



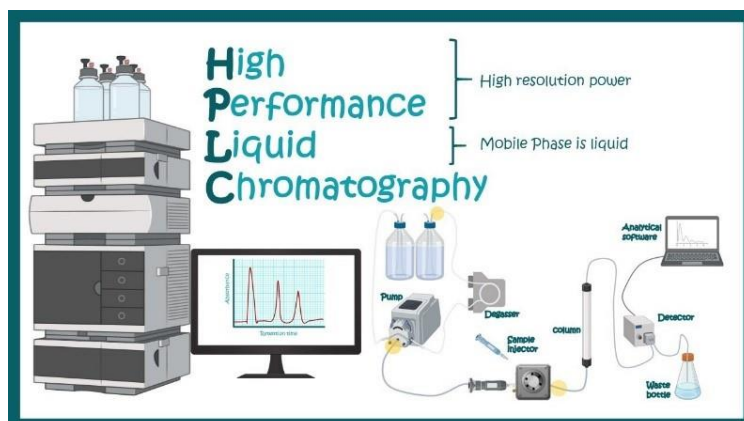
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

«Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων με χρήση υγρής
χρωματογραφίας»

THESIS:

«Development of a liquid chromatography method for the determination of phenolic
compounds»



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ:

Λουλούδη Ευμορφία

Σακκά Παναγιώτα Μαρία

ΟΝΟΜΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑΣ:

Τσιάκα Θάλεια

ΑΙΓΑΛΕΩ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων με χρήση υγρής
χρωματογραφίας»**

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική Επιτροπή:

Α/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1.	Τσίακα Θάλεια	Διδακτικό Προσωπικό ΕΣΠΑ / Επιβλέπουσα	
2.	Σινάνογλου Βασιλεία	Καθηγήτρια – Κοσμήτορας της Σχολής Επιστημών Τροφίμων / Μέλος	
3.	Στρατή Ειρήνη	Επίκουρη καθηγήτρια / Μέλος	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένες Λουλούδη Ευμορφία του Δημητρίου με αριθμό μητρώου 19684180 και Σακκά Παναγιώτα Μαρία του Αθανασίου, με αριθμό μητρώου 19684085, φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είναι συγγραφείς της παρούσας πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια που είχαν για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επιπλέον, οι όποιες πηγές από τις οποίες έγινε χρήση δεδομένων, ιδεών και λέξεων, είτε επακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουν ότι η εργασία αυτή έχει συγγραφεί από αυτές αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας, τόσο δικής τους, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση των πτυχίων μας.»

Οι Δηλούσες

Λουλούδη Ευμορφία Σακκά Παναγιώτα Μαρία



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την αξιότιμη καθηγήτριά μας κα. Θάλεια Τσιάκα αφενός για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μας και αφετέρου για την συνεχή στήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μας εργασίας. Ήταν πάντα εκεί, να μας καθοδηγεί και να μας βοηθάει να εξελιχθούμε τόσο μορφωτικά όσο και σαν άνθρωποι.

Ευχαριστούμε θερμά και τα μέλη της 3μελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν με σκοπό να μας ακούσουν.

Έπειτα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειες μας καθώς χωρίς τον αγώνα που καταβάλλουν καθημερινά αλλά και τη στήριξη τους δε θα είχαμε τη δυνατότητα να σπουδάσουμε σε μια πόλη μακριά από τον τόπο κατοικίας μας με σκοπό την επαγγελματική μας εξέλιξη.

Τέλος, ευχαριστούμε όλους αυτούς τους φίλους που στάθηκαν δίπλα μας και μας βοήθησαν ως το πέρας της ακαδημαϊκής μας πορείας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήμερα, στη βιομηχανία τροφίμων, ολοένα και περισσότερο αποκτούν ενδιαφέρον οι φαινολικές ενώσεις και η αξιοποίησή τους για την παραγωγή καινοτόμων και βελτιωμένων προϊόντων. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών που συναντώνται σε φυτικούς οργανισμούς. Η παρούσα εργασία εστιάζει στα φαινολικά οξέα, τα οποία αποτελούν την κυριότερη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων. Σημαντική πηγή φαινολικών οξέων αποτελούν τα παραπροϊόντα της αγρο-διατροφικής βιομηχανίας. Οι ενώσεις αυτές που παραλαμβάνονται από τα παραπροϊόντα βρίσκουν διάφορες εφαρμογές σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας, αλλά κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων. Έτσι, τα φαινολικά οξέα έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις βιοδραστικές τους ιδιότητες και για τα πιθανά οφέλη τους στην υγεία των ανθρώπων. Οι κύριες βιοδραστικές ιδιότητες που παρουσιάζουν είναι η αντιοξειδωτική, η αντιαλλεργική, η αντιγηραντική, η αντιμικροβιακή και η αντιφλεγμονώδης δράση. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι εκχύλισης και τεχνικές ανάλυσης προκειμένου να καταστεί όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματική η αξιοποίηση των ενώσεων αυτών.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μίας μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) συζευγμένης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode Array – PDA) για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό 15 φαινολικών οξέων σε φυτικά εκχυλίσματα, με κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών χρωματογραφίας. Έπειτα, ακολούθησε η επικύρωση της μεθόδου με τον προσδιορισμό της γραμμικότητας, της πιστότητας, της ακρίβειας και των ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ). Στη συνέχεια, η επικυρωμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των μελετούμενων φαινολικών οξέων σε διάφορα εκχυλίσματα καφέ και σε εκχύλισμα φράουλας. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται πως η μέθοδος εμφανίζει γραμμικότητα, καλή επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, για τα περισσότερα φαινολικά οξέα. Αντίθετα, η μέθοδος δεν παρουσιάζει ικανοποιητική ακρίβεια. Επίσης, τα περισσότερα φαινολικά οξέα έχουν την ικανότητα να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Τέλος, μετά την εφαρμογή της μεθόδου σε διάφορα φυτικά εκχυλίσματα, τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν ήταν τα γαλλικό, πρωτοκατεχικό, χλωρογενικό, 4-υδροξυβενζοϊκό, καφεϊκό, κινναμικό, φερουλικό οξύ. Το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ εμφανίζεται σε υψηλή συγκέντρωση στον ντεκαφεϊνέ καφέ, ενώ το καφεϊκό οξύ εμφανίζεται σε υψηλή συγκέντρωση στο εκχύλισμα φράουλας.

Λέξεις κλειδιά: Φαινολικές ενώσεις, Φαινολικά οξέα, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων, Ανάπτυξη μεθόδου, Επικύρωση μεθόδου, Φυτικά εκχυλίσματα

ABSTRACT

Today, in the food industry, the use of phenolic compounds for the production of innovative and improved food products is gathering interest. Phenolic compounds are one of the main classes of secondary metabolites found in plant tissues. This thesis focuses on phenolic acids, which are the main group of phenolic compounds. By-products of the agri-food industry are an important source of phenolic acids. These compounds obtained from by-products find various applications in many branches of industry, but mainly in the food industry. Thus, phenolic acids have been extensively studied for their bioactive properties and potential health benefits in humans. Their main bioactive properties are antioxidant, anti-allergic, anti-aging, antimicrobial, and anti-inflammatory activities. Thus, in order to make the utilization of these compounds as efficient as possible, a wide range of extraction methods and analytical techniques have been developed.

In this thesis, a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method coupled with a Photodiode Array (PDA) detector was developed for the identification and quantification of 15 phenolic acids in plant extracts, with appropriate adjustment of the chromatographic conditions. The method was then validated after determining the linearity, the precision, the accuracy and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The validated method was then applied for the determination and quantification of the studied phenolic acids in various coffee extracts, as well as in strawberry extract. The results indicate that the method shows linearity, good repeatability, and reproducibility for all concentrations studied for most phenolic acids. On the contrary, the accuracy of the method should be improved. Also, most phenolic acids were detected and quantified at very low concentrations. Last but not least, after applying the method to various plant extracts, the phenolic acids identified were gallic, protocatechuic, chlorogenic, 4-hydroxybenzoic, caffeic, cinnamic and ferulic acids. Decaffeinated coffee contains 4-hydroxybenzoic acid in high concentration, while caffeic acid occurs in high concentration in strawberry extract.

Keywords: Phenolic compounds, Phenolic acids, High-Performance Liquid Chromatography, Photo Diode Array detector, Method development, Method validation, Plant extracts

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
1. Φαινολικές ενώσεις: Γενικά στοιχεία	12
2. Φαινολικά οξέα	14
3. Δράσεις φαινολικών οξέων.....	18
4. Τεχνικές εκχύλισης φαινολικών ενώσεων	23
5. Τεχνικές ανάλυσης φαινολικών ενώσεων.....	30
6. Βιομηχανικές εφαρμογές των φαινολικών ενώσεων	34
7. Τρόποι ενσωμάτωσης φαινολικών ενώσεων σε προϊόντα.....	36
ΣΚΟΠΟΣ	38
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
1. Διάγραμμα ροής.....	39
2. Αναλώσιμα και οργανολογία.....	40
2.1. Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες.....	40
2.2. Συσκευές και επιστημονικά όργανα.....	41
3. Προκατεργασία δειγμάτων για ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	42
4. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού φαινολικών οξέων με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
1. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου	46
1.1. Γραμμικότητα μεθόδου (Linearity).....	46
1.2. Πιστότητα (Precision)	51
1.2.1. Επαναληψιμότητα (Repeatability).....	51
1.2.2. Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility).....	54
1.3. Ακρίβεια (Accuracy)	58

1.4. Όριο αντίχενυσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).....	62
1.5. Σταθερότητα (Stability).....	67
2. Εφαρμογή της επικυρωμένης μεθόδου σε φυτικά εκχυλίσματα.....	71
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Φαινόλη: η χαρακτηριστική ομάδα που περιέχεται στη χημική δομή των φαινολικών ενώσεων.	12
Εικόνα 2: Χημική δομή φαινολικών οξέων.....	14
Εικόνα 3: Παραδείγματα φαινολικών οξέων.....	14
Εικόνα 4: Βιοδραστικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων.....	18
Εικόνα 5: α) Τεχνική εκχύλισης στερεού – υγρού, β) Τεχνική εκχύλισης υγρού – υγρού.....	24
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του Soxhlet.....	24
Εικόνα 7: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης με υπερήχους.....	25
Εικόνα 8: Αυτοματοποιημένη εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση μικροσφαιρών διπλού υδροξειδίου με διαλυτό Fe_3O_4	26
Εικόνα 9: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού.....	26
Εικόνα 10: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης υγρού υπό πίεση.....	27
Εικόνα 11: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης με μικροκύματα.....	28
Εικόνα 12: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων.....	28
Εικόνα 13: Ένα απλοποιημένο σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	31
Εικόνα 14: Μέθοδοι ανάλυσης των φαινολικών ενώσεων.....	33
Εικόνα 15: Βιομηχανικές εφαρμογές των φαινολικών ενώσεων.....	35
Εικόνα 16: Φαινολικά οξέα που μελετήθηκαν, το βέλτιστο μήκος κύματος όπου έγινε ο προσδιορισμός (280 nm) και ο χρόνος έκλουσής τους (Ret. Time) σε λεπτά.....	44
Εικόνα 17: Χρωματογραφήματα των φαινολικών οξέων, που μελετήθηκαν, στο βέλτιστο μήκος κύματος (280nm).....	45
Εικόνα 18: Α) Χρωματογράφημα ξανθού καφέ, Β) Χρωματογράφημα μαύρου καφέ, Γ) Χρωματογράφημα ντεκαφεϊνέ, Δ) Χρωματογράφημα καφέ με μαστίχα.....	73
Εικόνα 19: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος φράουλας.....	73

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Παραδείγματα τροφίμων που περιέχουν φαινολικές ενώσεις.....	13
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά φαινολικά οξέα και πιθανές πηγές τους.	15
Πίνακας 3: Παραδείγματα φαινολικών οξέων και οι βιοδραστικές τους ιδιότητες.....	20
Πίνακας 4: Μέθοδοι εκχύλισης φαινολικών ενώσεων και παραδείγματα εφαρμογής τους.	29
Πίνακας 5: Τεχνικές ανάλυσης φαινολικών οξέων και μερικά παραδείγματα.....	33
Πίνακας 6: Παραδείγματα ενθυλάκωσης φαινολικών ενώσεων	37
Πίνακας 7: Πρότυπες ουσίες.....	40
Πίνακας 8: Φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε, η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του καθενός και ο συντελεστής προσδιορισμού R^2	49
Πίνακας 9: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας της προς επικύρωση μεθόδου	52
Πίνακας 10: Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας της προς επικύρωση μεθόδου	55
Πίνακας 11: Αποτελέσματα σχετικού σφάλματος της προς επικύρωση μεθόδου.....	59
Πίνακας 12: Αποτελέσματα για τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) και τα όρια ανίχνευσης (LOD) των φαινολικών οξέων της προς επικύρωση μεθόδου.....	65
<i>Πίνακας 13: Αποτελέσματα της σταθερότητας των φαινολικών οξέων που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν με την προς επικύρωση μέθοδο, στη χαμηλή συγκέντρωση (5 mg/L).....</i>	<i>68</i>
Πίνακας 14: Αποτελέσματα σταθερότητας για τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν με την προς επικύρωση μέθοδο στη μεσαία συγκέντρωση (50 mg/L)	69
Πίνακας 15: Αποτελέσματα σταθερότητας για τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν με την προς επικύρωση μέθοδο στην υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L)	70
Πίνακας 16: Τα διάφορα εκχυλίσματα καφέ και το εκχύλισμα φράουλας που μελετήθηκαν, τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν και οι συγκεντρώσεις στις οποίες βρέθηκαν σε κάθε δείγμα	72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας	39
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς για το γαλλικό οξύ	47
Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς για το πρωτοκατεχικό οξύ	47
Διάγραμμα 4: Καμπύλη αναφοράς για το κινναμικό οξύ	48
Διάγραμμα 5: Καμπύλη αναφοράς για το βανιλλικό οξύ	48
Διάγραμμα 6: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOQ και του LOD του γαλλικού οξέος.....	63
Διάγραμμα 7: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOQ και του LOD του γεντισικού οξέος	63
Διάγραμμα 8: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOQ και του LOD του καφεϊκού οξέος	64
Διάγραμμα 9: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOQ και του LOD του ροσμαρινικού οξέος	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ

Εξίσωση 1: Εξίσωση υπολογισμού σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%).....	51
Εξίσωση 2: Εξίσωση υπολογισμού της ακρίβειας.....	58
Εξίσωση 3: Εξίσωση υπολογισμού της σχετικής ακρίβειας (RE%).....	58
Εξίσωση 4: Εξίσωση υπολογισμού σχετικού σφάλματος (RE%)	58
Εξίσωση 5: Εξίσωση για τον υπολογισμό του ορίου αντίχνευσης.....	62
Εξίσωση 6: Εξίσωση για τον υπολογισμό του ορίου ποσοτικοποίησης.....	62

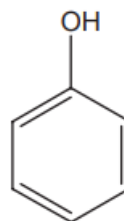
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Φαινολικές ενώσεις: Γενικά στοιχεία

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις κυριότερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και απαντώνται σε ποικίλους φυτικούς ζώντες οργανισμούς, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, οι ξηροί καρποί, τα όσπρια, τα μπαχαρικά, διάφοροι σπόροι και βότανα, με τη μορφή πολυμερών, τα οποία ονομάζονται πολυφαινόλες.[1]

Από χημικής άποψης, αποτελούν οργανικές ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες σε έναν εξαμελή αρωματικό δακτύλιο (Εικόνα 1). Διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα δομών και λειτουργιών. Πιο συγκεκριμένα, χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες, τις απλές φαινόλες, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, και τις πολυφαινόλες, όπως είναι τα φλαβονοειδή, οι λιγνάνες, τα στυλβένια και οι ταννίνες.[2] Επίσης, οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν βιοδραστικές ουσίες και πολλές από αυτές παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Ακόμη, σύμφωνα με έρευνες, φαίνεται να έχουν ανασταλτική δράση κατά της καρκινογένεσης και των μεταλλάξεων. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί πως οι φαινολικές ενώσεις συνδέονται στενά με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τόσο των φρέσκων, όσο και των επεξεργασμένων τροφίμων, όπως το χρώμα, η γεύση και το άρωμα, αλλά και με τη διατροφική ποιότητά τους. Έτσι, η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε φαινολικά, συχνά, σχετίζεται με πληθώρα πλεονεκτημάτων για την υγεία του ανθρώπου, και θεωρείται κομμάτι μίας υγιεινής διατροφής. [3,4]

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά παραδείγματα τροφίμων και ποτών που διαθέτουν υψηλό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων.



Εικόνα 1: Φαινόλη: η χαρακτηριστική ομάδα που περιέχεται στη χημική δομή των φαινολικών ενώσεων.

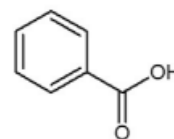
Πηγή:
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-5164-7_1

Πίνακας 1: Παραδείγματα τροφίμων που περιέχουν φαινολικές ενώσεις

Κατηγορία τροφίμου	Παραδείγματα
Φρούτα	Μύρτιλα, φράουλες, σμέουρα, βατόμουρα, μήλα, κεράσια, σταφύλια, εσπεριδοειδή
Λαχανικά	Μπρόκολο, σπανάκι, λαχανίδα, κρεμμύδια, σκόρδο, αγκινάρες, πιπεριές
Βότανα & Μπαχαρικά	Θυμάρι, ρίγανη, δεντρολίβανο, φασκόμηλο, κανέλα, γαρύφαλλο, κουρκουμάς
Ξηροί καρποί & Σπόροι	Αμύγδαλα, καρύδια, πεκάνς, λιναρόσπορος, σπόροι chia
Τσάι & Καφές	Πράσινο τσάι (κατεχίνες)
Κακάο	Σκόνη κακάο, μαύρη σοκολάτα
Όσπρια	Φακές, φασόλια, ρεβίθια
Δημητριακά ολικής άλεσης	Βρώμη, σίτος, κριθάρι, καστανό ρύζι
Κρασί	Κόκκινο κρασί
Μπύρα	Μπύρες από βυνοποιημένο κριθάρι

2. Φαινολικά οξέα

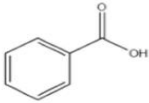
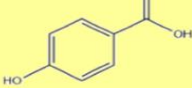



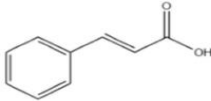
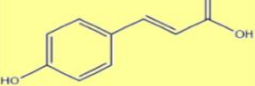



Η παρούσα πτυχιακή εργασία εστιάζει από το σύνολο των φαινολικών ενώσεων, στα φαινολικά οξέα (Εικόνα 2). Με τον όρο «φαινολικό οξύ» περιγράφεται μία φαινολική ένωση η οποία διαθέτει μία καρβοξυλομάδα. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μία από τις κυριότερες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων και είναι βιολογικά ενεργά μόρια. Παράγονται από την φωτοσύνθεση στα φυτά και αποτελούν μία μεγάλη ομάδα φυσικών ενώσεων που υπάρχουν σε ένα ευρύ φάσμα βρώσιμων και μη φυτών και χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες, τα υδροξυβενζοϊκά και τα υδροξυκινναμικά οξέα (Εικόνα 3). [2]



Phenolic acids

Εικόνα 2: Χημική δομή φαινολικών οξέων
Πηγή: <https://study.com/academy/lesson/what-are-phenol-disinfectants-definition-advantages-disadvantages.html>

Όσον αφορά τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, καθώς και τα παράγωγά τους (γαλλικό, βανιλικό, συριγγικό, πρωτοκατεχικό οξύ), βρίσκονται σε αφθονία σε ελαιούχους σπόρους, στα δημητριακά, στον καφέ, στα βατόμουρα, στις σταφίδες και σε διάφορα λαχανικά, όπως τα μπιζέλια και τα κολοκύθια. Τα υδροξυκινναμικά οξέα και τα παράγωγά τους (κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό, σιναπινικό οξύ) είναι αρωματικές ενώσεις και απαντώνται κυρίως στον καφέ, στα δημητριακά, σε φρούτα όπως οι τομάτες, τα κεράσια, τα ροδάκινα και τα εσπεριδοειδή, καθώς και στους χυμούς των εσπεριδοειδών, σε λαχανικά όπως οι πατάτες και το σπανάκι, αλλά και στα αμύγδαλα. Γενικά, τα φαινολικά οξέα έχουν μελετηθεί για τα πιθανά οφέλη που μπορούν να προσφέρουν στην υγεία των ανθρώπων.[2]

Controls	1 OH	1 OH + 1 Methoxy	1 OH + 2 Methoxys	2 OH
 Benzoic Acid	 4-Hydroxy Benzoic Acid	 Vanillic Acid	 Syringic Acid	 Protocatechuic Acid
 Cinnamic Acid	 P-Coumaric Acid	 Ferulic Acid	 Sinapic Acid	 Caffeic Acid

Εικόνα 3: Παραδείγματα φαινολικών οξέων
Πηγή: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/5/419>

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) αναφέρονται χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολικών οξέων, καθώς και οι κυριότερες πηγές από τις οποίες μπορούν να παραληφθούν.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά φαινολικά οξέα και πιθανές πηγές τους.

Φαινολικό οξύ	Τρόφιμο
Gallic acid (Γαλλικό οξύ)	Σταφύλια, μύρτιλα, τσάι, κρασί, ξηροί καρποί
Protocatechuic acid (Πρωτοκατεχικό οξύ)	Κεράσια, αχλάδια, δαμάσκηνα, καρότα, κρεμμύδια
Caffeic acid (Καφεϊκό οξύ)	Καφές, μήλα, μούρα, εσπεριδοειδή, τομάτες, αγκινάρες
Ferulic acid (Φερουλικό οξύ)	Σίτος, ρύζι, βρώμη, καλαμπόκι, μήλα, τομάτες, σπανάκι, σπαράγγια, καρότα
Sinapinic acid (Σιναπινικό οξύ)	Μπρόκολο, κουνουπίδι, ραδίκια, ελαιόλαδο
Salicylic acid (Σαλικυλικό οξύ)	Μούρα, πορτοκάλια, τομάτες, πιπεριές, θυμάρι, δεντρολίβανο
Gentisic acid (Γεντισικό οξύ)	Σμέουρα, φράουλες, βατόμουρα, σπανάκι, τομάτες, καφές, κρασί, κακάο, σοκολάτα
4-hydroxybenzoic acid (4-υδροξυβενζοϊκό οξύ)	Μούρα, λεμόνια, γκρέιπφρουτ, πορτοκάλια, σπανάκι, κρεμμύδια, τσάι, μέλι
Syringic acid (Συριγγικό οξύ)	Μούρα, σίτος, βρώμη, φακές, ρεβίθια, μελιτζάνες, γλυκοπατάτες, κανέλα, θυμάρι, κόκκινο κρασί
Cinnamic acid (Κινναμικό οξύ)	Κανέλα, φράουλες, ανανάς, πορτοκάλια, τομάτες, βασιλικός, μοσχοκάρυδο
o-coumaric acid (o-κουμαρικό οξύ)	Μήλα, αχλάδια, κεράσια, σταφύλια, καρότα, πιπεριές, φακές, ρεβίθια, σόγια, μαϊντανός, κόλιανδρος
m-coumaric acid (m-κουμαρικό οξύ)	Μήλα, αχλάδια, κεράσια, σταφύλια, καρότα, πιπεριές, μπρόκολο, φακές,

	ρεβίθια, σόγια, μαϊντανός, κόλιανδρος, κανέλα
p-coumaric acid (p-κουμαρικό οξύ)	Φράουλες, ανανάς, κεράσια, τομάτες, καρότα
Rosmarinic acid (Ροσμαρινικό οξύ)	Δεντρολίβανο, δυόσμος, μέντα, ρίγανη, φασκόμηλο, μελισσόχορτο, θυμάρι, βασιλικός

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, υπάρχει μία πληθώρα τροφίμων, τα οποία αποτελούν εξαιρετικές πηγές φαινολικών οξέων, αλλά και φαινολικών ενώσεων γενικά. Εκτός αυτών, αξίζει να σημειωθεί πως σημαντική πηγή φαινολικών αποτελούν και διάφορα παραπροϊόντα που προέρχονται κυρίως από την αγρο-διατροφική βιομηχανία. Ο κλάδος αυτός, παράγει τεράστιους όγκους αποβλήτων ως αποτέλεσμα της παραγωγής, παρασκευής και κατανάλωσης τροφίμων, γεγονός που έχει οδηγήσει στην ανάγκη για επαναχρησιμοποίηση των αποβλήτων. Τα παραπροϊόντα αυτά αναγνωρίζονται, όλο και περισσότερο, ως μία ωφέλιμη, άφθονη και χαμηλού κόστους πηγή για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων, όπως οι φαινολικές ενώσεις (κυρίως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή). Έτσι, έχουν αναπτυχθεί και αναπτύσσονται ολοένα και νεότερες τεχνολογίες επεξεργασίας των παραπροϊόντων της βιομηχανίας αυτής. Η ανάκτηση των φαινολικών από τα παραπροϊόντα της αγρο-διατροφικής βιομηχανίας μπορεί να περιλαμβάνει, συνοπτικά, τέσσερα στάδια: 1) την εκχύλιση των φαινολικών από το στερεό υπόστρωμα, 2) την προ-επεξεργασία του εκχυλίσματος με μεμβράνες (membrane technologies), 3) τον επιλεκτικό διαχωρισμό μεμονωμένων συστατικών - στόχων και 4) την τελική επεξεργασία με λυοφιλίωση για την παραγωγή ξηρών κλασμάτων του εκχυλίσματος. [5]

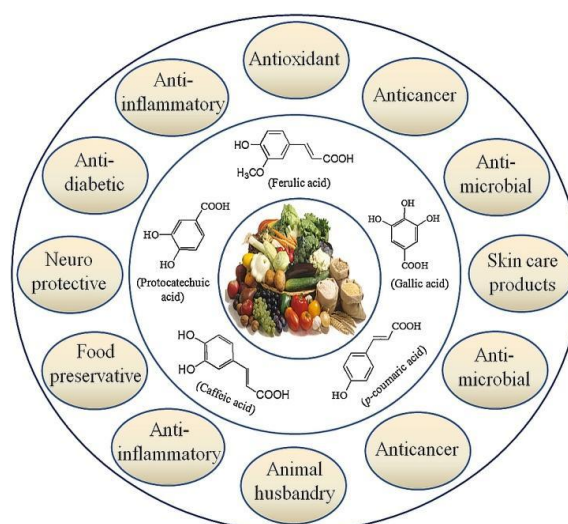
Οι φαινολικές ενώσεις που παραλαμβάνονται από τα διάφορα παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων μπορούν να βρουν διάφορες χρήσεις και εφαρμογές σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας, με σπουδαιότερη τη βιομηχανία τροφίμων, όπου μπορούν να επαναξιοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων (αντιοξειδωτικά, χρωστικές ουσίες, αρωματικοί παράγοντες, κ.α.). Μερικά παραδείγματα παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων από τα οποία μπορεί να γίνει παραλαβή των φαινολικών οξέων είναι οι πούλπες φρούτων (π.χ. σταφύλια, μήλα, διάφορα είδη μούρων), παραπροϊόντα

οινοποιίας (φλούδες σταφυλιών, σπόροι και κοτσάνια), παραπροϊόντα καφέ, πίτυρα δημητριακών και απόβλητα ελαιοτριβείων.[6,7]

3. Δράσεις φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν μελετηθεί διεξοδικά για τις βιοδραστικές τους ιδιότητες, αλλά και για τα πιθανά οφέλη τους στην υγεία των ανθρώπων. Πιστεύεται πως η δράση τους βασίζεται στην ικανότητά τους να δρουν κατά των ελεύθερων ριζών, και να προστατεύουν τα κύτταρα από οποιαδήποτε βλάβη προκαλούν οι ελεύθερες αυτές ρίζες. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές δράσεις, καθώς πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί σε δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιγηραντική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδης και αντιαλλεργική δράση, καθώς και δράση κατά του καρκίνου. Επιπλέον, συμβάλλουν τόσο στην αντιμετώπιση όσο και στην πρόληψη διάφορων νόσων, όπως ο διαβήτης, η νόσος Alzheimer και οι καρδιαγγειακές νόσοι. Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικότερα κάποιες από τις προαναφερθείσες βιοδραστικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων (Εικόνα 4). [3]

Μία από τις σημαντικότερες βιολογικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι φαινολικές ενώσεις προστατεύουν τα κύτταρα και τους ιστούς από το οξειδωτικό στρες, που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα κυτταρικά στοιχεία (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) και να οδηγήσουν σε διάφορες χρόνιες παθήσεις, όπως διάφορα είδη καρκίνου, καρδιαγγειακές παθήσεις ή και διαταραχές του νευρικού συστήματος. Επιπρόσθετα, οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν και αντιφλεγμονώδη δράση. Μπορούν να ρυθμίσουν και να μειώσουν την φλεγμονή στο σώμα, η οποία σχετίζεται με αρκετές ασθένειες, όπως οι αρθρίτιδες και η αλλεργική ρινίτιδα, καθώς και να βοηθήσουν στην ανακούφιση του πόνου και του οιδήματος. Αυτό συμβαίνει έπειτα από αναστολή φλεγμονογόνων μορίων και ενζύμων που προκαλούν φλεγμονή. Χαρακτηριστική είναι και η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών ενώσεων, η οποία τις καθιστά αποτελεσματικούς φυσικούς



Εικόνα 4: Βιοδραστικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων

Πηγή:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6734135>

αντιμικροβιακούς παράγοντες κατά των παθογόνων μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, διαθέτουν την ικανότητα να εμποδίζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό βακτηρίων, μυκήτων, ιών και άλλων μικροοργανισμών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να γίνεται χρήση των φαινολικών ενώσεων για την συντήρηση των τροφίμων, αλλά και στη φαρμακοβιομηχανία, καθώς και την ανάπτυξη καινοτόμων αντιμικροβιακών παραγόντων.[8]

Επίσης, πολλές φαινολικές ενώσεις έχουν μελετηθεί για τις πιθανές αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα, οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να βοηθούν τόσο στην πρόληψη, όσο και στη θεραπεία του καρκίνου. Όσον αφορά την πρόληψη του καρκίνου, τα φαινολικά φαίνεται να δρουν ως παράγοντες χημειοπροφύλαξης, δηλαδή προστατεύουν το DNA από βλάβες, αλλά και από το οξειδωτικό στρες. Αναφορικά με την θεραπεία του καρκίνου, οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, να επηρεάζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, και να καταστέλλουν την αγγειογένεση, δηλαδή τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων στους όγκους. Τέλος, αξίζει να αναφερθούν τα οφέλη των φαινολικών ενώσεων, και κυρίως των φλαβονοειδών, στην υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, έχουν την ικανότητα, μεταξύ άλλων, να βελτιώνουν την λειτουργία του ενδοθηλίου, να μειώνουν τις φλεγμονές στα αιμοφόρα αγγεία και να μειώνουν την αρτηριακή πίεση. [1,8,9]

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζονται ορισμένα φαινολικά οξέα και οι βιοδραστικές τους ιδιότητες.[10,11]

Πίνακας 3: Παραδείγματα φαινολικών οξέων και οι βιοδραστικές τους ιδιότητες.

Δράση	Φαινολικά Οξέα
<p align="center">Αντιμικροβιακή δράση</p>	<p>Γαλλικό οξύ: Παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και ιών. Έχει μελετηθεί για τις δυνατότητές του ως φυσικό συντηρητικό σε τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα.</p>
	<p>Καφεϊκό οξύ: Έχει αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε διάφορα βακτήρια και μύκητες. Έχει διερευνηθεί για το ρόλο του στην αναστολή της ανάπτυξης τροφιμογενών παθογόνων και ως πιθανή θεραπεία για διάφορες λοιμώξεις.</p>
	<p>Χλωρογενικό οξύ: Εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση έναντι πολλών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων στελεχών που είναι ανθεκτικά στα συμβατικά αντιβιοτικά. Έχει μελετηθεί για την πιθανή χρήση του στη συντήρηση τροφίμων και ως εναλλακτικός αντιμικροβιακός παράγοντας.</p>
	<p>Ροσμαρινικό οξύ: Έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια σε διάφορα βακτήρια, μύκητες και ιούς. Έχει διερευνηθεί για την πιθανή εφαρμογή του ως φυσικό συντηρητικό και ως θεραπευτικός παράγοντας στη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών.</p>
	<p>Φερουλικό οξύ: Παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι μιας σειράς μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και ιών. Έχει μελετηθεί για τις δυνατότητές του ως φυσικός αντιμικροβιακός παράγοντας στη συντήρηση τροφίμων και ως θεραπευτικός παράγοντας στη διαχείριση μικροβιακών λοιμώξεων.</p>
<p align="center">Αντικαρκινική δράση</p>	<p>Ελλαγικό οξύ: Έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και προκαλεί απόπτωση σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του πνεύμονα.</p>
	<p>Ροσμαρινικό οξύ: Έχει επιδείξει αντικαρκινικές επιδράσεις αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων,</p>

	<p>προκαλώντας απόπτωση και καταστέλλοντας τον σχηματισμό όγκων σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου και του ήπατος.</p> <p>Φερουλικό οξύ: Έχει μελετηθεί για τις πιθανές αντικαρκινικές του ιδιότητες και έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στην αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, την πρόκληση απόπτωσης και τη μείωση της ανάπτυξης όγκων σε καρκίνους, όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του ήπατος και του παχέος εντέρου.</p> <p>Κουρκουμίνη: Έχει μελετηθεί εκτενώς για την ικανότητά της να αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων, να προκαλεί απόπτωση και να αναστέλλει τον σχηματισμό όγκων και τη μετάσταση.</p>
<p>Αντιφλεγμονώδη δράση</p>	<p>Κουρκουμίνη: Έχει ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και έχει μελετηθεί εκτενώς για την ικανότητά της να αναστέλλει διάφορες φλεγμονώδεις οδούς και μεσολαβητές.</p> <p>Ροσμαρινικό οξύ: Επιδεικνύει αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια.</p> <p>Φερουλικό οξύ: Έχει επιδείξει αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα αναστέλλοντας φλεγμονώδεις μεσολαβητές και μονοπάτια, όπως ο NF-κB και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες.</p> <p>Γαλλικό οξύ: Διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας φλεγμονώδη ένζυμα όπως η κυκλοοξυγενάση (COX) και η λιποξυγενάση (LOX), καθώς και ρυθμίζοντας τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες.</p> <p>Χλωρογενικό οξύ: Επιδεικνύει αντιφλεγμονώδη δράση μειώνοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του NF-κB.</p> <p>Καφεϊκό οξύ: Εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες καταστέλλοντας τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, αναστέλλοντας τα ένζυμα COX και διαμορφώνοντας τη σηματοδότηση NF-κB.</p>

Αντιοξειδωτική δράση	Γαλλικό οξύ: Καθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες και βοηθά στην προστασία των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη.
	Καφεϊκό οξύ: Δρα ως αντιοξειδωτικό εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και αναστέλλοντας τις οδούς που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.
	Φερουλικό οξύ: Διαθέτει αντιοξειδωτική δράση με τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών, τη χηλικοποίηση μεταλλικών ιόντων και τη ρύθμιση της αντιοξειδωτικής ενζυμικής δραστηριότητας.
	Ροσμαρινικό οξύ: Παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και μειώνοντας το οξειδωτικό στρες.
	Χλωρογενικό οξύ: Λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό καθαρίζοντας τις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλοντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων και ρυθμίζοντας τα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα.
	Πρωτοκατεχουικό οξύ: Παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες και μειώνοντας την οξειδωτική βλάβη.

Συμπερασματικά, η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε φαινολικά θεωρείται ύψιστης σημασίας για την υγεία, αλλά και την ευεξία του ανθρώπινου οργανισμού. Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών και βιολογικών δράσεων, με πολλά οφέλη για την υγεία. Η παρουσία τους σε ποικίλα φυτά, και κατ'επέκταση σε τρόφιμα, έχει εγείρει το ενδιαφέρον των επιστημόνων και αποτελούν θέμα εκτενούς έρευνας όσον αφορά τις πιθανές θεραπευτικές τους ιδιότητες.

4. Τεχνικές εκχύλισης φαινολικών ενώσεων

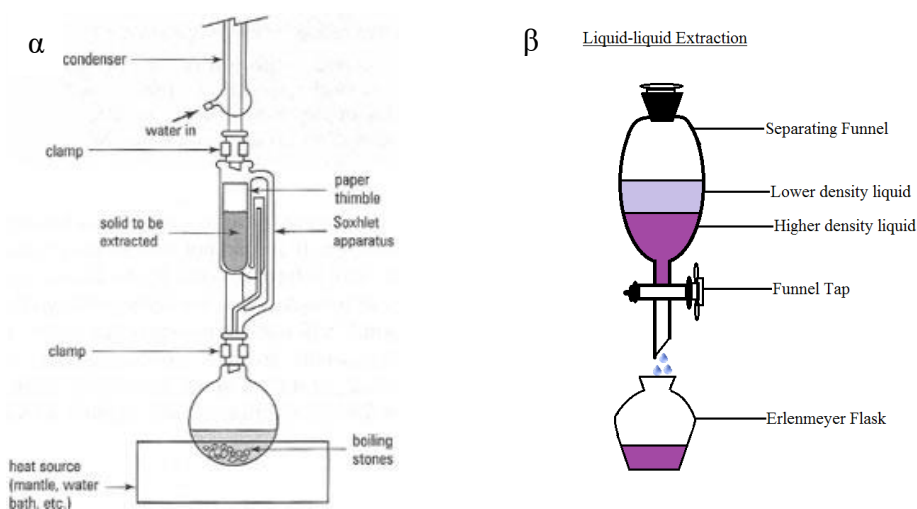
Όπως προαναφέρθηκε, οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν ενώσεις με τεράστιο ενδιαφέρον, οπότε η εκχύλισή τους κρίνεται ύψιστης σημασίας. Γενικότερα, η εκχύλιση είναι μία διαδικασία κατά την οποία ένα επιθυμητό συστατικό ή μία ουσία αφαιρείται επιλεκτικά από ένα μείγμα χρησιμοποιώντας έναν κατάλληλο διαλύτη. Είναι μία κοινή τεχνική που χρησιμοποιείται σε διάφορες επιστημονικές, βιομηχανικές και καθημερινές εφαρμογές για την απομόνωση και τον διαχωρισμό συγκεκριμένων ενώσεων ή ουσιών από σύνθετα υποστρώματα. Ο βασικός μηχανισμός εκχύλισης περιλαμβάνει τη μεταφορά μίας ένωσης ή ουσίας στόχου από μία φάση (συνήθως στερεά, υγρή ή αέρια) σε μία άλλη φάση (συνήθως υγρή) χρησιμοποιώντας έναν κατάλληλο διαλύτη. Η φάση που περιέχει την ένωση ή τις ενώσεις-στόχους μετά την εκχύλιση αναφέρεται συχνά ως "εκχύλισμα", ενώ η αρχική φάση αναφέρεται ως "δείγμα" ή "υπόστρωμα". Η θεμελιώδης αρχή στην οποία βασίζεται η εκχύλιση είναι η διαφορά στη διαλυτότητα ή τη συγγένεια της ένωσης στόχου στις δύο φάσεις.[12]

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η επιτυχία της διαδικασίας της εκχύλισης βασίζεται σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής του διαλύτη, της θερμοκρασίας, της πίεσης, της ενέργειας που πιθανά εφαρμόζεται, και των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων της ένωσης στόχου και του υποστρώματος (πχ. πτητικότητα ενώσεων). Η παραλαβή μπορεί να βελτιστοποιηθεί και να προσαρμοστεί στις συγκεκριμένες ανάγκες, όπως η μεγιστοποίηση της απόδοσης και η επίτευξη υψηλής καθαρότητας εκχυλίσματος.[12,13]

Στη σύγχρονη εποχή υπάρχει πληθώρα μεθόδων εκχύλισης, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως. Παρακάτω αναφέρονται μερικοί τρόποι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή των φαινολικών ενώσεων από διάφορες πηγές, όπως φυτικά υλικά, τρόφιμα ή ποτά.[13]

Εκχύλιση υγρού-υγρού ή στερεού-υγρού

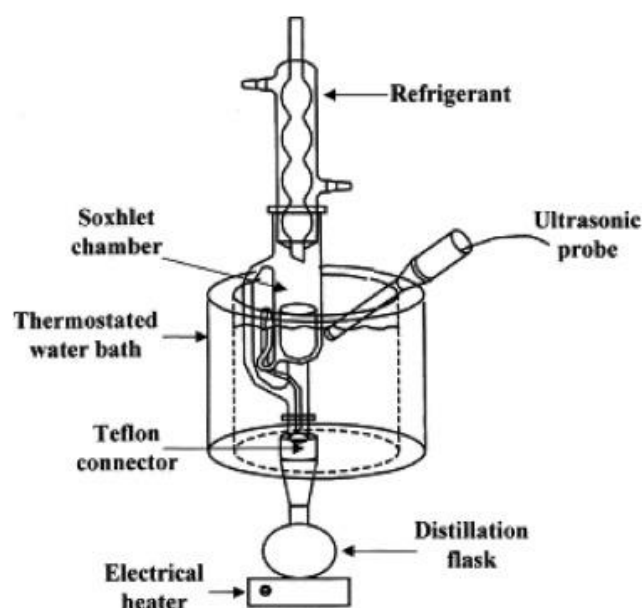
Η εκχύλιση με διαλύτες (Εικόνα 5) αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους εκχύλισης. Κατά τη διαδικασία αυτή, το δείγμα εμποτίζεται σε κατάλληλο διαλύτη, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη ή τα μείγματά τους με νερό, για παρατεταμένη περίοδο, επιτρέποντας στις φαινολικές ενώσεις να διαλυθούν. [14]



Εικόνα 5: α) Τεχνική εκχύλισης στερεού – υγρού, β) Τεχνική εκχύλισης υγρού – υγρού
Πηγή: <https://www.aurorabiomed.com/comparing-liquid-liquid-extraction-supported-liquid-extraction-and-solid-phase-extraction/>

Εκχύλιση Soxhlet

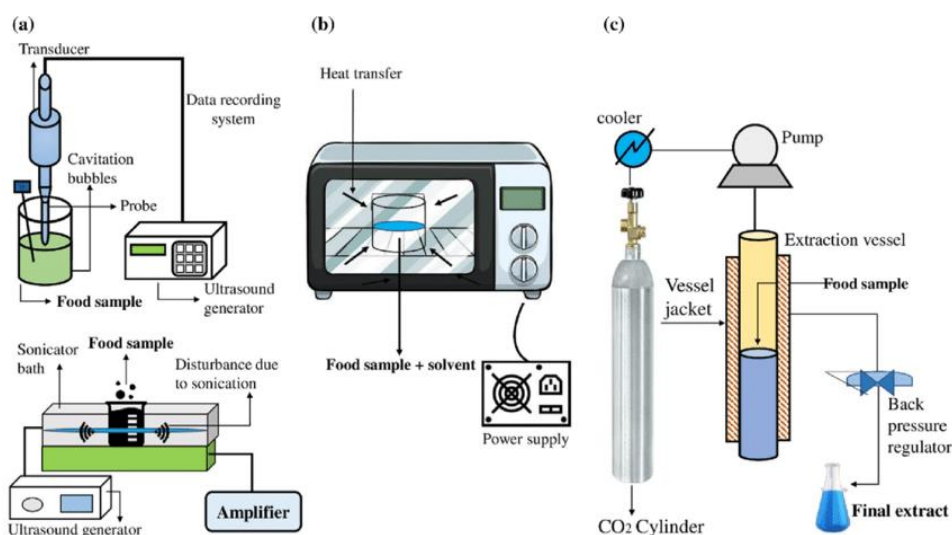
Άλλη μία μέθοδος παραλαβής φαινολικών ενώσεων είναι η εκχύλιση Soxhlet κατά την οποία το δείγμα τοποθετείται σε μία δακτυλήθρα μέσα σε έναν εκχυλιστή Soxhlet (Εικόνα 6) και ένας μη πτητικός διαλύτης όπως η αιθανόλη ή η μεθανόλη ανακυκλώνεται συνεχώς μέσω του στερεού υλικού για να εκχυλιστούν οι επιθυμητές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ενώσεων, χρησιμοποιώντας αναρροή. Η τεχνική εκχύλισης Soxhlet χρησιμοποιείται, συνήθως, για την εκχύλιση μη πτητικών ενώσεων, όπως τα φαινολικά οξέα, από στερεά δείγματα.[15]



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του Soxhlet.
Πηγή: https://biocyclopedia.com/index/chem_lab_methods/solidliquid_extraction.php

Εκχύλισης με υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction - UAE)

Στην εκχύλιση με υπερήχους (Εικόνα 7), χρησιμοποιείται διαλύτης ή μέσο εκχύλισης για τη διευκόλυνση της παραλαβής φαινολικών ενώσεων από το δείγμα. Η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από τη διαλυτότητα των ενώσεων-στόχων και τις ειδικές απαιτήσεις της ανάλυσης. Οι κοινοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνουν αιθανόλη, μεθανόλη, νερό ή μείγματα αυτών των διαλυτών. Κατά την εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων, ο διαλύτης προστίθεται στο υλικό του δείγματος και εφαρμόζονται κύματα υπερήχων. Τα κύματα αυτά δημιουργούν φυσαλίδες σπηλαίωσης που καταρρέουν, δημιουργώντας τοπικές αλλαγές πίεσης, κρουστικά κύματα και μικροροές, που διευκολύνουν την απελευθέρωση και την εξαγωγή φαινολικών ενώσεων από το υπόστρωμα. [13]



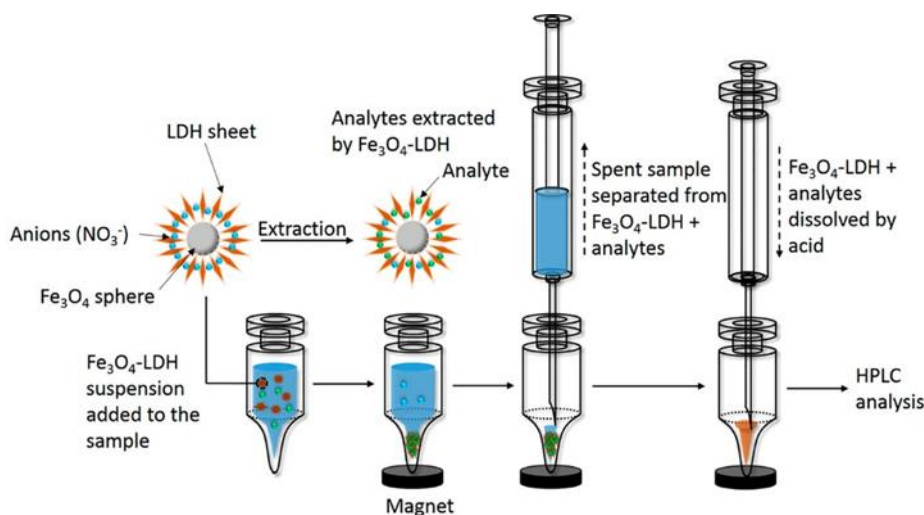
Εικόνα 7: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης με υπερήχους

Πηγή:

https://www.researchgate.net/publication/350151852_Techniques_and_modeling_of_polyphenol_extraction_from_food_a_review/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic

Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Extraction - SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Εικόνα 8) περιλαμβάνει τη χρήση προσροφητών στερεάς φάσης (π.χ. φυσίγγια ή δίσκους) για την επιλεκτική συγκράτηση των φαινολικών ενώσεων, ενώ απομακρύνονται οι παρεμβαλλόμενες ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις, στη συνέχεια, εκλύονται από τους προσροφητές χρησιμοποιώντας κατάλληλους διαλύτες.[16]

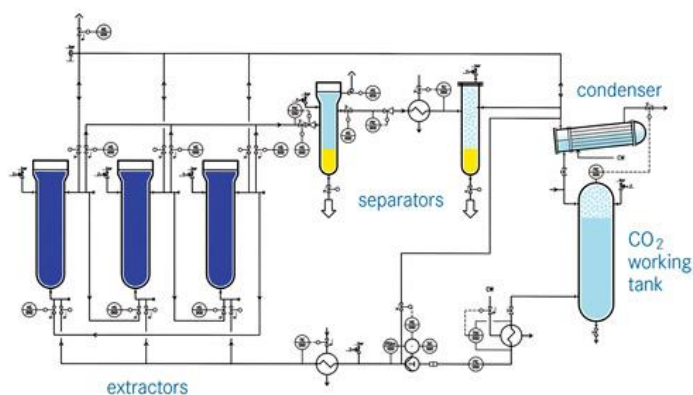


Εικόνα 8: Αυτοματοποιημένη εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση μικροσφαιρών διπλού υδροξειδίου με διαλυτό Fe₃O₄

Πηγή: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac503323e>

Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (Supercritical Fluid Extraction - SFE)

Η μέθοδος εκχύλισης SFE (Εικόνα 9) χρησιμοποιεί υπερκρίσιμα ρευστά, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, ως μέσο εκχύλισης. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης (κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση), το υπερκρίσιμο ρευστό εκχylίζει φαινολικές ενώσεις.

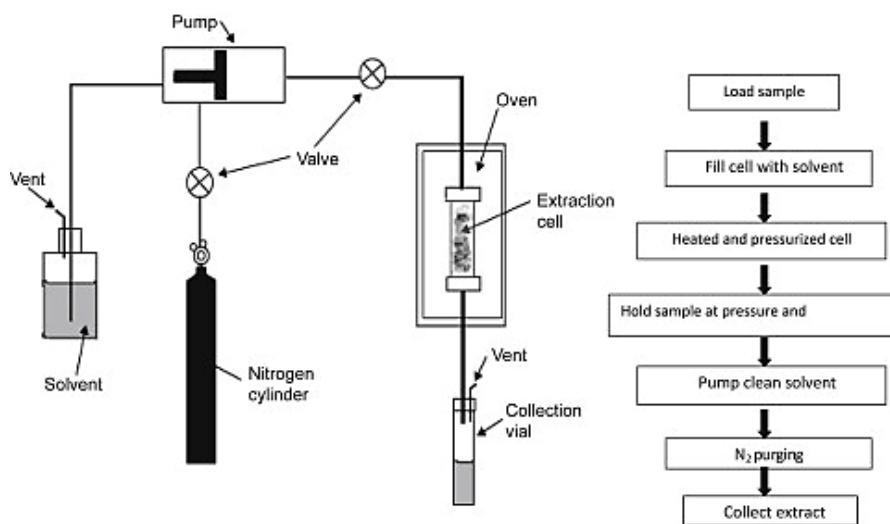


Εικόνα 9: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού

Πηγή: [IMPORTANCE-OF-SUPERCritical-FLUID-EXTRACTION-TECHNIQUES-IN-PHARMACEUTICAL-INDUSTRY-A-REVIEW.pdf](https://www.researchgate.net/publication/312111111-IMPORTANCE-OF-SUPERCritical-FLUID-EXTRACTION-TECHNIQUES-IN-PHARMACEUTICAL-INDUSTRY-A-REVIEW) (researchgate.net)

Εκχύλιση υγρού υπό πίεση (Pressurised Liquid Extraction - PLE)

Η μέθοδος εκχύλισης PLE (Εικόνα 10), επίσης γνωστή ως επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη, χρησιμοποιεί αυξημένη θερμοκρασία και πίεση για να ενισχύσει την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων. Περιλαμβάνει την κυκλοφορία ενός διαλύτη μέσω του δείγματος πολλαπλές επαναλαμβανόμενες φορές υπό ελεγχόμενες συνθήκες.[17]

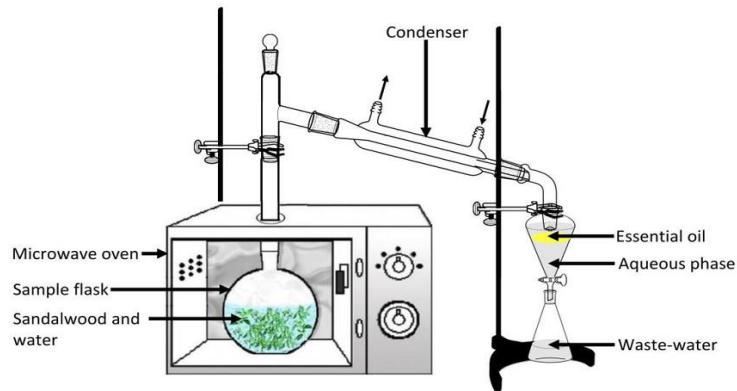


Εικόνα 10: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης υγρού υπό πίεση

Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128023259000069>

Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction - MAE)

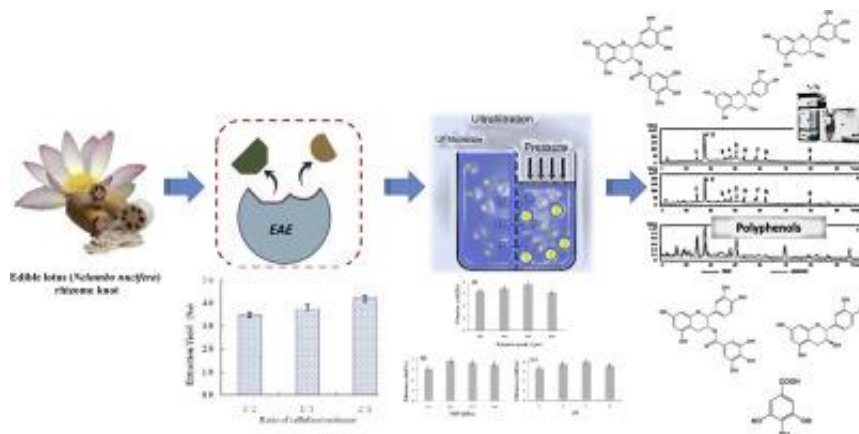
Η εκχύλιση με μικροκύματα (Εικόνα 11) είναι μια τεχνική προετοιμασίας δείγματος που χρησιμοποιεί ενέργεια μικροκυμάτων και βασίζεται στα φαινόμενα της διπολικής ροπής και της ιοντικής αγωγιμότητας, για να ενισχύσει την εκχύλιση στοχευμένων ενώσεων από στερεά ή ημιστερεά δείγματα, όπως φυτικά υλικά. Στην εκχύλιση με μικροκύματα, ο διαλύτης τυπικά επιλέγεται με βάση τη διαλυτότητα των στοχευόμενων ενώσεων, όπως οι φαινολικές ενώσεις. Οι κοινοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν αιθανόλη, μεθανόλη ή μείγματα νερού και οργανικών διαλυτών. Ο διαλύτης δρα ως το μέσο εκχύλισης που αλληλεπιδρά με το δείγμα για την παραλαβή των φαινολικών ενώσεων μέσω της εφαρμογής της ενέργειας μικροκυμάτων. [13,18]



Εικόνα 11: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης με μικροκύματα
 Πηγή: <https://www.semanticscholar.org/paper/Response-Surface-Methodology-for-Optimization-of-of-Kusuma-Mahjud/0ba797d112fd94a262f3755005687a76d8d175e0>

Εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων (Enzyme-Assisted Extraction - EAE)

Η μέθοδος της εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων (Εικόνα 12) περιλαμβάνει τη χρήση συγκεκριμένων ενζύμων, όπως οι κυτταρινάσες ή οι πηκτινάσες, για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την απελευθέρωση των φαινολικών ενώσεων. Αυτή η μέθοδος μπορεί να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές εκχύλισης για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης.[13,19]



Εικόνα 12: Μηχανισμός λειτουργίας εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων
 Πηγή: : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918304149>

Κάθε μέθοδος εκχύλισης έχει τα πλεονεκτήματα, αλλά και τους περιορισμούς της, και η επιλογή της εξαρτάται τόσο από το δείγμα, όσο και από τις συγκεκριμένες απαιτήσεις της μελέτης ή της εφαρμογής. Παράγοντες όπως η αποτελεσματικότητα εκχύλισης, η εκλεκτικότητα, η μήτρα του δείγματος και η επιθυμητή καθαρότητα των φαινολικών ενώσεων, ο χρόνος και άλλες συνθήκες εκχύλισης επηρεάζουν την επιλογή της μεθόδου εκχύλισης. Μετά την εκχύλιση, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση διάφορων αναλυτικών τεχνικών.[13,17]

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4), παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα, για κάθε μέθοδο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Στον πίνακα αυτό, φαίνονται η

μέθοδος εκχύλισης που εφαρμόσθηκαν, τα φυτά/υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και κάποια ενδεικτικά φαινορικά οξέα που εκχυλίστηκαν με την κάθε μέθοδο.[12,13]

Πίνακας 4: Μέθοδοι εκχύλισης φαινολικών ενώσεων και παραδείγματα εφαρμογής τους.

Μέθοδοι Εκχύλισης	Φυτικό Υπόστρωμα	Ενώσεις που εκχυλίστηκαν	Διαλύτης
Εκχύλιση με διαλύτες	Κατακάθι καφέ (χρησιμοποιημένο κατακάθι καφέ από κόκκους καφέ)	Χλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ	Μείγμα αιθανόλης-νερού
Εκχύλιση Soxhlet	Φλούδες λεμονιού (εξωτερικό στρώμα φρούτων λεμονιού)	Κιτρικό Οξύ	Νερό
Εκχύλιση με υπερήχους	Φύλλα δεντρολίβανου (φρέσκα & αποξηραμένα)	Ροσμαρινικό Οξύ	Αιθανόλη
Εκχύλιση στερεάς φάσης	Φύλλα πράσινου τσαγιού (αποξηραμένα και αλεσμένα)	Καφεϊκό οξύ	Ροφητικό SPE: C18 (οκταδεκυλοσιλάνιο) με βάση το πυρίτιο
Εκχύλιση με μικροκύματα	Αμπελόφυλλα (αποξηραμένα & αλεσμένα)	Γαλλικό Οξύ	Νερό
Εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων	Πίτουρο ρυζιού (υποπροϊόν άλεσης ρυζιού)	Φερουλικό Οξύ	Ένζυμο: Κυτταρίνη

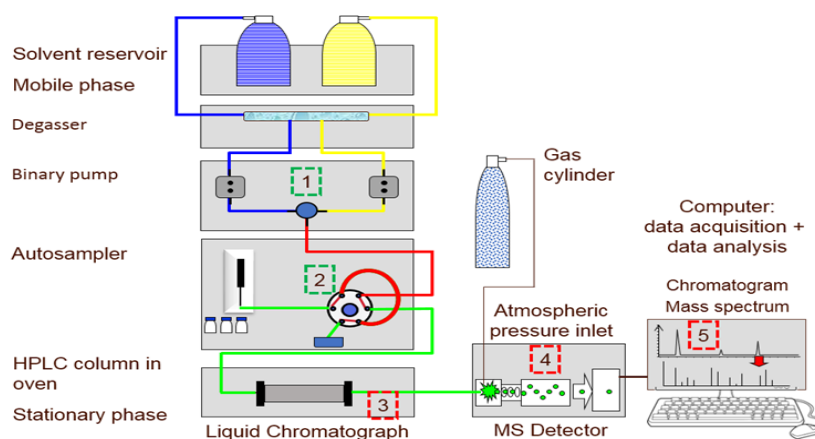
5. Τεχνικές ανάλυσης φαινολικών ενώσεων

Εδώ και πολλά χρόνια, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός αναλυτικών τεχνικών για την ανίχνευση, την ποσοτικοποίηση και την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από πλήθος παραγόντων, όπως η χημική φύση της ένωσης, το υπόστρωμα του δείγματος, η απαιτούμενη ευαισθησία, καθώς και ο εξοπλισμός που είναι διαθέσιμος. Μερικές από τις τεχνικές για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων, που θα αναφερθούν παρακάτω, είναι η φασματοφωτομετρία ορατού – υπεριώδους (Ultraviolet – Visible Spectrophotometry – UV-Vis), η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin – layer Chromatography - TLC), η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry - MS), η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography - GC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection - HPLC-PDA).[20]

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί μία από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους ανάλυσης των φαινολικών ενώσεων. Με τη χρήση της HPLC, οι φαινολικές ενώσεις χωρίζονται βάσει της δομής και των φυσικών τους ιδιοτήτων, και μετά μπορούν να ανιχνευθούν, αλλά και να ποσοτικοποιηθούν. Η ανάλυση γίνεται με τη χρήση μίας στήλης HPLC και μίας κινητής φάσης που περνά από τη στήλη και διαχωρίζει τις ενώσεις με βάση την χημική τους συγγένεια με την κινητή φάση. Η ανάλυση με τη μέθοδο HPLC περιλαμβάνει (αναφορικά) τα εξής βήματα:

1. Προετοιμασία του δείγματος: Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από το δείγμα και τη διάλυση τους σε κατάλληλο διαλύτη.
2. Προετοιμασία του συστήματος HPLC: Αυτή περιλαμβάνει την επιλογή της κατάλληλης οργανολογίας HPLC, του κατάλληλου συστήματος διαλυτών κινητής φάσης και του κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης (PDA, MS, κτλ).
3. Ρύθμιση του συστήματος HPLC: Αυτή περιλαμβάνει τη ρύθμιση της ροής του διαλύτη, τη θερμοκρασία της στήλης και την πίεση του συστήματος, καθώς και την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ανίχνευσης.
4. Εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα HPLC: Το δείγμα εισάγεται στο σύστημα με τη βοήθεια μια σύριγγας και μια βαλβίδας εισαγωγής δείγματος ή ενός αυτόματου δειγματολήπτη.

5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός των υπό ανάλυση ενώσεων: Το δείγμα διέρχεται από τη στήλη HPLC, που παράλληλα τη διαπερνά η κινητή φάση με σταθερή ροή. Η φάση αυτή περνά από τη στήλη, εκλούοντας σε διαφορετικούς χρόνους, ανάλογα με την πολικότητά τους, τις αναλυόμενες ενώσεις.
6. Ανίχνευση και ανάλυση: Κατά την έκλυση των ουσιών το αναλυτικό σήμα που προκύπτει καταγράφεται από έναν ανιχνευτή. Στη συνέχεια, οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τον ανιχνευτή επεξεργάζονται από έναν υπολογιστή και αποτυπώνονται υπό τη μορφή χρωματογραφήματος.[21]



Εικόνα 13: : Ένα απλοποιημένο σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), ενωμένο με φασματόμετρο μάζας (LC-MS), το οποίο αποτελείται από: (1) δυαδική αντλία για κινητή φάση, (2) βαλβίδα 6 θυρών αυτόματης δειγματοληψίας και θρόγχο έγχυσης, (3) θερμαντήρα, (4) ανιχνευτή, (5) ηλεκτρονικό υπολογιστή.

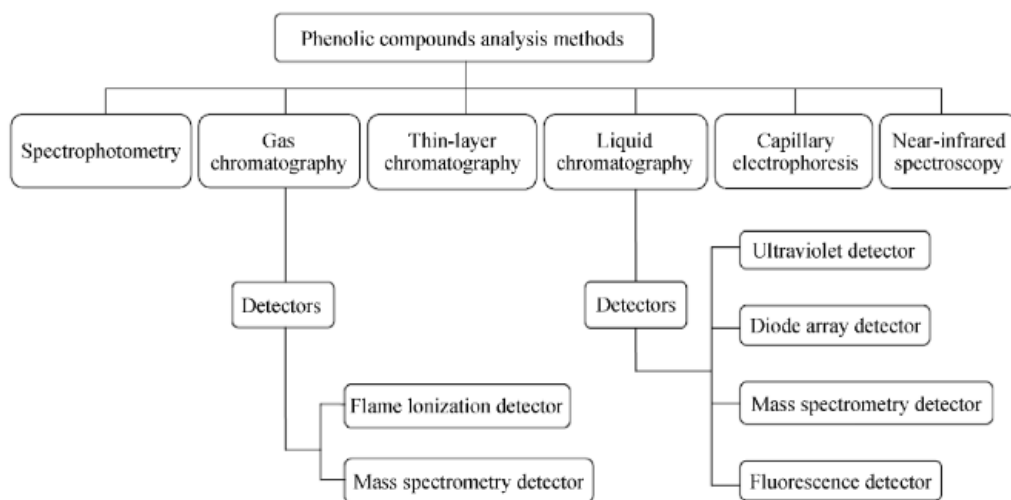
Πηγή: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/liquid-chromatography-including-hplc-uhplc-and-lcxl-344048>

Μία επιπλέον τεχνική ανάλυσης φαινολικών ενώσεων αποτελεί η φασματοφωτομετρία ορατού υπεριώδους (UV-Vis). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του φωτός από τις φαινολικές ενώσεις σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Η ανάλυση αυτή απαιτεί ένα φασματοφωτόμετρο που μπορεί να μετρήσει την απορρόφηση του φωτός σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Η απορρόφηση του φωτός από τις φαινολικές ενώσεις μπορεί να μετρηθεί σε διάφορα μήκη κύματος, ανάλογα με τις ιδιότητες απορρόφησης της κάθε φαινολικής ένωσης. Η τεχνική αυτή είναι γρήγορη, αξιόπιστη και απαιτεί μικρές ποσότητες δείγματος. Ωστόσο, δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση ανάμεσα σε διαφορετικούς τύπους φαινολικών ενώσεων, αλλά μόνο την ποσοτικοποίηση του συνόλου τους. Για αυτόν το λόγο, συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές ανάλυσης.[22]

Όσον αφορά την αέρια χρωματογραφία (GC), αποτελεί μία τεχνική ανάλυσης η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για πτητικές ή ημι-πτητικές φαινολικές ενώσεις. Περιλαμβάνει την εξάτμιση των ενώσεων, το διαχωρισμό τους σε μία τριχοειδή στήλη και την ανίχνευση με κατάλληλο ανιχνευτή, όπως για παράδειγμα ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) ή η φασματομετρία μάζας (MS). [9]

Τέλος, η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry) αποτελεί μία αποτελεσματική τεχνική για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων σε δείγματα. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη διάκριση των ενώσεων με βάση τη μάζα τους και τη διασπορά τους στον χώρο. Συνήθως, η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η υγρή και η αέρια χρωματογραφία, για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων (Εικόνα 13).[12]

Αυτές είναι μερικές από τις αναλυτικές μεθόδους (Εικόνα 14), (Πίνακας 5) που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων. Η επιλογή της κατάλληλης, κάθε φορά, μεθόδου εξαρτάται από τις ειδικές απαιτήσεις της ανάλυσης, όπως για παράδειγμα η ιδιαιτερότητα της προς ανάλυσης ένωσης, η ευαισθησία, η ακρίβεια, αλλά και ο διαθέσιμος εξοπλισμός.[12] Στο πειραματικό μέρος θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).



Εικόνα 14: : Μέθοδοι ανάλυσης των φαινολικών ενώσεων

Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875536417301036>

Πίνακας 5: Τεχνικές ανάλυσης φαινολικών οξέων και μερικά παραδείγματα

Τεχνικές Ανάλυσης	Φυτικό Υπόστρωμα	Φαινολικά Οξέα
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	Μούρα σταφυλιού (φρέσκα ή κατεψυγμένα)	Γαλλικό οξύ, Καφεϊκό οξύ, π-Κουμαρικό οξύ
Φασματοσκοπία υπεριώδους φάσματος (UV-Vis)	Φύλλα τσαγιού (αποξηραμένα και αλεσμένα)	Κατεχίνες, Επικατεχίνες
Αέρια Χρωματογραφία GC-FID	Άνθη Λεβάντας	Συστατικά αιθέριων ελαίων (π.χ. λιναλοόλη, οξικός λιναλυλεστέρας)
Φασματομετρία μάζας (LC-MS)	Μύρτιλλα (φρέσκα ή κατεψυγμένα)	Χλωρογενικό οξύ, Καφεϊκό οξύ

6. Βιομηχανικές εφαρμογές των φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας, όπως η βιομηχανία τροφίμων και συσκευασίας αυτών, η βιομηχανία φαρμάκων ή η βιομηχανία καλλυντικών. Η αξιοποίησή τους στηρίζεται κυρίως στις βιοδραστικές τους ιδιότητες, όπως για παράδειγμα η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους δράση (Εικόνα 15).[23]

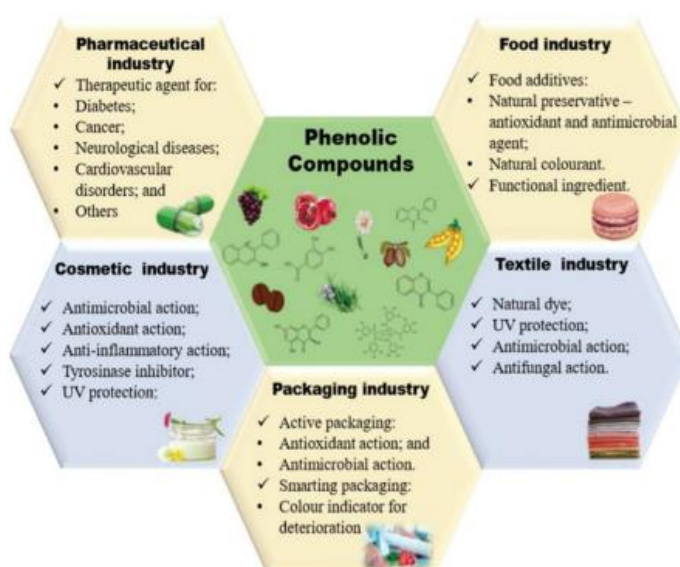
Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότεροι καταναλωτές δίνουν έμφαση τόσο στην διατροφική αξία, όσο και στην προέλευση των προϊόντων που καταναλώνουν. Έτσι, έχουν την απαίτηση να χρησιμοποιούνται φυσικά συστατικά για την παρασκευή των τροφίμων. Ακόμη, στη βιομηχανία τροφίμων, εξαιτίας ορισμένων περιορισμών για τη χρήση τεχνητών προσθέτων στα τρόφιμα, αναζητούνται εναλλακτικές λύσεις, που θα αντικαταστήσουν τα τεχνητά πρόσθετα. Οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να αποτελούν την κατάλληλη εναλλακτική λύση στα παραπάνω προβλήματα, μιας και παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Έτσι, τα φαινολικά οξέα βρίσκουν εφαρμογή ως φυσικά αντιοξειδωτικά και στοχεύουν στην επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των προϊόντων, στην αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων και τη διατήρηση της ποιότητας των προϊόντων. Ακόμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φυσικά συντηρητικά, καθώς έχουν την ικανότητα να αναστείλουν την ανάπτυξη βακτηρίων, μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών, αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής, προλαμβάνοντας αλλοιώσεις και εξασφαλίζοντας την ασφάλεια των προϊόντων. Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις βρίσκουν εφαρμογή σε επεξεργασμένα τρόφιμα, έχοντας ως στόχο να εμπλουτίσουν τις λειτουργικές ιδιότητες των τροφίμων και να προσφέρουν στους καταναλωτές πιθανά οφέλη για την υγεία τους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται ως λειτουργικά συστατικά για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων, συμπληρωμάτων διατροφής και διατροφοδραστικών προϊόντων (nutraceuticals), που στόχο έχουν να προσφέρουν οφέλη στην υγεία των ανθρώπων. Επιπρόσθετα, οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία, για την ενίσχυση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και του χρώματος των τροφίμων. Οι φαινολικές ενώσεις συνεισφέρουν τόσο στη γεύση, όσο και στο άρωμα διαφόρων τροφίμων και ποτών και βοηθούν τόσο στην ενίσχυση, όσο και στην πρόληψη της υποβάθμισης του χρώματος.[23]

Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί πως τα φαινολικά βρίσκουν εφαρμογή στις ενεργές και τις βρώσιμες συσκευασίες των τροφίμων. Οι ενεργές συσκευασίες έχουν ως κύρια

λειτουργία τους την αυξημένη προστασία του τροφίμου, ενώ οι βρώσιμες συσκευασίες διαθέτουν πλήθος λειτουργιών, μία από τις οποίες είναι η χρήση τους ως φορείς για τα διάφορα πρόσθετα τροφίμων. Έτσι, οι φαινολικές ενώσεις, που διαθέτουν αντιοξειδωτικές ή/και αντιμικροβιακές ιδιότητες, μπορούν να ενσωματωθούν είτε στα πολυμερή από τα οποία κατασκευάζονται οι προαναφερθείσες συσκευασίες, είτε στους φορείς που επικαλύπτουν τα υλικά συσκευασίας, προκειμένου να ωφελήσουν το συσκευασμένο τρόφιμο.[23]

Όπως στη βιομηχανία τροφίμων, έτσι και στη βιομηχανία καλλυντικών, γίνεται χρήση των φυσικών πρόσθετων ως εναλλακτικές των τεχνητών. Έχει αποδειχθεί πως οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδραστικά συστατικά σε καλλυντικά προϊόντα. Μία από τις χρήσεις τους είναι αυτή σε προϊόντα με αντηλιακή προστασία, καθώς έχουν την ικανότητα να απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία, εξαιτίας της ύπαρξης χρωμοφόρων ομάδων στη δομή τους, και έτσι αποφεύγεται η εισχώρηση της ηλιακής ακτινοβολίας στο δέρμα.[23]

Αν και οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να παρουσιάζουν αρκετές προοπτικές για χρήση σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας τροφίμων, αλλά και καλλυντικών, πρέπει πρώτα να αντιμετωπιστούν κάποια εμπόδια, όπως για παράδειγμα η ευαισθησία των ενώσεων αυτών στη θερμότητα και στο φως, η οποία οδηγεί στην απώλεια της βιοδραστικότητάς τους, ή η μελέτη και διερεύνηση της πιθανής τοξικότητάς τους και της ασφάλειάς τους.[23]



Εικόνα 15: Βιομηχανικές εφαρμογές των φαινολικών ενώσεων

Πηγή:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/fo/d0fo02324h/unauth>

7. Τρόποι ενσωμάτωσης φαινολικών ενώσεων σε προϊόντα

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν πολύ ευαίσθητες ενώσεις τόσο στο φως όσο και στη θερμότητα, κάτι που τις καθιστά ασταθείς κατά την επεξεργασία, τη διανομή και την αποθήκευση των τροφίμων. Η μη σταθερότητά τους αυτή μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την δραστηριότητα τους, καθώς και τα πιθανά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου, κατά την πέψη. Ακόμη, μεγάλος αριθμός φαινολικών ενώσεων, όταν βρίσκονται στην ελεύθερη μορφή τους, παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα στο νερό, με αποτέλεσμα οι ενώσεις αυτές να παρουσιάζουν «φτωχή» βιοδιαθεσιμότητα. Τέλος, πολλές από τις φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν δυσάρεστη γεύση (στυφή και πικρή), η οποία πρέπει να καλυφθεί πριν την ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα.[24,25]

Στη βιομηχανία τροφίμων η ενθυλάκωση αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αποτελεσματικότερη ενσωμάτωση των βιοδραστικών ενώσεων στα τρόφιμα, προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα. Ως ενθυλάκωση ορίζεται η μέθοδος κατά την οποία ένα βιοδραστικό μόριο εγκλείεται μέσα σε μία άλλη φυσική δομή, η οποία ονομάζεται φορέας και η οποία είναι μη αναμείξιμη, και μπορεί να είναι στερεή ή ρευστή. Υπάρχουν δύο τύποι ενθυλάκωσης, η μικρο-ενθυλάκωση και η νανο-ενθυλάκωση, ανάλογα το μέγεθος του φορέα. Γενικά, υπάρχουν διαθέσιμες πολλές μέθοδοι ενθυλάκωσης και τα ενθυλακωμένα προϊόντα βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων, αλλά και καλλυντικών. Οι διάφορες μέθοδοι ενθυλάκωσης κατατάσσονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) στις χημικές μεθόδους (π.χ. διεπιφανειακός πολυμερισμός), β) στις φυσικοχημικές μεθόδους (π.χ. γαλακτωματοποίηση) και γ) στις φυσικο-μηχανικές μεθόδους (π.χ. ξήρανση με ψεκασμό, ξήρανση με κατάψυξη, ψύξη με ψεκασμό, εξώθηση). Η μέθοδος της ενθυλάκωσης που θα χρησιμοποιηθεί επιλέγεται τόσο βάσει της φύσης του εγκλεισμένου βιοδραστικού μορίου, όσο και βάσει της φύσης του υλικού-φορέα (μέγεθος, πάχος, διαλυτότητα, διαπερατότητα και ποσοστό αποδέσμευσης εγκλεισμένου μορίου).[24,26]

Όσον αφορά τα υλικά ενθυλάκωσης, τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ως υλικά – φορείς αποτελούν οι πολυσακχαρίτες, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Η επιλογή του κατάλληλου φορέα βασίζεται στις επιθυμητές ιδιότητες του τελικού προϊόντος, καθώς έχει βρεθεί πως η σύνθεση του υλικού – φορέα δεν επηρεάζει μόνο την αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης, αλλά φαίνεται να επηρεάζει και τις τελικές ιδιότητες του προϊόντος. Οι πιο κοινοί φορείς ενθυλάκωσης είναι οι πολυσακχαρίτες,

οι οποίοι παραλαμβάνονται από πληθώρα πηγών, και είναι βιοδιασπώμενοι, βιοσυμβατοί και μη τοξικοί. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι πολυσακχαρίτες είναι το άμυλο, η πηκτίνη και η χιτοζάνη. Από τις πρωτεΐνες ευρεία χρήση βρίσκουν η ζελατίνη, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος και η ζεΐνη του αραβοσίτου, ενώ από τα λιπίδια συχνή χρήση βρίσκει το φωσφολιπίδιο λεκιθίνη. Μερικές φορές, μπορεί να υπάρξει συνδυασμός δύο ή περισσότερων φορέων, έτσι ώστε να βελτιωθούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του συστήματος.[26]

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6) παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα ενθυλάκωσης φαινολικών ενώσεων, οι οποίες έχουν προέλθει από διάφορα παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, ο φορέας και η μέθοδος ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκε, τα προϊόντα που παρήχθησαν, καθώς και η δράση τους στο νέο προϊόν.[6]

Πίνακας 6: Παραδείγματα ενθυλάκωσης φαινολικών ενώσεων

Παραπροϊόν	Φορέας ενθυλάκωσης	Μέθοδος ενθυλάκωσης	Προϊόν τροφίμου	Βιοδραστικότητα
Πούλπα παντζαριών	Πρωτεΐνη σόγιας	Ξήρανση με ψύξη	Ψευτοδημητριακά	Αντιοξειδωτική δράση
Φλούδες μελιτζάνας	Μαλτοδεξτρίνη/Αραβικό κόμμι	Ξήρανση με ψεκάσμο	Καραμέλες	Αντιοξειδωτική δράση
Κέλυφος κακάο	Μαλτοδεξτρίνη/Αραβικό κόμμι	Ξήρανση με ψεκάσμο	Μπισκότα	Αντιοξειδωτική δράση
Φλούδες σταφυλιών	Μαλτοδεξτρίνη	Ξήρανση με ψεκάσμο	Πουρές μήλων	Αντιοξειδωτική δράση
Κουκούτσια σταφυλιών	Χιτοζάνη	Ιοντική ζελατινοποίηση	Βιοδιασπώμενες μεμβράνες τροφίμων	Αντιοξειδωτική δράση
	Συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος	Ξήρανση με ψεκάσμο	Γιαούρτι	Αντιοξειδωτική δράση
Φλούδες και σπόροι Jaboticaba	Αλγινικό νάτριο / Χιτοζάνη	Ιοντική ζελατινοποίηση	Μπισκότα με άμυλο Cassava	Αντιοξειδωτική δράση
Φλούδες ροδιού	Μαλτοδεξτρίνη	Ξήρανση με ψεκάσμο	Παγωτό	Αντιοξειδωτική δράση / Αναστολή α-γλυκοζιδάσης
Πούλπα κερασιών	Απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος	Ξήρανση με ψύξη	Μπισκότα	Αντιοξειδωτική δράση

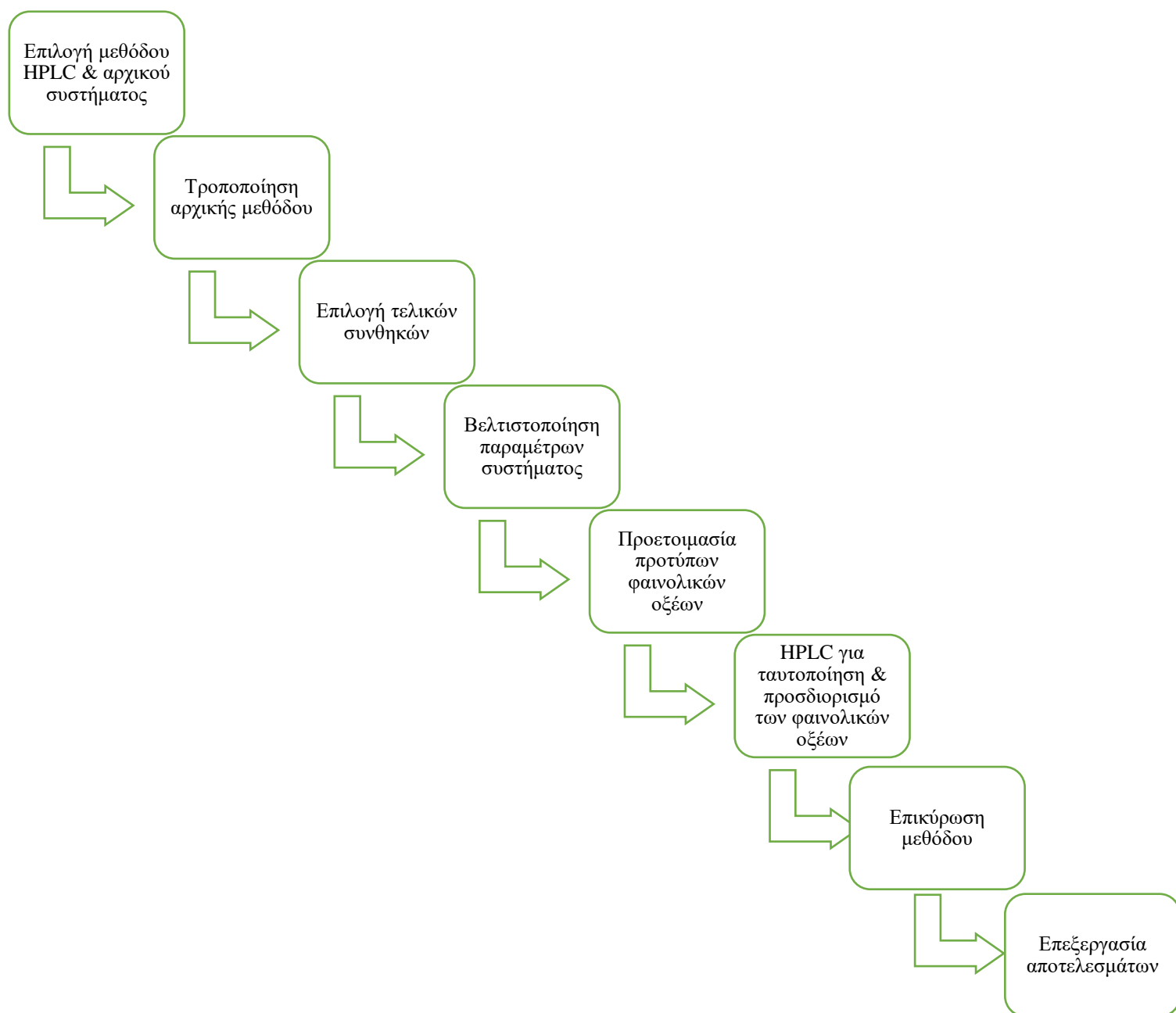
ΣΚΟΠΟΣ

Ο πρωταρχικός στόχος αυτής της μελέτης είναι η ανάπτυξη, η επικύρωση και εφαρμογή μίας μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) συζευγμένης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (photodiode array, PDA) για την ταυτοποίηση και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 15 φαινολικών οξέων σε φυτικά εκχυλίσματα. Η μέθοδος επικεντρώθηκε στον ικανοποιητικό διαχωρισμό φαινολικών οξέων, ακολουθούμενο από την ποσοτικοποίηση τους με κατασκευή καμπυλών αναφοράς με χρήση πρότυπων ενώσεων. Αρχικά, έλαβε χώρα η ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου με κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών χρωματογραφίας (σύσταση κινητής φάσης, ροή διαλύτη, πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης). Στη συνέχεια, ακολούθησε η επικύρωση της μεθόδου με τον προσδιορισμό της γραμμικότητας, της πιστότητας και της ακρίβειας της μεθόδου που αναπτύχθηκε. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, καθώς και η σταθερότητα των διαλυμάτων παρακαταθήκης των φαινολικών οξέων. Τέλος, η επικυρωμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των μελετούμενων φαινολικών οξέων σε εκχυλίσματα ξανθού καφέ, μαύρου καφέ, ντεκαφεϊνέ, καφέ με μαστίχα, αλλά και εκχύλισμα φράουλας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Διάγραμμα ροής

Στο διάγραμμα ροής που ακολουθεί (Διάγραμμα 1) παρουσιάζεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε. Η προετοιμασία των προτύπων, καθώς και οι αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) εκπονήθηκαν στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

2. Αναλώσιμα και οργανολογία

2.1. Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες

Για τις αναλύσεις HPLC χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (HPLC grade), η οποία αγοράστηκε από την εταιρεία Chem-Lab NV (Zedelgem, Belgium), νερό (HPLC grade), το οποίο αγοράστηκε από την εταιρεία Fischer-Scientific (Loughborough, UK) και οξικό οξύ (acetic acid for HPLC), καθαρότητας HPLC. Οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Πρότυπες ουσίες

ΠΡΟΤΥΠΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ
Γαλλικό οξύ (Gallic acid)
Πρωτοκατεχικό οξύ (Protocatechuic acid)
Γεντισικό οξύ (Gentisic acid)
4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ (4-Hydroxybenzoic acid)
Χλωρογενικό οξύ (Chlorogenic acid)
Καφεϊκό οξύ (Caffeic acid)
Συριγικό οξύ (Syringic acid)
Φερουλικό οξύ (Ferulic acid)
Κινναμικό οξύ (Cinnamic acid)
m-Κουμαρικό οξύ (m-Coumaric acid)
Σαλικυλικό οξύ (Salicylic acid)
o-Κουμαρικό οξύ (o-Coumaric acid)
Ροσμαρινικό οξύ (Rosmarinic acid)
Βενζοϊκό οξύ (Benzoic acid)
Βανιλλικό οξύ (Vanillic acid)

2.2.Συσκευές και επιστημονικά όργανα

Για την ζύγιση των πρότυπων ουσιών χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια στο πέμπτο δεκαδικό ψηφίο του γραμμαρίου της εταιρίας KERN.

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση αποτελείται από την αντλία LC-20AD, τον απαερωτή DGU-20A3, έναν ανιχνευτή στο υπεριώδες – ορατό (Ultraviolet – Visible) SPD-20, έναν ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode Array detector – PDA) και μία στήλη διαχωρισμού Supelco C – 18 (Sigma – Aldrich, Missouri, USA) με εσωτερική διάμετρο 25 mm x 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm. Η δειγματοληψία έγινε με τη χρήση μικρο - σύριγγας (100 micro) (Hamilton, Nevada, USA).

Η ανάπτυξη της μεθόδου έγινε στο λογισμικό LC Solutions το οποίο αποτελείται από τέσσερις εφαρμογές: LC Real Time Analysis, LC Postrun Analysis, LC Analysis Editor και LC Browser. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel.

3. Προκατεργασία δειγμάτων για ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων φαινολικών οξέων συγκεκριμένη ποσότητα στερεάς ουσίας διαλύθηκε σε 1mL μεθανόλης ώστε να παραληφθούν διαλύματα συγκέντρωσης με εύρος τιμών από 1000 mg/L έως 75000 mg/L. Σε κάθε πρότυπο διάλυμα φαινολικού οξέος προστέθηκε μικρή ποσότητα οξικού οξέος ίση με 1% v/v, έτσι ώστε να βελτιωθούν ορισμένοι παράμετροι της ανάλυσης, όπως η διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου. Τα πρότυπα αυτά διαλύματα θεωρήθηκαν ως διαλύματα παρακαταθήκης (stock).

Μετά από υπολογισμούς, προσδιορίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των αρχικών διαλυμάτων (stocks) των φαινολικών οξέων, που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης των φαινολικών οξέων. Παρασκευάστηκαν οχτώ (8) διαφορετικά διαλύματα φαινολικών οξέων με συγκεντρώσεις 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L και 200 mg/L. Τα διαλύματα αυτά περιείχαν τα εξής φαινολικά οξέα: γαλλικό, γεντισικό, πρωτοκατεχικό, 4-υδροξυβενζοϊκό, καφεϊκό, χλωρογενικό, συριγικό, φερουλικό, m-κουμαρικό, κινναμικό, σαλικυλικό, ροσμαρινικό και ο-κουμαρικό οξύ. Ξεχωριστά διαλύματα παρασκευάστηκαν για τα φαινολικά οξέα βανιλικό και βενζοϊκό, με τις ίδιες τελικές συγκεντρώσεις. Αξίζει να σημειωθεί πως οι συγκεντρώσεις του βενζοϊκού οξέος στα διαλύματα που παρασκευάστηκαν ήταν διαφορετικές και μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις των λοιπών φαινολικών οξέων (100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L, 700 mg/L και 800 mg/L).

Τέλος, έγινε προετοιμασία των τυφλών δειγμάτων, τα οποία περιείχαν μόνο μεθανόλη, έτσι ώστε να πραγματοποιείται καθαρισμός της στήλης, να εντοπίζονται τυχόν φαινόμενα carry-over μεταξύ των δειγμάτων, καθώς και για την σταθερότητα και ορθή λειτουργία του χρωματογραφικού συστήματος.

4. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού φαινολικών οξέων με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελεί μία μέθοδο η οποία βρίσκει ευρεία εφαρμογή προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση διάφορων ενώσεων σε ένα μείγμα. Η μέθοδος HPLC μπορεί να είναι κανονικής φάσης (Normal Phase, NP) ή αντίστροφης φάσης (Reversed Phase, RP). Κατά την μέθοδο HPLC κανονικής φάσης, γίνεται χρήση πολικής στατικής φάσης και μη πολικής κινητής φάσης. Έτσι, όσο πιο πολικοί είναι οι αναλυτές (analytes) ή προσδιοριζόμενες ενώσεις, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η συγκράτηση στη στατική φάση, ενώ όσο πιο υδρόφιλοι είναι (οι αναλυτές), τόσο περισσότερο θα «προτιμούν» την κινητή φάση. Όσον αφορά την μέθοδο HPLC αντίστροφης φάσης, γίνεται χρήση μη πολικής στατικής φάσης και αρκετά πολικής κινητής φάσης. Έτσι, όσο λιγότερο πολικοί είναι οι αναλυτές, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η συγκράτησή τους στην στατική φάση, ενώ όσο πιο πολικοί είναι, τόσο περισσότερο θα «προτιμούν» την κινητή φάση. Για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων ευρέως χρησιμοποιούμενη και προτιμώμενη είναι η μέθοδος HPLC αντίστροφης φάσης (RP). Επίσης, η έκλυση των ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με βαθμιδωτή (gradient elusion), είτε με ισοκρατική (isocratic elusion) έκλυση. Κατά τη βαθμιδωτή έκλυση, η συγκέντρωση της κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού, ενώ κατά την ισοκρατική έκλυση η συγκέντρωση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.[27,28]

Ο διαχωρισμός των φαινολικών οξέων διεξήχθη με στήλη αντίστροφης φάσης (Reversed phase, RP). Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης συνίσταται από διαλύτη A [νερό – και 2% (v/v) οξικό οξύ] και διαλύτη B [μεθανόλη – 2% (v/v) οξικό οξύ]. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 mL/min και το πρόγραμμα για τη βαθμιδωτή έκλυση ήταν αρχικά 5% B, γραμμική βαθμίδωση 5-40% B για 45 λεπτά και γραμμική βαθμίδωση 40-5% B για 5 λεπτά. Η βαθμίδωση παρέμεινε σταθερή 3 λεπτά στις αρχικές συνθήκες (5% B) για εξισορρόπηση της στήλης πριν την επόμενη ανάλυση. Ο όγκος των δειγμάτων, αλλά και του «τυφλού» (blank) ήταν 20 μ L, ενώ η θερμοκρασία της στήλης παρέμεινε στους 25 °C.

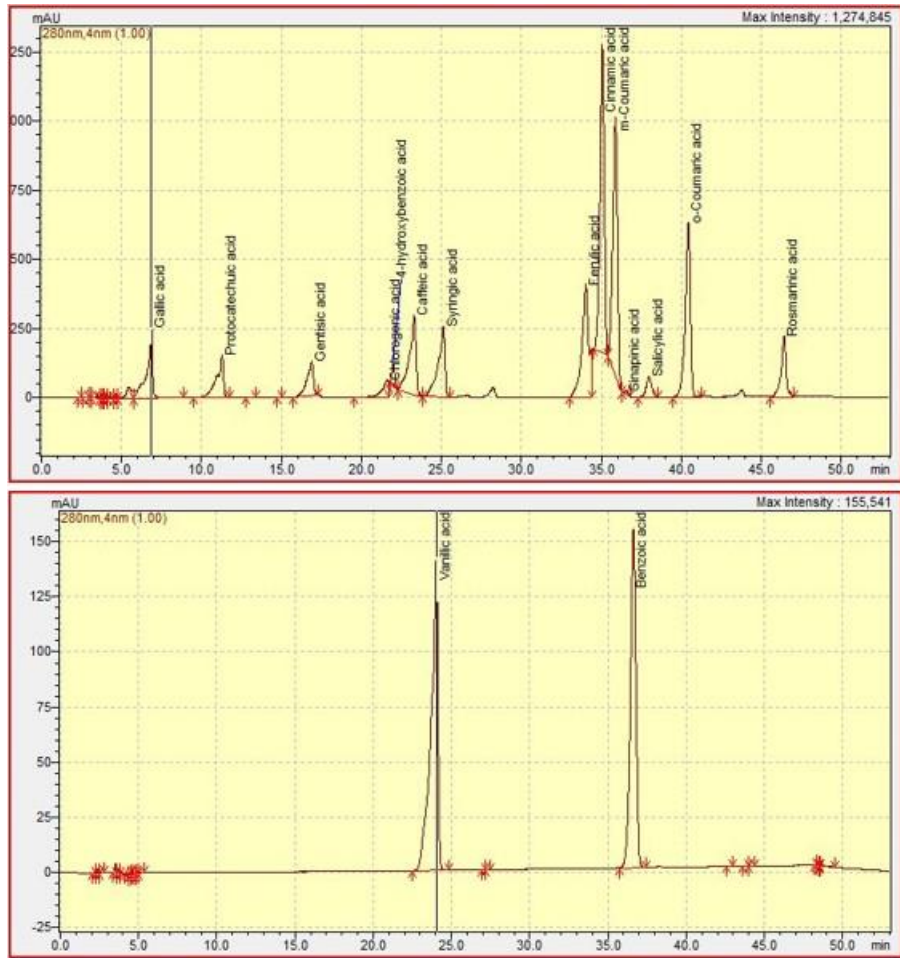
Τα μήκη κύματος που μελετήθηκαν ήταν τα εξής: 210 nm, 230 nm, 254 nm, 265 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nm και 365 nm. Το βέλτιστο μήκος κύματος όπου έγινε ο προσδιορισμός των φαινολικών οξέων ήταν τα 280 nm.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας (Εικόνα 16) με τα προς μελέτη φαινολικά οξέα, το βέλτιστο μήκος κύματος στο οποίο πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός και ο χρόνος έκλουσής τους (Retention Time - RT) σε λεπτά. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα (Εικόνα 17) που προέκυψαν από την ανάλυση των φαινολικών οξέων.

ID#	Name	Type	Channel	Ret. Time
1	Gallic acid	Target	Ch3 280nm	6.869
2	Protocatechuic a	Target	Ch3 280nm	11.281
3	Gentisic acid	Target	Ch3 280nm	16.886
4	4-hydroxybenzoi	Target	Ch3 280nm	21.982
5	Chlorogenic acid	Target	Ch3 280nm	21.583
6	Caffeic acid	Target	Ch3 280nm	23.289
7	Syringic acid	Target	Ch3 280nm	25.111
8	Ferulic acid	Target	Ch3 280nm	34.022
9	Cinnamic acid	Target	Ch3 280nm	35.047
10	m-Coumaric acid	Target	Ch3 280nm	35.875
11	Sinapinic acid	Target	Ch3 280nm	36.541
12	Salicylic acid	Target	Ch3 280nm	37.961
13	o-Coumaric acid	Target	Ch3 280nm	40.430
14	Rosmarinic acid	Target	Ch3 280nm	46.420

ID#	Name	Type	Channel	Ret. Time
1	Vanillic acid	Target	Ch3 280nm	24.000
2	Benzoic acid	Target	Ch3 280nm	35.600

Εικόνα 16: Φαινολικά οξέα που μελετήθηκαν, το βέλτιστο μήκος κύματος όπου έγινε ο προσδιορισμός (280 nm) και ο χρόνος έκλουσής τους (Ret. Time) σε λεπτά



Εικόνα 17: Χρωματογραφήματα των φαινολικών οξέων, που μελετήθηκαν, στο βέλτιστο μήκος κύματος (280nm)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

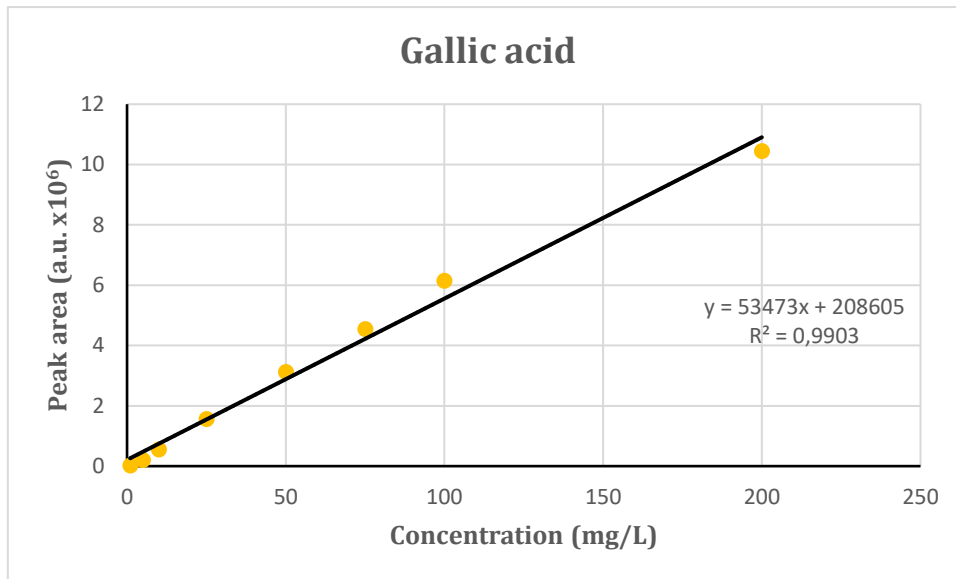
Η αναλυτική μέθοδος, που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, επικυρώθηκε με τον προσδιορισμό των εξής παραμέτρων: γραμμικότητα, πιστότητα και ακρίβεια. Αξίζει να αναφερθεί πως η πιστότητα διαθέτει δύο υποκατηγορίες, την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα. Επίσης, προσδιορίστηκαν τόσο τα όρια ανίχνευσης (LOD), όσο και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ), για κάθε φαινολικό οξύ που μελετήθηκε. Τέλος, προσδιορίστηκε η σταθερότητα των διαλυμάτων παρακαταθήκης (stocks), για κάθε φαινολικό οξύ, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Για την επικύρωση της μεθόδου ακολουθήθηκαν οι κατευθυντήριες οδηγίες επίσημων φορέων, όπως το International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (<https://www.ich.org/>) και η Eurachem (<https://www.eurachem.org/index.php>).

1.1.Γραμμικότητα μεθόδου (Linearity)

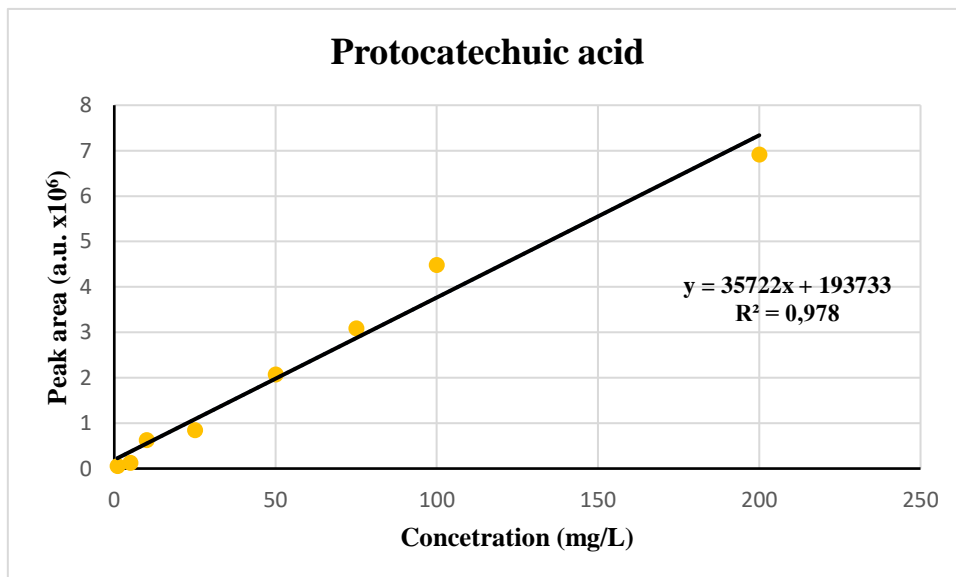
Η γραμμικότητα μίας αναλυτικής διαδικασίας είναι η ικανότητα της διαδικασίας αυτής να λαμβάνει αποτελέσματα δοκιμών (εντός ενός δεδομένου εύρους τιμών), τα οποία είναι ευθέως ανάλογα με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα.[29,30]

Για τον προσδιορισμό της γραμμικότητας, κατασκευάστηκε μία σειρά οχτώ διαφορετικών πρότυπων διαλυμάτων με εύρος συγκεντρώσεων από 1 mg/L έως 100 mg/L. Οι συγκεντρώσεις του βενζοϊκού οξέος στα διαλύματα που παρασκευάστηκαν ήταν διαφορετικές και μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις των λοιπών φαινολικών οξέων με εύρος από 100 mg/L έως 800 mg/L. Οι καμπύλες βαθμονόμησης των προτύπων ουσιών, που κατασκευάστηκαν, αποτελούν διαγράμματα της συγκέντρωσης των προτύπων φαινολικών οξέων συναρτήσει του εμβαδού των κορυφών του χρωματογραφήματος. Η εξίσωση παλινδρόμησης και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) υπολογίστηκαν για κάθε καμπύλη φαινολικού οξέος ξεχωριστά.

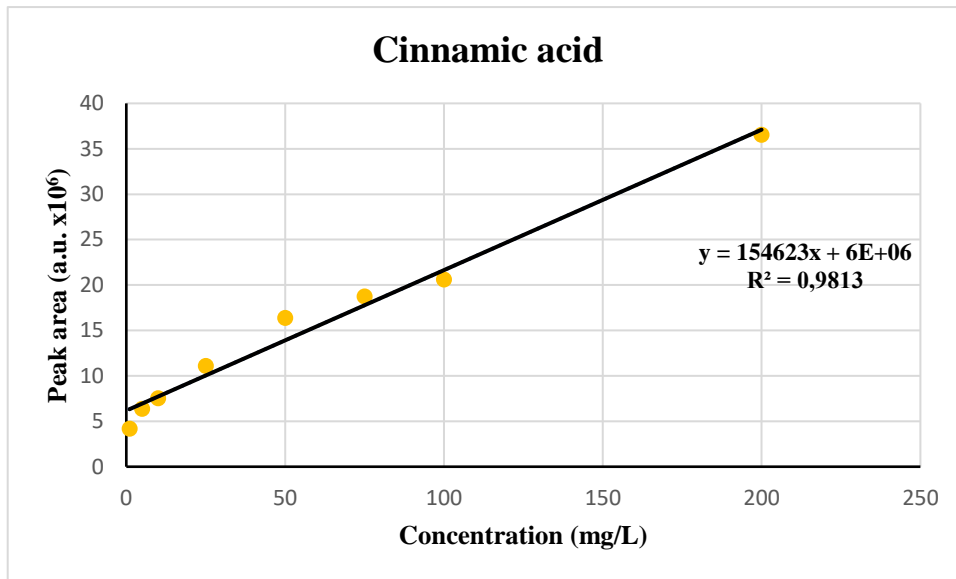
Ενδεικτικά παρακάτω παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς, δηλαδή τα διαγράμματα συγκέντρωσης [Concentration (mg/L)] συναρτήσει του εμβαδού [Peak area (au x 10⁶)], για ορισμένα από τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε (Διάγραμμα 3 έως 5).



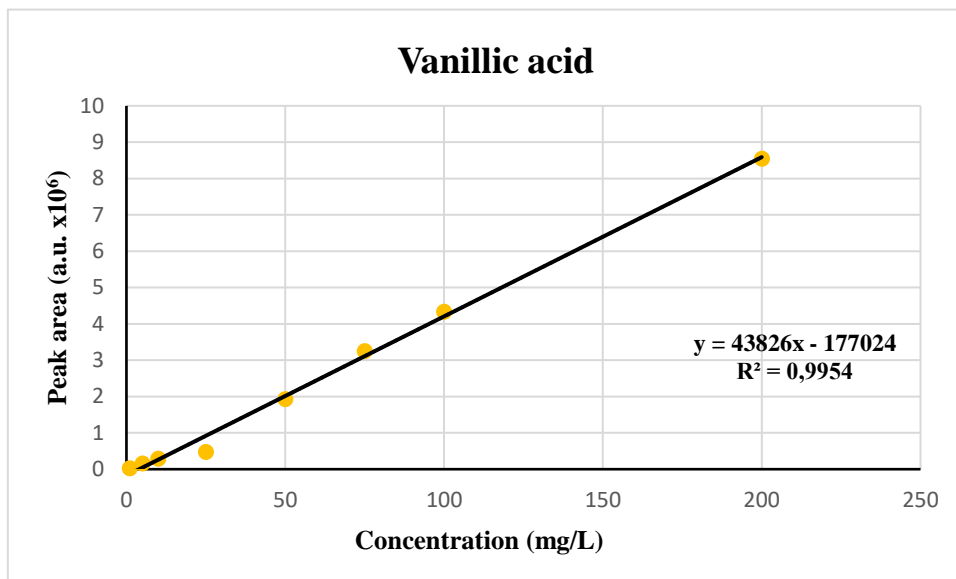
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς για το γαλλικό οξύ



Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς για το πρωτοκατεχικό οξύ



Διάγραμμα 4: Καμπύλη αναφοράς για το κινναμικό οξύ



Διάγραμμα 5: Καμπύλη αναφοράς για το βανιλικό οξύ

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) συνοψίζονται τα φαινορικά οξέα που μελετήθηκαν, οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς του κάθε φαινολικού οξέος καθώς και ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 .

Πίνακας 8: Φαινορικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε, η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του καθενός και ο συντελεστής προσδιορισμού R^2

Φαινορικά οξέα	Εξίσωση καμπύλης αναφοράς	R^2
Γαλλικό οξύ	$y = 53473x + 208605$	0,990
Πρωτοκατεχικό οξύ	$y = 35722x + 193733$	0,978
Γεντισικό οξύ	$y = 29500x + 165236$	0,985
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	$y = 7210,8x + 79407$	0,936
Χλωρογενικό οξύ	$y = 15551x + 30389$	0,976
Καφεϊκό οξύ	$y = 51984x + 421875$	0,979
Συριγγικό οξύ	$y = 64050x + 437902$	0,983
Φερουλικό οξύ	$y = 91218x + 701528$	0,959
Κινναμικό οξύ	$y = 154623x + (6 \cdot 10^6)$	0,981
m-κουμαρικό οξύ	$y = 183610x - 485331$	0,983
Σαλικυλικό οξύ	$y = 14112x + 100058$	0,971
o-κουμαρικό οξύ	$y = 143177x - 218854$	0,982
Ροσμαρινικό οξύ	$y = 38830x + 101239$	0,981
Βανιλλικό οξύ	$y = 43826x - 177024$	0,995
Βενζοϊκό οξύ	$y = 8363,5 - 111572$	0,964

Προκειμένου να γίνει αποδεκτή μία καμπύλη αναφοράς, δηλαδή να παρουσιάζει γραμμικότητα, αυτή πρέπει να είναι ευθεία γραμμή με συντελεστή προσδιορισμού $R^2 \geq 0,98$. [29,30] Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 8) ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 ήταν μεγαλύτερος από 0,9 για όλα τα φαινορικά οξέα στο υπό μελέτη εύρος συγκεντρώσεων, με το γαλλικό και το βανιλλικό να παρουσιάζουν συντελεστή προσδιορισμού ίσο με 0,99.

1.2. Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα μίας αναλυτικής διαδικασίας εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ ανεξάρτητων αποτελεσμάτων δοκιμής, που έχουν προέλθει κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Η πιστότητα, όπως ήδη αναφέρθηκε, χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες, την επαναληψιμότητα (repeatability) και την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility).[29–31]

1.2.1. Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Ως επαναληψιμότητα ορίζεται η εγγύτητα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την ίδια μέθοδο, το ίδιο δείγμα και τις ίδιες συνθήκες (χειριστής, χρονική περίοδος, εξοπλισμός). [29,30]

Τα πειράματα που αφορούν την επαναληψιμότητα περιλάμβαναν μετρήσεις του ίδιου δείγματος (μείγμα φαινολικών οξέων), με τη χρήση της ίδιας μεθόδου και των ίδιων εξωτερικών πειραματικών συνθηκών (χειριστής, εξοπλισμός). Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου ποιότητας (quality control standards, QC) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή, μία μεσαία και μία υψηλή (5 mg/L, 50 mg/L και 100 mg/L). Για κάθε συκέντρωση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

Έπειτα, καταγράφηκε το εμβαδόν κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος, υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων του κάθε δείγματος από τις αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς, καθώς και ο μέσος όρος αυτών. Στη συνέχεια, υπολογίσθηκε η τυπική απόκλιση των μετρήσεων (stdev), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD%), η οποία αποτελεί το κριτήριο για την επαναληψιμότητα. Προκειμένου να κριθεί μία μέθοδος επαναλήψιμη, η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%) πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με 15% ($RSD\% \leq 15\%$) (Εξίσωση 1).

$$RSD\% = \frac{stdev}{\bar{x}} * 100$$

Εξίσωση 1: Εξίσωση υπολογισμού σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%)

Πίνακας 9: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας της προς επικύρωση μεθόδου

Φαινολικά οξέα	Συγκεντρώσεις	RSD%
Γαλλικό οξύ	5 mg/L	5,71
	50 mg/L	10,42
	100 mg/L	3,72
Πρωτοκατεχικό οξύ	5 mg/L	7,71
	50 mg/L	6,62
	100 mg/L	2,89
Γεντισικό οξύ	5 mg/L	18,57
	50 mg/L	6,25
	100 mg/L	4,80
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	5 mg/L	40,93
	50 mg/L	14,08
	100 mg/L	6,94
Χλωρογενικό οξύ	5 mg/L	166,86
	50 mg/L	8,10
	100 mg/L	20,66
Καφεϊκό οξύ	5 mg/L	5,38
	50 mg/L	10,09
	100 mg/L	4,87
Συριγγικό οξύ	5 mg/L	5,10
	50 mg/L	4,28
	100 mg/L	8,64
Φερουλικό οξύ	5 mg/L	11,17
	50 mg/L	5,39
	100 mg/L	73,12
Κινναμικό οξύ	5 mg/L	3,11
	50 mg/L	34,31
	100 mg/L	108,74

m-κουμαρικό οξύ	5 mg/L	15,55
	50 mg/L	5,95
	100 mg/L	10,63
Σαλικυλικό οξύ	5 mg/L	6,94
	50 mg/L	3,03
	100 mg/L	2,36
ο-κουμαρικό οξύ	5 mg/L	2,39
	50 mg/L	3,23
	100 mg/L	2,61
Ροσμαρινικό οξύ	5 mg/L	14,67
	50 mg/L	4,06
	100 mg/L	7,11
Βανιλλικό οξύ	5 mg/L	2,25
	50 mg/L	1,58
	100 mg/L	9,68
Βενζοϊκό οξύ	200 mg/L	2,97
	500 mg/L	1,61
	700 mg/L	7,16

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 9) τα περισσότερα από τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν με την προς επικύρωση μέθοδο παρουσιάζουν επαναληψιμότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Ωστόσο, ορισμένα, όπως το γεντισικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το χλωρογενικό οξύ δεν παρουσιάζουν επαναληψιμότητα στη χαμηλή συγκέντρωση (5 mg/L), καθώς οι σχετικές τους αποκλίσεις (RSD%) βρέθηκαν πως είναι ίσες με 18,57, 40,93, 166,86 αντίστοιχα. Επίσης, κάποια από τα φαινολικά οξέα, όπως το χλωρογενικό οξύ, το φερουλικό οξύ και το κινναμικό οξύ, δεν παρουσιάζουν επαναληψιμότητα στην υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L), καθώς οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) τους βρέθηκαν ίσες με 20,66, 73,12 και 108,74 αντίστοιχα.

1.2.2. Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)

Ως αναπαραγωγιμότητα ορίζεται η εγγύτητα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την ίδια μέθοδο, το ίδιο δείγμα, αλλά κάτω από διαφορετικές εξωτερικές πειραματικές συνθήκες (π.χ. διαφορετικός χειριστής, διαφορετική μέρα ανάλυσης).[29,30]

Όσον αφορά τα πειράματα για την αναπαραγωγιμότητα, περιλάμβαναν μετρήσεις του ίδιου δείγματος (μείγμα φαινολικών οξέων), με την χρήση της ίδιας μεθόδου, αλλά διαφορετικές ημέρες. Για τον προσδιορισμό της αναπαραγωγιμότητας παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου ποιότητας (quality control standards, QC) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή, μία μεσαία και μία υψηλή (5 mg/L, 50 mg/L και 100 mg/L), και εκτελέστηκαν αναλύσεις σε τρεις διαφορετικές μέρες, τρεις επαναλήψεις εντός ημέρας για κάθε διάλυμα ελέγχου ποιότητας.

Έπειτα, καταγράφηκε το εμβαδόν κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος, υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων του κάθε δείγματος από τις αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς, καθώς και ο μέσος όρος αυτών. Στη συνέχεια, υπολογίσθηκε η τυπική απόκλιση των μετρήσεων (stdev), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD%), η οποία αποτελεί και κριτήριο για την αναπαραγωγιμότητα. Προκειμένου να κριθεί μία μέθοδος αναπαραγωγίσιμη, η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%) πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με 15% ($RSD\% \leq 15\%$) (Εξίσωση 1).

Πίνακας 10: Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας της προς επικύρωση μεθόδου

Φαινολικά οξέα	Συγκεντρώσεις	RSD%
Γαλλικό οξύ	5 mg/L	11,70
	50 mg/L	12,41
	100 mg/L	4,42
Πρωτοκατεχικό οξύ	5 mg/L	8,36
	50 mg/L	5,49
	100 mg/L	2,74
Γεντισικό οξύ	5 mg/L	11,08
	50 mg/L	12,41
	100 mg/L	11,73
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	5 mg/L	8,75
	50 mg/L	11,04
	100 mg/L	15,56
Χλωρογενικό οξύ	5 mg/L	15,00
	50 mg/L	11,09
	100 mg/L	13,82
Καφεϊκό οξύ	5 mg/L	10,37
	50 mg/L	7,43
	100 mg/L	10,20
Συριγγικό οξύ	5 mg/L	4,92
	50 mg/L	4,22
	100 mg/L	5,79
Φερουλικό οξύ	5 mg/L	15,86
	50 mg/L	4,46
	100 mg/L	10,72
Κινναμικό οξύ	5 mg/L	8,55
	50 mg/L	11,04
	100 mg/L	15,64

m-κουμαρικό οξύ	5 mg/L	14,34
	50 mg/L	14,19
	100 mg/L	16,74
Σαλικυλικό οξύ	5 mg/L	9,41
	50 mg/L	6,55
	100 mg/L	6,32
ο-κουμαρικό οξύ	5 mg/L	4,06
	50 mg/L	4,42
	100 mg/L	3,31
Ροσμαρινικό οξύ	5 mg/L	9,93
	50 mg/L	7,10
	100 mg/L	5,48
Βανιλλικό οξύ	5 mg/L	5,19
	50 mg/L	2,17
	100 mg/L	3,13
Βενζοϊκό οξύ	200 mg/L	3,83
	500 mg/L	2,72
	700 mg/L	2,45

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 10) σχεδόν όλα τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν με την προς επικύρωση μέθοδο εμφανίζουν αναπαραγωγιμότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις (χαμηλή, μεσαία, υψηλή), αφού η σχετική τυπική απόκλισή τους και στις τρεις συγκεντρώσεις είναι μικρότερη από το 15% ($RSD\% \leq 15\%$). Ωστόσο, το φερουλικό οξύ φαίνεται να μην εμφανίζει αναπαραγωγιμότητα στη χαμηλή συγκέντρωση (5 mg/L), καθώς η σχετική τυπική απόκλισή του υπολογίστηκε πως είναι μεγαλύτερη του 15% ($RSD\% = 15,86$). Επίσης, υπάρχουν φαινολικά οξέα τα οποία δεν παρουσιάζουν αναπαραγωγιμότητα στην υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L). Αυτά είναι το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ με $RSD\% = 15,56$, το κινναμικό οξύ με $RSD\% = 15,64$ και το m-κουμαρικό οξύ με $RSD\% = 16,74$.

Ωστόσο, παρατηρείται πως η σχετική τυπική απόκλιση των φαινολικών οξέων αυτών δεν αποκλίνει πολύ από το αποδεκτό όριο.

Τέλος, παρατηρείται πως το χλωρογενικό οξύ στη χαμηλή συγκέντρωση (5 mg/L) εμφανίζει $RSD \% = 15,00$. Θεωρείται πως το οξύ αυτό παρουσιάζει αναπαραγωγικότητα στη συγκέντρωση αυτή, καθώς βάσει ορισμού μία μέθοδος προκειμένου να εμφανίζει αναπαραγωγικότητα πρέπει η σχετική τυπική απόκλιση (RSD %) να είναι μικρότερη ή και ίση με το 15%.

1.3.Ακρίβεια (Accuracy)

Ως ακρίβεια ορίζεται η συμφωνία μεταξύ της μετρούμενης συγκέντρωσης και της «αληθούς τιμής» (true value). Υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ της μετρούμενης τιμής (x_i) και της «αληθούς τιμής» (μ) (Εξίσωση 2, Εξίσωση 3). Το σχετικό σφάλμα αποτελεί κριτήριο με βάση το οποίο αξιολογείται η ακρίβεια. Γενικά, όσο πιο κοντά είναι η μετρούμενη τιμή στην «αληθή τιμή», δηλαδή όσο πιο μικρό είναι το σχετικό σφάλμα της μέτρησης, τόσο μεγαλύτερη ακρίβεια παρουσιάζει μία μέθοδος. [27,28]

$$\text{Ακρίβεια} = x_i - \mu$$

Εξίσωση 2: Εξίσωση υπολογισμού της ακρίβειας

$$\text{Σχετική ακρίβεια (RE\%)} = [(x_i - \mu) / \mu] \times 100$$

Εξίσωση 3: Εξίσωση υπολογισμού της σχετικής ακρίβειας (RE\%)

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας της μεθόδου παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου ποιότητας (quality control, QC) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία χαμηλή (5 mg/L), μία μεσαία (50 mg/L) και μία υψηλή (100 mg/L). Προκειμένου να αξιολογηθεί η ακρίβεια της προς επικύρωση μεθόδου υπολογίστηκε το σχετικό σφάλμα (RE%) (Εξίσωση 4). Για να εμφανίζει μία μέθοδος ακρίβεια οι τιμές του σχετικού σφάλματος (RE%) πρέπει να κυμαίνονται από 90% έως 110%.

$$\text{Σχετικό σφάλμα (RE\%)} = [(C') / (C)] \times 100$$

Εξίσωση 4: Εξίσωση υπολογισμού σχετικού σφάλματος (RE\%)

όπου C' η πρότυπη συγκέντρωση που υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης και C η «ονομαστική» πρότυπη συγκέντρωση που προστέθηκε.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η ακρίβεια της μεθόδου για το QC διάλυμα με συγκέντρωση 5 mg/L, ήταν εκτός αποδεκτών ορίων για αυτό και δεν παρουσιάζεται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα σχετικού σφάλματος της προς επικύρωση μεθόδου

Φαινολικά οξέα	Συγκεντρώσεις	Σχετικό σφάλμα (RE%)
Γαλλικό οξύ	50 mg/L	108,87
	100 mg/L	111,03
Πρωτοκατεχικό οξύ	50 mg/L	104,91
	100 mg/L	114,25
Γεντισικό οξύ	50 mg/L	91,63
	100 mg/L	103,72
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	50 mg/L	111,61
	100 mg/L	108,80
Χλωρογενικό οξύ	50 mg/L	108,80
	100 mg/L	91,26
Καφεϊκό οξύ	50 mg/L	100,90
	100 mg/L	133,02
Συριγγικό οξύ	50 mg/L	132,07
	100 mg/L	100,74

Φερουλικό οξύ	50 mg/L	237,06
	100 mg/L	108,39
Κιναμικό οξύ	50 mg/L	119,89
m-κουμαρικό οξύ	50 mg/L	83,89
	100 mg/L	107,04
Σαλικυλικό οξύ	50 mg/L	118,39
	100 mg/L	106,44
ο-κουμαρικό οξύ	50 mg/L	110,79
	100 mg/L	97,64
Ροσμαρινικό οξύ	50 mg/L	108,83
	100 mg/L	106,96
Βανιλλικό οξύ	50 mg/L	95,93
	100 mg/L	102,98
Βενζοϊκό οξύ	500 mg/L	91,92
	700 mg/L	67,32

Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 11) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν το σχετικό σφάλμα (RE%) και κατ' επέκταση την ακρίβεια της μεθόδου που αναπτύχθηκε. Παρατηρείται πως για το πλήθος των φαινολικών οξέων παρουσιάζει ακρίβεια στη μεσαία (50 mg/L) και στην υψηλή (100 mg/L) συγκέντρωση, ενώ στη χαμηλή συγκέντρωση (5 mg/L) το σχετικό σφάλμα (RE%) ήταν εκτός των αποδεκτών ορίων. Πιο συγκεκριμένα, μερικά από τα φαινολικά οξέα τα οποία εμφανίζουν σχετικό σφάλμα εκτός των αποδεκτών ορίων είναι το καφεϊκό οξύ στην υψηλή συγκέντρωση (RE% = 133,02), το φερουλικό οξύ στη μεσαία συγκέντρωση (RE% = 237,06), το βενζοϊκό οξύ στην υψηλή συγκέντρωση (RE% = 67,32) και το κινναμικό οξύ το οποίο δεν παρουσιάζει ακρίβεια τόσο στην χαμηλή (5 mg/L), όσο και στην υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L).

1.4.Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) αποτελούν ενδείξεις για την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου. Το όριο ποσοτικοποίησης, είναι η χαμηλότερη ποσότητα της οποίας μπορεί να μετρηθεί αξιόπιστα η συγκέντρωση μίας υπό εξέταση ένωσης. Το όριο ανίχνευσης, ορίζεται ως η μικρότερη ποσότητα μίας ένωσης που μπορεί να ανιχνευθεί χωρίς να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί αξιόπιστα η συγκέντρωσή της.[29,30] Τόσο το όριο ποσοτικοποίησης, όσο και το όριο ανίχνευσης, για κάθε φαινολικό οξύ, υπολογίστηκαν με βάση την τυπική απόκλιση της αποτέμνουσας της ευθείας και την κλίση της αντίστοιχης καμπύλης βαθμονόμησης κάθε φαινολικού οξέος, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης προσδιορίστηκαν σε μονάδες mg/L.

Προκειμένου να προσδιορισθεί τόσο το όριο ανίχνευσης, όσο και το όριο ποσοτικοποίησης του κάθε φαινολικού οξέος, παρασκευάστηκαν 4 διαφορετικά διαλύματα (μείγματα όλων των προς ανάλυση φαινολικών οξέων) στην χαμηλή περιοχή συγκεντρώσεων, με συγκεντρώσεις 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,5 mg/L και 4,0 mg/L το κάθε ένα. Για το βενζοϊκό οξύ οι συγκεντρώσεις ήταν 87,5 mg/L, 100,0 mg/L, 137,5 mg/L και 175,0 mg/L. Αφού αναλύθηκαν, καταγράφηκαν τα αποτελέσματα και κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς της συγκέντρωσης συναρτήσει του εμβαδού της προκύπτουσας κορυφής του χρωματογραφήματος, για κάθε φαινολικό οξύ, ξεχωριστά. Έπειτα, υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για κάθε φαινολικό με τους εξής τύπους:

$$LOD = 3,3 * \frac{Sb(stdev)}{a},$$

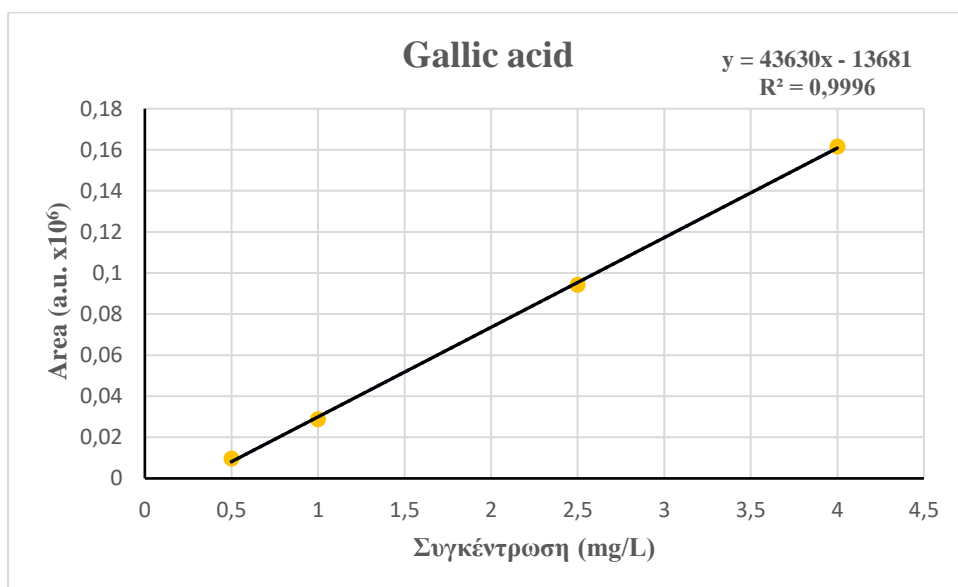
Εξίσωση 5: Εξίσωση για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης

$$LOQ = 10 * \frac{Sb(stdev)}{a},$$

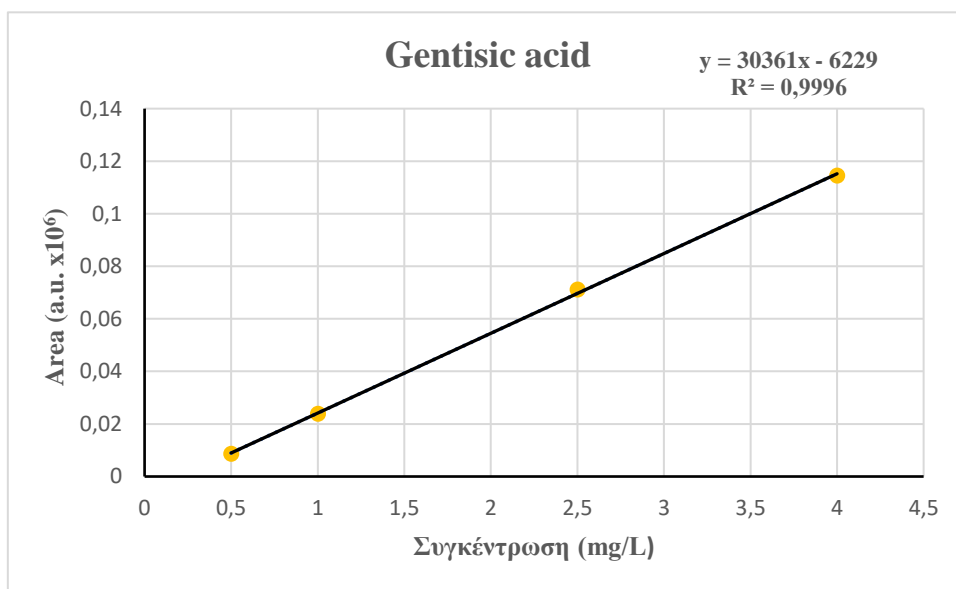
Εξίσωση 6: Εξίσωση για τον υπολογισμό του ορίου ποσοτικοποίησης

όπου a η κλίση της ευθείας της καμπύλης βαθμονόμησης, για κάθε φαινολικό οξύ και $Sb(stdev)$ η τυπική απόκλιση της αποτέμνουσας της ευθείας της καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε φαινολικό οξύ.[29,30]

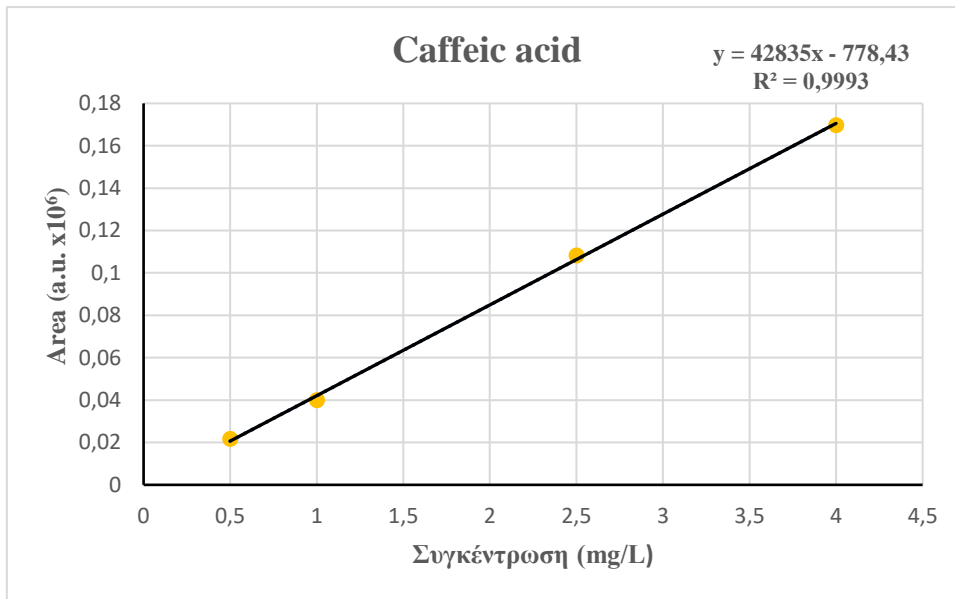
Παρακάτω, ενδεικτικά, παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων, δηλαδή τα διαγράμματα συγκέντρωσης [Concentration (mg/L)] συναρτήσεως του εμβαδού [Peak area (au x 10⁶)], για ορισμένα από τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε (Διάγραμμα 6 έως 9).



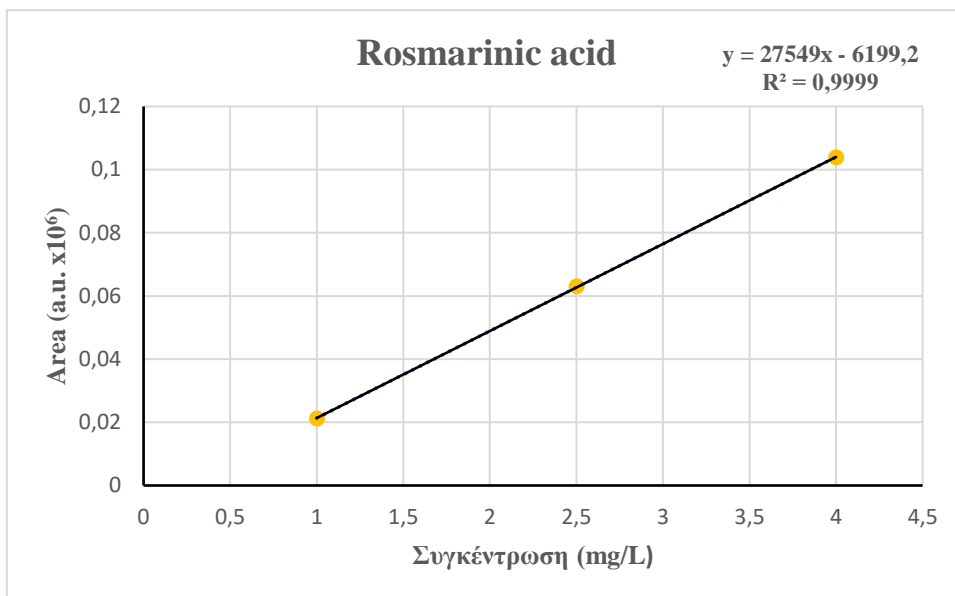
Διάγραμμα 6: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOQ και του LOD του γαλλικού οξέος



Διάγραμμα 7: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOQ και του LOD του γεντισικού οξέος



Διάγραμμα 8: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOQ και του LOD του καφεϊκού οξέος



Διάγραμμα 9: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOQ και του LOD του ροσμαρινικού οξέος

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12) παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) των φαινολικών οξέων όπως υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις 5 και 6 αντίστοιχα (Εξίσωση 5, Εξίσωση 6), για κάθε ένα από τα φαινολικά οξέα ξεχωριστά.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα για τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) και τα όρια ανίχνευσης (LOD) των φαινολικών οξέων της προς επικύρωση μεθόδου

Φαινολικά οξέα	Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του LOD-LOQ	R ²	LOQ	LOD
Γαλλικό οξύ	$y = 43630x - 13681$	0,9996	0,3268	0,1078
Πρωτοκατεχικό οξύ	$y = 28754x - 7373,6$	0,9926	1,4767	0,4873
Γεντισικό οξύ	$y = 4409,3 + 2485,8$	0,9996	0,3451	0,1139
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	$y = 7210,8x + 79407$	0,9955	1,1532	0,3807
Χλωρογενικό οξύ	$y = 6983,3x - 1255,7$	0,9032	9,1158	3,0082
Καφεϊκό οξύ	$y = 42835 - 778,43$	0,9993	0,4597	0,1517
Συριγγικό οξύ	$y = 83345x - 21955$	0,9967	0,9839	0,3247
Φερουλικό οξύ	$y = 96514x - 19910$	0,9973	0,8926	0,2946
Κινναμικό οξύ	$y = 10^6x + (2 \cdot 10^6)$	0,9957	1,1230	0,3706
m-κουμαρικό οξύ	$y = 30774x + 44869$	0,952	6,2539	2,0638
Σαλικυλικό οξύ	$y = 14549x - 6206,8$	0,9998	0,3671	0,1212
ο-κουμαρικό οξύ	$y = 67326x - 11041$	0,9389	4,3735	1,4433
Ροσμαρινικό οξύ	$y = 27549x - 6199,2$	0,9999	0,2110	0,0696
Βανιλλικό οξύ	$y = 38242x - 6078,7$	0,9527	3,8181	1,2600
Βενζοϊκό οξύ	$y = 11094x - 334886$	0,9917	126,29656	41,67787

Οι ενώσεις με χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) είναι και αυτές που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα προς ανάλυση δείγματα. Με βάση τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 12), τα φαινορικά οξέα τα οποία δύναται να ποσοτικοποιηθούν όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις είναι τα: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γεντισικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ, σαλικυλικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, βανιλικό οξύ και βενζοϊκό οξύ.

Οι ενώσεις με χαμηλά όρια ανίχνευσης (LOD) είναι και αυτές που μπορούν να ανιχνευθούν, αλλά όχι να ποσοτικοποιηθούν, όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις μέσα σε δείγματα. Με βάση τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 12) τα φαινορικά οξέα τα οποία δύναται να ανιχνευθούν όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις είναι τα: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γεντισικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ, σαλικυλικό οξύ, ροσμαρινικό και βενζοϊκό οξύ.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) για το βενζοϊκό οξύ διαφέρουν αρκετά από τα υπόλοιπα φαινορικά οξέα, καθώς η καμπύλη αναφοράς για το βενζοϊκό οξύ έχει κατασκευασθεί σε διαφορετικά εύρη συγκεντρώσεων (87,5 mg/L, 100,0 mg/L, 137,5 mg/L και 175,0 mg/L).

1.5.Σταθερότητα πρότυπων διαλυμάτων (Stability)

Τέλος, εξετάστηκε η σταθερότητα των διαλυμάτων παρακαταθήκης (stocks) των φαινολικών οξέων. Μέσω της μελέτης της σταθερότητας των stocks δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού της σταθερότητας αυτών για καθορισμένο χρονικό διάστημα. Όταν ένα stock είναι σταθερό, τότε η συγκέντρωσή του παραμένει ίδια με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, εάν το stock υποβαθμίζεται και δεν παραμένει σταθερό με την πάροδο του χρόνου, η συγκέντρωσή του τείνει να μειώνεται.[29,32,33]

Προκειμένου να προσδιορισθεί η σταθερότητα των stocks των φαινολικών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου, παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου ποιότητας (QC). Μελετήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις για κάθε φαινολικό οξύ (5 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L). Για το βενζοϊκό οξύ οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν διαφορετικές (200 mg/L, 500 mg/L, 700 mg/L). Η πρώτη ανάλυση έγινε την ημέρα παρασκευής τους και η επόμενη έπειτα από δύο μήνες, αφού διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους -20 °C.

Στον πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 13, 14, 15) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα έπειτα από τη διεξαγωγή του πειράματος για την αξιολόγηση της σταθερότητας.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα της σταθερότητας των φαινολικών οξέων που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν με την προς επικύρωση μέθοδο, στη χαμηλή συγκέντρωση (5 mg/L)¹

Φαινολικό οξύ	Ημέρα παρασκευής stock διαλύματος	2 μήνες μετά
Γαλλικό οξύ	c	c
Πρωτοκατεχικό οξύ	c	c
Γεντισικό οξύ	e	e
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	d	d
Χλωρογενικό οξύ	d	d
Καφεϊκό οξύ	c	c
Συριγγικό οξύ	c	c
Φερουλικό οξύ	c	c
Κινναμικό οξύ	b, c	b
m-κουμαρικό οξύ	d	d
Σαλικυλικό οξύ	e	e
o-κουμαρικό οξύ	d	d
Ροσμαρινικό οξύ	d	d
Βανιλλικό οξύ	e	e
Βενζοϊκό οξύ	c	c

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 13, στη χαμηλή συγκέντρωση που μελετήθηκε (5 mg/L) όλα τα φαινολικά οξέα παραμένουν σταθερά έπειτα από δύο μήνες διατήρησης στο ψυγείο.

¹ Κοινά σύμβολα ανά σειρά δείχνουν μη σημαντική στατιστική διαφορά, δηλαδή p-value $\leq 0,05$.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα σταθερότητας για τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν με την προς επικύρωση μέθοδο στη μεσαία συγκέντρωση (50 mg/L)²

Φαινολικό οξύ	Ημέρα παρασκευής	2 μήνες μετά
Γαλλικό οξύ	b	b
Πρωτοκατεχικό οξύ	b	b
Γεντισικό οξύ	c	d
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	c	c
Χλωρογενικό οξύ	b,c	c
Καφεϊκό οξύ	b	b
Συριγγικό οξύ	b	b
Φερουλικό οξύ	b	b
Κινναμικό οξύ	a	a
m-κουμαρικό οξύ	c	c
Σαλικυλικό οξύ	c	d
o-κουμαρικό οξύ	c	c
Ροσμαρινικό οξύ	b	c
Βανιλλικό οξύ	c	d
Βενζοϊκό οξύ	b	b

Στη μεσαία συγκέντρωση (50 mg/L), όπως φαίνεται και από τον πίνακα 14, σταθερότητα παρουσιάζουν τα: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ, m-κουμαρικό οξύ, o-κουμαρικό οξύ και βενζοϊκό οξύ.

² Κοινά σύμβολα ανά σειρά δείχνουν μη σημαντική στατιστική διαφορά, δηλαδή p-value \leq 0,05.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα σταθερότητας για τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν με την προς επικύρωση μέθοδο στην υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L)³

Φαινολικό οξύ	Ημέρα παρασκευής	2 μήνες μετά
Γαλλικό οξύ	a	a
Πρωτοκατεχικό οξύ	a	a
Γεντισικό οξύ	b	a
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	a	b
Χλωρογενικό οξύ	a,b	b
Καφεϊκό οξύ	a	a
Συριγγικό οξύ	a	a
Φερουλικό οξύ	a	b
Κινναμικό οξύ	b	a
m-κουμαρικό οξύ	a	b
Σαλικυλικό οξύ	b	a
o-κουμαρικό οξύ	a	b
Ροσμαρινικό οξύ	a	a
Βανιλλικό οξύ	a	b
Βενζοϊκό οξύ	a	b

Τέλος, στην υψηλή συγκέντρωση που μελετήθηκε (100 mg/L), όπως προκύπτει και από τον πίνακα 15, σταθερότητα παρουσιάζουν τα: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγγικό οξύ και ροσμαρινικό οξύ.

Γενικά, παρατηρήθηκε μη σταθερότητα των διαλυμάτων παρακαταθήκης (stocks) στις υψηλές συγκεντρώσεις, γεγονός μη αναμενόμενο, καθώς όσο πιο πυκνό είναι ένα διάλυμα, τόσο δυσκολότερα υποβαθμίζεται. Η μη σταθερότητα αυτή μπορεί να οφείλεται σε πιο πεπλατισμένες κορυφές, που προκύπτουν από το χρωματογράφημα, άρα και σε διαφορετικά προσδιοριζόμενα εμβαδά που παρατηρήθηκαν 2 μήνες μετά από την παρασκευή των διαλυμάτων και ήταν πιο έντονες ή πιο προφανείς στις υψηλές συγκεντρώσεις. Προκειμένου να ληφθούν καλύτερα αποτελέσματα για την σταθερότητα των διαλυμάτων παρακαταθήκης, καλό θα ήταν να μελετηθεί η σταθερότητα ένα μήνα μετά την παρασκευή τους.

³ Κοινά σύμβολα ανά σειρά δείχνουν μη σημαντική στατιστική διαφορά, δηλαδή p-value \leq 0,05.

2. Εφαρμογή της επικυρωμένης μεθόδου σε φυτικά εκχυλίσματα

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των προς μελέτη φαινολικών οξέων σε εκχυλίσματα ξανθού καφέ, μαύρου καφέ, ντεκαφεϊνέ, καφέ με μαστίχα, αλλά και σε εκχύλισμα φράουλας. Τα εκχυλίσματα καφέ λήφθηκαν έπειτα από διάλυση 3g αλεσμένου καφέ σε 50 mL νερό, μέχρι να επιτευχθεί βρασμός, ο οποίος σταμάτησε όταν δημιουργήθηκε αφρός. Στη συνέχεια, 1 mL κάθε δείγματος καφέ υπέστη λυοφιλίωση και τα στερεά υπολείμματα διαλύθηκαν σε 1 mL μεθανόλης + 0,1% v/v φορμικό οξύ.[34] Το εκχύλισμα της φράουλας έχει ληφθεί ύστερα από εκχύλιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 80:20 για 24 ώρες.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 16) παρουσιάζονται τα διάφορα δείγματα καφέ, καθώς και το δείγμα της φράουλας, τα φαινολικά οξέα που μπόρεσαν να προσδιορισθούν στα δείγματα αυτά, καθώς και η συγκέντρωση του κάθε φαινολικού οξέος, η οποία υπολογίστηκε από τις καμπύλες αναφοράς (Πίνακας 8).

Πίνακας 16: Τα διάφορα εκχυλίσματα καφέ και το εκχύλισμα φράουλας που μελετήθηκαν, τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν και οι συγκεντρώσεις στις οποίες βρέθηκαν σε κάθε δείγμα

Δείγματα	Φαινολικά οξέα	Συγκεντρώσεις
Ξανθός καφές	Πρωτοκατεχικό οξύ	57,46 mg/L
	Χλωρογενικό οξύ	299,54 mg/L
	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	543,90 mg/L
Μαύρος καφές	Πρωτοκατεχικό οξύ	44,04 mg/L
	Χλωρογενικό οξύ	37,81 mg/L
	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	56,25 mg/L
	Καφεϊκό οξύ	- ⁴
	Φερουλικό οξύ	- ⁵
Ντεκαφεϊνέ	Πρωτοκατεχικό οξύ	26,79 mg/L
	Χλωρογενικό οξύ	663,68 mg/L
	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	1200,70 mg/L
	Καφεϊκό οξύ	76,53 mg/L
	Κινναμικό οξύ	- ⁶
Καφές με μαστίχα	Πρωτοκατεχικό οξύ	213,54 mg/L
	Χλωρογενικό οξύ	492,44 mg/L
	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	851,10 mg/L
	Φερουλικό οξύ	61,55 mg/L
Φράουλα	Γαλλικό οξύ	589,48 mg/L
	Καφεϊκό οξύ	1415,16 mg/L
	Πρωτοκατεχικό οξύ	552,76 mg/L

⁴ Το καφεϊκό οξύ στο εκχύλισμα του μαύρου καφέ ενώ ταυτοποιήθηκε, δεν ποσοτικοποιήθηκε.

⁵ Το φερουλικό οξύ στο εκχύλισμα του μαύρου καφέ ενώ ταυτοποιήθηκε, δεν ποσοτικοποιήθηκε.

⁶ Το κινναμικό οξύ στο εκχύλισμα του ντεκαφεϊνέ καφέ ενώ ταυτοποιήθηκε, δεν ποσοτικοποιήθηκε.

υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, βενζοϊκό οξύ, σαλικυλικό και φερουλικό οξύ. Αν και όλοι οι τύποι καφέ περιέχουν παρόμοια φαινολικά οξέα, οι ποσότητες στις οποίες βρίσκονται αυτά στον κάθε τύπο διαφέρουν. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους καλλιέργειας, τις διαφορετικές γεωργικές πρακτικές, αλλά και στον βαθμό καβουρδίσματος.[35]

Η διαδικασία του καβουρδίσματος επηρεάζει σημαντικά το περιεχόμενο του καφέ σε φαινολικά οξέα. Έτσι, ο ξανθός καφές, ή αλλιώς ελαφρά καβουρδισμένος καφές, διατηρεί περισσότερη από την αρχική περιεκτικότητα σε φαινολικά οξέα σε σχέση με το μαύρο, ο οποίος έχει υποστεί περισσότερο καβούρδισμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο μαύρος καφές καβουρδίζεται σε υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες συμβάλλουν στην υποβάθμιση των φαινολικών οξέων και κυρίως του χλωρογενικού και των παραγώγων του.[35,36]

Επιπρόσθετα, διαφορά στο περιεχόμενο των φαινολικών οξέων παρουσιάζει και ο ντεκαφεϊνέ σε σύγκριση με τους υπόλοιπους τύπους καφέ. Η διαφορά αυτή οφείλεται στη διαδικασία αφαίρεσης της καφεΐνης από τον καφέ. [35,36]

Τέλος, ο καφές με μαστίχα εκτός από τα φαινολικά οξέα που βρίσκονται φυσικά στον καφέ, περιέχει και φαινολικά οξέα που σχετίζονται με την ρητίνη της μαστίχας. Κύριος εκπρόσωπος των φαινολικών οξέων της μαστίχας αποτελεί το μαστικό οξύ (mastic acid), το οποίο είναι υπεύθυνο για το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση της μαστίχας.[36,37]

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 16), τα φαινολικά οξέα που μπόρεσαν να προσδιορισθούν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε στα διάφορα δείγματα του καφέ ήταν τα: πρωτοκατεχικό, 4-υδροξυβενζοϊκό, χλωρογενικό, καφεϊκό, φερουλικό και κινναμικό οξύ. Τα φαινολικά οξέα που προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν και στα τέσσερα δείγματα καφέ ήταν τα πρωτοκατεχικό, 4-υδροξυβενζοϊκό και χλωρογενικό οξύ. Παρατηρώντας τον πίνακα που προαναφέρθηκε (Πίνακας 16) το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το χλωρογενικό οξύ βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε όλα τα δείγματα του καφέ, με τον ντεκαφεϊνέ να παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (1200,70 mg/L). Επίσης, το καφεϊκό οξύ προσδιορίστηκε στον μαύρο καφέ και στον ντεκαφεϊνέ, ενώ ποσοτικοποιήθηκε μόνο στον ντεκαφεϊνέ. Αντίστοιχα, το φερουλικό οξύ αν και

προσδιορίστηκε στον μαύρο καφέ και στον καφέ με μαστίχα, ποσοτικοποιήθηκε μόνο στον καφέ με μαστίχα. Ακόμη, το κινναμικό οξύ μπόρεσε να προσδιορισθεί μόνο στον ντεκαφεϊνέ, χωρίς όμως να ποσοτικοποιηθεί.

Ακόμη, συγκρίνοντας τον ξανθό με τον μαύρο καφέ παρατηρείται πως οι συγκεντρώσεις στις οποίες βρίσκονται τα χλωρογενικό, 4-υδροξυβενζοϊκό και πρωτοκατεχικό οξύ στον ξανθό καφέ είναι πολύ μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις αυτών στο μαύρο καφέ. Η διαφορά αυτή οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στη διαδικασία του καβουρδίσματος. Οι κόκκοι του μαύρου καφέ υφίστανται καβούρδισμα σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες και αυτό έχει ως συνέπεια την υποβάθμιση του περιεχομένου των φαινολικών οξέων.

Όσον αφορά τη φράουλα, αυτή αποτελεί ένα φρούτο με ποικίλη διατροφική σύνθεση, πληθώρα φυτοχημικών ουσιών και φυτικών ινών. Η φράουλα θεωρείται καλή πηγή πολλών βιταμινών και ανόργανων στοιχείων, καθώς και πολυφαινολών. Οι κύριες ομάδες πολυφαινολών που βρίσκονται στη φράουλα είναι οι ανθοκυανίνες και οι ελλαγιτανίνες. Ακόμη, οι φράουλες περιέχουν μικρές ποσότητες φαινολικών οξέων, όπως το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ και παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος.[38]

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 16, τα φαινολικά οξέα τα οποία μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν στο εκχύλισμα της φράουλας, με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε, είναι τα γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ και καφεϊκό οξύ. Το καφεϊκό οξύ φαίνεται να βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση (1415,16 mg/L), καθώς όπως προκύπτει και από τη βιβλιογραφία, αποτελεί ένα από τα κύρια φαινολικά οξέα της φράουλας.

Τα διάφορα εκχυλίσματα του καφέ που μελετήθηκαν, παρουσιάζουν διαφορές όσον αφορά το περιεχόμενο των φαινολικών οξέων, τόσο μεταξύ τους, όσο και σε σύγκριση με το εκχύλισμα φράουλας. Όπως προκύπτει από τον πίνακα 16, στα διάφορα εκχυλίσματα του καφέ ταυτοποιήθηκαν περισσότερα φαινολικά οξέα απ' ό,τι στο εκχύλισμα της φράουλας. Επίσης, σύμφωνα με τον πίνακα 16, σε όλα τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε το πρωτοκατεχικό οξύ, το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα της φράουλας. Τέλος, συγκρίνοντας το εκχύλισμα της φράουλας, στο οποίο ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε το καφεϊκό οξύ, με το εκχύλισμα του ντεκαφεϊνέ καφέ,

παρατηρείται πως το καφεϊκό οξύ βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα της φράουλας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης αποτελεί μία από τις πιο ευρέως διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών οξέων.

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία μέθοδος για την ταυτοποίηση και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δεκαπέντε (15) φαινολικών οξέων με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης συζευγμένης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC – PDA). Έπειτα, η επικυρωμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό, αλλά και την ποσοτικοποίηση των προς μελέτη φαινολικών οξέων σε εκχυλίσματα ξανθού καφέ, μαύρου καφέ, ντεκαφεϊνέ, καφέ με μαστίχα, αλλά και σε εκχύλισμα φράουλας.

Από την επικύρωση της μεθόδου που αναπτύχθηκε, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα. Η μέθοδος φαίνεται να παρουσιάζει γραμμικότητα για όλα τα φαινολικά οξέα, καθώς ο συντελεστή προσδιορισμού τους (R^2) ήταν μεγαλύτερος από 0,9 στο υπό μελέτη εύρος συγκεντρώσεων. Όσον αφορά την πιστότητα, η μέθοδος παρουσιάζει καλή επαναληψιμότητα και αναπαραγωγικότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (5,0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L). Ωστόσο, υπήρξαν φαινολικά οξέα τα οποία δεν εμφάνισαν επαναληψιμότητα στη χαμηλή συγκέντρωση των 5 mg/L (γεντισικό οξύ με RSD % = 18,57, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ με RSD % = 40,93, χλωρογενικό οξύ με RSD % = 166,86) και κάποια άλλα δεν εμφάνισαν επαναληψιμότητα στην υψηλή συγκέντρωση των 100 mg/L (χλωρογενικό οξύ με RSD % = 20,66, φερουλικό οξύ με RSD % = 73,12, κινναμικό οξύ με RSD % = 108,74.). Επίσης, το φερουλικό οξύ (RSD % = 15,86) φαίνεται να μην παρουσιάζει αναπαραγωγικότητα στη χαμηλή συγκέντρωση (5 mg/L), ενώ υπήρξαν και φαινολικά οξέα τα οποία δεν εμφάνισαν αναπαραγωγικότητα στην υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L) (4-υδροξυβενζοϊκό οξύ με RSD % = 15,56, το κινναμικό οξύ με RSD % = 15,64 και το m-κουμαρικό οξύ με RSD % = 16,74). Προκειμένου να βελτιωθεί η πιστότητα της μεθόδου, ωφέλιμο θα ήταν να αυξηθούν οι μετρήσεις και οι επαναλήψεις για κάθε μετρούμενη συγκέντρωση, έτσι ώστε να επιτευχθεί βελτίωση της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Έπειτα, από τον υπολογισμό του σχετικού σφάλματος (RE%) και κατ' επέκταση τον προσδιορισμό της ακρίβειας, η μέθοδος δεν παρουσιάζει ικανοποιητική ακρίβεια. Συγκεκριμένα, στη χαμηλή συγκέντρωση των 5 mg/L το σχετικό σφάλμα όλων των

φαινολικών οξέων υπολογίσθηκε και βρέθηκε εκτός των αποδεκτών ορίων, οπότε η μέθοδος δεν παρουσιάζει ακρίβεια στη συγκέντρωση αυτή. Αντίθετα, στη μεσαία συγκέντρωση (50 mg/L), καθώς και στην υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L) το πλήθος των φαινολικών οξέων παρουσιάζουν ακρίβεια, με εξαίρεση κάποια φαινολικά οξέα όπως το φερουλικό οξύ στη μεσαία συγκέντρωση (RE% = 237,06) και το βενζοϊκό οξύ στην υψηλή συγκέντρωση (RE% = 67,32).

Ακόμη, από τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) των φαινολικών οξέων, προκύπτει πως τα περισσότερα φαινολικά οξέα έχουν την δυνατότητα, όχι μόνο να ανιχνευθούν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αλλά και να ποσοτικοποιηθούν.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η σταθερότητα των διαλυμάτων παρακαταθήκης (stocks), μετά από τη διατήρησή τους για δύο μήνες εντός κατάψυξης. Προέκυψε πως το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το συριγγικό οξύ παραμένουν σταθερά ανεξαρτήτως συγκέντρωσης. Στη χαμηλή συγκέντρωση που μελετήθηκε (5 mg/L) παρατηρήθηκε σταθερότητα όλων των φαινολικών οξέων. Στη μεσαία συγκέντρωση (50 mg/L) σταθερότητα παρουσίασαν τα: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ m-κουμαρικό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ και βενζοϊκό οξύ. Τέλος, στην υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L) σταθερότητα παρουσίασαν τα: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγγικό οξύ και ροσμαρινικό οξύ.

Η επικυρωμένη μέθοδος εφαρμόστηκε σε εκχυλίσματα ξανθού καφέ, μαύρου καφέ, ντεκαφεϊνέ, καφέ με μαστικά, αλλά και σε εκχύλισμα φράουλας. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν στα διάφορα δείγματα ήταν τα: πρωτοκατεχικό οξύ, γλωρογενικό οξύ, 4- υδροξυβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ και γαλλικό οξύ. Πολλά από αυτά μπόρεσαν να ποσοτικοποιηθούν, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ το οποίο ποσοτικοποιήθηκε και στα τέσσερα εκχυλίσματα του καφέ και το πρωτοκατεχικό οξύ το οποίο ποσοτικοποιήθηκε τόσο στα εκχυλίσματα του καφέ όσο και στο εκχύλισμα φράουλας.

Τα εκχυλίσματα στα οποία ταυτοποιήθηκαν τα περισσότερα φαινολικά οξέα ήταν αυτά του μαύρου και του ντεκαφεϊνέ καφέ, ενώ το εκχύλισμα στο οποίο ποσοτικοποιήθηκαν τα περισσότερα φαινολικά οξέα ήταν αυτό του ντεκαφεϊνέ καφέ. Έτσι, συμπεραίνεται πως ο ντεκαφεϊνέ είναι ο πιο πλούσιος καφές όσον αφορά το

φαινολικό περιεχόμενο. Αυτό οφείλεται, αρχικά, στο γεγονός ότι η διαδικασία αφαίρεσης της καφεΐνης δεν υποβαθμίζει την σύσταση του καφέ σε φαινολικές ενώσεις.[34] Επίσης, η καφεΐνη φαίνεται να παρουσιάζει προ-οξειδωτική δράση, και η παρουσία της κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος πιθανό να προκαλεί οξείδωση σε κάποια από τα περιεχόμενα φαινολικά οξέα του καφέ.[39] Έτσι, μπορεί να εξηγηθεί η χαμηλότερη συγκέντρωση των φαινολικών οξέων σε εκχυλίσματα κανονικού καφέ, συγκριτικά με τον ντεκαφεϊνέ.

Τέλος, οι μελλοντικοί στόχοι και τα βήματα προς βελτίωση για την παρούσα εργασία που θα μπορούσαν να γίνουν είναι τα εξής: α) μελέτη περισσότερων φυτικών εκχυλισμάτων προκειμένου να διεξαχθεί συγκριτική μελέτη, β) βελτίωση του διαχωρισμού κάποιων φαινολικών οξέων με αλλαγή του ανιχνευτή (π.χ. φασματομετρία μάζας (MS), αντί για συστοιχία φωτοδιοδίων (PDA)) και κατ' επέκταση της στήλης διαχωρισμού (διαφορετικό μέγεθος σωματιδίων, διάμετρος και μήκος στήλης), έτσι ώστε να μειωθεί και ο χρόνος ανάλυσης, και γ) ανάπτυξη μεθόδου για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών, που αποτελούν την αμέσως επόμενη μεγάλη κατηγορία φαινολικών ενώσεων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mou-Tuan Huang Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II* **1992**, 6.
2. Vermerris, W.; Nicholson, R. Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In *Phenolic Compound Biochemistry*; Vermerris, W., Nicholson, R., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; pp. 1–34 ISBN 978-1-4020-5164-7.
3. A. Escarpa; M. C. Gonzalez An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods: Critical Reviews in Analytical Chemistry: Vol 31, No 2. *Taylor & Francis Online* **2010**, 31, 57–139, doi:10.1080/20014091076695.
4. Delgado, A.M.; Issaoui, M.; Chammem, N. Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods. *J aoac int* **2019**, 102, 1356–1364, doi:10.5740/jaoacint.19-0128.
5. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chemistry* **2006**, 99, 191–203, doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
6. Shahidi, F.; Varatharajan, V.; Oh, W.; Peng, H. Phenolic Compounds in Agri-Food by-Products, Their Bioavailability and Health Effects. *Journal of Food Bioactives* **2019**, 5, doi:10.31665/JFB.2019.5178.
7. Tapia-Quirós, P.; Montenegro-Landívar, M.F.; Reig, M.; Vecino, X.; Cortina, J.L.; Saurina, J.; Granados, M. Recovery of Polyphenols from Agri-Food By-Products: The Olive Oil and Winery Industries Cases. *Foods* **2022**, 11, 362, doi:10.3390/foods11030362.
8. Kumar, N.; Goel, N. Phenolic Acids: Natural Versatile Molecules with Promising Therapeutic Applications. *Biotechnol Rep (Amst)* **2019**, 24, e00370, doi:10.1016/j.btre.2019.e00370.
9. Zhang, Y.; Cai, P.; Cheng, G.; Zhang, Y. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications* **2022**, 17, 1934578X211069721, doi:10.1177/1934578X211069721.
10. Roche, A.; Ross, E.; Walsh, N.; O'Donnell, K.; Williams, A.; Klapp, M.; Fullard, N.; Edelstein, S. Representative Literature on the Phytonutrients Category: Phenolic Acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, 57, 1089–1096, doi:10.1080/10408398.2013.865589.
11. Subbiah, V.; Xie, C.; Dunshea, F.R.; Barrow, C.J.; Suleria, H.A.R. The Quest for Phenolic Compounds from Seaweed: Nutrition, Biological Activities and Applications. *Food Reviews International* **2023**, 39, 5786–5813, doi:10.1080/87559129.2022.2094406.
12. Xu, C.-C.; Wang, B.; Pu, Y.-Q.; Tao, J.-S.; Zhang, T. Advances in Extraction and Analysis of Phenolic Compounds from Plant Materials. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2017**, 15, 721–731, doi:10.1016/S1875-5364(17)30103-6.
13. Alara, O.R.; Abdurahman, N.H.; Ukaegbu, C.I. Extraction of Phenolic Compounds: A Review. *Current Research in Food Science* **2021**, 4, 200–214, doi:10.1016/j.crfs.2021.03.011.
14. aurorabiodev, A. Liquid-Liquid vs Supported-Liquid vs Solid-Phase Extraction. *Aurora Biomed*.
15. Solid-Liquid Extraction | Solvent Extraction | Laboratory Techniques Available online:

- https://biocyclopedia.com/index/chem_lab_methods/solidliquid_extraction.php (accessed on 18 September 2023).
16. Tang, S.; Chia, G.H.; Chang, Y.; Lee, H.K. Automated Dispersive Solid-Phase Extraction Using Dissolvable Fe₃O₄-Layered Double Hydroxide Core–Shell Microspheres as Sorbent. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11070–11076, doi:10.1021/ac503323e.
 17. Mandal, S.C.; Mandal, V.; Das, A.K. Chapter 6 - Classification of Extraction Methods. In *Essentials of Botanical Extraction*; Mandal, S.C., Mandal, V., Das, A.K., Eds.; Academic Press: Boston, 2015; pp. 83–136 ISBN 978-0-12-802325-9.
 18. H. Kusuma; M. Mahfud [PDF] Response Surface Methodology for Optimization Studies of Microwave-Assisted Extraction of Sandalwood Oil | Semantic Scholar Available online: <https://www.semanticscholar.org/paper/Response-Surface-Methodology-for-Optimization-of-of-Kusuma-Mahfud/0ba797d112fd94a262f3755005687a76d8d175e0> (accessed on 20 September 2023).
 19. Zhu, Z.; Li, S.; He, J.; Thirumdas, R.; Montesano, D.; Barba, F.J. Enzyme-Assisted Extraction of Polyphenol from Edible Lotus (*Nelumbo Nucifera*) Rhizome Knot: Ultra-Filtration Performance and HPLC-MS² Profile. *Food Research International* **2018**, *111*, 291–298, doi:10.1016/j.foodres.2018.05.047.
 20. Robbins*, R.J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology Available online: <https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/jf026182t> (accessed on 18 September 2023).
 21. Sagar Aryal HPLC: Principle, Parts, Types, Uses, Diagram Available online: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (accessed on 18 September 2023).
 22. Granato, D.; Santos, J.S.; Maciel, L.G.; Nunes, D.S. Chemical Perspective and Criticism on Selected Analytical Methods Used to Estimate the Total Content of Phenolic Compounds in Food Matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *80*, 266–279, doi:10.1016/j.trac.2016.03.010.
 23. Bianca R. Albuquerque; Sandrina A. Heleno; M. Beatriz P. P. Oliveira; Lillian Barros; Isabel C. F. R. Ferreira Phenolic Compounds: Current Industrial Applications, Limitations and Future Challenges - Food & Function (RSC Publishing). *FOOD & FUNCTION* **2020**, doi:10.1039/DOFO02324H.
 24. Garavand, F.; Jalai-Jivan, M.; Assadpour, E.; Jafari, S.M. Encapsulation of Phenolic Compounds within Nano/Microemulsion Systems: A Review. *Food Chemistry* **2021**, *364*, 130376, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130376.
 25. Munin, A.; Edwards-Lévy, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 793–829, doi:10.3390/pharmaceutics3040793.
 26. Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S.; Bugarski, B. An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications. *Procedia Food Science* **2011**, *1*, 1806–1815, doi:10.1016/j.profoo.2011.09.265.
 27. Mohyeddin Assali; Nihal Zohud; Murad Abualhasan; Noura Ghazal RP-HPLC Method Development and Validation of Synthesized Codrug in Combination with Indomethacin, Paracetamol, and Famotidine. **2020**, *9*, doi:10.1155/2020/1894907.
 28. Biology with Animations High Performance Liquid Chromatography HPLC-UV-VIS Detector Animation - YouTube Available online:

- <https://www.youtube.com/watch?v=eCj0cRtJvJg> (accessed on 20 September 2023).
29. Method Validation Available online: <https://www.eurachem.org/index.php/mnu-tsk-mv> (accessed on 26 September 2023).
 30. EMA Research and Development Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development> (accessed on 26 September 2023).
 31. ΔΗΜΟΥ ΑΡΓΥΡΩ-ΙΩΑΝΝΑ Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HPLC για ποσοτικό προσδιορισμό και έλεγχο προσμίξεων του βαλπροϊκού νατρίου και προσδιορισμό EDTA σε ενέσιμο διάλυμα, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ: ΑΘΗΝΑ, 2017.
 32. Ghulam A. Shabir HPLC Method Development and Validation for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Technology Europe* **2004**, 16.
 33. 8. Stability | MOOC: Validation of Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) Methods (Analytical Chemistry) Course Available online: https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/8-stability (accessed on 18 September 2023).
 34. Tsiaka, T.; Kritsi, E.; Bratakos, S.M.; Sotiroudīs, G.; Petridi, P.; Savva, I.; Christodoulou, P.; Strati, I.F.; Zoumpoulakis, P.; Cavouras, D.; et al. Quality Assessment of Ground Coffee Samples from Greek Market Using Various Instrumental Analytical Methods, In Silico Studies and Chemometrics. *Antioxidants (Basel)* **2023**, 12, 1184, doi:10.3390/antiox12061184.
 35. R. Portillo, O.; Arévalo, A.C. Coffee's Phenolic Compounds. A General Overview of the Coffee Fruit's Phenolic Composition. *RB* **2022**, 7, 1–19, doi:10.21931/RB/2022.07.03.31.
 36. Teodora COSTEA; Alkan SEVDE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SIMPLE AND FLAVOURED TURKISH COFFEE - ProQuest Available online: <https://www.proquest.com/openview/6ba8ffcf5d918f08f45d5e1275b1d168/1?pq-origsite=gscholar&cbl=75936> (accessed on 17 September 2023).
 37. Erskine, E.; Subaşı, B.G.; Vahapoglu, B.; Capanoglu, E. Coffee Phenolics and Their Interaction with Other Food Phenolics: Antagonistic and Synergistic Effects. *ACS Omega* **2022**, 7, 1595, doi:10.1021/acsomega.1c06085.
 38. Maurizio Battino; Francesca Giampieri; Alfonso Varela-López; Sadia Afrin; Massimiliano Gasparrini; Tamara Y. Forbes-Hernandez; Patricia Reboredo-Rodriguez; Bruno Mezzetti Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* **2016**, 3, doi:10.1021/acs.jafc.6b00857.
 39. Soares, M.J.; Sampaio, G.R.; Guizzellini, G.M.; Figueira, M.S.; Pinaffi, A.C.D.C.; Soares Freitas, R.A.M.; Shahidi, F.; De Camargo, A.C.; Torres, E.A.F.D.S. Regular and Decaffeinated Espresso Coffee Capsules: Unravelling the Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Properties in Milk Model System upon in Vitro Digestion. *LWT* **2021**, 135, 110255, doi:10.1016/j.lwt.2020.110255.