



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ,
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ
ΤΕΧΝΙΚΩΝ - ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΥΣΤΑΣΗ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΤΑΛΑΝΤΗ ΧΡΙΣΤΟΥ

2021



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ,
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ
ΤΕΧΝΙΚΩΝ - ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΥΣΤΑΣΗ**

ΑΤΑΛΑΝΤΗ ΧΡΙΣΤΟΥ

**Διατριβή η οποία υποβλήθηκε προς απόκτηση διδακτορικού
τίτλου σπουδών στο Πανεπιστήμιο Κύπρου**

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2021

ΑΤΑΛΑΝΤΗ ΧΡΙΣΤΟΥ

ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ

Υποψήφιος Διδάκτορας: Αταλάντη Χρίστου

Τίτλος Διατριβής: Ανάλυση πολυφαινολών σε δείγματα χαρουπιού με χρήση φασματοφωτομετρικών, ηλεκτροφορητικών και χρωματογραφικών τεχνικών – Επίδραση παραγόντων στη φαινολική τους σύσταση.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για απόκτηση Διδακτορικού διπλώματος στο Τμήμα Χημείας και εγκρίθηκε στις 20/12/2021 από τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.

Εξεταστική Επιτροπή:

Ερευνητικός Σύμβουλος:

Δρ. Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Πρόεδρος Εξεταστικής Επιτροπής:

Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής:

Δρ. Χάρης Ρ. Θεοχάρης, Καθηγητής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής:

Δρ. Δημήτρης Μάκρης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής:

Δρ. Απόστολος Σπύρος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Χημείας (Τομέας Αναλυτικής & Περιβαλλοντικής), Πανεπιστήμιο Κρήτης

Υπεύθυνη δήλωση

Η παρούσα διατριβή υποβάλλεται προς συμπλήρωση των απαιτήσεων για απονομή Διδακτορικού Τίτλου του Πανεπιστημίου Κύπρου. Είναι προϊόν πρωτότυπης εργασίας αποκλειστικά δικής μου, εκτός των περιπτώσεων που ρητώς αναφέρονται μέσω βιβλιογραφικών αναφορών, σημειώσεων ή και άλλων δηλώσεων.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου και πειράματα πραγματοποιήθηκαν επίσης στο σύστημα HPLC-HRMS που βρίσκεται στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου της Χαέν, υπό την επίβλεψη της Δρ. Κωνσταντίνας Καπνίση-Χριστοδούλου (Σεπτέμβριος 2016 - Δεκέμβριος 2021).

Αταλάντη Χρίστου

.....

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που στάθηκαν στο πλάι μου και μου συμπαραστάθηκαν, ο καθένας με το δικό του και μοναδικό τρόπο, σε όλο αυτό το ταξίδι για την πραγματοποίηση ενός σημαντικού και συνάμα δύσκολου προσωπικού μου στόχου, αυτού των διδακτορικών μου σπουδών. Η παρουσία, υποστήριξη, επιμονή και υπομονή των ανθρώπων αυτών αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για την επίτευξη του προσωπικού μου αυτού στόχου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική μου σύμβουλο Δρ. Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για την ευκαιρία που μου παρείχε να πραγματοποιήσω τις διδακτορικές μου σπουδές ως μέρος της ερευνητικής της ομάδας, στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης. Την ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδες συμβουλές, καθώς και την αδιάκοπη ενθάρρυνση και συμπαράσταση που μου προσέφερε όλο αυτό διάστημα.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εσωτερικής εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή Δρ. Χάρη Ρ. Θεοχάρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη, για την πολύτιμη τους συμμετοχή στις επιτροπές αξιολόγησης της ερευνητικής μου διατριβής, καθώς, επίσης, και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Απόστολο Σπύρο του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Δημήτριο Μακρή του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν ως εξωτερικά μέλη της εξεταστικής επιτροπής και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους σχετικά με την επιμέλεια του τελικού κειμένου της διατριβής.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Δρ. Juan F. Garcia-Reyes του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου της Χαέν και τη μεταδιδακτορική του φοιτήτρια Δρ. Ana Belén Martínez Piernas για την άψογη συνεργασία, την πολύτιμη βοήθεια και τη σημαντική συνεισφορά τους στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής εργασίας. Αν και από απόσταση, η βοήθεια τους ήταν καθοριστική.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κύπρου καθώς και το Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας για τη χρηματοδότηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο μεταδιδακτορικό ερευνητή του Εργαστηρίου Ενόργανης Ανάλυσης, Δρ. Ιωάννη Σταύρου, και στους συμφοιτητές μου Ηλιάνα Αγαθοκλέους, Αθηνά Νικολάου, Κατερίνα Ιωάννου, Γεωργία Ιωάννου και Μάριο Χριστοδούλου. Τους ευχαριστώ πολύ για την άψογη συνεργασία, τις πολύτιμες συμβουλές, τις ευχάριστες στιγμές και για την αμέριστη στήριξη.

Δε θα μπορούσα βεβαίως να παραβλέψω την οικογένειά μου, τη μητέρα μου Αγγέλα και τις αδερφές μου Χρυσίδα, Θέτιδα και Θίσιβη. Τις ευχαριστώ για την ψυχική υποστήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση. Η πίστη τους στις δυνατότητές μου ήταν αυτή που με ώθησε να προχωρήσω και να θέτω όλο και υψηλότερους στόχους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου Αιμιλία, Βαλάντω, Ειρήνη, Έλενα και Ελένη για την υπομονή και πολύπλευρη συμπαράσταση που επέδειξαν στα άγχη και τις ανησυχίες μου όλο αυτό το διάστημα. Να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη φίλη μου Αιμιλία για τις πολύτιμες επιστημονικές της συμβουλές.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η πολυφαινολική σύσταση των χαρουπιών έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των πολυάριθμων βιολογικών και ευεργετικών τους ιδιοτήτων. Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη μιας βέλτιστης και κατάλληλης μεθόδου για την ανάκτηση, τον καθαρισμό και την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα χαρούπια και στα παράγωγα προϊόντα τους.

Σε πρώτο στάδιο, υπό τις συνθήκες αυτές, έλαβε χώρα η βελτιστοποίηση μιας μη συμβατικής μεθόδου εκχύλισης και πιο συγκεκριμένα, της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους (ultrasound-assisted extraction, UAE). Μέσω της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης (response surface methodology, RSM) κατέστη δυνατή η μελέτη της επίδρασης του λόγου στερεού-διαλύτη, της συγκέντρωσης του διαλύτη, του χρόνου εκχύλισης, του πλάτους των υπερήχων και του τρόπου λειτουργίας των υπερήχων στην ικανότητα εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων, με ταυτόχρονο προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων (total phenolic content, TPC). Σε σχέση με τις κλασσικές διεργασίες εκχύλισης, η προτεινόμενη βέλτιστη μέθοδος εξαγωγής προσέφερε υψηλότερες αποδόσεις σε σημαντικά μειωμένους χρόνους επεξεργασίας.

Ακολούθως, αναπτύχθηκε μια απλή, γρήγορη και αξιόπιστη ηλεκτροφορητική μέθοδος ανάλυσης, με χρήση του συστήματος της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς (capillary electrophoresis, CE) σε σύζευξη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (diode array detection, DAD), για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των 12 πιο συχνά απαντώμενων στη σάρκα και στους σπόρους των χαρουπιών πολυφαινολικών ενώσεων. Έχοντας ως στόχο τον πλήρη διαχωρισμό των υπό μελέτη αναλυτών, παράγοντες όπως ο τύπος και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, η παρουσία προσθέτων και η εφαρμοζόμενη τάση, μελετήθηκαν λεπτομερώς. Η χρήση της β-κυκλοδεξτρίνης (β-cyclodextrin, β-CD) και του ιοντικού υγρού (ionic liquid, IL), ως πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα, μελετήθηκε για πρώτη φορά και επέτρεψε τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των υπό μελέτη βιοδραστικών ουσιών. Παράλληλα, με σκοπό την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων συστατικών των εκχυλισμάτων, πριν την ηλεκτροφορητική τους ανάλυση, έλαβε χώρα αξιολόγηση της εκχύλισης στερεάς-φάσης (solid-phase extraction, SPE), ως στρατηγικής καθαρισμού των εκχυλισμάτων. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των βέλτιστα ληφθέντων εκχυλισμάτων, που ακολούθησε, επέτρεψε τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των κύριων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων της σάρκας των ώριμων και άγουρων καρπών. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την παρουσία του γαλλικού οξέος ως κύριου συστατικού, τόσο

των ώριμων, όσο και των άγουρων καρπών, και υπογράμμισαν τη μεγάλη επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύνθεση.

Στη συνέχεια, προτάθηκε η χρήση του συστήματος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (high-performance liquid chromatography, HPLC) σε σύζευξη με τη φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (high-resolution mass spectrometry, HRMS), ως μια πιο ευαίσθητη και εκλεκτική τεχνική, για την ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου των χαρουπιών και των παράγωγων προϊόντων τους. Συγκεκριμένα, κατά το τρίτο στάδιο της παρούσας μελέτης, αξιολογήθηκε η επίδραση του βαθμού ωρίμανσης, της μεθόδου κατεργασίας και της γεωγραφικής προέλευσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύσταση μέσω μιας πλήρους στατιστικής ανάλυσης. Παράλληλα, μέσω της αξιολόγησης του φαινολικού περιεχομένου της σάρκας και των σπόρων των χαρουπιών, προσδιορίστηκε η κατανομή των εν λόγω ενώσεων κατά μήκος των καρπών. Όσον αφορά την αξιολόγηση της επίδρασης της γεωγραφικής προέλευσης των χαρουπιών στην πολυφαινολική τους σύσταση, χρησιμοποιήθηκε μια πολυμεταβλητή στατιστική προσέγγιση με σκοπό τη μελέτη της σχέσης μεταξύ του φαινολικού περιεχομένου των χαρουπιών και της γεωγραφικής τους προέλευσης.

Abstract

Polyphenols in carobs have recently attracted great attention due to their wide range of biological and health-promoting effects. A comprehensive study was conducted to find an optimum method for the extraction, purification, and characterization of these valuable bioactive substances in carobs and their derived products.

Under this framework, the ultrasound-assisted extraction (UAE) of polyphenols was optimized by the maximization of the yield in total phenolics using response surface methodology (RSM). In particular, the effects of solid-solvent ratio, solvent concentration, extraction time, sonication amplitude, and sonication mode were investigated and optimized using a complete experimental design. In comparison to conventional extraction techniques, UAE offered a higher yield of antioxidants and a shorter processing time.

Then, a simple, reliable, and fast capillary electrophoretic method (capillary electrophoresis-diode array detector, CE-DAD) was developed and validated for the simultaneous determination of 12 polyphenolic compounds, the most frequently found in carob's pulp and seeds. Several parameters, which affect the separation, were investigated in order to determine the optimum separation conditions. These include background electrolyte (BGE) concentration and pH, addition of organic solvents and other modifiers, and applied voltage. The present work deals with the development of a novel dual electrophoretic system based on the combined use of β -cyclodextrin (β -CD) and ionic liquid (IL) as buffer additives. Solid-phase extraction (SPE) was evaluated as a clean-up strategy prior to the electrophoretic analysis of extracts. The application of the developed electrophoretic method to real samples enabled the identification and quantification of the main phenolic constituents of both ripe and unripe carob pulp extracts. The results revealed the predominance of gallic acid in both ripe and unripe carob pulp and highlighted the great influence of the ripening stage on carobs polyphenolic composition.

The phenolic profiles of carobs and carob-based products were, then, analyzed by the use of high-performance liquid chromatography – high-resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS), which is a more sensitive and selective technique. In particular, the effects of the ripening stage, processing method, and geographical origin on carobs phenolic composition were investigated through the analysis of carobs and derived products by the use of HPLC-HRMS, combined with a complete statistical analysis. In addition, through the characterization of the phenolic pattern of different carob parts, the distribution of secondary metabolites across the fruit was also established. As far as the evaluation of the effect of

geographical origin to the polyphenolic content is concerned, a multivariate statistical approach was employed to study the relationship between the phenolic composition of carobs and their growing regions.

ΑΤΑΝΑΝΤΗ ΧΡΙΣΤΟΥ

Περιεχόμενα

Υπεύθυνη δήλωση.....	i
Ευχαριστίες	ii
Περίληψη	iv
Abstract	vi
Κατάλογος Σχημάτων	xii
Κατάλογος Πινάκων	xiv
Κατάλογος Συντμήσεων	xv
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Χαρουπιά	1
1.2. Καρπός χαρουπιάς	2
1.2.1. Βασικά χαρακτηριστικά.....	2
1.2.2. Παράγωγα προϊόντα και χρήσεις	3
1.2.3. Χημική σύσταση	5
1.3. Πολυφαινόλες	6
1.3.1. Γενικά.....	6
1.3.2. Δομή και κατηγορίες.....	6
1.3.3. Βιολογική δράση.....	10
1.4. Φαινολική σύσταση χαρουπιών	11
1.4.1. Εκχύλιση	12
1.4.1.1. Προκατεργασία δείγματος	13
1.4.1.2. Μέθοδος εκχύλισης.....	14
1.4.1.2.1. Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.....	14
1.4.1.2.2. Εναλλακτικές τεχνικές εκχύλισης.....	15
1.4.1.2.3. Βελτιστοποίηση μεθόδου εκχύλισης.....	20
1.4.1.3. Καθαρισμός εκχυλισμάτων	25
1.4.2. Ανάλυση.....	26
1.4.2.1. Φασματοφωτομετρικές τεχνικές	26
1.4.2.2. Χρωματογραφικές τεχνικές.....	27
1.4.2.3. Ηλεκτροφορητικές τεχνικές	30
1.4.2.3.1. Κυκλοδεξτρίνες (CDs).....	31
1.4.2.3.2. Ιοντικά υγρά (IL).....	32
1.4.3. Γεωγραφική προέλευση	34
1.4.3.1. Χημειομετρικά εργαλεία	35
1.4.3.2. Μέθοδοι ταξινόμησης	35
1.4.3.2.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA).....	36
1.4.3.2.2. Διαχωριστική ανάλυση μέσω παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).....	36

1.4.4. Βαθμός ωρίμανσης.....	37
1.4.5. Μέθοδος κατεργασίας.....	38
1.4.6. Ποικιλία και φύλο χαρουπιάς.....	39
1.5. Πρωτοτυπία μελέτης.....	39
2. Μεθοδολογία.....	41
2.1. Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	41
2.2. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (CE).....	43
2.2.1. Οργανολογία.....	44
2.2.2. Ανίχνευση.....	45
2.2.3. Βασικές αρχές CE.....	45
2.2.4. Τεχνικές CE.....	50
2.2.4.1. Ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (CZE).....	51
2.2.4.2. Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (EKC).....	51
2.3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	53
2.3.1. Τύποι υγροχρωματογραφίας.....	54
2.3.2. Οργανολογία.....	55
2.3.3. Ανίχνευση.....	56
2.3.3.1. Φασματομετρία μαζών (MS).....	57
3. Πειραματικό μέρος.....	62
3.1. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων.....	62
3.1.1. Αντιδραστήρια.....	62
3.1.2. Προετοιμασία εκχυλισμάτων.....	62
3.1.2.1. Δείγματα χαρουπιού.....	62
3.1.2.2. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE).....	63
3.1.2.3. Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.....	65
3.1.2.3.1. Εκχύλιση υπό ανάδευση.....	65
3.1.2.3.2. Εκχύλιση Soxhlet.....	65
3.1.3. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC).....	66
3.1.4. Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	67
3.2. Προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD.....	68
3.2.1. Αντιδραστήρια.....	68
3.2.2. Σύνθεση IL.....	69
3.2.3. Προετοιμασία εκχυλισμάτων.....	70
3.2.3.1. Δείγματα χαρουπιού.....	70
3.2.3.2. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE).....	70
3.2.3.3. Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).....	71
3.2.3.3.1. Επιλογή κατάλληλου προσροφητικού υλικού.....	71
3.2.3.3.2. Καθαρισμός εκχυλισμάτων.....	72
3.2.4. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (CE).....	73

3.2.5. Ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων	74
3.2.5.1. Ανάπτυξη μεθόδου.....	74
3.2.5.2. Επικύρωση μεθόδου.....	77
3.3. Προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής HPLC-HRMS	78
3.3.1. Αντιδραστήρια	78
3.3.2. Προετοιμασία εκχυλισμάτων	79
3.3.2.1. Δείγματα χαρουπιού.....	79
3.3.2.2. Προϊόντα χαρουπιού	81
3.3.2.3. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE).....	82
3.3.2.4. Καθαρισμός εκχυλισμάτων	82
3.3.3. HPLC-HRMS.....	83
3.3.4. Αξιολόγηση χρωματογραφικής μεθόδου	85
3.3.5. Στατιστική ανάλυση.....	86
4. Αποτελέσματα.....	87
4.1. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων	87
4.1.1. Βελτιστοποίηση UAE	88
4.1.1.1. Δοκιμή ελέγχου κρίσιμων παραγόντων	88
4.1.1.1.1. Γραφική ανάλυση αποτελεσμάτων	90
4.1.1.1.2. Μελέτη επίδρασης κύριων παραγόντων	92
4.1.1.1.3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων συνεχούς και παλμικής εκχύλισης	93
4.1.1.2. Βελτιστοποίηση παραμέτρων εξαγωγής - RSM	96
4.1.1.2.1. Ανάλυση παλινδρόμησης και ανάλυση διακύμανσης αποτελεσμάτων	97
4.1.1.2.3. Ανάλυση επιφανειών απόκρισης και ισομετρικών διαγραμμάτων	99
4.1.1.2.4. Προσδιορισμός βέλτιστων επιπέδων και επικύρωση μαθηματικών μοντέλων	100
4.1.2. Σύγκριση εναλλακτικών και κλασσικών τεχνικών εκχύλισης.....	101
4.1.3. Σύγκριση φαινολικού περιεχομένου σάρκας άγουρων και ώριμων καρπών	103
4.1.3.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων TPC και υπάρχουσας βιβλιογραφίας.....	104
4.1.4. Συμπεράσματα	105
4.2. Προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD.....	106
4.2.1. Ανάπτυξη μεθόδου CE.....	107
4.2.1.1. Επίδραση τύπου και συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος.....	107
4.2.1.2. Χρήση προσθέτων στο ρυθμιστικό διάλυμα.....	110
4.2.1.2.1. Επίδραση οργανικών τροποποιητών	110
4.2.1.2.2. Επίδραση SDS.....	111
4.2.1.2.3. Επίδραση β-CD	111
4.2.1.2.4. Επίδραση IL	114
4.2.1.3. Επίδραση εφαρμοζόμενης τάσης	117
4.2.1.4. Βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού	118

4.2.2. Αξιολόγηση μεθόδου	118
4.2.2.1. Γραμμικότητα, LODs και LOQs	118
4.2.2.2. Πιστότητα.....	119
4.2.3. Καθαρισμός εκχυλισμάτων-Εκχύλιση στερεάς φάσης	121
4.2.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση δειγμάτων σάρκας χαρουπιού	123
4.2.4.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων και υπάρχουσας βιβλιογραφίας	125
4.2.5. Συμπεράσματα	128
4.3. Προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής HPLC-HRMS	130
4.3.1. Ανάπτυξη και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου.....	131
4.3.2. Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων-Παράγοντες που επηρεάζουν τη φαινολική σύνθεση των χαρουπιών	136
4.3.2.1. Επίδραση της διαδικασίας ωρίμανσης και κατανομή των πολυφαινολών στον καρπό.....	136
4.3.2.2. Επίδραση μεθόδου κατεργασίας	140
4.3.2.3. Επίδραση γεωγραφικής προέλευσης.....	144
4.3.3. Συμπεράσματα	152
5. Γενικά συμπεράσματα.....	154
6. Μελλοντική εργασία	156
7. Βιβλιογραφία.....	157

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1. Το δέντρο της χαρουπιάς	1
Σχήμα 1.2. Χάρτης καλλιεργειών χαρουπιάς	1
Σχήμα 1.3. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή χαρουπιών, σύμφωνα με τον FAO για τα έτη 1994-2019.	2
Σχήμα 1.4. Ωριμοί και άγουροι καρποί.	3
Σχήμα 1.5. (A) Τα μέρη του χαρουπιού και (B) τα μέρη του σπόρου.	3
Σχήμα 1.6. Χημική σύσταση χαρουπιών και παράγωγα προϊόντα.	5
Σχήμα 1.7. Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την απομόνωση των φαινολικών συστατικών.	12
Σχήμα 1.8. Βασική αρχή λειτουργίας των συμβατικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται κατά την εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων στα δείγματα χαρουπιού.	15
Σχήμα 1.9. Οι σύγχρονες τεχνικές εξαγωγής και οι βασικές αρχές λειτουργίας τους.	16
Σχήμα 1.10. (A) Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της σπηλαιώσης και (B) διάρρηξη κυτταρικού τοιχώματος και απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών συστατικών δειγμάτων βασιλικού.	17
Σχήμα 1.11. (A) Λουτρό υπερήχων και (B) ηχοβολέας υπερήχων.	18
Σχήμα 1.12. Βασικά στάδια RSM.	21
Σχήμα 1.13. Δομές α-, β- και γ-CD.	31
Σχήμα 1.14. Τα συνήθη κατιόντα και ανιόντα που δομούν τα ΙL.	33
Σχήμα 2.1. Μηχανισμός αντίδρασης Folin-Ciocalteu	42
Σχήμα 2.2. Μέτρηση της απορρόφησης του μπλε χρωμοφόρου συμπλόκου.	42
Σχήμα 2.3. Τυπική διάταξη ενός συστήματος CE.	44
Σχήμα 2.4. Κατανομή φορτίου στη διεπιφάνεια της τριχοειδούς στήλης.	47
Σχήμα 2.5. Σειρά έκλυσης σε ένα τυπικό ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό.	49
Σχήμα 2.6. Κατανομή ροής υγρών υπό την επίδραση (A) ηλεκτροοσμωτικής πίεσης και (B) υδροδυναμικής πίεσης.	50
Σχήμα 2.7. Τρόπος λειτουργίας CZE.	51
Σχήμα 2.8. Βασική αρχή διαχωρισμού MEKC με χρήση ανιονικών επιφανειοδραστικών.	52
Σχήμα 2.9. Χημική αντίδραση ομάδων σιλανόλης και οργανοχλωριωμένου σιλανίου.	54
Σχήμα 2.10. Τυπικό σύστημα HPLC.	56
Σχήμα 2.11. Συνοπτικό διάγραμμα φασματομέτρου μαζών.	58
Σχήμα 2.12. Βασική αρχή λειτουργίας του ESI.	59
Σχήμα 2.13. Αναπαράσταση τυπικού συστήματος TOF-MS.	60
Σχήμα 2.14. Σύγχρονα συστήματα TOF-MS.	61
Σχήμα 3.1. Άγουροι και ώριμοι καρποί της επαρχίας Πάφου.	63
Σχήμα 3.2. Σύστημα εκπομπής υπερήχων (ultrasonic probe system).	64
Σχήμα 3.3. Συνοπτικό διάγραμμα της διαδικασίας που ακολουθήθηκε κατά την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων μέσω της UAE.	64
Σχήμα 3.4. Εκχύλιση υπό ανάδευση της σάρκας των άγουρων καρπών.	65
Σχήμα 3.5. Ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της συσκευής Soxhlet.	66
Σχήμα 3.6. Καμπύλη βαθμονόμησης γαλλικού οξέος.	67
Σχήμα 3.7. Συνοπτικό διάγραμμα των πειραματικών σχεδιασμών που εφαρμόστηκαν.	68
Σχήμα 3.8. Δομή του L-AlaC ₄ Lac.	70
Σχήμα 3.9. Αντιπροσωπευτική πορεία σύνθεσης του L-AlaC ₄ Lac.	70
Σχήμα 3.10. Συνοπτική διαδικασία SPE.	72
Σχήμα 3.11. Καθαρισμός των εκχυλισμάτων της ώριμης και άγουρης σάρκας χαρουπιών με χρήση της SPE σε φυσίγγια DPA-6S.	73

Σχήμα 3.12. Σύστημα CE-DAD.	74
Σχήμα 3.13. Περιοχές δειγματοληψίας.	79
Σχήμα 3.14. Τα χαρούπια που συλλέχθηκαν από τις 7 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.	80
Σχήμα 3.15. Σάρκα και σπόροι (A) άγουρων και (B) ώριμων καρπών.	80
Σχήμα 3.16. Προϊόντα χαρουπιού που μελετήθηκαν.	81
Σχήμα 3.17. Εκχυλίσματα σάρκας χαρουπιών από τις 7 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.	83
Σχήμα 3.18. Σύστημα HPLC-HRMS.	84
Σχήμα 4.1. Διάγραμμα κύριων επιδράσεων.	91
Σχήμα 4.2. Διαγράμματα κανονικής πιθανότητας των μεθόδων (A) CUAΕ και (B) PUAΕ.	95
Σχήμα 4.3. Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα των μεθόδων (A, B) CUAΕ και (C, D) PUAΕ.	99
Σχήμα 4.4. Σύγκριση αποδοτικότητας κλασσικών και εναλλακτικών τεχνικών εξαγωγής.	103
Σχήμα 4.5. Αντίδραση συμπλοκοποίησης βορικών ιόντων και πολυφαινολών (n=0,1).	108
Σχήμα 4.6. Επίδραση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη (Borate) στους χρόνους μετανάστευσης των υπό μελέτη αναλυτών (pH 9.5).	110
Σχήμα 4.7. Επίδραση συγκέντρωσης β-CD στις ηλεκτροφορητικές ευκινησίες των υπό μελέτη αναλυτών (35 mM Borate, pH 9.5).	112
Σχήμα 4.8. Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής του λόγου 1/(μερ – μf) ως προς το λόγο 1/[CD], για τον υπολογισμό των σταθερών συμπλοκοποίησης σύμφωνα με την Εξίσωση 3.6 (35 mM Borate, pH 9.5).	113
Σχήμα 4.9. Επίδραση της συγκέντρωσης του IL (L-AlaC ₄ Lac) στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των υπό μελέτη αναλυτών (35 mM Borate, 15 mM β-CD, pH 9.5).	116
Σχήμα 4.10. Επίδραση της συγκέντρωσης του IL (L-AlaC ₄ Lac) στη διαχωριστική ικανότητα (R _s) και εκλεκτικότητα (α) για τα ζεύγη χλωρογενικό οξύ (5)-κερκετίνη (9) και κατεχόλη (3)-φερουλικό οξύ (8) (35 mM Borate, 15 mM β-CD, pH 9.5).	116
Σχήμα 4.11. Επίδραση της εφαρμοζόμενης τάσης στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των υπό μελέτη αναλυτών (35 mM Borate, 15 mM β-CD, 3 mM L-AlaC ₄ Lac, pH 9.5).	117
Σχήμα 4.12. Ηλεκτροφερόγραμμα βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού (35 mM Borate, 15 mM β-CD, 3 mM L-AlaC ₄ Lac, pH 9.5, V=30 kV).	118
Σχήμα 4.13. Ποσοστά ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων για το κάθε υπό εξέταση προσροφητικό υλικό.	122
Σχήμα 4.14. Ηλεκτροφερόγραμμα εκχυλίσματος ώριμης σάρκας χαρουπιού (35 mM Borate, 15 mM β-CD, 3 mM L-AlaC ₄ Lac, pH 9.5, V=30 kV).	123
Σχήμα 4.15. EICs των υπό μελέτη αναλυτών (1 mg/L).	132
Σχήμα 4.16. Γραφική αναπαράσταση των κύριων πολυφαινολικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα σάρκας χαρουπιού που συλλέχθηκαν από τις 7 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.	144
Σχήμα 4.17. Δισδιάστατη απεικόνιση της κατανομής των δειγμάτων (scores plot και loading plot) στους δύο πρώτους κύριους άξονες, PC1 και PC2.	149
Σχήμα 4.18. Διάγραμμα των αποτελεσμάτων (scores plot) της PLS-DA (LV1 έναντι LV2) με τη χρήση όλων των υπό εξέταση δειγμάτων.	150
Σχήμα 4.19. Διάγραμμα ροής των διαδοχικά χρησιμοποιούμενων μικρότερων μοντέλων PLS-DA δύο τάξεων. Στο Σχήμα παρέχονται, επίσης, οι διαστάσεις του συνόλου των δεδομένων καθώς και οι LVs που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των μοντέλων.	151
Σχήμα 4.20. Η δισδιάστατη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων (scores plot) έναντι των αξόνων LV1 και LV2, για τα διαδοχικά μικρότερα μοντέλα PLS-DA δύο τάξεων που κατασκευάστηκαν.	151

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1. Οι κύριες κατηγορίες των πολυφαινολών, η χημική τους δομή και αντιπροσωπευτικά παραδείγματα.	7
Πίνακας 2.1. Αντιπροσωπευτικά όρια ανίχνευσης των πιο διαδεδομένων ανιχνευτών στην CE... ..	45
Πίνακας 2.2. Βασικότερες τεχνικές CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός.....	50
Πίνακας 2.3. Βασικές αρχές διαχωρισμού των πιο κοινών τεχνικών υγροχρωματογραφίας.....	55
Πίνακας 2.4. Απόδοση ανιχνευτών υγροχρωματογραφίας.	57
Πίνακας 2.5. Βασικές αρχές λειτουργίας των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων αναλυτών στη MS.	59
Πίνακας 3.1. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.....	84
Πίνακας 3.2. Συνθήκες λειτουργίας ESI.	85
Πίνακας 4.1. Επίπεδα ανεξάρτητων μεταβλητών πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού.	89
Πίνακας 4.2. Πειραματικές τιμές πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού δοκιμής ελέγχου.	90
Πίνακας 4.3. Πειραματικά αποτελέσματα παραγοντικού σχεδιασμού CUAΕ.	96
Πίνακας 4.4. Πειραματικά αποτελέσματα παραγοντικού σχεδιασμού PUAΕ.....	97
Πίνακας 4.5. Αποτελέσματα ANOVA τετραγωνικών μοντέλων CUAΕ και PUAΕ.	98
Πίνακας 4.6. Βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής, προτεινόμενες και πειραματικές τιμές του TPC κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.....	101
Πίνακας 4.7. Σύγκριση TPC σάρκας άγουρων και ώριμων καρπών.	104
Πίνακας 4.8. Οι υπολογιζόμενες σταθερές συμπλοκοποίησης των υπό μελέτη πολυφαινολών με τη β-CD.....	114
Πίνακας 4.9. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση της ηλεκτροφορητικής μεθόδου.	120
Πίνακας 4.10. Ποσοτικά δεδομένα από την EKC-DAD ανάλυση των εκχυλισμάτων της σάρκας ώριμων και άγουρων καρπών.	125
Πίνακας 4.11. Κύριες αναλυτικές παράμετροι των υπό εξέταση αναλυτών.....	134
Πίνακας 4.12. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της προτεινόμενης χρωματογραφικής μεθόδου.	135
Πίνακας 4.13. Φαινολική σύσταση της σάρκας και των σπόρων των ώριμων και άγουρων καρπών.	139
Πίνακας 4.14. Φαινολική σύσταση της ακατέργαστης πρώτης ύλης και των παράγωγων προϊόντων του χαρουπιού.	143
Πίνακας 4.15. Οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα σάρκας χαρουπιού, ταξινομημένες ανά περιοχή δειγματοληψίας.	145
Πίνακας 4.16. Αποτελέσματα της LOOCV των μοντέλων PLS-DA που αναπτύχθηκαν.....	152

Κατάλογος Συντμήσεων

ACN, acetonitrile, ακετονιτρίλιο

AgLac, silver lactate, γαλακτικός άργυρος

ANOVA, analysis of variance, ανάλυση διακύμανσης

Borate, sodium tetraborate decahydrate, δεκαένυδρο τετραβορικό νάτριο

CD, cyclodextrin, κυκοδεξτρίνη

CE, capillary electrophoresis, ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς

CMC, critical micellar concentration, κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση

CUAE, continuous ultrasound-assisted extraction, συνεχής εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

CZE, capillary zone electrophoresis, ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς

ECD, electrochemical detector, ηλεκτροχημικός ανιχνευτής

EKC, electrokinetic chromatography, ηλεκτροκινητική χρωματογραφία

EOF, electroosmotic flow, ηλεκτροωσμωτική ροή

ESI, electrospray ionization, ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

EtOH, ethanol, αιθανόλη

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας

FD, fluorescence detector, ανιχνευτής φθορισμού

FID, flame ionization detector, ανιχνευτής ιονισμού φλόγας

GAE, gallic acid equivalents, ισοδύναμα γαλλικού οξέος

GC, gas chromatography, αέρια χρωματογραφία

HAT, hydrogen atom transfer, μεταφορά ατόμου υδρογόνου

HPLC, high-performance liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

HRMS, high-resolution mass spectrometry, φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας

IL, ionic liquid, ιοντικό υγρό

L-AlaC₄Cl, L-Alanine tert-butyl ester hydrochloride, υδροχλωρικός τερτ βουτυλεστέρας της L-αλανίνης

L-AlaC₄Lac, L-alanine tert butyl ester lactate, γαλακτικός τερτ βουτυλεστέρας της L-αλανίνης

LBG, locust bean gum, κόμμα χαρουπιού

LLE, liquid-liquid extraction, εκχύλιση υγρού-υγρού

LOD, limit of detection, όριο ανίχνευσης

LOQ, limit of quantitation, όριο ποσοτικοποίησης

LV, latent variable, λανθάνουσα μεταβλητή

MAE, microwave-assisted extraction, εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

ME, matrix effect, επίδραση μητρικού υλικού

MeOH, methanol, μεθανόλη

MS, mass spectrometry, φασματομετρία μάζας

MS/MS, tandem mass spectrometry, διαδοχική φασματομετρία μάζας

PCA, principal component analysis, ανάλυση κύριων συνιστωσών

PCs, principal components, κύριες συνιστώσες

PLE, pressurized liquid extraction, εκχύλιση με υγρό υπό πίεση

PLS-DA, partial least squares discriminant analysis, διαχωριστική ανάλυση μέσω παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων

PLSR, partial least squares regression, παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων

PUAE, pulsed ultrasound-assisted extraction, παλμική εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

RMSE, root mean square error, ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος

RSD, relative standard deviation, σχετική τυπική απόκλιση

RSM, response surface methodology, μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης

SD, standard deviation, τυπική απόκλιση

SDS, sodium dodecyl sulfate, δωδεκυλοθειικό νάτριο

SET, single electron transfer, μεταφορά ενός ηλεκτρονίου

SFE, supercritical fluid extraction, εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού

SLE, solid-liquid extraction, εκχύλιση στερεού-υγρού

SPE, solid-phase extraction, εκχύλιση στερεάς φάσης

TOF, time-of-flight, αναλυτής μαζών «χρόνου πτήσης»

TPC, total phenolic content, ολικό φαινολικό περιεχόμενο

UAE, ultrasound-assisted extraction, εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

UHPLC, ultra-high-performance liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης

UV/Vis, ultraviolet/visible, υπεριώδες/ορατό

1. Εισαγωγή

1.1. Χαρουπιά

Η χαρουπιά είναι ένα αειθαλές και μακρόβιο δέντρο, της τάξης των Κυαμοειδών (Fabaceae family), που καλλιεργείται ευρέως στην περιοχή της Μεσογείου (Σχήμα 1.1) [1–3]. Το επιστημονικό της όνομα, *Ceratonia siliqua*, προέρχεται από την ελληνική λέξη κέρασ (κέρατο) και τη λατινική *siliqua* (λοβός), υποδηλώνοντας, έτσι, το σχήμα και τη σκληρότητα του καρπού [4]. Το δέντρο αυτό ευδοκιμεί σε περιοχές με ήπιο και ξηρό κλίμα, φτωχά εδάφη, ενώ απαιτείται ελάχιστη φροντίδα για την ανάπτυξή του [2,5]. Σήμερα, η χαρουπιά αποτελεί ένα πολύ σημαντικό συστατικό στοιχείο της μεσογειακής βλάστησης, τόσο για οικονομικούς, όσο και για περιβαλλοντικούς λόγους, με την παραγωγή και κατανάλωση των καρπών της να σημειώνουν σημαντική αύξηση τα τελευταία χρόνια [6,7]. Χαρουπιές απαντώνται, επίσης, και σε άλλα μέρη του κόσμου με κλίμα ανάλογο με αυτό των μεσογειακών χωρών, όπως για παράδειγμα στις ΗΠΑ (Καλιφόρνια), στο Μεξικό, στη Χιλή, στη Νότια Αφρική καθώς και στην Αυστραλία (Σχήμα 1.2.) [8,9].

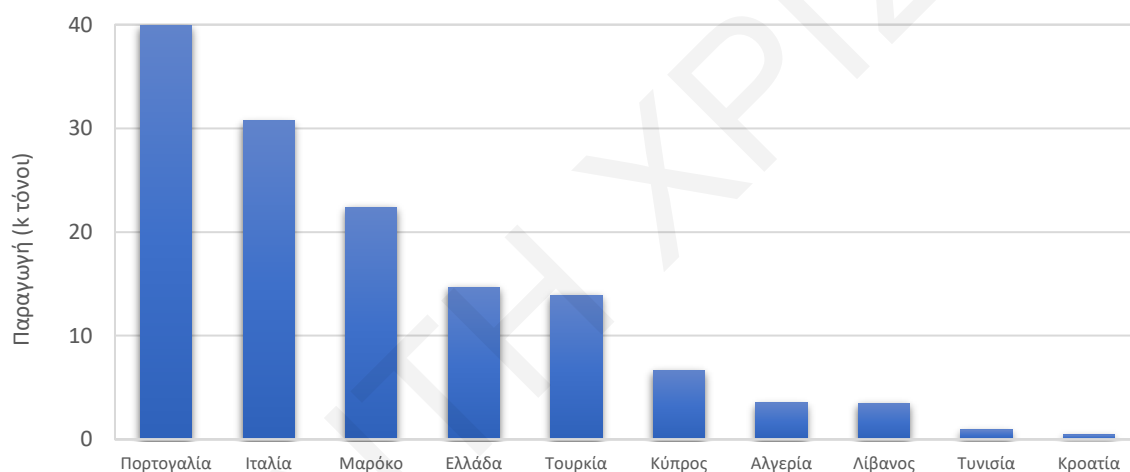


Σχήμα 1.1. Το δέντρο της χαρουπιάς [3].



Σχήμα 1.2. Χάρτης καλλιεργειών χαρουπιάς [10].

Σύμφωνα με τα παγκόσμια στοιχεία της Διεθνούς Οργάνωσης Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), η καλλιεργούμενη έκταση της χαρουπιάς ανέρχεται στα 46000 εκτάρια παγκοσμίως, έκταση η οποία αντιστοιχεί σε μια ετήσια παραγωγή της τάξεως των 130000 τόνων (μέσος όρος για τα έτη μεταξύ του 1994 και του 2019). Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή χαρουπιών είναι η Πορτογαλία, η Ιταλία, το Μαρόκο, η Ελλάδα και η Τουρκία. Σημαντικές ποσότητες παράγονται, επίσης, από την Κύπρο, την Αλγερία και το Λίβανο, με τις αποδόσεις αυτές να εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων οι ποικιλίες των χαρουπιών, οι πρακτικές καλλιέργειας που ακολουθούνται, καθώς και οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στην κάθε περιοχή (Σχήμα 1.3) [9,11].



Σχήμα 1.3. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή χαρουπιών, σύμφωνα με τον FAO για τα έτη 1994-2019 [11].

1.2. Καρπός χαρουπιάς

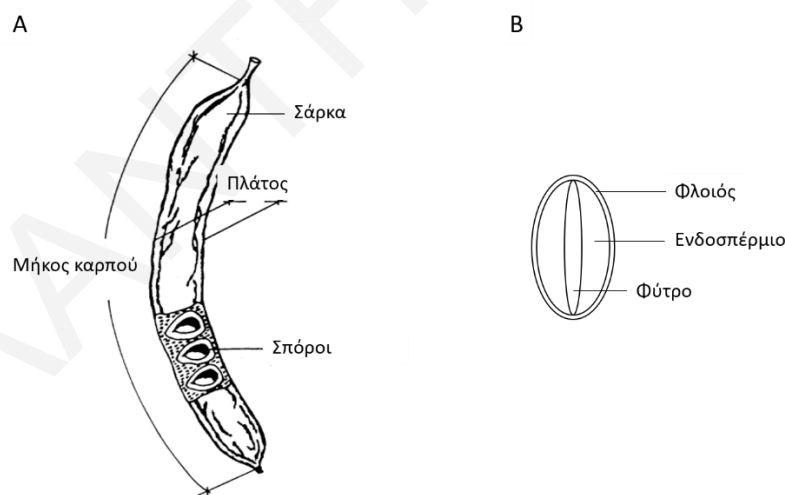
1.2.1. Βασικά χαρακτηριστικά

Το χαρούπι, ο καρπός της χαρουπιάς, έχει χρώμα πράσινο όταν είναι άγουρο, ενώ μετά την πλήρη του ωρίμανση αποκτά ένα σκούρο καφέ χρώμα και, ταυτόχρονα, συρρικνώνεται εξαιτίας της μείωσης της περιεκτικότητάς του σε υγρασία (Σχήμα 1.4) [9]. Πρόκειται για ένα μη διανοιγμένο, επιμήκη και συμπιεσμένο λοβό, με ευθύγραμμο ή καμπυλωτό σχήμα και βάρος που κυμαίνεται στο εύρος 5-30 g [6,12]. Ο ώριμος καρπός έχει μήκος από 10 έως 30 cm και πλάτος από 1.5 μέχρι 3.5 cm, με τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία του, καθώς και τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή όπου αναπτύσσεται [9,13].



Σχήμα 1.4. Ωριμοι και άγουροι καρποί.

Το χαρούπι αποτελείται από τη σάρκα, η οποία αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος του καρπού (90%), και από τους σπόρους, οι οποίοι αντιστοιχούν μόλις στο 10% του συνολικού του βάρους. Η σάρκα αποτελείται από ένα εξωτερικό δερματώδες στρώμα, το περικάρπιο, και μια μαλακότερη εσωτερική περιοχή, το μεσοκάρπιο. Οι σπόροι με τη σειρά τους απαρτίζονται από το φλοιό (30-33%), το ενδοσπέρμιο (42-46%) και το φύτρο (23-25%), τα οποία και απεικονίζονται στο πιο κάτω σχήμα (Σχήμα 1.5) [6,14,15].



Σχήμα 1.5. (Α) Τα μέρη του χαρουπιού και (Β) τα μέρη του σπόρου [10].

1.2.2. Παράγωγα προϊόντα και χρήσεις

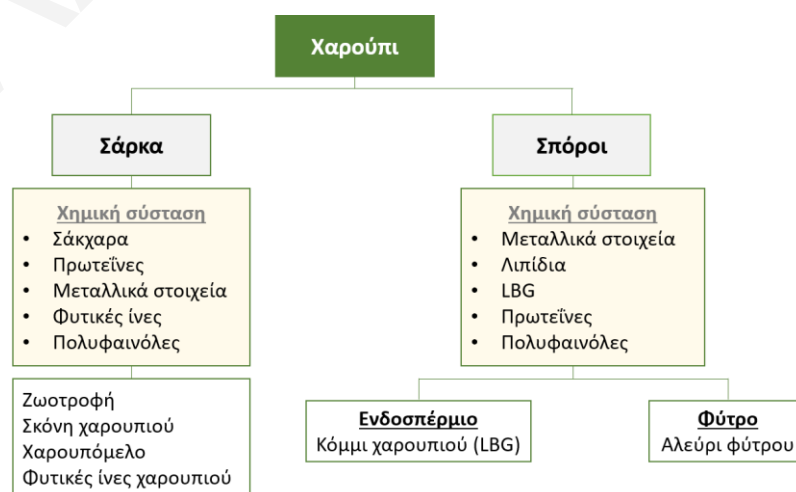
Η χαρουπιά καλλιεργείται εδώ και χιλιάδες χρόνια σε διάφορα μέρη του κόσμου, με τους καρπούς της να έχουν χρησιμοποιηθεί, τόσο ως τροφή για τον άνθρωπο και τα ζώα, όσο και για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών [16]. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για τα

χαρούπια ως μια φθηνή πρώτη ύλη για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων έχει αυξηθεί, κυρίως από τις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών [17–19]. Βιομηχανικά, τα χαρούπια χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή του κόμμεος χαρουπιού (locust bean gum, LBG), ενός προϊόντος που εξάγεται από το ενδοσπέρμιο των σπόρων και χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα ως ένα φυσικό πρόσθετο (E410), λόγω της ικανότητάς του να δρα ως πηκτικός και σταθεροποιητικός παράγοντας [20–22]. Από το φύτρο των σπόρων, παράγεται το αλεύρι φύτρων χαρουπιού, το οποίο εξαιτίας της υψηλής του περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βρίσκει ευρεία εφαρμογή στα συμπληρώματα διατροφής για τον άνθρωπο [23]. Επιπλέον, το συγκεκριμένο άλευρο δεν περιέχει γλουτένη, αλλά είναι πλούσιο σε καρουβίνη, μια πρωτεΐνη με παρόμοιες ρεολογικές ιδιότητες, και, ως εκ τούτου, απαντάται ως συστατικό στα τρόφιμα που προορίζονται για άτομα με δυσανεξία στη γλουτένη (κοιλιοκάκη) [23,24].

Διάφορα προϊόντα μπορούν επίσης να προκύψουν και από τη σάρκα των χαρουπιών [25]. Δεδομένου πως η κύρια χρήση των καρπών της χαρουπιάς περιορίζεται στην παραγωγή του κόμμεος χαρουπιού, μεγάλες ποσότητες σάρκας παραμένουν σήμερα ανεκμετάλλευτες [26]. Μέχρι στιγμής, η κύρια εφαρμογή της σάρκας του χαρουπιού επικεντρώνεται στην κτηνοτροφία, όπου και χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή [27,28]. Επιπλέον, η σάρκα του χαρουπιού έχει χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή διαφόρων παράγωγων προϊόντων, με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα τη σκόνη και το σιρόπι χαρουπιού (ή χαρουπόμελο) [25]. Όσον αφορά τη σκόνη χαρουπιού, ή όπως αλλιώς αποκαλείται αλεύρι χαρουπιού, λαμβάνεται αφότου τα χαρούπια, μετά την απομάκρυνση των σπόρων τους, ψηθούν και αλεσθούν. Το προϊόν αυτό αποτελεί μια φυσική γλυκαντική ουσία που παρουσιάζει γεύση και εμφάνιση παρόμοια με αυτήν της σοκολάτας, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του κακάο. Η απουσία των ψυχοδραστικών ουσιών, της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης, από τη σκόνη χαρουπιού την καθιστούν ως μια υγιή εναλλακτική λύση για το κακάο [24,29]. Παράλληλα, η σάρκα του χαρουπιού διαθέτει μια υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και γι' αυτό χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή σιροπιού, το οποίο λαμβάνεται μέσω της εξαγωγής των εν λόγω συστατικών [9]. Το προϊόν που προκύπτει μετά την απομάκρυνση των υδατανθράκων από τη σάρκα του χαρουπιού είναι ένα προϊόν πλούσιο σε διαιτητικές ίνες, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο με την ονομασία «φυτικές ίνες χαρουπιού» (carob fiber) και βρίσκει εφαρμογή ως συστατικό σε διάφορα τρόφιμα [25,30]. Στο Σχήμα 1.6 συνοψίζονται τα παράγωγα προϊόντα του χαρουπιού που αναφέρθηκαν προηγουμένως, ενώ γίνεται αναφορά και στη χημική τους σύσταση.

1.2.3. Χημική σύσταση

Η μελέτη της σύστασης των χαρουπιών, καθώς και των προϊόντων τους, κατέδειξε τη μεγάλη διατροφική τους αξία και προσέλυσε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας [31]. Όπως αποδείχθηκε, η σάρκα του χαρουπιού διαθέτει μια υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (50-65%) και κυρίως σε σακχαρόζη, γεγονός στο οποίο αποδίδεται η γλυκιά της γεύση. Επιπλέον, διαθέτει σημαντικά ποσά πρωτεϊνών (1-5%) και μεταλλικών στοιχείων (1-6%), με κυριότερα το ασβέστιο, το κάλιο, το μαγνήσιο, το νάτριο και το σίδηρο. Η χαμηλή της περιεκτικότητα σε λίπη (0.2-0.8%), καθώς και η παρουσία των φυτικών ινών (9-13%) σε αυτήν, επιτρέπουν το χαρακτηρισμό της ως ένα υγιεινό τρόφιμο αλλά και ως μια σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών [14,31–33]. Σε σχέση με τη σάρκα του χαρουπιού, οι σπόροι του καρπού βρέθηκαν να διαθέτουν μια υψηλότερη περιεκτικότητα λιπιδίων και μεταλλικών στοιχείων [3,6]. Βασικό συστατικό των σπόρων αποτελεί μια γαλακτομαννάνη (galactomannan), το LBG, η οποία αντιπροσωπεύει το 80-85% του συνολικού βάρους του ενδοσπερμίου. Όσον αφορά το φύτρο των σπόρων, αποδείχθηκε ως μια εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών, με το ποσοστό τους να ανέρχεται στο 55-65% [34]. Πολύ σημαντική είναι, επίσης, η παρουσία των πολυφαινολικών ενώσεων στα χαρούπια, με τις ενώσεις αυτές να έχουν ανιχνευθεί, τόσο στη σάρκα, όσο και στους σπόρους του καρπού. Πρόσφατα ένας μεγάλος αριθμός ερευνών επικεντρώθηκε στην αξιοποίηση της σάρκας και των σπόρων του χαρουπιού, καθώς θεωρούνται μια εξαιρετική πηγή πολυφαινολικών ενώσεων, συστατικών με πληθώρα θετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου [3]. Η χημική σύσταση του χαρουπιού, όπως αποδείχθηκε, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, με κυριότερους την ποικιλία του χαρουπιού, τη γεωγραφική του προέλευση, καθώς και το βαθμό ωρίμανσής του [35].



Σχήμα 1.6. Χημική σύσταση χαρουπιών και παράγωγα προϊόντα.

1.3. Πολυφαινόλες

1.3.1. Γενικά

Οι φαινολικές ή πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις πιο διαδεδομένες και πολυάριθμες ομάδες φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών [36,37]. Οι ενώσεις αυτές φαίνεται να διαδραματίζουν ένα σύνθετο ρόλο στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή των φυτών, εφόσον προάγουν τη φυσιολογική τους επιβίωση, προστατεύοντας τα από την ακτινοβολία UV και τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, λειτουργούν ως οπτικά σήματα για τα έντομα επικονιαστές, ενώ, παράλληλα, συμβάλλουν στο χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φυτικών προϊόντων [37,38]. Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο και, ως εκ τούτου, απαντώνται σε διάφορα προϊόντα φυτικής προέλευσης, όπως για παράδειγμα στα φρούτα, τα λαχανικά, τους ξηρούς καρπούς, το τσάι, το μέλι και το κρασί [39].

1.3.2. Δομή και κατηγορίες

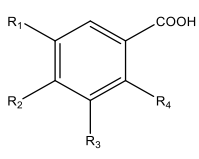
Οι πολυφαινόλες συνιστούν μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων και έχουν δομή που χαρακτηρίζεται από έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι φέρουν έναν ή περισσότερους υδροξυλικούς υποκαταστάτες [40,41]. Ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που διαθέτουν, καθώς και από το είδος της δομικής μονάδας που συνδέει τους αρωματικούς δακτυλίους μεταξύ τους, οι πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να διακριθούν στις εξής κύριες κατηγορίες: τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τις ταννίνες, τα στυλβένια και τις λιγνάνες [3,37,42]. Οι δομές των πέντε αυτών κατηγοριών παρατίθενται στον Πίνακα 1.1, μαζί με τις διάφορες υποκατηγορίες τους και κάποια αντιπροσωπευτικά τους παραδείγματα.

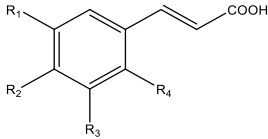
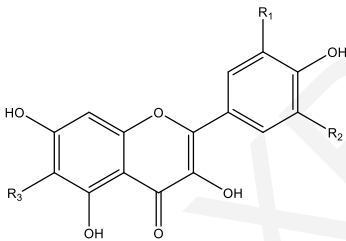
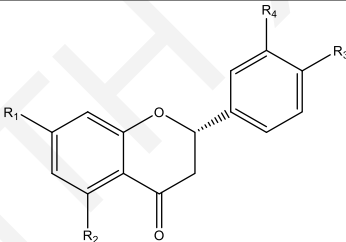
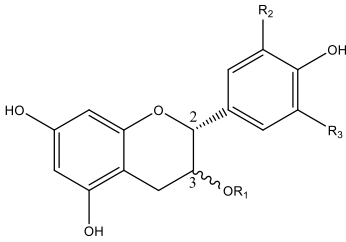
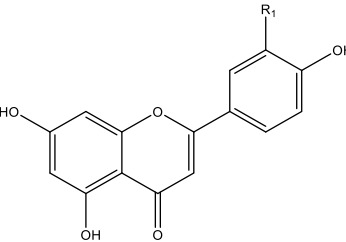
Στην κατηγορία των φαινολικών οξέων συγκαταλέγονται τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (υδροξυβενζοϊκά οξέα), καθώς και τα παράγωγα του κινναμικού οξέος (υδροξυκινναμικά οξέα). Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, απαρτίζονται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω τριών ατόμων άνθρακα υπό τη μορφή του οξυγονωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου. Με βάση το βαθμό οξείδωσης του κεντρικού δακτυλίου, τα φλαβονοειδή μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής υποκατηγορίες: φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ανθοκυανιδίνες και ισοφλαβόνες [43,44]. Οι ταννίνες αποτελούν ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες, τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες [37]. Οι πρώτες, αποτελούν κατά κύριο λόγο πολυμερή του γαλλικού ή ελλαγικού οξέος και της γλυκόζης. Στο κέντρο των μορίων βρίσκεται ένας πυρήνας πολυόλης (συνήθως γλυκόζης), με τις

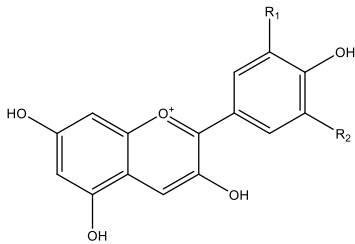
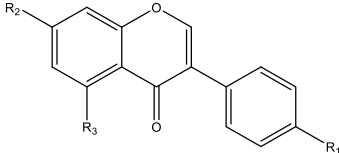
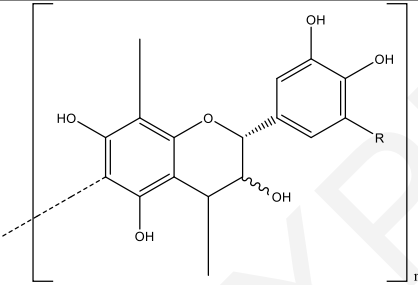
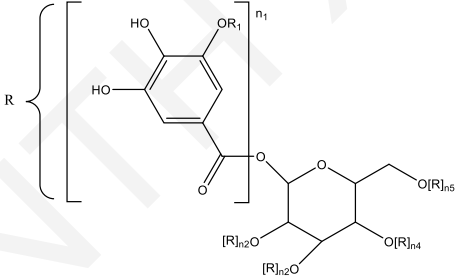
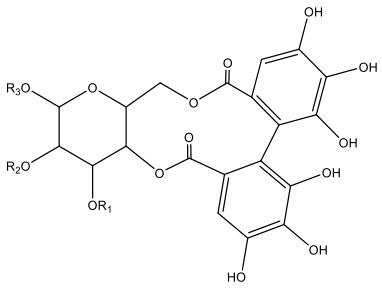
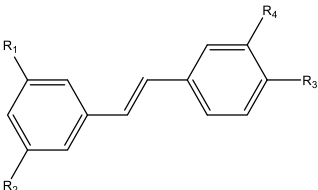
υδροξυλικές του ομάδες να είναι πλήρως ή μερικώς εστεροποιημένες με μονάδες γαλλικού (γαλλοταννίνες) ή ελλαγικού οξέος (ελλαγιταννίνες). Κατά την υδρόλυσή τους, ελευθερώνονται μονάδες γαλλικού και ελλαγικού οξέος, αντίστοιχα [45]. Αντίθετα, οι συμπυκνωμένες ταννίνες, γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες, είναι ανθεκτικές στην υδρόλυση και συνιστούν ολιγομερή ή πολυμερή των φλαβανολών [46]. Οι λιγνάες αποτελούν μια πολύ μικρή κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων με δομή που χαρακτηρίζεται από δύο μονάδες φαινυλοπροπανίου. Τα στιλβένια, ή όπως αλλιώς αποκαλούνται στιλβενοειδή, χαρακτηρίζονται από ένα διπλό δεσμό που συνδέει δύο αρωματικούς δακτυλίους σε μια C₆-C₂-C₆ διαμόρφωση. Ως εκ τούτου, τα στιλβένια μπορούν να απαντηθούν στην cis ή trans τους διαμόρφωση, με τα trans ισομερή να είναι τα πιο συχνά απαντώμενα [47].

Η ομάδα των πολυφαινολικών ενώσεων χαρακτηρίζεται από μια μεγάλη ποικιλία χημικών δομών. Συγκεκριμένα, έχουν δομές που ποικίλουν, από απλά φαινολικά μόρια μέχρι και συστατικά υψηλού πολυμερισμού [37]. Στους φυτικούς ιστούς, συνήθως, απαντώνται στη συζευγμένη τους μορφή, με μία ή και περισσότερες μονάδες σακχάρου να είναι δεσμευμένες στις υδροξυλικές τους ομάδες, αν και μπορούν να υπάρξουν άμεσες συνδέσεις των μονάδων σακχάρου με τα άτομα άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Συνδέσεις και με άλλα μόρια, όπως για παράδειγμα με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια, καθώς και με άλλες φαινόλες είναι επίσης πιθανές [43].

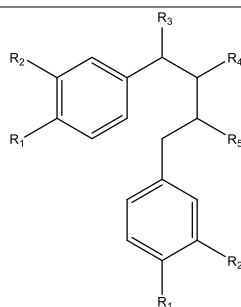
Πίνακας 1.1. Οι κύριες κατηγορίες των πολυφαινολών, η χημική τους δομή και αντιπροσωπευτικά παραδείγματα.

Κατηγορία	Βασική δομή	Αντιπροσωπευτικές ενώσεις
Φαινολικά οξέα		Γαλλικό οξύ (R ₁ :OH, R ₂ :OH, R ₃ :OH, R ₄ :H)
Υδροξυβενζοϊκά οξέα		Συριγγικό οξύ (R ₁ :OCH ₃ , R ₂ :OH, R ₃ :OCH ₃ , R ₄ :H)
		Γεντισικό οξύ (R ₁ :OH, R ₂ :H, R ₃ :H, R ₄ :OH)
		Πρωτοκατεχικό οξύ (R ₁ :OH, R ₂ :OH, R ₃ :H, R ₄ :H)

		Κινναμικό οξύ (R ₁ :H, R ₂ :H, R ₃ :H, R ₄ :H)
		Καφεϊκό οξύ (R ₁ :OH, R ₂ :OH, R ₃ :H, R ₄ :H)
Υδροξυκινναμικά οξέα		Φερουλικό οξύ (R ₁ :OCH ₃ , R ₂ :OH, R ₃ :H, R ₄ :H)
		Σιναπικό οξύ (R ₁ :OCH ₃ , R ₂ :OH, R ₃ :OCH ₃ , R ₄ :H)
Φλαβονοειδή		
Φλαβονόλες		Κερκετίνη (R ₁ :H, R ₂ :OH, R ₃ :H)
		Μυρικετίνη (R ₁ :OH, R ₂ :OH, R ₃ :H)
		Καεμφερόλη (R ₁ :H, R ₂ :H, R ₃ :H)
Φλαβανόνες		Ναρινγενίνη (R ₁ :OH, R ₂ :OH, R ₃ :OH, R ₄ :H)
Φλαβανόλες (Κατεχίνες)		(+)-Κατεχίνη (R ₁ :H, R ₂ :H, R ₃ :OH, C ₂ :R, C ₃ :S)
		(-)-Επικατεχίνη (R ₁ :H, R ₂ :H, R ₃ :OH, C ₂ :R, C ₃ :R)
		(-)-Επιγαλλοκατεχίνη (R ₁ :H, R ₂ :OH, R ₃ :OH, C ₂ :R, C ₃ :R)
Φλαβόνες		Απιγενίνη (R ₁ :H)
		Λουτεολίνη (R ₁ :OH)

Ανθοκυανιδίνες		Κυανιδίνη (R ₁ :OH, R ₂ :H)
		Δελφινιδίνη (R ₁ :OH, R ₂ :OH)
		Πελαργονιδίνη (R ₁ :H, R ₂ :H)
Ισοφλαβόνες		Γενιστεΐνη (R ₁ :OH, R ₂ :OH, R ₃ :OH)
Ταννίνες		
Συμπυκνωμένες ταννίνες (προανθοκυανιδίνες)		Προκυανιδίνη B1 (R:H, n=2, επικατεχίνη- (4β→8)-κατεχίνη)
		Προκυανιδίνη B4 (R:H, n=2, κατεχίνη- (4α→8)-επικατεχίνη)
Υδρολύμενες ταννίνες		
Γαλλοταννίνες		1,2,3,4,6-πεντα-O-γαλλοϋλο- β-D-γλυκοπυρανόζη (R ₁ :H, n ₁ -n ₅ =1)
Ελλαγιταννίνες		Τελλυμαγρανδίνη II (R ₁ =R ₂ =R ₃ : γαλλόλυο (galloyl)-ομάδα)
Στιλβένια		Ρεσβερατρόλη (R ₁ :OH, R ₂ :OH, R ₃ :OH, R ₄ :H)

Λιγνάες

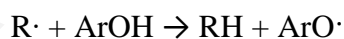


Σεκοΐσολαρικρεσινόλη
(R₁:OH, R₂:OCH₃, R₃:H,
R₄:CH₂OH, R₅:CH₂OH)

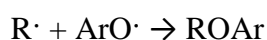
1.3.3. Βιολογική δράση

Τα τελευταία χρόνια, οι πολυφαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εξαιτίας των πολυάριθμων ευεργετικών τους ιδιοτήτων. Όπως αποδείχθηκε, οι ενώσεις αυτές διαθέτουν αντιαλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιθρομβωτικές και αντιϊκές ιδιότητες, με ίσως σημαντικότερη την αντιοξειδωτική τους δράση [37,48]. Επιπλέον, μελέτες κατέδειξαν πως οι ενώσεις αυτές μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο των χρόνιων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, του διαβήτη και των καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενώ, παράλληλα, φαίνεται να παρουσιάζουν νευροπροστατευτική δράση [49].

Οι περισσότερες από τις προαναφερθείσες βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων σχετίζονται άμεσα με την αντιοξειδωτική τους δράση [37]. Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική τους συμπεριφορά οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στην ικανότητά τους να δρουν ως ομάδες δότες ηλεκτρονίου ή/και υδρογόνου, συμβάλλοντας, έτσι, στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Μέσω του μηχανισμού μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), μια ελεύθερη ρίζα (R·) αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από το φαινολικό μόριο (ArOH), με αποτέλεσμα η ίδια η φαινολική ένωση να διαθέτει πλέον ένα μονήρες ηλεκτρόνιο (ArO·). Ωστόσο, η ρίζα που προκύπτει είναι σχετικά σταθερή και, επομένως, αποκλείεται το ενδεχόμενο μιας νέας αλυσιδωτής αντίδρασης. Αντίθετα, το φαινόξυ ριζικό ενδιάμεσο μπορεί να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες, οδηγώντας, έτσι, στον τερματισμό του σταδίου της διάδοσης (Εξίσωση 1.2).



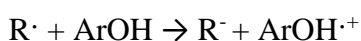
Εξίσωση 1.1.



Εξίσωση 1.2.

Σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό που έχει προταθεί, το μηχανισμό μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET), το αντιοξειδωτικό συστατικό, στην προκειμένη περίπτωση η πολυφαινόλη, μπορεί να δώσει ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα,

καθιστώντας το ίδιο ως ένα ριζικό κατιόν, σύμφωνα με την Εξίσωση 1.3. Ομοίως, η ρίζα που σχηματίζεται είναι ιδιαίτερα σταθερή και δε μπορεί να συμβάλει στο στάδιο της διάδοσης, παρά μόνο στον τερματισμό της [37,50,51].



Εξίσωση 1.3.

Επιπλέον, οι ενώσεις αυτές μπορούν να δεσμεύσουν χηλικά διάφορα μεταλλοϊόντα, αποτρέποντας, έτσι, τον καταλυόμενο από μέταλλα σχηματισμό των εν λόγω δραστικών ειδών (ελευθέρων ριζών) [37]. Δεδομένης της μεγάλης δραστικότητας και της επιβλαβούς φύσης των ελευθέρων ριζών, ο τερματισμός των αλυσιδωτών τους αντιδράσεων αποτρέπει την οξείδωση σημαντικών βιομορίων, όπως για παράδειγμα των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, συμβάλλοντας, έτσι, στην προστασία του οργανισμού από το οξειδωτικό στρες και τις επακόλουθες ασθένειές του [52].

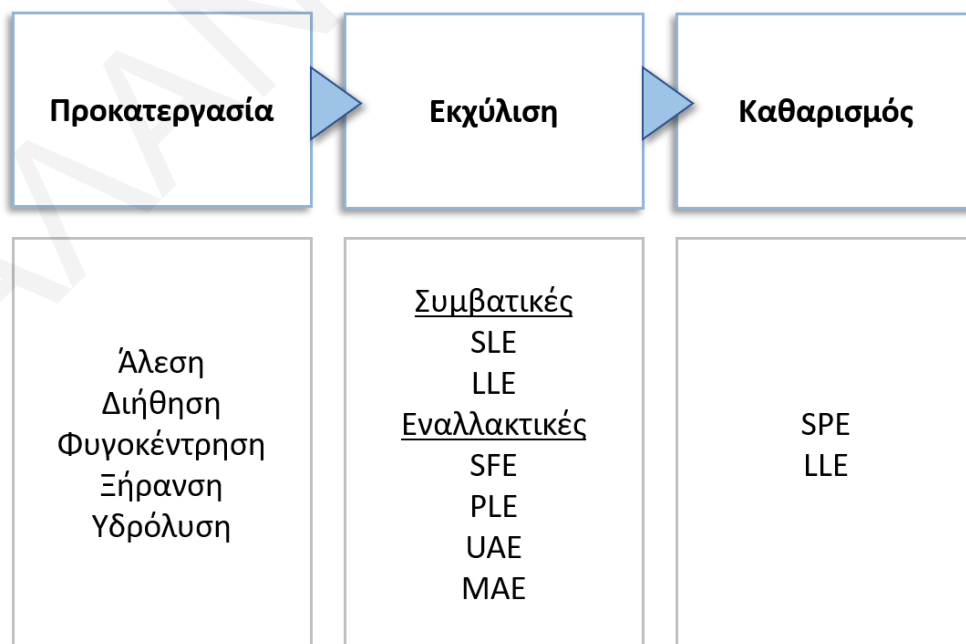
1.4. Φαινολική σύσταση χαρουπιών

Τα τελευταία χρόνια, τα χαρούπια έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς θεωρούνται μια εξαιρετική πηγή βιοδραστικών συστατικών και, συγκεκριμένα, πολυφαινολικών ενώσεων. Μέχρις στιγμής, έχει μελετηθεί το φαινολικό περιεχόμενο, τόσο των καρπών (σάρκα και σπόροι), των φύλλων και του κορμού της χαρουπιάς, όσο και των παράγωγων προϊόντων τους [16,18,23,25,53–57]. Διαφορετικές ενώσεις ανιχνεύθηκαν στα διάφορα τμήματα που μελετήθηκαν, με τη σάρκα του χαρουπιού και τα φύλλα του δέντρου να παρουσιάζουν τα υψηλότερα επίπεδα πολυφαινολών [3]. Η φαινολική ανάλυση των χαρουπιών και των προϊόντων τους κατέδειξε υψηλά επίπεδα φαινολικών οξέων (κυρίως γαλλικού οξέος, συμπεριλαμβανομένων της ελεύθερης του μορφής, καθώς και των παραγώγων του, όπως για παράδειγμα ο γαλλικός μεθυλεστερας), φλαβονοειδών (ιδιαίτερα πλούσια περιεκτικότητα σε φλαβονόλες, μεταξύ των οποίων η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η καεμφερόλη, καθώς και τα γλυκοζιτικά τους παράγωγα) και ταννινών (με τις συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούμενες από μονάδες φλαβαν-3-όλης και φλαβαν-3,4-διόλης να είναι οι πιο συχνά απαντώμενες) [58–61]. Παρόλα αυτά, σημαντικές διαφορές φαίνεται να παρατηρούνται μεταξύ των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας όσον αφορά τη φαινολική σύνθεση των χαρουπιών, η οποία, όπως αποδείχθηκε, εξαρτάται όχι μόνο από την ποικιλία, το φύλο, τη γεωγραφική προέλευση, τις συνθήκες καλλιέργειας και το βαθμό ωρίμανσης των χαρουπιών, αλλά, επίσης, και από τις τεχνολογικές μεθόδους που ακολουθούνται, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων εξαγωγής και ανάλυσης των πολυφαινολικών ενώσεων [62]. Επιπλέον, διαφορετικές ενώσεις μπορούν να ανιχνευθούν σε προϊόντα χαρουπιού που έχουν υποστεί επεξεργασία κάτω από διαφορετικές συνθήκες,

γεγονός που καθιστά εξαιρετικά δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας [3]. Στη συνέχεια, γίνεται αναφορά στον κάθε ένα παράγοντα ξεχωριστά, με αναφορά στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία και στη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της επίδρασής του.

1.4.1. Εκχύλιση

Η εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων συνιστά ένα εξαιρετικά κρίσιμο στάδιο, με σημαντική επίδραση στη μετέπειτα διαδικασία ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης. Εξαιτίας της μεγάλης τους πολυπλοκότητας και της ποικιλίας τους όσον αφορά τις χημικές τους δομές και τις αντίστοιχες περιεκτικότητες τους στο δείγμα, δεν κατέστη δυνατή η τυποποίηση ενός γενικού πρωτοκόλλου εξαγωγής των εν λόγω βιοδραστικών ενώσεων [63]. Ενώ θεωρείται σχεδόν αδύνατη η ανάπτυξη ενός τυπικού πρωτοκόλλου εξαγωγής για όλες τις πολυφαινολικές ενώσεις, υπάρχουν κάποιες γενικές προσεγγίσεις, κοινά αποδεκτές, όσον αφορά την εξαιρετικά αυτή δύσκολη πτυχή της έρευνας των πολυφαινολών [64]. Στο Σχήμα 1.7 απεικονίζεται το γενικό διάγραμμα ροής που ακολουθείται κατά την απομόνωση των πολυφαινολικών ενώσεων από τα διάφορα υπό εξέταση δείγματα. Μια τυπική διαδικασία περιλαμβάνει την κατάλληλη προκατεργασία του δείγματος, την εκχύλιση των υπό μελέτη συστατικών και τον επακόλουθο καθαρισμό των εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια, περιγράφεται κάθε ένα στάδιο ξεχωριστά.



Σχήμα 1.7. Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την απομόνωση των φαινολικών συστατικών.

1.4.1.1. Προκατεργασία δείγματος

Πριν την εξαγωγή των πολυφαινολών, προηγείται η συλλογή των δειγμάτων και η κατάλληλη επεξεργασία τους. Είναι κοινά αποδεκτή η ανάγκη για τη συλλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος, είτε αυτό αντιστοιχεί σε κάποιο φυτικό προϊόν/τρόφιμο, ή ακόμα και σε κάποιο βιολογικό δείγμα. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί κατά το στάδιο της μεταφοράς, επεξεργασίας και αποθήκευσης των δειγμάτων προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η αλλοίωση ή/και η απώλεια των αναλυτών στόχων [64].

Η προκατεργασία του δείγματος θεωρείται εξαιρετικά σημαντική και μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό το τελικό αποτέλεσμα της αναλυτικής μέτρησης. Ανάλογα με τη μήτρα του δείγματος και τις ιδιαιτερότητές της, επιλέγεται η αντίστοιχη μέθοδος επεξεργασίας. Για παράδειγμα, τα υγρά δείγματα μπορούν να υποβληθούν απευθείας σε εξαγωγή των πολυφαινολικών τους συστατικών, χωρίς κάποια προηγούμενη επεξεργασία τους πλην της διήθησης, φυγοκέντρωσης ή/και αραίωσης [63]. Στην περίπτωση των στερεών δειγμάτων, πραγματοποιείται συνήθως ξήρανσή τους, στον αέρα, στο φούρνο είτε μέσω της διαδικασίας της λυοφιλοποίησης. Η απομάκρυνση της υγρασίας των στερεών δειγμάτων έχει ως σκοπό τον περιορισμό της ενζυμικής τους δραστηριότητας και, ως εκ τούτου, την προστασία των πολυφαινολικών τους συστατικών. Έχει αποδειχθεί ότι η ξήρανση των δειγμάτων μέσω της διαδικασίας της λυοφιλοποίησης είναι πιο αποδοτική όσον αφορά την προστασία των πολυφαινολικών ενώσεων. Αντίθετα, η έκθεση στη θερμότητα, το φως και το οξυγόνο μπορούν να έχουν αρνητική επίδραση στο φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων [64,65]. Ακολούθως, πραγματοποιείται άλεση του ξηρού δείγματος, προκειμένου να επιτευχθεί μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του προς εκχύλιση υλικού και, συνεπώς, αύξηση της επιφάνειας επαφής μεταξύ του δείγματος και του διαλύτη εκχύλισης στο μετέπειτα στάδιο της εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων [63].

Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ο τελικός στόχος της κάθε χημικής ανάλυσης. Για παράδειγμα, εάν ο σκοπός της μελέτης είναι ο προσδιορισμός του συνόλου των πολυφαινολικών ενώσεων ως άγλυκα συστατικά ή ο προσδιορισμός της πραγματικής πολυφαινολικής σύστασης των δειγμάτων. Ανάλογα, λοιπόν, με το σκοπό της κάθε μελέτης, η επεξεργασία του δείγματος είναι διαφορετική. Στην πρώτη περίπτωση, είναι απαραίτητο ένα στάδιο υδρόλυσης των δειγμάτων με σκοπό την απελευθέρωση των άγλυκων συστατικών, κάτι που δε χρειάζεται φυσικά στη δεύτερη περίπτωση. Αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί η όξινη, η αλκαλική ή η ενζυμική υδρόλυση, η πρώτη βρίσκει μεγαλύτερη εφαρμογή, συνήθως με τη χρήση του υδροχλωρικού οξέος (HCl). Αφού το δείγμα υποστεί

μια κατάλληλη επεξεργασία, είναι πλέον έτοιμο για το επόμενο στάδιο της διαδικασίας, το οποίο περιλαμβάνει την εξαγωγή των αναλυτών στόχων [63].





1.4.1.2. Μέθοδος εκχύλισης

1.4.1.2.1. Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εκχύλισης επιδρά σημαντικά στην όλη διαδικασία της ανάλυσης. Η εκχύλιση υγρού-υγρού (liquid-liquid extraction, LLE) και η εκχύλιση στερεού-υγρού (solid-liquid extraction, SLE) αποτελούν τις απλούστερες και πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές απομόνωσης των πολυφαινολικών ενώσεων από υγρά και στερεά δείγματα, αντίστοιχα [66]. Στην πρώτη περίπτωση, η εκχύλιση στηρίζεται στο διαφορετικό βαθμό διαλυτοποίησης των πολυφαινολικών ενώσεων ανάμεσα σε δύο μη αναμίξιμα υγρά. Αντίθετα, στην SLE, το στερεό δείγμα εμποτίζεται με το διαλύτη εκχύλισης και η εξαγωγή πραγματοποιείται μέσω της σταδιακής διαλυτοποίησης των πολυφαινολικών ενώσεων στο υγρό μέσο. Οι συμβατικές αυτές τεχνικές πραγματοποιούνται υπό ανάδευση, θέρμανση και αναρροή του διαλύτη σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα και ελεγχόμενες θερμοκρασίες [63,66].

Για την εξαγωγή των περιεχόμενων στα χαρούπια πολυφαινολικών ενώσεων, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες συμβατικές τεχνικές εξαγωγής, βασιζόμενες στην SLE. Μεταξύ των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν, η εκχύλιση Soxhlet, η διαβροχή (maceration), η έγχυση (infusion) και η αφέψηση (decoction) [26,60,61,67–69] (Σχήμα 1.8). Η πρώτη, η εκχύλιση Soxhlet, αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων από τα δείγματα χαρουπιού. Στη συγκεκριμένη τεχνική, το προς εκχύλιση δείγμα τοποθετείται σε έναν ειδικό περιέκτη, κατασκευασμένο από διηθητικό χαρτί, και, ακολούθως, τοποθετείται μέσα στο θάλαμο εκχύλισης. Αφού συναρμολογηθεί η διάταξη (Σχήμα 1.8), λαμβάνει χώρα θέρμανση του διαλύτη με χρήση ενός θερμαντικού μέσου. Όταν η θερμοκρασία του διαλύτη φτάσει το σημείο βρασμού του, οι ατμοί του μεταφέρονται μέσω ενός εξωτερικού σωλήνα στο πάνω μέρος του θαλάμου εκχύλισης και, ακολούθως, περνώντας μέσα από τον ψυκτήρα, πραγματοποιείται υγροποίηση των ατμών του διαλύτη. Ο διαλύτης, τελικά, καταλήγει μέσα στο θάλαμο εκχύλισης όπου βρίσκεται το δείγμα. Με τον τρόπο αυτό ο διαλύτης έρχεται σε επαφή με το δείγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση των συστατικών του δείγματος. Όταν η ποσότητα του διαλύτη φτάσει στο σημείο της υπερχειλίσης, λαμβάνει χώρα σιφωνισμός, με αποτέλεσμα όλο το μίγμα του διαλύτη και των εκχυλισθέντων συστατικών να επιστρέφει πίσω στη σφαιρική φιάλη. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, μέχρι την πλήρη εξαγωγή των εκχυλισθέντων ενώσεων

[65]. Στο Σχήμα 1.8 συνοψίζεται η βασική αρχή λειτουργίας της εκχύλισης Soxhlet, καθώς και των λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενων τεχνικών της διαβροχής, έγχυσης και αφέψησης.

	Εκχύλιση Soxhlet	Διαβροχή	Έγχυση	Αφέψηση
Τεχνική εκχύλισης	 <p>Ψυκτήρας Θάλαμος εκχύλισης Σφαιρική φιάλη/Διαλύτης</p>			
Βασική αρχή	Συνεχής επαναροή «καθαρού» διαλύτη στο θάλαμο εκχύλισης όπου βρίσκεται το δείγμα.	Εμβάπτιση του φυτικού υλικού στο διαλύτη εκχύλισης για μεγάλο χρονικό διάστημα (μερικές μέρες), σε κλειστό δοχείο, σε θερμοκρασία δωματίου και με σταθερή ή σποραδική ανάδευση.	Παρόμοια με τη διαβροχή. Η εκχύλιση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ζεστό ή κρύο διαλύτη για ένα μικρότερο χρονικό διάστημα. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται συνήθως το νερό.	Παρόμοια με την έγχυση. Πραγματοποιείται ταυτόχρονος βρασμός του φυτικού υλικού και του διαλύτη εκχύλισης για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα.

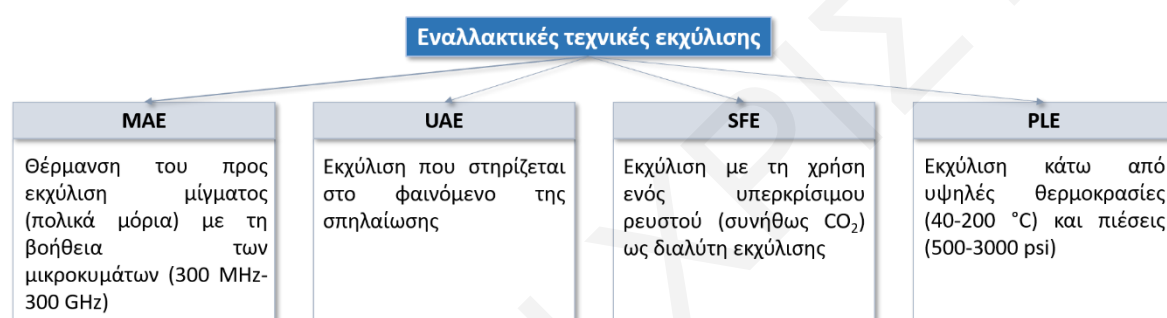
Σχήμα 1.8. Βασική αρχή λειτουργίας των συμβατικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται κατά την εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων στα δείγματα χαρουπιού [70,71].

Παρόλο που οι κλασσικές αυτές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα κατά την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων, είναι συχνά χρονοβόρες, απαιτούν μεγάλες ποσότητες διαλυτών και άλλων αντιδραστηρίων, ενώ, παράλληλα, μπορούν να οδηγήσουν σε αποικοδόμηση των εξεταζόμενων βιοδραστικών ενώσεων εξαιτίας των υψηλών τους θερμοκρασιών και των μεγάλων χρόνων επεξεργασίας τους [3,72]. Ως εκ τούτου, με την πάροδο των χρόνων έχουν αναπτυχθεί ορισμένες νέες, εναλλακτικές και πιο προηγμένες τεχνικές εκχύλισης, για τις οποίες γίνεται αναφορά στη συνέχεια.

1.4.1.2.2. Εναλλακτικές τεχνικές εκχύλισης

Οι εναλλακτικές τεχνικές εκχύλισης αναπτύχθηκαν για την αντιμετώπιση των προβλημάτων των παραδοσιακών τεχνικών που μόλις αναφέρθηκαν. Μεταξύ των εναλλακτικών αυτών τεχνικών, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (microwave-assisted extraction, MAE), η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (ultrasound-assisted extraction, UAE), η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (supercritical fluid extraction, SFE) και η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (pressurized liquid extraction, PLE), βρίσκουν ευρεία εφαρμογή κατά τη μελέτη των πολυφαινολικών ενώσεων [37]. Στο Σχήμα 1.9 παρουσιάζεται μια συνολική σχηματική αναπαράσταση των σύγχρονων αυτών τεχνικών εξαγωγής. Οι σύγχρονες αυτές

τεχνικές φαίνεται να αποτελούν μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση, προσφέροντας τα εξής πλεονεκτήματα έναντι των κλασικών τεχνικών: μικρότερος χρόνος επεξεργασίας των δειγμάτων, μικρότεροι όγκοι διαλυτών, λιγότερα τοξικά απόβλητα, υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης και σημαντικά καλύτερη αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων [73]. Παρόλα αυτά, στις πλείστες περιπτώσεις απαιτείται εξειδικευμένος εξοπλισμός, με το κόστος του να είναι αρκετά υψηλό [71]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι δυνατή η σύζευξη δύο ή και περισσότερων τεχνικών εξαγωγής. Αυτό συμβαίνει στις καταστάσεις στις οποίες μια μεμονωμένη μέθοδος εκχύλισης δε θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματική και για αυτό κρίνεται απαραίτητος ο συνδυασμός τουλάχιστον δύο [73].



Σχήμα 1.9. Οι σύγχρονες τεχνικές εξαγωγής και οι βασικές αρχές λειτουργίας τους.

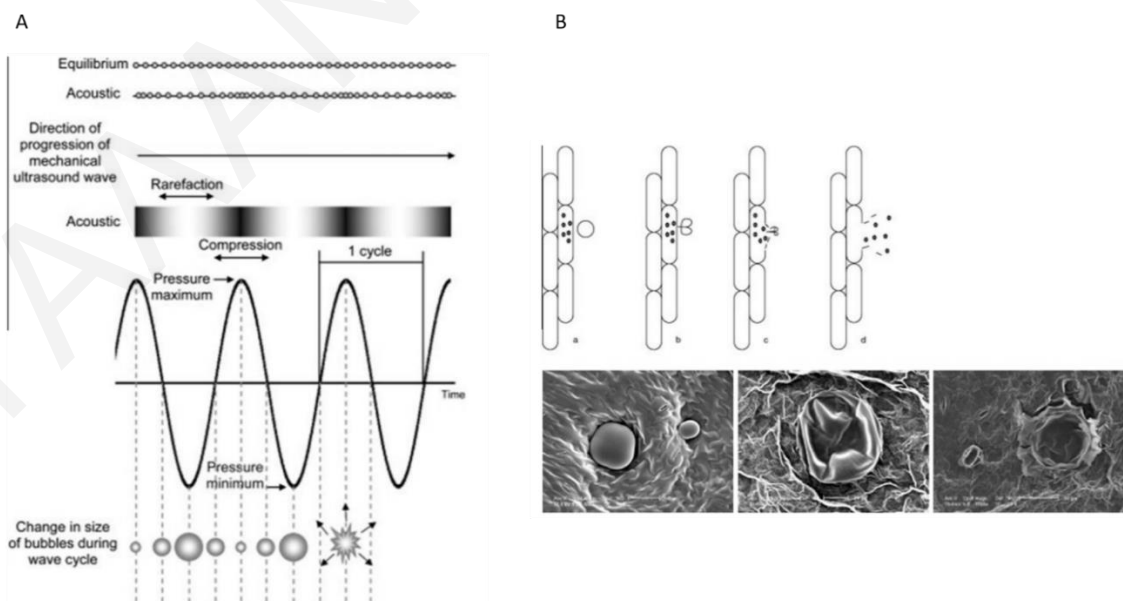
Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει η UAE, η οποία, όπως αποδείχθηκε, μπορεί να προσφέρει έναν απλό, καινοτόμο, οικονομικό, φιλικό προς το περιβάλλον και κυρίως αποτελεσματικό τρόπο εξαγωγής των εν λόγω αντιοξειδωτικών ενώσεων [74,75]. Η αυξημένη της αποτελεσματικότητα μπορεί να αποδοθεί στο φαινόμενο της υπερηχητικά προκαλούμενης σπηλαίωσης (acoustic cavitation) και, κατά συνέπεια, στις επακόλουθες φυσικές, μηχανικές και χημικές της επιδράσεις [76–78].

Η UAE στηρίζεται στη χρήση των υπερηχητικών κυμάτων, συχνότητας 20-100 kHz, για την εξαγωγή των εκχυλισθέντων συστατικών. Κατά τη διάδοση ενός υπερηχητικού κύματος σε ένα υγρό μέσο, λαμβάνει χώρα διαμήκης μετατόπιση (longitudinal displacements) των σωματιδίων του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαδοχή δύο φάσεων εντός του ελαστικού μέσου, της συμπίεσης (compression) και της αραιώσης/επέκτασης (rarefaction). Ως αποτέλεσμα της εναλλασσόμενης μεταβολής της πίεσης στο υγρό μέσο, δημιουργούνται σε αυτό μικροσκοπικές φυσαλίδες αέρα, οι οποίες είναι σε θέση να συστέλλονται και να

διαστέλλονται ως αποτέλεσμα των εναλλασσόμενων κύκλων της συμπίεσης και της επέκτασης. Κατά την επέκταση του μεγέθους τους, πάνω από ένα κρίσιμο σημείο, προκαλείται κατάρρευση των φυσαλίδων, η οποία συνοδεύεται με την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας. Το φαινόμενο της δημιουργίας, επέκτασης και, τελικά, κατάρρευσης των φυσαλίδων αέρα σε ακτινοβολούμενα με υπέρηχους υγρά μέσα είναι γνωστό ως υπερηχητικά προκαλούμενη σπηλαιώση.

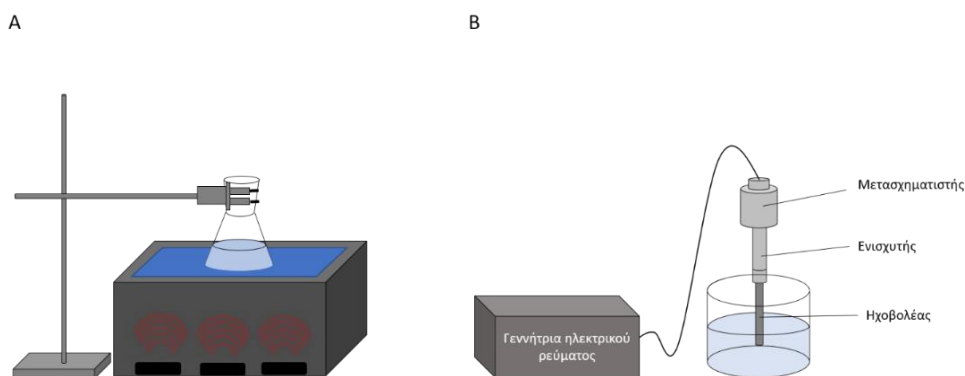
Αυτή η κατάρρευση των φυσαλίδων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ακραίων τοπικών συνθηκών οι οποίες χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, που φτάνουν μέχρι τους 5000 K και τις 50-1000 atm, αντίστοιχα. Τα θερμά αυτά σημεία (hot-spots) είναι σε θέση να προκαλέσουν αύξηση της χημικής δραστηριότητας του μέσου. Οι υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις που δημιουργούνται κατά την κατάρρευση των φυσαλίδων σπηλαιώσης κοντά στις στερεές επιφάνειες έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικροπιδάκων (microjets) και κυμάτων κρούσης (shock waves), τα οποία κατευθυνόμενα προς το φυτικό υλικό μπορούν να προκαλέσουν τη διάρρηξη του κυτταρικού του τοιχώματος, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών του συστατικών. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας, προσφέροντας υψηλότερες αποδόσεις σε σημαντικά μειωμένους χρόνους επεξεργασίας [78,79]. Στο Σχήμα 1.10 απεικονίζεται η διαδικασία που μόλις περιγράφηκε. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η τεχνική αυτή δεν απαιτεί τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών και για το λόγο αυτό θεωρείται κατάλληλη για την ανάκτηση των θερμικά ευαίσθητων συστατικών [37].



Σχήμα 1.10. (Α) Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της σπηλαιώσης και (Β) διάρρηξη κυτταρικού τοιχώματος και απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών συστατικών δειγμάτων βασιλικού [80].

Η εφαρμογή των υπερήχων στο υπό εκχύλιση μίγμα μπορεί να γίνει άμεσα μέσω της χρήσης ενός ηχοβολέα υπερήχων (ultrasonic probe), ή έμμεσα μέσω της χρήσης ενός λουτρού υπερήχων (ultrasonic bath) (Σχήμα 1.11). Η απευθείας εφαρμογή των υπερήχων στο μίγμα της εκχύλισης είναι πιο αποδοτική, καθώς επιτρέπει την ελεύθερη διάδοση των υπερήχων μέσα στο υγρό μέσο χωρίς καμιά παρεμπόδιση πέρα από αυτήν που προκαλείται από το ίδιο το μέσο. Αντίθετα, η βύθιση του περιέκτη του προϊόντος μέσα στο λουτρό υπερήχων, υστερεί σε απόδοση, αφού το υπερηχητικό κύμα θα πρέπει πρώτα να διασχίσει το υγρό που περιέχεται μέσα στη συσκευή υπερήχων (συνήθως νερό) και έπειτα το τοίχωμα του περιέκτη. Όταν, πλέον, φτάσει στο δείγμα, η ένταση του είναι αρκετά μειωμένη. Συγκεκριμένα, η ισχύς των υπερηχητικών κυμάτων, στην περίπτωση της άμεσης εφαρμογής, φάνηκε να είναι 100 φορές μεγαλύτερη από αυτήν της έμμεσης μεθόδου, με το χρόνο εκχύλισης της πρώτης να μην ξεπερνά τα 20 λεπτά. Πέραν από τη μειωμένη της ισχύ, η εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων εμφανίζει ανομοιογενή κατανομή της έντασης των υπερήχων κατά μήκος της συσκευής και, ως εκ τούτου, μειωμένη αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται, κυρίως σε βιομηχανική κλίμακα, εξαιτίας του χαμηλού της κόστους καθώς και της δυνατότητάς της για ταυτόχρονη εκχύλιση πολλών δειγμάτων [79,80].

Ο ηχοβολέας υπερήχων (ultrasonic probe) αποτελεί ένα πανίσχυρο εργαλείο για τη διεξαγωγή της UAE. Ένα τυπικό σύστημα άμεσης εκπομπής υπερήχων αποτελείται από: (1) μία γεννήτρια που μετατρέπει την τάση σε ηλεκτρική ενέργεια υψηλής συχνότητας (ultrasound generator), (2) ένα μετασχηματιστή, ο οποίος μετατρέπει την ηλεκτρική ενέργεια σε μηχανικές ταλαντώσεις (δονήσεις) σταθερής συχνότητας (transducer), (3) έναν ενισχυτή που αυξάνει το πλάτος ταλάντωσης των υπερήχων (amplifier) και (4) τον ηχοβολέα για την εκπομπή των υπερηχητικών κυμάτων εντός του δείγματος (probe). Σημαντικό πλεονέκτημα της εν λόγω τεχνικής αποτελεί ο μειωμένος χρόνος επεξεργασίας της.



Σχήμα 1.11. (Α) Λουτρό υπερήχων και (Β) ηχοβολέας υπερήχων.

Όσον αφορά την εφαρμογή της UAE σε δείγματα χαρουπιών, έχουν δημοσιευθεί ορισμένες μελέτες στις οποίες επιχειρήθηκε ο χαρακτηρισμός του φαινολικού περιεχομένου εκχύλισμάτων που προέκυψαν υπό την επίδραση των υπερήχων. Ωστόσο, σε πολύ λίγες περιπτώσεις επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών εξαγωγής της μεθόδου και σύγκρισή της με άλλες κλασσικές τεχνικές εξαγωγής [17,31,62,81,82].

Παράγοντες που επιδρούν στην απόδοση της UAE

Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της UAE, συμπεριλαμβανομένων των παραμέτρων λειτουργίας της μεθόδου, των παραμέτρων του μέσου εκχύλισης, καθώς και εκείνων που σχετίζονται με τη μήτρα του δείγματος. Η συχνότητα, η ισχύς και το πλάτος των υπερηχητικών κυμάτων αποτελούν τις σημαντικότερες παραμέτρους λειτουργίας της μεθόδου. Κατά την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων, έχουν αναφερθεί τιμές ισχύος και συχνότητας υπερήχων στο εύρος 50-400 W και 20-60 kHz, αντίστοιχα. Επίσης, έχει αναφερθεί η εκχύλιση με τη χρήση της συνεχούς (continuous ultrasound-assisted extraction, CUAE) και της παλμικής λειτουργίας (pulsed ultrasound-assisted extraction, PUAE).

Εξίσου σημαντική επίδραση στην απόδοση της UAE φαίνεται να έχει η θερμοκρασία, ο χρόνος και ο διαλύτης της εκχύλισης. Στις περισσότερες περιπτώσεις λαμβάνεται υπόψη ο έλεγχος της θερμοκρασίας και η διατήρησή της σε χαμηλά επίπεδα (25-65 °C), δεδομένου ότι αυτή αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου και οι υπερβολικά ψηλές τιμές της μπορούν να οδηγήσουν σε αποσύνθεση των ευαίσθητων πολυφαινολικών συστατικών. Οι χρόνοι εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται στο εύρος 5-35 min και είναι σημαντικά μικρότεροι από εκείνους που αναφέρθηκαν κατά την εφαρμογή των κλασσικών τεχνικών εξαγωγής. Όσον αφορά τους διαλύτες εκχύλισης, η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη και το νερό βρίσκουν ευρεία εφαρμογή κατά την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων. Τα υδατικά διαλύματα της μεθανόλης, αιθανόλης και ακετόνης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικότερα για την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων. Τέλος, η μήτρα του δείγματος φαίνεται να διαδραματίζει ένα εξίσου σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της εκχύλισης. Συγκεκριμένα, αφού επιλεγεί το κατάλληλο μέγεθος των σωματιδίων του προς εκχύλιση υλικού, θα πρέπει να αναμειχθεί με το διαλύτη εκχύλισης σε μια τέτοια αναλογία που να επιτρέπει την αποδοτική εξαγωγή των πολυφαινολικών συστατικών. Συνήθως, χρησιμοποιούνται αναλογίες στερεού-διαλύτη που βρίσκονται κοντά στο λόγο 1:20 [65,73,79]. Η βελτιστοποίηση όλων των πιο πάνω παραμέτρων κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η απόδοση της διαδικασίας εκχύλισης και να επιτευχθεί ακριβής ανάλυση των πολυφαινολικών συστατικών.

1.4.1.2.3. Βελτιστοποίηση μεθόδου εκχύλισης

Ο όρος βελτιστοποίηση αναφέρεται στη βελτίωση της απόδοσης ενός συστήματος, μιας διαδικασίας ή ενός προϊόντος, με σκοπό την επίτευξη του καλύτερου δυνατού αποτελέσματος. Ο όρος αυτός έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στον τομέα της αναλυτικής χημείας, κυρίως κατά τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών διεξαγωγής μιας αναλυτικής μεθόδου [83].

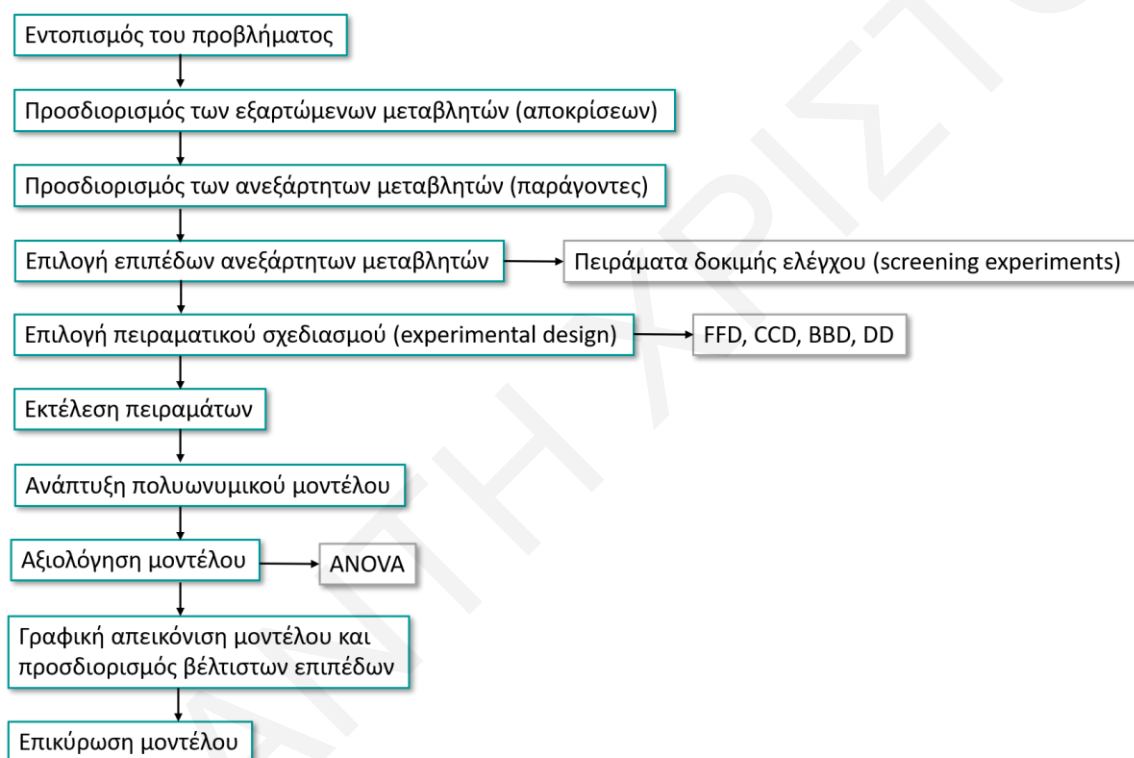
Οι κλασσικές μελέτες βελτιστοποίησης στηρίζονται στη μονοπαραγοντική προσέγγιση (single factor approach), κατά την οποία μεταβάλλεται μόνο ένας παράγοντας κάθε φορά, ενώ όλοι οι υπόλοιποι παραμένουν σταθεροί (one-variable-at-a-time). Ουσιαστικά, με την εν λόγω προσέγγιση μελετάται η επίδραση του κάθε παράγοντα ξεχωριστά στην πειραματική απόκριση. Αν και δημοφιλής, η μέθοδος αυτή θεωρείται χρονοβόρα και υψηλού κόστους, αφού απαιτεί τη διεξαγωγή ενός μεγάλου αριθμού πειραματικών δοκιμών. Το σημαντικότερο της όμως μειονέκτημα έγκειται στο γεγονός ότι δε λαμβάνει υπόψη τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπό μελέτη μεταβλητών, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να περιγράψει επαρκώς την πραγματική σχέση μεταξύ της πειραματικής απόκρισης και των υπό εξέταση παραγόντων. Αντίθετα, μπορεί πολλές φορές να οδηγήσει σε παραπλανητικά αποτελέσματα και εσφαλμένα συμπεράσματα [83,84].

Τις τελευταίες δεκαετίες, γίνεται χρήση πολυμεταβλητών στατιστικών τεχνικών (multivariate statistic techniques), με τη μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (response surface methodology, RSM) να αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο βελτιστοποίησης. Βασικό της γνώρισμα, η μελέτη της επίδρασης, τόσο των ανεξάρτητων μεταβλητών, όσο και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων [85]. Στην πραγματικότητα, πρόκειται για μια συλλογή μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών που βασίζονται στην προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε μια πολυωνυμική συνάρτηση, η οποία, με τη σειρά της, θα πρέπει να μπορεί να περιγράψει τη συμπεριφορά του συνόλου των δεδομένων και να κάνει στατιστικές προβλέψεις. Στόχος αυτού αποτελεί η ταυτόχρονη βελτιστοποίηση όλων των υπό εξέταση μεταβλητών [83].

Η μέθοδος αυτή προτάθηκε από τον Box και τους συνεργάτες του, στις αρχές της δεκαετίας του 50, προκειμένου να ξεπεραστούν οι αδυναμίες των τότε χρησιμοποιούμενων παραδοσιακών τεχνικών βελτιστοποίησης [86]. Σε σχέση με τις κλασσικές τεχνικές, η RSM μπορεί να προσφέρει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, λαμβάνοντας υπόψη τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπό εξέταση μεταβλητών. Επιτρέπει τη μαθηματική μοντελοποίηση του υπό διερεύνηση συστήματος, μειώνοντας, ταυτόχρονα, τον αριθμό των

πειραματικών δοκιμών και, συνεπώς, το χρόνο και το κόστος της διαδικασίας της βελτιστοποίησης [87]. Ο όρος «μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης» προέκυψε από τη γραφική απεικόνιση των μαθηματικών μοντέλων προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων. Σήμερα έχει υιοθετηθεί πλήρως από τα κείμενα της χημειομετρίας [83].

Η RSM βρίσκει σήμερα ευρεία εφαρμογή στις μελέτες βελτιστοποίησης των συνθηκών εκχύλισης. Στο Σχήμα 1.12 συνοψίζονται τα κύρια στάδια που ακολουθούνται κατά την εφαρμογή της μεθόδου. Στη συνέχεια, εξετάζεται το κάθε στάδιο ξεχωριστά.



Σχήμα 1.12. Βασικά στάδια RSM.

Αφού εντοπιστεί το αναλυτικό πρόβλημα και προσδιοριστεί η υπό εξέταση πειραματική απόκριση (εξαρτώμενη μεταβλητή), λαμβάνει χώρα επιλογή των ανεξάρτητων μεταβλητών (παραγόντων) καθώς και των αντίστοιχων επιπέδων τους. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται οι πειραματικές μεταβλητές οι οποίες μπορούν να μεταβληθούν ανεξάρτητα η μία από την άλλη (π.χ. θερμοκρασία, pH, χρόνος κτλ.). Αντίθετα, οι εξαρτώμενες μεταβλητές αποτελούν τις μετρούμενες τιμές των πειραματικών δοκιμών (αναλυτικό σήμα). Όσον αφορά τις ανεξάρτητες μεταβλητές, θα πρέπει να αντιπροσωπεύουν τους σημαντικότερους

παράγοντες του υπό μελέτη συστήματος. Για τη σωστή τους επιλογή, πραγματοποιείται, συνήθως, μια δοκιμή ελέγχου κρίσιμων παραγόντων [83,88].

Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση ενός συστήματος και είναι πρακτικά αδύνατο να εντοπιστούν και να ελεγχθούν οι μικρές συνεισφορές από τον κάθε ένα. Επομένως, για πρακτικούς λόγους, επιλέγονται οι παράγοντες εκείνοι που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη επίδραση στην πειραματική απόκριση. Για τον προσδιορισμό των κρίσιμων αυτών για τη διαδικασία μεταβλητών πραγματοποιείται μια δοκιμή ελέγχου (screening design), συνήθως, με τη χρήση ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού δύο επιπέδων (2^k full factorial design) [89].

Οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί περιλαμβάνουν πειράματα με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των επιπέδων των υπό εξέταση παραγόντων. Στην περίπτωση των 2^k παραγοντικών σχεδιασμών, για κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή επιλέγονται δύο επίπεδα, ένα χαμηλό (-1) και ένα υψηλό (+1), και πραγματοποιούνται συνολικά 2^k πειραματικές δοκιμές, όπου k ο συνολικός αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι απαιτούμενες επαναλήψεις [90]. Δεδομένου ότι ο κάθε εξεταζόμενος παράγοντας έχει τις δικές του μονάδες μέτρησης και το δικό του εύρος εργασίας, είναι απαραίτητη η κανονικοποίηση (normalizing) των επιπέδων των μεταβλητών πριν την οποιαδήποτε διεργασία ανάλυσης [89]. Για την κωδικοποίηση των επιπέδων των μεταβλητών, χρησιμοποιείται η ακόλουθη μαθηματική σχέση:

$$X = \frac{x - [x_{\max} + x_{\min}]/2}{[x_{\max} - x_{\min}]/2} \quad \text{Εξίσωση 1.4.}$$

όπου x : η φυσική μεταβλητή, X : η κωδικοποιημένη μεταβλητή, και x_{\max} και x_{\min} : η μέγιστη και ελάχιστη τιμή της φυσικής μεταβλητής.

Οι 2^k πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί στηρίζονται στην παραδοχή ότι η μετρούμενη πειραματική απόκριση είναι γραμμική συνάρτηση των εξεταζόμενων μεταβλητών, με τα πειραματικά αποτελέσματα να προσαρμόζονται στην πιο κάτω μαθηματική εξίσωση:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad \text{Εξίσωση 1.5.}$$

όπου k : ο αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών, β_0 : σταθερά, β_i : οι συντελεστές των γραμμικών παραμέτρων, x_i : οι ανεξάρτητες μεταβλητές, ε : το σφάλμα (residual), η διαφορά μεταξύ της υπολογιζόμενης και πειραματικής απόκρισης [83,91].

Με στατιστική ανάλυση του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης που προκύπτει προσδιορίζονται οι σημαντικότερες για τη διαδικασία ανεξάρτητες μεταβλητές, οι οποίες χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο της RSM.

Αφού προσδιοριστούν οι κρίσιμες για τη διαδικασία μεταβλητές και οριοθετηθεί η εξεταζόμενη πειραματική περιοχή, ακολουθεί η επιλογή του κατάλληλου πειραματικού σχεδιασμού και, στη συνέχεια, η εκτέλεση των πειραμάτων. Μεταξύ των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων πειραματικών σχεδιασμών είναι ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (full factorial design, FFD), ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (central composite design, CCD), ο σχεδιασμός Box-Behnken (Box-Behnken design, BBD) και ο σχεδιασμός Doehlert (Doehlert design, DD) [88].

Σε αυτό το στάδιο, ο πειραματικός σχεδιασμός θα πρέπει να διασφαλίζει πως για κάθε παράγοντα επιλέγονται τουλάχιστον τρία επίπεδα. Στην περίπτωση του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού, η χρήση του περιορίζεται στην εφαρμογή των 3^2 παραγοντικών σχεδίων (δύο παράγοντες και τρία επίπεδα), αφού σε διαφορετική περίπτωση ο όγκος των απαιτούμενων πειραματικών δοκιμών είναι τεράστιος, με αποτέλεσμα τη μη αποδοτική μοντελοποίηση του υπό μελέτη συστήματος [83].

Ακολούθως, λαμβάνοντας υπόψη πως τα γραμμικά μοντέλα (Εξίσωση 1.5) δεν είναι κατάλληλα για την εκτίμηση της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων, τα πειραματικά αποτελέσματα προσαρμόζονται σε πολυωνμικά μοντέλα δευτέρας τάξεως, σύμφωνα με τη σχέση:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Εξίσωση 1.6.}$$

όπου β_0 : σταθερά, β_i : οι συντελεστές των γραμμικών παραμέτρων, x : οι ανεξάρτητες μεταβλητές, β_{ii} : οι συντελεστές των τετραγωνικών παραμέτρων, β_{ij} : οι συντελεστές των παραμέτρων αλληλεπίδρασης και ε : το σφάλμα (residual), η διαφορά μεταξύ της υπολογιζόμενης και της πειραματικής απόκρισης [83,92].

Για την επίλυση του συστήματος εξισώσεων που δίνεται παραπάνω, χρησιμοποιείται η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, μέσω της πολλαπλής ανάλυσης παλινδρόμησης, όπου και προσδιορίζονται οι συντελεστές του πολυωνμικού μοντέλου. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μοντελοποίηση του συστήματος, δηλαδή η λήψη της μαθηματικής εξίσωσης που περιγράφει την εμπειρική σχέση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και της εξαρτώμενης μεταβλητής [89].

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την αξιολόγηση της αξιοπιστίας του μαθηματικού μοντέλου. Συγκεκριμένα, μέσω της ανάλυσης διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA), επιτυγχάνεται η εύρεση των σημαντικών παραμέτρων των εν λόγω τετραγωνικών μοντέλων, καθώς και η αξιολόγηση της ποιότητας των μοντέλων αυτών. Κεντρική ιδέα της ANOVA, είναι η σύγκριση της μεταβλητότητας που προέρχεται από την αλλαγή του επιπέδου του ελεγχόμενου παράγοντα με αυτή που προκύπτει από καθαρά τυχαία σφάλματα κατά τη μέτρηση της πειραματικής τιμής, με απώτερο σκοπό την εύρεση των στατιστικά σημαντικών επιδράσεων. Οι τιμές F και p (F- και p-values), ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού (adjusted R^2) και ο συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV) αποτελούν τις πιο συχνά εξεταζόμενες παραμέτρους κατά τον έλεγχο της αξιοπιστίας και ακρίβειας των προσδιοριζόμενων μαθηματικών μοντέλων [83,88].

Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα γραφική απεικόνιση του μαθηματικού μοντέλου και εύρεση των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας του συστήματος. Η γραφική αναπαράσταση της μαθηματικής εξίσωσης επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης των τρισδιάστατων επιφανειών απόκρισης (response surface plots) και, λιγότερο συχνά, μέσω των δισδιάστατων ισομετρικών διαγραμμάτων (contour plots). Μέσω των διαγραμμάτων επιφανειών απόκρισης επιτυγχάνεται η τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και της αντίστοιχης πειραματικής απόκρισης, ενώ, αντίθετα, μέσω των ισομετρικών διαγραμμάτων η σχέση αυτή απεικονίζεται σε δύο μόνο διαστάσεις. Η δισδιάστατη αυτή απεικόνιση των επιφανειακών διαγραμμάτων επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης γραμμών σταθερής απόκρισης, οι οποίες προβάλλονται ως προς το επίπεδο των ανεξάρτητων μεταβλητών [89].

Για την εύρεση των συντεταγμένων των κρίσιμων σημείων (μέγιστο, ελάχιστο ή σαγματικό (saddle) σημείο) ενός τετραγωνικού μοντέλου σαν και αυτό της Εξίσωσης 1.7, λαμβάνεται η πρώτη παράγωγος της μαθηματικής συνάρτησης η οποία και ορίζεται ίση με το μηδέν (Εξίσωση 1.8-1.9) [83].

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad \text{Εξίσωση 1.7.}$$

$$\frac{dy}{dx_1} = \beta_1 + 2\beta_{11} x_1 + \beta_{12} x_2 = 0 \quad \text{Εξίσωση 1.8.}$$

$$\frac{dy}{dx_2} = \beta_2 + 2\beta_{22} x_2 + \beta_{12} x_1 = 0 \quad \text{Εξίσωση 1.9.}$$

Μέσω της επίλυσης του πιο πάνω συστήματος πρώτης τάξεως, επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός των συντεταγμένων των κρίσιμων αυτών σημείων [89]. Για να εξακριβωθεί

αν αυτά αντιπροσωπεύουν ελάχιστα, μέγιστα ή σαγματικά σημεία, θα πρέπει να εξεταστεί το αντίστοιχο διάγραμμα της αποκριτικής επιφάνειας. Στην περίπτωση που αποτελεί μέγιστο σημείο, τότε αυτό υποδεικνύει και τα βέλτιστα επίπεδα των εξεταζόμενων παραγόντων. Στην περίπτωση που εξετάζονται περισσότερες από μια εξαρτώμενες μεταβλητές, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η συνάρτηση επιθυμητότητας (desirability function) προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες της διεργασίας [88].

Στο τέλος της όλης διαδικασίας, λαμβάνει χώρα πειραματική επαλήθευση της αξιοπιστίας του μοντέλου. Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά για το σκοπό αυτό στηρίζεται στον προσδιορισμό του σφάλματος μεταξύ των πειραματικών και θεωρητικών τιμών. Πραγματοποιείται, δηλαδή, σύγκριση των τιμών που λαμβάνονται πειραματικά, κάτω από τις προσδιορισθέντες βέλτιστες συνθήκες, με εκείνες που προβλέπονται θεωρητικά από το ίδιο το μοντέλο. Η μικρή απόκλιση μεταξύ των πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών υποδηλώνει την πολύ καλή προβλεψιμότητα του μοντέλου επιφανειών απόκρισης και την αξιοπιστία του όσον αφορά τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών [87].

1.4.1.3. Καθαρισμός εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα των πολυφαινολικών ενώσεων από τα φυτικά προϊόντα μπορεί να περιέχουν και διάφορους άλλους τύπους ενώσεων, πέραν των πολυφαινολών, όπως για παράδειγμα τα σάκχαρα, τα οργανικά οξέα, τα λίπη, τα αλκαλοειδή, τα τερπενοειδή, τα κεριά και διάφορες άλλες χρωστικές. Η παρουσία των εν λόγω συστατικών στα εκχυλίσματα μπορεί να παρεμποδίσει την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η απομάκρυνσή τους, πριν από τη φασματοφωτομετρική, χρωματογραφική ή ηλεκτροφορητική ανάλυση των εκχυλισμάτων [37]. Για το σκοπό αυτό, μετά την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων λαμβάνει χώρα ένας περαιτέρω καθαρισμός των εκχυλισμάτων, συνήθως με χρήση της LLE ή της εκχύλισης στερεάς φάσης (solid-phase extraction, SPE) [63].

Παρόλο που η LLE επιτρέπει τη διαχείριση μεγάλων όγκων δειγμάτων, η απαίτησή της για μεγάλους όγκους διαλυτών, οι μεγάλοι χρόνοι επεξεργασίας της και η πιθανότητα επιμόλυνσης των δειγμάτων, περιορίζουν σε μεγάλο βαθμό την εφαρμογή της [37]. Αντίθετα, η SPE αποτελεί μια πιο γρήγορη, απλή και οικονομική εναλλακτική λύση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον καθαρισμό, όσο και για την προσυγκέντρωση των πολυφαινολικών συστατικών. Στην περίπτωση των υγρών δειγμάτων, η SPE συναντάται κυρίως ως μέσο εκχύλισης παρά ως μέσο καθαρισμού των εκχυλισμάτων [66]. Όσον αφορά τον καθαρισμό των πολυφαινολικών ενώσεων, έχει αναφερθεί η χρήση διαφόρων

προσροφητικών υλικών, με τα φυσίγγια C₁₈ να βρίσκουν και τη μεγαλύτερη εφαρμογή [65]. Η ανάπτυξη των πολυμερικών προσροφητικών, όπως για παράδειγμα του HLB (πολυμερές διβινυλοβενζολίου και Ν-βινυλοπυρρολιδόνης), έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες, με τα εν λόγω προσροφητικά υλικά να αποδεικνύονται, σε αρκετές περιπτώσεις, πιο αποτελεσματικά [37]. Πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στα φυσίγγια SPE, είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του προσροφητικού τους υλικού, η οποία επιτυγχάνεται συνήθως με διαβίβαση ποσότητας μεθανόλης, νερού ή μίγματος των δύο. Μετά την εισαγωγή των δειγμάτων, ακολουθεί απομάκρυνση των ανεπιθύμητων τους συστατικών (π.χ. σάκχαρα) μέσω της έκπλυσης των φυσιγγίων με νερό, συνήθως οξινισμένο με υδροχλωρικό οξύ [66]. Για την έκλυση των πολυφαινολικών συστατικών από τα φυσίγγια χρησιμοποιείται ένας κατάλληλος διαλύτης, ο οποίος και καθορίζεται από το είδος του προσροφητικού υλικού [63].

1.4.2. Ανάλυση

Διάφορες αναλυτικές μέθοδοι έχουν, μέχρι στιγμής, προταθεί για το χαρακτηρισμό της φαινολικής σύνθεσης των εκχυλισμάτων των χαρουπιών, καθώς και των παράγωγων προϊόντων τους. Συγκεκριμένα, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες φασματοφωτομετρικές μέθοδοι για την εκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, καθώς και χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές τεχνικές για την ακριβέστερη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μεμονωμένων πολυφαινολικών συστατικών [3]. Στη συνέχεια, αναφέρονται περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την εφαρμογή των εν λόγω τεχνικών κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων. Οι βασικές αρχές που διέπουν την κάθε μέθοδο, ξεχωριστά, διατυπώνονται στο Κεφάλαιο 2.

1.4.2.1. Φασματοφωτομετρικές τεχνικές

Οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων. Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν την ταχεία αξιολόγηση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, μέσω της αναγνώρισης των διαφορετικών δομικών μονάδων των πολυφαινολικών τους συστατικών [37]. Διάφορες φασματοφωτομετρικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων χαρουπιού, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu να αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη αναλυτική δοκιμή. Η τεχνική αυτή βρίσκει ευρεία εφαρμογή κατά την εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (total phenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων. Πέραν από το TPC των εκχυλισμάτων χαρουπιού, έχει επίσης προσδιοριστεί το ολικό τους περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (total flavonoid content,

TFC) με τη χρήση της μεθόδου του χλωριούχου αργιλίου (aluminium chloride, AlCl_3). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί η χρήση του αντιδραστηρίου της 4-διμεθυλαμινοκινναμωμικής αλδεΐδης (dimethylaminocinnamaldehyde, DMAC) και της βανιλίνης για το χαρακτηρισμό του ολικού τους περιεχομένου σε προανθοκυανιδίνες (total proanthocyanidin content, TPaC). Όσον αφορά το περιεχόμενό τους σε υδρολύμενες ταννίνες (total hydrolysable tannin content, TTC), αυτές προσδιορίστηκαν με εφαρμογή των μεθόδων του νιτρώδους νατρίου (NaNO_2) και της ροδανίνης [3].

Παρόλο που οι φωτομετρικές αυτές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των χαρουπιών, οι τεχνικές αυτές στερούνται της εξειδίκευσης για τον προσδιορισμό των επιμέρους πολυφαινολικών συστατικών και, συχνά, οδηγούν σε υπερεκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου [25,64]. Παρόλα αυτά, παρέχουν ένα απλό, γρήγορο και οικονομικό μέσο ανάλυσης των πολυφαινολικών ενώσεων και είναι ιδανικές στις περιπτώσεις ελέγχου πολυάριθμων δειγμάτων [93].

Οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, τόσο για την εκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου των υπό εξέταση δειγμάτων, όσο και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας [37]. Μια συνήθης πρακτική που ακολουθείται στηρίζεται στην εύρεση μιας πιθανής συσχέτισης μεταξύ του φαινολικού περιεχομένου των υπό εξέταση εκχυλισμάτων και της αντίστοιχης αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων χαρουπιού έχει αξιολογηθεί κυρίως έναντι της ρίζας του 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζυλίου (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) και της κατιονικής ρίζας του 2,2'-αζινο-δις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, $\text{ABTS}^{\bullet+}$) [3]. Ωστόσο, η παρούσα έρευνα περιορίζεται στον προσδιορισμό του TPC των εκχυλισμάτων χαρουπιού με χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu, για αυτό και δε θεωρείται αναγκαία η περαιτέρω αναφορά σε οποιαδήποτε άλλη φασματοφωτομετρική μέθοδο ανάλυσης.

1.4.2.2. Χρωματογραφικές τεχνικές

Η χρήση των προηγμένων αναλυτικών τεχνικών επέτρεψε την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των επιμέρους πολυφαινολικών συστατικών. Μεταξύ των τεχνικών αυτών, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high-performance liquid chromatography, HPLC) αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων [47]. Η σχετικά πρόσφατη εξέλιξη στην οργανολογία της, η οποία επέτρεψε τη χρήση υλικών πλήρωσης μεγέθους σωματιδίων μικρότερου των 2 μm και υψηλότερων πιέσεων (μέχρι και 15000 psi), είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του

χρόνου ανάλυσης και την επίτευξη αποδοτικότερων διαχωρισμών [94]. Συγκεκριμένα, η υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης (ultra-high-performance liquid chromatography, UHPLC) επέτρεψε την επίτευξη 5- έως 10-φορές ταχύτερων διαχωρισμών σε σχέση με τη συμβατική υγροχρωματογραφία, διατηρώντας σταθερή ή ακόμα και αυξάνοντας τη διαχωριστική ικανότητα [47].

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των πολυφαινολικών ενώσεων εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων όπως για παράδειγμα η πολικότητα των ενώσεων και ο βαθμός πολυμερισμού τους. Στην πραγματικότητα, για κάθε κατηγορία ενώσεων θα πρέπει να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού τους, μέσω της επιλογής της κατάλληλης στατικής και κινητής φάσης καθώς και του κατάλληλου συστήματος έκλουσης των διαλυτών [37]. Ως επί το πλείστον ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των πολυφαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται σε στήλες αντίστροφης φάσης (κυρίως C₁₈ και C₈, μήκους: 100-300 mm και εσωτερικής διαμέτρου: 2-4.6 mm), με τη σειρά έκλουσης των πολυφαινολικών ενώσεων να καθορίζεται από την πολικότητα των αναλυτών [63,94,95]. Ο διαλύτης έκλουσης περιλαμβάνει συνήθως μια υδατική και μια λιγότερο πολική οργανική φάση (κυρίως μεθανόλη και ακετονιτρίλιο), στις οποίες γίνεται προσθήκη κάποιου οξέος με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα το φορμικό, το οξικό και το φωσφορικό οξύ (0.05-0.5% v/v). Η οξίνιση της κινητής φάσης (pH 2-4) είναι απαραίτητη για την καταστολή του ιονισμού των φαινολικών υδροξυλομάδων και, κατ' επέκταση, τη λήψη αποδοτικότερων κορυφών (πιο οξείες κορυφές με λιγότερο tailing) [37,47,93]. Ο διαχωρισμός των πολυφαινολικών επιτυγχάνεται συνήθως μέσω της βαθμιδωτής έκλουσης της κινητής φάσης, ξεκινώντας από ένα καθαρά υδατικό σύστημα και αυξάνοντας, στη συνέχεια, σταδιακά τη συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη, με μια ταχύτητα ροής στο εύρος 0.3-1.6 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή και συνήθως κοντά στη θερμοκρασία δωματίου, αν και πρόσφατα έχει αναφερθεί η χρήση υψηλότερων τιμών της (μέχρι 40-50 °C). Όσον αφορά τον όγκο έγχυσης του δείγματος, αυτός βρέθηκε να κυμαίνεται από 1 μέχρι 100 μL, ανάλογα με το είδος και τις διαστάσεις της αναλυτικής στήλης [37,96].

Ακολουθώντας, για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των διαχωριζόμενων αναλυτών, πραγματοποιείται σύζευξη του συστήματος HPLC με έναν κατάλληλο ανιχνευτή. Κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων έχει αναφερθεί η χρήση των ανιχνευτών υπεριώδους/ορατού (ultraviolet/visible, UV/Vis), φθορισμού (fluorescence detector, FD), των ηλεκτροχημικών ανιχνευτών (electrochemical detectors, ECD) καθώς και της φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry, MS) [37,96]. Μεταξύ αυτών, ο ανιχνευτής UV/Vis και η MS αποτελούν, με διαφορά, τις μεθόδους επιλογής κατά την ανάλυση των

πολυφαινολικών ενώσεων [64,97]. Η μεγάλη ποικιλία στις χημικές δομές των πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες μπορεί να κυμαίνονται από απλά φαινορικά οξέα μέχρι σύνθετα πολυμερή (π.χ. ταννίνες), καθώς και οι εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στις οποίες μπορούν να απαντηθούν στις μήτρες των φυτικών προϊόντων, καθιστούν τη σύζευξη της HPLC με τη MS (HPLC-MS) καθώς και τη διαδοχική φασματομετρία μάζας (tandem mass spectrometry, MS/MS, HPLC-MS/MS) την πιο κατάλληλη προσέγγιση για το δομικό χαρακτηρισμό και τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων. Η MS και η MS/MS χαρακτηρίζονται από μεγάλη εκλεκτικότητα και μπορούν να παρέχουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την ταυτότητα και τα δομικά χαρακτηριστικά των διαχωριζόμενων αναλυτών [98].

Τα τελευταία χρόνια, η φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (high resolution mass spectrometry, HRMS), έχει γίνει ευρέως αποδεκτή ως μια εξαιρετικά ευαίσθητη και εκλεκτική τεχνική ανίχνευσης και έχει, μέχρι στιγμής, χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό της φαινολικής σύνθεσης διαφόρων προϊόντων [47,99]. Η HPLC-HRMS έχει αποδείξει την εξαιρετική αναλυτική της απόδοση, παρέχοντας πιο ολοκληρωμένες πληροφορίες σχετικά με την ακριβή μοριακή μάζα, τη στοιχειακή σύνθεση και τη λεπτομερή μοριακή δομή μιας δεδομένης ένωσης και, ταυτόχρονα, επιτρέποντας στοχευμένους και μη στοχευμένους τρόπους ανάλυσης [47,100,101].

Πρόσφατα έχει προταθεί η χρήση της υγροχρωματογραφίας δύο διαστάσεων (HPLC-2D) για την ανάλυση των πολύπλοκων δειγμάτων. Η HPLC-2D αποτελεί ένα πανίσχυρο αναλυτικό εργαλείο το οποίο στηρίζεται στη χρήση δύο διαφορετικών χρωματογραφικών στηλών. Συγκεκριμένα, τα συστατικά που εκλύονται από την πρώτη διάσταση (στήλη) υποβάλλονται σε ένα δεύτερο χρωματογραφικό διαχωρισμό, σε μια δεύτερη στήλη (διάσταση), με σκοπό την περαιτέρω βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας και την αύξηση της εκλεκτικότητας του διαχωρισμού. Συνήθως, συνδυάζονται δύο αναλυτικές στήλες με διαφορετικούς μηχανισμούς διαχωρισμού προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη ανάλυση των υπό μελέτη συστατικών [63,102].

Λιγότερο συχνά γίνεται χρήση της αέριας χρωματογραφίας (gas chromatography, GC) για την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων. Γενικά, για την ανάλυση των πολυφαινολών μέσω της GC απαιτείται ένα προηγούμενο στάδιο παραγωγοποίησης των ενώσεων, με σκοπό την εξασφάλιση της πτητικότητας και της θερμικής τους σταθερότητας. Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID) εξακολουθεί να βρίσκει ευρεία εφαρμογή, αλλά η εξέχουσα θέση της MS κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων είναι σήμερα αδιαμφισβήτητη [37,96].

1.4.2.3. Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (capillary electrophoresis, CE) αποτελεί μια άλλη υποσχόμενη μέθοδο διαχωρισμού, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων. Η CE αποτελεί ένα πολύτιμο αναλυτικό εργαλείο εφόσον μπορεί να προσφέρει αποδοτικούς διαχωρισμούς, σε μικρούς χρόνους ανάλυσης και με ελάχιστες απαιτήσεις σε όγκους δείγματος και άλλων αντιδραστηρίων [103]. Μέχρι στιγμής, η CE έχει χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών διαφόρων προϊόντων φυτικής προέλευσης, μεταξύ των οποίων τα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα μπαχαρικά, το τσάι, ο καφές, η μπύρα, τα φυτικά έλαια, τα δημητριακά, τα όσπρια, οι ξηροί καρποί, το κακάο, το μέλι και το κρασί [104,105].

Παρά την ευρεία της χρήση κατά την ανάλυση των φυτοχημικών συστατικών, η CE δε βρήκε εφαρμογή κατά τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των χαρουπιών. Παρόλο που οι Roseiro et al. και οι Almanasrah et al. επιχείρησαν να αναλύσουν το φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων σάρκας χαρουπιού με χρήση της CE, δεν κατάφεραν να επιτύχουν τον πλήρη διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών στόχων [26,58,106].

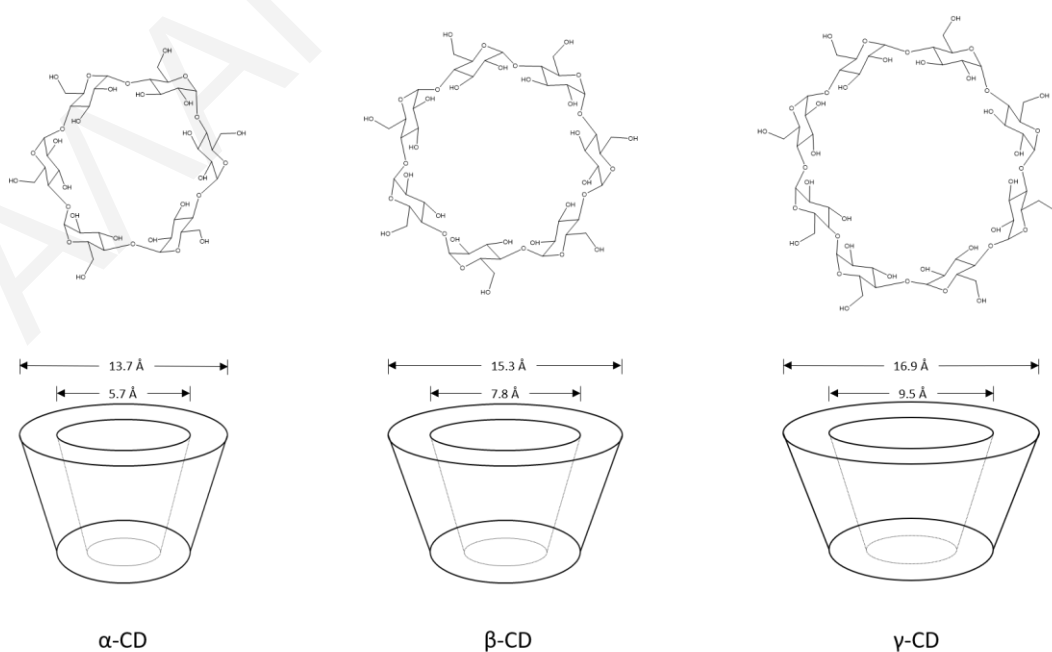
Η ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (capillary zone electrophoresis, CZE) με χρήση του δεκαένυδρου τετραβορικού νατρίου (sodium tetraborate decahydrate, Borate) ως ηλεκτρολυτικού διαλύματος, καθώς και η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς (electrokinetic chromatography, EKC) βασισμένη στην προσθήκη του δωδεκυλοθειικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, SDS), ως επιφανειοδραστικού συστατικού, αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ηλεκτροφορητικές τεχνικές κατά την ανάλυση των εν λόγω αντιοξειδωτικών ενώσεων [107]. Παρόλο που η μέτρηση της απορρόφησης στο UV/Vis αποτελεί το συνηθέστερο τρόπο ανίχνευσης στην CE, έχει επίσης αναφερθεί η χρήση των ανιχνευτών φθορισμού, των ηλεκτροχημικών ανιχνευτών καθώς και της MS [108,109].

Στις περιπτώσεις διαχωρισμού πολύπλοκων δειγμάτων, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί διάφοροι διαλύτες (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) καθώς και άλλοι τροποποιητές, ως πρόσθετα στην κινητή φάση [110,111]. Οι κυκλοδεξτρίνες (cyclodextrins, CDs), για παράδειγμα, έχουν χρησιμοποιηθεί για το χειρόμορφο και μη χειρόμορφο διαχωρισμό των εν λόγω αντιοξειδωτικών ενώσεων [112–118]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει η εφαρμογή των ιοντικών υγρών (ionic liquids, ILs) στην CE, με τα IL να έχουν χρησιμοποιηθεί, τόσο ως πρόσθετα στην κινητή φάση, όσο και για την παρασκευή του ίδιου του ηλεκτρολυτικού διαλύματος [119].

1.4.2.3.1. Κυκλοδεξτρίνες (CDs)

Οι CDs πέραν από τη χρήση τους ως χειρόμορφοι επιλογείς κατά το διαχωρισμό των οπτικά ενεργών μορίων, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετα για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας του διαχωρισμού μη χειρόμορφων συστατικών [118]. Πρόκειται για κυκλικούς ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενους από μόρια α -D-γλυκοπυρανόζης συνδεόμενα με α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι πιο κοινές και εμπορικά διαθέσιμες φυσικές CDs είναι η α -, β - και γ -CD, οι οποίες αποτελούνται από 6, 7 και 8 μονάδες γλυκοπυρανόζης, αντίστοιχα (Σχήμα 1.13). Παράλληλα, μπορεί να πραγματοποιηθεί παραγωγοποίηση των υδροξυλομάδων των CDs, προκειμένου να παραχθούν παράγωγα CDs με επιπλέον σημεία αλληλεπίδρασης ή και διαφορετική πολικότητα. Οι θεικές, οι καρβοξυμεθυλικές, οι αλκυλικές και οι αρωματικές CDs έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην CE [120,121].

Η δομή των CDs προσομοιάζει με το σχήμα του κοίλου κόλουρου κώνου. Η εξωτερική τους επιφάνεια είναι υδρόφιλη, εξαιτίας των δευτεροταγών και πρωτοταγών υδροξυλομάδων που βρίσκονται στο μεγαλύτερο και μικρότερο στόμιο του κώνου, αντίστοιχα, ενώ, αντίθετα, η εσωτερική τους κοιλότητα είναι υδρόφοβη [122]. Εξαιτίας της ιδιαίτερης αυτής τους δομής, οι CDs είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με μόρια κατάλληλου μεγέθους και να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού. Ως αποτέλεσμα της συμπλοκοποίησης, προκαλείται μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των υπό μελέτη αναλυτών και, ως εκ τούτου, βελτίωση της εκλεκτικότητας του διαχωρισμού [117].



Σχήμα 1.13. Δομές α -, β - και γ -CD.

1.4.2.3.2. Ιοντικά υγρά (IL)

Τα IL αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών οργανικών διαλυτών [123]. Πέραν από την εφαρμογή τους στον τομέα της ανάλυσης (απομόνωση, διαχωρισμός και ανίχνευση), έχει αναφερθεί η χρήση τους και σε άλλους κλάδους της σύγχρονης επιστήμης, όπως για παράδειγμα στην οργανική σύνθεση και την κατάλυση [124]. Οι μοναδικές αλληλεπιδράσεις που μπορούν να προσφέρουν τα εν λόγω υλικά, προσέλκυσαν το ενδιαφέρον της αναλυτικής χημείας και ιδιαίτερα της επιστήμης του διαχωρισμού [123].

Στην πραγματικότητα, πρόκειται για ιοντικές ενώσεις, των οποίων το σημείο τήξεως είναι ίσο ή μικρότερο των 100 °C. Αποτελούνται εξ ολοκλήρου από ιόντα, και, στις πλείστες των περιπτώσεων, δομούνται από ένα οργανικό κατιόν και ένα οργανικό ή ανόργανο ανιόν [125]. Γενικά, αποτελούνται από ογκώδη, μη συμμετρικά οργανικά κατιόντα (π.χ. κατιόν μιδαζολίου, πυρρολίου, πυριδίνης, αμμωνίου και φωσφονίου) και από διάφορα οργανικά ή ανόργανα ανιόντα (π.χ. τετραφθοροβορίδιο, οξικό ανιόν, ανιόν βρωμίου και χλωρίου) (Σχήμα 1.14) [126].

Τα ILs παρουσιάζουν ξεχωριστές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα η θερμική σταθερότητα, η μηδενική τάση ατμών και η δυνατότητα ρύθμισης του ιξώδους και της διαλυτότητάς τους στο νερό ή σε άλλους οργανικούς διαλύτες [125,127]. Ανάλογα με το συνδυασμό κατιόντος-ανιόντος, μπορούν να προκύψουν ILs διαφορετικής πολικότητας, σημείου τήξεως και ιξώδους, για αυτό και συχνά χαρακτηρίζονται ως «designer solvents» [126]. Εξαιτίας των μοναδικών αυτών τους χαρακτηριστικών, τα IL έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της ευρύτερης επιστημονικής κοινότητας και έχουν βρει πολλές εφαρμογές στους διαχωρισμούς με χρήση της GC, HPLC και CE.

Όσον αφορά την εφαρμογή τους στην CE, τα IL έχουν χρησιμοποιηθεί, τόσο ως πρόσθετα στην κινητή φάση, όσο και για την τροποποίηση της επιφάνειας του τριχοειδούς (δυναμική και χημική τροποποίηση) [123]. Ως πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους ίδιους τους αναλύτες μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου, οδηγώντας, έτσι, σε νέους μηχανισμούς διαχωρισμού. Επιπλέον, τα προερχόμενα από το IL κατιόντα είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με τις αρνητικά φορτισμένες σιλιανομάδες της επιφάνειας του τριχοειδούς, μεταβάλλοντας, έτσι, την ηλεκτροσωματική ροή (electroosmotic flow, EOF) του συστήματος [128]. Η δυναμική επικάλυψη του τριχοειδούς (dynamic coating), με χρήση του IL ως το μόνο ηλεκτρολυτικό μέσο, προσφέρει τη δυνατότητα αλληλεπιδράσεων των αναλυτών, όχι μόνο με την κύρια

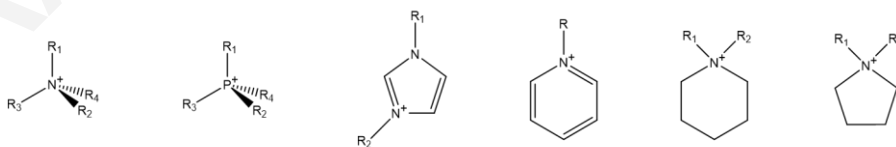
μάζα του διαλύματος, αλλά και με την ίδια στήλη [123]. Τα IL έχουν χρησιμοποιηθεί, τόσο για τη δυναμική, όσο και για τη χημική τροποποίηση της στήλης. Και στις δύο περιπτώσεις έχει αναφερθεί μεταβολή ή ακόμα και αντιστροφή της EOF [126].

Οι Yanes et al. ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν ένα IL για το διαχωρισμό των πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων των σπόρων σταφυλιού. Μέσω της χρήσης του IL, ως το μόνο ηλεκτρολυτικό διάλυμα, κατάφεραν να επιτύχουν αντιστροφή της EOF. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε προσρόφηση των ιμιδαζολικών κατιόντων στην επιφάνεια του τριχοειδούς, φορτίζοντας τη θετικά, οδηγώντας, έτσι, την κύρια μάζα του διαλύματος προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Όσον αφορά τους αναλύτες, αυτοί βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν, τόσο με τα ελεύθερα κατιόντα του ιμιδαζολίου, όσο και με εκείνα της επιφάνειας του τριχοειδούς [129].

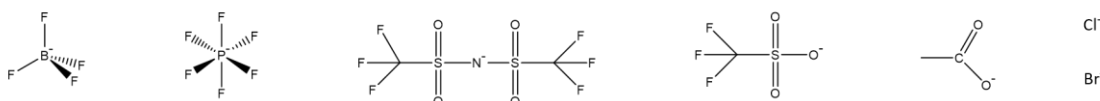
Επομένως, τα ILs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα, ως το μοναδικό ηλεκτρολυτικό μέσο, καθώς και για την τροποποίηση της επιφάνειας του τριχοειδούς. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα πρόσθετα όπως για παράδειγμα με το SDS και διάφορους τύπους CDs [128].

Εξ όσων γνωρίζουμε δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως ο οποιοσδήποτε συνδυασμός IL και CD για το διαχωρισμό των πολυφαινολικών ενώσεων. Υπό αυτές τις συνθήκες, μελετήθηκε λεπτομερώς η συνεργειακή δράση της β-CD και του IL του γαλακτικού τερτ βουτυλεστέρα της L-αλανίνης (L-alanine tert butyl ester lactate, L-AlaC₄Lac) κατά το διαχωρισμό της εν λόγω κατηγορίας ενώσεων. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την κατανόηση του μηχανισμού διαχωρισμού των ενώσεων στην παρουσία της CD και του IL.

Κατιόντα:



Ανιόντα:



Σχήμα 1.14. Τα συνήθη κατιόντα και ανιόντα που δομούν τα IL.

1.4.3. Γεωγραφική προέλευση

Η γεωγραφική προέλευση των χαρουπιών αποτελεί άλλο έναν παράγοντα που επιδρά σημαντικά στη φαινολική σύσταση των καρπών. Χαρακτηριστική είναι η δημοσίευση των Rakib et al., μελέτη στην οποία διερευνήθηκε το φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων σάρκας χαρουπιού από έξι διαφορετικές περιοχές του Μαρόκο (Essaouira, Béni-Mellal, Tafraout, Nador, Fès and Taza). Μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων παρατηρήθηκαν σημαντικές ποσοτικές διαφορές, με τα δείγματα από τις περιοχές Essaouira, Béni-Mellal και Taza να παρουσιάζουν και τα υψηλότερα επίπεδα πολυφαινολών. Όπως αναφέρεται από τους ίδιους τους ερευνητές, η διαφορετική γεωγραφική προέλευση των καρπών καθώς και η διαφορετική ποικιλία τους, πιθανό να ευθύνονται για τις παρατηρούμενες ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές των δειγμάτων [130]. Η επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης των χαρουπιών στην πολυφαινολική τους σύσταση υπογραμμίζεται, επίσης, και από τις μελέτες των Farag et al., Vekiarı et al. και Kyriacou et al., με τους τελευταίους να επισημαίνουν τη σημαντική επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών και, πιο συγκεκριμένα του υψόμετρου, στη φαινολική σύνθεση των προϊόντων [131–133].

Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη πως το πολυφαινολικό προφίλ των χαρουπιών και, κατ' επέκταση, των προϊόντων τους επηρεάζεται από διάφορες γεωγραφικές παραμέτρους, μεταξύ των οποίων οι κλιματικές (βροχόπτωση και θερμοκρασία) και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (έδαφος, υψόμετρο και έκθεση στον ήλιο), οι πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να προταθούν ως δείκτες για τη διερεύνηση της γεωγραφικής προέλευσης, τόσο των χαρουπιών, όσο και των παράγωγων προϊόντων τους. Ως εκ τούτου, οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια πηγή αναλυτικών δεδομένων για την αντιμετώπιση των ζητημάτων που αφορούν το χαρακτηρισμό, την ταξινόμηση ή ακόμα και την πιστοποίηση της ταυτότητας των δειγμάτων χαρουπιού, συνήθως με τη βοήθεια των χημειομετρικών εργαλείων.

Μέχρι στιγμής, οι πολυφαινολικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση της ποικιλίας και της γεωγραφικής προέλευσης διαφόρων προϊόντων φυτικής προέλευσης όπως για παράδειγμα τα φρούτα, οι χυμοί και τα κρασιά [134]. Όσον αφορά τα δείγματα χαρουπιού, εξ όσων γνωρίζουμε, δεν επιχειρήθηκε προηγούμενη διαφοροποίησή τους με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση, χρησιμοποιώντας τα φαινολικά τους προφίλ ως τους χαρακτηριστικούς δείκτες διάκρισης. Μέχρι στιγμής, έχει αναφερθεί η χρήση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών (μήκος/πλάτος/πάχος λοβών, βάρος σάρκας, αριθμός/μήκος/πλάτος/πάχος/βάρος σπόρων), της θρεπτικής τους σύστασης (περιεκτικότητα σε υγρασία, λίπη, πρωτεΐνες, σάκχαρα, διαιτητικές ίνες, ιχνοστοιχεία), των

αρωματικών τους προφίλ (πτητικές οργανικές ενώσεις), καθώς και των δεδομένων από την υπέρυθη φασματοσκοπική τους ανάλυση, για τη διάκριση της γεωγραφικής τους προέλευσης [135–140]. Μόνο οι Farag et al. ανέφεραν τη χρήση των πολυφαινολών, ως πιθανών δεικτών, για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων χαρουπιού. Παρόλα αυτά, στην εν λόγω μελέτη, η ανάλυση κύριων συνιστωσών (principal component analysis, PCA) φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματική για την καταγραφή των μεταβολών των πολυφαινολών εξαιτίας του διαφορετικού βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών, παρά εξαιτίας της διαφορετικής γεωγραφικής τους προέλευσης [131].

1.4.3.1. Χημειομετρικά εργαλεία

Η εφαρμογή των εξελιγμένων διαδικασιών ανάλυσης δεδομένων, των λεγόμενων χημειομετρικών μεθόδων, έχει αποδειχθεί ως ένα πολύτιμο εργαλείο για τη διάκριση και την ταξινόμηση των φυτικών προϊόντων με βάση την ποικιλία και τη γεωγραφική τους προέλευση [141]. Συχνά, ο τεράστιος όγκος δεδομένων που προκύπτει από τις σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές, καθιστά αναγκαία τη χρήση των χημειομετρικών εργαλείων προκειμένου να εξαχθεί αποτελεσματικά η μέγιστη σχετική χημική πληροφορία [142]. Ειδικότερα, η χημειομετρία αναφέρεται στον κλάδο της χημείας που ασχολείται με την εφαρμογή των μεθοδολογιών των μαθηματικών, της στατιστικής και της κοινής λογικής με σκοπό: 1) το σχεδιασμό και τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών και 2) τη βελτίωση της ποιότητας και την αύξηση της αξιοπιστίας των πληροφοριών που προκύπτουν από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων [47,143].

1.4.3.2. Μέθοδοι ταξινόμησης

Οι χημειομετρικές μέθοδοι ταξινόμησης που χρησιμοποιούνται για την εύρεση των συσχετίσεων και των τάσεων μεταξύ των δειγμάτων στηρίζονται στην πολυπαραμετρική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν μεθοδολογίες που εφαρμόζονται σε ένα μεγάλο αριθμό δεδομένων με σκοπό την ομαδοποίηση των δειγμάτων που εμφανίζουν ορισμένα κοινά αναλυτικά χαρακτηριστικά. Τα μοντέλα ταξινόμησης που αναπτύσσονται μπορούν να περιγράψουν τη μαθηματική σχέση μεταξύ ενός συνόλου μεταβλητών που προέρχονται από τις χημικές μετρήσεις και ενός ποιοτικού χαρακτηριστικού. Οι χημειομετρικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των εν λόγω μοντέλων μπορούν να διακριθούν στις εξής δύο κατηγορίες: α) μη-επιβλεπόμενες (unsupervised) και (β) επιβλεπόμενες (supervised) τεχνικές. Στην πρώτη περίπτωση, δεν περιλαμβάνεται καμία πληροφορία για την αρχική κατάταξη των δειγμάτων και η όποια πιθανή πληροφορία προκύπτει μετά από τη χημειομετρική τους ανάλυση. Αντίθετα, στις επιβλεπόμενες μεθόδους διάκρισης, είναι

εκ των προτέρων γνωστές οι ομάδες ταξινόμησης. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, αξιολογείται ο βαθμός επιτυχίας της εύρεσης των εν λόγω ομάδων με τη χρήση των ομάδων εκπαίδευσης και ελέγχου [143].

Μεταξύ των πολυπαραμετρικών αυτών τεχνικών, η PCA, ως μια μη-επιβλεπόμενη μέθοδος, και η επιβλεπόμενη διαχωριστική ανάλυση μέσω παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (supervised partial least squares discriminant analysis, PLS-DA), αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανάλυσης δεδομένων κατά τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης διαφόρων προϊόντων διατροφής.

1.4.3.2.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

Η PCA είναι μια τεχνική ανάλυσης δεδομένων που σκοπό έχει τη δημιουργία καινούργιων μεταβλητών (κύριες συνιστώσες, principal components, PCs), οι οποίες είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών, έτσι ώστε να είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και συνάμα να μπορούν να περιγράψουν το μεγαλύτερο μέρος της συνολικής διακύμανσης. Η πρώτη PC (PC1) είναι σε θέση να περιγράψει το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αποτελεσμάτων, ενώ η αμέσως επόμενη, η PC2, εξάγεται για να διατηρήσει το μέγιστο ποσό της υπολειπόμενης διακύμανσης και είναι ορθογώνια ως προς τη PC1. Οι υπόλοιπες PCs υπολογίζονται ακριβώς με το ίδιο σκεπτικό. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μείωση του συνολικού αριθμού των μεταβλητών, με κόστος την απώλεια μόνο ενός μικρού ποσού της συνολικής διακύμανσης. Μέσω της μείωσης των διαστάσεων του συνόλου των δεδομένων, είναι δυνατή η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων μέσω των διαγραμμάτων των αποτελεσμάτων (scores plot) και των φορτίων (loadings plot). Τα διαγράμματα των αποτελεσμάτων (scores plot) επιτρέπουν την απεικόνιση της κατανομής των δειγμάτων και την εύρεση των ομοιοτήτων ή/και διαφορών μεταξύ των παρατηρήσεων. Από την άλλη, τα διαγράμματα των φορτίων θεωρούνται εξαιρετικά χρήσιμα για τη μελέτη της συμπεριφοράς των μεταβλητών και τον προσδιορισμό των μεταξύ τους συσχετίσεων [143,144].

1.4.3.2.2. Διαχωριστική ανάλυση μέσω παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)

Η PLS-DA είναι μια γραμμική μέθοδος ταξινόμησης που συνδυάζει τις ιδιότητες της παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (partial least squares regression, PLSR) μαζί με τη διαχωριστική ισχύ των μεθόδων ταξινόμησης [145]. Ουσιαστικά αποτελεί μια παραλλαγή της PLSR, στην οποία η απόκριση αποτελεί κατηγορική μεταβλητή. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζει την PLSR για τη δημιουργία μοντέλων παλινδρόμησης μέσω της προβολής των αποκρίσεων (Y) και των περιγραφικών μεταβλητών (X) σε ένα νέο χώρο. Μέσω της

παλινδρόμησης επιτυγχάνεται η ανάπτυξη των μοντέλων πρόβλεψης. Στόχος της μεθόδου είναι η εξαγωγή των λανθανουσών μεταβλητών (latent variables, LVs), οι οποίες είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών και μπορούν να ερμηνεύσουν το μεγαλύτερο ποσό της διακύμανσης της απόκρισης και να παρέχουν καλή μοντελοποίηση των αποκρίσεων [143].

1.4.4. Βαθμός ωρίμανσης

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι άγουροι καρποί μπορούν να χαρακτηριστούν ως μια σημαντικότερη πηγή πολυφαινολικών ενώσεων σε σχέση με τα ώριμα φρούτα. Για τη διερεύνηση της επίδρασης του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στην πολυφαινολική τους σύσταση, έχει προσδιοριστεί, τόσο το TPC των ώριμων και άγουρων καρπών, όσο και τα μεμονωμένα πολυφαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, το TPC της σάρκας των άγουρων καρπών βρέθηκε να κυμαίνεται στο εύρος 198.2-258.5 mg GAE/g δείγματος στις μελέτες των Benchikh et al. και Saci et al., με τις τιμές αυτές να παρουσιάζουν σημαντική μείωση, της τάξεως των 85-93%, κατά τη μετάβαση του καρπού από το άγουρο στο ώριμο στάδιο [146,147].

Σημαντικές ήταν και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν κατά την εξέταση των φαινολικών προφίλ των εκχυλισμάτων της ώριμης και άγουρης σάρκας. Οι Ydjedd et al. αναφέρουν χαρακτηριστικά τη διπλάσια περιεκτικότητα των άγουρων καρπών σε γαλλικό οξύ και τη μεγαλύτερη αφθονία των ώριμων καρπών σε ελλαγικό και p-κουμαρικό οξύ. Χαρακτηριστική ήταν, επίσης, η αναφορά για μείωση της περιεκτικότητας των καρπών σε φλαβονοειδή με την αύξηση του βαθμού ωρίμανσής τους [148]. Αντίθετα, στις μελέτες των Benchikh et al. και Kyriacou et al., το γαλλικό οξύ παρουσίασε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο ώριμο στάδιο [133,149]. Μάλιστα, οι τελευταίοι υποστηρίζουν την πλήρη απουσία του κατά το πρώιμο στάδιο της ωρίμανσης και τη μετέπειτα εμφάνιση του στους καρπούς εξαιτίας της υδρόλυσης των υδρολυόμενων ταννινών και την επακόλουθη απελευθέρωση των μονάδων του γαλλικού οξέος και των σακχάρων [133].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, η μεταβολή της φαινολικής σύστασης των σπόρων του χαρουπιού κατά τη διαδικασία της ωρίμανσής τους. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης των Santonocito et al, οι ώριμοι σπόροι παρουσίασαν μια σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε φλαβονόλες και προανθοκυανιδίνες, ενώ, αντίθετα, οι φλαβανόλες, οι γαλλοταννίνες, το γαλλικό οξύ και τα παράγωγα του ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα δείγματα από τους άγουρους καρπούς [150].

Παρόλα αυτά, σε καμία προηγούμενη μελέτη δεν επιχειρήθηκε ταυτόχρονη αξιολόγηση του φαινολικού προφίλ της σάρκας και των σπόρων των ώριμων και άγουρων καρπών, με σκοπό τη διερεύνηση της κατανομής των εν λόγω ενώσεων κατά μήκος του καρπού κατά το ώριμο και άγουρο στάδιο.

1.4.5. Μέθοδος κατεργασίας

Τα χαρούπια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων, μεταξύ των οποίων η σκόνη/αλεύρι χαρουπιού, το χαρουπόμελο, οι φυτικές ίνες χαρουπιού και πολλά άλλα. Η φαινολική τους σύσταση δε, διαφέρει σημαντικά, γεγονός που αποδίδεται στις διαφορετικές μεθόδους κατεργασίας που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τους.

Το γαλλικό οξύ αποδείχθηκε ως η κύρια πολυφαινολική ένωση των δειγμάτων σιροπιού, σύμφωνα με τις μελέτες των Paragiannopoulos et al. και Dhadoudi et al. Σύμφωνα με τους ερευνητές, το γαλλικό οξύ εκχυλίστηκε μαζί με τα σάκχαρα κατά τη διαδικασία παρασκευής του προϊόντος. Επιπρόσθετα, η απουσία των υδρολυόμενων ταννινών από το τελικό προϊόν, κατέδειξε την υδρόλυσή τους κατά το στάδιο παραλαβής του προϊόντος [16,25].

Όπως ήταν αναμενόμενο, οι φυτικές ίνες χαρουπιού, ένα προϊόν που παραλαμβάνεται από τη σάρκα του χαρουπιού μετά την απομάκρυνση των σακχάρων, κατέδειξαν χαμηλότερα ποσοστά γαλλικού οξέος καθώς και υδρολυόμενων ταννινών σε σχέση με την ακατέργαστη σάρκα. Όπως προαναφέρθηκε, οι ενώσεις αυτές απομακρύνθηκαν κατά το στάδιο εξαγωγής των υδατανθράκων. Παρόλα αυτά, οι φυτικές ίνες χαρουπιού παρουσίασαν μια συνολικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, γεγονός που αποδόθηκε, εν μέρη, στην απώλεια μάζας των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της εξαγωγής των υδατανθράκων, οι οποίοι και αντιπροσωπεύουν το 40-50% του συνολικού βάρους της σάρκας. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των εν λόγω προϊόντων, είναι πιθανό να υφίσταται διάνοιξη της μήτρας του φυτικού υλικού, διευκολύνοντας έτσι την εξαγωγή των δεσμευόμενων σε αυτήν πολυφαινολικών ενώσεων [25].

Η θερμική κατεργασία των προϊόντων σκόνης χαρουπιού είχε, όπως αποδείχθηκε, σημαντική επίδραση στα επίπεδα των ταννινών και του γαλλικού οξέος. Σύμφωνα με τους Paragiannopoulos et al. και Ortega et al., η θερμική κατεργασία των προϊόντων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του γαλλικού οξέος και, συνάμα, τη μείωση των συγκεντρώσεων ή ακόμα και τη μη ανίχνευση της κατηγορίας των ταννινών. Οι ενώσεις αυτές είναι πιθανό να υδρολύονται κατά το στάδιο της θερμικής κατεργασίας των αλευριών,

οδηγώντας, έτσι, σε αύξηση της περιεκτικότητας των προϊόντων σε απλά φαινολικά οξέα [25,151].

1.4.6. Ποικιλία και φύλο χαρουπιάς

Τα δέντρα της χαρουπιάς μπορούν να χαρακτηριστούν ως θηλυκά, αρσενικά ή ερμαφρόδιτα, ανάλογα με τα άνθη που διαθέτουν. Αυτή τους η διαφοροποίηση φαίνεται να επιδρά σημαντικά στη φαινολική σύσταση των καρπών τους, σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης των Custódio et al. Οι εν λόγω ερευνητές μέσω της αξιολόγησης του φαινολικού περιεχομένου της σάρκας χαρουπιών, προερχόμενων, τόσο από θηλυκές, όσο και από ερμαφρόδιτες ποικιλίες, κατάφεραν να αποδείξουν τη σημαντική επίδραση του φύλου και της ποικιλίας της χαρουπιάς στη φαινολική σύνθεση των καρπών της. Συγκεκριμένα, οι ερμαφρόδιτες ποικιλίες χαρουπιών παρουσίασαν μια σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες [67]. Ομοίως, τα φύλλα από τις ερμαφρόδιτες και τις αρσενικές ποικιλίες χαρουπιάς παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα TPC σε σχέση με τα φύλλα από τα θηλυκά δέντρα [152].

Πέραν από την επίδραση του φύλου της χαρουπιάς, η ποικιλία των χαρουπιών φαίνεται να διαδραματίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην πολυφαινολική τους σύσταση. Η γενετική αυτή τους τροποποίηση έχει, όπως αποδείχθηκε, σημαντική επίδραση στη φαινολική σύσταση της σάρκας, των σπόρων, καθώς και των φύλλων της χαρουπιάς [23,67,152].

1.5. Πρωτοτυπία μελέτης

Τα τελευταία χρόνια, η μελέτη της φαινολικής σύστασης των χαρουπιών έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των πολυάριθμων ευεργετικών τους ιδιοτήτων. Παρόλο που αρκετές μελέτες επικεντρώθηκαν στην ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων χαρουπιού, δεν υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με τις βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής τους, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές και μη συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ της βιβλιογραφίας. Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη μιας βέλτιστης και κατάλληλης μεθόδου ανάκτησης, με σκοπό την εξαγωγή του μεγαλύτερου δυνατού ποσού των πολυφαινολών. Υπό αυτές τις συνθήκες, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση μιας μη συμβατικής μεθόδου εκχύλισης και, πιο συγκεκριμένα, της UAE μέσω της RSM. Είναι η πρώτη φορά που η PUAE εφαρμόστηκε για την ανάκτηση των περιεχόμενων στα χαρούπια πολυφαινολικών ενώσεων.

Αφού προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων, έλαβε χώρα ηλεκτροφορητική ανάλυση των βέλτιστα ληφθέντων εκχυλισμάτων. Είναι η

πρώτη φορά που αναφέρεται η επιτυχής εφαρμογή της CE κατά την ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων χαρουπιού. Πρωτοτυπία αποτελεί, επίσης, η χρήση της β-CD σε συνδυασμό με το IL του L-AlaC₄Lac κατά την ανάπτυξη της εν λόγω ηλεκτροφορητικής μεθόδου ανάλυσης. Εξ όσων γνωρίζουμε, δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως ο οποιοσδήποτε συνδυασμός IL και CD κατά την ανάλυση της συγκεκριμένης κατηγορίας ενώσεων. Υπό αυτές τις συνθήκες, μελετήθηκε λεπτομερώς ο μηχανισμός που ακολουθείται κατά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό στην παρουσία των εν λόγω τροποποιητών και, συγκεκριμένα, η συνεργειακή δράση της β-CD και του L-AlaC₄Lac.

Στη συνέχεια, μέσω της HPLC-HRMS μελετήθηκε η επίδραση του βαθμού ωρίμανσης, της μεθόδου κατεργασίας και της γεωγραφικής προέλευσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύσταση. Παρόλο που έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες η σημαντική επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύνθεση, είναι η πρώτη φορά που μελετάται, ταυτόχρονα, η κατανομή των εν λόγω ενώσεων κατά μήκος του καρπού στο ώριμο και το άγουρο στάδιο. Όσον αφορά τα προϊόντα του χαρουπιού, γίνεται μια λεπτομερής διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν το φαινολικό τους περιεχόμενο. Αν και υπάρχουν κάποια αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα, η παρούσα έρευνα παρέχει μια πιο λεπτομερή ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της ταυτόχρονης αξιολόγησης του φαινολικού περιεχομένου, τόσο των προϊόντων του χαρουπιού (καβουρδισμένη σκόνη χαρουπιού, ωμή σκόνη χαρουπιού, χαρουπόμελο, μη θερμικά επεξεργασμένο χαρουπόμελο, καβουρδισμένη σάρκα χαρουπιού), όσο και της ακατέργαστης πρώτης ύλης. Όσον αφορά την επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης των χαρουπιών στην πολυφαινολική τους σύνθεση, είναι η πρώτη φορά που επιτυγχάνεται επιτυχής ταξινόμηση των εν λόγω ειδών με βάση τα φαινολικά τους προφίλ.

2. Μεθοδολογία

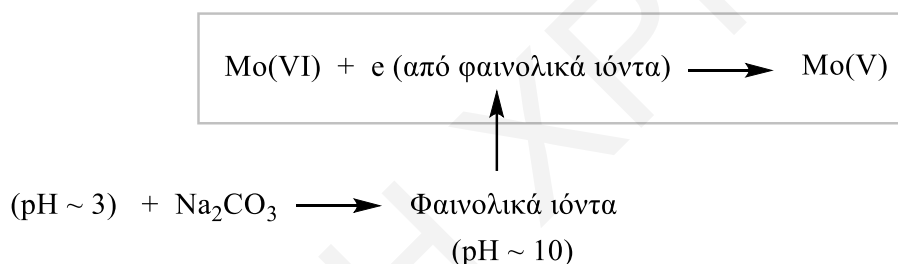
2.1. Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Πρόκειται για μια φασματοφωτομετρική μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση του TPC των εκχυλισμάτων των φυτικών προϊόντων [153]. Η εξαιρετικά χρήσιμη αυτή μέθοδος στηρίζεται στη χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, το οποίο προτάθηκε αρχικά από τους Folin και Denis (1912) με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση των φαινολικών παραγώγων στα ούρα του ανθρώπου και αργότερα, το 1927, τροποποιήθηκε από τους Folin και Ciocalteu, όταν και χρησιμοποιήθηκε για την έμμεση ανάλυση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης [154–156]. Σήμερα, το εν λόγω αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του συνόλου των πολυφαινολικών ενώσεων βάση μιας διαδικασίας που διατυπώθηκε, αρκετά αργότερα, από τους Singleton και Rossi (1965) [156–158].

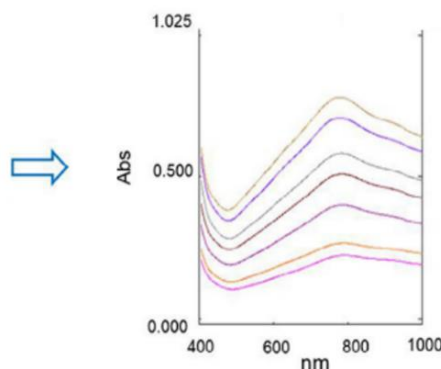
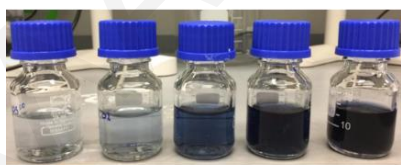
Εν συντομία, για την παρασκευή του αντιδραστηρίου, 100 g βολφραμικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) και 25 g μολυβδαινικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) διαλύονται σε 700 mL απεσταγμένου νερού και στο μίγμα που προκύπτει προστίθενται 50 mL συμπυκνωμένου διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl) και 50 mL διαλύματος φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) περιεκτικότητας 85%. Μετά την οξίνιση του μίγματος, λαμβάνει χώρα βρασμός του για 10 h. Ακολουθεί ψύξη του μίγματος και προσθήκη 150 g θειικού λιθίου ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), οπότε και προκύπτει ένα κίτρινου χρώματος διάλυμα, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το οποίο είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμο [159].

Παρόλο που δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως η χημική δομή του εν λόγω αντιδραστηρίου, πιστεύεται ότι αποτελείται από ένα μίγμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από τα φωσφομολυβδαινικά και τα φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα [159]. Ομοίως, εξαιτίας της μεγάλης του πολυπλοκότητας, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ο μηχανισμός που ακολουθείται κατά τη δοκιμή Folin-Ciocalteu [159]. Παρόλα αυτά, υποστηρίζεται η ύπαρξη ενός μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων σύμφωνα με τον οποίον λαμβάνει χώρα οξειδωση των φαινολικών ιόντων και επακόλουθη αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu [154,156]. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αναγωγή του εν λόγω αντιδραστηρίου στην παρουσία των πολυφαινολικών ενώσεων, υπό αλκαλικές συνθήκες, και στον επακόλουθο σχηματισμό ενός μπλε χρωμοφόρου συμπλόκου, πιθανόν του $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ [154,160]. Οι αλκαλικές συνθήκες, κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η αντίδραση (pH ~ 10-12), είναι απαραίτητες για το σχηματισμό των φαινολικών ιόντων βάση των οποίων επιτυγχάνεται η αναγωγή του εν λόγω αντιδραστηρίου [159,161]. Τα

μολυβδαινικά ιόντα ανάγονται ευκολότερα σε σχέση με τα άλλα συστατικά του μίγματος και, επομένως, στην παρουσία των φαινολικών ιόντων προκαλείται αναγωγή του Mo^{6+} σε Mo^{5+} , σύμφωνα με την εξίσωση του Σχήματος 2.1 [159,161]. Ως αποτέλεσμα της αναγωγής, προκαλείται μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από κίτρινο σε μπλε. Το μπλε χρωμοφόρο σύμπλοκο που σχηματίζεται παρουσιάζει μια μέγιστη απορρόφηση γύρω στα 765 nm, η ένταση της οποίας μπορεί να μετρηθεί φασμαφωτομετρικά [153,154,161]. Η ένταση της απορρόφησης του συμπλόκου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αναγωγικών συστατικών του δείγματος (Σχήμα 2.2) για την ποσοτικοποίηση των οποίων γίνεται χρήση πρότυπης ένωσης αναφοράς [160,161]. Ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιείται, στις πλείστες των περιπτώσεων, το γαλλικό οξύ, με τα αποτελέσματα να εκφράζονται σε όρους ισοδύναμων γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE) [154].



Σχήμα 2.1. Μηχανισμός αντίδρασης Folin-Ciocalteu.



Σχήμα 2.2. Μέτρηση της απορρόφησης του μπλε χρωμοφόρου συμπλόκου.

Παρόλο που η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι απλή, πρακτική και με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, υστερεί ως προς την εκλεκτικότητα για τις πολυφαινολικές ενώσεις [159,161,162]. Ενώσεις όπως τα σάκχαρα, οι αρωματικές αμίνες, τα αμινοξέα, το διοξείδιο

του θείου, κάποια οργανικά οξέα όπως για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ και ορισμένα στοιχεία μετάπτωσης (π.χ. Fe^{2+}), εξαιτίας του αναγωγικού τους χαρακτήρα, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, με αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση του TPC [154,160,161]. Στην πραγματικότητα, η μέθοδος αυτή αποτελεί μέτρο της συνολικής αναγωγικής ικανότητας των εκχυλισμάτων [160]. Εξαιτίας των παρεμβολών αυτών, συνιστάται η χρήση και κάποιας ηλεκτροφορητικής και χρωματογραφικής αναλυτικής μεθόδου με σκοπό τον προσδιορισμό των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών των δειγμάτων.

2.2. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (CE)

Η CE αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο διαχωρισμού με ευρεία εφαρμογή στον τομέα της ανάλυσης. Η ευρεία της αποδοχή οφείλεται στη μεγάλη της ευαισθησία και αποδοτικότητα, καθώς και στους πολύ μικρούς χρόνους ανάλυσης που παρουσιάζει. Επιπλέον, οι εξαιρετικά μικρές απαιτήσεις της σε όγκους δείγματος και άλλων αντιδραστηρίων, την έχουν καταστήσει ως ένα πολύτιμο αναλυτικό εργαλείο με πολλές εφαρμογές σε διάφορους κλάδους της σύγχρονης επιστήμης [163–165].

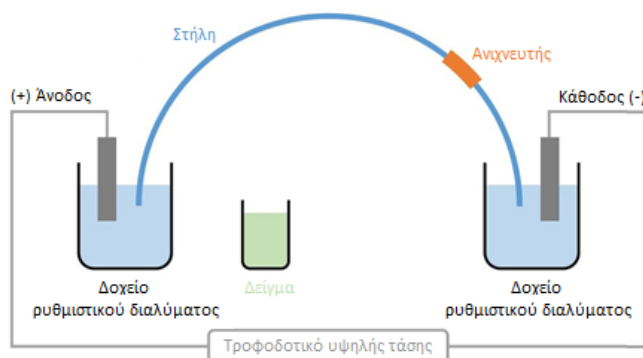
Η CE αποτελεί μια σύγχρονη τεχνική διαχωρισμού και μπορεί να θεωρηθεί ως η ενόργανη έκδοση της κλασσικής ηλεκτροφόρησης [166]. Η ηλεκτροφόρηση, ως τεχνική διαχωρισμού, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από το Σουηδό χημικό Arnie Tiselius κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '30 σε μια προσπάθεια μελέτης των πρωτεϊνών του ορού, μια εργασία για την οποία τιμήθηκε με το βραβείο Nobel. Αργότερα, το 1967, δημοσιεύτηκε από τον Hjerten η πρώτη εργασία με εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης σε ανοικτό σωλήνα. Ακολούθησαν οι μελέτες των Virtanen και Mikkers, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες από γυαλί και τεφλόν, εσωτερικής διαμέτρου 200 μm . Στις αρχές της δεκαετίας του 80, οι Jorgenson και Lukacs ανέπτυξαν την πρώτη μέθοδο ενόργανης ηλεκτροφόρησης, με χρήση τριχοειδών στηλών από τηγμένη πυρίτια, εσωτερικής διαμέτρου 75 μm . Η μελέτη αυτή αποτέλεσε τη βάση για τη θεμελίωση της τεχνικής CE στον τομέα των ενόργανων μεθόδων ανάλυσης [167].

Όπως και στην κλασσική ηλεκτροφόρηση, ο διαχωρισμός των αναλυτών στην CE βασίζεται στις διαφορετικές ταχύτητες μετανάστευσης των φορτισμένων σωματιδίων σε ένα ηλεκτροφορητικό μέσο, κατά μήκος του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο [166]. Στην CE, ο διαχωρισμός πραγματοποιείται μέσα σε τριχοειδείς στήλες, εσωτερικής διαμέτρου 10-100 μm και συνολικού μήκους 40-100 cm, πληρωμένες με το ρυθμιστικό διάλυμα [166,167].

2.2.1. Οργανολογία

Η CE χαρακτηρίζεται από μια πολύ απλή οργανολογία. Στο Σχήμα 2.3 αναπαρίσταται μια γενική διάταξη του συστήματος της CE. Εν συντομία, ένα τυπικό σύστημα CE δομείται από μια τριχοειδή στήλη από τηγμένη πυρίτια (διαμέτρου 10-100 μm και συνολικού μήκους 40-100 cm), τα άκρα της οποίας εκτείνονται ανάμεσα σε δύο δοχεία που περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα και μέσα στα οποία βρίσκονται βυθισμένα δύο ηλεκτρόδια λευκόχρυσου. Τα ηλεκτρόδια βρίσκονται συνδεδεμένα με το τροφοδοτικό υψηλής τάσης, ικανό να παρέχει διαφορά δυναμικού μέχρι και 30 kV. Το δείγμα εισάγεται από το ένα άκρο του τριχοειδή σωλήνα, ενώ εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Οι διαχωριζόμενοι αναλύτες παρατηρούνται μέσω ενός ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται, συνήθως, στο αντίθετο άκρο [166].

Η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη μπορεί να γίνει είτε υδροδυναμικά είτε ηλεκτροκινητικά. Και στις δύο περιπτώσεις, το ένα άκρο του τριχοειδή σωλήνα, μαζί με το ηλεκτρόδιο του, απομακρύνονται από το δοχείο του ρυθμιστικού διαλύματος και τοποθετούνται σε ένα άλλο μικρό δοχείο που περιέχει το προς ανάλυση δείγμα. Ακολουθεί εφαρμογή τάσης (ηλεκτροκινητική έγχυση) ή πίεσης (υδροδυναμική έγχυση) για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Οι εγχόμενοι όγκοι είναι της τάξεως των nL (συνήθως 5-10 nL), αν και έχουν αναφερθεί και όγκοι μικρότεροι από 100 pL. Για την επίτευξη του διαχωρισμού, τριχοειδές και ηλεκτρόδιο επαναφέρονται στο αρχικό δοχείο με το ρυθμιστικό διάλυμα. Η ηλεκτροκινητική έγχυση μειονεκτεί αφού κάνει κάποιου είδους διάκριση μεταξύ των ιόντων. Με την ηλεκτροκινητική έγχυση, εισάγονται μεγαλύτερες ποσότητες ευκίνητων ιόντων και μικρότερες ποσότητες βραδύτερων φορτισμένων συστατικών [166,168,169].



Σχήμα 2.3. Τυπική διάταξη ενός συστήματος CE.

2.2.2. Ανίχνευση

Παρόλο που η απορρόφηση UV/Vis αποτελεί τη συνηθέστερη τεχνική ανίχνευσης στην CE, έχει, επίσης, αναφερθεί η χρήση των ανιχνευτών φθορισμού, των ηλεκτροχημικών ανιχνευτών καθώς και της MS. Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται οι συνηθέστερες τεχνικές ανίχνευσης στην CE, μαζί με τα αντίστοιχα όρια ανίχνευσης για την κάθε μία.

Πίνακας 2.1. Αντιπροσωπευτικά όρια ανίχνευσης των πιο διαδεδομένων ανιχνευτών στην CE [170].

Ανιχνευτής	LOD (mol)	LOD (mol/L)
UV/Vis	10^{-12} - 10^{-15}	10^{-5} - 10^{-6}
Φθορισμού	10^{-15} - 10^{-20}	10^{-10} - 10^{-11}
Ηλεκτροχημικός (αγωγιμότητα, αμπερομετρία)	10^{-16} - 10^{-18}	10^{-7} - 10^{-8}
MS	10^{-17}	10^{-8} - 10^{-9}

Εξαιτίας της μεγάλης του συμβατότητας με το σύστημα της CE, ο ανιχνευτής UV/Vis (190-600 nm) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανίχνευσης κατά τη διάρκεια των ηλεκτροφορητικών διαχωρισμών. Στην περίπτωση των ανιχνευτών UV/Vis, η ανίχνευση πραγματοποιείται πάνω στην ίδια τη στήλη (on column), η οποία και λειτουργεί σαν κυψελίδα ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, ένα μικρό τμήμα της προστατευτικής επίστρωσης πολυιμιδίου αφαιρείται από την εξωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς, και, έτσι, παραμένει εκτεθειμένη η διάφανη τηγμένη πυρίτια, η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως παράθυρο ανίχνευσης. Ωστόσο, εξαιτίας του μικρού μήκους της οπτικής διαδρομής, η οποία περιορίζεται στην εσωτερική διάμετρο του τριχοειδούς, παρατηρούνται σχετικά υψηλά όρια ανίχνευσης (10^{-5} - 10^{-6} M). Τέτοιου είδους ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση της απορρόφησης σε ένα μόνο μήκος κύματος, ή, στην περίπτωση των ανιχνευτών συστοιχίας διόδων (diode-array detector, DAD), για την ταυτόχρονη παρακολούθηση της απορρόφησης σε πολλαπλά μήκη κύματος του ορατού και υπεριώδους φάσματος [166,169].

2.2.3. Βασικές αρχές CE

Στην CE, η ταχύτητα μετανάστευσης ενός ιόντος καθορίζεται από δύο παράγοντες, την ηλεκτροφορητική του ταχύτητα και την ταχύτητα ροής της κύρια μάζας του διαλύματος, ή όπως αλλιώς αποκαλείται της EOF, σύμφωνα με τη σχέση:

$$v = v_{ep} + v_{eo}$$

Εξίσωση 2.1.

όπου v : η ταχύτητα του ιόντος ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), v_{ep} : η ηλεκτροφορητική ταχύτητα του ιόντος ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) και v_{eo} : η ταχύτητα της EOF ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$).

Η ηλεκτροφορητική ταχύτητα περιγράφει την κίνηση ενός ιόντος μέσα στο τριχοειδές όταν σε αυτό εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και είναι ίση με το γινόμενο της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας του ιόντος και της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \mu_{ep} \cdot \frac{V}{L}$$

Εξίσωση 2.2.

όπου v_{ep} : η ηλεκτροφορητική ταχύτητα του ιόντος ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), μ_{ep} : η ηλεκτροφορητική ευκινησία του ιόντος ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) και E : η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$), η οποία καθορίζεται από την τιμή της εφαρμοζόμενης τάσης (V , V) και το μήκος της στήλης (L , cm).

Η ηλεκτροφορητική ευκινησία είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ των ηλεκτροστατικών δυνάμεων και των δυνάμεων τριβής που ασκούνται σε ένα ιόν όταν αυτό κινείται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Συγκεκριμένα, με εφαρμογή ενός σταθερού ηλεκτρικού πεδίου, τα ιόντα υπόκεινται σε μια ηλεκτροστατική δύναμη, F_e , η οποία τα επιταχύνει ως προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο και είναι ανάλογη του φορτίου του ιόντος (q) και της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου (E), σύμφωνα με τη σχέση:

$$F_e = q \cdot E$$

Εξίσωση 2.3.

Μέσα σε ένα διάλυμα, η επιβραδυντική δύναμη της τριβής, F_F , που ασκείται στο ιόν, εξισορροπεί την ηλεκτροστατική δύναμη και μειώνει την ταχύτητα των ιόντων σύμφωνα με τη σχέση:

$$F_F = -6 \pi \eta r v_{ep}$$

Εξίσωση 2.4.

όπου F_F : η δύναμη της τριβής, η : το ιξώδες του διαλύματος, r : η ιοντική ακτίνα (για σφαιρικό ιόν) και v_{ep} : η ηλεκτροφορητική ταχύτητα του ιόντος.

Στο σημείο ισορροπίας των δύο αυτών δυνάμεων ($F_e = F_F$), αντικαθιστώντας τις πιο πάνω εξισώσεις, εξάγεται η σχέση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας (μ_{ep}):

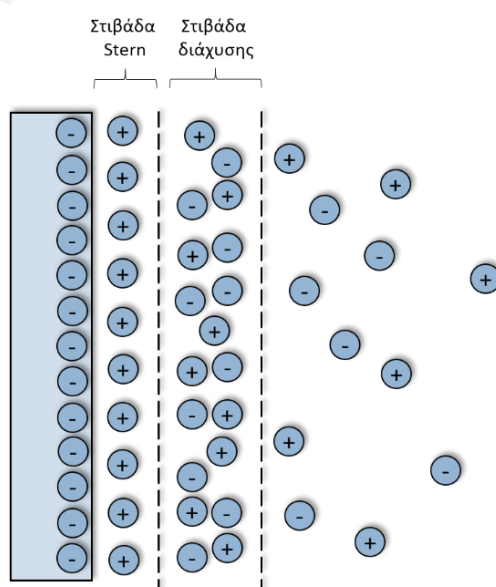
$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Εξίσωση 2.5.

Σύμφωνα με την Εξίσωση 2.5, η ηλεκτροφορητική ευκινησία είναι ανάλογη του ιοντικού φορτίου του αναλύτη και αντιστρόφως ανάλογη των επιβραδυντικών παραγόντων τριβής.

Συνεπώς, δύο ουσίες πρόκειται να διαχωριστούν μεταξύ τους, εάν διαφέρουν, είτε ως προς το φορτίο τους, είτε ως προς τις δυνάμεις τριβής που υφίστανται κατά την κίνησή τους στο ρυθμιστικό διάλυμα. Μικρά σε μέγεθος και μεγάλα σε φορτίο ιόντα πρόκειται να παρουσιάσουν μεγάλες ηλεκτροφορητικές ευκινησίες, σε αντίθεση με τα μεγάλα ιόντα με μικρό φορτίο που αναμένεται να παρουσιάσουν μικρότερες τιμές. Αντιθέτως, τα ουδέτερα σωματίδια δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν.

Κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού κατά μήκος ενός τριχοειδή σωλήνα, ο οποίος περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα, λαμβάνει χώρα ένα φαινόμενο γνωστό ως EOF, σύμφωνα με το οποίο προκαλείται ροή της κύριας μάζας του διαλύματος, είτε προς την κάθοδο, είτε προς την άνοδο. Αιτία της δημιουργίας της είναι η ηλεκτρική διπλοστιβάδα, που αναπτύσσεται μεταξύ της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας της τριχοειδούς στήλης και της κύριας μάζας του διαλύματος. Σε τιμές pH μεγαλύτερες από 3, προκαλείται αποπρωτονίωση των σιλανομάδων του εσωτερικού τοιχώματος της στήλης ($\text{SiOH} \rightarrow \text{SiO}^-$), με αποτέλεσμα αυτή να φορτίζεται αρνητικά. Έτσι, αντισταθμιστικά ιόντα τείνουν να προσροφώνται σε αυτήν μέσω ηλεκτροστατικής έλξης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ηλεκτρικής διπλοστιβάδας και μιας διαφοράς δυναμικού (δυναμικό ζ) κοντά στα τοιχώματα του τριχοειδούς. Το γεγονός αυτό εξισορροπεί το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας του τριχοειδούς, μέσω της δημιουργίας μιας σταθερής στιβάδας προσροφημένων ιόντων (Stern) και μιας εξωτερικής στιβάδας διάχυσης. Κατά την εφαρμογή δυναμικού κατά μήκος του τριχοειδούς, τα κατιόντα της διάχυτης εξωτερικής στιβάδας έλκονται προς την κάθοδο και επειδή είναι επιδιαλυτωμένα παρασύρουν μαζί τους και την κύρια μάζα του διαλύματος (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4. Κατανομή φορτίου στη διεπιφάνεια της τριχοειδούς στήλης.

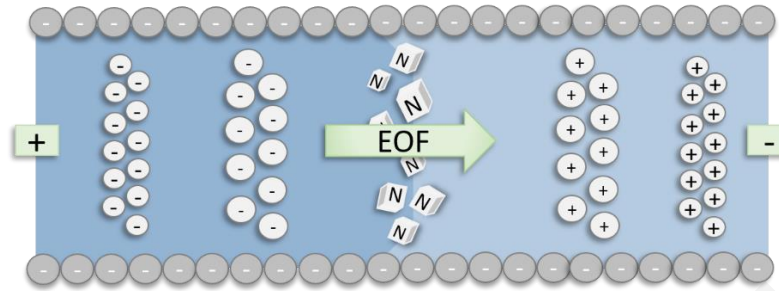
Η ταχύτητα της EOF είναι γενικά μεγαλύτερη από την ηλεκτροφορητική ταχύτητα των ιόντων, με αποτέλεσμα να λειτουργεί ως αντλία της κινητής φάσης κατά την CE. Συγκεκριμένα, η ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα περιγράφεται από τη σχέση:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{\eta}\right) \left(\frac{V}{L}\right) \quad \text{Εξίσωση 2.6.}$$

όπου v_{eo} : η ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), μ_{eo} : η ηλεκτροωσμωτική ευκινησία ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), η οποία περιγράφεται από το λόγο του γινομένου της διηλεκτρικής σταθεράς του ρυθμιστικού διαλύματος (ε) και του δυναμικού ζήτα της επιφάνειας του τριχοειδούς (ζ) ως προς το ιξώδες του ηλεκτρολυτικού διαλύματος (η), και E : η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$), η οποία ισούται με το λόγο της εφαρμοζόμενης τάσης (V) ως προς το συνολικό μήκος της στήλης (L).

Αν και οι αναλύτες μετακινούνται μέσα στο τριχοειδές ανάλογα με το φορτίο τους (με βάση την ηλεκτροφορητική τους ταχύτητα), η ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα είναι επαρκής ούτως ώστε να παρασύρει όλα τα θετικά, ουδέτερα, ακόμα και τα αρνητικά σωματίδια προς το ίδιο άκρο του τριχοειδούς έτσι, ώστε να μπορούν να ανιχνευθούν καθώς διέρχονται από ένα κοινό σημείο. Η ηλεκτροφορητική και ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα μιας ουσίας μπορούν να δρουν ως προς την ίδια ή σε αντίθετες κατευθύνσεις, ανάλογα με το φορτίο του ιόντος. Υπό κανονικές συνθήκες, δηλαδή όταν η επιφάνεια του τριχοειδούς είναι αρνητικά φορτισμένη, η ροή της κινητής φάσης πραγματοποιείται από την άνοδο προς την κάθοδο. Ως αποτέλεσμα, τα κατιόντα, τα οποία μετακινούνται στην ίδια κατεύθυνση με την EOF, κινούνται ταχύτερα και εξέρχονται πρώτα από τη στήλη. Αντίθετα, τα ανιόντα τα οποία μετακινούνται προς την άνοδο, δηλαδή προς την αντίθετη κατεύθυνση, παρουσιάζουν μικρότερες ταχύτητες και διέρχονται τελευταία από τον ανιχνευτή. Συνεπώς, η σειρά έκλουσης σε ένα τυπικό ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό είναι η ακόλουθη: πρώτα το ταχύτερο κατιόν (μεγάλο θετικό φορτίο και μικρό μέγεθος), ακολουθούμενο από τα διαδοχικώς βραδύτερα κατιόντα (μικρότερα φορτία και μεγαλύτερα μεγέθη), έπειτα τα μη διαχωριζόμενα ουδέτερα σωματίδια, ως μια ζώνη, και τέλος το βραδύτερο ανιόν (μικρό αρνητικό φορτίο και μεγάλο μέγεθος), ακολουθούμενο από τα διαδοχικώς ταχύτερα ανιόντα (μεγάλα φορτία και μικρά μεγέθη), σύμφωνα με το Σχήμα 2.5. Η κατεύθυνση της EOF μπορεί να αναστραφεί, μέσω τη χρήσης κατιονικού επιφανειοδραστικού στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το επιφανειοδραστικό προσροφάται στα τοιχώματα του τριχοειδούς, φορτίζοντάς το θετικά. Ως αποτέλεσμα, τα ανιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος συγκεντρώνονται κοντά

στην επιφάνεια του τριχοειδούς και με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου παρασύρονται προς την κάθοδο, δηλαδή το θετικό ηλεκτρόδιο.



Σχήμα 2.5. Σειρά έκλουσης σε ένα τυπικό ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό.

Ο χρόνος (t_m) που απαιτείται για να διανύσει μια διαλυμένη ουσία την απόσταση (l) από το σημείο εισαγωγής της στον τριχοειδή μέχρι το σημείο ανίχνευσής της (δραστικό μήκος τριχοειδούς) δίνεται από τη σχέση:

$$t_m = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V} \quad \text{Εξίσωση 2.7.}$$

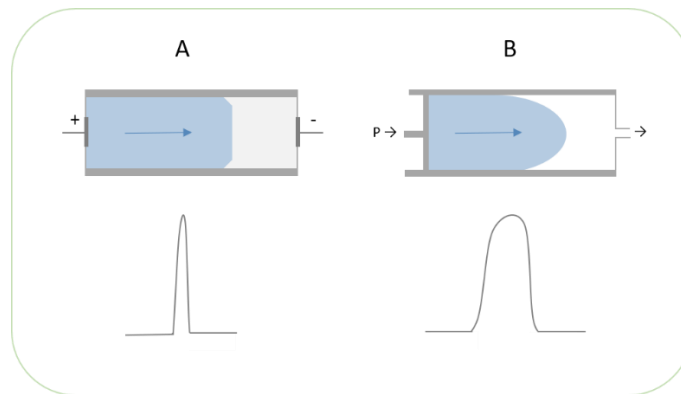
όπου t_m : ο χρόνος μετανάστευσης της ουσίας, v_{ep} και v_{eo} : η ηλεκτροφορητική και ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα, αντίστοιχα, l : το δραστικό μήκος της στήλης και L : το συνολικό μήκος του τριχοειδούς.

Αντίστοιχα, με βάση τους χρόνους μετανάστευσης των αναλυτών (t_m) και του ουδέτερου δείκτη (δηλαδή της EOF) (t_{eo}), μπορούν να προσδιοριστούν οι ηλεκτροωσμωτικές (μ_{eo}) και ηλεκτροφορητικές ευκινησίες, σύμφωνα με τις πιο κάτω εξισώσεις:

$$\mu_{eo} = \frac{lL}{t_{eo}V} \quad \text{Εξίσωση 2.8.}$$

$$\mu_{ep} = \frac{Ll}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad \text{Εξίσωση 2.9.}$$

Ένα βασικό χαρακτηριστικό της EOF είναι η επίπεδη κατανομή της κατά μήκος της τριχοειδούς στήλης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.6, η κινητήρια δύναμη της ροής (δηλαδή το αρνητικό φορτίο στα τοιχώματα του σωλήνα) είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη κατά μήκος του τριχοειδή, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται πτώση της πίεσης και η ροή του διαλύματος να είναι ομοιόμορφη σε ολόκληρη τη στήλη. Σε αντίθεση με την παραβολική κατανομή, που συναντάται σε ροή προκαλούμενη από πίεση (π.χ. υδροχρωματογραφία), η επίπεδη κατανομή δε συνεισφέρει σημαντικά στη διεύρυνση των ζωνών, γεγονός που ενισχύει την αποδοτικότητα των κορυφών [166,167,169].



Σχήμα 2.6. Κατανομή ροής υγρών υπό την επίδραση (A) ηλεκτροωσμωτικής πίεσης και (B) υδροδυναμικής πίεσης.

2.2.4. Τεχνικές CE

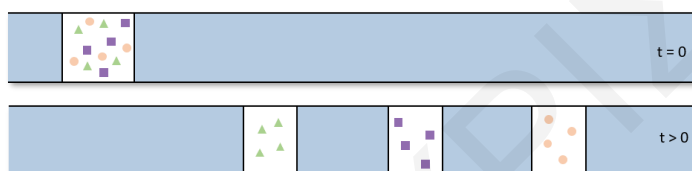
Κατά τη διάρκεια των χρόνων έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές CE. Εξαιτίας των πολυάριθμων τρόπων λειτουργίας της, η CE παρουσιάζει μια μεγάλη ευελιξία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια πληθώρα εφαρμογών. Κάθε τρόπος λειτουργίας παρουσιάζει το δικό του μοναδικό μηχανισμό διαχωρισμού, με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η ανάλυση μιας ευρείας κλίμακας ενώσεων, από απλά ανόργανα μόρια μέχρι σύνθετα βιολογικά πολυμερή. Στον Πίνακα 2.2 συνοψίζονται οι διάφοροι τρόποι λειτουργίας της CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός στην κάθε περίπτωση. Μεταξύ των τεχνικών που αναπτύχθηκαν, η CZE και η EKC αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ηλεκτροφορητικές τεχνικές διαχωρισμού.

Πίνακας 2.2. Βασικότερες τεχνικές CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός.

Τεχνική CE	Αρχή διαχωρισμού
Ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (CZE)	Κίνηση σε ελεύθερο διάλυμα / Φορτίο ως προς μέγεθος
Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (EKC)	Υδροφοβες/ιοντικές αλληλεπιδράσεις με πρόσθετα/ψευδοστατική φάση (π.χ. μικύλλια, CDs)
Ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς (CEC)	Υδροφοβες/ιοντικές αλληλεπιδράσεις με στατική φάση (υλικό πλήρωσης ή επικάλυψη στήλης)
Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής (CGE)	Μέγεθος και φορτίο μορίου
Ισοηλεκτρική εστίαση τριχοειδούς (CIEF)	Ισοηλεκτρικό σημείο
Ισοταχυφόρηση τριχοειδούς (CITP)	Κινούμενα μέτωπα/Μετανάστευση σε όρια ανάλογα με το λόγο φορτίο ως προς μέγεθος

2.2.4.1. Ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (CZE)

Η CZE αποτελεί την απλούστερη και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική CE [168]. Στην τεχνική αυτή, οι ουσίες διαχωρίζονται σε τριχοειδές που περιέχει μόνο ρυθμιστικό διάλυμα και ο μηχανισμός του διαχωρισμού βασίζεται στις βασικές αρχές της ηλεκτροφόρησης (οι οποίες διατυπώθηκαν παραπάνω) [167]. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.7, κατά την CZE, τα συστατικά του δείγματος κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και διακρίνονται, έτσι, σε ξεχωριστές ζώνες [166,167]. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να διαχωριστούν οι θετικά και αρνητικά φορτισμένοι αναλύτες, όχι όμως και τα ουδέτερα συστατικά τα οποία παρασύρονται από την EOF και συνεκλούνται μαζί της [167].



Σχήμα 2.7. Τρόπος λειτουργίας CZE.

2.2.4.2. Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (EKC)

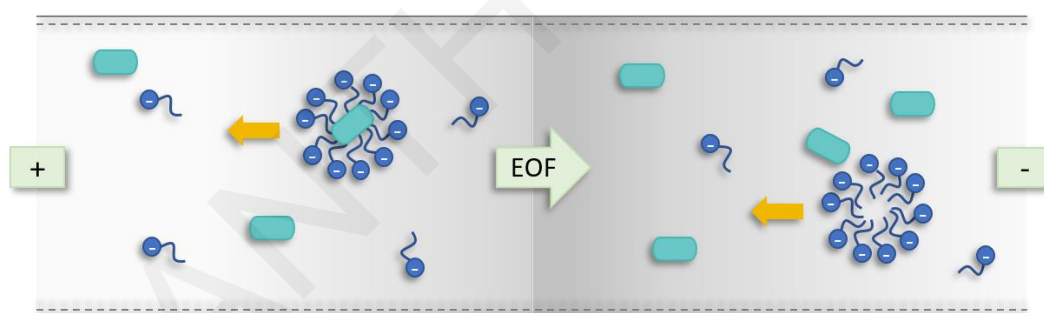
Η EKC συνιστά ένα υβρίδιο της CE και της υγροχρωματογραφίας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό, τόσο φορτισμένων, όσο και ουδέτερων αναλυτών. Βασικό γνώρισμα της EKC, είναι η παρουσία προσθέτου στο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο λειτουργεί ως ψευδοστατική φάση και το οποίο αλληλεπιδρά σε διαφορετικό βαθμό με τον κάθε αναλύτη. Ως ψευδοστατικές φάσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα μικύλλια, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζουν και οι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες [166,171].

Μικυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς (MEKC)

Η CE που πραγματοποιείται παρουσία μικυλλίων, αναφέρεται ως MEKC [166]. Στην τεχνική αυτή, ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει επιφανειοδραστική ουσία σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (critical micellar concentration, CMC). Στη συγκέντρωση αυτή, τα τασιενεργά συστατικά σχηματίζουν σφαιρικά συσσωματώματα, στα οποία οι υδρογονανθρακικές ουρές εκτείνονται προς το εσωτερικό των μικυλλίων, αφήνοντας, έτσι, τις υδρόφιλες ομάδες σε άμεση επαφή με το υδατικό διάλυμα [166]. Στις περισσότερες

περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται ανιονικά επιφανειοδραστικά, με το SDS να αποτελεί το πιο ευρέως διαδεδομένο τασιενεργό συστατικό στη ΜΕΚC [172].

Στο Σχήμα 2.8 αναπαρίσταται η βασική αρχή της μεθόδου, με χρήση ανιονικών επιφανειοδραστικών. Εν συντομία, η επιφάνεια ενός ανιονικού μικυλλίου έχει μεγάλο αρνητικό φορτίο, το οποίο του προσδίδει μεγάλη ηλεκτροφορητική ευκινησία ως προς την άνοδο. Καθώς η EOF είναι ισχυρότερη από την ηλεκτροφορητική ταχύτητα των μικυλλίων, τα ανιονικά μικύλλια παρασύρονται τελικά προς την κάθοδο, παρουσιάζοντας, ωστόσο, μια αρκετά χαμηλότερη ταχύτητα [173]. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης το μίγμα του ρυθμιστικού διαλύματος αποτελείται από μια ταχύτερα κινούμενη υδατική φάση, την κινητή φάση, και μια βραδύτερα κινούμενη μικυλλιακή φάση, την ψευδοστατική φάση [166,172]. Κατά τη μετανάστευσή τους, τα μικύλλια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις προσδιοριζόμενες ουσίες μέσω υδροφοβικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [167]. Με τον τρόπο αυτό, οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ της υδατικής και της μικυλλιακής φάσης, σε διαφορετικό βαθμό, και είναι δυνατό να διαχωριστούν, τόσο τα φορτισμένα, όσο και τα ουδέτερα συστατικά του δείγματος [166].



Σχήμα 2.8. Βασική αρχή διαχωρισμού ΜΕΚC με χρήση ανιονικών επιφανειοδραστικών.

Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία κυκλοδεξτρίνης (CD-EKC)

Οι CD's έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για το διαχωρισμό, τόσο χειρόμορφων, όσο και μη χειρόμορφων μορίων. Εξαιτίας της ιδιαίτερης δομής που παρουσιάζουν (υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα) έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού (host/guest complexes) με μια ποικιλία αναλυτών [117,174]. Η συμπλοκοποίηση των αναλυτών λαμβάνει χώρα μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου, ενώ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της συμπλοκοποίησης φαίνεται να διαδραματίζουν οι στεरिकές αλληλεπιδράσεις [175]. Ως

αποτέλεσμα της συμπλοκοποίησης, προκαλείται μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των αναλυτών και, ως εκ τούτου, βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας [117].

2.3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η HPLC ανήκει στην κατηγορία των χρωματογραφικών τεχνικών. Η χρωματογραφία, ως τεχνική διαχωρισμού, αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια του προηγούμενου αιώνα από το Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett στην προσπάθεια του να διαχωρίσει φυτικές χρωστικές με τη βοήθεια μιας στήλης που περιείχε λεπτόκοκκο ανθρακικό ασβέστιο ως πληρωτικό υλικό. Οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως χρωματιστές ταινίες στη στήλη. Γι' αυτό και ο Tswett έδωσε στην τεχνική το χαρακτηριστικό αυτό όνομα, από τις ελληνικές λέξεις «χρώμα» και «γραφή» [176].

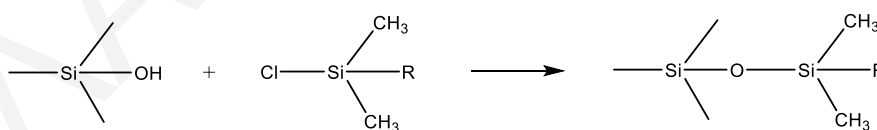
Η χρωματογραφία συνιστά μια πανίσχυρη τεχνική διαχωρισμού. Στην τεχνική αυτή, η κινητή φάση η οποία περιέχει το δείγμα προς ανάλυση διέρχεται διαμέσου μιας στατικής φάσης, η οποία μπορεί να είναι, είτε καθηλωμένη στη στήλη, είτε σε μια στερεή επιφάνεια. Για να μπορέσουν τα συστατικά του δείγματος να διαχωριστούν μεταξύ τους, θα πρέπει να αλληλεπιδρούν με τις δύο αυτές φάσεις σε διαφορετικό βαθμό. Όσο πιο ισχυρά κατακρατείται ένα συστατικό από τη στατική φάση, τόσο πιο αργά κινείται διαμέσου της στήλης και άρα τόσο πιο αργά εκλύεται από αυτήν – και το αντίθετο. Εξαιτίας αυτής της διαφοράς στην κινητικότητα, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται, δίνοντας στο τελικό χρωματογράφημα κορυφές σε διαφορετικούς χρόνους, οι οποίες μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά και ποσοτικά [166].

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται ανάλογα με τη φύση τις κινητής φάσης στις εξής κύριες κατηγορίες: την υγροχρωματογραφία, την αεριοχρωματογραφία και τη χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού με τις κινητές φάσεις να είναι υγρά, αέρια και υπερκρίσιμα ρευστά, αντίστοιχα [166]. Η HPLC αποτελεί μια σύγχρονη μορφή της υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία η στήλη πακετάρεται με πορώδη σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου (3-5 μm) και η υγρή κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στήλης μέσω της εφαρμογής υψηλών πιέσεων [177,178]. Η HPLC έκανε την εμφάνιση της κατά τα τέλη της δεκαετίας του '60, όταν και αναπτύχθηκε η τεχνολογία παραγωγής πληρωτικών υλικών με σωματίδια μικρής διαμέτρου, καθώς και εξελιγμένων μέσων που θα μπορούσαν να παράγουν τις υψηλές πιέσεις που απαιτούνται για τη ροή της κινητής φάσης. Σήμερα, η HPLC αντιπροσωπεύει το 60% της παγκόσμιας αγοράς των επιστημών διαχωρισμού [179]. Ο όρος υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιείται για να διακρίνει αυτές τις νεότερες τεχνικές από τις παλαιότερες, οι οποίες περιλαμβάνουν γυάλινες στήλες με

μεγαλύτερου μεγέθους πληρωτικά υλικά. Αν και οι παλαιότερες αυτές τεχνικές χρειάζονται περισσότερο χρόνο προκειμένου να διεξαχθούν και δε διαθέτουν την απαιτούμενη επαναληψιμότητα, εντούτοις εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται κυρίως για παρασκευαστικούς σκοπούς [180].

2.3.1. Τύποι υγροχρωματογραφίας

Η ευρεία αποδοχή της HPLC πιθανό να οφείλεται στους διάφορους τρόπους λειτουργίας της. Στον Πίνακα 2.3 συνοψίζονται οι βασικότερες τεχνικές HPLC και οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός στην κάθε περίπτωση. Η χρωματογραφία κατανομής αποτελεί το συνηθέστερο τύπο υγροχρωματογραφίας, με το διαχωρισμό να στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του δείγματος μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Η τεχνική αυτή υποδιαιρείται σε δύο ομάδες: τη χρωματογραφία υγρού-υγρού και τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης. Στην πρώτη περίπτωση, η υγρή στατική φάση κατακρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση. Στη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης, η οποία αποτελεί και την επικρατέστερη τεχνική, η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού στήριξης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται αντίδραση των ομάδων σιλανόλης της επιφάνειας του υλικού πλήρωσης με ένα οργανοχλωριωμένο σιλάνιο, σύμφωνα με την εξίσωση του Σχήματος 2.9. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει εισαγωγή υδρογονανθρακικών ομάδων (π.χ. C₈ και C₁₈) ή και ομάδων υδρογονάνθρακα με πολικές τερματικές ομάδες (π.χ. R-CN, R-NH₂) στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης.



Σχήμα 2.9. Χημική αντίδραση ομάδων σιλανόλης και οργανοχλωριωμένου σιλανίου.

Με βάση τη σχετική πολικότητα της κινητής και στατικής φάσης, η χρωματογραφία κατανομής διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: τη χρωματογραφία κανονικής φάσης και τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιείται μια στατική φάση υψηλής πολικότητας, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένας σχετικά μη πολικός διαλύτης, για αυτό και οι λιγότερο πολικές ενώσεις εκλύονται πρώτες από τη στήλη. Αντίθετα, στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης η στατική φάση είναι μη πολική, ενώ η κινητή φάση είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης, με αποτέλεσμα τα πολικότερα συστατικά

να εκκλούνται πρώτα. Ίσως τα $\frac{3}{4}$ των εφαρμογών της HPLC να πραγματοποιούνται με στήλες αντίστροφης φάσης, με συνηθέστερη τη χρήση των επιστρώσεων C₈ και C₁₈.

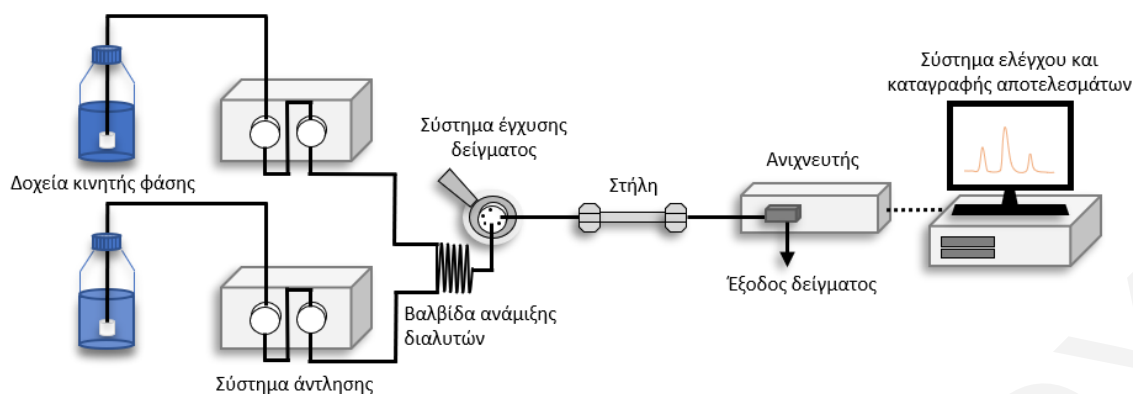
Η ανάλυση στην HPLC μπορεί να πραγματοποιηθεί, είτε με ισοκρατική, είτε με βαθμιδωτή έκλυση. Στην πρώτη περίπτωση, η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Πολλές φορές, η απόδοση του διαχωρισμού ενισχύεται μέσω της βαθμιδωτής έκλυσης κατά την οποία χρησιμοποιούνται δύο ή τρία συστήματα διαλυτών που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα. Ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της έκλυσης με προγραμματισμένο τρόπο, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά ο χρόνος διαχωρισμού και να βελτιώνεται η διαχωριστική ικανότητα [166,181].

Πίνακας 2.3. Βασικές αρχές διαχωρισμού των πιο κοινών τεχνικών υγροχρωματογραφίας [181].

Τεχνική	Βασική αρχή διαχωρισμού
Χρωματογραφία κατανομής	Κατανομή αναλυτών μεταξύ κινητής και στατικής φάσης
Χρωματογραφία προσρόφησης	Προσρόφηση αναλυτών στη στατική φάση
Χρωματογραφία ιαονανταλλαγής	Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτισμένων αναλυτών και αντίθετα φορτισμένων ομάδων στατικής φάσης
Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών	Μέγεθος και σχήμα αναλυτών

2.3.2. Οργανολογία

Τα σύγχρονα συστήματα HPLC παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή απόδοση λόγω της χρήσης υλικών πλήρωσης με σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου. Για να επιτευχθούν, ωστόσο, ικανοποιητικές ταχύτητες ροής της κινητής φάσης όταν χρησιμοποιούνται τέτοια υλικά πλήρωσης απαιτούνται εξαιρετικά υψηλές πιέσεις (μερικές χιλιάδες psi). Ως αποτέλεσμα, η οργανολογία της HPLC είναι αρκετά πιο πολύπλοκη και δαπανηρή σε σχέση με αυτή που χρησιμοποιείται σε άλλες χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού. Τα σημαντικότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται μια διάταξη HPLC είναι: (1) τα δοχεία της κινητής φάσης και το σύστημα επεξεργασίας διαλυτών, (2) το σύστημα άντλησης, (3) το σύστημα έγχυσης του δείγματος, (4) η χρωματογραφική στήλη, (5) ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές, (6) το σύστημα ελέγχου και καταγραφής των αποτελεσμάτων (Σχήμα 2.10) [177,178].



Σχήμα 2.10. Τυπικό σύστημα HPLC.

2.3.3. Ανίχνευση

Ένα ιδανικό σύστημα ανίχνευσης θα πρέπει να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: (i) μεγάλη ευαισθησία, (ii) γραμμική απόκριση σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων, (iii) σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα, (iv) σύντομους χρόνους απόκρισης, ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής, (v) μικρούς όγκους ανίχνευσης προς αποφυγή της διεύρυνσης των κορυφών, (vi) αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση, (vii) χαμηλό θόρυβο και (viii) σταθερή απόκριση, ανεξάρτητη από τις μεταβολές της θερμοκρασίας και της σύστασης της κινητής φάσης [166,182]. Στην πραγματικότητα είναι αδύνατο να υπάρξει ένας ανιχνευτής που να πληροί όλα τα παραπάνω κριτήρια. Αν και δεν υπάρχει ένας καθολικός ανιχνευτής στην HPLC, οι ανιχνευτές που είναι σήμερα διαθέσιμοι επιτρέπουν την εκτέλεση μιας ευρείας κλίμακας εφαρμογών [183].

Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο τύποι ανιχνευτών στην HPLC: (α) αυτοί που ανταποκρίνονται σε μια βασική ιδιότητα της κινητής φάσης (bulk property detectors) και (β) εκείνοι που ανταποκρίνονται σε μια ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού (solute property detectors). Οι πρώτοι μετρούν τη μεταβολή μιας φυσικής ιδιότητας του διαλύτη έκλυσης (π.χ. δείκτης διάθλασης) στην παρουσία των εκλουόμενων συστατικών, ενώ, οι δεύτεροι επικεντρώνονται σε με μια φυσική ή χημική ιδιότητα του ίδιου του συστατικού (π.χ. απορρόφηση στο UV/Vis) [166,184]. Στον Πίνακα 2.4 συνοψίζονται οι συνηθέστεροι τύποι ανίχνευσης στην HPLC.

Πίνακας 2.4. Απόδοση ανιχνευτών υγροχρωματογραφίας [182].

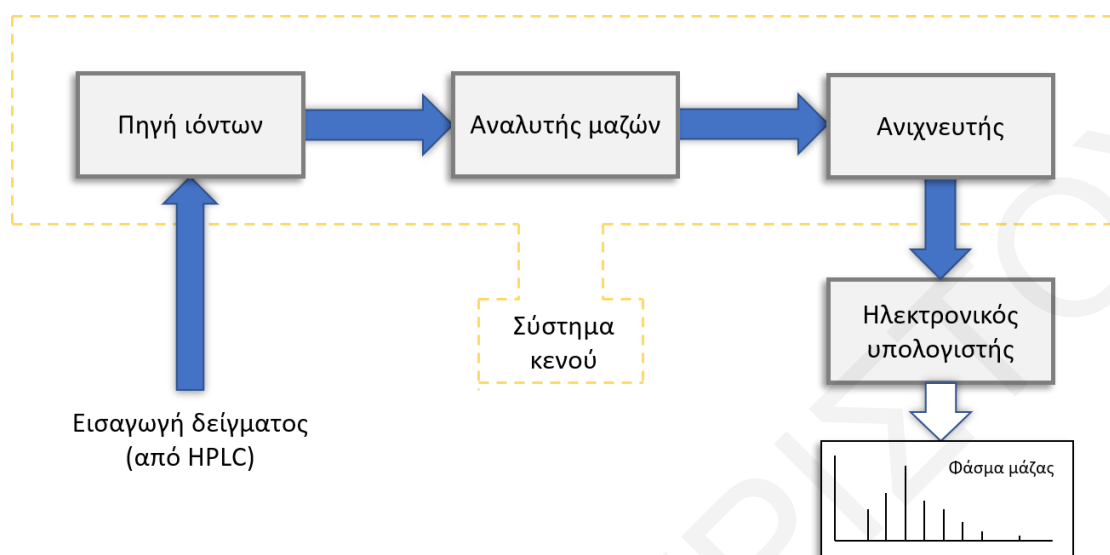
Ανιχνευτής	Όριο ανίχνευσης (ng)
Δείκτη διάθλασης	10-100
Σκέδασης φωτός	0.1
Απορρόφησης UV/Vis	0.1
Ηλεκτροχημικός	0.01-0.001
Φθορισμού	0.01-0.001
Φασματομετρίας μαζών	0.1-0.001

Η φύση του αναλύτη προσδιορίζει και τον τύπο του ανιχνευτή που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί στην κάθε εφαρμογή [182]. Ο ανιχνευτής UV/Vis ήταν ένας από τους πρώτους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στην υγροχρωματογραφία και εξακολουθεί, μέχρι και σήμερα, να αποτελεί ένα από τους δημοφιλέστερους τύπους ανίχνευσης στην HPLC. Ο συγκεκριμένος τύπος ανίχνευσης στηρίζεται στην απορρόφηση UV/Vis ακτινοβολίας (200-600 nm) από το διάλυμα καθώς αυτό διέρχεται από την κυψελίδα έκλουσης [183]. Η ευρεία του χρήση οφείλεται κυρίως στο χαμηλό του κόστος και τη μεγάλη του σταθερότητα. Ωστόσο, πολλές φορές απαιτείται η χρήση πιο ευαίσθητων και εκλεκτικών τεχνικών ανίχνευσης. Η ανάγκη για ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενώσεων από πολύπλοκα μίγματα και μάλιστα σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις οδήγησε σε αύξηση των εφαρμογών της MS. Η σύζευξη της HPLC με τη MS (HPLC-MS) αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές διαχωρισμού της σύγχρονης αναλυτικής χημείας [66].

2.3.3.1. Φασματομετρία μαζών (MS)

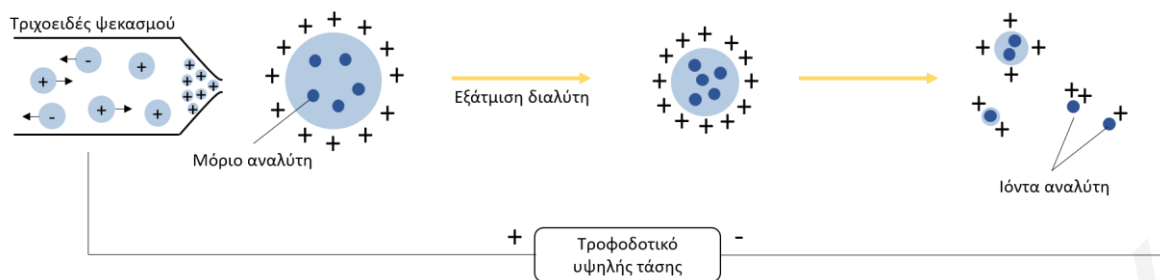
Η MS είναι ίσως η τεχνική με το μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών. Στην εν λόγω τεχνική διαχωρισμού, τα μόρια ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και, στη συνέχεια, διαχωρίζονται με βάση το λόγο μάζα-προς-φορτίο (m/z) [166,182]. Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών διαθέτει, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.11, τα εξής επιμέρους τμήματα: (1) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, (2) την πηγή ιόντων, όπου τα μόρια του δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα, (3) τον αναλυτή μαζών στον οποίο διαχωρίζονται τα ιόντα με βάση το λόγο m/z , (4) τον ανιχνευτή, ο οποίος μετατρέπει την ιοντική δέσμη σε ηλεκτρικό σήμα και (5) το σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων. Η πηγή ιόντων, ο αναλυτής μαζών και ο ανιχνευτής λειτουργούν υπό συνθήκες κενού, προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν συγκρούσεις των παραγόμενων ιόντων με ουδέτερα μόρια που υπάρχουν στο σύστημα. Τέτοιου είδους συγκρούσεις έχουν ως αποτέλεσμα τη

μείωση της ευαισθησίας του οργάνου και τη λήψη εξαιρετικά πολύπλοκων φασμάτων [185,186].



Σχήμα 2.11. Συνοπτικό διάγραμμα φασματομέτρου μαζών.

Αν και έχουν προταθεί διάφοροι τύποι ιοντισμού, ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI) αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πηγή ιόντων κατά τη μελέτη των πολυφαινολικών ενώσεων [37,63,95]. Ο ESI πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία μέσω μιας διαδικασίας που απεικονίζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 2.12. Εν συντομία, το διάλυμα του δείγματος τροφοδοτείται στο τριχοειδές ψεκασμού, το οποίο διατηρείται σε δυναμικό 1-4 kV, και μετατρέπεται, υπό την επίδραση του ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, σε ένα λεπτό εκνέφωμα φορτισμένων σταγονιδίων. Ακολούθως, η εξάτμιση του διαλύτη μετατρέπει τα φορτισμένα σταγονίδια σε ιόντα αέριας φάσης. Συγκεκριμένα, καθώς απομακρύνεται ο διαλύτης, το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται σε τέτοιο βαθμό που, τελικά, οι απώσεις μεταξύ των φορτίων είναι τόσο ισχυρές που υπερνικούν τις δυνάμεις της επιφανειακής τάσης. Ως εκ τούτου, προκαλείται επαναλαμβανόμενη διάσπαση των σταγονιδίων με τελικό αποτέλεσμα την εκρόφηση των ιόντων στο περιβάλλον αέριο. Συνήθως ένα αέριο εκνέφωσης (nebulizer gas) και ένα αέριο ξήρανσης (drying gas) χρησιμοποιούνται για να διευκολύνουν τη διαδικασία σχηματισμού των φορτισμένων σταγονιδίων και την εξάτμιση του διαλύτη, αντίστοιχα [185–187].



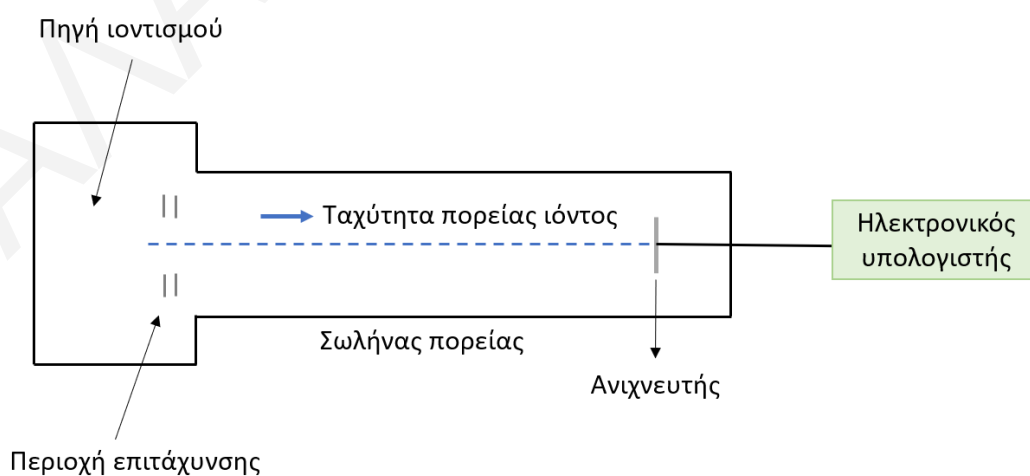
Σχήμα 2.12. Βασική αρχή λειτουργίας του ESI.

Στη συνέχεια, τα παραγόμενα ιόντα επιταχύνονται προς τον αναλυτή μαζών όπου και διαχωρίζονται με βάση το λόγο m/z [185]. Διάφοροι τύποι αναλυτών έχουν χρησιμοποιηθεί κατά τη μελέτη των πολυφαινολικών ενώσεων, μεταξύ των οποίων ο τετραπολικός αναλυτής, ο αναλυτής μαζών «χρόνου πτήσης» (time-of-flight, TOF) και ο αναλυτής «παγίδας ιόντων» (ion trap). Επιπλέον, συχνά γίνεται χρήση της MS/MS, συνήθως με το συνδυασμό τριών τετραπόλων [63]. Στον Πίνακα 2.5 συνοψίζονται οι βασικές αρχές λειτουργίας του κάθε αναλυτή μαζών που αναφέρθηκε προηγουμένως.

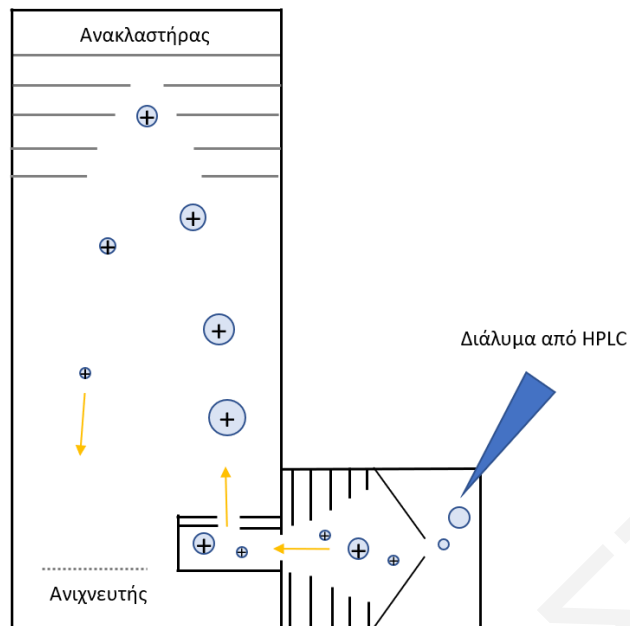
Πίνακας 2.5. Βασικές αρχές λειτουργίας των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων αναλυτών στη MS [185].

Αναλυτής μαζών	Βασική αρχή λειτουργίας
Τετραπολικός αναλυτής	Λειτουργεί ως φίλτρο μάζας, επιτρέποντας μόνο σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z να φτάσουν στον ανιχνευτή, όλα τα υπόλοιπα ιόντα εξουδετερώνονται
Αναλυτής TOF	Τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση το διαφορετικό χρόνο πτήσης τους για μια γνωστή απόσταση
Αναλυτής «παγίδας ιόντος»	Τα ιόντα παγιδεύονται σε ένα τρισδιάστατο πεδίο. Η αύξηση της κινητικής ενέργειας των ιόντων οδηγεί στη σταδιακή τους απελευθέρωση από την παγίδα
Τριπλό τετράπολο	Πρώτο τετράπολο: επιλογή μητρικού ιόντος Δεύτερο τετράπολο: θραύση μητρικού ιόντος και παραγωγή θυγατρικών ιόντων Τρίτο τετράπολο: διαχωρισμός θυγατρικών ιόντων

Δεδομένου ότι η παρούσα έρευνα στηρίχτηκε στη χρήση του αναλυτή μαζών TOF, κρίνεται απαραίτητη μια πιο λεπτομερής εξέταση του τρόπου λειτουργίας του. Στην τεχνική αυτή, τα επιταχυνόμενα σωματίδια διέρχονται μέσω ενός σωλήνα πορείας (drift tube), ο οποίος είναι απαλλαγμένος από πεδία και έχει μήκος περίπου ένα μέτρο (Σχήμα 2.13). Εφόσον όλα τα ιόντα έχουν, κατά την είσοδό τους στο σωλήνα, την ίδια κινητική ενέργεια, οι ταχύτητες που αποκτούν μέσα στο σωλήνα είναι αντιστρόφως ανάλογες της μάζας τους. Έτσι, τα ελαφρύτερα ιόντα κινούνται ταχύτερα μέσα στο σωλήνα και φθάνουν νωρίτερα στον ανιχνευτή. Αντίθετα, τα βαρύτερα σωματίδια κινούνται βραδύτερα και ανιχνεύονται αργότερα. [166]. Τα πρώιμα συστήματα TOF-MS αν και προσέφεραν μικρούς χρόνους ανάλυσης, παρουσίαζαν ένα σημαντικό μειονέκτημα, περιορισμένη διακριτική ικανότητα [186,188]. Ωστόσο, σήμερα, εξαιτίας της βελτιωμένης τους τεχνολογίας, είναι σε θέση να προσφέρουν πολύ υψηλές τιμές διακριτικής ικανότητας της τάξεως των 10000-40000 FWHM (full width at half maximum) και ακρίβεια μάζας στο εύρος 1-5 ppm [189]. Η εισαγωγή ανακλαστήρων (reflectors), η οποία διπλασίασε το μήκος της διαδρομής πτήσης, καθώς και η χρήση συστημάτων γρήγορης ανίχνευσης επέτρεψαν την ανάπτυξη μιας νέας γενιάς οργάνων, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των φασματομέτρων μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (Σχήμα 2.14.) [188]. Η σύζευξη της HPLC με τη HRMS παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή αναλυτική απόδοση, παρέχοντας πιο ολοκληρωμένες πληροφορίες σχετικά με την ακριβή μοριακή μάζα, τη στοιχειακή σύνθεση και τη λεπτομερή μοριακή δομή μιας δεδομένης χημικής ένωσης και, ταυτόχρονα, επιτρέποντας στοχευμένους και μη-στοχευμένους τρόπους ανάλυσης [189].



Σχήμα 2.13. Αναπαράσταση τυπικού συστήματος TOF-MS.



Σχήμα 2.14. Σύγχρονα συστήματα TOF-MS.

Οι κύριες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στη MS διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: (α) την τεχνική πλήρους σάρωσης (full scan) και (β) την τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (single ion monitoring, SIM). Στην πρώτη περίπτωση, λαμβάνεται το πλήρες φάσμα μεταξύ δύο τιμών m/z για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Η τεχνική αυτή είναι εξαιρετικά χρήσιμη για την ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων και, συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της ταυτότητας/δομής άγνωστων ενώσεων με βάση τα μοριακά τους βάρη ή/και τα υπάρχοντα πρότυπα φάσματα. Η τεχνική SIM στηρίζεται στην παρακολούθηση συγκεκριμένων ιόντων και χρησιμοποιείται κυρίως για την ποσοτική ανάλυση γνωστών ενώσεων των οποίων τα φάσματα μάζας είναι ήδη διαθέσιμα [186].

3. Πειραματικό μέρος

Στη συνέχεια περιγράφεται το πειραματικό μέρος, για κάθε μελέτη ξεχωριστά, που πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή. Το πειραματικό μέρος είναι χωρισμένο σε τρία υποκεφάλαια, που αντιστοιχούν στις τρεις βασικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν: (1) εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων, (2) προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD και (3) προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής HPLC-HRMS.

3.1. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων

3.1.1. Αντιδραστήρια

Για την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες η ακετόνη, η μεθανόλη (MeOH) και η αιθανόλη (EtOH), οι οποίες προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Supelco (Bellefonte, PA, USA) και ήταν υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (HPLC-grade). Τα αντιδραστήρια για τη φασματοφωτομετρική ανάλυση, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) καθώς και το πρότυπο του γαλλικού οξέος, προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.1.2. Προετοιμασία εκχυλισμάτων

3.1.2.1. Δείγματα χαρουπιού

Λήφθηκαν ώριμοι και άγουροι καρποί από χαρουπιές της επαρχίας Πάφου (Σχήμα 3.1). Οι καρποί συλλέχθηκαν το 2019 από το ίδιο δέντρο, που βρίσκεται στο χωριό Αρχιμανδρίτα της επαρχίας Πάφου (υψόμετρο: 436 m), σε διαφορετικούς χρόνους ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσής τους. Συγκεκριμένα, οι άγουροι καρποί συλλέχθηκαν αρχές Ιουνίου, ενώ αρχές Σεπτεμβρίου συλλέχθηκαν τα ώριμα φρούτα. Η περιεκτικότητα των άγουρων και ώριμων καρπών σε υγρασία, η οποία προσδιορίστηκε με βαρυμετρική ανάλυση σύμφωνα με την επίσημα αποδεκτή μέθοδο του Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [190], βρέθηκε να είναι ίση με $71.7 \pm 0.1\%$ και $14.5 \pm 0.2\%$, αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες, οι καρποί που συλλέχθηκαν, αρχικά, πλύθηκαν και τεμαχίστηκαν. Οι σπόροι απομακρύνθηκαν και η σάρκα που παρέμεινε αλέσθηκε (Thermomix® TM5, Vorwerk, Wuppertal, Germany) και, στη συνέχεια, ξηράθηκε με τη βοήθεια ενός λυοφιλοποιητή (LyoDry Compact Benchtop Freeze Dryer, Mechatech Systems Bristol, UK). Για τη λήψη σκόνης χαρουπιού με ομοιόμορφο μέγεθος σωματιδίων, έλαβε χώρα κοσκίνισμα της απαλλαγμένης από υγρασία σκόνης χαρουπιού με τη χρήση

ενός κόσκινου, διαμέτρου πόρων 250 μm (Endecotts, London, UK). Τέλος, τα δείγματα συσκευάστηκαν υπό κενό (4100050 Sealcom-V, J. P. Selecta, Barcelona, Spain) και αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την περαιτέρω τους επεξεργασία και ανάλυση.



Σχήμα 3.1. Άγουροι και ώριμοι καρποί της επαρχίας Πάφου.

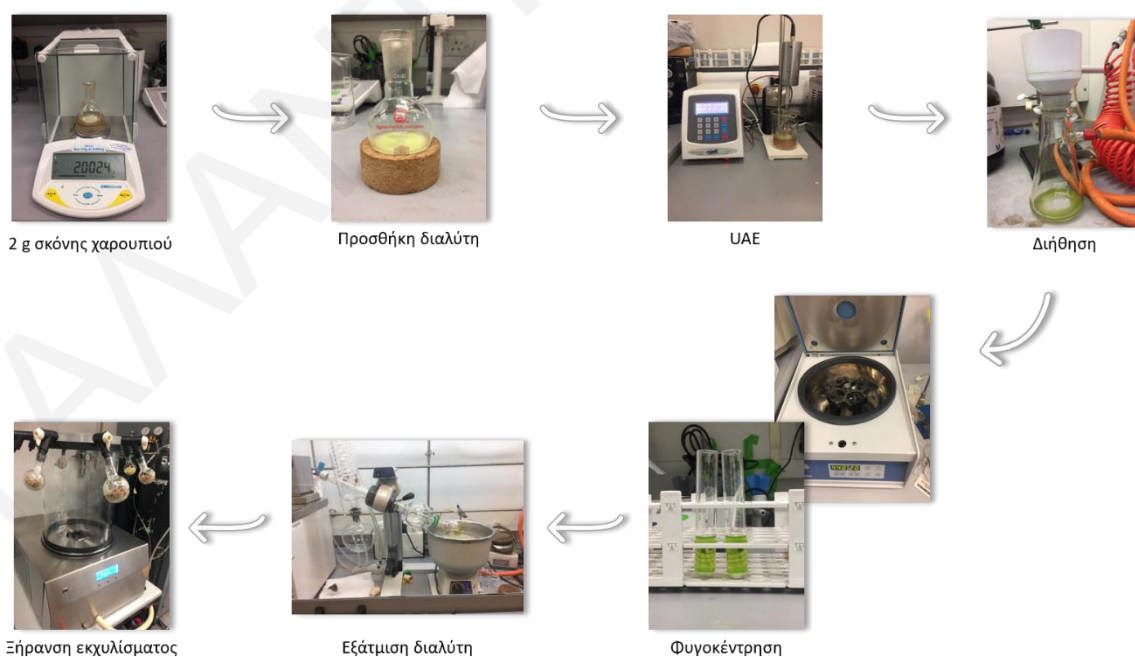
3.1.2.2. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)

Η UAE πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός συστήματος εκπομπής υπερήχων (ultrasonic probe system) ισχύος 500 W και συχνότητας 20 kHz, της εταιρείας Optic Ivymen System[®] (CY-500, Madrid, Spain) (Σχήμα 3.2). Για την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων, 2 g σκόνης χαρουπιού αναμείχθηκαν με την κατάλληλη ποσότητα διαλύτη και το μίγμα που προέκυψε υπέστη κατεργασία με υπερήχους κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, σύμφωνα με τον εκάστοτε πειραματικό σχεδιασμό. Ειδικότερα, η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές αναλογίες στερεού-διαλύτη και συγκεντρώσεις διαλύτη, μεταβάλλοντας, ταυτόχρονα, το χρόνο επεξεργασίας των δειγμάτων και το πλάτος ταλάντωσης των υπερήχων, με απώτερο σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση, τόσο της συνεχούς (0s:0s), όσο και της παλμικής λειτουργίας (5s:5s). Μετά την εξαγωγή των πολυφαινολών, ακολούθησε διήθηση (Whatman no1, Maidstone, UK) και φυγοκέντρηση (Centromix II-BL, Selecta, Barcelona, Spain) του διηθήματος με σκοπό την απομάκρυνση οποιουδήποτε περιεχόμενου στερεού. Για την απομάκρυνση του διαλύτη και τη λήψη του στερεού εκχυλίσματος, έγινε εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό (RE300, stuart[®], Wolf Laboratories, North Yorkshire, UK) και, στη συνέχεια, ξήρανση του εκχυλίσματος μέσω της διαδικασίας λυοφιλοποίησης. Στο Σχήμα 3.3 αναπαρίστανται διαγραμματικά η συνοπτική διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την

εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων. Το στερεό δείγμα που προέκυψε συσκευάστηκε υπό κενό και αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, μέχρι την περαιτέρω του ανάλυση. Όλα τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν εις τριπλούν.



Σχήμα 3.2. Σύστημα εκπομπής υπερήχων (ultrasonic probe system).



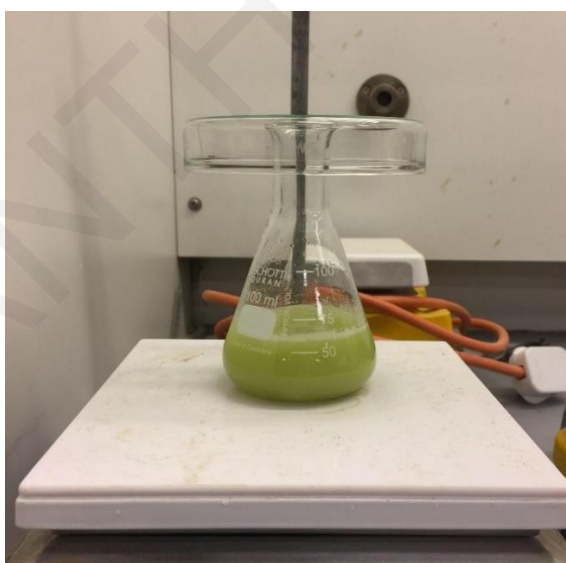
Σχήμα 3.3. Συνοπτικό διάγραμμα της διαδικασίας που ακολουθήθηκε κατά την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων μέσω της UAE.

3.1.2.3. Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης

Στη συνέχεια, έλαβε χώρα ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων με τη χρήση δύο ευρέως χρησιμοποιούμενων κλασσικών τεχνικών εξαγωγής. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση υπό ανάδευση και η εκχύλιση Soxhlet. Για σκοπούς σύγκρισης, οι δύο αυτές τεχνικές πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες που προσδιορίστηκαν κατά την ανάπτυξη της UAE.

3.1.2.3.1. Εκχύλιση υπό ανάδευση

Εν συντομία, έλαβε χώρα εκχύλιση υπό ανάδευση (14 min) του φυτικού υλικού (2 g) με 50 mL του διαλύτη εκχύλισης (57%, v/v, ακετόνη), σε θερμοκρασία δωματίου και με τη χρήση του μαγνητικού αναδευτήρα (Σχήμα 3.4). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εκχύλισης, έλαβε χώρα απομάκρυνση των αδιάλυτων στερεών (διήθηση και φυγοκέντρηση) και ξήρανση του εκχυλίσματος (εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό και λυοφιλοποίηση). Το στερεό εκχύλισμα αποθηκεύτηκε υπό κενό και στην κατάψυξη (-20 °C), μέχρι την περαιτέρω του ανάλυση. Για κάθε δείγμα έλαβαν χώρα τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις.

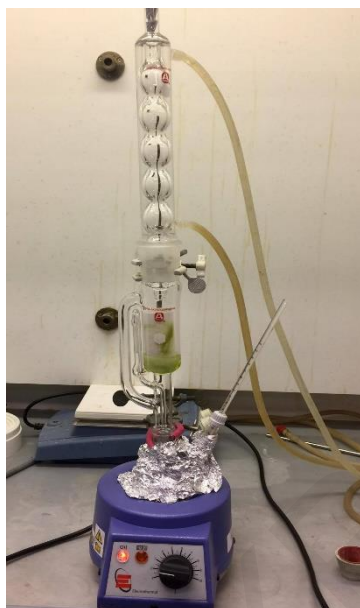


Σχήμα 3.4. Εκχύλιση υπό ανάδευση της σάρκας των άγουρων καρπών.

3.1.2.3.2. Εκχύλιση Soxhlet

6 g σκόνης χαρουπιού εκχυλίστηκαν με συνεχή επαναροή του διαλύτη εκχύλισης (150 mL, 57%, v/v, ακετόνη) μέσω της συσκευής Soxhlet (Σχήμα 3.5). Μετά από 6 h κατεργασίας, έλαβε χώρα ξήρανση του εκχυλίσματος (εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό και

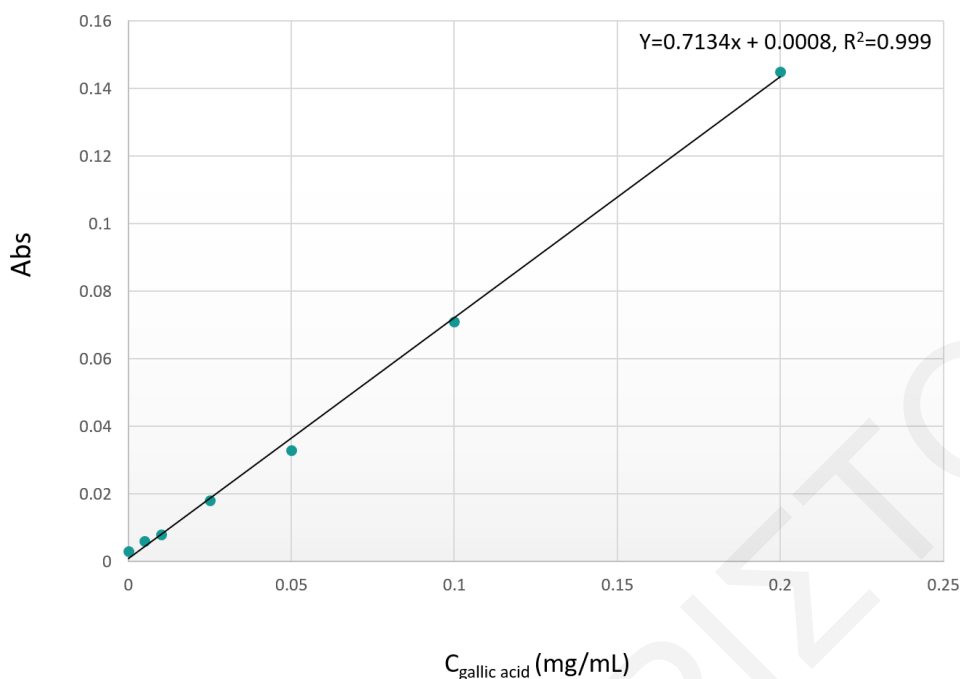
λυοφιλοποίηση) και αποθήκευσή του υπό κενό στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε τρεις φορές.



Σχήμα 3.5. Ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της συσκευής Soxhlet.

3.1.3. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC)

Το TPC των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με χρήση της φασματοφωτομετρικής μεθόδου Folin-Ciocalteu, όπως περιγράφεται από τους Singleton και Rossi (1965) [191]. Εν συντομία, πριν τη διεξαγωγή της ανάλυσης, τα λυοφιλοποιημένα εκχυλίσματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 20 mL του διαλύτη εκχύλισης και φιλτραρίστηκαν για την απομάκρυνση οποιουδήποτε αδιάλυτου σωματιδίου. Στη συνέχεια, 2 mL του κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος αναμείχθηκαν με 10 mL του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, του οποίου προηγήθηκε αραιώση 1:10 (v/v). Ακολούθησε προσθήκη 8 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 , περιεκτικότητας 7.5% w/v, και το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε σε ηρεμία, στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Τέλος, έλαβε χώρα μέτρηση της απορρόφησης του μείγματος στα 765 nm (UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan). Ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ με τα αποτελέσματα του TPC να εκφράζονται σε όρους mg GAE ανά g σάρκας χαρουπιού και σε ορισμένες περιπτώσεις, για σκοπούς σύγκρισης, σε όρους mg GAE/g εκχυλίσματος. Στο Σχήμα 3.6 παρουσιάζεται η σχετική καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε, βασισμένη στο γαλλικό οξύ.

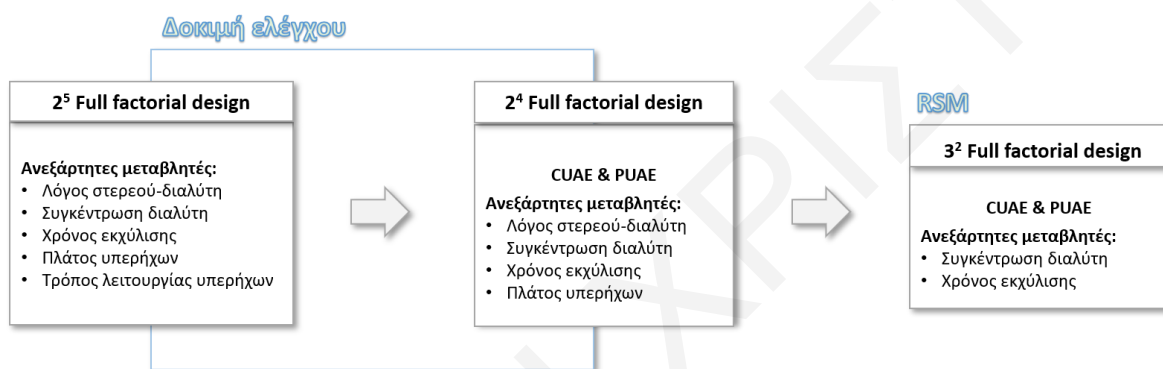


Σχήμα 3.6. Καμπύλη βαθμονόμησης γαλλικού οξέος.

3.1.4. Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων μέσω της UAE, αρχικά, έλαβε χώρα μια δοκιμή ελέγχου κρίσιμων παραγόντων και, στη συνέχεια, βελτιστοποίηση των επιπέδων των κρίσιμων μεταβλητών μέσω της RSM. Για κάθε μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένας ξεχωριστός πειραματικός σχεδιασμός. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός 5 μεταβλητών και 2 επιπέδων (2^5 full factorial design), με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της αναλογίας στερεού-διαλύτη, της συγκέντρωσης του διαλύτη, του χρόνου εκχύλισης, του πλάτους των υπερήχων και του τρόπου λειτουργίας των υπερήχων στην ικανότητα ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων. Στη συνέχεια, με βάση τα αρχικά αποτελέσματα της δοκιμής ελέγχου, αναπτύχθηκαν δύο ξεχωριστοί παραγοντικοί σχεδιασμοί, για κάθε τρόπο λειτουργίας (συνεχή και παλμική). Ειδικότερα, εφαρμόστηκαν δύο πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί 4 μεταβλητών και 2 επιπέδων (2^4 full factorial designs), προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της αναλογίας στερεού-διαλύτη, της συγκέντρωσης του διαλύτη, του χρόνου εκχύλισης και του πλάτους των υπερήχων στο TPC με τη χρήση, τόσο της συνεχούς, όσο και της παλμικής λειτουργίας. Αφού προσδιορίστηκαν οι κρίσιμες για τη διαδικασία μεταβλητές, μέσω της δοκιμής ελέγχου που πραγματοποιήθηκε, ακολούθησε βελτιστοποίηση των επιπέδων τους μέσω της RSM. Η συγκέντρωση του διαλύτη και ο

χρόνος της εκχύλισης ήταν οι δύο κύριες ανεξάρτητες μεταβλητές που επιλέχθηκαν με βάση τα προκαταρκτικά πειράματα, των οποίων τα βέλτιστα επίπεδα προσδιορίστηκαν μέσω της RSM, η οποία και βασίστηκε σε δύο νέους πλήρεις παραγοντικούς σχεδιασμούς (3^2 full factorial designs). Στο Σχήμα 3.7 γίνεται μια σύνοψη των πειραματικών σχεδιασμών που χρησιμοποιήθηκαν. Ο στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της ANOVA. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με χρήση του στατιστικού λογισμικού προγράμματος RStudio (έκδοση 1.3.1073).



Σχήμα 3.7. Συνοπτικό διάγραμμα των πειραματικών σχεδιασμών που εφαρμόστηκαν.

3.2. Προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD

3.2.1. Αντιδραστήρια

Οι αναλύτες (+)-κατεχίνη (1), (±)-ναρινγενίνη (2), κατεχόλη (3), trans-κιναμικό οξύ (4), χλωρογενικό οξύ (5), γεντισικό οξύ (6), καεμφερόλη (7), φερουλικό οξύ (8), κερκετίνη (9), μυρικετίνη (10), καφεϊκό οξύ (11) και γαλλικό οξύ (12) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Τα πρότυπα διαλύματα των αναλυτών, συγκέντρωσης 1 mg/mL, παρασκευάστηκαν σε διαλύτη MeOH και αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, για όχι πάνω από τρεις μήνες. Τα ενδιάμεσα πρότυπα μίγματα των αναλυτών, παρασκευάζονταν σε εβδομαδιαία βάση με κατάλληλη αραιώση των διαλυμάτων των πρότυπων ενώσεων σε διαλύτη MeOH. Ειδικότερα, επιλέχθηκε η εξής σύσταση για το πρότυπο μίγμα των αναλυτών: 0.05 mg/mL κατεχίνη, ναρινγενίνη, κιναμικό οξύ, κατεχόλη και γεντισικό οξύ, 0.10 mg/mL φερουλικό οξύ, καεμφερόλη, μυρικετίνη, κερκετίνη, καφεϊκό οξύ και γαλλικό οξύ και 0.15 mg/mL χλωρογενικό οξύ. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν υψηλής

αναλυτικής καθαρότητας (HPLC-grade) και προμηθεύτηκε από την εταιρεία Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε το Borate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), το διβασικό φωσφορικό νάτριο (sodium phosphate dibasic, Phosphate, Na_2HPO_4), καθώς και μίγμα του borate με το τρις(υδροξυμέθυλο)αμινομεθάνιο (tris(hydroxymethyl)aminomethane, TRIS, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), το pH των οποίων ρυθμίστηκε μέσω της προσθήκης διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH). Η MeOH, το ακετονιτρίλιο (acetonitrile, ACN), η β -CD, το SDS και το IL του L-AlaC₄Lac χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα. Για τη σύνθεση του IL χρησιμοποιήθηκαν, ως αντιδραστήρια, ο υδροχλωρικός τερτ βουτυλεστέρας της L-αλανίνης (L-Alanine tert-butyl ester hydrochloride, L-AlaC₄Cl) και ο γαλακτικός άργυρος (silver lactate, AgLac). Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

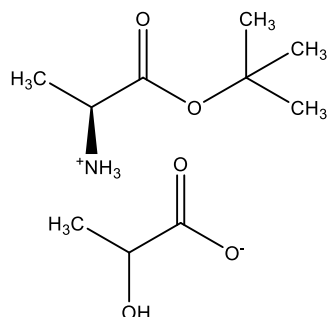
Για την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων από τα υπό εξέταση δείγματα χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης εκχύλισης η ακετόνη, η οποία επιλέχθηκε να είναι υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (HPLC-grade) και προμηθεύτηκε από την εταιρεία Supelco (Bellefonte, PA, USA). Ακολούθως, για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα φυσίγγια Maxi-Clean™ C₁₈ (900 mg) της εταιρείας Grace (Columbia, Maryland, USA), τα φυσίγγια OASIS® HLB (400 mg) από την Waters (Miliford, MA, USA), καθώς και τα φυσίγγια Discovery® DPA-6S (500 mg) της εταιρείας Supelco (Bellefonte, PA, USA). Η οξίνιση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με υδροχλωρικό οξύ (HCl) της εταιρείας Scharlau Chemie (Barcelona, Spain).

Πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα της CE, λάμβανε χώρα φιλτράρισμα όλων των διαλυμάτων μέσω φίλτρων διαμέτρου πόρων 0.45 μm και επακόλουθη απαέρωσή τους με τη χρήση λουτρού υπερήχων.

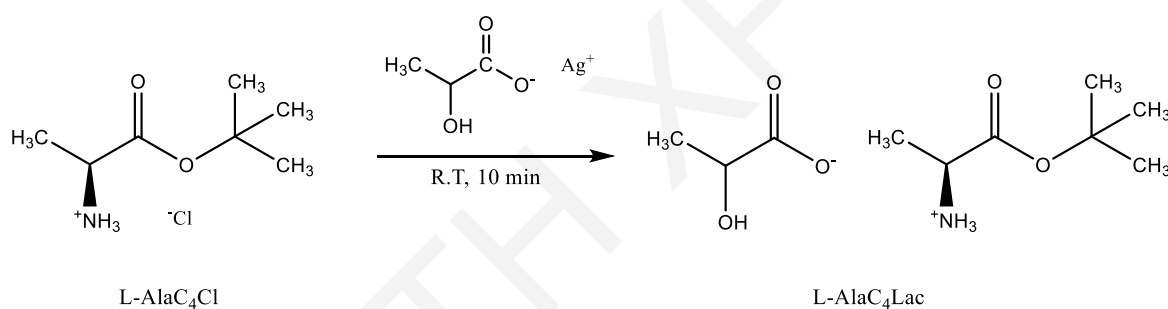
3.2.2. Σύνθεση IL

Στη συγκεκριμένη μελέτη, έγινε σύνθεση και χρήση του IL του L-AlaC₄Lac, η δομή του οποίου παρατίθεται στη συνέχεια (Σχήμα 3.8). Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες [192]. Συγκεκριμένα, για την παρασκευή του, κατάλληλες ποσότητες L-AlaC₄Cl και AgLac μεταφέρθηκαν σε MeOH, ξεχωριστά, προς σχηματισμό δύο διαφορετικών μιγμάτων. Ακολούθως, τα δύο αυτά μίγματα αναμείχθηκαν και αναδεύτηκαν για περίπου δύο ώρες. Το στερεό που προέκυψε (AgCl) απομακρύνθηκε από το προϊόν μίγμα με διήθηση, ενώ ο διαλύτης του διηθήματος εξατμίστηκε υπό κενό.

Τέλος, έλαβε χώρα καθαρισμός του προϊόντος μέσω ανακρυστάλλωσης με μίγμα MeOH/αιθέρα. Στο Σχήμα 3.9 απεικονίζεται η αντιπροσωπευτική πορεία σύνθεσης που ακολουθήθηκε.



Σχήμα 3.8. Δομή του L-AlaC₄Lac.



Σχήμα 3.9. Αντιπροσωπευτική πορεία σύνθεσης του L-AlaC₄Lac.

3.2.3. Προετοιμασία εκχυλισμάτων

3.2.3.1. Δείγματα χαρουπιού

Μελετήθηκε το φαινολικό προφίλ των άγουρων και ώριμων καρπών, που συλλέχθηκαν από το χωριό Αρχιμανδρίτα της επαρχίας Πάφου. Αφού προσδιορίστηκε το TPC της σάρκας των εν λόγω καρπών, κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης, έλαβε χώρα ηλεκτροφορητική ανάλυση των δειγμάτων, με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μεμονωμένων τους φαινολικών συστατικών.

3.2.3.2. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)

Η ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων από τα δείγματα της ώριμης και άγουρης σάρκας χαρουπιών επιτεύχθηκε μέσω της UAE, η οποία βελτιστοποιήθηκε κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης. Εν συντομία, για την εξαγωγή των πολυφαινολικών

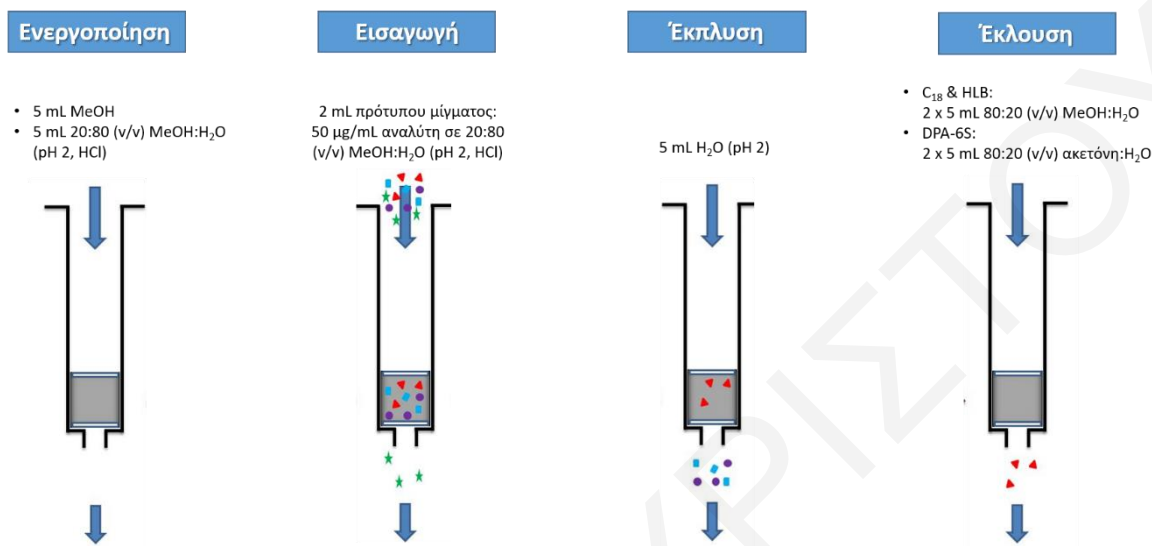
ενώσεων, 2 g σκόνης χαρουπιού αναμείχθηκαν με 50 mL υδατικού διαλύματος ακετόνης, περιεκτικότητας 57%, v/v. Το μίγμα που προέκυψε υπέστη κατεργασία με υπέρηχους, πλάτους 50%, για 14 min, μέσω της παλμικής λειτουργίας (5s:5s). Ακολούθησε διήθηση και φυγοκέντρηση του διηθήματος με σκοπό την απομάκρυνση οποιουδήποτε περιεχόμενου στερεού. Για την απομάκρυνση του διαλύτη και τη λήψη στερεού εκχυλίσματος, πραγματοποιήθηκε εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό και, στη συνέχεια, ξήρανση του εκχυλίσματος μέσω της διαδικασίας λυοφιλοποίησης. Το στερεό δείγμα που προέκυψε συσκευάστηκε υπό κενό και αποθηκεύτηκε στους -20 °C, μέχρι την περαιτέρω του ανάλυση. Όλα τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν εις τριπλούν.

3.2.3.3. Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

3.2.3.3.1. Επιλογή κατάλληλου προσροφητικού υλικού

Με σκοπό τον περαιτέρω καθαρισμό των εκχυλισμάτων, πριν την ηλεκτροφορητική τους ανάλυση, πραγματοποιήθηκε σύγκριση τριών εμπορικά διαθέσιμων προσροφητικών υλικών (Maxi-Clean™ C₁₈, Oasis® HLB, Discovery® DPA-6S) ως προς την ικανότητά τους για ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων και απομάκρυνση των άλλων ανεπιθύμητων συστατικών. Όλα τα πειράματα SPE πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες κενού μέσω της συσκευής Visiprep™ SPE Vacuum Manifold System (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Αρχικά, για την ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων των προσροφητικών υλικών των φυσιγγίων διαβιβάστηκε ποσότητα (5 mL) MeOH και, έπειτα, μίγματος 20:80 (v/v) MeOH:οξινισμένου νερού (pH 2, HCl). Στη συνέχεια, διαβιβάστηκαν 2 mL του πρότυπου μίγματος των αναλυτών (50 µg/mL, 20:80 v/v MeOH:οξινισμένο νερό) και ακολούθησε έκπλυση των φυσιγγίων με 5 mL οξινισμένου νερού (pH 2, HCl). Δεδομένου του όξινου χαρακτήρα των πολυφαινολικών ενώσεων, η οξίνιση του πρότυπου μίγματος των αναλυτών κρίθηκε απαραίτητη, προκειμένου να αποφευχθεί ο ιοντισμός τους και, συνεπώς, η απώλειά τους κατά το στάδιο του καθαρισμού. Επιπλέον, η παρουσία της MeOH στο πρότυπο μίγμα ενισχύει τη διαλυτότητα των πολυφαινολών και, ως εκ τούτου, την επιτυχή μεταφορά τους στα αντίστοιχα φυσιγγία SPE. Για την έκλυση των αναλυτών στόχων από τα φυσιγγία C₁₈ και HLB χρησιμοποιήθηκε μίγμα MeOH:H₂O 80:20 (v/v) (2x5 mL). Στην περίπτωση των φυσιγγίων DPA-6S, αυτό επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης μίγματος ακετόνης:H₂O 80:20 (v/v) (2 x 5 mL), σύμφωνα με τις υποδείξεις των κατασκευαστών. Στο Σχήμα 3.10 απεικονίζεται η συνοπτική διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την SPE. Αφού συλλέχθηκαν τα τελικά κλάσματα, ξηράθηκαν και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1 mL MeOH. Ακολούθησε ηλεκτροφορητική ανάλυση των τελικών δειγμάτων και προσδιορισμός των ποσοστών

ανάκτησης του κάθε προσροφητικού. Μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης παρουσίασαν τα φυσίγγια DPA-6S, για αυτό και χρησιμοποιήθηκαν για τον περαιτέρω καθαρισμό των εκχυλισμάτων.



Σχήμα 3.10. Συνοπτική διαδικασία SPE.

3.2.3.3.2. Καθαρισμός εκχυλισμάτων

Τα φυσίγγια DPA-6S αποδείχθηκαν τα καταλληλότερα για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων (Σχήμα 3.11). Όπως περιγράφεται παραπάνω, τα φυσίγγια ενεργοποιήθηκαν με 5 mL MeOH και εξισορροπήθηκαν με 5 mL μίγματος 20:80 (v/v) MeOH:οξινισμένου H₂O (pH 2, HCl). Ακολούθησε εισαγωγή των υπό εξέταση δειγμάτων, τα οποία παρασκευάστηκαν με διαλυτοποίηση των ληφθέντων στερεών εκχυλισμάτων σε 20 mL οξινισμένου μεθανολικού διαλύματος (20:80, v/v, MeOH:οξινισμένο H₂O). Στη συνέχεια, έλαβε χώρα απομάκρυνση των ανεπιθύμητων, μη-φαινολικών, συστατικών (π.χ. σάκχαρα) μέσω της έκπλυσης των φυσιγγίων με 5 mL οξινισμένου νερού (pH 2, HCl). Τέλος, για την παραλαβή των πολυφαινολικών ενώσεων από τα φυσίγγια χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα ακετόνης, σύστασης 80% v/v (2x5 mL). Τα τελικά εκχυλίσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1 mL MeOH, φιλτραρίστηκαν με τη χρήση φίλτρων διαμέτρου πόρων 0.45 µm και αναλύθηκαν με χρήση του συστήματος CE-DAD.



Σχήμα 3.11. Καθαρισμός των εκχυλισμάτων της ώριμης και άγουρης σάρκας χαρουπιών με χρήση της SPE σε φυσίγγια DPA-6S.

3.2.4. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (CE)

Όλοι οι αναλυτικοί διαχωρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα Agilent CE G1600A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) εφοδιασμένο με DAD (Σχήμα 3.12). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 205 nm. Ο χειρισμός του συστήματος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Agilent ChemStation. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε στήλη από τηγμένη πυρίτια, αποτελεσματικού (δραστικού) μήκους 40 cm και με συνολικό μήκος 48.5 cm. Για την ενεργοποίηση κάθε καινούργιας στήλης λάμβανε χώρα διαδοχική έκπλυσή της με H₂O (30 min), 1 M NaOH (60 min), H₂O (30 min) και τέλος με το ρυθμιστικό διάλυμα (30 min). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αποπρωτονίωση των επιφανειακών ομάδων σιλανόλης του εσωτερικού τοιχώματος του τριχοειδούς και σχηματισμός της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας. Με σκοπό τη διατήρηση των συνθηκών αποπρωτονίωσης των σιλανομάδων του τριχοειδούς, λάμβανε χώρα καθημερινή ενεργοποίησή του μέσω της διαδοχικής έκπλυσης της στήλης με H₂O (5 min), 1 M NaOH (10 min), H₂O (5 min) και τέλος με το ρυθμιστικό διάλυμα (5 min). Μεταξύ των διαδοχικών αναλύσεων, λάμβανε χώρα έκπλυση της στήλης για 3 min, μόνο με το ρυθμιστικό διάλυμα. Απαραίτητη κρίθηκε η ανανέωση του ρυθμιστικού διαλύματος μετά από τρεις διαδοχικές αναλύσεις. Για την αποθήκευση της στήλης, μετά από τη χρήση της, λάμβανε χώρα έκπλυσή της με νερό (15 min).

Η εισαγωγή των δειγμάτων στη στήλη πραγματοποιήθηκε με χρήση της υδροδυναμικής έγχυσης, μέσω της εφαρμογής πίεσης 50 mbar για 6 s. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε σταθερή στους 25 °C. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν εφαρμόζοντας δυναμικό 25 kV, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά. Η EOF ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας, ως ουδέτερο δείκτη (neutral marker), τη MeOH. Η ταυτοποίηση των κορυφών επιτεύχθηκε μέσω της σύγκρισης των χρόνων κατακράτησης και των φασμάτων UV με αυτά των αυθεντικών προτύπων, καθώς και με χρήση της τεχνικής spiking.



Σχήμα 3.12. Σύστημα CE-DAD.

3.2.5. Ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

3.2.5.1. Ανάπτυξη μεθόδου

Κατά την ανάπτυξη της ηλεκτροφορητικής μεθόδου ανάλυσης, μελετήθηκε η επίδραση του τύπου, της συγκέντρωσης και του pH του ρυθμιστικού διαλύματος, της παρουσίας προσθέτων και της εφαρμοζόμενης τάσης στην ικανότητα διαχωρισμού των πολυφαινολικών ενώσεων. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, μελετήθηκε, ταυτόχρονα, η μεταβολή της EOF (ηλεκτροσωματική ταχύτητα και ευκινήσια) και της ηλεκτροφορητικής ευκινήσιας/ταχύτητας των αναλυτών, με απώτερο σκοπό την κατανόηση του μηχανισμού

που ακολουθείται κατά το διαχωρισμό. Για τον υπολογισμό τους, χρησιμοποιήθηκαν οι Εξισώσεις 2.8 και 2.9, οι οποίες διατυπώθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Παράλληλα, στην περίπτωση της CD-EKC, διερευνήθηκε ο βαθμός συμπλοκοποίησης των αναλυτών στόχων από τη β-CD, μέσω του προσδιορισμού των σταθερών συμπλοκοποίησης, K . Με την παραδοχή ότι όλοι οι αναλύτες σχηματίζουν 1:1 σύμπλοκα με τη β-CD, χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη χημική εξίσωση για να περιγράψει τη διαδικασία της συμπλοκοποίησης.



όπου A : ο ελεύθερος αναλύτης, CD : η ελεύθερη β-CD και $A-CD$: το σύμπλοκο αναλύτη και β-CD.

Συνεπώς, η ηλεκτροφορητική ευκινησία ενός αναλύτη (μ_{ep}) σε ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα που περιέχει τον εν λόγω τροποποιητή, ορίζεται ως ο σταθμισμένος μέσος όρος της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας της συμπλοκοποιημένης, μ_c , και της ελεύθερης μορφής, μ_f , του αναλύτη, όπως περιγράφεται από την ακόλουθη μαθηματική εξίσωση:

$$\mu_{ep} = x_f \mu_f + x_c \mu_c \quad \text{Εξίσωση 3.2.}$$

όπου x_f και x_c : το γραμμομοριακό κλάσμα του αναλύτη στην ελεύθερη και δεσμευμένη κατάσταση, αντίστοιχα.

Χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις στην κατάσταση ισορροπίας, η παραπάνω μαθηματική σχέση (Εξίσωση 3.2) μπορεί να εκφραστεί ως ακολούθως:

$$\mu_{ep} = \frac{[A]}{[A]+[A-CD]} \mu_f + \frac{[A-CD]}{[A]+[A-CD]} \mu_c \quad \text{Εξίσωση 3.3.}$$

Παράλληλα, χρησιμοποιώντας την έκφραση της σταθεράς ισορροπίας (Εξίσωση 3.4) και συνδυάζοντάς την με την Εξίσωση 3.3, προκύπτει μια σχέση που συνδέει την ηλεκτροφορητική ευκινησία του αναλύτη και τη σταθερά συμπλοκοποίησης, ως ακολούθως (Εξίσωση 3.5).

$$K = \frac{[A-CD]}{[A][CD]} \quad \text{Εξίσωση 3.4.}$$

$$\mu_{ep} = \frac{\mu_f + \mu_c K [CD]}{1 + K [CD]} \quad \text{Εξίσωση 3.5.}$$

Με αναδιάταξη της παραπάνω σχέσης (Εξίσωση 3.5) προκύπτει η ακόλουθη μαθηματική εξίσωση (Εξίσωση 3.6), βάση της οποίας υπολογίστηκαν οι σταθερές συμπλοκοποίησης.

$$\frac{1}{(\mu_{ep}-\mu_f)} = \frac{1}{(\mu_c-\mu_f)K} \frac{1}{[CD]} + \frac{1}{(\mu_c-\mu_f)} \quad \text{Εξίσωση 3.6.}$$

Συγκεκριμένα, κατασκευάζοντας το διάγραμμα του λόγου $1/(\mu_{ep}-\mu_f)$ ως προς το λόγο $1/[CD]$ και αξιοποιώντας την κλίση (λ) και την αποτέμνουσα (y_0) της προκύπτουσας ευθείας, υπολογίστηκαν οι σταθερές συμπλοκοποίησης ως ακολούθως [193]:

$$K = \frac{y_0}{\lambda} \quad \text{Εξίσωση 3.7.}$$

Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο πλήρης διαχωρισμός των 12 υπό μελέτη πολυφαινολών στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα. Κριτήριο αξιολόγησης του διαχωρισμού, η διαχωριστική ικανότητα (resolution, R_S). Στην πράξη, ο όρος αυτός αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητας της στήλης να διαχωρίσει δύο αναλύτες [166], A και B, και περιγράφεται από τη σχέση:

$$R_S = \frac{2[(t_m)_B - (t_m)_A]}{w_A + w_B} \quad \text{Εξίσωση 3.8.}$$

όπου $(t_m)_A$ και $(t_m)_B$ οι χρόνοι μετανάστευσης των αναλυτών A και B, αντίστοιχα, και w_A και w_B το εύρος της βάσης των κορυφών. Όταν η τιμή της R_S είναι ίση ή μεγαλύτερη από 1.5, τότε ο διαχωρισμός θεωρείται πλήρης.

Μια άλλη σημαντική παράμετρος που αξιολογήθηκε κατά την ανάπτυξη της ηλεκτροφορητικής μεθόδου ήταν αυτή του παράγοντα κατακράτησης (retention factor, k'). Ο παράγοντας κατακράτησης ή χωρητικότητας, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την περιγραφή της μετανάστευσης των διαλυμένων ουσιών στις στήλες [166,167,194], υπολογίστηκε ως ακολούθως:

$$k' = \frac{t_m - t_{eo}}{t_{eo}} \quad \text{Εξίσωση 3.9.}$$

όπου t_m : ο χρόνος μετανάστευσης του αναλύτη και t_{eo} : ο χρόνος μετανάστευσης της EOF, δηλαδή του ουδέτερου δείκτη.

Παράλληλα, αξιολογήθηκε η εκλεκτικότητα της μεθόδου, με προσδιορισμό του παράγοντα εκλεκτικότητας (α), σύμφωνα με τη σχέση:

$$\alpha = \frac{k_B'}{k_A'} = \frac{(t_m)_A - t_{eo}}{(t_m)_B - t_{eo}} \quad \text{Εξίσωση 3.10.}$$

όπου k_B' και k_A' : οι παράγοντες κατακράτησης των βραδύτερα και ταχύτερα εκλουόμενων συστατικών, αντίστοιχα, $(t_m)_A$ και $(t_m)_B$: οι χρόνοι μετανάστευσης των συστατικών A και B, αντίστοιχα, και t_{eo} : ο χρόνος μετανάστευσης της EOF, δηλαδή του ουδέτερου δείκτη.

Για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας των κορυφών, προσδιορίστηκε ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (number of theoretical plates, N) χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 3.11. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, τόσο μεγαλύτερη είναι η αποδοτικότητα της μεθόδου. Ο όρος αυτός, ουσιαστικά, αποτελεί μέτρο του βαθμού διεύρυνσης των κορυφών. Ένα αποδοτικό σύστημα θα δώσει οξείες κορυφές, ενώ, αντίθετα, μια λιγότερο αποδοτική μέθοδος θα συμβάλει στη διεύρυνση της ζώνης του κάθε αναλύτη, με αρνητική επίπτωση στη διαχωριστική ικανότητα [195].

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 \quad \text{Εξίσωση 3.11.}$$

όπου t_m : ο χρόνος μετανάστευσης της ουσίας και w : το εύρος της βάσης της κορυφής της.

3.2.5.2. Επικύρωση μεθόδου

Στα πλαίσια επικύρωσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκαν διάφορα μέτρα αξιολόγησης. Συγκεκριμένα, η βέλτιστη μέθοδος που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την πιστότητα, τα όρια ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (limit of quantitation, LOQ). Στη συνέχεια, γίνεται λεπτομερής αναφορά σε κάθε μέτρο αξιολόγησης που αναφέρθηκε.

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας αναφέρεται στην ευθέως ανάλογη εξάρτηση της μετρούμενης ιδιότητας του αναλύτη (μέσα σε ένα δεδομένο εύρος) ως προς τη συγκέντρωσή (ποσότητα) του στο δείγμα [196]. Για τον προσδιορισμό της, κατασκευάστηκαν εξωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης, στην απουσία δηλαδή μήτρας, για τις 12 πολυφαινολικές ενώσεις μέσω της γραφικής απεικόνισης του εμβαδού της κάθε κορυφής ως προς τη συγκέντρωση του αντίστοιχου προτύπου. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εγχύσεις των πρότυπων διαλυμάτων σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 50-150% της αναμενόμενης περιοχής εργασίας. Να σημειωθεί ότι έγιναν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, με τις συγκεντρώσεις των πρότυπων ενώσεων να κυμαίνονται στο εύρος 1-500 $\mu\text{g/mL}$ (ανάλογα με τον κάθε αναλύτη). Για τον κάθε αναλύτη, επιλέχθηκαν επτά διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων.

Ως LOD ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί από το όργανο, αλλά όχι απαραίτητα και να ποσοτικοποιηθεί. Για να είναι σε θέση να ποσοτικοποιηθεί ένα συστατικό θα πρέπει η συγκέντρωσή του στο δείγμα να ξεπερνά το LOQ. Ειδικότερα, ο όρος LOQ εκφράζει τη χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη που είναι σε θέση να ποσοτικοποιηθεί από το σύστημα [196]. Τα LODs και LOQs μπορούν να υπολογιστούν από τις καμπύλες βαθμονόμησης, ως ακολούθως:

$$LOD = 3.3 \frac{s}{m} \quad \text{Εξίσωση 3.12.}$$

$$LOQ = 10 \frac{s}{m} \quad \text{Εξίσωση 3.13.}$$

όπου s : η τυπική απόκλιση της απόκρισης και m : η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.

Η πιστότητα (precision) αποτελεί μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα κάτω από τις ίδιες (επαναληψιμότητα, intra-day precision) ή διαφορετικές (αναπαραγωγιμότητα, inter-day precision) συνθήκες [196]. Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, πραγματοποιήθηκαν 10 διαδοχικές εγχύσεις του πρότυπου μίγματος των αναλυτών (συγκέντρωσης 50 $\mu\text{g/mL}$ για τον κάθε αναλύτη) εντός της ίδιας ημέρας, ενώ, αντίστοιχα, για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας, έλαβαν χώρα 5 επαναλήψεις για 5 συνεχόμενες μέρες. Κριτήριο αξιολόγησης της πιστότητας, η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD):

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad \text{Εξίσωση 3.14.}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \text{Εξίσωση 3.15.}$$

όπου s : η τυπική απόκλιση, \bar{x} : η μέση τιμή των N μετρήσεων και x_i : η κάθε επιμέρους μέτρηση.

3.3. Προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής HPLC-HRMS

3.3.1. Αντιδραστήρια

Για την ανάλυση HPLC-HRMS, αγοράστηκε MeOH αναλυτικής καθαρότητας LC-MS-grade και μυρμηκικό οξύ από τις εταιρείες Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) και Fluka (Bucks, Switzerland), αντίστοιχα. Ομοίως, χρησιμοποιήθηκε υψηλής καθαρότητας νερό για την προετοιμασία της κινητής φάσης (ultra-pure water), για τη λήψη του οποίου χρησιμοποιήθηκε η συσκευή καθαρισμού του νερού Milli-Q-Plus της εταιρείας Millipore (Milford, MA, USA).

Οι αναλύτες (+)-κατεχίνη (1), (±)-ναρινγενίνη (2), κατεχόλη (3), trans-κινναμικό οξύ (4), χλωρογενικό οξύ (5), γεντισικό οξύ (6), καεμφερόλη (7), φερουλικό οξύ (8), κερκετίνη (9), μυρικετίνη (10), καφεϊκό οξύ (11) και γαλλικό οξύ (12) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Τα πρότυπα διαλύματα των αναλυτών, συγκέντρωσης

1 mg/mL, παρασκευάστηκαν σε διαλύτη MeOH (LC-MS grade) και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, για όχι πάνω από τρεις μήνες. Τα ενδιάμεσα πρότυπα μίγματα των αναλυτών, παρασκευάζονταν σε εβδομαδιαία βάση με κατάλληλη αραιώση των διαλυμάτων των πρότυπων ενώσεων σε διαλύτη MeOH (LC-MS grade). Το πρότυπο μίγμα εργασίας παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 1 mg/L για τον κάθε αναλύτη.

Τα αντιδραστήρια για την προετοιμασία των εκχυλισμάτων, συμπεριλαμβανομένων της MeOH και της ακετόνης, αναλυτικής καθαρότητας HPLC-grade, και του ασκορβικού οξέος, προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα φυσίγγια Discovery® DPA-6S (500 mg) της εταιρείας Supelco (Bellefonte, PA, USA). Η οξίνιση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με υδροχλωρικό οξύ (HCl) της εταιρείας Scharlau Chemie (Barcelona, Spain).

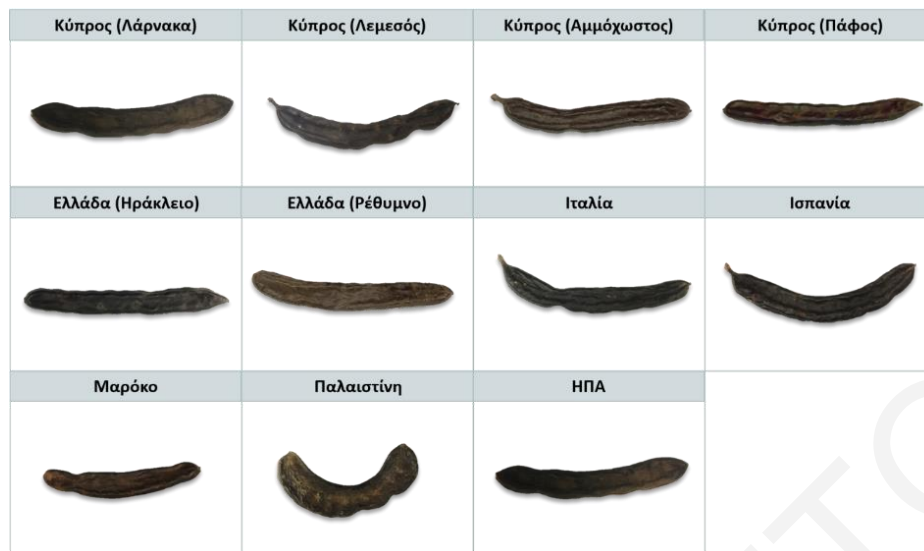
3.3.2. Προετοιμασία εκχυλισμάτων

3.3.2.1. Δείγματα χαρουπιού

Συλλέχθηκαν συνολικά 33 δείγματα χαρουπιών από 7 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, την Κύπρο (Λάρνακα 1-3, Λεμεσός 4-6, Αμμόχωστος 7-9, Πάφος 10-12), την Ελλάδα (Ηράκλειο Κρήτης 13-15, Ρέθυμνο Κρήτης 16-18), την Ιταλία (Σικελία 19-21), την Ισπανία (Μαγιόρκα 22-24), το Μαρόκο (Μαρακές 25-27), την Παλαιστίνη (Γάζα 28-30) και τις ΗΠΑ (Winston-Salem Βόρεια Καρολίνα, 31-33) (Σχήμα 3.13 και 3.14). Η συλλογή πραγματοποιήθηκε τους μήνες Αύγουστο και Σεπτέμβριο του 2020, κατά το ώριμο στάδιο των καρπών.



Σχήμα 3.13. Περιοχές δειματοληψίας.



Σχήμα 3.14. Τα χαρουπία που συλλέχθηκαν από τις 7 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Η επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύσταση αξιολογήθηκε μέσω της ανάλυσης των καρπών (σάρκας και σπόρων) που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Πάφου (Κύπρος) (Σχήμα 3.15). Έτσι, στην περίπτωση αυτή, η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τους μήνες Ιούνιο (άγουροι καρποί) και Σεπτέμβριο (ώριμα φρούτα) του 2020, από το ίδιο δέντρο που βρίσκεται στο χωριό Αρχιμανδρίτα της επαρχίας Πάφου. Να σημειωθεί ότι πρόκειται για το ίδιο δέντρο του οποίου οι καρποί αναλύθηκαν φασματοφωτομετρικά και ηλεκτροφορητικά, κατά τα προηγούμενα στάδια της παρούσας μελέτης.

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν, αρχικά πλύθηκαν και θρυμματίστηκαν. Στη συνέχεια, αφού διαχωρίστηκαν η σάρκα και οι σπόροι, λυοφιλοποιήθηκαν, αλέσθηκαν σε λεπτή σκόνη και κοσκινίστηκαν για τη λήψη σωματιδίων ομοιόμορφου μεγέθους. Τα δείγματα που προέκυψαν (ξηρή σκόνη σάρκας και σπόρων χαρουπιού) συσκευάστηκαν υπό κενό και αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την περαιτέρω τους επεξεργασία και ανάλυση.



Σχήμα 3.15. Σάρκα και σπόροι (A) άγουρων και (B) ώριμων καρπών.

3.3.2.2. Προϊόντα χαρουπιού

Παράλληλα, μελετήθηκε η φαινολική σύσταση διαφόρων παράγωγων προϊόντων του χαρουπιού, με απώτερο σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των μεθόδων κατεργασίας στη φαινολική σύνθεση των προϊόντων. Για το σκοπό αυτό, μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα καβουρδισμένης σκόνης χαρουπιού (χαρουπόσκονη), ακατέργαστου (ωμού) άλευρου χαρουπιού (μη καβουρδισμένη σκόνη χαρουπιού που επεξεργάζεται σε θερμοκρασίες κάτω των 40 °C), χαρουπόμελου (σιρόπι χαρουπιού που επεξεργάζεται σε θερμοκρασία υψηλότερη των 40 °C) και ωμού (ακατέργαστου) χαρουπόμελου (που υπόκειται επεξεργασία σε θερμοκρασίες κάτω των 40 °C) (Σχήμα 3.16). Όλα τα προϊόντα αγοράστηκαν από την εταιρεία Creta Carob, μια ελληνική τοπική επιχείρηση (Ρέθυμνο, Κρήτη). Παράλληλα, από την ίδια εταιρεία, προμηθεύτηκαν μη επεξεργασμένοι καθώς και καβουρδισμένοι ώριμοι καρποί, προκειμένου να γίνει σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου τους και να αξιολογηθεί μεμονωμένα η επίδραση της θερμικής κατεργασίας στη φαινολική σύσταση των προϊόντων. Στην περίπτωση αυτή, μελετήθηκε το φαινολικό περιεχόμενο μόνο της σάρκας των χαρουπιών, για την παραλαβή της οποίας πραγματοποιήθηκε σύνθλιψη των καρπών και απομάκρυνση των σπόρων. Η σάρκα που προέκυψε από τους ακατέργαστους και καβουρδισμένους καρπούς υποβλήθηκε σε επεξεργασία, όπως περιγράφεται παραπάνω, προκειμένου να μετατραπεί σε ξηρή σκόνη. Τα υπόλοιπα προϊόντα υποβλήθηκαν απευθείας στην ακόλουθη διαδικασία εκχύλισης, χωρίς κάποια προηγούμενη επεξεργασία.



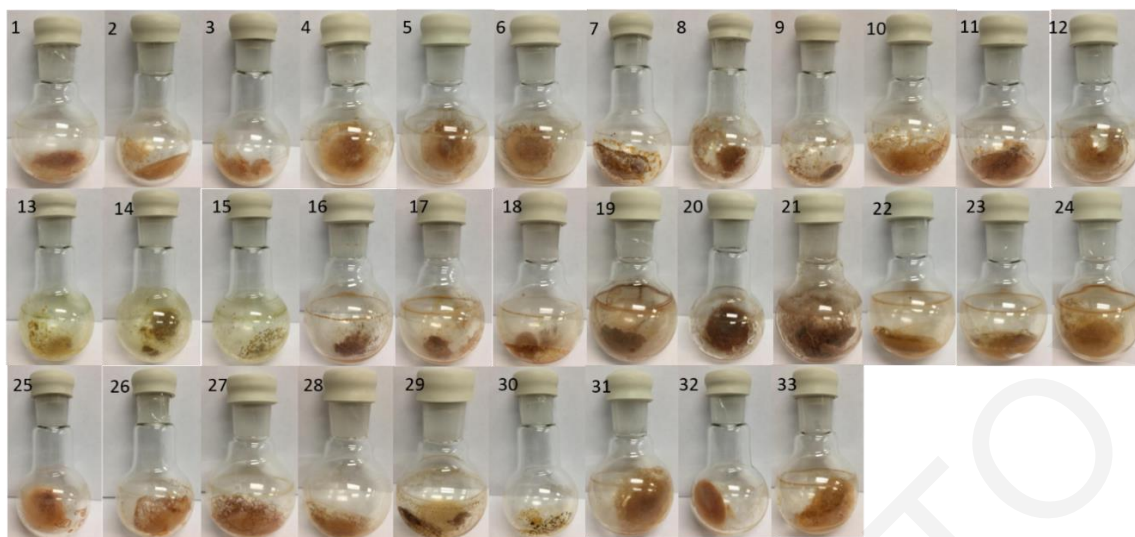
Σχήμα 3.16. Προϊόντα χαρουπιού που μελετήθηκαν.

3.3.2.3. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)

Η ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων επιτεύχθηκε μέσω της UAE, η οποία βελτιστοποιήθηκε κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης. Εν συντομία, για την εξαγωγή των πολυφαινολικών ενώσεων, 2 g δείγματος αναμείχθηκαν με 50 mL υδατικού διαλύματος ακετόνης, περιεκτικότητας 57%, v/v. Παράλληλα, για την αποτροπή της οξειδωσης των πολυφαινολών κατά το στάδιο της εκχύλισης και της μετέπειτα αποθήκευσης των δειγμάτων, έγινε χρήση ενός αντιοξειδωτικού συστατικού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε, ως αντιοξειδωτικό, το ασκορβικό οξύ, το οποίο και προστέθηκε στο διαλύτη εκχύλισης, σε συγκέντρωση 0.5% w/v. Το μίγμα που προέκυψε υπέστη κατεργασία με υπερήχους, πλάτους 50%, για 14 min, μέσω της παλμικής λειτουργίας (5s:5s). Ακολούθησε διήθηση και φυγοκέντρηση του διηθήματος με σκοπό την απομάκρυνση οποιουδήποτε περιεχόμενου στερεού. Για την απομάκρυνση του διαλύτη και τη λήψη στερεού εκχυλίσματος, πραγματοποιήθηκε εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό και, στη συνέχεια, ξήρανση του εκχυλίσματος μέσω της διαδικασίας λυοφιλοποίησης. Το στερεό δείγμα που προέκυψε συσκευάστηκε υπό κενό και αποθηκεύτηκε στους -20 °C, μέχρι την περαιτέρω του ανάλυση. Όλα τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν εις τριπλούν.

3.3.2.4. Καθαρισμός εκχυλισμάτων

Για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα φυσίγγια DPA-6S, τα οποία αποδείχθηκαν καταλληλότερα για την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων περιγράφεται λεπτομερώς στο δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης. Εν συντομία, για την ενεργοποίηση των φυσιγγίων διαβιβάστηκε ποσότητα MeOH και έπειτα μίγματος MeOH:οξιτισμένου νερού. Τα ξηρά εκχυλίσματα, αφού διαλυτοποιήθηκαν σε οξιτισμένο υδατικό διάλυμα MeOH, διαβιβάστηκαν στα φυσίγγια όπου και πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των ανεπιθύμητων τους συστατικών μέσω της έκπλυσης των φυσιγγίων με οξιτισμένο νερό. Τέλος, έγινε παραλαβή των πολυφαινολικών ενώσεων μέσω της χρήσης υδατικού διαλύματος ακετόνης. Τα τελικά εκχυλίσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού (Σχήμα 3.17), επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 2 mL MeOH, φιλτραρίστηκαν με φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.45 μm, αραιώθηκαν κατάλληλα (1:100 ή/και 1:1000 σε 90:10 v/v H₂O:MeOH) και αναλύθηκαν μέσω του συστήματος HPLC-HRMS.



Σχήμα 3.17. Εκχυλίσματα σάρκας χαρουπιών από τις 7 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

3.3.3. HPLC-HRMS

Όλοι οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα Agilent HPLC 1220 series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) (Σχήμα 3.18). Ο διαχωρισμός αντίστροφης φάσης πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου C₁₈ (Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈), διαστάσεων 4.6 x 100 mm και μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης 1.8 μm. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης, με τη θερμοκρασία της στήλης να διατηρείται σταθερή στους 25 °C. Για την έκλουση, χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα διαλυτών με ταχύτητα ροής 0.5 mL/min. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος συγκέντρωσης 0.1% v/v, το οποίο ορίστηκε ως η κινητή φάση A, ενώ ως κινητή φάση B επιλέχθηκε η καθαρή MeOH (100% v/v). Το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε παρατίθεται στον Πίνακα 3.1. Ο απαιτούμενος χρόνος εξισορρόπησης της στήλης, μετά από κάθε ανάλυση, ήταν τα 10 λεπτά. Πριν από τη χρήση τους, λάμβανε χώρα διήθηση των διαλυτών μέσω φίλτρων μεμβράνης PVDF διαμέτρου πόρων 0.45 μm, με σκοπό την απομάκρυνση οποιουδήποτε περιεχόμενου στερεού. Ομοίως, πριν από την έγχυσή τους στο σύστημα, όλα τα δείγματα διηθούνταν μέσω φίλτρων σύριγγας PTFE διαμέτρου πόρων 0.45 μm. Ως όγκος έγχυσης επιλέχθηκαν τα 10 μL.



Σχήμα 3.18. Σύστημα HPLC-HRMS.

Πίνακας 3.1. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.

Χρόνος	Σύσταση κινητής φάσης B (%)
0	5
5	5 (ισοκρατική έκλουση)
35	55 (γραμμική αύξηση)
40	100 (γραμμική αύξηση)
45	100 (σταθεροποίηση)

Για την ανίχνευση των διαχωριζόμενων συστατικών, έγινε σύζευξη του συστήματος HPLC με φασματοόμετρο μάζας τύπου χρόνου πτήσης Agilent 6220 TOF-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) εξοπλισμένο με πηγή ESI, σε λειτουργία αρνητικής πολικότητας (αρνητικού ιοντισμού). Στον Πίνακα 3.2 συνοψίζονται οι παράμετροι λειτουργίας της πηγής ιοντισμού. Τα φάσματα μάζας καταγράφηκαν σε εύρος m/z 50-1000, ενώ η απόκτηση και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Agilent Mass Hunter (έκδοση B.02.00 build 2.0.197.0). Οι εν λόγω μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το πανεπιστήμιο της Jaén και την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Δρ. Juan F. García-Reyes.

Πίνακας 3.2. Συνθήκες λειτουργίας ESI.

Παράμετρος	Τιμή
Τάση τριχοειδούς βελόνας (Capillary voltage)	2500 V
Πίεση αερίου εκνέφωσης (άζωτο) (Nebulizer gas pressure)	40 psi
Ρυθμός ροής αερίου ξήρανσης (άζωτο) (Drying gas flow rate)	9 L/min
Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης (άζωτο) (Drying gas temperature)	325 °C
Τάση θραυσματοποίησης (Fragmentor voltage)	140 V

3.3.4. Αξιολόγηση χρωματογραφικής μεθόδου

Η προτεινόμενη αναλυτική μέθοδος αξιολογήθηκε σε όρους γραμμικότητας, LODs και LOQs, πιστότητας (intra-day και inter-day precision) και επίδρασης του μητρικού υλικού (matrix effect, ME). Για τη διερεύνηση της γραμμικότητας, κατασκευάστηκαν εσωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης (matrix-matched calibration curves). Για την κατασκευή τους, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός, στη μήτρα του δείγματος (εκχύλισμα δείγματος σάρκας χαρουπιού, αριθμός 16), γνωστών συγκεντρώσεων των πρότυπων αναλυτών, στο επιθυμητό πάντα εύρος εργασίας. Τα LODs και LOQs υπολογίστηκαν με βάση το λόγο του σήματος ως προς το θόρυβο (signal/noise, S/N), ως ακολούθως:

$$LOD: \frac{S}{N} = 3 \quad \text{Εξίσωση 3.16.}$$

$$LOQ: \frac{S}{N} = 10 \quad \text{Εξίσωση 3.17.}$$

Για τον πειραματικό τους προσδιορισμό, έλαβε χώρα σύγκριση του σήματος του λευκού δείγματος (θόρυβος) με εκείνα των προτύπων, που κατασκευάστηκαν εντός της μήτρας (matrix-matched standard solutions), σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων.

Η πιστότητα, σε όρους επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας, αξιολογήθηκε με χρήση του πρότυπου μίγματος των αναλυτών, το οποίο παρασκευάστηκε εντός της μήτρας, σε επίπεδο συγκεντρώσεων 10 μg/g δείγματος. Συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, έλαβαν χώρα 5 διαδοχικές αναλύσεις του πρότυπου μίγματος των αναλυτών εντός της ίδιας ημέρας, ενώ για τη διερεύνηση της αναπαραγωγιμότητας, λάμβανε

χώρα μία έγχυση του μίγματος την ημέρα για σύνολο πέντε διαδοχικών ημερών. Κριτήριο αξιολόγησης της πιστότητας, η RSD (Εξίσωση 3.14).

Η ME στη διαδικασία του ιοντισμού, όσον αφορά την καταστολή ή την ενίσχυση του μετρούμενου αναλυτικού σήματος, διερευνήθηκε με σύγκριση των κλίσεων που προέκυψαν από τις εσωτερικές και τις εξωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν, ως ακολούθως:

$$ME (\%) = \left(\frac{\text{κλίση εσωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης}}{\text{κλίση εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης}} - 1 \right) * 100 \quad \text{Εξίσωση 3.18.}$$

Οι αρνητικές τιμές της υποδηλώνουν την καταστολή του μετρούμενου σήματος, ενώ, αντίθετα, οι θετικές της τιμές υποδεικνύουν θετικές επιδράσεις.

3.3.5. Στατιστική ανάλυση

Στην παρούσα μελέτη, όλες οι πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως οι μέσοι όροι των τιμών των τριών επαναλήψεων συν/πλην την τυπική απόκλιση (standard deviation, SD). Η σύγκριση των μέσων τιμών και η εύρεση των στατιστικά σημαντικών διαφορών επιτεύχθηκε μέσω της μονόδρομης ανάλυσης διακύμανσης (one-way ANOVA) ακολουθούμενη από τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων Duncan (Duncan's multiple range test). Για διάστημα εμπιστοσύνης 95%, οι διαφορές μεταξύ των μεμονωμένων μέσων θεωρήθηκαν σημαντικές για τιμές p μικρότερες του 0.05. Ακολούθως, οι μέσες τιμές του συνόλου των δεδομένων υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Συγκεκριμένα, το σύνολο των δεδομένων που υποβλήθηκε σε επεξεργασία αποτελείτο από μια μήτρα διαστάσεων 33x10, στην οποία οι σειρές αντιπροσώπευαν το σύνολο των δειγμάτων χαρουπιού που αναλύθηκαν (33 δείγματα) και οι στήλες, τις συγκεντρώσεις των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών που ανιχνεύθηκαν μέσω της ανάλυσης HPLC-HRMS που πραγματοποιήθηκε (10 μεταβλητές). Αρχικά, για τη μείωση των διαστάσεων του συνόλου των δεδομένων και τον εντοπισμό τυχόν υφιστάμενων ομαδοποιήσεων των δειγμάτων χαρουπιού με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση, εφαρμόστηκε η μη επιβλεπόμενη (unsupervised) PCA. Στη συνέχεια, η επιβλεπόμενη (supervised) PLS-DA, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των μοντέλων ταξινόμησης και για την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τα χαρακτηριστικά της διάκρισης. Οι αναφερόμενες στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση στατιστικού λογισμικού προγράμματος RStudio (έκδοση 1.3.1073).

4. Αποτελέσματα

Στο κεφάλαιο αυτό καταγράφονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής έρευνας. Το κεφάλαιο χωρίζεται σε τρία μέρη, ως ακολούθως: 1) εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων, 2) προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD και (3) προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής HPLC-HRMS.

4.1. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων

Η ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων από τα δείγματα χαρουπιού συνιστά ένα εξαιρετικά δύσκολο έργο, εξαιτίας της χημικής τους πολυπλοκότητας, της πολύπλοκης φύσης της μήτρας, καθώς και των αλληλεπιδράσεών τους με άλλα παρόντα συστατικά στο φυτικό υλικό [37]. Η διαδικασία της εκχύλισης αποτελεί ίσως το κρίσιμότερο στάδιο της συνολικής διαδικασίας ανάλυσης, με επίδραση, τόσο στην ανίχνευση των πολυφαινολικών ενώσεων, όσο και στην αντίστοιχη ποσοτικοποίησή τους. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εκχύλισης μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη φαινολική σύνθεση των εκχυλισμάτων των φυτικών υλικών, οδηγώντας πολλές φορές σε μη-αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

Παρόλο που αρκετές μελέτες επικεντρώθηκαν στην ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων χαρουπιού, εντούτοις, δεν υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με τις βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής τους, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές και μη-συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ της βιβλιογραφίας. Ως εκ τούτου, προκύπτει η ανάγκη για την ανάπτυξη μιας βέλτιστης και κατάλληλης μεθόδου για την εκχύλιση, τον καθαρισμό, καθώς και το χαρακτηρισμό των περιεχόμενων στα χαρούπια πολυφαινολικών ενώσεων.

Κάτω από αυτό το πλαίσιο, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση μιας μη-συμβατικής μεθόδου εκχύλισης και, πιο συγκεκριμένα, της UAE. Κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης, μελετήθηκε, μέσω μιας πλήρους στατιστικής ανάλυσης, η επίδραση διαφόρων παραμέτρων, μεταξύ των οποίων ο λόγος στερεού-διαλύτη, η συγκέντρωση του διαλύτη, ο χρόνος εκχύλισης, το πλάτος των υπερήχων και ο τρόπος λειτουργίας των υπερήχων, στην ικανότητα εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων από δείγματα άγουρης σάρκας χαρουπιών. Για τις μελέτες της βελτιστοποίησης επιλέχθηκε, ως δείγμα, η άγουρη σάρκα των χαρουπιών, η οποία, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρουσιάζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και, ταυτόχρονα, χαμηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα, τα οποία και δρουν παρεμποδιστικά. Για τον προσδιορισμό της αποδοτικότητας της μεθόδου

επιλέχθηκε, ως μέτρο, το TPC, το οποίο επέτρεψε την ταχεία και εύκολη αξιολόγηση της φαινολικής σύστασης των εκχυλισμάτων. Μέσω της RSM, κατέστη δυνατή η εύρεση των βέλτιστων επιπέδων της κάθε εξεταζόμενης μεταβλητής και, συνεπώς, η μεγιστοποίηση του TPC των εκχυλισμάτων. Σε σχέση με τις κλασσικές διεργασίες εκχύλισης, η προτεινόμενη βέλτιστη μέθοδος εξαγωγής προσέφερε υψηλότερες αποδόσεις σε σημαντικά μειωμένους χρόνους επεξεργασίας. Η σύγκριση του TPC των εκχυλισμάτων της σάρκας, τόσο των άγουρων, όσο και των ώριμων καρπών, που ελήφθησαν κάτω από τις βέλτιστες αυτές συνθήκες, κατέδειξε τη σημαντική επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύσταση.

Όσον αφορά προηγούμενη εφαρμογή της εν λόγω μεθόδου σε δείγματα χαρουπιού, παρόλο που σε ορισμένες μελέτες έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού του φαινολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων που ελήφθησαν υπό την επίδραση των υπερήχων, εντούτοις, σε πολύ λίγες περιπτώσεις επιχειρήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών εξαγωγής της μεθόδου [17,62,81]. Να σημειωθεί, επίσης, πως σε καμιά προηγούμενη μελέτη δεν έχει αναφερθεί η χρήση της PUAΕ για την ανάκτηση των περιεχόμενων στα χαρούπια πολυφαινολικών ενώσεων.

4.1.1. Βελτιστοποίηση UAE

4.1.1.1. Δοκιμή ελέγχου κρίσιμων παραγόντων

Με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης των υπό μελέτη μεταβλητών στην απόδοση της διαδικασίας εκχύλισης, έγινε χρήση ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού (2 επιπέδων και 5 μεταβλητών, 2^5 full factorial design). Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση του λόγου στερεού-διαλύτη (A), της συγκέντρωσης του διαλύτη (B), του χρόνου εκχύλισης (C), του πλάτους των υπερήχων (D), και του τρόπου λειτουργίας των υπερήχων (E), στην ικανότητα εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων από δείγματα άγουρης σάρκας χαρουπιών, μέσω της UAE. Για κάθε εξεταζόμενη μεταβλητή, επιλέχθηκαν δύο επίπεδα, οι τιμές των οποίων, φυσικές και κωδικοποιημένες, παρατίθενται στον Πίνακα 4.1. Για την επιλογή των ορίων της κάθε εξεταζόμενης μεταβλητής, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα, τα οποία και βασίστηκαν στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία [20, 25, 61, 63, 199–204]. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με μίγματα ακετόνης-νερού, αιθανόλης-νερού και μεθανόλης-νερού, με το υδατικό διάλυμα της ακετόνης να δίνει και το καλύτερο αποτέλεσμα, δηλαδή, τις υψηλότερες τιμές TPC.

Πίνακας 4.1. Επίπεδα ανεξάρτητων μεταβλητών πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού.

Ανεξάρτητη μεταβλητή	Συμβολισμός	Επίπεδο μεταβλητής	
		Χαμηλό (-1)	Υψηλό (+1)
Λόγος στερεού-διαλύτη	A	1:10	1:25
Συγκέντρωση διαλύτη (% ακετόνη, v/v)	B	50	80
Χρόνος εκχύλισης (min)	C	10	20
Πλάτος υπερήχων (%)	D	50	75
Τρόπος λειτουργίας υπερήχων (διάρκεια παλμού : διάστημα μεταξύ παλμών (sec))	E	Συνεχής (0:0)	Παλμική (5:5)

Εφόσον έλαβαν χώρα όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των ανεξάρτητων μεταβλητών, εις τριπλούν και με τυχαία σειρά για ελαχιστοποίηση του συστηματικού σφάλματος, προσδιορίστηκε το TPC των εκχυλισμάτων (Πίνακας 4.2), το οποίο και ορίστηκε ως η εξαρτώμενη μεταβλητή του πειραματικού σχεδιασμού (Y). Να σημειωθεί πως οι τιμές του TPC που παρατίθενται στον Πίνακα 4.2, αποτελούν τις μέσες τιμές των τριών επαναλήψεων του κάθε δυνατού συνδυασμού, με τη διακύμανση των τιμών να εκφράζεται σε όρους SD. Υπό τις συνθήκες που μελετήθηκαν, οι πειραματικές τιμές του TPC βρέθηκαν να κυμαίνονται στο εύρος 70.14-129.33 mg GAE/g σάρκας χαρουπιού. Όσον αφορά την ύπαρξη ακραίων τιμών (statistical outliers), κατασκευάστηκε ένα θηκόγραμμα (boxplot), με σκοπό τον εντοπισμό τους και τη μετέπειτα απομάκρυνσή τους από το σύνολο των δεδομένων. Καμία πειραματική τιμή δε φάνηκε να αποτελεί ακραία παρατήρηση, γεγονός που επέτρεψε τη χρήση όλων των πειραματικών δεδομένων στην επακόλουθη στατιστική ανάλυση.

Πίνακας 4.2. Πειραματικές τιμές πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού δοκιμής ελέγχου.

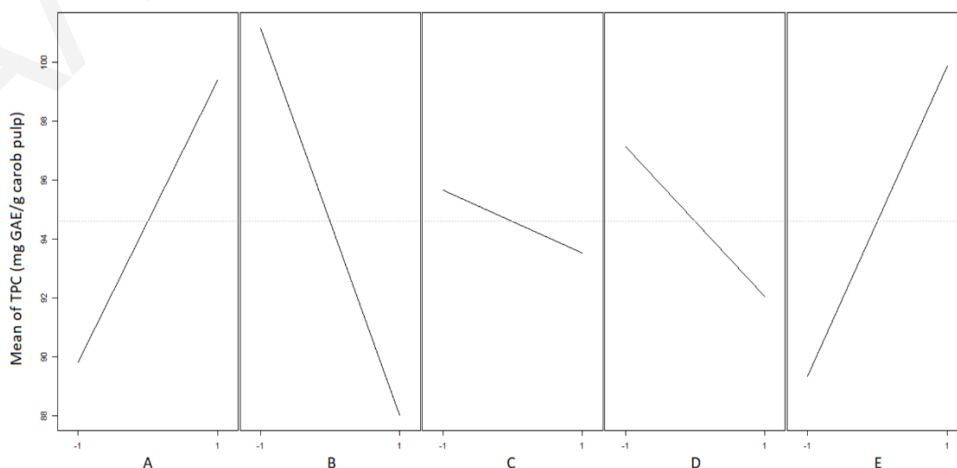
Ανάλυση	Μεταβλητή					Απόκριση TPC (mg GAE/g σάρκας χαρουπιού) Y	SD
	A	B	C	D	E		
1	-1	+1	-1	-1	-1	76.15	3.64
2	-1	+1	-1	-1	+1	75.83	1.46
3	-1	+1	-1	+1	-1	70.14	2.85
4	-1	+1	-1	+1	+1	91.95	1.89
5	-1	+1	+1	-1	-1	78.22	2.97
6	-1	+1	+1	-1	+1	89.24	3.05
7	-1	+1	+1	+1	-1	81.92	4.45
8	-1	+1	+1	+1	+1	103.65	4.16
9	-1	-1	-1	-1	-1	115.85	3.28
10	-1	-1	-1	-1	+1	115.43	0.87
11	-1	-1	-1	+1	-1	93.00	2.11
12	-1	-1	-1	+1	+1	97.78	1.60
13	-1	-1	+1	-1	-1	90.39	2.19
14	-1	-1	+1	-1	+1	102.67	2.32
15	-1	-1	+1	+1	-1	75.06	4.05
16	-1	-1	+1	+1	+1	78.79	1.37
17	+1	+1	-1	-1	-1	82.21	2.03
18	+1	+1	-1	-1	+1	88.97	2.87
19	+1	+1	-1	+1	-1	80.93	4.25
20	+1	+1	-1	+1	+1	94.81	1.57
21	+1	+1	+1	-1	-1	91.79	3.21
22	+1	+1	+1	-1	+1	87.11	2.81
23	+1	+1	+1	+1	-1	86.33	2.96
24	+1	+1	+1	+1	+1	129.33	0.58
25	+1	-1	-1	-1	-1	119.73	4.79
26	+1	-1	-1	-1	+1	118.42	3.56
27	+1	-1	-1	+1	-1	93.64	4.91
28	+1	-1	-1	+1	+1	103.83	5.06
29	+1	-1	+1	-1	-1	101.00	2.26
30	+1	-1	+1	-1	+1	110.85	4.48
31	+1	-1	+1	+1	-1	93.06	1.48
32	+1	-1	+1	+1	+1	99.84	1.40

4.1.1.1.1. Γραφική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η γραφική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού, επέτρεψε την εύρεση των κύριων παραγοντικών επιδράσεων. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκε το διάγραμμα κύριων επιδράσεων (main effects plot) (Σχήμα 4.1), βάση του οποίου αξιολογήθηκε η ισχύς της κάθε εξεταζόμενης μεταβλητής. Ένα τέτοιο διάγραμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση της σχετικής ισχύος των υπό διερεύνηση παραγόντων, καθώς και για τον προσδιορισμό της θετικής ή της αρνητικής τους επιρροής στην απόκριση. Πρόκειται για ένα διάγραμμα απεικόνισης των μέσων τιμών της απόκρισης σε κάθε επίπεδο της εξεταζόμενης μεταβλητής, με μια ευθεία γραμμή να συνδέει τους μέσους όρους των

τιμών. Στην περίπτωση λήψης ευθείας, παράλληλης με τον άξονα x, υποδηλώνεται η μη ύπαρξη σημαντικής επίδρασης, με τους μέσους όρους των τιμών της απόκρισης να παραμένουν ίδιοι, ή σχεδόν ίδιοι, σε κάθε επίπεδο της εξεταζόμενης μεταβλητής. Αντίθετα, η λήψη μη-οριζόντιας ευθείας, υποδηλώνει την ύπαρξη σημαντικής επίδρασης, με την απόκριση να παρουσιάζει διαφορετική τιμή σε κάθε επίπεδο του υπό διερεύνηση παράγοντα. Μάλιστα, όσο πιο απότομη η κλίση της ευθείας, τόσο μεγαλύτερη η επίδραση της ανεξάρτητης μεταβλητής. Όσον αφορά την κλίση της μη-παράλληλης ευθείας, ανάλογα με το πρόσημό της, θετικό ή αρνητικό, μπορεί να διαπιστωθεί η θετική ή, αντίστοιχα, η αρνητική επίδραση της υπό διερεύνηση μεταβλητής [205, 206].

Από τις κλίσεις των γραφημάτων που ελήφθησαν, διαπιστώθηκε πως όλοι ανεξαιρέτως οι εξεταζόμενοι παράγοντες επιδρούν σημαντικά στη διαδικασία της εκχύλισης. Μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων, η συγκέντρωση του διαλύτη (B) παρουσίασε τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόκριση (μεγαλύτερη κλίση ευθείας), ενώ, αντίθετα, ο χρόνος της εκχύλισης (C) αποδείχθηκε ως η λιγότερο σημαντική παράμετρος (μικρότερη κλίση ευθείας). Με περαιτέρω αξιολόγηση του γραφήματος, διαπιστώθηκε πως η συγκέντρωση του διαλύτη (B), το πλάτος των υπερήχων (D) και ο χρόνος εκχύλισης (C) επιδρούν αρνητικά στη διαδικασία της ανάκτησης, εφόσον παρατηρήθηκε μείωση του TPC με την αύξηση των επιπέδων τους (αρνητική κλίση ευθείας). Αντίθετη συμπεριφορά κατέδειξε η αναλογία στερεού-διαλύτη (A) (θετική κλίση ευθείας), υποδεικνύοντας, έτσι, τη θετική της συνεισφορά στην όλη διαδικασία. Όσον αφορά τον τρόπο λειτουργίας των υπερήχων (E), υψηλότερες αποδόσεις ελήφθησαν στην περίπτωση της παλμικής λειτουργίας (PUAE), υποδεικνύοντας, έτσι, τη μεγαλύτερη της αποτελεσματικότητα κατά την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων.



Σχήμα 4.1. Διάγραμμα κύριων επιδράσεων.

4.1.1.1.2. Μελέτη επίδρασης κύριων παραγόντων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συγκέντρωση του διαλύτη (B) φάνηκε να αποτελεί τη σημαντικότερη υπό εξέταση ανεξάρτητη μεταβλητή. Συγκεκριμένα, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ακετόνης, αποδείχθηκαν αποτελεσματικότερες για την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της πολικότητας του εκχυλιστικού μέσου, με τη μείωση της συγκέντρωσης της ακετόνης και, κατ' επέκταση, την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό. Δεδομένου ότι η πλειονότητα των πολυφαινολικών ενώσεων απαντάται στους φυτικούς ιστούς υπό τη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή, με τις μονάδες σακχάρου να καθιστούν τις φαινολικές ενώσεις πιο υδατοδιαλυτές, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ακετόνης αποδείχθηκαν πιο κατάλληλες για την αποτελεσματική εξαγωγή των εν λόγω ενώσεων [205]. Επιπρόσθετα, η παρουσία του νερού στο διαλύτη εκχύλισης ενισχύει τη διόγκωση του φυτικού υλικού, μέσω προσρόφησης, με αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας επαφής στερεού-εκχυλιστικού μέσου και, κατ' επέκταση, την καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στο φυτικό υλικό. Σύμφωνα με τους Prasad et al., το νερό δρα ως διογκωτικός παράγοντας, επιτρέποντας την καλύτερη μεταφορά μάζας των βιοδραστικών ενώσεων και ενισχύοντας, έτσι, την αποδοτικότητα της εκχύλισης [206].

Εξίσου σημαντικός στη διαδικασία της εκχύλισης φάνηκε να είναι και ο τρόπος λειτουργίας των υπερήχων (E). Υψηλότερες αποδόσεις TPC επιτεύχθηκαν με εφαρμογή της παλμικής λειτουργίας σε όλες τις περιπτώσεις. Η PUAΕ αποδείχθηκε αποτελεσματικότερη για τη μελέτη των εν λόγω βιοδραστικών ενώσεων, εφόσον, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες, η συνεχής έκθεση του φυτικού υλικού στα υπερηχητικά κύματα μπορεί να προκαλέσει την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης, και, κατά συνέπεια, την αποδόμηση των ευαίσθητων πολυφαινολικών συστατικών [207]. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, η υπεροχή της παλμικής λειτουργίας έναντι της συνεχούς εκχύλισης έχει υπογραμμιστεί και σε άλλες προηγούμενες μελέτες. Πέραν της αυξημένης της αποδοτικότητας, έχει, επίσης, αναφερθεί η μειωμένη της ενεργειακή κατανάλωση, ο καλύτερος έλεγχος της θερμοκρασίας της, καθώς ο μειωμένος ρυθμός διάβρωσης του συστήματος εκπομπής υπερήχων (ultrasonic probe) [208].

Σημαντική αποδείχθηκε, επίσης, η επίδραση του λόγου στερεού-διαλύτη (A). Εν συντομία, η αύξηση του λόγου στερεού-διαλύτη επέτρεψε την καλύτερη διείσδυση του διαλύτη εκχύλισης στη φυτική μήτρα, ενισχύοντας, έτσι, τη μεταφορά μάζας των πολυφαινολικών ενώσεων και, συνεπώς, την αποδοτικότητα της διαδικασίας εκχύλισης. Αντίθετα, η χρήση χαμηλών τιμών του επέφερε το γρήγορο κορεσμό του διαλύτη εκχύλισης και, ως αποτέλεσμα, τη μη ολοκλήρωση της διαδικασίας εξαγωγής. Επιπρόσθετα, η παρουσία

μεγάλης ποσότητας φυτικού υλικού μπορεί να προκαλέσει αύξηση του ιξώδους του διαλύματος, παρεμποδίζοντας, έτσι, τη διάχυση των πολυφαινολών στο εκχυλιστικό μέσο. Παράλληλα, μπορεί να προκαλέσει εξασθένηση των υπερηχητικών κυμάτων, παρεμποδίζοντας το φαινόμενο της σπηλαιώσης και, συνεπώς, την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων [209]. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, διαπιστώθηκε πως απαιτείται ένας επαρκής όγκος διαλύτη εκχύλισης προκειμένου να καταστεί δυνατή η αποτελεσματική διαλυτοποίηση των φυτοχημικών συστατικών από το προς εκχύλιση υλικό και να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις ανάκτησης.

Όσον αφορά το πλάτος των υπερηχητικών κυμάτων (D), το TPC των εκχυλισμάτων βρέθηκε να μειώνεται με την αύξηση των επιπέδων του. Παρόλο που η αύξηση του πλάτους των υπερήχων οδηγεί σε αύξηση των υπερηχητικών επιδράσεων, η χρήση υπερβολικά υψηλών τιμών του μπορεί να προκαλέσει την αποδόμηση των φαινολικών συστατικών, επιδρώντας, έτσι, αρνητικά στην απόδοση της διαδικασίας εκχύλισης [210,211]. Κατά κανόνα, οι υψηλότερες τιμές του ενισχύουν τη διαδικασία της σπηλαιώσης, η οποία, με τη σειρά της, επιταχύνει τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και διευκολύνει την απελευθέρωση των περιεχόμενων πολυφαινολικών συστατικών [212]. Ωστόσο, οι υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις που παράγονται ως αποτέλεσμα της διέλευσης τέτοιων κυμάτων, μεγάλου πλάτους, μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στις δομές των αναλυτών στόχων και να επιφέρουν μείωση του TPC [213].

Με την παράταση του χρόνου εκχύλισης παρατηρήθηκε μείωση του TPC. Γενικά, ένας μεγαλύτερος χρόνος επεξεργασίας συμβάλλει στην περαιτέρω διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος του φυτικού ιστού, επιτρέποντας την καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στα φυτικά κύτταρα και, κατά συνέπεια, την εξαγωγή ενός μεγαλύτερου ποσού πολυφαινολών. Ωστόσο, όταν ο χρόνος επεξεργασίας είναι αρκετά μεγάλος, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να υποστούν υποβάθμιση εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής θερμότητας, ως αποτέλεσμα της παρατεταμένης έκθεσης του φυτικού υλικού στα υπερηχητικά κύματα [211,214]. Η οξείδωση των πολυφαινολικών ενώσεων είναι ένας άλλος παράγοντας στον οποίο μπορεί να αποδοθεί η παρατηρούμενη μείωση του TPC.

4.1.1.1.3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων συνεχούς και παλμικής εκχύλισης

Με βάση τα αρχικά αποτελέσματα της δοκιμής ελέγχου, διαπιστώθηκε πως όλοι οι επιμέρους παράγοντες επιδρούν σημαντικά στη φαινολική απόδοση. Μεταξύ αυτών, τέσσερις αριθμητικές (λόγος στερεού-διαλύτη, συγκέντρωση διαλύτη, χρόνος εκχύλισης, πλάτος υπερήχων) και μία κατηγορική μεταβλητή (τρόπος λειτουργίας υπερήχων). Με

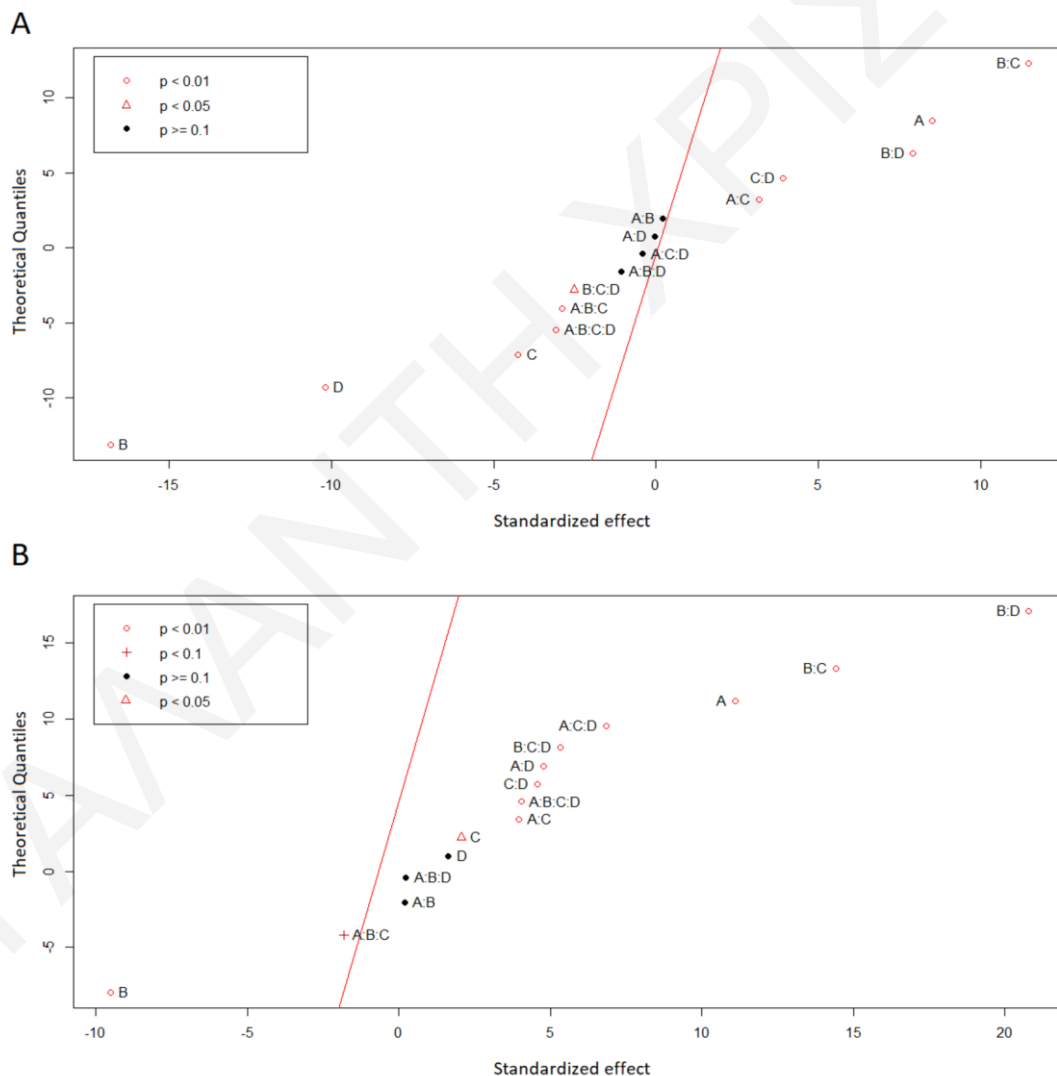
δεδομένο ότι ο τρόπος λειτουργίας των υπερήχων (E), ο οποίος αποτελεί μια ποιοτική μεταβλητή, παρουσίασε σημαντική επίδραση στην απόκριση, έλαβαν χώρα ξεχωριστές στατιστικές αναλύσεις, για κάθε μέθοδο εκχύλισης, προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράγοντες εκείνοι που ασκούν σημαντική επίδραση στην απόδοση, τόσο της συνεχούς, όσο και της παλμικής λειτουργίας, με τη χρήση δύο ξεχωριστών παραγοντικών σχεδιασμών (2 επιπέδων και 4 μεταβλητών, 2^4 full factorial designs). Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκαν τα αρχικά πειραματικά αποτελέσματα της δοκιμής ελέγχου, βάση των οποίων κατασκευάστηκαν δύο ξεχωριστοί παραγοντικοί σχεδιασμοί, ένας για κάθε τρόπο λειτουργίας, με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του λόγου στερεού-διαλύτη (A), της συγκέντρωσης του διαλύτη (B), του χρόνου εκχύλισης (C) και του πλάτους των υπερήχων (D) στην ικανότητα ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων με τη χρήση της συνεχούς και της παλμικής λειτουργίας.

Ακολούθως, για κάθε μέθοδο εκχύλισης (CUAE και PUAE), έλαβε χώρα στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (μέσω ελέγχου t, t-test), τα ευρήματα της οποίας παρατίθενται στο Σχήμα 4.2, μέσω των διαγραμμάτων κανονικής πιθανότητας. Τα διαγράμματα αυτά θεωρούνται εξαιρετικά χρήσιμα, τόσο για τη σύγκριση του μεγέθους της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών, όσο και της σημαντικότητας των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Σε αυτού του είδους τα διαγράμματα, οι αμελητέες επιδράσεις κατανέμονται κανονικά, με μηδενικούς μέσους και διασπορά, σ^2 , και τείνουν να πέσουν πάνω σε μια ευθεία γραμμή σε αυτό το γράφημα. Σε αντίθεση, οι σημαντικές επιδράσεις έχουν μη μηδενικούς μέσους και αποκλίνουν από την ευθεία αυτή. Μάλιστα, όσο σημαντικότερη είναι η επίδραση, τόσο μεγαλύτερη είναι η απόκλιση που παρατηρείται [215].

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της CUAE, διαπιστώθηκε πως όλοι οι υπό εξέταση παράγοντες (A, B, C, D) διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ανάκτησης. Μαζί με αυτούς και κάποιες από τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (B·C, B·D, C·D, A·C, A·B·C·D, A·B·C, B·C·D). Με βάση την απόσταση από την ευθεία γραμμή του γραφήματος, είναι προφανές πως η συγκέντρωση του διαλύτη (B) αποτέλεσε τη σημαντικότερη υπό εξέταση μεταβλητή. Η συγκέντρωση του διαλύτη (B), το πλάτος των υπερήχων (D), ο χρόνος εκχύλισης (C), καθώς και ορισμένες αλληλεπιδράσεις τους (A·B·C·D, A·B·C, B·C·D) φάνηκαν να επιδρούν αρνητικά στη διαδικασία της εκχύλισης, μιας και εντοπίστηκαν στην αριστερή πλευρά του γραφήματος. Αντίθετα, η παρουσία των υπόλοιπων μεταβλητών στη δεξιά πλευρά υπέδειξε και τη θετική τους συνεισφορά.

Σε αντίθεση με τη CUAE, το πλάτος των υπερήχων (D) δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της παλμικής λειτουργίας, με τον όρο αυτό να κατανέμεται κανονικά κατά

μήκος της ευθείας γραμμής του γραφήματος. Συγκεκριμένα, το διάγραμμα κανονικής πιθανότητας που προέκυψε με τη χρήση της παλμικής λειτουργίας, κατέδειξε ένα μικρότερο αριθμό κύριων παραγόντων (A, B, C) και, ταυτόχρονα, ένα μεγαλύτερο αριθμό αλληλεπιδράσεων (B·D, B·C, A·C·D, B·C·D, A·D, C·D, A·B·C·D, A·C) με σημαντική επίδραση στο TPC. Στην περίπτωση της PUAΕ, η αναλογία στερεού-διαλύτη (A) και η συγκέντρωση του διαλύτη (B) αποτέλεσαν τις μεταβλητές με τη σημαντικότερη επίδραση στην απόκριση, με τους όρους αυτούς να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη απόκλιση από την ευθεία. Η συγκέντρωση του διαλύτη (B) αποτέλεσε τη μόνη υπό εξέταση μεταβλητή με αρνητική επίδραση στην απόδοση της παλμικής λειτουργίας.



Σχήμα 4.2. Διαγράμματα κανονικής πιθανότητας των μεθόδων (A) CUAΕ και (B) PUAΕ.

4.1.1.2. Βελτιστοποίηση παραμέτρων εξαγωγής - RSM

Μετά τη λεπτομερή στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, κρίθηκε απαραίτητη η περαιτέρω βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του διαλύτη (B) και του χρόνου εκχύλισης (C), προκειμένου να προσδιοριστούν οι συνθήκες εκείνες που επιτρέπουν την αποδοτικότερη εξαγωγή των υπό μελέτη αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ως εκ τούτου, οι κρίσιμες αυτές μεταβλητές μελετήθηκαν λεπτομερώς (B: 50, 65, 80% και C: 10, 15, 20 min), ενώ ο λόγος στερεού-διαλύτη (A) και το πλάτος των υπερήχων (D) αποκλείστηκαν από τη διαδικασία της βελτιστοποίησης και, πιο συγκεκριμένα, οι μεταβλητές αυτές διατηρήθηκαν σταθερές στις βέλτιστες τιμές τους (A:1/25 και D: 50%), σύμφωνα πάντα με τα αποτελέσματα της αρχικής στατιστικής ανάλυσης. Όσον αφορά την αναλογία στερεού-διαλύτη (A), η οποία κατέδειξε σημαντική επίδραση στην απόκριση και για τις δύο μεθόδους εκχύλισης, διατηρήθηκε σταθερή στο υψηλότερο της επίπεδο το οποίο έδωσε, σε όλες τις περιπτώσεις, καλύτερα αποτελέσματα TPC και αποκλείστηκε, έτσι, από την περαιτέρω βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης. Όσον αφορά το πλάτος των υπερήχων (D), μεταβλητή που παρουσίασε σημαντική επίδραση μόνο στην περίπτωση της CUAΕ, εξαιρέθηκε από την τελική διαδικασία της βελτιστοποίησης, με το χαμηλότερο της επίπεδο (50%) να προσφέρει υψηλότερες τιμές TPC, καθώς και μειωμένη κατανάλωση ενέργειας. Η βελτιστοποίηση των κρίσιμων μεταβλητών, για κάθε μέθοδο εκχύλισης, επιτεύχθηκε μέσω της RSM, με τους αντίστοιχους πειραματικούς σχεδιασμούς (3^2 full factorial designs) και τα πειραματικά τους αποτελέσματα να παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.3 και 4.4.

Πίνακας 4.3. Πειραματικά αποτελέσματα παραγοντικού σχεδιασμού CUAΕ.

Ανάλυση	Συγκέντρωση διαλύτη (% ακετόνη, v/v) B	Χρόνος εκχύλισης (min) C	TPC (mg GAE/g σάρκας χαρουπιού) Y	SD
1	80	10	82.21	2.03
2	80	15	84.19	1.62
3	80	20	91.79	3.21
4	65	10	112.61	2.46
5	65	15	114.35	2.51
6	65	20	109.42	0.76
7	50	10	119.73	2.12
8	50	15	114.24	1.73
9	50	20	101.00	2.26

Πίνακας 4.4. Πειραματικά αποτελέσματα παραγοντικού σχεδιασμού ΡUΑΕ.

Ανάλυση	Συγκέντρωση διαλύτη (% ακετόνη, v/v) B	Χρόνος εκχύλισης (min) C	TPC (mg GAE/g σάρκας χαρουπιού) Y	SD
1	80	10	91.31	0.84
2	80	15	92.34	0.84
3	80	20	87.11	2.81
4	65	10	116.32	1.78
5	65	15	119.14	1.80
6	65	20	117.02	1.41
7	50	10	121.42	0.62
8	50	15	123.95	2.34
9	50	20	110.85	4.98

4.1.1.2.1. Ανάλυση παλινδρόμησης και ανάλυση διακύμανσης αποτελεσμάτων

Αρχικά, τα πειραματικά αποτελέσματα, σχετικά με το TPC, προσαρμόστηκαν σε δύο πολυωνμικά μοντέλα δευτέρας τάξεως, προκειμένου να αποκτηθούν οι μαθηματικές εξισώσεις που περιγράφουν την εμπειρική σχέση μεταξύ των εξεταζόμενων κρίσιμων μεταβλητών (B και C) και της αντίστοιχης πειραματικής απόκρισης (TPC). Τα μαθηματικά μοντέλα που προέκυψαν, μέσω της πολλαπλής ανάλυσης παλινδρόμησης, περιγράφονται από τις ακόλουθες μαθηματικές εξισώσεις:

$$Y_{CUAE} = 4.36 + 5.40B - 4.79C - 0.06B^2 - 0.06C^2 + 0.09B \cdot C \quad \text{Εξίσωση 4.1.}$$

$$Y_{PUAE} = -103.70 + 6.79B + 4.91C - 0.06B^2 - 0.21C^2 + 0.02B \cdot C \quad \text{Εξίσωση 4.2.}$$

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση (Πίνακας 4.5), ANOVA, των προτεινόμενων μοντέλων κατέδειξαν και την ορθότητά τους, δηλαδή, την ικανότητά τους να περιγράφουν επαρκώς τη διακύμανση των αποτελεσμάτων και να αναπαριστούν την πραγματική σχέση μεταξύ των εξεταζόμενων μεταβλητών και της αντίστοιχης πειραματικής απόκρισης. Συγκεκριμένα, οι στατιστικές παράμετροι που αξιολογήθηκαν, μεταξύ των οποίων οι παράμετροι F (F-values) και p (p-values), ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού (R_{adj}^2) και ο προβλεπόμενος συντελεστής προσδιορισμού (R_{pred}^2), κατέδειξαν την πολύ καλή προβλεψιμότητα των τετραγωνικών μοντέλων και επέτρεψαν τη μετέπειτα χρήση τους στη διαδικασία της βελτιστοποίησης μέσω της RSM.

Επιπλέον, μέσω της στατιστικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε (Πίνακας 4.5), προσδιορίστηκαν οι σημαντικοί όροι των εν λόγω τετραγωνικών μοντέλων επιφανειών

απόκρισης. Με τους όρους αυτούς να εμφανίζουν τιμές σημαντικότητας, p , μικρότερες ή ίσες του 0.05, για επίπεδο σημαντικότητας 95%. Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, διαπιστώθηκε πως οι γραμμικοί όροι της συγκέντρωσης του διαλύτη (B) και του χρόνου εκχύλισης (C), ο τετραγωνικός όρος της συγκέντρωσης του διαλύτη (B^2), καθώς και ο όρος της αλληλεπίδρασης των κρίσιμων αυτών μεταβλητών (B·C) παρουσιάζουν σημαντική επίδραση στην απόδοση της CUAΕ. Στην περίπτωση της PUAE, τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη σημαντική επίδραση των όρων πρώτης και δευτέρας τάξεως της συγκέντρωσης του διαλύτη (B, B^2), με το χρόνο εκχύλισης να παρουσιάζει σημαντική επίδραση μόνο στην τετραγωνική του μορφή (C^2). Να σημειωθεί πως δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση των παραμέτρων στην περίπτωση της παλμικής λειτουργίας. Για άλλη μια φορά, η συγκέντρωση του διαλύτη και, πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε ακετόνη φάνηκε να αποτελεί την κρισιμότερη υπό εξέταση μεταβλητή.

Πίνακας 4.5. Αποτελέσματα ANOVA τετραγωνικών μοντέλων CUAΕ και PUAE.

Source	Sum of squares (SS)	Degree of freedom (DF)	Mean square (MS)	F-value	p-value
CUAE					
Model				110.10	< 0.0001 ($2.5 \cdot 10^{-14}$) ***
B	2948.1	1	2948.1	345.60	< 0.0001 ($1.6 \cdot 10^{-14}$) ***
C	76.0	1	76.0	8.91	0.0071 **
B^2	1056.6	1	1056.6	123.86	< 0.0001 ($2.9 \cdot 10^{-10}$) ***
C^2	12.9	1	12.9	1.51	0.2324
B·C	601.2	1	601.2	70.47	< 0.0001 ($3.8 \cdot 10^{-8}$) ***
Residuals	179.1	21	8.5		
$R^2=0.963$, $R^2_{adj}=0.955$, $R^2_{pred}=0.937$					
PUAE					
Model				97.08	< 0.0001 ($8.8 \cdot 10^{-14}$) ***
B	3595.5	1	3595.5	349.98	< 0.0001 ($1.4 \cdot 10^{-14}$) ***
C	38.1	1	38.1	3.71	0.0678
B^2	1156.4	1	1156.4	112.56	< 0.0001 ($6.8 \cdot 10^{-10}$) ***
C^2	172.4	1	172.4	16.78	0.0005 ***
B·C	24.4	1	24.4	2.38	0.1381
Residuals	215.7	21	10.3		
$R^2= 0.959$, $R^2_{adj}= 0.949$, $R^2_{pred}= 0.929$					

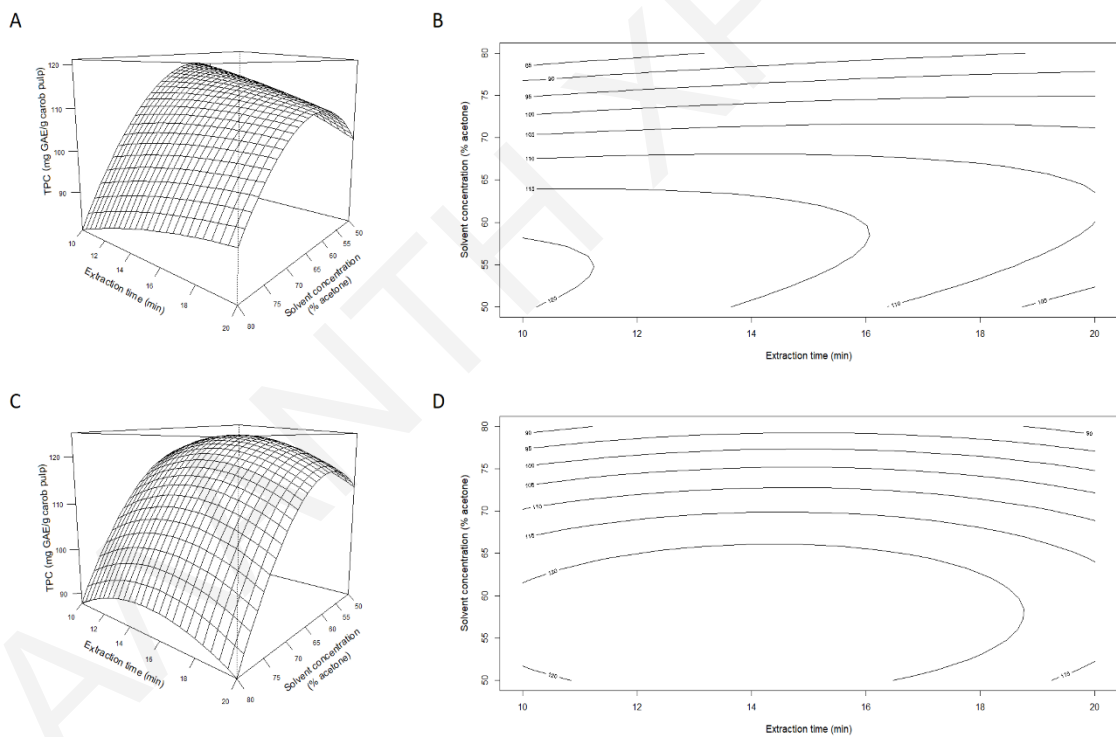
* Σημαντική επίδραση για $p \leq 0.05$

** Σημαντική επίδραση για $p \leq 0.01$

*** Σημαντική επίδραση για $p \leq 0.001$

4.1.1.2.3. Ανάλυση επιφανειών απόκρισης και ισομετρικών διαγραμμάτων

Τα πολυωνμικά μοντέλα που αναπτύχθηκαν (Εξισώσεις 4.1 και 4.2) χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των τρισδιάστατων διαγραμμάτων επιφανειών απόκρισης (response surface plots), καθώς και των δισδιάστατων ισομετρικών διαγραμμάτων (contour plots), βάση των οποίων κατέστη δυνατή η γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ των ανεξάρτητων και της εξαρτώμενης μεταβλητής. Οι επιφάνειες απόκρισης και τα ισομετρικά διαγράμματα αποτελούν γραφικές αναπαραστάσεις των μοντέλων παλινδρόμησης και θεωρούνται εξαιρετικά χρήσιμες, τόσο για την κατανόηση των σημαντικών επιδράσεων, όσο και για τον προσδιορισμό των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών [216]. Οι επιφάνειες απόκρισης και τα ισομετρικά διαγράμματα που προέκυψαν, για κάθε μέθοδο εκχύλισης, απεικονίζονται στο Σχήμα 4.3.



Σχήμα 4.3. Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα των μεθόδων (A, B) CUAE και (C, D) PUAE.

Από τα διαγράμματα που προέκυψαν, διαπιστώθηκε πως η ανάκτηση των πολυφαινολών μπορεί να βελτιστοποιηθεί μέσω της επιλογής των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών. Στην περίπτωση της CUAE, αρχικά, παρατηρήθηκε αύξηση του TPC με την αύξηση της συγκέντρωσης της ακετόνης, μέχρι την επίτευξη μιας μέγιστης τιμής. Ωστόσο, με περαιτέρω

αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύτη, πέρα από τη βέλτιστη αυτή τιμή, παρατηρήθηκε μείωση του TPC. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, με την αλλαγή της συγκέντρωσης της ακετόνης προκαλείται μεταβολή της πολικότητας του διαλύτη εκχύλισης, η οποία, με τη σειρά της, μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων και, επομένως, την αποδοτικότητα της μεθόδου εκχύλισης. Όσον αφορά την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, στα υψηλότερα επίπεδα ακετόνης, η ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων βελτιώθηκε αισθητά με την αύξηση του χρόνου επεξεργασίας, φθάνοντας σε μια μέγιστη τιμή, μετά την οποία παρατηρήθηκε ελάττωση του TPC, πιθανόν εξαιτίας της οξειδωσης ή/και αποσύνθεσης των ευαίσθητων αυτών συστατικών. Ωστόσο, στην περιοχή των χαμηλών επιπέδων της ακετόνης, η αύξηση του χρόνου επεξεργασίας των δειγμάτων, επέφερε τη μείωση του TPC. Η ελλειπτική μορφή του ισομετρικού διαγράμματος της CUAΕ (Σχήμα 4.3), κατέδειξε την ύπαρξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπό μελέτη κρίσιμων μεταβλητών. Κατά κανόνα, τα ελλειπτικά ισομετρικά διαγράμματα υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπό εξέταση μεταβλητών, σε αντίθεση με τα κυκλικά διαγράμματα τα οποία υποδηλώνουν αμελητέες αλληλεπιδράσεις [216].

Μια παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της παλμικής εκχύλισης, με τη συγκέντρωση του διαλύτη και το χρόνο εκχύλισης να επιδρούν, αρχικά, θετικά στη διαδικασία της ανάκτησης και, έπειτα, αρνητικά με περαιτέρω αύξηση των επιπέδων τους, πέραν των προσδιορισθέντων βέλτιστων τιμών. Με βάση τα διαγράμματα που κατασκευάστηκαν, διαπιστώθηκε πως η ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων μπορεί να βελτιστοποιηθεί μέσω της χρήσης σχετικά χαμηλού ποσοστού ακετόνης και μικρού χρόνου επεξεργασίας.

4.1.1.2.4. Προσδιορισμός βέλτιστων επιπέδων και επικύρωση μαθηματικών μοντέλων

Μέσω της RSM κατέστη δυνατή η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων. Τα βέλτιστα επίπεδα της κάθε εξεταζόμενης μεταβλητής, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με βάση τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν, παρατίθενται στον Πίνακα 4.6. Στην περίπτωση της συνεχούς λειτουργίας, ως βέλτιστες συνθήκες αποδείχθηκαν οι ακόλουθες: 54% (v/v) ακετόνη, ως διαλύτης εκχύλισης, και 10 min, ως χρόνος επεξεργασίας, για αναλογία στερεού-διαλύτη και πλάτος υπερήχων 1:25 και 50%, αντίστοιχα. Στην περίπτωση της παλμικής λειτουργίας, οι βέλτιστες συνθήκες επιτεύχθηκαν μέσω της χρήσης 57% (v/v) ακετόνης και 14 min χρόνου επεξεργασίας, και πάλι για αναλογία στερεού-διαλύτη 1:25 και πλάτος υπερήχων 50%. Αν και με αρκετά παρόμοιες

συνθήκες εξαγωγής, η PUAΕ επέφερε και το πιο επιθυμητό αποτέλεσμα, υποδεικνύοντας, έτσι, την υπεροχή της έναντι της συνεχούς λειτουργίας.

Με σκοπό την επαλήθευση της αξιοπιστίας των μοντέλων επιφανειών απόκρισης για ποσοτικές προβλέψεις, πραγματοποιήθηκαν εκ νέου πειράματα κάτω από τις εκτιμώμενες από τα μοντέλα βέλτιστες συνθήκες. Στον Πίνακα 4.6, συνοψίζονται οι προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές του TPC, οι οποίες, όπως αποδείχθηκε, βρίσκονται σε μια πολύ καλή συμφωνία μεταξύ τους, με το ποσοστό σφάλματος να είναι μικρότερο του 3.92 και 2.80% για τη CUAΕ και τη PUAΕ, αντίστοιχα. Η ισχυρή συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των προτεινόμενων και πειραματικών τιμών του TPC επιβεβαίωσε την εγκυρότητα και αποτελεσματικότητα των μοντέλων να αντικατοπτρίζουν τις τιμές της απόκρισης και, συνεπώς, να προσδιορίζουν τις βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής.

Πίνακας 4.6. Βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής, προτεινόμενες και πειραματικές τιμές του TPC κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.

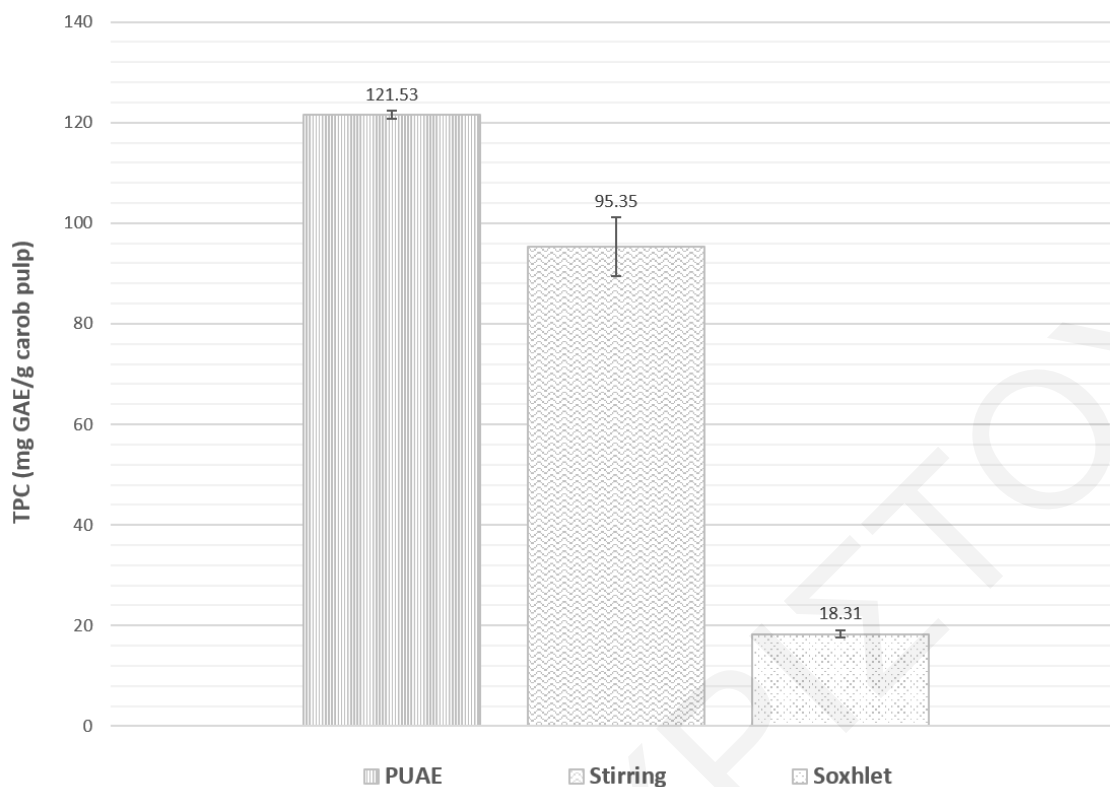
Μέθοδος εκχύλισης	Βέλτιστες συνθήκες UAE				Μέγιστη τιμή TPC (mg GAE/g σάρκας χαρουπιού)		Ποσοστό σφάλματος (%)
	Λόγος στερεού-διαλύτη	Συγκέντρωση διαλύτη (% v/v, ακετόνη)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Πλάτος υπερήχων (%)	Προβλεπόμενη	Πραγματική (πειραματική)	
CUAE	1:25	54	10	50	121.13	116.56 ± 2.39	3.92
PUAE	1:25	57	14	50	124.93	121.53 ± 0.82	2.80

4.1.2. Σύγκριση εναλλακτικών και κλασσικών τεχνικών εκχύλισης

Αφού προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων, έλαβε χώρα σύγκριση μεταξύ της προτεινόμενης βέλτιστης μεθόδου εκχύλισης, της PUAΕ, και κάποιων ευρέως χρησιμοποιούμενων κλασσικών τεχνικών εξαγωγής. Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των εναλλακτικών και κλασσικών τεχνικών εξαγωγής παρατίθενται στο Σχήμα 4.4. Αρχικά, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των υπερήχων στην ικανότητα εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποδόσεων που επιτεύχθηκαν μέσω της PUAΕ (121.53 ± 0.82 mg GAE/g σάρκας χαρουπιού), με αυτές που αποκτήθηκαν μέσω μιας συμβατικής μεθόδου, που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ακριβώς τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (1:25 αναλογία στερεού-διαλύτη, 57%, v/v, ακετόνη ως διαλύτης εκχύλισης και 14 min χρόνος επεξεργασίας), χωρίς, ωστόσο, την παρουσία των υπερήχων, μόνο με ανάδευση του προς εκχύλιση μίγματος (95.35 ± 5.84 mg GAE/g σάρκας χαρουπιού). Όπως διαπιστώθηκε, η παρουσία των υπερήχων οδήγησε σε

σημαντική αύξηση του TPC, μια αύξηση που ξεπέρασε το 25%, υποδεικνύοντας, έτσι, τη μεγάλη τους συνεισφορά στη διαδικασία της εκχύλισης. Η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της UAE έναντι των συμβατικών τεχνικών εξαγωγής, έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες, στις οποίες υπογραμμίζεται η μεγάλη της αποδοτικότητα, καθώς και ο μειωμένος χρόνος επεξεργασίας [217–222]. Όπως αναφέρεται, η ενίσχυση της ανάκτησης των φυτοχημικών συστατικών αποδίδεται στην επίδραση του φαινομένου της σπηλαίωσης, ως αποτέλεσμα της διέλευσης των υπερήχων, διευκολύνοντας τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και, συνεπώς, την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών συστατικών [219,222,223].

Μελέτες πραγματοποιήθηκαν και με τη χρήση της συσκευής Soxhlet, μια τεχνική η οποία έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων. Ωστόσο, η τεχνική αυτή αποδείχθηκε εντελώς ακατάλληλη για την εξαγωγή των υπό μελέτη αντιοξειδωτικών συστατικών. Συγκεκριμένα, οι πολύ χαμηλές αποδόσεις TPC που προέκυψαν (18.31 ± 0.67 mg GAE/g σάρκας χαρουπιού), χρησιμοποιώντας ακριβώς το ίδιο σύστημα διαλυτών (57%, v/v, ακετόνη) και αναλογία στερεού διαλύτη (1:25) αλλά, ταυτόχρονα, ένα πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επεξεργασίας (6 h), κατέδειξαν την πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα της εν λόγω κλασσικής μεθόδου εκχύλισης. Οι υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλοι χρόνοι επεξεργασίας που ακολουθούνται κατά τη διεξαγωγή της, πιθανό να οδηγούν σε οξείδωση ή/και αποικοδόμηση των ευαίσθητων φαινολικών συστατικών, γεγονός που αιτιολογεί τα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα TPC που παρατηρήθηκαν και, συνεπώς, την πολύ μικρή αποδοτικότητα της μεθόδου [222]. Λαμβάνοντας υπόψη την κατανάλωση μεγάλου όγκου διαλυτών, το μεγάλο χρόνο επεξεργασίας, καθώς και τα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα TPC που προέκυψαν με τη χρήση της τεχνικής Soxhlet, διαπιστώθηκε η ακαταλληλότητα της μεθόδου για την απομόνωση των φαινολικών συστατικών, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα [222,224]. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν διαπιστώθηκε η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της UAE έναντι των κλασσικών τεχνικών εξαγωγής.



Σχήμα 4.4. Σύγκριση αποδοτικότητας κλασσικών και εναλλακτικών τεχνικών εξαγωγής.

4.1.3. Σύγκριση φαινολικού περιεχομένου σάρκας άγουρων και ώριμων καρπών

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ενός καρπού, λαμβάνει χώρα μια σειρά πολύπλοκων βιοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες επηρεάζουν τα επίπεδα των φυτοχημικών συστατικών και οδηγούν στην ανάπτυξη των χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος [146,147]. Στην παρούσα μελέτη, αποδείχθηκε πως ο βαθμός ωρίμανσης των χαρουπιών επηρεάζει σημαντικά τη φαινολική τους σύσταση. Συγκεκριμένα, κατά την ωρίμανσή τους, καταγράφηκε σημαντική μείωση του TPC της σάρκας των χαρουπιών (Πίνακας 4.7), μια μείωση που έφτασε το ποσοστό των 88%. Τα άγουρα χαρούπια παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πολυφαινολών (121.53 ± 0.82 mg GAE/g σάρκας χαρουπιού ή 180.99 ± 0.77 mg GAE/g εκχυλίσματος σάρκας χαρουπιού) σε σχέση με τα ώριμα χαρούπια (14.24 ± 0.17 mg GAE/g σάρκας χαρουπιού ή 21.57 ± 0.32 mg GAE/g εκχυλίσματος σάρκας χαρουπιού), γεγονός που επέτρεψε το χαρακτηρισμό τους ως μια σημαντικότερη πηγή πολυφαινολικών ενώσεων. Η μείωση αυτή, μπορεί να αποδοθεί στην οξείδωσή τους από το ένζυμο της οξειδάσης πολυφαινολών ή/και στη δέσμευση τους από τους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων, γεγονός που παρεμποδίζει την απελευθέρωσή τους από τους φυτικούς ιστούς [146].

Όσον αφορά την εκατοστιαία απόδοση της διαδικασίας εκχύλισης (Πίνακας 4.7), η οποία και ορίστηκε ως ο λόγος της μάζας του εκχυλίσματος ως προς τη μάζα του αρχικού δείγματος, δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στην τιμή της, παρόλο που τα άγουρα χαρούπια παρουσίασαν μια πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην εξαγωγή και άλλων ενώσεων, πέραν των πολυφαινολών, οι οποίες συνεισφέρουν στη συνολική μάζα του εκχυλίσματος.

Πίνακας 4.7. Σύγκριση TPC σάρκας άγουρων και ώριμων καρπών.

Βαθμός ωρίμανσης	TPC		Απόδοση εκχύλισης (%)
	(mg GAE/g σάρκας χαρουπιού)	(mg GAE/g εκχυλίσματος σάρκας χαρουπιού)	
Άγουρη σάρκα	121.53 ± 0.82	180.99 ± 0.77	66.04 ± 1.16
Ωριμη σάρκα	14.24 ± 0.17	21.57 ± 0.32	66.90 ± 1.09

4.1.3.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων TPC και υπάρχουσας βιβλιογραφίας

Δυστυχώς, τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το TPC των χαρουπιών, εκτός του ότι είναι σπάνια, ποικίλουν, ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιείται, την ποικιλία και τη γεωγραφική τους προέλευση, τις συνθήκες καλλιέργειας και το βαθμό ωρίμανσής τους [72]. Αυτό καθιστά την ποσοτική σύγκριση των αποτελεσμάτων από διαφορετικές μελέτες εξαιρετικά δύσκολη. Παρόλα αυτά, σε συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα, οι Benchikh et al., Ouzounidou et al. και Saci et al. ανέφεραν τη σταδιακή μείωση του TPC με την αύξηση της ωρίμανσης του καρπού, αποκαλύπτοντας ποσοστά απώλειας της τάξεως του 83-93% [146,147,225,226].

Να σημειωθεί πως οι τιμές του TPC που παρατίθενται στον Πίνακα 4.7, για σκοπούς σύγκρισης, εκφράζονται σε όρους mg GAE/g σάρκας χαρουπιού και mg GAE/g εκχυλίσματος σάρκας χαρουπιού. Το TPC που καταγράφηκε, στην παρούσα μελέτη, για τη σάρκα του άγουρου καρπού (121.53 ± 0.82 mg GAE/g σάρκας χαρουπιού, 180.99 ± 0.77 mg GAE/g εκχυλίσματος σάρκας χαρουπιού) αποδείχθηκε αρκετά υψηλότερο σε σχέση με αυτό που αναφέρθηκε από τους Sebai et al. (28.07 ± 0.99 mg GAE/kg σάρκας χαρουπιού) και Qasem et al. (127.02 ± 7.18 mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος) για τα εκχυλίσματα των άγουρων καρπών και, ταυτόχρονα, χαμηλότερο από αυτό που σημειώθηκε από τους

Benchikh et al. (19.82 ± 0.48 g GAE/100 g ξηρού χαρουπιού) και Saci et al. (258.55 ± 2.57 mg GAE/g ξηρού υλικού) [146,147,227,228]. Πρόσφατα, οι Ydjedd et al., κατά την ανάλυση των άγουρων καρπών από την Αλγερία, ανέφεραν μια τιμή TPC αρκετά παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη (162.55 ± 5.44 mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος) [148].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρατηρήθηκε μείωση του TPC κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, με τα ώριμα χαρούπια να παρουσιάζουν τα χαμηλότερα επίπεδα πολυφαινολών (14.24 ± 0.17 mg GAE/g σάρκας χαρουπιού, 21.57 ± 0.32 mg GAE/g εκχυλίσματος σάρκας χαρουπιού). Παρόλα αυτά, οι τιμές που προσδιορίστηκαν για τα ώριμα χαρούπια παραμένουν υψηλότερες από εκείνες που αναφέρθηκαν από τους Paragiannopoulos et al. (8.31 g GAE/kg kibbles) και Makris and Kefalas (9.28 mg GAE/g kibbles) [20,25]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Roseiro, Duarte et al., οι οποίοι ανέφεραν υψηλότερα επίπεδα πολυφαινολών με χρήσης της SFE (27.1 ± 0.8 mg GAE/g εκχυλίσματος) και παρόμοια αποτελέσματα TPC μέσω της UAE (20.4 ± 1.8 mg GAE/g εκχυλίσματος) [72]. Παρόλο που το TPC των εκχυλισμάτων της ώριμης σάρκας χαρουπιών βρέθηκε να είναι αρκετά παρόμοιο με εκείνο που αναφέρθηκε σε προηγούμενες μελέτες [146,229,230], θα πρέπει να τονιστεί, για άλλη μια φορά, η σημαντική επίδραση της μεθόδου εκχύλισης, της γεωγραφικής προέλευσης και της ποικιλίας των χαρουπιών στη φαινολική τους σύσταση.

4.1.4. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, στο παρόν στάδιο, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση μιας μη συμβατικής μεθόδου εκχύλισης, της UAE, μέσω της RSM. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση του λόγου στερεού-διαλύτη, της συγκέντρωσης του διαλύτη, του χρόνου εκχύλισης, του πλάτους των υπερήχων και του τρόπου λειτουργίας των υπερήχων (συνεχής ή παλμική) στην ικανότητα εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων, με σκοπό τη μεγιστοποίηση του TPC των εκχυλισμάτων. Μεταξύ των παραμέτρων που εξετάστηκαν, η συγκέντρωση του διαλύτη παρουσίασε τη σημαντικότερη επίδραση στην απόκριση. Οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν αποδείχθηκαν αρκετά παρόμοιες, τόσο για τη συνεχή, όσο και την παλμική λειτουργία. Στην περίπτωση της CUAE, ως βέλτιστες συνθήκες αποδείχθηκαν οι ακόλουθες: 54% (v/v) ακετόνη, ως διαλύτης εκχύλισης, και 10 min, ως χρόνος επεξεργασίας, για αναλογία στερεού-διαλύτη και πλάτος υπερήχων 1:25 και 50%, αντίστοιχα. Όσον αφορά την PUAE, οι βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής επιτεύχθηκαν μέσω της χρήσης 57% (v/v) ακετόνης και 14 min χρόνου επεξεργασίας, και πάλι για αναλογία στερεού διαλύτη 1:25 και πλάτος υπερήχων 50%. Αν και με αρκετά παρόμοιες συνθήκες

εξαγωγής, η PUAΕ αποδείχθηκε καταλληλότερη για την αποτελεσματική εξαγωγή των υπό μελέτη βιοδραστικών συστατικών. Επιπλέον, σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους επεξεργασίας, η προτεινόμενη μέθοδος εξαγωγής προσέφερε υψηλότερες αποδόσεις σε σημαντικά μειωμένους χρόνους επεξεργασίας. Η μέθοδος αυτή διαθέτει απλοποιημένο χειρισμό, μειωμένο χρόνο επεξεργασίας και βελτιωμένη ποσοτικοποίηση των αναλυτών στόχων. Συνεπώς, μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια απλή, οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος για την εξαγωγή των περιεχόμενων στα χαρούπια πολυφαινολικών ενώσεων.

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu επέτρεψε την αξιολόγηση του φαινολικού περιεχομένου της σάρκας των άγουρων και ώριμων καρπών και κατέδειξε τη σημαντική επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύσταση. Τα άγουρα χαρούπια παρουσίασαν μια αρκετά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, γεγονός που επέτρεψε το χαρακτηρισμό τους ως μια σημαντικότερη πηγή αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ωστόσο, παρόλο που οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι επιτρέπουν την ταχεία εξέταση των δειγμάτων όσον αφορά την ποσότητα των περιεχόμενων αντιοξειδωτικών τους συστατικών, είναι συχνά επιρρεπείς στην υπερεκτίμηση του φαινολικού τους περιεχομένου. Η παρουσία άλλων αναγωγικών ενώσεων (π.χ. σάκχαρα), πέραν των πολυφαινολών, στα υπό εξέταση δείγματα, οδηγεί, πολλές φορές, σε υψηλότερα επίπεδα TPC, γεγονός που καθιστά αναγκαία την περαιτέρω ανάλυση των εκχυλισμάτων με τη χρήση μιας ηλεκτροφορητικής ή χρωματογραφικής αναλυτικής τεχνικής. Ως εκ τούτου, για τον ακριβή ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων, ακολούθησε ηλεκτροφορητική ανάλυση των βέλτιστα ληφθέντων εκχυλισμάτων της σάρκας των άγουρων και ώριμων καρπών. Ακολουθεί, λεπτομερής περιγραφή των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης των εκχυλισμάτων.

4.2. Προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD

Αφού προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων, έλαβε χώρα ηλεκτροφορητική ανάλυση των βέλτιστα ληφθέντων εκχυλισμάτων. Στόχος, ο ταυτόχρονος ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των δώδεκα πιο συχνά απαντώμενων στη σάρκα και στους σπόρους των χαρουπιών πολυφαινολικών ενώσεων. Παρά την ευρεία εφαρμογή της CE κατά την ανάλυση των φυτοχημικών συστατικών, δεν έχει αναφερθεί προηγούμενη επιτυχής χρήση της όσον αφορά το χαρακτηρισμό της φαινολικής σύνθεσης των χαρουπιών. Παρόλο που οι Roseiro et al. [26] και Almanasrah et al. [58,106] επιχείρησαν να αναλύσουν το φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων σάρκας χαρουπιού με τη

χρήση της τεχνικής CE, δεν κατάφεραν να επιτύχουν τον πλήρη διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών στόχων.

Υπό τις συνθήκες αυτές, αναπτύχθηκε, σε πρώτο στάδιο, μια απλή, γρήγορη και αξιόπιστη ηλεκτροφορητική μέθοδος η οποία επέτρεψε τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των υπό μελέτη αναλυτών. Έχοντας ως στόχο τον πλήρη διαχωρισμό των υπό ανάλυση ενώσεων, παράγοντες όπως ο τύπος και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, η παρουσία προσθέτων και η εφαρμοζόμενη τάση μελετήθηκαν λεπτομερώς. Η χρήση της β-CD σε συνδυασμό με το IL, ως πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα, μελετήθηκε για πρώτη φορά και, όπως αποδείχθηκε, η συνεργειακή τους δράση επέτρεψε τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των υπό μελέτη βιοδραστικών συστατικών.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, αφού αξιολογήθηκε ως προς την πιστότητα, τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, εφαρμόστηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των κύριων πολυφαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων των ώριμων και άγουρων καρπών. Ωστόσο, η ηλεκτροφορητική ανάλυση, που ακολούθησε, κατέδειξε την παρουσία και άλλων ενώσεων, πέραν των πολυφαινολών, για αυτό και ένα περαιτέρω στάδιο καθαρισμού των εκχυλισμάτων κρίθηκε απαραίτητο. Για το σκοπό αυτό, αξιολογήθηκε η SPE, ως στρατηγική καθαρισμού των εκχυλισμάτων. Μέσω της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης που ακολούθησε διαπιστώθηκε, για άλλη μια φορά, η σημαντική επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύσταση.

4.2.1. Ανάπτυξη μεθόδου CE

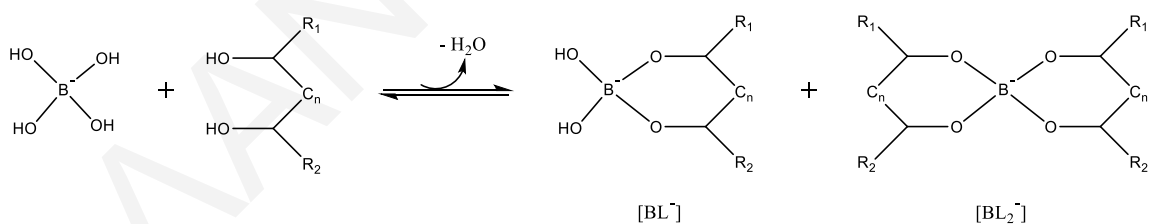
Παράγοντες όπως ο τύπος, η συγκέντρωση και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, η παρουσία προσθέτων, η εφαρμοζόμενη τάση και η θερμοκρασία φαίνεται να επιδρούν σημαντικά στην ταχύτητα μετανάστευσης των διαφόρων υπό μελέτη αναλυτών. Η επιμέρους μελέτη τους κρίθηκε απαραίτητη προκειμένου να προσδιοριστούν οι συνθήκες εκείνες που επιτρέπουν τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των αναλυτών στόχων. Στη συνέχεια, γίνεται εκτενής αναφορά στους παράγοντες εκείνους των οποίων η μεταβολή επέφερε και το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή, τον πλήρη διαχωρισμό των αναλυτών σε μικρό χρόνο ανάλυσης.

4.2.1.1. Επίδραση τύπου και συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος

Η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (τύπου και συγκέντρωσης) αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη παράμετρο που θα πρέπει να διερευνηθεί κατά την ανάπτυξη μιας ηλεκτροφορητικής μεθόδου. Το ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο παρέχει το μέσο για τη

διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και, κατά συνέπεια, το διαχωρισμό των φορτισμένων συστατικών, διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροφορητική διαδικασία [231,232]. Ένα ρυθμιστικό διάλυμα χαρακτηρίζεται από τη σύνθεσή του, δηλαδή τον τύπο και τη συγκέντρωση των ιόντων του, καθώς και τη ρυθμιστική του ικανότητα, τα οποία και θα πρέπει αξιολογηθούν κατά το πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης [232].

Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε χρήση του Borate, το οποίο αποτελεί και το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ηλεκτρολυτικό διάλυμα κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων [118,233]. Η ευρεία του χρήση οφείλεται στην ικανότητα των βορικών ιόντων να σχηματίζουν αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα με τις γειτονικές υδροξυλικές ομάδες των αρωματικών δακτυλίων των πολυφαινολών (Σχήμα 4.5), επιδρώντας, έτσι, σημαντικά στην ηλεκτροφορητική ευκινησία των εν λόγω αναλυτών [118]. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, τα βορικά ιόντα μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με ομάδες διολών, οι οποίες έχουν την κατάλληλη γεωμετρία, σε κυκλικές ή μη κυκλικές πολυυδροξύ ενώσεις. Συγκεκριμένα, μπορούν να σχηματίσουν πενταμελείς και εξαμελείς δακτυλίους με τις 1,2- (n=0) και 1,3-διόλες (n=1), αντίστοιχα, μέσω αλληλεπιδράσεων ιόντος-διπόλου, ενισχύοντας, έτσι, την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού [111,234]. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως η χρήση άλλων ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων (Tris/Borate, Phosphate), όχι μόνο δεν προσέφερε επαρκή διαχωρισμό, άλλα και επέφερε αστάθεια στη γραμμή βάσης (baseline).

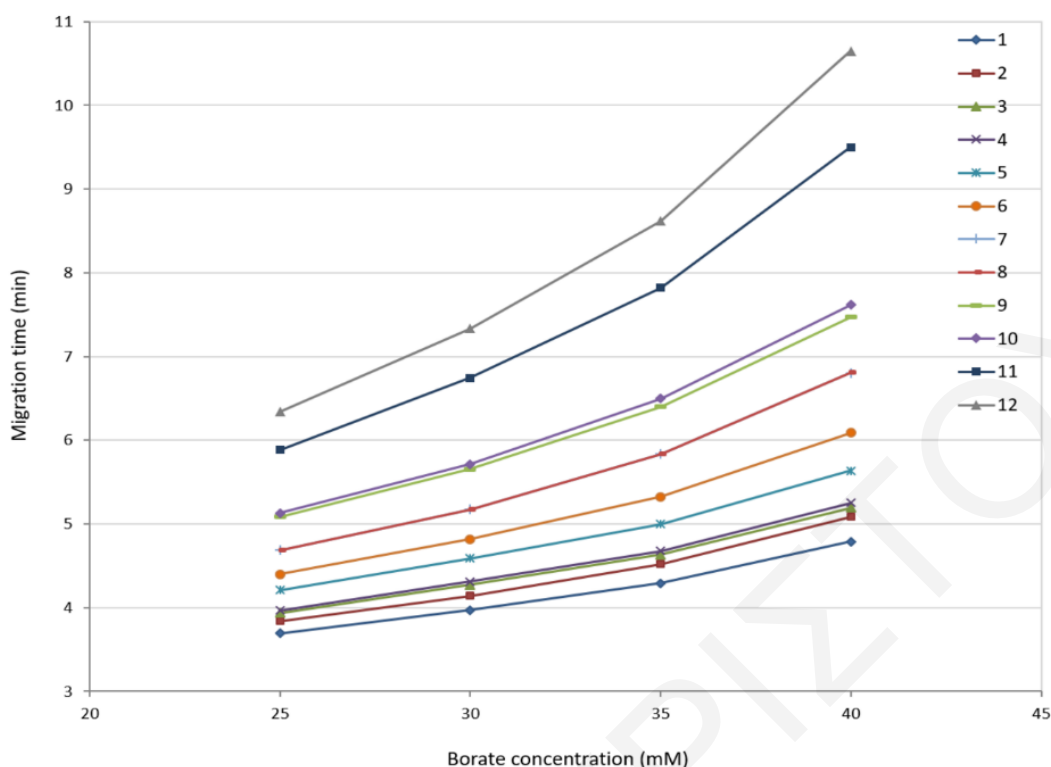


Σχήμα 4.5. Αντίδραση συμπλοκοποίησης βορικών ιόντων και πολυφαινολών (n=0,1).

Στη συνέχεια, διατηρώντας σταθερό το pH του ρυθμιστικού διαλύματος και ίσο με 9.5, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη (25-40 mM) στην ικανότητα διαχωρισμού των αναλυτών. Να σημειωθεί ότι προηγουμένως έλαβε χώρα βελτιστοποίηση της τιμής του pH, η επίδραση του οποίου μελετήθηκε σε εύρος τιμών 8.5-10.0. Λαμβάνοντας υπόψη τους μικρούς χρόνους ανάλυσης και την υψηλή αποδοτικότητα των κορυφών, σε συνδυασμό με τον ικανοποιητικό διαχωρισμό που επιτεύχθηκε σε pH 9.5, η

τιμή αυτή επιλέχθηκε ως βέλτιστη και διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.6, με την αύξηση της συγκέντρωσης του Borate παρατηρήθηκε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης και των 12 αναλυτών, γεγονός που οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας. Αυτό πιθανό να οφείλεται, είτε στη μείωση της EOF (μ_{eo}), είτε στην αύξηση των αλληλεπιδράσεων βορικών ιόντων-πολυφαινολών με την αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη. Όσον αφορά τη μεταβολή της EOF, η παρατηρούμενη μείωση ($\Delta\mu_{eo} = -4.4 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{min}^{-1}$) πιθανό να οφείλεται στην ελάττωση του δυναμικού ζήτα (zeta potential) και στην αύξηση του ιξώδους, ως αποτέλεσμα της αύξησης της ιοντικής ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος [116]. Παράλληλα, μέσω της απεικόνισης της μεταβολής των παραγόντων κατακράτησης (k') των υπό διερεύνηση αναλυτών, επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός των συμπλόκων βορικών ιόντων-πολυφαινολών και η επακόλουθη ενίσχυση της συμπλοκοποίησης με αυξανόμενη τη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη. Συγκεκριμένα, όπως και στην περίπτωση των χρόνων μετανάστευσης, η αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη επέφερε τη σταδιακή αύξηση των παραγόντων κατακράτησης όλων των υπό εξέταση αναλυτών. Η αύξηση των παραγόντων κατακράτησης, η οποία και αντανακλάται από την αύξηση των χρόνων μετανάστευσης, υποδηλώνει ότι, όχι μόνο η μείωση της EOF, αλλά και η ενίσχυση της συμπλοκοποίησης βορικών ιόντων-πολυφαινολών φέρει ευθύνη για την παρατηρούμενη μεταναστευτική συμπεριφορά των αναλυτών στόχων. Εξάλλου, η μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των υπό μελέτη αναλυτών κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του Borate από 25 σε 40 mM (από $\Delta\mu_{ep} = -0.6 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{min}^{-1}$ για το χλωρογενικό οξύ μέχρι $\Delta\mu_{ep} = -1.1 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{min}^{-1}$ για την καεμφερόλη και το φερουλικό οξύ), υποδεικνύει για άλλη μια φορά την ενίσχυση του φαινομένου της συμπλοκοποίησης. Ως βέλτιστη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη επιλέχθηκαν τα 35 mM Borate μέσω των οποίων επιτεύχθηκε καλύτερος διαχωρισμός χωρίς ωστόσο να μειώνεται η αποδοτικότητα των κορυφών, κάτι που παρατηρήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.



Σχήμα 4.6. Επίδραση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη (Borate) στους χρόνους μετανάστευσης των υπό μελέτη αναλυτών (pH 9.5).

4.2.1.2. Χρήση προσθέτων στο ρυθμιστικό διάλυμα

Η εκλεκτικότητα και η διαχωριστική ικανότητα σε ένα ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με την προσθήκη τροποποιητών στο ρυθμιστικό διάλυμα [235]. Η χρήση των προσθέτων μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού μέσω της μεταβολής της EOF και των φορτίων των αναλυτών ή ακόμα και μέσω της εισαγωγής πρόσθετων αλληλεπιδράσεων [110,236]. Κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων έχει αναφερθεί η χρήση διαφόρων προσθέτων, με κυριότερη τη χρήση των οργανικών διαλυτών και των ανιονικών επιφανειοδραστικών [110,236].

4.2.1.2.1. Επίδραση οργανικών τροποποιητών

Δεδομένης της ανάγκης για επίτευξη πλήρους διαχωρισμού, η χρήση προσθέτων κρίθηκε απαραίτητη. Με σκοπό την περαιτέρω βελτίωση του διαχωρισμού, έγινε, αρχικά, προσθήκη MeOH και ACN στο ρυθμιστικό διάλυμα, σε εύρος συγκεντρώσεων 0-10% v/v. Ωστόσο, η παρουσία των οργανικών διαλυτών στο ρυθμιστικό διάλυμα οδήγησε σε αύξηση του χρόνου ανάλυσης και διεύρυνση των κορυφών, ως συνέπεια της ελάττωσης της EOF (μ_{eo}). Συγκεκριμένα, η παρουσία των οργανικών διαλυτών στο ρυθμιστικό διάλυμα οδήγησε σε

μεταβολή του δυναμικού ζήτα (μείωση), καθώς και του ιξώδους (μείωση στην περίπτωση της MeOH και αύξηση στην περίπτωση του ACN) και της διηλεκτρικής σταθεράς (μείωση) του ηλεκτρολυτικού μέσου, με αποτέλεσμα την αισθητή ελάττωση της EOF [237]. Εφόσον η παρουσία των εν λόγω οργανικών τροποποιητών δεν επέφερε βελτίωση του διαχωρισμού, ένα καθαρά υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα θεωρήθηκε καταλληλότερο για την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων και επιλέχθηκε για τις περαιτέρω μελέτες βελτιστοποίησης.

4.2.1.2.2. Επίδραση SDS

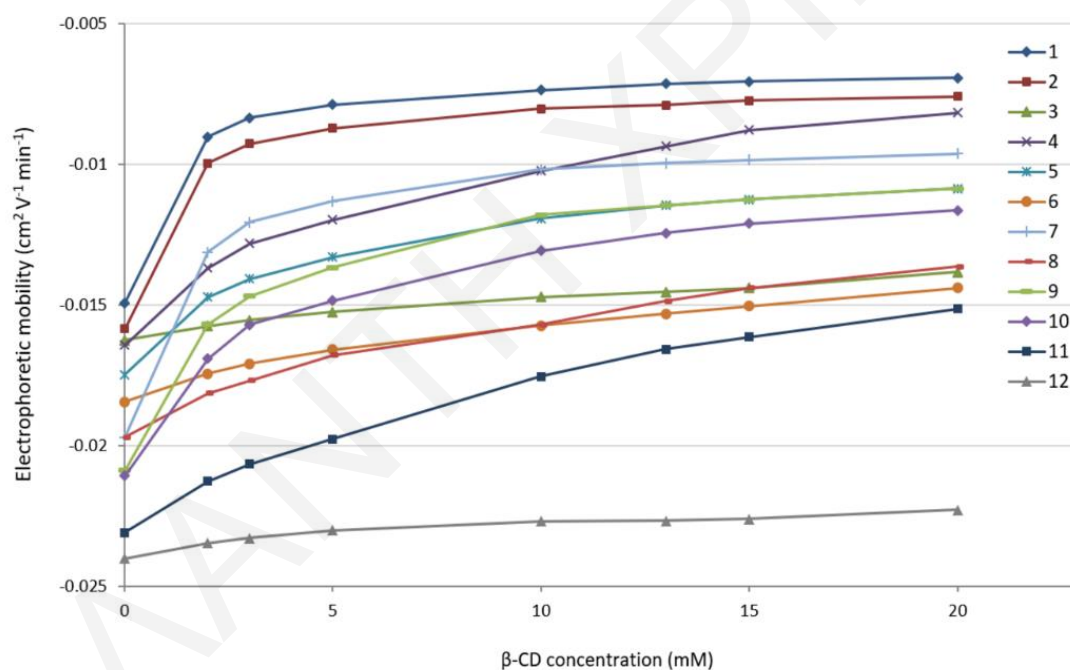
Εφόσον δεν επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της κλασσικής CZE, η EKC προτάθηκε ως μια εναλλακτική μέθοδος ανάλυσης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το SDS, ως ανιονικό επιφανειοδραστικό, σε συγκεντρώσεις που επέτρεπαν το σχηματισμό μικυλλίων (10 και 15 mM). Ωστόσο, η MEKC όχι μόνο δε βελτίωσε το διαχωρισμό, αλλά οδήγησε σε μείωση της εκλεκτικότητας και επικάλυψη των κορυφών. Οι υδρόφοβες ή/και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύχθηκαν μεταξύ των αναλυτών και των μικυλλίων [103], είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι ακόμα και με την προσθήκη MeOH στο μικυλλιακό σύστημα, δεν παρατηρήθηκε βελτίωση του διαχωρισμού. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, το SDS αποκλείστηκε από τις περαιτέρω μελέτες βελτιστοποίησης.

4.2.1.2.3. Επίδραση β-CD

Η β-CD έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα κατά την ανάλυση διαφόρων βιοδραστικών συστατικών [118,238]. Εξαιτίας της ιδιαίτερης δομής που παρουσιάζει (υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα), έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα εγκλεισμού με μια ποικιλία αναλυτών, από ισχυρά πολικά μόρια μέχρι άπολους αλειφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες [117,239]. Ως αποτέλεσμα της συμπλοκοποίησης αυτής, προκαλείται μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των υπό μελέτη αναλυτών και, ως εκ τούτου, βελτίωση του εκάστοτε διαχωρισμού [116,240].

Στην παρούσα μελέτη, με σκοπό τη βελτίωση του διαχωρισμού των υπό ανάλυση πολυφαινολών, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος (35 mM Borate, pH 9.5), έγινε προσθήκη β-CD σε εύρος συγκεντρώσεων 2-20 mM. Στο Σχήμα 4.7 παρουσιάζεται η μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των υπό μελέτη αναλυτών (Εξίσωση 2.9) ως συνάρτηση της προστιθέμενης συγκέντρωσης β-CD. Όπως είναι φανερό, με την αύξηση της συγκέντρωσης του προστιθέμενου τροποποιητή,

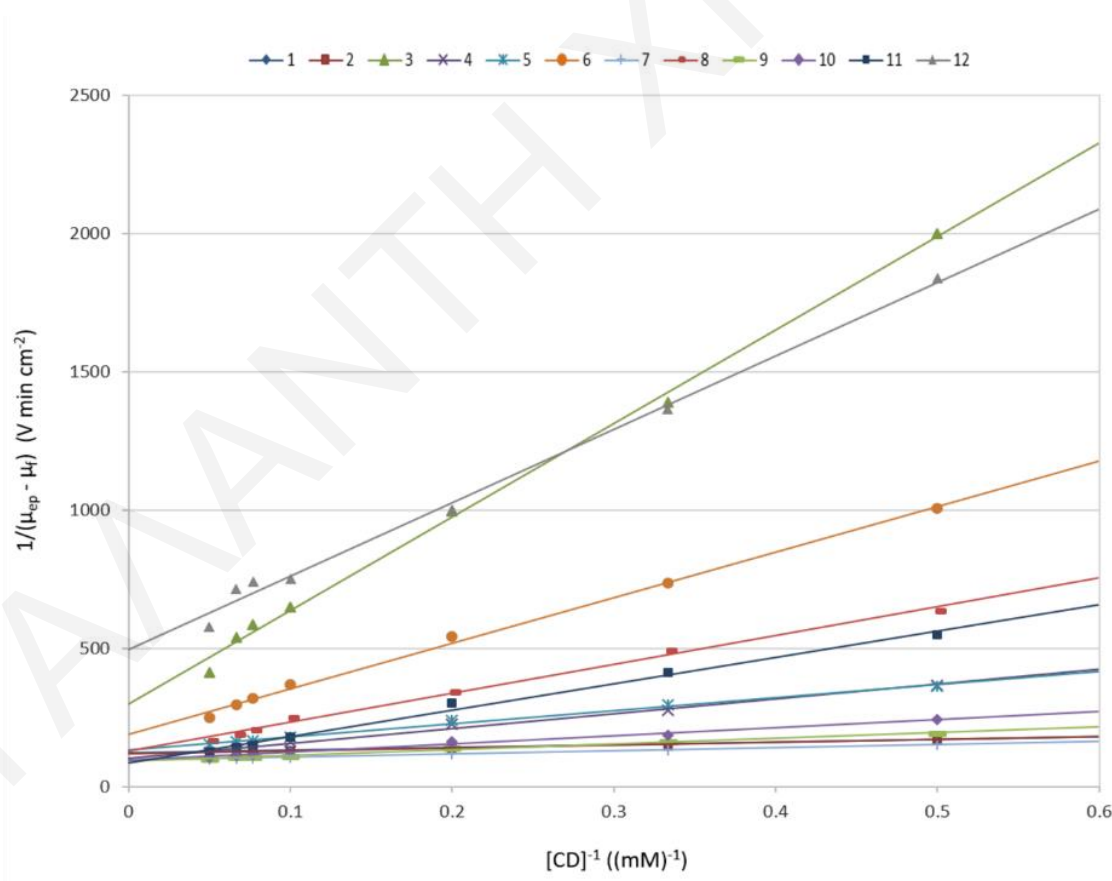
παρατηρήθηκε αύξηση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας όλων των αναλυτών. Η αύξηση της ταχύτητας των αναλυτών (λιγότερο αρνητική) μπορεί να αποδοθεί στη συμπλοκοποίησή τους από τη β -CD και, κατά συνέπεια, στην αύξηση του μεγέθους του ιόντος στόχου. Αξίζει να σημειωθεί ότι με την προσθήκη της β -CD στο ρυθμιστικό διάλυμα, τα ζεύγη κατεχόλη (3)-κινναμικό οξύ (4), καεμφερόλη (7)-φερουλικό οξύ (8) και κερκετίνη (9)-μυρικετίνη (10) απέκτησαν διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ευκινησίες και, έτσι, κατάφεραν να διαχωριστούν. Από την άλλη, με την αύξηση της συγκέντρωσης του τροποποιητή, οι ηλεκτροφορητικές ευκινησίες των κερκετίνη (9)-γλωρογενικό οξύ (5) και κατεχόλη (3)-φερουλικό οξύ (8) πλησίασαν αρκετά μεταξύ τους, με αποτέλεσμα την πλήρη επικάλυψη των κορυφών τους. Λαμβάνοντας υπόψη τα όσα προαναφέρθηκαν, η συγκέντρωση 15 mM β -CD επιλέχθηκε ως η βέλτιστη, παρόλο που δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός για τα ζεύγη γλωρογενικό οξύ (5)-κερκετίνη (9) και κατεχόλη (3)-φερουλικό οξύ (8).



Σχήμα 4.7. Επίδραση συγκέντρωσης β -CD στις ηλεκτροφορητικές ευκινησίες των υπό μελέτη αναλυτών (35 mM Borate, pH 9.5).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η παρατηρούμενη μεταναστευτική συμπεριφορά των αναλυτών στόχων στην παρουσία της β -CD μπορεί να αποδοθεί στη βάση των σταθερών συμπλοκοποίησης (K), έγινε προσπάθεια συσχέτισμού των τιμών K και της παρατηρούμενης κινητικότητας των αναλυτών, με σκοπό την κατανόηση του μηχανισμού που ακολουθείται κατά το διαχωρισμό. Στο Σχήμα 4.8 απεικονίζονται οι ευθείες γραμμές που προέκυψαν κατά τη γραφική απεικόνιση του λόγου $1/(\mu_{ep} - \mu_f)$ ως προς το λόγο $1/[CD]$

(Εξίσωση 3.6), βάση των οποίων υπολογίστηκαν οι σταθερές K . Οι συντελεστές συσχέτισης που προέκυψαν ($R^2 > 0.99$) κατέδειξαν και την ορθότητα της αρχικής παραδοχής σχετικά με το σχηματισμό των 1:1 συμπλόκων. Από την κλίση και την αποτέμνουσα της κάθε ευθείας υπολογίστηκε η ισχύς της συμπλοκοποίησης για τον κάθε αναλύτη, με τις υπολογιζόμενες σταθερές K να παρατίθενται στον Πίνακα 4.8. Η κατεχίνη (1), η ναρινγενίνη (2) και η καεμφερόλη (7) παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές, αιτιολογώντας, έτσι, τη μεγάλη μεταβολή της ηλεκτροφορητικής τους ευκινησίας στην παρουσία της β -CD. Υψηλές τιμές παρατηρήθηκαν, επίσης, και στην περίπτωση της κερκετίνης (9), της μυρικετίνης (10) και του χλωρογενικού οξέος (5), των οποίων οι χρόνοι μετανάστευσης και οι ηλεκτροφορητικές ευκινησίες παρουσίασαν εξίσου σημαντική μεταβολή μετά την προσθήκη του τροποποιητή. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, διαπιστώθηκε ότι ο διαχωρισμός των αναλυτών στην παρουσία της β -CD βασίζεται στις διαφορετικές τιμές των σταθερών K και, κατ' επέκταση, στο διαφορετικό βαθμό συμπλοκοποίησης των ενώσεων, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από αντίστοιχες προηγούμενες μελέτες [116].



Σχήμα 4.8. Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής του λόγου $1/(\mu_{ep} - \mu_f)$ ως προς το λόγο $1/[CD]$, για τον υπολογισμό των σταθερών συμπλοκοποίησης σύμφωνα με την Εξίσωση 3.6 (35 mM Borate, pH 9.5).

Πίνακας 4.8. Οι υπολογιζόμενες σταθερές συμπλοκοποίησης των υπό μελέτη πολυφαινολών με τη β -CD.

Ένωση	K (M^{-1})
Κατεχίνη (1)	1265.0
Ναρινγενίνη (2)	1100.4
Κατεχόλη (3)	88.1
Κινναμικό οξύ (4)	190.1
Χλωρογενικό οξύ (5)	280.5
Γεντισικό οξύ (6)	115.6
Καεμφερόλη (7)	815.2
Φερουλικό οξύ (8)	122.2
Κερκετίνη (9)	436.5
Μυρικετίνη (10)	320.7
Καφεϊκό οξύ (11)	90.2
Γαλλικό οξύ (12)	186.4

4.2.1.2.4. Επίδραση Π

Τα Π έχουν χαρακτηριστεί πρόσφατα ως μια εξαιρετική κατηγορία προσθέτων μιας και, όπως αποδείχθηκε, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ένα ευρύ φάσμα ενώσεων και να συνεισφέρουν στο διαχωρισμό [123]. Στην προσπάθεια εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού των υπό μελέτη ενώσεων, έλαβε χώρα σύνθεση ενός Π και επακόλουθη προσθήκη του μέσα στην κινητή φάση (ρυθμιστικό διάλυμα). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση του L-AlaC₄Lac στην ικανότητα διαχωρισμού των ενώσεων.

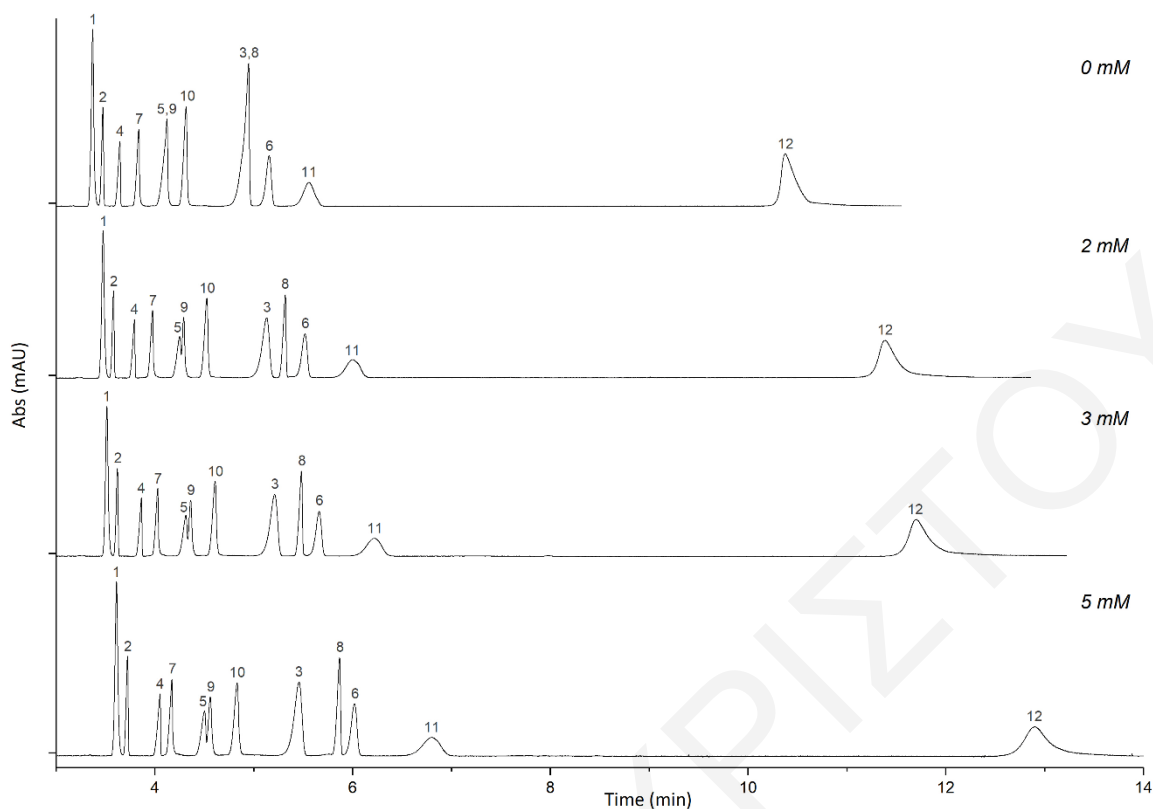
Στο Σχήμα 4.9 παρουσιάζονται τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν κατά την προσθήκη του Π (0-5 mM) στο ρυθμιστικό διάλυμα (35 mM Borate, 15 mM β -CD, pH 9.5). Όπως αποδείχθηκε, η παρουσία του Π βελτίωσε σημαντικά το διαχωρισμό. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός για το ζεύγος κατεχόλη (3)-φερουλικό οξύ (8), ενώ, παράλληλα, βελτιώθηκε σημαντικά και ο διαχωρισμός των κορυφών του χλωρογενικού οξέος (5) και της κερκετίνης (9). Επιπρόσθετα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.10, η αύξηση της συγκέντρωσης του Π οδήγησε σε σημαντική αύξηση των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας (R_s) και της εκλεκτικότητας (α) για τα ζεύγη κατεχόλη(3)-φερουλικό οξύ (8) και χλωρογενικό οξύ (5)-κερκετίνη (9).

Η βελτιωμένη αυτή εκλεκτικότητα και διαχωριστική ικανότητα μπορεί να αποδοθεί κυρίως στη μείωση της EOF (μ_{eo}) εξαιτίας της αύξησης της ολικής συγκέντρωσης του άλατος,

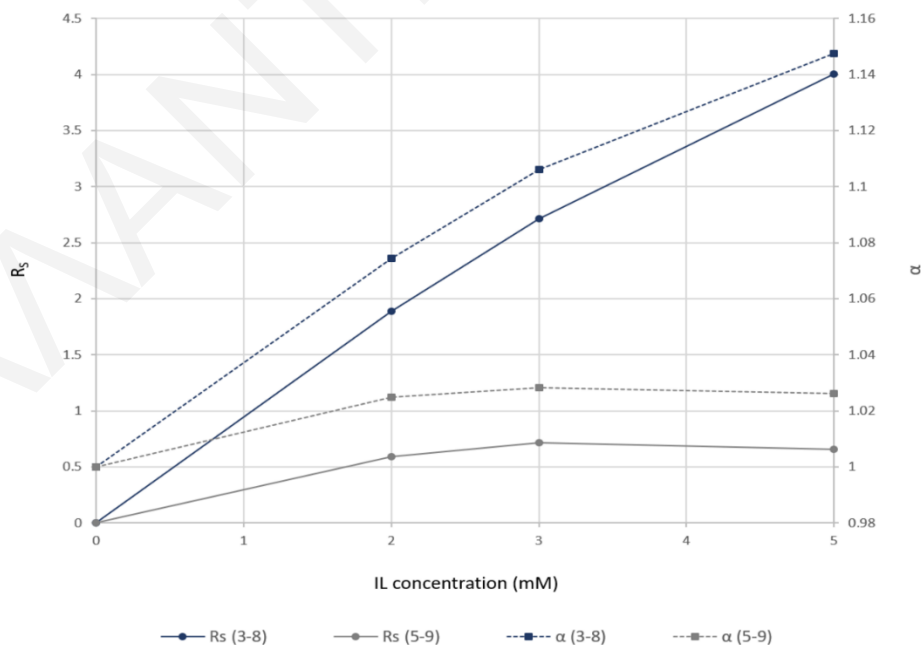
καθώς και της επικάλυψης των αρνητικά φορτισμένων σιλανομάδων της επιφάνειας της τριχοειδούς στήλης από τα κατιόντα του προστιθέμενου IL [241]. Ως αποτέλεσμα της μείωσης της EOF, παρατηρήθηκε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης των αναλυτών, προσφέροντας, έτσι, περισσότερες δυνατότητες για αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυφαινολικών ενώσεων και του συστήματος διαχωρισμού. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μεταβολή της ηλεκτροωσμωτικής ευκινησίας (μ_{eo}) από $30.0 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$ σε $27.4 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$, με αύξηση της συγκέντρωσης του IL από 0 σε 5 mM.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως η χρήση μόνο του IL ως πρόσθετο στο ρυθμιστικό διάλυμα, χωρίς την παρουσία της β -CD, δεν παρουσίασε κάποιου είδους εκλεκτικότητα έναντι των αναλυτών στόχων, με τις ηλεκτροφορητικές ευκινησίες των αναλυτών να μην παρουσιάζουν κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή. Αυτό πιθανότατα να υποδεικνύει τη μη ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ του IL και των υπό μελέτη πολυφαινολικών ενώσεων [241]. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την ύπαρξη ενός συνεργειακού φαινομένου, σύμφωνα με το οποίο, τόσο η β -CD, όσο και το IL, διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία του διαχωρισμού [242]. Εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των δύο αυτών τροποποιητών (β -CD και IL), προκαλείται αλλαγή στο μέγεθος και στο σχήμα της κοιλότητας της β -CD, κάτι που, όπως αποδείχθηκε, είναι εξαιρετικά χρήσιμο για την εκλεκτική συμπλοκοποίηση των αναλυτών στόχων [241]. Όσον αφορά τις ηλεκτροφορητικές ευκινησίες των αναλυτών, η μεταβολή τους κατά την προσθήκη του IL (από $-7.0 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$ μέχρι $-22.6 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$ στα 0 mM IL στο εύρος $-5.9 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$ μέχρι $-21.4 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$ στα 5 mM IL), επιβεβαίωσε την ύπαρξη αυτής της συνέργειας και υπογράμμισε τη συμμετοχή του κατιόντος του IL στο σχηματισμό των συμπλόκων αναλύτη/ β -CD.

Ωστόσο, με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του IL, πέραν των 5 mM, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας. Στις υψηλότερες αυτές συγκεντρώσεις, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του IL και της β -CD πιθανό να είναι τόσο ισχυρές, που το IL να ανταγωνίζεται πλέον τους ίδιους τους αναλύτες όσον αφορά τη συμπλοκοποίηση με τη β -CD [241]. Για το λόγο αυτό, η επίδραση του IL δε μελετήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Επομένως, τα 3 mM L-AlaC₄Lac επιλέχθηκαν για τις περαιτέρω μελέτες βελτιστοποίησης, συγκέντρωση στην οποία επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός.



Σχήμα 4.9. Επίδραση της συγκέντρωσης του IL (L-AlaC₄Lac) στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των υπό μελέτη αναλυτών (35 mM Borate, 15 mM β-CD, pH 9.5).

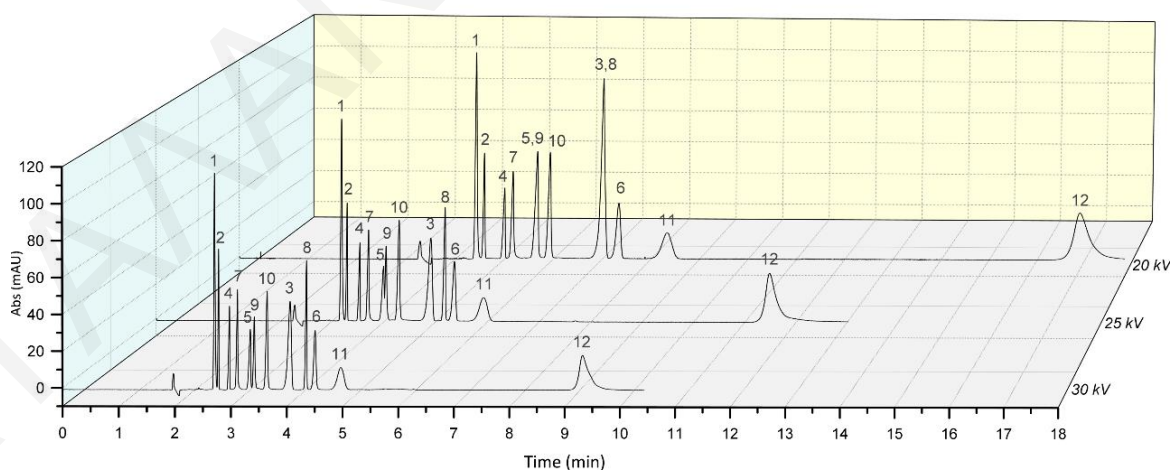


Σχήμα 4.10. Επίδραση της συγκέντρωσης του IL (L-AlaC₄Lac) στη διαχωριστική ικανότητα (R_s) και εκλεκτικότητα (α) για τα ζεύγη χλωρογενικό οξύ (5)-κερκετίνη (9) και κατεχόλη (3)-φερουλικό οξύ (8) (35 mM Borate, 15 mM β-CD, pH 9.5).

4.2.1.3. Επίδραση εφαρμοζόμενης τάσης

Η τάση που εφαρμόζεται στα άκρα της τριχοειδούς στήλης φαίνεται να αποτελεί άλλο ένα παράγοντα που επιδρά σημαντικά στην ικανότητα διαχωρισμού των υπό μελέτη ενώσεων. Η αλλαγή στην τιμή της προκαλεί μεταβολή της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, την κινητήρια δύναμη πίσω από την ηλεκτροφορητική μετανάστευση των ιόντων, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την ταχύτητα της EOF (v_{eo}) και την ταχύτητα μετανάστευσης των φορτισμένων σωματιδίων (v_{ep}) [243,244].

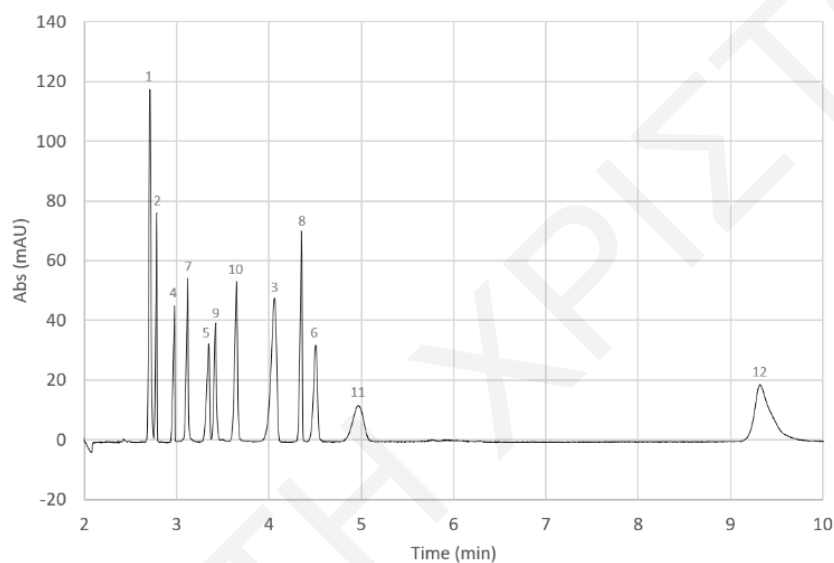
Με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού των υπό ανάλυση ενώσεων, εφαρμόστηκε τάση στο εύρος τιμών 20-30 kV (Σχήμα 4.11). Όπως ήταν αναμενόμενο, η αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης οδήγησε σε αύξηση της ταχύτητας της EOF ($v_{eo}= 8.8$ cm/min στα 20 kV και $v_{eo}=24.3$ cm/min στα 30 kV), μείωση του χρόνου ανάλυσης και αύξηση της αποδοτικότητας των κορυφών. Η μεταβολή της εφαρμοζόμενης τάσης επηρέασε και τις ταχύτητες μετανάστευσης των ιόντων (v_{ep}), με τις τιμές τους να κυμαίνονται από το εύρος -2.1 – -6.9 cm/min στα 20 kV στο εύρος -6.6 – -19.1 cm/min στα 30 kV. Εξαιτίας της μείωσης του φαινομένου της διαμήκου διάχυσης των μορίων με τη μείωση του χρόνου ανάλυσης, οι κορυφές των αναλυτών στο ηλεκτροφερόγραμμα έγιναν πιο οξείες με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί πλήρης διαχωρισμός και των δώδεκα πολυφαινολικών ενώσεων. Ως εκ τούτου, τα 30 kV επιλέχθηκαν ως η βέλτιστη εφαρμοζόμενη τάση, τιμή στην οποία επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός όλων των πολυφαινολικών ενώσεων ($R_s \geq 1.5$).



Σχήμα 4.11. Επίδραση της εφαρμοζόμενης τάσης στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των υπό μελέτη αναλυτών (35 mM Borate, 15 mM β -CD, 3 mM L-AlaC₄Lac, pH 9.5).

4.2.1.4. Βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού

Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες, ο πλήρης διαχωρισμός των πολυφαινολικών ενώσεων επιτεύχθηκε σε χρόνο μικρότερο των 10 min μέσω της χρήσης 35 mM Borate, ως ηλεκτρολυτικού διαλύματος, στην παρουσία 15 mM β -CD και 3 mM L-AlaC₄Lac, ως πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα, σε pH 9.5 και με εφαρμοζόμενη τάση ίση με 30 kV. Στο Σχήμα 4.12 παρατίθεται το ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε κάτω από τις βέλτιστες αυτές συνθήκες.



Σχήμα 4.12. Ηλεκτροφερόγραμμα βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού (35 mM Borate, 15 mM β -CD, 3 mM L-AlaC₄Lac, pH 9.5, V=30 kV).

4.2.2. Αξιολόγηση μεθόδου

Της ανάπτυξης της μεθόδου ακολούθησε η επικύρωσή της. Συγκεκριμένα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε σε όρους γραμμικότητας, πιστότητας, LODs και LOQs. Τα ποσοτικά κριτήρια αξιολόγησης της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου, τα οποία παρατίθενται στο Πίνακα 4.9, κατέδειξαν την ικανότητα της μεθόδου να παρέχει ακριβή και υψηλής ποιότητας δεδομένα κατά την εφαρμογή της σε πραγματικά δείγματα. Ακολουθεί η περιγραφή των αποτελεσμάτων της αξιολόγησης.

4.2.2.1. Γραμμικότητα, LODs και LOQs

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας, κατασκευάστηκαν εξωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης, στην απουσία δηλαδή μήτρας, για τις 12 πολυφαινολικές ενώσεις μέσω της γραφικής απεικόνισης του εμβαδού της κάθε κορυφής ως προς τη συγκέντρωση του

αντίστοιχου προτύπου. Να σημειωθεί ότι έγιναν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, με τις συγκεντρώσεις των πρότυπων ουσιών να κυμαίνονται στο εύρος 1-500 µg/mL (ανάλογα με τον κάθε αναλύτη). Για τον κάθε αναλύτη, επιλέχθηκαν επτά διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Η εξίσωση της ευθείας που προέκυψε κατέδειξε τη γραμμική σχέση μεταξύ του εμβαδού της κορυφής και της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη, με τους αντίστοιχους συντελεστές συσχέτισης (R^2) να είναι σε όλες τις περιπτώσεις μεγαλύτεροι του 0.99. Από τις υψηλές τιμές των R^2 διαπιστώθηκε η πολύ καλή γραμμικότητα που χαρακτηρίζει τη μέθοδο που αναπτύχθηκε.

Όσον αφορά τα LODs και τα LOQs, αυτά υπολογίστηκαν με βάση την τυπική απόκλιση της απόκρισης και την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης, σύμφωνα με τις Εξισώσεις 3.12 και 3.13. Οι πολύ χαμηλές τιμές τους ήταν επαρκείς ώστε να επιτρέψουν την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ακόμα και των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα δείγματα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, τα LODs και τα LOQs βρέθηκαν να κυμαίνονται στο εύρος 0.56-5.20 µg/mL και 1.69-15.77 µg/mL, αντίστοιχα. Παρόμοιες τιμές αναφέρθηκαν και σε προηγούμενες μελέτες κατά την ανάλυση των πολυφαινολών σε δείγματα κρασιού, πρόπολης και πορτοκαλιών, με χρήση ανάλογης οργανολογίας [233,245,246].

4.2.2.2. Πιστότητα

Για την πλήρη αξιολόγηση της πιστότητας της μεθόδου, μελετήθηκε, τόσο η επαναληψιμότητα (repeatability, intra-day precision) των χρόνων μετανάστευσης και των εμβαδών των αναλυτών, όσο και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility, inter-day precision) των αποτελεσμάτων. Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, πραγματοποιήθηκαν 10 διαδοχικές εγχύσεις του πρότυπου μίγματος των αναλυτών (συγκέντρωσης 50 µg/mL για τον κάθε αναλύτη) εντός της ίδιας ημέρας, ενώ αντίστοιχα για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας, έλαβαν χώρα 5 επαναλήψεις για 5 συνεχόμενες μέρες. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης εκφράζονται στον Πίνακα 4.9 σε όρους RSD (%). Οι τιμές που λήφθηκαν, τόσο για τις επαναλήψεις που έγιναν εντός της ίδιας ημέρας ($RSD_{tm} \leq 0.39\%$ και $RSD_{Area} \leq 1.27\%$), όσο και για εκείνες που πραγματοποιήθηκαν εντός των 5 διαδοχικών ημερών ($RSD_{tm} \leq 0.85\%$ και $RSD_{Area} \leq 4.81\%$), κατέδειξαν την πολύ καλή επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα που χαρακτηρίζει τη μέθοδο που αναπτύχθηκε. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά παρόμοιες με εκείνες που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες, ή/και σε ορισμένες περιπτώσεις αρκετά χαμηλότερες, υπογραμμίζοντας για άλλη μια φορά την αξιοπιστία της προτεινόμενης ηλεκτροφορητικής μεθόδου [104, 235, 249].

Πίνακας 4.9. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση της ηλεκτροφορητικής μεθόδου.

Ένωση	Καμπύλη Βαθμονόμησης			LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Πιστότητα (% RSD)			
	Εύρος γραμμικότητας ($\mu\text{g/mL}$)	Εξίσωση	R^2			Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
						t_m	Εμβαδόν	t_m	Εμβαδόν
Κατεχίνη	1 – 64	$y = 2.45x - 1.9179$	0.998	0.63	1.90	0.25	0.46	0.40	1.38
Ναρινγενίνη	1 – 64	$y = 2.2218x - 1.8656$	0.998	0.74	2.25	0.24	0.56	0.33	2.04
Κιναμικό οξύ	1 – 64	$y = 1.1592x - 0.1757$	0.999	0.56	1.69	0.12	0.60	0.53	2.94
Καεμφερόλη	2 – 64	$y = 0.6869x - 0.1493$	0.998	1.14	3.44	0.22	0.61	0.62	2.46
Χλωρογενικό οξύ	2 – 64	$y = 0.7183x - 0.7222$	0.996	1.29	3.67	0.11	0.65	0.43	2.23
Κερκετίνη	2 – 64	$y = 1.0258x - 1.1475$	0.997	1.06	3.22	0.19	0.85	0.54	2.04
Μυρικετίνη	5 – 200	$y = 0.6813x - 2.4841$	0.995	4.75	14.39	0.16	0.68	0.58	4.08
Κατεχόλη	2 – 64	$y = 4.2567x - 6.5256$	0.996	1.13	3.43	0.09	0.79	0.55	2.39
Φερουλικό οξύ	2 – 64	$y = 1.4657x - 2.2587$	0.996	1.40	4.23	0.21	0.58	0.55	2.62
Γεντισικό οξύ	2 – 64	$y = 2.5671x - 2.1697$	0.997	1.21	3.68	0.24	0.58	0.69	2.57
Καφεϊκό οξύ	4 – 64	$y = 1.3675x - 1.3064$	0.995	1.67	5.06	0.18	0.87	0.70	2.85
Γαλλικό οξύ	5 – 500	$y = 1.7983x - 7.9542$	0.999	5.20	15.77	0.39	1.27	0.85	4.81

4.2.3. Καθαρισμός εκχυλισμάτων-Εκχύλιση στερεάς φάσης

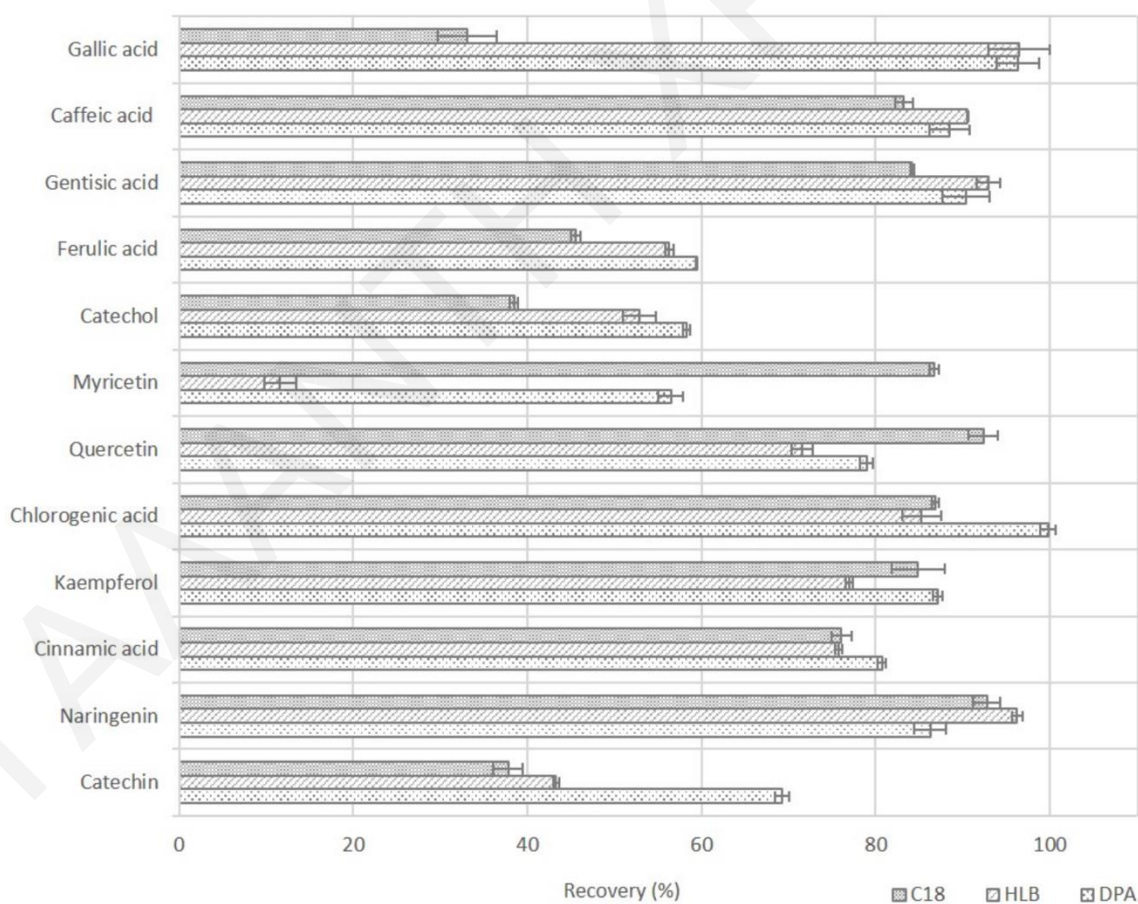
Ο περαιτέρω καθαρισμός των εκχυλισμάτων, πριν την ηλεκτροφορητική τους ανάλυση, κρίθηκε απαραίτητος, με σκοπό τον περιορισμό των παρεμβολών από άλλα ενδογενή συστατικά του μίγματος, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, των πηκτινών, και των πρωτεϊνών. Τα συστατικά αυτά, εξαιτίας του αναγωγικού τους χαρακτήρα, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, γεγονός που αιτιολογεί τα υψηλά επίπεδα TPC που καταγράφηκαν στην παρούσα μελέτη [248]. Επιπλέον, η παρουσία τους δυσχεραίνει την ηλεκτροφορητική και χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων, εξαιτίας της συνέκλουσής τους με τα υπό διερεύνηση πολυφαινολικά συστατικά, γεγονός που καθιστά αναγκαία την προηγούμενη απομάκρυνσή τους από τα υπό εξέταση δείγματα.

Με σκοπό την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων, μη-φαινολικών, συστατικών των εκχυλισμάτων, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση της μεθόδου SPE. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε σύγκριση τριών εμπορικά διαθέσιμων προσροφητικών υλικών (Maxi-Clean™ C¹⁸, Oasis® HLB, Discovery® DPA-6S) ως προς την ικανότητά τους για ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων και εξάλειψη των παρεμβολών από άλλα ενδογενή συστατικά του δείγματος. Στο Σχήμα 4.13 παρουσιάζονται οι τιμές της ανάκτησης, μαζί με τις αντίστοιχες τιμές της RSD, που λήφθηκαν για τον κάθε αναλύτη σε κάθε διαδικασία SPE που υποβλήθηκε. Στο σημείο αυτό, να αναφερθεί πως οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο της έκλουσης, επιλέχθηκαν αφότου πρώτα έγιναν δοκιμές με μίγματα MeOH:H₂O, στην περίπτωση των φυσιγγίων C₁₈ και HLB, και ακετόνης:H₂O, στην περίπτωση των DPA-6S. Δεδομένου του όξινου χαρακτήρα των υπό μελέτη ενώσεων, κρίθηκε απαραίτητη η προηγούμενη οξίνιση των πρότυπων δειγμάτων, πριν την εισαγωγή τους στα φυσίγγια, προκειμένου να αποφευχθεί ο ιονισμός τους και, κατ' επέκταση, να περιοριστεί η απώλειά τους κατά το στάδιο του καθαρισμού.

Μεταξύ των προσροφητικών που εξετάστηκαν, τα φυσίγγια DPA-6S παρουσίασαν την καλύτερη ικανότητα ανάκτησης των αναλυτών στόχων, με υψηλές τιμές ανάκτησης (56.45–99.80%) και αποδεκτές τιμές RSD (μικρότερες του 2.65%). Το προσροφητικό τους υλικό (πολυαμιδική ρητίνη) θεωρείται κατάλληλο για την προσρόφηση των πολικών συστατικών και, κυρίως, των πολυφαινολών, μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων των πολυφαινολικών ενώσεων και των αμιδικών ομάδων της ρητίνης.

Αντίθετα, πολύ χαμηλά ποσοστά ανάκτησης παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των φυσιγγίων C₁₈ και HLB, για αυτό και θεωρήθηκαν ακατάλληλα για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων. Παρόλο που τα φυσίγγια C₁₈ έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την

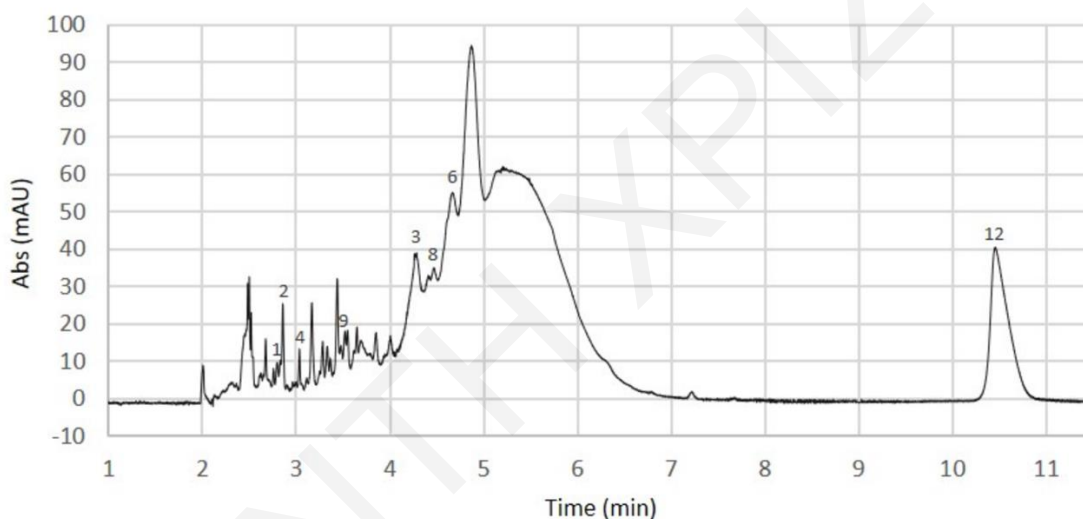
ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων, στην παρούσα μελέτη παρουσίασαν εξαιρετικά χαμηλές αποδόσεις. Εξαιτίας της μεγάλης τους υδροφοβικότητας, τα εν λόγω φυσιγγία παρουσίασαν πολύ χαμηλά ποσοστά ανάκτησης για τα πολικότερα συστατικά του δείγματος, όπως για παράδειγμα για το γαλλικό οξύ. Όσον αφορά τα φυσιγγία HLB, παρόλο που το προσροφητικό τους υλικό (πολυμερές διβινυλοβενζολίου και Ν-βινυλοπυρρολιδόνης) επιτρέπει, τόσο τις υδρόφοβες, όσο και τις υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, στην παρούσα μελέτη, τα εν λόγω φυσιγγία δεν επέτρεψαν την αποτελεσματική ανάκτηση των υπό μελέτη αναλυτών. Σύμφωνα με τους Michalkiewicz et al., η καλύτερη αποδοτικότητα των φυσιγγίων HLB έναντι αυτών του C₁₈ μπορεί επίσης να αποδοθεί και στις αρωματικές δομές του προσροφητικού τους υλικού, βάση των οποίων μπορούν να αναπτύξουν π-π αλληλεπιδράσεις με τα μόρια των πολυφαινολικών ενώσεων και, έτσι, να ενισχύσουν την κατακράτηση των εν λόγω συστατικών [249].



Σχήμα 4.13. Ποσοστά ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων για το κάθε υπό εξέταση προσροφητικό υλικό.

4.2.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση δειγμάτων σάρκας χαρουπιού

Στη συνέχεια, η προτεινόμενη ηλεκτροφορητική μέθοδος (ΕΚC) εφαρμόστηκε επιτυχώς για την ανάλυση των βέλτιστα ληφθέντων εκχυλισμάτων της ώριμης και άγουρης σάρκας χαρουπιών και αποκάλυψε σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων. Στο Σχήμα 4.14 παρατίθεται το ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος της ώριμης σάρκας χαρουπιού. Τα ηλεκτροφερογράμματα, τόσο της ώριμης, όσο και της άγουρης σάρκας, κατέδειξαν ένα σημαντικό αριθμό κορυφών, υποδεικνύοντας, έτσι, τη μεγάλη τους περιεκτικότητα σε πολυφαινολικά συστατικά.



Σχήμα 4.14. Ηλεκτροφερόγραμμα εκχυλίσματος ώριμης σάρκας χαρουπιού (35 mM Borate, 15 mM β -CD, 3 mM L-AlaC₄Lac, pH 9.5, V=30 kV).

Η σάρκα του χαρουπιού βρέθηκε να περιέχει μια μεγάλη ποικιλία από πολυφαινολικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε επέτρεψε την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα της ώριμης σάρκας. Μεταξύ των ενώσεων αυτών, η κατεχίνη (1), η ναρινγενίνη (2), το κινναμικό οξύ (4), η κερκετίνη (9), η κατεχόλη (3), το φερουλικό οξύ (8), το γεντισικό οξύ (6) και το γαλλικό οξύ (12). Ομοίως, οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις ανιχνεύθηκαν και κατά την ανάλυση των εκχυλισμάτων της άγουρης σάρκας, από τις οποίες μόνο οι επτά κατάφεραν να ποσοτικοποιηθούν. Μεταξύ των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν, η κατεχίνη (1), το χλωρογενικό οξύ (5), η κερκετίνη (9), η μυρικετίνη (10), η κατεχόλη (3), το γεντισικό οξύ (6), το καφεϊκό οξύ (11) και το γαλλικό οξύ (12). Η κατεχίνη (1), αν και ανιχνεύτηκε και

μάλιστα με μεγάλο εμβαδόν κορυφής, δεν ποσοτικοποιήθηκε εξαιτίας της συνέκλουσής της με ένα άλλο συστατικό του δείγματος. Η καεμφερόλη (7), ένας από τους αναλύτες στόχους, δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα υπό εξέταση δείγματα, παρόλο που προηγούμενες μελέτες αναφέρουν την παρουσία της στη σάρκα του χαρουπιού. Δυστυχώς, η εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου δεν επέτρεψε τον προσδιορισμό της ταυτότητας ενός σημαντικού αριθμού συστατικών των εκχυλισμάτων εξαιτίας, είτε της συνέκλουσής τους με άλλες ενώσεις, είτε των πολύ χαμηλών τους συγκεντρώσεων.

Στον Πίνακα 4.10 συνοψίζονται οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα υπό εξέταση δείγματα. Όπως παρατηρήθηκε και νωρίτερα, κατά την ανάλυση του TPC, τα άγουρα χαρούπια παρουσίασαν μια σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (912.58 $\mu\text{g/g}$ σάρκας χαρουπιού έναντι 283.13 $\mu\text{g/g}$ σάρκας χαρουπιού στα ώριμα χαρούπια). Σύμφωνα με τους Ydjedd et al., η υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις, που καταγράφεται στο πρώιμο στάδιο της ωρίμανσης του καρπού, είναι αποτέλεσμα της προσπάθειάς του να προστατευθεί από διάφορους περιβαλλοντικούς κινδύνους, βιοτικούς ή/και αβιοτικούς, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του [148]. Μεταξύ των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν, το γαλλικό οξύ φάνηκε να αποτελεί την κύρια πολυφαινολική ένωση της σάρκας, τόσο των ώριμων (183.92 $\mu\text{g/g}$ σάρκας χαρουπιού), όσο και των άγουρων καρπών (205.10 $\mu\text{g/g}$ σάρκας χαρουπιού). Σημαντική συνεισφορά στο φαινολικό περιεχόμενο της σάρκας των άγουρων καρπών κατέδειξαν επίσης το γεντισικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ και η κερκετίνη, με την ποσοστιαία τους περιεκτικότητα να ανέρχεται στα 21, 18, 15 και 13%, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές ανιχνεύτηκαν σε πολύ χαμηλές ή ακόμα και αμελητέες ποσότητες στα εκχυλίσματα της ώριμης σάρκας. Στην περίπτωση της ώριμης σάρκας, το γαλλικό οξύ φάνηκε να αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό των εκχυλισμάτων (65%). Εν κατακλείδι, οι σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές που παρατηρήθηκαν κατά την ανάλυση της σάρκας των ώριμων και άγουρων καρπών κατέδειξαν τη μεγάλη επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύνθεση.

Πίνακας 4.10. Ποσοτικά δεδομένα από την ΕΚC-DAD ανάλυση των εκχυλισμάτων της σάρκας ώριμων και άγουρων καρπών.

Ένωση	Συγκέντρωση (μg/g σάρκας χαρουπιού)		% Περιεκτικότητα	
	Ωριμη σάρκα	Άγουρη σάρκα	Ωριμη σάρκα	Άγουρη σάρκα
Κατεχίνη	4.63 ± 0.16	n.q.	2	0
Ναρινγενίνη	12.79 ± 0.33	n.d.	5	0
Κινναμικό οξύ	9.74 ± 0.20	n.d.	3	0
Καεμφερόλη	n.d.	n.d.	0	0
Χλωρογενικό οξύ	n.d.	135.44 ± 1.89	0	15
Κερκετίνη	19.84 ± 0.70	122.32 ± 1.81	7	13
Μυρικετίνη	n.d.	60.80 ± 1.58	0	7
Κατεχόλη	11.99 ± 0.62	33.86 ± 0.82	4	4
Φερουλικό οξύ	9.18 ± 0.79	n.d.	3	0
Γεντισικό οξύ	31.03 ± 1.03	190.85 ± 2.66	11	21
Καφεϊκό οξύ	n.d.	164.20 ± 2.83	0	18
Γαλλικό οξύ	183.92 ± 3.50	205.10 ± 1.77	65	22
Σύνολο	283.13	912.58	100	100

n.d.: δεν ανιχνεύθηκε

n.q.: δεν ποσοτικοποιήθηκε

4.2.4.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων και υπάρχουσας βιβλιογραφίας

Σε σύγκριση με προηγούμενες μελέτες, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές όσον αφορά τις ενώσεις που ανιχνεύτηκαν και την αντίστοιχη ποσοτικοποίησή τους. Παρόλα αυτά, στις πλείστες των περιπτώσεων υπογραμμίζεται η παρουσία του γαλλικού οξέος ως κύριου συστατικού των καρπών, των φύλλων, του κορμού, καθώς και των παράγωγων προϊόντων του χαρουπιού, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης [16,25,81].

Οι Papaγιαννοπουλος et al. χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διαλυτών εκχύλισης και ένα στάδιο καθαρισμού των εκχυλισμάτων παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην

παρούσα μελέτη, κατάφεραν μέσω της σύζευξης του χρωματογραφικού συστήματος διαχωρισμού (HPLC) με τη MS/MS, να ανιχνεύσουν 41 μεμονωμένα φαινολικά συστατικά στα χαρούπια, με το γαλλικό οξύ (174.1 mg/kg kibbles) και τη γλυκοζυλιωμένη μορφή της μυρικετίνης (myricetin-desoxyhexoside, 148.8 mg/kg kibbles) να αναφέρονται ως οι κύριες πολυφαινολικές ενώσεις των εξεταζόμενων δειγμάτων (kibbles) [25]. Η χρήση της MS/MS επέτρεψε τον προσδιορισμό της δομής και, συνεπώς, της ταυτότητας ενός μεγαλύτερου αριθμού πολυφαινολικών συστατικών.

Η όξινη υδρόλυση που χρησιμοποιήθηκε σε μια προηγούμενη μελέτη, με σκοπό τη διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών και την επακόλουθη απελευθέρωση των άγλυκων συστατικών της σάρκας του χαρουπιού, είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη ενός εντελώς διαφορετικού προφίλ πολυφαινολικών ενώσεων, με κυριότερα συστατικά την πυρογαλλόλη ($48.02 \pm 3.55\%$), την κατεχίνη ($19.10 \pm 2.11\%$) και το ταννικό οξύ ($9.01 \pm 1.40\%$) [55]. Σύμφωνα με τους Roseiro et al., παρόλο που το γαλλικό οξύ βρέθηκε, για άλλη μια φορά, να αποτελεί το βασικό συστατικό των εκχυλισμάτων της σάρκας χαρουπιού που προέκυψαν με χρήση της μη συμβατικής UAE καθώς και της κλασσικής SLE, ένα αρκετά διαφορετικό φαινολικό προφίλ λήφθηκε με εφαρμογή της μεθόδου SFE, όπου διαπιστώθηκε η απουσία του γαλλικού οξέος [62]. Βέβαια στην περίπτωση της SFE, η ανάλυση έγινε σε δείγματα σάρκας χαρουπιού τα οποία προηγουμένως υποβλήθηκαν σε διαδικασία απομάκρυνσης των σακχάρων. Τα υδατοδιαλυτά φαινολικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου και του γαλλικού οξέος, πιθανό να απομακρύνθηκαν, μαζί με τα σάκχαρα, από το τελικό προϊόν. Σε μια πρόσφατη μελέτη των Kyrtzizis et al., μελετήθηκε το φαινολικό περιεχόμενο κυπριακών χαρουπιών [250]. Παρόλο που τα χαρούπια που μελετήθηκαν ήταν της ίδιας γεωγραφικής προέλευσης με αυτά που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, η ποσότητα του γαλλικού οξέος που αναφέρθηκε ήταν σημαντικά υψηλότερη ($959.6 \mu\text{g/g}$ σάρκας). Οι όξινες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των εν λόγω εκχυλισμάτων πιθανό να ευθύνονται για τα αυξημένα επίπεδα του γαλλικού οξέος. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως το στάδιο της εκχύλισης μπορεί να προκαλέσει αποδόμηση ή/και υδρόλυση των φαινολικών συστατικών με αποτέλεσμα τη λήψη μη αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων.

Οι Goulas et al. μελέτησαν, επίσης, τη φαινολική σύσταση δειγμάτων σάρκας χαρουπιών κυπριακής προέλευσης [81]. Στην εν λόγω μελέτη, αναφέρθηκαν παρόμοια πολυφαινολικά προφίλ, με το γαλλικό οξύ να είναι και πάλι το κυρίαρχο συστατικό των εκχυλισμάτων ($63.7\text{-}74.6\%$). Υψηλές συγκεντρώσεις αναφέρθηκαν και για τη μυρικετίνη και την κατεχίνη στις περιπτώσεις χρήσης μίγματος νερού-ακετόνης και οξινισμένης ακετόνης κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Αντίθετα, το ελλαγικό οξύ ήταν το μόνο φαινολικό οξύ που

ανιχνεύθηκε κατά την ανάλυση των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων της σάρκας των χαρουπιών από την Τυνησία, για την παραλαβή των οποίων χρησιμοποιήθηκε μια παρόμοια μέθοδος εξαγωγής, βασισμένη στους υπέρηχους [31]. Στην εν λόγω μελέτη, επιτεύχθηκε η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση δεκαεννέα πολυφαινολικών συστατικών, με τις γαλλοταννίνες ακολουθούμενες από τα φλαβονοειδή να αποτελούν τις κύριες κατηγορίες ενώσεων. Μια τέτοια διακύμανση των αποτελεσμάτων αποδίδεται κυρίως στη διαφορετική γεωγραφική προέλευση των υπό εξέταση δειγμάτων, η οποία, όπως αποδείχθηκε, έχει σημαντική επίδραση στη φαινολική σύνθεση των χαρουπιών.

Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα φαινολικών οξέων, και κυρίως γαλλικού οξέος (1647.5 mg/kg ινών χαρουπιού, 2675.6 μg/g χαρουπάλευρου), έχουν αναφερθεί κατά την ανάλυση των παράγωγων προϊόντων του χαρουπιού συμπεριλαμβανομένων των ινών χαρουπιού και του χαρουπάλευρου [61,151]. Η υψηλότερη τους περιεκτικότητα σε γαλλικό οξύ έχει αποδοθεί στις τεχνολογικές διαδικασίες που ακολουθούνται κατά την παρασκευή τους. Συγκεκριμένα, οι υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή του χαρουπάλευρου έχουν ως αποτέλεσμα την υδρόλυση των ταννινών, βασικών συστατικών των καρπών, και την επακόλουθη απελευθέρωση του γαλλικού οξέος [25,151]. Στην περίπτωση των ινών χαρουπιού, οι υψηλές συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν, αποδόθηκαν, εν μέρη, στην απώλεια βάρους του δείγματος κατά την εξαγωγή των υδατανθράκων, καθώς και στη διάρρηξη της μήτρας του φυτικού υλικού κατά το στάδιο της επεξεργασίας του προϊόντος [25].

Ο βαθμός ωρίμανσης των χαρουπιών αποτελεί, όπως αποδείχθηκε, άλλο έναν παράγοντα που επιδρά σημαντικά στη φαινολική σύνθεση των καρπών [131,148,149]. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, οι Ydjedd et al. υπογράμμισαν την παρουσία των φαινολικών οξέων, ως των κύριων συστατικών της σάρκας των ώριμων και άγουρων καρπών, με το γαλλικό οξύ να απαντάται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, τόσο στα ώριμα (27.84%), όσο και στα άγουρα χαρούπια (43.15%) [148]. Σε μια πρόσφατη μελέτη που διεξάχθηκε από τους Farag et., διαπιστώθηκε η μεγαλύτερη περιεκτικότητα των άγουρων καρπών σε φλαβονοειδή, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τα παρόντα ευρήματα [131]. Αντίθετα, στις μελέτες των Ydjedd et al. και Benchikh et al. παρατηρήθηκε αύξηση της περιεκτικότητας των φλαβονοειδών κατά το στάδιο της ωρίμανσης [148,149]. Όσον αφορά την παρούσα έρευνα, μια τέτοια αύξηση παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της ναρινγενίνης, η οποία δεν ανιχνεύθηκε προηγουμένως στο άγουρο στάδιο. Η μείωση της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή που παρατηρήθηκε στην προκειμένη περίπτωση μπορεί να αποδοθεί στον πολυμερισμό ή/και την γλυκοζυλίωση τους κατά το στάδιο της ωρίμανσης,

με αποτέλεσμα τη μείωση του περιεχομένου των άγλυκων συστατικών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει η μελέτη των Kyriacou et al., σύμφωνα με την οποία δεν ανιχνεύθηκε γαλλικό οξύ κατά τα πρώιμα στάδια της ωρίμανσης του καρπού [133]. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος σχεδόν διπλασιάστηκε όταν ο καρπός έφτασε στο τελικό στάδιο της ωρίμανσης, με τη συγκέντρωση του να φτάνει τα 215.5 μg/g σάρκας, μια τιμή που βρίσκεται αρκετά κοντά με αυτήν που αναφέρθηκε στην παρούσα μελέτη. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η υδρόλυση των ταννινών (υδρολυόμενων ταννινών) και η επακόλουθη απελευθέρωση των μονάδων γλυκόζης και γαλλικού οξέος, αποτελεί τη βασική αιτία της παρατηρούμενης αύξησης της περιεκτικότητας του γαλλικού οξέος κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού [133]. Η αποδόμηση των γαλλοταννινών και η επακόλουθη απελευθέρωση του γαλλικού οξέος κατά την ωρίμανση των χαρουπιών αναφέρεται επίσης και σε προηγούμενες μελέτες [149]. Παρόλα αυτά, δεν έχει αναφερθεί σε καμία άλλη μελέτη η απουσία του γαλλικού οξέος από το άγουρο στάδιο, με το γαλλικό οξύ να αποτελεί, στις πλείστες των περιπτώσεων, την ένωση με την υψηλότερη περιεκτικότητα, τόσο στα ώριμα, όσο και στα άγουρα εκχυλίσματα χαρουπιού .

Σημαντικές διαφορές φαίνεται να παρατηρούνται μεταξύ των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας όσον αφορά τη φαινολική σύσταση των χαρουπιών, η οποία, όπως αποδείχθηκε, εξαρτάται, όχι μόνο από το βαθμό ωρίμανσης, την ποικιλία, το φύλο, τη γεωγραφική προέλευση και τις συνθήκες καλλιέργειας των χαρουπιών, αλλά, επίσης, και από τις τεχνολογικές μεθόδους που ακολουθούνται συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων εξαγωγής και ανάλυσης των πολυφαινολικών ενώσεων [3]. Εκτός αυτού, διαφορετικές ενώσεις μπορούν να ανιχνευθούν και σε προϊόντα χαρουπιού που έχουν υποστεί επεξεργασία υπό διαφορετικές συνθήκες, καθιστώντας, έτσι, εξαιρετικά δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας [25,151].

4.2.5. Συμπεράσματα

Αφού προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων, κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας διδακτορικής εργασίας, ακολούθως, κατά το δεύτερο στάδιο, αναπτύχθηκε μια απλή, γρήγορη και αξιόπιστη ηλεκτροφορητική μέθοδος με στόχο το διαχωρισμό και την ανάλυση των περιεχόμενων στη σάρκα των χαρουπιών πολυφαινολικών ενώσεων. Με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού των υπό εξέταση ενώσεων, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραμέτρων μεταξύ των οποίων ο τύπος, η συγκέντρωση και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, η προσθήκη οργανικών διαλυτών και άλλων τροποποιητών και η εφαρμοζόμενη τάση. Σημαντική

αποδείχθηκε η παρουσία της β -CD στο ρυθμιστικό διάλυμα, η προσθήκη της οποίας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των ηλεκτροφορητικών ευκινήσιών των αναλυτών στόχων και τη βελτίωση του διαχωρισμού, μέσω του μηχανισμού συμπλοκοποίησης. Η χρήση της β -CD και του IL (L-AlaC₄Lac), ως πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα, αναφέρθηκε για πρώτη φορά κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση της συγκεκριμένης κατηγορίας ενώσεων και, όπως αποδείχθηκε, έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα.

Ο πλήρης διαχωρισμός και των 12 πολυφαινολικών ενώσεων επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης 35 mM Borate, ως ηλεκτρολυτικό διάλυμα, στην παρουσία 15 mM β -CD και 3 mM L-AlaC₄Lac, ως πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος διατηρήθηκε σταθερό και ίσο με 9.5, ενώ εφαρμόστηκε διαφορά δυναμικού ίση με 30 kV. Κάτω από τις βέλτιστες αυτές συνθήκες, επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των αναλυτών σε χρόνο μικρότερο των 10 min. Ακολούθως, η μέθοδος που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την πιστότητα, τα LODs και τα LOQs, βάση των οποίων διαπιστώθηκε η καταλληλότητά της για την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων σε δείγματα χαρουπιού.

Με σκοπό την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων, μη φαινολικών, συστατικών των εκχυλισμάτων, πριν την ηλεκτροφορητική τους ανάλυση, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση της μεθόδου SPE. Τα φυσίγγια DPA-6S αποδείχθηκαν ως τα καταλληλότερα για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων, παρουσιάζοντας τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης.

Η εφαρμογή της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου (EKC-DAD) στα εκχυλίσματα της ώριμης και άγουρης σάρκας, επέτρεψε την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των περιεχόμενων στην κάθε περίπτωση πολυφαινολών. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την παρουσία του γαλλικού οξέος ως κύριου συστατικού της σάρκας, τόσο των ώριμων, όσο και των άγουρων καρπών, και υπογράμμισαν τη σημαντική επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύνθεση.

Ωστόσο, στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί πως η ηλεκτροφορητική ανάλυση των εκχυλισμάτων επέτρεψε την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μόνο ενός μικρού αριθμού του συνόλου των περιεχόμενων πολυφαινολικών ενώσεων. Η πολύπλοκη φύση της μήτρας, η μεγάλη ποικιλία στις χημικές τους δομές, καθώς και οι εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις τους, καθιστούν την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων ένα εξαιρετικά δύσκολο έργο. Επομένως, προκύπτει η ανάγκη για την ανάπτυξη μιας πιο εκλεκτικής και συνάμα πιο ευαίσθητης μεθόδου, με σκοπό τη λήψη αντιπροσωπευτικότερων αποτελεσμάτων όσον αφορά τη φαινολική σύνθεση των χαρουπιών. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν,

προτείνεται η χρήση ενός συστήματος HPLC-HRMS για την ακριβέστερη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών στόχων.

4.3. Προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής HPLC-HRMS

Κατά το τρίτο στάδιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιχειρήθηκε η ανάλυση της φαινολικής σύνθεσης, τόσο των καρπών της χαρουπιάς, της σάρκας και των σπόρων, όσο και των παράγωγων προϊόντων τους με χρήση της τεχνικής HPLC-HRMS. Πέραν από την επίδραση του βαθμού ωρίμανσης, μελετήθηκε, επίσης, η επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης στη φαινολική σύνθεση των χαρουπιών καθώς και της μεθόδου κατεργασίας στη φυτοχημική σύσταση των προϊόντων, μέσω μιας πλήρους στατιστικής ανάλυσης. Επιπρόσθετα, μέσω της αξιολόγησης του φαινολικού περιεχομένου της σάρκας και των σπόρων του χαρουπιού, προσδιορίστηκε η κατανομή των εν λόγω ενώσεων κατά μήκος του καρπού.

Συγκεκριμένα, η επίδραση των παραδοσιακών τεχνικών επεξεργασίας, όπως για παράδειγμα η θερμική και μηχανική κατεργασία, αξιολογήθηκε μέσω της ανάλυσης του φαινολικού περιεχομένου των παράγωγων προϊόντων του χαρουπιού, συμπεριλαμβανομένων της καβουρδισμένης σκόνης χαρουπιού, του ακατέργαστου (ωμού) χαρουπάλευρου, του χαρουπόμελου που υπέστη επεξεργασία σε θερμοκρασία κάτω των 40 °C, του χαρουπόμελου που για την παραγωγή του χρησιμοποιήθηκαν υψηλότερες θερμοκρασίες (πάνω από 40 °C), καθώς και των καβουρδισμένων καρπών. Μέχρι στιγμής, τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη φαινολική σύσταση των προϊόντων του χαρουπιού θεωρούνται ανεπαρκή, μιας και δεν επιτρέπουν τη σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου των διαφόρων προϊόντων και, συνεπώς, την εξαγωγή ξεκάθαρων συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση των διαφόρων τεχνολογιών επεξεργασίας.

Παράλληλα, διερευνήθηκαν οι μεταβολές στη φαινολική σύσταση των καρπών, της σάρκας και των σπόρων, κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης. Αν και η σημαντική επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των χαρουπιών στη φαινολική τους σύνθεση έχει ήδη επισημανθεί, στο παρόν στάδιο πραγματοποιήθηκε επιπλέον σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου, τόσο της σάρκας, όσο και των σπόρων, των ώριμων και άγουρων καρπών. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως δεν υπάρχουν αντίστοιχα προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία να γίνεται σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου της σάρκας και των σπόρων, των ώριμων και άγουρων καρπών. Μέσω του χαρακτηρισμού της φαινολικής σύστασης της

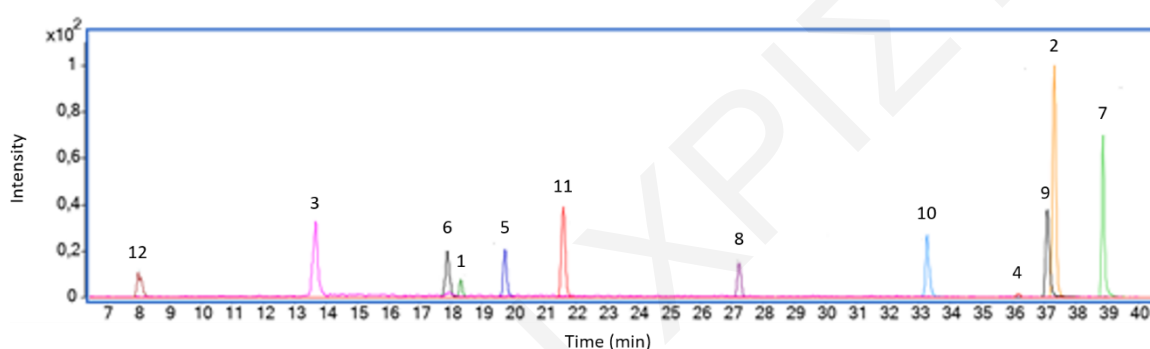
σάρκας και των σπόρων, τόσο των ώριμων, όσο και των άγουρων χαρουπιών, προσδιορίστηκε, επίσης, η κατανομή των εν λόγω ενώσεων κατά μήκος του καρπού.

Όσον αφορά την επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης των χαρουπιών στην πολυφαινολική τους σύσταση, αυτή διερευνήθηκε μέσω μιας πολυμεταβλητής στατιστικής προσέγγισης. Συγκεκριμένα, για τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της πολυφαινολικής σύστασης των χαρουπιών και της αντίστοιχης γεωγραφικής τους προέλευσης, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές PCA και PLS-DA. Εξ όσων γνωρίζουμε, δεν έχει, μέχρι τώρα, επιχειρηθεί διαφοροποίηση των ειδών χαρουπιού με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση, χρησιμοποιώντας τα φαινολικά τους προφίλ ως τους χαρακτηριστικούς δείκτες. Μέχρι στιγμής, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των χαρουπιών (μήκος/πλάτος/πάχος λοβών, βάρος σάρκας, αριθμός/μήκος/πλάτος/πάχος/βάρος σπόρων), η θρεπτική τους σύσταση (περιεκτικότητα σε υγρασία, λίπη, πρωτεΐνες, σάκχαρα, διαιτητικές ίνες, ιχνοστοιχεία), τα αρωματικά τους προφίλ (πηκτικές οργανικές ενώσεις), καθώς και τα δεδομένα από την υπέρυθη φασματοσκοπική τους ανάλυση, έχουν προταθεί ως πιθανοί δείκτες για τη διάκριση της γεωγραφικής τους προέλευσης [135–139]. Μόνο οι Farag et al. ανέφεραν τη χρήση των δευτεροταγών μεταβολιτών, ως πιθανών δεικτών, για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων χαρουπιού. Παρόλα αυτά, στην εν λόγω μελέτη, η προσέγγιση PCA φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματική για την καταγραφή των μεταβολών των πολυφαινολών εξαιτίας του διαφορετικού βαθμού ωρίμανσής τους, παρά εξαιτίας της διαφορετικής γεωγραφικής τους προέλευσης [131].

4.3.1. Ανάπτυξη και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου

Η ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με χρήση του συστήματος HPLC-HRMS, με μικρή τροποποίηση των συνθηκών διαχωρισμού της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε από τους Abrankó et al. [251]. Οι χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν επέτρεψαν το διαχωρισμό των αναλυτών στόχων σε χρόνο ανάλυσης μικρότερο των 40 min. Στο Σχήμα 4.15 απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα των εξαγόμενων ιόντων (extracted ion chromatograms, EICs) των υπό μελέτη αναλυτών. Για την ταυτοποίηση των πολυφαινολικών ενώσεων των υπό εξέταση δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση, τόσο των χρόνων κατακράτησης, όσο και των φασμάτων μάζας τους με εκείνα των πρότυπων ουσιών. Στον Πίνακα 4.11 συνοψίζονται οι κύριες αναλυτικές παράμετροι για κάθε υπό εξέταση ουσία, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου κατακράτησης (retention time, t_R), του χημικού τύπου, των χαρακτηριστικών θραυσμάτων, των θεωρητικών και των πειραματικών μαζών. Για κάθε αναλύτη επιλέχθηκαν τουλάχιστον

δύο ιόντα, συμπεριλαμβανομένων του μοριακού ιόντος και ενός ιόντος θραύσματος, με σφάλμα μάζας μικρότερο των 5 ppm, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της ταυτοποίησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένα τρίτο ιόν συμπεριλήφθηκε στη διαδικασία της αναγνώρισης, εξαιτίας της μεγάλης του περιεκτικότητας. Σε κάθε περίπτωση, η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με παρακολούθηση του μοριακού ιόντος, $[M-H]^-$, το οποίο αποτέλεσε και το πιο άφθονο ιόν. Η μεγάλη ακρίβεια μάζας που χαρακτηρίζει την αναλυτική μέθοδο που αναπτύχθηκε, η οποία επιτρέπει ακριβείς μετρήσεις μάζας, στις περισσότερες περιπτώσεις εντός σφάλματος 5 ppm, προσφέρει ένα υψηλό βαθμό επιβεβαίωσης της ταυτότητας των υπό εξέταση αναλυτών.



Σχήμα 4.15. EICs των υπό μελέτη αναλυτών (1 mg/L).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επικύρωση της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου (Πίνακας 4.12). Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου που αναπτύχθηκε, κατασκευάστηκαν εσωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης (matrix-matched calibration curves), μέσω του εμβολιασμού των εκχυλισμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων, στο επιθυμητό εύρος εργασίας. Οι συντελεστές συσχέτισης που προέκυψαν ($R^2 > 0.994$), κατέδειξαν τη γραμμική σχέση της συγκέντρωσης των αναλυτών, στο εξεταζόμενο εύρος εργασίας, και της αντίστοιχης απόκρισης του ανιχνευτή. Τα LODs και LOQs υπολογίστηκαν με βάση το λόγο του σήματος ως προς το θόρυβο (Εξίσωση 3.16 και 3.17). Συγκεκριμένα, για τον πειραματικό προσδιορισμό τους, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των σημάτων του λευκού δείγματος (θόρυβος) με εκείνα των αραιωμένων προτύπων που παρασκευάστηκαν εντός της μήτρας του δείγματος (matrix-matched standard solutions). Τα LODs και LOQs βρέθηκαν να κυμαίνονται στο εύρος 0.03-3.0 $\mu\text{g/g}$ δείγματος και 0.1-10 $\mu\text{g/g}$ δείγματος, αντίστοιχα, τιμές που θεωρούνται ικανοποιητικές για τον

ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε πραγματικά δείγματα.

Για την αξιολόγηση της πιστότητας της αναλυτικής μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο μίγμα των αναλυτών το οποίο παρασκευάστηκε εντός της μήτρας (matrix-matched standard solutions) σε επίπεδο συγκεντρώσεων 10 μg/g δείγματος. Συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας (intra-day precision) πραγματοποιήθηκαν 5 επαναληπτικές αναλύσεις του πρότυπου μίγματος των αναλυτών μέσα σε μία μόνο μέρα, ενώ για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας (inter-day precision), οι μετρήσεις περιορίστηκαν στη μία επανάληψη την ημέρα, για σύνολο πέντε διαδοχικών ημερών. Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της πιστότητας της αναλυτικής μεθόδου εκφράζονται στον Πίνακα 4.12 σε όρους RSD. Όπως διαπιστώθηκε, η επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα που χαρακτηρίζει τη μέθοδο που αναπτύχθηκε, η οποία αναφέρεται στη % RSD των εμβαδών των κορυφών, ήταν αρκετά ικανοποιητική, με τις αντίστοιχες τιμές της RSD να μην υπερβαίνουν τα ποσοστά των 12 και 20%, αντίστοιχα.

Η επίδραση του μητρικού υλικού (matrix effect, ME) στη διαδικασία του ιονισμού, όσον αφορά την καταστολή ή την ενίσχυση του μετρούμενου σήματος, διερευνήθηκε συγκρίνοντας τις κλίσεις που προέκυψαν από τις εσωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης (matrix-matched calibration curves) με τις αντίστοιχες που ελήφθησαν κατά τη βαθμονόμηση με πρότυπα διαλύματα βασιζόμενα σε καθαρούς διαλύτες (εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης), σύμφωνα με την Εξίσωση 3.18.

Οι αρνητικές τιμές της ME υποδηλώνουν την καταστολή του αναλυτικού σήματος, ενώ, τα θετικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ενισχυτικές επιδράσεις. Στην προκειμένη περίπτωση, το αναλυτικό σήμα των εξεταζόμενων ιόντων δε φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία του μητρικού υλικού, με τις αντίστοιχες τιμές της ME να κυμαίνονται σε χαμηλά όρια ($ME \leq 21\%$). Δεδομένης της αμελητέας ME, η ποσοτικοποίηση των αναλυτών στόχων βασίστηκε στις εξωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης, με τη χρήση των καθαρών προτύπων, στην απουσία, δηλαδή, της μήτρας. Συμπερασματικά, η προτεινόμενη χρωματογραφική μέθοδος αποδείχθηκε ένα πολύ αποτελεσματικό αναλυτικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη αναλυτών, υποδεικνύοντας εξαιρετικά χαρακτηριστικά απόδοσης.

Πίνακας 4.11. Κύριες αναλυτικές παράμετροι των υπό εξέταση αναλυτών.

Ένωση	t _R (min)	Στοιχειακή σύνθεση	Ιόν	Θεωρητικό ιόν (m/z)	Πειραματικό ιόν (m/z)	Σφάλμα μάζας (ppm)
Γαλλικό οξύ	7.99	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.0142	169.0138	-3.69
		C ₆ H ₆ O ₃	Θραύσμα 1	125.0244	125.0242	-1.73
		C ₅ H ₆ O ₂	Θραύσμα 2	97.0295	97.0301	6.09
Κατεχόλη	13.63	C ₆ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻	109.0295	109.0294	-1.55
		C ₆ H ₅ O ₂	Θραύσμα 1	108.0217	108.0222	4.79
Γεντισικό οξύ	17.91	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.0193	153.0188	-3.30
		C ₆ H ₆ O ₂	Θραύσμα 1	109.0295	109.0286	-4.57
Κατεχίνη	18.33	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	289.0718	289.0731	4.61
		C ₆ H ₆ O ₂	Θραύσμα 1	109.0295	109.0290	-4.57
Χλωρογενικό οξύ	19.73	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.0878	353.0882	1.11
		C ₇ H ₁₂ O ₆	Θραύσμα 1	191.0564	191.0555	-3.18
Καφεϊκό οξύ	21.59	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.0350	179.0345	-2.34
		C ₈ H ₈ O ₂	Θραύσμα 1	135.0452	135.0448	-2.59
		C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.0506	193.0509	2.33
Φερουλικό οξύ	27.23	C ₉ H ₁₀ O ₂	Θραύσμα 1	149.0608	149.0604	-2.69
		C ₈ H ₇ O ₂	Θραύσμα 2	134.0373	134.0377	2.75
		C ₁₅ H ₁₀ O ₈	[M-H] ⁻	317.0303	317.0297	-1.71
Μυρικετίνη	33.26	C ₈ H ₈ O ₃	Θραύσμα 1	151.0401	151.0386	-9.65
		C ₉ H ₈ O ₂	[M-H] ⁻	147.0452	147.0454	1.62
Κιναμικό οξύ	36.20	C ₈ H ₈	Θραύσμα 1	103.0553	103.0557	3.62
		C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.0354	301.0353	-0.67
Κερκετίνη	37.12	C ₇ H ₆ O ₂	Θραύσμα 1	121.0295	121.0298	2.43
		C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.0612	271.0619	2.70
		C ₇ H ₄ O ₄	Θραύσμα 1	151.0037	151.0036	-0.54
Ναρινγενίνη	37.34	C ₉ H ₆ O ₄	Θραύσμα 2	177.0193	177.0199	3.19
		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.0405	285.0477	0.13
Καεμφερόλη	38.90	C ₇ H ₄ O ₄	Θραύσμα 1	151.0034	151.0031	-1.98

Πίνακας 4.12. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της προτεινόμενης χρωματογραφικής μεθόδου.

Ένωση	Εύρος γραμμικότητας (μg/g δείγματος)	Γραμμικότητα (R ²)	LOD (μg/g δείγματος)	LOQ (μg/g δείγματος)	Πιστότητα (RSD %)		ΜΕ (%)
					Επαναληψιμότητα	Αναπαραγωγιμότητα	
Γαλλικό οξύ	1 - 50	0.999	0.3	1	6	7	-13
Κατεχόλη	1 - 100	0.999	0.3	1	9	16	5
Γεντισικό οξύ	0.4 - 50	0.997	0.12	0.4	6	18	1
Κατεχίνη	1 - 100	0.994	0.3	1	6	20	7
Χλωρογενικό οξύ	1 - 50	0.999	0.3	1	4	14	3
Καφεϊκό οξύ	0.5 - 50	0.999	0.15	0.5	7	14	11
Φερουλικό οξύ	0.5 - 100	0.999	0.15	0.5	6	15	-5
Μυρικετίνη	1 - 50	0.999	0.3	1	8	11	-15
Κιναμικό οξύ	10 - 1000	0.998	3	10	4	18	-1
Κερκετίνη	1 - 50	0.995	0.3	1	12	19	-21
Ναρινγενίνη	0.1 - 10	0.998	0.03	0.1	3	15	-2
Καεμφερόλη	0.1 - 10	0.995	0.03	0.1	5	15	-18

4.3.2. Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων-Παράγοντες που επηρεάζουν τη φαινολική σύνθεση των χαρουπιών

4.3.2.1. Επίδραση της διαδικασίας ωρίμανσης και κατανομή των πολυφαινολών στον καρπό

Οι ώριμοι και άγουροι καρποί που αναλύθηκαν στο παρόν στάδιο συλλέχθηκαν από το ίδιο δέντρο, διασφαλίζοντας, έτσι, παρόμοιες και ελεγχόμενες περιβαλλοντικές και καλλιεργητικές συνθήκες. Στον Πίνακα 4.13 συνοψίζονται τα αναλυτικά δεδομένα που προέκυψαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση της σάρκας και των σπόρων, των ώριμων και άγουρων καρπών. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα, οι άγουροι καρποί (τόσο η σάρκα, όσο και οι σπόροι) βρέθηκαν να περιέχουν μια σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Σύμφωνα με τους Ydjedd et al., η υψηλή αυτή περιεκτικότητα των άγουρων καρπών σε πολυφαινολικές ενώσεις, είναι αποτέλεσμα της προσπάθειας του καρπού να προστατευθεί, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του, από διάφορους βιοτικούς ή/και αβιοτικούς περιβαλλοντικούς κινδύνους [148].

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αισθητή μείωση του περιεχομένου σχεδόν όλων των υπό μελέτη πολυφαινολών κατά τη μετάβαση του καρπού από το άγουρο στο ώριμο στάδιο. Στην περίπτωση της σάρκας των χαρουπιών, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($p < 0.05$) των περιεχομένων του γαλλικού οξέος, του γεντισικού οξέος, της κατεχίνης, του φερουλικού οξέος, της μυρικετίνης και της ναρινγενίνης κατά την ωρίμανση του καρπού. Αντίθετα, τα επίπεδα της κερκετίνης και της καεμφερόλης παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητα ($p > 0.05$). Κατά την εξέταση της φαινολικής σύστασης των σπόρων του χαρουπιού κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση των συγκεντρώσεων του γαλλικού οξέος, της κατεχίνης και του φερουλικού οξέος ($p < 0.05$), μη σημαντική μεταβολή ($p > 0.05$) των επιπέδων του καφεϊκού οξέος, της μυρικετίνης και της ναρινγενίνης, καθώς και απρόσμενη αύξηση ($p < 0.05$) του περιεχομένου της κερκετίνης και της καεμφερόλης (σχεδόν τριπλάσια και τετραπλάσια συγκέντρωση στο ώριμο στάδιο). Όλες αυτές οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στα βιοσυνθετικά μονοπάτια των εν λόγω φυτοχημικών συστατικών [252].

Παράλληλα, μέσω της αξιολόγησης του φαινολικού περιεχομένου της σάρκας και των σπόρων, τόσο των άγουρων, όσο και των ώριμων καρπών, προσδιορίστηκε η κατανομή των εν λόγω βιοδραστικών ενώσεων κατά μήκος του λοβού. Κατά τη σύγκριση της σύστασης της σάρκας και των σπόρων, διαπιστώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές. Συγκεκριμένα, οι σπόροι παρουσίασαν μια σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ($p < 0.05$).

Το τελευταίο έρχεται σε αντίθεση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία αναφέρεται πως η πλειονότητα των πολυφαινολικών ενώσεων απαντάται στη σάρκα του χαρουπιού και όχι στους σπόρους του [25,253,254]. Παρόλα αυτά σε καμιά προηγούμενη μελέτη δεν έχει πραγματοποιηθεί σύγκριση του φαινολικού προφίλ της σάρκας των χαρουπιών και ολόκληρων των σπόρων τους, παρά μόνο συγκεκριμένων τμημάτων τους, συμπεριλαμβανομένων του φλοιού των σπόρων, του ενδοσπέρμιου και του φύτρου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι πολυφαινολικές ενώσεις περιορίζονται στο εξωτερικό περίβλημα των σπόρων, το φλοιό, ο οποίος, γενικά, έχει μια πολύ μικρή συνολική περιεκτικότητα [25,255]. Συνεπώς, η άποψη πως η πλειονότητα των πολυφαινολικών ενώσεων στα χαρούπια απαντάται στη σάρκα του λοβού θα πρέπει να αναθεωρηθεί, αφού, όπως αποδείχθηκε στην παρούσα μελέτη, κάτι τέτοιο δεν υφίσταται.

Το γαλλικό οξύ φάνηκε να αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της σάρκας, τόσο των ώριμων, όσο και των άγουρων καρπών. Πέρα από το γαλλικό οξύ, η σάρκα των άγουρων καρπών κατέδειξε, επίσης, υψηλά επίπεδα φλαβονοειδών, μεταξύ των οποίων η κατεχίνη, η μυρικετίνη και η κερκετίνη. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα της ώριμης σάρκας, το φαινολικό τους προφίλ φάνηκε να κυριαρχείται από το γαλλικό οξύ. Η μειωμένη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή της ώριμης σάρκας, μπορεί να αποδοθεί στον πολυμερισμό ή/και τη γλυκοζυλίωσή τους κατά το στάδιο της ωρίμανσης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη παρουσία των άγλυκων συστατικών. Σε σχέση με τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφορητική ανάλυση των εκχυλισμάτων, η χρωματογραφική τους ανάλυση με τη χρήση του συστήματος HPLC-HRMS κατέδειξε αξιοσημείωτες διαφορές. Συγκεκριμένα, η εν λόγω οργανολογία επέτρεψε την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενώσεων που προηγουμένως ήταν αδύνατον να προσδιοριστούν, είτε λόγω των χαμηλών τους συγκεντρώσεων, είτε εξαιτίας της συνέκλουσής τους με άλλα συστατικά του δείγματος. Η κατεχίνη αποτελεί ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα, η ποσοτικοποίηση της οποίας στα άγουρα χαρούπια με τη χρήση της CE ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί, εξαιτίας της συνέκλουσής της με ένα άλλο συστατικό του δείγματος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γαλλικό οξύ, η ποσοτικοποίηση του οποίου στο άγουρο στάδιο με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης κατέδειξε μια σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα, σε σχέση με αυτή που προσδιορίστηκε με τη χρήση της CE. Η μεγάλη αυτή διαφορά που παρατηρήθηκε δε μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε. Μπορεί όμως να αποδοθεί στη διαφορετική χρονολογία συγκομιδής των καρπών. Εφόσον οι καρποί συλλέχθηκαν με ένα χρόνο διαφορά, οι διαφορετικοί εξωγενείς παράγοντες κάτω

από τους οποίους αναπτύχθηκαν, περιβαλλοντικοί και μη, πιθανό να επηρέασαν τη φαινολική τους σύσταση.

Όσον αφορά τους σπόρους του χαρουπιού, παρουσίασαν μια υψηλή περιεκτικότητα σε κατεχίνη, γαλλικό οξύ και κερκετίνη, τόσο στο ώριμο, όσο και στο άγουρο στάδιο. Όπως αποδείχθηκε, οι ώριμοι σπόροι χαρακτηρίζονται από μια υψηλότερη περιεκτικότητα σε φλαβονόλες (κερκετίνη και καεμφερόλη), ενώ οι φλαβονόλες (κατεχίνη) αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των ενώσεων των σπόρων των άγουρων χαρουπιών. Μεταξύ των φαινολικών οξέων που ανιχνεύθηκαν, το γαλλικό οξύ ήταν αυτό με την υψηλότερη περιεκτικότητα και στα δύο στάδια της ωρίμανσης. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, οι Santonocito et al. υπογράμμισαν την παρουσία των φλαβονολών και των φλαβονολών, μεταξύ των οποίων ο δεοξυεξοζίτης της κερκετίνης (quercetin-deoxyhexoside) και η κατεχίνη, ως των κύριων συστατικών των εκχυλισμάτων των άγουρων και των ώριμων σπόρων, αντίστοιχα. Το γαλλικό οξύ και τα παράγωγά του ανιχνεύθηκαν επίσης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους σπόρους των άγουρων καρπών [150]. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και κατά την ανάλυση των εκχυλισμάτων του φλοιού και του φύτρου των σπόρων σε άλλες προηγούμενες μελέτες, στις οποίες προσδιορίστηκαν υψηλά επίπεδα κατεχίνης, κερκετίνης, επικατεχίνης, απιγενίνης, γαλλικού οξέος, καθώς και των παραγώγων τους [253,256,257].

Πίνακας 4.13. Φαινολική σύσταση της σάρκας και των σπόρων των ώριμων και άγουρων καρπών.

Ένωση	Συγκέντρωση (μg/g δείγματος)			
	Άγουρο στάδιο		Ωριμο στάδιο	
	Σάρκα	Σπόροι	Σάρκα	Σπόροι
Γαλλικό οξύ	1514.00 ± 70.19 ^α	667.33 ± 45.62 ^β	373.67 ± 8.62 ^γ	333.67 ± 10.41 ^γ
Κατεχόλη	nd	nd	nd	nd
Γεντισικό οξύ	1.49 ± 0.24 ^α	nd ^β	nq ^β	nd ^β
Κατεχίνη	719.76 ± 10.02 ^γ	4265.33 ± 154.95 ^α	nq ^δ	1503.33 ± 64.93 ^β
Χλωρογενικό οξύ	nd	nd	nd	nd
Καφεϊκό οξύ	nq ^β	1.31 ± 0.09 ^α	nq ^β	1.88 ± 0.47 ^α
Φερουλικό οξύ	2.40 ± 0.12 ^β	5.31 ± 0.80 ^α	nq ^γ	2.24 ± 0.24 ^β
Μυρικετίνη	46.17 ± 7.20 ^α	13.03 ± 0.96 ^β	9.73 ± 2.18 ^β	6.68 ± 1.91 ^β
Κινναμικό οξύ	nq	nd	nd	nd
Κερκετίνη	25.50 ± 1.76 ^γ	436.33 ± 10.02 ^β	6.95 ± 1.59 ^γ	1644.00 ± 21.52 ^α
Ναρινγενίνη	6.77 ± 0.99 ^α	1.73 ± 0.57 ^γ	5.23 ± 0.24 ^β	0.69 ± 0.19 ^γ
Καεμφερόλη	1.49 ± 0.39 ^γ	27.90 ± 5.48 ^β	nd ^γ	75.57 ± 11.80 ^α
Σύνολο	2317.48 ± 68.50 ^γ	5418.28 ± 173.38 ^α	395.58 ± 9.11 ^δ	3567.36 ± 49.58 ^β

Τα διαφορετικά γράμματα (α-δ) εντός της ίδιας σειράς υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών (p<0.05), σύμφωνα με τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων Duncan.

nd: δεν ανιχνεύθηκε

nq: δεν ποσοτικοποιήθηκε

4.3.2.2. Επίδραση μεθόδου κατεργασίας

Ακολούθως, προσδιορίστηκε η κύρια φαινολική σύσταση των προϊόντων του χαρουπιού με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της μεθόδου κατεργασίας στη φαινολική σύνθεση των προϊόντων. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε δείγματα καβουρδισμένης σκόνης χαρουπιού, ακατέργαστου (ωμού) χαρουπάλευρου, χαρουπόμελου, θερμικά επεξεργασμένου ($>40\text{ }^{\circ}\text{C}$) και μη ($<40\text{ }^{\circ}\text{C}$), καθώς και σε δείγματα καβουρδισμένης σάρκας χαρουπιού. Παράλληλα, για σκοπούς σύγκρισης μελετήθηκε η πολυφαινολική σύσταση της ακατέργαστης σάρκας χαρουπιού, η οποία αποτέλεσε τη βάση για την παρασκευή των πιο πάνω προϊόντων. Τα ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση, τόσο της πρώτης ύλης (ακατέργαστη σάρκα χαρουπιού), όσο και των παράγωγων προϊόντων του χαρουπιού, παρατίθενται στη συνέχεια (Πίνακας 4.14).

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του Πίνακα 4.14, η κατεργασία των χαρουπιών επηρεάζει σημαντικά τα φαινολικά προφίλ και τις αντίστοιχες ποσότητες των πολυφαινολών που ανιχνεύονται στα προϊόντα με βάση το χαρούπι. Συγκεκριμένα, το γαλλικό οξύ αποδείχθηκε ως το κύριο συστατικό των δειγμάτων του χαρουπόμελου, ενώ, τα υπόλοιπα συστατικά ανιχνεύθηκαν σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό πιθανό να υποδεικνύει την εξαγωγή του γαλλικού οξέος μαζί με τα σάκχαρα, κατά τη διαδικασία της παρασκευής του χαρουπόμελου. Η επεξεργασία με το νερό είναι πολύ πιθανό να διευκολύνει την απελευθέρωση του γαλλικού οξέος από τη μήτρα του χαρουπιού, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται πολύ υψηλά επίπεδα γαλλικού οξέος στο τελικό προϊόν, σημαντικά υψηλότερα ($p<0.05$) σε σχέση με την ακατέργαστη πρώτη ύλη. Σε συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα, οι Paragiannopoulos et al. ανέφεραν, επίσης, υψηλά επίπεδα γαλλικού οξέος, καθώς και υδρολυόμενων ταννινών σε δείγματα από σιρόπι χαρουπιού [25]. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν, επίσης, από τους Dhaoudi et al. Στην εν λόγω μελέτη, το γαλλικό οξύ βρέθηκε να είναι η κύρια ένωση των δειγμάτων σιροπιού, ενώ, παράλληλα, ανιχνεύθηκαν υψηλές ποσότητες ενός γλυκοζιδίου της κερκετίνης (quercetin glycoside) και του συριγγικού οξέος [16].

Η θερμική κατεργασία είχε, όπως αποδείχθηκε, αρνητικό αντίκτυπο στη φαινολική σύνθεση του εν λόγω προϊόντος. Όπως διαπιστώθηκε, το προϊόν που επεξεργάστηκε σε θερμοκρασία υψηλότερη των $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ παρουσίασε μια σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε γαλλικό οξύ ($p<0.05$). Η κατεργασία του προϊόντος σε υψηλές θερμοκρασίες πιθανό να προκάλεσε τη θερμική αποικοδόμηση των ευαίσθητων πολυφαινολικών συστατικών. Συνεπώς, το σιρόπι χαρουπιού που επεξεργάζεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να θεωρηθεί ως

μια σημαντικότερη πηγή πολυφαινολών, γεγονός που ενθαρρύνει την παραγωγή και τη χρήση του. Δυστυχώς, δε μπορεί να γίνει σύγκριση με προηγούμενες μελέτες καθώς είναι η πρώτη φορά που μελετάται η φαινολική σύνθεση δείγματος σιροπιού που παρασκευάστηκε κάτω από ήπιες θερμοκρασίες και συνθήκες.

Αποδόμηση των φαινολικών συστατικών παρατηρήθηκε, επίσης, και κατά τη θερμική επεξεργασία, το καβούρδισμα, της σκόνης χαρουπιού. Όπως παρατηρήθηκε, τα επίπεδα του γαλλικού οξέος, της κατεχίνης και της κερκετίνης μειώθηκαν σημαντικά ($p < 0.05$) κατά τη θερμική επεξεργασία του προϊόντος, ενώ, ταυτόχρονα, τα περιεχόμενα του κινναμικού οξέος, της μυρικετίνης ή ακόμα και του γεντισικού οξέος, παρουσίασαν μια σημαντική αύξηση ($p < 0.05$). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το καβούρδισμα μπορεί να προκαλέσει την αποδόμηση των υδρολυόμενων ταννινών, οδηγώντας, έτσι, σε αύξηση της ποσότητας του γαλλικού οξέος και, συνεπώς, σε μείωση της συνολικής περιεκτικότητας των ταννινών στο τελικό προϊόν [25]. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε μια ανάλογη τάση. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, αρκετές προηγούμενες μελέτες αναφέρουν υψηλότερα επίπεδα πολυφαινολών στην καβουρδισμένη σκόνη, σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με το μη θερμικά επεξεργασμένο προϊόν, αποδίδοντας τη διαφορά αυτή στην υδρόλυση των γαλλοταννινών και των ελλαγιταννινών, κατά τη θερμική επεξεργασία του προϊόντος, και στην επακόλουθη απελευθέρωση των μονάδων του γαλλικού οξέος [258–261]. Βέβαια, οι εν λόγω μελέτες επικεντρώνονται στον προσδιορισμό του TPC των δειγμάτων σκόνης χαρουπιού και όχι στη μελέτη των επιμέρους πολυφαινολικών τους συστατικών. Δεδομένου ότι το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του TPC, μπορεί να ανιχνεύσει οποιαδήποτε φαινολική ένωση υπάρχει στο δείγμα, όχι μόνο τις φυσικές πολυφαινόλες αλλά και τα νεοσχηματιζόμενα φαινολικά συστατικά, που προκύπτουν κατά τη θερμική επεξεργασία του προϊόντος, είναι δυνατό να ανιχνεύσει τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard, με δομή φαινολικού πυρήνα, και, ως αποτέλεσμα, να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου, όσον αφορά την περίπτωση της καβουρδισμένης σκόνης χαρουπιού. Επιπλέον, η θερμική κατεργασία του προϊόντος είναι δυνατό να προκαλέσει τη διάσπαση των τοιχωμάτων των κυτταρικών δομών και, συνεπώς, να επηρεάσει τη διαλυτότητα των προηγουμένως αδιάλυτων ή και δεσμευόμενων συστατικών, οδηγώντας, έτσι, στην ανίχνευση υψηλότερων συγκεντρώσεων. Επομένως, η αύξηση των επιπέδων του κινναμικού οξέος, της μυρικετίνης και του γεντισικού οξέος, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της διαλυτότητας των αντίστοιχων ενώσεων εξαιτίας της θερμικής κατεργασίας του προϊόντος.

Όσον αφορά το φαινολικό προφίλ του ωμού χαρουπάλευρου, βρέθηκε να είναι αρκετά παρόμοιο με αυτό της ακατέργαστης πρώτης ύλης. Ωστόσο, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν όσον αφορά τις ποσότητες των αντίστοιχων ενώσεων που ανιχνεύθηκαν, με το ωμό χαρουπάλευρο να παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πολυφαινολών ($p < 0.05$). Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στις τεχνολογικές διαδικασίες που ακολουθούνται για την παρασκευή του χαρουπάλευρου. Συγκεκριμένα, τα διάφορα στάδια επεξεργασίας του προϊόντος, μεταξύ των οποίων η μηχανική του κατεργασία, είναι πιθανό να οδήγησαν σε διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος και σε επακόλουθη απελευθέρωση των δεσμευόμενων πολυφαινολικών συστατικών, με αποτέλεσμα την ανίχνευση υψηλότερων συγκεντρώσεων στο τελικό προϊόν.

Σε αντίθεση με τη σκόνη χαρουπιού, η θερμική κατεργασία της σάρκας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητάς της σε γαλλικό οξύ. Σε αυτή την περίπτωση, η υδρόλυση των υδρολυόμενων ταννινών και η επακόλουθη απελευθέρωση των μονάδων του γαλλικού οξέος αποτελεί τη μοναδική πιθανή εξήγηση για την παρατηρούμενη συμπεριφορά της σάρκας κατά την επεξεργασία της σε υψηλές θερμοκρασίες. Κατά τη διαδικασία του καβουρδίσματος, παρατηρήθηκε, επίσης, μείωση της περιεκτικότητας της σάρκας σε μυρικετίνη, πιθανόν εξαιτίας της θερμικής της αποδόμησης, καθώς και αύξηση της διαλυτότητας της κατεχίνης και του κινναμικού οξέος.

Πίνακας 4.14. Φαινολική σύσταση της ακατέργαστης πρώτης ύλης και των παράγωγων προϊόντων του χαρουπιού.

Ένωση	Συγκέντρωση (μg/g δείγματος)					
	Χαρουπόμελο		Σκόνη χαρουπιού		Σάρκα Χαρουπιού	
	< 40 °C	> 40 °C	Ωμή	Καβουρδισμένη	Ωμή	Καβουρδισμένη
Γαλλικό οξύ	1923.37 ± 191.76 ^α	1283.15 ± 63.14 ^β	1097 ± 95.34 ^γ	667.64 ± 22.36 ^ε	322.54 ± 8.42 ^ζ	855.27 ± 80.90 ^δ
Κατεχόλη	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Γεντισικό οξύ	4.97 ± 0.34 ^α	4.17 ± 0.56 ^β	1.08 ± 0.7 ^δ	1.86 ± 0.63 ^γ	0.89 ± 0.32 ^δ	1.18 ± 0.35 ^{γδ}
Κατεχίνη	nd	nd	19.90 ± 0.65 ^α	2.01 ± 0.88 ^γ	3.51 ± 0.92 ^γ	12.20 ± 3.85 ^β
Χλωρογενικό οξύ	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Καφεϊκό οξύ	0.66 ± 0.10 ^β	1.08 ± 0.10 ^α	ηq	ηq	ηq	ηq
Φερουλικό οξύ	8.45 ± 1.69 ^β	18.40 ± 4.02 ^α	5.73 ± 1.37 ^{βγ}	4.37 ± 0.51 ^{βγ}	7.74 ± 1.30 ^{βγ}	6.39 ± 1.20 ^{βγ}
Μυρκετίνη	1.78 ± 0.07 ^ε	6.95 ± 0.39 ^δ	24.11 ± 4.42 ^β	39.14 ± 2.92 ^α	24.08 ± 1.11 ^β	12.14 ± 2.21 ^γ
Κινναμικό οξύ	ηq	ηq	ηq	35.78 ± 1.07 ^β	ηq	45.30 ± 7.76 ^α
Κερκετίνη	6.65 ± 0.16 ^γ	10.01 ± 0.51 ^γ	34.08 ± 3.43 ^α	20.48 ± 2.92 ^β	19.82 ± 1.97 ^β	18.42 ± 6.88 ^β
Ναρινγενίνη	0.61 ± 0.21 ^γ	1.02 ± 0.26 ^γ	3.67 ± 0.57 ^β	3.39 ± 0.54 ^β	5.41 ± 1.44 ^α	5.02 ± 0.15 ^α
Καεμφορόλη	0.65 ± 0.26 ^γ	nd	1.99 ± 0.29 ^α	1.64 ± 0.31 ^{αβ}	1.36 ± 0.29 ^β	1.13 ± 0.48 ^{βγ}
Σύνολο	1947.15 ± 189.75 ^α	1324.76 ± 66.95 ^β	1188.22 ± 102.21 ^β	776.32 ± 19.76 ^γ	385.34 ± 9.46 ^δ	923.73 ± 96.68 ^γ

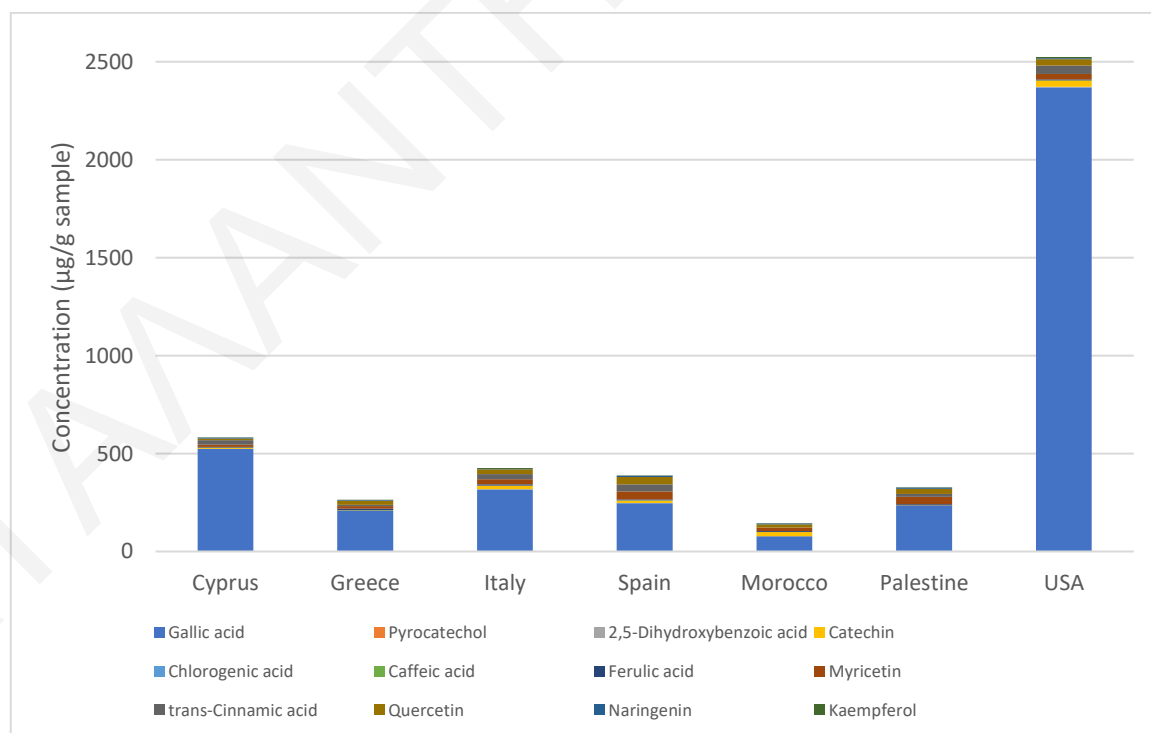
Τα διαφορετικά γράμματα (α-ζ) εντός της ίδιας σειράς υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών ($p < 0.05$), σύμφωνα με τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων Duncan.

nd: δεν ανιχνεύθηκε

ηq: δεν ποσοτικοποιήθηκε

4.3.2.3. Επίδραση γεωγραφικής προέλευσης

Για την εκτίμηση της επίδρασης της γεωγραφικής προέλευσης των χαρουπιών στην πολυφαινολική τους σύσταση, διερευνήθηκαν, επίσης, τα φαινολικά προφίλ χαρουπιών που συλλέχθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Στον Πίνακα 4.15 παρατίθενται τα εύρη των συγκεντρώσεων στα οποία ανιχνεύθηκε η κάθε ουσία, οι μέσες τιμές της συγκέντρωσης καθώς και οι αντίστοιχες τιμές της SD, ταξινομημένες ανά περιοχή δειγματοληψίας. Μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν διαπιστώθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις του φαινολικού τους περιεχομένου ($p < 0.05$), γεγονός που αποδόθηκε στη διαφορετική γεωγραφική τους προέλευση. Αυτές οι διακυμάνσεις του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων παριστάνονται γραφικά στο Σχήμα 4.16. Ειδικότερα, η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά κυμάνθηκε από 144.23 $\mu\text{g/g}$ στα δείγματα της σάρκας των χαρουπιών που συλλέχθηκαν από το Μαρόκο έως 2523.25 $\mu\text{g/g}$ στα δείγματα της σάρκας των χαρουπιών από τις ΗΠΑ. Σε όλες τις περιπτώσεις, το γαλλικό οξύ ήταν το συστατικό με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα, γεγονός που συμφωνεί με τα προηγούμενα ευρήματα. Σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες χλωρογενικού οξέος και κατεχόλης και για το λόγο αυτό οι εν λόγω αναλύτες δε συμπεριλήφθηκαν στην επακόλουθη πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.



Σχήμα 4.16. Γραφική αναπαράσταση των κύριων πολυφαινολικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα σάρκας χαρουπιού που συλλέχθηκαν από τις 7 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Πίνακας 4.15. Οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα σάρκας χαρουπιού, ταξινομημένες ανά περιοχή δειγματοληψίας.

Ένωση	Συγκέντρωση (μg/g δείγματος)													
	Γεωγραφική προέλευση													
	Κύπρος		Ελλάδα		Ιταλία		Ισπανία		Μαρόκο		Παλαιστίνη		ΗΠΑ	
Εύρος	Μέση τιμή ± SD	Εύρος	Μέση τιμή ± SD	Εύρος	Μέση τιμή ± SD	Εύρος	Μέση τιμή ± SD	Εύρος	Μέση τιμή ± SD	Εύρος	Μέση τιμή ± SD	Εύρος	Μέση τιμή ± SD	
Γαλλικό οξύ	300.70-1157.00	523.72 ± 262.68 ^β	44.74-328.89	207.05 ± 129.27 ^{βγ}	197.04-487.63	316.25 ± 152.15 ^{βγ}	216.17-295.67	246.04 ± 43.28 ^{βγ}	65.80-95.88	77.28 ± 16.25 ^γ	133.11-380.12	234.04 ± 129.55 ^{βγ}	2274.44-2535.12	2369.35 ± 144.07 ^α
Κατεχόλη	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Γεντισικό οξύ	nq-0.99	0.17 ± 0.33 ^γ	0.67-1.98	1.20 ± 0.52 ^β	1.26-1.72	1.52 ± 0.24 ^β	1.20-1.22	1.21 ± 0.01 ^β	nq-1.50	0.90 ± 0.79 ^β	nq	nq	1.27-3.04	± 0.96 ^α
Κατεχίνη	nd-17.84	6.29 ± 4.67 ^{γδ}	nq-4.57	1.95 ± 2.20 ^δ	17.04-22.60	19.14 ± 3.02 ^β	7.00-17.98	12.61 ± 5.50 ^γ	16.76-25.57	20.26 ± 4.67 ^β	nq-2.98	1.51 ± 1.49 ^δ	25.75-36.32	± 5.98 ^α
Χλωρογενικό οξύ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
Καφεϊκό οξύ	nd-0.88	0.07 ± 0.25 ^α	nd-3.06	0.93 ± 1.23 ^α	nd	nd	nq-0.81	± 0.46 ^α	nq	nq	nq	nq	nq-0.73	± 0.42 ^α
Φερουλικό οξύ	nq-9.65	3.61 ± 2.69 ^α	4.59-8.55	7.00 ± 1.48 ^α	4.12-5.68	5.11 ± 0.86 ^α	4.55-7.00	6.03 ± 1.30 ^α	4.79-6.20	5.46 ± 0.71 ^α	6.03-6.81	6.53 ± 0.43 ^α	4.49-7.33	5.77 ± 1.45 ^α

Μυρκετίνη	4.15- 36.27	11.94 ± 9.70 ^γ	nd- 24.96	13.67 ± 11.77 ^{βγ}	19.74- 34.43	26.08 ± 7.55 ^{αβγ}	33.47- 45.21	40.37 ± 6.14 ^α	15.22- 25.41	18.61 ± 5.88 ^{βγ}	29.63- 46.43	36.14 ± 9.01 ^α	25.00- 30.26	28.05 ± 2.73 ^{αβ}
Κιναμικό οξύ	nd-53.85	22.78 ± 24.14 αβγ	nq- 18.41	5.76 ± 8.95 ^{βγ}	21.50- 35.57	26.67 ± 7.74 ^{αβγ}	23.90- 42.52	35.37 ± 10.03 αβ	nq	nq	nq- 46.88	15.63 ± 27.06 αβγ	29-83- 50.37	42.32 ± 10.96 ^α
Κερκετίνη	nd-15.82	8.15 ± 4.78 ^δ	9.30- 37.31	21.48 ± 10.81 ^{βγδ}	13.59- 34.68	24.04 ± 10.55 αβγ	24.87- 56.76	38.29 ± 16.53 ^α	10.19- 27.30	16.68 ± 9.27 ^{νδ}	21.51- 35.34	26.13 ± 7.98 ^{αβγ}	27.45- 38.77	32.28 ± 5.84 ^{αβ}
Ναρινγενίνη	3.64- 7.65	5.37 ± 1.15 ^α	2.07- 6.92	3.86 ± 1.93 ^{αβ}	2.36- 3.15	2.74 ± 0.39 ^β	4.15- 6.55	5.69 ± 1.34 ^α	3.66- 5.88	4.60 ± 1.14 ^{αβ}	5.38- 6.30	5.82 ± 0.46 ^α	3.48-5.83	4.67 ± 1.17 ^{αβ}
Καεμφερόλη	nd-1.73	0.58 ± 0.64 ^β	1.07- 4.12	1.89 ± 1.11 ^β	1.58- 7.93	4.02 ± 3.42 ^{αβ}	0.93- 2.40	1.90 ± 0.84 ^β	0.23- 0.60	0.41 ± 0.18 ^β	1.96- 3.71	2.63 ± 0.94 ^{αβ}	1.47- 13.29	5.89 ± 6.45 ^α
Σύνολο	380.35- 1243.41	582.64 ± 279.56 β	71.83- 402.12	264.85 ± 140.40 ^{βγ}	316.85- 590.92	425.65 ± 145.51 βγ	364.44- 419.36	388.03 ± 28.58 βγ	122.23- 159.26	144.23 ± 19.46 ^γ	213.91- 511.94	328.36 ± 160.52 βγ	2429.96- 2704.65	2523.25 ± 157.05 ^α

Τα διαφορετικά γράμματα (α-δ) εντός της ίδιας σειράς υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών ($p < 0.05$), σύμφωνα με τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων Duncan.

nd: δεν ανιχνεύθηκε

nq: δεν ποσοτικοποιήθηκε

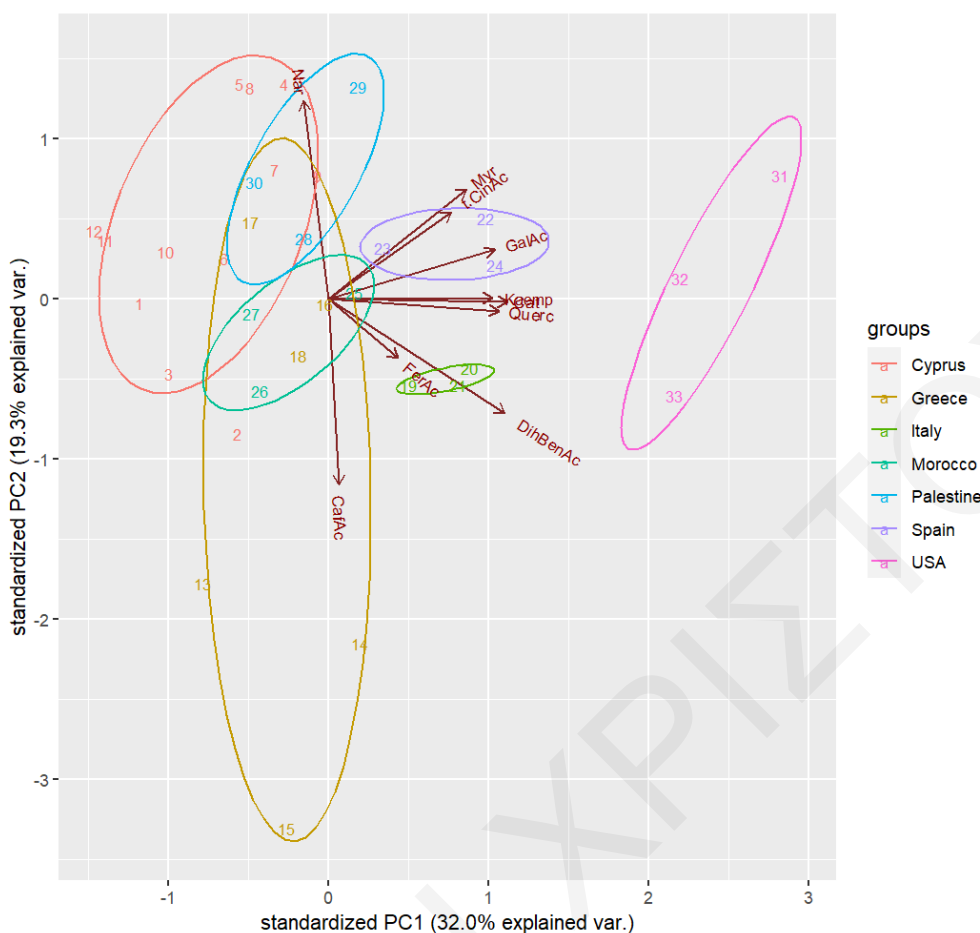
Δεδομένου του μεγάλου αριθμού των υπό εξέταση μεταβλητών (των πολυφαινολών), εφαρμόστηκε, αρχικά, η PCA προκειμένου να διερευνηθεί η δομή του συνόλου των δεδομένων και να εντοπιστούν οι μεταβλητές εκείνες που ευθύνονται για τις παρατηρούμενες ομοιότητες ή και διαφορές μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων. Αφού πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση του πίνακα του συνόλου των δεδομένων (33 δείγματα και 10 μεταβλητές), προκειμένου να αποκτήσουν όλες οι μεταβλητές την ίδια βαρύτητα, εφαρμόστηκε η PCA για τον εντοπισμό τυχόν υφιστάμενων ομαδοποιήσεων των δειγμάτων σάρκας χαρουπιού με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση.

Μέσω της PCA, ξεκινώντας από συνολικά 10 μεταβλητές κατάφεραν να εντοπιστούν οι 5 πρώτες PCs οι οποίες είναι σε θέση να εξηγήσουν αθροιστικά το 83.49% της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων. Αυτό βέβαια δεν παραβλέπει το γεγονός ότι οι τρεις πρώτες PCs μπορούν να εξηγήσουν ήδη ένα αξιόλογο ποσοστό της τάξης του 65.47%, το οποίο ενδεχομένως να θεωρείται αρκετό για τις περαιτέρω αναλύσεις. Η δισδιάστατη και τρισδιάστατη απεικόνιση της κατανομής των αποτελεσμάτων (scores plot) στους δύο και τρεις πρώτους κύριους άξονες (PC1: 32.03%, PC2: 19.34%, PC3: 14.10%), αντίστοιχα, κατέδειξε το σαφή διαχωρισμό των ειδών που συλλέχθηκαν από τις ΗΠΑ, την Ισπανία και την Ιταλία. Αντίθετα, τα προερχόμενα από την Κύπρο, την Ελλάδα, το Μαρόκο και την Παλαιστίνη δείγματα δεν κατάφεραν να διαχωριστούν, εξαιτίας της προφανούς επικάλυψης των ομάδων τους (συστάδες, clusters), τόσο στα δισδιάστατα όσο και στα τρισδιάστατα διαγράμματα (Σχήμα 4.17).

Επιπρόσθετα, από τη διάταξη των μεταβλητών στο γράφημα (loading plot) διαπιστώθηκε πως η πλειονότητα των πολυφαινολικών ενώσεων συγκεντρώνεται στη δεξιά πλευρά του γραφήματος και συσχετίζονται μεταξύ τους θετικά, αφού σχηματίζουν μεταξύ τους οξείες γωνίες. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες των διαχωριζόμενων ομάδων, οι οποίες αντιπροσωπεύονται από τις ΗΠΑ, την Ιταλία και την Ισπανία. Συγκεκριμένα, η φαινολική σύσταση των ισπανικών δειγμάτων χαρουπιού χαρακτηρίζεται κυρίως από την παρουσία της μυρικετίνης, του γαλλικού και του κινναμικού οξέος, ενώ το γεντισικό και το φερουλικό οξύ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν τη φαινολική σύνθεση των ιταλικών δειγμάτων. Όλες οι προαναφερθείσες πολυφαινόλες, μαζί με την καεμφερόλη, την κερκετίνη και την κατεχίνη, βρέθηκαν να περιέχονται σε υψηλά επίπεδα στα δείγματα των ΗΠΑ. Από την άλλη, το καφεϊκό οξύ που εντοπίστηκε μόνο του στο κάτω μέρος του διαγράμματος, αποδείχθηκε χαρακτηριστική ένωση των ελληνικών δειγμάτων. Τα δείγματα ελληνικής προέλευσης, βρέθηκαν διασκορπισμένα κατά μήκος του άξονα PC2, γεγονός που υποδηλώνει τη μεγάλη τους διακύμανση όσον αφορά την

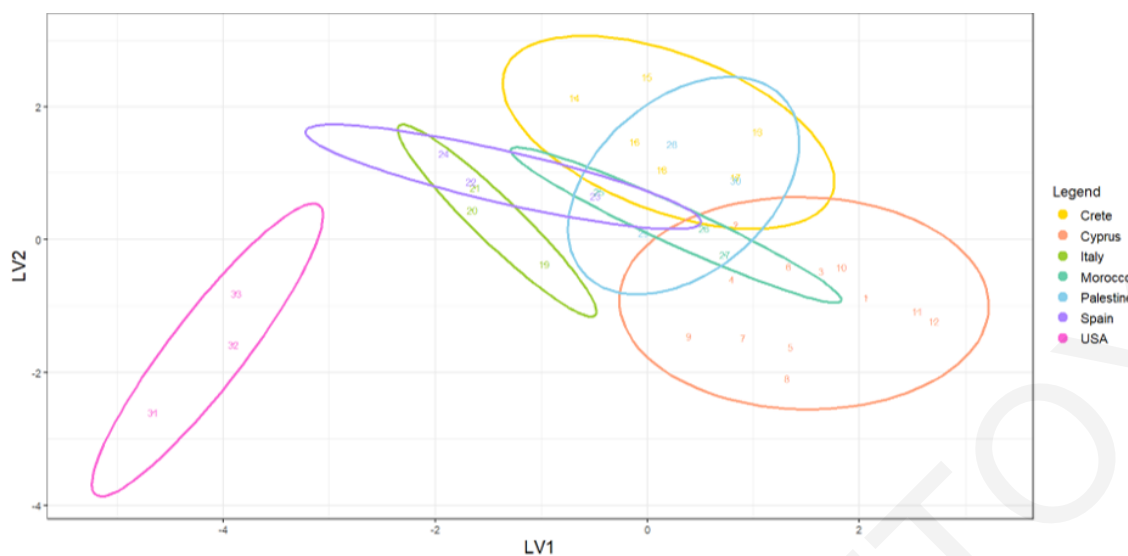
περιεκτικότητά τους σε καφεϊκό οξύ καθώς και σε ναρινγενίνη. Η τρίτη δέσμη μεταβλητών, απαρτίζεται από τη ναρινγενίνη, η οποία, όπως αποδείχθηκε, συσχετίζεται αρνητικά με τη μεταβλητή του καφεϊκού οξέος. Η παρουσία των δειγμάτων από Ελλάδα, Κύπρο και Παλαιστίνη στην άνω πλευρά του γραφήματος, υποδηλώνει τη χαρακτηριστική παρουσία της ναρινγενίνης σε αυτά.

Παρόλα αυτά, δεν επιτεύχθηκε κανένας στατιστικά σημαντικός διαχωρισμός των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από την Κύπρο, την Ελλάδα, το Μαρόκο και την Παλαιστίνη, γεγονός που αποδίδεται στις παρόμοιες κλιματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στις εν λόγω μεσογειακές περιοχές. Αντίθετα, τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις ΗΠΑ κατέδειξαν ένα σαφή διαχωρισμό. Τα εν λόγω δείγματα εντοπίστηκαν στη δεξιά πλευρά του γραφήματος, αρκετά μακριά από τα δείγματα της μεσογειακής λεκάνης. Επομένως, η PCA κατάφερε να επιδείξει τη σημαντική διαφορά που υπάρχει στη φαινολική σύσταση των δειγμάτων της Μεσογείου και της Αμερικής, με τα τελευταία να παρουσιάζουν μια σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Επομένως, παρόλο που δεν επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Μεσογείου, με εξαίρεση τα δείγματα από την Ιταλία και την Ισπανία, η PCA επέτρεψε τη σαφή διαφοροποίηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τις μεσογειακές και μη μεσογειακές περιοχές, πιθανόν εξαιτίας των διαφορετικών τους κλιματικών συνθηκών. Πέραν από την επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης, η φαινολική σύσταση των χαρουπιών είναι δυνατό να επηρεάζεται και από διάφορες άλλες παραμέτρους, μεταξύ των οποίων η ποικιλία, το φύλο, οι συνθήκες καλλιέργειας και ο βαθμός ωρίμανσης των χαρουπιών, παράγοντες που δυστυχώς ήταν αδύνατο να ελεγχθούν. Ως αποτέλεσμα, οι ομοιότητες ή/και διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων που εξετάστηκαν μπορεί να οφείλονται και σε άλλους παράγοντες, πέραν από τη διαφορετική γεωγραφική προέλευση των χαρουπιών.



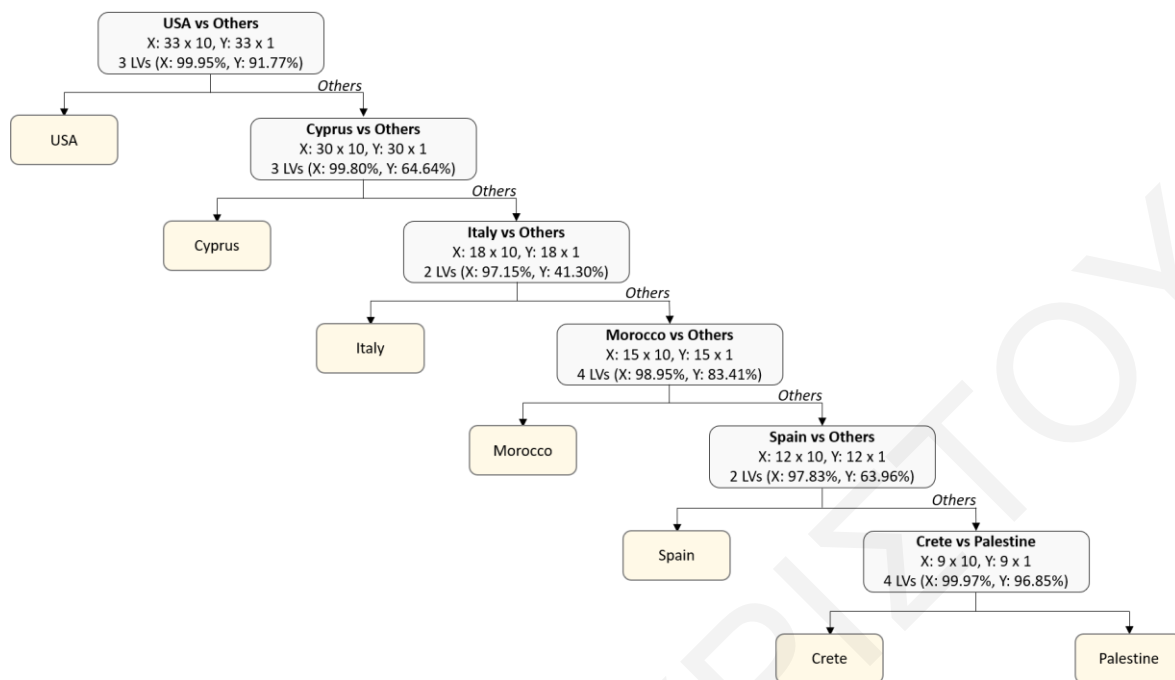
Σχήμα 4.17. Δισδιάστατη απεικόνιση της κατανομής των δειγμάτων (scores plot και loading plot) στους δύο πρώτους κύριους άξονες, PC1 και PC2.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η PLS-DA στον κανονικοποιημένο πίνακα δεδομένων προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική ταξινόμηση των δειγμάτων χαρουπιού σύμφωνα με τη γεωγραφική τους προέλευση. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν οι τέσσερις πρώτες LVs, οι οποίες ήταν σε θέση να ερμηνεύσουν το 99.99% της συνολικής διακύμανσης των παραμέτρων (X) καθώς και το 44.17% της μεταβλητότητας των ομάδων (Y), και κατέδειξαν τη χαμηλότερη τιμή της ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (root mean square error, RMSE) κατά τη διασταυρωμένη επικύρωση (leave-one-out cross-validation, LOOCV) του μοντέλου. Και πάλι, τα δείγματα των ΗΠΑ κατέδειξαν έναν ξεκάθαρο διαχωρισμό. Ωστόσο, δεν επιτεύχθηκε πλήρης οπτική διάκριση των υπολοίπων μεσογειακών δειγμάτων. Στο Σχήμα 4.18 παριστάνεται το διάγραμμα της κατανομής των αποτελεσμάτων (scores plot) κατά μήκος των αξόνων LV1 και LV2, όπου τα δείγματα των ΗΠΑ που εντοπίζονται στο κάτω μέρος του γραφήματος, εμφανίζοντας αρνητικές τιμές LV1 και LV2, παρουσιάζουν μια ξεκάθαρη διαφοροποίηση.

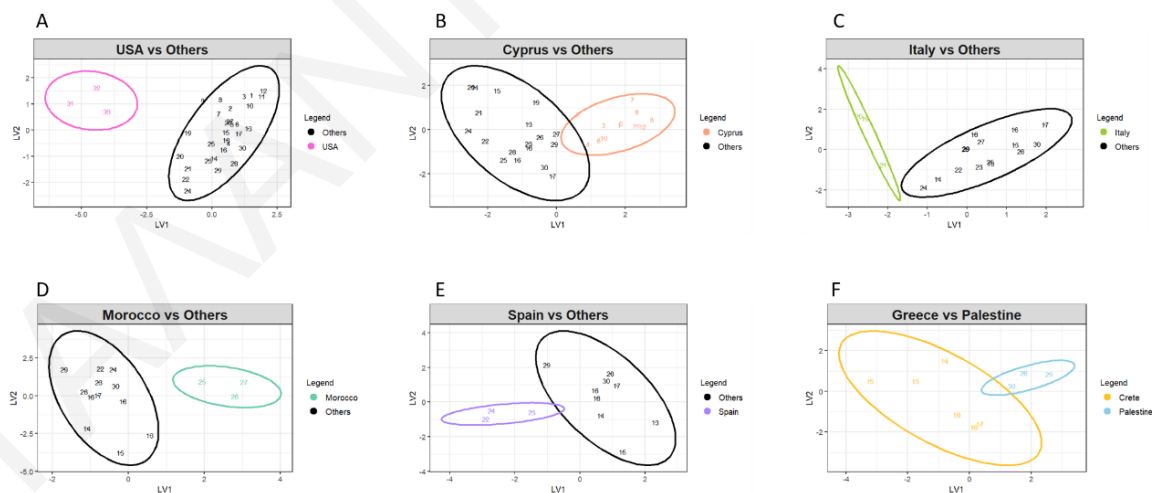


Σχήμα 4.18. Διάγραμμα των αποτελεσμάτων (scores plot) της PLS-DA (LV1 έναντι LV2) με τη χρήση όλων των υπό εξέταση δειγμάτων.

Εφόσον το μεμονωμένο μοντέλο PLS-DA που αναπτύχθηκε αποδείχθηκε αναποτελεσματικό για την πλήρη διάκριση των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση, προτάθηκε η διαδοχική χρήση μικρότερων μοντέλων, δύο τάξεων, με βάση το διάγραμμα ροής που παριστάνεται στο Σχήμα 4.19. Με βάση τα διαγράμματα που προέκυψαν από τα διαδοχικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν (A. USA vs Others, B. Cyprus vs Others, C. Italy vs Others, D. Morocco vs Others, E. Spain vs Others, F. Greece vs Palestine), διαπιστώθηκε η επίτευξη μιας ικανοποιητικής ταξινόμησης των υπό εξέταση δειγμάτων (Σχήμα 4.20). Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε μια ελαφριά επικάλυψη των υπό εξέταση τάξεων, εξαιτίας της μεγάλης μεταβλητότητας των αντίστοιχων ομάδων, η διαδοχική χρήση των μικρότερων μοντέλων PLS-DA, επέτρεψε τη σαφέστερα καλύτερη διαφοροποίηση των δειγμάτων, σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν. Στον Πίνακα 4.16 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από την LOOCV των μοντέλων που αναπτύχθηκαν, τα οποία και διασφαλίζουν την ικανοποιητική τους απόδοση. Συγκεκριμένα, η επικύρωση των μοντέλων πραγματοποιήθηκε με αξιολόγηση της ακρίβειας (του λόγου του αθροίσματος των αληθώς θετικών και αληθώς αρνητικών περιπτώσεων), της ευαισθησίας (ικανότητας ανίχνευσης αληθώς θετικών περιπτώσεων) και της ειδικότητας (ικανότητας ανίχνευσης αληθώς αρνητικών περιπτώσεων). Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.16, όλες οι κατηγορίες δειγμάτων κατέδειξαν ικανοποιητικές τιμές ειδικότητας (≥ 0.944), ευαισθησίας (≥ 0.889) και ακρίβειας (≥ 0.917), με εξαίρεση τα δείγματα από την Ιταλία (μοντέλο Italy vs Others) που παρουσίασαν ακρίβεια ίση με 0.889 και αρκετά χαμηλή ευαισθησία (0.333).



Σχήμα 4.19. Διάγραμμα ροής των διαδοχικά χρησιμοποιούμενων μικρότερων μοντέλων PLS-DA δύο τάξεων. Στο Σχήμα παρέχονται, επίσης, οι διαστάσεις του συνόλου των δεδομένων καθώς και οι LVs που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των μοντέλων.



Σχήμα 4.20. Η δισδιάστατη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων (scores plot) έναντι των αξόνων LV1 και LV2, για τα διαδοχικά μικρότερα μοντέλα PLS-DA δύο τάξεων που κατασκευάστηκαν.

Πίνακας 4.16. Αποτελέσματα της LOOCV των μοντέλων PLS-DA που αναπτύχθηκαν.

Μοντέλο	Ειδικότητα (Specificity)		Ευαισθησία (Sensitivity)		Ακρίβεια (Accuracy)	
	USA	Others	USA	Others	USA	Others
USA vs Others	1	1	1	1	1	1
Cyprus vs Others	0.944	0.917	0.917	0.944	0.933	0.933
Italy vs Others	1	0.333	0.333	1	0.889	0.889
Morocco vs Others	1	1	1	1	1	1
Spain vs Others	1	0.889	0.889	1	0.917	0.917
Greece vs Palestine	1	1	1	1	1	1

Εν κατακλείδι, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αποδείχθηκε πως οι πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων χαρουπιού. Πιθανόν ένας μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων να έδινε πιο ξεκάθαρα και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

4.3.3. Συμπεράσματα

Διάφοροι είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν τη φαινολική σύνθεση των χαρουπιών. Μεταξύ αυτών, ο βαθμός ωρίμανσης των χαρουπιών, η μέθοδος επεξεργασίας και η γεωγραφική τους προέλευση μελετήθηκαν λεπτομερώς στην παρούσα μελέτη. Πέραν αυτών, προσδιορίστηκε η κατανομή των εν λόγω δευτερογενών μεταβολιτών κατά μήκος του καρπού, μέσω της ανάλυσης της φαινολικής σύστασης της σάρκας και των σπόρων. Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των κύριων πολυφαινολικών ενώσεων των εξεταζόμενων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση του συστήματος HPLC-HRMS.

Όπως αποδείχθηκε, οι άγουροι καρποί (σάρκα και σπόροι) αποτελούν μια σημαντικότερη πηγή πολυφαινολικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αισθητή μείωση του περιεχομένου σχεδόν όλων των υπό μελέτη πολυφαινολών κατά τη μετάβαση του καρπού από το άγουρο στο ώριμο στάδιο. Ταυτόχρονα, οι σπόροι βρέθηκαν να περιέχουν μια σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις. Το γαλλικό οξύ αποδείχθηκε ως το κύριο συστατικό των εκχυλισμάτων της ώριμης και άγουρης σάρκας, ενώ η κατεχίνη, η κερκετίνη και το γαλλικό οξύ φάνηκαν να αποτελούν τα κύρια συστατικά των σπόρων.

Επιπλέον, σημαντική αποδείχθηκε και η μέθοδος επεξεργασίας που ακολουθείται για την παρασκευή των προϊόντων με βάση το χαρούπι. Όπως παρατηρήθηκε, το φαινολικό

περιεχόμενο των δειγμάτων σιροπιού παρουσίασε μια σημαντικά υψηλή περιεκτικότητα σε γαλλικό οξύ, ένωση που πιθανό να εκχυλίστηκε μαζί με τους υδατάνθρακες κατά τη διαδικασία παρασκευής του προϊόντος. Η θερμική κατεργασία είχε, όπως αποδείχθηκε, αρνητικό αντίκτυπο στα φαινολικά συστατικά των δειγμάτων σιροπιού και σκόνης χαρουπιού, πιθανόν εξαιτίας της θερμικής αποικοδόμησης των ευαίσθητων αυτών ενώσεων. Η μη θερμικά επεξεργασμένη σκόνη χαρουπιού κατέδειξε ένα αρκετά παρόμοιο φαινολικό προφίλ με αυτό της ακατέργαστης σάρκας, με τη διαφορά πως στο ωμό χαρουπάλευρο οι ενώσεις ανιχνεύθηκαν σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η διάρρηξη της φυτικής μήτρας και η επακόλουθη απελευθέρωση των δεσμευόμενων συστατικών πιθανό να ευθύνονται για τα υψηλά επίπεδα πολυφαινολών που παρατηρήθηκαν στα δείγματα της μη θερμικά επεξεργασμένης σκόνης. Σε αντίθεση με το χαρουπάλευρο, η θερμική κατεργασία της σάρκας επέφερε την αύξηση του συνόλου των πολυφαινολών, πιθανόν εξαιτίας της υδρόλυσης των ταννινών και της επακόλουθης απελευθέρωσης των μονάδων του γαλλικού οξέος.

Αξιοσημείωτες διαφορές παρατηρήθηκαν, επίσης, κατά την ανάλυση των δειγμάτων σάρκας χαρουπιού που συλλέχθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Η PCA επέτρεψε τη διαφοροποίηση των δειγμάτων των ΗΠΑ και της Μεσογείου. Ακολούθως, μέσω της διαδοχικής χρήσης των μοντέλων PLS-DA επιτεύχθηκε η ικανοποιητική διάκριση όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν σύμφωνα πάντα με τη γεωγραφική τους προέλευση. Συμπερασματικά, οι πολυφαινόλες μπορούν να αξιοποιηθούν ως δείκτες για τη διάκριση της γεωγραφικής προέλευσης των χαρουπιών, σε συνδυασμό πάντα με τα πολύτιμα χημειομετρικά εργαλεία.

5. Γενικά συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια η πολυφαινολική σύσταση των χαρουπιών έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των αυξημένων ενδείξεων πως η κατανάλωσή τους συνδέεται με μια πληθώρα θετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου. Παρόλο που έχουν γίνει αρκετές μελέτες όσον αφορά τη φαινολική σύσταση των χαρουπιών και των προϊόντων τους, η απουσία μιας τυποποιημένης μεθόδου εκχύλισης καθιστά αδύνατη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας και, συνεπώς, την εξαγωγή ξεκάθαρων συμπερασμάτων. Υπό αυτό το πλαίσιο, στο πρώτο στάδιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση μιας μη συμβατικής μεθόδου εκχύλισης, της UAE. Μέσω μιας πλήρους στατιστικής ανάλυσης, μελετήθηκε η επίδραση του λόγου στερεού-διαλύτη, της συγκέντρωσης του διαλύτη, του χρόνου εκχύλισης, του πλάτους των υπερήχων και του τρόπου λειτουργίας των υπερήχων στην ικανότητα εξαγωγής των εν λόγω βιοδραστικών συστατικών. Σε σχέση με τις κλασσικές τεχνικές εξαγωγής, η προτεινόμενη βέλτιστη μέθοδος UAE προσέφερε σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις.

Ακολούθως, έλαβε χώρα η ανάπτυξη μιας ηλεκτροφορητικής μεθόδου ανάλυσης, με στόχο τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων των βέλτιστα ληφθέντων εκχυλισμάτων. Προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός των υπό μελέτη αναλυτών, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραμέτρων, μεταξύ των οποίων ο τύπος, η συγκέντρωση και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, η προσθήκη οργανικών διαλυτών και άλλων τροποποιητών και η εφαρμοζόμενη τάση. Η χρήση της β-CD σε συνδυασμό με το PL, που αναφέρθηκαν για πρώτη φορά κατά τη μελέτη της εν λόγω κατηγορίας ενώσεων, αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική όσον αφορά τη βελτίωση του διαχωρισμού, πιθανόν εξαιτίας της συνεργειακής τους δράσης. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των εκχυλισμάτων, που ακολούθησε, κατέδειξε σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων. Ωστόσο, δεν επέτρεψε την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός σημαντικού αριθμού πολυφαινολών, εξαιτίας των πολύπλοκων τους δομών, των χαμηλών τους συγκεντρώσεων καθώς και της πολύπλοκης φύσης της μήτρας του δείγματος.

Ως εκ τούτου, προτάθηκε η χρήση του συστήματος HPLC-HRMS, ως μια πιο ευαίσθητη και εκλεκτική τεχνική, με σκοπό τη λήψη αντιπροσωπευτικότερων αποτελεσμάτων όσον αφορά τη φαινολική σύνθεση των χαρουπιών και των προϊόντων τους. Μέσω της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε, μελετήθηκε η επίδραση του βαθμού ωρίμανσης, της μεθόδου κατεργασίας και της γεωγραφικής προέλευσης στη φαινολική σύσταση των χαρουπιών, ενώ, παράλληλα, μέσω της εξέτασης του φαινολικού περιεχομένου της σάρκας και των σπόρων αξιολογήθηκε η κατανομή των εν λόγω ενώσεων κατά μήκος του καρπού. Είναι η πρώτη

φορά που επιτυγχάνεται ταξινόμηση των εν λόγω ειδών με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση χρησιμοποιώντας τα πολυφαινολικά τους προφίλ ως τους χαρακτηριστικούς δείκτες διάκρισης.

Εν κατακλείδι, η παρούσα έρευνα συνιστά μια ολοκληρωμένη μελέτη, κατά την οποία, αφού προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής των πολυφαινολικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρική, ηλεκτροφορητική και χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στόχος ήταν η μελέτη των παραγόντων που επιδρούν στη φαινολική σύσταση των χαρουπιών.

6. Μελλοντική εργασία

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως η πλειονότητα των πολυφαινολικών ενώσεων απαντάται στους φυτικούς ιστούς υπό τη συζευγμένη τους μορφή, και κυρίως ως γλυκοζίτες, προτείνεται η μη στοχευμένη ανάλυση των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, προτείνεται η χρήση της μεθοδολογίας HPLC-HRMS για την εφαρμογή της μη στοχευμένης ανάλυσης, με στόχο τον προσδιορισμό του συνόλου των δευτερογενών μεταβολιτών και τη λήψη πιο αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων όσον αφορά τη φαινολική σύνθεση των υπό μελέτη φυτικών προϊόντων. Μέσω της μη στοχευμένης ανάλυσης μπορούν να προσδιοριστούν, τόσο τα άγλυκα συστατικά, όσο και τα γλυκοζιτικά τους παράγωγα. Συγκεκριμένα, βάση των χαρακτηριστικών θραυσμάτων των εν λόγω ενώσεων είναι δυνατός ο προσδιορισμός των άγλυκων συστατικών, των μονάδων σακχάρου καθώς και του είδους του γλυκοζιτικού δεσμού. Επιπρόσθετα, καθιστάται δυνατή η ταυτοποίηση των ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους και των σύνθετων πολυμερών (π.χ. ταννίνες). Παράλληλα, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν πειράματα υδρόλυσης, με σκοπό την απελευθέρωση των άγλυκων συστατικών των εκχυλισμάτων και τη διευκόλυνση της στοχευμένης ανάλυσης. Θα μπορούσαν, επίσης, να προστεθούν και άλλα συστατικά στη λίστα των αναλυτών στόχων, όπως για παράδειγμα κάποιες ταννίνες.

7. Βιβλιογραφία

- [1] Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruazo, G., Rezgui, F., Louaileche, H., Kati, D. E. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 827–835.
- [2] Srour, N., Daroub, H., Toufeili, I., Olabi, A. *J. Sci. Food Agric.* 2016, 96, 3047–3057.
- [3] Stavrou, I. J., Christou, A., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Food Chem.* 2018, 269, 355–374.
- [4] Karababa, E., Coşkuner, Y. *Ind. Crops Prod.* 2013, 42, 440–446.
- [5] Bernardo-Gil, M. G., Roque, R., Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Gírio, F., Esteves, P. *J. Supercrit. Fluids* 2011, 59, 36–42.
- [6] Goulas, V., Stylos, E., Chatziathanasiadou, M. V., Mavromoustakos, T., Tzakos, A. *G. Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17.
- [7] Matthaus, B., Özcan, M. M. *Sci. Hort. (Amsterdam)*. 2011, 130, 181–184.
- [8] Benković, M., Srećec, S., Bauman, I., Ježek, D., Karlović, S., Kremer, D., Karlović, K., Erhatic, R. *Food Technol. Biotechnol.* 2016, 54, 432–440.
- [9] Nasar-Abbas, S. M., e-Huma, Z., Vu, T. H., Khan, M. K., Esbenshade, H., Jayasena, V. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, 15, 63–72.
- [10] Battle, I., Tous, J. *Carob tree, Ceratonia siliqua L.*, IPGRI, Rome, 1997.
- [11] FAO FAOSTAT database <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> [accessed Oct 19, 2021].
- [12] El Batal, H., Hasib, A., Dehbi, F., Zaki, N., Ouattmane, A., Boulli, A. *J. Mater. Environ. Sci.* 2016, 7, 3278–3285.
- [13] Khatib, S., Vaya, J. *Fig, carob, pistachio, and health*, First Edit., Elsevier Inc., 2010.
- [14] Salinas, M. V., Carbas, B., Brites, C., Puppo, M. C. *Food Bioprocess Technol.* 2015, 8, 1561–1570.
- [15] Tetik, N., Turhan, I., Oziyci, H. R., Karhan, M. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2011, 62, 572–576.
- [16] Dhaouadi, K., Belkhir, M., Akinocho, I., Raboudi, F., Pamies, D., Barrajon, E., Estevan, C., Fattouch, S. *LWT - Food Sci. Technol.* 2014, 57, 1–8.

- [17] Hadrich, B., Dimitrov, K., Kriaa, K. *J. Food Process. Preserv.* 2017, *41*, 1–10.
- [18] Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., Carcea, M. *Food Chem.* 2014, *153*, 109–113.
- [19] Barracosa, P., Osório, J., Cravador, A. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2007, *114*, 250–257.
- [20] Makris, D. P., Kefalas, P. *Food Technol. Biotechnol.* 2004, *42*, 105–108.
- [21] Vitali Čepo, D., Mornar, A., Nigović, B., Kremer, D., Radanović, D., Vedrina Dragojević, I. *LWT - Food Sci. Technol.* 2014, *58*, 578–586.
- [22] Martin-Diana, A. B., Izquierdo, N., Albertos, I., Sanchez, M. S., Herrero, A., Sanz, M. A., Rico, D. *J. Food Process. Preserv.* 2017, *41*.
- [23] Custódio, L., Escapa, A. L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N., Nogueira, J. M. F., Romano, A. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2011, *66*, 78–84.
- [24] Bengoechea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., Guerrero, A., Puppo, M. C. *Food Chem.* 2008, *107*, 675–683.
- [25] Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H. R., Mellenthin, A., Haber, B., Galensa, R. *J. Agric. Food Chem.* 2004, *52*, 3784–3791.
- [26] Roseiro, L. B., Tavares, C. S., Roseiro, J. C., Rauter, A. P. *Ind. Crops Prod.* 2013, *44*, 119–126.
- [27] Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M. S., Nakayama, T. *J. Agric. Food Chem.* 2002, *50*, 373–377.
- [28] Raposo, S., Constantino, A., Rodrigues, F., Rodrigues, B., Lima-Costa, M. E. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017, *181*, 827–843.
- [29] Moreira, T. C., Transfeld da Silva, Á., Fagundes, C., Ferreira, S. M. R., Cândido, L. M. B., Passos, M., Krüger, C. C. H. *LWT - Food Sci. Technol.* 2017, *76*, 326–329.
- [30] Biernacka, B., Dziki, D., Gawlik-Dziki, U., Różyło, R., Siastała, M. *LWT - Food Sci. Technol.* 2017, *77*, 186–192.
- [31] Rached, I., Barros, L., Fernandes, I. P., Santos-Buelga, C., Rodrigues, A. E., Ferchichi, A., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C. F. R. *Food Funct.* 2016, *7*, 1319–1328.
- [32] Oziyici, H. R., Tetik, N., Turhan, I., Yatmaz, E., Ucgun, K., Akgul, H., Gubbuk, H., Karhan, M. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2014, *167*, 149–152.

- [33] Youssef, M. K. E., El-Manfaloty, M. M., Ali, H. M. *Food Public Heal.* 2013, 3, 304–308.
- [34] Brassesco, M. E., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M., Pintado, M. *Trends Food Sci. Technol.* 2021, 114, 310–322.
- [35] Rtibi, K., Selmi, S., Jabri, M. A., Mamadou, G., Limas-Nzouzi, N., Sebai, H., El-Benna, J., Marzouki, L., Eto, B., Amri, M. *RSC Adv.* 2016, 6, 44345–44353.
- [36] Zhang, B., Cai, J., Duan, C., Reeves, M. J., He, F. 2015, 6978–7014.
- [37] Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., Valéro, J. R. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2011, 31, 227–249.
- [38] Lakey-beitia, J., Berrocal, R., Rao, K. S., Durant, A. A. 2015, 466–479.
- [39] Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D., Li, S., Chen, Y., Li, H. 2016.
- [40] Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. *Molecules* 2016, 21.
- [41] Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. *Antioxidants Redox Signal.* 2013, 18, 1818–1892.
- [42] Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., Tai, T. C. *Nutrients* 2013, 5, 3779–3827.
- [43] Pandey, K. B., Rizvi, S. I. 2009, 2, 270–278.
- [44] Manganaris, G. A., Goulas, V., Vicente, R., Terry, L. A. 2013.
- [45] Nazzaro, F., Fratianni, F., Feo, V. De *Polyphenols , the new frontiers of prebiotics*, 1st ed., Elsevier Inc., 2020, Vol. 94.
- [46] Bentradi, N., Hamida-ferhat, A. *Date palm fruit (Phoenix dactylifera): Nutritional values and potential benefits on health*, Second Edi., Elsevier Inc., 2020.
- [47] Lucci, P., Saurina, J., Núñez, O. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2017, 88, 1–24.
- [48] Porgali, E., Büyüktuncel, E. *Food Res. Int.* 2012, 45, 145–154.
- [49] Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 1365–1402.
- [50] Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. *Angew. Chemie - Int.*

Ed. 2011, 50, 586–621.

- [51] Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. *J. Phys. Chem. A* 2004, 108, 4916–4922.
- [52] Ningappa, M. B., Dinesha, R., Srinivas, L. *Food Chem.* 2008, 106, 720–728.
- [53] Uysal, S., Zengin, G., Aktumsek, A., Karatas, S. *J. Funct. Foods* 2016, 22, 518–532.
- [54] Custódio, L., Patarra, J., Alberício, F., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Romano, A. *Nat. Prod. Res.* 2015, 29, 2155–2159.
- [55] Rtibi, K., Jabri, M. A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., El-Benna, J., Amri, M., Marzouki, L. *RSC Adv.* 2015, 5, 84207–84215.
- [56] Custódio, L., Escapa, A. L., Patarra, J., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N. R., Florêncio Nogueira, J. M., Romano, A. *Rec. Nat. Prod.* 2013, 7, 225–229.
- [57] Balaban, M. *Phytochem. Anal.* 2004, 15, 385–388.
- [58] Almanasrah, M., Roseiro, L. B., Bogel-Lukasik, R., Carvalheiro, F., Brazinha, C., Crespo, J., Kallioinen, M., Mänttari, M., Duarte, L. C. *Ind. Crops Prod.* 2015, 70, 443–450.
- [59] Loullis, A., Pinakoulaki, E. *Eur. Food Res. Technol.* 2018, 244, 959–977.
- [60] Huma, Z. E., Jayasena, V., Nasar-Abbas, S. M., Imran, M., Khan, M. K. *J. Food Process. Preserv.* 2018, 42, 1–10.
- [61] Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Haber, B. *Food Chem. Toxicol.* 2003, 41, 1727–1738.
- [62] Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque, R., Bernardo-Gil, M. G., Martins, A. I., Sepúlveda, C., Almeida, J., Meireles, M., Gírio, F. M., Rauter, A. P. *Ind. Crops Prod.* 2013, 47, 132–138.
- [63] Plaza, M., Domínguez-Rodríguez, G., Castro-Puyana, M., Marina, M. L. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, Woodhead Publishing, 2018.
- [64] Tsao, R. *Nutrients* 2010, 2, 1231–1246.
- [65] Al Jitan, S., Alkhoori, S. A., Yousef, L. F. *Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health*, 1st ed., Elsevier B.V., 2018, Vol. 58.
- [66] Olalla, L., Pateiro, M., Munekata, P. E. S. 2020, 1–27.

- [67] Custódio, L., Fernandes, E., Escapa, A. L., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Romano, A. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 7005–7012.
- [68] Custódio, L., Fernandes, E., Escapa, A. L., López-Avilés, S., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Romano, A. *Pharm. Biol.* 2009, *47*, 721–728.
- [69] Ghanemi, F. Z., Belarbi, M., Fluckiger, A., Nani, A., Dumont, A., De Rosny, C., Aboura, I., Khan, A. S., Murtaza, B., Benammar, C., Lahfa, B. F., Patoli, D., Delmas, D., Rébé, C., Apétoh, L., Khan, N. A., Ghringhelli, F., Rialland, M., Hichami, A. *J. Funct. Foods* 2017, *33*, 112–121.
- [70] Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I. *Curr. Res. Food Sci.* 2021, *4*, 200–214.
- [71] Louie, K. B., Kosina, S. M., Hu, Y., Otani, H., de Raad, M., Kuftin, A. N., Mouncey, N. J., Bowen, B. P., Northen, T. R. *Mass Spectrometry for Natural Product Discovery*, 3rd ed., Elsevier Ltd., 2020.
- [72] Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque, R., Bernardo-gil, M. G., Martins, A. I., Sepúlveda, C., Almeida, J., Meireles, M., Gírio, F. M. *Ind. Crop. Prod.* 2013, *47*, 132–138.
- [73] Aires, A. *Phenolic Compd. - Nat. Sources, Importance Appl.* 2017.
- [74] Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejcin, A., Pavlić, B. *Ultrason. Sonochem.* 2015, *23*, 360–368.
- [75] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. *Food Chem.* 2008, *106*, 804–810.
- [76] Ghitescu, R. E., Volf, I., Carausu, C., Bühlmann, A. M., Gilca, I. A., Popa, V. I. *Ultrason. Sonochem.* 2015, *22*, 535–541.
- [77] Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., Luo, X. *Ultrason. Sonochem.* 2018, *48*, 538–549.
- [78] Rahman, M. M., Lamsal, B. P. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2021, *20*, 1457–1480.
- [79] Rutkowska, M., Namieśnik, J., Konieczka, P. *Appl. Green Solvents Sep. Process.* 2017, 301–324.
- [80] Picó, Y. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2013, *43*, 84–99.

- [81] Goulas, V., Georgiou, E. *Foods* 2020, 9.
- [82] Saci, F., Benchikh, Y., Louaileche, H., Bachir, M. 2018, 42, 26–39.
- [83] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. *Talanta* 2008, 76, 965–977.
- [84] Ciric, A., Krajnc, B., Heath, D., Ogrinc, N. *Food Chem. Toxicol.* 2020, 135, 110976.
- [85] Silva, E. M., Rogez, H., Larondelle, Y. *Sep. Purif. Technol.* 2007, 55, 381–387.
- [86] Sarabia, L. A., Ortiz, M. C. In *Comprehensive Chemometrics*, 2009, pp. 345–390.
- [87] Aydar, A. Y. *Utilization of Response Surface Methodology in Optimization of Extraction of Plant Materials*, 2018.
- [88] Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Costa, P., ManuelLorenzosa, J. In *Design and Optimization of Innovative Food Processing Techniques Assisted by Ultrasound*, Academic Press, 2021, pp. 15–38.
- [89] Bas, D. 2007, 78, 836–845.
- [90] Khuri, I., Mukhopadhyay, S. *WIREs Comput. Stat.* 2010.
- [91] Antony, J. *6 Full Factorial Designs*, Second Edi., Elsevier Ltd, 2014.
- [92] Hanrahan, G., Zhu, J., Gibani, S., Patil, D. G. In *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 2004, pp. 8–13.
- [93] Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. 2013, 2328–2375.
- [94] Weber, F., Passon, M. In *Polyphenols in Plants*, Elsevier Inc., 2019, pp. 111–121.
- [95] Pyrzynska, K., Sentkowska, A. In *Chromatographic Analysis of Polyphenols*, Academic Press, 2019, pp. 353–364.
- [96] Olmo-García, L., Monasterio, R. P., Bajoub, A., Carrasco-Pancorbo, A. In *Dietary Polyphenols*, 2020, pp. 85–128.
- [97] Stavrou, I. J., Christou, A., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Food Chem.* 2018, 269, 355–374.
- [98] Barbosa, S., Campmajó, G., Saurina, J., Puignou, L., Núñez, O. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 591–602.
- [99] Barbosa, S., Pardo-Mates, N., Hidalgo-Serrano, M., Saurina, J., Puignou, L., Núñez,

O. J. Agric. Food Chem. 2018, 66.

- [100] Díaz-De-Cerio, E., Aguilera-Saez, L. M., María Gómez-Caravaca, A., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., Fernández, I., Arráez-Román, D., Laganà, A., Capriotti, A. L., Cavaliere, C. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, 410, 3607–3619.
- [101] Kalogiouri, N. P., Alygizakis, N. A., Aalizadeh, R., Thomaidis, N. S. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016, 408, 7955–7970.
- [102] Motilva, M. J., Serra, A., Macià, A. *J. Chromatogr. A* 2013, 1292, 66–82.
- [103] Martí, R., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J. M., Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S. *Food Chem.* 2017, 221, 439–446.
- [104] Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., Fernández-Gutiérrez Alberto, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 53, 1130–1160.
- [105] Roblová, V., Bittová, M., Kubáň, P., Kubáň, V. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 2862–2868.
- [106] Almanasrah, M., Brazinha, C., Kallioinen, M., Duarte, L. C., Roseiro, L. B., Bogel-lukasik, R., Carvalheiro, F., Mänttari, M., Crespo, J. G. *Sep. Purif. Technol.* 2015, 149, 389–397.
- [107] Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1220–1234.
- [108] Liu, E. H., Qi, L. W., Cao, J., Li, P., Li, C. Y., Peng, Y. B. *Molecules* 2008, 13, 2521–2544.
- [109] Arribas, A. S., Martínez-Fernández, M., Moreno, M., Bermejo, E., Zapardiel, A., Chicharro, M. *Electrophoresis* 2014, 35, 1693–1700.
- [110] Wu, T., Yu, C., Li, R., Li, J. *Instrum. Sci. Technol.* 2018, 46, 364–386.
- [111] Gotti, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 55, 775–801.
- [112] Kofink, M., Papagiannopoulos, M., Galensa, R. *Eur. Food Res. Technol.* 2007, 225, 569–577.
- [113] Gel-Moreto, N., Streich, R., Galensa, R. *Electrophoresis* 2003, 24, 2716–2722.
- [114] Gel-Moreto, N., Streich, R., Galensa, R. *J. Chromatogr. A* 2001, 925, 279–289.
- [115] Cheung, H. Y., Zhang, Q. F. *J. Chromatogr. A* 2008, 1213, 231–238.

- [116] Zhang, Q. F., Li, S. C., Lai, W. P., Cheung, H. Y. *Food Chem.* 2009, *113*, 684–691.
- [117] Chi, L., Li, Z., Dong, S., He, P., Wang, Q., Fang, Y. *Microchim. Acta* 2009, *167*, 179–185.
- [118] Cao, J., We, J., Tian, K., Su, H., Wan, J., Li, P. *J. Sep. Sci.* 2014, *37*, 3738–3744.
- [119] Tang, B., Bi, W., Tian, M., Row, K. H. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012, *904*, 1–21.
- [120] Ward, T. J., Ward, K. D. *Anal. Chem.* 2010, *82*, 4712–4722.
- [121] Zhang, X., Zhang, C., Sun, G., Xu, X., Tan, Y., Wu, H., Cao, R., Liu, J., Wu, J. *Instrum. Sci. Technol.* 2012, *40*, 194–215.
- [122] Lai, W.-F. *Deliv. Ther. Biogerontological Interv.* 2019, 49–59.
- [123] Stalcup, A. M., Cabovska, B. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2004, *27*, 1443–1459.
- [124] Qi, S., Cui, S., Chen, X., Hu, Z. *J. Chromatogr. A* 2004, *1059*, 191–198.
- [125] Kapnissi-Christodoulou, C. P., Stavrou, I. J., Mavroudi, M. C. *J. Chromatogr. A* 2014, *1363*, 2–10.
- [126] Tang, S., Liu, S., Guo, Y., Liu, X., Jiang, S. *J. Chromatogr. A* 2014, *1357*, 147–157.
- [127] Berthod, A., Ruiz-Ángel, M. J., Carda-Broch, S. *J. Chromatogr. A* 2008, *1184*, 6–18.
- [128] Vaher, M. In *Analytical Applications of Ionic Liquids*, 2016, Vol. 1483, pp. 105–136.
- [129] Yanes, E. G., Gratz, S. R., Baldwin, M. J., Robison, S. E., Stalcup, A. M. *Anal. Chem.* 2001, *73*, 3838–3844.
- [130] Rakib, E. M., Chicha, H., Abouricha, S., Alaoui, M. *J. Nat. Prod.* 2010, *3*, 134–140.
- [131] Farag, M. A., El-Kersh, D. M., Ehrlich, A., Choucry, M. A., El-Seedi, H., Frolov, A., Wessjohann, L. A. *Food Chem.* 2019, *283*, 675–687.
- [132] Vekiari, S. A., Ouzounidou, G., Ozturk, M., Görk, G. *Procedia - Soc. Behav. Sci.* 2011, *19*, 750–755.
- [133] Kyriacou, M. C., Antoniou, C., Roupheal, Y., Graziani, G., Kyratzis, A. *Antioxidants* 2021, *10*, 1–21.
- [134] Guo, J., Yuan, Y., Dou, P., Yue, T. *Food Chem.* 2017, *232*, 552–559.

- [135] Alabdi, F., Elharfi, N., Balouki, A., Kzaiber, F., Oussama, A. *J. Chem. Chem. Eng* 2011, 5, 1020–1029.
- [136] Christou, C., Agapiou, A., Kokkinofta, R. *J. Adv. Res.* 2018, 10, 1–8.
- [137] Kokkinofta, R., Yiannopoulos, S., Stylianou, M. A., Agapiou, A. *Metabolites* 2020, 10.
- [138] Krokou, A., Kokkinofta, R., Stylianou, M., Agapiou, A. *Eur. Food Res. Technol.* 2020, 246, 1419–1428.
- [139] Naghmouchi, S., Khouja, M. L., Romero, A., Tous, J., Boussaid, M. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2009, 121, 125–130.
- [140] Sidina, M. M., El Hansali, M., Wahid, N., Ouattmane, A., Boulli, A., Haddioui, A. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2009, 123, 110–116.
- [141] Makris, D. P., Kallithraka, S., Mamalos, A. *Talanta* 2006, 70, 1143–1152.
- [142] Pérez-Ràfols, C., Saurina, J. *Anal. Methods* 2015, 7, 8733–8739.
- [143] Kalogiouri, N. P., Samanidou, V. F. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021, 28, 59150–59164.
- [144] Saurina, J., Sentellas, S. In *Fast Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis*, 2015, pp. 517–547.
- [145] Kalogiouri, N. P., Aalizadeh, R., Dasenaki, M. E., Thomaidis, N. S. *Anal. Chim. Acta* 2020, 1134, 150–173.
- [146] Benchikh, Y., Louaileche, H., George, B., Merlin, A. *Ind. Crops Prod.* 2014, 60, 298–303.
- [147] Saci, F., Bachir bey, M., Louaileche, H., Gali, L., Bensouici, C. *J. Food Meas. Charact.* 2020, 14, 937–945.
- [148] Ydjedd, S., Chaalal, M., Richard, G., Kati, D. E., López-Nicolás, R., Fauconnier, M. L., Louaileche, H. *Int. Food Res. J.* 2017, 24, 2041–2049.
- [149] Benchikh, Y., Paris, C., Louaileche, H., Charbonnel, Céline, Ghoul, M., Chebil, L. *SDRP J. Food Sci. Technol.* 2016, 1, 85–91.
- [150] Santonocito, D., Granata, G., Geraci, C., Panico, A., Siciliano, E. A., Raciti, G., Puglia, C. 2020.

- [151] Ortega, N., Macià, A., Romero, M. P., Trullols, E., Morello, J. R., Anglès, N., Motilva, M. J. *J. Agric. Food Chem.* 2009, *57*, 7239–7244.
- [152] Custódio, L., Fernandes, E., Romano, A. *Acta Hortic.* 2009, *841*, 503–506.
- [153] Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* 2005, *53*, 4290–4302.
- [154] Granato, D., Santos, J. S., Maciel, L. G., Nunes, D. S. *Trends Anal. Chem.* 2016, *80*, 266–279.
- [155] Raventós, R. M. L. 2018.
- [156] Sciences, F. 2013, *2*, 1699–1708.
- [157] Velázquez, C., Guadalupe, M., Rojas, V., Alvarez, C., Chávez-servín, J. L., García-gasca, T., Ferriz, R. A., García, O. P., Rosado, J. L., López-sabater, C. M., Isabel, A., Mario, H., Montemayor, A., De, K., Carbot, T. 2015, *176*, 480–486.
- [158] Yoo, K. S., Lee, E. J., Leskovar, D., Patil, B. S. .
- [159] Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. A. *Anal. Methods* 2013, *5*, 5990–5999.
- [160] Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., Granato, D. *J. Food Sci.* 2015, *80*, C2397–C2403.
- [161] Matic, P., Sabljic, M., Jakobek, L. *J. AOAC Int.* 2017, *100*, 1795–1803.
- [162] Chen, L. Y., Cheng, C. W., Liang, J. Y. *Food Chem.* 2015, *170*, 10–15.
- [163] Spisso, A., Gomez, F. J. V., Fernanda Silva, M. *Electrophoresis* 2018, *39*, 1621–1627.
- [164] Álvarez, G., Montero, L., Llorens, L., Castro-Puyana, M., Cifuentes, A. *Electrophoresis* 2018, *39*, 136–159.
- [165] Huang, Y., Jansen, O., Frédérick, M., Mouithys-Mickalad, A., Nys, G., Servais, A. C., Crommen, J., Jiang, Z., Fillet, M. *J. Sep. Sci.* 2019, *42*, 609–618.
- [166] Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. *Principles of instrumental analysis*, 6th ed., Saunder College, 1998.
- [167] Frenz, J., Hancock, W. S. *Trends Biotechnol.* 1991, *9*, 243–250.
- [168] Landers, J. P. *Handbook of capillary electrophoresis*, 2nd editio., CRC Press, 1996.
- [169] Holland, L. A., Chetwyn, N. P., Perkins, M. D., Lunte, S. M. *Pharm. Res.* 1997, *14*,

372–387.

- [170] Tůma, P., Opekar, F. *Anal. Sep. Sci.* 2015, 607–628.
- [171] Kanchi, S., Sagrado, S., Sabela, M., Bisetty, K. *Capillary Electrophoresis Trends and Developments in Pharmaceutical Research*, 1st ed., Jenny Stanford Publishing, Boca Raton, 2017.
- [172] Terabe, S. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2009, 2, 99–120.
- [173] Terabe, S. *Chem. Rec.* 2008, 8, 291–301.
- [174] Guillaume, Y. C., Peyrin, E., Pharmacie, D., Saint-jacques, P. 1999, 71, 2046–2052.
- [175] Parmar, V., Patel, G., Abu-thabit, N. Y. *Responsive cyclodextrins as polymeric carriers for drug delivery applications*, Elsevier Ltd., 2018.
- [176] Poole, C. F. *The essence of chromatography*, 1st ed., Elsevier Science, Amsterdam, 2003.
- [177] Dong, M. W. *Modern HPLC for practicing scientists*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2006.
- [178] Moldoveanu, S., David, V. *Essentials in modern HPLC separations*, Elsevier, 2013.
- [179] Lough, W. J., Wainer, I. W. *High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice.*, Chapman and Hall, London, 1995.
- [180] McPolin, O. *An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis*, Mourne Training Services, 2009.
- [181] NIKI, E., WATANABE, N. *J. Japan Oil Chem. Soc.* 1980, 29, 278–284.
- [182] Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., Segura-Carretero, A. *Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, 2018.
- [183] Gilbert, M. T. *High Performance Liquid Chromatography*, Wright, 1987.
- [184] Flanagan, R. J., Taylor, A., Watson, I. D., Whelpton, R. *Fundamentals of Analytical Toxicology*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
- [185] Smith, R. W. *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition*, 2nd ed., Elsevier Ltd., 2013.

- [186] Trugo, L., Finglas, P. M. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, Academic Press, 1995, Vol. 67.
- [187] Hocart, C. H. *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, 2010.
- [188] Kaufmann, A. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 1st ed., Elsevier B.V., 2012, Vol. 58.
- [189] Campmajó, G., Núñez, N., Núñez, O. *Mass Spectrometry - Future Perceptions and Applications.*, IntechOpen, 2019.
- [190] Horwitz, W., Latimer, G. W., AOAC International 2007 *Official methods of analysis of AOAC International*, 18th ed., Gaithersburg, MD : AOAC International, 2007, 2005.
- [191] Singleton, V. L., Rossi, J. A., Jr, *J. Am. J. Enol. Vitic.* 1965, 16, 144–158.
- [192] Stavrou, I. J., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Electrophoresis* 2013, 34, 524–530.
- [193] Acosta, G., Linares, D., Olsina, R., Martí, L. D. 2006, 847–852.
- [194] Palmer, J., Atkinson, S., Yoshida, W. Y., Stalcup, A. M., Landers, J. P. *Electrophoresis* 1998, 19, 3045–3051.
- [195] Stauffer, E., Dolan, J., Newman, R. *Fire Debris Analysis*, Academic Press, 1919.
- [196] Stauffer, M. *Calibration and Validation of Analytical Methods A Sampling of Current Approaches*, IntechOpen, 2018, Vol. 55.
- [197] Aguilar-Hernández, G., De Lourdes García-Magaña, M., De los Ángeles Vivar-Vera, M., Sáyago-Ayerdi, S. G., Sánchez-Burgos, J. A., Morales-Castro, J., Anaya-Esparza, L. M., González, E. M. *Molecules* 2019, 24, 1–15.
- [198] Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C. G., Barbero, G. F. *Food Chem.* 2017, 219, 23–32.
- [199] Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., Abdul Hamid, A. *Food Chem.* 2016, 206, 156–166.
- [200] Martínez-Patiño, J. C., Gullón, B., Romero, I., Ruiz, E., Brnčić, M., Žlabur, J. Š., Castro, E. *Ultrason. Sonochem.* 2019, 51, 487–495.
- [201] Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., McHugh, T. H. *Ultrason. Sonochem.* 2012, 19, 365–372.

- [202] Şahin, S., İlbay, Z., Kırbaşlar, İ. *Chem. Eng. Commun.* 2018, 205, 717–726.
- [203] Terblanche, U., Semakalu, C., Mtunzi, F., Pillay, M. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 2017, 9, 303–312.
- [204] Antony, J. *A Systematic Methodology for Design of Experiments*, Second Edi., Elsevier Ltd, 2014.
- [205] Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., Mafra, L. *I. Food Chem.* 2014, 149, 151–158.
- [206] Prasad, K. N., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., Ismail, A. *Sep. Sci. Technol.* 2012, 47, 2417–2423.
- [207] Mahindrakar, K. V., Rathod, V. K. *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 2020, 149, 107841.
- [208] Brás, T., Paulino, A. F. C., Neves, L. A., Crespo, J. G., Duarte, M. F. *Ind. Crops Prod.* 2020, 150, 112395.
- [209] Jovanović, A. A., Đorđević, V. B., Zdunić, G. M., Pljevljakušić, D. S., Šavikin, K. P., Gođevac, D. M., Bugarski, B. M. *Sep. Purif. Technol.* 2017, 179, 369–380.
- [210] Ismail, B. B., Guo, M., Pu, Y., Wang, W., Ye, X., Liu, D. *Ultrason. Sonochem.* 2019, 52, 257–267.
- [211] Zhou, Y., Zheng, J., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., Li, H. *Molecules* 2017, 22, 1–13.
- [212] Zeng, W., Li, F., Wu, C., Ge, Y., Yu, R., Wu, X., Shen, L., Liu, Y., Li, J. *Sep. Sci. Technol.* 2020, 55, 728–738.
- [213] Xu, Y. Y., Qiu, Y., Ren, H., Ju, D. H., Jia, H. L. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2017, 47, 312–321.
- [214] Chavan, Y., Singhal, R. S. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2013, 17, 106–113.
- [215] Ahmad, A. L., Derek, C. J. C., Zulkali, M. M. D. 2008, 62, 702–708.
- [216] Liu, Y., Wei, S., Liao, M. *Ind. Crop. Prod.* 2013, 49, 837–843.
- [217] Garcia-castello, E. M., Rodriguez-lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., Cassano, A. *LWT - Food Sci. Technol.* 2015, 64, 1114–1122.
- [218] He, B., Zhang, L., Yue, X., Liang, J., Jiang, J., Gao, X., Yue, P. 2016, 204, 70–76.

- [219] Luo, X., Cui, J., Zhang, H., Duan, Y., Zhang, D., Cai, M., Chen, G. *Ind. Crop. Prod.* 2018, *112*, 296–304.
- [220] Pingret, D., Bourvellec, C. Le, Renard, C. M. G. C., Chemat, F. *J. Food Eng.* 2012, *111*, 73–81.
- [221] Virot, M., Tomao, V., Bourvellec, C. Le, Renard, C. M. C. G., Chemat, F. *Ultrason. - Sonochemistry* 2010, *17*, 1066–1074.
- [222] Xu, D., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., Li, H. 2017, *217*, 552–559.
- [223] Balachandran, S., Kentish, S. E. 2006, *13*, 471–479.
- [224] Oniszczuk, A., Podgórski, R., Oniszczuk, T., Zukiewicz-Sobczak, W., Nowak, R., Waksmundzka-Hajnos, M. *Ind. Crops Prod.* 2014, *61*, 377–381.
- [225] Ouzounidou, G., Vekiari, S., Asfi, M., Gork, M. G., Sakcali, M. S., Ozturk, M. *Pakistan J. Bot.* 2012, *44*, 1689–1695.
- [226] Benchikh, Y., Louailèche, H. *Acta Bot. Gall.* 2014, *161*, 175–181.
- [227] Sebai, H., Souli, A., Chehimi, L., Rtibi, K., Amri, M. *J. Med. Plants Res.* 2013, *7*, 85–90.
- [228] Qasem, M. A., Noordin, M. I., Arya, A., Alsalahi, A., Jayash, S. N. *PeerJ* 2018, *2018*, 1–27.
- [229] Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., Monzani, A. *J. Food Compos. Anal.* 1997, *10*, 166–172.
- [230] Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. *J. Food Compos. Anal.* 2007, *20*, 125–132.
- [231] Li, P., Li, S. P., Wang, Y. T. *Electrophoresis* 2006, *27*, 4808–4819.
- [232] Beckers, J. L., Boček, P. *Electrophoresis* 2003, *24*, 518–535.
- [233] Nicolaou, I. N., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Electrophoresis* 2010, *31*, 3895–3902.
- [234] Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Garrison, A. W., Freitag, D., Kettrup, A. *Anal. Chem.* 1998, *70*, 3798–3808.
- [235] Zhang, Z., Zhang, F., Liu, Y. *J. Chromatogr. Sci.* 2013, *51*, 666–683.
- [236] Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F., Smith, F. P. *Forensic Sci. Int.* 1998, *92*, 75–

- [237] Kok, W. *Instrumental Developments*, 2000.
- [238] Česla, P., Fischer, J., Jandera, P. *Electrophoresis* 2010, *31*, 2200–2210.
- [239] Cucinotta, V., Messina, M., Contino, A., Maccarrone, G., Orlandini, S., Giuffrida, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, *145*, 734–741.
- [240] Fejős, I., Kalydi, E., Malanga, M., Benkovics, G., Béni, S. *J. Chromatogr. A* 2020, *1627*, 461375.
- [241] Zhao, M., Cui, Y., Yu, J., Xu, S., Guo, X. *J. Sep. Sci.* 2014, *37*, 151–157.
- [242] Hui, B. Y., Raoov, M., Zain, N. N. M., Mohamad, S., Osman, H. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2017, *47*, 454–467.
- [243] Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borràs, E., Arola, L. *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 7143–7172.
- [244] Wang, S. P., Huang, K. J. *J. Chromatogr. A* 2004, *1032*, 273–279.
- [245] Franquet-Griell, H., Checa, A., Núñez, O., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Puignou, L. *J. Agric. Food Chem.* 2012, *60*, 8340–8349.
- [246] Herrero-Martínez, J. M., Oumada, F. Z., Rosés, M., Bosch, E., Ràfols, C. *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 2493–2500.
- [247] Gatea, F., Teodor, E. D., Matei, A. O., Badea, G. I., Radu, G. L. *Food Anal. Methods* 2015, *8*, 1197–1206.
- [248] Jerman Klen, T., Mozetič Vodopivec, B. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 12725–12731.
- [249] Michalkiewicz, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K. *J. Chromatogr. A* 2008, *1187*, 18–24.
- [250] Kyratzis, A. C., Antoniou, C., Papayiannis, L. C., Graziani, G., Roupheal, Y., Kyriacou, M. C. *Front. Plant Sci.* 2021, *11*, 1–19.
- [251] Abrankó, L., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, *403*, 995–1006.
- [252] Liu, Y., Ma, S. S., Ibrahim, S. A., Li, E. H., Yang, H., Huang, W. *Food Chem.* 2015, *185*, 159–164.

- [253] Ben Ayache, S., Reis, F. S., Inês Dias, M., Pereira, C., Glamočlija, J., Soković, M., Behija Saafi, E., C. F. R. Ferreira, I., Barros, L., Achour, L. *Food Chem.* 2021, 351.
- [254] Benković, M., Belščak-Cvitanović, A., Bauman, I., Komes, D., Srećec, S. *Food Res. Int.* 2017, 100, 211–218.
- [255] Brahim, E. B. 2017.
- [256] Albertos, I., Jaime, I., María, A., Gonz, L., Rico, D. 2015, 64, 650–656.
- [257] Rico, D., Martín-Diana, A. B., Martínez-Villaluenga, C., Aguirre, L., Silván, J. M., Dueñas, M., De Luis, D. A., Lasa, A. *Heliyon* 2019, 5.
- [258] Boublenza, I., Lazouni, H. A., Ghaffari, L., Ruiz, K., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F. *J. Food Qual.* 2017, 2017.
- [259] Eldeeb, G. S. S., Mosilhey, S. H. *J. Food Sci. Technol.* 2021.
- [260] Şahin, H., Topuz, A., Pischetsrieder, M., Özdemir, F. *Eur. Food Res. Technol.* 2009, 230, 155–161.
- [261] Van Rijs, P., Fogliano, V. *Food Funct.* 2020, 11, 5924–5932.