



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΙΣΘΗΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εφαρμογή χρωματομετρίας ψηφιακής εικόνας στον προσδιορισμό μετάλλων απευθείας
σε Ο/Λ γαλακτώματα

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ

Γεωργία Μπακάρα

ΑΜ: 20678199

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ

Γεωργία Ελένη Τσότσου

ΑΙΓΑΛΕΩ 2024



**UNIVERSITY OF
WEST ATTICA**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

DEPARTMENT OF AESTHETICS AND COSMETIC SCIENCE

DISSERTATION

Application of digital image colorimetry for the determination of metals directly in O/W emulsions

STUDENT NAME

Georgia Bakara

CN: 20678199

NAME OF SUPERVISOR

Georgia Eleni Tsotsou

EGALEO/2024

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Η προπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την
κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

ΒΑΡΒΑΡΕΣΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΑ	ΕΠΙΤΡΟΠΗ	
ΜΥΡΟΦΟΡΑ ΠΗΛΑΚΟΥΤΑ	ΕΠΙΤΡΟΠΗ	
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ	ΕΠΙΤΡΟΠΗ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μπακάρα Γεωργία του Παύλου, με αριθμό μητρώου 20678199 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Αισθητικής και Κοσμητολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Γ. ΜΠΑΚΑΡΑ

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τη καθηγήτρια κυρία Γ. Τσότσου, για τη πολύτιμη βοήθεια και τη καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ τη κυρία Μ. Πηλακούτα για τη δική της συμβολή στην ολοκλήρωση της εργασίας, και τη συνεισφορά της στην ανάλυση με XRF.

Αφιέρωσεις

Στην οικογένειά μου και τον σύντροφό μου.

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και αρχική επικύρωση μιας καινοτόμου μεθόδου προσδιορισμού μετάλλων, απευθείας σε O/W γαλακτώματα, με τη χρήση χρωματομετρίας ψηφιακής εικόνας με κινητό τηλέφωνο. Η μέθοδος στοχεύει στην άμεση ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του κοβαλτίου, χωρίς την ανάγκη προκατεργασίας του δείγματος, πχ. με εκχύλιση. Η χρήση μιας απλής κάμερας κινητού τηλεφώνου, σε συνδυασμό με το λογισμικό Image J, καθιστά τη διαδικασία αυτή προσιτή και χαμηλού κόστους, ενώ επιπλέον, δεν απαιτεί ειδικευμένο εξοπλισμό ή προσωπικό. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή, είναι συγκρίσιμη ως προς τον χρόνο ανάλυσης σε σχέση με άλλες τεχνικές ποσοτικής ανάλυσης γαλακτωμάτων, όπως η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη δημιουργία έγχρωμων συμπλόκων ενώσεων των μετάλλων, με ειδικά αντιδραστήρια. Συγκεκριμένα, η φερροζίνη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του κοβαλτίου, δημιουργώντας έγχρωμες σύμπλοκες ενώσεις εντός του γαλακτώματος. Στη συνέχεια, λαμβάνονται φωτογραφίες των δειγμάτων και γίνεται ανάλυση της έντασης του ανακλώμενου χρώματος μέσω του λογισμικού, το οποίο υπολογίζει την ένταση σε τρία χρωματικά κανάλια (κόκκινο, πράσινο, μπλε - RGB). Η μέθοδος επιτρέπει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με καμπύλες αναφοράς, ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση κοβαλτίου στο δείγμα.

Πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα καλλυντικά γαλακτώματα. Η μέθοδος έδειξε γραμμική σχέση μεταξύ της έντασης του χρώματος και της συγκέντρωσης κοβαλτίου. Συγκρίθηκε επιτυχώς, με τη φασματοσκοπία XRF για την επικύρωση των αποτελεσμάτων, αποδεικνύοντας την αξιοπιστία της. Εξετάσθηκε η παρεμβολή κοινών συστατικών στον προσδιορισμό κοβαλτίου και στη συνέχεια, προτάθηκε μια μέθοδος, που να περιορίζει τη παρεμβολή αυτή.

Επίσης, προσαρμόστηκε η γνωστή από τη βιβλιογραφία τεχνική FRAP, σύμφωνα με τη προτεινόμενη μεθοδολογία ανάλυσης. Η προσαρμοσμένη FRAP, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της βιταμίνης C, σε χαρτί χρωματογραφίας με κάμερα κινητού τηλεφώνου. Διαπιστώθηκε η γραμμικότητα μεταξύ της έντασης χρώματος και της συγκέντρωσης της βιταμίνης.

Τέλος, προκαταρκτικά πειράματα, απέδειξαν ότι η μεθοδολογία, με κατάλληλη τροποποίηση, μπορεί να παρακολουθήσει τα ολικά επίπεδα σιδήρου εντός γαλακτώματος.

Η εργασία επικεντρώνεται στην ανίχνευση μετάλλων σε καλλυντικά προϊόντα, καθώς πολλά από αυτά, όπως το κοβάλτιο, είναι τοξικά για τον ανθρώπινο οργανισμό σε υψηλότερα επίπεδα, ενώ σε χαμηλότερα μπορούν να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση και δερματίτιδα εξ επαφής. Η προτεινόμενη μέθοδος είναι δυνατόν να προσφέρει μια γρήγορη και οικονομική λύση για τον έλεγχο της ασφάλειας των καλλυντικών, εξαλείφοντας την ανάγκη πρόσβασης σε πολύπλοκα εργαστηριακά εργαλεία. Υπολείπονται περαιτέρω μελέτες επικύρωσης της μεθοδολογίας.

Λέξεις κλειδιά: Σίδηρος, κοβάλτιο, βιταμίνη C, χρωματομετρία, κινητό τηλέφωνο, FRAP, γαλακτώματα, παρεμπόδιση, επιλεκτική οξειδωση.

Abstract

The present thesis focuses on the development and preliminary validation of an innovative method for the determination of metals, directly in O/W emulsions, using digital image colorimetry with a mobile phone. The method aims at the direct detection and quantification of cobalt, without the need for sample pretreatment, such as extraction. The use of a simple mobile phone camera, combined with Image J software, makes this process accessible and low-cost, while also eliminating the need for specialized equipment or personnel. Additionally, the method is comparable in terms of analysis time, to other quantitative emulsion analysis techniques, such as atomic absorption spectroscopy.

The principle of the method is based on the formation of colored metal complexes with specific reagents. Specifically, ferrozine is used for the determination of cobalt, forming colored compounds within the emulsion. Subsequently, photographs of the samples are taken, and the intensity of the reflected color is analyzed using the software, which calculates the intensity in three color channels (red, green, blue - RGB). The method allows for comparison of results with reference curves to determine the concentration of cobalt in the sample.

Experiments were conducted on various cosmetic emulsions. The method demonstrated a linear relationship between color intensity and cobalt concentration. It was successfully compared with XRF spectroscopy for result validation, proving its reliability. The interference of common components in the determination of cobalt was examined, and a method was proposed to minimize this interference.

Additionally, the well-known FRAP technique from the literature was adapted according to the proposed analysis methodology. The adapted FRAP was used for the determination of vitamin C on chromatography paper with a mobile phone camera. The linearity between color intensity and vitamin concentration was confirmed.

Finally, preliminary experiments showed that with proper modification, the methodology can monitor total iron levels within emulsions.

The thesis emphasizes the importance of detecting metals in cosmetic products, as many of them, such as cobalt, are toxic to the human body at higher levels, while at lower levels, they can cause allergic reactions and contact dermatitis. The proposed method can offer a fast and cost-effective solution for checking the safety of cosmetics, eliminating the need for access to complex laboratory tools. Further validation studies of the methodology are required.

Keywords: Iron, cobalt, vitamin C, colorimetry, mobile phone, FRAP, emulsions, interference, selective oxidation.

Περιεχόμενα

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής.....	iii
ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Αφιερώσεις.....	vi
Περίληψη.....	vii
Abstract	viii
Περιεχόμενα	ix
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Σκοπός εργασίας.....	1
1.2. Καλλυντικά.....	1
1.3. Μέταλλα	2
1.3.1. Μέταλλα στα καλλυντικά προϊόντα.....	2
1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις μετάλλων στον οργανισμό	3
1.4. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ).....	5
1.5. Χρωματομετρία	6
1.5.1. Χρωματομετρία	6
1.5.2. Θεμελιώδεις Αρχές.....	6
1.5.3. Μέθοδοι Μέτρησης	7
1.5.4. Εφαρμογές.....	7
1.6. Μέθοδοι και τεχνικές προσδιορισμού μετάλλων σε καλλυντικά	8
1.6.1. Ειδικά για την XRF	9
1.6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός αναλυτών με τη φωτογραφική κάμερα κινητού τηλεφώνου	9
1.7. Ποσοτικός προσδιορισμός αναλυτών σε καλλυντικά με τη φωτογραφική κάμερα κινητού τηλεφώνου.....	10
1.7.1. Χρωματομετρική ανάλυση γλυκόζης σε γαλακτώματα	10
1.7.2. Χρωματομετρική ανάλυση ουρίας σε γαλακτώματα	11
1.8. FRAP τεχνική.....	11
2. Πείραμα μετάλλων.....	12
2.1. Αντιδραστήρια και μέθοδοι ανάλυσης	13
2.1.1. Αντιδραστήρια.....	13
2.1.2. Κρέμες	13

2.1.3.	Όργανα και συσκευές.....	16
2.1.4.	Μεθοδολογία λήψης φωτογραφίας	16
2.1.5.	Μεθοδολογία ανάλυσης φωτογραφίας.....	16
2.2.	Γραμμικότητα.....	17
2.3.	Βέλτιστες συνθήκες	26
2.3.1.	Βέλτιστος χρόνος.....	26
2.3.2.	Εύρος γραμμικής περιοχής	28
2.3.3.	Επιλογή βέλτιστου καναλιού χρώματος	29
2.3.4.	Περαιτέρω παρατηρήσεις.....	31
2.4.	Παρεμποδιστές.....	31
2.4.1.	Παρεμποδίσεις από αντικατάσταση της φερροζίνης στην ένωση συναρμογής	31
2.4.2.	Παρεμποδίσεις από συναρμογή παρεμβάλλοντων μετάλλων με τη φερροζίνη	33
2.4.3.	Παρεμπόδιση από το χρώμα του αρχικού γαλακτώματος.....	35
2.5.	Επιλεκτική οξείδωση	35
2.6.	XRF	37
2.6.1.	Όργανα και συσκευές.....	38
2.6.2.	Δείγματα και η προετοιμασία τους.....	38
2.6.3.	Συνθήκες λειτουργίας συστήματος EDXRF	38
2.6.4.	Συνθήκες ανάλυσης δειγμάτων	39
3.	FRAP/ BITAMINH C.....	41
3.1.	Αντιδραστήρια και μέθοδοι ανάλυσης	41
3.1.1.	Αντιδραστήρια.....	41
3.1.2.	Κρέμες	41
3.1.3.	Όργανα και συσκευές.....	43
3.1.4.	Μέθοδος λήψης φωτογραφίας.....	43
3.1.5.	Μέθοδος ανάλυσης φωτογραφίας.....	43
3.2.	Γραμμικότητα.....	43
3.3.	Βέλτιστες συνθήκες	46
3.3.1.	Βέλτιστος χρόνος.....	46
3.3.2.	Εύρος γραμμικής περιοχής	47
3.3.3.	Επιλογή βέλτιστου καναλιού χρώματος	48
4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση	48

5. Βιβλιογραφία.....	49
Παράρτημα.....	53
Κατάλογος γραφημάτων	53
Κατάλογος πινάκων.....	55
Κατάλογος εικόνων	56

1. Εισαγωγή

1.1. Σκοπός εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η ανάπτυξη και αρχική επικύρωση νέας μεθόδου με την οποία, θα δίνεται η δυνατότητα στον επιστήμονα να αναλύσει απευθείας, χωρίς προηγούμενη εκχύλιση, ένα O/W γαλάκτωμα και να διερευνήσει την περιεχόμενη συγκέντρωση κοβαλτίου, και τη συμμόρφωση αυτής με τις εκάστοτε προδιαγραφές. Η ανάλυση γίνεται με την χρήση κάμερας κινητού τηλεφώνου και ενός λογισμικού, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο το κόστος της ανάλυσης και την ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μεθοδολογία, εξαλείφει την ανάγκη πρόσβασης σε συγκεκριμένο εργαστηριακό εξοπλισμό, που μπορεί να μην υπάρχει καθολικά διαθέσιμος. Επιπρόσθετο πλεονέκτημα της μεθόδου, αποτελεί η συντομότερη διάρκεια της, σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, που χρησιμοποιούνται στη ποσοτική ανάλυση γαλακτωμάτων.

Η αρχή της μεθόδου ανίχνευσης βασίζεται στην έγχρωμη ένωση συναρμογής, που δημιουργείται με το δισθενές κοβάλτιο εντός του γαλακτώματος μετά τη προσθήκη ειδικού αντιδραστηρίου. Στη συνέχεια, λαμβάνεται φωτογραφία των χρωματισμένων δειγμάτων και γίνεται ανάλυση της έντασης του ανακλώμενου χρώματος, μέσω λογισμικού. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής, χρησιμοποιούνται για τη σύγκριση με καμπύλες αναφοράς, ώστε να προσδιοριστεί αν υπάρχει κοβάλτιο, στη καλλυντική σύνθεση και σε ποιά συγκέντρωση. Όλη η διαδικασία εκτελείται υπό ορισμένες συνθήκες, που έχουν οριστεί, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη γραμμικότητα και ευαισθησία. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο βέλτιστος χρόνος και το χρωματικό κανάλι κατά την ανάλυση, καθώς και τυχόν παρεμποδίσεις, που μπορεί να υπάρχουν και πως μπορεί να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα. Η εγκυρότητα της μεθοδολογίας αποδείχθηκε ύστερα από συσχέτιση αυτής με επιβεβαιωμένη μέθοδο(XRF).

Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη βαρέων μετάλλων σε ευρέως χρησιμοποιούμενα καλλυντικά, των οποίων η ανίχνευση, όπως προαναφέρθηκε απαιτεί χρόνο, κόπο και πόρους. Η μέθοδος, που προτείνουμε, άρει πολλούς από αυτούς τους περιορισμούς, οι οποίοι για πολλά εργαστήρια είναι αποτρεπτικοί για τη διεξαγωγή της ανάλυσης.

1.2. Καλλυντικά

Τα καλλυντικά χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα από τους ανθρώπους, με σκοπό να καθαρίσουν, να βελτιώσουν ή να αλλάξουν την εξωτερική εμφάνιση του δέρματος, των νυχιών, των δοντιών ή των μαλλιών. Ως καλλυντικό, θεωρείται οποιαδήποτε ουσία ή μίγμα ουσιών, πρόκειται να έρθει σε επαφή με το ανθρώπινο δέρμα ή με την εσωτερική κοιλότητα του στόματος και τα δόντια, για τον καθαρισμό, τον αρωματισμό τους, την αλλαγή της εμφάνισης και/ή να διορθώσει τις σωματικές οσμές και/ή να τα προστατεύσει και να τα διατηρήσει σε καλή κατάσταση, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό κανονισμό 93/35/EEC. (Borowska & Brzówska, 2015)

Σύστημα, ονομάζεται ο χώρος, ο οποίος έχει οριοθετηθεί και στον οποίο διεξάγονται μελέτες και πειράματα, ενώ οτιδήποτε βρίσκεται εκτός αυτού, ονομάζεται περιβάλλον. Φάση ενός συστήματος, είναι μια ομογενής περιοχή, που διαχωρίζεται από άλλες φάσεις με ορισμένες επιφάνειες. Όταν, σε ένα σύστημα βρίσκονται δύο ή περισσότερες φάσεις μαζί, η επιφάνεια διαχωρισμού τους ονομάζεται επιφάνεια διαχωρισμού ή διεπιφάνεια, και τα μόρια, που τη συνθέτουν, συμπεριφέρονται διαφορετικά όσον αφορά συγκεκριμένες πτυχές συγκριτικά με τα μόρια δύο ξεχωριστών φάσεων.

Σύστημα διασποράς, ονομάζεται αυτό που έχει δύο τουλάχιστον φάσεις και είναι ετερογενές. Η φάση, που δεν είναι διαλυμένη αλλά είναι ομοιόμορφα κατανομημένη στον χώρο ονομάζεται ασυνεχής ή εσωτερική, ενώ η άλλη ονομάζεται εξωτερική φάση ή μέσο διασποράς και είναι συνεχής. Ένα γαλάκτωμα, αποτελεί σύστημα με δύο μη μιγνυόμενες υγρές φάσεις, όπου η μία βρίσκεται διεσπαρμένη μέσα στην άλλη, με μορφή μικρών σταγονιδίων. Οι φάσεις μπορεί να είναι, είτε υδατικές, είτε ελαιώδεις. Στη περίπτωση, που η ελαιώδης φάση είναι διεσπαρμένη μέσα στην υδατική, τότε έχουμε ένα O/W γαλάκτωμα, ενώ στη περίπτωση που η υδατική είναι διεσπαρμένη μέσα στην ελαιώδη, τότε έχουμε ένα W/O γαλάκτωμα. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα, να έχουμε και πιο περίπλοκα συστήματα, με τρεις φάσεις, δηλαδή, μπορεί η υδατική φάση να έχει διασπαρεί, μέσα στην ελαιώδη και στη συνέχεια, αυτό το σύστημα να διασπαρεί μέσα σε υδατική φάση. Σε αυτή τη περίπτωση, έχουμε W/O/W διπλό γαλάκτωμα, το οποίο είναι ένα υγρό σύστημα διασποράς.

1.3. Μέταλλα

1.3.1. Μέταλλα στα καλλυντικά προϊόντα

Δυστυχώς, η χρήση των καλλυντικών σε ορισμένες περιπτώσεις, αποτελεί αιτία εμφάνισης αρνητικών επιδράσεων, οφειλόμενες στην παρουσία συγκεκριμένων χημικών ουσιών στις φόρμουλες των προϊόντων. Έχει διαπιστωθεί, ότι σε έναν μεγάλο αριθμό προϊόντων, που είναι διαθέσιμα αυτή τη στιγμή στην αγορά, υπάρχουν πολλές χημικές ουσίες, για τις οποίες έχουν εγερθεί ανησυχίες, συμπεριλαμβανομένων σε αυτές, τα παραβένια, φθαλικές ενώσεις, π-φαιθυλενοδιαμίνη (PPD), φορμαλδεΐδη, διοξάνιο, τρικλοζάνη και αρκετά μέταλλα. (Borowska & Brzóška, 2015) (Bocca, Pino, Alimonti, & Forte, 2014)

Η παρουσία των παραπάνω χημικών ουσιών, μέσα στα καλλυντικά, αποσκοπεί στην παροχή κάποιων ιδιοτήτων ή χαρακτηριστικών στο προϊόν, όπως είναι η αντιοξειδωτική δράση, η συντήρηση, το χρώμα, το άρωμα, η απορρόφηση UV ακτινοβολίας, η ενυδάτωση και η γαλακτωματοποίηση. Αυτές οι ουσίες, μπορεί να προστίθενται εξωγενώς στο προϊόν και επομένως, να είναι δυνατή η συμμόρφωσή τους με τους κανονισμούς και τα όρια, που επιβάλλονται από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Ωστόσο, πολλές φορές συναντάμε περιπτώσεις ουσιών, οι οποίες βρίσκονται ως προσμίξεις πρώτων υλών μέσα στο προϊόν και για αυτόν τον λόγο, μπορεί να είναι επικίνδυνη η χρήση τους για τον

ανθρώπινο οργανισμό ή μπορεί η παρουσία τους να επηρεάζει τη σταθερότητα του προϊόντος ή την αποτελεσματικότητά του. (Borowska & Brzóska, 2015)

Εξαιτίας, των αρνητικών επιδράσεων των μετάλλων, στον ανθρώπινο οργανισμό, η παρουσία τους σε καλλυντικά προϊόντα, έχει απαγορευθεί ή έχει περιοριστεί από τους κανονισμούς της κάθε χώρας. Στον Ευρωπαϊκό κανονισμό, περιγράφονται περίπου 1200 χημικές ουσίες, που είναι τοξικές για τον οργανισμό και έχει απαγορευθεί η χρήση τους. Ανάμεσα σε αυτές τις ουσίες, είναι και κάποια μέταλλα, όπως είναι το αρσενικό, ο μόλυβδος, το κάδμιο, το νικέλιο, ο υδράργυρος. Ωστόσο, σε ορισμένες χώρες, δεν υπάρχουν οι αντίστοιχοι κανονισμοί, σχετικά με το ποιές ουσίες επιτρέπονται να υπάρχουν στα καλλυντικά και τα όρια της επιτρεπόμενης συγκέντρωσής τους και για τον λόγο αυτόν, συναντάμε πολλά προϊόντα στην παγκόσμια αγορά, προερχόμενα εκτός ΕΕ, τα οποία περιέχουν μέταλλα σε συγκέντρωση ανώτερη των επιτρεπόμενων ορίων. (Borowska & Brzóska, 2015) (Bocca, Pino, Alimonti, & Forte, 2014)

1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις μετάλλων στον οργανισμό

Παρόλο που, η απορρόφηση των μετάλλων από το δέρμα είναι περιορισμένη (για το Co: 38,4 ng/cm², για το Ni: 31ng/cm²) τα στοιχεία αυτά, μπορούν να συσσωρευτούν στην επιδερμίδα ή στα εσωτερικά όργανα του ανθρώπου και να δημιουργήσουν έναν αριθμό προβλημάτων για τον οργανισμό, άλλοτε πιο ελαφριά και άλλοτε πιο σοβαρά και περίπλοκα. Έχουν καταγραφεί πολλά περιστατικά, τοπικής, κυρίως αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής, ή συστημικής επίδρασης, εξαιτίας της έκθεσης των χρηστών σε τοξικές ουσίες, που περιέχονται σε καλλυντικά. (Borowska & Brzóska, 2015) (Filon, et al., 2009)

Τα μέταλλα, που υπάρχουν στα καλλυντικά προϊόντα, πιθανώς να απορροφώνται από το δέρμα ή να συσσωρεύονται σε αυτό. Μέταλλα, όπως το νικέλιο, το χρώμιο ή το κοβάλτιο, συσσωρεύονται στη κερατίνη στοιβάδα και πιθανότατα, δημιουργούν αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής, ενώ αντίθετα, στοιχεία όπως, ο υδράργυρος, ο μόλυβδος, το αλουμίνιο και το κάδμιο, διαπερνούν την επιδερμίδα και εισέρχονται στο χόριο, από εκεί στα τριχοειδή αγγεία και περαιτέρω στη κυκλοφορία του αίματος, μέσω της οποίας μεταφέρονται στα όργανα και εκεί συσσωρεύονται με τοξικές επιπτώσεις. (Borowska & Brzóska, 2015)

Έχουν αναφερθεί αρκετά περιστατικά αλλεργικής δερματίτιδας εξ επαφής, από τη χρήση σκιών για τα μάτια, οι οποίες περιείχαν μικρές ποσότητες νικελίου και κοβαλτίου. (Bocca, Pino, Alimonti, & Forte, 2014)

Καταγράφονται παρόμοιες περιπτώσεις γυναικών, που παρουσίασαν διαφορετικά συμπτώματα, όπως είναι το έκζεμα, το οίδημα στα μάτια, η φαγούρα και η φλεγμονή, εξαιτίας της χρήσης σκιών, μάσκαρας και μολυβιού για τα μάτια, που περιείχαν χρώμιο και οξειδία του σιδήρου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα συμπτώματα υποχώρησαν, αφού σταμάτησαν να χρησιμοποιούν αυτά τα προϊόντα, παρόλαυτα υπάρχουν λίγα

περιστατικά, στα οποία, χρειάστηκε η θεραπεία με κορτικοστεροειδή για να καταφέρουν να περιορίσουν τα συμπτώματα. Για τον λόγο αυτόν, προτείνεται σε όσους γνωρίζουν, πως έχουν αλλεργία σε μέταλλα, να αποφεύγουν τη χρήση καλλυντικών, που περιέχουν σε οποιαδήποτε μορφή, στοιχεία όπως αυτά, που αναφέρθηκαν παραπάνω, δηλαδή το νικέλιο, το χρώμιο, το κοβάλτιο και ο σίδηρος. (Borowska & Brzóska, 2015)

Αν και ο υδράργυρος, είναι γνωστό ότι είναι πολύ τοξικός, απαντάται ακόμα και σήμερα σε μικρές συγκεντρώσεις σε καλλυντικά, όπως είναι οι κρέμες λεύκανσης, οι οποίες είναι διαθέσιμες, ακόμα και σε αναπτυγμένες χώρες. Η χρήση τέτοιου είδους κρεμών, οδηγεί σε διαταραχές του ύπνου, προβλήματα στο αναπνευστικό σύστημα, πρωτεϊνουρία, περιφερικό και περικογχικό οίδημα, πόνους στη μέση και πρήξιμο των νεφρών, λόγω συσσώρευσής του, η οποία οδηγεί σε βαθμιαία καταστροφή των νεφρών. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ο υδράργυρος, μπορεί να προκαλέσει προβλήματα και στον περίγυρω του ατόμου, χωρίς οι ίδιοι να κάνουν χρήση του καλλυντικού, που περιέχει αυτό το στοιχείο. (Borowska & Brzóska, 2015)

Το αλουμίνιο, είναι ακόμα ένα ιδιαίτερα τοξικό μεταλλικό στοιχείο, το οποίο περιέχεται κυρίως σε καλλυντικά, τα οποία περιέχουν συστατικά, προερχόμενα, από τη Νεκρά Θάλασσα. Το αλουμίνιο, απορροφάται από το δέρμα, συσσωρεύεται στον οργανισμό και μετά από παρατεταμένη χρήση καλλυντικών, που το περιέχουν, φαίνεται να επηρεάζει τα οστά, προκαλώντας οστεομαλακία αλλά και τον εγκέφαλο, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της νόσου Alzheimer και άλλων νευρολογικών διαταραχών. (Borowska & Brzóska, 2015) (Al-Dayel, Hefne, & Al-Ajyan, 2011) (Fattah & Pingitore Jr., 2009)

Τα πιο επιβλαβή, από όλα τα καλλυντικά προϊόντα, που περιέχουν ίχνη τοξικών μετάλλων, είναι τα κραγιόν, τα μολύβια χειλιών και τα λιπ-γκλος, καθώς αυτά κατά τη χρήση τους, έχουν μεγάλη πιθανότητα κατάποσης κατά τη κατανάλωση φαγητού ή ποτού. Επίσης, αρκετά επικίνδυνα είναι τα καλλυντικά φυσικής προέλευσης, που περιέχουν ως πρώτες ύλες, διάφορα εκχυλίσματα φυτών, λάσπες από τη Νεκρά Θάλασσα ή άλλες θάλασσες, μέλι, αργανέλαιο, ελαιόλαδο, αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών, τα οποία χρησιμοποιούνται ως αρωματικοί παράγοντες. Οι παραπάνω πρώτες ύλες, περιέχουν ποσότητες μετάλλων, στην ίδια συγκέντρωση με την οποία βρίσκονται στον ανώτερο φλοιό της γης. Τα στοιχεία αυτά, προσδένονται στην επιφάνεια των φυσικών αργιλοπυριτικών υλικών και γίνεται ανταλλαγή με τα ιόντα, που βρίσκονται στο δέρμα και με αυτόν τον τρόπο, απορροφώνται από το δέρμα. (Borowska & Brzóska, 2015) (Fattah & Pingitore Jr., 2009)

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, λόγω της τοξικότητας των μετάλλων στα καλλυντικά και της αδυναμίας αποφυγής τους, είναι αδήριτη ανάγκη, να βρεθεί μια μέθοδος, η οποία να μπορεί εύκολα και γρήγορα να προσδιορίζει και να ανιχνεύει τα μεταλλικά στοιχεία, που περιέχονται είτε ως συστατικά, είτε ως προσμίξεις. (Borowska & Brzóska, 2015) (Al-Dayel, Hefne, & Al-Ajyan, 2011) (Fattah & Pingitore Jr., 2009) (Filon, et al., 2009)

1.4. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C, γνωστή και ως ασκορβικό οξύ, είναι ένα υδρόφιλο μόριο και το πιο κοινό αντιοξειδωτικό στο ανθρώπινο δέρμα. Οι περισσότεροι οργανισμοί συνθέτουν τη βιταμίνη C από τη γλυκόζη. Ωστόσο, σε κάποιους οργανισμούς, όπως οι άνθρωποι, η σύνθεση αυτή δεν είναι αδύνατη λόγω της έλλειψης του ενζύμου L-gluconolactone oxidase, καθιστώντας απαραίτητη τη λήψη της βιταμίνης από τη διατροφή. (Pullar, Carr, & Vissers, 2017) (Bender & Fontana, 2023) (Ravetti, et al., 2019)

Η υψηλή συγκέντρωση βιταμίνης C στο δέρμα υποδηλώνει πολλές σημαντικές βιολογικές λειτουργίες, όπως η σύνθεση κολλαγόνου και η αντιοξειδωτική προστασία, καθώς και άλλες σημαντικές δραστηριότητες. Η βιταμίνη C λειτουργεί ως συμπράγοντας για τα ένζυμα, που σταθεροποιούν την τεταρτοταγή δομή του κολλαγόνου και προάγουν την έκφραση του γονιδίου του κολλαγόνου. Στο δέρμα, η σύνθεση κολλαγόνου γίνεται κυρίως από τους ινοβλάστες, οδηγώντας στην παραγωγή της βασικής μεμβράνης και της δερματικής μήτρας κολλαγόνου. Η εξάρτηση της υδροξυλάσης του κολλαγόνου από τη βιταμίνη C έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές μελέτες. (Pullar, Carr, & Vissers, 2017) (Bender & Fontana, 2023) (Gandhi, Elfeky, Ertugrul, Chela, & Daglilar, 2023) (Darr, Combs, & Pinnell, 1993) (Levavasseur, et al., 2015)

Επίσης, είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό που εξολοθρεύει οξειδωτικά από περιβαλλοντικούς ρύπους και την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UVR). Η συνδυαστική χρήση της με τη βιταμίνη E προσφέρει επιπρόσθετη προστασία, καθώς αναγεννά την οξειδωμένη βιταμίνη E, περιορίζοντας την οξειδωτική βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες. Επιπλέον, μειώνει τη σύνθεση της μελανίνης σε κυτταρικές καλλιέργειες και σε οργανισμούς, αλληλεπιδρώντας με την τυροσινάση, το ένζυμο κλειδί για τη μελανογένεση. Αυτό, την καθιστά χρήσιμη σε θεραπείες για δερματικές υπερμελαγχρώσεις, όπως το μέλασμα και οι κηλίδες ηλικίας. (Gandhi, Elfeky, Ertugrul, Chela, & Daglilar, 2023) (Benzie & Strain, 1996) (Darr, Combs, & Pinnell, 1993) (Qian, et al., 2023)

Η βιταμίνη C βοηθά στην πρόληψη της δερματικής γήρανσης, η οποία μπορεί να οφείλεται τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η χρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η φυσική γήρανση μειώνει την παραγωγή κολλαγόνου και ελαστίνης, ενώ η περιβαλλοντική γήρανση επιταχύνεται από παράγοντες όπως το κάπνισμα και η UVR, προκαλώντας αλλαγές στη δομή και λειτουργικότητα του δέρματος. Ακόμα, ενισχύει την παραγωγή λιπιδίων στον επιδερμικό φραγμό και προκαλεί τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, βοηθώντας στη διατήρηση της ενυδάτωσης του δέρματος και στην αντιμετώπιση της ξηρότητας, ένα κοινό φαινόμενο κυρίως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Η βιταμίνη C μπορεί να αποτρέψει ή να καθυστερήσει τη δημιουργία ρυτίδων μέσω της βελτιωμένης κολλαγόγένεσης. (Bender & Fontana, 2023) (Ravetti, et al., 2019) (Qian, et al., 2023) (Darr, Combs, & Pinnell, 1993)

Μελέτες έχουν δείξει ότι η βιταμίνη C βελτιώνει την επούλωση πληγών και τη σύνθεση κολλαγόνου σε καπνιστές και μη καπνιστές. Η ευεργετική επίδραση της βιταμίνης C στην επούλωση πληγών είναι από τις πιο σημαντικές. Η βιταμίνη αυτή, λειτουργεί ως συμπράγοντας για τη σύνθεση κολλαγόνου, ενισχύοντας την επούλωση τραυμάτων και μειώνοντας τη φλεγμονή τοπικά. Η βιταμίνη C, μπορεί να μειώσει τη φλεγμονή, που σχετίζεται με διάφορες δερματικές παθήσεις, όπως η ατοπική δερματίτιδα, η ψωρίαση και η ακμή. Αυτό, επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής κεραμιδίων και της ενίσχυσης της λειτουργίας της κερατινοποίησης. (Pullar, Carr, & Vissers, 2017) (Gandhi, Elfeky, Ertugrul, Chela, & Daglilar, 2023) (Darr, Combs, & Pinnell, 1993) (Chambial, Dwivedi, Shukla, Placheril, & Sharma, 2013) (Levasseur, et al., 2015)

Συνοψίζοντας, η βιταμίνη C είναι απαραίτητη για την υγεία του δέρματος, προσφέροντας προστασία από την οξειδωτική βλάβη, ενισχύοντας τη σύνθεση κολλαγόνου, περιορίζοντας τη μελανογένεση και βελτιώνοντας την ενυδάτωση και την επούλωση πληγών. Η συνεισφορά της στην πρόληψη της δερματικής γήρανσης και στη μείωση της φλεγμονής την καθιστά ένα σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της υγείας και της εμφάνισης του δέρματος. (Pullar, Carr, & Vissers, 2017) (Bender & Fontana, 2023) (Ravetti, et al., 2019) (Darr, Combs, & Pinnell, 1993) (Qian, et al., 2023) (Chambial, Dwivedi, Shukla, Placheril, & Sharma, 2013)

Το ασκορβικό οξύ, είναι ένα πολύ κοινό συστατικό στα καλλυντικά και προστίθεται σε αυτό ως αντιοξειδωτικό, ως παράγοντας περιποίησης του δέρματος, ως συστατικό αρωμάτων, ως λευκαντικός παράγοντας και επιπλέον, προστατεύει το δέρμα. Επίσης, χρησιμοποιείται πολύ συχνά, για τη ρύθμιση του pH σε καλλυντικά προϊόντα. (Boyer, et al., 2022) (Elmore, 2005)

1.5. Χρωματομετρία

1.5.1. Χρωματομετρία

Η χρωματομετρία είναι η επιστήμη που ασχολείται με την ποσοτικοποίηση και τη μέτρηση των χρωμάτων. Βασίζεται στη φυσική του φωτός, τη χημεία των χρωστικών και την ψυχοφυσική αντίληψη του χρώματος από τον άνθρωπο. Η χρωματομετρία έχει εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως η βιομηχανία, η γραφιστική, η ιατρική και η περιβαλλοντική παρακολούθηση. (Maloigne, Inacio, & Macaire, 2012)

1.5.2. Θεμελιώδεις Αρχές

1. **Φάσμα του Ορατού Φωτός:** Το φάσμα του ορατού φωτός εκτείνεται από περίπου 380 nm (ιώδες) έως 780 nm (κόκκινο). Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η αντίληψη των χρωμάτων από τον άνθρωπο βασίζεται στους τρεις τύπους κωνίων του αμφιβληστροειδούς, που είναι ευαίσθητα σε διαφορετικά μήκη κύματος φωτός.

2. **Χρωματικό Σύστημα CIE:** Το σύστημα CIE XYZ, που αναπτύχθηκε από τη Διεθνή Επιτροπή Φωτισμού (CIE), χρησιμοποιείται ευρέως για την τυποποίηση και την αναπαράσταση των χρωμάτων. Το σύστημα βασίζεται σε τρεις φανταστικές πηγές φωτός (X, Y, Z). Η συνιστώσα Y αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα, ενώ οι X και Z παρέχουν πληροφορίες για την απόχρωση και τον κορεσμό.
3. **Χρωματικές Συντεταγμένες:** Τα χρώματα αναπαρίστανται ως σημεία σε έναν τρισδιάστατο χώρο χρησιμοποιώντας χρωματικές συντεταγμένες. Το CIE 1931 χρωματικό διάγραμμα χρησιμοποιεί τις συντεταγμένες x, y για να προσδιορίσει την απόχρωση και τον κορεσμό. Οι συντεταγμένες αυτές προέρχονται από την κανονικοποίηση των τιμών X, Y, Z. (Maloigne, Inacio, & Macaire, 2012) (Berns, 2019) (Tooms, 2015)

1.5.3. Μέθοδοι Μέτρησης

1. **Φωτομετρία:** Η φωτομετρία μετρά την ένταση του φωτός που αντανακλάται ή εκπέμπεται από μια επιφάνεια. Οι μετρήσεις αυτές, μπορούν να συγκριθούν με πρότυπα χρώματος για τον ακριβή προσδιορισμό της απόχρωσης και του κορεσμού. Φωτομετρικά όργανα, στα οποία συγκαταλέγεται και η κάμερα κινητού τηλεφώνου χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία για την εξασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων. (Olerinyona, et al., 2020)
2. **Φασματοφωτομετρία:** Η φασματοφωτομετρία μετρά την ένταση του απορροφώμενου φωτός, σε διάφορα μήκη κύματος, για να δημιουργήσει ένα φασματικό προφίλ του χρώματος. Τα φασματοφωτόμετρα, χρησιμοποιούνται για την ακριβή ανάλυση και ποσοτικοποίηση των χρωμάτων, καθιστώντας τα ιδανικά για την ανάλυση των χρωστικών και των βαφών. (Mohammed)
3. **Χρωματόμετρα:** Τα χρωματόμετρα χρησιμοποιούν φίλτρα ή μονοχρωματικά φώτα για να μετρήσουν τις χρωματικές συντεταγμένες. Είναι φορητές συσκευές που προσφέρουν γρήγορες και ακριβείς μετρήσεις χρώματος. Χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία για την αξιολόγηση της ποιότητας των προϊόντων. (Milovanovic, et al., 2021)

1.5.4. Εφαρμογές

1. **Βιομηχανία:** Στη βιομηχανία, η χρωματομετρία χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας των χρωμάτων σε προϊόντα όπως υφάσματα, βαφές, πλαστικά και τρόφιμα. Εξασφαλίζει την ομοιομορφία των χρωμάτων και τη συμμόρφωση με τα πρότυπα.
2. **Γραφιστική και Εκτύπωση:** Στη γραφιστική, η χρωματομετρία βοηθά στην εξασφάλιση της συνέπειας των χρωμάτων από την οθόνη στην εκτυπωμένη μορφή. Οι σχεδιαστές χρησιμοποιούν χρωματόμετρα για να διασφαλίσουν ότι τα χρώματα στα έντυπα υλικά ανταποκρίνονται στις προδιαγραφές.

3. **Ιατρική και Βιολογία:** Η χρωματομετρία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των χρωματικών αλλαγών σε βιολογικά δείγματα, βοηθώντας στη διάγνωση ασθενειών και την παρακολούθηση των θεραπειών. Για παράδειγμα, η ανάλυση των χρωμάτων του δέρματος μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση δερματικών παθήσεων.
4. **Περιβαλλοντική Παρακολούθηση:** Στην περιβαλλοντική παρακολούθηση, η χρωματομετρία χρησιμοποιείται για την ανάλυση του χρώματος του νερού και του αέρα. Βοηθά στην ανίχνευση ρύπων και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του περιβάλλοντος. (McDonald, 1980) (Dakin & Brown, 2017)

1.6. Μέθοδοι και τεχνικές προσδιορισμού μετάλλων σε καλλυντικά

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι ανάλυσης μετάλλων στα καλλυντικά έως σήμερα και καθώς η τεχνολογία προχωράει, αναπτύσσονται όλο και περισσότερες τεχνικές ανίχνευσής τους, μερικές από αυτές πιο απλοϊκές, άλλες πιο γρήγορες και άλλες πιο φθηνές σε κόστος και πόρους. Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού μετάλλων σε γαλακτώματα συνδυάζει τα παραπάνω πλεονεκτήματα, δηλαδή είναι απλή από άποψη χειρισμών και εξοπλισμού, είναι γρήγορη και δεν απαιτεί εξειδικευμένα όργανα.

Οι τεχνικές, που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μετάλλων σε καλλυντικά προϊόντα, είναι η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης, η οποία είναι ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού μετάλλων και χρησιμοποιείται πιο συχνά για την ανάλυση βαρέων μετάλλων όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και ο υδράργυρος. Επίσης, πολύ ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, είναι η φασματομετρία μάζας, που ανιχνεύει πολύ μικρές ποσότητες πολλαπλών, ταυτόχρονα βαρέων μετάλλων και συνήθως, εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό ιχνών βαρέων μετάλλων σε καλλυντικά. Η φασματομετρία οπτικής εκπομπής, είναι ακόμα μια τεχνική, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μετάλλων, με καλή ευαισθησία και ικανότητα ανίχνευσης πολλαπλών στοιχείων. Η συγκεκριμένη τεχνική, χρησιμοποιεί το πλάσμα για να διεγείρει τα άτομα των μετάλλων και να καταγράψει την εκπομπή φωτός, που παράγεται. Επιπλέον, μια γνωστή στον χώρο μέθοδος είναι η χρωματογραφία ιόντων, η οποία έχει τη δυνατότητα διαχωρισμού και ανίχνευσης ανιόντων και κατιόντων σε δείγματα. Η πιο κοινή μέχρι σήμερα μέθοδος είναι η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού, η οποία χρησιμοποιεί τα συγκεκριμένα φάσματα, ώστε να γίνει ανίχνευση συγκεκριμένων μετάλλων. Τέλος, η φασματοσκοπία XRF, είναι μια μη καταστροφική μέθοδος, που χρησιμοποιεί ακτίνες X, για να διεγείρει τα άτομα μετάλλων και να μετρήσει την εκπομπή τους. Αποτελεί μια από τις λίγες μεθόδους, που δεν είναι καταστρεπτικές και επιτρέπουν την ανάλυση απευθείας στο προϊόν. Αυτή επίσης, είναι η μέθοδος η οποία επικύρωσε την χρωματομετρική μέθοδο, που αναπτύσσεται σε αυτή τη πτυχιακή. (Harris, 2015) (Jerkins, 1999) (Hoffman &

Stroobant, 2007) (Todd, 2017) (Bard, Faulkne, & Wiley, 1983) (Kissinger, Heinemann, & Dekker, 1996)

1.6.1. Ειδικά για την XRF

Η τεχνική της Φθορισμομετρίας Ακτινών Χ (X-ray Fluorescence, XRF) είναι μια μη καταστροφική αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της στοιχειακής σύστασης υλικών. Η XRF, βασίζεται στην διέγερση των ατόμων του δείγματος με ακτίνες Χ, οι οποίες προκαλούν εκπομπή δευτερογενών ακτίνων Χ, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε στοιχείο. Η ανάλυση αυτών των ακτίνων, μπορεί να αποκαλύψει την παρουσία και την συγκέντρωση των στοιχείων στο δείγμα. Η XRF έχει ευρεία χρήση στην γεωλογία, την αρχαιολογία, την βιομηχανία και την περιβαλλοντική επιστήμη, λόγω της ικανότητάς της να παρέχει γρήγορες και αξιόπιστες αναλύσεις, χωρίς να καταστρέφει τα δείγματα.

Η τεχνική XRF, περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια: τη διέγερση του δείγματος και την ανίχνευση των εκπεμπόμενων ακτίνων Χ. Στο πρώτο στάδιο, το δείγμα βομβαρδίζεται με πρωτογενείς ακτίνες Χ, οι οποίες προκαλούν την διέγερση και μετατόπιση ηλεκτρονίων από τα εσωτερικά τροχιακά των ατόμων προς τροχιακά υψηλότερης ενέργειας. Κατά την αποδιέγερση, λαμβάνει χώρα εκπομπή ακτίνων Χ, συγκεκριμένης ενέργειας. Στο δεύτερο στάδιο, αυτές οι εκπεμπόμενες ακτίνες Χ, ανιχνεύονται και αναλύονται με τη χρήση ενός φασματογράφου, που επιτρέπει την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση των στοιχείων στο δείγμα.

Η XRF είναι ιδιαίτερα πολύτιμη λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων της, όπως η δυνατότητα ανάλυσης χωρίς καταστροφή των δειγμάτων, η ταχύτητα και η ευκολία χρήσης. Επιπλέον, η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε εργαστηριακές συνθήκες όσο και επιτόπου, χάρη στην ύπαρξη φορητών συσκευών XRF. Οι περιορισμοί της περιλαμβάνουν την ανάγκη για ομοιογενή δείγματα και την αδυναμία ανίχνευσης στοιχείων με ατομικό αριθμό μικρότερο από αυτόν του μαγνησίου ($Z < 12$). Παρά ταύτα, η XRF συνεχίζει να εξελίσσεται με νέες τεχνολογίες και εφαρμογές, που διευρύνουν τις δυνατότητές της, καθιστώντας την αναπόσπαστο εργαλείο για την επιστημονική και βιομηχανική ανάλυση. (Jerkins, 1999) (Beckhoff, Kanngießer, Langhoff, Wedell, & Wolff, 2006) (Agarwal, 1991)

1.6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός αναλυτών με τη φωτογραφική κάμερα κινητού τηλεφώνου

Πλήθος δημοσιευμένων μελετών, έχουν καταδείξει ότι ο χρωματομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός αναλυτών σε διάλυμα, παρουσιάζει αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα, όταν γίνεται με χρήση κάμερας κινητού τηλεφώνου ή βάσει της απορρόφησης του έγχρωμου διαλύματος στο φωτόμετρο. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί στη βιβλιογραφία, ότι προσρόφηση του έγχρωμου διαλύματος σε στερεό υπόστρωμα (πχ.

χαρτί) επιτρέπει, με αποδεκτά τεχνικά χαρακτηριστικά τον ίδιο προσδιορισμό. (Jalal, Kim, & Shim, 2017) (Meng, Tayyab, Lin, Raji, & Javanmard, 2022) Άλλες μελέτες, χρησιμοποίησαν στερεά υποστρώματα, για την συγκέντρωση των αναλυτών, από διάλυμα αυτών και τον επιτόπιο προσδιορισμό τους μετά από αντίδραση στο στερεό μέσο με κατάλληλο χρωμογόνο. Συγκεκριμένα, με τη μεθοδολογία αυτή, έχει προσδιοριστεί το κόκκινο του μεθυλίου, το ουρικό οξύ και το κοβάλτιο, όπου ως στερεό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε μπεντονίτης με πολύ καλά αποτελέσματα. (Mazarakis & Tsotsou, 2024) Άλλες αναλύσεις, έχουν γίνει για τον προσδιορισμό εκρηκτικών υλών, χρησιμοποιώντας ειδικούς αισθητήρες πολυμερών γέλης. (Thirwimonmas, et al., 2021) Γενικά, η μέθοδος αυτή, βρίσκει εφαρμογή στον ποιοτικό έλεγχο καλλυντικών και τροφίμων, σε διαγνώσεις και στον προσδιορισμό βακτηριών και ιών, με μεγάλη επιτυχία, καθώς υπερτερεί, σε σχέση με άλλες μεθόδους, στον χρόνο, τη διαδικασία προσδιορισμού και τα υλικά που απαιτούνται.

Ως επέκταση των παραπάνω εφαρμογών, διερευνάται τα τελευταία χρόνια στο εργαστήριο, η χρήση κάμερας κινητού τηλεφώνου για τον προσδιορισμό αναλυτών, απευθείας σε αδιαφανή ρευστά όπως τα γαλακτώματα καλλυντικών ή τροφίμων. Η τεχνική αυτή, έχει επιτυχώς εφαρμοστεί στον προσδιορισμό γλυκόζης, ουρίας και αντιοξειδωτικού δυναμικού στα καλλυντικά. (Tsotsou & Tsara, 2023) (Tsotsou, 2024) Η παρούσα μελέτη, διερεύνησε την περαιτέρω εφαρμογή της γενικής μεθοδολογίας στον προσδιορισμό κοβαλτίου σε γαλακτώματα. Όπως αναφέρθηκε, η αρχή της μεθόδου ανίχνευσης βασίζεται στην έγχρωμη ένωση συναρμογής, που δημιουργείται με το διασπασμένο κοβάλτιο, εντός του γαλακτώματος, μετά τη προσθήκη ειδικού αντιδραστήριου. Στη συνέχεια, λαμβάνεται φωτογραφία των χρωματισμένων δειγμάτων και γίνεται ανάλυση της έντασης του ανακλώμενου χρώματος, μέσω λογισμικού. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής, χρησιμοποιούνται για τη σύγκριση με καμπύλες αναφοράς, ώστε να προσδιοριστεί αν υπάρχει κοβάλτιο στο γαλάκτωμα και σε ποιά συγκέντρωση.

1.7. Ποσοτικός προσδιορισμός αναλυτών σε καλλυντικά με τη φωτογραφική κάμερα κινητού τηλεφώνου

1.7.1. Χρωματομετρική ανάλυση γλυκόζης σε γαλακτώματα

Η βασική αρχή της τεχνικής, που χρησιμοποιήσαμε για την ανάλυση μετάλλων, έχει ήδη εφαρμοστεί στην ανάλυση γλυκόζης σε διάφορα γαλακτώματα. Κατά αναλογία, στη περίπτωση της γλυκόζης, γίνεται κατεργασία του γαλακτώματος με ειδικό αντιδραστήριο, το οποίο προσδίδει χρώμα, με ένταση ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης μέσα στο προϊόν. Λαμβάνεται φωτογραφία με τη κάμερα κινητού τηλεφώνου και στη συνέχεια, με το ίδιο πρόγραμμα ανάλυσης στον υπολογιστή, το Image J, αναλύεται η φωτογραφία και δημιουργούνται καμπύλες αναφοράς για τη ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων. (Tsotsou & Tsara, 2023)

Η γλυκόζη, αποτελεί τον πιο κοινό μονοσακχαρίτη στη φύση, και είναι μια από τις πιο σημαντικές πηγές ενέργειας για τη κυτταρική αναπνοή στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και σε πολλούς ακόμα, στη φύση. Στα καλλυντικά, είτε προστίθεται απευθείας ως συστατικό στο προϊόν, είτε αποτελεί μέρος φυτικών εκχυλισμάτων, προσδίδοντας πολλές ιδιότητες, όπως ενυδάτωση, μαλακτικές και υγροσκοπικές ιδιότητες. Η γλυκόζη δεν έχει παρατηρηθεί να δημιουργεί αλλεργικές αντιδράσεις, ερεθισμούς ή φλεγμονές, παρόλαυτα σε άτομα με ακμή, φαίνεται να επιδεινώνει τα συμπτώματά τους. (Tsotsou & Tsara, 2023)

Οι καμπύλες αναφοράς, που αναφέρονται στην μελέτη αυτή, δείχνουν γραμμικότητα, γεγονός, που υποδεικνύει πως η ένταση του χρώματος, που αποτυπώνεται στη φωτογραφία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης μέσα στο προϊόν. (Tsotsou & Tsara, 2023)

1.7.2. Χρωματομετρική ανάλυση ουρίας σε γαλακτώματα

Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ουρίας, με παρόμοια τεχνική, δηλαδή κατεργασία του δείγματος με αντιδραστήριο, που δίνει έγχρωμο προϊόν με την ουρία και στη συνέχεια, λήψη φωτογραφίας και περαιτέρω ανάλυσή της με το ειδικό λογισμικό και δημιουργία καμπύλης αναφοράς.

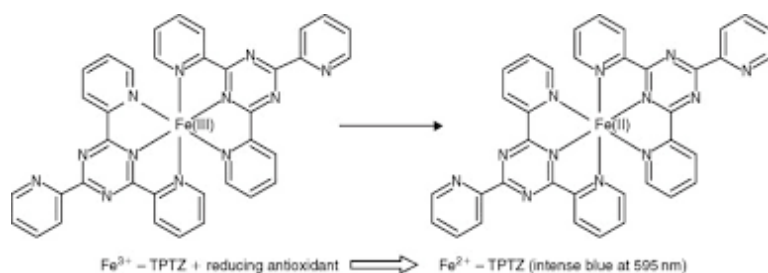
Η ουρία είναι μία υγροσκοπική ουσία, η οποία αποτελεί συστατικό του φυσικού ενυδατικού παράγοντα του δέρματος, που βρίσκεται στην επιδερμίδα και είναι απαραίτητη για την ενυδάτωση και την ακεραιότητα της κερατίνης στοιβάδας. Η ουρία βελτιώνει τη λειτουργία του επιδερμικού φραγμού και παράλληλα την αντιμικροβιακή άμυνα, ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση στα κερατινοκυττάρα, που αφορούν τη διαφοροποίησή τους και τα πεπτίδια, που συμμετέχουν στην άμυνα. Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλαπλασιασμού των κερατινοκυτταρων. Για τους παραπάνω λόγους, η ουρία αποτελεί ένα πολύ κοινό συστατικό στα καλλυντικά, κυρίως σε γαλακτώματα. (Piquero-Casals, et al., 2021) (Tsotsou, 2024)

1.8. FRAP τεχνική

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) είναι μια απλή και αυτοματοποιημένη δοκιμή, που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ισχύος σε βιολογικά υγρά, όπως το πλάσμα. Η δοκιμή, βασίζεται στη μετατροπή των ιόντων σιδήρου, από το αντιοξειδωτικό, από τη τρισθενή-σιδηρί (Fe^{3+}) στη δισθενή-σιδηρί (Fe^{2+}) μορφή υπό όξινες συνθήκες, δημιουργώντας ένα έγχρωμο σύμπλοκο με την τριπυριδυλοτριαζίνη, όπως φαίνεται στην εικόνα 1 (μόριο ανάλογο της φερροζίνης). Η μεταβολή της απορρόφησης στα 593 nm στο διάλυμα της αντίδρασης, συγκρίνεται με ένα πρότυπο διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης σιδηρούχων ιόντων. Η μέθοδος αυτή είναι αξιόπιστη και αποδίδει γραμμικές αλλαγές στην απορρόφηση, σε ευρύ φάσμα

συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών μιγμάτων, όπως το πλάσμα, και καθαρών αντιοξειδωτικών διαλυμάτων. Η FRAP, αξιολογεί τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των μη ενζυματικών αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού, παρέχοντας έναν δείκτη για την ανθεκτικότητα του οργανισμού στην οξειδωτική βλάβη, που μπορεί να συνδέεται με ασθένειες, όπως η στεφανιαία νόσος και ο καρκίνος. Η δοκιμή, δεν επηρεάζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών αντιοξειδωτικών και παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα. Οι στοιχειομετρικοί παράγοντες για τα αντιοξειδωτικά, είναι 2.0 για το Trolox, την άλφα-τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ και το ουρικό οξύ, ενώ για τη χολερυθρίνη είναι 4.0. Η μέθοδος FRAP, είναι σημαντική για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της προστασίας από το οξειδωτικό στρες. (Benzie & Strain, 1996)

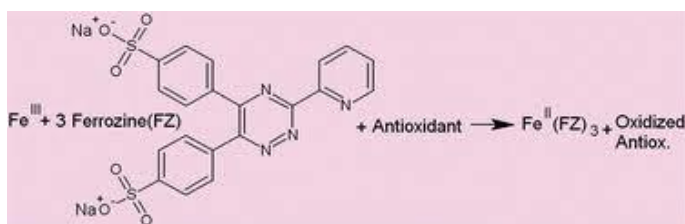
Η αρχή της τεχνικής FRAP είναι ανάλογη της αρχής της προτεινόμενης μεθοδολογίας. Και οι δύο τεχνικές, βασίζονται στη συμπλοκοποίηση μετάλλου με συμπλοκοποιητή (τριπυριδυλοτριαζίνη ή φερροζίνη αντίστοιχα). Η αναλογία αυτή, μας οδήγησε να διερευνήσουμε, κατά πόσο μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική FRAP, απευθείας σε γαλάκτωμα.



Εικόνα 1. Αρχή τεχνικής FRAP

2. Πείραμα μετάλλων

Όπως, αναφέρθηκε παραπάνω, τα μέταλλα περιέχονται συχνά σε μικρές ποσότητες σε καλλυντικά και δημιουργούν διάφορα προβλήματα στον καταναλωτή, λόγω της τοξικότητάς τους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η φερροζίνη δίνει έγχρωμο προϊόν με τον δισθενή σίδηρο, το δισθενές κοβάλτιο και τον μονοσθενή χαλκό, όπως φαίνεται στην εικόνα 2. (Kundra, Katyal, & Rathore, 1974) (Stokey, 1970)



Εικόνα 2. Αρχή συναρμογής μετάλλου με φερροζίνη

2.1. Αντιδραστήρια και μέθοδοι ανάλυσης

2.1.1. Αντιδραστήρια

Για το πείραμα χρησιμοποιήσαμε το κιτ biosis(Αθήνα, Ελλάδα) iron ferrozine R1: 3×60, R2: 1×45 ml. Το R1 περιέχει διάλυμα γουανιδίνης, με pH 5, το R2 περιέχει διάλυμα φερροζίνης και το R4 περιέχει διάλυμα σιδήρου 200μg/dl. Το stock σιδήρου(ACS grade iron(III)chloride hexahydrate, Merck) παρασκευάστηκε ως υδατικό διάλυμα 246,8mg/ml και το stock κοβαλτίου (ACS grade cobalt(II)nitrato hexahydrate, Merck) ως υδατικό διάλυμα: 9,797mg/ml.

2.1.2. Κρέμες

Για τις πειραματικές μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικές κρέμες, οι τρεις από αυτές είναι εμπορικές από την εταιρία ANAVERIS, ενώ οι άλλες τρεις παρήχθησαν στο εργαστήριο κοσμητολογίας του ΠΑΔΑ(κρέμα Δ και Ε). Τα συστατικά τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, (πίνακας 1) και το pH και το ιζώδες της κάθε κρέμας, φαίνονται στον πίνακα 2.

Κρέμα Α	Κρέμα Β	Κρέμα Γ	Κρέμα Δ	Κρέμα Ε
Aqua	Aqua	Aqua	Aqua	Aqua
Glycerin	Hydrogenated Polydecene	Cetaryl Isononoate	Mineral Oil	C12-15 Alkyl Benzoate
Coconut Alkanes	Cetearyl Alcohol	Glycerin	Cetearyl Alcohol	Caprylic/Capric Triglyceride
C14-C22 Alcohols	Diisopropyl Dimer Dilinoleate	Panthenol	Cithrol GMS	Arachidyl Alcohol
Caprylic/Capric Triglyceride	Caprylic/Capric Triglyceride	Cetaryl Alcohol	Phenoxyethanol	Behenyl Alcohol
Cetearyl Alcohol	Glyceryl Myristate	Ethylhexyl Stearate	Xanthan Gum	Arachidyl Glucoside
Oat Kernel Flour	Butylene Glycol	Cetearyl Ethylhexanoate	Sensiva SC 50	Phenoxyethanol
Vegetable Oil	Lanolin	Paraffinum Liquidum		Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer
Panthenol	Glycerin	Cyclopentasiloxane		Ethylhexyl Glycerin
Olive Fruit Oil	Coconut Oil	Dicetyl Phosphate		Citric Acid
Shea Butter	Dimethicone	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer		
Tocopherol	Ethylhexyl Stearate	Stearic Acid		

Sunflower Seed Oil	Inulin	Allantoin		
Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder	Trilaureth-4 Phosphate	Ceteth-10 Phosphate		
Lycorice Root Extract	Cetearyl Glucoside	Dimethicone		
Camellia Sinensis Leaf Extract	Panthenol	Sodium Caproyl/Lauroyl Lactylate		
Allantoin	Alisma Plantago Aquatica Extract	Phenoxyethanol		
Urea	Caprylyl Glycol	Isopropyl Myristate		
Fructose	Avocado Oil	Acrylamide/Sodium Acrylate Copolymer		
Maltose	Sodium Stearoyl Lactylate	Parfum		
Trehalose	Phytosterols	Imidazolidinyl Urea		
Sodium Hyaluronate	Shea Butter	Triethanolamine		
Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer	Alpha-Glucan Oligosaccharide	Methylparaben		
C12-20 Alkyl Glucoside	Xanthan Gum	Propylparaben		
Parfum	Chamomilla Recutita Flower Extract	Ethylparaben		
Dimethicone	Olive Fruit Oil	C11-15 Isoalkanes		
Pentylene Glycol	Tocopherol	Tridceth-6		
Xanthan Gum	Gellan Gum	Disodium EDTA		
Caprylyl Glycol	Potassium Sorbate			
Ethylexylglycerin	Squalene			
Coco-Caprylate/Capr	Rice Bran			

ate	Extract			
Potassium Cetyl Phosphate	Glyceryl Caprylate			
Cetaryl Glucoside	Sunflower Seed Oil			
Sodium Hydroxide	Phenylpropano I			
Citric Acid				
Potassium Sorbate				
Sodium Phytate				
Sodium PCA				
Sodium Lactate				
Sodium Chloride				
Butylene Glycol				
Glucose				
Phenoxyethano I				
Sodium Benzoate				

Πίνακας 1. Συστατικά γαλακτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής

	Κρέμα Α	Κρέμα Β	Κρέμα Γ	Κρέμα Δ	Κρέμα Ε
pH	5,11	5,13	5,88	5,10	6,15
Viscosity	72300cps/s92/0,5r pm	116600cps/s93/0,5r pm	500200cps/s94/0,3r pm	420k cps/s95/0,6r pm	360k cps/s95/0,3r pm

Πίνακας 2. pH και ιξώδες στους 20°C για κάθε γαλάκτωμα που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής

2.1.3. Όργανα και συσκευές

- Η κάμερα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 12MP f/1.8 OIS από το κινητό Samsung Galaxy S21 FE.
- Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν σε φωτογραφικό θάλαμο Shenzhen PULUZ Technology Limited (China), με μια ταινία με φωτάκια LED και ένα άνοιγμα στην οροφή, όπου τοποθετείται το κινητό τηλέφωνο. 23×23×23εκ.
- Για τη μέτρηση του pH, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή InoLab pH Level 1 precision pH meter (WTW GmbH &Co, Weilheim, Germany), που περιέχει ένα WTW
- SenTix 41 συνδυαστικό ηλεκτρόδιο. Πρότυπα υδατικά διαλύματα(Weilheim, Germany), χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του pHμέτρου.
- Για τη μέτρηση ιζώδους στα γαλακτώματα, χρησιμοποιήθηκε το ιζωδόμετρο Brookfield DV-E και τα Helipath T-bar spindles.
- Για την ομογενοποίηση των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήσαμε τον ομογενοποιητή SilversonL5M-A (East Longmeadow, MA, USA)

Για το πείραμα επίσης, χρειαστήκαμε:

- πιπέτες ακριβείας,
- σπάτουλες
- erpendorfs
- πλάκες μικροτιτλοδότησης και τα αντίστοιχα καψίδια μικροτιτλοδότησης(wells)

2.1.4. Μεθοδολογία λήψης φωτογραφίας

Η πλάκα μικροτιτλοδότησης, η οποία περιέχει τα wells με ποσότητα του δείγματος προς ανάλυση, τοποθετείται μέσα στον φωτογραφικό θάλαμο, προκειμένου να γίνει λήψη φωτογραφίας. Η πλάκα, πρέπει να βρίσκεται σε απόσταση από τη ταινία LED, όχι ακριβώς κάτω από αυτή, για να αποφευχθεί η αντανάκλαση του φωτός πάνω στη κρέμα. Επίσης, για τη σωστή λήψη φωτογραφίας, τα wells πρέπει να είναι τοποθετημένα παράλληλα σε σχέση με τη ταινία LED, για να δέχονται την ίδια ποσότητα φωτός. Επιπλέον, το κινητό τηλέφωνο πρέπει να τοποθετηθεί οριζόντιο και ίσιο πάνω από το άνοιγμα του φωτογραφικού θαλάμου(23 εκ πάνω από τα δείγματα). Τέλος, λαμβάνονται φωτογραφίες ανά πέντε λεπτά. Στον χρόνο ανάμεσα στη λήψη φωτογραφιών, το LED φως, είναι κλειστό.

2.1.5. Μεθοδολογία ανάλυσης φωτογραφίας

Αφού έχει γίνει λήψη φωτογραφίας με το κινητό τηλέφωνο, πρέπει να γίνει ανάλυση εικόνας RGB, χρησιμοποιώντας το λογισμικό επεξεργασίας εικόνας, Image J, σε μια επιλεγμένη περιοχή του σημείου, συνήθως, 2.000-3.000 τετραγωνικά pixels, περίπου. Οποιοσδήποτε περιοχές με μη ομοιογενή χρωματισμό (π.χ., στις άκρες του well), δεν ελήφθησαν υπόψη κατά την ανάλυση εικόνας. Λήφθηκαν οι τιμές του κόκκινου, του

πράσινου και του μπλε, καναλιού και με βάση αυτά, σχεδιάστηκαν γραφικές παραστάσεις σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων. Το κόκκινο κανάλι βρέθηκε ότι είναι βέλτιστο κατά την ανάλυση εικόνας των δειγμάτων με σίδηρο, που μελετήθηκαν κάτω από τις επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες. Αντίστοιχα, το πράσινο κανάλι, βρέθηκε ότι είναι το κατάλληλο για την ανάλυση φωτογραφιών δειγμάτων κοβαλτίου. Πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι εκτός από την επιλογή του κατάλληλου καναλιού στην ανάλυση, σημαντικό ρόλο, επίσης, παίζει και η ποιότητα της εικόνας.

2.2. Γραμμικότητα

Με σκοπό να διαπιστωθεί η γραμμική συσχέτιση της έντασης του χρώματος με τη συγκέντρωση του σιδήρου, παρασκευάστηκε σειρά από 8 πρότυπα, με συγκεντρώσεις από 0μg Fe_{tot} /g κρέμας μέχρι 35,9μg Fe_{tot} /g κρέμας (Fe_{tot} : αναφέρεται στο άθροισμα δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου). Στη συνέχεια, ζυγίστηκε 1gr από κάθε συγκέντρωση σε ένα φυαλίδιο χωρητικότητας 2g. Παρασκευάστηκε ένα μείγμα 1R1/3R2, συνολικά 1300μl, μετά από προσθήκη 429 μl R1 και 871μl R2 (1/3) και ανάδευση. Σε κάθε φυαλίδιο προτύπου προστέθηκαν 200μl από το μείγμα R1/R2 και ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση με πλαστική σπάτουλα. Ποσότητα της κρέμας κάθε προτύπου χρησιμοποιήθηκε για τη πλήρωση μίας αποσπώμενης κυψελίδας, ανά συγκέντρωση προτύπου. Η επιφάνεια ισοπεδώθηκε με μια σπάτουλα και οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν στο πλαίσιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης με τη σειρά, από τη μικρότερη συγκέντρωση (0), προς τη μεγαλύτερη (35,9). Τοποθετήθηκε η πλάκα μικροτιτλοδότησης στον φωτογραφικό θάλαμο. Έγινε λήψη φωτογραφίας κάθε 5 λεπτά και τέλος, κάθε φωτογραφία αναλύθηκε στο πρόγραμμα Image J, όπου λήφθηκαν οι εντάσεις του χρώματος για τα συγκεκριμένα πρότυπα, όπως φαίνονται στον πίνακα 3.

Με ίδια διαδικασία, παρασκευάστηκαν πρότυπα και στη κρέμα Γ και Δ, και λήφθηκαν με τον ίδιο τρόπο οι εντάσεις χρώματος, όπως φαίνονται στον πίνακα 4 και 5 αντίστοιχα.

Παρόμοια διαδικασία ακολούθηθηκε για να διαπιστωθεί η γραμμική συσχέτιση της έντασης του χρώματος με τη συγκέντρωση κοβαλτίου σε γαλάκτωμα. Για τον σκοπό αυτόν παρασκευάστηκαν εννέα πρότυπα, με συγκεντρώσεις από 0 μg $Co(II)$ /g κρέμας μέχρι 38,34μg $Co(II)$ /g κρέμας στη κρέμα Α. Αυτά τα πρότυπα, παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας stock συγκέντρωσης 9,797 mg Co /ml. Για τη παρασκευή τους, πραγματοποιήθηκε 1:20 αραιώση του stock κοβαλτίου στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ 1:2 αραιώση για τις πιο υψηλές. Για τη παρασκευή των προτύπων, έγινε προσθήκη 10g κρέμας σε ουροσυλλέκτη και η αντίστοιχη ποσότητα του stock για την επιθυμητή συγκέντρωση κοβαλτίου στο κάθε ένα και στη συνέχεια, έγινε πολύ καλή ανάμειξη. Στη συνέχεια, ζυγίστηκε 1gr από κάθε συγκέντρωση σε ένα φυαλίδιο χωρητικότητας 2g. Σε κάθε φυαλίδιο προτύπου προστέθηκαν 200μl από το R2 και ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση με πλαστική σπάτουλα. Στη περίπτωση του κοβαλτίου δεν χρειάζεται αναγωγικό μέσο, δηλαδή το R1, διότι το δισθενές κοβάλτιο δίνει την έγχρωμη αντίδραση,

που θέλουμε και το κοβάλτιο βρίσκεται ήδη σε αυτή τη μορφή. Ποσότητα της κρέμας κάθε προτύπου, χρησιμοποιήθηκε για τη πλήρωση μίας αποσπώμενης κυψελίδας, ανά συγκέντρωση προτύπου. Η επιφάνεια ισοπεδώθηκε με μια σπάτουλα και οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν στο πλαίσιο της πλάκας μικροτιλοδότησης με τη σειρά, από τη μικρότερη συγκέντρωση (0), προς τη μεγαλύτερη (38,34). Τοποθετήθηκε η πλάκα μικροτιλοδότησης στον φωτογραφικό θάλαμο. Έγινε λήψη φωτογραφίας κάθε 5 λεπτά και τέλος, κάθε φωτογραφία αναλύθηκε στο πρόγραμμα Image J, όπου λήφθηκαν οι εντάσεις του χρώματος για τα συγκεκριμένα πρότυπα, όπως φαίνονται στον πίνακα 6.

Με ίδια διαδικασία, παρασκευάστηκαν πρότυπα και στη κρέμα Δ και Ε, και λήφθηκαν με τον ίδιο τρόπο οι εντάσεις χρώματος, όπως φαίνονται στον πίνακα 7, 8 και 9 αντίστοιχα.

Σίδηρος

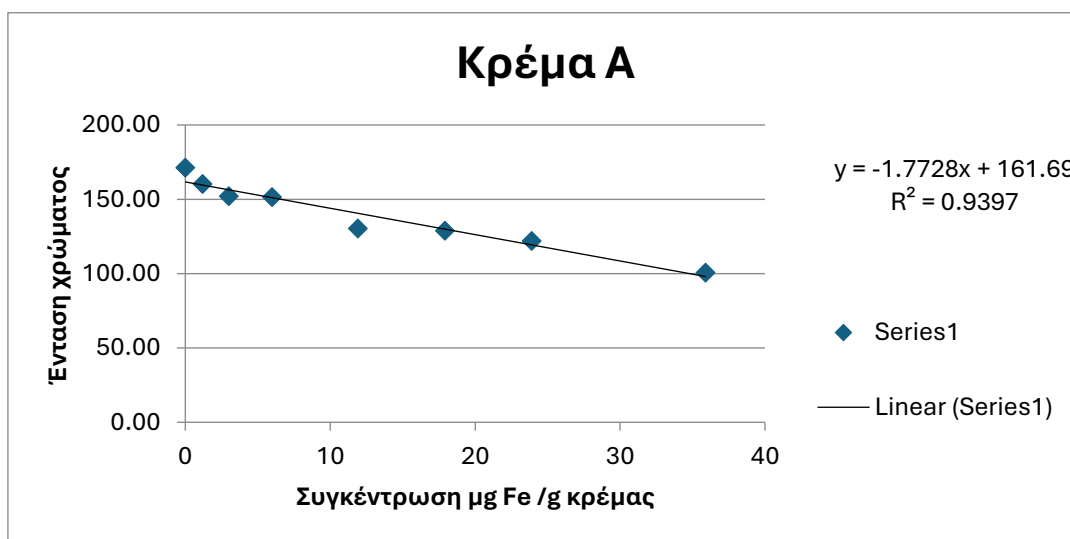
Η συγκέντρωση του σιδήρου, στους παρακάτω πίνακες, αναφέρεται στο ολικό σίδηρο, δηλαδή στο άθροισμα Fe(II) και Fe(III).

Κρέμα Α

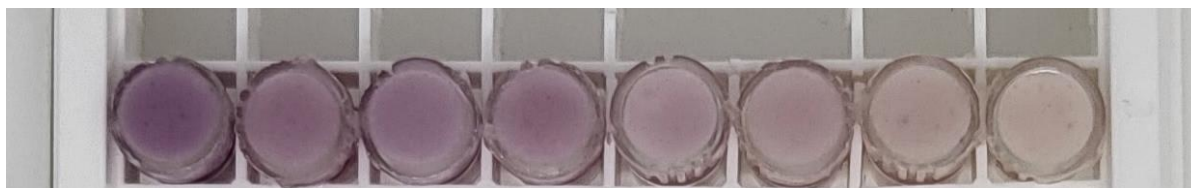
N. φωτογραφίας: 20231018_142024									
	μg Fe/g κρέμας	35,9	23,9	17,9	11,9	5,99	2,99	1,19	0
1	Ένταση χρώματος Red	100,59	121,87	128,75	130,45	151,39	152,15	160,22	171,23
2	Ένταση χρώματος Green	70,59	92,91	100,09	100,64	126,85	127,93	138,89	152,54
3	Ένταση χρώματος Blue	96,65	110,79	119,80	116,24	135,31	131,75	135,10	145,52
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	89,60	108,83	115,92	115,86	137,82	137,29	144,68	156,40
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	82,59	103,87	110,92	111,25	135,31	135,76	144,98	157,40

Πίνακας 3. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση σιδήρου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία

Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(1):



Γράφημα 1. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης σιδήρου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος



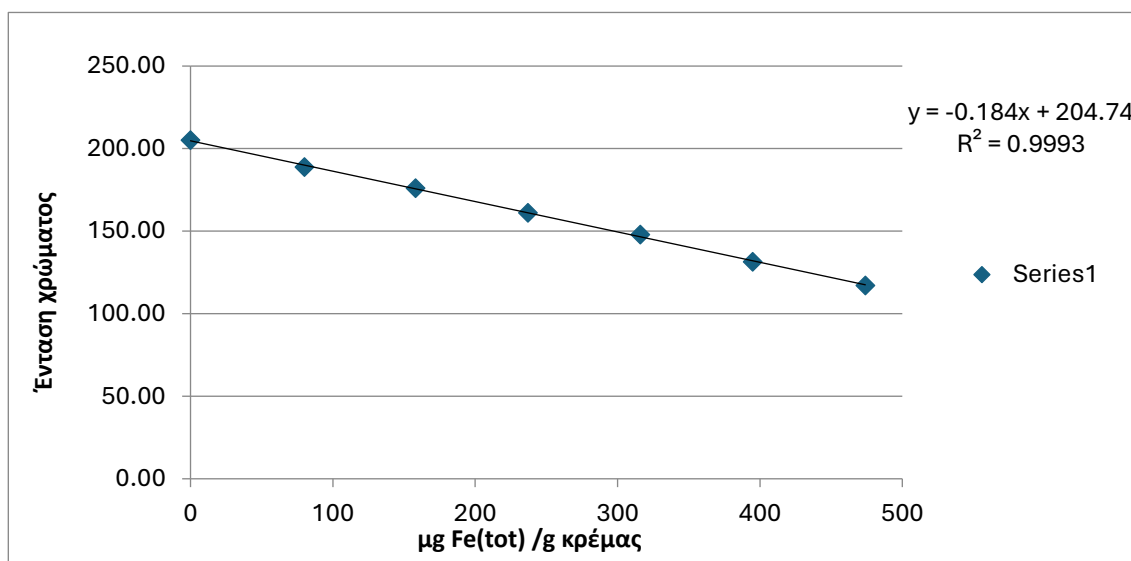
Εικόνα 3. Φωτογραφία προτύπων σιδήρου στη κρέμα Α, μετά την κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Οι συγκεντρώσεις φαίνονται με τη σειρά από την μεγαλύτερη έως την μικρότερη, σύμφωνα με τον πίνακα 3, ξεκινώντας από αριστερά προς τα δεξιά.

Κρέμα Γ

N. φωτογραφίας: 20231019_145730								
	μg Fe/g κρέμας	474	395	316	237	158	80	0
1	Ένταση χρώματος Red	123,99	136,64	151,73	165,57	179,89	193,37	208,13
2	Ένταση χρώματος Green	92,52	105,74	120,35	140,25	161,06	179,49	203,84
3	Ένταση χρώματος Blue	120,99	134,04	146,80	160,29	170,58	178,49	184,01
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	112,50	125,34	139,80	155,42	170,53	183,47	198,72
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	105,01	118,04	132,81	150,33	167,72	183,47	202,77

Πίνακας 4. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση σιδήρου στη κρέμα Γ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία

Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(2):



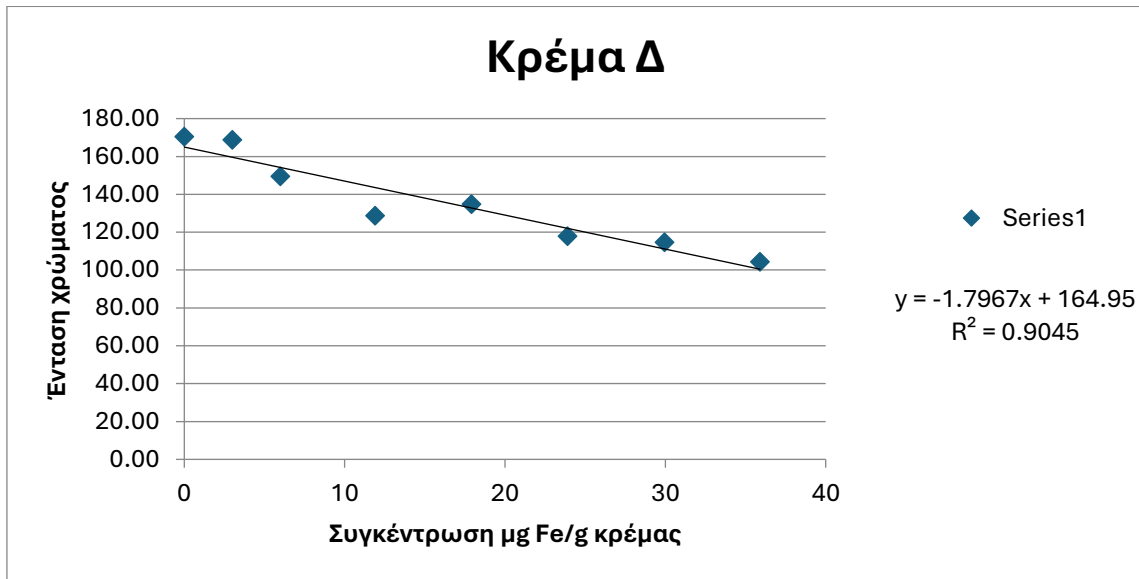
Γράφημα 2. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης σιδήρου στη κρέμα Γ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος

Κρέμα Δ

N. φωτογραφίας: 20240308_104758									
	μg Fe/g κρέμας	35,9	29,95	23,9	17,9	11,9	5,99	2,99	0
1	Ένταση χρώματος Red	104,28	114,70	117,90	134,71	128,60	149,38	168,70	170,44
2	Ένταση χρώματος Green	72,24	83,63	83,81	103,89	98,57	123,73	150,61	154,63
3	Ένταση χρώματος Blue	109,28	118,07	117,89	135,50	126,42	144,24	157,27	158,04
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	95,32	105,70	106,44	124,80	117,62	139,10	159,05	160,88
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	86,20	96,78	97,82	116,79	110,61	133,89	156,86	159,71

Πίνακας 5. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση σιδήρου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία

Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(3):



Γράφημα 3. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης σιδήρου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος

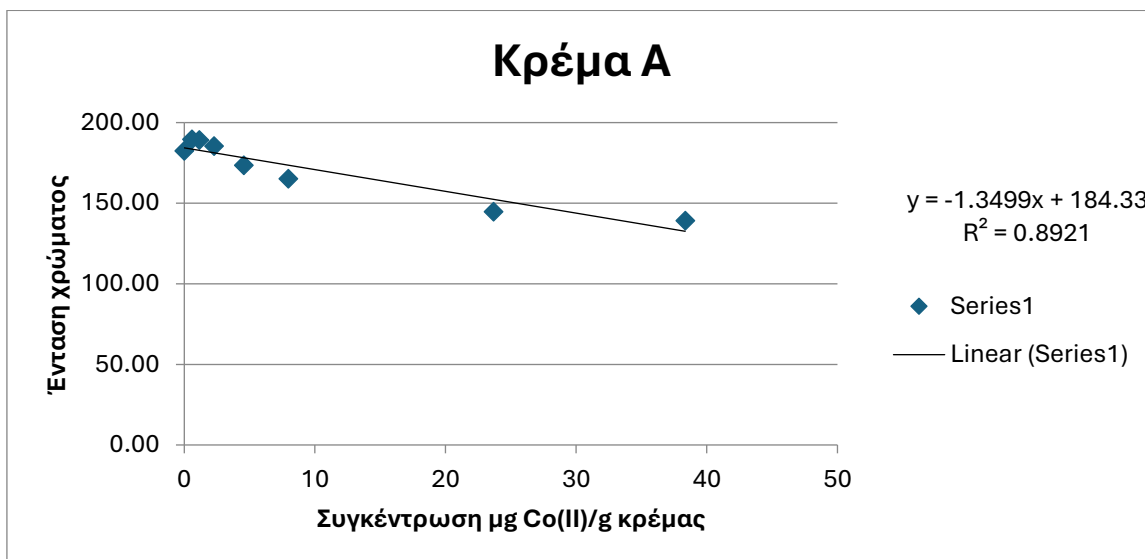
Κοβάλτιο

Κρέμα Α

N.φωτογραφίας: 20231031_105145									
	μg Co(II)/g κρέμας	38,342	23,668	7,953	4,543	2,272	1,136	0,568	0
1	Ένταση χρώματος Red	175,93	178,94	187,57	190,62	198,09	198,10	198,08	189,82
2	Ένταση χρώματος Green	139,18	144,63	165,06	173,36	185,45	189,11	189,60	182,33
3	Ένταση χρώματος Blue	116,67	122,75	145,60	155,47	169,42	173,25	173,80	163,57
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	144,00	148,67	166,08	173,35	184,35	186,66	187,07	178,33
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	147,63	152,38	169,57	176,46	187,41	190,11	190,34	182,33

Πίνακας 6. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση κοβαλτίου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία

Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(4):



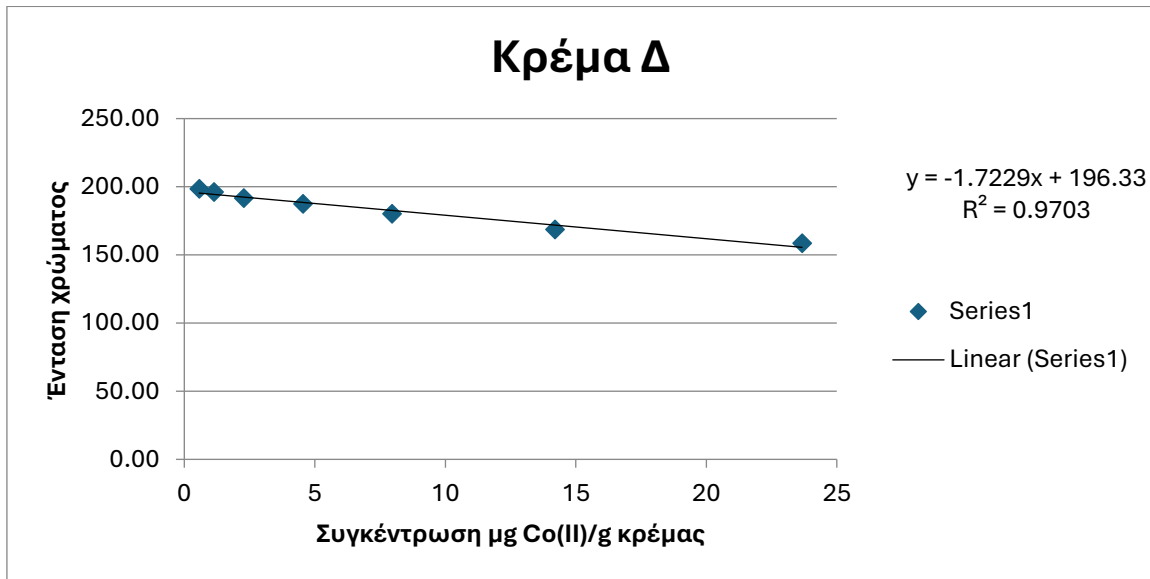
Γράφημα 4. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος

Κρέμα Δ

N. φωτογραφίας: 20240109_101123										
	µg Co(II)/g κρέμας	0	0,568	1,136	2,272	4,543	7,953	14,201	23,668	38,342
1	Ένταση χρώματος Red	202,62	200,35	202,12	201,16	200,49	199,13	193,28	187,32	192,85
2	Ένταση χρώματος Green	202,42	198,35	196,09	191,57	187,41	180,20	168,57	158,48	161,86
3	Ένταση χρώματος Blue	202,67	199,35	196,12	189,64	184,14	174,16	161,87	149,66	151,00
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	202,59	199,35	198,11	194,36	190,63	184,21	174,76	165,17	168,47
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) $0.299R+0.587G+0.14B$	202,52	199,35	198,10	194,38	190,96	185,19	175,11	166,15	169,88

Πίνακας 7. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία

Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(5):

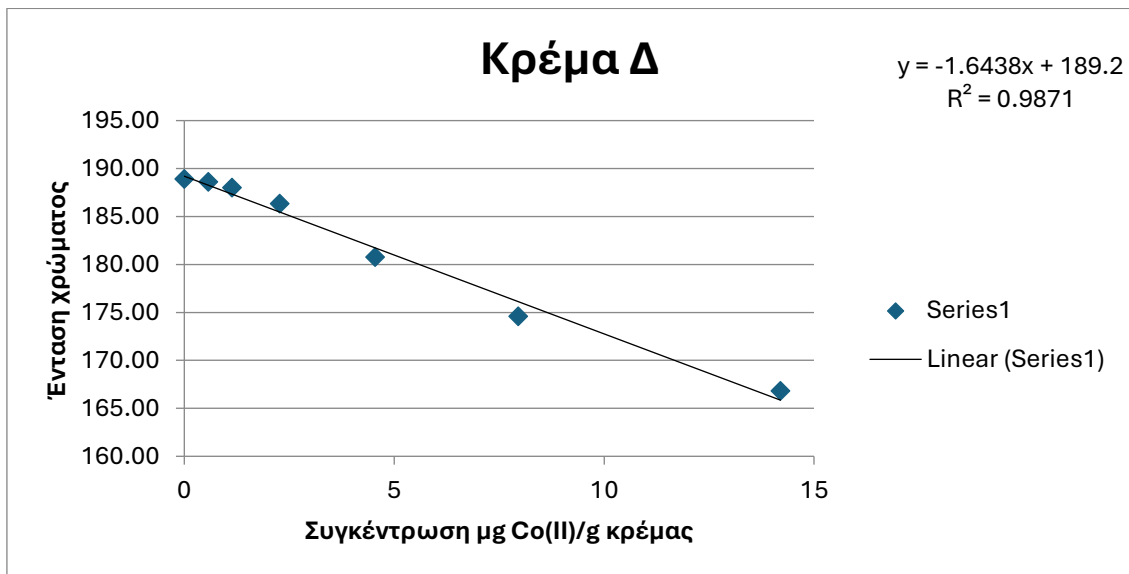


Γράφημα 5. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος

N. φωτογραφίας: 20240116_115933								
	µg Co(II)/g κρέμας	0	0,568	1,136	2,272	4,543	7,953	14,201
1	Ένταση χρώματος Red	190,20	192,63	194,00	191,41	191,52	193,52	193,00
2	Ένταση χρώματος Green	188,91	188,59	187,99	186,33	180,77	174,59	166,82
3	Ένταση χρώματος Blue	193,74	189,62	189,99	183,62	178,77	169,15	159,78
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	190,88	190,61	190,95	187,43	183,75	178,97	173,42
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	189,90	189,61	189,99	187,41	183,76	179,52	173,79

Πίνακας 8. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία

Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(6):



Γράφημα 6. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος



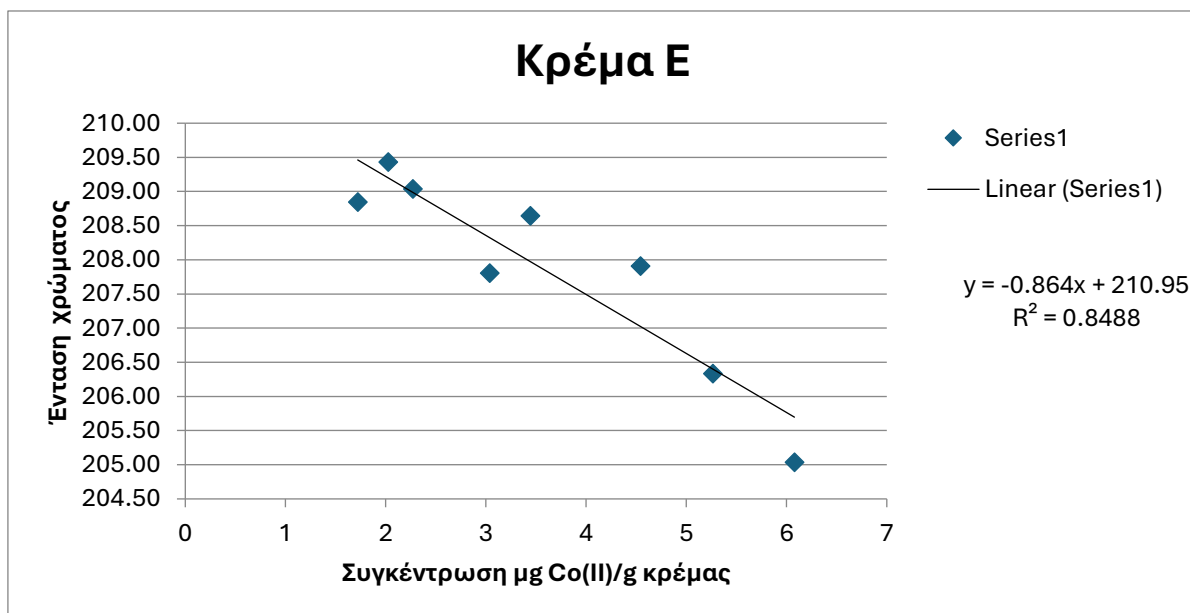
Εικόνα 4. Φωτογραφία προτύπων κοβαλτίου στη κρέμα Δ, μετά την κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Οι συγκεντρώσεις φαίνονται με την σειρά, από την μεγαλύτερη έως την μικρότερη, σύμφωνα με τον πίνακα 8, ξεκινώντας από αριστερά προς τα δεξιά

Κρέμα Ε

N. φωτογραφίας: 20240314_114905									
	μg Co(II)/g κρέμας	1,721	2,025	2,272	3,037	3,442	4,543	5,264	6,078
1	Ένταση χρώματος Red	213,28	215,79	216,91	217,43	218,03	216,86	216,46	217,18
2	Ένταση χρώματος Green	208,85	209,43	209,04	207,81	208,65	207,91	206,34	205,04
3	Ένταση χρώματος Blue	201,75	201,65	201,08	198,87	199,99	199,30	196,89	195,32
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	208,08	209,08	209,11	207,84	208,79	208,03	206,43	205,82
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	209,39	210,55	210,62	209,78	210,62	209,74	208,37	207,62

Πίνακας 9. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση κοβαλτίου στη κρέμα Ε μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία

Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(7):



Γράφημα 7. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Ε μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος

Υπολογίστηκαν, επίσης το LOQ και LOD, για τον προσδιορισμό κοβαλτίου ή σιδήρου στις αντίστοιχες κρέμες, όπου το LOQ αντιστοιχεί στο όριο ποσοτικοποίησης του αντίστοιχου μετάλλου και το LOD, αντιστοιχεί στο όριο ανίχνευσης του κοβαλτίου ή σιδήρου. Αυτά υπολογίστηκαν με βάση τους τύπους, που υπάρχουν στις προδιαγραφές του EMA (European Medicines Agency). (Guideline, 2023)

$$LOQ = 10 \cdot \sigma / S$$

$$LOD = 3,3 \cdot \sigma / S$$

Όπου σ = τυπικό σφάλμα της τεταγμένης επί την αρχή

S = κλίση της καμπύλης στο αντίστοιχο γράφημα

	Κρέμα	LOQ(μg/g κρέμας)	LOD(μg/g κρέμας)	Γράφημα
Co(II)	Δ	6,97	2,30	5,6 (μέσος όρος)
Fe(II)	Γ	39,5263	13,0437	2 (παρουσία EDTA)

Πίνακας 10. Τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης, του κοβαλτίου και του σιδήρου, όπως υπολογίστηκαν με βάση το τυπικό σφάλμα της τεταγμένης επί την αρχή και τη κλίση της ευθείας, που προκύπτει από το αντίστοιχο γράφημα, με βάση τους τύπους, που ορίζει η βιβλιογραφία

2.3. Βέλτιστες συνθήκες

2.3.1. Βέλτιστος χρόνος

Κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων, διερευνήθηκε ο βέλτιστος χρόνος της λήψης της φωτογραφίας. Ως βέλτιστος χρόνος ανάλυσης, επιλέχθηκε, στη περίπτωση του σιδήρου, χρόνος εντός του διαστήματος 30-50 λεπτά, μετά το τέλος γεμίσματος των wells, 5-25 λεπτά για το κοβάλτιο, καθώς η αντίδρασή του με τη φερροζίνη, είναι πιο σύντομη. Σε αυτούς τους χρόνους, βρέθηκαν οι βέλτιστες τιμές γραμμικής συσχέτισης (R^2 πλησιέστερο στη μονάδα), μεταξύ της συγκέντρωσης του μετάλλου και της έντασης του παραγόμενου χρώματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες 11 και 12 αντίστοιχα.

T(min) χρονικό διάστημα λήψης φωτογραφίας μετά το πέρας της κατεργασίας του δείγματος	R ²	Y=ax+b	Εύρος γραμμικής περιοχής
5min	0,8837	$y = -63,263x + 166601$	0-35,9μg/g κρέμας
10min	0,8200	$y = -1,1865x + 169,26$	0-35,9μg/g κρέμας
15min	0,8978	$y = -1,3567x + 171,35$	0-35,9μg/g κρέμας
20min	0,9113	$y = -1,5207x + 168,33$	0-35,9μg/g κρέμας
25min	0,9181	$y = -1,5656x + 166,81$	0-35,9μg/g κρέμας
30min	0,9309	$y = -1,6778x + 169,47$	0-35,9μg/g κρέμας
35min	0,9336	$y = -1,7158x + 165,68$	0-35,9μg/g κρέμας
40min	0,9397	$y = -1,7728x + 161,69$	0-35,9μg/g κρέμας
45min	0,9371	$y = -1,8358x + 163,29$	0-35,9μg/g κρέμας
50min	0,9389	$y = -1,8642x + 161,83$	0-35,9μg/g κρέμας
55min	0,9241	$y = -1,9038x + 163,54$	0-35,9μg/g κρέμας
60min	0,9371	$y = -1,9082x + 162,87$	0-35,9μg/g κρέμας

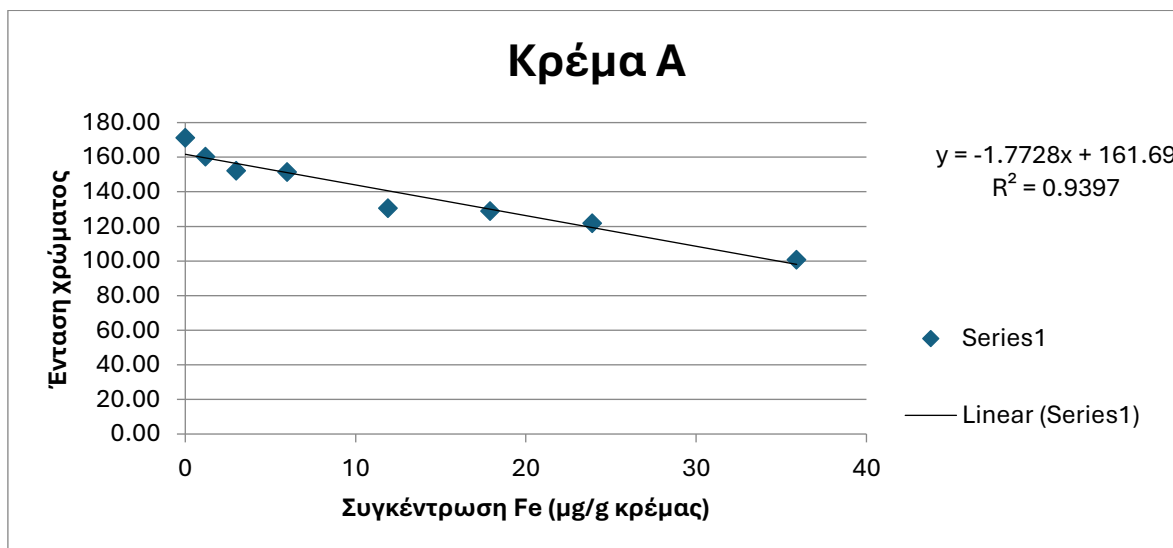
Πίνακας 11. Συντελεστής συσχέτισης R² και εξίσωση ευθείας για κάθε χρόνο λήψης φωτογραφίας στο δείγμα με σίδηρο στη κρέμα Α

T(min) χρονικό διάστημα λήψης φωτογραφίας μετά το πέρας της κατεργασίας του δείγματος	R ²	Y=ax+b	Εύρος γραμμικής περιοχής
5min	0,9802	$y = -1,723x + 186,42$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας
10min	0,9758	$y = -1,628x + 185,25$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας
15min	0,9817	$y = -1,639x + 188,28$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας
20min	0,9814	$y = -1,6882x + 185,75$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας
25min	0,9871	$y = -1,6438x + 189,2$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας
30min	0,9667	$y = -1,874x + 190,38$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας

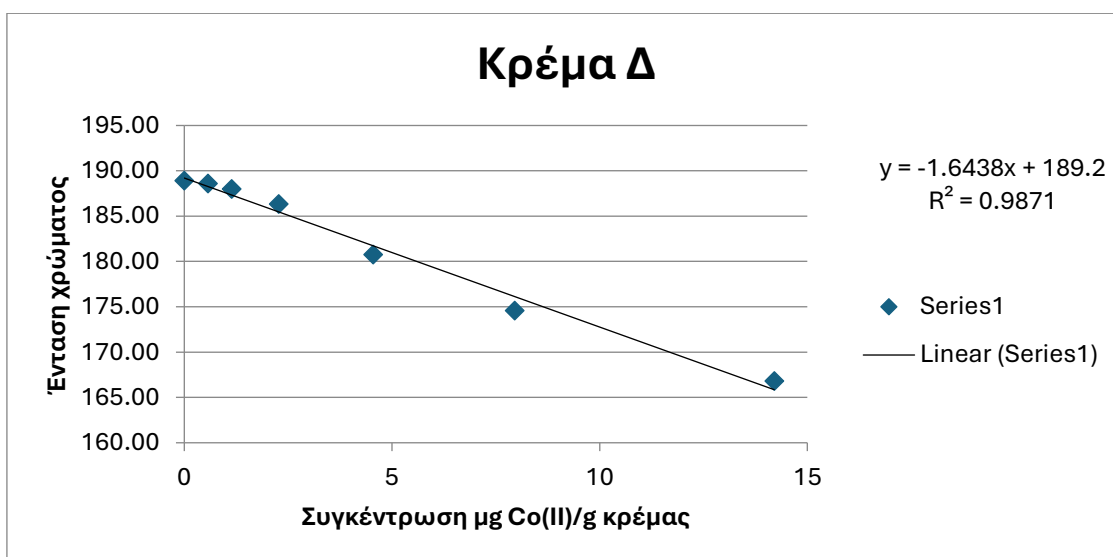
Πίνακας 12. Συντελεστής συσχέτισης R² και εξίσωση ευθείας για κάθε χρόνο λήψης φωτογραφίας στο δείγμα με κοβάλτιο στη κρέμα Δ

2.3.2. Εύρος γραμμικής περιοχής

Το εύρος της γραμμικής περιοχής σχετικά με το σίδηρο φαίνεται να είναι από 0μg/g κρέμας -35,9μg/g κρέμας, για το κοβάλτιο είναι από 0μg/g κρέμας -14,20μg/g κρέμας, αρκετά χαμηλά επίπεδα ανίχνευσης, δεδομένου ότι τα ανώτερα αποδεκτά επίπεδα κοβαλτίου στα καλλυντικά γαλακτώματα είναι 10-20μg/g. (Ahmed, Asada, & Hamza, 2021) Η γραμμική σχέση φαίνεται στα παρακάτω γραφήματα 8 και 9 αντίστοιχα.



Γράφημα 8. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης σιδήρου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος



Γράφημα 9. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος

2.3.3. Επιλογή βέλτιστου καναλιού χρώματος

Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως ανάλογα με το μέταλλο που προσδιορίζεται στο πείραμα, χρειάζεται να επιλεγθεί διαφορετικό χρωματικό κανάλι, ώστε να ληφθούν τα καλύτερα αποτελέσματα του R^2 και του εύρους γραμμικότητας. Συγκεκριμένα, για τον σίδηρο, το ιδανικό κανάλι, που χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις και τη δημιουργία των γραφημάτων είναι το κόκκινο κανάλι και για το κοβάλτιο είναι το πράσινο, όπως προκύπτει από τους παρακάτω πίνακες 13 και 14 αντίστοιχα.

N.φωτογραφίας: 20231018_142024	R²	Y=ax+b	Εύρος γραμμικής περιοχής
Ένταση χρώματος Red	0,9397	$y = -1,7728x + 161,69$	0-35,9μg/g κρέμας
Ένταση χρώματος Green	0,9134	$y = -2,0487x + 139,35$	0-35,9μg/g κρέμας
Ένταση χρώματος Blue	0,9144	$y = -1,2016x + 138,88$	0-35,9μg/g κρέμας
Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	0,9262	$y = -1,6649x + 146,56$	0-35,9μg/g κρέμας
Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	0,9221	$y = -1,87x + 146,08$	0-35,9μg/g κρέμας

Πίνακας 13. Συντελεστής συσχέτισης R² και εξίσωση της ευθείας για κάθε κανάλι ανάλυσης δείγματος σιδήρου στη κρέμα Α

N. φωτογραφίας: 20240116_115933	R²	Y=ax+b	Εύρος γραμμικής περιοχής
Ένταση χρώματος Red	0,14	$y = 0,0979x + 191,9$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας
Ένταση χρώματος Green	0,9871	$y = -1,6438x + 189,2$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας
Ένταση χρώματος Blue	0,9658	$y = -2,3712x + 191,06$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας
Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	0,9721	$y = -1,3111x + 190,89$	0-14,20μg Co(II)/g κρέμας

<p style="text-align: center;">Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B</p>	<p style="text-align: center;">0,9827</p>	<p style="text-align: center;">$y = -1,2039x + 190,13$</p>	<p style="text-align: center;">0-14,20μg Co(II)/g κρέμας</p>
---	---	---	--

Πίνακας 14. Συντελεστής συσχέτισης R² και εξίσωση της ευθείας για κάθε κανάλι ανάλυσης δείγματος κοβαλτίου στη κρέμα Δ

2.3.4. Περαιτέρω παρατηρήσεις

Κατά την ανάλυση των ληφθέντων φωτογραφιών, είναι καλό να αποφεύγεται η επιλογή περιοχών στα wells, που είναι κοντά στο χείλος του, που περιέχουν φυσαλίδες, που αντανακλά φως ή όπου υπάρχει σκιά, καθώς όλα τα παραπάνω επηρεάζουν τα αποτελέσματα έντασης χρώματος που δίνει το λογισμικό. Επίσης πρέπει η σειρά των καψιδίων μικροτιλοδότησης, να είναι σε επίπεδη επιφάνεια και παράλληλα προς την ταινία LED, για να δέχονται όλα τα well την ίδια ποσότητα φωτός υπό την ίδια γωνία, από τη ταινία LED του φωτογραφικού θαλάμου. Για τον ίδιο λόγο, πρέπει η επιφάνεια της κρέμας σε κάθε well, να είναι επίπεδη (ισοπέδωση με μια σπάτουλα). Όταν ξεκινάει η διαδικασία προσθήκης του μίγματος R1/R2 ή του R2 ανάλογα ποιο μέταλλο προσδιορίζεται, πρέπει να ολοκληρώνεται όσο πιο γρήγορα γίνεται (ο χρόνος από την έναρξη έως το τέλος, να μην ξεπερνάει τα 15λεπτά), ώστε να αποτυπωθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης, σε κοντινές χρονικές στιγμές στα wells.

2.4. Παρεμποδιστές

2.4.1. Παρεμποδιστές από αντικατάσταση της φερροζίνης στην ένωση συναρμογής

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διαπιστώθηκε πως υπήρχαν κάποια συστατικά στα γαλακτώματα, τα οποία αντικαθιστούν τη φερροζίνη και δημιουργούν τα ίδια ένα σύμπλοκο με τον σίδηρο ή το κοβάλτιο, που είναι άχρωμο. Επομένως, μετά τη κατεργασία με το μίγμα R1/R2, το δείγμα παραμένει άχρωμο, παρόλο, που περιέχει ικανή ποσότητα μετάλλου, είτε σιδήρου είτε κοβαλτίου, ώστε να υπάρξει ανάπτυξη χρώματος. Θεωρήθηκε, λοιπόν αναγκαίο να εξετασθεί, ποια συστατικά γαλακτωμάτων λειτουργούν ως παρεμποδιστές σε αυτή τη τεχνική. Για τον λόγο αυτόν, παρασκευάστηκαν stock από συχνά χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες, και που πιθανά θα λειτουργούσαν ως ανταγωνιστές. Προστέθηκε ποσότητα από κάθε stock σε φυαλίδιο των 2g, που περιείχε ποσότητα δείγματος συγκεκριμένης συγκέντρωσης μετάλλου. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προσθήκη μίγματος R1/R2 και μετά το τέλος της κατεργασίας των δειγμάτων, παρακολούθηθηκε η ανάπτυξη χρώματος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις μετάλλων στα δείγματα, που εξετάστηκαν: 29,95μg σιδήρου/g κρέμας, 3,44μg Co(II)/g κρέμας. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται ποιες ουσίες εξετάστηκαν, τα stock τους και σε τι ποσοστό προστέθηκαν στα δείγματα. (πίνακας 15).

Για το πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκαν:

- Dissodium EDTA : ΕΛΤΟΝ ΑΒΕΕ, NOURYON FUNCTIONAL CHEMICALS , BV., >99%
- Potassium Sorbate : ΕΛΤΟΝ ΑΒΕΕ, JIANGSU MUPRO IFT CORP. (MPP), 100%
- Sodium Gluconate : ΑΣΤΡΟΝ ΧΗΜΙΚΑ ΑΕ, JUNG BUZLAUER, 99-101%
- Zinc Bisglycinate : ΦΑΓΚΡΟΝ ΕΛΛΑΣ ΑΒΕΕ, GONMISOL, 20%
- Sodium Benzoate : ΑΣΤΡΟΝ ΧΗΜΙΚΑ ΑΕ, AESTMAN, FOOD GRADE, KOSHER, >99%
- Citric Acid : Merck, MW : 210,14
- Hexadecanoic Acid : ΕΛΤΟΝ ΑΒΕΕ, ΚΛΚ ΟΛΕΟ, 51%
- Octadecanoic Acid : ΕΛΤΟΝ ΑΒΕΕ, ΚΛΚ ΟΛΕΟ, 47,6%

Παρεμποδιστές	Stock % w/v	Συγκέντρωση στο δείγμα % w/w	Ανάπτυξη χρώματος στο δείγμα Fe	Ανάπτυξη χρώματος στο δείγμα Co	Αξιολόγηση παρεμποδιστή
Dissodium EDTA	9%	1%	×	×	ΝΑΙ
Potassium Sorbate	25%	1,5%	✓	✓	ΟΧΙ
Sodium Gluconate	25%	1,5%	✓	✓	ΟΧΙ
Zinc Bisglycinate	4%	0,4%	×	×	ΝΑΙ
Sodium Benzoate	5%	0,5%	✓	✓	ΟΧΙ
Citric Acid	10%	2%	✓	×	ΝΑΙ
Hexadecanoic Acid	0,91% in Ethanol	0,18%	✓	✓	ΟΧΙ
Octadecanoic Acid	0,86% in Ethanol	0,17%	✓	✓	ΟΧΙ

Πίνακας 15. Αποτελέσματα ανίχνευσης παρεμβάλλοντων συστατικών καλλυντικών στην προτεινόμενη μεθοδολογία, λόγω αντικατάστασης της φερροζίνης στη δημιουργία συμπλόκων με το κοβάλτιο ή τον σίδηρο. Παρουσιάζονται οι

ενώσεις των οποίων διερευνήθηκε η συναρμογή με το εκάστοτε μέταλλο, η συγκέντρωση του stock αυτών, η τελική συγκέντρωση των ενώσεων αυτών στα δείγματα γαλακτώματος και το αποτέλεσμα ανάπτυξης χρώματος

Όπως, φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, τα δείγματα, τα οποία περιέχουν ως συστατικό το Dissodium EDTA, το Zinc Bisglycinate και το Citric Acid, δεν μπορούν να αναλυθούν με αυτή τη τεχνική παρά μόνο με τις κλασσικές μεθόδους ανάλυσης, που φαίνονται στο κεφάλαιο 1.5. Επιπλέον, φαίνεται ότι το Citric Acid, παρεμβάλλεται εκλεκτικά στην συναρμογή του κοβαλτίου με τη φερροζίνη.

2.4.2. Παρεμποδίσεις από συναρμογή παρεμβάλλοντων μετάλλων με τη φερροζίνη

Επιπλέον, μελετήθηκε η πιθανότητα, να υπάρχει παρεμπόδιση της τεχνικής από διάφορα άλλα μέταλλα, τα οποία δημιουργούν έγχρωμο σύμπλοκο με τη φερροζίνη, αν και βιβλιογραφικά έχει βρεθεί ότι η φερροζίνη συναρμόζεται μόνο με τον δισθενή σίδηρο, το δισθενές κοβάλτιο και τον μονοσθενή χαλκό. Για αυτόν τον λόγο, παρασκευάστηκαν stock, από διάφορα μέταλλα, τα οποία πιθανώς να απαντηθούν σε καλλυντικές φόρμουλες ως προσμίξεις πρώτων υλών. Προστέθηκε ποσότητα από κάθε stock σε φυαλίδια των 2g, που περιείχαν ποσότητα κρέμας A. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προσθήκη αντιδραστηρίου R2 (100μl) και μετά το τέλος της κατεργασίας των δειγμάτων, παρακολούθηθηκε η ανάπτυξη χρώματος. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται ποια μέταλλα εξετάστηκαν, τα stock τους και σε τι ποσοστό προστέθηκαν στα δείγματα. (πίνακας 16).

Για το πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκαν:

- Μαγνήσιο, $MgCO_3$: J.T. Baker, Ph.Eur
- Κάλιο, KCl : Kalisel, 99,1%
- Νάτριο, NaCl : K.E ΚΑΛΑΜΑΡΑΚΗΣ-ΚΑΛΑΣ Α.Ε., >99,4%
- Ψευδάργυρος, $ZnCl_2$: Merck
- Ασβέστιο, $CaCl_2$: Sigma-Aldrich, MW: 110,99
- Χαλκός, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$: J.T. Baker
- Σίδηρος, $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$

Παρεμποδιστές	Stock % w/v	%w/w Συγκέντρωση στο δείγμα	Ανάπτυξη χρώματος στο δείγμα	Αξιολόγηση παρεμποδιστή
MgCO₃	0,15%	0,05%	×	OXI
KCl	14,9%	4,97%	×	OXI
NaCl	11,7%	3,90%	×	OXI
ZnCl₂	4,5%	1,5%	×	OXI
CaCl₂	50%	5%	×	OXI
CuSO₄ * 5 H₂O	0,52%	Από 0-0,108 %	Μπλε χρώμα από 0,0392%, πιθανότατα λόγω του χρώματος της ίδιας της ουσίας.	NAI
FeSO₄ * 7 H₂O	0,612%	0,0018%	✓	NAI

Πίνακας 16. Αποτελέσματα ανίχνευσης παρεμβάλλοντων μετάλλων στην προτεινόμενη μεθοδολογία. Παρουσιάζονται τα μέταλλα, των οποίων διερευνήθηκε η συναρμογή με φερροζίνη, η συγκέντρωση του Stock% αυτών, η τελική συγκέντρωση των μετάλλων στα δείγματα γαλακτώματος και το αποτέλεσμα ανάπτυξης χρώματος

Στον παραπάνω πίνακα, οι συγκεντρώσεις αφορούν το άλας του μετάλλου και όχι το καθαρό μέταλλο. Με βάση τον πίνακα 15, φαίνεται πως κανένα από τα μέταλλα, που ελέγχθηκαν, εκτός του χαλκού και του σιδήρου, δεν παρεμβάλλεται με τη μέθοδο. Συγκεκριμένα, κανένα εκτός του δισθενούς σιδήρου δεν δημιούργησε έγχρωμο σύμπλοκο με τη φερροζίνη, γεγονός, που επιβεβαιώνει τη βιβλιογραφία. Επιπλέον, στη περίπτωση του χαλκού, η παρεμβολή στη μέθοδο, φαίνεται να οφείλεται στο ίδιο το χρώμα του άλατος του μετάλλου σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επομένως επάγεται το συμπέρασμα, πως τα συγκεκριμένα μέταλλα, εκτός του δισθενούς σιδήρου, δεν αποτελούν παρεμπόδιση όταν η ανάπτυξη χρώματος γίνεται με τη προσθήκη R2. Όταν η κατεργασία του δείγματος έγινε με προσθήκη μίγματος R1/R2, στη περίπτωση του δισθενούς χαλκού, υπήρξε παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου σε μικρότερες συγκεντρώσεις αυτού, πιθανότατα λόγω της αναγωγής του. Άρα, ο μονοσθενής χαλκός, αποτελεί παρεμπόδιση, ενώ ο δισθενής χαλκός, μόνο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, οι οποίες γίνονται ήδη αντιληπτές με γυμνό μάτι. Συνεπώς, η εφαρμογή της μεθόδου για τον προσδιορισμό κοβαλτίου (δηλαδή προσθήκη μόνο του αντιδραστήριου R2), περιορίζεται σε γαλακτώματα ελεύθερα μονοσθενούς χαλκού και δισθενούς σιδήρου.

2.4.3. Παρεμπόδιση από το χρώμα του αρχικού γαλακτώματος

Διαπιστώθηκε, πως επειδή στην ανάλυση γαλακτωμάτων με τη τεχνική αυτή, δεν απαιτείται αραίωση, η εμφάνιση του παραμένει ίδια με την αρχική. Επομένως εάν το γαλάκτωμα είναι αρχικά χρωματισμένο η ανάλυση δεν μπορεί να γίνει, καθώς το αρχικό χρώμα αυτό, θα επηρεάζει την ένταση και την απόχρωση του αναπτυσσόμενου χρώματος και επακόλουθο αυτού, τα αποτελέσματα της ανάλυσης της φωτογραφίας του δείγματος, δεν θα είναι αντιπροσωπευτικά της πραγματικότητας. Συμπερασματικά, και το χρώμα του αρχικού γαλακτώματος λειτουργεί ως παρεμποδιστής στη τεχνική αυτή.

2.5. Επιλεκτική οξείδωση

Καθώς η τεχνική αυτή, κατά την ανάλυση συμπροσδιορίζει το δισθενές κοβάλτιο με τον δισθενή σίδηρο και τον μονοσθενή χαλκό, ήταν ανάγκη να βρεθεί τρόπος να δίνει έγχρωμο προϊόν με τη φερροζίνη, μόνο το κοβάλτιο από τα τρία μέταλλα. Επειδή το κοβάλτιο είναι αυτό, που είναι το πιο επικίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία σε σχέση με τον σίδηρο και τον χαλκό, έχει νόημα να προσδιορίζεται στα καλλυντικά. Αναζητήθηκε συνεπώς τεχνική, που να περιορίζει την συμπλοκοποίηση των άλλων δύο μετάλλων με τη φερροζίνη. Έτσι εξετάσθηκε η επιλεκτική οξείδωση του σιδήρου με διάφορα μέσα, δηλαδή η μετατροπή δισθενούς σιδήρου στο γαλάκτωμα σε τρισθενή, ο οποίος δεν δημιουργεί έγχρωμο σύμπλοκο με τη φερροζίνη. Η μετατροπή του μονοσθενούς σιδήρου σε δισθενή, δεν φαίνεται να αποτελεί πρόβλημα, καθώς άλατα του μονοσθενούς σιδήρου δεν απαντώνται συχνά. Σε μελλοντικά πειράματα είναι ανάγκη να εξετασθεί η επιλεκτική οξείδωση και του χαλκού, δηλαδή η μετατροπή μονοσθενούς χαλκού στο γαλάκτωμα σε δισθενή, ο οποίος δεν δημιουργεί έγχρωμο σύμπλοκο με τη φερροζίνη. Για την επιλεκτική οξείδωση, εξετάσθηκαν, η προσθήκη υποχλωριώδους νατρίου σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,001% και 0,1%) στις οποίες εκτέθηκαν τα δείγματα και η παραμονή των δειγμάτων σε φούρνο, στους 50°C για 72h. Δείγματα ελέγχου, παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT), ενώ υπήρξε και τυφλό δείγμα, το οποίο παρέμεινε και αυτό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήσαμε:

- Υποχλωριώδες νάτριο, GloChem, GLO208, 4,8%
- Κρέμα Δ
- Αντιδραστήριο R2
- 3,5Fe(II) μg/g κρέμας(παρασκευάστηκε από FeSO₄ *7H₂O)
- 4,54 μg Co(II)/g κρέμας

Στους παρακάτω πίνακες, φαίνονται οι εντάσεις του χρώματος που καταγράφηκαν, υπό διαφορετικές συνθήκες οξείδωσης του σιδήρου και του κοβαλτίου αντίστοιχα (πίνακας 17 και 18).

N.φωτογραφίας: 20240401_12023 0						
	3,5μg Fe(II)/g κρέμας	0,001%NaClO	0,10% NaClO	50°C	RT	0/BC
1	Ένταση χρώματος Red	204,41	211,03	207,37	161,03	210,76
2	Ένταση χρώματος Green	199,46	210,03	204,75	142,44	210,74
3	Ένταση χρώματος Blue	203,41	208,03	204,64	166,72	210,74
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	202,44	210,03	205,71	156,73	210,75
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114 B	201,43	210,03	205,53	150,73	210,75

Πίνακας 17. Ένταση χρώματος, μετά από κατεργασία των δειγμάτων με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Η κατεργασία έγινε στο τέλος της επώασης υπό διαφορετικές συνθήκες οξείδωσης του σιδήρου στη κρέμα Δ.

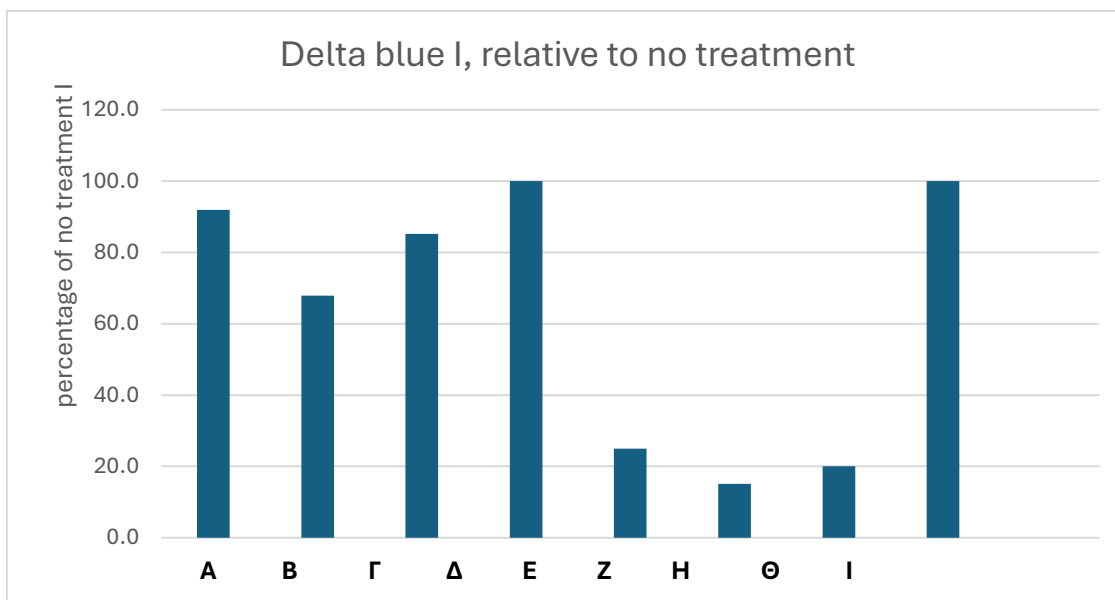
N.φωτογραφίας: 20240401_12023 0						
	4,54μg Co(II)/g κρέμας	0,001%NaClO	0,10% NaClO	50°C	RT	0/BC
1	Ένταση χρώματος Red	203,87	202,36	205,46	204,20	210,76
2	Ένταση χρώματος Green	192,52	197,15	194,44	192,01	210,74
3	Ένταση χρώματος Blue	188,92	193,19	191,09	188,52	210,74
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	195,02	197,29	196,84	194,85	210,75
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	195,64	198,22	197,47	195,37	210,75

Πίνακας 18. Ένταση χρώματος σε διαφορετικές συνθήκες οξείδωσης κοβαλτίου στη κρέμα Δ

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, διαπιστώνεται πως υπάρχει διαφορά έντασης χρώματος ανάμεσα στα δείγματα σιδήρου, που υπέστησαν οξείδωση, είτε με τη προσθήκη υποχλωριώδους νατρίου, είτε με τη παραμονή του δείγματος στον φούρνο, και στο δείγμα που παρέμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς καμία κατεργασία πριν τη προσθήκη του αντιδραστηρίου R2. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο κανάλι χρώματος, που στη περίπτωση του σιδήρου, όπως αναφέρθηκε στη παράγραφο 2.3.3., είναι το κόκκινο, παρατηρείται πως με όλες τις μεθόδους οξείδωσης, η ένταση χρώματος πλησιάζει την ένταση χρώματος, που προκύπτει από την ανάλυση του δείγματος, που δεν περιέχει ποσότητα σιδήρου. Δηλαδή, προκύπτει ότι η ανακλώμενη ένταση του φωτός, αυξάνεται κατά σειρά: RT<φούρνος<0,001%NaClO<0,1%NaClO<0/BC.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, κατά την ανάλυση των δειγμάτων με κοβάλτιο, διαπιστώνεται πως χρησιμοποιώντας το κατάλληλο κανάλι χρώματος, στη περίπτωση αυτή, το πράσινο, δεν υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην ένταση χρώματος, παρά μόνο κατά τη προσθήκη της μεγαλύτερης συγκέντρωσης υποχλωριώδους νατρίου.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις και δεδομένα, αποτυπώνονται γραφικά στο γράφημα (10).



Γράφημα 10. Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών οξείδωσης στην ένταση του χρώματος γαλακτωμάτων επιμολυσμένων με σίδηρο ή κοβάλτιο, μετά από κατεργασία τους με φερροζίνη. Η ένταση του χρώματος εκφράζεται ως ποσοστό της έντασης του χρώματος στο δείγμα, που παρέμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το βέλτιστο κανάλι χρώματος για τον προσδιορισμό κάθε μετάλλου αντίστοιχα. Τα γράμματα Α, αντιστοιχεί στο δείγμα, που περιέχει κοβάλτιο και 0,001% NaClO, το Β, στο δείγμα που περιέχει κοβάλτιο και 0,1% NaClO, το Γ, στο δείγμα που περιέχει κοβάλτιο και παρέμεινε στον φούρνο, το Δ, στο δείγμα που περιέχει κοβάλτιο και δεν υπέστη οξείδωση, το Ε, στο δείγμα που περιέχει σίδηρο και 0,001% NaClO, το Ζ, στο δείγμα που περιέχει σίδηρο και 0,1% NaClO, το Η, στο δείγμα που περιέχει σίδηρο και παρέμεινε στον φούρνο, το Θ, στο δείγμα που περιέχει σίδηρο και δεν υπέστη οξείδωση και το Ι αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα, που δεν περιείχε κανένα μέταλλο και 0%NaClO

Επομένως, όταν πρέπει να προσδιοριστεί η παρουσία μόνο κοβαλτίου σε ένα δείγμα, με τη συγκεκριμένη τεχνική, η προσθήκη υποχλωριώδους νατρίου, φαίνεται να είναι η λύση για τον περιορισμό εμφάνισης του σιδήρου, κατά την ανάλυση.

2.6. XRF

Η αντίδραση, στην οποία βασίζεται η προτεινόμενη μεθοδολογία, που αναπτύσσεται σε αυτή την εργασία, έχει ευρύτατα περιγραφεί στη βιβλιογραφία, για τον προσδιορισμό σιδήρου και κοβαλτίου σε διάλυμα, όχι όμως για τον απευθείας προσδιορισμό σε γαλακτώματα (Kundra, Katyal, & Rathore, 1974). Για τον λόγο αυτόν, υπήρχε η ανάγκη επιβεβαίωσης της τεχνικής αυτής, με μια βιβλιογραφικά αποδεκτή μεθοδολογία, η οποία να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μετάλλων. Η τεχνική, που επιλέχθηκε είναι η XRF. Με τη βοήθεια της κυρίας Μ. Πηλακούτα, επαληθεύθηκαν τα αποτελέσματα, που προέκυψαν από τη χρωματομετρική μέθοδο ανάλυσης.

2.6.1. Όργανα και συσκευές

Για τη προετοιμασία των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Διαφανής μεμβράνη τροφίμων
- Πλαστικά λαστιχάκια μαλλιών
- Στόμια από πλαστικά μπουκάλια νερού
- Πλαστικές σπάτουλες
- Συσκευή EDXRF, Amptek's Experimenter's XRF Kit system(X-123, Si-PIN detector (25 mm²), Mini-X USB-controlled X-ray tube (50 kV/100 μA) with a silver (Ag) anode)

2.6.2. Δείγματα και η προετοιμασία τους

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από:

- Κρέμα Γ, με συγκεντρώσεις σιδήρου(Fe_{tot}) από 0μg/g κρέμας μέχρι 35,9μg/g κρέμας
- Κρέμα Α, με συγκεντρώσεις $Co(II)$ από 0μg/g κρέμας μέχρι 78,30μg/g κρέμας

Αρχικά, για την προετοιμασία των δειγμάτων κρέμας κατάλληλων για ανάλυση XRF, χρειάστηκε να κοπούν τα στόμια από έναν αριθμό μπουκαλιών, ίσο με τα δείγματα. Ύστερα ένα κομμάτι από μεμβράνη, τοποθετήθηκε σε κάθε στόμιο μπουκαλιού και αφού τεκνιώθηκε καλά ώστε να μην υπάρχουν ζάρες στην επιφάνεια, ασφαλίστηκε με ένα πλαστικό λαστιχάκι μαλλιών και καταγράφηκε το βάρος του. Έπειτα, με μια πλαστική σπάτουλα, τοποθετήθηκε στην επιφάνεια της μεμβράνης ποσότητα δείγματος (περίπου 200 mg) και ισοπεδώθηκε, ώστε να μείνει ένα ομοιόμορφο και επίπεδο στρώμα κρέμας και καταγράφηκε ξανά το βάρος του. Για κάθε συγκέντρωση, παρασκευάστηκε το κάθε πρότυπο εις τριπλούν. Καθώς, η XRF, αναλύει στερεά δείγματα, αφέθηκαν, τα πρότυπα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος να στεγνώσουν (για 48-72 ώρες) και στη συνέχεια, ζυγίστηκαν για τελευταία φορά ώστε να προσδιοριστεί η μάζα του ξηρού δείγματος(πρέπει να είναι περίπου 65mg). Τέλος, ακολούθησε η ακτινοβολήση από το όργανο XRF.

2.6.3. Συνθήκες λειτουργίας συστήματος EDXRF

- Συνθήκες ακτινοβολήσης: 40kW, 20μA
- Η απόσταση μεταξύ του δείγματος και της πειραματικής διάταξης ήταν 1cm
- Γεωμετρία XRF 45°, χρησιμοποιήθηκε για τη γωνία πρόσπτωσης και την ανίχνευση
- Η ανάλυση του ανιχνευτή, ήταν 0,16keV στα 5,9keV(Mn Ka)
- Συνθήκες σωλήνα ακτίνων X: 2 mm collimator, 25 μm Al filter
- Χρόνος προθέρμανσης οργάνου: 5 λεπτά με σταδιακό ανέβασμα τάσης και ρεύματος
- Τα φάσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό SPECTRW

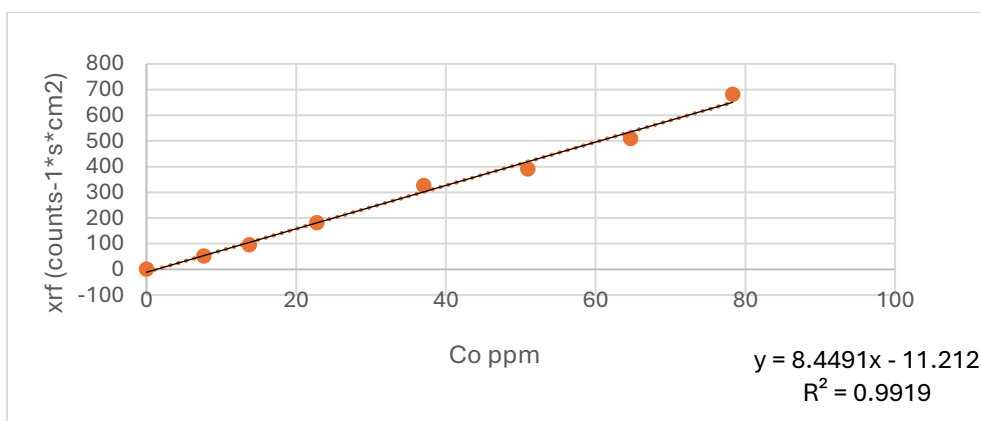
- Χρησιμοποιήθηκε σύστημα EDXRF (Amptek's Experimenter's XRF Kit system), συνδεδεμένο με υπολογιστή για τη καταγραφή και ανάλυση δεδομένων.

2.6.4. Συνθήκες ανάλυσης δειγμάτων

- Η μεταβολή μάζας εξαρτάται από το είδος του γαλακτώματος, την αρχική μάζα του δείγματος και τη θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Τα δείγματα αναλύθηκαν μετά από 2-3 μέρες, οπότε και δεν υπήρχε περαιτέρω απώλεια υγρασίας από το δείγμα

Co ppm	XRF mean value count rate per surface density FOR Co*1000
0	0
7,64	51,49
13,71	94,70
22,73	181,52
37,03	325,92
50,94	390,19
64,67	509,49
78,30	680,74

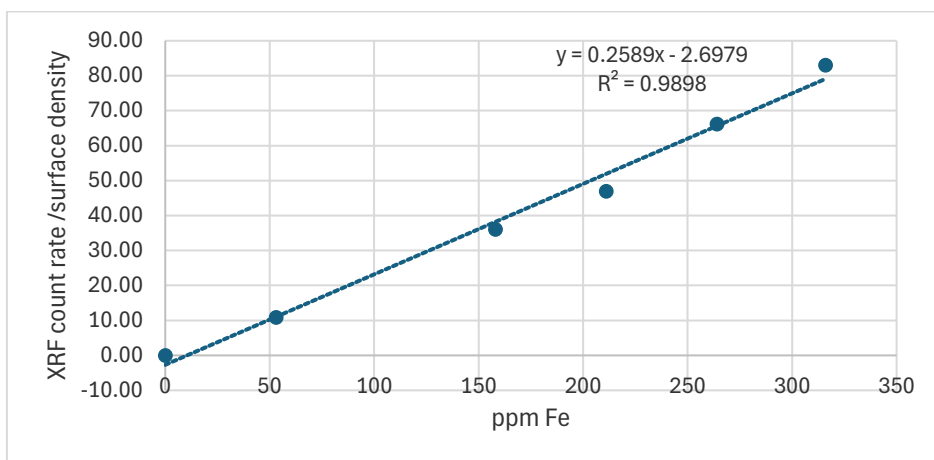
Πίνακας 19. Δεδομένα ανάλυσης προτύπων διαφορετικών συγκεντρώσεων κοβαλτίου στη κρέμα Α σε XRF mean count rate per surface density



Γράφημα 11. Καμπύλη αναφοράς κατά την ποσοτικοποίηση του περιεχόμενου κοβαλτίου σε πρότυπα δείγματα στη κρέμα Α με τη τεχνική XRF

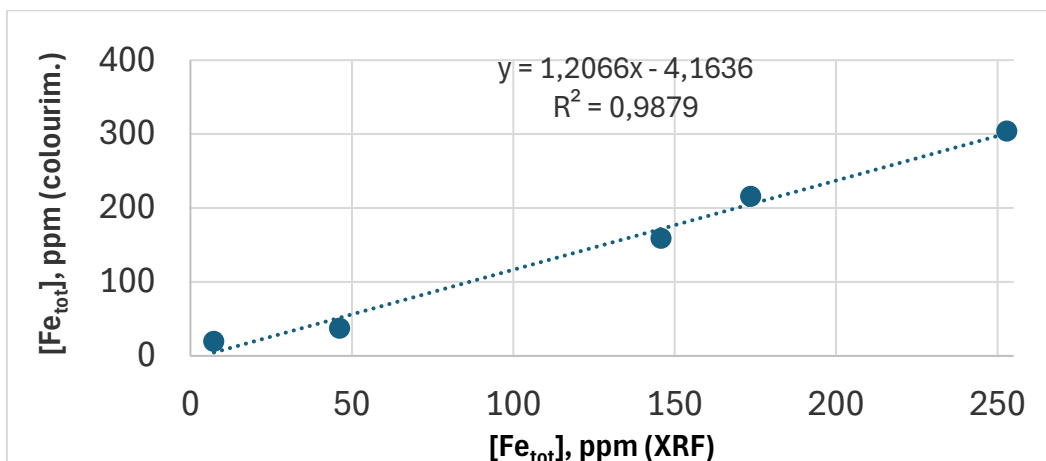
Fe ppm	XRF mean value count rate per surface density FOR Fe*1000
0	0,00
53	10,9
158	36,10
211	47,00
264	66,20
316	83,00

Πίνακας 20. Δεδομένα ανάλυσης προτύπων διαφορετικών συγκεντρώσεων σιδήρου στη κρέμα Γ σε XRF mean count rate per surface density



Γράφημα 12. Καμπύλη αναφοράς κατά την ποσοτικοποίηση του περιεχόμενου σιδήρου σε πρότυπα δείγματα στη κρέμα Γ με τη τεχνική XRF

Αποτυπώθηκαν οι συγκεντρώσεις ολικού σιδήρου, που προσδιορίστηκαν με την χρωματομετρική μέθοδο και οι συγκεντρώσεις, που προσδιορίστηκαν με την τεχνική XRF σε κοινό γράφημα (γράφημα 13), προκειμένου να διερευνηθεί η συσχέτισή τους. Σύμφωνα με το γράφημα 13, είναι εμφανής η γραμμική συσχέτιση των δύο μεθόδων, κάτι που υποδεικνύει την εγκυρότητα της χρωματομετρικής μεθόδου



Γράφημα 13. Καμπύλη συσχέτισης των δύο μεθόδων.

3. FRAP/ BITAMINH C

Η αρχή της τεχνικής FRAP είναι ανάλογη της αρχής της προτεινόμενης μεθοδολογίας. Και οι δύο τεχνικές, βασίζονται στη συμπλοκοποίηση μετάλλου με συμπλοκοποιητή (τριπυριδυλοτριαιζίνη ή φερροζίνη αντίστοιχα). Η αναλογία αυτή, μας οδήγησε να διερευνήσουμε κατά πόσο μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική FRAP, απευθείας σε γαλάκτωμα, κατ' αναλογία με τη βιβλιογραφία. (Tsotsou & Paraskevoroulou, 2024)

3.1. Αντιδραστήρια και μέθοδοι ανάλυσης

3.1.1. Αντιδραστήρια

- Ασκορβικό οξύ: L(+) Ascorbic acid Ph Eur grade, Merck
- MAK369-1kt, κιτ για FRAP: FRAP assay buffer, FeCl₃, FRAP probe, Sigma Aldrich

3.1.2. Κρέμες

Για τις πειραματικές μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές κρέμες, η μία είναι εμπορική από την εταιρία ANAVERIS, ενώ η δεύτερη παράχθηκε στο εργαστήριο κοσμητολογίας του ΠΑΔΑ(κρέμα Δ). Τα συστατικά τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα(21) και το pH και το ιζώδες της κάθε κρέμας, φαίνεται στον πίνακα 22.

Κρέμα Δ	Κρέμα Z
Aqua	Aqua

Mineral Oil	Glycerin
Cetearyl Alcohol	Cetyl Alcohol
Cithrol GMS	Avocado Oil
Phenoxyethanol	Isopropyl Isostearate
Xanthan Gum	Cetearyl Isononanoate
Sensiva sc 50	Myristyl Myristate
	Glyceryl Stearate Citrate
	Glyceryl Stearate
	Shea Butter
	Olive Fruit Oil
	Parfum
	Benzyl Alcohol
	Sodium Stearoyl Glutamate
	Caprylyl Glycol
	Xanthan Gum
	Phytosterols
	Sodium Gluconate
	Dehydroacetic Acid
	Sorbitan Oleate
	Ascorbyl Palmitate
	Tocopherol Acetate
	Citric Acid

Πίνακας 21. Συστατικά γαλακτωμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής

	Κρέμα Δ	Κρέμα Ζ
pH	5,10	5,45
Viscosity	420k cps/s95/0,6rpm	580k cps/s95/0,6rpm

Πίνακας 22. pH και ιξώδες στους 20°C για κάθε γαλάκτωμα που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής

3.1.3. Όργανα και συσκευές

- Χαρτί χρωματογραφίας, Grade 1 Chr Cellulose Chromatography Paper, Whatman
- Καλυπτρίδες μικροσκοπίου
- Η κάμερα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 12MP f/1.8 OIS από το κινητό Samsung Galaxy S21 FE.
- Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν σε φωτογραφικό θάλαμο Shenzhen PULUZ Technology Limited (China), με μια ταινία με φωτάκια LED και ένα άνοιγμα στην οροφή, όπου τοποθετείται το κινητό τηλέφωνο. 23×23×23εκ.

3.1.4. Μέθοδος λήψης φωτογραφίας

Η λήψη φωτογραφίας γίνεται με τον ίδιο τρόπο, όπως στη τεχνική για τον προσδιορισμό μετάλλων, που αναλύεται στην παράγραφο 2.1.4.

3.1.5. Μέθοδος ανάλυσης φωτογραφίας

Η ανάλυση της φωτογραφίας, γίνεται με τον ίδιο τρόπο, όπως στη τεχνική για τον προσδιορισμό μετάλλων, που αναλύεται στη παράγραφο 2.1.5.

3.2. Γραμμικότητα

Με σκοπό να διαπιστωθεί η γραμμική συσχέτιση της έντασης του χρώματος με τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού, παρασκευάστηκε σειρά από 8 πρότυπα στη κρέμα Ζ, με συγκεντρώσεις από 0μg ασκορβικού οξέως/g κρέμας μέχρι 1μg ασκορβικού οξέως/g κρέμας. Το ασκορβικό οξύ, προστέθηκε στη κρέμα από stock διάλυμα σε νερό, συγκέντρωσης 15%w/v. Για τη παρασκευή των προτύπων, προστέθηκαν σε 7g κρέμας Η, σε ουροσυλλέκτη, η αντίστοιχη ποσότητα του stock. Παρασκευάστηκε το μείγμα FRAP assay buffer, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή: 152μl, FeCl₃ solution: 19μl, FRAP probe: 19μl, και ανάδευση. Σε ειδικό χαρτί χρωματογραφίας, προστέθηκαν 10μl από το FRAP assay buffer. Αφού πέρασαν λίγα λεπτά ώστε να στεγνώσει η κάθε σταγόνα στο χαρτί, προστέθηκε με πλαστική σπάτουλα, μικρή ποσότητα από κάθε πρότυπο γαλάκτωμα σε κάθε σταγόνα αντίστοιχα, από τη μικρότερη συγκέντρωση(0μg/g κρέμας) στη μεγαλύτερη (1μg/g κρέμας). Στη συνέχεια, με μια καλυπτρίδα μικροσκοπίου, ισοπεδώθηκε η κρέμα, ώστε να έχει ένα ομοιόμορφο και επίπεδο στρώμα πάνω στη σταγόνα.

Τοποθετήθηκε το χαρτί μέσα στον θάλαμο φωτογραφίας . Έγινε λήψη φωτογραφίας (εικόνα 5) κάθε 5 λεπτά και τέλος, κάθε φωτογραφία αναλύθηκε στο πρόγραμμα Image J, όπου λήφθηκαν οι εντάσεις του χρώματος για τα συγκεκριμένα πρότυπα, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα(23).

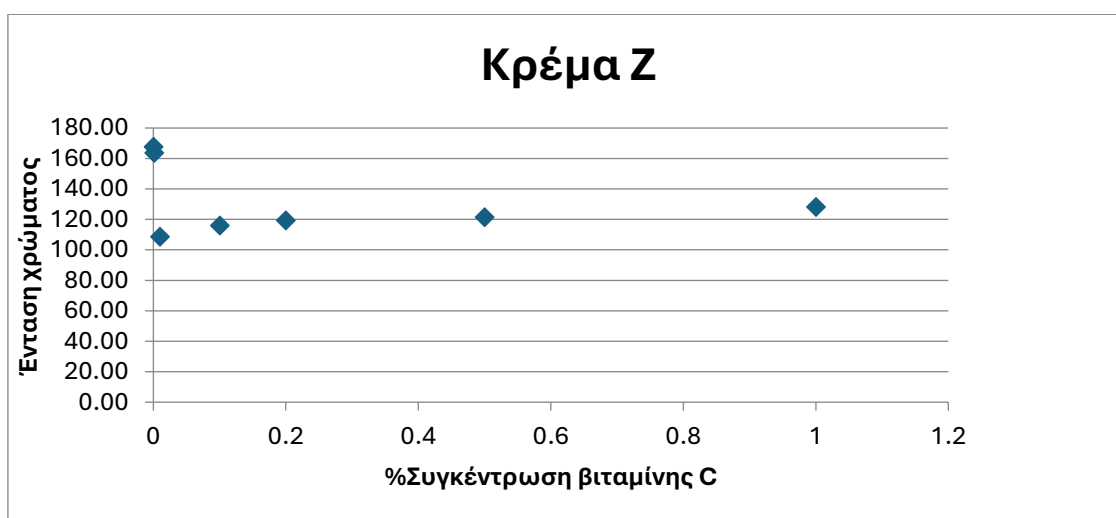
Με παρόμοια διαδικασία, παρασκευάστηκαν πρότυπα και στη κρέμα Δ(πίνακας 24).

Κρέμα Z

N.φωτογραφίας: 20231128_110311								
	Vit.C%	0	0,001	0,01	0,1	0,2	0,5	1
1	Ένταση χρώματος Red	167,63	163,92	109,46	116,69	121,75	123,61	129,63
2	Ένταση χρώματος Green	167,72	163,75	108,81	116,06	119,36	121,60	128,34
3	Ένταση χρώματος Blue	177,07	179,39	149,33	153,23	161,67	160,33	165,12
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	170,69	169,11	122,49	128,51	134,02	135,18	141,19
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	168,68	165,52	113,53	120,44	124,97	126,67	132,90

Πίνακας 23. Ένταση χρώματος και % συγκέντρωση βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Z, μετά από κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας

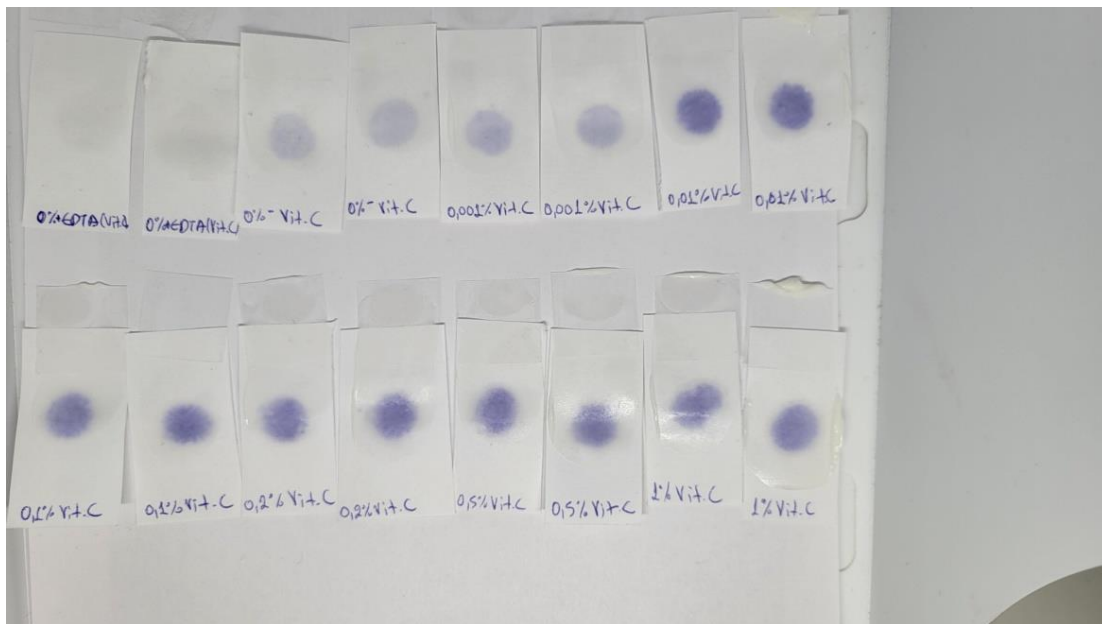
Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(14):



Γράφημα 14. Σχέση έντασης χρώματος και % συγκέντρωση βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Z μετά από κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος

Αρχικά, δοκιμάστηκε ο προσδιορισμός υψηλών συγκεντρώσεων (1%), όμως διαπιστώθηκε πως ήδη από 0,01% βιταμίνη C, υπάρχει κορεσμός. Για αυτόν τον λόγο, το πείραμα

επαναλήφθηκε, χρησιμοποιώντας χαμηλότερες συγκεντρώσεις της βιταμίνης, στη κρέμα Δ.



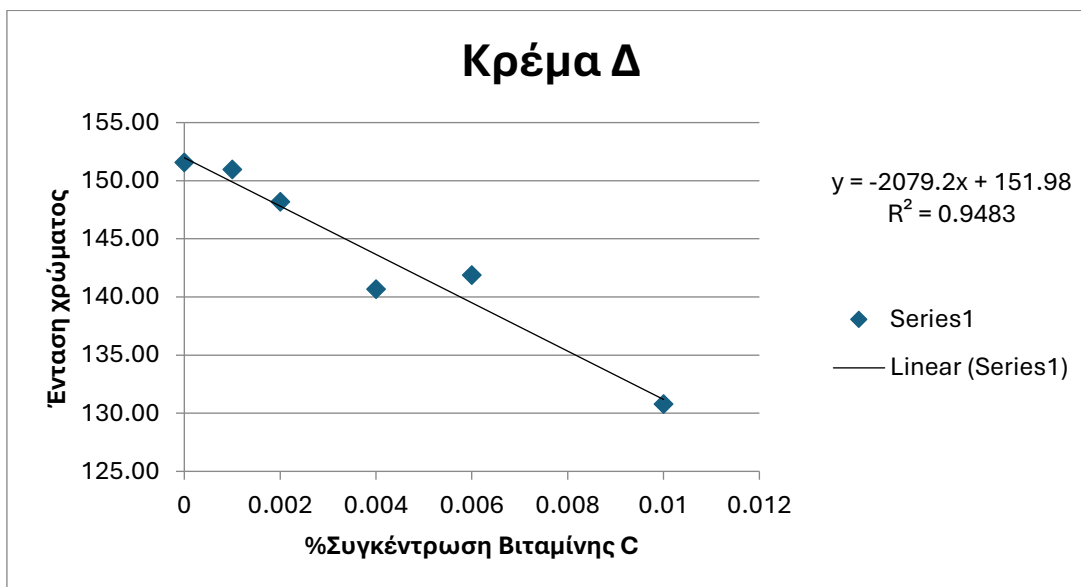
Εικόνα 5. Φωτογραφία προτύπων βιταμίνης C σε κρέμα Z μετά την κατεργασία τους με τη τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε στο χαρτί χρωματογραφίας. Οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης C στα πρότυπα, φαίνονται σημειωμένα επάνω στο χαρτί

Κρέμα Δ

N.φωτογραφίας: 20231205_132529							
	Vit.C%	0	0,001	0,002	0,004	0,006	0,01
1	Ένταση χρώματος Red	151,57	150,96	148,19	140,67	141,88	130,78
2	Ένταση χρώματος Green	160,23	159,57	157,85	151,55	153,07	142,64
3	Ένταση χρώματος Blue	181,23	180,84	180,69	181,25	180,88	180,22
4	Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	164,38	163,84	162,32	157,81	158,69	151,16
5	Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114B	160,06	159,44	157,55	151,66	152,88	143,35

Πίνακας 24. Ένταση χρώματος και % συγκέντρωση βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Δ, μετά από την κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας

Με βάση αυτά τα δεδομένα, προκύπτει το παρακάτω γράφημα(15):



Γράφημα 15. Σχέση έντασης χρώματος και % συγκέντρωση βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Δ, μετά από κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος

Υπάρχουν μόνο 6 σημεία στη καμπύλη στο παραπάνω γράφημα(15), επειδή τα δύο μεγαλύτερης συγκέντρωσης, ήταν στη κορεσμένη περιοχή και για αυτόν τον λόγο απορρίφθηκαν. Η καμπύλη αυτή αποτελεί μια αρχική ένδειξη της γραμμικής σχέσης μεταξύ της έντασης του χρώματος και της συγκέντρωσης της βιταμίνης, μια προϋπόθεση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιταμίνης C με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία. Καθώς το πείραμα δεν επαναλήφθηκε, πρέπει να γίνουν περισσότερα πειράματα για την επιβεβαίωση της γραμμικής συσχέτισης.

3.3. Βέλτιστες συνθήκες

3.3.1. Βέλτιστος χρόνος

Κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων, διερευνήθηκε ο βέλτιστος χρόνος της λήψης της φωτογραφίας. Ως βέλτιστος χρόνος ανάλυσης, επιλέχθηκε, 20-30 λεπτά, μετά το τέλος επάλειψης και ισοπέδωσης της κρέμας πάνω στη σταγόνα FRAP. Σε αυτούς τους χρόνους, βρέθηκε η βέλτιστη τιμή γραμμικής συσχέτισης(R^2 πλησιέστερο στη μονάδα), μεταξύ της % συγκέντρωσης της βιταμίνης C και της έντασης του παραγόμενου χρώματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 25.

T(min) χρονικό διάστημα λήψης φωτογραφίας μετά	R^2	$Y=ax+b$	Εύρος γραμμικής περιοχής

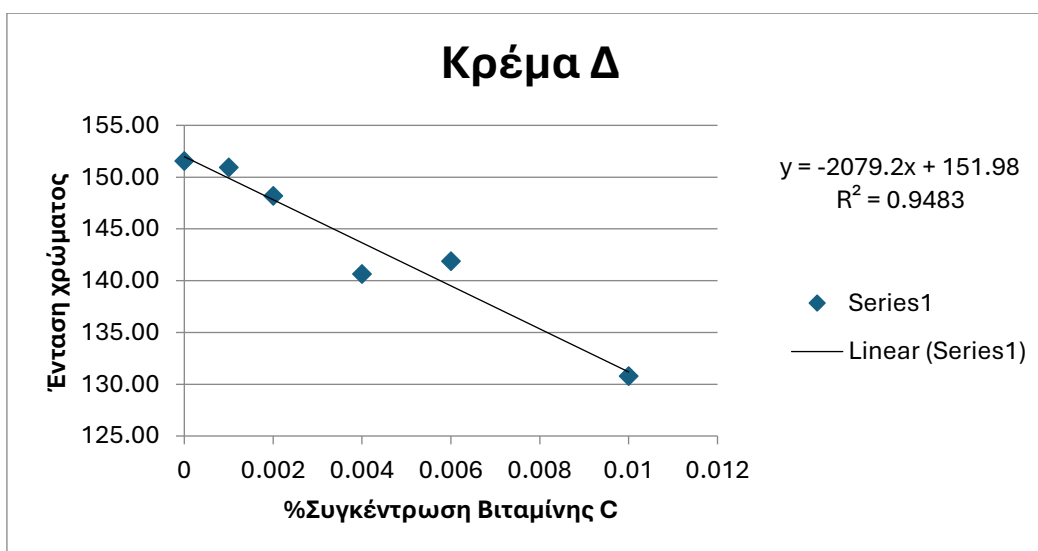
το πέρας της κατεργασίας του δείγματος			
5min	0,6664	$y = -1930,6x + 150,05$	0%-0,01%
10min	0,7835	$y = -2089,6x + 156,9$	0%-0,01%
30min	0,9483	$y = -2079,2x + 151,98$	0%-0,01%

Πίνακας 25. Συντελεστής συσχέτισης R^2 και εξίσωση της ευθείας για κάθε χρόνο λήψης φωτογραφίας στο δείγμα με βιταμίνη C στη κρέμα Δ

Στον παραπάνω πίνακα(25), βλέπουμε ότι λήφθηκαν φωτογραφίες μόνο για τρεις χρόνους, επομένως τα αποτελέσματα δεν είναι ασφαλή και χρειάζεται το πείραμα να επαναληφθεί και να ληφθούν φωτογραφίες σε περισσότερες χρονικές στιγμές. Ωστόσο, στα 30 λεπτά, φαίνεται ήδη καλή η γραμμικότητα.

3.3.2. Εύρος γραμμικής περιοχής

Το εύρος της γραμμικής περιοχής του ασκορβικού οξέως, είναι από 0% έως 0,01%, αρκετά χαμηλά επίπεδα ανίχνευσης, όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα(16).



Γράφημα 16. Σχέση έντασης χρώματος και %συγκέντρωσης βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Δ, μετά από κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος

3.3.3. Επιλογή βέλτιστου καναλιού χρώματος

Επιπλέον, παρατηρήθηκε το βέλτιστο χρωματικό κανάλι, που πρέπει να επιλεγεί κατά την ανάλυση της φωτογραφίας και τη δημιουργία του γραφήματος και της καμπύλης αναφοράς, ώστε να προκύπτει R^2 πιο κοντά στη μονάδα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα(26).

N.φωτογραφίας:	R²	Y=ax+b	Εύρος γραμμικής περιοχής
20240116_115933			
Ένταση χρώματος Red	0,9483	$y = -2079,2x + 151,98$	0%-0,01%
Ένταση χρώματος Green	0,9364	$y = -1731,9x + 160,79$	0%-0,01%
Ένταση χρώματος Blue	0,4708	$y = -70,743x + 181,12$	0%-0,01%
Μέση ένταση χρώματος (R+G+B)/3	0,9456	$y = -1302x + 164,69$	0%-0,01%
Σταθμισμένο άθροισμα(LUMA) 0.299R+0.587G+0.114 B	0,9432	$y = -1651,1x + 160,49$	0%-0,01%

Πίνακας 26. Συντελεστής R^2 και εξίσωση ευθείας για κάθε κανάλι ανάλυσης δείγματος βιταμίνης C στη κρέμα Δ

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Είναι σαφές, πως οι ανάγκες της εποχής μας, επιτάσσουν την ανάπτυξη γρήγορων, απλών, πράσινων και χαμηλού κόστους, τεχνικών ποιοτικού ελέγχου. Η χρωματομετρική τεχνική προσδιορισμού κοβαλτίου, που αναπτύσσεται σε αυτήν την εργασία, κατέχει τα παραπάνω χαρακτηριστικά, καθώς δεν απαιτεί τη χρήση οργανικών διαλυτών, μεγάλο χρόνο προετοιμασίας του δείγματος και ανάλυσής του και εξειδίκευση του χειριστή, ενώ χρησιμοποιεί μια απλή κάμερα κινητού τηλεφώνου.

Η μελέτη απέδειξε κατ' επανάληψη, τη γραμμική σχέση ανάμεσα στην ένταση του χρώματος, που προκύπτει από ανάλυση φωτογραφίας του δείγματος μετά από ειδική κατεργασία και στη συγκέντρωση του δισθενούς κοβαλτίου($R^2 : 0,9871$) και του δισθενούς σιδήρου($R^2 : 0,9397$). Αυτή η γραμμική συσχέτιση, αποδείχθηκε σε γαλακτώματα, διαφόρων pH και ιζώδους. Το εύρος γραμμικότητας όσον αφορά το κοβάλτιο, ξεκινά από συγκέντρωση 0μg Co(II)/g κρέμας και φτάνει μέχρι και τα 14,20μg Co(II)/g κρέμας, το

οποίο εκτείνεται εκατέρωθεν των αποδεκτών ορίων των επιπέδων κοβαλτίου(10-20μg/g κρέμας), σύμφωνα με το USFDA. (Ahmed, Asada, & Hamza, 2021)

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες παρεμποδίσεις στην συγκεκριμένη μέθοδο, οι οποίες περιορίζουν το εύρος των γαλακτωμάτων, που μπορούν να αναλυθούν με τη συγκεκριμένη τεχνική. Πιο αναλυτικά, ανταγωνιστές πρόσδεσης για το κοβάλτιο, αποτελούν το EDTA, το Zinc Bisglycinate και το Citric Acid, όταν βρίσκονται στο καλλυντικό. Δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη χρώματος στο γαλάκτωμα, καθώς δημιουργούν άχρωμο σύμπλοκο με το κοβάλτιο, αντί του συμπλόκου φερροζίνης-κοβαλτίου. Επίσης, παρεμπόδιση στο σήμα, που παίρνουμε από τη παρουσία κοβαλτίου, αποτελούν και ο δισθενής σίδηρος και ο μονοσθενής χαλκός, τα οποία δημιουργούν έγχρωμο σύμπλοκο με το μόριο της φερροζίνης.

Έγιναν, επίσης, πειράματα για την εξέταση της επιλεκτικής οξείδωσης του δισθενούς σιδήρου, είτε με τη προσθήκη οξειδωτικού μέσου(υποχλωριώδες νάτριο) είτε με τη παραμονή του δείγματος σε φούρνο στους 50°C. Από το πείραμα αυτό, υπάρχουν αρχικές ενδείξεις ότι η μέθοδος αυτή, περιορίζει σημαντικά τη παρεμβολή του δισθενούς σιδήρου στη συγκεκριμένη τεχνική.

Επιπλέον, η ανάλυση των δειγμάτων με τη τεχνική XRF, αποτελεί ισχυρή ένδειξη της γραμμικής σχέσης ανάμεσα στην ένταση χρώματος, που προκύπτει από την ανάλυση φωτογραφίας του δείγματος και στη περιεχόμενη συγκέντρωση κοβαλτίου. Επιβεβαιώθηκε με άλλα λόγια η γραμμική συσχέτιση, που κατέγραψε η προτεινόμενη μέθοδος.

Τέλος, παραλλάχθηκε η προτεινόμενη μεθοδολογία με βάση τη τεχνική FRAP και σε χαρτί χρωματογραφίας και προέκυψε γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην ένταση χρώματος και στη συγκέντρωση βιταμίνης C($R^2 :0,9483$). Το εύρος γραμμικότητας, εκτείνεται από 0% ασκορβικό οξύ έως 0,01%.

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθόδου, είναι αναγκαία για τη βιομηχανία στη σύγχρονη εποχή, καθώς έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών μεθόδων προσδιορισμού κοβαλτίου σε καλλυντικά. Όμως, πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες, ώστε να βρεθούν τρόποι περιορισμού των διάφορων παρεμβολών(πχ μέσω εκλεκτικής οξείδωση δισθενούς σιδήρου και μονοσθενούς χαλκού και μέσω ακύρωσης του ανταγωνισμού πρόσδεσης των EDTA, Zinc Bisglycinate και Citric Acid, υπό μεγάλη περίσσεια φερροζίνης)

5. Βιβλιογραφία

Agarwal, B. K. (1991). *X-Ray Spectroscopy* (2.). Heidelberg: Springer Berlin. doi:10.1007/978-3-540-38668-1

- Ahmed, A. Y., Asada, A., & Hamza, I. A. (2021). Cobalt and lead concentrations in cosmetic products sold at local markets in Saudi Arabia. *Toxicology Reports*, 8, 1693-1698. doi:10.1016/j.toxrep.2021.09.004
- Al-Dayel, O., Hefne, J., & Al-Ajyan, T. (2011). Human Exposure to Heavy Metals from Cosmetics. *Oriental Journal of Chemistry*, 27(1), 1-11. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., & Wiley, J. (1983). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, 60(1), 1-88. doi:10.1021/ed060pA25.1
- Beckhoff, B., Kanngießner, B., Langhoff, N., Wedell, R., & Wolff, H. (2006). *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis* (1.). Heidelberg: Springer Berlin. doi:10.1007/978-3-540-36722-2
- Bender, D. A., & Fontana, L. (2023). Vitamin C. *Encyclopedia of Human Nutrition* (4 εκδ., Τόμ. 1-4, σσ. 504-514). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-821848-8.00123-2
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 239(1), 70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Berns, R. S. (2019). *Billmeyer and Saltzman's Principles of Color Technology* (4 εκδ.). John Wiley & Sons Inc. doi:10.1002/9781119367314
- Bocca, B., Pino, A., Alimonti, A., & Forte, G. (2014, February). Toxic metals contained in cosmetics: A status report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(3), σσ. 447-467. doi:10.1016/j.yrtph.2014.02.003
- Borowska, S., & Brzóska, M. M. (2015). Metals in cosmetics: implications for human health. *Journal of Applied Toxicology*, 35(6), 551-567. doi:10.1002/jat.3129
- Boyer, I. J., Wilbur, J. J., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., . . . Heldreth, B. (2022). Safety Assessment of Ethers and Esters of Ascorbic Acid as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 41(2), 57-75. doi:10.1177/10915818221093545
- Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K., Placheril, J. J., & Sharma, P. (2013). Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28, 314-328. doi:10.1007/s12291-013-0375-3
- Dakin, J. P., & Brown, R. (2017). *Handbook of Optoelectronics* (2 εκδ., Τόμ. 1). doi:10.1201/9781315157009

- Darr, D. J., Combs, S. B., & Pinnell, S. R. (1993). Ascorbic Acid and Collagen Synthesis: Rethinking a Role for Lipid Peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307(2), 331-335. doi:10.1006/abbi.1993.1596
- Elmore, A. R. (2005). Final report of the safety assessment of L-Ascorbic Acid, Calcium Ascorbate, Magnesium Ascorbate, Magnesium Ascorbyl Phosphate, Sodium Ascorbate, and Sodium Ascorbyl Phosphate as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 24(2), 51-111. doi:10.1080/10915810590953851
- Fattah, A. A., & Pingitore Jr., N. E. (2009). *Low levels of toxic elements in Dead Sea black mud and mud-derived cosmetic products* (31). Environmental Geochemistry and Health. doi:10.1007/s10653-008-9201-x
- Filon, F. L., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Bovenzi, M., & Maina, G. (2009). In vitro absorption of metal powders through intact and damaged human skin. *Toxicology in Vitro*, 23(4), 574-579. doi:10.1016/j.tiv.2009.01.015
- Gandhi, M., Elfeky, O., Ertugrul, H., Chela, H. K., & Daglilar, E. (2023). Scurvy: Rediscovering a Forgotten Disease. *Diseases*, 11(2). doi:10.3390/diseases11020078
- Guideline, I. H. (2023). Validation of Analytical Procedures Q2(R2). ICH, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- Harris, D. C. (2015). *Quantitative Chemical Analysis* (9th εκδ., Τόμ. 407). doi:10.1007/s00216-015-9059-6
- Hoffman, E. d., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications* (3 εκδ.). Wiley. doi: 10.5860/choice.45-4389
- Jalal, U. M., Kim, S. C., & Shim, J. S. (2017). Histogram analysis for smartphone-based rapid hematocrit determination. *Biomed Opt Express*, 8(7), 3317-3328. doi:10.1364/BOE.8.003317
- Jerkins, R. (1999). X-ray Fluorescence Spectrometry. doi:10.1016/S0039-9140(00)00350-7
- Kissinger, P. K., Heinemann, W. R., & Dekker, M. (1996). Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry. doi:10.1016/S0165-9936(96)80740-0
- Kundra, S. K., Katyal, M., & Rathore, P. S. (1974). Spectrophotometric determination of copper(I) and cobalt(II) with ferrozine. *Analytical Chemistry*, 46(11), σσ. 1605-1606. doi:10.1021/ac60347a022
- Levavasseur, M., Becquart, C., Pape, E., Pigeyre, M., Rousseaux, J., Staumont-Sallé, D., & Delaporte, E. (2015). Severe scurvy: An underestimated disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 69, 1076-1077. doi:10.1038/ejcn.2015.99

- Maloigne, C. F., Inacio, F. R., & Macaire, L. (2012). Color Appearance Models. *Wiley*, 65-92. doi:10.1002/9781118562680.ch3
- Mazarakis, A. P., & Tsotsou, G. E. (2024). Smartphone-Based Colourimetric Detection of Methyl Red, Co(II), Uric Acid, and Topotecan after Pre-concentration onto a Hectorite Clay-Hydroxyethylcellulose Hybrid. *Current Analytical Chemistry*, 20(6), 429-437. doi:10.2174/0115734110290080240314043658
- McDonald, R. (1980). Color Physics for Industry. Society of Dyers and Colourists. doi:10.1002/col.5080130412
- Meng, Z., Tayyab, M., Lin, Z., Raji, H., & Javanmard, M. (2022). A Smartphone-Based Disposable Hemoglobin Sensor Based on Colorimetric Analysis. *Sensors (Basel)*, 23(1), 394. doi:10.3390/s23010394
- Milovanovic, B., Tomovic, V., Djekic, I., Miocinovic, J., Solowiej, B. G., Lorenzo, J. M., Tomasevic, I. (2021). Colour assessment of milk and milk products using computer vision system and colorimeter. *International Dairy Journal*, 120. doi:10.1016/j.idairyj.2021.105084
- Mohammed, T. (n.d.). Chapter 19 - Atomic absorption spectrophotometry. *Non-Destructive Material Characterization Methods* (549-586). doi:10.1016/B978-0-323-91150-4.00007-0
- Olerinyova, A., Sonn-Segev, A., Gault, J., Eichmann, C., Schimpf, J., Kopf, A. H., Kukura, P. (2020). Mass Photometry of Membrane Proteins. *Chem-Cell Press*, 7(1), 224-236. doi:10.1016/j.chempr.2020.11.011
- Piquero-Casals, J., Morgado-Carrasco, D., Granger, C., Trullàs, C., Jesús-Silva, A., & Krutmann, J. (2021). Urea in Dermatology: A Review of its Emollient, Moisturizing, Keratolytic, Skin Barrier Enhancing and Antimicrobial Properties. *Dermatology and Therapy*, 11, 1905-1915. doi:10.1007/s13555-021-00611-y
- Pullar, J. M., Carr, A. C., & Vissers, M. C. (2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Licensee MDPI*, 9(8), 866. doi:10.3390/nu9080866
- Qian, H., Shan, Y., Gong, R., Lin, D., Zhang, M., Wang, C., & Wang, L. (2023). Mechanism of action and therapeutic effects of oxidative stress and stem cell-based materials in skin aging: Current evidence and future perspectives. *Frontiers-Bioengineering and Biotechnology*, 10(2022), 1-11. doi:10.3389/fbioe.2022.1082403
- Ravetti, S., Clemente, C., Brignone, S., Hergert, L., Allemandi, D., & Palma, S. (2019). Ascorbic Acid in Skin Health. *Cosmetics*, 6(58), 1-8. doi:10.3390/cosmetics6040058
- Stookey, L. L. (1970). Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, 42(7), 779-781. doi:10.1021/ac60289a016

- Thipwimonmas, Y., Thiangchanya, A., Phonchai, A., Thainchaiwattana, S., Jomsati, W., Jomsati, S., Limbut, W. (2021). The Development of Digital Image Colorimetric Quantitative Analysis of Multi-Explosives Using Polymer Gel Sensors. *Chemical Sensors in Analytical Chemistry*, 21(23). doi:10.3390/s21238041
- Todd, P. J. (2017). Mass Spectrometry: A Textbook. *Springer*, 58(6), 59-60. doi:10.1063/1.1996478
- Tooms, M. S. (2015). *Colour Reproduction in Electronic Imaging Systems: Photography, Television, Cinematography*. doi:10.1002/9781119021780
- Tsotsou, G. E. (2024). Extraction-free analysis in cosmetics by digital image colorimetry, illustrated by the quantification of urea. *Heliyon*, 10(2024). doi:10.1016/j.heliyon.2024.e25503
- Tsotsou, G. E., & Paraskevopoulou, P. E. (2024). An extraction-free, smartphone-based approach for measuring the antioxidant capacity of emulsions using a paper-based DPPH assay. *Microchemical Journal*, 207. doi.org/10.1016/j.microc.2024.111792
- Tsotsou, G. E., & Tsara, A. K. (2023). Extraction-Free, In Situ Analysis of Glucose in Cosmetic Formulations Based on Digital Image Colorimetry by Smartphone. *Journal of Cosmetic Science*, 74(5), 289-300. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e25503

Παράρτημα

Κατάλογος γραφημάτων

Γράφημα 1. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης σιδήρου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος.....	19
Γράφημα 2. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης σιδήρου στη κρέμα Γ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος.....	20
Γράφημα 3. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης σιδήρου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος.....	21
Γράφημα 4. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος.....	22
Γράφημα 5. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος.....	23

Γράφημα 6. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος.....	24
Γράφημα 7. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Ε μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος.....	25
Γράφημα 8. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης σιδήρου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος.....	29
Γράφημα 9. Σχέση έντασης χρώματος και συγκέντρωσης κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πράσινο κανάλι χρώματος.....	29
Γράφημα 10. Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών οξείδωσης στην ένταση του χρώματος γαλακτωμάτων επιμολυσμένων με σίδηρο ή κοβάλτιο, μετά από κατεργασία τους με φερροζίνη. Η ένταση του χρώματος εκφράζεται ως ποσοστό της έντασης του χρώματος στο δείγμα, που παρέμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το βέλτιστο κανάλι χρώματος για τον προσδιορισμό κάθε μετάλλου αντίστοιχα. Τα γράμματα Α, αντιστοιχεί στο δείγμα, που περιέχει κοβάλτιο και 0,001% NaClO, το Β, στο δείγμα που περιέχει κοβάλτιο και 0,1% NaClO, το Γ, στο δείγμα που περιέχει κοβάλτιο και παρέμεινε στον φούρνο, το Δ, στο δείγμα που περιέχει κοβάλτιο και δεν υπέστη οξείδωση, το Ε, στο δείγμα που περιέχει σίδηρο και 0,001% NaClO, το Ζ, στο δείγμα που περιέχει σίδηρο και 0,1% NaClO, το Η, στο δείγμα που περιέχει σίδηρο και παρέμεινε στον φούρνο, το Θ, στο δείγμα που περιέχει σίδηρο και δεν υπέστη οξείδωση και το Ι αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα, που δεν περιείχε κανένα μέταλλο και 0%NaClO	37
Γράφημα 11. Καμπύλη αναφοράς κατά την ποσοτικοποίηση του περιεχόμενου κοβαλτίου σε πρότυπα δείγματα στη κρέμα Α με τη τεχνική XRF	39
Γράφημα 12. Καμπύλη αναφοράς κατά την ποσοτικοποίηση του περιεχόμενου σιδήρου σε πρότυπα δείγματα στη κρέμα Γ με τη τεχνική XRF.....	40
Γράφημα 13. Συσχέτιση των δύο μεθόδων. Φαίνονται οι ποσότητες, που προσδιορίστηκαν με την χρωματομετρική μέθοδο στον άξονα ψ και οι ποσότητες, που προσδιορίστηκαν με την τεχνική XRF στον άξονα χ. Διαπιστώνεται γραμμική σχέση, μεταξύ των συγκεντρώσεων που προσδιορίζει η κάθε τεχνική, άρα διαπιστώνεται η εγκυρότητα της χρωματομετρικής μεθόδου ...	41
Γράφημα 14. Σχέση έντασης χρώματος και % συγκέντρωση βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Ζ μετά από κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος	44
Γράφημα 15. Σχέση έντασης χρώματος και % συγκέντρωση βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Δ, μετά από κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος	46
Γράφημα 16. Σχέση έντασης χρώματος και %συγκέντρωσης βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Δ, μετά από κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κόκκινο κανάλι χρώματος	47

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Συστατικά γαλακτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής.....	15
Πίνακας 2. pH και ιξώδες στους 20°C για κάθε γαλάκτωμα που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής.....	15
Πίνακας 3. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση σιδήρου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία.....	18
Πίνακας 4. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση σιδήρου στη κρέμα Γ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία.....	19
Πίνακας 5. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση σιδήρου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία.....	20
Πίνακας 6. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση κοβαλτίου στη κρέμα Α μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία.....	21
Πίνακας 7. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία.....	22
Πίνακας 8. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση κοβαλτίου στη κρέμα Δ μετά από κατεργασία με τη προτεινόμενη μεθοδολογία.....	23
Πίνακας 9. Ένταση χρώματος και συγκέντρωση κοβαλτίου στη κρέμα Ε μετά από κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία.....	25
Πίνακας 10. Τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης, του κοβαλτίου και του σιδήρου, όπως υπολογίστηκαν με βάση το standard error και τη κλίση της ευθείας, που προκύπτει από το αντίστοιχο γράφημα, με βάση τους τύπους, που ορίζει η βιβλιογραφία.....	26
Πίνακας 11. Συντελεστής συσχέτισης R^2 και εξίσωση ευθείας για κάθε χρόνο λήψης φωτογραφίας στο δείγμα με σίδηρο στη κρέμα Α.....	27
Πίνακας 12. Συντελεστής συσχέτισης R^2 και εξίσωση ευθείας για κάθε χρόνο λήψης φωτογραφίας στο δείγμα με κοβάλτιο στη κρέμα Δ.....	28
Πίνακας 13. Συντελεστής συσχέτισης R^2 και εξίσωση της ευθείας για κάθε κανάλι ανάλυσης δείγματος σιδήρου στη κρέμα Α.....	30
Πίνακας 14. Συντελεστής συσχέτισης R^2 και εξίσωση της ευθείας για κάθε κανάλι ανάλυσης δείγματος κοβαλτίου στη κρέμα Δ.....	31
Πίνακας 15. Αποτελέσματα ανίχνευσης παρεμβάλλοντων συστατικών καλλυντικών στην προτεινόμενη μεθοδολογία, λόγω αντικατάστασης της φερροζίνης στη δημιουργία συμπλόκων με το κοβάλτιο ή τον σίδηρο. Παρουσιάζονται οι ενώσεις των οποίων διερευνήθηκε η συναρμογή με το εκάστοτε μέταλλο, η συγκέντρωση του stock αυτών, η τελική συγκέντρωση των ενώσεων αυτών στα δείγματα γαλακτώματος και το αποτέλεσμα ανάπτυξης χρώματος.....	32
Πίνακας 16. Αποτελέσματα ανίχνευσης παρεμβάλλοντων μετάλλων στην προτεινόμενη μεθοδολογία. Παρουσιάζονται τα μέταλλα, των οποίων διερευνήθηκε η συναρμογή με φερροζίνη, η συγκέντρωση του Stock% αυτών, η τελική συγκέντρωση των μετάλλων στα δείγματα γαλακτώματος και το αποτέλεσμα ανάπτυξης χρώματος.....	34

Πίνακας 17. Ένταση χρώματος, μετά από κατεργασία των δειγμάτων με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Η κατεργασία έγινε στο τέλος της επώασης υπό διαφορετικές συνθήκες οξείδωσης του σιδήρου στη κρέμα Δ.	36
Πίνακας 18. Ένταση χρώματος σε διαφορετικές συνθήκες οξείδωσης κοβαλτίου στη κρέμα Δ.....	36
Πίνακας 19. Δεδομένα ανάλυσης προτύπων διαφορετικών συγκεντρώσεων κοβαλτίου στη κρέμα Α σε XRF mean count rate per surface density	39
Πίνακας 20. Δεδομένα ανάλυσης προτύπων διαφορετικών συγκεντρώσεων σιδήρου στη κρέμα Γ σε XRF mean count rate per surface density	40
Πίνακας 21. Συστατικά γαλακτωμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής ...	42
Πίνακας 22. pH και ιξώδες στους 20°C για κάθε γαλάκτωμα που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής.....	43
Πίνακας 23. Ένταση χρώματος και % συγκέντρωση βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Z, μετά από κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας.....	44
Πίνακας 24. Ένταση χρώματος και % συγκέντρωση βιταμίνης C σε πρότυπα στη κρέμα Δ, μετά από την κατεργασία με την τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε σε χαρτί χρωματογραφίας.....	45
Πίνακας 25. Συντελεστής συσχέτισης R^2 και εξίσωση της ευθείας για κάθε χρόνο λήψης φωτογραφίας στο δείγμα με βιταμίνη C στη κρέμα Δ.....	47
Πίνακας 26. Συντελεστής R^2 και εξίσωση ευθείας για κάθε κανάλι ανάλυσης δείγματος βιταμίνης C στη κρέμα Δ	48

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Αρχή τεχνικής FRAP	12
Εικόνα 2. Αρχή συναρμογής μετάλλου με φερροζίνη.....	12
Εικόνα 3. Φωτογραφία προτύπων σιδήρου στη κρέμα Α, μετά την κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Οι συγκεντρώσεις φαίνονται με τη σειρά από την μεγαλύτερη έως την μικρότερη, σύμφωνα με τον πίνακα 3, ξεκινώντας από αριστερά προς τα δεξιά.....	19
Εικόνα 4. Φωτογραφία προτύπων κοβαλτίου στη κρέμα Δ, μετά την κατεργασία με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Οι συγκεντρώσεις φαίνονται με την σειρά, από την μεγαλύτερη έως την μικρότερη, σύμφωνα με τον πίνακα 8, ξεκινώντας από αριστερά προς τα δεξιά.....	24
Εικόνα 5. Φωτογραφία προτύπων βιταμίνης C σε κρέμα Z μετά την κατεργασία τους με τη τεχνική FRAP, όπως αυτή προσαρμόστηκε στο χαρτί χρωματογραφίας. Οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης C στα πρότυπα, φαίνονται σημειωμένα επάνω στο χαρτί	45