Tallinna Tehnikaülikool

TSÜKLODEKSTRIINIDE KASUTAMINE AROOMAINETE EKSTRAKTSIOONIKS

Anne Menert

Väitekiri on esitatud
Tallinna Tehnikaülikooli tehnika magistrikraadi taotlemiseks

Keemiainstituut
Biokeemia õppetool

Juhendajad: Professor Ado Köstner
Professor Raivo Vilu

T-6420
Tallinna Tehnikaülikooli
RAAMATUKOGU

Detsember, 1993

Tallinna Tehnikaülikool

TSÜKLODEKSTRIINIDE KASUTAMINE AROOMAINETE EKSTRAKTSIOONIKS

Anne Meneri

Väitekiri on esitatud
Tallinna Tehnikaülikooli tehnika magistrikraadi taotlemiseks

Keemiainstituut
Biokeemia õppetool

Juhendajad: Professor Ado Kõstner
Professor Raivo Vilu

T-6420
Tallinna Tehnikaülikooli
RAAMATUKOGU

Detsember, 1993

AUTORIDEKLARATSIOON

Deklareerin, et käesolev väitekiri, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli magistrikraadi taotlemiseks ja selle alusel ei ole varem taotletud teaduskraadi.

Anne Menert
Deklareerija

Prof. Raivo Vilu
Juhendaja

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada maitse- ja lõhnaainete ekstraktsiooni meetodid kasutades tsüklodekstriine (CD). Tsüklodekstriinid on tärklise fermentatiivse modifitseerimise produktid, mille kuuest kuni kaheksast glükoosi jäägist koosnev rõngasstruktuur võimaldab klatraaditüüpi komplekside teket väiksemate molekulide rõnga sisse sulgemise teel.

Detailsemalt uuriti β-tsüklodekstriini (β-CD) ja terpenoidsete ühendite komplekse tillis, köömnes ja loorberis, samuti humala α-mõruhapete komplekse.

Aroomikontsentraatide saamisel taimsest toormest, kasutades ekstrahendina β-CD lahuseid, kasutati järgmisi meetodeid: aurufaasis oleva eeterliku õli püüdmist β-CD lahusesse (barbotaazhimeetod), kuuma β-CD lahuse tsirkulatsiooni läbi taimse materjali kihi (ekstraktsioon) ja kuuma β-CD lahuse ühekordset juhtimist läbi taimse materjali kihi (perkolatsioon). Kõigi meetodite eeliseks on sihtprodukti, stabiilsete komplekside saamine taimsest materjalist eelnevalt toimeainet eraldamata. Optimaalsetel tehnoloogilistel tingimustel (β-CD ja taimse materjali suhe, β-CD lahuse kontsentratsioon, temperatuur, protsessi kestvus), õnnestus barbotaazhimeetodil β-CD kompleksi siduda 80% loorberilehtede ja 70% köömneseemnete eeterlikust õlist. Optimeeritud parema tulemuse andnud perkolatsioon-ekstraktsiooni puhul eraldati humalast kuni 95% mõruhapetest. Kristallilise produkti saagis lähteainete suhtes oli kõigil juhtudel 40...60%.

Ekstraktsiooniprotsessi jälgimiseks ja toimeaine koostise kindlakstegemiseks kasutati UV-spektrofotomeetriat, HPLC-d ja kristallstruktuuri uurimist. Füüsikalis-keemilise analüüsi tulemused näitasid, et eelnevalt eraldatud toimeainest saadud kompleksidel on samad omadused kui väljatöötatud üheastmelise protsessi käigus saadutel. Kristalliliste komplekside elektronmikroskoopia näitas samuti, et üht tüüpi eeterliku õli individuaalsete komponentide β-CD komplekside kristallid on sarnased, kompleksi valmistamismeetodist olenemata.

Looduslikest allikatest eraldatud lõhna- ja maitseained (näit. eeterlikud õlid) on keerukad mitmekomponendilised segud, mille iga komponent moodustab CD-ga eraldi kompleksi.

Kui toimeaine ja komplekside kontsentratsiooni määramiseks kasutada UV-spektroskoopiat, puudub informatsioon kompleksidesse seotud kromofoorsete rühmadeta komponentide kohta, samuti komplekside segu koostise kohta. Edaspidi planeeritakse komplekside koostise määramiseks kasutada peamiselt kapillaar-gaaskromatograafiat ja HPLC-d, millega seni on humala toimeaine kvalitatiivsel analüüsil saadud positiivseid tulemusi.

Aromatisaatorite koosseisu kuuluvaid üksikuid aineid identifitseeriti mudelainete UV-spektrite matemaatilise töötluse teel. Saadud tulemusi on kavas kasutada edaspidi HPLC-s UV-detektoriga saadud andmete tõlgendamisel. Leiti uuritud mudelainete optilise tiheduse ja kontsentratsiooni seost kirjeldavad võrrandid, mille alusel otsustati antud ainete tunnusainetena kasutamise üle.

Vajaduse individuaalsete komplekside arvu ja koostise kindlakstegemiseks tingivad toiduainetetööstuses toidulisanditete kehtivad ranged nõuded. Väljatöötatud kõrge stabiilsusega maitse- ja lõhnaainete preparaatide kasutamine Eesti toiduainetetööstuses on perspektiivne.

SUMMARY

The aim of the present dissertation was elaboration of extraction methods for flavor substances with the aid of cyclodextrins (CD). Cyclodextrins are products of enzymatic modification of starch. Their ring structure, consisting of 6 to 8 glucose units enables formation of clathrate type complexes by including the smaller molecules inside the ring.

The complexes of β-cyclodextrin (β-CD) with terpenoid compounds from dill, caraway, laurel and with hops α-bitter acids have been investigated in detail.

For preparing flavor concentrates from plant raw material using solutions of β-CD as extracting agent, the following methods have been used: trapping the essential oil in gas phase into β-CD solution (gas-bubbling method), circulation of hot β-CD solution through the column of plant material (extraction) and single passing of hot β-CD solution through the column of plant material (percolation). The advantage of all these methods is isolation of final product i.e. stable complexes immediately from plant substance, without extracting the active substance agent prior to complex formation. Under optimal technological conditions (relation of β-CD and plant material, concentration of β-CD solution, temperature, duration of the process) the oil retention for gas-bubbling method was over 80% and up to 70% for laurel leaf and caraway, respectively. Oil retention for extraction method was 37% (for caraway oil).

The best results have been obtained for percolation extraction. Under optimized conditions up to 95% of α-bitter acids have been isolated from hops. The yield of crystalline product was 40...60% in all cases.

UV-spectrophotometry, HPLC and crystal structure investigations were used for monitoring the extraction processes and determining the composition of active substance agent. The results of physical and chemical analysis indicated that complexes obtained from active substance agent isolated from plant matrix prior to complex formation have similar characteristics with those obtained in the course of the elaborated single step process. Electron microscopy showed as well that the crystals of β-CD complexes of individual compounds from one essential oil are similar, regardless of the preparing method of complex.

Flavor substances are complex multicompound mixtures each of which forms its own complex with β-CD. If UV-spectroscopy is used for analyzing the content of active substance and complexes, the compounds without chromophore groups might be missed. For this purpose in future CG and HPLC are intended to use. In the present work HPLC served for qualitative analysis of hop bitter acids. For identification of other compounds statistical treatment of UV-spectra of model compounds was attempted to use. The results might be useful for interpreting the HPLC data obtained with UV-detector. The need for identifying the number of individual complexes and their content arises from strict requirements for additional compounds in food industry. The use of elaborated stable flavour products is perspective.

SISUKORD

KOKKUVÕTE 3

SUMMARY 4

SISSEJUHATUS 7

KIRJANDUSE ÜLEVAADE 8
Tsüklodekstriinikompleksi teke ja võimalused selle kindlakstegemiseks 8

EKSPERIMENTAALNE OSA. MATERJALID JA MEETODID 16

1. MATERJALID 16

2. MEETODID 18
2.1. Aktiivse toimeaine eraldusmeetodid 18
2.1.1. Veeaurudestillatsioon 18
2.1.2. Ekstraktsioon orgaanilise lahustiga 19
2.1.2.1. α-hapete sisalduse määramine humalas spektrofotomeetriliselt 19
2.1.2.2. Humalaekstrakti ja lupuliiniekstrakti valmistamine mõruhapete analüüsiks HPLC-ga 19
2.1.3. Ekstraktsioon tsüklodekstriini lahusega 19
2.1.3.1. Ekstraktsioon barbotaazhmeetodil 20
2.1.3.2. Retsirkulatsioon-ekstraktsioon 20
2.1.3.3. Perkolatsioon-ekstraktsioon 21
2.2. Aktiivse toimeaine sisalduse määramismeetodid 22
2.2.1. Terpenoidsete ühendite sisalduse määramine spektrofotomeetriliselt 22
2.2.2. α-hapete sisalduse määramine kuivatatud humalas 28
2.2.3. α-hapete sisalduse määramine β-CD kompleksides ja katseandmete matemaatiline töötlus 28

3. TULEMUSED JA ARUTELU 31
3.1. Aktiivse toimeaine eraldamine standardmeetoditel 31
3.2. Aktiivse toimeaine ekstraktsioon tsüklodekstriini lahustega 32
3.2.1. Eeterlike õlide eraldamine β-CD komplekside moodustamise teel 32
3.2.1.1. Barbotaazhimeetod 32
3.2.1.2. Retsirkulatsioon-ekstraktsioon 37
3.2.2. Humala mõruhapete eraldamine β-CD komplekside moodustamise teel 42
3.2.2.1. Mõruhapete eraldamine peenestamata humalast retsirkulatsioon-ekstraktsioonil 42
3.2.2.2. Mõruhapete eraldamine peenestatud humalast retsirkulatsioonil 50
3.2.2.3. Mõruhapete eraldamine peenestatud humalast perkolatsioon-ekstraktsioonil 55
3.3. Tsüklodektstriinikomplekside analüüs 63
3.3.1. Mudelainete ja tsüklodekstriinikomplekside UV-spektrofotomeetria 63
3.3.2. Humalaekstraktide HPLC 76
3.3.3. Eeterlike õlide ja β-CD komplekside kristallstruktuur 81

JÄRELDUSED 87

KIRJANDUS 89

SISUKORD

AUTORI PUBLIKATSIOONID

I. Menert A., Laas, R., Kreen M. The quantitative characterization of complex formation of dill and laurel oils with β-cyclodextrin. TTÜ Toim., 1989, No. 688, 79-90.

II. Menert A. Complex formation of caraway and laurel leaf oils with β-cyclodextrin. TTÜ Toim., 1990, No. 715, 58-69.

III. Menert A. Complex formation of caraway oil with β-cyclodextrin by extraction method. TTÜ Toim., 1991, No. 727, 69-80.

IV. Vokk R., Menert A., Saar E.-K. Biotechnology of β-cyclodextrin. Inclusion complexes with essential oils and spices. Biotech Forum Europe, 1991, 8, No. 9, 510-516.

V. Saar E.-K., Hamburg A., Menert A., Vokk R. Stabilizing effect of cyclodextrins and microcrystalline celluloses in food products and pharmaceuticals. 40th Finnish Chemical Congress. Helsinki, Oct. 30th - Nov. 1st 1990. Kemia-Kemi, 1990, 17, No. 10B, 1006.

VI. Menert A., Kreen M., Köstner A. Complexes of dill caraway and laurel leaf oils with β-cyclodextrin. Abstracts. 3rd Wartburg Aroma Symposium concerning "Aroma production and application".Eisenach, Feb. 25th - 28th, 1991, 50.

VII.Menert A., Kreen M., Köstner A. Stabilization of essential oils with β-cyclodextrin. Russian Biochemistry & Biotechnology. 1991, 1, No 2/3, 115.

VIII.Menert A., Mähar A. Study of hop extracts by microcolumn liquid chromatography. Abstract Book. Biotechnology in Estonia, Latvia and Lithuania. Tallinn, 1992, 69.

SISSEJUHATUS

Maitseained on meie igapäevase toidu lahutamatud koostisosad. Nende tarvitamise ajalugu ulatub tagasi 5000a. kaugusele Vana-Hiinasse, Vana-Egiptusesse ja Vana-Indiasse, kus neil peale toidu maitsestamise oli muidki kasutusalasid, nagu lõhnastamine, viirukisuitsetamine, balsameerimine, mürkide neutraliseerimine [1].

Vürtside ja maitsetaimede põhilised toiduks tarvitamise viisid - kas värskelt või kuivatatult - püsisid pikka aega muutumatutena, mis mõjus ebasoodsalt nende kvaliteedile ja säilivusajale. Edusammudega orgaanilises ja eriti terpeenide keemias möödunud sajandi lõpul sai võimalikuks maitsetaimedest ekstraktide ja eeterlike õlide kujul aktiivsete toimeainete eraldamine, kuigi esimene viide selle kohta pärineb juba 13. sajandist [1,2]. Laiemat kasutamist leidsid niisugused nn. lahustuvad vürtsid alates käesoleva sajandi 30.-ndatest aastatest. Lahustitena kasutati esialgu kloorsüsivesinikke (diklorometaan), tänapäeval aga eelkõige veeldatud ja kokkusurutud gaase (freoonid, vedel CO_2).

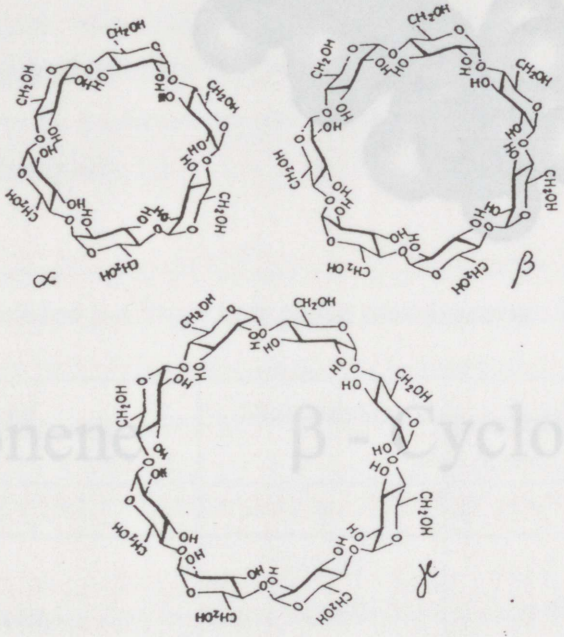
Kuigi toimeaine kontsentratsioon lahustùvates preparaatides on üldiselt kõrge, alluvad näiteks eeterlikud õlid veelgi kergemini väliskeskkonna ebasoodsatele teguritele kui töötlemata taimmaterjal, sest ei sisalda looduslikke fiksaatoreid (vaigud, mittelenduvad rasvhapped) ega antioksüdante. Sellest puudusest ülesaamiseks adsorbeeritakse vedelad preparaadid tahkele kandjale, milleks võib olla sool, glükoos, suhkur või suletakse mikrokapslitesse tärklise või kummiaraabiku abil.

Käesolevas töös püütakse mõlemale eespool püstitatud küsimusele, s.o. toimeainete ekstraktsioon ja nende säilitamine, lahendus leida ekstrahendi kasutamise eel, mis oleks ühtlasi ka saadud produkti stabilisaatoriks. Niisugusteks aineteks võivad olla tsüklodekstriinid. Maitseainetena käsitletakse nii neid, mille võtmekomponendiks on lenduvad terpenoidsed ühendid (till, köömned, loorber) kui ka näiteks humal, mille aktiivseks toimeaineks on mittelenduvad mõruhapped.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

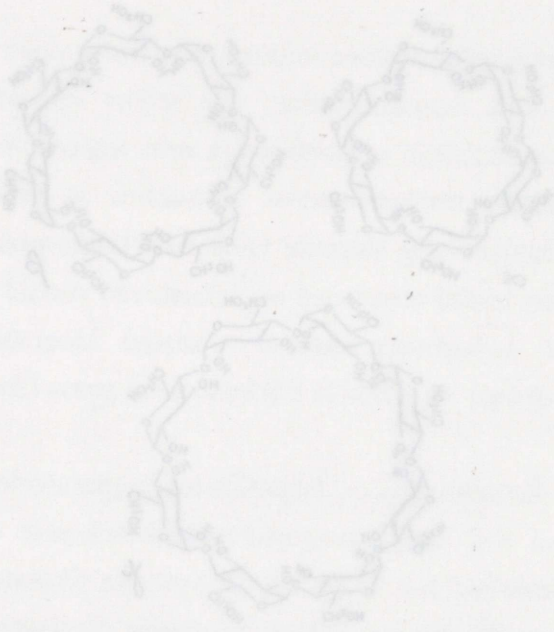
Tsüklodekstriinikompleksi teke ja võimalused selle kindlakstegemiseks

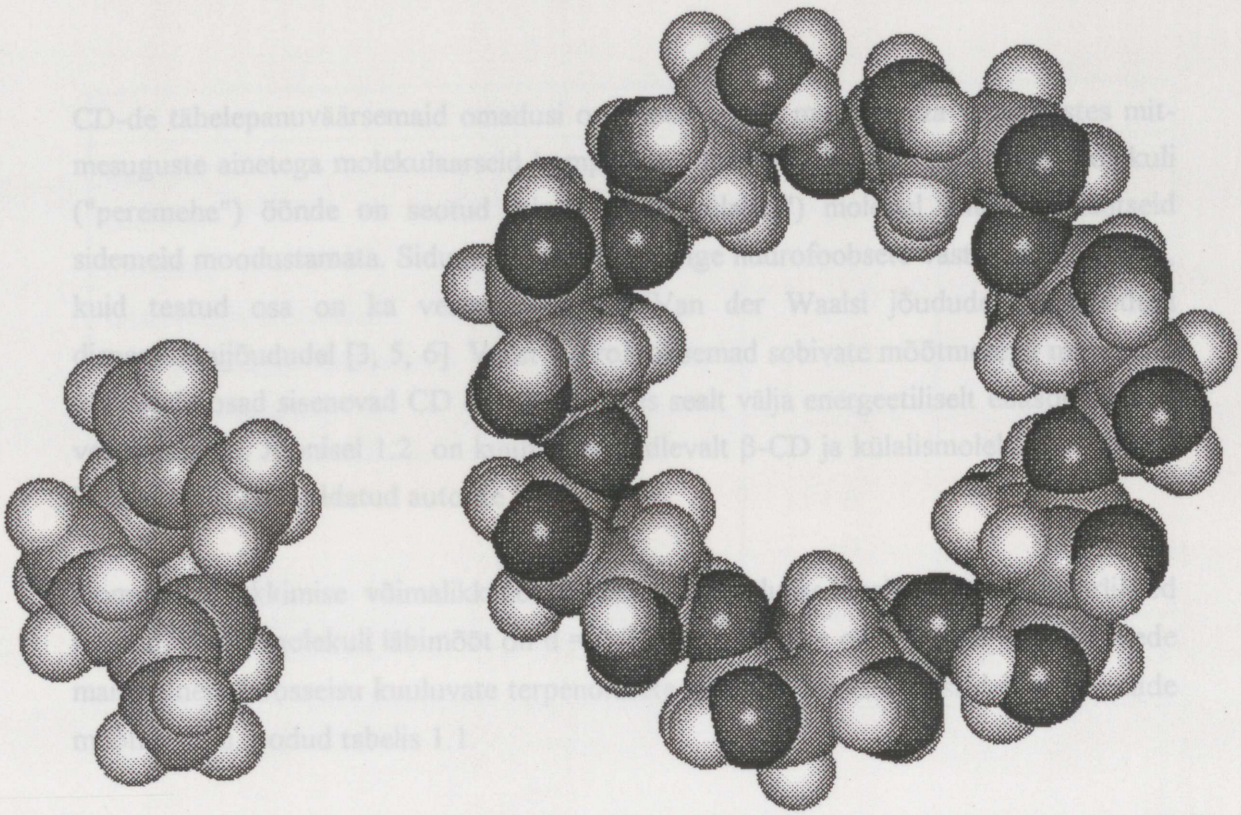
Tsüklodekstriine võib vaadelda kui ensümaatiliselt modifitseeritud tärklise erikuju. β-tsüklodekstriin (β-CD) on seitsmest α-d-glükopüranoosi jäägist α-1,4-glükosiidsete sidemete abil moodustatud makrotsükliline ühend (joon.1.1.).



Joonis 1.1. Tsüklodekstriinide struktuurvalemid. Glükoosijääkide arv: α-CD n=6, β-CD n=7, γ-CD n=8 [25].

Lahuses on glükoosijäägid C1 toolkonformatsioonis. Tüvikoonusekujulise molekuli välispinnal paiknevad hüdroksüülrühmad C6 juures on suunatud ühele poole, sekundaarsed hüdroksüülrühmad C2 ja C3 juures aga teisele poole ja lisaks sellele veel molekulisiseste vesiniksidemetega omavahel seotud. See tingib β-CD molekuli küllaldase jäikuse ka lahuses. Molekuli õõnes on ainult CH-rühmad ja glükosiidsed hapnikuaatomid, mille tõttu CD õõs on veega võrreldes vähem polaarne [3]. Viimasel ajal ei olda selles aga enam nii üheselt veendunud. Mõnede mittesümmeetriliselt asendatud benseeni derivaatide (nitroaniliin, nitrofenool) lahustuvuse võrdlemisel orgaanilistes lahustites ja CD-s, kasutades UV-spektromeetriat (solvatokromism), ilmnes CD lahustes punane nihe, mis näitab, nagu oleks CD-õõs veest polaarsem [4].





R-(+)-Limonene β - Cyclodextrin

Joon. 1.2. β-CD ja R-(+)-limoneeni molekulide mõõtmete võrdlus. Molekulimudelid ehitatud mõlema molekuli konformatsioonienergia analüüsi alusel paketiga HyperChem [52]

R-(+)-Limonene β - Cyclodextrin

CD-de tähelepanuväärsemaid omadusi on nende võime moodustada vesilahustes mitmesuguste ainetega molekulaarseid komplekse. Need on ühendid, milles CD molekuli ("peremehe") õõnde on seotud mingi aine ("külalise") molekul ilma kovalentseid sidemeid moodustamata. Sidumine toimub eelkõige hüdrofoobsete vastasmõjude arvel, kuid teatud osa on ka vesiniksidemetel, Van der Waalsi jõududel ja Londoni dispersioonijõududel [3, 5, 6]. Veest hüdrofoobsemad sobivate mõõtmetega molekulid või nende osad sisenevad CD õõnde, tõrjudes sealt välja energeetiliselt ebasoodsamad veemolekulid. Joonisel 1.2. on kujutatud võrdlevalt β-CD ja külalismolekul - R-(+)-limoneen ([52], avaldatud autorite loal).

Kompleksi tekkimise võimalikkuse hindamisel on olulised eelkõige geomeetrlilised tegurid. β-CD molekuli läbimõõt on d = 0.78 nm ja kõrgus on h = 0.78 nm . Mõnede maitseainete koosseisu kuuluvate terpenoidsete ühendite molekulmassid ja molekulide mõõtmed on toodud tabelis 1.1.

Tabel 1.1.

Mõned näited β-CD-ga kompleksi moodustavate ühendite kohta [7]

Ühend	Molekulmass	Ligikaudsed mõõtmed	
		pikkus, nm	diameeter, nm
1	2	3	4
allitsiin	162.27	1.2	0.5
allüülisotiotsüanaat	99.19	0.7	0.4
diallüüldisulfiid	146.26	1.2	0.5
anetool	148.20	1.0	0.6
bensaldehüüd	106.12	0.9	0.6
bensüülalkohol	108.13	0.9	0.6
bensoehape	122.12	0.9	0.6
borneool	154.24	1.1	0.7
tsineool	154.24	1.0	0.7
tsitraal	152.23	1.0	0.6
tsitronellool	156.26	1.0	0.6
kaneelaldehüüd	132.15	0.9	0.7
kaneelhape	148.16	0.9	0.7
eugenool	164.21	1.0	0.6
fenhoon	152.23	1.1	0.7
geraniool	154.24	1.0	0.7
kamfeen	136.23	0.9	0.7

1	2	3	4
karvoon	150.21	1.0	0.7
linalool	154.24	1.0	0.7
mentool	156.27	0.9	0.6
önanthappe etüülester	158.00	1.3	0.5
pelargoonhappe etüülester	186.30	1.5	0.5
α- ja β-pineenid	136.23	1.0	0.7
salitsüülhappe metüülester	152.00	1.1	0.7
terpineool	154.24	1.0	0.6
tümool	150.22	0.9	0.6
vanilliin	152.14	1.0	0.7

Nagu selgub, on neil ühenditel olemas eeldused β-CD-ga molekulaarsete komplekside moodustamiseks.

Kompleksi sulgemise tagajärjel muutuvad peamiselt külalismolekuli füüsikalised ja keemilised omadused,vähesel määral aga ka CD enda omadused. Mõlemad muutused võivad olla aluseks kompleksi moodustumise kindlakstegemisele. Külalismolekuli füüsikalistest omadustest muutuvad lahustuvus, spektraalsed omadused (absorptsioonispekter, NMR-spekter, fluorestsents, optiliselt aktiivsete ainete tsirkulaarse dikroismi spekter) ja kristallstruktuur.

Higuchi ja Connorsi poolt poolt esitatud faasilahustuvuse analüüsi kasutades võib leida külalismolekuli lahustuvuse sõltuvuse CD kontsentratsioonist [6]. Sellest tavaliselt lineaarsest sõltuvusest tõusuga 0-2.25 leitakse kompleksi assotsatsioonikonstant e. stabiilsuskonstant e.tasakaalukonstant (K_{ass} e. K_c e. K) [3,5,6,8] valemi (1) järgi, eeldades, et tekivad 1:1 kompleksid

$$K_c = \frac{c_F - [F]}{[F] * (c_D - c_F + [F])}, \text{ kus} \qquad (1)$$

K_c - 1:1 kompleksi assotsatsioonikonstant (stabiilsuskonstant), [M^{-1}]

c_F - külalismolekuli lahuse üldkontsentratsioon, [M]

c_D - CD üldkontsentratsioon, [M]

[F] - külalismolekuli tasakaalulahustuvus CD puudumisel [M].

Kui ei ole eelnevalt määratud kompleksi täpne stöhhiomeetria, siis oletatava stöhhiomeetrilise suhte abil määratud assotsatsioonikonstant näitab ainult molekulide vahelise interaktsiooni määra. Muude interpretatsioonide puhul on tema kasutamine piiratud - s.t. antud meetodi piires on konstantide väärtused reprodutseeritavad, kuid nad võivad erineda muudel meetoditel leituist. Dornier' jt. poolt sel viisil määratud assotsiatsioonikonstandid mõnedele aroomainetele on toodud tabelis 1.2. [8].

Tabel 1.2.

Aroomaine-β-CD komplekside assotsatsioonikonstandid (K_c), komplekside lahustuvused (S_c) ja faasilahustuvuse diagrammide liigid vesilahuses t = 25°C [8]

Ühend	K_c, [M^{-1}]	S_c, [mM]	Liik
bensoehape	90	10.8	A_L
etüülsalisülaat	1440	3.2	B_S
p-hüdroksübensaldehüüd	140	15	A_L
etüülvanilliin	130	12.1	A_L
frambinoon	100	15.5	A_L
eugenool	650	8.0	B_S
tümool	180	3.0	B_S
d,l-mentool	2240	6.4	B_S
karvoon	180	1.9	B_S
nerool	1050	2.0	B_S
β-ionoon	1520	0.9	B_S

Enamasti on K_c väärtused piires 10 - 10^4 [M^{-1}] [3]. Nagu tabelist selgub, on eriti stabiilne d,l-mentooli kompleks β-CD-ga. Antud juhul on see kooskõlas Szente poolt teostatud pikaajalise stabiilsustestiga samale ühendile [9]. Lahustuvuse analüüsil põhineb ka Dalbe ja Willemini poolt kasutatud originaalne, kuid lihtne ja kättesaadav meetod [10]. Vanilliin-β-CD ja karotiin-β-CD kompleksi lahustuvus ligi 90-s erinevas lahustis määrati Hanseni parameetrite (Londoni dispersioonijõudude, dipool-dipool vastasmõjude ja vesiniksidemete komponent) abil kolmemõõtmelises ruumis. Kompleksi moodustumine (vanilliini puhul) ja mittemoodustumine (karotiini puhul) on võimalik kindlaks teha vaid visuaalse vaatluse teel, määrates muidugi lahustuvuse mahu tsentri koordinaadid arvuti abil.

Spektraalseid meetodeid kasutatakse siiski enam. Kompleksi moodustumine muudab tihti külalismolekuli absorptsioonispektrit. Värvainete puhul, mis on happe-aluse

indikaatorid, on muutused sarnased nagu juhul, kui muutub pH. pH muutuste suhtes inertsete ainete puhul maksimumi asukoht ei muutu, seevastu võib tugevasti muutuda maksimumi intensiivsus [3]. Sõltuvuse

$$\frac{c_F * c_D}{\Delta E} = \frac{K_{DF}}{\Delta \varepsilon} + \frac{c_D}{\Delta \varepsilon}, \text{ kus} \qquad (2)$$

c_F - külalismolekuli lahuse üldkontsentratsioon, [M]

c_D - CD üldkontsentratsioon, [M]

K_{DF} - kompleksi dissotsatsioonikonstant, [M]

ΔE - külalismolekuli lahuse neelduvuse muutus CD lisamisel

$\Delta \varepsilon$ - külalismolekuli lahuse molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi muutus CD lisamisel

alusel (Hildebrand-Benesi võrrand) võib leida tekkinud kompleksi dissotsatasiooni-konstandi [5]. Selleks ehitatakse lineaarne sirge teljestikus $(c_F * c_D)/\Delta E$ - c_D (Scotti sirge), mille tõusu järgi leitakse $\Delta \varepsilon$ ja vabaliikme järgi K_{DF} või selle pöördväärtus K_{ass} [11]. Juhul, kui kompleksi teke külalismolekuli absorptsioonimaksimumi intensiivsust ei mõjuta, arvutatakse külalismolekuli-CD-kompleksi dissotsatsioonikonstant K_{DF}, kasutades Hildebrand-Benesi võrrandit kujul

$$\frac{c_F}{E} = \frac{K_{DF}}{\varepsilon} * \frac{1}{c_D} + \frac{1}{\varepsilon}, \qquad (3)$$

kus E - kompleksi neelduvus

ε - kompleksi molaarse ekstinktsiooni koefitsient $[M^{-1} * cm^{-1}]$.

Teljestikus c_F/E - $1/c_D$ ehitatud sirge vabaliikmest leitakse ε väärtus ja tõusu järgi K_{DF} [25].

Spektrofotomeetriliselt võib kindlaks teha ka värvitu ühendi CD-kompleksi dissotsatsiooni tasakaalukonstandi K_{DA}, kui kasutada konkureerivat komplekseerimist värvilise ühendi juuresolekul [25]. Kui värvitu ühend on võimeline kompleksi moodustama, mõjutab see värvilise ühendi CD-kompleksi neeldumismaksimumi intensiivsust. Dissotsatsioonikonstant K_{DA} arvutatakse valemi (4) järgi, mis sarnaneb valemiga sama konstandi leidmiseks faasilahustuvuse meetodil (vt. valem 1)

$$K_{DA} = \frac{[D]*(c_A - c_D + [D])}{c_D - [D]}, \quad (4)$$

kus $[D]$ - kompleksi sidumata vaba CD kontsentratsioon tasakaaluolukorras, [M]

c_A - antud spektripiirkonnas mitteneelduva külalismolekuli lahuse kontsentratsioon, [M]

c_D - üldine CD kontsentratsioon, [M].

Ka järeldus CD õõne apolaarsuse kohta pärineb just Van Etteni UV-spektrofotomeetria tulemustel, et CD-ga kompleksi moodustumisel on spektraalsed efektid sarnased nagu juhul, kui vesi asendada dioksaaniga [12].

Isegi siis, kui külalismolekuli spektris CD-ga koosmõju tagajärjel olulisi muutusi ei toimu, võib UV-spektri muutumatus ajas kaudselt kinnitada tõelise kompleksi teket [9,13,14], sest seotud molekulide stabiilsus on selle kohta veenvamaid tõendeid [15].

Aroomainete puhul on UV-spektrofotomeetriat kasutatud kromofoorseid rühmi, konjugeeritud kaksiksidet või benseenituuma sisaldavate puhaste ainete CD-komplekside uurimisel, nagu kaneelhape ja selle derivaadid [11], geraniool [13], tsitraal, kaneelaldehüüd [9,13], vanilliin, bensaldehüüd, kamper, mentoon [9], furfurüülmerkaptaan [12] jt.

Üheks veenvamaks tõendiks kompleksi tekke kohta on muidugi NMR-spektroskoopia, võimaldades CD ja tema derivaatide täielikku struktuuri ja konformatsiooni analüüsi nii CD enda kui külalismolekuli kaudu. Õõne sees paiknevad, C3 ja C5 süsinikuaatomite juures olevad prootonid annavad kõrgete väljade suunas märgatavaid nihkeid, juhul kui külalismolekul sisaldab karbonüülrühma või aromaatset tuuma, samal ajal kui teiste prootonite nihked on minimaalsed. NMR-spektroskoopia võimaldab ka määrata külalismolekuli asendi õõnes. C3 ja C5 juures paiknevate prootonite nihete suhtelised suurused kõrgete väljade suunas osutavad külalismolekuli CD õõnes paiknemise sügavusele; külalismolekuli prootonite nihete suhteline suurus näitab aga tema orien-

tatsiooni õõnes [3]. Nii näiteks selgus bensaldehüüd-α-CD kompleksi 470 MHz ^{1}HNMR spektrilt bensaldehüüdi ortoasendis oleva prootoni suhteliselt suuremast nihkest meta- ja paraasendiga võrreldes, et kompleksis paikneb, vastupidiselt traditsioonilisele ettekujutusele, CD õõnes just aldehüüdrühm [16].

Kuid NMR-spektroskoopiat võib kasutada ka tunduvalt lihtsamate ülesannete lahendamiseks, nagu kompleksi stöhhiomeetria, assotsatsioonikonstandi määramine (Hildebrandi-Benesi [5] või Scotti [11] järgi) ja konkureerivate efektide olemasolu kindlakstegemine. Sealjuures on võimalik eristada külalismolekuli omavahelisi assotsiaate tema CD kompleksidest, kuigi nende K_{ass} on samas suurusjärgus [17].
Kahjuks ei kuulu aga NMR-spektroskoopia rutiinsete analüüsimeetodite hulka.

Tabel 1.1.

EKSPERIMENTAALNE OSA. MATERJALID JA MEETODID

1.Materjalid

Materjal	Põhilised näitajad		Saamisviis/valmistaja*/hankija**
1	2		3
β-tsüklodekstriin (β-CD)	põhikomponent dekstroosekvivalent tuhk	> 98% <1.0% <4.0%	a) TTÜ biotehnoloogia labor* b) firma "Bioestron" (Kuusalu, Eesti)*
maitsetaimed 1) hariliku loorberipuu (*Laurus nobilis L.*) lehed	niiskus	< 12%	Hobski Loorberkombinaat (Gruusia)*
2) hariliku köömne (*Carum carvi L.*) seemned	niiskus	12.92%	Eestist 1988 - 1990.a.
3) hariliku humala (*Humulus lupulus L.*) käbid	alfa-happeid (UV-spektri järgi [18])	3.57%	Saku Õllethas**
eeterlikud õlid 1) tilliõli (Anethum graveolens L. ürdist)			a) Hadõzhenski Eeterlike Õlide Tehas(Ukraina)* b) Gruusia Toiduainetetööstuse TUI*
2) loorberiõli (lehtedest)			a) veeaurudestillatsioonil Ginzbergi seadmel [19] b) Gruusia Toiduainetetööstuse TUI*
3) köömneõli (seemnetest)			veeaurudestillatsioonil Ginzbergi seadmel [19]
muud reaktiivid 1) toiduetanool	põhikomponent	>96%	
2) metanool	alates 230nm	<0.1	puhastatud täiendavalt NaOI-ga vastavalt [20]
3) ortofosforhape H_3PO_4	mark h.^c.		
4) benseen	mark h.^c., põhikomponent	>99.8%	Tšerepovetsi Lämmastikväetiste tehas

1	2	3
mudelained UV-spektrofotomeetrias		
1) limoneen		importpreparaat
2) terpinoleen		Schimmel ja Co. Akt. Ges.
3) p-tsümeen		Trust "Sojuzreaktiv", Gorki kontor
4) α-pineen		Eesti TA Keemia Instituut
5) β-pineen		Eesti TA Keemia Instituut
6) ionoonide segu		JUSTIN DUPONT FRANCE
7) geraniool		Eesti TA Keemia Instituut
8) tümool		Apteek nr. 215
9) isoeugenool		Eesti TA Keemia Instituut

2. MEETODID

2.1.Aktiivse toimeaine eraldusmeetodid

2.1.1.Veeaurudestillatsioon

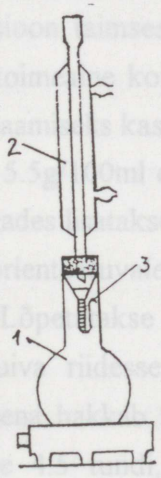
Eeterliku õli eraldamiseks loorberilehtedest ja köömneseemnetest kasutati Ginzbergi seadet [19]. See koosneb pikakaelalisest seisukolvist 1 (mahuga 1000ml), sellega lihvi abil ühendatud püstjahutist 2 ja jahuti otsas klaaskonksu küljes rippuvast Ginzbergi vastuvõtjast 3 (joon.2.1.). 100g peenestatud taimset materjali pannakse kolbi ja lisatakse 450ml dest. vett. Ginzbergi vastuvõtja täidetakse samuti dest. veega ja kolvi sisu viiakse keemiseni. Keemisel tekkivad aurud kondenseeruvad jahutis; destillaat läheb pärast õli eraldumist vastuvõtjas destillatsioonikolbi tagasi. Destilleerimise kiirus on 45-50 tilka /min. ja kestus 90 min. Õli kogus leitakse kaalumise teel pärast tema jahtumist toatemperatuurile. Õli sisaldus taimses materjalis arvutatakse valemi (5) järgi

$$C = \frac{A}{B} * 100, \qquad (5)$$

kus C - õli sisaldus taimses materjalis [%],

A - destillatsioonil eraldunud õli kogus [g],

B - taimse materjali kaalutis [g].



Joon.2.1. Ginzbergi seade eeterlike õlide veeaurudestillatsiooniks (selgitused tekstis)

2.1.2. Ekstraktsioon orgaanilise lahustiga

2.1.2.1. α-hapete sisalduse määramiseks humalas spektrofotomeetriliselt [18]

5g peenestatud humalat ekstraheeritakse 5 minutit 150ml benseeniga. Ekstrakt filtritakse klaasfiltril N°3 250ml mõõtkolbi. Humalaraba pestakse 6 korda a'15 ml benseeniga ja täidetakse mõõtkolb sellega kuni märgini. Sellest lahusest võetakse 1ml ja viiakse 100ml mõõtkolbi, lisatakse 1ml 0.2n NaOH lahust ja viiakse lahuse maht metanooliga kuni 100ml. Võrdlusproovil on mõruainete benseeniekstrakti asemel puhas benseen.

2.1.2.2. Humalaekstrakti ja lupuliinekstrakti valmistamine mõruhapete analüüsiks HPLC-ga

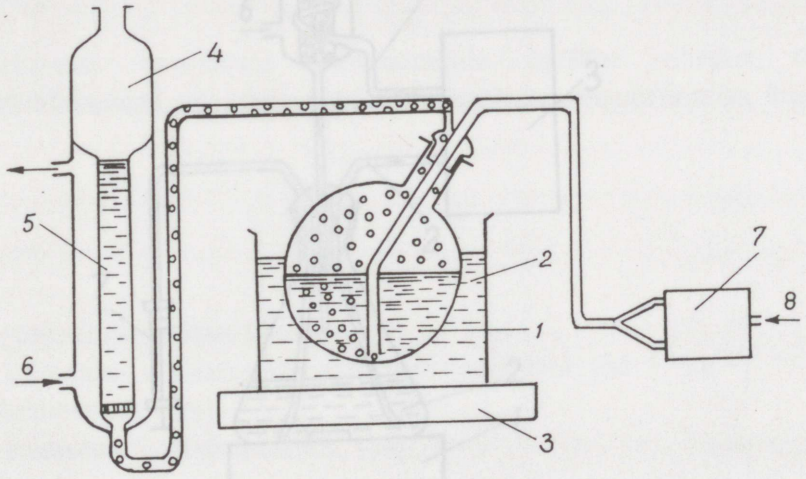
1-2g peenestatud humalale 50ml lihviga koonilises kolvis lisatakse 20ml metanooli, suletakse klaaskorgiga ja ekstraheeritakse magnetsegajal 0.5 tundi. Filtritakse läbi klaasfiltri ja säilitatakse külmutuskapis t=4°C juures [21]. Lupuliinekstrakti valmistamisel eraldatakse humalakäbidelt soomused ja nendelt käsitsi lupuliinnäärmed [22]. 0.054g näärmete kohta võeti 1.35ml metanooli, muus osas oli ekstrakti valmistamine analoogiline humala metanooliekstrakti valmistamisega.

2.1.3.Ekstraktsioon tsüklodekstriini lahusega

Aktiivse toimeaine ekstraktsioon taimsest materjalist CD-lahusega on võimalik tänu kompleksi moodustumisele toimeaine komponenetide ja CD molekulide vahel. Puhta toimeaine CD-kompleksi saamiseks kasutati kooskristallimise meetodit [23].
β-CD-st valmistatakse lahus 5.5g/100ml etanooli ja vee segus 1:3, mis on soojendatud 50°C-ni. Lahust pidevalt segades lisatakse toimeaine kaalutis arvestusega 0.1 kaaluosa beeta-CD-st (vasatavalt orienteeruvale toimeaine komponentide ja beeta-CD molekulmasside suhtele). Lõpetatakse soojendamine, mähitakse reaktsiooninõu alumiiniumfooliumisse ja kuiva riidesse, et aeglustada jahtumist, ning asetatakse loksutile. Jahtumise tulemusena hakkab eralduma valge kristalliline toimeaine-beeta-CD kompleks. Loksutatakse 4.5 tundi, seejärel asetatakse reaktsiooninõu ööseks külmkappi jääle, et saavutada suuremat kristallide saagist. Järgmisel päeval filtritakse kompleks klaasfiltril ning kuivatatakse toatemperatuuril õhu käes konstantse massini. Kompleksi säilitatakse toatemperatuuril kaanega suletud kaaluklaasis.

2.1.3.1.Ekstraktsioon barbotaazhmeetodil [II,IV]

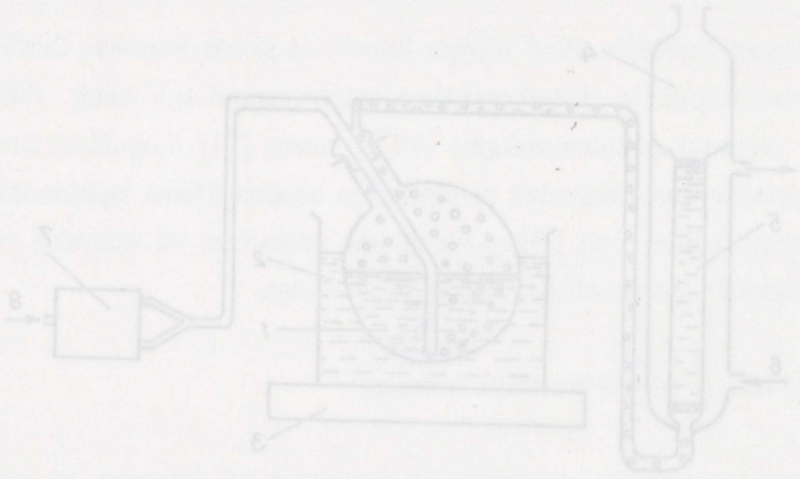
Taimses materjalis olev toimeaine viiakse aurufaasi ja absorbeeritakse otsekohe beeta-CD lahusega; sellele järgneb kristallimine (joon.2.2). Peenestatud taimse materjali suspensiooni 150ml vees (1) kuumutatakse keeval vesivannil (2) 1.5 tunni jooksul. Selle käigus vabanevaid toimeaine aure barboteeritakse läbi reaktori (4) poorse põhja ja püütakse 50°C juures olevasse β-CD lahusesse (5). β-CD etanooli vesilahuse (1:3) maht on 37.5ml. Taimse materjali kogus sõltub tema toimeaine sisaldusest, mis on eelnevalt määratud Ginzbergi meetodil ([19],vt. p.2.1.1.). β-CD ja taimse materjali kaaluline suhe valitakse selliselt, et tekiksid 1:1 kompleksid. Pärast kompleksi teket reaktor tühjendatakse ja segu kristallitakse samuti nagu p. 2.1.3.



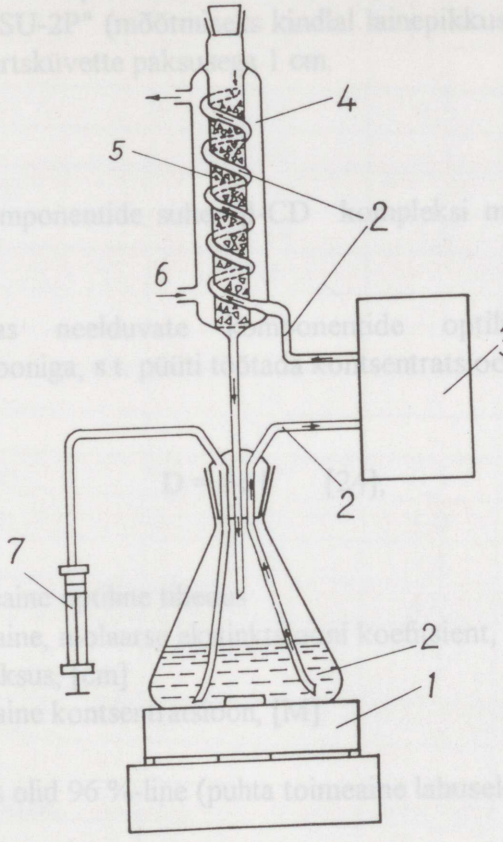
Joon.2.2. Seade toimeaine eraldamiseks taimsest materjalist β-CD komplekside moodustumise teel barbotaazhmeetodil (selgitused tekstis).

2.1.3.2.Retsirkulatsioonekstraktsioon [III,IV]

70°C juures olevat β-CD lahust tsirkuleeritakse läbi taimse materjaliga täidetud kolonni; tahke kompleks saadakse kristallimise teel (joon.2.3.). Valmistatakse β-CD lahus 1:3 etanooli ja vee segus (või puhtas vees) (2), mida hoitakse küttekehaga magnetsegajal (1). Sealt juhitakse see peristaltilise pumba (3) abil ekstraktori (4) alaossa. Ekstraktori veesärgis olevas spiraalis soojeneb β-CD lahus 70°C-ni ja


4
7
8
2
1
5
6
3

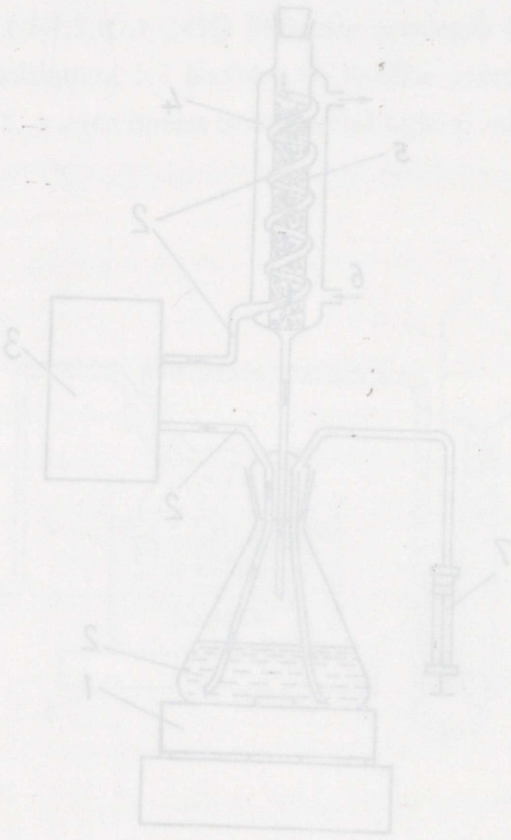
juhitakse seejärel taimsele materjalile (5) reaktori ülaosast. Eelsoojendatud β-CD lahust (koos juba tekkinud kompleksiga) tsirkuleeritakse läbi taimse materjali kihi, kuni toimeaine-β-CD kompleksi enam juurde ei teki. Protsessi jälgitakse proovide võtmise teel reaktsioonisegust voolikuga ühendatud süstla (7) abil. Vajalikud taimse materjali ja β-CD kogused arvutatakse ning tekkinud kompleks kristallitakse samuti nagu barbotaazhimeetodil ekstraktsioonil (p. 2.1.3.1.).



Joon 2.3. Seade toimeaine eraldamiseks taimsest materjalist β-CD komplekside moodustumise teel ekstraktsioonmeetodil

2.1.3.3. Perkolatsioonekstraktsioon

Ekstraktsiooniseade, selle eri osade temperatuur ning kasutatud taimse materjali ja β-CD koguse arvutus olid analoogilised retsirkulatsiooniga(p. 2.1.3.2). Seevastu taimset materjali ekstraheeriti ainult värskete koguste β-CD lahusega. Ekstraktori alaosast väljunud lahus koguti teatud ajavahemike järel eraldi katseklaasidesse. Kompleksi tekkimist proovides jälgiti toimeaine sisalduse järgi, mida mõõdeti spektrofotomeetriliselt.



2.2. Aktiivse toimeaine sisalduse määramismeetoodid

2.2.1. Terpenoidsete ühendite sisalduse määramine spektrofotomeetriliselt

Nii puhaste kui β-CD kompleksi koosseisu läinud terpenoidsete ühendite kvantitatiivsel määramisel kasutati spektrofotomeetreid "Specord UV-Vis" (skaneeriv, spektrite võtmiseks) ja "VSU-2P" (mõõtmiseks kindlal lainepikkusel; mõlemad Carl Zeiss, Jena) ning kaanega kvartsküvette paksusega 1 cm.

Eeldati, et

1) toimeaine komponentide suhe β-CD kompleksi moodustamise käigus ei muutu oluliselt;

2) UV-piirkonnas neelduvate komponentide optiline tihedus on võrdeline kontsentratsiooniga, s.t. püüti töötada kontsentratsioonipiirkonnas, kus

$$D = \varepsilon c l \quad [24], \tag{6}$$

kus D - toimeaine optiline tihedus
ε - toimeaine, molaarse ekstinktsiooni koefitsient, [M^{-1}. cm^{-1}]
l - kihi paksus, [cm]
c - toimeaine kontsentratsioon, [M]

Võrdluslahusteks olid 96 %-line (puhta toimeaine lahusele) ja 33 %-line etanool (β-CD kompleksile).

Kasutades erineva kontsentratsiooniga toimeaine lahuseid, ehitati kaliibrimissirge $D=f(c)$ neeldumismaksimumi kohta, mille ε oli suurim. Toimeaine kontsentratsioon uuritavas lahuses leiti sellelt sirgelt.

CD-komplekside toimeaine sisalduse määramisel eeldati veel, et

1) CD-l antud UV-piirkonnas neelduvus praktiliselt puudub;
2) UV-piirkonnas neelduvate külalismolekulide lahuste neelduvuse intensiivsus kompleksi moodustamise käigus ei muutu oluliselt.

Spektrite interpreteerimisel olid aluseks kirjanduse andmed uuritavate eeterlike õlide tüüpilisemate komponentide kohta (vt. tabelid 2.1 ... 2.3 ja joon. 2.4, 2.5).

Tabel 2.1.

Loorberiõli põhikomponendid kirjanduse põhjal

Komponent	Sisaldus, %			
	[26]	[27]	[28]	[30]
α-pineen	7,67	4,4	12	+
β-pineen	5,72	3,3	6	+
kamfeen	0,50	0,5	2	+
(+)-3 -kareen	0,18	-	-	-
sabineen	13,18	5,9	5	-
α-tujeen	0,76	-	-	-
limoneen	1,66	2,1	4	+
terpinoleen	-	-	0,3	-
γ-terpineen	0,58	-	1	-
α-terpineen	0,32	-	0,5	-
α-fellandreen	0,50	0,5	0,5	+
β-fellandreen	0,65	1,0	-	+
mürtseen	2,48	1,4	1	-
p-tsümeen	1,73	1,0	2	+
Kokku mono-terpeensüsivesinikke	36,0	> 20,1	> 21,8	
β-kariofülleen				+
C_8-aldehüüd				+
(oktüülaldehüüd,				
oktanaal)				+
tsitronellaal				+
linalool			11	+
geraniool			-	+
nerool			-	+
terpineen-4-ool			3	-
α-terpineool			6	-
β-terpineool			-	+
borneool			-	+
eugenool		1,8	2	+
metüüleugenool		-	-	+
linalüülatsetaat		-	-	+
nerüülatsetaat		-	-	+
α-terpineoolatsetaat		-	10	-
1,8-tsineool (eukalüptool)		34,8	30	50...70

Tabel 2.2.

Köömneõli põhikomponendid kirjanduse põhjal

Komponent	Sisaldus, %			
	[26]	[30]	[33]	[34]
α-pineen	jäljed	jäljed		
β-pineen	jäljed	jäljed		
kamfeen	-	-		
(+)3 -kareen	jäljed	-		
sabineen	jäljed	-		
α-tujeen	jäljed	-		
R(+)-limoneen	38,0	määramata	40,47	
terpindeen	-	jäljed		
α-terpineen	-	-		
α-fellandreen	jäljed	-		
mürtseen	-	jäljed		
p-tsümeen	-	jäljed		
Kokku monoter-peensüsivesinikke	>38,0		>40,47	
S-(+)-karvoon		53...63		51,2
trans-dihüdrokarvoon		jäljed		
cis-dihüdrokarvoon		jäljed		
tujoon		jäljed		
Kokku terpeenketoone		< 63		> 51,2
1-p-menten-4-ool ehk terpineen-4-ool		jäljed		
8-p-menten-2-ool (neo) ehk neodihüdrokarveool		jäljed		
8-p-menten-2-ool ehk dihüdrokarveool		jäljed		
8-p-menten-2-ool(iso) ehk isodihüdro-karveool		jäljed		
8-p-menten-2-ool(neo-iso) ehk neo-isodihüdrokarveool		jäljed		
cis-8-p-menten-1-ool ehk β-terpineool				
cis-karveool		jäljed		
trans-karveool		jäljed		

Tabel 2.2.

Kõõmneõli põhikomponendid kirjandusse põhjal

Komponent	Sisaldus, %			
	[26]	[30]	[33]	[34]
α-pineen	jäljed	jäljed		
β-pineen	jäljed	jäljed		
kamfeen	-	-		
(+)3 -kareen	jäljed	-		
sabineen	jäljed	-		
α-tujeen	jäljed	-		
R(+)-limoneen	3-8,0	määramata	40,47	
terpinoleen	-	jäljed		
α-terpineen	-	-		
α-fellandreen	jäljed	-		
mürseen	-	jäljed		
p-tsümeen	-	jäljed		
Kokku monoter-penoidsüsivesinikke	>38,0		>40,47	
S-(+)-karvoon		53...63		51,2
trans-dihüdrokarvoon		jäljed		
cis-dihüdrokarvoon		jäljed		
tujoon		jäljed		
Kokku terpeenketoone		< 63		> 51,2
1-p-menten-4-ool ehk terpineen-4-ool		jäljed		
8-p-menten-2-ool (neo) ehk neoisodihüdrokarveool		jäljed		
8-p-menten-2-ool ehk dihüdrokarveool		jäljed		
8-p-menten-2-ool(iso) ehk isodihüdrokarveool		jäljed		
8-p-menten-2-ool(neo-iso) ehk neoisodihüdrokarveool		jäljed		
cis-8-p-menten-1-ool ehk β-terpineool				
cis-karveool		jäljed		
trans-karveool		jäljed		

Tabel 2.3.

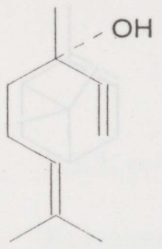
Tilliõli põhikomponendid kirjanduse põhjal

Komponent	Sisaldus, %								
	Ürdis		Õites	Seemnetes					
	[25]	[41]	[31]	[30]	[33]	[34]	[35]	[36]	[42]
α-pineen			1,36	jäljed					
β-pineen			-	jäljed					
kamfeen			0,04	-					
sabineen			0,12	-					
α-tujeen			0,27	-					
R(+)-limoneen	15,6		29,44*	10	60,25				
terpinoleen			0,14						
γ-terpineen			0,06	-					
α-terpineen			0,51	6					
α-fellandreen			23,62	6					
β-fellandreen			29,44*	-					
mürtseen			0,97	-					
β-otsimeen			0,1	-					
p-tsümeen			0,34	jäljed					
Kokku monoterpeen-süsivesinikke	50,5	61,80	56,97	>22	>60,25				
S(+)-karvoon	97,9	17,5	14,05	34,5		59,3	37,3	38,7	20
dihüdrokarvoon		0,80	1,30	12					
kamper			0,02	-					
fenhoon			0,05	-					
Kokku terpeenketoone	>37,9		15,42	46,5		>59,3	>37,3	>38,7	>20
karveool				4					
dihüdrokarveool				3,5					
isoeugenool			-	2,3					
gvajakool			0,02	-					
karvüülatsetaat			0,3						
anetofuraan e. (3,6-dimetüül-2,3,3a,4,5,7a-heksahüdroben-sofuraan)		19,10	19,8						

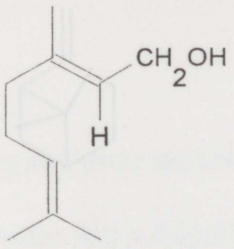
* R(+) - limoneen + β-fellandreen [34]

Komponent	Sisaldus, %								
	Õrdle		Õites	Seemnetes					
	[25]	[41]	[31]	[30]	[33]	[34]	[35]	[36]	[42]
α-pineen			1,36	jäljed					
β-pineen			-	jäljed					
kamfen			0,04	-					
sabineen			0,12	-					
α-tujeen			0,27	-					
R(+)-limoneen	15,6		29,44*	10	60,25				
terpinoleen			0,14						
γ-terpineen			0,06	-					
α-terpineen			0,51	6					
α-fellandreen			23,62	6					
β-fellandreen			29,44*	-					
mürtseen			0,97	-					
β-ocimeen			0,1	-					
p-tsümeen			0,34	jäljed					
Kolklõhe monoterpeen-süsivesinikke	50,5	61,80	56,97	>22	>60,25				
S(+)-karvoon	97,9	17,5	14,05	34,5		59,3	37,3	38,7	20
dihüdrokarvoon		0,80	1,30	12					
kamper			0,02	-					
fenhoon			0,05	-					
Kolklõhe terpeenketoone	>37,9		15,42	46,5		>59,3	>37,3	>38,7	> 20
karvool				4					
dihüdrokarveool				2,5					
isoeugenool				-	2,5				
fenüülatsetaat				0,02	-				
kaprüülatsetaat				0,3					
anetofuraan e. (3,6-dimetüül-2,3,3a,4,5,7a-heksahüdrobenzofuraan)		19,10	19,8						

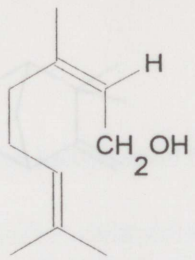
* R(+) - limoneen + β-fellandreen [34]



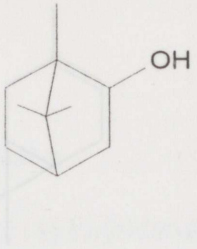
linalool



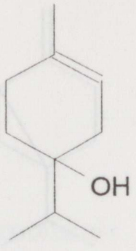
geraniool



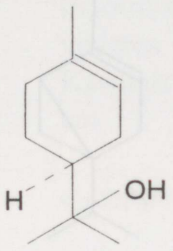
nerool



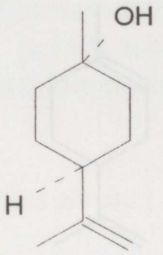
borneool



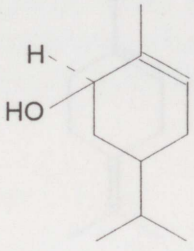
terpineen-4-ool



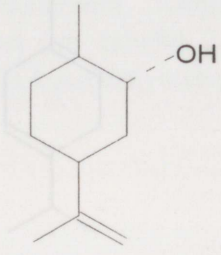
α-terpineool



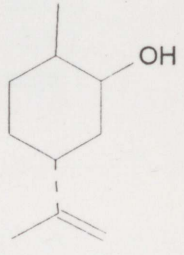
β-terpineool



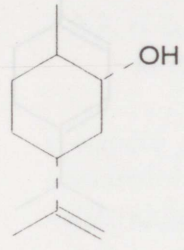
cis-karveool



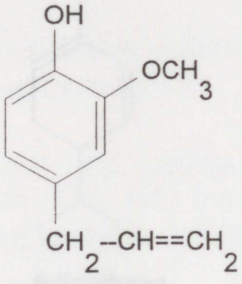
dihüdrokarveool



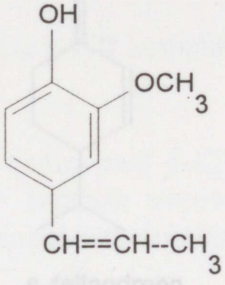
neodihüdrokarveool



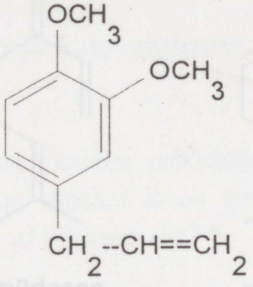
isodihüdrokarveool



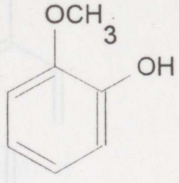
eugenool



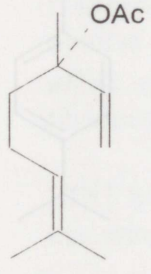
isoeugenool



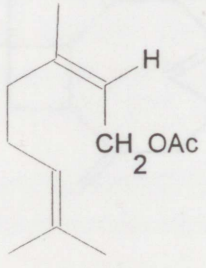
metüüleugenool



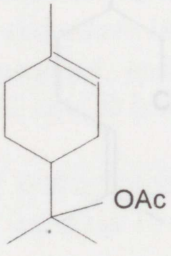
gvajakool



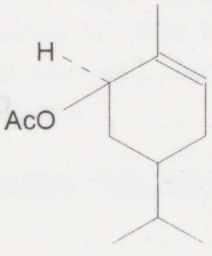
linalüül-
atsetaat



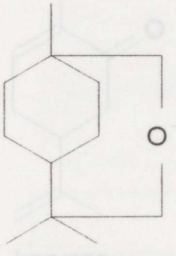
nerüül-
atsetaat



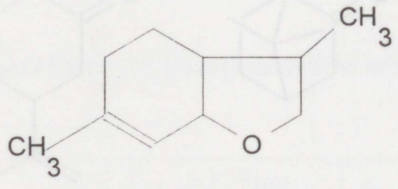
α-terpineool-
atsetaat



karveüül-
atsetaat

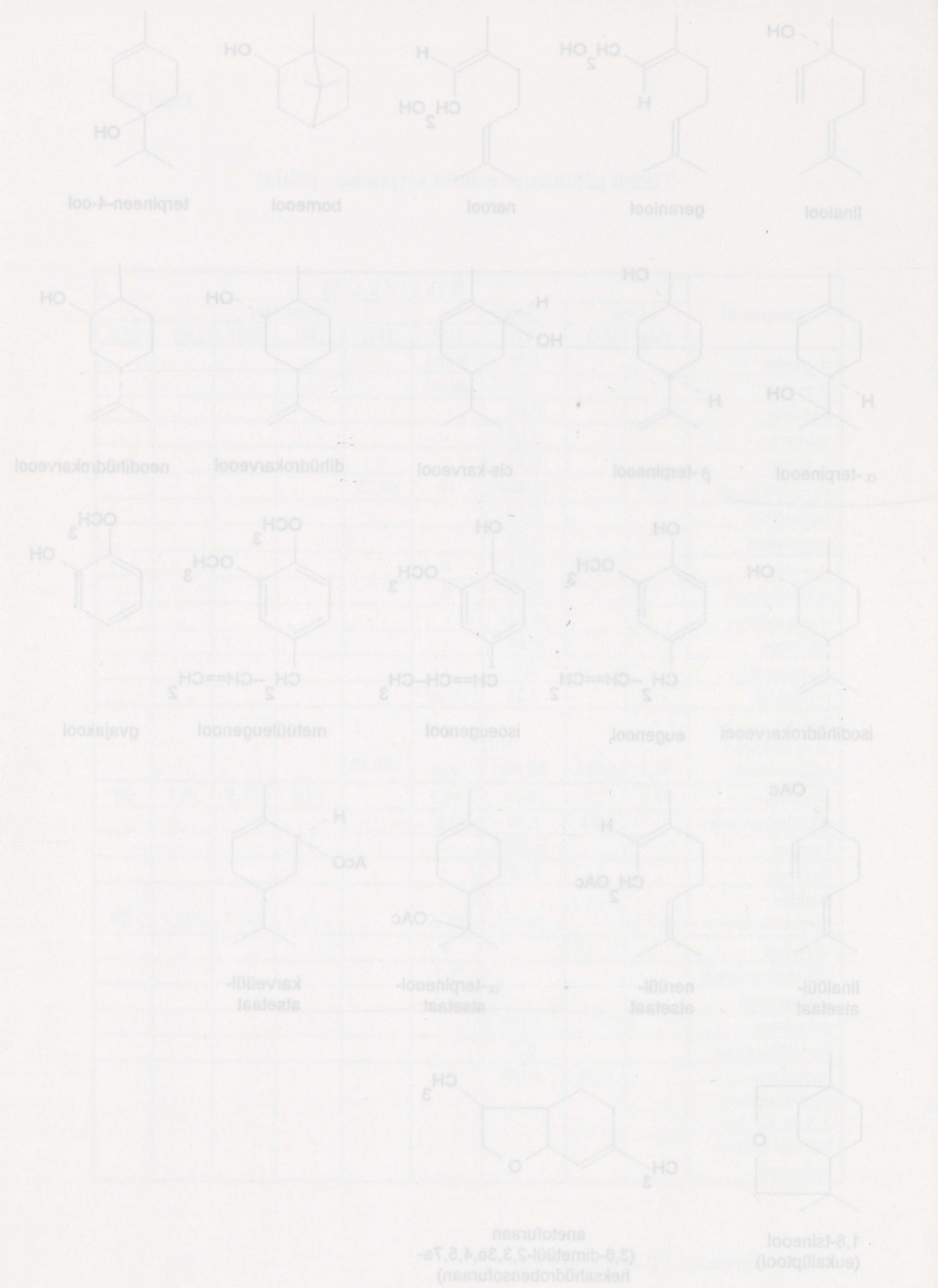


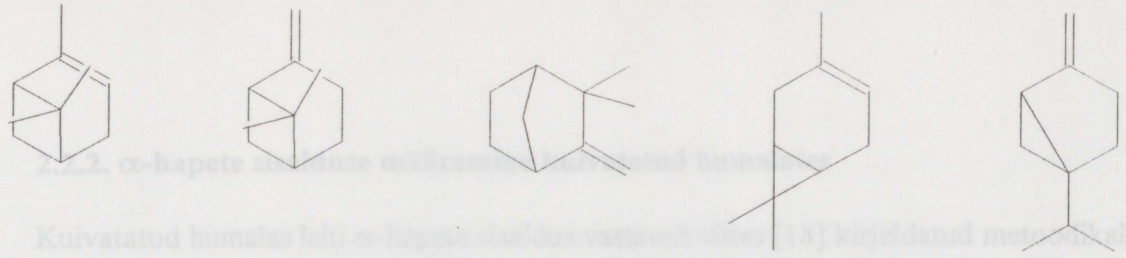
1,8-tsineool
(eukalüptool)



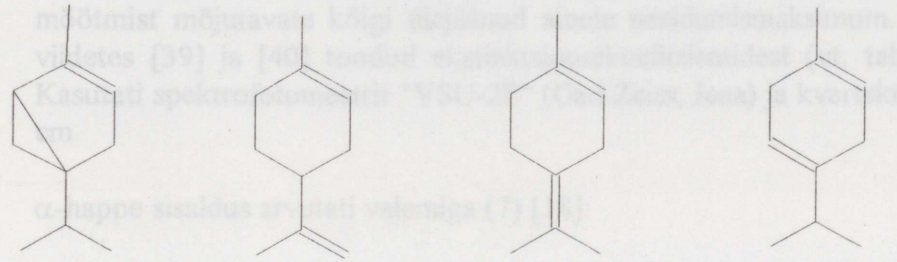
anetofuraan
(3,6-dimetüül-2,3,3a,4,5,7a-
heksahüdrobensofuraan)

Joon. 2.4. Tilli-, loorberi- ja köömneõlis leiduvate terpenoidsete ühendite (alkoholide, fenoolide, estrite jt.) struktuurvalemid

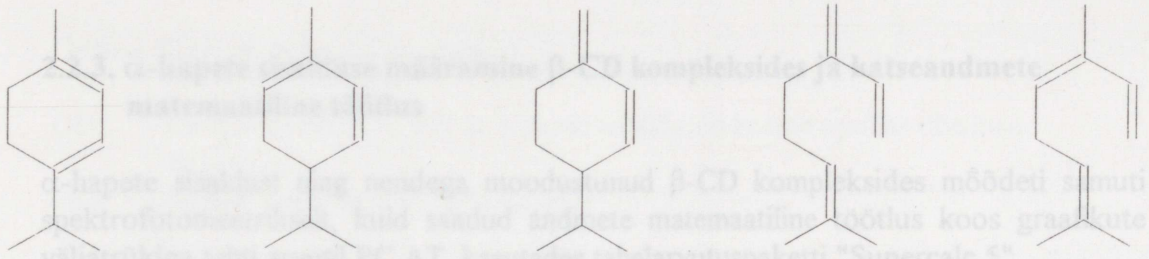




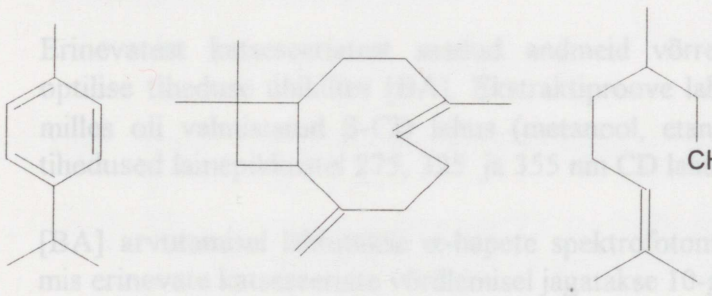
α-pineen β-pineen kamfeen Δ^3 kareen sabineen



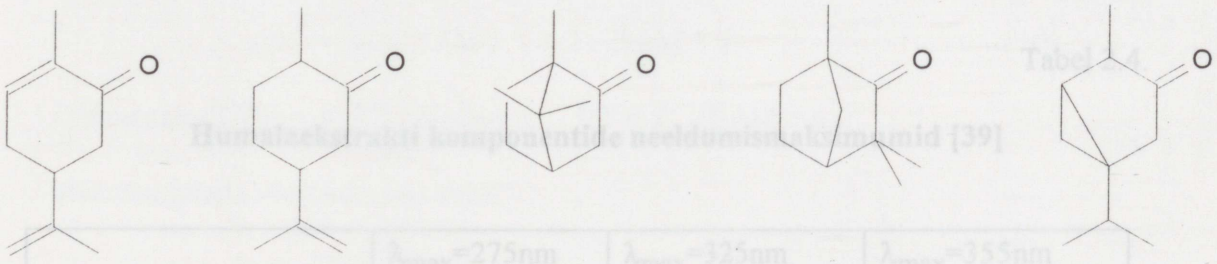
α-tujeen d-limoneen terpinoleen γ-terpineen



α-terpineen α-fellandreen β-fellandreen mürtseen β-otsimeen



p-tsümeen β-kariofülleen tsitronellaal



karvoon dihüdrokarvoon kamper fenhoon tujoon

Joon. 2.5. Tilli-, loorberi- ja köömneõlis leiduvate terpenoidsete ühendite (süsivesinike, aldehüüdide ja ketoonide) struktuurvalemid

2.2.2. α-hapete sisalduse määramine kuivatatud humalates

Kuivatatud humalas leiti α-hapete sisaldus vastavalt viites [18] kirjeldatud metoodikale (vt. ka p. 2.1.2.1). Humalaekstrakti optilist tihedust mõõdetakse kolmel lainepikkusel - 325 nm, 355 nm ja 275 nm, mis on vastavalt humulooni ja lupulooni leeliseliste metanoolilahuste neeldumismaksimum ning neil lainepikkustel optilise tiheduse mõõtmist mõjutavate kõigi ülejäänud ainete neeldumismaksimum. Sealjuures lähtuti viidetes [39] ja [40] toodud ekstinktsioonikoefitsientidest (vt. tabelid 2.4. ja 2.5.). Kasutati spektrofotomeetrit "VSU-2P" (Carl Zeiss, Jena) ja kvartsküvette paksusega 1 cm.

α-happe sisaldus arvutati valemiga (7) [18]:

$$\alpha\text{-happed} = (73{,}79 \cdot D_{325} - 51{,}56 \cdot D_{355} - 19{,}07 \cdot D_{275})/2, \quad [\%] \qquad (7)$$

2.2.3. α-hapete sisalduse määramine β-CD kompleksides ja katseandmete matemaatiline töötlus

α-hapete sisaldust ning nendega moodustunud β-CD kompleksides mõõdeti samuti spektrofotomeetriliselt, kuid saadud andmete matemaatiline töötlus koos graafikute väljatrükiga tehti arvutil PC AT, kasutades tabelarvutuspaketti "Supercalc 5".

Suhteline optilise tiheduse ühik [BA]

Erinevatest katseseeriatest saadud andmeid võrreldi α-happe sisalduse suhtelise optilise tiheduse ühikutes [BA]. Ekstraktiproove lahjendati 50...800 korda lahustiga, milles oli valmistatud β-CD lahus (metanool, etanool või vesi). Mõõdeti optilised tihedused lainepikkustel 275, 325 ja 355 nm CD lahusti vastu.

[BA] arvutamisel lähtutakse α-hapete spektrofotomeetrilise määramise valemist (7), mis erinevate katseseeriate võrdlemisel jagatakse 10-ga.

$$[BA] = (73.79 * OD325 - 51.56 * OD355 - 19.07 * OD275)/20 \qquad (8)$$

Tabel 2.4.

Humalaekstrakti komponentide neeldumismaksimumid [39]

Komponent	λ_{max}=275nm		λ_{max}=325nm		λ_{max}=355nm	
	1% E_{1cm}	ε	1% E_{1cm}	ε	1% E_{1cm}	ε
humuloon $C_{21}H_{30}O_5$	90	3261	381	13 804	318	11 522
lupuloon $C_{26}H_{38}O_4$	37	1529	331	13 678	460	19 008
ülejäänud komponendid	31		15		10	

Tabel 2.5.

Humulooni neeldumismaksimumid leeliselises EtOH-s [40]

	λ_{max}=228nm	λ_{max}=324nm	λ_{max}=350...361nm
ε	14 730	11 520	8750

[BA] ühikutes arvutati järgmised suurused:

BA - reaalsete optiliste tiheduste järgi arvutatud α-hapete sisaldus;
BAa - α-hapete sisalduse arvutuslik väärtus.

Optilise tiheduse ühikutes arvutati:

OD - lainepikkustel 275, 325 ja 355 nm mõõdetud kolme optilise tiheduse keskmine;
ODa - eelmise suuruse arvutuslik väärtus.

Arvutusliku α-hapete sisalduse ja arvutusliku keskmise optilise tiheduse leidmiseks kasutati hüperbooli valemit (9), millele eksperimentaalsete andmete põhjal ehitatud graafikud lähenesid kõige enam:

$$BA = BAM * T / (TP + T), \quad (9)$$

kus BAM - α-hapete maksimaalne sisaldus, [BA]
T - aeg, min.
TP - poolküllastuse aeg, s.t. aeg, mille jooksul ekstraheeritakse 50 % α-hapete maksimaalsest sisaldusest, min.

Võrrand (9) lineariseeriti selle mõlemast poolest pöördväärtuste võtmisega, saades võrrandi (10)

$$1/BA = TP / BAM * T + T / BAM * T. \quad (10)$$

Defineerides $1/BA = y$; $TP / BAM = a_1$; $1/T = x$; $1/BAM = a_0$,

võime kirjutada võrrandi (10) kujul:

$$y = a_1 * x + a_0 \quad (11)$$

Lineaarregressiooni kasutades leitakse a_1 ja a_0. Arvutuslik α-hapete sisaldus [BA]ühikutes (BAa) ja arvutuslikud optilise tiheduse keskmised (ODa) leiti valemiga (12):

$$y_a = (\bar{y} - \bar{x} * a_1) + a_1 * X, \quad (12)$$

kus y_a - y arvutatud väärtus,
$\bar{y}$, $\bar{x}$ - keskmised väärtused.

x ja $\bar{x}$ asemel kasutati vastavaid aja pöördväärtusi 1/T; y ja $\bar{y}$ asemel aga vastavaid BA või OD väärtusi. Mõningatel juhtudel võrreldi ODa (silutud optiliste tiheduste) järgi arvutatud α-hapete sisalduse graaafikut α-hapete sisalduse arvutuslike väärtuste (BAa) graafikuga.

Kolme optilise tiheduse keskmine igas katsepunktis arvutati katseandmete usaldatavuse esialgseks kontrolliks. Optiliste tiheduste kõvera kuju lähene misel hüperboolile loeti katse õnnestunuks. Et võimaldada mõlema suuruse (s.o. OD ja BA) kujutamist ühel graafikul, kasutatigi valemit (8), mis on tegelikult α-hapete sisalduse arvutamise valem, jagatud 10-ga.

Antud katsetes ei arvutatud korrelatsioonikoefitsiente ega standardhälbeid, sest eesmärgiks oli vaid kindlaks teha protsesside üldine dünaamika.

Suhtelise optilise tiheduse ühiku [BA] seos α-hapete protsentuaalse sisaldusega

Perkolatsioon-ekstraktsioonil ja retsirkulatsioon-ekstraktsioonil saadud katsetulemused on väljendatud suhtelistes optilise tiheduse ühikutes (BA). Järgnevalt leitakse seos nende suhteliste ühikute ja mõruhapete sisalduse (%-des) vahel.

Retsirkulatsioon-ekstraktsioon:

Punktis 2.1.2.1. toodud α-hapete sisalduse määramise eeskirja kohaselt ekstraheeritakse 5 g humalaid 250 ml benseeniga. Sellest tehakse veel 100-kordne lahjendus ja saadakse α-hapete sisaldus %-des. Seades nüüd vastavusse 1 optilise tiheduse ühiku ja 1 % , saame, et ühele optilise tiheduse ühikule vastav α-hapete kontsentratsioon on 50 mg / (250 x 100) = 2 μg α-happeid/ml. Antud katsetes leiti α-hapete sisaldus optiliste tiheduste väärtuste alusel lainepikkustel 275, 325 ja 355 nm. Tulemuste võrdlemiseks kolme optilise tiheduse keskmisega (samal graafikul) jagati saadud tulemus 10-ga, mis ongi suhteline BA-ühik. Seega 1BA = 2 * 10 μg α-happeid/ml. Korrutades selle lahuse mahuga, saame 1BA-le vastava α-hapete koguse μg-des lahuses.

Perkolatsioon-ekstraktsioon:

Siin võetakse aluseks α-hapete summaarne väljatulek, summeeritud on kõigist fraktsioonidest saadud α-happed, (s.o. SBA). Ka see väärtus on väljendatud suhtelistes optilise tiheduse ühikutes [BA]. Ühele BA ühikule vastav α-hapete kontsentratsioon on 20μg α-happeid/ml. Korrutades SBA väärtuse lahuse mahuga saame eraldunud α-hapete hulga μg-des.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Aktiivse toimeaine eraldamine standardmeetoditel

Taimsest materjalist (loorberilehtedest ja köömneseemnetest) eraldati eeterlik õli p. 2.1.1 kirjeldatud metoodika järgi Ginzbergi seadmel. Sel viisil määratud eeterliku õli sisaldust käsitleti baassuurusena muude parameetrite arvutamisel teiste eraldusmeetodite puhul (vt. tabel 3.1). Enne igat järjekordset ekstraktsiooniseeriat määrati eraldi vastava materjalipartii toimeaine (eeterliku õli) sisaldus.

Tabel 3.1.

Eeterlike õlide sisaldus loorberilehtedes ja köömnetes, määratud veeaurudestillatsiooniga Ginzbergi seadmel

Jrk. nr.	Materjal	Kaalutis, g	Lisatud vett, ml	Destillatsiooni aeg, min	Õli sisaldus, %
1	Loorber	75,0	450	90	1,11
2	Loorber	92,6	440	90	1,12
3	Loorber	66,5	350	70	1,64
4	Loorber	76,0	450	90	2,82
5	Köömned	100,0*	500	156	2,03
6	Köömned	100,0	500	87	3,57
7	Köömned	100,0	500	120	2,17
8	Köömned	100,0	450	120	3,43
9	Köömned	100,0	500	100	4,03

* purustamata

3.2. Aktiivse toimeaine ekstraktsioon tsüklodekstriini lahustega.

3.2.1. Eeterlike õlide eraldamine β-CD komplekside moodustamise teel.

3.2.1.1. Barbotaazhmeetod.

Enamkasutatavaks meetodiks aromatisaatorite ß-CD komplekside saamisel on kooskristallimine e. lahus-lahus meetod (co-crystallization) [3,5,9,11,23,51], vt.p. 2.1.3. Puhta toimeaine ja ß-CD lahused segatakse sobival temperatuuril, mille juures nad mõlemad lahustuvad; tekkinud kompleksi kristalliseerumine saavutatakse aeglasel jahutamisel ja pikaajalisel hoidmisel madalal temperatuuril. Kuid on teada, et ß-CD molekul on võimeline moodustama kompleksi sobivate mõõtmetega külalismolekuliga ka gaasifaasis. Sellel põhineb idee õhu puhastamiseks kahjulikest lahustiaurudest küllastatud ß-CD lahusega absorptsioonil [25].

Arvestades eeterlike õlide koostisesse kuuluvate terpenoidsete ühendite lenduvust, kasutati seda meetodit järgnevalt nendega ß-CD komplekside saamisel. Taimses materjalis leiduvad eeterlikud õlid viidi aurufaasi ja absorbeeriti seejärel kohe ß-CD lahusesse. Vaadeldes katseseadme konkreetset vormistust (p.2.1.3.1.) näeme, et eeterlike õlide aurud juhitakse ß-CD lahusesse läbi isoleerimata toru. On ilmne, et aurud seejuures jahtuvad ja tegelikult jõuab ß-CD lahusesse vee, veeauru, eeterliku õli ja selle aurude segu. Nimetatud segu reaktorisse juhtimiseks tuli kasutada õhupumpa. Optimaalsed tingimused kuivatatud loorberilehtedest ja köömneseemnetest eeterlike õlide eraldamiseks on välja töötatud töös [II].

Tabel 3.2.

Loorberilehtedest barbotaazhmeetodil β-CD lahusega eraldunud eeterlike õlide koguse sõltuvus ß-CD kontsentratsioonist.

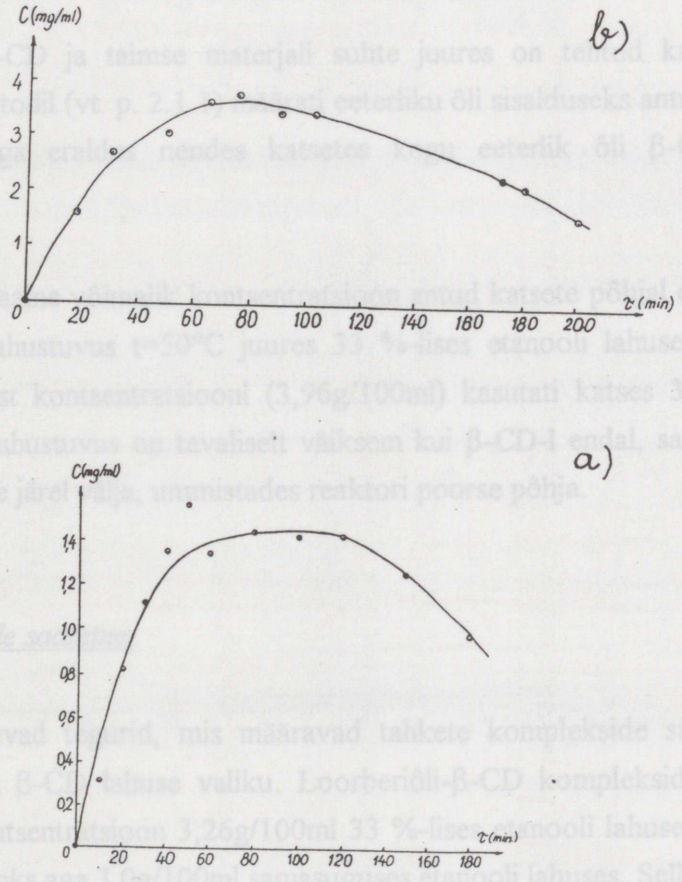
Jrk. nr.	β-CD konts., g/100ml	Õli maks. sisaldus, mg/ml	Eeterliku õli saagis, mg	Eeterliku õli saagis lehtedest, %	Eeterlik õli/ β-CD, g/g	1g õlile β-CD, g
1.	0,758	0,36	13,25	0,945	0,047	21,43
2.	0,756	0,105	3,48	0,248	0,013	78,16
3.	3,976	0,20	6,65	0,027	0,004	224,21
4.	1,48	2,25	149,60	1,67	0,272	3,68
5.	1,35	2,40	147,90	1,65	0,292	3,42
6.	1,36	1,15	57,53	1,29	0,112	8,86
7.	1,35	1,43	60,94	1,35	0,120	8,30
8.	1,36	1,44	70,41	1,56	0,138	7,24

Protsessi dünaamika

Eeldades, et terpenoidsed ühendid moodustavad ß-CD-ga enamasti 1:1 komplekse, jälgiti protsessi kulgu reaktorisse tekkiva eeterliku õli sisalduse järgi. õli sisaldust mõõdeti UV-spektrofotomeetriga. Püüti saavutada tingimused, millel eeterliku õli kontsentratsioon lahuses oleks maksimaalne. Selleks optimeeriti järgimööda protsessi läbiviimiseks kuluvat aega, sobivat ß-CD lahustit, ß-CD ja taimse materjali suhet ja ß-CD lahuse kontsentratsiooni. ß-CD reaktori temperatuur oli kõigil juhtudel 50°C ja taimse materjali suspensiooni hoiti keeval vesivannil.

Jooniselt 3.1, mis kujutab barbotaazhiprotsessi dünaamikat, selgub optimaalne aeg kompleksi tekkeks - umbes 90 min. (nii loorberi kui köömnete puhul). Edasi hakkab eeterliku õli kontsentratsioon reaktsioonisegus kondensatsiooniveega lahjenemise tõttu vähenema, mis on eeterliku õli eraldumise lõpu tunnuseks. Kõne alla võib tulla ka mõnede toimeaine komponentide lagunemine pikaajalisel kuumutamisel.

Vedela loorberiõli-ß-CD kompleksi näitel optimeeriti ülejäänud tingimused. Tulemused on tabelis 3.2.



Joon. 3.1. Barbotaazhiprotsessi dünaamika: a) - loorberiõli; b) - köömneõli

Joon. 3.1. Barbotaaziprotsessi dünaamika: a) - loorberiõli; b) - kõõnneõli

Järeldused:

1. β-CD lahustina peeti antud katseseerias sobivamaks 33 %-list etanooli vesilahust, milles β-CD lahustuvus on parem, kuna β-CD vesilahustega on tehtud katsed 1 ja 2. β-CD vesilahustega on taimsest materjalist võimalik toimeainet efektiivselt eraldada, kui
   a.) tõsta temperatuuri,
   b.) peenestada taimset materjali täiendavalt,
   c.) kasutada β-CD ülehulka (katse 1).

2. β-CD ja taimse materjali suhe oleneb toimeaine sisaldusest taimses materjalis. Vastavalt molekulmasside suhtele, on β-CD ja eeterliku õli vaheliste 1:1 komplekside tekkeks optimaalne suhe ≈10. β-CD ja eeterliku õli suhet varieeriti 3...224 g/g. β-CD ülehulga puhul (katsed 1 ja 2) seoti kompleksi ilmselt kogu eraldunud eeterlik õli, kuigi saagised olid väikesed. Eeterliku õli ülehulga puhul (katsed 4 ja 5) eraldus küll kogu eeterlik õli, kuid β-CD kompleksi sattus vaid osa sellest.

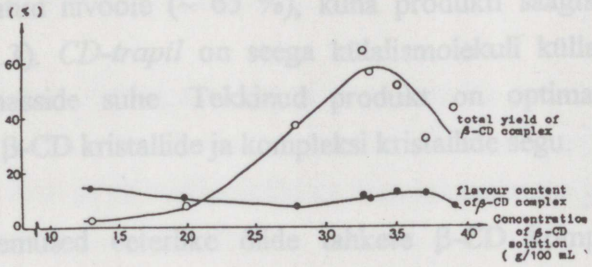
   Optimaalse β-CD ja taimse materjali suhte juures on tehtud katsed 6,7 ja 8. Ginzbergi meetodil (vt. p. 2.1.1) määrati eeterliku õli sisalduseks antud lehtedepartiis 1,11 %. Seega eraldus nendes katsetes kogu eeterlik õli β-CD-ga täidetud reaktorisse.

3. β-CD maksimaalne võimalik kontsentratsioon antud katsete põhjal oli 1,48g/100ml, kuigi β-CD lahustuvus t=50°C juures 33 %-lises etanooli lahuses on 5g/100ml. Sellele lähedast kontsentratsiooni (3,96g/100ml) kasutati katses 3. Et aga β-CD komplekside lahustuvus on tavaliselt väiksem kui β-CD-l endal, sadenes kompleks kohe tekkimise järel välja, ummistades reaktori poorse põhja.

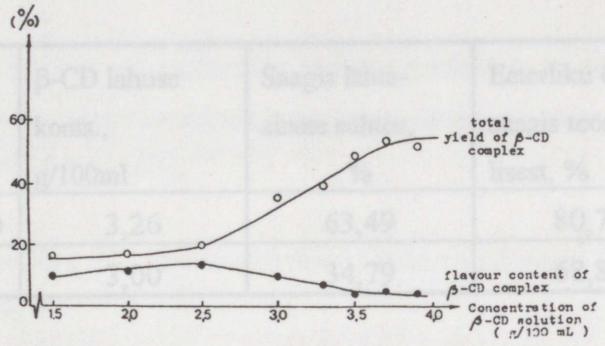
Tahkete komplekside saamine.

Jooniselt 3.2 selguvad tegurid, mis määravad tahkete komplekside saamiseks sobiva kontsentratsiooniga β-CD lahuse valiku. Loorberiõli-β-CD komplekside saamiseks on sobivaim β-CD kontsentratsioon 3,26g/100ml 33 %-lises etanooli lahuses; köömneõli-β-CD komplekside jaoks aga 3,0g/100ml samasuguses etanooli lahuses. Sellest väiksemal β-CD kontsentratsioonil jääb suurem osa kompleksist filtraati, suuremal kontsentratsioonil saadakse aga optimaalsest väiksema õlisisaldusega kompleksid. Põhjuseks on õlisaagise

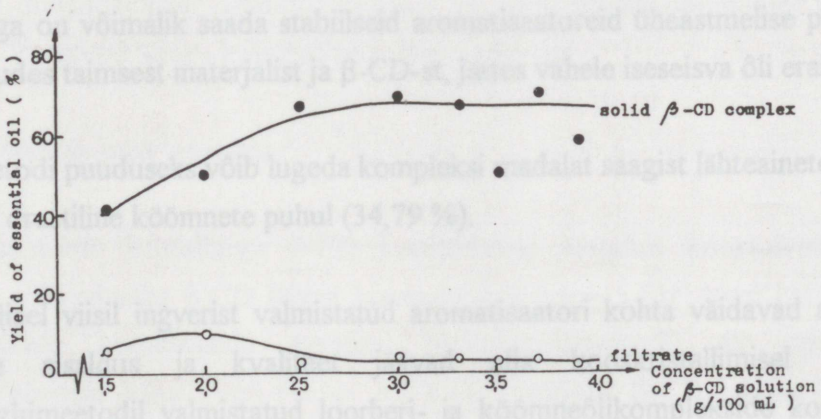
a)



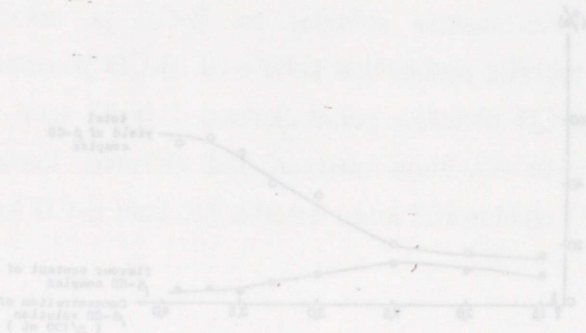
b)



Joon. 3.2. Eeterliku õli β-CD kompleksi saagise ja õli sisalduse sõltuvus β-CD lahuse kontsentratsioonist (barbotaazhimeetod). a) - loorberiõli; b) - köömneõli



Joon. 3.3. Eeterliku õli jaotus tahke β-CD kompleksi ja filtraadi vahel (barbotaazhimeetodil saadud köömneõli β-CD kompleks)



Joon. 3.2. Eeterliku õli β-CD kompleksi saagise ja õli sisalduse sõltuvus β-CD lahuse kontsentratsioonist (barbotaažimeetod). a) - loorberiõli, b) - kööminõli

Joon. 3.3. Eeterliku õli jaotus tahke β-CD kompleksi ja filtraadi vahel (barbotaažimeetodil saadud kööminõli β-CD kompleks)

püsimajäämine teatud nivoole (~ 65 %), kuna produkti saagis samal ajal tõuseb (vt. joonised 3.2 ja 3.3). *CD-trapil* on seega külalismolekuli küllastuse maksimum, mille määrab molekulmasside suhe. Tekkinud produkt on optimaalsest kõrgemal β-CD kontsentratsioonil β-CD kristallide ja kompleksi kristallide segu.

Kokkuvõtvad tulemused eeterlike õlide tahkete β-CD komplekside saamise kohta barbotaazhimeetodil (optimaalsetel tingimustel) on tabelis 3.3

Tabel 3.3.

Barbotaazhimeetodil valmistatud eeterliku õli-β-CD komplekside iseloomustus

Kompleks	β-CD lahuse konts., g/100ml	Saagis lähte-ainete suhtes, %	Eeterliku õli saagis teoreeti-lisest, %	Eeterliku õli sisaldus kompleksis, %
Loorberiõli-β-CD	3,26	63,49	80,73	11,51
Köömneõli-β-CD	3,00	34,79	68,85	9,96

Järeldused:

1. Barbotaazhimeetodil on võimalik valmistada samasuguse toimeaine sisaldusega komplekse kui kooskristallimisel. Ka eeterliku õli saagis teoreetilisest on päris rahuldav (üle 80 % ja kuni 70 % vastavalt loorberilehtede ja köömnete puhul).

   Seega on võimalik saada stabiilseid aromatisaatoreid üheastmelise protsessi käigus, lähtudes taimsest materjalist ja β-CD-st, jättes vahele iseseisva õli eraldamise etapi.

2. Meetodi puuduseks võib lugeda kompleksi madalat saagist lähteainete suhtes, mis on eriti drastiline köömnete puhul (34,79 %).

Analoogilisel viisil ingverist valmistatud aromatisaatori kohta väidavad autorid, et selle toimeaine sisaldus ja kvaliteet jäävad alla kooskristallimisel saadule [51]. Barbotaazhimeetodil valmistatud loorberi- ja köömneõlikomplekside koostise uurimine seisab alles ees.

3.1.1.2. Retsirkulatsioon-ekstraktsioon.

Ekstraktsioon taimsest materjalist tooraine eraldamise moodusena, kus ekstrahendina kasutatakse orgaanilist solventi, on ammu tuntud. Meetodi puuduseks on enamuse orgaaniliste solventide tule- ja plahvatusohtlikkus ning toimeainesse jääda võivad jäägid. ß-CD lahus on niisugustest puudustest vaba.

Järgnevalt uuriti tema ekstrahendina kasutamise võimalusi; ekstraheerimise aluseks on ß-CD võime üksikute toimeainete komponentidega komplekse moodustada.

Protsessi dünaamika

Optimaalsete tingimuste väljatöötamise skeem taimsest materjalist (köömneseemnetest) eeterlike õlide eraldamiseks retsirkulatsioon-ekstraktsioonil oli samasugune nagu eelmises punktis ja on esitatud töös [III].

Maksimaalne eeterliku õli kontsentratsioon reaktsioonisegus (0,947 mg/ml) saavutati järgmistel tingimustel:

a.) ekstraktori temperatuur 70°C,
b.) ß-CD lahuse mahtkiirus 1,30 ml/min,
c.) ß-CD lahuse kontsentratsioon 2,25g/100ml 33 %-lises etanooli vesilahuses,
d.) katse kestvus 90 min.

Protsessi dünaamika on kujutatud joonisel 3.4, kust selgub optimaalne katseaeg - 80 ... 100 min. Protsessi kulgu kirjeldab hüperbooli võrrand.

Tahkete komplekside saamine

Aromatisaatorite kristalliliste β-CD komplekside saamisel kooskristallimise meetodil peetakse sobivaimaks β-CD lahust kontsentratsiooniga 5,5g/100ml [23]. Köömneõli-β-CD tahkete komplekside saamisel barbotaazhimeetodil oli optimaalne β-CD kontsentratsioon 3,0g/100ml (vt. p. 3.2.1.1). Järelikult β-CD lahuse kontsentratsioon 2,25g/100ml, millega ekstraktsioonmeetodil saavutati köömneõli maksimaalne sisaldus reaktsioonisegus, ei kindlusta veel tahke kompleksi teket. Antud juhul töötati ka suure β-CD ülehulgaga, et tagada kõigi külalismolekulide varustamine β-CD-ga. Kristallilise kompleksi saagis aga jääb sellisel juhul väiksemaks, sest vaba β-CD lahustuvus on β-CD kompleksi lahustuvusest parem.

1. Ekstrahendi mahu vähendamine

Tahke kompleksi suurema saagise saavutamiseks optimeeriti eeterliku ôli ja β-CD suhet. Selleks vähendati esialgu ekstrahendi mahtu, kuna ekstraheeritava materjali maht jäi konstantseks. Eeldades, et köömneôli puhul on (molekulmasside alusel) arvutatud toimeaine ja β-CD suhe 0,13, ôli sisaldus köömnetes 2,5% ja köömnete kogus 3g, on β-CD kogus, mis tagab 1:1 kompleksi moodustumise, järgmine:

$$a = \frac{b' * c}{0,13 * 100} = \frac{3*2,5}{13} = 0,577g, \qquad (13)$$

kus a - β-CD kogus, g

b - eeterliku ôli kogus, g

b' - arvutuslik taimse materjali kogus, g

c - eeterliku ôli sisaldus taimses materjalis, %.

Tegelikult töötati β-CD ülehulgaga: eeterliku ôli teoreetilise sisalduse ja β-CD suhe oli 0,075.

Tabel 3.4.

Köömneôli-β-CD tahke kompleksi saagise sôltuvus tsirkuleeriva ekstrahendi mahust

β-CD konts., g/100 ml	Tsirkuleeriva lahuse maht, ml	Vedel kompleks ekstraktoris		Tahke kompleks		Eeterliku õli saagis köömnete suhtes, %
		õli saagis, %	õli/β-CD	saagis, %	õli sisaldus	
2,0	50	74,22	0,056	40,9	7,04	1,85
2,50	40	51,88	0,039	20,63	6,25	1,33
2,70	37	52,02	0,039	21,71	7,35	1,32
3,03	33	58,05	0,043	34,27	7,22	1,45
3,33	30	45,61	0,035	14,44	6,56	1,09
3,60	28	38,43	0,029	30,49	4,94	0,98
3,90	25	37,05	0,029	18,55	6,75	0,99

β-CD kogus, g/100 ml	Tsitrulleriva lahuse maht, ml	Vedel kompleks ekstraktoris		Tahke kompleks		Eeterliku õli saagis kõõmneto suhtes, %
		õli saagis, %	õli/β-CD	saagis, %	õli sisaldus	
2,0	50	74,22	0,056	40,9	7,04	1,85
2,50	40	51,88	0,039	20,63	6,25	1,33
2,70	37	52,02	0,039	21,71	7,35	1,32
3,03	33	58,05	0,043	34,27	7,22	1,45
3,33	30	45,61	0,035	14,44	6,56	1,09
3,60	28	38,43	0,029	30,49	4,94	0,98
3,90	25	37,05	0,029	18,55	6,75	0,99

Järeldused:

1. β-CD lahuse kontsentratsiooni tõstmine tsirkuleeriva lahuse mahu vähendamise arvel võimaldab rahuldava saagisega komplekside saamist vaid vedelas olekus ja kuni β-CD kontsentratsioonini 3,03g/100ml. Tsirkuleeriva lahuse mahu edasine vähendamine osutub läbi süsteemi tsirkuleerimiseks ebapiisavaks, mis avaldub õli saagise vähenemise näol.
2. Ka kristallisatsioonitingimused ei parane. Produkti väljatuleku võimaliku suurenemise varjutavad materjalikaod süsteemi seinte külge.
3. Ainus positiivne resultaat on õlisisalduse püsimine konstantsena (tahkes kompleksis). Selle tingib konstantne eeterliku õli ja β-CD suhe terves seerias.

2. <u>Reaktori mahu suurendamine</u>

Eeterliku õli - β-CD kompleksi kristalliseerumise uurimiseks kõrgemal β-CD kontsentratsioonil võeti kasutusele suurem ekstraktor (45 ml), kusjuures ekstrahendi maht jäi konstantseks (100 ml). Tulemus on tabelis 3.5.

Tabel 3.5.

Köömneõli β-CD tahke kompleksi saamine 45 ml mahuga ekstraktoris

β-CD konts. g/100 ml	Köömneõli saagis			Tahke kompleks		Eeterliku õli saagis seemnetest, %
	ekstraktoris, %	filtraadis, %	tahkes kompl., %	saagis, %	õli sisaldus	
2,5	51,0	26,09	27,36	34,07	7,30	1,39
2,7	55,53	24,60	33,53	53,75	5,67	1,43
3,0	57,23	13,22	28,24	45,33	5,66	1,47
3,3	40,93	12,52	25,87	55,85	4,21	1,05
3,6	74,98	18,80	36,49	49,62	6,68	1,93
3,9	63,48	14,13	24,21	43,32	5,08	1,63

Järeldused:

1. Lahjades β-CD lahustes on eeterliku õli jaotus filtraadi ja kristallilise kompleksi vahel peaaegu võrdne, kuna kontsentreeritumates lahustes (alates 3,0 g/100 ml) on erinevus peaaegu kahekordne (kristallilise kompleksi kasuks). Maksimaalne eeterliku õli väljatulek (36,5%) saavutatakse β-CD kontsentratsioonil 3,6g/100 ml.

2. Suurematel β-CD kontsentratsioonidel on ka kristallilise kompleksi saagis suurem. Alates kontsentratsioonist 2,7 g/100 ml on saagised 50% piirides, mis on rohkem kui barbotaazhmeetodil (35%, vt. p. 3.2.1.2), kuid siiski vähem kui kooskristallimisel (82,10 %, vt. p. 3.3.1).

3. Antud ekstraktsiooni jaoks võib optimaalseks lugeda β-CD kontsentratsiooni 3,6/100 ml, mille juures produkti väljatulek on 50% lähteainest ja eeterliku õli sisaldus on ~ 7%.

3. Eeterliku õli ja β-CD suhte mõju ekstraktsiooniprotsessile

Kahes viimases katseseerias, mis tehti kristallisatsiooniprotsessi uurimiseks, oli eeterliku õli ja β-CD suhe erinev, vastavalt 0,075 ja 0,1 (vt. tabelid 3.4 ja 3.5). On ilmne, et kui ekstraktsiooni lähteainete suhe on optimaalsest erinev eetrliku õli kasuks ja saavutatakse õli saagise tõus, on osa eeterliku õli komponente tahkes produktis lihtsalt adsorbeerituna β-CD kristallide pinnal. Kui aga eeterliku õli saagise tõus saavutatakse β-CD ülekuluga, võib oletada, et tegu on üksnes β-CD kompleksi suletud eeterliku õliga. Seda mõttekäiku kinnitavad järgmises tabelis toodud andmed.

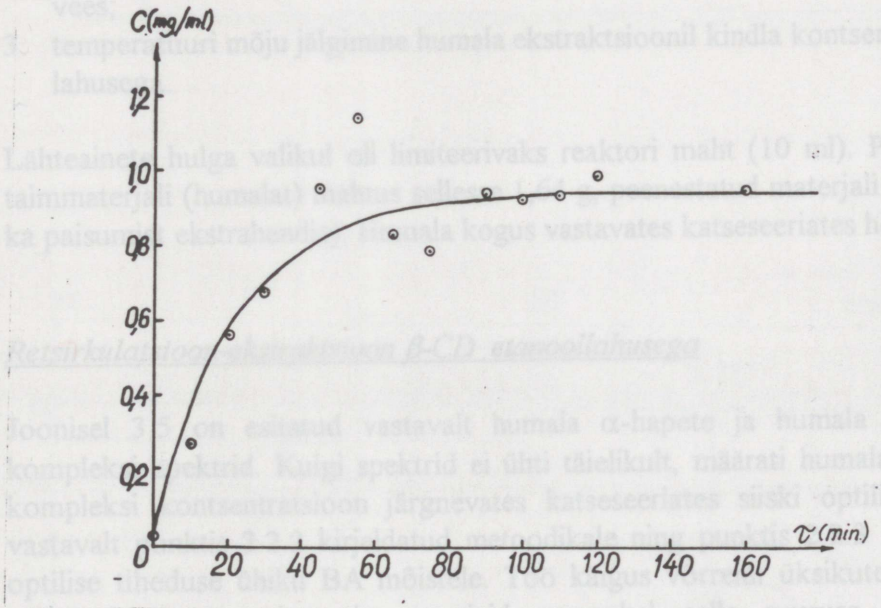
Tabel 3.6.

Köömneõli väljatuleku muutus sõltuvalt eeterliku õli ja β-CD suhtest

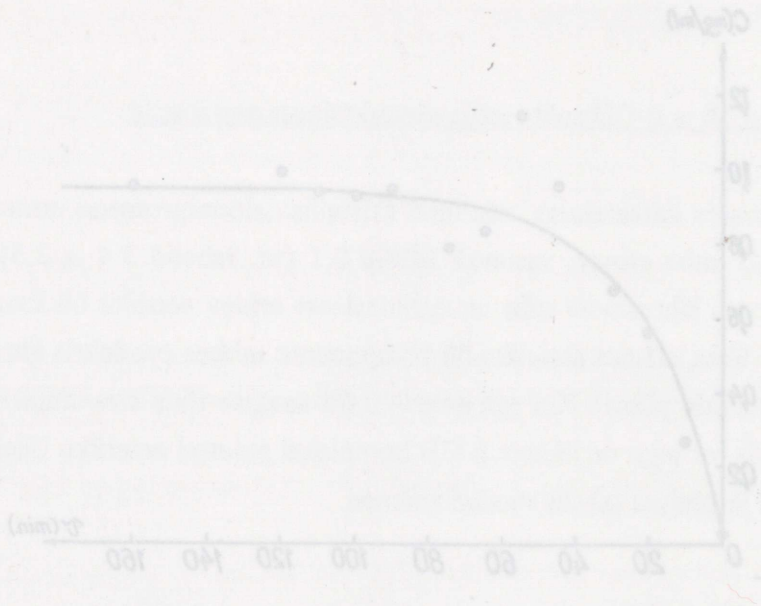
Eeterlik õli: β-CD (lähteainetena)	1 g eeterliku õli jaoks β-CD (ekstraktoris), g	Eeterliku õli väljatulek ekstraktoris, %	β-CD konts.,g/100ml
0,0227	60,27	72,97	2,25
0,0457	33,44	65,66	2,25
0,0680	24,55	61,28	2,25
0,075	35,93	74,22	2,0
0,1	19,60	51,0	2,5

Järeldused:

1. Taimsest koest toimeainete (eeterlike õlide) eraldamiseks on vajalik teatud β-CD ülehulk. Käesoleval juhul tingis selle ka peenestamata taimse tooraine kasutamine, mille tõttu difusioonitakistus oli suur.
2. β-CD etanoollahuseid võib käsitleda kui ekstrahente taimsest toorainest eeterlike õlide eraldamisel. Täpsemad tingimused protsessi läbiviimiseks on esitatud töö järgnevas osas.



Joon. 3.4. Ekstraktsiooniprotsessi dünaamika (köömneõli puhul)



3.2.2. Humala mõruhapete eraldamine β-CD komplekside moodustamise teel

3.2.2.1. Mõruhapete eraldamine peenestamata humalatest retsirkulatsioon-ekstraktsioonil

On teada, et β-CD kompleksid sobivate mõõtmetega hüdrofoobsete molekulidega tekivad kõige soodsamalt EtOH juuresolekul [25]. Nüüd seati ülesandeks välja selgitada, kas mõruainete eraldamine humalast on võimalik ka β-CD vesilahuste abil.

Meetodi kirjeldus on töö metoodikaosas punktis 2.1.3.2. Uuritavateks parameetriteks olid seega humala mõruhapete (α-hapete) β-CD komplekside saamiseks sobiv ekstrahent, lähteainete kogus, temperatuur ja β-CD lahuse kontsentratsioon. Viidi läbi järgmised katseseeriad:

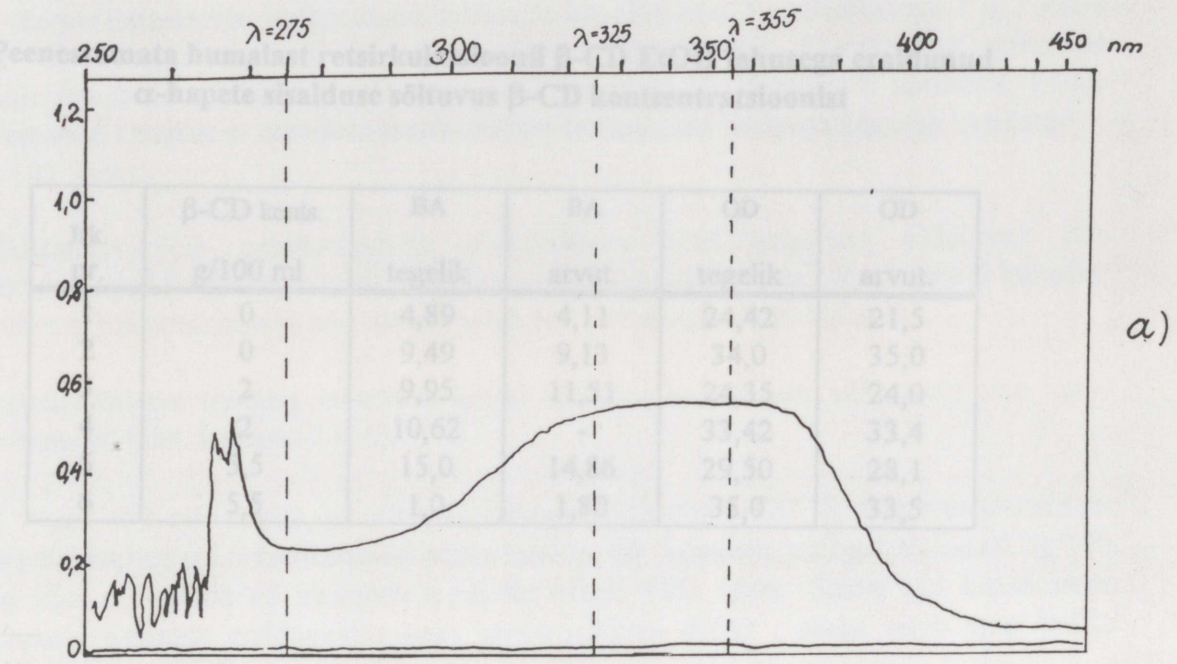
1. humala ekstraktsioon erineva kontsentratsiooniga β-CD lahustega etanooli vesilahuses;
2. humala ekstraktsioon erineva kontsentratsiooniga β-CD lahustega destilleeritud vees;
3. temperatuuri mõju jälgimine humala ekstraktsioonil kindla kontsentratsiooniga β-CD lahusega.

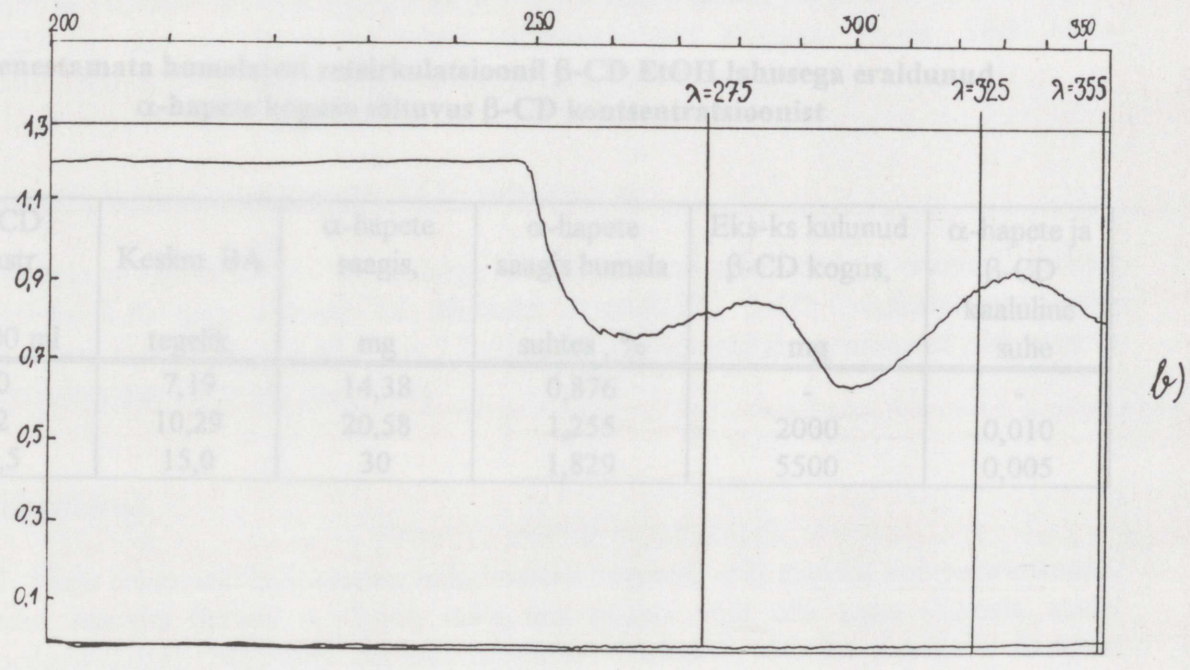
Lähteainete hulga valikul oli limiteerivaks reaktori maht (10 ml). Peenestamata kuiva taimmaterjali (humalat) mahtus sellesse 1,64 g, peenestatud materjali 2,13 g (arvestades ka paisumist ekstrahendis). Humala kogus vastavates katseseeriates hoiti konstantsena.

Retsirkulatsioon-ekstraktsioon β-CD etanoollahusega

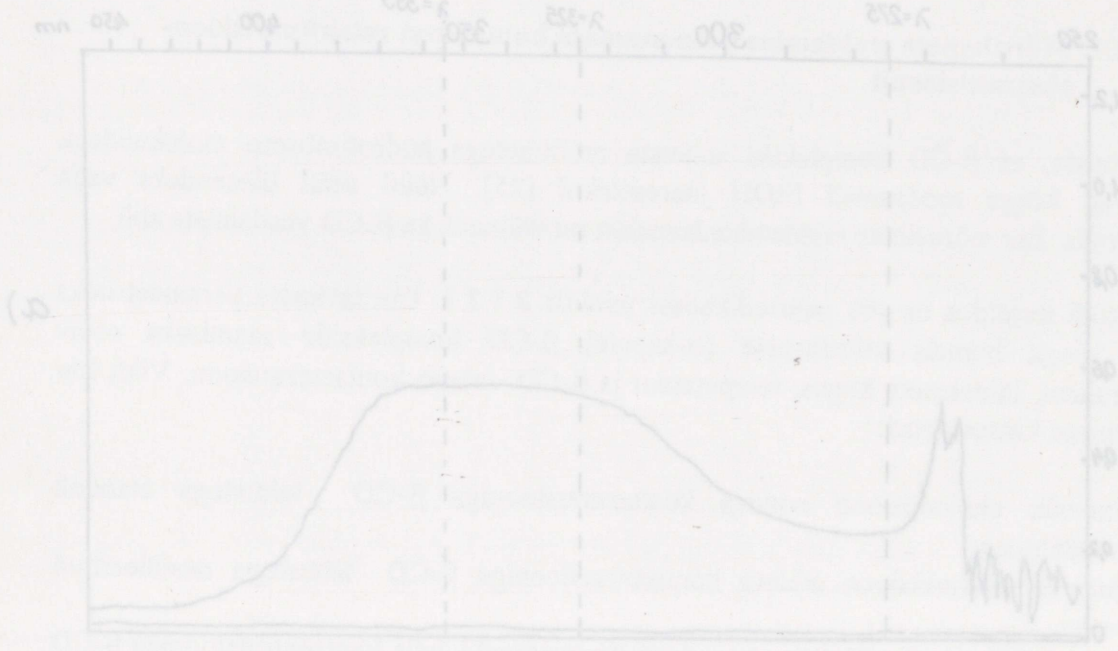
Joonisel 3.5 on esitatud vastavalt humala α-hapete ja humala α-hapete - β-CD kompleksi spektrid. Kuigi spektrid ei ühti täielikult, määrati humala α-hapete - β-CD kompleksi kontsentratsioon järgnevates katseseeriates siiski optilise tiheduse alusel vastavalt punktis 2.2.2 kirjeldatud metoodikale ning punktis 2.2.3 käsitletud suhtelise optilise tiheduse ühiku BA mõistele. Töö käigus võrreldi üksikute katsete esialgseid tulemusi ühes seerias ning seeriaid omavahel selle suuruse alusel. Tulemuste ümberarvutamisel lähtuti retsirkulatsioon-ekstraktsiooni puhul eeldusest, et 1 BA-le vastab 20 μg/ml α-happeid. BA_{arvut} ja OD_{arvut} on leitud tegelike tulemuste ($BA_{tegelik}$, $OD_{tegelik}$) pöördväärtuste ja aja pöördväärtuste sõltuvuse lineaarse regressiooni võrrandiga (vt. p. 2.2.3).

Humala α-hapete ja β-CD etanoollahusega retsirkulatsiooni tulemused on esitatud tabelites3.7 ja 3.8. Ekstrahendiks oli 1:3 etanooli ja vee segus lahustatud ja β-CD, mille kontsentratsiooni varieeriti piirides 0...5,5g/100 ml lahuses. Kõigis katsetes oli ekstraktori temperatuur 70°C, katse kestvus 60 min. ja β-CD lahuse mahtkiirus 1,30 ml/min. Tsirkuleeriva β-CD lahuse (reaktsioonisegu) maht oli 100 ml.





Joon. 3.5. a) Humala α-hapete spekter;
b) Humala α-hapete-β-CD kompleksi spekter



Tabel 3.7.

Peenestamata humalast retsirkulatsioonil β-CD EtOH lahusega eraldunud α-hapete sisalduse sõltuvus β-CD kontsentratsioonist

Jrk. nr.	β-CD konts. g/100 ml	BA tegelik	BA arvut.	OD tegelik	OD arvut.
1	0	4,89	4,11	24,42	21,5
2	0	9,49	9,13	34,0	35,0
3	2	9,95	11,51	24,35	24,0
4	2	10,62	-	33,42	33,4
5	5,5	15,0	14,86	29,50	28,1
6	5,5	1,0	1,80	35,0	33,5

Tabel 3.8.

Peenestamata humalatest retsirkulatsioonil β-CD EtOH lahusega eraldunud α-hapete koguse sõltuvus β-CD kontsentratsioonist

β-CD konstr., g/100 ml	Keskm. BA tegelik	α-hapete saagis, mg	α-hapete saagis humala suhtes , %	Eks-ks kulunud β-CD kogus, mg	α-hapete ja β-CD kaaluline suhe
0	7,19	14,38	0,876	-	-
2	10,29	20,58	1,255	2000	0,010
5,5	15,0	30	1,829	5500	0,005

Järeldused

1. Tervet katseseeriat iseloomustab tulemuste suur hajuvus. Paralleelkatsete 1 ja 2 puhul on see tingitud katses 2 erineva lahusti (metanooli) kasutamisest proovide lahjendamiseks mõõdetava OD väärtuseni. Küsimus jäi täiendavalt uurimata; kõigis ülejäänud katsetes ja katseseeriates lahjendati samasuguse lahusega nagu oli kasutatud β-CD jaoks.

Üldisemalt võib paralleelkatsete ebarahuldava kokkulangevuse põhjuseks olla lähtematerjali (humala) ebapiisav peenestusaste. Kasutati tööstuslikku pressitud humalat, milles lupuliinnäärmed ja neis olevad α-happed olid jaotunud ebaühtlaselt.

Paralleelkatsete tunduva erinevuse korral arvestati keskmiseks väärtuseks ühe katse tulemused (näit. katsetes 5 ja 6).

2. Nagu võib ette arvata, on võimalik kontsentreerituma β-CD lahusega saavutada α-hapete suuremat kontsentatsiooni ekstraktis. β-CD kontsentratsiooni tõstmisel 2g/100 ml kuni 5,5 g/100 ml suureneb α-hapete saagis 31% võrra. Samal ajal kulub sama koguse α-hapete eraldamiseks kaks korda rohkem β-CD ; seega tekib suur β-CD ülekulu (vt. tabel 8).

α-hapete ja β-CD vaheliseks 1:1 kompleksi moodustamiseks on nende optimaalne suhe $M_{\alpha\text{-hape}}/M_{\beta\text{-CD}}$ = 362,4 : 1135 = 0,319. Selle saavutamise üheks võimaluseks oleks tsirkuleeriva CD lahuse hulga optimeerimine. Reaktoris olevas 1,64 g humalas on α-happeid 0,035 x 1,64 = 0,0574 g. Vajalik kogus β-CD selle ekstraheerimiseks on 0,0574 : 0,319 = 0,180 g ning β-CD 5,5 %-list lahust kuluks seega 0,180 x 100 : 5,5 = 3,27 ml, mis << 100 ml ja ilmselt tsirkuleerimiseks ebapiisav kogus. Siiski oleks tsirkuleerivat β-CD lahuse hulka mõttekas edaspidi vähendada.

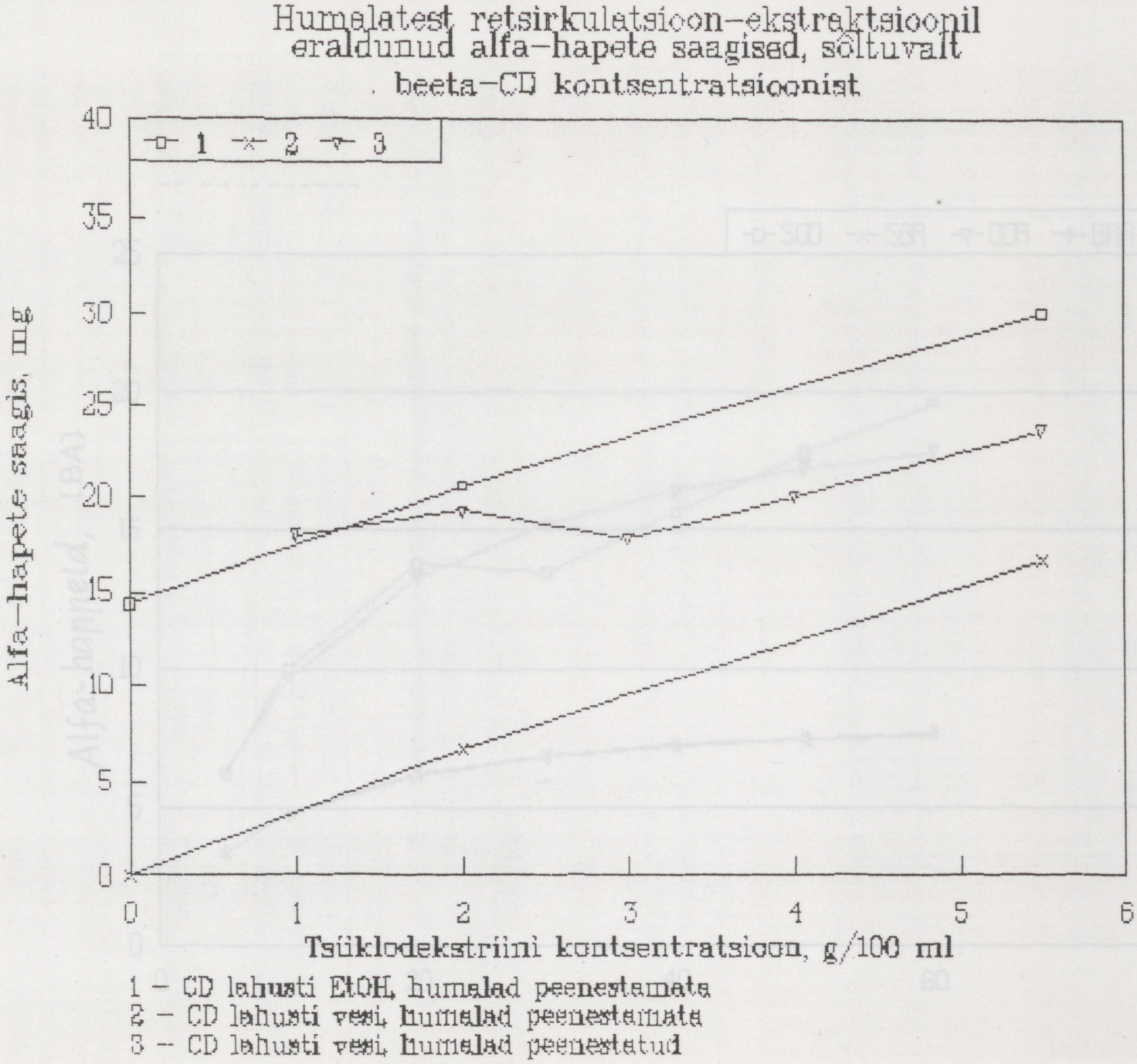
Retsirkulatsioon-ekstraktsioon β-CD vesilahusega

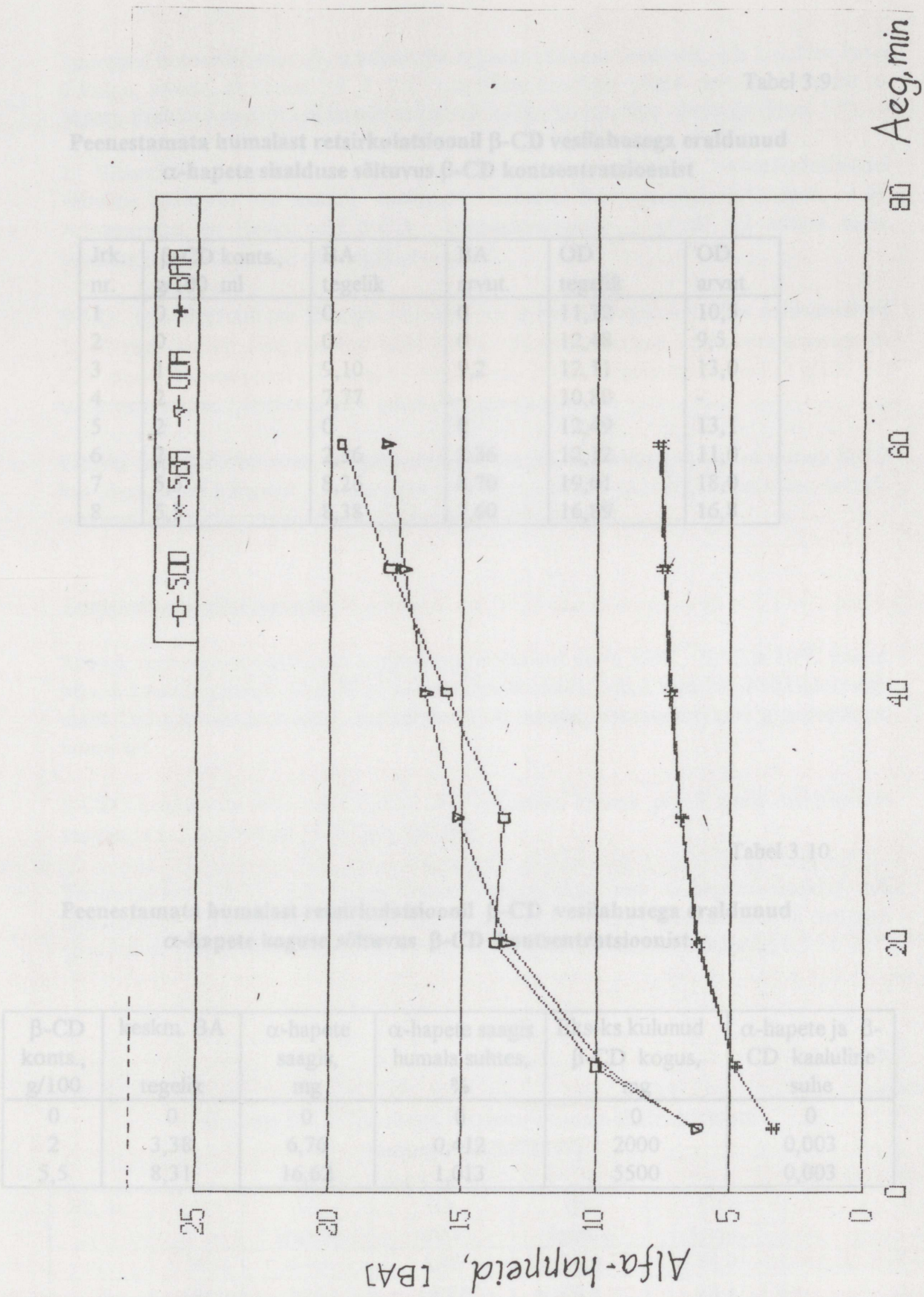
Humala α-hapete β-CD vesilahusega retsirkulatsiooni tulemused on esitatud tabelites 3.9 ja 3.10 ning joonisel 3.6. Humalat ekstraheeriti β-CD vesilahustega, mille kontsentratsioon lahuses oli 0,2 ja 5,5 g/100 ml. Ülejäänud katsetingimused jäid, eelneva katseseeriaga võrreldes, muutmata.

Järeldused

1. Nagu eelnevaski katseseerias, iseloomustab tulemusi, eriti madalal kontsentratsioonil, suur hajuvus (katsed 4, 5, 6), mille üks põhjus võib olla sama (humala madal peenestusaste). Madalatel optiliste tiheduste väärtustel võib ka α-hapete sisalduse arvutamise metoodika täpsus, kus kasutatakse eri lainepikkusel mõõdetud OD-de vahet, osutuda ebapiisavaks.

Joon. 3.6.


Humalatest retsirkulatsioon-ekstraktsioonil
eraldunud alfa-hapete saagised, sõltuvalt
beeta-CD kontsentratsioonist
1
2
3
Alfa-hapete saagis, mg
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
1
2
3
4
5
6
Tsüklodekstriini kontsentratsioon, g/100 ml
1 – CD lahusti EtOH, humalad peenestamata
2 – CD lahusti vesi, humalad peenestamata
3 – CD lahusti vesi, humalad peenestatud



Joon. 3.7. Optiliste tiheduste ja α-hapete sisalduse muutus ajas (katse 8, tab. 3.9)

Tabel 3.9.

Peenestamata humalast retsirkulatsioonil β-CD vesilahusega eraldunud α-hapete sisalduse sõltuvus β-CD kontsentratsioonist

Jrk. nr.	β-CD konts., g/100 ml	BA tegelik	BA arvut.	OD tegelik	OD arvut.
1	0	0	0	11,32	10,5
2	0	0	0	12,48	9,5
3	1	9,10	9,2	12,11	13,0
4	2	7,77	-	10,80	-
5	2	0	0	12,49	13,1
6	2	2,36	2.36	12,12	11,0
7	5,5	8,26	8,70	19,61	18,0
8	5,5	8,38	7,60	16,89	16,8

Tabel 3.10.

Peenestamata humalast retsirkulatsioonil β-CD vesilahusega eraldunud α-hapete koguse sõltuvus β-CD kontsentratsioonist

β-CD konts., g/100	keskm. BA tegelik	α-hapete saagis, mg	α-hapete saagis humala suhtes, %	Eks-ks kulunud β-CD kogus, mg	α-hapete ja β-CD kaaluline suhe
0	0	0	0	0	0
2	3,38	6,76	0,412	2000	0,003
5,5	8,31	16,62	1,013	5500	0,003

Suuremal kontsentratsioonil on tulemuste hajuvus väiksem: jooniselt, mis kirjeldab katse 8 kulgu, näeme, et silutud (vt. p. 2.2.3) optiliste tiheduste põhjal arvutatud tegelik α-hapete sisalduse muutus ajal langeb ideaalselt kokku arvutusliku kõveraga (joon. 3.7).

2. Ekstraktis saavutatava α-hapete kontsentratsiooni ja β-CD kontsentratsiooni vaheline sõltuvus on samuti analoogne eelneva katseseeriaga (vt. joon. 3.6). Arvestamata on jäetud vaid β-CD kontsentratsioonil 1 g/100 ml tehtud katse tulemused, mis on ilmselt ebaloogiliselt suured.

β-CD kontsentratsiooni tõusuga suureneb ka α-hapete väljatulek olles maksimaalselt 16,62 mg. See on siiski peaaegu kaks korda väiksem kui sama kontsentratsiooniga β-CD etanoollahuse puhul (vt. tabel 8). Madalamal β-CD kontsentratsioonil (2 g/100 ml) on erinevus kuni 3-kordne β-CD etanoollahuse kasuks.

Edasisi uuringuid otsustati sellegipoolest jätkata β-CD vesilahustega, et uurida β-CD kui ekstrahendi käitumist, optimeerides järk-järgult muid tegureid (temperatuur, humala peenestusaste, ekstraktsiooni viis, tsirkuleeriva lahuse hulk).

Temperatuuri mõju uurimine

Retsirkulatsioon-ekstraktsiooni temperatuurisõltuvust uuriti 50°C, 70°C ja 80°C juures. Muud katsetingimused jäeti kõigi kolme temperatuuri puhul samaks: reaktsioonisegu maht 100 ml, ekstraheerimise mahtkiirus 1,30 ml/min, lähteaineks 1,64 g peenestatud humalaid.

β-CD kontsentratsioon valiti selline, mis eelnevate katsete puhul andis maksimaalse saagise, s.t. 5,5 g/100 ml 33 %-lises EtOH-s.

Temperatuuril 80°C läbi viidud katse ebaõnnestus, sest α-hapete sisaldus tuli nullilähedane. Ka siin võib ebaedu üheks põhjuseks pidada ekstraheeritava materjali ebapiisavat peenestatust. Ülejäänud katsete tulemused on esitatud tabelis 3.11.

Tabel 3.11.

Humala β-CD lahusega retsirkulatsioon-ekstraktsiooni temperatuurisõltuvus

Jrk. nr.	t,°C	BA tegelik	BA arvut.	OD tegelik	OD arvut.
1	50	4,46	4,46	23,0	24,0
2	70	15,0	14,86	29,5	28,1

Järeldus

Esialgsete tulemuste põhjal on alust väita, et optimaalne temperatuur humalast α-hapete eraldamiseks retsirkulatsioon-ekstraktsioonil on 70° C.

3.2.2.2. Mõruhapete eraldamine peenestatud humalatest retsirkulatsioon-ekstraktsioonil

Humala peenestusaatme mõju selgitamiseks β-CD-ga retsirkulatsioon-ekstraktsioonil eralduvale α-hapete kontsentratsioonile ja saagisele viidi läbi rida katseid punktis 2.1.3.2 kirjeldatud metoodika järgi. Muutmatuteks parameetriteks jäid reaktsioonisegu temperatuur 70°C, ekstraheerimise mahtkiirus 1,30 ml/min ja katse kestvus 60 min.

Muutus ekstraheeritava lähteaine kogus (2,13 g) ja proovide võtmise sagedus katse alguses (intervall 3 min. kuni 20-nda minutini).

Et eesmärgiks oli endiselt seatud β-CD lahuse kui ekstrahendi omaduste uurimine, kasutati tema lahustina destilleeritud vett. β-CD kontsentratsiooni varieeriti piirides 1...5,5 g/100 ml.

Tulemused on esitatud tabelites 3.12 ja 3.13 ning joonistel 3.8,..3.10. Kokkuvõtvad tulemused kõigi retsirkulatsioon-ekstraktsiooni katsete kohta on joonisel 3.6.

Järeldused

1. Ilmneb, et ekstraheeritava materjali peenestusastmel ongi teatud efekt, kuigi see jääb loodetust väiksemaks β-CD. Kontsentratsioonil 5,5 g/100 ml eraldati peenestatud humalast α-happeid 23,6 mg, peenestamata humalast 16,62 mg (vt. tab.3.10 ja 3.13). Kontsentratsioonil 2 g/100 ml on efekt peaaegu kolmekordne, vastavalt 17,46 mg ja 6,76 mg.

2. Ettearvatult saadi β-CD kõrgematel kontsentratsioonidel suuremad α-hapete saagised kui madalamatel. Kuid erinevus näiteks 1%-lise ja 5,5%-lise β-CD kontsentratsiooni vahel oli küllaltki väike - vaid 5,6 mg (23,7%). Pealegi, nagu selgub tabelist 3.13, kulub 5,5%-lise β-CD lahuse puhul sama koguse α-hapete saamiseks kuni 5 korda rohkem β-CD. Selgub huvitav tõsiasi: lahjema β-CD lahusega ekstraheerimine retsirkulatsiooni tingimustes on efektiivsem!

Võib oletada, et β-CD on lahuses suures ülehulgas. Ilmselt tuleks tekkinud kompleks reaktsioonisegust kohe eemaldada. Võimalusi selleks ekstraktsiooni viisi muutmise teel on uuritud järgnevas punktis.

Tabel 3.12.

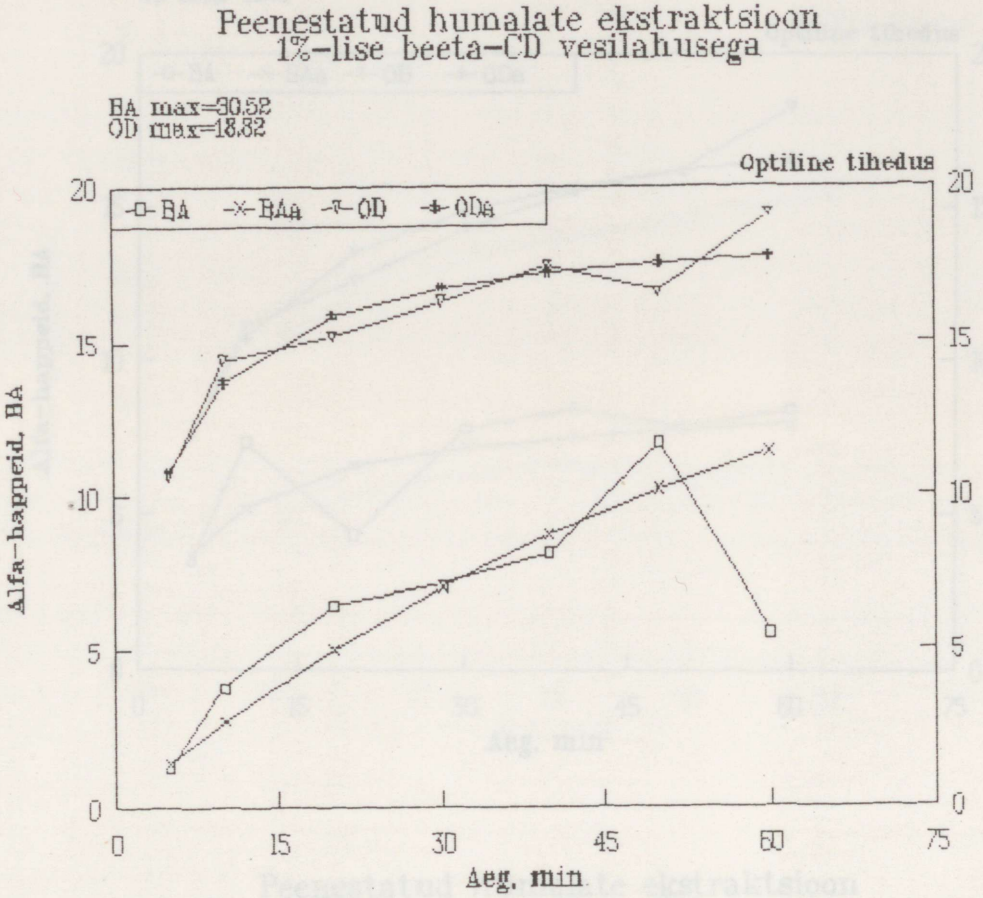
Peenestatud humalast retsirkulatsioon-ekstraktsioonil β-CD vesilahusega eraldunud α-hapete sisalduse sõltuvus β-CD kontsentratsioonist

Jrk. nr.	β-CD konts., g/100 ml	BA tegelik	BA arvut.	OD tegelik	OD arvut.
1	1	9,0	11,3	19,0	17,8
2	2	8,73	8,3	18,49	17,1
3	3	8,89	8,0	18,51	16,8
4	4	10,0	-	22,0	-
5	5	11,8	12,5	31,1	32,0

Tabel 3.13.

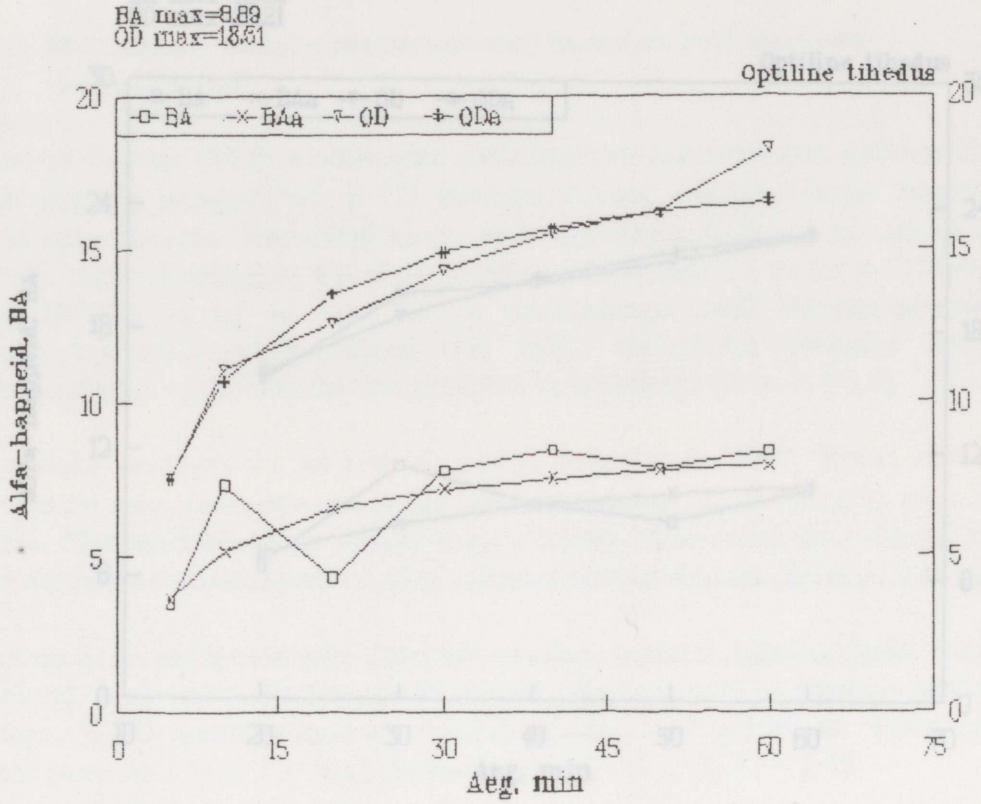
Peenestatud humalatest retsirkulatsioonil β-CD vesilahusega eraldunud α-hapete koguse sõltuvus β-CD kontsentratsioonist

β-CD konts., g/100 ml	BA tegelik	α-hapete saagis, mg	α-hapete saagis humala suhtes, %	Eks-ks kulunud β-CD kogus, mg	α-hapete ja β-CD kaaluline suhe
1	9,0	18,0	0,845	1000	0,018
2	8,73	17,46	0,820	2000	0,009
3	8,89	17,78	0,835	3000	0,006
4	10,0	20,0	0,939	4000	0,005
5,5	11,8	23,6	1,108	5500	0,004

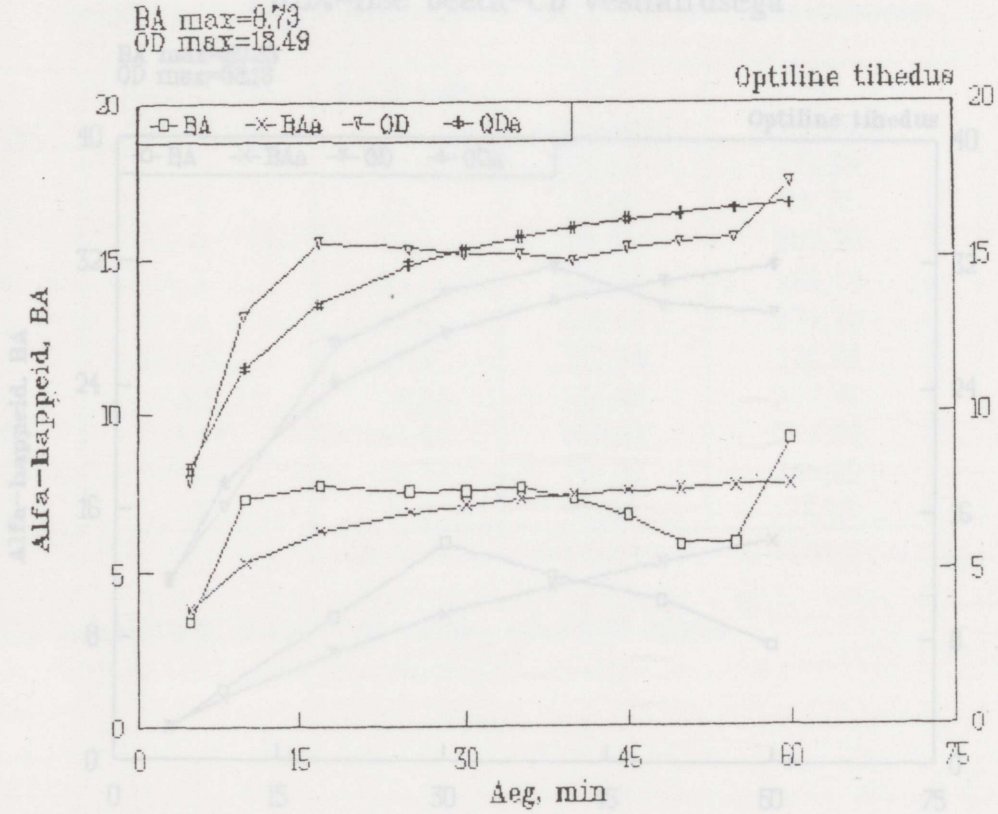

Peenestatud humalate ekstraktsioon
1%-lise beeta-CD vesilahusega
BA max=30.52
OD max=18.82
Optiline tihedus
BA
BAa
OD
ODa
Alfa-happeid, BA
Aeg, min
0
5
10
15
20
0
15
30
45
60
75

Joon. 3.8.

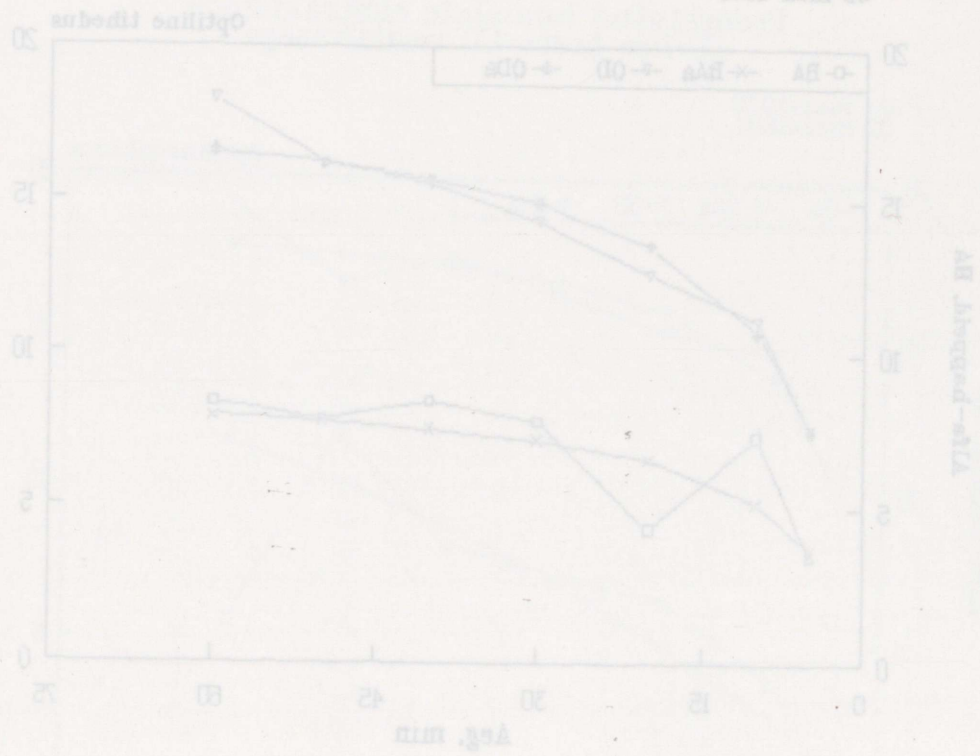
Peenestatud humalate ekstraktsioon
3%-lise beeta-CD vesilahusega

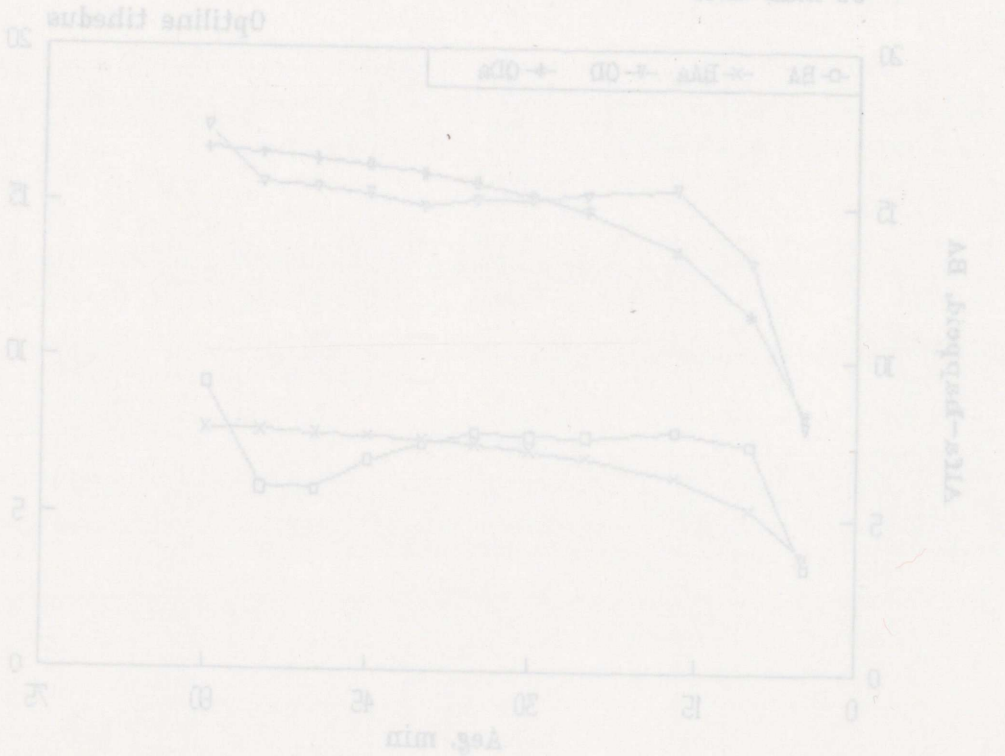


Peenestatud humalate ekstraktsioon
2%-lise beeta-CD vesilahusega

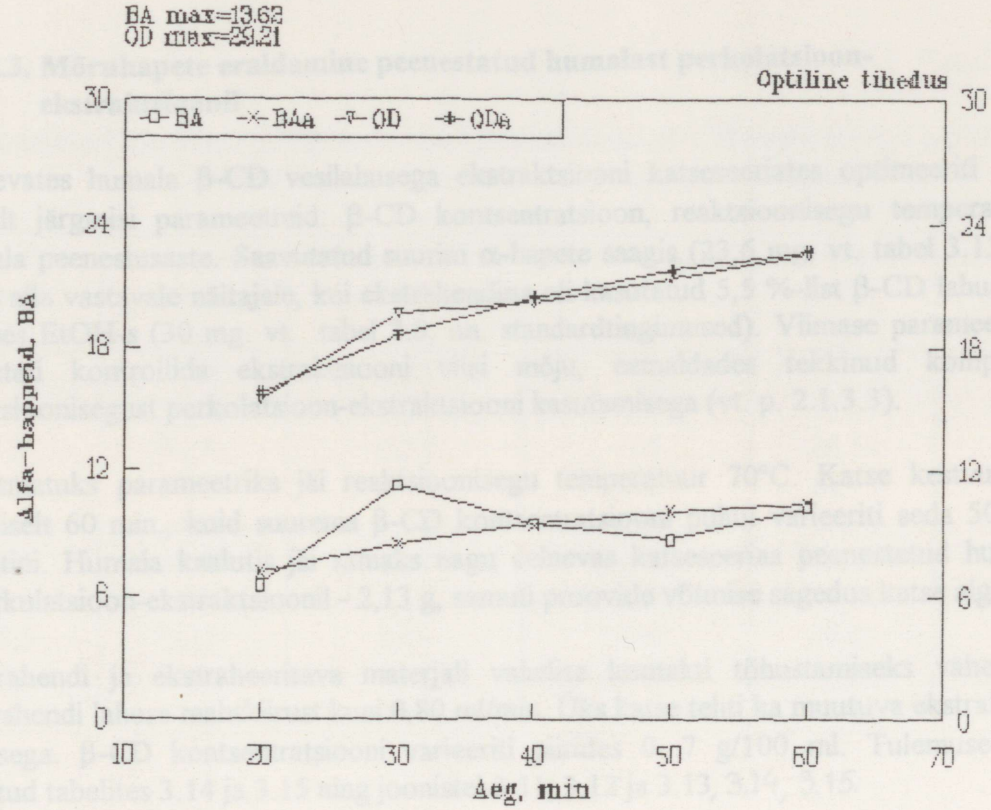


Joon. 3.9.

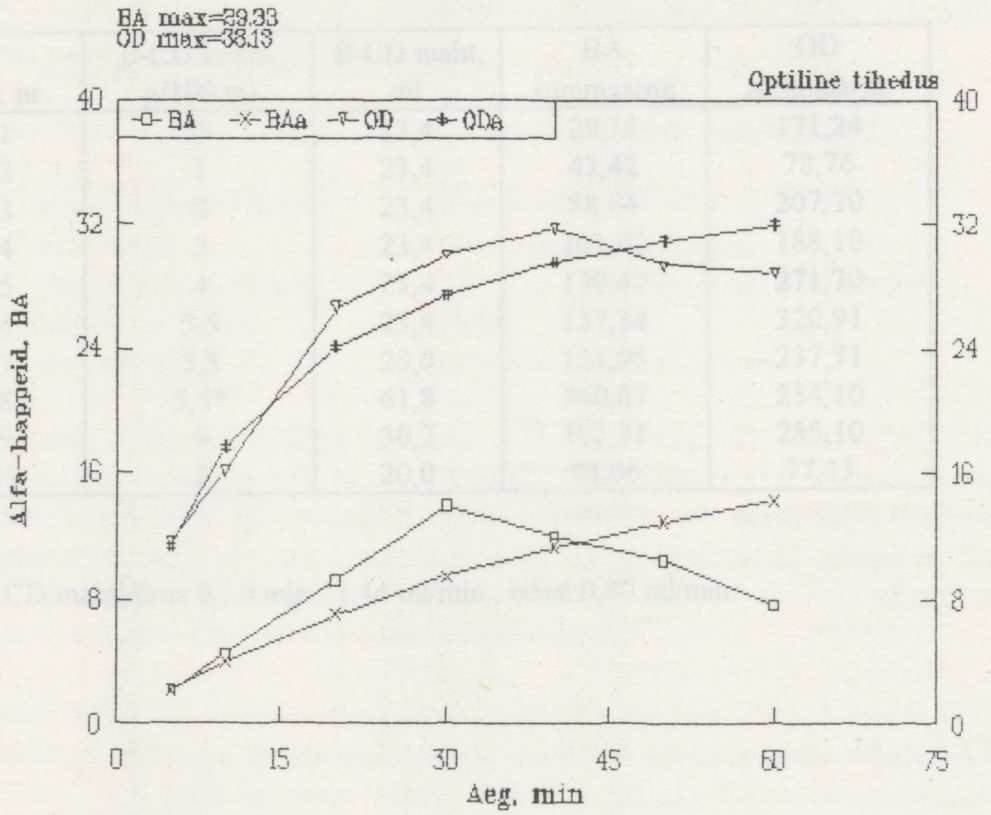

Optiline tiheduse
Aeg, min
Viia-perioor BA
BA
OD


Optiline tiheduse
Aeg, min
Viia-perioor BA
BA
OD

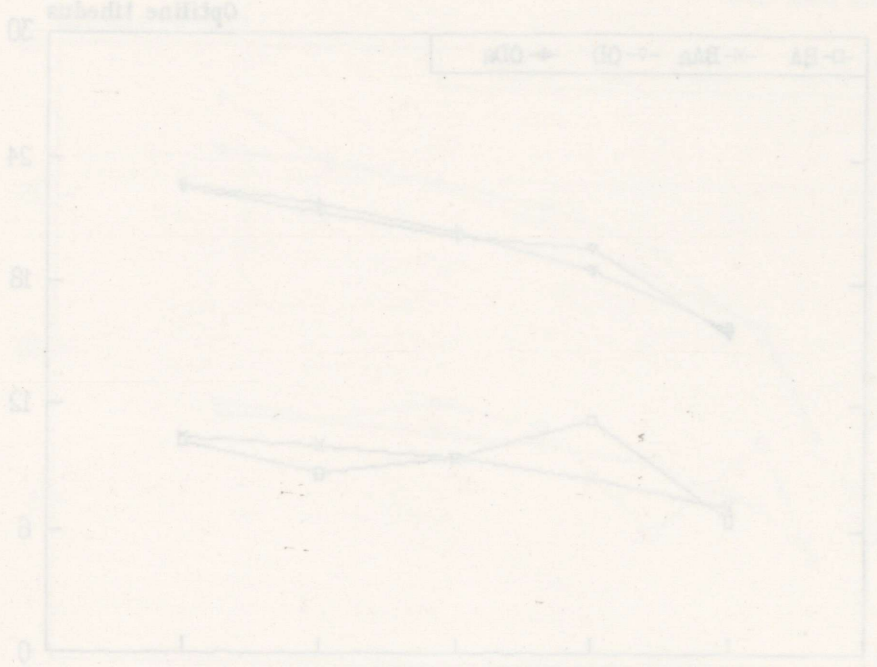
Peenestatud humalate ekstraktsioon
4%-lise beeta-CD vesilahusega



Peenestatud humalate ekstraktsioon
5.5%-lise beeta-CD vesilahusega



Joon. 3.10.



3.2.2.3. Mõruhapete eraldamine peenestatud humalast perkolatsioon-ekstraktsioonil

Eelnevates humala β-CD vesilahusega ekstraktsiooni katseseeriates optimeeriti järk-järgult järgmisi parameetreid: β-CD kontsentratsioon, reaktsioonisegu temperatuur, humala peenestusaste. Saavutatud suurim α-hapete saagis (23,6 mg, vt. tabel 3.13) jäi siiski alla vastavale näitajale, kui ekstrahendina oli kasutatud 5,5 %-list β-CD lahust 33 %-lises EtOH-s (30 mg. vt. tabel 3.8, nn. standardtingimused). Viimase parameetrina otsustati kontrollida ekstraktsiooni viisi mõju, eemaldades tekkinud kompleksi reaktsioonisegust perkolatsioon-ekstraktsiooni kasutamisega (vt. p. 2.1.3.3).

Muutmatuks parameetriks jäi reaktsioonisegu temperatuur 70°C. Katse kestvus oli põhiliselt 60 min., kuid suurema β-CD kontsentratsiooni puhul varieeriti seda 50...70 minutini. Humala kaalutis jäi samaks nagu eelnevas katseseerias peenestatud humala retsirkulatsioon-ekstraktsioonil - 2,13 g, samuti proovide võtmise sagedus katse algul.

Ekstrahendi ja ekstraheeritava materjali vahelise kontakti tõhustamiseks vähendati ekstrahendi lahuse mahtkiirust kuni 0,80 ml/min. Üks katse tehti ka muutuva ekstrahendi kiirusega. β-CD kontsentratsiooni varieeriti piirides 0...7 g/100 ml. Tulemused on esitatud tabelites 3.14 ja 3.15 ning joonistel 3.11, 3.12 ja 3.13, 3.14, 3.15.

Tabel 3.14.

Peenestatud humalast perkolatsioon-ekstraktsioonil β-CD vesilahusega eraldunud α-hapete sisalduse sõltuvus β-CD kontsentratsioonist

Jrk. nr.	β-CD konts., g/100 ml	β-CD maht, ml	BA summaarne	OD summaarne
1	0	23,4	29,38	171,24
2	1	23,4	43,42	78,76
3	2	23,4	88,04	207,70
4	3	23,4	101,02	188,10
5	4	23,4	170,47	271,70
6	5,5	23,4	137,34	320,91
7	5,5	28,0	121,95	237,71
8	5,5*	61,8	360,87	254,10
9	6	30,2	162,31	285,10
19	7	20,0	94,06	77,13

* β-CD mahtkiirus 0...9 min - 1,44 ml/min., edasi 0,80 ml/min.

Tabel 3.15.

Peenestatud humalast perkolatsioon-ekstraktsioonil β-CD vesilahusega eraldunud α-hapete koguse sõltuvus β-CD kontsentratsioonist

β-CD konts., g/100 ml	α-hapete saagis, mg	α-hapete saagis humala suhtes, %	Eks-ks kulunud β-CD kogus, mg	1g α-hapete β-CD, g	α-happed: β-CD, g/g
0	5,88	0,28	-	-	-
1	14,93	0,70	234	15,67	0,064
2	17,61	0,83	468	26,58	0,038
3	20,20	0,95	702	34,75	0,029
4	34,09	1,60	936	27,46	0,036
5,5	27,47	1,29	1287	46,85	0,021
5,5	24,39	1,15	1540	63,14	0,016
5,5	72,17*	3,39	3397	47,07	0,021
6	32,46	1,52	1812	55,82	0,018
7	18,81	0,88	1400	74,43	0,013

* Vt. eelmist märkust.

Järeldused

1. Eelnevates retsirkulatsioon-ekstraktsiooni seeriates leitud nn. standardtingimustel, s.o. 5,5 %-lise β-CD lahusega 33 %-lises EtOh-s eraldus humalast 30 mg α-happeid ehk humala suhtes 1,83 % (vt. tabel 3.8).

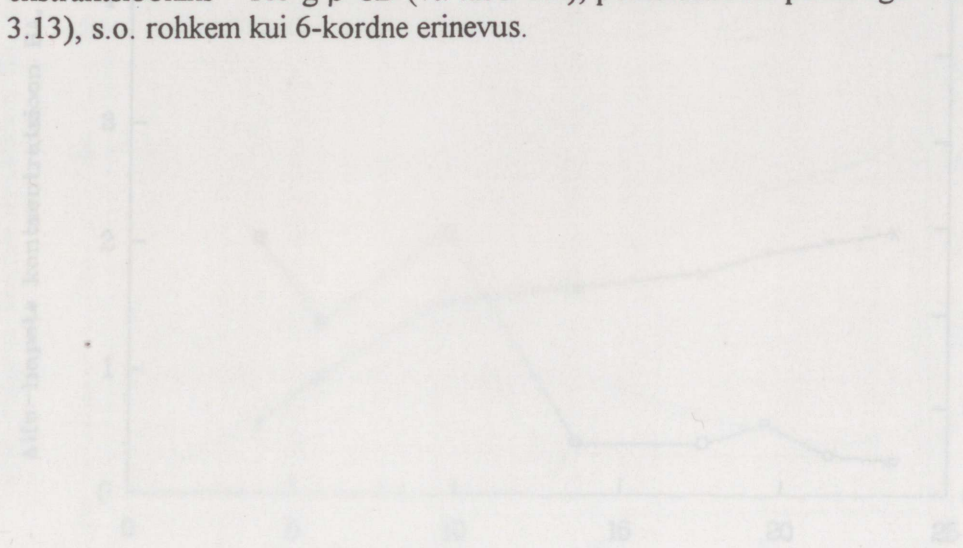
Optimaalsed tingimused humalast α-hapete eraldamiseks on aga järgmised:

materjali peenestusaste:	peenestatud,
ekstrahent:	5,5 %-line β-CD vesilahus,
ekstrahendi mahtkiirus:	0...9 min 1,44 ml/min, edasi 0,80 ml/min,
ekstraktsiooni aeg:	70 min,
ekstraktsiooni viis:	perkolatsioon-ekstraktsioon.

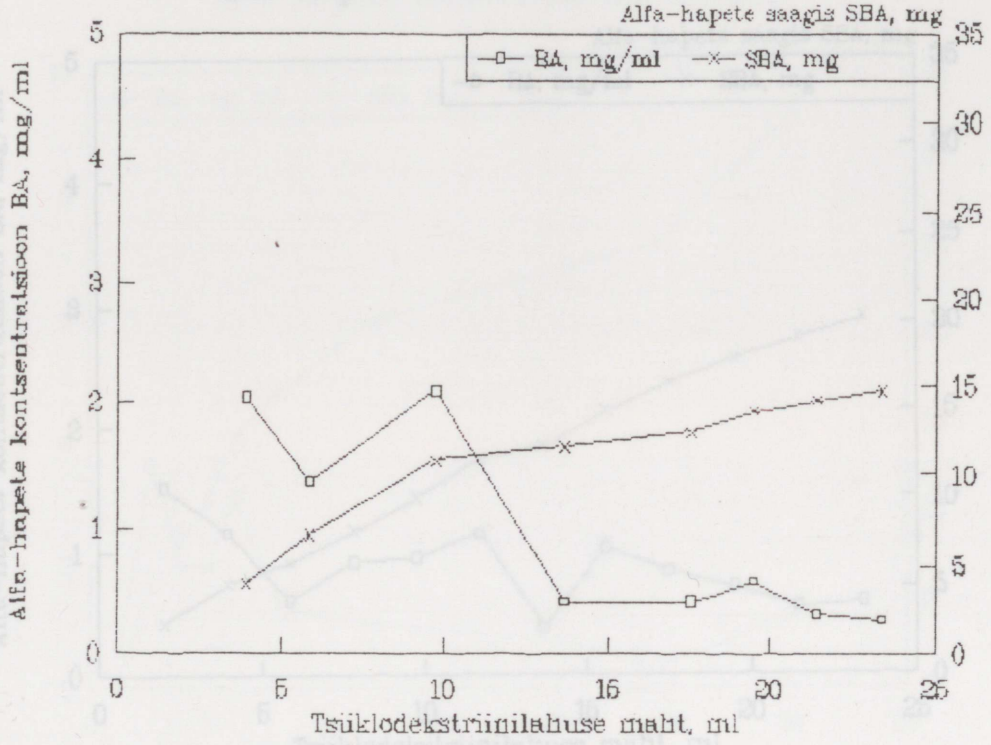
Niisugustel tingimustel eraldus humalast ~72 mg α-happeid, mis annab α-hapete saagiseks humala suhtes 3,39 % (vt. tabel 3.15). Metoodikaga [18] määratud α-hapete sisaldus antud humalapartiis oli 3,57 %. Järelikult on saavutatud optimaalsetel tingimustel humalast võimalik eraldada kuni 95 % seal leiduvatest α-hapetest. See on kaks korda rohkem kui nn. standardtingimustel. Seega võib perkolatsioon-ekstraktsiooni pidada retsirkulatsioon-ekstraktsioonist efektiivsemaks.

2. Tsüklodekstriini kasutamise seisukohalt osutub efektiivsemaks 4 %-lise β-CD-ga tehtud katse, sest 1 g α-hapete eraldamiseks kulub siin ligi kaks korda vähem β-CD kui 5,5 %-lise β-CD puhul muutuval mahtkiirusel (vt. tabel 3.15). Selles mõttes on tegelikult efektiivseim 1 %-lise β-CD-ga tehtud katse ja kõige vähem efektiivsem 7 %-lise β-CD-

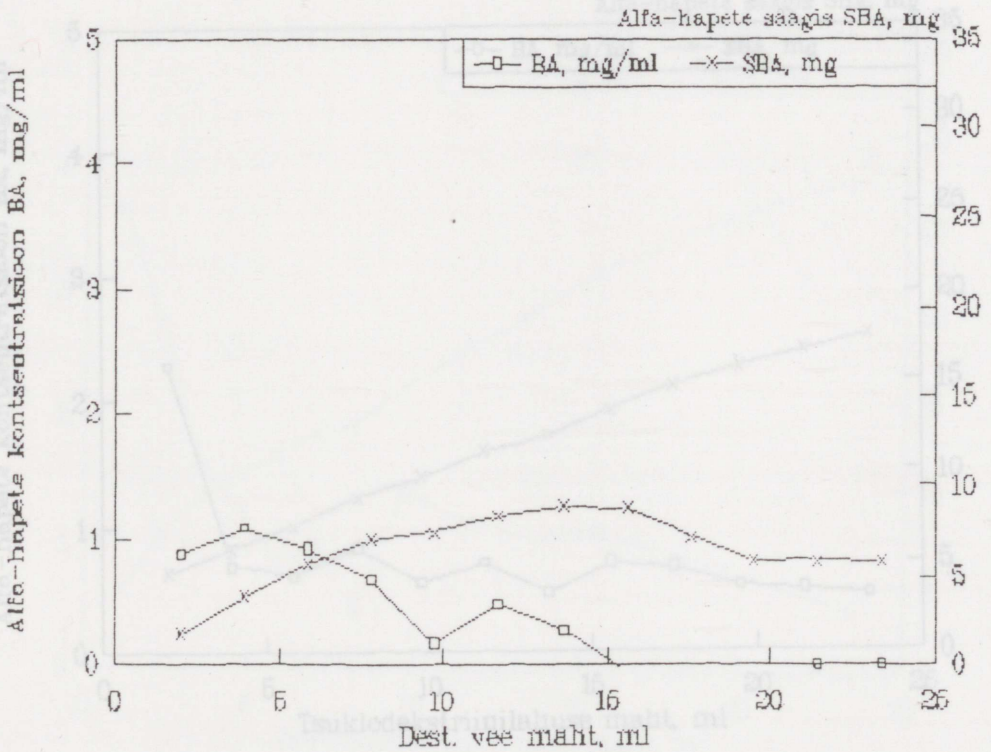
ga tehtud katse, mille vaheline erinevus on ligi 5 korda. Võrreldes aga tervet perkolatsioon-ekstraktsiooni seeriat eelnevate retsirkulatsion-ekstraktsiooni seeriatega, näeme esimese ilmset eelist just β-CD efektiivsemas kasutamises. Umbes sama α-hapete saagise puhul (~ 30 mg) kulub retsirkulatsioonil nn. standardtingimustel 1 g α-hapete ekstraktsiooniks ~ 183 g β-CD (vt. tabel 3.8), perkolatsiooni puhul aga ~ 27 g (vt. tabel 3.13), s.o. rohkem kui 6-kordne erinevus.



Humalatest perkolatsioon-ekstraktsioonil
1%-lise beeta-CD vesilahusega
alfa-hapete eraldumise dünaamika

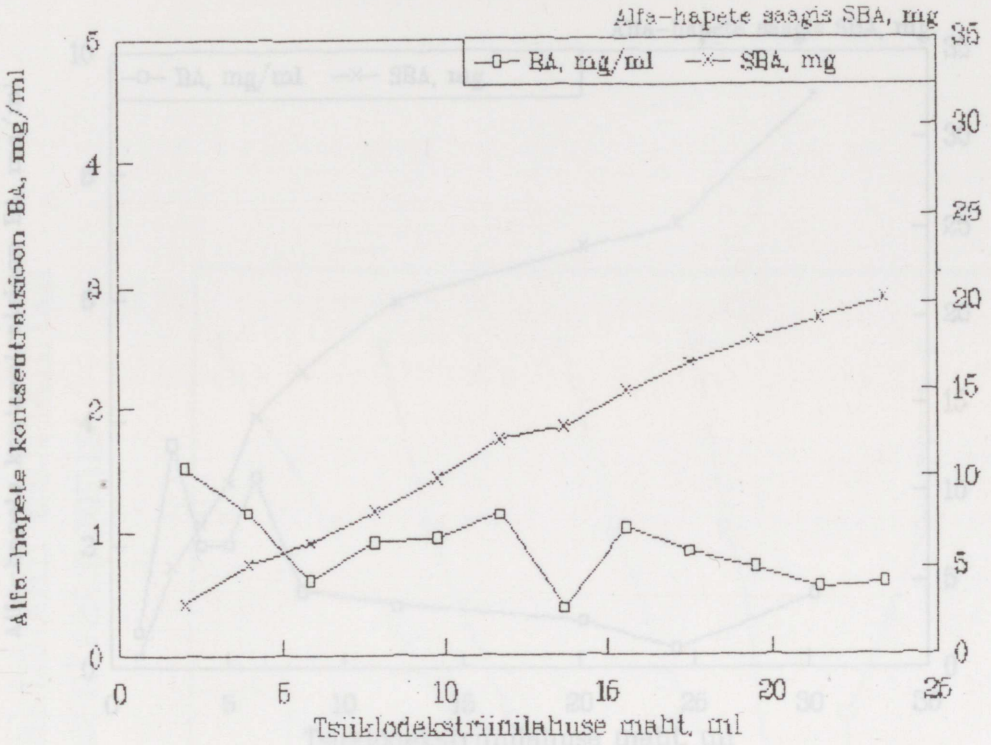


Humalatest perkolatsioon-ekstraktsioonil
dest. veega alfa- hapete eraldumise
dünaamika

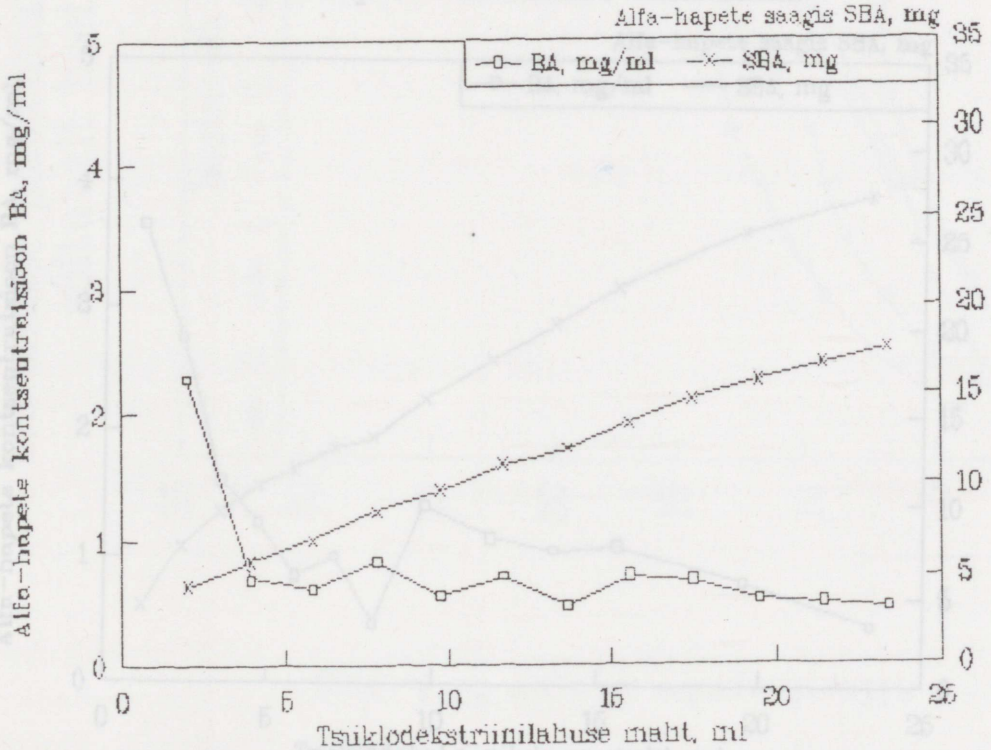


Joon. 3.11.

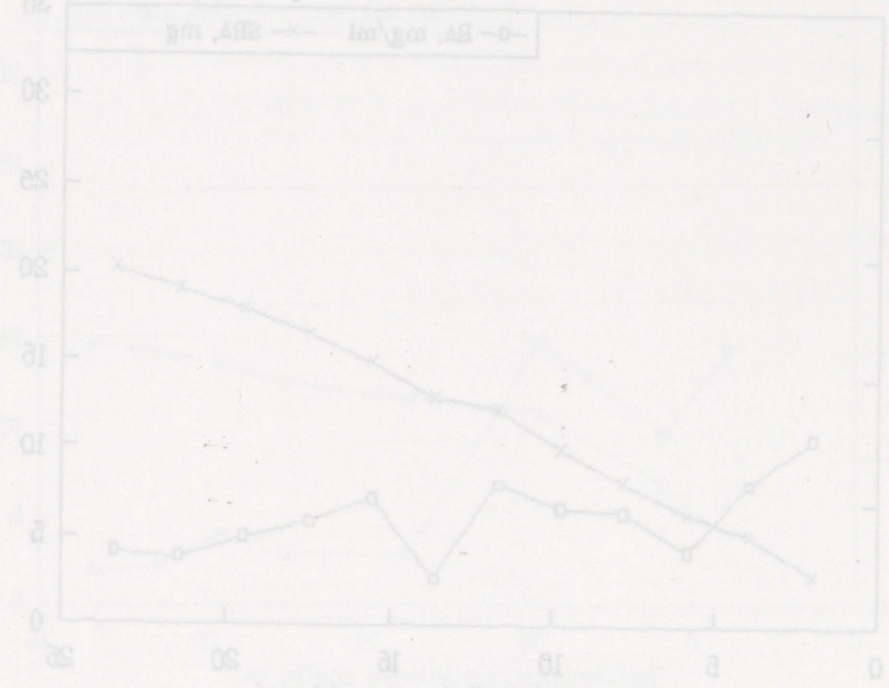
Humalatest perkolatsioon-ekstraktsioonil
3%-lise beeta-CD vesilahusega
alfa-hapete eraldumise dünaamika



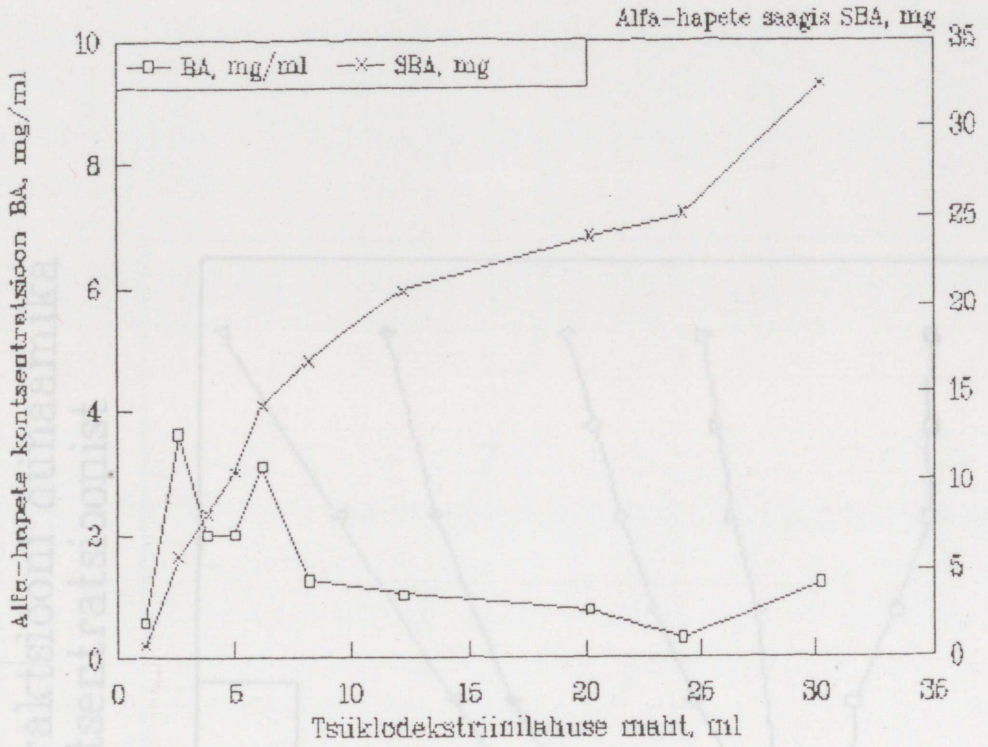
Humalatest perkolatsioon-ekstraktsioonil
2%-lise beeta-CD vesilahusega
alfa-hapete eraldumise dünaamika



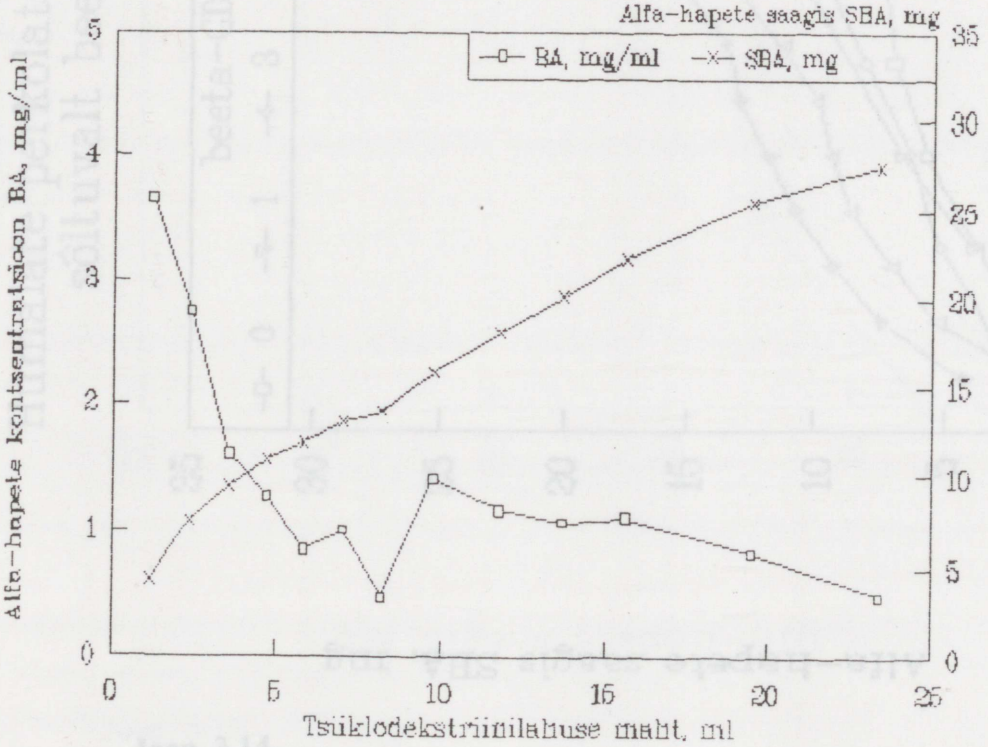
Joon. 3.12.



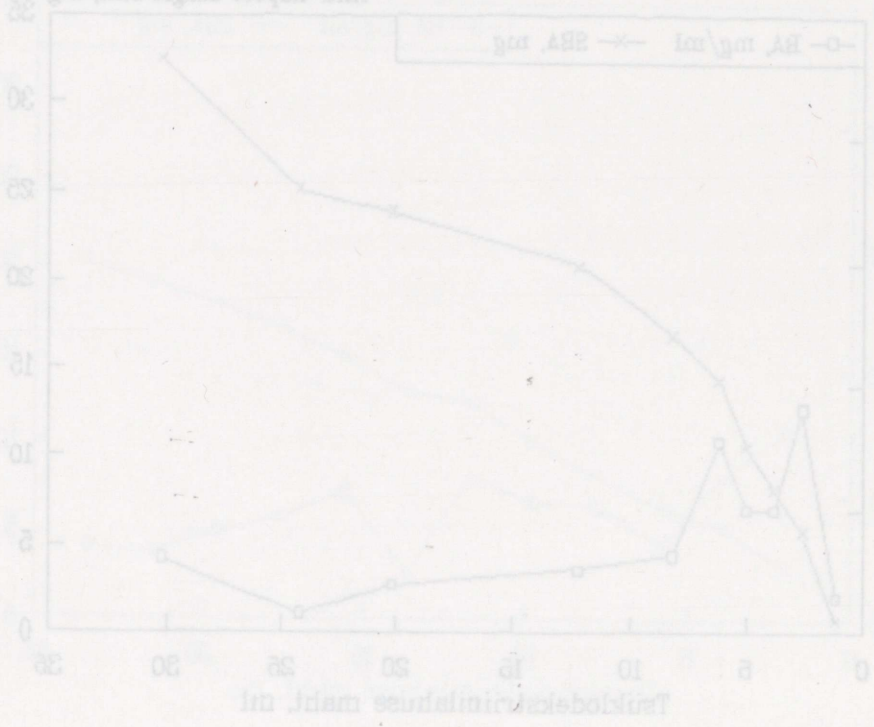
Humalatest perkolatsioon-ekstraktsioonil
6%-lise beeta-CD vesilahusega
alfa-hapete eraldumise dünaamika



Humalatest perkolatsioon-ekstraktsioonil
5.5%-lise beeta-CD vesilahusega
alfa-hapete eraldumise dünaamika



Joon. 3.13.



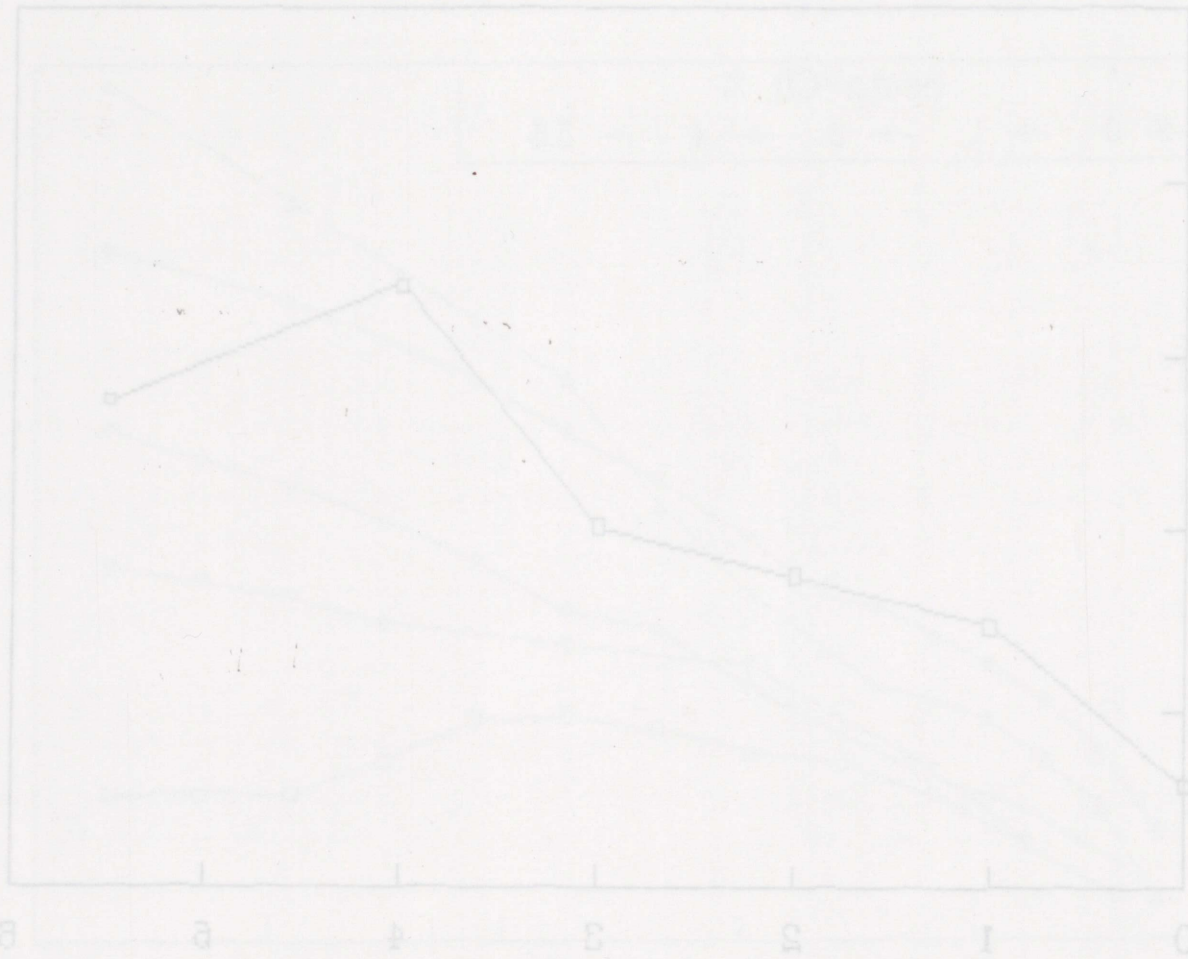
Joon. 3.14.

Humalate perkolatsioon–ekstraktsiooni dünaamika
sõltuvalt beeta–CD kontsentratsioonist
beeta–CD, %
0
1
3
4
5.5
Alfa–hapete saagis SBA, mg
0
5
10
15
20
25
30
Ekstrahendi maht, ml

Beta-CD, %
0
1
3
5
0
5
10
15
20
25
30
35
0
5
10
15
20
25
Retained mass, mg

Alfa-hapete saagised
humalate perkolatsioon-ekstraktsioonil
sõltuvalt beeta-CD kontsentratsioonist
Alfa-hapete saagis, mg
0
10
20
30
40
50
0
1
2
3
4
5
6
Tsiklodekstriini kontsentratsioon, g/100 ml

Joon. 3.15.



3.3. Tsüklodekstriinikomplekside analüüs

Käesolevas peatükis käsitletakse eelkõige ühe lähteaine, CD-ga kompleksi moodustavate külalismolekulide analüüsi. Uuritakse erinevate meetodite (UV-spektrofotomeetria, gaaskromatograafia, HPLC) kasutatavust ekstraktsiooni-protsessi dünaamika jälgimiseks.

Tsüklodekstriinikomplekside analüüsiks on antud töös kasutatud põhiliselt UV-spektrofotomeetriat; gaaskromatograafia ja HPLC rakendamine takerdus tehniliste raskuste taha.

3.3.1. Mudelainete ja tsüklodekstriinikomplekside UV-spektrofotomeetria

UV-spektromeetriat kui eeterlike õlide või üldisemalt aromatisaatorite uurimis-meetodit võib pidada ajalooliseks [38, 43, 46]. Tänapäeval leiab see meetod kasutamist eelkõige kombineeritult vedelikkromatograafia ja HPLC-ga, juhul kui detektorina kasutatakse UV- või DAD (fotodiood)-detektorit. Selle tõttu pole andmed mudelainete UV-neelduvuse kohta oma aktuaalsust siiski kaotanud.

Eesmärgiks seati uuritavates eeterlikes õlides leiduvate kromofoorseid rühmi sisaldavate ühendite ekstinktsioonikoefitsientide ε määramine ja võrdlus kirjanduse andmetega.

Molaarse ekstinktsiooni koefitsienti ε on lihtne määrata, kui aine optilise tiheduse sõltuvus kontsentratsioonist D=f(c) on võrdeline ja allub Lambert-Behr'i seadusele (vt. ptk. 2.2.1)

$$D = \varepsilon c l \qquad (6)$$

Sõltuvus (6) kehtib, kui homogeenset isotroopset keskkonda läbib monokromaatse valguse tasapinnaliste kiirte kimp, suurus c on aine tõeline kontsentratsioon ja elektronide arv ergastatud energeetilisel nivool on väike [24]. Nende tingimuste rikkumine viib näilistele kõrvalekalletele Lambert-Behr'i seadusest, mille tõttu sõltuvus (6) muutub mittelineaarseks. Sagedamini esinevad kõrvalekallete põhjused on:

1) füüsikalis-keemilised (seotud uuritava aine või kogu lahuse omadustega)
2) instrumentaalsed (kasutatavast spektrofotomeetrist tingitud)
3) uuritava aine anisotroopsusest tingitud.

3.3. Tsüklodekstriinikomplekside analüüs

Käesolevas peatükis käsitletakse eelkõige ühe lähteaine, CD-ga kompleksi moodustavate külalismolekulide analüüsi. Uuritakse erinevate meetodite (UV-spektrofotomeetria, gaaskromatograafia, HPLC) kasutatavust ekstraktsiooni-protsessi dünaamika jälgimiseks.

Tsüklodekstriinikomplekside analüüsiks on antud töös kasutatud põhiliselt UV-spektrofotomeetriat; gaaskromatograafia ja HPLC rakendamine takerdus tehniliste raskuste taha.

3.3.1. Mudelainete ja tsüklodekstriinikomplekside UV-spektrofotomeetria

UV-spektromeetriat kui eeterlike õlide või üldisemalt aromatisaatorite uurimismeetodit võib pidada ajalooliseks [38, 43, 46]. Tänapäeval leiab see meetod kasutamist eelkõige kombineeritult vedelikkromatograafia ja HPLC-ga, juhul kui detektorina kasutatakse UV- või DAD (fotodiood)-detektorit. Selle tõttu pole andmed mudelainete UV-neelduvuse kohta oma aktuaalsust siiski kaotanud.

Eesmärgiks seati uuritavates eeterlikes õlides leiduvate kromofoorseid rühmi sisaldavate ühendite ekstinktsioonikoefitsientide ε määramine ja võrdlus kirjanduse andmetega.

Molaarse ekstinktsiooni koefitsienti ε on lihtne määrata, kui aine optilise tiheduse sõltuvus kontsentratsioonist D=f(c) on võrdeline ja allub Lambert-Behr'i seadusele (vt. ptk. 2.2.1)

$$D = \varepsilon c l \qquad (6)$$

Sõltuvus (6) kehtib, kui homogeenset isotroopset keskkonda läbib mono kromaatse valguse tasapinnaliste kiirte kimp, suurus c on aine tõeline kontsentratsioon ja elektronide arv ergastatud energeetilisel nivool on väike [24]. Nende tingimuste rikkumine viib näilistele kõrvalekalletele Lambert-Behr'i seadusest, mille tõttu sõltuvus (6) muutub mittelineaarseks. Sagedamini esinevad kõrvalekallete põhjused on:

1) füüsikalis-keemilised (seotud uuritava aine või kogu lahuse omadustega)
2) instrumentaalsed (kasutatavast spektrofotomeetrist tingitud)
3) uuritava aine anisotroopsusest tingitud.

Kõrvalekallete peamiseks füüsikalis-keemiliseks põhjuseks on kontsentratsiooni c erinevus aine tõelisest kontsentratsioonist lahuses (dissotsatsiooni, assotsiatsiooni või lahustatud aine ja lahusti vahelise reaktsiooni tõttu). Kõne alla võivad tulla veel uuritava aine fluorestsents või lahuses leiduvad lisandid [24].

Juhul, kui uuritava lahuse kohta Lambert-Behr'i seadus ei kehti, on üheks võimaluseks valida kitsas kontsentratsioonipiirkond, kus sõltuvus D = f(c) on siiski lineaarne.

Teiseks võimaluseks on kasutada ruutvõrrandit

$$D=ac+bc^2, \qquad (14)$$

milles kordajad a ja b arvutatakse rea tuntud kontsentratsiooniga lahuste eksperimentaalselt leitud optiliste tiheduste järgi vähimruutude meetodil. Uuritava lahuse kontsentratsioon selgub ruutvõrrandi lahendamise teel.

Veelgi üldisemalt arvestab füüsikalis-keemilistest protsessidest tingitud kõrvale-kaldeid polünoomi võrrand

$$D=\varepsilon cl+\varepsilon c^2 l+...+\varepsilon c^n l \qquad (15)$$

Uuritava aine kontsentratsiooni võib sel juhul leida gradueeritud sõltuvusest
$D/\varepsilon l = f(c)$ [24].

Käesolevas töös valiti mudelaineteks terpeensüsivesinikest limoneen, terp noleen, p-tsümeen, α-pineen, β-pineen (leiduvad nii tilli-, köömne- kui loorberiõlis); ionoonide segu; terpeenalkoholidest geraniool (loorberiõlis); terpeenfenoolidest tümool ja isoeugenool (tilliõlis). Kõigil juhtudel l=const=1cm. Eksperimentaalselt leitud optiliste tiheduste D ja kontsentratsioonide c vahelise seose leidmiseks kasutati järgmisi regressioonivõrrandeid:

$$D=\varepsilon \cdot c \qquad (16)$$

$$D=a+\varepsilon \cdot c \qquad (17)$$

$$D=a+\varepsilon \cdot c+d \cdot c^2 \qquad (18)$$

$$D=\varepsilon \cdot c+d \cdot c^2 \qquad (19)$$

kus ε- molaarse ekstinktsiooni koefitsient, $[M^{-1}\ cm^{-1}]$
a, d - regressioonivõrrandi kordajad.

Kõrvalekallete peamiseks füüsikalis-keemilisteks põhjuseks on kontsentratsioon c erinevus aine tõelisest kontsentratsioonist lahuses (dissotsiatsioon, assotsiatsioon või lahustatud aine ja lahusti vahelise reaktsioon tõttu). Kõne alla võivad tulla veel uuritava aine fluorestents või lahuses leiduvad lisandid [24].

Juhul, kui uuritava lahuse kohta Lambert-Beer'i seadus ei kehti, on ühekiu võimalusele valida kitsas kontsentratsioonipiirkond, kus sõltuvus D = f(c) on siiski lineaarne.

Teiseks võimaluseks on kasutada ruutvõrrandit

$$D = ac + bc^2, \quad (14)$$

millele kordajad a ja b arvutatakse nn tuntud kontsentratsiooniga lahuste eksperimentaalselt leitud optiliste tiheduste järgi vähimruutude meetodil. Uuritava lahuse kontsentratsioon selgub ruutvõrrandi lahendamise teel.

Veelgi üldisemalt arvestab füüsikalis-keemilistest protsessidest tingitud kõrvale-kaldeid polünoomi võrrand

$$D = ac + bc^2 + \ldots + ec^n \quad (15)$$

Uuritava aine kontsentratsioon võib sel juhul leida gradueeritud sõltuvusest D=f(c) [24].

Käesolevas töös valiti mudelaineteks terpeensüsivesinikest limoneen, terpenoleen, p-tsümeen, α-pineen, β-pineen (leidvad nii tilli-, köömne- kui loorberiõlis); ioononide segu; terpeenalkoholidest geraniool (loorberiõlis); terpeenfenooldest timool ja isoeugenool (tilliõlis). Kõigil juhtudel l=const=1cm. Eksperimentaalselt leitud optiliste tiheduste D ja kontsentratsioonide c vahelise seose leidmiseks kasutati järgmisi regressioonivõrrandeid:

$$D = \varepsilon \cdot c \quad (16)$$

$$D = a + \varepsilon \cdot c \quad (17)$$

$$D = a + \varepsilon \cdot c + d \cdot c^2 \quad (18)$$

$$D = \varepsilon \cdot c + d \cdot c^2 \quad (19)$$

kus ε - molaarse ekstinktsioni koefitsient, [M^{-1} cm^{-1}]

a, d - regressioonivõrrandi kordajad.

Et katsepunktide arv kõigis seeriates oli $n \leq 8$, siis eeldati, et regressioonivõrrandi kordajate standardvead alluvad Studenti jaotusele. Võrrandite sobivust hinnati jääkstandardhälbe $S_{jääk}$ ja kordajate standardvigade S_a, S_ε ja S_d alusel, mis avalduvad järgnevalt [24].

$$D=\varepsilon\, c\ ;\ S_{jääk} = SQRT[\Sigma(D - \varepsilon\, c)^2/(n - 1)] \tag{20}$$

$$S_\varepsilon = S_{jääk}/SQRT(\Sigma x^2) \tag{21}$$

Veapiir ε jaoks $\varepsilon \pm tS_\varepsilon$, kus t - Studenti tegur, kui $\nu=n - 1$ ja $\alpha/2=0,025$

$$D=a+\varepsilon \cdot c\ ;\ S_{jääk}=SQRT[\Sigma(D - a-\varepsilon \cdot c)^2/(n - 2)] \tag{22}$$

$$S_a=S_{jääk} \cdot SQRT\{\Sigma x^2/[n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2]\} \tag{23}$$

$$S\varepsilon=S_{jääk} \cdot SQRT\{n/[n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2]\} \tag{24}$$

Veapiirid: $a \pm tS_a$ ja $\varepsilon \pm tS_\varepsilon$, kui $\nu=n - 2$ ja $\alpha/2=0,025$

$$D=\varepsilon \cdot c+d \cdot c^2\ ;\ S_{jääk}=SQRT[\Sigma(D - \varepsilon \cdot c - d \cdot c^2)^2/(n - 2)] \tag{25}$$

$$S\varepsilon=S_{jääk} \cdot SQRT\{\Sigma x^4/[\Sigma x^4 \Sigma x^2 - (\Sigma x^3)^2]\} \tag{26}$$

$$S_d=S_{jääk} \cdot SQRT\{\Sigma x^2/[\Sigma x^4 \Sigma x^2 - (\Sigma x^3)^2]\} \tag{27}$$

Veapiirid: $\varepsilon \pm tS\varepsilon$ ja $d \pm tS_d$, kui $\nu=n-3$ ja $\alpha/2=0,025$.

Kõigi mudelainete puhul püüti sõltuvus D = f(c) leida esialgu lineaarse sirge (17) kujul. Vabaliikme statistiline tähtsus selgitati Student'i teguri arvutamise teel [24]

$$t_{aj}=|aj|/S_{aj}\ , \tag{28}$$

kus |aj| - kordaja absoluutväärtus

S_{aj} - sama kordaja standardviga.

Kui $t_{aj} \leq t_{tab}$ ($\nu=n - m$ ja $\alpha=0,025$ puhul,

kus ν - vabadusastmete arv

n - katsepartiide arv

m - määratavate parameetrite arv),

Et katsepunktide arv kõigis seeriates oli n≤8, siis eeldati, et regressioonivõrrandi korrajate standardvead alluvad Student jaotusele. Võrrandite sobivust hinnati jääkstandardhälbe $S_{jääk}$ ja korrajate standardvigade S_a, S_e ja S_d alusel, mis avaldavad järgnevalt [24]:

$$D=e\ ;\ S_{jääk} = SQRT[\Sigma(D - e)^2/(n - 1)] \quad (20)$$

$$S_e = S_{jääk}\sqrt{SQRT(\Sigma x^2)} \quad (21)$$

Veapiir e jaoks $e \pm tS_e$, kus t - Student tegur, kui $\nu=n - 1$ ja $\alpha/2=0,025$

$$D=a+e\cdot c\ ;\ S_{jääk}=SQRT[\Sigma(D - a-e\cdot c)^2/(n - 2)] \quad (22)$$

$$S_a=S_{jääk}\cdot SQRT[\Sigma x^2/[n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2]] \quad (23)$$

$$Se=S_{jääk}\cdot SQRT[n/[n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2]] \quad (24)$$

Veapiirid: $a \pm tS_a$ ja $e \pm tS_e$, kui $\nu=n - 2$ ja $\alpha/2=0,025$

$$D=e\cdot c+d\cdot c_2\ ;\ S_{jääk}=SQRT[\Sigma(D - e\cdot c - d\cdot c_2)^2/(n - 2)] \quad (25)$$

$$Se=S_{jääk}\cdot SQRT[\Sigma x_4/[\Sigma x_4\Sigma x^2 - (\Sigma x_3)^2]] \quad (26)$$

$$S_d=S_{jääk}\cdot SQRT[\Sigma x^2/[\Sigma x_4\Sigma x^2 - (\Sigma x_3)^2]] \quad (27)$$

Veapiirid: $e \pm tSe$ ja $d \pm tS_d$, kui $\nu=n-3$ ja $\alpha/2=0,025$.

Kõigi mudelsainete puhul püüti sõltuvus D = f(c) leida esialgu lineaarse sõltuvuse (17) kujul. Vabaliikme statistiline tähtsus selgitati Student'i tegurit arvutamise teel [24]

$$t_{aj}=|a_j|/S_{aj}\ . \quad (28)$$

kus $|a_j|$ - korrajate absoluutväärtus

S_{aj} - sama korrajate standardviga.

Kui $t_{aj}<t_{tab}$ ($\nu=n - m$ ja $\alpha=0,025$ puhul,

kus ν - vabadusastmete arv

n - katsepunktide arv

m - määratavate parameetrite arv).

siis võib aj lugeda statistiliselt tähtsusetuks ja kehtib võrrand $D=\varepsilon c$. Regressioonivõrrandi mingile koefitsiendile arvutatud Student'i tegur näitab seega, kas sellel koefitsiendil on tähtsust või mitte, s.t. kas tema standardviga allub normaaljaotusele või mitte.

Lõpuks hinnati erinevate regressioonivõrrandite sobivust veel korrelatsiooni-koefitsiendi r abil. Lineaarse regressiooni kvantitatiivsel hindamisel oli selleks paarkorrelatsiooni koefitsient [49] ehk lineaarse korrelatsiooni koefitsient [48], mis avaldub regressioonist tingitud variatsiooni suhtena kogu variatsiooni (keskmiste suhtes):

$$r=SQRT(VR/TV), \quad (29)$$

kus VR - regressioonist tingitud variatsioon

TV - kogu variatsioon

ehk $$r=SQRT[(y_{arv} - \overline{y})^2/(y_{eksp} - \overline{y})^2] \quad (30)$$

Ruutvõrrandite (18) ja (19) adekvaatsuse kontrollimiseks kasutati korrelatiivset suhet η [49], mis tabelis 2 on küll samuti tähistatud r-ga:

$$\eta=SQRT\{1 - [\Sigma(y_{eksp} - y_{arv})^2/\Sigma(y_{eksp} - \overline{y})^2]\} \quad (31)$$

Siin võrreldakse erinevusi eksperimentaalse väärtuse suhtes.

Katseandmete matemaatiline töötlus toimus arvutil PC AT, kasutades tabel-arvutuspaketti "Supercalc 5" ja spetsiaalset BASIC programmi. Tulemused on esitatud tabelites 3.16 (kirjanduse andmed) ja 3.17 (eksperimentaalsed tulemused).

Järeldused:

1. LIMONEEN: sõltuvus D = f(c) on mittelineaarne, mõlemal lainepikkusel (265 ja 273 nm) kirjeldab seda kõige paremini ruutpolünoom. Leitud lgε väärtused (1,96 ja 1,87) erinevad oluliselt kirjanduses pakutud väärtusest (lgε=1,36; λ=250nm), kuigi ka lahusti ja lainepikkus on erinevad. Limoneeni struktuuris on kaks isoleeritud kaksiksidet (vt. joon.25, p. 2.2.1), mis eeldab neelduvust vaid λ<240nm juures. Ebaloomulikult suuri lgε väärtusi tingib ilmselt lisandite olemasolu.

2. TERPINOLEEN: sõltuvust D=f(c) kirjeldab Lambert-Behr'i seadus, lgε=2,28, kui λ=273nm. Paraku on see väärtus kirjanduses pakutust (lgε=2,66, λ=250nm) jällegi erinev, kuid seekord väidetakse algallikas [29], et proov ei olnud puhas.

3. p-TSÜMEEN: kõigil mõõdetud lainepikkustel (259, 265, 267, 273nm) on sõltuvus D=f(c) lineaarne, kusjuures r>0,9990. Lainepikkusel λ=273nm kehtib ka Lambert-Behr'i seadus, lgε=2,74, mis langeb peaaegu ideaalselt kokku kirjanduses pakutuga (lgε=2,71). Põhjuseks on p-tsümeeni benseenituuma sisaldav struktuur, mille tõttu tema spektris on hästi mõõdetavad K-ribad.

4. α-PINEEN, β-PINEEN: sõltuvus D=f(c) on lineaarne. Et aga kummagi aine molekulis on vaid üks kaksikside, näitavad leitud lgε väärtused (vastavalt 2,22 ja 2,24) vaid seda, et antud mudelainete proovid ei olnud puhtad.

5. IONOONIDE SEGU: nimetatud aineid tilli-, loorberi- ega köömneõlis ei leidu. Proovi uuriti lihtsalt kui ühte võimalikku aroomainete komponenti. lgε=3,18 (r=0,9997) lubab oletada, et selle koosseisu muid aineid peale ionoonide ei kuulu.

6. GERANIOOL, TÜMOOL: sõltuvust D=f(c) kirjeldab adekvaatselt vaid ruut-polünoom.

7. ISOEUGENOOL: leitud lgε väärtused (lgε=4,12, λ=260nm ja lgε=4,10, λ=266nm) ühtivad kirjanduses pakutud väärtusega (lgε=4,14, λ=262), kuigi r≤ 0,9980 kõigi proovitud regressioonivõrrandite puhul.

Järelikult võib antud töös määratud lgε väärtuste alusel mudelainetena kasutada p-tsümeeni, ionoonide segu ja isoeugenooli. Määratud lgε väärtuste kokkulangevus kirjanduses pakutuga sisendab julgust ka edaspidi UV-spektrofotomeetria põhjal protsessi kulgu jälgida.

Eeterlike õlide tähtsamate komponentide iseloomustus UV-neelduvuse järgi (kirjanduse põhjal)*

Komponent	λ_{max}	lg ε_{max}	Lahusti	Viide
1	2	3	4	5
ÜHE KAKSIKSIDEMEGA MONOTERPEENID				
α-pineen				
[(1R, 5R)-2-pineen või (1S, 5S)-	220	3,17	isooktaan	[29]
2-pineen]	250	0,31	isooktaan	[29]
β-pineen				
[(1R, 5R)-2(10)-pineen või (1S, 5S)-	210	3,73		[45]
2 (10) pineen]	222	1,94	isooktaan	[29]
	250	-0,26	isooktaan	[29]
kam feen				
{(1R)-2,2-dimetüül-3-metüleenbi-				
tsüklo [2,2,1] heptaan või (1S)-	220	2,10	isooktaan	[29]
-2,2-dimetüül-3-metüleenbitsüklo	250	-0,02	isooktaan	[29]
[2,2,1] heptaan}				
(+)-3-kareen				
{(1S)-3,7,7,-trimetüülbitsüklo-	220	2,30	isooktaan	[29]
[4,1,0] hepten-3-een või	250	0,92	isooktaan	[29]
(1R)-3,7,7,-trimetüülbitsüklo-				
[4,1,0] hepten-3-een}				
KAHE MITTEKONJUGEERITUD KAKSIKSIDEMEGA MONOTERPEENID				
R(+)-limoneen				
[(+)-p-menta-1,8-dieen]	220	2,41	isooktaan	[29]
	250	1,36	isooktaan	[29]
terpinoleen				
(p-menta-1,7-dieen)	220	3,41	isooktaan	[29]
	250	2,66	isooktaan	[29]
γ -terpineen				
(p-menta-1,4-dieen)	230	1,41	isooktaan	[29]
	250	0,70	isooktaan	[29]

* Ühendite nimetused on viidud vastavusse kehtiva süstemaatilise nomenklatuuriga Merck'i indeksi järgi [47].

Tabel 3.16

Eeterlike õlide tähtsamate komponentide isoloomustus UV-neeldumise järgi (kirjandusandmed põhjal)*

Komponent	λ_{max}	lg ε_{max}	Lahusti	Viide
1	2	3	4	5
ÜHE KAKSIKSIDEMEGA MONOTERPEENID				
α-pineen				
[(1R, 5R)-2-pineen või (1S, 5S)-2-pineen]	220	3,17	isooktaan	[29]
	250	0,31	isooktaan	[29]
β-pineen				
[(1R, 5R)-2(10)-pineen või (1S, 5S)-2 (10) pineen]	210	3,73	isooktaan	[45]
	222	1,94	isooktaan	[29]
	250	-0,26	isooktaan	[29]
kampfeen				
[(1R)-2,2-dimetüül-3-metüleenbitsüklo[2,2,1] heptaan või (1S)-2,2-dimetüül-3-metüleenbitsüklo[2,2,1] heptaan]	220	2,10	isooktaan	[29]
	250	-0,02	isooktaan	[29]
(+)-3-kareen				
[(1S)-3,7,7,-trimetüülbitsüklo[4,1,0] hepten-3-een või (1R)-3,7,7,-trimetüülbitsüklo[4,1,0] hepten-3-een]	220	2,30	isooktaan	[29]
	250	0,92	isooktaan	[29]
KAHE MITTEKONJUGEERITUD KAKSIKSIDEMEGA MONOTERPEENID				
R(+)-limoneen				
[(+)-p-menta-1,8-dieen]	220	2,41	isooktaan	[29]
	250	1,36	isooktaan	[29]
terpinoleen				
(p-menta-1,7-dieen)	220	3,41	isooktaan	[29]
	250	2,66	isooktaan	[29]
γ -terpineen				
(p-menta-1,4-dieen)	230	1,41	isooktaan	[29]
	250	0,70	isooktaan	[29]

* Ühendite nimetused on viidud vastavusse kehtiva süstemaatilise nomenklatuuriga Merck'i indeksi järgi [47].

1	2	3	4	5
KAHE KONJUGEERITUD KAKSIKSIDEMEGA MONOTERPEENID				
α-terpineen				
(p-menta-1,3-dieen)	265	3,81	isooktaan	[29]
	262	3,55	etanool	[32]
α-fellandreen				
(p-menta-1,5-dieen)	263	3,40	etanool	[32]
β-fellandreen				
(p-menta-5,7-dieen)	231	3,96	heksaan	[32]
mürtseen				
(2-metüül-6-metüleen-2,7-oktadieen)	225	4,23	isooktaan	[29]
	225	4,25	etanool	[32]
β-otsimeen				
(2,6-dimetüül-2,5,7-oktatrieen	235	4,22	isooktaan	[29]
AROMAATSED MONOTERPEENID				
p-tsümeen				
(4-isopropüültolueen; p-metüül-	212	3,76		[32]
-4-isopropüülbenseen)	217	3,74		[29]
	254	2,27	isooktaan	[29]
	259	2,40		[32]
	260	2,50	isooktaan	[29]
	265	2,53		[32]
	266	2,64	isooktaan	[29]
	267	2,52		[32]
	268	2,62	isooktaan	[29]
	273	2,60		[32]
	273	2,71	isooktaan	[29]
TERPEENKETOONID				
S(+)-karvoon				
[(S)-5-isopropenüül-2-metüül-	235	4,28	etanool	[32]
-2-tsükloheksenoon]	237	3,94		[37]
	320			[32]
	320	1,52	metanool	[38]

1	2	3	4	5
kamper				
[(1R)-1,7,7-trimetüülbitsüklo--[2,2,1]-heptaan-2-oon või (1S)-1,7,7-trimetüülbitsüklo--[2,2,1]-heptan-2-oon}	289	1,51	etanool	[45]
TERPEENFENOOLID				
eugenool				
[4-allüül-2-metoksüfenool;	229	3,79	etanool	[46]
1-hüdroksü-2-metoksü-4-	279			[43]
(2-propenüül)-benseen]	282	3,47	etanool	[46]
	310	1,88	etanool	[46]
isoeugenool				
(2-metoksü-4-propenüülfenool)	214	4,34	etanool	[46]
	256			[43]
	262	4,14	etanool	[43]
	263	4,2	etanool	[41]
	300	3,6	etanool	[44]
	300	3,62	etanool	[46]
metüülengenool				
(homogenool; eugenooli metüül-	230	3,88	etanool	[46]
ester; 4-alküül-1,2-dimetoksü-	280	3,47	etanool	[46]
benseen)	286	3,39	etanool	[46]

Mudelainete iseloomustus UV-neelduvuse järgi
(eksperimentaalselt leitud sõltuvuse D=f (c) alusel; α/2=0.025)

Limoneen segus heksaan : iPrOH, 92:8	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c + d * c^2$	$D = a + \varepsilon * c + d * c^2$
1	2	3	4
λ = 265 nm, n = 7			
a	0.047151	0	0.00879
ε	54.89 ± 10.86	94.08 ± 6.80	90.77 ± 9.01
d		-2871.4	-2670.9
$s_{jääk}$	$5.180 \cdot 10^{-2}$	$1.113 \cdot 10^{-2}$	$9.972 \cdot 10^{-3}$
s_a	$2.250 \cdot 10^{-2}$		
s_ε	4.225	2.647	3.240
s_d		213.7	233.4
$t = a / s_a$	$2.096 < t_{tab}$		
r	0.98550	0.99933	0.99957
lg ε	1.74	1.97	1.96
λ = 273 nm, n = 7	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c + d * c^2$	$D = a + \varepsilon * c + d * c^2$
a	0.039719	0	0.007524
ε	44.26 ± 9.12	77.21 ± 5.87	74.38 ± 7.81
d		-2413.4	-2241.8
$s_{jääk}$	$4.352 \cdot 10^{-2}$	$9.606 \cdot 10^{-3}$	8.645
s_a	$1.890 \cdot 10^{-2}$		
s_ε	3.550	2.284	2.808
s_d		184.45	202.36
$t = a / s_a$	$2.101 < t_{tab}$		
r	0.98429	0.99924	0.99951
lg ε	1.65	1.89	1.87
Terpinoleen etanoolis λ = 273 nm, n = 8	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	lg ε
a	0.01430	0	
ε	185.484	189.62 ± 4.84	2.28
$s_{jääk}$	$1.138 \cdot 10^{-2}$	$1.477 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$5.947 \cdot 10^{-3}$		
s_ε	2.336	2.051	
$t = a / s_a$	$2.405 < t_{tab}$		
r	0.99952	0.99907	
p-tsümeen etanoolis λ = 259 nm, n = 6	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	lg ε
a	0.01635	0	
ε	532.889	547.83 ± 23.73	2.74
$s_{jääk}$	$1.094 \cdot 10^{-2}$	$1.653 \cdot 10^{-2}$	

1	2	3	4
s_a	$6.005 \cdot 10^{-3}$		
s_ε	8.213	9.233	
$t = a / s_a$	$2.723 < t_{tab}$		
r	0.99953	0.99864	
$\lambda = 265$ nm, n = 6	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	$\lg \varepsilon$
a	0.01392	0	
ε	566.855	579.58 ± 20.17	2.76
$s_{jääk}$	$0.927 \cdot 10^{-3}$	$1.405 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$5.086 \cdot 10^{-3}$		
s_ε	6.956	7.848	
$t = a / s_a$	$2.738 < t_{tab}$		
r	0.99970	0.99913	
$\lambda = 267$ nm, n = 6	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	$\lg \varepsilon$
a	0.01326	0	
ε	540.931	553.04 ± 21.63	2.74
$s_{jääk}$	$1.174 \cdot 10^{-2}$	$1.507 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$6.444 \cdot 10^{-3}$		
s_ε	8.814	8.414	
$t = a / s_a$	$2.057 < t_{tab}$		
r	0.99947	0.99891	
$\lambda = 273$ nm, n = 6	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	$\lg \varepsilon$
a	0.01203	0	
ε	536.623	547.61 ± 17.68	2.74
$s_{jääk}$	$0.834 \cdot 10^{-2}$	$1.232 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$4.577 \cdot 10^{-3}$		
s_ε	6.260	6.879	
$t = a / s_a$	$2.628 < t_{tab}$		
r	0.99973	0.99926	
α-pineen etanoolis $\lambda = 244$ nm, n = 5	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	$\lg \varepsilon$
a	0.03127	0	
ε	159.905	165.88 ± 9.02	2.22
$s_{jääk}$	$1.746 \cdot 10^{-2}$	$2.803 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$1.157 \cdot 10^{-2}$		
s_ε	2.995	3.245	
$t = a / s_a$	$2.703 < t_{tab}$		
r	0.99947	0.99819	

β-pineen etanoolis $\lambda = 267$ nm, n = 8	$D = a + \varepsilon * c$		lg ε
a	0.01911		
ε	172.46 ± 5.08		2.24
$s_{jääk}$	$1.420 \cdot 10^{-2}$		
s_a	$6.743 \cdot 10^{-3}$		
s_ε	2.075		
$t = a / s_a$	$2.835 > t_{tab}$		
r	0.99957		
Ionoonide segu etanoolis, $\lambda = 288$ nm, n = 5	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	lg ε
a	0.002083	0	
ε	1516.20 ± 67.03	1520.31 ± 35.38	3.18
$s_{jääk}$	$1.193 \cdot 10^{-2}$	$1.046 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$7.747 \cdot 10^{-3}$		
s_ε	21.080	12.73	
$t = a / s_a$	$0.269 < t_{tab}$		
r	0.99971	0.99970	
Geraniool etanoolis $\lambda = 238$ nm, n = 6	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c + d * c^2$	$D = a + \varepsilon * c + d * c^2$
a	0.05082	0	0.03619
ε	265.03 ± 24.88	467.58 ± 116.51	360.44 ± 112.33
d		-59 962	-29 326
$s_{jääk}$	$3.006 \cdot 10^{-2}$	$2.340 \cdot 10^{-2}$	$1.857 \cdot 10^{-2}$
s_a	$1.579 \cdot 10^{-2}$		
s_ε	8.949	41.909	35.322
$t = a / s_a$	$3.219 > t_{tab}$		
r	0.99773	0.99862	0.99935
lg ε	2.42	2.67	2.56
Tümool etanoolis, $\lambda = 219$ nm, n=4	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c + d * c^2$	$D = a + \varepsilon * c + d * c^2$
a	0.11618	0	0.18050
ε	8395.6 ± 1231.0	11 270	6323.9
d		$14.999 \cdot 10^6$	$12.638 \cdot 10^6$
$s_{jääk}$	$2.274 \cdot 10^{-2}$	$5.627 \cdot 10^{-2}$	$1.534 \cdot 10^{-3}$
s_a	$2.423 \cdot 10^{-2}$		
s_ε	286.30		
$t = a / s_a$	$4.79 > t_{tab}$		
r	0.99884	0.99287	0.99999
lg ε	3.95	4.05	3.80
$\lambda = 277$nm, n= 6	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	lg ε
a	0.03148	0	
ε	2917.0 ± 393.4	3050.5 ± 227.5	3.46

β-pinocen etanoolis λ = 267 nm, n = 8	D = a + e * c		lg ε
a	0.01911		
e	172.46 ± 5.08		2.24
$s_{jääk}$	1.420 · 10^{-2}		
s_a	6.743 · 10^{-3}		
s_e	2.075		
$t = a / s_a$	2.835 > t_{tab}		
r	0.99957		
Ionoonide segu etanoolis λ = 288 nm, n = 5	D = a + e * c	D = e * c	lg ε
a	0.002083	0	
e	1516.20 ± 67.03	1529.31 ± 35.38	3.18
$s_{jääk}$	1.193 · 10^{-2}	1.046 · 10^{-2}	
s_a	7.747 · 10^{-3}		
s_e	21.080	12.73	
$t = a / s_a$	0.269 < t_{tab}		
r	0.99971	0.99970	
Geraniool etanoolis λ = 238 nm, n = 6	D = a + e * c	D = e * c + d * c_2	D = a + e * c + d * c_2
a	0.05082	0	0.03619
e	2653.03 ± 24.88	4672.58 ± 116.51	3604.44 ± 1122.33
d		-59 962	-29 326
$s_{jääk}$	3.006 · 10^{-2}	2.340 · 10^{-2}	1.857 · 10^{-2}
s_a	1.579 · 10^{-2}		
s_e	8.949	41.909	35.322
$t = a / s_a$	3.219 > t_{tab}		
r	0.99773	0.99862	0.99915
lg ε	2.42	2.67	2.56
Tümool etanoolis, λ = 219 nm, n=4	D = a + e * c	D = e * c + d * c_2	D = a + e * c + d * c_2
a	0.11618	0	0.18050
e	8395.6 ± 1231.0	11 270	6323.9
d		14.999 · 10^6	12.638 · 10^6
$s_{jääk}$	2.274 · 10^{-2}	5.627 · 10^{-2}	1.514 · 10^{-3}
s_a	2.423 · 10^{-2}		
s_e	286.30		
$t = a / s_a$	4.79 > t_{tab}		
r	0.99984	0.99287	0.99999
lg ε	3.95	4.05	3.80
λ = 272nm, n=6	D = a + e * c	D = e * c	lg ε
a	0.03148	0	
e	2912.0 ± 393.4	3050.5 ± 227.5	3.46

1	2	3	4
$s_{jääk}$	$3.930 \cdot 10^{-2}$	$4.082 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$2.665 \cdot 10^{-2}$		
s_ε	141.51	88.51	
$t = a / s_a$	$1.181 < t_{tab}$		
r	0.99533	0.99369	
$\lambda = 283$ nm, n = 6	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	$\lg \varepsilon$
a	0.02737	0	
ε	2706.0 ± 345.9	2822.0 ± 199.4	3.45
$s_{jääk}$	$3.445 \cdot 10^{-2}$	$3.578 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$2.343 \cdot 10^{-2}$		
s_ε	124.41	77.59	
$t = a / s_a$	$1.168 < t_{tab}$		
r	0.99580	0.99436	
Isoeugenool etanoolis $\lambda = 260$ nm, n = 5	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	$\lg \varepsilon$
a	0.01029	0	
ε	13 005.6 ± 1670.3	13 178.5 ± 651.9	4.12
$s_{jääk}$	$3.040 \cdot 10^{-2}$	$2.696 \cdot 10^{-2}$	
s_a	2.70 ± 10^{-2}		
s_ε	525.25	234.51	
$t = a / s_a$	$0.381 < t_{tab}$		
r	0.99756	0.99744	
$\lambda = 266$ nm, n = 5	$D = a + \varepsilon * c$	$D = \varepsilon * c$	$\lg \varepsilon$
a	0.01503	0	
ε	12 426.1 ± 1434.8	12 678.7 ± 583.9	4.10
$s_{jääk}$	$2.612 \cdot 10^{-2}$	$2.415 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$2.320 \cdot 10^{-2}$		
s_ε	451.18	210.05	
$t = a / s_a$	$0.648 < t_{tab}$		
r	0.99803	0.99775	

1	2	3	4
s_{jmk}	$3{,}930 \cdot 10^{-2}$	$4.082 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$2.665 \cdot 10^{-2}$		
s_g	141.51	88.51	
$t = a / s_g$	$1.181 < t_{tab}$		
r	0.99333	0.99369	
$\lambda = 283$ nm, $n = 6$	$D = a + s * c$	$D = g * c$	lg e
a	0.02737	0	
e	2706.0 ± 345.9	2822.0 ± 199.4	3.45
s_{jmk}	$3.445 \cdot 10^{-2}$	$3.578 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$2.343 \cdot 10^{-2}$		
s_g	124.41	72.59	
$t = a / s_g$	$1.168 < t_{tab}$		
r	0.99380	0.99436	
Isocupressol etanoolis $\lambda = 260$ nm, $n = 5$	$D = a + s * c$	$D = e * c$	lg e
a	0.01029	0	
e	$13\,005.6 \pm 1670.3$	$13\,178.5 \pm 651.9$	4.12
s_{jmk}	$3.040 \cdot 10^{-2}$	$2.696 \cdot 10^{-2}$	
s_a	2.70 ± 10^{-2}		
s_g	525.25	234.51	
$t = a / s_g$	$0.381 < t_{tab}$		
r	0.99756	0.99744	
$\lambda = 266$ nm, $n = 5$	$D = a + s * c$	$D = g * c$	lg e
a	0.01503	0	
e	$12\,426.1 \pm 1434.8$	$12\,678.7 \pm 583.9$	4.10
s_{jmk}	$2.612 \cdot 10^{-2}$	$2.415 \cdot 10^{-2}$	
s_a	$2.320 \cdot 10^{-2}$		
s_g	451.18	210.05	
$t = a / s_g$	$0.648 < t_{tab}$		
r	0.99803	0.99775	

Tsüklodekstriinikomplekside spektrofotomeetria

Kirjanduse andmetel on UV-spektrofotomeetriat siiani kasutatud põhiliselt puhaste ainetega, nagu kaneelhape [11], tsitraal, geraniool, kaneelaldehüüd [13] moodustunud komplekside analüüsiks või kompleksimoodustumise kindlaks tegemiseks.

Käesolevas töös kasutati seda ka niisugust tüüpi ainete segude, s.o. eeterlike õlide ja humala α-hapete analüüsil. Kontsentratsioonid arvutati neeldumis-maksimumis, mille ε oli suurim või mille tipp oli teravaim. Eeldati ka, et toimeaine komponentide suhe kompleksi moodustumise käigus oluliselt ei muutu (vt. p. 2.2.1).

Järgnevas tabelis 3.18 on eeterlike õlide β-CD-ga kooskristallimisel kompleksi-moodustumise tulemused, arvutatud UV-spektrofotomeetria andmete alusel. Iga tulemus on kolme üksikmõõtmise keskmine, suhtelise veaga 10% piires.

Tabel 3.18.

Kooskristallimisel saadud β-CD komplekside iseloomustus (UV-spektrofotomeetria järgi)

Kompleks	Mõõdetav lainepikkus	Saagis lähte-ainete suhtes	Õli saagis kompleksis	Õli sisaldus kompleksis
	λ, nm	%	%	%
Tilliõli-β-CD	273	69,84	80,14	10,54
Loorberiõli-β-CD	273	96,14	72,48	6,86
Köömneõli-β-CD	236	82,10	83,68	9,28

Nagu selgub, on sel meetodil määratud komplekside õlisisaldused kooskõlas gaaskromatograafia tulemustega, s.o. 10,0 või 10,5% köömneõli-β-CD kompleksis ja 6,76 või 9,3...9,7% tilliõlikompleksis [25, 50].

Kooskristallimise meetod on β-CD komplekside saamisel üks levinumaid. Tabelis 3.18 esitatud tulemusi käsitletakse seega lähtealusena muudel meetoditel valmistatud komplekside hindamisel. UV-spektrofotomeetria oli põhiline meetod ekstraktsioonidünaamika jälgimisel ja tekkinud kompleksides toimeaine sisalduse määramisel nii eeterlike õlide (p. 3.3.1) kui humala α-mõruhapete puhul (p. 3.3.2). Käesoleva peatüki alguses määratud eeterlikes õlides leiduvate mudelainete lgε väärtuste kokkulangevus kirjanduses pakutud väärtustega kinnitab täiendavalt UV-spektrofotomeetria kui lihtsa ja kättesaadava meetodi kasutatavust ka keerukate ainesegudega toimuvate protsesside jälgimisel.

3.3.2. Humalaekstraktide HPLC

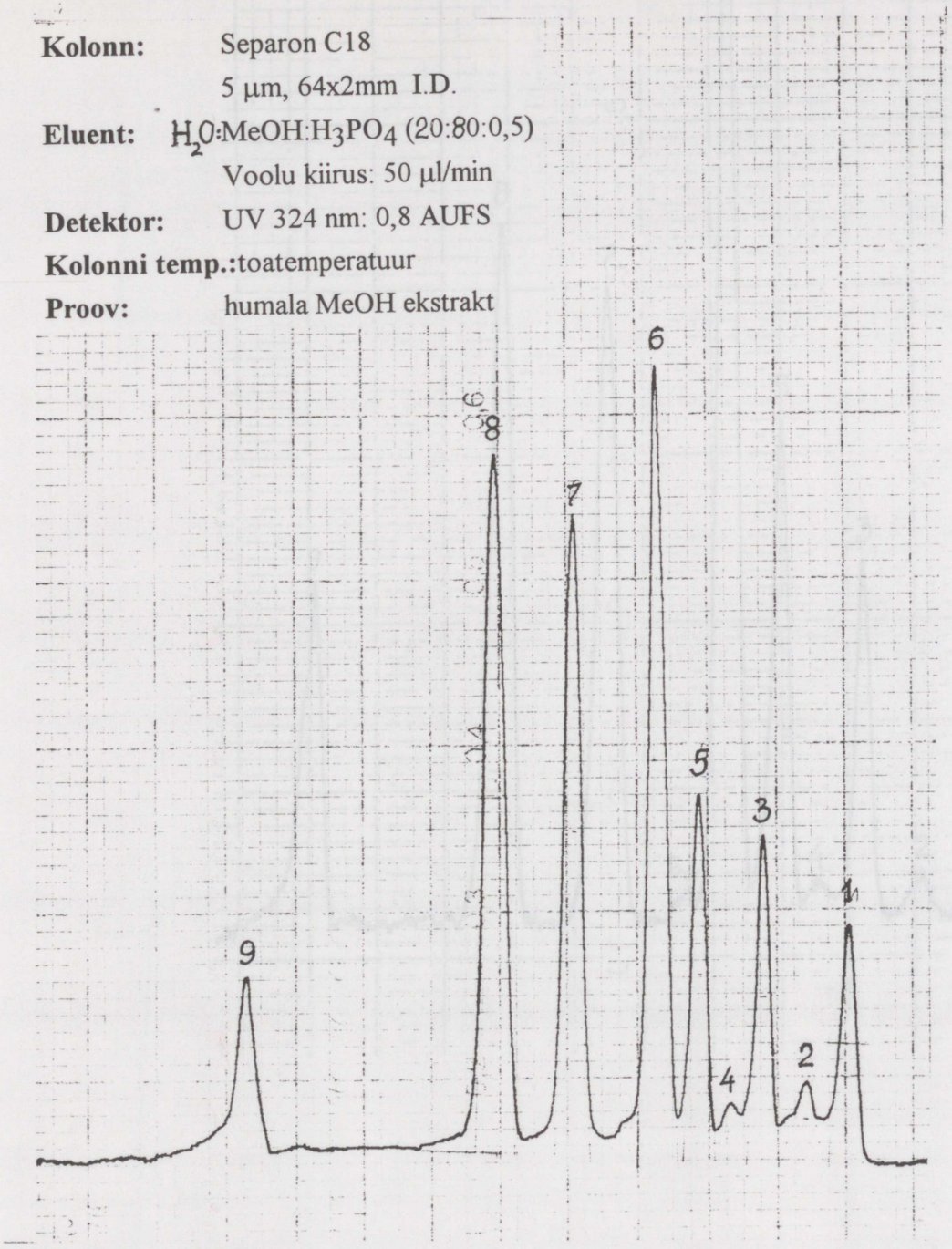
Humalaekstraktide traditsioonilised analüüsimeetodid on konduktomeetriline tiitrimine pliiatsetaadiga ehk LCV (lead conductance value) määramine ja UV-spektrofotomeetria [18]. Kumbki meetod ei ole selektiivne, kuna humalaekstraktide kvaliteedi üle otsustatakse vaid α-hapete sisalduse järgi. Erineva ekstrahendiga on aga humalast võimalik eraldada väga erinevaid toimeaineid (eeterlikke õlisid, α- ja β-happeid, polüfenoolseid ühendeid). Kuigi α-happed on humala toimeainete üks väärtuslikumaid komponente (annavad ~90% mõrudusest), on oluline teada nende üksikute homoloogide suhet, samuti β-hapete ja nende homoloogide suhet. Näiteks kohumulooni sisaldus oleneb humala päritolust (kasvukohast).

Humalaekstraktide koostise kindlakstegemiseks kasutatakse väga palju HPLC-d [21, 53]. Käesolevas töös kasutati selleks 5μm Separon C18 täidetud mikrokolonni (64x2mm). Eluendiks oli metanooli ja vee segu (80:20) H_3PO_4 lisandiga (0,5). Elueerimine toimus isokraatsel rezhiimil (joon. 3.16 ja 3.17). Komponentide identifitseerimine toimus HPLC-seadmesse sisse ehitatud skaneeriva UV-detektoriga (190...360nm). Joonisel 3.16 esitatud kromatogrammi igas tipus võeti selle ühendi spekter. Spektrid on joonistel 3.18 ja 3.19. Võrreldes neid viites [21] esitatud kromatogrammide ja viites [53] esitatud spektritega, identifitseeriti tipud järgnevalt:

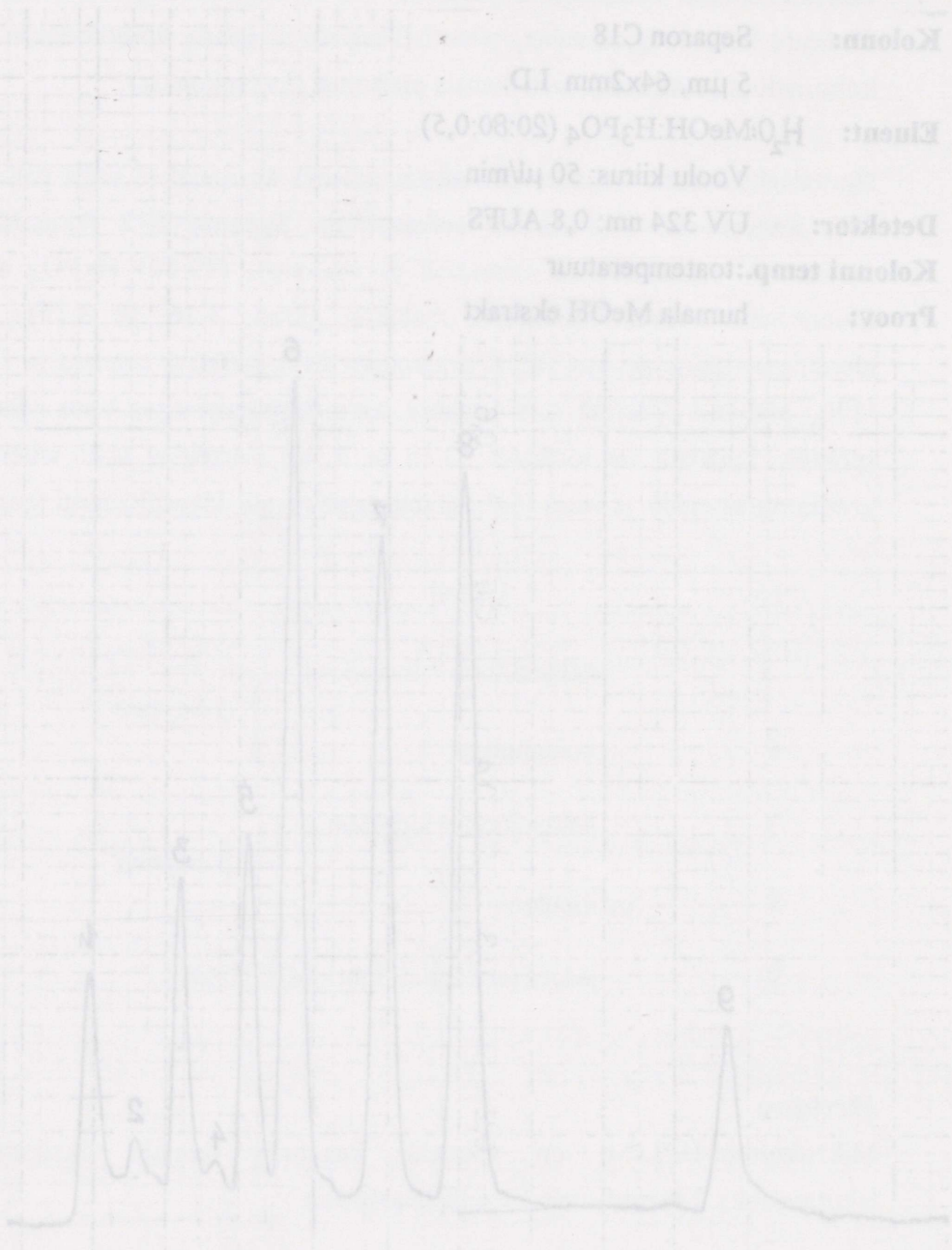
Nr.	Ühend	
5	adhumuloon + humuloon	α-happed
6	kohumuloon	
7	adlupuloon + lupuloon	β-happed
8	kolupuloon	
9	jäägid (eraldatud puhta MeOH-ga)	

Järeldus:

Mikrokolonn-HPLC-d on võimalik kasutada humala üksikute toimeainete lahutamiseks. Meetod sobib ka rutiinanalüüsiks.


Kolonn: Separon C18
5 µm, 64x2mm I.D.
Eluent: H_2O:MeOH:H_3PO_4 (20:80:0,5)
Voolu kiirus: 50 µl/min
Detektor: UV 324 nm: 0,8 AUFS
Kolonni temp.:toatemperatuur
Proov: humala MeOH ekstrakt
9
8
7
6
5
4
3
2
1

Joon. 3.16.



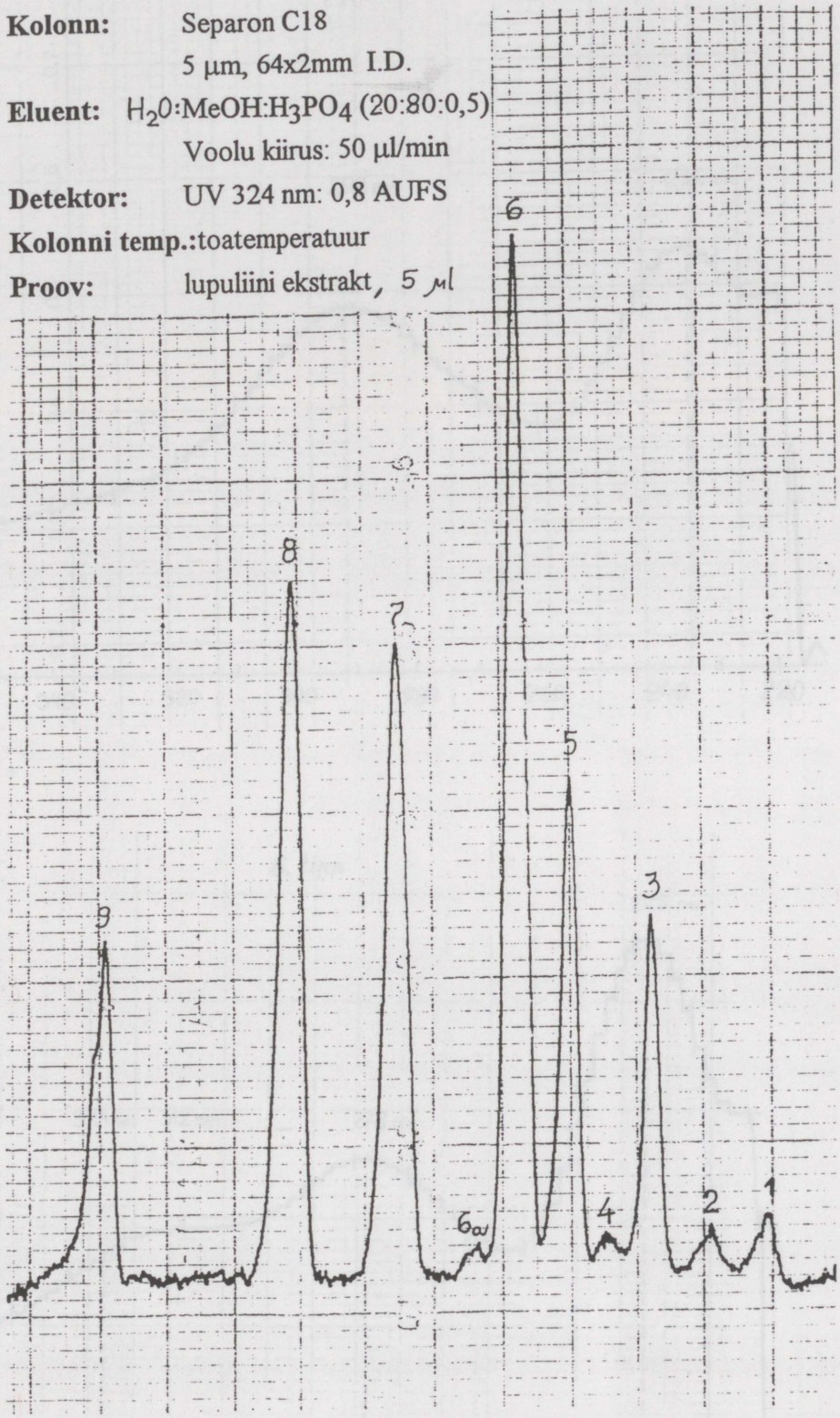
Kolonn: Separon C18
5 µm, 64x2mm I.D.

Eluent: H_2O:MeOH:H_3PO_4 (20:80:0,5)
Voolu kiirus: 50 µl/min

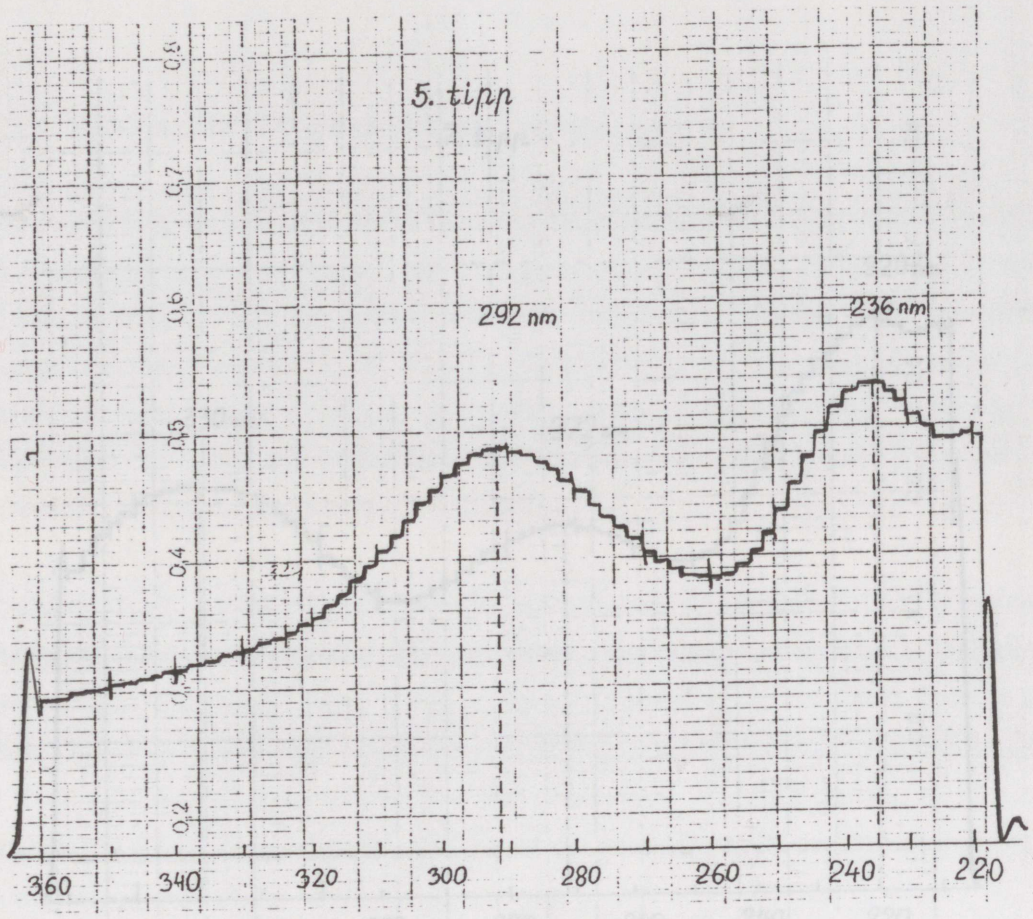
Detektor: UV 324 nm: 0,8 AUFS

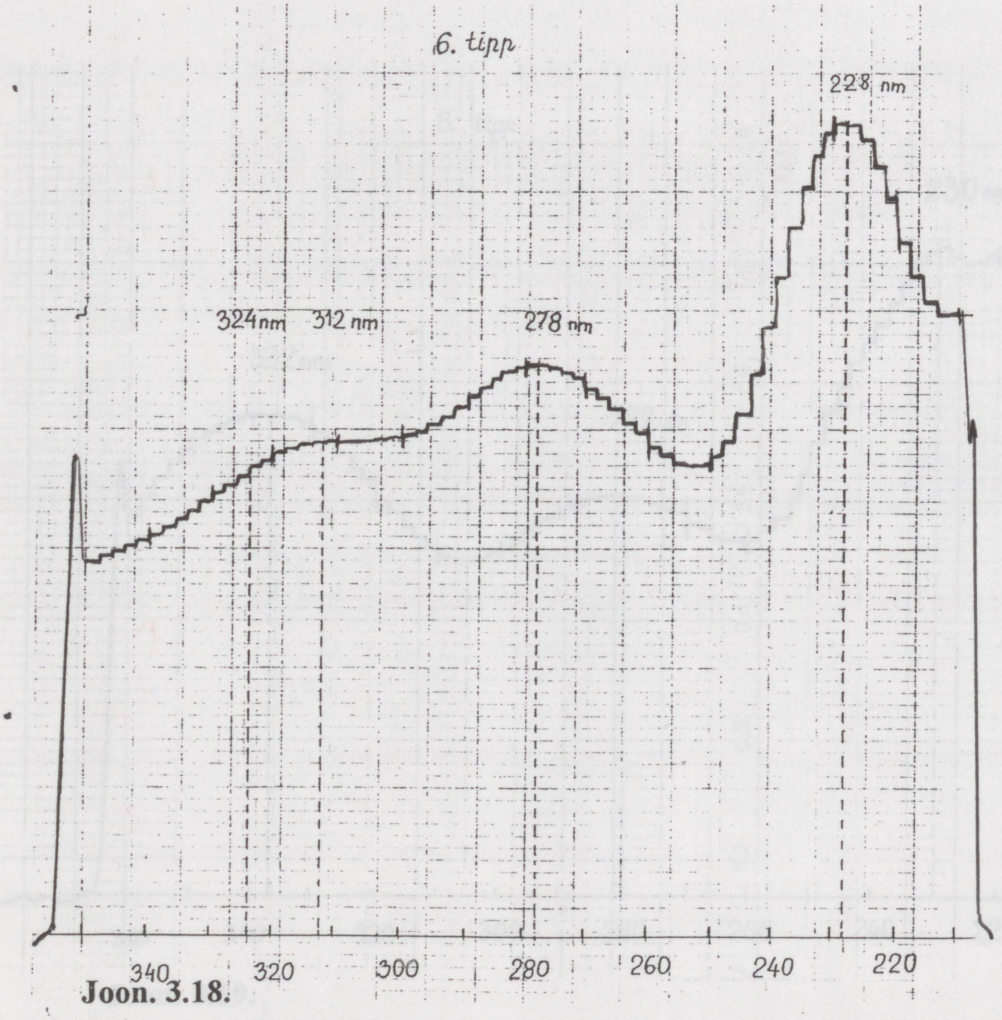
Kolonni temp.: toatemperatuur

Proov: lupuliini ekstrakt, 5 µl

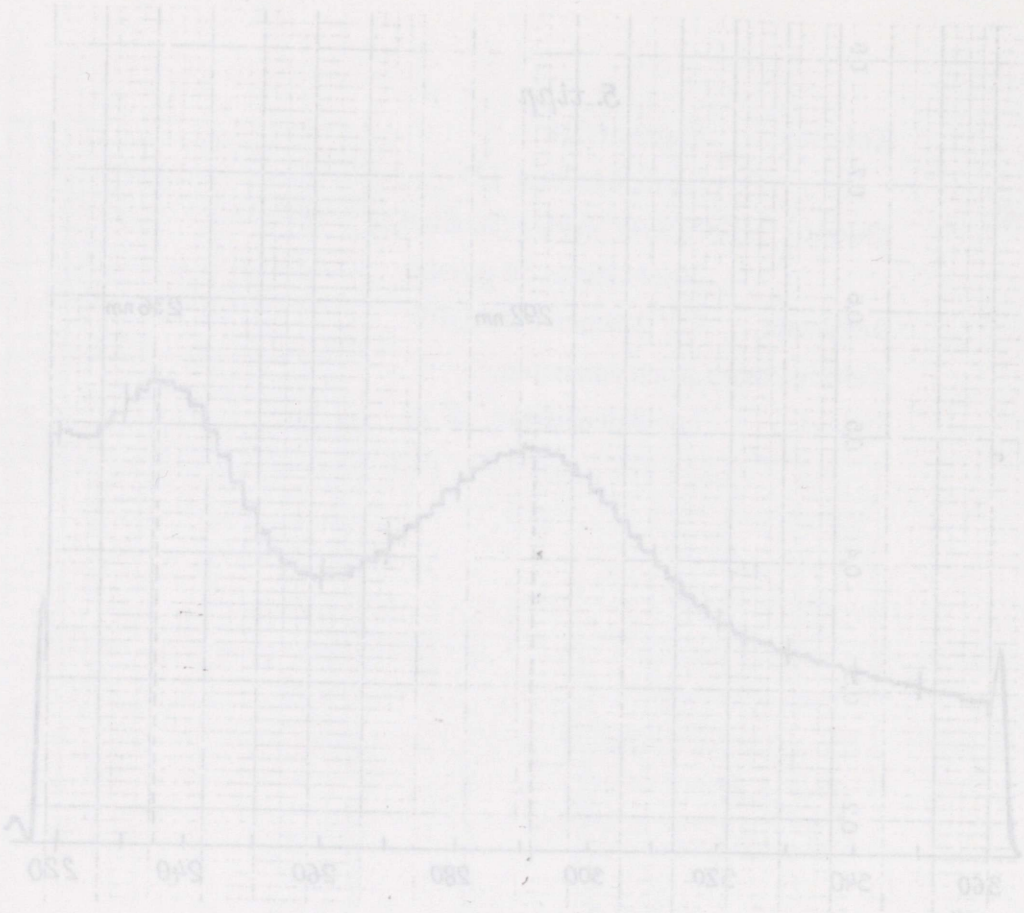


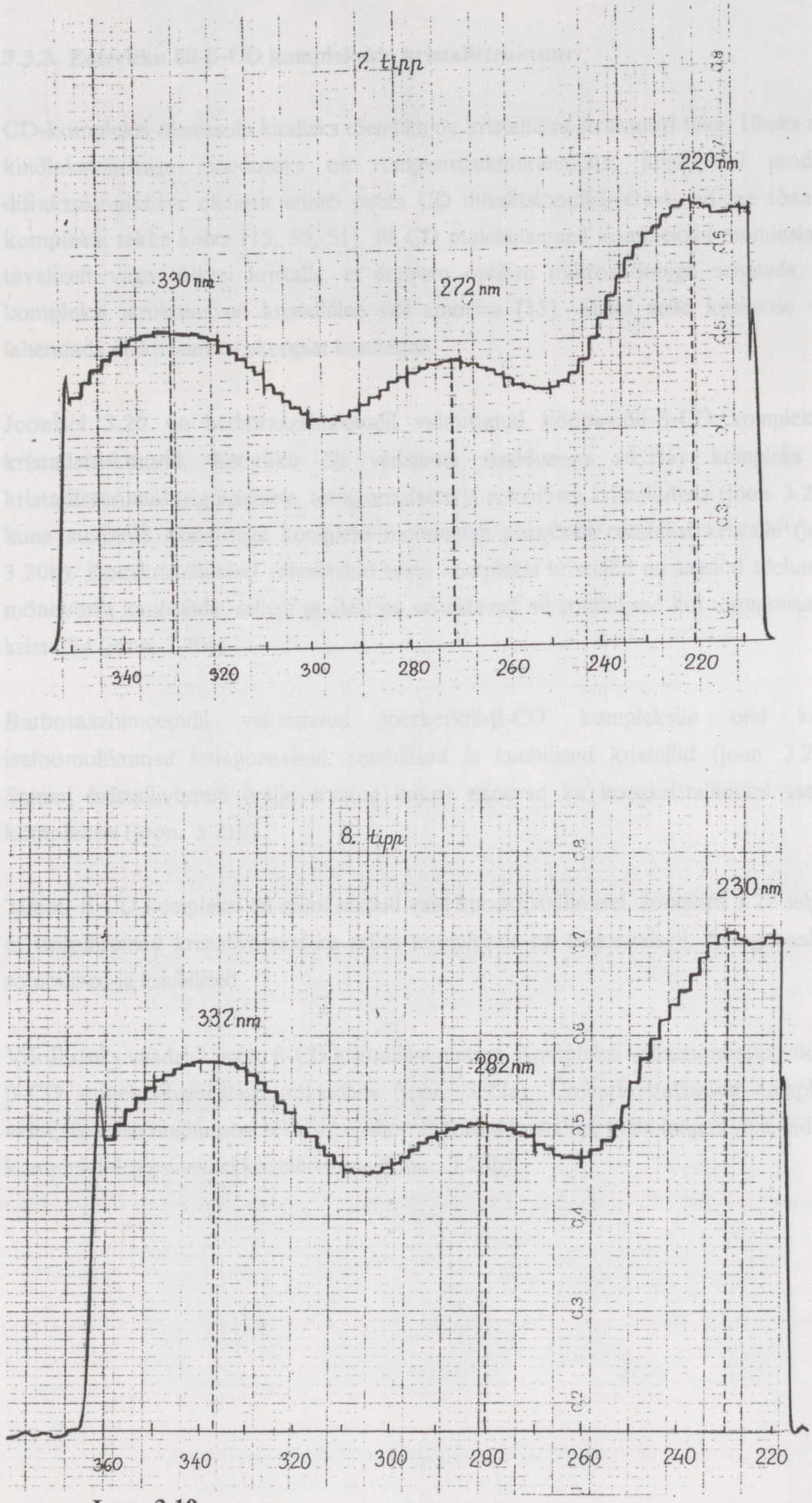
Joon. 3.17.


5. tipp
292 nm
236 nm
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,2
360
340
320
300
280
260
240
220

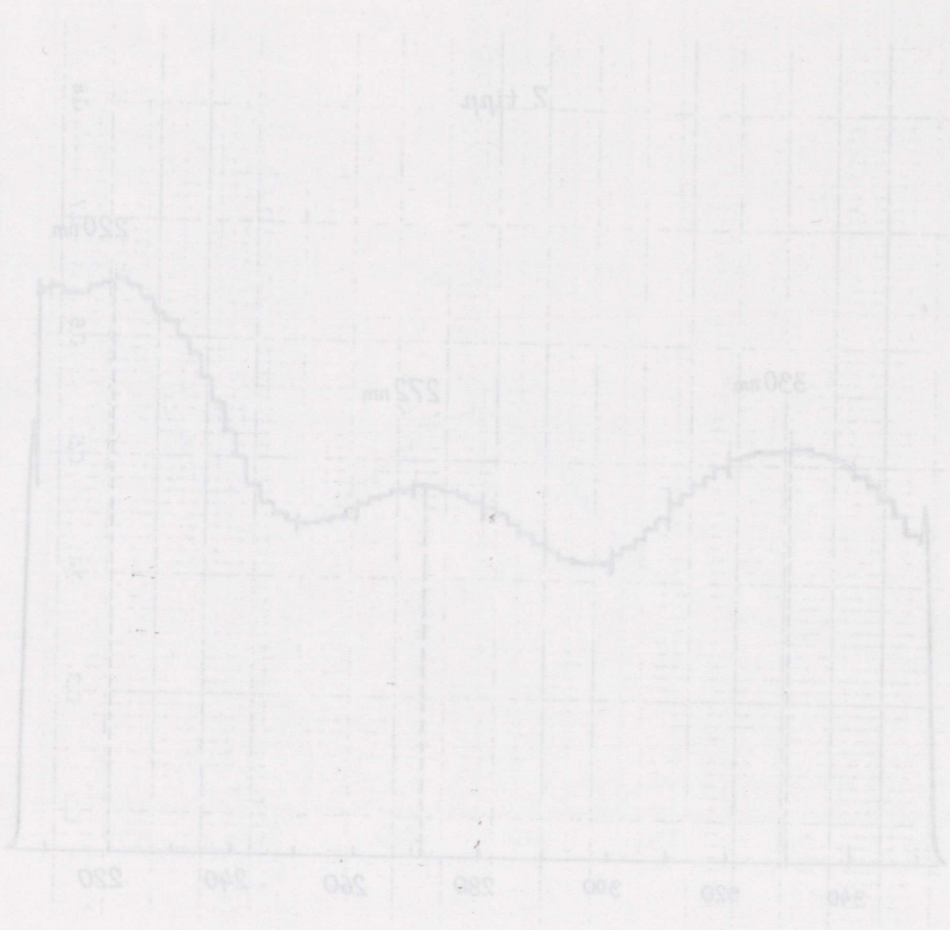

6. tipp
228 nm
324 nm
312 nm
278 nm
340
320
300
280
260
240
220

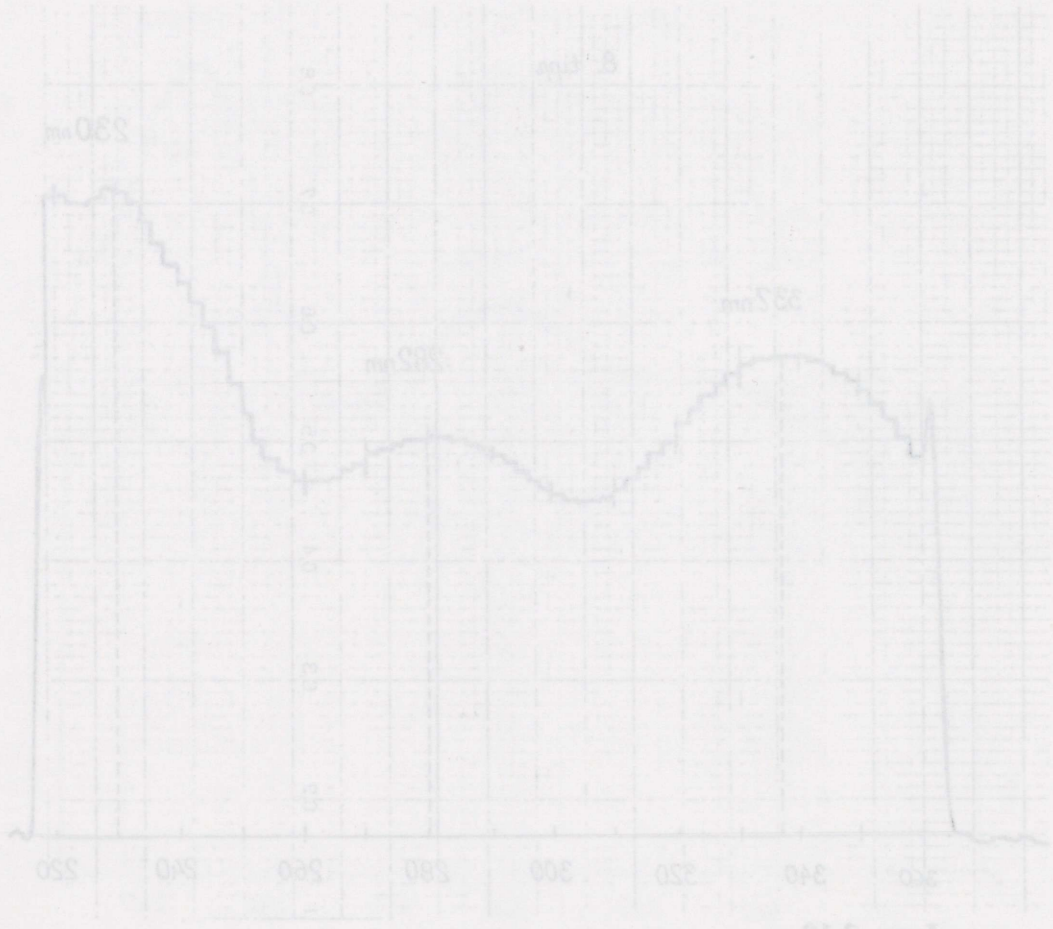
Joon. 3.18.




7. tipp
220nm
330nm
272nm
340
320
300
280
260
240
220
8. tipp
230nm
337nm
282nm
360
340
320
300
280
260
240
220

Joon. 3.19.





3.3.3. Eeterliku õli-β-CD komplekside kristallstruktuur

CD-kompleksi olemasolu kindlaks tõendiks on kristallilise struktuuri teke. Üheks selle kindlakstegemise mooduseks on röntgenstruktuuranalüüs; juhul kui produkti difraktsioonikõver oluliselt erineb puhta CD difraktsioonikõverast, on see tõendiks kompleksi tekke kohta [15, 50, 51]. Et CD molekulaarsed kompleksid moodustavad tavaliselt väga väikesi kristalle, ei õnnestu optilise mikroskoobiga selgitada, kas kompleksi struktuur on kristalliline või amorfne [15]. Siiski, selle küsimuse võib lahendada elektronmikroskoopiat kasutades.

Joonisel 3.20 on barbotaazhimeetodil valmistatud köömneõli-β-CD komplekside kristallstruktuurid. Eeterliku õli väiksema sisaldusega (4,3%) kompleks on kristalliseerunud trigonaalsete, tetragonaalsete ja rombiliste kristallidena (joon. 3.20a), kuna suurema sisaldusega kompleks moodustab peamiselt rombilisi kristalle (joon. 3.20b). Kooskristallimisel valmistatud sama kompleksi kristallid on saanud sõelumisel mõnevõrra kannatada; sellegi poolest on eristatavad nii rombilised kui tetragonaalsed kristallid (joon. 3.20c).

Barbotaazhimeetodil valmistatud loorberiõli-β-CD kompleksile olid kõige iseloomulikumad tetragonaalsed, rombilised ja kuubilised kristallid (joon. 3.21a). Samad kristallivormid (välja arvatud kuup) esinevad ka kooskristallimisel saadud kompleksis (joon. 3.21b).

Tilliõli-β-CD kompleksi on siiani saadud vaid kooskristallimisel. Jooniselt 3.22 selgub, et tüüpilisemad kristallvormid ka selles kompleksis on trigonaalsed, tetragonaalsed, rombilised ja kuubilised.

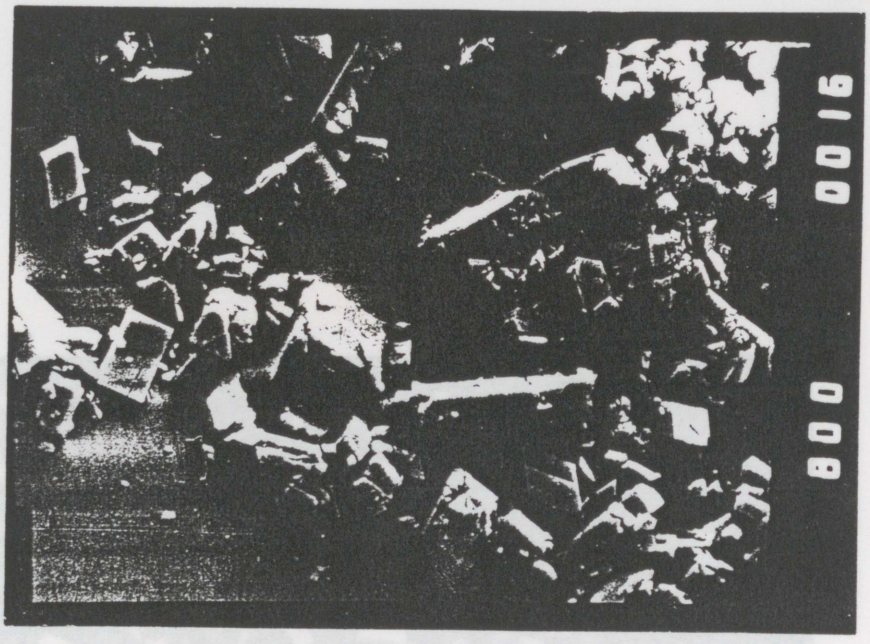
Võrdluseks vaadeldi puhta β-CD kristallilist ehitust. Kompleksi valmistamiseks võetav β-CD esineb ebamääraste tükkidena (joon. 3.23a). Ümberkristallimisel kompleksi valmista-mise tingimustes tekkisid ebakorrapärased kristallid, mille hulgas võib leida ka kompleksides esinevaid kristallivorme (joon. 3.23b).

Joon. 3.20. Köömneõli β-CD kompleksi kristallstruktuur.
a) barbotaazhimeetod, 988 ×, õli sisaldus 4,26%
b) barbotaazhimeetod, 395 ×, õli sisaldus 13,19%
c) kooskristallimine, 3050 ×, õli sisaldus 9,28%

a

b

c



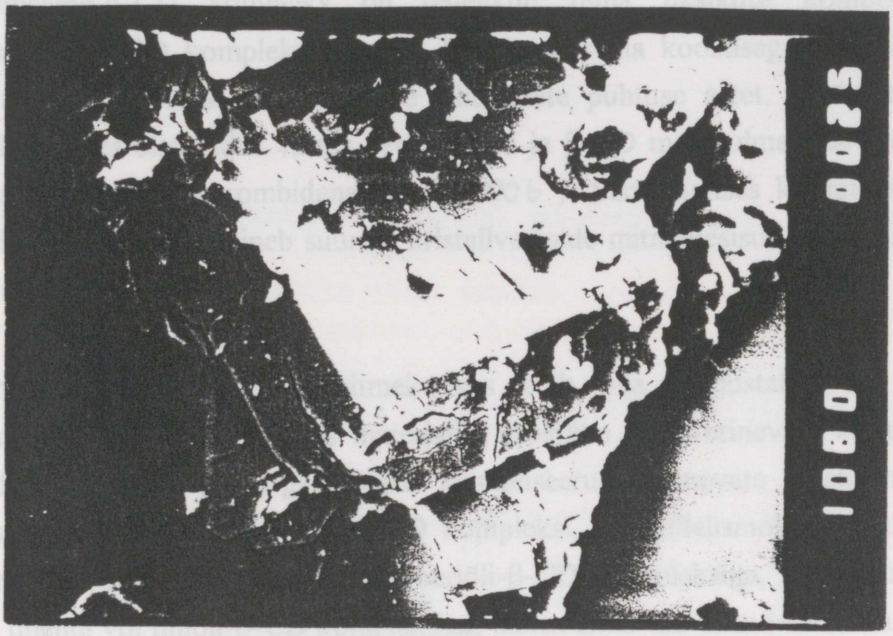
a

b

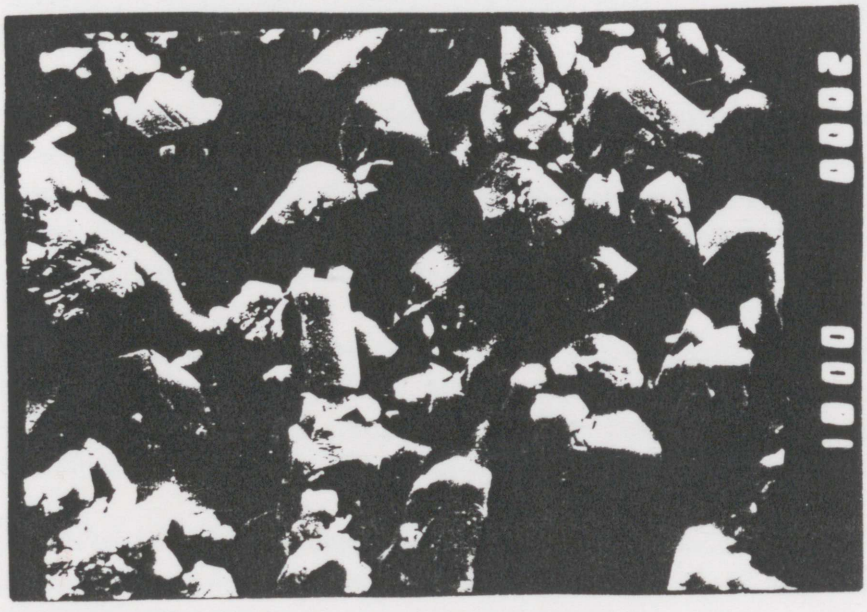
Joon. 3.21. Loorberiõli β-CD kompleksi kristallstruktuur.
a) barbotaazhimeetod, 400 ×, õli sisaldus 7,93%
b) kooskristallimine, 900 ×, õli sisaldus 6,86%

Joon. 3.22. Tilliõli β-CD kompleksi kristallstruktuur, kooskristallimine, 900 ×, õli sisaldus 5,46%

2000
1000



a



b

Joon. 3.23. Puhta β-tsüklodekstriini kristallstruktuur,
a) enne kompleksi valmistamist 900×
b) ümberkristallitud kompleksi valmistamise tingimustel 900×

Järeldused:

1. Toimeaine-β-CD kompleks on tegelikult tema üksikute komponentidega moodustunud β-CD komplekside segu. Homogeensema koostisega kompleksi võib saada, tõstes kompleksi-moodustamise lähteainete puhtuse astet. Köömneõli-β-CD kompleks, milles õlisisaldus vastas eeterliku õli ja β-CD molekulmasside suhtele 1:1, kristalliseerus põhiliselt rombidena (joon. 3.20 *b*). Samasuguses kompleksis, milles õlisisaldus oli väiksem, esineb suurem kristallvormide mitmekesisus. Osa neist võivad olla puhta β-CD kristallid.

2. Erinevate kristallivormide mitmekesisus võib olla põhjustatud ka erinevate komponentide rohkusest taimses materjalis. Eeterlike õlide erinevate komponentide üksikud kompleksid β-CD-ga võivad kristalliseeruda erinevate kristallvormidena. Näiteks võib võrrelda köömneõli-β-CD kompleksi, mis külalismolekulidena sisaldab põhiliselt karvooni ja limoneeni, loorberiõli-β-CD kompleksiga, milles on üle 30 erineva ühendi või tilliõli-β-CD kompleksiga, milles erinevaid ühendeid on ka üle 25.

JÄRELDUSED

1. β-tsüklodekstriini lahusega on võimalik eraldada taimsest koest toimeaineid. Töötati välja uudne samaaegse ekstrakstiooni ja kompleksimoodustamise metoodika, mille eeliseks on vahetult taimsest materjalist stabiilsete aromatisaatorikomplekside saamine, eraldamata eelnevalt sealt toimeainet.

2. Produkti, s.o. kristallilise β-CD kompleksi saagis ja eraldatava toimeaine kogus oleneb järgmistest teguritest:

   β-CD ja taimse materjali suhe,
   β-CD lahusti,
   taimse materjali peenestatus,
   temperatuur,
   protsessi kestvus.

3. β-CD ja taimse materjali suhe oleneb taimse materjali toimeaine sisaldusest. Parimaid tulemusi annab β-CD ja taimse materjali suhe, mis vastab β-CD molekulmassi ja toimeainekomponentide keskmise molekulmassi suhtele, eeldusel et tekivad 1:1 kompleksid. Peenestamata taimse materjali puhul on vajalik väike β-CD ülehulk.

4. Hüdrofoobsete külalismolekulide (eeterlike õlide komponendid) ekstraktsioon taimsest materjalist on võimalik vaid siis, kui β-CD lahuses on mõni orgaaniline solvent. Suhteliselt hüdrofiilseid toimeaineid (humala α-happed) on võimalik taimsest kandjast eraldada ka üksnes β-CD vesilahusega, mida võib pidada ökoloogiliselt puhtaks tehnoloogiaks.

5. Ülalloetletud tegurite alusel võrreldi erinevaid ekstraktsioonimooduseid: aurufaasis oleva toimeaine püüdmist β-CD lahusesse (barbotaazhimeetod), kuuma β-CD lahuse tsirkulatsiooni läbi taimse materjali kihi (ekstraktsioon) ja kuuma β-CD lahuse ühekordset juhtimist läbi tiamse materjali kihi (perkolatsioon).

6. Optimaalseks ekstraktsioonimooduseks osutus perkolatsioon, millega saadi suurim ekstraheeritava toimeaine saagis. Humalast eraldus 95 % α-mõruhappeid järgmistel tingimustel:

   ekstrahent: 5,5 %-line β-CD vesilahus;
   materjali olek: peenestatud;
   ekstrahendi mahtkiirus: 0...9 min. 1,44 ml/min, edasi 0,80 ml/min.;
   temperatuur: 70°C;
   ekstraktsiooni aeg: 70 min.

Perkolatsioon on ka ökonoomsem. Sama koguse toimeaine eraldamiseks kulub umbes 6 korda vähem β-CD kui retsirkulatsioonekstraktsiooniga.

7. Toimeaine - β-CD komplekside kristallimisel saadi tahke aromatisaatorina kätte 35...50 % lähteainetest. Saagis oleneb β-CD lahuse kontsentratsioonist ja optimaalseteks osutusid:

    köömneõli-β-CD (barbotaazh) - 3,0% β-CD,
    loorberiõli-β-CD (barbotaazh) - 3,26% β-CD,
    köömneõli-β-CD (ekstraktsioon) - 3,6 % β-CD.

    Võrdluseks: humala α-happed-β-CD (perkolatsioon, vedel produkt) 5,5% β-CD.

    CD-*trapil* on külalismolekuli küllastuse maksimum, mille määrab molekulmasside suhe. Tekkinud produkt on optimaalsest kõrgema β-CD kontsentratsiooniga β-CD kristallide ja kompleksi kristallide segu.

8. Ekstraktsiooniprotsesside jälgimiseks ekstraktis ja toimeaine koostise detekteerimiseks sobib UV-spektrofotomeetria. Saadud andmete usaldatavust kinnitab kirjandusest leitud ekstinktsiooniparameetrite kokkulangevus eksperimentaalselt määratutega. Viimastele anti ka statistiline hinnang.

9. Ekstraheeriva toimeaine ja ekstrakti koostise täpsemaks kindlasktegemiseks sobib HPLC. Kompleksi tekkimise üle võib otsustada ka kaudsete meetoditega (produkti kristallstruktuur, kompleksi stabiilsus).

10. Füüsikalis-keemilise analüüsi tulemused näitasid, et eelnevalt eraldatud toimeainest saadud kompleksidel on samad omadused kui väljatöötatud üheastmelise protsessi käigus saadutel.

Kirjandus

1. Farrell K.T. Spices, condiments and seasonings. Van Nostrand Reinhold Company Inc. New York, 1985.

2. Rothe M. Introduction to aroma research. Academic-Verlag, Berlin, 1988, 138 pp.

3. Schteinmann A.A. Cyclodextrins. Zhurnal Vsesojuznogo Khimicheskogo Obšestva im. Mendelejeva, 1985, 30, N$_o$ 5, 514-518 (in Russian).

4. Paulson A., Connors K.A. Solvatochromism and the nature of the interior of the cyclodextrin cavity. In: Minutes 5th Int. Symp. on Cyclodextrins, Paris 28-30 March 1990. Edit de Santé (1990), 71-76.

5. Cramer F., Saenger W., Spatz H.-Ch. Inclusion compounds. XIX. The formation of inclusion compounds of _- cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics. J. Am. Chem. Soc., 1967, 89, N°1, 14-20.

6. Higuchi T., Connors K.A. Phase solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instr., 1965, 4, 117-212.

7. Lindner K., Szente L., Szejtli J. Food flavouring with ß-cyclodextrin-complexed flavour substances. Acta Aliment., 1981, 10, N°3, 175-186.

8. Dornier M., Jallageas J.C., Serpelloni M., Mentink L., Crouzet J. Determination of association constants between ß-cyclodextrin and aroma compounds. In: [4], 230-233.

9. Szente L., Harangi J., Szejtli J. Long term storage stability studies on flavour-ß-cyclodextrin complexes. In: O. Huber, J. Szejtli (eds.). Proc. 4th Int. Symp. on Cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers (1988), 545-549.

10. Dalbe B., Willemin C.Characterization of inclusion compound with cyclodextrins using solubility parameters method. In: [4], 411-417.

11. Uekama K., Otagiri M., Kanie Y., Tanaka S., Ikeda K. Inclusion complexes of cinnamic acids with cyclodextrins. Mode of inclusion in aqueous solutions. Chem. Pharm. Bull., 1975, 23, N°7, 1421-1430.

12. Van Etten R.L., Sebastian J.F., Clowes Q.A., Bender M.L. Acceleration of phenyl ester cleavage by cycloamyloses. A model for enzymatic specifity. J. Am. Chem. Soc. 1967, 89, 3242-3253.

13. Szente L., Gál-Füzy M., Szejtli J. Tea aromatization with beta-cyclodextrin complexed flavours. Acta Aliment., 1988, 17, N°2, 193-199.

14. Szente L. Szejtli J. Molecular encapsulation of natural and synthetic coffee flavour with ß-cyclodextrin. J. Food Science, 1986, 51, N°4, 1024-1027.

15. Szejtli J., Szente L., Bánky-Elöd E. Molecular encapsulation of volatile, easily oxidizable labile flavour substances by cyclodextrins. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 1979, 101, NN°1-2, 27-46.

16. Chang Ch.-J., Choi H.-S., Wei Y.-Ch., Mak V., Knevel A.M., Madden K.M., Carlson G.P., Grant D.M., Diaz L., Morin F. Molecular specifity of cyclodextrin complexation. In: R.B. Friedman (ed.). Biotechnology of amylodextrin oligosaccharides. ACS Symposium Series, 458, 1991, 296-316.

17. Djedaïni F., Perly B. Multinuclear NMR answers to structural problems in the field of cyclodextrin chemistry and technology. In: [4], 124-129.

18. Fertmann G.I., Muravitzkaya L.V. Handbook for laboratory workers of breweries. Moscow: Lyegkaya i pištševaya prom.,1982, 208 pp.(in Russian)

19. Persidskaya K.G., Chipiga A.P. Handbook for workers of essential oils manufactories. Moscow: Lyegkaya i pištševaya prom., 1981, 144 pp.(in Russian)

20. Styskin Ye.L., Itzikson L.B., Braude Ye.V. Practical High Performance Liquid Chromatography. Moscow: Khimiya, 1986, 288 pp.(in Russian).

21. Bodkin C.L., Clarke B.J., Kavanagh T.E., Moulder P.H., Reitze J.D., Skinner R.N. Preparation and analysis of liquid CO^2 hop extracts. ASBC Journal, 1980, 38,N°4, 137- 142.

22. Lyaštšenko N.I. Study of bitter substances in hops lupulin and their utilization efficiency. Prikl. biokhim. i mikrobiol., 1978, 14, issue 1, 144-149 (in Russian).

23. Szejtli J., Szente L., Kolta R., Lindner K., Zilahi T., Koeszegi B. A method for preparation of cyclodextrin inclusion complexes with natural and artificial spices, aroma and flavour compounds. Hung. pat. 174 699 (1979) (in Hungarian).

24. Berschtein I.Ya., Kaminsky Yu. L. Spectrophotometric analysis in organic chemistry. Leningrad: Khimiya, 1986, 200 pp. (in Russian).

25. Szejtli J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1982, 296 pp.

26. Ikeda R.M., Stanley W.L., Vannier S.H., Spitler E.M. The monoterpene hydrocarbon composition of some essential oils. J. Food Science, 1962, 27, N°5, 455-458.

27. Kekelidze N.A., Goryaev M.I., Dembitzky A.D., Krotova G.I., Pruidze B.G. Study of substances belonging to the composition of essential oils. XXVI. Investigation of the terpene fraction of the essential oil from leaves and stems of laurel *(Laurus nobilis L.)*. Izv. Akad. Nauk. Kaz. SSR, 1966, N°4, 86-91 (in Russian).

28. Buttery R.G., Black D.R., Guadagni D.G., Ling L.C., Connolly G., Teranishi R.California bay oil. I. Constituents, odor properties. J. Agr. Food Chem., 1974, 32. N°5 773-777.

29. O'Connor R.T., Goldblatt L.A. Correlation of ultraviolet and infrared spectra of terpene hydrocarbons. Anal. Chem., 1954, 26, N°11, 1726-1737.

30. Masada Y. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1976, 334 pp.

31. Nitz S., Spraul M.H., Drawert F. Gas chromatographic and sensory analysis of dill blossoms *(Anethum graveolens L.)*. Chem. Microbiol. Technol. Lebensm., 1991, 13, 183-186.

32. Goryaev M., Pliva I. Investigation methods of essential oils. Alma-Ata: Izd.-vo Akad. Nauk. Kaz. SSR, 1962, 752 pp. (in Russian).

33. Koul G.L., Nigam S.S. Studies on Indian essential oils. Part II. Colorimetry. Perfume and Essential Oil Rec., 1966, 57, N°3, 156-159.

34. Ravid U., Bassat M., Putievsky E., Weinstein W., Ikan R., Isolation and determination of optically pure carvone enantiomers from caraway *(Carum carvi L.)*, dill *(Anethum graveolens)*, spearmint *(Mentha spicata)* and *Mentha Longifolia (L.) Huds.* Flav. Fragr. J. 1987, 2, 95-97.

35. Reilly J., Drumm P.J. Determination of carvone in dill oil. Analyst, 1928, 53, 209-211.

36. Pohloudek-Fabini R., Göckeritz D. Zur Microanalyse von Carvone. II. Mitt. Mikroanalytik Ätherischer Öle. Die Nahrung, 1963, 7, N°3, 122-128.

37. Stadler P.A. Gas-chromatographische Untersuchung der Ketone des Lavandinöls. Helv. Chim. Acta, 1960, 43, N°196, 1601-1621.

38. Verma S.M. Carvone analysis by ultra-violet absorption in Indian dill oils *(Anethum sowa)*. Current Science, 1960, 29, N°9, 345-346.

39. Schmidt L.G. Hop bitter substances and methods of their analysis. Moskow: CINTI Pishcheprom, 1964, 64 pp.

40. Stevens R. The chemistry of hop constituents. Chem. Rev., 1967, 67, No. 1, 19-71.

41. Pobozsny K., Kernoczi L., Tetenyi P., Hethelyi I., Szejtli J. Assay of volatile oil-cyclodextrin complexes by pyrolysis gas-chromatogaphy. Planta Medica, 1981, 42, No 3, 255-259.

42. Betts T.J. The carvone and dillapiole content of dill fruits by gas chromatography without preliminary destillation, J.Pharm. Pharmac., 1969, 21, 259-262.

43. Gillam A.E., Stern E.S. Electronic Absorption spectroscopy, Arnold, London, 1954.

44. Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C. Spectrometric idendification of organic compounds. Mir, Moskva,1977, 590 pp. (in Russian).

45. Scott A.I. Interpretation of the UV spectra of natural products. N.Y.: Pergamon Press, 1964, 443 pp.

46. Lang L. Absorption spectra in the ultra violet and visible region. vol.II N.Y.: Academic Press, 1961, 425 pp.

47. Fluka Chemika-Biochemika, Fluka Chemie AG, 1993, 1528 pp.

48. Book S.A. Statistics. Basic Technigues for Solving Applied Problems. N.Y.: McGraw-Hill Book Company, 1981.

49. Sautin S.N., Punin A.Ye. The world of computers and chemical engineering. Leningrad: Khimija, 1991, 143 pp. (in Russian).

50. Szente L., Szejtli J. New results on the molecular encapsulation of flavours by cyclodextrins. In: Proc. 2 nd Wartburg Aroma Symp., 1987. Abhandl. Akad. Wissensch. DDR, 1988, 2N, 101-106.

51. Sankarikutty B., Marayanan C.S. Molecular encapsulation of fresh ginger flavour. Kogumikus [4], lk.600-603.

52. Köstner A., Ploom T., Tiivel T. Conformational computations on cyclodextrins and their complexes. 7th Nordic Symposium on Computer Simulation. Abstracts, Espoo, Finland, 1993, 61.

53. Sandra P., Steebeke G., Ghys M., Schomburg G. Micro liquid chomatography - diode array detection of hop bitter acids. J. High Res. Chrom., 1990, 13, July, 527-528.