



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
«Προσδιορισμός τοκοφερολών σε κελυφωτά φιστίκια (*Pistacia vera*)
καθώς και χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη και
προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας υδροοαλκοολικών
εκχυλισμάτων κελυφωτών φιστικιών»



Επιβλέπων: Παππάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΓΓΕΛΙΚΗ Ν. ΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2020

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

**«Προσδιορισμός τοκοφερολών σε κελυφωτά φιστίκια (*Pistacia vera*)
καθώς και χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη και
προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας υδροοαλκοολικών
εκχυλισμάτων κελυφωτών φιστικιών»**

**«Determination of tocopherols in pistachio nuts (*Pistacia vera*) as well
as chromatographic and spectroscopic study and determination of
antioxidant capacity of hydroalcoholic pistachio extracts»**

Αγγελική Ν. Μητροπούλου

Επιβλέπων: Παππάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παππάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Ταραντίλης Α. Πέτρος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Γαρδέλη Χρυσανγή, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α

**Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει διασταυρωθεί από λογισμικό ανίχνευσης
λογοκλοπής, με τη συναίνεση και την έγκριση της συγγραφέως, που διαθέτει το
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Αθήνα 2020

«...Μή σφίγγεις ἄδικα τὰ παπούτσια σου σὰ νὰ φυτεύεις πλατάνια

Μὴ γίνεσαι ΠΕΠΡΩΜΕΝΟΝ...»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας στα πλαίσια του κύκλου των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, με κατεύθυνση την Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων.

Επιθυμώ να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Παππά, ο οποίος υπήρξε εισηγητής του θέματος της παρούσας εργασίας. Είμαι ευγνώμων για την καθοδήγηση και για την υποστήριξη του σε όλα τα εμπόδια που αντιμετώπισα του σε όλη την διάρκεια της μελέτης. Επιπλέον θέλω να υπογραμμίσω τις ευχαριστίες μου για την υπομονή και την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον Καθηγητή κ. Πέτρο Ταραντίλη για την βοήθεια του στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης αλλά και για την υποστήριξη του σε άλλες σημαντικές δραστηριότητες του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τις ξεχωριστές ευχαριστίες μου θέλω να εκφράσω στην Υποψήφια Διδάκτορα Λυδία Βαλάση όπου με εμπιστεύτηκε εξ αρχής και με εκτίμησε ερευνητικά αλλά και προσωπικά, καθώς νιώθω πλέον ότι κέρδισα μια ακόμα φίλη. Είμαι ευγνώμων για την στήριξη και την επιστημοσύνη που μου πρόσφερε απλόχερα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών Μελέτης και Αξιοποίησης Φυσικών Προϊόντων που συνέβαλαν στην επιστημονική μου κατάρτιση καθώς και την ομάδα του εργαστηρίου για την συνεργασία στον εργαστηριακό χώρο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την συμφοιτήτριά και φίλη μου Δήμητρα Αρβανιτάκη, διότι χωρίς εκείνη αυτός ο κύκλος σπουδών μου δεν θα ήταν ο ίδιος, καθώς και την οικογένειά μου για την ευκαιρία που μου παρείχαν να φέρω εις πέρας τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Προσδιορισμός τοκοφερολών σε κελυφωτά φιστίκια (*Pistacia vera*) καθώς και χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας υδροοαλκοολικών εκχυλισμάτων κελυφωτών φιστικιών.

Τα κελυφωτά φιστίκια (*Pistacia vera*) είναι σημαντικά γεωργικά προϊόντα για πολλές χώρες, αποτελώντας εξαιρετική πηγή θρεπτικών συστατικών, ακόρεστων λιπαρών οξέων, πρωτεϊνών, μεταλλικών στοιχείων και ινών, καθώς και φυσικών βιοενεργών συστατικών (τοκοφερόλες, καροτενοειδή, χλωροφύλλες, φλαβονοειδή).

Η παρούσα μελέτη ασχολείται με το χαρακτηρισμό χημικών συστατικών ιδιαίτερης αξίας προερχόμενων από κελυφωτά φιστίκια ποικιλίας Αιγίνης. Είναι σημαντικό να διερευνηθούν τα χημικά χαρακτηριστικά του κελυφωτού φιστικιού, δεδομένου ότι οι καταναλωτές απαιτούν όλο και περισσότερες πληροφορίες για τα τρόφιμα που καταναλώνουν. Παράλληλα, η συσχέτιση των φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών δεδομένων θα μπορούσε να οδηγήσει στη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών, στη μελέτη των συστατικών του φιστικιού, που παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των χρωματογραφικών.

Για τους παραπάνω λόγους, συλλέχθηκαν, το έτος συγκομιδής 2018, 30 δείγματα κελυφωτών φιστικιών από οκτώ διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Κάθε δείγμα αλέσθηκε χονδροειδώς και ακολούθησε κοκκομετρία (500-800μm). Η περιεκτικότητα σε ολικό λίπος προσδιορίστηκε με την επίσημη μέθοδο 948.22 του AOAC, ενώ παράλληλα παραλήφθηκαν υδρομεθανολικά εκχυλίσματα των δειγμάτων.

Παραλήφθηκε φιστικέλαιο από κάθε δείγμα με την τεχνική Soxhlet και σε αυτό προσδιορίστηκαν ποσοτικά οι α-, β-, γ-, δ-τοκοφερόλες με HPLC συζευγμένη με φθορισμομετρικό ανιχνευτή.

Στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα χρησιμοποιώντας τις δοκιμές ABTS και DPPH, έγινε χρωματογραφική μελέτη τους με χρήση της τεχνικής HPLC-DAD και HPLC-MS και καταγράφηκαν τα FTIR φάσματά τους με χρήση της τεχνικής ATR.

Για τα 30 δείγματα που αναλύθηκαν, το ποσοστό ολικού λίπους κυμάνθηκε μεταξύ 52,53-64,83% με μέση τιμή $59,55 \pm 2,81\%$, ενώ ο μέσος όρος της περιεκτικότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων υπολογίστηκε σε 0,15 g/g φιστικιού. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης των τοκοφερολών έδειξαν ότι η γ-τοκοφερόλη (συνεκλουόμενη με τη β-τοκοτριενόλη) είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα, ενώ η β-τοκοφερόλη ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH κυμάνθηκε μεταξύ 0,04-11,63 mM με μέση τιμή $2,22 \pm 2,30$ mM Trolox, ενώ η παρεμποδιστική δράση βρέθηκε 0,61-40,90% με μέσο όρο $10,35 \pm 8,55\%$. Η δοκιμή προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS έδωσε τιμές μεταξύ 8,06-10,26 mM με μέσο όρο $9,97 \pm 0,42$ mM Trolox. Η παρεμποδιστική δράση υπολογίστηκε μεταξύ 77,12-99,56% με μέση τιμή $96,73 \pm 4,25\%$. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (DAD and MS) απέδειξε την παρουσία απλών φαινολών και πολυφαινολών στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα κελυφωτού φιστικιού. Επίσης, έγινε απόδοση των κυριότερων κορυφών των FTIR των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων..

Εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γ.Π.Α

Λέξεις κλειδιά: *Pistacia vera*· Υδρομεθανολικά εκχυλίσματα· ABTS· DPPH· Τοκοφερόλες· HPLC-DAD· HPLC-MS· Φαινολικά συστατικά· FTIR· ATR

ABSTRACT

Determination of tocopherols in pistachio nuts (*Pistacia vera*) as well as chromatographic and spectroscopic study and determination of antioxidant capacity of hydroalcoholic pistachio extracts.

The pistachio nut is an important agricultural commodity for a number of countries being an excellent source of nutrients, unsaturated fatty acids, proteins, minerals and fibers as well as natural bioactive ingredients (tocopherols, carotenoids, chlorophylls).

The present study deals with the characterization of great significance chemical compounds derived from pistachios of the Greek variety 'Aegina'. It is important to explore the chemical characteristics of shell peanuts, as consumers are increasingly demanding information about the foods they consume. At the same time, the correlation between spectroscopic and chromatographic data could lead to the use of spectroscopic techniques in the study of the components of pistachio, which have significant advantages over chromatographic ones.

For the above reasons, in the harvest year 2018, 30 samples of peeled pistachios from eight different regions of Greece were collected. Each sample was coarsely ground and followed by granulometry (500-800 μ m). The total fat content was determined by the official method 948.22 of AOAC, while hydromethanolic extracts of the samples were obtained.

Pistachio oil was obtained from each sample using the Soxhlet technique, and it quantified α -, β -, γ -, and d-tocopherols with HPLC coupled with a fluorescence detector.

In hydromethanolic extracts, the antioxidant capacity was evaluated using the ABTS and DPPH tests, their chromatographic study was performed using the HPLC-DAD and HPLC-MS techniques and their FTIR spectra were recorded using the ATR technique.

For the 30 samples analyzed, the percentage of total fat ranged between 52.53-64.83% with an average of $59.55 \pm 2.81\%$, while the mean value of phenolic compounds was calculated as 0.15 g/g of pistachio sample. The results of the tocopherol quantitative analysis showed that γ -tocopherol (co-eluted with β -tocotrienol) content was the highest, whereas β -tocopherol was at lower levels. Total antioxidant capacity using the DPPH assay ranged from 0.04 to 11.63 mM with a mean of 2.22 ± 2.30 mM Trolox, while scavenging capacity was found to be 0.61-40.90% on average of $10.35 \pm 8.55\%$. The ABTS antioxidant assay was between 8.06-10.26 mM with 9.97 ± 0.42 mM Trolox mean value, following with scavenging capacity between 77.12-99.56% and average $96.73 \pm 4.25\%$.

The qualitative determination of the phenolic compounds by HPLC (DAD and MS) demonstrated the presence of simple phenols and polyphenols in pistachios methanolic extracts. Finally, the research was completed by peak correspondence of pistachios' methanolic extracts FTIR spectra.

Laboratory of General Chemistry of AUA

Keywords: *Pistacia vera*· Pistachio methanolic extracts· ABTS· DPPH· Tocopherols· HPLC-DAD· HPLC-MS· Phenolic compounds· FTIR· ATR

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
ΦΙΣΤΙΚΙΑ.....	14
I. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	14
II. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ ΣΕ ΔΙΕΘΝΕΣ ΚΑΙ ΕΓΧΩΡΙΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.....	15
III. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΑ	16
IV. ΕΛΑΦΟΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	17
V. ΦΥΤΕΥΣΗ, ΑΡΔΕΥΣΗ, ΚΛΑΔΕΜΑ, ΛΙΠΑΝΣΗ.....	17
VI. ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ, ΞΗΡΑΝΣΗ, ΔΙΑΛΟΓΗ.....	18
VII. ΕΧΘΡΟΙ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	19
VIII. ΦΙΣΤΙΚΙ ΑΙΓΙΝΗΣ ΩΣ ΠΡΟΙΟΝ Π.Ο.Π.....	19
A.1 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ SOXHLET	21
A.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ.....	22
A.3.1 ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΕΣ ΚΑΙ ΤΟΚΟΤΡΙΕΝΟΛΕΣ.....	23
A.3.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	24
A.3.2.1 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	28
A.3.2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	29
A.4 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-VIS)	29
A.5 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	30
A.5.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΩΝ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (HPLC-FLUORESCENCE).....	30
A.6.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΔΙΟΔΩΝ (HPLC-DAD).....	31
A.5.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (HPLC- MS).....	31

A.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ Fourier (FTIR).....	32
A.7.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ FTIR	34
A.7.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ FTIR.....	35
A.7.6 ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΕΞΑΣΘΕΝΗΜΕΝΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΑΚΛΑΣΗΣ (ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE, ATR).....	36
A.8 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	37
B.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	38
B.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΛΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ	39
B.3 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	41
B.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ	42
B.4.1 ΔΟΚΙΜΗ DPPH	42
B.4.2 ΔΟΚΙΜΗ ABTS	42
B.5 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-VIS)	43
B.6 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΩΝ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΜΕ HPLC ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (FLUORESCENCE DETECTOR).....	43
B.7 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ HPLC-DAD	44
B.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ HPLC-DAD/MS.....	45
B.9 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ	47
Γ.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΛΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ	49
Γ.2 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	50
Γ.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ	51
Γ.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ UV-VIS	53
Γ.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΩΝ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΜΕ HPLC ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (FLUORESCENCE DETECTOR).....	54
Γ.6 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ HPLC-DAD ΚΑΙ HPLC-MS.....	60
Γ.7 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ FTIR	75
Δ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	77
Ε ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	78

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Αριθμός	Τίτλος	Σελίδα
	Εισαγωγή	
Πίνακας Ι	Εκτάσεις, παραγωγή και απόδοση καλλιέργειας φιστικιού στις ελληνικές περιφέρειες το έτος 2012	15
	Α' Μέρος	
Πίνακας Α.1	Αντιπροσωπευτικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας υπερύθρου	33
Πίνακας Α.2	Σταθερές Δύναμης (κ) και Ανηγγμένη Μάζα (μ) για διάφορα ατομικά ζεύγη	35
	Β' Μέρος	
Πίνακας Β.1	Κωδικοποίηση των δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών, συγκομιδής 2018	38
Πίνακας Β.2.	Πρόγραμμα ανάλυσης των μεθανολικών εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HPLC-DAD)	44
Πίνακας Β.3	Βάση δεδομένων πιθανών φαινολικών συστατικών στα μεθανολικά εκχυλίσματα	46
	Γ' Μέρος	
Πίνακας Γ.1.	Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικού λίπους (g ελαίου/100 g αποξηραμένου καρπού). 1 Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (n=3).	46
Πίνακας Γ.2	Ποσότητα φαινολικών συστατικών δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών	50
Πίνακας Γ.3	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mmol ισοδύναμων Trolox ανά mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος) και παρεμποριστική δράση (%) των μεθανολικών εκχυλισμάτων βάσει των δοκιμών DPPH και ABTS.	52
Πίνακας Γ.4	Υπολογισμός αναλυτικής ακρίβειας μεταξύ 3 διαδοχικών ημερών (n=3).	52
Πίνακας Γ.5	Αποτελέσματα ανάλυσης τοκοφερολών (α -, β -, γ - και δ -) για τα δείγματα φιστικελαίων πριν γίνει η διόρθωση με τους συντελεστές ανάκτησης.	57
Πίνακας Γ.6	Υπολογισμός ανακτησιμότητας για τις τοκοφερόλες (α -, β -, γ - και δ -).	58
Πίνακας Γ.7	Τελικά αποτελέσματα ανάλυσης τοκοφερολών (α -, β -, γ - και δ -) για τα δείγματα φιστικελαίων	59
Πίνακας Γ.8	Χρόνος έκλουσης των πρότυπων ενώσεων κατά τη ανάλυση με HPLC-MS	64
Πίνακας Γ.9	Φαινολικά συστατικά που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα μαζί με το χρόνο έκλουσής τους (min), $\lambda_{\max}$ (nm) και το εμβαδόν κάθε κορυφής (ως μέσος όρος των τριών επαναλήψεων).	70
Πίνακας Γ.10	Δομές φαινολικών συστατικών που υπάρχουν στα μεθανολικά εκχυλίσματα κελυφωτού φιστικιού	72
Πίνακας Γ.11.	Απόδοση κορυφών του φάσματος FTIR υδρομεθανολικού εκχυλίσματος κελυφωτού φιστικιού.	75

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Αριθμός	Τίτλος	Σελίδα
	Εισαγωγή	
Εικόνα Ι	Παραγόμενες ποσότητες (ανά 1000 τόνους) των κυριότερων χωρών παραγωγής φιστικιού στον κόσμο για τα έτη 2001- 2011	15
	Α' Μέρος	
Εικόνα Α. 1	Συσκευή ημισυνεχούς εκχύλισης Soxhlet	21
Εικόνα Α. 2	Λεπτομερής συνδεσμολογία συσκευής Soxhlet	22
Εικόνα Α. 3	Αλυσιδωτή αντίδραση αντιοξειδωτικών	23
Εικόνα Α. 4	Χημική δομή τοκοφερολών και τοκοτριενολών που υπάρχουν στα τρόφιμα	24
Εικόνα Α. 5	Κατηγοριοποίηση πολυφαινολών	25
Εικόνα Α. 6	Ακτινοβολία διερχόμενη από κυψελίδα που περιέχει διάλυμα απορροφητικής ουσίας	30
Εικόνα Α. 7	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Συστοιχίας Διόδων	31
Εικόνα Α. 8	Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας υπερύθρου	33
Εικόνα Α. 9	Σχηματική αναπαράσταση δονήσεων τάσης και κάμψης	33
Εικόνα Α. 10	Συγκεντρωτική αναπαράσταση λήψης φάσματος με φασματοσκοπία FTIR	35
Εικόνα Α. 11	Ανάκλαση στην κρίσιμη γωνία	36
	Β' Μέρος	
Εικόνα Β.1	Κόσκινο μεγέθους 500 μm	38
Εικόνα Β.2	Κόσκινο μεγέθους 800 μm	38
Εικόνα Β.3	Καρτούσες	40
Εικόνα Β.4	Συσκευή Soxhlet	40
Εικόνα Β.5	Καθαρισμός μεθανολικών εκχυλισμάτων πριν την ανάλυση με φιλτράκια HPLC Chromafil Χίτς CA-45/25	41
Εικόνα Β.6	Σύστημα FTIR	48
Εικόνα Β.7	Υποδοχή με κρύσταλλο ZnSe που χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ATR	48
	Γ' Μέρος	
Εικόνα Γ.1	Καμπύλη βαθμονόμησης Trolox για τη δοκιμή DPPH	51
Εικόνα Γ.2	Καμπύλη βαθμονόμησης Trolox για τη δοκιμή ABTS.	52
Εικόνα Γ.3	Αντιπροσωπευτικό φάσμα UV-Vis υδρομεθανολικού εκχυλίσματος κελυφωτού φιστικιού.	54
Εικόνα Γ.4	Καμπύλη αναφοράς α -T.	54
Εικόνα Γ.5	Καμπύλη αναφοράς β -T.	55
Εικόνα Γ.6	Καμπύλη αναφοράς γ -T	55
Εικόνα Γ.7	Καμπύλη αναφοράς δ -T.	56
Εικόνα Γ.8	Χρωματογράφημα ενός διαλύματος εργασίας από μείγμα τοκοφερολών (Α) και ενός τυχαίου δείγματος φιστικελαίου (Β) από την ανάλυση HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Κορυφές: 1, α -τοκοφερόλη, 2, β -τοκοφερόλη, 3, γ -τοκοφερόλη και β -τοκοτριενόλη, 4, δ -τοκοφερόλη.	57
Εικόνα Γ.9	Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα υδρομεθανολικού εκχυλίσματος φιστικιού κατά την ανάλυση με HPLC-DAD.	61
Εικόνα Γ.10	Χρωματογράφημα mixture-1 πρότυπων ενώσεων με ανάλυση HPLC-MS. Κορυφές: 1, γαλλικό οξύ, 2, επικατεχίνη, 3, φερουλικό οξύ, 4, 7-ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 5, μυρισετίνη, 6, κερκετίνη.	61
Εικόνα Γ.11	Χρωματογράφημα mixture-2 πρότυπων ενώσεων με ανάλυση HPLC-MS. Κορυφές: 1, γλωρογενικό οξύ, 2, καφεϊκό οξύ, 3, p-κουμαρικό οξύ, 4, 7-ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 5, λουτεολίνη.	62

Εικόνα Γ.12	Χρωματογράφημα mixture-3 πρότυπων ενώσεων με ανάλυση HPLC-MS. Κορυφές: 1, συριγγικό οξύ, 2, ροσμαρινικό οξύ, 3, κερκετίνη, 4, καμφερόλη	62
Εικόνα Γ.13	Χρωματογράφημα Απιγενίνης με ανάλυση HPLC-MS.	62
Εικόνα Γ.14	Χρωματογράφημα Φλωρογλυκινόλη με ανάλυση HPLC-MS.	62
Εικόνα Γ.15	Χρωματογράφημα Ρεσορκινόλη με ανάλυση HPLC-MS.	63
Εικόνα Γ.16	Χρωματογράφημα Βανιλικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	63
Εικόνα Γ.17	Χρωματογράφημα Εριοδικτυόλη με ανάλυση HPLC-MS.	63
Εικόνα Γ.18	Χρωματογράφημα Ναρινγκενίνη με ανάλυση HPLC-MS	63
Εικόνα Γ.19	Χρωματογράφημα Συναπικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	64
Εικόνα Γ.20	Χρωματογράφημα 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	64
Εικόνα Γ.21	Φάσμα μάζας Φλωρογλυκινόλη με ανάλυση HPLC-MS	65
Εικόνα Γ.22	Φάσμα μάζας Γαλλικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	65
Εικόνα Γ.23	Φάσμα μάζας Ρεσορκινόλη 1 με ανάλυση HPLC-MS.	65
Εικόνα Γ.24	Φάσμα μάζας 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	66
Εικόνα Γ.25	Φάσμα μάζας Επικατεχίνη με ανάλυση HPLC-MS	66
Εικόνα Γ.26	Φάσμα μάζας Βανιλικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	66
Εικόνα Γ.27	Φάσμα μάζας Συριγγικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS	67
Εικόνα Γ.28	Φάσμα μάζας 4-κουμαρικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	67
Εικόνα Γ.29	Φάσμα μάζας Συναπικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	67
Εικόνα Γ.30	Φάσμα μάζας Φερουλικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	68
Εικόνα Γ.31	Φάσμα μάζας Ροσμαρινικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.	68
Εικόνα Γ.32	Φάσμα μάζας Εριοδικτυόλη με ανάλυση HPLC-MS.	68
Εικόνα Γ.33	Φάσμα μάζας Κερκετίνη με ανάλυση HPLC-MS.	89
Εικόνα Γ.34	Φάσμα μάζας Ναρινγκενίνη με ανάλυση HPLC-MS.	89
Εικόνα Γ.35	Φάσμα μάζας Λουτεολίνη με ανάλυση HPLC-MS.	89
Εικόνα Γ.36	Φάσμα μάζας Απιγενίνη με ανάλυση HPLC-MS.	70
Εικόνα Γ.37	Αντιπροσωπευτικό φάσμα FTIR υδρομεθανολικού εκχυλίσματος κελυφατού φιστικιού.	75

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
ABTS	2,2'- διαζω-3- αιθυλο-βενζοθειαζολινο- σουλφονικό οξύ	2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid
ATR	Attenuated Total Reflectance	Εξασθενημένη Ολική Ανάκλαση
CDL	Curved Dissolution Line	Θερμοκρασία Πηγής Ιοντισμού
DAD	Diode-Array Detector	Ανιχνευτής Συστοιχίας Διόδων
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλ
DTGS	Deuterated TriGlycine Sulfate	Δευτεριωμένη Θεϊκή Τριγλυκίνη
FIR	Far Infra Red	Άπω Υπέρυθρο
FTIR	Fourier Transformation Infra Red	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier
HPLC	High-Pressure Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης
	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
IR	Infra Red	Υπέρυθρο
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μαζών
MIR	Mid Infra Red	Μέσο Υπέρυθρο
MS	Mass Spectroscopy	Φασματομετρία Μαζών
MSD	Mass Selective Detector	Φασματογράφος Μάζας Τετράπολου
NIR	Near Infra Red	Εγγύς Υπέρυθρο
RMS	Root Mean Square	Ρίζα του Μέσου Όρου του Αθροίσματος των Τετραγώνων
RP	Reversed Phase	Ανεστραμένης Φάσης
RSN	Ratio Signal-to-Noise	Λόγος Σήματος προς Θόρυβο
THF	Tetrahydrofuran	Τετραυδροφουράνιο
ZPD	Zero Path Difference	Διαφορά Μηδενικής Διαδρομής
ΠΟΠ	Protected Designation of Origin	Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΦΙΣΤΙΚΙΑ

Ι. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η πρώτη αναφορά στη φιστικιά στην αρχαία ελληνική γραμματεία θεωρείται ότι έγινε τον 4ο και 3ο αιώνα π.Χ. από τον Θεόφραστο (Περί Φυτών Ιστορία, IV, 4,7). Ο Θεόφραστος γράφει ότι, όπως λένε, στην Ινδική και στην Βακτρία (Αφγανιστάν) φύεται ένα δένδρο όμοιο με την τέρμινθον (τερέβινθον) ως προς τα φύλλα, τους κλάδους και τα άλλα, διαφορετικό όμως προς τον καρπό. Οι καρποί είναι κάρυα που μοιάζουν με τα αμύγδαλα, αλλά είναι μικρότεροι και το κέλυφός τους δεν είναι τραχύ, στη γεύση δε, είναι πολύ νοστιμότεροι από τα αμύγδαλα και γι' αυτό προτιμώνται. Ο Θεόφραστος περιγράφει το δένδρο χωρίς να το ονομάζει. Το όνομα «πιστάκια» (από την περσική λέξη πίστα που σημαίνει φιστίκι) απαντάται για πρώτη φορά στον Νίκανδρο (Θηριακά, 891) τον 2ο αιώνα π.Χ., ο οποίος επίσης τονίζει την ομοιότητα των καρπών με τα αμύγδαλα. Ο Διοσκουρίδης τον 1ο αιώνα μ.Χ. αναφέρει ότι τα φιστίκια παράγονται στη Συρία και έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες (Περί Ύλης Ιατρικής, Λόγος Πρώτος, 124). Για τα φιστίκια γράφει και ο Αθηναίος τον 2ο αιώνα μ.Χ. (Δειπνοσοφισταί, XIV, 649d-e): τα φιστίκια, τα οποία προσφέρονται στο τραπέζι των σοφών, σύμφωνα με τα τότε γνωστά, παράγονται στη Συρία και στην Αραβία. Ο καρπός είναι λευκόφαιος, μακρός, πράσινος στο εσωτερικό και ενώ είναι λιγότερο χυμώδης από τον σπόρο της κουκουναριάς είναι περισσότερο εύγευστος από αυτόν. Αν και τα φιστίκια ήταν γνωστά ήδη στους αρχαίους Έλληνες και εκτιμώνται για τη νόστιμη γεύση τους, δεν είναι γνωστός σήμερα ο χρόνος εισαγωγής και καλλιέργειας της φιστικιάς στην Ελλάδα. Είναι ενδιαφέρον ότι εισήχθη στη Ρώμη περίπου το 30μ.Χ. και ταυτόχρονα στην Ισπανία (Πλίνιος, XV, 83,91). Ο Γεννάδιος (1914) ο οποίος ερευνήσε το θέμα αυτό αναφέρει ότι κατά τις πρώτες δεκαετίες του 19ου αιώνα το φιστίκι ήταν «οπωρικόν» της Ασίας και η φιστικιά δεν απαντιόταν στην Ελλάδα (Γεωργιάδου, 2009).

Η φιστικιά πιθανόν κατάγεται από την κεντρική Ασία όπου μεγάλες εκτάσεις με αυτοφυή δέντρα βρέθηκαν σε περιοχές γνωστές σήμερα ως Ιράν, Τουρκμενιστάν, Αφγανιστάν. Στη μεσογειακή Ευρώπη εισήχθησαν κατά προσέγγιση στην αρχή της προχριστιανικής περιόδου. Σήμερα καλλιεργείται σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από θερμό και ξηρό κλίμα, όπως ο Λίβανος, η Παλαιστίνη, το Ιράν, η Ινδία, η Τουρκία, η Νότια Ευρώπη, οι ξηροθερμικές χώρες της Ασίας και Αφρικής και οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Καλιφόρνια) (Ποντίκης, 1996).

Στην Ελλάδα φαίνεται πως η φιστικιά ήρθε γύρω στο 1860 και πρωτοκαλλιεργήθηκε στην Αττική. Στη διάδοσή της συνέβαλαν οι γεωπόνοι Ορφανίδης (1869) και Γεννάδιος (1882), που δημιούργησαν τα πρώτα φυτώρια φιστικιάς στο Δημόσιο Δενδροκομείο που βρισκόταν στην περιοχή της τωρινής ΑΓΣΑ. Αρχικά η καλλιέργεια της φιστικιάς περιορίστηκε στα παράλια της Αττικής και στη νήσο Αίγινα. Από το 1950 άρχισε να εκτείνεται η καλλιέργεια της στη Βοιωτία, Κορινθία, Εύβοια και Φθιώτιδα και αργότερα από το 1968 στην κεντρική και βόρεια Ελλάδα (Θεσσαλία, Χαλκιδική, Ροδόπη), στην Κρήτη και στις Κυκλάδες (Ποντίκης, 1996).

II. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ ΣΕ ΔΙΕΘΝΕΣ ΚΑΙ ΕΓΧΩΡΙΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Η καλλιέργεια του φιστικιού πραγματοποιείται σε παγκόσμια βάση. Στην Εικ. I αναφέρονται οι παραγόμενες ποσότητες των κυριότερων χωρών παραγωγής φιστικιού του κόσμου για τα έτη 2001-2011. Το έτος 2011 την πρώτη θέση καταλάμβανε το Ιράν, τη δεύτερη θέση οι ΗΠΑ και την τρίτη θέση η Τουρκία (Αλυφαντή, 2013).

Στη διάρκεια των δέκα ετών, σημειώνεται σχεδόν διπλασιασμός της παραγόμενης ποσότητας του Ιράν, παράλληλα παρατηρείται σχεδόν τριπλασιασμός της παραγόμενης ποσότητας των ΗΠΑ, στην Τουρκία, επίσης, επισημαίνεται σχεδόν τετραπλασιασμός της παραγόμενης ποσότητάς της. Αντίθετα, η ελληνική παραγωγή κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα (Αλυφαντή, 2013).

Στον πίνακα I αναφέρονται οι καλλιεργούμενες εκτάσεις, η παραγωγή και η απόδοση παραγόμενης ποσότητας ανά στρέμμα φιστικιού στις ελληνικές περιφέρειες, με έτος αναφοράς το 2012. Παρατηρείται ότι την πρώτη θέση στις καλλιεργούμενες εκτάσεις και την παραγόμενη ποσότητα κατείχε η περιφέρεια Αττικής, ενώ τη δεύτερη θέση στις καλλιεργούμενες εκτάσεις και την παραγόμενη ποσότητα κατείχε η περιφέρεια Στερεάς Ελλάδας. Αντίθετα, την υψηλότερη απόδοση παραγωγής ανά στρέμμα κατείχε η περιφέρεια Δυτικής Μακεδονίας (Αλυφαντή, 2013).

Εικόνα I Παραγόμενες ποσότητες (ανά 1000 τόνους) των κυριότερων χωρών παραγωγής φιστικιού στον κόσμο για τα έτη 2001- 2011 (Eurostat).

Χώρες	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Αφγανιστάν	2,8	2,8	2,2	2,31	2,457	2,457	4,2	4,3	3	3,83	4,203
Αζερμπαϊτζάν	Μ.Δ.	Μ.Δ.	10	10	11	15	3	3	2	2	3
Κίνα	26	28	3	32	34	36	38	40	45	58	74
Ακτή Ελεφαντοστού	133	145	116	132	148	162	187	206	226	242	288
Κύπρος	15	15	15	14	15	12	25	24	75	19	24
Ελλάδα	9,54	8,86	7,93	7,917	8,847	8,233	8,148	8,1	10,124	8,998	9,58
Ιράν	249	249	306,192	184,899	229,657	250	315,5	446,647	446,647	446,647	472,097
Ιταλία	1,762	1,877	1,993	2,4	2,719	1,024	2,782	2	3,11	9,17	10,801
Ιορδανία	Μ.Δ.	Μ.Δ.	Μ.Δ.	Μ.Δ.	Μ.Δ.	Μ.Δ.	Μ.Δ.	618	469	623	630
Κιργιστάν	127	126	149	92	300	500	800	759	818	800	888
Μαδαγασκάρη	210	200	195	200	210	220	230	254	197	187	223
Μαυρίκιος	5	4	5	6	7	5	6	7	6	6	6
Μεξικό	21	7	7	11	26	4	10	21	66	71	69
Μαρόκο	30	27	50	47	56	65	66	69	88	78	75
Πακιστάν	196	197	195	3,425	597	632	536	773	773	663	659
Συρία	37,436	52,84	47,6	21,2	446,642	73183	52,066	52,6	61,484	57,471	55,61
Τυνησία	1,1	800	1,2	1,8	2	272	2,5	2,5	2,5	2,3	2,1
Τουρκία	30	35	90	30	60	110	73,416	120,113	81,795	128	112
Η.Π.Α.	73,03	137,44	53,98	157,397	128,367	107,955	188,696	126,1	161,025	236,775	201,395
Ουζμπεκιστάν	219	250	200	250	300	203	200	190	205	200	222

Πίνακας I. Εκτάσεις, παραγωγή και απόδοση καλλιέργειας φιστικιού στις ελληνικές περιφέρειες το έτος 2012 (ΕΛΣΤΑΤ).

Γεωγραφικές Περιφέρειες	Φιστικιές		
	Εκτάσεις (στρέμματα)	Παραγωγή (τόνοι)	Απόδοση (τόνοι/στρέμματα)
Σύνολο Χώρας	40,501	7,091	0,18
Κεντρική Μακεδονία	3,377	0,845	0,25
Ανατολική Μακεδονία & Θράκη	0,72	0,17	0,24
Δυτική Μακεδονία	0,50	0,20	0,40
Θεσσαλία	2,935	0,582	0,20
Ήπειρος	0	0	0
Ιόνια Νησιά	0	0	0
Δυτική Ελλάδα	0	0	0
Στερεά Ελλάδα	16,670	2,743	0,16
Πελοπόννησος	0,254	0,52	0,20
Αττική	17,000	2,805	0,17

Βόρειο Αιγαίο	0,50	0,1	0,02
Νότιο Αιγαίο	0,13	0,3	0,23
Κρήτη	0,80	0,23	0,29

III. BOTANIKH ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Η φιστικιά (*Pistacia vera*) ανήκει στην οικογένεια των Anacardiaceae. Κατά τον Zohary (1952) το γένος *Pistacia* περιλαμβάνει 11 είδη. Το είδος *Pistacia vera* L. είναι η καλλιεργούμενη ήμερη φιστικιά.

Τα υποκείμενα της φιστικιάς είναι σπορόφυτα διαφόρων ειδών του γένους *Pistacia*. Στην Ελλάδα χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά η τσικουδιά λόγω της καλής της συγγένειας με τη φιστικιά και της ανθεκτικότητάς της στους μύκητες του γένους *Phytophthora*. Στη χώρα μας, καλλιεργείται κυρίως η «Αιγινήτικη» ποικιλία, η οποία έχει πολύ ικανοποιητικές δενδροκομικές ιδιότητες (Γεωργιάδου 2009). Ωστόσο, η καλλιέργεια ενός μόνο υποκειμένου και μιας μόνο ποικιλίας ελλοχεύει κινδύνους, διότι ευνοεί τη διάδοση νέων ή εισαγομένων παθογόνων και εχθρών στα οποία τα δένδρα μπορεί να παρουσιάζουν ευπάθεια. Στις ΗΠΑ πραγματοποιείται σημαντική έρευνα για τη δημιουργία νέων ποικιλιών με καλύτερες δενδροκομικές ιδιότητες και υψηλότερες ποσοτικές και ποιοτικές αποδόσεις (Kallsen *et al.*, 2009).

Ο καρπός είναι δρύπη, με σχήμα επίμηκες ωοειδές και σχηματίζεται σε σύνθετους βότρες. Οι καρποί της φιστικιάς αποτελούνται από τρία μέρη. Το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο. Το εξωκάρπιο είναι ένα μαλακό σαρκώδες κύτος. Αντίθετα, το μεσοκάρπιο αποτελεί το σκληρό κέλυφος, ενώ το ενδοκάρπιο είναι το σπέρμα, δηλαδή η ψίχα του καρπού που αποτελεί και το βρώσιμο μέρος του καρπού. Το σπέρμα περιβάλλεται από λεπτό φλοιό χρώματος βυσσινί ή κόκκινο στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς του, που περικλείει το έμβρυο και τις δύο κοτυληδόνες, που έχουν χρώμα, ανάλογα με την ποικιλία, από κρεμ μέχρι πράσινο. Μετά την επίτευξη πλήρους μεγέθους του καρπού, το μεσοκάρπιο σκληραίνει και σχηματίζει το σκληρό κέλυφος. Αυτό συμβαίνει κατά τη διάρκεια του Ιουνίου. Το ενδοκάρπιο ξεκινά την ανάπτυξή του τον Ιούλιο και γεμίζει πλήρως μέχρι τα μέσα Αυγούστου. Οι καρποί κατά την ωρίμανση αποκτούν χρώμα κρεμ ή κίτρινο με κόκκινη ή ροζ απόχρωση στο τμήμα που βλέπει ο ήλιος. Επιπλέον, το εξωκάρπιο γίνεται μαλακό και ξεκολλάει από το ξυλοποιημένο μεσοκάρπιο εύκολα. Στους γεμάτους καρπούς το ξυλοποιημένο μεσοκάρπιο σχίζεται κατά μήκος της ραφής (ανοικτά φιστίκια), σε ποσοστό που κυμαίνεται από 20-95%, χαρακτηριστικό που καθορίζει την ποιότητά τους και συνεπώς και την τιμή πώλησής τους (Ferguson, Polito, Kallsen, 2005· Γεωργιάδου, 2009).

Το ριζικό σύστημα του δένδρου είναι πολύ εκτεταμένο και διεισδύει σε μεγάλα βάθη. Έτσι, η φιστικιά αντέχει σε μακρές περιόδους ξηρασίας. Το φθινόπωρο από το Νοέμβριο αρχίζουν να πέφτουν τα φύλλα και το δένδρο μένει σε λήθαργο όλο το χειμώνα. Η βλάστηση αρχίζει να εκπύσσεται στα άρρενα δένδρα από τις αρχές Μαρτίου και στα θήλεα από τα τέλη Μαρτίου και ολοκληρώνεται στα τέλη Απριλίου με μέσα Μαΐου. Ο καρπός, μετά το δέσιμό του, τον Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο αυξάνει σε μέγεθος, ενώ το σπέρμα δεν αναπτύσσεται κατά το διάστημα αυτό. Μέχρι το τέλος Ιουνίου το ενδοκάρπιο παραμένει μαλακό και ο καρπός είναι ευάλωτος σε προσβολές εντόμων. Από το τέλος Ιουνίου το ενδοκάρπιο γίνεται σκληρό και το σπέρμα αρχίζει να αναπτύσσεται και φτάνει το τελικό του μέγεθος στα μέσα Αυγούστου. Η παραγωγική ζωή της φιστικιάς υπολογίζεται σε 100 και πλέον έτη. Ένας από τους φυσιολογικούς χαρακτήρες του δένδρου είναι η παρενιαυτοφορία κατά την οποία εναλλάσσονται μία χρονιά με μεγάλη παραγωγή και μία με μικρή ή με ακαρπία (Γεωργιάδου, 2009).

Η φιστικιά είναι δένδρο φυλλοβόλο και δυικό, δηλαδή υπάρχουν αρσενικά και θηλυκά δέντρα. Η επικονίαση γίνεται με τον αέρα, διότι το θήλυ άνθος δεν φέρει πέταλα και δεν ελκύει τις μέλισσες. Ωστόσο, έχουν μελετηθεί και τεχνικές γονιμοποίησης τόσο με ηλεκτροστατικά μεταφερόμενη γύρη όσο και με άλλη τεχνητή γονιμοποίηση. Ειδικότερα, επιστήμονες έχουν επινοήσει ένα μηχάνημα που μετέφερε ηλεκτροστατικά γύρη και μηχανικά την εναπόθετε στα θηλυκά δένδρα (η παραπάνω τεχνική έχει εφαρμοστεί πειραματικά σε φιστικιές στην Καλιφόρνια, τον Απρίλιο του 1998). Συγκριτικά με τα δένδρα που είχαν φυσική επικονίαση, τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι μέσω της ηλεκτροστατικής μεταφερόμενης γύρης στα νεαρά θηλυκά δέντρα, παράγονταν 16,2% περισσότερο άνθη ανά σύμπλεγμα, ενώ ένα ποσοστό 11,3% των δένδρων είχε υψηλότερη απόδοση. Επιπρόσθετα, αφενός τα ανοικτά φιστικιά αυξήθηκαν με ποσοστό 18,6% και αφετέρου τα κενά φιστικιά μειώθηκαν κατά 60%. Συμπερασματικά, η ηλεκτροστατική επικονίαση της φιστικιάς θα μπορούσε να αντικαταστήσει τη φυσική επικονίαση με τον αέρα ή να δράσει συνδυαστικά, με αποτέλεσμα την υψηλότερη απόδοση στις καλλιέργειες και συγχρόνως την καλύτερη ποιότητα στους καρπούς. Επίσης, κάποιοι άλλοι ερευνητές μελέτησαν την τεχνητή γονιμοποίηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ήταν μια αποτελεσματική μέθοδος σε φιστικιές. Οι μελετητές πρότειναν τη χρήση της ως μία τεχνική, η οποία θα μπορούσε δυνητικά να αντικαταστήσει τη φυσική επικονίαση και να εξασφαλίσει υψηλές αποδόσεις και πολύ καλής ποιότητας καρπούς (Αλυφαντή, 2013).

IV. ΕΛΑΦΟΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Η φιστικιά αναπτύσσεται σε κλίματα ζεστά και ξηρά. Τα τελευταία χρόνια επεκτάθηκε και βορειότερα (Κεντρική και Β. Ελλάδα) αλλά αντιμετωπίζει προβλήματα κυρίως λόγω μυκητολογικών ασθενειών (Βασιλακάκης, 2010).

Η φιστικιά αντέχει σε χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα τόσο περίπου όσο η αμυγδαλιά, έχει, όμως, μεγαλύτερες απαιτήσεις σε θερμοκρασία κάτω των 7οC για να διακοπεί ο λήθαργος των οφθαλμών. Η άνοιξη δεν πρέπει να είναι υγρή διότι ο βροχερός και υγρός καιρός παρεμποδίζουν την μεταφορά της γύρης με συνέπεια τη μη επίτευξη της καρπόδεσης. Επιπλέον, ο υγρός και ζεστός καιρός ευνοούν την ανάπτυξη μυκητολογικών ασθενειών. Το καλοκαίρι πρέπει να είναι ζεστό και το φθινόπωρο παρατεταμένο και κάπως ζεστό για να ωριμάσει και να συγκομισθεί ο καρπός. Ο καρπός ωριμάζει το Σεπτέμβριο (Βασιλακάκης, 2010).

Το δέντρο μπορεί να αναπτυχθεί σε ποικίλα εδάφη. Μπορεί να αξιοποιήσει άγονα εδάφη, ασβεστώδη, όχι όμως υγρά και συνεκτικά. Καλύτερες αποδόσεις έχουμε όταν το δέντρο καλλιεργείται σε εδάφη ελαφρά που στραγγίζονται πολύ καλά, λιπαίνονται και αρδεύονται σύμφωνα με τις απαιτήσεις του φυτού (Βασιλακάκης, 2010).

V. ΦΥΤΕΥΣΗ, ΑΡΔΕΥΣΗ, ΚΛΑΔΕΜΑ, ΛΙΠΑΝΣΗ

Στην Ελλάδα, οι φιστικιές φυτεύονται συνήθως σε γραμμές ή σε ορθογώνια παραλληλόγραμμα. Οι αποστάσεις μεταξύ των δένδρων είναι 7x7m ή 7x6m ή 6x6m (Γεωργιάδου, 2009), ενώ η σχέση αρσενικών προς θηλυκά δένδρα είναι συνήθως 1:8 (Herrera, 1997).

Η φιστικιά, αν και είναι ανθεκτική στην ξηρασία, δίνει σαφώς μεγαλύτερη και καλύτερης ποιότητας παραγωγή όταν ποτίζεται. Το πότισμα δίνει καλύτερα αποτελέσματα όταν γίνεται κατά το γέμισμα των καρπών, δηλαδή τους καλοκαιρινούς

μήνες. Τα συστήματα αρδεύσεως που εφαρμόζονται κυρίως είναι οι λεκάνες, κατά σταγόνες (στάγδην) και οι εκτοξευτήρες (Γεωργιάδου, 2009).

Κατά τη διάρκεια της περιόδου λήθαργου των δέντρων, από το Νοέμβριο έως το Μάρτιο, απαιτείται κλάδεμα. Ειδικότερα το κλάδεμα προτείνεται να γίνεται αργά τον χειμώνα και κυρίως πριν από το ξεκίνημα των οφθαλμών. Γενικότερα, πρέπει να είναι ελαφρύ (αφαίρεση 10-15% των κλάδων της κόμης των δέντρων) και να αποσκοπεί στη διατήρηση του σχήματος και στην ανανέωση του καρποφόρου ξύλου. Σε αντίθετη περίπτωση, τα αυστηρά κλαδέματα (αφαίρεση πάνω από 30% της κόμης των δέντρων) αυξάνουν το ποσοστό των κλειστών καρπών (Γεωργιάδου, 2009).

Κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, από τον Απρίλιο μέχρι τον Οκτώβριο, η λίπανση αποτελεί καθοριστικής σημασίας καλλιεργητική επέμβαση για την αύξηση της παραγωγικότητας της φιστικιάς. Άλλωστε, πολύ σημαντική επίδραση ασκεί στη γονιμότητα του εδάφους, και συνεπώς στη βελτίωση της παραγωγικότητας του δέντρου, η οργανική ουσία (χούμος) που δημιουργείται με την τακτική προσθήκη χωνεμένης κοπριάς ή χλωρής λίπανσης (Γεωργιάδου, 2009).

VI. ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ, ΞΗΡΑΝΣΗ, ΔΙΑΛΟΓΗ

Η συγκομιδή αρχίζει όταν τα περισσότερα φιστίκια πάνω στο δέντρο έχουν ωριμάσει. Στην Ελλάδα αρχίζει τις πρώιμες χρονιές γύρω στα μέσα Αυγούστου και τις όψιμες χρονιές γύρω στο τέλος Αυγούστου. Σε γενικές γραμμές, σε ένα διάστημα 20 ημερών πραγματοποιείται η βέλτιστη συγκομιδή. Η συγκομιδή μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρωνακτικά ή μηχανικά.

Στην Ελλάδα η συγκομιδή γίνεται χειρωνακτικά. Στρώνονται δύο μεγάλα πανιά γύρω από το δέντρο και οι εργαζόμενοι χτυπούν τους καρπούς με ξύλινα κοντάρια που στο ένα μέρος τους έχουν υφασμάτινο περίβλημα, για να μην τραυματίσουν το δέντρο. Κατόπιν αδειάζουν τα φιστίκια από τα πανιά σε σάκους.

Στην Αμερική η συγκομιδή πραγματοποιείται μηχανικά. Εκτελείται χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος μηχανές. Η μια τινάζει το δέντρο και η άλλη συλλαμβάνει τους καρπούς. Η μέση ημερήσια συλλογή αφορά περίπου 400 έως 500 δέντρα και αντιπροσωπεύει περίπου 6.000 έως 8.000 κιλά ξηρού φιστικιού.

Η απόδοση όταν το δένδρο είναι σε πλήρη καρποφορία (8-10 χρόνων) ανέρχεται κατά μέσο όρο στα 10 κιλά ξηρά φιστίκια ανά δένδρο. Ωστόσο, πολύ σημαντικές θεωρούνται οι πληροφορίες σχετικά με την απόδοση του κάθε δένδρου μέσα σε ένα φιστικεώνα. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να συμβάλουν καθοριστικά στην ανάπτυξη αποτελεσματικών πρακτικών διαχείρισης. Στην Αμερική, για την επίτευξη αυτού του στόχου, έχει αναπτυχθεί ένα αυτοματοποιημένο σύστημα παρακολούθησης της απόδοσης. Το σύστημα αυτό, σε έναν εμπορικό οπωρώνα, είναι σε θέση να προσδιορίσει τα δέντρα, να μετρήσει τις αποδόσεις τους (κατά τη συλλογή των καρπών) και να πραγματοποιήσει χαρτογράφηση. Η ικανότητά του να μετρήσει την απόδοση μεμονωμένων δέντρων παρέχει πρωτόγνωρες πληροφορίες στους παραγωγούς, τόσο για την παραγωγικότητα του δένδρου όσο και για τη διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν την παραγωγή. Τα δεδομένα που καταγράφονται από τη χρήση αυτού του συστήματος έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματικές μελέτες για τη βελτίωση της παραγωγικότητας και τη διαχείριση των φιστικεώνων.

Αμέσως μετά τη συγκομιδή τα φιστίκια οδηγούνται στις αποφλοιωτικές μηχανές και ακολουθεί η αφαίρεση του εξωκάρπιου από το σκληρό κέλυφος. Το στάδιο αυτό πρέπει να πραγματοποιείται εντός 24 ωρών από τη συγκομιδή, λόγω του ότι ο καρπός είναι πολύ ευαίσθητος και υπάρχει η πιθανότητα να δημιουργηθούν κηλίδες στο κέλυφος, καθώς και να δημιουργηθεί μύκητας ή να αυξηθεί το ποσοστό της

αφλατοξίνης. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η βελτίωση της ποιότητας και συγχρόνως η μικροβιολογική ασφάλεια. Η διεργασία της αποφλοιώσης περιλαμβάνει την αρχική πλύση του καρπού. Ο καρπός κατόπιν με ειδική διεργασία αποφλοιώνεται. Κατά τη συγκομιδή, τα φρέσκα φιστίκια έχουν περίπου 30% υγρασία. Για να δημιουργηθεί ένα σταθερό γεωργικό προϊόν, οι καρποί πρέπει να ξεραθούν και να αποκτήσουν υγρασία 7% ή λιγότερο. Σε αυτά τα χαμηλά επίπεδα υγρασίας μύκητες και βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν, αλλά δεν πολλαπλασιάζονται.

Επακολουθεί η διαδικασία της αποξήρανσης, η οποία μπορεί να είναι φυσική με άπλωμα του καρπού στον ήλιο για να ξηραθεί ή τεχνητή με ξήρανση σε ξηραντήριο, και στη συνέχεια η αποθήκευση σε κατεψυγμένο περιβάλλον.

Έπειτα ακολουθεί η διαλογή φιστικιού, σε ανοικτό και κλειστό. Η διαλογή του φιστικιού μπορεί να πραγματοποιηθεί με αρκετούς τρόπους, τόσο χειρωνακτικά όσο και μηχανικά. Η μηχανική διαλογή ωστόσο θεωρείται αποτελεσματικότερη, διότι επιτυγχάνεται εξοικονόμηση χρόνου και παράλληλα μείωση κόστους στην επεξεργασία φιστικιού. Επιπρόσθετα, η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει τη μείωση του κινδύνου εισαγωγής παθογόνων, που ελλοχεύει μέσω του διαχωρισμού των καρπών με το χέρι. Συνεπώς, συγχρόνως συμβάλλει στην ασφάλεια της υγείας των καταναλωτών. Ένα από τα είδη μηχανικής διαλογής πραγματοποιείται από ειδικές βελόνες που διαχωρίζουν τα ανοικτά φιστίκια (δηλαδή τα φιστίκια που έχουν διασπασμένο κέλυφος) από τα κλειστά φιστίκια. Μια άλλη μέθοδος για τον διαχωρισμό κλειστού και ανοικτού φιστικιού χρησιμοποιεί τον ήχο, ως ένα μέσο για την ταξινόμηση. Η ακρίβεια της ταξινόμησης αγγίζει το 91,7%. Σε μια άλλη έρευνα μελετήθηκε ένα σύστημα διαχωρισμού με βάση τον συνδυασμό ακουστικής ανίχνευσης και τεχνητών νευρωνικών δικτύων. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν μέσο όρο στην ακρίβεια του συστήματος 97,51% (Mahmoudi *et al.*, 2006).

Το φιστίκι μετά τη διαλογή, μπορεί να καταναλωθεί ωμό ή ψημένο ως σνακ, καθώς και να χρησιμοποιηθεί στη μαγειρική, την αλλαντοποιία, στη ζαχαροπλαστική, σε παγωτά, σε καραμέλες, σε αρτύματα (Duke, 1989· Walheim, R., Walheim, L., 1981). Στην Ελλάδα, οι άγουροι καρποί χρησιμοποιούνται, επίσης, για την παρασκευή παραδοσιακών γλυκών κουταλιού. Επίσης, ο καρπός του φιστικιού χρησιμοποιείται για την παραγωγή γάλακτος, φιστικελαίου, καλλυντικών (Lashgarara, Mirdamadi, Mirzaei, 2012).

VII. ΕΧΘΡΟΙ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Η φιστικιά έχει πάρα πολλούς εχθρούς. Το ευρύτομο προκαλεί ζημιές αλλά καταπολεμάται με εντομοκτόνα. Άλλοι εχθροί είναι: ο τρωγόκαρπος, ο σκόρος των φιστικιών, η βαμβακάδα, οι φυλλοδέτες κ.α. Οι μυκητολογικοί εχθροί είναι εκείνοι που μπορούν να μειώσουν όχι μόνο την παραγωγή μιας σοδειάς αλλά και την καρποφορία ετών. Οι κυριότερες είναι: Καμαροσπόριο, Σεπτόρια, Ζύμες και Αδρoμύκωση (Βασιλακάκης, 2010).

VIII. ΦΙΣΤΙΚΙ ΑΙΓΙΝΗΣ ΩΣ ΠΡΟΙΟΝ Π.Ο.Π.

Το 1994 έγινε η ένταξη του φιστικιού Αιγίνης στα προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ). Ο θεσμός των προϊόντων ΠΟΠ είναι μία απόφαση της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την προστασία ονομαστών προϊόντων συγκεκριμένης περιοχής, τα οποία πλήττονται από αθέμιτο ανταγωνισμό.

Η ένταξη του φιστικιού Αιγίνης στα προϊόντα ΠΟΠ έγινε κατ' εφαρμογή του Π.Δ. 81/19.3.1993, ύστερα από αίτηση που κατέθεσε ο Αγροτικός Συνεταιρισμός Αίγινας, μετά από ενημέρωση και πρόταση της Διεύθυνσης Γεωργίας Πειραιά. Την ευθύνη από πλευράς Διεύθυνσης Γεωργίας είχε ο τοπικός γεωπόνος Αριστοτέλης Τέκος και τη μελέτη, οικονομική και σκοπιμότητας, έκανε ο γεωπόνος Μιχάλης Μουτσάτσος. Σύμφωνα με τη μελέτη, ο λόγος για τους οποίους το φιστίκι Αιγίνης εντάχθηκε στα προϊόντα ΠΟΠ είναι:

- α) Το φιστίκι Αιγίνης είναι προϊόν συγκεκριμένης περιοχής, όπως αποδεικνύεται από την πανελλήνια φήμη του και την σύνδεση του ονόματός του με την Αίγινα.
- β) Το φιστίκι Αιγίνης, λόγω ενός σπάνιου συνδυασμού παραγόντων, έχει ιδιαίτερη γεύση.
- γ) Η καλλιέργεια της φιστικιάς μαζί με άλλους παράγοντες έχει συγκρατήσει τον πληθυσμό της Αίγινας και δεν παρατηρείται η τάση ερήμωσης της επαρχίας.

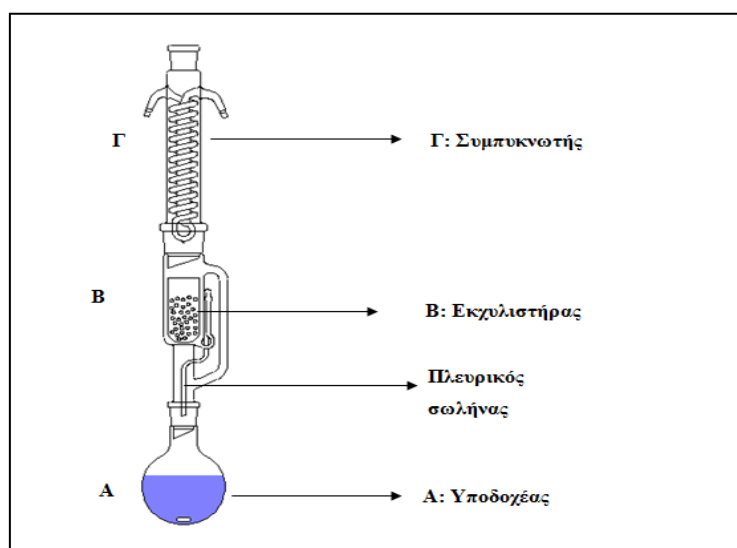
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ SOXHLET

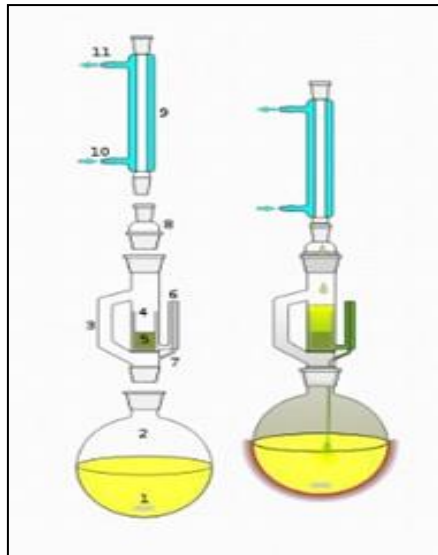
Ο διαλύτης θερμαίνεται στο κατώτερο σημείο Α (Εικ.Α.1) σε φιάλη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση. Καθώς αναβράζει ο ατμός του διαλύτη περνά μέσω ενός βραχίονα απόσταξης και συσσωρεύεται στο θάλαμο που βρίσκεται το κύπελλο που περιέχει το στερεό δείγμα (καρτούσα) (σημείο Β στην Εικ Α.1). Ο ατμός του διαλύτη ψύχεται και αποστάζει ξανά μέσα στο θάλαμο που βρίσκεται το στερεό υλικό χάριν της βοήθειας του συμπυκνωτή. Ο θάλαμος που με το στερεό υλικό γεμίζει σιγά-σιγά με το θερμό διαλύτη. Μία ποσότητα του του ελαίου, δηλαδή της επιθυμητής ένωσης διαλύεται στον ζεστό διαλύτη. Την στιγμή όπου ο θάλαμος Soxhlet είναι σχεδόν πλήρης, εκτελείται σιφωνισμός δηλαδή εκκένωση του θαλάμου . Ο διαλύτης μαζί με το έλαιο που έχει διαλυθεί σε αυτόν επιστρέφεται στη φιάλη απόσταξης. Η λειτουργία του θαλάμου εξασφαλίζει ότι κατά τη μεταφορά του διαλύτη στην φιάλη δεν μεταφέρεται επίσης στερεό. Έπειτα από πολλούς κύκλους σιφωνισμού η επιθυμητή ένωση συγκεντρώνεται στη φιάλη απόσταξης. Το πλεονέκτημα της λειτουργίας Soxhlet είναι ότι, αντί να διέρχονται πολλά τμήματα του θερμού διαλύτη μέσω του δείγματος, ανακυκλώνεται το ίδιο ποσό του διαλύτη αρκετές φορές. (Βαλάση, 2016).

Στο τέλος της εκχύλισης απομακρύνεται ο διαλύτης, συνήθως με τη βοήθεια ενός περιστροφικού εξατμιστήρα κενού, συγκρατώντας το έλαιο. Το μη διαλυτό μέρος των εκχυλισμένων στερεών συγκρατείται στο θάλαμο και συνήθως απορρίπτεται (Βαλάση, 2016).

Λεπτομερής συνδεσμολογία της συσκευής Soxhlet υπάρχει στην Εικ. Α.2.



Εικόνα Α.1. Συσκευή ημισεχούς εκχύλισης Soxhlet.



Εικόνα Α.2. Λεπτομερής συνδεσμολογία συσκευής Soxhlet.

όπου 1: αναδευτήρας, 2: γυάλινη φιάλη (η φιάλη δε θα πρέπει να είναι υπερπλήρης και ο όγκος του διαλύτη μέσα σε αυτή πρέπει να είναι 3-4 φορές ο όγκος του θαλάμου), 3: διαδρομή απόσταξης, 4: θάλαμος Soxhlet, 5: στερεά, 6: σιφόνι-κορυφή, 7: σιφόνι-έξοδος, 8: προσαρμογέας επέκτασης, 9: συμπυκνωτής, 10: νερό ψύξης-είσοδος, 11: νερό ψύξης-έξοδος.

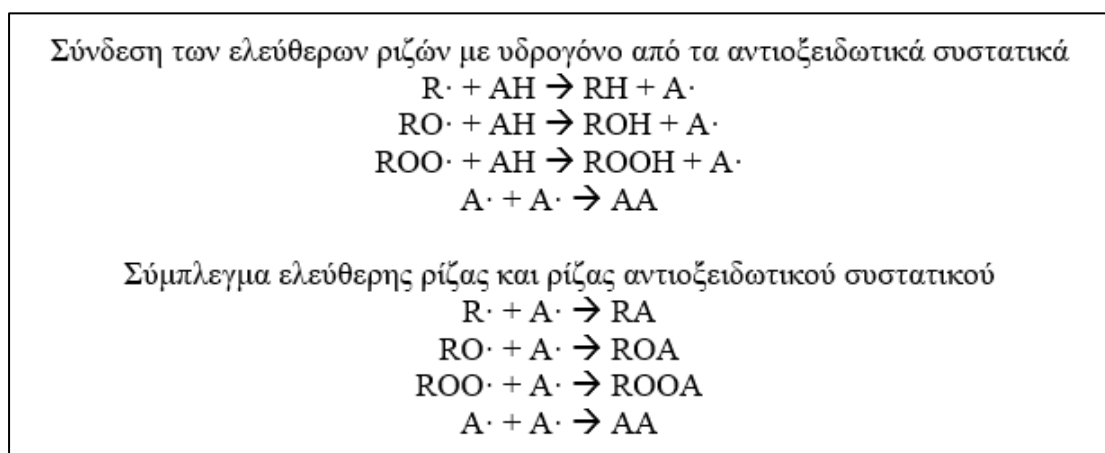
Είναι σημαντικό να αναφέρουμε κάποια λειτουργικά σημεία προσοχής κατά την λειτουργία της συσκευής Soxhlet (Βαλάση, 2016):

- Η στήλη πρέπει να παραμένει κατακόρυφη, ώστε να επιτευχθεί τη μέγιστη επαφή μεταξύ υγρού και ατμού.
- Η κυκλοφορία του νερού στον υδροψυκτήρα κυκλοφορεί από την βάση προς τα πάνω (κάτω-είσοδος και πάνω-έξοδος) για την επίτευξη της καλής κυκλοφορίας του αέρα και για την αποφυγή της απότομης επαφής του θερμού αποστάγματος με το ψυχρό νερό.
- Συνίσταται η λίπανση όλων των σημείων σύνδεσης των γυαλικών της συσκευής για τη διατήρηση της ελαττωμένης πίεσης (βέλτιστη κατάσταση είναι η επίτευξη κενού).
- Ο εξωτερικός φαρδύς σωλήνας εσωκλείει έναν σπирάλ γυάλινο σωλήνα. Το σπирάλ σχήμα του σωλήνα διευκολύνει να έρχεται μεγαλύτερη ποσότητα ατμού σε επαφή με το ψυκτικό μέσο και επιτυγχάνεται πιο γρήγορα η συμπύκνωση του ατμού.

A.2 ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Η έρευνα σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα έχει επικεντρωθεί τόσο σε βιολογικό επίπεδο όσο και στον τομέα των τροφίμων. Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες που έχουν την ικανότητα να επιβραδύνουν ή να αποτρέπουν την οξείδωση άλλων ουσιών. Ως οξείδωση ορίζεται η χημική αντίδραση κατά την οποία παρατηρείται μεταφορά ηλεκτρονίων από μια ουσία σε ένα οξειδωτικό σώμα. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις παράγουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να καταστρέψουν τα κύτταρα (Karvela *et al.*, 2011). Τα αντιοξειδωτικά σταματούν αυτές

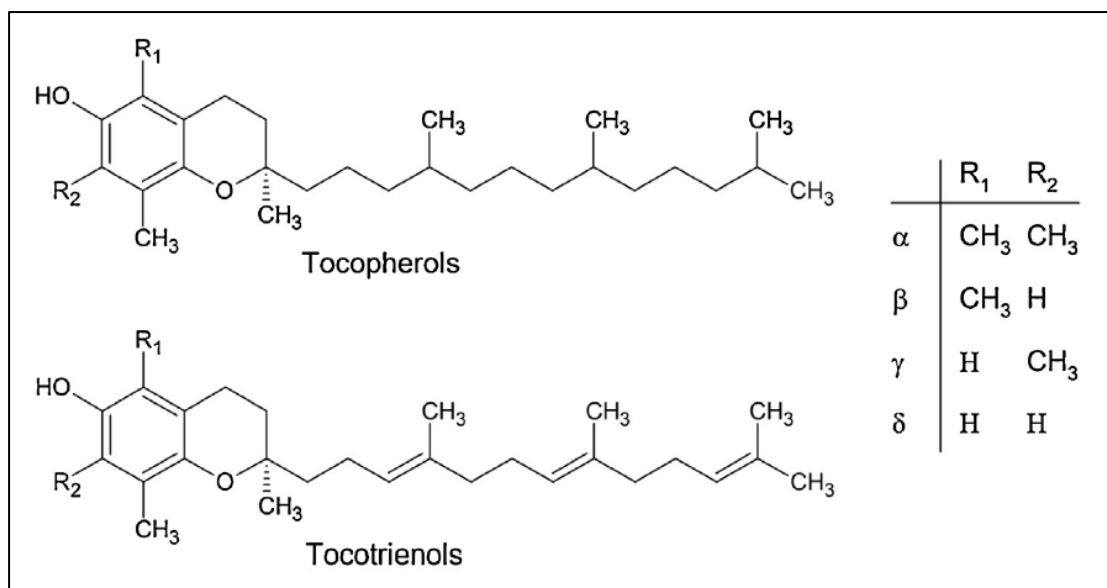
τις αλυσιδωτές αντιδράσεις είτε απομακρύνοντας τις ενδιάμεσες ελεύθερες ρίζες, δηλαδή λειτουργώντας ως δεσμευτές ριζών είτε αναστέλλοντας άλλες αντιδράσεις οξειδωσης με το να οξειδώνονται αυτά ανάγοντας παράλληλα τα υδροϋπεροξειδία σε υδροξυ-ενώσεις (Εικ. Α.3). Τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται σε δύο βασικές ομάδες: πρωτογενή (αυτά που σταματούν την αλυσιδωτή αντίδραση της οξείδωσης) και δευτερογενή (αυτά που την προλαμβάνουν) (Belitz, Grosch, Schieberle, 2011). Μπορούν να ενεργούν ανεξάρτητα, αλλά είναι περισσότερο αποτελεσματικά όταν συνδυάζονται (Dai, Mumper, 2010).



Εικόνα Α.3. Αλυσιδωτή αντίδραση αντιοξειδωτικών.

A.3.1 ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΕΣ ΚΑΙ ΤΟΚΟΤΡΙΕΝΟΛΕΣ

Τα μεθυλικά παράγωγα της τοκόλης [2-μεθύλ-2(4',8',12' τριμεθυλοδεκατρι)χρομαν-6-όλης] ονομάζονται τοκοφερόλες. Επιπλέον, τα αντίστοιχα μεθυλικά παράγωγα της τοκοτριενόλης βρίσκονται στα τρόφιμα. Και οι τέσσερις τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες, με τις χημικές δομές που δίνονται στην Εικ. Α.4. βρίσκονται πρώτιστα στα σιτηρά, στους ξηρούς καρπούς και στα έλαια των κρταμβόσπορων. Αυτά τα οξειδοαναγωγικού τύπου λιπίδια έχουν διατροφικό και αναλυτικό ενδιαφέρον (Belitz, Grosch, Schieberle, 2011). Λόγω της μη πολικής τους φύσης, η παρουσία τους στα έλαια είναι προφανής (Ojeda-Amador, Fregapane, Desamparados, 2018). Είναι δραστικά ισοδύναμα της βιταμίνης Ε, ως αντιοξειδωτικά παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων στα οποία περιέχονται και σχετίζονται με ισχυρισμούς υγείας που επιβεβαιώνονται από κλινικά στοιχεία (Servili, Montedoro, 2002). Οι διάφορες τοκοφερόλες διαφέρουν στον αριθμό και στη θέση των μεθυλομάδων στο δακτύλιο. Η α-τοκοφερόλη έχει τη μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα που βασίζεται κυρίως στις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες με τις οποίες επιβραδύνεται ή αποτρέπεται η οξείδωση των λιπών, ωστόσο το κύριο ισομερές τοκοφερολών στο κελυφωτό φιστίκι είναι η γ-τοκοφερόλη η οποία απορροφάται τόσο αποτελεσματικά όσο και η α-τοκοφερόλη (Belitz, Grosch, Schieberle, 2011· Gentile *et al.*, 2007· Juhaimi *et al.*, 2018).



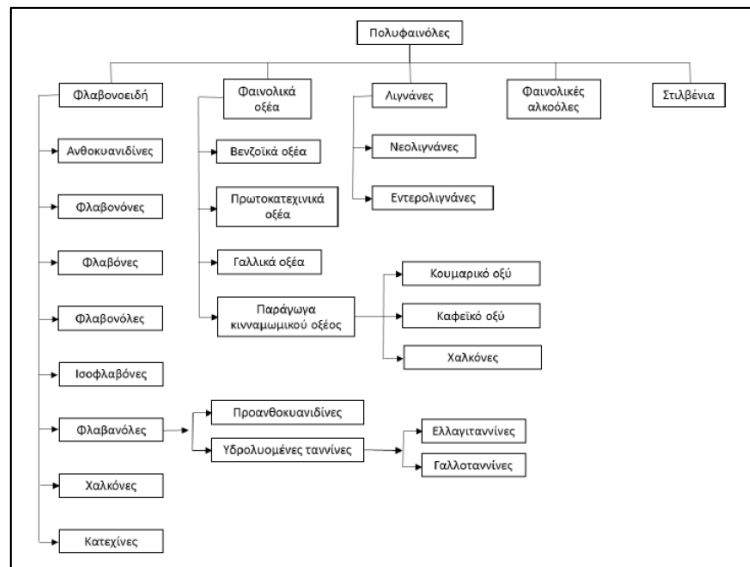
Εικόνα Α.4.. Χημική δομή τοκοφερολών και τοκοτριενολών που υπάρχουν στα τρόφιμα.

A.3.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Τα αντιοξειδωτικά που περιέχουν φαινολική ομάδα διαδραματίζουν το σημαντικότερο ρόλο στα τρόφιμα (Belitz, Grosch, Schieberle, 2011). Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες αναφέρεται ως ο κυριότερος τρόπος αντιοξειδωτικής δράσης τους. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών συστατικών εξαρτάται από το χημικό τύπο και από τον τρόπο με τον οποίο είναι κατανομημένες οι λειτουργικές ομάδες (-OH) στο μόριο (Δημητρίου, Συνάμογλου, 2014).

Οι φαινολικές ενώσεις συνιστούν μία ομάδα οργανικών μορίων, η οποία συντίθεται από τα φυτά κατά την διάρκεια της ανάπτυξής τους, προκειμένου να τα προστατέψει από μολύνσεις, ασθένειες, τραυματισμούς, την ακτινοβολία UV, ενώ παράλληλα παρεμποδίζει την καταστροφή των σπόρων μέχρι τη βλάστησή τους (Dermeche *et al.*, 2013· Stalikas, 2007). Επίσης, θεωρούνται υπεύθυνες για τις χρωστικές αρκετών φρούτων και λαχανικών (Dermeche *et al.*, 2013). Στη φύση υπάρχουν περίπου 8000 ενώσεις που ανήκουν στη κατηγορία των φαινολικών.

Οι φαινολικές ενώσεις συνήθως βρίσκονται είτε με τη μορφή γλυκοζιτών με ένα ή περισσότερα σάκχαρα σαν υποκαταστάτες της υδροξυλομάδας ή άμεσα συνδεδεμένα με κάποιο άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου ή ως αγλυκόνες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Καθεμία φαινολική ένωση χαρακτηρίζεται από έναν αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο με έναν τουλάχιστον υδροξυλικό υποκαταστάτη και ενδεχομένως μία ή περισσότερες λειτουργικές ομάδες. Ο όρος «φυτικές φαινολικές ενώσεις» εμπερικλείει απλές φαινόλες και πολυφαινόλες, όπως φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβονόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες), φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά, υδροξυκινναμωμικά), στυλβένια, λιγνάνες, συμπτυκνωμένες (προανθοκυανιδίνες) και υδρολύομενες ταννίνες (Εικ. Α.5) (Δημητρίου, Συνάμογλου, 2014). Στην αντιοξειδωτική ικανότητα συνεισφέρουν τόσο οι φλαβονοειδείς όσο και η μη φλαβονοειδείς ενώσεις, με τα διμερή προανθοκυανιδινών να έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και να ακολουθούν κατά φθίνουσα σειρά οι φλαβανόλες, φλαβονόλες, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα και τα απλά φαινολικά οξέα (Soobrattee *et al.*, 2005).



Εικόνα Α.5. Κατηγοριοποίηση πολυφαινολών.

Τα φιστίκια είναι πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων και έχουν καταταχθεί στα πρώτα 50 προϊόντα τροφίμων που έχουν το υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό (Halvorsen *et al.*, 2006).

Απλές φαινόλες

Οι απλές φαινόλες περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο ενωμένο απευθείας με ένα ή περισσότερα υδροξύλια, ενώ οι πολυφαινόλες έχουν στο μόριο τους πολλούς φαινολικούς δακτυλίους (Waterhouse, 2002). Απλές φαινόλες στο φιστίκι διακρίνουμε τη ρεσορκινόλη και τη φλορογλουκινόλη.

Πολυφαινόλες

Α) Φλαβονοειδή

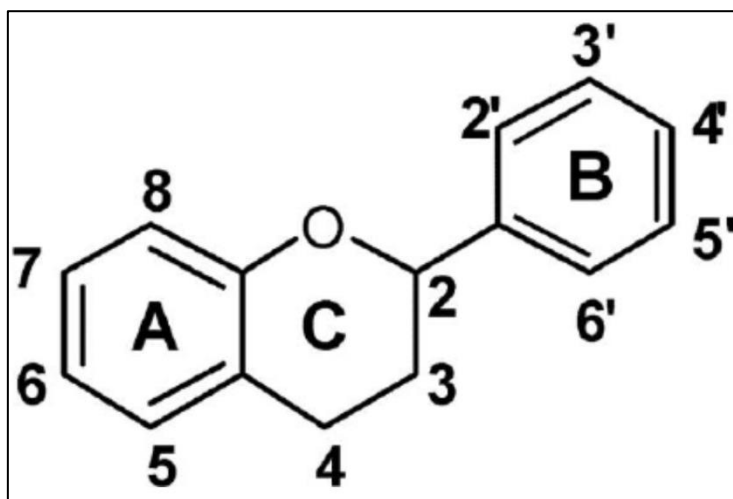
Στα φλαβονοειδή οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες αποδίδονται λόγω της παρουσίας των φαινολικών υδροξυλομάδων που συνδέονται με δομές δακτυλίου και μπορούν να δράσουν ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου, δεσμευτές οξυγόνου και να σχηματίσουν χηλικά σύμπλοκα. Μπορούν, επίσης, να ενεργοποιήσουν αντιοξειδωτικά ενζύμων και να αναστείλουν τις οξειδάσεις. Η ικανότητα των φλαβονοειδών να δρουν σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες έγκειται χημικά στο ότι τα δυναμικά οξειδοαναγωγής των φλαβονοειδών ριζών που σχηματίζονται είναι αρκετά χαμηλά σε σχέση με αυτά των υπεροξειδικών και αλκοξυ-ριζών. Αυτό σημαίνει ότι τα φλαβονοειδή απενεργοποιούν αυτές τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέπουν τις καταστροφικές συνέπειες των περαιτέρω αντιδράσεων (Rice-Evens, Millew, Paganga, 1996· Procházková, Boušová, Wilhelmová, 2011).

Σε ό,τι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών σημαντικό ρόλο παίζουν (Εικ.Α.5) (Δημητρίου, Συνάμογλου, 2014· Rice-Evens, Millew, Paganga, 1996):

A) Η ύπαρξη υδροξυ-ομάδων στις θέσεις 3- στο δακτύλιο C και 5- στο δακτύλιο A. Ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ των –OH στις θέσεις 3- και 5- με την κετονομάδα αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών.

B) Ο βαθμός ακορεστότητας στο δακτύλιο C (διπλός δεσμός μεταξύ θέσεων 2- και 3) σε συνδυασμό με την παρουσία οξο-ομάδας στη θέση 4-. Η ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου ευθύνεται για τον απεντοπισμό των e⁻ στο δακτύλιο B.

Γ) Η ύπαρξη ορθο-διυδροξυ-διάταξης στο δακτύλιο B στις θέσεις 3- και 4-. Η ταυτόχρονη παρουσία των υδροξυλίων στο δακτύλιο B έχει το ρόλο του δότη υδρογόνου για τη σταθεροποίηση των ελεύθερων ριζών.



Εικόνα Α.5. Κατηγοριοποίηση πολυφαινόλων.

Φλαβόνες

Χαρακτηρίζονται από ένα διπλό δεσμό μεταξύ C-2 και C-3 του δακτυλίου C. Με μια σειρά μετασχηματισμών που επηρεάζουν τον ετεροκυκλικό ανθρακικό δακτύλιο μπορούν να δώσουν ανθοκυανιδίνες και κατεχίνες (Μπισμπίκης, 2017).

Φλαβονόνες

Χαρακτηρίζονται από έναν κορεσμένο δεσμό μεταξύ C- και C-3 του δακτυλίου C και ένα άτομο οξυγόνου (καρβονυλομάδα) στη θέση 4 (Μπισμπίκης, 2017).

Φλαβονόλες

Χαρακτηρίζονται από ένα διπλό δεσμό μεταξύ C-2 και C-3 του δακτυλίου C. Διαφέρουν από τις φλαβόνες καθώς διαθέτουν μια ομάδα υδροξυλίου στη θέση 3- και μπορούν να θεωρηθούν 3-δεοξυ-φλαβονόλες (Μπισμπίκης, 2017).

Φλαβανόλες

Χαρακτηρίζονται από έναν κορεσμένο δεσμό μεταξύ C- και C-3 του δακτυλίου C και ένα άτομο οξυγόνου (καρβονυλομάδα στη θέση 4). Διαφέρουν από τις

φλαβονόνες καθώς διαθέτουν μια ομάδα υδροξυλίου στη θέση 3 και μπορούν να θεωρηθούν 3-υδροξυ-φλαβονόνες ή 2-υδρο-φλαβονόλες (Μπισμπίκης, 2017).

Φλαβανόνες

Χαρακτηρίζονται από την έλλειψη του καρβονυλίου στη θέση 3 (Μπισμπίκης, 2017).

Ισοφλαβόνες

Χαρακτηρίζονται από ένα φαινολικό δακτύλιο (A ring) ενωμένο με τον εξαμερή ετεροκυκλικό δακτύλιο (C ring) και ακόμα ένα φαινολικό δακτύλιο (B ring) στη θέση C-3 (Μπισμπίκης, 2017).

B) Μη φλαβονοειδή

Φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά, υδροξυκινναμωμικά)

Τα φαινολικά οξέα δρουν ως χηλικές ενώσεις με σοβαρό αντίκτυπο στις υδροξυ- και υπεροξυ- ρίζες (Paiva, Russell, 1999). Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων σε σχέση με τη δραστική καρβοξυλομάδα. Μονο-υδροξυ υποκατεστημένα βενζοϊκά οξέα με την υδροξυλική ομάδα (-OH) σε όρθο- ή παρα- θέση σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα (-COOH) δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ συμβαίνει το αντίθετο όταν ο υποκαταστάτης είναι σε μέτα-θέση. Παρατηρείται, επίσης, αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης με την αύξηση του βαθμού υδροξυλίωσης (Rice-Evens, Millew, Paganga, 1996).

Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας καρβοξυλικής ομάδας σαν υποκαταστάτη στον φαινολικό δακτύλιο. Συνήθη υδροξυ-βενζοϊκά οξέα είναι τα: γαλλικό, πρωτοκατεχουϊκό, σαλικυλικό, βανιλικό, συριγγικό, ελλαγικό, p-υδροξυ-βενζοϊκό. Παράγωγα των οξέων είναι αλδεΐδες, όπως η βανιλίνη, οι οποίες έχουν μια αλδευδομάδα αντί μιας καρβοξυλομάδας (Μπισμπίκης, 2017· Manach *et al.*, 2004).

Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Χαρακτηρίζονται από τον σκελετό C6 – C3 δηλαδή ένα φαινολικό δακτύλιο και 3 άτομα άνθρακα συνδεδεμένα σε αυτόν. Συνήθη υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι τα: κινναμικό, p-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό, 5-υδροξυ-φερουλικό, σιναπικό, χλωρογενικό, γαλλικό (Μπισμπίκης, 2017· Manach *et al.*, 2004).

Στιλβένια

Χαρακτηρίζονται από τον ανθρακικό σκελετό C6 – C2 – C6. Τα στιλβένια απαρτίζονται κυρίως από την trans-ρεσβερατρόλη και το γλυκοζίτη της (Μπισμπίκης, 2017).

Λιγνάνες

Είναι διμερή ή ολιγομερή που προκύπτουν από τη σύζευξη μονολυγνολών. Τυπικά ο όρος λιγνάνη σημαίνει διμερές μονολυγνολών με δεσμό 8-8' (β-β), ενώ ο όρος νεολιγνάνη αφορά δεσμό 8-8'. Συνήθως λιγνάνες είναι: (+)-πινορεσινόλη, (+)-σισαμίνη και το (-)-πλικατικό οξύ (Μπισμπίκης, 2017).

Συμπυκνωμένες ταννίνες (προανθοκυανιδίνες)

Είναι ολιγομερή ή πολυμερή φλαβανο-3-όλης (κατεχίνης). Τα πολυμερή φτιάχνονται από τη δράση οξέων ή ενζύμων, συνήθως αποτελούνται από 2-10 μονομερή και ονομάζονται φλαβονάλες. Παράδειγμα συμπυκνωμένης ταννίνης: προκυανιδίνη B2 (επικατεχίνη-4β→8')-επικατεχίνη (Μπισμπίκης, 2017).

Υδρολύμενες ταννίνες (γαλλοταννίνες, ελλαγιταννίνες)

Γαλλοταννίνες

Χαρακτηρίζονται από έναν σκελετό πολυόλης (μια ένωση με πολλές ομάδες υδροξυλίου) υποκατεστημένο με 10-12 μονάδες γαλλικού οξέος. Η πιο συχνά απαντόμενη πολυόλη είναι η D-γλυκόζη αλλά συναντάμε και κατεχίνη και τριτερπενοειδή μονάδα για πολυόλη. Οι γαλλοταννίνες με σκελετό D-γλυκόζης συντίθεται από 1,2,3,4,6-πενταγαλλουλο-γλυκόζη. Ένα παράδειγμα γαλλοταννίνης είναι το: εξα-γαλλουλο ένωση 2-O-διγαλλουλο-1,3,4,6-τετρα-O-γαλλουλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (Μπισμπίκης, 2017).

Ελλαγιταννίνες

Προέρχονται από την πεντα-γαλλουλο-γλυκόζη και αντίθετα με τις γαλλοταννίνες περιέχουν επιπλέον δεσμούς C-C μεταξύ γειτονικών μορίων γαλλικού οξέος και πεντα-γαλλουλο-γλυκόζης. Λόγω των δύο εστερικών δεσμών μεταξύ των γαλλικών οξέων και της πολυόλης σε συνδυασμό με την παρουσία των ορθο-υποκαταστατών που δημιουργούν χωρική παρεμπόδιση υπάρχει χειρομορφία και περιορισμένη περιστροφή γύρω από τον άξονα C-C (Μπισμπίκης, 2017).

A.3.2.1 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Οι ενώσεις αυτές κατέχουν αντιμικροβιακές, αντιυολογικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιγηραντικές ιδιότητες, βοηθούν στην ανανέωση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προσφέρουν έμμεση προστασία στον ανθρώπινο οργανισμό ενεργοποιώντας διάφορα ενδογενή αμυντικά συστήματα (Lule, Xia, 2005· Han, Shen, Lou, 2007). Τροφές πλούσιες σε φαινολικές ενώσεις συνεισφέρουν σημαντικά στην πρόληψη πολλών ασθενειών όπως του καρκίνου, του διαβήτη και διάφορων καρδιαγγειακών παθήσεων (Lambert *et al.*, 2005· Vita, 2005).

A.3.2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στα φυτά μπορεί να σχετίζονται με τη φυσιολογία του φυτού ή να είναι περιβαλλοντικοί ή γεωγραφικοί. Η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από το στάδιο ανάπτυξης και τα μέρη του φυτού (καρποί, φύλλα, άνθη, σπέρματα) (Wang *et al.*, 1996), ενώ ακόμα και το φαινόμενο της παρενιαυτοφορίας των δενδροκομικών ειδών πιστεύεται ότι επιδρά στα επίπεδα των φαινολικών συστατικών. Διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων παρατηρούνται και μεταξύ ποικιλιών του ίδιου είδους αλλά και μέσα στην ίδια ποικιλία ανάλογα με την εποχή συγκομιδής (Ryan, Robards, Lavee, 1999).

Αύξηση των επιπέδων των φαινολικών ενώσεων στους ιστούς των φυτών μπορεί να προκαλέσει και η έλλειψη ή η περίσσεια ενός θρεπτικού στοιχείου. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση των φαινολικών συστατικών. Τα φαινολικά συστατικά συμμετέχουν στους μηχανισμούς επαγόμενης άμυνας των φυτών βοηθώντας στην επιβίωσή τους. Οι προσβολές από εχθρούς και ασθένειες καθώς και οι μηχανικές βλάβες μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα φαινολικών ενώσεων. Η σύνθεση των φαινολικών ενώσεων μπορεί να επηρεασθεί και από τη γεωγραφική τοποθεσία στην οποία βρίσκεται ένα φυτό. Άλλοι αβιοτικοί παράγοντες, εκτός των κλιματικών και γεωγραφικών, που μπορούν να επηρεάσουν το φαινολικό περιεχόμενο των φυτών είναι η ρύπανση, το έδαφος και οι θερμοκρασίες αποθήκευσης (Wang, Stretch, 2001).

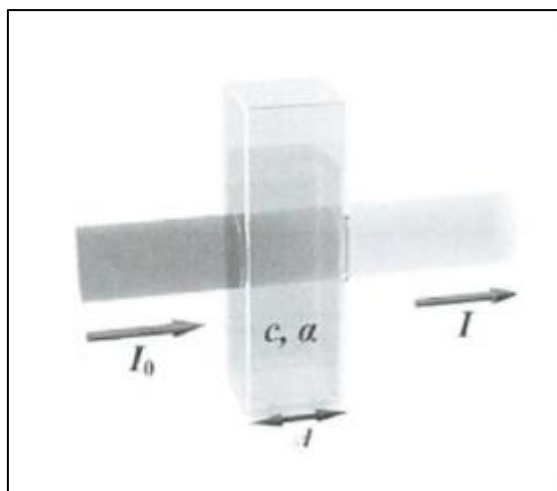
A.4 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-VIS)

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) είναι μία συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική στην ανάλυση φυτοχημικών ενώσεων (Thermo Spectronic, 2013). Περιλαμβάνει τη μέτρηση της ποσότητας της υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας που απορροφάται από μια ουσία σε ένα διάλυμα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο UV-Vis (Pretsch *et al.*, 2009). Ως εκ τούτου, όταν η δέσμη φωτός διέρχεται μέσω μιας διάφανης κυψελίδας, η οποία περιέχει ένα διάλυμα μιας απορροφητικής ουσίας, μπορεί να προκύψει μείωση της έντασης του φωτός (Εικ. Α.6). Ο νόμος των Beer-Lambert εκφράζεται ως:

$$A = a \times b \times C \quad (1)$$

όπου A: η απορρόφηση ή η οπτική πυκνότητα, a: η απορροφητικότητα ή ο συντελεστής απόσβεσης, b: το μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα από το δείγμα (cm), C: η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στο διάλυμα (g/L)

Τα a και b είναι σταθερές, επομένως, η απορρόφηση A είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση c.



Εικόνα Α.6. Ακτινοβολία διερχόμενη από κυψελίδα που περιέχει διάλυμα απορροφητικής ουσίας.

Η ποσοτικοποίηση φυτοχημικών ουσιών σε ολικά φυτικά εκχυλίσματα δεν είναι τόσο εύκολη όσο οι μετρήσεις γνωστών διαλυμάτων μιας συγκεκριμένης ουσίας που απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αντίθετα, λόγω της φύσης του εκχυλίσματος, η επιλογή ενός μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης ($\lambda_{\max}$) δεν είναι δυνατή. Ως εκ τούτου έχουν προταθεί πολλές χρωματομετρικές αντιδράσεις κατά τις οποίες η συγκέντρωση ενός χημικού στοιχείου ή μιας χημικής ένωσης σε ένα διάλυμα καθορίζεται με τη βοήθεια ενός χρωμοφόρου αντιδραστήριου. Τέτοιες μέθοδοι αποτελούν τις πλέον κατάλληλες για συνήθεις εργαστηριακές εφαρμογές, δεδομένου ότι είναι εύκολες στην εκτέλεση, ταχείες και έχουν σχετικά χαμηλό κόστος (Harborne, 1990).

A.5 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High-Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δε ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για ένα διαχωρισμό (Corradini, 2011).

Ο ποιοτικός προσδιορισμός έχει ως σκοπό να διερευνήσει και πιστοποιήσει την ταυτότητα μίας ουσίας που διαχωρίζεται με HPLC από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος.

A.5.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΩΝ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (HPLC-FLUORESCENCE)

Στους περισσότερους ανιχνευτές φθορισμού της HPLC, ο φθορισμός παρατηρείται με φωτοηλεκτρικό ανιχνευτή τοποθετημένο σε γωνία 90° σε σχέση με τη δέση διεγερσης. Οι πιο απλοί ανιχνευτές χρησιμοποιούν πηγή υδραργύρου για διέγερση και ένα ή περισσότερα φίλτρα για απομόνωση μιας ζώνης από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία. Τα καλύτερα όργανα βασίζονται σε πηγή αερίου ξένου και χρησιμοποιούν μονοχρώματα για απομόνωση της ακτινοβολίας φθορισμού. Ένα εγγενές πλεονέκτημα των φθορισμομετρικών μεθόδων είναι η μεγάλη τους ευαισθησία, η οποία κατά κανόνα είναι μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από τις περισσότερες μεθόδους απορρόφησης. Το πλεονέκτημα αυτό εκμεταλλεύεται η υγροχρωματογραφία για το διαχωρισμό και προσδιορισμό των συστατικών δειγμάτων που φθορίζουν (Skoog, Holler, Nieman, 2002).

A.6.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΔΙΟΔΩΝ (HPLC-DAD)

Σε ένα φασματοφωτόμετρο συστοιχίας φωτοδιόδων μετριοούνται όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα γρήγορης συλλογής του φάσματος ή μεγαλύτερου λόγου σήμα-προς-θόρυβο ή κάποιου ενδιαμέσου συνδυασμού των δύο. Διαπερνά το δείγμα λευκό φως (με όλα τα μήκη κύματος) και στη συνέχεια, το φως εισέρχεται σε έναν πολυχρωμάτορα, ο οποίος αναλύει το φως στα επιμέρους μήκη κύματος και το κατευθύνει στη συστοιχία φωτοδιόδων. Κάθε δίοδος λαμβάνει διαφορετικό μήκος κύματος, και έτσι όλα τα μήκη κύματος μετριοούνται ταυτόχρονα (Harris, 2015).



Εικόνα Α.7. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Συστοιχίας Διόδων.

A.5.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (HPLC-MS)

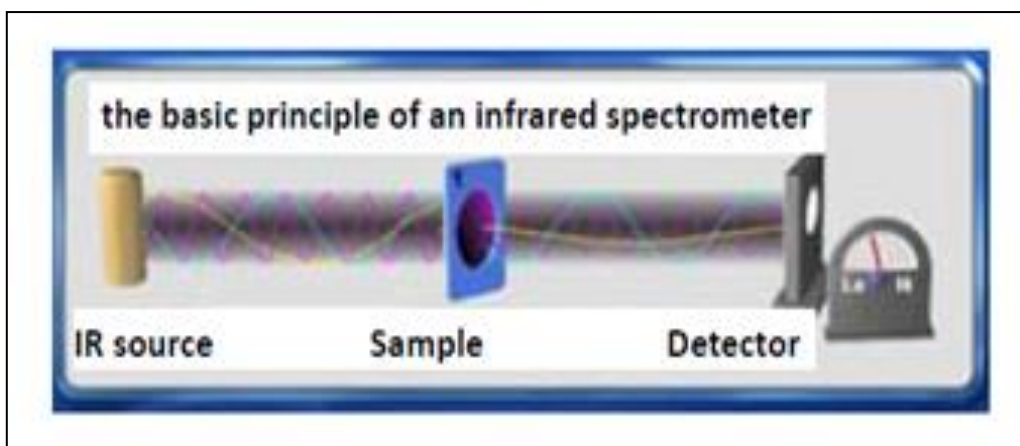
Η Υγρή Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μαζών (Liquid Chromatography Mass Spectrometry, LC-MS) έχει σημαντική συνεισφορά στην ταυτοποίηση των φλαβονοειδών. Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την ανάλυση, γεγονός πολύ κρίσιμο για τη μελέτη ουσιών, όπως τα φαινολικά όπου η απομόνωσή τους μπορεί να είναι αρκετά δύσκολη. Ωστόσο, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της φασματομετρίας μάζας είναι η συνδυασμένη τεχνική MS/MS με την οποία, εκτός από τα θραύσματα του μοριακού ιόντος, παραλαμβάνεται και δεύτερη σειρά θραυσμάτων που προκαλείται με την επιπλέον διάσπαση των αρχικών. Έτσι, κάθε φαινολική ένωση παράγει ένα φάσμα μαζών το οποίο είναι μοναδικό και μπορεί να λειτουργήσει ως «δακτυλικό αποτύπωμα» για την ταυτοποίηση της δομής του (Τσιμογιάννης *et al.*, 2008).

A.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ Fourier (FTIR)

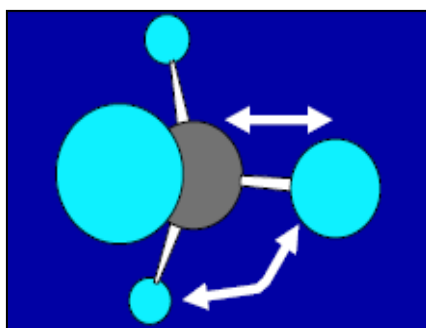
Οι τεχνικές φασματοσκοπίας έχουν διαδοθεί επειδή είναι γρήγορες, χαμηλού κόστους και μη καταστροφικές, κατάλληλες για στερεά και υγρά δείγματα. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του δείγματος με την ακτινοβολούσα ενέργεια ως μια συνάρτηση του μήκους κύματος ή της συχνότητας (Γεωργιάδου, 2015). Συνήθως αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού ο οποίος ορίζεται σαν το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός.

Η υπέρυθη φασματοσκοπία είναι μια από τις πλέον σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές. Τα φάσματα λαμβάνονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, είτε ολόκληρα είτε ορισμένες ταινίες απορρόφησής τους με άλλα γνωστά φάσματα. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές η ταυτοποίηση άγνωστων οργανικών ουσιών, αλλά και η πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Για το λόγο αυτό η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην οργανική και φαρμακευτική χημεία, στη φαρμακογνωσία και στην ανάλυση φυσικών προϊόντων, φαρμάκων, τροφίμων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κ.ά (Κουβουτσάκης, 2013).

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) είναι μια τεχνική που βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από το μέσο που εξετάζεται. Όταν το εξεταζόμενο μέσο εκτίθεται σε υπέρυθη ακτινοβολία, μέρος της ενέργειας IR μπορεί να απορροφηθεί και το υπόλοιπο θα μεταδοθεί. Εάν τοποθετήσουμε έναν ανιχνευτή, που είναι ευαίσθητος στην υπέρυθη ακτινοβολία, στη διαδρομή της εκπεμπόμενης ακτίνας μπορούμε να ανιχνεύσουμε την ενέργεια που δεν απορροφάται και συνεπώς να προσδιορίσουμε το ποσό της ενέργειας που απορροφάται (Εικ. Α.8.) (Κουβουτσάκης, 2013).



Εικόνα Α.8. Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας υπερώθρου.



Εικόνα Α.9. Σχηματική αναπαράσταση δονήσεων τάσης και κάμψης (Ταραντίλης, 2004).

Παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα δόνησης είναι οι εξής (Παππάς, 2000):

- Α) Συζυγιακό φαινόμενο (συμμετοχή σε δομές συντονισμού).
- Β) Επαγωγικό φαινόμενο: Η παρουσία ενός ηλεκτροθετικού ή ηλεκτραρνητικού ατόμου μπορεί να επηρεάσει το μήκος, την ισχύ και την τάξη ενός δεσμού.
- Γ) Στερεοχημικές παρεμποδίσεις: Στους δακτυλίους μεγάλου μεγέθους και στις μη κυκλικές κετόνες η κίνηση του ατόμου C κατά την τάση του δεσμού C=O «απορροφάται» από τις κινήσεις των γειτονικών ατόμων C. Σε δακτυλίους με 3,4,5 άτομα, η τάση του δεσμού C=O συμπίπτει τα γειτονικά άτομα, με αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας όσο το μέγεθος του δακτυλίου μικραίνει. Αυτό οφείλεται στην ελάττωση του p και στην αύξηση του s χαρακτήρα του δεσμού, που ελαττώνει το μήκος του διπλού δεσμού, καθιστώντας τον πιο δύσκαμπτο.
- Δ) Δεσμοί υδρογόνου: Προκαλούν επιμήκυνση των δεσμών ανάμεσα στα άτομα και ελαττώνουν τη σταθερά δύναμης του δεσμού k και μετατόπιση σε χαμηλότερες συχνότητες. Αφορά τόσο ενδομοριακούς, όσο και διαμοριακούς δεσμούς.

Οι συχνότητες (ή οι κυματαριθμοί) στις οποίες οργανικές δραστικές ομάδες απορροφούν υπέρυθη ακτινοβολία καλούνται «συχνότητες χαρακτηριστικών ομάδων» (group frequencies) και είναι σπάνια επακριβώς οι ίδιες, λόγω των αλληλεπιδράσεων με άλλες δονήσεις που σχετίζονται με το ένα ή και με τα δύο άτομα που αποτελούν την ομάδα. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι συνήθως μικρές. Κατά συνέπεια, μπορεί να οριστεί ένα εύρος συχνοτήτων μέσα στο οποίο είναι πολύ πιθανόν να βρεθεί η κορυφή της απορρόφησης μιας δεδομένης δραστικής ομάδας. Οι

χαρακτηριστικές συχνότητες των ομάδων επιτρέπουν μια επιστημονική πρόβλεψη ως προς το εάν μια ομάδα υπάρχει ή όχι σε ένα μόριο (Skoog, Holler, Nieman, 2002).

Σε ένα φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας διακρίνουμε την περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων και των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η πρώτη εκτείνεται στην περιοχή $4000-1400\text{ cm}^{-1}$ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στις δονήσεις των ομάδων. Η δεύτερη αντίστοιχα εκτείνεται στην περιοχή $1400-600\text{ cm}^{-1}$, στην οποία οι απορροφήσεις αφορούν δονήσεις του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» κάθε ένωσης (Κουβουτσάκης, 2013).

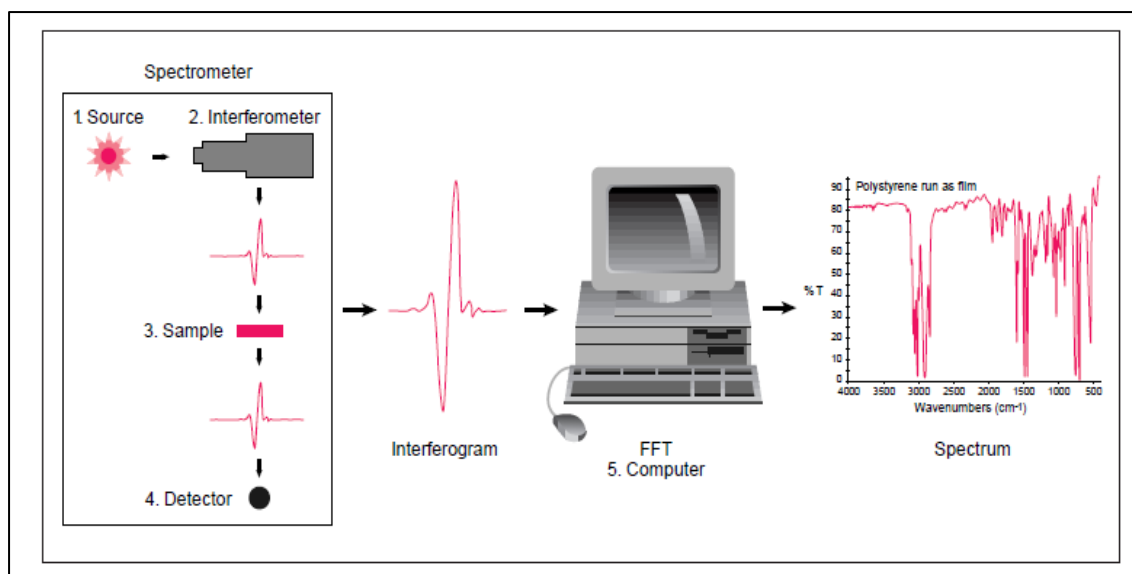
A.7.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ FTIR

Τα φασματοφωτόμετρα FTIR μπορούν, χάρη στο συμβολόμετρο, να εξετάζουν ταυτόχρονα πολλά σημεία του φάσματος. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε 10-20 δευτερόλεπτα και επαναλαμβάνεται συνήθως 20-100 φορές. Το τελικό φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο των επαναλήψεων «σαρώσεων» που έχουν εκτελεστεί. Με αυτόν τον τρόπο, όταν αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων ο «θόρυβος» μειώνεται και οι εντάσεις των απορροφήσεων βελτιώνονται σημαντικά. Η εξασφάλιση ότι το συμβολόγραμμα εξετάζει κάθε φορά τα ίδια σημεία του φάσματος γίνεται με τη βοήθεια μονοχρωματικής ακτινοβολίας λέιζερ. Η εξέταση πολλών ταυτόχρονα σημείων προσδίδει σε αυτού του τύπου τα φασματοφωτόμετρα πολύ μεγάλη ταχύτητα. Σε αντίθεση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα IR, κάθε σημείο εξετάζεται διαδοχικά και μια φορά (Κουβουτσάκης, 2013).

Η καταγραφή φασμάτων με το μετασχηματισμό Fourier παρουσιάζει, εκτός της υψηλής ταχύτητας καταγραφής, τα πλεονεκτήματα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και του χαμηλού «θορύβου». Επιπλέον, μπορούν να αφαιρεθούν ή να προστεθούν δύο φάσματα, να μεγεθυνθεί τμήμα του φάσματος, να διορθωθεί η βασική γραμμή κλπ. Αρνητικοί παράγοντες στην ποιότητα των FTIR φασμάτων είναι: α) η υγρασία του δείγματος και β) η υγρασία του χώρου τοποθέτησης του δείγματος. Η υγρασία του δείγματος πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλή. Αυτό σε μεγάλο βαθμό μπορεί να λυθεί με την τεχνική της λυοφιλίωσης των δειγμάτων. Η υγρασία του χώρου του δείγματος μειώνεται με την τοποθέτηση μέσα σ' αυτόν αφυδραντικών (π.χ. silica gel) ή τη διαβίβαση ξηρού αέρα ή αζώτου (Κουβουτσάκης, 2013).

Επειδή στο χώρο των οργάνων υπάρχει ατμοσφαιρικός αέρας, το φάσμα που καταγράφεται «λαμβάνει υπόψη» του και εκείνα τα αέρια συστατικά που απορροφούν στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμοί και διοξείδιο του άνθρακα). Για το λόγο αυτό πριν από τη λήψη του φάσματος του δείγματος καταγράφεται φάσμα αναφοράς (background). Το φάσμα αναφοράς λαμβάνεται με τον υποδοχέα του δείγματος χωρίς δείγμα, αλλά περιέχοντας κατά περίπτωση KBr (τεχνική DRIFT ή δισκίων) ή το διαλύτη διάλυσης του δείγματος ή μόνο τον ατμοσφαιρικό αέρα. Το φάσμα αναφοράς στη συνέχεια αφαιρείται αυτόματα, με τη βοήθεια του λογισμικού, από το συνολικό φάσμα. Ένα φάσμα αναφοράς χρησιμοποιείται για διάφορα δείγματα, επειδή αυτό το φάσμα είναι χαρακτηριστικό μονάχα για το όργανο (Κουβουτσάκης, 2013).

Πριν από την καταγραφή φασμάτων πρέπει να γίνεται ευθυγράμμιση των οπτικών μερών του φασματοφωτομέτρου. Η διαδικασία αυτή γίνεται αυτόματα με τη βοήθεια του λογισμικού του οργάνου. Κύρια η ευθυγράμμιση αποσκοπεί στο να είναι οι γωνίες που σχηματίζει ο διαχωριστής δέσμης με το κινούμενο και το ακίνητο κάτοπτρο ίσες (Κουβουτσάκης, 2013).



Εικόνα Α.13. Συγκεντρωτική αναπαράσταση λήψης φάσματος με φασματοσκοπία FTIR.

A.7.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ FTIR

Πλεονεκτήματα (Smita *et al.*, 2009)

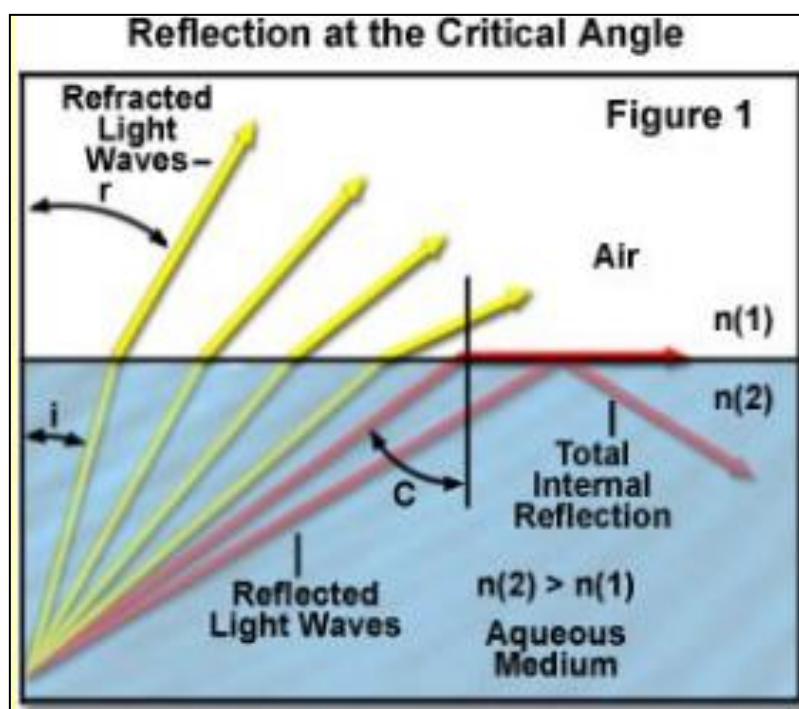
- 1) Είναι μία μη καταστρεπτική τεχνική.
- 2) Επιτρέπει τον προσδιορισμό κάθε διαφορετικού είδους ενώσεων του δείγματος (ποιοτική ανάλυση).
- 3) Αποτελεί άμεσο δείκτη της ποσότητας των ενώσεων που υπάρχουν στο δείγμα μέσω του μεγέθους των κορυφών στο φάσμα (ποσοτική ανάλυση).
- 4) Παρέχει εξαιρετικά ακριβείς και επαναλήψιμες μετρήσεις.
- 5) Μετρούνται όλες οι υπέρυθρες συχνότητες ταυτόχρονα και η ταχύτητα των μετρήσεων είναι υψηλή, συνήθως της τάξης του 1 sec (Felgett Advantage).
- 6) Έχει αυξημένη ευαισθησία με χαμηλά επίπεδα θορύβου (μείωση τυχαίου θορύβου των μετρήσεων) (Jacquinot Advantage).
- 7) Χαρακτηρίζεται από μηχανική απλότητα, καθώς το μόνο διαρκώς κινούμενο τμήμα του ιντερφερόμετρου είναι ο κινούμενος καθρέπτης και ως αποτέλεσμα είναι σπάνια η μηχανική βλάβη.
- 8) Παρέχει μετρήσεις που δεν απαιτούν εξωτερική βαθμονόμηση. Γίνεται εσωτερική βαθμονόμηση μέσω ενός laser HeNe χωρίς την ανάγκη βαθμονόμησης από το χρήστη (Connes Advantage).

Μειονεκτήματα (Παππάς, 2000)

- 1) Το φάσμα υπέρυθρου μπορεί να παρουσιάζει έντονες απορροφήσεις που οφείλονται στο H₂O και το CO₂ του χώρου του φασματοφωτόμετρου.
- 2) Απαιτείται ακριβής ρύθμιση των οπτικών του οργάνου, κυρίως του συμβολομέτρου Michelson. Σε αντίθεση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα, που δίνουν κακής ποιότητας αλλά χρησιμοποιήσιμα φάσματα όταν δεν είναι καλώς ρυθμισμένα, τα φωτόμετρα FTIR δεν παρέχουν καμία πληροφορία όταν δεν έχουν καλή ρύθμιση.

A.7.6 ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΕΞΑΣΘΕΝΗΜΕΝΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΑΚΛΑΣΗΣ (ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE, ATR)

Στην τεχνική ATR, μια υπέρυθη ακτίνα κατευθύνεται πάνω σε έναν οπτικά πυκνό κρύσταλλο (στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης) με υψηλό δείκτη διάθλασης με μία ορισμένη γωνία (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005), δηλαδή μια δέσμη IR κατευθύνεται σε ένα κατάλληλο πρίσμα υπό γωνία που υπερβαίνει την κρίσιμη γωνία. Όταν ξεπεραστεί η κρίσιμη γωνία, παρουσιάζεται ολική εσωτερική ανάκλαση εντός του μέσου (εικ. Α.14). Η κρίσιμη γωνία ορίζεται όταν η γωνία διάθλασης (r) γίνεται ίση με 90° και ισχύει ο νόμος του Snell $\sin(\theta) = n(1)/n(2)$ όπου $n(1) \neq n(2)$ όπου θ ορίζεται η κρίσιμη γωνία c .



Εικόνα Α.14. Ανάκλαση στην κρίσιμη γωνία.

Η ακτινοβολία IR ανακλάται ολικά εσωτερικά από την πίσω επιφάνεια, η οποία είναι σε επαφή με το δείγμα. Αυτή η εσωτερική ανάκλαση στη διεπιφάνεια κρυστάλλου-δείγματος δημιουργεί ένα εφήμερο κύμα που εκτείνεται πέρα από την επιφάνεια του κρυστάλλου διεισδύοντας μέσα στο δείγμα που έρχεται σε επαφή με τον κρύσταλλο. Μπορεί να είναι ευκολότερο να σκεφτούμε αυτό το παροδικό κύμα ως μια «φούσκα» υπέρυθρων που κάθετα στην επιφάνεια του κρυστάλλου. Αυτό το παροδικό κύμα προεξέχει μόνο μερικά microns ($0,5-5 \mu\text{m}$) πέρα από την επιφάνεια του κρυστάλλου και μέσα στο δείγμα. Κατά συνέπεια, πρέπει να υπάρχει καλή επαφή μεταξύ του δείγματος και της επιφάνειας του κρυστάλλου. Σε περιοχές του υπέρυθρου φάσματος, όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια, το παροδικό κύμα θα είναι εξασθενημένο. Η εξασθενημένη δέσμη από κάθε παροδικό κύμα επιστρέφει στον κρύσταλλο, εξέρχεται από το αντίθετο άκρο του κρυστάλλου και διοχετεύεται στον ανιχνευτή στο φασματόμετρο IR (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005). Την πορεία της υπέρυθρης ακτινοβολίας κατά τη μέθοδο ATR. Οι ATR συσκευές μετρούν τη συνολική ανακλώμενη ενέργεια από την επιφάνεια του δείγματος σε επαφή με τον κρύσταλλο μετάδοσης υπέρυθρων (Kaya-Celikera, Mallikarjunana, Dalay,

2011). Χρησιμοποιείται ATR πολλαπλής αναπήδησης (multi-bounce). Το σύστημα στη συνέχεια, δημιουργεί ένα υπέρυθρο φάσμα (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005).

A.8 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθούν ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά δειγμάτων κελυφωτού φιστικιού (*Pistacia vera*) ελληνικής προέλευσης, από διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα, με απώτερο σκοπό την ανάδειξη της διατροφικής αξίας του.

Προς τούτο:

- 1) Από τα δείγματα παραλήφθηκε φιστικέλαιο και σε αυτό:
 - i. Προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά του σε λιπαρά συστατικά.
 - ii. Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των τοκοφρολών α-, β-, γ- και δ- .
- 2) Παραλήφθηκαν υδρομεθανολικά εκχυλίσματα τα οποία, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά. Στη συνέχεια στα εκχυλίσματα αυτά:
 - i. Εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με χρήση των δοκιμών DPPH και ABTS.
 - ii. Μελετήθηκαν χρωματογραφικά (HPLC/DAD, HPLC/MS) και προσδιορίστηκαν ποιοτικά τα κυριότερα φαινολικά συστατικά.
 - iii. Μελετήθηκαν φασματοσκοπικά (UV-Vis, FTIR) και συσχετίστηκαν τα φασματοσκοπικά ευρήματα με τα περιεχόμενα φαινολικά συστατικά.

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Β.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Συγκεντρώθηκαν 30 δείγματα κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας «Αιγίνης», συγκομιδής 2018, από 8 διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Τα δείγματα προέλευσης από το Βόλο τα Μέγαρα, τη Φθιώτιδα Αίγινα, την Εύβοια, , την Τροιζήνα, τη Θήβα, τον Αυλώνα ξηράθηκαν στον ήλιο ή μηχανικά (τελικό ποσοστό υγρασίας 5-7% w/w).

Πίνακας Β.1. Κωδικοποίηση των δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών, συγκομιδής 2018.

Αριθμός δείγματος	Κωδικός	Προέλευση	Τρόπος ξήρανσης
1	PERIV-KSHRANT-2018	Περιβόλα Αίγινας	Μηχανική
2	KYPSELI-KSHRANT-2018	Κυψέλη Αίγινας	Μηχανική
3	KYPSELI-HLIOS-2018	Κυψέλη Αίγινας	Φυσική
4	FAROS-KSHRANT-2018	Φάρος Αίγινας	Μηχανική
5	VWVOY-KSHRANT-2018	Βωβού Αίγινας	Μηχανική
6	LEFK-KSHRANT-2018	Λεύκη Αίγινας	Μηχανική
7	LEFK-HLIOS-2018	Λεύκη Αίγινας	Φυσική
8	SOUV-HLIOS-2018	Σουβάλα Αίγινας	Φυσική
9	LIVADI-2018	Λιβάδι Αίγινας	Φυσική
10	KAVOURO-HLIOS-2018	Καβουρόπετρα Αίγινας	Φυσική
11	ASWMA-2018	Ασώματοι Αίγινας	Φυσική
12	KOULINARI-AIGINA-2018	Κουλινάρι Αίγινας	Φυσική
13	EUVOIA-1-2018	Καστανιώτισσα Ιστιαίας	Μηχανική
14	EUVOIA-2-2018	Καστανιώτισσα Ιστιαίας	Μηχανική
15	EUVOIA-3-2018	Βαθύ Αυλίδας	Μηχανική
16	VAREA-2018	Βαρέα Μεγάρων	Μηχανική
17	LAKK-MEG-HLIOS-2018	Λάκκα Μεγάρων	Φυσική
18	LAKK-MEG-KSHRANT-2018	Λάκκα Μεγάρων	Μηχανική
19	LIAKOTA-2018	Λιακοτά Μεγάρων	Μηχανική
20	AMORA-MEG-2018	Μέγαρα	Μηχανική
21	TROIZ-2018	Τροιζήνα	Φυσική
22	MWL-LAM-2018	Μώλος Φθιώτιδας	Μηχανική
23	MEND-FTHIOT-2018	Μενδενίτσα Φθιώτιδας	Μηχανική
24	MODI-FTHIOT-2018	Μόδι Φθιώτιδας	Μηχανική
25	MAKRH-FTHIOT-2018-2	Μάκρη Φθιώτιδας	Μηχανική
26	MAKRH-FTHIOT-2018-1	Μάκρη Φθιώτιδας	Μηχανική
27	LAD-FTHIOT-2018	Λαδικού Φθιώτιδας	Μηχανική
28	STEFAN-VOLOS-2018	Στεφανοβίκειο Βόλου	Φυσική
29	THIVA-2018	Θήβα	Μηχανική
30	AULWNAS-2018	Αυλώνας Ωρωπού	Μηχανική

Έπειτα από την παραλαβή τους χρησιμοποιήθηκε φιστικοθραύστης για την αποκελύφωσή τους και πολυκόφτης για τη κονιορτοποίησή τους.

Ακολουθώς πραγματοποιήθηκε κοκκομετρία των δειγμάτων με μέγεθος κόκκων σκόνης φιστικιού 500-800 μm (Εικ. Β.1 και Β.2). Το στάδιο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, διότι εξασφαλίζει άριστη ομογενοποίηση ώστε επιτευχθεί η αποδοτικότερη εκχύλιση από το διαλύτη. Μετά από τις παραπάνω ενέργειες, τα κοκκομετρημένα δείγματα καταψύχθηκαν (-20°C), προστατευμένα από το φως, μέσα σε ερμητικά κλειστές σακούλες μέχρι να αναλυθούν περαιτέρω.



Εικόνα Β.1. Κόσκινο μεγέθους 500 μm .



Εικόνα Β.2. Κόσκινο μεγέθους 800 μm .

Β.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΛΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ολικών λιπιδίων των κελυφωτών φιστικιών προσδιορίστηκε με ημισυνεχή εκχύλιση με οργανικό διαλύτη σε συσκευή Soxhlet, σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOAC 948.22. Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, μια ποσότητα 3-4 g από το κάθε δείγμα, μεταφέρθηκε σε προζυγισθέν φυσίγγιο εκχύλισης (καρτούσα) σε αναλυτικό ζυγό (Kern PCB). Στη συνέχεια, η καρτούσα με το δείγμα τοποθετήθηκε στον εκχυλιστήρα της συσκευής Soxhlet, ο οποίος προσαρμόστηκε σε προζυγισμένη γυάλινη φιάλη, η οποία περιείχε 250-300 mL από το διαλύτη εκχύλισης (πετρελαϊκός αιθέρας). Το δείγμα εκχυλίστηκε για έξι ώρες. Μετά την παραλαβή του λίπους, ο διαλύτης εκχύλισης απομακρύνθηκε σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα κενού συνδεδεμένο με υδατόλουτρο (Laborota 400 efficient, Link Lab, Heidolph) στους 35°C.

Η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε λίπος υπολογίστηκε με δύο τρόπους: α) απευθείας ζύγιση του ελαίου μετά την εξάτμιση σε αναλυτικό ζυγό και β) ζύγιση των απολιπασμένων δειγμάτων (η καρτούσα μετά το τέλος της εκχύλισης και αφού αφέθηκε να εξατμιστεί ο διαλύτης) σε ζυγό ακριβείας. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε τρόπο και υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των δύο τρόπων.

$$(\alpha) \% \text{λίπος} = \frac{M_1 - M_0}{M_2} \times 100 \quad (\text{εξίσωση 2})$$

όπου M_0 : μάζα φιάλης (g), M_1 : μάζα φιάλης + μάζα δείγματος μετά την εκχύλιση (g), M_2 : μάζα αρχικού δείγματος (g)

$$(\beta) \% \text{λίπος} = \frac{G_0 - G_1}{G_2} \times 100 \quad (\text{εξίσωση 3})$$

όπου G_0 : μάζα καρτούσας + μάζα δείγματος πριν την εκχύλιση (g), G_1 : μάζα καρτούσας + μάζα απολιπασμένου δείγματος μετά την εκχύλιση (g), G_2 : μάζα αρχικού δείγματος (g).

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν καρτούσες (Εικ. Β.3), συσκευή Soxhlet (Εικ. Β.4) και περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Εικ. Β.5).



Εικόνα Β.5. Καρτούσες.



Εικόνα Β.4. Συσκευή Soxhlet.



Εικόνα Β.5. Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού.

Β.3 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 8 g κοκκομετρημένη ψίχα φιστικιού μαζί με 120 mL πετρελαϊκό αιθέρα. Ακολούθησε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων (Grant, 35kHz) για 15 λεπτά και διήθηση με χωνί Buchner σε συνδυασμό με αντλία κενού προκειμένου να πραγματοποιηθεί διήθηση υπό κενό. Η παραπάνω διαδικασία της εκχύλισης και της διήθησης πραγματοποιήθηκε ακόμα δύο φορές κρατώντας κάθε φορά το ίδιο στερεό υπόλειμμα και προσθέτοντας 120 mL πετρελαϊκό αιθέρα ανά φορά. Το τελικό απολιπασμένο ίζημα του διαλύματος που συγκρατήθηκε στο χωνί Buchner συλλέχθηκε και διατηρήθηκε στην κατάψυξη έως τη μετέπειτα χρήση του.

Στη συνέχεια, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL παρασκευάστηκε οξινισμένο υδρομεθανολικό διάλυμα (80 mL MeOH, 100 μ L πυκνό HCl και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο H₂O).

Σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 2 g από το απολιπασμένο δείγμα που είχε αποθηκευτεί στην κατάψυξη μαζί με 14 mL από το οξινισμένο υδρομεθανολικό διάλυμα της ογκομετρικής φιάλης (80% MeOH και 0,1% HCl v/v). Ακολούθησε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά και φυγοκέντριση στις 7000 στροφές για 5 λεπτά (Sigma 3K18). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε vial με πιπέτα Pasteur, ενώ στο στερεό υπόλειμμα επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία της εκχύλισης και της φυγοκέντρισης για ακόμα δύο φορές. Κάθε φορά τα υπερκείμενα συγκεντρώνονταν στο ίδιο vial.

Ακολούθησε εξάτμιση μέχρι ξηρού, στους 30°C, σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα κενού συνδεδεμένο με υδατόλουτρο. Ακολούθως η πλήρης απομάκρυνση του διαλύτη έλαβε χώρα σε ρεύμα αερίου N₂. Στο σημείο αυτό, υπολογίστηκε η ποσότητα φαινολικών συστατικών, όπως αυτά παραλήφθηκαν για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

Η επαναδιαλυτοποίηση κάθε δείγματος έγινε με MeOH /LC-MS. Το διάλυμα που προέκυψε, διαβιβάστηκε σε πολικό φίλτρο HPLC Chromafil Xtra CA-45/25 για την κατακράτηση τυχόν υπολειμμάτων μη πολικού χαρακτήρα στο προς ανάλυση δείγμα (εικ. Β.8). Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα οξινίστηκαν με HCOOH και αραιώθηκαν μέχρι τελικού όγκου 1 mL έτοιμα ανάχθηκαν σε τελική ολική συγκέντρωση 2500 ppm με οξίνιση 1% μυρμηγκικού οξέος και τελικό όγκο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20°C).



Εικόνα Β.6.Καθαρισμός υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων και κλασματοποίηση (πολικών και μη συστατικά) με φίλτρα HPLC Chromafil Xtra CA-45/25.

B.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

B.4.1 ΔΟΚΙΜΗ DPPH

Η παρεμποδιστική δράση της ρίζας DPPH προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Minioti και Georgiou (2010) με ορισμένες τροποποιήσεις, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Agilent 8453. Αναμείχθηκαν 100 μL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος με 4 mL διαλύματος εργασίας DPPH $8,1 \times 10^{-5}$ M σε οξικό αιθυλεστέρα. Το μίγμα αναδεύτηκε έντονα για λίγα δευτερόλεπτα και διατηρήθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν στα 515 nm έναντι ενός τυφλού διαλύματος ($A_0=100$ μL οξικού αιθυλεστέρα αντί υδρομεθανολικού εκχυλίσματος). Τα αντιοξειδωτικά συστατικά των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων αντέδρασαν με τη ρίζα DPPH, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του μωβ διαλύματος DPPH. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Η παρεμποδιστική δράση των δειγμάτων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Παρεμποδιστική δράση (\%)} = [(A_0 - A_{\text{δείγματος}}) / A_0] \times 100 \quad (\text{Εξίσωση 4})$$

Η καμπύλη βαθμονόμησης (0,08-1 mM) κατασκευάστηκε με τη χρήση Trolox ως εξωτερικό πρότυπο και οι αποκτηθείσες τιμές συγκέντρωσης εκφράστηκαν ως mmol/L ισοδύναμων Trolox ανά mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος .

B.4.2 ΔΟΚΙΜΗ ABTS

Η δοκιμή προσδιορισμού ABTS τροποποιήθηκε βάσει των μεθόδων των Rajaei *et al.* (2010) και Torres-Martinez *et al.* (2018). Συνοπτικά, 96 mg ABTS αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και προστέθηκαν 440 μL υδατικού διαλύματος $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ 0,14 M. Το μίγμα διατηρήθηκε 18 ώρες προστατευμένο από το φως σε θερμοκρασία δωματίου για σταθεροποίηση της οξείδωσης του ABTS. Πριν από την περαιτέρω χρήση του, το διάλυμα ABTS^+ αραιώθηκε με EtOH σε τιμή απορρόφησης $0,7 \pm 0,005$ (διάλυμα εργασίας). Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε μείγμα 100 μL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος με 2 mL διαλύματος εργασίας ABTS^+ , ακολούθησε ανακίνηση με vortex (Boeco) και επώαση στο σκοτάδι για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα αξιολογήθηκε με μέτρηση της

παρεμποδιστικής δράσης του παραπάνω μείγματος. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 734 nm, έναντι ενός διαλύματος ελέγχου ($A_0=100$ μL EtOH αντί υδρομεθανολικού εκχυλίσματος). Η παρουσία αντιοξειδωτικών συστατικών στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα είχε ως αποτέλεσμα την εξασθένηση του χρώματος του διαλύματος εργασίας με αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής της απορρόφησης. Όλες οι μετρήσεις εκτελέστηκαν εις τριπλούν χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο Agilent 8453. Η παρεμποδιστική δράση υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 4.

Το Trolox, ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, χρησιμοποιήθηκε για την καμπύλη βαθμονόμησης σε περιοχή συγκεντρώσεων 0,05-1 mM και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα, εκφρασμένη σε mmol/L ισοδύναμων Trolox ανά mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος, υπολογίστηκε ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση.

B.5 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-VIS)

Καταγράφηκαν τα φάσματα UV-Vis των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με μηδενισμό του οργάνου (Cary 60 UV-Vis, Agilent) με ένα τυφλό διάλυμα (blank) που περιείχε μόνο το διαλύτη της εκχύλισης (MeOH). Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε κυψελίδα χαλαζία και φασματοφωτομετρήθηκε σε εύρος 200-900 nm. Τα φάσματα UV-Vis επεξεργάστηκαν με το λογισμικό CaryWinUV 5.0.

B.6 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΩΝ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΜΕ HPLC ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (FLUORESCENCE DETECTOR)

Η χρωματογραφική ανάλυση διεξήχθη σε μονάδα HPLC εξοπλισμένη με αντλία JASCO PU 980 με βρόχο ένεσης 100 μL , ανιχνευτή φθορισμού JASCO FP920 (Co. Ltd., Japan) υποστηριζόμενο από το λογισμικό Clarity Lite για την επεξεργασία των δεδομένων και με μία ODS Hypersyl στήλη (4,6 x 250 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm , Thermo Scientific).

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των α -, β -, γ - και δ -τοκοφερολών (T) στο φιστικέλαιο, που παραλήφθηκε από εκχύλιση με συσκευή Soxhlet, χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία ακολούθησε το πρότυπο ISO 9936:2006. Η κινητή φάση αποτελούνταν από τετραυδροφουράνιο (THF)/n-επτάνιο (4:96, v/v) με ρυθμό ροής 1,0 mL/min και ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL . Η εκροή ανιχνεύθηκε σε έναν ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης 295 nm και μήκος κύματος εκπομπής στα 330 nm. Το σύστημα λειτουργούσε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι τοκοφερόλες ταυτοποιήθηκαν με χρωματογραφικές συγκρίσεις των χρόνων συγκράτησης του πρότυπου διαλύματος των αναλυτών και ποσοτικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν από τριπλές μετρήσεις για κάθε δείγμα και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις κάθε δείγματος.

Πρότυπα διαλύματα εργασίας, με διαλύτη n-επτάνιο, των τοκοφερολών α -T (96,53 $\mu\text{g/mL}$), β -T (85,74 $\mu\text{g/mL}$), γ -T (87,40 $\mu\text{g/mL}$) και δ -T (81,14 $\mu\text{g/mL}$), παρασκευάστηκαν και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι στους -20°C . Με χρήση των διαλυμάτων εργασίας, παρασκευάζονταν καθημερινά πρότυπα διαλύματα (0,15 – 20 $\mu\text{g/mL}$). Για κάθε τοκοφερόλη κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης.

Η ανάκτηση (recovery) αξιολογήθηκε με την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων ισομερών (+)- α -T, (+)- β -T, (+)- γ -T και (+)- δ -T στα δείγματα φιστικελαίου. Οι προστιθέμενες ποσότητες ήταν χαμηλής, μέσης και υψηλής συγκέντρωσης σε

τοκοφερόλες (0,2, 10 και 20 $\mu\text{g/mL}$). Η ανάκτηση υπολογίστηκε βάσει της εξίσωσης 5:

$$\text{Ανάκτηση (\%)} = (C_{\text{εμβολιασμένου δείγματος}} / (C_{\text{δείγματος}} + C_{\text{τοκοφερόλης που προστέθηκε}})) \times 100, \quad (5)$$

Η ακρίβεια, μεταξύ διαδοχικών ημερών (interday precision), προσδιορίστηκε με χρήση δύο συγκεντρώσεων (15 και 20 $\mu\text{g/mL}$) πρότυπων τοκοφερολών εις τριπλούν σε τρεις διαδοχικές ημέρες. Χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση (6):

$$\text{Ακρίβεια (\%)} = (\text{Τυπική απόκλιση} / \text{Μέσος όρος } C) \times 100, \quad (6)$$

Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων των τοκοφερολών στο φιστικέλαιο υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 6.

B.7 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ HPLC-DAD

Η ανάλυση των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών έγινε με βάση τη μέθοδο των Garavand, Madadlou, Moini (2007).

Η χρωματογραφική ανάλυση διεξήχθη σε μονάδα HPLC (1100 Agilent HPLC) εφοδιασμένη με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis (Diode Array Detector, DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP Chemstation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίστροφης φάσης Discovery HS C₁₈ (4,6 x 250 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm , Supelco).

Για την κινητή φάση, συνδυάστηκαν δύο συστήματα διαλυτών φιλτραρισμένοι με Nylon filter 47 mm και 0,45 μm . Ο διαλύτης Α ήταν απιονισμένο H₂O καθαρότητας HPLC, ρυθμισμένο σε pH = 2,2 με προσθήκη HCOOH 0,1% (v/v) και ο διαλύτης Β ήταν MeOH καθαρότητας HPLC, ρυθμισμένο σε pH = 2,2, με προσθήκη 0,1% HCOOH 0,1% (v/v). Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,5 mL/λεπτό. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος έγινε με βαθμιδωτή έκλουση για καλύτερο και σαφέστερο διαχωρισμό. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα εξής μήκη κύματος: 230, 280, 320, 360, 530 nm. Το πρόγραμμα ανάλυσης που είχε συνολική διάρκεια 75 λεπτά παρουσιάζεται στον πίνακα Β.2. Τα τελευταία 20 λεπτά που παρουσιάζονται στον πίνακα οφείλονται στη σταθεροποίηση της πίεσης. Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Β.3.

Πίνακας Β.2 . Πρόγραμμα ανάλυσης των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με γρήγη χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχία διόδων (HPLC-DAD).

Χρόνος (min)	Ποσοστό H ₂ O σε μηρνηγκικό οξύ 0,1% (v/v)	Ποσοστό MeOH σε μηρνηγκικό οξύ 0,1% (v/v)
0	90	10
9	75	25
15	70	30
22	60	40
35	50	50
48	35	65
55	20	80
70	20	80
75	90	10
95	90	10

B.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ HPLC-DAD/MS

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Shimatzu LC/MS-2010A εξοπλισμένο με δυαδική αντλία LC-10ADvp, απαερωτή DGU-14A, βαλβίδα ανάμειξης διαλυτών FCV-10ALvp, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp ρυθμισμένο σε όγκο ένεσης 20 μL , ανιχνευτή συστοιχίας διόδων SPD-M10Avp, φούρνο στήλης CTO-10Avp και μονάδα ελέγχου SCL-10Avp. Για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό LCMS solution 3.40.307.

Η στήλη (ρυθμισμένη σε θερμοκρασία 30°C) και το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης ήταν όμοια με αυτά της ανάλυσης HPLC-DAD. Ο φασματογράφος μάζας απλού τετράπολου (Mass Selective Detector, MSD) ρυθμίστηκε ως εξής:

- A) Λειτουργία απόκτησης (Acquisition mode): Αρνητικός ιοντισμός με ηλεκροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)
- B) Όρια ανίχνευσης μαζών: 50 -1000 m/z
- Γ) Ταχύτητα σάρωσης (Scan Speed): 6000amu/s
- Δ) Ροή αερίου εκνέφωσης (Nebulizing Gas Flow): 1,5L/min
- E) Ανώτατη επιτρεπόμενη θερμοκρασία (Heat Block Temperature): 300°C
- ΣΤ) Θερμοκρασία πηγής ιοντισμού (Curved Dissolvation Line, CDL Temperature): 250°C
- Z) Δυναμικό περιοχής εκνέφωσης (Interface Voltage): 2,5kV
- H) Δυναμικό ανιχνευτή (Detector Voltage): 1,55kV

Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 100 ppm σε MeOH καθαρότητας HPLC-MS των πρότυπων ενώσεων: (Απιγενίνη, Φλωρογλουκινόλη, Ρεσορκινόλη, Βανιλικό οξύ, Εριοδικτύολη, Ναρινγκενίνη, Συναπικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ) με βάση τη βιβλιογραφία (Πίνακας 8.1) (Bolling, 2017· Masoumi *et al.*, 2014· Juhaimi *et al.*, 2018· Rezaie *et al.*, 2015· Garavand, Madadlou, Moini, 2017· Mokhtarpour *et al.*, 2014· Tasioula-Margari, Tsabolatidou, 2015· Fattahifar *et al.*, 2018· Schulze-Kaysers, Feuereisen, Schieber, 2015· Taghizadeh *et al.*, 2018· Sonmezdag, Kelebek, Selli, 2018· Saitta *et al.*, 2014· Khoddami, Wilkes, Roberts, 2013· Tsantili *et al.*, 2011) Επιπλέον παρασκευάστηκαν και τα παρακάτω διαλύματα συγκέντρωσης 10 ppm, σε κάθε ένωση, σε MeOH καθαρότητας HPLC-MS:

Διάλυμα 1: γαλλικό οξύ, επικατεχίνη, φερουλικό οξύ, 7-ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, μυρισετίνη, κερκετίνη,

Διάλυμα-2: χλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, 7-ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, λουτεολίνη,

Διάλυμα-3: συριγγικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, κερκετίνη, καμφερόλη

Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο B.3.

Πίνακας B.3 . Βάση δεδομένων πιθανών φαινολικών συστατικών στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα.

ΠΡΟΤΥΠΗ	M.T	[M] (mass)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	170,02152	171,0288	169,01425
(+)-κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	291,08631	289,07176

(-)-επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	291,08631	289,07176
Εριοδικτυόλη-7-O-γλυκοζίτης	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,11621	451,12349	449,10894
Εριοδικτυόλη	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288,06339	289,07066	287,05611
Ναρινγενίνη-7-O-νεοεσπεριδίνη	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580,17921	581,18648	579,17193
Ναρινγκενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,06847	273,07575	271,06120
Κερκετίνη-3-O- ρουτινοσίδη	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15339	611,16067	609,14611
Κερκετίνη 3-O-γαλακτοσίδη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,09548	465,10275	463,08820
Κερκετίνη 3-O-γλυκοζίτης	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463,08765	464,09493	462,08038
Κερκετίνη 3-O- γλυκουρονίδη	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	478,07474	479,08202	477,06747
Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,04265	303,04993	301,03538
Γενιστείνη-7-O-γλυκοζίτης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,10565	433,11292	431,09837
Γενιστείνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,05282	271,06010	269,04555
Νταϊντζεΐνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,05791	255,06518	253,05063
Απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,05282	271,06010	269,04555
Απιγενίνη-7-O-γλυκοζίτης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,1056	433,11288	431,0984
Μυρικετλίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,03757	319,04484	317,03029
Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,04774	287,05501	285,04046
Καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,04774	287,05501	285,04046
Κυανιδίνη-3-O-γλυκοζίτης	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁	484,07724	485,08451	483,06996
	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,10839	450,11566	448,10111
Κυανιδίνη-3-O-γλυκοζίτης	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,10839	450,11566	448,10111
Μονογαλοϋλογλυκοζίτης	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	332,07435	333,08162	331,06707
Πεντα-O-γαλοϋλοl-β-D-γλυκοζίτης	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	940,11818	941,12546	939,11091
Εξαγαλοϋλοεξόζη	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	1092,12914	1093,13641	1091,12186
17:1- ανακαρδικό οξύ	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	374,28210	375,28937	373,27482
13:0- ανακαρδικό οξύ	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	320,23514	321,24242	319,22787
13:1- ανακαρδικό οξύ (στεβιόλη)	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318,21949	319,22677	317,21222
Ρεσβερατρόλη	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,07864	229,08592	227,07137
Ρεσορκινόλη	C ₆ H ₆ O ₂	110,03678	111,04961	109,02950
Φλωρογλουκινόλη	C ₆ H ₆ O ₃	126,03169	127,03897	125,02442
Βανιλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	168,04226	169,04953	167,03498
π-κουμμάρικό οξύ (trans-2-υδροξυκυναμικό οξύ)	C ₉ H ₈ O ₃	164,04734	165,05462	163,04007
Συναπικό οξύ (trans-3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυκυναμικό οξύ)	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,06847	225,07575	223,06120
Πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	154,02661	155,03388	153,01933
Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,09508	355,10236	353,08781
Ρουτίνη	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15338	611,16066	609,14611
Καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	180,04226	181,04953	179,03498
Φερουλικό οξύ (3-μεθοξυ-4-υδροξυκυναμικό οξύ)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05791	195,06518	193,05063
Πινोκεμπρίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256,07356	257,08083	255,06628
Υδροξυτυροσόλη(3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη)	C ₈ H ₁₀ O ₃	154,06299	155,07027	153,05572
Σαλικιλικό οξύ (4-υδροξυβενζοϊκό οξύ)	C ₇ H ₆ O ₃	138,03169	139,03897	137,02442
Βανιλίνη (3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζαλδεΐδη)	C ₈ H ₈ O ₃	152,04734	153,05462	151,04007
Πυρογαλόλη (1,2,3-τριυδροξυβενζόλιο)	C ₆ H ₆ O ₃	126,03169	127,03897	125,02442
Τυροσόλη(4-υδροξυφαινυλαιθανόλη)	C ₈ H ₁₀ O ₂	138,06808	139,07535	137,06080
Συριγγαλδεΐδη (3,5-διμεθοξυ-4-Υδροξυβενζαλδεΐδη)	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,05791	183,06518	181,05063
Μεθυλο-(3,4-διυδροξυβενζοϊκό)	C ₈ H ₈ O ₄	168,04226	169,04953	167,03498
μεθύλ-(3,4,5- τριυδροξυβενζοϊκό)	C ₈ H ₈ O ₅	184,03717	185,04445	183,02990

Συριγγικό οξύ (3,5-διμεθόξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ)	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,05282	199,06010	197,04555
Αιθυλο-(3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό)	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,05282	199,06010	197,04555
Φορμονονετίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268,07356	269,08083	267,06628
Γλυκιδίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,06847	285,07575	283,06120
Βιοχανίνη Α	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,06847	285,07575	283,06120
C-15-ανακαρδικό οξύ (C15:3)	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	342,21949	343,22677	341,21222
C-15-ανακαρδικό οξύ (C15:2)	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	344,23514	345,24242	343,22787
C-15-ανακαρδικό οξύ (C15:1)	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	346,25079	347,25807	345,24352

B.9 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ

Τα φάσματα FTIR των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων ελήφθησαν με την τεχνική ATR εις τριπλούν για κάθε δείγμα με φασματόμετρο υπερύθρου Thermo Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA) με ανιχνευτή δευτεριωμένης θεϊκής τριγλυκίνης (DTGS). Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή με ειδικό λογισμικό OMNIC 8.2.0.387 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) για την καταγραφή και την επεξεργασία των φασμάτων (Εικ. Β.8). Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ATR κατά την οποία σε έναν οριζόντιο υποδοχέα ATR (Spectra-Tech Incorporation, Stamford, CT, USA) συνδέεται ένας κρύσταλλος ZnSe τραπεζοειδούς σχήματος (800 x 10 x 4 mm) (Εικ. Β.7). Ο κρύσταλλος περικλείεται από κυψελίδα ανοξείδωτου χάλυβα, επιβάλλει στην ηλεκτρομαγνητική να προσπίπτει στο δείγμα και, στη συνέχεια, να ανακλάται υπό γωνίας 45°. Έτσι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ανακλάται ολικά. Για την καταγραφή των φασμάτων, περίπου 200 μ L υδρομεθανολικού εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν επί του κρυστάλλου ATR και αφέθηκαν σε φούρνο για 15 λεπτά στους 35°C ώστε να στεγνώσουν. Αυτό παρήγαγε μία ομοιόμορφη μεμβράνη επί του κρυστάλλου. Τα φάσματα καταγράφηκαν με διαχωριστική ικανότητα 4 cm^{-1} και 100 σαρώσεις. Η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν 0,6329 mm/s. Το φάσμα υποβάθρου (background) συλλέχθηκε χρησιμοποιώντας μόνο τον κρύσταλλο ZnSe, πριν την καταγραφή φάσματος κάθε δείγματος. Ο καθαρισμός του κρυστάλλου γινόταν κάθε φορά με μεθανόλη.

Τα φάσματα FTIR εξομαλύνθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Savitsky-Golay και διορθώθηκε η γραμμική βάση. Στη συνέχεια, εξάχθηκε το μέσο φάσμα κάθε δείγματος από τις τρεις επαναλήψεις και κανονικοποιήθηκε (μέγιστη τιμή απορρόφησης 1). Κάθε μέσο φάσμα εξάχθηκε και αποθηκεύτηκε ως αρχείο .csv για τη χρήση του στη διακριτική ανάλυση.



Εικόνα Β.7 Σύστημα FTIR.



Εικόνα Β.8. Υποδοχή με κρύσταλλο ZnSe που χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ATR.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΛΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Η περιεκτικότητα του ολικού λιπιδικού περιεχομένου των 30 δειγμάτων φιστικελαίου, χρησιμοποιώντας την επίσημη μέθοδο του AOAC 948.22 παρουσιάζεται, στον πίνακα Γ.1. Το ποσοστό κυμάνθηκε μεταξύ 52.53 - 64.83% με μέση τιμή $59.55 \pm 2.81\%$.

Πίνακας Γ. 1. Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικού λίπους (g ελαίου/100 g αποξηραμένου καρπού).

Αριθμός δείγματος	Ολικό λίπος (% w/w)
1	$60,90 \pm 4,91$
2	$62,18 \pm 1,83$
3	$61,90 \pm 0,77$
4	$63,24 \pm 2,49$
5	$57,52 \pm 6,76$
6	$60,04 \pm 5,90$
7	$57,68 \pm 5,32$
8	$57,41 \pm 8,98$
9	$60,40 \pm 1,58$
10	$63,27 \pm 1,99$
11	$62,00 \pm 0,63$
12	$59,91 \pm 9,32$
13	$58,42 \pm 3,00$
14	$59,67 \pm 2,60$
15	$59,26 \pm 4,28$
16	$61,48 \pm 4,77$
17	$62,42 \pm 1,08$
18	$59,88 \pm 0,24$
19	$60,74 \pm 6,38$
20	$60,11 \pm 3,09$
21	$64,83 \pm 18,37$
22	$58,95 \pm 2,94$
23	$61,17 \pm 9,21$
24	$60,26 \pm 5,53$
25	$55,57 \pm 7,14$
26	$53,80 \pm 11,93$
27	$52,53 \pm 7,23$
28	$58,09 \pm 6,81$
29	$57,09 \pm 3,65$
30	$55,70 \pm 1,99$

¹Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση ($v=3$).

Συγκρίνοντας με την μελέτη της Γεωργιάδου (2015), όπου μετρήθηκε η περιεκτικότητα του λίπους ίδια ποικιλίας φιστικιών και βρέθηκε ότι κυμαίνεται μεταξύ 57,5% έως 62%, τα αποτελέσματα συμπίπτουν με την παρούσα μελέτη. Τα

αποτελέσματα φαίνεται να συμφωνούν και με την μελέτη της ομάδας Martínez *et al.* (2016) όπου η μέση περιεκτικότητα λιπιδικού περιεχομένου των κελυφωτών φιστικιών κυμαίνεται γύρω στο 50% (w/w). Επιπλέον βρέθηκε μέση τιμή περιεκτικότητας σε λίπος δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera* L.) καλλιεργημένων στην Τουρκία $59,69 \pm 1,80\%$ που αντιστοιχούν σε πέντε διαφορετικές ποικιλίες, (Yildiz, Gürcan, Özdemir, 1998). Τυχόν μικρές διαφορές απόδοσης λιπιδικού περιεχομένου μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές που σχετίζονται με την ποικιλία, τις καλλιεργητικές συνθήκες, το χρόνο συγκομιδής, κλιματικούς και γεωγραφικούς παράγοντες.

Γ.2 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Ο χρόνος που απαιτείται από το διαλύτη για να επιδράσει με το στερεό υλικό είναι σημαντικός για την ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών και εξαρτάται από τη θερμοκρασία της εκχύλισης, την επιφάνεια του στερεού υλικού, το ιξώδες του διαλύτη και τη ροή του (Ballard *et al.*, 2009· Meireles, 2009). Επιπλέον, η ικανότητα ανάκτησης των ενώσεων-στόχων εξαρτάται από τη διαλυτότητα των ενώσεων στον επιλεγμένο διαλύτη. Η επιλογή του διαλύτη καθορίζεται από τους παρακάτω παράγοντες:

- Α) Την επιφανειακή τάση και το ιξώδες του διαλύτη, διότι ο διαλύτης πρέπει να είναι ικανός να διαπερνά τη μήτρα του υλικού και το ιξώδες του θα πρέπει να είναι χαμηλό ώστε να ρέει εύκολα.
- Β) Τη δυνατότητα απομάκρυνσης του διαλύτη με σκοπό την ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων αυτού στο τελικό εκχύλισμα.
- Γ) Τη διαβροχή του διαλύτη καθώς επηρεάζει τη διείσδυσή του μέσα στους πόρους της μήτρας.
- Δ) Τις ιδιότητες του διαλύτη (να είναι χημικά και θερμικά σταθερός, να είναι οικονομικά προσιτός, να μην είναι τοξικός, να μην αντιδρά με τις προς εκχύλιση ουσίες, να μην είναι διαβρωτικός, να μην είναι εύφλεκτος)
- Ε) Τη δυνατότητα ανάκτησης ή ανακύκλωσης του διαλύτη, ώστε να μειωθεί η ποσότητα χρήσης του.

Πίνακας Γ.2. Ποσότητα υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων από δείγματα κελυφωτών φιστικιών.

Αριθμός δείγματος	Περιεκτικότητα υδρομεθανολικού εκχυλίσματος (g/g απολιπασμένου δείγματος)	Περιεκτικότητα υδρομεθανολικού εκχυλίσματος (g/g φιστικιού)
1	0,227	0,0908
2	0,2685	0,1074
3	0,26	0,104
4	0,244	0,0976
5	0,231	0,0924
6	0,1725	0,069
7	0,1815	0,0726
8	0,251	0,1004
9	0,237	0,0948
10	0,2305	0,0922
11	0,235	0,094
12	0,365	0,146
13	0,338	0,1352
14	0,274	0,1096

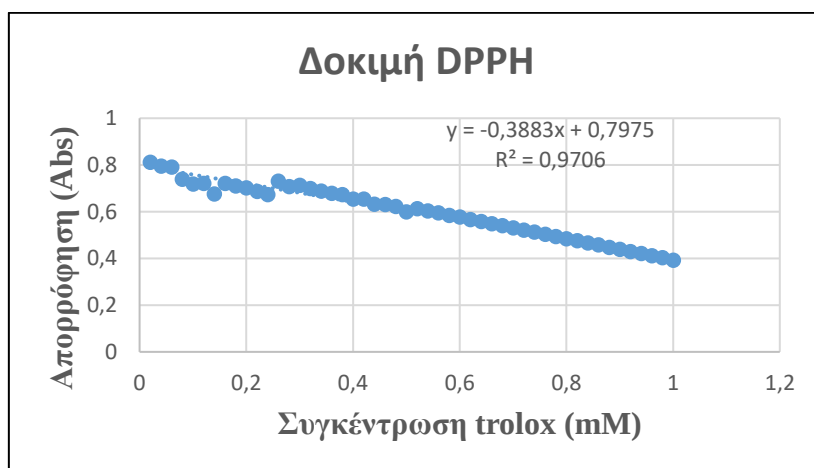
15	0,215	0,086
16	0,302	0,1208
17	0,197	0,0788
18	0,234	0,0936
19	0,2665	0,1066
20	0,2195	0,0878
21	0,3325	0,133
22	0,225	0,09
23	0,374	0,1496
24	0,1545	0,0618
25	0,26	0,104
26	4,224	1,6896
27	0,2765	0,1106
28	0,1045	0,0418
29	0,195	0,078
30	0,265	0,106

Γ.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

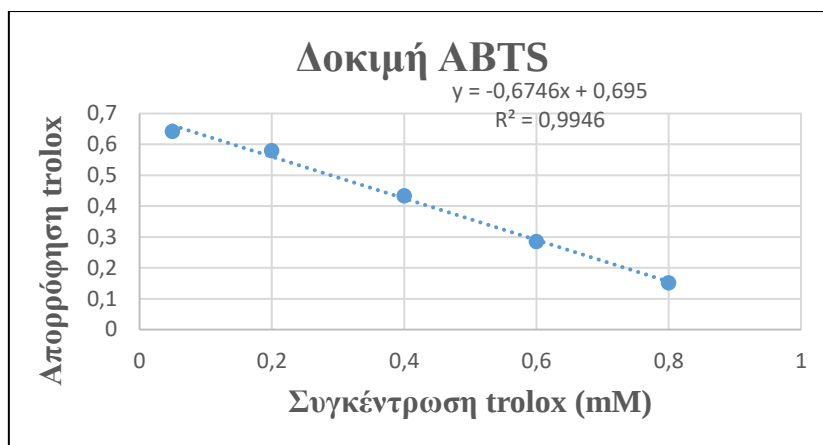
Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε με υπολογισμό της παρεμποδιστικής δράσης των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με χρήση των δοκιμών DPPH και ABTS, παρουσιάζονται στον πίνακα Γ.3. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε σε ισοδύναμα Trolox. Οι καμπύλες βαθμονόμησης (Εικ. Γ.1 και Γ.2) με τις αντίστοιχες εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αντίστοιχα:

$$A_{DPPH} = (-0.388) \times TE + 0.797, R^2 = 0.971, \quad (\text{εξίσωση 7})$$

$$A_{ABTS} = (-0.675) \times TE + 0.695, R^2 = 0.995, \quad (\text{εξίσωση 8})$$



Εικόνα Γ.1. Καμπύλη βαθμονόμησης της δοκιμής DPPH.



Εικόνα Γ.2. Καμπύλη βαθμονόμησης της δοκιμής ABTS.

Πίνακας Γ.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με χρήση των δοκιμών DPPH και ABTS.

Αριθμός δείγματος	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mM Trolox/ mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος)		Παρεμποδιστική δράση (%)	
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
1	3,50	0,92	8,06	77,12
2	0,50	7,70	10,19	98,92
3	0,16	8,01	9,95	96,56
4	1,03	10,67	10,23	99,33
5	3,68	9,36	10,11	98,23
6	2,23	16,34	9,96	97,02
7	2,14	14,60	10,10	98,09
8	3,40	9,26	9,84	95,45
9	2,12	3,05	10,15	98,60
10	0,30	5,55	10,14	98,41
11	0,43	7,86	9,68	94,08
12	0,25	8,62	10,06	97,76
13	11,63	40,90	9,94	96,34
14	1,31	10,71	9,63	92,59
15	0,05	9,35	9,80	95,04
16	4,80	24,64	10,24	99,42
17	2,53	0,61	9,94	96,63
18	0,83	8,18	10,13	98,40
19	0,98	2,91	10,24	99,44
20	1,58	3,58	10,16	98,48
21	2,72	11,24	10,25	99,52
22	3,34	5,45	10,04	97,29
23	1,38	12,16	9,31	91,54
24	1,41	2,11	9,77	94,63
25	3,71	18,22	10,10	98,12
26	3,65	17,92	10,17	98,63
27	4,91	25,11	10,16	98,58

28	0,12	6,31	10,26	99,56
29	1,78	4,58	10,15	98,56
30	0,04	6,44	10,25	99,53

Η αντιοξειδωτική ικανότητα όπως προσδιορίστηκε από τη δοκιμή DPPH κυμάνθηκε μεταξύ 0,04-11,63 mM με μέση τιμή $2,22 \pm 2,30$ mM Trolox. Η παρεμποδιστική δράση κυμάνθηκε μεταξύ 0,61-40,90% με μέσο όρο $10,35 \pm 8,55\%$.

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή ABTS κυμάνθηκε μεταξύ 8,06-10,26 mM με μέση τιμή $9,97 \pm 0,42$ mM. Η παρεμποδιστική δράση κυμάνθηκε μεταξύ 77,12-99,56% με μέση τιμή $96,73 \pm 4,25\%$.

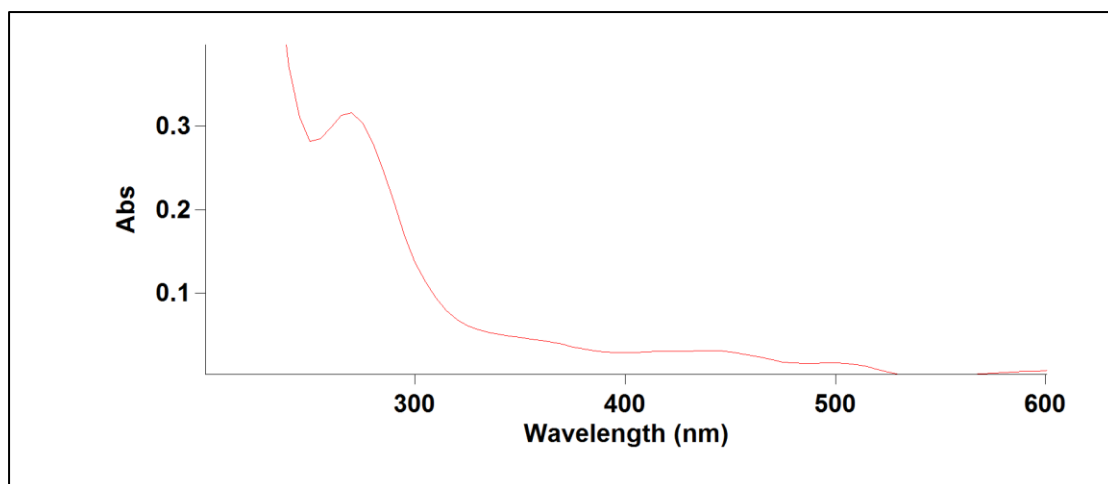
Βάσει των Rajaei *et al.* (2010), δείγματα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά έδειξαν ισχυρότερη απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών, δηλαδή υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στην παρούσα μελέτη, η ποσότητα των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων από τα δείγματα κελυφωτών φιστικιών δεν παρουσίασε αναλογικότητα με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων δεν εκχυλίζονται μόνο φαινολικά συστατικά, επομένως, σε αυτό το στάδιο δεν μπορεί να γίνει άμεση συσχέτιση των φαινολικών ενώσεων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Σε σύγκριση με την μελέτη των Tomaino *et al.* (2010) όπου διερεύνησαν υδρομεθανολικά εκχυλίσματα κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Bronte από την περιοχή της Κατάνιας της Ιταλίας, τα αποτελέσματά τους δείχνουν να έχουν μέση τιμή DPPH $0,019 \pm 0,001$ mM Trolox και μέση τιμή ABTS $2,19 \pm 0,14$ mM Trolox. Γεγονός που μας δείχνει ότι υπάρχει πιθανότητα η ποικιλία Bronte να παρουσιάζει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Γενικότερα, οι τιμές του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ήταν υψηλότερες όταν η εκχύλιση ήταν μέσω ψυχρής συμπίεσης σε σύγκριση με εκείνη με εκχύλιση soxhlet (Juhaimi *et al.*, 2018). Τέλος, σημειώνεται διαφορά μεταξύ των δύο δοκιμών. Αυτό οφείλεται στο ότι η δοκιμή DPPH αφορά κυρίως υδρόφιλες ενώσεις, ενώ η δοκιμή ABTS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση τόσο των υδρόφιλων όσο και των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών συστατικών.

Γ.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ UV-VIS

Τα φάσματα UV-Vis των διάφορων φαινολικών ενώσεων έχουν χαρακτηριστική υφή, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με την υποκατηγορία της ένωσης. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα UV-Vis των φλαβονοειδών εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 250-370 nm. Ο δακτύλιος A απορροφά στα 250-300 nm, ενώ οι δακτύλιοι B και C στα 300-370 nm. Στα 260-280 nm απορροφούν και τα φαινολικά οξέα που ανήκουν στις μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις. Οι ανθοκυάνες παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 530 nm. Ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα UV-Vis των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων φαίνεται στην Εικ. Γ.3. Βάσει των φασμάτων UV-Vis των δειγμάτων επιλέχθηκαν τα 230, 280, 320, 360, 530 nm στη μετέπειτα ανάλυση με HPLC-DAD.



Εικόνα Γ.3. Αντιπροσωπευτικό φάσμα UV-Vis υδρομεθανολικού εκχυλίσματος κελυφωτού φιστικιού.

Γ.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΩΝ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΜΕ HPLC ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (FLUORESCENCE DETECTOR)

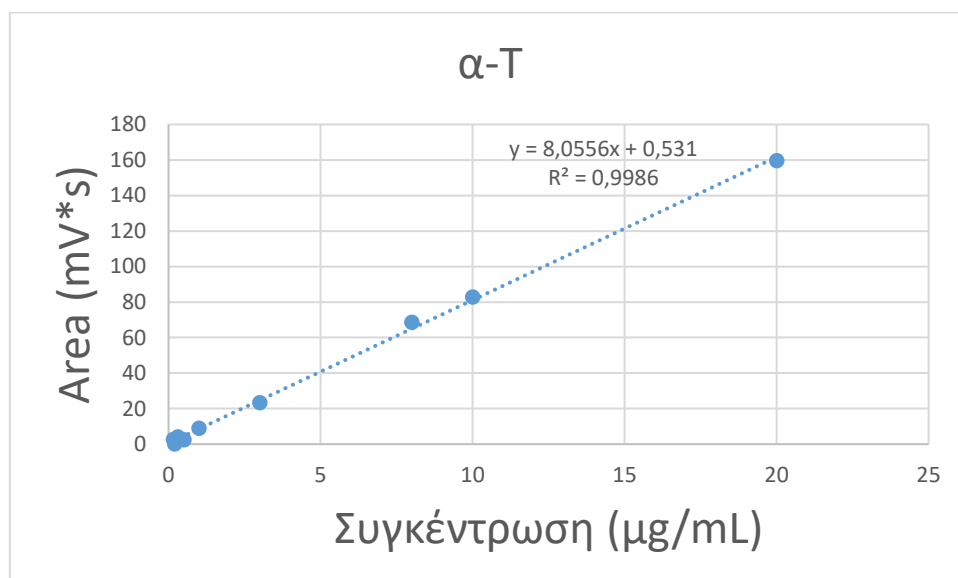
Το όριο ανίχνευσης (LOD) για την ανάλυση τοκοφερολών ήταν 0,15 $\mu\text{g/mL}$. Οι καμπύλες βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσιάζονται στις Εικ. Γ.4, Γ.5, Γ.6 και Γ.7 και οι αντίστοιχες εξισώσεις ήταν:

$$\text{Εμβαδόν (mV} \times \text{s)} = 8.0556 \times C_{\alpha\text{-T}} (\mu\text{g/mL}) + 0.531, R^2 = 0.999, \quad (9)$$

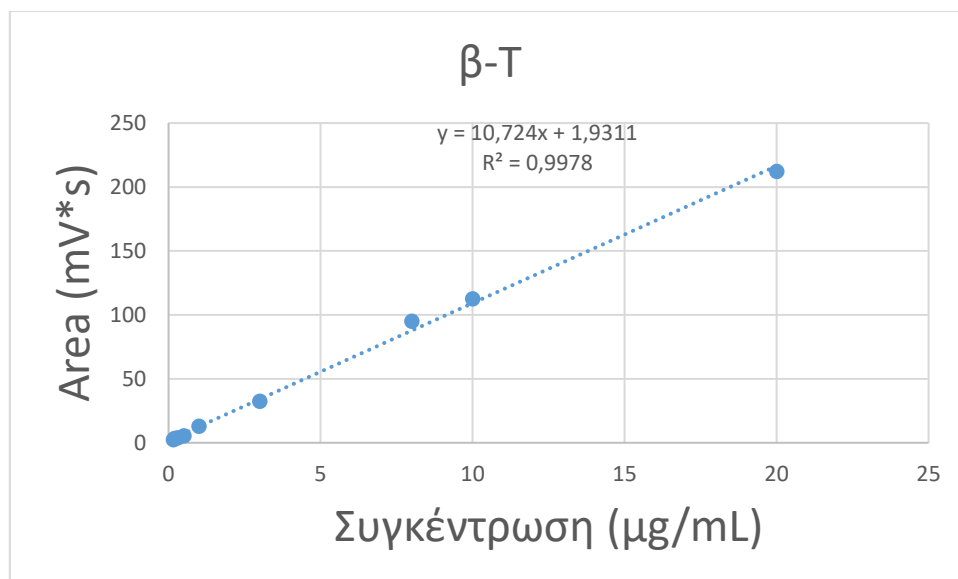
$$\text{Εμβαδόν (mV} \times \text{s)} = 10.724 \times C_{\beta\text{-T}} (\mu\text{g/mL}) + 1.9311, R^2 = 0.998, \quad (10)$$

$$\text{Εμβαδόν (mV} \times \text{s)} = 13.786 \times C_{\gamma\text{-T}} (\mu\text{g/mL}) + 2.5428, R^2 = 0.978, \quad (11)$$

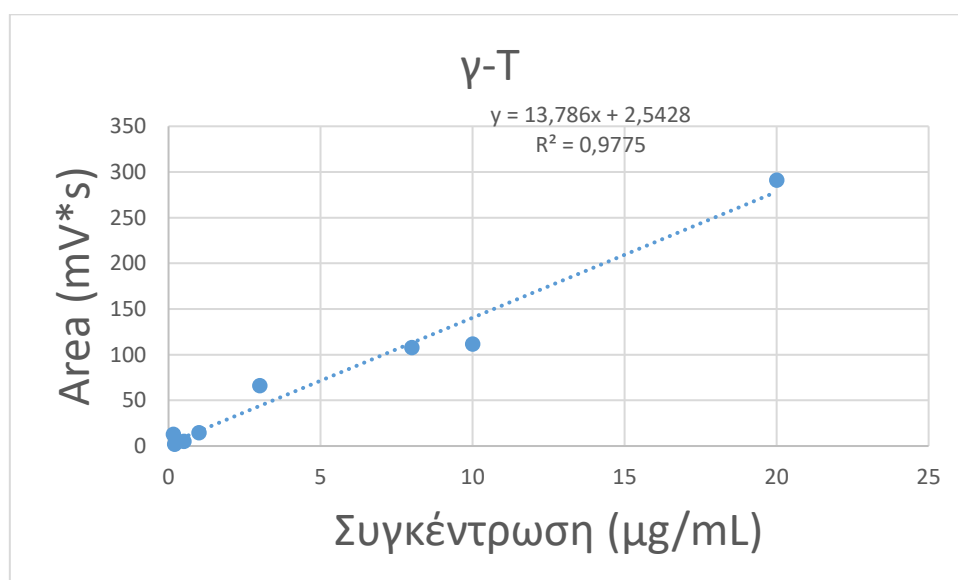
$$\text{Εμβαδόν (mV} \times \text{s)} = 14.617 \times C_{\delta\text{-T}} (\mu\text{g/mL}) + 2.1461, R^2 = 0.997, \quad (12)$$



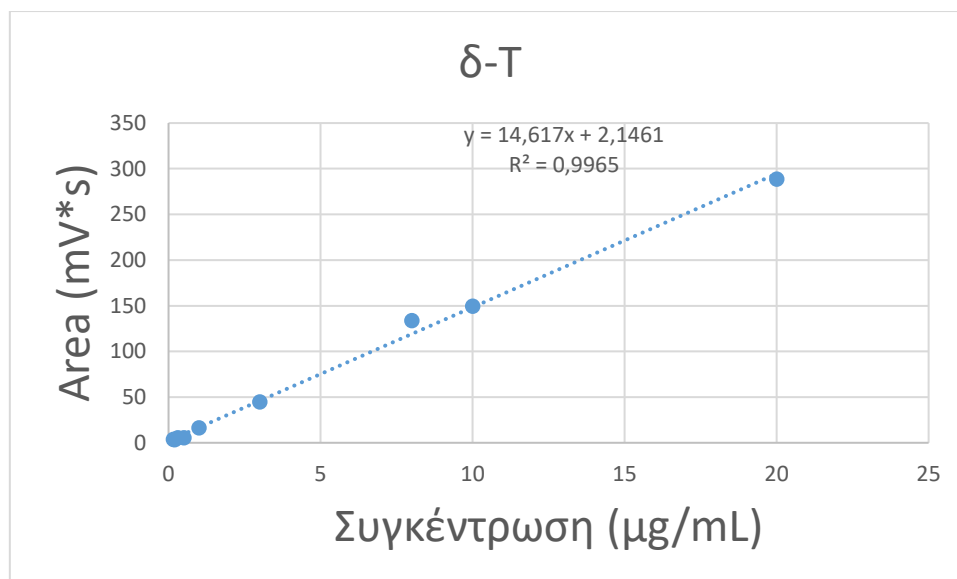
Εικόνα Γ.4. Καμπύλη βαθμονόμησης της $\alpha\text{-T}$.



Εικόνα Γ.5. Καμπύλη αναφοράς της β-T.



Εικόνα Γ.6. Καμπύλη βαθμονόμησης της γ-T.



Εικόνα Γ.7. Καμπύλη βαθμονόμησης της δ-T.

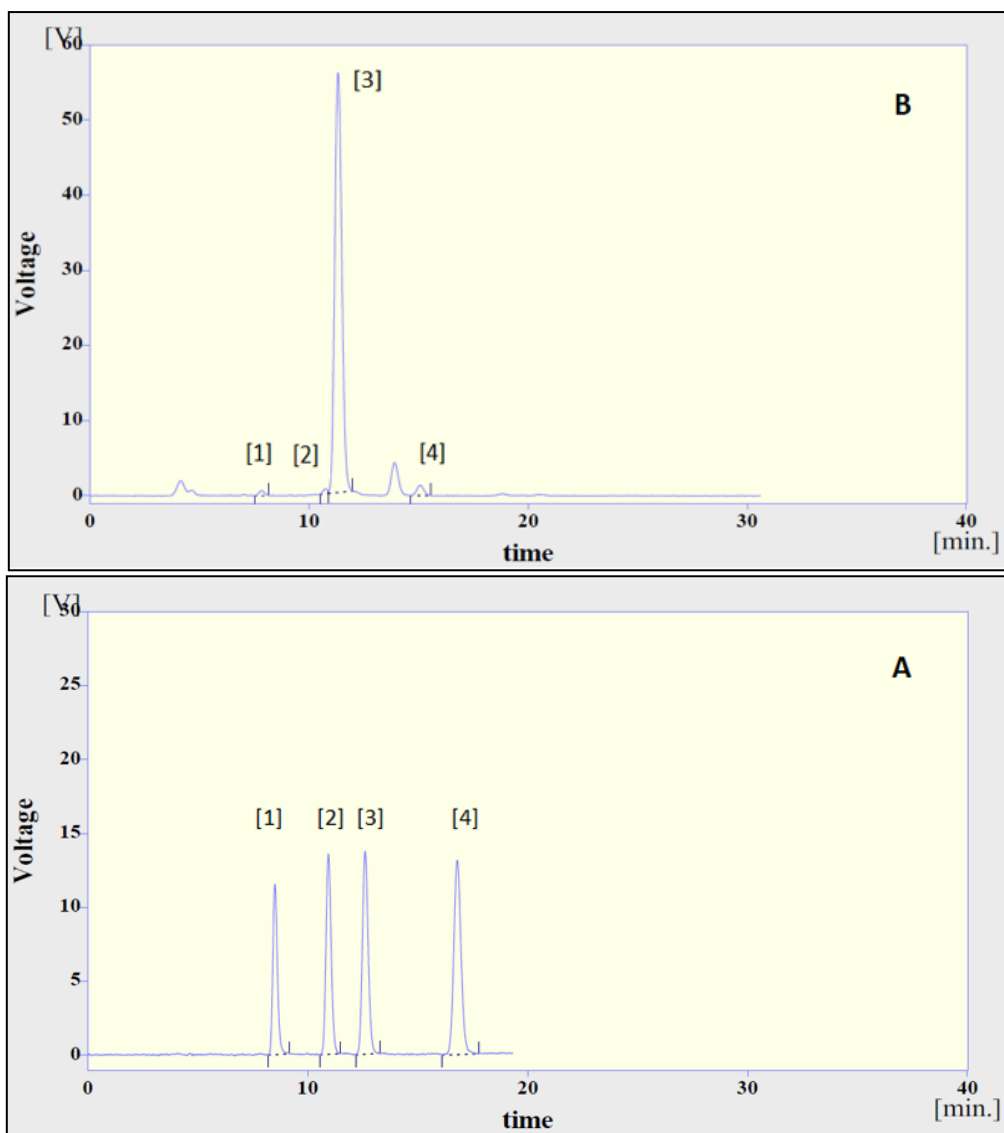
Η ανάκτηση, όπως αυτή υπολογίστηκε από την Εξίσωση 5, βρέθηκε 98,47%, 77,86%, 47,44% και 110,37% για τις α-T, β-T, γ-T και δ-Tα αντίστοιχα. Η αναλυτική ακρίβεια μεταξύ διαδοχικών ημερών υπολογίστηκε από τα δεδομένα του πίνακα Γ.4 και ήταν κατά μέσο όρο 3,08%, 5,99%, 4,89% και 2,75% (εξίσωση 6) α-T, β-T, γ-T και δ-Tα αντίστοιχα.

Η Εικόνα Γ.8 απεικονίζει το διαχωρισμό των τοκοφερολών όπως προσδιορίστηκαν με την τεχνική HPLC χρησιμοποιώντας ανιχνευτή φθορισμού. Οι χρόνοι συγκράτησης για τις α-, β-, γ- και δ-T ήταν περίπου 8, 10, 12 και 16 λεπτά κατά αντιστοιχία.

Οι συγκεντρώσεις των τοκοφερολών υπολογίστηκαν με χρήση των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς (πίνακας Γ.5) διορθώθηκαν με βάση την τιμή ανάκτησης κάθε τοκοφερόλης (πίνακας Γ.6). Υψηλή τιμή ανάκτησης (>100%) υποδηλώνει υπερεκτίμηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων ενώ χαμηλή (<100%) υποδηλώνουν υποεκτίμηση των συγκεντρώσεων.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκτιμάται από τον συντελεστή μεταβολής της συγκέντρωσης και προσδιορίζεται από την εξίσωση 6.

Η τελική συγκέντρωση κάθε τοκοφερόλης για τα 30 δείγματα φιστικελαίου και η επαναληψιμότητα της μεθόδου, όπως προσδιορίζεται από τον συντελεστή μεταβολής (CV), παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.7.



Εικόνα Γ.8. Χρωματογράφημα ενός διαλύματος εργασίας από μείγμα τοκοφερολών (Α) και δείγματος φιστικελαίου (Β) από την ανάλυση HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή. (Κορυφές: 1: α-T, 2: β-T, 3: γ-T και β- τοκοτριενόλη, 4: δ-T).

Πίνακας Γ.4. Υπολογισμός αναλυτικής ακρίβειας μεταξύ τριών διαδοχικών ημερών (n=3).

Τοκοφερόλες	Συγκεντρώσεις (μg/mL)	Ακρίβεια μεταξύ διαδοχικών ημερών (inter-day)
α-T	15	1,66
	20	4,50
β-T	15	3,80
	20	8,19
γ-T	15	4,50
	20	5,29
δ-T	15	2,37
	20	3,13

Πίνακας Γ.5. Συγκέντρωση τοκοφερολών (α-, β-, γ- και δ-) για τα δείγματα φιστικελαίων πριν γίνει η διόρθωση με τους συντελεστές ανάκτησης.

Αριθμός δείγματος	Συγκέντρωση (μg/mL)			
	α-T	β-T	γ-T*	δ-T
1	2,25 ± 0,06**	0,97 ± 0,05	91,62 ± 2,43	2,22 ± 0,16
2	1,56 ± 0,08	0,67 ± 0,09	87,32 ± 4,55	2,00 ± 0,01

3	4,04 ± 0,08	1,31 ± 0,08	106,18 ± 1,16	2,43 ± 0,10
4	2,78 ± 0,20	0,98 ± 0,08	95,73 ± 4,50	2,09 ± 0,24
5	2,73 ± 0,35	0,67 ± 0,12	97,16 ± 1,01	2,55 ± 0,31
6	3,17 ± 0,66	0,60 ± 0,05	92,72 ± 2,38	2,17 ± 0,04
7	1,69 ± 0,14	1,03 ± 0,02	72,16 ± 1,01	1,91 ± 0,14
8	1,70 ± 0,02	0,51 ± 0,1	74,92 ± 2,03	1,98 ± 0,03
9	2,12 ± 0,20	0,65 ± 0,09	101,46 ± 1,68	2,34 ± 0,05
10	0,53 ± 0,03	0,79 ± 0,22	54,29 ± 18,79	1,58 ± 0,47
11	2,52 ± 0,17	1,39 ± 0,27	93,09 ± 1,36	2,20 ± 0,11
12	1,86 ± 0,24	0,74 ± 0,06	96,68 ± 1,31	2,35 ± 0,09
13	4,32 ± 0,15	1,39 ± 0,09	102,62 ± 3,54	2,08 ± 0,07
14	3,03 ± 0,27	1,75 ± 0,11	82,56 ± 2,17	1,98 ± 0,12
15	3,46 ± 0,22	1,07 ± 0,12	84,73 ± 2,89	1,91 ± 0,14
16	2,88 ± 0,12	0,52 ± 0,06	76,01 ± 1,08	1,55 ± 0,19
17	1,95 ± 0,20	1,36 ± 0,16	90,80 ± 3,75	2,39 ± 0,34
18	0,69 ± 0,11	0,86 ± 0,06	56,49 ± 2,05	1,42 ± 0,04
19	2,23 ± 0,41	0,35 ± 0,00	74,21 ± 0,85	1,46 ± 0,05
20	2,20 ± 0,47	1,23 ± 0,12	96,55 ± 2,72	2,16 ± 0,26
21	1,54 ± 0,22	0,67 ± 0,02	46,28 ± 3,87	1,74 ± 0,03
22	3,23 ± 0,07	0,46 ± 0,02	74,71 ± 2,48	1,33 ± 0,13
23	4,23 ± 0,04	0,61 ± 0,06	96,99 ± 5,34	1,69 ± 0,04
24	2,08 ± 0,19	1,42 ± 0,16	78,07 ± 11,24	2,16 ± 0,82
25	1,45 ± 0,13	1,53 ± 0,05	80,35 ± 3,58	1,97 ± 0,11
26	2,43 ± 0,42	0,55 ± 0,07	75,10 ± 6,88	1,61 ± 0,35
27	4,14 ± 0,07	1,73 ± 0,51	80,98 ± 1,15	2,10 ± 0,02
28	5,81 ± 0,21	1,21 ± 0,29	107,11 ± 2,61	2,20 ± 0,06
29	1,95 ± 0,19	0,54 ± 0,01	74,72 ± 2,19	1,76 ± 0,05
30	2,54 ± 0,11	-	102,48 ± 1,45	2,19 ± 1,24

* Επειδή στον ίδιο χρόνο συνεκκλύονται η γ-τοκοφερόλη και η β-τοκοτριενόλη είναι πιθανό στην υπολογισθείσα συγκέντρωση να εμπεριέχονται και οι δύο αν υπάρχουν στο εκάστοτε δείγμα.

** Μέσος όρος ± τυπική απόκλιση, ποσοτικοποιημένα χρησιμοποιώντας ως εσωτερικά πρότυπα τις αντίστοιχες τοκοφερόλες

Πίνακας Γ.6. Υπολογισμός ανάκτησης για τις τοκοφερόλες (α-, β-, γ- και δ-).

Τοκοφερόλες	Υπάρχουσα συγκέντρωση (µg/mL)	Προστιθέμενη συγκέντρωση (µg/mL)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (µg/mL)	Ανάκτηση	
				%	Μέσος όρος (%)
α-T	1,30	0,24	1,91	124,13	98,47
		10,22	6,82	59,22	
		19,74	23,57	112,05	
β-T	0,64	0,31	0,32	33,49	77,86
		10,30	9,56	87,30	
		19,61	22,84	112,80	
γ-T	63,85	0,19	65,13	101,70	47,44
		7,93	7,63	10,63	
		20,95	25,42	29,98	
δ-T	0,93	0,21	1,56	135,93	110,37
		10,08	8,26	75,04	
		19,59	24,65	120,14	

Πίνακας Γ.7. Συγκέντρωση τοκοφερολών (α-, β-, γ- και δ-) στα δείγματα φιστικελαιών.

Δείγματα	Συγκέντρωση (μg/mL)				Επαναληψιμότητα* (CV, %) n=3			
	α-T	β-T	γ-T**	δ-T	α-T	β-T	γ-T	δ-T
1	2,29 ± 0,06***	1,25 ± 0,06	193,13 ± 5,12	2,01 ± 0,14	2,75	4,69	2,65	7,11
2	1,59 ± 0,08	0,86 ± 0,11	184,07 ± 9,59	1,81 ± 0,01	5,20	13,06	5,21	0,39
3	4,10 ± 0,08	1,68 ± 0,11	223,82 ± 2,45	2,20 ± 0,09	2,04	6,45	1,09	4,24
4	2,83 ± 0,20	1,26 ± 0,11	201,78 ± 9,48	1,89 ± 0,22	7,16	8,61	4,70	11,67
5	2,78 ± 0,35	0,87 ± 0,15	204,80 ± 2,12	2,31 ± 0,28	12,65	17,70	1,04	12,12
6	3,22 ± 0,67	0,77 ± 0,07	195,44 ± 5,02	1,97 ± 0,04	20,91	8,57	2,57	1,91
7	1,72 ± 0,14	1,33 ± 0,03	152,10 ± 2,14	1,73 ± 0,13	8,33	2,01	1,41	7,36
8	1,73 ± 0,02	0,65 ± 0,12	157,93 ± 4,27	1,79 ± 0,03	1,04	18,85	2,70	1,79
9	2,15 ± 0,20	0,83 ± 0,11	213,88 ± 3,55	2,12 ± 0,04	9,29	13,35	1,66	1,99
10	0,53 ± 0,03	1,01 ± 0,28	114,45 ± 39,60	1,43 ± 0,43	6,62	27,72	34,60	30,02
11	2,56 ± 0,17	1,79 ± 0,34	196,23 ± 2,86	1,99 ± 0,10	6,73	19,18	1,46	5,07
12	1,88 ± 0,25	0,96 ± 0,08	203,79 ± 2,77	2,13 ± 0,08	13,14	8,17	1,36	3,78
13	4,39 ± 0,15	1,79 ± 0,11	216,32 ± 7,47	1,88 ± 0,07	3,35	6,38	3,45	3,52
14	3,07 ± 0,28	2,25 ± 0,14	174,04 ± 4,57	1,79 ± 0,11	9,03	6,40	2,63	6,02
15	3,51 ± 0,22	1,37 ± 0,16	178,60 ± 6,09	1,73 ± 0,13	6,36	11,48	3,41	7,28
16	2,93 ± 0,12	0,66 ± 0,07	160,22 ± 2,28	1,41 ± 0,17	4,15	11,13	1,42	12,27
17	1,98 ± 0,20	1,75 ± 0,21	191,41 ± 7,90	2,17 ± 0,31	10,17	12,13	4,13	14,22
18	0,70 ± 0,11	1,11 ± 0,08	119,08 ± 4,32	1,29 ± 0,03	15,51	7,03	3,62	2,64
19	2,26 ± 0,41	0,45 ± 0,00	156,43 ± 1,80	1,33 ± 0,04	18,36	0,56	1,15	3,26
20	2,23 ± 0,48	1,58 ± 0,16	203,53 ± 5,74	1,96 ± 0,24	21,50	9,91	2,82	12,24
21	1,56 ± 0,22	1,07 ± 0,32	97,56 ± 8,15	1,58 ± 0,03	14,41	30,46	8,36	2,11
22	3,28 ± 0,07	0,62 ± 0,02	157,49 ± 5,24	1,20 ± 0,12	2,22	3,61	3,33	10,15
23	4,15 ± 0,04	0,78 ± 0,07	185,36 ± 11,25	1,50 ± 0,04	1,03	9,21	6,07	2,41
24	2,11 ± 0,19	1,82 ± 0,21	164,57 ± 23,70	1,96 ± 0,74	9,01	11,51	14,40	37,91
25	1,47 ± 0,13	1,96 ± 0,06	169,36 ± 7,54	1,79 ± 0,10	8,67	3,24	4,45	5,86
26	2,47 ± 0,43	0,71 ± 0,09	158,31 ± 14,51	1,46 ± 0,32	17,35	12,85	9,16	21,66
27	4,20 ± 0,07	2,22 ± 0,65	170,70 ± 2,42	1,90 ± 0,02	1,68	29,47	1,42	1,20
28	5,90 ± 0,22	1,56 ± 0,37	225,78 ± 5,51	1,99 ± 0,05	3,69	23,81	2,44	2,76
29	1,98 ± 0,19	0,70 ± 0,02	157,50 ± 4,63	1,59 ± 0,05	9,69	2,29	2,94	2,99
30	2,58 ± 0,11	-	216,02 ± 3,06	1,98 ± 1,12	4,47	-	1,42	56,55

* Τυπική απόκλιση/Μέσος όρος

** Επειδή στον ίδιο χρόνο συνεκλούνται η γ-T και η β-τοκοτριενόλη είναι πιθανό στην υπολογισθείσα συγκέντρωση να εμπεριέχονται και οι δύο αν υπάρχουν στο εκάστοτε δείγμα.

*** Μέσος όρος ± τυπική απόκλιση, ποσοτικοποιημένα χρησιμοποιώντας ως εσωτερικά πρότυπα τις αντίστοιχες τοκοφερόλες

Η περιεκτικότητα των φιστικελαιών σε τοκοφερόλες, εκφραζόμενη σε 10²μg/mL φιστικελαιίου κυμάνθηκε από 0,53 (δείγμα 10) έως 5,90 (δείγμα 28), 0,45 (δείγμα 19) έως 2,25 (δείγμα 14), 97,56 (δείγμα 21) έως 225,78 (δείγμα 28) και 1,20 (δείγμα 22) έως 2,31 (δείγμα 5) για α-, β-, γ- και δ-T αντίστοιχα.

Οι Gentile *et al.* (2007) μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φιστικιού της Σικελίας (*Pistacia vera* L. Var. Bronte) και διαπίστωσαν ότι μεταξύ των T, η γ-T ήταν το μόνο ισομερές της βιταμίνης E που βρέθηκε στο λιπόφιλο εκχύλισμα του φιστικιού. Η παρούσα μελέτη έρχεται σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα δεδομένου ότι στο φιστικέλαιο από ελληνικό κελυφωτό φιστίκι ποικιλίας Αιγίνης δεν προσδιορίστηκε μόνο η γ-T αλλά και τα τέσσερα ισομερή της βιταμίνης E (α-, β-, γ- και δ-T). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της μελέτης των Ojeda-Amador, Fregapane,

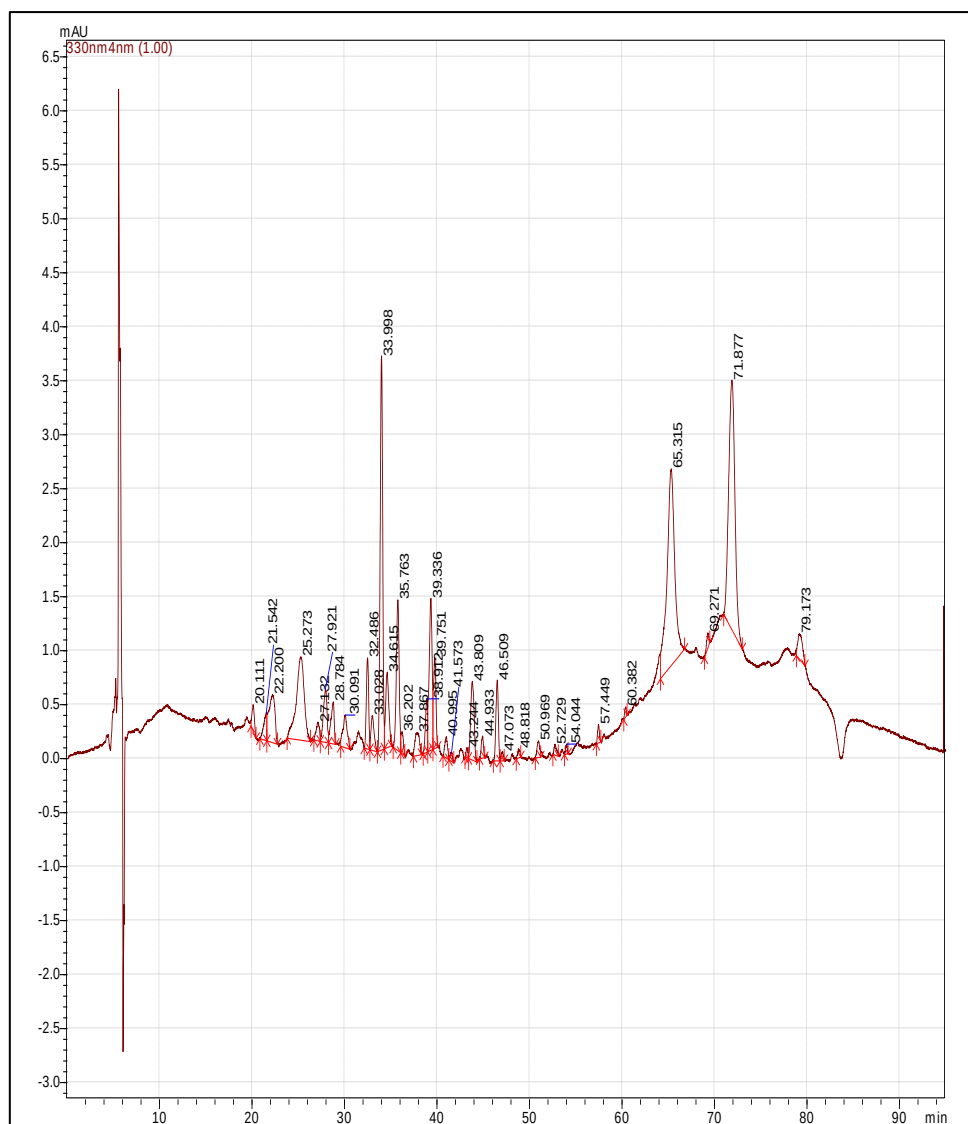
Desamparados (2018) έδειξαν ότι οι α-T και β-T εμφανίζονται σε χαμηλές ποσότητες, γεγονός που συμφωνεί με τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η γ-T συνεκλύεται με τη β-τοκοτριενόλη και ως αποτέλεσμα το υπολογισμένο περιεχόμενο της γ-T περιλαμβάνει και τα δύο ισομερή της βιταμίνης Ε. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δείχνουν ότι η κύρια μορφή σε όλα τα δείγματα ήταν η γ-T (μαζί με τη β-τοκοτριενόλη), ενώ η περιεκτικότητα σε β-T ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη μελέτη των Martinez *et al.* (2016).

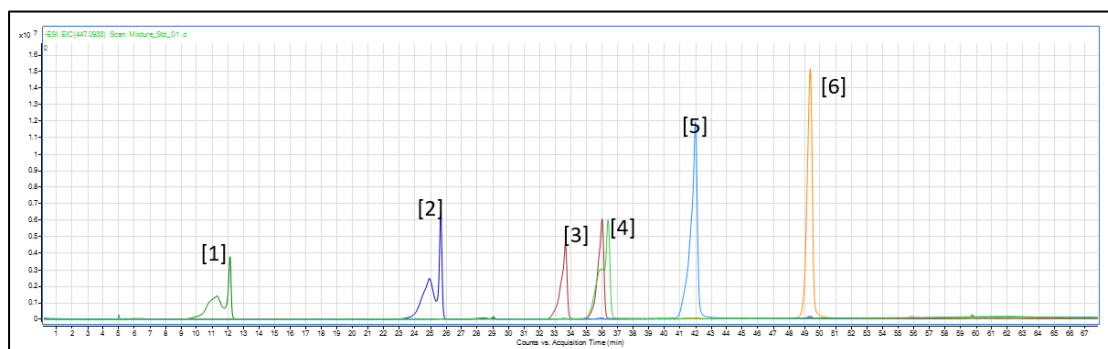
Γ.6 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ HPLC-DAD ΚΑΙ HPLC-MS

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας το χρόνο έκλουσης (Retention Time), το φάσμα μαζών, το φάσμα απορρόφησης κάθε συστατικού και βιβλιογραφικά δεδομένα (Garavand, Madadlou, Moini, 2007).

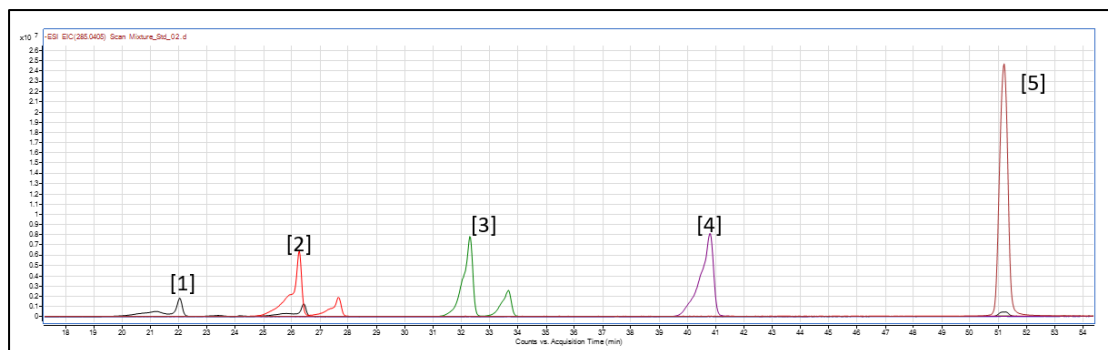
Στην Εικ. Γ.9 φαίνεται το χρωματογραφικό προφίλ αντιπροσωπευτικού υδρομεθανολικού εκχυλίσματος φιστικιού κατά την ανάλυση με HPLC-DAD. Στις Εικόνες Γ.13-Γ.20 παραθέτονται τα χρωματογραφήματα μειγμάτων και μεμονωμένων πρότυπων ενώσεων, η ανάλυση των οποίων έγινε με HPLC-MS. Στις εικόνες Γ.21-Γ.36 παρουσιάζονται τα φάσματα μαζών των πρότυπων ενώσεων. Στον πίνακα Γ.8 παρουσιάζονται οι φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα, ο χρόνος έκλουσής τους, το μέγιστο μήκος κύματος καθώς και το εμβαδόν της. Η ταυτοποίηση κάθε φαινολικής ένωσης βασίστηκε σε συνδυασμό σύγκρισης του χρόνου έκλουσης, του φάσματος μάζας και της απορρόφησης UV μεταξύ των δειγμάτων, των προτύπων και της βιβλιογραφίας. Σχετικά με το φάσμα μάζας κάθε συστατικού λήφθηκε υπόψη το θραύσμα μάζας m/z του μοριακού ιόντος του.



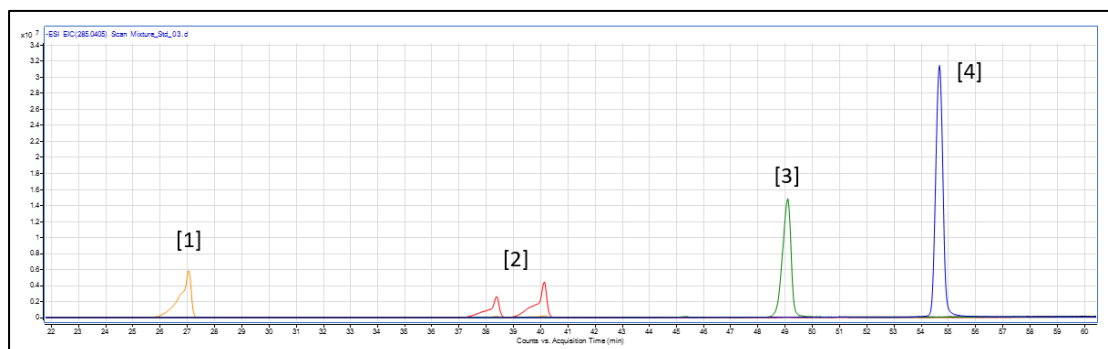
Εικόνα Γ.9. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα υδρομεθανολικού εκχυλίσματος φιστικιού κατά την ανάλυση με HPLC-MS.



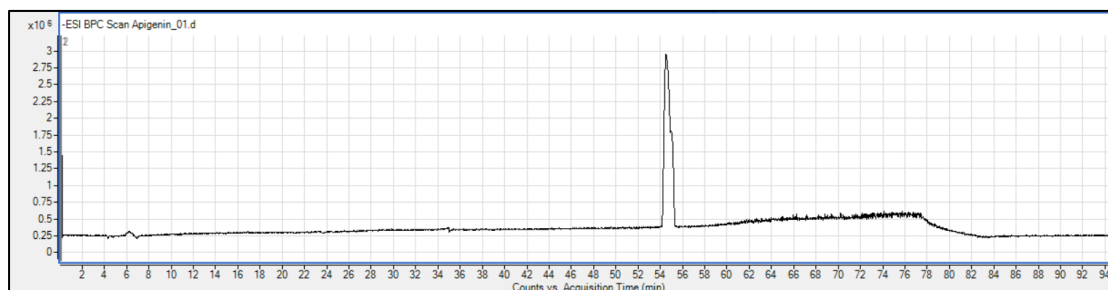
Εικόνα Γ.10. Χρωματογράφημα του μίγματος-1 πρότυπων ενώσεων με ανάλυση HPLC-MS. Κορυφές: 1, γαλλικό οξύ, 2, επικατεχίνη, 3, φερουλικό οξύ, 4, 7-ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 5, μυρισετίνη, 6, κερκετίνη.



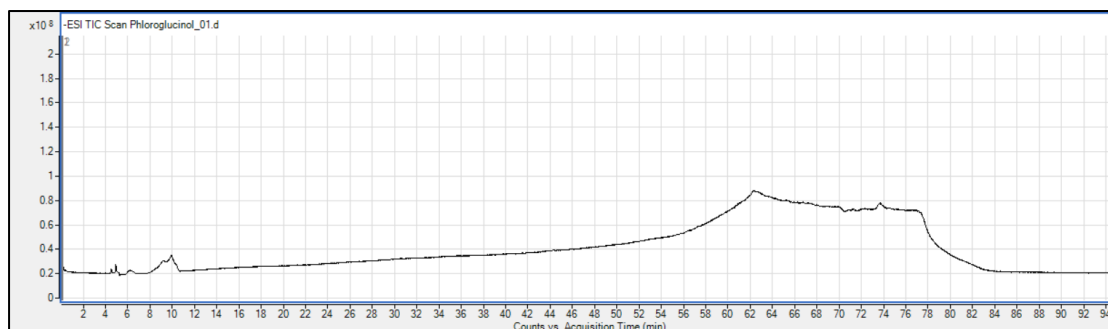
Εικόνα Γ.11. Χρωματογράφημα μίγματος-2 πρότυπων ενώσεων με ανάλυση HPLC-MS. Κορυφές: 1, χλωρογενικό οξύ, 2, καφεϊκό οξύ, 3, p-κουμαρικό οξύ, 4, 7-o-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 5, λουτεολίνη.



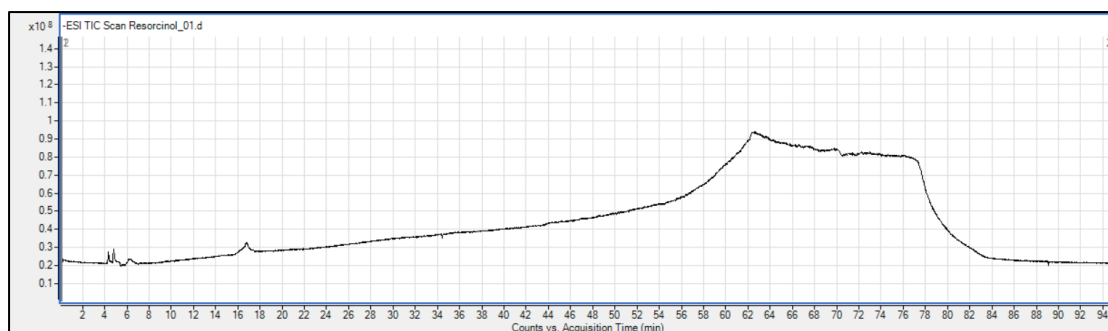
Εικόνα Γ.12. Χρωματογράφημα μίγματος-3 πρότυπων ενώσεων με ανάλυση HPLC-MS. Κορυφές: 1, συριγγικό οξύ, 2, ροσμαρινικό οξύ, 3, κερκετίνη, 4, καμφερόλη.



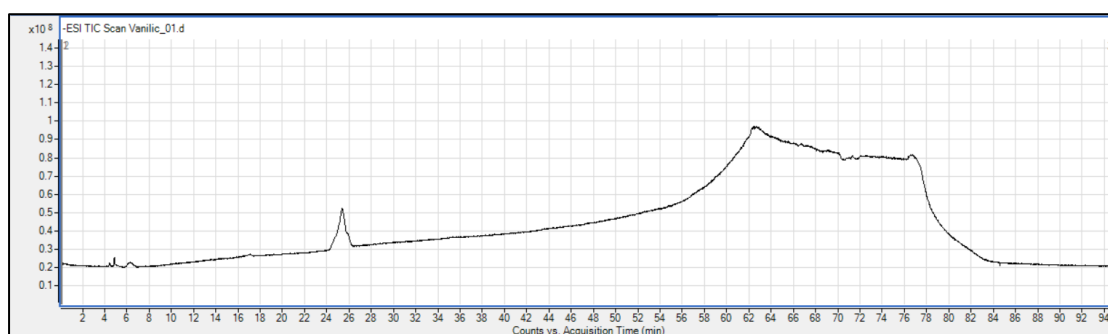
Εικόνα Γ.13. Χρωματογράφημα Απιγενίνη με ανάλυση HPLC-MS.



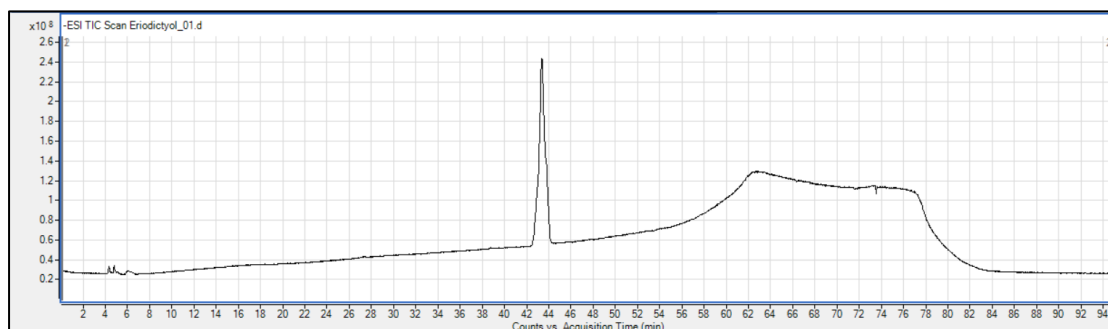
Εικόνα Γ.14. Χρωματογράφημα Φλωρογλουκινόλη με ανάλυση HPLC-MS.



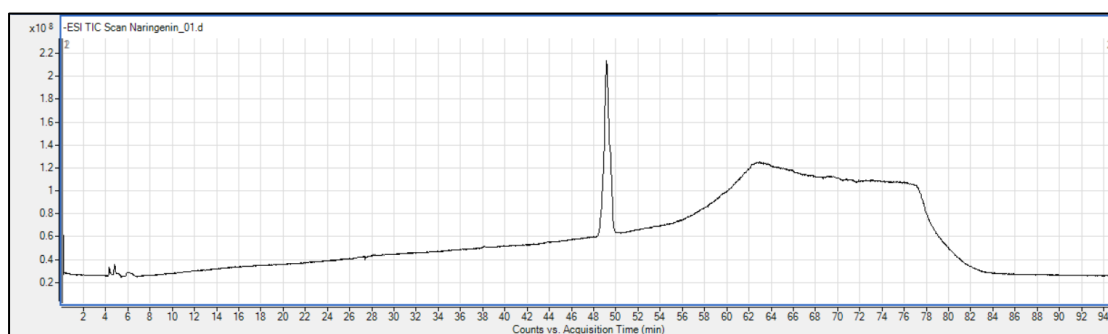
Εικόνα Γ.15. Χρωματογράφημα Ρεσορκινόλη με ανάλυση HPLC-MS.



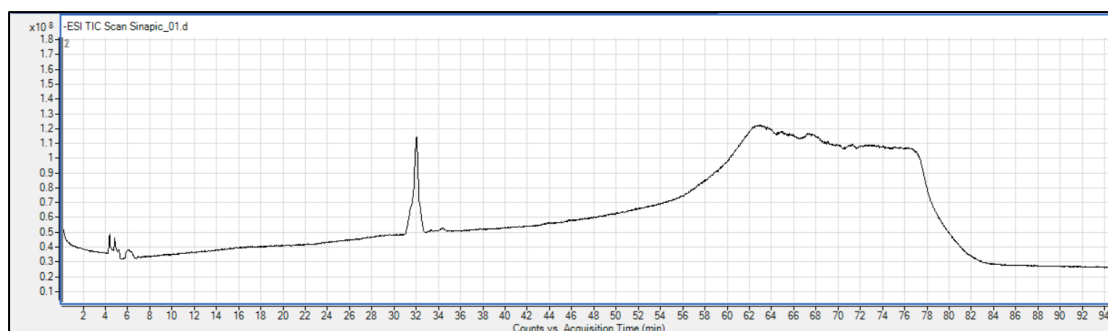
Εικόνα Γ.16. Χρωματογράφημα Βανιλικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



Εικόνα Γ.17. Χρωματογράφημα Εριοδικτυόλη με ανάλυση HPLC-MS.

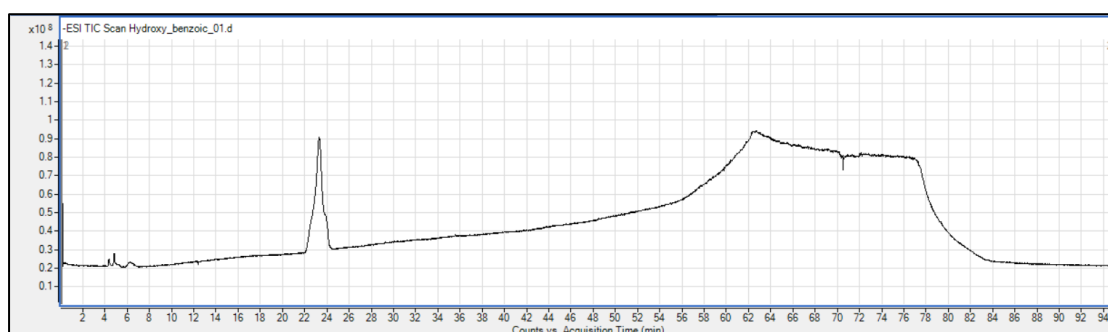


Εικόνα Γ.18. Χρωματογράφημα Ναρινγκενίνη με ανάλυση HPLC-MS.



+

Εικόνα Γ.19. Χρωματογράφημα Συναπικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



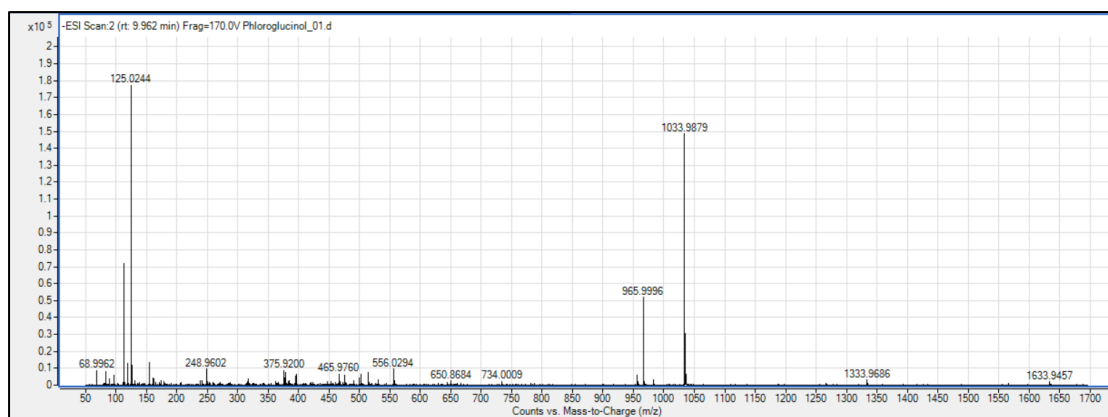
+

Εικόνα Γ.20. Χρωματογράφημα 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.

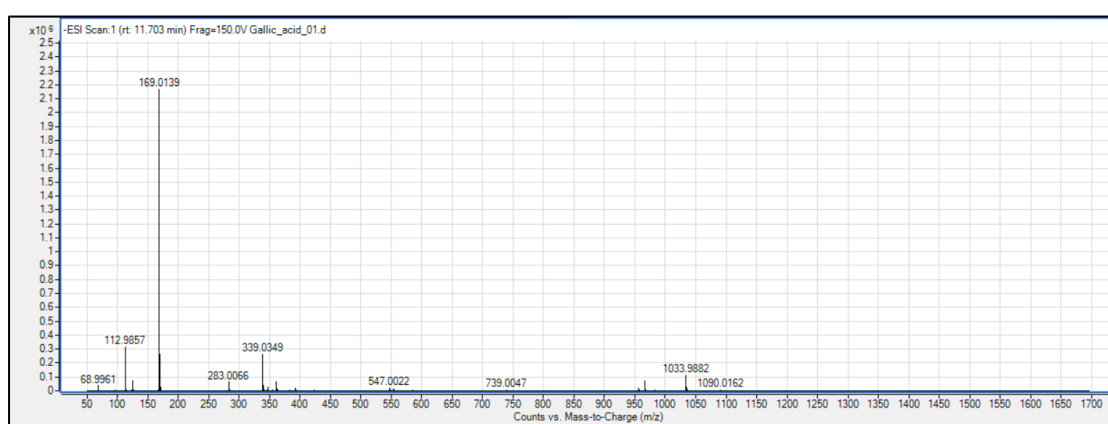
Με βάση τα παραπάνω χρωματογραφήματων δημιουργήθηκε ο πίνακας 6.1

Πίνακας Γ.8 Χρόνος έκλουσης των πρότυπων ενώσεων κατά τη ανάλυση με HPLC-MS.

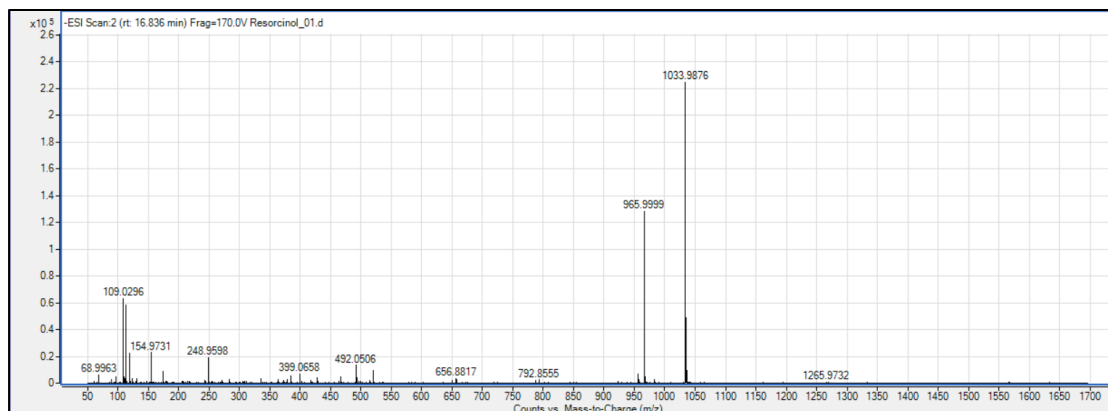
Ονομασία	[M-H] ⁻ (m/z)	RT (λεπτά)
Φλωρογλουκινόλη	125,02442	9,910
Γαλλικό οξύ	169,01425	11,686
Ρεσορκινόλη	109,02950	16,760
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	137,02442	23,323
Επικατεχίνη	289,07176	24,792
Βανιλικό οξύ	167,03498	25,379
Καφεικό οξύ	179,03498	26,225
Συριγγικό οξύ	197,04555	26,370
4-κουμαρικό οξύ	163,04007	31,338
Συναπικό οξύ	223,06120	32,020
Φερουλικό οξύ	193,05063	32,419
Ροσμαρινικό οξύ	359,0772	39,180
Εριοδικτυόλη	287,05611	43,369
Κερκετίνη	301,0354	48,371
Ναρινγκενίνη	271,06120	49,182
Λουτεολίνη	285,04046	49,960
Καμφερόλη	285,04046	53,509
Απιγενίνη	269,04555	54,603



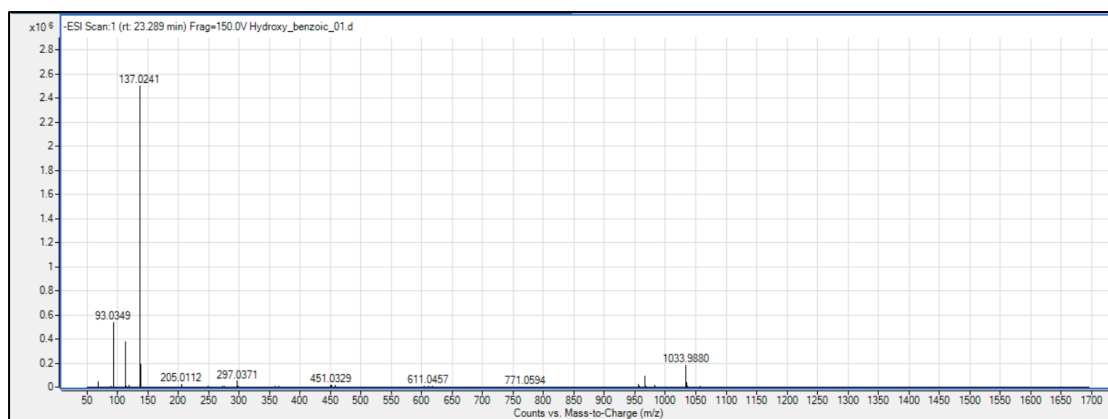
Εικόνα Γ.21. Φάσμα μαζών Φλωρογλουκινόλη με ανάλυση HPLC-MS.



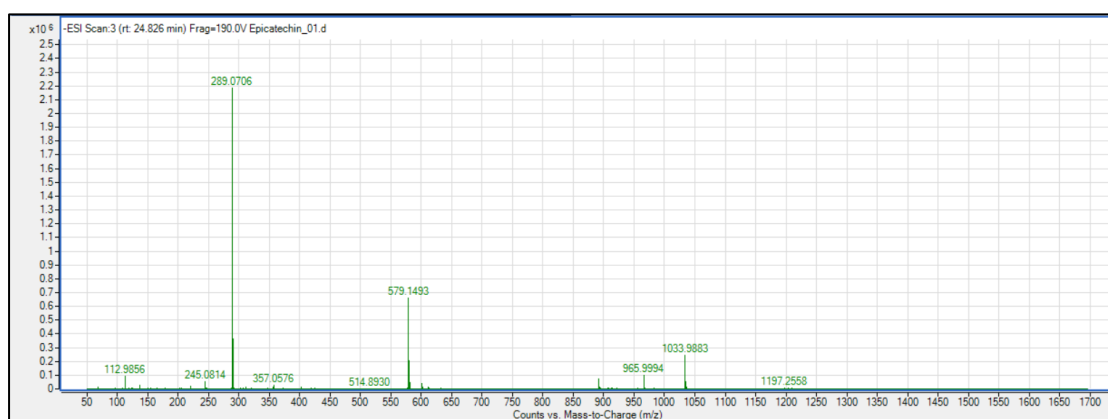
Εικόνα Γ.22. Φάσμα μαζών Γαλλικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



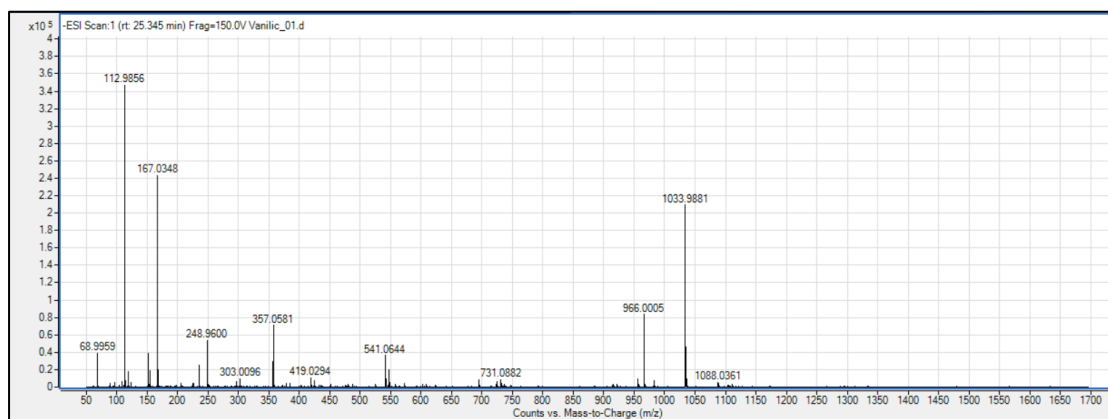
Εικόνα Γ.23. Φάσμα μαζών Ρεσορκινόλη με ανάλυση HPLC-MS.



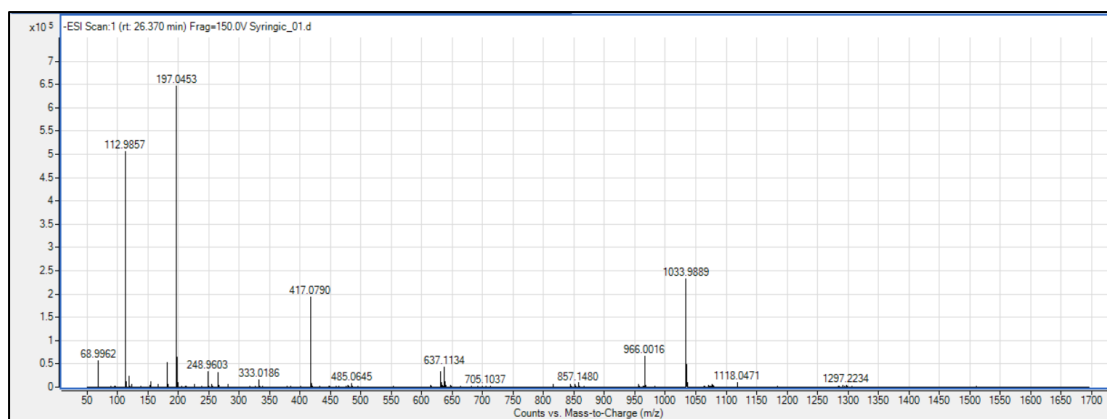
Εικόνα Γ.24. Φάσμα μαζών 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



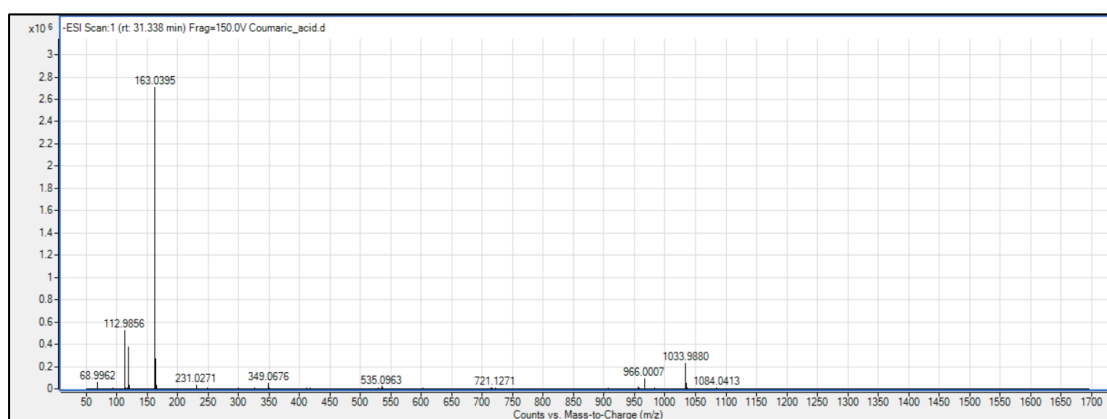
Εικόνα Γ.25. Φάσμα μαζών Επικατεχίνη με ανάλυση HPLC-MS.



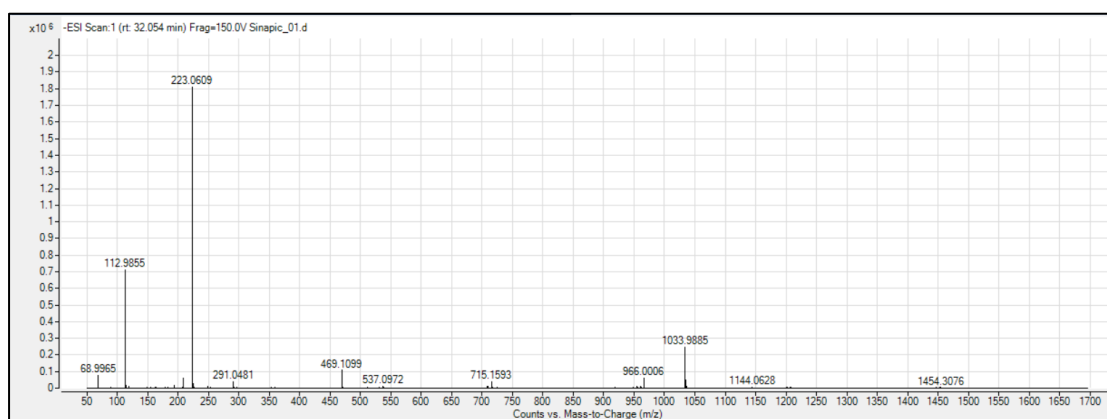
Εικόνα Γ.26. Φάσμα μαζών Βανιλικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



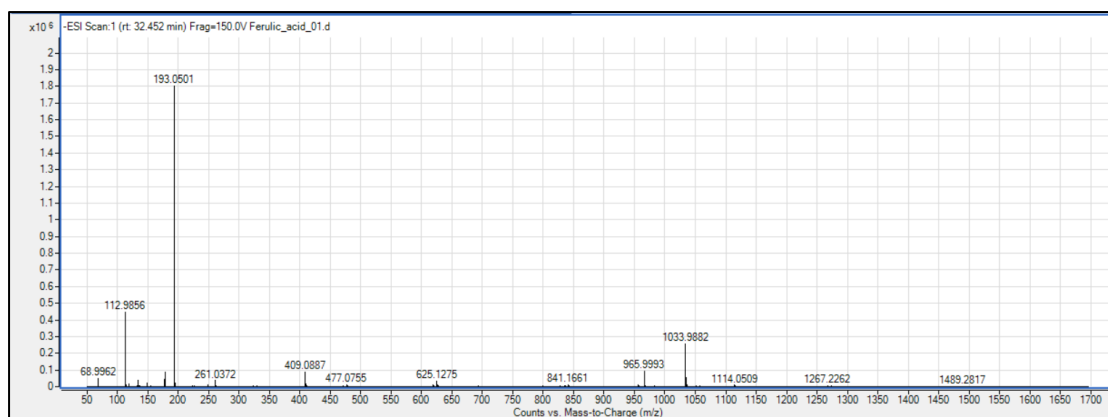
Εικόνα Γ.27. Φάσμα μαζών Συριγγικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



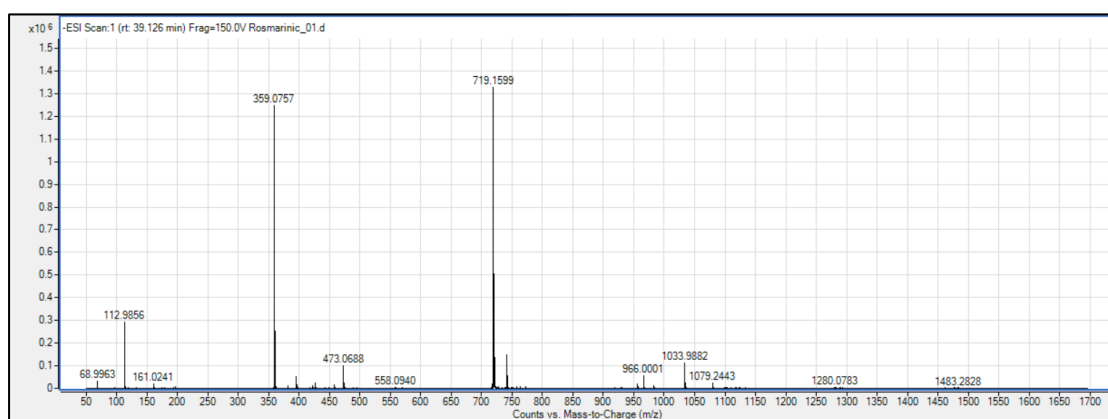
Εικόνα Γ.28. Φάσμα μαζών 4-κουμαρικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



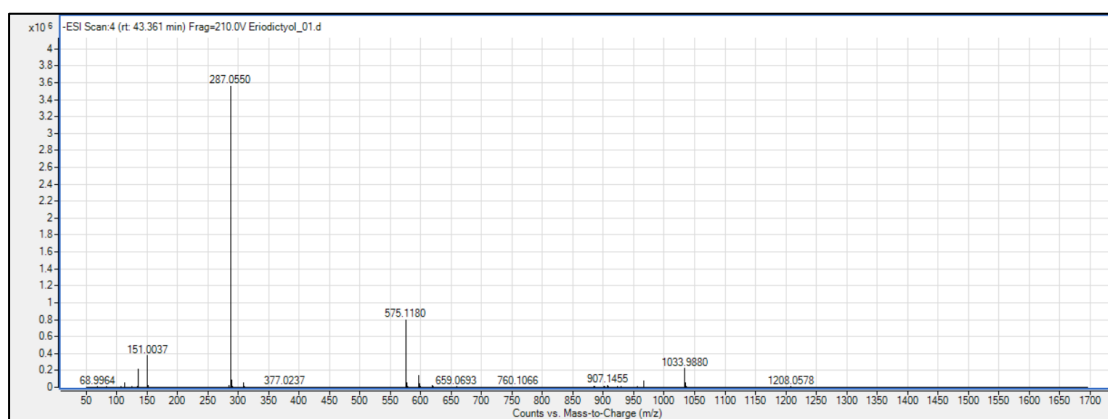
Εικόνα Γ.29. Φάσμα μαζών Συναπικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



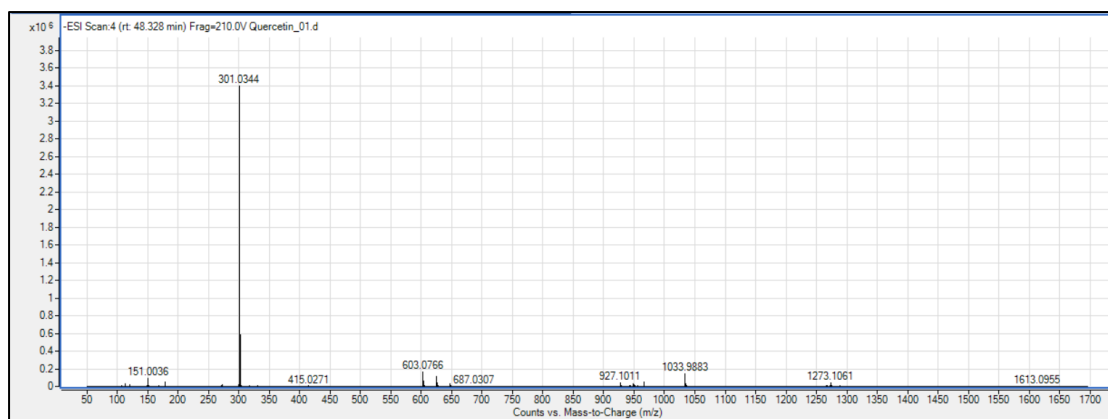
Εικόνα Γ.30. Φάσμα μαζών Φερουλικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



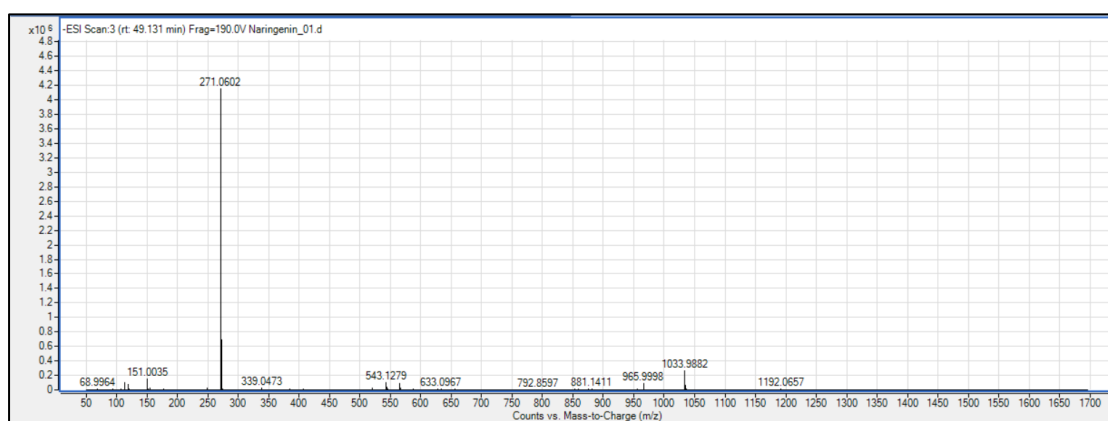
Εικόνα Γ.31 Φάσμα μαζών Ροσμαρινικό οξύ με ανάλυση HPLC-MS.



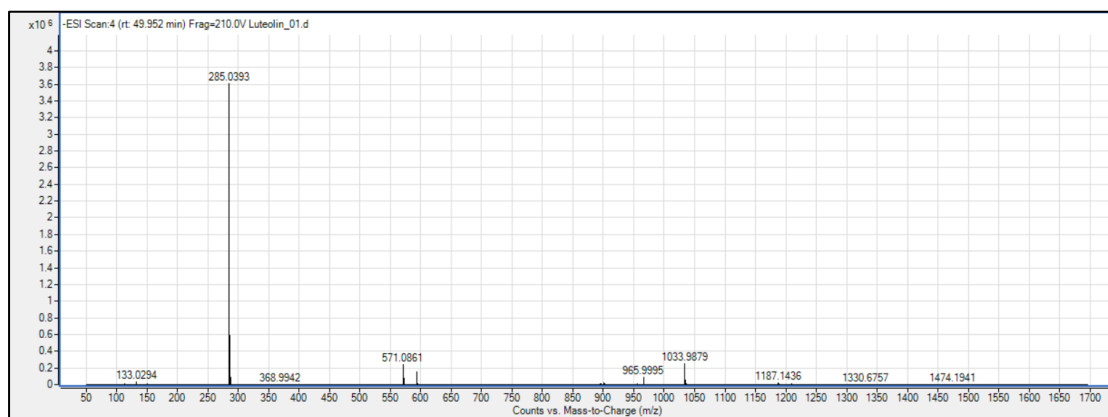
Εικόνα Γ.32. Φάσμα μαζών Εριοδικτυόλη με ανάλυση HPLC-MS.



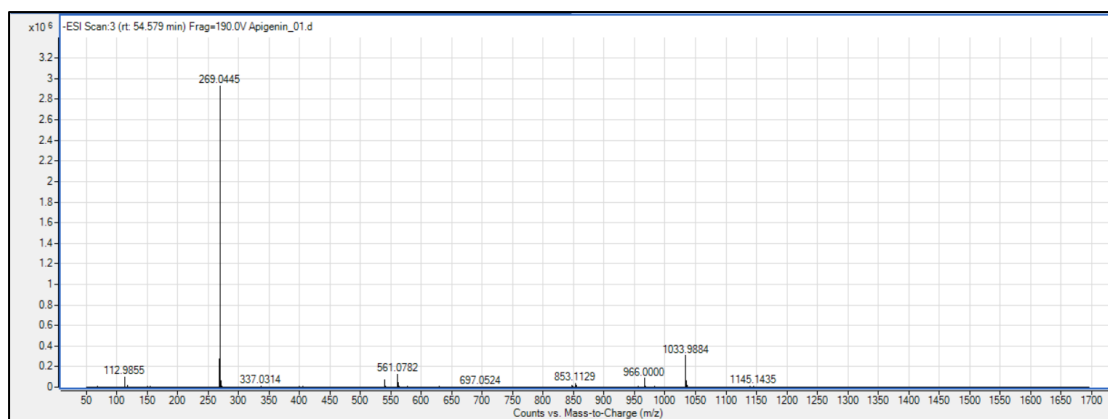
Εικόνα Γ.33. Φάσμα μαζών Κερκετίνη με ανάλυση HPLC-MS.



Εικόνα Γ.34. Φάσμα μαζών Ναρινγκενίνη με ανάλυση HPLC-MS.



Εικόνα Γ.35. Φάσμα μαζών Λουτελίνη με ανάλυση HPLC-MS.



Εικόνα Γ.36. Φάσμα μαζών Απιγενίνη με ανάλυση HPLC-MS.

Πίνακας Γ.9. Φαινολικά συστατικά που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα, ο χρόνος έκλουσής τους (RT) (min), $\lambda_{\max}$ (nm) και το εμβαδόν κάθε κορυφής (ως μέσος όρος των τριών επαναλήψεων).

Δείγματα	Φλωρογλουκινόλη			Γαλλικό οξύ			Ρεσορκινόλη			4-υδροξυβενζοϊκό οξύ		
	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area
1	9,995	280	3640	11,312	230	22,581	16,231	230	11,256	-		
2	9,956	280	237,2	11,471	280	22,6	16,941	280	12,3	23,725	280	1,3
3	10,535	230	2473,1	-			16,222	230	15,098	-		
4	10,203	280	4930,2	12,155	280	7324,3	-			23,571	230	21978
5	10,301	280	4740,1	12,184	280	6076,9	15,976	280	35339,6	-		
6	9,781	230	985,8	11,943	280	26,8	16,784	280	6,1	23,729	280	90,4
7	10,151	280	10514,6	11,863	280	29466	16,835	320	5,2	-		
8	10,265	280	504,9	12,199	280	410	16,237	230	12755,3	-		
9	10,193	280	5544,5	12,157	280	7009,3	16,383	230	13047,5	-		
10	9,281	230	39,4	12,294	280	555,5	16,196	230	24454,1	-		
11	9,796	230	1428,2	12,227	280	413	16,054	230	43617,3	23,879	230	2976,2
12	-			-			-			-		
13	10,102	280	5477,6	12,12	280	51,3	16,025	230	34122,2	23,985	230	40656
14	9,52	280	5	11,37	280	16,5	16,821	280	12,3	23,481	280	29,3
15	9,685	230	1008,2	12,285	280	384,8	15,919	230	16622	23,663	230	2185,8
16	9,986	230	34157,5	-			-			23,205	230	17366,8
17	10,134	280	9997,5	11,833	280	2784,6	-			23,022	320	10,6
18	10,274	280	5083,1	12,238	280	7738,9	16,153	230	26684,1	23,964	230	35611,8
19	9,609	230	1573,8	12,183	280	437,4	16,005	230	39148,4	23,677	230	23868,3
20	9,636	230	2653,3	12,182	280	187,9	15,966	230	36388,6	23,751	230	33029,5
21	-			-			-			-		
22	10,416	230	3581,7	11,201	280	897,2	16,653	230	31217,7	-		
23	9,65	230	4304,6	11,887	280	30330	-			-		
24	10,051	230	2281	-			16,077	230	3823	23,137	230	231,7
25	10,179	280	7425,6	12,192	280	2121,9	-			23,696	230	564,6
26	9,655	230	1383,5	11,982	280	19,5	15,745	230	3028,8	-		
27	9,982	230	1751,4	-			-			23,311	230	16616,7
28	9,513	230	1020	11,25	280	51,1	15,092	230	182,2	-		
29	9,528	230	1407	11,98	280	33	15,735	230	4130,6	-		
30	9,852	280	7,9	11,333	280	18,3	16,755	280	12	23,375	280	77,6

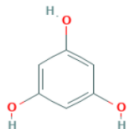
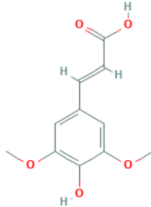
Δείγματα	Βανιλικό οξύ			Συριγγικό οξύ			π-κουμμαρικό οξύ			Συναπικό οξύ		
	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area
1	25,024	230	12038,7	-			30,902	280	49,9	-		
2	25,554	280	6,9	-			31,587	320	9,1	-		

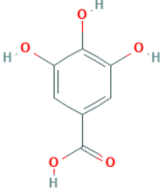
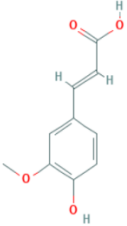
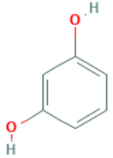
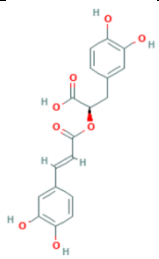
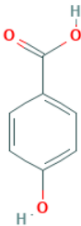
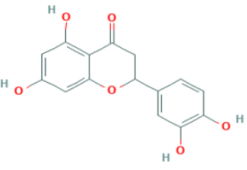
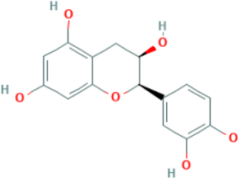
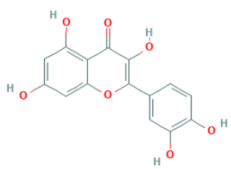
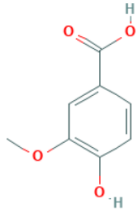
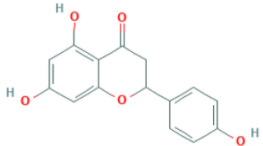
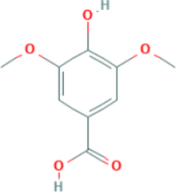
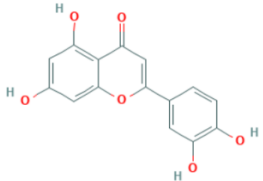
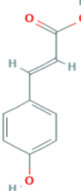
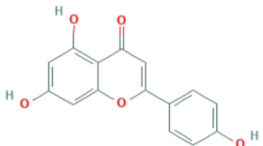
3	25,684	230	9927	26,426	230	10121,2	31,903	230	5933,4	-		
4	25,357	230	21,571	26,698	230	9328,3	31,422	230	3926,3	-		
5	25,451	230	30064,1	26,708	230	12485	31,392	230	6564,4	-		
6	25,96	280	7,4	-			-			32,262	320	7,8
7	25,157	320	9,1	-			31,241	320	26,4	-		
8	25,041	230	3405	26,721	230	117,4	31,344	230	1287,2	-		
9	-			26,464	230	687,2	-			-		
10	25,012	230	30246,8	25,765	230	5750,6	30,994	280	73,7	-		
11	25,531	230	11238,1	26,604	230	13197,8	30,983	230	5623,3	-		
12	-			-			-			-		
13	25,354	230	25131,2	26,502	230	282,2	-			32,424	230	112,3
14	25,293	280	5,3	-			31,29	280	36,1	-		
15	25,65	230	197,2	26,466	230	896,6	30,856	280	96,5	-		
16	25,112	230	12255	-			31,152	230	4775,8	-		
17	-			-			31,033	320	10,4	-		
18	25,372	230	31327,9	26,647	230	13161,2	31,27	230	6874,6	32,445	230	21828,7
19	25,631	230	23868,3	26,412	230	11415,6	30,844	280	75,3	-		
20	25,773	230	4598,5	26,363	230	9732,1	30,717	280	41,6	-		
21	-			-			-			-		
22	25,754	230	9882	26,615	230	14938,8	30,38	230	4796,4	31,917	230	2587,5
23	25,371	320	7	-			31,331	380	73,2	-		
24	-			26,597	230	617,9	27,825	230	1261,8	-		
25	25,215	230	228,2	26,489	230	294,3	31,751	230	183	32,44	230	109,5
26	-			-			-			-		
27	25,101	230	12195,4	26,583	230	3958,9	31,509	230	47,4	32,093	360	11,1
28	-			-			30,844	230	36,7	-		
29	25,811	230	1401,2	-			-			32,311	230	145
30	25,282	280	6,3	-			31,239	280	39,4	-		
Δείγματα	Φερουλικό οξύ			Ροσμαρινικό οξύ			Εριοδικτυόλη			Ναρινγκενίνη		
	RT	λ _{max}	Area	RT	λ _{max}	Area	RT	λ _{max}	Area	RT	λ _{max}	Area
1	32,598	360	6,5	-			-			-		
2	-			39,7	320	5,9	-			-		
3	-			-			-			-		
4	-			39,621	230	107,3	43,793	320	20,3	-		
5	32,594	230	18941,2	39,601	230	1484,9	43,787	320	13,4	-		
6	-			-			-			-		
7	-			-			-			-		
8	32,622	230	619	39,571	230	114,8	-			-		
9	-			38,922	280	125,1	43,043	230	56,6	-		
10	-			-			43,097	280	24	-		
11	32,632	230	4652	39,44	230	70,6	-			-		
12	-			-			-			-		
13	-			39,445	230	1267,3	-			-		
14	-			-			-			-		
15	-			-			42,891	320	21,5	-		
16	-			-			-			-		
17	32,673	230	6,3	-			43,074	320	15,5	-		
18	-			39,415	230	1723,6	43,614	320	9,3	-		
19	-			-			42,862	320	7	-		
20	-			-			-			-		
21	-			-			-			-		
22	-			-			-			48,727	280	205
23	-			-			43,706	320	10	-		
24	-			-			-			-		
25	-			-			42,991	230	63	-		
26	-			40,236	280	36,6	-			-		
27	-			-			43,787	320	8,5	-		
28	-			-			42,833	320	5,8	-		

29	-			-			-			-		
30	-			39,297	280	10,5	-			-		
Δείγματα	Λουτεολίνη			Κατεχίνη			Απιγενίνη			Επικατεχίνη		
	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area	RT	$\lambda_{\max}$	Area
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54,777	230	60,6
2	49,748	280	5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	24,509	230	34686,5	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	24,557	230	7082,1	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	24,049	230	34589,1	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	65,439	280	22,8	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54,4	230	60,1
10	-	-	-	-	-	-	66,037	360	25,8	-	-	-
11	-	-	-	24,613	230	2976,2	65,894	360	14,5	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	24,648	230	12438,7	66,112	360	8,1	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	24,371	230	273,8	65,759	360	12,4	-	-	-
16	-	-	-	24,135	230	11418,9	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	24,933	320	7,5	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	24,657	230	12681,7	-	-	-	54,236	320	5,9
20	-	-	-	-	-	-	65,534	360	10,5	54,152	320	9
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	62,071	280	97,02	-	-	-
23	-	-	-	24,976	230	146,8	65,116	360	6,3	-	-	-
24	-	-	-	24,777	230	313,4	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	65,392	360	9,6	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Η ανάλυση των φαινολικών συστατικών έδειξε ότι στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα κελυφωτού φιστικιού υπάρχουν οι απλές φαινόλες και τα φλαβονοειδή του πίνακα Γ.10.

Πίνακας Γ.10. Δομές φαινολικών συστατικών που υπάρχουν στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα κελυφωτού φιστικιού.

Ονομασία	Δομή	Ονομασία	Δομή
Φλωρογλουκινόλη		Συναπικό οξύ	

Γαλλικό οξύ		Φερουλικό οξύ	
Ρεσορκινόλη		Ροσμαρινικό οξύ	
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ		Εριοδικτυόλη	
Επικατεχίνη		Κερκετίνη	
Βανιλικό οξύ		Ναρινγκενίνη	
Συριγγικό οξύ		Λουτεολίνη	
4-κουμμαρικό οξύ		Απιγενίνη	

Συζήτηση

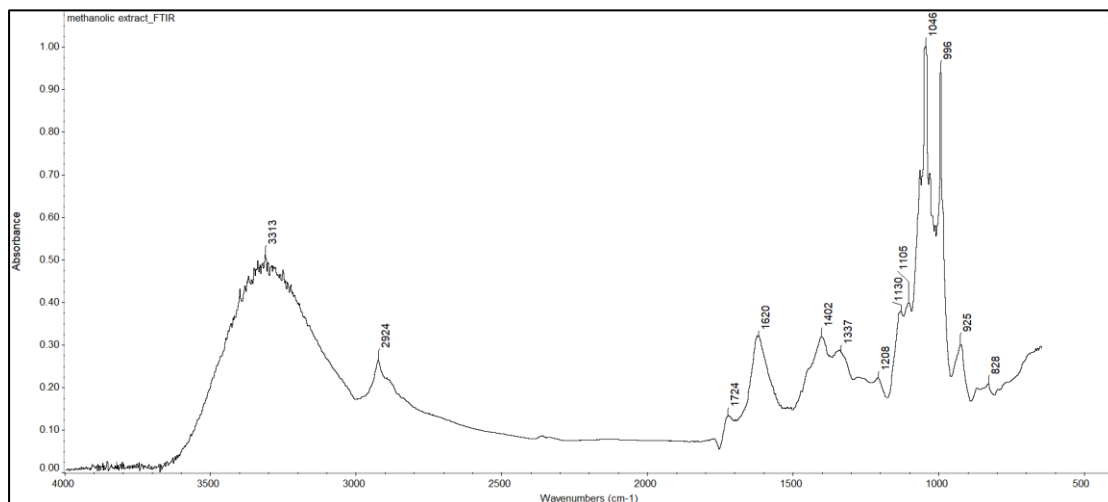
Σύμφωνα με τη μελέτη των Fattahifar *et al.* (2018), στο κέλυφος των κελυφωτών φιστικιών προσδιορίστηκαν ως βασικά αντιοξειδωτικά συστατικά τα εξής :φλωρογλουκινόλη, γαλλικό οξύ, ναρινγκίνη, βανιλικό οξύ, κατεχίνη, και πρωτοκατεχουικό οξύ. Εκτός από ναρινγκίνη και πρωτοκατεχουικό οξύ, τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με την παρούσα μελέτη.

Τα γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχουικό οξύ, η κατεχίνη, καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το συναπικό οξύ, η ναρινγκενίνη, χλωρογενικό οξύ , π-κουμαρικό οξύ, η ρουτίνη, η ρεσβερατρόλη, το βανιλικό οξύ , η καμφερόλη, η κερκετίνη και η λουτεολίνη ήταν τα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα του φιστικιού, με την κατεχίνη να είναι η κυρίαρχη πολυφαινόλη (Juhaيمي *et al.*, 2018). Η πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων βρέθηκε παρόμοια με την παρούσα ερευνητική μελέτη με εξαίρεση τα πρωτοκατεχουικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κερκετίνη , ρεσβερατρόλη, καφεϊκό οξύ, ρουτίνη και καμφερόλη.

Η ανάλυση των Garavand, Madadlou, Moini (2017) με HPLC-MS έδειξε αυξημένες ποσότητες βανιλικό οξέος, π-κουμαρικό οξύ, ναρινγκενίνη και κατεχίνη και ύπαρξη φλωρογλουκινόλη και συναπικό στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα του κελύφους κελυφωτού φιστικιού, που παραλήφθηκαν με εκχύλιση υποβοηθούμενη από λουτρό υπερήχων. Στη μελέτη των Sonmezdag, Kelebek, Selli (2017), που αφορούσε το φαινολικό προφίλ κελυφωτών φιστικιών *Pistacia vera* L. cv. Uzun, αναγνωρίστηκαν συνολικά 12 φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων έξι φαινολικών οξέων, πέντε φλαβονολών και μίας φλαβάν-3-όλης. Συγκεκριμένα, καφεϊκό οξύ, , π-κουμαρικό οξύ , γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχουικό οξύ, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ, εριοδικτυόλη-7-O-γλυκοζίτης, ρουτίνη, ναρινγκίνη, εριοδικτυόλη και λουτεολίνη. Επιπλέον οι κύριες ενώσεις που εντοπίστηκαν οι Martínez *et al.* (2016) ήταν κατεχίνη, γαλλικό οξύ, εριοδικτυόλη και κυανιδίνη-3-O-γαλακτοζίτης. Μόνο η τελευταία ένωση δεν έρχεται σε συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Κοιτώντας παλαιότερες έρευνες οι Seeram *et al.*(2015) ταυτοποίησαν σε φιστίκια ρουτίνη, κερκετίνη, λουτελίνη, ναρινγκενίνη, απιγενίνη και εριοδικτυόλη. Εκτός από τις ανθοκυανίνες, αυτά τα φλαβονοειδή αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στο φιστίκι. Οι Ballistreri *et al.* επιβεβαίωσαν την παρουσία κερκετίνης, λουτεολίνης, εριοδικτυόλης, και ναρινγκενίνης σε μη αποφλοιωμένους πυρήνες φιστικιού. Τέλος σε μία παλαιότερη μελέτη το 2007 μελετήθηκε από τους Gentile *et al* (2007) το υδρόφιλο τμήμα του εκχυλίσματος φιστικιού το οποίο αποδείχθηκε πλούσια πηγή πολυφαινολών μεταξύ των οποίων η trans-ρεσβερατρόλη, προανθοκυανιδίνες και μια αξιοσημείωτη ποσότητα των ισοφλαβονών νταϊντζίνη και γενιστείνη. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα γιατί τα φαινολικά συστατικά νταϊντζίνη και γενιστείνης δεν εντοπίστηκαν κατά τον ποιοτικό προσδιορισμό με HPLC.

Γ.7 ΜΕΛΕΤΗ ΥΔΡΟΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ FTIR

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη μάς απασχολεί η περιοχή MIR του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που βρίσκεται μεταξύ 4000 και 400 cm^{-1} . Η Εικ. Γ.37 απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα FTIR ενός δείγματος υδρομεθανολικού εκχυλίσματος κελυφωτού φιστικιού με τις κυριότερες κορυφές σημειωμένες. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο κυματαριθμό που αποδίδεται σε συγκεκριμένες δονήσεις και χημικές δομές των φαινολικών συστατικών (Πίνακας Γ.11).



Εικόνα Γ.37. Αντιπροσωπευτικό φάσμα FTIR υδρομεθανολικού εκχυλίσματος κελυφωτού φιστικιού.

Πίνακας Γ.11. Απόδοση κορυφών του φάσματος FTIR υδρομεθανολικού εκχυλίσματος κελυφωτού φιστικιού.

Κυματαριθμός (cm^{-1})	Λειτουργική ομάδα	Χημικό συστατικό	Σύντμηση	Βιβλιογραφική αναφορά
3313	O-H (τάση)	φαινόλες, αλκοόλες	$\nu(\text{O-H})$	(Rafiee <i>et al.</i> , 2017· Senthilkumar <i>et al.</i> , 2017)
2924	C-H (ασύμμετρη τάση αρωματικού δακτυλίου)	αρωματικές ενώσεις	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$	(Okur <i>et al.</i> , 2019· Senthilkumar <i>et al.</i> , 2017)
	C-H (ασύμμετρη τάση των CH_2 των ανθρακικών αλυσίδων)	αλκάνια	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$	(Rafiee <i>et al.</i> , 2017· Senthilkumar <i>et al.</i> , 2017)
	O-H (τάση)	καρβοξυλικά οξέα	$\nu(\text{O-H})$	(Senthilkumar <i>et al.</i> , 2017)
1724	C=O (τάση)	φλαβονοειδή, πολυφαινόλες, κατεχίνες	$\nu(\text{C=O})$	(Okur <i>et al.</i> , 2019· Rafiee <i>et al.</i> , 2017· Senthilkumar <i>et al.</i> , 2017)
1620	C = C (τάση)	αρωματικές ενώσεις	$\nu(\text{C=C})$	(Senthilkumar <i>et al.</i> , 2017)
1402	C-C (τάση αρωματικού δακτυλίου)	αρωματικές ενώσεις	$\nu(\text{C-C})$	(Senthilkumar <i>et al.</i> , 2017)
1337, 1208, 1130, 1105, 1046	C-O (τάση)	αλκοόλες, εστέρες,	$\nu(\text{C-O})$	(Okur <i>et al.</i> , 2019· Rafiee <i>et al.</i> , 2017·

		καρβοξυλικά οξέα		Senthilkumar <i>et al.</i> , 2017)
996, 925, 828	Μονοκυκλικές ή/και πολυκυκλικές ενώσεις			(Demiral, Gülmezoğlu Atilgan, Sensöz, 2008)

Αναλύοντας τον Πίνακα Γ.11 σε σχέση με τα φάσματα των δειγμάτων, παρατηρήθηκαν ομοιότητες μεταξύ τους στις φασματικές περιοχές. Σύμφωνα με τον Rafiee *et al.*, (2017) οι κορυφές στον κυματαριθμό 3313 cm^{-1} είναι η δόνηση τάσης του O-H των φαινολικών ομάδων και υδροξυλομάδων, στον κυματαριθμό 1724 cm^{-1} οφείλεται στην ύπαρξη καρβονυλικού οξέος, ενώ οι κορυφές 1337, 1208, 1130, 1105, 1046 cm^{-1} οφείλονται στην ύπαρξη C-O δεσμών.

Όσον αφορά την κορυφή στον κυματαριθμό 2924 cm^{-1} σύμφωνα με τις ερευνητικές ομάδες των Okur *et al.*, (2019), Senthilkumar *et al.*, (2017) και Rafiee *et al.*, (2017) οφείλεται στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης των C-H δεσμών αρωματικών ενώσεων ή/και αλκανίων ή/ και στην ύπαρξη καρβονυλικών οξέων (O-H).

Επιπλέον, σύμφωνα με Senthilkumar *et al.*, (2017) η δόνηση στα 1620 cm^{-1} οφείλεται στους αρωματικούς διπλούς δεσμούς C=C ενώ η δόνηση στα 1402 cm^{-1} στην τάση C-C των αρωματικών δακτυλίων. Τέλος οι κορυφές στα 996, 925, 828 cm^{-1} οφείλονται σε μονοκυκλικές ή/και πολυκυκλικές ενώσεις σύμφωνα με τους Demiral, *et al* (2008).

Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετά από την διερεύνηση χημικών συστατικών, 30 δειγμάτων κελυφωτού φιστικιού (*Pistacia vera*) ελληνικής προέλευσης ποικιλίας «Αιγίνης», από διάφορες γεωγραφικές περιοχές καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Το ποσοστό ολικού λίπους παρουσιάζει μικρές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που μπορεί να οφείλεται σε ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες και κυμάνθηκε μεταξύ 52.53 - 64.83% με μέση τιμή $59.55 \pm 2.81\%$.
- Το ποσοστό ολικού λίπους φαίνεται να ομοιάζει με ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Τουρκία με μέση τιμή περιεκτικότητας $59,69 \pm 1,80\%$.
- Η αντιοξειδωτική ικανότητα των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων όπως προσδιορίστηκε από τη δοκιμή DPPH κυμάνθηκε μεταξύ 0,04-11,63 mM με μέση τιμή $2,22 \pm 2,30$ mM Trolox. Η παρεμποδιστική δράση κυμάνθηκε μεταξύ 0,61-40,90% με μέσο όρο $10,35 \pm 8,55\%$.
- Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με τη δοκιμή ABTS κυμάνθηκε μεταξύ 8,06-10,26 mM με μέση τιμή $9,97 \pm 0,42$ mM. Η παρεμποδιστική δράση κυμάνθηκε μεταξύ 77,12-99,56% με μέση τιμή $96,73 \pm 4,25\%$.
- Οι διαφορές που παρουσιάστηκαν στις δοκιμές DPPH και ABTS σχετίζονται με την φύση του εκχυλίσματος καθώς η πρώτη εφαρμόζεται κυρίως σε υδατικά εκχυλίσματα ενώ η δεύτερη λειτουργεί εξίσου σε υδατικά και λιπόφιλα εκχυλίσματα. Συνεπώς η εκτέλεση και των δύο κρίθηκε απαραίτητη για την σύγκριση των αποτελεσμάτων.
- Υπάρχει πιθανότητα η ποικιλία Αιγίνης να εμφανίζει εντονότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από την Ιταλική ποικιλία Bronte.
- Δεν παρουσιάστηκε αναλογική συσχέτιση της περιεκτικότητας υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων και της παρεμποδιστικής τους δράσης, πράγμα που μπορεί ενδεχομένως να αποδοθεί στο ότι κατά την παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων δεν εκχυλίζονται μόνο φαινολικά συστατικά που συνδέονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα.
- Μέσω της χρωματογραφικής μελέτης (HPLC/DAD, HPLC/MS) των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκαν ποιοτικά τα κυριότερα φαινολικά τους συστατικά : φλωρογλουκινόλη, συναπικό οξύ, γαλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, ρεσορκινόλη, ροσμαρινικό οξύ, 4-υδρόξυβενζοϊκό οξύ, εριοδυκτυόλη, επικατεχίνη, κερκετίνη, βανιλικό οξύ, ναρινγκενίνη, συριγγικό οξύ, λουτεολίνη, 4-κουμαρικό οξύ και απιγενίνη.

- Δεν εντοπίστηκαν ίχνη νταιζδεΐνης και γενιστεΐνης κατά τον ποιοτικό προσδιορισμό με HPLC.
- Η παρούσα μελέτη έρχεται σε αντίθεση αποτελέσματα φιστικελαίου ποικιλίας Bronte καθώς στο φιστικέλαιο από ελληνικό κελυφωτό φιστίκι ποικιλίας Αιγίνης προσδιορίστηκαν και τα τέσσερα ισομερή της βιταμίνης E (α-, β-, γ- και δ-T).
- Η γ-T συνεκλύεται με τη β-τοκοτριενόλη και ως αποτέλεσμα το υπολογισμένο περιεχόμενο της γ-T περιλαμβάνει και τα δύο ισομερή της βιταμίνης E κατά τον προσδιορισμό με HPLC- Fluorescence Detector.
- Η περιεκτικότητα σε β-T βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.
- Τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν και φασματοσκοπικά (UV-Vis, FTIR) και αποδόθηκαν οι βασικές κορυφές, οι οποίες αποδίδονται σε συγκεκριμένες δονήσεις και χημικές δομές των φαινολικών συστατικών οι οποίες συμφωνούν με την βιβλιογραφία.

Ε.ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

- Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να χρησιμοποιηθούν από επόμενους ερευνητές ώστε να γίνει η σύγκριση των χημικών χαρακτηριστικών του φιστικιού με άλλες ποικιλίες.
- Θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί εάν υπάρχουν ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές στα χημικά χαρακτηριστικά των φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης σε διαφορετικά γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας.
- Ερευνητές θα μπορούσαν να συσχετίσουν τα φασματοσκοπικά δεδομένα με τα χρωματογραφικά με την πιθανότητα να σημειωθεί διαφοροποίηση των δειγμάτων καθώς οι φασματοσκοπικές τεχνικές παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των χρωματογραφικών διότι είναι πιο γρήγορες, αυτοποιημένες και φιλικότερες προς το περιβάλλον

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΙΕΘΝΗΣ

Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhoo, K., Keefe, S.O. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins using response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 3064-3072.

Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food Chemistry*, 4th ed., Springer: Berlin, Germany, 2011.

Bolling, B.W. Almond Polyphenols: Methods of Analysis, Contribution to Food Quality, and Health Promotion. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, 16, 346-368.

Corradini D. *International Handbook of HPLC*, 2nd ed., CRC Press: Florida, USA, 2011.

Dai, J., Mumper, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules* **2010**, 15, 7313-7352.

Demiral, I., Gülmezoğlu Atilgan, N., Sensöz, S. Production of biofuel from soft shell of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Chem Eng Commun.* **2008**, 196, 104-115.

Dermeche, S., Nadoura, M., Larroche, C., Mouliti-Mati, F., Michaud, P. Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem* **2013**, 48, 1532-1552.

Duke, J.A. *Handbook of Nuts*, CRC Press: Florida, USA, 1989.

Fattahifar, E., Barzegar, M., Gavligi, H.A., Sahari, M.A. Evaluation of the inhibitory effect of pistachio (*Pistacia vera* L.) green hull aqueous extract on mushroom tyrosinase activity and its application as a button mushroom postharvest anti-browning agent. *Postharvest Biol Technol* **2018**, 145, 157-165.

Ferguson, L., Polito, V., Kallsen, C. The pistachio tree: Botany and physiology and factors that affect yield. In *Pistachio production manual*, L. Ferguson, University of California Inc: USA, 2005, pp. 31-39.

Fusco, V., Besten, H. M. W., Logrieco, A. F., Rodriguez, F. P., Skandamis, P. N., Stessl, B., Teixeira, P. Food safety aspects on ethnic foods: toxicological and microbial risks. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, 6, 24-32.

Garavand, F., Madadlou, A., Moini, S. Determination of phenolic profile and antioxidant activity of pistachio hull using high performance liquid chromatography diode array detector. *Int. J. Food Prop.* **2017**, 20, 19-29.

Gentile, C., Tesoriere, L., Butera, D., Fazzari, M., Monastero, M., Allegra, M., Livrea, M.A. Antioxidant Activity of Sicilian Pistachio (*Pistacia vera* L. Var. Bronte) Nut Extract and Its Bioactive Components. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 643-648.

Halvorsen, B.L., Carlsen, M.H., Phillips, K.M., Bohn, S.K., Holte, K., Jacobs, D.R.Jr., Blomhoff, R. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr* **2006**, *84*, 95-135.

Han, X., Shen, T., Lou, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mole. Sci.* **2007**, *8*, 950-988.

Harborne, J.B. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 2nd ed., Springer: Berlin, Germany, 1990.

Harris, D.C. Quantitative Chemical Analysis, 9th ed., W. H. Freeman and Company: New York, USA, 2015.

Herrera, E. Growing pistachio in New Mexico. Coop Ext Serv Circ 532, 1997.

Juhaimi, F.A., Ozcan, M.M., Ghafoor, K., Babiker, E.E., Hussain, S. Comparison of cold-pressing and soxhlet extraction systems for bioactive compounds, antioxidant properties, polyphenols, fatty acids and tocopherols in eight nut oils. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 3163-3173.

Kallsen, C.E., Parfitt, D.E., Maranto, J., Holtz, B.A. New pistachio varieties show promise for California cultivation. *Calif Agric* **2009**, *63*, 18-23.

Karvela, E., Makris, D.P., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V.T. The effect of pH on the Efficiency of Vinification By-Product Extracts to Inhibit Lipid Peroxidation in a Lecithin Liposome Model Matrix. *J. Food Qual.* **2011**, *34*, 299-305.

Kaya-Celikera, H., Mallikarjunana, P. K., Dalay, O. Determination of aflatoxin level in peanut paste using Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection. In *Applying Advances in Food Process Engineering in a Changing World: The Industry Perspective*, P.S. Taoukis, N.G. Stoforos, V.T. Karathanos, G.D. Saravacos, Springer: Berlin, Germany, 2011, pp. 141-152.

Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **2013**, *18*, 2328-2375.

Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G.Y., Liao, J., Yang, C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigation. *Am J Clin Nutr* **2005**, *81*, 284S-291S.

Lashgarara, F., Mirdamadi, S.M., Mirzaei, S. Implications and challenges of agricultural extention in marketing of pistachios (Rafsanjan city, Iran). *J Agric Biol Sci* **2012**, *7*, 46-49.

Lule, S.U., Xia, W. Food phenolics, proc and cons: A review. *Food Rev Int* **2005**, *21*, 367-388.

Mahmoudi, A., Mahmoud, O., Aghagolzadeh, A., Borgayee, A.M. Grading of Iranian's export pistachio nuts based on artificial neural networks. *Int J Agric Biol* **2006**, 8, 371-376.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **2004**, 79, 727-747,

Martínez, M.L., Fabani, M.P., Baroni, M.V., Huaman, R.N.M., Ighani, M., Maestri, D.M., Wunderlin, D., Tapia, A., Feresin, G.E. Argentinian pistachio oil and flour: a potential novel approach of pistachio nut utilization. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, 53, 2260–2269.

Masoumi, M., Mehrabian, S., Rahimi, M.K., Bagheri, F., Masoumi, H. Evaluation of Antimutagenic and Anticarcinogenic Effects of Phenolic Compounds in Fresh and Dried Kernels of Pistachio, Hazelnut and Walnut. *Res J Pharm Biol Chem Sci* **2014**, 5, 1311-1319.

Meireles, M.A.A. *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*, 1st ed., CRC Press: Florida, USA, 2009.

Minioti, K.S., Georgiou, C.A. Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas y Aceites* **2010**, 61, 45-51.

Mokhtarpour, A., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Mesgaran, M.D., Pourmollae, F. Extraction of Phenolic Compounds and Tannins from Pistachio By-products. *Annu Res Rev Biol*, **2014**, 4, 1330-1338.

Ojeda-Amador, R.M., Fregapane, G., Desamparados, S.M. Composition and properties of virgin pistachio oils and their by-products from different cultivars. *Food Chem.* **2018**, 240, 123-130.

Okur, I., Baltacioğlu, C., Ağçam, E., Baltacioğlu, H., Alpas, H. Evaluation of the Effect of Different Extraction Techniques on Sour Cherry Pomace Phenolic Content and Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds by FTIR and HPLC. *Waste Biomass Valori* **2019**, 10, 3545-3555.

Paiva, S.A.R., Russell, R.M. b-Carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr* **1999**, 18, 426-433.

Pretsch, E., Bühlmann, P., Badertscher, M. *Structure Determination of Organic Compounds*, 4th ed., Springer: Berlin, Germany, 2009.

Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, 82, 513-523.

Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M.A., Maherani, B. Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high-valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chem* **2017**, 220, 115-122.

Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A.M., Sahari, M.A., Esfahani, Z.H. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 107-112.

Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., Golmohammadzadeh, S. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food Chem.* **2015**, *173*, 577-583.

Rice-Evens, C.A., Millew, N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **1996**, *20*, 933-956.

Ryan, D., Robards, K., Lavee, S. Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int J Food Sci Tech* **1999**, *34*, 265-274.

Saitta, M., Loredana La Torre, G., Potorti, A.G., Bella, G.D., Dugo, G. Polyphenols of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Oil Samples and Geographical Differentiation by Principal Component Analysis. *J Am Oil Chem Soc* **2014**, *91*, 1595-1603.

Schulze-Kaysers, N., Feuereisen, M.M., Schieber, A. Phenolic compounds in edible species of the Anacardiaceae family-a review. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 73301-73314.

Senthilkumar, S.R., Sivakumar, T., Arulmozhi, K.T., Mythili, N. FT-IR analysis and correlation studies on the antioxidant activity, total phenolics and total flavonoids of Indian commercial teas (*Camellia sinensis* L.)-A novel approach. *Int. Res. J. Biological Sci.* **2017**, *6*, 1-7.

Servili, M., Montedoro, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 602-613.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed., Saunders College: Philadelphia, USA, 1998.

Smita, T., Mishra, H.N. A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control* **2009**, *20*, 840-846.

Sonmezdag, A.S. Kelebek, H., Selli, S. Pistachio oil (*Pistacia vera* L. cv. Uzun): characterization of key odorants in a representative aromatic extract by GC-MS-olfactometry and phenolic profile by LC-ESI-MS/MS. *Food Chem.* **2018**, *240*, 24-31.

Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res* **2005**, *579*, 200-213.

Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268-3295.

Taghizadeh, S.F., Rezaee, R., Davarynejad, G., Karimi, G., Nemati, S.H., Asili, J. Phenolic profile and antioxidant activity of *Pistacia vera* var. Sarakhs hull and kernel

extracts: the influence of different solvents. *J Food Meas Charact.* **2018**, 12, 2138-2144.

Tasioula-Margari, M., Tsabolatidou, E. Extraction, Separation and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS, *Antioxidants* **2015**, 4, 548-562.

Tomaino A., Martorana M., Arcoraci T., Monteleone D, Giovinazzo C., Saija A. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins, *Biochimie*, **2010**, 1115-1122

Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y.M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., Garciglia, R.S. Antioxidant Activity of the Essential Oil and its Major Terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacogn. Mag.* **2018**, 13, 875-880.

Tsantili, E., Konstantinidis, K., Christopoulos, M.V., Roussos, P.A. Total phenolics and flavonoids and total antioxidant capacity in pistachio (*Pistachia vera* L.) nuts in relation to cultivars and storage conditions. *Sci Hort* **2011**, 129, 694-701.

Vita, J.A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* **2005**, 81, 292S-297S.

Walheim, R., Walheim, L. Western Fruit and Nuts, HP Books, Inc.: Tucson, AZ, 1981, p. 166.

Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 701-705.

Wang, S.Y., Stretch, A.W. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 969-974.

Waterhouse, A.L. Determination of total phenolic compounds. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, R.E. Wrolstad, T.E. Acree, H. An, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, P. Sporns, Wiley: New Jersey, USA, 2002, pp. I1.1.1-I1.1.8.

Yıldız, M., Gürcan, S.T., Özdemir, M. Oil Composition of Pistachio Nuts (*Pistacia vera* L.) from Turkey *TÜBİTAK Marmara Research Center, Food Science and Technology Research Institute*, **1998**, 100 (3), 84-86

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Αλυφαντή, Κ. Οι τοπικές καλλιέργειες και η βιώσιμη τοπική ανάπτυξη: η περίπτωση της φιστικοκαλλιέργειας του Δήμου Αίγινας. Μεταπτυχιακή μελέτη, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα, 2013.

Βαλάση, Λ. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια και φιστικέλαιο Αιγίνης με τις φασματοσκοπικές τεχνικές FTIR και Raman. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016.

Βασιλακάκης, Μ.Δ. *Στοιχεία Γενικής και Ειδικής Δενδροκομίας*, Γαρταγάνη: Θεσσαλονίκη, 2010.

Γεωργιάδου, Μ. Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009.

Γεωργιάδου, Μ. Μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών με στόχο τη μείωση της αφλατοξίνης. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015.

Δημητρίου, Στ., Συνάμογλου, Σ. Προσδιορισμός φλαβονοειδών και φαινολών σε φυτά της οικογένειας Solanaceae. Πτυχιακή μελέτη, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, 2014.

Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούτης, Χρ., Παπαϊωάννου, Άγγ., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ.Ε., Φούντζουλα, Χρ. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. Στο *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας*, Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούτης, Χρ., Παπαϊωάννου, Άγγ., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ.Ε., Φούντζουλα, Χρ., Κάλλιπος Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα: Αθήνα, Ελλάδα, 2015.

Κουβουτσάκης, Π.Γ. Γεωγραφική ταξινόμηση οσπρίων φακής (*Lens culinaris* L.) με χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας συνδυασμένης με χημειομετρικές μεθόδους. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2013.

Μπισμπίκης, Μ. Προσδιορισμός και αξιολόγηση των διατιθέμενων προς απορρόφηση αντιοξειδωτικών από Μεσογειακά ξηρά φρούτα. Πτυχιακή εργασία, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 2017.

Παππάς, Χ. Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού κενάφ (*Hibiscus cannabinus* L.). Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2000.

Ποντίκης, Κ.Α. *Ειδική δενδροκομία*, Σταμούλης: Αθήνα, 1996.

Ταραντίλης, Π. Τεχνικές εκχύλισης και απόσταξης, χρωματογραφικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης-Παραλαβή, διαχωρισμός, απομόνωση, καθαρισμός και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2004.

Τσιμογιάννης, Δ. Αντιοξειδωτική Δράση Φλαβονοειδών Ενώσεων και Εκχυλισμάτων Αρωματικών Φυτών: Αναγωγή Ελευθέρων Ριζών και Προστασία Φυτικών Ελαίων. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2008.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

ΕΛΣΤΑΤ. ... <<https://www.statistics.gr/>> (24 Μαρτίου 2020)

EUROSTAT. ... <<https://ec.europa.eu/eurostat/home?>> (24 Μαρτίου 2020)

PerkinElmer Life and Analytical Sciences. «FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR)». 2005 <http://www.uts.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf> (24 Μαρτίου 2020)

Thermo Spectronic. «Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications». 2013 <http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/359201.PDF> (18 Μαρτίου 2020)