

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ Σ. ΜΗΝΙΩΤΗ
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΟ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΘΗΝΑ 2009

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ Σ. ΜΗΝΙΩΤΗ

ΧΗΜΙΚΟΥ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΟ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ	(Καθηγητής Γ.Π.Α., Επιβλέπων)
Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ	(Καθηγητής Γ.Π.Α., Μέλος)
Γ. ΜΟΥΣΔΗΣ	(Ερευνητής Β' Ε.Ι.Ε., Μέλος)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ	(Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ	(Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Γ. ΜΟΥΣΔΗΣ	(Ερευνητής Β' Ε.Ι.Ε.)
Μ. ΚΩΜΑΪΤΗΣ	(Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Ε. ΜΠΑΚΕΑΣ	(Επικ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)
Ν. ΘΩΜΑΪΔΗΣ	(Επικ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)
Π. ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ	(Επικ. Καθηγητής Γ.Π.Α.)

ΑΘΗΝΑ 2009

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Γενικό Τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα»

(Νόμος 5343/1932, άρθρο 202)

Αφιερώνεται στους γονείς μου Σωκράτη και Γεωργία
και στον αρραβωνιαστικό μου Αθανάσιο.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 με τίτλο 'Όλική αντιοξειδωτική ενεργότητα, ελεύθερες ρίζες και βαρέα μέταλλα στο ελαιόλαδο: Δείκτες βιολογικής αξίας, σταθερότητας και γεωγραφικής προέλευσης'. Το έργο υλοποιήθηκε στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης και συγχρηματοδοτήθηκε κατά 80% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και κατά 20% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας.

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γενικού Τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος έγινε από τον Καθηγητή Κ. Γεωργίου, ο οποίος είχε την επίβλεψη των προσπαθειών μου και προς τον οποίο εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες, για την συνεχή συνδρομή του στον προγραμματισμό της δουλειάς μου, τις σημαντικές συμβουλές του, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας, καθώς και για την πολύτιμη και συνεχή καθοδήγηση του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν στη διόρθωση της παρούσας διατριβής, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους, οι οποίες συνετέλεσαν στην ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ θερμά τον Διευθυντή του Εργαστηρίου, Καθηγητή Μ. Πολυσίου για τη δυνατότητα εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας, για την δυνατότητα χρήσης του εξοπλισμού του Εργαστηρίου και την δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας για την οικονομική ενίσχυση που προσέφερε σε εμένα και το Εργαστήριο κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την ελαιοπαραγωγική εταιρία Μινέρβα Α.Ε. για την ευγενική προσφορά των χαρτογραφημένων δειγμάτων ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις της παρούσας εργασίας.

Δεν θα παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και ιδιαίτερα την Κ. Πουλλή και τον Ε. Κωμαίτη, για το ευχάριστο περιβάλλον, την βοήθεια και τη φιλία που μου προσέφεραν κατά το διάστημα της παραμονής μου στο Εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τον αρραβωνιαστικό μου, οι οποίοι στάθηκαν στο πλευρό μου και στήριξαν όλες τις προσπάθειές μου με υπομονή.

Αθήνα, Οκτώβριος 2009

Αικατερίνη Σ. Μηνιώτη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
SUMMARY	vi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Μέθοδοι προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας	1
1.1. Η μέθοδος DPPH	5
1.2. Η μέθοδος ABTS	7
1.3. Η μέθοδος FRAP	8
1.4. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu	9
1.5. Μέθοδοι Φωταύγειας	11
1.5.1. Χημειοφωταύγεια	11
1.5.1.1. Συστήματα χημειοφωταύγειας υγρής φάσης	12
1.5.1.2. Συστήματα χημειοφωταύγειας σε αέριο φάση	15
1.5.2. Βιοφωταύγεια	15
1.5.2.1. Χαρακτηριστικά βιοφωταύγειας	16
1.5.2.2. Προσαρμογή της βιοφωταύγειας σε ζωντανούς οργανισμούς	16
1.5.2.3. Βιοφωταυγείς οργανισμοί	17
1.5.2.4. Εφαρμογές της βιοφωταύγειας	19
1.6. Σύνοψη	19
2. Τεχνική εισαγωγής δείγματος σε ροή - Flow Injection (FI)	22
2.1. Ιστορική εξέλιξη-Η τεχνική της συνεχούς αεριοδιαχωριζόμενης ροής	22
2.2. Γενικές αρχές λειτουργίας της τεχνικής FI	23
2.3. Θεωρητικά στοιχεία της FI	25
2.3.1. Διασπορά του δείγματος	26
2.3.2. Αμοιβαία διασπορά δείγματος και αντιδραστήριου	28
2.3.3. Διασπορά και εφαρμογές συστημάτων FI	28
2.3.4. Επίδραση του αντιδραστήρα στη μορφή των καμπυλών FI	29
2.4. Οργανολογία αναλυτή FI	31
2.4.1. Συστήματα προώθησης αντιδραστηρίων	31

2.4.2. Συστήματα εισαγωγής δείγματος	32
2.4.3. Αντιδραστήρες και δίαυλοι συστήματος FI	33
2.4.4. Ανιχνευτές	34
2.4.5. Συστήματα καταγραφής και επεξεργασίας σημάτων	34
2.5. Συστήματα FI	35
2.6. Ο φωτοπολλαπλασιαστής	37
2.6.1. Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο	38
2.6.2. Η δευτερογενής εκπομπή	39
2.6.3. Μορφή και βασικές αρχές του φωτοπολλαπλασιαστή	39
2.6.4. Η φωτοκάθοδος	40
2.6.5. Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής	41
2.6.6. Το σκοτεινό ρεύμα	42
2.6.7. Χρηστικές παράμετροι	42
2.6.8. Εφαρμογές του φωτοπολλαπλασιαστή	43
3. Συστήματα εισαγωγής δείγματος σε ροή δεύτερης γενεάς - Sequential Injection (SI)	44
3.1. Εισαγωγή στην τεχνική διαδοχικής εισαγωγής SI	44
3.2. Σμίκρυνση της οργανολογίας	45
3.3. Ανάμιξη και διάχυση	46
3.4. Η τεχνική SI και ο σχεδιασμός lab-on-valve	47
3.5. Οπτικές ίνες	47
3.6. Ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (DAD)	49
3.7. Μέθοδοι	52
3.7.1. Μέθοδοι βασιζόμενες σε αντιδραστήρια (ενός σημείου)	52
3.7.2. Έγχυση Μικροσφαιριδίων	53
3.7.3. Χρωματογραφία συγγένειας SI	53
3.7.4. Sequential injection chromatography	54
3.7.5. Κατεργασία δείγματος	55
4. Το ελαιόλαδο	56
4.1. Ιστορική αναδρομή	56
4.2. Το δέντρο	56
4.3. Η ελιά	57
4.4. Η παραγωγή του ελαιολάδου	57

4.4.1. Η συλλογή του ελαιοκάρπου	58
4.4.2. Η αποθήκευση του ελαιοκάρπου	59
4.4.3. Τα στάδια παραγωγής του ελαιολάδου από τον καρπό	60
4.5. Η σύσταση του ελαιολάδου	61
4.5.1. Τριγλυκερίδια	62
4.5.2. Πολυφαινόλες	64
4.5.3. Βιταμίνες	66
4.5.4. Χρωστικές	67
4.5.5. Ιχνοστοιχεία	68
4.5.6. Υδατάνθρακες	69
4.5.7. Αλειφατικές αλκοόλες	69
4.5.8. Στερόλες	69
4.6. Η αποθήκευση του ελαιολάδου	70
4.6.1. Περιέκτες αποθήκευσης	70
4.6.2. Χώροι αποθήκευσης	71
4.6.3. Θερμοκρασία αποθήκευσης	71
4.7. Βιολογικές και άλλες ιδιότητες του ελαιολάδου	72
4.8. Ελαιόλαδο και Υγεία	73
4.9. Η ποιότητα του ελαιολάδου	74
4.10. Άλλα βρώσιμα έλαια	76
4.10.1. Σησαμέλαιο	76
4.10.2. Ηλιέλαιο	76
4.10.3. Σογιέλαιο	76
4.10.4. Αραβοσιτέλαιο	77
4.11. Η νοθεία του ελαιολάδου	77
ΣΤΟΧΟΙ	80
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
5. Ανάπτυξη ταχείας μεθόδου βιοφωταύγειας για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας και εφαρμογή σε εκχυλίσματα ελαιολάδου	81
5.1. Εισαγωγή	81
5.2. Πειραματικό μέρος	83
5.2.1. Αντιδραστήρια και διαλύματα	83

5.2.2. Προετοιμασία δείγματος	84
5.2.3. Οργανολογία	84
5.2.4. Μετρήσεις βιοφωταύγειας σε σύστημα FI	86
5.2.5. Μέθοδος υπολογισμού της ενεργότητας της υπεροξειδάσης (HRP)	87
5.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	87
5.3.1. Βελτιστοποίηση	88
5.3.1.1. Επιλογή διαλύτη	88
5.3.1.2. Επιλογή συστήματος διαύλων	89
5.3.1.3. Επιλογή συγκεντρώσεως αντιδραστηρίων–μήκους σπειράματος-όγκου δειγματοληψίας–ταχύτητας ροής	89
5.3.2. Στοιχεία επικύρωσης μεθόδου	91
5.3.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε διαλύματα αντιοξειδωτικών και σε εκχυλίσματα δειγμάτων ελαιολάδου	93
5.4. Συμπεράσματα	96
6. Ταχεία μέθοδος SI για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας βρώσιμων ελαίων με τη μέθοδο FRAP	97
6.1. Εισαγωγή	97
6.2. Πειραματικό μέρος	98
6.2.1. Αντιδραστήρια και διαλύματα	98
6.2.2. Προετοιμασία δείγματος	99
6.2.3. Οργανολογία	99
6.2.4. Αναλυτικές διαδικασίες	101
6.2.4.1. Μέθοδος SI	101
6.2.4.2. Μέθοδος FRAP	103
6.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	103
6.3.1. Βελτιστοποίηση	103
6.3.2. Βαθμονόμηση	107
6.3.3. Στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου SI	108
6.3.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε εκχυλίσματα ελαίων	109
6.4. Συμπεράσματα	113

7. Σύγκριση διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου – μελέτη της διακύμανσης της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας κατά την ήπια οξείδωση	114
7.1. Εισαγωγή	114
7.2. Υλικά και Μέθοδοι	115
7.2.1. Αντιδραστήρια	115
7.2.2. Οργανολογία	116
7.2.3. Δείγματα ελαιολάδου	116
7.2.4. Εκχύλιση ελαιολάδου	118
7.2.5. Μέθοδος DPPH στο ολικό κλάσμα και στο μεθανολικό εκχύλισμα	118
7.2.6. Μέθοδος ABTS στο μεθανολικό εκχύλισμα	118
7.2.7. Ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες	119
7.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	120
7.3.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ενεργότητας	120
7.3.2. Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινόλες	126
7.3.3. Συσχέτιση του ολικού περιεχομένου των φαινολών με τις TAC των μεθόδων ABTS και DPPH	126
7.3.4. Συσχέτιση των τιμών TAC με την περιοχή και την ποικιλία προέλευσης, και με αναλυτικές παραμέτρους του ελαιολάδου	128
7.3.5. Συσχέτιση των μεθόδων ABTS, DPPH και Folin-Ciocalteu με την μέθοδο βιοφωταύγειας FI	131
7.4. Συμπεράσματα	131
7.5. Ήπια οξείδωση	132
7.5.1. Μέθοδος	132
7.5.2. Αποτελέσματα	132
8. Εκτίμηση πιθανής συσχέτισης της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας του ελαιολάδου με τα περιεχόμενα ιχνοστοιχεία	134
8.1. Εισαγωγή στην φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος	134
8.1.1. Πλάσμα	134

8.1.2. Πηγή	135
8.1.3. Τετραπολικός αναλυτής μαζών	136
8.1.4. Προετοιμασία δείγματος	137
8.1.5. Εισαγωγή δείγματος	138
8.1.6. Δημιουργία ατόμων	138
8.1.7. Οργανολογία	139
8.1.8. Φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις	142
8.2. Εφαρμογές της τεχνικής ICP-MS στον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων στο ελαιόλαδο	144
8.3. Χαρτογράφηση των Ελληνικών παρθένων ελαιολάδων με βάση το περιεχόμενό τους σε ιχνοστοιχεία	146
8.3.1. Οργανολογία	146
8.3.2. Αντιδραστήρια	147
8.3.3. Αναλυτική διαδικασία	147
8.3.4. Ποσοτικός προσδιορισμός	148
8.4. Στατιστική ανάλυση	149
8.5. Αποτελέσματα και συζήτηση	150
8.5.1. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης	155
8.5.2. Συσχέτιση των περιεχόμενων ιχνοστοιχείων με τις τιμές TAC	156
8.6. Συμπεράσματα	157
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	158
ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	160
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	162
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	167
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ABBREVIATIONS	171
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	174

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αυτοματοποίηση των αναλυτικών μεθόδων στις μέρες μας καθίσταται αναγκαία, ώστε μεγάλος αριθμός αναλύσεων να μπορεί να διεκπεραιώνεται αξιόπιστα, σε μικρό χρόνο, ελαχιστοποιώντας την ανθρώπινη παρέμβαση. Η τεχνική της εισαγωγής δείγματος σε ροή (Flow Injection, FI) και η νεώτερη της, η τεχνική διαδοχικής εισαγωγής (Sequential Injection, SI), αποτελούν τις περισσότερες εφαρμόσιμες τεχνικές αυτοματοποίησης, διότι συνδυάζουν την τεχνολογική ανάπτυξη στους κλάδους των μικροκατασκευών και μικροϋπολογιστών με την αυξημένη συχνότητα μετρήσεων, την άμεση λήψη αποτελεσμάτων και την ελάχιστη κατανάλωση αντιδραστηρίων. Οι αναλυτές FI και SI συνδυάζουν την ευκολία στη χρήση με το μικρό κόστος, ενώ επιδέχονται εύκολα σμίκρυνση επιτρέποντας την κατασκευή φορητών αναλυτικών οργάνων.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκαν καινοτόμες αυτοματοποιημένες μέθοδοι για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC) του ελαιολάδου, βασιζόμενες στις τεχνικές FI και SI:

1. **Αυτοματοποιημένη μέθοδος βιοφωταύγειας** (κεφάλαιο 5): Ως αρχή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η οξειδωση της λουμινόλης από το υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία του ενζύμου της υπεροξειδάσης (HRP) ως καταλύτη. Αποτέλεσμα της οξειδωσης αποτέλεσε η εκπομπή φωτός (βιοφωταύγεια), το οποίο ενισχύθηκε με την παρουσία *p*-ιωδοφαινόλης. Κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου, το οποίο περιείχε τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, αναμίχθηκε με το ρεύμα του αντιδραστηρίου εργασίας το οποίο ήταν μίγμα λουμινόλης – ενζύμου HRP – *p*-ιωδοφαινόλης. Η βιοφωταύγεια που παράγεται κατά την αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου εργασίας με το υπεροξειδίο του υδρογόνου, μειώνεται λόγω της κατανάλωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα αντιοξειδωτικά του μεθανολικού εκχυλίσματος. Αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση αρνητικών κορυφών στο καταγράφημα, το ύψος των οποίων είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών. Χρησιμοποιήθηκε οργανολογία συστήματος FI που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της μεθόδου στις ακόλουθες παραμέτρους: 1) στον αριθμό των δίαυλων του

συστήματος FI, 2) στην ταχύτητα ροής, 3) στο μήκος του σπειράματος ανάμιξης και 4) στις συγκεντρώσεις των HRP, υπεροξειδίου του υδρογόνου και *p*-ιωδοφαινόλης. Το όριο ανίχνευσης υπολογίσθηκε σε 13×10^{-6} M ισοδύναμα γαλλικού οξέος, ενώ το όριο ποσοτικοποίησης σε 43×10^{-6} M ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η γραμμική περιοχή ήταν στην περιοχή συγκεντρώσεων $1,0 \times 10^{-6}$ έως $1,0 \times 10^{-4}$ M, ενώ η επαναληψιμότητα του συστήματος ήταν καλύτερη από 2,8% RSD (n=4). Ο ρυθμός δειγματοληψίας ήταν 180 δείγματα/ώρα.

- II. **Αυτοματοποιημένη μέθοδος FRAP** (κεφάλαιο 6): Η μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να ανάγουν το Fe(III) στο σύμπλοκο σιδηρο-2,4,6, τριπυριδυλ-s-τριαζίνης (Fe(III) – TPTZ) σε Fe(II) στο αντίστοιχο σιδηρι-σύμπλοκο (Fe(II) – TPTZ) σε όξινο περιβάλλον, γνωστή στη βιβλιογραφία ως μέθοδος FRAP, τροποποιήθηκε και αυτοματοποιήθηκε σε σύστημα SI. Η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε ως προς τις συγκεντρώσεις των Fe(III) και TPTZ, τον ενιόμενο όγκο του μεθανολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου και την ταχύτητα ροής. Η επικύρωση της μεθόδου έγινε με προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης, της γραμμικότητας, της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε σε 0,89 μmol ισοδύναμα $\text{FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ ελαιολάδου. Η γραμμική περιοχή προσδιορίστηκε από 0,01 έως 0,2 mM με σταθερά συσχέτισης $r=0,9995$. Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD %) της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας ήταν 0,79% (n=54) και 3,6% (n=3) αντίστοιχα. Ο ρυθμός δειγματοληψίας προσδιορίστηκε σε 90 δείγματα την ώρα. Τα αποτελέσματα κυμάνθηκαν μεταξύ 24,7 και 1162 μmol ισοδύναμα $\text{FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ ελαιολάδου για τα δείγματα ελαιολάδου και από 2,8 έως 5,8 μmol ισοδύναμα $\text{FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ ελαίου για δείγματα ηλιέλαιου, σογιέλαιου, αραβοσιτελαίου και σησαμελαίου. Με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε, αποδείχθηκε ότι το ελαιόλαδο είχε το υψηλότερο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο, ενώ τα σησαμέλαιο, αραβοσιτέλαιο, σογιέλαιο και ηλιέλαιο ακολουθούν με χαμηλότερες τιμές. Κατά την ανάλυση 54 δειγμάτων εδωδιμων ελαίων έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με δοκιμασία t κατά ζεύγη, μεταξύ της αυτοματοποιημένης και της δια χειρός εκτελούμενης μεθόδου FRAP, όπου βρέθηκε ότι συσχετίζονται καλά.

Οι προτεινόμενες μέθοδοι παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ενεργότητας:

- ✓ Επιτεύχθηκαν χαμηλά όρια ανίχνευσης.
- ✓ Μικρός χρόνος ανάλυσης των δειγμάτων.
- ✓ Ευκολία στην εφαρμογή.
- ✓ Επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.
- ✓ Μεγάλη ταχύτητα δειγματοληψίας.
- ✓ Χαμηλού κόστους φορητή οργανολογία.
- ✓ Μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίου και δείγματος.

Επιπλέον, τροποποιήθηκαν και προσαρμόστηκαν για την εκτίμηση της TAC του ελαιολάδου οι μέθοδοι DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu (κεφάλαιο 7). Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν συγκρίθηκαν μεταξύ τους κατά την ανάλυση 50 δειγμάτων εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου που προέρχονται από διαφορετικές Ελληνικές περιοχές και ποικιλίες.

Προσδιορίστηκαν οι τιμές ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας στο μεθανολικό εκχύλισμα και στο ολικό κλάσμα του ελαιολάδου με τη μέθοδο DPPH. Η μέθοδος τροποποιήθηκε ως προς την συγκέντρωση του διαλύματος της ρίζας, 13 μM έναντι 20 μM της πρωτότυπης μεθόδου και ως προς τις τελικές αναλογίες δείγματος/ διαλύματος DPPH. Επίσης αυξήθηκε ο χρόνος επώασης στην 1 h προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση των αντιοξειδωτικών με τη ρίζα. Οι τιμές της TAC στο μεθανολικό εκχύλισμα κυμάνθηκαν μεταξύ 1,29 και 9,95 mM ισοδύναμα γαλλικού οξέος Kg^{-1} ελαιολάδου και μεταξύ 77 και 177 mM mM ισοδύναμα γαλλικού οξέος Kg^{-1} ελαιολάδου στο ολικό κλάσμα. Οι καμπύλες βαθμονόμησης ήταν γραμμικές για όλα τα δείγματα ελαιολάδου (συντελεστής συσχέτισης: 0,98-1,000). Η ακρίβεια της μεθόδου κυμάνθηκε μεταξύ 2,2 και 3,5 % RSD στο ολικό κλάσμα και μεταξύ 7,0 και 9,9 % RSD στο μεθανολικό εκχύλισμα.

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος ABTS τροποποιήθηκε με αλλαγή του οξειδωτικού αντιδραστηρίου από υπερθειικό κάλιο σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και χρήση του ενζύμου υπεροξειδάση (HRP) ως καταλύτη. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται με μεθανόλη. Το τελικό ποσοστό μεθανόλης στο διάλυμα της σχηματιζόμενης ρίζας ABTS*⁺ είναι περίπου 80%, και έτσι αναμιγνύεται πλήρως με το μεθανολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου. Το πέρας της αντίδρασης σχηματισμού

της ρίζας προσδιορίστηκε πειραματικά με μετρήσεις της απορρόφησης στα 734 nm ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι την λήψη σταθερής τιμής και βρέθηκε ότι απαιτούνται τρεις ώρες παραμονής του μίγματος των αντιδραστηρίων στο σκοτάδι. Οι τιμές ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας με τη μέθοδο ABTS στο μεθανολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου κυμάνθηκαν μεταξύ 5,42 και 22,5 mM ισοδύναμα γαλλικού οξέος Kg⁻¹ ελαιολάδου. Οι καμπύλες βαθμονόμησης ήταν γραμμικές για όλα τα δείγματα (συντελεστές συσχέτισης: 0,99-1,000). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε μεταξύ 6,9 και 9,7 % RSD.

Προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες στο μεθανολικό κλάσμα του ελαιολάδου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, το οποίο βρέθηκε μεταξύ των τιμών 3,80 και 29,4 mM ισοδύναμα γαλλικού οξέος Kg⁻¹ ελαιολάδου. Η μέθοδος τροποποιήθηκε ως προς το χρόνο μέτρησης των διαλυμάτων μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων. Τα διαλύματα διατηρούνται στο σκοτάδι για 2 h πριν την μέτρηση αντί για 24 h όπως αναφέρει η πρωτότυπη μέθοδος. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε μεταξύ των τιμών 6,4 και 8,8 % RSD.

Το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες συγκρίθηκε με τις τιμές TAC, όπως προσδιορίστηκαν στο μεθανολικό εκχύλισμα με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Οι συντελεστές συσχέτισης βρέθηκαν $r=0,89$ και $r=0,69$ αντίστοιχα. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου DPPH με αυτά της μεθόδου ABTS στο μεθανολικό εκχύλισμα κρίθηκε ικανοποιητική ($r=0,81$). Εντούτοις, οι τιμές της μεθόδου DPPH στο ολικό κλάσμα δεν παρουσίασαν σύγκριση με τις τιμές των μεθόδων DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu που εφαρμόστηκαν στο μεθανολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου, λόγω της παρουσίας των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών συστατικών στο ολικό κλάσμα των δειγμάτων.

Πραγματοποιήθηκε πολυστοιχειακή ανάλυση δειγμάτων εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου από διάφορες Ελληνικές περιοχές και ποικιλίες με χρήση της τεχνικής της φασματομετρίας μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS), με σκοπό την χαρτογράφηση του Ελληνικού ελαιολάδου και την πιθανή σύγκριση των τιμών TAC με το περιεχόμενο σε ιχνοστοιχεία (κεφάλαιο 8). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τη στατιστική προσέγγιση της ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (PCA), η οποία επιτρέπει την ομαδοποίηση άγνωστων δειγμάτων μετά τον έλεγχο πιθανής διαφοροποίησης των δειγμάτων γνωστών περιοχών και ποικιλιών.

Η περιοχή συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων για την βαθμονόμηση των στοιχείων της Ομάδας Α: ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{153}Eu , ^{164}Dy και ^{166}Er κυμαίνεται από 1 έως 100 ng L^{-1} , ενώ της Ομάδας Β: ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{66}Zn και ^{88}Sr από 0,1 έως 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Τα In και Ge χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα αντίστοιχα.

Οι σταθερές συσχέτισης r στις καμπύλες βαθμονόμησης κυμάνθηκαν από 0,997 έως 0,99998 για το σύνολο των στοιχείων. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 92% (^{166}Er) και 118% (^{57}Fe), ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκαν σε τιμές μεταξύ 0,011 (^{166}Er) και 0,61 (^{118}Sn) $\mu\text{g L}^{-1}$ για την ομάδα Α και 0,73 (^{55}Mn) έως 420 (^{57}Fe) $\mu\text{g L}^{-1}$ για την ομάδα Β. Όπως είναι αναμενόμενο οι σπάνιες γαίες, ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{153}Eu , ^{164}Dy και ^{166}Er , περιέχονται στα δείγματα σε χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα μέταλλα ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{66}Zn και ^{88}Sr . Προσδιορίστηκε η ευαισθησία και επαναληψιμότητα της αναλυτικής διαδικασίας, συμπεριλαμβανομένης της χώνευσης των δειγμάτων. Η σχετική τυπική απόκλιση κυμάνθηκε μεταξύ 0,8% (^{153}Eu) και 9% (^{25}Mg).

Για την διαφοροποίηση των δειγμάτων ελαιολάδου σύμφωνα με την περιοχή προέλευσης και την ποικιλία, επιλέχθηκαν τα ισότοπα των στοιχείων: ^{25}Mg , ^{57}Fe , ^{66}Zn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{153}Eu και ^{166}Er .

Αν και τα αποτελέσματα όπως προσδιορίστηκαν με την εύκολη και γρήγορη αυτή μέθοδο ICP-MS, δεν συσχετίζονται με την αντιοξειδωτική ενεργότητα των δειγμάτων, αποτέλεσαν ωστόσο δεδομένα μιας πλήρους χαρτογράφησης του ελληνικού εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου.

SUMMARY

The automation of analytical methods is very important as a large analytical batch can be processed with accuracy, in short time, while the human intervention is minimized. Flow injection (FI) and the newer sequential injection (SI) analysis are the most applicable automation techniques. They incorporate the technological development in both microdevices and microcomputers. The frequency of measurements is increased, data are taken directly and the consumption of reagents is minimized. The FI and SI analyzers are easy in use, portable and have low cost.

In this thesis, novel automated methods for olive oil total antioxidant capacity (TAC) assessment, based on flow and sequential injection techniques, were developed:

- I. **High throughput bioluminometric method** (chapter 5): The chemistry involved was the horseradish peroxidase (HRP) catalysed oxidation of luminol by hydrogen peroxide. Oxidation results in light emission (bioluminescence) that is enhanced using p-iodophenol sensitizer. Aliquot of the olive oil extract containing hydrophilic antioxidants was merged with a luminol – HRP – p-iodophenol reagent stream. Bioluminescence resulting after merging the mixture with a hydrogen peroxide stream was suppressed upon increasing antioxidants' concentration resulting in negative peaks due to hydrogen peroxide consumption by antioxidants. The method has been optimized on: 1) number of manifold channels, 2) flow rates, 3) coil length and 4) HRP, hydrogen peroxide and p-iodophenol concentrations, in a laboratory made analyzer. Detection limit was calculated at 13×10^{-6} M gallic acid equivalent, limit of quantification was 43×10^{-6} M gallic acid equivalent, linear range was between 1.0×10^{-6} and 1×10^{-4} M and intra laboratory precision was better than 2.8% RSD (n=4). The method is fully automated achieving a sampling rate of 180 per hour.
- II. **High throughput sequential injection method for FRAP assessment** (chapter 6): The FRAP assay that measures the ability of the antioxidant to reduce the ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine salt (Fe(III) – TPTZ) to the blue colored ferrous complex (Fe(II) – TPTZ) at pH 3.6, was modified

and automated in a SI system. The method has been optimized for Fe(III) and TPTZ concentration, injection volume of methanolic extract and flow rate. The proposed method was validated in terms of detection limit, linearity, repeatability and reproducibility. Detection limit was 0.89 $\mu\text{mol equiv. FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$. Linear range was 0.01-0.2 mM, $r=0.9995$. The relative standard deviation (RSD %) of repeatability and reproducibility were 0.79% ($n=54$) and 3.6% ($n=3$) respectively, while a sampling rate of 90 per hour was achieved. Antioxidant activities estimated by the automated method were in the range of 24.7-1162 $\mu\text{mol equiv. FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ for olive oil samples and 2.8 - 5.8 $\mu\text{mol equiv. FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ for sunflower, soya, corn and sesame oil. Results indicated that olive oil had the highest antioxidant content while sesame, corn, soya and sunflower oils are following with lower values. During the analysis of 54 edible oil samples, the developed SI method was compared and correlated well with the FRAP assay, using a paired t-test method.

The proposed methods offer several advantages:

- ✓ Low detection limits were achieved.
- ✓ Short analysis time.
- ✓ Simplicity: the proposed methods are simple to perform.
- ✓ Repeatability and reproducibility
- ✓ Analytical throughput.
- ✓ Low cost portable apparatus.
- ✓ Low reagent and sample consumption.

The DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods were modified and applied for olive oil TAC and TPC assessment (chapter 7). The developed methods were compared during the analysis of a total of 50 extra virgin olive oil samples from different Greek regions and cultivars.

Antioxidant capacities were determined in the methanolic olive oil extract and total fraction using the DPPH method. This method was modified in terms of the DPPH radical concentration (13 mM in advanced of 20 mM using in original method) and the final sample/DPPH working solution ratios. In addition, incubation time was increased at 1 hour for the completion of antioxidant and DPPH radical reaction. Antioxidant capacities in methanolic extracts were found between 1.29 and 9.95 mM equiv. of gallic acid Kg^{-1} olive oil, while in olive oil,

TAC was between 77 and 177 mM equiv. of gallic acid Kg⁻¹ olive oil. Calibration curves acquired for all olive oil samples were linear (correlation coefficients: 0.98-1.000). Precision ranged between 2.2 and 3.5 % RSD for the total fraction method and 7.0 and 9.9 % RSD for the method acquired in methanolic extract.

The ABTS method was modified using hydrogen peroxide as oxidant instead of persulfate potassium, and horseradise peroxidase (HRP) enzyme as catalyst for the ABTS radical formation reaction. Three hours were required for the ABTS radical formation reaction. After reaction completion, the volumetric flask was filled with methanol. Final methanol concentration in ABTS^{•+} solution was 80% (v/v). This working solution was mixed with methanolic olive oil extract completely. Antioxidant capacities determined in the methanolic olive oil extract were between 5.42 – 22.5 mM equiv. of gallic acid Kg⁻¹ olive oil. Calibration curves acquired for all olive oil samples were linear (correlation coefficients: 0.99-1.000). Precision ranged between 6.9 and 9.7 % RSD.

The total phenol content was determined in methanolic olive oil fraction using the Folin-Ciocalteu method, that was found between 3.80 and 29.4 mM equiv. of gallic acid Kg⁻¹ olive oil. The method was modified in terms of the time measurement of samples-folin reagent mixtures. Mixtures were stored in the dark for 2 hours instead of 24 hours as in manually FRAP method. Precision ranged between 6.4 and 8.8 % RSD.

Total phenol content correlates with total antioxidant capacity assessed in hydrophilic fraction through the DPPH (r=0.89) and the ABTS (r=0.69) assays. The methanolic extract DPPH values correlate significantly with the ABTS values (r=0.81). However, the DPPH values for total olive oil correlate poorly with the ABTS assay, the Folin-Ciocalteu method and the DPPH assay in methanolic extract. Total phenols content shows good correlation with ABTS and DPPH values and could serve as a useful indicator for olive oil antioxidant capacity.

A multi-element analysis of virgin olive oil samples from different regions and cultivars was carried out by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) aiming at mapping Greek olive oil and checking the probable correlation of results from multi-element analysis with TAC values (chapter 8). Data were processed by means of the chemo metric approach of Principal

Component Analysis (PCA) that allows classifying unknown samples after checking possible differentiation of samples of known origin and cultivar.

For the quantitative analysis, standard solutions were prepared by diluting multi-element solutions of ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{153}Eu , ^{164}Dy , ^{166}Er isotopes (Group A, $10\ \mu\text{g L}^{-1}$) and of ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{66}Zn , ^{88}Sr isotopes (Group B, $100\ \mu\text{g L}^{-1}$). The calibration range for the elements of Group A was from 1 to $100\ \text{ng L}^{-1}$ and for Group B was from 0.1 to $100\ \mu\text{g L}^{-1}$. In and Ge were used as internal standards, respectively.

The correlation coefficients of calibration curves were between 0.997 and 0.99998 for all elements. The isotopes ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{153}Eu , ^{164}Dy , ^{166}Er were present in samples in lower amounts than ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{66}Zn , ^{88}Sr .

Results from recovery experiments were in the range of 92 (^{166}Er) – 118% (^{57}Fe). Furthermore, limits of quantification, LoQs, were in the range of 0.011 (^{166}Er) - 0.61 (^{118}Sn) $\mu\text{g L}^{-1}$ for Group A elements and 0.73 (^{55}Mn) – 420 (^{57}Fe) $\mu\text{g L}^{-1}$ for Group B elements. Sensitivity and reproducibility of analytical procedure, including the digestion pre-treatment of samples, were also determined. The relative standard deviation was between 0.8 (^{153}Eu) and 9% (^{25}Mg).

For the principal component analysis 7 elements (^{25}Mg , ^{57}Fe , ^{66}Zn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{153}Eu and ^{166}Er) were selected to differentiate extra virgin olive oils according to region and cultivar.

Although trace element content did not correlate well with TAC values, the results obtained were a map of the trace element content of Greek olive oils during the analysis by this simple and rapid ICP-MS method.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ

Κλινικές δοκιμές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει τη συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης φρούτων και λαχανικών και της συχνότητας εμφάνισης ασθενειών, όπως καρδιολογικών ασθενειών, νεοπλασιών και ασθενειών σχετικών με το γήρας [1]. Τα αντιοξειδωτικά συστατικά που περιέχονται στα τρόφιμα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα φαινολικά συστατικά, οι βιταμίνες E και C, και τα καροτενοειδή, πιστεύεται ότι είναι τα συστατικά εκείνα που προστατεύουν από τις σχετικές με το οξειδωτικό στρες ασθένειες [2].

Οι ελεύθερες ρίζες και άλλες ενεργές ενώσεις οξυγόνου παράγονται με μεταβολικές και φυσιολογικές διαδικασίες και μπορεί να προκαλέσουν επιβλαβείς οξειδωτικές αντιδράσεις στους οργανισμούς, οι οποίοι τις αποβάλλουν μέσω ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Κάτω από ειδικές συνθήκες, η αύξηση των οξειδωτικών ουσιών και η μείωση των αντιοξειδωτικών δεν μπορεί να αποτραπεί και κατά συνέπεια, η οξειδωτική ισορροπία μεταπίπτει προς την οξειδωτική κατάσταση. Έτσι, το οξειδωτικό στρες αυξάνεται.

Γενικά, ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ενώσεις που αναστέλλουν την οξείδωση ή παρεμποδίζουν τις αντιδράσεις που προωθούνται από το οξυγόνο ή τα υπεροξειδία. Πολλές από αυτές τις ενώσεις, όπως για παράδειγμα οι τοκοφερόλες, χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε διάφορα προϊόντα, σε τρόφιμα, όπως στα λίπη και τα έλαια, σε σαπούνια και καλλυντικά, με σκοπό την πρόληψη της οξείδωσής τους και του σχηματισμού ανεπιθύμητων προϊόντων. Στον τομέα της διατροφής, ως αντιοξειδωτικά ορίζονται συνθετικά ή φυσικά συστατικά, τα οποία προστίθενται ή περιέχονται στα τρόφιμα με σκοπό να προλάβουν ή να περιορίσουν την αλλοίωσή τους από την επίδραση του οξυγόνου του αέρα. Στην βιοχημεία και ιατρική, τα αντιοξειδωτικά είναι ένζυμα ή άλλες οργανικές ενώσεις, όπως η βιταμίνη E και το β-καροτένιο, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να προστατεύουν τους ιστούς από τις καταστροφικές επιδράσεις της οξείδωσης. Στη βιολογία, ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται μία χημική

ένωση που μειώνει σημαντικά το αποτέλεσμα της επίδρασης ενεργών ενώσεων οξυγόνου ή αζώτου, στην κανονική φυσιολογική κατάσταση των ανθρώπων. Ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να καταναλώνει ενεργές ενώσεις οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), ώστε να σταματά τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ριζών ή να παρεμποδίζει την εξ αρχής γέννηση των ενεργών οξειδωτικών ενώσεων. Τα αντιοξειδωτικά συχνά περιλαμβάνουν αναστολείς αντιδράσεων ελευθέρων ριζών, συμπλεκτικά μεταλλοϊόντων και μεταλλικά στοιχεία τα οποία βρίσκονται στο ενεργό κέντρο αντιοξειδωτικών ενζύμων. Για παράδειγμα το σελήνιο είναι ένας συμπαράγοντας των σεληνοπρωτεϊνών, οι οποίες μειώνουν τα υπεροξειδία σε υδατικά συστήματα.

Σχετική έρευνα στη βιβλιογραφία δείχνει ότι ο αριθμός των δημοσιεύσεων σχετικά με τα αντιοξειδωτικά και το οξειδωτικό στρες αυξήθηκε θεαματικά μέσα σε μία δεκαετία, 1684 άρθρα δημοσιεύθηκαν έως το 1993 και ο αριθμός τους έφτασε τα 6510 άρθρα έως το 2003 [3]. Είναι πολύ ενδιαφέρουσα για το κοινό, τους επιστήμονες και τους ερευνητές που ασχολούνται με τους τομείς της υγείας και της διατροφής, η εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας των τροφίμων που καταναλώνονται. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της σύνθεσης των τροφίμων, ο διαχωρισμός και η μεμονωμένη μελέτη του κάθε αντιοξειδωτικού είναι χρονοβόρα, δαπανηρή και μη αποτελεσματική, διότι δεν λαμβάνονται υπόψη οι πιθανές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών συστατικών σε ένα μίγμα τροφίμου. Επομένως η ανάπτυξη μεθόδων με στόχο την γρήγορη ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας των υπό εξέταση δειγμάτων κρίνεται αναγκαία. Η επιλογή μίας μεθόδου ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας είναι αρκετά δύσκολη, αφού υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων που υποστηρίζουν ότι μετράνε την ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα *in vitro*. Το κύριο πρόβλημα των μεθόδων αυτών είναι η έλλειψη στοιχείων επικύρωσης, τα οποία αποδεικνύουν ότι μετράνε αξιόπιστα την αντιοξειδωτική ενεργότητα των τροφίμων και των βιολογικών δειγμάτων. Αρκετές ανασκοπήσεις έχουν δημοσιευθεί σχετικά με αυτές τις μεθόδους, αλλά οι απόψεις ως προς το ποιά είναι η πλέον κατάλληλη, ποικίλουν αρκετά. Δεν φαίνεται να υπάρχει μια γενική συναίνεση, πολύ πιθανόν εξαιτίας της πολυπλοκότητας που παρουσιάζει το πεδίο των αντιοξειδωτικών. Στην ανασκόπηση των Frankel και Meyer, οι συγγραφείς σημειώνουν ότι είναι προβληματική η χρήση μίας μονοδιάστατης μεθόδου για την εκτίμηση της

αντιοξειδωτικής ενεργότητας στα πολύπλοκα δείγματα τροφίμων και βιολογικών δειγμάτων [4]. Ένα γενικό πρωτόκολλο ελέγχου πρέπει να α) επιλέγει ένα σχετικό σύστημα (υπόστρωμα), β) δοκιμάζει ποικίλες οξειδωτικές συνθήκες όπως pH, διαλύτες κλπ, γ) μετράει τα αρχικά και δευτερογενή προϊόντα της οξειδωσης, δ) συγκρίνει αντιοξειδωτικά στις ίδιες μοριακές συγκεντρώσεις με τα ενεργά συστατικά, ε) ποσοτικοποιεί με βάση την έναρξη της περιόδου ή την επί τοις % μείωση ή τον ρυθμό σχηματισμού ή την αποσύνθεση ενός προϊόντος. Έχει επικρατήσει οι μέθοδοι να ποσοτικοποιούν με βάση την τιμή IC₅₀, η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού ή του μίγματος αντιοξειδωτικών που πετυχαίνει την μείωση του αρχικού σήματος απορρόφησης, φωταύγειας ή φθορισμού κατά 50% (half maximal inhibitory concentration). Η τιμή αυτή χρησιμοποιείται γιατί οδηγεί σε αποτελέσματα ανεξάρτητα από το αρχικό σήμα. Οι μέθοδοι γενικά διαφέρουν στα χρησιμοποιούμενα συστήματα, στις συνθήκες αντίδρασης, στην τεχνική ανίχνευσης και στις μεθόδους ποσοτικοποίησης. Γενικά, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: 1. στις μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου, (hydrogen atom transfer reaction based assays, HAT) και 2. στις μεθόδους που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (single electron transfer reaction based assays, ET). Είναι εξαιρετικά δύσκολη η σύγκριση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από διαφορετικές μεθόδους. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι αντιοξειδωτικής ενεργότητας.

Οι ET μέθοδοι είναι οι πιο διαδεδομένες και συχνά χρησιμοποιούμενες για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας (total antioxidant capacity, TAC). Περιλαμβάνουν δύο συστατικά στο μίγμα της αντίδρασης, το αντιοξειδωτικό και το οξειδωτικό.

Πίνακας 1.1. Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ενεργότητας in vitro

Μέθοδοι αντιδράσεων μεταφοράς ατόμου υδρογόνου	
$ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + LH \rightarrow ROOH + L^{\bullet}$	ORAC (oxygen radical absorbance capacity)
	Crocin bleaching assay
	IOU (inhibited oxygen uptake)
	Inhibition of linoleic acid oxidation
	Inhibition of LDL oxidation
Μέθοδοι αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίου	
$M(n) + e \text{ (από AH)} \rightarrow AH^{\bullet+} + M(n-1)$	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)
	FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter)
	DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl)
	Copper (II) reduction capacity
	Total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent
Άλλες μέθοδοι	
TOSC (total oxidant scavenging capacity)	
Inhibition of Briggs-Rauscher oscillation reaction	
Chemiluminescence	
Electrochemiluminescence	

Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:

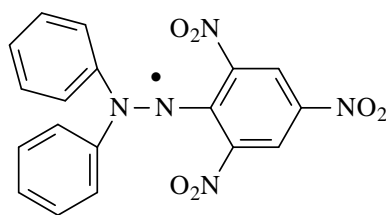
Οξειδωτικό + e (αντιοξειδωτικού) → ανηγμένη μορφή οξειδωτικού + οξειδωμένη μορφή αντιοξειδωτικού

Το οξειδωτικό προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από το αντιοξειδωτικό οδηγώντας σε αλλαγή του χρώματος του πρώτου. Ο βαθμός αλλαγής του χρώματος είναι ανάλογος με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Το τελικό σημείο της αντίδρασης, που προσδιορίζεται φωτομετρικά, είναι το σημείο όπου το χρώμα παύει να αλλάζει και φτάνει σε πλατώ. Η μεταβολή της απορρόφησης ΔΑ

συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού δίνει μία γραμμική καμπύλη ως ένα σημείο που στο τέλος εμφανίζει πλατώ. Η κλίση της γραμμής αντανάκλα την αναγωγική ικανότητα του αντιοξειδωτικού, η οποία εκφράζεται ως ισοδύναμη αυτής του αντιοξειδωτικού Trolox (Trolox equivalent, TE) ή του γαλλικού οξέος (Gallic acid equivalent, GAE). Αυτές οι μέθοδοι μοιάζουν με τις οξειδοαναγωγικές μεθόδους της κλασσικής χημικής ανάλυσης [5]. Στα παρακάτω πεδία παρουσιάζονται θεωρητικά σημεία των μεθόδων TAC που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διατριβή.

1.1. Η μέθοδος DPPH

Το DPPH (2,2-δι(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πυκριλυδραζίλιο) αποτελεί μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου. Η κατανάλωσή του από τα αντιοξειδωτικά, έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση του πορφυρού χρώματος του διαλύματός του, η οποία παρακολουθείται στα 515 nm, όπου παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας.



DPPH

Η διαδικασία που ακολουθείται γενικά έχει ως εξής: Το διάλυμα DPPH σε μεθανόλη (3,9 mL, 25 mg L⁻¹) αναμιγνύεται με το διάλυμα του δείγματος (0,1 mL) σε κυψελίδα και παρακολουθείται η απορρόφηση της αντίδρασης στα 515 nm για 30 min ή μέχρι να λάβει σταθερή τιμή. Το ποσοστό % του DPPH που παραμένει (% DPPH_{rem}) σε σχέση με το αρχικό DPPH_{T=0} εκφράζεται ως:

$$\% DPPH_{rem} = 100 \times [DPPH]_{rem} / [DPPH]_{T=0}$$

όπου το %DPPH_{rem} είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη τιμή IC₅₀ του αντιοξειδωτικού, διότι έτσι τα αποτελέσματα είναι ανεξάρτητα από την αρχική απορρόφηση του διαλύματος της ρίζας DPPH, δηλαδή το αρχικό σήμα.

Ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης υπολογίζεται από την κινητική καμπύλη του DPPH με το αντιοξειδωτικό και είναι γνωστός ως T_{IC50} .

Η κινητική συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών κατηγοριοποιείται σύμφωνα με το χρόνο που απαιτείται για την εμφάνιση ενός πλατό, δηλαδή για να φτάσει η απορρόφηση του μίγματος της αντίδρασης σε σταθερή τιμή [6]:

- Γρήγορα αντιοξειδωτικά, <5 min,
- Ενδιάμεσα αντιοξειδωτικά, 5-30 min,
- Αργά αντιοξειδωτικά, >30 min.

Ένας άλλος τρόπος παρουσίασης της αντιοξειδωτικής ενεργότητας που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία είναι η αποτελεσματικότητα κατά των ριζών (antiradical efficiency, AE) και υπολογίζεται ως $(1/IC_{50})T_{IC50}$.

Η μέθοδος DPPH είναι τεχνικά απλή αλλά παρουσιάζει μερικά μειονεκτήματα που περιορίζουν τη χρήση της. Το DPPH αποτελεί μία πολύ σταθερή ρίζα αζώτου, που δεν δείχνει όμως ομοιότητα με τις πολύ ενεργές υπεροξυ-ρίζες που παίρνουν μέρος στην λιπιδική υπεροξειδωση. Πολλά αντιοξειδωτικά που θα αντιδρούσαν γρήγορα με υπεροξυ-ρίζες, αντιδρούν αργά ή καθόλου με το DPPH. Αυτό εκφράζεται με τις τιμές του T_{IC50} που κυμαίνονται μεταξύ 1,15 min για το ασκορβικό οξύ και 103 min για την ρουτίνη (rutin). Συνεπώς, η αντιοξειδωτική ενεργότητα ενός μίγματος αντιοξειδωτικών δεν μπορεί να ρυθμιστεί ή να προβλεφθεί.

Επίσης, η κινητική μεταξύ του DPPH και των αντιοξειδωτικών δεν είναι γραμμική σε σχέση με τις συγκεντρώσεις του DPPH. Για το λόγο αυτό είναι προτιμότερο να εκφράζεται η αντιοξειδωτική ενεργότητα με χρήση της IC_{50} .

Αν και η μέθοδος φαίνεται να περιλαμβάνει μία αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου, πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η αντίδραση μεταξύ φαινολών και DPPH βασίζεται σε αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου [7]. Το κρίσιμο στάδιο για την ταχύτητα της αντίδρασης αυτής περιλαμβάνει μία διαδικασία ταχείας μεταφοράς ηλεκτρονίου από τα φαινοξυ-ανιόντα (ArO^-) στη ρίζα DPPH $^{\bullet}$. Η μεταφορά του ατόμου υδρογόνου από το ουδέτερο μόριο $ArOH$ στο DPPH $^{\bullet}$ γίνεται πολύ αργά σε διαλύτες που είναι ισχυροί πρωτονιοδέκτες, όπως η μεθανόλη και η αιθανόλη. Αναφέρεται επίσης ότι η παρουσία μικρών ποσοτήτων οξέων ή βάσεων μπορεί να επηρεάσει δραματικά την ισορροπία

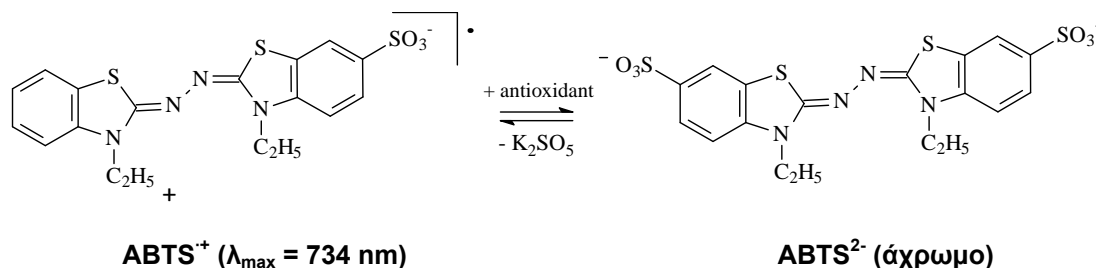
ιονισμού των φαινολών και να προκαλέσει την μείωση ή την ενίσχυση αντίστοιχα των μετρούμενων σταθερών ταχύτητας.

1.2. Η μέθοδος ABTS

Η μέθοδος ABTS αναπτύχθηκε αρχικά από τους Miller και Rice-Evans το 1993 [8] και αργότερα εξελίχθηκε [9]. Στην βελτιωμένη έκδοσή της, το οξειδωτικό $ABTS^{+\cdot}$ παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) ($ABTS^{2-}$) με υπερθειικά ιόντα. Συγκεκριμένα, 7 mmol του αμμωνιακού άλατος ABTS διαλύονται σε νερό και κατεργάζονται με 2,45 mmol υπερθειικού καλίου και το μίγμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 h, ώστε να προκύψει βαθύ κυανό διάλυμα. Αυτό το διάλυμα αραιώνεται με αιθανόλη ή ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,4, ώστε το διάλυμα που προκύπτει να έχει απορρόφηση περίπου 0,7 μονάδες στα 734 nm. Όγκος 1 mL από το διάλυμα αυτό αναμιγνύεται με 10 μ L του δείγματος. Η απορρόφηση μετρείται στους 30 °C σε διάστημα 1, 4 και 6 min μετά την ανάμιξη. Η διαφορά της μέτρησης της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού δίνει ευθεία γραμμή μέχρι τη λήψη πλατώ. Η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών που δίνει την ίδια % μεταβολή στην απορρόφηση του $ABTS^{+\cdot}$ με αυτήν διαλύματος του αντιοξειδωτικού Trolox 1 mM εκφράζεται ως TEAC.

Σε παραλλαγή της μεθόδου [10] η ελεύθερη ρίζα προκύπτει από το αντίστοιχο αμμωνιακό άλας της ένωσης ABTS, ενζυματικά, με οξείδωσή του από το H_2O_2 , παρουσία του ενζύμου υπεροξειδάση HRP.

Τα αντιοξειδωτικά καταναλώνουν το έγχρωμο κατιόν σε βαθμό ανάλογο με την συγκέντρωσή τους σύμφωνα με την αντίδραση:



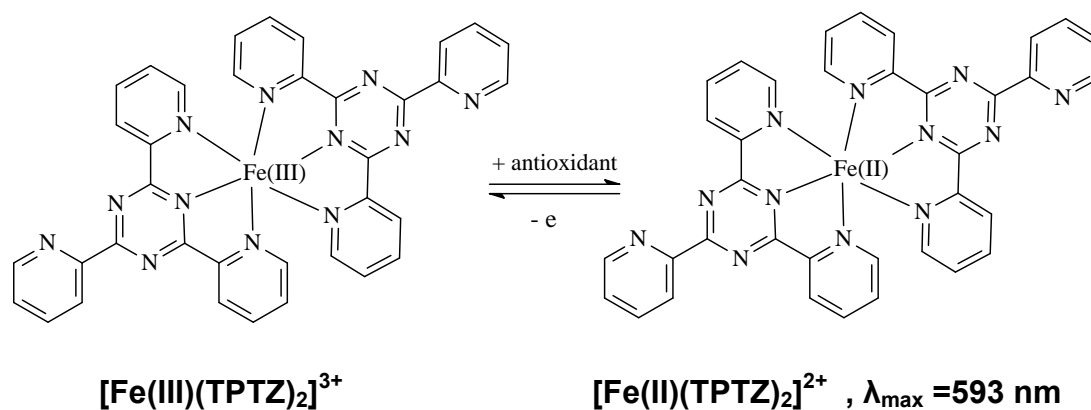
Λόγω της ευκολίας εφαρμογής της, η μέθοδος ABTS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ενεργότητας και έχουν προσδιοριστεί οι τιμές TEAC για πολλά συστατικά και δείγματα τροφίμων. Οι

τιμές TEAC των καθαρών αντιοξειδωτικών συστατικών δεν παρουσιάζουν καθαρή συσχέτιση με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που χάνουν τα αντιοξειδωτικά. Οι τιμές TEAC του ασκορβικού οξέος (1,05), της α-τοκοφερόλης (0,97), της γλουταθιόνης (1,28), και του ουρικού οξέως (1,01) είναι περίπου ίδιες παρόλο που η γλουταθιόνη δίνει ένα ηλεκτρόνιο για το σχηματισμό της οξειδωμένης γλουταθιόνης, ενώ τα υπόλοιπα είναι δότες δύο ηλεκτρονίων. Το φερουλικό οξύ (1,90) και το *p*-κουμαρικό οξύ (2,00) έχουν συγκρίσιμες τιμές TEAC. Το καφεϊκό οξύ παρουσιάζει τιμή TEAC 1,00 παρόλο που έχει όμοια χημική δομή με το φερουλικό οξύ. Επίσης, η κερκετίνη (3,00) και η καμφερόλη (1,00) έχουν παρόμοιες χημικές δομές αλλά παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά στις τιμές TEAC. Επομένως η ισχύς ενός αντιοξειδωτικού δεν είναι ανάλογη των ηλεκτρονίων που δίνει ούτε της χημικής δομής του.

Προφανώς, οι διαφορές στην ταχύτητα της αντίδρασης μεταξύ των αντιοξειδωτικών και οξειδωτικών δεν συγκρίνονται με τις τιμές TEAC, εφόσον πρόκειται για μία μέθοδο τελικού σημείου.

1.3. Η μέθοδος FRAP

Στη μέθοδο αυτή, το άλας του τρισθενούς σιδήρου $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ (TPTZ= 2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη) χρησιμοποιείται ως οξειδωτικό. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του άλατος του Fe(III) (~0,70 V) είναι όμοιο με αυτό του $\text{ABTS}^{+\cdot}$ (~0,68 V). Η μέθοδος λαμβάνει χώρα σε όξινες συνθήκες (pH 3,6) και περιλαμβάνει την ακόλουθη διαδικασία: Το οξειδωτικό παρασκευάζεται με ανάμιξη 2,5 mL διαλύματος TPTZ συγκέντρωσης 10 mM σε διάλυμα HCl 40 mM, 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών, pH 3.6 και 2,5 mL διαλύματος $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης 20 mM. Το τελικό διάλυμα περιέχει Fe(III) σε συγκέντρωση 1,67 mM και TPTZ σε 0,83 mM. Ο σίδηρος και τα άλλα μεταλλοϊόντα που περιέχονται στα τρόφιμα σχηματίζουν σύμπλοκα με τα αντιοξειδωτικά οδηγώντας σε αρνητικά σφάλματα.



Για τη μέτρηση της τιμής FRAP, ποσότητα 300 μL πρόσφατα παρασκευασμένου αντιδραστηρίου FRAP θερμαίνεται στους 37 $^{\circ}\text{C}$ και έπειτα λαμβάνεται μέτρηση τυφλού στα 593 nm. Κατόπιν προστίθενται 10 μL δείγματος και 30 μL νερού. Οι μετρήσεις της απορρόφησης λαμβάνονται μετά από την ανάμιξη και κάθε 15 s για 4 min. Υπολογίζεται η μεταβολή της απορρόφησης $\Delta A = A_{4 \text{ min}} - A_{0 \text{ min}}$ και εκφράζεται σε ισοδύναμα Fe(II). Η βαθμονόμηση γίνεται με πρότυπα διαλύματα FeSO_4 . Η ΔA είναι γραμμικά ανάλογη με τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Μία μονάδα FRAP εκφράζει την μετατροπή 1 mol Fe(III) σε Fe(II). Οι τιμές FRAP για το ασκορβικό οξύ, την α -τοκοφερόλη και το ουρικό οξύ είναι ακριβώς ίδιες (2,0) όπως και στη μέθοδο ABTS.

Ο Pulido και οι συνεργάτες του μέτρησαν τις τιμές FRAP για διάφορες πολυφαινόλες, στο νερό και στην μεθανόλη [11]. Η απορρόφηση στα 593 nm δεν λαμβάνει σταθερή τιμή εντός 4 min αλλά συνεχίζει να αυξάνει αργά ακόμη και μετά από αρκετές ώρες. Για κάποια αντιοξειδωτικά η αντίδραση με το αντιδραστήριο FRAP δεν ολοκληρώνεται πρακτικά ποτέ. Πολυφαινόλες με όμοια συμπεριφορά είναι το καφεϊκό οξύ, το ταννικό οξύ, το φερουλικό και το ασκορβικό οξύ καθώς και η κερκετίνη.

1.4. Η μέθοδος Folin – Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) προτάθηκε αρχικά για την ανάλυση πρωτεϊνών επωφελούμενη από την δραστικότητα του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιεί έναντι στο πρωτεϊνικό κατάλοιπο της τυροσίνης, η οποία περιέχει μία φαινυλομάδα [12]. Αρκετά χρόνια αργότερα, οι Celeste και συνεργάτες εφάρμοσαν την μέθοδο στην ανάλυση οίνων χρησιμοποιώντας την τεχνική της

έγχυσης σε ροή (FI) [13]. Ένας μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων εφαρμόζει την μέθοδο FC παράλληλα με κάποια ET μέθοδο (FRAP, ABTS κλπ) και συχνά οδηγείται σε γραμμική συσχέτιση μεταξύ του περιεχομένου σε ολικές φαινόλες και της αντιοξειδωτικής ενεργότητας των δειγμάτων. Το συμπέρασμα αυτό δεν αποτελεί έκπληξη αφού τα δύο είδη μεθόδων βασίζονται σε παρόμοιες χημείες.

Η μέθοδος βασίζεται στην οξειδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέως (Folin-Ciocalteu reagent, FCR) με τις ακόλουθες δομές:



σε φωσφορομολυβδενικό / φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε χρώματος σε αλκαλικό περιβάλλον.

Το αντιδραστήριο FC παρασκευάζεται τυπικά με βρασμό (για 10 h) μίγματος βολφραμικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 g), μολυβδαινικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 g), συμπυκνωμένου υδροχλωρικού οξέος (100 mL), 85% φωσφορικού οξέος (50 mL) και νερού (700 mL). Μετά το βρασμό, προστίθεται θειϊκό λίθιο ($\text{Li}_2\text{SO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 150 g) στο μίγμα ώστε να προκύψει διάλυμα έντονου κίτρινου χρώματος, το αντιδραστήριο FC. Η κατανάλωσή του από αναγωγικά αντιδραστήρια οδηγεί σε διάλυμα πράσινου χρώματος και η προσθήκη οξειδωτικών μπορεί να διατηρήσει το επιθυμητό κίτρινο χρώμα. Η χημική φύση του αντιδραστηρίου FC δεν είναι επακριβώς γνωστή. Αμφίδρομες αναγωγικές αντιδράσεις ενός ή δύο ηλεκτρονίων σχηματίζουν ενώσεις κυανού χρώματος, πιθανώς $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$. Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μία αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου λαμβάνει χώρα μεταξύ των αναγωγικών και του Mo(VI):



Το αντιδραστήριο FC είναι μη ειδικό στα φαινολικά συστατικά διότι μπορεί να αναχθεί και από άλλα μη φαινολικά συστατικά όπως η βιταμίνη C και ο Cu(I). Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το FCR μόνο υπό βασικές συνθήκες, γι' αυτό πραγματοποιείται ρύθμιση με διάλυμα ανθρακικού νατρίου σε pH 10. Ο ιοντισμός ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό φαινολικού ανιόντος, το οποίο ανάγει το FCR. Η αντίδραση αυτή υποστηρίζει τον μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίου. Τα κυανού χρώματος συστατικά που σχηματίζονται, είναι ανεξάρτητα από τη δομή των φαινολικών συστατικών,

αποκλείοντας την πιθανότητα σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ του κεντρικού μετάλλου και των φαινολικών συστατικών.

Η μέθοδος των ολικών φαινολών με χρήση του FCR είναι απλή και αναπαραγώγιμη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται συχνά στη μελέτη των φαινολικών αντιοξειδωτικών.

1.5. Μέθοδοι φωταύγειας

1.5.1. Χημειοφωταύγεια

Ως χημειοφωταύγεια (chemiluminescence) χαρακτηρίζεται η εκπομπή φωτός με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας (luminescence), ως αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης [14]. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι της ακόλουθης μορφής:



Όπου A και B είναι τα αντιδρώντα, E* ένα διεγερμένο ενδιάμεσο, P το προϊόν της αντίδρασης και hν το εκπεμπόμενο φως.



Σχήμα 1.1. Χημειοφωταύγεια στο εργαστήριο

Η εκπομπή του φωτός είναι αποτέλεσμα της ενεργειακής μετάπτωσης του ενδιάμεσου προϊόντος από την διεγερμένη κατάσταση στην θεμελιώδη. Στοιχειομετρικά, ένα φωτόνιο παράγεται από ένα μόριο αντιδραστήριου, όμως πρακτικά στις μη ενζυμικές αντιδράσεις η απόδοση δεν ξεπερνά το 1%. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χημειοφωταύγειας στο εργαστήριο είναι η δοκιμή της λουμινόλης (luminol), η οποία αλληλεπιδρά με το σίδηρο σε δείγμα αίματος. Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα λουμινόλης συγκέντρωσης 0,1 M, το οποίο περιέχει Na₂CO₃ και NaHBO₃. Το διάλυμα μεταφέρεται σε πλαστική φιάλη με ακροφύσιο spray, έτοιμο να χρησιμοποιηθεί σε επιφάνεια στην οποία υπάρχει

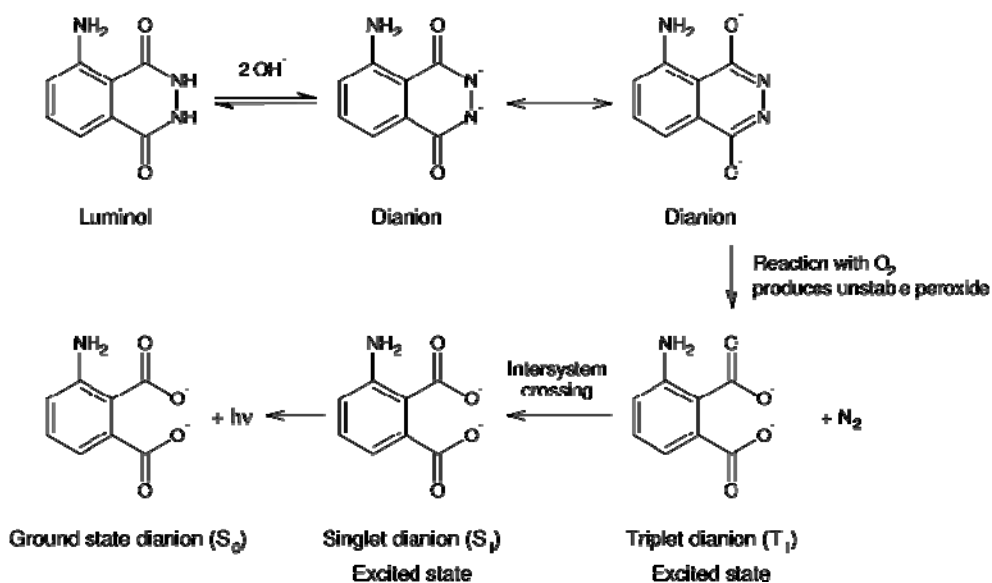
αίμα. Ο σίδηρος της αίμης καταλύει την αντίδραση οξείδωσης της λουμινόλης, που οδηγεί σε παραγωγή φωταύγειας. Η χημειοφωταύγεια διαρκεί για λίγα δευτερόλεπτα και είναι περισσότερο ορατή στο σκοτάδι.

1.5.1.1. Συστήματα χημειοφωταύγειας υγρής φάσης

- Η λουμινόλη αντιδρά με το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), σε αλκαλικό διάλυμα, παρουσία σιδήρου, χαλκού ή άλλου καταλύτη και παράγει χημειοφωταύγεια. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η ακόλουθη:



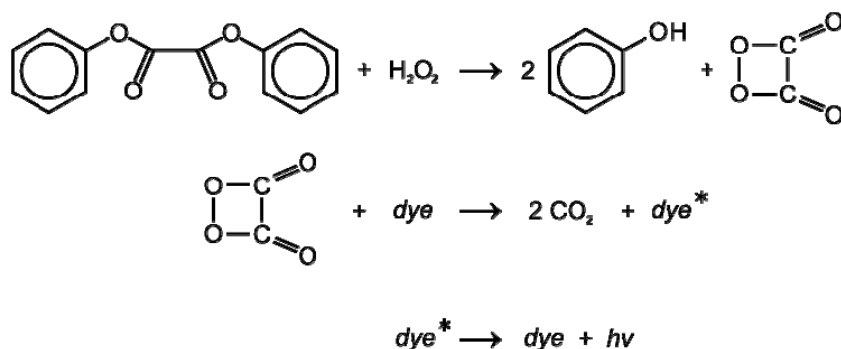
στην οποία παράγεται το 3-αμινοφθαλικό οξύ (3-APA). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 1%. Ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται στο σχήμα 1.2.



Σχήμα 1.2. Ο μηχανισμός της αντίδρασης χημειοφωταύγειας της λουμινόλης

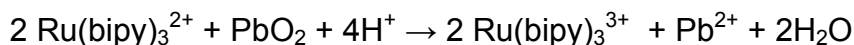
Η λουμινόλη βρίσκεται με τη μορφή διανιόντος (dianion) σε αλκαλικό διάλυμα. Η αντίδραση με το περιεχόμενο στο διάλυμα O_2 οδηγεί στον σχηματισμό ασταθών υπεροξυ-ριζών, οι οποίες βρίσκονται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση T_1 . Η μετάπτωση του συστήματος σε χαμηλότερες απλές ενεργειακές στάθμες, S_1 , έως την θεμελιώδη κατάσταση S_0 , έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φωτός ($h\nu$).

- Το χημικό φως *cyalume* χρησιμοποιείται στις αυτοφωτιζόμενες ράβδους (lightsticks). Εκπέμπεται φως κατά την χημειοφωταυγή αντίδραση:



Η χημειοφωταύγεια που οφείλεται στην αποδιέγερση της φθορίζουσας χρωστικής [dye*], παράγεται από την αντίδραση του οξαλικού διφαινουλίου με το υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία καταλύτη, όπως του σαλικυλικού νατρίου. Πρόκειται για την αντίδραση χημειοφωταύγειας με την μεγαλύτερη απόδοση που φτάνει το 15%. Η απόχρωση του εκπεμπόμενου φωτός εξαρτάται από την χρήση της κατάλληλης χρωστικής.

- Το οξαλικό χλωρίδιο $\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$ παράγει φως κατά την οξειδωσή του, αλλά μόνο παρουσία ενός ευαισθητοποιητή. Στον πίνακα 1.2. παρουσιάζονται ενώσεις που δρουν ως ευαισθητοποιητές, η χρήση των οποίων οδηγεί σε εκπομπή ακτινοβολίας διαφορετικού χρώματος. Το οξαλικό χλωρίδιο αντιδρά με το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε οργανικό μέσο, για παράδειγμα σε CH_2Cl_2 , παρουσία ενός ευαισθητοποιητή. Η ένταση και η διάρκεια της εκπομπής του φωτός εξαρτώνται από την χρησιμοποιούμενη ένωση. Η Ροδαμίνη 6G δίνει λαμπρό πορτοκαλί φως μέτριας διάρκειας εκπομπής.
- Η αναγωγή του Ru(III) στο σύμπλοκο $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$, σε Ru(II), σε αλκαλικό διάλυμα παρουσία οξειδωτικών αντιδραστηρίων, οδηγεί σε εκπομπή φωτός. Πρώτα πραγματοποιείται η αντίδραση σχηματισμού του Ru(III):



Κατά την προσθήκη διαλύματος τετραϋδροβορικού νατρίου NaBH_4 , το Ru(III) ανάγεται σε Ru(II), με ταυτόχρονη εκπομπή πορτοκαλί ακτινοβολίας.

- Το τετράκισ(διμεθυλο-αμινο)αιθυλένιο, TMAE, εκπέμπει κυανοπράσινη ακτινοβολία λόγω της οξειδωσής του από τον αέρα.
- Η πυρογαλλόλη παρουσιάζει επίσης την ιδιότητα της χημειοφωταύγειας. Εάν υδατικό διάλυμα πυρογαλλόλης, που περιέχει επιπλέον NaOH και K_2CO_3 , αναμιχθεί με φορμαλδεΰδη, παράγεται μικρής διάρκειας ερυθρή ακτινοβολία.

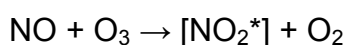
Πίνακας 1.2. Ευαισθητοποιητές

Χρώμα	Ευαισθητοποιητής (sensitizer)
Μπλε	9,10-Διφαινυλ-ανθρακένιο
Πράσινο	9,10-Δις-(φαινυλ-αιθυνυλ)-ανθρακένιο
Ανοιχτό Πράσινο	Τετρακένιο
Κίτρινο	1-Χλωρο-9,10-δις-(φαινυλ-αιθυνυλ)-ανθρακένιο
Πορτοκαλί	5,12-Δις-(φαινυλ-αιθυνυλ)ναφθακένιο, Ρουμπρίνη, Ροδαμίνη 6G
Κόκκινο	Ροδαμίνη Β

- Το μόριο του O_2 μπορεί επίσης να οδηγήσει σε χημειοφωταύγεια. Εκπέμπεται ασθενέστατο κόκκινο φως μετά την ανάμιξη διαλύματος H_2O_2 30% με διάλυμα $NaClO$ 5%. Για την ανίχνευση της ακτινοβολίας απαιτείται η παρουσία ενός ευαισθητοποιητή.
- Η οξειδωση της λουσιγενίνης αποτελεί μία από τις πιο γνωστές αντιδράσεις χημειοφωταύγειας. Υδατικό διάλυμα λουσιγενίνης αναμιγνύεται με ισχυρά αλκαλικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου, παρουσία αιθανόλης ή ακετόνης, οπότε παράγεται ακτινοβολία πράσινου χρώματος, που τελικά μετατρέπεται σε μπλε. Η διάρκεια εκπομπής μπορεί να ξεπεράσει τα 2 min, υπό συνθήκες.
- Διαλύματα που περιέχουν ιόντα $Mn(VII)$, $Mn(IV)$ ή $Mn(III)$ οδηγούν σε χημειοφωταύγεια κατά την αναγωγή τους σε $Mn(II)$ από το $NaBH_4$ σε όξινο διάλυμα.

1.5.1.2. Συστήματα χημειοφωταύγειας σε αέριο φάση

- Μία από τις πιο γνωστές αντιδράσεις χημειοφωταύγειας είναι αυτή της οξειδωσης του στοιχειακού λευκού φωσφόρου από τον υγρό αέρα, που οδηγεί στην παραγωγή πράσινης λάμψης. Πρόκειται για μία αντίδραση αέριας φάσης του φωσφόρου πάνω σε στερεό, όπου το οξυγόνο παράγει τις διεγερμένες καταστάσεις του $(PO)_2$ και HPO .
- Άλλη μία αντίδραση αέριας φάσης εφαρμόζεται στην ανίχνευση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) από αναλυτικά εμπορικά όργανα που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο ποιότητας του περιβαλλοντικού αέρα. Υπό την επίδραση του O_3 στο NO σχηματίζεται μία διεγερμένη κατάσταση του διοξειδίου του αζώτου [NO_2^*].



Η διεγερμένη κατάσταση [NO_2^*] παράγει φως στην ορατή προς υπέρυθρη περιοχή του φάσματος, καθώς μεταπίπτει σε χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη. Η μέτρηση των φωτονίων, τα οποία είναι ανάλογα με τη συγκέντρωση του NO , γίνεται με έναν φωτοπολλαπλασιαστή. Για τον προσδιορισμό του NO_2 σε ένα δείγμα, το οποίο δεν περιέχει NO , πρέπει να γίνει πρώτα η μετατροπή του σε NO , διότι το NO_2 δεν αλληλεπιδρά με το O_3 .

1.5.2. Βιοφωταύγεια

Ο όρος βιοφωταύγεια (bioluminescence) αναφέρεται στην παραγωγή και εκπομπή φωτός από ζωντανούς οργανισμούς ως αποτέλεσμα χημικών αντιδράσεων κατά τις οποίες χημική ενέργεια μετατρέπεται σε φωτεινή ενέργεια. Στις περισσότερες περιπτώσεις, στις αντιδράσεις αυτές, οι οποίες λαμβάνουν χώρα είτε μέσα στο κύτταρο είτε στον εξωκυττάριο χώρο, συμμετέχει το μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης, ATP.

Σε ειδική κατηγορία βιοφωταύγειας χρησιμοποιούνται ένζυμα, τα οποία δρουν ως καταλύτες των χημειοφωταυγών αντιδράσεων. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που μετράει την ικανότητα κατανάλωσης του H_2O_2 από τα αντιοξειδωτικά συστατικά των τροφίμων, χρησιμοποιεί το ένζυμο υπεροξειδάση για την οξειδωση ενός μορίου-υποστρώματος προς τον σχηματισμό ενός προϊόντος και την παραγωγή φωτός. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών παρεμποδίζει την οξειδωση. Η φύση της παρεμπόδισης δεν είναι σαφώς καθορισμένη. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να παρεμποδίσουν την

αντίδραση οξείδωσης α) αντιδρώντας απευθείας με το H_2O_2 , β) αντιδρώντας με ενδιάμεσα προϊόντα που σχηματίζονται από το ένζυμο και το H_2O_2 , ή γ) παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του H_2O_2 στο ένζυμο. Έτσι είναι αρκετά δύσκολο να εξηγηθεί η χημική έννοια των αποτελεσμάτων. Η τεχνική αυτού του είδους βιοφωταύγειας επιτρέπει την ανίχνευση μικροποσοτήτων ενός βιομορίου. Οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν σε μικρότερες των $fmol$ ποσότητες, δηλαδή κάτω από τα όρια ανίχνευσης των περισσοτέρων συστημάτων.

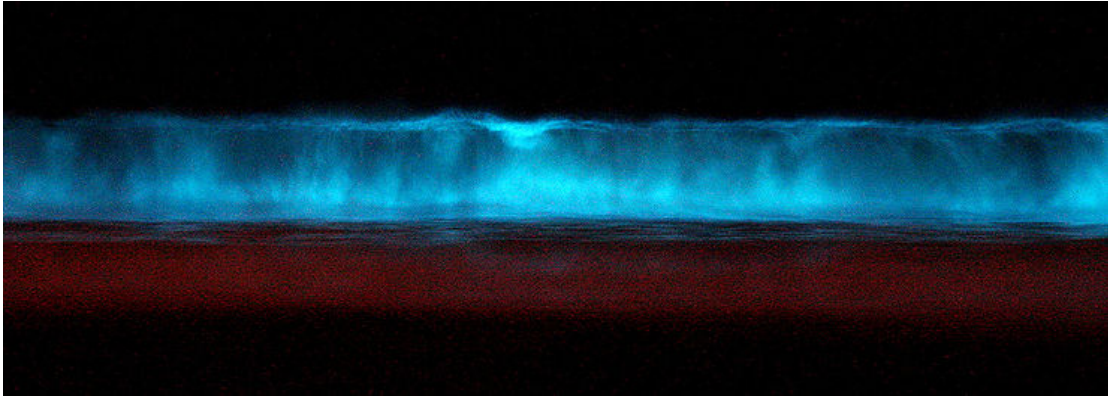
1.5.2.1 Χαρακτηριστικά βιοφωταύγειας

Το 90% της θαλάσσιας ζωής εκτιμάται ότι παράγει βιοφωταύγεια σε διάφορες μορφές. Το μεγαλύτερο ποσοστό εκπέμπει μπλε και πράσινη ακτινοβολία, σε μήκη κύματος που διαπερνούν τα θαλασσινό νερό πιο εύκολα. Εντούτοις, υπάρχουν κάποια είδη ψαριών υπό εξαφάνιση που παράγουν ερυθρό ή υπέρυθρο φως και επιπλέον το γένος *Tomopteris* εκπέμπει κίτρινη βιοφωταύγεια. Οι περισσότερες μορφές βιοφωταύγειας είναι διακριτές μόνο κατά τη διάρκεια της νύχτας. Εκτός του θαλάσσιου χώρου, το φαινόμενο της βιοφωταύγειας είναι λιγότερο διαδεδομένο, αλλά παρατηρείται μεγαλύτερη ποικιλία χρωμάτων στο εκπεμπόμενο φως. Οι δύο πλέον γνωστές μορφές είναι οι πυγολαμπίδες και κάποια είδη σκουληκιών (*glow worms*). Υπάρχουν και πολλά άλλα έντομα, στα οποία έχει παρατηρηθεί αυτή η ιδιότητα.

1.5.2.2. Προσαρμογή της βιοφωταύγειας σε ζωντανούς οργανισμούς

Έχουν διατυπωθεί πέντε κύριες αποδεκτές θεωρίες που επεξηγούν την εμφάνιση της ιδιότητας της βιοφωταύγειας σε ζωντανούς οργανισμούς. Οι οργανισμοί παράγουν φως με σκοπό:

- Την κάλυψη
- Την προσέλκυση
- Τον αντιπερισπασμό
- Την επικοινωνία
- Το φωτισμό



Σχήμα 1.3. Φωτογραφία φαινομένου βιοφωταύγειας, η λήψη της οποίας έγινε σε παραλία της Καλιφόρνια, το 2005. Απεικονίζονται λαμπερά φωτισμένα κύματα, που περιέχουν δισεκατομμύρια στελέχη του μικροοργανισμού *Lingulodinium polyedrum*.

1.5.2.3. Βιοφωταυγείς οργανισμοί

Όλα τα κύτταρα παράγουν κάποιας μορφής βιοφωταύγεια σε κάποια περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, αλλά ως επί το πλείστον δεν είναι ορατή με γυμνό μάτι. Η βιοφωταύγεια κάθε μικροοργανισμού είναι μοναδική ως προς το μήκος κύματος, τη διάρκεια, το χρόνο και τη συχνότητα των σημάτων. Στον πίνακα 1.3. περιλαμβάνονται είδη μικροοργανισμών που παρουσιάζουν ορατή βιοφωταύγεια.

Πίνακας 1.3. Είδη μικροοργανισμών που εμφανίζουν την ιδιότητα της βιοφωταύγειας

<p>Γήινοι οργανισμοί</p>	<p>arthropods, fireflies, glow worms, railroad worms, mycetophilid flies, centipedes, millipedes, annelids, μανιτάρια (Omphalotus olearius, Omphalotus nidiformis), Panellus stipticus, στελέχη του Mycena, Dyakia striata</p>
<p>Ψάρια</p>	<p>Cookie-cutter shark , Marine hatchetfish Anglerfish, Flashlight fish, Pineconefish, Porichthys, Gulper eel, rattails</p>
<p>• Θαλάσσιοι οργανισμοί</p>	<p>Cnidarians, Sea pens, Corals, <i>Aequorea victoria</i> (jellyfish), Ctenophores, Echinoderms (Ophiurida), Nudibranchs, Crustaceans, Οστρακοειδή, Krill, Molluscs clams, Octopus, Bolitaenidae, Teuthida Colossal Squid, Mastigoteuthidae, Sepiolidae, Sparkling Enope Squid, Vampire squid</p>
<p>Μικροοργανισμοί</p>	<p>Dinoflagellates, Vibrionaceae (<i>Vibrio fischeri</i>, <i>Vibrio harveyi</i>, <i>Vibrio phosphoreum</i>)</p>

Η ανάπτυξη του κλάδου της βιοτεχνολογίας βασίζεται στην παρατήρηση και χρησιμοποίηση βιοφωταυγών οργανισμών σε πολλούς τομείς της έρευνας. Οι μικροοργανισμοί αποτελούν πειραματικά μοντέλα.



Lampyris noctiluca

Σχήμα 1.4. Οργανισμός που παρουσιάζει βιοφωταύγεια σε ακραίο τμήμα του σώματός του και γίνεται αντιληπτό μόνο κατά τη διάρκεια της νύχτας.

1.5.2.4. Εφαρμογές της βιοφωταύγειας

- Στην αέρια ανάλυση, για τον προσδιορισμό ρύπων στον ατμοσφαιρικό αέρα. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό N-οξειδίων, του O₃ και του NO με όρια ανίχνευσης χαμηλότερα από 1 ppb.
- Στον προσδιορισμό ανόργανων ενώσεων σε υγρή φάση.
- Στον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων, όπου χρησιμοποιούνται ένζυμα. Το υπόστρωμα δεν συμμετέχει στην χημειοφωταυγή αντίδραση, αλλά το προϊόν της σύζευξης του ενζύμου με το υπόστρωμα.
- Στην ανίχνευση και τον προσδιορισμό βιομορίων με συστήματα ανοσοχημικών αντιδράσεων όπως στην τεχνική Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA.
- Στην παρασκευή αλληλουχιών DNA.
- Σε αυτοφωτιζόμενα αντικείμενα, όπως συστήματα ασφάλειας κλπ.

1.6. Σύνοψη

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία μεθόδων για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας. Οι μέθοδοι λαμβάνουν χώρα σε όξινες (FRAP), ουδέτερες (ABTS) και βασικές (Folin-Ciocalteu) συνθήκες. Η τιμή του pH έχει σημαντική επίδραση στην αναγωγική ικανότητα των αντιοξειδωτικών. Σε όξινες συνθήκες η αναγωγική ικανότητα μειώνεται εξαιτίας της πρωτονίωσης των αντιοξειδωτικών,

ενώ σε βασικές συνθήκες ο ιονισμός του πρωτονίου των φαινολικών συστατικών ενισχύει την αναγωγική ικανότητα του δείγματος. Το οξειδωτικό αντιδραστήριο στην μέθοδο FRAP έχει παραπλήσιο οξειδοαναγωγικό δυναμικό με αυτό του ABTS²⁻ (~0,7 V), αλλά το δυναμικό του Mo(VI)/Mo(V) δεν είναι γνωστό, πιθανώς λόγω της πολύπλοκης φύσης του αντιδραστήριου FC. Αυτά τα οξειδωτικά αντιδραστήρια μπορούν να αντιδρούν με κοινά αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες E ($E^\circ=0,5V$) και C ($E^\circ=0,28V$) και άλλα φαινορικά συστατικά. Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία από μεθόδους και οξειδωτικά αντιδραστήρια μεταξύ των οποίων μπορεί να επιλεγεί το κατάλληλο για συγκεκριμένο δείγμα. Το οξειδωτικό πρέπει να είναι εκλεκτικό μόνο ως προς τα αντιοξειδωτικά και δεν πρέπει να οξειδώνει συστατικά της μήτρας του δείγματος όπως για παράδειγμα η ζάχαρη, η οποία υπάρχει σε πολλά δείγματα τροφίμων. Είναι γνωστό ότι η ζάχαρη μειώνει τη συγκέντρωση μεταλλοϊόντων όπως ο Cu (II). Η εφαρμογή περισσότερων της μίας μεθόδων για την μέτρηση της αναγωγικής ικανότητας ενός αντιοξειδωτικού οδηγεί συχνά σε έξοχες γραμμικές συσχετίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, σε πολλές δημοσιεύσεις αναφέρονται πολύ καλές συσχετίσεις με $r^2 > 0,99$, μεταξύ του περιεχομένου σε ολικές φαινόλες, όπως μετρείται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, και της αντιοξειδωτικής ενεργότητας όπως εκτιμάται με τις μεθόδους FRAP, TEAC και ABTS [15]. Η μέθοδος FC παρουσιάζει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις ET μεθόδους:

- Το αντιδραστήριο FC είναι εμπορικά διαθέσιμο και η διαδικασία έχει καθοριστεί πλήρως.
- Η απορρόφηση του χρωμοφόρου σε μεγάλο μήκος κύματος, 730 nm, ελαχιστοποιεί την παρεμπόδιση της μήτρας του δείγματος, η οποία είναι συνήθως έγχρωμη.
- Είναι μία κοινώς αποδεκτή μέθοδος και εφαρμόζεται σε αναλύσεις ρουτίνας σε διατροφικά αντιοξειδωτικά σε ερευνητικά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο.
- Παράγεται ένας μεγάλος αριθμός συγκρίσιμων αποτελεσμάτων.

Η μέθοδος FC πραγματοποιείται σε βασικές συνθήκες (pH 10) για τον ιονισμό των φαινολικών συστατικών. Απλές φαινόλες, όπως η φαινυλομάδα της τυροσίνης, αντιδρούν με το αντιδραστήριο FC παρόλο που δεν είναι

αντιοξειδωτικά που καταναλώνουν ελεύθερες ρίζες. Για το λόγο αυτό η συσχέτιση μεταξύ της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας και του περιεχομένου ολικών φαινολών δεν είναι απολύτως επιτυχημένη. Η μέθοδος FC εφαρμόζεται για υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά διότι χρησιμοποιεί υδατικό μέσο. Για λιπόφιλα αντιοξειδωτικά απαιτείται τροποποίηση σε λιπόφιλο μέσο ή εκχύλιση των υδρόφιλων φαινολικών συστατικών από το δείγμα.

2. ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ - FLOW INJECTION (FI)

2.1. Ιστορική εξέλιξη - Η τεχνική της συνεχούς αεροδιαχωριζόμενης ροής

Οι μέθοδοι έγχυσης σε ροή (Flow Injection, FI) στη σημερινή μορφή τους περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τους Ruzicka και Hansen στη Δανία [16] και τον Stewart και τους συνεργάτες του στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής [17] κατά τα μέσα της δεκαετίας του 1970. Οι μέθοδοι FI αποτελούν εξέλιξη των μεθόδων αεροδιαχωριζόμενης ροής, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα σε κλινικά εργαστήρια κατά τις δεκαετίες του 1960 και 1970, για τον αυτοματισμό αναλύσεων ρουτίνας δειγμάτων αίματος και ούρων για διαγνωστικούς ιατρικούς σκοπούς. Στα συστήματα αεροδιαχωριζόμενης ροής, τα οποία κατασκευάστηκαν σε βιομηχανική κλίμακα από μία μόνο εταιρία στις ΗΠΑ, τα δείγματα μεταφέρονταν μέσω του συστήματος προς τον ανιχνευτή με ένα διάλυμα σε ροή. Το διάλυμα χωρίζεται σε πολλά τμήματα με ενδιάμεση παρεμβολή φυσαλίδων αέρα. Ο σκοπός των φυσαλίδων αυτών ήταν η αποφυγή υπερβολικής διασποράς του δείγματος, η ενίσχυση της τυρβώδους ανάμιξης των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων και η έκπλυση των τοιχωμάτων των σωληνώσεων για να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ διαδοχικών δειγμάτων. Ωστόσο διαπιστώθηκε ότι η υπερβολική διασπορά και η διασταυρούμενη μόλυνση εκμηδενίζονται σχεδόν πλήρως σε ένα καλά σχεδιασμένο σύστημα χωρίς φυσαλίδες αέρα και ότι η ανάμιξη δειγμάτων και αντιδραστηρίων μπορεί να επιτευχθεί εύκολα [18].

Η απουσία φυσαλίδων εισάγει αρκετά πλεονεκτήματα στις μετρήσεις με έγχυση σε ροή, όπως:

- Υψηλοί ρυθμοί ανάλυσης, τυπικά από 100 έως 300 δείγματα την ώρα,
- Βελτιωμένοι χρόνοι απόκρισης, συχνά απαιτείται λιγότερο από 1 min μεταξύ έγχυσης του δείγματος και λήψης σήματος από τον ανιχνευτή,
- Ταχύτεροι χρόνοι έναρξης και τερματισμού του συστήματος, μικρότεροι από 5 min,
- Απλούστερες και ευκολότερα τροποποιήσιμες συσκευές.

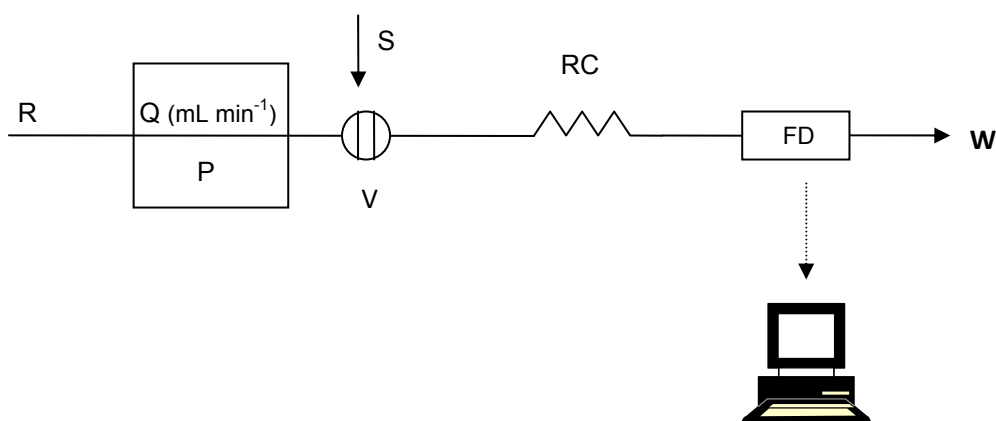
Τα δύο τελευταία πλεονεκτήματα έχουν ιδιαίτερη σημασία, επειδή καθιστούν εφικτή και οικονομική την αυτοματοποίηση σε σχετικά περιορισμένο αριθμό μετρήσεων και όχι κατ' ανάγκη σε βάση μετρήσεων ρουτίνας. Ως αποτέλεσμα

αυτών των πλεονεκτημάτων, τα συστήματα συνεχούς αεριοδιαχωριζόμενης ροής έχουν αντικατασταθεί από μεθόδους FI.

2.2. Γενικές Αρχές Λειτουργίας της τεχνικής FI

Η τεχνική FI βασίζεται στην εισαγωγή ενός υγρού δείγματος σε συνεχές ρεύμα διαλύματος κατάλληλου αντιδραστηρίου [19]. Το εισαγόμενο δείγμα σχηματίζει ζώνη κινούμενη προς τον ανιχνευτή, που καταγράφει συνεχώς το μετρούμενο μέγεθος (απορρόφηση, φθορισμό, δυναμικό, κ.α.)

Το απλούστερο σύστημα FI (σχήμα 2.1.) αποτελείται από μια περισταλτική αντλία (P) για την προώθηση του φέροντος αντιδραστηρίου (R), μέσα από ένα λεπτό σωλήνα διαμέτρου 0,5 έως 1,5 mm, μία βαλβίδα εισαγωγής (V), με την οποία αυστηρά καθορισμένος όγκος δείγματος (S) εισάγεται στο φέρον αντιδραστήριο και ένα σπείραμα αντίδρασης (RC), όπου η ζώνη του δείγματος αναμιγνύεται και αντιδρά με τα συστατικά του φέροντος αντιδραστηρίου.



Σχήμα 2.1. Σύστημα FI ενός διαύλου.

Επιλέγεται συγκεκριμένη τιμή ταχύτητας ροής Q . Η αναλυτική παράμετρος του προϊόντος που σχηματίζεται μετρείται στον ανιχνευτή ροής (FD) και το σήμα καταγράφεται σε προσωπικό υπολογιστή. Ένα τυπικό γράφημα έχει τη μορφή μιας κορυφής. Η συγκέντρωση του δείγματος (C) σχετίζεται με το ύψος (H), το εμβαδό (A) ή το πλάτος της κορυφής (W) σε ορισμένο ύψος. Η συγκέντρωση υπολογίζεται από καμπύλη αναφοράς και οι σχέσεις που χρησιμοποιούνται, όταν η ανίχνευση γίνεται με ανιχνευτή γραμμικής αποκρίσεως, είναι:

$$H = k_1 C$$

$$A = k_2 C$$

$$W = k_3 \log C + a$$

Όπου k_1 , k_2 και k_3 είναι συντελεστές αναλογίας.

Εκτός από τη μέτρηση του ύψους της κορυφής, μερικές φορές αξιοποιείται η κατακόρυφη απόσταση κάποιου σημείου, που βρίσκεται στο ανερχόμενο ή κατερχόμενο τμήμα της καμπύλης, από τη γραμμή βάσης. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί τη βάση για τις τεχνικές βαθμιδωτής συγκέντρωσης.

Η μέτρηση του εμβαδού δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν ο ανιχνευτής είναι λογαριθμικής αποκρίσεως, όπως τα εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων, γιατί η σχέση παύει να είναι γραμμική, αφού η περιοχή που βρίσκεται κοντά στη γραμμή βάσης έχει διαφορετική βαρύτητα από την περιοχή που βρίσκεται κοντά στην κορυφή.

Τέλος, η μέτρηση του πλάτους της κορυφής δίνει μεγαλύτερη περιοχή μετρήσεων, γίνεται σε μονάδες χρόνου και αποτελεί τη βάση των ογκομετρήσεων FI.

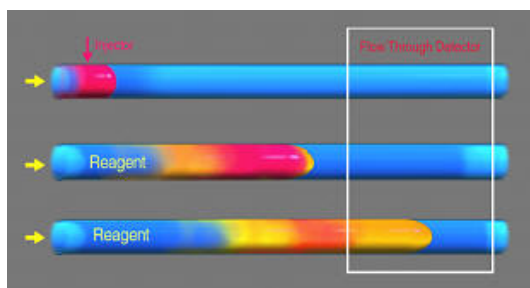
Ο χρόνος από την εισαγωγή του δείγματος έως την εμφάνιση του μεγίστου της κορυφής, είναι ο χρόνος παραμονής T , κατά τον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση. Ο χρόνος έκπλυσης είναι ο χρόνος από την εμφάνιση του μεγίστου της κορυφής μέχρι την απομάκρυνση του δείγματος από τον ανιχνευτή. Ένα σωστά σχεδιασμένο σύστημα FI έχει πολύ γρήγορη απόκριση, όπου ο χρόνος T κυμαίνεται από 2 έως 30 s. Με την προϋπόθεση ότι και ο χρόνος έκπλυσης είναι μικρός, επιτυγχάνεται καλή συχνότητα μετρήσεων. Συνήθεις τιμές των παραμέτρων ενός συστήματος δίνονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Τυπικές τιμές παραμέτρων συστήματος FI

Όγκος δείγματος	40-200 μL
Διάμετρος σπειραμάτων	0,5-1,5 mm
Ταχύτητα ροής	0,5-2,5 mL min^{-1}
Όγκος ανιχνευτή ροής	8-40 μL
Μήκος σπειραμάτων	10-200 cm
Χρόνος ανάλυσης	20-60

2.3. Θεωρητικά στοιχεία της FI

Αμέσως μετά την έγχυση του δείγματος με βαλβίδα στο σύστημα FI, η ζώνη του δείγματος αποκτά μία κατανομή συγκέντρωσης, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 2.2.



Σχήμα 2.2. Μορφή της ζώνης του δείγματος στη ροή του αντιδραστηρίου (reagent).

Καθώς η ζώνη κινείται στον σωλήνα, αρχίζει να διασπείρεται (dispersion). Το σχήμα που αποκτά η ζώνη καθορίζεται από δύο φαινόμενα. Το πρώτο είναι η εξαναγκασμένη μεταφορά (convection), η οποία είναι αποτέλεσμα της στρωτής ροής, κατά την οποία το κέντρο του υγρού κινείται ταχύτερα σε σχέση με το υγρό που βρίσκεται πλησιέστερα προς τα τοιχώματα του σωλήνα. Έτσι, η ζώνη αποκτά ένα μέτωπο παραβολικού σχήματος και μία λοξότητα στην κατανομή. Η διεύρυνση της ζώνης οφείλεται και στη διάχυση, η οποία διακρίνεται στην ακτινωτή (radial) ή κάθετη προς τη ροή και στη διαμήκη (longitudinal), η οποία είναι παράλληλη προς τη ροή. Έχει αποδειχθεί ότι η διαμήκης διάχυση δεν είναι σημαντική σε στενούς σωλήνες, ενώ πάντοτε σημαντική είναι η ακτινωτή διάχυση. Στις πολύ μικρές ταχύτητες ροής, η ακτινωτή διάχυση αποτελεί την κυριότερη αιτία διασποράς. Στην πράξη οι αναλύσεις με την τεχνική FI πραγματοποιούνται σε συνθήκες που ευνοούν τη

διασπορά τόσο με εξαναγκασμένη μεταφορά όσο και με ακτινωτή διάχυση. Στις συνθήκες αυτές λαμβάνονται κορυφές με διεύρυνση στην αρχή τους. Στην περίπτωση αυτή η ακτινωτή διασπορά από τα τοιχώματα προς το κέντρο βοηθά και την 'έκπλυση' των τοιχωμάτων από τον αναλύτη περιορίζοντας έτσι τη διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των δειγμάτων.

2.3.1. Διασπορά του δείγματος

Η διασπορά D ορίζεται από την εξίσωση

$$D = C_0 / C$$

Όπου C_0 είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο εγχεόμενο δείγμα και C είναι η συγκέντρωση κορυφής στον ανιχνευτή. Η διασπορά μετρείται εύκολα με έγχυση διαλύματος χρωστικής ουσίας γνωστής συγκέντρωσης C_0 και στη συνέχεια μέτρηση της απορρόφησης σε μια κυψελίδα ροής. Μετά τη βαθμονόμηση, η C υπολογίζεται από το νόμο του Beer, $A = \epsilon_0 b C$, όπου A η τιμή της απορρόφησης, ϵ_0 η μοριακή απορροφητικότητα σε $L \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, b η οπτική διαδρομή σε cm και C η συγκέντρωση mol L^{-1} .

Η διασπορά εξαρτάται από τρεις αλληλοσυνδεόμενες μεταβλητές: τον όγκο του δείγματος, το μήκος του σωλήνα και την ταχύτητα ροής. Η επίδραση του όγκου του δείγματος στη διασπορά μελετάται ενώ διατηρούνται σταθερές οι άλλες δύο μεταβλητές. Με αύξηση του όγκου του δείγματος παρατηρείται αύξηση του ύψους της κορυφής και μείωση της διασποράς. Ο όγκος του δείγματος V συνδέεται με τη διασπορά D με την ακόλουθη σχέση:

$$1/D = 1 - e^{-kV}$$

Όπου k σταθερά για συγκεκριμένο σύστημα FI. Να σημειωθεί ότι για μεγάλους όγκους δείγματος, η διασπορά γίνεται ίση με τη μονάδα φτάνοντας σε πλατό. Κάτω από τις συνθήκες αυτές δεν πραγματοποιείται καμία ανάμιξη μεταξύ του δείγματος και του φέροντος διαλύματος και επομένως δεν υπάρχει αραίωση. Όμως στις περισσότερες αναλύσεις, το δείγμα πρέπει να αναμιγνύεται με το φέρον διάλυμα. Η αύξηση του όγκου του δείγματος οδηγεί ταυτόχρονα σε αύξηση του εύρους της κορυφής με επακόλουθη μείωση της συχνότητας μετρήσεων. Η σημαντική επίδραση του όγκου δείγματος στο ύψος της κορυφής καθιστά απαραίτητη την αυστηρά επαναλήψιμη εισαγωγή των δειγμάτων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που αναμένονται τιμές διασποράς μεγαλύτερες από 2.

Όταν ο όγκος του δείγματος και η ταχύτητα ροής διατηρούνται σταθερά, το μήκος του σωλήνα έχει σημαντική επίδραση στη διασπορά. Καθώς αυξάνεται το μήκος του σωλήνα, εμφανίζονται κορυφές με μεγαλύτερο εύρος και μικρότερο ύψος. Η απορρόφηση μειώνεται ενώ αυξάνεται η διασπορά. Επιπλέον, η αύξηση της ταχύτητας ροής οδηγεί σε επερχόμενη μείωση της διασποράς όταν οι υπόλοιπες μεταβλητές διατηρούνται σταθερές.

Ο μέσος χρόνος παραμονής του δείγματος T εξαρτάται από το μήκος L και την ακτίνα R του σωλήνα, καθώς και από την ταχύτητα ροής Q , σύμφωνα με την εξίσωση

$$T = \pi R^2 L / Q.$$

Σημειώνεται ότι όσο πιο συμμετρική είναι η κορυφή τόσο ο μέσος χρόνος παραμονής πλησιάζει το χρόνο εμφάνισης του μεγίστου της κορυφής. Η διασπορά έχει βρεθεί ότι είναι ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του μέσου χρόνου παραμονής T

$$D = k' T^{1/2}.$$

Όπου k' είναι σταθερά που εξαρτάται από το συγκεκριμένο σύστημα FI που εξετάζεται. Κατά συνέπεια, η διασπορά είναι ευθέως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του μήκους, της ακτίνας του σωλήνα, και αντιστρόφως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας της ταχύτητας ροής.

Όταν $D = 2$ το δείγμα έχει υποστεί αραίωση 1:1 μέσα στο φέρον ρεύμα. Γενικά το δείγμα υφίσταται αραίωση 1:($D-1$). Τιμές $D = 1-3$ χαρακτηρίζουν σύστημα περιορισμένης διασποράς, ενώ $D = 3-10$ μεσαίας διασποράς και $D > 10$ μεγάλης διασποράς.

Ανάλογα με το αν επικρατεί διασπορά λόγω μεταφοράς ή λόγω διάχυσης διακρίνονται τρεις περιπτώσεις:

- Διασπορά ελεγχόμενη από τη μεταφορά. Στην περίπτωση αυτή η διάχυση δεν έχει εξελιχθεί γιατί το δείγμα μόλις έχει εισαχθεί στη ροή.
- Διασπορά ελεγχόμενη από τη διάχυση. Στην περίπτωση αυτή έχει περάσει πολύς χρόνος από την εισαγωγή του δείγματος και η διάχυση έχει μεταβάλει τη διαμόρφωση της ζώνης του.
- Διασπορά ελεγχόμενη από τη μεταφορά και τη διάχυση. Η περίπτωση αυτή είναι χαρακτηριστική για όλα σχεδόν τα συστήματα FI . Παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες στη θεωρητική περιγραφή της.

2.3.2. Αμοιβαία διασπορά δείγματος και αντιδραστηρίου

Όχι μόνο το δείγμα διασπείρεται στο αντιδραστήριο αλλά και το αντιδραστήριο στο δείγμα. Παρουσιάζονται ζώνες μειούμενης συγκέντρωσης του δείγματος καθώς απομακρυνόμαστε από το κέντρο του. Σε αυτές τις ζώνες, που μειώνεται η συγκέντρωση του δείγματος, η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου βαίνει αυξανόμενη. Παρατηρείται δηλαδή αμοιβαία διασπορά δείγματος και αντιδραστηρίου. Ο συντελεστής του αντιδραστηρίου ορίζεται παρόμοια με αυτόν του δείγματος:

$$D_R = C_{R0} / C_R$$

Όπου C_{R0} η αρχική συγκέντρωση του αντιδραστηρίου και C_R η συγκέντρωση που έχει όταν περνά από τον ανιχνευτή.

Τα δύο μεγέθη σχετίζονται με την παρακάτω σχέση:

$$1 / D + 1 / D_R = 1$$

Έτσι μεγάλη διασπορά του δείγματος σημαίνει μικρή διασπορά του αντιδραστηρίου και αντίστροφα.

2.3.3. Διασπορά και εφαρμογές συστημάτων FI

Όπως αναφέρθηκε, τα συστήματα FI χαρακτηρίζονται ως περιορισμένης, μεσαίας ή μεγάλης διασποράς.

- Συστήματα περιορισμένης διασποράς ($D = 1-3$). Όταν ενδιαφέρει ο προσδιορισμός να γίνει σε δείγμα 'ως έχει', δηλαδή χωρίς να προηγηθεί αραίωση, κατεργασία ή προσθήκη αντιδραστηρίων, η τεχνική χρησιμοποιείται ως ένα μέσο για την αυτοματοποιημένη, ταχεία και επαναλήψιμη μεταφορά του δείγματος στον ανιχνευτή. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιούνται συστήματα περιορισμένης διασποράς στα οποία συνήθως οι ταχύτητες ροής είναι μεγάλες, ο όγκος του δείγματος σε σχέση με τον όγκο του αντιδραστήρα είναι σημαντικός και το μήκος και η ακτίνα του αντιδραστήρα είναι μικρή. Κλασσικό παράδειγμα είναι ο προσδιορισμός pH με ηλεκτρόδιο υάλου ροής και ο προσδιορισμός μεταλλοϊόντων με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης.
- Συστήματα μεσαίας διασποράς ($D = 3-10$). Όταν για να προσδιορισθεί ένα μη ανιχνεύσιμο συστατικό δείγματος μετατρέπεται με χημική αντίδραση σε

ανιχνεύσιμο είδος, χρησιμοποιείται σύστημα μεσαία διασποράς, που επιτρέπει την επαναλήψιμη ανάμιξη των αντιδρώντων και τον έλεγχο του χρόνου αντίδρασης. Σε αυτή την περίπτωση δεν ενδιαφέρει η ολοκλήρωση της αντίδρασης αλλά η επαναληπτικότητα της ανάμιξης και του χρόνου αντίδρασης. Τα περισσότερα συστήματα FI υπάγονται σε αυτήν την κατηγορία και χαρακτηρίζονται από αντιδραστήρες με μεγαλύτερους όγκους, χαμηλότερες ταχύτητες ροής και προσθήκη ενός ή περισσότερων ρευμάτων αντιδραστηρίων. Η συχνότητα μετρήσεων και η ευαισθησία είναι γενικά μικρότερες από ότι στην προηγούμενη κατηγορία.

- Συστήματα μεγάλης διασποράς ($D > 10$). Πετυχαίνονται με χρήση εξωτερικού θαλάμου αναμείξεως με αναδευτήρα, του οποίου ο όγκος κυριαρχεί του όγκου του συστήματος. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται στις ογκομετρήσεις FI, που η θεωρητική τους θεμελίωση περιγράφεται από τους Ruzicka και Hansen [16].

2.3.4. Επίδραση του αντιδραστήρα στη μορφή των καμπυλών FI

Παρακάτω περιγράφονται οι σπουδαιότεροι αντιδραστήρες που χρησιμοποιούνται στην FI.

Στον ευθύγραμμο διάυλο δεν υπάρχει δευτερεύουσα ροή. Έτσι η ακτινική διασπορά οφείλεται μόνο στη διάχυση η οποία για το χρόνο που διαρκεί ένα πείραμα είναι ασήμαντη. Στην περίπτωση αυτή επικρατεί η αξονική διασπορά και οι κορυφές που λαμβάνονται είναι ασύμμετρες.

Ο περιελιγμένος αντιδραστήρας ή σπείραμα αντίδρασης είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος αντιδραστήρα. Στον αντιδραστήρα αυτό επάγεται δευτερεύουσα ροή. Το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση μιας πιο συμμετρικής, υψηλής και στενής κορυφής από αυτή που παρατηρείται με χρήση ευθύγραμμου διαύλου ίδιου μήκους. Όσο πιο μικρή είναι η διάμετρος περιέλιξης του σπειράματος τόσο πιο έντονη είναι η επίδραση στη μορφή των κορυφών.

Ο πλεκτός αντιδραστήρας, που αρχικά χρησιμοποιήθηκε για δημιουργία ανιχνεύσιμων προϊόντων στην έξοδο χρωματογραφικής στήλης δημιουργεί έντονη δευτερεύουσα ροή με αποτέλεσμα τη λήψη υψηλότερων και στενότερων κορυφών.

Η πλήρωση του αντιδραστήρα με σφαιρίδια αδρανούς υλικού έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε χρωματογραφικές τεχνικές και έχει όλα τα πλεονεκτήματα

που παρουσιάζει ο πλεκτός αντιδραστήρας. Πετυχαίνοντας ακόμα μεγαλύτερη μείωση του εύρους των κορυφών, είναι ο μοναδικός αντιδραστήρας που επιτρέπει την ταυτόχρονη παρουσία περισσότερων του ενός δειγμάτων, εμποδίζοντας τη μεταξύ τους ανάμιξη. Μειονέκτημά του είναι ότι παρουσιάζει μεγάλο λόγο επιφάνειας προς όγκο, γεγονός που βοηθά την ανάπτυξη ανεπιθύμητων επιφανειακών φαινομένων και τη δημιουργία υψηλών πιέσεων. Αν βέβαια μία αλληλεπίδραση στερεού-υγρού είναι επιθυμητή, όπως στην περίπτωση ακινητοποιημένων ενζύμων, το γεγονός αυτό είναι σημαντικό πλεονέκτημα.

Ένας θάλαμος αναμείξεως, με το μεγάλο συντελεστή διασποράς που παρουσιάζει, δίνει τη δυνατότητα για πραγματοποίηση ογκομετρήσεων, για την αραίωση πολύ πυκνών δειγμάτων και την εκτέλεση πειραμάτων βαθμιδωτής συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα δεν βασίζονται σε μετρήσεις μόνο στην κορυφή αλλά αξιοποιούνται δεδομένα που λαμβάνονται στο ανερχόμενο ή/και κατερχόμενο τμήμα της καμπύλης. Κορυφές που λαμβάνονται με τον αντιδραστήρα αυτό είναι ασύμμετρες και παρουσιάζουν ένα αργά κατερχόμενο τμήμα. Έχουν δηλαδή μεγάλο εύρος και δεν επιτρέπουν μεγάλη συχνότητα μετρήσεων.

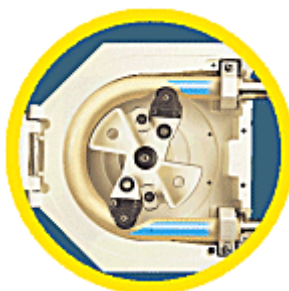
Πρέπει να τονισθεί ότι γενικά ο στόχος κατά το σχεδιασμό του αντιδραστήρα είναι η επίτευξη μέγιστης ανάμιξης δείγματος-αντιδραστηρίου, και ταυτόχρονα η ελαχιστοποίηση του πλάτους των κορυφών.

2.4. Οργανολογία αναλυτή FI

Ένας αναλυτής FI αποτελείται από α) σύστημα προώθησης των αντιδραστηρίων, β) σύστημα εισαγωγής του δείγματος, γ) αντιδραστήρα, δ) ανιχνευτή, και ε) καταγραφέα και/ ή Η/Υ.

2.4.1. Συστήματα προώθησης αντιδραστηρίων

Για την προώθηση των αντιδραστηρίων χρησιμοποιούνται κυρίως περισταλτικές αντλίες, συσκευές στις οποίες το ρευστό, υγρό ή αέριο, βρίσκεται μέσα σε σωλήνα και πιέζεται από μικρούς περιστρεφόμενους μεταλλικούς κυλίνδρους. Οι αντλίες αυτές επιτρέπουν την εύκολη ρύθμιση των ταχυτήτων ροής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναρρόφηση διαλυμάτων και συνήθως έχουν τη δυνατότητα προώθησης αντιδραστηρίων σε περισσότερους του ενός διαύλους. Το μειονέκτημα τους είναι ότι η ροή που δημιουργούν δεν είναι τελείως ελεύθερη παλμών. Επίσης υπάρχει κίνδυνος να αναπτυχθούν παλμοί στατικού ηλεκτρισμού, που επιβάλλουν τη λήψη μέτρων όταν χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων. Οι σωλήνες που χρησιμοποιούνται στις περισταλτικές αντλίες, παρά την ποικιλία των υλικών κατασκευής, δεν επιτρέπουν τη χρήση όλου του φάσματος των οργανικών διαλυτών. Το πρόβλημα της προώθησης διαβρωτικού διαλύτη λύνεται περιστασιακά με την ακόλουθη προώθηση υδατικού μέσου για τον εκτοπισμό του πρώτου από το σύστημα. Μία αντλία καλής κατασκευής πρέπει να μην παρουσιάζει αυξομειώσεις της ταχύτητας ροής, ιδιότητα ιδιαίτερα σημαντική κατά τη διάρκεια των μετρήσεων και να επιτρέπει το ακαριαίο σταμάτημα της ροής, ιδιότητα ιδιαίτερα χρήσιμη στην τεχνική με παύση ροής (stop flow, FI-SF). Η σταθερότητα της ροής πετυχαίνεται με σύστημα αναδράσεως στο τροφοδοτικό της αντλίας για την αντιμετώπιση αυξήσεων της αντίστασης του συστήματος ροής. Στο σχήμα 2.3 απεικονίζεται ένα είδος περισταλτικής αντλίας.



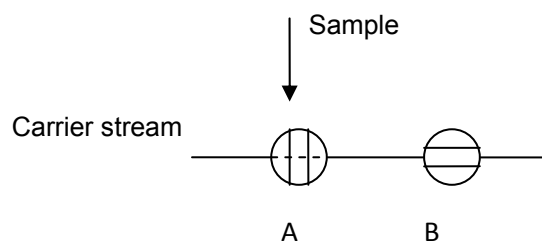
Σχήμα 2.3. Εικόνα στην οποία φαίνεται ένας διάυλος τοποθετημένος σε περισταλτική αντλία.

Οι πλέον κοινά χρησιμοποιούμενες αντλίες διαθέτουν 8 έως 10 περιστρεφόμενους κυλίνδρους σε κυκλική διεύθυνση έτσι, ώστε κάθε στιγμή οι μισοί να πιέζουν τους σωλήνες. Οι περιστρεφόμενοι κύλινδροι τυπικών περισταλτικών αντλιών του εμπορίου έχουν αρκετό μήκος, ώστε να είναι δυνατή η παράλληλη τοποθέτηση και λειτουργία πολλών πλαστικών σωλήνων. Η ταχύτητα ροής του συστήματος ελέγχεται από την ταχύτητα περιστροφής του κινητήρα, η οποία πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 30 περιστροφές / min, όπως επίσης και από την εσωτερική διάμετρο των πλαστικών σωλήνων.

2.4.2. Συστήματα εισαγωγής δείγματος

Στα πρώτα συστήματα FI, η εισαγωγή του δείγματος γινόταν με ένεση (injection) μέσω διαφράγματος (septum), από όπου προήλθε και το όνομα της τεχνικής. Ο τρόπος αυτός εισαγωγής παρουσίαζε κακή επαναληψιμότητα ενώ δεν δεχόταν αυτοματοποίηση.

Οι εγχυτές ή εισαγωγείς (injectors) δειγμάτων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην FI είναι παρόμοιοι με τους αντίστοιχους που χρησιμοποιούνται σε τεχνικές υγροχρωματογραφίας HPLC. Ο όγκος του δείγματος καθορίζεται από τον όγκο του βρόχου δειγματοληψίας ο οποίος πληρώνεται με διάλυμα δείγματος. Το μέγεθος του δείγματος στις μεθόδους FI κυμαίνεται από 10 έως 200 μL , ενώ συνήθεστερα ο όγκος του δείγματος που εγχέεται είναι 10 έως 30 μL . Για μία επιτυχημένη μέτρηση, είναι σημαντικό το διάλυμα του εισαγόμενου δείγματος να εγχέεται ταχύτατα αποκτώντας τη μορφή ενός παλμού ή βύσματος (plug) υγρού στο φέρον ρεύμα. Επιπλέον, οι εγχύσεις δεν πρέπει να διαταράσσουν τη ροή του φέροντος ρεύματος. Μία τυπική μέθοδος εισαγωγής δείχνεται στο σχήμα 2.4.



Σχήμα 2.4. Εισαγωγή δείγματος στη βαλβίδα. Θέση A: φόρτωση του δείγματος (load), Θέση B: έγχυση του δείγματος (inject) στο φέρον ρεύμα (carrier stream).

Με τη βαλβίδα δειγματοσιμίου στην θέση A, η ροή των αντιδραστηρίων συνεχίζει μέσω της παράκαμψης, ενώ το δείγμα ρέει μέσω της βαλβίδας. Όταν η βαλβίδα στραφεί κατά 90°, στη θέση B, το δείγμα εισάγεται στη ροή σαν μία καθορισμένη ζώνη. Για πρακτικούς λόγους, η ροή μέσω της παράκαμψης διακόπτεται όταν η βαλβίδα είναι στη θέση αυτή, επειδή η διάμετρος του βρόχου δειγματοσιμίου (sampling loop) είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τη διάμετρο του σωλήνα παράκαμψης. Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η έγχυση μπορεί να γίνει με σύριγγα, ο πλέον χρησιμοποιούμενος τρόπος εισαγωγής δείγματος βασίζεται σε βρόχους δειγματοληψίας, παρόμοιους με αυτούς της υγρής χρωματογραφίας. Στα συστήματα FI συχνά περιλαμβάνεται ένα τμήμα σωλήνα με τη μορφή σπειράματος. Τυπική διάμετρος του σπειράματος είναι 1 cm ή μικρότερη. Το σπείραμα βελτιώνει την αξονική διασπορά και ενισχύει την ακτινωτή ανάμιξη δείγματος και αντιδραστηρίου, τα οποία οδηγούν σε περισσότερο συμμετρικές κορυφές.

2.4.3. Αντιδραστήρες και διάυλοι συστήματος FI

Οι διάφοροι τύποι αντιδραστήρων που χρησιμοποιούνται περιγράφονται στο εδάφιο 2.3.4. Συνήθως, τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή τους είναι το PVC, η γόμμα σιλικόνης (silicone rubber) και πολυμερή με φθόριο F (fluoropolymer) όπως τα PTFE και PVDF.

Τα πιο κοινά εμπορικά ονόματα διαύλων περισταλτικής αντλίας είναι Tygon, Viton, Norylene, Biorene, Teflon κ.α. Στην αγορά διατίθεται μία μεγάλη ποικιλία διαύλων με εσωτερική διάμετρο από 0,25 έως 4 mm. Έτσι, μπορούν να πραγματοποιηθούν ροές από 0,0005 έως και 40 mL min⁻¹. Για εκχυλίσεις, διάχυση αερίων και διαπίδυση χρησιμοποιούνται ειδικά συστήματα με

μεμβράνες, που εκλεκτικά επιτρέπουν ή αποκλείουν τη δίοδο σε διαλύτες ή ουσίες.

2.4.4. Ανιχνευτές

Ανιχνευτές που διαθέτουν κυψελίδα ροής και χρησιμοποιούνται στην τεχνική της αεροδιαχωριζόμενης ροής ή στην τεχνική της υγρής χρωματογραφίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην τεχνική FI. Ενώ στις χρωματογραφικές τεχνικές υπάρχει συνήθως ανάγκη για μη εκλεκτικούς ανιχνευτές, στη FI επιζητείται η μεγαλύτερη δυνατή εκλεκτικότητα του ανιχνευτή.

Κατά το σχεδιασμό ενός συστήματος FI πρέπει να εκτιμάται η επίδραση της κυψελίδας ροής στο πλάτος των κορυφών. Η διαπλάτυνση των κορυφών οφείλεται κυρίως στο 'νεκρό όγκο', τον όγκο της κυψελίδας ροής, του ανιχνευτή. Οι κυψελίδες ροής που χρησιμοποιούνται στην HPLC έχουν συνήθως όγκο μικρότερο από 20 μL και είναι κατάλληλες για την FI.

Οι ανιχνευτές αποκρίνονται στη συγκέντρωση του διαλύματος, είτε σε όλη τη μάζα του ή στο τμήμα με το οποίο έρχονται σε άμεση επαφή. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι οπτικοί ανιχνευτές και στη δεύτερη οι ηλεκτροχημικοί. Στο υποκεφάλαιο 2.6 περιγράφεται λεπτομερώς ο φωτοπολλαπλασιαστής, ένας ανιχνευτής που χρησιμοποιείται ευρύτατα στις μέρες μας.

2.4.5. Συστήματα καταγραφής και επεξεργασίας σημάτων

Εκτός από τον απλό καταγραφέα, ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής όχι μόνο διευκολύνει τον χειριστή του συστήματος κατά τον έλεγχο της πειραματικής διεργασίας, τη λήψη, επεξεργασία και παρουσίαση των δεδομένων, αλλά και επιτρέπει την ανάπτυξη μεθοδολογιών που διαφορετικά θα ήταν αδύνατη η εφαρμογή τους. Ως παραδείγματα αναφέρονται η μέτρηση πλάτους κορυφής της τάξεως δεκάτων δευτερολέπτου, και οι τεχνικές βαθμιδωτής συγκέντρωσης. Η χρήση Η/Υ είναι απαραίτητη για την επίτευξη ικανοποιητικής ακρίβειας και επαναληψιμότητας κατά την εκτέλεση των σχετικών πειραμάτων.

2.5. Συστήματα FI

Συστήματα ενός διαύλου μπορούν να χρησιμεύσουν για απλή μεταφορά του δείγματος σε ανιχνευτή (συστήματα περιορισμένης διασποράς) ή και να επιτρέψουν την προσαρμογή αντίδρασης (συστήματα μεσαίας διασποράς), αρκεί να μην χρειάζεται σταδιακή προσθήκη των αντιδραστηρίων, η αντίδραση να γίνεται σε ένα στάδιο με σταθερές συνθήκες και τα αντιδραστήρια να είναι συμβατά μεταξύ τους.

Συστήματα δύο διαύλων επιτρέπουν την ύπαρξη σταθερής περιόδου αντιδραστηρίου σε όλη τη ζώνη του δείγματος. Παρόλα αυτά, λόγω της διασποράς του δείγματος, η ευαισθησία είναι λίγο μικρότερη από αυτή που πετυχαίνεται με την μη αυτοματοποιημένη μέθοδο.

Σε περίπτωση χρήσεως μίγματος ασύμβατων αντιδραστηρίων χρησιμοποιείται σύστημα με προανάμιξη αντιδραστηρίων και εισαγωγή του δείγματος στο μίγμα που προκύπτει. Με την τεχνική αυτή γίνεται δυνατή η χρήση ασταθών αντιδραστηρίων όπως Br_2 , Mn(III) , Ag(II) , Cr(III) , που παράγονται *in situ*.

Για την προσαρμογή αντιδράσεων πολλών σταδίων, χρησιμοποιούνται συστήματα πολλών διαύλων με σταδιακή προσθήκη αντιδραστηρίων. Έτσι η προσδιοριζόμενη ουσία αντιδρά επί καθορισμένο και αυστηρά επαναλήψιμο χρόνο με το πρώτο αντιδραστήριο μέχρι το σημείο που συναντά το ρεύμα του δεύτερου αντιδραστηρίου. Ακολούθως προωθείται προς τον ανιχνευτή, όπου γίνεται η μέτρηση. Με αυτόν τον τρόπο ο χρονισμός των σταδίων της ανάλυσης είναι απόλυτα καθορισμένος και επαναλήψιμος. Έχει αποδειχθεί ότι για αποτελεσματική ανάμιξη τα δύο ρεύματα που αναμειγνύονται πρέπει να σχηματίζουν με το ρεύμα που προκύπτει γωνία 30° .

Σε περίπτωση που το αντιδραστήριο δεν υπάρχει σε διαλυτή μορφή, χρησιμοποιούνται πληρωμένες στήλες. Σε αδρανή υλικά πληρώσεως είναι δυνατή και η ακινητοποίηση ενζύμων. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες με ιονανταλλάκτη για κατεργασία του δείγματος ή σχηματισμό ανιχνεύσιμου χημικού είδους. Με τη χρήση στήλης, το αντιδραστήριο δεν ρέει συνεχώς αλλά χρησιμοποιείται μόνο όταν εισάγεται δείγμα και έτσι πετυχαίνεται οικονομία στην κατανάλωση του αντιδραστηρίου. Επίσης, αποφεύγεται η αραίωση του δείγματος αφού έρχεται σε επαφή με στερεό μόνο αντιδραστήριο.

Για αύξηση της εκλεκτικότητας έχουν αναπτυχθεί συστήματα εκχύλισης, που έχουν μικρή κατανάλωση οργανικού διαλύτη και μειώνουν στο ελάχιστο τους κινδύνους από την τοξικότητά του. Η επιτυχία της τεχνικής αυτής οφείλεται στο διαμερισμό του δείγματος σε μικροσταγονίδια μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται οι σταγόνες του οργανικού διαλύτη.

Η διάχυση αερίου από το ρεύμα του δείγματος (δότης) σε ρεύμα αντιδραστήριου (δέκτης) με τα δύο ρεύματα να ρέουν παράλληλα ή αντιπαράλληλα και διαχωρισμένα με μεμβράνη, είναι μία πολύ εκλεκτική τεχνική. Αέρια όπως CO_2 , NH_3 , SO_2 , HCN , HF και HCl , μπορούν να διαχωριστούν με μεγάλη επαναληπτικότητα και να προσδιοριστούν με το κατάλληλο ρεύμα δέκτη. Η τεχνική αυτή με αντικατάσταση της μεμβράνης διάχυσης από μεμβράνη διαπίδωσης επιτρέπει διαχωρισμούς μικρομοριακών ενώσεων από ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες.

Στην τεχνική των συγχωνευόμενων ζωνών (merging zones) γίνεται ταυτόχρονη εισαγωγή δείγματος και αντιδραστήριου σε δύο διαφορετικά ρεύματα, τα οποία συναντώνται κατά την ροή προς τον ανιχνευτή. Έτσι πετυχαίνεται οικονομία προς το αντιδραστήριο και είναι δυνατή η εκτίμηση τυχόν παρεμποδιστικής δράσης ουσιών που συνυπάρχουν.

Στην τεχνική των ογκομετρήσεων FI μπορούν να πραγματοποιηθούν τιτλοδοτήσεις κατά συνεχή τρόπο. Το δείγμα αναμειγνύεται με το φέρον διάλυμα σε θαλαμίσκο ανάμιξης, όπου σκόπιμα πραγματοποιείται ευρεία διασπορά. Στη συνέχεια το μίγμα αναμειγνύεται με αντιδραστήριο το οποίο περιέχει ένα δείκτη. Εάν ο ανιχνευτής παρακολουθεί το χρώμα του δείκτη παρουσία περίσσειας αναλύτη, τότε λαμβάνονται θετικές κορυφές αυξανόμενου πλάτους. Για παράδειγμα, έστω ότι τιτλοδοτείται ένα οξύ με πρότυπο διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, το οποίο περιέχει το δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης. Με την προσθήκη του δείγματος, το χρώμα του διαλύματος αλλάζει από μπλε σε κίτρινο και παραμένει κίτρινο έως ότου καταναλωθεί το οξύ, οπότε και επαναχρωματίζεται μπλε. Η συγκέντρωση του αναλύτη προσδιορίζεται από το εύρος της κορυφής στο μισό του ύψους της. Τιτλοδοτήσεις αυτού του τύπου μπορούν να πραγματοποιηθούν με ρυθμό 60 δειγμάτων /h.

Σε περιπτώσεις της τεχνικής αναχαίτισης ροής, διακόπτεται η ροή, οπότε διακόπτεται σχεδόν και η διασπορά. Παρατηρείται αύξηση της ευαισθησίας των

μετρήσεων με το να αφεθεί η αντίδραση να προχωρήσει πληρέστερα χωρίς να αραιωθεί η ζώνη του δείγματος λόγω διασποράς. Για την εφαρμογή αυτή απαιτείται συσκευή χρονομέτρησης, η οποία θα διακόψει τη λειτουργία της αντλίας σε επακριβώς καθορισμένη χρονική στιγμή, για ορισμένο χρόνο και σε τακτά χρονικά διαστήματα. Μία επιπλέον εφαρμογή της τεχνικής αναχαίτισης ροής αφορά στις κινητικές μετρήσεις. Στη συγκεκριμένη εφαρμογή η ροή διακόπτεται με το αντιδρών μίγμα στην κυψελίδα ροής και στη συνέχεια οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων ή των προϊόντων παρακολουθούνται ως συνάρτηση του χρόνου. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στον ενζυματικό προσδιορισμό της γλυκόζης, ο οποίος βασίζεται στη χρήση του ενζύμου αφυδρογονάση της γλυκόζης [20]. Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία του ενζύμου β-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD), το οποίο δρα ως χρωμοφόρο αντιδραστήριο ($\lambda = 340 \text{ nm}$). Μέχρι και 120 δείγματα /h μπορούν να προσδιοριστούν με τον τρόπο αυτό. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι καταναλώνεται λιγότερο από μια μονάδα του δαπανηρού ενζύμου για κάθε δείγμα.

2.6. Ο φωτοπολλαπλασιαστής

Οι φωτοπολλαπλασιαστές (Photomultiplier tubes, PMTs) ανήκουν στην κατηγορία των λυχνιών κενού (vacuum tubes) και ειδικότερα των φωτολυχνιών (phototubes), και είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στην υπεριώδη, ορατή και εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία [21]. Αυτοί οι ανιχνευτές πολλαπλασιάζουν το σήμα που προέρχεται από μία δέσμη φωτός έως και 10^8 φορές. Αυτό πραγματοποιείται με πολλαπλές επιφάνειες δυνόδων, οι οποίες είναι ικανές να ανιχνεύσουν ακόμη και μεμονωμένα φωτόνια όταν η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι πολύ χαμηλή. Οι φωτοπολλαπλασιαστές παρουσιάζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων, όπως της υψηλής απόδοσης, η οποία συνήθως ορίζεται ως το πηλίκο του σήματος που 'φεύγει' από τον ανιχνευτή προς εκείνο το οποίο δέχεται ο ανιχνευτής, του μικρού σήματος θορύβου, της υψηλής ταχύτητας απόκρισης και της ευρείας περιοχής ανίχνευσης. Η χρήση των φωτοπολλαπλασιαστών έχει εισαχθεί σε πολλά επιστημονικά πεδία, όπως στην πυρηνική και πρακτική φυσική, την αστρονομία, σε ιατρικές διαγνώσεις, σε

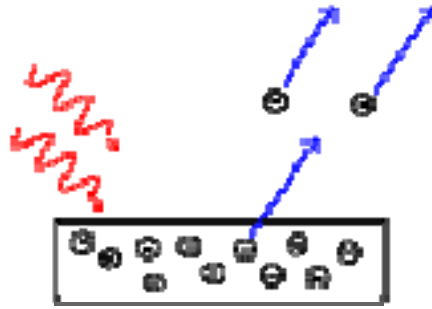
αιματολογικές εξετάσεις, καθώς και σε τεχνικές λήψης φωτογραφιών του ανθρώπινου σώματος.

Η ανάπτυξη του φωτοπολλαπλασιαστή στοιχειοθετήθηκε από δύο αρχές: το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο (photoelectric effect) και την δευτερογενή εκπομπή (secondary emission).

2.6.1. Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο

Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο βασίζεται στην εκπομπή ηλεκτρονίων από ένα υλικό μετά την απορρόφηση ενέργειας από ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, όπως από ακτίνες X ή ορατό φως. Τα εκπεμπόμενα ηλεκτρόνια αναφέρονται ως φωτοηλεκτρόνια. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό και ως φαινόμενο Hertz προς τιμή του Heinrich Rudolf Hertz, ο οποίος το ανακάλυψε το έτος 1887, χρησιμοποιώντας υπεριώδη ακτινοβολία. Δύο χρόνια αργότερα οι Elster και Geitel απέδειξαν το ίδιο φαινόμενο χρησιμοποιώντας ορατό φως επάνω σε επιφάνειες αλκαλίων, καλίου και νατρίου. Η προσθήκη του καισίου επέτρεψε την έκταση της περιοχής ευαισθησίας προς υψηλότερα μήκη κύματος, προς την ερυθρή περιοχή του ορατού φάσματος.

Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο λαμβάνει χώρα με φωτόνια ενέργειας μερικών eV. Εάν ένα φωτόνιο έχει υψηλή ενέργεια, τότε κατά την αλληλεπίδραση του με το υλικό, είτε μειώνεται η ενέργειά του, οπότε αυξάνεται το μήκος κύματος (φαινόμενο Compton) (~keV), είτε δημιουργείται ένα ζεύγος στοιχειώδους σωματιδίου και το αντί-σωματίδιό του, δηλαδή από ένα φωτόνιο δημιουργείται ένα ζεύγος ηλεκτρονίου (e-) – ποζιτρονίου (e+) (Pair production) (~MeV).



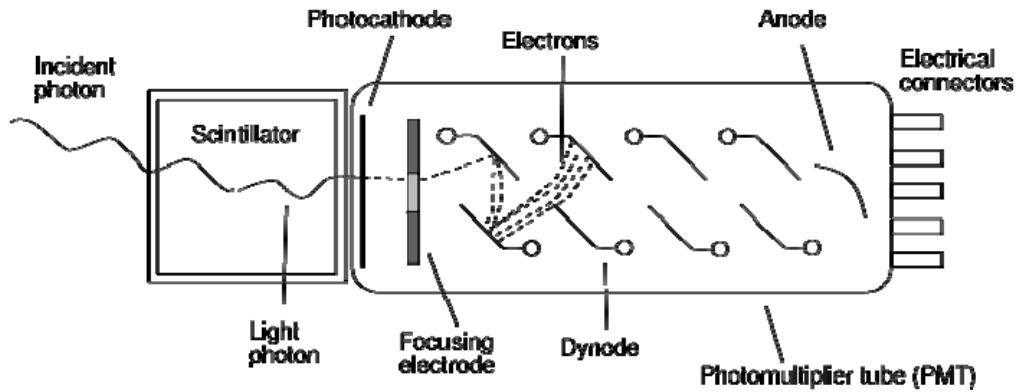
Σχήμα 2.5. Σχηματική παράσταση του φωτοηλεκτρικού φαινομένου. Από την μεταλλική επιφάνεια εκπέμπονται ηλεκτρόνια, τα οποία αποκτούν ενέργεια από τα προσπίπτοντα φωτόνια.

2.6.2. Η δευτερογενής εκπομπή

Η δευτερογενής εκπομπή είναι ένα φαινόμενο, όπου πλεόνασμα ηλεκτρονίων, τα οποία ονομάζονται δευτερογενή ηλεκτρόνια, εκπέμπονται από την επιφάνεια ενός υλικού όταν ένα συγκεκριμένο σωματίδιο, συνήθως ηλεκτρόνιο ή ιόν, προσκρούει στην επιφάνεια με επαρκή ενέργεια υπό κενό. Ο αριθμός των δευτερογενών ηλεκτρονίων, που εκπέμπεται ανά αρχικό σωματίδιο, χαρακτηρίζει την απόδοση της δευτερογενούς εκπομπής. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε αρχικά το 1902 από τους Austin και Starke, ενώ η εφαρμοσιμότητά του στην μέτρηση σημάτων ακτινοβολίας ανακαλύφθηκε αργότερα, το 1919 από τον Joseph Slepian.

2.6.3. Μορφή και βασικές αρχές του φωτοπολλαπλασιαστή

Ο φωτοπολλαπλασιαστής κατασκευάζεται από υάλινο σωλήνα, μέσα στον οποίο παρατίθενται μία φωτοκάθοδος (photocathode), πολλές δύνοδοι (dynodes) και μία άνοδος (anode) υπό κενό. Τα αρχικά φωτόνια (incident photons) κτυπούν στο υλικό της φωτοκαθόδου, η οποία παρουσιάζεται ως μία λεπτή επιφάνεια στην είσοδο της συσκευής. Τα ηλεκτρόνια (electrons) παράγονται ως συνέπεια του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και όπως φαίνεται στο σχήμα 2.6, κατευθύνονται από το ηλεκτρόδιο (focusing electrode) προς τον ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή, όπου πολλαπλασιάζονται με την διαδικασία της δευτερογενούς εκπομπής.



Σχήμα 2.6. Φωτοπολλαπλασιαστής συζευγμένος με τμήμα φωταυγούς υλικού (*scintillator*)

Υπάρχουν δύο κοινές μορφές φωτοπολλαπλασιαστών, ο σχεδιασμός *head-on*, ο οποίος φαίνεται και στο σχήμα, στον οποίο το φως περνά μέσω της επίπεδης κυκλικής κορυφής του σωλήνα και ο σχεδιασμός *side-on*, στον οποίο το φως εισέρχεται από μία ειδική οπή στο πλάι του. Εκτός από το υλικό της φωτοκαθόδου, στην απόδοση του φωτοπολλαπλασιαστή παίζουν σημαντικό ρόλο η διαπερατότητα του υλικού της εισόδου και η διαρρύθμιση των δυνόδων. Είναι εμπορικά διαθέσιμη μία μεγάλη ποικιλία φωτοπολλαπλασιαστών με διαφορετικούς συνδυασμούς αυτών των παραμέτρων, καθώς και με επιπρόσθετες σχεδιαστικές μεταβλητές.

2.6.4. Η φωτοκάθοδος

Η φωτοκάθοδος είναι ένα αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο, το οποίο επιστρώνεται με ένα φωτοευαίσθητο υλικό. Η σύσταση της φωτοκαθόδου καθορίζεται ανάλογα με την χρήση της. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι τα ακόλουθα:

- Ag-O-Cs, λέγεται και S-1. Αυτό ήταν το πρώτο υλικό που χρησιμοποιήθηκε και αναπτύχθηκε το 1929. Είναι ευαίσθητο στην περιοχή των 300-1200 nm. Επειδή παρουσιάζει μεγαλύτερο σκοτεινό ρεύμα από τα πιο σύγχρονα υλικά, σήμερα χρησιμοποιείται μόνο για την υπέρυθη περιοχή υπό ψύξη.
- Sb-Cs, έχει απόκριση από το υπεριώδες ως το ορατό και χρησιμοποιείται κυρίως σε φωτοκαθόδους τύπου ανάκλασης.

- Διαλκαλικό κράμα (Sb-Rb-Cs και Sb-K-Cs). Η περιοχή απόκρισης είναι παρόμοια με την φωτοκάθοδο Sb-Cs, αλλά με μεγαλύτερη ευαισθησία και μικρότερο σκοτεινό ρεύμα. Οι επιφάνειες αυτές ταιριάζουν με υλικά κατάλληλα για μετρήσεις φωταύγειας.
- Υψηλής θερμοκρασίας ή χαμηλού θορύβου διαλκαλικό κράμα, Na-K-Sb. Το υλικό αυτό είναι ανθεκτικό και σε θερμοκρασίες άνω των 175°C. Σε θερμοκρασία δωματίου, αυτή η φωτοκάθοδος παρουσιάζει πολύ χαμηλό σκοτεινό ρεύμα και επομένως είναι ιδανική για εφαρμογές μέτρησης φωτονίων.
- Πολυαλκαλικό κράμα, Na-K-Sb-Cs. Η φωτοκάθοδος πολυαλκαλικού κράματος παρουσιάζει μία ευρεία περιοχή απόκρισης από το υπεριώδες έως το εγγύς υπέρυθρο.
- GaAs. Αυτό το υλικό καλύπτει μία ευρύτερη περιοχή του φάσματος από το πολυαλκαλικό κράμα, από το υπεριώδες έως τα 930 nm.
- InGaAs. Παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος σε σχέση με το GaAs. Επιπλέον, στην περιοχή 900-1000 nm έχει καλύτερο λόγο σήμα προς θόρυβο σε σύγκριση με το Ag-O-Cs. Με ειδικές τεχνικές αυτή η φωτοκάθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μετρήσεις άνω των 1700 nm.
- Cs-Te, Cs-I. Τα υλικά αυτά είναι ευαίσθητα στις ακτίνες UV και UV υπό κενό, αλλά δεν χρησιμοποιούνται για το ορατό φως. Το Cs-Te δεν είναι ευαίσθητο σε μήκη κύματος άνω των 320 nm, ενώ το Cs-I άνω των 200 nm.

2.6.5. Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής

Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής αποτελείται από έναν αριθμό ηλεκτροδίων, τα οποία ονομάζονται δύνοδοι. Σε κάθε δύνοδο εφαρμόζεται μεγαλύτερο θετικό δυναμικό κατά 90 V από την προηγούμενη. Τα ηλεκτρόνια, αφήνοντας την φωτοκάθοδο, έχουν την ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου. Καθώς κινούνται προς την πρώτη δύνοδο, επιταχύνονται από το ηλεκτρικό πεδίο και αποκτούν πολύ μεγαλύτερη ενέργεια. Καθώς κτυπούν την πρώτη δύνοδο, περισσότερα ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας εκπέμπονται και αυτά με τη σειρά τους επιταχύνονται προς την δεύτερη δύνοδο. Η γεωμετρία του συμπλέγματος των δυνόδων είναι τέτοια, ώστε να παράγεται ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ηλεκτρονίων σε κάθε επίπεδο. Τελικά τα ηλεκτρόνια

φτάνουν την άνοδο, όπου η συσσώρευση φορτίου οδηγεί στην άφιξη ενός νέου φωτονίου στην φωτοκάθοδο μέσω ενός παλμού. Το ρεύμα, το οποίο προκύπτει τελικά, ενισχύεται ηλεκτρονικά και μετρείται.

2.6.6. Το σκοτεινό ρεύμα

Ως σκοτεινό ρεύμα (dark current) χαρακτηρίζεται ένα σχετικά μικρό ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο διέρχεται μέσα από φωτοευαίσθητες συσκευές, όπως ο φωτοπολλαπλασιαστής, ακόμα και όταν δεν εισέρχονται φωτόνια σε αυτή. Το σκοτεινό ρεύμα δημιουργείται λόγω του σχηματισμού ηλεκτρονίων και οπών στην μονωμένη περιοχή της συσκευής όπου διαχέονται από το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο. Το σκοτεινό ρεύμα αποτελεί την κύρια πηγή θορύβου. Επειδή το μεγαλύτερο ποσοστό του σκοτεινού ρεύματος προέρχεται από τα θερμικά ηλεκτρόνια, η απόδοση του φωτοπολ-λαπλασιαστή βελτιώνεται με ψύξη. Πρακτικά τα θερμικά σκοτεινά ρεύματα περιορίζονται σημαντικά με ψύξη του ανιχνευτή στους -30°C . Για τον σκοπό αυτό διατίθενται στο εμπόριο μανδύες τοποθέτησης των μεταλλακτών, οι οποίοι μπορούν να ψυχθούν με κυκλοφορία κατάλληλου ψυκτικού ρευστού.

2.6.7. Χρηστικές παράμετροι

Οι φωτοπολλαπλασιαστές χρησιμοποιούν 1000 έως 2000 V για να επιταχύνουν τα ηλεκτρόνια μέσω του συμπλέγματος των δυνόδων. Το πλέον αρνητικό δυναμικό συνδέεται στην κάθοδο, ενώ το πιο θετικό στην άνοδο. Συνήθως προτιμούνται υψηλού αρνητικού δυναμικού κάθοδοι, διότι με αυτόν τον τρόπο, το φωτορεύμα μετρείται σε χαμηλά δυναμικά. Οι τιμές δυναμικού ταξινομούνται στις δυνόδους με ένα ανθεκτικό διαιρέτη δυναμικού, αν και είναι πιθανόν να παρατηρηθούν κάποιες διακυμάνσεις. Ο διαιρέτης μπορεί να σχεδιαστεί κατάλληλα, ώστε να χρησιμοποιείται σε ποικιλία εφαρμογών. Κάποιες οργανολογίες που χρησιμοποιούν φωτοπολλαπλασιαστές έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν το δυναμικό της ανόδου, ώστε να ελέγχεται η απόδοση του συστήματος.

Οι φωτοπολλαπλασιαστές πρέπει να προστατεύονται από το έντονο φως διότι μπορεί να προκληθεί μόνιμη βλάβη στη φωτοευαίσθητη επιφάνειά τους. Για το λόγο αυτό οι συσκευές περιβάλλονται από φωτοστεγανό διαμέρισμα με σκοπό να αποφευχθεί ακόμα και η στιγμιαία έκθεση τους στο φως της ημέρας ή

σε άλλο έντονο φως. Όταν δε χρησιμοποιούνται σε χώρους με έντονα μαγνητικά πεδία, τα οποία μπορούν να καμπυλώσουν την πορεία των ηλεκτρονίων, προστατεύονται από μία στιβάδα ειδικού κράματος νικελίου-σιδήρου, Ni-Fe, το οποίο έχει πολύ μεγάλη μαγνητική διαπερατότητα (mu-metal). Αυτό το μαγνητικό πεδίο συχνά διατηρείται στο δυναμικό της καθόδου. Σε αυτή την περίπτωση, το εξωτερικό πεδίο πρέπει επίσης να μονωθεί ηλεκτρικά εξαιτίας του υψηλού δυναμικού σε αυτό.

2.6.8. Εφαρμογές του φωτοπολλαπλασιαστή

Οι φωτοπολλαπλασιαστές αποτέλεσαν το πρώτο 'ηλεκτρικό μάτι' σε μετρήσεις διακυμάνσεων (interruptions) σε δέσμες φωτός. Χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με υλικά που επιδεικνύουν την χαρακτηριστική ιδιότητα της φωταύγειας όταν διεγερθούν με ακτινοβολία ιονισμού (scintillators), για την ανίχνευση πυρηνικής και σωματιδιακής ακτινοβολίας. Επίσης χρησιμοποιούνται σε ερευνητικά εργαστήρια για τη μέτρηση της έντασης και του φάσματος υλικών που εκπέμπουν φως, καθώς και σε διάφορα ιατρικά όργανα. Για παράδειγμα, οι συσκευές ανάλυσης αίματος χρησιμοποιούν φωτοπολλαπλασιαστές για τον προσδιορισμό της σχετικής συγκέντρωσης διαφόρων συστατικών που ανιχνεύονται στο αίμα σε συνδυασμό με οπτικά φίλτρα και θερμοηλεκτρικές λάμπες (incandescent lamps).

3. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΓΕΝΙΑΣ - SEQUENTIAL INJECTION (SI)

3.1. Εισαγωγή στην τεχνική διαδοχικής εισαγωγής SI

Το πρώτο βήμα προς την σημερινή μορφή της τεχνικής διαδοχικής εισαγωγής (sequential injection analysis, SI) πραγματοποιήθηκε το 1990, όταν για πρώτη φορά προτάθηκε και αποδείχθηκε πειραματικά η αρχή της τεχνικής αυτής [22]. Ήταν ξεκάθαρο ότι η SI σχετίζεται άμεσα με τις τεχνικές FI, αφού στηρίζεται στις ίδιες αρχές εισαγωγής δείγματος και αντιδραστηρίων, ελέγχου της διάχυσης και του επαναλήψιμου χρόνου. Εντούτοις, το πλεονέκτημα της SI οφείλεται στον αυστηρό έλεγχο των δύο κινητικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα συγχρόνως: ενώ το εισαγόμενο δείγμα κινείται μέσα στο δίαυλο, που αποτελεί τη φυσική διαδικασία διάχυσης του δείγματος στις ζώνες των αντιδραστηρίων, παράλληλα ανιχνεύονται τα προϊόντα των αντιδράσεων που αποτελούν τη χημική διαδικασία. Η διαφορά των τεχνικών FI και SI έγκειται στο χειρισμό των δειγμάτων. Στα συστήματα SI, το δείγμα και οι ζώνες του αντιδραστηρίου τοποθετούνται διαδοχικά ή μία μετά την άλλη από την βαλβίδα εισαγωγής και αναμιγνύονται με εναλλαγές της φοράς της ροής. Η διάχυση ελέγχεται με προγραμματισμό της ροής. Οι εναλλαγές της ροής και οι απότομες επιταχύνσεις χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της ανάμιξης και της ταχύτητας απόδοσης του συστήματος ενώ το σταμάτημα της ροής χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του χρόνου της αντίδρασης. Επίσης, στα συστήματα SI, η άντληση των διαλυμάτων των αντιδραστηρίων γίνεται από την βαλβίδα εισαγωγής. Χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι αντιδραστηρίων και παράγονται λιγότερα απόβλητα, σε σύγκριση με τα συστήματα FI. Η ερευνητική κοινότητα αναγνώρισε ταχύτατα αυτά τα πλεονεκτήματα, με αποτέλεσμα η τεχνική SI να βρει σύντομα εφαρμογή σε μια ποικιλία μεθόδων με τη χρήση φασματομετρικού, ηλεκτροχημικού, ραδιοχημικού, φθορισμομετρικού και χημειοφωταυγούς ανιχνευτή. Ο Lenehan και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν μία περιεκτική ανασκόπηση όπου συνοψίζεται η ανάπτυξη πάνω από 300 εργασιών σχετικών με συστήματα SI, μέχρι το 2002 [23]. Από τότε, η SI επεκτάθηκε και σε τεχνικές διαχωρισμού, όπως η *sequential injection chromatography* (SIC), μία καινοτόμος τεχνική με δυνατότητα πολλών πρακτικών εφαρμογών.

3.2. Σμίκρυνση της οργανολογίας

Τα συστήματα SI σχεδιάστηκαν αρχικά με σκοπό την αυτοματοποίηση βιομηχανικών διεργασιών. Για τη χρήση τους στο εργαστήριο, τα όργανα SI έχουν πανομοιότυπη κατασκευή με τα αντίστοιχα FI. Η αντλία, η βαλβίδα και ο ανιχνευτής συνδέονται με δίαυλους, οι οποίοι λειτουργούν ως αντιδραστήρες. Η εξέλιξη των τεχνικών SI οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ανάπτυξη μικροαναλυτικών συστημάτων [24]. Στα συστήματα αυτά η έρευνα εστιάζεται στην ελαχιστοποίηση των συστημάτων χειρισμού των αντιδραστηρίων με στόχο την ανάπτυξη αναλυτικών εργαστηρίων σε μικροψηφίδα (microchip). Τα προφανή πλεονεκτήματα αυτής της σμίκρυνσης της οργανολογίας είναι τα ακόλουθα: η μικρή κατανάλωση του δείγματος και των αντιδραστηρίων, η ελαχιστοποίηση της παραγωγής των χημικών αποβλήτων, το μικρό μέγεθος της οργανολογίας και η δυνατότητα μεταφοράς της, η ανάπτυξη παραλλαγών της SI οργανολογίας συνοδευόμενη από δύο σημαντικές διαφορές. Τα συστήματα SI λειτουργούν σε προγραμματιζόμενη ροή και όχι με συνεχόμενη ροή.

Η ένταξη της κυψελίδας ροής και των διαύλων εισαγωγής δείγματος, η πρόσβαση στους περιέκτες των αντιδραστηρίων, καθώς και η εισαγωγή μικροστηλών και συστημάτων ανάμιξης σε μια πολυθεσιακή βαλβίδα (multiposition valve) οδήγησε στο σχεδιασμό μίας νέας πλατφόρμας που ονομάστηκε lab-on-valve (LOV). Η εισαγωγή της αντλίας σύριγγος (syringe pump) πλεονεκτεί έναντι της περισταλτικής αντλίας αφού ελευθερώνει το σύστημα από τη δημιουργία παλμών. Μέσα στα επόμενα 5 χρόνια, ο σχεδιασμός LOV αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη νέων τεχνικών όπως η έγχυση μικροσφαιριδίων (Bead Injection, BI) [25] και η χρωματογραφία μικροανάλυσης SI [26]. Επίσης, τα συστήματα SI βρήκαν εφαρμογή ως πρώτο μέρος στην ανάλυση ατομικής απορρόφησης και του συζευγμένου επαγωγικά πλάσματος (ICP) [27]. Προφανώς οι περισσότερες μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση αντιδραστηρίων μπορούν να αυτοματοποιηθούν σε συστήματα SI-LOV είτε σε μορφή διαλύματος είτε μέσω αλληλεπίδρασης διαλύματος και στερεών επιφανειών στο σχεδιασμό έγχυσης μικροσφαιριδίων BI [28].

3.3. Ανάμιξη και διάχυση

Το κλειδί σε κάθε επιτυχημένη τεχνική ροής είναι ο σχεδιασμός του τρόπου με τον οποίο γίνεται η ανάμιξη του δείγματος και των αντιδραστηρίων, καθώς και η περαιτέρω χημική αντίδραση μεταξύ τους. Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στον συνδυασμό της μεταφοράς και διάχυσης των αντιδραστηρίων.

Είναι γνωστός και πλήρως κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο ένας ενιόμενος όγκος ομογενούς υγρού διαχέεται εξαιτίας της αρχικής ανάπτυξης του σε σχήμα κοίλης σφαίρας, και του μετέπειτα μετασχηματισμού του σε σφαίρα κατά την κίνησή του μέσα στον δίαυλο. Αυτή η διαδικασία παρατηρείται εύκολα με την εισαγωγή ενός όγκου χρωστικής και καταγράφοντας τις αλλαγές του σχήματος των κορυφών από ασύμμετρες κορυφές σε κορυφές Gauss. Στα συστήματα ροής για την συμφωνία της αυτοματοποιημένης μεθόδου με την διαχειρόσυκτη εκτελούμενη μέθοδο είναι επιθυμητή η προώθηση της ακτινωτής διασποράς και ο έλεγχος της διαμήκουσ διάχυσης [29]. Προφανώς, στην περίπτωση του χρωματογραφικού διαχωρισμού η διαμήκουσ διάχυση πρέπει να ελαχιστοποιηθεί, ενώ στις τεχνικές SI πρέπει αρχικά να μεγιστοποιηθεί με σκοπό την προώθηση της μεταφοράς του δείγματος και του αντιδραστηρίου που τοποθετούνται εναλλάξ σε ζώνες μέσα στο δίαυλο του συστήματος. Η ακτινωτή ανάμιξη πρέπει να προωθείται με σκοπό την πλήρη αλληλεπίδραση των αντιδρώντων. Σε πρακτικές εφαρμογές η διάχυση είναι τόσο αργή διαδικασία, ώστε κατάλληλα ανάμιξη επιτυγχάνεται με ακτινωτή διασπορά.

Για την βελτιστοποίηση της ανάμιξης σε συσκευές μικροροής αρκεί η μελέτη των συνθηκών ροής. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν δύο παράμετροι προς βελτιστοποίηση: η γεωμετρία του δίαυλου ροής και το πρόγραμμα της ροής. Τα κλασσικά συστήματα FI σχεδιάζονται με σπειράματα αντίδρασης τοποθετημένα μετά την συνάντηση των αντιδραστηρίων για την βελτίωση της ανάμιξης. Η ροή που παράγεται μέσω περισταλτικών αντλιών δεν είναι ποτέ απαλλαγμένη από παλμούς.

3.4. Η τεχνική SI και ο σχεδιασμός lab-on-valve

Ο σχεδιασμός του συστήματος SI-LOV χρησιμοποιεί πρόγραμμα ροής, το οποίο περιλαμβάνει αντιστροφές της φοράς ροής, επιταχύνσεις της ταχύτητας ροής, σταμάτημα ροής, και θέσεις μεγάλης ταχύτητας. Αυτές οι παράμετροι προωθούν γρήγορη ακτινωτή ανάμιξη, ενώ η διαμήκουσ ελέγχεται μέσω της

επιλογής των ενιόμενων όγκων και του μήκους της διαδρομής του αναλύτη τόσο προς τα εμπρός όσο και προς την αντίθετη κατεύθυνση. Εφόσον οι χρόνοι αντίδρασης ή επώασης ρυθμίζονται από το σταμάτημα της ροής, το οποίο πραγματοποιείται όταν το δείγμα βρίσκεται στο στείραμα ή καλύτερα ακόμα στην κυψελίδα, το μήκος του σωλήνα που χρησιμοποιεί για την πορεία του μπορεί να ελαχιστοποιηθεί. Συγχρόνως, πολύ στενοί δίαυλοι, για παράδειγμα εσωτερικής διαμέτρου μικρότερης από 0,5 mm i.d., πρέπει να αποφεύγονται, για την ελαχιστοποίηση του λόγου επιφάνειας/ όγκου, και επομένως την ελαχιστοποίηση της απορρόφησης των αναλυτών στα τοιχώματα των διαύλων. Επιπροσθέτως, οι δίαυλοι μικρού μήκους και διαμέτρου είναι κατάλληλοι για χαμηλή ροή η οποία εφαρμόζεται με ακρίβεια ενώ η χρήση των γρήγορων εναλλαγών της ροής επιτρέπει την εύκολη και ταχεία έκπλυση των διαύλων. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνονται οι φυσαλίδες του αέρα ή τα αιωρούμενα σωματίδια.

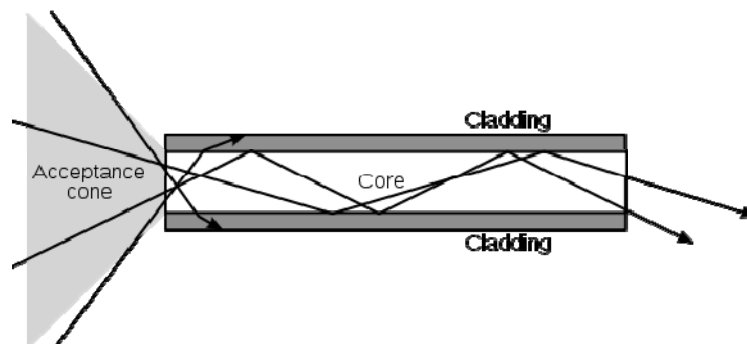
Η απορρόφηση και ο φθορισμός μπορούν να εφαρμοστούν σε συνδυασμό με μία πολυχρηστική κυψελίδα ροής ενσωματωμένη στο σύστημα LOV. Χαρακτηριστική είναι η χρήση οπτικών ινών που εφαρμόζονται σε διαύλους με διάμετρο ελαφρώς μικρότερη των διαύλων του συστήματος LOV. Η απόσταση μεταξύ των άκρων ορίζει το μήκος της οπτικής διαδρομής και λαμβάνει συνήθως τιμές από 1 έως 10 mm. Η μέτρηση φθορισμού λαμβάνει χώρα με τοποθέτηση των οπτικών ινών σε γωνία, ενώ ο συνδυασμός απορρόφησης και φθορισμού απαιτεί τη χρήση τριών οπτικών ινών. Το ίδιο σύστημα LOV χρησιμοποιείται για τις τεχνικές έγχυσης μικροσφαιριδίων και μικροχρωματογραφίας συγγένειας.

3.5. Οπτικές ίνες

Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 άρχισαν να εμφανίζονται στην αγορά όργανα τα οποία χρησιμοποιούσαν οπτικές ίνες (optical fibers) για τη διαβίβαση της ακτινοβολίας από το ένα τμήμα τους στο άλλο [30]. Οι οπτικές ίνες πρόσθεσαν μια νέα διάσταση στο σχεδιασμό των οπτικών οργάνων.

Οι οπτικές ίνες είναι λεπτές υάλινες ή πλαστικές ίνες ικανές να μεταδώσουν ακτινοβολίες σε αποστάσεις μεγαλύτερες από μερικές δεκάδες μέτρα. Η διάμετρος των οπτικών ινών κυμαίνεται από 0,05 mm έως 0,6 cm. Όταν πρόκειται να μεταδοθούν είδωλα χρησιμοποιούνται δεσμίδες (bundles)

ινών οι οποίες συντήκονται στα άκρα τους. Μία σπουδαία εφαρμογή αυτών των δεσμίδων είναι η χρήση τους στην ιατρική διαγνωστική, όπου η ευκαμψία τους επιτρέπει μεταφορά ειδώλων οργάνων μέσα από ελικοειδείς διαδρομές προς τον εξετάζοντα ιατρό. Οι οπτικές ίνες χρησιμοποιούνται όχι μόνο για την παρατήρηση αλλά και για τον φωτισμό αντικειμένων, όπου επιτυγχάνεται φωτισμός χωρίς θέρμανσή τους, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία σε πολλές περιπτώσεις. Η διάδοση του φωτός μέσα σε μία οπτική ίνα πραγματοποιείται με ολικές εσωτερικές ανακλάσεις, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.1. Για να συμβεί ολική ανάκλαση πρέπει η ίνα να καλυφθεί με υλικό, το οποίο έχει δείκτη διάθλαση μικρότερο από τον δείκτη διάθλασης του υλικού κατασκευής της ίνας. Έτσι, μία τυπική υάλινη ίνα έχει έναν πυρήνα (core) με δείκτη διάθλασης περίπου 1,6 καλυμμένο με υάλινο μανδύα (cladding) με δείκτη διάθλασης 1,5. Τυπικές πλαστικές ίνες αποτελούνται από έναν μανδύα πολύ(μεθυλομεθακρυλικού) υλικού με δείκτη διάθλασης 1,5 καλυπτόμενου με μανδύα πολυμερούς υλικού με δείκτη διάθλασης 1,4.



Σχήμα 3.1. Σχηματική παρουσίαση της οπτικής διαδρομής του φωτός μέσα από μια οπτική ίνα.

Μία οπτική ίνα μεταδίδει ακτινοβολία η οποία περικλείεται σε περιορισμένο κώνο με ημιγωνία όπως δείχνει το σχήμα 3.1. Το αριθμητικό άνοιγμα της ίνας αποτελεί μέτρο του μεγέθους του καλούμενου κώνου αποδοχής (acceptance cone). Το αριθμητικό άνοιγμα ισούται με: $n_3 \sin\theta = (n_1^2 - n_2^2)^{1/2}$, όπου θ η γωνία με την οποία εισέρχεται η οπτική δέσμη στην ίνα, n_1 ο δείκτης διάθλασης του πυρήνα της ίνας, n_2 ο δείκτης διάθλασης του περιβλήματος και n_3 ο δείκτης διάθλασης του μέσου. Φυσικά ισχύει $n_1 > n_2 > n_3$.

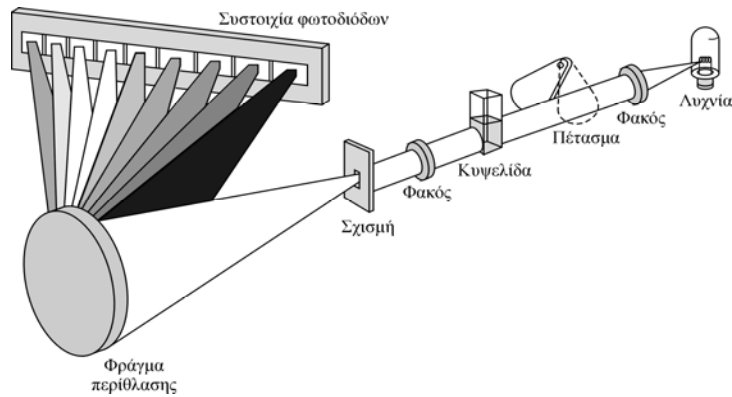
Με κατάλληλη επιλογή των υλικών μπορούν να κατασκευαστούν ίνες, μέσω των οποίων μπορεί να μεταδοθεί υπεριώδης, ορατή και υπέρυθρη

ακτινοβολία. Οι αισθητήρες οπτικών ινών, οι οποίοι καλούνται και οπτροδία (optrodes), αποτελούνται από μία φάση αντιδραστήριου η οποία ακινητοποιείται στο ένα άκρο της ίνας. Αλληλεπίδραση του αναλύτη με το αντιδραστήριο προκαλεί μεταβολή στην απορρόφηση, αντανακλαστικότητα, φθορισμό ή φωταύγεια, η οποία στη συνέχεια μεταδίδεται στον ανιχνευτή μέσω της οπτικής ίνας. Οι αισθητήρες οπτικών ινών είναι γενικά απλά και φθηνά συστήματα και εύκολα κατασκευάζονται σε μικρές διαστάσεις.

3.6. Ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (DAD)

Γύρω στα 1980 εμφανίστηκε στο εμπόριο το πρώτο ηλεκτρονικό πολυδιαυλικό φασματόμετρο, που σχεδιάστηκε ειδικά για μετρήσεις μοριακής απορρόφησης στην υπεριώδη και ορατή περιοχή [31]. Με τις συσκευές αυτές τοποθετημένες στο εστιακό επίπεδο ενός μονοχρωμάτορα, μπορεί να ληφθεί ένα φάσμα με ηλεκτρονική αντί μηχανική σάρωση. Όλα τα δεδομένα για τον προσδιορισμό του φάσματος μπορούν να συλλεχθούν ταυτόχρονα. Τα πολυδιαυλικά όργανα επιτρέπουν ταχύτερη λήψη φασμάτων, καθώς και τη δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών συστατικών σε δείγματα.

Στο σχήμα 3.2 απεικονίζεται το οπτικό διάγραμμα ενός τυπικού πολυδιαυλικού φασματομέτρου υπεριώδους-ορατού. Ως πηγή χρησιμο-ποιείται η λυχνία δευτερίου τόσο για την υπεριώδη (190 έως 400 nm) όσο και για την ορατή περιοχή (400 έως 700 nm). Σε περιπτώσεις μετρήσεων στην ορατή περιοχή, συχνά χρησιμοποιείται η λυχνία βολφραμίου, η οποία αποδίδει μεγαλύτερη ενέργεια. Η ακτινοβολία, μετά τη διέλευσή της μέσα από το διαλύτη (τυφλό) ή το μετρούμενο δείγμα, εστιάζεται στη σχισμή εισόδου και στη συνέχεια προσπίπτει στην επιφάνεια ενός ολογραφικού ανακλαστικού οπτικού φράγματος.



Σχήμα 3.2. Πολυδιαυλικό φασματόμετρο συστοιχίας διόδων, HP 8452A, Hewlett-Packard Company.

Ο μεταλλάκτης είναι μία σειρά φωτοδιόδων, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από μία επαφή p πολωμένη ανάστροφα. Η ανάστροφη πόλωση δημιουργεί μία στιβάδα απογύμνωσης, η οποία μηδενίζει την αγωγιμότητα της επαφής. Κάθε φωτοδίοδος είναι τμήμα ενός ολοκληρωμένου κυκλώματος μεγάλης κλίμακας, το οποίο σχηματίζεται σε μία ψηφίδα πυριτίου. Όταν προσπέσει ακτινοβολία στη ψηφίδα, στη στιβάδα απογύμνωσης δημιουργούνται ζεύγη οπών και ηλεκτρονίων, τα οποία διεισδύουν στο υλικό της διόδου και παράγουν ρεύμα ανάλογο με την ένταση της ακτινοβολίας. Η σειρά διόδων αποτελείται από ένα ραβδίό p -τύπου, το οποίο διαχέεται σε υπόστρωμα πυριτίου n -τύπου δημιουργώντας μία επιφάνεια αποτελούμενη από μία σειρά διαδοχικών στοιχείων. Οι τυπικές διαστάσεις κάθε στοιχείου είναι 2,5 επί 0,025 mm. Η διασπορά του οπτικού φράγματος και το μέγεθος των διόδων έχουν τέτοιες τιμές, ώστε να επιτυγχάνεται διακριτική ικανότητα 2 nm σε ολόκληρη τη φασματική περιοχή. Η φασματική περιοχή απόκρισης των φωτοδιόδων είναι 190 έως 1.100 nm.

Φως το οποίο προσπίπτει στην επιφάνεια με τα στοιχεία, δημιουργεί φορτία τόσο στην p όσο και στην n περιοχή. Τα θετικά φορτία συλλέγονται και αποθηκεύονται στα ραβδία p -τύπου για να ολοκληρωθούν στη συνέχεια. Τα φορτία που σχηματίζονται στις περιοχές n υποδιαιρούνται μεταξύ τους αναλογικά στις δύο γειτονικές περιοχές p . Ο αριθμός των στοιχείων του μεταλλάκτη στη ψηφίδα, κυμαίνεται από 64 έως 4.096. Οι περισσότερες συνηθισμένες συστοιχίες αποτελούνται από 1.024 στοιχεία. Το ολοκληρωμένο κύκλωμα που συμπληρώνει τη συστοιχία φωτοδιόδων περιλαμβάνει ακόμα έναν πυκνωτή αποθήκευσης και ένα μεταγωγό διακόπτη στερεάς κατάστασης

για κάθε δίοδο, καθώς και ένα κύκλωμα για διαδοχική σάρωση κάθε ξεχωριστού κυκλώματος διόδου-πυκνωτή. Παράλληλα προς κάθε φωτοδίοδο συνδέεται ένας πυκνωτής αποθήκευσης φορτίου 10 pF. Κάθε ζεύγος διόδου-πυκνωτή συνδέεται διαδοχικά με μία κοινή γραμμή εξόδου μέσω του ολισθαίνοντος καταχωρητή (shift register) N-bit και των διακοπών τρανζίστορ. Ο ολισθαίνων καταχωρητής κλείνει διαδοχικά και στιγμιαία καθέναν από τους διακόπτες και φορτίζει τον πυκνωτή στα -5 V , δυναμικό το οποίο πολώνει ανάστροφα την αντίστοιχη επαφή pn . Ακτινοβολία η οποία προσπίπτει επάνω στη στιβάδα απογύμνωσης της επαφής pn , παράγει φορτία (ηλεκτρόνια και οπές) τα οποία δημιουργούν ένα ρεύμα που αποφορτίζει μερικώς τον πυκνωτή του κυκλώματος. Το φορτίο του πυκνωτή, που χάνεται με τον τρόπο αυτό, αντικαθίσταται κατά τη διάρκεια του επόμενου κύκλου. Το προκαλούμενο ρεύμα φόρτισης του πυκνωτή ολοκληρώνεται στο κύκλωμα προενίσχυσης, το οποίο παράγει ένα δυναμικό ανάλογο πλέον με την ένταση της ακτινοβολίας. Μετά την ενίσχυση, το αναλογικό σήμα μεταφέρεται από τον προενισχυτή σε αναλογικό-ψηφιακό μετατροπέα και στη συνέχεια σε μικροεπεξεργαστή, ο οποίος ελέγχει το σήμα εξόδου.

Κατά τη χρήση μίας συστοιχίας φωτοδίοδων, το εύρος της σχισμής του φασματομέτρου ρυθμίζεται έτσι, ώστε το είδωλο της σχισμής εισόδου να καλύπτει την περιοχή της επιφάνειας μίας διόδου της συστοιχίας. Έτσι, η λαμβανόμενη πληροφορία είναι ισοδύναμη προς την αντίστοιχα καταγραμμένη κατά τη διάρκεια της σάρωσης σε ένα συμβατικό φασματομέτρο. Με τη συστοιχία, η συνολική πληροφορία για ολόκληρο το φάσμα συσσωρεύεται ταυτόχρονα σημείο προς σημείο σε κάθε ξεχωριστό στοιχείο και όχι διαδοχικά στο ίδιο στοιχείο. Για να βελτιωθούν οι λόγοι σήματος - προς - θόρυβο, πραγματοποιείται επαναλαμβανόμενη λήψη φασμάτων και αποθήκευση στη μνήμη του υπολογιστή.

Κάθε σάρωση με το όργανο αυτό διαρκεί 0,1 s. Με τόσο σύντομους χρόνους έκθεσης ελαχιστοποιείται η φωτοδιάσπαση του δείγματος, παρά την απευθείας τοποθέτησή του μεταξύ πηγής και μονοχρωμάτορα.

3.7. Μέθοδοι

Οι δημοσιεύσεις συστημάτων SI-LOV και οι εφαρμογές τους αποτελούν μία θαυμάσια πηγή πληροφοριών σχετικά με διάφορους σχεδιασμούς και χρήσεις της τεχνικής SI όπως εφαρμόζεται στα εργαστήρια διεθνώς [32-41]. Επιπρόσθετες λεπτομέρειες για την λειτουργία του συστήματος, τα συστατικά και τις χρήσεις τους είναι διαθέσιμες στην τρίτη έκδοση του εγχειριδίου Flow Injection Analysis [29].

3.7.1. Μέθοδοι βασιζόμενες σε αντιδραστήρια (ενός σημείου)

Οι μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδραστήρια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: *μέτρηση με βάση τη ροή (ενός σημείου)*, η οποία πραγματοποιείται καθώς η ζώνη του δείγματος περνάει από τον ανιχνευτή και ακολουθεί ο σχηματισμός της κορυφής, και *μέτρηση με βάση την ταχύτητα της αντίδρασης*, όπου η ζώνη του δείγματος παραμένει στον ανιχνευτή και το σήμα αποτελεί μία καμπύλη της ταχύτητας αντίδρασης. Για τη μέτρηση με βάση την ταχύτητα αντίδρασης, η επίδραση του καταλύτη της αντίδρασης και των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων επιλέγονται έτσι, ώστε να επικρατούν συνθήκες ψευδοπρώτης τάξεως αντίδρασης που διασφαλίζουν ότι η συγκέντρωση του αναλύτη C_A είναι ανάλογη της κλίσης dA/dt της καμπύλης ταχύτητας της αντίδρασης. Υπάρχουν δύο πλεονεκτήματα της μέτρησης με βάση τη ταχύτητα αντίδρασης σε ρύθμιση με σταμάτημα της ροής. Πρώτον, αφού το σήμα βασίζεται στην κλίση της καμπύλης της ταχύτητας αντίδρασης, κάθε σήμα υποβάθρου που προκαλείται από αρχική απορρόφηση του δείγματος ή και των αντιδραστηρίων ελαχιστοποιείται. Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα όταν τα προς ανάλυση δείγματα διαφοροποιούνται στο χρώμα και στα συστατικά της μήτρας. Επίσης, εάν τα διαδοχικά ενιώμενα αντιδραστήρια απορροφούν στο μήκος κύματος της ανίχνευσης, ή εάν η σταθερά διάθλασης (refractive index) μεταξύ των διαδοχικά ενιωμένων ζωνών ποικίλει, η τεχνική της παύσης της ροής ελαχιστοποιεί τις αλληλεπιδράσεις. Επίσης, η τεχνική αυτή οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας δειγματοληψίας. Αυτό επιτυγχάνεται με εισαγωγή των ζωνών του δείγματος και των αντιδραστηρίων στο σπείραμα ανάμιξης, όταν η αντίδραση του προηγουμένως εισαγόμενου δείγματος παρακολουθείται με την τεχνική της παύσης της ροής στην κυψελίδα ροής. Ενώ μέχρι πρότινος, κυρίως ενζυμικές μέθοδοι αυτοματοποιούνταν επιτυχώς σε συστήματα SI, ομοίως

επιτυχημένη παρουσιάζεται η αυτοματοποίηση των κινητικών μεθόδων που χρησιμοποιούν αντιδραστήρια και επιτρέπουν όρια ανίχνευσης όμοια με τις φασματομετρικές μεθόδους.

3.7.2. Έγχυση Μικροσφαιριδίων

Η τεχνική έγχυσης μικροσφαιριδίων (*Bead injection, BI*) διαφέρει στο ότι το αντιδραστήριο είναι ακινητοποιημένο στην επιφάνεια μιας στατικής φάσης η οποία αποτελείται από μικροσφαιρίδια διαμέτρου 30-200 μm . Το κεντρικό σημείο όλων των τεχνικών BI είναι ο χειρισμός ενός εναιωρήματος μικροσφαιριδίων (*bead suspension*), καθώς τα υλικά αυτά πρέπει να μετρούνται με ακρίβεια, να μεταφέρονται μέσω του δικτύου των διαύλων και να τοποθετούνται στην κυψελίδα ροής, όπου αντιδράσεις μεταξύ του διαλύματος και της επιφάνειας λαμβάνουν χώρα. Τα υποστρώματα αυτά μεταφέρονται και τοποθετούνται με ταχύτητες της τάξεως των 10 $\mu\text{L s}^{-1}$, αλληλεπιδρούν με τους αναλύτες με ταχύτητες 1-2 $\mu\text{L s}^{-1}$ και απομακρύνονται με υψηλές ταχύτητες άνω των 200 $\mu\text{L s}^{-1}$. Κρίσιμα σημεία της φασματομετρίας BI είναι η παγίδευση ορισμένου ποσοστού υποστρώματος στην κυψελίδα ροής και η ομοιόμορφη τοποθέτηση των μικροσφαιριδίων. Έχουν χρησιμοποιηθεί μικροσφαιρίδια από διάφορα υλικά ανάλογα με την φύση της ανάλυσης, όπως κατιονανταλλακτικά σφαιρίδια C-25 Sephadex.

3.7.3. Χρωματογραφία συγγένειας SI

Η τεχνική αυτή, που χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό πρωτεϊνών του ανοσοποιητικού συστήματος (ανασοπρωτεϊνών), βασίζεται στην μοριακή αναγνώριση μεταξύ μίας συγκεκριμένης θέσης στην στατική φάση και μιας ομάδας της πρωτεΐνης, η οποία και δεσμεύεται, ενώ τα μη επιθυμητά συστατικά της μήτρας, όπως άλατα και άλλες πρωτεΐνες, απομακρύνονται με την κινητή φάση. Συνήθως η χρωματογραφία συγγένειας λαμβάνει χώρα σε σύστημα συνεχόμενης ροής σε στατική φάση σταγονιδίων Sephadex ή Sepharose, με προσθήκη πρωτεΐνης A ή G, ως εκλεκτικό αντιδραστήριο. Η πρωτεΐνη A έχει πολλαπλή δυνατότητα δέσμευσης αντισωμάτων που αναγνωρίζεται από το κλάσμα Fc των μορίων IgG. Σε pH 6 ή μεγαλύτερο οι ομάδες τις ιστιδίνης φορτίζονται και δεσμεύονται εκλεκτικά ενώ σε pH χαμηλότερο από 3 τα δεσμευμένα IgG ελευθερώνονται. Στην SI τεχνική της χρωματογραφίας

συγγένειας η στήλη σχηματίζεται μέσα στο σύστημα LOV, σε διάυλο τοποθετημένο μεταξύ της κεντρικής θύρας της πολυθεσιακής βαλβίδας και της κυψελίδας ροής. Τυπικοί όγκοι είναι: όγκος στήλης 10 μL , όγκος κυψελίδας ροής 8 μL , ενώ ο νεκρός όγκος μεταξύ της κυψελίδας και της άκρης της στήλης είναι 0,1 μL . Με χρήση ενός κλάσματος 5 μL διαλύματος HCl 0,1N, σχεδόν το σύνολο των μορίων IgG που συγκρατούνται στη στήλη εκλούνται στην κυψελίδα ροής όπου ανιχνεύονται φασματοφωτομετρικά στα 280 nm. Η χρήση προγραμματιζόμενης ροής εφαρμόζεται στην προσρόφηση των μορίων IgG στη στήλη με ροή 5 $\mu\text{L s}^{-1}$. Τα μόρια εκλούνται από τη στήλη με ταχύτητα 2 $\mu\text{L s}^{-1}$. Η φόρτωση της στήλης γίνεται με ταχύτητα 40 $\mu\text{L s}^{-1}$ και απομακρύνεται από το σύστημα με ταχύτητα 400 $\mu\text{L s}^{-1}$. Η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται μέσα σε 120 s χρησιμοποιώντας μόνο 2 mL κινητής φάσης [26,42].

Η χρωματογραφία σε μία ανανεώσιμη στήλη μικροσφαιριδίων είναι πιο ανθεκτική σε μικρές αλλαγές, καθώς ο όγκος των μικροσφαιριδίων που δεσμεύονται μέσα σε μια ανανεώσιμη στήλη είναι λιγότερο κρίσιμος και επιπλέον επειδή ο αναλύτης εκλύεται και ανιχνεύεται σε διάλυμα και όχι σε επιφάνεια. Χρησιμοποιώντας ένα μικρό κλάσμα διαλύτη η πρώτη έκλουση επιτρέπει στο σύνολο σχεδόν των μορίων να βρίσκονται στην κυψελίδα ροής την ίδια χρονική στιγμή, οδηγώντας σε εξαιρετικά όρια ανίχνευσης.

3.7.4. Sequential injection chromatography

Η χρωματογραφική τεχνική SIC ήταν η πρώτη που ωφελήθηκε από την εισαγωγή της προγραμματιζόμενης ροής. Αναπτύχθηκε από τον Satinsky και τους συνεργάτες του και εφαρμόστηκε στον διαχωρισμό φαρμακευτικών συστατικών με χρήση στηλών αντιστρόφου φάσεως [43]. Σε αντίθεση με τις τεχνικές HPLC, που απαιτούν στήλες σωματιδίων και πρέπει να χρησιμοποιούν αντλίες υψηλής πίεσης για την ώθηση της κινητής φάσης προς τη στήλη, οι τεχνικές SIC χρησιμοποιούν πορώδη υλικά από διοξείδιο του πυριτίου. Οι στήλες αυτές κατασκευάζονται με τη διαδικασία sol-gel, παρουσιάζουν πολύ χαμηλή αντοχή στη ροή και έχουν ικανοποιητικό αριθμό θεωρητικών πλακών για την επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού συστατικών με αρκετά όμοια δομή [43,44]. Με προγραμματισμό της ροής της κινητής φάσης επιτρέπεται μεγάλη ποικιλία στους ενιόμενους όγκους του δείγματος ή και του διαλύτη. Καθώς ο διαλύτης διαχέεται στο φέρον υγρό σχηματίζεται μία βαθμίδωση στη

συγκέντρωση, που χρησιμοποιείται για τη διαδοχική έκλυση των αναλυτών από την στατική φάση. Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει έξι στάδια: (1) εξισορρόπηση της στήλης, (2) εισαγωγή του δείγματος, (3) συγκράτηση των αναλυτών στη στήλη και έκλυση των συστατικών της μήτρας, (4) σχηματισμό βαθμίδωσης των συγκεντρώσεων, (5) έκλυση του αναλύτη και ανίχνευση, και (6) καθαρισμό της στήλης. Το πλεονέκτημα της SIC είναι ότι οι ταχύτητες ροής μπορούν να προγραμματιστούν μεμονωμένα για κάθε στάδιο του πρωτοκόλλου της μεθόδου. Έτσι τα βήματα 1 και 6 μπορούν να πραγματοποιηθούν σε υψηλές ταχύτητες ροής, ενώ τα βήματα 3 και 4 σε χαμηλές ταχύτητες.

Η τεχνική SI βρίσκει ολοένα νέες εφαρμογές σε μεθόδους με φασματομετρική ανίχνευση [45,46].

3.7.5. Κατεργασία δείγματος

Η κατεργασία του δείγματος πραγματοποιείται με παράπλευρες συσκευές που μπορούν να συζευχθούν με την LOV. Ένα επιπρόσθετο εξάρτημα όπως μία σύριγγα ή μία περισταλτική αντλία δίνει τη δυνατότητα στο σύστημα να πραγματοποιήσει την κατεργασία του δείγματος απομακρύνοντας σωματίδια με μία μικροστήλη ή να ελαχιστοποιήσει τα συστατικά της μήτρας με διάλυση. Η χρήση προγραμματιζόμενης ροής για αυτές τις λειτουργίες προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα τα οποία δεν είναι εφικτά όταν χρησιμοποιείται συνεχόμενη ροή για την ίδια τεχνική καθαρισμού.

4. ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

4.1. Ιστορική αναδρομή

Ευρήματα από αρχαιολογικές έρευνες όπως λίθινα τμήματα πιεστηρίων και πιθάρια για την αποθήκευση του ελαιολάδου αποδεικνύουν ότι οι ελιές καλλιεργούνταν και χρησιμοποιούνταν για το λάδι τους από τους Ασσύριους στην Περσία και την Βόρεια Μεσοποταμία πριν το 5.000 π.Χ. [47]. Περίπου 2.000 χρόνια αργότερα, οι Φοίνικες άρχισαν να διαδίδουν την καλλιέργεια της ελιάς στη Μ. Ασία, στα νησιά του Αιγαίου, στην ηπειρωτική Ελλάδα και στη Βόρεια Αφρική. Με την πάροδο του χρόνου, η καλλιέργειά της εξαπλώθηκε σε ολόκληρη τη Μεσόγειο καθώς και σε άλλες περιοχές της Υψηλίου. Το γεγονός ότι η ελιά ήταν αφιερωμένη στη θεά Αθηνά δείχνει τη σημασία της ακόμα και στη Μυθολογία.

4.2. Το δέντρο

Η επίσημη ονομασία της αιθαλούς υπεραιώνობιας ελιάς είναι *Olea Europaea Sativa*. Το εξημερωμένο ελαιόδεντρο έχει καταγωγή από την ανατολική λεκάνη της Μεσογείου. Προσαρμόζεται σε μακριάς διαρκείας ξηρά και θερμά καλοκαίρια, ενώ δείχνει ιδιαίτερη αντοχή και σε θερμοκρασίες που αγγίζουν πολλές φορές τους 0°C. Τα ελαιόδεντρα στην ενήλικη ζωή τους είναι δέντρα μεσαίου μεγέθους. Σε κάποιες περιπτώσεις τα δέντρα μπορούν να φτάσουν έως τα 10 m σε ύψος. Παρόλα αυτά συναντώνται και νάνοι ελαιόδεντρα για καλλωπιστικούς σκοπούς. Στον Μεσογειακό χώρο, τα ελαιόδεντρα ανθοφορούν στα τέλη της Άνοιξης, από Απρίλιο-Μάιο, ενώ η συγκομιδή ξεκινά από τα τέλη Νοεμβρίου και τελειώνει τον Φεβρουάριο του επόμενου έτους για τις πιο νότιες περιοχές.



Σχήμα 4.1. Το ελαιόδεντρο

Οι ελιές αρχίζουν να παράγουν καρπό μετά τα 15 χρόνια και μπορεί να ζήσουν μέχρι και 700 χρόνια σύμφωνα με βοτανικές έρευνες. Σήμερα υπάρχουν πάνω από 700 εκατομμύρια ελαιόδεντρα σε ολόκληρο τον κόσμο, το 80% των οποίων υπάρχει στην Ευρώπη, 42% στην Ισπανία, 24% στην Ιταλία και το 12% στην Ελλάδα. Το υπόλοιπο ποσοστό (20%) κατανέμεται στην Ανατολή, στη Β. Αφρική, τη Ν. Αμερική και τις Ν.Δ. Η.Π.Α.

4.3. Η ελιά

Η ελιά αποτελείται από τον μεσόκαρπο σε ποσοστό 78-80% και το κουκούτσι σε ποσοστό 14-16%. Το 50% του καρπού είναι νερό, το 25% υδατάνθρακες, το 25% έλαιο, ενώ περιέχονται και μικρά ποσά πρωτεΐνης [48].

4.4. Η παραγωγή του ελαιολάδου

Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής του ελαιολάδου συγκεντρώνεται στις Μεσογειακές χώρες (98%). Η Ευρωπαϊκή Ένωση συγκεντρώνει το 75% της παραγωγής ανά τον κόσμο, ενώ η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα συμπληρώνουν το 97% της ευρωπαϊκής παραγωγής. Η Τυνησία και η Τουρκία έχουν το 9% και το 5% της παραγωγής αντίστοιχα. Στον πίνακα 4.1 αναφέρονται οι κύριες χώρες παραγωγού ελαιολάδου καθώς και τα ποσοστά κατανάλωσης στις χώρες αυτές. Τα δεδομένα αναφέρονται στην περίοδο 1990-2000.

Πίνακας 4.1. Στοιχεία για την ετήσια παραγωγή και κατανάλωση του ελαιολάδου σε διάφορες χώρες για την περίοδο 1990-2000.

Χώρα	Παραγωγή %	Κατανάλωση %	Ετήσια κατανάλωση (kg) / άτομο
Ισπανία	31,4	23,3	12,1
Ιταλία	31,4	31,6	11,2
Ελλάδα	17,3	9,8	19,5
Πορτογαλία	2,0	2,5	5,2
Γαλλία	0,1	2,1	1,3
Τυνησία	9,0	2,7	7,9
Τουρκία	5,0	3,2	1,2
Συρία	4,2	4,0	6,1
Μαρόκο	2,4	2,2	1,8
Αλγερία	1,5	1,2	-
ΗΠΑ	0,1	5,7	0,6

4.4.1. Η συλλογή του ελαιοκάρπου

Η καλύτερη εποχή συλλογής του ελαιοκάρπου συμπίπτει με την μεταβολή του χρώματος από πρασινοκίτρινο σε μαυροϊώδες. Άγουρος ελαιόκαρπος δίνει ελαιόλαδο με έντονο πράσινο χρώμα και πικρίζουσα γεύση. Η παραμονή του ελαιοκάρπου στο δέντρο έχει ως συνέπεια την αύξηση της οξύτητας, την αλλαγή του χρώματος και μεταβολές στα αρωματικά συστατικά. Αλειφατικές ενώσεις με έξι άτομα άνθρακα και οι αντίστοιχοι εστέρες είναι οι ενώσεις που συνεισφέρουν στο λεγόμενο άγουρο (unripe) χαρακτηριστικό του αρώματος. Έχει βρεθεί ότι τα συστατικά αυτά με έξι άτομα C ελαττώνονται με την ωρίμανση. Υπάρχει επομένως βέλτιστος χρόνος συγκομιδής. Βέβαια, δεν μπορεί να επιτευχθεί η ίδια φυσική κατάσταση σε όλα τα ελαιόδεντρα και όλο τον ελαιόκαρπο. Για την ποικιλία Κορωνέϊκη, η συλλογή αρχίζει από τα μέσα του Νοεμβρίου. Η συγκέντρωση της trans-2-εξανάλης ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης από το άγουρο στο ώριμο και υπερώριμο στάδιο. Το άγουρο στάδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη εξανάλης, εξεν-3-όλης-1 και εξεν-2-όλης-1. Το μεσαίο στάδιο ωριμότητας μπορεί να χαρακτηριστεί μόνο από την περιεκτικότητα σε οξικό εξυλεστέρα και όχι από τις προαναφερόμενες

ενώσεις με έξι άτομα άνθρακα. Το υπερώριμο στάδιο χαρακτηρίζεται από την ελαττωμένη περιεκτικότητα σε ενώσεις έξι ατόμων C που αποδίδεται στην ελάττωση της ενεργότητας του ενζύμου λιποξυγενάση κατά το χειμώνα. Ο χαρακτηρισμός των σταδίων ωριμότητας πραγματοποιείται κυρίως με ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών συστατικών παρά με οργανοληπτικό έλεγχο.

Η συγκομιδή της ελιάς γίνεται είτε από το έδαφος είτε από το δέντρο. Ο τρόπος συγκομιδής επηρεάζει την ποιότητα του ελαιολάδου ανάλογα με τον τραυματισμό που θα δεχθεί ο καρπός. Στα χτυπημένα σημεία επέρχεται αλλαγή του βιοχημικού μεταβολισμού και αναπτύσσονται ανεπιθύμητες ενζυμικές αντιδράσεις, με αποτέλεσμα την τελική υποβάθμιση του ελαιολάδου. Η πλέον κατάλληλη μέθοδος μαζέματος του καρπού είναι με τα χέρια ή με κτένες από το δέντρο.

Για την ποικιλία Κορωνέικη εφαρμόζεται σε μεγάλη έκταση ελαφρύ ράβδισμα ή χρήση ελαιοσυλλεκτών, ενώ σε μερικές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται δίκτυα. Για τη μείωση της ποιοτικής υποβάθμισης πρέπει να μειωθεί ο χρόνος μεταξύ συλλογής και σύνθλιψης στην πρώτη περίπτωση και να μαζεύεται από τα δίκτυα ο καρπός όσο πιο τακτικά γίνεται στη δεύτερη. Ο μέγιστος χρόνος παραμονής είναι 7 ημέρες. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του ελαιοκάρπου θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη η μηχανική ζημιά που μπορεί να προκληθεί και να αποφευχθούν οι μυκητιακές ζυμώσεις.

4.4.2. Η αποθήκευση του ελαιοκάρπου

Οι ελιές πρέπει να φυλάσσονται σε καλώς αεριζόμενους χώρους, στους οποίους η θερμοκρασία διατηρείται κάτω από 25 °C και η σχετική υγρασία σε 75%. Η απ' ευθείας επαφή με το έδαφος θα πρέπει να αποφεύγεται. Ως μέσα συσκευασίας χρησιμοποιούνται είτε σακιά από νήμα γιούτας με οπές που επιτρέπουν τον αερισμό του ελαιοκάρπου είτε διάτρητα τελάρα. Τα σακιά δεν πρέπει να τοποθετούνται το ένα επάνω στο άλλο για να μην περιορίζεται ο αερισμός, να μην τραυματίζεται ο καρπός και να μην αναπτύσσονται μύκητες. Καλύτερες συνθήκες εξασφαλίζονται με τα τελάρα τα οποία όμως δεν βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή λόγω του μεγαλύτερου κόστους.

4.4.3. Τα στάδια παραγωγής του ελαιολάδου από τον καρπό

Τα στάδια που ακολουθούνται για την παραγωγή του ελαιολάδου από τον καρπό είναι τα ακόλουθα:

A. Αποφύλλωση. Φύλλα και κλαδιά που συλλέγονται με τον ελαιόκαρπο πρέπει να απομακρυνθούν. Το βάρος τους δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1%.

B. Πλύσιμο. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι πόσιμο σύμφωνα με τις οδηγίες της Ε.Ε. και την εθνική νομοθεσία.

Γ. Μεταφορά. Ενδείκνυται η χρήση μεταφορικής ταινίας που δεν τραυματίζει τον καρπό.

Δ. Θραύση-Σπάσιμο. Επηρεάζει την ποιότητα και την ποσότητα του ελαιολάδου. Χρησιμοποιούνται κυρίως ελαιόμυλοι, κυλινδρόμυλοι και σφυρόμυλοι. Γενικά πλεονεκτούν οι μεταλλικοί σπαστήρες διότι καταλαμβάνουν ελάχιστο χώρο. Το σπάσιμο του ελαιόκαρπου γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα (20-30 min), γεγονός που περιορίζει την επαφή του καρπού με τον αέρα, ώστε να μην ευνοείται η οξειδωτική αλλοίωση του ελαιολάδου. Επιπλέον, είναι δυνατή η ρύθμιση του βαθμού άλεσης (12-15 grm). Μειονέκτημα των σπαστήρων αυτών είναι η ρύπανση του ελαιολάδου με βαρέα μέταλλα, κυρίως Cu και Fe, που ευνοούν την οξειδωτική τάγγιση. Επίσης, μερικές φορές δεν ανοίγουν όλα τα ελαιοκύτταρα της σάρκας, ενώ ευνοείται ο σχηματισμός γαλακτωμάτων με αποτέλεσμα την παρουσία μεγάλης ποσότητας μούργας στο ελαιόλαδο. Ο βαθμός άλεσης επηρεάζει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου. Ελαιόκαρπος που σπάστηκε με μικρότερο αριθμό στροφών του σφυρόμυλου έδωσε καλύτερη ποιότητα ελαιολάδου, σε σχέση με εκείνο που προήλθε από ελαιόκαρπο τεμαχισμένο με περισσότερες στροφές σφυρόμυλου.

E. Μάλαξη. Χρησιμοποιούνται ημισφαιρικοί ή ημικυλινδρικοί ανοξειδωτικοί μαλακτήρες με διπλά τοιχώματα μέσα στα οποία κυκλοφορεί νερό, του οποίου η θερμοκρασία δεν πρέπει να ξεπερνά τους 45 °C. Οι μαλακτήρες διαθέτουν κάθετους ή οριζόντιους ρότορες (20-40 grm). Η θερμοκρασία της ελαιόπαστας δεν πρέπει να ξεπερνά τους 22-25 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει τα γευστικά και αρωματικά συστατικά και το καθιστά ευπαθές στην τάγγιση. Ο χρόνος μάλαξης εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς και δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20-30 min. Η αύξηση του χρόνου μάλαξης μειώνει το περιεχόμενο σε πολυφαινόλες διότι οξειδώνονται κατά την επαφή του ελαιολάδου με τον αέρα και κατά την δράση ενζύμων (πολυφαινολοοξειδάσες).

Z. Διαχωρισμός. Υπάρχουν τρεις μέθοδοι διαχωρισμού του ελαιολάδου από την ελαιόπαστα, με πίεση (pressing), με φυγοκέντριση και με διήθηση (percolation). Η μέθοδος της διήθησης βασίζεται στην διαφορά της επιφανειακής τάσης μεταξύ του ελαίου και του περιεχόμενου νερού. Χρησιμοποιείται η μηχανή Sinolea, στην οποία είναι προσαρτημένες ασάλινες λεπίδες. Όταν μία ασάλινη λεπίδα βυθιστεί στην ελαιόπαστα το έλαιο δείχνει την τάση να την επικαλύψει.

Σήμερα ο διαχωρισμός γίνεται με φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες απλού ή αυτόματου τύπου, η λειτουργία των οποίων στηρίζεται στη διαφορά των ειδικών βαρών των προς διαχωρισμό υγρών. Κατά τον διαχωρισμό μεγάλη σημασία έχει η θερμοκρασία του χρησιμοποιούμενου νερού, η οποία δεν πρέπει να ξεπερνά τους 30 °C γιατί αλλοιώνονται τα οργανοληπτικά συστατικά του ελαιολάδου και οξειδώνεται πιο γρήγορα. Αν η θερμοκρασία του νερού είναι εκτός των προβλεπόμενων ορίων, 25-30 °C, η ποιότητα επηρεάζεται σημαντικά. Η ποσότητα του νερού που προστίθεται ανάλογα με τον τύπο του ελαιοτριβείου πρέπει να κυμαίνεται από 35 έως 45%. Σημαντικό ρόλο στην ποιότητα παίζει ο καθαρισμός των διαχωριστήρων που πρέπει να γίνεται καθημερινά για τον απλό τύπο και δύο φορές την εβδομάδα για τον αυτόματο. Αν δεν γίνει πλήρης διαχωρισμός των ξένων υλών και του νερού, το έλαιο που λαμβάνεται αλλοιώνεται πολύ εύκολα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του.

Με τη μέθοδο της φυγοκέντρισης μειώνεται η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά γιατί χρησιμοποιείται νερό, το οποίο τα διαλυτοποιεί. Το περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά είναι το ίδιο για τις άλλες δύο μεθόδους.

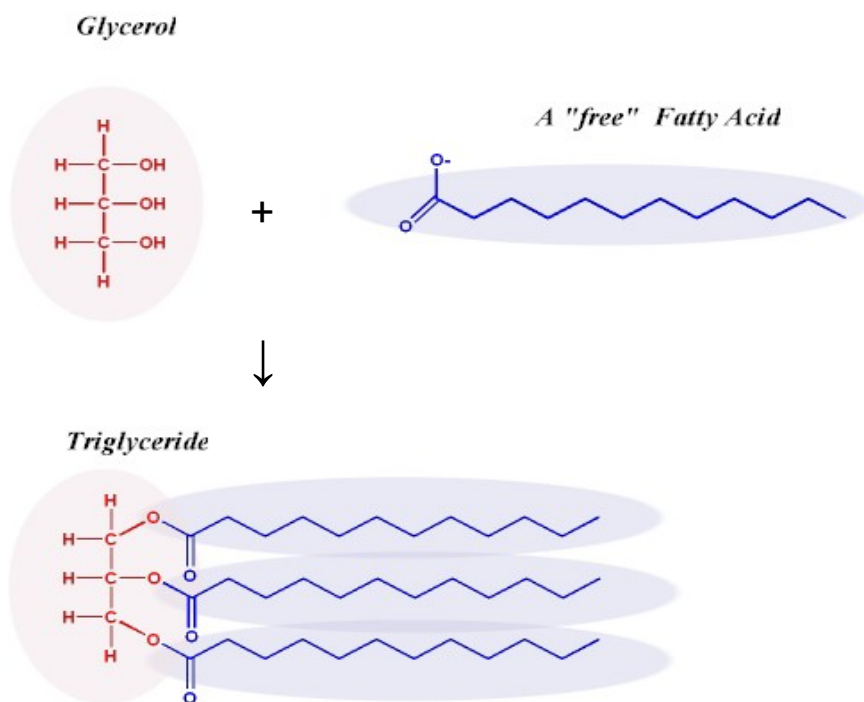
4.5. Η σύσταση του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο αποτελείται κατά 98 έως 99% από τριγλυκερίδια. Το υπόλοιπο ποσοστό περιλαμβάνει ελεύθερα λιπαρά οξέα, υδατάνθρακες, τριτερπενικές αλκοόλες, στερόλες, τοκοφερόλες, βιταμίνες, χρωστικές, φαινολικά και αρωματικά συστατικά.

4.5.1. Τριγλυκερίδια

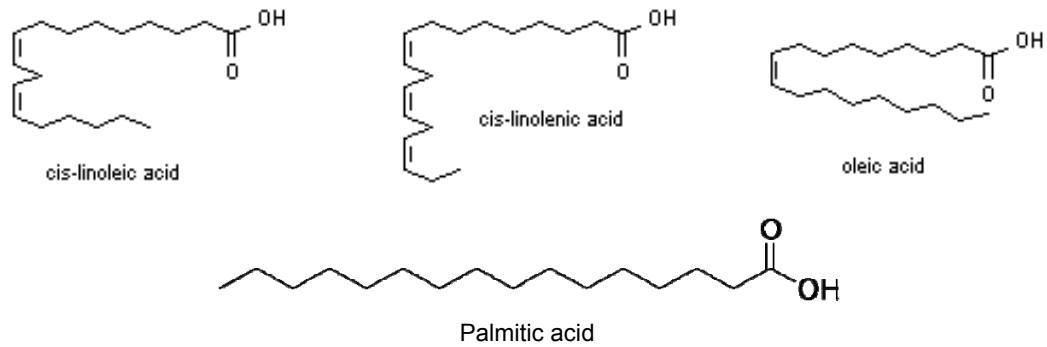
Τα τριγλυκερίδια (triglyceride) σχηματίζονται από τρία ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acid) που συνδέονται σε ένα μόριο γλυκερόλης (glycerol). Τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ. Η θέση 2 της γλυκερόλης καταλαμβάνεται από ακόρεστο λιπαρό οξύ με περισσότερο σύνηθες το λινολενικό οξύ. Τα λιπαρά

οξέα έχουν γενικό συντακτικό τύπο $CH_3(CH_2)_nCOOH$, όπου n είναι ο αριθμός των μεθυλομάδων που κυμαίνεται μεταξύ 12 και 20. Λιπαρά οξέα με περισσότερα από 20 άτομα C τείνουν να στερεοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου και απαντώνται στα κεριά. Το ελαιόλαδο περιέχει 72% μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, 14% πολυακόρεστα και 14% κορεσμένα λιπαρά οξέα.

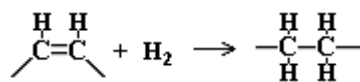


Σχήμα 4.2. Σχηματισμός του τριγλυκεριδίου.

Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχουν ένα διπλό δεσμό, ενώ τα πολυακόρεστα περιέχουν περισσότερους διπλούς δεσμούς. Το ελαϊκό οξύ (oleic acid) (C18:1) είναι ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ και περιέχεται σε ποσοστά 55-83% στο ελαιόλαδο. Το λινελαϊκό οξύ (cis-linoleic acid) (C18:2) είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με δύο διπλούς δεσμούς και έχει περιεκτικότητα περίπου 3,5-21% στο ελαιόλαδο. Το λινολενικό οξύ (cis-linolenic acid) (C18:3) είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με τρεις διπλούς δεσμούς και έχει περιεκτικότητα μικρότερη από 0,9%. Κορεσμένα λιπαρά οξέα που περιέχεται στο ελαιόλαδο είναι το στεατικό οξύ (stearic acid) (C18:0) (0,5-5,0%) και το παλμιτικό οξύ (palmitic acid) (C16:0) (7,5-20%).



Η υδρογόνωση του λίπους είναι μία διαδικασία κατά την οποία εισέρχεται ρεύμα υδρογόνου σε καυτό φυτικό έλαιο θερμοκρασίας από 250 έως 400°C, παρουσία μετάλλου ως καταλύτη, συνήθως νικελίου ή πλατίνας. Η διαδικασία διαρκεί αρκετές ώρες. Το ελαϊκό οξύ (C18:1) και το λινελαϊκό οξύ (C18:2) μετατρέπονται στο κορεσμένο στεατικό οξύ (C18:0).



Αντίδραση υδρογόνωσης

Το ελαιόλαδο δεν περιέχει trans-λιπαρά οξέα. Ένα έλαιο μερικώς υδρογονωμένο, μπορεί να περιέχει cis και trans λιπαρά οξέα. Συνέπεια της υδρογόνωσης είναι η στερεοποίηση του ελαίου σε θερμοκρασία δωματίου. Το ελαιόλαδο δεν υφίσταται την διαδικασία υδρογόνωσης, σε αντίθεση με άλλα βρώσιμα λίπη όπως η μαργαρίνη.

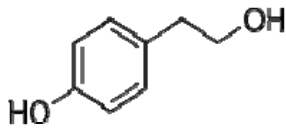
Τα επίπεδα των λιπαρών οξέων, με τη μορφή τριγλυκεριδίων, ποικίλουν κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης της ελιάς, ενώ εξαρτώνται από την ποικιλία και της συνθήκες καλλιέργειας και κλίματος. Γενικά, είναι αποδεκτό ότι ελαιόλαδα που προέρχονται από περιοχές με ψυχρό κλίμα περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαϊκού οξέος σε σχέση με αυτά που προέρχονται από θερμότερες περιοχές.

Τρόφιμα τα οποία περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, τείνουν να οξειδώνονται κατά την παραμονή τους. Η ταχύτητα οξείδωσης είναι συνάρτηση του βαθμού ακορεστότητας της λιπαρής ύλης, π.χ. η ταχύτητα οξείδωσης του λινελαϊκού οξέως ($\Delta\Delta^{9,12}$) είναι είκοσι φορές μεγαλύτερη εκείνης του ελαϊκού ($\Delta\Delta^9$). Κάθε πρόσθετος διπλός δεσμός ($\Delta\Delta$) στο μόριο εικοσαπλασιάζει την ταχύτητα οξείδωσης.

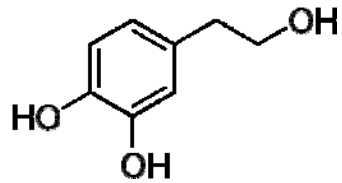
Με τον όρο *στοιχειώδη λιπαρά οξέα* (essential fatty acids) χαρακτηρίζονται τα λιπαρά οξέα που δεν σχηματίζονται στον οργανισμό του ανθρώπου. Είναι απαραίτητα για την ύπαρξη του και πρέπει να τα λάβει έτοιμα από την τροφή. Είναι μόνο δύο, το λινελαϊκό, ένα ω-6 λιπαρό οξύ και το α-λινολενικό, ένα ω-3 λιπαρό οξύ. Τα λιπαρά αυτά οξέα αποτελούν τη βάση από την οποία σχηματίζονται και άλλα ω-6 και ω-3 λιπαρά οξέα σε υγιείς οργανισμούς.

4.5.2. Πολυφαινόλες

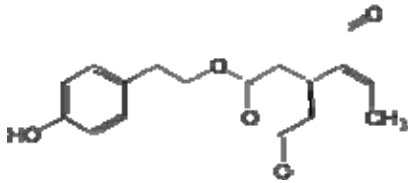
Στα φαινολικά συστατικά οφείλεται η πικρή γεύση του ελαιολάδου, η στυπτικότητα και η αντοχή του στην οξειδωση. Διάφορες φλαβόνες και φλαβονόλες καθώς και το βανιλλικό όξύ και τα κιναιμικά οξέα, όπως τα καφεϊκό και *p*-κουμαρικό οξύ, έχει αναφερθεί ότι βρίσκονται στην ελιά [48]. Το κυρίαρχο φαινολικό οξύ που περιέχεται στο ελαιόλαδο είναι το *p*-κουμαρικό οξύ ($1-10 \mu\text{g g}^{-1}$) και ακολουθούν το συρινγικό και το βανιλλικό οξύ σε μικρότερα ποσά. Ωστόσο η ελιά περιέχει έναν αριθμό χαρακτηριστικών συστατικών όπου περιλαμβάνονται η τυροσόλη, η υδροxyτυροσόλη και η ελευρωπαίνη η οποία αποτελεί και το πλέον σημαντικό φαινολικό συστατικό. Η ελευρωπαίνη είναι ένας εστέρας του ελενολικού οξέος με την υδροxyτυροσόλη. Οι φλαβονοειδείς πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο είναι φυσικά αντιοξειδωτικά και παρουσιάζουν πληθώρα θρεπτικών επιδράσεων. Η περιεκτικότητα των αντιοξειδωτικών πολυφαινολών είναι περίπου 5 mg ανά 10 g ελαιολάδου. Το περιεχόμενο σε φαινόλες εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, τον χρόνο συγκομιδής, την διαδικασία παραγωγής, το χρονικό διάστημα που είναι αποθηκευμένο το ελαιόλαδο και τέλος αν είναι ραφινρισμένο.



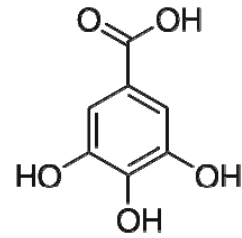
Τυροσόλη



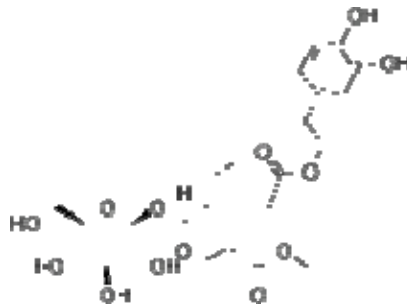
Υδροξυτυροσόλη



Ελαιοκανθάλη



Γαλλικό οξύ



Ελευρωπαίνη

Συγκεκριμένες ποικιλίες ελιάς, όπως αυτές της Τοσκάνης (Tuscan), έχουν πολύ υψηλές περιεκτικότητες σε πολυφαινόλες. Τα ελαιόλαδα αυτά είναι πολύτιμα καθώς μπορούν να αναμιχθούν με έλαια μικρής περιεκτικότητας φαινολών για να επιμηκύνουν το χρόνο ζωής τους.

Οι ελιές που συλλέγονται στις αρχές του έτους έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Οι ελιές που συλλέγονται προς το τέλος του έτους, περιέχουν λιγότερες πολυφαινόλες και έχουν πιο γλυκιά γεύση. Η συγκέντρωση των πολυφαινολών αυξάνει κατά την ανάπτυξη του ελαιοκάρπου μέχρι το χρώμα του να μεταβάλλεται από πράσινο σε πορφυρό, οπότε αρχίζει να μειώνεται. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι παλαιότερα ήταν επιθυμητή η συγκομιδή στην περίοδο της μέγιστης ωρίμανσης, όπου η γεύση του ελαιολάδου ήταν γλυκιά ενώ υπήρχε απώλεια ή μειωμένη παρουσία θρεπτικών συστατικών. Στις μέρες μας η δυνατή πικρή γεύση γίνεται πιο επιθυμητή σε

συνδυασμό με την παρουσία των αντιοξειδωτικών στην μέγιστη συγκέντρωσή τους.

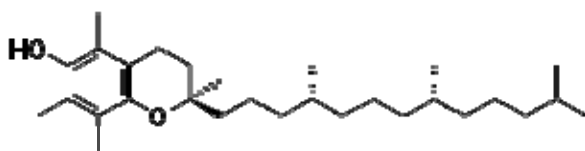
Πολλά έχουν ειπωθεί σχετικά με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την συλλογή του καρπού της ελιάς. Εάν η τεχνική όμως χρησιμοποιηθεί με σωστό τρόπο έχει μικρή επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου.

Το ραφινάρισμα εφαρμόζεται σε ελαιόλαδα που έχουν αυξημένη οξύτητα, είναι παλαιά, έχουν υποστεί τάγγιση, έχουν προέλθει από άρρωστους καρπούς ή έχουν κάποιο άλλο μειονέκτημα που τα καθιστά ανεπιθύμητα προς κατανάλωση. Η διαδικασία περιλαμβάνει την εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, την απόσμηση και τον αποχρωματισμό. Τα ραφιναρισμένα ελαιόλαδα είναι φτωχότερα σε τυροσόλη και άλλα φαινολικά συστατικά. Η συγκέντρωση των πολυφαινόλων στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 50 και 80 ppm, ενώ το ραφιναρισμένο έλαιο περιέχει πολυφαινόλες σε συγκέντρωση μικρότερη των mg ανά kg ελαιολάδου.

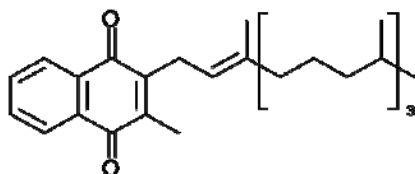
Κατά την παραμονή του ελαιολάδου στον περιέκτη, οι πολυφαινόλες οξειδώνονται με αργό ρυθμό. Ένα ελαιόλαδο που αποθηκεύεται κατάλληλα και αναγράφει ημερομηνία λήξεως, μπορεί να καταναλωθεί με ασφάλεια.

4.5.3. Βιταμίνες

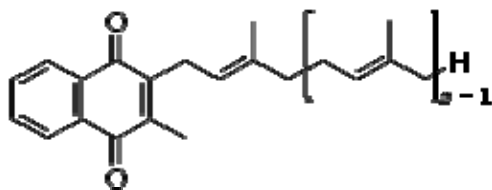
Οι βιταμίνες διακρίνονται γενικά σε δύο κατηγορίες: τις λιποδιαλυτές και τις υδατοδιαλυτές. Το ελαιόλαδο περιέχει κυρίως λιποδιαλυτές βιταμίνες, οι οποίες συνήθως δεν καταστρέφονται κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. Εντούτοις, οι ελιές περιέχουν εξίσου και τα δύο είδη βιταμινών. Η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) αποτελεί ένα φυσικό αντιοξειδωτικό (150-300 ppm). Τα φυτικά έλαια αποτελούν τη δεύτερη πηγή της βιταμίνης K μετά τα πράσινα λαχανικά.



Η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)



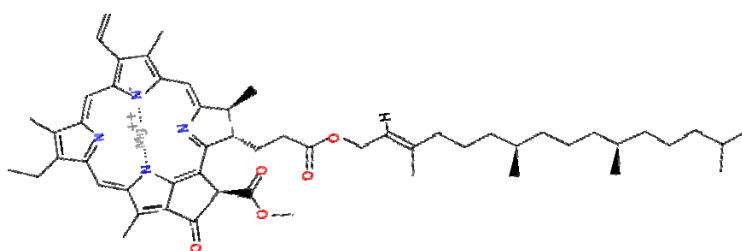
Η βιταμίνη K1



Η βιταμίνη K2

4.5.4. Χρωστικές

Το χρώμα του ελαιολάδου εξαρτάται από τις χρωστικές που περιέχει ο καρπός. Οι πράσινες ελιές δίνουν ελαιόλαδο πράσινου χρώματος εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη. Οι ώριμες ελιές δίνουν ελαιόλαδο κίτρινου χρώματος λόγω της παρουσίας των καροτενοειδών χρωστικών. Το χρώμα του ελαιολάδου εξαρτάται από τον ακριβή συνδυασμό και το ποσοστό των παραπάνω χρωστικών.



Η χλωροφύλλη α



Το β καροτένιο

4.5.5. Ιχνοστοιχεία

Τα ιχνοστοιχεία κατανέμονται ποικιλοτρόπως στη φύση και περιέχονται στο νερό, το έδαφος και τον αέρα. Όπως αναμένεται, μεταφέρονται σε μικρές ποσότητες, σε μία ποικιλία τροφίμων, μεταξύ των οποίων και το ελαιόλαδο [50]. Ο μόλυβδος Pb θεωρείται ένα από τα πλέον επικίνδυνα στοιχεία για την υγεία του ανθρώπου και προέρχεται κυρίως από την καύση υλών, τις

βιομηχανικές εκπομπές, τα βερνίκια και τις χημικές χρωστικές ουσίες. Το κάδμιο, ακόμα πιο επικίνδυνο στοιχείο, είναι περίπου δέκα φορές πιο τοξικό από το μόλυβδο και προέρχεται από τη χρήση του στην βιομηχανία σε ηλεκτρόδια μπαταριών, σε χρώματα και ως σταθεροποιητής σε γόμμες και πλαστικά. Άλλα μέταλλα, όπως ο ψευδάργυρος και ο χαλκός παρουσιάζουν βιολογική δράση σε μικρές δόσεις αλλά έχουν τοξική επίδραση σε μεγαλύτερες ποσότητες. Υψηλή συγκέντρωση χαλκού σε τρόφιμα πιθανώς να εμφανίζονται εξαιτίας των μυκητοκτόνων καταλοίπων που περιέχουν χαλκό και χρησιμοποιούνται στην γεωργία και σε υδραυλικά συστήματα. Ο ψευδάργυρος περιέχεται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων και περιβαλλοντολογικών δειγμάτων και μέχρι στιγμής έχει άγνωστη τοξική δράση.

Ειδικά στο ελαιόλαδο, τα στοιχεία αυτά είναι παρόντα εξαιτίας μιας ποικιλίας παραγόντων όπως είναι οι διαδικασίες κατεργασίας της ελιάς (μόλυνση από χαλκό), οι διαδικασίες αποθήκευσης (μόλυνση από Cd ή Cu) ή η ύπαρξη δρόμων ταχείας κυκλοφορίας και βαριάς βιομηχανίας κοντά σε φυτείες ελαιόδεντρων (παρουσία μολύβδου). Η παρουσία μερικών μετάλλων και σπάνιων γαιών σε πολύ μικρές ποσότητες της τάξεως των ppb ή και μικρότερες ανά κιλό ελαιολάδου σχετίζεται με τα περιεχόμενα στο έδαφος ιχνοστοιχεία της περιοχής προέλευσης, ενώ η παρουσία των μετάλλων Al και Ca έχει συνδεθεί με τη χρήση φωσφορικών λιπασμάτων.

Τα μέταλλα αυτά εκτός από την επικινδυνότητα που εμπεριέχουν για την υγεία του ανθρώπου, παίρνουν μέρος σε αντιδράσεις οξειδωσης των αλυσίδων των λιπαρών οξέων όπου δρουν ως καταλύτες. Επομένως, επιδρούν σημαντικά στην μείωση του χρόνου ζωής του ελαιολάδου. Καθίσταται συνεπώς αναγκαίος ο προσδιορισμός τους στο ελαιόλαδο ως ένας ακόμα δείκτης που μαζί με την ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα καθορίζει την ποιότητα του ελαιολάδου.

4.5.6. Υδατάνθρακες

Το σκουαλένιο αποτελεί ένα σημαντικό υδατάνθρακα του παρθένου ελαιολάδου. Η περιεκτικότητά του είναι 2,5-9,3 mg/g ελαιολάδου. Περιέχονται και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδατάνθρακες όπως το φαινανθρένιο, το πυρένιο και το 1,2-βενζανθρακένιο.



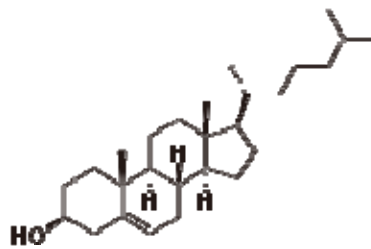
Το σκουαλένιο

4.5.7. Αλειφατικές αλκοόλες

Το ελαιόλαδο περιέχει κορεσμένες αλειφατικές αλκοόλες ευθείας αλυσίδας με 18 έως 28 άτομα C. Οι κυριώτερες είναι η εξαεικοσανόλη, η οκταεικοσανόλη και η τετραεικοσανόλη. Εστέρες των λιπαρών αλκοολών με τα λιπαρά οξέα περιέχονται επίσης στο ελαιόλαδο (waxes). Οι κυριότεροι εστέρες έχουν 36, 38, 40, 42, 44 και 46 άτομα C.

4.5.8. Στερόλες

Οι κυριότερες στερόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο είναι η β-σιτοστερόλη, η Δ^5 -αβεναστερόλη και η καμπεστερόλη. Σε μικρότερα ποσά περιέχονται οι σιγμαστερόλη, χοληστερόλη, 24-μεθυλενοχοληστερόλη, Δ^7 -καμπεστερόλη, $\Delta^{5,23}$ σιγμασταδιενόλη, σιτοστανόλη, $\Delta^{5,24}$ σιγμασταδιενόλη, Δ^7 σιγμαστενόλη, Δ^7 αβεναστερόλη. Οι 4,4 διμεθυλοστερόλες (τριτερπενικές αλκοόλες) περιέχονται στο ελαιόλαδο σε συγκεντρώσεις από 100 έως 150 mg/100g ελαιολάδου. Η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη είναι δύο από τις κυριότερες τριτερπενικές διαλκοόλες.



Η Χοληστερόλη

4.6. Η αποθήκευση του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο μπορεί να διατηρηθεί περισσότερο από κάθε άλλο βρώσιμο έλαιο. Εάν μάλιστα αποθηκευτεί σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να υποστεί τάγγιση ή να οξειδωθεί. Φυσικά, η ποιότητα του ελαιολάδου παίζει σημαντικό ρόλο στη διάρκεια ζωής του, καθώς

ελαιόλαδα χαμηλής ποιότητας έχουν διάρκεια ζωής μόλις έξι μήνες ή και λιγότερο. Αντίθετα, ελαιόλαδα υψηλής ποιότητας είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, που εκτός από το υγιεινό πλεονέκτημα που προσδίδουν, επιμηκύνουν σημαντικά το χρόνο ζωής των ελαιολάδων. Κατά το στάδιο της αποθήκευσης πρέπει να ελέγχεται η θερμοκρασία και η επαφή του ελαιολάδου με νερό, στερεά συστατικά ή κολλοειδείς ακαθαρσίες για την αποφυγή ανεπιθύμητων αντιδράσεων, λιπολυτικών ή οξειδωτικών. Πριν την αποθήκευση, το ελαιόλαδο πρέπει να απαλλαγεί από τη μούργα διότι λόγω των διαφόρων ζυμώσεων, υποβαθμίζεται η ποιότητά του. Η απομάκρυνση της μούργας γίνεται σε δεξαμενές καθίζησης, απουσία αέρα και φωτός. Πρέπει να αποφευχθεί ιδιαίτερα η ύπαρξη έστω και μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνικής φύσεως ενώσεων οι οποίες αποικοδομούνται προς δύσοσμα προϊόντα τα οποία επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

4.6.1. Περιέκτες αποθήκευσης

Οι πλέον κατάλληλες επιλογές περιεκτών αποθήκευσης είναι οι υάλινοι, ειδικά οι σκουρόχρωμοι, οι κεραμικοί, οι πορσελάνινοι ή από αδρανή μέταλλα περιέκτες, όπως είναι ο χάλυβας. Το ελαιόλαδο δεν πρέπει να αποθηκεύεται σε περιέκτες κατασκευασμένους από ενεργά μέταλλα, όπως ο χαλκός ή ο σίδηρος. Η χημική αντίδραση των μετάλλων αυτών με το ελαιόλαδο μπορεί να οδηγήσει σε προϊόντα οξειδωσης και επομένως στην καταστροφή του. Επίσης, πρέπει να αποφεύγονται οι πλαστικοί περιέκτες διότι το ελαιόλαδο τείνει να προσροφά μόρια βινυλοχλωρίδιου προερχόμενα από PVC (Polyvinyl Chloride). Τελευταία χρησιμοποιείται για την συσκευασία ο πολυεστέρας του τερεφθαλικού οξέος, PET. Το ελαιόλαδο οξειδώνεται ταχέως από την επαφή του με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Για το λόγο αυτό πρέπει ο περιέκτης να είναι πάντα κλειστός με σφιχτό πώμα. Αν τα δοχεία αποθήκευσης πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ξανά πρέπει να υποστούν σχολαστικό πλύσιμο με καυστική σόδα ή άλλου είδους απορρυπαντικό.

4.6.2. Χώροι αποθήκευσης

Το ελαιόλαδο πρέπει να αποθηκεύεται σε δροσερό και σκοτεινό μέρος, όπως ιδανικά σε κελάρι, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και σταθερή. Κάλο θα είναι να αποφεύγονται χώροι κοντά σε θερμαντικές συσκευές, όπως

φούρνοι, και να αποθηκεύεται μακριά από το ηλιακό φως. Το ελαιόλαδο μπορεί να ψυχθεί ή να καταψυχθεί, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η ποιότητά του. Να σημειωθεί ότι η μείωση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος αποθήκευσης θα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κρυστάλλων, που όμως εξαφανίζονται όταν το ελαιόλαδο επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

4.6.3. Θερμοκρασία αποθήκευσης

Η ιδανική θερμοκρασία για την αποθήκευση του ελαιολάδου είναι 13°C, αν και η συνήθης θερμοκρασία δωματίου των 21°C είναι κατάλληλη εφόσον παραμένει σχεδόν σταθερή. Το ελαιόλαδο στερεοποιείται στους 2°C, αλλά επανέρχεται στην υγρή κατάσταση αμέσως μόλις η θερμοκρασία αυξηθεί.

Εάν οι συνθήκες αποθήκευσης του ελαιολάδου είναι κατάλληλες, ο χρόνος ζωής του είναι τουλάχιστον δύο χρόνια. Εντούτοις, το άρωμα και η γεύση του, καθώς και όλες οι θρεπτικές του ιδιότητες διατηρούνται σε μέγιστες τιμές για ένα χρόνο. Να σημειωθεί ότι η κατανάλωση του ελαιολάδου ακόμα και μετά την ημερομηνία λήξεως του, δεν είναι επιβλαβής, αλλά το άρωμα και η γεύση του θα είναι δυσάρεστα. Καθώς το ελαιόλαδο παλαιώνει τα επίπεδα οξύτητάς του ανεβαίνουν. Το ελαιόλαδο έχει την ιδιότητα να προσροφά κάποιες οσμές που το περιβάλλουν. Τρία σημάδια που δείχνουν ότι το ελαιόλαδο δεν είναι πλέον κατάλληλο για κατανάλωση είναι τα ακόλουθα:

- Τάγγισμα
- Γεύση και άρωμα κρασιού
- Μεταλλική γεύση, ειδικά όταν έχει αποθηκευτεί σε μεταλλικούς περιέκτες.

4.7. Βιολογικές και άλλες ιδιότητες του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο είναι μια 'χαρισματική' λιπαρή ύλη και υπερτερεί έναντι όλων των άλλων λιπαρών υλών που προέρχονται είτε από το ζωικό είτε από το φυτικό βασίλειο παρ' ότι έχει όμοια θερμιδική αξία. Το ελαιόλαδο αποδίδει ενέργεια 9,3 kcal/g. Είναι μαζί με το σησαμέλαιο τα μόνα φυτικά έλαια που μπορούν να καταναλωθούν αμέσως μετά την παραλαβή τους χωρίς να υποστούν καμιά απολύτως επεξεργασία. Από την πρώτη στιγμή της έκθλιψης του ελαιοκάρπου, το ελαιόλαδο διατηρεί τα συστατικά του, γευστικά και αρωματικά. Το ίδιο το λάδι δρα ως μη πολικός διαλύτης και εκχυλίζει

αρωματικές και γευστικές ουσίες. Διαχωρίζεται από την ελαιοζύμη με φυσικές μεθόδους, πίεση και φυγοκέντριση, και δεν υποβάλεται σε εξευγενισμό. Είναι πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Κάθε κουταλιά ελαιολάδου περιέχει περίπου το 10% της απαραίτητης ημερήσιας ποσότητας σε βιταμίνη E. Το ελαιόλαδο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε φυσικά αντιοξειδωτικά και θρεπτικά συστατικά, όπως οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή και τα καροτένια, και λόγω της παρουσίας τους, παρουσιάζει αντοχή στο τάγγισμα. Έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε σκουαλένιο, που ρυθμίζει ενεργά τον μεταβολισμό.

Αφομοιώνεται από τον οργανισμό κατά 98%, ενώ σημαντικό ρόλο παίζει η απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών του. Έχει αποδειχθεί ότι μόνο το λίπος του μητρικού γάλακτος αφομοιώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από το ελαιόλαδο. Πέπτεται από τον οργανισμό του ανθρώπου στον ιδανικότερο βαθμό, ενώ η σύνθεσή του σε λιπαρά οξέα, και η παρουσία της χλωροφύλλης βοηθά τη λειτουργία του πεπτικού σωλήνα, διεγείρει το ένζυμο παγκρεατική λιπάση και διευκολύνει τις εκκρίσεις της χολής.

4.8. Ελαιόλαδο και Υγεία

Η αντιοξειδωτική ενεργότητα των πολυφαινολών που περιέχονται στο ελαιόλαδο συμβάλει σημαντικά στην υγεία του ανθρώπου σε πολλές λειτουργίες του οργανισμού, μερικές από τις οποίες αναφέρονται στην συνέχεια.

Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας που έχουν υποστεί οξείδωση (oxidized low-density lipoproteins, LDL) έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην εμφάνιση της αρτηριοσκλήρυνσης (atherosclerosis). Τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν τις LDL πρωτεΐνες από την οξείδωση.

Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν ή και αναστέλλουν τον ρυθμό ανάπτυξης ορισμένων βακτηρίων όπως των *Salmonella*, *Cholera*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* και *Influenza in vitro*. Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν τον σημαντικό ρόλο των πολυφαινολών στην διατροφή και συμβάλλουν στην επιτυχημένη προώθηση του ελαιολάδου ως ένα αντιμικροβιακό τρόφιμο.

Υπάρχει μία ολοένα αυξανόμενη υποψία ότι οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται στο σώμα του ανθρώπου από το οξειδωτικό stress, αποτελούν την κύρια αιτία της εμφάνισης διαφόρων μορφών νεοπλασιών, ειδικότερα σε ασθενείς που εμφανίζουν προδιάθεση σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπου

παράγεται ελεύθερο οξυγόνο. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα φαινολικά αντιοξειδωτικά του ελαιολάδου παρουσιάζουν μία σημαντική ικανότητα να μειώνουν τις ενεργές ενώσεις οξυγόνου, που σχετίζονται με τον καρκίνο του στήθους και του εντέρου.

Πρόσφατες έρευνες που έγιναν σε αρουραίους έδειξαν ότι το φαινολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου μείωσε δραματικά το οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε από δευτερογενή καπνό τσιγάρου (παθητικό κάπνισμα).

Οι αλλοιώσεις του δέρματος που οφείλονται στην υπερβολική έκθεση στις ηλιακές ακτίνες και το περιβαλλοντικό stress, σχετίζονται άμεσα με τις επιβλαβείς λειτουργίες των ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται στα κύτταρα του δέρματος. Τα πολυφαινολικά συστατικά του ελαιολάδου συγκρίθηκαν με πιο 'παραδοσιακά' αντιοξειδωτικά συστατικά όπως οι τοκοφερόλες, τα οποία χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων, ως προς την δυνατότητα πρόληψης των δερματικών αλλοιώσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες έχουν την μέγιστη δράση καταστροφής των ελεύθερων ριζών (free radical scavengers).

4.9. Η ποιότητα του ελαιολάδου

Όπως σε κάθε προϊόν, έτσι και στο ελαιόλαδο η ποιότητα έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί επηρεάζει σε ουσιαστικό βαθμό την τιμή του και τη γενικότερη αποδοχή του από το καταναλωτικό κοινό. Η ποιότητα πρέπει να αποδεικνύεται από αδιάσειστα στοιχεία, δηλαδή με τον προσδιορισμό χαρακτηριστικών φυσικοχημικών και οργανοληπτικών παραμέτρων από έμπειρο επιστημονικό προσωπικό.

Η ποιότητα του ελαιολάδου διαμορφώνεται από τη στιγμή που το λάδι σχηματίζεται στον ελαιόκαρπο. Ειδικότερα εξαρτάται από την καλή ποιότητα του ελαιοκάρπου, την ωριμότητα, την ποικιλία, τις καλλιεργητικές πρακτικές, το έδαφος, τις κλιματολογικές συνθήκες, το χρόνο συγκομιδής, τον έλεγχο φυτοφαρμάκων, τον τρόπο μεταφοράς και αποθήκευσης, τις τεχνικές σύνθλιψης, την αποθήκευση της πάστας και τις μεθόδους παραλαβής και το ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων.

Οι ποιοτικές κατηγορίες του ελαιολάδου όπως έχουν καθοριστεί από το Διεθνές Συμβούλιο του ελαιολάδου είναι οι εξής:

- ❖ Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (Extra virgin olive oil) το οποίο έχει:

- βαθμό οργανοληπτικής δοκιμής (panel test) μεγαλύτερο ή ίσο του 6,5
- μέγιστη οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, 1,0 % w/w
- μέγιστο αριθμό υπεροξειδίων 20 meq O₂ Kg⁻¹ ελαίου
- K₂₇₀ μικρότερη ή ίση του 0,20
- ΔΚ μικρότερη ή ίση του 0,01
- ❖ Παρθένο ελαιόλαδο (Virgin olive oil) το οποίο έχει:
 - βαθμό οργανοληπτικής δοκιμής (panel test) μεγαλύτερο ή ίσο του 5,5
 - μέγιστη οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, 2,0 % w/w
 - μέγιστο αριθμό υπεροξειδίων 20 meq O₂ Kg⁻¹ ελαίου
 - K₂₇₀ μικρότερη ή ίση του 0,25
 - ΔΚ μικρότερη ή ίση του 0,01
- ❖ Κοινό ή ημιφίνο παρθένο ελαιόλαδο (Semifine virgin olive oil) το οποίο έχει:
 - βαθμό οργανοληπτικής δοκιμής (panel test) μεγαλύτερο ή ίσο του 3,5
 - μέγιστη οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, 3,3 % w/w
 - μέγιστο αριθμό υπεροξειδίων 20 meq O₂ Kg⁻¹ ελαίου
 - K₂₇₀ μικρότερη ή ίση του 0,25
 - ΔΚ μικρότερη ή ίση του 0,01
- ❖ Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο (Iampante virgin olive oil) το οποίο έχει:
 - βαθμό οργανοληπτικής δοκιμής (panel test) μεγαλύτερο ή ίσο του 3,5
 - μέγιστη οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, 3,3 % w/w
 - μέγιστο αριθμό υπεροξειδίων 20 meq O₂ Kg⁻¹ ελαίου
 - K₂₇₀ μικρότερη ή ίση του 0,25
 - Δεν υπάρχει όριο για τη σταθερά ΔΚ
- ❖ Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο (refined olive oil) το οποίο έχει:
 - οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ μικρότερη του 0,5 % w/w
 - αριθμό υπεροξειδίων μικρότερο του 10 meq O₂ Kg⁻¹ ελαίου
 - K₂₇₀ μικρότερη του 1,2
 - ΔΚ μικρότερη του 0,16
- ❖ Ελαιόλαδο (olive oil) το οποίο έχει:
 - οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ μικρότερη του 1,5 % w/w
 - αριθμό υπεροξειδίων μικρότερος του 15 meq O₂ Kg⁻¹ ελαίου
 - K₂₇₀ μικρότερη ή ίση του 1,0
 - ΔΚ μικρότερη ή ίση του 0,13

- ❖ Ακατέργαστο πυρηνέλαιο (Olive pomace oil) το οποίο έχει:
 - Μέγιστη οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, 1,5 % w/w
 - Μέγιστο αριθμό υπεροξειδίων 15 meq O₂ Kg⁻¹ ελαίου
 - K₂₇₀ μικρότερη ή ίση του 2,0
 - ΔΚ μικρότερη ή ίση του 0,2

Σημαντικό για την ποιότητα του ελαιολάδου είναι η σωστή χρήση φυτοφαρμάκων. Τα φυτοφάρμακα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες της Ε.Ε. ή τη νομοθεσία της κάθε χώρας. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να δίνονται πληροφορίες σε ότι αφορά:

- Τον τύπο του φυτοφαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε
- Την οδηγία και τη συσκευή χρήσης
- Την μέση ποσότητα φυτοφαρμάκου ανά εκτάριο ή στρέμμα
- Την ημερομηνία
- Την υπογραφή του αρμόδιου προσώπου

Ο έλεγχος της ποιότητας και γνησιότητας του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου γίνεται με ενόργανες τεχνικές σχεδιασμένες να δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Η ποιότητα χαρακτηρίζεται από δείκτες όπως τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και panel test για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

4.10. Άλλα βρώσιμα έλαια [51]

4.10.1. Σησαμέλαιο

Το σησαμέλαιο λαμβάνεται από τους καρπούς του σουσαμιού (*Sesamum indicum* και *S. Orientale*). Τα σπέρματα αυτά περιέχουν συνήθως 47-56% έλαιο, διακρίνονται δε στις ποικιλίες: ινδική, αφρικανική και ανατολική. Η παραλαβή του γίνεται κατόπιν διπλής ή τριπλής πίεσης των καθαρισμένων σπόρων. Η τελευταία πίεση γίνεται εν θερμώ. Το παραγόμενο έλαιο έχει ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Το σησαμέλαιο είναι γενικώς άοσμο, έχει ήπια και ευχάριστη γεύση και χαρακτηρίζεται για τη μεγάλη του αντοχή κατά την παραμονή του για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το σησαμέλαιο νοθεύεται συνήθως με αραχιδέλαιο και βαμβακέλαιο.

4.10.2. Ηλιέλαιο

Λαμβάνεται από τα σπέρματα του κοινού ηλίανθου (*Helianthus annuus*), ο οποίος καλλιεργείται ειδικά για την παραγωγή αυτού του ελαίου. Η περιεκτικότητα των σπερμάτων σε έλαιο εξαρτάται από την προέλευσή τους, συνήθως όμως κυμαίνεται μεταξύ 30-40%. Η παραλαβή του βρώσιμου ελαίου γίνεται μετά από ψυχρή πίεση των καθαρισμένων και αποφλοιωμένων σπερμάτων.

4.10.3. Σογιέλαιο

Το έλαιο αυτό λαμβάνεται μετά από έκθλιψη ή εκχύλιση των σπερμάτων της σόγιας (*Soja hispida*), τα οποία περιέχουν συνήθως 17-18% έλαιο. Το φυτό αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένο στην Κίνα, την Ιαπωνία και την Αμερική. Ως εδώδιμο χρησιμοποιείται το έλαιο αυτό κατόπιν εξευγενισμού (ραφινάρισματος). Έχει υποκίτρινο έως υποπράσινο χρώμα. Όταν εκτίθεται στον αέρα, ξεραίνεται βραδέως. Χρησιμοποιείται στην βιομηχανία μετά από ανάμιξη με λινέλαιο σε φυλλοτάπητες, τυπογραφικά μελάνια κ.α. Ως εδώδιμο χρησιμοποιείται είτε αυτούσιο είτε στην νοθεία του ελαιολάδου, είτε στην βιομηχανία της μαργαρίνης και των μαγειρικών λιπών. Μετά την έκθλιψη, οι παραμένοντες πλακούντες περιέχουν περίπου 40% λεύκωμα, 40% υδατάνθρακες και είναι πλούσιοι σε κάλιο και φωσφορικό οξύ. Λόγω της μεγάλης βιολογικής τους αξίας οι πλακούντες αυτοί αλέθονται και χρησιμοποιούνται στη διατροφή ανθρώπων και ζώων.

4.10.4. Αραβοσιτέλαιο

Το αραβοσιτέλαιο λαμβάνεται από τα φύτρα του αραβοσίτου (*Zea mais*), τα οποία περιέχουν 40-50% έλαιο, κατόπιν πίεσεως ή εκχύλισης. Έχει χρώμα ανοιχτό κίτρινο και γεύση δημητριακών. Χρησιμοποιείται συχνά για εδώδιμους σκοπούς αυτούσιο ή σε ανάμιξη με άλλα έλαια.

4.11. Η νοθεία του ελαιολάδου

Για τη νοθεία του ελαιολάδου, το οποίο είναι το ακριβότερο από τα υπόλοιπα φυτικά έλαια, χρησιμοποιούνται συνήθως τα σπορέλαια, όπως το πυρηνέλαιο, το αραβοσιτέλαιο, το φοινικέλαιο, το ηλιέλαιο, το σογιέλαιο, το βαμβακέλαιο κ.α. Τα σπορέλαια περιέχουν αυξημένες ποσότητες πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων σε σύγκριση με το ελαιόλαδο, στο οποίο κυριαρχεί το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ. Η ανάμιξη του ελαιολάδου με ποσά σπορέλαιων αποτελεί αναμφισβήτητη απάτη εις βάρος του καταναλωτή, σπάνια όμως χαρακτηρίζεται ως πράξη κατά της υγείας του.

Η γνησιότητα ελέγχεται με ενόργανες μεθόδους αναλύσεως και τον προσδιορισμό παραμέτρων όπως η τριλινολεϊνη και οι στερόλες. Χρησιμοποιούνται επίσης κλασσικές μέθοδοι όπως ο δείκτης διάθλασης και ο αριθμός υπεροξειδίων. Πραγματοποιούνται φασματομετρικές μετρήσεις σε μήκη κύματος 232-274 nm που βοηθούν στην ανίχνευση μορφολογικών μεταβολών που επήλθαν κατά τη διάρκεια επεξεργασίας αποχρωματισμού με γαίες, όπως είναι ο σχηματισμός συζυγιακών διενίων. Χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων. Η περιεκτικότητα σε λινολενικό οξύ αποτελεί δείκτη γνησιότητας του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου (>0,9%). Ο προσδιορισμός των στερολών χρησιμοποιείται στον χαρακτηρισμό της βοτανικής προέλευσης. Το ελαιόλαδο περιέχει ελάχιστο ποσό β-σιτοστερόλης 93% και ολικές στερόλες 1.000 mg Kg⁻¹. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύεται η προσθήκη επεξεργασμένου ή αποστερολοποιημένου ελαίου σε παρθένα ελαιόλαδα. Το σιγμαστα-3,5-διένιο σχηματίζεται κατά την αφυδάτωση της β-σιτοστερόλης. Ο προσδιορισμός του μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο καθαρότητας του ελαιολάδου. Ο προσδιορισμός αλκενίων, τα οποία προέρχονται από την αποικοδόμηση του σκουαλενίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση επεξεργασμένου ελαιολάδου σε παρθένο. Ο προσδιορισμός αλειφατικών αλκοολών και

τριτερπενικών διαλκοολών χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της γνησιότητας του ελαιολάδου. Οι τριτερπενικές διαλκοόλες, ερυθρόλη και ουβαόλη βρίσκονται στο ελαιόλαδο μόνο σε μικρά ποσά. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις βρίσκονται σε ελαιόλαδο εκχυλισμένο με διαλύτη. Επίσης η περιεκτικότητα σε αλειφατικές αλκοόλες δεν πρέπει να ξεπερνά τα 300 mg Kg⁻¹. Μία εναλλακτική λύση του προσδιορισμού των αλειφατικών αλκοολών είναι ο προσδιορισμός των κηρών. Έτσι διαπιστώνεται αν εκχυλισμένο με διαλύτη έλαιο έχει προστεθεί σε εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο και αν το εκχυλισμένο ελαιόλαδο έχει κατεργαστεί με ισχυρά οξειδωτικά αντιδραστήρια για να ελαττωθεί το ποσό των διαλκοολών ή των n-αλκοολών. Η βιοσύνθεση των φυτικών τριγλυκεριδίων γίνεται με τρόπο ώστε όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα βρίσκονται στη θέση 2 των τριγλυκεριδίων. Παρά τις εξαιρέσεις η ύπαρξη κορεσμένων διαλκοολών στη θέση 2 είναι απόδειξη της παρουσίας κορεσμένων λιπαρών οξέων. Επίσης γίνεται ανάλυση των τριγλυκεριδίων με την τεχνική της HPLC για τον προσδιορισμό της τριλινολείνης (<0,5%), που βρέθηκε σε σημαντικά ποσά σε μερικά φυτικά έλαια. Ο προσδιορισμός των trans λιπαρών οξέων αποδεικνύει νοθεία. Η παρουσία τους οφείλεται στην προσθήκη ελαίου που έχει υποστεί υδρογόνωση (σπορέλαια) ή εστεροποίηση (ελαιόλαδα). Τα trans λιπαρά οξέα συναντώνται σε σπορέλαια εκχυλισμένα από γενετικώς τροποποιημένες ποικιλίες και αποστερο-λοποιημένα σε υψηλή θερμοκρασία απόσμησης, μεγαλύτερη των 250 °C. Επίσης, προσδιορίζονται σε πυρηνέλαια υποβληθέντα σε έντονες συνθήκες επεξεργασίας κατά τη διάρκεια του αποχρωματισμού και της απόσμησης. Από τον προσδιορισμό των trans ισομερών είναι δυνατόν να ανιχνευτεί αν εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα έχουν κατεργαστεί παράνομα ώστε να δίνουν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όμοια του αυθεντικού ελαιολάδου. Χρησιμοποιείται η IR φασματοσκοπία για τον προσδιορισμό κορεσμένων λιπαρών και trans ισομερών σε εστεροποιημένα έλαια. Για τον προσδιορισμό χαρακτηριστικών πτητικών ουσιών υπεύθυνων για το άρωμα του ελαιολάδου, όπως η trans-εξανάλη 2, χρησιμοποιείται η τεχνική GC-MS. Χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία NMR ¹H και ¹³C για τον προσδιορισμό της έντασης της ακορεστότητας, τη θέση των διπλών δεσμών και το λόγο μονοακόρεστα/πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό βαρέων μετάλλων, όπως του Fe και του Cu, ενώ αυξανόμενη είναι για το σκοπό αυτό και η χρήση της τεχνικής ICP-MS.

ΣΤΟΧΟΙ

Όπως προκύπτει από την σχετική βιβλιογραφία, μέρος της οποίας παρατίθεται στο κεφάλαιο της εισαγωγής, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον αφ'ενός για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC) σε διάφορα είδη τροφίμων και αφ'ετέρου για την ανάπτυξη αξιόπιστων, εύκολων και γρήγορων μεθόδων προσδιορισμού της.

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη αυτοματοποιημένων μεθόδων για τον προσδιορισμό της TAC και η εφαρμογή τους στο ελαιόλαδο. Η εκτίμηση της TAC του ελαιολάδου αποκτά εξαιρετικό ενδιαφέρον αφού αποτελεί σημαντικό παράγοντα ποιότητας και σχετίζεται με πολλές παραμέτρους που αφορούν στο ελαιόλαδο, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4 της εισαγωγής. Οι διαθέσιμες τεχνικές αυτοματισμού στο εργαστήριο είναι η τεχνική εισαγωγής δείγματος σε ροή (Flow Injection, FI) και η πιο εξελιγμένη τεχνική διαδοχικής εισαγωγής δείγματος (Sequential Injection, SI). Στόχος της διατριβής αποτελεί η μελέτη διαφόρων χημικών συστημάτων και ο συνδυασμός τους με τις δύο αυτοματοποιημένες τεχνικές, ώστε να επιλεγθούν οι πλέον κατάλληλες μέθοδοι.

Επόμενος στόχος της διατριβής είναι η εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων του ελληνικού εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, τα οποία είναι χαρακτηρισμένα ως προς την ποικιλία και την περιοχή προέλευσης. Ο προσδιορισμός θα πραγματοποιηθεί με τις αυτοματοποιημένες μεθόδους αλλά και με αναλυτικές μεθόδους, γνωστές στην βιβλιογραφία, όπως οι DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα θα συγκριθούν με σκοπό την εκτίμηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των μεθόδων. Επίσης, θα εξετασθεί πιθανή συσχέτιση της προσδιοριζόμενης TAC με την περιοχή προέλευσης και την ποικιλία των δειγμάτων.

Τελικός στόχος της παρούσας διατριβής είναι ο προσδιορισμός των ιχνοστοιχείων στα δείγματα ελαιολάδου με σκοπό την εκτίμηση πιθανής συσχέτισης με τις τιμές TAC και την ταυτοποίηση των δειγμάτων ως προς την ποικιλία και την περιοχή προέλευσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΑΧΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

5.1. Εισαγωγή

Οι ελεύθερες ρίζες, έχει αποδειχθεί, ότι συμμετέχουν σε διάφορες παθολογικές διαδικασίες, όπως σε διάφορες μορφές καρκίνου, στην αρτηριοσκλήρωση και σε κυτταρικές αλλαγές που συνδέονται με την γήρανση [52]. Η κατανάλωση αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες περιέχονται στα τρόφιμα, φαίνεται ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία του ανθρώπινου οργανισμού από αυτές τις ασθένειες, με συνέπεια να παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον, τα τελευταία χρόνια, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους.

Το ελαιόλαδο περιέχει ένα υψηλό ποσοστό φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως οι τοκοφερόλες, τα καροτενοειδή, οι στερόλες και τα φαινολικά συστατικά. Μεταξύ των φαινολικών συστατικών, οι ο-διυδροξυ-φαινόλες αποτελούν πολύ ενεργά αντιοξειδωτικά, τα οποία περιέχονται στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο [53]. Το περιεχόμενο ποσοστό των φαινολικών συστατικών ποικίλει σε διάφορα δείγματα ελαιολάδου [54]. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών στο ελαιόλαδο είναι ένας σημαντικός παράγοντας, ο οποίος συμβάλλει στην προστασία του από την οξείδωση και στην σταθερότητά του κατά την διάρκεια της αποθήκευσης και της θερμικής κατεργασίας.

Μία κλασσική μέθοδος για τον προσδιορισμό του περιεχομένου των ολικών φαινολών είναι η Folin-Ciocalteu [55,56]. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται το συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά σε εκχυλίσματα ελαιολάδου, ενώ για τον προσδιορισμό των μεμονωμένων αντιοξειδωτικών συστατικών έχουν εφαρμοστεί μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας HPLC [57-59]. Εντούτοις, για τον ποιοτικό έλεγχο του ελαιολάδου, είναι πιο χρήσιμη και πρακτική η εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας (total antioxidant capacity, TAC). Η προσέγγιση αυτή πλεονεκτεί, διότι εξοικονομείται χρόνος ανάλυσης, έχει μειωμένο κόστος, ενώ προσδιορίζονται και οι πιθανές συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών συστατικών. Καθώς τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν ισχυρά με τις ελεύθερες ρίζες, οι

περισσότερες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την εκτίμηση της TAC μετρούν την παρεμπόδιση μίας τεχνικά αναπτυσσόμενης οξειδωτικής διαδικασίας κατά την προσθήκη του ελαιολάδου. Αυτές οι μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους στο χημικό σύστημα και στον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Μία από τις κατηγορίες των μεθόδων αυτών βασίζεται στην κατανάλωση μίας σταθερής έγχρωμης ελεύθερης ρίζας. Η μέθοδος DPPH είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για το ελαιόλαδο [60-63]. Όμως για μια ολοκληρωμένη εκτίμηση της TAC του ελαιολάδου είναι προτιμότερο να εφαρμόζονται διαφορετικές μέθοδοι βασιζόμενες σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι μέθοδοι ABTS και FRAP έχουν εφαρμοστεί πρόσφατα στο ελαιόλαδο [64-69].

Μέχρι τώρα, μόνο μία μέθοδος χημειοφωταύγειας (chemiluminescence, CL) έχει δημοσιευθεί σχετικά με την εκτίμηση της TAC στο ελαιόλαδο [70]. Γενικά, οι αντιδράσεις χημειοφωταύγειας πλεονεκτούν σε ευαισθησία, παρουσιάζουν ευρείες περιοχές γραμμικότητας, ευκολία στον χειρισμό, ενώ χρησιμοποιούνται χαμηλού κόστους οργανολογίες για την ανίχνευση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Η αυτοματοποίηση των μεθόδων CL παρουσιάζει πλεονεκτήματα όπως μεγαλύτερη ακρίβεια και αναλυτική ικανότητα. Ειδικά, η αυτοματοποίησή τους σε συστήματα ροής επιτρέπει τον αυστηρό έλεγχο της ανάμιξης των αντιδραστηρίων και του χρόνου αντίδρασης, με αποτέλεσμα την βελτίωση της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου. Αν και έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι FI με αμπερομετρικό και φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή [71,72], καμία μέθοδος CL σε σύστημα ροής δεν έχει δημοσιευθεί για τον προσδιορισμό της TAC στο ελαιόλαδο.

Μία αυτοματοποιημένη μέθοδος σε σύστημα ροής που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό της TAC του ελαιολάδου θα παρουσιασθεί στο σημείο αυτό. Η χημεία της μεθόδου περιλαμβάνει την οξείδωση της λουμινόλης (luminol) από το υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 με την χρήση του ενζύμου υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP) ως καταλύτη της αντίδρασης. Αποτέλεσμα της αντίδρασης οξείδωσης είναι η παραγωγή ελεύθερων ριζών και βιοφωταύγειας, της οποίας το σήμα ενισχύεται με την παρουσία της *p*-ιωδοφαινόλης (*p*-iodophenol) [73]. Η αντιοξειδωτική ενεργότητα εκτιμάται μέσω της μείωσης της ακτινοβολίας εκπομπής λόγω της κατανάλωσης του H_2O_2 από τα αντιοξειδωτικά. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στην ανάλυση 50 δειγμάτων ελαιολάδου από διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες και περιοχές.

5.2. Πειραματικό μέρος

5.2.1. Αντιδραστήρια και διαλύματα

Η λουμινόλη (3-αμινοφθαλιδοραζίδιο), καθαρότητας 97%, προμηθεύθηκε από την Aldrich (Steinheim, Germany), η *p*-ιωδοφαινόλη, καθαρότητας 98%, από την Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany), η υπεροξειδάση (HRP) τύπου II ενεργότητας 222 U mg⁻¹, από τη Sigma (Steinheim, Germany) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, αναλυτικής καθαρότητας, συγκέντρωσης 30% (o/o), από τη Merck (Darmstadt, Germany). Το δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH₂PO₄ αγοράστηκε από την Panreac (Barcelona, Spain) και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 0,01 M και pH 7,4. Παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης λουμινόλης 20 mM, *p*-ιωδοφαινόλης 20 mM και HRP 80 IU mL⁻¹ στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Τα διαλύματα παρακαταθήκης διατηρούνται στους +4°C για ένα μήνα. Διάλυμα εργασίας λουμινόλης 2,0 mM - *p*-ιωδοφαινόλης 2,0 mM - HRP 0,64 IU mL⁻¹ και διάλυμα H₂O₂ 1,0 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, παρασκευάζονται ημερησίως.

Οι οργανικοί διαλύτες, μεθανόλη, αιθανόλη, ακετονιτρίλιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), προπανόλη-1, προπανόλη-2 και ακετόνη προμηθεύθηκαν από τη Merck. Το γαλλικό οξύ αγοράστηκε από τη Riedel-de Haën (Seelze, Germany), το 6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ (trolox), καθαρότητας 97%, από την Aldrich, η τυροσόλη, (2-(4-υδροξυφαινυλ) αιθανόλη, καθαρότητας 98%, από την Alfa Aesar και το πρωτοκατεχουϊκό (3,4-διυδροξυβενζοϊκό) οξύ, αναλυτικής καθαρότητας, από την Sigma. Πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος, trolox και πρωτοκατεχουϊκού οξέος παρασκευάζονται ημερησίως σε μίγμα μεθανόλης:νερού 80:20 (o/o) σε περιοχή συγκεντρώσεων 1-100 μM, ενώ διαλύματα τυροσόλης παρασκευάζονται σε περιοχή συγκεντρώσεων 1-100 mM. Χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό όπου απαιτείται.

5.2.2. Προετοιμασία δείγματος

Ένα σύνολο 50 δειγμάτων εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου από διάφορες ποικιλίες και περιοχές της Ελλάδας προσφέρθηκε ευγενικά από την ελαιοπαραγωγική εταιρία Μινέρβα Α.Ε. στο εργαστήριο. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80 °C μέχρι την στιγμή της ανάλυσης, όπου

αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ποσότητα 0,70 g δείγματος ελαιολάδου εκχυλίζεται δις με κλάσματα μίγματος μεθανόλης : νερού 80:20 (o/o) όγκου 0,7 mL. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα διαχωρίζονται από τη λιπαρή φασή με φυγοκέντριση 5 min σε 5000 rpm και έπειτα ενώνονται. Ακολουθεί αραίωση του εκχυλίσματος με το μίγμα μεθανόλης : νερού 80:20 (o/o), πριν την εισαγωγή στο σύστημα ροής FI, σε αναλογία 1:1.

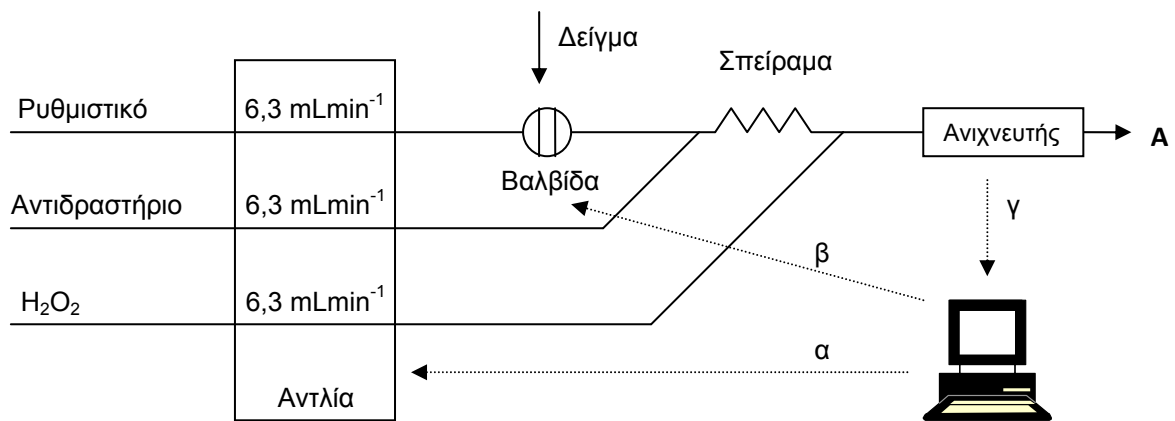
5.2.3. Οργανολογία

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε εκχυλίσματα ελαιολάδου μέσω της μεθόδου βιοφωταύγειας, πραγματοποιείται με έναν αναλυτή FI που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο και παρουσιάζεται στο σχήμα 5.1. Ο αναλυτής περιλαμβάνει μία περισταλτική αντλία Mimipuls 3 Gilson, μία χαμηλής πίεσης βαλβίδα εισαγωγής δείγματος VICI Valco E60-CE και ένα υάλινο οριζόντιο σωλήνα ως κυψελίδα ροής. Η ανίχνευση του φωτός πραγματοποιείται με ένα φωτοπολλαπλασιαστή (photomultiplier tube) Hammamatsu HC 135-01, ο οποίος συνδέεται με την πύλη εξόδου RS-232 ηλεκτρονικού υπολογιστή. Ο συγκεκριμένος φωτοπολλαπλασιαστής παρουσιάζει εξαιρετική ευαισθησία και ακρίβεια, ενώ έχει πλήρως αυτοματοποιημένη λειτουργία. Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές παράμετροι του συγκεκριμένου φωτοπολλαπλασιαστή.

Για την κατασκευή του σπειράματος ανάμιξης μήκους 50 cm και του βρόχου δειγματοληψίας όγκου 17 μ L, χρησιμοποιήθηκε σωλήνας PTFE εσωτερικής διαμέτρου 0,8 mm i.d., ενώ οι σωλήνες που χρησιμοποιούνται στην περισταλτική αντλία είναι από Tygon, εσωτερικής διαμέτρου 1,30 mm i.d. Για την λήψη των αποτελεσμάτων και τον έλεγχο των παραμέτρων του αναλυτή FI, αναπτύχθηκε στο εργαστήριο λογισμικό με χρήση της γλώσσας προγραμματισμού Lab View. Με τη βοήθεια του λογισμικού πραγματοποιούνται μετρήσεις του ύψους των κορυφών, επεξεργάζονται τα δεδομένα και εξάγονται σε αρχεία κειμένου, ενώ διορθώνεται η ολίσθηση της γραμμής βάσης. Ο έλεγχος της αντλίας, στις θέσεις έναρξης και παύσης, και της βαλβίδας εισαγωγής, στις θέσεις φόρτωσης και ένεσης του δείγματος, επιτυγχάνεται μέσω του λογισμικού. Το λογισμικό χρησιμοποιείται με ηλεκτρονικό υπολογιστή που 'τρέχει' Windows XP.

Πίνακας 5.1. Χαρακτηριστικές παράμετροι της λυχνίας φωτοπολλαπλασιαστή Hamamatsu HC 135-01 PMT

Τύπος	Head on
Μέγεθος	25 mm
Περιοχή ισχύος	21mm
Τύπος καθόδου	Διαλκαλικό κράμα
Βέλτιστο λ	420 nm
Ευαισθησία κορυφής	85 mA/W
Υλικό παραθύρου	Πυριτικό άλας βορίου
Min λ	300 nm
Max λ	650 nm
Ευαισθησία ακτινοβολίας στην κορυφή	60 V/nW
Ευαισθησία φωτεινότητας ανόδου	30 A/lm
Rise Time	1,5 ns
Χρόνος μετατροπής	17 ns
Σχήμα/ Αριθμός δυνόδων	L/10
Τύπος εξόδου	Μετρητής φωτονίων
Σκοτεινό ρεύμα	100 typ. counts s ⁻¹



Σχήμα 5.1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος σε ροή για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας στο ελαιόλαδο με τη μέθοδο της βιοφωταύγειας. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών έχει συγκέντρωση 0,01 M και pH 7,4. Το αντιδραστήριο έχει σύσταση: λουμινόλη 2,0 mM - *p*-ιωδοφαινόλη 2,0 mM - HRP 0,64 IU mL⁻¹, το ρεύμα H₂O₂ έχει συγκέντρωση 1,0 mM, το σπείραμα έχει μήκος 50 cm, ενώ ο όγκος του βρόχου δειγματοληψίας είναι 17 μL. α: αναλογική και β: ψηφιακή γραμμή ελέγχου, γ: λήψη δεδομένων, A: απόβλητα.

5.2.4. Μετρήσεις βιοφωταύγειας σε σύστημα FI

Για τις μετρήσεις βιοφωταύγειας χρησιμοποιείται σύστημα τριών διαύλων, που παρουσιάστηκε λεπτομερώς στο σχήμα 5.1. Τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα εισάγονται αρχικά στο κανάλι του ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο στη συνέχεια συναντά το ρεύμα του αντιδραστήριου λουμινόλης - *p*-ιωδοφαινόλης - HRP. Η βιοφωταύγεια παράγεται μετά την ανάμιξη του μίγματος αντιδραστήριου-δείγματος με το ρεύμα υπεροξειδίου του υδρογόνου και παρουσιάζει μειωμένη ένταση με αύξηση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η εμφάνιση αρνητικών κορυφών, λόγω της κατανάλωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα αντιοξειδωτικά. Το σήμα της γραμμής βάσης προέρχεται από ένεση τυφλού δείγματος και αποτελεί την μέγιστη τιμή βιοφωταύγειας του πειράματος. Η ταχύτητα ροής διατηρείται στην τιμή 6,3 mL min⁻¹ σε κάθε κανάλι, ενώ η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 25±1°C. Η αντιοξειδωτική ενεργότητα των δειγμάτων εκφράζεται σε mmol L⁻¹ ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά κιλό

ελαιολάδου (mmol L^{-1} of gallic acid equivalents per kilogram of oil, GAE) και υπολογίζεται με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης γαλλικού οξέος.

5.2.5. Μέθοδος υπολογισμού της ενεργότητας της υπεροξειδάσης (HRP)

Μία μονάδα ενεργότητας IU αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την αποσύνθεση $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min}$ στους 25°C σε διάλυμα pH 7,0, υπό ορισμένες συνθήκες. Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα: I) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,2 \text{ M}$ και pH 7,0. Διαλύονται $27,2 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ σε $1 \text{ L H}_2\text{O}$ και το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 7,0 με προσθήκη KOH. II) Διάλυμα H_2O_2 $0,0017 \text{ M}$. Αραιώνεται 1 mL διαλύματος H_2O_2 30% σε $100 \text{ mL H}_2\text{O}$. Κατόπιν αραιώνεται 1 mL του παραπάνω διαλύματος σε 50 mL του ρυθμιστικού. III) Διάλυμα 4-αμινοαντιπυρένιου $0,0025 \text{ M}$ και φαινόλης $0,17 \text{ M}$. Διαλύονται 810 mg φαινόλης σε $40 \text{ mL H}_2\text{O}$. Προστίθενται 25 mg 4-αμινοαντιπυρένιου και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τελικού όγκου 50 mL με H_2O . IV) Διάλυμα ενζύμου 1 mg mL^{-1} σε H_2O .

Στην κυψελίδα τοποθετούνται $1,4 \text{ mL}$ διαλύματος III και $1,5 \text{ mL}$ διαλύματος II. Προστίθενται $0,1 \text{ mL}$ του διαλύματος IV του προς εξέταση ενζύμου και παρακολουθείται η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm για 4 έως 5 min. Η ενεργότητα του ενζύμου εκφράζεται σε μονάδες ενεργότητας ανά mg ενζύμου και υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Units mg}^{-1} = \Delta A_{510} \text{ min}^{-1} / 6,58 \times \text{mg ενζύμου mL}^{-1} \text{ μίγματος αντίδρασης}$$

Για τις μετρήσεις απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης JASCO V-550 UV/Vis.

5.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Καθώς το ελαιόλαδο διαλύεται στην προπανόλη-2, δοκιμάστηκε αρχικά η απευθείας εισαγωγή του ελαιολάδου στο σύστημα ροής, αντικαθιστώντας το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με την προπανόλη-2 τόσο στο διάλυμα ροής, όσο και στην παρασκευή των διαλυμάτων αντίδρασης. Πραγματοποιήθηκαν ενέσεις δειγμάτων ελαιολάδου εμβολιασμένων με το συνθετικό αντιοξειδωτικό trolox σε συγκεντρώσεις από $0,1$ έως $100 \mu\text{M}$, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αρνητικών κορυφών μεγάλου ύψους, που όμως δεν ανταποκρίνονταν αναλογικά με την συγκέντρωση του trolox. Δοκιμάστηκαν αραιώσεις 1:10 και 1:100, οι οποίες μείωσαν το ύψος των αρνητικών κορυφών, αλλά το σήμα δεν

ήταν ανάλογο της συγκέντρωσης. Διάφοροι διαλύτες και μίγματα διαλυτών δοκιμάστηκαν για την αντικατάσταση της προπανόλης-2, ενώ τα ανακτώμενα αντιοξειδωτικά μέσω μιας διαδικασίας εκχύλισης, εισήχθησαν στο σύστημα.

5.3.1. Βελτιστοποίηση

5.3.1.1. Επιλογή διαλύτη

Για την επιλογή του κατάλληλου μέσου διαλυτοποίησης των εκχυλισμάτων ελαιολάδου εισήχθησαν στο σύστημα FI επτά οργανικοί διαλύτες, μεταξύ των οποίων η μεθανόλη, η αιθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), η προπανόλη-1, η προπανόλη-2 και η ακετόνη, το απιονισμένο νερό, καθώς και τα υδατικά μίγματα των διαλυτών αυτών σε αναλογίες 80:20 και 20:80 (ο/ο). Η εισαγωγή της μεθανόλης, της αιθανόλης, του DMSO, της προπανόλης-1 και της ακετόνης οδήγησε σε αρνητικές κορυφές εξαιτίας της οξειδωσής τους από το H_2O_2 , παρεμποδίζοντας την βιοφωταύγεια. Το ακετονιτρίλιο και η προπανόλη-2 οδήγησαν σε θετικές κορυφές τυφλού, γεγονός που οφείλεται πιθανότατα σε ατελή ανάμιξή τους με το ρυθμιστικό διάλυμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι το ακετονιτρίλιο και η προπανόλη-2 έχουν χρησιμοποιηθεί ως διαλύτες σε αντιδράσεις οξειδωσης με το H_2O_2 [74,75], γεγονός που αποδεικνύει ότι οι ίδιοι δεν οξειδώνονται ταχέως από το H_2O_2 . Οι πέντε διαλύτες, που οδήγησαν σε αρνητικές κορυφές, δοκιμαστήκαν σε μίγματα διαλύτη:νερού 80:20 (ο/ο) και παρουσίασαν κορυφές μικρότερου ύψους. Μεταξύ αυτών, το μίγμα μεθανόλης:νερού 80:20 (ο/ο) οδήγησε στην μικρότερη αρνητική κορυφή, επιτρέποντας χαμηλότερα όρια ανίχνευσης. Αν και μία περαιτέρω μείωση του τυφλού επιτυγχάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του νερού σε 80%, το μίγμα μεθανόλης:νερού 80:20 (ο/ο) επιλέχθηκε ως ο καταλληλότερος διαλύτης αφού επιπλέον χρησιμοποιείται εκτεταμένα, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, για την εκχύλιση των φαινολικών αντιοξειδωτικών από το ελαιόλαδο [56,76,77].

Για την παραλαβή του συνολικού υδρόφιλου κλάσματος των αντιοξειδωτικών είναι απαραίτητα δύο στάδια εκχύλισης. Ένα στάδιο αραίωσης 1:1 του εκχυλίσματος με τον διαλύτη κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθούν ύψη κορυφών εκτός της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μεθανόλη οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, με αποτέλεσμα οι αρνητικές κορυφές του τυφλού να ενδέχεται να

καλύψουν τα σήματα που παράγονται από διαλύματα χαμηλών συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών. Αυτό είναι ένα σημαντικό πρόβλημα, όμως από τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται ότι η συγκεκριμένη αντίδραση οξειδωσης είναι αργή στο διαλύτη μεθανόλη:νερό 80:20 (ο/ο). Επιπλέον, το ρεύμα του H₂O₂ προστίθεται με μεγάλη ταχύτητα ροής μόλις πριν από τον ανιχνευτή (σχήμα 5.1). Έτσι, ο χρόνος για την αντίδραση οξειδωσης της μεθανόλης είναι ελάχιστος (~1s) ελαχιστοποιώντας τα σήματα του τυφλού.

5.3.1.2. Επιλογή συστήματος διαύλων

Για την απλοποίηση του συστήματος FI, αναπτύχθηκε η εκδοχή μίας οργανολογίας δύο διαύλων, απομακρύνοντας τον διάυλο του ρυθμιστικού διαλύματος, με εισαγωγή του δείγματος απευθείας στο ρεύμα του αντιδραστήριου. Δοκιμάστηκαν σπειράματα μήκους 50, 100, 150 και 200 cm, για την επίτευξη ικανοποιητικής ανάμιξης. Ελήφθησαν δεδομένα από πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος σε περιοχή συγκεντρώσεων 1-100 μM σε ταχύτητες ροής 6,3, 4,9, 3,2 και 1,6 mL min⁻¹ σε έναν πειραματικό σχεδιασμό 4 × 4. Η συγκεκριμένη μελέτη βελτιστοποίησης έδειξε ότι η χρήση του συγκεκριμένου συστήματος διαύλων είναι ακατάλληλη για την μέθοδο αυτή. Η εισαγωγή των πιο πυκνών προτύπων διαλυμάτων συγκεντρώσεων 50-100 μM, οδήγησε σε διπλές κορυφές ή κορυφές με ώμους. Επιπλέον, οι κορυφές που προέρχονται από την εισαγωγή των αραιών διαλυμάτων ήταν θετικές εξαιτίας της ατελούς ανάμιξης με το φέρον ρεύμα. Λόγω των μειονεκτημάτων αυτών επιλέχθηκε σύστημα τριών διαύλων, όπου το δείγμα εισάγεται σε ρεύμα του ρυθμιστικού διαλύματος.

5.3.1.3. Επιλογή συγκεντρώσεως αντιδραστηρίων- μήκους σπειράματος –όγκου δειγματοληψίας - ταχύτητας ροής

Αν και το συνθετικό ανάλογο της βιταμίνης E, το αντιοξειδωτικό trolox έχει χρησιμοποιηθεί πολλάκις για την έκφραση τιμών ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας, επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ ως πρότυπο αντιοξειδωτικό για την βελτιστοποίηση του αντιδραστήριου, του συστήματος και της ταχύτητας ροής, καθώς αποτελεί ένα φυσικό αντιοξειδωτικό συστατικό του ελαιολάδου. Ο πίνακας 5.2. περιέχει τα αποτελέσματα που εξάγονται από την βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 5.2. Επίδραση των συγκεντρώσεων του μικτού αντιδραστήριου στην καμπύλη βαθμονόμησης του γαλλικού οξέως.

Αντιδραστήριο	C	Κλίση±SD, φωτόνια s ⁻¹ M ⁻¹ (× 10 ⁹)	Intercept±SD, φωτόνια s ⁻¹ (× 10 ⁶)	DL ^a , 10 ⁻⁶ M	r
HRP	^b 0,13	1,4±0,1	0,05±0,01	21	0,99
	^b 0,64	22±1	0,45±0,06	8,1	0,998
	^b 3,2	32±2	1,2±0,2	19	0,994
<i>p</i> -ιωδοφαινόλη	^c 0,50	23±2	0,17±0,08	10	0,993
	^c 2,0	22±2	0,15±0,09	12	0,991
	^c 5,0	5±1	0,15±0,04	24	0,96
H ₂ O ₂	^c 0,50	8,5±0,6	0,11±0,03	11	0,992
	^c 1,0	23±2	0,23±0,09	12	0,992
	^c 2,0	57±3	0,7±0,1	5,3	0,994
	^c 3,0	70±10	1,7±0,4	17	0,94
	^c 5,0	140±8	1,8±0,4	8,6	0,995

Όγκος δείγματος: 17 μ L, μήκος σπειράματος: 50 cm, ταχύτητα ροής: 6,3 mL min⁻¹.

Γραμμική περιοχή: 1-100 μ M, ^aΌριο ανίχνευσης, DL, υπολογίζεται ως 3 φορές την τυπική απόκλιση του σταθερού όρου δια την κλίση της καμπύλης. ^bIU mL⁻¹, ^c mM.

Τα αποτελέσματα προέρχονται από μια διαδικασία στην οποία χρησιμοποιείται λουμινόλη 2,0 mM, *p*-ιωδοφαινόλη 2,0 mM, HRP 0,64 IU mL⁻¹ και διάλυμα H₂O₂ 1,0 mM. Το φώς που εκπέμπεται μέσω της βιοφωταυγούς αντίδρασης εξαρτάται από την ενεργότητα της HRP. Παρόλο που η ευαισθησία αυξάνεται με την ενεργότητα του ενζύμου, η ενδιάμεση συγκέντρωση των 0,64 IU mL⁻¹ προτιμήθηκε διότι ισορροπεί μεταξύ της ευαισθησίας και του χαμηλού ορίου ανίχνευσης. Η ευαισθησία αυξάνεται με μείωση της συγκέντρωσης της *p*-ιωδοφαινόλης. Ανάμεσα στις δύο χαμηλές συγκέντρωσης των 0,50 και 2,0 mM, οι οποίες οδήγησαν σε ιδανική ευαισθησία, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 2,0 mM καθώς με αυτήν παρατηρήθηκαν μικρότερες τιμές τυφλού. Αν και η ευαισθησία αυξάνεται ανάλογα με την συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, επιλέχθηκε μία μικρή συγκέντρωση του 1,0 mM για την προστασία του φωτοπολλαπλασιαστή από υψηλά επίπεδα φωτός που παράγουν οι υψηλές συγκεντρώσεις H₂O₂.

Ο πίνακας 5.3 περιέχει τα αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης του μήκους του σπειράματος, L , του όγκου δειγματοληψίας, V , και της ταχύτητας ροής, Q . Χρησιμοποιείται μήκος σπειράματος 50 cm, όγκος δείγματος 17 μL και ταχύτητα ροής 6,3 mL min^{-1} , ενώ μεταβάλλεται κάθε φορά μία παράμετρος από τις τρεις. Στα μήκη σπειράματος 50 και 100 cm παρατηρήθηκαν οι ικανοποιητικότερες ευαισθησίες. Ωστόσο επιλέχθηκε το μήκος των 50 cm, καθώς επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ταχύτητα δειγματοληψίας (180 δείγματα/h έναντι 90 δείγματα/h). Μεταξύ των όγκων εισαγωγής δείγματος που δοκιμάστηκαν, αυτοί των 70 και 100 μL παρουσίασαν τον ίδιο συντελεστή συσχέτισης στην καμπύλη βαθμονόμησης του γαλλικού οξέως. Αν και ο όγκος εισαγωγής των 17 μL έδειξε μειωμένη ευαισθησία κατά 20%, επιλέχθηκε, καθώς παρατηρήθηκε μείωση του ορίου ανίχνευσης και αύξηση της ταχύτητας δειγματοληψίας. Μεταξύ των τιμών της ταχύτητας ροής Q που δοκιμάστηκαν, οι τιμές 1,6, 3,2, 4,9 και 6,3 mL min^{-1} οδήγησαν σε σήματα τυφλού ύψους 2,97, 0,36, 0,17 και 0,12 $\times 10^6$ φωτόνια s^{-1} , αντίστοιχα. Η τιμή 6,3 mL min^{-1} είναι μάλλον μεγάλη για ένα τυπικό σύστημα FI, αλλά επιλέχθηκε λόγω του μικρού σήματος του τυφλού. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μεγάλη τιμή της ταχύτητας ροής επιτρέπει λιγότερο χρόνο για την οξειδωση της μεθανόλης από το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

5.3.2. Στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Οι κορυφές του σχήματος 5.2 αποδεικνύουν την άριστη αναπαραγωγιμότητα και την ελάχιστη μόλυνση εκ μεταφοράς (carry over) της μεθόδου. Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης είναι

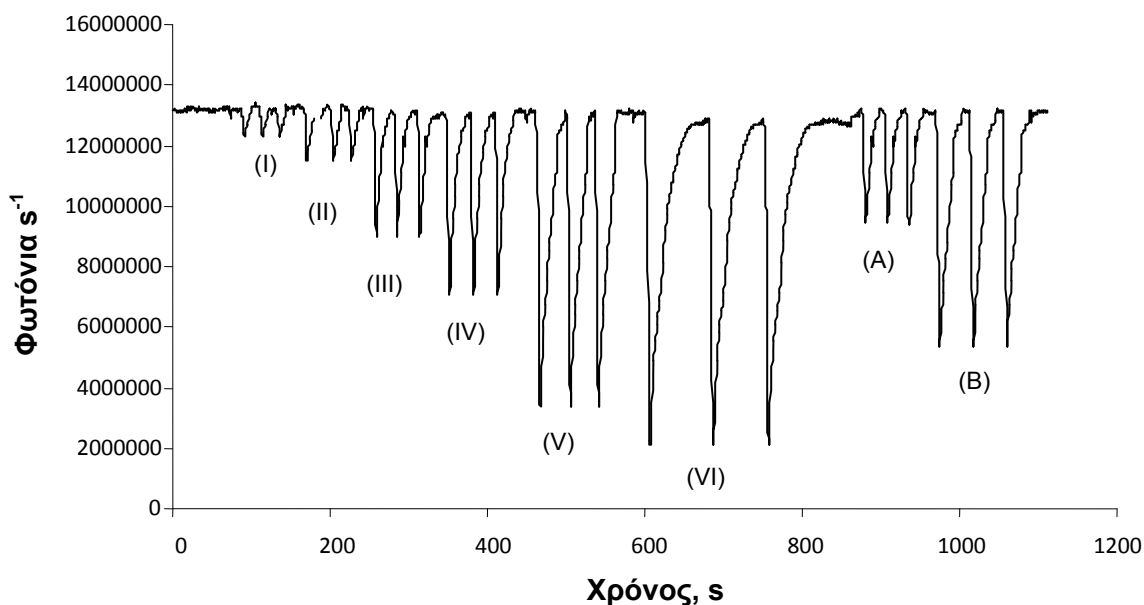
$$\text{Ύψος κορυφής (counts s}^{-1}\times 10^6) = (23\pm 2) \times 10^3 C_M + (0,2\pm 0,1), r=0,99.$$

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος του συστήματος FI με πολλαπλές ενέσεις προτύπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων $1,0 \times 10^{-6}$ και $1,0 \times 10^{-4}$ M. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις είναι 2,8 και 1,1% ($n=4$), αντίστοιχα. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε σε 13×10^{-6} M και το όριο ποσοτικοποίησης σε $4,3 \times 10^{-5}$ M. Ο θόρυβος της γραμμής βάσης μετρήθηκε για 2h και βρέθηκε χαμηλότερος από 5,3% RSD. Η ταχύτητα δειγματοληψίας που επιτεύχθηκε με αυτή την πλήρως αυτοματοποιημένη μέθοδο είναι 180 δείγματα/h.

Πίνακας 5.3. Επίδραση των παραμέτρων του συστήματος FI στην καμπύλη βαθμονόμησης του γαλλικού οξέος.

Παράμετρος	Κλίση±SD		Intercept±SD	DL ^a	r
	Φωτόνια s ⁻¹ M ⁻¹ (× 10 ⁹)	Φωτόνια s ⁻¹ M ⁻¹ (× 10 ⁶)	10 ⁻⁶ M		
L, cm	50	23±1	0,40±0,07	9,1	0,99
	100	25±1	0,20±0,08	9,6	0,98
	150	19±1	0,36±0,07	11	0,98
	200	17±1	0,19±0,06	11	0,99
V, μL	17	23±2	0,2±0,1	13	0,99
	70	27±4	0,3±0,2	22	0,97
	100	27±4	0,3±0,2	22	0,97
Q, mL min ⁻¹	6,3	21±1	0,21±0,04	5,7	0,992
	4,9	7,5±0,4	0,19±0,01	6,0	0,992
	3,2	3,6±0,3	0,40±0,01	8,3	0,98
	1,6	0,39±0,06	0,300±0,002	15	0,93

2,0 mM λουμινόλη, 2,0 mM ρ-ιωδοφαινόλη, 0,64 IU mL⁻¹ HRP, 1,0 mM H₂O₂, Γραμμική περιοχή 1 -100 μM, ^a Όριο ανίχνευσης, DL, υπολογίζεται ως 3 φορές την τυπική απόκλιση του σταθερού όρου δια την κλίση της καμπύλης.



Σχήμα 5.2. Τυπικά σήματα από το σύστημα FI. Οι αρνητικές κορυφές ελήφθησαν από τριπλές ενέσεις τυφλού, προτύπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος και δύο δειγμάτων ελαιολάδου. Συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος: (I) 0,0, (II) 1,0 ×

10^{-6} , (III) $5,0 \times 10^{-6}$, (IV) $1,0 \times 10^{-5}$, (V) $5,0 \times 10^{-5}$, (VI) $1,0 \times 10^{-4}$ M, (A) ελαιόλαδο από την Αρκαδία και (B) ελαιόλαδο από τη Λακωνία.

5.3.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε διαλύματα αντιοξειδωτικών και σε εκχυλίσματα δειγμάτων ελαιολάδου

Προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ενεργότητα τεσσάρων αντιοξειδωτικών συστατικών, που αναφέρονται στον πίνακα 5.4, με την μέθοδο βιοφωταύγειας FI. Είναι γνωστό ότι, η αντιοξειδωτική 'ισχύς' ενός συστατικού εξαρτάται άμεσα από παράγοντες που συνδέονται με τη δομή του μορίου του όπως ο αριθμός και η θέση των υδρόξυ- ή μεθόξυ- ομάδων [71] και ενισχύεται από την απουσία ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τον σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου. Η αντιοξειδωτική ενεργότητα θα μπορούσε να συσχετισθεί με την κλίση της καμπύλης και ακολουθεί την σειρά:

γαλλικό οξύ>trolox>πρωτοκατεχουικό οξύ>τυροσόλη.

Η τυροσόλη είναι το αντιοξειδωτικό που παρουσιάζει την μικρότερη ισχύ. Η σειρά ενεργότητας των παραπάνω αντιοξειδωτικών συμφωνεί με άλλες δημοσιευμένες μελέτες [70,71].

Πίνακας 5.4. Δεδομένα βαθμονόμησης για τέσσερα διαφορετικά αντιοξειδωτικά (Ύψος κορυφής vs C, n=4).

Αντιοξειδωτικό	κλίση±SD	
	φωτόνια $s^{-1}M^{-1}(\times 10^{10})$	r
Γαλλικό οξύ ^a	3,96±0,30	0,997
Trolox ^a	2,57±0,17	0,991
Πρωτοκατεχουικό οξύ ^a	1,63±0,32	0,993
Τυροσόλη ^b	$(1232,8\pm 8,5) \times 10^{-5}$	0,999

Γραμμική περιοχή: ^a1-100 μ M, ^b1-100 mM.

Τα δείγματα ελαιολάδου αναλύονται τρεις φορές με την προτεινόμενη μέθοδο. Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ενεργότητας κυμαίνονται μεταξύ 1,1 και 150 mM σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά Kg ελαιολάδου, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 5.5. Αυτή η ευρεία περιοχή τιμών δικαιολογείται πιθανότατα λόγω των διαφορών στις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών μεταξύ των δειγμάτων. Η αντιοξειδωτική ενεργότητα, που προσδιορίζεται με την μέθοδο FI, εξαρτάται από μία ποικιλία αντιοξειδωτικών

συστατικών που έχουν διαφορετική κινητική συμπεριφορά [78]. Αυτό φαίνεται και με το σύστημα που αναπτύχθηκε αφού διαφορετικά αντιοξειδωτικά έδωσαν διαφορετικές κλίσεις καμπύλης βαθμονόμησης (Πίνακας 5.4). Τα αποτελέσματα των δειγμάτων ελαιολάδου συμφωνούν με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, με χρήση συστήματος FI με αμπερομετρικό ανιχνευτή [71].

Πίνακας 5.5. Ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα (TAC, mM γαλλικού οξέως Kg⁻¹ ελαιολάδου) διαφορετικών ελαιολάδων ως προς την ποικιλία και την περιοχή προέλευσης, προσδιοριζόμενη με την μέθοδο βιοφωταύγειας FI.

Δείγμα	Περιοχή	Ποικιλία	TAC±SD (n=3)	Δείγμα	Περιοχή	Ποικιλία	TAC±SD (n=3)
1	Χανιά	Κορωνέϊκη	22±4	26	Λακωνία	Αθηνολιά	40±4
2			51±6	27			102±6
3			25±5	28	Ζάκυνθος	Κορωνέϊκη	36±2
4			99±5	29			6,2±0,3
5			72±5	30			93±5
6			88±7	31			83±1
7			4,5±0,5	32			51±3
8			29±4	33			42±4
9	Μεσσηνία		15±1	34			43±3
10			39±3	35	Εύβοια	Μεγάρων	41±4
11			21±3	36	Πιερία		59±5
12			9,3±0,7	37		Κολίνδρου	94±4
13			36±3	38	Χαλκιδική	Χαλκιδικής	48±4
14			58±4	39			58±5
15			14±2	40		Πρασινολιά	20±3
16			1,1±0,1	41			17±2
17			52±3	42	Αρκαδία	Αθηνολιά	14±1
18		Μαυρολιά	88±7	43	Ηράκλειο	Κορωνέϊκη	81±7
19			4,0±0,3	44			88±6
20	Λακωνία	Ανάμικτο	96±5	45			43±3
21		Κορωνέϊκη	24±4	46			79±5
22		Αθηνολιά	100±8	47			150±10
23			91±5	48	Λέσβος	Κολοβή	63±3
24			20±2	49			50±2
25			53±3	50		Αδραματινή	110±8

5.4. Συμπεράσματα

Η μέθοδος βιοφωταύγειας για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας είναι εύχρηστη εξαιτίας της αυτοματοποιημένης διαδικασίας που αναπτύχθηκε. Η παρεμπόδιση από την μεθανόλη, η οποία οφείλεται στην αργή αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, αναιρείται κινητικά με τη μέτρηση του σήματος βιοφωταύγειας αμέσως μετά την ανάμιξη. Η μέθοδος απαιτεί χρόνο επαφής των αντιδραστηρίων μόλις 1 s στο σύστημα ροής. Στηρίζεται σε έναν πλήρως αυτοματοποιημένο αναλυτή FI, χαμηλού κόστους, ο οποίος θα μπορούσε να αποτελέσει το πρωτότυπο για την ανάπτυξη μιας φορητής οργανολογίας στην εκτίμηση της ποιότητας του ελαιολάδου. Τα αποτελέσματα θα συγκριθούν με αυτά που λαμβάνονται από την εφαρμογή των φωτομετρικών μεθόδων ABTS, DPPH και Folin-Ciocalteu στα ίδια δείγματα ελαιολάδου, όπως περιγράφεται στα αντίστοιχα εδάφια του κεφαλαίου 7. Σε σύγκριση με τις ήδη δημοσιευμένες μεθόδους FI για τον προσδιορισμό της TAC του ελαιολάδου [71,72], η προτεινόμενη μέθοδος στηρίζεται σε διαφορετική αρχή ανίχνευσης, παρουσιάζει μεγαλύτερη ταχύτητα δειγματοληψίας και ακρίβεια.

Θα ήταν ενδιαφέρουσα η συσχέτιση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας με την ακριβή σύσταση των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών συστατικών, που προσδιορίζονται με την εφαρμογή μιας μεθόδου HPLC. Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή δεν αποτελεί σκοπό της παρούσας διατριβής. Η προτεινόμενη μέθοδος για την εκτίμηση της TAC θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε γεωργικό προϊόν, που περιέχει αντιοξειδωτικά συστατικά που αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αυτά τα αντιοξειδωτικά θα μπορούσαν να εκχυλιστούν με χρήση διαφόρων διαλυτών ή μιγμάτων διαλυτών που έχουν δοκιμαστεί στην μελέτη αυτή.

6. ΤΑΧΕΙΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΒΡΩΣΙΜΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP

6.1. Εισαγωγή

Οι τεχνικές ροής αναγνωρίζονται στις μέρες μας ως ικανές και χρήσιμες μεθοδολογίες για τον αυτοματισμό των αναλυτικών διαδικασιών σε πολλά πεδία. Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μία ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή αυτών των τεχνικών στη βιβλιογραφία για την ανάλυση περίπλοκων δειγμάτων σε συνδυασμό με διαδικασίες προεργασίας δείγματος και διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης [79].

Μερικά από τα πλεονεκτήματα των συστημάτων ροής, μεταξύ των οποίων η ακρίβεια, η αναπαραγωγιμότητα και η μεγάλη αναλυτική ικανότητα, έχουν εφαρμοστεί στο πεδίο των βρώσιμων ελαίων [80]. Η αυτοματοποίηση πολλών μεθόδων, που χρησιμοποιούνται ήδη για τον προσδιορισμό της σταθερότητας και της αντιοξειδωτικής ενεργότητας, θα μπορούσε να εισάγει πλεονεκτήματα όπως μεγάλη προσαρμοστικότητα, ευκολία στο χειρισμό και χαμηλό κόστος και να γίνει η πλέον κατάλληλη επιλογή για την ανάλυση βρώσιμων ελαίων. Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί μέθοδοι που έχουν προσαρμοστεί σε συστήματα FI, όπως η Folin-Ciocalteu [81], η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του περιεχομένου σε φαινόλες σε παρθένα ελαιόλαδα, καθώς και η μέθοδος της αντιοξειδωτικής ισχύος (Antioxidant Power Assay, AOP) [82] που μετράει την ηλεκτροχημική συμπεριφορά των μεθανολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου με χρήση της υδροδυναμικής βολταμμετρίας. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας του ελαιολάδου έχει αναπτυχθεί μία απλή μέθοδος, η οποία στηρίζεται σε σύστημα FI με αμπερομετρική ανίχνευση [71]. Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της τιμής της ανισιδίνης (anisidine value) [83] καθώς και των ελεύθερων λιπαρών οξέων [84] σε δείγματα φοινικέλαιων, έχουν αναπτυχθεί με συστήματα ροής FI.

Η ανάλυση διαδοχικής εισαγωγής (sequential injection, SI) αποτελεί μία σύγχρονη προσέγγιση στα συστήματα ροής. Το κύριο πλεονέκτημα των τεχνικών SI έναντι των πιο παραδοσιακών συστημάτων FI είναι η δυνατότητα διατήρησης ενός κοινού σχεδιασμού του συστήματος για τις περισσότερες μεθοδολογίες. Τροποποιήσεις γίνονται μόνο σε παραμέτρους του προγράμματος που χρησιμοποιείται και στην επιλογή του μήκους κύματος ανίχνευσης. Ένα ακόμα πλεονέκτημα των τεχνικών SI είναι το γεγονός ότι καταναλώνουν τυπικά λιγότερο από το 1/10 των αντιδραστηρίων και του δείγματος και συνεπώς παράγουν

λιγότερα απόβλητα, ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται ακριβά ή επικίνδυνα χημικά αντιδραστήρια ή προϊόντα. Έχει αναπτυχθεί μία μέθοδος SI [85] για τον προσδιορισμό του σιδήρου Fe (III) σε βρώσιμα έλαια, η οποία στηρίζεται στο σχηματισμό του ερυθρού συμπλόκου του θειοκυανιούχου σιδήρου σε οργανικό μέσο.

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται μία αυτοματοποιημένη αναλυτική μέθοδος για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε εκχυλίσματα ελαιολάδου χρησιμοποιώντας μία αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET). Η μέθοδος FRAP [86] είναι γρήγορη, απλή στην εφαρμογή, έχει αναπαραγωγιμότητα και είναι κατάλληλη για αυτοματοποίηση σε σύστημα SI. Μέχρι τώρα δεν έχει δημοσιευθεί καμία αυτοματοποιημένη FRAP μέθοδος που να έχει εφαρμοστεί σε ελαιόλαδο. Η μέθοδος μετράει την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να ανάγει το Fe (III) στο σιδηρο-σύμπλοκό του με την 2, 4, 6 – τρι(2-πυριδιλ)-s-τριαζίνη (TPTZ) σε Fe (II), στο αντίστοιχο σιδηρι-σύμπλοκο μπλε χρώματος σε όξινο διάλυμα pH 3,6. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα για μόλις 14 s στο σπείραμα ανάμιξης του συστήματος SI. Το δείγμα βρίσκεται μεταξύ των δύο ζωνών του αντιδραστήριου FRAP με μορφή 'sandwich'. Η αυτοματοποιημένη μέθοδος συγκρίνεται με την δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο FRAP κατά την ανάλυση 54 δειγμάτων βρώσιμων ελαίων.

6.2. Πειραματικό μέρος

6.2.1. Αντιδραστήρια και διαλύματα

Ο εφουδατομένος χλωριούχος τρισθενής σίδηρος ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) προμηθεύθηκε από την Panreac Química S. A. και η 2,4,6-τρι(2-πυριδιλ)-s-τριαζίνη, TPTZ, από τη Fluka. Το άνυδρο οξικό νάτριο και η μεθανόλη προμηθεύθηκαν από την SDS. Το οξικό οξύ και ο ένυδρος θειικός σίδηρος είναι από τη Merck, ενώ το υδροχλωρικό οξύ από τη Lab-Scan. Το γαλλικό οξύ προμηθεύθηκε από το την Riedel-de Haën. Τα αντιοξειδωτικά 4-υδροξυ-3-μεθοξυ-κινναμμονικό (φερουλικό) οξύ, 4-υδροξυ-κινναμμονικό (p-κουμαρικό) οξύ, και 3, 4-διυδροξυ βενζοϊκό (πρωτοκατεχουϊκό) οξύ, προμηθεύθηκαν από τη Sigma. Η 2-(4-υδροξυφαινυλ) αιθανόλη (τυροσόλη) αγοράστηκε από την Alfa Aesar. Χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό όπου απαιτείται. Παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης, TPTZ 10 mM, σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 0,4 M, και χλωριούχου σιδήρου 20 mM, τα οποία είναι

σταθερά για τουλάχιστον μία εβδομάδα στους 4 °C. Το διάλυμα εργασίας FRAP παρασκευάζεται την ημέρα της ανάλυσης και περιλαμβάνει FeCl₃ συγκέντρωσης 1,45 mM και TPTZ συγκέντρωσης 0,85 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,3 M, pH 3,6. Πρότυπα διαλύματα FeSO₄ σε περιοχή συγκεντρώσεων από 0,10 έως 2,00 mM και διαλύματα αντιοξειδωτικών συγκέντρωσης 1,0 mM παρασκευάζονται για την βαθμονόμηση και την κινητική μελέτη αντίστοιχα. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται το μίγμα μεθανόλης:νερού 80:20 (ο:ο).

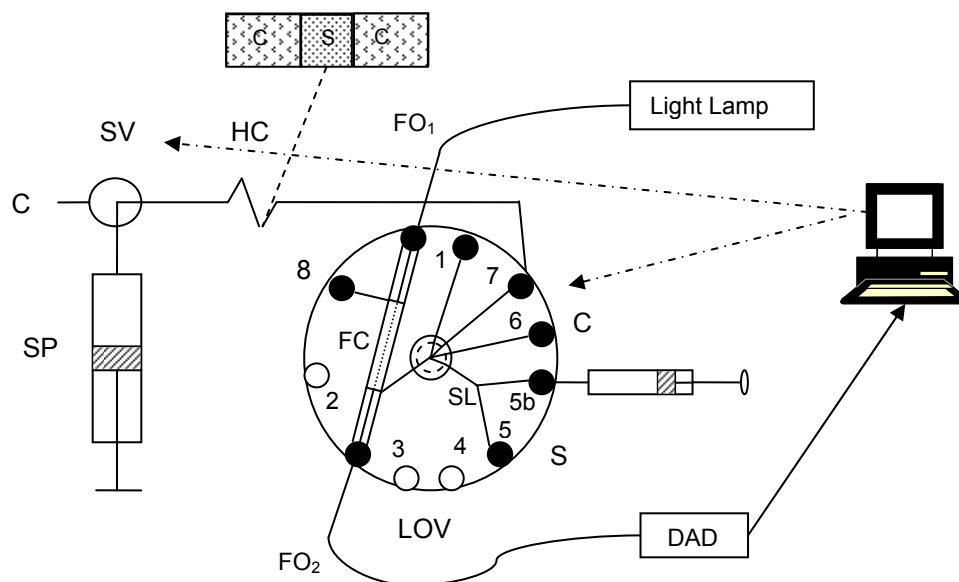
6.2.2. Προετοιμασία δείγματος

Δείγματα από σησαμέλαιο, σογιέλαιο, ηλιέλαιο και καλαμποκέλαιο προμηθεύθηκαν από την αγορά, ενώ τα δείγματα ελαιολάδου από την ελαιοπαραγωγική εταιρία Μινέρβα Α.Ε. Όλα τα δείγματα διατηρούνται στους -80 °C, απουσία φωτός μέχρι την στιγμή της ανάλυσης.

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει δύο στάδια εκχύλισης. Ποσότητα ίση με 1,000 g δείγματος ελαίου ζυγίζεται απευθείας σε δοκιμαστικό σωλήνα φυγοκέντρου, όγκου 2,00 mL. Το υδρόφιλο εκχύλισμα συλλέγεται μετά από εκχύλιση του δείγματος με δύο κλάσματα μίγματος μεθανόλης:νερού 80:20 (ο:ο), όγκου 0,50 mL το κάθε ένα. Μετά τη φυγοκέντρωση στις 5.000 στρ/μιν για 5 μιν, τα υπερκείμενα ενώνονται και το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται σε αναλογία 1:2 (ο:ο) με τον διαλύτη για την αυτοματοποιημένη μέθοδο.

6.2.3. Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα MicroSIA της εταιρίας FIALab® (Η.Π.Α.), του οποίου διάγραμμα παρουσιάζεται στο σχήμα 6.1. Το σύστημα περιλαμβάνει μία αντλία με σύριγγα ακριβείας, όγκου 1.000 μL, μία βαλβίδα σύριγγας, ένα σπείραμα ανάμιξης και μία μονάδα lab-on-valve, διαστάσεων 12,7 cm × 15,3 cm, που περιέχει και την κυψελίδα ροής. Οι δίαυλοι του συστήματος είναι κατασκευασμένοι από Teflon εσωτερικής διαμέτρου 0,8 mm ή 0,5 mm. Οι θύρες που δεν χρησιμοποιούνται (# 2, 3, 4, σχήμα 6.1.) κλείνονται με ειδικά πώματα από Teflon.



Σχήμα 6.1. Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος MicroSIA. SP: αντλία σύριγγας, LOV: lab-on valve μονάδα, SV: βαλβίδα σύριγγας, SL: βρόχος δειγματοληψίας, HC: σπείραμα ανάμιξης, FO₁: οπτική ίνα συνδεδεμένη με την πηγή φωτός (light lamp), FO₂: οπτική ίνα συνδεδεμένη με τον ανιχνευτή, FC: κυψελίδα ροής, DAD: ανιχνευτής συστοιχίας διόδων, C: φέρον αντιδραστήριο, S: δείγμα, • θύρες εν χρήση, ○ κλειστές θύρες.

Οι δύο οπτικές ίνες που συνδέονται με το σύστημα MicroSIA προμηθεύθηκαν από την εταιρία Ocean Optics (Η.Π.Α.) και είναι κατάλληλες για μετρήσεις στην ορατή (Vis) και την υπεριώδη (UV) περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η οπτική ίνα FO₁ που συνδέεται με την πηγή του φωτός, και επομένως μεταφέρει το φως στην κυψελίδα ροής όπου γίνεται η αντίδραση, έχει εσωτερική διάμετρο 200 μm, ενώ η οπτική ίνα που συνδέεται με τον ανιχνευτή FO₂ και μεταφέρει το σήμα σε αυτόν, έχει εσωτερική διάμετρο 400 μm.

Η πηγή φωτός είναι μία λάμπα βολφραμίου-αλογόνου, από την Ocean Optics (Η.Π.Α.), κατάλληλη για μετρήσεις στο ορατό και το εγγύς υπέρυθρο (450-2200 nm). Ο ανιχνευτής συνδέεται με Η/Υ που τρέχει τα Windows XP. Το λογισμικό είναι το OOBBase32 και ο έλεγχος του συστήματος γίνεται μέσω της συριακής θύρας RS-232.

Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις για την δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο FRAP πραγματοποιήθηκαν με ένα φασματοφωτόμετρο Jasco V-550 UV-Vis διπλής

δέσμης (Ιαπωνία). Για τη ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρονικό pH-μετρο της Orion® (Η.Π.Α.).

6.2.4. Αναλυτικές διαδικασίες

6.2.4.1. Μέθοδος SI

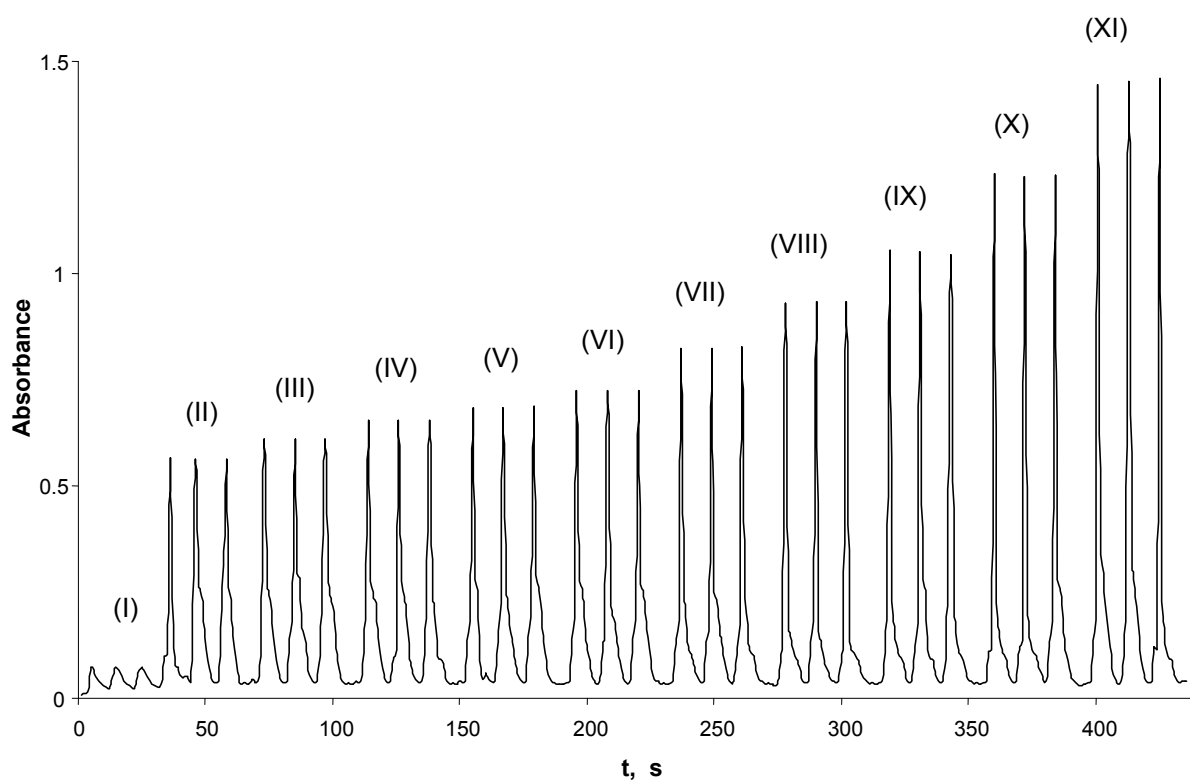
Πριν τη μέτρηση, ο βρόχος δειγματοληψίας γεμίζεται χειροκίνητα με αναρρόφηση του δείγματος από τη θύρα # 5 στη θύρα # 5b με τη βοήθεια μιας πλαστικής σύριγγας (σχήμα 6.1.). Η αντλία σύριγγας συνδέεται με τη θύρα 7. Η όλη αυτοματοποιημένη διαδικασία παρουσιάζεται συνοπτικά στον πίνακα 6.1. Η θέση 1 της LOV καταλήγει σε απόβλητα, ενώ η θέση 8 καταλήγει σε απόβλητα μέσω της κυψελίδας.

Πίνακας 6.1. Αυτοματοποιημένη διαδικασία για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ισχύς σε βρώσιμα έλαια.

Βήμα	Θέση βαλβίδας (# θύρας)	Θέση SV	Χρόνος (s)	Ταχύτητα ροής ($\mu\text{L s}^{-1}$)
1 ^ο	5	load	8,3	30
2 ^ο	1	inject	1,25	200
3 ^ο	6	load	5,0	200
4 ^ο	8	inject	5,0	100
5 ^ο	5	load	5,0	17
6 ^ο	6	load	8,0	25
7 ^ο	8	inject	6,0	130

Αρχικά, η LOV γυρνά στη θέση 5 (σχήμα 6.1) για την αναρρόφηση 250 μL δείγματος μέσω του σπειράματος ανάμιξης (βήμα 1^ο) και μετά γυρίζει στη θέση 1 για την αποβολή του δείγματος στα απόβλητα (βήμα 2^ο). Τα βήματα 1 και 2 είναι απαραίτητα για την έκπλυση των διαύλων του συστήματος με το δείγμα. Ο κύκλος της ανάλυσης ξεκινά όταν η βαλβίδα σύριγγας, SV, γυρίζει στη θέση φόρτωσης (load) και η LOV στην θέση 6 για το γέμισμα της σύριγγας με 1000 μL του

αντιδραστηρίου FRAP (Βήμα 3^ο). Η LOV γυρίζει στη θέση 8 , η SV στην θέση ένεσης (inject), οπότε 500 μL του φέροντος αντιδραστηρίου μεταφέρονται στο σπείραμα ανάμιξης HC (Βήμα 4^ο). Ακολούθως, η LOV τίθεται στη θέση 5 και η SV στη θέση load, οπότε 90 μL δείγματος μεταφέρονται στο HC (Βήμα 5^ο). Έπειτα η LOV γυρνά στη θέση 6 για την εισαγωγή 200 μL του αντιδραστηρίου FRAP στο HC (Βήμα 6^ο). Τελικά, η LOV τίθεται στη θέση 8 και η SV στη θέση inject για την μεταφορά του μίγματος αντίδρασης στην κυψελίδα ροής για τη μέτρηση και τελικά στα απόβλητα (Βήμα 7^ο).



Σχήμα 6.2. Καταγράφημα κορυφών συστήματος SI. Πραγματοποιήθηκαν τριπλές ενέσεις διαλυμάτων: (I), τυφλού και εκχυλισμάτων ελαιολάδου συγκεντρώσεων: (II), 349,2; (III), 401,3; (IV), 451,1; (V), 487,5; (VI), 533; (VII), 644,5; (VIII), 767,3; (IX), 906; (X), 1112,2; (XI), 1350,5 μmol ισοδύναμα $\text{FeSO}_4 \text{g}^{-1}$ ελαιολάδου.

Αυτό το πρόγραμμα τύπου 'sandwich' επιτρέπει μόλις 14 s για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Ο ανιχνευτής συλλέγει δεδομένα στα 595 nm σε καταγραφόμενα χρόνου (t, s) – απορρόφησης (absorbance), όπως αυτό του σχήματος 6.2.

6.2.4.2. Μέθοδος FRAP

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος FRAP που αναπτύχθηκε από τους Benzie και Strain [86]. Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα: α) ρυθμιστικό διάλυμα οξικών συγκέντρωσης 0,3 M και pH 3,6 (3,1 g CH₃COONa και 16 mL CH₃COOH ανά L διαλύματος), β) διάλυμα TPTZ 10 mM L⁻¹ σε διάλυμα HCl 40 mM L⁻¹ και γ) διάλυμα FeCl₃ 6H₂O 20 mM L⁻¹. Το διάλυμα εργασίας FRAP παρασκευάζεται ημερησίως με ανάμιξη 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος, 2,5 mL διαλύματος TPTZ και 2,5 mL διαλύματος FeCl₃ 6H₂O. Ποσότητα 660 μL διαλύματος FRAP θερμαίνεται στους 37°C και λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης στα 593 nm ως τυφλό. Σε 60 μL εκχυλίσματος ελαίου προστίθενται 660 μL διαλύματος FRAP και το μίγμα αφήνεται στο σκοτάδι για 10 min. Μετρείται η απορρόφηση του μίγματος, η οποία αφαιρείται από την αρχική τιμή απορρόφησης του διαλύματος εργασίας.

6.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

6.3.1. Βελτιστοποίηση

Δοκιμάστηκαν διάφορες αναλογίες αραιώσης του μεθανολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου με τον διαλύτη, ώστε να βρεθεί η πλέον κατάλληλη για την εισαγωγή της στο σύστημα SI. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν μίγματα εκχυλίσματος: διαλύτη σε αναλογίες 1:0, 1:1, 1:2, 1:3 και 1:4 (ο:ο). Οι αναλογίες 1:0 και 1:1 παρουσίασαν κορυφές ύψους 3,3 και 2,8 μονάδων απορρόφησης, αντίστοιχα. Όταν χρησιμοποιήθηκε η αραιώση 1:3 δεν εμφανίστηκαν κορυφές, ενώ η 1:4 οδήγησε σε μικρές αρνητικές κορυφές, εξαιτίας της μεγάλης αραιώσεως του δείγματος. Η αραιώση 1:2 έδωσε κορυφές ύψους περίπου 1,8 μονάδων απορρόφησης και επιλέχθηκε ως βέλτιστη, επειδή η γραμμική περιοχή του φασματοφωτόμετρου DAD είναι μεταξύ 0,1 και 2,8 μονάδες απορρόφησης. Ο έλεγχος της γραμμικότητας του οργάνου MicroSIA πραγματοποιήθηκε με τετραπλές ενέσεις διαλυμάτων του δείκτη φαινολοφθαλεΐνη σε περιοχή συγκεντρώσεων από 0,01 έως 0,2 mM. Στον πίνακα 6.2. παρουσιάζονται οι τιμές απορρόφησης των διαλυμάτων φαινολοφθαλεΐνης συναρτήσει της συγκέντρωσης στα 550 nm. Η τιμή της σταθεράς συσχέτισης της συγκέντρωσης με τον μέσο όρο των τιμών A_{MO} προσδιορίστηκε σε r=0,9995.

Για την βελτιστοποίηση του όγκου εισαγωγής του δείγματος δοκιμάστηκαν οι όγκοι των 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 και 130 μL. Όπως φαίνεται στο

σχήμα 6.3α, μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης και καλύτερη ευαισθησία επιτυγχάνεται με όγκο 90 μL . Η εισαγωγή όγκων από 40 έως 80 μL , οδήγησε σε μικρές κορυφές, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκαν όγκοι μεταξύ 100 και 130 μL , παρατηρήθηκαν διπλές κορυφές, πιθανώς λόγω ενός φαινομένου υπερφόρτωσης.

Πίνακας 6.2. Έλεγχος γραμμικότητας του οργάνου MicroSIA

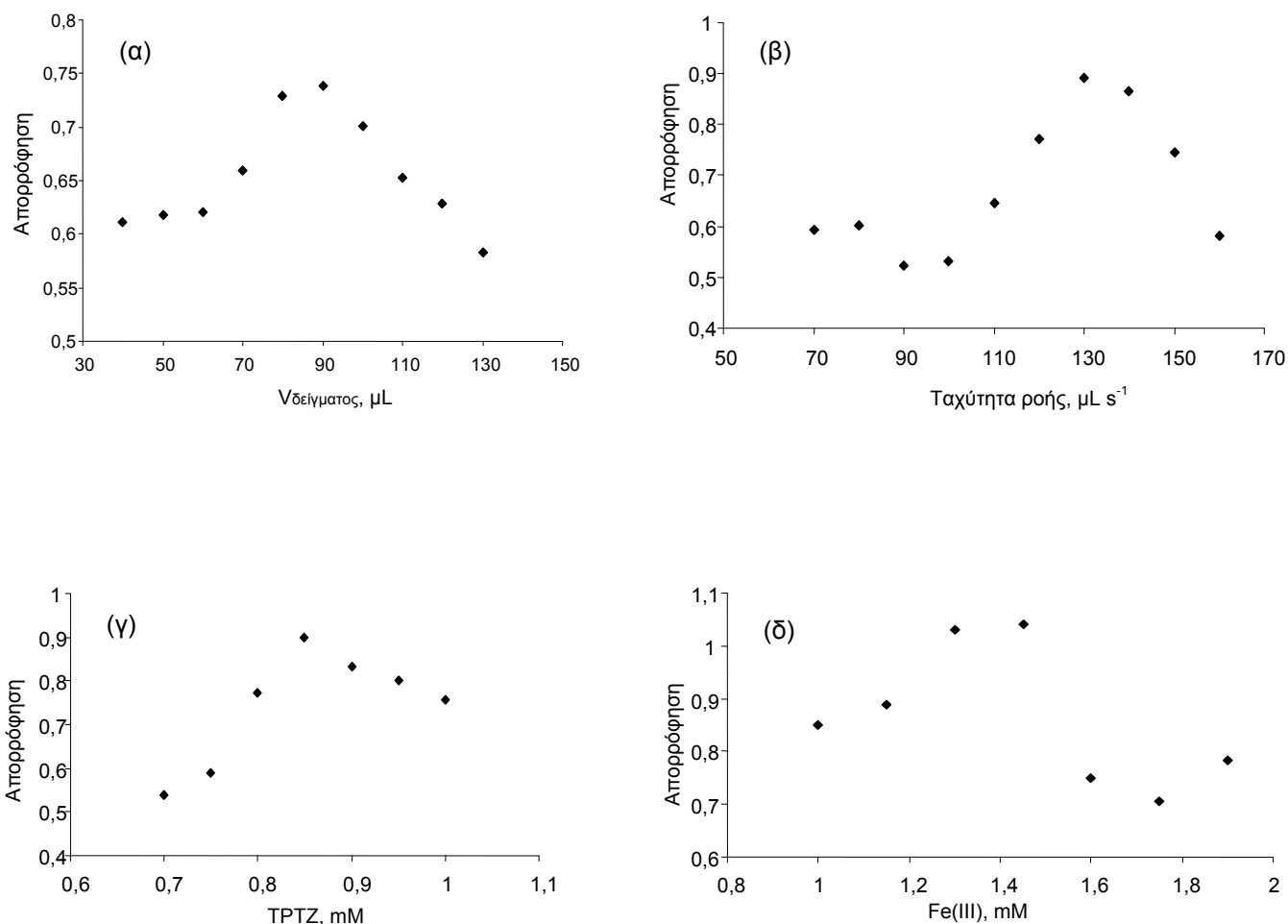
C (mM)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A _{MO}
0,01	0,143	0,146	0,147	0,147	0,147±0,002
0,025	0,389	0,391	0,393	0,395	0,393±0,002
0,05	0,762	0,760	0,761	0,762	0,761±0,001
0,075	1,125	1,126	1,120	1,120	1,122±0,003
0,1	1,450	1,453	1,452	1,459	1,455±0,004
0,125	1,760	1,729	1,745	1,733	1,736±0,014
0,15	2,151	2,124	2,138	2,122	2,128±0,013
0,175	2,395	2,509	2,423	2,423	2,452±0,050
0,2	2,832	2,746	2,860	2,738	2,781±0,061

Για τη βελτιστοποίηση της ταχύτητας ροής δοκιμάστηκαν οι τιμές: 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 και 160 $\mu\text{L s}^{-1}$. Επιλέχθηκε η τιμή 130 $\mu\text{L s}^{-1}$ ως βέλτιστη αφού οδήγησε στην καλύτερη ευαισθησία του συστήματος, όπως φαίνεται στο σχήμα 6.3β. Όταν η ταχύτητα ροής παίρνει τιμές από 70 έως 100 λαμβάνονται κορυφές μεγάλου εύρους. Οι τιμές 110 έως 160 δίνουν συμμετρικές κορυφές, ενώ η μέγιστη ευαισθησία επιτυγχάνεται με την τιμή 130 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Τέλος, έγινε βελτιστοποίηση στη συγκέντρωση του αντιδραστηρίου FRAP. Μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 και 1,00 mM για το TPTZ (Σχήμα 6.3γ) και 1,00, 1,15, 1,30, 1,45, 1,60, 1,75 και 1,90 mM για το Fe(III) (Σχήμα. 6.3δ). Η μεγαλύτερη ευαισθησία και το καλύτερο σχήμα κορυφών παρατηρήθηκε με συγκεντρώσεις 0,85 mM για το TPTZ και 1,45 mM για το Fe(III) στο διάλυμα εργασίας FRAP. Ο Fe(III) είναι σε περίσσεια σε αυτό το σύστημα. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης σχηματισμού του συμπλόκου $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ μεταξύ του Fe(III) και του TPTZ, είναι 1:2. Έχει αποδειχθεί ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου μπορούν να δεσμεύσουν το Fe(III) και να σχηματίσουν σύμπλοκα που αντιδρούν με τα αντιοξειδωτικά [1]. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται συνήθως αυξημένη συγκέντρωση Fe(III) για την πρόληψη αυτής της παρεμπόδισης [1,86]. Ο βέλτιστος λόγος συγκεντρώσεων $[\text{Fe}(\text{III})]:[\text{TPTZ}]$ βρέθηκε να είναι 1,7:1 έναντι του

2:1 που χρησιμοποιείται στην δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο FRAP [86]. Στην αυτοματοποιημένη μέθοδο, ο χρόνος επαφής του μεθανολικού εκχυλίσματος του ελαίου με το Fe (III) του αντιδραστηρίου FRAP είναι σημαντικά μικρότερος (μερικά s έναντι 4-10 min) και επομένως οι πιθανές αντιδράσεις του Fe (III) με άλλες ενώσεις (metal chelators) πλην των αντιοξειδωτικών περιορίζεται.

Για τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων του όγκου εισαγωγής και της ταχύτητας ροής, καθώς και των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων του διαλύματος FRAP, δηλαδή του Fe (III) και του TPTZ, εφαρμόστηκε επιπλέον ο αλγόριθμος Simplex με αρχικό σχεδιασμό πέντε πειραμάτων. Οι υπολογισμοί του αλγόριθμου Simplex έγιναν με πρόγραμμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας σε γλώσσα C για περιβάλλον MSDOS. Μετά από κάθε δοκιμή σημειώνεται η απόκριση, η οποία εκφράζεται με τη συνάρτηση Απόκριση= $0,5 \times Y + 0,5 \times \text{Π.Κ.}$, όπου Y είναι το ύψος της κορυφής και Π.Κ. είναι παράγοντας της κορυφής ανάλογος της συμμετρίας και του σχήματός της. Το ύψος της κορυφής προκύπτει με αφαίρεση της γραμμής βάσης από το μέγιστο της κορυφής. Ο Π.Κ. παίρνει τιμές 0, 0,5, 1,0, 1,5. Σε περιπτώσεις ασύμμετρων ή διπλών κορυφών ο Π.Κ. λαμβάνει την τιμή μηδέν, ενώ σε περιπτώσεις εμφάνισης ουράς ή μετώπου στην κορυφή λαμβάνει την τιμή 0,5. Οι τιμές 1,0 και 1,5 αντιστοιχούν σε σχήμα κορυφών πολύ ικανοποιητικό και άριστο (μικρό εύρος) αντίστοιχα. Στον πίνακα 6.3 παρουσιάζονται τα πειράματα του αλγόριθμου Simplex.



Σχήμα 6.3. Βελτιστοποίηση παραμέτρων και συγκεντρώσεων αντιδραστηρίου FRAP της μεθόδου SI. (α): όγκος εισαγωγής δείγματος, μL , (β): ταχύτητα ροής, $\mu\text{L s}^{-1}$ (γ) συγκέντρωση TPTZ, mM, (δ) συγκέντρωση Fe(III), mM.

Οι δοκιμές Simplex ολοκληρώνονται όταν 5 διαδοχικά πειράματα δεν διαφέρουν στην απόκριση περισσότερο από 5%. Τα σκιασμένα πειράματα του πίνακα 6.3 ανταποκρίνονται στην παραδοχή αυτή, αφού Απόκριση= $1,007 \pm 0,051$ με %rsd=5,1%. Παρατηρείται ότι η μέθοδος Simplex οδήγησε σε όμοιες βέλτιστες τιμές συγκεντρώσεων και παραμέτρων με αυτές του σχεδιασμού πειραμάτων 4×4 , και συγκεκριμένα οι μέσοι όροι των 5 σκιασμένων πειραμάτων είναι: $C_{\text{Fe}}=1,458 \text{ mM}$, $C_{\text{TPTZ}}=0,847 \text{ mM}$, $V=90,0 \mu\text{L}$ και $Q=131,2 \mu\text{L s}^{-1}$.

Πίνακας 6.3. Πειράματα βελτιστοποίησης με χρήση του αλγόριθμου Simplex.

Πειράμα	Fe(mM)	TPTZ(mM)	V (μL)	Q (μL/sec)	Ύψος	ΠΚ	Απόκριση
1	2,16	0,58	5	200	0,110	0	0,055
2	1,16	0,83	5	10	0,104	0	0,052
3	1,66	0,58	200	10	0,699	0	0,350
4	1,16	1,08	200	200	0,526	0	0,263
5	1,66	0,83	100	100	0,570	0	0,285
6	1,597	0,705	139	68,7	0,447	0	0,224
7	1,402	0,814	58	76,1	0,510	1	0,755
8	1,807	0,719	64,6	155,6	0,474	1,5	0,987
9	1,552	0,783	122,2	100,8	0,659	0	0,329
10	1,53	0,778	113,9	116,9	0,910	0,5	0,705
11	1,519	0,841	109,8	124,9	1,158	1,0	1,079
13	1,607	0,941	141,5	157,1	0,425	0	0,213
14=7	1,402	0,814	58	76,1	0,510	1	0,708
15	1,599	0,871	112,3	135,6	1,639	1,5	1,569
16	1,402	0,821	93,1	151,5	1,063	1	1,032
17	1,504	0,854	76,4	114	0,986	1	0,993
18	1,488	0,822	81,2	137,3	0,884	1	0,942
19=11	1,519	0,841	109,8	124,9	1,158	1	1,079
20	1,378	0,897	89,6	128,1	0,981	1	0,991
21	1,564	0,822	93,7	123,6	1,412	1	1,206

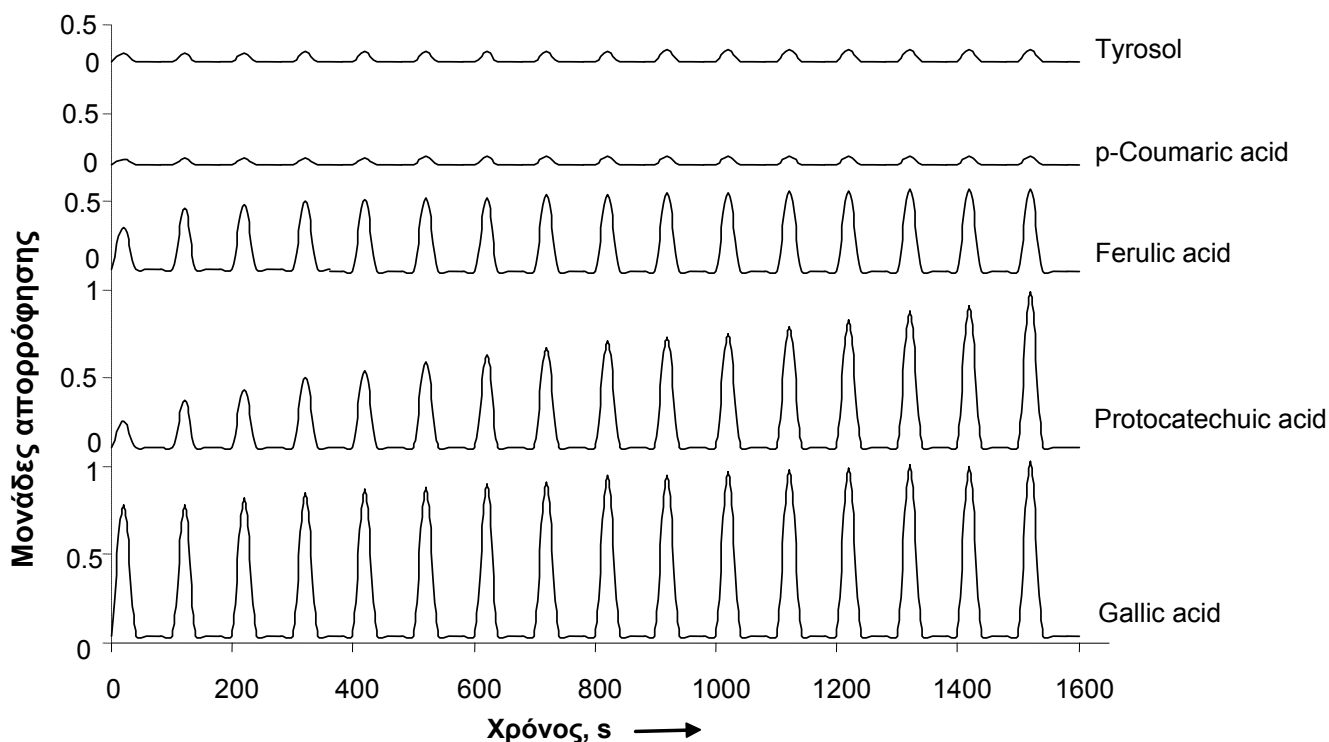
6.3.2. Βαθμονόμηση

Για την βαθμονόμηση της μεθόδου SI, επιλέχθηκαν δύο εκχυλίσματα ελαιολάδου με χαμηλή και υψηλή τιμή αντιοξειδωτικής ενεργότητας. Παρασκευάστηκαν 6 μίγματα διαφορετικών αναλογιών, τα 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 και 0:100 (o/o), τα οποία μετρήθηκαν με την αυτοματοποιημένη και την δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο FRAP. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων τίθενται σε σύστημα αξόνων, της μεθόδου SI σε συνάρτηση με την δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο. Αυτή η πρακτική βαθμονόμησης χρησιμοποιείται όταν το αποτέλεσμα που εξάγεται από μία μέθοδο εξαρτάται από πολλά συστατικά που παρουσιάζουν διαφορετική κινητική συμπεριφορά έναντι του αντιδραστηρίου [87]. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Fe(II) μmol ανά g δείγματος ελαιολάδου (μmol equiv. of Fe (II) g⁻¹). Η εξίσωση βαθμονόμησης είναι η ακόλουθη:

$$SI_{\text{method}} = (0,9979 \pm 0,0026) \times FRAP_{\text{method}}, r = 0,999, n=6$$

Η προτεινόμενη μέθοδος μετράει την αντιοξειδωτική ενεργότητα σε μία καθορισμένη χρονική στιγμή, αυστηρά επαναλήψιμη από το σύστημα. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ενεργότητας των βρώσιμων ελαίων δεν είναι απαραίτητη η ολοκλήρωση της αντίδρασης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ελαιολάδο περιέχει αντιοξειδωτικά συστατικά με διαφορετικές κινητικές

συμπεριφορές, οι οποίες μπορούν εύκολα να μελετηθούν από το παρόν σύστημα SI. Στο σχήμα 6.4 φαίνεται η κινητική πέντε φυσικών αντιοξειδωτικών του ελαιολάδου. Η αντίδραση ολοκληρώνεται γρήγορα για την τυροσόλη και το *p*-κουμαρικό οξύ, πιο αργά για το φερουλικό οξύ, ενώ για τα γαλλικό και προτωκατεχουϊκό συνεχίζεται, ακόμα και για μετά από 26 min. Ταυτόχρονα, φαίνεται από το σχήμα και η ισχύς κάθε αντιοξειδωτικού, που ακολουθεί την σειρά: γαλλικό οξύ > προτωκατεχουϊκό οξύ > φερουλικό οξύ > τυροσόλη ≈ *p*-κουμαρικό οξύ.



Σχήμα 6.4. Κινητική αντιοξειδωτικών συστατικών του ελαιολάδου με το αντιδραστήριο FRAP, όπως καταγράφηκε από το σύστημα MicroSIA. Οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών είναι 1,0 mM σε μεθανόλη: νερό 80:20 (ο:ο).

6.3.3. Στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου SI

Η προτεινόμενη αυτοματοποιημένη μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και την ακρίβεια. Η γραμμικότητα προσδιορίστηκε με τη μέτρηση ενός εκχυλίσματος ελαιολάδου σε διάφορες

αραιώσεις. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε ως τρεις φορές την τυπική απόκλιση από την τριπλή εισαγωγή δείγματος στο σύστημα. Η επαναληψιμότητα εκτιμήθηκε από τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης για κάθε δείγμα. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκτιμήθηκε από την ανάλυση τριών δειγμάτων, μικρής, μεσαίας και υψηλής αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε δύο διαφορετικές ημέρες. Τα αποτελέσματα της επικύρωσης της μεθόδου SI παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4. Η γραμμή βάσης διατηρείται σταθερή κατά το χρονικό διάστημα της ανάλυσης. Η ταχύτητα δειγματοληψίας της μεθόδου είναι 90 δείγματα h⁻¹. Οι κορυφές που εμφανίζονται στο σχήμα 6.2 αντανακλούν επίσης την καλή επαναληψιμότητα μεταξύ των ενέσεων καθώς και την ελάχιστη ολίσθηση του συστήματος.

Στον πίνακα 6.4 παρουσιάζονται επίσης στοιχεία επικύρωσης της δια χειρός εκτελούμενης μεθόδου FRAP.

Πίνακας 6.4. Στοιχεία επικύρωσης για την μέθοδο SI και την δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο FRAP.

Μέθοδος	(κλίση±SD)× 10 ⁻³	intercept(±SD)×10 ⁻³	r	DL ^α	SD ^β	RSD% ^β	SD ^γ	RSD% ^γ
SI	10,71 (± 0,23)	305 (± 13)	0,998	0,89	3,0	0,79	14,7	3,6
Δια χειρός	9,132 (± 0,082)	7,8 (± 4,3)	0,999	0,88	1,5	0,37	14,1	2,5

^αμολι ισοδύναμα Fe (II) g⁻¹ ελαιολάδου, ^βΕπαναληψιμότητα n=54, ^γΑναπαραγωγιμότητα n=3, n: αριθμός δειγμάτων

6.3.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε εκχυλίσματα ελαίων

Ένα σύνολο 54 δειγμάτων βρώσιμων ελαίων αναλύθηκαν τόσο με την αυτοματοποιημένη, όσο και με την δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο FRAP. Στην μέθοδο SI κάθε εκχύλισμα εισάγεται στο σύστημα τρεις φορές, ενώ στην δια χειρός μέθοδο κάθε μίγμα αντιδραστηρίου FRAP-εκχυλίσματος μετρείται επίσης τρεις φορές. Οι τιμές αντιοξειδωτικής ενεργότητας ακολουθούμενες από την τυπική απόκλιση, όπως προσδιορίστηκαν και με τις δύο μεθόδους παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5. Για την αυτοματοποιημένη μέθοδο οι τιμές κυμαίνονται από 24,7 έως 1162 μολι ισοδύναμα Fe (II) g⁻¹ για το ελαιόλαδο, ενώ από 2,8 έως 5,8 μολι ισοδύναμα Fe (II) g⁻¹ για τα υπόλοιπα βρώσιμα έλαια. Είναι φανερό ότι το

ελαιόλαδο έχει το μεγαλύτερο περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά, ενώ τα υπόλοιπα ακολουθούν με σημαντικά μικρότερες τιμές. Η αυτοματοποιημένη μέθοδος συγκρίθηκε με την δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο χρησιμοποιώντας την δοκιμασία t κατά ζεύγη. Οι τιμές του κριτηρίου t για όλα τα ζεύγη κυμάνθηκαν από 0,83 έως 2,71. Αυτές οι τιμές είναι μικρότερες από την κρίσιμη τιμή 2,78. Με τον τρόπο αυτό αποδεικνύεται ότι η αυτοματοποιημένη μέθοδος μπορεί να αντικαταστήσει την δια χειρός εκτελούμενη αφού τα λαμβανόμενα αποτελέσματα είναι ισοδύναμα.

Πίνακας 6.5. Αντιοξειδωτική ενεργότητα ελαίων προσδιορισμένη με την μέθοδο SI και την δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο FRAP.

Δείγμα #	Μέθοδος SI	Δια χειρός FRAP	Τιμή t^p
	M.O. \pm SD ^a (n=3)	M.O. \pm SD ^a (n=3)	
Ελαιόλαδο 1	162,7 \pm 3,3	164,9 \pm 1,3	1,08
2	621,3 \pm 3,3	624,5 \pm 1,6	1,53
3	231,0 \pm 3,2	233,3 \pm 1,7	1,13
4	1069,1 \pm 3,1	1073,2 \pm 1,6	2,02
5	1057,9 \pm 2,6	1062,0 \pm 1,7	2,29
6	396,5 \pm 2,6	399,2 \pm 1,5	1,56
7	528,0 \pm 2,8	530,9 \pm 1,5	1,62
8	334,6 \pm 3,4	337,1 \pm 1,4	1,22
9	976,4 \pm 2,6	980,3 \pm 1,6	2,23
10	774,5 \pm 3,0	778,0 \pm 1,5	1,84
11	1066,5 \pm 3,1	1070,6 \pm 1,5	2,10
12	222,3 \pm 3,4	224,6 \pm 1,8	1,07
13	437,7 \pm 3,4	440,5 \pm 1,7	1,27
14	690,3 \pm 3,5	693,7 \pm 1,3	1,55
15	1162,0 \pm 3,5	1166,3 \pm 1,4	1,98
16	393,7 \pm 3,7	396,4 \pm 1,6	1,16
17	347,7 \pm 3,6	350,3 \pm 1,7	1,13
18	1113,9 \pm 3,2	1118,1 \pm 1,7	2,02
19	237,0 \pm 3,3	239,4 \pm 1,9	1,09
20	418,8 \pm 3,6	421,6 \pm 1,8	1,19
21	153,7 \pm 3,5	155,9 \pm 1,4	1,00
22	184,4 \pm 2,5	186,6 \pm 1,5	1,34
23	157,3 \pm 2,6	159,5 \pm 1,4	1,30
24	35,0 \pm 3,4	36,9 \pm 1,8	0,87
25	25,6 \pm 2,8	253,0 \pm 1,7	1,28
26	293,6 \pm 3,2	296,1 \pm 1,6	1,22

27	680,4 ± 2,9	683,7 ± 1,3	1,81
28	63,9 ± 3,0	65,9 ± 1,2	1,09
29	985,9 ± 3,6	989,8 ± 1,6	1,72
30	675,7 ± 3,5	679,0 ± 1,7	1,47
31	214,4 ± 3,4	216,8 ± 1,6	1,07
32	217,8 ± 3,3	220,1 ± 1,9	1,06
33	193,7 ± 3,0	195,9 ± 1,7	1,13
34	560,4 ± 3,0	563,4 ± 1,8	1,52
35	589,6 ± 3,0	592,7 ± 1,7	1,56
36	102,8 ± 3,4	104,9 ± 1,4	0,98
37	645,3 ± 3,4	648,6 ± 1,4	1,52
38	319,7 ± 2,6	322,2 ± 1,6	1,46
39	129,8 ± 2,5	132,0 ± 1,8	1,20
40	59,4 ± 2,8	61,4 ± 1,5	1,10
41	103,9 ± 2,8	105,9 ± 1,6	1,12
42	74,2 ± 3,2	76,2 ± 1,7	0,98
43	79,9 ± 3,0	81,9 ± 1,8	1,00
44	199,9 ± 3,4	202,2 ± 1,3	1,08
45	141,1 ± 3,6	143,2 ± 1,2	1,00
46	145,2 ± 3,6	147,4 ± 1,5	0,96
47	24,7 ± 3,7	26,6 ± 1,6	0,83
48	511,7 ± 3,1	514,7 ± 1,6	1,47
49	95,8 ± 3,5	97,9 ± 1,6	0,94
50	123,4 ± 3,3	125,5 ± 1,7	0,99
<i>Σογιέλαιο</i>	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,1	0,84
<i>Σησαμέλαιο</i>	5,8 ± 0,3	6,1 ± 0,1	1,71
<i>Ηλιέλαιο</i>	28 ± 0,3	3,2 ± 0,1	2,61
<i>Αραβοσιτέλαιο</i>	3,7 ± 0,3	4,1 ± 0,1	2,71

^aμποί ισοδύναμα Fe (II) g⁻¹, ^bΗ κρίσιμη τιμή t για 4 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,78 για ρ=0,05

Πραγματοποιήθηκε επίσης μία πιο κοινή διαδικασία βαθμονόμησης της μεθόδου SI, για τον υπολογισμό των τιμών αντιοξειδωτικής ενεργότητας. Χρησιμοποιήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης Fe(II), όπως προκύπτει μετά από εισαγωγή πρότυπων διαλυμάτων Fe(II) συγκεντρώσεων 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM στο σύστημα SI: $A=(0,906\pm 0,005) \times C_{Fe} + (0,192\pm 0,187)$ $r=0,999$, $n=5$. Με αυτή τη μέθοδο βαθμονόμησης οι τιμές για την αυτοματοποιημένη μέθοδο κυμαίνονται στην περιοχή 9,0 – 1243,7 $\mu\text{mol equiv. FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$. Οι σχετικές διαφορές μεταξύ των τιμών που λαμβάνονται από τη δια χειρός εκτελούμενη μέθοδο και την μέθοδο SI με αυτή τη βαθμονόμηση είναι από 6,2% έως 66,2%, και είναι σημαντικές.

6.4. Συμπεράσματα

Η προτεινόμενη μέθοδος επιτρέπει τον απευθείας προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε εκχυλίσματα ελαίων με πλήρη αυτοματοποίηση της μεθόδου FRAP. Αυτή η μέθοδος που επιτρέπει μεγάλη ταχύτητα δειγματοληψίας είναι αποτελεσματική ως προς την εξοικονόμηση χρόνου και κόστους, ενώ παράλληλα δίνει τη δυνατότητα της ανάλυσης 'επί τόπου' διότι χρησιμοποιεί οργανολογία η οποία μπορεί πολύ εύκολα να γίνει φορητή. Η μέθοδος έχει καλή ευαισθησία και πιστότητα, ενώ συγκρίνεται καλά με την δια χειρός μέθοδο FRAP.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα εκχυλίσματα τροφίμων που περιέχουν αντιοξειδωτικά, χρησιμοποιώντας το ίδιο ή διαφορετικό μέσο εκχύλισης.

7. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ - ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΗΠΙΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗ

7.1. Εισαγωγή

Κάθε ποικιλία παρουσιάζει συγκεκριμένα φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, τα οποία προσδίδουν στον καρπό και το χυμό της ελιάς διαφορετική σύσταση και ιδιότητες. Τόσο η σύσταση του ελαιολάδου, όσο και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, εκτός από την ποικιλία, επηρεάζονται έντονα και από διάφορους άλλους παράγοντες όπως οι κλιματικές και αγρονομικές συνθήκες, το χρόνο της συγκομιδής και τις εφαρμοζόμενες γεωπονικές πρακτικές.

Οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται στο ανθρώπινο σώμα μέσω της αερόβιας αναπνοής εμφανίζονται σε διάφορες μορφές, συμπεριλαμβανομένων των υπεροξυ, υδροξυ, υδροϋπεροξυ και αλκοξυ ριζών [88]. Στα υγιή άτομα, υπάρχουν ένζυμα με φυσικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που απομακρύνουν αυτές τις ελεύθερες ρίζες, ενώ τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από την τροφή, βοηθούν επίσης στην εξουδετέρωσή τους. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να καταναλώνονται τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικά, όπως το ελαιόλαδο, ώστε να μειώνονται οι επιδράσεις από το οξειδωτικό στρες στον οργανισμό του ανθρώπου.

Δεδομένα που προσδιορίζουν το περιεχόμενο των αντιοξειδωτικών στο ελαιόλαδο είναι πολύ σημαντικά για τους επιστήμονες των τροφίμων, τους ιατρούς, τις βιομηχανίες και τους καταναλωτές. Έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί διάφορες μεθοδολογίες για τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων αντιοξειδωτικών συστατικών στο ελαιόλαδο, αλλά η χρήση μίας τιμής που να χαρακτηρίζει το αντιοξειδωτικό δυναμικό του ελαιολάδου συνολικά είναι μεγάλο πλεονέκτημα [89]. Έτσι, εισάγεται ο όρος της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC), για την εκτίμηση της οποίας έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι.

Ένας αριθμός αυτών των μεθόδων μετράει την αναστολή μιας σταθερής ή τεχνητά σχηματιζόμενης ελεύθερης ρίζας κατά την προσθήκη του ελαιολάδου. Η μέθοδος DPPH είναι μία κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εκτίμηση της TAC του ελαιολάδου. Βασίζεται στον αποχρωματισμό του πορφυρού

διαλύματος της ρίζας DPPH εξαιτίας της αντίδρασης στην οποία αυτή καταναλώνεται από τα αντιοξειδωτικά. Ο βαθμός του αποχρωματισμού μετρείται φασματοφωτομετρικά στα 515 nm. Αυτή η μέθοδος έχει εφαρμοστεί τόσο στο υδρόφιλο [60, 62, 65], όσο και στο λιπόφιλο κλάσμα του ελαιολάδου [60].

Σε υδρόφιλα κλάσματα ελαίων, έχει χρησιμοποιηθεί και μία ακόμη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιεί την τεχνητά σχηματιζόμενη ελεύθερη ρίζα ABTS^{•+}. Η μέθοδος βασίζεται στον αποχρωματισμό του κυανοπράσινου διαλύματος της ρίζας, λόγω της κατανάλωσής της από τα αντιοξειδωτικά. Ο αποχρωματισμός παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 734 nm.

Μία διαφορετική τιμή που σχετίζεται με την TAC και προσδιορίζεται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής αξίας είναι το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες. Αυτό, μετρείται με την μέθοδο Folin-Ciocalteu [55,56] και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 765 nm σε μεθανολικά εκχυλίσματα.

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιείται η χαρτογράφηση των Ελληνικών ελαιολάδων, σύμφωνα με την περιοχή προέλευσης και την ποικιλία. Επιπλέον, γίνεται μελέτη της επίδρασης της ποικιλίας και της περιοχής στα αποτελέσματα, ενώ τελικά συγκρίνονται οι αναλυτικές μέθοδοι ABTS, DPPH και Folin-Ciocalteu κατά τον προσδιορισμό της TAC του ελαιολάδου.

7.2. Υλικά και Μέθοδοι

7.2.1. Αντιδραστήρια

Η ρίζα DPPH (2,2-δι(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πυκριλυδραζίλιο), καθαρότητας 90%, το ABTS (2,2'-αζινοδισ(3-αιθυλοβενζοθειαζολίν-6-σουλφονικό οξύ) σε μορφή διαμμωνιακού άλατος, καθαρότητας 98%, και το ένζυμο υπεροξειδάση, HRP, τύπου II, ενεργότητας 222 U mg⁻¹, προμηθεύθηκαν από τη Sigma. Το γαλλικό οξύ αγοράστηκε από τη Riedel-de Haën, ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας και η μεθανόλη, αναλυτικής καθαρότητας, από τη Merck. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, συγκέντρωσης 30% σε υδατικό διάλυμα, το οξικό νάτριο και το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, προμηθεύθηκαν επίσης από τη Merck. Το n-εξάνιο, βαθμού καθαρότητας 95%, προμηθεύθηκε από τη Lab Scan, ενώ το ανθρακικό νάτριο από την SDS. Απιονισμένο νερό χρησιμοποιείται όπου είναι απαραίτητο.

7.2.2. Οργανολογία

Η απορρόφηση στις μεθόδους DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu παρακολουθείται με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Jasco V-550 UV-Vis συνδεδεμένο με υπολογιστή, σε ελεγχόμενη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα ρυθμιστικά διαλύματα οξικών και ανθρακικών ρυθμίζονται με ηλεκτρονικό pH-μετρο Orion®.

7.2.3. Δείγματα ελαιολάδου

Σύνολο από 50 δείγματα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, Ελληνικών περιοχών και ποικιλιών, διατηρούνται στους -80°C, προφυλαγμένα από το φως, μέχρι την ημέρα της ανάλυσης. Τα δείγματα προέρχονται από την συγκομιδή του έτους 2005-2006. Έχουν πλήρως χαρακτηριστεί από την ελαιοπαραγωγική εταιρία Μινέρβα Α.Ε., ως προς διάφορες παραμέτρους, οι οποίες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΙΝΕΡΒΑ

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΧΩΡΙΟ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΖΩΝΗ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	FFA	Α. ΥΠΕΡ	Κ. 270	Κ. 332	ΔΙΚ	RANCIAMAT	E-U	CHOLEST	BRASSIC	CAMPE	B-SITO	D-7	T	STEROLS	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	C 22:0
51ΔΠ030206	ΑΛΚΙΑΝΟ	ΧΑΝΙΑ	13	ΚΟΡΝΕΙΚΗ	0.4	10.4	0.13	1.42	-0.004	12.4	3.15	0.06	0	4.21	94.16	0.17	1245	10.33	0.8	0.06	0.10	2.41	78.59	6.01	0.79	0.43	0.24	0.15	
52ΔΠ030206	ΑΖΟΛΑΚΟΣ	ΧΑΝΙΑ	13	ΚΟΡΝΕΙΚΗ	0.45	10.8	0.11	1.45	-0.002	16.5	2.46	0.06	0.08	3.71	94.38	0.18	1199	10.45	0.69	0.04	0.07	2.1	78.95	5.87	0.58	0.4	0.28	0.14	
54ΔΠ030206	ΑΓΥΙΑ	ΧΑΝΙΑ	13	ΚΟΡΝΕΙΚΗ	0.14	9	0.1	1.44	-0.003	13.6	3.33	0.12	0.07	4.11	94.31	0.11	1069	10.1	0.7	0.04	0.07	2.6	78.8	5.9	0.71	0.46	0.28	0.17	
55ΔΠ030206	ΜΑΛΕΜΕ	ΧΑΝΙΑ	11	ΚΟΡΝΕΙΚΗ	0.35	8.7	0.12	1.58	-0.003	15.7	3.79	0.04	0.05	3.15	95.34	0.22	1364	10.9	0.67	0.04	0.1	2.7	77.5	6.7	0.61	0.46	0.22	0.15	
56ΔΠ030206	ΒΛΑΤΟΣ	ΧΑΝΙΑ	14	ΚΟΡΝΕΙΚΗ	0.25	8.8	0.1	1.44	-0.002	24.3	2.39	0.06	0.09	3.4	95.12	0.22	963	7.8	0.27	0.14	0.18	2.7	83.5	3.8	0.35	0.44	0.27	0.14	
59ΔΠ030206	ΑΓ ΠΛΑΤΕΛΕΦΗΜΩΝ	ΧΑΝΙΑ	12	ΚΟΡΝΕΙΚΗ	0.29	12.2	0.14	1.79	-0.004	16.6	4.89	0.08	0.11	2.66	95.24	0.23	1026	10.8	0.5	0.05	0.07	2.7	79.1	4.7	0.41	0.55	0.32	0.18	
327ΔΠ041105	ΧΑΛΑΖΟΝ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	10	ΚΟΡΝΕΙΚΗ	0.49	6	0.12	1.31	-0.003	10.5	6.12	0.12	0.14	93.81	0.4	0.06	2.58	78.4	4.5	0.68	0.42	0.27	0.13						
328ΔΠ041105	ΠΥΡΟΣ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	11	ΜΑΥΡΟΛΑ	0.15	4.8	0.12	1.44	-0.003	14.4	4.44	0.08	0	3.28	94.5	0.16	1336	10.23	0.96	0.04	0.07	3.31	77.3	7.1	0.62	0.36	0.25	0.11	
329ΔΠ041105	ΚΡΕΜΜΥΔΙΑ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	11	ΜΑΥΡΟΛΑ	0.11	3.8	0.12	1.53	-0.005	17.2	4.31	0.07	0	3.76	94.6	0.17	1394	10.21	1	0.04	0.07	2.47	77.5	7.1	0.69	0.37	0.26	0.11	
346ΔΠ141105	ΚΡΟΤΙΝΑ	ΠΕΡΙΑ	3	ΜΕΓΑΡΟΝ	0.6	5.4	0.12	1.57	-0.001	8.45	3.02	0.06	0	2.89	95.41	0.27	1145	13.9	1.49	0.04	0.08	1.95	70.2	11.3	0.7	0.34	0.26	0.12	
346ΔΠ141105	ΑΓΙΝΙΟ	ΠΕΡΙΑ	2	ΚΟΝΙΑΡΟΥ	0.25	10.2	0.13	1.86	-0.001	10.2	2.2	0.07	0.01	3.32	94.97	0.31	1428	12.1	0.84	0.05	0.1	2.82	73.09	8.64	0.59	0.43	0.28	0.12	
347ΔΠ141105	ΠΟΛΥΤΥΡΟΣ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	0.33	6.4	0.14	1.84	-0.001	1.5	0.8	0.07	0	3.94	93.88	0.31	2012	11.74	1.14	0.04	0.08	2.59	73.82	9.38	0.77	0.39	0.3	0.1			
348ΔΠ141105	ΒΡΑΣΤΑΝΑ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	0.13	9.6	0.1	1.32	-0.003	10.9	2	0.03	0	2.4	95.75	0.27	1488	9.71	0.53	0.06	0.09	2.43	79.59	5.78	0.54	0.46	0.41	0.1			
349ΔΠ141105	ΜΕΤΑΓΚΡΙΤΣΙ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	0.14	9.2	0.09	1.7	-0.002	12.2	2.38	0.03	0	1.68	95.35	0.44	1703	8.75	0.44	0.05	0.06	3.43	79.07	6.84	0.53	0.54	0.4	0.1			
353ΔΠ141105	ΟΛΥΝΘΟΣ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	0.25	9.6	0.09	1.69	-0.002	15.8	0.79	0.07	0	3.8	94.88	0.19	1124	11.09	1	0.09	0.13	1.86	79.4	5.26	0.55	0.56	0.36	0.36	0.12		
370ΔΠ171105	ΑΣΠΙΤΟΣ	ΛΑΚΩΝΙΑ	0.43	5.8	0.11	1.87	-0.003	13.9	2.79	0.12	0	3.78	94.41	0.3	1112	13.69	1.06	0.08	0.13	2.52	73.52	7.71	0.83	0.37	0.24	0.1			
371ΔΠ171105	ΔΙΛΙΜΟΝΙΑ	ΛΑΚΩΝΙΑ	0.33	4.2	0.13	1.8	-0.004	13	2.94	0.17	0	3.47	95.09	0.14	1293	10.63	0.77	0.15	0.27	2.19	76.36	5.29	0.5	0.38	0.25	0.1			
372ΔΠ171105	ΑΓ ΓΕΩΡΓΙΟΣ	ΛΑΚΩΝΙΑ	0.2	4.4	0.11	1.81	-0.002	19.9	1.84	0.12	0	3.53	95.13	0.16	1127	11.37	0.77	0.12	0.2	2.87	78.37	5.06	0.5	0.42	0.27	0.1			
373ΔΠ171105	ΝΕΑΠΟΛΗ	ΛΑΚΩΝΙΑ	0.29	5.3	0.1	1.65	-0.002	13.6	2.1	0.12	0.01	3.31	95.5	0.14	1471	10.81	0.64	0.13	0.22	2.75	77.64	6.82	0.51	0.4	0.26	0.09			
374ΔΠ171105	ΑΓ ΑΠΟΣΤΟΛΟΙ	ΛΑΚΩΝΙΑ	4	0.11	1.65	-0.003	16.2	3.13	0.13	0	4.05	94.64	0.13	1139	11.99	0.88	0.1	0.17	2.57	78.02	4.09	0.64	0.4	0.27	0.1				
375ΔΠ171105	ΑΓ ΑΗΜ ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	ΛΑΚΩΝΙΑ	0.19	4.3	0.12	1.81	-0.003	21.1	2.2	0.13	0.01	3.4	95.2	0.18	1094	11.37	0.73	0.11	0.19	2.73	78.68	4.72	0.57	0.42	0.27	0.1			
376ΔΠ171105	ΒΕΛΙΣ	ΛΑΚΩΝΙΑ	0.16	4.1	0.1	1.38	-0.002	22	1.95	0.08	0.01	2.96	95.97	0.15	1490	9.9	0.97	0.14	0.24	2.63	79.93	4.7	0.46	0.42	0.26	0.11			
377ΔΠ171105	ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	ΛΑΚΩΝΙΑ	0.25	4.2	0.14	1.75	-0.003	26.4	1.59	0.14	0.01	3	95.71	0.21	1196	10.72	0.71	0.16	0.26	2.7	79.11	4.96	0.47	0.4	0.26	0.1			
391ΔΠ281105	ΜΟΥΖΚΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	0.23	6.6	0.13	1.88	-0.003	18	4.17	0.08	0	3.74	94.23	0.21	977	12.48	0.86	0.03	0.06	2.25	77.96	4.94	0.62	0.38	0.26	0.12			
392ΔΠ281105	ΛΑΓΚΑΔΑΚΙΑ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	0.25	4.4	0.14	1.49	-0.003	14.7	8.59	0.13	0.05	4.44	93.13	0.28	882	11.94	0.82	0.04	0.07	2.09	79.14	4.26	0.7	0.42	0.31	0.15			
395ΔΠ281105	ΓΑΛΑΡΟ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	0.47	6.6	0.15	1.68	-0.003	16.7	7.99	0.09	0.1	3.65	94.05	0.26	1211	12.63	1.03	0.05	0.07	2.48	76.14	6.17	0.67	0.41	0.27	0.1			
397ΔΠ281105	Κ. ΓΕΡΑΚΑΡΙ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	0.45	5.4	0.16	1.56	-0.003	19.9	5.62	0.08	0	3.75	94.17	0.15	1096	11.08	1.08	0.87	0.07	1.97	78.16	4.87	0.63	0.45	0.26	0.1			
400ΔΠ281105	ΤΡΑΓΑΚΙ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	0.28	6	0.14	1.65	-0.003	17.2	4.42	0.05	0	3.78	94.23	0.25	1024	12.3	0.99	0.05	0.07	2.19	78.32	4.54	0.65	0.4	0.28	0.13			
401ΔΠ281105	ΤΖΙΛΒΗ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	0.23	4.7	0.15	1.62	-0.003	15.3	1.21	0.06	0	3.9	94.52	0.22	1068	12.74	0.85	0.05	0.06	2.58	76.98	5.04	0.81	0.45	0.28	0.1			
403ΔΠ281105	ΒΑΡΡΕΣ	ΖΑΚΥΝΘΟΣ	0.19	5.5	0.12	1.49	-0.003	15.5	3.49	0.09	0.02	3.82	94.28	0.2	1029	12.24	0.97	0.04	0.06	2.37	76.62	5.03	0.77	0.44	0.3	0.11			
410ΔΠ051205	ΔΡΟΣΙΑ	ΕΥΒΟΙΑ	5	90%	ΜΕΓΑΡΩΝ	0.38	14.2	0.11	1.85	-0.003	4.98	1.84	0.07	0	2.73	95.64	0.23	1830	15.1	1.83	0.05	0.09	2.09	67.17	12.47	0.73	0.38	0.23	0.1
412ΔΠ051205	ΑΝΑΛΥΦΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	0.16	11.3	0.14	1.53	-0.005	13.3	4.6	0.06	0.01	3.71	94.64	0.26	1272	11.55	0.8	0.06	0.07	2.8	76.84	5.67	0.79	0.43	0.26	0.14			
413ΔΠ051205	ΚΡΕΜΜΥΔΙΑ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	0.27	8.2	0.12	1.43	-0.002	11.2	4.57	0.08	0.01	3.3	94.74	0.16	1334	9.75	0.8	0.04	0.07	2.42	77.89	8.97	0.73	0.36	0.25	0.08			
413ΔΠ051205 β	ΚΡΕΜΜΥΔΙΑ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	0.18	6	0.11	1.38	-0.002	11	4.42	0.09	0	3.28	94.95	0.15	1275	9.21	0.82	0.06	0.06	2.42	78.94	6.3	0.69	0.39	0.33	0.15			
418ΔΠ051205	ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	0.23	8.6	0.12	1.45	-0.002	15.1	3.61	0.12	0	3.29	94.91	0.16	1157	11.53	0.73	0.04	0.05	2.62	78.44	5.34	0.56	0.45	0.25	0.1			
420ΔΠ051205	ΦΟΝΙΚΟΥΝΤΑ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	0.21	9.3	0.13	1.55	-0.003	15.1	4.16	0.07	0	3.27	94.91	0.17	1260	11.29	0.66	0.05	0.05	2.65	77.78	5.99	0.57	0.44	0.23	0.15			
421ΔΠ051205	ΦΟΝΙΚΟΥΝΤΑ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	0.26	7.6	0.13	1.47	-0.003	16	2.41	0.08	0.01	3.52	94.91	0.25	1136	11.77	0.74	0.04	0.06	2.84	77.36	6.03	0.58	-0.42	0.25	0.1			
424ΔΠ051205	ΚΑΜΠΟΣ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	0.27	7.2	0.13	1.36	-0.004	9.87	0.98	0.1	0	3.85	94.42	0.17	1177	10.46	0.84	0.05	0.06	2.84	79.04	5.5	0.89	0.43	0.23	0.12			
425ΔΠ051205	ΣΤΑΡΟΠΗΓΗ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	0.18	7.6	0.15	1.56	-0.005	18.9	2.28	0.09	0	3.65	94.9	0.16	1205	10.77	0.7	0.05	0.06	2.89	78.52	5.84	0.75	0.43	0.26	0.12			
427ΔΠ051205	ΜΑΚΡΥΣΙ	ΑΡΚΑΔΙΑ	0.26	6.2	0.13	1.43	-0.003	17.1	2.53	0.06	0.06	3.1																	

7.2.4. Εκχύλιση ελαιολάδου

Ποσότητα 1,000 g ελαιολάδου εκχυλίζεται με δύο κλάσματα, όγκου 0,500 mL το κάθε ένα, μίγματος μεθανόλης:νερού 80:20 (ο:ο). Μετά τον διαχωρισμό του λιπαρού κλάσματος, με φυγοκέντριση για 5 min στις 5.000 rpm, τα δύο υδρόφιλα εκχυλίσματα ενώνονται. Ο τρόπος αυτός της εκχύλισης εφαρμόστηκε για τις μεθόδους DPPH και ABTS.

7.2.5. Μέθοδος DPPH στο ολικό κλάσμα και στο μεθανολικό εκχύλισμα

Παρασκευάζεται ημερησίως διάλυμα εργασίας της σταθερής ρίζας DPPH, συγκέντρωσης $1,3 \times 10^{-4}$ M σε οξικό αιθυλεστέρα. Το διάλυμα αυτό, πορφυρού χρώματος, έχει απορρόφηση περίπου ίση με 1,2 μονάδες απορρόφησης στα 515 nm. Όγκος 4,0 mL διαλύματος DPPH προστίθεται αφενός σε ποσότητες ελαιολάδου 20, 80, 120 και 180 mg, για τη μέτρηση στο ολικό κλάσμα καθώς και σε 170 μ L μεθανολικού εκχυλίσματος. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση των μιγμάτων για λίγα δευτερόλεπτα με συσκευή ανάδευσης Vortex και στη συνέχεια η επώασή τους σε σκοτεινό περιέκτη για 1 ώρα. Η μέτρηση των απορροφήσεων γίνεται στα 515 nm με οξικό αιθυλεστέρα στην κυψελίδα αναφοράς. Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο ελαιόλαδο ή εκχυλίζονται στο μεθανολικό εκχύλισμα, καταναλώνουν την ρίζα DPPH, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματός της. Η ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα εκφράζεται σε mmol L^{-1} ισοδύναμα γαλλικού οξέως ανά kg ελαιολάδου (Gallic Acid Equivalents, GAE). Για τον υπολογισμό της TAC στο ολικό κλάσμα λαμβάνεται υπόψη για κάθε δείγμα η ποσότητα εκείνη του ελαιολάδου που μειώνει την αρχική απορρόφηση του διαλύματος DPPH κατά 50%, IC_{50} . Στο παράρτημα I παρατίθενται τα αποτελέσματα της μέτρησης με την μέθοδο DPPH για τα 50 δείγματα του ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν.

7.2.6. Μέθοδος ABTS στο μεθανολικό εκχύλισμα

Η μέθοδος ABTS έχει περιγραφεί από την Pellegrini και τους συνεργάτες της [67]. Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος τροποποιείται αλλάζοντας το οξειδωτικό αντιδραστήριο από υπερθειικό κάλιο σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και καταλύτη το ένζυμο υπεροξειδάση HRP. Αρχικά, παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης ABTS, H_2O_2 και HRP σε συγκεντρώσεις 20, 20 mM και 55,5 IU mL^{-1} , αντίστοιχα, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών συγκέντρωσης 0,02

M και pH 4,6. Τα διαλύματα αυτά είναι σταθερά για περισσότερο από ένα μήνα, όταν διατηρούνται στους 4°C, απουσία φωτός. Το διάλυμα εργασίας της ρίζας ABTS^{•+} παρασκευάζεται με ανάμιξη ορισμένων όγκων από τα διαλύματα παρακαταθήκης ABTS, H₂O₂ και HRP, και συγκεκριμένα 16, 0,16 και 5,4 mL, αντίστοιχα, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Ο σχηματισμός της ρίζας ολοκληρώνεται μετά από 3 ώρες παραμονής του μίγματος στο σκοτάδι. Επιλέχθηκε περίσσεια κατά 50 φορές του αντιδραστηρίου ABTS έναντι του H₂O₂ με σκοπό την αναστολή πιθανών αντιδράσεων των αντιοξειδωτικών με τυχόν ελεύθερο H₂O₂ [90]. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται με μεθανόλη. Το χρονικό διάστημα για την ολοκλήρωση της αντίδρασης προσδιορίστηκε πειραματικά με μετρήσεις της απορρόφησης στα 734 nm ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι την λήψη σταθερής τιμής. Το κυανοπράσινο διάλυμα εργασίας της ABTS^{•+} περιέχει 1,6 mM ABTS και 1,6 mM ABTS^{•+} και έχει απορρόφηση περίπου 1,2 μονάδες. Σε ποσότητες 20, 100, 180 και 260 μL από το κάθε εκχύλισμα ελαιολάδου, προστίθενται 4,0 mL διαλύματος ABTS^{•+} καθώς και μίγμα μεθανόλης:νερού 80:20 (ο:ο) μέχρι τη συμπλήρωση του όγκου στα 5,0 mL. Τα μίγματα αναδεύονται μηχανικά για λίγα s σε συσκευή ανάδευσης vortex και ακολούθως αφήνονται στο σκοτάδι για 1 ώρα. Η τιμή της απορρόφησης μετρείται έναντι μίγματος μεθανόλης:νερού 80:20 (ο:ο). Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο μεθανολικό εκχύλισμα καταναλώνουν την ελεύθερη ρίζα ABTS^{•+} με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματός της. Η TAC εκφράζεται σε mmol L⁻¹ ισοδύναμα γαλλικού οξέως ανά kg ελαιολάδου (Gallic Acid Equivalents, GAE) και υπολογίζεται με χρήση συγκεκριμένου όγκου για το κάθε δείγμα, που προκαλεί μείωση της αρχικής απορρόφησης του διαλύματος ABTS^{•+} κατά 50%, με τη βοήθεια διαγραμμάτων απορρόφησης-όγκου εκχυλίσματος. Στο παράρτημα II παρατίθενται τα αποτελέσματα της μέτρησης με τη μέθοδο ABTS για τα 50 δείγματα του ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν.

7.2.7. Ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες

Το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες προσδιορίστηκε στα εκχυλίσματα των δειγμάτων ελαιολάδου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, όπως περιγράφεται από την Carannesì και τους συνεργάτες της [55]. Η μέθοδος τροποποιήθηκε ως

προς το χρόνο μέτρησης των διαλυμάτων μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων.

Τα διαλύματα προς μέτρηση στα 765 nm παρασκευάζονται ως εξής: σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL αναμιγνύονται 1 mL διαλύματος προτύπου γαλλικού οξέος ή 0,4 mL μεθανολικού εκχυλίσματος ελαίου, 6 mL μεθανόλης, 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και 5 mL διαλύματος Na_2CO_3 7,5%. Ο όγκος των διαλυμάτων συμπληρώνεται στα 50 mL με απιονισμένο νερό. Η εκχύλιση των φαινολών από το έλαιο γίνεται κατόπιν ανάμιξης 0,5 g δείγματος ελαίου με 0,5 mL n-εξανίου και τριπλή εκχύλιση με 0,333 mL μίγματος μεθανόλης :νερού 80:20 (ο:ο). Μετά από φυγοκέντριση για 5 min στις 5.000 rpm, συλλέγεται το μεθανολικό εκχύλισμα (κάτω φάση). Τα διαλύματα διατηρούνται στο σκοτάδι για 2 ώρες πριν την μέτρηση αντί για 24 ώρες όπως αναφέρει η πρότυπη μέθοδος.

7.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

7.3.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ενεργότητας

Υπολογίζεται η διαφορά της απορρόφησης μεταξύ του αρχικού διαλύματος της ρίζας, DPPH ή ABTS, A_0 , πριν την προσθήκη του ελαιολάδου ή του μεθανολικού εκχυλίσματος, και αυτής μετά την αντίδραση, A_{sample} , δηλαδή $\Delta A = A_0 - A_{\text{sample}}$. Βρέθηκε γραμμική σχέση μεταξύ της ΔA και της ποσότητας του ελαιολάδου και επομένως της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών του δείγματος. Από τη γραμμική αυτή σχέση, υπολογίζεται η τιμή IC_{50} για κάθε δείγμα ελαιολάδου, δηλαδή η ποσότητα εκείνη του δείγματος που προκαλεί 50% μείωση της απορρόφησης του αρχικού διαλύματος της ρίζας DPPH ή ABTS. Η τιμή IC_{50} είναι αντιπροσωπευτική για κάθε δείγμα ελαιολάδου αφού δεν εξαρτάται από την αρχική απορρόφηση του διαλύματος της ρίζας A_0 . Εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ενεργότητα κάθε δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic acid Equivalent Antioxidant Capacity, GEAC, mM Gallic acid Kg^{-1} olive oil) με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς του αντιοξειδωτικού γαλλικού οξέως.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης του γαλλικού οξέος, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την μετατροπή της μείωσης της απορρόφησης (absorbance inhibition, AI) συναρτήσεως των ισοδύναμων γαλλικού οξέος (GAE, μM), για τις μεθόδους ABTS και DPPH, είναι οι ακόλουθες:

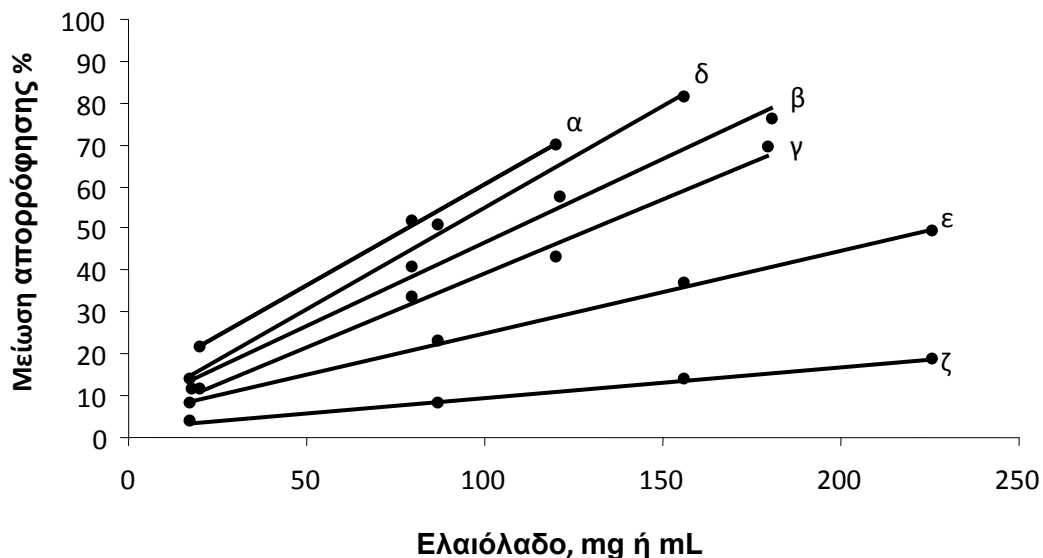
$$AI_{ABTS} \times 10^2 = (6,10 \pm 0,71) \times GAE + (6,2 \pm 4,0), r=0,997$$

$$AI_{DPPH} \times 10^2 = (6,78 \pm 0,31) \times GAE + (1,4 \pm 2,6), r=0,998$$

Η περιοχή συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος και στις δύο μεθόδους είναι 2-50 μ M.

Στο σχήμα 7.1. παρουσιάζεται αυτή η γραμμική συσχέτιση για τρία ενδεικτικά δείγματα ελαιολάδου που παρουσίασαν υψηλή (α & δ), μεσαία (β & ε) και χαμηλή (γ & ζ) τιμή TAC, κατά τη μέτρησή τους με τις μεθόδους DPPH (α, β, γ) και ABTS (δ, ε, ζ). Η τιμή της αντιοξειδωτικής ενεργότητας των δειγμάτων βρίσκεται να είναι ανάλογη με την κλίση της καμπύλης % μείωση απορρόφησης-ποσότητα ελαιολάδου.

Μέθοδοι DPPH και ABTS στο ελαιόλαδο



Σχήμα 7.1. Σχέση μεταξύ της ποσότητας σε mg ή mL ελαιολάδου και της επί τοις % μείωσης της απορρόφησης, όπως μετρήθηκε με την μέθοδο DPPH (α, β, γ) και ABTS (δ, ε, ζ) αντίστοιχα σε τρία δείγματα ελαιολάδου με υψηλή (α & δ), μεσαία (β & ε) και χαμηλή (γ & ζ) τιμή TAC. Δίνονται οι κλίσεις \pm SD και οι σταθερές συσχέτισης: (α) $7,73 \pm 0,20$, $0,9997$; (β) $6,39 \pm 0,44$, $0,995$; (γ) $5,66 \pm 0,39$, $0,995$; (δ) $7,77 \pm 0,41$, $0,998$; (ε) $3,149 \pm 0,094$, $0,9991$; (ζ) $1,159 \pm 0,046$, $0,998$.

Στον πίνακα 7.1. παρουσιάζονται οι τιμές TAC για το σύνολο των δειγμάτων ελαιολάδου που αναλύθηκαν με τις μεθόδους ABTS και DPPH. Στον

πίνακα σημειώνονται και οι αντίστοιχες ποικιλίες και περιοχές προέλευσης. Οι τιμές TAC που προσδιορίστηκαν στο μεθανολικό εκχύλισμα με τις μεθόδους ABTS και DPPH, κυμαίνονται μεταξύ 5,42 – 22,5 και 1,29 – 9,95 mM γαλλικού οξέος Kg⁻¹ ελαιολάδου, αντίστοιχα. Στο ολικό κλάσμα ελαιολάδου, οι τιμές TAC προσδιορίστηκαν στην περιοχή 77 - 177 mM γαλλικού οξέος Kg⁻¹ ελαιολάδου, με την μέθοδο DPPH. Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο DPPH είναι μεγαλύτερης τάξης μεγέθους στο ολικό κλάσμα σε σχέση με τα αποτελέσματα στο μεθανολικό εκχύλισμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ολικό κλάσμα περιέχει λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, όπως τη βιταμίνη E καθώς και άλλες τοκοφερόλες που αυξάνουν σημαντικά την αντιοξειδωτική ενεργότητα του ελαιολάδου [60].

Προσδιορίστηκε η επαναληψιμότητα των μεθόδων DPPH και ABTS. Οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης %RSD κυμαίνονται μεταξύ 2,2% και 3,5% (n=3) για τη μέθοδο DPPH στο ολικό κλάσμα και 7,0% και 9,9% για τη μέθοδο στο μεθανολικό εκχύλισμα. Η σχετική τυπική απόκλιση %RSD βρέθηκε μεγαλύτερη για την μέθοδο στο μεθανολικό εκχύλισμα γιατί περιλαμβάνει το στάδιο της εκχύλισης. Εντούτοις, η επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι ικανοποιητική. Οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης RSD, για τη μέθοδο ABTS, κυμαίνονται μεταξύ 6,9% και 9,7%.

Πίνακας 7.1. Αποτελέσματα από την εκτίμηση της TAC και του περιεχομένου φαινόλων κατά την ανάλυση δειγμάτων ελαιολάδου από διάφορες Ελληνικές περιοχές και ποικιλίες, με εφαρμογή των μεθόδων DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu

N° Δείγματος	Περιοχή	Ποικιλία	Φαινόλες ^a		TAC ^a	
			Folin-Ciocalteu	ABTS	DPPH	DPPH
				Μεθανολικό εκχύλισμα		Ολικό κλάσμα
1	Χανιά	Κορωνέϊκη	12,3	8,65	3,67	90,5
2	-/-	-/-	14,3	8,51	4,03	95,1
3	-/-	-/-	24,9	14,1	7,10	122
4	-/-	-/-	10,3	11,8	3,95	79
5	-/-	-/-	15,6	14,8	5,22	96
6	-/-	-/-	16,6	19,2	7,32	101
7	-/-	-/-	19,2	18,4	6,24	113
8	-/-	-/-	10,1	11,1	4,03	85
9	Μεσσηνία	-/-	10,0	5,71	3,06	90,2
10	-/-	-/-	7,8	5,42	2,61	83,4
11	-/-	-/-	12,1	8,23	4,10	126
12	-/-	-/-	17,0	8,77	5,35	98,3
13	-/-	-/-	10,2	6,86	2,44	96,3
14	-/-	-/-	14,4	16,1	5,92	117
15	-/-	-/-	15,3	14,7	4,86	93
16	-/-	-/-	3,8	7,28	1,29	77

17	--	--	15,3	16,5	4,51	96
18	--	Μαυρολιά	15,3	13,7	6,23	123
19	--	--	11,0	14,3	5,13	125
20	Λακωνία	Ανάμεικτο	11,7	13,7	5,92	111
21	--	Κορωνείκη	21,1	12,1	6,44	114
22	--	Αθηνολιά	9,4	6,48	2,84	125
23	--	--	29,4	18,6	7,51	117
24	--	--	25,1	22,5	9,57	115
25	--	--	9,0	11,1	2,94	77
26	--	--	10,8	13,7	3,13	93
27	--	--	15,2	14,5	5,61	129
28	Ζάκυνθος	Κορωνείκη	13,2	10,8	5,91	122
29	--	--	24,7	17,4	9,12	119
30	--	--	19,6	13,2	6,95	117
31	--	--	22,9	17,0	9,20	118
32	--	--	8,1	10,9	3,09	96
33	--	--	7,6	11,4	3,25	86
34	--	--	14,0	13,7	4,90	99
35	Εύβοια	Μεγάρων	7,5	10,7	2,04	78
36	Πιερία	--	11,4	8,21	3,88	175
37	--	Κολίνδρου	20,3	11,7	5,79	112

38	Χαλκιδική	Χαλκιδικής	26,2	22,1	9,95	110
39	-//-	-//-	16,0	17,1	5,58	94
40	-//-	Πρασινολιά	21,5	8,75	5,16	127
41	-//-	-//-	13,8	7,01	3,28	82,6
42	Αρκαδία	Αθηνολιά	15,9	15,8	6,30	96
43	Ηράκλειο	Κορωνείκη	24,1	15,3	8,72	131
44	-//-	-//-	24,2	15,5	6,26	167
45	-//-	-//-	28,0	17,3	8,71	133
46	-//-	-//-	21,9	17,7	8,92	148
47	-//-	-//-	12,0	11,9	3,21	88
48	Λέσβος	Αδραματινή	27,8	18,4	9,69	119
49	-//-	Κολοβή	17,4	11,4	4,28	177
50	-//-	-//-	12,3	14,3	4,36	90

^a mM ισοδύναμα γαλλικού οξέος kg⁻¹ ελαιολάδου

7.3.2. Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινόλες

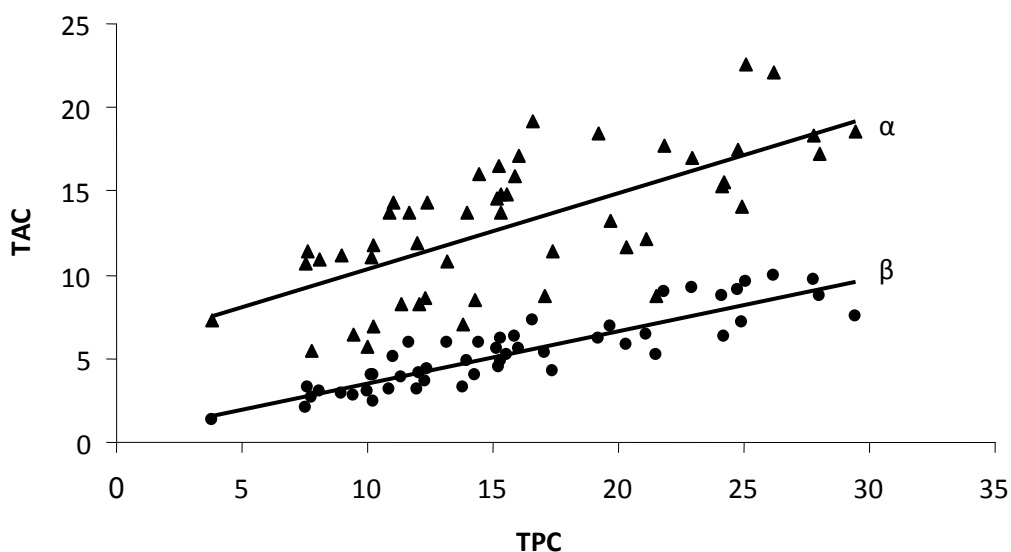
Το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες (total phenol content, TPC) εκφράζεται σε mmol L⁻¹ ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά kg ελαιολάδου. Η βαθμονόμηση έγινε με καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέως σε περιοχή συγκεντρώσεων 1 - 50 μM. Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολών είναι η ακόλουθη:

$$\text{TPC} \times 10^2 = (1,938 \pm 0,066) \times \text{GAE} + (1,8 \pm 1,7), r=0,998.$$

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων ελαιολάδου παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1. και κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 3,8 και 29,4 mM γαλλικού οξέος Kg⁻¹ ελαιολάδου. Προσδιορίστηκε η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης %RSD κυμάνθηκαν μεταξύ 6,4% και 8,8% (n=3). Το περιεχόμενο των φαινολών κυμαίνεται περίπου στην ίδια περιοχή με τα αποτελέσματα της TAC της μεθόδου ABTS.

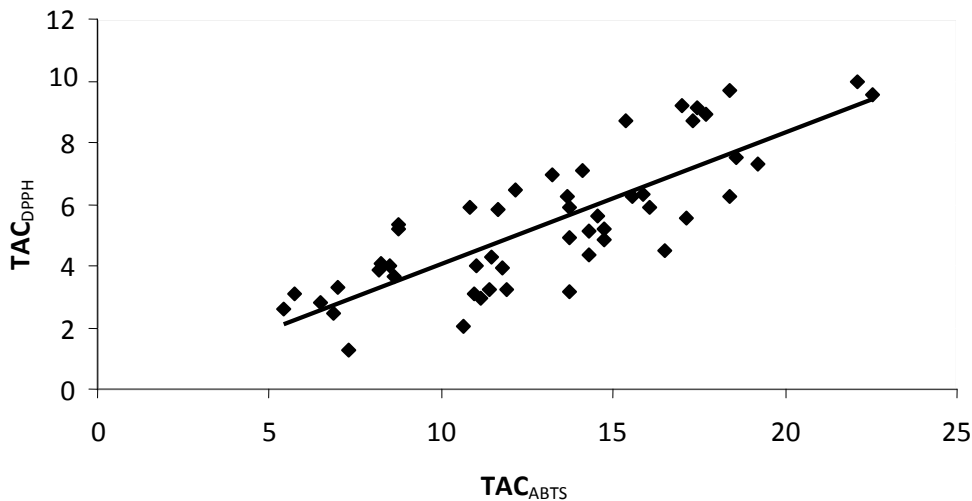
7.3.3. Συσχέτιση του ολικού περιεχομένου των φαινολών με τις TAC των μεθόδων ABTS και DPPH

Εξετάστηκε η σχέση που πιθανόν να υπάρχει μεταξύ του περιεχομένου σε φαινόλες και της αντιοξειδωτικής ενεργότητας, όπως προσδιορίστηκε με τις δύο μεθόδους. Η ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα στο υδρόφιλο κλάσμα αυξάνει ανάλογα με το περιεχόμενο σε φαινόλες στις περισσότερες περιπτώσεις, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 7.1. Στο σχήμα 7.2α φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των τιμών TAC, που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ABTS, και των τιμών TPC. Η σταθερά συσχέτισης έχει τιμή r=0,69, ενώ η κλίση της καμπύλης (α) δείχνει ότι οι τιμές TAC είναι μειωμένες κατά 54% σε σχέση με τις τιμές TPC. Υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των τιμών TAC, που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο DPPH στο μεθανολικό εκχύλισμα και των τιμών TPC. Στην περίπτωση αυτή, η σταθερά συσχέτισης παίρνει την τιμή r=0,89, ενώ η κλίση της καμπύλης (β) δείχνει ότι οι τιμές TAC είναι κατά 68% μικρότερες από ότι οι τιμές TPC (σχήμα 7.2β). Είναι φανερό ότι η μέθοδος Folin-Ciocalteu οδηγεί σε μεγαλύτερα αποτελέσματα. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα [65, 91]. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην χαμηλή εκλεκτικότητα της μεθόδου Folin-Ciocalteu, διότι στην αντίδραση μπορούν να λάβουν μέρος οποιεσδήποτε ενώσεις με υδροξυομάδες ικανές να οξειδωθούν [55, 57].



Σχήμα 7.2. Συσχέτιση μεταξύ των τιμών TAC και του περιεχομένου σε φαινόλες TPC κατά την ανάλυση 50 δειγμάτων εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Η TAC εκτιμήθηκε με την εφαρμογή των μεθόδων ABTS (α) και DPPH (β) στο μεθανολικό εκχύλισμα, ενώ οι φαινόλες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα της TAC και του TPC εκφράζονται σε mM γαλλικού οξέος kg^{-1} ελαιολάδου. Οι εξισώσεις συσχέτισης είναι: (α) $y=(0,456\pm 0,070) + (5,8\pm 1,2)x$, $r=0,69$; (β) $y=(0,315\pm 0,023) + (0,37\pm 0,39)x$, $r=0,89$.

Στο σχήμα 7.3 παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των μεθόδων DPPH και ABTS σε μεθανολικό εκχύλισμα. Η σταθερά συσχέτισης έχει τιμή $r=0,81$. Από την κλίση της καμπύλης φαίνεται ότι οι τιμές TAC που λαμβάνονται με τη μέθοδο DPPH είναι κατά 57% χαμηλότερες από τις TAC του ABTS. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην διαφορετική αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών με τις δύο ρίζες. Η σχέση μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου DPPH στο ολικό κλάσμα με τις άλλες μεθόδους στο μεθανολικό εκχύλισμα δεν είναι γραμμική. Οι σταθερές συσχέτισης είναι: $r=0,22$, με την ABTS, $r=0,50$, με την Folin-Ciocalteu, και $r=0,45$ με την DPPH.



Σχήμα 7.3. Ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα σε μεθανολικά εκχυλίσματα εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων, όπως προσδιορίστηκε με τις μεθόδους DPPH και ABTS (n=50). Οι τιμές TAC εκφράζονται σε mM γαλλικού οξέος kg⁻¹ ελαιολάδου. Η εξίσωση συσχέτισης είναι: $y=(0,428\pm0,045) - (0,22\pm0,62)$, $r=0,81$.

7.3.4. Συσχέτιση των τιμών TAC με την περιοχή και την ποικιλία προέλευσης, και με αναλυτικές παραμέτρους του ελαιολάδου

Έγινε σύγκριση των τιμών TAC και TPC μετά από ομαδοποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με την ποικιλία, την περιοχή, καθώς και με το συνδυασμό ποικιλία - περιοχή προέλευσης. Στον πίνακα 7.2. παρουσιάζονται οι σταθερές συσχέτισης μεταξύ των αποτελεσμάτων. Οι κρίσιμες τιμές ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων είναι: 0,8783 (n=5), 0,8114 (n=6), 0,7545 (n=7), 0,7067 (n=8), 0,6664 (n=9), 0,6020 (n=11), 0,3610 (n=30) για $p=0,05$ [92]. Για τις περιπτώσεις που οι σταθερές συσχέτισης είναι μεγαλύτερες από αυτές τις τιμές, υπάρχει στατιστική συσχέτιση, που σημαίνει ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των δύο μεθόδων που συγκρίνονται. Η μέθοδος DPPH στο μεθανολικό εκχύλισμα έδωσε καλές συσχετίσεις με τις μεθόδους ABTS και Folin-Ciocalteu για όλες τις περιοχές, τις ποικιλίες και τους συνδυασμούς ποικιλίας-περιοχής. Οι τιμές r κυμαίνονται μεταξύ 0,72 και 0,98. Αντιθέτως, η συσχέτιση της μεθόδου DPPH στο ολικό κλάσμα με τις υπόλοιπες τρεις μεθόδους στο μεθανολικό εκχύλισμα είναι φτωχή. Οι τιμές r κυμαίνονται μεταξύ 0,10 και 0,98,

και στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι μικρότερες των αντιστοίχων κρίσιμων τιμών. Μεταξύ των πέντε περιοχών προέλευσης, τα δείγματα από τη Λακωνία έδειξαν τις χαμηλότερες συσχετίσεις ($r: 0,11-0,87$). Οι δύο ποικιλίες, Κορωνέϊκη και Αθηνολιά, έδειξαν σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα με την μέθοδο DPPH στο ολικό κλάσμα σε σχέση με τις μεθόδους στο μεθανολικό εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα για την Αθηνολιά έδειξαν τις χαμηλότερες συσχετίσεις. Τα αποτελέσματα από τις ποικιλίες Μαυρολιά, Μεγάρων, Κολίνδρου, Χαλκιδικής, Πρασινολιά, Κολοβή και Αδραματινή δεν περιλήφθηκαν στις δοκιμές σύγκρισης, λόγω του πολύ μικρού αριθμού διαθέσιμων δειγμάτων. Συμπεριλήφθηκε η ποικιλία Αθηνολιά, παρά του μικρού αριθμού δειγμάτων, καθώς πρόκειται για μια δυναμική ποικιλία του Ελληνικού ελαιολάδου.

Οι τιμές της TAC για τα 50 δείγματα ελαιολάδου συγκρίθηκαν επίσης με έναν αριθμό αναλυτικών παραμέτρων που χαρακτηρίζουν το profile του ελαιολάδου. Οι παράμετροι αυτοί αναφέρονται στον πίνακα που παρατίθεται στο εδάφιο 7.2.3. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων TAC και TPC και των παραμέτρων αυτών.

Πίνακας 7.2. Συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των τιμών TAC των μεθόδων ABTS και DPPH με τις τιμές TPC των δειγμάτων ελαιολάδου με βάση την περιοχή, την ποικιλία και τον συνδυασμό ποικιλία-περιοχή.

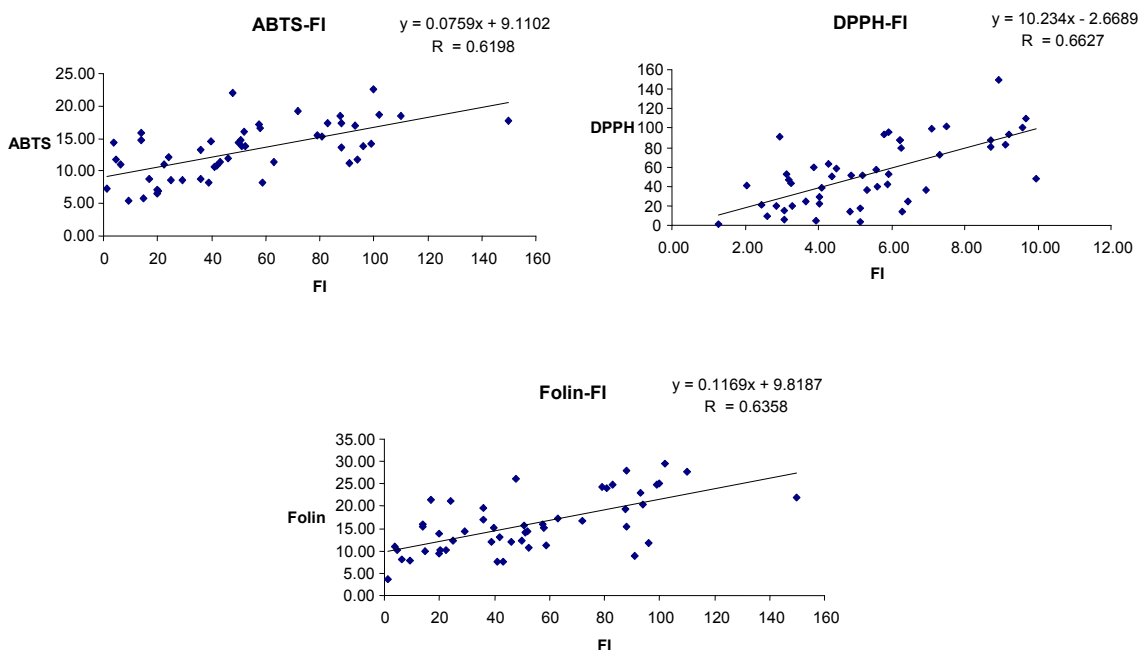
Μέθοδος	Folin-Ciocalteu	ABTS στο μεθανολικό εκχύλισμα	DPPH στο μεθανολικό εκχύλισμα	DPPH
Folin-Ciocalteu		0,52 ^{1*}	0,83 ¹	0,98 ¹
		0,63 ²	0,87 ²	0,48 ^{2*}
		0,77 ³	0,87 ³	0,39 ^{3*}
		0,90 ⁴	0,98 ⁴	0,78 ⁴
		0,83 ^{5*}	0,84 ^{5*}	0,74 ^{5*}
ABTS στο μεθανολικό εκχύλισμα	0,71 ^a		0,85 ¹	0,54 ^{1*}
	0,85 ^b		0,75 ²	0,48 ^{2*}
	0,67 ^{2a}		0,86 ³	0,11 ^{3*}
	0,85 ^{3b}		0,87 ⁴	0,48 ^{4*}
			0,91 ⁵	0,73 ^{5*}
DPPH στο μεθανολικό εκχύλισμα	0,92 ^a	0,79 ^a		0,81 ¹
	0,90 ^b	0,92 ^b		0,73 ²
	0,93 ^{2a}	0,72 ^{2a}		0,43 ^{3*}
	0,92 ^{3b}	0,92 ^{3b}		0,83 ⁴
				0,59 ^{5*}
DPPH	0,78 ^a	0,52 ^a	0,73 ^a	
	0,39 ^{b*}	0,10 ^{b*}	0,37 ^{b*}	
	0,53 ^{2a*}	0,35 ^{2a*}	0,64 ^{2a*}	
	0,39 ^{3b*}	0,13 ^{3b*}	0,42 ^{3b*}	

¹Χανιά (n=8), ²Μεσσηνία (n=11), ³Λακωνία (n=8), ⁴Ζάκυνθος (n=7), ⁵Ηράκλειο (n=5),
^aΚορωνέϊκη (n=30), ^bΑθηνολιά (n=7), ^{2a}Μεσσηνία-Κορωνέϊκη (n=9), ^{3b}Λακωνία-Αθηνολιά (n=6)

*Η συσχέτιση δεν είναι στατιστικά σημαντική και επομένως η μηδενική υπόθεση, ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων δεν μπορεί να απορριφθεί.

7.3.5. Συσχέτιση των μεθόδων ABTS, DPPH και Folin-Ciocalteu με την μέθοδο βιοφωταύγειας FI

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις δια χειρός εκτελούμενες μεθόδους ABTS, DPPH και Folin-Ciocalteu συγκρίθηκαν με την αυτοματοποιημένη μέθοδος βιοφωταύγειας FI (κεφάλαιο 5). Οι συντελεστές συσχέτισης ήταν: $r = 0,6627$ για FI-DPPH, $r = 0,6198$ για FI-ABTS και $r = 0,6358$ για FI-Folin Ciocalteu. Η συσχέτιση των μεθόδων δεν κρίθηκε ικανοποιητική. Θεωρήθηκε ως αποδεκτή η συσχέτιση με $r \geq 0,69$.



Σχήμα 7.4 Συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δια χειρός εκτελούμενων μεθόδων ABTS, DPPH και Folin-Ciocalteu με την μέθοδο βιοφωταύγειας FI

7.4. Συμπεράσματα

Παρατηρήθηκαν καλές συσχετίσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενεργοτήτων που προσδιορίστηκαν στο μεθανολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι οι δύο μέθοδοι έχουν την ίδια ικανότητα να προβλέπουν την αντιοξειδωτική ενεργότητα του ελαιολάδου. Οι υψηλές συσχετίσεις μεταξύ των μεθόδων Folin-Ciocalteu, DPPH και ABTS καταδεικνύουν ότι το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος προανίχνευσης για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε μεθανολικό εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα της

μεθόδου DPPH στο ελαιόλαδο έδειξαν φτωχή συσχέτιση με τις υπόλοιπες μεθόδους, λόγω της παρουσίας των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών συστατικών στα δείγματα. Οι τιμές TAC των ABTS και DPPH στο μεθανολικό εκχύλισμα είναι συστηματικά μικρότερες από τις τιμές της Folin-Ciocalteu.

7.5. Ήπια οξείδωση

7.5.1. Μέθοδος

Αποθηκεύτηκαν 32 δείγματα ελαιολάδου σε ορθογώνιες πλάκες μικροτιτλοδοτήσεως (microtiter plates), 96 (12 × 8) θέσεων. Μεταξύ των διαφορετικών σχημάτων του πυθμένα των κελιών, επίπεδο, V και U, επιλέχθηκε το σχήμα U. Οι διαστάσεις του κάθε κελιού είναι 6,8 × 10 mm. Το υλικό κατασκευής της πλάκας είναι το Teflon. Κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης συμπληρώνεται με 8 δείγματα ελαιολάδου, όπου ποσότητα ίση με 200 μL ελαιολάδου τοποθετείται σε 12 κελιά. Οι τέσσερις πλάκες φυλάσσονται στο σκοτάδι και σε χώρο που αερίζεται αλλά προστατεύεται από τη σκόνη του περιβάλλοντος. Κάθε μήνα γίνεται ο προσδιορισμός της τιμής TAC με την μέθοδο DPPH, όπου λαμβάνεται ποσότητα ελαιολάδου που αντιστοιχεί περίπου στην IC₅₀ συγκέντρωση του δείγματος.

7.5.2. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα TAC δίνονται στον Πίνακα 7.4. και αναφέρονται σε ισοδύναμα trolox εκφρασμένα σε mM trolox /kg ελαιολάδου (TEAC). Η εξίσωση μετατροπής της ΔA σε ισοδύναμα trolox είναι: $\Delta A = (0,023 \pm 0,003) \times TEAC + (0,0025 \pm 0,0022)$, $r = 0,9995$. Παρατηρείται ότι υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες δεν υφίσταται άμεση καταστροφή των αντιοξειδωτικών ουσιών κατά τη διάρκεια τεσσάρων μηνών. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην ποικιλότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών που περιέχονται στο ελαιόλαδο καθώς και στην διαφορετική κινητική συμπεριφορά που παρουσιάζουν. Λόγω αυτού του συμπεράσματος, η μελέτη της μεταβολής των τιμών TAC, με εφαρμογή της ήπιας οξείδωσης, σταμάτησε μετά το πέρας των τεσσάρων μηνών.

Πίνακας 7.4. Τιμές TAC προσδιοριζόμενες με τη μέθοδο DPPH συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης

Περιοχή	Ποικιλία	TAC			
		1ος Μήνας	2ος Μήνας	3ος Μήνας	4ος Μήνας
Χανιά	Κορωνέικη	272	294	263	257
Λακωνία	Αθηνολιά	254	281	252	229
Ζάκυνθος	Κορωνέικη	340	338	304	294
Εύβοια	Μεγάρων	241	267	240	212
Λακωνία	Αθην-Κορ	323	368	317	328
Ηράκλειο	Κορωνέικη	304	312	279	270
Χαλκιδική	Χαλκιδικής	289	288	254	248
Χανιά	Κορωνέικη	271	288	259	227
Λακωνία	Ανάμικτο	328	369	322	313
Ζάκυνθος	Κορωνέικη	356	375	339	322
Ηράκλειο	Κορωνέικη	412	454	406	411
Λακωνία	Αθηνολιά	502	560	494	498
Ηράκλειο	Κορωνέικη	457	454	410	401
Ηράκλειο	Κορωνέικη	384	415	368	371
Πιερία	Μεγάρων	479	358	280	265
Λέσβος	Κολοβή	485	312	283	259
Λέσβος	Αδραμαπινή	346	380	357	322
Ζάκυνθος	Κορωνέικη	315	344	316	298
Μεσσηνία	Κορωνέικη	437	469	441	441
Ζάκυνθος	Κορωνέικη	396	419	384	367
Πιερία	Κολίνδρου	326	339	304	294
Μεσσηνία	Μαυρολιά	388	353	321	306
Χανιά	Κορωνέικη	333	369	330	303
Λακωνία	Αθην-Κορ	412	464	380	401
Μεσσηνία	Κορωνέικη	240	256	232	198
Χανιά	Κορωνέικη	285	314	285	264
Ζάκυνθος	Κορωνέικη	304	335	296	285
Μεσσηνία	Κορωνέικη	311	344	310	307
Λακωνία	Αθηνολιά	385	399	351	360
Χανιά	Κορωνέικη	322	339	319	291
Λέσβος	Κολοβή	286	223	210	267
Χαλκιδική	Πρασινολιά	222	317	249	176

8. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΤΑ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

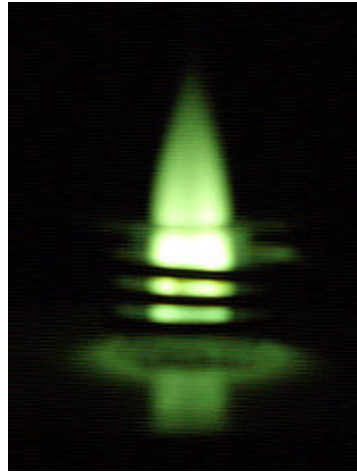
8.1. Εισαγωγή στην φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 η φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICPMS) αναπτύχθηκε ως μια από τις σπουδαιότερες τεχνικές στοιχειακής ανάλυσης, λόγω των επιτυγχανόμενων χαμηλών ορίων ανίχνευσης για τα περισσότερα στοιχεία, του υψηλού βαθμού εκλεκτικότητας και της σχετικά καλής επαναληψιμότητας και ακρίβειας [93]. Στις εφαρμογές αυτές, για την ατομοποίηση και τον ιοντισμό χρησιμοποιείται πυρσός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP). Η εισαγωγή του δείγματος σε μορφή διαλύματος επιτυγχάνεται με έναν συμβατικό ή υπερηχητικό εκνεφωτή. Για στερεά δείγματα εφαρμόζεται η αποσύνθεση του δείγματος με σπινθήρα ή λέιζερ ή η εκκένωση λάμπης. Όργανα κατάλληλα για τις τεχνικές αυτές διατίθενται στην αγορά από το 1983. Θετικά μεταλλικά ιόντα, που παράγονται σε έναν πυρσό ICP συμβατικού τύπου εισάγονται ως δείγματα με τη βοήθεια μιας διαφορικής αντλίας συνδεδεμένης με το τετραπολικό φασματόμετρο μαζών. Με τον τρόπο αυτό παράγονται φάσματα που αποτελούνται από απλές σειρές κορυφών που αντιστοιχούν στα ισότοπα των στοιχείων που υπάρχουν στο δείγμα. Τα φάσματα αυτά χρησιμοποιούνται τόσο για την ποιοτική ταυτοποίηση, όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των στοιχείων του δείγματος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται συνήθως με καμπύλες βαθμονόμησης, που αποδίδουν τον λόγο του σήματος των ιόντων του αναλύτη προς το σήμα των ιόντων ενός εσωτερικού προτύπου, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης.

8.1.1. Πλάσμα

Ως πλάσμα ορίζεται ένα αέριο, ηλεκτρικά αγώγιμο μίγμα, που περιέχει σημαντικές συγκεντρώσεις κατιόντων και ηλεκτρονίων, τέτοιες, ώστε το σύνολο να εμφανίζεται ηλεκτρικά ουδέτερο. Στο πλάσμα αργού, το οποίο είναι και το συχνότερα χρησιμοποιούμενο στις αναλύσεις εκπομπής, τα ιόντα αργού και τα ηλεκτρόνια είναι οι κύριοι φορείς ηλεκτρικού φορτίου, αν και σε μικρότερες ποσότητες είναι παρόντα στο μίγμα και κατιόντα τα οποία προέρχονται από το δείγμα. Τα ιόντα αργού, αφού σχηματίσουν το πλάσμα, είναι ικανά να

απορροφήσουν αρκετή ενέργεια από μία εξωτερική πηγή, ώστε να διατηρήσουν την θερμοκρασία σε επίπεδο, όπου περαιτέρω ιοντισμός συντηρεί την κατάσταση του πλάσματος. Οι θερμοκρασίες του πλάσματος φτάνουν έως τους 10.000 K.



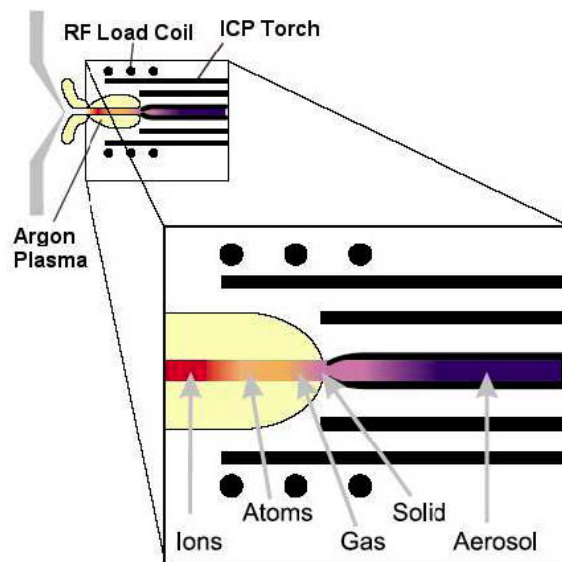
Σχήμα 8.1. Φωτογραφία ενός ICP πλάσματος καλυμμένο με πράσινο γυαλί.

8.1.2. Πηγή

Η τυπική πηγή ενός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος καλείται πυρσός (torch). Αποτελείται από τρεις ομόκεντρους σωλήνες χαλαζία μέσα από τους οποίους ρέει αέριο αργό. Ανάλογα με τον σχεδιασμό του πυρσού ο ρυθμός κατανάλωσης του αργού κυμαίνεται από 5 έως 20 L min⁻¹. Η διάμετρος του μεγαλύτερου σωλήνα είναι συνήθως 2,5 cm. Γύρω από τον εξωτερικό σωλήνα υπάρχει ένα υδρόψυκτο επαγωγικό πηνίο, το οποίο τροφοδοτείται από μία γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων ισχύος 0,2 έως 2 KW στα 27 ή 41 MHz. Στο σχήμα 8.2 παρουσιάζεται σχηματικά ο ιοντισμός του δείγματος στην πηγή ICP. Η έναρξη του ιοντισμού γίνεται με έναν σπινθήρα από πηνίο Tesla. Τα σχηματιζόμενα ιόντα και τα αντίστοιχα ηλεκτρόνια, αλληλεπιδρούν στη συνέχεια με το μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο, που παράγεται από το επαγωγικό πηνίο. Η αλληλεπίδραση αυτή αναγκάζει τα ιόντα και τα ηλεκτρόνια εντός του πηνίου να κινούνται σε κλειστές δακτυλιοειδείς διαδρομές. Λόγω αυτής της κίνησης δημιουργείται ωμική θέρμανση από την αντίσταση στην κίνηση των ιόντων και ηλεκτρονίων. Η θερμοκρασία του πλάσματος που δημιουργείται με τον τρόπο αυτό είναι πολύ υψηλή, σε σημείο που απαιτείται θερμική μόνωση του εξωτερικού κυλίνδρου χαλαζία. Η μόνωση αυτή επιτυγχάνεται με ροή αργού γύρω από τα τοιχώματα του σωλήνα. Η επαπτόμενη ροή ψύχει τα

εσωτερικά τοιχώματα του κεντρικού σωλήνα και επικεντρώνει το πλάσμα ακτινωτά.

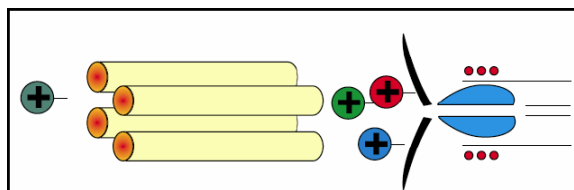
Μία πρόσφατη καινοτομία επιτρέπει την κατά 90° περιστροφή του πυρσού, ώστε να προσανατολισθεί οριζόντια με το φασματομετρικό σύστημα. Η εκπεμπόμενη από το κέντρο του πλάσματος ακτινοβολία χρησιμοποιείται στη συνέχεια για ανάλυση. Αυτή η διάταξη αποδείχθηκε ότι βελτιώνει τα όρια ανίχνευσης κατά τέσσερις έως δέκα φορές.



Σχήμα 8.2. Ο ιονισμός του δείγματος στην πηγή ICP (πηγή Perkin Elmer)

8.1.3. Τετραπολικός αναλυτής μαζών

Ο συνηθέστερος τύπος φασματομέτρου μαζών, που χρησιμοποιείται στη φασματομετρία ατομικών μαζών, είναι ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (quadropole mass analyzer), ο οποίος απεικονίζεται στο σχήμα 8.3. Το όργανο αυτό έχει μικρό μέγεθος, μικρό κόστος και είναι μηχανικά πιο ανθεκτικό από τους περισσότερους τύπους των φασματομέτρων μαζών. Έχει το πλεονέκτημα των υψηλών ταχυτήτων σάρωσης, ώστε ολόκληρο το φάσμα μαζών να λαμβάνεται σε χρόνο μικρότερο των 100 ms.



Σχήμα 8.3. Σχηματικό διάγραμμα του τετραπολικού αναλυτή (Perkin Elmer)

Καρδιά του τετραπολικού φασματομέτρου είναι οι τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδοι, οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μίας πηγής συνεχούς ρεύματος DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον, σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζονται εναλλασσόμενα ρεύματα AC, με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° . Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με αυτή τη συσκευή, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με δυναμικό από 5 έως 10V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας τον λόγο τους σταθερό. Κάποια χρονική στιγμή, όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μία συγκεκριμένη τιμή λόγου μάζας προς φορτίο, m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φθάνουν στον μεταλλάκτη μόνο τα ιόντα των οποίων οι λόγοι m/z βρίσκονται σε μία στενή περιοχή τιμών. Με τα τετραπολικά όργανα μπορούν εύκολα να διακριθούν ιόντα που διαφέρουν κατά μία μονάδα μάζας.

8.1.4. Προετοιμασία δείγματος

Πριν την εισαγωγή του δείγματος στο όργανο ICP-MS για την πολυστοιχειακή ανάλυση απαιτείται επισταμένη χώνευση της οργανικής ύλης. Στην περίπτωση του ελαιολάδου, πραγματοποιείται αποσύνθεση της λιπαρής ύλης με την οξειδωση των λιπαρών οξέων.

Ο καθαρισμός των γυάλινων αντικειμένων και του άλλου εξοπλισμού απαιτεί ξεχωριστή προσοχή όταν τα προς προσδιορισμό στοιχεία βρίσκονται σε ίχνη. Οι διαδικασίες αποσύνθεσης περιλαμβάνουν, ενδεχομένως, και επικίνδυνους χειρισμούς, συνεπώς, κάθε μέθοδος πρέπει να συνοδεύεται και από υποδείξεις ασφαλείας. Τα ανόργανα οξέα, όπως το νιτρικό οξύ, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι βοηθητικές ύλες, που χρησιμοποιούνται στην αποτέφρωση, πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, υψηλότερης εν γένει από εκείνη που αντιστοιχεί στον αναλυτικό βαθμό καθαρότητας. Ορισμένοι κατασκευαστές παράγουν χημικά αντιδραστήρια που είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για τον προσδιορισμό ιχνών βαρέων μετάλλων. Η ανάλυση περιλαμβάνει άλλωστε και τουλάχιστον τέσσερα τυφλά δείγματα, ώστε να διαπιστωθεί τόσο ο βαθμός καθαρότητας της συσκευών, δηλαδή των δοχείων χώνευσης, όσο και των αντιδραστηρίων.

Η μέθοδος χώνευσης που θα εξετασθεί είναι η χώνευση υπό πίεση. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται μόνο καταλλήλως σχεδιασμένα δοχεία και φούρνοι πίεσεως. Ειδικότερα χρησιμοποιούνται συσκευές μικροκυμάτων που έχουν σχεδιασθεί για εργαστηριακή χρήση. Ο βασικός περιορισμός της τεχνικής αυτής είναι η μικρή ποσότητα του δείγματος που μπορεί να χωνευθεί στους συνηθέστερους τύπους των διατιθεμένων στο εμπόριο οβίδων. Συνήθως τα λαμβανόμενα προϊόντα χώνευσης μπορούν να αναλυθούν μετά από αραίωση.

8.1.5. Εισαγωγή δείγματος

Το δείγμα μεταφέρεται στον πυρσό με ροή αργού 0,3 έως 1,5 L min⁻¹ μέσα από τον κεντρικό σωλήνα χαλαζία. Τα δείγματα εισάγονται στο ρεύμα αργού με πνευματική εκνέφωση (διαλύματα ή εναιωρήματα), υπερηχητική εκνέφωση (διαλύματα) ή ηλεκτροθερμική εξαέρωση (στερεά, υγρά ή διαλύματα). Οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες συσκευές έγχυσης δείγματος είναι εκνεφωτές διαφόρων τύπων, όπως συγκεντρωτικού σωλήνα, διασταυρούμενης ροής, πορώδους δίσκου και τύπου *Babington*. Η μεγαλύτερη πηγή θορύβου στην τεχνική ICP είναι το στάδιο εισαγωγής του δείγματος. Ένα τυπικό πλάσμα αποτελείται από έναν εξαιρετικά έντονο, λαμπρό-λευκό και αδιαφανή πυρήνα, που προς τα επάνω καταλήγει σε ουρά όμοια με φλόγα. Ο πυρήνας, ο οποίος προεξέχει μερικά χιλιοστόμετρα πάνω από τον σωλήνα, παρέχει ένα συνεχές φάσμα, πάνω στο οποίο υπερτίθεται το ατομικό φάσμα του αργού. Το συνεχές φάσμα προέρχεται από την επανασύνδεση των ιόντων του αργού και των άλλων ουσιών με ηλεκτρόνια. Στην περιοχή 10 έως 30 mm πάνω από τον πυρήνα, το συνεχές φάσμα εξασθενεί και το πλάσμα καθίσταται διαφανές. Οι φασματικές παρατηρήσεις γίνονται συνήθως σε ύψη 15 έως 20 mm πάνω από το επαγωγικό πηνίο. Στην περιοχή αυτή η ακτινοβολία υποβάθρου είναι απαλλαγμένη από τις γραμμές του αργού και έτσι η θέση αυτή είναι η καταλληλότερη για αναλυτικές μετρήσεις.

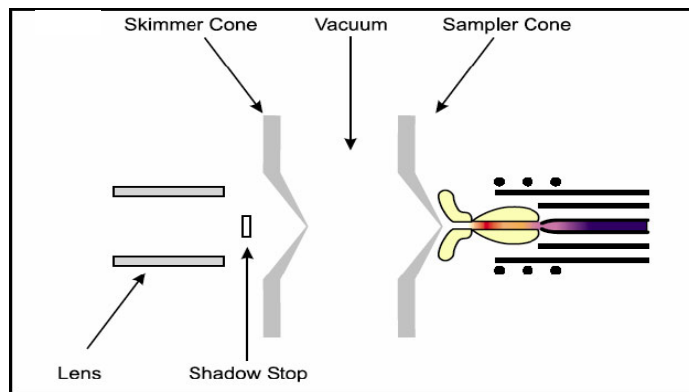
8.1.6. Δημιουργία ατόμων

Τη στιγμή που τα άτομα του δείγματος φθάνουν στο σημείο παρατήρησης, παραμένουν μόλις 2 ms σε περιοχή θερμοκρασιών 4000 έως 8000 K. Οι θερμοκρασίες αυτές είναι περίπου δύο με τρεις φορές μεγαλύτερες

από τις θερμοκρασίες που επικρατούν στις φλόγες ακετυλενίου/ υποξειδίου του αζώτου, οι οποίες χρησιμοποιούνται στις τεχνικές φλόγας. Αυτό συνεπάγεται πληρέστερη ατομοποίηση και λιγότερα προβλήματα χημικών παρεμποδίσεων. Οι παρεμποδίσεις λόγω ιοντισμού είναι μικρές ή ανύπαρκτες και αυτό οφείλεται πιθανώς στο ότι η συγκέντρωση των ηλεκτρονίων από τον ιοντισμό του αργού είναι μεγάλη σε σύγκριση με αυτή που οφείλεται στο ιοντισμό των συστατικών του δείγματος. Η ατομοποίηση πραγματοποιείται σε χημικώς αδρανές περιβάλλον, γεγονός που επιμηκύνει τη ζωή του αναλύτη εμποδίζοντας τον σχηματισμό οξειδίων. Επιπλέον, η κατανομή θερμοκρασιών του πλάσματος είναι σχετικά ομοιόμορφη, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται φαινόμενα αυτοαπορρόφησης και αυτοαντιστροφής. Έτσι συνήθως παρατηρούνται γραμμικές καμπύλες απορρόφησης για πολλές τάξεις μεγέθους συγκεντρώσεων.

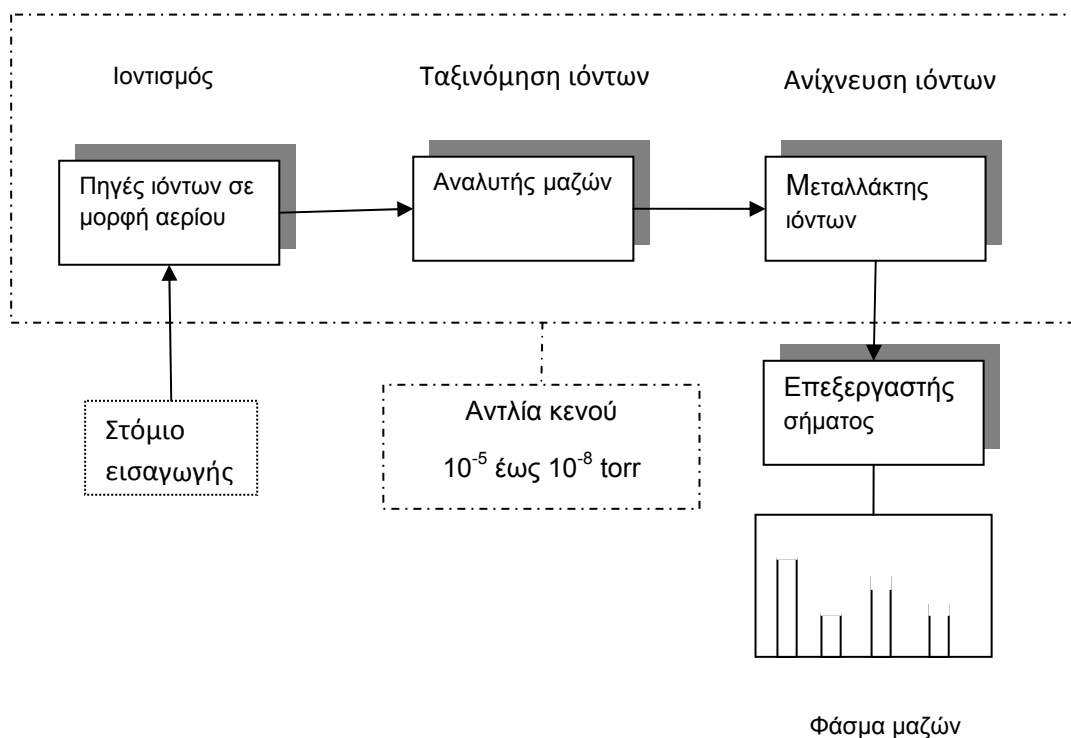
8.1.7. Οργανολογία

Κρίσιμο τμήμα του οργάνου είναι το σημείο διασύνδεσης του πυρσού ICP, ο οποίος λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση, με το φασματόμετρο μαζών, όπου η πίεση πρέπει να είναι μικρότερη των 10^{-4} torr. Η σύζευξη αυτή επιτυγχάνεται με ένα διαφορικά αντλούμενο συζεύκτη, ο οποίος αποτελείται από έναν κώνο δειγματοληψίας (sampler cone), που είναι ένας υδρόψυκτος κώνος νικελίου με ένα μικρό στόμιο ($< 1,0$ mm) στο κέντρο του (σχήμα 8.4). Το θερμό αέριο πλάσμα μεταφέρεται μέσω του στομίου σε μία περιοχή, η οποία διατηρείται σε πίεση 1 torr με μηχανική αντλία. Στην περιοχή αυτή πραγματοποιείται ταχεία διαστολή του αερίου με αποτέλεσμα την ψύξη του. Ένα κλάσμα του αερίου της περιοχής αυτής μεταφέρεται στη συνέχεια μέσω μίας μικρής οπής σε έναν δεύτερο κώνο, ο οποίος ονομάζεται αποκορυφωτής (skimmer) και στην συνέχεια σε έναν θάλαμο, ο οποίος διατηρείται στην πίεση του φασματομέτρου μαζών. Εδώ τα θετικά ιόντα διαχωρίζονται από τα ηλεκτρόνια και τα μοριακά σωματίδια με αρνητικό δυναμικό επιταχύνονται και εστιάζονται με μαγνητικό φακό ιόντων στο στόμιο εισόδου ενός τετραπολικού αναλυτή μαζών.



Σχήμα 8.4. Η περιοχή σύζευξης του οργάνου ICP με το MS (Perkin Elmer)

Το φασματομέτρο μαζών είναι ένα όργανο το οποίο διαχωρίζει ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση τον λόγο μάζα προς φορτίο, m/z . Τα περισσότερα ιόντα που εξετάζονται είναι μονοφορτισμένα επομένως ο λόγος αυτός ισούται απλά με τη μάζα του ιόντος. Στο σχήμα 8.5 φαίνεται ένα συνοπτικό διάγραμμα ενός φασματομέτρου μαζών.



Σχήμα 8.5. Συνοπτικό διάγραμμα ενός φασματομέτρου μαζών

Ο ρόλος του σημείου εισόδου (στόμιο εισαγωγής) είναι η εισαγωγή μικροποσότητας δείγματος στην πηγή ιόντων, όπου οι ενώσεις του δείγματος μετατρέπονται σε αεριώδη ιόντα μετά από βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια,

φωτόνια, ιόντα ή μόρια. Εναλλακτικά ο ιοντισμός μπορεί να επιτευχθεί με θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια. Από την πηγή ιόντων εξέρχεται ένα ρεύμα θετικών, συχνότερα, ή αρνητικών ιόντων σε αεριώδη κατάσταση, τα οποία επιταχύνονται προς τον αναλυτή μαζών. Ο ρόλος του αναλυτή μαζών είναι ανάλογος με αυτόν του μονοχρωμάτορα στα οπτικά φασματομέτρα. Στον πρώτο η διασπορά βασίζεται στον λόγο μάζας-προς-φορτίο των ιόντων του αναλυτή και όχι στο μήκος κύματος των φωτονίων. Ένα φασματομέτρο μαζών περιλαμβάνει έναν μεταλλάκτη που μετατρέπει την ιοντική δέσμη σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο μπορεί να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία, να αποθηκευθεί στην μνήμη ενός υπολογιστή και να παρουσιασθεί ή να καταγραφεί με διάφορους τρόπους. Οι μεταλλάκτες είναι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές και διακρίνονται σε εκείνους διακριτών δυνάδων και συνεχούς δυνάδου. Οι διακριτών δυνάδων έχουν σχεδιασθεί για την ανίχνευση θετικών ιόντων. Κάθε δυνάδος βρίσκεται σε υψηλότερο δυναμικό από την προηγούμενη. Η κάθοδος και οι πολλαπλές δυνάδοι έχουν επιφάνειες Cu/Be από τις οποίες εκπέμπονται ριπές ηλεκτρονίων όταν προσκρούουν σε αυτές ιόντα ή ηλεκτρόνια υψηλών ενεργειών. Υπάρχουν ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές ακόμα και με 20 δυνάδους, οι οποίοι παρέχουν τυπικές ενισχύσεις ρεύματος της τάξης των 10^7 .

Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής συνεχούς δυνάδου έχει σχήμα τρομπέτας και κατασκευάζεται από ύαλο υψηλής περιεκτικότητας σε μόλυβδο. Κατά μήκος του εφαρμόζεται δυναμικό 1,8 έως 2,0 kV. Ιόντα, τα οποία προσκρούουν στην επιφάνεια κοντά στην είσοδο, εκβάλλουν ηλεκτρόνια τα οποία στη συνέχεια αναπηδούν κατά μήκος της επιφάνειας προκαλώντας την αποδέσμευση περισσότερων ηλεκτρονίων μετά από κάθε πρόσκρουση. Τα φασματομέτρα μαζών απαιτούν ένα πολύπλοκο σύστημα παραγωγής κενού για διατήρηση της πίεσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλα τα τμήματά του, εκτός από το τμήμα επεξεργαστή σήματος και το σύστημα ανάγνωσης και καταγραφής. Μεταλλάκτες αυτού του τύπου παρέχουν ενίσχυση του ρεύματος της τάξης των 10^5 έως και 10^8 .

Στις προδιαγραφές απόδοσης ενός τυπικού εμπορικού φασματομέτρου μαζών εξοπλισμένου με πυρσό ICP αναφέρονται περιοχή μαζών 3 έως 300, δυνατότητα διάκρισης ιόντων που διαφέρουν κατά μία μονάδα λόγου m/z και δυναμική περιοχή σήματος 6 τάξεων μεγέθους. Με αυτόν τον τύπο οργάνου έχουν μετρηθεί πάνω από το 90% των στοιχείων του περιοδικού πίνακα. Οι

χρόνοι μέτρησης είναι 10 s για κάθε στοιχείο και τα όρια ανίχνευσης βρίσκονται στην περιοχή 0,1 έως 10 ppb. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις στο μέσο της καμπύλης αναφοράς είναι 2% έως 4%. Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε σύζευξη συστήματος δειγματοληψίας λέιζερ με ICPMS για την στοιχειακή ανάλυση στερεών δειγμάτων. Στα όργανα αυτά, που απαιτούν ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, δέσμες παλμικού λέιζερ πυκνότητας ισχύος $10^{12} \text{ W cm}^{-2}$ εστιάζονται σε επιφάνεια μερικών τετραγωνικών μικρομέτρων του στερεού δείγματος. Ακτινοβολίες υψηλής έντασης εξαερώνουν ταχύτατα τα περισσότερα υλικά, ακόμα και τα πιο δύστηκτα.

8.1.8. Φασματοσκοπικές Παρεμβολές

Φασματοσκοπικές παρεμβολές προκύπτουν όταν ένα ιοντικό σωματίδιο στο πλάσμα έχει τον ίδιο λόγο m/z με το ιόν του αναλύτη. Διακρίνονται οι εξής κατηγορίες:

- **Ισοβαρικές παρεμβολές.** Ισοβαρικά σωματίδια είναι δύο στοιχεία με ισότοπα, που έχουν ουσιαστικά την ίδια μάζα. Για τη φασματομετρία ατομικών μαζών με τετραπολικό φασματόμετρο μαζών, ισοβαρικά σωματίδια είναι ισότοπα, που διαφέρουν ως προς τη μάζα τους λιγότερο από μία μονάδα. Τα περισσότερα στοιχεία του περιοδικού πίνακα διαθέτουν ένα, δύο, ή και τρία ισότοπα, για τα οποία δεν παρουσιάζονται ισοβαρικές επικαλύψεις. Εξαιρεση αποτελεί το ίνδιο, το οποίο αποτελείται από δύο σταθερά ισότοπα τα $^{113}\text{In}^+$ και $^{115}\text{In}^+$. Το πρώτο ισότοπο επικαλύπτεται από το $^{113}\text{Cd}^+$ και το δεύτερο από τον $^{115}\text{Sn}^+$. Συνήθως ισοβαρική παρεμβολή παρουσιάζεται στα ισότοπα μεγαλύτερης φυσικής αφθονίας και επόμενως στην πιο ευαίσθητη κορυφή. Για παράδειγμα, η πολύ έντονη κορυφή του $^{40}\text{Ar}^+$ επικαλύπτει την κορυφή του πιο άφθονου ισότοπου $^{40}\text{Ca}^+$ (97%) καθιστώντας αναγκαία τη χρήση της κορυφής του αμέσως λιγότερο άφθονου ισότοπου $^{44}\text{Ca}^+$ (2,1%). Σε άλλο παράδειγμα το πιο άφθονο ισότοπο του νικελίου $^{58}\text{Ni}^+$ παρεμβολίζεται από την ισοβαρική επικάλυψη του $^{58}\text{Fe}^+$. Η παρεμβολή αυτή μπορεί να διορθωθεί με μέτρηση της κορυφής του $^{56}\text{Fe}^+$. Από τον λόγο των φυσικών αφθονιών των ισότοπων $^{56}\text{Fe}^+$ και $^{58}\text{Fe}^+$ μπορεί να υπολογισθεί η συνεισφορά του Fe στην κορυφή $m/z=58$ και να γίνει η σχετική διόρθωση. Επειδή οι ισοβαρικές επικαλύψεις είναι ακριβώς προβλέψιμες από τους πίνακες φυσικής αφθονίας των ισότοπων, μπορούν να πραγματοποιηθούν διορθώσεις με χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Σε ορισμένα σύγχρονα όργανα οι διορθώσεις αυτές πραγματοποιούνται αυτόματα.

- Παρεμποδίσεις πολυατομικών ιόντων. Ένα σοβαρότερο πρόβλημα παρεμπόδισης δημιουργείται από διάφορα πολυατομικά σωματίδια, που σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ σωματιδίων του πλάσματος και σωματιδίων της μήτρας του δείγματος ή της ατμόσφαιρας. Συνέπεια των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι ο σχηματισμός διαφόρων μοριακών ιόντων, τα οποία είναι δυνατόν να παρεμποδίζουν. Αυτός ο τύπος της παρεμπόδισης συναντάται συχνότερα σε περιοχές τιμών λόγου m/z μικρότερων από 82 περίπου. Μεταξύ των πιθανών παρεμποδιστών είναι τα σωματίδια $^{40}\text{Ar}^{2+}$, $^{40}\text{ArH}^+$, $^{16}\text{O}_2^+$, $\text{H}_2^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{OH}^+$, $^{14}\text{N}_2^+$. Παραδείγματα σοβαρών παρεμποδίσεων από πολυατομικά ιόντα είναι η επικάλυψη του $^{14}\text{N}_2^+$ από το $^{28}\text{Si}^+$, του NOH^+ από το $^{31}\text{P}^+$, του $^{16}\text{O}_2^+$ από το $^{32}\text{S}^+$, του $^{40}\text{ArO}^+$ από το $^{56}\text{Fe}^+$ και του $^{40}\text{Ar}_2^+$ από το $^{80}\text{Se}^+$. Μερικές από τις παρεμποδίσεις αυτές μπορούν να διορθωθούν με μέτρηση τυφλού. Σε άλλες περιπτώσεις θα πρέπει να επιλεγεί ένα διαφορετικό ισότοπο του αναλύτη.

- Παρεμποδίσεις από οξειδία και υδροξείδια. Οι σοβαρότερες παρεμποδίσεις οφείλονται στα οξειδία και υδροξείδια, που σχηματίζονται από τον ίδιο τον αναλύτη, από τα συστατικά της μήτρας, από τον διαλύτη και τα αέρια του πλάσματος. Σχεδόν όλα τα χημικά σωματίδια σχηματίζουν σε κάποιο βαθμό ιόντα MO^+ και MOH^+ , όπου το M αντιπροσωπεύει τον αναλύτη ή ένα στοιχείο της μήτρας. Υπάρχει πιθανότητα οι κορυφές ενός από τα ιόντα του αναλύτη να επικαλύπτονται από τις κορυφές των σωματιδίων αυτών. Για παράδειγμα, τα μονοφορτισμένα ιόντα των οξειδίων των πέντε φυσικών ισotόπων του τιτανίου έχουν μάζες 62 έως και 66. Οι κορυφές αυτών των ιόντων αποτελούν πιθανές παρεμποδίσεις για τις κορυφές των $^{62}\text{Ni}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$, $^{65}\text{Cu}^+$ και $^{66}\text{Zn}^+$. Προβλήματα δημιουργούνται επίσης από τα οξειδία και τα υδροξείδια των ισotόπων του ασβεστίου κατά τον προσδιορισμό πολλών μεταλλικών στοιχείων. Ο σχηματισμός ενός οξειδίου στο πλάσμα εξαρτάται από πειραματικές συνθήκες όπως η ταχύτητα ροής του εκτοξευτή, η ισχύς της ακτινοβολίας ραδιοσυχνότητας, η τοποθέτηση του αποκορυφωτή του δείγματος, το μέγεθος του στομίου εισαγωγής του δείγματος, η σύσταση των αερίων του πλάσματος, ο αποκλεισμός του οξυγόνου και το ποσοστό του απομακρυνόμενου διαλύτη. Όλες αυτές οι πειραματικές μεταβλητές μπορούν

να ρυθμιστούν ώστε να εξουδετερωθεί το πρόβλημα των επικαλύψεων από κορυφές οξειδίων και υδροξειδίων.

- **Επιδράσεις των συστατικών της μήτρας.** Οι επιδράσεις της μήτρας του δείγματος γίνονται αντιληπτές σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 500 – 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Συνήθως οι επιδράσεις αυτές μειώνουν το σήμα του αναλύτη, αν και κάτω από ορισμένες πειραματικές συνθήκες μπορεί να παρατηρηθεί και ενίσχυση του σήματος. Κάθε συστατικό του δείγματος σε υψηλή συγκέντρωση οδηγεί σε παρεμπόδιση αυτού του τύπου. Οι επιδράσεις των συστατικών της μήτρας μπορούν γενικά να ελαχιστοποιηθούν με χρήση αραιότερων διαλυμάτων, με αλλαγή της πορείας εισαγωγής του δείγματος ή με απομάκρυνση των ουσιών που προκαλούν το πρόβλημα. Επίσης, οι παρεμποδίσεις αυτές μπορούν να εξουδετερωθούν με χρήση του κατάλληλου εσωτερικού προτύπου, το οποίο θα πρέπει να είναι ένα στοιχείο με μάζα και δυναμικό ιοντισμού περίπου ίδια με εκείνα του αναλύτη.

8.2. Εφαρμογές της τεχνικής ICP-MS στον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων στο ελαιόλαδο

Η εκτίμηση του περιεχόμενου σε ιχνοστοιχεία ενός ελαιολάδου αποτελεί σημαντικό δείκτη της διατροφικής του αξίας. Τα ιχνοστοιχεία που περιέχονται σε ένα δείγμα ελαιολάδου αποτελούν σημαντικό παράγοντα χαρακτηρισμού και ανίχνευσης πιθανής νοθείας του ελαιολάδου [94]. Η παρουσία κάποιων μετάλλων στο τελικό προϊόν μπορεί να είναι επιβλαβής, ακόμα και επικίνδυνη για την υγεία του καταναλωτή, ενώ συγχρόνως δύναται να επιταχύνει τις διαδικασίες οξείδωσης, ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης της τάξεως των $\mu\text{g g}^{-1}$.

Εκτός του φυσικού περιεχόμενου, με πηγή προέλευσης κυρίως το έδαφος καλλιέργειας (σπάνιες γαίες), αλλά και την προσθήκη φωσφορικών λιπασμάτων (Ca και Al), ιχνοστοιχεία είναι δυνατόν να εισαχθούν στο ελαιόλαδο τόσο κατά τις διαδικασίες παραγωγής όσο και κατά την επαφή του με μεταλλικούς περιέκτες αποθήκευσης (Cu και Fe).

Οι πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων σε έλαια φυτικής προέλευσης είναι η φασματομετρία ατομικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission, ICP-AES) [94,95,96] και η φασματομετρία ατομικής

απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrometry, AAS) [97, 98, 99, 100], ειδικά σε συνδυασμό με φούρνο γραφίτη (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, GFAAS) [96, 101, 102]. Τα λίπη και τα έλαια αποτελούν ιδιαίτερα δύσκολα δείγματα για τον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων, καθώς πολλά από αυτά βρίσκονται σε επίπεδα χαμηλότερα των ppb. Για το λόγο αυτό η φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο, όχι μόνο εξαιτίας της μεγάλης ευαισθησίας που παρουσιάζει, αλλά και επειδή επιτρέπει μία εξαιρετικά εύκολη πολυστοιχειακή ανάλυση με μία μόνο δειγματοληψία μιας πολύπλοκης μήτρας όπως του ελαιολάδου [103-105].

Πριν την εισαγωγή του δείγματος στο πλάσμα, απαιτείται η κατεργασία του, η οποία περιλαμβάνει την υγρή, ή την ξηρή χώνευση, ή τη χώνευση με μικροκύματα, με σκοπό την μείωση της επίδρασης της οργανικής μήτρας. Η απευθείας ανάλυση παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα με σοβαρότερο αυτό της εξάλειψης του πλάσματος. Άλλη αρνητική επίδραση μπορεί να παρουσιαστεί από τη φραγή του ακροφύσιου (injector) λόγω εναπόθεσης άνθρακα, προερχόμενου από την ατελή οξειδωση της οργανικής μήτρας. Τα μειονεκτήματα αυτά αντιμετωπίζονται με την προσθήκη οξυγόνου στο πλάσμα και με μείωση της θερμοκρασίας μέσα στο θάλαμο ψεκασμού [106].

Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων αποτελεί μια εναλλακτική τεχνική για την απευθείας εισαγωγή των δειγμάτων στο ICP [95,107]. Η τεχνική αυτή απαιτεί αρκετές ρυθμίσεις και μετατροπές, ώστε να σχηματιστεί το κατάλληλο γαλάκτωμα του δείγματος μέσα στο όργανο.

Έχουν δημοσιευθεί και άλλες εναλλακτικές τεχνικές, όπως η φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με ηλεκτροθερμική συμπύκνωση [108] και η απευθείας ανάλυση φρέσκων ελαίων με συνδυασμό αποκόλλησης με laser και ICP-TOF-MS ανάλυση [109].

8.3. Χαρτογράφηση των Ελληνικών παρθένων ελαιολάδων με βάση το περιεχόμενό τους σε ιχνοστοιχεία.

Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος προσδιορισμού 15 ισοτόπων: ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{66}Zn , ^{88}Sr , ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{153}Eu , ^{164}Dy και ^{166}Er , με χρήση της τεχνικής ICP-MS, σε δείγματα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου [110]. Τα πειράματα που ακολουθούν αποσκοπούν αφενός στην εκτίμηση πιθανής συσχέτισης του περιεχόμενου σε ιχνοστοιχεία με την ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα των δειγμάτων και αφετέρου στην ανεύρεση ενός χρήσιμου εργαλείου στην ταυτοποίηση της ποικιλίας ή/και της περιοχής προέλευσης του δείγματος ελαιολάδου.

8.3.1. Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε το όργανο ICP-MS ELAN 9000 της Perkin Elmer (SCIEX, Canada). Η εισαγωγή των δειγμάτων γίνεται μέσω ενός εκνεφωτή από χαλαζία. Η ροή του δείγματος προς τον εκνεφωτή διασφαλίζεται με μία περισταλτική αντλία. Ο πυρσός είναι τύπου Fassel με ακροφύσιο (injector) από πλατίνα. Στον πίνακα 8.1 παρουσιάζονται οι πειραματικές συνθήκες και οι παράμετροι του οργάνου υπό τις οποίες εκτελέστηκε η ανάλυση.

Για την υγρή χώνευση των δειγμάτων ελαιολάδου χρησιμοποιήθηκε ο φούρνος CEM με λειτουργία μικροκυμάτων (MarsX, USA) σε υψηλή πίεση και θερμοκρασία.

Πίνακας 8.1. Πειραματικές συνθήκες και παράμετροι οργάνου ICP-MS υπό τις οποίες εκτελέστηκε η ανάλυση.

Ισχύς γεννήτριας ραδιοσυχνοτήτων (W)	950
Ροή εκνεφωτή (φέρρον αέριο) ($L \text{ min}^{-1}$)	0,78
Δυναμικό φακών (V)	5,75
Αναλογικό δυναμικό (V)	-1900
Παλμικό δυναμικό (V)	950
Κατώφλι διευκρινιστή (V)	17
Διαχωριστότητα	0,7
Ταχύτητα περισταλτικής αντλίας (rpm)	24
Σαρώσεις/ανάγνωση	60
Επαναλήψεις	3
Νεκρός χρόνος (ns)	60

8.3.2. Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε νερό αντίστροφης όσμωσης με τιμή αγωγιμότητας 18ΜΩ, από συσκευή Milli-Q της Millipore (Bedford, MA) και υπερκάθαρο νιτρικό οξύ 65% της Merck. Από δύο πολύστοιχειακά πρότυπα διαλύματα (ELAN Atomic Spectroscopy Standard Solutions) που περιέχουν τις προσδιοριζόμενες σπάνιες γαίες ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{153}Eu , ^{164}Dy και ^{166}Er , σε συγκέντρωση $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ομάδα Α) και τα υπόλοιπα στοιχεία ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{66}Zn και ^{88}Sr , σε συγκέντρωση $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ομάδα Β) σε 1% (ο/ο) HNO_3 , πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις για τις καμπύλες βαθμονόμησης. Τα δείγματα του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου προσφέρθηκαν προς ανάλυση από την ελαιοπαραγωγική εταιρία Μινέρβα Α.Ε. Ο υάλινος εξοπλισμός καθαρίζεται με παραμονή σε διάλυμα 2% (ο/ο) HNO_3 , για μία ημέρα, ξεπλένεται με υπερκάθαρο νερό και αφήνεται σε καθαρό, προστατευμένο από τη σκόνη, χώρο, να στεγνώσει.

8.3.3. Αναλυτική διαδικασία

Ζυγίζονται 0,4 g δείγματος ελαιολάδου κατευθείαν στο δοχείο χώνευσης. Η χώνευση πραγματοποιείται με προσθήκη 5,0 mL πυκνού HNO_3 65% σε κάθε

δείγμα. Το πρόγραμμα της χώνευσης [110] τροποποιημένο με τη συγχώνευση δύο σταδίων σε ένα, παρουσιάζεται στον πίνακα 8.2. Μετά την χώνευση, τα δοχεία ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρικές φιάλες των 20 mL και αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό.

Πίνακας 8.2. Πρόγραμμα χώνευσης του φούρνου CEM

Βήμα	Ισχύς (W)	Χρόνος μεταβολής (min)	Διάρκεια (min)
1	250	1	4
2	0	1	4
3	400	5	7
4	720	1	6
5	360	1	5

Θερμοκρασία: 200 °C

Μία τυπική παρτίδα ανάλυσης περιέχει τουλάχιστον 3 τυφλά δείγματα που έχουν υποστεί την ίδια πορεία ανάλυσης με τα δείγματα, καθώς και ένα τυφλό εμβολιασμένο με πρότυπο διάλυμα που περιέχει τα 15 ισότοπα. Το τυφλό δείγμα είναι διάλυμα 1% (ο/ο) HNO₃. Μετά το τέλος μιας αναλυτικής παρτίδας μετρείται ένα πρότυπο διάλυμα μέσης συγκέντρωσης της περιοχής βαθμονόμησης, για λόγους ποιοτικού ελέγχου, όπως για την εκτίμηση πιθανής ολίσθησης του οργάνου κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Προσδιορίστηκαν τα όρια ποσοτικοποίησης (Limits of Quantification, LoQs) ως το 10πλάσιο της τυπικής απόκλισης του σήματος του τυφλού, μετά από διόρθωση ως προς το βάρος και την αραιώση του δείγματος.

8.3.4. Ποσοτικός προσδιορισμός

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 15 στοιχείων στα δείγματα ελαιολάδου πραγματοποιούνται καμπύλες βαθμονόμησης πέντε σημείων. Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από διαδοχικές αραιώσεις των δύο πολυστοιχειακών διαλυμάτων παρακαταθήκης. Η περιοχή συγκεντρώσεων για την βαθμονόμηση των στοιχείων της Ομάδας Α κυμαίνεται από 1 έως 100 ng L⁻¹, ενώ της Ομάδας Β από 0,1 έως 100 µg L⁻¹. Το In και το Ge χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα αντίστοιχα.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανάκτησης με προσθήκη προτύπων διαλυμάτων σε χωνευμένο δείγμα ελαιολάδου σε συγκεντρώσεις 0,25, 0,5 και 1,0 ng L⁻¹ για την ομάδα Α και 0,125, 0,25 και 0,5 μg L⁻¹ για την ομάδα Β.

8.4. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) του προγράμματος Statistica 6.0 (StatSoft 2001 Edition). Πρόκειται για ένα εργαλείο στατιστικής που συνήθως χρησιμοποιείται για την ομαδοποίηση δεδομένων [111]. Ο κύριος στόχος της PCA είναι να μειώσει τον μεγάλο αριθμό των μεταβλητών (variables) σε έναν κατά πολύ μικρότερο αριθμό κύριων συνιστωσών (principal components, PCs), οι οποίες συλλαμβάνουν την τεράστια πλειονότητα της διαφοράς μεταξύ των δεδομένων. Με άλλα λόγια, προτίθεται να συμπιέσει την υπάρχουσα πληροφορία η οποία υπάρχει σε μια πολυφασματική εικόνα “n” καναλιών, σε λιγότερα από “n” νέα κανάλια, τα οποία είναι και τα προϊόντα του μετασχηματισμού. Μαθηματικά το πλήθος των καναλιών πριν και μετά το μετασχηματισμό θα είναι το ίδιο, αλλά θα περιέχουν μικρότερο ποσοστό πληροφορίας. Στην PCA καμία μεταβλητή δεν θεωρείται εξαρτημένη.

Χρησιμοποιείται η μέθοδος των προβολών για να εξαχθεί από ένα πλήθος μεταβλητών X ένας περιορισμένος αριθμός νέων μεταβλητών T. Τα αντικείμενα στον χώρο παρίστανται ως σμήνος σημείων σε σύστημα αξόνων n διαστάσεων. Υπολογίζεται ο μέσος όρος για κάθε μεταβλητή. Το άνωσμα των μέσων όρων είναι ένα σημείο στο χώρο. Ο μέσος όρος αφαιρείται, διαδικασία που ισοδυναμεί με μετακίνηση των συντεταγμένων, ώστε η τομή τους να αντιστοιχεί στο σημείο που ορίζεται από τους μέσους όρους των μεταβλητών. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) είναι η ευθεία στον χώρο των αρχικών μεταβλητών X που προσαρμόζει καλύτερα τα δεδομένα σύμφωνα με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η ευθεία διέρχεται από το σημείο των μέσων όρων. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2) παρίσταται πάλι με μία ευθεία στον χώρο των X, ορθογώνια στην πρώτη κύρια συνιστώσα, η οποία διέρχεται επίσης από το σημείο των μέσων όρων. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα βελτιώνει κατά το δυνατόν την προσαρμογή των X. Οι PC1 και PC2 ορίζουν νέους άξονες και σχηματίζουν νέο επίπεδο χώρο των X όπου προβάλλονται τα

αρχικά σημεία. Οι συντεταγμένες των προβολών ως προς τους νέους άξονες ονομάζονται scores και συνιστούν το άνυσμα T_i , T_1 για την PC1 και T_2 για την PC2.

Η διεύθυνση κάθε κύριας συνιστώσας καθορίζεται από τα συνημίτονα των γωνιών που σχηματίζει με τους άξονες που ορίζονται από τις κύριες μεταβλητές X . Οι τιμές αυτές δείχνουν πώς οι αρχικές μεταβλητές εμπεριέχονται στην κύρια συνιστώσα και χαρακτηρίζονται ως φορτία, loadings. Σε κάθε άνυσμα συντεταγμένων αντιστοιχεί ένα άνυσμα φορτίων P_i . Η γραφική παράσταση των συντεταγμένων T_1 ως προς T_2 απεικονίζει τα αντικείμενα όπως είναι τοποθετημένα στα επίπεδα των προβολών και δίνει πληροφορίες για τη σχέση μεταξύ των αντικειμένων, ομοιότητας, ανομοιότητας, τάσεων κλπ. Η γραφική απεικόνιση των φορτίων P_1 ως προς P_2 δίνει πληροφορίες για τη σχέση μεταξύ των μεταβλητών. Αν οι δύο απεικονίσεις τεθούν η μία επί της άλλης είναι δυνατόν να διαπιστωθεί ποιές μεταβλητές επηρεάζουν τα διάφορα σμήνη αντικειμένων (clusters) και ποιές δεν σχετίζονται με τα αντικείμενα.

8.5. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής ICP-MS παρέχει τη δυνατότητα εξαγωγής καλών αποτελεσμάτων προσδιορισμού των εξεταζόμενων ισοτόπων σε δείγματα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου επτά ποικιλιών που παράγονται σε οχτώ Ελληνικές περιοχές.

Πριν την εφαρμογή της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού, προηγείται η εφαρμογή μιας ημιποσοτικής μεθόδου, με σκοπό την εκτίμηση του είδους και της ποσότητας των περιεχόμενων στοιχείων. Η δυνατότητα της εφαρμογής αυτής της μεθόδου παρέχεται από το ίδιο το λογισμικό του συστήματος. Η ταυτοποίηση των στοιχείων πραγματοποιείται από τα φάσματα MS. Για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό τους εισάγεται ένα πολυστοιχειακό πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Προσδιορίζονται οι συντελεστές απόκρισης (response factor) κάθε στοιχείου, οι οποίοι ορίζονται ως Σήμα στοιχείου (counts) / Σήμα εσωτερικού προτύπου (counts). Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείται το In σε συγκέντρωση $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Με βάση τα αποτελέσματα της ημιποσοτικής μεθόδου επιλέγονται τα ισότοπα που είναι δυνατόν να προσδιοριστούν καθώς και οι περιοχές συγκεντρώσεών τους.

Τα αποτελέσματα της πολυστοιχειακής ανάλυσης των παρθένων ελαιολάδων ομαδοποιούνται σύμφωνα με την περιοχή και την ποικιλία προέλευσής τους και παρουσιάζονται αντίστοιχα στους πίνακες 8.3 και 8.4. Οι πίνακες δείχνουν, για κάθε στοιχείο, τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης των n δειγμάτων της ομάδας, δηλαδή της περιοχής ή της ποικιλίας. Η ποσοτικοποίηση των ισοτόπων πραγματοποιείται με την μέθοδο εσωτερικού προτύπου, όπου ο λόγος του σήματος του στοιχείου προς το σήμα του εσωτερικού προτύπου, το οποίο προστίθεται σε ποσότητα ακριβώς ίση σε όλα τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα, τίθεται σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του στοιχείου. Η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου που προστίθεται υπολογίζεται έτσι, ώστε να δίνει σήμα (counts) περίπου αντίστοιχο με το σήμα του στοιχείου σε συγκέντρωση στο μέσο περίπου της καμπύλης βαθμονόμησης. Τα αποτελέσματα που εξάγονται από την ανάλυση των ελληνικών ελαιολάδων είναι συγκρίσιμα με αυτά των ιταλικών ελαιολάδων ως προς το είδος των ισοτόπων και την περιεκτικότητά τους [111].

Οι συντελεστές συσχέτισης r στις καμπύλες βαθμονόμησης $\text{Σήμα} = (A \pm SD) \times C + (B \pm SD)$, $n=5$, κυμαίνονται από 0,997 έως 0,99998 για το σύνολο των στοιχείων, αποδεικνύοντας την γραμμική συσχέτιση του σήματος σε συνάρτηση με την συγκέντρωση. Στον πίνακα 8.5 παρουσιάζονται οι κλίσεις A , οι σταθεροί όροι B και οι συντελεστές συσχέτισης r για το σύνολο των στοιχείων που εξετάζονται.

Πίνακας 8.5. Καμπύλες βαθμονόμησης των στοιχείων

Στοιχείο	(A±SD)×10 ⁻⁴	B±SD	r
²⁵ Mg	(60±0,38)	-(50±5)×10 ⁻⁴	0,99998
⁵⁵ Mn	(1283±25)	(0,009±0,028)	0,9996
⁵⁷ Fe	(29,9±2,4)	(-14±31) ×10 ⁻⁴	0,997
⁶⁰ Ni	(208,9±5,3)	(15±69)× 10 ⁻⁴	0,9997
⁶⁶ Zn	(107±3)	-(14±32)×10 ⁻⁴	0,9997
⁸⁸ Sr	(207±31)	(0,010±0,034)	0,9998
¹¹¹ Cd	(101,6±6,2)	-0,307±0,046	0,998
¹¹⁸ Sn	(344±21)	-1,07±0,16	0,998
⁸⁹ Y	(1565±57)	-(0,47±0,33)	0,998
¹³⁹ La	(1729±66)	-0,76±0,43	0,999
¹⁴¹ Pr	(1967±49)	-0,36±0,28	0,999
¹⁵² Sm	(525±19)	-0,11±0,11	0,998
¹⁵³ Eu	(1030±18)	-0,13±0,11	0,9995
¹⁶⁴ Dy	(525±16)	-0,090±0,090	0,999
¹⁶⁶ Er	(599±13)	-0,108±0,076	0,9993

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης, καθώς και τα όρια ποσοτικοποίησης δίνονται στον πίνακα 8.6. Οι ανακτήσεις κυμαίνονται μεταξύ 92% (¹⁶⁶Er) και 118% (⁵⁷Fe), ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκαν σε τιμές μεταξύ 0,011 (¹⁶⁶Er) και 0.61 (¹¹⁸Sn) μg L⁻¹ για την ομάδα A και 0,73 (⁵⁵Mn) έως 420 (⁵⁷Fe) μg L⁻¹ για την ομάδα B.

Πίνακας 8.6. Δεδομένα για την ανάκτηση και τα όρια ποσοτικοποίησης από την ανάλυση δειγμάτων εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου

Στοιχείο	Ανάκτηση (%)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
^{25}Mg	115	5,3
^{55}Mn	108	0,73
^{57}Fe	118	420
^{60}Ni	111	2,5
^{66}Zn	113	2,7
^{88}Sr	110	1,8
^{111}Cd	105	0,37
^{118}Sn	106	0,61
^{89}Y	100	0,11
^{139}La	102	0,14
^{141}Pr	99	0,053
^{152}Sm	99	0,091
^{153}Eu	97	0,042
^{164}Dy	96	0,032
^{166}Er	92	0,011

Όπως είναι αναμενόμενο οι σπάνιες γαίες, ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{153}Eu , ^{164}Dy και ^{166}Er , περιέχονται στα δείγματα σε χαμηλότερα ποσοστά εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα μέταλλα ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{66}Zn και ^{88}Sr .

Όπως είναι γνωστό, ο προσδιορισμός κάποιων στοιχείων με την τεχνική ICP-MS, παρεμποδίζεται από πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις. Για παράδειγμα, το σήμα του σιδήρου σε m/z 56 επηρεάζεται από τα $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ και $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, το σήμα του χρωμίου σε m/z 53 επηρεάζεται από τα $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ και $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, ενώ το σήμα του αρσενικού σε m/z 75 επηρεάζεται από το $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Προσδιορίστηκε το ισότοπο του σιδήρου ^{57}Fe αντί του ^{56}Fe , ενώ τα στοιχεία Cr και As παρουσίασαν μη γραμμικές καμπύλες βαθμονόμησης, αποδεικνύοντας την ύπαρξη των συγκεκριμένων ισοβαρικών παρεμποδίσεων και έτσι ο προσδιορισμός τους αποκλείστηκε από την μέθοδο.

Πίνακας 8.3. Η επίδραση της περιοχής προέλευσης στα επίπεδα ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) των ιχνοστοιχείων στο ελαιόλαδο

Περιοχή	²⁵ Mg	⁵⁵ Mn	⁵⁷ Fe	⁶⁰ Ni	⁶⁶ Zn	⁸⁸ Sr	¹¹¹ Cd	¹¹⁸ Sn	⁸⁹ Υ	¹³⁹ La	¹⁴¹ Pr	¹⁵² Sm	¹⁵³ Eu	¹⁶⁴ Dy	¹⁶⁶ Er
Μεσσηνία (n=10)	1040±560	27±11	1790±420	337±66	1910±223	27±18	3,1±0,3	7,2±0,5	0,54±0,39	1,64±0,59	0,23±0,12	0,24±0,09	0,19±0,06	0,15±0,05	0,14±0,04
Πιερία (n=6)	1480±660	34±16	4340±360	72±4	244±42	20±3	3,7±1,7	6,2±1,8	0,41±0,02	1,25±0,48	0,26±0,06	0,26±0,01	0,18±0,02	0,16±0,01	0,13±0,01
Χαλκιδική (n=4)	960±370	19±8	1380±840	118±59	173±91	25±8	2,5±0,4	5,7±1,5	0,38±0,13	<LOQ	0,16±0,03	0,21±0,03	0,18±0,03	0,13±0,02	0,13±0,02
Λακωνία (n=8)	1550±220	23±16	2720±340	146±99	763±48	20±11	2,9±1,7	4,8±1,0	0,48±0,36	1,05±0,80	<LOQ	0,27±0,09	0,18±0,03	0,16±0,05	0,13±0,03
Ζακυνθος (n=7)	1010±510	26±10	2370±390	106±57	<LOQ	28±14	14±3	5,7±4,5	0,32±0,09	0,63±0,25	0,15±0,04	0,20±0,03	0,16±0,03	0,13±0,01	0,12±0,01
Ηράκλειο (n=5)	613±281	23±13	2100±840	<LOQ	510±44	19±15	2,4±1,7	3,8±1,4	0,28±0,05	0,45±0,10	0,14±0,02	0,19±0,04	0,16±0,05	0,12±0,02	0,11±0,01
Χανιά (n=7)	528±157	11±3	970±380	125±62	567±256	12±2	2,5±0,3	4,0±0,7	0,28±0,03	0,52±0,10	0,13±0,01	0,18±0,02	0,17±0,02	0,12±0,01	0,12±0,01
Λέσβος (n=3)	602±348	24±12	1790±820	78±43	913±10	21±8	2,8±0,2	5,8±3,9	0,33±0,05	0,62±0,09	0,15±0,02	0,19±0,04	0,16±0,06	0,13±0,02	0,12±0,01

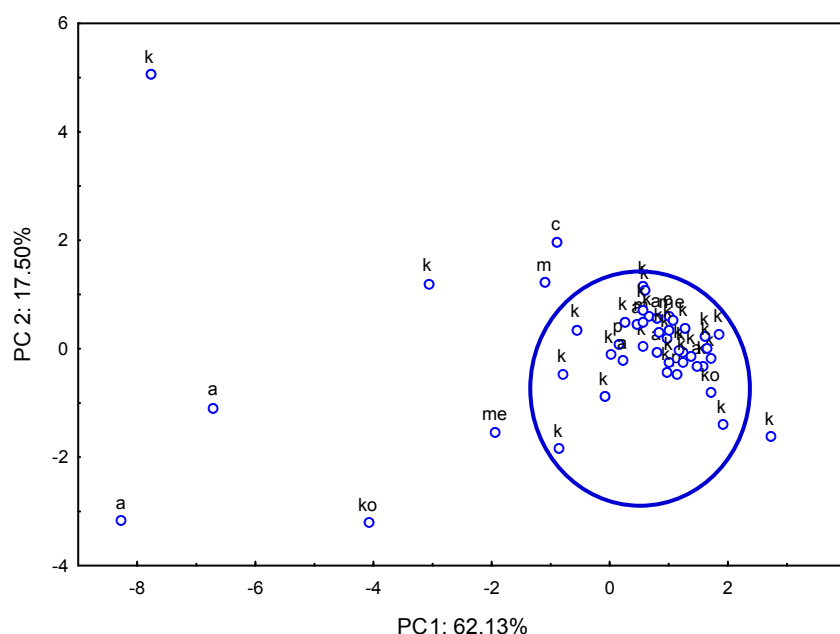
Πίνακας 8.4. Η επίδραση της ποικιλίας στα επίπεδα ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) των ιχνοστοιχείων στο ελαιόλαδο

Ποικιλία	²⁵ Mg	⁵⁵ Mn	⁵⁷ Fe	⁶⁰ Ni	⁶⁶ Zn	⁸⁸ Sr	¹¹¹ Cd	¹¹⁸ Sn	⁸⁹ Υ	¹³⁹ La	¹⁴¹ Pr	¹⁵² Sm	¹⁵³ Eu	¹⁶⁴ Dy	¹⁶⁶ Er
Κορωνέικη (n=29)	983±852	24±15	1980±290	203±39	1250±590	24±17	5,7±1,6	5,2±3,5	0,39±0,27	0,90±0,10	0,17±0,08	0,21±0,06	0,18±0,04	0,14±0,03	0,13±0,03
Μαυρολιά (n=2)	900±54	19±1	1600±320	102±874	1330±710	23±1	2,5±0,6	8,2±4,6	0,44±0,11	0,89±0,21	0,19±0,03	0,26±0,09	0,22±0,08	0,14±0,02	0,13±0,01
Μεγάρων (n=2)	1220±372	31±22	4050±450	123±63	587±122	19±5	2,3±0,5	6,3±2,2	0,36±0,08	1,1±0,8	0,22±0,13	0,24±0,05	0,18±0,01	0,15±0,02	0,13±0,01
Χαλκιδικής (n=2)	766±40	17±4	962±66	166±13	2470±150	28±3	2,6±0,5	6,3±0,7	0,47±0,15	0,75±0,18	0,17±0,05	0,23±0,03	0,19±0,05	0,15±0,01	0,13±0,03
Πρασινολιά (n=2)	1150±412	21±12	1790±450	71±34	998±551	23±13	2,3±0,3	5,1±2,1	0,29±0,04	2,7±0,3	0,14±0,01	0,18±0,01	0,17±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01
Αθηνολιά (n=7)	2360±247	32±3	4480±580	141±55	830±373	22±13	4,0±0,3	4,6±1,1	0,56±0,42	1,2±0,9	0,26±0,18	0,28±0,12	0,19±0,03	0,17±0,07	0,14±0,04
Κολοβή (n=2)	3210±334	81±58	7960±790	164±79	864±80	45±26	3,2±0,9	5,7±3,7	0,56±0,37	1,4±1,1	0,24±0,16	0,23±0,09	0,16±0,05	0,14±0,05	0,12±0,02

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας και της επαναληψιμότητας της διαδικασίας χώνευσης, ένα δείγμα ελαιολάδου υπέστη χώνευση τέσσερις φορές. Η σχετική τυπική απόκλιση κυμάνθηκε μεταξύ 0,8 (^{153}Eu) και 9% (^{25}Mg).

8.5.1. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης

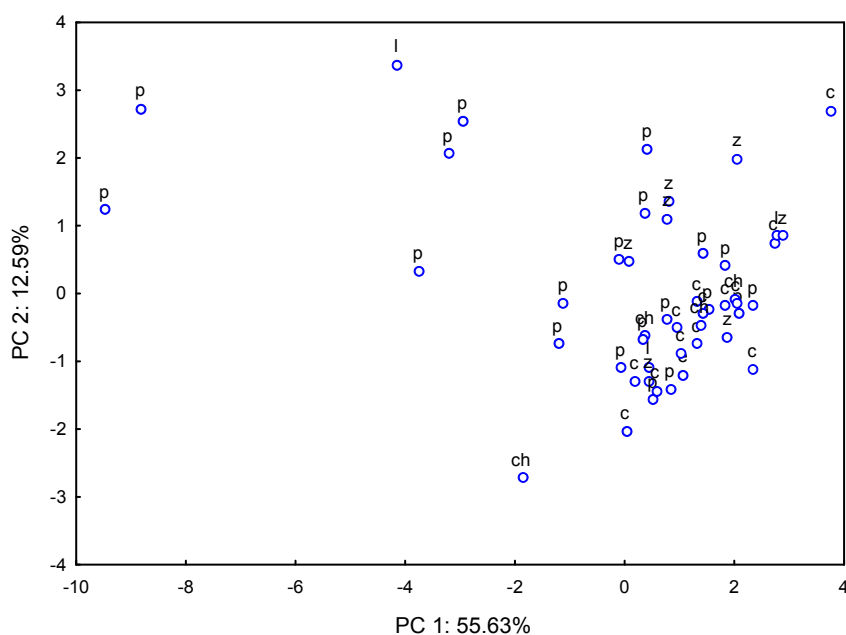
Για την διαφοροποίηση των δειγμάτων ελαιολάδου σύμφωνα με την ποικιλία, επιλέχθηκαν τα ακόλουθα ισότοπα στοιχείων: ^{25}Mg , ^{57}Fe , ^{66}Zn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{153}Eu και ^{166}Er . Στο σχήμα 8.6 εμφανίζονται τα scores για κάθε δείγμα στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες, που εκφράζουν το 79,63% της μεταβλητότητας της μήτρας δεδομένων. Είναι φανερό ότι η ποικιλία κορωνέϊκη έχει κυρίως θετικά scores στην πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1).



Σχήμα 8.6. Ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση την ποικιλία σε διάγραμμα των δύο κύριων συνιστωσών PC1 και PC2. Εμφανίζονται οι ποικιλίες: (k) κορωνέϊκη (p) πρασινολιά, (a) αθηνολιά, (ko) κολοβή, (m) μαυρολιά, (me) μεγάρων και (ch) χαλκιδικής.

Για την διαφοροποίηση των δειγμάτων ελαιολάδου σύμφωνα με την περιοχή προέλευσης, επιλέχθηκαν ομοίως τα ισότοπα των στοιχείων: ^{25}Mg , ^{57}Fe , ^{66}Zn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{153}Eu και ^{166}Er . Στο σχήμα 8.7 εμφανίζονται τα scores για κάθε δείγμα στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες, που εκφράζουν το 68,22% της μεταβλητότητας της μήτρας δεδομένων. Από το διάγραμμα αυτό δεν μπορεί να

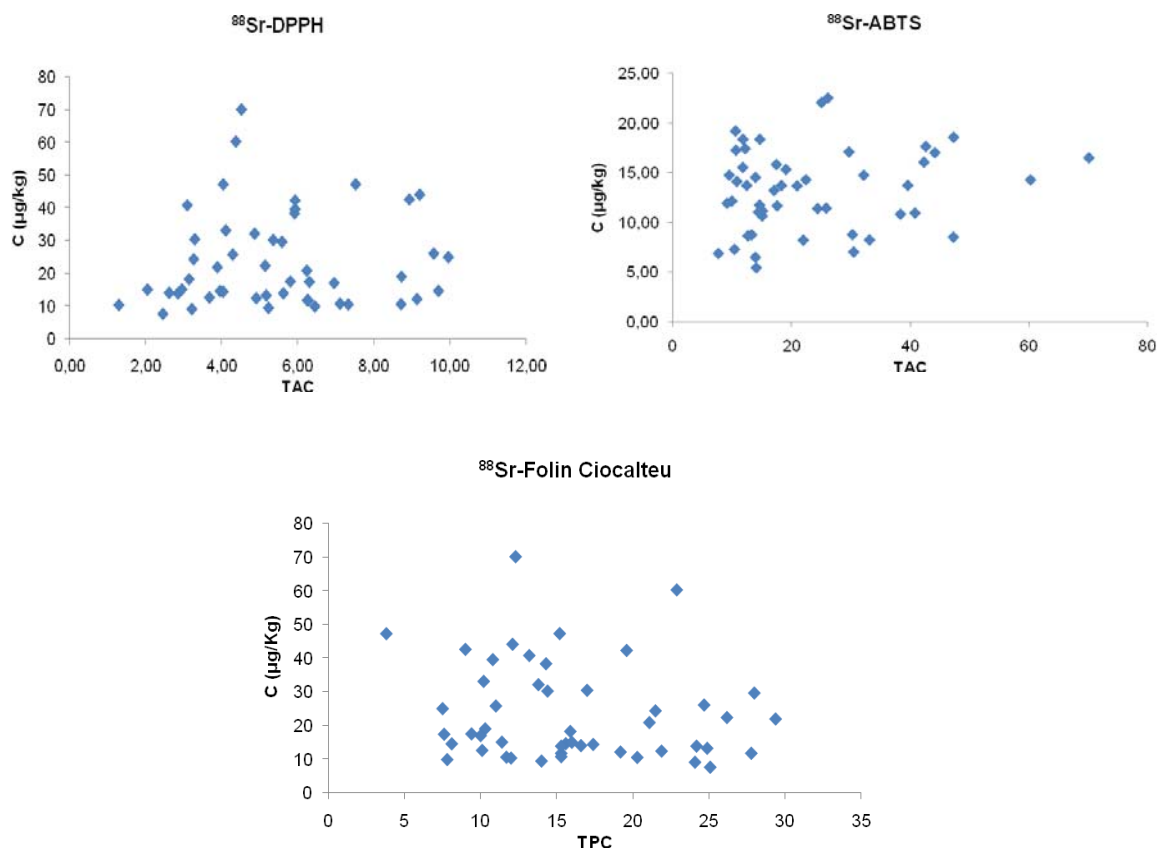
εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα ως προς μία τάση ομαδοποίησης των δειγμάτων.



Σχήμα 8.7. Αποτύπωση των δειγμάτων με βάση την περιοχή προέλευσης σε διάγραμμα των δύο κύριων συνιστωσών PC1 και PC2. Εμφανίζονται οι περιοχές: (p) Πελοπόννησος (Λακωνία και Μεσσηνία), (z) Ζάκυνθος, (ch) Χαλκιδική, (c) Κρήτη και (l) Λέσβος.

8.5.2. Συσχέτιση των περιεχόμενων ιχνοστοιχείων με τις τιμές TAC

Συγκρίθηκαν οι συγκεντρώσεις των περιεχόμενων ιχνοστοιχείων στα 50 δείγματα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου με τις τιμές ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας όπως προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu. Στο σχήμα 8.8 παρατίθενται ενδεικτικά τρία διαγράμματα της συγκέντρωσης του ισότοπου ^{88}Sr με τις τιμές TAC και TPC των μεθόδων DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα δεν εντοπίστηκε εμφανή συσχέτιση των παραμέτρων αυτών για το σύνολο των δειγμάτων ελαιολάδου που εξετάστηκαν. Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και για τα υπόλοιπα μέταλλα που μελετήθηκαν.



Σχήμα 8.8. Διαγράμματα της συγκέντρωσης του ισότοπου ^{88}Sr με τις τιμές TAC των μεθόδων DPPH και ABTS και τις τιμές TPC της μεθόδου Folin-Ciocalteu.

8.6. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν αποτελούν δεδομένα μιας πλήρους χαρτογράφησης του ελληνικού εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Το περιεχόμενο σε ιχνοστοιχεία των δειγμάτων προσδιορίστηκε ποσοτικά με μία εύκολη και γρήγορη ICP-MS μέθοδο, η οποία επιτρέπει χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση των δειγμάτων ελαιολάδου δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας και του περιεχόμενου των ιχνοστοιχείων. Επίσης, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ιχνοστοιχείων δεν οδήγησε σε ξεκάθαρη ταυτοποίηση της περιοχής και της ποικιλίας προέλευσης των δειγμάτων. Πιθανός λόγος είναι ο μικρός αριθμός αντιπροσωπευτικών δειγμάτων των υπό εξέταση περιοχών και ποικιλιών.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αναπτύχθηκαν επιτυχώς δύο πλήρως αυτοματοποιημένες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας στο ελαιόλαδο. Η μέθοδος βιοφωταύγειας, η οποία χρησιμοποιεί την αντίδραση οξειδωσης της λουμινόλης, στηρίζεται σε έναν πλήρως αυτοματοποιημένο αναλυτή FI, κατασκευασμένο στο εργαστήριο, χαμηλού κόστους, ο οποίος θα μπορούσε να αποτελέσει το πρωτότυπο για την ανάπτυξη φορητής οργανολογίας για την εκτίμηση της ποιότητας του ελαιολάδου. Η μέθοδος είναι αρκετά εύχρηστη, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα δειγματοληψίας (180 δείγματα/h). Η παρεμπόδιση από την παρουσία της μεθανόλης στον διαλύτη εκχύλισης, η οποία οφείλεται στην αργή αντίδραση με το υπεροξειδίο του υδρογόνου, αναιρείται κινητικά με τη μέτρηση του σήματος βιοφωταύγειας αμέσως μετά την ανάμιξη. Η μέθοδος απαιτεί χρόνο επαφής των αντιδραστηρίων μόλις 1 s στο σύστημα ροής.

Η δεύτερη αυτοματοποιημένη μέθοδος επιτρέπει τον απευθείας προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε εκχυλίσματα ελαίων με χρήση της μεθόδου FRAP σε συνδυασμό με την τεχνική της διαδοχικής εισαγωγής δείγματος σε ροή SI. Η μέθοδος επιτρέπει μεγάλη ταχύτητα δειγματοληψίας (90 δείγματα/h), είναι αποτελεσματική ως προς την εξοικονόμηση χρόνου και κόστους, ενώ παράλληλα δίνει τη δυνατότητα της ανάλυσης 'επί τόπου' διότι χρησιμοποιεί οργανολογία η οποία μπορεί πολύ εύκολα να γίνει φορητή. Η μέθοδος έχει καλή ευαισθησία και επαναληψιμότητα, ενώ συγκρίνεται καλά με την δια χειρός μέθοδο FRAP. Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα εκχυλίσματα τροφίμων που περιέχουν αντιοξειδωτικά, χρησιμοποιώντας το ίδιο ή διαφορετικό μέσο εκχύλισης.

Σχετικά με την εκτίμηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των μεθόδων, από την σύγκριση των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα. Η συσχέτιση των μεθόδων ABTS, DPPH και Folin-Ciocalteu με την αυτοματοποιημένη μέθοδο βιοφωταύγειας FI δεν κρίθηκε ικανοποιητική. Η μέθοδος FRAP δεν συσχετίζεται με τις υπόλοιπες μεθόδους πιθανώς διότι μετράει κατά κύριο λόγο την αναγωγική ικανότητα των αντιοξειδωτικών.

Παρατηρήθηκαν καλές συσχετίσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενεργοτήτων που προσδιορίστηκαν στο μεθανολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Οι υψηλές συσχετίσεις μεταξύ των μεθόδων Folin-Ciocalteu, DPPH και ABTS καταδεικνύουν ότι το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος προανίχνευσης για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας σε μεθανολικό εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH στο ελαιόλαδο έδειξαν φτωχή συσχέτιση με τις υπόλοιπες μεθόδους, λόγω της παρουσίας των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών συστατικών στα δείγματα. Οι τιμές TAC των μεθόδων ABTS και DPPH στο μεθανολικό εκχύλισμα είναι συστηματικά μικρότερες από τις τιμές της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Αυτό συμβαίνει διότι η μέθοδος Folin-Ciocalteu δεν είναι εκλεκτική ως προς τα αντιοξειδωτικά. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των τιμών TAC και της ποικιλίας και περιοχής προέλευσης των δειγμάτων ελαιολάδου.

Το περιεχόμενο σε ιχνοστοιχεία των δειγμάτων προσδιορίστηκε ποιοτικά και ποσοτικά με μία εύκολη και γρήγορη ICP-MS μέθοδο. Προσδιορίστηκαν χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης ενώ τα λαμβανόμενα αποτελέσματα ήταν επαναλήψιμα. Τα ισότοπα: ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{139}La , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{153}Eu , ^{164}Dy και ^{166}Er , περιέχονται στα δείγματα σε χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα μέταλλα: ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{60}Ni , ^{66}Zn και ^{88}Sr . Η σχετική τυπική απόκλιση των τιμών κυμάνθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα, ενώ αποδεκτά ήταν τα αποτελέσματα των ανακτήσεων.

Ωστόσο, δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας και του περιεχόμενου των ιχνοστοιχείων. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ιχνοστοιχείων δεν οδήγησε σε ξεκάθαρη ταυτοποίηση της περιοχής και της ποικιλίας προέλευσης των δειγμάτων. Το περιεχόμενο των αντιοξειδωτικών και των ιχνοστοιχείων στο ελαιόλαδο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες εκτός του φυσικού περιεχομένου, όπως η μέθοδος παραγωγής του ελαιολάδου, ο τρόπος μεταφοράς και αποθήκευσης κ.α. Έτσι, για να υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης πρέπει οι παράγοντες αυτοί να διατηρούνται σταθεροί σε όλα τα δείγματα. Εντούτοις, τα αποτελέσματα αποτελούν δεδομένα μιας πλήρους χαρτογράφησης του ελληνικού εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η έννοια της ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας (TAC) βρίσκει ένα πολύ ευρύ πεδίο εφαρμογών σε δείγματα που περιέχουν χημικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Εκτός από δείγματα τροφίμων και ποτών ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη καλλυντικών και φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός δημοσιευμένων μεθόδων προσδιορισμού της TAC βασιζόμενες σε διαφορετικούς μηχανισμούς και αρχές. Είναι δυνατή η τροποποίηση της χημείας, των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και αντιδραστηρίων, καθώς και των τεχνικών για την καταλληλότερη εφαρμογή τους στο δείγμα, ανάλογα με τη φύση του.

Μία πολύ ενδιαφέρουσα επέκταση των μεθόδων αυτών αποτελεί η ιδέα της αυτοματοποίησής τους. Έτσι, καθίσταται δυνατή η ταχύτατη ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με αξιοπιστία και επαναληψιμότητα. Το πλεονέκτημα αυτό βρίσκει εφαρμογή σε αναλύσεις ποιοτικού ελέγχου, ρουτίνας, αλλά και στην έρευνα. Παράλληλα, η σύγχρονη τάση της σμίκρυνσης της τεχνολογίας δίνει τη δυνατότητα της 'επί τόπου' ανάλυσης των δειγμάτων. Εκτός από τις τεχνικές FI (flow injection) και SI (sequential injection), μπορούν να εφαρμοστούν οι τεχνικές BI (bead injection) και SIC (sequential injection chromatography).

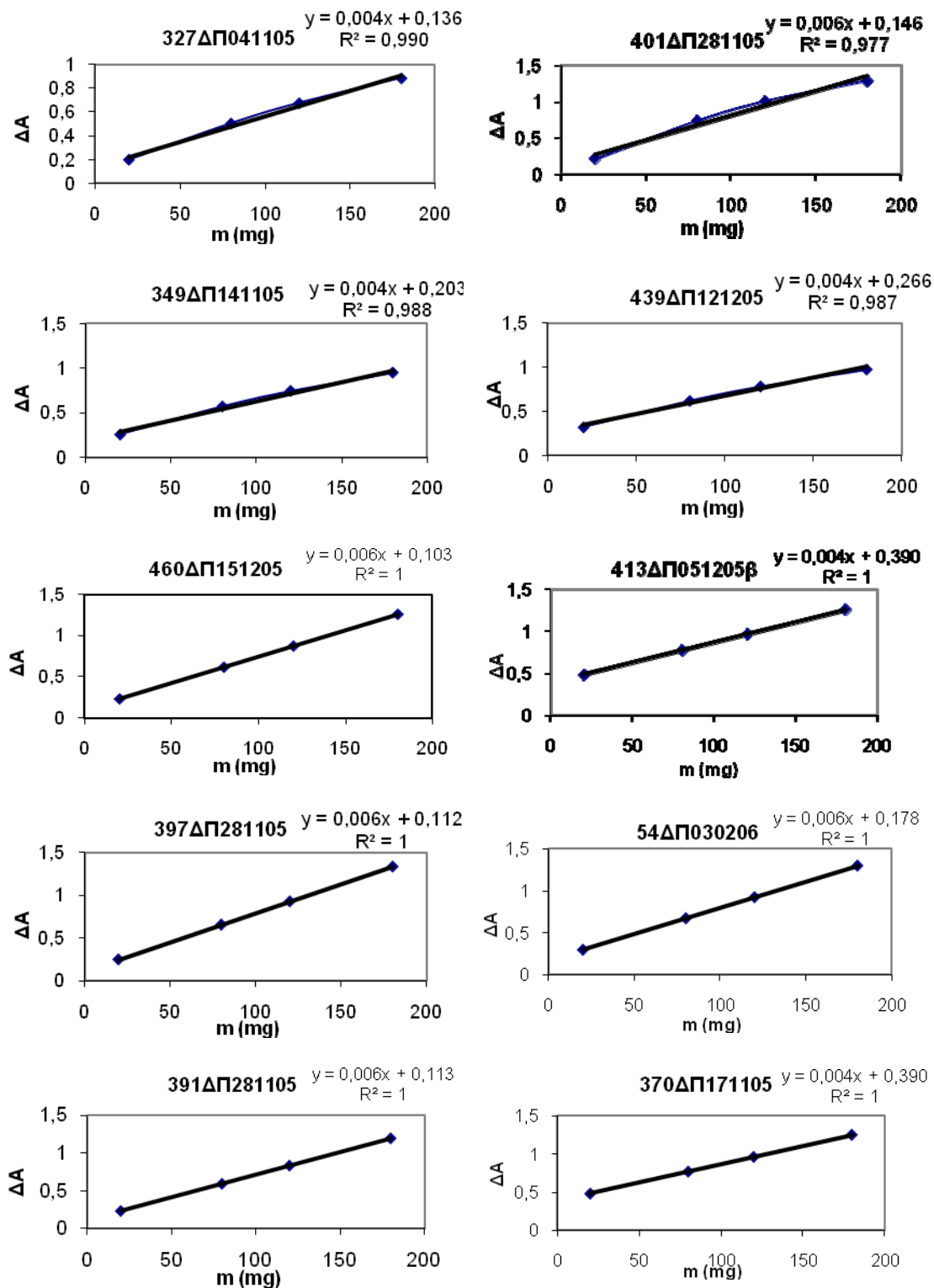
Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι δυνατόν να εφαρμοστούν αυτούσιες ή κατόπιν τροποποιήσεων σε πλήθος δειγμάτων τροφίμων διαφορετικής φύσεως, όπως σε χυμούς φρούτων, κρασί, καφέ, τσάι κ.α. Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών ουσιών γίνεται με διάφορους τρόπους και εκχυλιστικά μέσα, όπως αναφέρονται σχετικά στην βιβλιογραφία. Ιδανική αποτελεί η απευθείας ανάλυση των δειγμάτων χωρίς προκατεργασία.

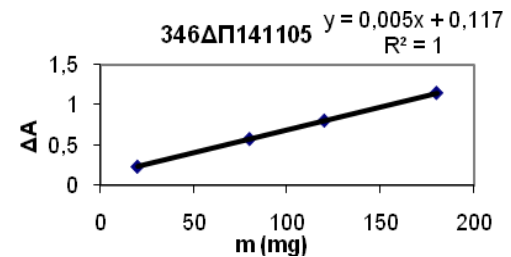
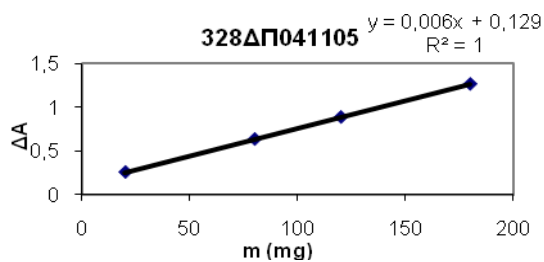
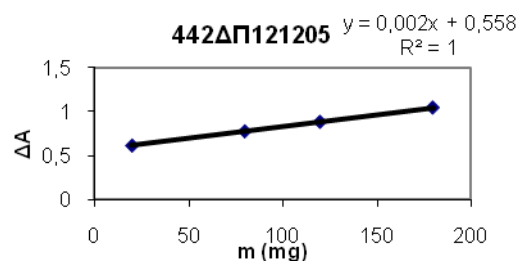
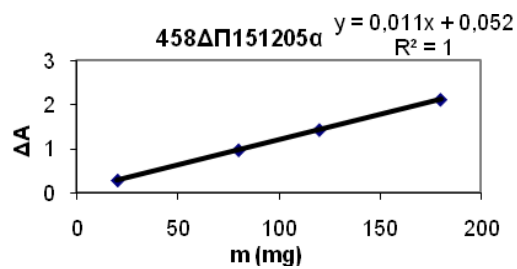
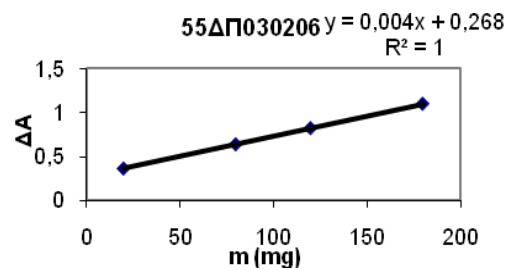
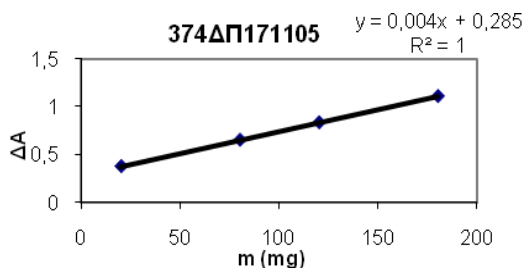
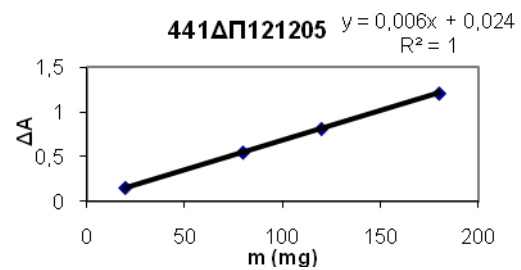
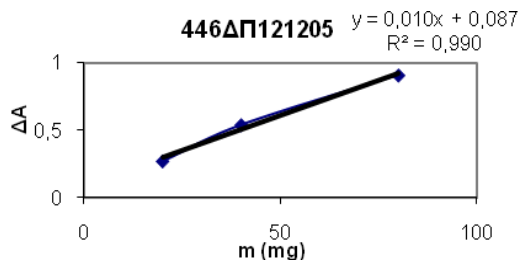
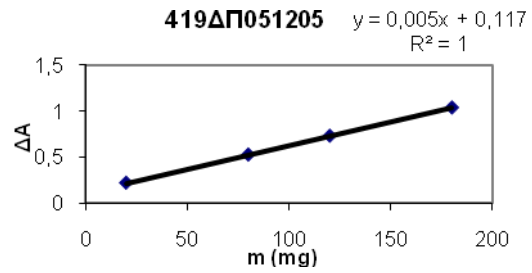
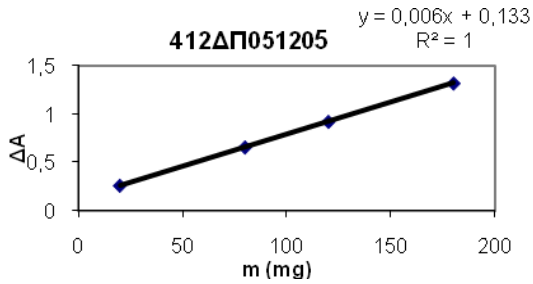
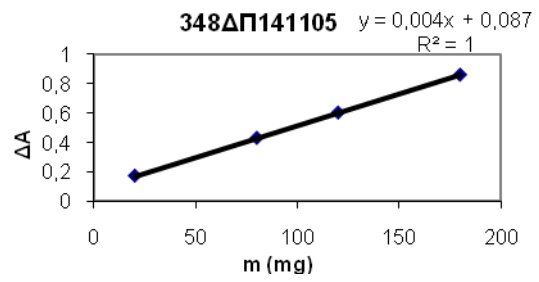
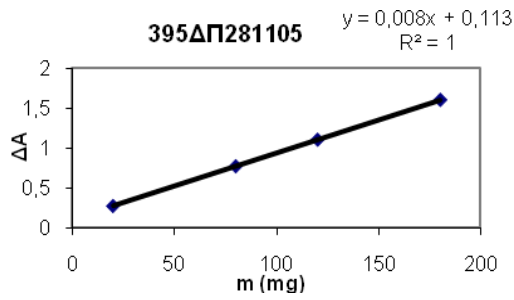
Υπάρχουν αναλυτικές μέθοδοι που θα μπορούσαν ακόμη να εφαρμοστούν για τον προσδιορισμό της TAC του ελαιολάδου. Μερικές από αυτές είναι: η ORAC (oxygen radical absorbance capacity), η αναστολή της οξειδωσης της LDL, η TOSC (total oxidant scavenging capacity), η Copper (II) reduction capacity κ.α., για τις οποίες υπάρχουν σχετικές αναφορές στη βιβλιογραφία. Πολλές από αυτές τις μεθόδους δεν έχουν αυτοματοποιηθεί ακόμα.

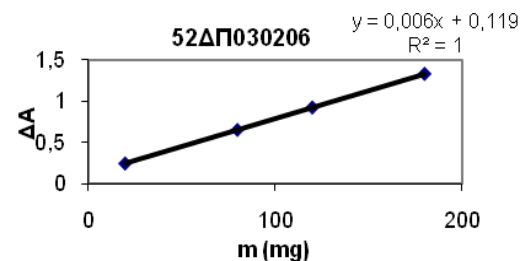
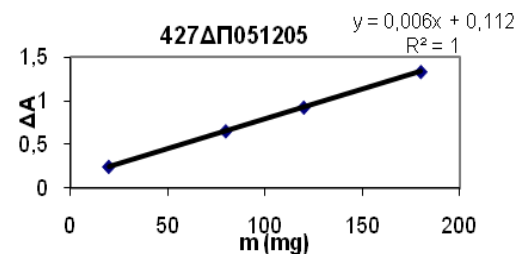
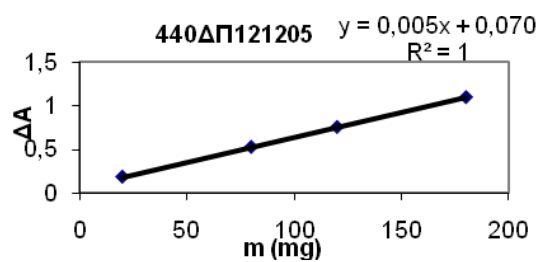
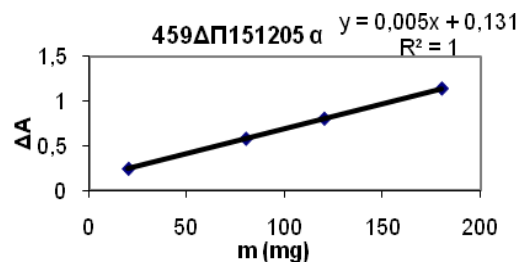
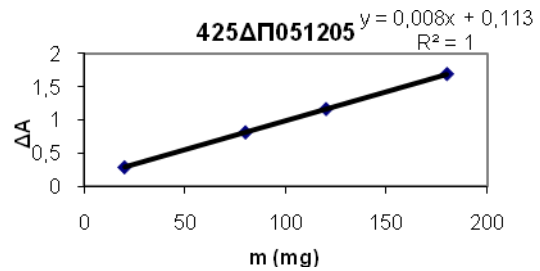
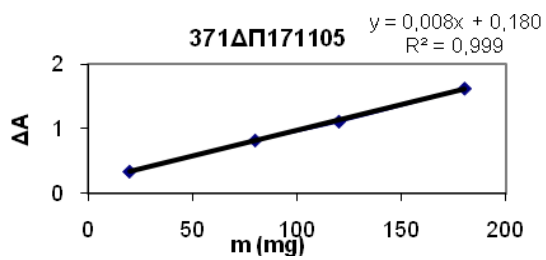
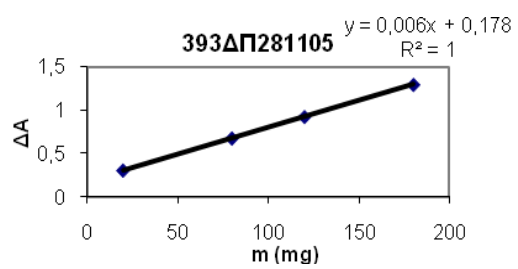
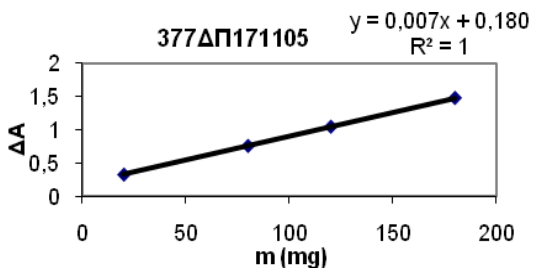
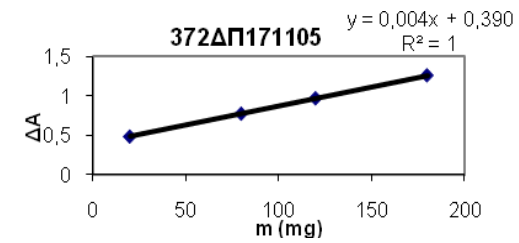
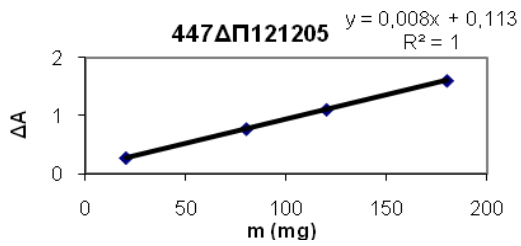
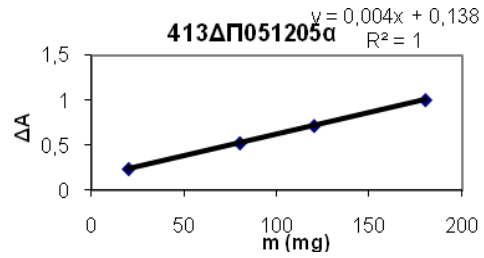
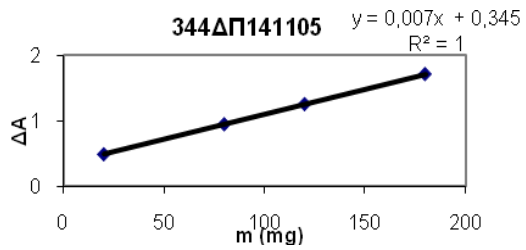
Σε ότι αφορά στον προσδιορισμό του περιεχομένου των ιχνοστοιχείων στο ελαιόλαδο και τη συσχέτισή του με την περιοχή προέλευσης, την ποικιλία, καθώς και με την ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα, είναι απαραίτητη η συλλογή μεγάλου αριθμού αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από τις εξεταζόμενες περιοχές και ποικιλίες, έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν ολοκληρωμένες ομαδοποιήσεις και πλήρεις χαρακτηρισμοί. Έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες πάνω σε αυτό το θέμα για το Ιταλικό και Ισπανικό ελαιόλαδο.

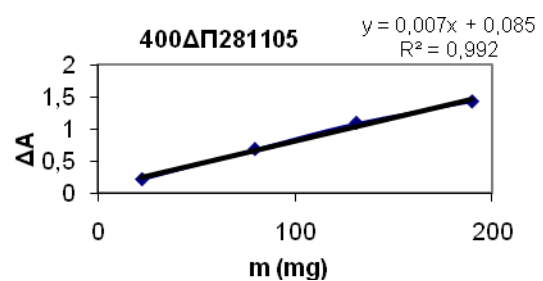
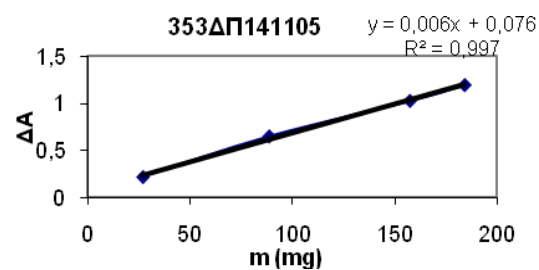
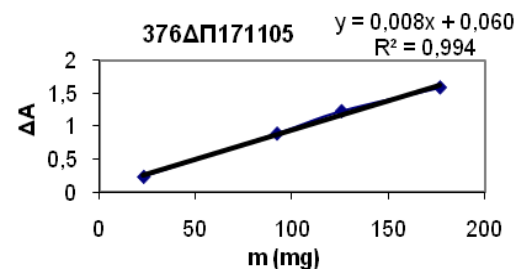
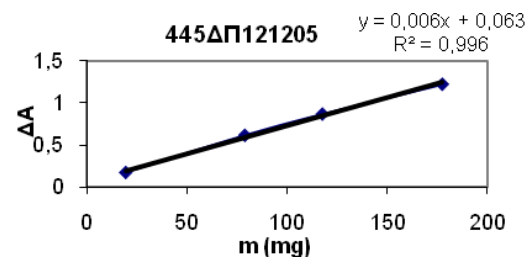
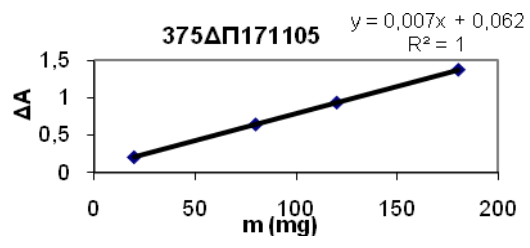
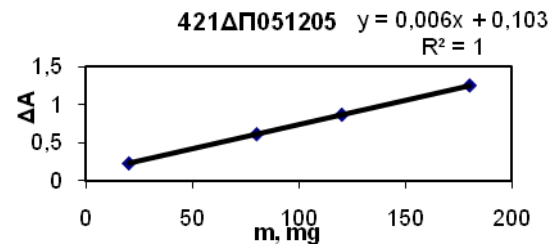
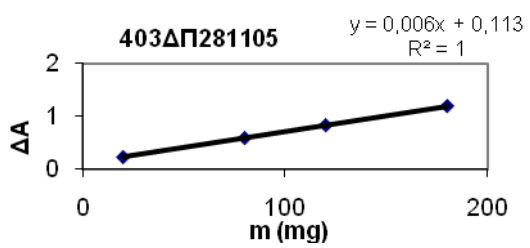
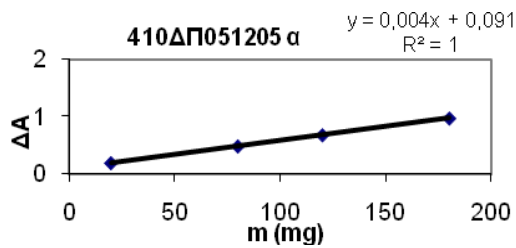
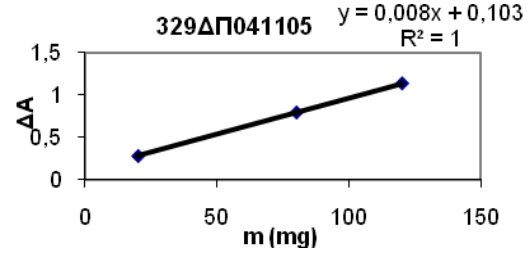
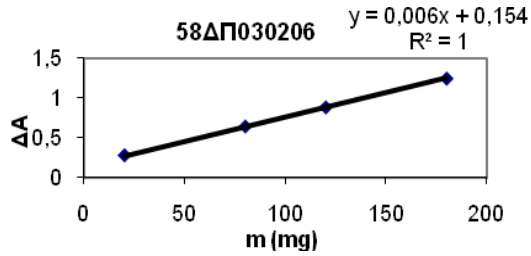
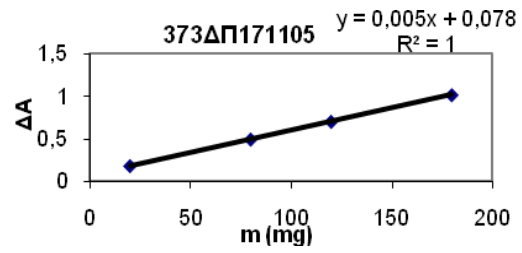
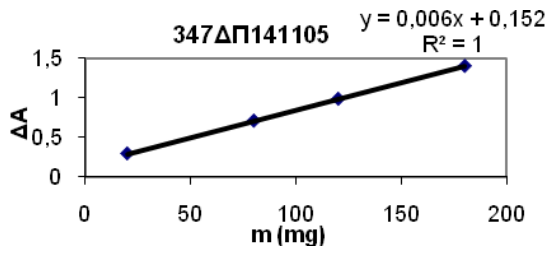
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

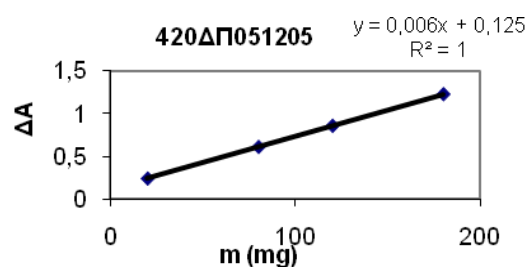
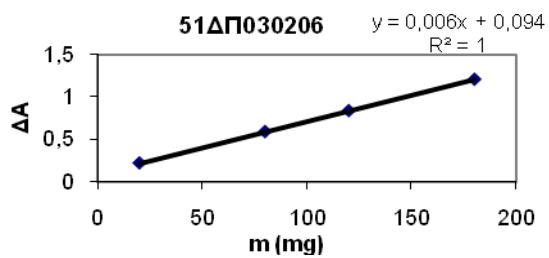
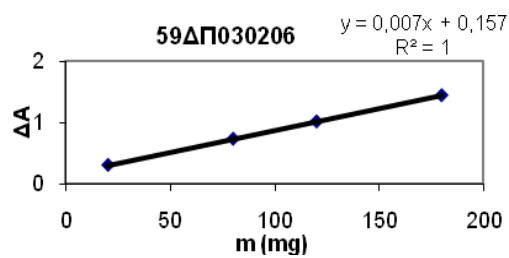
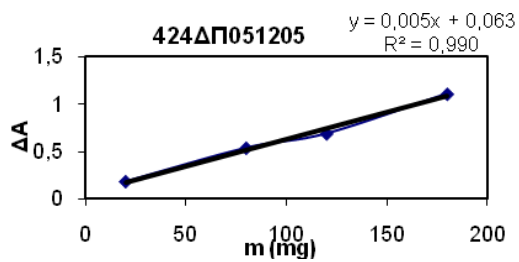
Αποτελέσματα της μέτρησης με την μέθοδο DPPH για τα 50 δείγματα του ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν





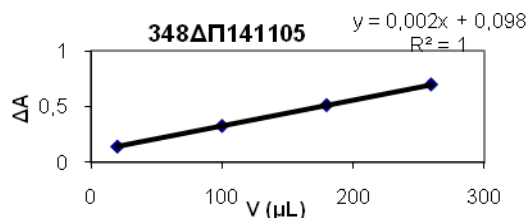
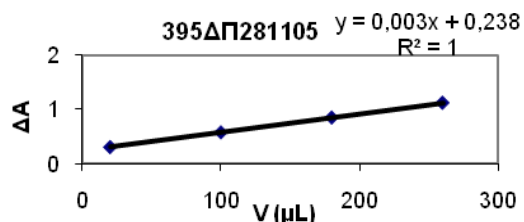
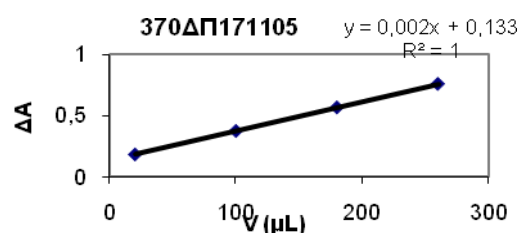
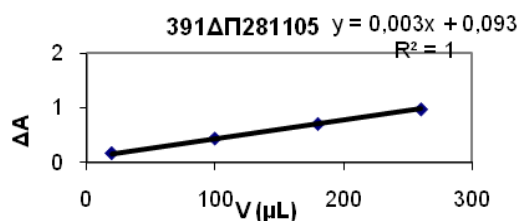
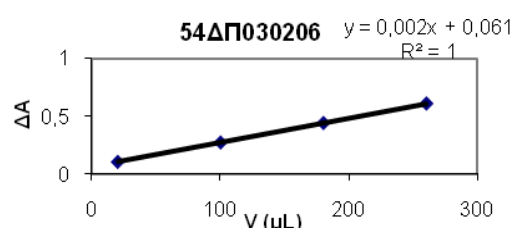
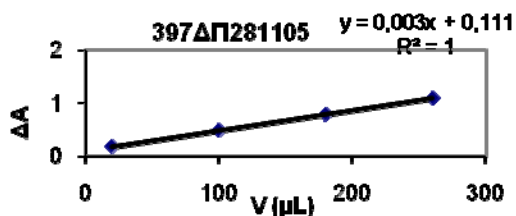
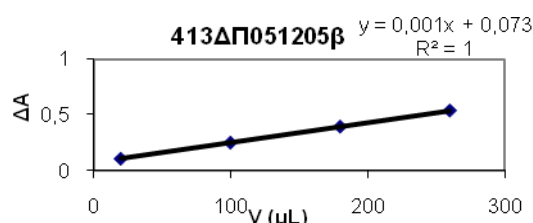
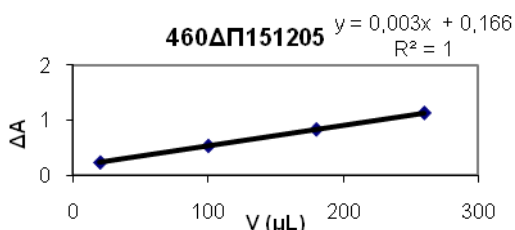
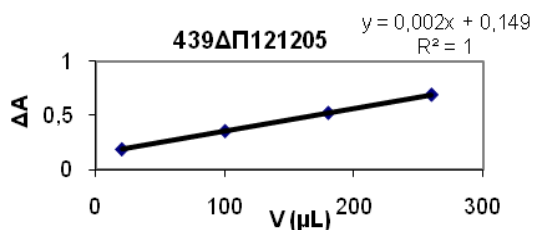
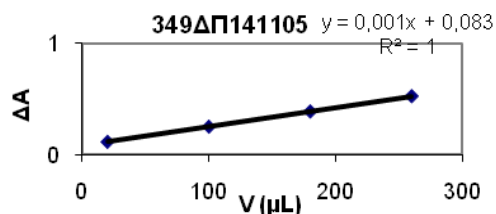
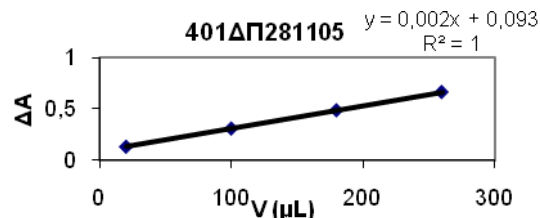
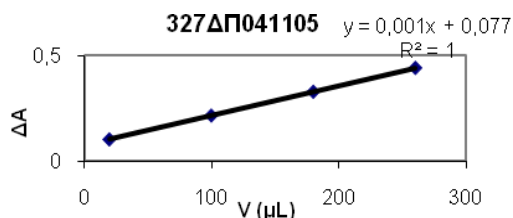


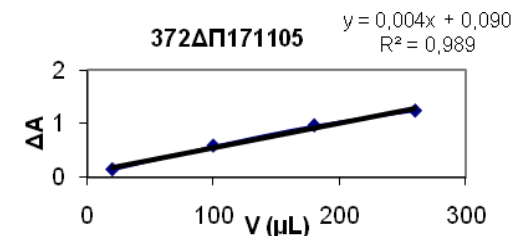
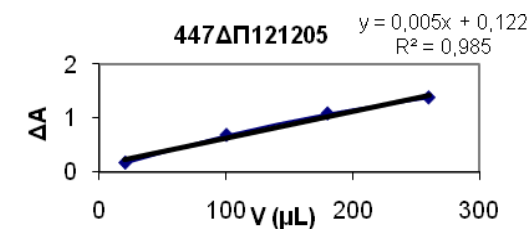
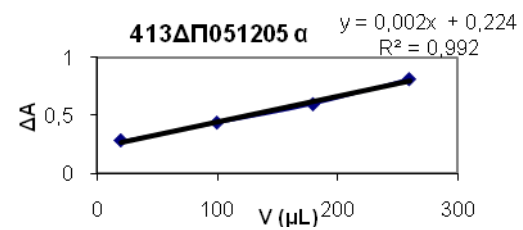
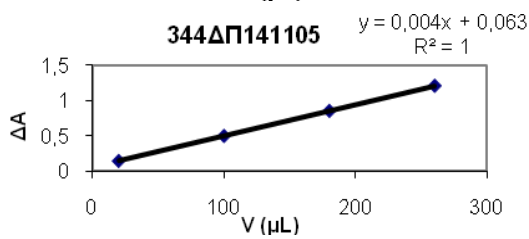
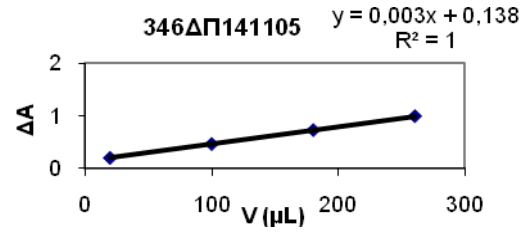
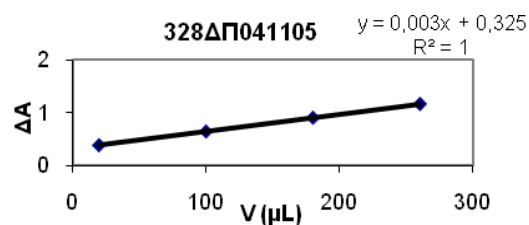
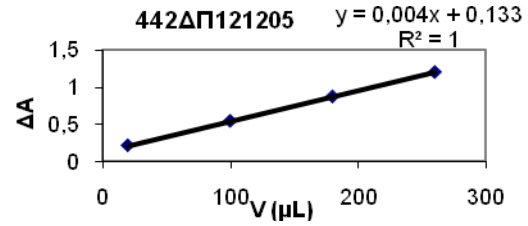
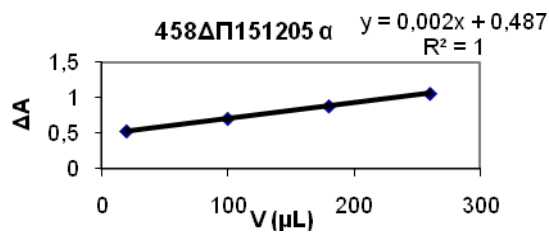
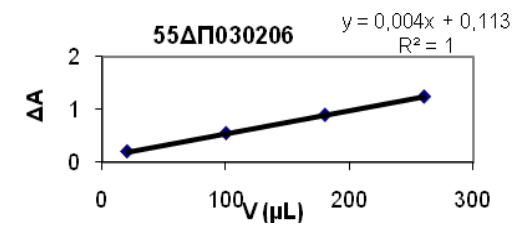
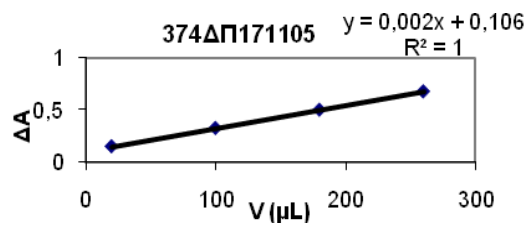
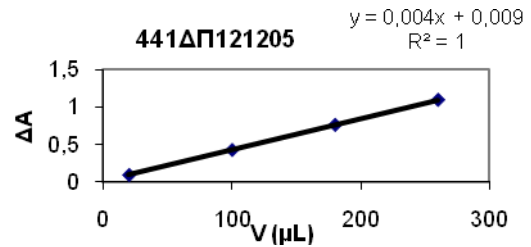
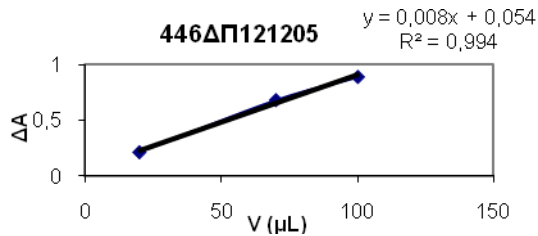
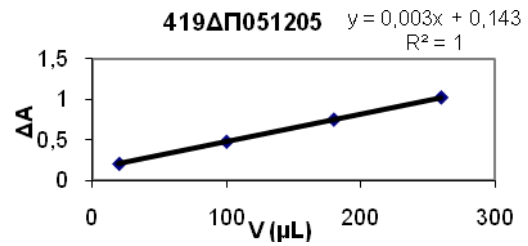
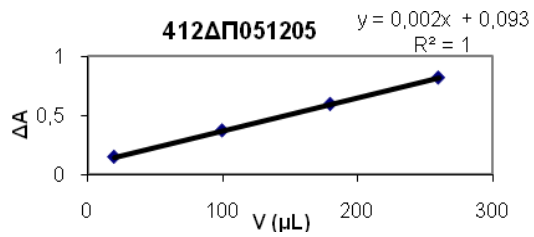


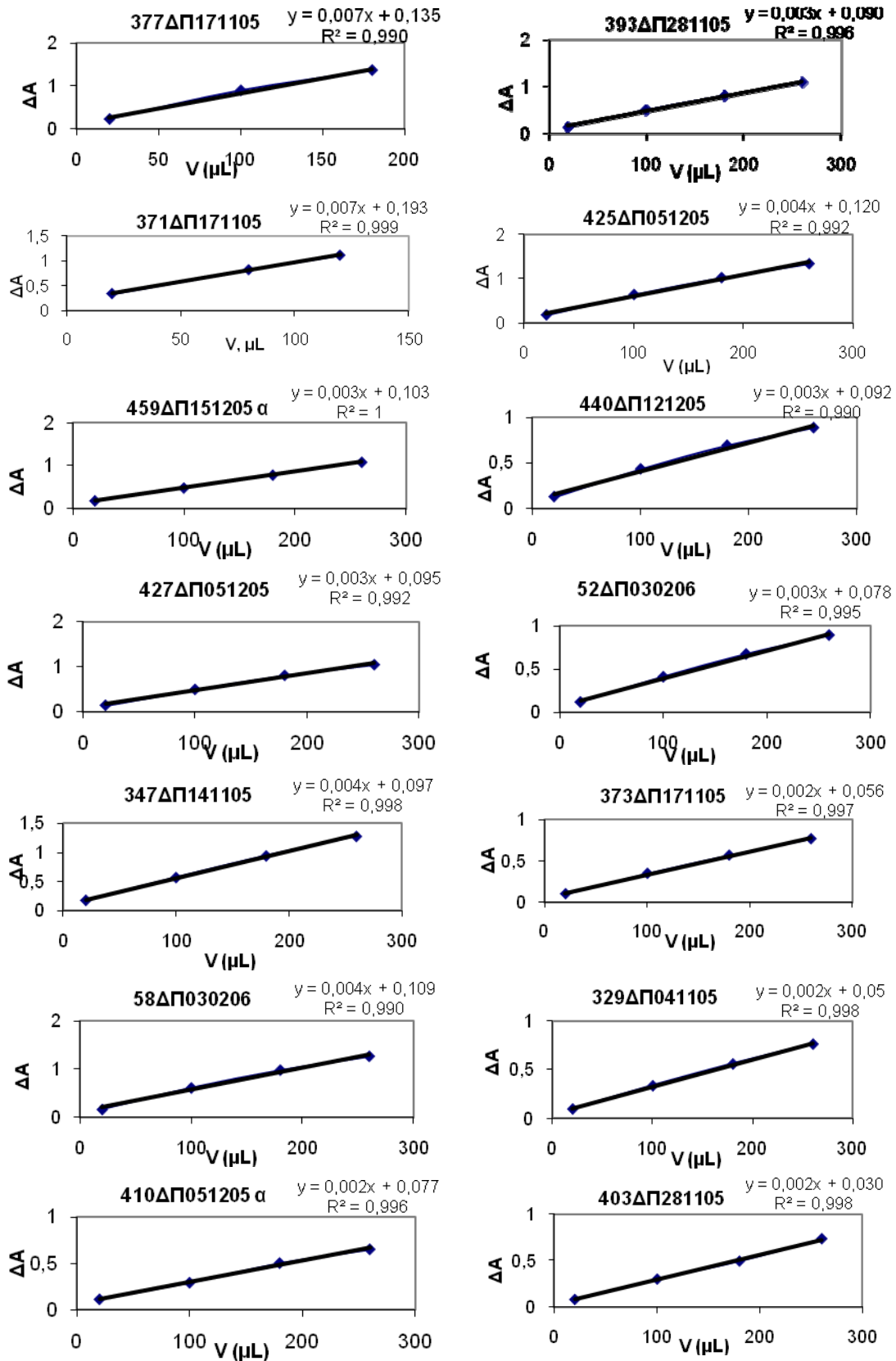


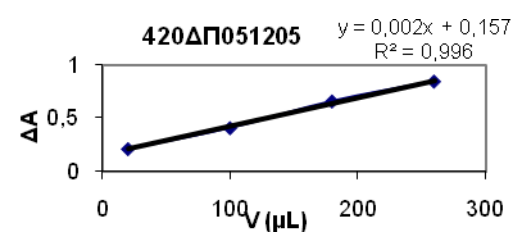
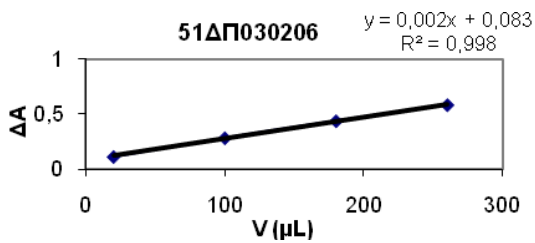
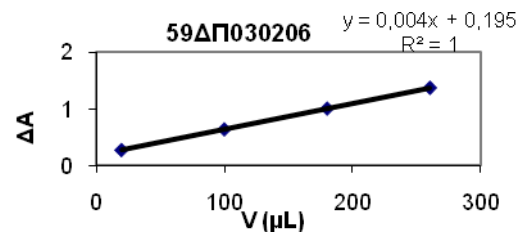
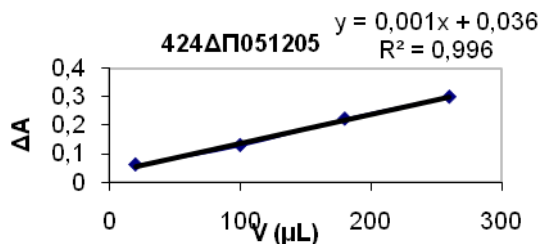
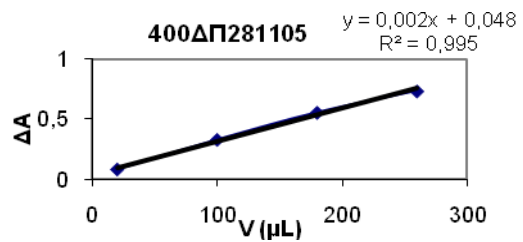
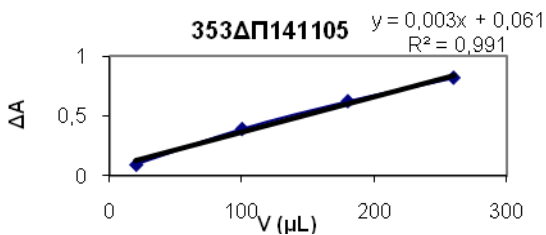
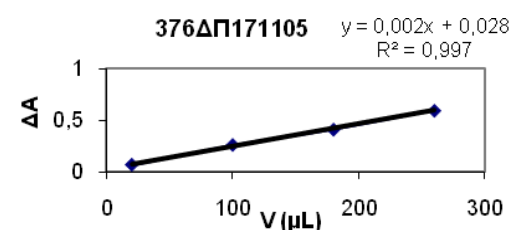
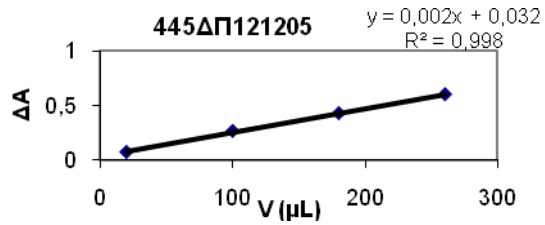
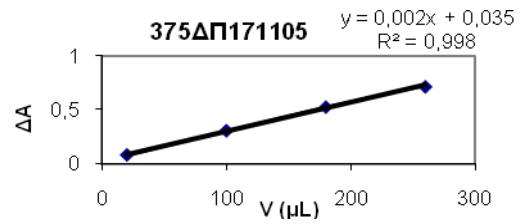
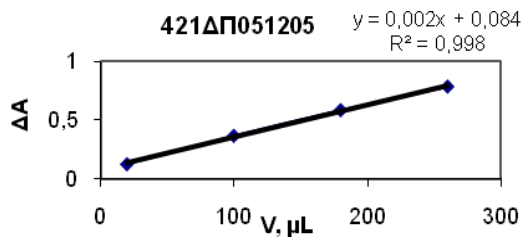
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Αποτελέσματα της μέτρησης με την μέθοδο ABTS για τα 50 δείγματα του ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν









ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ABBREVIATIONS

AAS	Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης	Atomic absorption spectrometry
ABTS	2,2'-αζινοδισ(3-αιθυλο-βενζο-θειαζολίν-6-σουλφονικό οξύ	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6 sulfonic acid
AC	Εναλλασσόμενο ρεύμα	Alternating current
AOP	Μέθοδος αντιοξειδωτικής ισχύος	Antioxidant power assay
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη	Adenosine-5'-triphosphate
BI	Έγχυση μικροσφαιριδίων	Bead injection
Bipy	Διπυριδίνη	Bipyridine (C ₅ H ₄ N) ₂
CL	Χημειοφωταύγεια	Chemiluminescence
DAD	Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων	Diode array detector
DC	Συνεχές ρεύμα	Direct current
DL	Όριο ανίχνευσης	Detection limit
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξειδίο	Dimethyl sulfoxide
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-δι(φαινυλο)-1-πυκκριλυδραζίλιο	2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Ανοσοενζυμική μέθοδος	Enzyme linked immunosorbent assay
ET	Αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου	Single electron transfer reaction based assay
FC	Μέθοδος Folin-Ciocalteu	Folin-Ciocalteu

FCR	Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	Folin-Ciocalteu reagent
FI	Τεχνική έγχυσης σε ροή	Flow injection
FI-SF	Έγχυσης με σταμάτημα ροής	Flow injection-stopped flow
FRAP	Μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής ισχύος με αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου	Ferric ion reducing antioxidant power
GAE	Ισοδύναμο γαλλικού οξέος	Gallic acid equivalent
GC-MS	Αέριοχρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας	Gas chromatography-mass spectrometry
GFAAS	Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με φούρνο γραφίτη	Graphite furnace atomic absorption spectrometry
HAT	Αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου	Hydrogen atom transfer reaction based assay
HC	Σπείραμμα ανάμιξης	Holding coil
HPLC	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης	High performance liquid chromatography
HRP	Ενζυμο Υπεροξειδάση	Horseradish peroxidase
H/Y	Ηλεκτρονικός Υπολογιστής	Personal computer
IC ₅₀	Συγκέντρωση που πετυχαίνει την μείωση του αρχικού αναλυτικού σήματος κατά 50%	Half maximal inhibitory concentration
ICP-AES	Φασματομετρία ατομικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος	Inductively coupled plasma atomic emission
ICP-MS	Φασματομετρία μαζών συζευγμένου επαγωγικά πλάσματος	Inductively coupled plasma Mass spectrometry

IOU	Προσδιορισμός του καταναλισκόμενου οξυγόνου	Inhibited oxygen uptake
IR	Υπέρυθρο	Infrared
IU	Διεθνής μονάδα	International unit
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας	Low density lipoprotein
LoQ	Όριο ποσοτικοποίησης	Limit of quantification
LOV	Πολυθεσιακή βαλβίδα	Lab-on-valve
NAD	β-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο	Nicotinamide adenine dinucleotide
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός	Nuclear magnetic resonance
ORAC	Μέτρηση της απορρόφησης ριζών οξυγόνου	Oxygen radical absorbance capacity
PCA	Ανάλυση κύριων συνιστωσών	Principal component analysis
PET	Πολυαιθυλοτερεφθαλικός εστέρας	Polyethylene terephthalate
PMT	Φωτοπολλαπλασιαστής	Photomultiplier tube
ppb	Μέρη στο δισεκατομμύριο	Parts per billion
ppm	Μέρη στο εκατομμύριο	Parts per million
PTFE	Πολυτετραφθοροεθυλένιο	Polytetrafluoroethylene
PVC	Πολυβινυλοχλωρίδιο	Polyvinyl chloride
PVDF	Πολυβινυλοδιενοφθορίδιο	Polyvinylidene fluoride
ROS	Ενεργές ενώσεις οξυγόνου	Reactive oxygen species

RSD	Σχετική τυπική απόκλιση	Relative standard deviation
SD	Τυπική απόκλιση	Standard deviation
SI	Διαδοχικής εισαγωγής	Sequential injection
SIC	Χρωματογραφία διαδοχικής εισαγωγής	Sequential injection chromatography
TAC	Ολική αντιοξειδωτική ενεργότητα	Total antioxidant capacity
TE	Ισοδύναμο Trolox	Trolox equivalent
TEAC	Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox	Trolox equivalent antioxidant capacity
TMAE	Τετράκις(διμεθυλο-αμινο)αιθυλένιο	<i>tert</i> aminodimethyl ethylene
TOSC	Ολική ικανότητα κατανάλωσης οξειδωτικού	Total oxidant scavenging capacity
TPC	Ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες	Total phenol content
TPTZ	2, 4, 6 – τρι(2-πυριδιλ)-s-τριαζίνη	2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine
UV	Υπεριώδες	Ultra Violet
Vis	Ορατό	Visible

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. D. Huang, B. Ou and R.L. Prior, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841, 2005.
2. C. Kaur and H. C. Kapoor, *International Journal of Food Science and Technology*, **36**, 703, 2001.
3. Source: *Web of Knowledge*, www.wok.ekt.com, 13/12/2009.
4. E. N. Frankel and A. S. Meyer, *Journal of Science of Food and Agriculture*, **80**, 1925, 2000.
5. I. F. F. Benzie and J. J. Strain, *Methods of Enzymology*, **299**, 15, 1999.
6. A. Jimenez-Escring, I. Jimenez- Jimenez, C. Sanchez-moreno and F. Saura-Calixto, *Journal of Science of Food and Agriculture*, **80**, 1686, 2000.
7. M. C. Foti, C. Daquino and C. Gerasi, *Journal of Organic Chemistry*, **69**, 2309, 2004.
8. N. J. Miller, C.A. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. A. Milner, *Clinical Science*, **84**, 407, 1993.
9. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231, 1999.
10. E. P. Labrinea and C. A. Georgiou, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4341, 2005.
11. R. Pulido, L. Bravo and F. Saura-Calixto, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3396, 2000.
12. O. Folin and V. Ciocalteu, *Journal of Biology and Chemistry*, **73**, 627, 1927.
13. M. Celeste, C. Tomas, A. Cladera, J.M. Estela and V. Cerda, *Analytica Chimica Acta*, **269**, 21, 1992.
14. D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Έκδοση 5^η, εκδόσεις Κωσταράκη, 2000, κεφάλαιο 15^ο, 439.
15. A. M. Connor, J. J. Luby, J. F. Hancock, S. Berkheimer and E. J. Hanson, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 893, 2002.
16. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, **78**, 145, 1975.
17. K. K. Stewart, G. R. Beecher and P. E. Hare, *Analytical Biochemistry*, **70**, 167, 1976.

18. B. Karlberg and G. E. Pacey, *Flow Injection Analysis. A Practical Guide*, New York: Elsevier, 1989.
19. Κ. Α. Γεωργίου, Ανάπτυξη νέων αυτοματοποιημένων φασματομετρικών μεθόδων ανάλυσης με την τεχνική της εισαγωγής δείγματος σε ροή και εφαρμογές στη φαρμακευτική ανάλυση. Αθήνα 1990, κεφάλαιο 2^ο, σελ 17.
20. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, **106**, 207, 1979.
21. D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Έκδοση 5^η, εκδόσεις Κωσταράκη, 2000, κεφάλαιο 7^ο, 201.
22. A)S. D. Kolev and I. D. Mc Kelvie, *Comprehensive analytical chemistry: Advances in flow injection analysis and related techniques* vol **54**, p. 23-43, 2008, Hungary, Wilson & Wilson's.
B)J. Ruzicka and G. D. Marshall, *Analytica Chimica Acta*, **237**, 329, 1990.
23. C. E. Lenehan, N. W. Barnett and S. W. Lewis, *Analyst*, **127**, 997, 2002.
24. Micro Total analysis Systems 2000, Proceedings of μTAS '2000 Symposium, Enschede, Netherlands, A. Van den Berg and P. Bergveld, Kluwer Academic Publishers, London, 2000.
25. J. Ruzicka, *Analytical Chemistry*, **69**, 5024, 1997.
26. H. Erxleben and J. Ruzicka, *Analyst*, **130**, 469, 2005.
27. J. Wang, E. H. Hansen and M. Miro, *Analytica Chimica Acta*, **499**, 139, 2003.
28. J. Ruzicka and L. Scampavia, *Analytical Chemistry*, **71**, 257A, 1999.
29. J. Ruzicka, *Flow Injection Analysis*, 3rd ed., CD-ROM Tutorial, Published by FIAlab Instruments, Inc., 2004. www.flowinjection.com, 13/12/2009.
30. D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Έκδοση 5^η, εκδόσεις Κωσταράκη, 2000, κεφάλαιο 7^ο, 212.
31. D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Έκδοση 5^η, εκδόσεις Κωσταράκη, 2000, κεφάλαιο 7^ο, 204, κεφάλαιο 13^ο, 383, κεφάλαιο 28^ο, 847-855.
32. T. Leelasattarathkul, S. Liawruangrath, M. Rayanakorn, *Talanta*, **70**, 656, 2006.
33. X. B. Long, M. Miro and R. Jensen, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **386**, 739, 2006.
34. M. Yang, Y. Xu and J.H. Wang, *Analytical Chemistry*, **78**, 5900, 2006.
35. J. Ruzicka, A.D. Carroll and I. Lahdesmaki, *Analyst*, **131**, 799, 2006.

36. E.H. Hansen, M. Miro and X.B. Long, *Analytical Letters*, **39**, 1243, 2006.
37. Y. Wang, M.L. Chen and J.H. Wang, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **21**, 535, 2006.
38. X.B. Long, M. Miro and E.H. Hansen, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **20**, 1203, 2005.
39. X.W. Chen, W.X. Wang and J.H. Wang, *Analyst*, **130**, 1240, 2005.
40. J. Jakmunee, L. Pathimapornlert and S.K. Hartwell, *Analyst*, **130**, 299, 2005.
41. C.H. Wu, L. Scampavia and J. Ruzicka, *Analyst*, **128**, 1123, 2003.
42. Y. Gutzman, A. D. Carroll and J. Ruzicka, *Analyst*, **131**, 809, 2006.
43. D. Satinsky, P. Solich, P. Chocholous and R. Karlicek, *Analytical Chimica Acta*, **499**, 205, 2003
44. D. Satinsky, J. Hulcova, P. Solich and R. Karlicek, *Journal of Chromatography A*, **1015**, 239, 2003
45. J. Jakmunee, L. Pathimapornlet, S. K. Harwell and K. Grudpan, *Analyst*, **130**, 299, 2005.
46. K. Grudpan, S. Khonyoung, S. K. Hartwell, S. Lapanantnoppakhun and J. Jakmunee, *Journal of Flow Injection Analysis*, **23**, 94, 2006.
47. J. Harwood and R. Aparicio, *Handbook of olive oil, Analysis and Properties*, chapter 2, p. 17, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 2000.
48. M. E. Κωμαΐτης, Η σημασία της ποιότητας του ελαιολάδου και παράγοντες που την επηρεάζουν, Σημειώσεις για το μεταπτυχιακό πρόγραμμα 'Χημική ανάλυση- έλεγχος ποιότητας', Μάιος 2004.
49. K. Robards, P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang and W. Glover, *Food Chemistry*, **66**, 401, 1999.
50. L. L. Pera, S. L. Curto, A. Visco, L. L. Torre and G. Dugo, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3090, 2002.
51. Δ. Σ. Γαλανός, Θέματα Χημείας Τροφίμων, σελ 128, 1975.
52. A., Nyska and R. Kohen, *Toxicological Pathology*, **30**, 620, 2002.
53. D. Boskou, G. Blekas and M. Tsimidou, *Current Topics in Nutraceutical Research*, **3**, 125, 2005.
54. G. I. Tonga, A. R. Tonga, M. Franconi, C. Marra and M. Guiso, *Journal of Nutrition*, **133**, 2532, 2003.

55. C. Capannesi, I. Palchetti, M. Mascini and A. Parenti, *Food Chemistry*, **71**, 553, 2000.
56. G. Montedoro, M. Servili, M. Baldioni and E. Miniati, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1571, 1992.
57. K. Hrnčirik and S. Fritsche, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 540, 2004.
58. L. Cabrini, V. Barzanti, D. Fiorentini, G. Grossi, B. Tolomelli, L. Zambonin and L. Landi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 6026, 2001.
59. A. Carrasco-Pancorbo, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, M. Del Carlo, T. Gallina-Toschi, G. Lercker, D. Compagnone and N. G. Fernandez-Gutierrez, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 8918, 2005.
60. J. C. Espin, C. Soler-Rivas and H. J. Wichers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 648, 2000.
61. T. Keceli and M. H. Gordon, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 1391, 2001.
62. A. Valavanidis, C. Nisiotou, Y. Papageorgiou, I. Kremli, N. Satravelas, N., Zinieris and H Zygalki, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2358, 2004.
63. M. Rossi, C. Alamprese and S. Ratti, *Food Chemistry*, **102**, 812, 2007.
64. A. Bendini, L. Cerretani, S. Vecchi, A. Carrasco-Pancorbo and G. Lercker, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4880, 2006.
65. S. Gorinstein, O. Martin-Belloso, E. Katrich, A. Lojek, M. Ciz, N. Gligelmo-miguel, R. Haruenkit, Y. S. Park, S.T. Jung and S. Trakhtenberg, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **14**, 154, 2003.
66. N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi and F. Brighenti, *Journal of Nutrition*, **133**, 2812, 2003.
67. N. Pellegrini, F. Visioli, S. Buratti and F. Brighenti, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2532, 2001.
68. F. Saura-Calixto and I. Coni, *Food Chemistry*, **94**, 442, 2006.
69. S. Silva, L. Gomes, F. Leitao, A. V. Coelho and L.V. Boas, *Food Science and Technology International*, **12**, 385, 2006.
70. K. Papadopoulos, T. Triantis, E. Yannakopoulou, A. Nikokavoura and D. Dimotikali, *Analytica Chimica Acta*, **266**, 41, 2003.

71. S. Mannimo, S. Buratti, M. S. Cosio, and N. Pellegrini, *Analyst*, **124**, 1115, 1999.
72. M. Battino, A. Politi, S. Bompadre, J. Scalzo, and B. Mezzetti, *Free Radical Biology and Medicine*, **36**, S127, 2004.
73. A. D. Ilyina, J. L. M. Hernández, J. E. M. Benavides, B. H. L. Luján, E. S. Bogatcheva, J. R. García and J. R. Martínez, *Luminescence*, **18**, 31, 2003.
74. M. Croston, J. Langston, R. Sangoi, and K. S. V. Santhanam, *International Journal of Nanoscience*, **1**, 277, 2002.
75. A. M. Sakharov and I. P. Skibida, I.P, *Russian Chemical Bulletin*, **44**, 1872, 1995.
76. F. Angerosa, N. D' Alessandro, P. Konstantinou and L. Di Giacinto, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 1802, 1995.
77. M. Brenes, A. García, P. García, J. J. Ríos and A. Carrido, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3535, 1999.
78. E. P. Labrinea and C. A. Georgiou. *Analytica Chimica Acta*, **526**, 63, 2004.
79. L. M. Magalhaes, M. Santos, M. A. Segundo, S. Reis and L. F. C. Lima, *Talanta*, **77**, 1559, 2009.
80. K. S. Miniotti and C. A. Georgiou, *Food Chemistry*, **109**, 455, 2008.
81. J. A. Garsia-Mesa and R. Mateos, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 3863, 2007.
82. M. Del Carlo, G. Sacchetti, C. Di Mattia, D. Compagnone, D. Mastrocola, L. Liberatore, A. Cichelli, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 4072, 2004.
83. B. Saad, W. T. Wai, B. P. Lim and M. I. Saleh, *Analytica Chimica Acta*, **591**, 248, 2007.
84. B. Saad, C. W. Ling, M. S. Jab, B. P. Lim, A. S. M. Ali, W. T. Wai and M. I. Saleh, *Food Chemistry*, **102**, 1407, 2007.
85. P. C. A. G. Pinto, L. M. F. S. Saraiva and J. L. F. C. Lima, *Analytica Chimica Acta*, **555**, 377, 2006.
86. I. F. F. Benzie and J. J. Strain, *Analytical Biochemistry*, **239**, 70, 1996.
87. E. P. Labrinea, N. S. Thomaidis and C. A. Georgiou, *Analytica Chimica Acta*, **448**, 201, 2001.

88. L. Mascitelli, F. Pezzetta and J. L. Sullivan, *Annals of Internal Medicine*, **146**, 394, 2007.
89. C. I. G. Tuberoso, A. Kowalczyk, E. Sarritzu and P. Cabras, *Food Chemistry*, **103**, 1494, 2007.
90. E. P. Labrinea and C. A. Georgiou, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4341, 2005.
91. C. S. Sánchez, A. M. T. González, M. C. García-Parrilla, J. J. Q. Granados, H. L. G. de la Serrana and M. C. L. Martínez, *Analytica Chimica Acta*, **593**, 103, 2007.
92. A. F. Siegel and C. J. Morgan. Bivariate data and regression. *Statistics and data analysis: an introduction*, 2nd ed, John Willey and Sons, Inc., U.S.A., pp. 541-543, 1996.
93. D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Έκδοση 5^η, εκδόσεις Κωσταράκη, 2000, κεφάλαιο 11^ο, 304-320.
94. M. Zeiner, I. Steffan and I. J. Cindric, *Microchemical Journal*, **81**, 171, 2005.
95. A. Anthemidis, V. Arvanitidis and J. A. Stratis, *Analytica Chimica Acta*, **537**, 271, 2005.
96. I. J. Cindric, M. Zeiner and I. Steffan, *Microchemical Journal*, **85**, 136, 2007.
97. C. M. Canario and D. A. Katskov, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **20**, 1386, 2005.
98. A. Roca, C. Cabrera, M. L. Lorenzo and M. C. Lopez, *Grasas y Aceites*, **51**, 393, 2000.
99. F. F. Lopez, C. Cabrera, M. L. Lorenzo and M. C. Lopez, *Journal of Food Science*, **65**, 206, 2000.
100. B. P. Cid, A. F. Albores, E. F. Gomez and E. F. Lopez, *Analyst*, **126**, 1304, 2001.
101. M. S. Jimenez, A. Lopez and J. R. Castillo, *Atomic Spectroscopy*, **23**, 183, 2002.
102. E. Lendinez, M. L. Lorenzo, C. Cabrera and M. C. Lopez, *Science of the Total Environment*, **278**, 183, 2001.
103. M. S. Jimenez, R. Velarte, M. T. Gomez and J. R. Castillo, *Atomic Spectroscopy*, **25**, 1, 2004.

104. J. S. Becker and H. Dietze, *International Journal of Mass Spectrometry*, **228**, 127, 2003.
105. D. Beauchemin, *Analytical Chemistry*, **78**, 4111, 2006.
106. S. J. Hill, J. Harley and L. Ebdon, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **7**, 23, 1992.
107. M. S. Jimenez, R. Velarte and J. R. Castillo, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **18**, 1154, 2003.
108. S. J. Huang and S. J. Jiang, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **16**, 664, 2001.
109. N. H. Bings, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **17**, 759, 2002.
110. C. Benincasa, J. Lewis, E. Perri, G. Sindona and A. Tagarelli, *Analytica Chimica Acta*, **585**, 366, 2007.
111. Α. Τσαντίλη-Κακουλίδου, Σημειώσεις στατιστικής - χημειομετρίας, πολύ-παραμετρικές στατιστικές μέθοδοι, Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών 'Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών Ενώσεων', Αθήνα 2004.