



Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης
Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής

Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΑΤΟΜΙΚΗ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ**

ΖΑΖΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΤΣΙΟΥΔΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΑΤΟΜΙΚΗ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ**

ΖΑΖΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΤΣΙΟΥΔΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

**Υποβολή Πτυχιακής Διατριβής που αποτελεί μέρος απαιτήσεων για την
απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ
Θεσσαλονίκης.**

Θεσσαλονίκη 2012

Εισηγητές : Ζώτος Αναστάσιος

Παπώτη Βασιλική

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ
ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΑΤΟΜΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ**

ΖΑΖΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΤΣΙΟΥΔΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

**ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα
Τεχνολογίας Τροφίμων, 541 01, Τ.Θ 14561**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συγκέντρωση επιλεγμένων ανόργανων συστατικών (Na, K, Ca, Li, Mg, Cu, Pb, Al, Zn) σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς κατάλληλων για κατανάλωση. Τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν από δείγματα φύλλων ελιάς που συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές της Θεσσαλονίκης (Ανατολική, Δυτική, Σίνδος) με σκοπό να μελετηθεί αν αποτελούν αξιόλογη πηγή των υπό μελέτη ανόργανων συστατικών. Τα ανόργανα συστατικά που μελετήθηκαν είτε αποτελούν επιθυμητά συστατικά σημαντικής διατροφικής αξίας, είτε ανεπιθύμητα συνδεδεμένα με αρνητικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Για το σκοπό της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η επίδραση των παραγόντων: αναλογία υλικού/διαλύτη εκχύλισης, χρόνος παρασκευής εγχυμάτων, μέθοδος παρασκευής φυτικών εκχυλισμάτων, διαλύτης εκχύλισης, καθώς και ο παράγοντας προέλευση δείγματος. Ο προσδιορισμός των ανόργανων συστατικών στα υπό μελέτη εκχυλίσματα έγινε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης και ατομικής εκπομπής. Τα ροφήματα παρουσίασαν παραπλήσιο περιεχόμενο σε Na, K, Ca, Li και Mg ανεξαρτήτως προέλευσης και συνθηκών παρασκευής. Τα επίπεδα Cu, Zn, Al και Pb υδατοαιθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς δε διαφοροποιήθηκαν με την προέλευση του υλικού. Εγχύματα φύλλων ελιάς παρουσίασαν παραπλήσια και καλύτερα επίπεδα σε Na, K, και Ca από αντίστοιχα βουνίσσιου, φλαμούρι και πράσινου τσαγιού που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη για λόγους σύγκρισης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	1
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	2
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.2 ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ.....	8
1.2.1 Γενικά.....	8
1.2.2 Ιστορικό Χρήσης	9
1.2.3 Βιοενεργό Δυναμικό Φύλλων Ελιάς & Προϊόντων τους	11
1.3.1 Γενικά.....	14
1.3.2 Δειγματοληψία & διαχείριση δείγματος	15
1.3.3 Παραλαβή βιοενεργών κλασμάτων	16
1.4 ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	19
1.4.1 Γενικά/Σημασία Προσδιορισμού Ανόργανων στοιχείων	19
1.4.2 Σημασία ανόργανων στοιχείων για τον ανθρώπινο οργανισμό	20
1.4.3 Χαρακτηριστικά επιλεγμένων ανόργανων στοιχείων που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας	21
1.4.4 Προσδιορισμός ανόργανων στοιχείων	27
1.4.5 Ανόργανα συστατικά φύλλων ελιάς	33
1.4.6 Σύνοψη πρακτικών και ευρημάτων βιβλιογραφικών εργασιών με αντικείμενο το ανόργανο περιεχόμενο φυτικών υλικών και προϊόντων τους	34
2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ - ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	37
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	38
3.1 ΦΥΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	38
3.1.1 Φύλλα ελιάς (O. europaea L.)	38
3.1.2 Άλλα φυτικά υλικά	39
3.1.3 Προκατεργασία φύλλων ελιάς	39
3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ/ΔΙΑΛΥΤΕΣ/ΠΡΟΤΡΥΠΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	40
3.3 ΟΡΓΑΝΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ	40
3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	41
3.4.1 Παρασκευή εγχυμάτων	41
3.4.2 Παρασκευή αφεψημάτων.....	42
3.4.3 Παρασκευή εκχυλισμάτων υπό ανάδευση	42
3.4.4 Παρασκευή εκχυλισμάτων σε υδατόλουτρο	43

3.4.5 Παρασκευή εκχυλισμάτων σε λουτρό υπερήχων	43
3.4.6 Παρασκευή εκχυλισμάτων σε τη βοήθεια των μικροκυμάτων	43
3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΥΤΙΚΩΝ ΡΟΦΗΜΑΤΩΝ	44
3.5.1 Φλογοφωτομετρικός Προσδιορισμός Na, K, Ca και Li	44
3.5.2 Προσδιορισμός Cu, Pb, Mg, Al, Zn με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης φούρνου ηλεκτρικά θερμαινόμενου γραφίτη	47
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	51
4.1.1. Επίδραση της προκατεργασίας των δειγμάτων με οξέα στην ανάκτηση Na, K, Ca και Li από το προς ανάλυση υπόστρωμα.....	51
4.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ Na, K ΚΑΙ Ca ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΒΟΤΑΝΑ	61
4.3 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ Na, K, Ca, Li ΚΑΙ Mg ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ.....	63
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	68
6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	69
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ενδεικτική συνοπτική παρουσίαση βιοενεργού δυναμικού επιλεγμένων φυσικών προϊόντων (που αποτέλεσαν και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας).....	7
Πίνακας 2. Συνοπτική παρουσίαση πρακτικών παραλαβής φαινολικών βιοενεργών κλασμάτων από φύλλα ελιάς.....	18
Πίνακας 3. Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη σε ανόργανα στοιχεία για ενήλικα 70kg.....	26
Πίνακας 4. Περιεκτικότητα φύλλων ελιάς σε επιλεγμένα ανόργανα στοιχεία.....	34
Πίνακας 5. Συνθήκες ανάλυσης Cu, Mg, Pb, Al, Zn.....	49
Πίνακας 6. Συγκέντρωση ανόργανων συστατικών σε εκχυλίσματα βοτάνων.....	67
Πίνακας 7. Συγκέντρωση ανόργανων συστατικών σε εκχυλίσματα βοτάνων της διεθνούς βιβλιογραφίας.....	67

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.** α) Συσκευασίες ολόκληρων ή θρυμματισμένων φύλλων ελιάς για την παρασκευή αφεψημάτων και χυμός φύλλων ελιάς (φραπελιά), β) κάψουλες και δισκία φύλλων ελιάς, απόσταγμα φύλλων ελιάς, και γ) αντιγυραντικές κρέμες προσώπου, κρέμες επαναδόμησης χεριών και σώματος και σαμπουάν με βάση εκχύλισμα φύλλων ελιάς.....10
- Σχήμα 2.** Ζυμαρικά με εκχύλισμα φύλλων ελιάς και λάδι εμπλουτισμένο με φύλλα ελιάς.....10
- Σχήμα 3.** Απεικόνιση διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης και εκπομπής με φλόγα.....29
- Σχήμα 4.** Φλογοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό των στοιχείων Na, K, Ca και Li στα υπό μελέτη φυτικά ροφήματα.....47
- Σχήμα 5.** Βασικά τμήματα διάταξης φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης με φούρνο ηλεκτρικά θερμαινόμενου γραφίτη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.....50
- Σχήμα 6.** Επίδραση της προκατεργασίας των δειγμάτων με οξέα στην ανάκτηση Na, K, Ca και Li από το προς ανάλυση υπόστρωμα (εκχύλισμα φύλλων ελιάς).....53
- Σχήμα 7.** Επίδραση αναλογίας φυτικού υλικού/νερού στο περιεχόμενο εγχυμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K, Ca και Li.....54
- Σχήμα 8.** . Επίδραση του χρόνου παρασκευής εγχυμάτων φύλλων ελιάς στο περιεχόμενο τους σε Na, K, Ca και Li.....56

- Σχήμα 9.** . Επίδραση διαλύτη παρασκευής εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς (λουτρού υπερήχων 2% w/v και χρόνου παρασκευής 10min) στο περιεχόμενο τους σε Na, K, Ca και Li.....58
- Σχήμα 10.** Περιεχόμενο εγχυμάτων (2% w/v, 10min) φυτικών υλικών (βουνίσιο, φλαμούρι, φασκόμηλο, πράσινο τσάι, χαμομήλι, φύλλα ελιάς) σε Na, K και Ca.....60
- Σχήμα 11.** Περιεχόμενο εγχυμάτων (2% w/v, 10min) φυτικών υλικών (βουνίσιο, φλαμούρι, φασκόμηλο, πράσινο τσάι, χαμομήλι, φύλλα ελιάς) σε Na, K και Ca.....62
- Σχήμα 12.** Περιεχόμενο σε Na εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας.....63
- Σχήμα 13.** Περιεχόμενο σε K εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας.....64
- Σχήμα 14.** Περιεχόμενο σε Ca εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας.....64
- Σχήμα 15.** Περιεχόμενο σε Li εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας.....65
- Σχήμα 16.** Περιεχόμενο σε Mg εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας.....65

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Υπό το φως ολοένα και περισσότερων ευρημάτων που συσχετίζουν την υγεία με τη διατροφή, το ενδιαφέρον ανεύρεσης φυσικών πηγών βιοενεργών ενώσεων τα τελευταία χρόνια αυξήθηκε σημαντικά (Kris-Etherton et al., 2002, Shibamoto et al., 2008, Ho et al., 2008). Η αξία και η ευρεία χρήση των φυσικών προϊόντων ήταν γνωστές από την αρχαιότητα σε όλα τα μήκη και πλάτη της γης. Φυσικά προϊόντα αποτελούσαν βασικά συστατικά όχι μόνο της ανθρώπινης διατροφής, αλλά και της παραδοσιακής ιατρικής, και κοσμητικής. Πολλοί συγγραφείς εκείνης της περιόδου κατέγραψαν φυτικά υλικά και περιέγραψαν τις θεραπευτικές τους δράσεις διαφυλάττοντας έτσι και μεταδίδοντας τη γνώση στις μεταγενέστερες γενιές. Από τότε έως σήμερα ευρήματα ποικίλων μελετών ανέδειξαν τον ευεργετικό ρόλο και τις βιοενεργές δράσεις διαφόρων φυσικών συστατικών και προϊόντων, γεγονός που οδήγησε στη διεθνώς ραγδαία εξέλιξη της Βιομηχανίας Λειτουργικών Τροφίμων και άλλων Νέων Προϊόντων. Όλο και περισσότερα προϊόντα με βάση φυσικές πηγές διατίθενται πλέον στην αγορά με στόχο να συμπληρώσουν την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τη συνήθη διατροφή, να ενισχύσουν τους μηχανισμούς άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού, να αξιοποιήσουν τις ευεργετικές δράσεις των φυσικών βιοενεργών συστατικών τους για πρόληψη και θεραπεία ασθενειών και δυσλειτουργιών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σύμφωνα με Έρευνες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) το 70-80% του παγκόσμιου πληθυσμού στηρίζεται σε μη συμβατικές ιατρικές προσεγγίσεις που βασίζονται στη χρήση φυτικών σκευασμάτων για την πρόληψη και θεραπεία από διάφορες ασθένειες και δυσλειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού (Kalny et al., 2007).

Όπως ήδη περιγράφηκε παραπάνω, τα φυσικά προϊόντα ελκύουν ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον του καταναλωτικού κοινού και κατά συνέπεια της βιομηχανίας, κυρίως χάρη στην αυξανόμενη ζήτηση για την αξιοποίηση πηγών με

ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία δράσεις και για την αντικατάσταση συνθετικών υλών που έχουν συνδεθεί με ανεπιθύμητες επενέργειες (Yanishlieva-Maslarova, 2001, Frankel, 2007). Το γεγονός ότι στα φυσικά προϊόντα απαντάται πλήθος βιοενεργών/λειτουργικών συστατικών όπως φαινόλες, φλαβονοειδή, φυτοστερόλες, τερπένια, βιταμίνες, μέταλλα, φυτικές ίνες, ευχημικές ουσίες κ.ά με καλά τεκμηριωμένες ευεργετικές και λειτουργικές δράσεις αιτιολογεί το ευρύ ενδιαφέρον που έχουν κατακτήσει (Joy et al., 1998, Kris-Etherton et al., 2002, Liang & Fang, 2006). Ακολούθως παρουσιάζονται ενδεικτικά (**Πίνακας 1**) φυσικά προϊόντα (που αποτέλεσαν και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας) με ευρύ ενδιαφέρον και ορισμένες ιδιότητες που τους έχουν αποδοθεί.

Αν και πλήθος φυτικών υλικών μελετάται και ευρέως αξιοποιείται χάρη στις φαρμακευτικές τους ιδιότητες και τη διατροφική τους αξία (Gomez, 2003) εδώ και πολλά χρόνια, προσφάτως προέκυψε ενδιαφέρον για μια συνολικότερη προσέγγιση του προφίλ των βιοενεργών φυτικών υλικών. Από την άλλη πλευρά, καθώς κάθε τι φυσικό δεν είναι κατά ανάγκη και «ασφαλές» προέκυψαν και ερωτήματα σχετικά με το περιεχόμενο αυτών των υλικών σε ανεπιθύμητα συστατικά (Bast et al., 2002, Schilter et al., 2003, Kroes & Walker, 2004, Gualati et al., 2006, Coppens et al., 2006, van Breeman et al., 2007, Hanekamp & Bast, 2007, Rietjens et al., 2008). Για τη διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών υλοποιούνται πλέον μελέτες με αντικείμενο την παρουσία «ρυπαντών» ή «καταλοίπων» (όπως μυκοτοξίνες, φυτοφάρμακα, τοξικά μέταλλα κ.ά.) σε φυσικά προϊόντα με βιοενεργό ενδιαφέρον. Τέτοιου τύπου συστατικά που μπορούν να προκύψουν μεταξύ άλλων λόγω του περιβάλλοντος ανάπτυξης του υλικού, των εφαρμοζόμενων καλλιεργητικών πρακτικών, των συνθηκών διαχείρισης της συλλεχθείσας πρώτης ύλης, των υλικών συσκευασίας, μπορεί να επιφέρουν δυσμενείς δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, για να επιτευχθεί το επιθυμητό ευεργετικό αποτέλεσμα από την κατανάλωση φυτικών προϊόντων, χωρίς να διακυβεύεται από αυτά η υγεία των καταναλωτών, είναι αναγκαίο να διασφαλίζεται η ποιότητα της αρχικής πρώτης ύλης (WHO, 2003, Baye & Hymete, 2010).

Προσωπικότητες που κατέκτησαν την ύψιστη θέση στην ιστορία της ιατρικής όπως ο Ιπποκράτης (460-377 π.Χ.) και ο Διοσκουρίδης (40-80 μ.Χ) συγκαταλέγουν το

φυτό *Olea europaea* L. μεταξύ αυτών που καταγράφουν για τις θεραπευτικές τους δράσεις. Προϊόντα και παραπροϊόντα της ελαιοκαλλιέργειας συγκαταλέγονται μεταξύ των διαφόρων φυσικών πηγών βιοενεργών συστατικών που επιτυχώς αξιοποιήθηκαν στο πέρασμα των χρόνων για διατροφικούς, φαρμακευτικούς και άλλους σκοπούς (Khan, 2007). Μεταξύ των πολλών φυσικών πηγών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά και άλλα βιοενεργά συστατικά, τα φύλλα της ελιάς προκάλεσαν πρόσφατα το έντονο ενδιαφέρον των ερευνητών. Ωστόσο, το υλικό αυτό έχει κυρίως μελετηθεί σε σχέση με το φαινολικό περιεχόμενό του και εργασίες σχετικές με άλλα συστατικά του που χρήζουν διατροφικό και λειτουργικό ενδιαφέρον, αλλά και τυχόν ανεπιθύμητα συστατικά του, απουσιάζουν από τη διεθνή βιβλιογραφία.

Πίνακας 1. Ενδεικτική συνοπτική παρουσίαση βιοενεργού δυναμικού επιλεγμένων φυσικών προϊόντων (που αποτέλεσαν και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας)

	Προστασία έναντι καρδιακών παθήσεων	Προστασία έναντι νευρο-εκφυλιστικών ασθενειών (Alzheimer, Parkinson, κ.ά)	Προστασία έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου	Αντι-φλεγμονώδης δράση	Αντική δράση (έναντι π.χ. HIV)	Αντι-οξειδωτική δράση	Αντιβιοτική δράση	Αντι-μικροβιακή & βακτηριοστα-τική δράση	Ευεξία & ενίσχυση ανοσοποιητικού	Αντισηπτική δράση	Επουλωτική
ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ	+	+	+	+	+	+		+	+		
ΧΑΜΟΜΗΛΙ				+		+		+	+	+	+
ΦΑΣΚΟΜΗΛΟ				+	+			+	+		
ΠΡΑΣΙΝΟ ΤΣΑΙ	+										
ΜΑΥΡΟ ΤΣΑΙ	+										
ΦΛΑΜΟΥΡΙ		+							+		

(Basgel & Erdemoglou, 2006, Asres et al., 2005, Guarrera, 2005, Schachter, 2009, Crone & Gabriel, 2002,

http://www.energybalance.com/download/Olive_Leaf_Olea_europaea_Overview_of_Studies_and_Results.pdf)

1.2 ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ

1.2.1 Γενικά

Η ελιά ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας των Ελαιϊδών (*Oleaceae*) και η καταγωγή της χάνεται στα βάθη των αιώνων. Οι θεραπευτικές ιδιότητες των προϊόντων της ελιάς ήταν γνωστές στην Ιατρική επιστήμη της αρχαιότητας (Σφακιωτάκης, 1996, Θεριός, 2005, Κυριτσάκης, 2007, Therios, 2009). Προσφάτως το ενδιαφέρον έχουν προσελκύσει και άλλα προϊόντα εκτός από το ελαιόλαδο και τον ελαιόκαρπο χάρη στο πλούσιο βιοδραστικό δυναμικό τους (Boskou et al., 2005, Visioli et al., 2006, Boskou, 2006, Tsimidou & Paroti, 2010, Quideau et al., 2011). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στα φύλλα της ελιάς, υλικό ιδιαίτερα πλούσιο σε βιοενεργά συστατικά, εύκολο στη διαχείριση, οικονομικό και διαθέσιμο σε ποσότητες.

Τα φύλλα της ελιάς (*Olea europaea* L., καλλιεργούμενη ελιά) κέρδισαν το έντονο ενδιαφέρον ειδικών από τομείς της επιστήμης και βιομηχανίας τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, κυρίως χάρη στο περιεχόμενο τους σε φαινολικά συστατικά με ευρέως γνωστές βιοενεργές ιδιότητες (Soler-Rivas et al., 2000, Benavente-Garcia et al., 2000, Boskou, 2006, Nenadis & Tsimidou, 2009, Erbay & Icier, 2010). Από την άλλη πλευρά, ως παραπροϊόν της ελαιοκαλλιέργειας, αποτελούν βιοδιαθέσιμη φτηνή πηγή. Μεγάλες ποσότητες είναι διαθέσιμες κατά το κλάδεμα των ελαιοδένδρων, τη συγκομιδή του καρπού και από τα ελαιοτριβεία, (Tabera et al., 2004, Meirinhos, et al., 2005, Makris et al., 2007, Sanchez Avila et al., 2007). Ο αριθμός των ελαιοδένδρων που μόνο στην Ελλάδα ξεπερνά τα 130×10^6 δένδρα, σε ένα παγκόσμιο σύνολο $\sim 900 \times 10^6$ δένδρων, αντικατοπτρίζει το μέγεθος της ποσότητας των φύλλων που μπορεί να διατεθεί προς εκμετάλλευση (Θεριός, 2005). Μέχρι σήμερα το υλικό αυτό κυρίως καίγεται, κομποστοποιείται, αποτίθεται στο περιβάλλον και χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή (Martin Garcia et al, 2003, 2004 & 2006, Yanez-Ruiz & Molina-Alcaide, 2008, Erbay & Icier, 2010).

1.2.2 Ιστορικό Χρήσης

Η χρήση των φύλλων της ελιάς για διάφορους σκοπούς φαίνεται ότι ήταν γνωστή από την αρχαιότητα. Αναφέρεται ότι οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν εκχυλίσματα φύλλων ελιάς για να μουμιοποιήσουν τους Φαραώ τους, ενώ ο Διοσκουρίδης (*De Materia Medica*, 60-80 μ.Χ) καταγράφει τις εν δυνάμει δράσεις εκχυλισμάτων του υλικού, δίνοντας παράλληλα την πρώτη ίσως συνταγή για την παρασκευή αφεψημάτων από φύλλα ελιάς. Επιπλέον, η παραδοσιακή χρήση σκευασμάτων από φύλλα ελιάς παρουσιάζεται μαζί με αυτή άλλων φυτικών υλικών σε μελέτες με εθνοβοτανικό ενδιαφέρον (Guarrera, 2005, Lardos, 2006, Gião et al., 2007, Khan et al., 2007, Tahraoui et al., 2007). Στοιχεία μαρτυρούν την φαρμακολογική χρήση αφεψημάτων φύλλων ελιάς στην αντιμετώπιση σοβαρών κρουσμάτων ελονοσίας, περιστατικών θανατηφόρου πυρετού και υπέρτασης κατά τη διάρκεια του 19^{ου}-20^{ου} αιώνα σε Αφρική, Ισπανία, Γαλλία, Αγγλία και Μυτιλήνη. Ωστόσο, αν και καταχωρημένο σε Φαρμακοποιίες, το υλικό φαίνεται πως μετέπειτα είχε σχετικά περιορισμένη χρήση.

Στις μέρες μας, εμπορικά προϊόντα φύλλων ελιάς διατίθενται πλέον ως σκευάσματα αποξηραμένων φύλλων ελιάς που προορίζονται για οικιακή παρασκευή αφεψημάτων, ως χυμός φύλλων ελιάς, ως συμπληρώματα διατροφής τύπου κάψουλας, δισκίων, αποσταγμάτων, «spray» και άλλων προϊόντων. Επίσης αποτελούν συστατικά ολοένα και περισσότερων καλλυντικών προϊόντων (**Σχήμα 1**).

Φύλλα αλλά και εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έχουν ήδη το ρόλο τους ως πρόσθετα σε διάφορα τρόφιμα (**Σχήμα 2**) (Erbay & Icier, 2010, De Leonardis & Macciola, 2010, Ch. 30 in Preedy & Watson). Εξάλλου το ιστορικό της χρήσης τους, σε συνδυασμό με αποτελέσματα διαθέσιμων τοξικολογικών μελετών για επιμέρους συστατικά των προϊόντων της ελιάς, καθώς και εκχυλίσματα αυτών είναι αρκετά ελπιδοφόρα για την ασφαλή χρήση τέτοιου τύπου προϊόντων (Petkov et al., 1972, Liu, 1995, Farag et al., 2003, Soni et al., 2006, Kounatidis et al., 2009, EFSA Journal

2011;9(4):2033). Ωστόσο, συχνά πολλά από τα προϊόντα που ήδη κυκλοφορούν στις διεθνείς αγορές δεν φέρουν έγκριση αρμόδιων φορέων (ΕΟΦ, FDA).



Σχήμα 1 α. Συσκευασίες ολόκληρων ή θρυμματισμένων φύλλων ελιάς για παρασκευή αφεψημάτων και χυμός φύλλων ελιάς (φραπελιά), **1β)** κάψουλες και δισκία φύλλων ελιάς, απόσταγμα φύλλων ελιάς, και **1γ)** αντιγυραντικές κρέμες προσώπου, επαναδόμησης χεριών και σώματος και σαμπουάν με βάση εκχύλισμα φύλλων ελιάς



Σχήμα 2. Ζυμαρικά με εκχύλισμα φύλλων ελιάς και λάδι εμπλουτισμένο με φύλλα ελιάς

1.2.3 Βιοενεργό Δυναμικό Φύλλων Ελιάς & Προϊόντων τους

Τα φύλλα της ελιάς, αποτελούν πηγή διαφόρων κατηγοριών βιοενεργών ενώσεων με ιδιαίτερο ενδιαφέρον χάρη στις ευεργετικές για την υγεία δράσεις, το θεραπευτικό τους δυναμικό και τις λειτουργικές τους ιδιότητες. Πειραματικές και κλινικές μελέτες πιστοποιούν την παρουσία τέτοιων συστατικών σε διάφορους τύπους σκευασμάτων του υλικού, αλλά και την πληθώρα των δράσεων των τελευταίων. Το πλήθος των βιοενεργών δράσεων προϊόντων του υλικού συσχετίζεται με την παρουσία ενός ή / και περισσότερων βιοενεργών συστατικών και τη συνεργιστική τους δράση. Τα φύλλα της ελιάς αρχικά συγκέντρωσαν ενδιαφέρον κυρίως χάρη στο πλούσιο περιεχόμενό τους σε ιδιαίτερα δραστικά φαινολικά αντιοξειδωτικά συνδεδεμένα με καλά τεκμηριωμένες δράσεις (Tsimidou & Paroti, 2010, Erbay & Icier, 2010). Ωστόσο, το υλικό φαίνεται να αποτελεί πλούσια πηγή και άλλων συστατικών (Tsimidou & Paroti, 2010) που χρήζουν ενδιαφέρον.

Συγκεκριμένα, τα φύλλα της ελιάς περιέχουν κυρίως:

- Φαινολικά συστατικά
 - απλές φαινόλες & οξέα (όπως τυροσόλη, υδροxyτυροσόλη & συγγενείς ενώσεις)
 - βενζοϊκά & κινναμωμικά οξέα
 - φλαβονοειδή (όπως λουτελίνη, απιγενίνη & συγγενείς ενώσεις)
 - σεκοϊριδοειδή (όπως ελαιοευρωπαϊνή & συγγενείς ενώσεις)
 - άλλες συγγενείς ενώσεις (όπως ελενολικό οξύ, βερμπασκοζίτη)
- τερπενοειδή (όπως ουρσολικό οξύ, μασλινικό οξύ, ουβαόλη, σκουαλένιο)
- βιταμίνες (όπως καροτενοειδή, τοκοφερόλες)
- φυσικές χρωστικές (όπως καροτενοειδή, χλωροφύλλες)

- φυτοστερόλες (όπως β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη)

Επιπλέον το υλικό, όπως και άλλα φυτικά υλικά, περιέχει πρωτεΐνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία και άλλα συστατικά (Wang, Tai & Hu, 2010) με διατροφική αξία, που καθόλου δεν έχουν μελετηθεί σε ότι αφορά την αξιοποίηση του στην παραγωγή προϊόντων για την πρόσληψη και των ανωτέρω. Σήμερα η ραγδαία διάθεση ποικίλων εμπορικών προϊόντων με βάση τα φύλλα της ελιάς (De Leonardis & Macciola, 2010) οφείλεται σε επιστημονικά ευρήματα που συνεχώς αναδεικνύουν μεταξύ άλλων (Khan, 2007, De Leonardis & Macciola, 2010, Tsimidou & Papoti, 2010, Brenes et al., 2010, Chondrogianni et al., 2010, Erbay, 2011):

- Τα δυνητικά ευεργετήματα του υλικού έναντι:
 - καρδιαγγειακών παθήσεων
 - νευροεκφυλιστικών ασθενειών (όπως Parkinson, Alzheimer)
 - ιογενών ασθενειών (όπως HIV)
 - καρκινογένεσεων
 - διαβήτη
 - γαστρεντερικών διαταραχών
 - διαταραχών αναπνευστικού συστήματος
 - οστεοπόρωσης κ.ά.
- Την πληθώρα των βιοενεργών δράσεων του υλικού:
 - αντιοξειδωτική δράση
 - αντιφλεγμονώδης δράση
 - αντιμικροβιακή δράση

- αντιβακτηριοστατική δράση
- αντιμυκητιακή δράση
- αντιπαρασιτική δράση
- αντιυπερτασιακή δράση
- ευεργετική επίδραση στα αιμοπετάλια και την πήξη του αίματος
- αντισπασμωδική δράση
- επουλωτική δράση έναντι εγκαυμάτων
- προστατευτική δράση έναντι ακτινοβολιών
- αποτοξινωτική δράση
- αντισηπτική δράση
- αύξηση ενεργητικότητας & ενίσχυση ανοσοποιητικού
- αντιγυραντική δράση
- ιδιότητες επαναδόμησης δέρματος κ.ά.

Η ανάδειξη του πλήρους προφίλ του υλικού και η παρασκευή νέων βελτιστοποιημένων προϊόντων με βάση αυτό αποτελεί αντικείμενο έρευνας ολοένα και περισσότερων ερευνητών, αλλά και υπευθύνων σε τομείς έρευνας και ανάπτυξης βιομηχανικών μονάδων. Επιπλέον, σε διαρκή ραγδαία εξέλιξη είναι και η κυκλοφορία νέων σκευασμάτων με βάση το υλικό στις διεθνείς αγορές (<http://www.healthtrade.gr/olives.html>, <http://www.olivus.com/>, [http://www.anyvitamins.com/olive leaf extract.htm](http://www.anyvitamins.com/olive_leaf_extract.htm), http://kritikidiatrofi.gr/product_gr.php?id=112&flag=normal, <http://www.naturalhealthconsult.com/monographs/oliveleaf.html>).

Η ασφαλή διάθεση τέτοιων προϊόντων επιτάσσει την διασφάλιση ασφαλούς πρώτης ύλης απαλλαγμένης από την πιθανή παρουσία ανεπιθύμητων ενώσεων. Η σύσταση του εδάφους και το περιβάλλον ανάπτυξης παίζουν καθοριστικό ρόλο στα επίπεδα επιθυμητών και μη συστατικών που μπορεί να βρεθούν τελικά σε ένα φυτικό υλικό και κατά συνέπεια σε τελικά προϊόντα (Gurta et al., 2010).

1.3 ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ & ΤΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΦΥΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

1.3.1 Γενικά

Κάθε φυτικό υλικό υπόκειται στην επίδραση διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Παράγοντες όπως η ποικιλία, οι καλλιεργητικές τεχνικές, το περιβάλλον ανάπτυξης (γεωγραφικό, κλιματικό, εδαφολογικό), η παρουσία ασθενειών ή τροφοπενιών, η ηλικία, η χρονική περίοδος δειγματοληψίας, το τμήμα του φυτικού υλικού (ρίζα, στέλεχος, φύλλα, άνθος, πέταλα κ.ά) μπορούν να διαφοροποιήσουν ποιοτικά και ποσοτικά τη χημική σύσταση και το βιοενεργό δυναμικό του (Tsimidou & Paroti, 2010). Ακόμη και η μετέπειτα από τη συλλογή, διαχείριση ενός υλικού μπορεί να διαφοροποιήσει σημαντικά το περιεχόμενο και τις ιδιότητες ενός τελικού παρασκευάσματος (Launert, 1989, Samuelsson, 1992, Parr & Bolwell, 2000, Houghton & Raman, 2002, Perez-Jimenez et al, 2008). Η αναγκαιότητα διερεύνησης των παραπάνω στη βέλτιστη αξιοποίηση ενός υλικού οφείλεται στο γεγονός ότι η διάθεση νέων φυσικών προϊόντων προϋποθέτει την προτυποποίηση τους, κάτι που είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την ποιότητα και σταθερότητα της πρώτης ύλης (Khan, 2006), αλλά και τη διασφάλιση ενός περιεχομένου άνευ ανεπιθύμητων συστατικών (βαρέων μετάλλων, τοξινών, φυτοφαρμάκων, άλλων ρυπαντών). Η διασφάλιση του τελευταίου για τα τρόφιμα επιβάλλεται εξάλλου και από την ευρωπαϊκή νομοθεσία από μια σειρά Κανονισμών

και Οδηγιών για την ασφάλεια των τροφίμων (π.χ. Καν 1881/06/ΕΚ, Καν 470/09/ΕΚ, Καν 396/05/ΕΚ, Οδηγίες 98/83, 2006/125 & 141)

1.3.2 Δειγματοληψία & διαχείριση δείγματος

Φυτικά υλικά συλλέγονται κατά την περίοδο που αναμένεται η μέγιστη συγκέντρωση (όταν υπάρχει σχετική γνώση) σε βιοενεργά συστατικά ή ευεργετική/λειτουργική δράση ώστε να διασφαλιστούν βέλτιστα χαρακτηριστικά. Μετέπειτα, επιβάλλεται η εφαρμογή κανόνων καλής εργαστηριακής πρακτικής και διαχείρισης του δείγματος για την αποφυγή μεταβολών χημικής σύστασης και δράσης (Launert, 1989, Ody, 1993, Houghton & Raman, 2002). Αρχικά για την απομάκρυνση εξωτερικών παραγόντων επιμόλυνσης (π.χ. χώμα, σκόνη) προτείνεται πλύση του νωπού υλικού με νερό και ακολούθως προσεκτική στράγγιση για την αποφυγή ανάπτυξης μυκήτων κ.ά. Επίσης καθίσταται απαραίτητη η κατάλληλη συντήρηση του υλικού, ως τη χρήση, για τον περιορισμό στο μικρότερο δυνατό βαθμό ενζυμικών διεργασιών που μπορεί να συμβούν μετά το «θάνατο» του φυτού. Πρέπει να σημειωθεί, πως εκτός από τα παραπάνω παράγοντες όπως η ευαισθησία του υλικού κατά την έκθεσή του σε υψηλές θερμοκρασίες, και η μακροπρόθεσμη και / ή μη σωστή αποθήκευση του πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (Paiva Martins & Gordon, 2001, Savournin, et al., 2001, Silva et al., 2006). Επιπλέον, ως πλέον ασφαλέστερη πρακτική προτείνεται η αποθήκευση του υλικού χωρίς αυτό να υποβληθεί σε επιπλέον διεργασίες (π.χ. τεμαχισμό, κονιοποίηση) προκειμένου να περιοριστούν αλλοιώσεις και οξειδώσεις.

Στη βιβλιογραφία με αντικείμενο τη μελέτη φυτικών υλικών (συμπεριλαμβανομένων των φύλλων της ελιάς) ως πηγή βιοενεργών ενώσεων, το φυτικό υλικό άλλοτε χρησιμοποιείται:

α) νωπό, άμεσα μετά την παραλαβή και ύστερα από επιμελή καθαρισμό του,

β) μετά από απόψυξη, το υλικό μετά την παραλαβή και ύστερα από επιμελή καθαρισμό του εισάγεται στην κατάψυξη, όπου και παραμένει μέχρι τη χρήση του,

γ) κυρίως αποξηραμένο, μετά την παραλαβή και ύστερα από επιμελή καθαρισμό του η ξήρανση του υλικού μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους: λυοφιλίωση, παραμονή στον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, παραμονή σε αεριζόμενο ή μη φούρνο ορισμένης θερμοκρασίας ή/και κενού, έκθεση σε μικροκύματα κ.ά. Καθώς με τη ξήρανση επιτυγχάνεται απλώς αδρανοποίηση ενζύμων, τα αποξηραμένα υλικά πρέπει να προστατεύονται από την υγρασία κατά την αποθήκευση. Ερμητικά κλεισμένοι γυάλινοι σκουρόχρωμοι περιέκτες, απουσία αέρα και περιβάλλον δροσερό και ξηρό θεωρούνται κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης (Samuelsson, 1992).

1.3.3 Παραλαβή βιοενεργών κλασμάτων

Εκτός όμως από τον τρόπο ξήρανσης και αποθήκευσης/συντήρησης ενός φυτικού υλικού οι συνθήκες παραλαβής (διαλύτης, μέθοδος, χρόνος, θερμοκρασία, αναλογία φυτικού υλικού/ διαλύτη κ.ά) των βιοενεργών συστατικών/κλασμάτων είναι επίσης καθοριστικές για τη σύσταση και το περιεχόμενο ενός τελικού παρασκευάσματος (Wang & Weller, 2006). Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης βασίζεται κυρίως στη φύση των συστατικών που επιδιώκεται να παραληφθούν, σε συνδυασμό με το κόστος και το σκοπό εφαρμογής του εκχυλίσματος (Houghton & Raman, 1998). Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης βιοενεργών συστατικών από ένα φυτικό υλικό με χρήση συγκεκριμένου διαλύτη, είναι άμεσα επηρεαζόμενη και από άλλους παράγοντες (αναλογία υλικού / διαλύτη, διαθέσιμη επιφάνεια επαφής υλικού με διαλύτη, κ.ά) (Wang & Weller, 2006).

Καθώς το πλήθος των εργασιών με αντικείμενο το βιοενεργό δυναμικό των φύλλων της ελιάς επικεντρώνονται στην παραλαβή φαινολικών κλασμάτων, οι διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί αφορούν στην παραλαβή των παραπάνω. Έτσι

οι διαλύτες που έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από φύλλα ελιάς είναι: η μεθανόλη, η αιθανόλη, το νερό, η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας, το DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο), υδατικά μίγματα μεθανόλης ή αιθανόλης σε διάφορες αναλογίες, καθώς επίσης και διάφοροι από τους παραπάνω διαλύτες ή μίγματα αυτών με ταυτόχρονη παρουσία οξέος (Tsimidou & Papoti, 2009). Υδατικοί και υδατοαλκοολικοί διαλύτες αποκλείουν την συνεκχύλιση μεγάλου μέρους χρωστικών που συμπαραλαμβάνονται σε σημαντικό βαθμό στην περίπτωση αλκοολούχων μέσων εκχύλισης, ενώ η παρουσία οξέων συνεισφέρει στην παραλαβή απλούστερων ενώσεων που προκύπτουν από τη διάσπαση σύνθετων συστατικών (De Leonardis et al., 2007).

Η ανάδειξη των φυσικών προϊόντων χάρη στο βιοδραστικό τους περιεχόμενο οδήγησε στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων ποσοτικής παραλαβής βιοενεργών κλασμάτων από φυσικά προϊόντα. Μειονεκτήματα παλαιότερων συμβατικών μεθόδων εκχύλισης (Soxhlet, απόσταξη με υδρατμούς, εκχύλιση υγρού-υγρού), όπως η τοξικότητα των απαιτούμενων διαλυτών, οι μεγάλοι απαιτούμενοι όγκοι διαλυτών, η απαιτούμενη ποσότητα πρώτων υλών, οι υψηλές θερμοκρασίες, οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης, οδήγησαν στην αναζήτηση βελτιωμένων τεχνικών. Η χρήση υπερήχων, μικροκυμάτων, ρευστών σε υπερκρίσιμη κατάσταση, κ.ά. σύγχρονες προσεγγίσεις φαίνεται ότι ενισχύουν την παραλαβή βιοενεργών ενώσεων κάτω από ηπιότερες θερμοκρασίες (απαραίτητες για την παραλαβή θερμοευαίσθητων συστατικών), συντομότερα, με κατανάλωση μικρών όγκων διαλυτών και από μικρές ποσότητες φυτικού υλικού (Starmans & Nijhuis, 1996, Wang & Weller, 2006). Για τα φύλλα ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες προσεγγίσεις (**Πίνακα 2**) (κυρίως για την παραλαβή του φαινολικού τους περιεχομένου).

Πίνακας 2. Συνοπτική παρουσίαση πρακτικών παραλαβής φαινολικών βιοενεργών κλασμάτων από φύλλα ελιάς

Ενδεικτική αναφορά	Μέθοδοι παραλαβής βιοενεργών συστατικών	Περιγραφή μεθόδου
Gariboldi <i>et al.</i> , 1986	Εκχύλιση με παραμονή	Ποσότητα υλικού παραμένει σε ορισμένη ποσότητα διαλύτη για ώρες ή/και ημέρες
Jaron-Lujan <i>et al.</i> , 2006, Papoti & Tsimidou, 2009, Goulas <i>et al.</i> , 2010, Xystouris <i>et al.</i> , 2011	Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων	Επιλεγμένη αναλογία υλικού / διαλύτη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα
Giao, <i>et al.</i> , 2007, Papoti <i>et al.</i> , 2011, Xystouris <i>et al.</i> , 2011	Παρασκευή αφεψήματος	Βρασμός επιλεγμένης αναλογίας υλικού / διαλύτη για ορισμένο χρονικό διάστημα
Giao, <i>et al.</i> , 2007, Xystouris <i>et al.</i> , 2011, Papoti <i>et al.</i> , 2011	Παρασκευή εγχύματος	Παραμονή επιλεγμένης αναλογίας υλικού / διαλύτη σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο για καθορισμένο χρονικό διάστημα ή προσθήκη ορισμένης ποσότητας βραστό νερού σε ορισμένη ποσότητα υλικού και παραμονή για ορισμένο χρόνο
Jaron-Lujan & de Castro, 2006 Xystouris <i>et al.</i> , 2011, Papoti <i>et al.</i> , 2011	Εκχύλιση σε τάρακτρο / ανάδευση	Παραμονή επιλεγμένης αναλογίας υλικού / διαλύτη σε θερμοστατούμενο τάρακτρο για ώρες ή ημέρες
Ryan <i>et al.</i> , 2002, 2003	Με πολτοποίηση	Πολτοποίηση φύλλων ελιάς με νερό σε μπλέντερ
Le Floch <i>et al.</i> , 1998	Εκχύλιση με ρευστά σε υπερκρίσιμες συνθήκες	Η εκχύλιση επιτυγχάνεται υπό συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης που υπερβαίνουν την κρίσιμη τιμή ρευστών όπως το CO ₂
Jaron-Lujan <i>et al.</i> , 2006	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα	Επιλεγμένη αναλογία υλικού / διαλύτη εκτίθεται σε μικροκύματα για καθορισμένο χρονικό διάστημα.

1.4 ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

1.4.1 Γενικά/Σημασία Προσδιορισμού Ανόργανων στοιχείων

Τα φυτικά υλικά αποτέλεσαν αντικείμενα μελέτης και αξιοποίησης στην κατεύθυνση παραγωγής νέων βιοενεργών προϊόντων χάρη στο πλήθος των βιοδραστικών και λειτουργικών συστατικών τους. Μεταξύ αυτών, τα ανόργανα στοιχεία των φυσικών προϊόντων φαίνεται να έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων, καθώς πολλά από αυτά είναι είτε απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού (π.χ. Na, K, Ca, Mg), είτε ανεπιθύμητα (τοξικά μέταλλα Cd, Hg, As, Pb) λόγω δυσμενών δράσεων που συνδέονται με την πρόσληψή τους (Βουδούρη-Κοντομηνά, 1987, Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου, 1996, Nielsen, 1998).

Ο προσδιορισμός των ανόργανων στοιχείων σε τρόφιμα και ποτά παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη διαπίστωση της θρεπτικής αξίας και ποιότητας, καθώς και τον έλεγχο για την παρουσία επιμολύνσεων (έδαφος, ατμόσφαιρα, καλλιεργητικές πρακτικές, βιομηχανική επεξεργασία, συσκευασία) (Βουδούρη-Κοντομηνά, 1987, Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου, 1996, Nielsen, 1998). Εκτός από τα παραπάνω, η σημασία του προσδιορισμού των ανόργανων συστατικών στα τρόφιμα εξυπηρετεί και τεχνολογικούς σκοπούς, καθώς η παρουσία ορισμένων στοιχείων μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην υφή ή/και ποιότητα ενός τροφίμου ή να επηρεάσει την επεξεργασία του (Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου, 1996, Nielsen, 1998). Επιπλέον, εκτός από τον προσδιορισμό των διαφόρων επιμέρους στοιχείων ο προσδιορισμός των ανόργανων συστατικών περιλαμβάνει και τον προσδιορισμό της τέφρας. Ο τελευταίος αποτελεί κριτήριο γνησιότητας, ποιότητας, εξευγενισμού, θρεπτικής αξίας και αφορά το ανόργανο υπόλειμμα που απομένει μετά την τέλεια καύση της οργανικής ουσίας (Βουδούρη-Κοντομηνά, 1987, Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου, 1996). Εξάλλου η σημαντικότητα του προσδιορισμού των ανόργανων συστατικών φανερώνεται και από το γεγονός ότι αποτελούν στοιχεία που πρέπει να

αναγράφονται στις ετικέτες των προϊόντων για την νόμιμη κυκλοφορία τους στα ράφια των καταναλωτών.

1.4.2 Σημασία ανόργανων στοιχείων για τον ανθρώπινο οργανισμό

Τα ανόργανα στοιχεία αποτελούν μια από τις έξι βασικές κατηγορίες θρεπτικών υλών που υπάρχουν στα τρόφιμα (υδατάνθρακες, λιπαρές ύλες, πρωτεΐνες, νερό, ανόργανα συστατικά, βιταμίνες) και είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού, ενώ όπως και οι βιταμίνες δεν προσφέρουν ενέργεια. Τα ανόργανα στοιχεία χρησιμοποιούνται από το ανθρώπινο σώμα με πολλούς τρόπους: συστατικά του ερειστικού συστήματος, απαραίτητα για υγρά κυττάρων και σώματος, και απαραίτητα σε βιταμίνες, ένζυμα και ορμόνες (Μπόσκου, 2004). Ονομάζονται έτσι για να διακρίνονται από τα οργανικά (που περιέχουν άνθρακα) και κατηγοριοποιούνται σε :

- Κύρια στοιχεία, όπως τα: Na, K, Ca, Mg, Cl, P που είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο σε ποσότητες >50 mg/ημέρα.
- Ιχνοστοιχεία, όπως τα: Fe, I, F, Zn, Se, Cu, Mn, Cr, Mo, Co, Ni που είναι απαραίτητα σε συγκεντρώσεις <50mg/ημέρα, ενώ σε μεγαλύτερες ποσότητες μπορεί να εμφανίσουν τοξικές ή/και άλλες ανεπιθύμητες δράσεις.
- Υπεριχνοστοιχεία (Al, As, Ba, Bi, B, Br, Cd, Cs, Ge, Hg, Li, Pb, Rb, Sb, Si, Sm, Sn, Sr, Tl, Ti, W) που η αναγκαιότητά τους για τον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί.
- Βαρέα μέταλλα (Hg, As, Cd, Pb,Sb) που η παρουσία τους πάνω από ορισμένα όρια είναι συνδεδεμένη με τοξικές και άλλες ανεπιθύμητες δράσεις.

Ο ρόλος των ανόργανων συστατικών στη διατροφή είναι πολύ σημαντικός καθώς κάθε στοιχείο επιτελεί συγκεκριμένες λειτουργίες (Belitz, 2006). Για το λόγο αυτό τα ανόργανα συστατικά έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών

που προσπαθούν να ενισχύσουν την πρόσληψη των παραπάνω μέσω μιας ισορροπημένης διατροφής που θα εξασφαλίσει ευεργετικά για την υγεία αποτελέσματα. Η ιδιαίτερη σημασία ορισμένων ανόργανων στοιχείων για τη διατροφή φαίνεται και από το γεγονός ότι για αυτά έχουν οριστεί τιμές συνιστώμενης παροχής, υπάρχουν διατροφικά συμπληρώματα που τα περιέχουν, προστίθενται σε τρόφιμα για αύξηση της διατροφικής αξίας, ενώ η παρουσία τους σε ένα τρόφιμο επιβάλλει την ειδική επισήμανσή του. Όταν ένα τρόφιμο φέρει μήνυμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι έχει ιδιαίτερες θρεπτικές ιδιότητες χάρη σε ορισμένα συστατικά του τότε υποχρεωτικά στην επισήμανσή του πρέπει να παρέχονται ορισμένες πρόσθετες πληροφορίες (Διαθρεπτική Επισήμανση, Οδηγία 90/496/ΕΟΚ). Καθώς λοιπόν η παρουσία ανόργανων συστατικών σε ένα τρόφιμο είναι συνδεδεμένη με εν δυνάμει ευεργετικές δράσεις, πληροφορίες στην σήμανση τροφίμων σχετικές με αυτά αποτελούν διαθρεπτικό ισχυρισμό και κατά συνέπεια τα τρόφιμα αυτά οφείλουν υποχρεωτικά να περιλαμβάνουν και Διαθρεπτική Επισήμανση (Κανονισμός 1925/2006).

1.4.3 Χαρακτηριστικά επιλεγμένων ανόργανων στοιχείων που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας

Νάτριο (Na): Το νάτριο είναι το ενδέκατο στοιχείο του περιοδικού πίνακα και ανήκει στα αλκάλια. Είναι μαλακό ασημένιο μεταλλικό στοιχείο και αποτελεί το έκτο σε αφθονία μέταλλο στο πλανήτη (το 2% του φλοιού της γης αποτελείται από νάτριο). Η πιο συνηθισμένη του μορφή είναι το NaCl, ενώ σχηματίζει εύκολα ενώσεις με οξυγόνο (Na_2O , Na_2O_2 , NaO_2) και με άλλα στοιχεία (π.χ. Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaF , Na_2SO_4) (Moreno, 2003). Η περιεκτικότητα του σώματος σε νάτριο είναι 1,4 g/kg. Το νάτριο βρίσκεται κυρίως ως εξωκυτταρικό συστατικό και διατηρεί την ωσμωτική πίεση των εξωκυτταρικών υγρών. Επιπλέον, ενεργοποιεί κάποια ένζυμα, όπως την αμυλάση. Η απορρόφηση του νατρίου είναι γρήγορη, ξεκινάει 3-6 min μετά την πρόσληψη και ολοκληρώνεται μέσα σε 3 h. Η ημερήσια πρόσληψη του

νατρίου είναι κατά μέσο όρο 2,5 g (θήλεα άτομα) με 3,3 g (άρρενα άτομα), ενώ οι ελάχιστες απαιτήσεις για ενήλικες κυμαίνονται από 1,3 μέχρι 1,6 g/ ημέρα (ίσο με 3,3-4,0 g/ ημέρα NaCl). Η ανεπαρκής ή υπερβολική πρόσληψη νατρίου έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές οργανικές δυσλειτουργίες. Από διατροφικής άποψης, η ημερήσια πρόσληψη νατρίου πρέπει να περιοριστεί σε 2,3 g (αντιστοιχεί σε 6g NaCl). Χαμηλή πρόσληψη σε νάτριο μπορεί να επιτευχθεί με ανάλατη διαίτα ή χρησιμοποιώντας διαιτητικό αλάτι (Belitz, 2004).

Κάλιο (K): Το κάλιο είναι ένα αργυρόλευκο μεταλλικό στοιχείο που δεν βρίσκεται σε καθαρή μορφή ελεύθερο στη φύση, αλλά συνδεδεμένο με άλλα στοιχεία. Το κάλιο είναι το τρίτο αφθονότερο μέταλλο στο ανθρώπινο σώμα μετά το ασβέστιο και τον φώσφορο. Αυτό αντιπροσωπεύει το 5 % του μεταλλικού περιεχομένου του σώματος. Η συγκέντρωση του στο σώμα είναι 2 g/kg. Αποτελεί το πιο κοινό κατιόν των ενδοκυτταρικών υγρών (συνήθως η παρουσία του περιορίζεται μέσα στα κύτταρα). Ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση μέσα στο κύτταρο, συμμετέχει στην μεταφορά μέσω της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και στην ενεργοποίηση γλυκολυτικών και αναπνευστικών ενζύμων. Σε μια φυσιολογική διατροφή η πρόσληψη καλίου είναι 2-5,9 g/ ημέρα, ενώ ελάχιστη ημερήσια πρόσληψη υπολογίζεται στα 782 mg. Η ανεπάρκεια καλίου επιφέρει δυσλειτουργίες και μπορεί να είναι αποτέλεσμα υποσιτισμού ή κατά κύριο λόγο κατανάλωσης ανεπαρκών σε κάλιο τροφίμων. Οι πατάτες, η μελάσα, αποξηραμένα φρούτα, καρυκεύματα, ηλιόσποροι αποτελούν ιδιαίτερα πλούσιες πηγές καλίου (Taylor, 1995, Belitz, 2004).

Ασβέστιο (Ca): Η ολική συγκέντρωση ασβεστίου στο σώμα είναι περίπου 1500 g για αυτό και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ανόργανα συστατικά του ανθρώπινου σώματος. Βρίσκεται σε αφθονία στον σκελετό και σε μερικούς ιστούς του σώματος. Το ασβέστιο αποτελεί θεμελιώδες θρεπτικό στοιχείο γιατί συμμετέχει στην δόμηση του μυϊκού συστήματος και ελέγχει βασικές διεργασίες όπως συστολή μυών (κινητικό σύστημα, χτύπος καρδιάς), θρόμβωση αίματος, λειτουργία εγκεφαλικών κυττάρων και ανάπτυξη κυττάρων. Ανεπάρκεια ασβεστίου προκαλεί σοβαρές δυσλειτουργίες όπως μείωση της ανάπτυξης του ατόμου, φτωχή ποιότητα οστών και δοντιών, ραχίτιδα. Η επιθυμητή πρόσληψη ασβεστίου (g/ ημέρα)

ορίζεται ως εξής: από 0 έως 6 μηνών (0,4), από 6 έως 12 μηνών (0,6), 1 έως 5 χρονών (0,8), 6 έως 10 χρονών (0,8-1,2), 11 έως 24 χρονών και έγκυες γυναίκες (1,2 με 1,5), 25 έως 65 χρονών (1,0) και πάνω από 65 χρονών (1,5). Το γάλα και τα προϊόντα του αποτελούν την κύρια πηγή ασβεστίου, ενώ ακολουθούν τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, το κρέας, το ψάρι και τα αυγά. Για την απορρόφηση του ασβεστίου απαιτείται η ύπαρξη επαρκούς ποσότητας βιταμίνης D (Taylor,1995, Belitz, 2004).

Λίθιο (Li): Το Li βρίσκεται σε διάφορες συγκεντρώσεις στα τρόφιμα. Κύρια πηγή πρόσληψης του είναι τα δημητριακά και τα λαχανικά, τα οποία συμβάλουν σε ποσοστό 66-90 % στην ολική πρόσληψη. Στην ολική πρόσληψη Li συμβάλλουν επίσης το πόσιμο νερό και τα αφεψήματα. Σε κάποιες περιοχές (π.χ Μεξικό) το πόσιμο νερό εμφανίζει αξιόλογες ποσότητες Li (έως και 170μg/L). Ιχνοποσότητες Li ανιχνεύθηκαν στον ανθρώπινο οργανισμό και σε ιστούς εμβρύων μόλις στα τέλη του 19ου αιώνα. Ωστόσο, χρειάστηκε ακόμη ένας αιώνας για να αποδειχθεί η αναγκαιότητα του. Αποτελέσματα ερευνών σε πειραματόζωα ανέδειξαν συσχετίσεις μεταξύ χαμηλών συγκεντρώσεων Li και υψηλών ποσοστών θνησιμότητας, προβλημάτων συμπεριφοράς και αναπαραγωγής. Ωστόσο, στον άνθρωπο η έλλειψη Li δεν έχει αποδειχθεί να προκαλεί ασθένειες, αν και χαμηλή πρόσληψη έχει συσχετισθεί με αυξημένα ποσοστά χρήσης ναρκωτικών ουσιών, αυτοκτονιών, ανθρωποκτονιών και άλλων εγκλημάτων. Το Li παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των εμβρύων στους πρώτους μήνες της κύησης. Η βιοχημική δράση του είναι πολυπαραγοντική και σχετίζεται άμεσα με τις λειτουργίες των ενζύμων, των ορμονών και των βιταμινών. Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη Li για έναν ενήλικα 70kg είναι 650-3100 μg (Gerhard, 2004).

Μαγνήσιο(Mg): Η συγκέντρωση μαγνησίου στο σώμα είναι 250mg/ kg. Η ημερήσια ανάγκη είναι 300-400mg, ενώ από μια φυσιολογική δίαιτα η ημερήσια πρόσληψη αντιστοιχεί σε 300-500 mg. Ως συστατικό και ενεργοποιητής πολλών ενζύμων, ιδίως εκείνων που σχετίζονται με τη μετατροπή πλούσιων σε ενέργεια φωσφορικών ενώσεων, και ως σταθεροποιητής των μεμβρανών του πλάσματος, των ενδοκυτταρικών μεμβρανών και των νουκλεϊνικών οξέων, το μαγνήσιο αποτελεί

στοιχείο ζωτικής σημασίας. Εξαιτίας του αναντικατάστατου ρόλου του στον ανθρώπινο οργανισμό, η ανεπάρκεια του προκαλεί σοβαρές δυσλειτουργίες (Belitz, 2004).

Χαλκός (Cu): Η συγκέντρωση χαλκού στο ανθρώπινο σώμα είναι 80-100 mg. Ο χαλκός αποτελεί συστατικό πολλών οξειδοοξειδοοξειδωτικών (κυτοχρωμική οξειδάση, σουπεροξειδοδισμουτάση, τυροσινάση, ουρικήαση, αμινοοξειδάση). Στο πλάσμα του αίματος βρίσκεται δεσμευμένος με την κερουλοπλασμίνη, η οποία καταλύει την οξείδωση Fe^{2+} προς Fe^{3+} . Αυτή η αντίδραση έχει μεγάλη σημασία γιατί το Fe^{3+} είναι η μοναδική μορφή στο αίμα που μεταφέρεται από την τρασφερίνη στον αποθεματικό σίδηρο (iron pool) που βρίσκεται στο συκώτι. Η ημερήσια ανάγκη σε χαλκό είναι 1-1,5mg το οποίο και καλύπτεται από μια φυσιολογική δίαιτα. Ο χαλκός είναι ανεπιθύμητος στην επεξεργασία και στην αποθήκευση τροφίμων καθώς καταλύει πολλές ανεπιθύμητες αντιδράσεις (π.χ. οξειδωτική καταστροφή του ασκορβικού οξέος). Η υπερβολική απόθεση χαλκού στους ιστούς προκαλεί την Νόσο Wilson, ενώ χρόνια έλλειψη χαλκού προκαλεί δυσλειτουργία στην σύνθεση της ντοπαμίνης, με εμφάνιση κατάθλιψης, στην σύνθεση μελανίνης από δερματικά κύτταρα, καθώς και δυσλειτουργίες στον μεταβολισμό λιπών και τριγλυκεριδίων (Walravens, 1980, Belitz, 2004).

Μόλυβδος(Pb): Η μόλυνση του περιβάλλοντος με μόλυβδο αυξήθηκε με την εκβιομηχάνιση και από τα καυσαέρια των αυτοκινήτων που κινούνται με μολυβδόχο βενζίνη. Ο τετρααιθυλιούχος μόλυβδος $[(C_2H_5)_4Pb]$, που χρησιμοποιείται για να αυξήσει τον αριθμό των οκτανίων της βενζίνης, μετατρέπεται με καύση σε ενώσεις μολύβδου που απαντώνται σε μια ζώνη πλάτους ~ 30m κατά μήκος δρόμων και εθνικών οδών (τα επίπεδα μολύβδου μειώνονται σημαντικά πέρα από αυτή την απόσταση). Μείωση στα επίπεδα του μολύβδου στη βενζίνη και αυξανόμενη χρήση αμόλυβδης βενζίνης έχουν οδηγήσει σε ελάττωση της έκτασης της περιβαλλοντικής μόλυνσης από το στοιχείο. Τα λαχανικά με μεγαλύτερη επιφάνεια κάλυψης (σπανάκι, λάχανο, μαρούλι κ.ά) μπορούν να περιέχουν υψηλά επίπεδα όταν καλλιεργούνται κοντά σε πηγές εκπομπής μολύβδου. Περαιτέρω πηγές μόλυνσης (μικρότερης εμβέλειας) είναι επιφάνειες,

σκεύη και περιέκτες που περιέχουν μόλυβδο. Αυτό αποτελεί κίνδυνο ιδιαίτερα όταν τα παραπάνω έρθουν σε επαφή με ξινά τρόφιμα. 1,75 mg μολύβδου θεωρούνται ως η ανεκτή εβδομαδιαία δόση για ενήλικες 70 kg (Belitz, 2006). Η εισαγωγή στον οργανισμό δόσης αλάτων μολύβδου προκαλεί πονοκέφαλο, κράμπες, αδυναμία, πόνο στα πόδια, δυσκοιλιότητα, σπασμούς, κατάρρευση μέχρι και κώμα (Μπόσκου, 2004). Ωστόσο, η περιβαλλοντική μόλυνση από μόλυβδο δεν έχει προκαλέσει σημαντική αύξηση των επιπέδων του στοιχείου στα τρόφιμα και των επιπέδων κινδύνου από την πρόσληψη του. Αυτό ευθύνεται στο γεγονός ότι η αύξηση του μολύβδου στο έδαφος δεν είναι ανάλογη με την παρουσία του στα φυτά και ότι η κατανάλωση επιβαρυσμένων με μόλυβδο προϊόντων δεν οδηγεί σε σημαντική απορρόφησή του, δεδομένου ότι ο περισσότερος απομακρύνεται με τα περιττώματα.

Ψευδάργυρος(Zn): Η συνολική ποσότητα ψευδαργύρου στον ιστό των ενήλικων ανθρώπων είναι 2-4 g .Η ημερήσια ανάγκη είναι 5-10 mg και καλύπτεται από μια φυσιολογική διατροφή (6-22 mg ψευδαργύρου/ ημέρα). Ο ψευδάργυρος αποτελεί συστατικό πολλών ενζύμων (π.χ αλκοολική δεϋδρογονάση, γαλακτική δεϋδρογονάση, μηλική δεϋδρογονάση, γλουταμινική δεϋδρογονάση, καρβοξυπεπτιδάσες Α και Β, και καρβονική ανυδράση). Άλλα ένζυμα (π.χ διπεπτιδάσες, αλκαλική φωσφατάση, λεκιθινάση και ενολάση) ενεργοποιούνται από τον ψευδάργυρο. Ο ψευδάργυρος απαιτείται για όλες σχεδόν τις πτυχές του μεταβολισμού των κυττάρων. Τη σύνθεση και μεταγραφή DNA, τη μετάφραση mRNA σε πρωτεΐνες, τη δομή και τη σταθεροποίηση πρωτεϊνών. Ακόμα, είναι απαραίτητος για τον μεταβολισμό της βιταμίνης Α. Υψηλή πρόσληψη Zn είναι τοξική για τους ανθρώπους. Δηλητηρίαση από ψευδάργυρο έχει παρατηρηθεί ως αποτέλεσμα κατανάλωσης ξινισμένου φαγητού που έχει διατηρηθεί σε επικαλυμμένα με ψευδάργυρο μεταλλικά δοχεία (Belitz, 2006, Ruz, 2003).

Αργίλιο (Al): Το σώμα περιέχει 50-150 mg αργιλίου .Σε γερασμένους οργανισμούς είναι δυνατόν να βρεθούν και υψηλότερα επίπεδα. Η μέση ημερήσια πρόσληψη αργιλίου είναι 2-10 mg. Απορροφάται μόνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις από τη γαστρεντερική οδό. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποβάλλεται

κυρίως με τα κόπρανα. Πειράματα σε ζώα με υψηλές συγκεντρώσεις αργιλίου έδειξαν ότι δεν σχετίζεται με τοξικότητα. Αυτό φαίνεται να ισχύει και για τους ανθρώπους. Γι' αυτό και είναι αβάσιμη η απροθυμία χρήσης αλουμινένιων σκευών μαγειρικής. Ωστόσο μερικές πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει ότι η συσσώρευση αργιλίου στους ανθρώπους μπορεί να προκαλέσει σημαντική ζημιά σε κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Σύμφωνα με τα παραπάνω και την Οδηγία 90/496/ΕΟΚ παρουσιάζεται ακολούθως συγκεντρωτικός πίνακας (**Πίνακας 3**) με την Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη σε επιλεγμένα ανόργανα στοιχεία για ενήλικα 70kg.

Πίνακας 3. Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη σε ανόργανα στοιχεία για ενήλικα 70kg

Ανόργανο Στοιχείο	Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη	Μονάδα
Na	2,9	g
K	2 - 5,9	g
Ca	1	g
Li	650 – 3100	μg
Mg	300 – 450	g
Cu	1-1,5	mg
Zn	15	mg
Al	5	mg
Pb	1,75 (ανώτατη ανεκτή εβδομαδιαία)	mg

(Οδηγία 90/496/ΕΟΚ, Fernandez et al., 2002, Ozcan et al.,2008)

1.4.4 Προσδιορισμός ανόργανων στοιχείων

1.4.4.1 Γενικά

Τα επιμέρους ανόργανα στοιχεία προσδιορίζονται στα τρόφιμα με διάφορες τεχνικές (Βουδούρη-Κοντομηνά, 1987, Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου, 1996, Nielsen, 1998), οι κυριότερες εκ των οποίων είναι:

- φλογοφωτομετρία (φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής με φλόγα)
- φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φλόγα ή φούρνο γραφίτη
- φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP)
- ιοντική χρωματογραφία
- φασματοσκοπία ακτίνων X
- ανάλυση μέσω ενεργοποίησης με νετρόνια
- ανάλυση μέσω εκλεκτικών ηλεκτροδίων
- ογκομετρικές αναλύσεις
- σταθμικές αναλύσεις
- χρωματομετρικές, ηλεκτροχημικές κ.ά αναλύσεις

Μεταξύ των διαφόρων κατάλληλων, οι τεχνικές της φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης και εκπομπής είναι από τις πιο συχνά και επιτυχώς χρησιμοποιούμενες στην ανάλυση προσδιορισμού ανόργανων συστατικών σε ένα δείγμα. Ακολούθως περιγράφεται συνοπτικά η αρχή λειτουργίας των παραπάνω τεχνικών που αποτέλεσαν και τα εργαλεία ανάλυσης της παρούσας εργασίας.

1.4.4.2 Ατομική φασματοσκοπία (Παπαδογιάννης, 1994, Nielsen, 1998, Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2000, Skoog et al., 2005)

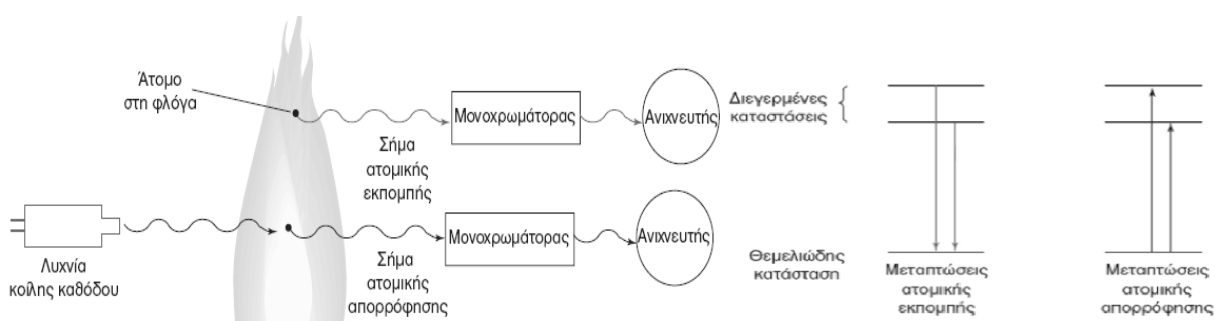
Στην ατομική φασματοσκοπία μια ουσία εξαχνώνεται και αποσυντίθεται σε άτομα όταν εκτεθεί σε υψηλή ενέργεια. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε στοιχείου βασίζεται στο γεγονός ότι άτομα στην αέρια φάση απορροφούν ή εκπέμπουν ακτινοβολία χαρακτηριστικού μήκους κύματος. Η ατομική φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ανόργανων στοιχείων με αποτελεσματικότητα (μεγάλη ευαισθησία, εκλεκτικότητα, ταχύτητα) για ποιοτικούς και ποσοτικούς αναλυτικούς σκοπούς, καθώς το φάσμα απορρόφησης και εκπομπής κάθε ατόμου χημικού στοιχείου αποτελείται από διακριτές αντιπροσωπευτικές γραμμές (δακτυλικό αποτύπωμα του στοιχείου). Έτσι, το κάθε στοιχείο μπορεί να ταυτοποιηθεί και να εκτιμηθεί η συγκέντρωσή του με ακρίβεια ακόμα και παρουσία άλλων στοιχείων.

Τύποι ατομικής φασματοσκοπίας είναι η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης και η φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής. Το **Σχήμα 3** απεικονίζει την απορρόφηση και εκπομπή ατόμων σε φλόγα. Στην ατομική απορρόφηση άτομα απορροφούν μέρος χαρακτηριστικής ακτινοβολίας που εκπέμπει πηγή (οξείες γραμμές, χαρακτηριστικές του προς ανάλυση στοιχείου εκπέμπονται από λυχνία κοίλης καθόδου), ενώ το υπόλοιπο της ακτινοβολίας φθάνει στον ανιχνευτή. Στην ατομική εκπομπή άτομα που βρίσκονται ήδη σε διεγερμένη κατάσταση μετακινούνται σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση εκπέμποντας ακτινοβολία χαρακτηριστικού μήκους κύματος. Οι δυο τεχνικές παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες στην αρχή λειτουργίας, στην απαιτούμενη προκατεργασία των δειγμάτων, στις πιθανές παρεμποδίσεις και στην απαιτούμενη οργανολογία.

Η ατομική φασματοσκοπία προϋποθέτει τα άτομα του κάθε στοιχείου να είναι «ατομοποιημένα» ώστε να είναι δυνατή η λήψη του φάσματος τους, δηλαδή να μην είναι ενωμένα με άλλα στοιχεία. Αυτό επιτυγχάνεται κατά το στάδιο της ατομοποίησης που περιλαμβάνει το διαχωρισμό των σωματιδίων της ύλης σε μόρια

και τη διάσπαση των τελευταίων σε άτομα. Συνήθως πραγματοποιείται με έκθεση του δείγματος σε θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια, ενώ συχνά της ανάλυσης προηγείται και κατάλληλη κατεργασία (π.χ. χώνευση ή καύση, όξινη κατεργασία). Στόχος της προκατεργασίας είναι η διάσπαση της οργανικής ύλης και τελικά η διευκόλυνση της απελευθέρωσης των ατόμων από τις χημικές ενώσεις και τα μόρια των χημικών στοιχείων κατά την ατομοποίηση. Η προκατεργασία του δείγματος πραγματοποιείται συνήθως με υγρή (παρουσία κάποιου οξέος, συνήθως θειικό, νιτρικό, υπερχλωρικό ή μίγματα αυτών) ή ξηρή καύση. Ορισμένα τρόφιμα μπορούν ωστόσο να αναλυθούν χωρίς προκατεργασία κάτω από κατάλληλες συνθήκες.

Οι παρεμποδίσεις στην ατομική φασματοσκοπία είναι κυρίως φασματικές (επικάλυψη σήματος προς προσδιορισμό στοιχείου από σήματα άλλων στοιχείων ή μορίων του δείγματος ή από σήματα που προέρχονται από φλόγα ή φούρνο), χημικές (προέρχονται από κάθε συστατικό που μειώνει το σήμα του προς προσδιορισμό στοιχείου) και ιονισμού (σε υψηλές θερμοκρασίες εκτός από ατομοποίηση λαμβάνει χώρα και ιονισμός ατόμων στοιχείου. Τα ιονικά φάσματα διαφέρουν από τα ατομικά). Αυτές μπορούν να περιοριστούν σχετικά εύκολα με επιλογή βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας (π.χ. εναλλακτικό μήκος κύματος, αύξηση θερμοκρασίας), προσθήκη ειδικών αντιδραστηρίων (αποδέσμευση, τροποποιητών μήτρας, καταστολέων ιονισμού κ.ά.) και κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης που στηρίζονται στη μέθοδο της γνωστής προσθήκης.



Σχήμα 3. Απεικόνιση διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης και εκπομπής με φλόγα

Φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής με φλόγα

Η φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής με φλόγα (φλογοφωτομετρία) είναι τεχνική απλή, χαμηλού κόστους, ταχεία, που παρέχει αποτελέσματα ικανοποιητικής ευαισθησίας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας κατά την ανάλυση στοιχείων που δεν απαιτούν υψηλή ενέργεια διέγερσης. Βασίζεται στην μέτρηση της εκπεμπόμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας η οποία προέρχεται από την αποδιέγερση ήδη διεγερμένων ατόμων του προς ανάλυση στοιχείου. Η ταχεία αποδιέγερση των διεγερμένων σωματιδίων συνοδεύεται από παραγωγή απλών γραμμωτών φασμάτων στην υπεριώδη και ορατή περιοχή, τα οποία χρησιμεύουν στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους.

Η τεχνική βρίσκει ακόμα σημαντικές εφαρμογές στον προσδιορισμό αλκαλίων και αλκαλικών γαιών που διεγείρονται εύκολα στις χαμηλές θερμοκρασίες της φλόγας, δίνοντας φάσματα (εκπομπής) εξαιρετικής απλότητας και απαλλαγμένα από παρεμποδίσεις άλλων μετάλλων. Όταν αλκαλιμέταλλο ή αλκαλική γαία εισαχθεί σε φλόγα, η ενέργεια από τη φλόγα διεγείρει το ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας του ατόμου του μετάλλου το οποίο και μεταβαίνει σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Κατά την επιστροφή του διεγερμένου ηλεκτρονίου από τη διεγερμένη υψηλότερης ενέργειας κατάσταση (ασταθής) στη βασική/θεμελιώδη κατάσταση (σταθερή) εκπέμπεται ενέργεια με μήκος κύματος στην ορατή περιοχή (χρωματισμός φλόγας).

Τα όργανα που αξιοποιούνται στην κατεύθυνση ενός φλογοφωτομετρικού προσδιορισμού αποτελούνται από ένα σύστημα ψεκασμού του δείγματος σε ένα λύχνο παραγωγής της φλόγας και μια φωτομετρική διάταξη. Η διάταξη αυτή μπορεί να είναι ένας μονοχρωμάτορας που μπορεί να απομονώνει την επιθυμητή φασματική γραμμή εκπομπής, ή ένα σύστημα φίλτρων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ορισμένα μόνο στοιχεία. Ως πηγή ακτινοβολίας λειτουργεί η ίδια η φλόγα που εκτός από ατομοποιητής, έχει και ρόλο να διεγείρει τα άτομα των προς ανάλυση στοιχείων. Για να είναι δυνατή η ατομοποίηση πρέπει η φλόγα να

έχει κατάλληλη θερμοκρασία. Η βασική παράμετρος που καθορίζει την απαιτούμενη θερμοκρασία ώστε να πραγματοποιηθεί τελικά διέγερση-αποδιέγερση και κατά συνέπεια εκπομπή ακτινοβολίας για κάθε στοιχείο είναι η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και βασικής κατάστασής του. Όσο μεγαλύτερη η διαφορά, τόσο μεγαλύτερη η απαιτούμενη θερμοκρασία. Η τελευταία επιτυγχάνεται με συνδυασμό κατάλληλου αερίου καύσης (ακετυλένιο, υδρογόνο, κυάνιο, προπάνιο) και οξειδωτικού αερίου (αέρας, οξυγόνο, οξείδιο αζώτου). Τα διάφορα στοιχεία απαιτούν εκτός από διαφορετικό συνδυασμό οξειδωτικού και καύσιμου αερίου και διαφορετικά χαρακτηριστικά φλόγας (φλόγα πλούσια ή φτωχή σε καύσιμο, ύψος φλόγας, ταχύτητες ροής καυσίμου και οξειδωτικού) για να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάλυσή τους.

Φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη

Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει μέτρηση απορροφούμενης ακτινοβολίας από άτομα του υπό ανάλυση στοιχείου στη θεμελιώδη κατάσταση. Τα βασικά τμήματα ενός συστήματος φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης είναι η πηγή ακτινοβολίας, ο τεμαχιστής ή πτερωτή, το σύστημα ατομοποίησης (φλόγα ή φούρνος γραφίτη), ο μονοχρωμάτορας ή φίλτρο, ο ανιχνευτής και τέλος το σύστημα ενίσχυσης και ανάγνωσης. Με βάση τον τρόπο ατομοποίησης -φλόγα ή φούρνο γραφίτη- διακρίνονται αντιστοίχως δύο είδη. Στην ατομική απορρόφηση με φούρνο γραφίτη που διακρίνεται για υψηλή εκλεκτικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης χρησιμοποιείται ηλεκτρική ενέργεια αντί φλόγα. Εδώ επιτυγχάνονται θερμοκρασίες μέχρι ~3000 °C, ενώ μετά την εισαγωγή του δείγματος, η ανάλυση λαμβάνει χώρα σε 3-4 στάδια διάρκειας λίγων δευτερολέπτων που προγραμματίζονται ως προς τη θερμοκρασία τους, τη διάρκειά τους και το ρυθμό ανόδου της θερμοκρασίας. Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν: ξήρανση δείγματος, απανθράκωση, ατομοποίηση και καθαρισμό γραφίτη από τυχόν υπολείμματα.

Αρχικά εξατμίζεται ο διαλύτης σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία και ακολουθεί αποτέφρωση σε υψηλότερη θερμοκρασία. Μετά την αποτέφρωση, το ρεύμα αυξάνει απότομα προκαλώντας αύξηση της θερμοκρασίας. Η ατομοποίηση του δείγματος πραγματοποιείται σε χρονικό διάστημα έως και μερικών δευτερολέπτων. Η απορρόφηση των ατομοποιηθέντων σωματιδίων μετρείται στην περιοχή επάνω από την θερμανθείσα επιφάνεια (γραφίτης). Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περιοχή του φούρνου διαβιβάζεται αδρανές αέριο για να αποφευχθεί η οξείδωση του γραφίτη, που εξυπηρετεί και στην απομάκρυνση αερίων που παράγονται στα πρώτα στάδια θέρμανσης. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης η παροχή του αερίου διακόπτεται για να μην παρασυρθεί το δείγμα έξω από το χώρο της μέτρησης. Το αναλυτικό σήμα είναι η ολοκλήρωση της απορρόφησης ως προς τον χρόνο κατά τη διάρκεια της ατομοποίησης.

Πηγή ακτινοβολίας είναι συνήθως μια λυχνία κοίλης καθόδου, χαρακτηριστική του προς προσδιορισμό στοιχείου. Αυτή αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια (άνοδο και κάθοδο) σε γυάλινο σωλήνα. Η κάθοδος της πηγής είναι από το προς προσδιορισμό στοιχείο, ενώ η άνοδος είναι από αδρανές υλικό. Στο εσωτερικό της λυχνίας υπάρχει αδρανές αέριο (συνήθως Ar) σε ελαττωμένη πίεση. Λόγω εφαρμογής διαφοράς δυναμικού ηλεκτρόνια κατευθύνονται από την κάθοδο προς την άνοδο και κατά τη διαδρομή τους ιονίζουν άτομα αργού. Αυτά προσπίπτουν με ταχύτητα στην κάθοδο αποσπώντας άτομα του στοιχείου από το οποίο αυτή αποτελείται (που είναι ίδιο με το προς ανάλυση). Τα άτομα αυτά διεγείρονται κατόπιν σύγκρουσης με αργό και κατά την αποδιέγερσή τους εκπέμπουν ακτινοβολία ορισμένων φασματικών γραμμών, χαρακτηριστική για το προς ανάλυση στοιχείο. Η απαιτούμενη φασματική γραμμή μπορεί εν συνεχεία να απομονωθεί με τη βοήθεια του μονοχρωμάτορα. Η ακτινοβολία που εκπέμπει η λυχνία είναι αυτή που θα απορροφήσουν τα άτομα τους προς προσδιορισμό στοιχείου (μεταβαίνοντας από θεμελιώδη κατάσταση σε διεγερμένη). Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του προς ανάλυση στοιχείου (ακολουθεί το νόμο Lambert-Beer).

1.4.5 Ανόργανα συστατικά φύλλων ελιάς

Η ανάλυση του ανόργανου περιεχομένου των φύλλων ελιάς αποτελεί μέθοδο διάγνωσης της θρεπτικής κατάστασης του δένδρου και της γονιμότητας του εδάφους. Ωστόσο, σαν πρακτική δεν είναι ευρέως διαδεδομένη λόγω έλλειψης απαραίτητων πληροφοριών για τις διατροφικές απαιτήσεις των δένδρων της ελιάς, αλλά και την δυσκολία προσδιορισμού της κατάλληλης χρονικής στιγμής δειγματοληψίας (Fernandez-Escobar et al., 1999, Chatzissavidis et al., 2009, Chatzistathis et al., 2010). Γνώση των εποχιακών διακυμάνσεων στη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών των φύλλων ελιάς είναι απαραίτητη για την κατανόηση της φυσιολογίας της ελιάς, αλλά και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης του ανόργανου περιεχομένου των φύλλων (Chatzissavidis et al., 2009). Η συσσώρευση ανόργανων συστατικών και ιχνοστοιχείων σε φύλλα ελιάς είναι αποτέλεσμα: α) της πρόσληψης τους από το έδαφος δια μέσω των ριζών και β) της λήψης τους από την περιβάλλουσα ατμόσφαιρα. Είναι δύσκολο ωστόσο να εξακριβωθούν με ακρίβεια τα ποσοστά που λαμβάνονται από αερομεταφερόμενη εναπόθεση και αυτά από το έδαφος (Madejon, 2006). Μέχρι σήμερα οι παράγοντες που έχουν μελετηθεί σε εργασίες που παρουσιάζουν δεδομένα για το περιεχόμενο φύλλων ελιάς σε ανόργανα συστατικά είναι :

– η σύσταση του εδάφους σε αζωτούχες ενώσεις και άλλα συστατικά (Therios & Sakellariadis, 1988, Chatzissavidis et al., 2005, Chatzistathis et al., 2010)

– η ηλικία των φύλλων και η περίοδος συλλογής τους (Fernandez-Escobar et al., 1999, Chatzistathis et al., 2010)

Γενικά, παρατηρήθηκε ότι η ηλικία των φύλλων επηρεάζει τη σύσταση τους. Φύλλα νεαρής ηλικίας παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό σε N, P, K, Zn, B, ενώ μεγαλύτερης ηλικίας περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό Ca, Mg, Mn, Cu και Fe (Fernandez-Escobar et al., 1999). Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι το ανόργανο περιεχόμενο φύλλων από διαφορετικούς τύπους εδάφους ή διαφορετικής

περιόδου συλλογής δεν διαφοροποιείται ουσιαστικά. Καλύτερα ωστόσο φαίνεται να είναι αμμώδη και λασπώδη εδάφη με επάρκεια σε N, P, K και νερό. Στον **Πίνακα 4** συνοψίζεται το εύρος των συγκεντρώσεων επιλεγμένων ανόργανων στοιχείων φύλλων ελιάς που προέκυψαν από σχετική βιβλιογραφική ανασκόπηση.

Πίνακας 4. Περιεκτικότητα φύλλων ελιάς σε επιλεγμένα ανόργανα στοιχεία

Ανόργανο στοιχείο	Εύρος συγκεντρώσεων
Na	0,24 – 0,63 % ξηρής ουσίας
K	0,45% - 0,9 % ξηρής ουσίας
Ca	0,83% - 4,5% ξηρής ουσίας
Mg	0,05% - 0,2 % ξηρής ουσίας
Cu	15 – 90 µg/g ξηρής ουσίας
Pb	1 – 5,8 µg/g ξηρής ουσίας

(Fernandez et al., 1999, Chatzisavvidis et al.,2005, Madejon et al., 2006, Chatzistathis et al., 2010)

1.4.6 Σύνοψη πρακτικών και ευρημάτων βιβλιογραφικών εργασιών με αντικείμενο το ανόργανο περιεχόμενο φυτικών υλικών και προϊόντων τους

Στην κατεύθυνση ανάδειξης και υιοθέτησης ενός υγιεινού τρόπου ζωής η σημασία των ανόργανων συστατικών στην ανθρώπινη διατροφή και το γεγονός ότι φυτικά υλικά μπορούν να αποτελέσουν καλές πηγές αυτών αποτελούν αντικείμενα ενδιαφέροντος πλήθος επιστημόνων, αλλά και τμημάτων έρευνας και ανάπτυξης βιομηχανικών μονάδων. Επιπλέον, όσο το πρόβλημα της περιβαλλοντικής ρύπανσης διογκώνεται και όσο τεκμηριώνονται οι αρνητικές επιπτώσεις της συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στον ανθρώπινο οργανισμό, τόσο περισσότερο θα αποτελεί αντικείμενο ελέγχου και μελέτης η παρουσία τοξικών μετάλλων σε φυτικά προϊόντα. Για όλους τους παραπάνω λόγους τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα

έντονο ενδιαφέρον για το ανόργανο περιεχόμενο φυτικών πηγών και προϊόντων τους που ήδη μελετώνται και αξιοποιούνται χάρη στο ευρύτερο βιοενεργό δυναμικό τους.

Τα ευρήματα των εκάστοτε μελετών με αντικείμενο το ανόργανο περιεχόμενο διαφόρων φυσικών προϊόντων ποικίλλουν ανάλογα με το σκοπό της εργασίας, το μελετηθέν φυτικό υλικό, τη φύση του προς ανάλυση δείγματος (μέρος φυτικού υλικού, καλλιεργητικές πρακτικές που χρησιμοποιήθηκαν, τόπος δειγματοληψίας, ηλικία φυτού, ηλικία φυτικού τμήματος), τον τρόπο διαχείρισης του δείγματος (π.χ. συνθήκες ξήρανσης και αποθήκευσης), τον τρόπο παρασκευής του μελετηθέντος εκχυλίσματος, τις συνθήκες της ανάλυσης, τον τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων κ.ά. Για όλους τους παραπάνω λόγους συχνά δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί ορθή σύγκριση των ευρημάτων των διαφόρων μελετών και διεξαγωγή γενικευμένων συμπερασμάτων. Ωστόσο, σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά πρόσφατων εργασιών (Fernandez et al., 2002, Kuban et al. 2005, Basgel & Erdemoglu, 2006, McKay & Blumberg, 2006, Ozcan et al., 2007, Kalny et al., 2007, Yuan et al., 2007, Bobrowska-Grzesik & Jakobik-Kolon, 2008, Mossion et al., 2008, Malik et al., 2008, Karak & Bhagat, 2010, Hamrcu, 2010) με αντικείμενο μελέτης τα ανόργανα συστατικά φυσικών προϊόντων οδήγησε στα εξής συμπεράσματα:

- Η ανάλυση των ανόργανων συστατικών σε φυτικά υλικά αλλά και προϊόντα αυτών γίνεται κατά το πλείστον με τεχνικές φασματοσκοπίας ατομικής εκπομπής και ατομικής απορρόφησης.

- Συχνά χρησιμοποιείται η πρακτική της υγρής όξινης καύσης των δειγμάτων πριν την κυρίως ανάλυσή τους. Ωστόσο, υπάρχουν και εργασίες που το στάδιο αυτό παραλείπεται, είτε παρουσιάζονται αποτελέσματα αρνητικής επίδρασης της προκατεργασίας στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Το παραπάνω έχει κυρίως ισχύ για περιπτώσεις ανάλυσης εκχυλισμάτων φυτικών υλικών και όχι ίδιων φυτικών υλικών. Στην περίπτωση εφαρμογής υγρής χώνευσης ως μέσα συνήθως χρησιμοποιούνται HNO_3 , HCl , H_2O_2 , H_2SO_4 (Βουδούρη-Κοντομηνά, 1987, Πολυχρονιάδου-Αλιχανίδου, 1996, Nielsen, 1998, Chan et al., 2010).

- Εκχυλίσματα φυτικών υλικών μπορούν να αποτελέσουν καλές πηγές απαραίτητων κύριων στοιχείων και ιχνοστοιχείων. Με την κατανάλωση ροφημάτων φυτικών υλικών μπορεί να καλυφτεί μέρος της ανάγκης του οργανισμού σε ανόργανα συστατικά. Επιπλέον, φαίνεται πως ο οργανισμός μπορεί να απορροφήσει καλύτερα ορισμένα από τα ανόργανα συστατικά που χρειάζεται από εκχυλίσματα φυτικών υλικών παρά από το ίδιο το υλικό (Bitsch et al., 2001).

- Η σύσταση φυτικών εκχυλισμάτων σε ανόργανα συστατικά μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη φύση του φυτικού υλικού (ποικιλία, προέλευση, γεωλογικο-κλιματολογικές συνθήκες ανάπτυξης, καλλιεργητικές πρακτικές, ηλικία κ.ά παράγοντες), τη μέθοδο (αφεψήματα, εγχύματα, άλλα), τις συνθήκες εκχύλισης (χρόνος συνήθως από 3-20 min), κ.ά.

- Σύμφωνα με τα ευρήματα των περισσότερων εργασιών ροφήματα φυτικών υλικών, ακόμη και εκείνα από επιβαρημένη πρώτη ύλη, δεν ξεπερνούν τα επιτρεπτά όρια σε τοξικά μέταλλα. Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις που περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να είναι καθοριστικοί στην επιβάρυνση φυτικών προϊόντων με βαρέα μέταλλα (Yuan et al., 2007, Mossion et al. 2008, Malik et al. 2008).

Όλα τα παραπάνω αποτέλεσαν σημεία αναφοράς για την επιλογή διαφόρων παραμέτρων και κατευθύνσεων της παρούσας εργασίας.

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ - ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση των φύλλων της *O. europaea* L. ως πηγή ανόργανων συστατικών με προοπτική την αξιοποίησή τους στην παρασκευή βιοενεργών εκχυλισμάτων κατάλληλων για κατανάλωση.

Για την εξυπηρέτηση του παραπάνω σκοπού πραγματοποιήθηκε:

α) διερεύνηση εκείνων των παραμέτρων που μπορεί να επηρεάσουν την εκχυλισσιμότητα επιλεγμένων ανόργανων συστατικών που υπάρχουν στα φύλλα της ελιάς,

β) διερεύνηση της επίδρασης της προέλευσης του δείγματος στο περιεχόμενο εκχυλισμάτων του υλικού σε επιλεγμένα ανόργανα συστατικά,

γ) σύγκριση του περιεχομένου επιλεγμένων εκχυλισμάτων του υλικού σε επιλεγμένα ανόργανα συστατικά με αντίστοιχα εκχυλίσματα ευρέως χρησιμοποιούμενων φυτικών υλικών στην παρασκευή ροφημάτων τύπου τσαγιού.

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε να μελετηθούν:

- το υλικό των φύλλων της ελιάς, διότι πρόκειται για πηγή α) πλούσια σε πολλά βιοενεργά συστατικά, β) με αποδεδειγμένες ευεργετικές για την υγεία δράσεις, γ) βιοδιαθέσιμη και οικονομική και δ) που τα τελευταία χρόνια έχει κερδίσει ιδιαίτερο επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον.

- ανόργανα συστατικά α) με διατροφικό ενδιαφέρον: Na, K, Ca, Mg, Al, Zn και Li, και β) ανεπιθύμητα με εν δυνάμει τοξικές επιπτώσεις: Cu, Pb.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΦΥΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Φύλλα ελιάς (*O. europaea* L.)

Φύλλα δένδρων ελιάς (*O. europaea* L.) από διάφορες ποικιλίες αποτέλεσαν το κύριο υλικό-αντικείμενο έρευνας της παρούσας εργασίας. Το δείγμα φύλλων ελιάς που χρησιμοποιήθηκε στην προκαταρκτική μελέτη ήταν ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα που προέκυψε από τη συνένωση φύλλων διαφόρων διαθέσιμων δειγμάτων. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές της Θεσσαλονίκης (Ανατολική Θεσ /νίκη, Δυτική Θεσ /νίκη και Σίνδο) από τυχαία δένδρα ελιάς την περίοδο Μάρτιο-Μάιο 2010.

Επίσης, δεύτερο αντιπροσωπευτικό δείγμα φύλλων ελιάς χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Αυτό προέκυψε από τη συνάθροιση φύλλων διαφορετικών ποικιλιών και χρονικών περιόδων δειγματοληψίας που προερχόταν από τον πειραματικό ελαιώνα του Σταθμού Γεωργικής Έρευνας στον Άγιο Μάμα Χαλκιδικής (συλλογή Ιούνιος 2006- Φεβρουάριος 2008).

Για συνολικότερη εκτίμηση του περιεχομένου του υπό μελέτη υλικού σε επιλεγμένα ανόργανα στοιχεία, σε συνδυασμό με διερεύνηση της επίδρασης της μεθόδου εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα που συλλέχτηκαν την περίοδο Μάρτιο-Μάιο 2010 από τυχαία δένδρα των περιοχών Ανατολικής, Δυτικής, Θεσσαλονίκης και Σίνδου. Τα δείγματα αφορούσαν ώριμα φύλλα ελιάς (1ου-2ου έτους).

3.1.2 Άλλα φυτικά υλικά

Για την αξιολόγηση των ευρημάτων της παρούσας εργασίας σχετικά με το περιεχόμενο ροφημάτων του υπό μελέτη υλικού (φύλλων ελιάς) σε επιλεγμένα ανόργανα στοιχεία αναλύθηκαν παράλληλα αντίστοιχα ροφήματα και άλλων φυτικών υλικών. Τα φυτικά υλικά που επιλέχθηκαν χρησιμοποιούνται ευρέως στην παρασκευή ροφημάτων τύπου τσαγιού και καταναλώνονται από μεγάλη μερίδα καταναλωτών. Τα υλικά αυτά ήταν εμπορικά αποξηραμένα δείγματα που αγοράστηκαν από την ανοιχτή αγορά της Θεσσαλονίκης. Τα υλικά που αξιοποιήθηκαν για τον σκοπό αυτό ήταν:

- βουνίσιο τσάι,
- πράσινο τσάι,
- φλαμούρι ,
- φασκόμηλο,
- χαμομήλι

3.1.3 Προκατεργασία φύλλων ελιάς

Σε όλες τις περιπτώσεις το φυτικό υλικό μετά τη συλλογή του μεταφέρθηκε άμεσα στο εργαστήριο, πλύθηκε επιμελώς για απομάκρυνση σκόνης, χρώματος κ.ά. και ξηράνθηκε με λυοφιλίωση. Το λυοφιλωμένο φυτικό υλικό αποθηκεύτηκε κατάλληλα σε ξηραντήρα και σκοτεινό περιβάλλον (θερμοκρασία περιβάλλοντος). Η εξέταση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε όσο το δυνατόν πιο σύντομα μετά τη δειγματοληψία.

3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ/ΔΙΑΛΥΤΕΣ/ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων K, Cu, Mg, Zn γνωστών συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκαν πυκνά πρότυπα διαλύματα ($1000 \pm 0,002$ ppm με 2-5% νιτρικό οξύ) της εταιρίας Merk (Darmstadt, Germany). Για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων Pb, Ca και Na χρησιμοποιήθηκαν πυκνά πρότυπα διαλύματα (1000 ppm) από την Polyscience Niles (USA), ενώ για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων Li χρησιμοποιήθηκε $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99,1%) της εταιρίας Riedel de Haen. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης HCl 37% της εταιρίας Carlo erba reagenti (Romano, Italy), HNO_3 65% της Merk (Darmstadt, Germany), H_2SO_4 της Merk (Darmstadt, Germany), EtOH (99,5%, Panreac, Spain) και απιονισμένο νερό.

3.3 ΟΡΓΑΝΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Προσδιορισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε επιλεγμένα μέταλλα έγινε:

- Σε διάταξη φασματοσκοπίας ατομικής εκπομπής (Φλογοφωτόμετρο)
- Σε διάταξη ατομικής απορρόφησης Perkin Elmer 2100 (Germany) με φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη (HGA 700) και αυτόματο δειγματολήπτη (AS-70).

Άλλες συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν :

- Λυοφιλίωσης (Christ, Gamma 1-20)
- Θέρμανσης (Fisher Scientific, USA)
- Ανάδευσης (Gallenkawp, England)
- Λουτρό υπερήχων (Elmas 30H Elmasonic, Germany)
- Μικροκυμάτων (Microwave Thermo scientific, England)
- Υδρολόουτρο (Buchi 461 waterbath, Switzerland)

- Ζυγοί ακριβείας δύο και τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern, Germany)
- Αυτόματες πιπέτες 20-200 μL και 100-1000 μL (Gilson, Franse)

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν διηθητικό χαρτί και διάφορα γυάλινα σκεύη όπως εσφυρισμένες ογκομετρικές, κωνικές και σφαιρικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσης, γυάλινες κάψες κ.ά.

3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα της προοπτικής αξιοποίησης φύλλων ελιάς στην παρασκευή ροφημάτων πλούσιων σε ανόργανα συστατικά με διατροφικό ενδιαφέρον, αλλά και να προσδιοριστεί το περιεχόμενο αυτών σε επιλεγμένα ανεπιθύμητα ανόργανα στοιχεία παρασκευάστηκε σειρά υδατικών και υδατοαιθανολικών ροφημάτων κατάλληλων για κατανάλωση. Τα ροφήματα ήταν: εγχύματα, αφεψήματα, εκχυλίσματα υπό ανάδευση, σε λουτρό υπερήχων, σε μικροκύματα, καθώς και σε υδατόλουτρο. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε λυοφιλωμένο υλικό που τεμαχίστηκε λίγο πριν από την εκχύλιση. Για την επιλογή των συνθηκών εργασίας (πρακτικές εκχύλισης, αναλογία φυτικού υλικού διαλύτη, χρόνος εκχύλισης) αξιοποιήθηκαν συνήθειες πρακτικές τις βιβλιογραφίας για αντίστοιχα ροφήματα φύλλων ελιάς ή/και άλλων φυτικών υλικών.

3.4.1 Παρασκευή εγχυμάτων

Σε γυάλινο σκεύος (ποτήρι ζέσεως ή κωνική φιάλη) που περιείχε κατάλληλη ποσότητα φυτικού υλικού προστέθηκε ορισμένος όγκος βρασμένου νερού. Το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ορισμένο χρονικό διάστημα. Παρασκευάστηκαν εγχύματα με αναλογίες φυτικού υλικού/νερού 0,5, 1, 2 και 5 %

w/v για χρονικό διάστημα 10 min (μελέτη της επίδρασης της αναλογίας φυτικού υλικού διαλύτη στο ανόργανο περιεχόμενο ροφημάτων), καθώς και 2 % w/v για 3, 5, 10 ή 20 min (μελέτη της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης-έγχυσης στο ανόργανο περιεχόμενο ροφημάτων).

Για τη μελέτη της επίδρασης της μεθόδου παρασκευής ροφημάτων στο ανόργανο περιεχόμενό τους παρασκευάστηκε σειρά ροφημάτων με αναλογία φυτικού υλικού/διαλύτη 2% w/v ως εξής:

3.4.2 Παρασκευή αφεψημάτων

Για την παρασκευή αφεψημάτων κατάλληλη ποσότητα νερού θερμάνθηκε (θερμαντική εστία) σε γυάλινο σκεύος (ποτήρι ζέσεως ή κωνική φιάλη) μέχρι βρασμού, οπότε και προστέθηκε ορισμένη ποσότητα φυτικού υλικού (αναλογία υλικού / νερού 2% w/v). Ο βρασμός του μίγματος διατηρήθηκε για χρονικό διάστημα 10 min .

3.4.3 Παρασκευή εκχυλισμάτων υπό ανάδευση

Για την παρασκευή συμβατικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε μίγμα κατάλληλης ποσότητας φυτικού υλικού/ νερού (2% w/v) σε πωματισμένη κωνική φιάλη (για την αποφυγή εξάτμισης του διαλύτη) προστατευμένη από το φως. Η εκχύλιση έλαβε χώρα υπό συνεχή ανάδευση για ορισμένο χρονικό διάστημα (10 min). Με όμοιο τρόπο και σε αναλογία φυτικού υλικού/ νερού 2% w/v παρασκευάστηκαν επίσης υδατοαιθανολικά εκχυλίσματα «βάμματα» (αιθανόλης/νερού 50/50 και 25/75 v/v) για χρονικό διάστημα 24h.

3.4.4 Παρασκευή εκχυλισμάτων σε υδατόλουτρο

Γυάλινο σκεύος (ποτήρι ζέσεως ή κωνική φιάλη) που περιείχε ορισμένη αναλογία υλικού/νερού (2% w/v) τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο (80 °C), για ορισμένο χρονικό διάστημα (10 min).

3.4.5 Παρασκευή εκχυλισμάτων σε λουτρό υπερήχων

Για την παρασκευή εκχυλισμάτων σε λουτρό υπερήχων τοποθετήθηκε μίγμα κατάλληλης ποσότητας φυτικού υλικού/ διαλύτη (2% w/v) σε κωνική φιάλη, η οποία τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για χρονικό διάστημα 10min. Ο διαλύτης ήταν νερό, αιθανόλη ή μίγμα αιθανόλης-νερό σε αναλογία 25/75 και 50/50 (v/v) (μελέτη της επίδρασης του διαλύτη εκχύλισης).

3.4.6 Παρασκευή εκχυλισμάτων σε τη βοήθεια των μικροκυμάτων

Για λόγους σύγκρισης παρασκευάστηκε και ενδεικτικό υδατικό εκχύλισμα (2% w/v) με τη βοήθεια της ενέργειας των μικροκυμάτων για χρόνο 30sec. Μεγαλύτερη έκθεση στα μικροκύματα δεν ήταν εφικτή για την αποφυγή απωλειών. Τα τελευταία χρόνια η προσέγγιση αυτή αξιοποιείται συχνά για εξοικονόμηση χρόνου, ενέργειας, κόστους κτλ.

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, μετά το πέρας της εκχύλισης το εκχύλισμα διηθήθηκε (από διηθητικό χαρτί) για την απομάκρυνση των στερεών. Κάθε προς ανάλυση εκχύλισμα προέκυπτε από τη συνένωση τριών ίδιων εκχυλισμάτων για

αποφυγή σφαλμάτων που θα οφείλονταν στη διαδικασία παρασκευής εκχυλίσματος.

3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΥΤΙΚΩΝ ΡΟΦΗΜΑΤΩΝ

Ο προσδιορισμός Na, K, Ca και Li στα υπό μελέτη ροφήματα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας ατομικής εκπομπής με φλόγα (φλογοφωτομετρικός προσδιορισμός), ενώ για τον προσδιορισμό Cu, Mg, Pb, Al και Zn χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας επιχειρήθηκε επανειλημμένα και ο προσδιορισμός και άλλων μετάλλων (π.χ. Fe, Cd), καθώς και ο προσδιορισμός των παραπάνω μετάλλων σε άλλα ροφήματα με τη βοήθεια της φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης. Η επιτυχής ολοκλήρωση των τελευταίων δε στάθηκε εφικτή λόγω σειράς προβλημάτων που προέκυψαν με το σύστημα της ατομικής απορρόφησης.

3.5.1 Φλογοφωτομετρικός Προσδιορισμός Na, K, Ca και Li

Για τον προσδιορισμό των στοιχείων Na, K, Ca και Li χρησιμοποιήθηκε σύστημα φασματοσκοπίας ατομικής εκπομπής με φλόγα (**Σχήμα 4**). Η ατομοποίηση των στοιχείων πραγματοποιήθηκε με φλόγα που προέκυψε από το συνδυασμό καύσιμου αερίου και αέρα (ως οξειδωτικό αέριο). Τα μέταλλα μετρήθηκαν με την επιλογή του κατάλληλου φίλτρου για το κάθε προς προσδιορισμό στοιχείο (Na: 589,3 nm, K: 766,5 nm, Ca: 422,7 nm, Li: 670,8nm). Από πυκνά πρότυπα διαλύματα των στοιχείων Na, K, Ca και Li παρασκευαζόταν κάθε φορά σειρά διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (Na: 0,25-40ppm, K: 0,2-10ppm, Ca:10-1000ppm, Li: 0,1-10ppm) που αναλύονταν για την κατασκευή καμπυλών αναφοράς (γραμμική

συνάρτηση συγκέντρωσης-ακτινοβολίας εκπομπής). Ενδεικτικά παρουσιάζονται στο Παράρτημα δεδομένα από την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων των στοιχείων και οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς. Για κάθε σειρά πειραμάτων, πραγματοποιούταν παρασκευή νέων προτύπων διαλυμάτων και εκ νέου ανάλυσή τους, ενώ σε κάθε σειρά πειραμάτων γινόταν έλεγχος της επαναληψιμότητας της μέτρησης για κάθε στοιχείο σε ενδεικτικό δείγμα ($n=7$). Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων ήταν σε κάθε περίπτωση ικανοποιητική ($CV\% < 10$, $n=7$). Συγκεκριμένα, το εύρος των τιμών του συντελεστή διασποράς (CV) ήταν: Na= 5,5 - 10,4%, K= 2,1 - 6,4%, Ca= 1,4 - 5,6% και Li= 2,1 - 7,6%. Για τη λειτουργία του φλογοφωτομέτρου και τελικά τον φλογοφωτομετρικό προσδιορισμό Na, K, Ca και Li ακολουθούνταν τα εξής βήματα:

- Θέση σε λειτουργία του κομπρεσέρ τροφοδοσίας αέρα.
- Θέση σε λειτουργία του φλογοφωτομέτρου με το διακόπτη POWER.
- Άνοιγμα της βαλβίδας παροχής του καύσιμου αερίου και εν συνεχεία τροφοδοσία του φλογοφωτομέτρου με αέριο (από το FUEL).
- Αυτόματο άναμμα της φλόγας με συνεχή πίεση του διακόπτη IGNITION.
- Μετά το άναμμα της φλόγας επιλογή από το διακόπτη FILTER SELECT του φίλτρου του προς προσδιορισμό στοιχείου.
- Ρύθμιση με το FUEL της παροχής του καύσιμου αερίου για επίτευξη μπλε φλόγας (τέλεια καύση) και αναμονή ~10 min για σταθεροποίηση.
- Προσεχτική τοποθέτηση του τριχοειδή σωλήνα σε απιονισμένο νερό και ρύθμιση του μηδενός (BLANK) της κλίμακας (έλεγχος ορθής αναρρόφησης και σε αντίθετη περίπτωση ρύθμιση μέσω σχετικής στρόφιγγας).
- Τοποθέτηση του πυκνότερου πρότυπου διαλύματος στον τριχοειδή και περιστροφή του διακόπτη FUEL μέχρι λήψης της μέγιστης δυνατής ένδειξης στον ψηφιακό πίνακα του οργάνου. Ρύθμιση της ευαισθησίας με το κουμπιά COARCE και FINE. Μεταφορά της υποδιαστολής με το κουμπί D.P. όπου απαραίτητο.
- Τοποθέτηση των προτύπων διαλυμάτων και εν συνεχεία των προς ανάλυση δειγμάτων στον τριχοειδή σωλήνα (χωρίς μεταβολή ευαισθησίας, παροχής καυσίμου, D.P.) και λήψη των αντίστοιχων αποτελεσμάτων.

- Η κάθε μέτρηση (ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας κατά την αποδιέγερση του στοιχείου που μεταβαίνει από διεγερμένη-υψηλότερη κατάσταση σε σταθερότερη κατάσταση-χαμηλότερης ενέργειας) παρεχόταν ως ένδειξη (FLM) στον ψηφιακό πίνακα.

- Με το πέρας της ανάλυσης για το κλείσιμο της συσκευής πραγματοποιούταν κλείσιμο της φιάλη τροφοδοσίας του αερίου, του διακόπτη FUEL, του φλογοφωτόμετρου (από το διακόπτη POWER) και του κομπρεσέρ τροφοδοσίας αέρα.

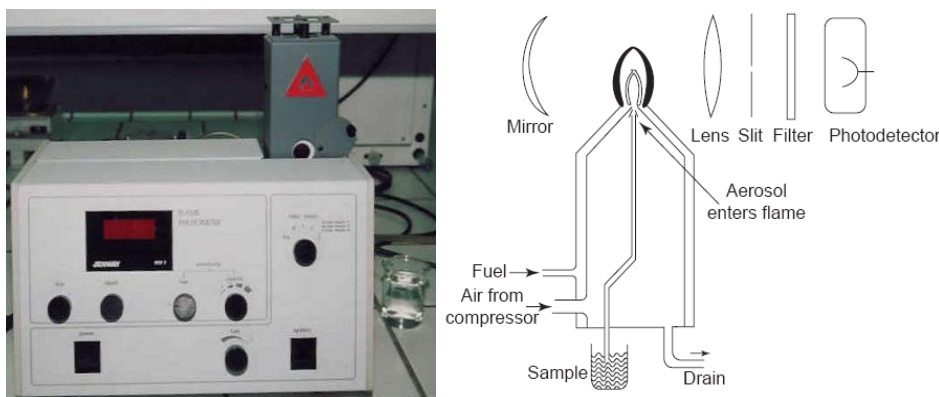
- Σημείωση:

- ο Η επαναρύθμιση του μηδενός ήταν αναγκαία σε κάθε αλλαγή στοιχείου, καθώς και η επαναβεβαίωση του στην περίπτωση μέτρησης εν συνεχεία μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

- ο Αν τα δείγματα (φυτικά ροφήματα) που μετρούνταν έδιναν ενδείξεις πάνω από το ανώτατο όριο της γραμμικής περιοχής της καμπύλης αναφοράς γίνονταν κατάλληλες αραιώσεις οι οποίες λαμβάνονταν υπόψη στην απόδοση των τελικών αποτελεσμάτων.

- ο Οι μετρήσεις των εντάσεων εκπομπής των στοιχείων δεν έχουν μονάδες (FLM, αυθαίρετες μονάδες).

Για έλεγχο της πιθανότητας αύξησης της αποτελεσματικότητας της μεθόδου ανάλυσης μετά από κατεργασία των δειγμάτων με οξύ (που θα διευκόλυε την αποδέσμευση των μετάλλων από το υπόστρωμα του δείγματος) ποσότητα ροφήματος αφέθηκε σε πυκνά διαλύματα οξέων (π. HCl, H₂SO₄ ή HNO₃) για 2h πριν την ανάλυση. Παράλληλα αναλύθηκε το ίδιο δείγμα και χωρίς κατεργασία.



Σχήμα 4. Φλογοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό των στοιχείων Na, K, Ca και Li στα υπό μελέτη φυτικά ροφήματα

3.5.2 Προσδιορισμός Cu, Pb, Mg, Al, Zn με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης φούρνου ηλεκτρικά θερμαινόμενου γραφίτη

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των στοιχείων Cu, Mg, Pb, Al και Zn χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ατομικής απορρόφησης με τη βοήθεια της διάταξης (**Σχήμα 5**) Perkin Elmer 2100. Η ατομοποίηση των στοιχείων πραγματοποιήθηκε σε φούρνο ηλεκτρικά θερμαινόμενου γραφίτη. Τα μέταλλα μετρήθηκαν ως εξής: ο Cu στα 324,8nm, το Mg στα 285,2 nm, ο Pb στα 283,3nm, το Al στα 309,3nm και ο Zn στα 213,9nm. Αρχικά, παρασκευάστηκε από πυκνά πρότυπα διαλύματα των στοιχείων σειρά διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (Cu: 6 – 80ppb, Mg:50-1600ppb, Pb: 0,0064-0,1ppm, Al: 100-5000ppb, Zn: 100-500ppb) που αναλύθηκαν για την κατασκευή καμπυλών αναφοράς (γραμμική συνάρτηση συγκέντρωσης-απορρόφησης). Ενδεικτικά παρουσιάζονται στο Παράρτημα δεδομένα από την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων των στοιχείων και οι αντίστοιχες καμπύλες.

Για τη λειτουργία της ατομικής απορρόφησης και τελικά τον προσδιορισμό των μετάλλων ακολουθούνταν τα εξής βήματα:

- Άνοιγμα φιάλης αργού που τροφοδοτεί φούρνο γραφίτη.

- Άνοιγμα νερού ψύξης.
- Εγκατάσταση κατάλληλης λυχνίας κοίλης καθόδου του προς προσδιορισμό στοιχείου.
- Άνοιγμα αυτόματου δειγματολήπτη, κύριας μονάδας και υπολογιστή (H/Y).
- Ρύθμιση οργάνου μέσω H/Y (επιλογή κατάλληλης λυχνίας-LAMP, επιλογή ανάλυσης μέσω ατομοποίησης με φούρνο γραφίτη-FURNACE ANALYSIS, επιλογή του προς ανάλυση στοιχείου-ELEMENT).
- Στροφή μηχανισμού φούρνου έξω από την πορεία της φωτεινής δέσμης της πηγής.
- Επιλογή πλήκτρου SET UP για ευθυγράμμιση της λυχνίας (βελτιστοποίηση θέσης λυχνίας με ρύθμιση σχετικών βιδών για λήψη μέγιστου σήματος στη μπάρα γραφικών του SET UP).
 - Επιστροφή του φούρνου στη θέση του.
 - Προθέρμανση για ~ 20min.
 - Επιλογή πλήκτρου GAIN ώστε η μπάρα γραφικών να έρθει στη μέση της οθόνης.
 - Επιλογή πλήκτρου PROGRAM ELEMENT, για την είσοδο παραμέτρων λειτουργίας (για όργανο: wavelength, slit, current, για φούρνο γραφίτη: θερμοκρασιακό πρόγραμμα ξήρανσης-αποτέφρωσης-ατομοποίησης-καθαρισμού και για αυτόματο δειγματολήπτη: θέσεις δειγμάτων, προτύπων, τροποποιητή μήτρας και ποσότητες όγκων έγχυσης αυτών, βλ. **Πίνακα 5**).
- Επιλογή πλήκτρου RUN ELEMENT.
- Γέμισμα περιεκτών με δείγματα και πρότυπα και τοποθέτησή τους στις προκαθορισμένες θέσεις του δίσκου του αυτόματου δειγματολήπτη.
- Επιλογή πλήκτρου SAMPLE CONTROL και εν συνεχεία επιλογή πλήκτρου RESET SAMPLER.
- Επιλογή πλήκτρου SAMPLER ON/OFF για αυτόματη εκκίνηση της ανάλυσης.

- Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρεχόταν από ένδειξη του οργάνου που αντιστοιχούσε σε ολοκλήρωση του εμβαδού της κορυφής απορρόφησης μετά από αφαίρεση του σήματος υποβάθρου.

- Μετά το πέρας της ανάλυσης για το κλείσιμο του συστήματος πραγματοποιούνταν κλείσιμο του γενικού διακόπτη του οργάνου, του αυτόματου δειγματολήπτη, του υπολογιστή, της παροχής του νερού και του αερίου.

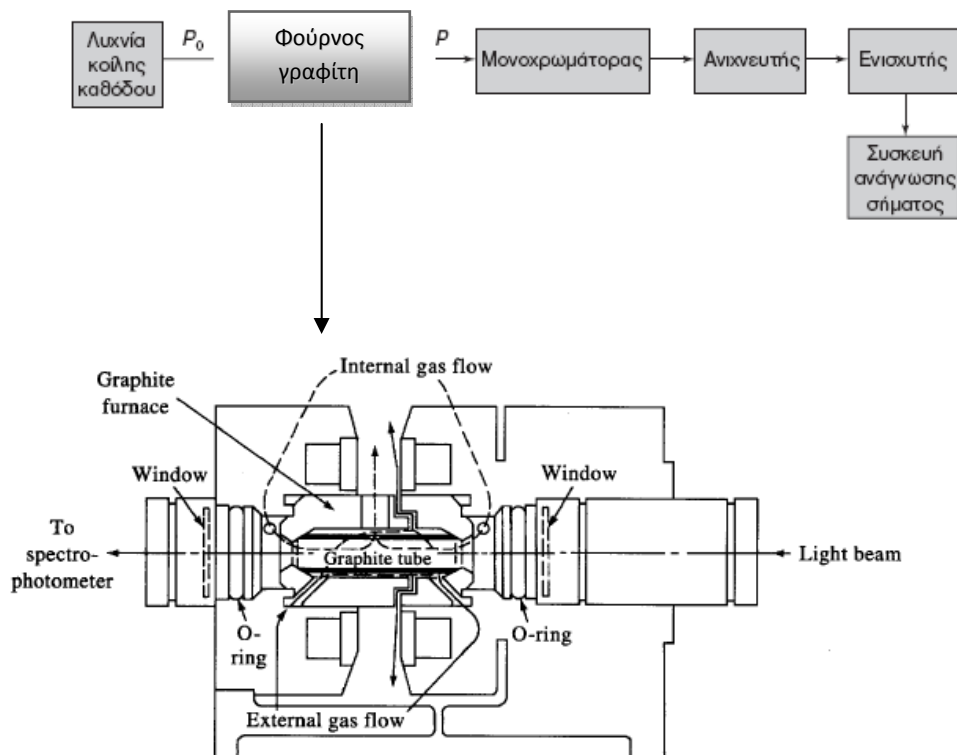
- Σημείωση:

- ο με SAMPLE CONTROL και SAMPLER STAND BY ρυθμιζόταν ο αυτόματος δειγματολήπτης, έτσι ώστε η άκρη της σύριγγας έγχυσης να εισέρχεται στην οπή του φούρνου χωρίς να ακουμπά σε αυτόν και να απέχει από το κάτω μέρος του γραφίτη 2-3mm.

- ο με SAMPLER ON/OFF και ALARM STOP μπορούσε να διακοπεί η λειτουργία του οργάνου σε περίπτωση ανάγκης.

Πίνακας 5. Συνθήκες ανάλυσης Cu, Mg, Pb, Al και Zn

Παράμετρος	Cu	Mg	Pb	Al	Zn
Wavelength (nm)	324,8	285,2	283,3	309,3	213,9
Slit (nm)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Current (A)	30	30	10	20	20
Inject volume (μL)	5	30	10	5	5
Matrix Modifier	-	-	0,2 NH ₄ H ₂ PO ₄	0,05mgMg(NO ₃) ₂	0,05mgMg(NO ₃) ₂
Pretreatment temperature (°C)	1200	1900	850	1700	700
Atomization temperature (°C)	2300	1700	1800	2500	1800
Diluent	0,2 % HNO ₃	Ιονισμένο νερό	0,2 % HNO ₃	0,2% HNO ₃	0,2% HNO ₃



Σχήμα 5. Βασικά τμήματα διάταξης φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης με φούρνο ηλεκτρικά θερμαινόμενου γραφίτη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια της προκαταρκτικής μελέτης (παράγραφος 4.1), καθώς και της συγκριτικής μελέτης του ανόργανου δυναμικού του υλικού σε σχέση με εκείνο ευρέως χρησιμοποιούμενων φυτικών υλικών (παράγραφος 4.2) χρησιμοποιήθηκε αντιπροσωπευτικό δείγμα φύλλων ελιάς (βλ. Πειραματικό Μέρος) που προέκυψε από την ανάμιξη φύλλων ελιάς:

A) που συλλέχθηκαν από Ανατολική Θεσσαλονίκη, Δυτική Θεσσαλονίκη και Σίνδο για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, ή

B) παλαιότερης συλλογής (προέλευση Σταθμός Γεωργικής Έρευνας, Άγιος Μάμας Χαλκιδικής).

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

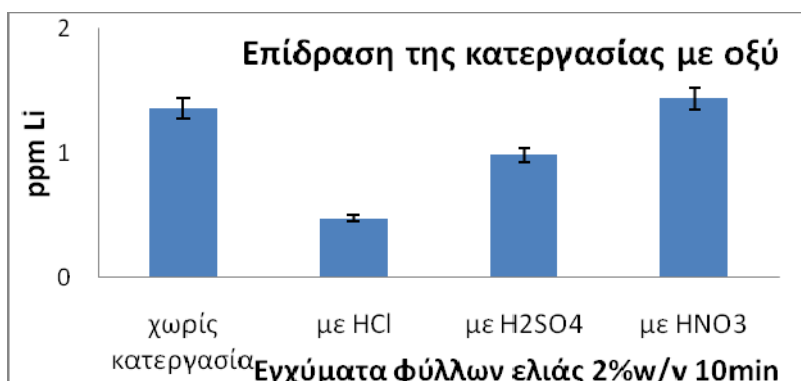
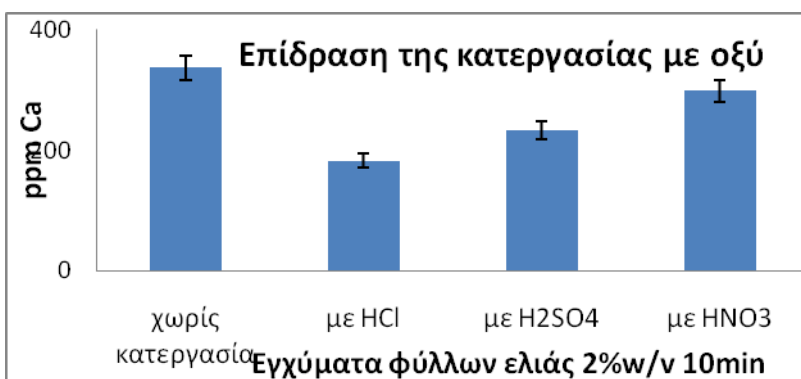
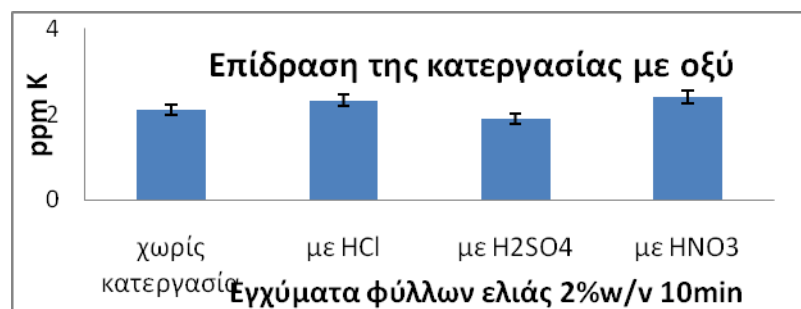
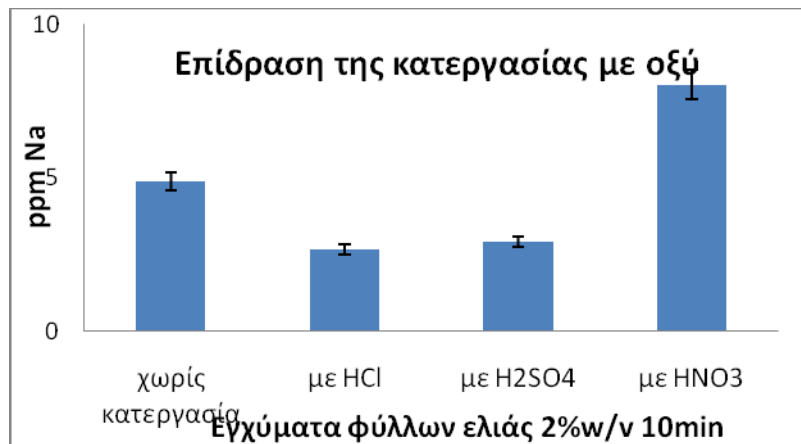
4.1.1. Επίδραση της προκατεργασίας των δειγμάτων με οξέα στην ανάκτηση Na, K, Ca και Li από το προς ανάλυση υπόστρωμα

Η συνήθης πρακτική που αξιοποιείται ως τεχνική προκατεργασίας ενός δείγματος πριν την ανάλυσή του μέσω ατομικής φασματοσκοπίας είναι κυρίως κάποια όξινη κατεργασία. Για το λόγο αυτό για διερεύνηση της επίδρασης της προκατεργασίας στην ανάκτηση Na, K, Ca και Li από το προς ανάλυση υπόστρωμα κατεργάστηκε ενδεικτικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς με υδροχλωρικό, θειικό και νιτρικό οξύ (HCl, H₂SO₄ και HNO₃), ενώ το ίδιο εκχύλισμα αναλύθηκε και χωρίς κατεργασία. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Σχήμα 6** η κατεργασία των δειγμάτων στις περισσότερες περιπτώσεις δε συνεισέφερε στην ανάκτηση των μετάλλων από το προς ανάλυση δείγμα.

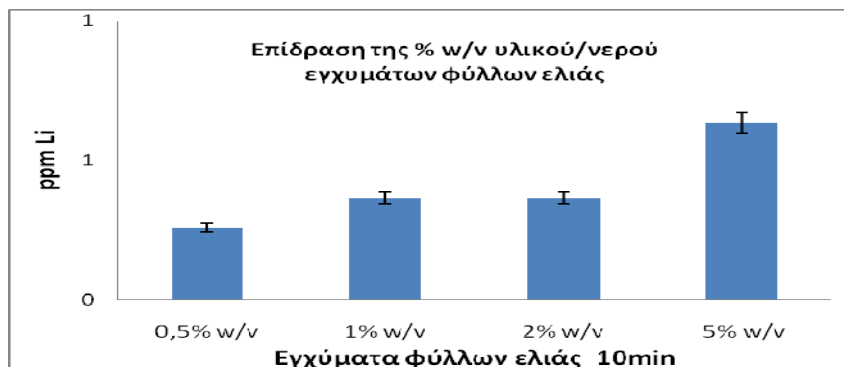
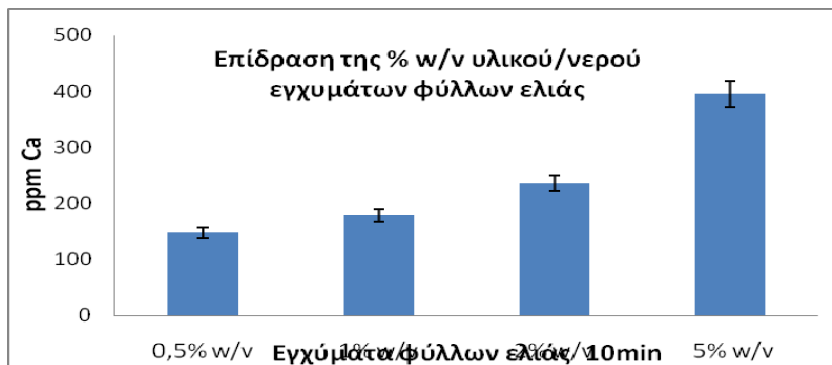
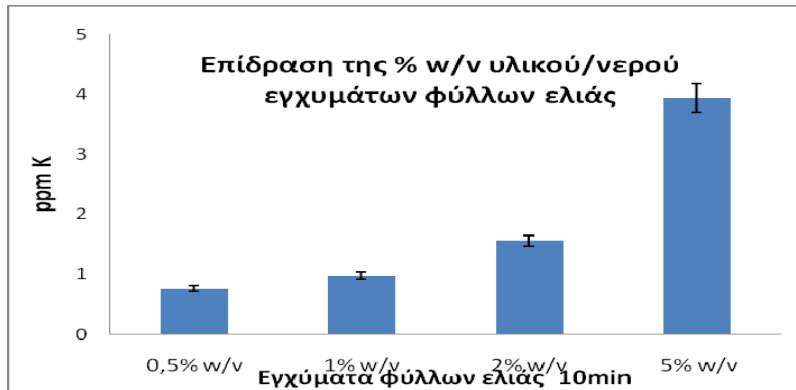
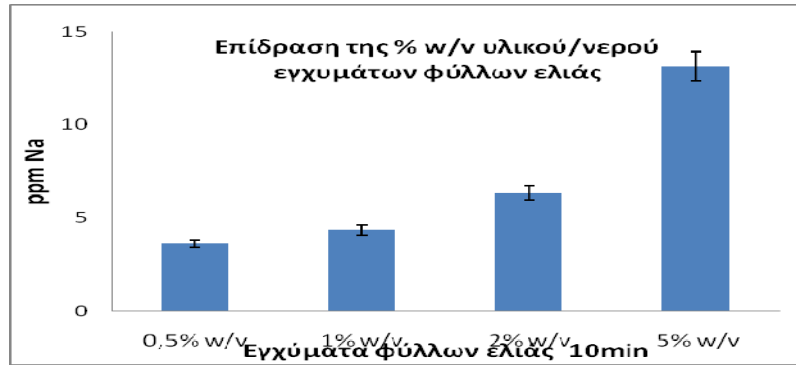
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης (Σχήμα 6) για τον προσδιορισμό του Na η χρήση υδροχλωρικού και θεικού οξέος είχε αρνητική επίδραση, ενώ η κατεργασία με νιτρικό οξύ ενίσχυσε την ανάκτηση Na από το υπόστρωμα του δείγματος. Για τον προσδιορισμό του K δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ προκατεργασίας και μη του δείγματος. Όσον αφορά τον προσδιορισμό Ca καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν χωρίς προκατεργασία. Η χρήση HCl και H₂SO₄ είχαν επίσης αρνητική επίδραση για την ανάκτηση Ca και Li από το προς ανάλυση εκχύλισμα. Τέλος, δεν σημειώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον προσδιορισμό του Li για τα δείγματα χωρίς και με κατεργασία. Για όλα τα παραπάνω, αλλά και για λόγους απλούστευσης της πειραματικής διαδικασίας και ελάττωσης του κόστους της ανάλυσης επιλέχθηκε να μην συμπεριληφθεί στάδιο κατεργασίας στην πειραματική διαδικασία. Αυτό αποτελεί εξάλλου συνήθη πρακτική εργασιών της βιβλιογραφίας με παραπλήσιο σκοπό με την παρούσα μελέτη (Ozcan et al., 2008, Kara, 2009).

4.1.2 Επίδραση της αναλογίας φυτικού υλικού/διαλύτη στο περιεχόμενο εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K, Ca & Li

Η διερεύνηση της επίδρασης της αναλογίας ξηρού φυτικού υλικού/διαλύτη στο περιεχόμενο εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K, Ca και Li πραγματοποιήθηκε για εγχύματα 10min χρόνου παρασκευής. Ο χρόνος παρασκευής, αλλά και οι αναλογίες υλικού/νερού η επίδραση των οποίων μελετήθηκε επιλέχθηκαν με βάση ευρέως χρησιμοποιούμενες πρακτικές στην παρασκευή ροφημάτων τύπου τσαγιού, τόσο σε καθημερινή χρήση, όσο και σε βιβλιογραφικές μελέτες (π.χ. Grzic & Koloň, 2008). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον **Σχήμα 7**.



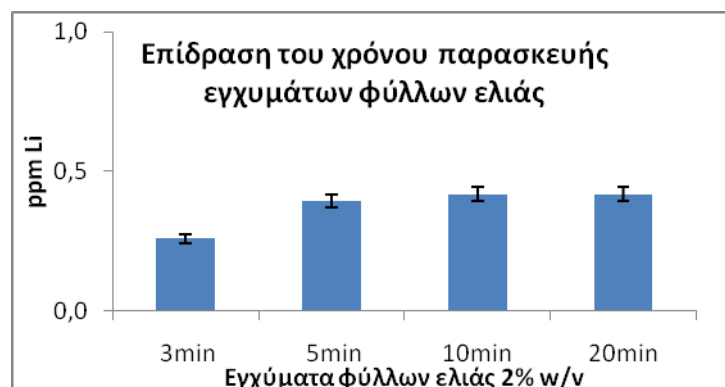
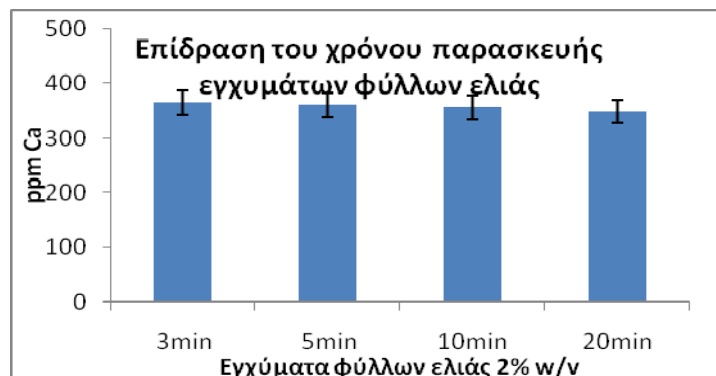
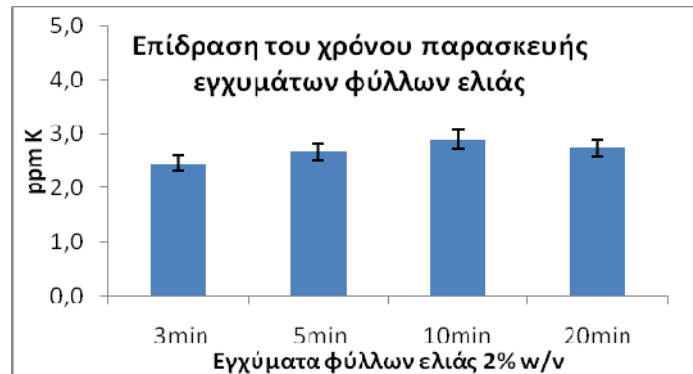
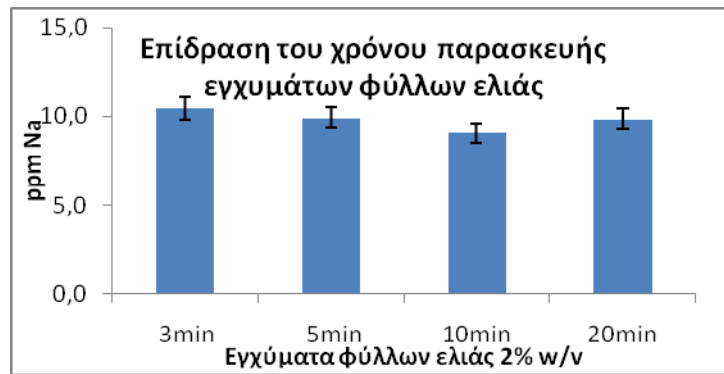
Σχήμα 6. Επίδραση της προκατεργασίας των δειγμάτων με οξέα στην ανάκτηση Na, K, Ca και Li από το προς ανάλυση υπόστρωμα (εγχύλισμα φύλλων ελιάς)



Σχήμα 7. Επίδραση αναλογίας φυτικού υλικού/νερού στο περιεχόμενο εγχυμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K, Ca και Li

4.1.3. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στο περιεχόμενο εγχυμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K, C και Li

Εκτενής μελέτη διαθέσιμων βιβλιογραφικών δεδομένων που αφορούσαν την παρασκευή φυτικών εγχυμάτων, έδειξε ότι μεταξύ των διαφόρων χρόνων που εφαρμόζονται για το σκοπό αυτό, συνήθως χρησιμοποιούνται χρόνοι μικρότεροι των 20 min (Basgel&Erdemoglu, 2006, Ozcan et al.,2008). Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, καθώς επίσης και την πρακτικότητα της εφαρμογής διαφόρων χρόνων παρασκευής ροφημάτων η μελέτη της επίδρασης του χρόνου παρασκευής εγχυμάτων φύλλων ελιάς στο περιεχόμενό τους σε Na, K, Ca και Li έγινε σε εγχύματα (2% w/v) με χρόνους παρασκευής 3, 5, 10 και 20 min. Τα αποτελέσματα της διερεύνησης αυτής παρουσιάζονται στο **Σχήμα 8**. Σύμφωνα με τα παραπάνω ο χρόνος παραμονής του υλικού με το βρασμένο νερό δεν επηρέασε σημαντικά το περιεχόμενο εγχυμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K και Ca. Εξαίρεση αποτέλεσε το Li. Το περιεχόμενο εγχυμάτων σε Li αυξήθηκε από τα 3 στα 5 min, χωρίς να σημειωθεί περεταίρω στατιστικώς σημαντική αύξηση για χρόνους παρασκευής 10 και 20 min. Έτσι για τις περεταίρω μελέτες επιλέχθηκε ως χρόνος παρασκευής ροφημάτων για τη μελέτη της επίδρασης άλλων παραγόντων τα 10min.

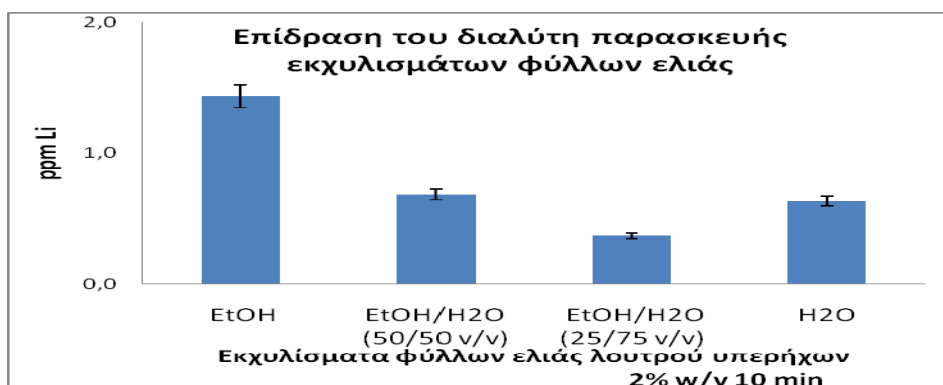
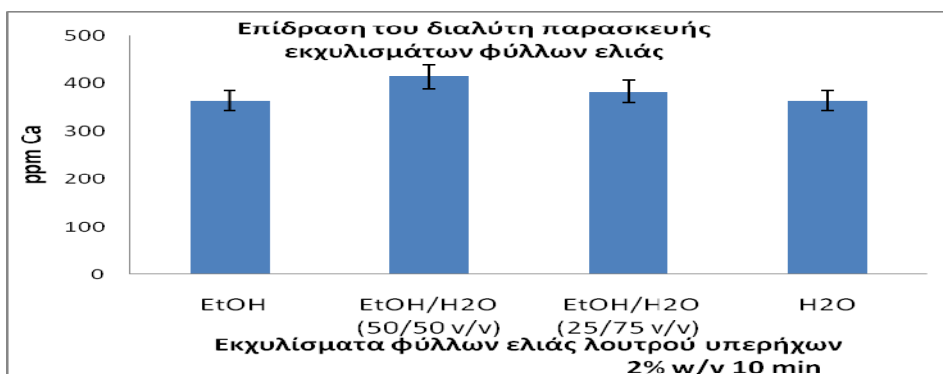
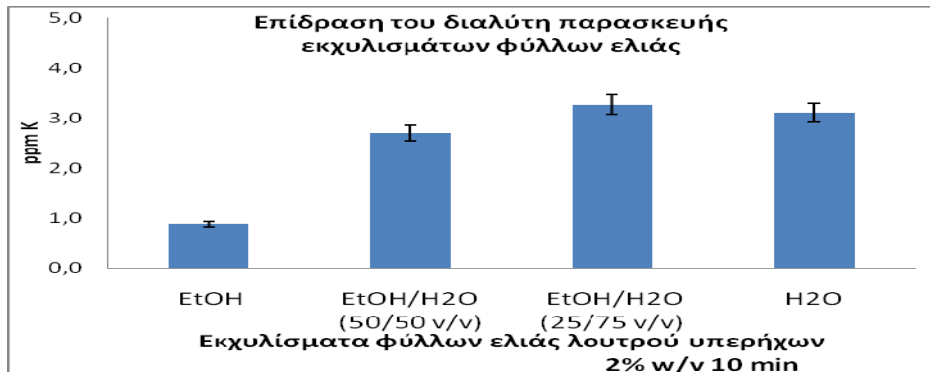
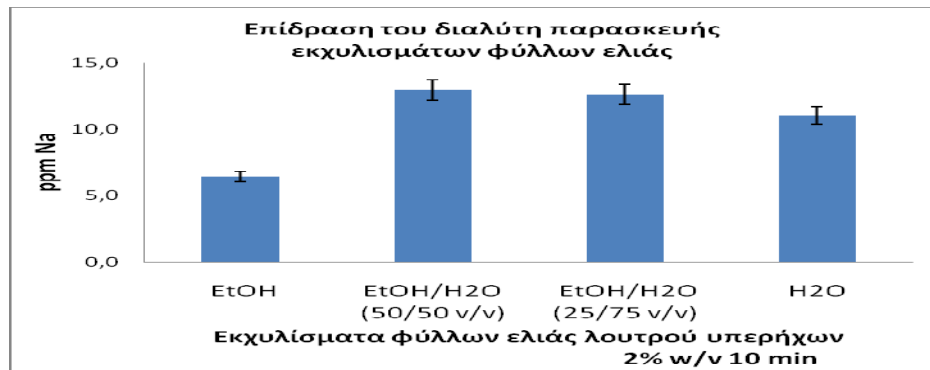


Σχήμα 8. Επίδραση του χρόνου παρασκευής εγχυμάτων φύλλων ελιάς στο περιεχόμενους σε Na, K, Ca και Li

4.1.4. Επίδραση διαλύτη εκχύλισης στο περιεχόμενο εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K, Ca και Li

Η επιλογή των διαλυτών για την παρασκευή των υπό μελέτη εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση την τοξικότητα τους και την καταλληλότητα της χρήσης τους για κατανάλωση. Σημειώνεται ότι η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την μελέτη ασφαλών για τον ανθρώπινο οργανισμό εκχυλισμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη αντί της μεθανόλης (που χρησιμοποιείται σε εργασίες με άλλο αντικειμενικό σκοπό), το νερό ασφαλής διαλύτης χαμηλού κόστους, αλλά και μίγματά τους. Επιλέχθηκε να μελετηθεί η επίδραση του διαλύτη σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς που παρασκευάστηκαν σε λουτρό υπερήχων (2% w/v και χρόνος παρασκευής 10min). Η τελευταία αποτελεί μια αποτελεσματική και ευρείας εφαρμογής σύγχρονη τεχνική εκχύλισης που αξιοποιείται σε πολλές μελέτες με αντικείμενο τη διερεύνηση του βιοενεργού δυναμικού φυτικών πηγών (Wang & Weller, 2006). Εξάλλου η διερεύνηση δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε εγχύματα και αφεψήματα λόγω της πτητικότητας των υπό μελέτη διαλυτών αιθανόλη και αιθανόλη/νερό (25/75 και 50/50, v/v). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο **Σχήμα 9**.

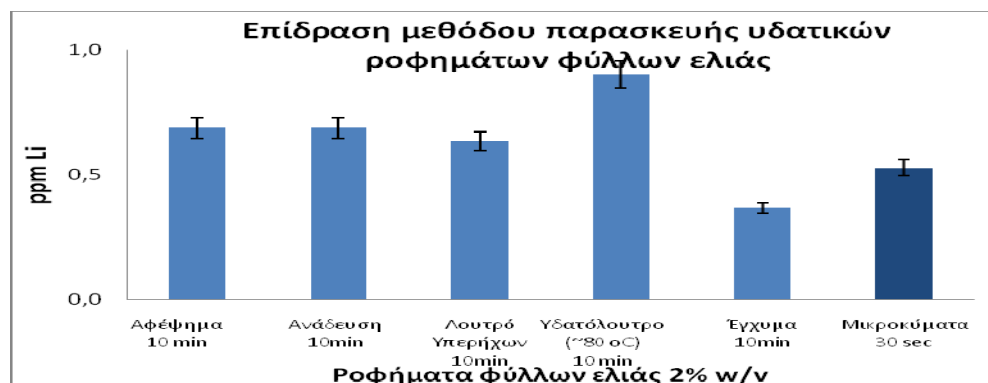
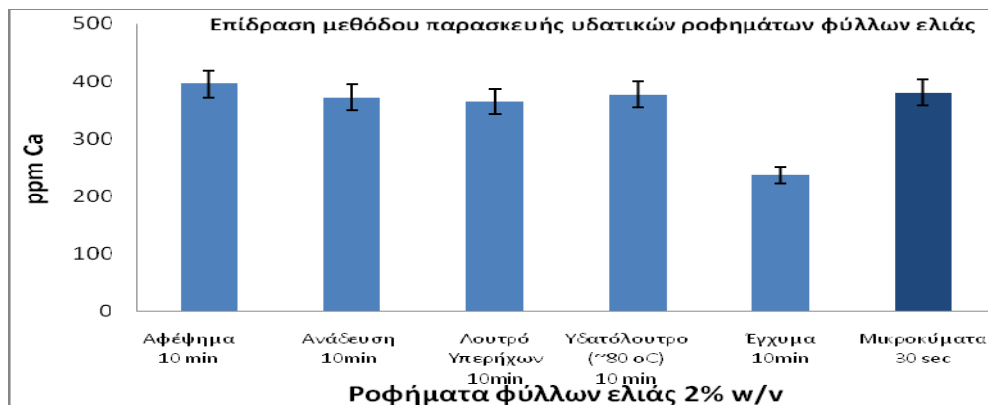
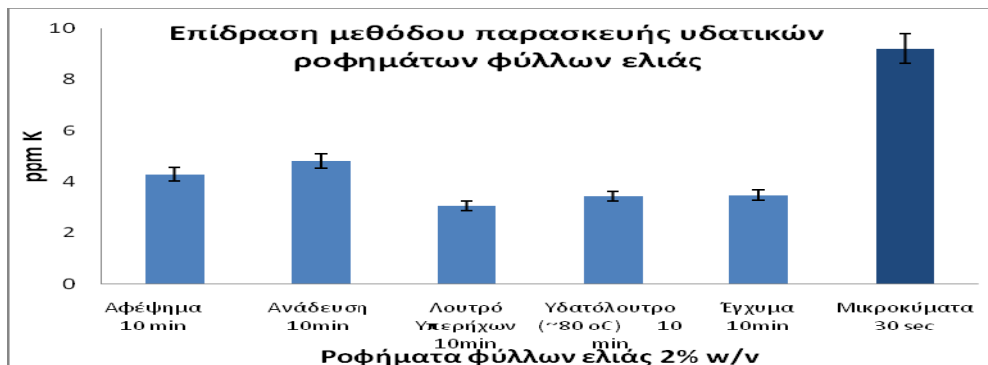
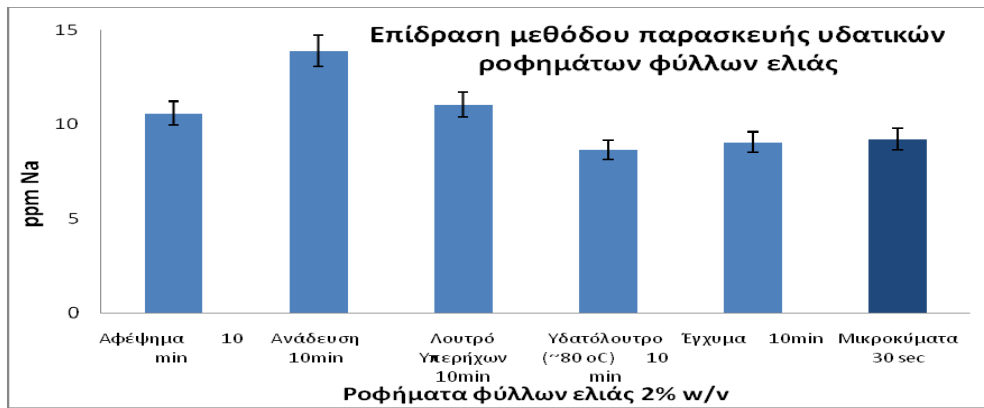
Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα μεταξύ αιθανόλης, νερού και υδατοαιθανολικών μιγμάτων που μελετήθηκαν, καλύτερη εκχυλιστική ικανότητα (για τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης) των Na, K και Ca από το υλικό φάνηκε να παρουσιάζουν το νερό και τα υδατοαιθανολικά μίγματα. Ωστόσο, η τάξη μεγέθους των αποτελεσμάτων δεν παρουσίασε ουσιαστική διαφοροποίηση. Εξίσου καλή συμπεριφορά με τους υπόλοιπους υπό μελέτη διαλύτες παρουσίασε και η αιθανόλη στην περίπτωση του Ca. Στην περίπτωση του Li η αιθανόλη φάνηκε να υπερέχει συγκριτικά με τους υπόλοιπους υπό μελέτη διαλύτες.



Σχήμα 9. Επίδραση διαλύτη παρασκευής εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς (λουτρού υπερήχων 2% w/v και χρόνου παρασκευής 10min) στο περιεχόμενό τους σε Na, K, Ca και Li

4.1.5. Επίδραση μεθόδου εκχύλισης στο περιεχόμενο εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K, Ca και Li

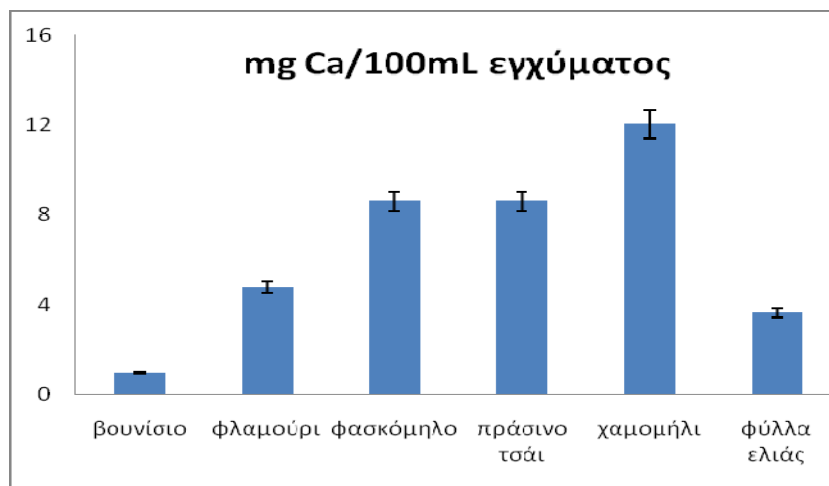
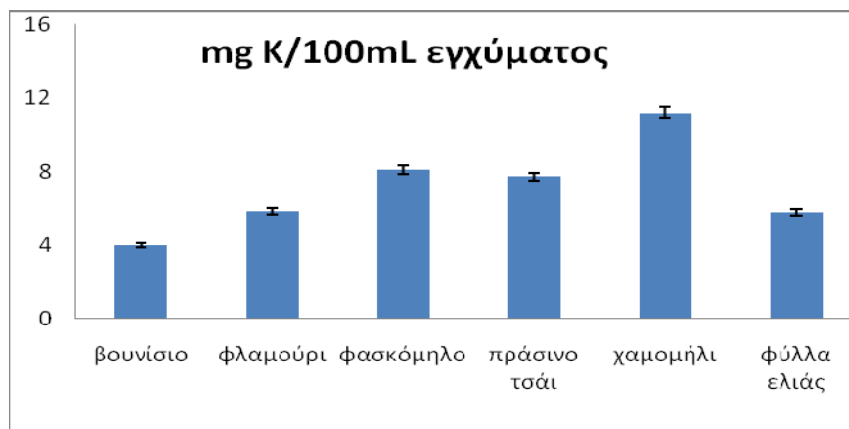
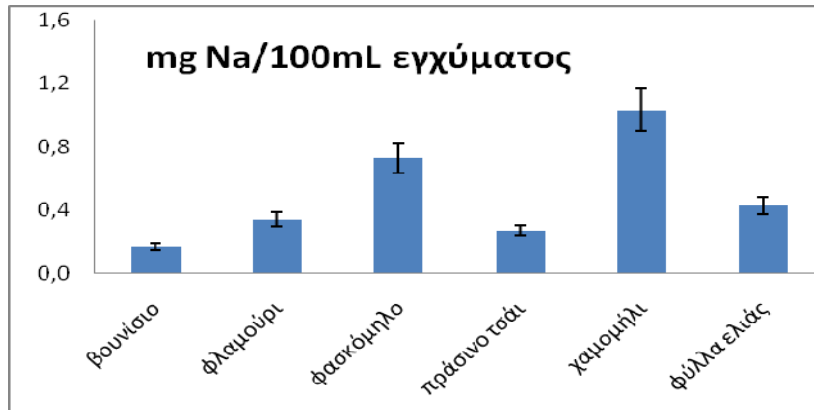
Η παρούσα διερεύνηση πραγματοποιήθηκε για συμβατικά εκχυλίσματα καθημερινής πρακτικής και ευρείας όπως εγχύματα και αφεψήματα, τα οποία μελετήθηκαν συγκριτικά με άλλες απλές πρακτικές όπως η χρήση υδατόλουτρου, λουτρού υπερήχων, ανάδευσης και μικροκυμάτων. Η μελέτη της επίδρασης της μεθόδου εκχύλισης στο περιεχόμενο σε Na, K, Ca και Li υδατικών εκχυλισμάτων (2% w/v) φύλλων ελιάς δεν παρουσίασε έντονες αποκλίσεις. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο **Σχήμα 10**. Σύμφωνα με αυτά, η τάξη μεγέθους του περιεχομένου σε Na, K, Ca και Li υδατικών εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς που παραλήφθηκαν με διαφορετικές προσεγγίσεις δεν φάνηκε να διαφοροποιείται σημαντικά. Στατιστικώς υψηλότερο περιεχόμενο σημείωσε το εκχύλισμα που παραλήφθηκε υπό συνεχή ανάδευση έναντι των υπολοίπων για το Na και το K. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι εκχύλισμα φύλλων ελιάς που παραλήφθηκε με τη χρήση της ενέργειας των μικροκυμάτων μόλις σε 30sec σημείωσε παραπλήσιο περιεχόμενο σε Na, Ca και Li με εκείνο των υπόλοιπων υδατικών εκχυλισμάτων (πλην αυτού που παραλήφθηκε υπό συνεχή ανάδευση) που παρασκευάστηκαν σε χρόνο 10min. Το περιεχόμενο του ίδιου εκχυλίσματος σε K αποδείχθηκε μάλιστα υψηλότερο σε σχέση με εκείνο των υπολοίπων υπό μελέτη εκχυλισμάτων. Το Ca παρουσίασε στατιστικώς ίδια περιεκτικότητα σε όλα τα υπό μελέτη εκχυλίσματα πλην του εγχύματος που εμφάνισε τη μικρότερη συγκέντρωση. Τα υπό μελέτη εκχυλίσματα ακολούθησαν την εξής σειρά σε ότι αφορά το περιεχόμενό του σε Li: Υδατόλουτρο > Αφέψημα~Ανάδευση~Λουτρό Υπερήχων > Μικροκύματα~Έγχυμα. Ωστόσο, δε σημειώθηκαν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις στην τάξη μεγέθους των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 10. Επίδραση μεθόδου εκχύλισης στο περιεχόμενο υδατικών εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K, Ca και Li

4.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ Na, K ΚΑΙ Ca ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΒΟΤΑΝΑ

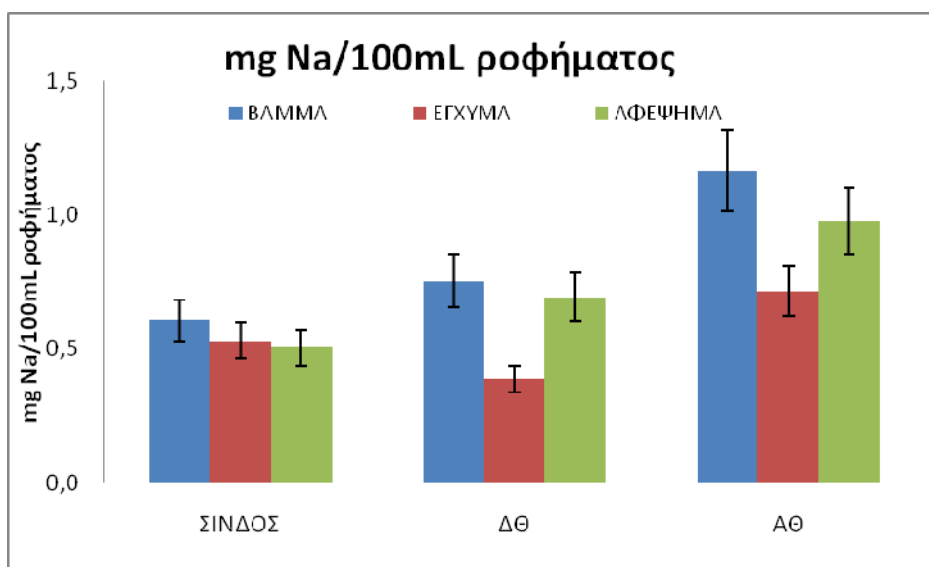
Για λόγους αξιολόγησης του περιεχομένου του υπό μελέτη υλικού (φύλλων ελιάς) σε Na, K και Ca πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση του περιεχομένου στα παραπάνω ανόργανα στοιχεία εγχυμάτων (2% w/v, 10 min) από βουνίσιο τσάι, φλαμούρι, φασκόμηλο, πράσινο τσάι, χαμομήλι και φύλλα ελιάς (αντιπροσωπευτικό δείγμα). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 11**. Σχετικά με το περιεχόμενο εγχύματος φύλλων ελιάς σε Na, αυτό φαίνεται να υστερεί σε σχέση με τα αντίστοιχα εγχυμάτων από χαμομήλι και φασκόμηλο. Ωστόσο, το έγχυμα φύλλων ελιάς είχε παραπλήσιο περιεχόμενο σε Na σε σχέση με το φλαμούρι και καλύτερο συγκριτικά με το βουνίσιο και πράσινο τσάι. Σε ότι αφορά το περιεχόμενο εγχύματος φύλλων ελιάς σε K αυτό φάνηκε να υστερεί σε σχέση με τα αντίστοιχα χαμομηλιού, φασκόμηλου και πράσινου τσαγιού. Εντούτοις, βρέθηκε καλύτερο από το βουνίσιο και παραπλήσιο εκείνου από φλαμούρι. Επιπλέον, το περιεχόμενο εγχύματος φύλλων ελιάς σε Ca ήταν υψηλότερο μόνο εκείνου από βουνίσιο τσάι.



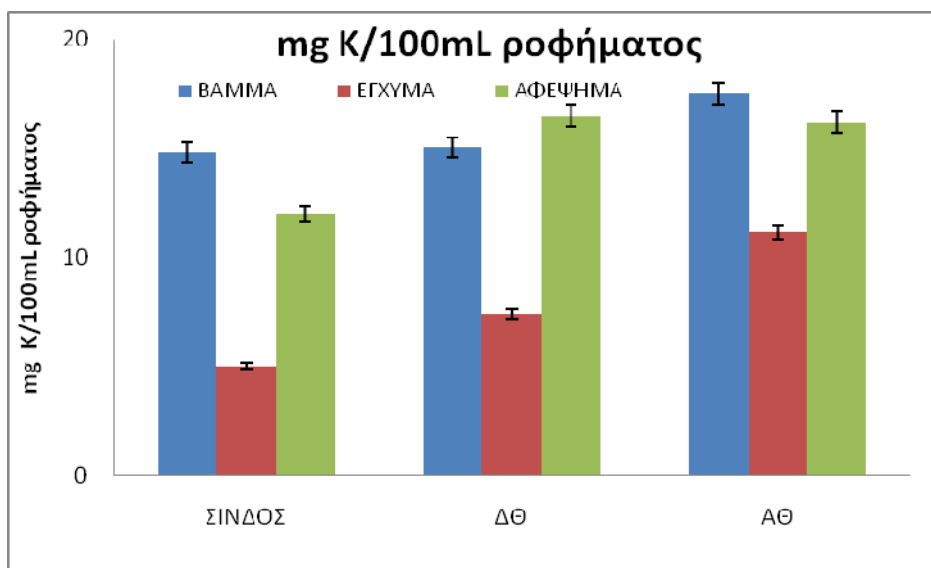
Σχήμα 11. Περιεχόμενο εγχυμάτων (2% w/v, 10min) φυτικών υλικών (βουνίσιο, φλαμούρι, φασκόμηλο, πράσινο τσάι, χαμομήλι, φύλλα ελιάς) σε Na, K και Ca

4.3 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ Na, K, Ca, Li ΚΑΙ Mg ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

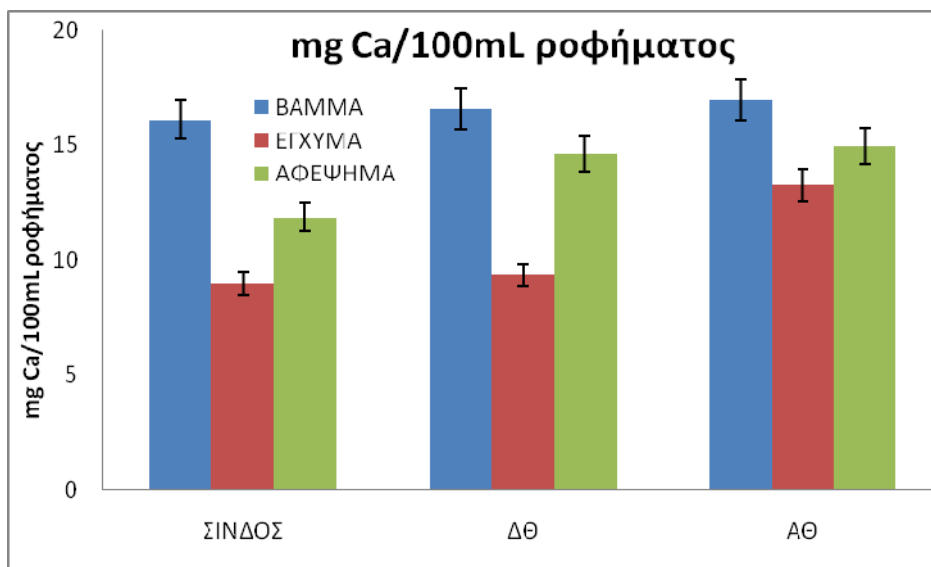
Προκειμένου να αξιολογηθεί συνολικότερα το υπό μελέτη υλικό (φύλλα ελιάς) σε ότι αφορά το περιεχόμενό του σε Na, K, Ca, Li και Mg παρασκευάστηκαν ροφήματα από δείγματα φύλλων ελιάς που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές (Ανατολική Θεσσαλονίκη, Δυτική Θεσσαλονίκη, Σίνδος). Στα ακόλουθα **Σχήματα 12-16** παρουσιάζονται αντιστοίχως τα επίπεδα των υπό μελέτη υδατοαιθανολικών βαμμάτων (2% w/v, παρασκευασμένων με 25/75 v/v EtOH/H₂O υπό 24h ανάδευση), εγχυμάτων (2% w/v, 10 min) και αφεψημάτων (2% w/v, 10min) φύλλων ελιάς στα παραπάνω ανόργανα στοιχεία. Εμπορικά βάμματα φυτικών ροφημάτων χρησιμοποιούνται ευρέως με τη μορφή σταγόνων ή άλλων προϊόντων στις αγορές, καθώς η παρουσία αιθανόλης (συνήθως σε ποσοστό 25%) αυξάνει τη διάρκεια ζωής τέτοιου τύπου προϊόντων. Για το λόγο αυτό, στη φάση διερεύνησης της επίδρασης της προέλευσης του δείγματος στο περιεχόμενο ροφημάτων του σε Na, K, Ca, Li και Mg παράλληλα με τα εγχύματα και αφεψήματα μελετήθηκαν και υδατοαιθανολικά εκχυλίσματα του υλικού.



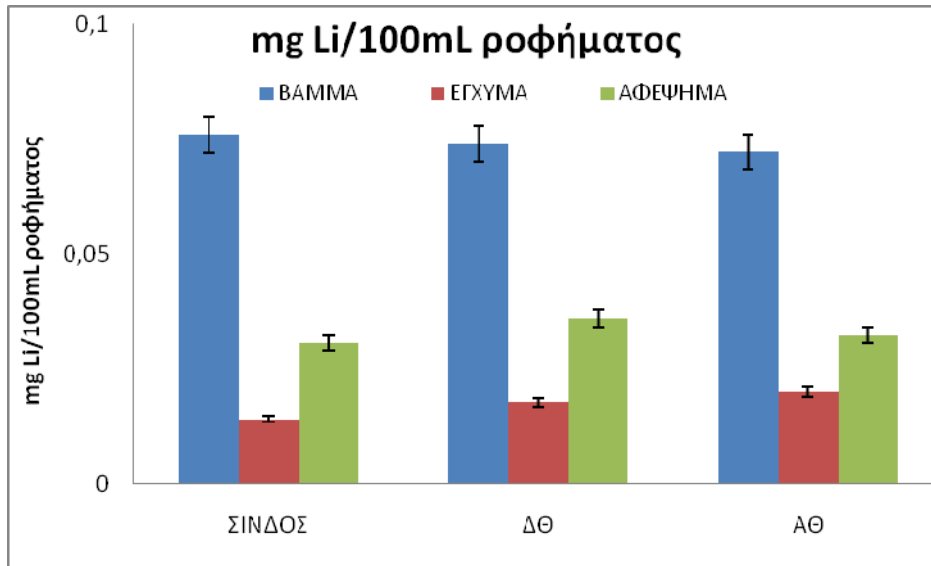
Σχήμα 12. Περιεχόμενο σε Na εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας



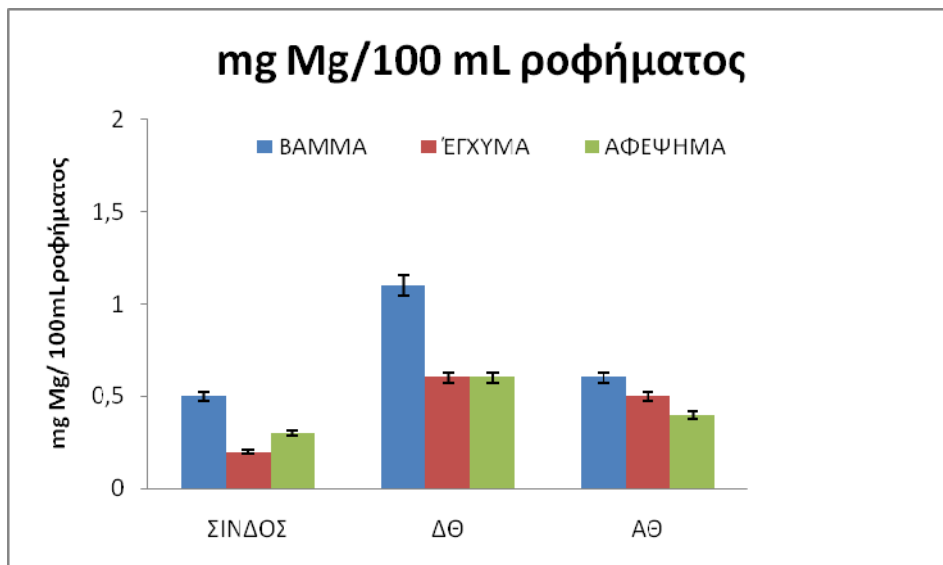
Σχήμα 13. Περιεχόμενο σε K εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας



Σχήμα 14. Περιεχόμενο σε Ca εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας



Σχήμα 15. Περιεχόμενο σε Li εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας



Σχήμα 16. Περιεχόμενο σε Mg εγχυμάτων, αφεψημάτων και βαμμάτων φύλλων ελιάς από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω Σχήματα όλα τα υπό μελέτη ροφήματα παρουσίασαν παραπλήσιο περιεχόμενο στα υπό μελέτη μέταλλα ανεξαρτήτως προέλευσης. Σε όλες τις περιπτώσεις σημειώθηκαν χαμηλότερα επίπεδα στα επιμέρους ανόργανα στοιχεία στην περίπτωση των εγχυμάτων. Αυτό κρίθηκε λογικό καθώς τα συγκεκριμένα ροφήματα προέρχονταν από ηπιότερων συνθηκών παρασκευαστική διαδικασία σε σχέση με τα βάμματα που η παρασκευή τους διήρκεσε 24h και τα αφεψήματα που παρασκευάστηκαν υπό βρασμό. Σε ότι αφορά το Li αυτό βρέθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στα υδατοαιθανολικά εκχυλίσματα σε σχέση με τα υπό μελέτη υδατικά. Στην περίπτωση του Na βάμματα και αφεψήματα παρουσίασαν παραπλήσια επίπεδα, ενώ για τα K και Ca τα βάμματα παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα από τα αφεψήματα. Σε Mg τα υπό μελέτη εγχύματα και αφεψήματα παρουσίασαν ίδιες συγκεντρώσεις, ενώ υψηλότερα επίπεδα Mg σημειώθηκαν για τα βάμματα.

4.4. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΥΔΑΤΟΑΙΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΣΕ Cu, Pb, Zn ΚΑΙ Al

Για την περίπτωση των βαμμάτων φύλλων ελιάς (2% w/v, παρασκευασμένων με 25/75 v/v EtOH/H₂O υπό 24h ανάδευση) πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του περιεχομένου τους σε Cu, Zn, Pb και Al. Τα αποτελέσματα αυτού του προσδιορισμού παρουσιάζονται ακολούθως στον **Πίνακα 6**. Σύμφωνα με τα ευρήματα η προέλευση των δειγμάτων δεν διαφοροποίησε ουσιαστικά το περιεχόμενο των υπό μελέτη βαμμάτων σε Cu, Zn, Pb και Al. Ο τοξικός Pb βρέθηκε στα υπό ανάλυση βαμμάτα, ωστόσο σε αμελητέα επίπεδα.

Πίνακας 6. Συγκέντρωση (mg /100 mL) βαμμάτων φύλλων ελιάς σε Cu, Zn, Pb και Al

Βάμμα φύλλων ελιάς από	mgCu/ 100 mL	mgZn/100mL	mgPb/100mL	mgAl/ 100 mL
Σίνδο	0,003	0,03	0,0001	0,03
Δυτική Θεσ/νική	0,001	0,03	0,0002	0,06
Ανατολική Θεσ/νική	0,002	0,03	0,0001	0,02

Όπως ήδη σημειώθηκε στο Θεωρητικό Μέρος πλήθος εργασιών της διεθνούς βιβλιογραφίας μελετά το περιεχόμενο φυτικών ροφημάτων σε ανόργανα συστατικά. Από τα πιο συχνά υλικά που έχουν αναλυθεί ως προς τη συγκέντρωση ροφημάτων τους σε επιμέρους ανόργανα συστατικά είναι το χαμομήλι, το φασκόμηλο, το πράσινο και μαύρο τσάι, το φλαμούρι, το δενδρολίβανο, ο μάραθος, η μέντα, ο βασιλικός, η τσουκνίδα κ.ά. Στον **Πίνακα 7** που ακολουθεί παρουσιάζονται επίπεδα μετάλλων που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας σε διάφορα φυτικά ροφήματα βιβλιογραφικών εργασιών. Σύμφωνα με τα παραπάνω και τα επίπεδα που σημειώθηκαν για τα υπό μελέτη μέταλλα στα υπό μελέτη εκχυλίσματα φύλλων ελιάς της παρούσας εργασίας παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς της παρούσας εργασίας παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα (Na: 0,6-1,2 , K: 6-14,2, Li:0,02-0,08, Ca: 10,5-16,2 και για το Mg: 0,2 – 1,1) σε όλα τα υπό μελέτη μέταλλα. Ωστόσο απόλυτες συσχετίσεις δε μπορούν να διεξαχθούν για λόγους που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.4.6 του Θεωρητικό Μέρους.

Πίνακας 7: Συγκέντρωση ανόργανων συστατικών σε εκχυλίσματα βοτάνων της διεθνούς βιβλιογραφίας

Ανόργανα συστατικά	Συγκέντρωση (mg/ 100 ml)
Na	2,30 – 256
K	120 – 2750
Ca	0,84 – 1759
Li	0,17 - 0,30
Mg	5,83 – 318
Cu	0,004 - 0,12
Pb	0,002 - 0,385

(Fernandez et al.,2002, Ozcan et al.,2008)

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα φύλλα της ελιάς περιέχουν παραπλήσια επίπεδα ανόργανων συστατικών ανεξαρτήτως προέλευσης και συνθηκών παρασκευής ροφημάτων.

Η όξινη κατεργασία των δειγμάτων δε συνεισέφερε στη βελτίωση της ανάκτησης των προς ανάλυση μετάλλων από τα υπό ανάλυση υποστρώματα.

Με την αύξηση της αναλογίας φυτικού υλικού/ διαλύτη αυξήθηκε και η περιεκτικότητα των εγχυμάτων φύλλων ελιάς σε ανόργανα συστατικά.

Ο χρόνος παραμονής του υλικού με το βρασμένο νερό δεν επηρέασε σημαντικά το περιεχόμενο εγχυμάτων φύλλων ελιάς σε Na, K και Ca. Εξαίρεση αποτέλεσε το Li.

Μεταξύ των διαλυτών που μελετήθηκαν, καλύτερη εκχυλιστική ικανότητα για την ανάκτηση μετάλλων από φύλλα ελιάς φάνηκε να παρουσιάζουν το νερό και τα υδατοαιθανολικά μίγματα.

Απλές καθημερινές πρακτικές παρασκευής ροφημάτων φύλλων ελιάς όπως η παρασκευή εγχυμάτων, αφεψημάτων και ροφημάτων με χρήση μικροκυμάτων οδηγούν σε ροφήματα με ικανοποιητικό περιεχόμενο σε ανόργανα συστατικά.

Το περιεχόμενο εγχύματος φύλλων ελιάς σε Na, K Ca φάνηκε να υστερεί σε σχέση με αντίστοιχα ευρέως χρησιμοποιούμενων βοτάνων όπως φασκόμηλο και χαμομήλι. Ωστόσο παρουσίασε παραπλήσια ή καλύτερα επίπεδα στα παραπάνω μέταλλα από βουνήσιο, φλαμούρι και πράσινο τσάι.

6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Ανάλυση και άλλων ανόργανων συστατικών σε φυτικά ροφήματα φύλλων ελιάς

Προσδιορισμός ανόργανου περιεχομένου ροφημάτων φύλλων ελιάς παρασκευασμένων από δείγματα διαφορετικής ποικιλίας, ηλικίας, χρονικής περιόδου συλλογής, τοποθεσίας.

Προσδιορισμός των ανόργανων συστατικών και με άλλες φασματοσκοπικές μεθόδους

7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agalias, A. M., E., Magiatis, P., Mitaku, S., Gikas, E., Tzarbopoulos, A. Quantitation of oleuropein and related metabolites in decoctions of <i>Olea europaea</i> leaves from ten greek cultivated varieties by HPLC with diode array detection. <i>J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.</i> 2006 , <i>28</i> , 1557-1571.
Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. <i>Food Chem.</i> 2009 , <i>112</i> , 863-867.
Amiot, M. J., Fleuriet, A., Macheix, J. J. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 1986 , <i>34</i> , 823-828.
Andrade, P. B., Pereira, D., M., Ferreres, F., Valentao, P. Recent trends in high throughput analysis and antioxidant potential screening for phenolics. <i>Current Pharmaceutical Analysis</i> 2008 , <i>4</i> (3), 137-150.
Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C.F.R., Oliveira, M. B. P.P., Pereira, J. A. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. <i>Food Chem.</i> 2008 , <i>107</i> , 1106-1113.
Bast, A., Chandler, R. F., Choy, P. C., Delmulle, L. M., Gruenwald, J., Halkes, S. B. A., Keller, K., Koeman, J. H., Peters, P., Przyrembel, H., de Ree, E. M., Renwick, A. G., Vermeer, I. T. M. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. <i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i> 2002 , <i>12</i> , 195-211.
Bayçin, D., Altiok, E., Semra, Ü., Bayraktar, O. Adsorption of olive leaf (<i>Olea europaea</i> L.) antioxidants on silk fibroin. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2007 , <i>55</i> , 1227-1236.
Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P., (2004). Χημεία Τροφίμων pp, 1366,1369, 3rd edition, Τζιόλας, Θεσσαλονίκη.
Benavente-García, O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from <i>Olea europaea</i> L. leaves. <i>Food Chem.</i> 2000 , <i>68</i> , 457-462.
Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker G. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. <i>Molecules</i> 2007 , <i>12</i> , 1679-1719.
Blázquez, J. M. Ιστορία και εξέλιξη της ελιάς. <i>In: The world olive encyclopaedia</i> . IOOC (Eds), 1996 , Madrid, Spain (μετάφραση στα ελληνικά).
Bombardelli, E., Bombardelli, V. Twenty years' experience in the botanical health food market. <i>Fitoterapia</i> 2005 , <i>76</i> , 495– 507.
Boskou, D. Characteristics of the olive tree and olive fruit. <i>In: Olive oil Chemistry and Technology</i> (2 nd ed), Boskou, D. (Ed), AOCS Press, 2006b , Champaign Illinois, USA.

Boskou, D. Sources of natural antioxidant phenols. <i>In: Antioxidant plant phenols. Sources, structure-activity relationship, current trends in analysis and characterization</i> , Boskou, D.; Gerothanassis, I.; Kefalas, P. (Eds), Research Signpost, 2006a , Kerala, India.
Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M. Phenolic compounds in olive oil and olives. <i>Curr. Top. Nutr. Res.</i> 2005 , <i>3</i> (2), 125-136.
Chapman, H. D., Pratt, P. F. Plant analysis. <i>In: Methods of analysis for soils, plants, and waters</i> , Chapman, H. D., Pratt, P. F. (Eds), 1961 , University of California, Division of Agricultural Sciences, pp. 56-60.
Chatzissavidis A. Ch. , Therios N. I., Molassiotis N. A., Seasonal Variation of Nutritional Status of olive Plants as affected by boron Concentration in nutrient solution. <i>Journal of Plant Nutrition</i> , 2005 , <i>28</i> , 309-321.
Chatzistathis Th., Therios I., Alifragis D., Dimmasi K. Effect of sampling time and soil type on Mn, Fe, zn, Ca, Mg, K and P concentrations of olive (<i>Olea europaea</i> L.,cv 'Koroneiki') leaves. <i>Scientia Horticulturae</i> , 2010 , <i>126</i> , 291-296.
Chiou, A., Salta, F.N., Kalogeropoulos, N., Mylona, A., Ntalla, I., Andrikopoulos, N. K., Retention and distribution of polyphenols after pan-frying of french fries in oils enriched with olive leaf extract. <i>J. Food Sci.</i> 2007 , <i>72</i> (8), S574-S584.
Clifford, H. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. <i>In: Antioxidants in food</i> . Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), Woodhead Pbs. Ltd. 2001 , Cambridge, UK.
Coppens, P., Fernandes da Silva, M., Pettman, S. European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. <i>Toxicology</i> 2006 , <i>221</i> , 59-74.
De Lucas, A., Martinez de la Ossa E., Rincón, J., Blanco, M. A., Gracia, I. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. <i>J. Supercrit. Fluids</i> 2002 , <i>22</i> , 221-228.
Donaire, J. P., Sánchez, A. J., López-Gorgé, J., Recalde, L. Metabolic changes in fruit and leaf during ripening in the olive. <i>Phytochem.</i> 1975 , <i>14</i> , 1167-1169.
Farag, R. S., Mahmoud, E. A., Basuny, A. M. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. <i>International Journal of Food Science and Technology</i> 2007 , <i>42</i> , 107-115.
Fernández-Escobar, R., Moreno, R., García-Creus M. Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. <i>Sci. Hort.</i> 1999 , <i>82</i> , 25-45.
Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Soares, M. E., Bastos, M. L., Pereira, J. A. Antioxidant activity and phenolic contents of <i>Olea europaea</i> L. leaves sprayed with different copper formulations. <i>Food Chem.</i> 2007 , <i>103</i> , 188-195.
Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli I. Volatiles from leaves, fruits, and virgin oil from <i>Olea europaea</i> cv. Olivastra Seggianese from Italy. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2003 , <i>51</i> , 1382-1386.
Gariboldi, P., Jommi, G., Verotta, L. Secoiridoids from <i>Olea europaea</i> . <i>Phytochem.</i> 1986 , <i>25</i> (4), 865-869.
Gião, M. S., González-Sanjosé, M. L., Rivero-Pérez, M. D., Pereira, C. I., Pintado, M. E., Malcata, F. . Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction

features. <i>J. Sci. Food Agric.</i> 2007 , <i>87</i> , 2638–2647.
Guarrera, P. M. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium) <i>Fitoterapia</i> 2005 , <i>76</i> , 1 - 25.
Gulati, O. P., Ottaway, P. B. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. <i>Toxicology</i> 2006 , <i>221</i> , 75–87.
Hanekamp, J. C., Bast, A. Food supplements and European regulation within a precautionary context: A critique and implications for nutritional, toxicological and regulatory consistency. <i>Crit. Rev. Food Sci. Nutr.</i> 2007 , <i>47</i> , 267-285.
Harborne, J. B. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall, 1973 , London, UK, pp. 1-7.
Harborne, J. B., Baxter, H. Phytochemistry dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. Taylor and Francis, Washington DC, USA, 1993 , pp. 453-454.
Houghton, P. J., Raman, A. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. Chapman and Hall, 2002 , London, UK.
Japón-Luján, R. Ruiz-Jiménez., Luque de Castro, M. D. Discrimination and classification of olive tree varieties and cultivation zones by biophenol contents. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2006a , <i>54</i> , 9706-9712.
Japón-Luján, R., Luque de Castro M. D., Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. <i>J. Chromatogr. A.</i> 2006b , <i>1136</i> , 185-191.
Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J. M., Luque de Castro, M. D. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 2006d , <i>385</i> , 753–759.
Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J. M., Luque de Castro, M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. <i>J. Chromatogr. A.</i> 2006c , <i>1108</i> , 76–82.
Khan, I. A. Issues related to botanicals. <i>Life Sci.</i> 2006 , <i>78</i> , 2033-2038.
Khan, M. Y. Panchal, S. Vyas, N. Butani, A. Kumar V. <i>Olea europaea</i> : A phyt -pharmacological review. <i>Phcog. Rev.</i> 2007 , <i>1 (1)</i> , 114-118.
Kosaraju, S. L., D’ath, L., Lawrence, A. Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. <i>Carb. Polym.</i> 2006 , <i>64</i> , 163-167.
Kroes, R., Walker R. Safety issues of botanicals and botanical preparations in functional foods. <i>Toxicology</i> 2004 , <i>198</i> , 213–220.
Kruger, C. L., Mann, S. W. Safety evaluation of functional ingredients. <i>Food Chem. Toxicol.</i> 2003 , <i>41</i> , 793-805.
Launert, E. <i>In</i> :The Hamlyn guide to edible and medicinal plants of Britain and northern Europe. The Hamlyn

Publishing Group Ltd., 1989 , London.
Lavee, S. Βιολογία και φυσιολογία του ελαιοδέντρου. <i>In: The world olive encyclopaedia</i> . IOOC (Eds), 1996 , Madrid, Spain (μετάφραση στα ελληνικά).
Le Floch, F., Tena, M. T., Ríos, A., Valcárcel, M. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. <i>Talanta</i> 1998 , <i>46</i> , 1123-1130.
Liu, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. <i>J. Ethnopharmacol.</i> 1995 , <i>49</i> , 57-68.
Luque de Castro, M. D., Japon-Lujan, R. State-of-the-art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives. <i>Trends Anal. Chem.</i> , 2006 , <i>25</i> , 501-510.
Madejon P., Maranon T., Murillo J. Biomonitoring of tace elements in the leaves and fruits of wild olive and holm oak trees. <i>Science of total Enviroment</i> 2006, <i>355</i> , 187-203.
Malik, N. S. A., Bradford, J. M. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. <i>Sci. Hort.</i> 2006 , <i>110</i> , 274-278.
Martín García, A.I., Moumen, A., Yáñez Ruiz, D. R., Alcaide, E. M. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. <i>Anim. Feed Sci. Technol.</i> 2003 , <i>107</i> , 61-74.
Martín García, Yáñez Ruiz, A. I., Moumen, A., D. R., Alcaide, E. M. Effect of polyethylene-glycol on the chemical composition and nutrient availability of olive (<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>) by-products. <i>Anim. Feed Sci. Technol.</i> 2004 , <i>114</i> , 159-177.
Martín García, Yáñez Ruiz, A. I., Moumen, A., D. R., Alcaide, E. M. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>) leaf fermentation in continuous fermentors. <i>Small Ruminant Research</i> 2006 , <i>61</i> , 53-61.
Martín-García, A. I., Molina Alcaide, E. Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>) leaves for ruminants. <i>Anim. Feed Sci. Technol.</i> 2008 , <i>142</i> , 317-329.
Martins, F. M., Gordon, M. H. Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl-4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (<i>Olea europaea</i>) leaves. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2001 , <i>49</i> , 4214-4219.
Mourtzinos, I., Salta, F., Yannakopoulou, K. Chiou, A., Karathanos, V. T. Encapsulation of Olive Leaf Extract in β -Cyclodextrin. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2007 , <i>55</i> , 8088-8094.
Mylonaki, S. K., E., Makris, D. P., Kefalas, P. Optimisation of the extraction of olive (<i>Olea europaea</i>) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. <i>Anal. Bioana. Chem.</i> 2008 , <i>392</i> , 977-985.
Naczk, M., Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables, occurrence, extraction and analysis. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 2006 , <i>41</i> , 1523-1542.
Nenadis, N., Tsimidou, M. Z. Oleuropein and related secoiridoids. Antioxidant activity and sources other than

<i>Olea europaea</i> L. (olive tree). <i>Recent Prog. Med. Plants</i> 2009 , 25 (6), 53–74.
Nielsen S. <i>Food Analysis</i> , 1998, <i>Aspen Publishers, Inc.</i> , USA.
Rada, M., Guinda, Á., Cayuela, J. Solid/liquid extraction and isolation by molecular distillation of hydroxytyrosol from <i>Olea europaea</i> L. leaves. <i>Eur. J. Lipid Sci. Technol.</i> 2007 , 109, 1071-1076.
Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (<i>Olea europaea</i> L.). <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2006 , 54, 434-440.
Rietjens, I. M. C. M., Slob, W., Galli, C., Silano V. Risk assessment of botanicals and botanical preparations intended for use in food and food supplements: Emerging issues. <i>Toxicol. Lett.</i> 2008 , 180, 131–136.
Rojas -Molina, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A., Alonso-Moraga, A. Genotoxicity of vegetable cooking oils in the <i>Drosophila</i> wing spot test. <i>Environ. Mol. Mutagen.</i> 2005 , 45, 90-95.
Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A., Alonso-Moraga, Á. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. <i>Mut. Res.</i> 2005 , 585, 147–155.
Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P. D., Lavee S., Robards, K. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar <i>Hardy's Mammoth</i> . <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2002b , 50, 6716-6724.
Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. Biotransformations of phenolic compounds in <i>Olea europaea</i> L. <i>Sci. Hort.</i> 2002a , 92, 147-176.
Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (<i>Olea europaea</i>) cultivar <i>Hardy's Mammoth</i> . <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2003 , 51, 2532-2538.
Samuelsson, G. Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προέλευσης. Εγχειρίδιων φαρμακογνωσίας. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1996 , Ηράκλειο, Ελλάς, pp. 1-29, 124, 179-181, 212-218 (μετάφραση στα ελληνικά).
Sánchez Ávila, N., Capote, F. P., Luque de Castro M. D. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. <i>J. Chromatogr. A.</i> 2007 , 1165, 158-165.
Sarkar, S. Functional foods as self-care and complementary medicine. <i>Nutr. Food Sci.</i> 2007 , 37 (3), 160-167.
Schilter, B., Andersson, C., Anton, R., Constable, A., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A. G., Korver, O., Smit, F., Walker R. Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements. <i>Food Chem. Toxicol.</i> 2003 , 41, 1625–1649.
Schmidl, M. K., Labuza, T. P. <i>In: Essentials of functional foods</i> . Schmidl, M.K., Labuza, T.P. (Eds), Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA, 2000 , pp. 3-16, 165-179.
Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A. V., Vilas Boas L. Phenolic compounds and antioxidant activity of <i>Olea europaea</i> L. fruits and leaves. <i>Food Sci. Technol. Int.</i> 2006 , 12, 385-395.
Soler-Rivas, C., Espin, J. C., Wichers, H. J. Oleuropein and related compounds. <i>J. Sci. Food Agric.</i> 2000 , 80, 1013-

1023.
Somova, L. I., Shode, F. O., Mipando M. Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. <i>Phytomedicine</i> 2004 , <i>11</i> , 121–129.
Somova, L. I., Shode, F. O., Ramnanan, P., Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from <i>Olea europaea</i> , subspecies africana leaves. <i>J. Ethnopharmacol.</i> 2003 , <i>84</i> , 299-305.
Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., Crea, R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. <i>Food Chem. Toxicol.</i> 2006 , <i>44</i> , 903-915.
Starmans, D. A. J., Nijhuis, H. H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. <i>Trends in Food Science & Technology</i> 1996 , <i>7</i> , 191-197.
Tabera, J., Guinda, A, Ruiz-Rodríguez, A., Señoráns, Ibáñez, E., Albi, T., Reglero, G. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2004 , <i>52</i> , (4774-4779).
Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., Lyoussi, B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). <i>J. Ethnopharmacol.</i> 2007 , <i>110</i> , 105-117.
Therios, I. Olives, CTOP Production Science, Horticulture 18, 2009 , CABI Head Office, UK.
Therios I.N and Sakellariadis S.D.Effects of nitrogen form on growth and mineral composition of olive plants (<i>Olea europaea</i> L.). <i>Scientia Horticulturae</i> 1988 , <i>35</i> , 167-177.
Tsimidou, M. Analysis of virgin olive oil polyphenols. <i>Seminars in Food Analysis</i> 1999 , <i>4</i> (1), 13-29.
Tsimidou, M., Lytridou, M., Boskou, D., Pappa-Louisi, A., Kotsifaki, F., Petrakis, C. On the determination of minor phenolic acids of virgin olive oil by RP-HPLC. <i>Grasas y Aceites</i> 1996 , <i>47</i> , 151-157.
Tura, D., Robards, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. <i>J. Chromatogr. A.</i> 2002 , <i>975</i> , 71-93.
Van Breemen, R. B., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R. The role of quality assurance and standardization in the safety of botanical dietary supplements. <i>Chem. Res. Toxicol.</i> , 2007 , <i>20</i> (4), 577-582.
Visioli, F., Bogani, P., Galli, C. Healthful properties of olive oil minor components. <i>In: Olive oil Chemistry and Technology</i> (2 nd ed), Boskou, D. (Ed), AOCS Press, 2006 , Champaign Illinois USA.
Visioli, F., Galli, G. Biological properties of olive oil phytochemicals. <i>Crit. Rev. Food Sci. Nutr.</i> 2002 , <i>42</i> , 209-221.
Walker R. Criteria for risk assessment of botanical food supplements. <i>Toxicol. Lett.</i> 2004 , <i>149</i> , 187–195
Wang, L., Weller, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. <i>Trends in Food Science & Technology</i> 2006 , <i>17</i> , 300-312.

Θεριός, Ι. Ελαιοκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνη, 2005, Θεσσαλονίκη, Ελλάς.
Κυριτσάκης, Α. Κ. Ελαιόλαδο συμβατικό και βιολογικό, βρώσιμη ελιά-πάστα ελιάς, Αφοί Λ. Ακριτίδη, Ο.Ε., 2007, Θεσσαλονίκη, Ελλάς.
Μπαλατσούρας Γ. Η επιτραπέζια ελιά. 1992, Αθήνα, Ελλάς, pp.1-66.
Μπαλατσούρας Γ. Το ελαιόδενδρο. Εκδόσεις Πελεκάνος, 1994, Αθήνα, Ελλάς, pp. 363-449.
Μπαλατσούρας, Γ. Εργασίες επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς, In: Παγκόσμια Εγκυκλοπαίδεια της Ελαίας, 1996, Madrid, Spain, pp. 300-306.
Νενάδης, Ν. Βιοφαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα. Σχέση δομής-δραστικότητας (διδακτορική διατριβή), 2004, ΑΠΘ. Θεσσαλονίκη, Ελλάς.
Παπαδογιάννη, Ι.Ν. Εργαστηριακές Ασκήσεις Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, Εκδόσεις Γραφικές Τέχνες, 1994, Θεσσαλονίκη
Παπαδογιάννη, Ι.Ν., Σαμανίδου, Β.Φ. Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Εκδόσεις Πήγασος, 2000, Θεσσαλονίκη
Σφακιωτάκης, Ε. Μαθήματα ελαιοκομίας. Τυρο ΜΑΝ, 1996, Θεσσαλονίκη, Ελλάς.
http://www.energybalance.com/download/Olive_Leaf_Olea_europaea_Overview_of_Studies_and_Results.pdf , (http://www.healthtrade.gr/olives.html , http://www.olivus.com/ , http://www.anyvitamins.com/olive_leaf_extract.htm , http://kritikidiatrosi.gr/product_gr.php?id=112&flag=normal , http://www.naturalhealthconsult.com/monographs/oliveleaf.html).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

- *Παράρτημα 1*

Ενδεικτική παρουσίαση πρότυπων καμπυλών για προσδιορισμό Na, K, Ca, Li που έγιναν με φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής και Cu, Mg, Pb, Al και Zn που έγιναν με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών Na, K, Ca, Li χρησιμοποιήθηκε πρότυπο πυκνό διάλυμα και με την βοήθεια του τύπου της αραιώσης παρασκευάστηκαν νέα αραιωμένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Όπου C_1 = η συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος

V_1 = ο όγκος του διαλύματος

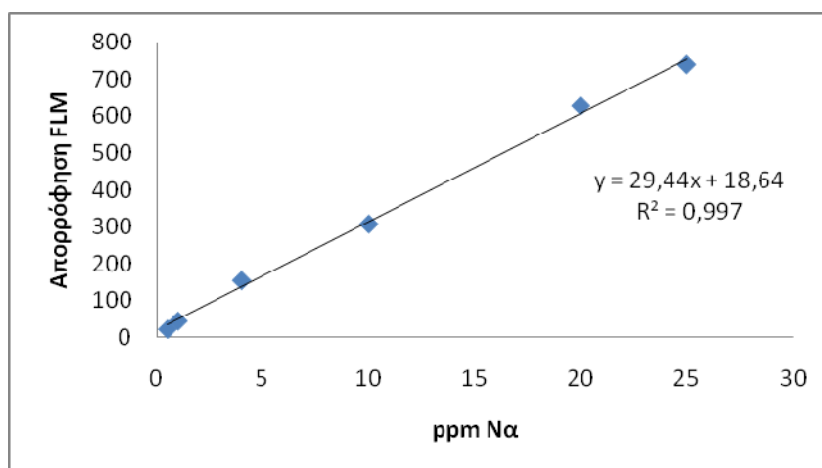
C_2 = η συγκέντρωση του αραιωμένου διαλύματος

V_2 = ο όγκος του αραιωμένου διαλύματος

Η πρότυπη καμπύλη του Na που φαίνεται παρακάτω στο Σχήμα 1Π κατασκευάστηκε από τις τιμές του πίνακα 1Π και η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε είναι: $y = 29,44x + 18,646$ με $R^2 = 0,9976$, όπου το y αντιστοιχεί στην ένδειξη του φλογοφωτομέτρου και το x στα ppm Na.

Πίνακας 1Π. Αποτελέσματα ενδείξεων φλογοφωτόμετρου για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Na

Na ppm	FLM
0,5	22
1	44
4	154
10	307
20	627
25	739

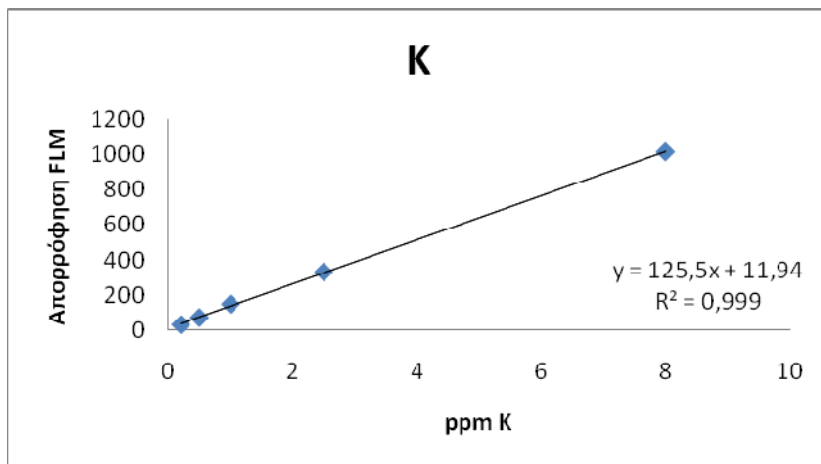


Σχήμα 1Π. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό Na

Η πρότυπη καμπύλη του K φαίνεται στο Σχήμα 2Π κατασκευάστηκε από τις τιμές του πίνακα 2Π και η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε είναι: $y = 125,51 x + 11,946$ με $R^2 = 0,9997$, όπου το y αντιστοιχεί στην ένδειξη του φλογοφωτομέτρου και το x στα ppm K.

Πίνακας 2Π. Αποτελέσματα ενδείξεων φλογοφωτόμετρου για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Κ

Κ ppm	FLM
0,2	30
0,5	70
1	147
2,5	330
8	1014

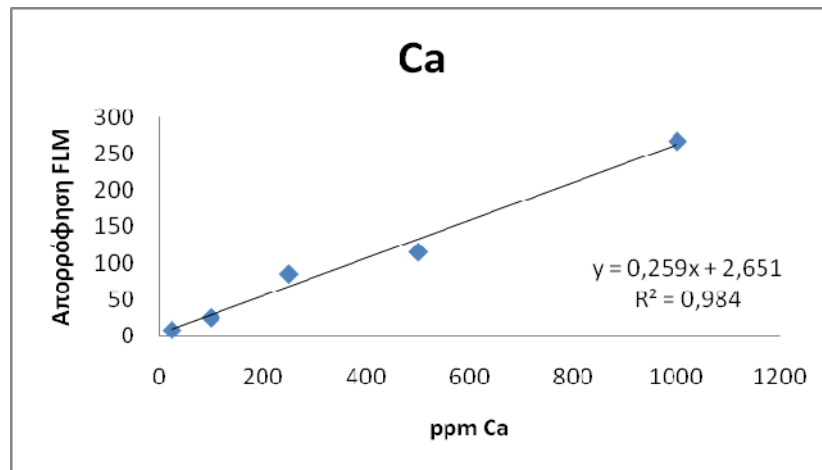


Σχήμα 2Π. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό Κ

Η πρότυπη καμπύλη του Ca φαίνεται στο Σχήμα 3Π κατασκευάστηκε από τις τιμές του πίνακα 3Π και η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε είναι: $y = 0,2596x + 2,6512$ με $R^2 = 0,9848$, όπου το y αντιστοιχεί στην ένδειξη του φλογοφωτομέτρου και το x στα ppm Κ.

Πίνακας 3Π. Αποτελέσματα ενδείξεων φλογοφωτόμετρου για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Ca

Ca ppm	FLM
25	8
100	25
250	85
500	115
1000	267

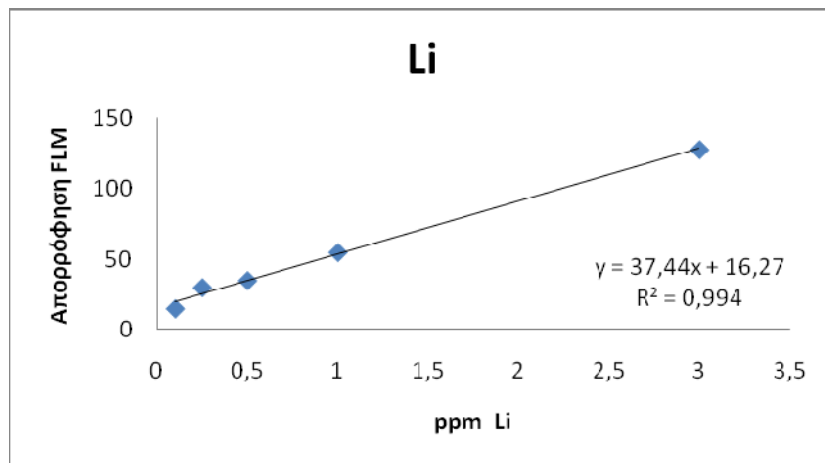


Σχήμα 3Π. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό Ca

Επίσης, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του Li, όπως φαίνεται στο σχήμα 4Π από τις τιμές του πίνακα 4Π. Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε είναι: $y = 37,449x + 16,274$ με $R^2 = 0,9942$, όπου το y αντιστοιχεί στην ένδειξη του φλογοφωτομέτρου και το x στα ppm Ca.

Πίνακας 4Π. Αποτελέσματα ενδείξεων φλογοφωτόμετρου για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Li

Li ppm	FLM
0,1	15
0,25	30
0,5	35
1	55
3	128

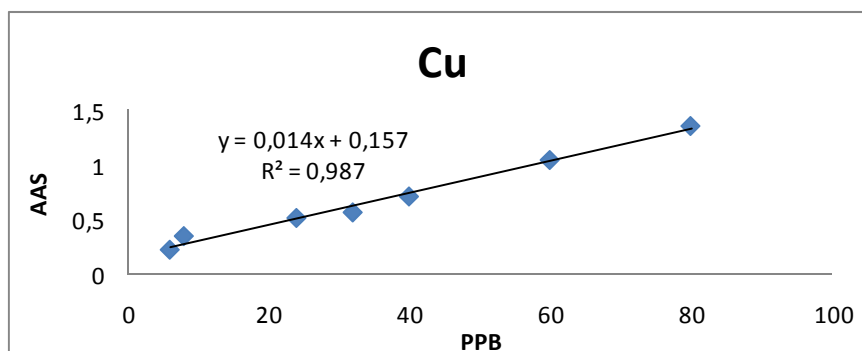


Σχήμα 4Π. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό Li.

Ακολουθούν πρότυπες καμπύλες αναφοράς για προσδιορισμό Cu, Pb και Mg με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.

Πίνακας 5Π. Αποτελέσματα απορροφήσεων ατομικής φασματοσκοπίας για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Cu.

Cu ppb	EAAS
6	0,224
8	0,349
24	0,515
32	0,566
40	0,712
60	1,046
80	1,358

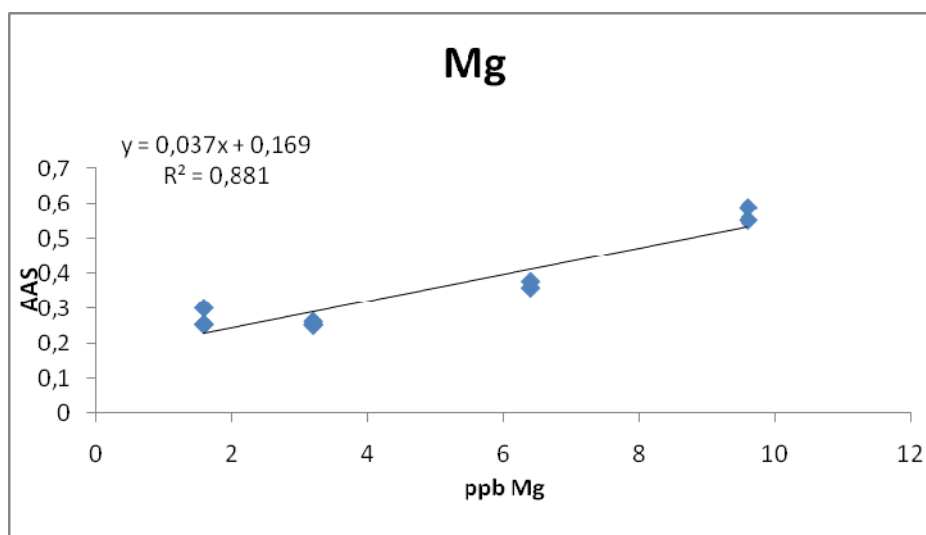


Σχήμα 5Π. Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς για τον προσδιορισμό Cu με ατομική φασματοσκοπία απορρόφησης.

Η πρότυπη καμπύλη του Cu φαίνεται στο Σχήμα 5Π κατασκευάστηκε από τις τιμές του πίνακα 5Π και η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε είναι: $y = 0,0147 x + 0,1575$ με $R^2 = 0,9879$, όπου το y αντιστοιχεί στην απορρόφηση της ατομικής φασματοσκοπίας και το x στα ppb Cu.

Πίνακας 6Π. Αποτελέσματα απορροφήσεων ατομικής φασματοσκοπίας για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Mg.

Mgppb	AAS
1,6	0,253
1,6	0,254
1,6	0,300
3,2	0,262
3,2	0,254
3,2	0,251
6,4	0,358
6,4	0,376
9,6	0,551
9,6	0,588



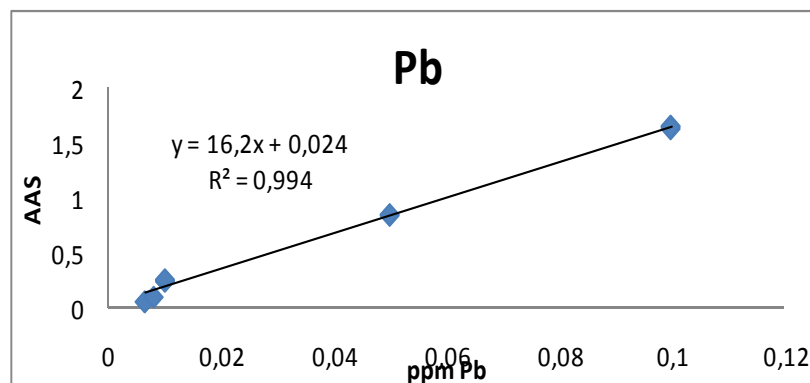
Σχήμα 6Π. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Mg για τον προσδιορισμό Mg με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης

Η πρότυπη καμπύλη του Mg φαίνεται στο Σχήμα 6Π κατασκευάστηκε από τις τιμές του πίνακα 6Π και η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε είναι: $y = 0,0379 x + 0,169$ με $R^2 = 0,8813$, όπου το y αντιστοιχεί στην απορρόφηση της ατομικής φασματοσκοπίας και το x στα $\mu\text{g/L}$ Mg.

Ομοίως ακολουθούν καμπύλες αναφοράς Pb (Πίνακας 7Π, Σχήμα 7Π), Al (Πίνακας 8Π, Σχήμα 8Π) και Zn (Πίνακας 9Π, Σχήμα 9Π)

Πίνακας 7Π. Αποτελέσματα απορροφήσεων ατομικής φασματοσκοπίας για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Pb.

$\mu\text{g/L}$ Pb	AAS
0,0064	0,06
0,0064	0,06
0,008	0,10
0,01	0,24
0,01	0,25
0,01	0,26
0,05	0,84
0,05	0,85
0,1	1,65
0,1	1,62
0,1	1,641

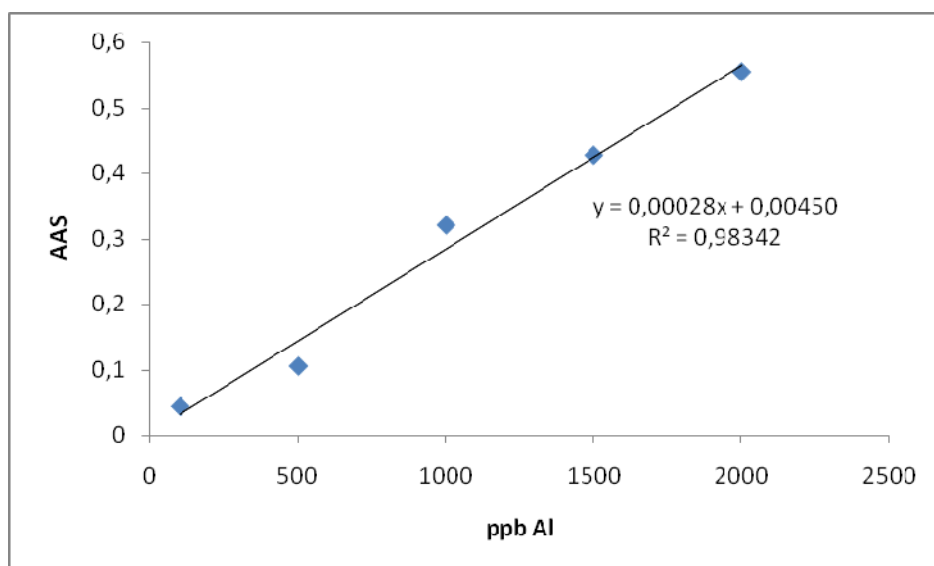


Σχήμα 7Π. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Pb για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης Pb σε δείγματα με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.

Πίνακας 8Π. Αποτελέσματα απορροφήσεων ατομικής φασματοσκοπίας για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Al.

ppb Al	AAS
100	0,054
100	0,04
100	0,038
500	0,105
500	0,098
500	0,114
1000	0,319
1000	0,339
1000	0,305
1500	0,443
1500	0,425
1500	0,416
2000	0,522
2000	0,573
2000	0,571
4000	0,893

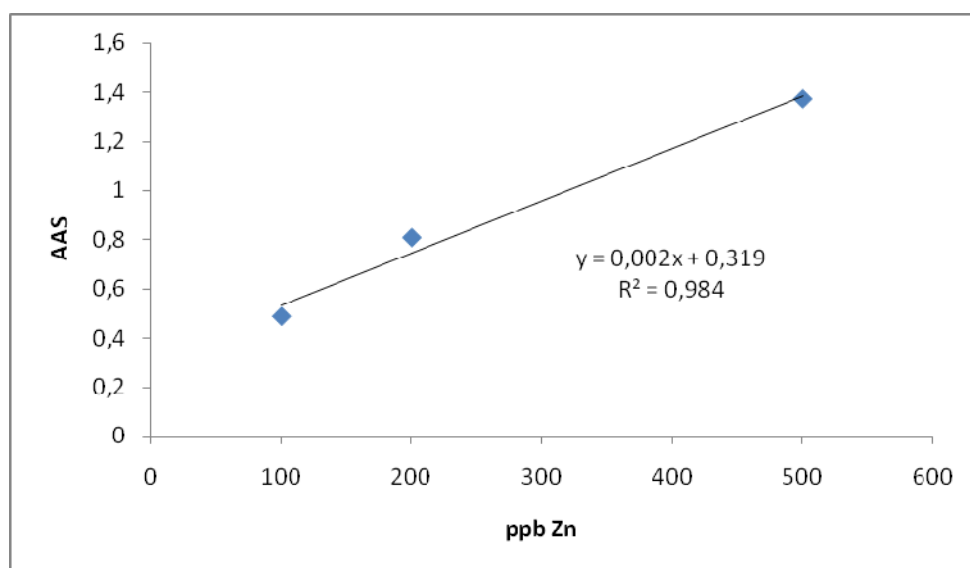
4000	0,838
4000	0,843



Σχήμα 8Π. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Pb για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης Pb σε δείγματα με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης

Πίνακας 9Π. Αποτελέσματα απορροφήσεων ατομικής φασματοσκοπίας για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Zn.

ppb Zn	AAS
100	0,53
100	0,48
100	0,451
200	0,715
200	0,915
200	0,793
500	1,087
500	1,656



Σχήμα 9Π. . Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Zn για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης Zn σε δείγματα με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης