12$ ).  $R^2X = 99.9\%$ ,  $R^2Y = 72.3\%$ ,  $Q^2 = 41.4\%$ .



**Σχήμα 12.** Φάσματα FT-IR από χαρακτηριστικά δείγματα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης στην περιοχή 4000-450  $cm^{-1}$ .

❖ *Επεξεργασία Raman Φασμάτων - Χημειομετρική Ανάλυση*

Στην περίπτωση επεξεργασίας των Raman φασμάτων των υπο μελέτη εκχυλισμάτων οι απορροφήσεις αυτών δεν απέδωσαν εμφανή στοιχεία διαφοροποίησης μεταξύ σκόρδων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης. Ως εκ τούτου η περαιτέρω ανάλυση τους με στατιστικά πακέτα ομοίως δεν απέδωσε plots τα οποία να μπορούν να αξιοποιηθούν. Συμπερασματικά, η φασματοσκοπική Raman ανάλυση δεν ενδείκνυται για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης

## Γ) Γενικά Συμπεράσματα

Συνολικά τα συμπεράσματα τα οποία εξάγονται από το παρών Ερευνητικό Έργο κινούνται σε τρεις άξονες, συγκρίνοντας σε κάθε περίπτωση τα Σκόρδα Βύσσας με σκόρδα τα οποία προέρχονται από άλλες περιοχές της ημεδαπής (Θήβα και Χαλκίδα) αλλά και της αλλοδαπής (Κίνα και Αργεντινή):

- στη μελέτη των πτητικών συστατικών του σκόρδου
- στη μελέτη των μη πτητικών συστατικών του σκόρδου
- στη μελέτη με επεξεργασμένων εκχυλισμάτων σκόρδου

### ❖ *Μελέτη των πτητικών συστατικών*

Τα Σκόρδα Βύσσας συγκρινόμενα ως προς τα πτητικά τους συστατικά παρουσιάζουν:

- 1) **Υψηλές** αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο
- 2) **Υψηλές** αποδόσεις σε συγκεκριμένα σουλφίδια (διαλλυλο δι και τρισουλφίδιο), τα οποία είναι δείκτες ποιότητας για το αιθέριο έλαιο που τα περιέχει άρα και για το είδος του φυτικού υλικού (γεωγραφική προέλευση) από τα οποία προέρχεται.
- 3) **Υψηλή** διαχωριστική ικανότητα βάση του στατιστικού πακέτου SPSS 14. Συγκεκριμένα η στατιστική επεξεργασία του συνόλου των συστατικών των αιθερίων ελαίων απέδωσε για τα Σκόρδα Βύσσας υψηλή ομαδοποίηση άρα και διαφοροποίηση σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους παραγωγούς της ημεδαπής αλλά και της αλλοδαπής. Με λίγα λόγια, είναι δυνατό να παρατηρηθεί διάκριση των Σκόρδων Βύσσας από σκόρδα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης με έλεγχο των πτητικών συστατικών που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο τους.

### ❖ *Μελέτη των μη πτητικών συστατικών*

Τα Σκόρδα Βύσσας συγκρινόμενα ως προς τα μη πτητικά τους συστατικά παρουσιάζουν:

**Υψηλή** απόδοση στα πρόδρομα S-αλκ(εν)υλοκυστεϊνο σουλφοξειδία, **αλλιλίνη** και **μεθίλη**.

#### ❖ *Μελέτη με επεξεργασμένων εκχυλισμάτων σκόρδου*

Η φασματοσκοπική ανάλυση και περαιτέρω στατιστική επεξεργασία αυτής απέδωσε πολύ καλή διάκριση σε ότι αφορούσε τη μέθοδο υπερύθρου (FT-IR). Συγκεκριμένα, έγινε εφικτή η διάκριση δειγμάτων σκόρδου διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης και κυρίως δειγμάτων σκόρδου προερχόμενα από την περιοχή της Βύσσας συγκρινόμενα τόσο με δείγματα προέλευσης της ημεδαπής και ακόμη περισσότερο με δείγματα εισαγόμενα.

Επισημάνεται ότι από τις υπόλοιπες εφαρμοζόμενες πειραματικές πορείες στην παρούσα μελέτη, η φασματοσκοπική μελέτη με τη μέθοδο υπερύθρου (FT-IR) σε μη επεξεργασμένα εκχυλίσματα σκόρδου (των οποίων η παραλαβή ήταν η λιγότερο απαιτητική σε χρόνο και αντιδραστήρια ενώ συγχρόνως αντανάκλουσε αντιπροσωπευτικότερα το προφίλ του φυτικού υλικού), είναι μέθοδος γρήγορη μη καταστροφική για το δείγμα και εύκολη να εφαρμοστεί στην πράξη.

#### *Συμπερασματικά...*

*το Σκόρδο Βύσσας αποδείχθηκε ότι ξεχωρίζει σε σχέση με τα υπόλοιπα σκόρδα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης τόσο ως προς το αιθέριο έλαιο (ποσότητα και σύσταση) το οποίο μπορεί να απομονωθεί, όσο και ως προς τα πρόδρομα σουλφοξειδία (αλλιλίνη και μεθιλίνη). Επιπρόσθετα είναι δυνατό να εφαρμοστεί μέθοδος διάκρισης η οποία αποδίδει στο Σκόρδο Βύσσας χαρακτηριστικά διαφοροποιημένης γεωγραφικής προέλευσης. Τέλος, οι υψηλές αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο όπως και σε αλλιλίνη και μεθιλίνη καθιστούν το Σκόρδο Βύσσας ως γεωργικό προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας.*