

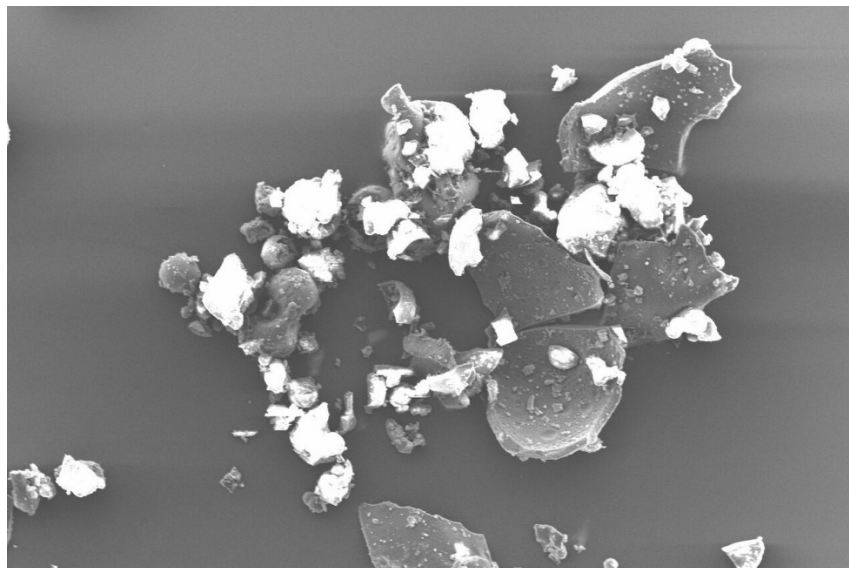
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**<< ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΕ
ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΠΕΔΙΟΥ >>**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΣΤΑΘΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**<< ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΕ
ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΠΕΔΙΟΥ >>**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΣΤΑΘΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

Εξεταστική Επιτροπή: **Ιωάννης Καπόλος (επιβλέπων)**
 Γεώργιος Ζακυνθινός (μέλος)
 Ιωακείμ Σπηλιόπουλος (μέλος)

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε κινητική μελέτη της μεταβολής του σχήματος και του μεγέθους σωματιδίων δείγματος φιλτραρισμένης κρέμας για καφέ με τη μέθοδο της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής στους 50 °C. Η εργασία περιλαμβάνει θεωρητικό και πειραματικό μέρος. Στο θεωρητικό μέρος της εργασίας γίνεται ανασκόπηση από τη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με το θέμα. Αναφέρονται στοιχεία που αφορούν στη νανοτεχνολογία, σε μεθόδους κατανομής και χαρακτηρισμού μεγέθους νανοσωματιδίων, αλλά και σε μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού. Επίσης παρατίθενται στοιχεία σχετικά με τη μέθοδο της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου και σε ορισμένους ανιχνευτές που αυτή συνδυάζεται. Επιπλέον, παρουσιάζονται πειραματικές εφαρμογές της συγκεκριμένης τεχνικής από άλλες ερευνητικές εργασίες. Στο πειραματικό μέρος, έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές, ώστε να βρεθούν ποιες θα είναι οι κατάλληλες συνθήκες λειτουργίας της συσκευής της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου, καθώς και να είναι εφικτός ο προσδιορισμός του γεωμετρικού του όγκου, ο οποίος είναι μια παράμετρος της συσκευής αυτής. Για το σκοπό αυτό, διεξήχθη το πείραμα με τη χρήση latex πολυμερών 0,25, 0,45 και 1,05 μm. Με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλώνει ο χρόνος παραμονής του δείγματος στους 50 °C, τόσο περισσότερο τα σωματίδια συσσωματώνονται. Με τη βοήθεια μαθηματικής σχέσης, διαπιστώθηκε ότι η διάμετρος σωματιδίων της κρέμας για καφέ παίρνουν τιμές από 23,55 έως και 40,33 nm, ενώ με τη συσκευή Zetasizer, οι τιμές κυμαίνονται από 147 έως 555,5 nm.

Λέξεις-κλειδιά: νανοτεχνολογία, μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής, πολυμερή, φιλτραρισμένη κρέμα καφέ, κατανομή μεγέθους, διάμετρος σωματιδίων

ABSTRACT

In the present study we made a kinetic study of change of the shape and size of particles of a coffee creamer sample with the method of flow field flow fractionation in the temperature of 50 °C. The study contains both theoretical and experimental parts. To support our topic under theoretical basis we referred to an extended international literature review. Data concerning the nanotechnology, the methods of distribution and characterization of the size of nanoparticles and the methods of quantification analysis, are referred. Additionally, data regarding the method of flow field flow fractionation and the relative detectors are presented. Reference to relevant research studies on experimental appliance using the same technique is also cited. In the experimental part of the study preliminary tests were made to identify the suitable conditions for the proper function of the flow field flow fractionation equipment and for the identification of geometric volume which is a parameter of this device. For the need of the experiment we used latex biopolymer of 0,25, 0,45 and 1,05 µm. Using scanning electron microscope it was found that as long as the sample remains in the temperature of 50 °C, so much the particles continue to agglomerate. With the help of a mathematical formula it was ascertained that the diameter of the particles of the coffee creamer varies from 23,55 to 40,33 nm, while the device of Zetasizer displays values from 147 to 555,5 nm.

Keywords: nanotechnology, asymmetrical flow field flow fractionation, polymer, filtered coffee creamer, size distribution, nanoparticle diameter

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	σελ. 2
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	σελ. 2
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	σελ. 3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	σελ.5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ. 7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ.....	σελ. 10
2.1. Νανοσωματίδια.....	σελ. 10
2.2 Νανοσωματίδια και άνθρωπος.....	σελ. 13
2.3 Νανοσωματίδια και τρόφιμα.....	σελ. 13
2.4 Νανοσωματίδια και είδη κοσμετολογίας	σελ. 16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	σελ.17
ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ	
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ	
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ.....	
3.1 ICP-MS.....	σελ. 17
3.2 Τεχνικές μικροσκοπίας.....	σελ. 17
3.2.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.....	σελ. 18
3.2.2 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.....	σελ. 18
3.3 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους.....	σελ.19
3.4 Σκέδαση φωτός πολλαπλής γωνίας	σελ.19
3.5 Μονοφασική χρωματογραφία πεδίου.....	σελ. 19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΔΙΟΥ	σελ. 22
ΑΣΥΜΜΕΤΡΗΣ ΡΟΗΣ – ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ.....	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ	σελ. 24
ΧΡΩΜΑΤΟΦΡΑΦΙΑΣ ΠΕΔΙΟΥ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗΣ	
ΡΟΗΣ.....	
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	σελ. 26
Υλικά, όργανα και μεθοδολογία.....	σελ. 26
Υλικά και όργανα.....	σελ. 26
Μεθοδολογία.....	σελ. 27
Αποτελέσματα.....	σελ. 33
Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	σελ. 67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ. 68

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

AES	Atomic Emission Spectroscopy
AF ⁴	Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation
DLS	Dynamic Light Scattering
DOM	Diluted Organic Matter
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy
FFF	Field Flow Fractionation
F ⁴	Flow Field Flow Fractionation
FS	Fluorescence Spectrometry
HDC	Hydrodynamic Chromatography
ICP	Inductively Coupled Plasma
LDL	Low Density Lipoprotein
MALS	Multi Angle Light Scattering
MS	Mass Spectrometry
OES	Optical Emission Spectroscopy
PCS	Photon Correlation Spectroscopy
PSS	Polystyrene Sulfonate
SEC	Size Exclusion Chromatography
SF ⁴	Symmetric Flow Field Flow Fractionation
SdFFF	Sedimentation Field Flow Fractionation
sp-ICP	single particle- Inductively Coupled Plasma
TEM	Transmission Electron Microscopy
UV	Ultraviolet
Vis	Visible

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μέταλλα και οξείδια μετάλλων που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα και σε υλικά που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα.σελ. 10
Πίνακας 2: Οι συνθήκες χρόνου και ροής για την ανάλυση του δείγματος latex με διάμετρο 0,25 μm.σελ. 28
Πίνακας 3: Κατάλληλες συνθήκες χρόνου και ροών για το διαχωρισμό των κορυφών σε μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτωνσελ. 29
Πίνακας 4: Χρόνοι που πραγματοποιήθηκαν οι τέσσερις ενέσεις για την κινητική της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ.σελ. 31
Πίνακας 5: Η διάμετρος των σωματιδίων της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ όπως υπολογίστηκε από το μηχάνημα του Zetasizer.σελ. 60

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Χρωματογράφημα της κρέμας καφέ που δεν έχει φιλτραριστεί.σελ. 33
Εικόνα 2: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ που έχει αναμιχθεί με βραστό νερό.σελ. 35
Εικόνα 3: Χρωματογράφημα του πολυμερούς με μέγεθος διαμέτρου 0,25 μm.σελ. 37
Εικόνα 4: Χρωματογράφημα του πολυμερούς με μέγεθος διαμέτρου 0,45 μm.σελ. 39
Εικόνα 5: Χρωματογράφημα του πολυμερούς με μέγεθος διαμέτρου 1,05 μm.σελ. 41
Εικόνα 6: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας σε θερμοκρασία 50°C για το χρόνο 0.σελ. 43
Εικόνα 7: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για το χρόνο 1 ώρα και 40 λεπτά.σελ. 45
Εικόνα 8: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για το χρόνο 3 ώρες και 14 λεπτά.σελ. 47
Εικόνα 9: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας για καφέ σε θερμοκρασία 50°C για το χρόνο 4 ώρες και 37 λεπτά.σελ. 49
Εικόνα 10: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για τον χρόνο 0.σελ. 50
Εικόνα 11: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για τον χρόνο 1 ώρα και 40 λεπτά.σελ. 52
Εικόνα 12: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για τον χρόνο 3 ώρες και 14 λεπτά.σελ.54
Εικόνα 13: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για τον χρόνο 4 ώρες και 37 λεπτά.σελ.56
Εικόνα 14: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας για το χρόνο 0σελ.57

Εικόνα 15: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας για το χρόνο 1 ώρα και 40 λεπτά.σελ. 58
Εικόνα 16: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας για το χρόνο 3 ώρες και 14 λεπτά.σελ. 59
Εικόνα 17: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας για το χρόνο 4 ώρες και 34 λεπτά.σελ. 60
Εικόνα 18: Σωματίδια κρέμας για καφέ πριν την θέρμανση του δείγματος στους 50° C.σελ.61
Εικόνα 19: Σωματίδια κρέμας για καφέ πριν τη θέρμανση του δείγματος στους 50° C.σελ.61
Εικόνα 20: Σωματίδια κρέμας για καφέ πριν τη θέρμανση του δείγματος στους 50° C και εμφάνιση των μεγεθών αυτών.σελ.62
Εικόνα 21: Σωματίδια κρέμας για καφέ πριν τη θέρμανση του δείγματος στους 50° C.σελ.62
Εικόνα 22: Σωματίδια κρέμας για καφέ με σφαιρικό σχήμα.σελ. 63
Εικόνα 23: Σωματίδια κρέμας για καφέ έπειτα από θέρμανση της κρέμας στους 50° C.σελ.64
Εικόνα 24: Αλλαγή του σχήματος των σωματιδίων κρέμας για καφέ έπειτα από θέρμανση του δείγματος στους 50° C.σελ. 65
Εικόνα 25: Τα σωματίδια κρέμας για καφέ έπειτα από θέρμανση του δείγματος στους 50° C.σελ.65

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η τεχνολογία των νανοσωματιδίων αποτελεί έναν κλάδο της επιστήμης με εφαρμογή σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας τροφίμων. Τα νανοσωματίδια με τη χρήση τους προσδίδουν φυσικές ιδιότητες στα τρόφιμα, οι οποίες τα καθιστούν ελκυστικά στους καταναλωτές και επομένως τα κάνουν περισσότερο ανταγωνιστικά στις αγορές. Παρ' όλα τα πλεονεκτήματα που απορρέουν από τη χρήση της τεχνολογίας των νανοσωματιδίων πρέπει να μελετάται η τυχόν τοξική δράση των νανοσωματιδίων σε ζωντανούς οργανισμούς, και κυρίως στον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των σωματιδίων, όπως είναι η ιονική ισχύς, το pH, το μέγεθος, το επιφανειακό φορτίο τους, αποτελούν πρόσφορο πεδίο για έρευνα και προσελκύουν όλο και περισσότερο το επιστημονικό ενδιαφέρον σε παγκόσμια κλίμακα.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μέσα στο πλαίσιο και σε συνέχεια των μελετών που εκπονούνται στο Εργαστήριο Χημείας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Πελοποννήσου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρα Ιωάννη Καπόλου. Η εργασία αποτελείται από το θεωρητικό και το πειραματικό μέρος. Στο πρώτο κεφάλαιο του θεωρητικού μέρους της εργασίας, παρατίθενται εισαγωγικές έννοιες σχετικά με τη νανοτεχνολογία και παρατίθενται τα αντικείμενα μελέτης αρκετών ερευνητών σχετικά με αυτή. Στο δεύτερο κεφάλαιο δίνεται ο ορισμός των νανοσωματιδίων, ορισμένα παραδείγματα αυτών και βλέπουμε τη σχέση που συνδέει τα νανοσωματίδια με τα τρόφιμα, τον άνθρωπο και τα είδη κοσμετολογίας. Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά σε μεθόδους χαρακτηρισμού μεγέθους και ποσοτικού προσδιορισμού νανοσωματιδίων, αλλά και σε μεθόδους για τον προσδιορισμό της κατανομής μεγέθους αυτών. Στο τέταρτο κεφάλαιο αναφέρεται η τεχνική της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής και παρουσιάζονται ορισμένοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται με αυτή, ενώ στο πέμπτο κεφάλαιο εκθέτονται αρκετές πειραματικές ανασκοπήσεις της μεθόδου από τη διεθνή βιβλιογραφία. Στο πειραματικό μέρος της εργασίας δίνεται σημασία στα πειράματα που πραγματοποιηθήκαν. Στο πρώτο στάδιο βρέθηκαν ποιες είναι οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου. Ακολούθως υπολογίστηκε ποιος είναι ο γεωμετρικός όγκος του καναλιού της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου. Στο τρίτο στάδιο μελετήθηκε ποια είναι η κινητική συσσωμάτωσης σωματιδίων φιλτραρισμένης κρέμας για καφέ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τον όρο νανοτεχνολογία νοείται ο κλάδος της επιστήμης που περιλαμβάνει την κατασκευή, επεξεργασία και εφαρμογή δομών, συσκευών και συστημάτων ελέγχοντας σχήματα και μεγέθη της νανομετρικής κλίμακας (Ruud *et al.*, 2011). Η νανοτεχνολογία περιλαμβάνει την έρευνα, την ανάπτυξη τεχνολογίας και τον έλεγχο δομών με μέγεθος και σχήμα μεταξύ 1 έως 100 nm (Quintanilla-Carvajal *et al.*, 2010). Πρόκειται για ένα νέο πεδίο τεχνολογίας που έχει ανακύψει τα τελευταία χρόνια.

Η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας σε ιατρικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες, καθώς και σε βιομηχανίες τροφίμων, έχει ελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Χάρη στις αυξημένες απαιτήσεις των καταναλωτών για πιο υγιεινά και ασφαλή τρόφιμα, καθώς και για edώδιμα συστήματα τροφίμων ικανά να περιλάβουν, να προστατέψουν και να ελευθερώσουν λειτουργικές ενώσεις, οι ερευνητές συγκεντρώνουν την προσπάθειά τους στη νανοτεχνολογία για να καλύψουν θέματα που αφορούν στα τρόφιμα και στη θρέψη (Silva *et al.*, 2011). Τα υλικά σε μέγεθος νανομέτρων και η ανάπτυξη της τεχνολογίας ικανή να χειριστεί ή να συγκαλέσει τέτοια υλικά, μπορεί να παρέχει εμπορικές, τεχνολογικές και επιστημονικές ευκαιρίες στο χώρο της βιομηχανίας (Huang *et al.*, 2010).

Η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στον τομέα των τροφίμων μπορεί να ευνοήσει την τροποποίηση μερικών χαρακτηριστικών μακροκλίμακας των τροφίμων όπως είναι η υφή, η γεύση, άλλα αισθητήρια χαρακτηριστικά, η αντοχή του χρώματος, η επεξεργασιμότητα και η σταθερότητα του τροφίμου κατά τη διάρκεια της ζωής του, οδηγώντας παράλληλα στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού νέων προϊόντων. Η νανοτεχνολογία μπορεί να βελτιώσει τη διαλυτότητα στο νερό, τη θερμική σταθερότητα και τη στοματική βιοδιαθεσιμότητα λειτουργικών χημικών ενώσεων (Huang *et al.*, 2010; Mc Clements *et al.*, 2009, 2007).

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στη νανοτεχνολογία, δεν είναι λίγες, ενώ τα επιστημονικά άρθρα που γράφτηκαν, μαρτυρούν τη μεγάλη ποικιλία των θεματικών ενοτήτων που καλύπτει αυτός ο κλάδος. Ο Singh *et al.*(2014) στα πλαίσια της επιστήμης και της ασφάλειας των τροφίμων έχουν προτείνει μεθόδους μέτρησης για την ανίχνευση, το χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση υλικών της νανομετρικής κλίμακας, που έχουν κατασκευαστεί για τρόφιμα. Εστιάζουν στις δυσκολίες που ανακύπτουν κατά την ανίχνευση τεχνολογικά επεξεργασμένων νανοϋλικών σε τρόφιμα και δίνουν ιδιαίτερη σημασία στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τροφίμων. Επίσης παρουσιάζουν τις εφαρμογές αλλά και τους

περιορισμούς των ήδη υπαρχόντων τεχνικών ανάλυσης στην ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των τεχνολογικά επεξεργασμένων νανοϋλικών στα τρόφιμα.

Άλλο άρθρο πραγματεύεται την εφαρμογή γαλακτωμάτων από νανοϋλικά στα τρόφιμα. Η χρήση λοιπόν των νανογαλακτωμάτων χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την κατασκευή συστημάτων που περικλείουν λειτουργικές χημικές ενώσεις, τις προστατεύουν από τη φθορά, ενώ ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών. Τέλος δίνεται σημασία στις μεθόδους παραγωγής, στα υλικά που χρησιμοποιούνται και στις ισχύουσες αναλυτικές τεχνικές για την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό των νανογαλακτωμάτων (Silva *et al.*, 2012).

Οι Loeschner *et al.*(2013) θέλησαν να ανιχνεύσουν και να χαρακτηρίσουν σωματίδια της νανομετρικής κλίμακας αργύρου σε κρέας από κοτόπουλο με τη βοήθεια εξειδικευμένων αναλυτικών τεχνικών, ενώ οι Ramos *et al.* (2014) θέλησαν να χαρακτηρίσουν και να ποσοτικοποιήσουν νανοσωματίδια από άργυρο σε τρόφιμα, που είναι ωφέλιμα για την υγεία (nutraceuticals), αλλά και σε ποτά. Οι Contado *et al.*(2013), με τη βοήθεια της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου καθίζησης θέλησαν να χαρακτηρίσουν το μέγεθος σωματιδίων διοξειδίου του πυριτίου που χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων. Οι Artiaga *et al.*(2015), θέλησαν να μελετήσουν τη μετανάστευση και το χαρακτηρισμό νανοσωματιδίων αργύρου από περιέκτες τροφίμων, λαμβάνοντας υπόψη τις παραμέτρους που επηρεάζουν τη μετανάστευση σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 10/2011.

Οι Lopez-Heras *et al.* (2014) θέλησαν να ασχοληθούν με το χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση νανοσωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου από ρουτίλιο σε προϊόντα κοσμητολογίας και τροφίμων. Κατά την ανάλυση των νανοσωματιδίων δύο προβλήματα προέκυψαν, ο προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους τους και η στοιχειακή ποσοτικοποίησή τους. Οι Mudalige *et al.* (2015), θέλησαν να προσδιορίσουν την κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων χρυσού σε διατροφικά συμπληρώματα. Η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός, η απέκκριση και η τοξικότητα σε ένα βιολογικό σύστημα εξαρτώνται από το μέγεθος των σωματιδίων και ο προσδιορισμός του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους είναι απαραίτητος για τον πλήρη χαρακτηρισμό αυτών. Οι Dan *et al.* (2015) θέλησαν να ασχοληθούν με την ανάλυση νανοσωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου σε αντηλιακά προϊόντα.

Ένας από τους πιο άμεσους τρόπους έκθεσης του ανθρώπου σε σωματίδια της νανομετρικής κλίμακας που απελευθερώνονται στο περιβάλλον είναι το πόσιμο νερό. Οι

Dononan *et al.* (2016) θέλησαν να αναπτύξουν και να εφαρμόσουν ταχείες και αξιόπιστες αναλυτικές μεθόδους για τη μελέτη μετανάστευσης νανοσωματιδίων κατά την επεξεργασία του πόσιμου νερού.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί, πώς επιδρά η θερμοκρασία των 50°C με την πάροδο του χρόνου στην κατανομή μεγέθους των σωματιδίων σε στιγμιαία κρέμα του καφέ, καθώς και ποια μεταβολή προκάλεσε η θερμοκρασία αυτή στο σχήμα και το μέγεθος των σωματιδίων αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: NANOTEΧΝΟΛΟΓΙΑ

2.1. Νανοσωματίδια

Η παρουσία των νανοϋλικών γίνεται ήδη πιο γνωστή σε μια ευρεία ποικιλία προϊόντων και τομέων συμπεριλαμβανομένου της ιατρικής, της κοσμετολογίας, της βιομηχανίας ρούχων, της μηχανικής, της ηλεκτρονικής και των τροφίμων (López-Heras *et al.*, 2014). Νανοϋλικό είναι το φυσικό, τυχαίο ή κατασκευασμένο υλικό που περιέχει σωματίδια σε ελεύθερη μορφή ή σαν ένα σύνολο ή σαν ένα συσσωμάτωμα, όπου για το 50% ή περισσότερο των σωματιδίων μια ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις είναι στο εύρος μεγέθους μεταξύ 1 nm - 100 nm (European Commission, 2011).

Παραδείγματα σχετικών νανοϋλικών αποτελούν τα νανοσωματίδια Ag που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία τροφίμων και τα νανοσωματίδια TiO₂ που χρησιμοποιούνται ως λευκαντικοί παράγοντες σε τρόφιμα. Ο Ag μάλιστα έχει αντιμικροβιακή δράση (Soto-Alvaredo *et al.*, 2013). Στον πίνακα 1 παρατίθενται ορισμένα νανοσωματίδια και η σχετική χρήση αυτών.

Πίνακας 1: Μέταλλα και οξείδια μετάλλων που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα και σε υλικά που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα.

Υλικό	Κατηγοριοποίηση	Χρήσεις
Διοξείδιο του τιτανίου	E171	παράγοντας χρωματισμού (λευκός)
Οξείδια σιδήρου	E172	παράγοντας χρωματισμού (διάφορα χρώματα)
Μεταλλικός άργυρος	E174	χρώμα επισήμανσης σε συσκευασία τροφίμων
Μεταλλικός χρυσός	E175	χρώμα
Διοξείδιο του πυριτίου	E551	αντισυσσωματικός παράγοντας

Πηγή: (Calzolari *et al.*, 2012)

Η νάνο-συσκευασία τροφίμων είναι μια νέα μορφή συσκευασίας, που βασίζεται στα νανοϋλικά και αποτελεί μια από τις περισσότερο αναπτυγμένες μεθόδους στην επιστήμη της

νανοτεχνολογίας. Μπορεί κάλλιστα να αντικαταστήσει τη συμβατική συσκευασία τροφίμων, ως μία ριζική εναλλακτική επιλογή (Huang *et al.*, 2015). Τα νανοσύνθετα πολυμερή μπορούν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως υλικά συσκευασίας τροφίμων και ανάλογα με το σκοπό χρήσης τους μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες (Chaudhry *et al.*, 2008):

- (1) Βελτιωμένη συσκευασία: τα πολυμερή με νανο-πληρωτές έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον χάρη στο ενδεχόμενο τους να αυξάνουν τη διάρκεια ζωής φρέσκων και επεξεργασμένων τροφίμων που συσκευάζονται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα ενώ βελτιώνονται οι ιδιότητες της συσκευασίας (όπως στεγανότητα στην είσοδο του οξυγόνου). Τα νανοσύνθετα πολυμερή μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα του φρέσκου κατεψυγμένου και επεξεργασμένου κρέατος, πουλερικών και θαλασσινών, επιβραδύνοντας την απώλεια υγρασίας, ελαττώνοντας την οξείδωση του λίπους και μειώνοντας τον αποχρωματισμό του τροφίμου, βελτιώνοντας παράλληλα την εμφάνιση του.
- (2) Ένεργος συσκευασία: η ενσωμάτωση νανο-πληρωτών με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση (όπως άργυρος, οξείδιο του ψευδαργύρου, οξείδιο του μαγνησίου) παρατείνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος ενισχύοντας την ποιότητα και την ασφάλεια του τρόφιμου, παρεμποδίζοντας τους παράγοντες που ευνοούν τη μικροβιακή ανάπτυξη (Cushen *et al.*, 2012).
- (3) Έξυπνη συσκευασία: η ενσωμάτωση νανο-αισθητήρων μέσα στα υλικά συσκευασίας διευκολύνει στην ανίχνευση και στον εντοπισμό της κατάστασης που βρίσκεται το τρόφιμο κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση για λόγους ασφαλείας. Χάρη στη δυνατότητα καταγραφής, παρακολούθησης και εντοπισμού εξωτερικών ή εσωτερικών αλλαγών στο περιβάλλον του τρόφιμου, πληροφορείται ο καταναλωτής για την κατάσταση του τρόφιμου.
- (4) Διασπώμενα ή κομποστοποιήσιμα πολυμερή: τα βιοπολυμερή είναι γνωστά για τη μειωμένη μηχανική τους αντοχή, για τη μειωμένη θερμική σταθερότητα, καθώς και για την μειωμένη αντοχή στην είσοδο αερίων. Η ενσωμάτωση νανο-πληρωτών σε νανοσύνθετα βιοπολυμερή υλικά έχει ενισχύσει τις χημικές και φυσικές ιδιότητές τους. Τα νανοσύνθετα βιοπολυμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παράταση της διάρκειας ζωής φρέσκων προϊόντων όπως φρούτα και λαχανικά ελέγχοντας την αναπνευστική ανταλλαγή (Akbari *et al.*, 2007).

Μια άλλη εφαρμογή των νανοϋλικών είναι αυτή στα γαλακτώματα. Τα νανογαλακτώματα είναι ένα από τα πιο ενδιαφέροντα πεδία εφαρμογής από τη στιγμή που δρουν ως φορείς ή συστήματα μεταφοράς για λιπόφιλα συστατικά όπως είναι τα τρόφιμα που φέρουν πρόσθετα που ευνοούν την υγεία του καταναλωτή και προσφέρουν ιατρικό όφελος (nutraceuticals), τα φάρμακα, οι γεύσεις, τα αντιοξειδωτικά και οι αντιμικροβιακοί παράγοντες (Jiahui *et al.*, 2004; Kesisoglou *et al.*, 2007; McClements *et al.*, 2007, Sanguansri and Augustin, 2006; Weiss *et al.*, 2008, Wissing *et al.*, 2004). Τα νανογαλακτώματα αποτελούνται από μια λιπαρή φάση διασκορπισμένη σε μία υγρή συνεχή φάση, όπου κάθε σταγονίδιο ελαίου περιβάλλεται από μία λεπτή διεπιφανειακή στοιβάδα ενός γαλακτωματοποιητή. Τα νανογαλακτώματα παρουσιάζουν καλή σταθερότητα έναντι στη συσσωμάτωση σταγονιδίων και έναντι στο διαχωρισμό λόγω βαρύτητας.

2.2 Νανοσωματίδια και άνθρωπος

Κατά την τελευταία δεκαετία οι νανοτεχνολογίες έχουν επιφέρει σημαντικές καινοτομίες στο χώρο των επιχειρήσεων και στον καταναλωτικό τομέα. Τα κατασκευασμένα νανοσωματίδια έχουν κυριολεκτικά χρησιμοποιηθεί σε εκατοντάδες προϊόντα που βρίσκονται στα ράφια των σούπερ μάρκετ μεταξύ των οποίων είναι τα καλλυντικά, τα προϊόντα προσωπικής περιποίησης και τα τρόφιμα. Παρά το πλήθος των προτερημάτων που προσφέρει η νανοτεχνολογία, δεν πρέπει να αμελούνται τυχόν μειονεκτήματα που ενδέχεται να προκύψουν από αυτήν σε βάρος του περιβάλλοντος, αλλά και της δημόσιας υγείας. Ωστόσο, η επιστημονική κοινότητα ενδιαφέρεται αναφορικά με αυτό το θέμα και πλέον υπάρχει μια ευρύτερη συζήτηση σχετικά με τους κινδύνους των πολλών κατασκευασμένων νανοϋλικών. Πρόσφατα παραδείγματα στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι τα κατασκευασμένα ανόργανα νανοσωματίδια και οι νανοδομές από άνθρακα μπορεί συμπτωματικά ή επί σκοπού να έρθουν σε επαφή με ζωντανούς οργανισμούς, μπορεί να διαταράξουν την φυσιολογική δραστηριότητα και μπορεί να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία και σε ασθένειες (Blasco and Picó, 2011).

Τα ιόντα αργύρου είναι γνωστό πως είναι πολύ τοξικά. Ωστόσο η τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου δεν έχει ακόμα θεμελιωθεί. Τοξικολογικές μελέτες πάντως που έχουν διεξαχθεί σε εργαστηριακή βάση, έχουν δείξει πως τα νανοσωματίδια αργύρου είναι κυτταροτοξικά, γενοτοξικά (genotoxic), αντιπολλαπλασιαστικά (antiproliferative) και πιθανώς καρκινογόνα (Asharani *et al.*, 2009). Ωστόσο τοξικολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ζωντανούς οργανισμούς είναι περιορισμένες και τα συμπεράσματά τους συχνά αντικρουόμενα (Ji *et al.*, 2007; Takenaka, 2001). Επιπροσθέτως, η τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από παραμέτρους όπως το επιφανειακό φορτίο, το μέγεθος, η δομή, η συσσωμάτωση, τα υλικά επικάλυψης ή το pH. Επίσης, άλλοι παράγοντες είναι ο αριθμός των σωματιδίων και η συγκέντρωση μάζας (mass concentration), η περιοχή επιφάνειας (surface area), η στοιχειώδης σύσταση, η σύσταση ηλεκτρολυτών και η ιονική ισχύς του διαλύματος (Levard *et al.*, 2012).

2.3 Νανοσωματίδια και τρόφιμα

Τα τελευταία χρόνια η νανοτεχνολογία και τα νανοσωματίδια έχουν εμφανιστεί σε όλα τα στάδια της παραγωγής τροφίμων. Στις μέρες μας τα νανοσωματίδια, τα

νανογαλακτώματα και τα νανοσύνθετα υλικά είναι διαθέσιμα ως βασικά υλικά παραγωγής τροφίμων. Η νανοτεχνολογία έχει εφαρμοστεί σε διάφορες εφαρμογές παραγωγής τροφίμων. Τα οργανικά νανοσωματίδια έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστήματα μεταφοράς θρεπτικών συστατικών ή τροφίμων που φέρουν πρόσθετα που ευνοούν την υγεία του καταναλωτή και προσφέρουν ιατρικό όφελος, γενικά μικκύλια, νανοσφαίρες ή άλλες μορφές, αποτελούμενα από αποδεκτά υλικά τροφίμων, τα οποία είναι διαθέσιμα ως χαμηλού κόστους χύδην υλικά.

Τα ενεργά συστατικά είναι παγιδευμένα μέσα σε μια σφαίρα νανοσωματιδίου, που τα προστατεύει από ανεπιθύμητες φυσικές ή χημικές αντιδράσεις. Τα μικκύλια είναι συστήματα φραγμένα με μονή στοιβάδα, ενώ τα λιποσώματα είναι συστήματα φραγμένα με διπλή στοιβάδα, γεγονός που τους δίνει τη δυνατότητα να έχουν την ίδια πολικότητα τόσο στο εσωτερικό της σφαίρας όσο και γύρω από αυτή. Όταν το σωματίδιο διαταραχτεί από μια φυσική ή χημική αλλαγή, ανοίγει και απελευθερώνει τα ενεργά συστατικά. Το μέγεθος των μικκυλίων κυμαίνεται τυπικά στο εύρος των 1-100 nm, ενώ το μέγεθος των λιποσωμάτων κυμαίνεται τυπικά στο εύρος των 100-300 nm (Peters *et al.*, 2011).

Τρία είδη νανοσωματιδίων, διακρίνονται σε αυτά που βασίζονται στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στους πολυσακχαρίτες. Τα νανοσωματίδια που βασίζονται στα λιπίδια, είναι μεταξύ των οργανικών νανοσωματιδίων που εφαρμόζονται περισσότερο, από τη στιγμή που παράγονται από φυσικά συστατικά σε μια βιομηχανική κλίμακα και από τη στιγμή που μπορούν να περικλύσουν συστατικά με διαφορετικές διαλυτότητες. Ο όρος λιπίδια χρησιμοποιείται εδώ με μια ευρεία έννοια για να περιγράψει τα φωσφολιπίδια, τα τριγλυκερίδια, τα λιπαρά οξέα, τα στεροειδή και τους κηρούς. Τα κυριότερα νανοσωματίδια που βασίζονται στα λιπίδια και μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα και σε τρόφιμα που φέρουν πρόσθετα που ευνοούν την υγεία του καταναλωτή και προσφέρουν ιατρικό όφελος είναι τα λιποσώματα. Σε εφαρμογές τροφίμων νανοδομημένα λιπίδια χρησιμοποιούνται για να διασπείρουν υδροφοβικό β-καροτένιο σε ροφήματα, να παγιδεύσουν ένζυμα για παραγωγή τυριού και να ενισχύσουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα με βιταμίνες για να αυξήσουν τη διατροφική αξία και να βοηθήσουν στην πέψη εγγενών συστατικών που απαντώνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Peters *et al.*, 2011).

Χρησιμοποιώντας λιποσώματα έχει καταστεί εφικτό να μεταφέρονται λειτουργικά συστατικά (ουσίες που φέρουν πρόσθετα που ευνοούν την υγεία του καταναλωτή και προσφέρουν ιατρικό όφελος, αντιμικροβιακές ουσίες και γεύσεις σε τρόφιμα. Από την

πλευρά των πρωτεϊνών υπάρχουν οι σφαιρικές πρωτεΐνες (όπως οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος) που μπορούν να σχηματίσουν σωματίδια των 40 nm, ενώ το 95% των καζεϊνών είναι φυσικά self-assembled μικκύλια με διάμετρο 50-500 nm. Άλλο παράδειγμα πρωτεΐνης νανοσωματιδίου είναι το νανοσωματίδιο ζελατίνης (Peters *et al.*, 2011).

Οι πολυσακχαρίτες είναι συστατικά που απαντώνται φυσικά σε φυτά (όπως η πηκτίνη, η κόμη γκουάρ), σε ζώα (όπως η χιτοζάνη, ηθειική χονδροητίνη), σε άλγεις (όπως τα άλατα αλγινικού οξέος), σε μικροοργανισμούς (όπως η δεξτράνη). Μέχρι στιγμής η χιτοσάνη είναι ένας φυσικά βιοδιασπώμενος και βιοσυμβατός υδατάνθρακας και αποτελεί έναν από τους πιο πολύτιμους υδατάνθρακες νανοσωματίδιο που εφαρμόζεται σε φαρμακευτικές και βιοϊατρικές εφαρμογές. Τέλος το τροποποιημένο άμυλο χρησιμοποιείται ήδη ως νανοσωματίδιο τροφίμων (Peters *et al.*, 2011).

2.4 Νανοσωματίδια και είδη κοσμετολογίας

Η εφαρμογή των νανοσωματιδίων δεν περιορίζεται μόνο στα τρόφιμα, άλλα επεκτείνεται και σε άλλα προϊόντα και είδη κοσμετολογίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων νανοσωματιδίων αποτελεί το διοξείδιο του τιτανίου. Το διοξείδιο του τιτανίου χρησιμοποιείται σε ενυδατικές κρέμες και σε αντιηλιακά προϊόντα, αφού μάλιστα μπορεί να δράσει σαν ασπίδα απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου (Lopez-Heras *et al.*, 2014)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

3.1 ICP-MS

Ποσοτικές και στοιχειακές αναλύσεις μεταναστεύσιμων νανοϋλικών πραγματοποιούνται με τις τεχνικές: επαγωγικά συνδεδεμένο πλάσμα με φασματοσκοπία μάζας (ICP-MS), με ατομική εκπομπή (ICP-AES) και με οπτική εκπομπή (ICP-OES). Ο υψηλός βαθμός επιλεκτικότητας, ευαισθησίας και ακρίβειας καθιστούν τις τεχνικές αυτές από τις πιο αποτελεσματικές για τον προσδιορισμό ιχνών μεταλλικών ιόντων. Η συγκέντρωση του δείγματος δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, αφού το όριο ανίχνευσης κυμαίνεται μεταξύ του 0,1-10 ppm. Τα αποτελέσματα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την πολυπλοκότητα του δείγματος. Η τεχνική επαγωγικά συνδεδεμένου πλάσματος με φασματοσκοπία μάζας προτιμάται περισσότερο από τις δύο άλλες τεχνικές (ICP-AES και ICP-OES) χάρη στην υψηλή επιλεκτικότητα και ευαισθησία της. Όταν το νανοϋλικό εισέρχεται στο επαγωγικά συνδεδεμένο πλάσμα, τα άτομα της προς ανάλυσης ουσίας παράγουν μία λάμψη αεριοποιημένων ιόντων μέσα στο πλάσμα, τα οποία μετρούνται ως ένας ενιαίος παλμός από τον ανιχνευτή και εμφανίζονται σαν μία ακίδα στο γράφημα (Echegoyen and Nerín, 2013). Στην περίπτωση του επαγωγικά συνδεδεμένου πλάσματος τα δείγματα δεν μπορούν να εισέλθουν κατευθείαν στην πηγή ιόντων, αλλά μάλλον μέσω της βοήθειας συνδεδεμένων τεχνικών, όπως είναι η υδροδυναμική χρωματογραφία (HDC-ICP-MS) (Tiede *et al.*, 2010) και η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου (FFF-ICP-MS) (Loeschner *et al.*, 2013). Η υδροδυναμική χρωματογραφία διαχωρίζει τα σωματίδια με βάση το συντελεστή διάχυσής τους ο οποίος είναι αντιστρόφως ανάλογος από την υδροδυναμική διάμετρό τους σύμφωνα με την εξίσωση των Stokes και Einstein (Huang *et al.*, 2015).

3.2 Τεχνικές μικροσκοπίας

Οι ιδανικές μεθοδολογίες για την ανίχνευση και την οπτικοποίηση νανοσωματιδίων για διάφορες ιδιότητες όπως το μέγεθος, το σχήμα, η δομή, η διασπορά και η κατάσταση θρόμβωσης είναι κυρίως οι τεχνικές ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας. Οι τεχνικές ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας που βασίζονται στη χρήση επιταχυνόμενων ηλεκτρονίων σαν

μια πηγή φωτισμού, παρουσιάζουν καλύτερη ανάλυση σε σχέση με την κοινή μικροσκοπία (Huang *et al.*, 2015).

3.2.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται μέσω ενός δείγματος, για να ληφθεί μια φωτογραφία που παρέχει δύο διαστάσεων πληροφορίες για νανοσωματίδια δηλαδή το σχήμα, τη μορφολογία, την κατανομή μεγέθους, την ομοιομορφία και το βαθμό συσσωμάτωσης τους με ανάλυση που φτάνει τα 0,1 nm (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης υψηλής ανάλυσης) (Llorens *et al.*, 2012a). Παρόλα αυτά υγρά δείγματα δεν μπορούν να μπουν στο θάλαμο του μικροσκοπίου για αυτό και απαιτείται ειδική προκατεργασία του δείγματος (Mavrocordatos *et al.*, 2007). Όσον αφορά τα διαλύματα, η αφυδάτωση θα μπορούσε να προκαλέσει ανεπιθύμητη συσσωμάτωση των σωματιδίων και αλλαγές στις επιφανειακές ιδιότητές του (Huang *et al.*, 2015).

3.2.2 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) μια συγκεντρωμένη ακτίνα ηλεκτρονίων αλληλεπιδρά με άτομα στην επιφάνεια του δείγματος και με τα δευτερογενή ηλεκτρόνια του, παράγοντας οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, τα οποία ανιχνεύονται σχηματίζοντας έτσι τη φωτογραφία του δείγματος. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης έχει χαμηλότερη ανάλυση απ' ό,τι το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, όμως έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να δείχνει την επιφανειακή τοπογραφία και τη σύνθεση του δείγματος. Η συσκευή του μικροσκοπίου σάρωσης με τους ανιχνευτές ικανούς να άγουν σε υψηλό ή χαμηλό κενό (~ 2 Torr) είναι χρήσιμοι για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων (Llorens *et al.*, 2012b). Η επιφάνεια του δείγματος χρειάζεται να είναι αγωγίμη, έτσι πρέπει να είναι καλυμμένη με μια στρώση αγωγίμου υλικού, αλλά αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια πληροφορίας. Η εικονική απεικόνιση νανοσωματιδίων στη φυσική τους κατάσταση είναι κρίσιμη για τη μελέτη τους με καμία βέβαια προκατεργασία δεν είναι εφικτό να αποφευχθούν εντελώς οι παρεμβολές που προκύπτουν από την ξήρανση και την προετοιμασία του δείγματος. Αυτές οι παρεμβολές μπορούν να αποφευχθούν με τη χρήση της περιβαλλοντικής μικροσκοπίας σάρωσης (ESEM) που επιτρέπει στα δείγματα να απεικονίζονται στη φυσική τους κατάσταση, χωρίς επικάλυψη ή προκατεργασία κάτω από μια μεταβλητή υγρασία έως και 75% (Doucet *et al.*, 2005).

3.3 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

Από τη στιγμή που το μέγεθος, το φορτίο και οι φυσικοχημικές ιδιότητες αποτελούν τυπικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, χρωματογραφικές τεχνικές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό τους. Στην περίπτωση της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC) τα μόρια διαχωρίζονται κυρίως με βάση το σχήμα τους. Τα μεγαλύτερα μόρια εκλούνται γρηγορότερα από τα μικρότερα. Κάνοντας βαθμονόμηση με πρότυπα διαλύματα μάζας είναι δυνατό να υπολογιστεί η μοριακή μάζα συστατικών όμοιας χημικής δομής (αλλά πρέπει να δοθεί προσοχή στο γεγονός ότι η έκλυση μπορεί να επηρεαστεί από το σχήμα της ένωσης) (Peters *et al.*, 2011).

3.4 Σκέδαση φωτός πολλαπλής γωνίας

Μία από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και το χαρακτηρισμό της κατανομής μεγέθους νανοσωματιδίων είναι η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου (FFF). Είναι μια τεχνική που αφ' ενός διαχωρίζει σωματίδια διαφορετικών μεγεθών, αφ' ετέρου εάν συνδυαστεί με κατάλληλους ανιχνευτές παρέχει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με αυτά. Ένας από τους ανιχνευτές που συνδυάζεται με τη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου είναι ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας (Multi Angle Light Scattering, MALS). Ο ανιχνευτής αυτός παρέχει στοιχεία σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων (ακτίνα σωματιδίου). Αυτή η μη καταστροφική τεχνική ανίχνευσης κάνει χρήση μιας ακτίνας λέιζερ η οποία διέρχεται από ένα κελί ροής μέσα από το οποίο διέρχονται τα σωματίδια. Το λέιζερ που προσπίπτει επάνω στα σωματίδια σκεδάζεται προς διάφορες κατευθύνσεις, ενώ από γύρω είναι τοποθετημένες σε γωνία διαφορετικών μοιρών φωτοδιόδοι που μετράνε ταυτόχρονα την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός. Μετρώντας λοιπόν τη γωνιακή εξάρτηση του σκεδαζόμενου φωτός είναι δυνατό να υπολογιστεί η ακτίνα των σωματιδίων (Wyatt, 1998).

3.5 Μονοφασική χρωματογραφία πεδίου

Η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό αναλυτών με υψηλό εύρος μοριακών μαζών, από μακρομόρια έως νανοσωματίδια και σωματίδια με μέγεθος μικρομέτρων (όπως κύτταρα). Η βασική διαμόρφωση των πιο κοινών συσκευών μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου βασίζεται σε ένα ορθογώνιο, επίπεδο κανάλι που αποκτάται κόβοντας ένα πλαστικό, λευκό φύλλο που

τοποθετείται μεταξύ δύο επίπεδων τοιχωμάτων. Οι διαστάσεις αυτής της λωρίδας-καναλιού είναι 50 cm μήκος, 2 cm πλάτος, ενώ το ύψος του καναλιού ποικίλει μεταξύ 50 μm έως 500 μm . Αντίθετα από την υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου δεν έχει στάσιμη φάση, αποκλείοντας έτσι τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλυτή και της στάσιμης φάσης (Peters *et al.* 2011).

Από την είσοδο, ένας υγρός φορέας (κινητή φάση) προωθείται μέσα στο κανάλι δημιουργώντας ένα παραβολικό μέτωπο ροής, όπως θα συνέβαινε αν κινείτο μέσα σε έναν τριχοειδή σωλήνα, προωθώντας τα δείγματα προς την έξοδο. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται από την αλληλεπίδραση των συστατικών του δείγματος με ένα εξωτερικά παραγόμενο πεδίο, το οποίο είναι κάθετο στη ροή της κινητής φάσης. Οι προς ανάλυση ουσίες κινούνται με τη βοήθεια της κάθετης αυτής δύναμης προς την κάτω πλευρά του καναλιού (κάτω επίπεδο τοίχωμα), αλλά τα μικρού μεγέθους σωματίδια διαχέονται πίσω στο κέντρο του καναλιού πιο γρήγορα. Από τη στιγμή που η ροή της κινητής φάσης είναι υψηλότερη στο κέντρο του καναλιού, τα μικρού μεγέθους σωματίδια εκλούνται νωρίτερα από τα μεγαλύτερου μεγέθους (Peters *et al.*, 2011).

Στο τέλος του καναλιού τα σωματίδια μεταφέρονται σε έναν ανιχνευτή (παραδείγματος χάρη ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους ή ανιχνευτής σκέδασης φωτός) ή σε μια συσκευή συλλογής δείγματος για περαιτέρω ανάλυση (Peters *et al.*, 2011).

Ο τύπος του πεδίου (δύναμη) διαφέρει μεταξύ των τεχνικών μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου και προσδιορίζει ποια ιδιότητα των σωματιδίων είναι υπεύθυνη για την κατακράτηση και το διαχωρισμό τους. Η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ροής (AF^4) εφαρμόζει μία κάθετη δευτερογενή ροή και ο διαχωρισμός εξαρτάται από το συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων. Η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου καθίζησης ($SdFFF$) χρησιμοποιεί μια φυγόκεντρο δύναμη, οδηγώντας στο διαχωρισμό σύμφωνα με τον όγκο των σωματιδίων και σύμφωνα με την επιπλέον μάζα του σωματιδίου. Άλλοι τύποι πεδίων περιλαμβάνουν ηλεκτρικά πεδία (ηλεκτρική μονοφασική χρωματογραφία) και μαγνητικά πεδία (μαγνητική μονοφασική χρωματογραφία). Επιπλέον υπάρχει και η θερμική μονοφασική χρωματογραφία. Η AF^4 χρωματογραφία είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο (von der Kammer *et al.*, 2011).

Οι δύο τύποι της F^4 χρωματογραφίας είναι η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου συμμετρικής ροής (SF^4) και η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής (AF^4).

Ο διαχωρισμός τους προκύπτει από το διαφορετικό τρόπο παραγωγής του κάθετου πεδίου στη ροή του διαλύτη.

Στη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου συμμετρικής ροής η ροή του διαλύτη είναι ίδια και στην είσοδο και στην έξοδο του καναλιού. Το επάνω τοίχωμα του καναλιού είναι διαπερατό και η αντίστροφη ροή παράγεται από έναν υγρό διαλύτη που περνά μέσα από αυτό και τη μεμβράνη από μια ανεξάρτητη αντλία. Το δείγμα εισάγεται στο κανάλι μαζί με το διαλύτη ροής. Μετά από την εισαγωγή του δείγματος ακολουθεί μια περίοδος ηρεμίας και παύσης της ροής, όπου τα σωματίδια ισορροπούν υδροδυναμικά με την αντίστροφη ροή. Έπειτα η ροή του διαλύτη ξεκινάει ξανά, τα σωματίδια κινούνται μέσα στο κανάλι και διαχωρίζονται (von der Kammer *et al.*, 2011).

Στη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής το επάνω τοίχωμα του καναλιού είναι μη διαπερατό και η αντίστροφη ροή επιτυγχάνεται από μια πλεονάζουσα ροή στην είσοδο του καναλιού. Μετά από την ένεση του δείγματος ακολουθεί μια περίοδος συγκέντρωσης όπου μια καλά ισορροπημένη αντίστροφη ροή παράγεται από την είσοδο και την έξοδο του καναλιού. Η ένεση ή η συγκέντρωση του δείγματος τεχνικά πραγματοποιείται από δύο διαφορετικές διαδικασίες ανάλογα με τον κατασκευαστή της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου. Κατά την πρώτη διαδικασία το δείγμα εισάγεται ανεξάρτητα, από ένα τρίτο άνοιγμα στη ζώνη συγκέντρωσης. Κατά τη δεύτερη διαδικασία το δείγμα εισάγεται μαζί με την εισαγωγική ροή (από την είσοδο του καναλιού). Εδώ η ροή που είναι για τη συγκέντρωση του δείγματος, εισάγεται στα δύο τρίτα της φοράς του ρεύματος του καναλιού με μια ταχύτητα ροής, την ροή συγκέντρωσης (focus flow) μαζί με την ροή του ανιχνευτή (von der Kammer *et al.*, 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΔΙΟΥ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗΣ ΡΟΗΣ - ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον της χρήση της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής ως μίας τεχνικής για το διαχωρισμό και το χαρακτηρισμό μακρομορίων και κολλοειδών σωματιδίων. Τα μακρομόρια συχνά παρουσιάζουν ένα μεγάλο βαθμό πολυδιασποράς και/ή μία τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα. Συνεπώς, η κλασματοποίηση του μεγέθους και ο χαρακτηρισμός του είναι σημαντικά για τη μελέτη αυτών των σωματιδίων. Η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ή πιο κοινώς μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κλασματοποίηση και το χαρακτηρισμό μακρομορίων και κολλοειδών σωματιδίων σε ένα μεγάλο εύρος μεγέθους (περίπου από 2 nm έως > 1 μm). Η μέθοδος αυτή παρέχει την δυνατότητα να κλασματοποιηθούν μακρομόρια με $M_r > 10^7$ gr/mol. Πλεονέκτημα της μεθόδου, αποτελεί το γεγονός ότι αυτή δεν περιλαμβάνει στατική φάση και έτσι περιορίζονται οι δυνάμεις διάτμησης. Επιπλέον, το φιλτράρισμα πριν από την ένεση δεν είναι απαραίτητο (Nilsson, 2013).

Δύο από τις τεχνικές ανίχνευσης που συνδυάζονται πιο συχνά με τη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής είναι ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός (laser) πολλαπλής γωνίας και ο ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους (Schmidt *et al.*, 2009).

Από τις τεχνικές που μπορούν να λειτουργήσουν κατ' ευθείαν με υγρά δείγματα, οι πιο διαδεδομένες είναι αυτές που βασίζονται στη σκέδαση φωτός λέιζερ. Από αυτές εκείνες που χρησιμοποιούνται πιο πολύ είναι η φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS) ή η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Πρόκειται για τεχνικές που είναι αρκετά απλές στη χρήση, γρήγορες και σχετικά χαμηλού κόστους. Αν και η μέθοδος του DLS μπορεί να παρουσιάσει αξιόπιστα αποτελέσματα όταν έχει να προσδιορίσει μέγεθος σωματιδίου σε δείγματα που περιέχουν μόνο ένα μέγεθος σωματιδίων (μονοδιασπαρμένα) μειονεκτεί στο να εμφανίσει αξιόπιστα αποτελέσματα σε δείγματα με διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων (πολυδιασπαρμένα). Για παράδειγμα οι Calzolari *et al.*, (2011) έχουν δείξει ότι χρησιμοποιώντας την τεχνική του dynamic light scattering για να μετρήσουν ένα μείγμα νανοσωματιδίων χρυσού 5, 15 και 45 nm πρακτικά φαίνονται μόνο τα σωματίδια χρυσού των 45 nm. Αυτό συμβαίνει διότι το σκεδαζόμενο φως που προέρχεται από την επιφάνεια του μεγαλύτερου σε μέγεθος νανοσωματιδίου επικαλύπτει το σκεδαζόμενο φως των μικρότερων σε μέγεθος σωματιδίων

και έτσι δεν ανιχνεύεται ξεχωριστά το σκεδαζόμενο φως μικρότερων σωματιδίων (Calzolari *et al.*, 2012).

Ο ανιχνευτής ορατού υπεριώδους (UV-Vis detector) χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με τη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου για προσδιορισμούς δειγμάτων, παρόλο που η ευαισθησία του περιορίζεται στις συγκεντρώσεις της τάξης των mg/L και η επιλεκτικότητά του είναι σχετικά χαμηλή (ακόμα και εάν ολόκληρα φάσματα είναι καταχωρημένα) (Laborda *et al.*, 2016). Ο ανιχνευτής ορατού υπεριώδους σε συνδυασμό με το επαγωγικά συνδεδεμένο πλάσμα με φασματοσκοπία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό νανοσωματιδίων αργύρου σε κρέας κοτόπουλου που έχει υποστεί ενζυμική χώνευση (Loeschner *et al.*, 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΠΕΔΙΟΥ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗΣ ΡΟΗΣ

Οι εφαρμογές της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής αυξάνουν σήμερα σε παγκόσμια κλίμακα. Παράλληλα δημοσιεύονται όλο και περισσότερα άρθρα σχετικά με τη μέθοδο αυτή. Αυτό συμβαίνει διότι η ίδια έχει τη δυνατότητα να διαχωρίζει κολλοειδείς ενώσεις και μακρομόρια αρκετά μικρού μεγέθους (της τάξεως των νανομέτρων και μικρομέτρων) σε ένα αρκετά μεγάλο εύρος διαστάσεων (από ορισμένα νανόμετρα έως μερικά μικρόμετρα). Εδώ ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένες εφαρμογές της μεθόδου.

Σε μία εργασία οι Dou *et al.* (2016) ασχολήθηκαν με το διαχωρισμό και το χαρακτηρισμό του πλάσματος κρόκου αυγού από κότα χρησιμοποιώντας την εν λόγω μέθοδο μαζί με τους ανιχνευτές ορατού υπεριώδους, σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας και φθορισμού (AF4-UV-MALS-FS). Με τη χρήση της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής διαχωρίστηκαν τρία κύρια συστατικά του πλάσματος κρόκου αυγού, διαλυτές πρωτεΐνες, χοληστερόλη LDL και τα συσσωματώματα αυτών βάσει του υδροδυναμικού τους μεγέθους.

Οι Ramos *et al.* (2014) εκτιμήσαν την εφαρμοσιμότητα της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής με επαγωγικά συνδεδεμένο πλάσμα και φασματοσκοπία μάζας (AF⁴-ICP-MS) για το διαχωρισμό, χαρακτηρισμό και ποσοτικοποίηση νανοσωματιδίων αργύρου σε σύνθετα τροφοφάρμακα και δείγματα αφεψημάτων.

Οι Loeschner *et al.* (2015) εφάρμοσαν τη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής με επαγωγικά συνδεδεμένο πλάσμα και φασματοσκοπία μάζας (AF⁴-ICP-MS) για την ποσοτική ανάλυση νανοσωματιδίων αργύρου σε κοτόπουλο έπειτα από ενζυμική προεργασία του δείγματος.

Σε μια άλλη εργασία οι Wahlund *et al.* (2011) χρησιμοποίησαν τη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου με τους ανιχνευτές σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας και δείκτη διάθλασης για τον διαχωρισμό και τον χαρακτηρισμό αμύλου από διαφορετική βοτανική προέλευση. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με βάση την υδροδυναμική τους διάμετρο. Δείγματα αμύλου έδωσαν δύο μεγέθη πληθυσμών αντιπροσωπεύοντας κυρίως την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη με μια αλληλοεπικαλυπτόμενη περιοχή όπου η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη πιθανώς εκλούνται μαζί. Μεγάλες διαφορές βρέθηκαν στις σχετικές ποσότητες των δύο πληθυσμών όσον αφορά τη μοριακή μάζα και την υδροδυναμική

διάμετρο τους, που εξαρτώνται από την προέλευση του αμύλου αλλά και από τις διαφορετικές ποικιλίες.

Τα συνθετικά νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται σε μια μεγάλη ποικιλία καταναλωτικών προϊόντων προάγοντας οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός, η αποβολή και η τοξικότητα των νανοσωματιδίων σε ένα βιολογικό σύστημα εξαρτάται από το μέγεθος του σωματιδίου. Για τον πλήρη χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων αυτών είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους. Έτσι οι Mudalige *et al.*, (2015) χρησιμοποίησαν τη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής μαζί με επαγωγικά συνδεδεμένο πλάσμα και φασματοσκοπία μάζας για τον προσδιορισμό της κατανομής μεγέθους νανοσωματιδίων χρυσού σε διαιτητικά συμπληρώματα.

Η χρήση προϊόντων νανοτεχνολογίας διαδίδεται όλο και περισσότερο. Με τη συνεχή αυτή διάδοση της χρήσης τους, προκύπτει το ερώτημα του ποια θα είναι τα αποτελέσματα της παρουσίας των αντιμικροβιακών προϊόντων όπως νανοσωματίδια αργύρου, στο υδάτινο περιβάλλον. Συνδυάζοντας διαφορετικές τεχνικές (μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής με single particle επαγωγικά συνδεδεμένο πλάσμα και με φασματοσκοπία μάζας και ανιχνευτή ορατού υπεριώδους, AF4-spICP-MS-UV-VIS) μελετήθηκε η διαδικασία συσσωμάτωσης νανοσωματιδίων αργύρου σε τεχνητό θαλασσινό νερό (António *et al.*, 2015).

Τα χαρακτηριστικά της κατακράτησης κολλοειδών, η ανάκτηση και η κατανομή μεγέθους προτύπων μακρομορίων και φυσικά διαλυμένης οργανικής ύλης (DOM) εξετάστηκαν συστηματικά χρησιμοποιώντας τη μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής με τη χρήση μεμβρανών διαφορετικών μεγεθών και διαφορετικών διαλυμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα polystyrene sulfonate (PSS) γνωστού μοριακού βάρους για να προσδιοριστούν η διάχυση (διαπερατότητα permeation) και τα ποσοστά ανάκτησης τους με μεμβράνες διαφορετικών ονομαστικών μοριακών βαρών με το σύστημα της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής (Zhou and Guo, 2015).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της πειραματικής αυτής εργασίας είναι:

- 1) να βρεθεί ποιες είναι οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος της μονοφασικής χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής,
- 2) να προσδιοριστεί ποιος είναι ο γεωμετρικός όγκος του καναλιού της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου
- 3) να μελετηθεί η κινητική συσσωμάτωσης των σωματιδίων από κρέμα για καφέ.

Διεξοδικότερα μελετήθηκε ποιες θα είναι οι συνθήκες εκείνες, χρόνου και ροής που θα χρησιμοποιηθούν για τον καλλίτερο διαχωρισμό και κλασματοποίηση των σωματιδίων διαφορετικών μεγεθών δειγμάτων από πολυμερή και latex με την τεχνική της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής. Δεύτερον με τη χρήση πρότυπων δειγμάτων πολυμερών γνωστής ονομαστικής διαμέτρου και γνωστών άλλων παραμέτρων (όπως ο χρόνος έκλουσης των σωματιδίων) προσδιορίστηκε με τη βοήθεια μαθηματικών σχέσεων ο γεωμετρικός όγκος της στήλης του συστήματος της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου. Γνωρίζοντας το γεωμετρικό όγκο της στήλης μπορούμε με μια πειραματική διαδικασία να υπολογίσουμε άλλες άγνωστες παραμέτρους. Επιπροσθέτως επαληθεύτηκε εάν τα αποτελέσματα μέτρησης της διαμέτρου των πρότυπων δειγμάτων πολυμερών με το όργανο της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ταυτίζονται με τα αποτελέσματα που παρουσίασε το μηχάνημα Zetasizer. Τρίτον μελετήθηκε ποια ήταν η επίδραση του χρόνου θέρμανσης στους 50° C στα σωματίδια κρέμας για καφέ , δηλαδή ποιες είναι οι μεταβολές στο σχήμα και στο μέγεθος των σωματιδίων (όπως συσσωμάτωση σωματιδίων, αλλαγή στο σχήμα των σωματιδίων).

Υλικά, όργανα και μεθοδολογία

Υλικά και όργανα

Για τη διεκπεραίωση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Wyatt Eclipse της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου και το μηχάνημα Astra ως ανιχνευτής σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας. Μηχάνημα μέτρησης του σκεδαζόμενου φωτός ZetasizerZS.

Κυψελίδα για το μηχάνημα του ZetasizerZS του 1 cm. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Μembrάνη αναγεννημένης κυτταρίνης (5kDa) για το κανάλι της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου. Συσκευή για την παραγωγή υπερκάθαρου νερού (3D) της εταιρίας ELGA και λουτρό υπερήχων για την αποφυγή της συσσωμάτωσης των σωματιδίων στο προς ανάλυση δείγμα. Συσκευή διήθησης του υπερκάθαρου νερού. Φίλτρο με διάμετρο πόρων του 0,1 μm για τη συσκευή διήθησης του υπερκάθαρου νερού. Πρότυπα δείγματα γνωστής ονομαστικής διαμέτρου PMMA Monodispers μεγέθους 0,25 μm, titanium dioxide μεγέθους σωματιδίων 0,45 μm και Polystyrene monodisperse μεγέθους σωματιδίων 1,05 μm και τα τρία ήταν δείγματα της εταιρείας Polyscience Inc. Περιέκτες για την αποθήκευση των δειγμάτων για ανάλυση. Σύριγγα για ένεση του δείγματος της εταιρίας Hamilton. Αντλία και ανιχνευτής συστοιχίας διόδων της εταιρίας Shimadzu. Φίλτρο διήθησης με πόρους του ενός μm για τη διήθηση των σωματιδίων της κρέμας για καφέ. Αναλυτικός ζυγός. Μεταλλική σπάτουλα για τη ζύγιση χημικών ενώσεων. Σιφόνιο μετρήσεως των 10 ml. Θερμαντικός αναδευτήρας. Ποτήρι ζέσεως των 100 ml. Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml. Ξηραντήρας. Στιγμαία κρέμα για καφέ (coffee creamer). Υδατόλουτρο θέρμανσης της εταιρίας Julabo

Μεθοδολογία

1) Κατά το 1^ο πειραματικό μέρος χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα latex πολυμερών για να βρεθούν οι παραμετρικές τιμές χρόνου και ροής που θα χρησιμοποιούνται για την καλλίτερη, δυνατή επίτευξη διαχωρισμού των σωματιδίων της στιγμιαίας κρέμας για καφέ αλλά και των ίδιων των πολυμερών. Αρχικά δημιουργήθηκαν 3 διαλύματα κολλοειδών με τις διαμέτρους 0,25 μm, 0,45 μm και 1,05 μm αντιστοίχως. Τα δείγματα πριν από την είσοδό τους στο μηχάνημα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 5-10 λεπτά. Αυτή η ενέργεια έγινε προκειμένου να έχουμε καλλίτερη διασπορά των σωματιδίων στο διάλυμα, αλλά και να αποφευχθεί η συσσωμάτωση των σωματιδίων. Έπειτα με τη χρήση της σύριγγας πραγματοποιείται η ένεση του εκάστοτε δείγματος στο loop του μηχανήματος με χωρητικότητα 20 μm.

Το πρόγραμμα Wyatt Eclipse του υπολογιστή περιέχει κάποιες κενές θέσεις στις οποίες θα μπουν οι παραμετρικές τιμές χρόνου και ροής. Το πρόγραμμα του υπολογιστή που συνδέεται με το μηχάνημα δίνει τις ενέργειες elution, focus, focus + inject και elution + inject. Με τον κατάλληλο συνδυασμό αυτών των ενεργειών σε συνδυασμό με το χρόνο της κάθε ενέργειας και της ροής του διαλύτη μπορεί να πραγματοποιηθεί κλασματοποίηση των

διαφόρων σωματιδίων του δείγματος. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι συνθήκες χρόνου και ροής της 1^{ης} ένεσης που πραγματοποιήθηκε.

Πίνακας 2: Οι συνθήκες χρόνου και ροής για την ανάλυση του δείγματος latex με διάμετρο 0,25 μm .

Ενέργεια	Χρόνος (min)	Ροές (ml/min)
Elution	1	1 ml/min
Focus + inject	2	-
Focus	5	-
Elution	20	1 ml/min
Σύνολο	28	-

Η συνολική ροή του συστήματος είναι συνάρτηση της ροής του ανιχνευτή (detector flow) που ήταν 2 ml/min, της ροής συγκέντρωσης (focus flow) που ήταν 1,5 ml/min και της ροής της ένεσης του δείγματος (injection flow) που ήταν 0,4 ml/min.

Σκοπός ήταν το χρωματογράφημα να έχει διαχωρισμένες καλά κορυφές, η κάθε μία που θα αντιστοιχούσε σε διαφορετικό μέγεθος σωματιδίου. Έτσι με αυτό τον τρόπο αλλάζοντας τους αριθμούς του χρόνου και της ροής των παραπάνω ενεργειών τελικά καταλήγουμε να πάρουμε ένα χρωματογράφημα με καλά διαχωρισμένες κορυφές.

Η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την παραλαβή χρωματογραφήματος με διαχωρισμένες κορυφές μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών επαναλήψεων με διάφορες τιμές χρόνου και ροής.

Ύστερα από αρκετές επαναλήψεις με τη δοκιμή διαφόρων συνθηκών χρόνου και ροών καταλήξαμε σε ποια μέθοδο παρατηρείται καλός διαχωρισμός των κορυφών του χρωματογραφήματος και μάλιστα σε μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων. Οι παραμετρικές τιμές χρόνου και ροής της συγκεκριμένης μεθόδου φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Κατάλληλες συνθήκες χρόνου και ροών για το διαχωρισμό των κορυφών σε μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων.

Ενέργεια	Χρόνος (min)	Ροές (ml/min)
Elution	1	1 ml/min
Focus	3	-
Focus + inject	3	-
Focus	5	-
Elution	30	1 ml/min
Σύνολο	42	-

Η ροή του ανιχνευτή (detector flow) ήταν 1 ml/min, η ροή συγκέντρωσης (focus flow) ήταν 3 ml/min και η ροή της ένεσης του δείγματος (injection flow) ήταν 0,2 ml/min. Μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των σωματιδίων ήταν η ροή του focus flow που ήταν 3 ml/min.

Οι τελευταίες συνθήκες λοιπόν εφαρμόστηκαν για το διαχωρισμό των κορυφών δείγματος κρέμας για καφέ που δεν είχε φιλτραριστεί και για το διαχωρισμό των κορυφών φιλτραρισμένης κρέμας καφέ που έχει αναμιχθεί με βραστό νερό. 2,5 gr κρέμας καφέ ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml. Συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με 3D απεσταγμένο νερό. Έπειτα ακολούθησε το φιλτράρισμα με τη βοήθεια της σύριγγας και 1 ml φιλτραρισμένης ουσίας τοποθετήθηκε σε έναν πλαστικό περιέκτη. Προστέθηκαν με το σιφώνιο 9 ml 3D νερού που έβρασε σε ποτήρι ζέσεως στον θερμαντικό αναδευτήρα, μέσα στο vial μαζί με το 1ml της φιλτραρισμένης ουσίας. Αφού ανακινήθηκε το δείγμα, πραγματοποιήθηκε η ένεση της ουσίας μέσα στο μηχάνημα της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου.

2) Κατά το 2^ο πειραματικό μέρος ήταν αναγκαία η βαθμονόμηση του οργάνου της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου, αλλά και η εύρεση του γεωμετρικού όγκου του μηχανήματος. Η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πρότυπων δειγμάτων latex και πολυμερών των 0,25, 0,45 και 1,05 μm . Αφού τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο των υπερήχων για 5-10 λεπτά, ακολούθησε η ένεση στο μηχάνημα της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου. Θέλοντας να επαληθεύσουμε το μέγεθος της διαμέτρου των σωματιδίων τα δείγματα αναλύθηκαν και με το Zetasizer. Πιο συγκεκριμένα μια ποσότητα δείγματος τοποθετήθηκε σε μια πλαστική κυψελίδα και ακολούθησε η ανάλυση με το Zetasizer. Τέλος γνωρίζοντας τους χρόνους έκλουσης των δειγμάτων με τους κατάλληλους υπολογισμούς επαληθεύουμε το μέγεθος του γεωμετρικού όγκου.

Ο τύπος που χρησιμοποιείται για την εύρεση της διαμέτρου των σωματιδίων που αναλύθηκαν με το μηχάνημα της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής είναι ο παρακάτω:

$$d = \frac{2 \cdot k \cdot T \cdot V^0}{\pi \cdot \eta \cdot F_{cr} \cdot w^2} \cdot \frac{t_R}{t_0}$$

όπου

$$k = 1.23 \cdot 10^{-38} \text{ J K}^{-1}$$

$$T = 300 \text{ K}$$

$$V^0 = 1.5 \text{ cm}^3$$

$$\eta = 0.85 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$$

$$F_{cr} = 1 \text{ cm}^3/\text{min}$$

$$w = 350 \cdot 10^{-6} \text{ m}$$

t_R = ο χρόνος της δεύτερης κορυφής ή της τρίτης

t_0 = ο χρόνος της πρώτης κορυφής (void peak).

Το κλάσμα πριν τους χρόνους είναι ίσο με $2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m}$.

Με τις κατάλληλες αντικαταστάσεις των χρόνων της πρώτης κορυφής (void peak) και το χρόνο της δεύτερης ή τρίτης κορυφής υπολογίζονται οι τιμές των διαμέτρων των

σωματιδίων για τα χρωματογραφήματα που πήραμε από το μηχάνημα της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής. Ο ίδιος τύπος χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση του γεωμετρικού όγκου γνωρίζοντας βέβαια άλλες γνωστές παραμέτρους.

3) Κατά το 3^ο πειραματικό μέρος μελετήθηκε κινητικά ποια ήταν η επίδραση της θερμοκρασίας των 50 °C στο μέγεθος και στο σχήμα των σωματιδίων που παρέμειναν στην κρέμα μετά από το φιλτράρισμα. Μελετήθηκε λοιπόν η κινητική των συγκεκριμένων σωματιδίων.

Πιο συγκεκριμένα παρασκευάζεται σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml κολλοειδές διάλυμα 1% από στιγμιαία κρέμα για καφέ. Αφού τα τοποθετήσω σε 4 vials φιλτράρω το καθένα και μπαίνουν τα φιλτραρισμένα πλέον διαλύματα σε 4 νέα vials. Τα 4 αυτά vials παραμένουν σε ζεστό υδατόλουτρο των 50°C για 20-30 λεπτά μέχρι να σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία τους. Αφού σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία πατάω το χρονόμετρο και κάνω ένεση από ένα vial στο μηχάνημα της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου. Ακολουθώ όταν πραγματοποιηθεί η ένεση κρατάω δεύτερο χρόνο και κάνω τη δεύτερη ένεση. Με αυτό τον τρόπο συνεχίζω και για τις επόμενες 2 ενέσεις. Οι χρόνοι που κάνω τις ενέσεις παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Χρόνοι που πραγματοποιήθηκαν οι τέσσερις ενέσεις για την κινητική της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ.

Ένεση	Χρόνος (min)
1 ^η ένεση	0
2 ^η ένεση	100
3 ^η ένεση	194
4 ^η ένεση	277

Στη συνέχεια κρατάω ένα vial και το τοποθετώ σε ξηραντήρα μέχρι να μείνει στον πάτο του περιέκτη ξηρό υπόλειμμα στιγμιαίας κρέμας για καφέ. Έπειτα αυτό το ξηρό υπόλειμμα

μεταφέρεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του σχήματός του.

Πρέπει να αναφερθεί ότι οι ενέσεις που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη της κινητικής συσσωμάτωσης των σωματιδίων αναλύθηκαν από τον ανιχνευτή της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου (ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους) και έπειτα από τον DLS ανιχνευτή. Άρα για την κινητική χρησιμοποιήθηκαν 3 μηχανήματα για την εξαγωγή αποτελεσμάτων: η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής, ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας (Astra) και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για να προσδιοριστεί το σχήμα και το μέγεθος των σωματιδίων έπειτα από θέρμανση στους 50° C.

Αποτελέσματα

7/8/2016 17:49:54 1 / 1

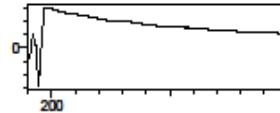
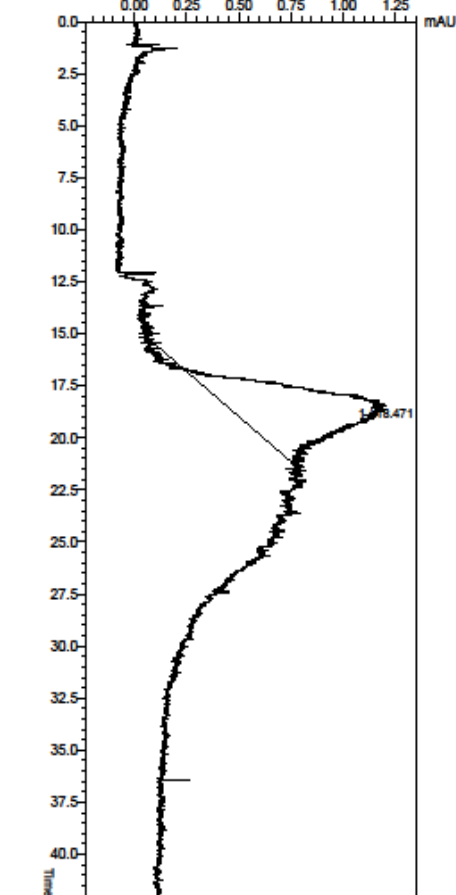
==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\filtered cream 1% 2 (2016-05-31_15-47).lod

PDA Ch1 280nm 4nm

Peak# : 1
Retention Time : 18.471



Spectrum Index Report

Εικόνα 1: Χρωματογράφημα της κρέμας καφέ που δεν έχει φιλτραριστεί.

Για τα γραφήματα από 1 έως 10 χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες του πίνακα 3, δηλαδή οι συνθήκες που περιέχουν το focus flow ίσο με 3ml/min.

Στο γράφημα 1 παρατηρούμε ότι στα 18,471 min παρατηρείται μια κορυφή με μεγάλο εύρος. Αυτό συμβαίνει διότι η κρέμα δεν έχει φιλτραριστεί και περιέχει συστατικά όπως λιποσφαιρίδια, καζεϊνικά μικκύλια και άλλα μακρομόρια τα οποία δεν έχουν διαχωριστεί, για αυτό και παρουσιάζονται με τη μορφή μιας κορυφής με μεγάλο εύρος.

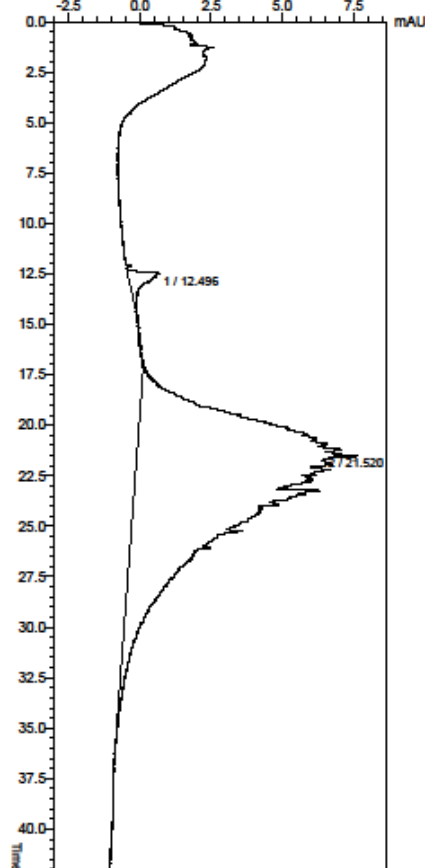
==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

<UV Spectrum Index>

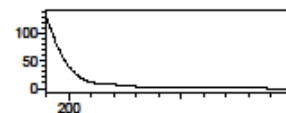
File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\filtered cream 1% boll 1 (2016-06-02_14-47).lod

PDA Ch1 280nm 4nm

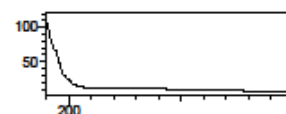
-2.5 0.0 2.5 5.0 7.5 mAU



Peak# : 1
Retention Time : 12.496



Peak# : 2
Retention Time : 21.520



Spectrum Index Report

Εικόνα 2: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ που έχει αναμιχθεί με βραστό νερό.

Παρατηρούνται δύο κορυφές, η πρώτη είναι η κορυφή του νεκρού όγκου (void peak) στα 12,496 min και η δεύτερη είναι κορυφή έκλυσης των σωματιδίων της φιλτραρισμένης κρέμας στα 21,520 min. Αφού η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα της

μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής είναι δυνατόν να υπολογίσουμε με τη βοήθεια του τύπου τη διάμετρο των σωματιδίων της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ που έχει αναμιχθεί με βραστό νερό. Για το παρόν γράφημα η διάμετρος των σωματιδίων είναι $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,722 = 3,926 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 3,926 \cdot 10^{-2} \mu\text{m} = 39,26 \text{ nm}$.

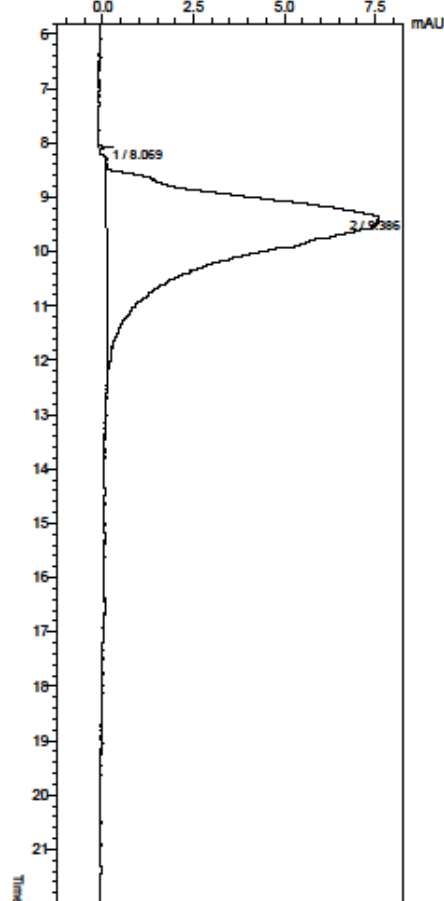
Οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο δείγμα πραγματοποιούνται επίσης και για τα υπόλοιπα χρωματογραφήματα που φέρουν κορυφή νεκρού όγκου και κορυφή έκλυσης σωματιδίων.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

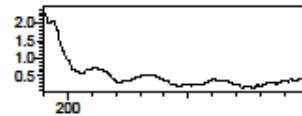
<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\PMMA 0,25 mic 6h (2016-04-11_13-16).jcd

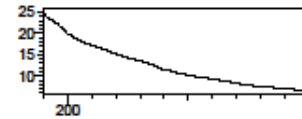
PDA Ch1 280nm 4nm



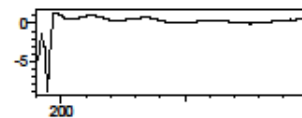
Peak# : 1
Retention Time : 8.069



Peak# : 2
Retention Time : 9.386



Peak# : 3
Retention Time : 45.541



Spectrum Index Report

Εικόνα 3: Χρωματογράφημα του πολυμερούς με μέγεθος διαμέτρου 0,25 μm .

Η πρώτη κορυφή στα 8,069 min είναι η κορυφή του νεκρού όγκου, ενώ η δεύτερη κορυφή στα 9,386 min είναι η κορυφή των σωματιδίων διαμέτρου 0,25 μm .

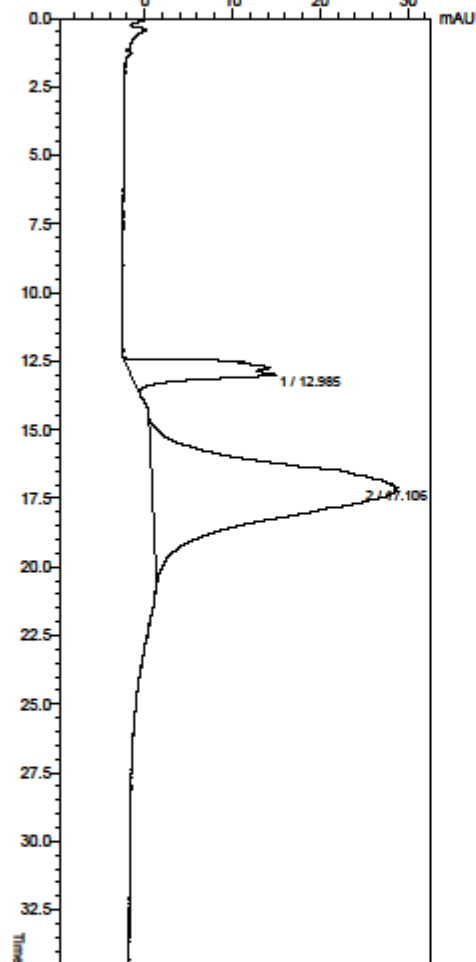
Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (9,386:8,069) = 2,28 \cdot 10^{-8} \cdot 1,163 = 2,652 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 2,652 \cdot 10^{-2} \mu\text{m} = 26,52 \text{ nm}$.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

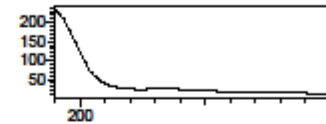
<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\PMMA 0,3 mic 10th astra (2016-04-20_17-05).lcd

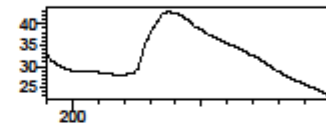
PDA Ch1 280nm 4nm



Peak# : 1
Retention Time : 12.985



Peak# : 2
Retention Time : 17.106



Spectrum Index Report

Εικόνα 4: Χρωματογράφημα του πολυμερούς με μέγεθος διαμέτρου 0,45 μm.

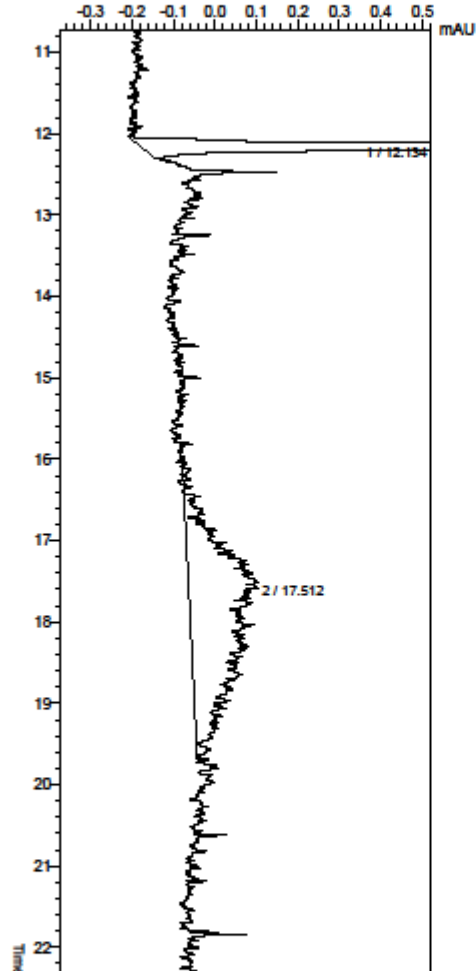
Η κορυφή του νεκρού όγκου παρατηρείται στα 12,985 min και η κορυφή έκλουσης των σωματιδίων διαμέτρου 0,45 μm παρατηρείται στα 17,106 min. Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (17,106 : 12,985) = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,317 = 3 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 3 \cdot 10^{-2} \text{ μm} = 30 \text{ nm}$.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

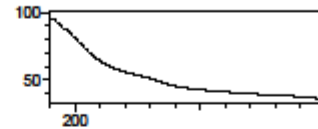
<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\pmma 1mic_focus 3 mimin_2 (2016-06-22_12-38).lcd

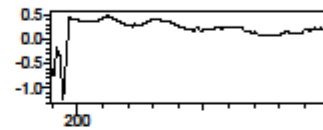
PDA Ch1 280nm 4nm



Peak# : 1
Retention Time : 12.134



Peak# : 2
Retention Time : 17.512



Spectrum Index Report

Εικόνα 5: Χρωματογράφημα του πολυμερούς με μέγεθος διαμέτρου 1,05 µm.

Η κορυφή του νεκρού όγκου παρατηρείται στα 12,134 min, ενώ η κορυφή έκλυσης των σωματιδίων του πολυμερούς με διάμετρο 1,05 µm παρατηρείται στα 17,512 min.

Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (17,512 : 12,134) = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,443 = 3,29 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 3,29 \cdot 10^{-2} \mu\text{m} = 32,9 \text{ nm}$.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα είναι αναγκαία η εξακρίβωση των αποτελεσμάτων του μεγέθους της διαμέτρου των σωματιδίων με τη βοήθεια του Zetasizer. Τα αποτελέσματα που δείχνει το Zetasizer για τις διαμέτρους των πολυμερών είναι: 328,5 nm για το δείγμα πολυμερούς ονομαστικής διαμέτρου 0,25 μm , 632,4 nm για το δείγμα πολυμερούς ονομαστικής διαμέτρου 0,45 μm και 916,5 nm για το δείγμα πολυμερούς ονομαστικής διαμέτρου 1,05 μm . Παρατηρούμε ότι η απόκλιση τιμών της διαμέτρου με τη διάμετρο που έχει υπολογίσει το Zetasizer δεν είναι πολύ μεγάλη.

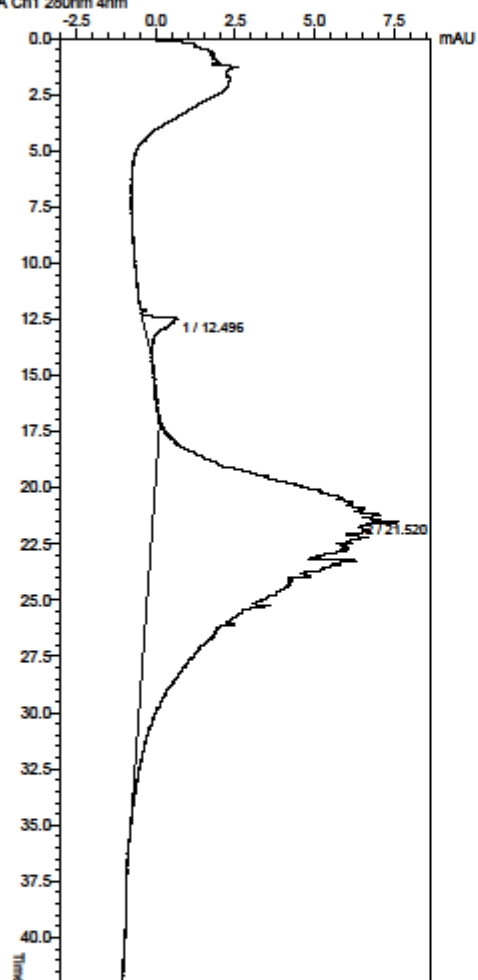
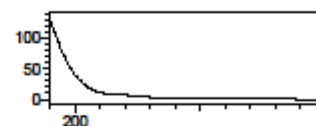
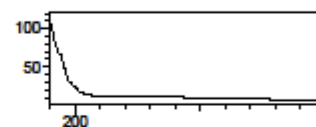
Θέλοντας να μελετήσουμε την κινητική της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σαν συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες του πίνακα 3. Από τα αποτελέσματα όμως των γραφημάτων είδαμε ότι οι κορυφές έκλυσης δεν σταμάταγαν νωρίτερα από τα 42 λεπτά που διήρκτησε η ανάλυση, αλλά εκεί διακόπτονταν. Έτσι έπρεπε να δοκιμάσουμε άλλες συνθήκες για τον διαχωρισμό των κορυφών. Παρακάτω ακολουθούν τα γραφήματα όπου οι κορυφές έκλυσης διακόπτονται ή συνεχίζουν να εμφανίζονται μετά τα 42 λεπτά.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\filtered cream 1% boll 1 (2016-06-02_14-47).lod

PDA Ch1 280nm 4nm

Peak# : 1
Retention Time : 12.496Peak# : 2
Retention Time : 21.520

Spectrum Index Report

Εικόνα 6: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας σε θερμοκρασία 50°C για το χρόνο 0.

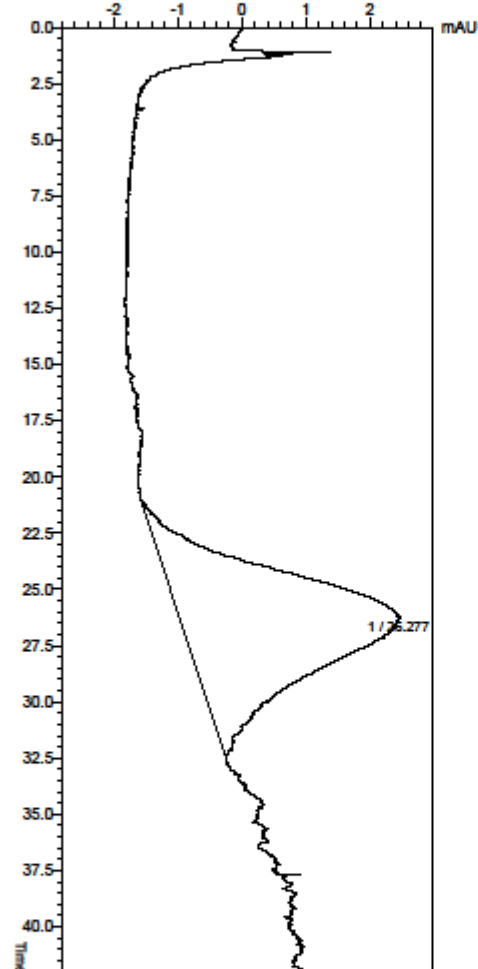
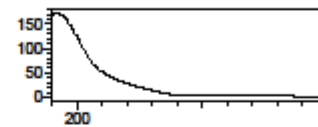
Το συγκεκριμένο γράφημα δεν παρουσιάζει κάποιο πρόβλημα μιας και η κορυφή του νεκρού όγκου παρατηρείται στα 12,496 min ενώ η κορυφή έκλουσης των σωματιδίων παρατηρείται στα 21,520 min. Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (21,520 : 12,496) = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,722 = 3,926 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 3,926 \cdot 10^{-2} \mu\text{m} = 39,26 \text{ nm}$.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\filtered cream 1% 50oC 2 (2016-06-15_12-08).lcl

PDA Ch1 280nm 4nm

Peak# : 1
Retention Time : 26.277

Spectrum Index Report

Εικόνα 7: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για το χρόνο 1 ώρα και 40 λεπτά.

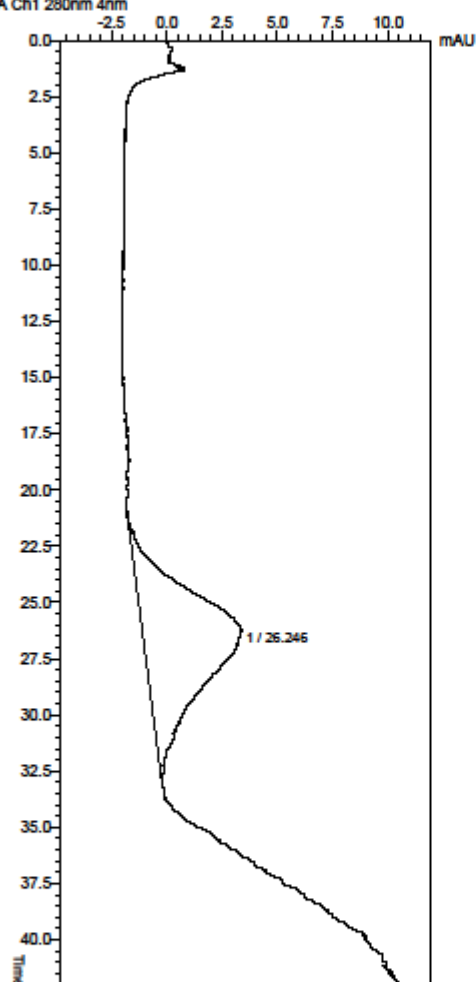
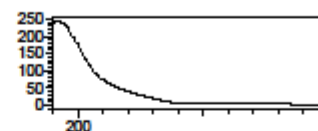
Η κορυφή έκλυσης παρατηρείται στα 26,277 min, αλλά από εκεί και έπειτα το γράφημα φαίνεται να διακόπτεται.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\filtered cream 1% 50c 3 (2016-06-15_12-53).lod

PDA Ch1 280nm 4nm

Peak# : 1
Retention Time : 26.246

Spectrum Index Report

Εικόνα 8: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για το χρόνο 3 ώρες και 14 λεπτά.

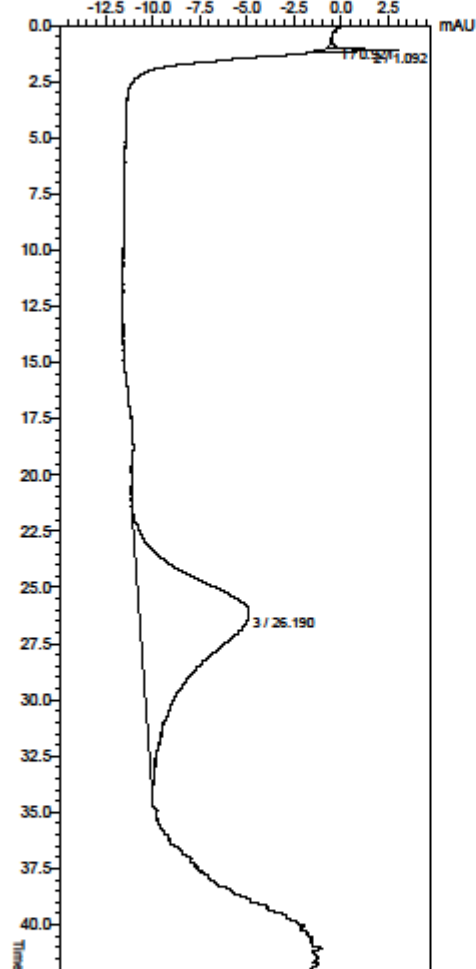
Η κορυφή έκλουσης εμφανίζεται στα 26,246 min , αλλά από εκεί και έπειτα το γράφημα φαίνεται να διακόπτεται.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

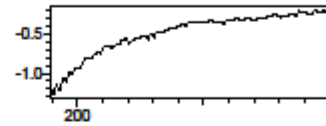
<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\filtered cream 1% 50oC 4 (2016-06-15_13-39).lcl

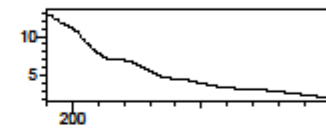
PDA Ch1 280nm 4nm



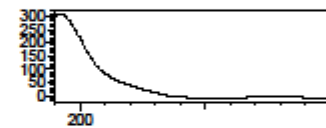
Peak# : 1
Retention Time : 0.921



Peak# : 2
Retention Time : 1.092



Peak# : 3
Retention Time : 26.190



Spectrum Index Report

Εικόνα 9: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας για καφέ σε θερμοκρασία 50°C για το χρόνο 4 ώρες και 37 λεπτά.

Η κορυφή έκλυσης παρατηρείται στα 26,190 min, αλλά από εκεί και έπειτα στα 42 λεπτά διακόπτεται το γράφημα, τη στιγμή που μια δεύτερη κορυφή εμφανίζεται.

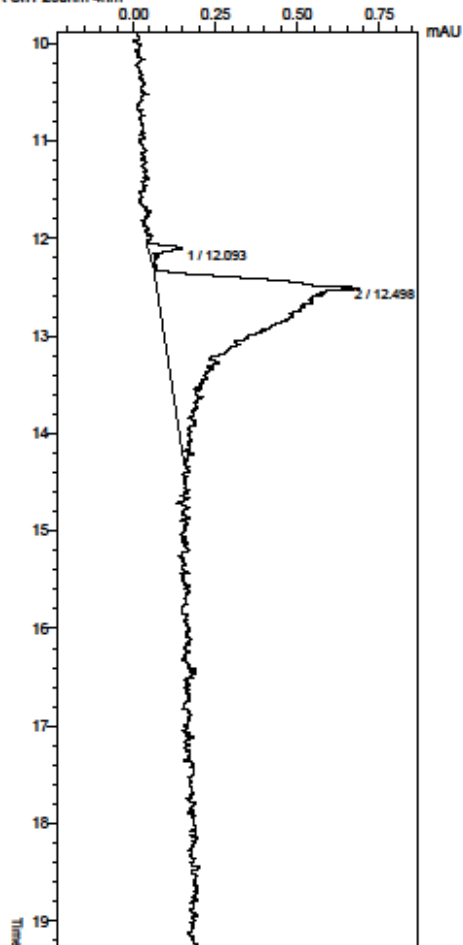
7/7/2016 17:37:30 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

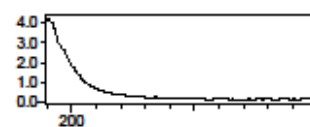
<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\kinetic0 (2016-06-23_11-25).lod

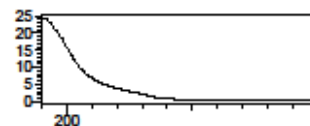
PDA Ch1 280nm 4nm



Peak# : 1
Retention Time : 12.093



Peak# : 2
Retention Time : 12.498



Spectrum Index Report

Εικόνα 10: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για τον χρόνο 0.

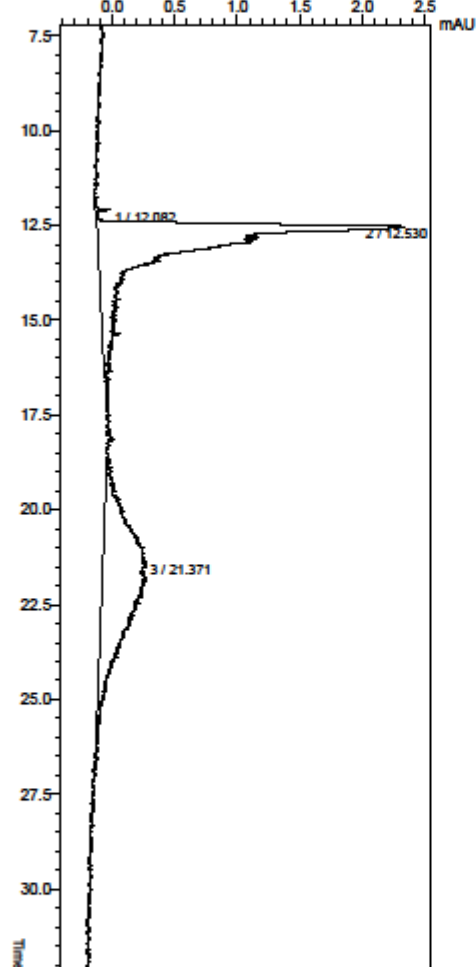
Η κορυφή του νεκρού όγκου παρατηρείται στα 12,093 min, ενώ η κορυφή έκλουσης των σωματιδίων της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ παρατηρείται στα 12,498 min. Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (12,498 : 12,093) = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,033 = 2,355 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 2,355 \cdot 10^{-2} \mu\text{m} = 23,55 \text{ nm}$.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

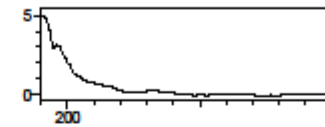
<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\kinetic1 (2016-06-23_12-49).lcl

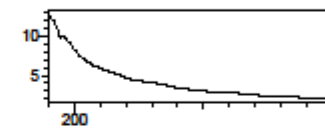
PDA Ch1 280nm 4nm



Peak# : 1
Retention Time : 12.082



Peak# : 2
Retention Time : 12.530



Peak# : 3
Retention Time : 21.371



Spectrum Index Report

Εικόνα 11: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για τον χρόνο 1 ώρα και 40 λεπτά.

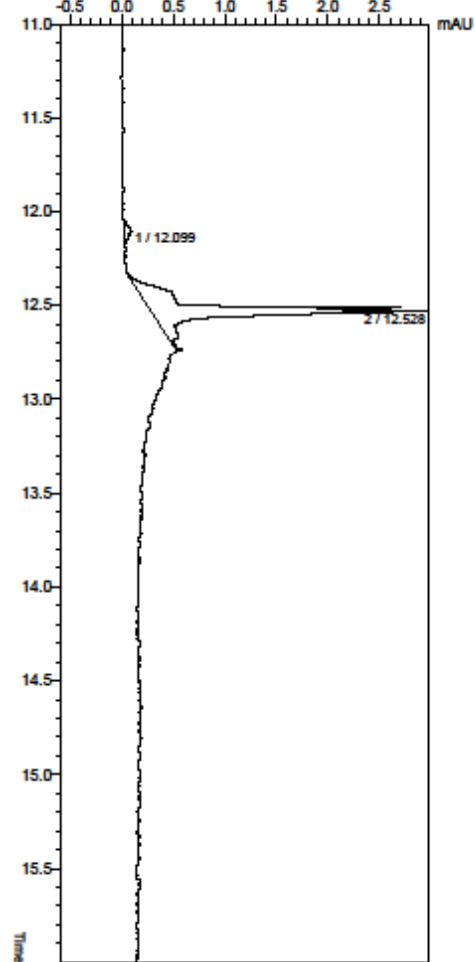
Η κορυφή του νεκρού όγκου παρατηρείται στα 12,082 min, ενώ οι κορυφές έκλυσης των σωματιδίων της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ παρατηρούνται στα 12,498 και στα 21,371 min. Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος που παρουσιάζει κορυφή έκλυσης στα 12,498 min σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (12,498 : 12,082) = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,034 = 2,357 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 2,357 \cdot 10^{-2} \text{ }\mu\text{m}$. Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος που παρουσιάζει κορυφή έκλυσης στα 21,371 min σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (21,371 : 12,082) = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,769 = 4,033 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 4,033 \cdot 10^{-2} \text{ }\mu\text{m} = 40,33 \text{ nm}$.

==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

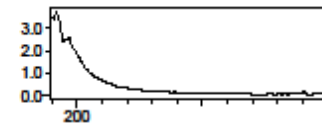
<UV Spectrum Index>

File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\kinetic2 (2016-06-23_14-38).lcl

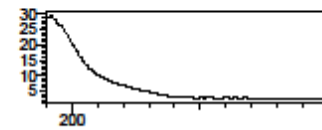
PDA Ch1 280nm 4nm



Peak# : 1
Retention Time : 12.099



Peak# : 2
Retention Time : 12.528



Spectrum Index Report

Εικόνα 12: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για τον χρόνο 3 ώρες και 14 λεπτά.

Η κορυφή του νεκρού όγκου παρατηρείται στα 12,099 min, ενώ η κορυφή έκλουσης των σωματιδίων της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ παρατηρείται στα 12,528 min. Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (12,528 : 12,099) = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,035 = 2,36 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 2,36 \cdot 10^{-2} \mu\text{m} = 23,6 \text{ nm}$.

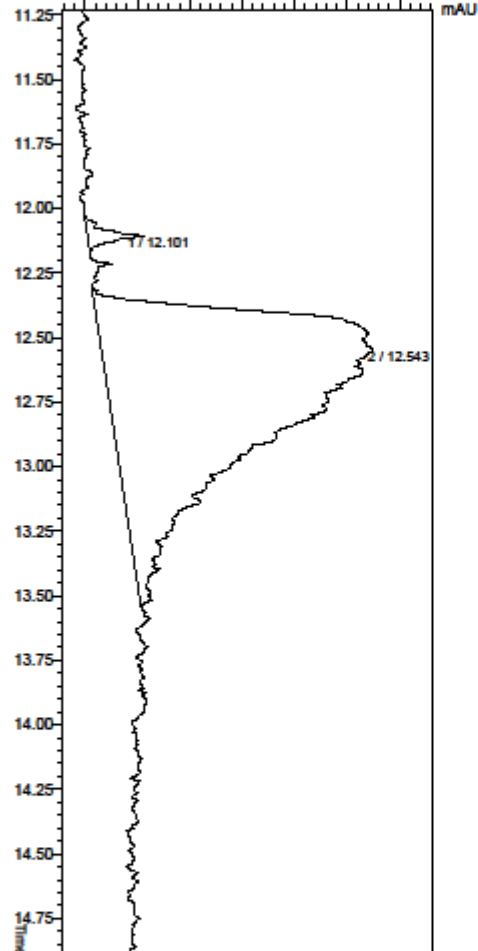
==== Shimadzu LCsolution UV Spectrum Index ====

<UV Spectrum Index>

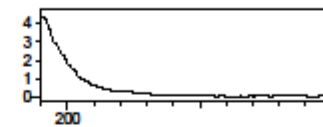
File Name : C:\Program Files\WTE\Eclipse\Results\kinetic3 (2016-06-23_16-02).lod

PDA Ch1 280nm 4nm

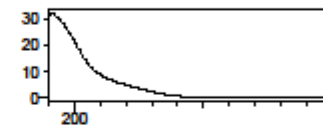
0,0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 mAU



Peak# : 1
Retention Time : 12.101



Peak# : 2
Retention Time : 12.543

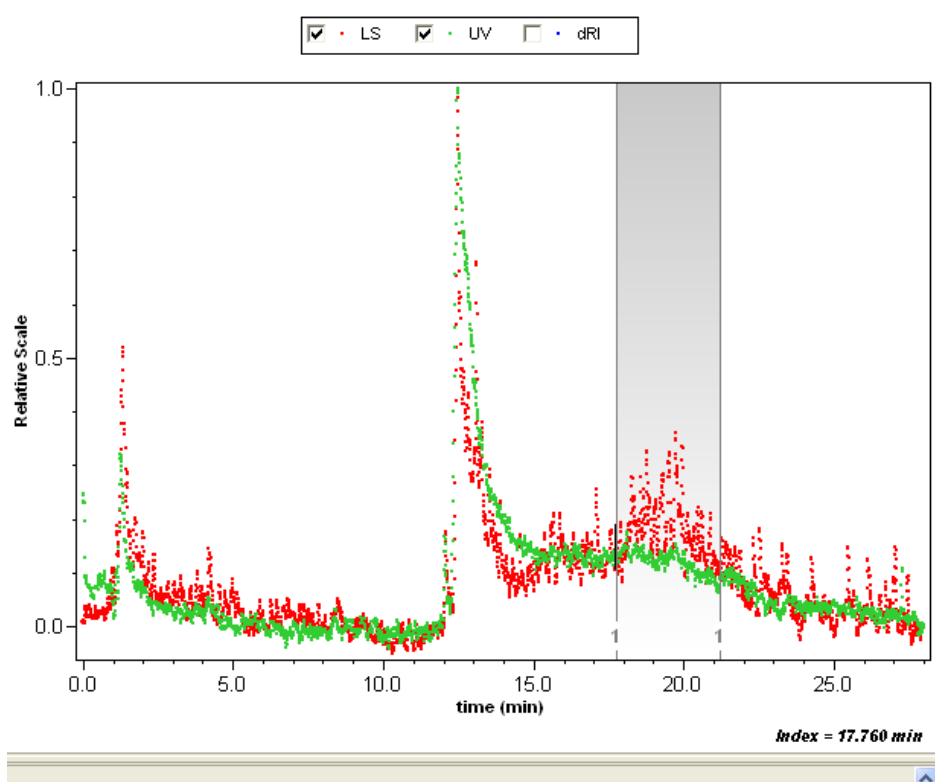


Spectrum Index Report

Εικόνα 13: Χρωματογράφημα φιλτραρισμένης κρέμας καφέ σε θερμοκρασία 50°C για τον χρόνο 4 ώρες και 37 λεπτά.

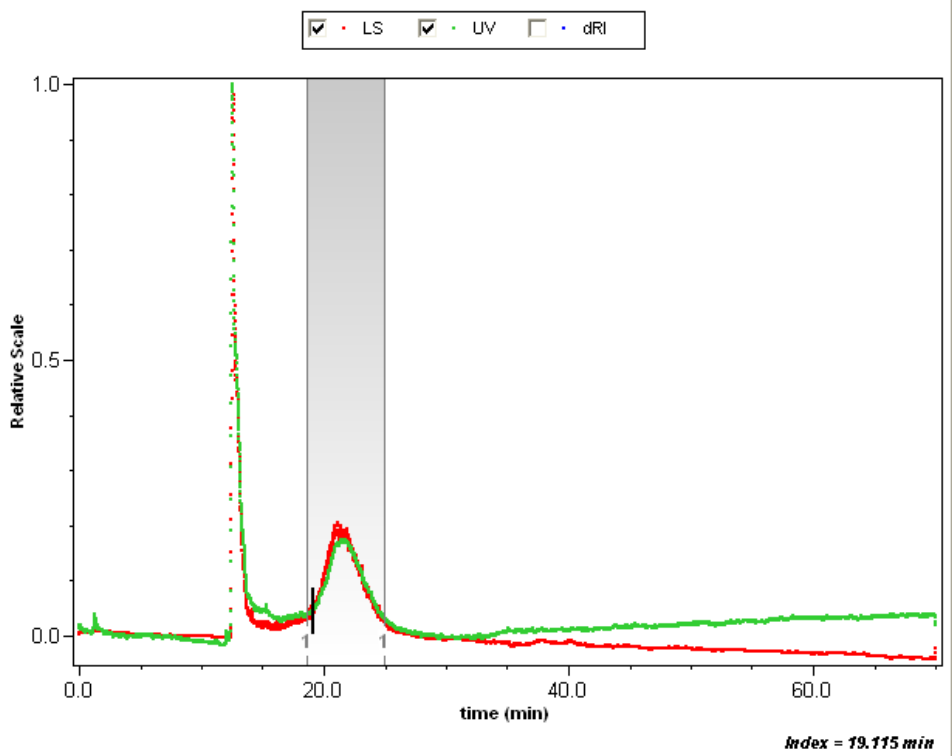
Η κορυφή του νεκρού όγκου παρατηρείται στα 12,101 min, ενώ η κορυφή έκλυσης των σωματιδίων της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ παρατηρείται στα 12,543 min. Η διάμετρος των σωματιδίων του συγκεκριμένου χρωματογραφήματος σύμφωνα με τον τύπο είναι: $d = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot (12,543 : 12,101) = 2,28 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 1,037 = 2,364 \cdot 10^{-8} \text{ m} = 2,364 \cdot 10^{-2} \mu\text{m} = 23,64 \text{ nm}$.

Τα τέσσερα δείγματα κρέμας καφέ με την θερμοκρασία των 50° C αναλύθηκαν και με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας (MALS) και φαίνονται παρακάτω.



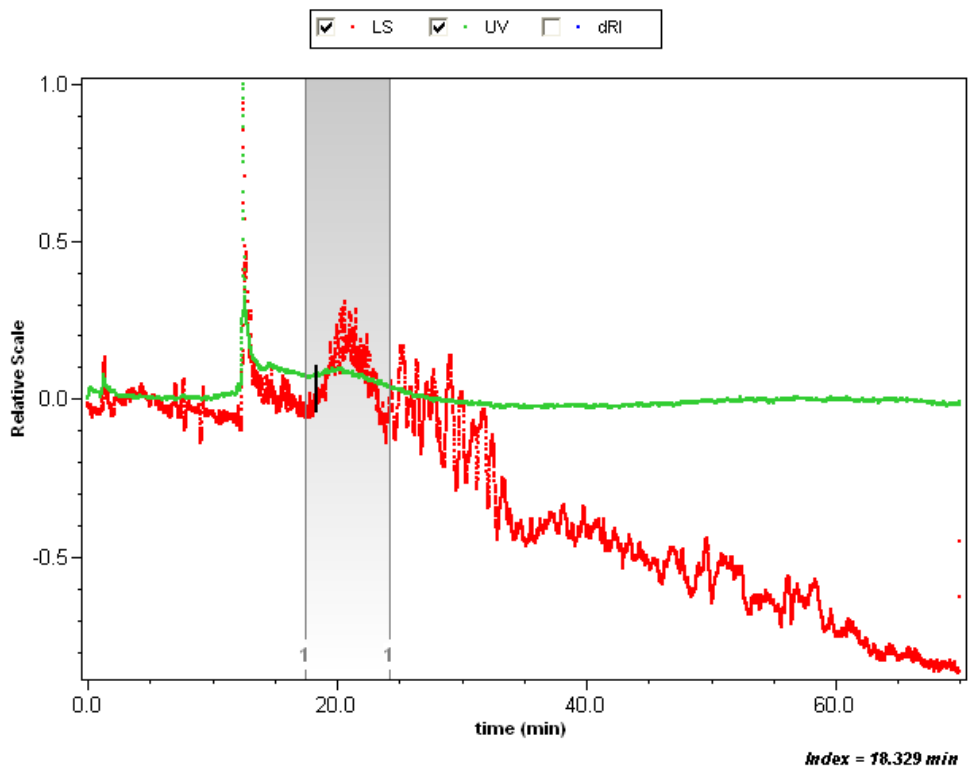
Εικόνα 14: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας για το χρόνο 0.

Η κορυφή έκλυσης των σωματιδίων παρατηρείται στα 20 min.



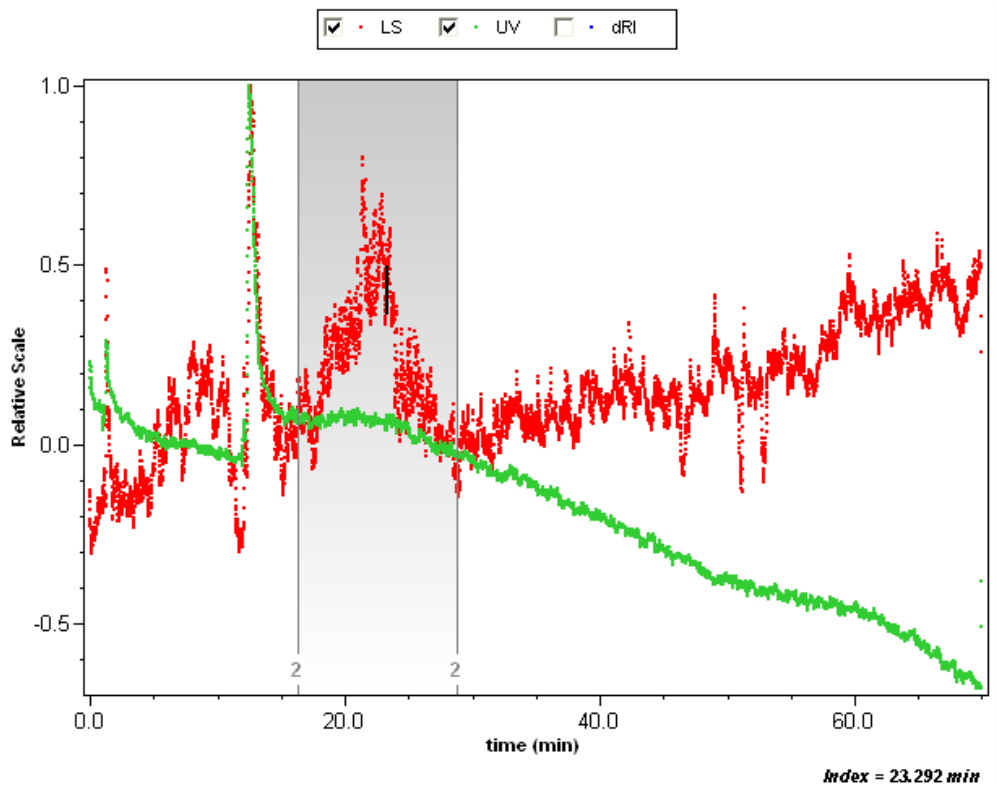
Εικόνα 15: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας για το χρόνο 1 ώρα και 40 λεπτά.

Η κορυφή έκλυσης των σωματιδίων παρατηρείται κοντά στα 20 min.



Εικόνα 16: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας για το χρόνο 3 ώρες και 14 λεπτά.

Η κορυφή έκλυσης των σωματιδίων παρατηρείται στα 20 min.



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ με τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας για το χρόνο 4 ώρες και 34 λεπτά.

Η κορυφή έκλυσης των σωματιδίων παρατηρείται στα 20 min.

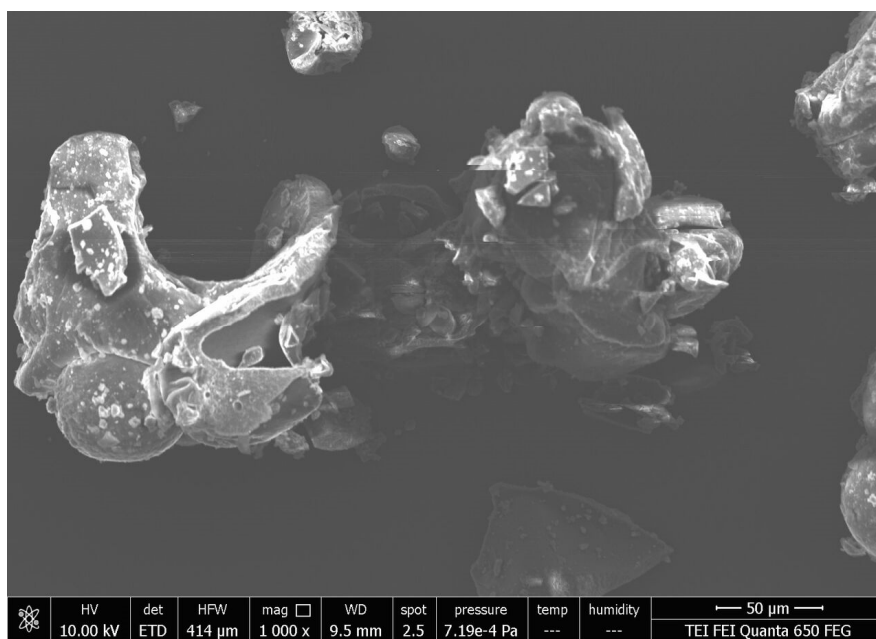
Τα τέσσερα δείγματα κρέμας καφέ αναλύθηκαν και στο μηχάνημα του Zetasizer. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω, στον πίνακα 5. Το δείγμα κρέμας καφέ για χρόνο 0 παρουσίασε μέγεθος διαμέτρου 147 nm. . Το δείγμα κρέμας καφέ για χρόνο 1 ώρα και 40 λεπτά παρουσίασε μέγεθος διαμέτρου 148,5 nm. Το δείγμα κρέμας καφέ για χρόνο 3 ώρες και 14 λεπτά παρουσίασε μέγεθος διαμέτρου 340,7 nm. Το δείγμα κρέμας καφέ για χρόνο 4 ώρες και 37 λεπτά παρουσίασε μέγεθος διαμέτρου 555,5 nm.

Πίνακας 5: Η διάμετρος των σωματιδίων της φιλτραρισμένης κρέμας καφέ όπως υπολογίστηκε από το μηχάνημα του Zetasizer.

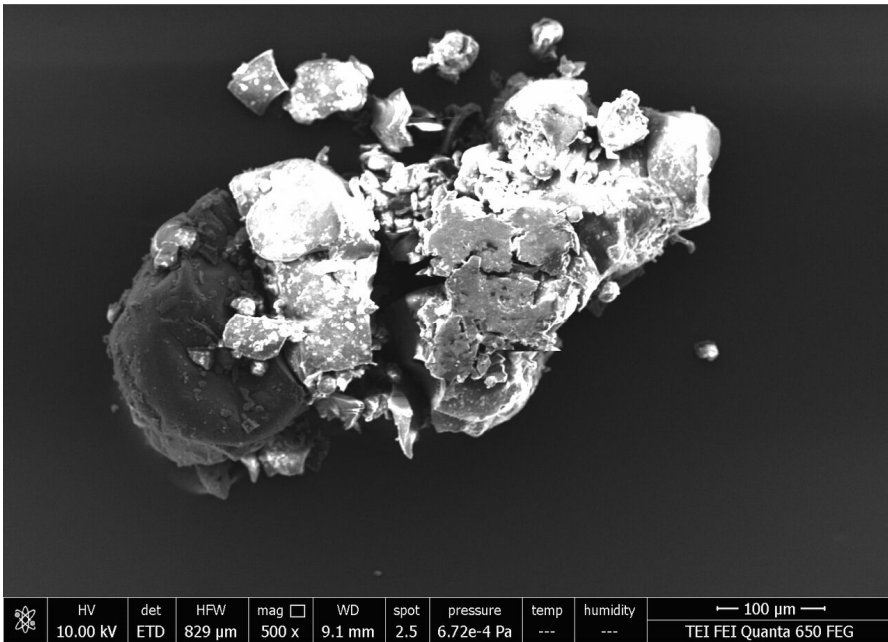
Χρόνος*	Διάμετρος (nm)
0	147
1 ώρα και 40 λεπτά	148,5
3 ώρες και 14 λεπτά	340,7
4 ώρες και 37 λεπτά	555,5

* ο χρόνος του πίνακα 4 έχει μετατραπεί από λεπτά σε ώρες

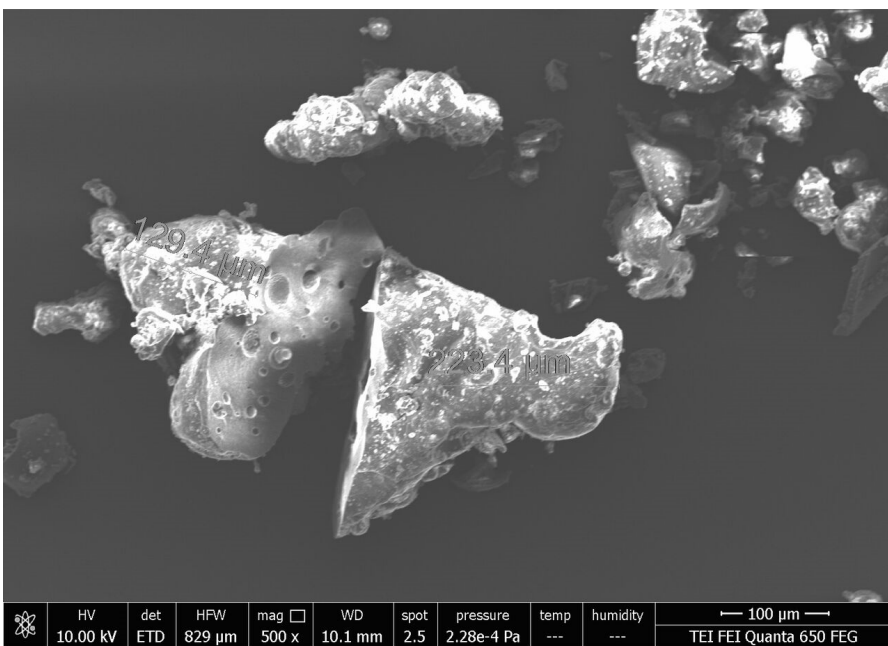
Με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης παρατηρήθηκε η δομή και το μέγεθος των σωματιδίων της κρέμας για καφέ πριν και μετά τη θέρμανση. Οι εικόνες 1-5 αφορούν τα σωματίδια της κρέμας για καφέ πριν τη θέρμανση.



Εικόνα 18: Σωματίδια κρέμας για καφέ πριν την θέρμανση του δείγματος στους 50° C.

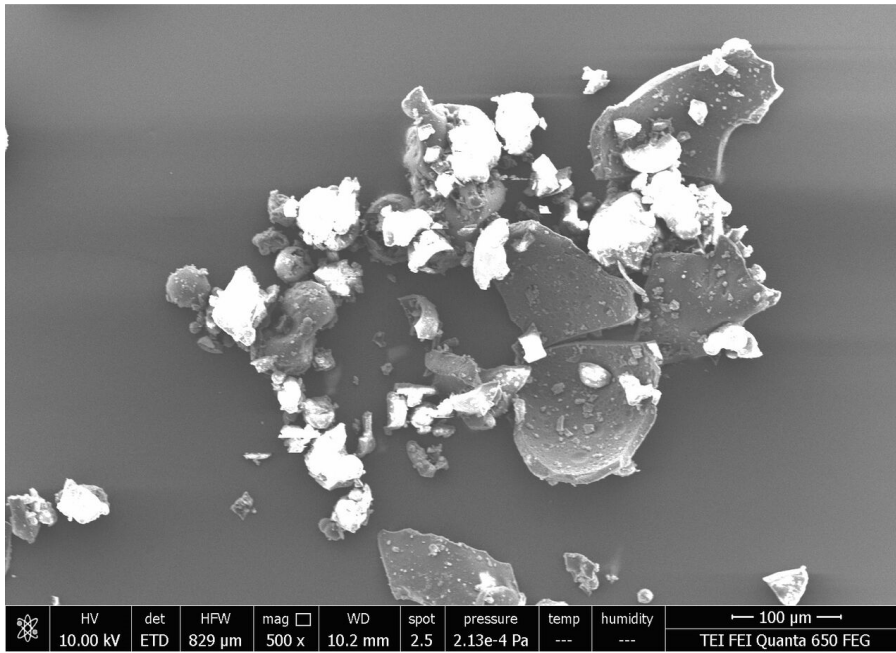


Εικόνα 19: Σωματίδια κρέμας για καφέ πριν τη θέρμανση του δείγματος στους 50° C.



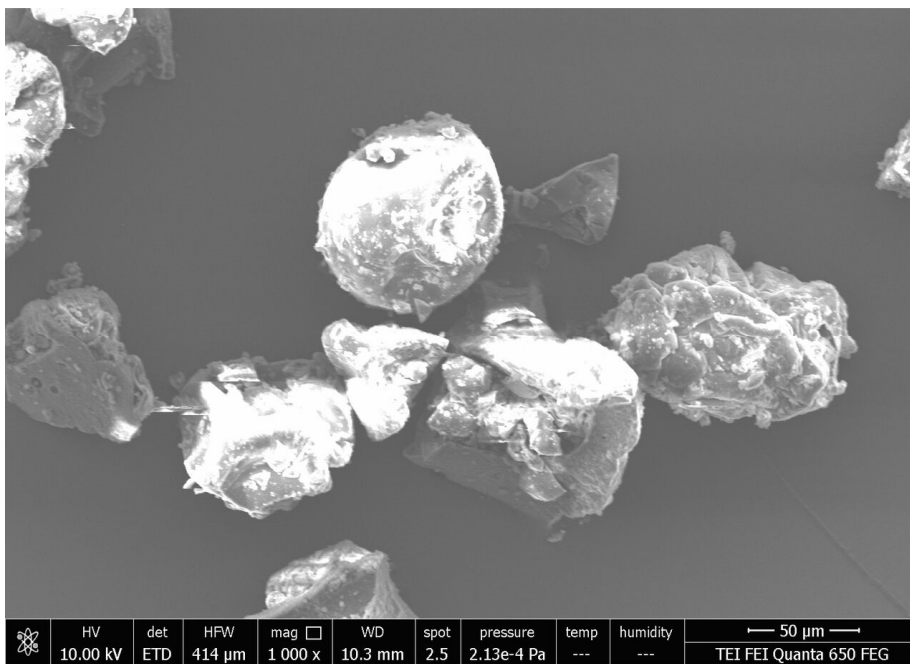
Εικόνα 20: Σωματίδια κρέμας για καφέ πριν τη θέρμανση του δείγματος στους 50° C και εμφάνιση των μεγεθών αυτών.

Στην εικόνα 3 το πρώτο κομμάτι αριστερά είναι 129,4 μm και το δεύτερο κομμάτι δεξιά είναι 223,4 μm.



Εικόνα 21: Σωματίδια κρέμας για καφέ πριν τη θέρμανση του δείγματος στους 50° C.

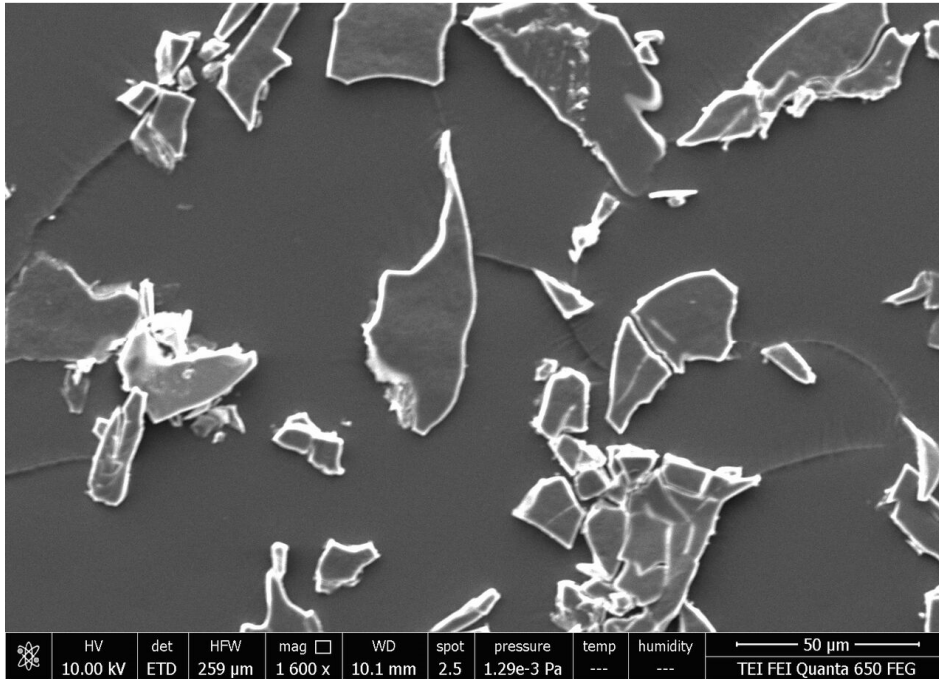
Παρατηρούνται μικρά και μεγάλα θραύσματα με τα μικρότερα να έχουν λευκό χρώμα.



Εικόνα 22: Σωματίδια κρέμας για καφέ με σφαιρικό σχήμα.

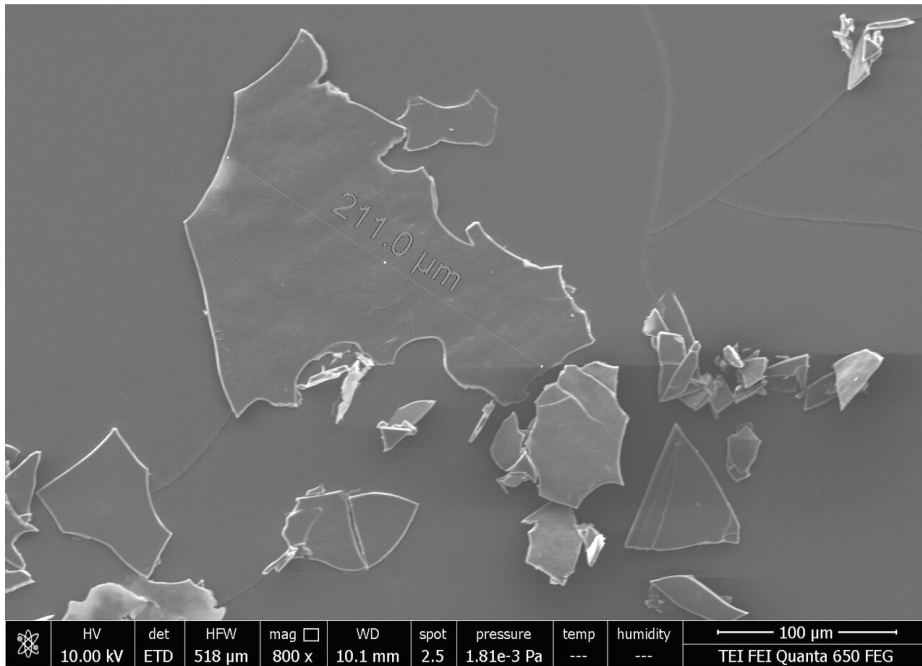
Το χρώμα τους είναι λευκό και γκρι. Παρατηρούμε ότι τα σωματίδια αυτά είναι κατά μέσο όρο μεγαλύτερα των 100 μm. Η μορφολογία τους παρουσιάζει σχήματα σφαιρικά και κυρίως ακανόνιστα.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιήθηκε επίσης για να φανεί ποια είναι η μορφολογία και το σχήμα των σωματιδίων έπειτα από θέρμανση της κρέμας καφέ στους 50° C.



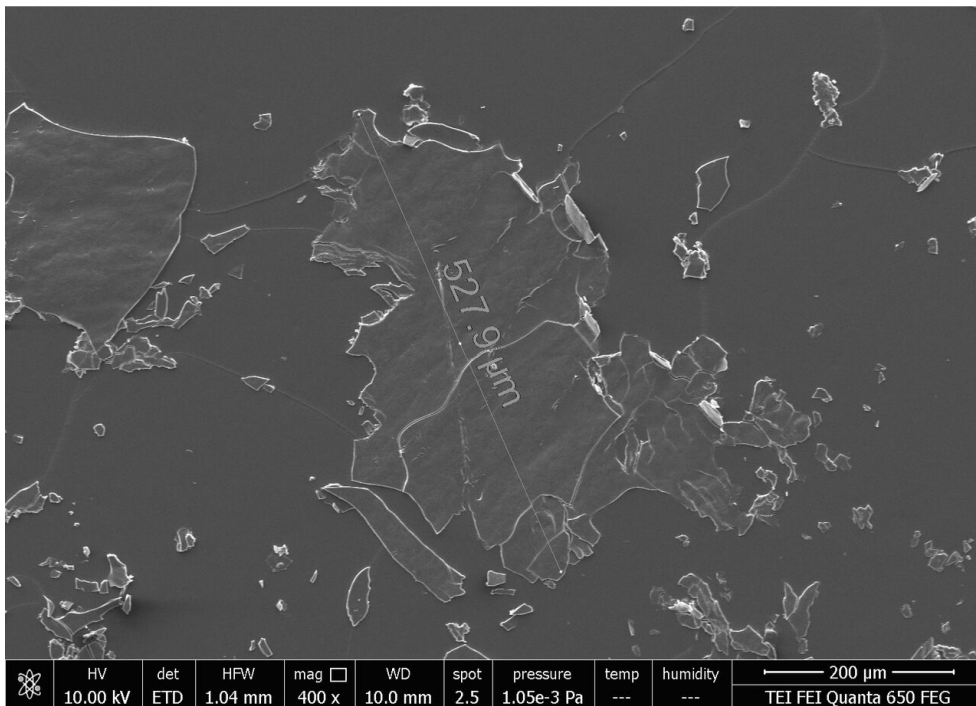
Εικόνα 23: Σωματίδια κρέμας για καφέ έπειτα από θέρμανση της κρέμας στους 50° C.

Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται σχήματα ακανόνιστα.



Εικόνα 24: Αλλαγή του σχήματος των σωματιδίων κρέμας για καφέ έπειτα από θέρμανση του δείγματος στους 50° C.

Το μέγεθος σωματιδίου που φαίνεται στην εικόνα 7 είναι 211 μm.



Εικόνα 25: Τα σωματίδια κρέμας για καφέ έπειτα από θέρμανση του δείγματος στους 50° C.

Το μέγεθος του σωματιδίου της εικόνας 8 είναι 527,9 μm.

Παρατηρούμε ότι μετά από τη θέρμανση του δείγματος κρέμας για καφέ η μορφολογία των σωματιδίων έχει αλλάξει και έχουν σχηματιστεί πλάκες με διάφορες διαστάσεις, από 50 έως 500 μm . Οι πλάκες αυτές φαίνονται αλλιώς σαν κομμάτια σπασμένων γυαλιών και θραυσμάτων.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

- 1) Η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου ασύμμετρης ροής (AF⁴) είναι μια πολύ καλή τεχνική για τον διαχωρισμό ενός μεγάλου εύρους σωματιδίων (από ένα νανόμετρο έως ορισμένα μικρόμετρα) σε βιολογικά δείγματα, δείγματα τροφίμων και κολλοειδή διαλύματα.
- 2) Ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός πολλαπλής γωνίας (MALS) είναι ένας καλός ανιχνευτής για τον προσδιορισμό του μεγέθους σωματιδίων σε ένα μεγάλο εύρος τιμών, από ένα νανόμετρο έως ορισμένα μικρόμετρα.
- 3) Το μηχάνημα του Zetasizer είναι ένα καλό μηχάνημα για τον προσδιορισμό του μεγέθους της διαμέτρου σωματιδίων σε ένα μεγάλο εύρος τιμών (από ένα νανόμετρο έως ορισμένα μικρόμετρα).
- 4) Η τεχνική της ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) είναι μια χρήσιμη τεχνική για την εξασφάλιση πληροφοριών όσον αφορά στη μορφολογία της επιφάνειας δειγμάτων και στον προσδιορισμό του μεγέθους και του σχήματος σωματιδίων.
- 5) Όπως φαίνεται από τη διεθνή βιβλιογραφία που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, αλλά και από τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παρούσα μελέτη, η τεχνική της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής εξασφαλίζει σημαντικά αποτελέσματα, πολύ χρήσιμα για τον επιστημονικό κλάδο της Τεχνολογίας Τροφίμων και για το λόγο αυτό διαδίδεται ευρύτατα διεθνώς και προσελκύει όλο και περισσότερο το επιστημονικό ενδιαφέρον.
- 6) Ο συνδυασμός διαφορετικών τεχνικών ανάλυσης παρέχει πληρέστερα και ασφαλέστερα αποτελέσματα απ' ό,τι η μονομερής χρήση μίας μόνο μεθόδου (παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός AF⁴-ICP-MS).
- 7) Γενικότερα ο κλάδος της νανοτεχνολογίας εξελίσσεται σήμερα σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς έχει ευρύτατη εφαρμογή σε πολλούς τομείς όπως στην επεξεργασία τροφίμων, στις τεχνικές συσκευασίας, στις τεχνικές παραγωγής νανογαλακτωμάτων κ.λ.π.

BIBΛIOΓPAΦIA

Akbari Z., Ghomashci T., Moghadam S. (2007). Improvement in food packaging industry with biobased nanocomposites. *International Journal of Food Engineering*, Vol. 3, p. 1556-3758.

António D. C., Cascio C., Jakšić Ž., Jurašin D., Lyons D. M., Nogueira A. J. A., Rossi F., Calzolari L. (2015). Assessing silver nanoparticles behavior in artificial seawater by mean o AF4 and spICP-MS. *Marine Environmental Research*, Vol. 111, p. 162-169.

Artiaga G., Ramos K., Ramos L., Cámara C., Gomez-Gomez M. (2015). Migration and characterization of nanosilver from foods containers by AF⁴-ICP-MS. *Food Chemistry*, Vol. 166, p.76-85.

Asharani P. V., Mun G. L. K., Hande M. P., Valiyaveetil S. (2009). Cytotoxicity and Genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nan*, Vol. 3, p. 279-290.

Blasco C., Picó Y. (2011). Determining nanomaterials in food. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 30, p. 84-99.

Calzolari L., Gilliland D., Rossi F. (2012). Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 29, p.1183-1193.

Calzolari L., Gilliland D., Garcia C. P., Rossi F., (2011). Separation and characterization of gold nanoparticles mixtures by flow field-flow fractionation. *J Chromatogr A*, Vol. 1218, p. 4234-4239.

Chaudhry Q., Scotter M., Blackburn J., Ross B., Boxall A., Castle L., *et al.* (2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives and Contaminants: Part A*, Vol. 25, 241-258.

Contado C., Ravani L., Passarella M. (2013). Size characterization by Sedimentation Field Flow Fractionation of silica particles used as food additives. *Analytica Chimica Acta*, Vol 788, p.183-192.

Cushen M., Kerry J., Morris M., Cruz-Romero M., Cummins E. (2012). Nanotechnologies in the food industry-recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 24, p. 30-46.

Dan Y., Shi H., Stephan C., Liang X. (2015). Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, Vol. 122, p.119-126.

Donovan A. R., Adams C. D., Ma Y., Stephan C., Eichholz T., Shi H. (2016). Single particle ICP-MS characterization of titanium dioxide, silver and gold nanoparticles during drinking water treatment. *Chemosphere*, 144, p. 148-153.

Dou H., Magnusson E., Choi J., Duan F., Nilsson L., Lee S. (2016). Study on aggregation behavior of low density lipoprotein in hen egg yolk plasma by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiple detectors. *Food Chemistry*, Vol. 192, p. 228-234.

Doucet J. F., Lead R. J., Maguire L., Achterberg P. E. & Millward E. G. (2005). Visualisation of natural aquatic colloids and particles – a comparison of conventional high vacuum and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Environmental Monitoring*, Vol. 7, p. 115-121.

EC Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Official Journal of the European Union*. L 275: 38-4

Echegoyen Y., Nerin C. (2013). Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 62, p. 16-22.

Huang Q., Yu H., Ru Q., (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75, p. 50-57.

Huang Y. J., Xu L., Zhou W., (2015). Safety assessment of nanocomposite for food packaging application. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 45, p.187-199.

Ji J. H., Jung H. J., Kim S. S., Yoon U. J., Park J. D. Choi S. B. *et al.* (2007). A twenty eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*, Vol. 19, p. 857-871.

Jiahui H., Johnson P. K., Williams Lii R. O. (2004). Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Vol. 30, p. 233-245.

Kesisoglou F., Pamnai S., Wu Y. H. (2007). Application of nanoparticles in oral delivery of immediate release formulations. *Current nanoscience*, Vol. 3, p. 183-190.

Laborda F., Bolea E., Cepria G., Gómez M. T., Jiménez M. S., Pérez-Arantegui J., Castillo j. R. (2016). Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 904, p. 10-32.

Levard C., Hotze E. M., Lowry G. V., Brown E. G. (2012). Environmental Transformations of silver nanoparticles: Impact of stability and toxicity. *Environmental Science and Technology*, Vol. 46, p. 6900-6914

Llorens A., Lloret E., Picouet A. P., Trbojevič R., Fernandez A., (2012b). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 24, p. 19-29.

Llorens A., Lloret E., Picouet P., Fernandez A. (2012a). Study of the antifungal potential of novel cellulose/ copper composites as absorbent materials for fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 158, p.113-119.

Loeschner K., Navratilova J., Grombe R., Linsinger P. J. T., Købler C., Møhlhave K., Larsen H. E. (2015). In house validation of a method for determination of silver nanoparticles in chicken meat based on asymmetric flow-field flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Food Chemistry*. Vol. 181, p.78-84.

Loeschner K., Navratilova J., Købler C., Møhlhave K., Wagner S., Kammer F., Larsen H. E. (2013). Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS. *Anal Bioanal Chem*, Vol. 405, p. 8185-8195

López-Heras I., Madrid Y., Cámara C. (2014). Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* Vol, 124, p. 71-78.

Mavrocordatos D., Perret D., Leppard G. G. (2007). Strategies and advances in the characterization of environmental colloids by electron microscopy. In Wilkinson K. J., Lead J. R., (Eds.). *Environmental colloids and particles: Behaviour, structure and characterization*. p. 345-404. Chichester UK: Wiley

McClements D. J., Decker A. E., Weiss J., (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, Vol. 72, p. 109-124

McClements J. D., Decker A. E., Park Y., Weiss J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol 49, p. 577-606.

Mudalige T. K., Qu H., Linder S. W. (2015). An improved methodology of asymmetric flow field flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of size distribution of gold nanoparticles in dietary supplements. *Journal of chromatography A*, Vol. 1420, p. 92-97.

Mudalige T. K., Qu H., Linder S. W. (2015). An improved methodology of asymmetric flow field flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of size distribution of gold nanoparticles in dietary supplements. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1420, p. 92-97.

Nilsson L. (2013). Separation and characterization of food macromolecules using field-flow fractionation: A review. *Food Hydrocolloids*, Vol. 30, p. 1-11.

Peters R., ten Dam G., Bouwmeester H., Helsper H., Almaier G., von de Kammer F., Ramsch R., Solans C., Tomaniová M., Hajslova J., Weigel S., (2011). Identification and characterization of organic nanoparticles in food. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, p. 100-112.

Quintanilla-Carvajal M., Camacho-Diaz B., Meraz-Torres L., Chanona-Pérez J., Alamilla-Beltrán L., Jimeréz Aparicio A., (2010). Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing. *Food Engineering Reviews*, Vol. 2, p. 39-50.

Ramos K., Ramos L., Cámara C., Gomez-Gomez M. (2014). Characterization and quantification of silver nanoparticles in nutraceuticals and beverages by asymmetric flow field flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry

Sanguansri P., Augustin A. M. (2006). Nanoscales materials development- a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 17, p. 547-556.

Schmidt B., Petersen J. H., Bender Koch C., Plackett D., Johansen N. R., Katiyar V., Larsen E. H. (2009). Combining asymmetrical flow field-flow fractionation with light-scattering and inductively coupled plasma mass spectrometric detection for characterization of nanoclay used in biopolymer nanocomposites. *Food Additives & Contaminants: Part A*, Vol. 26, p. 1619-1627.

Silva D. Hélder, Cerqueira A, Miguel, Vicente A. Antonio, (2012). Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization, *Food Bioprocess Technol*, Vol 5, p. 854-867.

Singh G., Stephan C., Westerhoff P., Carlander D., Duncan V. T. (2014). Measurement Methods to Detect, Characterize, and Quantify Engineered Nanomaterials in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 13, p. 693-704.

Soto-Alvaredo J., Montes-Bayon M., Bettmer J. (2013). Speciation of silver nanoparticles and silver (I) by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICP-MS. *Anal. Chem*, Vol. 85, p. 1316-1321.

Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzman U., *et al.*, (2001). Pulmonary and systematic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 109, p. 547-551.

Tiede K., Boxall A. B. A., Wang M. X., Gore D., Tiede D., Baxter M., *et al.* (2010). Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Vol. 25, p.1149-1154.

Von der Kammer F., Legros S., Larsen E. H., Loeschner K., Hofmann T. (2011). Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *Trends in analytical chemistry*, Vol. 30, p. 425-436.

Wahlund K., Leeman M., Santacruz S. (2011). Size separations of starch of different botanical origin studied by asymmetrical-flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Anal Bioanal Chem*, Vol. 399, p. 1455-1465.

Weiss J., Decker E., McClements D., Kristbergsson K., Helgason T., Awad T. (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, Vol. 3, p. 146-154.

Wissing A, S., Kayser O., Müller H. R. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 56, p. 1257-1272.

Wyatt J. P. (1998). Submicrometer particle sizing by multiangle light scattering following fractionation. *J Colloid interface Science*, Vol. 197, p. 9-20.

Zhengzhen Z., Laodong G. (2015). A critical evaluation of an asymmetrical flow field-flow fractionation system for colloidal size characterization of natural organic matter. *Journal of Chromatography A*, vol. 1399, p. 53–64.