



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ ΣΤΟ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ NMR ΚΑΙ
FOLIN-CIOCALTEU

Καλαμπόκη Ηλιάνα

Χημικός

Υπεύθυνος : Αναπληρωτής Καθηγητής Προκόπιος Μαγιάτης

Αθήνα 2016

Ευχαριστίες

- Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, την καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτσά , την καθηγήτρια κ. Ιωάννα Χήνου και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Προκόπιο Μαγιάτη, οι οποίοι δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.
- Ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Λ. Σκαλτσούνη, κ. Β. Ρούσση και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ.Μ. Κουλάδη που δέχτηκαν να εκπονήσω το μεταπτυχιακό μου στον τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων.
- Ευχαριστώ τον υπεύθυνο για αυτή τη διπλωματική εργασία, αναπληρωτή καθηγητή, κ. Προκόπιο Μαγιάτη για την ανάθεση του θέματος και τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια αυτής της εργασίας.
- Ευχαριστώ την ΕΔΙΠ κ. Ελένη Μέλλιου για την συμβολή της στην υλοποίηση αυτής της εργασίας
- Ευχαριστώ τους καθηγητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για τις γνώσεις που μου προσέφεραν, καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.
- Ευχαριστώ τον ερευνητή κ. Σταυρόπουλο από το Δημόκριτο για την κατασκευή του ARISTOEMTRO™
- Ευχαριστώ τον Δρ. Ραπατζίκο Κωνσταντίνο από το Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο για την ανάπτυξή του ειδικού αλγόριθμου για την εκτίμηση του χρώματος στο ARISTOLEO-test.
- Ευχαριστώ τη διδάκτορα Νικητία Μέξια για τις πολύτιμες συμβουλές της.
- Ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο μου Παναγιώτη Διαμαντάκο για τη στήριξη και την υπομονή του.
- Ευχαριστώ τους φίλους μου Άννια, Κατερίνα, Αιμιλία, Σωτήρη, Χρυσάνθη για τις ευχάριστες στιγμές στο εργαστήριο.
- Ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας για το ευχάριστο κλίμα.

- Ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για την αγάπη τους και την συμπαράστασή τους.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	8
---------------	---

Α΄ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Ελιά

1.1 Βοτανική ταξινόμηση.....	10
1.2 Σύσταση καρπού και κριτήρια κατάταξης ποικιλιών ελιάς.....	11
1.3 Ποικιλίες ελιών για ελαιοποίηση.....	13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Ελαιόλαδο

2.1 Η παραγωγή του ελαιοκάρπου.....	14
2.2 Η σύσταση του ελαιολάδου.....	15
2.3 Κριτήρια ποιότητας και γνησιότητας του ελαιολάδου.....	21
2.3.1 Μέτρηση οξύτητας.....	22
2.3.2 Μέτρηση των υπεροξειδίων.....	23
2.3.3 Μέτρηση δεικτών Κ.....	23
2.3.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση	24
2.4 Επίσημες ποιοτικές κατηγορίες ελαιολάδου.....	26
2.4.1 Παρθένο ελαιόλαδο.....	26
2.4.2 Εξευγενισμένο ελαιόλαδο.....	26
2.4.3 Ελαιόλαδο αποτελούμενο λαμπάντε.....	26
2.4.4 Ακατέργαστα πυρηνέλαια.....	26
2.4.5 Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο.....	27
2.4.6 Πυρηνέλαιο.....	27
2.5 Ελαιόλαδο και υγεία.....	27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Βιολογικές δράσεις των φαινολικών συστατικών.....

3.1 Βιολογικές δράσεις απλών φαινολικών ενώσεων.....	30
3.2 Βιολογικές δράσεις συζευγμένων φαινολικών ενώσεων.....	32
3.2.1 Βιολογικές δράσεις ελευρωπαΐνης.....	32
3.2.2 Βιολογικές δράσεις της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης.....	33
3.2.3 Βιολογικές δράσεις της ελαιοκανθάλης.....	33
3.2.4 Βιολογικές δράσεις της ελαιασίνης.....	35
3.2.5 Βιολογικές δράσεις της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη.....	36
3.3 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών.....	37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. Μέθοδοι προσδιορισμού των φαινολών

4.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).....	38
4.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	39
4.3 Αέρια χρωματογραφία – φασματοφωτομετρία μάζας (CGC – MS).....	40
4.4 Μέθοδος Folin – Ciocalteu.....	41
4.5 Μέθοδος DPPH.....	42
4.6 Μέθοδος του υπερμαγγανικού καλίου (KMnO ₄).....	43
4.7 Μέθοδος FRAP.....	43
4.8 Μέθοδος ORAC.....	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. Ποσοτικός προσδιορισμός με τη χρήση φασματοφωτομέτρου

5.1 Αρχή της μεθόδου.....	45
5.2 Νόμος Lambert – Beer.....	46
5.3 Διέγερση ηλεκτρονίων.....	48
5.4 Οργανολογία.....	49
5.5 Διαδικασία ανάλυσης.....	52

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6. Μέθοδος οπτικού προσδιορισμού του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (δείκτης D1)

6.1 Αρχή της μεθόδου.....	54
6.2 Μέθοδος οπτικού προσδιορισμού του δείκτη D ₁	56
6.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου οπτικού προσδιορισμού.....	57
6.3.1. Αύξηση του όγκου της υδατικής φάσης.....	57
6.3.2. Μείωση του χρόνου αναμονής	58
6.4 Κατασκευή χρωματικής κλίμακας.....	60
6.5 Εξάρτηση της μεθόδου από την αλλαγή της θερμοκρασίας.....	62
6.5.1 Εφαρμογή της μεθόδου σε τρεις θερμοκρασίες.....	62
6.5.2 Εφαρμογή της μεθόδου σε αυξημένες θερμοκρασίες	63
6.6 Έλεγχος σταθερότητας του αντιδραστηρίου.....	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7. Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (δείκτης D1) με τη χρήση φασματοφωτομέτρου

7.1 Αρχή της μεθόδου.....	68
7.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του δείκτη D1.....	68
7.3 Μελέτη σταθερότητας του αντιδραστηρίου.....	71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

8. Απομόνωση φαινολικών παραγώγων

8.1 Απομόνωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης.....	78
8.1.1 Απομόνωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) αντίστροφης πλάκας.....	78
8.1.2 Παραλαβή ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με χρήση ρητίνης (XAD7) και απομόνωση με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	80
8.1.3 Παραλαβή ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με χρήση ρητίνης (XAD7) και απομόνωση ελαιοκανθάλης – ελαιασίνης με χρήση CN-στήλη.....	81
8.1.4 Παραλαβή εκχυλίσματος με ανάδευση και απομόνωση ελαιοκανθάλης – ελαιασίνης με χρήση CN- στήλη.....	86

8.2 Απομόνωση αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης.....	89
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

9. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς της μεθόδου που αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό του αθροίσματος

9.1 Πρότυπη καμπύλη ελαιασίνης.....	91
9.2 Πρότυπη καμπύλη ελαιοκανθάλης.....	92
9.3 Πρότυπη καμπύλη της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης.....	94
9.4 Πρότυπη καμπύλη της υδρόξυτυροσόλη.....	96
9.5 Συσχέτιση καμπύλων αναφοράς ελαιασίνης, ελαιοκανθάλης, της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης	98

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

10. Μέθοδος Folin –Ciocalteu

10.1 Αρχή της μεθόδου.....	99
----------------------------	----

10.2 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού φαινολών.....	100
10.3 Πρότυπη καμπύλη με καφεϊκό οξύ.....	100
10.4 Πρότυπες καμπύλες αναφοράς της μεθόδου Folin – Ciocalteu με καθαρές ουσίες.....	101
10.4.1 Πρότυπη καμπύλης αναφοράς ελαιασίνης.....	101
10.4.2 Πρότυπη καμπύλης αναφοράς ελαιοκανθάλης.....	102
10.4.3 Πρότυπη καμπύλης αναφοράς της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης.....	103
10.4.4 Πρότυπη καμπύλης αναφοράς υδρόξυτυροσόλης.....	104
10.5 Συσχέτιση ελαιασίνης – ελαιοκανθάλης σύμφωνα με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu – αποτελέσματα.....	106

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

11. Μέθοδος άμεσου προσδιορισμού ελαιασίνης και ελαιοκανθάλης σε ελαιόλαδο με χρήση φασματοσκοπίας H^1 - NMR	110
--	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

12. Αριστόμετρο.....	111
12.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς.....	111
12.2 Μελέτη σταθερότητας των απορροφήσεων σε σχέση με το χρόνο.....	112
12.3 Εξάρτηση της μεθόδου με τη θερμοκρασία.....	115
12.3.1 Θέρμανση στους 40°C σε υδρόλουτρο.....	115
12.3.2 Θέρμανση στους 50°C στο φούρνο.....	115

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13 : Αποτελέσματα.....	117
---------------------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14 : Συμπεράσματα.....	133
---------------------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15 : Βιβλιογραφία.....	134
---------------------------------	-----

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού δύο σεκοϊριδοειδών και συγκεκριμένα της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης σε εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα, με τη χρήση φασματοφωτομέτρου. Ο λόγος για τον οποίο θελήσαμε να αναπτύξουμε μια τέτοια μέθοδο είναι η σπουδαιότητα των δύο αυτών συστατικών του ελαιολάδου, οι οποίες ενισχύουν τις υγειοπροστατευτικές ιδιότητες του. Μετά την ανάπτυξη της νέας μεθόδου, θελήσαμε να τη συγκρίνουμε με δύο καθιερωμένες μεθόδους μέτρησης φαινολών τη μέθοδο NMR, με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας αναφέρονται, αρχικά, τα βοτανικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Oleaceae καθώς και η διάκριση των ποικιλιών ελιάς στην Ελλάδα. Στη συνέχεια, γίνεται μια αναφορά στο ελαιόλαδο, στον τρόπο παραγωγής του, στις κατηγορίες των ελαιολάδων και στα κριτήρια ποιότητας και γνησιότητας. Επίσης παρουσιάζονται οι χημικές κατηγορίες και οι βιολογικές ιδιότητες των συστατικών του ελαιόλαδου. Τέλος αναφέρονται μέθοδοι ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού των φαινολών στο ελαιόλαδο και πιο αναλυτικά η αρχή της μεθόδου του οργάνου που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία.

Στο δεύτερο μέρος αναφέρεται η ανάπτυξη της νέας μεθόδου που αφορά τον οπτικό προσδιορισμό του δείκτη D1 (άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης) και τον ποσοτικό προσδιορισμό του δείκτη D1 με τη χρήση φασματοφωτομέτρου. Επιπλέον αναφέρονται οι τρόποι απομόνωσης των σεκοϊριδοειδών ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης και της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης. Επίσης παρουσιάζονται οι μέθοδοι NMR και Folin-Ciocalteu που χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των μεθόδων. Ένα σημαντικό μέρος της παρούσας εργασίας περιλαμβάνει την εφαρμογή της μεθόδου άμεσου φωτομετρικού ποσοτικού προσδιορισμού του δείκτη D1 σε ελληνικά δείγματα ελαιόλαδου και την σύγκρισή τους με τις άλλες μεθόδους.

Τέλος αναπτύχθηκε μια συσκευή, το ΑΡΙΣΤΟΜΕΤΡΟ™ με τη βοήθεια του εργαστηρίου φυσικής του Δημόκριτου, η οποία μετρώντας την απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος που αναφέρεται στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί πιο εύκολα και γρήγορα το άθροισμα της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης (δείκτης D1).

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Η ελιά ή ελαιόδεντρο είναι ένα φυτό με μεγάλη ιστορική και εμπορική σημασία που η αρχή της καλλιέργειας της χρονολογείται 7000 χρόνια πριν. Η ελιά συνδέθηκε άρρηκτα με τους λαούς της Μεσογείου και κατ' επέκταση με την ελληνική ιστορία και παράδοση.

Η αγριελιά πρωτοεμφανίστηκε στην Ανατολική Μεσόγειο, αλλά η πρώτη καλλιέργεια της πραγματοποιήθηκε στον Ελλαδικό χώρο και συγκεκριμένα στο Αιγαίο κατά την προϊστορική περίοδο. Η αρχέγονη σχέση της ελιάς με τον Ελλαδικό χώρο επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι η ελληνική ονομασία «ελιά» διατηρείται στις περισσότερες ευρωπαϊκές γλώσσες.

Η ελιά θεωρήθηκε ιερό δέντρο ,ιδιαίτερα προστατευόμενο και υπήρξε σύμβολο ειρήνης, νίκης, σοφίας και φιλίας των λαών , με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τη στέψη των νικητών των ολυμπιακών αγώνων με στεφάνι ελιάς, τον κότινο.

Εκτός από το δέντρο σημαντικό ρόλο έπαιζε και το προϊόν του καρπού, το ελαιόλαδο , ή αλλιώς ο «υγρός χρυσός», όπως το αποκαλούσε ο Όμηρος, το οποίο εξακολούθησε να έχει ιδιαίτερη θέση στη ζωή των Ελλήνων, ως αναπόσπαστο συστατικό της καθημερινής τους διατροφής.

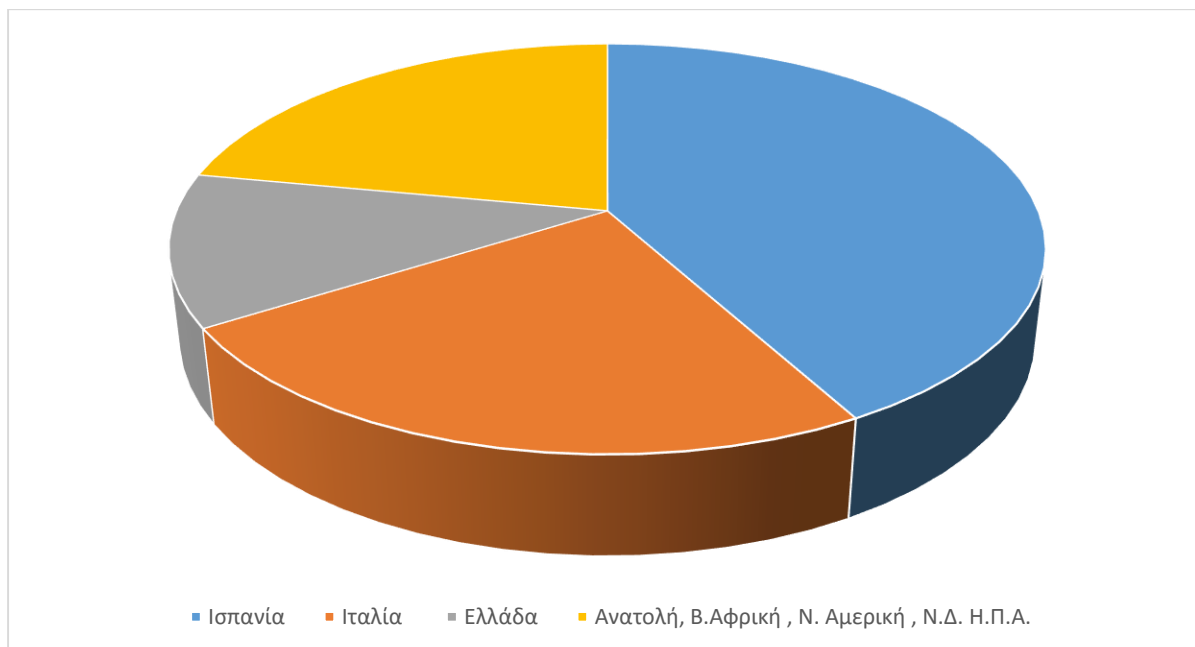
Η ελιά και τα προϊόντα της είχαν ταυτιστεί με τις θεραπευτικές και διατροφικές τους ιδιότητες από το παρελθόν. Από το 4000 π.Χ. ήταν γνωστή η χρήση του ελαιολάδου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ο Αριστοτέλης μελέτησε το ελαιόδενδρο και ανήγαγε την καλλιέργεια του σε επιστήμη. Ο Όμηρος το παρομοίασε με "χρυσό υγρό" ενώ ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της Ιατρικής, το περιγράφει σαν το "τέλειο θεραπευτικό". Στα κείμενα που έχουν διασωθεί αναφέρονται περισσότερες από 60 φαρμακευτικές και ιατρικές χρήσεις του ελαιολάδου. Αυτές περιλαμβάνουν δερματολογικές ασθένειες, μυϊκούς πόνους, θεραπεία του έλκους , φλεγμονές των ούλων, αϋπνία, ναυτία, πυρετό και στομαχικούς πόνους. Ο Διοσκουρίδης ονομάζει το ελαιόλαδο "προς την εν υγεία χρήσιν άριστον". Αναφέρει ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες κατά του έρπητος και της άφθας.

Με το πέρασμα των χρόνων ο θεραπευτικός και διατροφικός χαρακτήρας των καρπών της ελιάς και των προϊόντων της ενισχύεται και κατέχουν μια σημαντική θέση στη μεσογειακή διατροφή . Η ελιά και κατ' επέκταση το ελαιόλαδο περιέχουν ένα μεγάλο πλήθος βιοδραστικών μεταβολιτών, οι οποίοι έχουν σημαντικές βιολογικές δράσεις και ενισχύουν συνεχώς τον ισχυρισμό για τον υγειοπροστατευτικό τους χαρακτήρα.

Στη συνέχεια παρατίθενται πληροφορίες σχετικά με την ελιά , το ελαιόλαδο , τις βιολογικές ιδιότητες των βιοδραστικών μεταβολιτών και τέλος μέθοδοι προσδιορισμού των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.

1. Ελιά

Το ελαιόδεντρο που καλλιεργείται έχει καταγωγή από την ανατολική λεκάνη της Μεσογείου. Τα ελαιόδεντρα είναι δέντρα μεσαίου μεγέθους (10m ύψους) και στο μεσογειακό χώρο, ανθοφορούν στα τέλη της άνοιξης, ενώ η συγκομιδή ξεκινά από τα τέλη Οκτωβρίου και τελειώνει τον Φεβρουάριο του επόμενου έτους για τις πιο νότιες περιοχές. Οι ελιές αρχίζουν να παράγουν καρπό από τα 5 τους χρόνια και μπορεί να ζήσουν μέχρι 7000 χρόνια. Σήμερα υπάρχουν πάνω από 700 εκατομμύρια ελαιόδεντρα σε ολόκληρο τον κόσμο, περίπου το 80% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου προέρχεται από τις μεσογειακές χώρες, με τη χώρα μας να είναι η τρίτη μεγαλύτερη χώρα παραγωγής με 12% μετά την Ισπανία με 42%, την Ιταλία με 24%. Το υπόλοιπο ποσοστό (20%) κατανέμεται στην Ανατολή, στη Β. Αφρική, τη Ν. Αμερική και τις Ν.Δ. Η.Π.Α.



Εικόνα 1.1 : Στατιστική κατάταξη της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου [1]

1.1 Βοτανική ταξινόμηση

Η επίσημη ονομασία της αειθαλούς υπεραιωνόβιας ελιάς ή ελαιόδεντρο (επιστ. Ελαία, *Olea*) είναι *Olea europaea* ανήκει στην οικογένεια Oleaceae (Ελαιιδών) και στο γένος *Olea*, το οποίο περιέχει 40 διαφορετικά είδη. Το πιο διαδεδομένο είδος και αυτό με το μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον είναι αυτό που προανέφερα είναι το είδος *Olea europaea*. Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες υπάγονται στο υποείδος *Olea europaea var. sativa*. Στο είδος αυτό ανήκουν πολλές ποικιλίες για παραγωγή ελαιολάδου, βρώσιμων ελιών ή διπλής χρήσης. Ενώ οι αγριελιές ανήκουν στο υποείδος *Olea europaea var. sylvestris*.

Βασίλειο	<i>Plantae</i>
Διαίρεση	<i>Magnoliophyta</i>
Κλάση	<i>Magnoliopsida</i>
Υποκλάση	<i>Asteridae</i>
Τάξη	<i>Lamiales</i>
Οικογένεια	<i>Oleaceae</i>
Υποοικογένεια	<i>Oleoideae</i>
Γένος	<i>Olea</i>

Πίνακας 1.2: Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς

1.2 Σύσταση καρπού – ποικιλίες ελιών

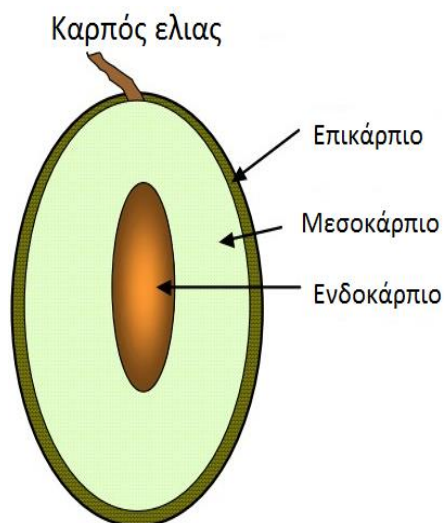
Σύσταση καρπού

Η ελιά διαθέτει έναν ωοειδή καρπό, ο οποίος αποτελείται από τρία τμήματα. Αυτά είναι το επικάρπιο ή επιδερμίδα, το μεσοκάρπιο ή σάρκα και το ενδοκάρπιο.

Το επικάρπιο είναι ένας προστατευτικός ιστός, ο οποίος αποτελεί το 1-3% του συνολικού βάρους του καρπού και κατά την διάρκεια της ωρίμανσης αλλάζει το χρώμα του.

Το μεσοκάρπιο αποτελεί το 70-80% του συνολικού βάρους του καρπού, από το οποίο το 50% του καρπού είναι νερό, το 25% υδατάνθρακες, το 25% έλαιο, ενώ περιέχονται και μικρά ποσά πρωτεΐνης.

Το ενδοκάρπιο αποτελεί το σπέρμα του καρπού της ελιάς, το οποίο προστατεύεται με ένα ξυλώδες περίβλημα και αποτελεί το 18 – 20% του συνολικού βάρους του καρπού.



Περιέχονται :

- ✓ Επικάρπιο : 1-3%
- ✓ Μεσοκάρπιο : 70 – 80 %
 - 50% νερό
 - 25% υδατάνθρακες
 - 25% έλαιο
- ✓ Ενδοκάρπιο : 18 – 20 %

Εικόνα 1.3 : Σχηματική εγκάρσια τομή ελαιοκάρπου [2]

Κριτήρια κατάταξης ποικιλιών ελιάς

Οι ποικιλίες ελιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα σήμερα, πιστεύεται ότι είναι περισσότερες από 100 και ταξινομούνται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Κατάταξη ελληνικών ποικιλιών βάσει μεγέθους ελαιοκάρπου

- A. μικρόκαρπες
- B. μεσόκαρπες
- Γ. χονδρολιές ή αδρόκαρπες ή αλλιώς επιτραπέζιες ποικιλίες.



Εικόνα 1.4 : απεικόνιση ποικιλιών ελαιοκάρπων με βάση το κριτήριο του μεγέθους του καρπού

Οι μικρόκαρπες είναι κατάλληλες για παραγωγή λαδιού, οι χονδρολιές για παραγωγή επιτραπέζιων ελιών και οι μεσόκαρπες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως λαδολιές και ως επιτραπέζιες.

2. Κατάταξη βάσει μεγέθους πυρήνα:

- A. μικροπύρηνες
- B. μεσοπύρηνες
- Γ. μακροπύρηνες

3. Κατάταξη βάσει της ελαιοπεριεκτικότητας

Η πιο χρήσιμη διάκριση ποικιλιών ελιάς είναι αυτή που γίνεται βάση της ελαιοπεριεκτικότητας του καρπού.

A. ποικιλίες για ελαιοποίηση, όπου ο καρπός της ελιάς χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την παραλαβή ελαιολάδου.

B. επιτραπέζιες ποικιλίες , όπου ο καρπός χρησιμοποιείται για επιτραπέζια κατανάλωση

Γ. ποικιλίες διπλής χρήσης , όπου χρησιμοποιούνται και για ελαιοποίηση και ως βρώσιμη

Οι ποικιλίες που προορίζονται για παραγωγή ελαιολάδου είναι κυρίως μικρόκαρπες και πρέπει η ελαιοπεριεκτικότητα να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη.

1.3 Ποικιλίες για ελαιοποίηση

Ενδεικτικά μερικές από τις πιο συχνές ποικιλίες για ελαιοποίηση είναι οι ακόλουθες:

➤ **Κορωνέικη – *Olea europaea cv. Microcarpa***

Είναι γνωστή και ως Λιανολιά, Ψιλολιά, Λαδολιά και Κρητικιά. Απαντάται συχνά στην Πελοπόννησο, στην Κρήτη και στα Ιόνια νησιά. Είναι η σπουδαιότερη ελαιοποιήσιμη ποικιλία στην Ελλάδα. Είναι πολύ παραγωγική ποικιλία με λάδι άριστης ποιότητας, με ευχάριστο άρωμα και γεύση. Παράγει πολύ μικρό καρπό με μικρή σχέση σάρκα/πυρήνα (5:1) και μεγάλη ελαιοπεριεκτικότητα (15-27%).

➤ **Κουτσουρελιά- *Olea europaea cv microphylla***

Είναι γνωστή και ως Πατρινιά, Πατρινή, Λαδολιά και Λιανολιά. Απαντάται συχνά στην Πελοπόννησο και στη Ναύπακτο. Είναι ποικιλία μέτριας παραγωγικότητας που προτιμά πλούσια ή μέσης συστάσεως εδάφη. Ο καρπός της είναι πλούσιος σε ελαιόλαδο καλής ποιότητας. Ο πυρήνας είναι σχετικά μικρός, με αιχμή στα δύο άκρα του. Η ελαιοπεριεκτικότητα του καρπού είναι 24-30%.

➤ **Λιανολιά Κερκύρας – *Olea europaea cv. Craneomorpha***

Είναι γνωστή και ως Σουβλολιά, Κορφολιά, Πρεβεζάνα και Δαφνόφυλλη. Απαντάται συχνά στην Κέρκυρα, στους Παξούς, στην Κεφαλλονιά, στη Ζάκυνθο και στις παράλιες περιοχές της Ηπείρου. Η ελαιοπεριεκτικότητα του καρπού κυμαίνεται γύρω στο 19%.

➤ **Μυρτολιά - *Olea europaea cv. microcarpa subrotunda***

Είναι γνωστή και ως Μερτολιά και Μουρτολιά. Καλλιεργείται κυρίως στους Νομούς Λακωνίας και Λασιθίου. Συνήθως παίρνει μεγαλύτερες διαστάσεις από την Κορωνέικη ελιά. Η ελαιοπεριεκτικότητα του καρπού κυμαίνεται γύρω στο 25%.

➤ **Αθηνολιά- *Olea europaea cv. mamilaris***

Η ποικιλία αυτή ωριμάζει αργά και η συγκομιδή της γίνεται από το τέλος Δεκεμβρίου έως τις αρχές Ιανουαρίου. Ο καρπός της είναι μεσαίου μεγέθους με οβάλ σχήμα. Το βάρος της είναι από 2.2 μέχρι 2.9 γραμμάρια και το ύψος της ποικίλει από 7.5 έως 25 χιλιοστά. Το λάδι από Αθηνολιά είναι εξαιρετικής ποιότητας με χαμηλή οξύτητα.

➤ **Αγουρομανάκι – *Olea europaea cv. Ovalis***

Το αγουρομανάκι καλλιεργείται στην Αργολίδα, Κορινθία, Αρκαδία, Σπέτσες και στην Ερμιονίδα. Είναι γνωστή και ως Αγουρομανάκι και Αγουρομάνακο. Επίσης είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στο ψύχος. Η περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο φτάνει το 25%.

➤ **Αδραμυτινή – *Olea europaea cv. media subrotunda***

Η Αδραμυτινή καλλιεργείται κυρίως σε Μυτιλήνη, Χίο, Εύβοια και στην Άνδρο. Είναι γνωστή και ως Αϊβαλιώτικη, Κασδαγλίτισσα, Μυτιληνιά και Φραγκολιά. Προέρχεται από τη Μ. Ασία. Η περιεκτικότητα της Αδραμυτινής σε ελαιόλαδο φτάνει το 22-25% το οποίο είναι λεπτόρρευστο και έχει εξαιρετικό άρωμα.

Κεφάλαιο 2

2. ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελιάς με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου.

- Ως **έλαια** θεωρούνται τα προϊόντα των οποίων η σύσταση είναι ελαιώδης στους 20°C (θερμοκρασία δωματίου).

2.1 Η παραγωγή του ελαιολάδου

- **Η συλλογή του ελαιοκάρπου**

Η εποχή συλλογής του ελαιοκάρπου συμπίπτει με τη μεταβολή του χρώματος από πρασινοκίτρινο σε μαυροϊώδες. Άγουρος ελαιοκάρπος δίνει ελαιόλαδο με έντονο πράσινο χρώμα και πικρή γεύση. Η παραμονή του ελαιοκάρπου στο δέντρο έχει ως συνέπεια την αύξηση της οξύτητας, την αλλαγή του χρώματος και μεταβολές στα αρωματικά συστατικά.

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 συγκομιδής του καρπού είναι με τα χέρια ή με κτένες από το δέντρο.

Για τη μείωση της ποιοτικής υποβάθμισης πρέπει να μειωθεί ο χρόνος μεταξύ συλλογής και σύνθλιψης. Ο μέγιστος χρόνος παραμονής είναι 24 ώρες.

- **Η αποθήκευση του ελαιοκάρπου**

Οι ελιές πρέπει να φυλάσσονται σε καλώς αεριζόμενους χώρους, στους οποίους η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται κάτω από 25°C και η σχετική υγρασία σε 75%. Θα πρέπει επίσης να αποφεύγεται η απευθείας επαφή με το έδαφος. Οι ελιές αποθηκεύονται είτε σε σακιά με οπές ώστε να επιτρέπεται ο αερισμός είτε σε τελάρα.

- **Τα στάδια παραγωγής του ελαιολάδου από τον καρπό**

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

- I. **Αποφύλλωση** : η απομάκρυνση των φύλλων και των κλαδιών από τον ελαιοκάρπο.
- II. **Πλύσιμο** : πλύσιμο του ελαιοκάρπου με νερό το οποίο πρέπει να είναι πόσιμο
- III. **Μεταφορά**
- IV. **Θραύση – σπάσιμο** : χρησιμοποιούνται κυρίως ελαιόμυλοι, κυλινδρόμυλοι και σφυρόμυλοι. Αυτό το στάδιο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο όσον αφορά την ποιότητα και την ποσότητα του ελαιολάδου. Το σπάσιμο του ελαιοκάρπου γίνεται σε σύντομο

χρονικό διάστημα (5min), γεγονός που περιορίζει την επαφή του καρπού με τον αέρα, ώστε να μην ευνοείται η οξειδωτική αλλοίωση του ελαιολάδου.

- V. **Μάλαξη** : για τη μάλαξη χρησιμοποιούνται ημισφαιρικοί ή ημικυλινδρικοί ανοξείδωτοι μαλακτήρες με διπλά τοιχώματα μέσα στα οποία κυκλοφορεί νερό, του οποίου η θερμοκρασία δεν πρέπει να ξεπερνά τους 28°C. Η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει τα γευστικά και αρωματικά συστατικά και το καθιστά ευπαθές στην οξείδωση. Η αύξηση του χρόνου μάλαξης μειώνει το περιεχόμενο σε πολυφαινόλες διότι οξειδώνονται κατά την επαφή του ελαιολάδου με τον αέρα και κατά τη δράση ενζύμων.
- VI. **Διαχωρισμός** : ο διαχωρισμού του ελαιολάδου από την ελαιόπαστα μπορεί να γίνει με πίεση ή με φυγοκέντρωση .

2.2 Η σύσταση του ελαιολάδου

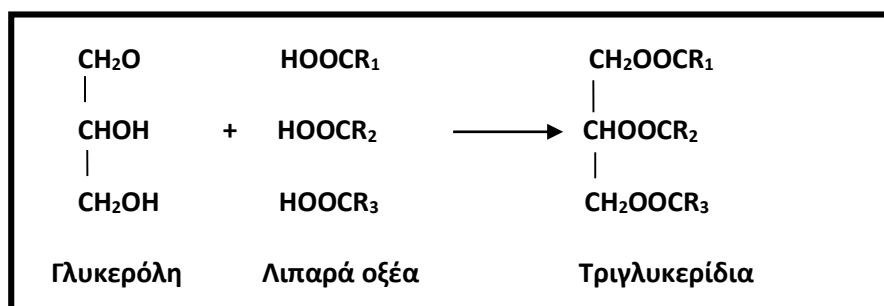
Το ελαιόλαδο είναι ένα μίγμα τρι-, δι- και μονό- γλυκεριδίων και θεωρείται από τις καλύτερες πηγές λιπαρών οξέων και φυσικών αντιοξειδωτικών, των φαινόλων και των πολυφαινόλων. Το ελαιόλαδο αποτελείται από μονοακόρεστα, πολυακόρεστα και κορεσμένα λιπαρά οξέα, κυρίως υπό τη μορφή εστέρων με γλυκερόλη, τα τριγλυκερίδια, τα οποία συνιστούν το 98-99% της σύστασης του ελαιολάδου. Το υπόλοιπο ποσοστό περιλαμβάνει ελεύθερα λιπαρά οξέα, υδατάνθρακες, τριτερπενικές αλκοόλες, τοκοφερόλες, βιταμίνες, χρωστικές, φαινολικά και αρωματικά συστατικά.

ΣΑΠΟΝΟΠΟΙΗΣΙΜΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	ΚΛΑΣΜΑ	ΜΗ ΣΑΠΟΝΟΠΟΙΗΣΙΜΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	ΚΛΑΣΜΑ
Τριγλυκερίδια		Στερόλες	
Διγλυκερίδια (1 – 3 %)		Υδρογονάνθρακες (σκουαλένιο)	
Μονογλυκερίδια (0,25%)		Τερπένια	
		Τοκοφερόλες (α , β , γ)	
		Χλωροφύλλες	
		Καροτενοειδή	
		Φαινόλες	

Πίνακας 2.1 : Χημική σύσταση του ελαιολάδου

- **Τριγλυκερίδια**

Τα τριγλυκερίδια σχηματίζονται από τρία ελεύθερα λιπαρά οξέα που συνδέονται σε ένα μόριο γλυκερόλης. Τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το λινολενικό. Τα λιπαρά οξέα έχουν γενικό συντακτικό τύπο $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ όπου n είναι ο αριθμός των μεθυλενομάδων που κυμαίνεται μεταξύ 12 και 20. Το ελαιόλαδο περιέχει 72% μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, 14% πολυακόρεστα και 14% κορεσμένα λιπαρά οξέα.



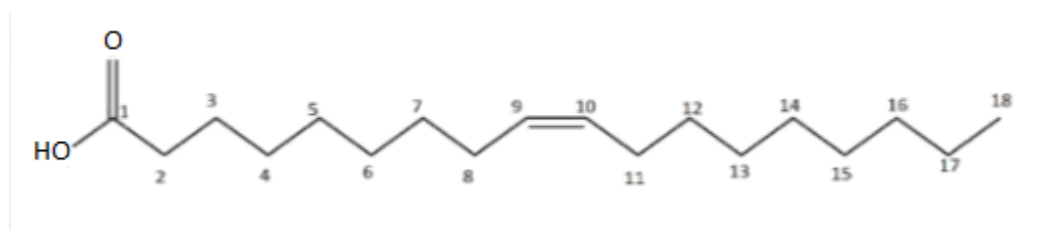
Εικόνα 2.2 : Αντίδραση σχηματισμού τριγλυκεριδίων

Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχουν ένα διπλό δεσμό, ενώ τα πολυακόρεστα περιέχουν περισσότερους διπλούς δεσμούς.

Λιπαρά οξέα	Είδος	Ποσοστό στο ελαιόλαδο
Ελαϊκό οξύ (C18:1)	Μονοακόρεστο	55-83%
Λινελαϊκό οξύ (C18:2)	Πολυακόρεστο	3,5-21%
Λινολενικό οξύ (C18:3)	Πολυακόρεστο	<0,9%
Στεατικό οξύ	Κορεσμένο	0,5-5,0%
Παλμιτικό οξύ	Κορεσμένο	7,5-20%

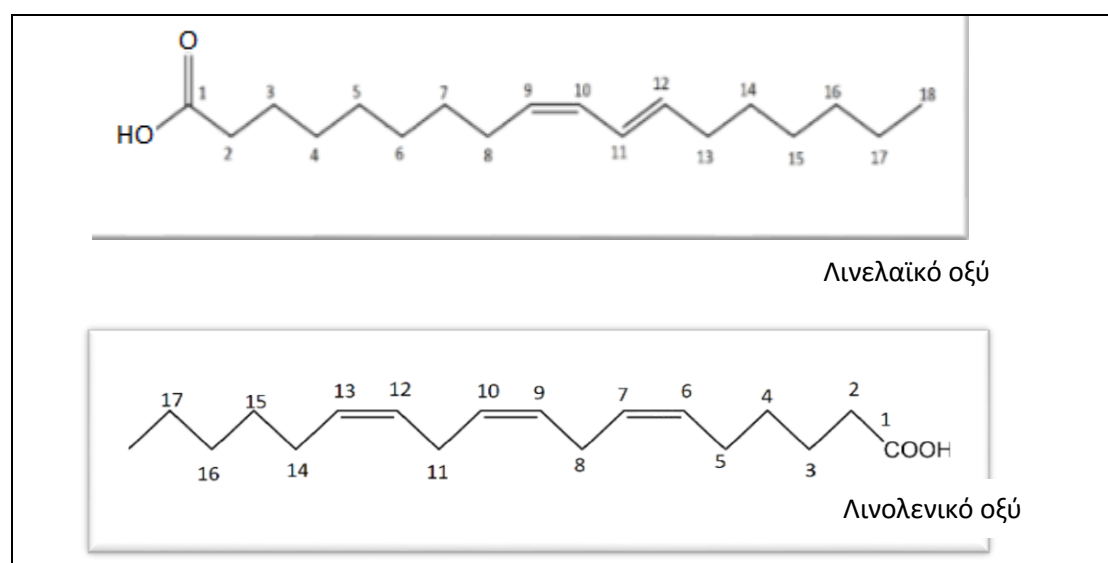
Πίνακας 2.3 : Κυριότερα λιπαρά οξέα των ελαιολάδων

Μονοακόρεστο λιπαρό οξύ



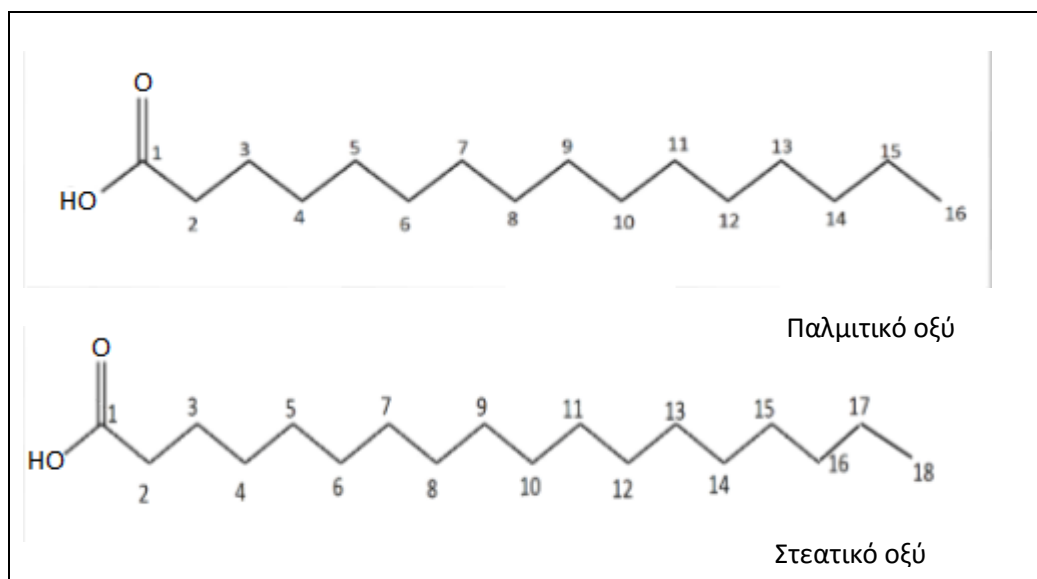
Εικόνα 2.4 : σχηματική απεικόνιση του ελαϊκού οξέος

Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα



Εικόνα 2.5 : σχηματική απεικόνιση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων

Κορεσμένα λιπαρά οξέα



Εικόνα 2.6 : σχηματική απεικόνιση των κορεσμένων λιπαρών οξέων

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

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.

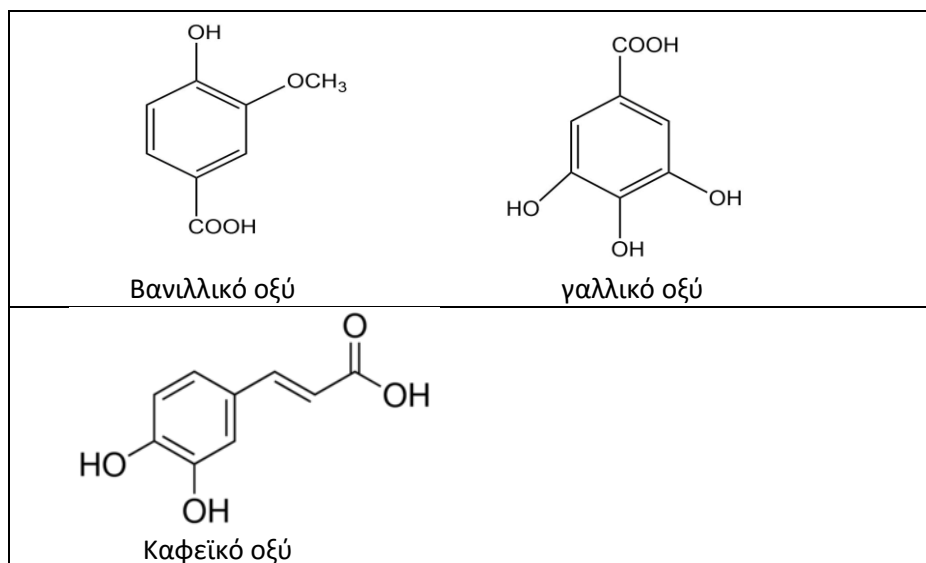
- **Φαινολικά συστατικά**

Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται τα απλά φαινολικά συστατικά όπως τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα συζευγμένα φαινολικά συστατικά όπως τα σεκοϊριδοειδή και τέλος τα флаβονοειδή.

Στα φαινολικά συστατικά οφείλεται η αντοχή του ελαιολάδου στην οξείδωση. Στην ελιά έχει αναφερθεί ότι βρίσκονται διάφορες флаβόνες και флаβονόλες καθώς και το βανιλικό οξύ και τα κινναμικά οξέα, όπως τα καφεϊκό και p-κουμαρικό οξύ. Το κυριότερο φαινολικό οξύ που περιέχεται στο ελαιόλαδο είναι το p-κουμαρικό οξύ. Ωστόσο η ελιά περιέχει έναν αριθμό χαρακτηριστικών συστατικών όπου περιλαμβάνονται η τυροσόλη, η υδρόξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη και ο λιγκστροσίδης τα οποία αποτελούν σημαντικά φαινολικά συστατικά.

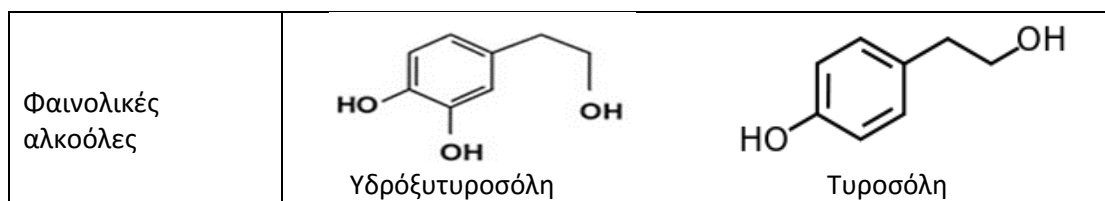
Η ελευρωπαΐνη είναι ένας εστέρας του ελενολικού οξέος με την υδρόξυτυροσόλη. Οι флаβονοειδείς πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο είναι φυσικά αντιοξειδωτικά και παρουσιάζουν πληθώρα θρεπτικών αντιδράσεων. Το περιεχόμενο σε φαινόλες εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, το χρόνο συγκομιδής, την διαδικασία παραγωγής και το χρονικό διάστημα που είναι αποθηκευμένο το ελαιόλαδο.

Φαινολικά οξέα



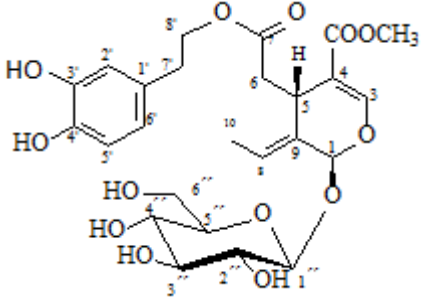
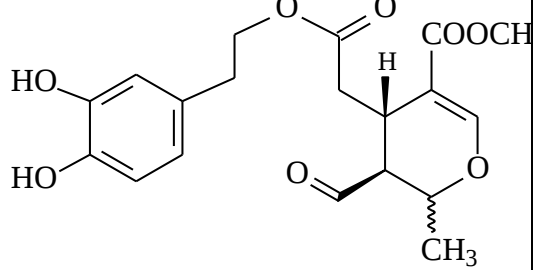
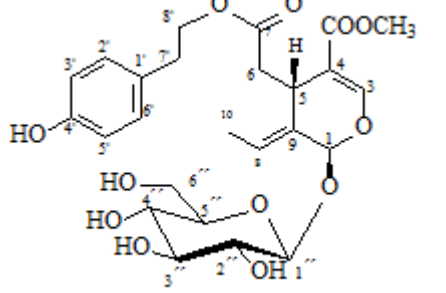
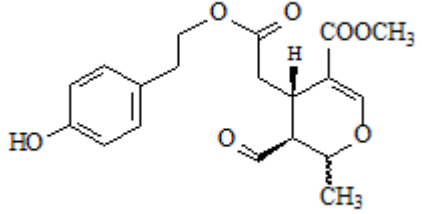
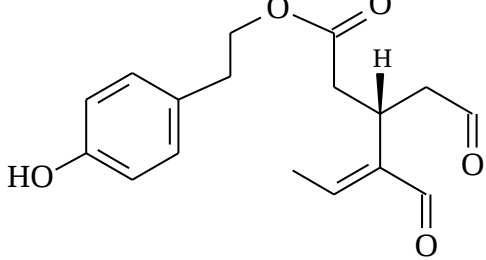
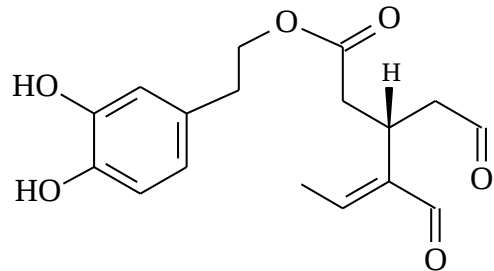
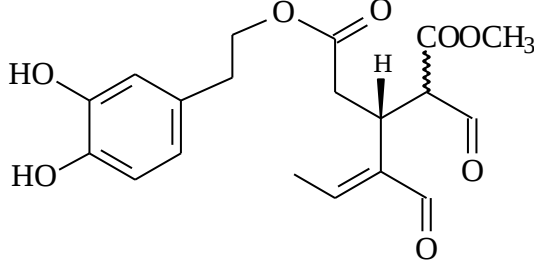
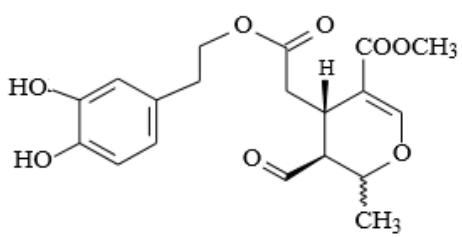
Εικόνα 2.7 : Σχηματική απεικόνιση των φαινολικών οξέων

Φαινολικές αλκοόλες



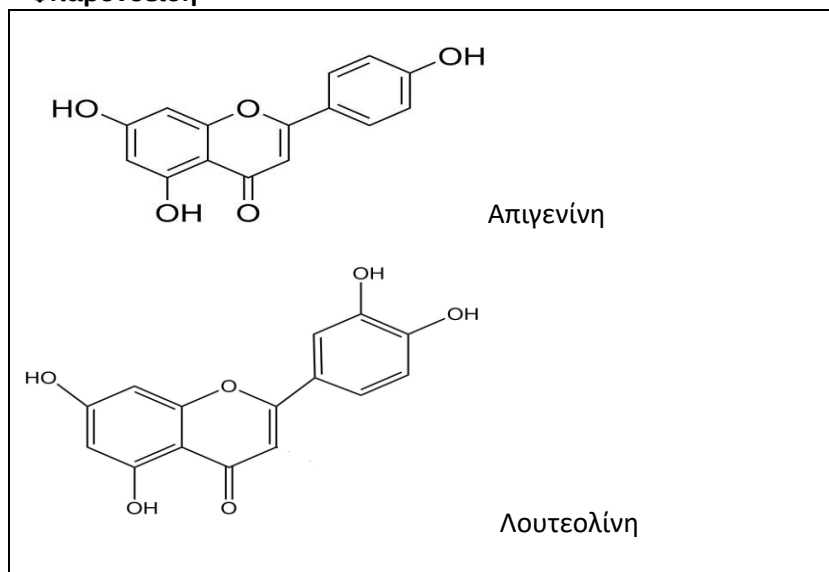
Εικόνα 2.8 : σχηματική απεικόνιση των φαινολικών αλκοολών

Συζευγμένα φαινολικά συστατικά

 Ελευρωπαΐνη	 Άγλυκο της ελευρωπαΐνης (κλειστή μορφή)
 Λιγκιστροσίδης	 Άγλυκο του λιγκιστροσίδης (κλειστή μορφή)
 Ελαιοκανθάλη	 Ελαιασίνη
 Ελευρωπαΐνοδιάλες	 Ελαιομισσιονάλη

Εικόνα 2.9 : σχηματική απεικόνιση των συζευγμένων φαινολικών συστατικών

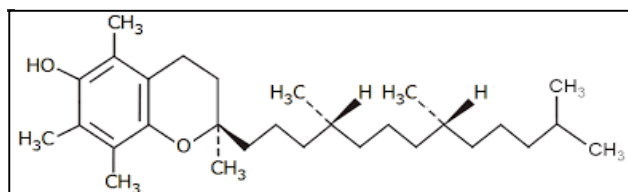
Φλαβονοειδή



Εικόνα 2.10 : σχηματική απεικόνιση των φλαβονοειδών

- **Βιταμίνες**

Οι βιταμίνες διακρίνονται γενικά σε δύο κατηγορίες τις λιποδιαλυτές και τις υδατοδιαλυτές. Το ελαιόλαδο περιέχει κυρίως λιποδιαλυτές βιταμίνες, ενώ οι ελιές περιέχουν εξίσου και τα δύο είδη βιταμινών. Η βιταμίνη Ε (α- τοκοφερόλη) αποτελεί ένα φυσικό αντιοξειδωτικό.



Εικόνα 2.11 : α – τοκοφερόλη

- **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 το συνδυασμό και το ποσοστό των παραπάνω χρωστικών.

- **Ιχνοστοιχεία**

Τα ιχνοστοιχεία κατανέμονται ποικιλοτρόπως στη φύση και περιέχονται στο νερό , στο έδαφος, στον αέρα και σε μικρές ποσότητες στο ελαιόλαδο.

Στο ελαιόλαδο βρίσκονται τα στοιχεία όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός εξαιτίας των διεργασιών της κατεργασίας της ελιάς και των διαδικασιών αποθήκευσης

Τα μέταλλα αυτά παίρνουν μέρος σε αντιδράσεις οξείδωσης των αλυσίδων των λιπαρών οξέων όπου δρουν ως καταλύτες. Αφού δρουν σαν καταλύτες , τα ιχνοστοιχεία επιδρούν

σημαντικά στη μείωση του χρόνου ζωής του ελαιολάδου. Οπότε είναι σημαντικό να προσδιορίζουμε τη ποσότητα των ιχνοστοιχείων στο ελαιόλαδο, η οποία αποτελεί ένα δείκτη που καθορίζει τη ποιότητα του ελαιολάδου.

- **Στερόλες**

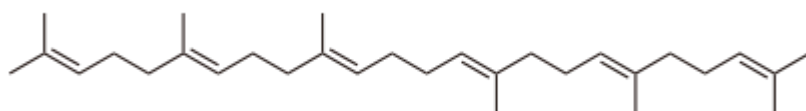
Οι κυριότερες στερόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο είναι η β-σιτοστερόλη, η Δ-αβεναστερόλη και η καμπεστερόλη.

- **Αλειφατικές αλκοόλες**

Το ελαιόλαδο περιέχει κορεσμένες αλειφατικές αλκοόλες ευθείας αλυσίδας με 18 έως 28 άτομα C.

- **Υδατάνθρακες**

Το σκουαλένιο αποτελεί ένα σημαντικό υδατάνθρακα του παρθένου ελαιολάδου, με περιεκτικότητα 2,5-10mg/g ελαιολάδου.



Εικόνα 2.12 : σχηματική απεικόνιση σκουαλενίου

2.3 Κριτήρια ποιότητας και κριτήρια γνησιότητας του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο είναι προϊόν με ιδιαίτερες οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες και εξαιτίας του υψηλού κόστους είναι επιρρεπές σε νοθεία.

Για τη διασφάλιση της Ποιότητας και της Γνησιότητας του ελαιολάδου έχουν θεσπιστεί νομοθετικές διατάξεις (Κανονισμός ΕΚ 2568/91 και Τροποποιήσεις του) που καθορίζουν τόσο τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όσο και τις μεθόδους χημικής ανάλυσης και οργανοληπτικής αξιολόγησης. Πρόκειται για τα κριτήρια ποιότητας, παράμετροι με καθορισμένες τιμές για την κάθε κατηγορία ελαιολάδου, παρέκκλιση των οποίων υποδηλώνει προϊόν υποβαθμισμένης ποιότητας και για κριτήρια γνησιότητας για ανίχνευση τυχών προσθήκης άλλων φυτικών ελαίων.

Κριτήρια ποιότητας	Οξύτητα
	Αριθμός υπεροξειδίων
	Φασματοσκοπική εξέταση στο υπεριώδες (λ=232nm και λ=270nm)
	Οργανοληπτική ανάλυση για το παρθένο ελαιόλαδο
Κριτήρια γνησιότητας (για ανίχνευση νοθείας με άλλα έλαια)	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων
	Στερόλες
	Φασματοσκοπική εξέταση στο υπεριώδες
	Trans-λιπαρά οξέα
	Αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων
	Τριγλυκερίδια
	Στερόλες

Πίνακας 2.12 : κριτήρια ποιότητας και γνησιότητας του ελαιολάδου

Κριτήρια ποιότητας

2.3.1 Μέτρηση οξύτητας

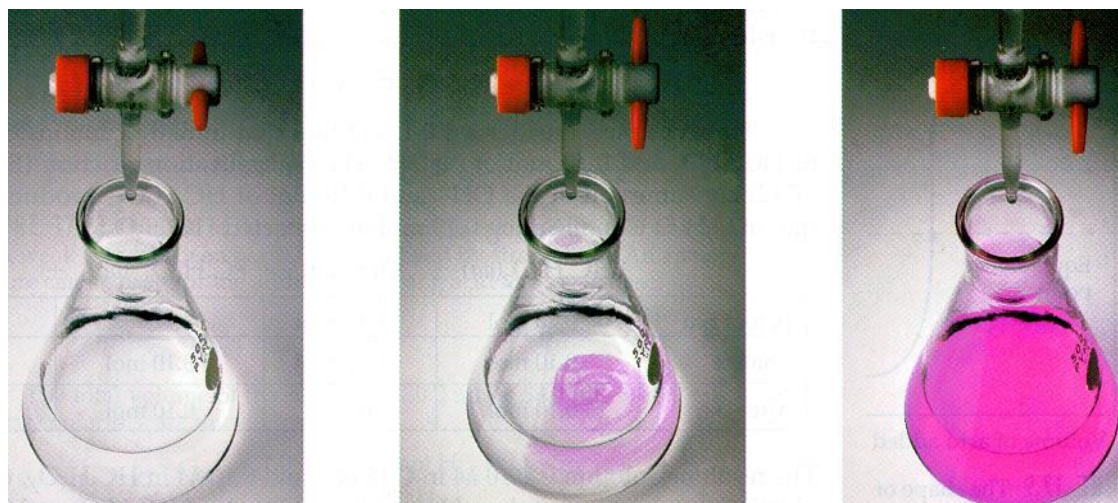
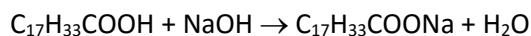
Το ελαιόλαδο είναι μίγμα εστέρων της γλυκερίνης με οργανικά λιπαρά οξέα, από τα οποία ακόρεστα είναι κυρίως το ελαϊκό οξύ και κορεσμένα το στεατικό και παλμιτικό οξύ. Οι εστέρες αυτοί, λόγω υδρόλυσης, διασπώνται εν μέρει σε γλυκερίνη και ελεύθερα οξέα. Η παρουσία ελεύθερων οξέων μειώνει την ποιότητα του ελαιολάδου και είναι πολύ σημαντικός ο ποσοτικός τους προσδιορισμός, ο οποίος γίνεται με τη μέτρηση της οξύτητας.

Ο βαθμός ελεύθερης οξύτητας ορίζεται ως το ποσό των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο και εκφράζεται ως ποσοστό (%) του ελαϊκού οξέος. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση του ελαιολάδου σε διάφορες κατηγορίες: εξαιρετικό παρθένο, παρθένο, ελαιόλαδο,

Επειδή τα λιπαρά οξέα που περιέχονται σε κάθε δείγμα ελαιολάδου ποικίλουν ποιοτικά και ποσοτικά, για τον προσδιορισμό της οξύτητας του ελαιολάδου δεχόμαστε ότι η συνολική ποσότητα των ελεύθερων λιπαρών του οξέων υπάρχει αποκλειστικά με τη μορφή του ελαϊκού οξέος, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ή πιο απλά $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$ ($M_r=282$).

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας των οξέων στο δείγμα του ελαιολάδου χρησιμοποιείται η μέθοδος της ογκομέτρησης, η οποία βασίζεται στην εξουδετέρωση της ποσότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων από το πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH).

Το δείγμα διαλύεται αρχικά σε μίγμα αιθανόλης – αιθέρα και στη συνέχεια ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα NaOH παρουσία δείκτη φαινολοφθαλεΐνης. Η αντίδραση η οποία πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 2.13 : διαδικασία ογκομέτρησης με πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) με δείκτη φαινολοφθαλεΐνη

Μετά την εξουδετέρωση, η οποία παρατηρείται με την αλλαγή του χρώματος της υδατικής φάσης ισχύει :

$$n \text{ (mmol) οξέος} = n \text{ (mmol) βάσης} = C \cdot V \text{ m}_{\text{ελαϊκού}} = CV \cdot 10^{-3} \cdot 282 = 0,282 \cdot CV \text{ g}$$

Αρα $\text{Οξύτητα \%} = (0,282 \text{ C V} / m_{\text{ελαιολάδου}}) * 100$
 $= (28,2 \text{ C V} / m_{\text{ελαιολάδου}})(g \text{ ελαϊκού} / 100g \text{ ελαιολάδου})$

2.3.2 Μέτρηση υπεροξειδίων

Η τιμή των υπεροξειδίων μετρά την κατάσταση οξείδωσης του ελαιολάδου, δεδομένου ότι προσδιορίζει τη συγκέντρωση των υπεροξειδίων στο δείγμα. Τα υπεροξείδια είναι κύριες ενώσεις οξείδωσης, που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης του ελαιολάδου, ως συνέπεια της παρουσίας οξυγόνου. Σε ένα δεύτερο στάδιο της διαδικασίας οξείδωσης, τα υπεροξείδια διασπώνται σε διαφορετικά τελικά προϊόντα οξείδωσης. Η τιμή υπεροξειδίου, καθώς επίσης και η οξύτητα, χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν τις κατηγορίες ελαιολάδου. Για να ταξινομηθεί ένα ελαιόλαδο ως εξαιρετικό παρθένο, η μέγιστη τιμή υπεροξειδίου δεν πρέπει να υπερβεί τα 20 χιλιοστοίσοδύναμα ανά κιλό ελαιολάδου.

Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζει την ποσότητα αυτών των συστατικών του δείγματος (εκφρασμένη σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά kg) που οξειδώνουν το ιωδιούχο κάλιο κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες αναλύσεις. Το δείγμα διαλύεται σε μίγμα οξικού οξέος και χλωροφόρμιου και προστίθεται διάλυμα ιωδιούχου καλίου και ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου.

Ο αριθμός υπεροξειδίων (AY), εκφράζεται σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά kg, δίνεται από τη σχέση:

$$AY = V \times T \times 1000 / m$$

Όπου:

- ✓ V είναι ο αριθμός των ml του προτύπου διαλύματος θειοθειικού νατρίου (6.4) χρησιμοποιούμενου για την ογκομέτρηση, μετά την αφαίρεση του λευκού,
- ✓ T είναι η ακριβής κανονικότητα του διαλύματος θειοθειικού νατρίου (6.4) που χρησιμοποιείται,
- ✓ m είναι η μάζα του δείγματος σε g.

2.3.3 Μέτρηση δεικτών Κ

Απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα: είναι ένας άλλος δείκτης που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της ποιότητας του ελαιολάδου. Αυτή η μέτρηση δίνει πληροφορίες για την ποιοτική κατάσταση του ελαιολάδου και ειδικότερα για τον προσδιορισμό του βαθμού της οξειδωτικής του αλλοίωσης. Καθοριστικό ρόλο για τον έλεγχο της νοθείας του ελαιολάδου παίζουν οι σταθερές K232, και K270 (απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα). Η φασματοφωτομετρική εξέταση του ελαιολάδου στο υπεριώδες, μετρά τις απορροφήσεις σε μήκη κύματος 232nm και 270nm, που τις συμβολίζουμε με K (K232, K270). Υπάρχει και ο δείκτης ΔK=(K270-(K264+K276))/ 2 που ορίζεται από μια μαθηματική σχέση υπολογισμού συντελεστών απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η απορρόφηση στα 232nm, οφείλεται σε ενώσεις (υδροϋπεροξειδία) που παράγονται σε ένα πρωταρχικό στάδιο οξείδωσης αλλά και σε ενώσεις (συζυγή διένια), που παράγονται σε ένα ενδιάμεσο στάδιο οξείδωσης. Έτσι η τιμή του συντελεστή K232 αυξάνεται, όταν ο ελαιόκαρπος αποθηκεύεται για πολλές μέρες μέχρι την έκθλιψή του, αλλά και όταν το ελαιόλαδο έχει αποθηκευτεί σε άσχημες συνθήκες.

Η απορρόφηση στα 270nm, οφείλεται σε ενώσεις με καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες), οι οποίες αποτελούν δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, καθώς και από ενώσεις (συζυγή τριένια), που παράγονται κατά την διάρκεια της βιομηχανικής του επεξεργασίας. Έτσι η τιμή του συντελεστή απορρόφησης K270 εξαρτάται, από το πόσο φρέσκο είναι το ελαιόλαδο. Παλαιά ελαιόλαδα ή μίγματα με παλαιά ελαιόλαδα, έχουν έχουν αυξημένες τιμές του K270. Επιπλέον, η τιμή του K270 αμέσως μετά την εμφιάλωση, είναι πολύ χαμηλή και αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας του ελαιολάδου. Η έκθεση του ελαιολάδου στην ηλιακή ακτινοβολία και γενικότερα η αποθήκευσή του σε υψηλές θερμοκρασίες, επιταχύνουν την πρόοδο της γήρανσης. Η απορρόφηση λοιπόν του ελαιολάδου στο υπεριώδες, αποτελεί ένα σημαντικό κριτήριο της ποιότητάς του. Επί πλέον ο συντελεστής K270 και ο δείκτης ΔΚ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σαν κριτήρια γνησιότητας (ενδεχόμενης νοθείας του).

Σύμφωνα με την Κοινοτική Νομοθεσία οι συντελεστές K για το τυποποιημένο ελαιόλαδο θα πρέπει να είναι :

K232

- μικρότερος του 2,50 για το «εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο»,
- μικρότερος του 2,60 για το «παρθένο ελαιόλαδο»,
- ενώ για το ελαιόλαδο «αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα» δεν υπάρχει όριο.

K270

- μικρότερος του 0,22 για το «εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο»,
- μικρότερος του 0,25 για το «παρθένο ελαιόλαδο» και
- μικρότερος του 0,90 για το ελαιόλαδο «αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα»

ΔΚ

Όσο μικρότερη είναι η τιμή του ΔΚ, τόσο υψηλότερη είναι η ποιότητα του ελαιολάδου, με μέγιστη τιμή 0,01 για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο.

2.3.4 Οργανοληπτική εξέταση

Η **οργανοληπτική αξιολόγηση** του ελαιολάδου στηρίζεται στις ανθρώπινες αισθήσεις και το χρώμα, η γεύση και το άρωμα είναι τα κύρια χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν την ποιότητα του παρθένου ελαιολάδου. Η οργανοληπτική αξιολόγηση χρησιμοποιείται, επειδή είναι η αποτελεσματικότερη μέθοδος για να αξιολογηθούν οι ποιοτικές διαφορές μεταξύ των ελαιολάδων, διαφορές που η φυσικοχημική ανάλυση αποτυγχάνει να εντοπίσει.

Χρώμα: Το χρώμα συνδέεται με την ποιότητα του ελαιολάδου και αυτό του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου είναι μεταξύ ανοικτού κίτρινου και πράσινου, ανάλογα με την περιεκτικότητα χλωροφύλλης και καροτένιου που περιέχονται στην ελιά. Οι χλωροφύλλες είναι υπεύθυνες για το κίτρινο-πράσινο χρώμα, ενώ το καροτένιο δίνει απόχρωση μεταξύ κίτρινου και κόκκινου. Το επίπεδο των ουσιών αυτών σχετίζεται με γενετικούς παράγοντες, τις συνθήκες παραγωγής και το στάδιο ωρίμανσης των καρπών. Η συγκέντρωσή τους μειώνεται με την πάροδο της ωρίμανσης και εξαφανίζεται στην πλήρη ωρίμανση του καρπού. Να σημειωθεί πως οι οργανοληπτικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την αξιολόγηση του παρθένου ελαιολάδου δεν απαιτούν τον προσδιορισμό του χρώματος, καθώς η μέτρηση αυτή γίνεται με χρήση ειδικών οργάνων.

Γεύση: Η γεύση είναι η αίσθηση που γίνεται αντιληπτή όταν ενεργοποιούνται οι γευστικοί κάλυκες. Οι τέσσερις βασικές γεύσεις είναι το γλυκό, το αλμυρό, το ξινό και το πικρό. Το παρθένο ελαιόλαδο δεν περιέχει σάκχαρα ή αλάτι και η αίσθηση του ξινού, που οφείλεται στα ελεύθερα λιπαρά οξέα, δεν γίνεται αντιληπτή, επειδή αυτά δεν είναι διαλυτά στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος. Το πικρό, στο παρθένο ελαιόλαδο οφείλεται σε ενώσεις που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο. Το ποσοστό των ενώσεων αυτών στο ελαιόλαδο εξαρτάται από γενετικούς παράγοντες, την ωρίμανση των καρπών και τις τεχνολογικές διαδικασίες εξαγωγής του ελαίου. Η συγκέντρωσή τους μειώνεται κατά την ωρίμανση, φθάνοντας στο μέγιστο όταν οι καρποί αποκτήσουν πορφυρό χρωματισμό.

Το ελαιόλαδο που εξάγεται σε μεταλλικούς μύλους είναι πικρότερο από εκείνο των πέτρινων μύλων. Η μακρόχρονη μάλαξη και οι υψηλές θερμοκρασίες μειώνουν την πικράδα. Με τον ίδιο τρόπο, η εξαγωγή με πίεση ή το διφασικό φυγοκεντρικό σύστημα παράγουν ελαιόλαδα με εντονότερη πικρή γεύση. Τα άγλυκα των γλυκοζιτών ευθύνονται για τη στυπτική γεύση (astringency) ορισμένων παρθένων ελαιολάδων. Η παρουσία τους δημιουργεί μια αίσθηση ξηρότητας και αγουρίλας στο στόμα, όπως η γεύση που έχουν ορισμένα κρασιά ή κυδώνια. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι ελαιόλαδα με αυξημένη περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη δίνουν την αίσθηση του πικάντικου στα ελαιόλαδα.

Άρωμα: Το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου είναι το σύνολο των αντιληπτών αισθήσεων, που δημιουργείται όταν οι διάφορες χημικές ενώσεις, που μεταφέρονται με τον αέρα κατά τη διάρκεια της εισπνοής και εκπνοής, φτάσουν στους υποδοχείς της όσφρησης. Το άρωμα παράγεται από πτητικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Το ερέθισμα μπορεί να γίνει αντιληπτό άμεσα (nasal), όταν το άρωμα φθάνει στο οσφραντικό επιθήλιο μέσω της μύτης και έμμεσα (retro nasal), όταν το άρωμα που γίνεται πτητικό στη θερμοκρασία του σώματος, περνά διαμέσου του στόματος στο οσφραντικό επιθήλιο.

Πάνω από εκατό πτητικές ενώσεις έχουν προσδιοριστεί στο παρθένο ελαιόλαδο που συμβάλλουν στο ξεχωριστό άρωμά του, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται C6 αλκοόλες, αλδεΐδες και εστέρες. Καμία από αυτές τις ενώσεις μόνη της, δεν μπορεί να εξηγήσει τη συνολική αίσθηση του αρώματος που δίνει το παρθένο ελαιόλαδο.

Το στάδιο ωρίμανσης των καρπών κατά τη συγκομιδή επηρεάζει το άρωμα του ελαιολάδου. Η μέγιστη ένταση αρώματος αντιστοιχεί στη μέγιστη περιεκτικότητα σε πτητικές ουσίες στο βέλτιστο στάδιο ωρίμανσης. Το σύστημα έκθλιψης του ελαιολάδου και οι συνθήκες κατά την επεξεργασία – ιδίως κατά την άλεση και μάλαξη του καρπού - επηρεάζουν το είδος και την ένταση του αρώματος. Έντονη άλεση και παρατεταμένη μάλαξη σε υψηλές θερμοκρασίες επιδρούν αρνητικά στο άρωμα του παραγομένου ελαιολάδου. Εντούτοις, η πίεση ή το διφασικό φυγοκεντρικό σύστημα παράγουν ελαιόλαδα με εντονότερο άρωμα.

2.4 Ποιοτικές κατηγορίες ελαιολάδου

Η **ποιοτική κατάταξη του ελαιολάδου** ακολουθεί συγκεκριμένη μεθοδολογία και υπακούει σε διεθνείς σταθερές όπως αυτές προβλέπονται από τους κανονισμούς που έχει εφαρμόσει το **Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου** (International Olive Council) το οποίο έχει συσταθεί ακριβώς για την προστασία της ποιότητας του ελαιολάδου και των καταναλωτών. [8]

Επίσημες Ποιοτικές Κατηγορίες Ελαιολάδου

2.4.1 Παρθένα Ελαιόλαδα

Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες, με συνθήκες που δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρισης και της διήθησης.

Τα έλαια αυτά κατατάσσονται και ταξινομούνται αναλυτικά με τις ακόλουθες ονομασίες:

α) Εξαιρετικό ή έξτρα Παρθένο Ελαιόλαδο (extra virgin olive oil)

Το ελαιόλαδο, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (οξύτητα), δεν υπερβαίνει τα 0,8 g ανά 100 g (0,8%) και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

β) Παρθένο Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 2,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

γ) Ελαιόλαδο Λαμπάντε

Το ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα είναι μεγαλύτερη του 2,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

2.4.2 Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό παρθένων ελαιολάδων, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0,3 % και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

2.4.3 Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα

Το έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

2.4.4 Ακατέργαστο Πυρηνέλαιο

Το έλαιο που λαμβάνεται από τους πυρήνες της ελιάς, κατόπιν επεξεργασίας με διαλύτες ή με φυσικά μέσα ή το έλαιο που αντιστοιχεί (με εξαίρεση ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά) σε ελαιόλαδο λαμπάντε.

2.4.5 Εξευγενισμένο Πυρηνέλαιο

Το έλαιο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό του ακατέργαστου πυρηνέλαιου, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0,3% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

2.4.6 Πυρηνέλαιο

Το έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου πυρηνέλαιου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

Κατηγορία	Οξύτητα	Αριθμός υπεροξειδίων (meqO ₂ /kg)	K270	K232	ΔΚ
Εξαιρετικά παρθένο	≤0,8	≤20	≤0,2	≤2,50	≤0,01
Παρθένο	≤2,0	≤20	≤0,25	≤2,60	≤0,01
Λαμπάντε	>3,3	>20	>0,25	≤3,70	-
Εξευγενισμένο	≤0,5	≤5	≤1,2	≤3,40	≤0,16
Ελαιόλαδο	≤1,0	≤15	≤1,0	≤3,30	≤0,13

Πίνακας 2.14 : κατηγορίες ελαιολάδων

Εκτός τις παραπάνω κατηγορίες ελαιολάδου, το προϊόν διακρίνεται επίσης σε:

Ελαιόλαδο Π.Ο.Π. (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης) : Πρόκειται για Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο, το οποίο παράγεται στα συγκεκριμένα γεωγραφικά όρια κάποιας περιοχής και τα χαρακτηριστικά του οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο γεωγραφικό αυτό περιβάλλον. Το περιβάλλον αυτό περιλαμβάνει τους φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία του προϊόντος λαμβάνουν χώρα στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή. Η τυποποίησή τους γίνεται σε αριθμημένα μπουκάλια.

Ελαιόλαδο Π.Γ.Ε. (Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης): Πρόκειται για Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο, του οποίου μια συγκεκριμένη ποιότητα ή άλλο χαρακτηριστικό μπορούν να αποδοθούν στη γεωγραφική του προέλευση και του οποίου η παραγωγή ή /και η μεταποίηση ή/και η επεξεργασία πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.

Ελαιόλαδο Προϊόν Οργανικής Καλλιέργειας : Πρόκειται για Εξαιρετικό Παρθένο ή Παρθένο Ελαιόλαδο, το οποίο προέρχεται από ελαιώνες στους οποίους εφαρμόζονται οι κανόνες της βιολογικής καλλιέργειας. Όλη η διαδικασία, από την καλλιέργεια έως και την εμφιάλωση, ελέγχονται από ειδικούς Οργανισμούς Πιστοποίησης και το ελαιόλαδο συνοδεύεται από ειδικές αναλύσεις που πιστοποιούν την έλλειψη υπολειμμάτων χημικών ουσιών στο τελικό προϊόν.

2.5 Ελαιόλαδο και υγεία

Το ελαιόλαδο περιέχει υψηλά επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) καθώς και πληθώρα βιοδραστικών συστατικών. Από αυτά, τα φαινολικά συστατικά είναι τα εκτενέστερα μελετημένα. Σχετικά με τα οφέλη των MUFA στην ανθρώπινη υγεία, ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Ποτών αδειοδότησε ποιοτικούς ισχυρισμούς υγείας

(health claims), για πρώτη φορά το 2004, σχετικά με την προστασία που προσφέρουν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα του ελαιόλαδου κατά του κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων. Συνολικά, τα οφέλη των λιπαρών οξέων του ελαιόλαδου συνοψίστηκαν στο πρώτο Διεθνές Συνέδριο για το Ελαιόλαδο και την υγεία, το 2005. [5], [10]

Το ελαιόλαδο όμως είναι παραπάνω από μια πλούσια πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα φαινολικά του συστατικά έχουν δείξει αντι-φλεγμονώδεις και χημειο-προστατευτικές ιδιότητες. [11] Η ελαιοκανθάλη του ελαιόλαδου, έχει βρεθεί να έχει παρόμοια δράση με το αντιφλεγμονώδες φάρμακο ibuprofene. Σε καμία από τις μελέτες, στις οποίες έχει εξεταστεί ο ρόλος των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου, δεν έχει παρουσιαστεί κυτταροτοξικότητα. [12]

Η ευρωπαϊκή μελέτη EUROLIVE (The effect of olive oil consumption on oxidative damage in European populations) παρουσίασε, το 2006, τεκμηριωμένες αποδείξεις για τον προστατευτικό ρόλο των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου. Τα πειράματα της μελέτης αυτής πραγματοποιήθηκαν σε 200 υγιείς εθελοντές από όλη την Ευρώπη και κατέδειξαν προστασία ενάντια στο οξειδωτικό στρες, κατόπιν καθημερινής κατανάλωσης 25 ml ελαιόλαδου πλούσιου σε φαινολικά συστατικά (παρθένο ελαιόλαδο). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα HDL (καλής χοληστερόλης), και μειωμένοι δείκτες λιπιδικού οξειδωτικού στρες μετά από τρίμηνη κατανάλωσης παρθένου ελαιόλαδου. Επιπλέον, η ίδια μελέτη, έδειξε μείωση σε δείκτες οξείδωσης του DNA, της τάξεως του 13% - ποσοστό συγκρίσιμο με τα ποσά που παρατηρούνται με το "κόψιμο" του καπνίσματος. [62]

Είναι επιστημονικά αποδεδειγμένη η ευεργετική επίδραση του ελαιόλαδου σε πληθώρα προβλημάτων υγείας που απασχολούν το σύγχρονο άνθρωπο: καρδιαγγειακά νοσήματα, αρτηριοσκλήρυνση, υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, παχυσαρκία, οστεοπόρωση, δερματολογικά προβλήματα. Επίσης, το ελαιόλαδο έχει αποδειχθεί ότι έχει αντικαρκινική και αντιγηραντική δράση και ωφελεί σε μεγάλο βαθμό το ανοσοποιητικό και πεπτικό σύστημα.

Ενέργεια	900kcal
Πρωτεΐνες	0.0g
Υδατάνθρακες	0.0g
Λιπαρά	100.0g
Κορεσμένα	16.0g
Μονοακόρεστα	76.0g
Πολυακόρεστα	7.9g
Χοληστερόλη	0.0mg

Πίνακας 2.15 : διατροφική αξία παρθένου ελαιόλαδου (100ml)

Επιπλέον σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 432/2012, τα ελαιόλαδα πλέον διακρίνονται ανάλογα με την ποσότητα των αντιοξειδωτικών που περιέχουν ως προς την επίδρασή τους στην υγεία. Στο ελαιόλαδο η υδροξύ- τυροσόλη και η τυροσόλη βρίσκονται υπό ελεύθερη μορφή σε πολύ μικρό ποσοστό (<10mg/kg). Ενώ οι πιο σημαντικές φαινολικές ουσίες του ελαιόλαδου είναι κυρίως η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη και δευτερευόντως η αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης και του λιγκστροσίδη, οι οποίες είναι παράγωγα τυροσόλης και υδροξύτυροσόλης.

Σύμφωνα με τον κανονισμό της ευρωπαϊκής ένωσης που εξέδωσε η ευρωπαϊκή επιτροπή για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA) σχετικά με το ελαιόλαδο εάν σε ένα ελαιόλαδο μπορεί να πιστοποιηθεί η περιεκτικότητά του σε υδροξύτυροσόλη και παράγωγά της με κάποιο

τρόπο, έχει τη δυνατότητα να το αναγράφει στην ετικέτα του, προκειμένου αυτό να μπορεί να καταναλωθεί ως έλαιο με υγειοπροστατευτικές ιδιότητες.

Ο ισχυρισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για ελαιόλαδο το οποίο περιέχει τουλάχιστον 5 mg υδροxyτυροσόλης και τα παράγωγά της (π.χ. σύμπλεγμα ελευρωπαΐνης και τυροσόλης) για κάθε 20 γραμμάρια ελαιολάδου. Προκειμένου να φέρει αυτόν τον ισχυρισμό, θα πρέπει να παρέχεται στον καταναλωτή η πληροφορία ότι το ωφέλιμο αποτέλεσμα αποκτάται από την ημερήσια πρόσληψη 20 γραμμαρίων ελαιολάδου.

Εξαιτίας της σημαντικότητας των τεσσάρων σεκοϊριδοειδών στο ελαιόλαδο πριν από 3 χρόνια αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος, η οποία επιτρέπει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους στο ελαιόλαδο με χρήση της Φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$). [15]

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος που θα περιγραφεί παρακάτω έχει τον ίδιο σκοπό, δηλαδή τον εύκολο και γρήγορο ποσοτικό προσδιορισμό των δύο πιο διαδεδομένων σεκοϊριδοειδών της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης.

3 Κεφάλαιο

3. Βιολογικές δράσεις των φαινολικών συστατικών

Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου εμφανίζουν ιδιαίτερη βιοδιαθεσιμότητα στον άνθρωπο, η οποία συντελεί στην ενίσχυση της άποψης ότι τα φαινολικά συστατικά ασκούν θετική επίδραση στην υγεία. Αν και οι ευεργετικές επιδράσεις του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου είναι γενικά γνωστές, πρόσφατα άρχισαν να ερευνώνται και οι βιολογικές ιδιότητες των μικροσυστατικών του που κατέχουν επίσης σημαντικό ρόλο.

Οι φαινόλες του ελαιόλαδου λειτουργούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά και προστατεύουν το ελαιόλαδο από την οξείδωση, όταν αυτό δέχεται την καταστροφική επίθεση του οξυγόνου του ατμοσφαιρικού αέρα και της ηλιακής ακτινοβολίας.

Ένα ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες έχει υψηλό βαθμό προστασίας και αντοχής στον χρόνο, ενώ ταυτόχρονα η κατανάλωσή του προστατεύει τα ανθρώπινα κύτταρα από το οξειδωτικό stress.

Έχουν γίνει πάρα πολλές μελέτες οι οποίες συσχετίζουν την θετική επίδραση του ελαιόλαδου στη υγεία με τη παρουσία φαινολών. Μερικά παραδείγματα θετικών επιδράσεων είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Η κατανάλωση ελαιόλαδου σχετίζεται με τη μείωση της συγκέντρωσης LDL-χοληστερόλης και με την ταυτόχρονη αύξηση της HDL-χοληστερόλης. Αυτό έχει ως συνέπεια να μειώνεται ο κίνδυνος καρδιαγγειακών νοσημάτων. [16]
- ✓ Έχει αποδειχθεί in vitro ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. [17]
- ✓ Επίσης είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες καθώς προστατεύουν από την οξείδωση το DNA. Αυτή η ιδιότητα τους έχει αποδειχθεί in vivo [19], [20] και in vitro [18].

Το φαινολικό κλάσμα του ελαιόλαδου είναι ένα σύνολο απλών φαινολών και πολυφαινολών. Από διάφορους τύπους ελαιόλαδου έχουν απομονωθεί περισσότερες από 20 φαινόλες. Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε :

- i. απλές φαινολικές ενώσεις,
- ii. συζευγμένα παράγωγα φαινολικών ενώσεων (φαινολικοί γλυκοσίδες και σεκοϊριδοειδή)
- iii. φλαβονοειδή

3.1 Βιολογικές δράσεις απλών φαινολικών ενώσεων (φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες)

Τα **φαινολικά οξέα** είναι γνωστά κυρίως για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες αλλά και για τις **αντιτροφικές** τους δράσεις. [21]

Τα φαινολικά οξέα παρέχουν **προστασία κατά των καρδιαγγειακών νοσημάτων** μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης τους και συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2.

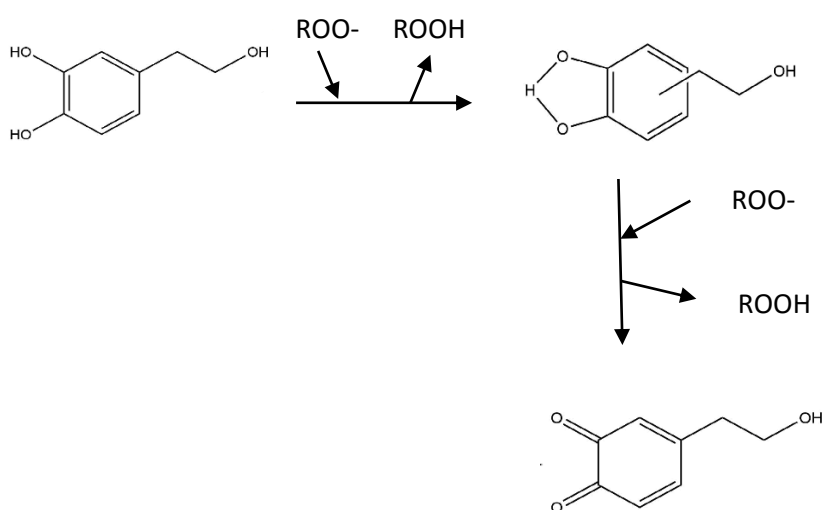
Επιπλέον είναι δραστικά κατά των μικροοργανισμών *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* και *Listeria monocytogenes*. Επίσης έχουν **αντιφλεγμονώδη** δράση αφού αναστέλλουν την 5-λιποξυγενάση [22] και κάποια παράγωγα καφεϊκού οξέος έχουν πιθανή αντισπασμωδική δράση αφού προκαλούν in vivo αναστολή των σπασμών που προκαλούνται σε πειραματόζωα με ηλεκτρικά μέσα. [23]

Άλλες σημαντικές δράσεις είναι η αντιαλλεργική, η προστατευτική έναντι παρενεργειών από τις χημειοθεραπείες.

Οι πιο διαδεδομένες **φαινολικές αλκοόλες** στην ελιά είναι η υδρόξυτυροσόλη και η τυροσόλη οι οποίες έχουν τις ακόλουθες βιολογικές δράσεις

- **Αντιοξειδωτική δράση**

Οι δύο αυτές φαινόλες διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Αυτό έχει ως συνέπεια να έχουν σημαντική δράση έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου. Η δράση αυτή οφείλεται στην ικανότητα παγίδευσης των ελευθέρων ριζών μειώνοντας έτσι τα επίπεδα των δραστικών μορφών του οξυγόνου. Το οξειδωτικό στρες που παράγεται από τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) έχει συνδεθεί με ορισμένες μορφές καρκίνου. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η υδρόξυτυροσόλη και η τυροσόλη μειώνουν την παραγωγή ROS [24]



Σχήμα 3.1 : μηχανισμός παγίδευσης ελεύθερων ριζών από την υδρόξυτυροσόλη

- **Αντιμικροβιακή δράση**

Ιδιαίτερα η υδροξυτυροσόλη αλλά και η τυροσόλη έχουν εμφανίσει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε πολλά στελέχη βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για εντερικές λοιμώξεις και λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. [17]

Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των οστών και την πρόληψη από την οστεοπενία, λόγω της πολύ ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης τους [25]

Η **υδρόξυτυροσόλη** έχει αναφερθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και αθηροσκλήρωσης. Επίσης αναστέλλει τη λιποξυγενάση του αραχιδονικού οξέος ή εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο αίμα του ανθρώπου (in vitro) . [26]

Άλλες δράσεις της υδρόξυτυροσόλης είναι η αντιμικροβιακή [63] ενάντια στα στελέχη της *Pseudomonas fluorescens* ATCC.[27] , η αντιϊκή [64] και αντιφλεγμονώδης δράση [65],[26].

Έρευνες μέχρι σήμερα έδειξαν ότι η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην ανθρώπινη προμυελοκυτταρική λευχαιμία HL60 κύτταρα και στον ανθρώπινο καρκίνο του παχέος εντέρου. [28] Επιπλέον, η υδροξυτυροσόλη έχει βρεθεί ότι ασκεί ισχυρή

αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση ενάντια σε ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου. [29]

Η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη έχουν την ιδιότητα να προκαλούν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7. [30]

Η **τυροσόλη** βρίσκεται στο καρπό της ελιάς σε μικρότερες ποσότητες από την υδροξυτυροσόλη και η αντιοξειδωτική της δράση είναι ασθενέστερη. Η τυροσόλη προστατεύει από την οξείδωση την LDL χοληστερόλη. Επιπλέον έχει καρδιοτονωτικές ιδιότητες και καρδιοπροστατευτικές.

3.2 Βιολογικές δράσεις συζευγμένων φαινολικών συστατικών

Τα σημαντικότερα συστατικά τα οποία εντάσσονται σε αυτή την κατηγορία είναι η ελευρωπαΐνη, το άγλυκο της ελευρωπαΐνης, ο λιγκστροσίδης, το άγλυκο του λιγκστροσίδη και τα παράγωγά τους ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη.

3.2.1 Βιολογικές δράσεις ελευρωπαΐνης

Το μόριο της **ελευρωπαΐνης** χαρακτηρίζεται από ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις όπως:

- **αντικαρκινική**

Η ελευρωπαΐνη παρουσιάζει δράση έναντι πολλών σειρών καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων.

- **αντιμικροβιακή**

Η ελευρωπαΐνη παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή δράση όσον αφορά τα *Gram* – αρνητικά όσο και στα *Gram* – θετικά βακτήρια. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται με την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βακτηρίων των οποίων ο πολλαπλασιασμός αναστέλλεται από το μόριο της ελευρωπαΐνης είναι οι *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*. [31], [32]

- **αντιική**

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιικής δράσης είναι οι ιοί του έρπη, της ηπατίτιδας, ο ρινοϊός και ο ιός που προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα. [33]

- **αντιοξειδωτική**

Η ελευρωπαΐνη διαθέτει ικανότητα παγίδευσης ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα ριζών NO

- **αντιφλεγμονώδης**

Η αντιφλεγμονώδης δράση της διενεργείται με αναστολή της δράσης του ενζύμου λιποξυγεννάση και της παραγωγής του λευκοτριενίου B₄

- **υπολιπιδαιμική**

Επιπλέον η ελευρωπαΐνη παρουσιάζει υπολιπιδαιμική δράση, μειώνοντας τα ολικά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, ενώ ταυτόχρονα μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος σε κουνέλια με υπερχοληστερολαιμία.

3.2.2 Βιολογικές δράσεις της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης

Το μόριο της **αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης** είναι ένα ελαιώδες συστατικό και κατατάσσεται στις όρθο- διφαινόλες . Το άγλυκο της ελευρωπαΐνης έχει τις ακόλουθες φαρμακολογικές δράσεις:

- **Δράση κατά της νόσου Alzheimer**

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση του άγλυκου ελευρωπαΐνης βελτίωσε σημαντικά τη γνωστική απόδοση των νέων / μεσήλικων TgCRND8 ποντικών, σε σχέση με ίδιας ηλικίας ποντίκια με un - συμπληρωμένη δίαιτα .Χρησιμοποιήθηκαν διπλά διαγονιδιακά ποντίκια TgCRND8 (που υπερεκφράζουν δυο μεταλλάξεις στην ανθρώπινη πρωτεΐνη προδρόμου αμυλοειδούς), ηλικίας 1,5 και 4 μηνών, και ποντίκια ελέγχου φυσικού τύπου ίδιας ηλικίας. Χορηγήθηκε επί 8 εβδομάδες στη διατροφή τους άγλυκο ελευρωπαΐνης σε δόση 50 mg / kg τροφής. Η ανάλυση ανοσοφθορισμού εγκεφαλικού ιστού στα διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί άγλυκο ελευρωπαΐνης έδειξε σημαντικά μειωμένα επίπεδα β-αμυλοειδούς και οι πλάκες που εμφανίστηκαν ήταν λιγότερες και λιγότερο συμπαγείς. [71]

- **Αντιοξειδωτική δράση,**

Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση , η οποία είναι συγκρίσιμη με αυτή της ελευρωπαΐνης.

- **Αντιμικροβιακή δράση**

Επίσης το άγλυκο της ελευρωπαΐνης είναι ένα φαρμακολογικά δραστικό μόριο, γνωστό για τη δυνητική χρησιμοποίησή του σαν αντιμικροβιακό σε κάποιες κοινές ασθένειες των ελαιόδεντρων. [34] Για παράδειγμα, εμποδίζει την ωτοκία του εντόμου *Dacus oleae* που προσβάλλει την ελιά . [35]

- **Αντικαρκινική δράση**

Υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να αποτρέπει τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό κυττάρων στον καρκίνο του μαστού . [36]

3.2.3 Βιολογικές δράσεις ελαιοκανθάλης

Μερικές από τις φαρμακολογικές της δράσεις είναι οι ακόλουθες:

- **Δράση κατά της νόσου Alzheimer**

Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τα διαλυτά ολιγομερή του αμυλοειδούς-b1-42 πεπτιδίου, δρουν ως βασική νευροτοξίνη στη νόσο Alzheimer. Κατά συνέπεια, οι ενώσεις που δύνανται να τροποποιήσουν τη δημιουργία των ολιγομερών αυτών (τα οποία αναφέρονται ως ADDLs), μπορεί να έχουν θεραπευτική δράση έναντι της ασθένειας του Alzheimer. Η ελαιοκανθάλη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ικανότητά της να διαταράσσει τον ολιγομερισμό αυτό, προστατεύοντας ταυτόχρονα τους νευρώνες από τις συναπτοπαθολογικές επιπτώσεις των ADDLs. [37] Η ελαιοκανθάλη επίσης, έχει την ιδιότητα να αναστέλλει το σχηματισμό tau-ινιδίων τροποποιώντας ομοιοπολικά το PHF-6 πεπτίδιο που είναι ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό τους. Αυτή η διαδικασία

οδηγεί σε νευροϊνιδιακές εμπλοκές οι οποίες συνδέονται εγγενώς με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer. Οι δυο αλδεΐδες της ελαιοκανθάλης σχηματίζουν σύμπλοκο με την δομική μονάδα της λυσίνης μέσω της αντίδρασης σχηματισμού βάσης Schiff στο PHF6 πεπτίδιο, επηρεάζοντας σημαντικά την συσσωμάτωση των T (tau) πρωτεϊνών στα νευροϊνίδια. [38]

Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι η ελαιοκανθάλη ενισχύει την κάθαρση του Αβ από τον εγκέφαλο μέσω upregulation της P-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr) και της LDL lipoprotein receptor related protein-1 (LRP1) που είναι οι κύριες πρωτεΐνες μεταφοράς του Αβ, στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB). Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και οι in vitro και in vivo μελέτες, οι οποίες έγιναν σε καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικών εγκεφάλου, όπου η ελαιοκανθάλη αύξησε την έκφραση και δραστηριότητα της P-gr και LRP1.

Επίσης μελέτη με 125I-Αβ40 έδειξε ότι η χορήγηση της ελαιοκανθάλης σε C57BL / 6 ποντίκια άγριου τύπου ενίσχυσε την κάθαρση του 125I-Αβ40 από τον εγκέφαλο από $62,0 \pm 3,0\%$ για ποντίκια ελέγχου $79.9 \pm 1.6\%$ για τα ποντίκια με ελαιοκανθάλη. Η μελέτη αυτή κράτησε 2 εβδομάδες και στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτονικά σε δόση 10 mg/kg δυο φορές την ημέρα. Διαπιστώθηκε αυξημένη P-gr και έκφραση LRP1 στα μικροαγγεία του εγκεφάλου επιβεβαιώνοντας το ρόλο αυτών των πρωτεϊνών για την ενίσχυση της κάθαρσης 125I-Αβ40 από την ελαιοκανθάλη.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν σημαντική αύξηση αποικοδόμησης του 125I-Αβ40 ως αποτέλεσμα της upregulation των ενζύμων αποικοδόμησης του Αβ νεπριλυσίνη (NEP) και του insulin degrading enzyme (IDE). [72]

Το ίδιο φαινόμενο έχει μελετηθεί αναλυτικά από άλλη ομάδα που έδειξε ότι η ελαιοκανθάλη in vitro δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς με το ινιδιογόνο τμήμα των tau πρωτεϊνών. [74]

- **Δράση κατά της οστεοαρθρίτιδας**

Η οστεοαρθρίτιδα (OA) είναι μια ασθένεια της οποίας η εξέλιξη χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO). Πρόσφατα, η ελαιοκανθάλη που απομονώθηκε από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο βρέθηκε να εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση παρόμοια με αυτή της ιβουπροφαίνης, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, που χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπευτική διαχείριση των κοινών φλεγμονωδών νόσων. Η ελαιοκανθάλη και τα παράγωγά της μειώνουν την επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτες σύνθεση NO στα κύτταρα των χόνδρων, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η βιωσιμότητα των κυττάρων. Επίσης, η ελαιοκανθάλη παρεμβαίνει στη σύνθεση των προσταγλανδινών, μέσω της ανασταλτικής δράσης που ασκεί στα ένζυμα της κυκλοξυγενάσης. [39] Συνεπώς η ελαιοκανθάλη δυνητικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό όπλο για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας .

- **Αντικαρκινική δράση**

Η ελαιοκανθάλη έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυτταρικών σειρών των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και του προστάτη και κατέδειξε αντι – αγγειογενετική δραστηριότητα. Αναστέλλει τη

φωσφορυλίωση της c-Met κινάσης in vitro με IC50 4,8 μ M, οπότε ενδέχεται να έχει θεραπευτική χρήση για την καταπολέμηση κακοηθειών. Επίσης αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την εισβολή των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF7, MDA MB231 και PC-3 του στήθους και του προστάτη, αντίστοιχα. [40]

Επιπλέον η ελαιοκανθάλη έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει τη δράση της ραπαμικίνης (mTor: mammalian target of rapamycin), η οποία είναι μία κινάση. Η κινάση αυτή παίζει σημαντικό ρόλο για την ομοιόσταση, το μεταβολισμό και τον κυτταρικό κύκλο. Σε περίπτωση εμφάνισης καρκίνου παρατηρείται συχνά ανώμαλη ενεργοποίηση της, η οποία υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η ελαιοκανθάλη αναστέλλοντας τη δράση της, μειώνει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. [41]

Πρόσφατα οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η ελαιοκανθάλη μπορεί να προκαλέσει το θάνατο στα καρκινικά κύτταρα πολύ γρήγορα, μέσα σε 30 λεπτά, αντί των 16 έως 24 ωρών που απαιτείται για προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. [75]

- **Ελέγχει τη γήρανση του δέρματος**

Παρεμποδίζει τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων σε περιπτώσεις στρες που οφείλεται σε περιβαλλοντικούς λόγους, με τη διέγερση της σύνθεσης δερματικών λιπιδίων, καθώς και με τη διέγερση των γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με τη διαφοροποίηση ανάμεσα στα κύτταρα. [42]

- **Αντιμικροβιακή δράση**

Επίσης η ελαιοκανθάλη έχει αποδειχθεί ότι δεν υδρολύεται στο στομάχι και γι' αυτό το λόγο βοηθάει στην αναχαίτιση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Helicobacter pylori*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση πεπτικού έλκους και ορισμένων τύπων καρκίνου. [43]

- **Αντιφλεγμονώδης δράση**

Η ελαιοκανθάλη έχει αντιφλεγμονώδη δράση έναντι σε μακροφάγα κύτταρα J774 ποντικού και σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα ATDC5. Από αυτή την έρευνα προτάθηκε η ελαιοκανθάλη ως ένα μελλοντικό θεραπευτικό μέσο για την θεραπεία των φλεγμονών από αρθροπάθειες. [44]

- **Αντιογκογόνο δράση**

3.2.4 Βιολογικές δράσεις της ελαιασίνης

Η ελαιασίνη είναι μια ουσία με φαρμακολογικές δράσεις παρόμοιες με αυτές της ελαιοκανθάλης, κυρίως σε ό, τι αφορά την τοπική χρήση της.

- **Αντιοξειδωτική δράση**

Μια σημαντική δράση που εμφανίζει, σε αντίθεση με την ελαιοκανθάλη, είναι η προστασία των ανθρώπινων κυττάρων από το οξειδωτικό στρες σε μεγαλύτερο βαθμό ακόμα και από την υδροξυτυροσώλη. [45]

- **Αναστολέας μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE)**

Η αναστολή του ACE επιφέρει αγγειοδιαστολή συνεπώς η ελαιασίνη θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της υπέρτασης και της καρδιακής ανεπάρκειας. [46]

- **Αντιγηραντική δράση**

Η ελαιασίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, και έτσι μπορεί να αποτρέψει την οξείδωση της LDL, το οξειδωτικό στρες και τις οξειδωτικές βλάβες του DNA. Τα ενδοθηλιακά πρόγονα αιμοποιητικά κύτταρα (EPC) συνιστούν το βασικό μηχανισμό με τον οποίο επιδιορθώνονται τα κατεστραμμένα αιμοφόρα αγγεία. Επίσης, αυτά τα κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες. Η ελαιασίνη μειώνει τη γήρανση των κυττάρων που επάγεται από την αγγειοτενσίνη II και αναστέλλει το σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της νιτροτυροσίνης και τη μείωση των οξειδωτικών βλαβών στο DNA. Επιπλέον, η ελαιασίνη αυξάνει το αγγειογενετικό δυναμικό των ενδοθηλιακών πρόγονων αιμοποιητικών κυττάρων *in vitro*. Συνεπώς η ελαιασίνη μπορεί να προστατεύσει τα EPC από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την αγγειοτενσίνη II. [47]

- **Καρδιοπροστατευτική δράση**

Η ελαιασίνη αναστέλλει την απελευθέρωση μυελοϋπεροξειδάσης από τα ουδετερόφιλα, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει το ρόλο του ελαιόλαδου στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Παρ' όλα αυτά όμως το άμεσο αποτέλεσμα της ελαιασίνης στη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. [48]

- **Αντιφλεγμονώδης δράση**

Η ελαιασίνη ενισχύει την αντιφλεγμονώδη δράση συμπλόκων αιμοσφαιρίνης και απτοσφαιρίνης 1-1 και 2-2 και μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο σε ασθένειες που σχετίζονται με τη αθηροσκλήρωση. [49]

3.2.5 Βιολογικές ιδιότητες αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη

Είναι ένα ελαιώδες συστατικό, που έχει απομονωθεί παλαιότερα από την ελιά. Είναι γνωστή, όπως σχεδόν όλες οι φαινολικές ουσίες της *Olea europaea*, για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Επίσης το άγλυκο του λιγκστροσίδη προκαλεί υψηλά επίπεδα αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε υπερεκφραζόμενα καρκινικά κύτταρα μαστού HER2 και έδειξε μέτρια κυτταροτοξικότητα ενάντια σε μια ομάδα 39 ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro*. [50] Επίσης εμφανίζει την υψηλότερη αντι-μεταστατική δράση σε σχέση με την ελαιοκανθάλη και την τυροσόλη. Το άγλυκο του λιγκστροσίδη ενώ εμφανίζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα στερείται κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικά κύτταρα. Τέλος, ασκεί ελάχιστη ανασταλτική δράση στη φωσφορυλίωση του c-MET, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει ότι η αντι-μεταστατική του δράση θα μπορούσε να είναι μέσω διαφορετικού μοριακού στόχου από το c-MET. [51]

3.3 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα στο καρπό της ελιάς. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι έχουν την δυνατότητα να αποτρέπουν αλλά και να θεραπεύουν διάφορες ασθένειες όπως να μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων . Τα φλαβονοειδή δρουν ως αντιοξειδωτικά δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης χρησιμοποιούνται κυρίως ως αγγειοπροστατευτικά και τονωτικά φλεβών

Κεφάλαιο 4

4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου όπως προανέφερα συμβάλλουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες στα πλαίσια μιας ποικίλης και ισορροπημένης διατροφής.

Ο ισχυρισμός υγείας μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο για το ελαιόλαδο το οποίο περιέχει τουλάχιστον 5 mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της (π.χ. σύμπλοκο ελευρωπαΐνης και τυροσόλης) ανά 20 g ελαιολάδου (αλλιώς 250 mg/l ή 250 ppm) μέχρι την ημερομηνία λήξης του . Για να χρησιμοποιηθεί ο ισχυρισμός αυτός, θα πρέπει να παρέχεται στον καταναλωτή η πληροφορία ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα εξασφαλίζονται με την ημερήσια πρόσληψη 20 g ελαιολάδου. Επίσης είναι πολύ σημαντικό να αναγράφεται το ποσοστό των ολικών φαινολών ανά 100 g ελαιολάδου αλλά και το ποσοστό του αθροίσματος της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης (δείκτης D1)

Ο δείκτης D1 είναι πολύ σημαντικό να προσδιορίζεται γιατί η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη είναι δύο σεκοϊριδοειδή τα οποία μπορούν να δώσουν υγειοπροστατευτικές ιδιότητες στο ελαιόλαδο. Όπως προαναφέρθηκε μερικές από τις ιδιότητες της ελαιοκανθάλης είναι η ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση , η δράση της ως αναστολέας της εξέλιξης της νόσου Alzheimer και η προστασία έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων ενώ η ελαιασίνη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Αν ένα ελαιόλαδο ξεπερνάει τα 5 mg ελαιοκανθάλη και ελαιασίνης (δείκτη D1) ανά 20 g ελαιολάδου, αυτό μόνο αρκεί για να το κατατάξει σε ελαιόλαδο το οποίο μπορεί να πάρει ισχυρισμό υγείας.

Για όλους αυτούς τους λόγους είναι πολύ ωφέλιμο να βρεθεί μια αξιόλογη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, δηλαδή του δείκτη D1 στο ελαιόλαδο.

Οι μέθοδοι , οι οποίοι χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα για τον ποσοτικό και τον ποιοτικό προσδιορισμό των φαινολών στο ελαιόλαδο είναι οι ακόλουθοι.

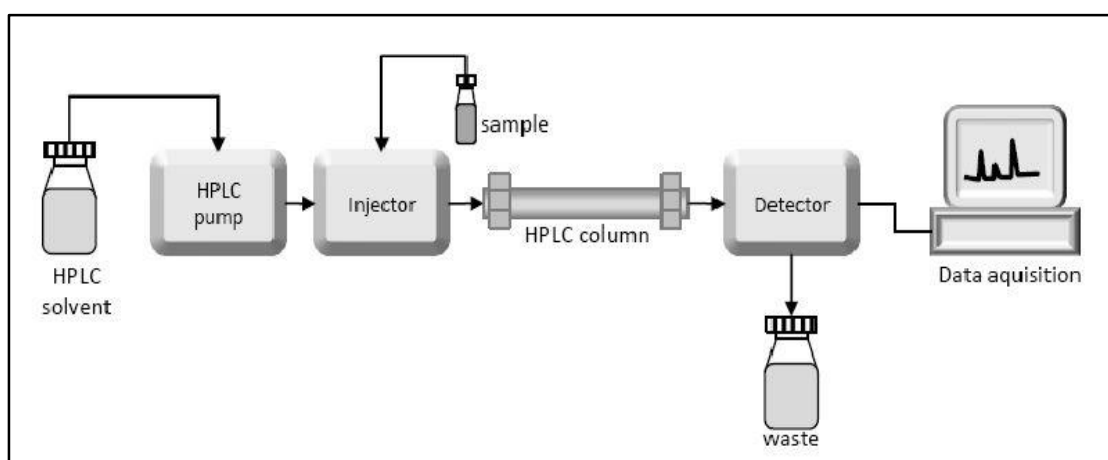
4.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού, ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών ουσιών των τροφίμων είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Ως HPLC, ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσκευή υγρού χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανείς διαλύτες (οργανικοί, νερό, ρυθμιστικά διαλύματα και άλλα), υπό ελεγχόμενη πίεση, ενώ η στατική φάση αποτελείται από πυριτική πηκτή ή από πολυμερείς ενώσεις .[52]

Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης, η μέθοδος HPLC αποδίδει χρωματογραφικούς διαχωρισμούς σύμφωνα με τις αρχές προσρόφησης , της κατανομής ή συνδυασμού αυτών, της ιοντοανταλλαγής και τέλος της μοριακής διήθησης. Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για τον διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλουσης με αυτούς προτύπων ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού.

Τα τελευταία χρόνια, η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης-ανάστροφης φάσης (Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography, RP-HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible, UV-Vis), αποτελεί την πρώτιστη μέθοδο ανάλυσης, για δεδομένες αναλύσεις [53]. Με RP-HPLC, συνδυασμένη με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή και κινητή φάση ακετονιτρίλιο-οξικό οξύ, έχειδειχθεί ότι μπορούν ταυτόχρονα να διαχωριστούν και ποσοτικοποιηθούν οι κύριες φαινολικές ενώσεις, όπως αυτές που παραλαμβάνονται από εκχύλιση του ελαιολάδου . [54]

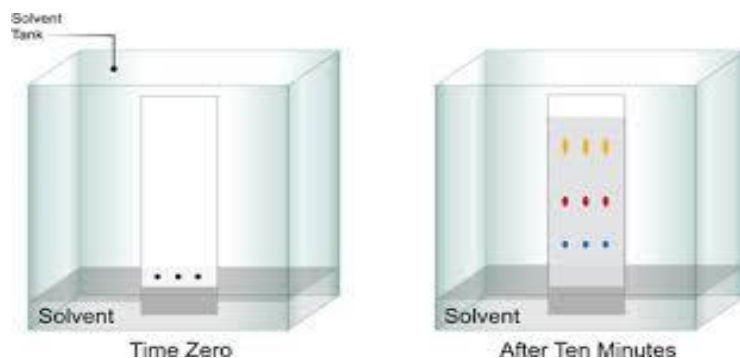
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τη RP-HPLC/UV-Vis, έχουν εφαρμοστεί συστήματα όπως υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή υπερύθρου (Infrared Liquid Chromatography, IR-LC) [55] και υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή κυκλικού διχρωϊσμού (Circular Dichroism Liquid Chromatography, CD-LC) .[56]



Εικόνα 4.1 : σχηματική απεικόνιση του αέριου χρωματογράφου

4.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Άλλη μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού, ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών ουσιών των τροφίμων είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC). Στην TLC, ο διαχωρισμός γίνεται σε πλάκες με στατική φάση κυτταρίνη, πολυαμίδιο και συνηθέστερα silica gel, ενώ ως σύστημα ανάπτυξης μίγματα διαφόρων διαλυτών. Για την επιλογή των καταλληλότερων από τα παραπάνω, λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα των συστατικών των οποίων επιδιώκεται ο διαχωρισμός. Επειδή ελάχιστες φαινολικές ενώσεις είναι έγχρωμες και επομένως απευθείας ανιχνεύσιμες πάνω στην πλάκα, συνήθως η τελευταία παρατηρείται στο υπεριώδες φως και ψεκάζεται με διάφορα αντιδραστήρια. Η εμφάνιση φθορισμού και χαρακτηριστικών χρώσεων αποτελεί ένδειξη παρουσίας φαινολικών ενώσεων με ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά ή και αντιοξειδωτική δράση

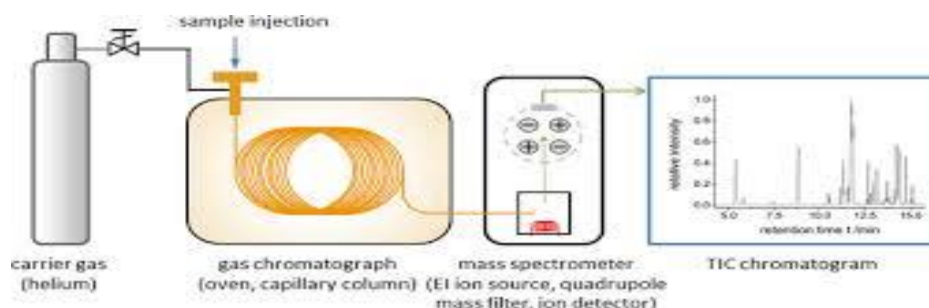


Εικόνα 4.2 : σχηματική απεικόνιση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

4.3 Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Αέρια χρωματογραφία, (Gas Chromatography - GC) ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσσκευή αέριου χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανή αέρια (άζωτο ή ήλιο), υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία, ενώ η στατική φάση αποτελείται από πυριτική πηκτή ή στερεό προσροφητικό μέσο που συνιστά τη στερεή ή φέρουσα φάση με μόνιμη επικάλυψη υγρής φάσης. Με τρόπο ανάλογο της υγρής χρωματογραφίας, τα συστατικά μεταβαίνουν από τον εισαγωγέα στη στήλη και διαχωρίζονται με τη βοήθεια του φέροντος αερίου και της θερμοκρασίας του φούρνου. Επιπρόσθετα, για την αύξηση της πτητικότητας και σταθερότητας ορισμένων συστατικών συχνά απαιτείται παραγωγοποίηση αυτών.

Τα τελευταία χρόνια, ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS), θεωρείται βασικό εργαλείο για την ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου φυτικών προϊόντων, καθώς είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος, κατάλληλη για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων, από τη GC. Στην περίπτωση των πολικών φαινολών εφαρμόζονται μέθοδοι παραγωγοποίησης για την αύξηση της πολικότητας και σταθερότητας των ενώσεων. Παράλληλα, σε ότι αφορά την εξέλιξη της φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry, MS) επιτρέπεται πλέον η ταυτοποίηση πολικών μορίων όπως οι πολυφαινόλες.

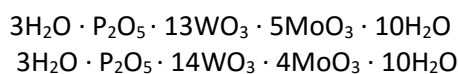


Εικόνα 4.3 : σχηματική απεικόνιση αέριου χρωματογράφου

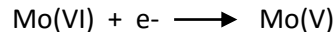
4.4 Η Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) είναι μια φωτομετρική τεχνική βασισμένη στην «αναγωγική δράση» παρουσία πολυφαινολικών ομάδων, που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου σε φυσικά προϊόντα. [57] Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών.

Η οξείδωση των φαινολών γίνεται με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (folin- ciocalteu reagent) με τις ακόλουθες δομές:



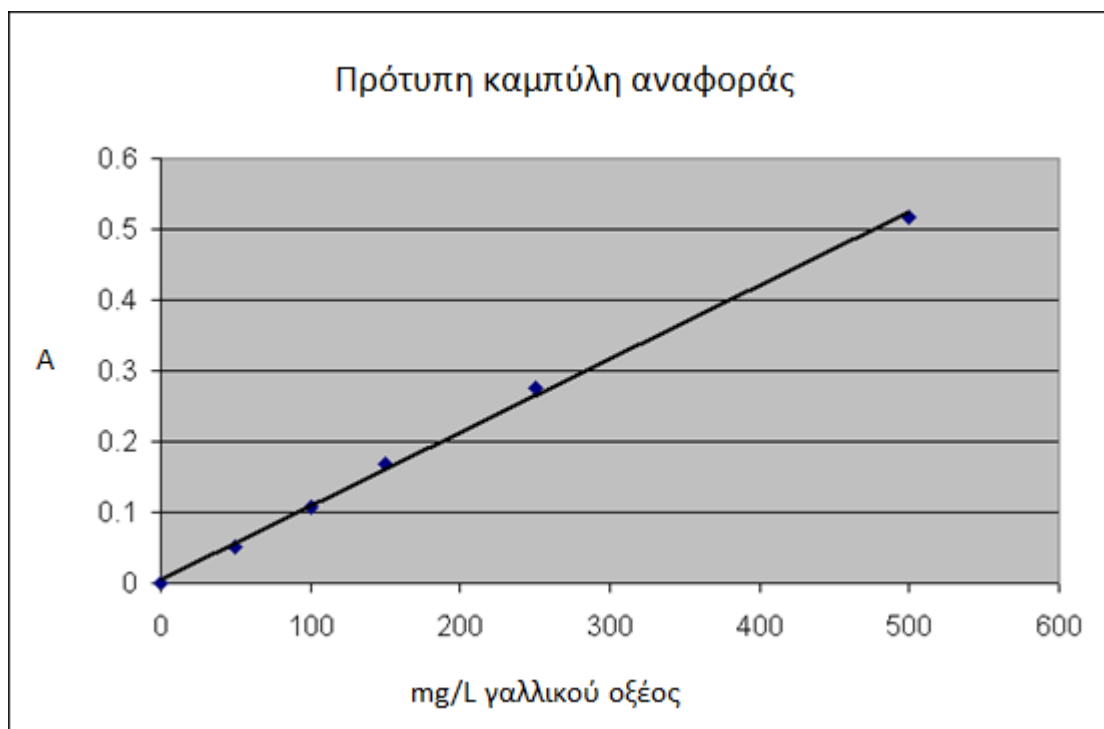
Το αντιδραστήριο FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo- W), χαρακτηριστικής μπλε χρώσης, που απορροφά στο ορατό (725nm). Κατά τη διαδικασία της αντίδρασης λαμβάνουν χώρα δύο αμφίδρομες αναγωγικές αντιδράσεις ενός ή δύο ηλεκτρονίων, τα οποία σχηματίζουν ενώσεις κυανού χρώματος, πιθανώς (PMoW11O40). Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μια 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 όπως η βιταμίνη C.

Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το FC 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 FC. 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.

Οι φαινόλες που καθορίζονται από τον δείκτη FC εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

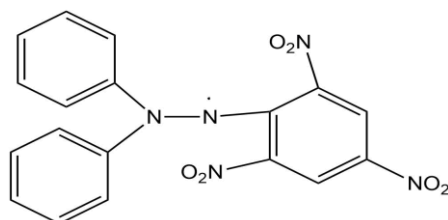


Εικόνα 4.4 : πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος με τη μέθοδο Folin Ciocalteu

Η περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες βρίσκεται μετρώντας την απορρόφηση στα 725nm και υπολογίζοντας τις περιεκτικότητες με την βοήθεια της παραπάνω πρότυπης καμπύλης.

4.5 Η Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) είναι μια μέθοδος εκτίμησης του πολυφαινολικού περιεχομένου που βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Η κατανάλωση του αντιδραστηρίου από τα αντιοξειδωτικά, έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένιση του πορφυρού χρώματος του διαλύματος του, η οποία παρακολουθείται στα 520nm, όπου παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας.



Εικόνα 4.4 : σχηματική απεικόνιση της ρίζας DPPH

Στην ικανότητα αυτή των πολυφαινολών, αποδίδεται η αντιοξειδωτική τους δράση, με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να δίνει μετρήσεις της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολών του εκχυλίσματος αυτού. Αποτελεί *in vitro* τεχνική και πλεονεκτεί ως

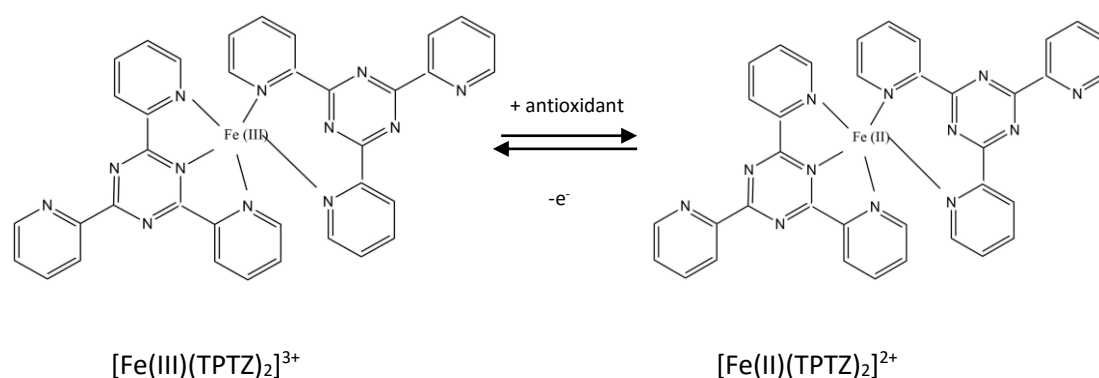
προς το ότι η δέσμευση των ελευθέρων ριζών του DPPH από τις πολυφαινόλες του δείγματος και η φασματοφωτομέτρηση του συνολικού διαλύματος αντίδρασης (π.χ. εκχύλισμα DPPH) δεν είναι χρονοβόρες διαδικασίες. Οι φωτομετρήσεις πραγματοποιούνται περίπου μια ώρα μετά την παρασκευή του διαλύματος στα 520-700 nm. Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συνεπάγεται αυξημένη δέσμευση των ελευθέρων (κατά τα άλλα σταθερών) ριζών του DPPH, και κατά επέκταση μειωμένη τιμή απορρόφησης. Η ικανότητα αυτή του δεσμευτικού παράγοντα στηρίζεται στην προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου κάθε φορά, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του βαθμού δέσμευσης ελευθέρων ριζών.

4.6 Η Μέθοδος του Υπερμαγγανικού Καλίου (KMnO₄)

Όπως η μέθοδος Folin-Ciocalteu, έτσι και αυτή προσδιορίζει τις ολικές φαινολικές ουσίες σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ουσιών από το υπερμαγγανικό κάλιο, στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Το τέλος της αντίδρασης σημειώνεται με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη carmin-indigo, από το κυανό στο κίτρινο. Ο δείκτης αυτός οξειδώνεται πριν από ορισμένα συστατικά του δείγματος, αλλά μετά από τις φαινολικές ουσίες. Η αλλαγή του χρώματός του συμπίπτει με το τέλος της οξείδωσης των φαινολικών ουσιών, έτσι ώστε να αποφεύγεται παραπέρα κατανάλωση για οξείδωση άλλων διαφόρων συστατικών του δείγματος.

4.7 Η Μέθοδος FRAP

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) είναι αρκετή γρήγορη και άμεση, υπολογίζει τη συνολική αντιοξειδωτική δύναμη (αναγωγικής ικανότητας) ενός φυτικού εκχυλίσματος [58] και στηρίζεται στην αναγωγή, κάτω από όξινες συνθήκες, του συμπλόκου Fe+3-TPTZ σε δισθενή μορφή, που αποκτά έντονο μπλε χρώμα και απορροφά στα 593nm.



Εικόνα 4.5: σχηματική απεικόνιση οξειδοαναγωγικής αντίδρασης του συμπλόκου Fe⁺³ - TPTZ

Η μέθοδος αυτή θεωρείται μια οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος αλλά έχει το μειονέκτημα ότι δεν προσδιορίζει τις θειολικές ομάδες σαν αντιοξειδωτικά.

4.8 Η Μέθοδος ORAC

Η Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Χρησιμοποιεί μία «γεννήτρια» ελευθέρων ριζών, μέσω θερμικής αποσύνθεσης μίας αζωτοένωσης, ώστε να δώσει μία σταθερή ροή υπεροξυλο-ριζών σε ένα κορεσμένο διάλυμα αέρα. Τα αντιοξειδωτικά συναγωνίζονται με το υπόστρωμα για τις ρίζες και εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την οξείδωση του υποστρώματος. Σύμφωνα με την πρότυπη μορφή αυτής της μεθόδου, ο ρυθμός της υπεροξείδωσης ρυθμίζεται μέσω της απώλειας του φθορισμού της β-PE είναι μία ένδειξη φθοράς από την αντίδρασή της με την υπεροξυλο-ρίζα. Η ένταση του φθορισμού (485-525nm) μετρείται για 35min σε pH=7,4 και στους 37°C [59]

5 Κεφάλαιο

5 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολών με τη χρήση φασματοφωτομέτρου

Η Φασματομετρία UV-Vis ονομάζεται η μέτρηση της έντασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (~190- 800 nm) μετά από την αλληλεπίδραση της με την ύλη.

Η απορρόφηση στο UV-Vis δεν χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο (όπως συμβαίνει με την φασματομετρία υπερύθρου, IR), αλλά δίνει πληροφορίες για ομάδες ατόμων στο μόριο. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση ονομάζεται χρωμοφόρο και η απεικόνιση της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος παρέχει το φάσμα απορρόφησης της υπό προσδιορισμό ουσίας.

Με τη φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού συσχετίζουμε το ποσοστό της απορρόφησης με τη συγκέντρωση της ουσίας που μελετάμε με τη βοήθεια μιας γραφικής συνάρτησης.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης ενός ή περισσότερων αναλυτών μέσω της χρήσης φασματοφωτομέτρου είναι μια από τις χρησιμότερες αναλυτικές τεχνικές στη φαρμακευτική ανάλυση.

5.1 Αρχή της μεθόδου

Οι απορροφήσεις της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους και του ορατού τμήματος του φάσματος είναι αποτέλεσμα των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονιακή δομή του μορίου. Τα εξωτερικά ηλεκτρόνια είναι εκείνα τα οποία μεταβαίνουν σε διαφορετικές τροχιές και προκαλούν απορρόφηση ενέργειας. Οι αλλαγές της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας του μορίου μιας χημικής ένωσης προκαλούν μεταβολές της διπολικής ροπής του και αυτή η μεταβολή είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του χημικού μορίου και της ηλεκτρονιακής ακτινοβολίας

Για πρακτικούς λόγους το φάσμα χωρίζεται σε τρεις περιοχές:

1. Ορατή περιοχή (vis) μεταξύ μηκών κύματος 400 -800 nm
2. Την κυρίως υπεριώδη περιοχή μεταξύ 200 – 400nm
3. Την άπω υπεριώδη περιοχή κάτω από 200nm

Στη φασματοφωτομετρία ισχύει ότι :

$$\text{Απορρόφηση (Absorbance)} = -\log (\text{διαπερατότητας}) (\text{transmittance})$$

Όπου διαπερατότητα ονομάζεται η ένταση του εξερχόμενου φωτός προς την ένταση του προσπίπτοντος φωτός.

Μήκος κύματος : ονομάζεται η γραμμική απόσταση μεταξύ δύο ισοδύναμων σημείων σε ένα κύμα με μονάδες μέτρησης για το ορατό και το υπεριώδες τα nm.

Φάσμα απορρόφησης είναι η απεικόνιση της απορρόφησης ή της διαπερατότητας της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος.



Εικόνα 5.1 : φάσμα απορρόφησης

5.3 Νόμος Lambert - Beer

Ο νόμος του Lambert συνδέει την ένταση (I_0) της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που προσπίπτει σε μια στοιβάδα ουσίας πάχους d με την ένταση (I) της εξερχόμενης από τη στοιβάδα ακτινοβολίας.

Η σχέση αυτή είναι γνωστή και ως νόμος Beer –Lambert και αποτελεί βασική αρχή της φασματοφωτομετρίας:

Η οπτική πυκνότητα (απορρόφηση) για σταθερό πάχος στοιβάδας και ορισμένο μήκος κύματος φωτός είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος που απορροφά.

$$\text{Log } I_0 / I = \epsilon * c * l$$

$$\text{Log } I_0 / I = A$$

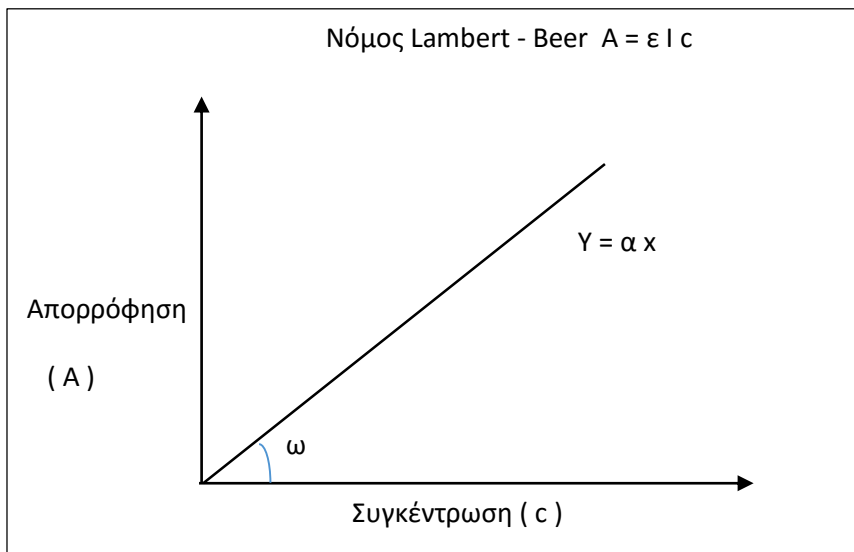
A = απορρόφηση

α = συντελεστής απορρόφησης είναι μια σταθερά που εξαρτάται από την φύση της ουσίας που απορροφά την ακτινοβολία και από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας

c = συγκέντρωση

b = μήκος διαδρομής

ϵ = μοριακός συντελεστής απορρόφησης, $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$



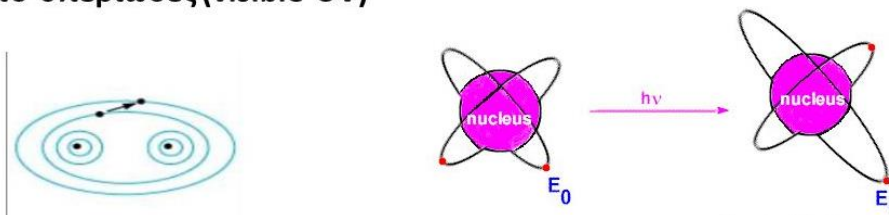
Εικόνα 5.2: Πρότυπη καμπύλη σύμφωνα με το νόμο Lambert – Beer

Προϋποθέσεις ισχύος του νόμου Lambert – Beer

- ✓ Ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και της διαλυμένης ουσίας είναι η απορρόφηση.
- ✓ Τα διαλύματα δεν πρέπει να είναι πυκνά δηλαδή η απορρόφηση να κυμαίνεται από $0,1 < A < 1$ διότι στα πυκνά διαλύματα οι αποστάσεις μεταξύ των σωματιδίων που απορροφούν γίνονται μικρές ώστε καθένα από αυτά να επηρεάζει την κατανομή του φορτίου στα γειτονικά σωματίδια και συνεπώς και την ικανότητα τους να απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος. Στα πυκνά διαλύματα δεν παραμένει σταθερή η μοριακή απορροφητικότητα ϵ .
- ✓ Η προσπίπτουσα ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική
- ✓ Η απορρόφηση να γίνεται σε όγκο διαλύματος ομοιόμορφης διατομής (κυψελίδα να έχει ομοιόμορφη διατομή)
- ✓ Η μέτρηση να γίνεται στη μέγιστη απορρόφηση ($\lambda_{\max}$)

5.3 Διέγερση ηλεκτρονίων

Ορατό-υπεριώδες (visible-UV)



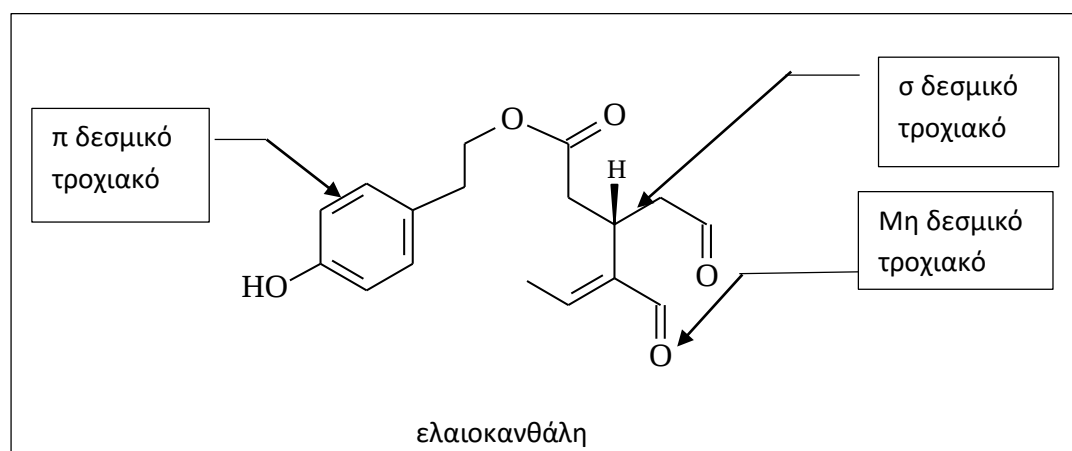
Εικόνα 5.3 : Σχηματική απεικόνιση διέγερση ηλεκτρονίου

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού βασίζεται στη διέγερση των ηλεκτρονίων, τα οποία καταλαμβάνουν ένα νέο τροχιακό (μοριακό τροχιακό). Τα ατομικά τροχιακά των δυο συνδεδεμένων ατόμων σχηματίζουν ένα δεσμικό τροχιακό (χαμηλής ενέργειας) και ένα αντιδεσμικό τροχιακό (υψηλής ενέργειας).

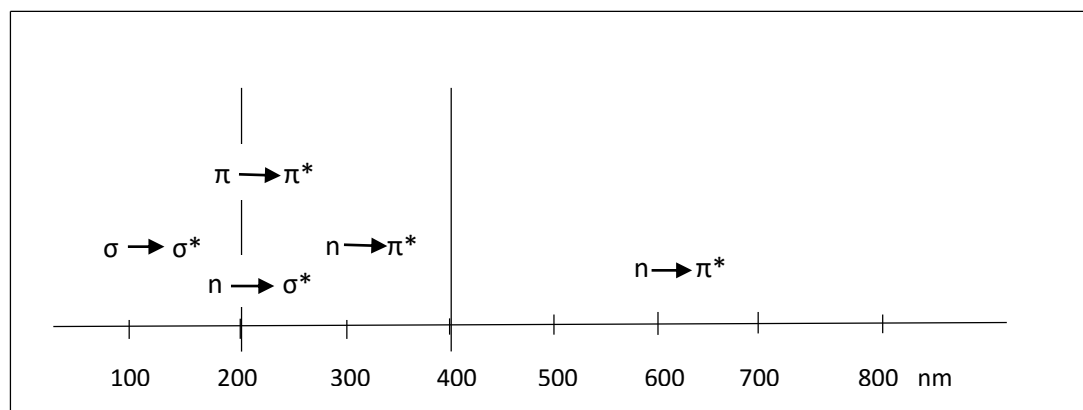
Πιο συγκεκριμένα, τα ατομικά τροχιακά s , τα οποία οφείλονται για τους απλούς δεσμούς πραγματοποιούν μια μετάβαση από ένα δεσμικό μοριακό τροχιακό σ και ένα αντιδεσμικό σ^* . Αυτή η μετάβαση απαιτεί ενέργεια της οποίας το μήκος κύματος πέφτει στην άπω υπεριώδη περιοχή.

Τα ατομικά τροχιακά p , τα οποία οφείλονται για τους διπλούς – τριπλούς δεσμούς και προκαλούν μετάβαση ηλεκτρονίου από ένα δεσμικό μοριακό τροχιακό π και ένα αντιδεσμικό π^* . Αυτή η μετάβαση απαιτεί ενέργεια της οποίας το μήκος κύματος εμφανίζεται στη διαχωριστική γραμμή της άπω και κυρίως υπεριώδη περιοχή.

Ενώ τα ηλεκτρόνια σθένους που δεν συμμετέχουν σε χημικούς δεσμούς (π.χ. N, O, S, αλογόνα) αναφέρονται ως μη δεσμικά ηλεκτρόνια (n). Τα μη δεσμικά ηλεκτρόνια μπορούν να μεταβούν στο αντιδεσμικό π^* τροχιακό, όπου η μετάβαση αυτή εμφανίζεται στην υπεριώδη και ορατή περιοχή.



Ηλεκτρονικές μεταπτώσεις



Όπως φαίνεται και στο σχήμα χρειαζόμαστε μεγάλη ενέργεια (μικρό μήκος κύματος) για μεταπτώσεις ηλεκτρονίων από το δεσμικό τροχιακό σ στο αντιδεσμικό τροχιακό σ^* . τέτοιες ενώσεις είναι αυτές που έχουν μόνο απλούς δεσμούς (π.χ. αλκάνια) και αυτή η κατηγορία δεν αφορά την Φασματομετρία UV-Vis.

Αντίθετα δραστικές ομάδες, όπως $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, NHR , $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$ και $-\text{Cl}$ που περιέχουν μη δεσμικά ηλεκτρόνια σθένους απορροφούν κοντά στα 200 nm, που αντιστοιχεί σε μετάπτωση $n \rightarrow \sigma^*$. Οι ομάδες αυτές φέρουν αδεσμικό ή αδεσμικά τροχιακά.

Ενώ οι χρωμοφόρες ομάδες, οι οποίες είναι δραστικές ομάδες (π.χ. ακόρεστοι δεσμοί) που προκαλούν ηλεκτρονικές μεταπτώσεις και είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση του μορίου στο εγγύς υπεριώδες ή ορατό. Παραδείγματα: $\text{N}=\text{N}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{N}=\text{O}$, $\text{C}=\text{O}$.

Η ύπαρξη πολλών διπλών δεσμών και συγκεκριμένα συζυγιακών δεσμών προκαλούν τις μεταβάσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow \pi^*$ ενισχύονται σε μεγαλύτερο βαθμό και οι απορροφήσεις τους παρουσιάζονται σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Η ύπαρξη συζυγιακών δεσμών σε μια οργανική ένωση έχει ως αποτέλεσμα μια ισχυρή μετάβαση $\pi \rightarrow \pi^*$, που μετακινεί την απορρόφηση στην κυρίως υν περιοχή

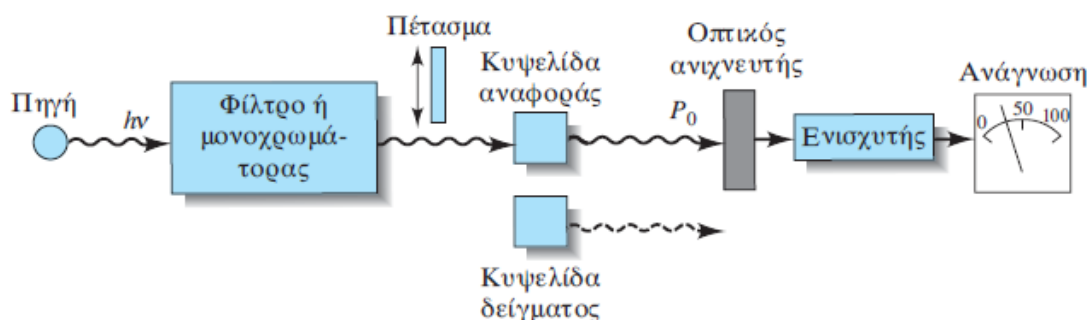
5.4 Οργανολογία

Η συνήθης οργανολογία και εφαρμογές της Φασματομετρίας UV - Vis περιορίζονται από το εγγύς υπεριώδες (190-400 nm) έως και το ορατό (400-800 nm), καθώς σε $\lambda < 190$ nm απορροφούν :

- ✓ Ο ατμοσφαιρικός αέρας, οπότε οι μετρήσεις θα έπρεπε να πραγματοποιούνταν στο κενό.
- ✓ Ο χαλαζίας από τον οποίο κατασκευάζονται οι κυψελίδες και τα υπόλοιπα οπτικά εξαρτήματα των οργάνων.

Φασματόμετρα απλής δέσμης ή φωτόμετρα: είναι όργανα που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της ισχύος της ακτινοβολίας και χρησιμοποιεί φίλτρο για την απομόνωση στενής περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Από τον μονοχρωμάτορα του οργάνου εξέρχεται μια και μόνη δέσμη. Για την αφαίρεση της παράσιτης ακτινοβολίας υπάρχουν δυο επιλογές:

- 1) Εισαγωγή του τυφλού διαλύματος (blank) στην κυψελίδα και ρύθμιση της κλίμακα ανάγνωσης του οργάνου, ώστε να δείχνει απορρόφηση $A=0$ και, ακολούθως, τοποθέτηση του δείγματος της προσδιοριζόμενης ουσίας και μέτρηση της απορρόφησης,
- 2) Πραγματοποίηση δυο μετρήσεων απορρόφησης, τυφλού και δείγματος και αφαίρεση του σήματος του τυφλού από το δείγμα.

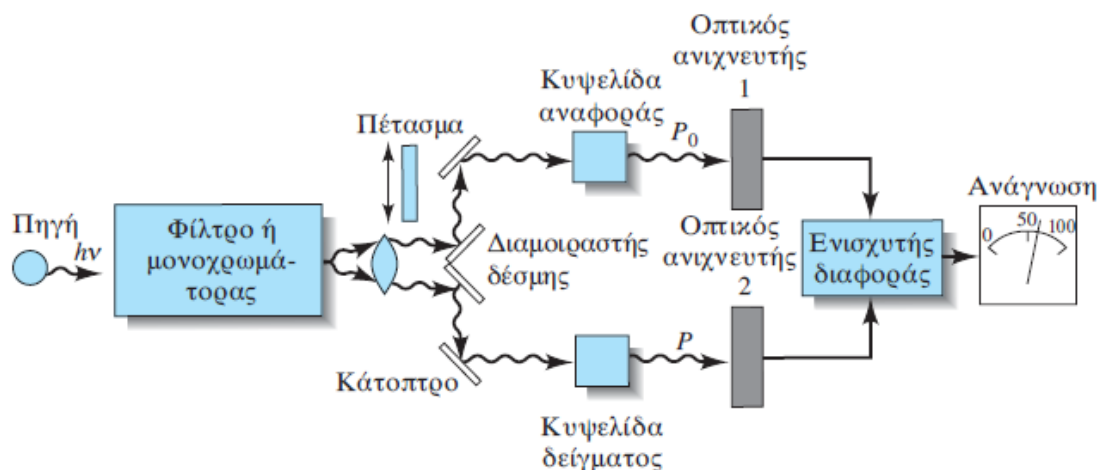


Εικόνα 4.5: φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης

Φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης: είναι όργανα όπου η απομόνωση της μονοχρωματικής δέσμης γίνεται με μονοχρωμάτορα (πρίσματος ή φράγματος).

- ✓ Ορατού(340 –800nm)
- ✓ Υπεριώδους ορατού(190 –800nm)
- ✓ Υπερύθρου(2 –15μm)

Η μονοχρωματική δέσμη που παράγεται από τον μονοχρωμάτορα χωρίζεται σε δυο παράλληλες δέσμες της ίδιας ισχύος. Η μια προσπίπτει στην κυψελίδα με το τυφλό διάλυμα και η άλλη στην κυψελίδα με το διάλυμα του δείγματος. Η δέσμη που προσπίπτει στο τυφλό διάλυμα παίζει ρόλο αφαιρετικής δέσμης και στον ανιχνευτή του φασματοφωτομέτρου μετριέται ο λόγος σήμα τυφλού/ σήμα δείγματος.



Εικόνα 5.6 : φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Τα φασματοφωτόμετρα αποτελούνται από τα παρακάτω μέρη:

1. Πηγή φωτός
2. Μονοχρωμάτορας
3. Κυψελίδες
4. ανιχνευτής

1. Πηγή ακτινοβολίας:

α) Για την υπεριώδη περιοχή χρησιμοποιούνται λυχνίες υδρογόνου ή δευτερίου. Οι λυχνίες αυτές αποτελούνται από ζεύγος ηλεκτροδίων μέσα σε υάλινο σωλήνα με παράθυρα χαλαζία γεμάτο από αέριο υδρογόνο ή δευτέριο σε χαμηλή πίεση. Όταν εφαρμοστεί υψηλή τάση, διεγείρονται τα ηλεκτρόνια του αερίου και εκπέμπεται ακτινοβολίας μήκους κύματος 180-350 nm.

β) για την ορατή περιοχή χρησιμοποιούνται λυχνίες βολφραμίου. Σε αυτή την περίπτωση θερμαίνεται το νήμα του βολφραμίου και με αυτό τον τρόπο υπάρχει συνεχής πηγή ρεύματος εκπομπή ακτινοβολίας (350-2500 nm).

2. Επιλογές μήκους κύματος

A) με φίλτρα, τα οποία αποτελούνται από υάλινα πλακίδια τα οποία περιέχουν έγχρωμες ουσίες (οξειδία μετάλλων) και χαρακτηρίζουν τα απλά φωτόμετρα

B) Μονοχρωμάτορες, όπου επιλέγεται μια δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας (εύρος μέχρι 0,1nm) σε ευρεία περιοχή μηκών κύματος, με τη δυνατότητα συνεχούς μεταβολής του μήκους κύματος.

Οι μονοχρωμάτορες αποτελούνται από:

- ✓ Σχισμή εισόδου που καθορίζει την ισχύ της ακτινοβολίας που εισέρχεται στον μονοχρωμάτορα

- ✓ Κατευθυντήρα , ο οποίος είναι φακός ή κάτοπτρο με τον οποίο η δέσμη γίνεται παράλληλη
- ✓ Στοιχείο διασποράς είναι πρίσμα ή φράγμα περιθλάσεως με την περιστροφή του οποίου επιλέγεται το επιθυμητό μήκος κύματος
- ✓ Συγκεντρωτικό φακό
- ✓ Σχισμή εξόδου

B1. Μονοχρωμάτορας πρίσματος : το πρίσμα (χαλαζίας , κρυσταλλικό πυρίτιο) αναλύει μια πολυχρωματική ακτινοβολία στα συστατικά της επειδή ο δείκτης διαθλάσεως του μεταβάλλεται με το μήκος κύματος.

B2. Μονοχρωμάτορας φράγματος : είναι φθινοί και έχουν σταθερό βαθμό μονοχρωματικότητας και η ισχύς της ακτινοβολίας δεν επηρεάζεται από το υλικό κατασκευής του φράγματος.

3. Κυψελίδες

Για την περιοχή του υπεριώδους UV χρησιμοποιούμε κυψελίδες από χαλαζία. Ενώ για την Περιοχή του ορατού Vis χρησιμοποιούνται κυψελίδες από κοινό γυαλί ή πλαστικό.

4. Ανιχνευτής

Οι ανιχνευτές μετατρέπουν το σήμα των φωτονίων της ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα. Ουσιαστικά τα φωτόνια προσκρούουν σε επιφάνειες κατεργασμένες με ειδικές ενώσεις, απελευθερώνουν ηλεκτρόνια και έτσι παράγεται το ηλεκτρικό ρεύμα.

5.5 Διαδικασία ανάλυσης

Η πορεία του ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολών με τη χρήση φασματοφωτομέτρου είναι η ακόλουθη.

- Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα το οποίο περιέχει τις ουσίες που επιθυμούμε να προσδιορίσουμε
- Λήψη του φάσματος απορρόφησης της προς προσδιορισμό ουσίας.
- Επιλογή του καταλληλότερου μήκους κύματος.
- Κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.
- Μέτρηση της απορρόφησης του άγνωστου δείγματος.
- ✓ Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται στο γραμμικό μέρος της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων διαλυμάτων.
- ✓ Ο ποσοτικός προσδιορισμός προτιμάται να γίνεται στην περιοχή λ_{max} γιατί εκεί μπορεί να εφαρμοσθεί ο νόμος Lambert–Beer, η τιμή της ϵ (α) παραμένει σταθερή ενώ επιτυγχάνονται χαμηλότερα όρια ανίχνευσης της προς προσδιορισμό ουσίας.

- ✓ Από την εξίσωση της ευθείας της πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίζουμε την άγνωστη συγκέντρωση του διαλύματος.

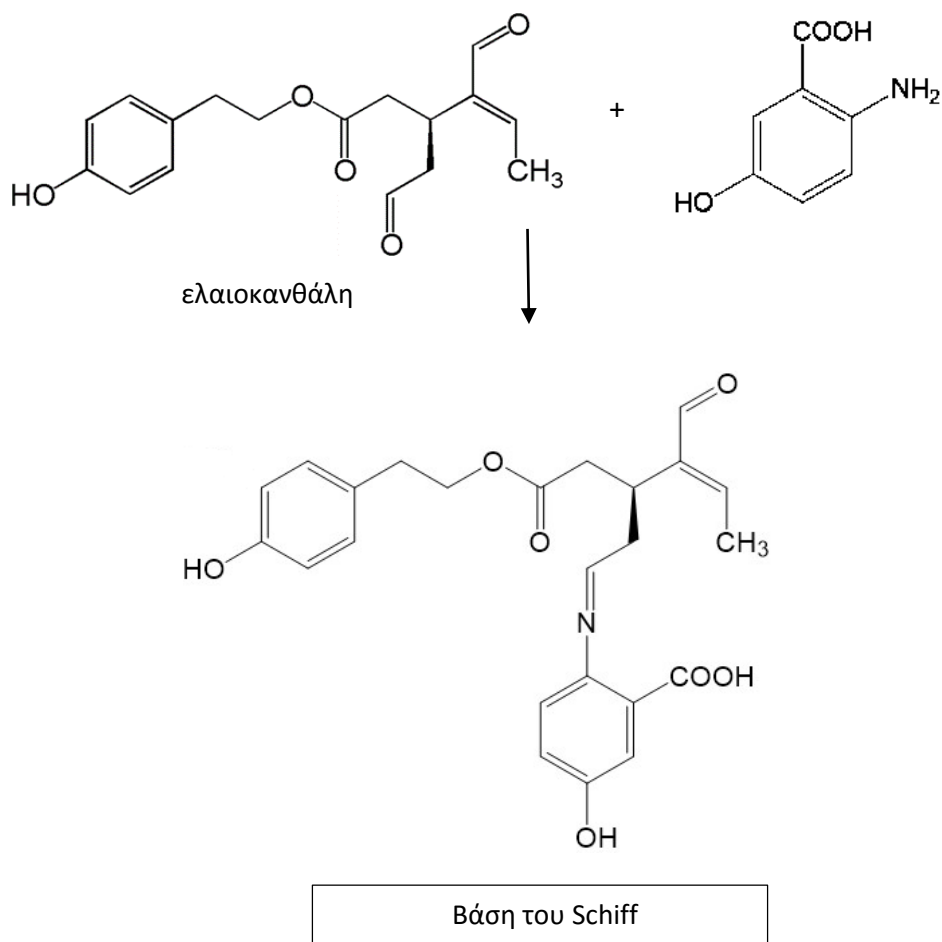
6 Κεφάλαιο

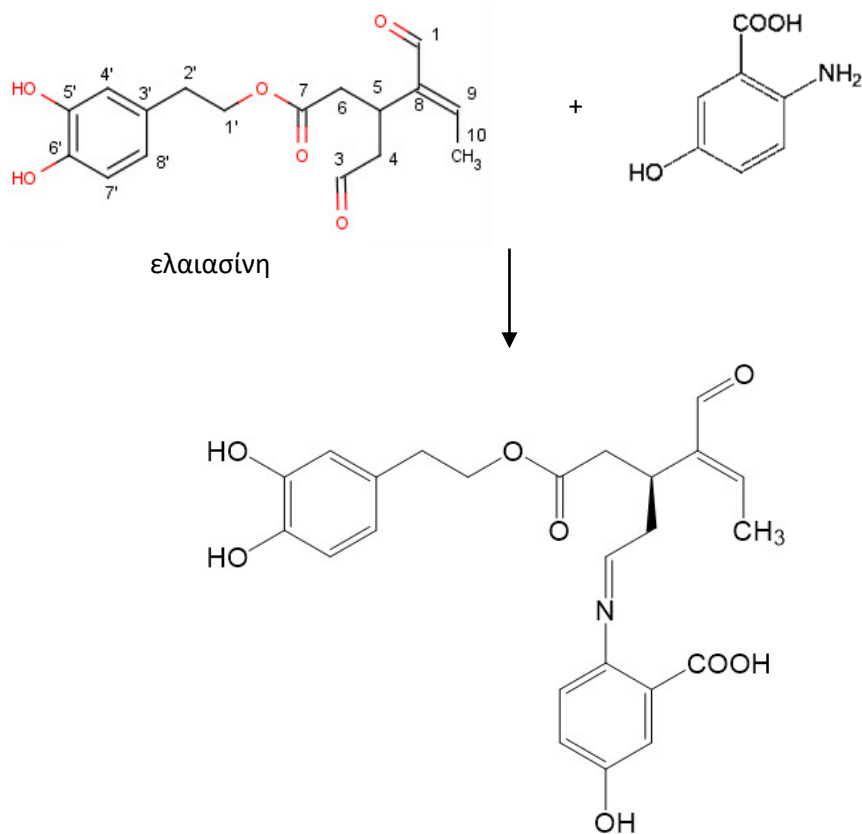
6.Μεθόδου οπτικού προσδιορισμού του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με βάση το ARISTOLEO test.

Από παλαιότερες μελέτες είχε παρατηρηθεί στο εργαστήριο ότι η ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη μπορούσαν να δημιουργήσουν βάσεις Schiff με τις αλδεΐδες των δύο σεκοϊριδοειδών και παρουσιάζονταν ένα κιτρινοπράσινο σύμπλοκο. Ξεκινώντας από αυτή την παρατήρηση ακολούθησε η επόμενη μέθοδος, η οποία είχε σαν στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό του αθροίσματος της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης, το οποίο είναι γνωστό σαν δείκτης D₁ μέσω μιας αντίδρασης σχηματισμού βάσεων Schiff στα ελαιόλαδα . Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε ώστε να μπορεί να δημιουργήσει υδατοδιαλυτές βάσεις Schiff με τις πολικές ουσίες του ελαιολάδου (ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη).

2.4 Αρχή της μεθόδου

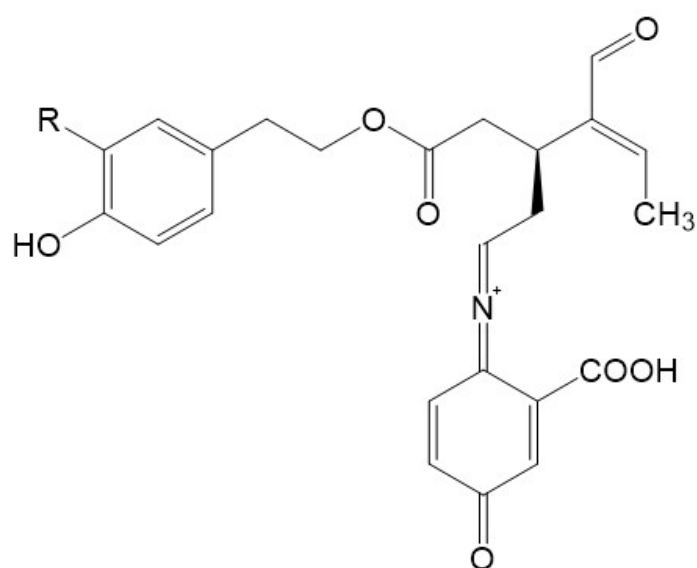
Το αντιδραστήριο p-OH ανθρανιλικό οξύ υπό όξινες συνθήκες αντιδρά με την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη, οι οποίες υπάρχουν στο ελαιόλαδο και δημιουργεί μια βάση του Schiff . Η βάση του Schiff μπορεί να συντεθεί από μια αλειφατική ή στην περίπτωση μας αρωματική αμίνη με μια καρβονυλική ένωση με πυρηνόφιλη προσθήκη. Ο σχηματισμός της αντίδρασης είναι πιθανόν να είναι ο ακόλουθος





Η βάση που σχηματίζεται έχει κίτρινο χρώμα, το οποίο με την επίδραση του ατμοσφαιρικού O_2 μέσω οξείδωσης οδηγεί σε πράσινο χρωμοφόρο η ένταση του οποίου εξαρτάται από την περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε ελαιοκανθάλη και ελαιοσίνη.

Πιθανή δομή του προϊόντος με πράσινο χρωμοφόρο :



Όπου R = H πιθανό προϊόν οξείδωσης της αντίδρασης της ελαιοκανθάλης με το αντιδραστήριο

R= OH πιθανό προϊόν οξείδωσης της αντίδρασης της ελαιοκανθάλης με το αντιδραστήριο

2.5 Μέθοδος οπτικού προσδιορισμού του δείκτη D₁ (ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη)

Επόμενοι στόχοι που τέθηκαν μετά την επιλογή του αντιδραστηρίου ήταν οι ακόλουθοι:

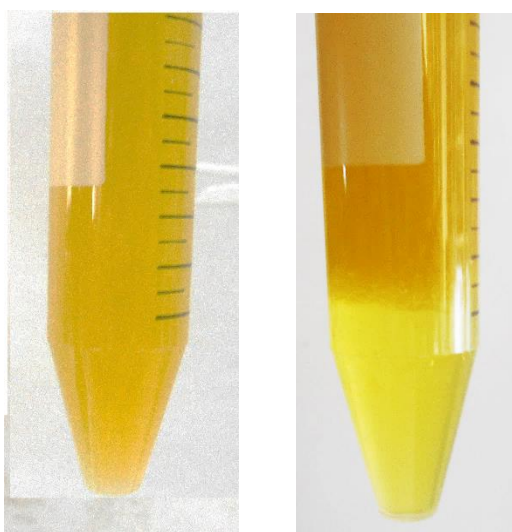
- ✓ Η περιεκτικότητα και η διαλυτότητα του αντιδραστηρίου
- ✓ Το στάδιο εισαγωγής του νερού και του αντιδραστηρίου

Για την μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού του δείκτη D₁ θέλαμε κορεσμένο διάλυμα του p-OH ανθρανιλικού οξέος. Ο κατάλληλος διαλύτης του p-OH ανθρανιλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το οξικό οξύ. Χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα διαλύτη ώστε να δημιουργήσουμε ένα κορεσμένο διάλυμα p-OH ανθρανιλικού οξέος παρουσία οξέος ώστε να αντιδρά με όλη την ποσότητα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης και να δημιουργούνται οι βάσεις του Schiff. Το αντιδραστήριο που επιλέχθηκε ήταν διαλυτό στο νερό.

Σημαντικό ήταν το στάδιο εισαγωγής του αντιδραστηρίου και του νερού. Μετά από πολλές δοκιμές διαπιστώθηκε ότι πρώτα θα γίνεται η εισαγωγή του αντιδραστηρίου και έπειτα του νερού. Με την αντίθετη διαδικασία δεν είναι εφικτή η δημιουργία της βάσης του Schiff και ως αποτέλεσμα δεν είναι δυνατή η δημιουργία του χρώματος της υδατικής φάσης.

Αρχικά ακολουθήθηκε η παρακάτω μέθοδος για τον οπτικό προσδιορισμό του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης:

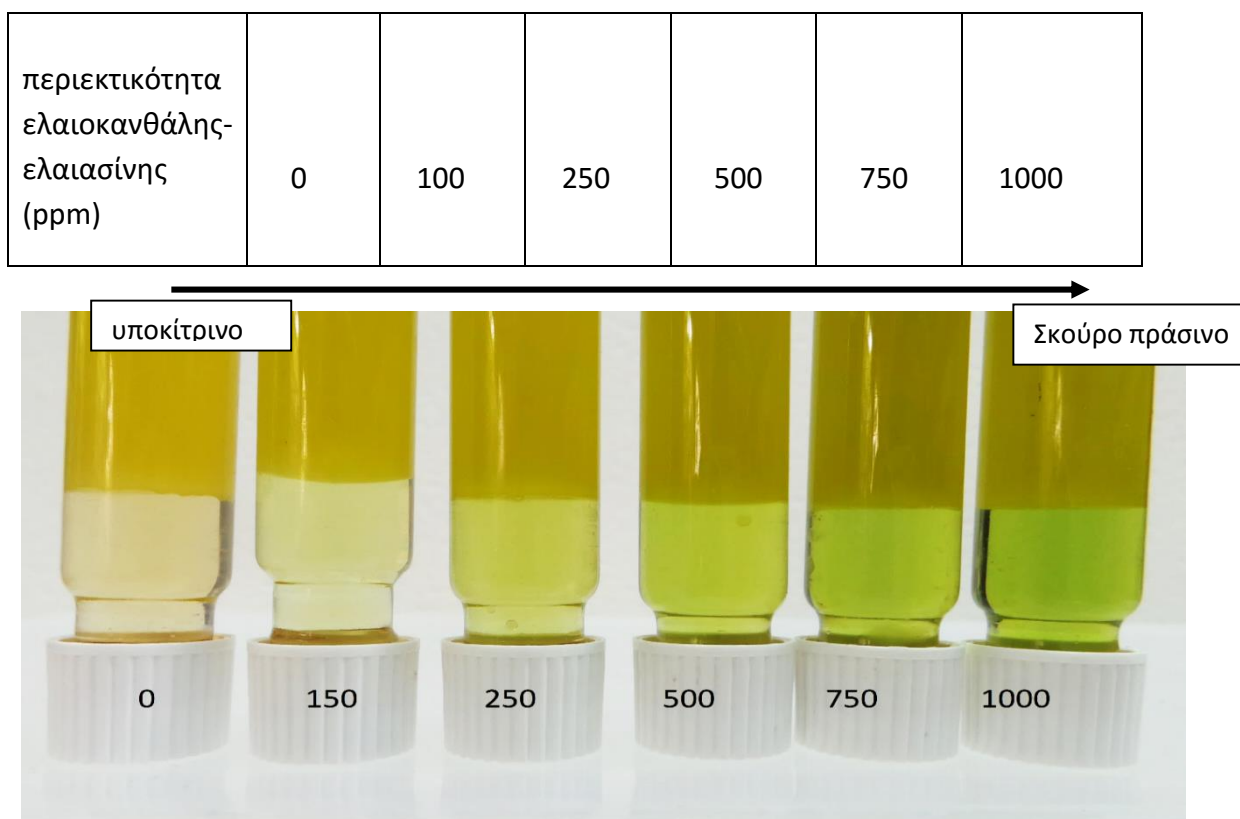
- Σε falcon τοποθετούνται 5ml ελαιολάδου
- Προσθήκη 1ml αντιδραστηρίου p-OH ανθρανιλικό οξύ (50mg αντιδραστηρίου διαλυμένο σε 20ml CH₃COOH)
- Ανάδευση και αναμονή για 10 min
- Προσθήκη 1ml νερού
- Ανάδευση και αναμονή για 50min
- Παρατήρηση χρώματος της υδατικής στιβάδας



Εικόνα 6.1 : αρχική και τελική φωτογραφία του δείγματος στο οποίο εφαρμόστηκε η μέθοδος ARISTOLEO

Παρατηρήθηκε ότι όσο υψηλότερη ήταν η περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη του ελαιολάδου, τόσο πιο σκούρο πράσινο εμφανιζόταν το χρώμα της υδατικής του στιβάδας.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η παραπάνω μέθοδος σε ελαιόλαδα διαφόρων γνωστών αναλογιών στο άθροισμα ελαιοκανθάλης- ελαιασίνης τα οποία είχαν παρασκευαστεί με ανάμιξη ενός ελαιολάδου με υψηλή περιεκτικότητα στο άθροισμα των δύο φαινολών και ενός ελαιολάδου με μηδενική περιεκτικότητα φαινολών και παρατηρήθηκε το χρώμα της υδατικής τους στιβάδας. Τα δύο ελαιόλαδα τα οποία χρησιμοποιήσαμε για να παρασκευάσουμε τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης είχαν αναλυθεί με τη μέθοδο NMR και είχε μετρηθεί με ακρίβεια η περιεκτικότητα τους στο άθροισμα των δύο φαινολών.



Εικόνα 6.2 : χρωματική κλίμακα

6.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου οπτικού προσδιορισμού

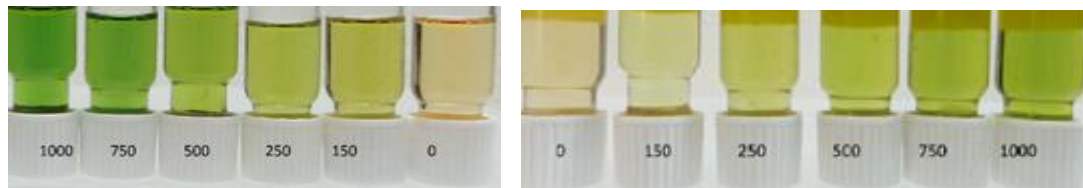
6.3.1 Αύξηση του όγκου της υδατικής φάσης

Εφαρμόστηκε η μέθοδος οπτικού προσδιορισμού του αθροίσματος D1 με μεγαλύτερη ποσότητα ελαιολάδου και αντιδραστηρίων χρησιμοποιώντας την ίδια αναλογία για να είναι πιο ευδιάκριτη η υδατική φάση.

- Σε ένα υάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 7,5ml ελαιολάδου
- Προσθήκη 1,5ml αντιδραστηρίου p-OH ανθρανιλικό οξύ (50mg αντιδραστηρίου διαλυμένο σε 20ml CH_3COOH)
- Ανάδευση και αναμονή για 10 min

- Προσθήκη 1,5ml υδατικού διαλύματος
- Ανάδευση και αναμονή για 50min
- Παρατήρηση χρώματος της υδατικής στιβάδας

Παρατηρήθηκε ότι η υδατική φάση ήταν πιο ξεκάθαρη και ήταν πιο εύκολη η διάκριση των διαβαθμίσεων του χρώματος σε όλες τις περιεκτικότητες του αθροίσματος .



Αυξημένη υδατική φάση

αρχική μέθοδος

Εικόνα 6.3 : σύγκριση δειγμάτων

6.3.2 Μείωση του χρόνου αναμονής

Εφαρμόστηκε η προηγούμενη μέθοδος σε δύο σειρές δειγμάτων, οι συγκεντρώσεις του αθροίσματος της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης ήταν οι ακόλουθες 0 , 150 , 250 , 500 , 750 και 1000 ppm. Τα δείγματα είχαν παρασκευαστεί με ανάμιξη δύο ελαιολάδων.

Στην πρώτη σειρά δειγμάτων εφαρμόστηκε η παρακάτω μέθοδος :

- Σε ένα υάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 7,5ml ελαιολάδου
- Προσθήκη 1,5ml αντιδραστηρίου p-OH ανθρανιλικό οξύ (50mg αντιδραστηρίου διαλυμένο σε 20ml CH_3COOH)
- Ανάδευση και **αναμονή για 10 min**
- Προσθήκη 1,5ml νερού
- Ανάδευση και αναμονή για 50min
- Παρατήρηση χρώματος της υδατικής στιβάδας

Ενώ στη δεύτερη σειρά δειγμάτων ακολουθήθηκε η εξής μέθοδος:

- Σε ένα υάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 7,5ml ελαιολάδου
- Προσθήκη 1,5ml αντιδραστηρίου p-OH ανθρανιλικό οξύ (50mg αντιδραστηρίου διαλυμένο σε 20ml CH_3COOH)
- Ανάδευση
- Προσθήκη 1,5ml νερού
- Ανάδευση και αναμονή για 50min
- Παρατήρηση χρώματος της υδατικής στιβάδας

Η σύγκριση των δύο σειρών δειγμάτων έδειξε ότι δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στο χρώμα της υδατικής φάσης των δειγμάτων.



1^η σειρά δειγμάτων (με αναμονή 10min)



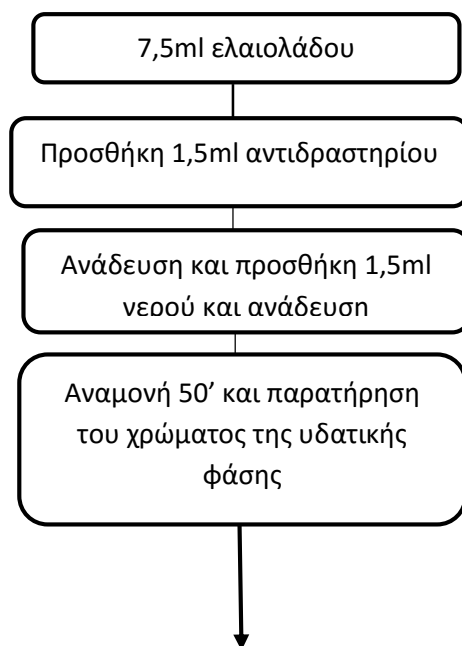
2^η σειρά δειγμάτων (χωρίς αναμονή)

Εικόνα 6.4: σύγκριση δυο δοκιμών

Τελική μέθοδος οπτικού προσδιορισμού του δείκτη D1

Η μέθοδος οπτικού προσδιορισμού του δείκτη D1 που θα αναφέρεται παρακάτω θα είναι η ακόλουθη:

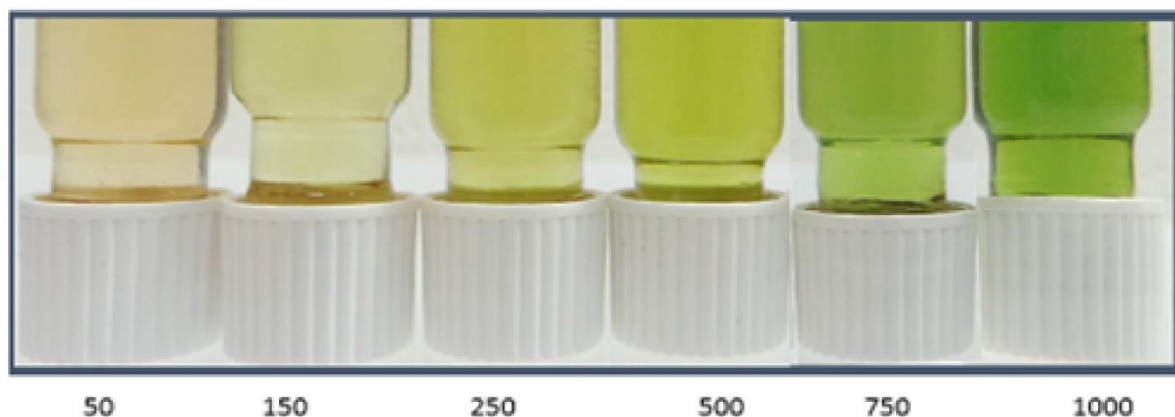
Σε ένα υάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 7,5ml ελαιολάδου. Στη συνέχεια προστίθενται 1,5ml αντιδραστηρίου p-OH ανθρανιλικού οξέος, το οποίο έχει διαλυθεί σε οξικό οξύ (50mg αντιδραστηρίου διαλυμένα σε 20ml οξικού οξέος). Έπειτα μετά από ανάδευση 30'' προστίθενται 1,5ml νερού και μετά από ανάδευση 30'' και αναμονή 50' παρατηρείται το χρώμα της υδατικής φάσης και με βάση την παρακάτω χρωματική κλίμακα προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του ελαιολάδου στο άθροισμα των δύο φαινολών



6.4 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΧΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

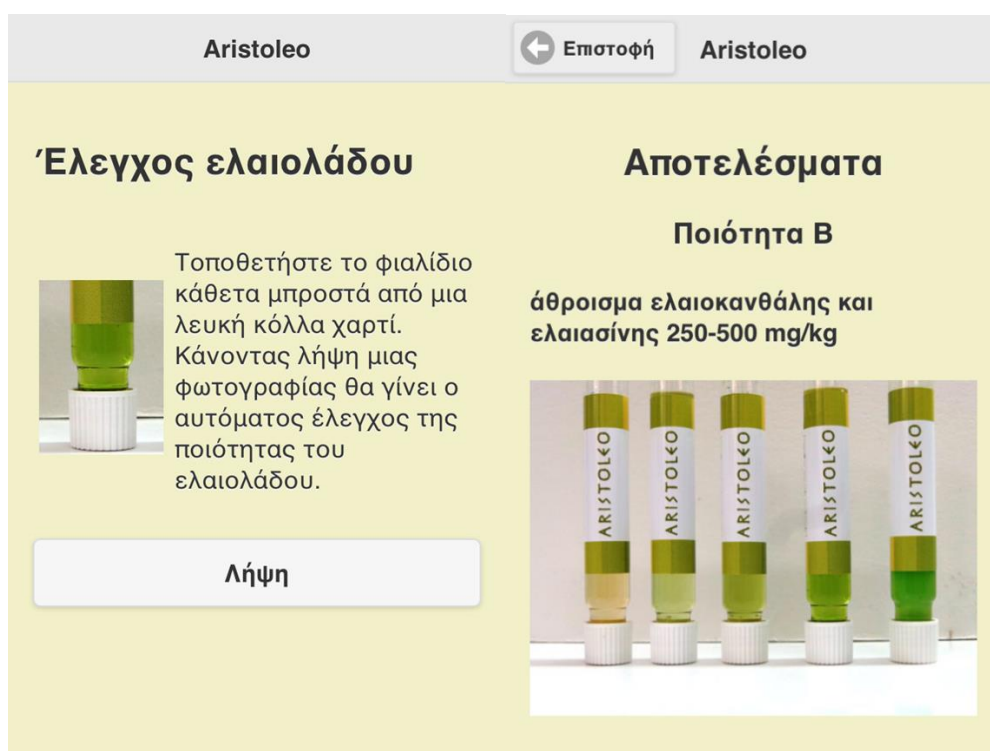
Ο επόμενος στόχος που τέθηκε ήταν η κατασκευή μιας χρωματικής κλίμακας βάση της οποίας θα είναι εφικτή η χρωματική σύγκριση της υδατικής φάσης των δειγμάτων με αυτή την κλίμακα.

Για την υλοποίηση αυτής της κλίμακας παρασκευάστηκαν 100 μίγματα ελαιολάδου, στα οποία η περιεκτικότητά τους στο άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης αυξανόταν κατά 1%. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ο οπτικός προσδιορισμός του δείκτη D1. Σε κάθε δείγμα τραβήχτηκαν πολλές φωτογραφίες, οι οποίες επεξεργάστηκαν και έτσι κατασκευάστηκε η ακόλουθη χρωματική κλίμακα. Τα μίγματα των ελαιολάδων παρασκευάστηκαν από ανάμιξη ενός ελαιολάδου που είχε μετρηθεί με ακρίβεια με τη μέθοδο NMR και είχε 1000ppm αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης και ενός ελαιολάδου που είχε μηδενική συγκέντρωση στις δύο φαινόλες.



Εικόνα 6.6 : χρωματική κλίμακα βάση της οποίας γίνονται οι συγκρίσεις των δειγμάτων και δίνεται το τελικό αποτέλεσμα

Ταυτόχρονα σε συνεργασία με το **Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο** αναπτύχθηκε μια εφαρμογή όπου τραβώντας μια φωτογραφία της υδατικής φάσης του δείγματός , με τη χρήση iPhone app κατατάσσει αυτόματα το άθροισμα της περιεκτικότητας ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης του ελαιολάδου σε μια από κατηγορίες που εμφανίζονται στη χρωματική κλίμακα. Αυτή η εφαρμογή στηρίχθηκε αναπτύσσοντας έναν ειδικό αλγόριθμο βάση του οποίου γίνεται εκτίμηση του χρώματος.



Εικόνα 6.7 : Τρόπος χρήσης της εφαρμογής

Με αυτό τον τρόπο κατασκευάστηκε μια κλίμακα και μια εφαρμογή με την οποία έγινε εφικτή η σύγκριση των δειγμάτων των ελαιολάδων όπου έχει εφαρμοστεί η μέθοδος του οπτικού προσδιορισμού.

Όλες οι μετρήσεις που ακολουθήθηκαν έγιναν με βάση την παραπάνω χρωματική κλίμακα.

6.5 ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΟΥ ΟΠΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΛΛΑΓΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

6.5.1 Εφαρμογή της μεθόδου σε τρεις θερμοκρασίες

Εφαρμόστηκε η μέθοδος οπτικού προσδιορισμού σε ελαιόλαδα με μεγάλη περιεκτικότητα του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης στις ακόλουθες θερμοκρασίες :

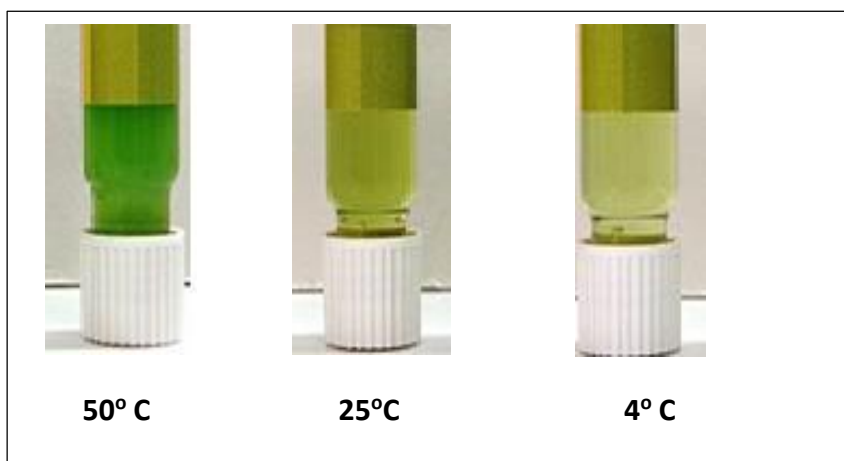
- ✓ θερμοκρασία δωματίου, 25°C
- ✓ θερμοκρασία ψυγείου , 4°C
- ✓ θερμοκρασία των 50°C

Από αυτό το πείραμα παρατηρήθηκε ότι στη θερμοκρασία περιβάλλοντος το χρώμα των δειγμάτων ήταν επιθυμητό στα 50min , στη θερμοκρασία ψυγείου στη 90min, ενώ όταν θερμάνθηκαν τα δείγματα στους 50°C στα 20min.

Επομένως η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία που βρίσκεται το δείγμα.

Παρακάτω φαίνεται η διαφορά του χρώματος που παρατηρήθηκε στις τρεις θερμοκρασίες στα 20min.

20min



Εικόνα 6.7 : Σύγκριση τριών δειγμάτων διαφορετικών θερμοκρασιών στον ίδιο χρόνο

6.5.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΑΥΞΗΜΕΝΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η παραπάνω μέθοδο τρεις φορές σε διαφορετικές υψηλές θερμοκρασίες

1. Την πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε όλη η διαδικασία σε υδρόλουτρο στους 60°C. Παρατηρήθηκε ότι η αλλαγή του χρώματος είχε πραγματοποιηθεί σε 10min αλλά το χρώμα δεν ήταν αυτό που περιμέναμε. (καφέ- πράσινο). Πιθανόν η αύξηση της θερμοκρασίας να κατέστρεψε το χρωμοφόρο που παράγεται κατά την αντίδραση. (Εικόνα 1)
2. Τη δεύτερη φορά πραγματοποιήθηκε όλη η διαδικασία σε φούρνο στους 50°C. Παρατηρήθηκε ότι η αλλαγή του χρώματος πραγματοποιήθηκε σε 20min και το χρώμα ήταν έντονο πράσινο, όπως αυτό που περιμέναμε. (εικόνα 2)
3. Την Τρίτη φορά πραγματοποιήθηκε όλη η διαδικασία σε ελαιόλουτρο στους 40°C. Παρατηρήθηκε ότι η αλλαγή του χρώματος έγινε στα 20min και το χρώμα της υδατικής φάσης ήταν όμοιο με το παραπάνω. (Εικόνα 3)



Εικόνα 1



Εικόνα 2



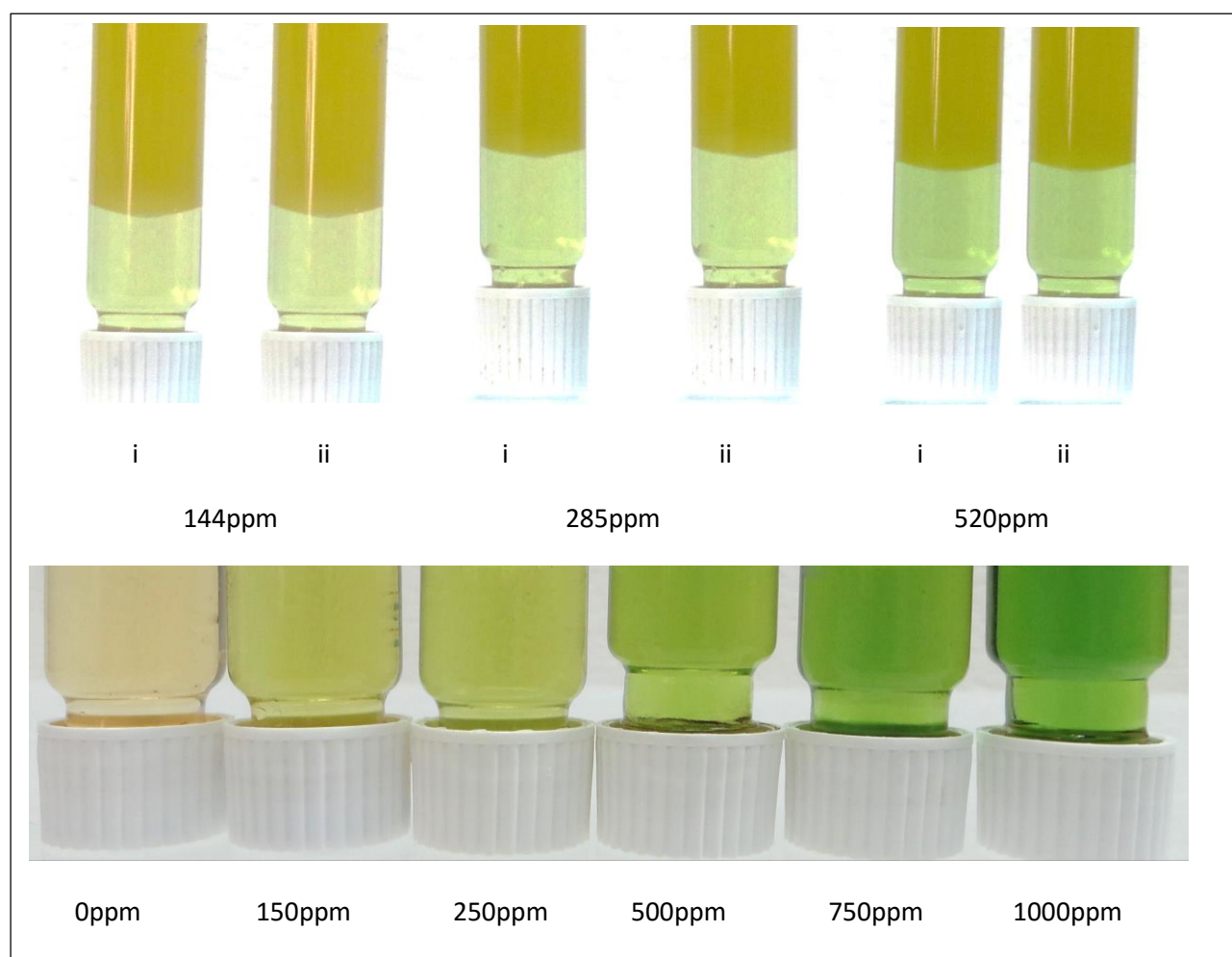
Εικόνα 3

Παρατηρήθηκε ότι στους 60°C το χρώμα της υδατικής φάσης δεν ήταν το επιθυμητό σύμφωνα με την κλίμακα.

6.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

Σκοπός της μελέτης ήταν ο έλεγχος της σταθερότητας του αντιδραστήριου (p-OH ανθρανιλικό οξύ)

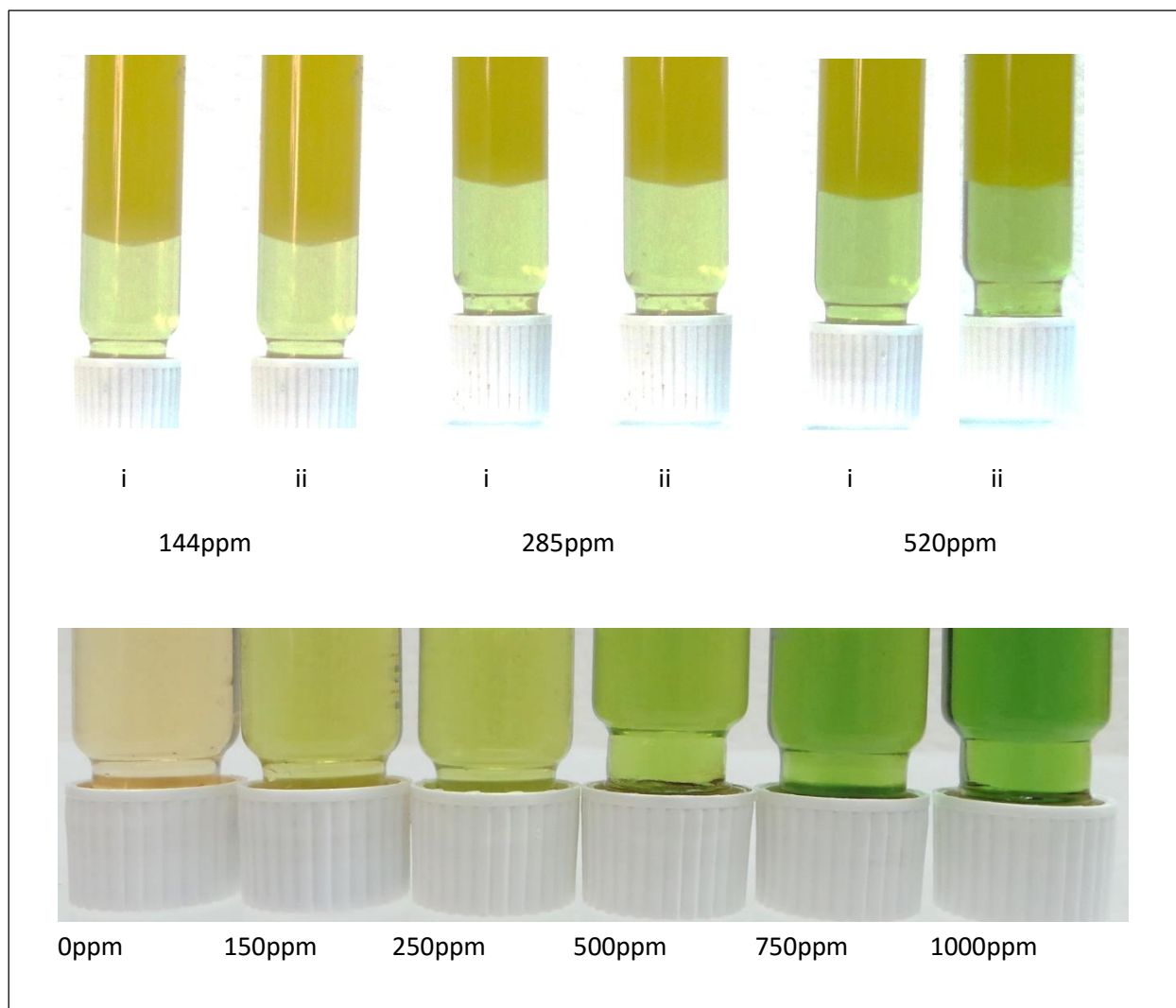
1. Εφαρμόστηκε η μέθοδος του οπτικού προσδιορισμού στις εξής συγκεντρώσεις: 144ppm , 285ppm , 520ppm σε αντιδραστήριο που είχε παρασκευαστεί σε χρόνο $t=0$ και σε χρόνο $t=24h$ εκτός ψυγείου.
 - i. Η μέθοδος εφαρμόστηκε την πρώτη φορά με αντιδραστήριο το οποίο παρασκευάστηκε την ίδια μέρα
 - ii. Τη δεύτερη φορά εφαρμόστηκε η μέθοδος με προσθήκη αντιδραστήριου το οποίο είχε μείνει 24h εκτός ψυγείου



Δεν παρατηρήθηκε καμιά διαφορά χρώματος ανάμεσα στα δείγματα που είχε προστεθεί αντιδραστήριο , το οποίο είχε παρασκευαστεί την ημέρα που έγινε η μέθοδος και στα δείγματα που είχε προστεθεί αντιδραστήριο που είχε μείνει εκτός ψυγείου για 24h.

2. Εφαρμόστηκε η μέθοδος του οπτικού προσδιορισμού στις εξής συγκεντρώσεις: 144ppm , 285ppm , 520ppm σε αντιδραστήριο που είχε παρασκευαστεί σε χρόνο $t=0$ και σε χρόνο $t=48h$ εκτός ψυγείου.

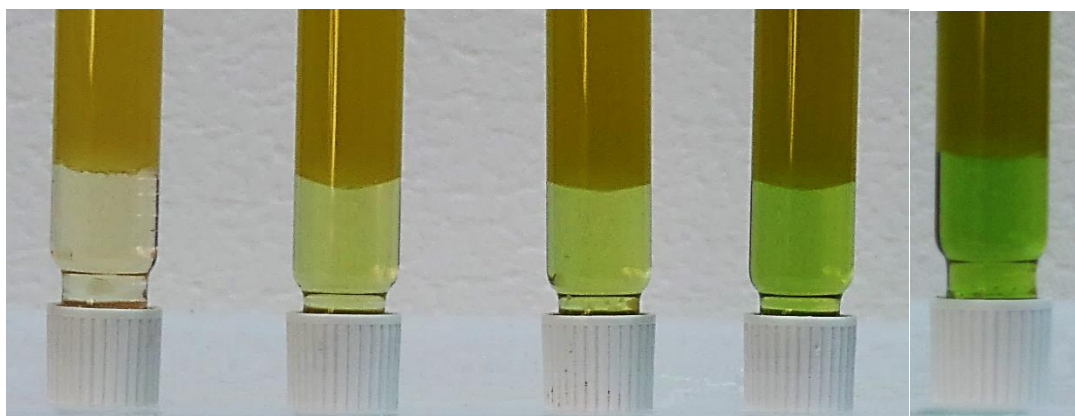
- i. Η μέθοδος εφαρμόστηκε την πρώτη φορά με αντιδραστήριο το οποίο παρασκευάστηκε την ίδια μέρα
- ii. Τη δεύτερη φορά προστέθηκε αντιδραστήριο το οποίο είχε μείνει 48h εκτός ψυγείου.



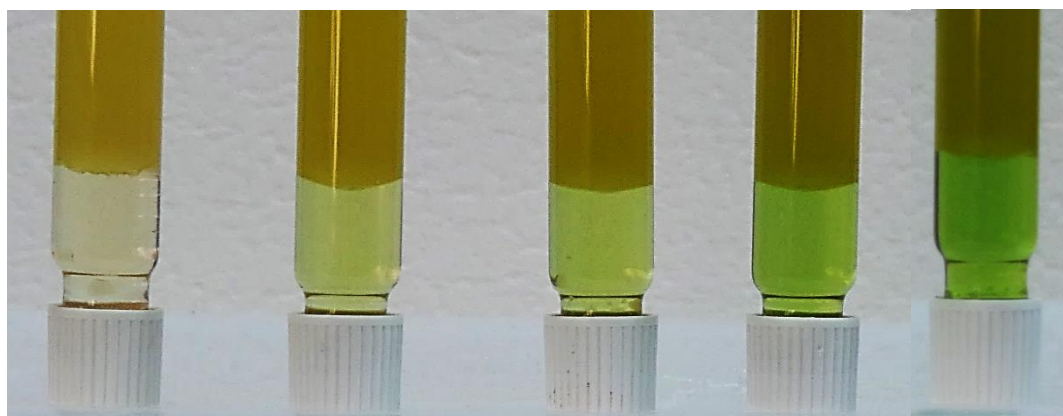
Παρατηρήθηκε διαφορά στο δείγμα που είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη και είχε προστεθεί το αντιδραστήριο το οποίο είχαμε αφήσει για 48h εκτός ψυγείου. Αυτό το δείγμα είχε πιο σκούρο πράσινο χρώμα.

3. Εφαρμόστηκε η μέθοδος οπτικού προσδιορισμού στις εξής συγκεντρώσεις: 0 , 211 , 422 , 704 και 1057ppm σε αντιδραστήριο που είχε παρασκευαστεί σε χρόνο $t=0$ και σε χρόνο $t=20$ ημερών μέσα στην κατάψυξη .

- i. Η μέθοδος εφαρμόστηκε την πρώτη φορά με αντιδραστήριο το οποίο παρασκευάστηκε την ίδια μέρα
- ii. Τη δεύτερη φορά προστέθηκε αντιδραστήριο το οποίο είχε αποθηκευτεί για 20 ημέρες μέσα στην κατάψυξη.

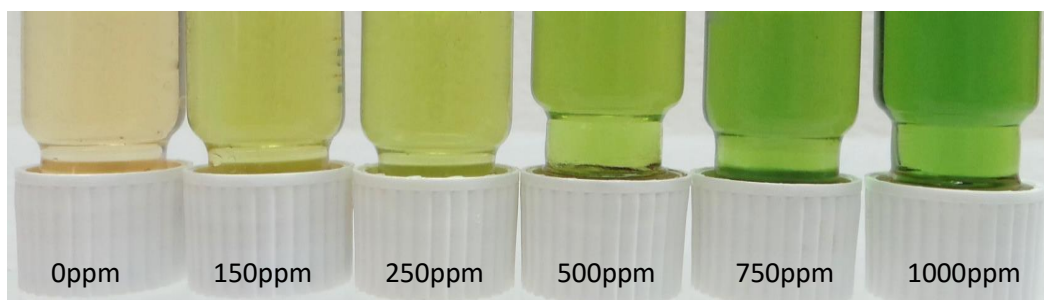


i. 0ppm 211ppm 422ppm 704ppm 1057ppm



0ppm 211ppm 422ppm 704ppm 1057ppm

ii.



0ppm 150ppm 250ppm 500ppm 750ppm 1000ppm

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα δείγματα τα οποία είχαν το αντιδραστήριο που φτιάχτηκε την ίδια ημέρα και σε αυτά που είχαν το αντιδραστήριο που είχε αποθηκευτεί μέσα στην κατάψυξη ήταν πολύ μικρές.

Παρόλα αυτά ο καλύτερος τρόπος αποθήκευσης του αντιδραστηρίου είναι σε στερεή μορφή και η παρασκευή του διαλύματος να γίνεται την ίδια μέρα που εφαρμόζεται η μέθοδος.

7 Κεφάλαιο

7.ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΘΡΟΙΣΜΑΤΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ–ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ

7.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του δείκτη D1 στηρίχτηκε στην αρχή της μεθόδου του οπτικού προσδιορισμού σε συνδυασμό με τη χρήση φασματοφωτομέτρου το οποίο μπορεί να συσχετίσει την απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος με την συγκέντρωση των αναλυτών που μετρήθηκαν. Με την χρήση αυτής της μεθόδου είναι πιο ακριβής ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του αθροίσματος της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης.

7.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ D1

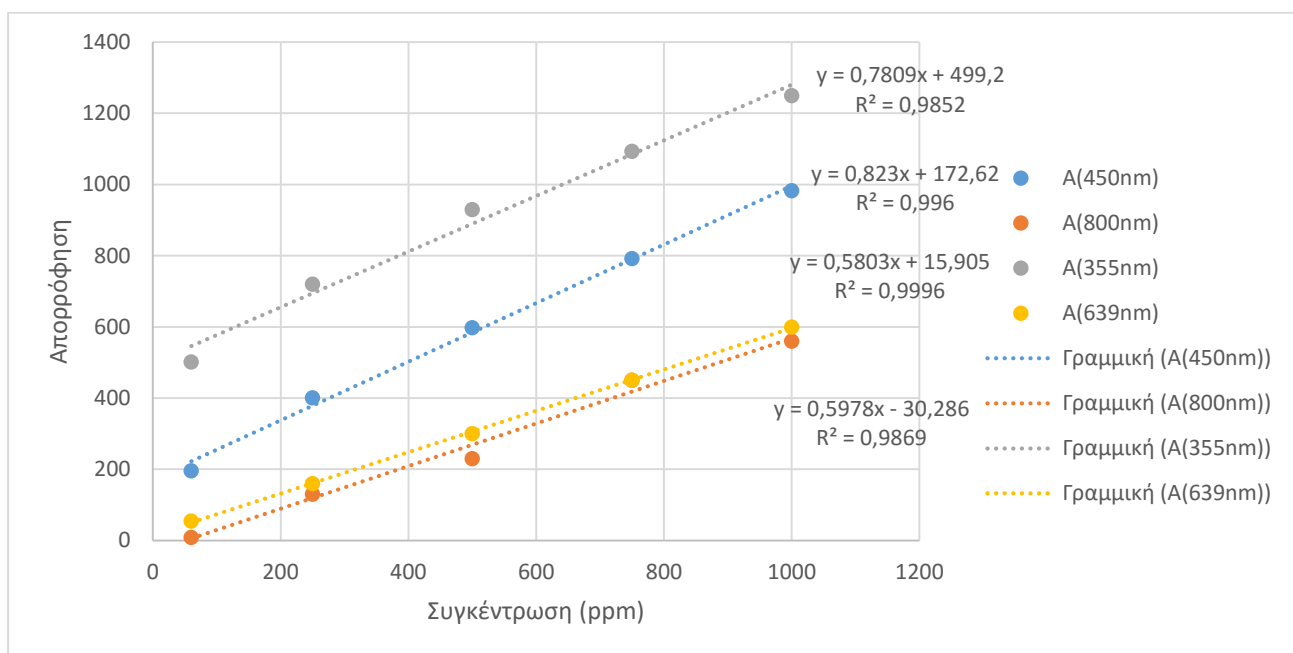
Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (δείκτης D1) βασίστηκε στη μέθοδο του οπτικού προσδιορισμού που περιεγράφηκε προηγουμένως. Αναλυτικά η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η ακόλουθη:

- Ζυγίστηκαν 8g ελαιολάδου (σε falcon)
- Προσθήκη 1,75 ml από το αντιδραστήριο p-OH ανθρανιλικό οξύ (50mg αντιδραστηρίου διαλυμένο σε 20ml CH₃COOH)
- Ανάδευση για 30''
- Προσθήκη 1,75ml νερού
- Ανάδευση για 30''
- Αναμονή για 50min .
- Φυγοκέντρωση για 1min στις 4000rpm
- Διαχωρισμός των δύο φάσεων με παραλαβή της υδατική (κάτω) φάση, με πιπέτα
- Μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο αρχικά στα παρακάτω μήκη κύματος : 800nm , 450nm , 355nm και 639nm.

Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με απεσταγμένο νερό.

Τα δείγματα των ελαιολάδων παρασκευάστηκαν από ανάμιξη δύο ελαιολάδων. Το πυκνό ελαιόλαδο είχε 1000 ppm στο άθροισμα ελαιοκανθάλης – ελαιασίνης και το αραιό είχε 0 ppm . Τα δείγματα είχαν μετρηθεί με τη μέθοδο NMR για τον ακριβή προσδιορισμό των δύο φαινολών.

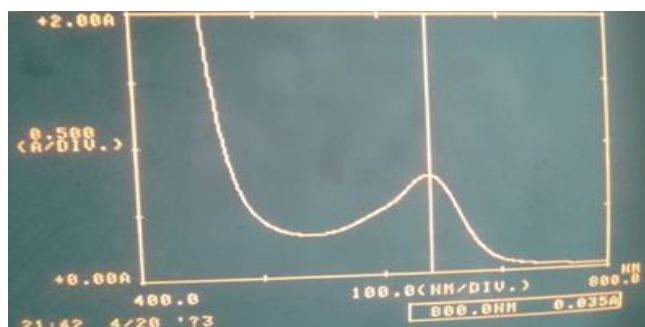
C (ppm)	800nm	639nm	450nm	355nm
60	0,009	0.055	0,196	0,502
250	0,130	0.160	0,401	0,720
500	0,260	0.300	0,598	0,930
750	0,450	0.450	0,792	1,093
1000	0,560	0.600	0,983	1,250



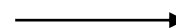
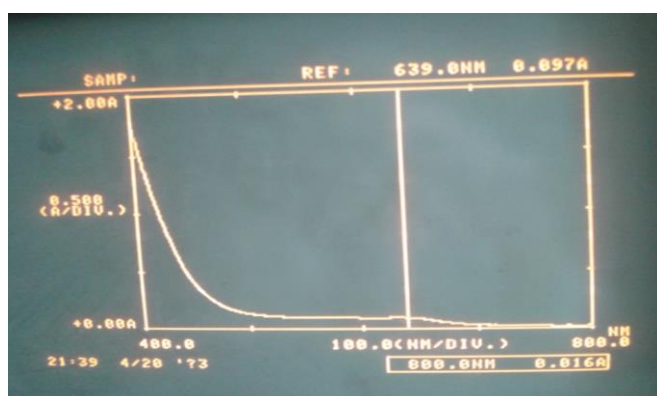
Στο φάσμα που πάρθηκε από 350 – 800 nm παρατηρήθηκε μία χαρακτηριστική απορρόφηση στα 639nm η οποία οφείλεται στο πράσινο χρώμα που έχει η υδατική φάση.

Παρατηρήθηκε ότι και στα τέσσερα μήκη κύματος υπάρχει μια πολύ καλή συσχέτιση ανάμεσα στις απορροφήσεις και τις περιεκτικότητες στο άθροισμα των δύο αναλυτών, αλλά ιδιαίτερα γραμμική συνάρτηση είναι στα 450nm και στα 639nm

Συσχέτιση οπτικού προσδιορισμού με ποσοτικού προσδιορισμού



Ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα στο άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (1000ppm) —————> Απορρόφηση στα 639nm



150ppm

Ελαιόλαδο με χαμηλή περιεκτικότητα στο άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (80ppm) —————> Απορρόφηση στα 639nm

Διαφορές μεθόδου οπτικού προσδιορισμού και ποσοτικού προσδιορισμού του δείκτη D1

1. Αυξήθηκε ο όγκος της υδατικής φάσης ώστε να προσαρμοστεί στην όγκο της κυψελίδας του φασματοφωτομέτρου και η μέτρηση να γίνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια.
2. Προστέθηκε το στάδιο της φυγοκέντρισης στις 4000rpm για 1min. Το στάδιο της φυγοκέντρισης δοκιμάστηκε αρχικά αμέσως μετά την προσθήκη νερού αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλήψιμα . Τελικά η φυγοκέντριση των δειγμάτων γίνεται αμέσως μετά τα 50' , ώστε να είναι πιο εύκολο και το επόμενο στάδιο , του διαχωρισμού των δύο φάσεων.
3. Μετά την φυγοκέντριση διαχωρίστηκαν η υδατική με την ελαιώδη φάση, παίρνοντας με πιπέτα την υδατική φάση.

7.3 ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ

Επόμενος στόχος που τέθηκε ήταν η μελέτη της σταθερότητας των απορροφήσεων της υδατικής φάσης μετά τα 50 min , αφού είχε διαχωριστεί με το ελαιόλαδο. Για να επιτευχθεί αυτή η μελέτη ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα εξής μήκη κύματος : 355nm , 450nm , 639nm , 800nm.

Τα δείγματα που μετρήθηκαν δημιουργήθηκαν από ανάμιξη δύο ελαιολάδων. (το ένα είχε μεγάλη περιεκτικότητα 1000ppm σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη και το άλλο είχε μικρότερη περιεκτικότητα 50ppm)

t(min) / 50ppm	355nm	450nm	639nm	800nm
10	0.449	0.076	0.048	0.043
25	0.500	0.092	0.052	0.045
40	0.540	0.105	0.050	0.059
⇒ 50	0.549	0.106	0.050	0.060
70	0.547	0.091	0.052	0.045
85	0.544	0.090	0.052	0.040
100	0.555	0.098	0.050	0.051
115	0.558	0.092	0.052	0.045
130	0.553	0.096	0.054	0.052

t(min) / 144ppm	355nm	450nm	639nm	800nm
10	0.445	0.075	0.045	0.034
25	0.572	0.139	0.070	0.068
40	0.612	0.163	0.080	0.075
⇒ 50	0.636	0.175	0.095	0.078
70	0.634	0.174	0.096	0.071
85	0.643	0.180	0.098	0.070
100	0.652	0.185	0.097	0.072

115	0.654	0.189	0.095	0.077
130	0.648	0.184	0.098	0.076

t(min) / 238ppm	355nm	450nm	639nm	800nm
10	0.597	0.207	0.102	0.095
25	0.674	0.261	0.109	0.099
40	0.740	0.319	0.135	0.133
⇒ 50	0.743	0.325	0.147	0.130
70	0.732	0.316	0.149	0.123
85	0.744	0.329	0.145	0.138
100	0.741	0.326	0.146	0.143
115	0.747	0.333	0.147	0.142
130	0.741	0.323	0.145	0.140

t(min) / 332ppm	355nm	450nm	639nm	800nm
10	0.597	0.264	0.140	0.112
25	0.672	0.319	0.152	0.123
40	0.734	0.380	0.170	0.162
⇒ 50	0.850	0.391	0.200	0.170
70	0.844	0.388	0.201	0.172
85	0.841	0.395	0.203	0.178
100	0.843	0.390	0.202	0.176
115	0.853	0.380	0.205	0.171
130	0.842	0.371	0.204	0.164



t(min) / 426ppm	355nm	450nm	639nm	800nm
10	0.622	0.267	0.125	0.094
25	0.801	0.425	0.182	0.167
40	0.855	0.485	0.205	0.182
50	0.977	0.512	0.252	0.214
70	0.973	0.515	0.251	0.229
85	0.979	0.515	0.254	0.222
100	0.967	0.519	0.253	0.225
115	0.970	0.524	0.252	0.229
130	0.968	0.525	0.254	0.229



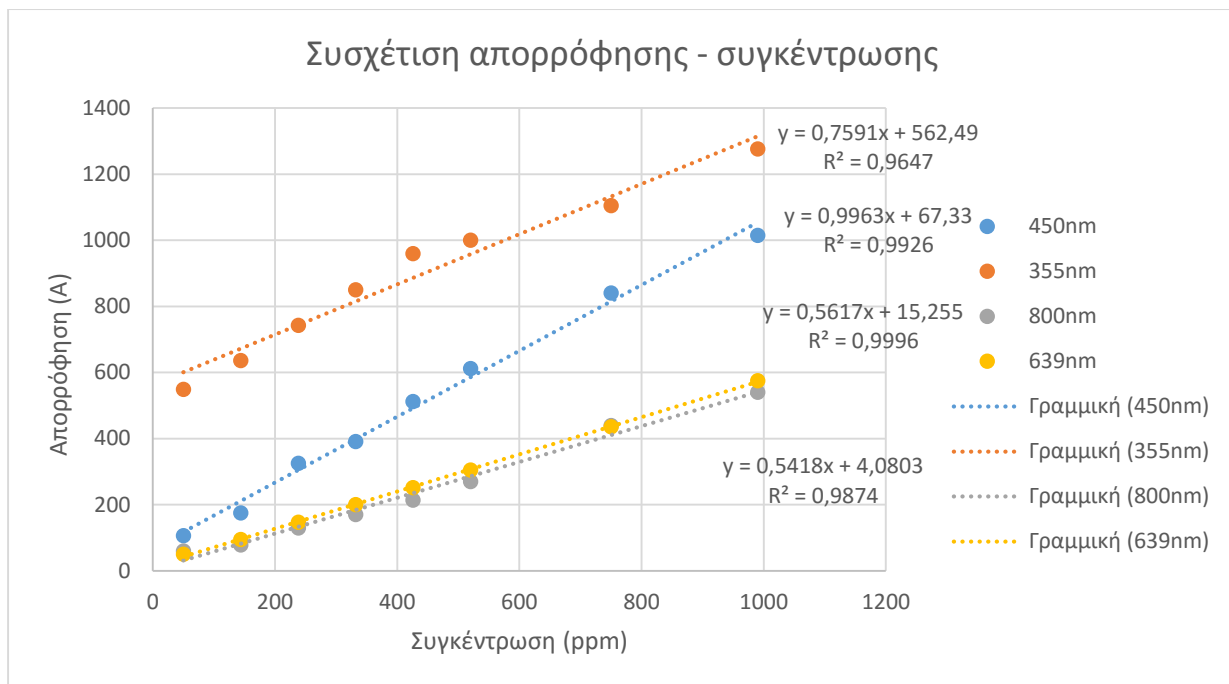
t(min) / 520ppm	355nm	450nm	639nm	800nm
10	0.637	0.307	0.150	0.130
25	0.828	0.447	0.215	0.194
40	0.884	0.538	0.250	0.209
50	0.949	0.612	0.305	0.270
70	0.953	0.614	0.304	0.269
85	0.951	0.613	0.307	0.270
100	0.942	0.614	0.306	0.271
115	0.932	0.612	0.305	0.275
130	0.933	0.625	0.302	0.273



t(min) / 755ppm	355nm	450nm	639nm	800nm
10	0.831	0.614	0.305	0.319
25	0.938	0.740	0.382	0.438
40	1.028	0.827	0.405	0.452
50	1.105	0.840	0.436	0.440
70	1.102	0.845	0.438	0.445
85	1.112	0.852	0.435	0.442
100	1.115	0.892	0.437	0.449
115	1.113	0.895	0.436	0.450
130	1.106	0.900	0.435	0.451

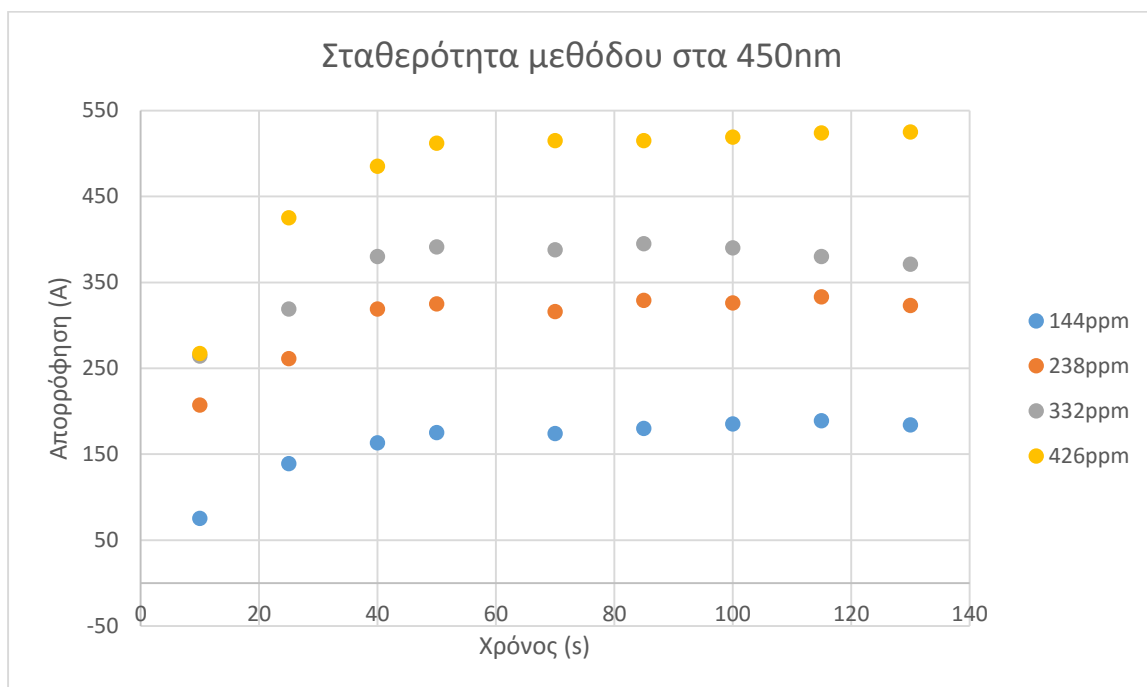


t(min) / 990ppm	355nm	450nm	639nm	800nm
10	0.951	0.612	0.298	0.258
25	1.148	0.834	0.415	0.363
40	1.217	0.927	0.501	0.424
50	1.276	1,015	0.575	0.540
70	1.280	1.000	0.572	0.552
85	1.179	1.001	0.573	0.567
100	1.181	1.009	0.570	0.577
115	1.182	1.015	0.571	0.580
130	1.179	1.018	0.569	0.578

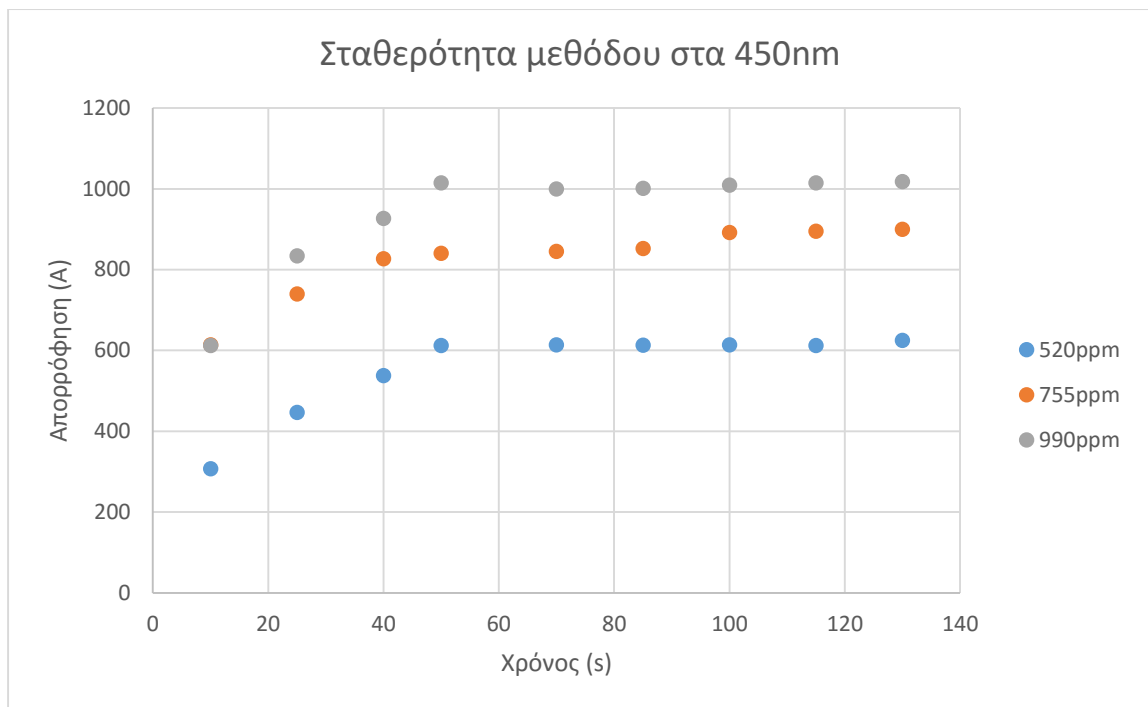


Διάγραμμα 7.1 : Συσχέτιση απορρόφησης – συγκέντρωσης στα 355nm , 450nm , 639nm και στα 800nm

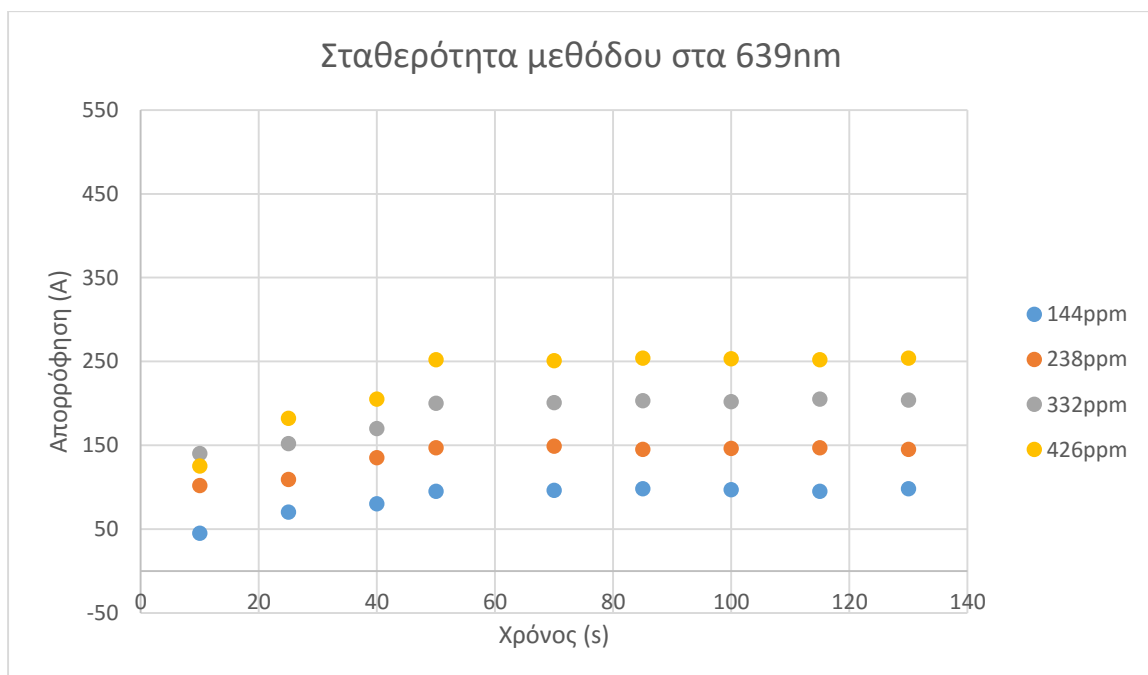
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρήθηκε καλύτερη γραμμικότητα στα 450nm και στα 639nm.



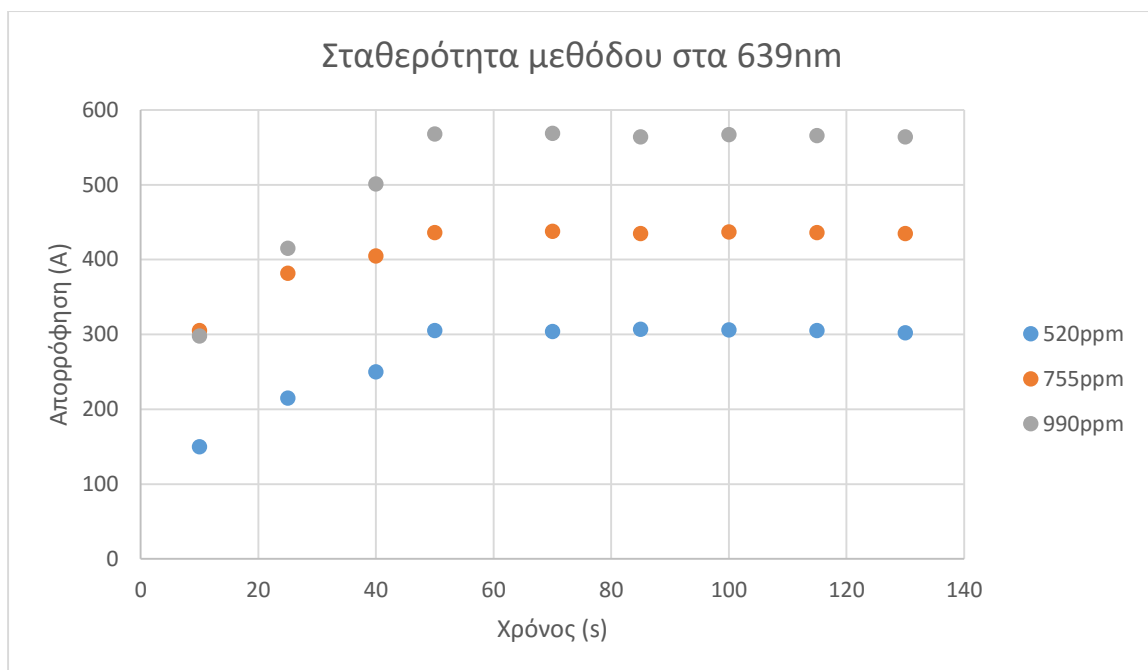
Εικόνα 7.2 : Συσχέτιση χαμηλών συγκεντρώσεων σε συνάρτηση με το χρόνο



Εικόνα 7.3 : Συσχέτιση υψηλών συγκεντρώσεων σε συνάρτηση με το χρόνο



Εικόνα 7.4 : Συσχέτιση υψηλών συγκεντρώσεων σε συνάρτηση με το χρόνο



Εικόνα 7.5 : Συσχέτιση υψηλών συγκεντρώσεων σε συνάρτηση με το χρόνο

Παρατηρήθηκε ότι οι απορροφήσεις στα 450nm και στα 639nm σταθεροποιούνται από τα 50 min έως στα 120min .

8 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

8.Απομόνωση φαινολικών παραγώγων

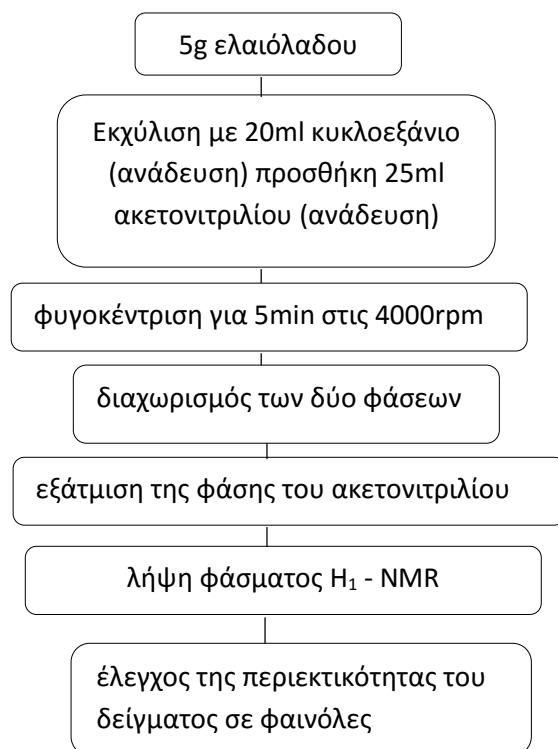
Αρχικά επιχειρήθηκε η απομόνωση των φαινολικών παραγώγων από δείγματα ελαιόλαδου και ελαιοκάρπου. Οι ουσίες που παρελήφθησαν, μελετήθηκαν περαιτέρω με ποικίλες τεχνικές ώστε να ταυτοποιηθεί η δομή τους και να εξασφαλιστεί ότι έχουν τη μέγιστη δυνατή καθαρότητα, ώστε να μπορούν χρησιμοποιηθούν σαν πρότυπες ουσίες .

8.1 Απομόνωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης

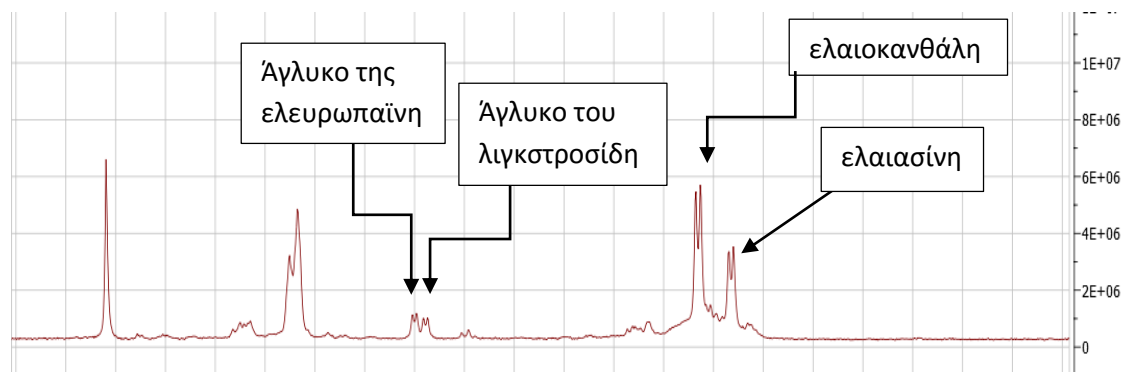
8.1.1 Απομόνωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδα (TLC) αντίστροφης πλάκας

- Παραλαβή φαινολικών συστατικών από ελαιόλαδο με την τεχνική υγρής-υγρής εκχύλισης

Αρχικά η επιλογή του ελαιολάδου έγινε με βάση την περιεκτικότητά του σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη. Χρησιμοποιήθηκε ελαιόλαδο , το οποίο είχε υψηλή περιεκτικότητα στις δύο φαινόλες ενώ είχε μικρές ποσότητες των άγλυκων της ελευρωπαΐνης και του λιγκτροσίδη. Έπειτα ακολουθήθηκε η εκχύλιση του ελαιολάδου σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο (Ευαγγελία Κάρκουλα):



Με αυτό τον τρόπο έγινε η παραλαβή του εκχυλίσματος των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, ανάμεσα σε αυτά και η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη.



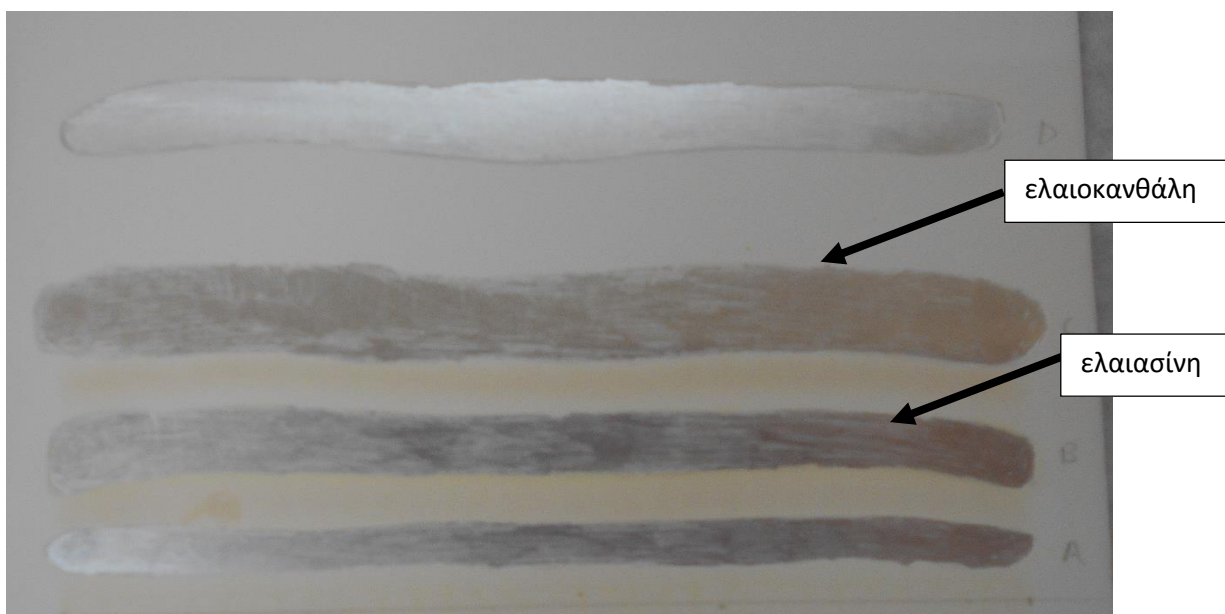
- **Διαδικασία απομόνωσης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)**

Στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC) , ο διαχωρισμός έγινε σε πλάκες αλουμινίου με στατική φάσης γέλη πυριτίου (silica gel) αντίστροφη φάσης, ενώ ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε μίγμα νερού - ακετονιτρίλιου . Για την επιλογή των καταλληλότερων διαλυτών , λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα των συστατικών των οποίων επιδιώκεται ο διαχωρισμός. Επειδή οι φαινολικές ενώσεις δεν είναι έγχρωμες και επομένως απευθείας ανιχνεύσιμες πάνω στην πλάκα, συνήθως η τελευταία παρατηρείται στο υπεριώδες φως και ψεκάζεται με βανιλίνη . Η εμφάνιση φθορισμού και χαρακτηριστικών χρώσεων αποτελεί ένδειξη παρουσίας φαινολικών ενώσεων με ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά ή και αντιοξειδωτική δράση.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη:

- ο ζυγίστηκαν 20mg του παραπάνω εκχυλίσματος, το οποίο διαλύθηκε σε 500 μ L ακετονιτρίλιου.
- ο Τοποθετήθηκε στη πλάκα με πιπέτα το εκχύλισμά μας
- ο Αναμονή για την ανάπτυξη της πλάκας σε θάλαμο με σύστημα διαλυτών 70% - 30% (νερό – ακετονιτρίλιο).

Όταν αναπτύχθηκε η πλάκα παρατηρήθηκαν στο υν 4 ζώνες , οι οποίες αφαιρέθηκαν με απόξεση από την πλάκα αλουμινίου και εκχειλίσθηκαν με προσθήκη 20ml ακετονιτρίλιου στους υπέρηχους για 20min. Στο τέλος διηθήθηκαν , εξατμίσθηκαν και από τα φάσματα στο H-NMR ταυτοποιήθηκε ποια από τις 4 ζώνες είναι η ελαιοκανθάλη και ποια η ελαιασίνη.



Εικόνα 8.1 : Απεικόνιση παρασκευαστικής πλάκας (pre-TLC) αντίστροφης φάσης

8.1.2 Παραλαβή ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με χρήση ρητίνης (XAD7) και απομόνωση με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

- **Παραλαβή εκχυλίσματος με χρήση ρητίνης (XAD7)**
 - ζυγίστηκαν 20g ρητίνης και προστέθηκαν 450ml ελαιόλαδο
 - ανάδευση μίγματος για 7h
 - Διήθηση ελαιολάδου με τη χρήση της ρητίνης και συλλογή τη ρητίνη , η οποία έχει προσλάβει τις ουσίες που μας ενδιαφέρουν
 - εκχύλιση της ρητίνης με κυκλοεξάνιο
 - ανάδευση για μισή ώρα
 - διαχωρισμός κυκλοεξανίου και της ρητίνης
 - Επανάληψη των τριών τελευταίων βημάτων με το κυκλοεξάνιο
 - εκχύλιση της ρητίνης με ακετονιτρίλιο
 - ανάδευση για μία ώρα
 - διαχωρισμός ακετονιτρίλιου και της ρητίνης
 - Παραλαβή ακετονιτρίλιου και εξάτμιση
 - Λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$

- **1ος καθαρισμός εκχυλίσματος με στόχο την απολίπανση**

Στη συνέχεια περάστηκε το εκχύλισμα από μία στήλη με silica αφού είχε διαλυθεί σε ακετονιτρίλιο. Μετά τη λήψη μερικών κλασμάτων , ελέγχθηκαν λαμβάνοντας φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και με αυτό τον τρόπο παρατηρήθηκε σε ποιο σημείο εκλούστηκαν οι ουσίες μας. Στη συνέχεια ενώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν αυτές τις ουσίες και εξατμίστηκαν.

- **2^{ος} καθαρισμός εκχυλίσματος :** απομόνωση των ουσιών με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

Στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - pre - TLC) , ο διαχωρισμός έγινε σε πλάκες αλουμινίου με στατική φάσης γέλη πυριτίου αντίστροφη φάσης (silica gel 60 RP-18 F254s), ενώ ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε μίγμα (35% - 65%) νερού - ακετονιτριλίου . αφού αναπτύχθηκε η πλάκα, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως προαναφέρθηκε και παρατηρήθηκαν δύο έντονες ζώνες, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$.



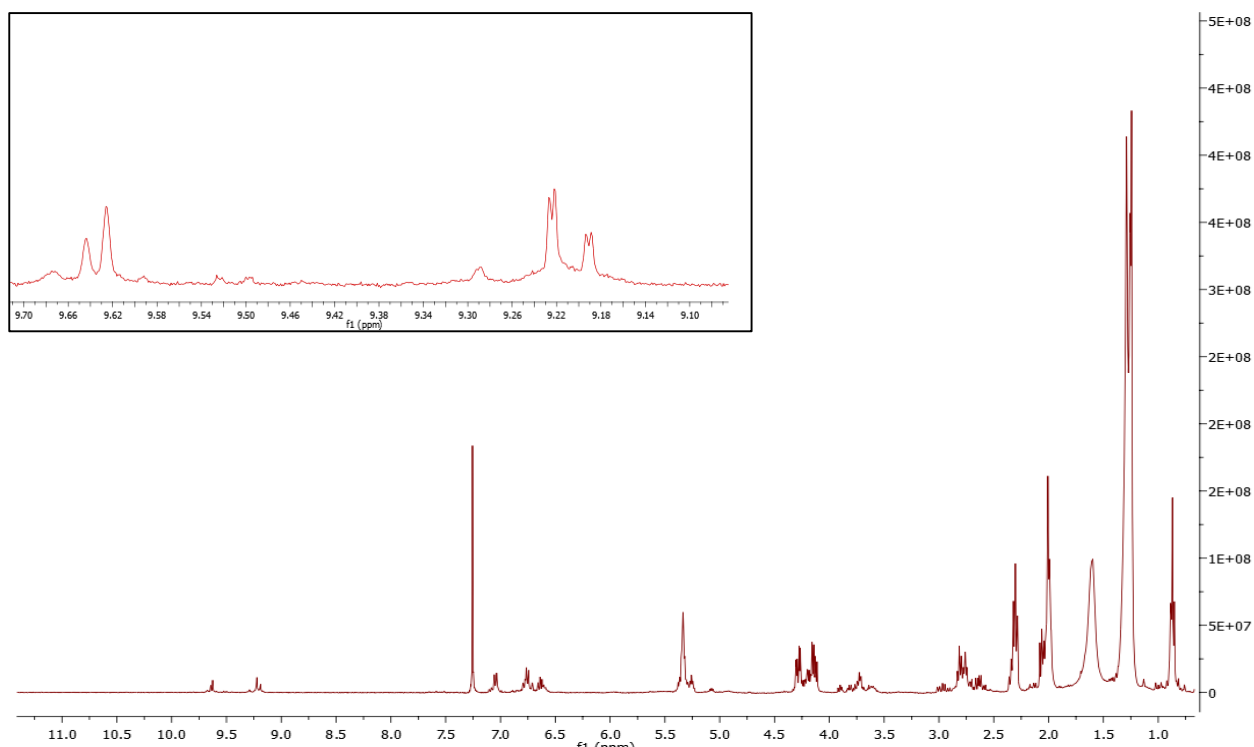
Εικόνα 8.2 : Απεικόνιση παρασκευαστικής πλάκας (pre-TLC) αντίστροφης φάσης

Από τη λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ ταυτοποιήθηκαν οι ζώνες B και C . Η B ζώνη περιείχε ελαιασίνη ενώ η C ζώνη περιείχε ελαιοκανθάλη.

8.1.3 Παραλαβή ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με χρήση ρητίνης (XAD7) και απομόνωση τους με χρήση CN- στήλη

- **Παραλαβή εκχυλίσματος με χρήση ρητίνης (XAD7)**

Ζυγίστηκαν 20g ρητίνης και προστέθηκαν 400ml ελαιόλαδο , τα οποία αναδεύτηκαν για ένα βράδυ. Στη συνέχεια φυγοκεντρίθηκε το ελαιόλαδο με τη ρητίνη και συλλέχθηκε η ρητίνη , με απόχυση του ελαιόλαδου. Έπειτα εκχυλίστηκε η ρητίνη με κυκλοεξάνιο και αναδεύθηκε για μισή ώρα. Διαχωρίστηκαν με διήθηση το κυκλοεξάνιο και η ρητίνη και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία με κυκλοεξάνιο. Τέλος επαναλάβαμε την ίδια διαδικασία προσθέτοντας ακετονιτρίλιο και αφήνοντας το να αναδεύεται για 1 ώρα. Στη συνέχεια διηθήσαμε και εξατμίσαμε το διήθημα και παραλάβαμε το εκχύλισμα, στο οποίο πήραμε φάσμα H1-NMR από το οποίο παρατηρήσαμε ότι στο εκχύλισμα υπήρχαν οι ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη αλλά υπήρχαν και λίπη.

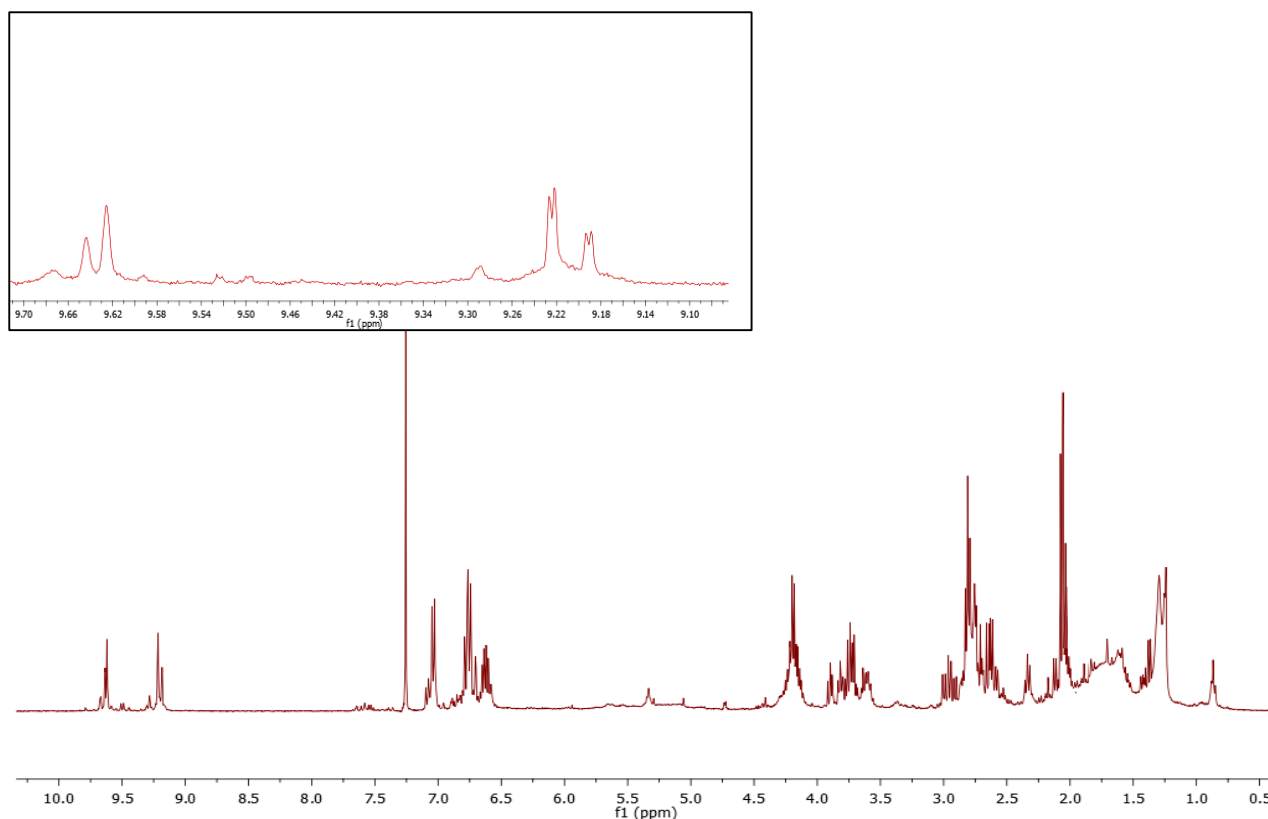


Εικόνα 8.3 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR αρχικού εκχυλίσματος

Απολίπανση του εκχυλίσματος με στήλη R18

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απολίπανση του εκχυλίσματος ήταν η ακόλουθη:

- Πακετάρισμα της στήλης με διάμετρο 1,5cm με σίλικα R18
- Έπειτα τοποθετήθηκε το εκχύλισμα στη στήλη αφού είχε διαλυθεί σε ακετονιτρίλιο
- Αφού συλλέχθηκαν είκοσι κλάσματα, ελέγχθηκαν με πλάκες TLC κανονικής φάσης και επιβεβαιώθηκαν με φάσματα H-NMR ότι περιείχαν την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη.
- Τέλος εξατμίστηκαν τα κλάσματα τα οποία περιείχαν τις δύο φαινόλες και ζυγίστηκε το εκχύλισμα.
- Φάσμα ^1H – NMR

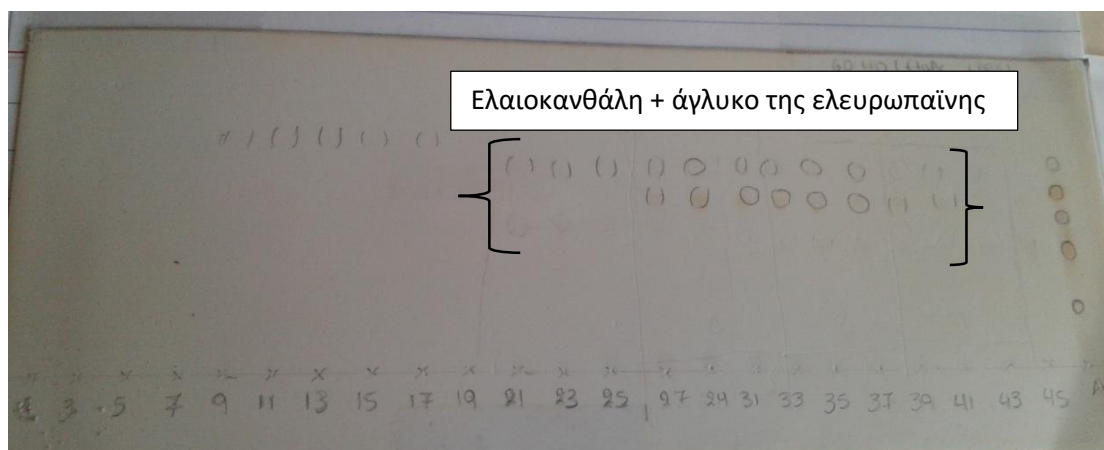


Εικόνα 8.4 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR του εκχυλίσματος μετά από τη απολίπανση.

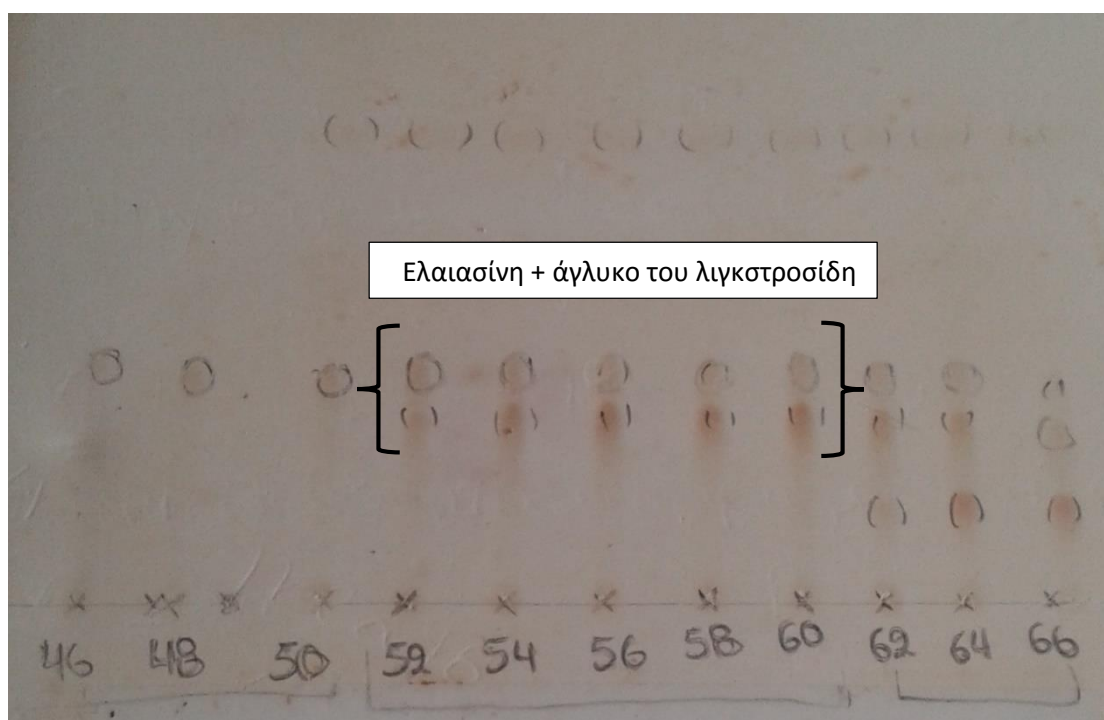
- **Απομόνωση με υγρή χρωματογραφία στήλης (LC) υπό χαμηλή πίεση**

Η υγρή χρωματογραφία στήλης (LC) υπό χαμηλή πίεση (300 mbar) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε κύανο σίλικα POLYGOPREP 60 – 30 CN και ως κινητή φάση μίγμα κυκλοξανίου και οξικού αιθυλεστέρα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν :

- Πακετάρισμα της στήλης σε ύψος 12cm με κύανο σίλικα
- Το μίγμα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν κυκλοεξάνιο – οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 90%-10%
- Έπειτα το εκχύλισμα μας διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα και στη συνέχεια προσθέσαμε κυκλοεξάνιο
- Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το διάλυμα στη στήλη , προστέθηκε το μίγμα των διαλυτών και συλλέχθηκαν κλάσματα
- Ταυτόχρονα ελέγχθηκαν τα κλάσματα με TLC κανονικής φάσης σε σύστημα 60%-40% οξικό αιθυλεστέρα – κυκλοεξάνιο
- Ενώθηκαν τα κλάσματα τα οποία είχαν ίδια εικόνα στις πλάκες TLC
- Στη συνέχεια ελέγχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες με φάσμα ^1H -NMR



Εικόνα 8.5 : Απεικόνιση πλάκας (TLC) κανονικής φάσης

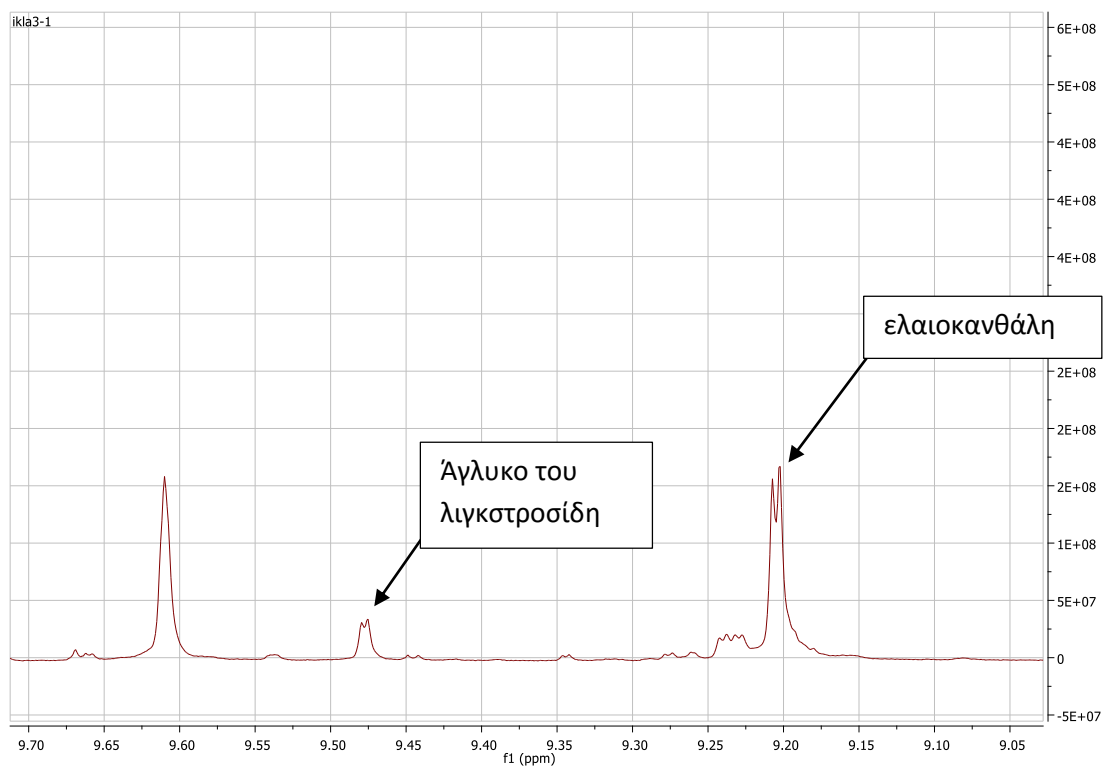


Εικόνα 8.6 : Απεικόνιση πλάκας (TLC) κανονικής φάσης

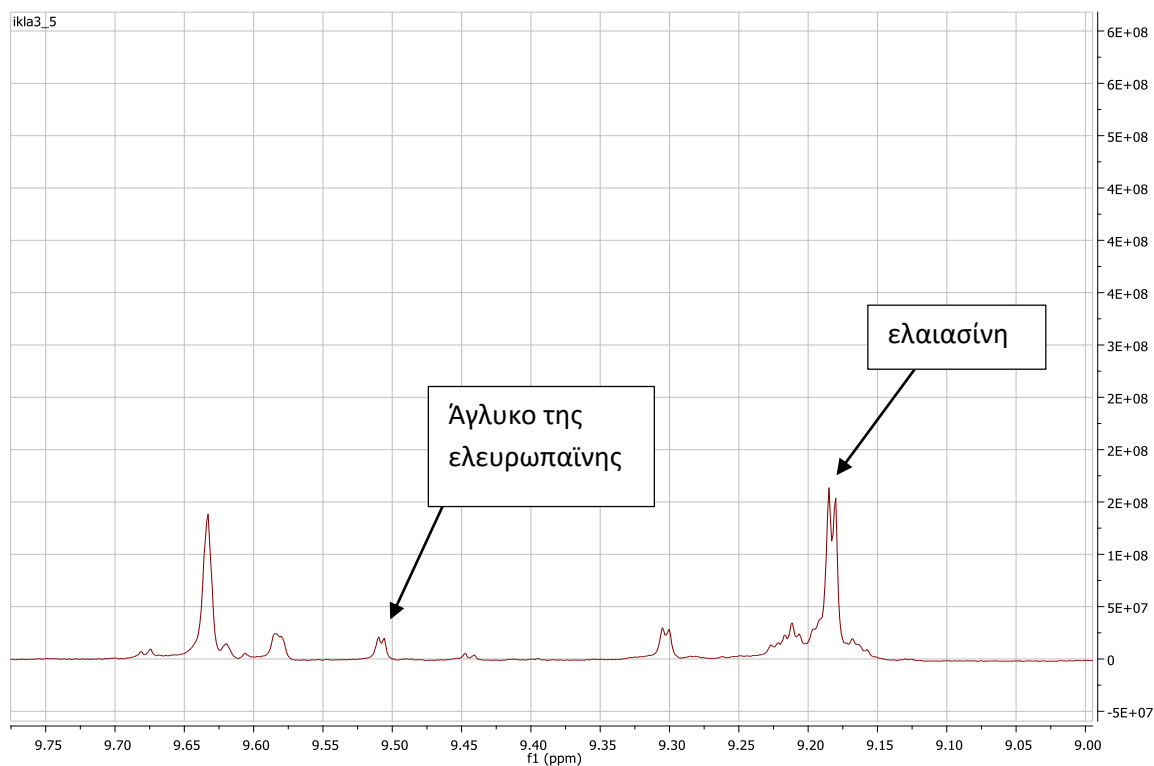
Από τα φάσματα πλάκας TLC παρατηρήθηκε ότι:

- η ελαιοκανθάλη εμφανίζεται από το 20^ο κλάσμα μέχρι το 40^ο κλάσμα
- η ελαιασίνη εμφανίζεται από το 50^ο κλάσμα μέχρι το 60^ο κλάσμα

Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν και με φάσματα ¹H-NMR τα οποία παρατίθενται στη συνέχεια.



Εικόνα 8.7 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR της ελαιοκανθάλης και του άγλυκου του λιγκτροσίδη



Εικόνα 8.8 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR της ελαιασίνης και του άγλυκου της ελευρωπαϊκής

Με αυτό τον τρόπο δεν καταφέραμε να απομονώσουμε την ελαιοκανθάλη και την ελαιασίνη από τα άγλυκα του λιγκστροσίδη και της ελευρωπαΐνης αντίστοιχα.

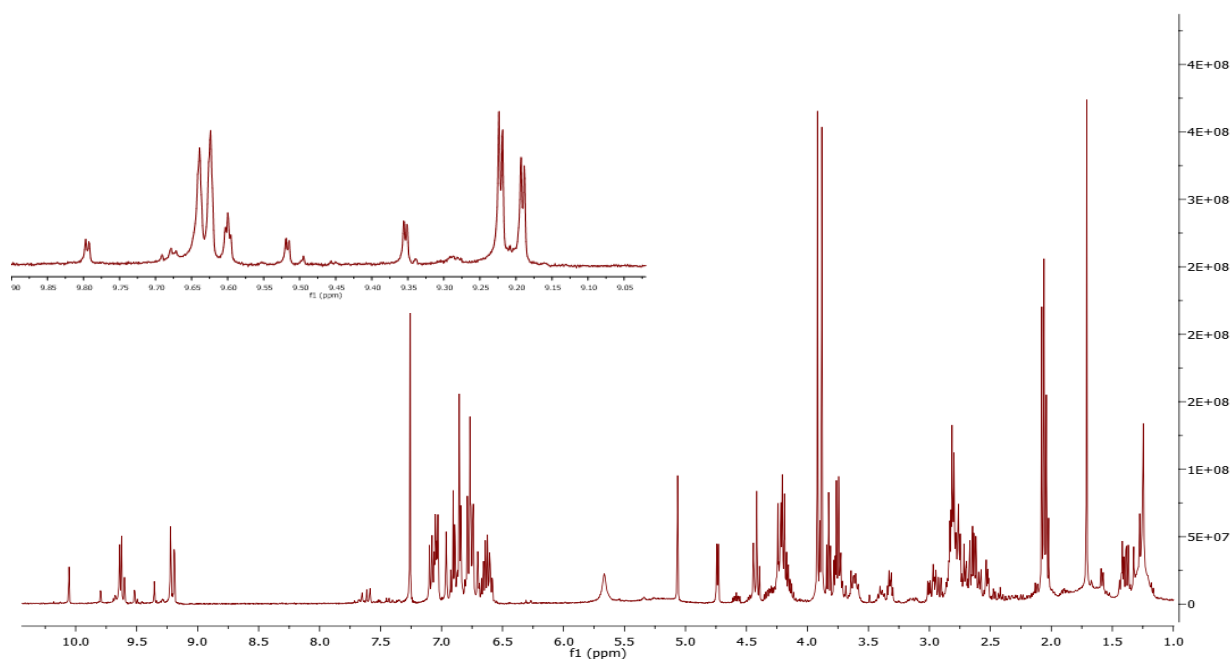
8.1.4 Παραλαβή εκχυλίσματος με ανάδευση και απομόνωση ελαιοκανθάλης – ελαιασίνης με χρήση CN- στήλη

- Παραλαβή εκχυλίσματος με ανάδευση του ελαιολάδου με νερό

Η παραλαβή του εκχυλίσματός μας έγινε με την ανάδευση του ελαιολάδου με το νερό . Με εξάτμιση του νερού παραλάβαμε το εκχύλισμα το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε στήλη για την απολίπανση και την απομόνωση των ουσιών.

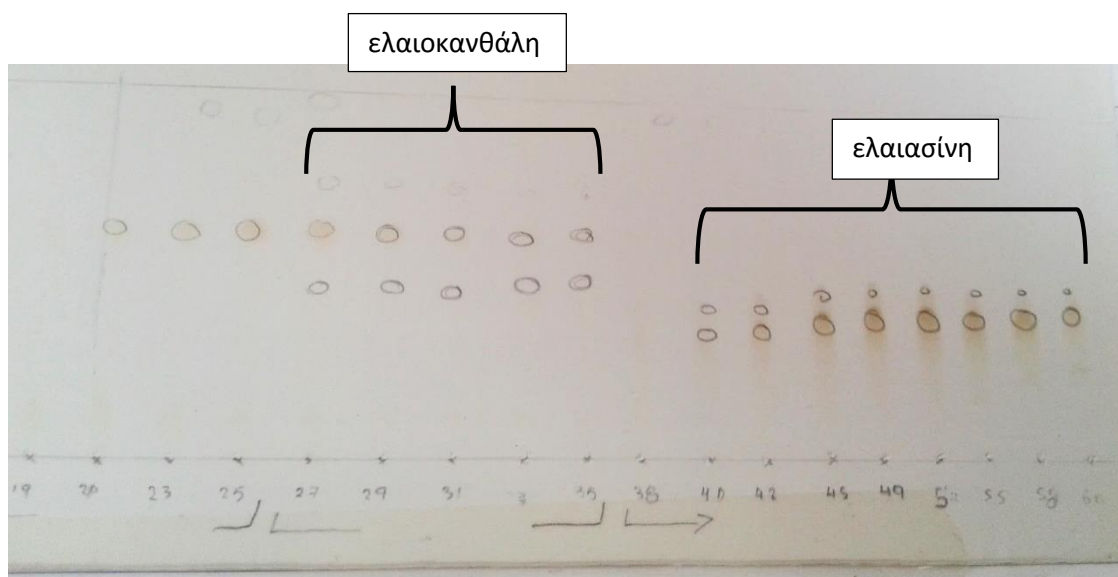
- Απολίπανση του εκχυλίσματος με στήλη R18

- Πακετάραμε τη στήλη με διάμετρο 1,5cm με σίλικα R18
- Έπειτα τοποθετήθηκε το εκχύλισμα στη στήλη αφού το είχαμε διαλύσει σε ακετονιτρίλιο
- Αφού πήραμε μερικά κλάσματα τα ελέγξαμε με πλάκες TLC κανονικής φάσης , το επιβεβαιώσαμε με φάσματα $^1\text{H-NMR}$, συλλέξαμε τα κλάσματα , τα εξατμίσαμε και ζυγίσαμε το εκχύλισμα.



Εικόνα 8.9 : Απεικόνιση φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του εκχυλίσματος μετά την απολίπανση

- Απομόνωση ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με χρήση κύανο – στήλης
 - Γεμίσαμε τη στήλη σε ύψος 12cm με κύανο σίλικα
 - Το μίγμα διαλυτών με το οποίο πακετάραμε τη στήλη ήταν κυκλοεξάνιο – οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 90%-10%
 - Έπειτα διαλύσαμε το εκχύλισμα μας σε οξικό αιθυλεστέρα και αφού διαλύθηκαν προσθέσαμε κυκλοεξάνιο
 - Στη συνέχεια τοποθετήσαμε το διάλυμα στη στήλη , προσθέσαμε το μίγμα των διαλυτών και συλλέξαμε κλάσματα.
 - Καθώς μαζεύαμε τα κλάσματα ελέγχαμε με TLC κανονικής φάσης τις ουσίες που βγαίνουν σε σύστημα 60%-40% οξικό αιθυλεστέρα – κυκλοεξάνιο.

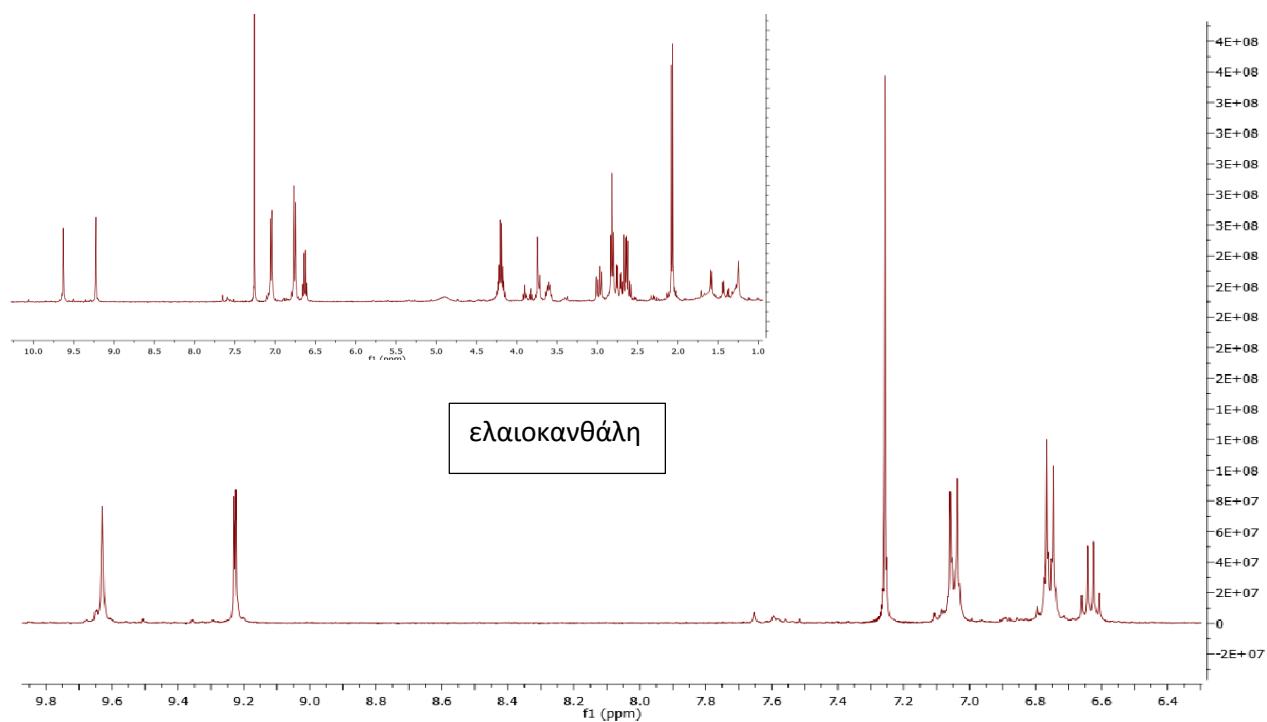


Εικόνα 8.10 : Απεικόνιση πλάκας (TLC) κανονικής φάσης

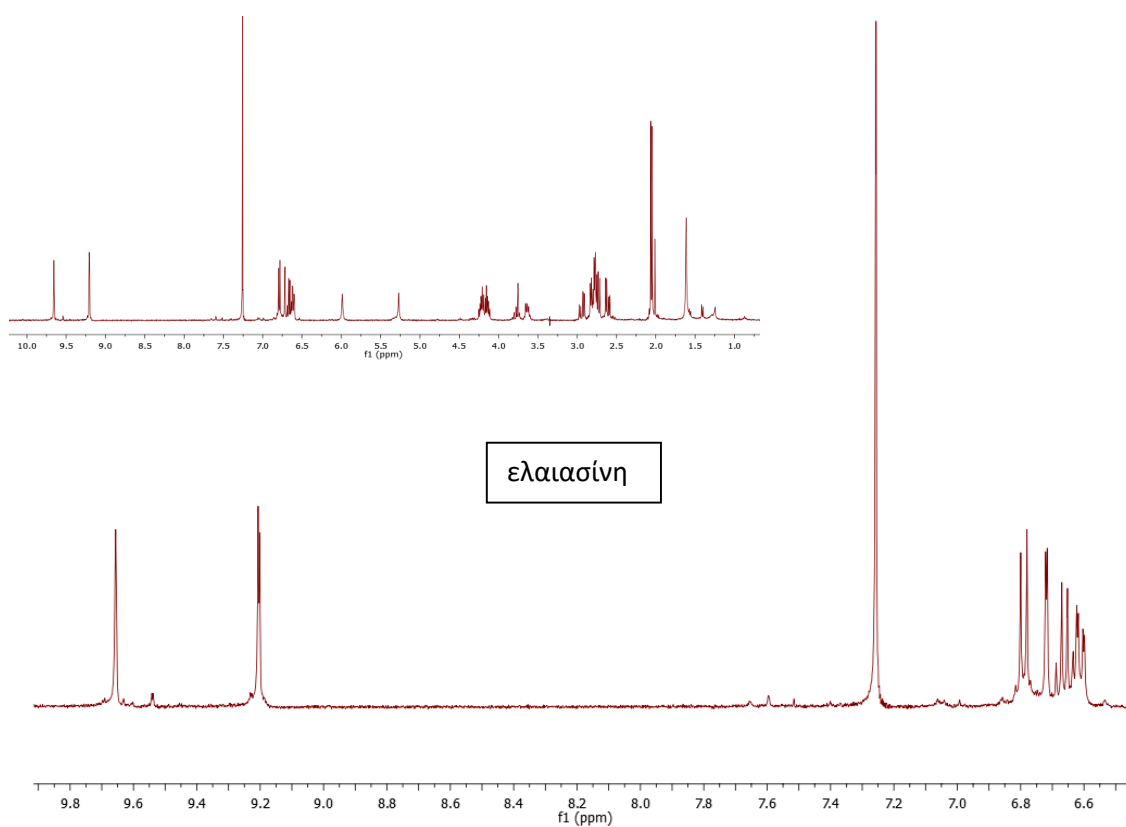
Από την πλάκα TLC που αναπτύχθηκε σε σύστημα 60-40 οξικό αιθυλεστέρα – κυκλοεξάνιο παρατηρήθηκαν τα εξής :

- ✓ Από το 24° έως το 37° κλάσμα εμφανίστηκε η ελαιοκανθάλη
- ✓ Από το 38° έως το 60° κλάσμα εμφανίστηκε η ελαιασίνη

Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με φάσματα $^1\text{H-NMR}$ που παρατίθενται παρακάτω :



Εικόνα 8.11 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR της ελαιοκανθάλης



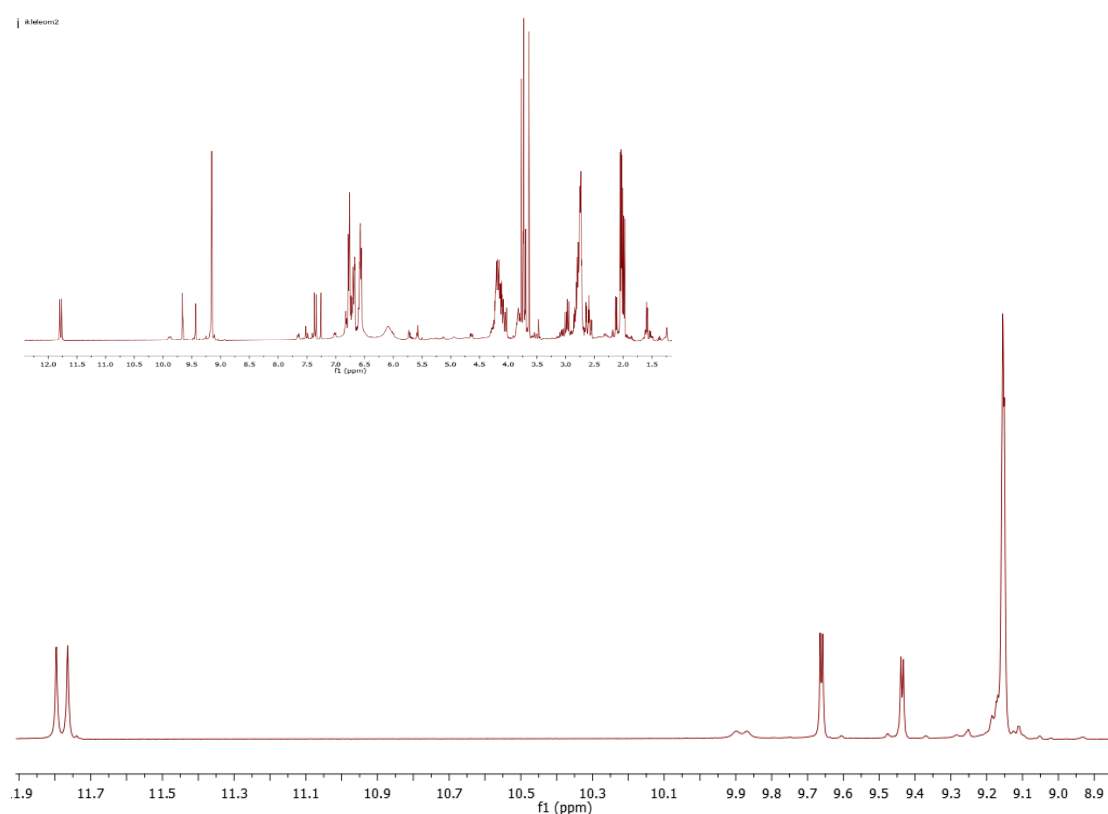
Εικόνα 8.12 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR της ελαιασίνης

Με αυτή τη διαδικασία απομονώθηκαν η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη με μεγάλη καθαρότητα .

8.2 Απομόνωση της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (κλειστή μορφή)

- Παραλαβή εκχυλίσματος μίγματος ελαιομισιονάλη και ελευρωπαϊνδιάλη από ελαιόκαρπο

Η παραλαβή του εκχυλίσματος, το οποίο τοποθετήθηκε στη στήλη έγινε με την επαφή των ελαιοκάρπων με κατάλληλο διαλύτη και εξατμίσαμε το διαλύτη για την παραλαβή του εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα μας περιείχε την ανοικτή μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης η οποία ταυτοποιήθηκε με φάσμα H-NMR.



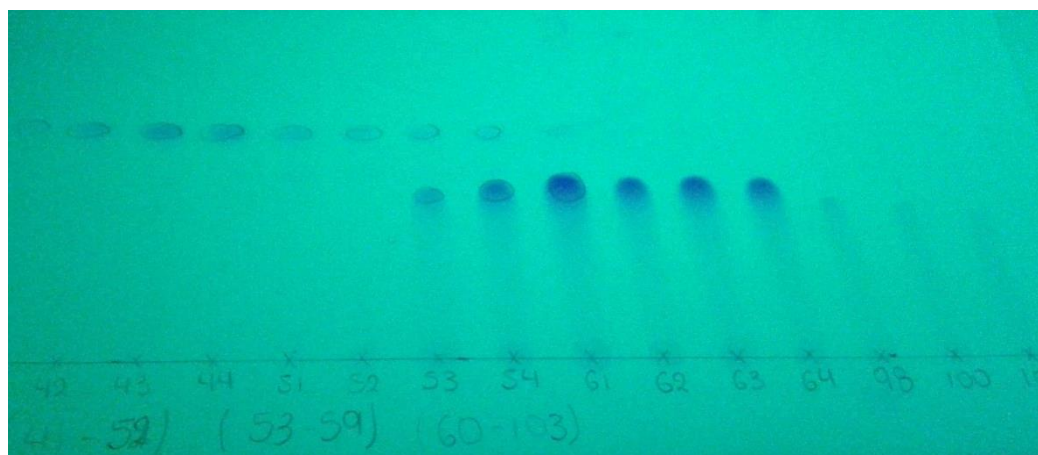
Εικόνα 8.13 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR αρχικού εκχυλίσματος του μίγματος ελαιομισιονάλη και ελευρωπαϊνδιάλη

- Απομόνωση της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (κλειστή μορφή)

Το εκχύλισμα με την ελαιομισιονάλη τοποθετήθηκε σε στήλη κανονικής φάσης με τη παρακάτω διαδικασία:

- ✓ Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν κυκλοεξάνιο με οξικό αιθελεστέρα (αρχικά σε αναλογία 90-10%). Η ελαιομισιονάλη διαλύθηκε σε οξικό αιθελεστέρα, αναδεύτηκε με σίλικα κανονικής φάσης και αφού εξατμίστηκε ο διαλύτης, τοποθετήθηκε η σίλικα στη στήλη, η οποία είχε ήδη πακεταριστεί.

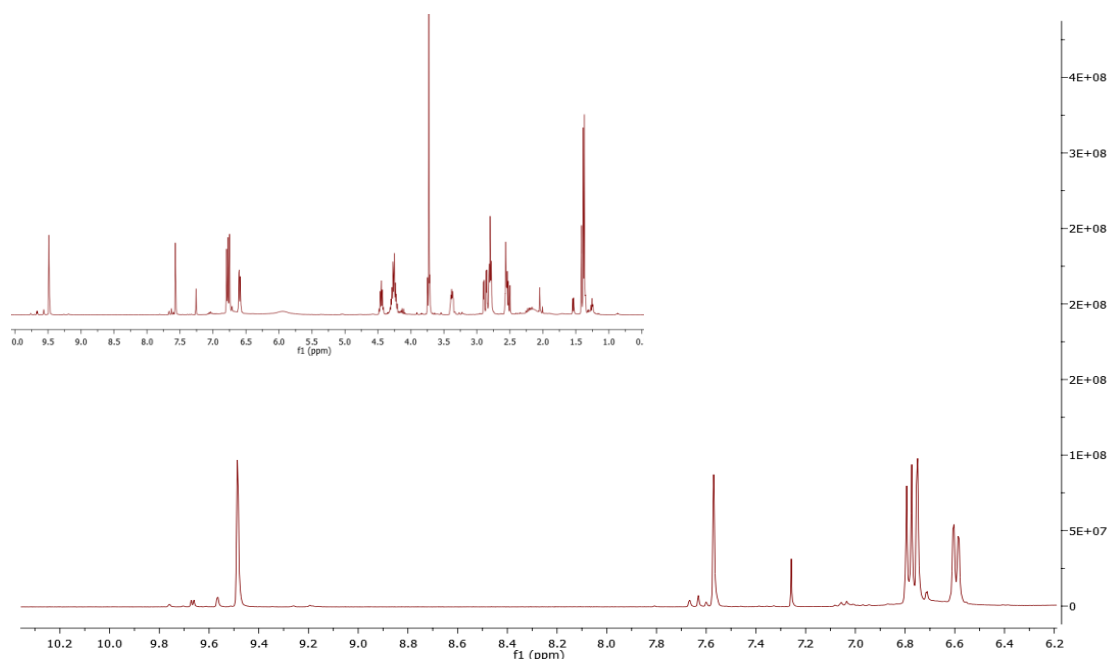
Αφου τοποθετήθηκε το εκχύλισμα , συλλέχθηκαν 15 κλάσματα με σύστημα διαλυτών 90-10% κυκλοεξάνιο – οξικό αιθυλεστέρα. Μετά τη συλλογή 15 κλασμάτων , συλλέχθηκαν τα επόμενα 15 κλάσματα με αναλογία διαλυτών 85-15%. Στη συνέχεια συνεχίστηκε η λήψη κλασμάτων με αναλογία διαλυτών 75-25%. Όταν συλλέχθηκαν όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα διαλυτών 60-40 % οξικό αιθυλεστέρα – κυκλοεξάνιο.



Εικόνα 8.14 : Απεικόνιση πλάκας (TLC) κανονικής φάσης

Συλλέχθηκαν από το 53^ο κλάσμα έως το 98^ο τα οποία μετά τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ ταυτοποιήθηκαν ότι περιέχουν την αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης.

Το μίγμα της ελαιομισιονάλης και της ελευρωπαΐνιδιάλης μετατράπηκε στην αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης όταν τοποθετήθηκε πάνω στη στήλη κανονικής φάσης. Αυτό ταυτοποιήθηκε και από φάσμα $^1\text{H-NMR}$ που παρουσιάζεται παρακάτω.



Εικόνα 8.15 : Απεικόνιση φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (κλειστή μορφή)

9 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

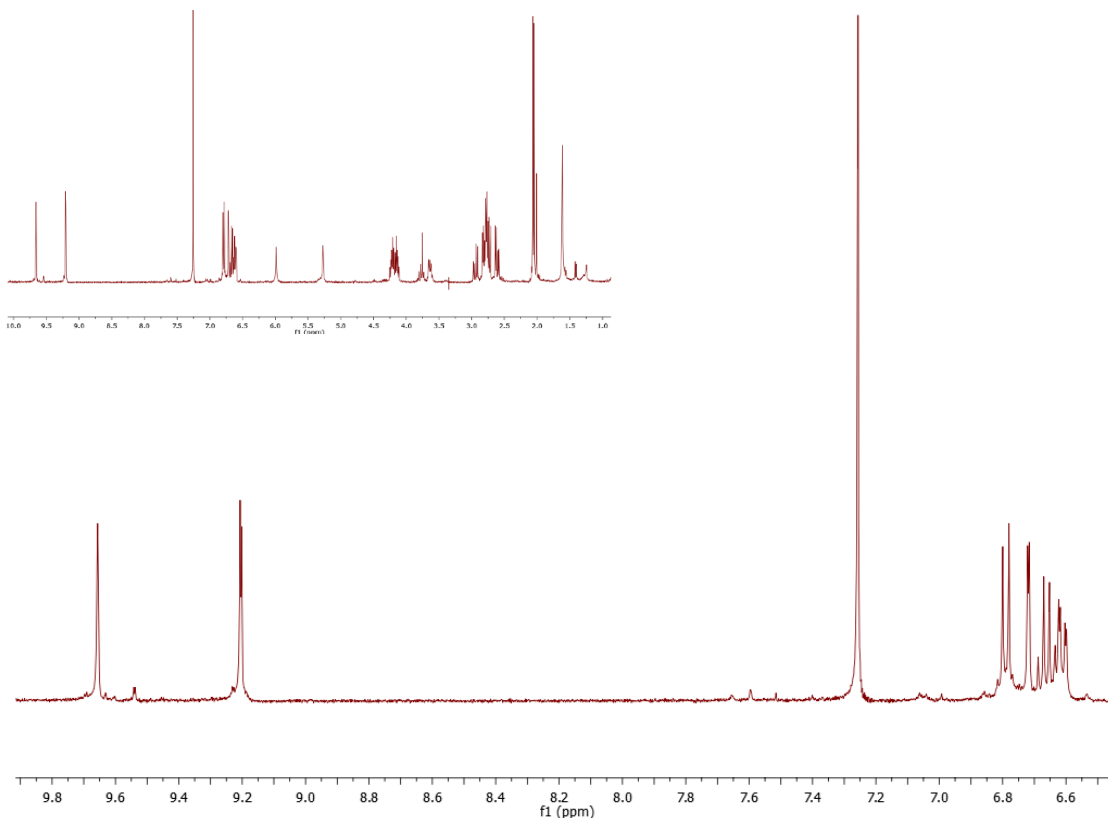
9. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς της μεθόδου του ποσοτικού προσδιορισμού του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (δείκτης D1)

Οι καμπύλες αναφοράς πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη γνωστής ποσότητας πρότυπων ουσιών μέσα σε ελαιόλαδο, το οποίο δεν περιείχε καμία από τις ουσίες που μελετήθηκαν. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε αυτός ο τρόπος προσδιορισμού των ουσιών είναι ώστε να εξασφαλίζεται η προσομοίωση της συμπεριφοράς τους όταν βρίσκονται εκ φύσεως μέσα στο ελαιόλαδο και έτσι να επιτυγχάνεται καλύτερος ποσοτικός προσδιορισμός που ανταποκρίνεται σε πραγματικές συνθήκες. Οι πρότυπες ουσίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των καμπυλών απομονώθηκαν εργαστηριακά από ελαιόλαδα ή ελιές όπως προαναφέρθηκε.

9.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ελαιασίνης

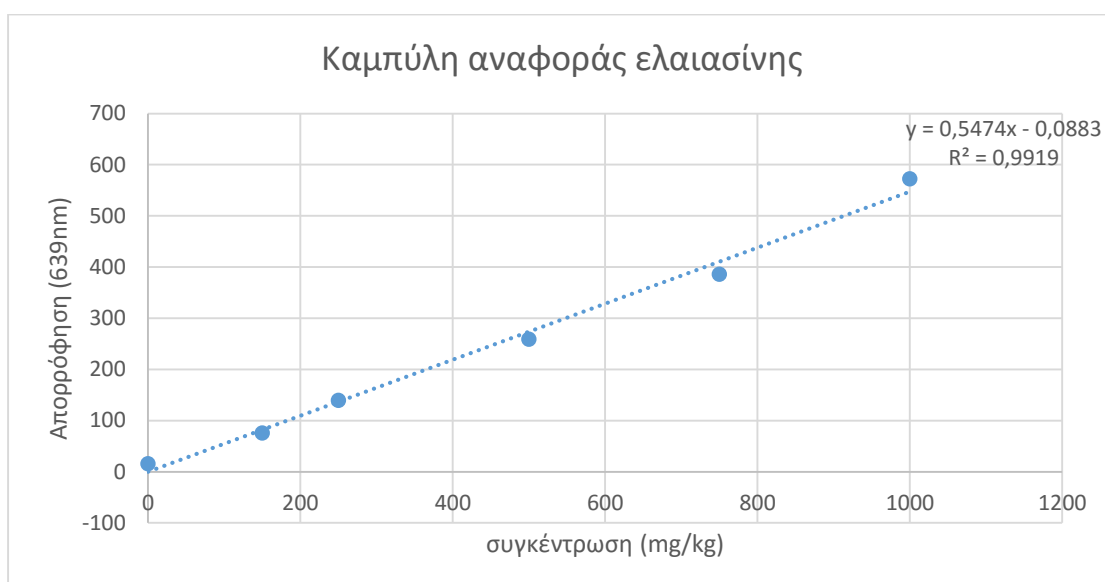
Ζυγίστηκαν 23,5mg ελαιασίνης που απομονώθηκε όπως προαναφέρθηκε από ελαιόλαδο και διαλύθηκε σε 21,2g λαδιού με μηδενική περιεκτικότητα σε φαινόλες. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν οι ακόλουθες αναλογίες 0 , 150, 250, 500, 750 και 1000ppm και εφαρμόστηκε η εργαστηριακή μέθοδο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Στο τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 639nm όπου είναι το μήκος κύματος που απορροφάται το πράσινο χρώμα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου έγινε με απεσταγμένο νερό.

Η καθαρότητα της ελαιασίνης ταυτοποιήθηκε με φάσμα $^1\text{H-NMR}$.



Εικόνα 9.1 : Απεικόνιση φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ελαιασίνης

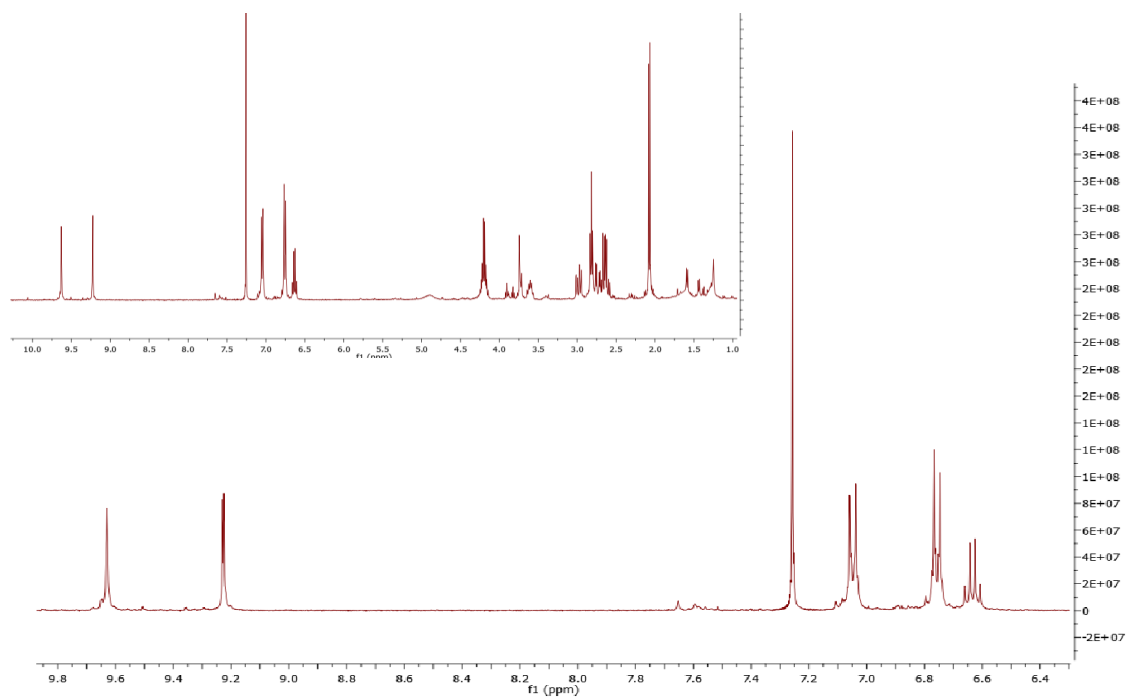
Συγκέντρωση (mg/kg)	Απορρόφηση (639nm)
0	0.016
150	0.076
250	0.140
500	0.259
750	0.386
1000	0.573



9.2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ελαιοκανθάλης

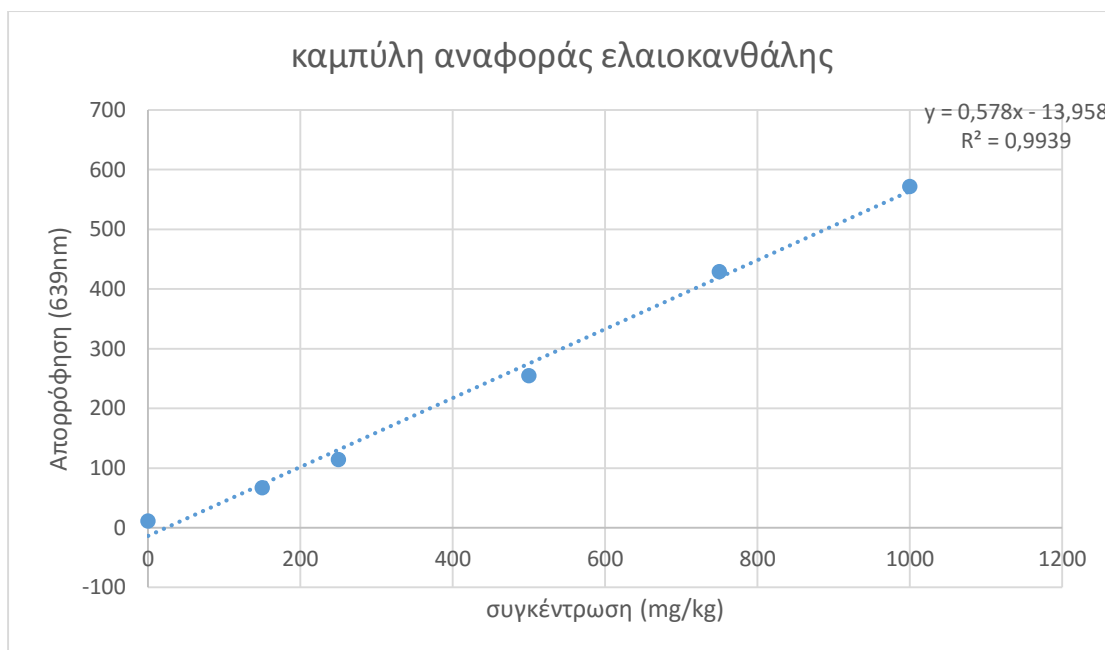
Ζυγίστηκαν 23,5mg ελαιοκανθάλης που απομονώθηκε όπως προαναφέρθηκε από ελαιόλαδο και διαλύθηκε σε 21,2g λαδιού με μηδενική περιεκτικότητα σε φαινόλες. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν οι ακόλουθες αναλογίες 0 , 150 , 250 , 500, 750 και 1000ppm και εφαρμόστηκε η εργαστηριακή μέθοδο που ανέφερα παραπάνω. Στο τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 639nm όπου είναι το μήκος κύματος που απορροφάται το πράσινο χρώμα. Ο μηδενισμός υν φασματοφωτομέτρου έγινε με απεσταγμένο νερό.

Η καθαρότητα της ελαιοκανθάλης ταυτοποιήθηκε με φάσμα H^1 -NMR .



Εικόνα 9.2 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR της ελαιοκανθάλης

Συγκέντρωση (mg/kg)	Απορρόφηση (639nm)
0	0.011
150	0.067
250	0.114
500	0.255
750	0.429
1000	0.572

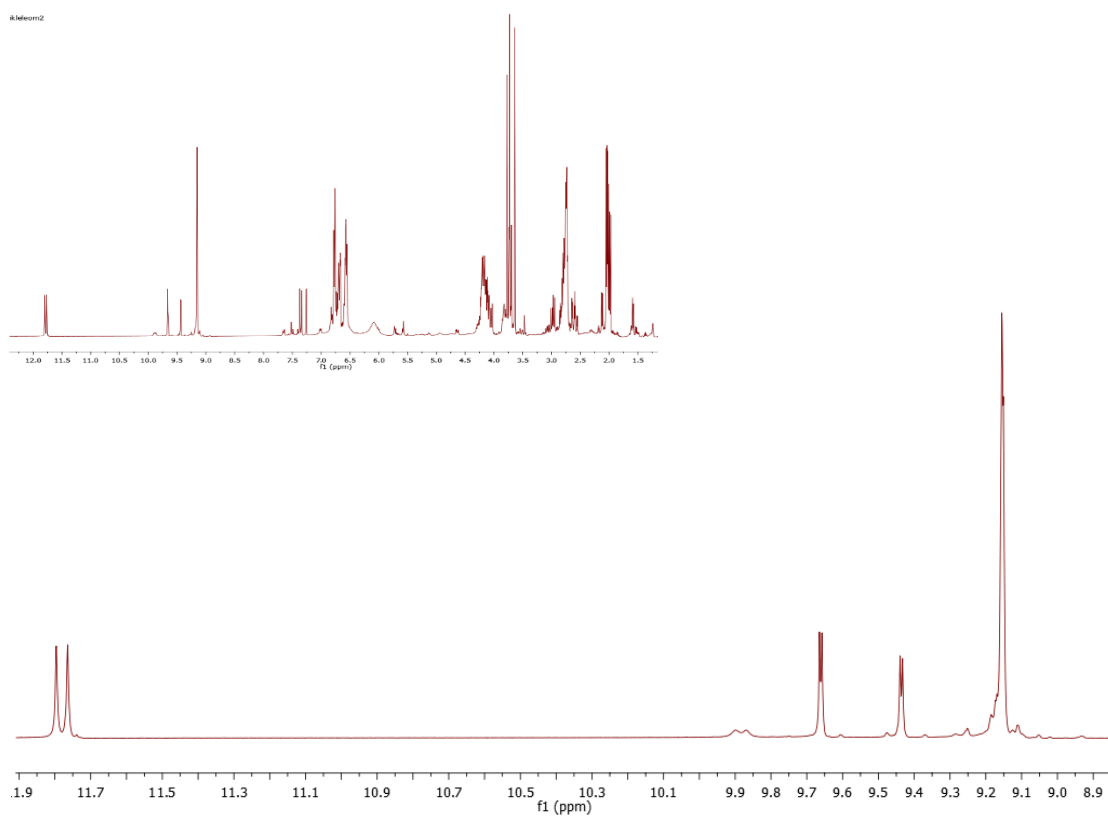


Παρατήρηση : πολύ καλή γραμμικότητα

9.3 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μίγματος ελαιομισιονάλης και ελευρωπαϊνδιάλης

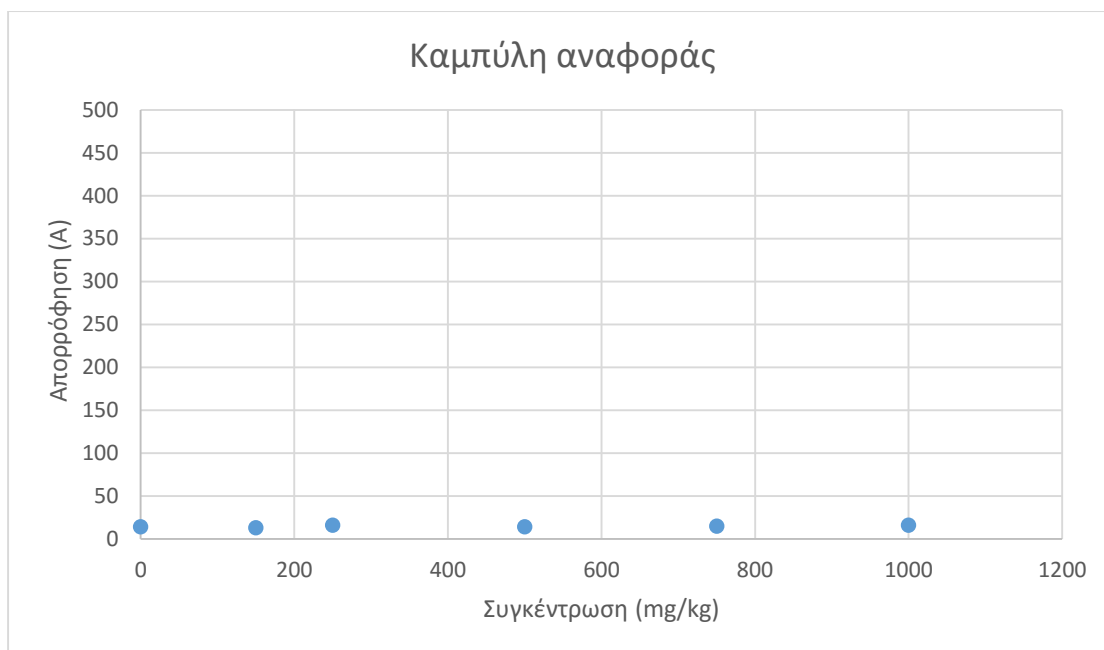
Ζυγίστηκαν 23,5mg μίγματος ελαιομισιονάλης και ελευρωπαϊνδιάλης που απομονώθηκε όπως προαναφέρθηκε από ελαιόλαδο και διαλύθηκε σε 21,2g λαδιού με μηδενική περιεκτικότητα σε φαινόλες. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν οι ακόλουθες αναλογίες 0 , 150 , 250 , 500, 750 και 1000ppm και εφαρμόστηκε η εργαστηριακή μέθοδο που ανέφερα παραπάνω. Στο τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 639nm όπου είναι το μήκος κύματος που απορροφάται το πράσινο χρώμα. Ο μηδενισμός υν φασματοφωτομέτρου έγινε με απεσταγμένο νερό.

Η καθαρότητα της ελαιομισιονάλης ταυτοποιήθηκε με φάσμα H^1 -NMR .



Εικόνα 9.3 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR του μίγματος ελαιομισσιονάλης και ελευρωπαϊνδιάλης

Συγκέντρωση (mg/kg)	Απορρόφηση (639nm)
0	0.015
150	0.013
250	0.016
500	0.014
750	0.012
1000	0.015



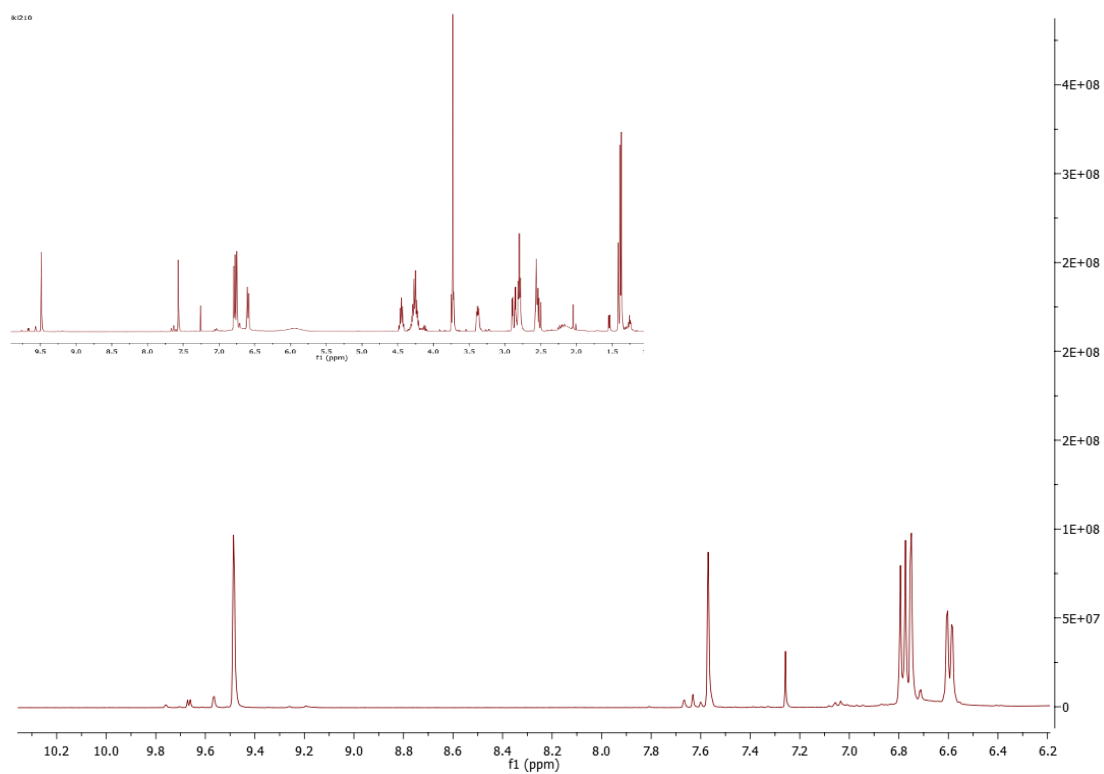
Παρατηρούμε ότι το μίγμα της ελαιομισσιονάλης και ελευρωπαϊνδιάλης δεν απορροφά στα 639nm με το αντιδραστήριο της μεθόδου ARISTOLEO

9.4 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς τα αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης (κλειστή μορφή)

Ζυγίστηκαν 23,5mg αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης που απομονώθηκε όπως προαναφέρθηκε από ελαιόλαδο και διαλύθηκε σε 21,2g λαδιού με μηδενική περιεκτικότητα σε φαινόλες. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν οι ακόλουθες αναλογίες 0 , 150 , 250 , 500, 750 και 1000ppm και εφαρμόστηκε η εργαστηριακή μέθοδο που ανέφερα παραπάνω. Στο τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 639nm όπου είναι το μήκος κύματος που απορροφάται το πράσινο χρώμα. Ο μηδενισμός υν φασματοφωτομέτρου έγινε με απεσταγμένο νερό.

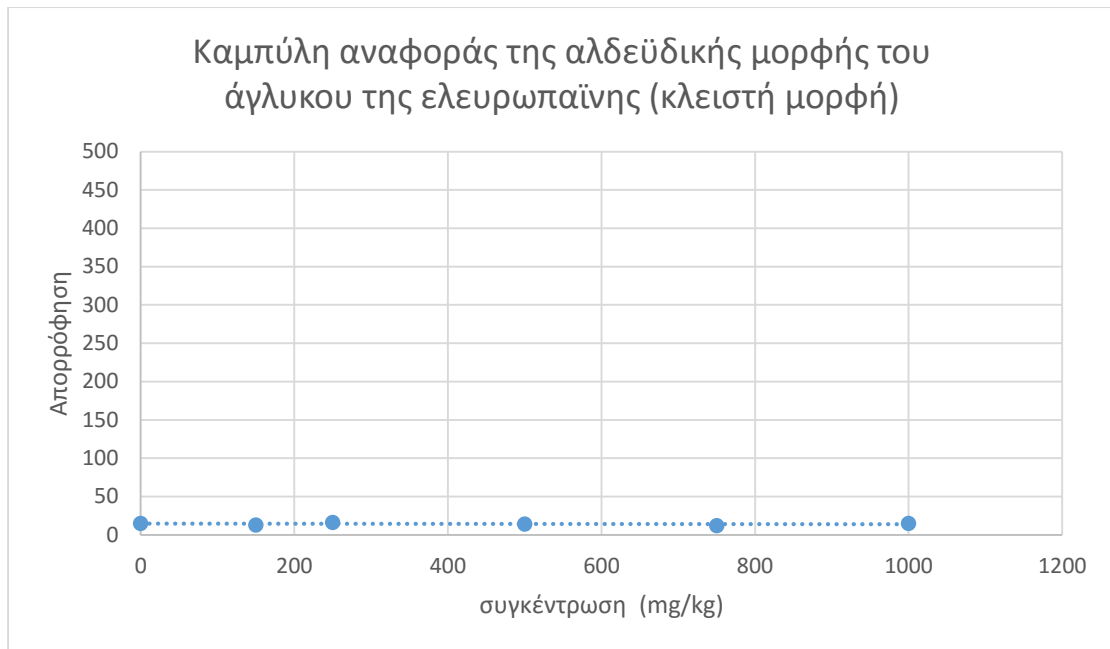
Αυτό που παρατηρήθηκε από τις απορροφήσεις των παραπάνω διαλυμάτων ήταν ότι η αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαϊνης δεν απορροφά στα 639nm.

Η καθαρότητα της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνης ταυτοποιήθηκε με φάσμα H^1 -NMR .



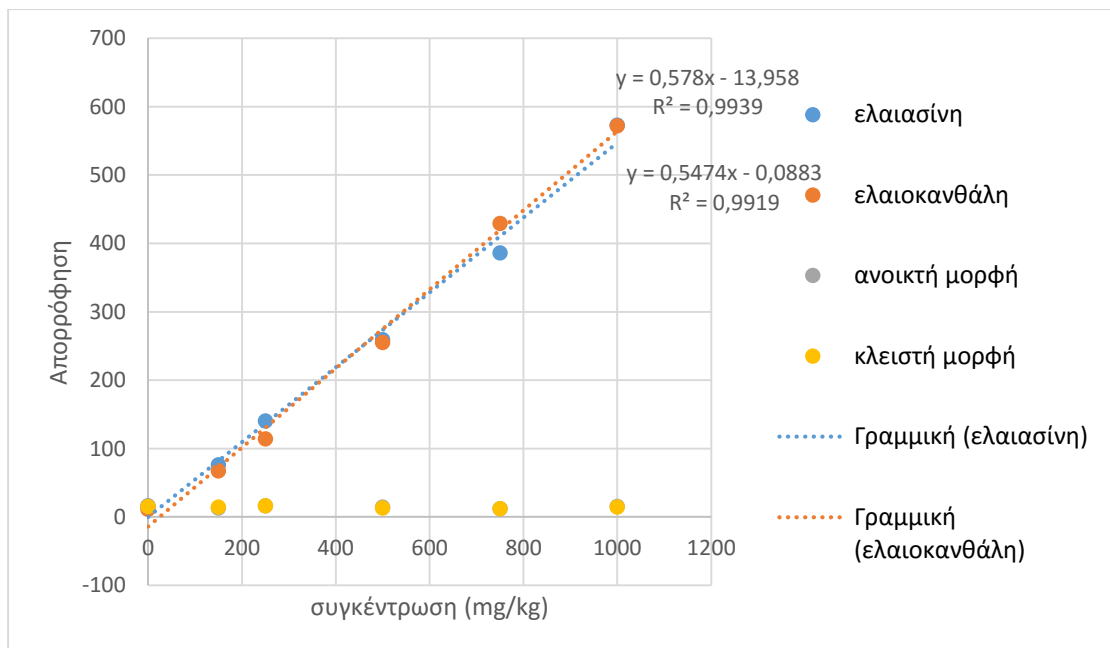
Εικόνα 9.4 : Απεικόνιση φάσματος ^1H -NMR της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (κλειστή μορφή)

Συγκέντρωση (ppm)	Απορρόφηση (639nm)
0	0.014
150	0.013
250	0.015
500	0.014
750	0.012
1000	0.014



**9.5 Αποτελέσματα και συσχέτιση ελαιασίνης – ελαιοκανθάλης – η αλδεϋδική μορφή του
άγλυκου της ελευρωπαϊνης (κλειστή μορφή) και του μίγματος ελαιομισσιονάλης και
ελευρωπαϊνδιάλης σύμφωνα με την μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού του δείκτη D1**

- ✓ Παρατηρήθηκε ότι η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη στις ίδιες συγκεντρώσεις δίνουν ίδιες απορροφήσεις στα 639nm. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ότι οι δύο αυτές φαινόλες αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο με το αντιδραστήριο πάρα – υδρόξυ – ανθρανιλικό οξύ.



Παρατήρηση : παρατηρούμε ότι οι ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο με το αντιδραστήριο της μεθόδου.

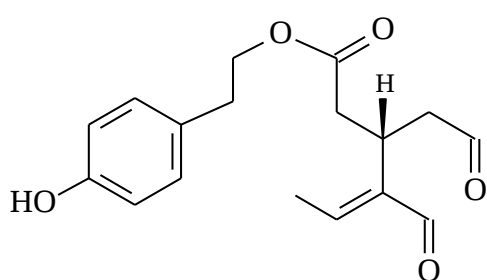
Κεφάλαιο 10

10. Μέθοδος Folin-Ciocalteu

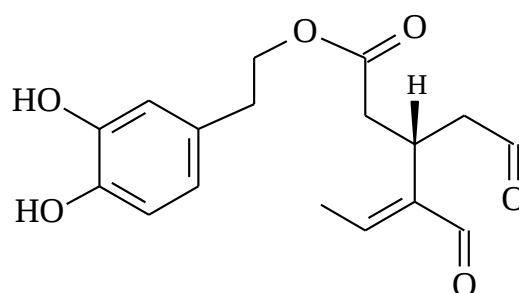
Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού φαινολών στο ελαιόλαδο (Folin-Ciocalteu)

10.1 Αρχή της μεθόδου

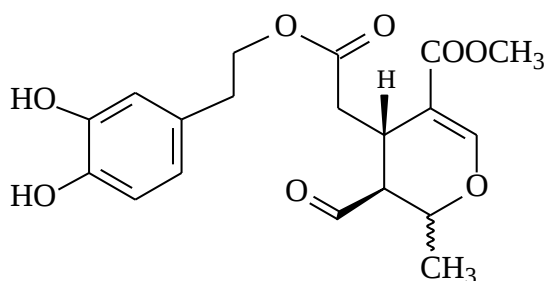
Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδαινικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (Folin – Ciocalteu reagent) σε φωσφορομολυβδενικό και φωσφοροβολφραμικό φαινολικό σύμπλοκο χρώματος μπλε σε αλκαλικό περιβάλλον. Οπότε θεωρητικά στην ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη, υδρόξυτυροσόλη και το άγλυκο της ελευρωπαΐνης περιμέναμε να αντιδράσουν μόνο τα φαινολικά υδροξύλια.



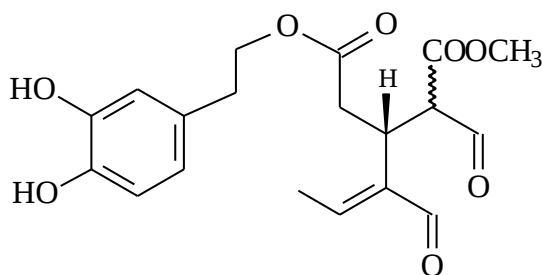
Ελαιοκανθάλη



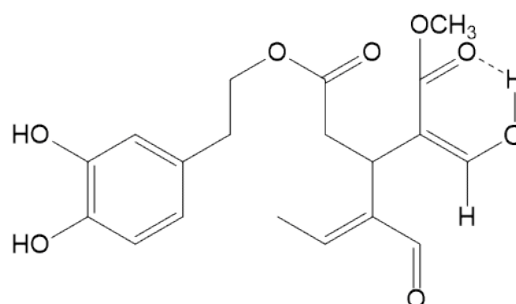
ελαιασίνη



Άγλυκο της ελευρωπαΐνης (κλειστή μορφή)



Ελευρωπαΐνοδιάλες



Ελαιομισσιονάλη

10.2 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού φαινολών

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Εκχύλιση φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου

- Ζυγίστηκαν 10g δείγματος ελαιολάδου, τα οποία αναμίχθηκαν με 50ml εξανίου και το εκχυλίστηκαν τρεις φορές με (30ml) υδατικό διάλυμα μεθανόλης (80%v/v).
- Στο τέλος το εκχύλισμα αραιώθηκε μέχρι τα 100ml και παρέμεινε σε σκοτεινό χώρο για μια νύχτα.

Μέθοδος Folin - Ciocalteu

- Τοποθετήθηκε 1ml από το εκχύλισμα και προστέθηκαν 5ml αντιδραστηρίου (Folin-ciocalteu) , το οποίο αραιώθηκε με νερό (1/10 v/v).
- Ανάδευση και παραμονή για 5min
- Προσθήκη 1ml από διάλυμα ανθρακικού νατρίου (20%w/v)
- Ανάδευση και παραμονή για 1h σε θερμοκρασία δωματίου
- Μέτρηση απορρόφησης στα 725nm

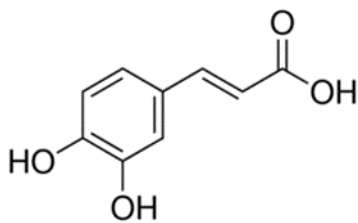
✓ Για **τυφλό** χρησιμοποιούμε **1ml H₂O**, 5ml αντιδραστηρίου Folin ,5ml Na₂CO₃

10.3 Πρότυπη καμπύλη με καφεϊκό οξύ

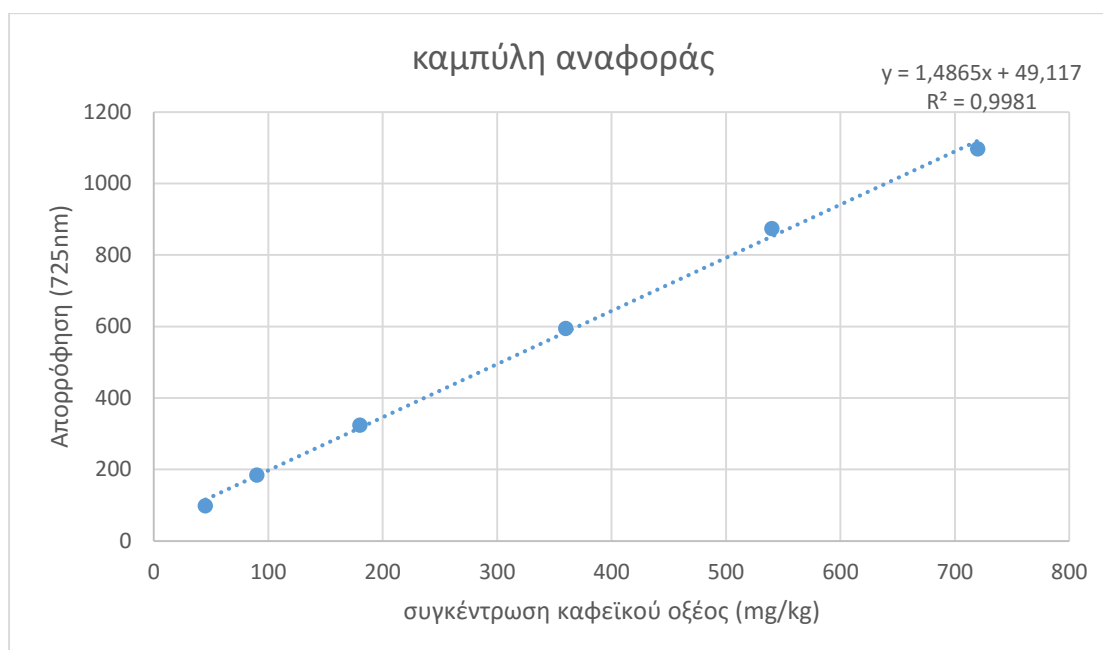
Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με το παραπάνω πρωτόκολλο , με εκχύλισμα διαλύματα των παρακάτω συγκεντρώσεων σε καφεϊκό οξύ διαλυμένα σε μεθανόλη (96%v/v) . οι αναλογίες ήταν οι ακόλουθες : 0.05 , 0.2 , 0.4 , 0.5 , 0.6 mmol /L

Το φασματοφωτόμετρο μηδενίστηκε με τυφλό διάλυμα που αντί για εκχύλισμα περιείχε 1ml νερό.

Συγκέντρωση (mmol/L)	Συγκέντρωση (mg/kg)	Απορρόφηση (725nm)
0.025	45	0.098
0.05	90	0.184
0.1	180	0.324
0.2	360	0.594
0.3	540	0.874
0.4	720	1.097



καφεϊκό οξύ : το οποίο περιέχει δύο φαινολικά υδροξύλια τα οποία θα αντιδράσουν με το αντιδραστήριο



Πρότυπη καμπύλη αναφοράς με καφεϊκό οξύ

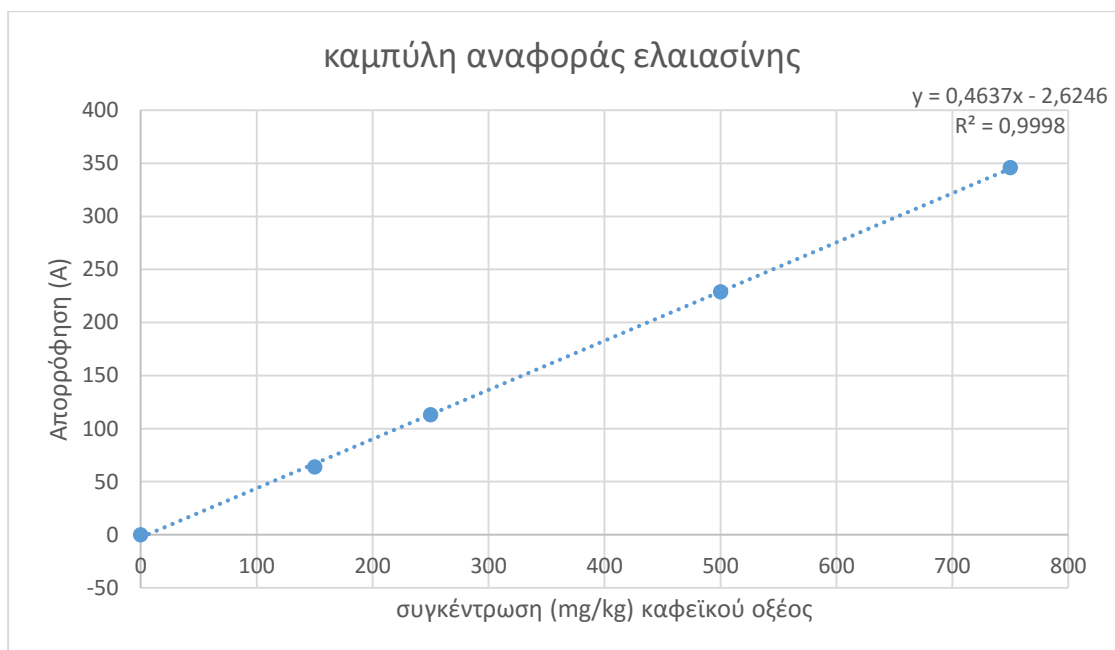
10.4 Πρότυπες καμπύλες αναφοράς της μεθόδου Folin – Ciocalteu με καθαρές ουσίες

10.4.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ελαιασίνης

Εφαρμόστηκε η παραπάνω μέθοδο σε ελαιόλαδα με μηδενική συγκέντρωση φαινολών στα οποία είχε προστεθεί ελαιασίνη , η οποία είχε απομονωθεί από ελαιόλαδο.

Παρασκευάσαμε τα μεθανολικά διαλύματα και μετά από μια ημέρα μετρήσαμε τις φαινόλες σύμφωνα με τη μέθοδο Folin. Τα δείγματα είχαν ένα εύρος συγκεντρώσεων που παρατίθενται παρακάτω .

Συγκέντρωση (mg/kg)	Απορρόφηση
0	0,000
150	0,064
250	0,113
500	0,229
750	0,346

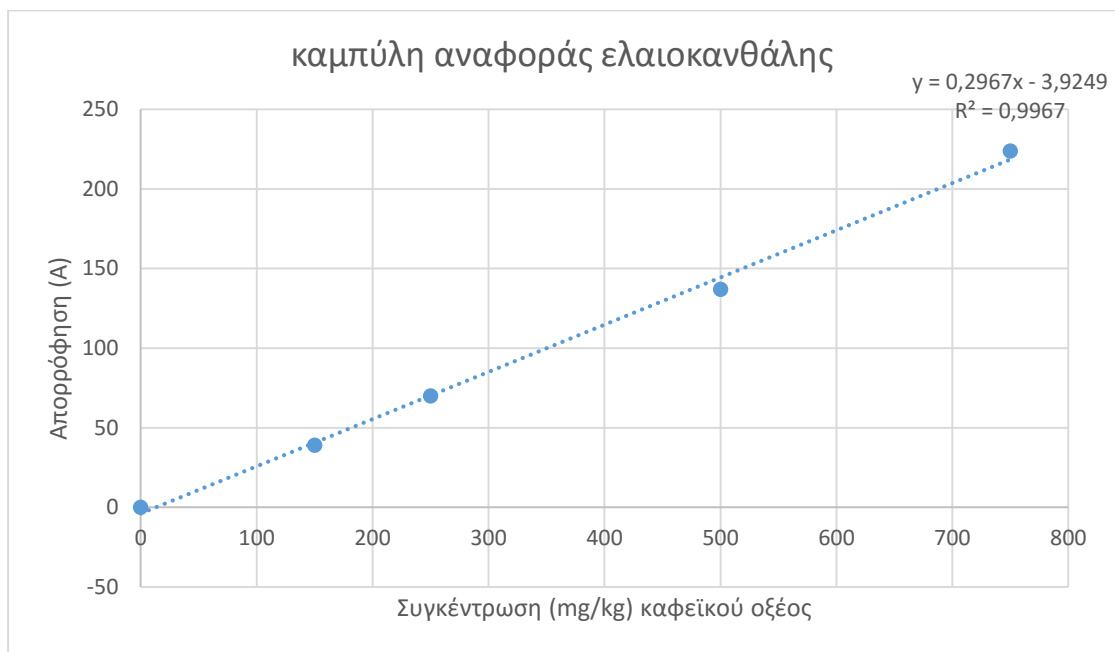


10.4.2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ελαιοκανθάλης

Εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin - Ciocalteu σε ελαιόλαδα με μηδενική συγκέντρωση φαινολών στα οποία είχε προστεθεί ελαιοκανθάλη , η οποία είχε απομονωθεί από ελαιόλαδο.

Παρασκευάστηκαν τα μεθανολικά διαλύματα και μετά από μια ημέρα μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη . Τα δείγματα είχαν ένα εύρος συγκεντρώσεων που παρατίθενται παρακάτω .

Συγκέντρωση	Απορρόφηση
0	0,000
150	0,039
250	0,70
500	0,137
750	0,224

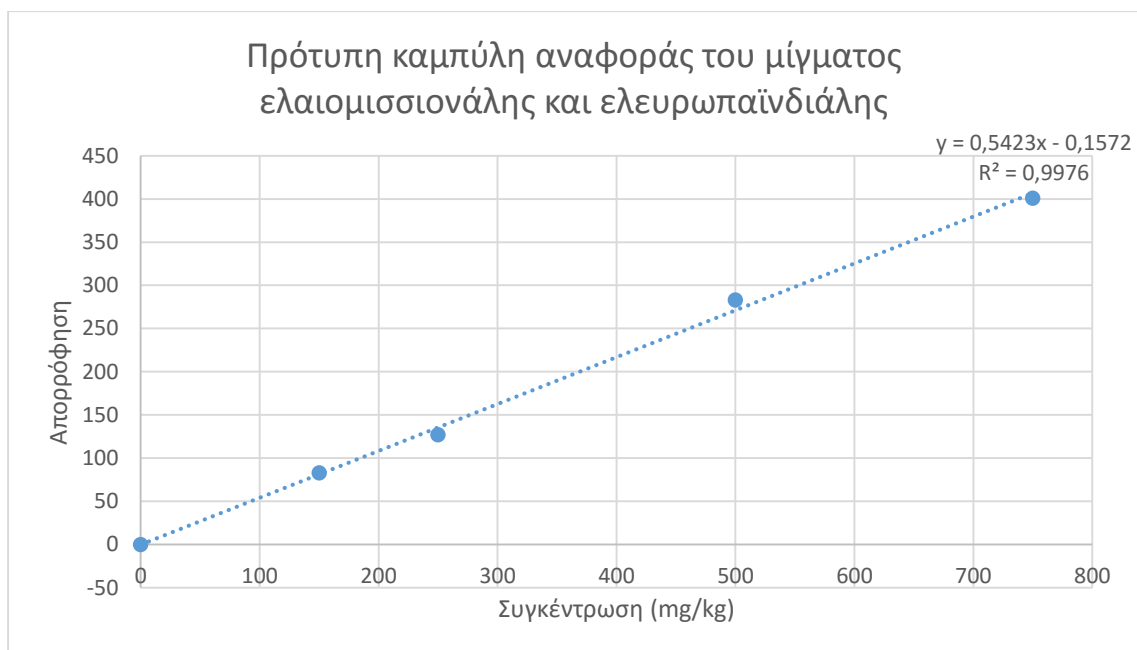


10.4.3 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του μίγματος ελαιομισσιονάλης και ελευρωπαϊνδιάλης

Εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin - Ciocalteu σε ελαιόλαδα με μηδενική συγκέντρωση φαινολών στα οποία είχε προστεθεί μίγμα ελαιομισσιονάλης και ελευρωπαϊνδιάλης, το οποίο είχε απομονωθεί από ελαιόλαδο.

Παρασκευάστηκαν τα μεθανολικά διαλύματα και μετά από μια ημέρα μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη. Τα δείγματα είχαν ένα εύρος συγκεντρώσεων που παρατίθενται παρακάτω.

Συγκέντρωση	Απορρόφηση
0	0,000
150	0,083
250	0,127
500	0,283
750	0,401

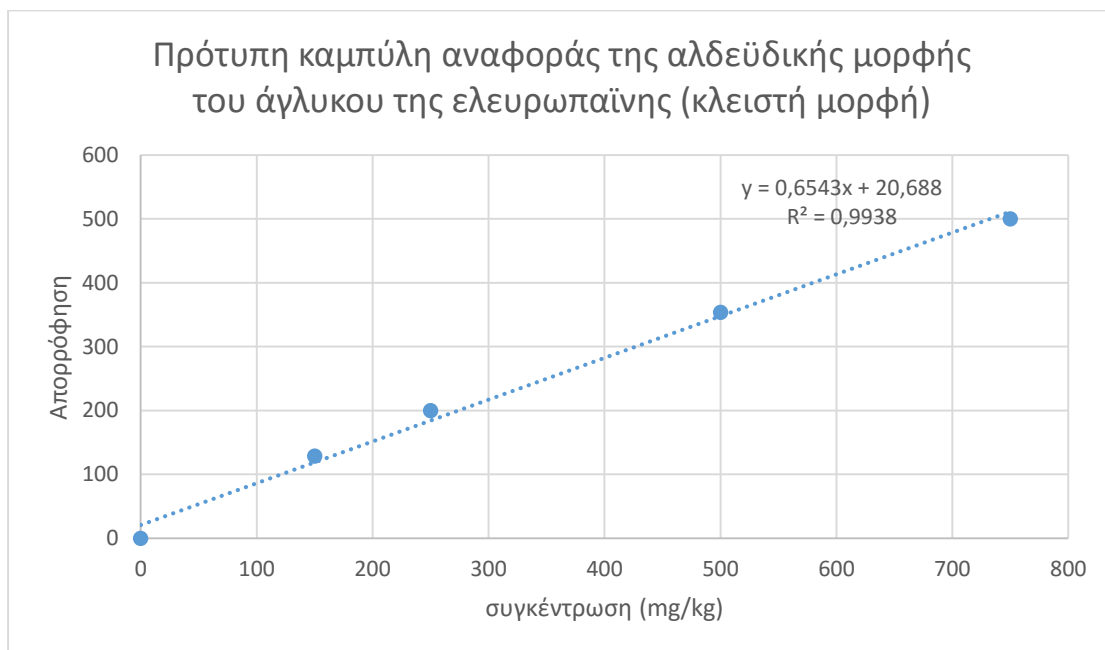


10.4.4 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαϊνής (κλειστή μορφή)

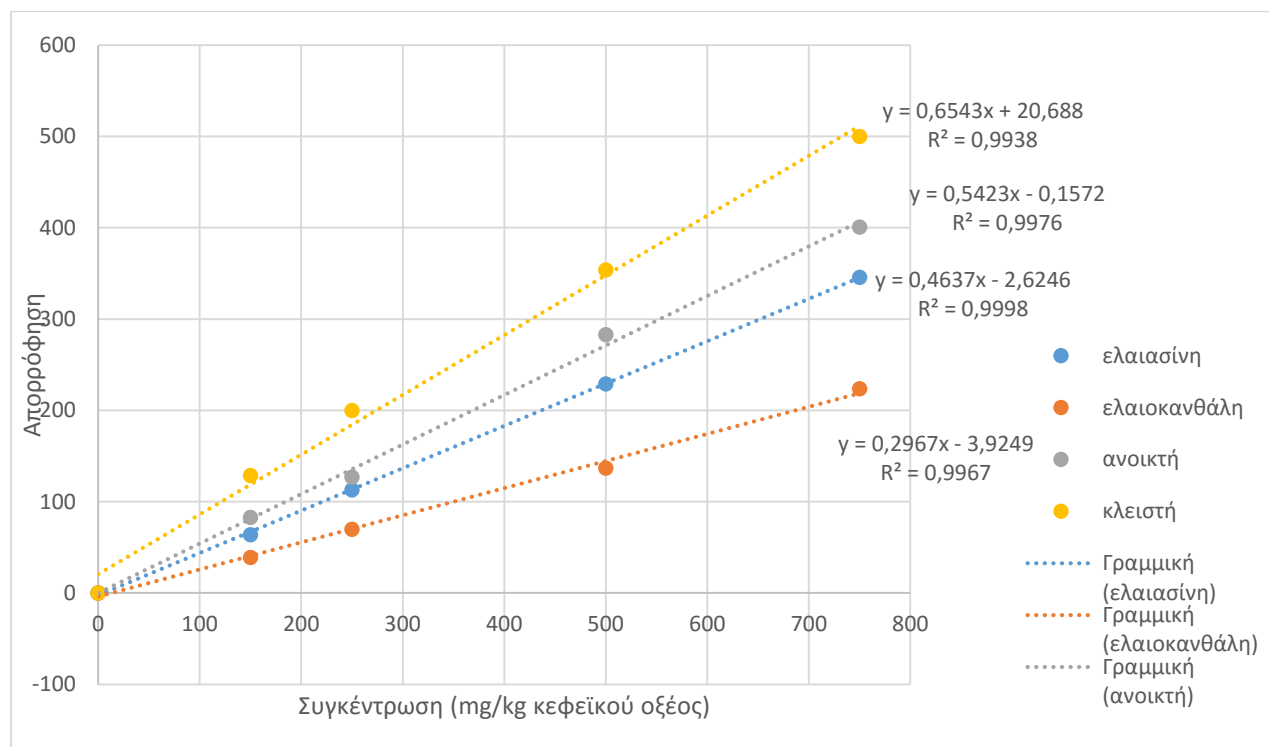
Εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin - Ciocalteu σε ελαιόλαδα με μηδενική συγκέντρωση φαινολών στα οποία είχε προστεθεί ελαιοκανθάλη , η οποία είχε απομονωθεί από ελαιόλαδο.

Παρασκευάστηκαν τα μεθανολικά διαλύματα και μετά από μια ημέρα μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη . Τα δείγματα είχαν ένα εύρος συγκεντρώσεων που παρατίθενται παρακάτω .

Συγκέντρωση	Απορρόφηση
0	0,000
150	0,129
250	0,200
500	0,354
750	0,500

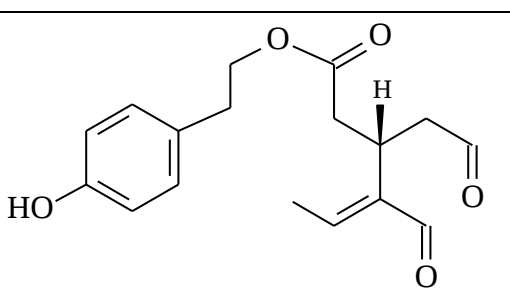


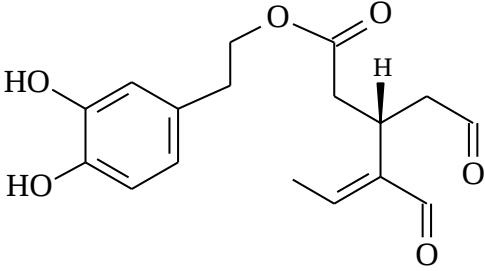
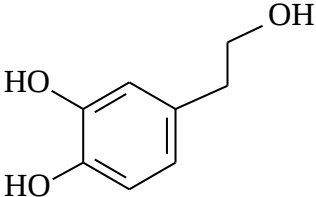
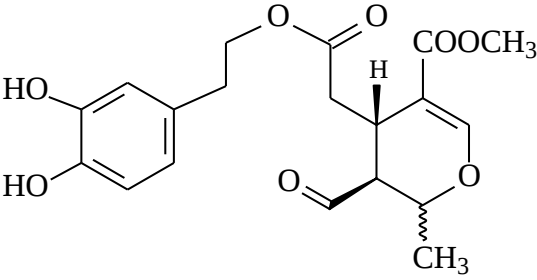
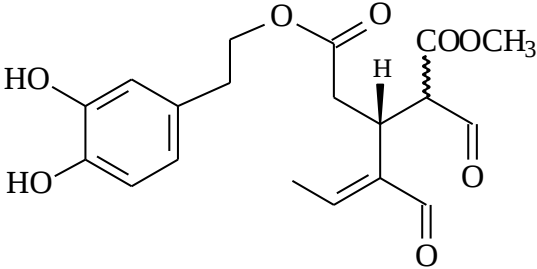
10.5 Συσχέτιση πρότυπων καμπυλών ελαιασίνη – ελαιοκανθάλης – υδροξύτυροσόλης – άγλυκο της ελερωπαϊνης (κλειστή μορφή) και του μίγματος ελαιομισσιονάλης και ελευρωπαϊνδιάλης

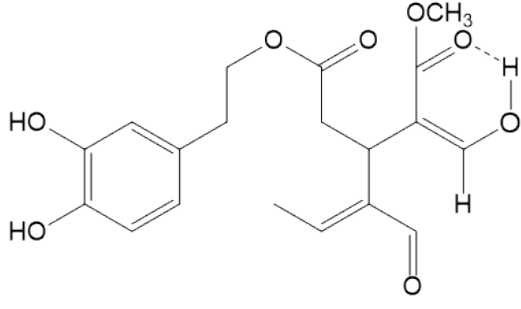


Αποτελέσματα

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου Folin – Ciocalteu , το αντιδραστήριο αντιδρά με τα φαινολικά υδροξύλια και με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται το σύμπλοκο κυανού χρώματος. Από τους συντακτικούς τύπους των παρακάτω ενώσεων υπολογίστηκε ότι η αναλογία των απορροφήσεων να είναι οι ακόλουθες:

Χημικές ενώσεις	Φαινολικά υδροξύλια
 Ελαιοκανθάλη	1 φαινολικό υδροξύλιο

 ελαιασίνη	2 φαινολικά υδροξύλια
 Υδρόξυ - τυροσόλη	2 φαινολικά υδροξύλια
 Αλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης (κλειστή μορφή)	2 φαινολικά υδροξύλια
 ελευροπαΐνοδιάλες +	2 φαινολικά υδροξύλια

 ελαιομισσιονάλη	2 φαινολικά υδροξύλια
--	----------------------------------

Με βάση την αρχή της μεθόδου αναμέναμε τα ακόλουθα:

- ✓ Στις ίδιες συγκεντρώσεις η απορρόφηση της ελαιασίνης και της αλδεϋδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπαΐνης να είναι διπλάσιες από την απορρόφηση της ελαιοκανθάλης.

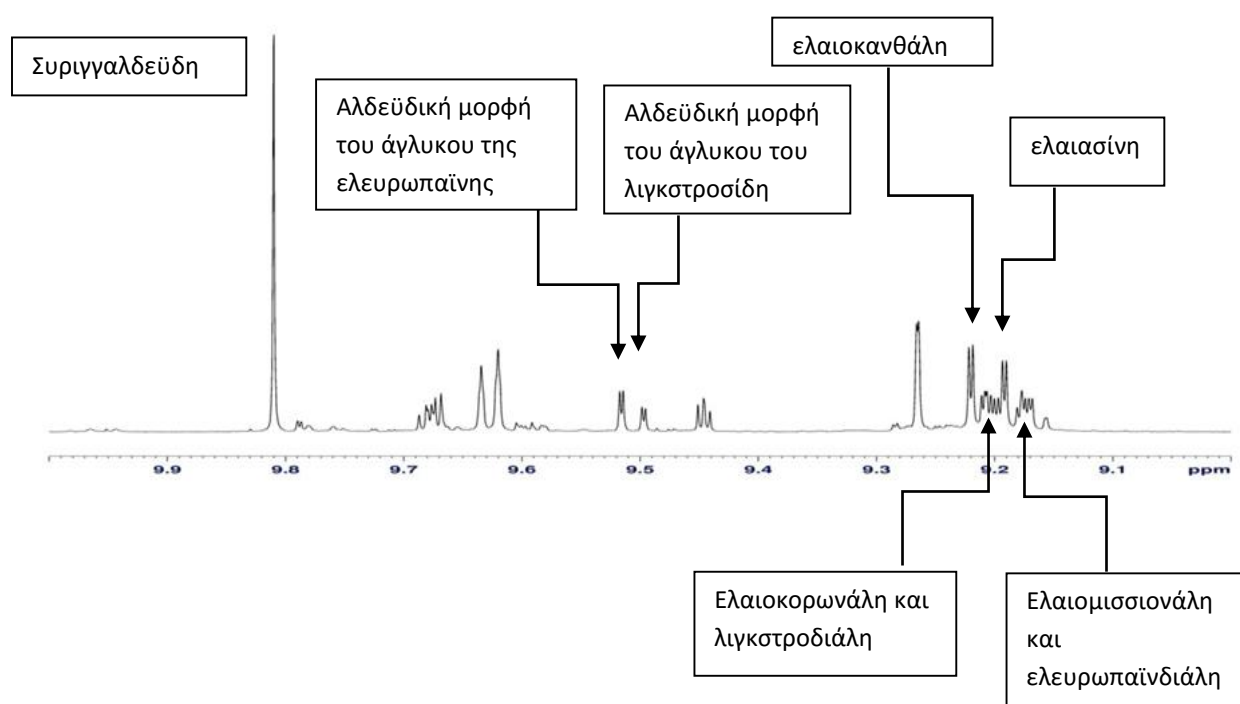
Αποτελέσματα από πρότυπες καμπύλες:

- ✓ Στις ίδιες συγκεντρώσεις οι απορροφήσεις της ελαιασίνης και της ελαιοκανθάλης έχουν αναλογία 3 προς 2. Από αυτό αποδεικνύεται ότι δεν αντιδρούν μόνο τα φαινολικά υδροξύλια αλλά και κάποιες αλδεϋδομάδες. Αυτό έχει σαν συνέπεια τα αποτελέσματα που εξάγονται από την αντίδρασης οξειδοαναγωγής Folin όσον αφορά το περιεχόμενο του ελαιολάδου σε ολικές φαινόλες να είναι συγκεχυμένα.

11 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

11. Μέθοδος άμεσου ποσοτικού προσδιορισμού φαινολών σε ελαιόλαδο με χρήση φασματοσκοπίας H^1 – NMR

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (H^1 – NMR) είναι μια τεχνική όπου επιτυγχάνεται η μέτρηση της ακριβούς συγκέντρωσης ενός ή περισσοτέρων αναλυτών μέσα σε ένα μίγμα. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η ποσοτικοποίηση με την τεχνική της φασματοσκοπίας H^1 - NMR είναι ότι όλες οι συχνότητες συντονισμού που παράγονται από έναν συγκεκριμένο πυρήνα έχουν ένταση ανάλογη προς τη μοριακή συγκέντρωση του αναλύτη και του αριθμού των πυρήνων που δημιουργούν αυτή τη συχνότητα. Με αυτό το τρόπο η περιοχή ολοκλήρωσης προς τον αριθμό των πυρήνων είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του αναλύτη.

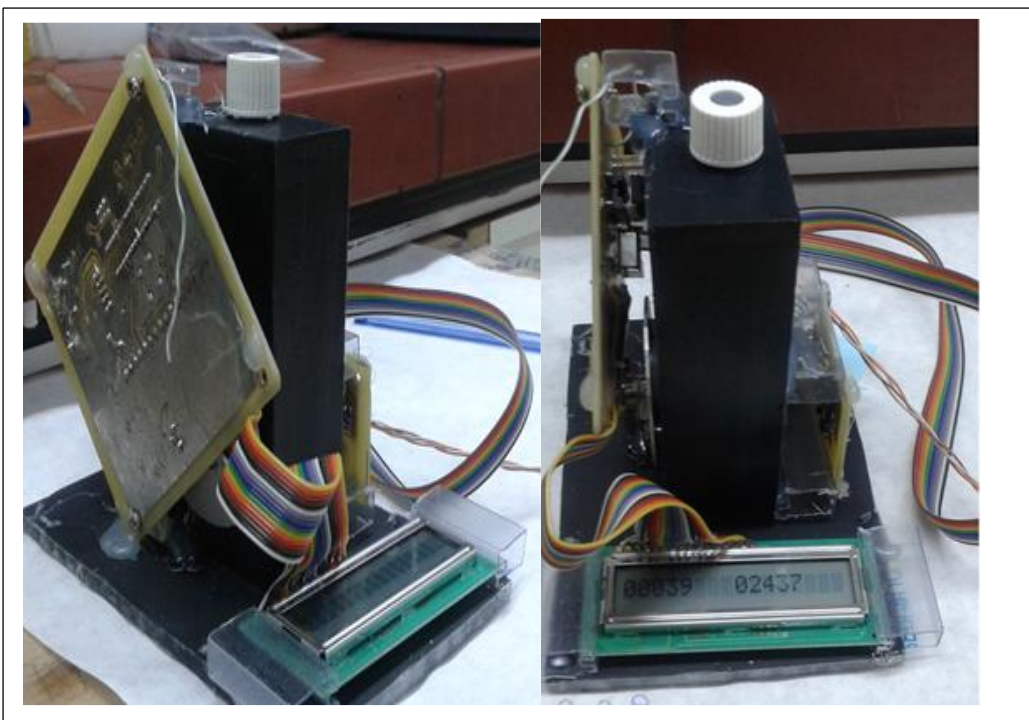


Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) γίνεται με την λήψη των φασμάτων πρωτονίου $1H$ -NMR και πραγματοποιήθηκε σε συσκευή NMR Bruker 400 MHz. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για λήψη φασμάτων ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο $CDCl_3$. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιούμε τη συριγγαλδεΰδη και ολοκληρώνουμε όλες τις παραπάνω κορυφές σε σχέση με αυτή του προτύπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

12. ΑΡΙΣΤΟΜΕΤΡΟ™

Το αριστόμετρο είναι μια συσκευή η οποία κατασκευάστηκε από το εργαστήριο Φυσικής του Δημόκριτου και σκοπό είχε τη μέτρηση της απορρόφησης στα 639nm των δειγμάτων ελαιολάδου στα οποία είχαμε εφαρμόσει τη μέθοδο οπτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του δείκτη D1(άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης). Αυτή η συσκευή απλοποιεί τη διαδικασία του ποσοτικού προσδιορισμού του δείκτη D1 και οι λόγοι θα αναλυθούν στη συνέχεια.



Εικόνα 12.1: Απεικόνιση του ΑΡΙΣΤΟΜΕΤΡΟΥ™ σε πιλοτικό στάδιο

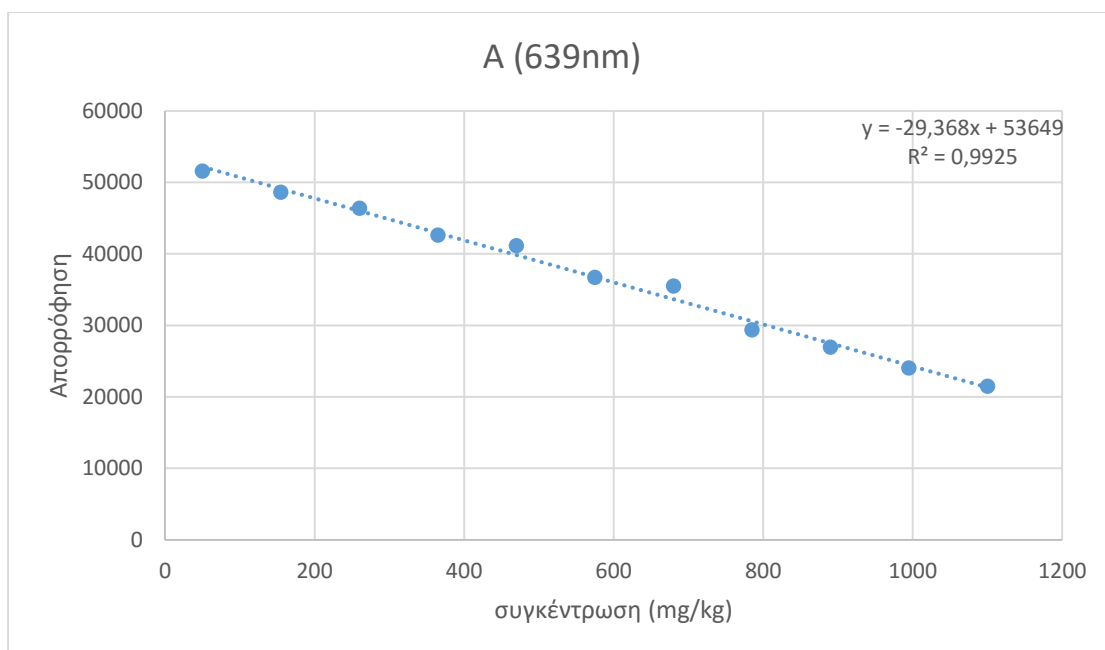
12.1 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάστηκαν ελαιοάδα συγκεκριμένων συγκεντρώσεων σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη από ανάμιξη ελαιολάδων και εφαρμόστηκε η μέθοδος οπτικού προσδιορισμού του δείκτη D1. Με τη χρήση του ΑΡΙΣΤΟΜΕΤΡΟΥ™ ακολουθήθηκε η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης χωρίς το στάδιο του διαχωρισμού των δύο στιβάδων.

Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με απεσταγμένο νερό.

c(mg/kg)	A(639 nm)σε χρόνο 50min
50	51565
155	48626

260	46360
365	42640
470	41159
575	36704
680	35501
785	29361
890	26931
995	24053
1100	21484



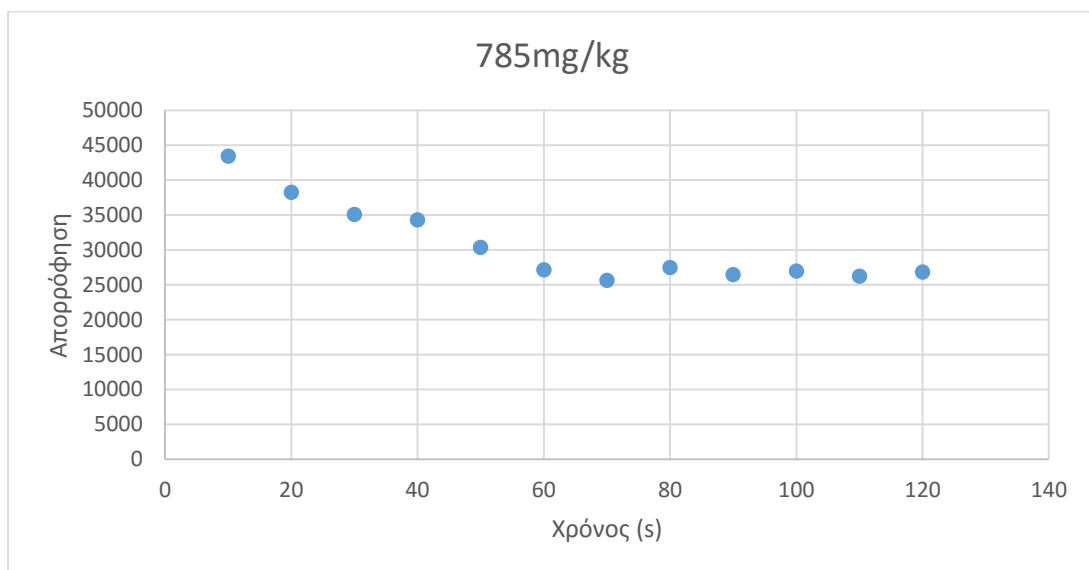
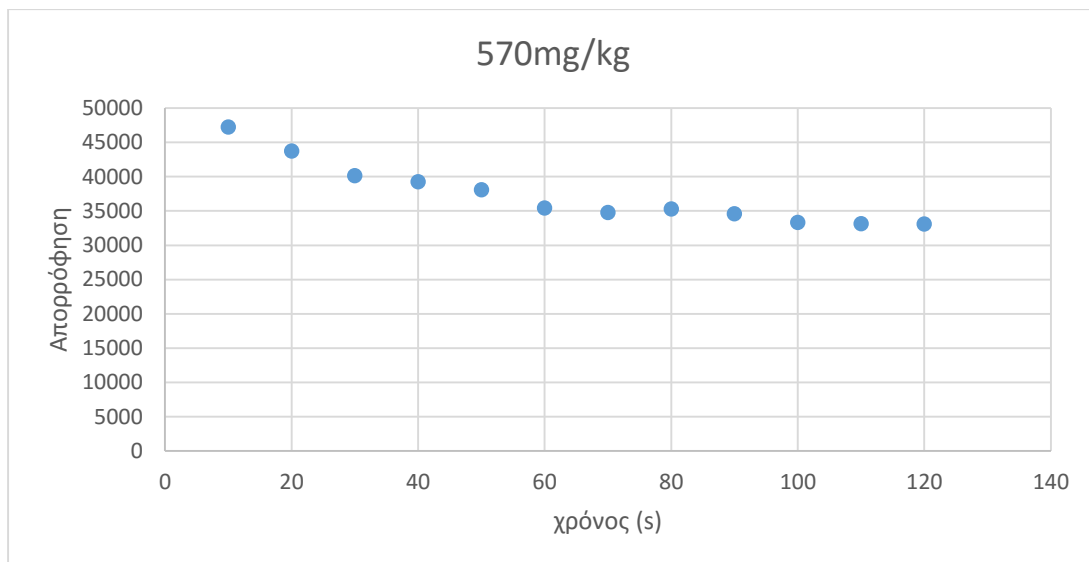
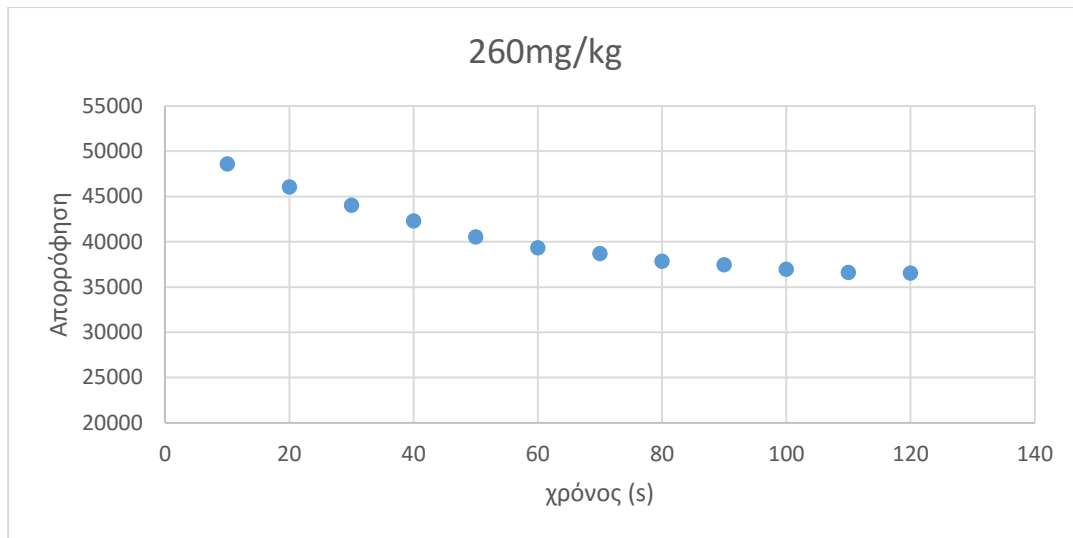
Με βάση την παραπάνω εξίσωση μπορούμε σε οποιοδήποτε δείγμα να υπολογίζουμε το άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με μεγαλύτερη ακρίβεια από τον οπτικό προσδιορισμό.

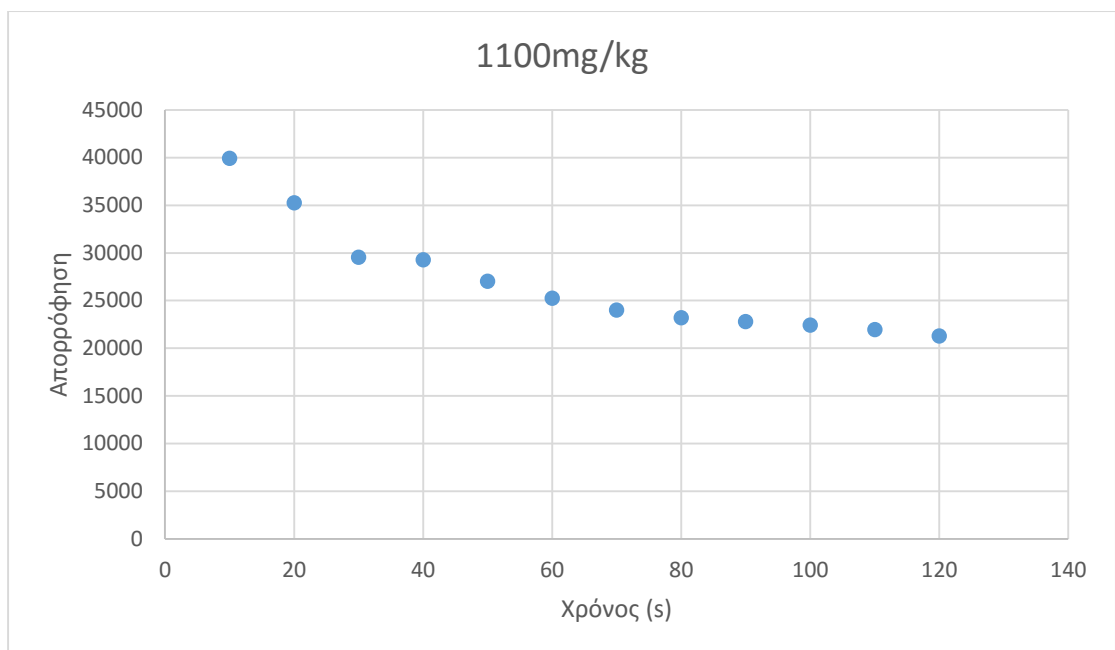
11.2 Μελέτη σταθερότητας των απορροφήσεων σε σχέση με το χρόνο

Παρασκευάστηκαν δέκα ελαιόλαδα με κλιμακούμενες περιεκτικότητες στο άθροισμα ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης, εφαρμόστηκε η μέθοδος του οπτικού προσδιορισμού και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα.

	Χρόνος											
C(mg/kg)	10min	20min	30min	40min	50min	60min	70min	80min	90min	100	110min	120min
50	51760	51645	50380	51138	50176	50674	50627	49882	50571	50002	50239	49767
260	48605	46047	44051	42317	40539	39320	38715	37858	37451	36976	36621	36525
575	47238	43740	40151	39260	38086	35463	34800	35313	34618	33321	33150	33091
785	43455	38252	32100	34343	30368	27166	25646	27504	26472	26972	26234	26822
1100	39937	35262	29552	29270	27030	25258	24011	21212	22795	24444	21951	21827

Χρόνος/	50mg/kg	260 mg/kg	575 mg/kg	785 mg/kg	1100 mg/kg
10	51760	48605	47238	43455	39937
20	51645	46047	43740	38252	35262
30	50380	44051	40151	35100	29552
40	51138	42317	39260	34343	29270
50	50176	40539	38086	30368	27030
60	50627	39320	35463	27166	25258
70	49882	38715	34800	25646	24011
80	50571	37858	35313	27504	23212
90	50571	37451	34618	26472	22795
100	50002	36976	33321	26972	22444
110	50239	36621	33150	26234	21951
120	49767	36525	33091	26822	21287





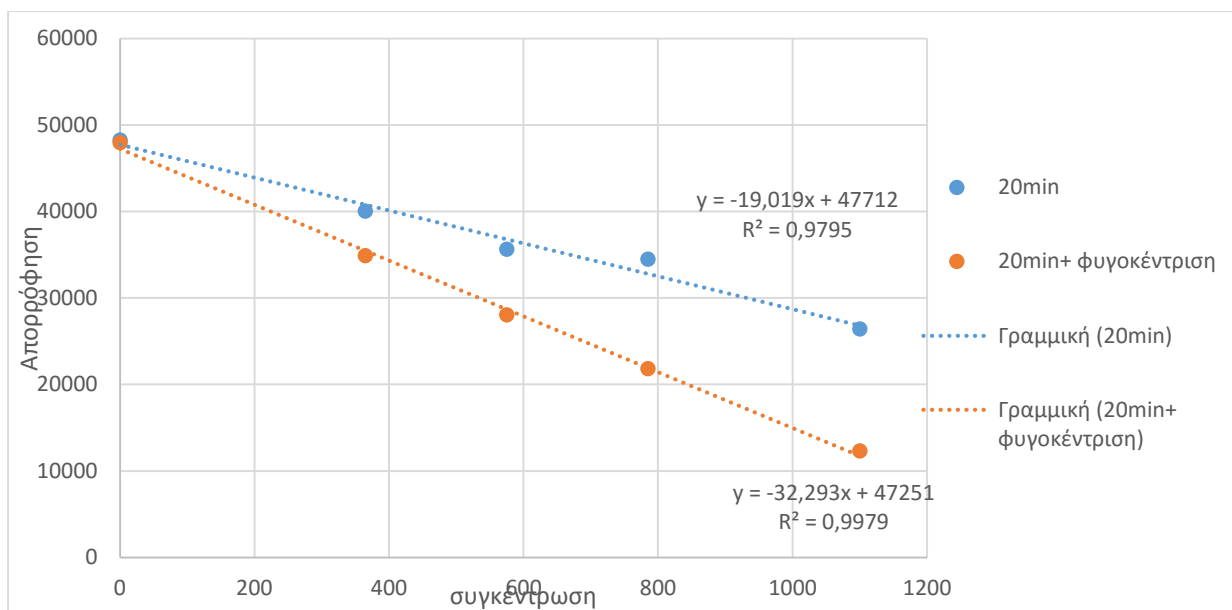
Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι οι απορροφήσεις μένουν σταθερές από τα 60min έως τα 120min.

12.3 Εξάρτηση της μεθόδου από την θερμοκρασία

12.3.1 Θέρμανση στους 40°C σε υδρόλουτρο

Εφαρμόστηκε η παραπάνω μέθοδος ενώ τα δείγματα ήταν στους 40 καθ' όλη την διάρκεια της αναμονής και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις τους κάθε 5min

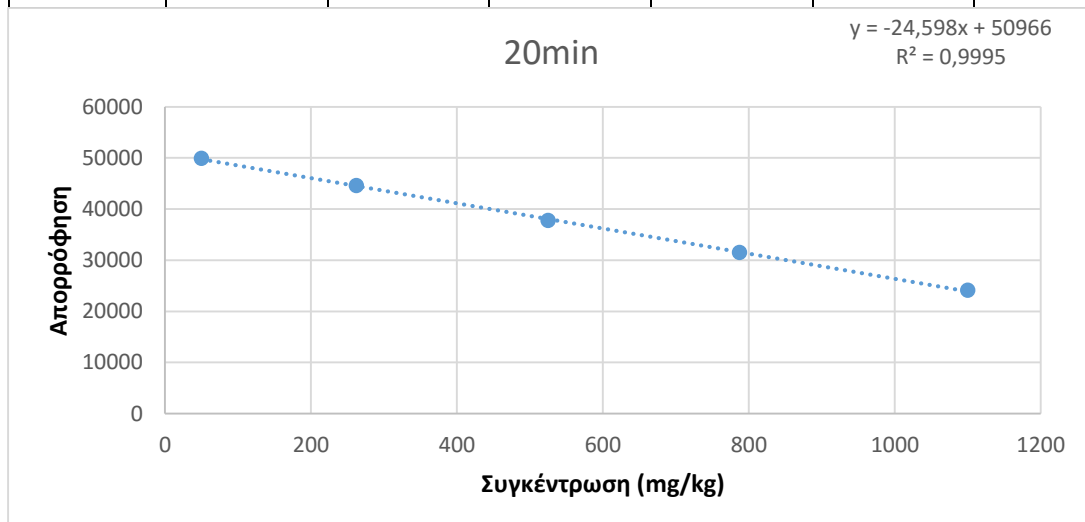
	5min	10min	15min	20min	20min+φυγ.
0	50791	50348	49664	48250	47952
365	49232	45806	42041	40052	34895
575	44893	40877	35841	35621	28065
785	41776	37651	34827	34503	21813
1100	40385	35052	30845	26405	12304



12.3.2 Θέρμανση σε φούρνο στους 50°C

Εφαρμόστηκε η παραπάνω μέθοδος ενώ τα δείγματα ήταν στους 40 καθ' όλη την διάρκεια της αναμονής και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις τους κάθε 5min

	5min	10min	15min	20min	25min	30min
50	51682	49709	50181	49903	48654	48530
262	50140	48522	45092	44580	41391	39522
525	47958	46326	42890	37732	33989	31750
787	41237	38281	34553	31483	29737	27955
110	40012	35945	29615	24130	24287	23560



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

13.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σύγκριση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με φασματοφωτόμετρο με την μέθοδο NMR και την μέθοδο Folin-Ciocalteu

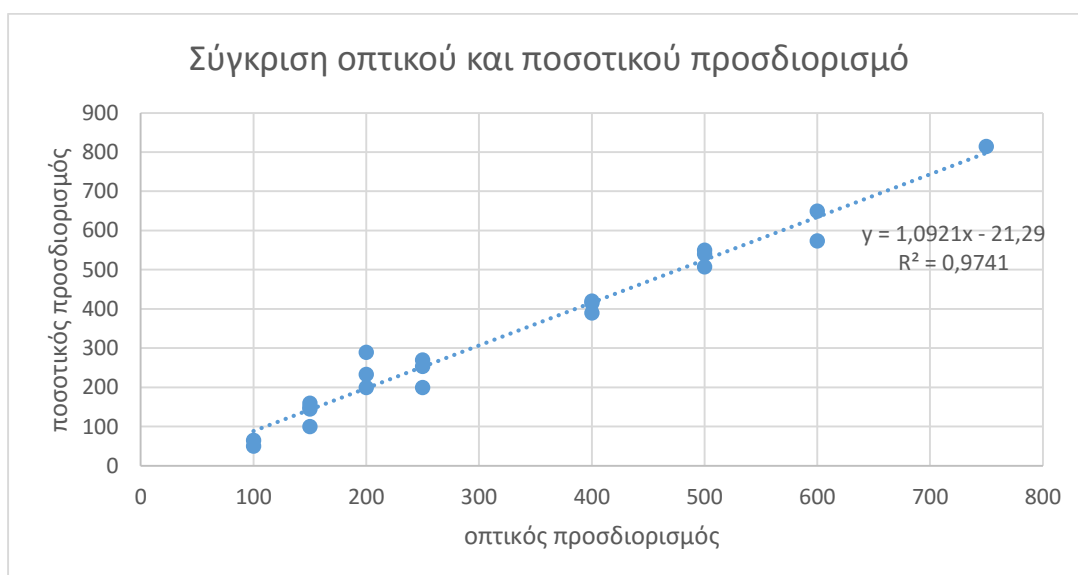
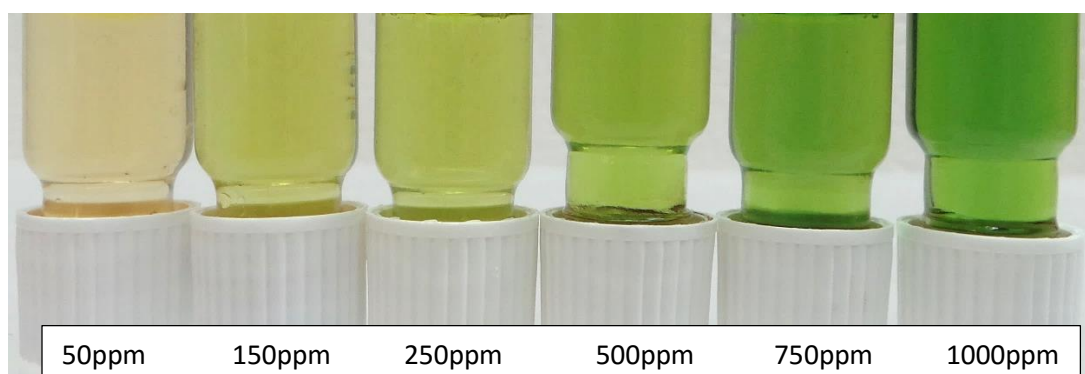
13.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΠΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ένας από τους στόχους μας ήταν η σύγκριση του οπτικού προσδιορισμού του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης με τον ποσοτικό προσδιορισμό. Για την επίτευξη αυτού του στόχου εφαρμόσαμε σε μια σειρά δειγμάτων και τους δύο προσδιορισμούς και συγκρίναμε τα αποτελέσματα.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Οπτικός προσδιορισμός	Ποσοτικός προσδιορισμός	
		A(639nm)	C (ppm)
1	500-750	395	650
2	150-250	131	200
3	500	335	550
4	<150	53	65
5	250	132	200
6	150-250	151	233
7	150-250	184	290
8	<150	44	50
9	>500	310	508
10	250	172	270
11	500-750	349	574
12	750	488	815
13	150	108	160
14	500	329	54
15	250	163	254

16	<150	74	100
17	<150	103	150
18	150	100	145
19	400	259	420
20	400	242	390
21	400	257	415

Ο οπτικός προσδιορισμός των παραπάνω δειγμάτων έγινε με βάση την παρακάτω χρωματική κλίμακα.



Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι ο οπτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός της μεθόδου έχει πολύ καλή συσχέτιση.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ARISTOLEO (ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ NMR

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν πολλά δείγματα ελαιόλαδου όσον αφορά τις δύο ουσίες ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη με την μέθοδο ARISTOLEO και τη μέθοδο NMR. Σε κάθε δείγμα ελαιόλαδου ξεχωριστά, προσδιορίστηκαν οι τιμές ολοκληρώσεων ελαιοκανθάλης, ελαιασίνης σε σχέση με την ολοκλήρωση του εσωτερικού προτύπου, στη μέθοδο του NMR. Ενώ στη μέθοδο ARISTOLEO προσδιοριζόταν το άθροισμα των δύο φαινολών. Με βάση τις καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν γι' αυτό το λόγο, προσδιορίστηκε η ακριβής ποσοτική σύσταση του ελαιόλαδου όσον αφορά το άθροισμα των δύο φαινολών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΘΡΟΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ARISTOLEO A (639nm)				C (ελαιο- κανθάλη) mg/Kg	mmol(ελαιοκανθάλης)
	1η επανάληψη	2η επανάληψη	3η επανάληψη	M.O.		
woc468	264	270	260	264,67	501,08	1,65
woc469	321	325	319	321,67	599,70	1,97
woc525	105	100	110	105,00	224,84	0,74
woc536	106	109	103	106,00	226,57	0,75
woc547	150	125	130	135,00	276,74	0,91
woc570	175	180	170	175,00	345,95	1,14
woc571	125	135	110	123,33	256,56	0,84
woc572	148	150	145	147,67	298,66	0,98
woc564	69	65	60	64,67	155,06	0,51
woc581	94	100	90	94,67	206,96	0,68
woc707	38	35	30	34,33	102,58	0,34
woc878	135	143	150	142,67	290,01	0,95
pdia306	124	129	120	124,33	258,29	0,85

woc822	10	9	10	9,67	59,90	0,20
woc828	9	8	9	8,67	58,17	0,19
woc927	32	40	35	35,67	104,89	0,35
woc926	59	60	54	57,67	142,95	0,47
woc917	208	205	209	207,33	401,89	1,32
woc930	80	75	80	78,33	178,70	0,59
woc929	80	75	79	78,00	178,13	0,59
woc902	51	50	51	50,67	130,84	0,43
woc900	271	269	271	270,33	510,88	1,68
woc932	109	110	105	108,00	230,03	0,76
woc909	125	120	126	123,67	257,14	0,85
woc914	57	50	55	54,00	136,61	0,45
woc904	700	655	658	671,00	1204,08	3,96
woc942	615	650	600	621,67	1118,73	3,68
woc1086	248	273	249	256,67	487,24	1,60
woc1072	250	265	265	260,00	493,01	1,62
woc1081	585	598	600	594,33	1071,44	3,52
woc1070	325	330	335	330,00	614,11	2,02
woc1065	773	688	720	727,00	1300,97	4,28
woc1092	470	478	476	474,67	864,40	2,84
woc1095	429	495	460	461,33	841,33	2,77
woc1085	254	258	256	256,00	486,09	1,60
woc1088	375	370	380	375,00	691,97	2,28
woc1093	325	315	305	315,00	588,16	1,93
woc1094	397	400	396	397,67	731,18	2,41
woc1119	350	342	392	361,33	668,32	2,20

woc1120	455	450	435	446,66	815,96	2,68
woc1124	302	295	315	304	569,13	1,87
woc1125	250	275	265	263,33	498,77	1,22
woc1126	302	325	300	309,00	577,78	1,90

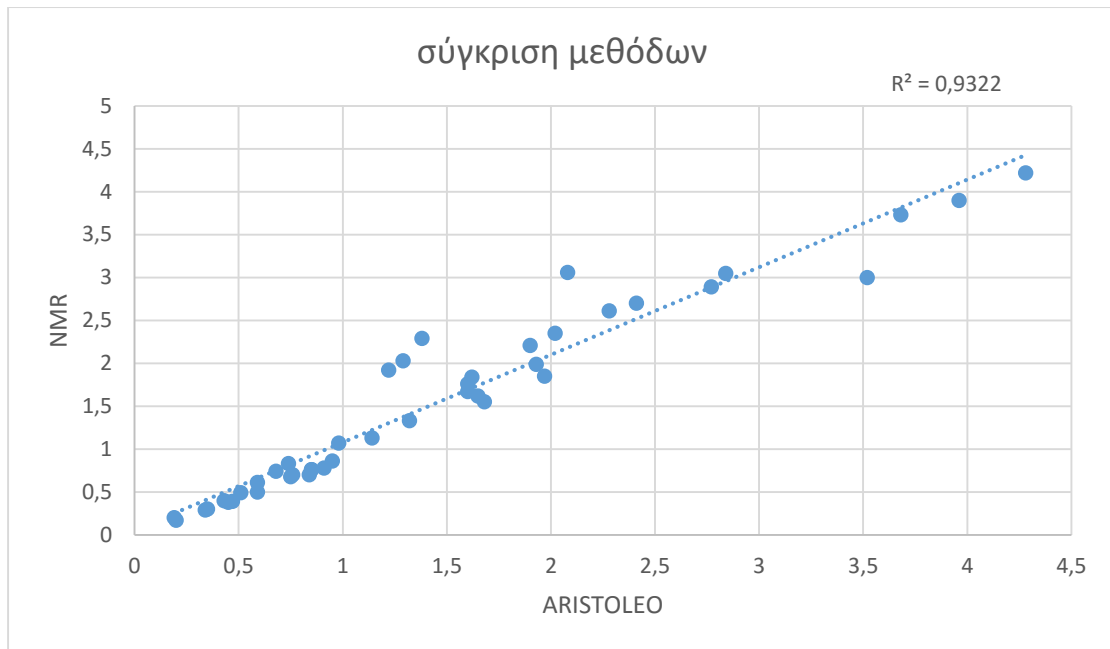
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ NMR

	NMR					
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	C (mg/kg) ελαιοκανθάλη	C ελαιασίνη	C (D1)	n(mmol) ελαιοκανθάλη	n(mmol) ελαιασίνη	n
woc468	255	250	505	0,84	0,78	1,62
woc469	342	233	575	1,13	0,73	1,85
woc525	161	96	257	0,53	0,30	0,83
woc536	150	60	210	0,49	0,19	0,68
woc547	155	88	243	0,51	0,28	0,78
woc570	193	158	351	0,63	0,49	1,13
woc571	126	90	216	0,41	0,28	0,70
woc572	182	152	334	0,60	0,48	1,07
woc564	91	60	151	0,30	0,19	0,49
woc581	115	116	231	0,38	0,36	0,74
woc707	80	9	89	0,26	0,03	0,29
woc878	177	88	265	0,58	0,28	0,86
pdia306	215	18	233	0,71	0,06	0,76
woc822	46	5	51	0,15	0,02	0,17
woc828	50	12	62	0,16	0,04	0,20
woc927	69	23	92	0,23	0,07	0,30
woc926	93	26	119	0,31	0,08	0,39

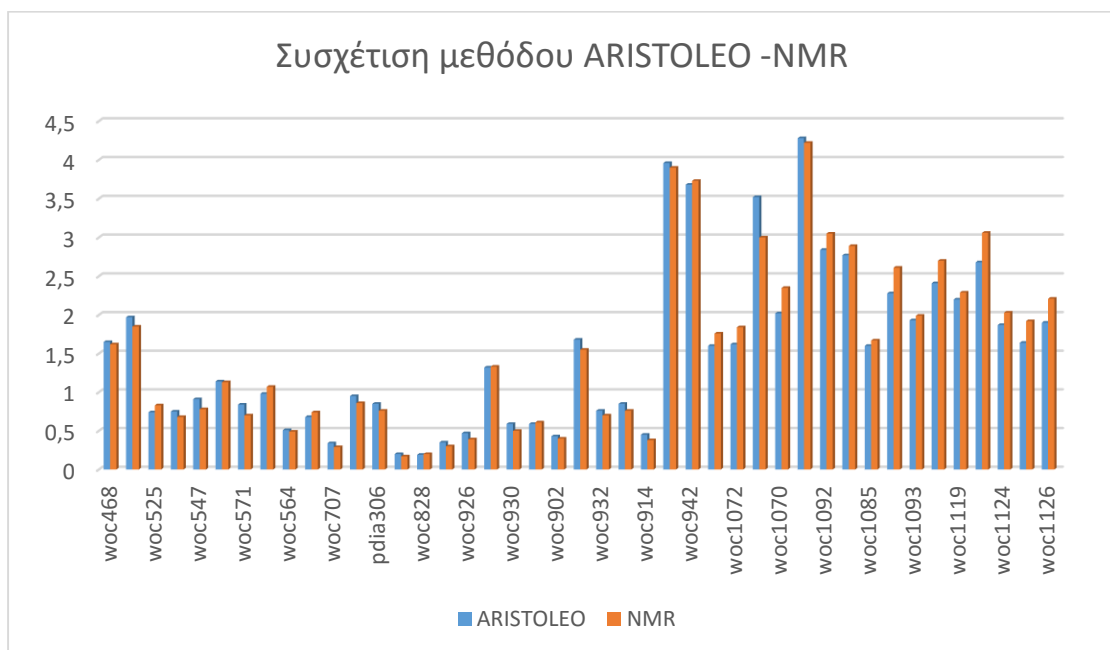
woc917	347	60	407	1,14	0,19	1,33
woc930	69	88	157	0,23	0,28	0,50
woc929	134	54	188	0,44	0,17	0,61
woc902	80	43	123	0,26	0,13	0,40
woc900	258	225	483	0,85	0,70	1,55
woc932	118	99	217	0,39	0,31	0,70
woc909	177	57	234	0,58	0,18	0,76
woc914	66	51	117	0,22	0,16	0,38
woc904	733	476	1209	2,41	1,49	3,90
woc942	774	379	1153	2,55	1,18	3,73
woc1086	328	219	547	1,08	0,68	1,76
woc1072	266	309	575	0,88	0,97	1,84
woc1081	577	353	930	1,90	1,10	3,00
woc1070	336	398	734	1,11	1,24	2,35
woc1065	877	426	1303	2,88	1,33	4,22
woc1092	625	317	942	2,06	0,99	3,05
woc1095	353	552	905	1,16	1,73	2,89
woc1085	296	222	518	0,97	0,69	1,67
woc1088	318	499	817	1,05	1,56	2,61
woc1093	320	300	620	1,05	0,94	1,99
woc1094	388	457	845	1,28	1,43	2,70
woc1119	463	247	710	1,52	0,77	2,29
woc1120	609	339	948	2,00	1,06	3,06
woc1124	434	194	628	1,43	0,61	2,03
woc1125	417	177	594	1,37	0,55	1,92
woc1126	528	152	680	1,74	0,48	2,21

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ARISTOLEO	NMR	ΑΠΟΚΛΙΣΗ %
	n(ολικά) mmol	n(ολικά) mmol	
woc468	1,65	1,62	1,71
woc469	1,97	1,85	6,06
woc525	0,74	0,83	10,85
woc536	0,75	0,68	8,64
woc547	0,91	0,78	13,78
woc570	1,14	1,13	0,82
woc571	0,84	0,70	17,56
woc572	0,98	1,07	8,50
woc564	0,51	0,49	4,55
woc581	0,68	0,74	8,10
woc707	0,34	0,29	13,68
woc878	0,95	0,86	10,14
pdia306	0,85	0,76	10,14
woc822	0,20	0,17	15,28
woc828	0,19	0,20	5,25
woc927	0,35	0,30	13,38
woc926	0,47	0,39	17,66
woc917	1,32	1,33	0,52
woc930	0,59	0,50	14,61
woc929	0,59	0,61	3,87
woc902	0,43	0,40	7,63
woc900	1,68	1,55	7,66
woc932	0,76	0,70	7,82
woc909	0,85	0,76	10,11

woc914	0,45	0,38	16,22
woc904	3,96	3,90	1,57
woc942	3,68	3,73	1,35
woc1086	1,60	1,76	9,11
woc1072	1,62	1,84	11,89
woc1081	3,52	3,00	14,85
woc1070	2,02	2,35	14,00
woc1065	4,28	4,22	1,48
woc1092	2,84	3,05	6,67
woc1095	2,77	2,89	4,11
woc1085	1,60	1,67	4,11
woc1088	2,28	2,61	12,64
woc1093	1,93	1,99	2,78
woc1094	2,41	2,70	11,06
woc1119	2,20	2,29	4,2
woc1120	2,68	3,06	12,36
woc1124	1,87	2,03	7,95
woc1125	1,64	1,92	14,76
woc1126	1,90	2,21	14,07



Παρατηρούμε ότι υπάρχει μια πάρα πολύ καλή συσχέτιση ανάμεσα στον ποσοτικό προσδιορισμό του αθροίσματος ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης (ARISTOLEO) και τη μέθοδο NMR.



ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ NMR – FOLIN CIOCALTEU

Στη συνέχεια συγκρίναμε την μέθοδο NMR με τη μέθοδο Folin Ciocalteu όσον αφορά τον δείκτη D1 δηλαδή το άθροισμα ελαιοκανθάλης – ελαιασίνης και τις ολικές φαινόλες. Όπως προανέφερα στη μέθοδο Folin υπολογίζαμε τις μετρούμενες φαινόλες σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος. Για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τις δύο μεθόδους, στη μέθοδο NMR μετατρέψαμε τις συγκεντρώσεις όλων των μετρούμενων φαινολών από mg/kg σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος. Για τη μετατροπή αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς των τεσσάρων φαινολών, οι οποίες είναι εκφρασμένες σε καφεϊκό οξύ (σελίδα 107).

ΜΕΘΟΔΟΣ NMR

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	C(mg/kg) Ελαιο- κανθάλη	Σκαφεϊκού οξέος	C(mg/kg) Ελαια- σίνη	Σκαφεϊκού οξέος(mg/kg)	Καλδεϋδικό άγλυκο	Σκαφεϊκού οξέος	ελαιομισιονάλη		Ccaf (ολικά) mg/kg
woc500	369	64,28	127	33,12	49	10,82	82	25,33	133,55
woc426	172	26,85	160	43,02	69	19,42	294	99,53	188,82
woc427	255	42,62	236	65,82	86	26,73	298	100,93	236,1
woc636	274	46,23	331	94,32	99	32,32	520	178,63	351,5
woc650	431	76,06	342	97,62	82	25,01	136	44,23	242,92
woc648	455	80,62	392	112,62	86	26,73	146	47,73	267,7
woc682	307	52,5	205	56,52	75	22	99	31,28	162,3
woc741	110	15,07	90	22,02	99	32,32	170	56,13	125,54
woc731	258	43,19	102	25,62	32	3,51	42	11,33	83,65
woc720	399	69,98	110	28,02	99	32,32	65	19,38	149,7
woc708	123	17,54	71	16,32	32	3,51	166	54,73	92,1
woc705	461	81,76	476	137,82	173	64,14	456	156,23	439,95
woc822	74	8,23	23	1,92	36	5,23	123	39,68	55,06
woc828	53	4,24	23	1,92	97	31,46	230	77,13	114,75
woc927	50	3,67	23	1,92	40	6,95	35	8,88	21,42
woc926	77	8,8	26	2,82	53	12,54	42	11,33	35,49
woc917	347	60,1	158	42,42	97	31,46	234	78,53	212,51

woc930	69	7,28	88	21,42	46	9,53	133	43,18	81,41
woc929	134	19,63	54	11,22	63	16,84	28	6,43	54,12
woc902	80	9,37	43	7,92	33	3,94	240	80,63	101,86
woc1065	877	160,8	426	122,82	36	5,23	0	0	288,85
woc1070	336	58,01	398	114,42	73	21,14	156	51,23	244,8
woc1072	266	44,71	309	87,72	60	15,55	143	46,68	194,66
woc1081	577	103,8	353	100,92	33	3,94	180	59,63	268,29
woc1085	296	50,41	222	61,62	33	3,94	32	7,83	123,8
woc1086	328	56,49	219	60,72	26	0,93	59	17,28	135,42
woc1092	625	112,92	317	90,12	114	38,77	0	0	241,81
woc1095	353	61,24	552	160,62	67	18,56	89	27,78	268,2

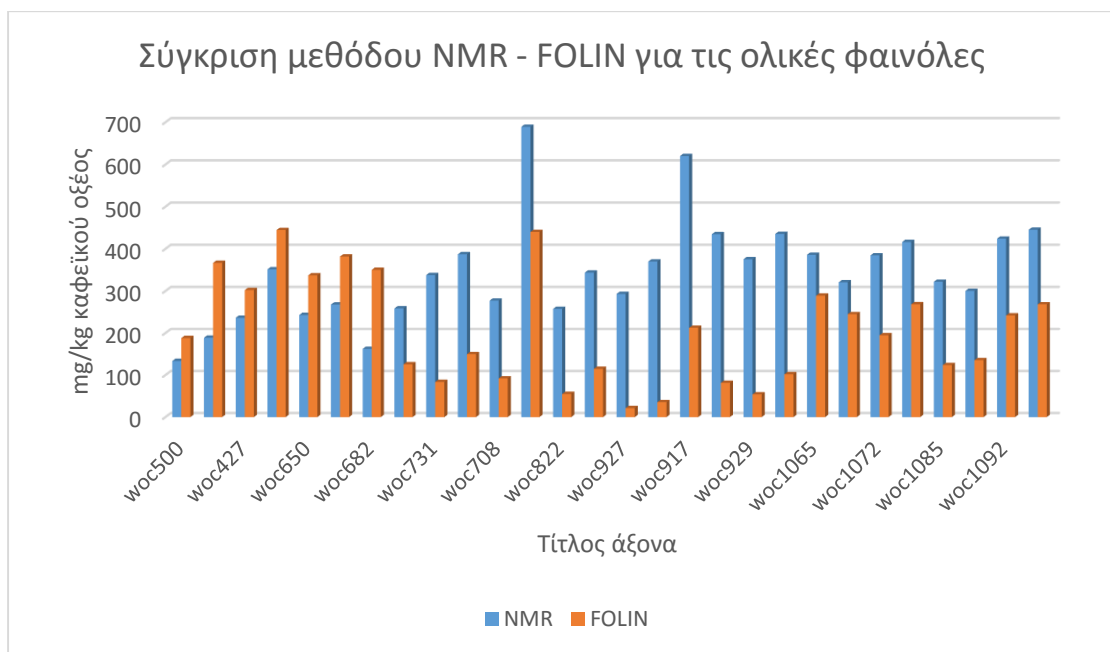
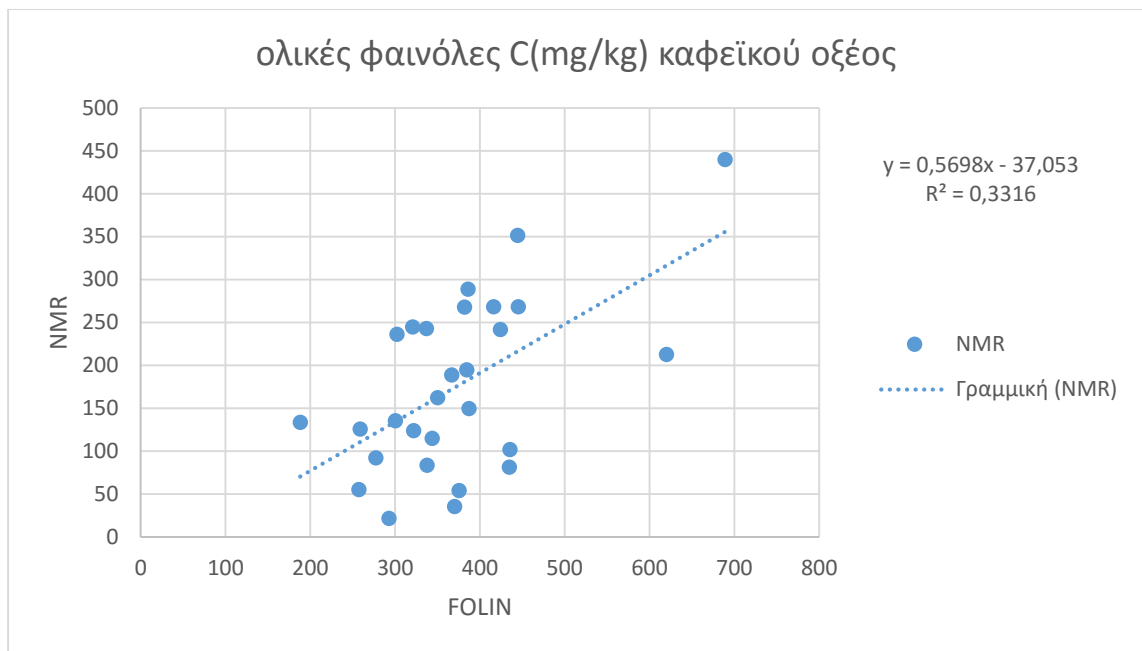
ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN-CIOCALTEU

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	A (725nm)	c (mg/kg καφεϊκού οξέος)
woc500	345	188,09
woc426	616	366,75
woc427	518	302,14
woc636	734	444,55
woc650	571	337,09
woc648	639	381,92
woc682	591	350,27
woc741	452	258,63
woc731	572	337,75
woc720	647	387,19
woc708	480	277,09
woc705	1105	689,14

woc822	450	257,31
woc828	581	343,68
woc927	504	292,91
woc926	621	370,05
woc917	1000	619,92
woc930	719	434,66
woc929	629	375,32
woc902	720	435,32
woc1065	645	385,87
woc1070	546	320,60
woc1072	643	384,55
woc1081	691	416,20
woc1085	548	321,92
woc1086	515	300,17
woc1092	703	424,11
woc1095	735	445.21

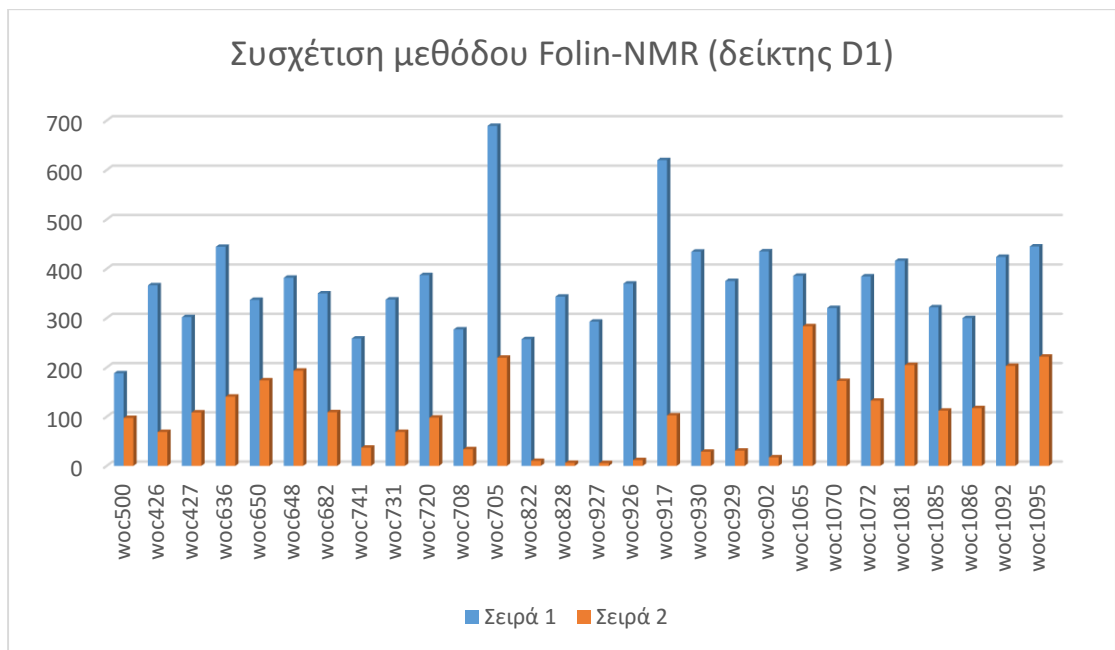
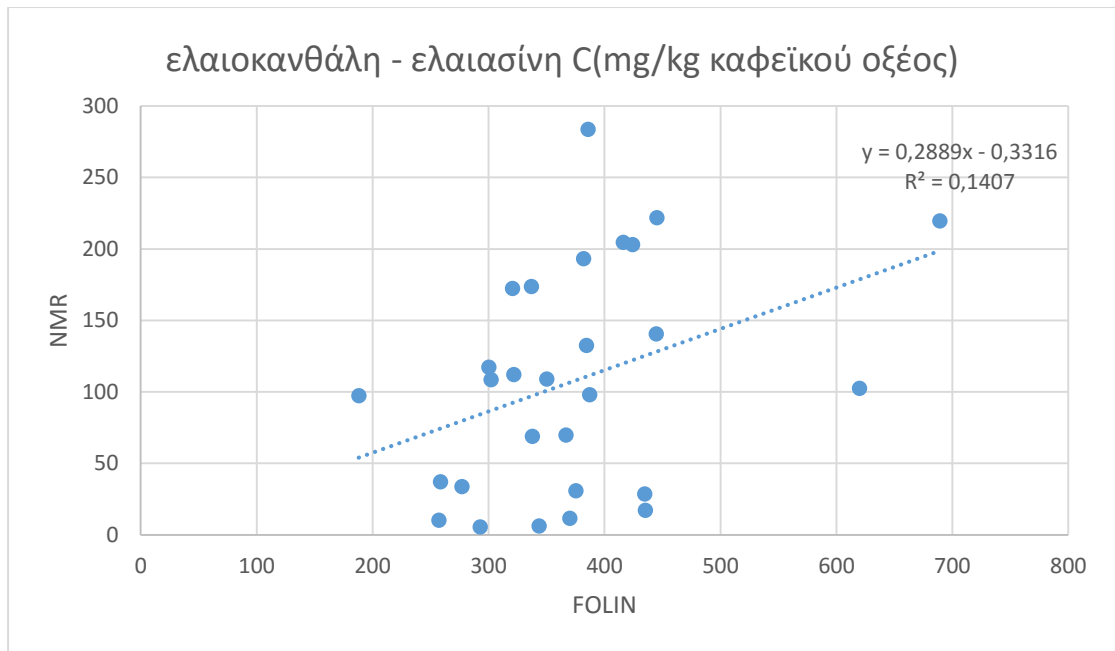
	FOLIN	NMR
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	c (mg/kg καφεϊκού οξέος)	c (mg/kg καφεϊκού οξέος)
woc500	188,09	133,55
woc426	366,75	188,82
woc427	302,14	236,1
woc636	444,55	351,5
woc650	337,09	242,92
woc648	381,92	267,7
woc682	350,27	162,3

woc741	258,63	125,54
woc731	337,75	83,65
woc720	387,19	149,7
woc708	277,09	92,1
woc705	689,14	439,95
woc822	257,31	55,06
woc828	343,68	114,75
woc927	292,91	21,42
woc926	370,05	35,49
woc917	619,92	212,51
woc930	434,66	81,41
woc929	375,32	54,12
woc902	435,32	101,86
woc1065	385,87	288,85
woc1070	320,60	244,8
woc1072	384,55	194,66
woc1081	416,20	268,29
woc1085	321,92	123,8
woc1086	300,17	135,42
woc1092	424,11	241,81
woc1095	445,21	268,2



	FOLIN	NMR
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	c (mg/kg καφεϊκού οξέος)	c (mg/kg καφεϊκού οξέος)δείκτης D1
woc500	188,09	97,4
woc426	366,75	68,87

woc427	302,14	108,44
woc636	444,55	140,55
woc650	337,09	173,68
woc648	381,92	193,24
woc682	350,27	109,02
woc741	258,63	37,07
woc731	337,75	68,81
woc720	387,19	98
woc708	277,09	33,86
woc705	689,14	219,58
woc822	257,31	10,15
woc828	343,68	6,16
woc927	292,91	5,59
woc926	370,05	11,69
woc917	619,92	102,52
woc930	434,66	28,7
woc929	375,32	30,85
woc902	435,32	17,29
woc1065	385,87	283,62
woc1070	320,60	172,43
woc1072	384,55	132,43
woc1081	416,20	204,72
woc1085	321,92	112,03
woc1086	300,17	117,21
woc1092	424,11	203,04
woc1095	445,21	221,86



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14

14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος εκλεκτικού οπτικού και φασματοφωτομετρικού εργαστηριακού ποσοτικού προσδιορισμού δύο συζευγμένων φαινολικών προϊόντων, της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης σε ελαιόλαδο. Από τη μέθοδο αυτή κατασκευάστηκε σε συνεργασία με το Πολυτεχνείο μια συσκευή η οποία μετράει την απορρόφηση στα 639nm και από την πρότυπη καμπύλη μπορούμε να υπολογίσουμε το άθροισμα σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη. Έπειτα συγκρίναμε τη μέθοδο ARISTOLEO με δύο καθιερωμένες μεθόδους εύρεσης της περιεκτικότητας των φαινολών, τη μέθοδο NMR και FOLIN-CIOCALTEU. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την εργασία ήταν τα ακόλουθα:

- ✓ Η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο στη μέθοδο με το ARISTOLEO, ενώ οι αλδεϋδικές μορφές του άγλυκου της ελευρωπαϊνης δεν απορροφούν στα 639nm
- ✓ Με τη μέθοδο FOLIN η ελαιοκανθάλη, η ελαιασίνη και οι αλδεϋδικές μορφές του άγλυκου της ελευρωπαϊνης δεν αντιδρούν σύμφωνα με τον θεωρητικά αναμενόμενο τρόπο. Η ελαιοκανθάλη και η ελαιασίνη δεν έχουν αναλογία 1 προς 2 αλλά 2 προς 3. Από αυτό προκύπτει ότι η συμμετοχή των αλδεϋδομάδων στην αντίδραση οξειδοαναγωγής Folin περιπλέκει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες
- ✓ Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της εργαστηριακής μεθόδου συμφωνούν με τα αποτελέσματα των μετρήσεων με τη μέθοδο NMR στο 93% των δειγμάτων με απόκλιση <15% στο άθροισμα ελαιοκανθάλης-ελαιασίνης (D1), ενώ η μέθοδο FOLIN φαίνεται ότι δεν μπορεί να συσχετίσει τις μετρούμενες ολικές φαινόλες με την περιεκτικότητα σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη αλλά ούτε και με τα ολικά συζευγμένα παράγωγα τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.

ΚΑΦΑΛΑΙΟ 15

15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] FAOSTAT (Food and Agriculture Organization) , <http://faostat.fao.org>
- [2] R. Ghanbari, F. Anwar, K.M. Alkharfy, A.-H. Gilani, N. Saari Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) – a review International Journal of Molecule Science, 13 (2012), pp. 3291–3340
- [3] Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G (2007). "Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade". *Molecules*. 12 (8): 1679–719. doi:10.3390/12081679. PMID 17960082.
- [4] "The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health". Retrieved September 13, 2014.
- [5] Genovese A, Caporaso N, Villani V, Paduano A, Sacchi R (2015). "Olive oil phenolic compounds affect the release of aroma compounds". *Food Chem*. 181: 284
- [6] RW Owen, A Giacosa, WE Hull, R Haubner, B Spiegelhalder, H Bartsch (2000). "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil". *European Journal of Cancer*. 36 (10): 1235–1247
- [7] RW Owen, W Mier, A Giacosa, WE Hull, B Spiegelhalder, H Bartsch (2000). "Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil" (PDF). *Clinical Chemistry*. 46 (7): 976–988.
- [8] <http://www.efet.gr>
- [9] FDA, Press release P04-100, 2004 <http://www.fda.gov/-dms/qhchoice/html>
- [10] Perez-Jimenez, F. et. al. (2005) International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest* 35:421-424.
- [11] Perona JS, et al. (2006) The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 17(7):429-445.
- [12] Beauchamp GK, et al. (2005) Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437(7055):45-46
- [13] Covas, M.I. et. al. (2006) The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 145: 333-341.
- [14] «California and World Olive Oil Statistics» (PDF). UC Davis. (Current link, Archive link to old address)
- [15] Evangelia Kakoula , Angeliki Skantzari, Eleni Melliou, and Prokopios Magiatis "Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil By Quantitative ¹H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils, Agricultural and food chemistry

- [16] Chrysoshoou C., Pitsavos C., Skoumas J., Masoura C., Katinioti A., Panagiotakos D., Stefanadis C., 2006. "The emerging anti-inflammatory role of HDLcholesterol, illustrated in cardiovascular disease free population; the ATTICA study." *Int. J. Cardio.*, 122, 29–33.
- [17] Medina E., de Castro A., Romero C., Brenes M., 2006. "Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity." *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4954–4961.
- [18] Quiles, J.L., Farquharson, A. J., Simpson, D.K. Grant. I. et al., "Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme Mrna in prostate cells. *Brit. J. Nutr* 2002, 88, 225-234
- [19] Weinbrenner et al, "Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men", *J. Nutr.* 2004, 134, 2314-2321.
- [20] Salvini S., Sera F., Carus D., Giovannelli L., Visioli F., Saieva C., Masala G., Ceroti M., Giovacchini V., Pitozzi V., Galli C., Romani A., Mulinacci N., Bortolomeazzi R., Dolara P., Palli D., 2006. "Daily consumption of a highphenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women." *Br. J. Nutr.*, 95, 742–751.
- [21] Harbome, J. B. (1989), "Methods in Plant Biochemistry I: Plant Phenolics", Academic Press, London.
- [24] Goya L., Mateos R., Bravo L., 2007. "Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide." *Eur. J. Nutr.*, 46, 70–78.
- [25] Cicerale S., Lucas L., Keast R., 2010, "Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil". *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 458-479.
- [26] Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G., Galli C., 1995. "Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil." *Thromb. Res.*, 78, 151–160.
- [27] Tuck K.L. and Hayball P.J., 2002. "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects", *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 636 – 644
- [28] Hashim Y.Z., Rowland I.R., McGlynn H., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposto S., Montedoro G., Kaisalo L., Wahala K., Gill C.I., 2008. "Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro." *Int. J. Cancer*, 122, 495–500.
- [29] Corona G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M.A., Spencer, J.P.E., 2009. "Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adeocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 ad cyclin D1." *Mol. Nutr. Food Res*, 53, 897–903
- [30] Han J., Talorete T.P.N., Yamada P., Isoda H., 2009, "Anti-proliferative and apototic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells." *Cytotechnology*, 59, 45–53
- [34] Briante R., Cara F. L., Tonziello M. P., Febbraio F. and Nucci R., 2001. "Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic beta-glycosidase." *J Agric. Food Chem.*, 49(7): 31983203.
- [35] Gariboldi P., Jommi G. and Verotta L., 1986. "Secoiridoids from *Olea europaea*." *Phytochemistry* 25(4): 865-869.

- [36] Pérez-Trujillo M., Gómez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernández-Cutiérrez A. and Parella T. 2010. "Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from *Olea europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycon". *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9129-9136
- [37] Pitt J., Roth W., Lacor P., Amos B. Smith III, Blankenship M., Velasco P., De Felice F., Breslin P. and Klein W.L. 2009. "Alzheimer's-associated A β oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal" *Toxicology and Applied Pharmacology* 240, 189–197
- [38] Li W., Sperry J. B., Crowe A., Trojanowski J. Q., Smith A. B. and Lee V. M. Y. 2009. "Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau". *J Neurochem* 110 (4): 1339- 1351.
- [39] Cicerale S., Lucas L.J. and Keast R.S.J., 2012. "Oleocanthal: a naturally occurring anti-inflammatory agent in virgin olive oil." p. 357-374. In: D. Boskou (ed.), *Olive Oil – Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. Intech, Croatia
- [40] Elnagar A.Y., Sylvester P.W., El Sayed K.A., 2011. "(-)-Oleocanthal as a c-Met Inhibitor for the Control of Metastatic Breast and Prostate Cancers." *Planta Med.* 2011 Feb 15.
- [41] Mohammad A. Khanfar , Sanaa K. Bardaweel , Mohamed R. Aki and Khalid A. El Sayed 2015, " Olive Oil-derived Oleocanthal as potent inhibitor of mammalian target of rapamycin: biological evaluation and molecular modeling studies." HHS Public Access
- [42] Estanove C., Pruvost F., Allart J.C., and Saldmann F., 2009. "Use of olive oil extract to control skin aging". WO 2009/122045 A2
- [43] Romero C., Medina E., Vargas J., Brenes M., De Castro A., 2007. "In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*." *J. Agric. Food Chem.*, 55, 680–686.
- [44] Morena Scotece , "New drugs from ancient natural foods. Oleocanthal, the natural occurring spicy compound of olive oil: a brief history", 2015
- [45] Pavia – Martins F. P. et al 2009
- [46] Somova L.I., Shode F.O., Ramnanan P. and Nadar A., 2003. "Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves", *Journal of Ethnopharmacology* 84 , 299- 305
- [47] Parzonko A., Naruszewicz M., 2012. "Oleacein protects endothelial progenitor cells against angiotensin II - induced oxidative stress" *Planta Med* 2012; 78 - PD88 DOI: 10.1055/s-0032-1320446
- [48] Czerwińska M., Kiss A.K., Naruszewicz M., 2012–a. "Oleacein from virgin olive oil may contributes to stabilization of atherosclerotic plaques by decrease myeloperoxidase release from neutrophils"
- [49] Agnieszka Filipek et al 2015, "Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression.
- [50] Menendez J.A., Vazquez-Martin R., Garcia-Villalba A., Carrasco-Pancorbo C., Oliveras-Ferraro A., Fernandez-Gutierrez A., and Segura-Carretero A., 2008. "tabAnti-HER2 (erbB-2)

oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin olive oil (EVOO)". BMC Cancer 2008, 8 (377), 1-23.

[51] Busnena B.A., Foudah A.I., Melancon T., El Sayed K.A., 2013. "Olive secoiridoids and semisynthetic bioisostere analogues for the control of metastatic breast cancer." Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21, 2117–2127

[52] Ανδρικόπουλος, 1999

[53] Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F. and Cimato, A. (1999), "Polyphenolic Content in Five Tuscany Cultivars of Olea Europaea L", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 47, pp. 964-967.

[54] Akasbi, M., Shoeman, D. W. and Saari-Csallany, A. (1993), "High-Performance Liquid Chromatography of Selected Phenolic: Compounds in Olive Oils", Journal of the American Oil Chemists' Society, Vol. 70, No. 4, pp. 367-370.

[55] Visser, T., Vredenbergregt, M. J., Ten Hove, G. J., De Jong, A. P. J. M. and Somsen, G. W. (1997), "Gradient Elution Liquid Chromatography-Infrared Spectrometry at pg'1 Level Using Capillary Column Switching and Addition of a Make-up Liquid: A Preliminary Study", Journal of Analytica Chimica Acta, Vol. 342, pp. 151-158

[56] Bringmann, G., Messer, K., Wohlarth, M., Kraus, J., Dumbuya, K. and Rückert, M. (1999), "HPLC-CD On-line Coupling in Combination with HPLC-NMR and HPLC- MSMS for the Determination of the Full Absolute Stereostructure of New Metabolites in Plant Extracts", Analytical Chemistry, Vol. 71, pp. 2678-2686.

[57] Balentine, D. A., Wiseman, S. A. and Bouwens, L. C. M. (1997), "The Chemistry of Tea Flavonoids", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 37, pp. 693- 704.

[58] Soobratee, M., Neergheen, V., Luximon-Ramma, A., Auroma, O. and Bahorum, T. (2005), "Phenolics as Potential Antioxidant Therapeutic Agents: Mechanism and Actions", Mutation Research, Vol. 579, pp. 200-213.

[59] Huang, D., Ou, B. and Prior R. L. (2005), "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays ", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 53, pp. 1841-56.

[60] Αθανάσιος Λάνταβος et al. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων.

Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Οργάνωσης & Διοίκησης Επιχειρήσεων, Τμήμα

Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων & Τροφίμων.

[61] Δ. Μπόσκου , "ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ" , Εκδόσεις Γαρταγάνη Θεσσαλονίκη

[62] Prieme H, et al. (1998) Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion. Carcinogenesis

[63] Furneri PM, Piperno A, Sajia A, & Bisignano G. (2004) Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. Antimicrob Agents Chemother 48: 4892–4894.

[64] Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, Zhang D, Zhang JZH, Chang YT, et al. (2009) Compositions and methods for treating obesity, obesity related disorders and for inhibiting the infectivity of human immunodeficiency virus. US Pat Appl Publ US 20090061031 A1 20090305.

- [65] Visioli F, Poli A, & Galli C. (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 22: 65–75.
- [66] European Community (EC). 2008. Commission Regulation No 640/2008 of 4 July 2008 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Communities*, L178:11-16.
- [67] International Olive Council (IOC). 2010. Sensory analysis of olive oil: method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T.20/Doc. No 15/Rev.3
- [68] IOC COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 4. 2011. Sensory analysis of olive oil method for the organoleptic assessment of virgin olive oil.
- [69] <http://www.amberlyst.com/literature/us/xad4>
- [70] <http://www.internationaloliveoil.org/projects/paginas/Section-a.htm>
- [71] Grose C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, et al. (2013) The Polyphenol Oleuropein Aglycone Protects TgCRND8 Mice against A β Plaque Pathology. *PLoS ONE* 8(8): e71702.
- [72] ACS Chem Neurosci. 2013 Jun 19;4(6):973-82. Olive-oil-derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. Abuznait AH, Qosa H, Busnena BA, El Sayed KA, Kaddoumi A
- [73] Li, W., Sperry, J. B., Crowe, A., Trojanowski, J. Q., Smith, A. B., 3rd, and Lee, V. M. (2009) Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau. *J. Neurochem.* 110, 1339–1351.
- [74] Monti, M. C., Margarucci, L., Tosco, A., Riccio, R., and Casapullo, A. (2011) New insights on the interaction mechanism between tau protein and oleocanthal, an extra-virgin olive-oil bioactive component. *Food Funct.* 2, 423–428.
- [75] Molecular & Cellular Oncology Volume 2, Issue 4, 2015