

ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

«Υγρό χρυσάφι», κατά τον Όμηρο. «Ίαμα», το αναφέρει ο Ασκληπιός.

Ανάγκη για ακριβή έλεγχο Υπεροξειδίων.

Με την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή

<< Τεχνολογίες αυτοματοποίησης στον ποιοτικό έλεγχο ελαιολάδου >>

Προτείνουμε

Αλλαγή τεχνολογίας



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τεχνολογίες αυτοματοποίησης στον ποιοτικό έλεγχο ελαιολάδου.

ΓΚΛΙΑΤΗΣ Σ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Θέμα

Τεχνολογίες αυτοματοποίησης στον ποιοτικό έλεγχο ελαιολάδου.

ΓΚΛΙΑΤΗΣ Σ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΦΥΣΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Θέμα

Τεχνολογίες αυτοματοποίησης στον ποιοτικό έλεγχο ελαιολάδου.

ΓΚΛΙΑΤΗΣ Σ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΦΥΣΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Κωνσταντίνος Α. Γεωργίου, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Μόσχος Γ. Πολυσίου, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Σέρκος Α. Χαρουτουιάν, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καλλιέργεια της ελιάς υφίσταται από τα πανάρχαια χρόνια , κυρίως στις περιοχές γύρω από τη λεκάνη της μεσογείου , προσέφερε και προσφέρει ένα από τα βασικότερα είδη διατροφής του ανθρώπου και συνδέθηκε με όλους τους πολιτισμούς που αναπτύχθηκαν σε αυτές. Το ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε σε ποικίλες χρήσεις πέρα από την διατροφή αποτελώντας την βασική καύσιμη-φωτιστική ύλη ήταν από τα λίγα γνωστά φαρμακευτικά μέσα για πολλούς αιώνες.

«Υγρό χρυσάφι», κατά τον Όμηρο.

«Ταμα», το αναφέρει ο Ασκληπιός.

Με την πάροδο του χρόνου παρουσία παραγόντων όπως η υγρασία , η θερμοκρασία , τα ένζυμα , οι μικροοργανισμοί , τα μέταλλα απελευθερώνονται λιπαρά οξέα από τα γλυκερίδια με αποτέλεσμα την υδρόλυση του ελαιολάδου . Γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα αρχικά την αύξηση της οξύτητας, στην συνέχεια την αύξηση του αριθμού υπεροξειδίων , ακολουθούμενη από την αύξηση κετονών , αλδευδών με τελικό αποτέλεσμα την αλλαγή της γεύσης , του αρώματος και τελικά την υποβάθμιση της ευεργετικής αξίας του , στον ανθρώπινο οργανισμό. Προφανώς οι παραπάνω αλλοιώσεις έχουν αρνητική επίπτωση και στην της εμπορική του αξία. Γεγονός το οποίο καθιστά απαραίτητο τον έλεγχο της οξειδωτικής κατάστασης του ελαιολάδου κατά την διάρκεια της παραγωγής , αποθήκευσης , τυποποίησης και διακίνησης του.

Η επίσημη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων είναι χρονοβόρα με παραγωγικότητα μονοψήφιου αριθμού αναλύσεων

ανά βάρδια, γίνεται δια χειρός (υποκειμενικότητα) , μεγάλη κατανάλωση σε οργανικούς διαλύτες (10 ml χλωροφόρμιο , 15 ml οξικού οξέος) ανά προσδιορισμό τιμής υπεροξειδίων .

Με σκοπό την βελτίωση των παραπάνω χαρακτηριστικών της επίσημης μεθόδου δημιουργείται η αναγκαιότητα αυτοματοποίησης αναλυτικών μεθόδων ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση μεγάλου αριθμού αναλύσεων σε μικρό χρονικό διάστημα , με τρόπο φιλικότερο (120 μL οξικού οξέος , 300 μL κ-προπανόλης ανά μέτρηση) προς το περιβάλλον , και μέγιστη αξιοπιστία .Στην παρούσα διατριβή περιγράφεται η ανάπτυξη και εφαρμογή της μέτρησης της τιμής των υπεροξειδίων στο ελαιόλαδο και εν δυνάμει και σε άλλες λιπαρές ουσίες με την χρήση αναλυτών προηγμένης ιατρικής τεχνολογίας. Στους συγκεκριμένους αναλυτές όλα τα στάδια της ανάλυσης , δειγματοληψία , φωτομέτρηση , ανάλυση δεδομένων και τελικά υπολογισμός των αποτελεσμάτων γίνονται με πλήρως αυτοματοποιημένο τρόπο μέσω εντολών ηλεκτρονικού υπολογιστή , προσδίδοντας άριστη ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Οι βιοχημικοί αναλυτές διαθέτουν τα πλεονεκτήματα της ευκολίας στην χρήση , μεγάλης ταχύτητας αναλύσεων .

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία περιλαμβάνει τις ακόλουθες ενότητες :

(α) Σχεδιασμός πρωτοκόλλου μέτρησης τιμής υπεροξειδίων σε Βιοχημικό αναλυτή (Κεφάλαιο 3) .

Προκαταρκτικοί έλεγχοι αντοχής εξοπλισμού στην επαφή με τα απαιτούμενα αντιδραστήρια της συγκεκριμένης μεθόδου . Έγινε έλεγχος αντοχής ελέγχθηκε της κυψελίδας , των σωληνώσεων , και των δειγματοληπτών όπου και τα αποτελέσματα ήταν θετικά .

Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου :

Βελτιστοποίηση : όγκου δείγματος , μήκους κύματος μέτρησης , συγκέντρωσης Ιωδιούχου Νατρίου , ανάδευσης , χρόνου επώασης.

(β) Επικύρωση πρωτοκόλλου (Κεφάλαιο 4) :

Προετοιμασία δειγμάτων παραλαβή προτύπων δειγμάτων , ανάλυση με την επίσημη μέθοδο , βαθμονόμηση με χρήση δειγμάτων ελαιολάδου , ανάλυση των δειγμάτων με την αυτοματοποιημένη μέθοδο , Συσχέτιση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων .

(γ) Επικύρωση μεθόδου (Κεφάλαιο 5) :

Προσδιορισμός Ακρίβειας (Accuracy), Επαναληψιμότητας (Repeatability) , Αναπαραγωγιμότητας Reproducibility , Ανιχνευσιμότητας Detectability μεθόδου .

Συμπέρασμα :

Τα αποτελέσματα είναι πλήρως συμβατά με την επίσημη μέθοδο , αφού η προτεινόμενη μέθοδος τυποποιήθηκε (βαθμονομήθηκε) με πραγματικά δείγματα αναλυμένα με την επίσημη μέθοδο εξαλείψαμε το φαινόμενο μήτρας (matrix effect). Επίσης η επαλήθευση-επικύρωση της μεθόδου η οποία έγινε σύμφωνα με τα πρότυπα του Ελληνικού Κειμένου Κοινοτικής Οδηγίας (2002/657/EK) είχε άριστα αποτελέσματα . Τέλος , τα χαρακτηριστικά της μεθόδου επιδέχονται βελτίωση με αύξηση του όγκου του δείγματος. Αυτό είναι φανερό από την μελέτη επαναληψιμότητας που έγινε για την μέτρηση του όγκου (πίνακας 16) όπου φαίνεται ότι με αύξηση του όγκου από 7 μL , που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία προσδιορισμού του Α.Υ., σε 9 μL η επαναληψιμότητα βελτιώνεται από 0,6% σε 0,2% CV.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ/ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Βιοχημικοί Αναλυτές , Αριθμός Υπεροξειδίων , Ελαιόλαδο , Αυτοματοποίηση , Αριθμός π-ανισιδίνης , ελεύθερες ρίζες , αυτοξειδωση .

ABSTRACT

The cultivation of olive trees existed since ancient times, especially in areas around the Mediterranean basin, and has offered one of the main foods of man and connected

with all the cultures that developed them. To oil used in a variety of uses beyond the diet being the major fuel-lighting material was one of the few known pharmaceutical agents for many centuries.

"Liquid gold" by Homer.

'Fix', mentions Asclepius.

With the passage of time in the presence of factors such as humidity, temperature, enzymes, microorganisms, metals released fatty acids from the glycerides resulting hydrolysis of olive oil. Which leads initially acidification, then the increase of the peroxide, followed by increased ketones, aldehydes and ultimately change the taste, aroma and ultimately degrade the beneficial value of, the human body. Obviously the above changes have negative impact in the commercial value. Which makes it necessary to control the oxidation state of the oil during the production, storage, and handling of standardization. The formal method used for the determination of the peroxide is time consuming with low productivity few analyzes per shift, are manually (subjective), large consumption of organic solvents (10 ml chloroform, 15 ml acetic acid) by determining peroxide value. In order to improve the above features of the official method creates the need for automation of analytical methods to parse large number of tests in little time, with friendly manner (acetic acid 120 μ L, 300 μ L propanol per measurement) to the environment, and maximum reliability. This thesis describes the development and application of measuring the peroxide value of the oil and potentially in other fat using advanced medical technology analysts. In these analyzers all stages of analysis, sampling, metering, data analysis, and finally calculates the results are fully automated through command computer, giving excellent accuracy and repeatability. Biochemical analyzers have the advantages of ease of use, high speed analysis. This research paper includes the following sections:

(A) Design Protocol measuring peroxide value in biochemistry analyzer (Chapter 3).

Preliminary checks resistance equipment in contact with the reagents required with this method. Were checked, the cell strength was tested, pipework and samplers where the results were positive.

Optimizing Protocol:

Optimization: sample volume, measurement wavelength, concentration sodium iodide, stirring, time of incubation.

(B) Validation Protocol (Chapter 4):

Sample preparation standards receipt samples analyzed by the official method, calibration using olive oil samples, analysis of samples by the automated method, Correlation results of the two methods.

(C) Validation method (Chapter 5):

Determination of Precision (Accuracy), Repeatability ,Reproducibility, Detectability of the method.

Conclusion:

The results are fully compatible with the official method, since the proposed method was standardized (calibrated) with real samples analyzed by the official method eliminated the effect matrix. Also verification-validation of the method was in accordance with the standards of Greek texts EU Directive (2002/657/EC) had excellent results. Finally, the characteristics of the method can be improved by increasing the sample volume. This is evident from the study repeatability done to measure the volume (Table 16) showing that increased volume of 7 μL , used in this work determining A.Y., 9 μL repeatability is improved CV from 0.6% to 0,2% .

SCIENTIFIC AREA / KEYWORDS

Biochemical, Peroxide, Olive, Automation, numbers, p-anisidine, free radicals, autoxidation.

Στους ανθρώπους που με στήριξαν :

Στις κόρες μου Κατερίνα και Δέσποινα , οι οποίες είχαν την υπομονή και την κατανόηση για τον χρόνο που δεν αφιέρωσα μαζί τους αλλά στο ταξίδι της γνώσης... αποτέλεσαν για εμένα πηγή έμπνευσης και ενέργειας ώστε να συνεχίσω να βαδίζω το εξελικτικό μονοπάτι.....Keep improving...

Στους Γονείς μου Σπύρο και Αικατερίνη , οι οποίοι με δίδαξαν την αξία της ζωής
ΚΑΙ ΗΤΑΝ ΠΑΝΤΑ ΔΙΠΛΑ ΜΟΥ ΣΤΙΣ ΔΥΣΚΟΛΕΣ ΣΤΙΓΜΕΣ .

Τη σύζυγο μου Ελεονώρα , η οποία με στήριξε ώστε να ανταπεξέλθω στις δυσκολίες τις καθημερινότητας μου .

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Γεωργίου τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την πολύτιμη καθοδήγησή του, τις συμβουλές και υποδείξεις κατά τη διάρκεια της διατριβής καθώς , για την μετάδοση του επιστημονικού τρόπου σκέψης.

Τον συνεργάτη και προϊστάμενο μου Γιάννη Πρατικάκη για την ευελιξία που μου παρείχε στην αλλαγή βάρδιας όταν αυτό χρειαζόταν .

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ Λεωνίδα Ν. Σκευάκη Ιατρό Μικροβιολόγο για την παροχή του εξοπλισμού για την υλοποίηση των πειραμάτων .

1.1. Ιστορική αναδρομή.....	1
1.2. Γενικές αρχές λειτουργίας Βιοχημικών αναλυτών.....	3
1.2.1. Τεχνικές υπολογισμού.....	3
1.2.2. Μήκη κύματος	5
1.2.3. Ομογενής ετερογενής.....	5
1.2.4. Τρόπος φόρτωσης.....	5
1.3. Κατηγορίες Αναλυτών.....	5
1.3.1. Υγρής και ξηράς.....	6
1.3.2. Κυψελίδες μιας χρήσης ή πολλαπλών.....	7
1.3.3. Ανοιχτού και κλειστού.....	8
1.3.4. Μικρής , μεσαίας και μεγάλης παραγωγικότητας	8
1.3.5. Αρθρωτοί , ολοκληρωμένοι , απλοί.....	9
1.4 Τεχνικές Ανάλυσης	
1.4.1. Φασματοφωτομετρία.....	10
1.4.2. Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης.....	14
1.4.3. Φλογοφωτομετρία.....	15
1.4.4. Φθορισμομετρία – Φωταύγεια	16
1.4.5. Θολοσιμετρία – Νεφελομετρία	20
1.4.6. Ηλεκτροχημεία.....	25
1.6. Οργανολογία	
1.6.1. Σύστημα διαχείρισης αντιδραστηρίων.....	26
1.6.2 . Σύστημα διαχείρισης Δειγμάτων.....	27
1.6.3. Λυχνίες παραγωγής φάσματος.....	27
1.6.4. Ανιχνευτές.....	28
1.7. Βιολογικά υγρά.....	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

2.1. Ιστορική αναδρομή.....	30
2.2. Σύσταση Ελαιολάδου	
2.2.1. Λιπαρά οξέα.....	31
2.2.2. Κατανομή λιπαρών οξέων στα γλυκερίδια του ελαιολάδου....	32
2.2.3. Μη γλυκεριδικά συστατικά του ελαιολάδου.....	34
2.2.4. Κυριότερα ασαπονωποίητα συστατικά του ελαιολάδου.....	34
2.2.5. Αρωματικά συστατικά του ελαιολάδου.....	35
2.2.6. Καροτενοειδείς χρωστικές	35
2.2.7. Μη γλυκεριδικοί εστέρες λιπαρών οξέων.....	36
2.2.8. Δι-υδρόξυ-τριτερπενικές αλκοόλες.....	37
2.2.9. Τοκοφερόλες.....	37
2.2.10. Φαινόλες.....	38
2.2.11. Φωσφολίποειδή.....	39
2.2.12. Χρωστικές.....	39
2.5. Κατηγορίες ελαιολάδου και πυρηνελαίου.....	41
2.5.1. Ελαιόλαδο.....	41
2.5.2. Παρθένο ελαιόλαδο	41
2.5.3. Ραφινρισμένο ελαιόλαδο.....	42
2.5.4. Πυρηνέλαιο.....	42
2.5.5. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο.....	43
2.5.6. Ραφινρισμένο πυρηνέλαιο.....	43

2.7. Μηχανισμός οξείδωσης.....	45
2.7.1. Έναρξη.....	45
2.7.2. Διάδοση.....	46
2.7.3. Τερματισμός.....	46
2.8. Προϊόντα διάσπασης των υπεροξειδίων.....	47
2.8.1. Μέθοδοι μέτρησης οξειδωτικού ταγγισμού.....	47
2.8.2. Αριθμός π-ανισιδίνης.....	47
2.8.3. Δοκιμή θειοβερβιτουρικού οξέος (αριθμός TBA).....	48
2.8.4. Απορρόφηση στο UV.....	49
2.9 Βιολογικές και θρεπτικές ιδιότητες ελαιολάδου.....	50

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΟΥ

3.1. Προτεινόμενη μέθοδος	
3.1.1. Πρωτόκολλο προτεινόμενης μεθόδου.....	52
3.1.2. Επιλογή μεθόδου Ιωδομετρία.....	52
3.1.3. Αντιδραστήρια.....	53
3.1.4. Περιγραφή λειτουργίας του αναλυτή.....	54
3.1.5. Πλεονεκτήματα της προτεινόμενης μεθόδου.....	54
3.2. Προσδιορισμός υπεροξειδίων μεθοδολογία.....	56
3.3. Προκαταρτικοί έλεγχοι	
3.3.1. Έλεγχος επαναληψιμότητας μέτρησης του όγκου.....	57
3.3.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας κυψελίδας στα αντιδραστήρια.....	60
3.4 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου.....	60
3.4.1. Βελτιστοποίηση όγκου δείγματος.....	62
3.4.2. Βελτιστοποίηση μήκους κύματος μέτρησης.....	65

3.4.3. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης Ιωδιούχου Νατρίου.....	65
3.4.4. Βελτιστοποίηση ανάδευσης.....	68
3.4.5. Βελτιστοποίηση χρόνου επώασης.....	69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

4.1. Επίσημη μέθοδος	
4.1.1. Τιτλοδότηση με την επίσημη μέθοδο.....	72
4.1.2. Προσδιορισμός υπεροξειδίων επίσημη μέθοδος.....	74
4.2. Βαθμονόμηση.....	75
4.3. Ανάλυση δειγμάτων.....	77
4.4. Σύγκριση μεθόδων.....	77
4.4.1. Συσχέτιση.....	77
4.4.2. Δοκιμή F test.....	79
4.4.3. Δοκιμή t test.....	81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

5.1. Επικύρωση μεθόδου	
5.1.1. Ακρίβεια Accuracy.....	84
5.1.2. Επαναληψιμότητα Repeatability.....	84
5.1.3. Αναπαραγωγιμότητα Reproducibility.....	85

5.1.4. Ανιχνευσιμότητα Detectability.....	88
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1. Πρωτοτυπία μεθόδου.....	90
6.2. Πλεονεκτήματα της μεθόδου.....	90
Βιβλιογραφία.....	92
Παράρτημα.....	95

Σκοπός Πτυχιακής εργασίας

Ο σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής είναι η ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης μεθόδου προσδιορισμού υπεροξειδίων στο ελαιολάδου επεκτάσιμη και σε άλλες λιπαρές ύλες με την μέθοδο της ιωδομετρίας . Η μέθοδος είναι μία προσαρμογή της επίσημης μεθόδου της COMMISSION REGULATION (EEC) No 2568/913.2 βασισόμενη στην μέθοδο προσδιορισμού η οποία αναπτύχθηκε από τους Panayotis G. Nourou, Constantinos A. Georgiou x , Moschos G. Polissiou. (1998).

Η προτεινόμενη μέθοδος έχει πολλαπλάσια παραγωγικότητα σε σχέση με τις υπάρχουσες μεθόδους , είναι φιλική προς το περιβάλλον , απλή στον χειρισμό .

Μα αυτόν τον τρόπο πιστεύουμε ότι μπορούμε να συνεισφέρουμε στο πεδίο της έρευνας , παρέχοντας στους ερευνητές μία ταχύτατη , εύχρηστη , χαμηλότερου

κόστους ανάλυσης σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες , υψηλής πιστότητας μέθοδο ανίχνευσης του αριθμού των υπεροξειδίων σε λιπαρές ουσίες. Καθιστώντας δυνατή την δυνατότητα ανάλυσης του αριθμού των υπεροξειδίων και σε δείγματα με ελάχιστο διαθέσιμο όγκο, όπως εκχυλίσματα ανθρώπινων ιστών , εκχυλίσματα τροφίμων .Η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος είναι μόλις μερικά 50 μL . , από αυτά, τα 48 μL μπορεί να ανακτηθούν . Επίσης δύναται η δυνατότητα σε εταιρείες τροφίμων για τακτικότερο , μεθοδικότερο , ακριβέστερο και οικονομικότερο έλεγχο , των λιπαρών υλών .

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

1.1. Ιστορική αναδρομή

Κλινική χημεία είναι ο κλάδος της ιατρικής επιστήμης ο οποίος ασχολείται με την ανάλυση των βιολογικών υλικών , συνήθως των υγρών του σώματος , προσφέροντας διαγνωστικές πληροφορίες για την κατάσταση του ανθρωπίνου σώματος .

Κτηνιατρική κλινική χημεία είναι ένας κλάδος της κλινικής χημείας η οποία έχει εφαρμογή στα ζώα .

Τον 16^ο αιώνα αναπτύχθηκαν συγκεκριμένες δοκιμασίες για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης, ουρίας , κρεατίνινης , ολικών λευκωμάτων , σφαιρινών και ορισμένων βασικών ενζύμων οι οποίες αποτέλεσαν ακρογωνιαίο λίθο της κλινικής χημείας .Το πρώτο χρωματόμετρο εφευρέθηκε από τον Jules Duboscq το 1870 .Οι χημικές αντιδράσεις μεταξύ του αναλύτη και του αντιδραστήριου που κατείχε κάποιο βαθμό εξειδίκευσης χρησιμοποιήθηκαν με την τελική χρωματομετρική μέτρηση και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη με την χρήση προτύπου καμπύλης. Οι περισσότερες αντιδράσεις ήταν σχετικά αδρανείς και η απαίτηση σε όγκους δείγματος ήταν σχετικά υψηλή .

Η εισαγωγή των ενζύμων ως αντιδραστήρια και η χρήση τους υπεριώδους μήκους κύματος αύξησαν την ευαισθησία , μείωσαν τον απαιτούμενο όγκο δείγματος . Η χρήση της ουρεάσης , οποία μετατρέπει την ουρία σε ιόν του αμμωνίου , εισήχθη στις αρχές του 1914 . Το 1949 , ο Ötjan Ouchterlony χρησιμοποίησε αντιγόνα ως αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό ανοσολογικών μεθόδων . Το 1968 ο Norman Anderson , κατασκεύασε ένα αναλυτή ο οποίος ήταν ο πρώτος αναλυτής ο οποίος συνεργαζόταν με ηλεκτρονικό υπολογιστή . Το 1974 εισήχθη στην αγορά ο πρώτος αυτόματος αναλυτής , ο οποίος είχε την δυνατότητα μέτρησης ορμονών , πρωτεϊνών και φαρμάκων . Στην συνέχεια η εξέλιξη ήταν ραγδαία όπου στις μέρες μας έχουμε πλήρως αυτοματοποιημένους αναλυτές , όπου η δειγματοληψία του δείγματος και του αντιδραστήριου γίνεται αυτόματα . Η μετάδοση των εξετάσεων και των

αποτελεσμάτων γίνεται αυτόματα. Οι αναλυτές ελέγχουν την καταλληλότητα των δειγμάτων ως προς το ιξώδες τους , θολερότητα τους , ύπαρξη ετεροφυλικών αντισωμάτων [1]. Η παραγωγικότητα μπορεί να φτάσει έως χιλιάδες αναλύσεις ανά ώρα . Υπάρχουν ενσωματωμένα συστήματα ποιοτικού ελέγχου.



Εικόνα 1 . Το κλινικό χημικό εργαστήριο τότε και τώρα . A. Τότε όλες οι αναλύσεις γίνονταν δια χειρός . B) Σύγχρονο κλινικό χημικό εργαστήριο με αυτόματους βιοχημικούς αναλυτές .

1.2. Γενικές αρχές λειτουργίας Βιοχημικών αναλυτών

Οι βιοχημικοί αναλυτές πραγματοποιούν αυτόματη ανάγνωση του γραμμικού κώδικα του υποδοχέα δείγματος λαμβάνοντας τις πληροφορίες του δείγματος αυτόματα από το σύστημα μηχανοργάνωσης του εργαστηρίου . Ελέγχουν την επάρκεια δείγματος στον αντίστοιχο υποδοχέα δείγματος , στην συνέχεια με αυτόματο τρόπο μεταφέρουν στην κυψελίδα αντιδραστήρια και δείγμα σε μικροποσότητες όπως αυτές ορίζονται από το πρωτόκολλο της ανάλυσης . Η μίξη του διαλύματος γίνεται αυτόματα. Με χρήση καμπύλης αναφοράς μετατρέπει την απορρόφηση σε συγκέντρωση.

1.2.1. Τεχνικές υπολογισμού

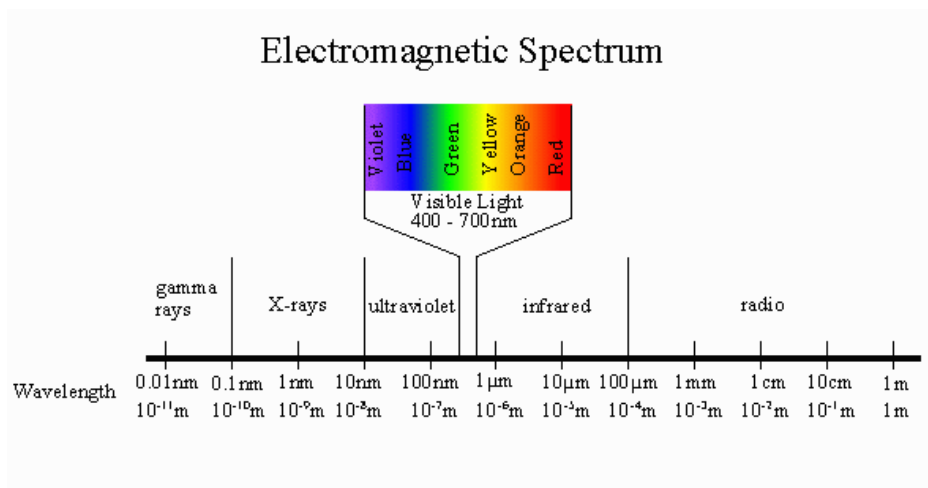
Τελικού σημείου ονομάζονται οι τεχνικές όπου η συγκέντρωση υπολογίζεται από την απορρόφηση η οποία μετριέται σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή έπειτα από την προσθήκη του αντιδραστήριου. Κινητικές ονομάζονται οι τεχνικές με τις οποίες η συγκέντρωση ή η ενεργότητα ενός ενζύμου υπολογίζεται με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων από τον ρυθμό μεταβολής της απορρόφησης ανά μονάδα χρόνου μεταξύ δύο σημείων.

1.2.2. Μήκη κύματος

Μήκη κύματος : Υπεριώδες , ορατό , εγγύς υπέρυθρο .**Φάσμα απορρόφησης:** Η απεικόνιση της απορρόφησης ή της διαπερατότητας της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος λ_{max} : Το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, χαρακτηριστικό για κάθε ένωση .



Εικόνα 2. λmax: Το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης



Εικόνα 3. Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Μονοχρωματικές είναι οι τεχνικές κατά τις οποίες χρησιμοποιείται ένα μήκος κύματος για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης, διχρωματικές είναι οι τεχνικές κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται δύο μήκη κύματος για τον υπολογισμό του αποτελέσματος.

1.2.3. Ομογενής ετερογενής

Ομογενείς χαρακτηρίζονται οι μεθοδολογίες όπου η μέτρηση γίνεται χωρίς να χρειάζεται διαχωρισμός του συμπλόκου αναλύτη – αντιδραστηρίου , ετερογενείς είναι οι μέθοδοι όπου χρειάζεται ο διαχωρισμός του συμπλόκου αναλύτη – αντιδραστηρίου πριν την μέτρηση .

1.2.4. Τρόπος φόρτωσης

Μία σημαντική παράμετρος της των αναλυτών κλινικής χημείας είναι ο τρόπος φόρτωσης των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων , βάση της οποίας κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες :

Συνεχούς φόρτωσης είναι οι αναλυτές με δυνατότητα προσθήκης νέων δειγμάτων ή αντιδραστηρίων εν ώρα ανάλυσης .

Μη συνεχούς φόρτωσης στους συγκεκριμένους αναλυτές η προσθήκη νέων δειγμάτων ή αντιδραστηρίων μπορεί να γίνει μόνο σε κατάσταση αναμονής δηλαδή όταν δεν εκτελούν αναλύσεις .

1.3. Κατηγορίες Αναλυτών

Οι αναλυτές έχουν ενσωματωμένες διάφορες τεχνικές .Χρησιμοποιούν υγρά ή στερεά αντιδραστήρια , κυψελίδες μιας χρήσεως ή πολλαπλών , παρέχουν στον χειριστή την δυνατότητα προγραμματισμού πρωτοκόλλων αναλύσεων ή έχουν μόνο ενσωματωμένα . Επίσης υπάρχουν μικρής ,μεγάλης παραγωγικότητας καλύπτοντας ολόκληρο το φάσμα των εργαστηρίων . Μπορεί να είναι μόνοι τους ή να είναι ενσωματωμένοι σε συστήματα αυτοματισμού .

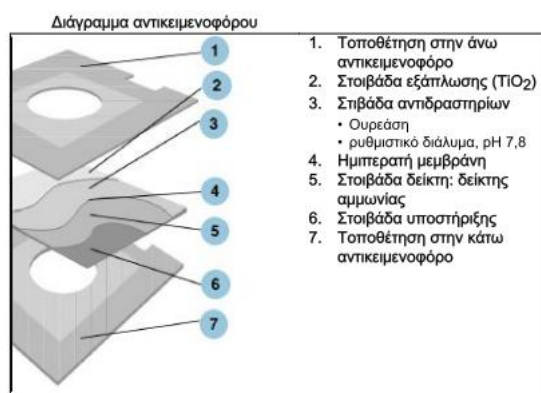
1.3.1. Υγρής και ξηράς

Οι αναλυτές αναλόγως με την μορφή των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούν μπορούν να διακριθούν σε αναλυτές υγρής χημείας . Αναλυτές υγρής χημείας είναι οι αναλυτές που χρησιμοποιούν υγρά αντιδραστήρια τα οποία μεταφέρονται με τους δειγματολήπτες των αντιδραστηρίων σε ειδικές κυψελίδες όπου αντιδρούν με τον αναλύτη του δείγματος όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση η παραγωγή του προϊόντος και η μέτρηση.



Εικόνα 4. Κυψελίδα φωτομέτρησης

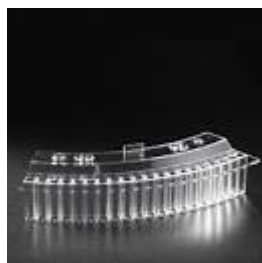
Αναλυτές ξηράς χημείας είναι οι αναλυτές που χρησιμοποιούν λυοφιλοποιημένα αντιδραστήρια ως κυψελίδες αντίδρασης και μέτρησης είναι ο ίδιος ο αντικειμενοφόρος ο οποίος φέρει τα αντιδραστήρια η μέτρηση γίνεται με την αρχή της ανακλαστικής φασματοσκοπίας .



Εικόνα 5. Κυψελίδα αντίδρασης ξηράς χημείας

1.3.2. Κυψελίδες μιας χρήσης ή πολλαπλών

Κυψελίδες είναι μικρά δοχεία τα οποία χρησιμοποιούνται τα δείγματα προς ανάλυση στο φασματοφωτόμετρο. Οι κυψελίδες μπορεί να είναι , τετράγωνες , καμπυλωτές , κατασκευασμένες από γυαλί , χαλαζία , ή πλαστικές . Υπάρχουν αναλυτές που χρησιμοποιούν κυψελίδες μιας χρήσης για μία μόνο μέτρηση η οποία απορρίπτεται και ανανεώνεται αυτόματα από ειδικό σύστημα φόρτωσης κυψελίδων . Πλεονέκτημα δεν υπάρχει πιθανός παράγοντας επιμόλυνσης μειονέκτημα κόστος , ταχύτητα. Αναλυτές με πλενόμενες κυψελίδες (κυβέτες) διαδικασία αυτόματη από τον ίδιο αναλυτή με ειδικά απορρυπαντικά και υγρά εγκλιματισμού των κυψελίδων . Οι κυψελίδες μετά από κάθε πλύση ελέγχονται φωτομετρικά από τον αναλυτή οπότε και επαναχρησιμοποιούνται έως ότου κριθούν ακατάλληλες . Πλεονέκτημα ταχύτητα , κόστος . Μειονέκτημα πολυπλοκότητα συστήματος πλυσίματος , πιθανότητα επιμολύνσεων . Τέλος υπάρχουν και οι αναλυτές οι οποίοι επιλεκτικά για ευαίσθητες εξετάσεις χρησιμοποιούν καινούργιες κυψελίδες ενώ για λιγότερο ευαίσθητες εξετάσεις επαναχρησιμοποιούν πλαινόμενες κυψελίδες .



Εικόνα 6. Κυψελίδες [30]

1.3.3. Ανοιχτού και κλειστού

Ανοιχτού τύπου χαρακτηρίζονται οι αναλυτές των οποίων το λογισμικό επιτρέπει στον χειριστή προγραμματίζει οποιοδήποτε πρωτόκολλο ανάλυσης ενώ παράλληλα είναι εφικτή η χρήση οποιουδήποτε αντιδραστηρίου .

Αντίθετα κλειστού τύπου είναι οι αναλυτές των οποίων το λογισμικό δεν επιτρέπει στον χειριστή τον προγραμματισμό πρωτοκόλλου ανάλυσης. Επιπλέον τα αντιδραστήρια που δέχεται είναι συγκεκριμένα με κρυπτογραφημένο γραμμικό κώδικα καθώς και συγκεκριμένη συσκευασία γεγονός που καθιστά αδύνατη την εισαγωγή άλλων αντιδραστηρίων .

Μία ενδιαμέση κατηγορία είναι εκείνη η οποία δίνει την δυνατότητα της εισαγωγής ενός συγκεκριμένου αριθμού πρωτοκόλλων αναλύσεων από τον χειριστή με ταυτόχρονη χρήση αντιδραστηρίων της επιλογής του .

1.3.4. Μικρής , μεσαίας και μεγάλης παραγωγικότητας

Ανάλογα με την ταχύτητα των αναλυτών η οποία ορίζεται ως ο αριθμός αναλύσεων ανά ώρα που μπορούν να εκτελεστούν κατατάσσονται σε αναλυτές μικρής παραγωγικότητας έως 400 αναλύσεις ανά ώρα , μεσαίας παραγωγικότητας έως 900 αναλύσεις ανά, μεγάλης παραγωγικότητας άνω των 900 αναλύσεων ανά ώρα καλύπτοντας τις ανάγκες μικρών εργαστηρίων , ερευνητικών ιδρυμάτων έως κεντρικών εργαστηρίων μεγάλων μονάδων υγείας .

1.3.5 Αρθρωτοί , ολοκληρωμένοι , απλοί



Εικόνα 7. Αρθρωτός αναλυτής [34]

Αρθρωτοί είναι οι αναλυτές οι οποίοι αποτελούνται από περισσότερους του ενός αναλυτές συνδεδεμένους εξασφαλίζοντας μεγάλη ταχύτητα ,κοινό σημείο φόρτωσης ευρεία γκάμα εξετάσεων ειδικά στις περιπτώσεις όπου είναι συνδεδεμένοι διαφορετικού τύπου αναλυτές . Οι αρθρωτοί αναλυτές είναι κατάλληλοι για μεγάλα εργαστήρια .



Εικόνα 8 . Ολοκληρωμένος (integrated) αναλυτής

Ολοκληρωμένοι αναλυτές είναι οι αναλυτές οι οποίοι εκτός των κοινών τεχνικών δηλαδή της φασματοφωτομετρίας και ποντεσιομετρίας έχουν ενσωματωμένες

πιπλέον όπως χημιφωταύγεια ,θφορισμομετρία και άλλες , οπότε είναι σε θέση να εκτελούν μεγάλη ποικιλία εξετάσεων .



Εικόνα 9 . Απλός Βιοχημικός αναλυτής.

Απλοί ονομάζονται οι αναλυτές οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να εκτελούν εξετάσεις με τις κοινές μεθόδους της φασματοφωτομετρίας και ποντεσιομετρίας .

1.4. Τεχνικές ανάλυσης .

1.4.1. Φασματοφωτομετρία

Οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές βασίζονται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να εκπέμπουν ή να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες συγκεκριμένων συχνοτήτων . Η απορρόφηση ορατής η υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων της εξωτερικής στοιβάδας .

Φασματοφωτομετρία είναι η μέτρηση της έντασης φωτός σε επιλεγμένο μήκος κύματος . Οι σύγχρονοι αναλυτές απομονώνουν ένα στενό εύρος μήκους κύματος του φάσματος για μέτρηση. Οι αναλυτές χρησιμοποιούν φωτομετρικά φίλτρα ,

χρησιμοποιώντας πρίσματα ή φράγματα τα οποία ονομάζονται φασματοφωτόμετρα . Η κύρια λειτουργία των φωτομετρικών φίλτρων ή των φασματοφωτομέτρων είναι η απομόνωση και η χρήση διακριτού τμήματος του φάσματος για μέτρηση . Η ενέργεια μεταδίδεται μέσω ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων τα οποία χαρακτηρίζονται από την συχνότητα και το μήκος κύματος. Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία περιλαμβάνει ακτινοβολία η οποία εκτείνεται από τις κοσμικές ακτίνες με μικρό μήκος κύματος όπως 10^{-9} nm μέχρι τα ράδιο κύματα πάνω από 1000 Km . Στους αναλυτές χρησιμοποιούν ακτινοβολία από το ορατό έως το υπεριώδες (290 -800 nm) . Επιπλέον το φως συμπεριφέρεται ως διακριτά πακέτα ενέργειας τα οποία καλούνται φωτόνια των οποίων η ενέργεια είναι αντιστρόφως ανάλογη του μήκους κύματος.

Σχέση ανάμεσα στην Απορρόφηση και στην διαπερατότητα [2].

Όταν μία προσπίπτουσα ακτίνα φωτός με ένταση I_0 περάσει μέσα από μία κυψελίδα η οποία περιέχει ένα διάλυμα μίας ουσίας η οποία απορροφά φως συγκεκριμένου μήκους κύματος λ , η ένταση της μεταδιδόμενης ακτίνας φωτός I_s είναι μικρότερη από το I_0 οπότε η διαπερατότητα του φωτός (T) ορίζεται ως $T = I_s / I_0$. Κάποιο μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ενδέχεται να διαθλασθεί από ή απορροφηθεί από το τοίχωμα της κυψελίδας ή από τον διαλύτη . Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να εξαλειφτούν χρησιμοποιώντας μία κυψελίδα αναφοράς η οποία είναι ίδια με την κυψελίδα του δείγματος . Η διαπερατότητα μέσω (T) μέσω της κυψελίδας αναφοράς I_R και διαιρείται από την I_0 . Στην πράξη η κυψελίδα αναφοράς εισάγεται και ο αναλυτής ρυθμίζεται σε μία αυθαίρετη κλίμακα 100 (Αντιστοιχεί το 100% της διαπερατότητας) μετά από αυτό το ποσοστό της διαπερατότητας που μετρείται οφείλεται στο δείγμα . Σε άλλες περιπτώσεις οι αναλυτές μετρούν την διαπερατότητα της κυψελίδας , με άδεια , με τον διαλύτη , και μετά με τον αναλύτη. Η ποσότητα φωτός που απορροφήθηκε (A) από την προσπίπτουσα ακτινοβολία στο δείγμα είναι ίση με :

$$A = -\log \frac{I_s}{I_R} = -\log T$$

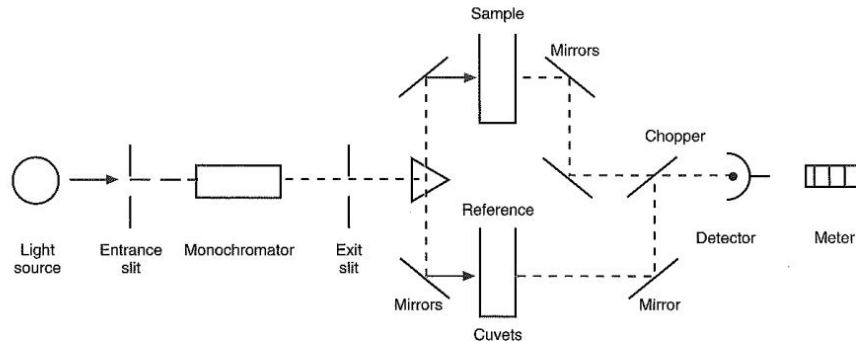


Figure 4-5 Double-beam-in-time spectrophotometer.

Εικόνα 10 . Σχηματική διάταξη φωτόμετρου

Νόμος του Beer .

Σύμφωνα με τον νόμο του Beer η συγκέντρωση μιας ουσίας είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του φωτός που απορροφάται ή αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου της διαπερατότητας . Η μαθηματική έκφραση του νόμου του Beer εκφράζεται ως :

$$A = \epsilon bc \quad \text{ή} \quad A = abc$$

Όπου :

A = Απορρόφηση

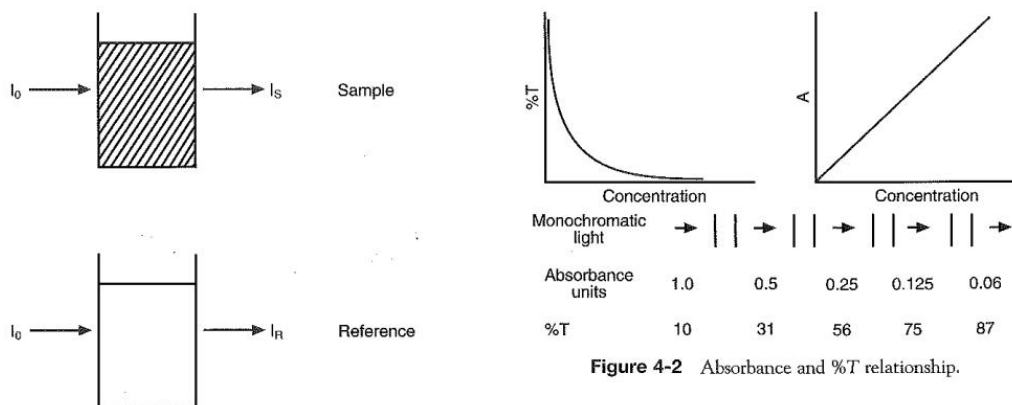
ϵ = συντελεστής μοριακής απορρόφηση (molar absorptivity), όταν η συγκέντρωση c εκφράζεται σε mol/L

a = απορροφητικότητα όταν, όταν η συγκέντρωση c εκφράζεται σε gr/L.

b = το μήκος της κυβελίδας σε εκατοστά

c = η συγκέντρωση του αναλύτη.

Η σχέση $A = \epsilon bc$ αποτελεί την βάση της ποσοτικής ανάλυσης η οποία βασίζεται φωτομετρία απορρόφησης. Η τιμή του ϵ και του a είναι σταθερές για συγκεκριμένη ουσία σε συγκεκριμένο μήκος κύματος κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως θερμοκρασίας ,τύπου διαλύτη, PH .



Εικόνα 11 . Σχηματική απεικόνιση συγκέντρωσης σε σχέση με απορρόφηση ,διαπερατότητας

Εφαρμογή του νόμου του Beer .

Στην πράξη η αναλογικότητα μεταξύ της απορρόφησης και της συγκέντρωσης δημιουργείται πειραματικά στον συγκεκριμένο αναλυτή κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Συχνά η γραμμική σχέση υφίσταται μέχρι μίας συγκεκριμένης απορρόφησης ή συγκέντρωσης. Σύμφωνα με αυτούς τους περιορισμούς πρέπει να δημιουργηθεί μία καμπύλη αναφοράς η οποία θα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ενός άγνωστου δείγματος .

$$\varepsilon = \frac{A}{dc} \quad \text{οπότε} \quad \frac{A_1}{b_1 c_1} = \frac{A_2}{b_2 c_2}$$

Επειδή το μήκος της κυψελίδας είναι ίδιο σε όλες τις μετρήσεις

$$\frac{A_1}{c_1} = \frac{A_2}{c_2} \Rightarrow \frac{A_c}{c_c} = \frac{A_u}{c_u} \quad \text{όπου } c = \text{βαθμονομητής, } u = \text{άγνωστο.}$$

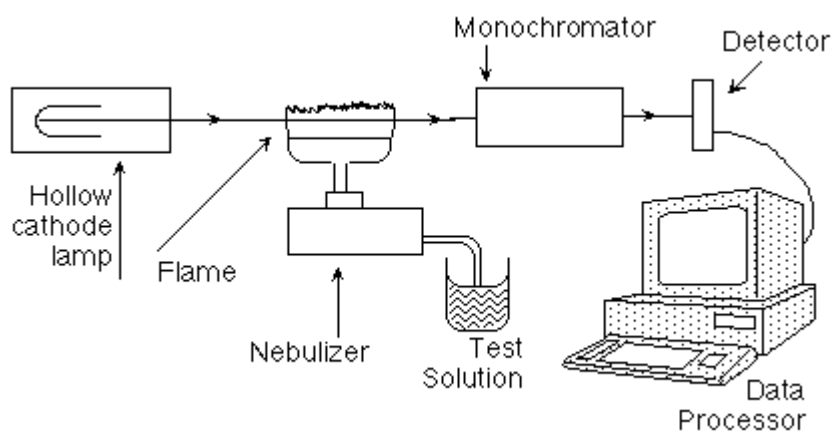
$$\frac{A_c}{c_c} = \frac{A_u}{c_u} \Rightarrow c_u = \frac{A_u}{A_c} \times c_c \Rightarrow c_u = A_u \times \frac{c_c}{A_c} = A_u \times K$$

Η τιμή K είναι σταθερή και υπολογίζεται από την απορρόφηση A_c του βαθμονομητή γνωστής συγκέντρωσης c_c . Για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς χρειάζονται τουλάχιστον δύο σημεία βαθμονομητή.

Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

1.4.2. Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης

Ανάλυση χημικών στοιχείων - αλκαλικών μετάλλων (ιχνοστοιχείων), π.χ. Zn σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Προσδιορισμός συγκέντρωσης (σε διάλυμα) ή περιεκτικότητας (στερεό δείγμα) Καθοδική λυχνία με αργό ή νέο: του στοιχείου που πρόκειται να ανιχνευθεί Καυστήρας: Φλόγας ή χωρίς φλόγα (καυστήρας γραφίτη) Μονοχρωμάτορας Ανιχνευτής



Εικόνα 12. Σχηματική διάταξη αναλυτή φασματοφωτομετρικής απορρόφησης.

Η φλόγα / φούρνος γραφίτη δίνει θερμική ενέργεια στο δείγμα (μετά από εξαέρωση) Διασπώνται οι χημικοί δεσμοί του μετάλλου (ατομοποίηση). Βρίσκεται σε **σταθερή μη διεγερμένη** ενεργειακή κατάσταση Τα άτομα του στοιχείου απορροφούν ακτινοβολία από καθοδική λυχνία στοιχείου ίδιου με το υπό εξέταση [32].

$$A = \text{σταθερή } C = \epsilon \times C, \text{ όπου } \chi = \text{μήκος καυστήρα.}$$

1.4.3. Φλογοφωτομετρία

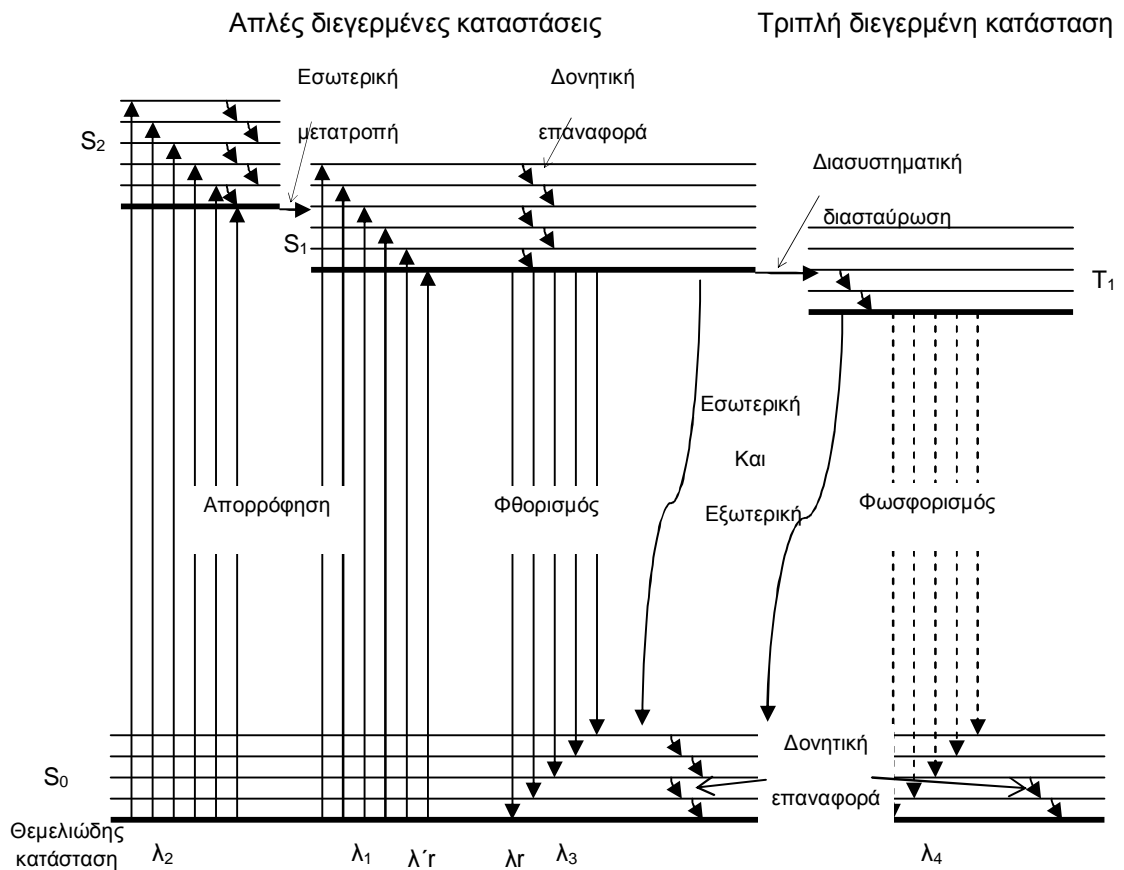
Η φασματοφωτομετρία εκπομπής φλόγας βασίζεται στην εκπομπή φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος αρκετών μεταλλικών στοιχείων όπως K, Na, Ca, Li, Mg όταν τους δίνεται συγκεκριμένη ενέργεια μέσω ζεστής φλόγας . Τα λίθιο παράγει κόκκινο χρώμα , το νάτριο κίτρινο , το κάλιο ιώδες , το ρουμπίνιο κόκκινο , και το μαγνήσιο μπλε όταν αυτά καίγονται. Τα παραπάνω χρώματα είναι χαρακτηριστικά για τα κατιόντα μετάλλων σε διάλυμα [33].

Μέρη: Νεφελοποιητής, καυστήρας, οπτικό σύστημα, ανιχνευτή .

Διαφορές από φασματομετρία ατομικής απορρόφησης .

- Τα άτομα των στοιχείων είναι διεγερμένα (εκπέμπουν)
- Φλόγα χαμηλής θερμοκρασίας, η οποία αντικαθιστά τη φωτεινή πηγή
- Φίλτρα για μονοχρωμάτορες
- Χαμηλού κόστους αναλυτές

1.4.4. Φθορισμομετρία – Φωταύγεια



Φωταύγεια: Εκπομπή φωτός ή ακτινοβολίας όταν ένα ηλεκτρόνιο επιστρέφει από ένα υψηλό επίπεδο ενέργειας σε χαμηλότερο επίπεδο ενέργειας.

Φθορισμομετρία

Ο φθορισμός είναι ένα φυσικοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένες ουσίες, μετά από διέγερση, εκπέμπουν ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας ένα άτομο ή μόριο το οποίο φθορίζει ονομάζεται φθοριοθόρο. Η φθορισμομετρία είναι πολύ ευαίσθητη μέθοδος και χρησιμοποιείται

για τον ποσοτική ανάλυση βιολογικών παραγόντων στην αναλυτική χημεία και στην βιοχημεία .

Σχέση συγκέντρωσης με την ένταση φθορισμού .

Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη και της έντασης της φθορισμομετρικής εκπομπής προέρχεται από τον νόμο των Beer-Lambert και εκφράζεται ως :

$$F = \Phi I_0 abc$$

Σχέση 4. Σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης αναλύτη και της έντασης της φθορισμομετρικής εκπομπής .

Όπου :

F = σχετική ένταση

Φ = φθορισμομετρική επάρκεια (όπως ο λόγος μεταξύ του κβάντου ακτινοβολίας προσπίπτοντος φωτός και του κβάντου της ακτινοβολίας η οποία απορροφάται).

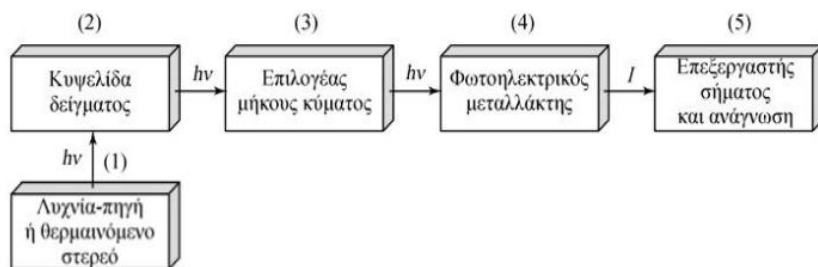
I_0 = αρχική ενέργεια διέγερσης .

a = συντελεστής γραμμομοριακής απορρόφησης .

b = όγκος στοιχείου ο οποίος προσδιορίζεται από την γεωμετρία της σχισμής εκπομπής και λήψης.

c = συγκέντρωση σε mol/L.

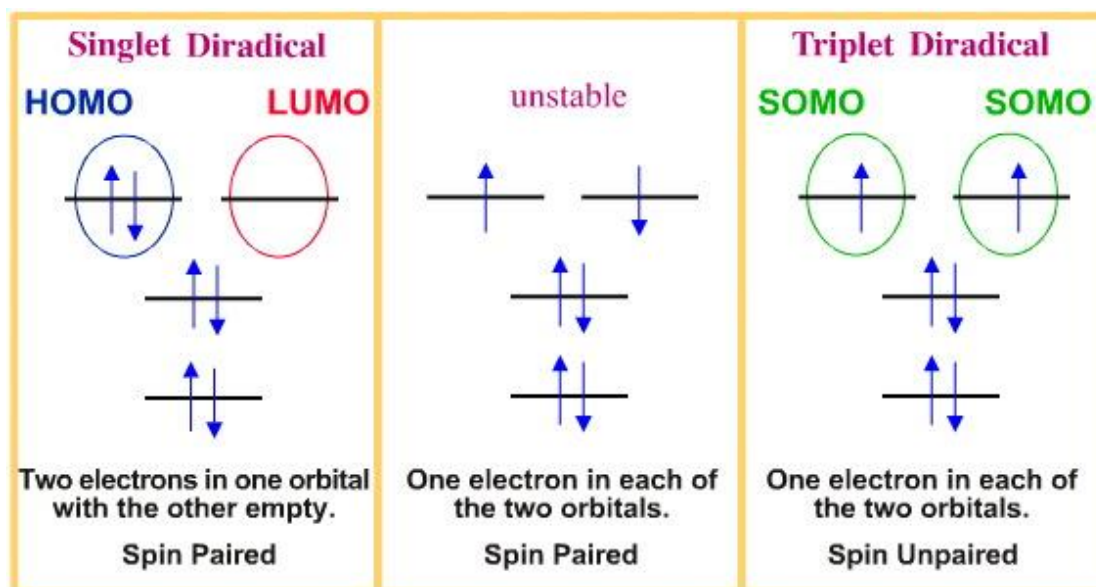
Η σχέση 4 ισχύει σε αραιά διαλύματα όπου η απορρόφηση της ακτινοβολίας είναι λιγότερο από το 2% της ακτινοβολίας διέγερσης διαφορετικά η σχέση δεν είναι γραμμική το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εσωτερική δράση φίλτρου (inner filter effect)[2] .



Εικόνα 13. Διάταξη φθορισμού .

Φωταύγεια

Φωταύγεια ονομάζεται είναι το φαινόμενο όπου κάποιες ουσίες εκπέμπουν λόγω διέγερσης από χημικούς παράγοντες , βιοχημικούς , ή λόγω ηλεκτροχημικών αντιδράσεων . Οι αναλυτές οι οποίοι μετρούν τον συγκεκριμένο τύπο ακτινοβολίας ονομάζονται αναλυτές φωταύγειας . Αρχή λειτουργίας : Η εκπομπή φωτός στην φωταύγεια , χημειοφωταύγεια και ηλεκτροχημειοφωταύγεια συμβαίνει όταν τα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στην θεμελιώδη κατάσταση από διεγερμένη μονή κατάσταση (singlet state) .



Εικόνα 14 . Θεμελιώδης και διεγερμένη κατάσταση ατόμων

Χημειοφωταύγεια

Χημειοφωταύγεια είναι η εκπομπή ακτινοβολίας όταν ένα ηλεκτρόνιο επιστρέφει από υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο σε χαμηλότερο . Όταν η διέγερση συμβαίνει λόγω χημικής αντίδρασης συγκεκριμένα λόγω οξειδωσης ενός οργανικού μορίου όπως λουμινόλης , ισολουμινόλης , εστέρα ακριδίνης , λουσιφερλίνη από οξειδωτικά μέσα όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου ,υποχλωριώδη ,ή οξυγόνο , η παραπάνω αντίδραση λαμβάνει χώρα παρουσία καταλυτών όπως ένζυμα (αλκαλική φωσφατάση,υπεροξειδάσης του χρένου , μικρουπεροξειδάση) , μεταλικών ιόντων ή μεταλλικών συμπλόκων (όπως Cu^{2+} , Fe^{3+}) και αίμης .

Βιοχημειοφωταύγεια

Η βιοχημειοφωταύγεια είναι μία ειδική χημειοφωταύγεια η συμβαίνει στα βιολογικά συστήματα . Στην βιοχημειοφωταύγεια κάποιο ένζυμο ή φωτοπρωτεΐνη αυξάνουν την ικανότητα της βιοχημειοφωταύγειας . Οι τεχνικές της χημειοφωταύγειας έχουν μεγάλη ευαισθησία [2].

Ηλεκτοχημειοφωταύγεια

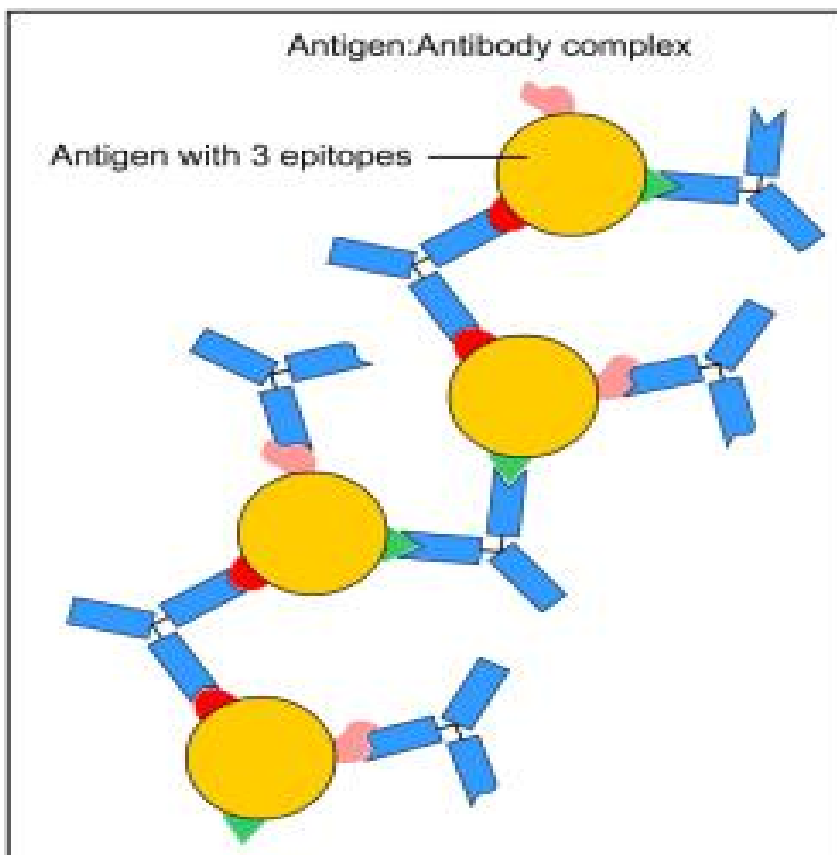
Η ηλεκτοχημειοφωταύγεια διαφέρει από την Χημειοφωταύγεια στο γεγονός ότι στην ηλεκτοχημειοφωταύγεια η αντίδραση χημειοφωταύγειας δημιουργείται ηλεκτροχημικά με την βοήθεια ηλεκτροδίων[2] .

1.4.5. Θολοσιμετρία – Νεφελομετρία

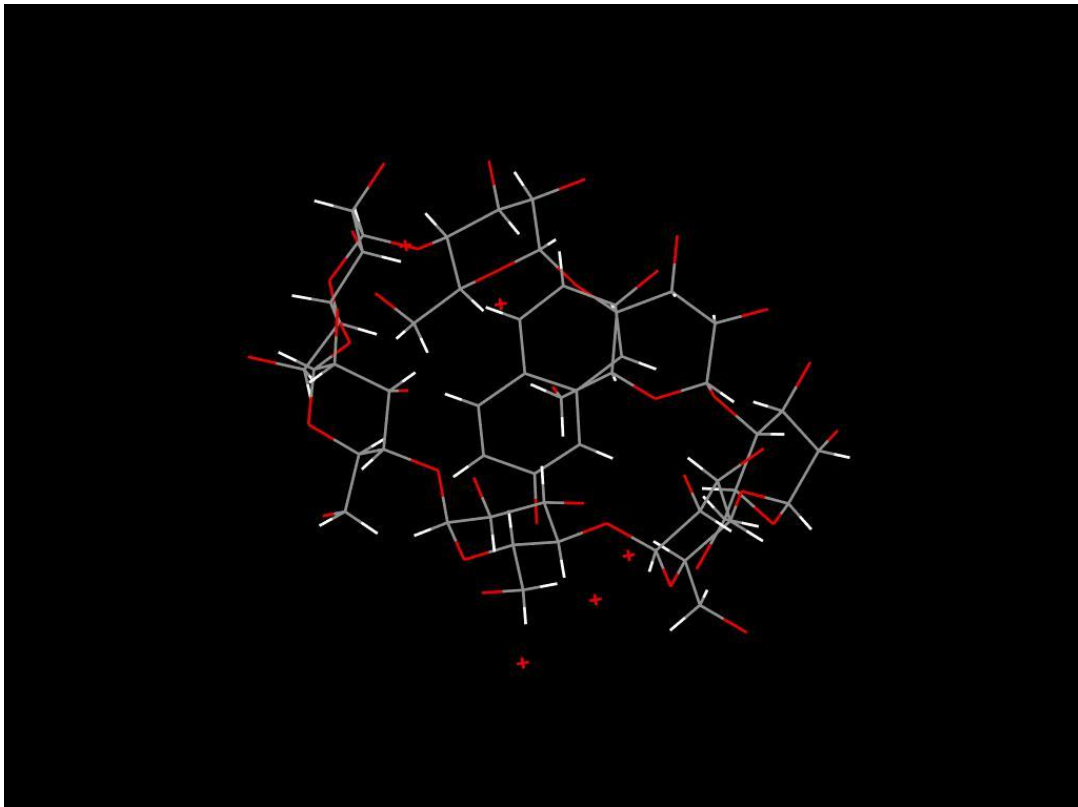
Βασική αρχή

Το φως σκεδάζεται όταν ακτινωτό φως περάσει μέσα από διάλυμα το οποίο συναντά μόρια με τα οποία έχει ελαστική σύγκρουση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την σκέδαση του φωτός προς όλες τις κατευθύνσεις. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την σκέδαση είναι το μήκος του σωματιδίου, η απόσταση παρατήρησης, πολωμένο, μη πολωμένο φως, συγκέντρωση σωματιδίων, μοριακό βάρος σωματιδίων του διαλύματος.

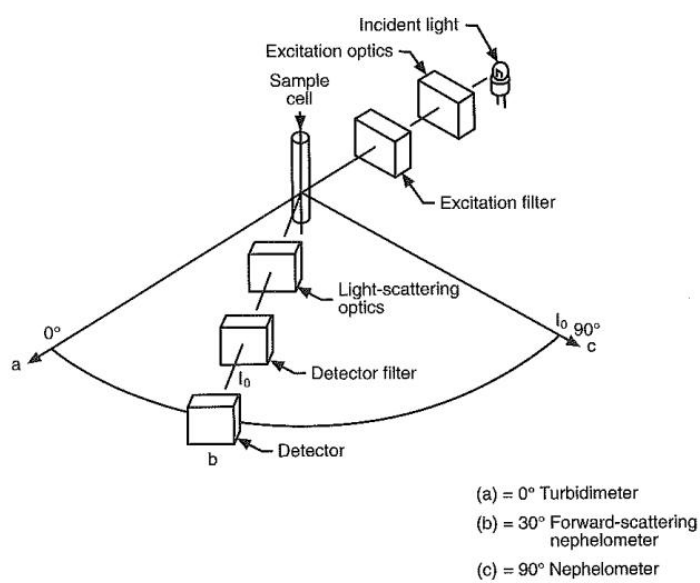
Η μέτρηση του σκεδαζομένου φωτός από σύμπλοκο μεταξύ αντιγόνου αντισώματος (εικόνα 15) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ανοσολογικών προσδιορισμών πρωτεϊνών.



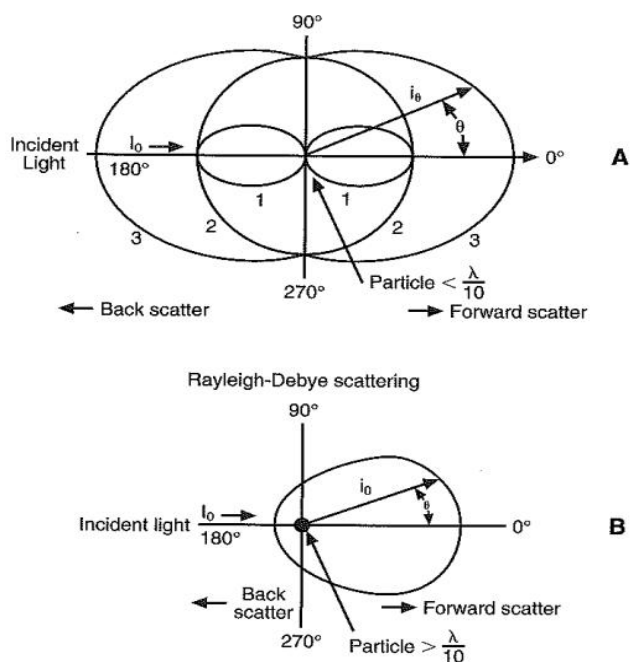
Εικόνα 15 . Σύμπλοκο αντιγόνου αντισώματος .



Εικόνα 16. *cyclodextrin-2,7-dihydroxy-naphthalene-4,6 H₂O* Στερεοχημική απεικόνιση υποστρώματος – προσδέτη .



Εικόνα 17. (a) Θολοσίμετρο (b) Νεφελόμετρο γωνία παρατήρησης 30° (c) Νεφελόμετρο γωνία παρατήρησης 90°



Εικόνα 18 (A). Η γωνία σκέδασης του φωτός για μικρά σωματίδια εξαρτάται από το πολωμένο και το μη πολωμένο προσπίπτων φως .

Εικόνα 18 (B). Η γωνία σκέδασης του για μεγαλύτερα σωματίδια εξαρτάται από το πολωμένο προσπίπτων φως .

Το 1871 Λόρδος Rayleigh διατύπωσε την παρακάτω ισότητα (Σχέση 1) η οποία υποδεικνύει την σχέση μεταξύ της έντασης I_s της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και της έντασης I_o της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η ισότητα αναφέρεται σε σωματίδια τα οποία έχουν πολύ μικρότερες διαστάσεις από αυτές του μήκους κύματος μικρότερη από $\lambda/10$. Όταν οι διαστάσεις των σωματιδίων τα οποία σκεδάζουν το προσπίπτων φως είναι πολύ μικρότερες από το μήκος κύματος του ,τότε όλα τα σωματίδια η υποβάλλονται στην ίδια ηλεκτρική ισχύ πεδίου ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα το σκεδαζόμενο κύμα φωτός από όλα τα σωματίδια να είναι σε φάση και να ενισχύει το ένα το άλλο . Όταν τα σκεδάζοντα σωματίδια είναι μεγαλύτερα από το προσπίπτων μήκος κύματος φωτός τα σκεδαζόμενα

μήκη κύματος δεν είναι σε φάση και έχουμε καταστροφική συμβολή στην ένταση του σκεδαζόμενου μήκους κύματος [2].

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{16\pi^2 \alpha \sin^2 \theta}{\lambda^4 r^2}$$

Σχέση 1

Όπου :

I_s = η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας

I_0 = ένταση του φωτός διέγερσης .

α = πολωσιμότητα των σωματιδίων .

θ = γωνία παρατήρησης .

λ = μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας .

r = απόσταση της σκεδαζόμενης ακτίνας από τον ανιχνευτή.

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{4\pi^2 (dn/dc)^2 M c \sin^2 \theta}{N_a \lambda^4 r^2}$$

Σχέση 2. Επίδραση των παραγόντων της συγκέντρωσης και μοριακού βάρους των σκεδαζόντων σωματιδίων στην σκεδαζόμενη ακτινοβολία .

Όπου I_s = η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από διεγερμένα σωματίδια από πολωμένο φως .

I_0 = η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας .

M = μοριακό βάρος (g/mol)

C = συγκέντρωση (g/mL) των σκεδαζόντων μορίων .

θ = γωνία παρατήρησης .

dn/dc = η αλλαγή στον δείκτη διάθλασης του διαλύτη σε σχέση με την αλλαγή

N_a = Αριθμός Avogadro

λ = μήκος κύματος προσπίπτουσας ακτινοβολίας .

r = απόσταση της σκεδαζόμενης ακτίνας από τον ανιχνευτή.

Θολοσιμετρία

Θολοσιμετρία ορίζεται η μέθοδος όπου γίνεται μέτρηση της ελάττωσης της έντασης του φωτός που διέρχεται μέσα από εναιώρημα, λόγω σκεδασμού, υπό γωνία 180°, σε φασματοφωτόμετρο. Η μέτρηση της μείωσης της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ονομάζεται θολοσιμετρία. Ανάλογα όπως ορίζεται η απορρόφηση στην φασματομετρία, ορίζεται η θολερότητα στην θολοσιμετρία ως :

$$I = I_0 e^{-bt} \quad \text{ή} \quad t = \frac{1}{b} \ln \frac{I_0}{I}$$

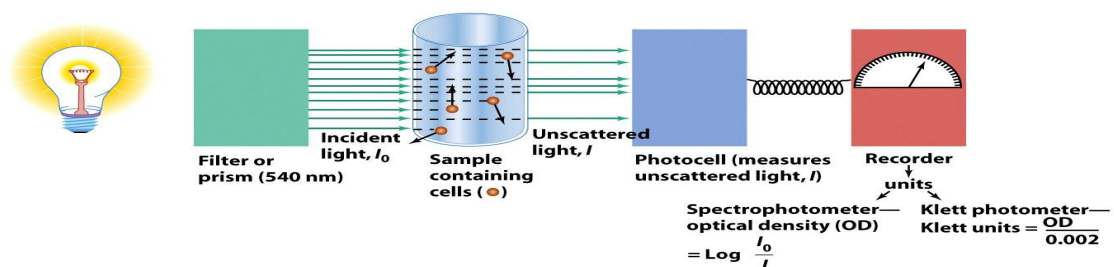
Όπου :

T = θολερότητα.

b = το μήκος της διαδρομής της προσπίπτουσας ακτίνας στο διάλυμα του σκεδάζοντος σωματιδίου.

I = ένταση προσπίπτοντος φωτός.

I_0 = σκεδαζόμενου φωτός .



Εικόνα 19 . Σχηματική απεικόνιση θολοσιμέτρου

Μέθοδος εκλογής για δείγματα με έντονη θολερότητα, που τα αιωρούμενα σωματίδια έχουν μεγάλο μέγεθος σε σχέση με το μήκος κύματος του ορατού φωτός, π.χ. κύτταρα, ανοσοσυμπλέγματα, κλπ.

Νεφελομετρία

Νεφελομετρία ορίζεται η μέτρηση της ενέργειας του φωτός που σκεδάζεται ή ανακλάται υπό γωνία του προσπίπτοντος φωτός, όταν αυτό διέρχεται μέσα από εναιώρημα. Τα νεφελόμετρα μετρούν το σκεδαζόμενο φως σε συγκεκριμένη γωνία σε σχέση με το προσπίπτον φως .

Μήκος κύματος διεγερόμενου = Μήκος κύματος ανιχνευόμενου

Μέθοδος εκλογής για δείγματα, σχετικά διαυγή, στα οποία αιωρούμενα σωματίδια έχουν μικρό μέγεθος σε σχέση με το μήκος κύματος του ορατού φωτός, π.χ. - προσδιορισμός φαρμάκων, π.χ. αντιεπιληπτικά, λιδοκαΐνη, γενταμυκίνη (+ φάση σύνδεσης με λευκωματίνη) -ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών στον ορό, π.χ.. σερουλοπλασμίνη, apoB, C3, C4, τρανσφερρίνη, αλβουμίνη, κ.α. Είναι πιο ειδική από τη θολοσιμετρία .

1.4.6. Ηλεκτροχημεία

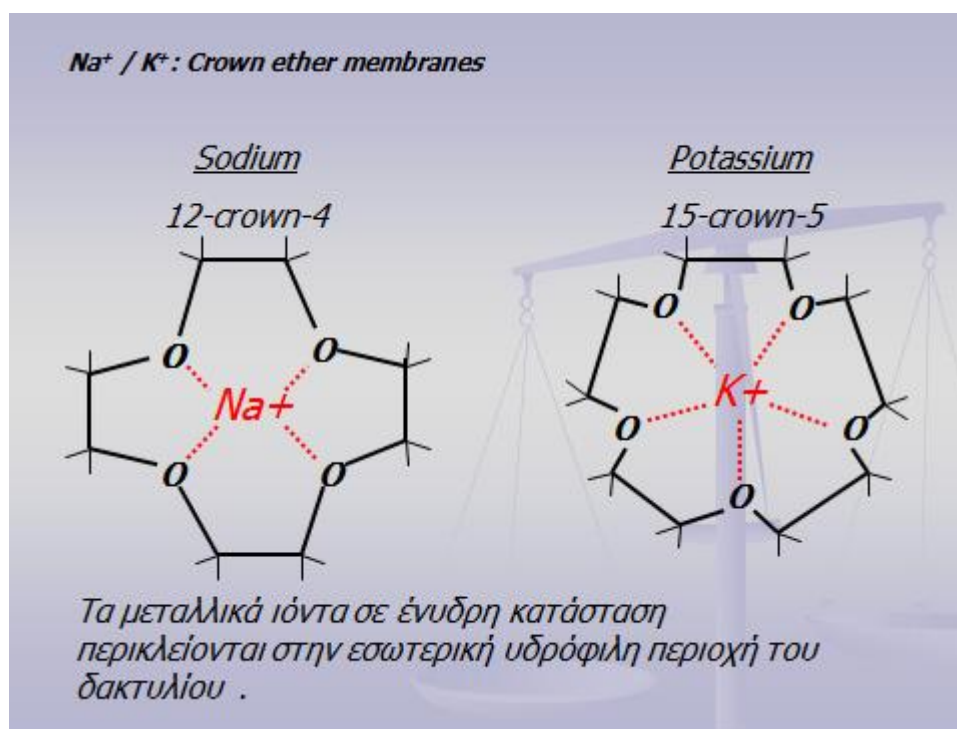
Ποτενσιομετρία

Η ποτενσιομετρία είναι τεχνική όπου μετράμε την διαφορά δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων , ανήκει στην κατηγορία των ηλεκτρικών μεθόδων που συνδέονται μέσω του υπό εξέταση διαλύματος.

Τύποι ηλεκτροδίων .

1. Οξειδοαναγωγικά ηλεκτρόδια

2. Ιοντοεπιλεκτικά
 - Γυάλινα: K, Na
 - Μεμβράνες: F, Cl, I
3. Αερίων
4. Ενζύμων (ουρία-ουρεάση, γλυκόζη-οξειδάση)



Εικόνα 20. Μεμβράνες ηλεκτροδίων στέμματος αιθέρα

1.6. Οργανολογία

1.6.1. Σύστημα διαχείρισης αντιδραστηρίων

Κατηγορία συνεχούς φόρτωσης

Είναι οι αναλυτές στους οποίους η φόρτωση των δειγμάτων μπορεί να γίνει σε ώρα λειτουργίας του αναλυτή .

Κατηγορία μη συνεχούς φόρτωσης

Ανήκουν οι αναλυτές στους οποίους η φόρτωση των δειγμάτων είναι εφικτή μόνο στην περίπτωση που ο αναλυτής είναι σε αδράνεια .

Όλοι σύγχρονοι αναλυτές είναι εφοδιασμένοι με ψυγείο οπότε διατηρούν τα αντιδραστήρια σε μεταξύ συγκεκριμένου εύρους θερμοκρασίας , συνήθως μεταξύ 3-7 °C .

1.6.2 . Σύστημα διαχείρισης Δειγμάτων

Υπάρχουν αναλυτές οι οποίοι χρησιμοποιούν δείγματα αραιωμένα με ειδικό αραιωτικό πριν αυτό μεταφερθεί στην κυψελίδα αντίδρασης .

Αναλυτές που μεταφέρουν το δείγμα αυτούσιο το στην κυψελίδα αντίδρασης. Αναλυτές που χρησιμοποιούν ρύγχη μιας χρήσεως και αναλυτές που χρησιμοποιούν ρύγχη δειγματοληψίας δείγματος πολλών χρήσεων

1.6.3. Λυχνίες παραγωγής φάσματος

Για την παραγωγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας οι αναλυτές , ανάλογα με το φάσμα ενδιαφέροντος χρησιμοποιούν αντίστοιχες λυχνίες όπως βολφραμίου (ορατό), Υδραργύρου ή δευτέρου (υπεριώδες) , Αλογόνου (ορατό-υπεριώδες).Για μονοχρωματικές ακτινοβολίες χρησιμοποιούν LED ή Laser .

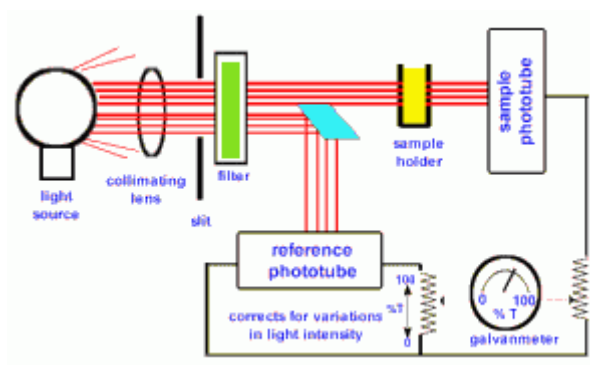


Εικόνα 21 . Λυχνίες

1.6.4. Ανιχνευτές

Υπεριώδους – ορατού (ultra violet – visible UV-Vis)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με καμπύλη αναφοράς, η οποία υπολογίζεται από τον αναλυτή με την χρήση προτύπων γνωστής συγκέντρωσης μετατρέποντας την απορρόφηση σε συγκέντρωση.



Εικόνα 22 . Διάταξη Φωτόμετρου

Φωτοανιχνευτής

Φωτοανιχνευτές είναι συσκευές οι οποίες μετατρέπουν το φως σε ηλεκτρικό σήμα το οποίο είναι ανάλογο του αριθμού των φωτονίων τα οποία προσπίπτουν στην φωτοευαίσθητη επιφάνεια του. Οι φωτοπολλαπλασιαστές σωλήνα (photomultiplier tube) χρησιμοποιούν φωτοδιόδους για μέτρηση της έντασης του φωτός στο ορατό και υπεριώδες φάσμα. Φωτοδιόδοι επίσης χρησιμοποιούνται και ως φωτοανιχνευτές. Φωτοδιόδοι είναι συσκευές στερεής κατάστασης(solid state)οι οποίοι κατασκευάζονται από φωτοευαίσθητους ημιαγωγούς.

Οπτικές ίνες

Η θέση των ξεχωριστών τμημάτων του αναλυτή όπως λυχνία , κυψελίδα , φακοί εστίασης , φωτοανυχνευτής υπαγορεύουν ένα οπτικό μονοπάτι όπου το φως θα ταξιδέψει από την πηγή δηλαδή λυχνία έως τον προορισμό φωτοπολλαπλασιαστή . Οπότε η προσαρμογή της κατασκευής του αναλυτή ως προς το οπτικό μονοπάτι δημιουργεί διάφορους περιορισμούς όπως σχεδιασμός , μήκος , κόστος του αναλυτή . Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί γίνεται χρήση οπτικών ινών οι οποίες μεταδίδουν το φως μέσω του μήκους του μέσω ανακλάσεων [34].

1.7 Βιολογικά υγρά

Τα ανθρώπινα υγρά μπορεί να είναι ορός είναι ένα κιτρινωπό υγρό του αίματος το οποίο διαχωρίζεται με φυγοκέντριση αφού πρώτα έχει περάσει ένα χρονικό διάστημα και έχουν δράσει οι παράγοντες πήξης του αίματος , πλάσμα είναι επίσης κιτρινωπό υγρό του αίματος το οποίο διαχωρίζεται με φυγοκέντριση χωρίς να έχουν δράσει οι παράγοντες πήξης λόγω παρουσίας αντιπηκτικού στο σωληνάριο δειγματοληψίας , ολικό αίμα , ούρα , ANY (εγκεφαλονωτιαίο υγρό) , είτε άλλα υγρά από ειδικές περιοχές του ανθρώπινου σώματος όπως αρθρικό υγρό από τις αρθρώσεις[34] .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

2.1 Ιστορική αναδρομή

Η καλλιέργεια της ελιάς υφίσταται από τα πανάρχαια χρόνια , κυρίως στις περιοχές γύρω από τη λεκάνη της μεσογείου , προσέφερε και προσφέρει ένα από τα βασικότερα είδη διατροφής του ανθρώπου και συνδέθηκε με όλους τους πολιτισμούς που αναπτύχθηκαν σε αυτές. Το ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε σε ποικίλες χρήσεις πέρα από την διατροφή αποτελώντας την βασική καύσιμη-φωτιστική ύλη ήταν από τα λίγα γνωστά φαρμακευτικά μέσα για πολλούς αιώνες [2].

<<Μέγιστον αγαθόν προς πάσαν του βίου θεραπείαν ο της ελιάς καρπός >> Σόλων

«Υγρό χρυσάφι», κατά τον Όμηρο.

«Ιαμα», το αναφέρει ο Ασκληπιός.

«Μέγα θεραπευτή», ο Ιπποκράτης

Το ελαιόλαδο σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (ΔΣΕ) , ελαιόλαδο είναι το προϊόν που παράγεται με εξαγωγή από τον καρπό του ελαιοδέντρου και δεν περιλαμβάνει έλαια που προκύπτουν χρησιμοποιώντας διαλύτες ή διαδικασίες επανεστεροποίησης ή ανάμιξης με άλλα έλαια .

2.2. Σύσταση Ελαιολάδου [3,4,5]

2.2.1 Λιπαρά οξέα

Ελαιικό οξύ	55-83 %
Λινελαϊκό	3,5-21 %
α-Λινολενικό οξύ	0-1,5 %

Πίνακας 1. Ακόρεστα λιπαρά οξέα

Παλμιτικό οξύ	7,5-20 %
Στεατικό οξύ	0,5-5 %

Πίνακας 2 . Ακόρεστα λιπαρά οξέα.

Τα λιπαρά οξέα σύμφωνα με το πρότυπο [10] παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

	Virgin olive oils	Olive oil Refined olive oil	Olive-pomace oil Refined olive-pomace oil
Fatty acid			
C14:0	0.0 - 0.05	0.0 - 0.05	0.0 - 0.05
C16:0	7.5 - 20.0	7.5 - 20.0	7.5 - 20.0
C16:1	0.3 - 3.5	0.3 - 3.5	0.3 - 3.5
C17:0	0.0 - 0.3	0.0 - 0.3	0.0 - 0.3
C17:1	0.0 - 0.3	0.0 - 0.3	0.0 - 0.3
C18:0	0.5 - 5.0	0.5 - 5.0	0.5 - 5.0
C18:1	55.0 - 83.0	55.0 - 83.0	55.0 - 83.0
C18:2	3.5 - 21.0	3.5 - 21.0	3.5 - 21.0
C18:3 ³			
C20:0	0.0 - 0.6	0.0 - 0.6	0.0 - 0.6
C20:1	0.0 - 0.4	0.0 - 0.4	0.0 - 0.4
C22:0	0.0 - 0.2	0.0 - 0.2	0.0 - 0.3
C24:0	0.0 - 0.2	0.0 - 0.2	0.0 - 0.2
<i>Trans</i> fatty acids			
C18:1 T	0.0 - 0.05	0.0 - 0.20	0.0 - 0.40
C18:2 T + C18:3 T	0.0 - 0.05	0.0 - 0.30	0.0 - 0.35

Πίνακας 3 . Εκατοστιαία διακύμανση της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα.

Ένας σημαντικός παράγοντας που επιδρά στην ακορεστότητα του ελαιολάδου είναι η θερμοκρασία του περιβάλλοντος . Η ακορεστότητα αυξάνει με την μείωση της θερμοκρασίας και με την αύξηση του υψομέτρου όπου καλλιεργούνται τα ελαιόδεντρα . Επίσης διαφορές στην εκατοστιαία σύνθεση του ελαιολάδου , σε λιπαρά οξέα εκτός από το οικολογικό περιβάλλον σχετίζονται και με την ποικιλία της ελιάς.

Επίσης η καθυστέρηση της συγκομιδής του ελαιοκάρπου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ακορεστότητας των ακόρεστων λιπαρών οξέων του ελαιολάδου κυρίως του λινελαϊκού και την μείωση του παλμιτικού γεγονός που το καθιστά περισσότερο ευαίσθητο στην οξείδωση [7].

2.2.2. Κατανομή λιπαρών οξέων στα γλυκερίδια του ελαιολάδου

Στον πίνακα 4 παρατίθεται η κατανομή των λιπαρών οξέων στα γλυκερίδια του ελαιολάδου [7]

Αριθμός διπλών δεσμών ανά μόριο τριγλυκεριδίου.	Κατανομή λιπαρών οξέων	Ποσότητα στο λάδι
0	-	0,0
1	ΠΕΠ	2,9
	ΠΠΕ	0,6
	ΠΕΣ	0,5
	ΠΣΕ	0,3
	ΣΕΣ	0,2
	ΑΟ	0,2
2	ΠΠΑ	1,2
	ΠΕΕ	18,4
	ΠΕΣ	2,3
	ΠΑΣ	0,1
	ΛΠΣ	0,7
	ΣΕΕ	5,1
	ΑΟ	2,2
3	ΠΛΕ	0,2
	ΠΕΛ	5,9
	ΕΠΑ	0,9
	ΣΛΕ	2,4
	ΛΣΕ	0,7
	ΣΕΛ	1,3
	ΕΕΕ	43,5
4	ΠΛΛ	0,4
	ΛΠΑ	0,2
	ΕΕΛ	6,8
	ΕΛΕ	3,5
	ΣΛΛ	0,2
	ΑΟ	0,1

Π = παλμιτικό οξύ , Ε = ελαιϊκό οξύ , Σ = στεατικό οξύ , Λ = λινελαϊκό οξύ ,
ΑΟ = άλλα οξέα (δεν προσδιορίστηκαν) [8].

Πίνακας 4. Κατανομή των λιπαρών οξέων στα τριγλυκερίδια του ελαιολάδου.

2.2.3. Μη γλυκεριδικά συστατικά του ελαιολάδου

Ερευνητές μετά από μία σειρά ερευνών κατέληξαν ότι το ασαπωνοποίητο κλάσμα του ελαιολάδου περιέχει διάφορους υδρογονάνθρακες όπως το ναφθαλίνιο και τα παράγωγα του, παραφίνες (αλκάνια,) όπως και διακλαδισμένης αλυσίδας υδρογονάνθρακες. Το κυριότερο συστατικό είναι ένας τριτερπενικός υδρογονάνθρακας το σκουαλένιο πολυακόρεστος υδρογονάνθρακας με 30 άτομα άνθρακα, το οποίο αποτελεί πρόδρομη ένωση της βιοσύνθεσης των στερολών. Το ελαιόλαδο περιέχει περισσότερο σκουαλένιο από όλες τις άλλες γνωστές λιπρές ύλες. Το σκουαλένιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης νοθείας του λαδιού.

Είδος λιπαρής ύλης	Αριθμός δειγμάτων	Σκουαλένιο (mg/100g λίπος)
Ελαιόλαδο	44	136-708
Βαμβακέλαιο	12	4-12
Καλαμποκέλαιο	9	19-36
Φυστικέλαιο	11	13-49
Σησαμέλαιο	9	7-17
Τσαγιέλαιο	3	8-16
Σησαμέλαιο	1	3

Πίνακας 5 . Περιεκτικότητα σε σκουαλένιο λιπαρών ουσιών.

2.2.4. Κυριότερα ασαπωνοποίητα συστατικά του ελαιολάδου

Εκτός από τα γλυκερίδια το ελαιόλαδο περιέχει και άλλα συστατικά τα οποία συναντώνται σε μικρές ποσότητες και αναφέρονται ως δευτερεύοντα συστατικά . Αρχικά ερευνήθηκαν στο ασαπωνοποίητο μέρος του ελαιολάδου .

Συστατικά	Παρθένο ελαιόλαδο
Σκουαλένιο και άλλοι υδρογονάνθρακες	30-50 %
Στερόλες	15 %
Εστέρες στερολών	-
Τριτερπενοειδείς αλκοόλες	10 %
Ανώτερες λιπαρές αλκοόλες	-
Κηροί	-
Τοκοφερόλες αντιοξειδωτικά , πτητικά και άλλα συστατικά.	25-45 %

Πίνακας 6. Εκατοστιαία σύνθεση του ασαπωνοποίητου μέρους του ελαιολάδου.

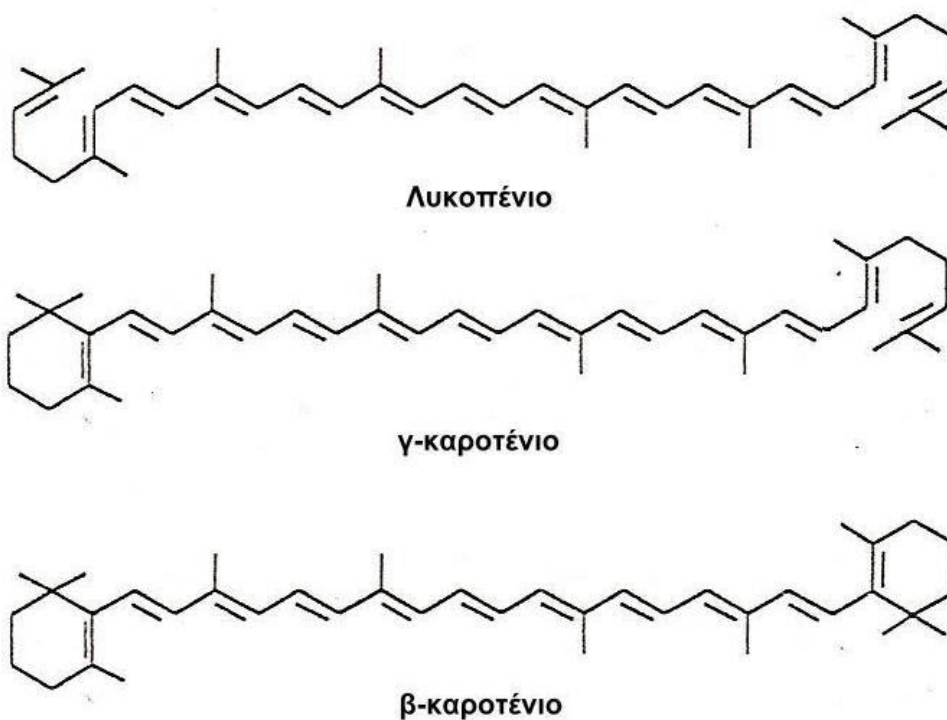
2.2.5. Αρωματικά συστατικά του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο έχει χαρακτηριστικό άρωμα και πολύ ευχάριστη γεύση .

Αναλύσεις σε αναλυτές αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας έδειξε ότι υπάρχουν πάνω από 70 συστατικά που συνθέτουν την ιδιαίτερη γεύση του ελαιολάδου και το χαρακτηριστικό του άρωμα [8] . Τα συστατικά αυτά σε αλειφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες, σε αλειφατικές και τερπενικές αλκοόλες, σε αλδεΐδες, κετόνες κ.α.[9].

2.2.6. Καροτενοειδείς χρωστικές

Οι καροτενοειδείς ενώσεις οι οποίες συναντώνται στο είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό ξανθοφύλη ($C_{40}H_{56}O_2$) δηλαδή το υδροξυλιωμένο α-καροτένιο . Ακολουθούν τα καροτένια τρεις ισομερείς ακόρεστοι υδρογονάνθρακες α,β και γ με μοριακό τύπο $C_{40}H_5$ και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις υπάρχει το λυκοπένιο.



Εικόνα 23 . Λυκοπένιο , καροτένια

2.2.7. Μη γλυκεριδική εστέρες λιπαρών οξέων

Εστέρες n-αλειφατικών λκοολών (C_{27}, C_{32}) στερολών (β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη και άλλες) και τριτερπενικών αλκοολών έχουν προσδιοριστεί στο μη γλυκεριδικό κλάσμα του ελαιολάδου . Έχουν προσδιορισθεί τριτερπενικές αλκοόλες , κυκλοαρετνόλη και β-αμυρίνη σε δείγματα ελαιολάδου . Συνολικά το ποσοστό των τριτερπενικών αλκοολών που προσδιορίστηκε ήταν 0,1 % . Εστέρες μεθανόλης και αιθανόλης έχουν εντοπισθεί στο πτητικό κλάσμα.

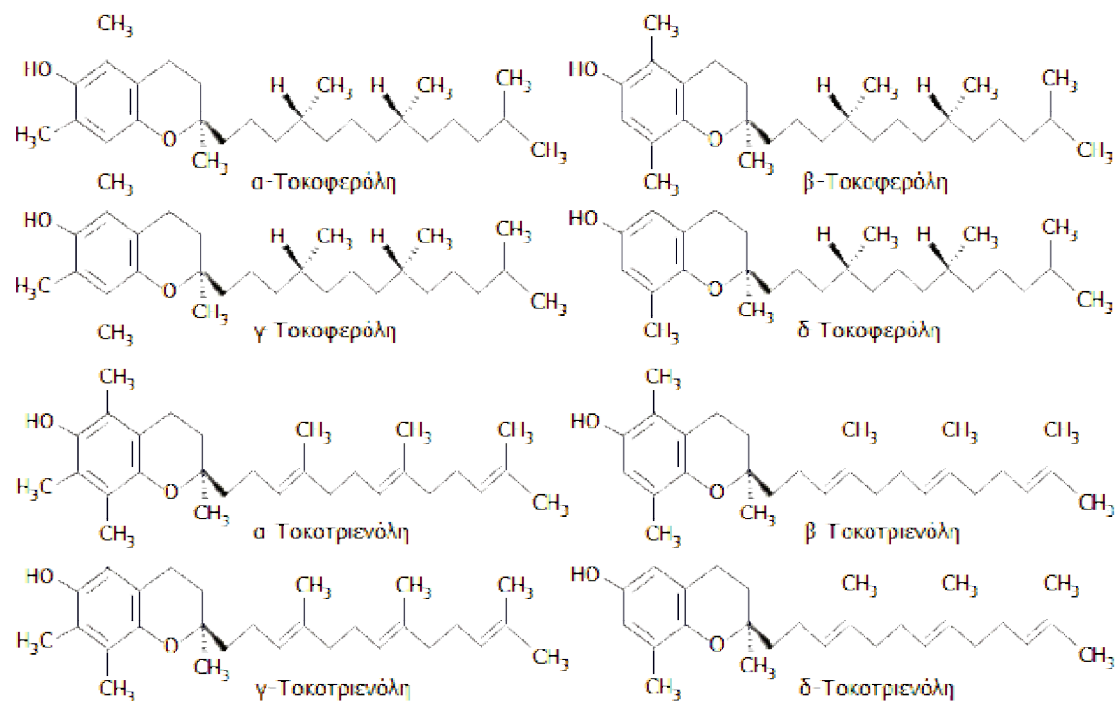
2.2.8. Δι-υδρόξυ-τριτερπενικές αλκοόλες

Στο ελαιόλαδο έχει εντοπισθεί η ύπαρξη ενός διηδρόξυ πεντακυκλικού τριτερπενικού συστατικού της ερυθροδιόλης (3β-17β δι-υδρόξυ Δ¹²-ολεανίνη). Ακόμη βρέθηκε διυδρόξυ τριτερπενικό συστατικό η ουβαόλη (3β-17β δι-υδρόξυ Δ¹²-ουρσίνη) [9].

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ερυθροδιόλης και της ουβαόλης με αέρια υγρή χρωματογραφία (Gas Liquid Chromatography) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κριτήριο διαφοροποίησης του ελαιολάδου με το πυρηνέλαιο [7].

2.2.9. Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι εταιοκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους . Σε μικρότερο ποσοστό συναντώνται στα ζωικά λίπη. Έχουν προσδιορηθεί διάφορα είδη στερολών α-β-γ-δ-ε και ζ. Διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως προς την θέση στην οποία βρίσκονται οι μευλικές ομάδες [10] .

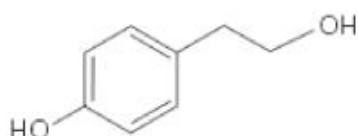


Εικόνα 24 . Τοκοφερόλες

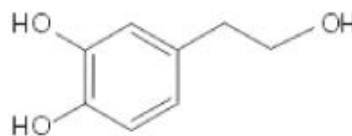
Από τις τοκοφερόλες οι οποίες συναντώνται στο ελαιόλαδο η α-τοκοφερόλη βρίσκεται σε ποσοστό 88,5 % , β και γ σε ποσοστό 1,6 % . Η συνολική ποσότητα των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο ποικίλει . Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε α-τοκοφαιρόλη κυμαίνεται από 12-150 ppm [11] . Σταδιακά ανοικοδομούνται οι τοκοφερόλες οπότε υπάρχει διακύμανση στην συγκέντρωσή τους . Επίσης ελαιόλαδο το οποίο παραλαμβάνεται από τον πυρήνα της ελιάς έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες από ότι στο σαρκώδες μέρος της ελιάς. Από την α προς την δ αυξάνεται η αντιοξειδωτική τους δράση οπότε είναι φυσικά αντιοξειδωτικά των λαδιών. Ο προσδιορισμός των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο βοηθά στην ανίχνευση νοθείας του ελαιολάδου με άλλα φυτικά έλαια . Η παρουσία γ τοκοφερόλης είναι σαφή ένδειξη νοθείας με καλαμποκέλαιο και άλλα σπορέλαια στα οποία συναντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό[7].

2.2.10. Φαινόλες

Οι φαινόλες είναι αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες απαντώνται και στο ελαιόλαδο . Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο κυμαίνεται και εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από τον τρόπο καλλιέργειας . Σύμφωνα με μελέτες δεν επηρεάζεται η σύνθεση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις από την ποικιλία , την ωριμότητα του ελαιοκάρπου , το κλίμα το έδαφος όπου καλλιεργούνται τα ελαιόδεντρα (Cinquanta et al,1977) . Οι κυριότερες από τις φαινόλες που συναντώνται η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη .



Τυροσόλη



Υδροξυτυροσόλη

Εικόνα 25. Τυροσόλη , Υδροξυτυροσόλη.

Το σύνολο των φαινολών καθώς και ο λόγος υδρόξυτυροσόλη / τυροσόλη παρουσιάζουν γραμμική συσχέτιση με την αντίσταση του ελαίου στην αυτοξειδωση (Tsimidou et al ,1992). Επίσης έχουν ανιχνευθεί στο ελαιόλαδο και φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ (3,4 – διυδροξύ-κιναμικό) και το πρωκατεχικό (3,4 διυδροξύ-βενζοϊκό) [9] . Φαινόλες οι οποίες απομονώθηκαν από τα φύλλα ελιάς , εμπόδισαν στην οξειδωση του ελαιολάδου .

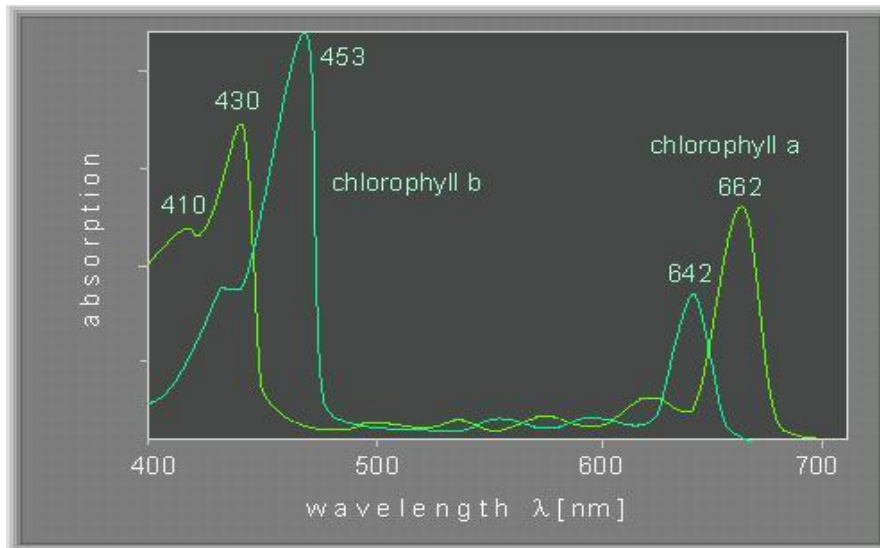
2.2.11. Φωσφολίποειδή

Στο ελαιόλαδο όπως και στα περισσότερα έλαια περιέχει μικρή ποσότητα φωσφολιπιδίων η οποία κυμαίνεται από 40- 135 ppm. Τα φωσφολιπίδια που συνήθως συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι η λεκιθίνη και η κεφαλίνη. Η μεγαλύτερη ποσότητα προέρχεται από τον πυρήνα του ελαιοκάρπου.

2.2.12. Χρωστικές

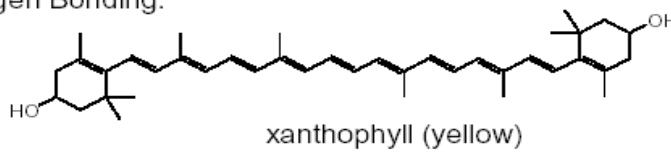
Η κυριότερη χρωστική του ελαιολάδου είναι η χλωροφύλλη , η οποία δίνει χαρακτηριστικό χρώμα στο ελαιόλαδο . Χλωροφύλλη α και β όπου η α έχει κυανοπράσινη μορφή , ενώ η β έχει κιτρινοπράσινη .

Στο μόριο τους περιέχει Mg , ανοικοδομούνται εύκολα σε φαιοφυτίνες . Παρουσία φωτός επιταχύνουν την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων ενώ στο σκοτάδι , παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση [13].

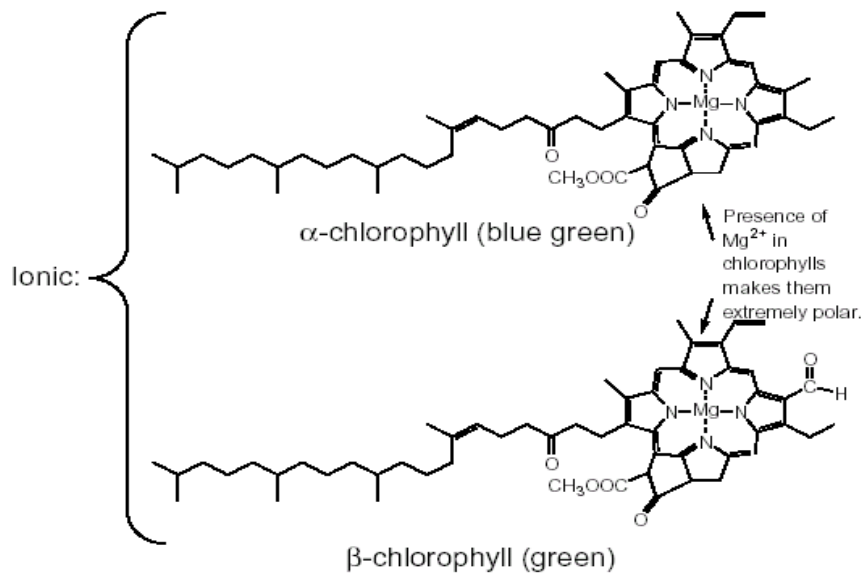
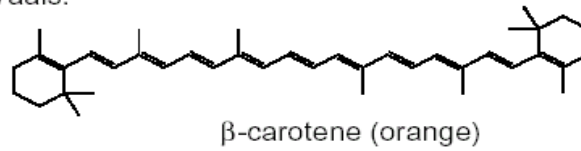


Εικόνα 25. Φάσμα απορρόφησης της χλωροφύλλης α και β

Hydrogen Bonding:



van der Waals:



Εικόνα 26. Ξανθοφύλλη , β-καροτένιο , χλωροφύλλη α , χλωροφύλλη β

2.5 Κατηγορίες ελαιόλαδου και πυρηνελαίου [14,15] .

2.5.1. Ελαιόλαδο

Ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται το προϊόν το οποίο παράγεται με εξαγωγή από τον καρπό του ελαιόδεντρου (*Olea Europa Sativa*) χωρίς την ανάμιξη με έλαια τα οποία προκύπτουν από διαδικασίες επανεστεροποίησης ή με την χρήση διαλυτών . Σε καμία περίπτωση το πυρηνέλαιο δεν πρέπει να χαρακτηρίζεται ως ελαιόλαδο.

2.5.2. Παρθένο ελαιόλαδο

Χαρακτηρίζεται το έλαιο το οποίο παραλαμβάνεται αποκλειστικά από τον καρπό της ελιάς με μηχανικά ή φυσικά μέσα και η τεχνική παραλαβής δεν προκαλεί αλλοίωση στην ποιότητα του . Το ελαιόλαδο της κατηγορίας αυτής δεν υποβάλλεται σε καμία κατεργασία εκτός από πλύσιμο, μετάγγιση ,φυγοκέντριση και διήθηση . Το παρθένο ελαιόλαδο μπορεί να καταναλωθεί όπως είναι . Διακρίνεται στις παρακάτω κατηγορίες:

A) Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (extra virgin olive oil)

Είναι το παρθένο ελαιόλαδο, του οποίου η οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ δεν υπερβαίνει το 0.8%. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε meqO₂ / kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος του 20, η σταθερά K₂₇₀ μικρότερη ή ίση με 0,22 και η σταθερά ΔK μικρότερη ή ίση με 0,01 .

B) Παρθένο ελαιόλαδο (virgin olive oil)

Είναι παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 2%. Ο αριθμός υπεροξειδίων και η τιμή ΔΚ καθορίζονται όπως στο ελαιόλαδο της προηγούμενης κατηγορίας, ενώ η τιμή K_{270} ορίζεται στα 0,25.

Γ) Ελαιόλαδο Λαμπάντε (virgin olive oil lampante)

Είναι παρθένο ελαιόλαδο με οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, που υπερβαίνει το 2%. Το ελαιόλαδο λαμπάντε είναι ακατάλληλο για κατανάλωση ως έχει και προορίζεται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση.

2.5.3. Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο

Είναι το ελαιόλαδο, το οποίο παραλαβαίνεται μετά από ραφινάρισα παρθένων ελαιόλαδων και του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν είναι δυνατό να υπερβαίνει τα 0,3g ανά 100g ελαιόλαδου, ενώ παράλληλα δεν έχει υποστεί αλλαγές στην αρχική δομή των τριγλυκεριδίων. Ο αριθμός υπεροξειδίων είναι μικρότερος του 20 meq O_2/kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 5, η σταθερά K_{270} μικρότερη ή ίση με 1,1 και η σταθερά ΔΚ μικρότερη ή ίση με 0,16.

2.5.4. Πυρηνέλαιο

Είναι το έλαιο το οποίο αποτελείται από μείγμα ραφιναρισμένου πυρηνελαίου και παρθένου (σε μικρότερο ποσοστό) του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1% και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή .

2.5.5. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο

Είναι το έλαιο το οποίο εξάγεται από την ελαιοπυρήνα ως υποπροϊόν της ελαιουργίας, με την χρησιμοποίηση διαλύτη. Το έλαιο αυτό δεν μπορεί να καταναλωθεί όπως είναι και πρέπει να υποστεί επεξεργασία του εξευγενισμού.

2.5.6. Ραφιναρτισμένο πυρηνέλαιο

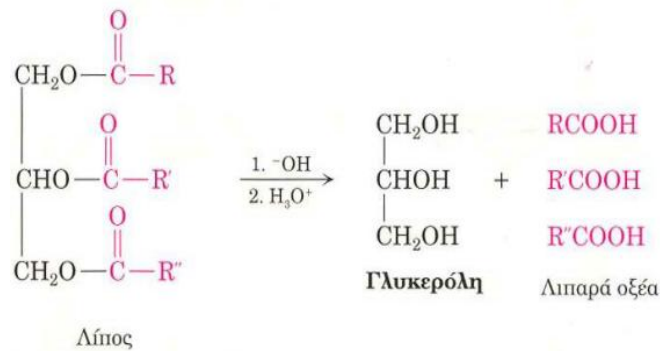
Είναι το έλαιο το οποίο λαμβάνεται από ραφινάρισμα του ακατέργαστου πυρηνελαίου του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαιϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 0,3%. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε meq02 /kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 10, η σταθερά K_{270} μικρότερη ή ίση με 2 και η σταθερά ΔK μικρότερη ή ίση με 0,2.

2.6 Κυριότερες αλλοιώσεις του ελαιολάδου [14,17].

2.6.1. Υδρολυτική τάγγιση

Παράγοντες όπως η υγρασία , η θερμοκρασία , τα ένζυμα , οι μικροοργανισμοί , τα μέταλλα συντελούν στην απελευθέρωση των λιπαρών οξέων από τριγλυκερίδια με αποτέλεσμα την υδρόλυση του ελαιολάδου . Συνοδεύεται από την αύξηση της οξύτητας την αλλαγή της γεύσης και τελικά την υποβάθμιση της εμπορικής αξίας .

Για να λάβει χώρα η υδρόλυση , είναι απαραίτητη η παρουσία νερού , η οποία εμφανίζεται συνήθως ως υγρασία του ελαίου. Το νερό προσβάλλει τους εστερικούς δεσμούς των τριγλυκεριδίων , σχηματίζοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερίνη καθώς επίσης μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια . Στο επόμενο σχήμα παρουσιάζεται η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων.



Σχήμα 1. Υδρόλυση των τριγλυκεριδίων

Η εκτίμηση της τάγγισης γίνεται με τον προσδιορισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων με υπολογισμό της οξύτητας και με τον προσδιορισμό της υγρασίας συνήθως με την μέθοδο Karl Fischer.

2.6.2. Κετονική τάγγιση

Η κετονική τάγγιση εμφανίζεται σε τρόφιμα που περιέχουν κορεσμένα λιπαρά οξέα μικρής ανθρακικής αλυσίδας παρουσία περιορισμένης ποσότητας, οξυγόνου, νερού και μυκήτων. Κατά την τάγγιση αυτή ελευθερώνονται ελεύθερα λιπαρά οξέα μικρού μοριακού βάρους που οξειδώνονται σε μεθυλ-κετόνες και αλειφατικές αλκοόλες οι οποίες έχουν κυρίως περιττό αριθμό ατόμων ανθράκων.

2.6.3. Οξειδωτική τάγγιση

Οι λιπαρές ουσίες όπως και το ελαιόλαδο οι οποίες περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, οξειδώνονται όταν έρθουν σε επαφή με το οξυγόνο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πτητικών προϊόντων δυσάρεστης οσμής και γεύσης. Τα προϊόντα αυτά υποβαθμίζουν την ποιότητα των λιπαρών υλών και σε μεγάλες ποσότητες δηλαδή σε προχωρημένο βαθμό οξείδωσης, θεωρούνται τοξικά. Όταν η οξείδωση λαμβάνει χώρα παρουσία

φωτός ονομάζεται φωτοξείδωση ενώ όταν γίνεται απουσία φωτός ονομάζεται αυτοξείδωση .

Ο αριθμός οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αυξάνεται με την αύξηση των συγκεντρώσεων των τους στο τρόφιμο. Οι κυριότερες ενώσεις που σχηματίζονται και είναι υπεύθυνες για την αλλοίωση της γεύσης του είναι οι κορεσμένες και οι ακόρεστες αλδεΐδες. Εκτός από την οσμή και τη γεύση , η οξείδωση του ελαιολάδου είναι πιθανό να επιφέρει αλλαγή και σε άλλες φυσικές ιδιότητες του , όπως το ιξώδες. Επιπλέον κατά την οξείδωση παρατηρείται απώλεια ή μείωση των απαραίτητων συστατικών για τον ανθρώπινο οργανισμό όπως λινελαϊκό οξύ , λινολενικό οξύ , όπως και απώλεια των λιποδιαλυτών βιταμινών.

2.7. Μηχανισμός οξείδωσης [18]

Η αυτοξείδωση βασίζεται στην κλασική πορεία σχηματισμού ελευθέρων ριζών από μόρια λιπαρών οξέων από την αντίδραση τους με μόρια οξυγόνου παρουσία καταλύτη. Ο μηχανισμός της οξείδωσης περιλαμβάνει τρία στάδια το στάδιο της έναρξης , της διάδοσης και του τερματισμού.

2.7.1. Έναρξη

Στο στάδιο της έναρξης είναι το αργό μέρος της αντίδρασης της οξείδωσης οπότε η κατανάλωση οξυγόνου είναι σχετικά μικρή . Το στάδιο μέχρι να εμφανισθεί η δυσάρεστη οσμή και γεύση ορίζεται ως το στάδιο της έναρξης . Για κάθε λιπαρή ύλη ο χρόνος που διαρκεί το αρχικό στάδιο της οξείδωσης διαφέρει . Η οξείδωση αρχίζει με τον σχηματισμό ελεύθερης ρίζας με την απόσπαση ενός υδρογόνου από ένα μόριο ακόρεστου λιπαρού οξέος.

2.7.2. Διάδοση

Με την επιτάχυνση της οξειδωσης η λιπαρή ύλη αποκτά δυσάρεστη οσμή και ταγγή γεύση. Οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν σχηματιστεί στο στάδιο της έναρξης, αντιδρούν με μόρια οξυγόνου δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίων οι οποίες με την σειρά τους αντιδρούν με άλλα μόρια λιπαρού οξέος, δημιουργώντας υδρουπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες. Η πορεία της αντίδρασης γίνεται πολύπλοκη λόγω της αστάθειας των υδρουπεροξειδίων τα οποία συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις.

2.7.3. Τερματισμός

Το στάδιο του τερματισμού λαμβάνει χώρα, όταν δύο ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζοντας αδρανή προϊόντα.

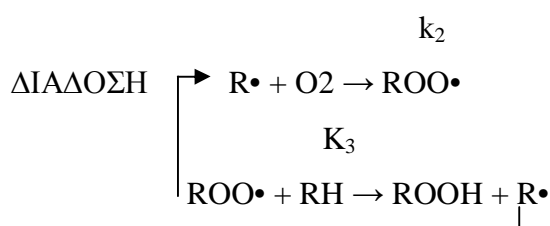
Παρακάτω φαίνεται ο μηχανισμός αυτοοξειδωσης [19]

ΦΑΣΕΙΣ ΑΥΤΟΞΕΙΔΩΣΗΣ

K_1

1. ΕΝΑΡΞΗ (Ωρίμανση) Παράγοντας έναρξης \rightarrow ελεύθερη ρίζα ($R\cdot$, $ROO\cdot$) (ενέργεια, Fe, Cu)

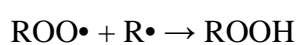
2.



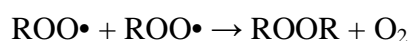
K_4

3. ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ $R\cdot + R\cdot \rightarrow R-R$

K_5



K_6



2.8. Προϊόντα διάσπασης των υπεροξειδίων

Τα υδρουπεροξειδία επειδή είναι ασταθείς ενώσεις διασπώνται εύκολα να δημιουργείται πλήθος πτητικών οργανικών ενώσεων οι οποίες ονομάζονται δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης . Οι ενώσεις αυτές είναι ενώσεις οι οποίες έχουν μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα και είναι υπεύθυνες για την δυσάρεστη οσμή και γεύση που εμφανίζουν οι οξειδωμένες λιπαρές ύλες. Στα δευτερογενή προϊόντα περιλαμβάνονται αλδεΐδες , κετόνες , αλκοόλες και υδρογονάνθρακες.

2.8.1. Μέθοδοι μέτρησης οξειδωτικού ταγγισμού

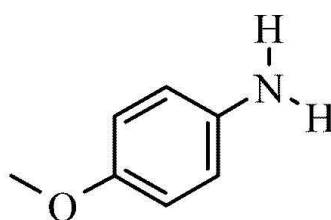
1. Αριθμός υπεροξειδίων [20].

Αριθμός υπεροξειδίων ($\text{ROOH} \rightarrow \text{I}_2$). Εκφράζεται σε $\text{meq O}_2/\text{kg}$ ελαίου είναι μέτρο της οξειδωτικής τάγγισης του ελαιολάδου και ένας σημαντικός οδηγός της ποιότητας του ελαιολάδου μαζί με τα λιπαρά οξέα , τα οποία είναι ένα μέτρο της υδρολυτικής τάγγισης . Ο αριθμός υπεροξειδίων αποτελεί έναν δείκτη ποιότητας κατά την παραγωγή αποθήκευση και εμπορία του ελαιολάδου. Η επίσημη αναλυτική μέθοδος [26] είναι η ιωδομετρική τιτλοδότηση μέθοδος κατά την οποία μετριέται το ιώδιο που απελευθερώνεται από το ιωδιούχο κάλιο προσδιορίζοντας τα υπεροξειδία που υπάρχουν στο ελαιόλαδο .

2.8.2. Αριθμός π-ανισιδίνης [21].

Ο δείκτης π-ανισιδίνης αποτελεί ένα περιεχομένου σε αλδεΐδες των λιπαρών υλών οι οποίες αναλύονται , κυρίως των α-β-ακόρεστων αλδευδών. Βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης στα 350 nm του προϊόντος που λαμβάνεται κατά την αντίδραση των συστατικών που βρίσκονται στο δείγμα με π-ανισιδίνη.

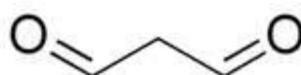
Η ένταση του χρώματος των προϊόντων της αντίδρασης , εξαρτάται όχι μόνο από την συγκέντρωση των αλδεϋδών αλλά και από την δομή τους . Η μοριακή απορροφητικότητα μεταβάλλεται ανάλογα με την δομή των αλδεϋδών ανάλογα με την δομή των αλδεϋδών. Ο βαθμός μοριακής απορροφητικότητας ενισχύεται αρκετά με την ύπαρξη διπλού δεσμού σε συζυγική θέση με την με την καρβονυλική ομάδα . Ως εκ τούτου οι ακόρεστες α-β-ακόρεστες αλδεύδες συνησφέρουν περισσότερο στον δείκτη π-ανισιδίνης.



Εικόνα 27. Μόριο π-ανισιδίνης

2.8.3. Δοκιμή θειοβαρβιτουρικού οξέος (αριθμός TBARS)

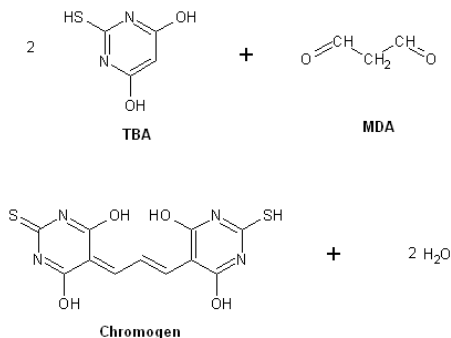
Η TBA ανάλυση μετράει δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης . Βασίζεται στο σχηματισμού ενός χρωμοφόρου (ροζ) μορίου από την αντίδραση μεταξύ του 2-Θειοβαρβιτουρικού οξέος και της μηλονικής αλδεϋδης . Η μηλονική αλδεϋδη , όπως πιστεύεται , όπως σχηματίζεται , από τα υπεροξειδία του λινελαϊκού οξέος [22].



Malondialdehyde

Εικόνα 28. Μηλονική αλδεϋδη (Malondialdehyde)

Δύο μόρια 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος αντιδρούν με ένα μόριο μηλονικής αλδεύδης .
 Η αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος και της μηλονικής αλδεύδης έχει ως εξής :



Σχήμα 2. Αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος και της μηλονικής αλδεύδης

Τελικά μετριέται φασματοφωτομετρικά το ροζ παράγωγο , δείκτης του βαθμού αυτοοξειδωσης σε λάδια και σε λίπη.

2.8.4. Απορρόφηση στο UV

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του ελαιολάδου ειδικότερα για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής κατάστασης του χρησιμοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες φάσμα[7] . Στα 232 nm είναι η μέγιστη απορρόφησης των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης (συζυγή υπεροξειδία) ενώ στα 270nm έχουμε το μέγιστο των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης (αλδεύδες ,κετόνες) , επίσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος απορροφούν και τα συζυγή διένυα και τριένια τα οποία δημιουργούνται κατά το ραφινάρισμα .

Μεγάλες τιμές απορρόφησης στ 270 nm μήκος κύματος μπορεί να προέρχονται είτε από την οξείδωση του ελαιολάδου είτε από χημική επεξεργασία(ραφινάρισμα).Γενικά χαμηλές τιμές K₂₃₂, K₂₇₀, και ΔΚ , αντιστοιχούν σε καλής ποιότητας ελαιολάδου.

2.9 Βιολογικές και θρεπτικές ιδιότητες ελαιολάδου

Ελαιόλαδο , Πεπτικό & Γαστρεντερικό σύστημα

Με την ημερήσια κατανάλωση ελαιολάδου λαμβάνουμε την ημερήσια ενέργεια που χρειάζεται ο οργανισμός από τα λίπη λόγω της πλούσιας σύστασης του σε λιπαρά οξέα (παλμιτικό , ελαϊκό , λινελαϊκό) .

Τα οξέα βρίσκονται υπό την μορφή τριγλυκεριδίων τα οποία υδρολύονται και αφομοιώνονται σε μεγάλο βαθμό από τον οργανισμό. Η ευκολία αφομοίωσης τους βοηθά στην αύξηση των εκκρίσεων του πεπτικού σωλήνα διευκολύνοντας έμμεσα την πέψη των άλλων τροφών όπως των λιποδιαλυτών βιταμινών και την καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών όπως ασβεστίου , σιδήρου και των μεταλλικών αλάτων και προστατεύει από τη γαστρίτιδα και τα έλκη. Είναι χολαγωγός ουσία, ενεργοποιεί την έκκριση των ορμονών του παγκρέατος και της χολής. Μειώνει δηλαδή την πιθανότητα χολολιθίασης (σχηματισμό πέτρας στη χολή). Το ελαιόλαδο είναι όχι μόνο εύκολο να αφομοιωθεί αλλά επίσης βοηθά στην πέψη άλλων λιπαρών ουσιών επειδή βοηθά τις εκκρίσεις του πεπτικού συστήματος και υποκινεί το παγκρεατικό ένζυμο lipase [23,24,25,26].

Δράση του ελαιολάδου στις καρδιαγγειακές παθήσεις

Λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (ελαϊκό οξύ) βοηθά στην μείωση της LDL (Low density lipoprotein) , της γνωστής ως κακής χοληστερόλης στον ορό του αίματος [27] .Υψηλά επίπεδα LDL στον ορό του αίματος συνδέονται με αρτηριοσκλήρωση και στεφανιαία νόσο. Επίσης Η λήψη του ελαιολάδου αυξάνει τη σύνθεση και την συγκέντρωση της HDL, χολεστερόλης (της καλής χολεστερόλης) και ταυτόχρονα καθιστά την LDL- χολεστερόλη (την κακή χολεστερόλη) λιγότερο ικανή για να προκαλέσει αθηρωματική βλάβη, εμποδίζοντας τόσο την οξείδωση της .

Ελαιόλαδο και διαβήτης .

Όταν το ελαιόλαδο λαμβάνεται ως μοναδική πηγή λίπους και ειδικά από άτομα με διαβήτη, δρα ευνοϊκά στην αργή εκκένωση του περιεχομένου του στομάχου στο δωδεκαδάκτυλο. Έτσι επιφέρει καλύτερο έλεγχο στη γλυκόζη στο αίμα[29].

Επίσης το ελαιόλαδο περιέχει λιγνολαϊκό οξύ (ω -6 λιπαρό οξύ) και α -λιγνολενικό οξύ (ω -3 λιπαρό οξύ). Τα συγκεκριμένα οξέα ο οργανισμός δεν μπορεί να τα αποσυνθέσει οπότε είναι απαραίτητα στον οργανισμό . Επίσης λόγω της σύστασης του σε ακόρεστα λιπαρά οξέα βοηθά στην διατήρηση της δομής του κυτταρικού τοιχώματος του εγκεφάλου με αποτέλεσμα την μείωση της πιθανότητας απώλειας μνήμης και της εμφάνισης Alzheimer .

Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε τοκοφερόλες και πολυφαινόλες (φυσικά αντιοξειδωτικά) τα οποία εμποδίζουν την οξείδωση . Επιπλέον οι φαινολικές ενώσεις επιφέρουν μείωση της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης . Ακόμη η Βιταμίνη E η οποία υπάρχει στο ελαιόλαδο προστατεύει το δέρμα από την ακτινοβολία και ανακουφίζει από το τσίμπημα των κουνουπιών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΟΥ

3.1. Προτεινόμενη μέθοδος

3.1.1. Πρωτόκολλο προτεινόμενης μεθόδου

Αρχικά έλεγχος της κυψελίδας κυψελίδας φωτομετρικά .

Προσθήκη αντιδραστηρίου 70 μL 1,0% (w / v) NaI σε κ-προπανόλη

Προσθήκη δείγματος ελαιολάδου 7 μL

Ανάδυση MA (μέτρια ένταση)

Προσθήκη αντιδραστηρίου 310 μL 44% (v / v) οξικού οξέος σε κ-προπανόλη

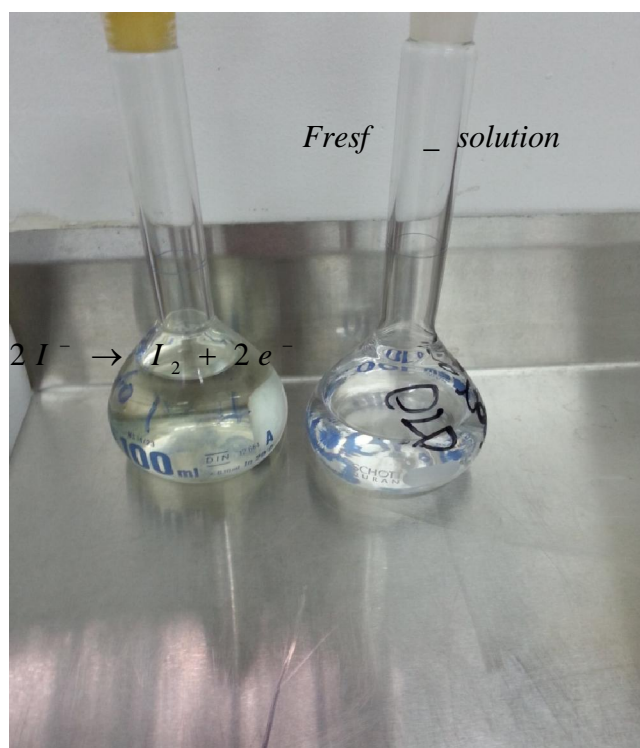
Ανάδυση MA (μέτρια ένταση)

Φωτομέτρηση στα 340 nm^x τυφλό στα 700 nm

Μετά από 300 δεύτερα Φωτομέτρηση στα 340 nm^x τυφλό στα 700 nm

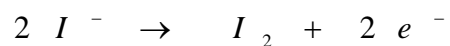
Επεξεργασία δεδομένων από το λογισμικό του αναλυτή με χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης , παραγωγή αποτελέσματος .

3.1.2 Επιλογή μεθόδου Ιωδομετρία



Εικόνα 29 . NaI 1% (w/v) in n-propanol. Ογκομετρική φιάλη αριστερά ,
I⁻ έχουν αναχθεί από το O₂ σε I₂ κίτρινωπό χρώμα . Δεξιά αντιδραστήριο σε μη
ανοιγμένη μορφή διαυγές .

Στην ιωδομετρία [28] (έμμεση μέθοδος) μπορούν να προσδιοριστούν και
οξειδωτικές ουσίες αφού προστεθεί περίσσεια ανιόντων I⁻ (KI ή NaI)
απελευθερώνοντας I₂ σύμφωνα με την ημιαντίδραση :



Όταν υδατικό διάλυμα I₂ αναμιγνύεται με διάλυμα KI, εμφανίζονται δύο κορυφές
απορρόφησης στα 288 εμφανίζονται και 350 nm , αντίστοιχα, υποδεικνύοντας τον
σηηματισμό I₃⁻. Η μοριακή απορροφητικότητα (ε) του I₃⁻ στα 288 και 350 nm
προσδιορίστηκαν να είναι 3,52 x 10⁴, και 2,32 x 10⁴ mol⁻¹ χ cm⁻¹, αντίστοιχα [45] .

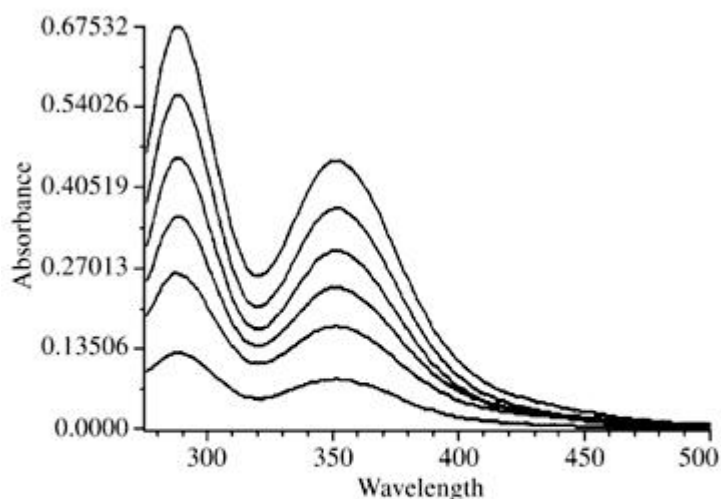
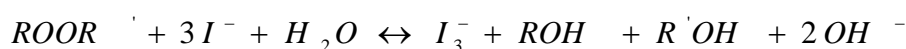


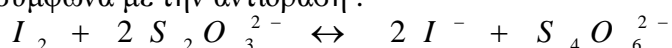
Figure 1. Spectral characteristics of released iodine with maxima at 288 nm and 352 nm and a minimum at 320 nm in the presence of 0.020 mol L⁻¹ of iodide and 0.010 mol L⁻¹ phosphoric acid. Iodate concentrations from 1 to 6 μmol L⁻¹.

Εικόνα 30. Φάσμα απορρόφησης στα του I₃⁻ στα 288 και 350 nm.

Για τα υπεροξείδια αντίστοιχα :



Το I₂ που ελευθερώνεται ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου (Na₂S₂O₃) σύμφωνα με την αντίδραση :



3.1.3. Αντιδραστήρια

Το Ιωδιούχο Κάλιο ,Ιωδιούχο νάτριο , κανονική -προπανόλη, χλωροφόρμιο , οξικό οξύ , και το Θειοθειικό Νάτριο ήταν προσφορά του Γεωπονικού Πανεπιστημίου .

Πριν από τη χρήση, η-προπανόλη και οξικό οξύ ελευθερώθηκαν από οξυγόνο με διαβίβαση ξηρού άζωτου 99,9%.

Διαλύματα περιέχει 0,25-3,0% (w / v) Ιωδιούχο νάτριο παρασκευάστηκαν σε

κ -προπανόλη και αποθηκεύτηκαν σε περιοχή προστατευόμενη από το από το φως. Τα διαλύματα οξικού οξέος ήταν ένα 42-46 % (v/ v) παρασκευάστηκαν σε κ-προπανόλη.

Ελαιόλαδα

του δείκτη υπεροξειδίων στο εύρος 2,35 έως 100 παρασκευάστηκαν σταθμίζοντας τις κατάλληλες ποσότητες των 2,35 PV και ένα έλαιο 100 PV ελαιόλαδο, καθώς είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί πιπέτα λόγω του ιξώδους του ελαιολάδου. Μείγματα που παρασκευάζονται με αυτόν τρόπο στη συνέχεια μετρήθηκαν σύμφωνα με τον EM για την βαθμονόμησης του αναλυτή .

3.1.4. Περιγραφή λειτουργίας του αναλυτή

Ο αναλυτής χειρίζεται τα δείγματα αυτόματα , έχει την δυνατότητα να αποθηκεύει τα αντιδραστήρια σε χώρο μ ελεγχόμενο φωτισμό και ψύξη . Επίσης η ποσότητες δειγματοληψίας διαχειρίζονται αυτόματα με ηλεκτροβαλβίδες και σύριγγες προαγόμενης τεχνολογίας . Υπάρχει η δυνατότητα αυτόματης εναλλαγής διαφορετικού μήκους κύματος μέτρησης . Το λογισμικό μπορεί να αποθηκεύσει αλλά και να δεχτεί πληροφορία ηλεκτρονικά από το σύστημα μηχανοργάνωσης .

Αναπαραγάγει αυτόματα τα αποτελέσματα κάνοντας χρήση της αποθηκευμένης πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

3.1.5. Πλεονεκτήματα της προτεινόμενης μεθόδου

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε σε Βιοχημικό αναλυτή προηγμένης τεχνολογίας . Τα υψηλά ποσοστά ανάλυση: Η ταχύτητα εκτέλεσης δειγμάτων είναι πάνω από 400 αναλύσεις ανά ώρα .

Πλήρης αυτοματοποίηση:

αυτόματη δειγματοληψία και μεταφορά του δείγματος στην κυψελίδα ανάλυσης χωρίς να χρειάζεται ζύγιση ή κάποιου άλλου είδους προεπεξεργασίας (ελαίου ή λιπαρής ύλης), η ανάλυση γίνεται με το πάτημα ενός κουμπιού. Η δειγματοληψία και μεταφορά των αντιδραστηρίων στην κυψελίδα αντίδρασης-φωτομέτρησης γίνεται αυτόματα χωρίς να χρειάζεται ανθρώπινη μεσολάβηση. Επίσης το ξέπλυμα των δειγματοληπτών είναι αυτόματο, η φωτομέτρηση καθώς επίσης και ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων υπολογίζονται από τον αναλυτή, χρησιμοποιώντας την εκάστοτε αποθηκευμένη πρότυπη καμπύλη αναφοράς παράγοντας το αποτέλεσμα αυτόματα στον εκτυπωτή ή σε σύστημα μηχανοργάνωσης.

Η έλλειψη ανθρωπίνων παρέμβαση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ακρίβειας και της ακρίβειας.

Χαμηλό κόστος: 0,2-2 ml οργανικών διαλυτών που καταναλώνονται ανά ανάλυση.

Η χαμηλή κατανάλωση διαλυτών και η αντικατάσταση των χλωριωμένων διαλυτών καθιστά την αναπτύξει μεθόδους φιλικές προς το περιβάλλον.

Χαμηλή κατανάλωση δείγματος: 0,3 έως 0,9 μL ανά ανάλυση.

Καλή συμφωνία με την χρονοβόρα επίσημη μέθοδο.

Προστασία των αντιδραστηρίων από το φως και το οξυγόνο της ατμόσφαιρας σε ελεγχόμενη θερμοκρασία από 3 έως 7 °C.

3.2. Προσδιορισμός υπεροξειδίων μεθοδολογία

Ο προσδιορισμός των υπεροξειδίων σε λιπαρές ύλες με την επίσημη μέθοδο [17] γίνεται με την μέθοδο της ιωδομετρίας.

Αυτοματοποιημένη μέθοδος σε πολυκαναλικό αναλυτή παράλληλης έγχυσης ροής για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υπεροξειδίων σε ελαιόλαδο.

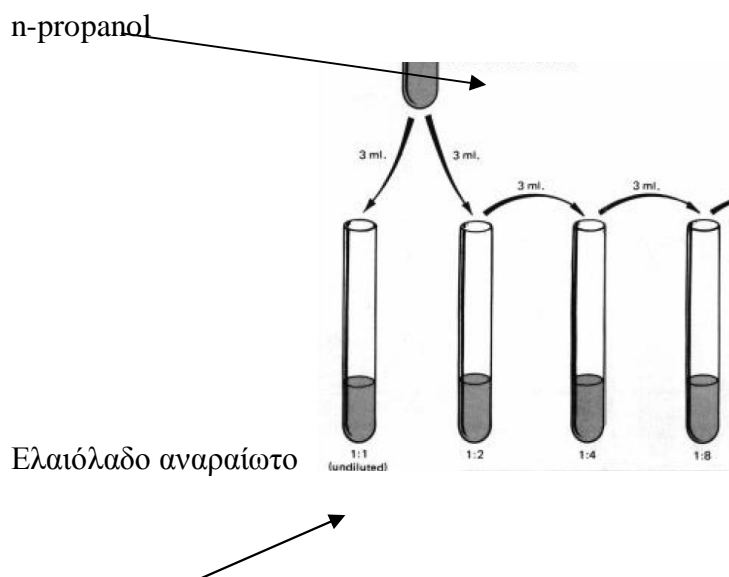
Αντιδραστήρια 1,0% (w / v) NaI σε κ-προπανόλη , 43.2% (v / v) οξικού οξέος σε η-προπανόλη η απορρόφηση μετρήθηκε σε Φασματοφωτόμετρο, στα 360 nm . Πεδίο εφαρμογής δείγματα ελαίων και λιπών ζωικής και φυτικής προέλευσης [20].

3.3. Προκαταρτικοί έλεγχοι

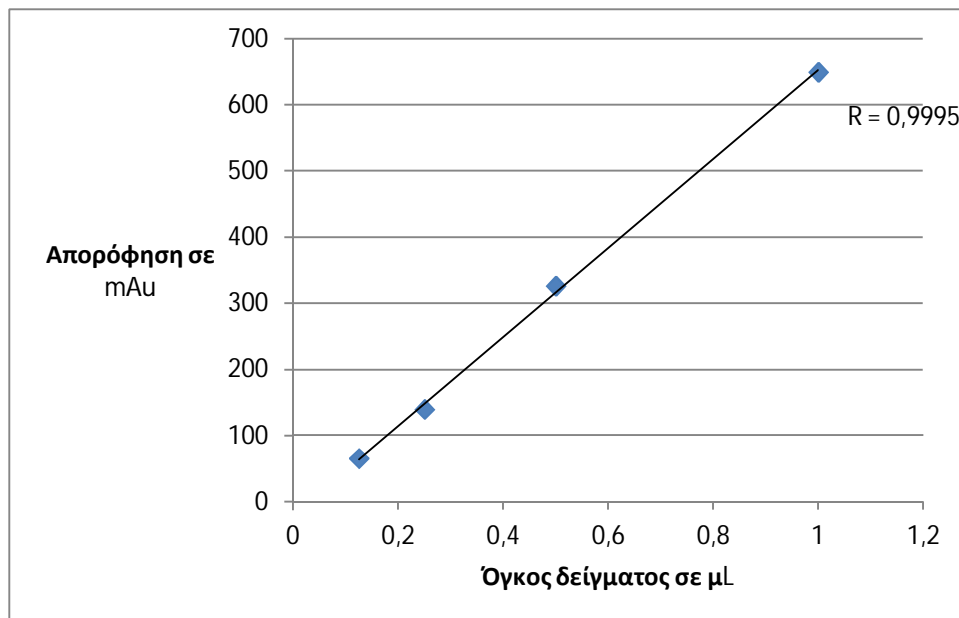
3.3.1. Έλεγχος επαναληψιμότητας μέτρησης του όγκου

Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της καμπύλης αναφοράς είναι δείγματα ελαιολάδου τα οποία αναλύθηκαν με την επίσημη μέθοδο [17] με αυτήν την τεχνική αποφύγαμε το (matrix effect) και είχαμε πλήρη ταύτιση των αποτελεσμάτων της προτεινόμενης μέθοδο και της επίσημης μεθόδου.

Το βασικό βήμα για να συνεχίσουμε τον σχεδιασμό και την υλοποίηση της μεθόδου στον Βιοχημικό αναλυτή ήταν ο έλεγχος της ακρίβειας και επαναληψιμότητας στη δειγματοληψία του ελαιολάδου και η μεταφορά του στην κυψελίδα αντίδρασης και μέτρηση της απορρόφησης στο 293 nm μήκος κύματος[29]. Χρησιμοποιήθηκε ελαιολάδο το οποίο αραιώθηκε χειροκίνητα με n-propanol σειριακά έως 1 μέρος ελαιολάδου προς 7 n-propanol και μετρήθηκαν στον αναλυτή στο (σχήμα 8) και (πίνακα 1) συντελεστής γραμμικής συσχέτισης $R = 0,9995$.



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της σειριακής αραίωσης



Σχήμα 4. Απορρόφηση έναντι όγκου δείγματος.

Αραίωση	Απορρόφηση mAu
1	649,63
0,5	326,24
0,25	139,88
0,125	65,79

Πίνακας 7. Απορροφήσεις έναντι αραίωση δείγματος

Επίσης ελέγχτηκε η επαναληψιμότητα , $n = 10$, οι τιμές είναι αυθαίρετες μονάδες αυθαίρετες μονάδες .

Τυχαίο δείγμα.	
	21,6±0,8
	20,9±0,8
	19,5±0,8
	19,9±0,8
	19,3±0,8
	19,1±0,8
	18,8±0,8
	18,7±0,8
	19,8±0,8
mean	19,6±0,8
sd	0,8
cv	4,5

Πίνακας 8. Επαναληψιμότητα $n=10$ Απορροφήσεις έναντι αραίωση δείγματος .

Τέλος επιβεβαιώθηκε ότι η απορρόφηση οφείλεται στο ελαιόλαδο κυρίως κετόνες , αλδεΐδες [30] , όταν μετρήθηκε το τυφλό αντιδραστήριου όπου δεν παρατηρήθηκε απορρόφηση στο μήκος κύματος 293 nm η οποία ήταν σταθερή και εφάμιλλη του μήκους κύματος 700 nm .

Χρωμοφόρο	ομάδα	nm
Ketone	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \end{array}$	195
		270–285
Aldehyde	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{—CHO} \\ \diagdown \end{array}$	210
		280–300

Τα παραπάνω στοιχεία αναλύθηκαν με Microsoft Office Excel 2007 .

3.3.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας κυψελίδας στα αντιδραστήρια

Πραγματοποίησα έλεγχο ανθεκτικότητας της κυψελίδας του αναλυτή με οξικό οξύ 35% σε κ-προπανόλη ο οποίος ήταν θετικός ως προς την αντοχή της δεν υπήρχε αλλοίωση της κυψελίδας επαληθεύτηκε με φωτομετρικό έλεγχο (φωτομετρικός έλεγχος σταθερή απορρόφηση για τουλάχιστον τέσσερα λεπτά μετά το πέρας της αντίδρασης) οπτικός έλεγχος δεν παρατηρήθηκε οπτικά καμία αλλαγή στην όψη της κυψελίδας .

3.4 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου

Για την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου , εκτελέστηκε μεταβολή μίας παραμέτρου (univariate procedure) σειρά δοκιμών με διαφορετικούς όγκους δείγματος , μετρήσεις σε διαφορετικά μήκη κύματος , διαφορετικές συγκεντρώσεις Ιωδιούχου Νατρίου , διαφορετικούς τρόπους ανάδευσης , έπειτα έγινε η στατιστική ανάλυση όπου και επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες του πειράματος . Έλεγχος τυφλού

αντιδραστηρίου (πίνακας 9) όταν στην κυψελίδα προστίθεται μόνο κ-προπανόλη (έλλειψη ιόντων Ιωδίου η απορρόφηση είναι μη σημαντική . Αντίθετα όλες τις συνθήκες ίδιες όταν προστίθεται NaI στην κυψελίδα έχουμε σημαντική απορρόφηση οπότε σε συνδυασμό και με το τυφλό δείγματος αποδεικνύεται ότι η απορρόφηση οφείλεται στην οξείδωση των ιόντων ιωδίου Γ και στην παραγωγή I₂.



Μήκος κύματος	Τυφλό αντιδραστηρίου	Τυφλό δείγματος 5μL
λ, nm	A (mAu) ± SD , (n=5)	A(mAu)±SD , (n=5)
293	27,8±1,3	43,4±2,3
340	19±2,4	27,5±3,6
383	17,47±3,4	23,7±3,6
405	4,96±4,2	8,2±3,4
452	-	-
510	-	-
540	-	-
577	-	-
600	-	-
700	-	-

Πίνακας 9. Έλεγχος τυφλού.

3.4.1. Βελτιστοποίηση όγκου δείγματος

Διαδοχικά έγιναν αλλαγές στον όγκο δειγματοληψίας του ελαιολάδου, από τα οποία προέκυψε ο βέλτιστος όγκος δείγματος βάση του καλύτερου CV. Επιπλέον έγινε δοκιμή τυφλού δείγματος, δηλαδή αντί ελαιόλαδο προστέθηκε στην κυψελίδα κ-προπανόλη το αποτέλεσμα ήταν απορρόφηση να κυμαίνεται στα του βασικά επίπεδα της απορρόφησης των αντιδραστηρίων σε συνδυασμό με την δοκιμή τυφλού αντιδραστηρίου δηλαδή αντί της προσθήκης NaI στην κυψελίδα προστέθηκε δείγμα και κανονική κ-προπανόλη όπου και σε αυτή την περίπτωση η απορρόφηση κυμαίνεται στα βασικά επίπεδα της απορρόφησης των αντιδραστηρίων, μηδενική γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι η απορρόφηση οφείλεται στα υπεροξείδια του δείγματος. Σύμφωνα με τα δεδομένα βέλτιστη επαναληψιμότητα παρατηρήσαμε όσο πλησιάζουμε στα 7 μL όγκο δείγματος (Πίνακας 10).

Sample volume	A \pm SD, (n=5) λ 383 nm	CV	A \pm SD, (n=5) λ 405 nm	CV	A \pm SD, (n=5) λ 452 nm	CV
2 μL	4,01 \pm 0,14 $\times 10^2$	3,6	1,56 \pm 0,06 $\times 10^2$	3,5	0,35 \pm 0,43 $\times 10^2$	33,09
3 μL	5,72 \pm 0,13 $\times 10^2$	2,6	2,60 \pm 0,06 $\times 10^2$	2,8	0,62 \pm 0,09 $\times 10^2$	2,5
4 μL	6,70 \pm 0,21 $\times 10^2$	3,1	3,06 \pm 0,09 $\times 10^2$	2,9	0,70 \pm 0,02 $\times 10^2$	3,7
5 μL	9,28 \pm 0,21 $\times 10^2$	2,4	4,24 \pm 0,01 $\times 10^2$	2,4	0,96 \pm 0,03 $\times 10^2$	3,3
6 μL	10,3 \pm 0,27 $\times 10^2$	2,6	4,74 \pm 0,13 $\times 10^2$	2,8	1,09 \pm 0,04 $\times 10^2$	9,3
7 μL	11,8 \pm 0,08 $\times 10^2$	0,7	5,42 \pm 0,03 $\times 10^2$	0,6	1,26 \pm 0,01 $\times 10^2$	0,5
8 μL	12,9 \pm 0,04 $\times 10^2$	0,3	5,92 \pm 0,03 $\times 10^2$	0,5	1,35 \pm 0,01 $\times 10^2$	0,7
9 μL	14,5 \pm 0,05 $\times 10^2$	0,3	6,66 \pm 0,01 $\times 10^2$	0,2	1,54 \pm 0,01 $\times 10^2$	0,5

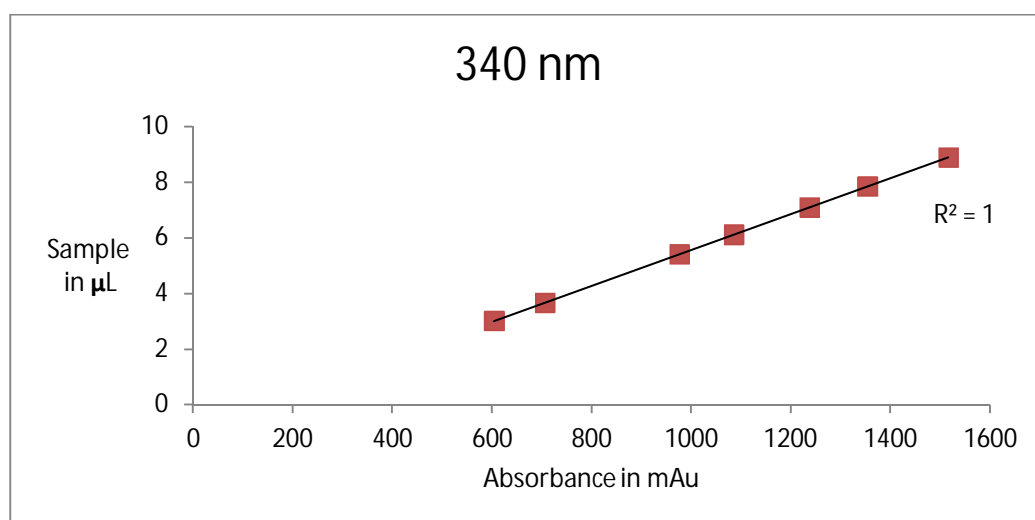
Πίνακας 10. Απορρόφηση σε διαφορετικούς όγκους δείγματος.

Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος παρουσιάζει ένα ακόμη πλεονέκτημα έναντι της επίσημης, είναι δυνατή η δημιουργία ενός δεύτερου ή ακόμη και τρίτου

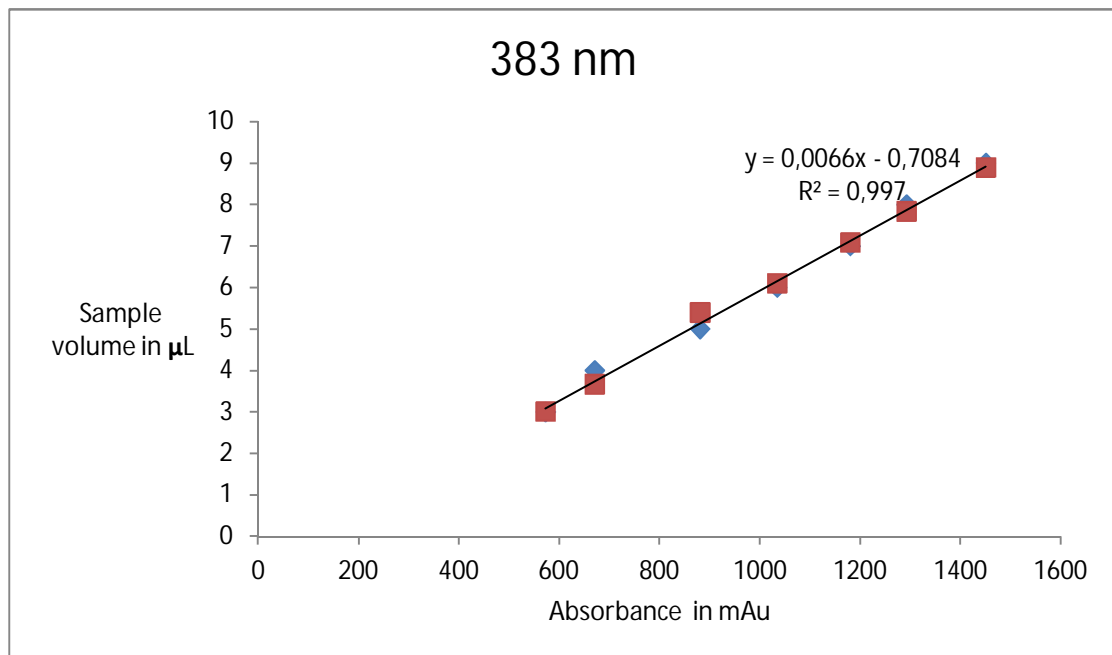
πρωτοκόλλου με διαφορετικό όγκο δείγματος ή και αντιδραστηρίου ώστε να υπολογιστούν τα δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις , γεγονός που κατά την επίσημη μέθοδο είναι δύσκολο και χρονοβόρο (πίνακας 10) .

Expected peroxide value (meq)	Weight of test portion (g)
0 to 12	5,0 to 2,0
12 to 20	2,0 to 1,2
20 to 30	1,2 to 0,8
30 to 50	0,8 to 0,5
50 to 90	0,5 to 0,3

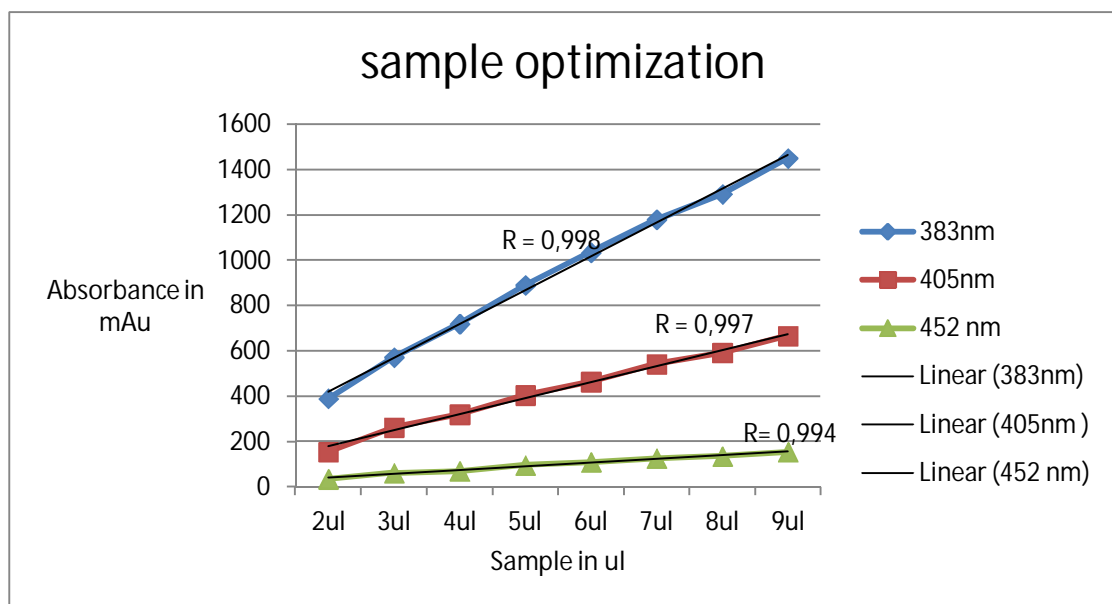
Πίνακας 11 . Προτεινόμενοι όγκοι δείγματος έναντι της συγκέντρωσης .



Σχήμα 5. Απορρόφηση στα 340 nm σε σχέση με τον όγκο δείγματος



Σχήμα 6. Απορρόφηση στα 340 nm σε σχέση με τον όγκο δείγματος



Σχήμα 7. Απορρόφηση στα 340 nm σε σχέση με τον όγκο δείγματος

3.4.2. Βελτιστοποίηση μήκους κύματος μέτρησης

Η επίδραση του μήκους κύματος στο αναλυτικό σήμα μας δίνει την δυνατότητα (Πίνακας 12) να χρησιμοποιήσουμε διαφορετικά πρωτόκολλα με αντίστοιχα μήκη κύματος 293 nm, 340 nm, 383 nm, 405 nm τα οποία είναι κατάλληλα για αντίστοιχες συγκεντρώσεις αποφεύγοντας να χρησιμοποιήσουμε διαφορετικούς όγκους δείγματος όπως προτείνει η επίσημη μέθοδος. Επιπλέον, πλέον του μήκους κύματος 510 nm η απορρόφηση είναι μη σημαντική οπότε το 700 nm είναι κατάλληλο για μηδενισμό.

Επίδραση μήκους κύματος Όγκος δείγματος 3 μL		
λ, nm	A \pm SD, (n=5)	RSD %
293	14,1\pm0,3 x10⁻²	2,2
340	6,0\pm0,1x10⁻²	2,2
383	5,7\pm0,1x10⁻²	2,3
405	2,6\pm0,06x10⁻²	2,5
452	0,6\pm0,02x10⁻²	4,0
510	0,09\pm0,02x10⁻²	16
577	0,01\pm0,8x10⁻²	1,0

Πίνακας 12. Επίδραση μήκους κύματος στην απορρόφηση.

3.4.3. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης Ιωδιούχου Νατρίου

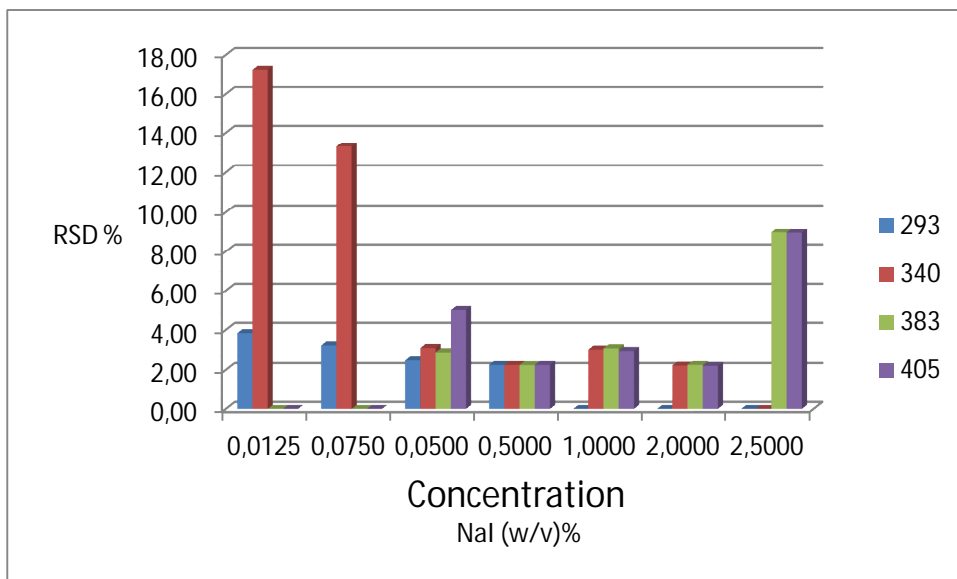
Διαδοχικά έγιναν μετρήσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaI, σκοπός της συγκεκριμένης δοκιμασίας είναι η βέλτιστη συγκέντρωση του αντιδραστηρίου σε NaI

, ελέγχοντας τα όρια της γραμμικότητας . Έχουμε την δυνατότητα επιλέγοντας την κατάλληλη συγκέντρωση αντιδραστηρίου σε NaI να διατηρήσουμε σταθερό τον όγκο δείγματος , έναντι της αλλαγής του όγκου δείγματος η οποία προτείνεται από στην EM για διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων βέλτιστη συγκέντρωση (Πίνακας 13) φαίνεται να είναι όταν πλησιάζουμε στην περιοχή 0,5 -1 NaI (v/v) in n-propanol .

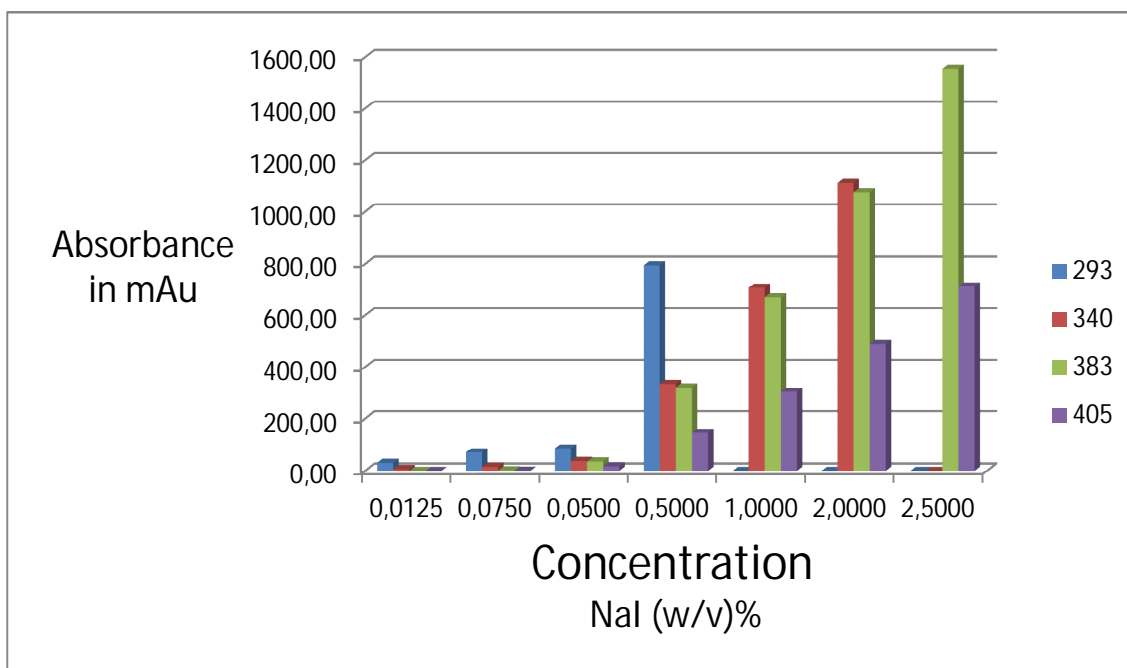
NaI (w/v) in-propanol	RSD %			
	293 nm	340 nm	383 nm	405 nm
12,5x10 ⁻²	3,8	17,2	ΕΕΦ*	ΕΕΦ
7,5x10 ⁻²	3,2	13,3	107,60	165,0
0,5x10 ⁻¹	2,4	3,1	2,8	5,0
0,5	2,3	2,6	2,2	2,3
1,0	ΕΕΦ	3,0	3,0	2,9
2,0	ΕΕΦ	2,2	2,2	2,2
2,5	ΕΕΦ	ΕΕΦ	8,9	8,9

* ΕΕΦ Εκτός εύρους φωτομέτρησης

Πίνακας 13 . RSD % σε σχέση με την συγκέντρωση σε NaI (v/v) in n-propanol



Σχήμα 8. RSD % σε σχέση με την συγκέντρωση σε NaI (v/v) in n-propanol



Σχήμα 9. Απορρόφηση σε σχέση με την συγκέντρωση σε NaI (v/v) in n-propanol

3.4.4. Βελτιστοποίηση ανάδευσης

Μία άλλη παράμετρος η οποία υπεισέρχεται στην αντίδραση είναι ο τρόπος ανάδευσης . Υπάρχουν τρεις διαβαθμίσεις ήπια ανάδευση (YA) , μέτρια ανάδευση (MA) , ισχυρή ανάδευση (IA) όπως φαίνεται από τον πίνακα 14 ο βέλτιστος τρόπος ανάδευσης είναι η MA στην οποία παρατηρείται η καλύτερη επαναληψιμότητα .

Μεταξύ ίδιας μέτρησης (n = 5)

Τρόπος Ανάδευση	λ 340nm		λ 383 nm		λ 405 nm	
	A ± SD	CV	A ± SD	CV	A ± SD	CV
YA	$11,9 \pm 0,17 \times 10^{-2}$	1,5	$11,2 \pm 0,16 \times 10^{-2}$	1,46	$5,14 \pm 0,07 \times 10^{-2}$	1,4
MA	$12,4 \pm 0,86 \times 10^{-2}$	0,7	$11,8 \pm 0,11 \times 10^{-2}$	0,94	$5,40 \pm 0,06 \times 10^{-2}$	1,2
ΔA	$12,7 \pm 0,16 \times 10^{-2}$	1,3	$12,1 \pm 0,15 \times 10^{-2}$	1,31	$5,56 \pm 0,07 \times 10^{-2}$	1,3

Τρόπος Ανάδευση	λ 452 nm		λ 510 nm	
	A ± SD	CV	A ± SD	CV
YA	$1,17 \pm 0,01 \times 10^{-2}$	1,0	$0,14 \pm 0,01 \times 10^{-2}$	4,4
MA	$1,24 \pm 0,04 \times 10^{-2}$	3,2	$0,14 \pm 0,03 \times 10^{-2}$	22
ΔA	$1,29 \pm 0,02 \times 10^{-2}$	1,9	$0,16 \pm 0,02 \times 10^{-2}$	16

Πίνακας 14 . Απορρόφηση σε σχέση με τον τρόπο ανάδευσης .

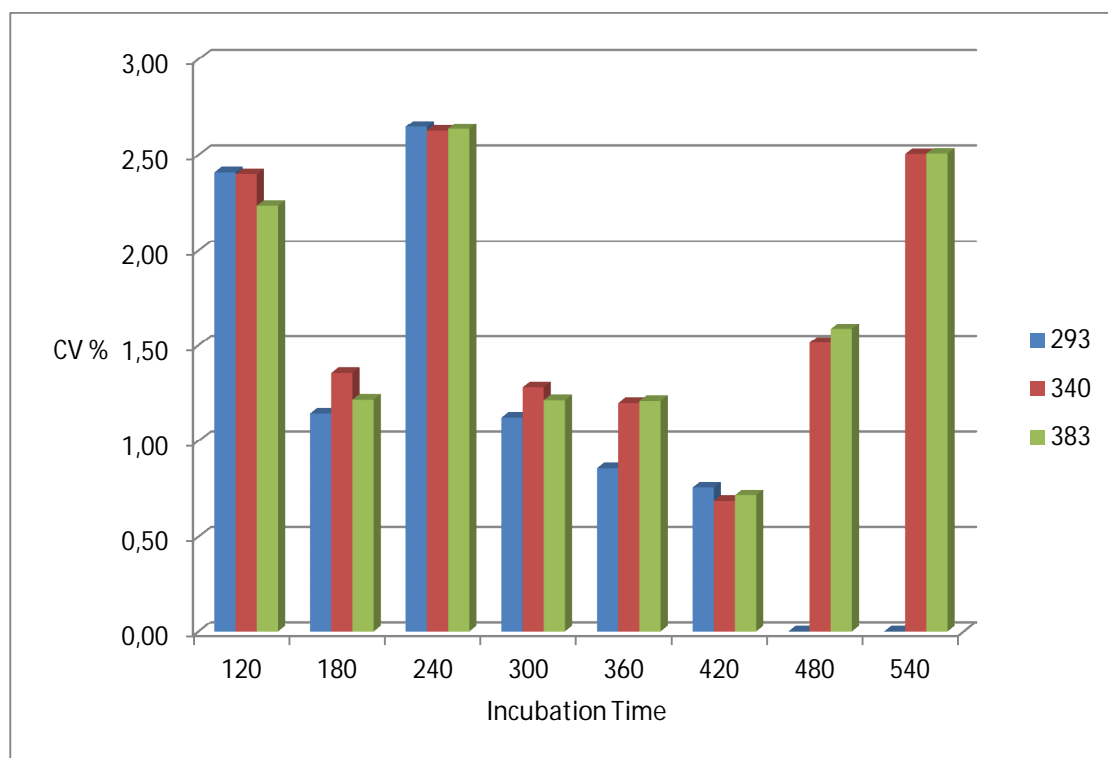
3.4.5. Βελτιστοποίηση χρόνου επώασης

Μετρήθηκε συγκεκριμένο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης η καλύτερη επαναληψιμότητα φαίνεται να υπάρχει στο χρονικό εύρος 300 – 400 δεύτερα . Χρόνος επώασης 300 δεύτερα συμπίπτει με τον χρόνο επώασης της **EM** .

Μεταξύ ίδιας μέτρησης (n = 5)

RSD % σε σχέση με τον χρόνο επώασης			
t ,s	293 nm	340 nm	383 nm
120	2,4	2,4	2,2
180	1,1	1,3	1,2
240	2,6	2,6	2,6
300	1,1	1,2	1,2
420	0,7	0,6	0,7
480	ΕΕΦ	1,5	1,5
540	ΕΕΦ	2,5	2,5
600	ΕΕΦ	1,5	1,3

Πίνακας 15 . RSD % σε σχέση με τον χρόνο ανάδευσης

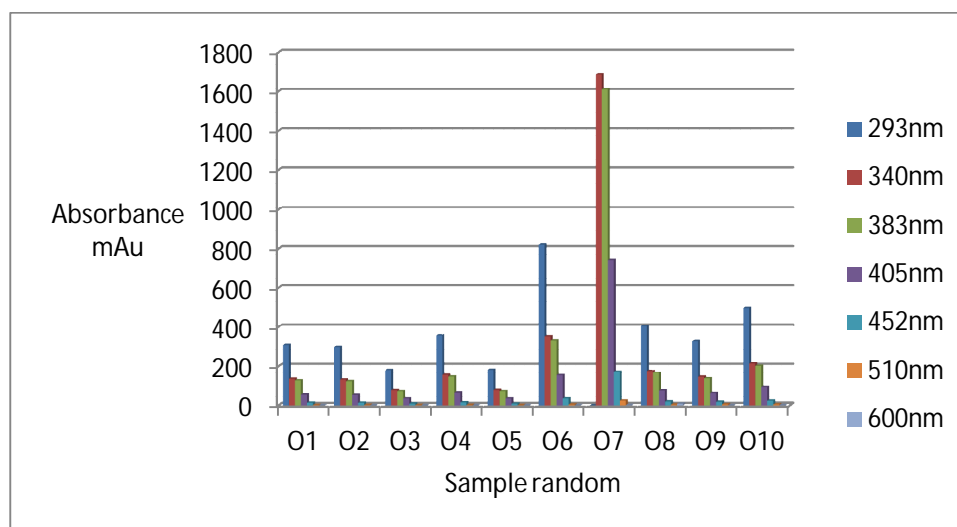


Σχήμα 10. RSD % σε σχέση με τον χρόνο ανάδευσης .

Έλεγχος ευαισθησίας του πρωτοκόλλου σε διαφορετικά δείγματα τυχαία δείγματα τα οποία ονομάστηκαν O1,O2,O3,O4,O5,O6,O7,O8,O9,O10 όπου παρατηρήθηκε διακύμανση των απορροφήσεων , ένδειξη ότι η μέθοδος ανταποκρίνεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις .

Απορροφήσεις Τυχαίων δείγματα ελαιολάδου					
	λ 293nm	λ 340nm	λ 383nm	λ 405nm	λ 452 nm
O1	$3,1 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$5,8 \times 10^{-2}$	$0,1 \times 10^{-2}$
O2	$3,0 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-2}$	$0,1 \times 10^{-2}$
O3	$1,8 \times 10^{-2}$	$7,8 \times 10^{-2}$	$7,3 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-2}$	$0,9 \times 10^{-2}$
O4	$3,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-2}$	$0,1 \times 10^{-2}$
O5	$1,8 \times 10^{-2}$	$7,9 \times 10^{-2}$	$7,4 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-2}$	$0,8 \times 10^{-2}$
O6	$8,2 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$0,4 \times 10^{-2}$
O7	ΕΕΦ	$1,7 \times 10^{-2}$	16×10^{-2}	$7,4 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$
O8	$4,0 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^{-2}$
O9	$3,3 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^{-2}$
O10	$4,9 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$9,4 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^{-2}$

Πίνακας 16. Απορροφήσεις διαφορετικών δειγμάτων .



Σχήμα 11. Απορροφήσεις διαφορετικών δειγμάτων .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

4.1. Επίσημη μέθοδος

4.1.1. Τιτλοδότηση με την επίσημη μέθοδο



(Εικόνα 32Α)

(Εικόνα 32Β)

Εικόνα 32Α. (Στάδιο μετά την προσθήκη Χλωροφορμίου)

Εικόνα 32Β. (Στάδιο μετά την προσθήκη ΚΙ)

Τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο [31] προσδιορισμού των υπεροξειδίων τα αποτελέσματα παρατίθενται στον **πίνακα 18**.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η δοκιμή έγινε με διάχυτο φυσικό ή με τεχνητό φωτισμό, ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,001 g, μια μάζα του δείγματος (ελαιολάδου), σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα, σύμφωνα με τον αναμενόμενο αριθμό υπεροξειδίων:

Expected peroxide value (meq)	Weight of test portion (g)
0 to 12	5,0 to 2,0
12 to 20	2,0 to 1,2
20 to 30	1,2 to 0,8
30 to 50	0,8 to 0,5
50 to 90	0,5 to 0,3

Πίνακας 17. Μάζα του δείγματος σύμφωνα με τον αναμενόμενο αριθμό υπεροξειδίων

Αποπωματίστηκε η φιάλη ανάμιξης όπου προστέθηκε το δείγμα που ζυγίστηκε στο προηγούμενο βήμα . Προστέθηκε 10 ml χλωροφορμίου . Διαλύθηκε γρήγορα το δείγμα με ανάδευση. Προσθήκη 15 ml οξικού οξέος και στη συνέχεια 1 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Πωματίστηκε γρήγορα, και έγινε ανάδευση επί ένα λεπτό, και αφέθηκε για ακριβώς πέντε λεπτά μακριά από το φώς σε θερμοκρασία 22° C. Προστέθηκαν περίπου 75 ml απεσταγμένου νερού. Το Ιώδιο που ελευθερώθηκε ογκομετρήθηκε με το θειοθειικού νατρίου 0,002 Mol / L για αναμενόμενες τιμές μικρότερες από 12, και διάλυμα 0,01 Mol / L για την αναμενόμενες τιμές πάνω από 12) με ζωηρή ανάδευση, χρησιμοποιώντας διάλυμα αμύλου (6.5) ως δείκτη. Έγινε διενέργεια δύο προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δοκιμής. Εκτελέστηκε το πείραμα ταυτόχρονα με τυφλό ώστε να ελεγχθεί αλλοίωση των αντιδραστηρίων εάν το αποτέλεσμα του τυφλού ξεπερνά 0,05 ml για το 0,01 mol / L νατρίου θειοθειικού διαλύματος τα αντιδραστήρια αντικαταστάθηκαν.

4.1.2. Προσδιορισμός υπεροξειδίων επίσημη μέθοδος

Ο προσδιορισμός των υπεροξειδίων σε λιπαρές ύλες με την επίσημη μέθοδο [17] γίνεται με την μέθοδο της ιωδομετρίας .

Πεδίο εφαρμογής δείγματα ελαίων και λιπών ζωικής και φυτικής προέλευσης .

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζει την ποσότητα των συστατικών του δείγματος, τα οποία εκφράζονται σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά χιλιόγραμμα, που οξειδώνουν το ιωδιούχο κάλιο κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες.

ΑΡΧΗ

Ανάμειξη του αναλυόμενου δείγματος , σε διάλυμα σε οξικό οξύ και χλωροφόρμιο, με διάλυμα ιωδιούχου καλίου. Η τιτλοδότηση του ιωδίου που ελευθερώθηκε με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου.

Μειονεκτήματα Αυτή η μέθοδος είναι χρονοβόρα, επιτρέποντας την ανάλυση μόνο 6-10 δείγματα ανά ώρα. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών όπως επίσης η χειροκίνητη προετοιμασία του δείγματος .

4.2. Βαθμονόμηση

Η βαθμονόμηση έγινε με χρήση των ελαχίστων τετραγώνων ως τιμές συγκεντρώσεως χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των μετρήσεων με την επίσημη μέθοδο.

Απαιτείται βαθμονόμηση για τον υπολογισμό συγκεντρώσεως του αναλύτη.

Απαιτείται αναμφισβήτητη εμπειρική ή θεωρητική σχέση μεταξύ αναλυτικής παραμέτρου (σήματος) και συγκεντρώσεως ή ποσότητας x . Η σχέση αυτή είναι η αναλυτική συνάρτηση ή συνάρτηση βαθμονόμησης (calibration function): $y = g(x)$.

Φασματοφωτομετρία (Νόμος Lambert – Beer): A (απορρόφηση) = $\epsilon b c$

Φθορισμομετρία: F (ισχύς φθορισμού) = $2,3 \Phi P_0 \epsilon b c = k c$

Προσαρμογή (fitting) ενός κατάλληλου μαθηματικού μοντέλλου στα πειραματικά δεδομένα (σήμα y – συγκέντρωση C). Πλέον εύχρηστη συνάρτηση βαθμονόμησης είναι γραμμική (linear), διέρχεται από την αρχή των αξόνων (origin) και είναι εφαρμόσιμη σε ευρεία δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων. Στην πράξη εμφανίζονται αποκλίσεις από ιδανική γραμμή βαθμονόμησης. Παραδείγματα: Αποκλίσεις νόμου Beer (πυκνά διαλύματα, χημική ισορροπία σωματιδίων, παράσιτη ακτινοβολία). Για την πλειονότητα των αναλυτικών τεχνικών, χρησιμοποιείται η γραμμική εξίσωση βαθμονόμησης: $y = a + b x$ όπου y = αναλυτικό σήμα, x = συγκέντρωση προτύπων, a = τομή στον άξονα των y και b = κλίση [28].

Έλεγχος καμπύλης βαθμονόμησης (calibration curve)

Εάν είναι γραμμική ή όχι και εάν όχι ποιός μορφής είναι.

Ποιά είναι η καλύτερη ευθεία που πρέπει να χαραχθεί;

Ποιά είναι η γραμμική περιοχή (περιοχή εργασίας);

Ποιό είναι το σφάλμα και τα όρια εμπιστοσύνης των παραμέτρων της τομής και της κλίσεως της ευθείας;

Ποιό είναι το σφάλμα και τα όρια εμπιστοσύνης στην προσδιοριζόμενη συγκέντρωση του αγνώστου που λαμβάνεται από την καμπύλη βαθμονόμησης;

Στη βαθμονόμηση χρησιμοποιείται η μονοπαραμετρική παλινδρόμηση ή προσαρμογή (univariate regression), που σημαίνει ότι οι μετρούμενες τιμές του αναλυτικού σήματος εξαρτώνται από μία μόνο ανεξάρτητη (χωρίς σφάλμα) μεταβλητή, τη συγκέντρωση προτύπων.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (Least Squares Method)

Στόχος της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων είναι να βρεθούν οι εκτιμήτριες (estimates) των αληθινών τιμών a και b . Αυτό πετυχαίνεται με τον υπολογισμό τιμών a και b για τις οποίες το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων (δηλαδή των e_i) να γίνεται ελάχιστο από όπου προκύπτει και το όνομα της μεθόδου :

$$\sum e^2 \rightarrow 0$$

Το τυχαίο συστατικό e_i αντιπροσωπεύει τη διαφορά: $e_i = y_i - \hat{y}$ όπου,

e_i = υπόλοιπο (residual) ή απόκλιση, y_i = παρατηρούμενη τιμή σήματος,

\hat{y} = τιμή σήματος υπολογιζόμενη από το μοντέλο = $a + bx_i$ Επομένως:

$$e_i = y_i - a - bx_i$$

Οι εκτιμήτριες ελαχίστων τετραγώνων των παραμέτρων a και b βρίσκονται με ελαχιστοποίηση του αθροίσματος των τετραγώνων των υπολοίπων ή αποκλίσεων,

$$R: R = \sum e_i^2 = \sum (y_i - a - bx_i)^2$$

Αυτές είναι γνωστές ως κανονικές εξισώσεις (normal equations). Μετά από επεξεργασία λαμβάνονται οι σχέσεις:

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} = \frac{n \sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i}{n \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum_i y_i \sum_i x_i^2 - \sum_i x_i \sum_i x_i y_i}{n \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2}$$

4.3. Ανάλυση δειγμάτων

Τα δείγματα από ήταν αναλυμένα με την επίσημη μέθοδο από το εργαστήριο OLITECN διαπιστευμένο από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOOC). Ορισμένα δείγματα αναλύθηκαν και με την επίσημη μέθοδο στο εργαστήριο ΓΠΑ. Αναλυθήκαν εις διπλούν $n=2$, τόσο με την επίσημη μέθοδο όσο και με την προτεινόμενη μέθοδο .

Δείγμα	Μέτρηση με την επίσημη μέθοδο	Τιμές OLITECN
Δ04	2,30	2,45
Δ11	6,53	6,94
Δ82	8,67	9,14

Πίνακας 18. Αποτελέσματα με την επίσημη μέθοδο

4.4. Σύγκριση μεθόδων [28]

Σύγκριση της ΑΜΠΥ την ΕΜ έγινε με την ανάλυση των πραγματικών δειγμάτων και με τις δύο μεθόδους και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας στατιστικές t και F test χρησιμοποιώντας το Microsoft Office Excel 2007 με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

4.4.1. Συσχέτιση

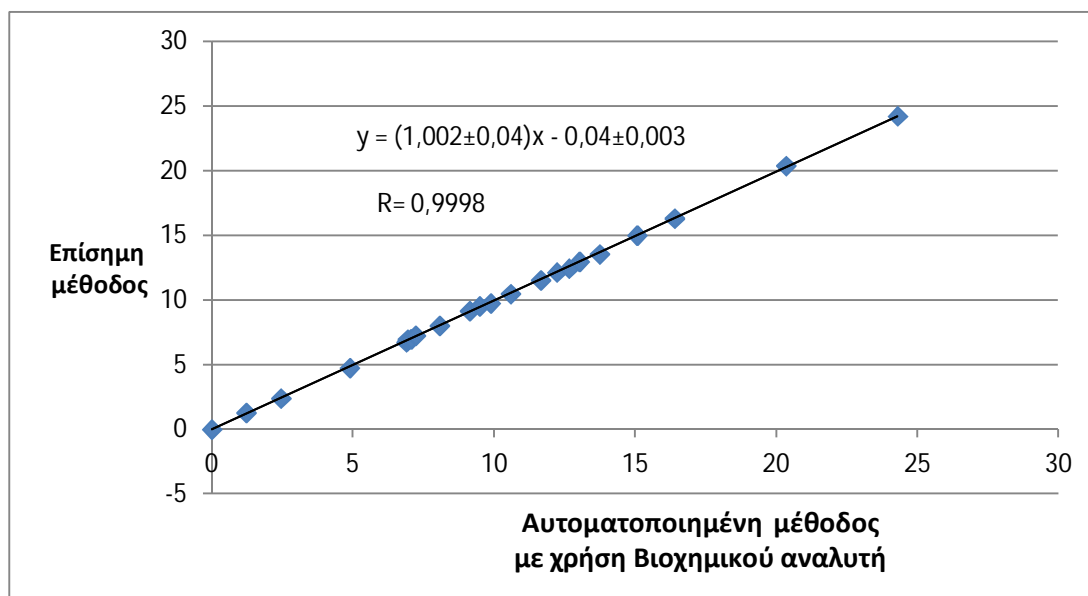
Το είδος και το μέγεθος της γραμμικής σχέσης μεταξύ δύο ποσοτικών μεταβλητών εκτιμάται με το συντελεστή συσχέτισης , οπότε συμπεραίνουμε αν οι δύο μέθοδοι

είναι ταυτόσημες. Αναλύθηκαν 23 δείγματα ελαιολάδου και με τις δύο μεθόδους πίνακας 19 . Όπως φαίνεται από το σχήμα 5 $R=0,9998$ από όπου προκύπτει ταύτιση των δύο μεθόδων .

Δείγμα	Επίσημη Μέθοδος	Αυτοματοποιημένη Μέθοδος
ΤΥΦΛΟ	0	0
Δ05	1,22	1,29
Δ04	2,45	2,41
Δ03	4,89	4,76
Δ88	6,89	6,75
Δ41	6,94	6,87
Δ11	6,94	6,97
Δ89	7,06	6,99
Δ86	7,22	7,26
Δ21	8,07	8,02
Δ82	9,14	9,17
Δ85	9,49	9,53
Δ97	9,88	9,76
Δ80	10,59	10,49
Δ28	11,66	11,54
Δ56	12,23	12,15
Δ70	12,66	12,45
Δ45	13,03	12,97
Δ94	13,74	13,56
Δ08	15,07	15,01
Δ36	16,4	16,32
Δ07	20,35	20,39
Δ71	24,3	24,23

Πίνακας 19. Τιμές υπεροξειδίων , επίσημη μέθοδος (EM) , αυτόματη μέθοδος (AM).

Σχήμα 12. Συσχέτιση μεταξύ Επίσημης μεθόδου



και Αυτόματης μεθόδου.

4.4.2. Δοκιμή F test

Το F test είναι μία δοκιμή η οποία υποδεικνύει αν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ δύο μεθόδων βασισμένη στην τυπική τους απόκλιση . F ορίζεται από τις διακυμάνσεις των δύο μεθόδων , όπου η διακύμανση είναι το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Σχέση 3.

όπου $s_1^2 > s_2^2$ Υπάρχουν δύο διαφορετικοί βαθμοί ελευθερίας ν_1 και ν_2 οι βαθμοί ελευθερίας προσδιορίζονται ως $N-1$ για κάθε περίπτωση.

Αν η τιμή της F από την (σχέση 3) ξεπερνά την τιμή που καθορίζεται από τον πίνακα 21 στο επιλεγμένο όριο εμπιστοσύνης, τότε υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων.

Critical values of $F=(s_1)^2/(s_2)^2$ at 95% confidence level

Degrees of freedom for s_2	Degrees of Freedom for s_1													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	∞
2	19.0	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5
3	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.84	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.62	8.53
4	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.75	5.63
5	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.50	4.36
6	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.81	3.67
7	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.58	3.51	3.44	3.38	3.23
8	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.08	2.93
9	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.86	2.71
10	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.84	2.77	2.70	2.54
11	3.98	3.59	3.36	3.20	3.10	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.57	2.40
12	3.88	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.47	2.30
13	3.81	3.41	3.18	3.02	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.38	2.21
14	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.31	2.13
15	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.25	2.07
16	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.19	2.01
17	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.15	1.96
18	3.56	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.11	1.92
19	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.07	1.88
20	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.04	1.84
30	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.84	1.62
∞	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.46	1.00

Πίνακας 20. Κρίσιμες τιμές του $F = (s_1)^2 / (s_2)^2$ σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

F-Test Two-Sample for Variances

	<i>Επίσημη Μέθοδος</i>	<i>Αυτοματοποιημένη Μέθοδος</i>
Mean.....	10,01	9,95
Variance.....	33,01	32,82
Observations.....	23	23
df.....	22	22
F.....	1,01	
P(F<=f) one-tail.....	0,49	
F Critical one-tail.....	2,04	

P(F<=f) one-tail μικρότερο από F Critical one-tail

4.4.3. Δοκιμή t test

Η δοκιμή Student t χρησιμοποιείται από τους αναλυτές οι οποίοι επιθυμούν να αξιολογήσουν αν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων, δηλαδή, εάν και οι δύο πράγματι μετρούν το ίδιο πράγμα. Σε αυτή τη μέθοδο, γίνεται σύγκριση μεταξύ δύο συνόλων επαναληπτικών μετρήσεων που έγιναν με δύο διαφορετικές μεθόδους μια από αυτές θα είναι μέθοδος δοκιμής και η άλλη θα είναι η αποδεκτή μέθοδος. Η στατιστική τιμή t υπολογίζεται και συγκρίνεται με την αντίστοιχη τιμή πίνακα για το δεδομένο αριθμό των δοκιμών στο επιθυμητό επίπεδο εμπιστοσύνης (Πίνακας 21). Εάν η υπολογιζόμενη τιμή t υπερβαίνει του πίνακα την τιμή t, τότε υπάρχει μια σημαντική διαφορά μεταξύ του αποτελέσματος των δύο μεθόδων στο εύρος αξιοπιστίας. Αν δεν υπερβαίνει την τιμή t του αντίστοιχου πίνακα, τότε μπορούμε να προβλέψουμε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων. Αυτό σε καμία περίπτωση δεν σημαίνει ότι οι δύο αποτελέσματα είναι ταυτόσημα. Υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι υπολογισμού τιμής t.

Στην παρούσα διατριβή θα χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο t με πολλαπλά δείγματα ελέγχου. Στο εργαστήριο κλινικής χημείας, μια νέα μέθοδος συχνά συγκρίνεται έναντι της αποδεκτής μεθόδου αναλύοντας πολλές διαφορετικά δείγματα εντός φυσιολογικού εύρους αναφοράς. Σε αυτήν την περίπτωση, η τιμή t υπολογίζεται με ελαφρώς διαφορετικό τρόπο, υπολογίζεται η διαφορά μεταξύ καθενός από τα ζεύγη

μετρήσεων σε κάθε δείγμα X, ο μέσος διαφοράς \bar{D} υπολογίζεται και οι αποκλίσεις καθενός από την \bar{D} χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουν την τυπική απόκλιση, sd. η τιμή t είναι υπολογίζεται από την (σχέση 4) .

$$t = \frac{\bar{D}}{sd_2} \sqrt{N} \quad Sd \sqrt{\frac{\sum(D_i - \bar{D})^2}{N-1}}$$

Σχέση 4 . Τύπος υπολογισμού τιμής t

όπου D_i είναι η ατομική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων για κάθε δείγμα, και το \bar{D} είναι ο μέσος όρος όλων των επιμέρους διαφορών.

t-Test: Paired Two Sample for Means

	<i>Επίσημη Μέθοδος</i>	<i>Αυτοματοποιημένη μέθοδος</i>
Mean.....	<u>10,01</u>	<u>9,95</u>
Variance.....	<u>33,01</u>	<u>32,82</u>
Observations.....	<u>23</u>	<u>23</u>
Pearson Correlation.....	<u>0,99</u>	
Hypothesized Mean Difference	<u>0</u>	
df.....	<u>22</u>	
t Stat.....	<u>3,67</u>	
P(T<=t) one-tail.....	<u>6,62x10⁻⁴</u>	
t Critical one-tail.....	<u>1,717144</u>	
P(T<=t) two-tail.....	<u>1,3x10⁻³</u>	
t Critical two-tail	<u>2,07</u>	

P(T<=t) one-tail μικρότερο από t Critical one-tail &

P(T<=t) two-tail μικρότερο από t Critical two-tail

Table A2. *t* values for various values of *df*

<i>df</i>	confidence interval						
	80%	90%	95%	98%	99%	99.8%	99.9%
	α level two-tailed test						
	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
	α level one-tailed test						
	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.313	636.589
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.598
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.849
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.160	3.373
∞ (σ known)	1.282	1.645	1.960	2.327	2.576	3.091	3.291

Πίνακας 21. Τιμές *t* με *n* βαθμούς ελευθερίας σε διάφορους βαθμούς ελευθερίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1. Επικύρωση μεθόδου [31-32]

5.1.1 Ακρίβεια Accuracy

Ακρίβεια ορίζεται η διαφορά (σφάλμα , error ή bias) μεταξύ του μέσου όρου χ_{mean} , μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής μ , η οποία γίνεται αποδεκτή ως η αληθής ορθή τιμή της μετρούμενης ποσότητας . Προσδιορίζεται με τον προσδιορισμό ορθότητας και πιστότητας.

5.1.2. Επαναληψιμότητα Repeatability

Επαναληψιμότητα (inter-day) είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών μετρήσεων του ίδιου δείγματος , τα ποία εκτελούνται υπό τις ίδιες συνθήκες δηλαδή , ίδια μέθοδος , ίδιος αναλυτής , ίδια συσκευή , σε μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ των μετρήσεων .

Διαδικασία

Ετοιμάζετε ένα σύνολο δειγμάτων με τις ίδιες μήτρες, εμβολιασμένα με τον αναλυτή να παράγετε συγκεντρώσεις που ισοδυναμούν με 1, 1,5 και 2 φορές το ελάχιστο απαιτούμενο όριο επίδοσης ή με 0,5, 1 και 1,5 φορά το επιτρεπόμενο όριο.

- Σε κάθε επίπεδο η ανάλυση πρέπει να γίνεται με έξι τουλάχιστον μετρήσεις.
- Ανάλυση των δειγμάτων.
- Υπολογίζετε τη συγκέντρωση σε κάθε δείγμα.
- Βρίσκετε τη μέση συγκέντρωση, την τυπική απόκλιση και τον συντελεστή μεταβλητότητας (%) των εμβολιασμένων δειγμάτων.
- Επαναλαμβάνετε τα βήματα αυτά τουλάχιστον άλλες δύο φορές. - Υπολογίζετε τις συνολικές μέσες συγκεντρώσεις και τους CV των εμβολιασμένων δειγμάτων.

5.1.3. Αναπαραγωγιμότητα Reproducibility

- Εντός προσδιορισμού επαναληψιμότητα (Within run)

Εντός προσδιορισμού επαναληψιμότητα είναι η επαναληψιμότητα σειράς μετρήσεων του ίδιου δείγματος , επομένως είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων του σταδίου της μέτρησης της αναλυτικής παραμέτρου .

Διαδικασία :

- Ετοιμάζετε ένα σύνολο από δείγματα συγκεκριμένων υλικών δοκιμής (ίδιες ή διαφορετικές μήτρες), εμβολιασμένα με την αναλύτη (-ες) . - Σε κάθε επίπεδο η ανάλυση πρέπει να γίνεται με έξι τουλάχιστον αντίγραφα.
- Επαναλαμβάνετε τα βήματα αυτά τουλάχιστον άλλες δύο φορές με διαφορετικούς χειριστές και διαφορετικές περιβαλλοντικές
- Ανάλυση των δειγμάτων.
- Υπολογίζετε τη συγκέντρωση σε κάθε δείγμα.
- Βρίσκετε τη μέση συγκέντρωση, την τυπική απόκλιση και τον συντελεστή μεταβλητότητας (%) των εμβολιασμένων δειγμάτων.

	n=6 , S1	n=6 , S2	n=6 , S3	n=6 , S4	n=6 , S5
	23,35±0,18	11,3±0,23	10,2±0,20	9,02±0,11	5,56±0,15
	23,09±0,18	10,86±0,23	9,87±0,20	9,01±0,11	5,59±0,15
	23,53±0,18	11,03±0,23	9,94±0,20	8,95±0,11	5,63±0,15
	23,55±0,18	10,82±0,23	9,72±0,20	8,91±0,11	5,78±0,15
	23,49±0,18	11,31±0,23	9,88±0,20	9,01±0,11	5,87±0,15
	23,54±0,18	10,82±0,23	9,62±0,20	9,24±0,11	5,45±0,15
SD	0,18	0,23	0,20	0,11	0,15
MEAN	23,43	11,02	9,87	9,02	5,65
CV	0,77	2,10	2,02	1,27	2,71

Επαναληψιμότητα (Within run) n=6. & Επαναληψιμότητα (between run) 1^η ημέρα.

Παρατηρούμε CV < 2,8 % σε σύνολο έξι δειγμάτων , n = 6 , μετρήσεων .

- Μεταξύ προσδιορισμών επαναληψιμότητα (between run) :

Μεταξύ προσδιορισμών επαναληψιμότητα ορίζεται η σειρά προσδιορισμών τιμημάτων του ίδιου δείγματος στα οποία εφαρμόζονται όλα τα στάδια της αναλυτικής μεθόδου ,όπου οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε διαφορετικές μέρες.

Αναλύθηκαν για τρεις ημέρες έξι διαφορετικά δείγματα επί έξι επαναλήψεις ανά ημέρα το κάθε δείγμα . Στους πίνακες 22,23,24,25 παρατίθενται τα αποτελέσματα .

Μετρήσεις 2^{ης} ημέρας					
Αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg O₂/kg .					
	n=6 , S1	n=6 , S2	n=6 , S3	n=6 , S4	n=6 , S5
	23,02±0,20	10,76±0,16	9,54±0,23	8,74±0,23	5,27±0,14
	23,34±0,20	10,57±0,16	9,76±0,23	8,91±0,23	5,32±0,14
	23,12±0,20	10,79±0,16	9,65±0,23	8,67±0,23	5,41±0,14
	23,09±0,20	10,87±0,16	9,33±0,23	8,78±0,23	5,23±0,14
	23,45±0,20	10,45±0,16	9,22±0,23	8,72±0,23	5,37±0,14
	23,49±0,20	10,65±0,16	9,78±0,23	8,45±0,23	5,23±0,14
SD	0,20	0,16	0,23	0,15	0,14
MEAN	23,25	10,68	9,55	8,71	5,31
CV	0,86	1,45	2,41	1,74	1,41

Πίνακας 23. Επαναληψιμότητα (between run) 2^η ημέρα.

Μετρήσεις 3^{ης} ημέρας					
Αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg O₂/kg .					
	n=6 , S1	n=6 , S2	n=6 , S3	n=6 , S4	n=6 , S5
	22,65±0,15	10,45±0,14	9,43±0,15	8,65±0,24	4,99±0,13
	23,03±0,15	10,52±0,14	9,65±0,15	8,53±0,24	4,74±0,13
	22,87±0,15	10,32±0,14	9,32±0,15	8,24±0,24	5,06±0,13
	22,91±0,15	10,49±0,14	9,51±0,15	8,95±0,24	4,87±0,13
	22,77±0,15	10,39±0,14	9,31±0,15	8,72±0,24	4,83±0,13
	23,02±0,15	10,74±0,14	9,27±0,15	8,49±0,24	5,05±0,13
SD	0,15	0,14	0,15	0,24	0,13
MEAN	22,88	10,49	9,42	8,60	4,92
CV	0,64	1,37	1,54	2,78	2,64

Πίνακας 24. Επαναληψιμότητα (between run) 3^η ημέρα.
Αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg O₂/kg .

	between run , 3 ημέρες , n = 6 ,				
	n=6 , S1	n=6 , S2	n=6 , S3	n=6 , S4	n=6 , S5
1 ^η Μέρα	23,43	11,02	9,87	9,02	5,65
2 ^η Μέρα	23,25	10,68	9,55	8,71	5,31
3 ^η Μέρα	22,88	10,49	9,42	8,6	4,92
SD	0,28	0,27	0,23	0,22	0,36
MEAN	23,19	10,73	9,61	8,78	5,29
CV	1,22	2,52	2,44	2,49	6,87

Πίνακας 25. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας (between run).
Αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε **meq O₂/kg** .

5.1.4. Ανιχνευσιμότητα Detectability

Εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη.

-Όριο ανίχνευσης (LOD)

Όριο ανιχνεύσεως ορίζεται η συγκέντρωση του δείγματος σε αναλύτη η οποία μπορεί να διακριθεί με ασφαλή στατιστικά όρια από το τυφλό του δείγματος .Τυφλό ορίζεται ένα δείγμα το οποίο έχει την ίδια σύσταση με το δείγμα του αναλύτη χωρίς αυτό να περιέχει αναλύτη . Η συγκέντρωση του αναλύτη η οποία παράγει

σήμα το οποίο υπερβαίνει κατά τρεις φορές την τυπική απόκλιση του σήματος που παράγει το τυφλό .Επειδή η τυπική απόκλιση εξαρτάται από τον αριθμό των μετρήσεων N , η Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) συνιστά την χρήση N=20 μετρήσεων του τυφλού για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης του LOD .

Για τον προσδιορισμό του LOD δείγμα ελαιολάδου δέκα ετών έχοντας μηδενικά υπεροξείδια n= 10 . Όπως φαίνεται στον (πίνακα 26)

LOD = 0,01 meq O₂/kg.

Τυφλό δείγματος n=10	
0,31±0,1	
0,25±0,1	
0,40±0,1	
0,36±0,1	
0,15±0,1	
0,29±0,1	
0,18±0,1	
0,12±0,1	
0,24±0,1	
0,15±0,1	
sd	0,01
mean	0,25
cv	4,07

Πίνακας 26. Αποτελέσματα τυφλού δείγματος n=10

- Όριο προσδιορισμού (LOQ).

Σε συγκεντρώσεις αναλύτη κοντά στη τιμή του LOD πιστότητα είναι φτωχή . Προφανώς η συγκέντρωση του αναλύτη η οποία μπορεί να προσδιοριστεί είναι σε

μεγαλύτερη συγκέντρωση της LOD, αυτή η συγκέντρωση, δηλαδή η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη η οποία μπορεί να προσδιορίσει ορίζεται ως LOQ. Όριο ποσοτικοποίησης είναι η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του τυφλού δείγματος 10 φορές την τυπική απόκλιση.

Σύμφωνα με τις τρέχουσες συνθήκες της προτεινόμενης μεθόδου, LOD και LOQ υπολογίστηκαν από μέσω της τυπικής απόκλισης του τυφλού και κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.

$$\underline{\underline{LOQ = LOD \times 10}} \Rightarrow \underline{\underline{LOQ = 0,01 \times 10}} \Rightarrow \underline{\underline{LOQ = 0,10 \text{ meq O}_2/\text{kg}}}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1. Πρωτοτυπία μεθόδου

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε ο προσδιορισμός υπεροξειδίων στο ελαιόλαδο φασματοφωτομετρικά. Η πρωτοτυπία της μεθόδου είναι ότι όλα τα στάδια της ανάλυσης γίνονται με αυτόματο τρόπο και είναι απόλυτα καθορισμένα οπότε αποφεύγονται ανθρώπινα λάθη.

6.2. Πλεονεκτήματα της μεθόδου

Ο αριθμός δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν ανά ημέρα σε σχέση με την επίσημη μέθοδο είναι πολλαπλάσιος, επίσης η χρήση διαλυτών είναι υποπολλαπλάσια φιλικότερη προς το περιβάλλον καθώς επίσης και οικονομικότερη.

Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει πλήρης συμφωνία αποτελεσμάτων με την επίσημη μέθοδο

Το όριο ανίχνευσης **LOD = 0,25 meq O₂/kg.**

χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και χαμηλό επίπεδο ανίχνευσης.

6.3. Συμβολή του προσδιορισμού του αριθμού Υπεροξειδίων στην διασφάλιση της ποιότητας του ελαιολάδου

Ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων του ελαιολάδου διασφαλίζει τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της σωστής αποθήκευσης του ελαιολάδου . Αλλά και της τρέχουσας κατάστασης αφού το τρίπτυχο της ισορροπίας οξύτητας – υπεροξειδίων – αλδεύδες , κετόνες είναι δυναμικά διαδοχικό . Επίσης ελέγχει την καταπόνηση του ελαιολάδου σε υψηλές θερμοκρασίες .

Βιβλιογραφία

[1]. A Guide to the History of Clinical Chemistry , Larry J. Kricka and John Savory, Clinical Chemistry 57:8 ,p 1118–1126 (2011) ,

<http://www.clinchem.org/content/57/8/1118.full.pdf> (last accessed at 20140614 18:06).

[2]. Fundamentals of CLINICAL CHEMISTRY , Sixth edition , TIETZ ,Carl A. Burtis, Ph D., Edward R. Ashwood, M.D.,David E. Runs, M.D.,Barbara G. Sawyer,Ph.D.,L.J.Kricka,DPhil.,F.A.C.B., C.Chem.,F.R.S.C., F.R.C.Path.,Jason Y.Park,M.D.,Ph.D. , ISBN : 978-0-7216-3865-2,2008.,16:67-83.

[3]. Μπαλτσούρα , Γ.Δ., Σύγχρονη Ελαιοκομία ,Το ελαιόλαδο. Αθήνα 1997.

[4]. Harwood, J., Aparicio, R., Handbook of Olive Oil, Analysis and Properties, Aspen publishers, Maryland. 2000.

[5]. Αποστόλου Κ. Κυριτσάκη (2007) Ελαιόλαδο ,συμβατικό & βιολογικό ,βρώσιμη ελιά-πάστα ελιά ; 4^η έκδοση .

[6]. file:///C:/Users/z002786f/Downloads/CXS_033e.pdf (Last accessed 23/06/2014 , 20:09).

[7]. Κυριτσάκης, Α.Κ.,1993,Το ελαιόλαδο, Τρίτη Έκδοση, Θεσσαλονίκη.

[8]. Nawar, W.W. 1970. The flavor of olive oil. 44th National meeting of american oil Chemist's Society . Chicago Illinois.

[9]. Fedeli, E. 1977. Organoleptic properties of olive oil (flavor, composition).Riv.Ital.dele Solt Grasse. 54:202.

[10]. Karleskind, A., 1996 , Oilw and fats Manual, volume 1.

[11]. Boatella, R1975.Analysis of tocopherols of vegetable oils by gas-phase chromatography.J.Ann.Brom.27:287.

[12]. Tsimidou , Maria , Papadpoulos ,George , Boskou , Dimitrios , 1992, Phenolic compounds and stability of virgin olive oil , Food Chem., 45(2):141-4.

[13]. Gutierrez – Rosales , Francisca , Garrbo-Fernandez, Juan , Gallardo-Cuerrero,Lourdes, Gandue-Rojas,Beatriz,Minguez-Mosquera,M.Isabel,1992,Action of Chlorophylls on the stability of virgin olive oil , J.Am.Oil Chem.Soc., 69(9):866-71.

[14]. INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL (IOOC)
COI/T.15/NC No 3/Rev. 7 May 2013 , TRADE STANDARD APPLYING TO OLIVE OILS AND OLIVE-POMACE OILS

[15]. Hui, Y.H, 1996, Edible oil and Fat products oils and oilseeds. Baily's industrial oil and fat products, Fifth Edition, Volume 2.

[16]. Αποστόλου Κ. Κυριτσάκη (1998) το ελαιόλαδο , χημική σύνθεση , Τεχνολογία , ποιοτικός έλεγχος , Βιολογική αξία , έκτη έκδοση ; Θεσσαλονίκη. 1998.

[17]. COMMISSION REGULATION (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis (OJ L 248, 5.9.1991, p. 1) : 2(29-30).

[18]. Allen, J., Hamilton, R. J., Rancidity in foods ,Blackie Academic: New York. 1983.

[19].

<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/trbio/files/KEF%201%20XHMEIA%202.pdf>

(Last accessed 11/05/2014,16:30).

[20]. Gutierrez – Rosales , Francisca , Garrbo-Fernandez, Juan , Gallardo-Cuerrero,Lourdes, Gandue-Rojas,Beatriz,Minguez-Mosquera,M.Isabel,1992,Action of Chlorophylls on the stability of virgin olive oil , J.Am.Oil Chem.Soc., 69(9):866-71.

[21]. Materias Grasas , 1980, Indice de o-anisidina , Grasas y Aceites, Vol 31 Fasc. 4.

[22]. (P.J.KE and A.D. WOYEWODA , Analytica Acta , 106 ,279-284,1979).

[23]. Harwood,J.L, Yaqood,P., Nutritional and health aspects of olive oil. European Journal of Lipid Science and Technology, 2002, 104 (9-10),p. 685-697.

[24]. Peraz-Jimenez, F., Ruamo , j., Perez-Martinez, P., Lorez-Segura, .F., Lopez-Miranda, J., The influence of olive oil on human health : Not a question of fat alone.Molecular Nutrition & Food Research , 2007, 51 (10),p. 1199-1208.

[25]. Stack, A. H., Madar, Z., Olive oil as a functional food : Epidemiology and nutritional approaches .Nutrition Reviews, 2002,60(6),p.170-176.

[26]. Human Apolipoprotein Mutants (NATO Asi Series) by C. R. Sirtori and Cesare R. Sirtori (Oct 31, 1986).

[27]. Letter Responding to Health Claim Petition dated August 28, 2003: Monounsaturated Fatty Acids from Olive Oil and Coronary Heart Disease (Docket No 2003Q-0559) November 1, 2004 ,
<http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/labelingnutrition/ucm072963.htm#i>
(accessed at 20140501 , 23:51).

[28]. Gary D. Christian ., ANALYTICAL CHEMISTRY , FIFTH EDITION,ISBN 0-471-59761-9, 1994, 24:34-58.

[29]. Automated flow injection spectrophotometric non-aqueous titrimetric determination of the free fatty acid content of olive oil Panayotis G. Nouros, Constantinos A. Georgiou, Moschos G. Polissiou , Analytica Chimica Acta 351 (1997) 291-297 .

[30]. (Gary D. Christian.,1998 (3).p 406-408.) .

[31]. COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044) (Text with EEA relevance) (2002/657/EC) , 8:4-12 .

[32]. HANDBOOK OF INSTRUMENTAL TECHNIQUES FOR ANALYTICAL CHEMISTRY FRANK SETLE , Earl Wehry EDITOR. ISBN 0-13-177338-0, QD79.I5H36 , 1997, 9:73-79.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ακρωνύμια

A	Absorbance	Απορρόφηση
SD	Standard Deviation	Τυπική απόκλιση
RSD %	Relative standard deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
nm	Nanometers	Νανόμετρα
EM	Official method	Επίσημη μέθοδος
ΕΕΦ	Photometer out of range	Εκτός εύρους φωτομέτρησης
HA	Low mix	Ήπια ανάδευση
MA	Medium mix	Μέτρια ανάδευση
IA	Robust mix	Ισχυρή ανάδευση
A ± SD	Absorbance ± Standard Deviation	
A ± SD	Απορρόφηση ± Τυπική απόκλιση.	
ΑΜΠΥ	Αυτόματη μέθοδος προσδιορισμού τιμής υπεροξειδίων	
TY	Peroxide Value	Τιμή Υπεροξειδίων
LOD	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantification	Όριο Προσδιορισμού