



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη του σχηματισμού α-δικαρβονυλικών ενώσεων από λιπαρές ύλες
(ελαιόλαδο, σπορέλαια)

Κωνσταντίνα Δ. Βαρδακά

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη καθηγήτρια ΓΠΑ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη του σχηματισμού α-δικαρβονυλικών ενώσεων από λιπαρές ύλες
(ελαιόλαδο, σπορέλαια)

“Study of the formation of α-dicarbonyl compounds in different lipid matters
(olive oil, vegetable oils)”

Κωνσταντίνα Δ. Βαρδακά

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μαρία Καψοκεφάλου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη του σχηματισμού α-δικαρβονυλικών ενώσεων από λιπαρές ύλες (ελαιόλαδο, σπορέλαια)

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) θεωρείται ως ένα από τα πολυτιμότερα συστατικά της Μεσογειακής διατροφής συμβάλλοντας σε μια πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων για την ανθρώπινη υγεία. Τα οφέλη αυτά απορρέουν από τη μοναδική χημική του σύσταση που περιλαμβάνει υψηλό ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων και αντιοξειδωτικά συστατικά όπως διάφορες φαινολικές ενώσεις και βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη). Γι' αυτό το σκοπό έχει μελετηθεί η επίδραση των συστατικών αυτών στην ποιότητα του EVOO κατά τη διάρκεια έντονων θερμικών διεργασιών (π.χ. μαγείρεμα). Τα σπορέλαια χρησιμοποιούνται για μαγείρεμα από την αρχαιότητα λόγω των οργανοληπτικών ιδιοτήτων που προσδίδουν στα τρόφιμα. Ωστόσο, πλήθος ερευνών αναφέρουν πως τα βρώσιμα αυτά έλαια έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν ενώσεις μικρού μοριακού βάρους όταν εκτεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες. Ανάμεσα σε αυτές τις ενώσεις περιλαμβάνονται οι α-δικαρβονυλικές ενώσεις όπως η γλυοξάλη (GO), η μεθυλογλυοξάλη (MGO) και το διακετύλιο (DA). Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των α-δικαρβονυλικών ενώσεων σε δείγματα EVOO και σπορέλαιων τα οποία υποβλήθηκαν σε έντονη θερμική επεξεργασία. Παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση των φαινολικών συστατικών, στο σχηματισμό των ενώσεων αυτών. Τέλος, με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, έγινε προσπάθεια να συνδεθεί ο βαθμός ακορεστότητας των λιπαρών οξέων των ελαιόλαδων και σπορέλαιων με την παραγωγή α-δικαρβονυλικών ενώσεων.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν αφορούν εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης (Κρήτη και Λέσβος) και της ίδιας ποικιλίας (Κορωνέικη) και έξι δείγματα σπορέλαιων (αραβοσιτέλαιο, ηλιέλαιο, σησαμέλαιο, πυρηνέλαιο, λάδι καρύδας και φοινικέλαιο). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των α-δικαρβονυλικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή αζώτου -φωσφόρου (GC-NPD) αφού είχε προηγηθεί η μετατροπή τους σε παράγωγα κινοξαλινών. Μεταξύ των δειγμάτων βρέθηκε πως το DA είναι η κύρια α-δικαρβονυλική ένωση σε ποσοστό 86,5% ενώ ακολουθεί η MGO και τέλος η GO σε ποσοστά 7,5 και 6,0% αντίστοιχα. Τα δείγματα ελαιόλαδου εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό DA (91,0%) και τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε GO (1,0%). Το λάδι καρύδας κατέχει τα υψηλότερα ποσοστά MGO (16,0%) και GO (13,0%). Ο παράγοντας φαινολικά φαίνεται να επιδρά στατιστικώς σημαντικά στην παραγωγή α-δικαρβονυλικών ενώσεων. Τέλος, ο βαθμός ακορεστότητας των λιπαρών οξέων επηρεάζει την παραγωγή GO, MGO και DA με τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFAs) να εμφανίζουν θετική επίδραση στην παραγωγή GO και MGO και αρνητική στην παραγωγή DA.

Επιστημονική περιοχή: Ανάλυση ελαιολάδου

Λέξεις Κλειδιά: Γλυοξάλη, μεθυλογλυοξάλη, διακετύλιο, α-δικαρβονυλικές ενώσεις,εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, σπορέλαια, GC-NPD

Study of the formation of α -dicarbonyl compounds in different lipid matters (olive oil, vegetable oils)

MSc Food, Nutrition and Health

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Chemistry and Food Analysis

ABSTRACT

Extra virgin olive oil (EVOO) is responsible for a large part of many health benefits associated with the Mediterranean diet as it is a fundamental ingredient of this diet. The peculiarities of this highly valued product are in part due to its unique chemical composition such as unsaturated fatty acids, as well as tocopherols (Vitamin E) or phenolic compounds. Several studies have been conducted to evaluate the effect of these compounds on quality under simulated cooking conditions. Edible oils have been used for cooking since ancient times. Deep fat frying produces desirable flavors and tastes in various fried foods. On the other hand, many studies have demonstrated that edible oils form diverse low molecular weight carbonyl compounds upon heat treatment. Among these carbonyl compounds, α -dicarbonyl compounds such as glyoxal (GO), methylglyoxal (MGO), and diacetyl (DA), reportedly cause numerous diseases. In the present study, GL, MGO, and DA were analyzed in different cooking oil samples during a high-temperature heating procedure. Besides, it has been evaluated the effect of total phenolic compounds on the formation of these compounds. Lastly, an attempt was made to link the degree of unsaturation of fatty acids in olive oils and seed oils with the production of α -dicarbonyl compounds, based on literature data.

Toxic α -dicarbonyl compounds, GO, MGO, and DA, released from the headspace from olive oil samples, sunflower oil, corn oil, sesame oil, kernel oil, coconut oil, and palm oil were analyzed by gas chromatography coupled with a nitrogen phosphorous detector (GC/NPD) after they were derivatized into a corresponding quinoxaline. In general, DA was formed from oil samples at the highest levels (86.5%) followed by MGO (7.5%) and GO (6.0%). Among the seven edible oils, olive oil generally yielded the highest level of DA (91.0%) and the lowest level of GO (1.0%), whereas coconut oil produced the highest levels of MGO (16.0%) and GO (13.0%). The factor *total phenolic compounds* appears to have a *statistically significant* effect on the production of α -dicarbonyl compounds. In conclusion, there is a correlation between unsaturated fatty acids and the production of these compounds. More specifically there is a positive correlation between MUFAs and the production of GO and MGO and a negative correlation between MUFAs and the production of DA.

Scientific area: Olive oil analysis

Keywords: Glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, α -dicarbonyl compounds, extra virgin olive oil, vegetable oils, GC-NPD

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, με τίτλο «Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία», στην κατεύθυνση «Χημεία Τροφίμων και Διατροφή», στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το εργαστηριακό μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Η ανάθεση και η επίβλεψη της εργασίας έγινε από την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. *Χρυσανγή Γαρδέλη*, την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ενεργή καθοδήγηση, την πολύτιμη βοήθεια και τις σημαντικές συμβουλές καθώς και για το χρόνο που αφιέρωσε για τη διόρθωση της παρούσας εργασίας. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. *Αθανάσιο Μαλλούχο* για τις συμβουλές του καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και την κα. *Μαρία Καψοκεφάλου* που μου έκανε την τιμή να αποτελεί μέλος της επιτροπής αξιολόγησης αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια Διδάκτωρ *Θεανώ Μικρού* για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές της σε όλα τα στάδια της έρευνας και συγγραφής της εργασίας καθώς επίσης και τη συνεργάτιδα μου Δήμητρα Λιακούτσου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο για την άριστη συνεργασία μας καθώς επίσης την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξαν όλο το χρονικό αυτό διάστημα.

Πίνακας Περιεχομένων

Εισαγωγή.....	1
Κεφάλαιο 1^ο – Το ελαιόλαδο	1
1.1 Νομοθεσία – Είδη ελαιόλαδου	1
1.2 Χημική Σύσταση ελαιόλαδου και σπορέλαιων.....	2
1.3 Αναλυτικές Τεχνικές	6
1.4 Οφέλη στην υγεία	7
Κεφάλαιο 2^ο – Προϊόντα προχωρημένης λιποξείδωσης (AGEs).....	8
2.1 Η αντίδραση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων.....	8
2.2 Η αντίδραση Maillard	10
2.3 Κοινά προϊόντα της αντίδρασης της υπεροξειδωσής και της αντίδρασης Maillard.....	13
2.3.1 Προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)	13
2.3.2 Γλυοξάλη (GO)	14
2.3.3 Μεθυλογλυοξάλη (MGO).....	16
2.3.4 Διακετύλιο (DA).....	17
2.3.5 Προϊόντα προχωρημένης λιποξείδωσης (ALEs)	18
2.4 Επίδραση των AGEs και ALEs στην υγεία – Τοξικότητα.....	19
Κεφάλαιο 3^ο – Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των α-DCs, AGEs, ALEs.....	20
3.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC) για τον προσδιορισμό των α -DCs	20
3.2 Τεχνικές Προσδιορισμού των AGEs	22
3.3 Τεχνικές Προσδιορισμού των ALEs.....	22
Κεφάλαιο 4^ο – Σκοπός	24
Πειραματικό Μέρος	25
Κεφάλαιο 5^ο – Μεθοδολογία Πειραμάτων	25
5.1 Υλικά και Όργανα	25
5.1.1 Αντιδραστήρια.....	25
5.1.2 Όργανα.....	25
5.1.3 Υλικά	26
5.2 Μέθοδοι.....	27
5.2.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του ολικού πολικού φαινολικού κλάσματος ελαιόλαδων και σπορέλαιων	27
5.2.2 Μελέτη της κινητικής της αντίδρασης της οξειδωσής των λιπιδίων, μέσω του ρυθμού σχηματισμού α -δικαρβονυλικών ενώσεων	31
Κεφάλαιο 6^ο – Αποτελέσματα – Συζήτηση	36

6.1 Προσδιορισμός ολικού πολικού φαινολικού κλάσματος ελαιόλαδων και σπορέλαιων	36
6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός α-δικαρβονυλικών ενώσεων σε σπορέλαια και ελαιόλαδα	39
6.2.1 Επίδραση φαινολικών συστατικών στην παραγωγή α-δικαρβονυλικών ενώσεων σε ελαιόλαδα	42
6.2.2 Επίδραση της σύστασης των λιπαρών οξέων στην παραγωγή α-δικαρβονυλικών ενώσεων σε ελαιόλαδα και σπορέλαια	45
Κεφάλαιο 7^ο – Συμπεράσματα.....	50
Κεφάλαιο 8^ο – Βιβλιογραφία	52
8.1 Ξένη Βιβλιογραφία.....	52
8.2 Ελληνική Βιβλιογραφία	58
8.3 Διαδίκτυο.....	58

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ελαιόλαδο αποτελεί προϊόν ζωτικής σημασίας για την οικονομική ευημερία και εξέλιξη των Μεσογειακών χωρών μιας και το 98% της παγκόσμιας παραγωγής παράγεται στις περιοχές αυτές (Gullón *et al.*, 2020). Η συνεχώς αυξανόμενη προτίμηση δεν οφείλεται αποκλειστικά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά αλλά και σε μια πληθώρα επιστημονικών ερευνών που αποδεικνύουν μοναδικά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Η τάση αυτή εγείρει το ενδιαφέρον ολόένα και περισσότερων ερευνητών ως προς τα βιοδραστικά του συστατικά και την υπεροχή του ως προς άλλες λιπαρές ύλες.

Κεφάλαιο 1^ο – Το ελαιόλαδο

1.1 Νομοθεσία

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius, ως ελαιόλαδο ορίζεται το έλαιο που προέρχεται αποκλειστικά από τον καρπό της ελιάς της Ευρωπαϊκής, *Olea europaea* L., με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τα πρότυπα εμπορίας του ελαιόλαδου θεσπίζονται σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 29/2012, ενώ ο Κανονισμός (ΕΕ) 1308/2013 αφορά την κοινή οργάνωση των αγορών των γεωργικών προϊόντων (OliveOil.com, 2020 ; Minagric, 2021).

Το άρθρο 73 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών ορίζει ως φυτικά έλαια και λίπη (ή σπορέλαια) τα βρώσιμα έλαια και λίπη που λαμβάνονται από τη σύνθλιψη των ελαιούχων καρπών και σπερμάτων ή την εκχύλιση τους με διαλύτες. Τα παρθένα φυτικά έλαια είναι βρώσιμα φυτικά έλαια που λαμβάνονται αποκλειστικά με μηχανικές διαδικασίες και θερμική επεξεργασία. Μπορούν να υποβληθούν μόνο σε πλύσιμο με νερό, καθίζηση, διήθηση και φυγοκέντρωση.

Είδη Ελαιόλαδου

Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου (IOC), ορίζει τα παρακάτω είδη ελαιόλαδου τα οποία παρουσιάζονται περιγραφικά στον **Πίνακα 1.1**

Πίνακας 1.1: Κατηγορίες ελαιόλαδου και χαρακτηριστικά τους. (International Olive Oil Council, 2020).

Είδη Ελαιόλαδου	Περιγραφή	Οξύτητα %	Δείκτης Υπεροξειδίων (meqO ₂ /kg)	Χοληστερόλη %
<i>Παρθένο Ελαιόλαδο</i> 1. Εξαιρετικό παρθένο 2. Κοινό Παρθένο 3. Μειονεκτικό Παρθένο, <i>la mpante</i>	Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους χωρίς να υφίσταται θερμική αλλοίωση το έλαιο.	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,5
		≤ 0,8	≤ 20	≤ 0,5
		≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,5
		> 3,3	> 20	≤ 0,5
<i>Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο</i>	Περιλαμβάνει αποχρωματισμό, απόσμηση, υδρογόνωση, εξουδετέρωση και λοιπές χημικές επεξεργασίες του ελαιόλαδου	≤ 0,3	≤ 5	≤ 0,5
<i>Ελαιόλαδο</i>	Προέρχεται από ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιόλαδου και παρθένου ελαιόλαδου εξαιρουμένου του μειονεκτικού.	≤ 1,0	≤ 15	≤ 0,5

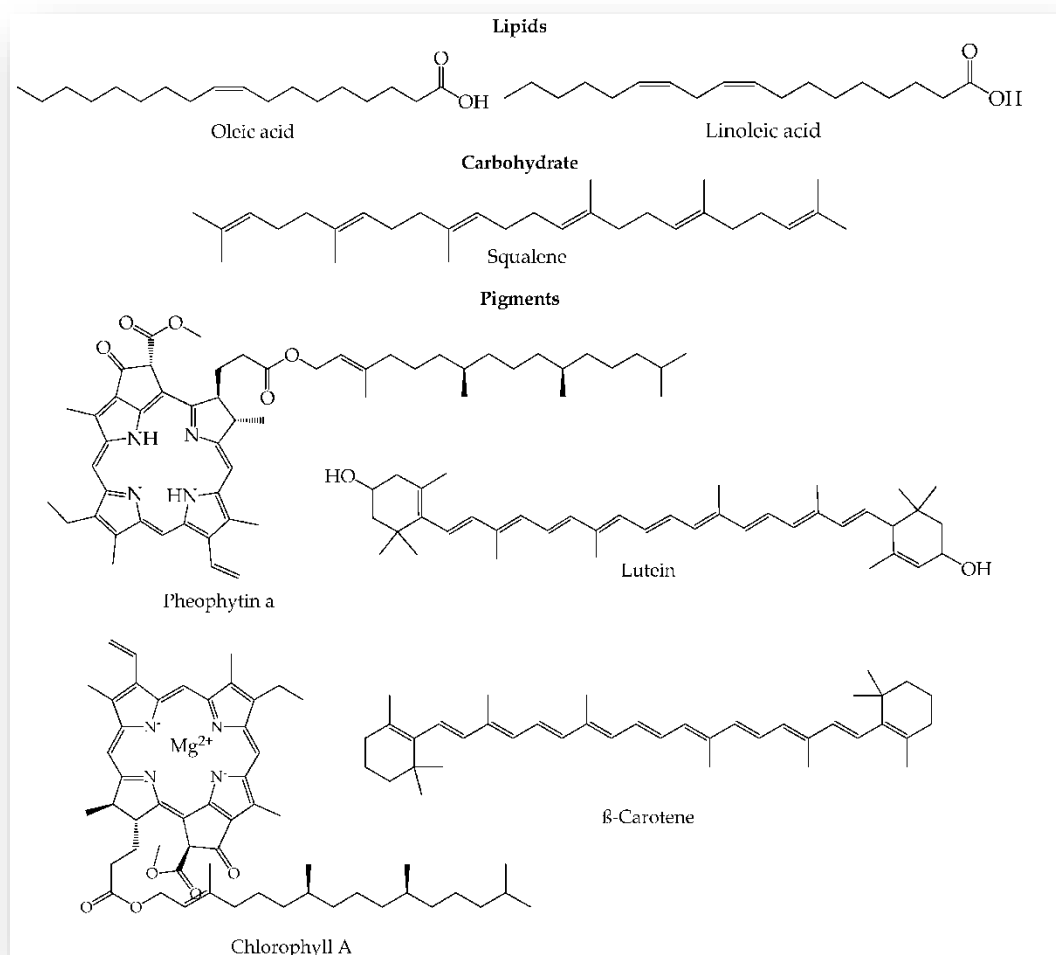
1.2 Χημική σύσταση ελαιόλαδου και σπορέλαιων

Χημική σύσταση ελαιόλαδου

Σύμφωνα με το USDA (United States Department of Agriculture) περίπου 13g ελαιόλαδου περιέχουν 119 kcal, 13,5 g λιπαρά οξέα εκ των οποίων 10 g είναι μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, 1,9 mg βιταμίνη E και 8,1 μg βιταμίνη K. Τα συστατικά του ελαιόλαδου θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Ως προς την πρώτη κατηγορία, κύριο συστατικό αποτελούν οι τριακυλογλυκερόλες (TAGs), δηλαδή το αποτέλεσμα της αντίδρασης τριών λιπαρών οξέων με ένα μόριο γλυκερόλης. Η περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) είναι 65,2 – 80,8% ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό ανήκει στο ελαϊκό οξύ (C18:1, μονοακόρεστο ω-9 λιπαρό οξύ) ακολουθεί το λινελαϊκό οξύ (C18:2, πολυακόρεστο ω-6 λιπαρό οξύ) και τέλος το παλμιτελαϊκό οξύ σε ποσοστό 3,5%. Εφόσον η περιεκτικότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) είναι 7,0 - 15,5% το ελαιόλαδο θεωρείται ελεύθερο σε *trans* λιπαρά οξέα (Foscolou, Critselis and Panagiotakos, 2018).

Σχετικά με τις στερόλες, απαντώνται τέσσερα διαφορετικά είδη που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της γνησιότητας του ελαιόλαδου μιας και η παρουσία τους συνδέεται με την ποιότητα του προϊόντος. Αυτά τα τέσσερα είδη περιλαμβάνουν τις κοινές στερόλες, τις 4α-μεθυλοστερόλες, τις τριτερπενικές

αλκοόλες και τις τριτερπενικές δι-αλκοόλες. Στο ΕVOO η τιμή τους κυμαίνεται μεταξύ 1000-2000 mg/Kg, όριο το οποίο θεσπίζεται από την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία (Jimenez-Lopez *et al.*, 2020). Από τα πιο σημαντικά συστατικά του ελαιόλαδου θεωρούνται οι τοκοφερόλες και συγκεκριμένα η α -τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε). Μπορεί να βρεθεί σε ένα εύρος τιμών 100-300 mg/Kg ελαιόλαδου και συμβάλλει στην οξειδωτική σταθερότητα λόγω φωτός μιας και αναστέλλει τη φωτοξείδωση που προκαλείται από το $^1\text{O}_2$. Σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται και οι β -, γ - και δ -τοκοφερόλη (10-20 mg/Kg). Η ολική συγκέντρωσή τους μειώνεται με τη διαδικασία της διεστεροποίησης γι' αυτό και εντοπίζονται μόνο στο ΕVOO και στο VOO. Τέλος, το σκουαλένιο είναι το πιο άφθονο συστατικό του ασαπωνοποίητου κλάσματος του ελαιόλαδου (200-7500 mg/Kg ελαιόλαδου). Συμβάλλει στην αναγέννηση της α -τοκοφερόλης αναστέλλοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που μπορεί να προκληθούν από τη δραστική ελεύθερή της ρίζας (Ambra *et al.*, 2016). Το υπόλοιπο κλάσμα υδατανθράκων στο ΕVOO αποτελείται από τριτερπένια και διτερπένια, ισοπρενοειδείς πολυολεφίνες, υδρογονάνθρακες και η -παραφίνες.



Εικόνα 1.1: Χημικές δομές σημαντικών ενώσεων του παρθένου ελαιόλαδου (Jimenez-Lopez *et al.*, 2020).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνουν τα φαινολικά συστατικά και τις χρωστικές. Όσον αφορά τα φαινολικά συστατικά, πλήθος ερευνών σχετίζεται με την απομόνωσή τους και την ταυτοποίησή τους λόγω της καλής συσχέτιση με την οξειδωτική σταθερότητα που προσφέρουν αλλά και την πρόληψη διάφορων παθήσεων. Στο ελαιόλαδο έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 36 διαφορετικές ενώσεις που κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες σύμφωνα με τη χημική τους δομή και είναι : τα φαινολικά οξέα, οι φαινόλες, τα φλαβονοειδή και οι λιγνάνες (Cicerale *et al.*, 2008).

Τα φαινολικά οξέα διαχωρίζονται σε τρεις επιπλέον κατηγορίες: (i) τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος : 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ και γεντιστικό οξύ, (ii) τα παράγωγα του κινναμικού οξέος : *o*-κουμαρικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, σιναπικό οξύ και 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ και (iii) τα παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος : *p*-υδροξυφαινυλοξικό οξύ, 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, 4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλοξικό οξύ και 3-(3,4-διυδροξυφαινυλ)προπανικό οξύ (Alu'datt *et al.*, 2017). Ως κυριότερες φλαβόνες βρέθηκαν η απιγενίνη, η λουτεολίνη και η (+)-ταξιφολίνη και ως φλαβονόλες, η καμφερόλη και η κερκετίνη (Morelló *et al.*, 2005). Στο παρθένο ελαιόλαδο ανιχνεύτηκαν και οι λιγνάνες (+)-1-ακέτοξυπινωρεσινόλη και (+)-πινωρεσινόλη σε ποσότητες που ποικίλουν από 1 έως 100 mg/Kg ελαιόλαδου (Brenes *et al.*, 2000) ενώ μέσω της τεχνικής HPLC-MS/MS απομονώθηκε μια νέα κατηγορία φαινολικών συστατικών που περιλαμβάνει τις ενώσεις 1-phenyl-6,7-dihydroxy-isochroman, 1-(3'-methoxy-4'-hydroxy)phenyl-6,7-dihydroxy-isochroman (Bianco *et al.*, 2002).

Η οικογένεια *Oleaceae*, στην οποία ανήκει και η ελιά, χαρακτηρίζεται από την παρουσία των σεκοϊριδοειδών. Χαρακτηριστικές ενώσεις της ομάδας αυτής αποτελούν η ελευρωπαΐνη και το λιγκστροσιδίο, που είναι εστέρες του ελενολικού οξέος με την 3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και με την 4-υδροξυφαινυλαιθανόλη (τυροσόλη), αντίστοιχα. Από τις ενώσεις αυτές προκύπτουν και τα παράγωγα ελαιοκανθάλη (διαλδευδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσιδίου χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα- , *p*-HPEA-EDA) και ελαιασίνη (διαλδευδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπαΐνης χωρίς την καρβοξυμεθυλομάδα, 3,4-DHPEA-EDA). Μάλιστα, στην ελαιοκανθάλη οφείλεται η αίσθηση «καψίματος» στο πίσω μέρος της γλώσσας που προέρχεται από ορισμένα ελαιόλαδα. Οι Parkinson και Keast, 2014 αναφέρουν πως ενεργοποιεί τον αισθητικό υποδοχέα TRPA1 που βρίσκεται στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα, προκαλώντας αυτή την ερεθιστική δράση. Παράλληλα οι Diamantakos *et al.*, 2015 προσδιόρισαν για πρώτη φορά ισομερείς μορφές του άγλυκου της ελευρωπαΐνης και του άγλυκου του λιγκστροσιδίου, με τις ονομασίες ελαιοκορωνάλη και ελαιομισσιονάλη.

Αναφορικά με την υδροξυτυροσόλη (HT), βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο ύστερα από το στάδιο της επεξεργασίας του

ελαιόκαρπού μιας και αποτελεί κύριο προϊόν υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης (Bertelli *et al.*, 2020). Εμφανίζει μια πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Wani *et al.*, 2018) και έχει εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) για την προστατευτική της δράση έναντι του οξειδωτικού stress (NDA, 2011). Ωστόσο μια εξίσου σημαντική ιδιότητα της HT, αφορά την ανασταλτική της δράση έναντι της MGO που παράγεται κατά τη διάρκεια της γλυκοζυλίωσης καθώς επίσης και της φρουκτοζαμίνης. Όπως αναφέρει ο Khan *et al.*, 2020 η HT αντιδρά και καταστέλλει τη δραστική καρβονυλική ομάδα της MGO. Η ανασταλτική αυτή δράση στα αρχικά στάδια της αντίδρασης Maillard οδηγεί στην αποφυγή δημιουργίας προηγμένων προϊόντων όπως N-ε-(καρβοξυμεθυλο)λυσίνη (CML).

Οι χρωστικές κατηγοριοποιούνται σε χλωροφύλλες και καροτενοειδή. Οι χλωροφύλλες (χλωροφύλλη α και β , φαιοφυτίνη α και β) είναι υπεύθυνες για το χρώμα του ελαίου. Για την Κορωνέικη ποικιλία οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 0,78-2,25 mg/Kg ελαιόλαδου (Karabagias *et al.*, 2019) και υπάρχει συμφωνία και με παλαιότερες έρευνες γι' αυτή την ποικιλία (Aparicio-Ruiz and Gandul-Rojas, 2014; Lazzerini and Domenici, 2017). Η χλωροφύλλη σε όξινο pH και σε προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης χάνει το Mg^{2+} του μορίου της και μετατρέπεται σε φαιοφυτίνη, με υψηλές συγκεντρώσεις της να υποδεικνύουν ένα παλαιό και υποβαθμισμένο δείγμα. Τα καροτενοειδή περιλαμβάνουν τις ενώσεις λουτεΐνη, β -καροτένιο, βιολαξανθίνη, νεοξανθίνη, ανθεραξανθίνη και σε μικρότερες συγκεντρώσεις β -κρυπτοξανθίνη και εστεροποιημένες ξανθοφύλλες. Σε 452 ελληνικά δείγματα φαίνεται η λουτεΐνη να είναι η κυρίαρχη χρωστική ακολουθώντας το β -καροτένιο με τη γεωγραφική προέλευση να μην επηρεάζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις τους ($p_{value}=0,17$) (Martakos *et al.*, 2019).

Χημική σύσταση σπορέλαιων

Τα εμπορικά σπορέλαια χαρακτηρίζονται ως μίγματα τριακυλογλυκερολών (TAGs, >95%) μαζί με την παρουσία τοκοφερολών/τοκοτριενολών (>900 mg/kg) και φυτοστερολών (>1%) (Hammond, 2003). Το αραβοσιτέλαιο αποτελείται από υψηλή συγκέντρωση PUFAs και συγκεκριμένα λινελαϊκό οξύ (58-62%). Αναφέρεται ως ένα από τα σπορέλαια με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φυτοστερόλες (8.300-25.500 ppm) και τοκοφερόλες (1.130-1.830 ppm) με κυριότερες τη β -σιτοστερόλη (63-70%) και τη γ -τοκοφερόλη (68-89%), αντίστοιχα. Έχει αποδειχθεί πως η γ -τοκοφερολή του αραβοσιτελαίου συμμετέχει, μεταξύ άλλων, στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και του σακχαρώδους διαβήτη (Ghazani and Marangoni, 2016). Και στην περίπτωση του ηλιέλαιου, κυριαρχούν τα PUFAs (60-70%) με κυριότερο το λινελαϊκό οξύ ενώ το ελαϊκό οξύ και το στεατικό οξύ κυριαρχούν στα MUFAs και SFA, αντίστοιχα. Εμπορικά διατίθεται σε τρία είδη ενώ για το μαγείρεμα συστήνονται τα ηλιέλαια με υψηλό ποσοστό PUFA. Είναι φυσικά εμπλουτισμένο με βιταμίνη E η οποία καταστρέφεται με τη διαδικασία του ραφινάρισματος γι' αυτό και συνήθως προστίθεται τεχνητά. Δίαιτα ενισχυμένη σε n-6 PUFAs ενισχύει την παραγωγή

προσταγλαδινών παρέχοντας αντιφλεγμονώδης δράσης. Το φοινικέλαιο εμφανίζει μια ισορροπημένη αναλογία κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα SFAs αποτελούν το 51% με το παλμιτικό οξύ να κυριαρχεί, τα MUFAs αντιπροσωπεύουν το 39% (κυρίως ελαϊκό οξύ) και τέλος τα PUFAs το 10% (κυρίως λινελαϊκό οξύ). Η βιταμίνη E βρίσκεται σε συγκεντρώσεις ~60 mg/g ελαίου εκ των οποίων τα 16 mg/g ελαίου αντιστοιχούν σε τοκοφερόλη. Στο εμπορικό προϊόν το καροτένιο βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-2 mg/g ελαίου) (Bester *et al.*, 2010). Το λάδι καρύδας αποτελείται κατά 90% από SFAs, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο από οποιοδήποτε άλλο εμπορικό σπορέλαιο. Το λαουρικό οξύ (12:0) κυριαρχεί έναντι του μυριστικού οξέος (14:0) και του παλμιτικού οξέος (16:0). Η παρουσία φαινολικών συστατικών (κατεχίνη, *p*-κουμαρικό οξύ και φερουλικό οξύ) σε συνδυασμό με το υψηλό ποσοστό SFAs το καθιστούν ιδιαίτερα σταθερό για μακροχρόνια αποθήκευση και χρήση κατά το μαγείρεμα (Deen *et al.*, 2020; Wallace, 2018). Τέλος, το σησαμέλαιο περιέχει μοναδικά συστατικά (λιγνάνες) όπως τη σησαμίνη και τη σησαμόλίνη που συμβάλλουν στην οξειδωτική του σταθερότητα (Janu *et al.*, 2013).

1.3 Αναλυτικές Τεχνικές

Το ελαιόλαδο συχνά αναφέρεται και ως ο υγρός χαλκός λόγω του αρώματος, της γεύσης και των μοναδικών ιδιοτήτων του στην ανθρώπινη υγεία. Με απώτερο σκοπό το οικονομικό όφελος, είναι συχνά τα φαινόμενα νοθείας με την ανάμιξη ελαιόλαδου με έλαια υποδεέστερης ποιότητας. Έτσι απαιτούνται γρήγορες, ακριβείς και σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης για την ανίχνευση της νοθείας. Οι πιο αξιόπιστες τεχνικές για ποσοτική ανάλυση αφορούν την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), την αέρια χρωματογραφία (GC), τον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR), τη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) και τη φασματοσκοπία Raman και IR. Παρόλα τα πλεονεκτήματά τους, είναι αρκετά χρονοβόρες, απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και χρήση χημικών που επιβαρύνουν το περιβάλλον. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί χημειομετρικές μέθοδοι βασισμένες σε πολύπλοκα μαθηματικά μοντέλα που συμβάλλουν στη δημιουργία μια βάσης δεδομένων για τον έλεγχο ποιότητας μεσογειακών προϊόντων όπως η ελιά (Avramidou, Doulis and Petrakis, 2018; Meenu, Cai and Xu, 2019).

Τα φαινολικά συστατικά ως ισχυρά αντιοξειδωτικά αυξάνουν τη διάρκεια ζωής του ελαιόλαδου. Η πιο συχνή μέθοδος προσδιορισμού τους είναι η φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC). Παρουσία φαινολικών συστατικών το αντιδραστήριο FC ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ και $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) ανάγεται και αποκτά μπλε χρώμα (W_8O_{23} και Mo_8O_{23}) το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 765 nm. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ (GA) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE). Μια από τις πολλά υποσχόμενες μεθόδους αφορά τη χρήση χημειοαισθητήρων ή βιοαισθητήρων. Στην περίπτωση αυτή, οι ερευνητές εκμεταλλεύτηκαν την αντίδραση FC για έναν *on-site* ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών. Χωρίς να απαιτείται προηγούμενη εκχύλιση των δειγμάτων και με τη χρήση της κάμερας ενός smart phone, παρατηρείται η αλλαγή

στο χρώμα του αντιδραστηρίου FC παρουσία πολυφαινολών. Η διαδικασία απαιτεί 15 λεπτά χωρίς τη χρήση εργαστηριακού εξοπλισμού, μειώνοντας το κόστος και τη διάρκεια της συμβατικής μεθόδου (Calabria *et al.*, 2020).

1.4 Οφέλη στην υγεία

Τα πολλαπλά οφέλη στην υγεία και συγκεκριμένα στη μείωση καρδιαγγειακών προβλημάτων αποδίδονται στη μεσογειακή διατροφή που είναι εμπλουτισμένη με EVOO. Εκτός των σημαντικών ιδιοτήτων που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.2**, στα οφέλη αυτά περιλαμβάνονται η επιβράδυνση των αρχικών σταδίων της αθηροσκλήρωσης, η μείωση της αρτηριακής πίεσης, η μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης νευρολογικών παθήσεων (π.χ. Alzheimer), μια μερική μείωση των επιβλαβών επιπτώσεων του καπνίσματος και η ανάσχεση προθρομβωτικών παραγόντων. Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ο καλύτερος έλεγχος του μεταβολικού συνδρόμου και του σακχαρώδους διαβήτη. Οι δυνητικά ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες οφείλονται και στα MUFAs, τα δευτερεύοντα φυσικά συστατικά του EVOO, με ισχυρές αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Yubero-Serrano *et al.*, 2019).

Πίνακας 1.2 : Κύριες βιολογικές ιδιότητες που σχετίζονται με την κατανάλωση EVOO (Jimenez-Lopez *et al.*, 2020; Guasch-Ferré *et al.*, 2014; Zamora-Zamora *et al.*, 2018).

Βιοδραστικότητα	Περιγραφή έρευνας	Αποτελέσματα
Καρδιο-προστατευτική Δράση	RCT, PREDIMED (n=7447 συμμετέχοντες με υψηλό ρίσκο CVD)	MED εμπλουτισμένη με EVOO μειώνει τον κίνδυνο CVD κατά 30%
	PREDIMED μελέτη παρατήρησης (n=7216 συμμετέχοντες)	10g EVOO/day μειώνουν το ρίσκο CVD κατά 10%
	Συστηματική ανασκόπηση 15 RCTs	10-50 mL EVOO/day μειώνει τη διαστολική πίεση του αίματος κατά 0,7 mm Hg
	Μετα-ανάλυση 26 RCTs	Κατανάλωση ελαιόλαδου με υψηλό φαινολικό περιεχόμενο, μειώνει σημαντικά το ρίσκο CVD και τις τιμές των φλεγμονωδών δεικτών
Αντιοξειδωτική Δράση	Ισχυρισμός υγείας από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την ασφάλεια τροφίμων (EFSA)	5 mg πολυφαινολών του ελαιόλαδου ανά ημέρα, προστατεύουν τα λιπίδια του αίματος από οξείδωση
	RCTs που αξιολογούν την επίδραση της κατανάλωσης EVOO στο οξειδωτικό stress των λιπιδίων του αίματος	EVOO και ελαιόλαδα με υψηλό TPC μειώνουν την οξείδωση της LDL με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο
	Ανασκόπηση μελετών in vitro	Οι λιγνάνες που περιέχονται στο EVOO εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση
Αντιφλεγμονώδης Δράση	Μετα-ανάλυση 13 μελετών βασισμένες σε 9 RCTs	Τακτική κατανάλωση EVOO μειώνει τα επίπεδα IL-6, CRP και TNF-α
	Μετα-ανάλυση RCTs (n=3106 συμμετέχοντες)	Διατροφή εμπλουτισμένη σε ελαιόλαδο μειώνει τα επίπεδα IL-6 και CRP στο

		πλάσμα του αίματος
	Τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη μελέτη (n=49 ασθενείς)	Κατανάλωση ελαιόλαδου με υψηλό TPC στο πρωινό, μειώνει τη μετα – γευματική φλεγμονώδη απόκριση
Αντικαρκινική Δράση	RCT, PREDIMED (n=4152 γυναίκες)	Οι γυναίκες που ακολουθούν MED πλούσια σε EVOO εμφανίζουν 62% μειωμένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου του μαστού
	Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση 83 ερευνών	Η τήρηση MED σχετίζεται με μειωμένη θνησιμότητα από καρκίνο καθώς και χαμηλά επίπεδα καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου κ.α.
	In vitro πειράματα αντικαρκινική δράση των φαινολικών συστατικών σε καρκινικές κυτταρικές γραμμές	Το φαινολικό κλάσμα του EVOO εμφανίζει αντικαρκινική και κυτταροτοξική δράση σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές γραμμές

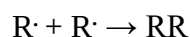
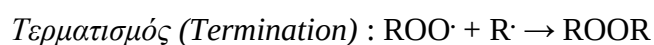
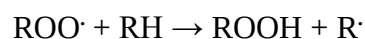
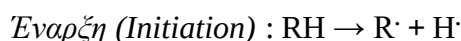
CVD: Καρδιαγγειακά νοσήματα, RCT: Τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή, MED: Μεσογειακή Διατροφή, HDL: Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, LDL: Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, IL-6: Ιντελευκίνη – 6, CRP: C – Αντιδρώσα Πρωτεΐνη, TNF-α: Παράγοντας νέκρωσης όγκων – α, TPC: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Κεφάλαιο 2^ο – Προϊόντα Προχωρημένης Λιποξείδωσης (AGEs)

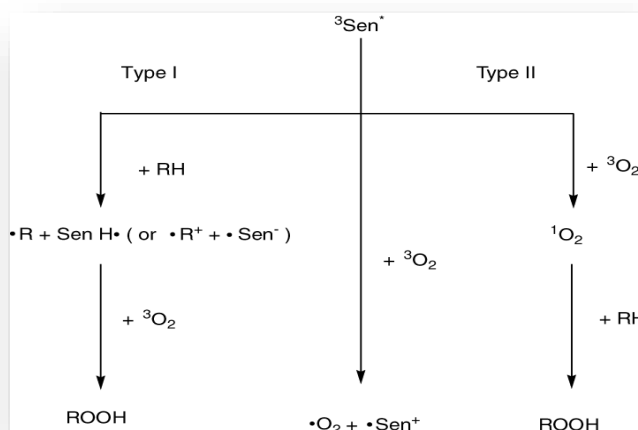
2.1 Η αντίδραση υπεροξείδωσης των λιπιδίων

Ως οξειδωτική σταθερότητα ενός ελαίου ορίζεται η ικανότητα του να αντιστέκεται στην οξείδωση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή της επεξεργασίας του. Αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της ποιότητας και του χρόνου ζωής του ελαίου καθώς σχηματίζονται τοξικές ενώσεις, οξειδωμένα πολυμερή και ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που υποβαθμίζουν τη γεύση (off-flavor) και τη θρεπτική αξία. Οι μηχανισμοί σχηματισμού των ενώσεων αυτών αφορούν κυρίως την αυτοοξείδωση και την φωτοοξείδωση και στηρίζονται σε διαφορετικούς τύπους οξυγόνου.

Η αυτοοξείδωση των βρώσιμων ελαίων είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση της οποίας ο ρυθμός αυξάνεται καθώς προχωρά η αντίδραση μέσω του σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τα τρία θεμελιώδη στάδια της έναρξης, της διάδοσης και του τερματισμού :



όπου $R^\cdot$: ρίζα ακυλολιπιδίου. Στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης αποσπάται ένα άτομο $-H$ από τη *cis* μεθυλενική ομάδα ενός πολυακόρεστου λιπαρού οξέος με αποτέλεσμα να δημιουργείται η ρίζα του λιπαρού οξέος (μόριο ή ιόν με ασύζευκτο e). Τα κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα είναι λιγότερο δραστικά και συνήθως δε συμμετέχουν στην υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων. Κατά αυτόν τον τρόπο λιπαρά οξέα με ένα διπλό δεσμό ή χωρίς διπλούς δεσμούς μπορούν να υποστούν οξείδωση αλλά όχι αλυσιδωτή διεργασία υπεροξείδωσης των λιπαρών οξέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το ελαϊκό οξύ ($C18:1\ n-9$), με ένα διπλό δεσμό, το οποίο δεν μπορεί να υποστεί διεργασία λιπιδικής υπεροξείδωσης (Catalá, 2006). Η ευκολία με την οποία απομακρύνεται το άτομο $-H$ εξαρτάται από τη θέση του στο μόριο του λιπαρού οξέος. Συγκεκριμένα, άτομα $-H$ που βρίσκονται σε C μεταξύ δύο διπλών δεσμών απομακρύνονται πιο εύκολα καθώς η παραγόμενη ρίζα σταθεροποιείται μέσω συντονισμού. Παρουσία οξυγόνου (3O_2) σχηματίζεται η υπεροξυ-ρίζα του λιπαρού οξέος ($ROO^\cdot$) η οποία στη συνέχεια αποσπά ένα άτομο $-H$ από άλλο λιπαρό οξύ και σχηματίζεται το υδροϋπεροξειδίο του λιπαρού οξέος ($ROOH$). Τα ποσοστά σχηματισμού των μορφών $ROO^\cdot$ και $ROOH$ εξαρτώνται μόνο από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου και τη θερμοκρασία. Τελικά, όταν οι δραστικές ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους, σχηματίζονται αδρανή προϊόντα και η αντίδραση τερματίζεται.



Εικόνα 2.1 : Η αντίδραση των ενεργοποιημένων ευαισθητοποιητών με τα υποστρώματα (Choe and Min, 2006).

Στη φωτοξείδωση, η ενέργεια προκύπτει από το φως το οποίο διεγείρει τους ευαισθητοποιητές (π.χ. χλωροφύλλη) και παράγονται ελεύθερες ρίζες μέσω δύο μηχανισμών (type I και II). Για τον πρώτο μηχανισμό (type I), οι ενεργοποιημένοι ευαισθητοποιητές αντιδρούν άμεσα με το λιπαρό οξύ, παράγοντας την ελεύθερη ρίζα και πυροδοτώντας έτσι την έναρξη της αλυσιδωτής αντίδρασης. Στο δεύτερο μηχανισμό ο ενεργοποιημένος από το φως ευαισθητοποιητής μεταφέρει ενέργεια στο

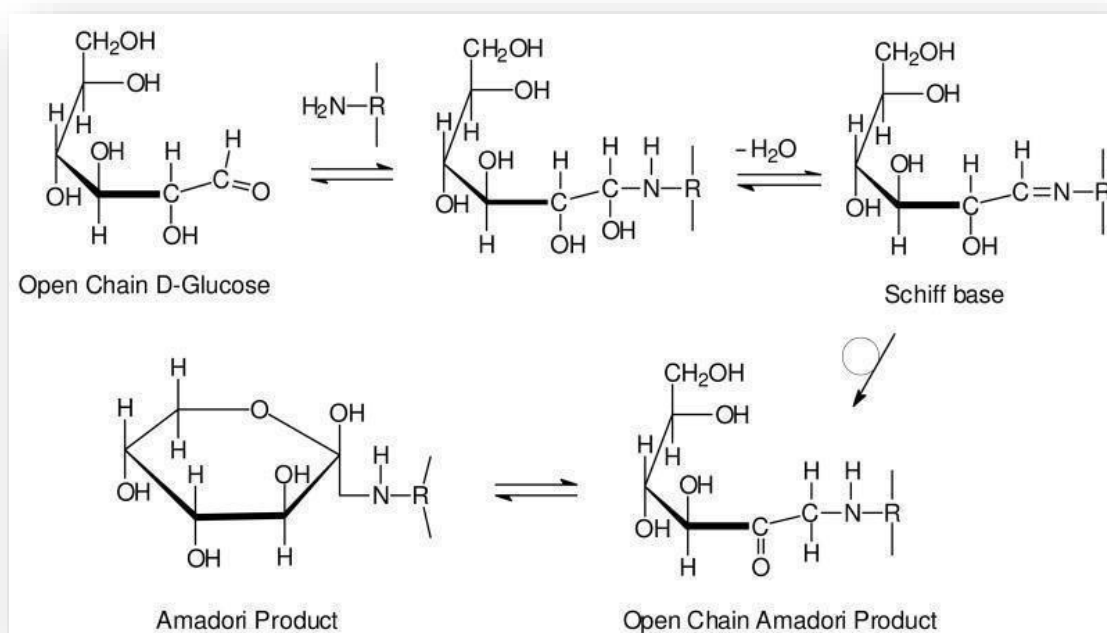
οξυγόνο το οποίο από τη βασική κατάσταση ($^3\text{O}_2$) μεταβαίνει στην απλή κατάσταση ($^1\text{O}_2$) (Εικόνα 2.1) (Choe and Min, 2006).

Τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (ROOH) είναι άοσμες και άγευστες ενώσεις, ιδιαίτερα ασταθής σε υψηλές θερμοκρασίες και στην παρουσία μετάλλων (Cu, Fe, Co, Ni). Στην περίπτωση αυτή τα ROOH διασπώνται ταχύτατα σε αλκοξυ-ρίζες οι οποίες με τη σειρά τους ευνοούν ένα νέο κύκλο αντιδράσεων παράγοντας τα δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αλδεϋδες, οι κετόνες, τα οξέα, οι αλκοόλες και διάφοροι μικρού μήκους υδρογονάνθρακες. Σε κάθε έλαιο ο χρόνος σχηματισμού των δευτερογενών προϊόντων διαφέρει. Χαρακτηριστικά, στα ελαιόλαδα τα δευτερογενή προϊόντα παράγονται απευθείας μετά τον σχηματισμό των ROOH ενώ στο ηλιέλαιο θα πρέπει να παραχθεί μια σημαντική ποσότητα ROOH για να ξεκινήσει ο σχηματισμός τους (Choe and Min, 2006).

Από τα δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης φαίνεται πως απασχολούν ιδιαίτερα τα εποξειδικά, υδροξειδικά και κετοξικά παράγωγα των λιπαρών οξέων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια υψηλών θερμοκρασιών (όπως μαγείρεμα, τηγάνισμα). Η κατηγορία αυτή των ενώσεων εμφανίζει υψηλή τοξικότητα καθώς οι ενώσεις αυτές αντιδρούν ταχύτατα με το DNA και τις πρωτεΐνες (Catalá, 2006). Σε πιο πρόσφατες μελέτες έχει επιτευχθεί ο ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός των εποξειδικών και υδροξειδικών παραγώγων των λιπαρών οξέων με εξαιρετική ακρίβεια και ευαισθησία μέσω GC-FID. Προκειμένου να συμβεί αυτό προηγήθηκε η μετατροπή τους σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES) και απομόνωση των πολικών FAMES μέσω εκχύλισης στερεής φάσης (SPE). Οι Xia and Budge, 2017 κατάφεραν να προσδιορίσουν τη θέση των χαρακτηριστικών υδρόξυ- ομάδων στα ακόρεστα υδροξειδικά λιπαρά οξέα μέσω GC-MS. Κατά αυτόν τον τρόπο, δόθηκαν περισσότερες πληροφορίες, σχετικά με τη θέση των διπλών δεσμών στα μόρια των λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα χρήσιμες σχετικά με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην οξείδωση.

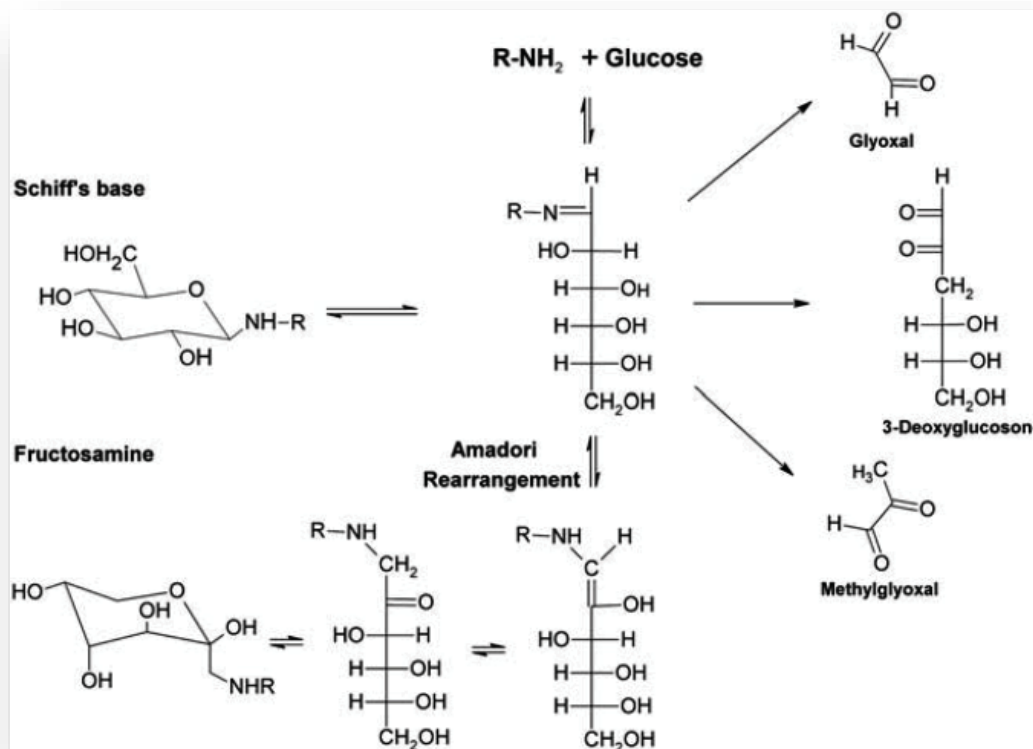
2.2 Η αντίδραση Maillard

Μια από τις κυριότερες αντιδράσεις των τροφίμων που συμβαίνει κυρίως κατά τη θερμική τους επεξεργασία, είναι η μη ενζυματική αμαύρωση γνωστή και ως αντίδραση Maillard (MR). Το όνομα της προέρχεται από τον Γάλλο Χημικό Louis Camille Maillard που το 1912 ανέφερε για πρώτη φορά την αντίδραση μεταξύ αναγόντων σακχάρων (όπως γλυκόζη και φρουκτόζη) και μια ελεύθερης αμινομάδας (πρωτεΐνες, πεπτίδια και αμινοξέα) παρουσία θερμότητας (Finot, 2005 ; Nie *et al.*, 2013). Η αντίδραση αποτελείται από τρία στάδια και τα τελικά της προϊόντα (MRPs) μπορούν να χαρακτηριστούν είτε ως επιθυμητά ή ανεπιθύμητα με βάση την διεργασία που έλαβε χώρα. Ανάλογα με το χρόνο και τη θερμοκρασία αναπτύσσονται μοναδικά αρώματα και γεύσεις ενώ σε πιο έντονες συνθήκες υποβαθμίζεται η ποιότητα του τροφίμου με τη δημιουργία πικρής και δυσάρεστης γεύσης (Lund and Ray, 2017).



Εικόνα 2.2 : Η αντίδραση μεταξύ της D-γλυκόζης και μιας αμινομάδας ($-\text{NH}_2$) προς το σχηματισμό της ένωσης Amadori (Zhang *et al.*, 2009).

Το αρχικό στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει την συμπύκνωση μιας καρβονυλομάδας (του αναγωγικού σακχάρου) με μια ελεύθερη αμινομάδα (συνήθως $\epsilon\text{-NH}_2$) ενός καταλοίπου λυσίνης μιας πρωτεΐνης. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στη δημιουργία μιας ασταθούς βάσης Schiff (αλδιμίνη) με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου νερού. Η γλυκοζυλαμίνη υφίσταται μια ενδομοριακή μετάθεση προς το σχηματισμό της σταθερότερης ένωσης 1-άμινο-1-δεοξυ-2-κετο-σακχάρου, που ονομάζεται και ένωση Amadori (**Εικόνα 2.2**) (ή ένωση Heyns όταν το αρχικό σάκχαρο είναι κετόζη). Εφόσον το αρχικό σάκχαρο είναι η γλυκόζη τότε δημιουργείται η *N*-υποκατεστημένη-D-γλυκοζυλαμίνη, η οποία με μετάθεση Amadori μετατρέπεται στη *N*-υποκατεστημένη-D-φρουκτοζαμίνη. Στο στάδιο αυτό, έχει βρεθεί πως η γλυκόζη εμφανίζει τον πιο αργό ρυθμό γλυκοζυλίωσης έναντι άλλων αναγόντων σακχάρων (Peng *et al.*, 2011). Πρόκειται για αμφίδρομες αντιδράσεις που δεν ευνοούνται σε χαμηλές τιμές pH (Zhang *et al.*, 2009).



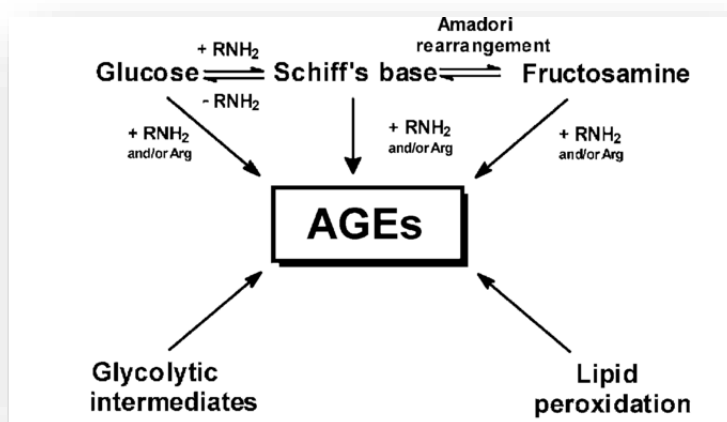
Εικόνα 2.3 : Αντιδράσεις σχηματισμού δραστικών δικαρβονυλικών ενώσεων μέσω της αντίδρασης Maillard (Peng *et al.*, 2011).

Τα προϊόντα Amadori που παράγονται κατά το αρχικό στάδιο της αντίδρασης αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τον σχηματισμό επιθυμητού αρώματος, γεύσης και καστανών πολυμερών. Η πορεία της αποικοδόμησης που ακολουθούν καθορίζεται από το pH του συστήματος. Σε ουδέτερο ή όξινο περιβάλλον ευνοείται η 1,2-ενολοποίηση με το σχηματισμό φουρφουράλης (από πεντόζες) ή υδρόξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF, από εξόζες). Σε αλκαλικές τιμές pH οι αρχικές ενώσεις υφίστανται 2,3 ενολοποίηση προς τον σχηματισμό ρεδουκτονονών (Troise, 2018). Πρόκειται για ενεδιόλες με γειτονική καρβονυλομάδα και έντονη αναγωγική ισχύ που εμπλέκονται σε διάφορες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Παράλληλα, εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση όπως στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος. Οι α-δικαρβονυλικές ενώσεις σχηματίζονται ύστερα από αποικοδόμηση και αφυδάτωση των ενώσεων του αρχικού σταδίου και οι σημαντικότερες ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι η βουτανεδιόνη, η γλυοξάλη και η μεθυλογλυοξάλη (Εικόνα 2.3). Σε επόμενο βήμα αντιδρούν με την $\alpha-NH_2$ των αμινοξέων προς τον σχηματισμό των αλδευδών Strecker (αποικοδόμηση Strecker). Συμβάλλουν στην ανάπτυξη της επιθυμητής γεύσης σε προϊόντα όπως το ψωμί, ο καφές, το κακάο και το επεξεργασμένο κρέας ωστόσο δρουν ως off-flavors στο επεξεργασμένο γάλα και στις μπίρες pilsner (Lund and Ray, 2017).

Στο τελικό στάδιο περιλαμβάνεται ο σχηματισμός καστανών χρωστικών που ονομάζονται μελανοΐδινες. Συνιστούν ενώσεις με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία των τροφίμων μιας και το καταναλωτικό κοινό ταυτίζει το καστανό χρώμα των τροφίμων με υψηλής ποιότητας προϊόντα. Απορροφούν σε μήκος κύματος 420 nm και κυριαρχούν στον καφέ, το κακάο, το ψωμί και το μέλι. Στην πορεία σχηματισμού τους συμμετέχουν αντιδράσεις κυκλοποίησης, αφυδάτωσης, μετάθεσης, ισομερίωσης και αποικοδόμησης μικρού μοριακού βάρους MRPs. Οι Wang, Qian and Yao, 2011 περιγράφουν πως κατά την αντίδραση Maillard, παράγονται υψηλού μοριακού βάρους μελανοΐδινες (HMW) που εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από τη θερμοκρασία και το χρόνο της αντίδρασης (>24h). Αναφέρεται επίσης, πως είναι πιθανό χρωμοφόρες ενώσεις να σχηματίζονται στο αρχικό στάδιο της MR οι οποίες μετέπειτα μέσω πολυμερισμού ή αντιδράσεων με άλλες MRPs, παράγουν HMW μελανοΐδινες στο τελικό αυτό στάδιο. Ένα από τα βασικά τους πλεονεκτήματα αφορά τη προστασία και τη διατήρηση των τροφίμων κατά την αποθήκευσή τους. Αξίζει να επισημανθεί πως οι μη αφομοιώσιμες HMW μελανοΐδινες εμφανίζουν *in vivo* οφέλη στην ανθρώπινη υγεία όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και πρεβιοτική δράση.

2.3 Κοινά προϊόντα της αντίδρασης της υπεροξειδωσης και της αντίδρασης Maillard

2.3.1 Προχωρημένα προϊόντα γλυκοζυλίωσης (Advanced glycation end-products, AGEs)



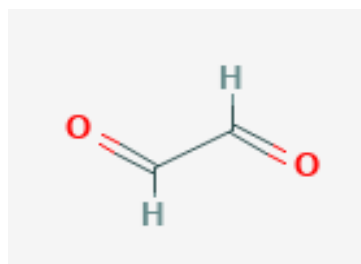
Εικόνα 2.3.1 : Διαφορετικά μονοπάτια σχηματισμού των AGEs (Ahmed *et al.*, 2005).

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η αντίδραση Maillard είναι μια από τις κυριότερες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη θερμική επεξεργασία των τροφίμων και οδηγεί σε μια πληθώρα προϊόντων (MRPs). Στα προϊόντα της αντίδρασης αυτής ανήκουν και τα προχωρημένα προϊόντα γλυκοζυλίωσης γνωστά και ως AGEs. Μια κατηγορία ετερογενών προϊόντων εκ των οποίων κάποια, εμφανίζουν διακριτές φωτοφυσικές ιδιότητες. Τα AGEs μπορεί να προέρχονται είτε από εξωγενείς ή ενδογενείς πηγές. Τα AGEs της τελευταίας

κατηγορίας προέρχονται από τη διατροφή και συμβολίζονται ως dAGEs ενώ στην πρώτη κατηγορία ο σχηματισμός τους αφορά διαδικασίες γλυκοζυλίωσης στα όργανα, τους ιστούς και τα σωματικά υγρά. Το περιεχόμενο των AGEs στα τρόφιμα είναι πολύ μεγαλύτερο συγκριτικά με τα *in vivo* σχηματιζόμενα προϊόντα λόγω των θερμικών επεξεργασιών. Μια χαρακτηριστική ένωση που σχηματίζεται κατά τη θέρμανση είναι η φουροσίνη. Σε ελαφρώς όξινο pH αποτελεί δείκτη της διατροφικής ποιότητας γαλακτοκομικών προϊόντων ύστερα από μέτρηση της βιοδιαθεσιμότητας καταλοίπων λυσίνης (Vistoli *et al.*, 2013). Τροφές πλούσιες σε λυσίνη και αργινίνη όπως τα γαλακτοκομικά και το κρέας αλλά και προϊόντα με ελεύθερα αμινοξέα όπως η σάλτσα σόγιας είναι πιο πιθανόν να σχηματίσουν AGEs μέσω MR σε υψηλές θερμοκρασίες. Εναλλακτικά, μέσω της λιπιδικής υπεροξειδωσης σχηματίζονται δικαρβονυλικά παραπροϊόντα που δρουν ως πρόδρομες ενώσεις των προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης. Κατά συνέπεια τρόφιμα πλούσια σε λιπαρά εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα CML (δείκτης προσδιορισμού των AGEs). Στα μονοπάτια σχηματισμού των προϊόντων αυτών προστίθενται και τα ανάγοντα σάκχαρα τα οποία αφού πρώτα μετατραπούν σε ενώσεις Amadori μέσω περαιτέρω αποικοδόμησης οδηγούν σε δραστικές ενώσεις όπως γλυοξάλη και μεθυλογλυοξάλη, που δρουν επίσης ως πρόδρομες ενώσεις (Εικόνα 2.3.1). Τα τελικά AGEs που παράγονται μέσω των ενώσεων αυτών αναλύονται περαιτέρω στα ακόλουθα κεφάλαια.

Με στόχο των περιορισμό της δημιουργίας τους έχουν μελετηθεί διάφοροι παράγοντες. Τα βιοδραστικά συστατικά και κυρίως οι φαινολικές ενώσεις καταστέλλουν τη δράση των α-δικαρβονυλικών ενώσεων εμποδίζοντας την τελική μετατροπή τους σε AGEs στα διατροφικά συστήματα. Ως προς τους εξωτερικούς παράγοντες οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη θερμοκρασία, το χρόνο, τη διαθεσιμότητα του νερού, το pH και την παρουσία μετάλλων. Η MR προχωρά πιο αργά σε όξινο pH ενώ παρουσία μετάλλων (Fe^{3+} και Cu^{2+}) η αντίδραση επιταχύνεται. Η θέρμανση σε υψηλά επίπεδα υγρασίας μειώνει τον ρυθμό της MR. Χαρακτηριστικά, η μέθοδος του ψησίματος φαίνεται να προάγει τον σχηματισμό των AGEs έναντι του βρασμού, σε δείγματα κρέατος. Εκτός όλων των προαναφερθέντων, τα υλικά συσκευασίας και ο τρόπος αποθήκευσης και μεταφοράς αξίζει να αναλυθούν περαιτέρω ως προς τη συμβολή τους στο σχηματισμό των ενώσεων αυτών (Zhang, Wang and Fu, 2020).

2.3.2 Γλυοξάλη (GO)



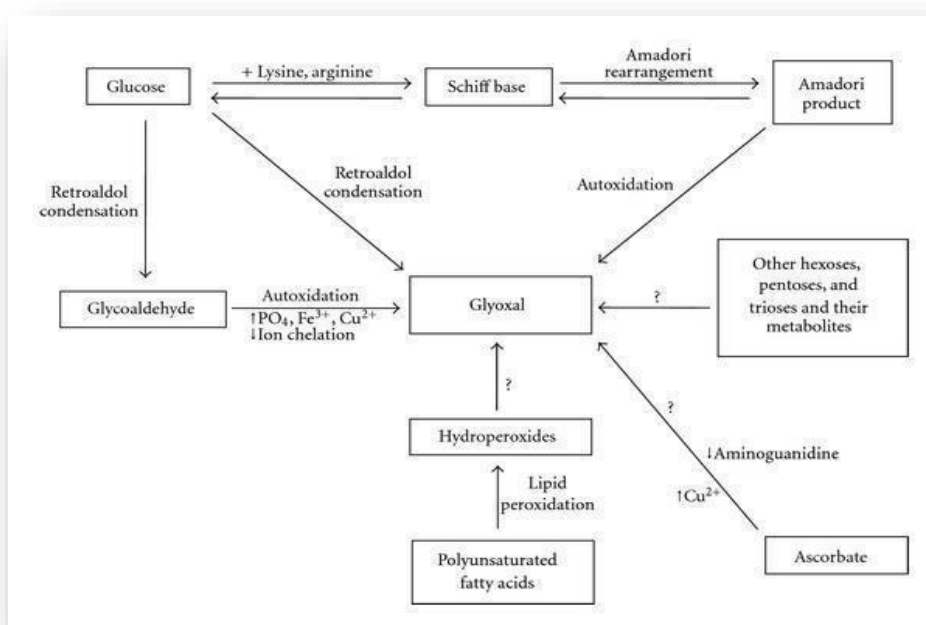
Η γλυοξάλη (GO) (Εικόνα 2.3.2) ανήκει στην κατηγορία των διαλδεΐδων και μπορεί να παραχθεί είτε μέσω της οξείδωσης των λιπιδίων ή ως παραπροϊόν βιολογικών διαδικασιών. Τρόφιμα που η παρασκευή τους περιλαμβάνει ζύμωση, ψήσιμο ή τηγάνισμα θεωρούνται πλούσια πηγή GO. Έτσι ως εξωγενείς πηγές

Εικόνα 2.3.2 :

Χημική δομή της γλυοξάλης.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyoxal>)

της GO χαρακτηρίζονται προϊόντα όπως η μύρα, το κρασί, το τσάι, τα γαλακτοκομικά και το ελαιόλαδο. Από περιβαλλοντικής πλευράς, έχει ανιχνευτεί GO στον καπνό τσιγάρου, στις εξατμίσεις αυτοκινήτων καθώς και σε υπόγεια ύδατα και στο έδαφος.



Εικόνα 2.3.3 : Διαφορετικές πορείες σχηματισμού της γλυοξάλης (Lange *et al.*, 2012).

Η ενδογενώς παραγόμενη GO ακολουθεί δύο διαφορετικά μονοπάτια (**Εικόνα 2.3.3**) σχηματισμού. Η πρώτη περίπτωση αφορά την αποικοδόμηση των σακχάρων και περιλαμβάνει δύο μηχανισμούς. Η γλυκόζη μετατρέπεται απευθείας μέσω αυτοοξειδωσης σε GO και η αντίδραση αυτή καταλύεται από την παρουσία φωσφορικών και μεταλλικών ιόντων (Fe^{3+} και Cu^{2+}). Πέρα από τη γλυκόζη και άλλα σάκχαρα όπως η γαλακτόζη, η φρουκτόζη, η ριβόζη, η μαννιτόλη και η γλυκερόλη οδηγούν στην παραγωγή GO. Ο δεύτερος μηχανισμός σχετίζεται με την αντίδραση Maillard και τον σχηματισμό των ενώσεων Amadori τα οποία μετατρέπονται μέσω ενολοποίησης σε γλυοξάλη όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω.

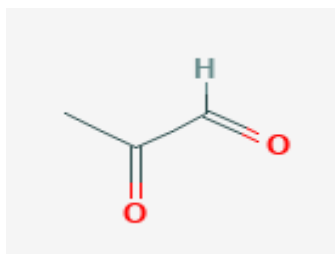
Όσον αφορά το μηχανισμό σχηματισμού της μέσω της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, αυτός περιλαμβάνει μη ενζυμική οξείδωση των PUFAs. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του λινελαϊκού οξέος ($\text{C}_{18:2}$). Στο αρχικό στάδιο της οξείδωσης σχηματίζεται η δραστική υπεροξυ-ρίζα η οποία λόγω δραστικότητας μετατρέπεται σε ένα πλήθος ενώσεων συμπεριλαμβανομένης και της συγκεκριμένης ένωσης. Έχει αναφερθεί πως αυτού του τύπου οι αλδεϋδες σχηματίζονται από μια δεύτερη οξείδωση των αρχικών υδροϋπεροξειδίων των λιπαρών οξέων. Τέλος και το

ασκορβικό οξύ υδρολύεται προς γλυοξάλη ωστόσο ο μηχανισμός αυτός παραμένει άγνωστος (Lange *et al.*, 2012).

AGEs παραγόμενα από GO

Η υψηλή δραστηριότητα της γλυοξάλης αποτυπώνεται στο υψηλό ποσοστό ανίχνευσής της στους βιολογικούς ιστούς παίζοντας καίριο ρόλο στη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών. Η αντίδραση της με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης οδηγεί στο σχηματισμό της *N*^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) μέσω του σχηματισμού ενός ενδιάμεσου αλδιμίνης. Αντιστοίχως, η αντίδραση με ένα κατάλοιπο κυστεΐνης οδηγεί στην ένωση *S*-(carboxymethyl)cysteine (CMC). Ο μηχανισμός της αντίδρασης μεταξύ GO και ενός καταλοίπου αργινίνης είναι ο πιο περίπλοκος μιας και περιλαμβάνει το σχηματισμό δυο ενδιάμεσων ιμιδαζολινών : G-DH1, *N*^δ-(3,4-dihydroxy-1-imidazolidin-2-yl) ornithine και του ισομερούς της G-DH2, (5-(4,5-dihydroxy-2-imino-1-imidazolidinyl) norvaline. Και τα δύο ενδιάμεσα προϊόντα μετατρέπονται είτε στην ένωση *N*^ε-(carboxymethyl)arginine (CMA) ή σε παράγωγα ιμιδαζολονών. Αν και οι ενώσεις G-DH1 και G-DH2 αποτελούν ενδιάμεσα, βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία έναντι της CMA. Αξίζει να τονιστεί, πως η GO λόγω της δομής της (Εικόνα 2.3.2) μπορεί να αντιδράσει με δύο κατάλοιπα λυσίνης ή αργινίνης. Η ένωση GOLD αποτελεί διμερές προϊόν της αντίδρασης της GO με δύο κατάλοιπα λυσίνης και ο μηχανισμός περιλαμβάνει ένα αρχικό ενδιάμεσο δι-ιμίνης το οποίο αντιδρά με ένα δεύτερο μόριο GO μέσω αντίδρασης Cannizzaro και με αφυδάτωση παράγεται το τελικό διμερές (Vistoli *et al.*, 2013).

2.3.3 Μεθυλογλυοξάλη (MGO)



Εικόνα 2.3.4 :
Χημική δομή της
μεθυλογλυοξάλης.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylglyoxal>)

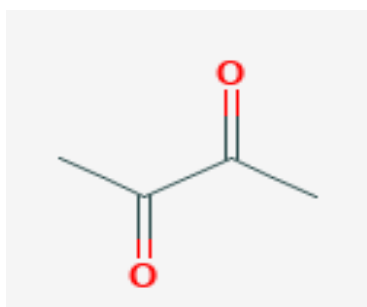
Η μεθυλο-γλυοξάλη πρόκειται για ένα κίτρινο υγροσκοπικό υγρό που είναι γνωστή και με την ονομασία 2-οξοπροπανάλη. Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του νερού και τη θερμοκρασία μπορεί να βρεθεί σε τρεις μορφές : μονοϋδρική (71%), διϋδρική (28%) και στην άνυδρη μορφή της (1%). Κύριες εξωγενείς πηγές της MGO είναι η αυτοοξείδωση των σακχάρων, η αντίδραση Maillard, η αποικοδόμηση των λιπιδίων και οι μικροβιακές ζυμώσεις. Τρόφιμα πλούσια σε υδατάνθρακες αποτελούν σημαντικές πηγές πρόσληψης της ένωσης αυτής. Έρευνες έχουν ανιχνεύσει υψηλά επίπεδα της στο μέλι, σε αναψυκτικά πλούσια σε σάκχαρα, στον καφέ λόγω της αντίδρασης Maillard και σε βρώσιμα έλαια λόγω του λιπιδικού τους προφίλ (Wang and Ho, 2012). Ενδογενώς τα μονοπάτια σχηματισμού της κατηγοριοποιούνται σε ενζυμικές και μη αντιδράσεις. Η κύρια οδός σύνθεσης της αφορά ενζυμική ή μη αποικοδόμηση τριφωσφορικών ενώσεων όπως η 3P-γλυκεραλδεϋδη. Επιπροσθέτως, τα λιπαρά οξέα μπορούν να οδηγήσουν στην

παραγωγή της μέσω του μεταβολισμού των κετονικών σωμάτων και συγκεκριμένα της ακετόνης (Vistoli *et al.*, 2013).

AGEs παραγόμενα από MGO

Η MGO έχει την ιδιότητα να προκαλεί μη αντιστρεπτή μετατροπή των πρωτεϊνών υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η αντίδραση της με ένα κατάλοιπο αργινίνης οδηγεί στο σχηματισμό ιμιδαζολικών παραγώγων. Ανάλογα με το άτομο -N που συμμετέχει στο μηχανισμό και το pH του συστήματος προκύπτουν τρία προϊόντα : MG-H1, MG-H2 και MG-H3 σε ίσες μορφές μιας και ο δακτύλιος τους μπορεί να ανοίξει προς το σχηματισμό της *N*⁷-carboxyethylarginine (CEA). Παράλληλα, η αντίδραση με ένα κατάλοιπο λυσίνης οδηγεί προς τη δημιουργία της carboxylethyllysine (CEL). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει ενδιάμεσο σχηματισμό μιας αλδιμίνης όπως και στην περίπτωση της CML. Η ενδιάμεση αλδιμίνη έχει την ικανότητα να αντιδράσει με τη γουανιδική ομάδα ενός καταλοίπου Arg και ύστερα από αφυδάτωση και αναδιάταξη οδηγεί στο ιμιδαζολικό παράγωγο MODIC. Όπως και η GO έτσι και η MGO μπορεί να αντιδράσει λόγω χημικής δομής με δύο παράγωγα λυσίνης. Αρχικά σχηματίζεται μια δι-ιμίνη στην οποία προστίθεται η MGO και μέσω του μηχανισμού της αντίδρασης Cannizzaro παράγεται το προϊόν MOLD. Οι παραπάνω αντιδράσεις ευνοούνται στην περίπτωση της MGO μιας και σταθεροποιείται περισσότερο η αποχωρούσα ομάδα λόγω -CH₃. Τέλος, μπορούν να λάβουν χώρα και αντιδράσεις με κατάλοιπα κυστεΐνης και τρυπτοφάνης που είναι αρκετά συνηθισμένες κατά τη μακρά αποθήκευση των τροφίμων (Vistoli *et al.*, 2013).

2.3.4 Διακετύλιο (DA)



Εικόνα 2.3.5 :
Χημική δομή του διακετυλίου.
(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Butanedione)

Το διακετύλιο ή αλλιώς βουτανодиόνη, είναι γνωστό για τη βουτυρώδη γεύση του και την ευρεία χρήση του ως αρωματικός παράγοντας. Ο σχηματισμός του μπορεί να επέλθει από διάφορα μονοπάτια, με κυριότερα την αποικοδόμηση των σακχάρων και την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Σε αυτά μπορεί να παρατηρηθεί απορρόφηση υψηλών επιπέδων ενέργειας ύστερα από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως συμβαίνει στο μαγείρεμα. Πιο πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι διακετύλιο σχηματίζεται από τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων, ενώ είναι επίσης γνωστό ότι αποτελεί φυσικό προϊόν της δράσης των μικροοργανισμών κατά τη ζύμωση σε ορισμένα τρόφιμα, όπως το γιαούρτι και η μπίρα. Επιπλέον, η αντίδραση Maillard αποτελεί σημαντική πορεία παραγωγής του διακετυλίου στα τρόφιμα. Για παράδειγμα, η μαλτόζη αποικοδομείται προς διακετύλιο μέσω της αντίδρασης ενός ενδιάμεσου προϊόντος Amadori με ένα κατάλοιπο λυσίνης.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει μελετηθεί η εμφάνιση τοξικότητας του διακετυλίου, κυρίως όταν αυτό βρίσκεται στην αέρια φάση σε υπερκείμενο χώρο. Η εισπνοή της ένωσης από εργάτες εργοστασίου που έρχονταν σε επαφή με αυτή στα πλαίσια παραγωγής ποπ κόρν, οδήγησε στην εμφάνιση αναπνευστικών νοσημάτων. Το περιστατικό αυτό οδήγησε τους επιστήμονες στην απαίτηση χαμηλού επιπέδου ασφάλειας του διακετυλίου στον αέρα προκειμένου να αποφεύγονται περαιτέρω προβλήματα στην υγεία. Αναφέρεται πως προκαλεί μια δοσο-εξαρτώμενη ενόχληση στην αναπνευστική οδό όταν βρεθεί σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 20 $\mu\text{g/g}$ (Shibamoto, 2014).

2.3.5 Προχωρημένα προϊόντα λιποξείδωσης (Advanced lipoxidation end-products, ALEs)

Ως ALEs χαρακτηρίζονται ενώσεις προσθήκης που προκύπτουν από την αντίδραση μεταξύ των δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης των λιπιδίων (RCCs) και πυρηνόφιλων μορίων όπως πρωτεΐνες και αμινοξέα. Αναφορικά με τα τελευταία πιο δραστικά ως προς την αντίδραση αυτή έχουν κριθεί τα κατάλοιπα λυσίνης (Lys), κυστεΐνης (Cys), ιστιδίνης (His) και αργινίνης (Arg). Τα ALEs ως προς τη χημική τους δομή χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες : (i) α , β -ακόρεστες αλδεΐδες συμπεριλαμβανόμενων των υδροξυλιωμένων (HHE, HNE) και μη παραγωγών τους (ακρολεΐνη, ACR) (ii) κετο-και οξο- αλδεΐδες, όπως MGO και (iii) δι-αλδεΐδες όπως η GO και η μαλοναλδεΐδη (MDA). Διαπιστώνεται μια σύγχυση ως προς μερικά RCCs όπως η GO και MGO που παράγονται και μέσω της οξείδωσης των λιπιδίων και μέσω της αποικοδόμησης των σακχάρων. Στην περίπτωση αυτή τα τελικά προϊόντα δεν αναφέρονται ούτε ως AGEs ούτε ως ALEs αλλά ως EAGLEs (either advanced glycation or lipoxidation products) (Vistoli *et al.*, 2013).

Ένας από τους πιο καλά μελετημένους μηχανισμούς σχηματισμού των ALEs είναι αυτός των α,β - ακόρεστων αλδεϋδών. Τα δευτερογενή προϊόντα RCCs που παράγονται από τη λιπιδική οξείδωση χαρακτηρίζονται από μια $\text{C}=\text{O}$ συζευγμένη με ένα διπλό δεσμό $\text{C}=\text{C}$. Η $\text{C}=\text{O}$ καθίστα τον β -C του διπλού δεσμού ιδιαίτερα ηλεκτρονιόφιλο και έτσι αντιδρά με πυρηνόφιλες πλευρικές αλυσίδες καταλοίπων αμινοξέων μέσω 1,2- και 1,4- προσθήκη Michael. Η 1,2 αντίδραση προσθήκης Michael περιλαμβάνει αντίδραση της $\text{C}=\text{O}$ του RCCs με την α - NH_2 με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας βάσης Schiff σε όξινο pH. Η ακρολεΐνη είναι ένα από τα δραστικότερα ηλεκτρονιόφιλα μόρια που αντιδρά με πυρηνόφιλα σύμφωνα με τη σειρά δραστικότητας $\text{Cys} > \text{His} > \text{Lys}$. Η MDA είναι από τις άφθονες αλδεΐδες που προκύπτει από την οξείδωση του αραχιδονικού και εικοσιπεντανοϊκού οξέος. Σημαντικό προϊόν προσθήκης της MDA με τις πρωτεΐνες είναι η φθορίζουσα χρωστική λιποφουσκίνη. Η ένωση αυτή είναι γνωστή και ως χρωστική του γήρατος καθώς συσσωρεύεται στον οργανισμό με την πάροδο του χρόνου (Vistoli *et al.*, 2013 ; Negre-Salvayre *et al.*, 2008).

2.4 Επίδραση των AGEs και ALEs στην υγεία – Τοξικότητα

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες ολοένα και πληθαίνουν τα επιστημονικά δεδομένα που αναφέρουν πως τα AGEs αυξάνουν το οξειδωτικό stress και τη φλεγμονώδη αντίδραση παίζοντας σημαντικό ρόλο στη δημιουργία χρόνιων παθήσεων. Η δράση αυτή περιγράφεται μέσω δυο βασικών μηχανισμών (Uribarri *et al.*, 2015). Ο πρώτος μηχανισμός αφορά τη δημιουργία σταυροδεσμών, δηλαδή μη φυσικά απαντώμενους ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Απότοκο αυτού, η συσσωμάτωση πρωτεϊνών, η δυσκαμψία των βιολογικών ιστών και η μετατροπή τους σε βιολογικώς μη λειτουργικές μορφές. Αυτός ο τύπος μηχανισμού έχει συσχετιστεί με τις καρδιαγγειακές παθήσεις, τον σακχαρώδη διαβήτη, τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, με παθήσεις του δέρματος και νευροεκφυλιστές νόσους. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την πρόσδεσή τους σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας έχοντας ως απόρροια την αυξημένη παραγωγή ROS (Reactive Oxygen Species) και των φλεγμονοδών κυτοκινών. Ο πιο μελετημένος υποδοχέας των AGEs είναι ο RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) (Lin, Wu and Yen, 2018). Σε μελέτες που αφορούν ζώα (κυρίως ποντίκια) βρέθηκε πως μειωμένη διατροφική πρόσληψη AGEs οδηγεί σε μειωμένα ποσοστά παθήσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress και σημαντική αύξηση του μέσου όρου ηλικίας. (Sharma *et al.*, 2015). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από εννέα ανεξάρτητες κλινικές μελέτες και σε ανθρώπους. Ο πληθυσμός που εξετάστηκε αφορούσε διαβητικούς χωρίς CDK και ασθενείς με CDK αλλά όχι διαβητικούς, υγιείς και υπέρβαρους σε διάφορα ηλικιακά groups. Προέκυψε πως διατροφή με μειωμένη πρόσληψη σε AGEs, οδηγεί σε μειωμένους δείκτες φλεγμονής, σε μειωμένο βάρος, μειωμένο οξειδωτικό stress, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αντίσταση στην ινσουλίνη (όπως αναλύθηκε μέσω HOMA). Συμπληρωματικά, για τη αναστολή της δράσης τους έχουν μελετηθεί διάφοροι συνθετικοί και φυσικοί αναστολείς. Ως προς την πρώτη κατηγορία παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες παρενέργειες κατά τις κλινικές δοκιμές ενώ η συνθετική τους διαδικασία καθίσταται χρονοβόρα και κοστοβόρα. Από την άλλη μεριά, τα φυσικώς απαντώμενα φλαβονοειδή στα τρόφιμα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της δράσης των AGEs καθώς αντιδρούν με τις δραστικές ενδιάμεσες καρβονυλικές ενώσεις εμποδίζοντας τον σχηματισμό τους (Peng *et al.*, 2011).

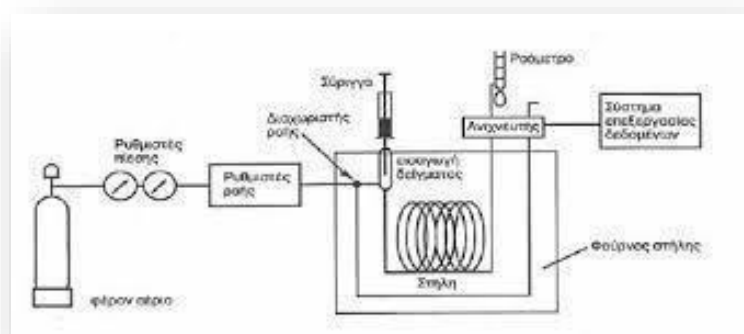
Όμοια και στα ALEs, μια πληθώρα ερευνών είναι απόδειξη της σημαντικής συσχέτισής τους με τη γήρανση και τη μακροζωία. Αναλυτικότερα, έχει αποδειχθεί πως η συγκέντρωσή τους αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας σε διάφορα είδη ζώων. Όσο χαμηλότερη η συγκέντρωσή τους τόσο αυξάνεται το προσδόκιμο ζωής των ζώων και η συσσώρευση τους πάνω από τις φυσιολογικές τιμές με την πάροδο των χρόνων σχετίζεται με μια σειρά παθολογικών καταστάσεων. Μεταξύ αυτών είναι η χρόνια υπερφόρτωση σιδήρου, ο διαβήτης τύπου II, η αθηροσκλήρωση, η νόσος

Alzheimer, η άνοια με σωμάτια Lewy, η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια, η νόσος Niemann Pick και η νόσος Parkinson. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις παρατηρήθηκε αλλαγή του λιπιδικού προφίλ ή/και οξειδωτικό stress. Για την αντιμετώπιση των παθολογικών αυτών καταστάσεων έχουν προταθεί διάφορες διατροφικές και φαρμακολογικές λύσεις. Διατροφικές παρεμβάσεις που περιλαμβάνουν τη μειωμένη πρόσληψη θερμίδων, τη μειωμένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και μεθειονίνη στη διατροφή αλλά και χρήση ραπαμυκίνης οδηγούν σε αναστολή της δράση των ALEs σε διάφορους ιστούς (ήπαρ, καρδιά και εγκέφαλος) (Pamplona, 2011; Jové *et al.*, 2020). Ωστόσο, παρά τις βλαπτικές συνέπειες που παρουσιάστηκαν, έχει αναφερθεί η προστατευτική τους δράση σε ορισμένα επίπεδα προάγοντας μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας (Mol *et al.*, 2019).

Κεφάλαιο 3^ο – Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των α -DCs, AGEs, ALEs

3.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC) για τον προσδιορισμό των α -DCs

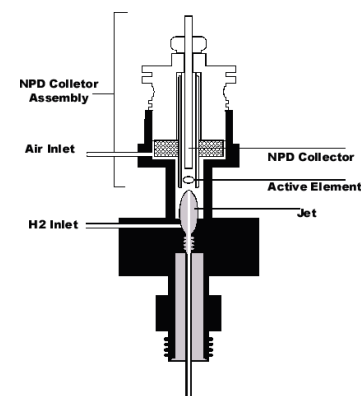
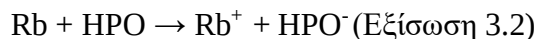
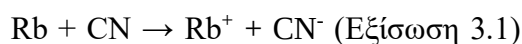
Η χρωματογραφία υγρού – αερίου βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού ή στα τοιχώματα ενός τριχοειδούς σωλήνα (Skoog, Holler, Crouch, 2007). Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από τη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Στην **Εικόνα 3.1** δίνεται το σχηματικό διάγραμμα ενός αεριοχρωματογράφου με τις βασικές του μονάδες. Βασικά πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η μεγάλη ευαισθησία, η ταχύτητα, η απλότητα, η επίτευξη δύσκολων διαχωρισμών, η δυνατότητα παραλαβής αναλλοίωτων των διαχωριζόμενων συστατικών και η επιτυχής εφαρμογή στην ποσοτική και ποιοτική ανάλυση (Χατζηϊωάννου & Κούππαρη, 2010).



Εικόνα 3.1: Συνοπτικό διάγραμμα ενός αεριο-χρωματογράφου (Χατζηϊωάννου & Κούππαρη, 2010).

Η GLC χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό οργανικών ουσιών σε πολύπλοκα δείγματα, όπως και τον προσδιορισμό διάφορων φυσικοχημικών μεγεθών. Προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι η πτητικότητα της χρωματογραφούμενης ουσίας στη θερμοκρασία της στήλης. Σε περιπτώσεις μη πτητικών ουσιών, αυτές μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα μέσω αντίδρασης με τα κατάλληλα αντιδραστήρια. Στην περίπτωση των α -δικαρβονυλικών ενώσεων, αν και πτητικές, μέσω του αντιδραστήριου OPD πραγματοποιείται η αντίδραση παραγωγοποίησης για την μετατροπή τους σε παράγωγα κιννοξαλίνης, 4-νιτροκιννοξαλίνης ή 6-νιτροκιννοξαλίνης (Jeong, Cha and Lee, 2017). Τόσο οι Jang *et al.*, 2013 όσο και οι Jiang *et al.*, 2013 για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κιννοξαλινών επιλέγουν ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD).

Ο NPD αποτελεί έναν εκλεκτικό ανιχνευτή καθώς, όπως φαίνεται και από την ονομασία του, αποκρίνεται μόνο σε ενώσεις που περιέχουν άτομα αζώτου ή/και φωσφόρου στο μόριο τους. Ουσιαστικά πρόκειται για έναν ανιχνευτή με παρόμοια μορφολογία μ' αυτή του ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID), με τη διαφορά ότι περιλαμβάνει ένα ηλεκτρικά θερμαινόμενο σφαιρίδιο (συνήθως αποτελείται από ρουβίδιο) πάνω από τον πίδακα (Εικόνα 3.2). Σε αντίθεση με τον FID, τα ιόντα στον NPD σχηματίζονται κοντά ή πάνω στην επιφάνεια του σφαιριδίου (Von Mühlen *et al.*, 2007; Jain, 2006). Συγκεκριμένα πραγματοποιείται ο ιοντισμός:



Εικόνα 3.2:
Ανιχνευτής αζώτου -φωσφόρου
(<http://www.chromedia.org>).

Ένα μικρό ρεύμα παράγεται από τη μετακίνηση αυτών των ιόντων προς το φορτισμένο συλλέκτη. Αυτό το ρεύμα μετρείται ως το σήμα από τον ανιχνευτή και προκύπτει η αντίστοιχη κορυφή στο χρωματογράφημα. Μεγαλύτερες ποσότητες της ένωσης δημιουργούν μεγαλύτερο σήμα, δίνοντας έτσι μεγαλύτερη κορυφή. Δεδομένου ότι η φλόγα δεν διατηρείται στον NPD, ο ιοντισμός υδρογονανθράκων δεν πραγματοποιείται όπως στον FID. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή εκλεκτικότητα σε ενώσεις που περιέχουν άζωτο και φώσφορο και την έλλειψη απόκρισης για άλλες ενώσεις. Η αποτελεσματικότητα ιοντισμού ενός NPD είναι περίπου 10.000 φορές καλύτερη για τις ενώσεις αζώτου και φωσφόρου έναντι των υδρογονανθράκων (Rood, 2007). Όπως και στον FID, έτσι και ο NPD δεν ανιχνεύει πολλά κοινά αέρια ή προσμείξεις. Το πιο βασικό πλεονέκτημα του NPD είναι η καλή επιλεκτικότητα και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης για τις ενώσεις που περιέχουν άζωτο και φώσφορο. Οι Jeong, Cha and Lee, 2017 αναφέρουν πως σε παλαιότερες μελέτες για την ανάλυση των α -δικαρβονυλικών ενώσεων έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες τεχνικές όπως αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD) και αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας με μικροεκχύλιση στερεής φάσης (HP/SPME, GC/MS) (Duflos *et al.*, 2006). Αν και οι τεχνικές αυτές προσφέρονται για την ανάλυση μη πτητικών και σταθερών ενώσεων,

δεν ενδείκνυνται για τις συγκεκριμένες πολύ πτητικές και έντονα δραστικές ενώσεις. Η υπεροχή του NPD έναντι του MS για τη συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων, ενισχύεται και από μια πρόσφατη μελέτη όπου βρέθηκε πως, η ευαισθησία του MS είναι πολύ πιο χαμηλή ενώ ο NPD περιορίζει τον ανεπιθύμητο θόρυβο άλλων πτητικών ενώσεων, παρέχοντας πιο αξιόπιστα αποτελέσματα (Zhu, Niu and Xiao, 2020). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως όταν χρησιμοποιείται ο NPD για μεγάλο χρονικό διάστημα, συνιστάται η περιοδική αλλαγή των θερμαινόμενων υλικών, γιατί υποβαθμίζεται η ποιότητα τους αργά με την πάροδο του χρόνου (Hage, 2019).

3.2 Τεχνικές προσδιορισμού των AGEs

Οι τεχνικές για τον προσδιορισμό της συγκεκριμένης τάξης ενώσεων διαχωρίζονται σε ενόργανες και ανοσοχημικές. Ως προς την πρώτη κατηγορία, περιλαμβάνεται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με διαφόρων ειδών ανιχνευτές, κυρίως με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) και φασματομετρία μάζας (MS). Μέσω της τεχνικής HPLC-DAD ανιχνεύεται η περιεκτικότητα της πυρρολίνης σε ορισμένα δείγματα τροφίμων αλλά επιβάλλεται η ύπαρξη έγχρωμων ενώσεων. Γι' αυτό τον σκοπό χρησιμοποιείται η φθορισμομετρία με την οποία προσδιορίζονται είτε ενώσεις φθορισμοφόρες (π.χ. πεντοσιδίνη) ή μη (π.χ. CML) αφού προηγηθεί παραγωγοποίηση με OPD. Στην ίδια κατηγορία υπάρχουν και μελέτες που αναφέρουν την αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με MS η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό τους σε δείγματα τροφίμων όπως γάλα και κρέας. Στην συγκεκριμένη τεχνική απαιτούνται πτητικές ενώσεις άρα προηγείται το βήμα της παραγωγοποίησης. Επιπροσθέτως, έχει χρησιμοποιηθεί και LC-MS/MS κυρίως για CML, αυξάνοντας την ευαισθησία έναντι της φθορισμομετρίας, χωρίς να απαιτείται παραγωγοποίηση. Οι ανοσοχημικές τεχνικές ανάλυσης εκπροσωπούνται από την τεχνική ELISA. Ωστόσο έχουν υπάρξει αναφορές για μη αξιόπιστα αποτελέσματα οδηγώντας σε αμφιλεγόμενα ενδεχόμενα (Sharma *et al.*, 2015). Βέβαια, σε πρόσφατη έρευνα φαίνεται να υπάρχει συμφωνία μεταξύ της ενόργανης και της ανοσοχημικής ανάλυσης (Gomez-Ojeda *et al.*, 2018).

3.3 Τεχνικές προσδιορισμού των ALEs

Μέχρι και πρόσφατα οι περισσότερες τεχνικές αφορούσαν τη φασματοσκοπία μάζας (MS) ή ήταν βασισμένες στην ανίχνευση αντισωμάτων. Πλέον έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που περιλαμβάνουν τη φθορισμομετρία, την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), την αέρια χρωματογραφία και τον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR). Η φασματοσκοπία προτιμάται για την ανίχνευση της MDA-dG (MDA-δεοξυγουανωσίνη) ενώ για ενώσεις όπως η MDALys προτιμάται η MS μαζί με φθορισμομετρία. Τόσο οι τεχνικές που βασίζονται σε ανίχνευση αντισωμάτων (π.χ. Elisa, Page) όσο και οι ενόργανες τεχνικές ανάλυσης παρά την υψηλή τους ευαισθησία φαίνεται να μην είναι δυνατό να προσδιορίσουν επακριβώς τις πρωτεΐνες που έχουν τροποποιηθεί ή την ακριβή θέση της τροποποίησης στο μόριο της πρωτεΐνης. Βέβαια, στην περίπτωση GC/MS τα

αποτελέσματα φανερώνουν αξιόπιστη ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της MDALys στα βιολογικά συστήματα. Εναλλακτικές τεχνικές όπως LC-ESI ή MALDI-MS που βασίζονται στην πρωτεομική ανάλυση θα μπορούσαν να συνδράμουν ώστε να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που αφορούν τη θέση της τροποποίησης ρίχνοντας περισσότερο φως στους μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα (Jové *et al.*, 2020).

Κεφάλαιο 4^ο – Σκοπός

Η παρούσα πτυχιακή εργασία σκοπεύει στη μελέτη της κινητικής της αντίδρασης της οξείδωσης των λιπιδίων, μέσω του ρυθμού σχηματισμού ενώσεων που διαθέτουν δραστικές ηλεκτρονιόφιλες καρβονυλομάδες (RCCs). Για την παραγωγή των δραστικών α -δικαρβονυλικών ενώσεων (γλυοξάλη, μεθυλογλυοξάλη και διακετύλιο) δείγματα ελαιόλαδων και σπορέλαιων θερμοξειδώθηκαν στους 150°C για 1h. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου, αφού είχε προηγηθεί ο σχηματισμός παραγώγων κιννοξαλίνης μέσω του αντιδραστηρίου OPD. Παράλληλα, μετρήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των υπό μελέτη δειγμάτων με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu. Τα δείγματα αναλύθηκαν ως προς την επίδραση του ολικού φαινολικού περιεχομένου στο σχηματισμό των RCCs. Τέλος, εκτιμήθηκε, από βιβλιογραφικά δεδομένα, η επίδραση της σύστασης των λιπαρών οξέων των δειγμάτων, στο σχηματισμό των δραστικών ενώσεων.

Κεφάλαιο 5°

5.1 Υλικά και Όργανα

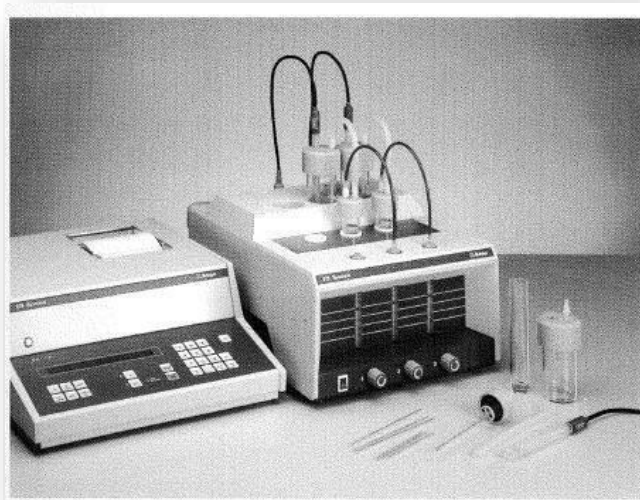
5.1.1 Αντιδραστήρια

- Διάλυμα 2-μεθυλογλυοξάλης 40% σε νερό, (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany)
- Κινοξαλίνη, 98% (Alfa Aesar, Kandel, Germany)
- 2-μεθυλοκινοξαλίνη, 97% (Acros Organics, Geel, Belgium)
- 2,3-διμεθυλοκινοξαλίνη, 97% (Acros Organics, Geel, Belgium)
- Ο-φαινυλοδιαμίνη (OPD) flaked 99,5%, (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany)
- Βενζοθειαζόλη (ISTD), 97% (Acros Organics, Geel Belgium)
- Οξικός αιθυλεστέρας, $\geq 99,8\%$ (Labscan International Ltd., Dublin, Ireland)
- Μεθανόλη (χρωματογραφικής καθαρότητας, $\geq 99,8\%$ (Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Εξάνιο (χρωματογραφικής καθαρότητας, $\geq 97\%$ (Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου 7,5% w/v (Na_2CO_3)
- Υδατικό διάλυμα γαλλικού οξέος ως πρότυπο (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ)
- Υδατικό διάλυμα Folin-Ciocalteu 1:10 v/v
- Υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου 1% v/v (NaOH)
- Μίγμα μεθανόλη : νερό 60/40 v/v
- Απιονισμένο νερό

5.1.2 Όργανα

- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας Fisons Instruments GC 8000 series με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD 800), (Fisons Instruments, Glasgow, UK)

- Περιστροφικός εξατμιστήρας (rotary evaporator) (IKA RV05, Staufen, Germany)
- Συσκευή Rancimat (679 Rancimat, Metrohm Switzerland) (**Εικόνα 5.1**)
- Orbital shaker OS 10 (Boeco, Germany)
- Φούρνος, Memmert UNB
- Φυγόκεντρος
- Αναλυτικός ζυγός, Memmert AE 200
- Votrex, (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
- Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους (UV-VIS), JASCO V-530, Tokyo, Japan



Εικόνα 5.1: Η συσκευή Rancimat 679 και το καταγραφικό της.

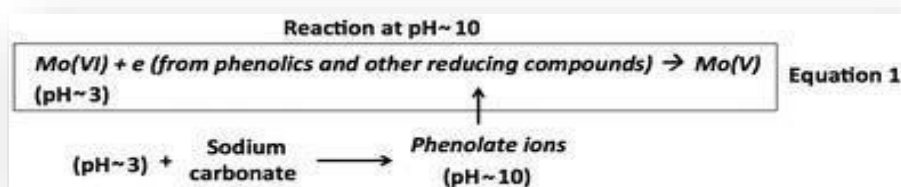
5.1.3 Υλικά

- Ογκομετρικές φιάλες (10, 25 και 50 mL)
- Ογκομετρικός κύλινδρος (100 mL)
- Ποτήρια ζέσεως (25, 50, 250 και 1000 mL)
- Πλαστικοί κωνικοί σωλήνες φυγόκεντρου (FALCON) (15 mL)
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur

- Πλαστικές κυψελίδες
- Μηχανική πιπέτα μεταβλητού όγκου 100-1000 μL και 10-100 μL
- Σιφόνια πλήρωσης (2, 5 και 10 mL)
- Φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (2 mL)
- Μαγνήτες

5.2 Μέθοδοι

5.2.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του ολικού πολικού φαινολικού κλάσματος ελαιόλαδων και σπορέλαιων.



Εικόνα 5.2 : Η αντίδραση οξειδοαναγωγής της μεθόδου Folin – Ciocalteu σε αλκαλικό περιβάλλον (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

Η μέθοδος Folin – Ciocalteu αποτελεί την περισσότερη ευρέως χρησιμοποιούμενη δοκιμή προσδιορισμού του ολικού φαινολικού κλάσματος σε τρόφιμα. Είναι μια χρωματομετρική μέθοδος η οποία βασίζεται στην αντίδραση οξειδοαναγωγής μεταξύ του αντιδραστήριου FC και των φαινολικών ενώσεων και πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον. Στις συνθήκες αυτές, αποβάλλεται ένα e^- από τη φαινολική ένωση και έτσι το φαινολικό ιόν προκαλεί την αναγωγή του αντιδραστήριου FC (**Εικόνα 5.2**).

Δείγματα

Εξετάστηκαν είκοσι δείγματα εξαιρετικών παρθένων ελαιόλαδων (EVOOs) διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης από την ποικιλία Κορωνέικη, ελαιοκομικής περιόδου 2018-2019. Τα δείγματα ελαιόλαδου παραλήφθηκαν από το Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων στα πλαίσια της Εμβληματικής Δράσης «Οι Δρόμοι της Ελιάς». Από το σύνολο των δειγμάτων που διέθετε το Εργαστήριο επιλέχθηκαν ελαιόλαδα με μέτριο έως υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC), δηλαδή από 50-500 mg GAE/Kg ελαιόλαδου (Servili *et al.*, 2004). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων του ολικού φαινολικού περιεχόμενου (TPC) τον προηγούμενο χρόνο είχε πραγματοποιηθεί από τον ΕΦΕΤ ενώ η συγκέντρωση των πολυφαινολών μέσω

HPLC είχε πραγματοποιηθεί από το ΕΚΠΑ (Πίνακας 5.1). Για συγκριτικούς λόγους, εξετάστηκαν και δέκα δείγματα σπορέλαιων (εμπορικά σκευάσματα) από: αραβοσιτέλαιο, ηλιέλαιο, σησαμέλαιο, εξευγενισμένο ελαιόλαδο, λάδι καρύδας και φοινικέλαιο.

Πίνακας 5.1: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GA Kg^{-1} ελαιόλαδου) και συγκέντρωση πολυφαινολών (mg Kg^{-1} ελαιόλαδου) των είκοσι δειγμάτων ελαιόλαδων που αναλύθηκαν κατά τη χρόνια 2019 (ΕΦΕΤ-ΕΚΠΑ).

Κωδικοί Δειγμάτων	Συγκέντρωση βιοφαινολών (mg Kg^{-1} ελαιόλαδου)	Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο (mg GAE Kg^{-1} ελαιόλαδου)
KOR_LAS_00_01	294,88	229,0
KOR_LAS_00_02	377,75	345,0
KOR_RET_00_02	218.40	211,0
KOR_RET_00_04	198.36	155,0
KOR_RET_00_07	299,27	219,0
KOR_RET_00_08	359,01	204,0
KOR_CHA_00_01	274,85	217,0
KOR_CHA_00_02	183.02	193,0
KOR_CHA_00_03	188.45	78,0
KOR_CHA_00_08	220.21	216,0
KOR_HER_00_03	189.46	195,0
KOR_HER_00_05	217.34	378,0
KOR_HER_00_06	353,99	259,0
KOR_HER_00_12	249.53	205,0
KOR_MES_00_01	348,85	281,0
KOR_MES_00_03	324,68	235,0
KOR_MES_00_04	206.42	210,0
KOR_MES_00_06	222.95	209,0

KOR_MES_00_07	251,92	-
KOR_LES_00_06	376,67	250,0

Εκχύλιση φαινολικών συστατικών ελαιόλαδων και σπορέλαιων

Σε πλαστικούς σωλήνες φυγόκεντρου 15,0 mL, ζυγίζονται 1,0 g ελαιόλαδου (με ακρίβεια 0,01 mg) και προστίθενται 2,0 mL εξανίου με σιφόνιο και το περιεχόμενο αναδεύεται. Στην συνέχεια προστίθενται 2,0 mL μίγματος MeOH:H₂O (60/40 v/v) με σιφόνιο και το περιεχόμενο αναδεύεται για 2 min σε κυκλοαναμίκτη. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 10 min στους 20°C και στις 2500 στροφές ανά λεπτό (RPM). Η άνω λιπαρή στοιβάδα απορρίπτεται ενώ συλλέγεται η κατώτερη υδατομεθανολική στοιβάδα.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος

Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος

Σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL, προστίθενται 30,0 mL μίγματος Μεθανόλη : Νερό (60/40 v/v) και 0,05 g γαλλικού οξέος (με ακρίβεια 0,01 mg). Το περιεχόμενο της φιάλης αναδεύεται μέχρι πλήρη διαλυτοποίηση και συμπληρώνεται η φιάλη μέχρι τη χαραγή με το διαλύτη. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 1000 mg/L.

Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης

Από το πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 1000 mg/L, μεταφέρονται με μηχανική πιπέτα 100, 200, 400, 600, 800 και 1000 μ L σε ογκομετρικές φιάλες των 10,0 mL και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων βαθμονόμησης είναι 10,20, 40, 60, 80 και 100 μ g/mL αντίστοιχα.

Δοκιμή Folin – Ciocalteu

Λευκό: Σε πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου 15,0 mL μεταφέρονται με μηχανική πιπέτα 1,0 mL απιονισμένο νερό και 5,0 mL αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu 1:10 v/v με σιφόνιο και αφήνονται σε ηρεμία για 3 min. Ακολουθεί προσθήκη 4,0 mL διαλύματος Na₂CO₃ 7,5% w/v και αναμονή 2h σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου. Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 10,0 mL. Το διάλυμα μεταφέρεται σε πλαστική κυψελίδα και μετράτε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 765 nm.

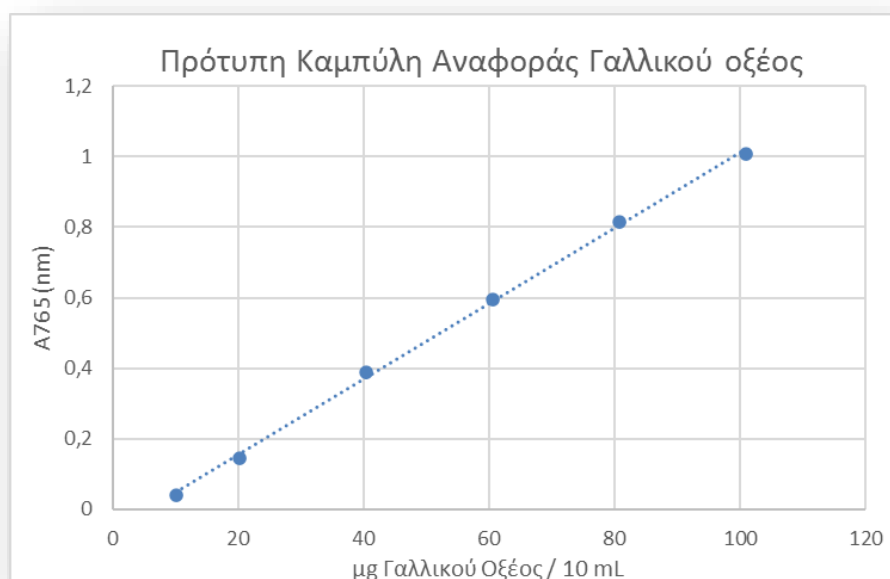
Διαλύματα Βαθμονόμησης: Σε πλαστικούς σωλήνες φυγόκεντρου 15,0 mL μεταφέρονται με μηχανική πιπέτα 1,0 mL του κάθε διαλύματος βαθμονόμησης και

5,0 mL αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu 1:10 v/v με σιφώνιο και αφήνονται σε ηρεμία για 3 min. Ακολουθεί προσθήκη 4,0 mL διαλύματος Na_2CO_3 7,5% w/v και αναμονή 2h σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου. Ο τελικός όγκος των διαλυμάτων είναι 10,0 mL. Τα διαλύματα μεταφέρονται σε πλαστικές κυψελίδες για μέτρηση της απορρόφησής τους σε μήκος κύματος 765 nm.

Δείγματα : Σε πλαστικούς σωλήνες φυγόκεντρου 15,0 mL μεταφέρονται με μηχανική πιπέτα 0,5 mL υδατομεθανολικού εκχυλίσματος και 0,5 mL απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, προστίθενται 5 mL αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu 1:10 v/v με σιφώνιο και αφήνονται σε ηρεμία για 3 min. Ακολουθεί προσθήκη 4,0 mL διαλύματος Na_2CO_3 7,5% w/v και αναμονή 2h σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου. Ο τελικός όγκος των διαλυμάτων είναι 10,0 mL. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται σε μήκος κύματος 765 nm, όπως και προηγούμενα. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα βαθμονόμησης συγκέντρωσης 10-100 mg GA/L. Για κάθε διάλυμα βαθμονόμησης, μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 765nm και προέκυψε η παρακάτω εξίσωση της ευθείας με κλίση 0,0107.



Διάγραμμα 5.1: Καμπύλη αναφοράς με πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος (φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin - Ciocalteu).

Με βάση την καμπύλη αναφοράς, το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά Kg παρθένου ελαιόλαδου σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\frac{\text{mg γαλλικού οξέος}}{\text{kg VOO}} = \frac{4 * C}{w}$$

όπου:

C : τα μg γαλλικού οξέος που περιέχονται σε 0,5 mL υδατομεθανολικού εκχυλίσματος

w : η μάζα του εκάστοτε δείγματος ελαιόλαδου (g).

5.2.2 Μελέτη της κινητικής της αντίδρασης της οξείδωσης των λιπιδίων, μέσω του ρυθμού σχηματισμού των α-δικαρβονυλικών ενώσεων.

Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τον ποσοτικό προσδιορισμό

Διάλυμα παρακαταθήκης των τριών παραγώγων κινοξαλίνης (stock mix)

Σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL προστίθενται 0,01 g (με ακρίβεια 0,01 mg) των τριών παραγώγων κινοξαλίνης (κίνοξαλίνη, 2-μεθυλοκίνοξαλίνη, 2,3-διμεθυλοκίνοξαλίνη). Για την πλήρη διάλυση των στερεών ουσιών προστίθεται μικρή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το διαλύτη. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 1,0 g/L. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -5°C και προτείνεται η συχνή ανανέωσή του.

Διαλύματα εργασίας του stock mix

Από το διάλυμα παρακαταθήκης (stock mix), προκύπτουν τα αραιωμένα διαλύματα εργασίας διαφορετικών συγκεντρώσεων. Σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL μεταφέρεται με μηχανική πιπέτα ποσότητα του διαλύματος (stock mix) και η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με οξικό αιθυλεστέρα. Προστίθενται ως εσωτερικό πρότυπο για την αέρια χρωματογραφία, 200 μL διαλύματος benzothiazole. Η τελική συγκέντρωση των αραιωμένων διαλυμάτων εργασίας είναι 0,2, 0,5, 1,0, 10, 50 και 100 μg/mL. Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς λαμβάνει χώρα καθημερινά πριν την ανάλυση δειγμάτων και βρέθηκε πως τα βέλτιστα R² προκύπτουν από τις συγκεντρώσεις 0,2 και 100 μg/mL. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εργασίας εμφανίζουν μεγάλο εύρος τιμών προκειμένου η καμπύλη βαθμονόμησης να περιλαμβάνει τις τιμές και των τριών ουσιών.

Προετοιμασία διαλυμάτων παρακαταθήκης και διαλυμάτων εργασίας για την παραγωγοποίηση των α-δικαρβονυλικών ενώσεων

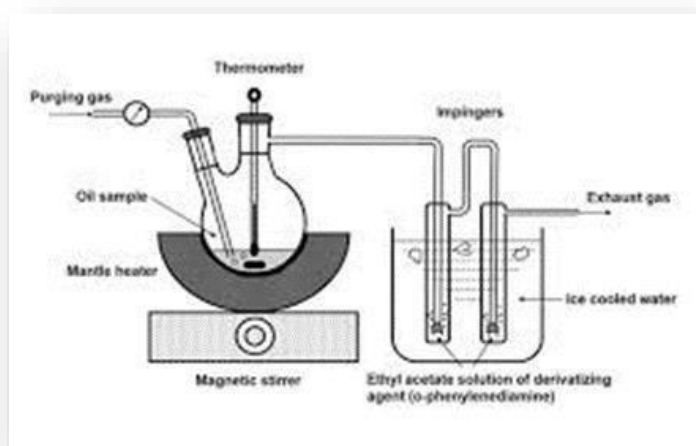
Πρωτογενές διάλυμα εσωτερικού προτύπου (ISTD): σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL προστίθενται 0,1 g βενζοθειαζόλης και η φιάλη αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με οξικό αιθυλεστέρα. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10,0 g/L. Η βενζοθειαζόλη έχει επιλεγεί μιας και παρέχει σήμα με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των αναλυτών. Προστίθεται κατά τη ανάλυση σε σταθερή ποσότητα σε όλα τα

δείγματα και διαλύματα βαθμονόμησης με σκοπό να αντισταθμίσει τυχαία και συστηματικά σφάλματα. Προτείνεται η αποθήκευση του διαλύματος στους -5°C και η συχνή ανανέωσή του.

Διάλυμα παρακαταθήκης αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (OPD): ζυγίζονται 0,01 g OPD (με ακρίβεια 0,01 mg) και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL. Η φιάλη αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με οξικό αιθυλεστέρα. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 1,0 g/L. Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν από κάθε ανάλυση ενώ το OPD αποθηκεύεται στους 2°C με αέριο άζωτο. Η χρήση του είναι απαραίτητη για τη μετατροπή των α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε παράγωγα κινოξαλινών (Jiang *et al.*, 2013).

Διάλυμα εργασίας αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (OPD): σε ογκομετρική φιάλη των 25,0 mL μεταφέρονται με σιφόνιο 5 mL διαλύματος παρακαταθήκης OPD που αναφέρθηκε προηγουμένως. Η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με οξικό αιθυλεστέρα. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 0,2 g/L.

Σχηματισμός παραγώγων κινοξαλίνης μέσω αντίδρασης των α -δικαρβονυλικών ενώσεων με το αντιδραστήριο OPD



Εικόνα 5.3 : Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής κινοξαλινών μέσω του αντιδραστηρίου OPD σε μαγειρικά έλαια (Wang *et al.*, 2019).

Για τον σχηματισμό των α -δικαρβονυλικών ενώσεων μέσω θερμοξείδωσης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Rancimat σύμφωνα με την αναπαράσταση της **Εικόνας 5.3**. Τόσο οι Wang *et al.*, 2019 όσο και οι Jiang *et al.*, 2013 στηρίχτηκαν σε παρόμοιες τεχνικές με σκοπό τη μεταφορά των πτητικών ενώσεων στο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης και διαλυτοποίησή τους σε αυτό.

Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα ζυγίζονται 10,0 g δείγματος ελαίου (με ακρίβεια 0,01 mg). Ο δοκιμαστικός σωλήνας φέρεται στη συσκευή επιταχυνόμενης

οξειδωσης λιπαρών υλών (Rancimat) και πωματίζεται με πλαστικό πόμα με δύο οπές. Η μια οπή εξυπηρετεί στη θερμοοξειδωση του ελαίου ενώ η δεύτερη οπή συνδέεται με εξωτερικό γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Οι δύο δοκιμαστικοί σωλήνες συνδέονται με πλαστικό σωληνάκι. Ο εξωτερικός δοκιμαστικός σωλήνας βρίσκεται βυθισμένος σε πάγο και περιέχει 25 mL του διαλύματος εργασίας OPD.

Το δείγμα ελαίου θερμαίνεται στη συσκευή Rancimat για 1 ώρα στους 150 °C (Εικόνα 5.4). Καθώς το δείγμα οξειδώνεται η γλυοξάλη (GO), η μεθυλογλυοξαλη (MGO) και το διακετύλιο (DA) εξατμίζονται ως πτητικές ενώσεις. Μέσω της σύνδεσης των δύο δοκιμαστικών σωληνίων, οι πτητικές ενώσεις μεταφέρονται και παγιδεύονται στο διάλυμα εργασίας OPD όπου και λαμβάνει χώρα η παραγωγοποίησή τους.



Εικόνα 5.4: Συσκευή Rancimat όπως τροποποιήθηκε για την παραγωγή δικαρβονυλικών ενώσεων και την παραγωγοποίησή τους σε κινοξαλίνες κατά την θέρμανση ελαιόλαδων και σπορέλαιων.

Μετά το πέρας μιας ώρας, τα 25,0 mL του διαλύματος εργασίας OPD που πλέον περιέχουν τα παράγωγα κινοξαλίνης, μεταφέρονται σε σφαιρική φιάλη και πωματίζονται. Η σφαιρική φιάλη φέρεται σε orbital shaker για 40 min στις 250 στροφές ανά λεπτό (RPM) προκειμένου να συνεχιστεί η αντίδραση παραγωγοποίησης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί συμπύκνωση του δείγματος σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 40°C με τη χρήση υδατόλουτρου. Μετά από απομάκρυνση του διαλύτη ο επιθυμητός τελικός όγκος του δείγματος είναι 0,5 mL. Σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη (2 mL) φέρονται με μηχανική πιπέτα τα 0,5 mL του δείγματος, 20,0 µL διαλύματος ISTD και συμπληρώνεται με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι τελικού όγκου 1,0 mL. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία τόσο για

τα σπορέλαια όσο και για τα ελαιόλαδα. Για κάποια δείγματα ελήφθησαν δύο μετρήσεις.

Ακολουθεί σχολαστικός καθαρισμός των τμημάτων της συσκευής Rancimat, ο οποίος συνίσταται στα παρακάτω:

1. Ως προς τα πλαστικά μέρη, πλένονται με ζεστό απιονισμένο νερό και διάλυμα καυστικού νατρίου 1%. Ξεπλένονται με νερό βρύσης και απιονισμένο νερό και τα σωληνάκια τοποθετούνται σε φούρνο στους 90 °C μέχρι πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας.
2. Για τα γυάλινα μέρη, ξεβγάζονται με ακετόνη τρεις φορές. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με απιονισμένο νερό και διάλυμα καυστικού νατρίου 1% στους 70 °C για 2h. Ξεπλένονται με νερό βρύσης και απιονισμένο νερό και τοποθετούνται σε φούρνο στους 110 °C για 1h μέχρι πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας.

Ποσοτικός προσδιορισμός των GO, MGO και DA με GC-NPD

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων γλυοξάλη (GO), μεθυλογλυοξάλη (MGO) και διακετύλιο (DA) πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με χρήση αέριας χρωματογραφίας αφού είχε προηγηθεί παραγωγοποίησή τους σε κινοξαλίνες. Το λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων ήταν το GCMS Solution Version 4.30 (Shimadzu). Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.2**. Για τη σύγκριση των ποσοτήτων των ουσιών χρησιμοποιήθηκε το εμβαδό των κορυφών.

Πίνακας 5.2: Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας.

Στήλη	Agilent CP-Wax 52CB (30 m X 0,32 mm i.d., d.f. 0,25μm)		
Θερμοκρασία Εισαγωγέα	250 °C		
Θερμοκρασία NPD	300 °C		
Φέρον Αέριο	Ήλιο (He)		
Όγκος έγχυσης	1 μL		
Λόγος διαμοιρασμού	1:10 (split ratio)		
Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα	Χρόνος (min)	Θερμοκρασία(°C)	Ρυθμός ανόδου (°C/min)
	1	80,0	-

	2	200,0	8
	15	240,0	20

Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν ως εξής : από την καμπύλη αναφοράς που προέκυψε από τα διαλύματα βαθμονόμησης των παραγώγων κιννοξαλινών προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση κιννοξαλίνης, 2-μεθυλοκιννοξαλίνης και 2,3-διμεθυλοκιννοξαλίνης κάθε δείγματος σε ppm. Η μετατροπή των παραγώγων κιννοξαλινών σε α -δικαρβονυλικές ενώσεις βασίζεται στην εξίσωση :

$$C_{GO} (\mu\text{g/g}) = \frac{\frac{\text{Κιννοξαλίνη } (\mu\text{g})}{\text{Mr, Κιννοξαλίνης } (\frac{\text{g}}{\text{mol}})}}{\text{Μάζα ελαιόλαδου } (\text{g})} \times \text{Mr}_{GO} (\text{g/mol})$$

Όπου $\text{Mr}_{\text{Κιννοξαλίνης}} = 130,15 \text{ g/mol}$ και $\text{Mr}_{GO} = 58,04 \text{ g/mol}$. Στην εξίσωση αυτή βασίζεται και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της MGO και DA σε $\mu\text{g/g}$. Η αθροιστική συγκέντρωση των α -δικαρβονυλικών ενώσεων προκύπτει ως εξής :

$$(C_{GO} + C_{MGO} + C_{DA}) \mu\text{g/g} = \text{Sum } (\mu\text{g/g}).$$

Η επί τοις % περιεκτικότητα για κάθε μια ένωση ξεχωριστά προκύπτει ως εξής :

$$\% GO = \frac{C_{GO} (\frac{\mu\text{g}}{\text{g}})}{\text{Sum } (\frac{\mu\text{g}}{\text{g}})} \times 100 \%$$

Όμοια υπολογίζονται και οι % περιεκτικότητες των ενώσεων MGO και DA.

Στατιστική επεξεργασία

Η μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (One-Way ANOVA) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Statgraphics Centurion 16.1.11. Οι μέσες τιμές της περιεκτικότητας των τριών α -δικαρβονυλικών ενώσεων συγκρίθηκαν με τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

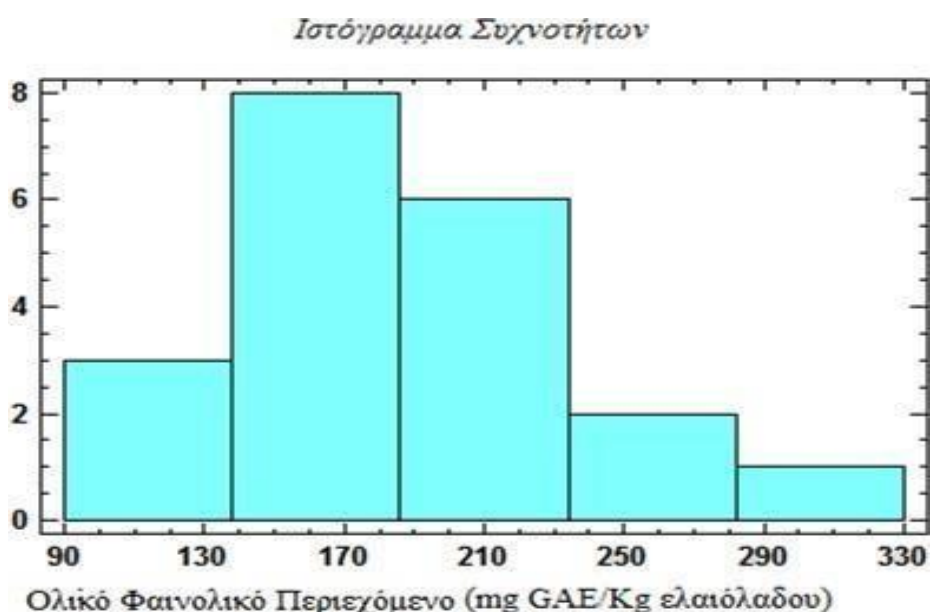
Κεφάλαιο 6^ο – Αποτελέσματα και Συζήτηση

6.1 Προσδιορισμός του ολικού πολικού φαινολικού κλάσματος ελαιόλαδων και σπορέλαιων.

Ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) μελετήθηκαν 20 διαφορετικά παρθένα ελαιόλαδα και 10 σπορέλαια. Το TPC προσδιορίστηκε με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu. Για την πρώτη κατηγορία, οι τιμές που προέκυψαν είναι πολλές και διαφορετικές και αυτές ομαδοποιούνται σε κλάσεις. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία προτείνεται ο τύπος του Sturges:

$$k = 1 + 3,32\log_{10} (n)$$

ο οποίος δίνει τον αριθμό των κλάσεων k ως συνάρτηση του μεγέθους του δείγματος n και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας οδηγός για την επιλογή κατάλληλου αριθμού κλάσεων. Οι 20 τιμές TPC ομαδοποιήθηκαν σε πέντε κλάσεις και η γραφική αναπαράστασή τους φαίνεται στο **Διάγραμμα 6.1**. Η περιεκτικότητα σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο κυμαίνεται μεταξύ 106,264 και 287,724 mg γαλλικού οξέος/Kg παρθένου ελαιόλαδου (VOO) ενώ η μέση τιμή είναι 187,399 mg GAE/Kg ελαιόλαδου. Το 55% των τιμών είναι συγκεντρωμένο στις πρώτες 2 από τις 5 κλάσεις, δηλαδή το 55 % των παρθένων ελαιόλαδων που μελετήθηκαν περιείχαν λιγότερα από 186,0 mg GAE/Kg ελαιόλαδου. Επίσης παρατηρείται πως οι συχνότητες φθίνουν καθώς αυξάνεται το TPC και μόνο το δείγμα με τον κωδικό KOR_LAS_00_02 εμφάνισε TPC μεγαλύτερο από 282 mg GAE/Kg ελαιόλαδου.



Διάγραμμα 6.1 : Ιστόγραμμα συχνοτήτων για τη γραφική αναπαράσταση της κατανομής των δειγμάτων από τη μεταβλητή ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/Kg ελαιόλαδου).

Η κατανομή βρίσκεται διασκορπισμένη σε ένα διάστημα 181,459 mg ($R = X_{\max} - X_{\min} = 287,724 \text{ mg} - 106,264 \text{ mg} = 181,459 \text{ mg}$). Τα αποτελέσματα εμφανίζουν ανομοιογένεια μιας και ο συντελεστής μεταβλητότητας ισούται 24,7 (>10%) και η μορφή της κατανομής χαρακτηρίζεται ως συμμετρική αφού ο τυποποιημένος συντελεστής ασυμμετρίας είναι εντός των ορίων -2 και 2 ($= 0,58$). Το μεγάλο εύρος τιμών θα μπορούσε να προκύψει ως λογική απόρροια των διαφορετικών γεωγραφικών προελεύσεων των δειγμάτων. Είναι γνωστό πως ο τρόπος καλλιέργειας, το κλίμα και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η συγκομιδή, η συσκευασία και ο τρόπος αποθήκευσης επηρεάζουν σημαντικά τις τιμές του TPC. Εφόσον το TPC κυμαίνεται μεταξύ αυτού του εύρους τιμών τα δείγματα χαρακτηρίζονται από μεσαία (50-200 mg GAE/Kg) έως υψηλή περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών (200-500 mg GAE/Kg). Γενικότερα, το TPC εμφανίζει ανομοιογένεια μεταξύ των Μεσογειακών χωρών με τις τιμές του να κυμαίνονται σε μεγάλο εύρος από 50 έως 1000 mg GAE/Kg με πιο συνηθισμένες τιμές εντός των ορίων 100-300 mg GAE/Kg (Kalogeropoulos and Tsimidou, 2014). Οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου συμβάλλουν στην προστασία των λιποπρωτεϊνών χαμηλής περιεκτικότητας από την οξειδωτική καταστροφή. Έτσι έχει θεσπιστεί από την EFSA ως κατώτερο όριο πως 20 g ελαιόλαδου θα πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον 5 mg HT και των παραγώγων της για να αποδοθεί ισχυρισμός υγείας (Pedan *et al.*, 2019). Συμπληρωματικά, το περιεχόμενο σε πολυφαινόλες θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 250 mg/Kg. Στην προκειμένη περίπτωση μόνο τα δείγματα KOR_LAS_00_02 και KOR_HER_00_05 πληρούν την τελευταία προϋπόθεση με τιμές 287,72 και 260,68 mg GAE/Kg αντίστοιχα. Οι Kalogeropoulos and Tsimidou, 2014 αναφέρουν πως σε 221 ελληνικά EVOO διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης και ποικιλίας το TPC κυμαίνεται μεταξύ 23-641 mg GAE/Kg με την Κορωνέικη ποικιλία να δίνει τις υψηλότερες τιμές (>250 mg GAE/Kg). Σε ισπανικά ελαιόλαδα οι αντίστοιχες τιμές κυμαίνονται μεταξύ 153-317 mg GAE/Kg (Borges *et al.*, 2015) ενώ σε ιταλικά ελαιόλαδα είναι 138-278 mg GAE/Kg (Negro *et al.*, 2019).

Όσον αφορά τα σπορέλαια, μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου, προέκυψε πως το ολικό φαινολικό περιεχόμενο δεν είναι δυνατόν να ανιχνευτεί. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τους Christodouleas *et al.*, 2014, καθώς μέσω της μεθόδου FC δεν ήταν δυνατό να ανιχνευτεί TPC σε δείγματα αραβοσιτελαίου, ηλιέλαιου και σησαμελαίου. Συμπληρωματικά, οι Janu *et al.*, 2013 προσδιόρισαν 1,8 mg για το λάδι καρύδας, 0,49 mg για το ηλιέλαιο και 0,33 mg GAE/100 g ελαίου για το σησαμέλαιο. Έχει παρατηρηθεί πως τα μη εξευγενισμένα σπορέλαια περιέχουν υψηλότερο TPC συγκριτικά με τα εξευγενισμένα. Μια εξήγηση είναι πως τα σπορέλαια εμφανίζουν μια μεγάλη ποικιλία φυσικών πολυφαινολών που ποικίλουν ανάλογα με την διαδικασία εκχύλισης και παραγωγής του ελαίου. Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική μείωση τους κατά τη θερμική επεξεργασία με σκοπό την απόκτηση εμπορικών προϊόντων.

Πίνακας 6.1 : Συγκεντρωτικός πίνακας της μάζας $\pm$ SD (g), του TPC $\pm$ SD (mg GAE/Kg ελαιόλαδου), του RSD και του ποσοστού μείωσης αρχικού και τελικού TPC για τα είκοσι ελαιόλαδα.

Κωδικός Δείγματος	Μάζα ελαιόλαδου (g)	TPC (mg GAE/Kg ελαιόλαδου)	RSD%	Ποσοστό Μείωσης (%)
KOR_LAS_00_01	1,0240 $\pm$ 0,004	198,44 $\pm$ 9,23	4,80	-13,34
KOR_LAS_00_02	1,0150 $\pm$ 0,002	287,72 $\pm$ 5,34	1,86	-16,60
KOR_RET_00_02	1,0094 $\pm$ 0,003	162,57 $\pm$ 14,72	9,05	-22,95
KOR_RET_00_04	1,0180 $\pm$ 0,000	131,55 $\pm$ 11,92	9,06	-15,13
KOR_RET_00_07	1,0233 $\pm$ 0,003	183,92 $\pm$ 11,09	6,03	-16,02
KOR_RET_00_08	1,0157 $\pm$ 0,004	195,83 $\pm$ 6,04	3,09	-4,00
KOR_CHA_00_01	1,0080 $\pm$ 0,012	227,35 $\pm$ 12,37	5,44	4,77
KOR_CHA_00_02	1,0037 $\pm$ 0,004	151,16 $\pm$ 9,81	6,49	-21,68
KOR_CHA_00_03	1,0214 $\pm$ 0,000	106,26 $\pm$ 2,28	2,15	36,24
KOR_CHA_00_08	1,0170 $\pm$ 0,003	180,85 $\pm$ 9,92	5,48	-16,27
KOR_HER_00_03	1,0262 $\pm$ 0,004	151,82 $\pm$ 7,95	5,24	-22,14
KOR_HER_00_05	1,0217 $\pm$ 0,009	260,68 $\pm$ 6,46	2,48	-31,04
KOR_HER_00_06	1,0158 $\pm$ 0,011	203,02 $\pm$ 8,77	4,32	-21,61
KOR_HER_00_12	1,0357 $\pm$ 0,005	179,42 $\pm$ 9,80	5,46	-12,48
KOR_MES_00_01	1,0147 $\pm$ 0,004	241,19 $\pm$ 3,32	1,38	-14,17
KOR_MES_00_03	1,0164 $\pm$ 0,003	201,52 $\pm$ 8,15	4,05	-14,25
KOR_MES_00_04	1,0096 $\pm$ 0,005	149,69 $\pm$ 12,97	8,67	-28,72
KOR_MES_00_06	1,0230 $\pm$ 0,006	185,94 $\pm$ 8,85	4,76	-11,03
KOR_MES_00_07	1,0252 $\pm$ 0,012	122,02 $\pm$ 6,21	5,09	-
KOR_LES_00_06	1,0159 $\pm$ 0,004	227,01 $\pm$ 13,38	5,89	-9,20

Ακολουθεί η σύγκριση των κατανομών για τις τιμές περιεκτικότητας σε TPC όπως προσδιορίστηκαν από τον ΕΦΕΤ (Πίνακας 5.1) και των τιμών περιεκτικότητας TPC όπως προσδιορίστηκαν κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου πειράματος (Πίνακας 6.1). Ο ένας πληθυσμός, τον οποίο θα συμβολίσουμε με A, είναι η κατανομή των τιμών της περιεκτικότητας σε TPC της 1^{ης} χρονιάς (ΕΦΕΤ) και ο άλλος, έστω B, η κατανομή των τιμών της περιεκτικότητας σε TPC της 2^{ης} χρονιάς. Ως μ_A θα συμβολίσουμε την άγνωστη μέση τιμή του πληθυσμού A και ως μ_B την επίσης άγνωστη μέση τιμή του πληθυσμού B. Τα δύο δείγματα έχουν ληφθεί ανεξάρτητα το ένα από το άλλο καθώς οι μετρήσεις περιεκτικότητας TPC αρχικά δεν επηρεάζουν τις μετρήσεις τελικά. Επίσης, πρόκειται για μικρά δείγματα ($n < 30$) και για αυτό θα εξεταστεί η κανονικότητα των πληθυσμών τους. Το Shapiro – Wilk test υπολόγισε ότι η P -τιμή είναι ίση με 0,28 για το μ_A και 0,94 για το μ_B . Για οποιοδήποτε $\alpha < 0,28$ (και $< 0,94$ αντίστοιχα) άρα και για $\alpha = 0,05$ δεν μπορεί να απορριφθεί η υπόθεση πως τα δείγματα του πληθυσμού A και του πληθυσμού B προέρχονται από κανονική κατανομή με 95% εμπιστοσύνη. Το F-test υπολόγισε ότι η P -τιμή είναι ίση με 0,012. Επομένως για $\alpha < 0,12$ άρα και για $\alpha = 0,01$ δεν

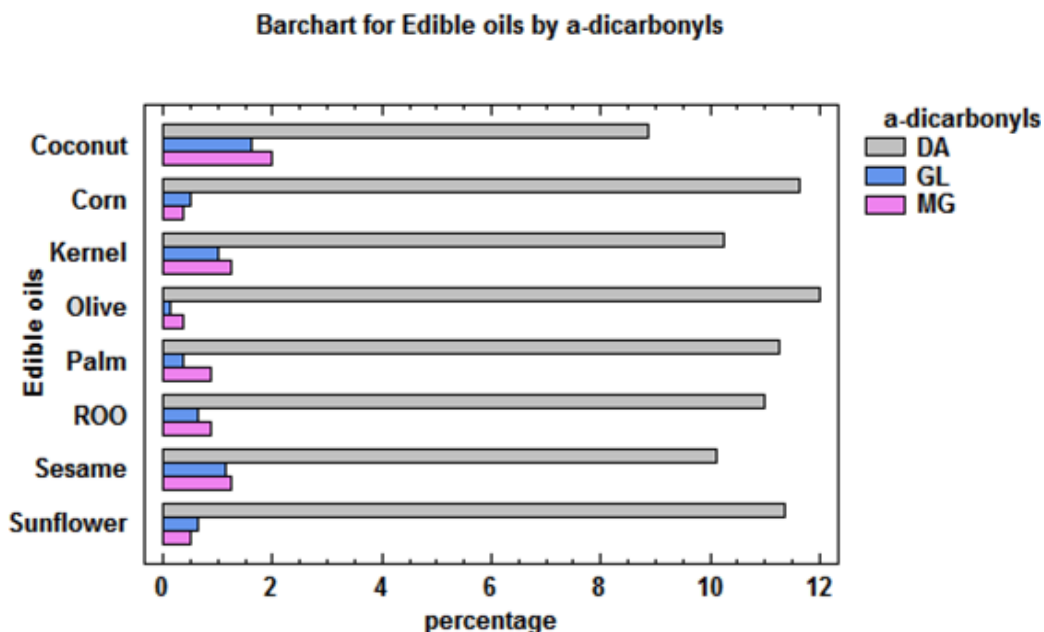
απορρίπτεται η ιδέα ότι τα δείγματα προέρχονται από πληθυσμούς με ίσες διακυμάνσεις. Τελικά, το t-test υπολόγισε ότι η P -τιμή είναι ίση με 0,0034. Άρα σε επίπεδο σημαντικότητας 1 % και εφόσον $\alpha > P$ -τιμή (= 0,0034) τα πειραματικά δεδομένα δίνουν στατιστικά σημαντικές αποδείξεις πως η μέση τιμή περιεκτικότητας TPC ανάμεσα στις δυο χρονιές διαφέρει. Μια εκτίμηση της διαφοράς $\mu_A - \mu_B$ για 99% πιθανότητα δίνεται από το διάστημα εμπιστοσύνης [-125,948; -8,9506].

Η αποθήκευση των δειγμάτων ελαιόλαδων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C), σε σκοτεινό μέρος, χωρίς πηγές θερμότητας και σε σκουρόχρωμα γυάλινα μπουκάλια τα οποία εμποδίζουν την UV-ακτινοβολία, την είσοδο υγρασίας και άλλων αερίων. Μετά από κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε αέριο N_2 προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωσή τους. Τα ποσοστά μείωσης μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} χρονιάς TPC κυμάνθηκαν από 4,00 έως 31,04%. Αν και οι συνθήκες αποθήκευσης στοχεύουν σε όσο το δυνατόν μικρότερα ποσοστά, έχει βρεθεί και σε Ιταλικά δείγματα EVOOs πως τα φαινολικά συστατικά μειώνονται σημαντικά στις ίδιες συνθήκες μετά την πάροδο του χρόνου (~18 μήνες). Η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική σε ελαιόλαδα χωρίς τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου. Σε ελαιόλαδα που είχαν αποθηκευτεί με άζωτο η μείωση φαίνεται να ξεκινά μετά από 6 μήνες. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται κυρίως σε μια συγκεκριμένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων, τα σεκοϊριδοειδή τα οποία καταναλώνονται με την πάροδο του χρόνου έτσι ώστε να αντισταθμίσουν και να εξουδετερώσουν διάφορα οξειδωτικά φαινόμενα (Smeriglio *et al.*, 2019). Και οι Kalogeropoulos and Tsimidou, 2014 τονίζουν πως σε ελληνικά ελαιόλαδα Κορωνέικης ποικιλίας που έχουν αποθηκευτεί με άζωτο το TPC διατηρήθηκε σε ποσοστό έως 70% ενώ σε αφιλτράριστα δείγματα παρατηρήθηκε σοβαρή μείωση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την έρευνα των Krichene *et al.*, 2015 όπου διαφορετικά δείγματα EVOOs εμφανίζουν ποσοστά μείωσης ~ 20% στους 25°C στους πρώτους 4,5 μήνες. Βέβαια, στην έρευνα αυτή εμφανίζονται ορισμένα δείγματα με ποσοστά αύξησης που οφείλεται σε υποβάθμιση των σύνθετων πολυφαινολών σε απλές φαινόλες. Δηλαδή, μικρό ποσοστό συνθέτων πολυφαινολών αρχικά, οδήγησε σε αυξημένο ποσοστό απλών φαινολών ύστερα από 12 μήνες στους 25 °C. Το συμπέρασμα της έρευνας αυτής εξηγεί και την αύξηση του TPC στα δείγματα KOR_CHA_00_01 και KOR_CHA_00_03 που όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 5.1 εμφανίζουν από τις χαμηλότερες περιεκτικότητες σε πολυφαινόλες κατά την 1^η χρονιά.

6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε σπορέλαια και ελαιόλαδα.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τριών α -δικαρβονυλικών ενώσεων εξετάστηκαν δέκα διαφορετικά εμπορικά δείγματα σπορέλαιων και δεκαέξι δείγματα παρθένων ελαιόλαδων με μέτριο ως υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Στο Διάγραμμα 6.2 παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) της γλυοξάλης (GO), μεθυλογλυοξάλης (MGO) και διακετυλίου (DA) που σχηματίστηκαν κατά τη θέρμανση σπορέλαιων και ελαιόλαδων στους 150°C για 1h . Για τα δείγματα αραβοσιτέλαιο (corn) και ηλιέλαιο (sunflower) οι τιμές αφορούν % ποσοστό μέσης τιμής περιεκτικότητας $\pm$ SD (n=2), για το δείγμα ελαιόλαδο (olive) οι τιμές αφορούν

% ποσοστό μέσης τιμής περιεκτικότητας $\pm$ SD (n=16) και τα υπόλοιπα δείγματα αφορούν % ποσοστό περιεκτικότητας χωρίς επαναλήψεις.

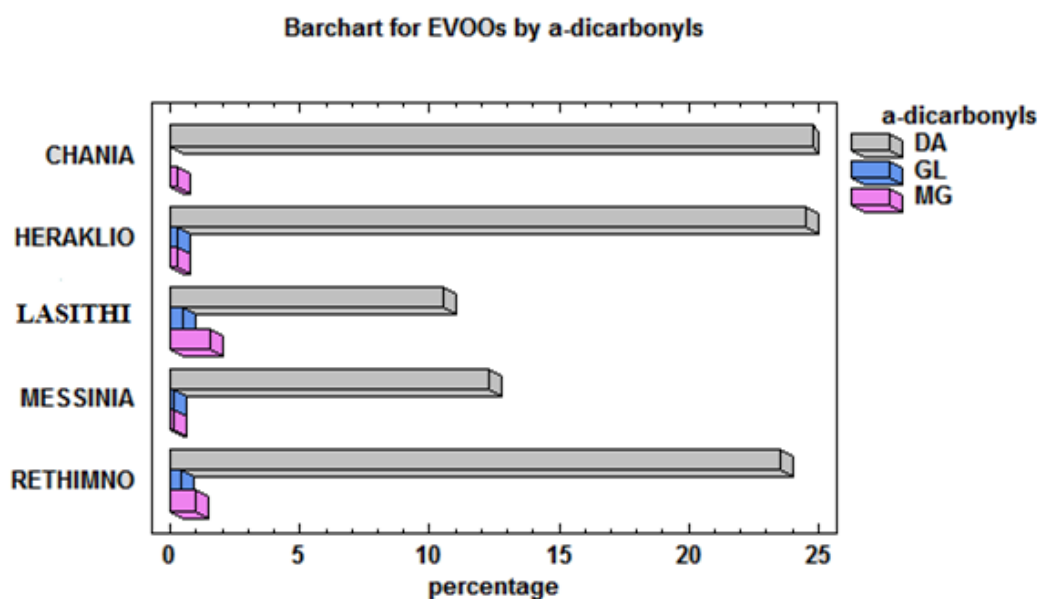


Διάγραμμα 6.2 : Ραβδόγραμμα του ποσοστού της μέσης τιμής περιεκτικότητας α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε οκτώ διαφορετικά δείγματα εμπορικών μαγειρικών ελαίων (σε συνθήκες $T=150^{\circ}\text{C}$ για 1h).

Με μια πρώτη ανάγνωση είναι ξεκάθαρο πως το % ποσοστό του διακετυλίου ξεχωρίζει σε όλα τα δείγματα και αποτελεί το 86,5% επί του συνόλου των α -δικαρβονυλικών ενώσεων και για τα οκτώ αυτά δείγματα. Στην περίπτωση του ελαιόλαδου το % ποσοστό του διακετυλίου αφορά το 91,0% των α -δικαρβονυλικών ενώσεων. Βέβαια, το ποσοστό αυτό δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές από τα αντίστοιχα για το αραβοσιτέλαιο και το ηλιέλαιο (93,0% και 91,0% αντίστοιχα), ενώ το φοινικέλαιο φαίνεται να αποδίδει το χαμηλότερο ποσοστό στην κατηγορία αυτή (71,0%). Η μεθυλογλυοξάλη αφορά το 7,5% επί του συνόλου των παρατηρήσεων και φαίνεται να εμφανίζεται αυξημένη στα δείγματα λάδι καρύδας, πυρηνέλαιο και σησαμέλαιο με ποσοστά 16, 10 και 10,0% αντίστοιχα. Τέλος, η γλυοξάλη αφορά το 6,0% του συνόλου των παρατηρήσεων ενώ και στην περίπτωση αυτή το λάδι καρύδας κατέχει το υψηλότερο ποσοστό με 13,0% έναντι του ελαιόλαδου που εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό γλυοξάλης (μόλις 1,0%).

Οι Degen *et al.*, 2012 πραγματοποίησαν μια εκτεταμένη έρευνα στον προσδιορισμό α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε ευρέως καταναλισκόμενα τρόφιμα. Στην έρευνα αυτή βρέθηκε πως η MGO αποτελεί προϊόν ελάχιστης αναλυτικής σημασίας μιας και μόνο σε ένα από 173 δείγματα βρέθηκε να εμφανίζει ικανοποιητική περιεκτικότητα. Σε έρευνα που σχετίζονταν με τον σχηματισμό GO και MGO σε ροφήματα, ανιχνεύτηκαν υψηλές συγκεντρώσεις σε δείγματα καφέ και

γάλα σόγιας (GO 587,5 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ και MGO 716,7 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) (Wang *et al.*, 2017). Οι Wang *et al.*, 2019 αναφέρει πως η χρονική διάρκεια δεν επηρεάζει τον σχηματισμό α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε υψηλές θερμοκρασίες. Η υψηλότερη περιεκτικότητα των ενώσεων αυτών παρατηρήθηκε μετά από θερμοξείδωση στους 150°C για 1h. Η GO που σχηματίστηκε σε δείγματα ελαιόλαδων και σε σπορέλαιων ήταν σημαντικά υψηλότερη στους 200°C έναντι των 150 °C. Επίσης ήταν η κυρίαρχη ένωση σε όλα τα δείγματα βρώσιμων ελαίων ακολουθώντας η MGO και τέλος το DA. Οι Fujioka and Shibamoto, 2004 προσδιόρισαν GO και MGO σε υψηλής διατροφικής αξίας έλαια. Μόνο στο ελαιόλαδο παρατηρήθηκε παραγωγή MGO υπό ελεγχόμενες συνθήκες αποθήκευσης (60 για 3,4 ημέρες). Υπό συνθήκες μαγειρέματος (200 °C για 1h) οι σχηματιζόμενες αλδεΐδες είχαν συγκρίσιμες τιμές με τις αντίστοιχες που παρήχθησαν από τις ελεγχόμενες συνθήκες αποθήκευσης. Σε πείραμα που αφορούσε σε λιπαρές ύλες προέκυψε το συμπέρασμα πως υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής των δραστικών ενώσεων και της θερμοκρασίας, μιας και καταγράφηκε σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας τους όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 100 στους 200°C. Επιπροσθέτως, η περιεκτικότητα σε διακετύλιο ήταν υψηλότερη συγκριτικά με GO και MGO σε όλα τα δείγματα και στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Στις συνθήκες αυτές η MGO εμφάνισε τη δεύτερη υψηλότερη περιεκτικότητα σε όλα τα δείγματα και η GO είχε την χαμηλότερη περιεκτικότητα μεταξύ των δειγμάτων (Jiang *et al.*, 2013). Τα συμπεράσματα αυτά συνηγορούν με τα πειραματικά αποτελέσματα και της παρούσας εργασίας.



Διάγραμμα 6.3 : Ραβδόγραμμα του ποσοστού της μέσης τιμής περιεκτικότητας α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε ελαιόλαδα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης (σε συνθήκες T=150 °C για 1h).

Ως προς τη σύγκριση των δειγμάτων ελαιόλαδων, προκύπτει ξανά πως το διακετύλιο αποτελεί την κυριότερη α -δικαρβονυλική ένωση με ποσοστό 95,6% επί

του συνόλου των παρατηρήσεων ενώ η γλυοξάλη αποτελεί μόλις το 1,25%. Όλα τα δείγματα ελαιόλαδου προέρχονται από την ποικιλία Κορωνέικη. Οι νομοί Χανιά, Ηράκλειο και Ρέθυμνο εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά διακετυλίου, ενώ στο νομό Λασιθίου εμφανίστηκε η υψηλότερη περιεκτικότητα σε μεθυλογλυοξάλη (12,0%).

6.2.1 Επίδραση φαινολικών συστατικών στην παραγωγή α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε ελαιόλαδα.

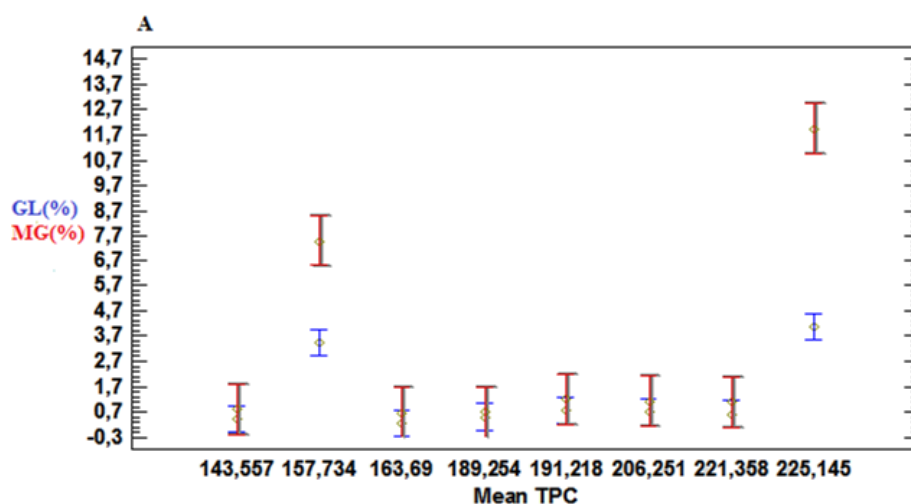
Πίνακας 6.2: Η μέση τιμή της περιεκτικότητας (%) α -δικαρβονυλικών ενώσεων (Γλυοξάλη, Μεθυλογλυοξάλη και Διακετύλιο) σε οκτώ δείγματα ελαιόλαδων και η μέση τιμή ολικού φαινολικού περιεχομένου (mg GAE/Kg ελαιόλαδου) των δειγμάτων αυτών.

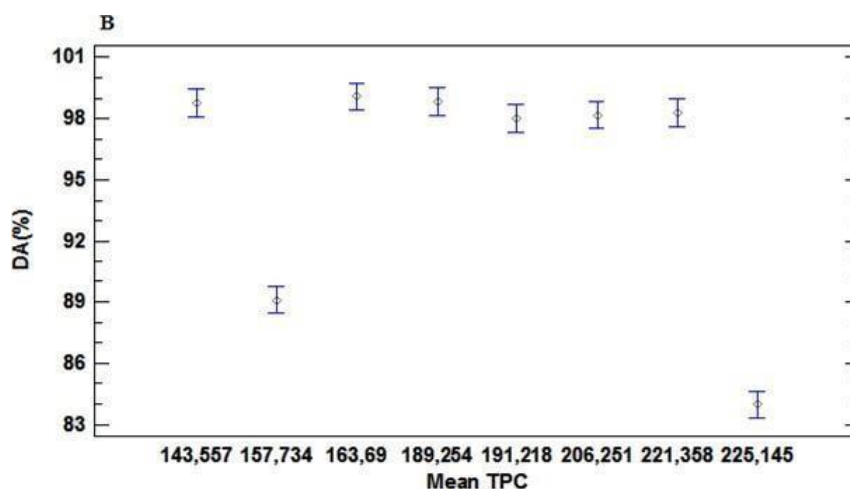
Κωδικός Δείγματος	TPC (mg GAE/Kg ελαιόλαδου)	Γλυοξάλη(%)	Μεθυλογλυοξάλη(%)	Διακετύλιο(%)
KOR_LAS_00_02	225,14	4,075 $\pm$ 0,89	11,952 $\pm$ 2,33	83,973 $\pm$ 1,43
KOR_RET_00_07	157,73	3,431 $\pm$ 0,89	7,487 $\pm$ 0,55	89,081 $\pm$ 0,33
KOR_RET_00_08	163,69	0,265 $\pm$ 0,05	0,657 $\pm$ 0,27	99,078 $\pm$ 0,32
KOR_CHA_00_01	189,25	0,497 $\pm$ 0,10	0,682 $\pm$ 0,36	98,820 $\pm$ 0,46
KOR_CHA_00_03	143,56	0,419 $\pm$ 0,03	0,814 $\pm$ 0,03	98,766 $\pm$ 0,00
KOR_HER_00_03	206,25	0,705 $\pm$ 0,23	1,122 $\pm$ 0,23	98,173 $\pm$ 0,35
KOR_HER_00_06	191,22	0,758 $\pm$ 0,02	1,216 $\pm$ 0,03	98,026 $\pm$ 0,01
KOR_MES_00_01	221,36	0,617 $\pm$ 0,24	1,085 $\pm$ 0,04	98,298 $\pm$ 0,28

Τα παραπάνω δείγματα ελαιόλαδων εξετάστηκαν ως προς την επίδραση του παράγοντα ολικό φαινολικό περιεχόμενο για την παραγωγή της κάθε α -δικαρβονυλικής ένωσης ξεχωριστά. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (One-Way ANOVA) με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Statgraphics Centurion 16.1.11.

Προς εξέταση της επίδρασης του παράγοντα *φαινολικό περιεχόμενο*, στη μέση τιμή της περιεκτικότητας σε γλυοξάλη, αναλύθηκαν δείγματα ελαιόλαδου από διαφορετικούς νομούς της Κρήτης ($n=7$) και μόνο ένα δείγμα της Πελοποννήσου, τα οποία προέρχονταν από την ποικιλία Κορωνέικη. Το F-test υπολόγισε πως η P -τιμή ισούται με $0,0001(<0,05)$ άρα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών γλυοξάλης με 95% πιθανότητα. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό δεν επιβεβαιώνεται και από το μη παραμετρικό test Kruskal-Wallis, το οποίο υπολόγισε ότι η P -τιμή ισούται με $0,059(>0,05)$ άρα δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των διάμεσων τιμών της γλυοξάλης με 95% πιθανότητα. Ωστόσο επειδή ο αριθμός των δειγμάτων δεν είναι αντιπροσωπευτικός και η P -τιμή του μη παραμετρικού τεστ είναι πολύ κοντά στο 0,05, θεωρείται πως τελικά υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του TPC στην παραγωγή GO.

Ο παράγοντας ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) αναλύθηκε σε δυο επιμέρους επίπεδα, $TPC > 200$ mg GAE/Kg ελαιόλαδου και $TPC < 200$ mg GAE/Kg ελαιόλαδου. Στην περίπτωση αυτή το F-test υπολόγισε πως η P -τιμή ισούται με $0,0001(<0,05)$ άρα ο παράγοντας TPC εν τέλει επιδρά στη μέση τιμή περιεκτικότητας γλυοξάλης.





Διάγραμμα 6.4: Μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα των ενώσεων γλυοξάλης, μεθυλογλυοξάλης (A) και διακετυλίου (B) σε δείγματα ελαιόλαδων, όπως συγκρίθηκαν με τη μέθοδο LSD για 95% πιθανότητα.

Κατά τον ίδιο τρόπο εξετάστηκε και η επίδραση του παράγοντα TPC στη μέση τιμή περιεκτικότητας μεθυλογλυοξάλης και διακετυλίου. Και στις δύο περιπτώσεις βρέθηκε πως αν και υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών (P -τιμή $< 0,05$) (**Διάγραμμα 6.4 A,B**), δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διάμεσων τιμών (P -τιμή $> 0,05$). Όμως λόγω της έλλειψης μεγάλου αριθμού δειγμάτων και στην περίπτωση αυτή το μη παραμετρικό τεστ δεν θα ληφθεί υπόψιν. Εν κατακλείδι, ο παράγοντας TPC εμφανίζει στατιστικά σημαντική επίδραση στο σχηματισμό α -δικαρβονυλικών ενώσεων (όταν $T=150$ °C για 1h) σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα όπου φαίνεται πως τα φαινολικά συστατικά επηρεάζουν τον σχηματισμό κυρίως της GO και της MGO. Πιο συγκεκριμένα, οι [Wu and Yen, 2005](#) προσδιόρισαν πως τα φαινολικά συστατικά (και συγκεκριμένα η λουτεολίνη) εμφανίζουν σημαντική ανασταλτική δράση στη διαδικασία της γλυκοξειδωσης μειώνοντας τη δημιουργία RCCs (όπως η γλυοξάλη). Άλλες κατηγορίες φαινολικών συστατικών όπως οι κατεχίνες του τσαγιού και οι προανθοκυανιδίνες, αντιδρούν με τα RCCs (κυρίως GO και MGO) αναστέλλοντας τη δημιουργία των AGEs. Σε δείγματα ψωμιού έχει βρεθεί πως η προσθήκη εκχυλίσματος από έλαιο σταφυλιού μειώνει τη δημιουργία CML($N^ε$ -(carboxymethyl)lysine) αφού αντιδρά και εξουδετερώνει τα δραστικά ενδιάμεσα προϊόντα ([Peng et al., 2011](#)). Για την μελέτη της επίδρασης φλαβονοειδών στην παραγωγή GO και MGO σε δείγμα γάλακτος σόγιας, μελετήθηκαν πέντε διαφορετικές ενώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι πέντε φαινολικές ενώσεις εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση και μάλιστα με σειρά δραστηριότητας για την ίδια συγκέντρωση : κερκετίνη > ρουτίνη > λουτεολίνη > κατεχίνη > γενιστεΐνη ([Wang et al., 2017](#)). Μάλιστα η κερκετίνη φαίνεται να

εμφανίζει υψηλότερη προτίμηση για αναστολή της δράσης της MGO έναντι της GO όταν συνυπάρχουν στο ίδιο δείγμα (Li *et al.*, 2014). Αξίζει να αναφερθεί πως και οι Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2014 τονίζουν εκτενώς πως πλήθος φαινολικών ενώσεων (κινναμωμικό οξύ και τα παράγωγά του, καφεϊκό οξύ, ελλαργικό οξύ, ολεανολικό οξύ, κερκετίνη και γαλλικό οξύ) σε αξιοσημείωτο αριθμό ερευνών, εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι των AGEs.

6.2.2 Επίδραση της σύστασης των λιπαρών οξέων στην παραγωγή α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε ελαιόλαδα και σπορέλαια.

Όπως φαίνεται και από το προηγούμενο κεφάλαιο, μια σειρά ερευνών έχει επικεντρωθεί στη μελέτη των φαινολικών συστατικών καθώς εμφανίζουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την ανασταλτική τους δράση έναντι των GO και MGO και εν τέλει ως προς τον σχηματισμό των AGEs. Εντούτοις, όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό τμήμα, οι α -δικαρβονυλικές ενώσεις μπορεί να προέρχονται και από την οξείδωση των λιπιδίων η οποία ευνοείται από έντονα θερμικά διεργασίες όπως και στην προκειμένη. Μιας και τα δείγματα παρουσιάζουν ανομοιογένεια ως προς τη σύσταση των λιπαρών οξέων, έχει ενδιαφέρον να μελετηθεί η συσχέτιση αυτών με την παραγωγή α -δικαρβονυλικών ενώσεων.

Πίνακας 6.3: Συγκεντρωτικός πίνακας των μέσων τιμών λιπαρών οξέων για σπορέλαια όπως προέκυψε βιβλιογραφικά.

	SFAs (%)	MUFAs (%)	PUFAs (%)	Βιβλιογραφία
<i>Αραβοσιτέλαιο</i>	16,760	30,436	52,807	Orsavova <i>et al.</i> , 2015
<i>Ηλιέλαιο</i>	12,495	28,631	53,174	Li <i>et al.</i> , 2013
<i>Σησαμέλαιο</i>	16,030	38,562	41,657	Dubois <i>et al.</i> , 2007
<i>Έλαιο Καρύδας</i>	92,350	6,1500	1,7500	Vingering <i>et al.</i> , 2010
<i>Φοινικέλαιο</i>	50,045	39,602	10,502	Ruenda <i>et al.</i> , 2014

Λόγω έλλειψης πειραματικών δεδομένων, η γραμμική συσχέτιση των λιπαρών οξέων των σπορέλαιων έναντι των α -δικαρβονυλικών ενώσεων θα μελετηθεί σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές τιμές όπως παρουσιάζονται και στον **Πίνακα 6.3**.

Πίνακας 6.4: Γραμμική συσχέτιση λιπαρών οξέων των σπορέλαιων έναντι των παραγόμενων α -δικαρβονυλικών ενώσεων κατά τη θερμική επεξεργασία.

Συντελεστής Γραμμικής Συσχέτισης, <i>r</i>	Γλυοξάλη (%)	Μεθυλογλυοξάλη (%)	Διακετύλιο (%)
<i>SFAs</i>	0,19	0,28	0,25
<i>MUFASs</i>	0,94	0,97	-0,96
<i>PUFAs</i>	-0,98	-0,99	0,99

Η εκατοστιαία περιεκτικότητα καθεμίας από τις α -δικαρβονυλικές ενώσεις για την περίπτωση των σπορέλαιων αναλύθηκε επί του παράγοντα σύσταση λιπαρών οξέων. Ο παράγοντας χωρίζεται σε τρία επίπεδα : κορεσμένα λιπαρά οξέα (*SFAs*), μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (*MUFAs*) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (*PUFAs*). Ωστόσο μέσω της σύγκρισης των μέσω τιμών της περιεκτικότητας σε γλυοξάλη, μεθυλογλυοξάλη και διακετύλιο δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (*P*-τιμή >0,05) σε επίπεδο σημαντικότητας 95% και για τα τρία επίπεδα ανάλυσης.

Βέβαια, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 6.4**, προκύπτει γραμμική συσχέτιση μέσω του συντελεστή Pearson. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson, *r* δείχνει πόσο ισχυρή ή όχι είναι η συσχέτιση σύμφωνα με τον τύπο:

$$r = s_{xys} / (s_x s_y), -1 \leq r \leq 1$$

Μεταξύ των α -δικαρβονυλικών ενώσεων και των *SFAs* φαίνεται να μην υπάρχει συσχέτιση. Η συσχέτιση αναφέρεται στα δείγματα αραβοσιτελαίου, ηλιέλαιου και σησαμελαίου μιας και προκύπτει βιβλιογραφικά πως τα 3 αυτά είδη έχουν παρόμοια σύσταση λιπαρών οξέων (συγκριτικά με φοινικέλαιο και λάδι καρύδας). Από την άλλη πλευρά, παρατηρείται ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των ακόρεστων λιπαρών οξέων και των τριών ενώσεων. Στην περίπτωση της γλυοξάλης, όσο αυξάνονται τα *MUFAs* αυξάνεται και η τιμή της περιεκτικότητά της ενώ όσο αυξάνονται τα *PUFAs*, η περιεκτικότητα μειώνεται. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για την περίπτωση της μεθυλογλυοξάλης αλλά για το *DA* αυξανόμενων των *MUFAs* μειώνεται η περιεκτικότητά του και αυξανόμενων των *PUFAs* αυξάνεται επίσης η περιεκτικότητά του.

Η συσχέτιση αυτή πιθανόν να οφείλεται στους μηχανισμούς δημιουργίας των δραστικών αυτών ενώσεων. Είναι γνωστό πως μέσω του μηχανισμού υπεροξειδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (λινελαϊκό και λινολενικό οξύ) προάγεται η δημιουργία δραστικών υπεροξειδίων τα οποία εν τέλει μετατρέπονται σε γλυοξάλη. Παράλληλα, οι παραγωγικές διεργασίες (υψηλή θερμότητα και φωτοξειδωση)

επηρεάζουν τη σύσταση των λιπαρών οξέων υποκινώντας τη δημιουργία μεθυλογλυοξάλης (Vistoli *et al.*, 2013).

Γενικά, απαιτείται περισσότερη ενέργεια για την διάσπαση λιπαρών οξέων με χαμηλό βαθμό ακορεστότητας μιας και απαιτούνται περισσότερα βήματα για τη διάσπαση των απλών C-C σε χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις. Υπό κανονικές συνθήκες η οξειδωση των λιπαρών οξέων προκύπτει αργά. Ωστόσο στην προκειμένη περίπτωση, η υψηλή θερμοκρασία και η διάρκεια του πειράματος, επιταχύνουν τη διαδικασία εμπλέκοντας διαφορετικούς μηχανισμούς. Πιο αναλυτικά η θέρμανση στους 150°C για 1h μπορεί να προσδώσει την απαραίτητη ενέργεια για την παραγωγή χαμηλού μοριακού βάρους δραστικών ρίζων όπως $\bullet\text{CH}_3$, $\bullet\text{CO}$ και $\bullet\text{CHO}$. Οι ενώσεις αυτές τελικά θα οδηγήσουν στην παραγωγή OHC-CHO (GO), OCH-CO (CH₃) (MGO) και (CH₃)CO-CO(CH₃) (DA) με διαφορετικά μονοπάτια από αυτά της συνηθισμένης αυτοοξειδωσης (Jiang *et al.*, 2013)

Οι Wang *et al.*, 2019 συσχετίζουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα με την παραγωγή GO, MGO, DA τονίζοντας πως όσο αυξάνεται το ποσοστό ακορεστότητας, τόσο αυξάνεται και η παραγωγή των α -δικαρβονυλικών ενώσεων. Η διαπίστωση αυτή αποτελεί άλλη μια αντίφαση με τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος καθώς το λάδι καρύδας, το οποίο βάσει της βιβλιογραφίας (Vingerling *et al.*, 2010) διαθέτει το υψηλότερο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων (~90%) εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά GO και MGO έναντι των υπολοίπων δειγμάτων όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 6.2**. Αντίθετα, το ελαιόλαδο με το αραβοσιτέλαιο και το ηλιέλαιο που εμφανίζουν ποσοστό ακορεστότητας ~ 80% εμφανίζουν συγκρίσιμες τιμές MGO (~3%). Κάθε φορά πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ότι το ελαιόλαδο έχει διαφορετική αναλογία MUFA:PUFA από τα σπορέλαια. Αλλά και οι Jiang *et al.*, 2013 παρατήρησαν αυτό το παράδοξο καθώς στο δείγμα με το υψηλότερο ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων δεν παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή α -δικαρβονυλικών ενώσεων. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως σε υψηλές θερμοκρασίες τα λιπαρά οξέα υποβαθμίζονται γρήγορα προς το σχηματισμό πτητικών δραστικών καρβονυλικών ενώσεων ανεξάρτητα από το βαθμό κορεστότητας και ακορεστότητας. Σε χαμηλές θερμοκρασίες (θέρμανση στους 60°C για 3 ημέρες) παρατηρήθηκε επίσης η δημιουργία GO και MGO σε βρώσιμα έλαια με τιμές συγκρίσιμες αυτές που προκύπτουν υψηλές θερμοκρασίες. Μάλιστα, στα ιχθυέλαια που περιλαμβάνουν PUFAs πιο μακριάς ανθρακικής αλυσίδας έναντι των PUFAs των σπορέλαιων ανιχνεύτηκαν GO και MGO σε υψηλότερες ποσότητες (Fujioka and Shibamoto, 2004).

Πίνακας 6.5: Μέση τιμή των λιπαρών οξέων των ελαιόλαδων για την επίδραση τους στην παραγωγή α -δικαρβονυλικών ενώσεων.

Κωδικός Δείγματος	Μέση τιμή SFAs (%)	Μέση τιμή MUFAs (%)	Μέση τιμή PUFAs (%)
KOR_LAS_00_02	14,305	77,640	7,150
KOR_RET_00_07	14,625	76,315	8,135
KOR_RET_00_08	14,630	76,420	8,020
KOR_CHA_00_01	17,430	75,615	6,065
KOR_CHA_00_03	17,265	74,775	6,995
KOR_HER_00_03	14,92	75,965	8,140
KOR_HER_00_06	14,935	75,815	8,285
KOR_MES_00_01	14,820	77,170	7,055
Mean	15,367 $\pm$ 1,24	76,214 $\pm$ 0,90	7,481 $\pm$ 0,78
RSD (%)	8%	2%	10%

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μέσων τιμών περιεκτικότητας γλυοξάλης, μεθυλογλυοξάλης και διακετυλίου για την περίπτωση των ελαιόλαδων επί του παράγοντα σύσταση λιπαρών οξέων. Λόγω έλλειψης πειραματικών δεδομένων, η γραμμική συσχέτιση των λιπαρών οξέων των ελαιόλαδων έναντι των α -δικαρβονυλικών ενώσεων θα μελετηθεί σύμφωνα με τις τιμές που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.5**, και αφορούν ανάλυση που είχε προηγηθεί στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τις ανάγκες του πειράματος.

Και στα τρία επίπεδα (SFAs, MUFAs, και PUFAs) το F-test υπολόγισε P -τιμή $< 0,05$ όμως το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis υπολόγισε P -τιμή = 0,059 $>$

0,05. Η ανάλυση έγινε και για τις τρεις ενώσεις έναντι και των τριών επίπεδων λιπαρών οξέων. Και στην περίπτωση αυτή ο αριθμός των δειγμάτων δεν είναι αξιόπιστος ώστε να ληφθεί υπό το μη παραμετρικό τεστ. Συμπερασματικά, και ο παράγοντας σύσταση των λιπαρών οξέων επιδρά στην παραγωγή α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε ελαιόλαδα.

Κεφάλαιο 7^ο – Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός τριών πτητικών δραστικών καρβονυλικών ενώσεων (GO, MGO και DA) μέσω αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, τα δείγματα ελαιόλαδων και σπορέλαιων αρχικά θερμοξειδώθηκαν σε συσκευή Rancimat για 1h στους 150°C έτσι ώστε να παραχθούν τα αντίστοιχα παράγωγα κινοξαλινών. Η συσκευή Rancimat αξιοποιήθηκε με μια νέα συνδεσμολογία επιτρέποντας την μεταφορά πτητικών ενώσεων παρουσία αέρα σε διάλυμα παραγωγοποίησης και διαλυτοποίησή τους σε αυτό. Με αυτό τον τρόπο προτείνεται μια εναλλακτική χρήση της.

Όσον αφορά την % περιεκτικότητα των α -δικαρβονυλικών ενώσεων, τόσο στα δείγματα ελαιόλαδων όσο και στα δείγματα σπορέλαιων, κυριάρχησε το διακετύλιο σε ποσοστό 86,5% ακολουθώντας η μεθυλογλυοξάλη και η γλυοξάλη. Ανάμεσα στα δείγματα στο ελαιόλαδο, το αραβοσιτέλαιο και το ηλιέλαιο σχηματίστηκαν τα υψηλότερα ποσοστά διακετυλίου. Η μεθυλογλυοξάλη που αφορούσε το 7,6% επί του συνόλου των παρατηρήσεων, κυριάρχησε στο λάδι καρύδας, το πυρηνέλαιο και το σησαμέλαιο. Η γλυοξάλη εμφανίστηκε ιδιαίτερα αυξημένη στο λάδι καρύδας ενώ στο ελαιόλαδο ανιχνεύτηκε σε ποσοστό μόλις 1,0%. Και ανάμεσα στα δείγματα ελαιόλαδων κυριάρχησε το διακετύλιο σε ποσοστό 95,6% επί του συνόλου των παρατηρήσεων με το δείγμα του νομού Χανίων να εμφανίζει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε μεθυλογλυοξάλη.

Η παραγωγή των α -δικαρβονυλικών ενώσεων μελετήθηκε ως προς την επίδραση των φαινολικών συστατικών και τη σύσταση των λιπαρών οξέων. Για την πρώτη περίπτωση, προηγήθηκε ο προσδιορισμός του ολικού πολικού φαινολικού κλάσματος μέσω της δοκιμής Folin-Ciocalteu. Για τα ελαιόλαδα, οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 106,264 και 287,724 mg γαλλικού οξέος/ Kg παρθένου ελαιόλαδου. Έτσι κατατάσσονται στην κατηγορία μέτριας έως υψηλής περιεκτικότητας σε TPC (50-500 mg GAE/Kg). Παράλληλα, προσδιορίστηκε το ποσοστό μείωσης του TPC, ύστερα από ένα χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου και ατμόσφαιρα αζώτου. Ακόμα και υπό τις συνθήκες αυτές προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μέση τιμή περιεκτικότητας TPC ανάμεσα στις δυο χρονιές. Το TPC των σπορέλαιων δεν ήταν δυνατό να ανιχνευθεί. Εν τέλει, ο παράγοντας TPC επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή GO, MGO και DA. Βέβαια, το συμπέρασμα αυτό θα έπρεπε να επιβεβαιωθεί με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων (στην παρούσα μελέτη $n < 30$).

Ως προς τη σύσταση των λιπαρών οξέων, φαίνεται πως επηρεάζει το σχηματισμό των α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε ελαιόλαδα. Όμως, και στην περίπτωση αυτή ο μικρός αριθμός των δειγμάτων περιορίζει την αξιοπιστία του συμπεράσματος. Συμπληρωματικά, παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση των PUFAs στην παραγωγή GO και MGO σε σπορέλαια.

Η βιβλιογραφία υστερεί ως προς τον σχηματισμό των α -δικαρβονυλικών ενώσεων σε ελαιόλαδα και σπορέλαια. Στην παρούσα εργασία αν και αναλύθηκαν δείγματα ελληνικής προέλευσης δεν καθίσταται δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων με παρόμοιες εργασίες. Έτσι, προτείνεται περισσότερη έρευνα γύρω από το ελαιόλαδο μιας και αποτελεί τρόφιμο με μοναδική σύσταση λιπαρών οξέων αλλά και βιοδραστικών συστατικών που εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι των α -DCs. Εν κατακλείδι, ενθαρρύνεται περαιτέρω έρευνα γύρω από τη θέσπιση κρίσιμων σημείων ελέγχου κατά τη παραγωγική διαδικασία των ελαίων. Στόχος η μείωση της περιεκτικότητας των τοξικών α -DCs που διαφεύγουν στον υπερκείμενο χώρο κατά τη διάρκεια θερμικών διεργασιών όπως το μαγείρεμα.

Κεφάλαιο 8^ο – Βιβλιογραφία

8.1 Ξένη Βιβλιογραφία

- ❖ AHMED, N., LÜTHEN, R., HÄUSSINGER, D., ŠEBEKOVÁ, K., SCHINZEL, R., VOELKER, W., HEIDLAND, A. and THORNALLEY, P., 2005. Increased Protein Glycation in Cirrhosis and Therapeutic Strategies to Prevent It. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), pp.718-724.
- ❖ Alu'datt, M., Rababah, T., Alhamad, M., Al-Rabadi, G., Tranchant, C., Almajwal, A., Kubow, S. and Alli, I., 2017. Occurrence, types, properties and interactions of phenolic compounds with other food constituents in oil-bearing plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(18), pp.3209-3218.
- ❖ Ambra, R., Natella, F., Lucchetti, S., Forte, V. and Pastore, G., 2016. α -Tocopherol, β -carotene, lutein, squalene and secoiridoids in seven monocultivar Italian extra-virgin olive oils. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(5), pp.538-545.
- ❖ Aparicio-Ruiz, R. and Gandul-Rojas, B. (2014) 'Decoloration kinetics of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by autoxidation', *Food Research International*, 65(PB), pp. 199–206.
- ❖ Avramidou, E. V., Doulis, A. G. and Petrakis, P. V. (2018) 'Chemometrical and molecular methods in olive oil analysis: A review', *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(11), pp. 1–18.
- ❖ Bianco, A., Coccioli, F., Guiso, M. and Marra, C., 2002. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chemistry*, 77(4), pp.405-411.
- ❖ Bertelli, M., Kiani, A., Paolacci, S., Manara, E., Kurti, D., Dhuli, K., Bushati, V., Miertus, J., Pangallo, D., Baglivo, M., Beccari, T. and Michellini, S., 2020. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *Journal of Biotechnology*, 309, pp.29-33.
- ❖ Bester, D., Esterhuysen, A., Truter, E. and van Rooyen, J., 2010. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), pp.334-348.
- ❖ Borges, T., Cabrera-Vique, C. and Seiquer, I., 2015. Antioxidant properties of chemical extracts and bioaccessible fractions obtained from six Spanish monovarietal extra virgin olive oils: Assays in Caco-2 cells. *Food & Function*, 6(7), pp.2375-2383.
- ❖ Brenes, M., García, A., García, P. and Garrido, A., 2000. Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by Means of a Coulometric Electrode Array System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), pp.5178-5183.
- ❖ Brühl, L., Weisshaar, R. and Matthäus, B., 2015. Epoxy fatty acids in used frying fats and oils, edible oils and chocolate and their formation in oils during heating. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(3), pp.425-434.
- ❖ Calabria, D., Mirasoli, M., Guardigli, M., Simoni, P., Zangheri, M., Severi, P., Caliceti, C. and Roda, A., 2020. Paper-based smartphone chemosensor for reflectometric on-site total polyphenols quantification in olive oil. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 305, pp.127-522.
- ❖ Catalá, A., 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), pp.1482-1495.

- ❖ Choe, E. and Min, D., 2006. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), pp.169-186.
- ❖ Christodouleas, D., Fotakis, C., Papadopoulos, K. and Calokerinos, A., 2014. Evaluation of total reducing power of edible oils. *Talanta*, 130, pp.233-240.
- ❖ Cicerale, S., Conlan, X., Sinclair, A. and Keast, R., 2008. Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), pp.218-236.
- ❖ Diamantakos, P., Velkou, A., Killday, B., Gimisis, T., Melliou, E., Magiatis, P., (2015). Oleokoronal and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil. *OLIVAE*, 122, 22-33.
- ❖ Degen, J., Hellwig, M. and Henle, T., 2012. 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(28), pp.7071-7079.
- ❖ Deen, A., Visvanathan, R., Wickramarachchi, D., Marikkar, N., Nammi, S., Jayawardana, B. and Liyanage, R., 2020. Chemical composition and health benefits of coconut oil: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- ❖ Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M., 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(7), pp.710-732.
- ❖ Duflos, G., Coin, V., Cornu, M., Antinelli, J. and Malle, P., 2006. Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(4), pp.600-611.
- ❖ FINOT, P., 2005. Historical Perspective of the Maillard Reaction in Food Science. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), pp.1-8.
- ❖ Foscolou, A., Critselis, E. and Panagiotakos, D. (2018) 'Olive oil consumption and human health: A narrative review', *Maturitas*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 60–66.
- ❖ Fujioka, K. and Shibamoto, T., 2004. Formation of genotoxic dicarbonyl compounds in dietary oils upon oxidation. *Lipids*, 39(5), pp.481-486.
- ❖ Ghazani, S. and Marangoni, A., 2016. Healthy Fats and Oils. *Encyclopedia of Food Grains*, pp.257-267.
- ❖ Guasch-Ferré, M., Hu, F., Martínez-González, M., Fitó, M., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Corella, D., Recondo, J., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Muñoz, M., Pintó, X., Lamuela-Raventós, R., Basora, J., Buil-Cosiales, P., Sorlí, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Martínez, J. and Salas-Salvadó, J., 2014. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Medicine*, 12(1).
- ❖ Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. and Simal-Gandara, J., 2020. Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. *Food Research International*, 137, pp.109-683.
- ❖ Gomez-Ojeda, A.; Jaramillo-Ortíz, S.; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Barbosa-Sabanero, G.; Luevano-Contreras, C.; de la Maza, M. P.; Uribarri, J.; del Castillo, M. D.; Garay-Sevilla, M. E. Comparative evaluation of three different ELISA assays and HPLC-ESI-ITMS/MS for the analysis of N ϵ -carboxymethyl lysine in food samples. *Food Chem.* 2018, 243, 11–18.
- ❖ Hage, D., 2019. Chromatography and electrophoresis. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, pp.135-157.
- ❖ Hammond, E., 2003. VEGETABLE OILS | Types and Properties. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, pp.5899-5904.

- ❖ Jain, A., 2006. Analysis of Organophosphate and Carbamate Pesticides and Anticholinesterase Therapeutic Agents. *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*, pp.681-701.
- ❖ Jang, H., Jiang, Y., Hengel, M. and Shibamoto, T., 2013. Formation of 4(5)-Methylimidazole and Its Precursors, α -Dicarbonyl Compounds, in Maillard Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), pp.6865-6872.
- ❖ Janu, C., Kumar, D., Reshma, M., Jayamurthy, P., Sundaresan, A. and Nisha, P., 2013. Comparative Study on the Total Phenolic Content and Radical Scavenging Activity of Common Edible Vegetable Oils. *Journal of Food Biochemistry*, 38(1), pp.38-49.
- ❖ Jeong, J. H., Cha, J. and Lee, K. G. (2017) 'Validation of analytical method for α -dicarbonyl compounds using gas chromatography–nitrogen phosphorous detector and their levels in alcoholic beverages', *International Journal of Food Science and Technology*, 52(6), pp. 1491–1497.
- ❖ Jiang, Y., Hengel, M., Pan, C., Seiber, J. and Shibamoto, T., 2013. Determination of Toxic α -Dicarbonyl Compounds, Glyoxal, Methylglyoxal, and Diacetyl, Released to the Headspace of Lipid Commodities upon Heat Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(5), pp.1067-1071.
- ❖ Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J., Barba, F., Prieto, M. and Simal-Gandara, J., 2020. *Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil*.
- ❖ Jové, M., Mota-Martorell, N., Pradas, I., Martín-Gari, M., Ayala, V. and Pamplona, R., 2020. The Advanced Lipoxidation End-Product Malondialdehyde-Lysine in Aging and Longevity. *Antioxidants*, 9(11), p.1132.
- ❖ Kalogeropoulos, N. and Tsimidou, M., 2014. Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants*, 3(2), pp.387-413.
- ❖ Karabagias, I., Badeka, A., Casiello, G., Longobardi, F. and Kontominas, M., 2019. Rapid screening of olive oil cultivar differentiation based on selected physicochemical parameters, pigment content and fatty acid composition using advanced chemometrics. *European Food Research and Technology*, 245(9), pp.2027-2038.
- ❖ Khan, M., Liu, H., Wang, J. & Sun, B., 2019. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advanced glycation end products: A comprehensive review. *Food Research International*, pp. 1-61.
- ❖ Krichene, D., Salvador, M. and Fregapane, G., 2015. Stability of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds during Long-Term Storage (18 Months) at Temperatures of 5–50 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(30), pp.6779-6786.
- ❖ Lange, J., Wood, K., Knight, J., Assimios, D. and Holmes, R., 2012. Glyoxal Formation and Its Role in Endogenous Oxalate Synthesis. *Advances in Urology*, 2012, pp.1-5.
- ❖ Lazzerini, C. and Domenici, V., 2017. Pigments in Extra-Virgin Olive Oils Produced in Tuscany (Italy) in Different Years. *Foods*, 6(4), p.25.
- ❖ Li, X., Zheng, T., Sang, S. and Lv, L., 2014. Quercetin Inhibits Advanced Glycation End Product Formation by Trapping Methylglyoxal and Glyoxal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(50), pp.12152-12158.
- ❖ Li, H., Fan, Y., Li, J., Tang, L., Hu, J. and Deng, Z., 2013. Evaluating and Predicting the Oxidative Stability of Vegetable Oils with Different Fatty Acid Compositions. *Journal of Food Science*, 78(4), pp.H633-H641.
- ❖ Lin, J., Wu, C. and Yen, G., 2018. Perspective of Advanced Glycation End Products on Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(9), pp.2065-2070.

- ❖ Lund, M. and Ray, C., 2017. Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(23), pp.4537-4552.
- ❖ Martakos, I., Kostakis, M., Dasenaki, M., Pentogennis, M. and Thomaidis, N., 2019. Simultaneous Determination of Pigments, Tocopherols, and Squalene in Greek Olive Oils: A Study of the Influence of Cultivation and Oil-Production Parameters. *Foods*, 9(1), p.31.
- ❖ Meenu, M., Cai, Q. and Xu, B. (2019) 'A critical review on analytical techniques to detect adulteration of extra virgin olive oil', *Trends in Food Science and Technology*, 91(July), pp. 391–408.
- ❖ Mol, M., Degani, G., Coppa, C., Baron, G., Popolo, L., Carini, M., Aldini, G., Vistoli, G. and Altomare, A., 2019. Advanced lipoxidation end products (ALEs) as RAGE binders: Mass spectrometric and computational studies to explain the reasons why. *Redox Biology*, 23, p.101083.
- ❖ Morelló, J., Vuorela, S., Romero, M., Motilva, M. and Heinonen, M., 2005. Antioxidant Activity of Olive Pulp and Olive Oil Phenolic Compounds of the Arbequina Cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), pp.2002-2008.
- ❖ Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C. and Salvayre, R., 2008. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, 153(1), pp.6-20.
- ❖ Negro, C., Aprile, A., Luvisi, A., Nicolì, F., Nutricati, E., Vergine, M., Miceli, A., Blando, F., Sabella, E. and De Bellis, L., 2019. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Italian Monovarietal Extra Virgin Olive Oils. *Antioxidants*, 8(6), p.161.
- ❖ NDA, E., 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865). *EFSA Journal*, 9(4).
- ❖ Nie, S., Huang, J., Hu, J., Zhang, Y., Wang, S., Li, C., Marcone, M. and Xie, M., 2013. Effect of pH, temperature and heating time on the formation of furan in sugar–glycine model systems. *Food Science and Human Wellness*, 2(2), pp.87-92.
- ❖ Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J., Vicha, R. and Mlcek, J., 2015. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), pp.12871-12890.
- ❖ Pamplona, R., 2011. Advanced lipoxidation end-products. *Chemico-Biological Interactions*, 192(1-2), pp.14-20.
- ❖ Parkinson, L. and Keast, R., 2014. Oleocanthal, a Phenolic Derived from Virgin Olive Oil: A Review of the Beneficial Effects on Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), pp.12323-12334.
- ❖ Peng, X., Ma, J., Chen, F. and Wang, M., 2011. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food & Function*, 2(6), p.289.
- ❖ Pedan, V., Popp, M., Rohn, S., Nyfeler, M. and Bongartz, A., 2019. Characterization of Phenolic Compounds and Their Contribution to Sensory Properties of Olive Oil. *Molecules*, 24(11), p.2041.
- ❖ Rood, D., 2007. Gas Chromatography Problem Solving and Troubleshooting. *Journal of Chromatographic Science*, 41(3), pp.164-165.

- ❖ Rueda, A., Seiquer, I., Olalla, M., Giménez, R., Lara, L. and Cabrera-Vique, C., 2014. Characterization of Fatty Acid Profile of Argan Oil and Other Edible Vegetable Oils by Gas Chromatography and Discriminant Analysis. *Journal of Chemistry*, 2014, pp.1-8.
- ❖ Sadowska-Bartos, I. and Bartosz, G., 2014. Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *BioMed Research International*, 2014, pp.1-17.
- ❖ Sánchez-Rangel, J., Benavides, J., Heredia, J., Cisneros-Zevallos, L. and Jacobo-Velázquez, D., 2013. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), p.5990.
- ❖ Schaich, K., 2012. Thinking outside the classical chain reaction box of lipid oxidation. *Lipid Technology*, 24(3), pp.55-58.
- ❖ SERVILI, M., SELVAGGINI, R., ESPOSTO, S., TATICCHI, A., MONTEDORO, G. and MOROZZI, G., 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), pp.113-127.
- ❖ Sharma, C., Kaur, A., Thind, S., Singh, B. and Raina, S., 2015. Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), pp.7561-7576.
- ❖ Shibamoto, T. (2014). Diacetyl: Occurrence, Analysis, and Toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4048–4053.
- ❖ Smeriglio, A., Toscano, G., Denaro, M., De Francesco, C., Agozzino, S. and Trombetta, D., 2019. Nitrogen Headspace Improves the Extra Virgin Olive Oil Shelf-Life, Preserving Its Functional Properties. *Antioxidants*, 8(9), p.331.
- ❖ Troise, A. D., 2018. Analytical strategies to depict the fate of the Maillard reaction in foods. *Current Opinion in Food Science*, Volume 19, pp. 15-22.
- ❖ Uribarri, J., del Castillo, M., de la Maza, M., Filip, R., Gugliucci, A., Luevano-Contreras, C., Macías-Cervantes, M., Markowicz Bastos, D., Medrano, A., Menini, T., Portero-Otin, M., Rojas, A., Sampaio, G., Wrobel, K., Wrobel, K. and Garay-Sevilla, M., 2015. Dietary Advanced Glycation End Products and Their Role in Health and Disease. *Advances in Nutrition*, 6(4), pp.461-473.
- ❖ Velasco, J., Marmesat, S., Bordeaux, O., Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, C., 2004. Formation and Evolution of Monoepoxy Fatty Acids in Thermoxidized Olive and Sunflower Oils and Quantitation in Used Frying Oils from Restaurants and Fried-Food Outlets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), pp.4438-4443.
- ❖ Vingerling, N., Oseredczuk, M., du Chaffaut, L., Ireland, J. and Ledoux, M., 2010. Fatty acid composition of commercial vegetable oils from the French market analysed using a long highly polar column. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 17(3), pp.185-192.
- ❖ Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M. and Aldini, G., 2013. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research*, 47(sup1), pp.3-27.
- ❖ Von Mühlen, C., de Oliveira, E., Morrison, P., Zini, C., Caramão, E. and Marriott, P., 2007. Qualitative and quantitative study of nitrogen-containing compounds in heavy gas oil using comprehensive two-dimensional gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *Journal of Separation Science*, 30(18), pp.3223-3232.
- ❖ Wallace, T., 2018. Health Effects of Coconut Oil—A Narrative Review of Current Evidence. *Journal of the American College of Nutrition*, 38(2), pp.97-107.

- ❖ Wang, Q., Hengel, M. and Shibamoto, T., 2019. Formation of toxic glyoxal, methylglyoxal and diacetyl formed in the headspace of heated edible oil. *Global Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1(1), pp. 1-8.
- ❖ Wang, C., Lu, Y., Huang, Q., Zheng, T., Sang, S. and Lv, L., 2017. Levels and formation of α -dicarbonyl compounds in beverages and the preventive effects of flavonoids. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), pp.2030-2040.
- ❖ Wang, Y. and Ho, C., 2012. Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal. *Chemical Society Reviews*, 41(11), p.4140.
- ❖ Wang, H., Qian, H. and Yao, W., 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), pp.573-584.
- ❖ Wani, T., Masoodi, F., Gani, A., Baba, W., Rahmanian, N., Akhter, R., Wani, I. and Ahmad, M., 2018. Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. *Trends in Food Science & Technology*, 77, pp.77-90.
- ❖ Wu, C. and Yen, G., 2005. Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), pp.3167-3173.
- ❖ Xia, W. and Budge, S., 2017. GC-MS Characterization of Hydroxy Fatty Acids Generated from Lipid Oxidation in Vegetable Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(2), p.1700313.
- ❖ Xia, W. and Budge, S., 2018. Simultaneous quantification of epoxy and hydroxy fatty acids as oxidation products of triacylglycerols in edible oils. *Journal of Chromatography A*, 1537, pp.83-90.
- ❖ Yubero-Serrano, E., Lopez-Moreno, J., Gomez-Delgado, F. and Lopez-Miranda, J., (2019) 'Extra virgin olive oil: More than a healthy fat', *European Journal of Clinical Nutrition*, 72(Table 1), pp. 8–17.
- ❖ Zamora-Zamora, F., Martínez-Galiano, J., Gaforio, J. and Delgado-Rodríguez, M., 2018. Effects of olive oil on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *Grasas y Aceites*, 69(4), p.272.
- ❖ Zhang, Q., Wang, Y. and Fu, L., 2020. Dietary advanced glycation end-products: Perspectives linking food processing with health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), pp.2559-2587.
- ❖ Zhang, Q., Ames, J., Smith, R., Baynes, J. and Metz, T., 2009. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Journal of Proteome Research*, 8(2), pp.754-769.
- ❖ Zhu, J., Niu, Y. and Xiao, Z., 2020. Characterization of important sulfur and nitrogen compounds in Lang baijiu by application of gas chromatography-olfactometry, flame photometric detection, nitrogen phosphorus detector and odor activity value. *Food Research International*, 131, p.109001.

8.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

- ❖ Χατζηϊωάννου, Θ. Π., Κούππαρη Μ. Α. (2010) Ενόργανη Ανάλυση, 7^η Έκδοση, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 439-453.
- ❖ Skoog, D., West, D., Holler, F. and Crouch, S., n.d. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 6th ed. Pp.903-9011.

8.3 Διαδίκτυο

- ❖ International Olive Council. 2021. *International Olive Council*.: <<https://www.internationaloliveoil.org/>> [Τελευταία Πρόσβαση 15 Νοεμβρίου 2020].
- ❖ OliveOil.com. 2020. *OliveOil.com*. <<https://www.oliveoil.com/>> [Τελευταία Πρόσβαση 15 Νοεμβρίου 2020].
- ❖ Minagric.gr. 2021. *Νομοθεσία Ελιάς Ελαιόλαδο*. <<http://www.minagric.gr/index.php/el/farmer-2/crop-production/elialadi/1774-nomothesia-elia-ladi>> [Τελευταία Πρόσβαση 16 Μαρτίου 2021].