ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ Α,Β ΘΟΥΙΟΝΗ, ΠΟΥΛΕΓΟΝΗ ΚΑΙ ΣΑΦΡΟΛΗ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

ΜΠΑΙΡΑΚΤΑΡΗ-ΜΟΛΥΝΔΡΗ ΝΙΟΒΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΘΗΝΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Εμμανουήλ Μικρός, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια

Ντότσικας Ιωάννης, Επικ. Καθηγητής

"Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα."

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια των Τροφίμων και προσθέτων τροφίμων (Τμήμα Α') και Χημικών κινδύνων τροφίμων και ειδικών αναλύσεων (Τμήμα Β') της Α' Χημικής Υπηρεσίας Αθηνών του Γενικού Χημείου του Κράτους στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας με κατεύθυνση "Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας".

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρό, την κ. Θεοδώρα Κλαδά, τον κ. Βασίλειο Τζαμτζή, την κ. Χριστίνα Σακελλαρίου και την κ. Αναστασία Αρβανιτάκη για την ουσιαστική στήριξη σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εκπαίδευσης. Ήταν πάντα δίπλα μου και με τις σωστές συμβουλές και την καθοδήγηση τους καταφέραμε να φέρουμε εις πέρας την παρούσα εργασία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, την Καθηγήτρια κ. Ειρήνη Παντερή και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Ντότσικα ,καθώς και τονΕπίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα για τα σχόλια και τις διορθώσεις τους. Οι προτάσεις τους συνέβαλλαν στη βελτιστοποίηση της εργασίας και της επιστημονικής μου κατάρτισης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια και τους φίλους μου για την πολύτιμη στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Επίσης όλα τα μέλη των εργαστηρίων που εργάστηκα για τα σχόλια και τη συνδρομή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη 7

Abstract 8

Κεφάλαιο 1ο

1.1 Εισαγωγή 9

1.2 Σκοπός εργασίας 9

1.3 Ανασκόπηση άλλων μεθόδων ανάλυσης 10

1.4 Βιοχημική διάσταση 11

1.4.1 Μεταβολισμός α,β θουιόνης 11

1.4.2 Μεταβολισμός πουλεγόνης 13

1.4.3 Μεταβολισμός σαφρόλης 15

Κεφάλαιο 2ο: Υλικά και μέθοδοι

2.1 Αεριοχρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών 17

2.2 Ταυτόχρονη Απόσταξη-Εκχύλιση (Simultaneous Distillation Extraction – SDE) 19

2.3 Αρωματικές ύλες και ορισμένα συστατικά τροφίμων με αρωματικές ιδιότητες 23

2.3.1 Θουιόνη (α και β) 23

2.3.2 Πουλεγόνη 25

2.3.3 Σαφρόλη 27

2.3.4 Μέτα τολυλεστέρας του οξικού οξέος 29

Κεφάλαιο 3ο: Αποτελέσματα

3.1 Καθορισμός των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών 34

3.2 Ανάπτυξη μεθόδου 37

3.3 Επικύρωση μεθόδου 48

3.3.1	Έλεγχος γραμμικότητας-Καμπύλες αναφοράς	48
3.3.2	Εφαρμογή μεθόδου σε τρόφιμα και ποτά	53
3.3.3	Επαναληψιμότητα	54
3.3.4	Ανάκτηση	69
3.3.5	Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)	74
3.4	Συμπεράσματα	77
	Παράρτημα	78
	Βιβλιογραφία	80

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ Α,Β ΘΟΥΙΟΝΗ, ΠΟΥΛΕΓΟΝΗ ΚΑΙ ΣΑΦΡΟΛΗ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

Περίληψη

Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων έχει δημοσιεύσει μια σειρά γνωμοδοτήσεων αναφορικά με κάποιες ουσίες οι οποίες βρίσκονται εκ φύσεως σε πρώτες ύλες για αρωματικές ουσίες και συστατικά τροφίμων με αρωματικές ιδιότητες όπως βότανα και μπαχαρικά. Σύμφωνα με την Αρχή των Εμπειρογνωμόνων για τις Αρωματικές Ύλες του Συμβουλίου της Ευρώπης αυτές οι ουσίες μπορούν να εγείρουν τοξικολογικές ανησυχίες.

Έτσι ο κανονισμός 1334/2008 περιλαμβάνει κατάλογο δεκαπέντε ουσιών οι οποίες δεν πρέπει να προστίθενται ως έχουν σε τρόφιμα. Επίσης, θεσπίζονται ανώτατα επίπεδα για την παρουσία ορισμένων από αυτές τις ουσίες σε ορισμένα σύνθετα τρόφιμα. Μεταξύ αυτών είναι η α και β θουιόνη, η πουλεγόνη και η σαφρόλη.

Στην εργασία αναπτύσσεται μέθοδος κατεργασίας με την τεχνική της Ταυτόχρονης Απόσταξης-Εκχύλισης με σκοπό την απομόνωση των προαναφερθέντων ουσιών από τρόφιμα και ποτά και μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού αυτών με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της (γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης) και εφαρμόστηκε στην ανάλυση τροφίμων και ποτών που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά.

Λέξεις-Κλειδιά: α, β θουιόνη, πουλεγόνη, σαφρόλη, SDE, GC-MS, ποσοτικός προσδιορισμός, αρωματικές ύλες.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE QUANTITATION OF THE NATURAL PRODUCTS A,B THUJONE, PULEGONE AND SAFROLE IN FOOD

Abstract

The European Food Safety Authority has published a series of opinions concerning certain substances occurring naturally in source materials for flavourings and food ingredients with flavouring properties such as herbs and spices. According to the Committee of Experts these substances raise toxicological concern.

Thus, the Regulation 1334/2008 provides a list of fifteen substances that must not be added as such to food. Also, maximum levels of certain substances are set in specific compound foods. Among these substances are the following: a and b thujone, pulegone and safrole.

In this thesis a method is developed using the Simultaneous Distillation Extraction technique in order to isolate the above mentioned substances from food and drink matrices and subsequently quantify them using the technique of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The method was validated and put into practice.

Key-Words: a, b thujone, pulegone, safrole, SDE, GC-MS, quantitation, flavourings.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο}

1.1 Εισαγωγή [19]

Η θέσπιση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1334/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 16ης Δεκεμβρίου 2008 για αρωματικές ύλες και ορισμένα συστατικά τροφίμων με αρωματικές ιδιότητες που χρησιμοποιούνται εντός και επί των τροφίμων κατέστησε αναγκαία την ανάπτυξη μεθόδου για την ποσοτική εκχύλιση ορισμένων ουσιών που απαντώνται φυσικώς σε αρωματικές ύλες με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών σε διάφορα υποστρώματα τροφίμων.

Συγκεκριμένα ο Κανονισμός περιλαμβάνει μία λίστα με δεκαπέντε ουσίες οι οποίες δεν πρέπει να προστίθενται ως έχουν σε τρόφιμα και ανώτατα επίπεδα για έντεκα από αυτές, μεταξύ των οποίων είναι η α,β θουιόνη, η πουλεγόνη και η σαφρόλη (Παράρτημα 1).

Οι εν λόγω ουσίες είναι ανεπιθύμητες χημικές ενώσεις που υπάρχουν εκ φύσεως σε κάποια φυτά (π.χ. μπαχαρικά, βότανα) και τρόφιμα. Είναι σχετικά μικρά μόρια που αποδίδουν ιδιαίτερα και σύνθετα αρώματα, είτε ατομικά είτε σε συνδυασμό.

Η αναλυτική στρατηγική που έχει υιοθετηθεί για τις ουσίες αυτές είναι η Ταυτόχρονη Απόσταξη-Εκχύλιση του δείγματος που ακολουθείται από ποσοτικοποίηση με GC-MS. Η διαδικασία εκχύλισης θα πρέπει να αξιολογηθεί ως προς την αποτελεσματικότητα (απόδοση και επαναληψιμότητα), την ανάκτηση του αναλύτη από το σύνθετο υπόστρωμα αλλά και ως προς την καταλληλότητα του αποκτηθέντος εκχυλίσματος (όπως κατάλληλη συγκέντρωση και απουσία παρεμποδίζουσων ουσιών που έχουν συνεκχυλιστεί).

1.2 Σκοπός εργασίας

Κύριος σκοπός αυτής της εργασίας είναι να προσφέρει μια επικυρωμένη μέθοδο για την ποσοτική εκχύλιση και ακολούθως τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών θουιόνη α και β, πουλεγόνη και σαφρόλη σε σύνθετα τρόφιμα σύμφωνα με τον κανονισμό 1334/2008 της ΕΕ. Η μέθοδος αναπτύχθηκε κατά κύριο λόγο στοχεύοντας στην αποτελεσματική «μεταφορά» της απαραίτητης υπάρχουσας τεχνολογίας και γνώσης δηλαδή στη χρήση μη ακριβού και ασυνήθη εξοπλισμού, ειδικά αφού το παραγόμενο πρωτόκολλο απευθύνεται σε κρατικό εργαστήριο ελέγχου.

Οι ιδιαίτεροι επιστημονικοί στόχοι είχαν ως εξής:

1. Ανάπτυξη μίας μεθόδου σύμφωνα με τα πρωτόκολλα εκχύλισης και μέτρησης για την θουιόνη α και β, την πουλεγόνη και την σαφρόλη που να βασίζεται στην Ταυτόχρονη Απόσταξη-Εκχύλιση των υπό ρύθμιση τροφίμων με στόχο τον τελικό προσδιορισμό με GC-MS και

2. Επικύρωση της παραπάνω μεθόδου εντός του εργαστηρίου (in-house) για να αποδειχθεί πως η μέθοδος είναι αποτελεσματική και επαναλήψιμη.

Η μέθοδος επικυρώθηκε με πειράματα που έλαβαν χώρα σε ένα εργαστήριο, σε μία σειρά από βότανα και τρόφιμα. Τα δείγματα επιλέχθηκαν με βάση τα είδη τροφίμων, βοτάνων και μπαχαρικών στα οποία με βάση την βιβλιογραφία θα ήταν πιο πιθανό να περιέχονται οι ουσίες αυτές και επιπλέον με τα όρια που έχουν τεθεί από την ΕΕ. Πέντε διαφορετικά υποστρώματα (βότανα αποξηραμένα, μπαχαρικά, έτοιμη σούπα, έτοιμη σάλτσα τομάτας, μικροπροϊόν ζαχαρωδών δροσερής αναπνοής) αναλύθηκαν για τις εξής ουσίες: θουιόνη α και β, πουλεγόνη και σαφρόλη.

1.3 Ανασκόπηση άλλων μεθόδων ανάλυσης [3,4,27-32]

Παρά το γεγονός της ύπαρξης μιας σειράς αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό μεμονωμένων αρωματικών ουσιών σε διαφορετικά υποστρώματα τροφίμων, καμία δεν προοριζόταν αποκλειστικά για ελεγκτικούς σκοπούς με συστηματική εφαρμογή από κάποιο εργαστήριο.

Ενώ πολλές μέθοδοι ανταποκρίνονται στο σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκαν (fit for purpose) ως προς την ακρίβεια ή/και την ευαισθησία, είτε δεν ήταν φιλικές ως προς το περιβάλλον (χρησιμοποιούμενοι διαλύτες), είτε ήταν απαραίτητος εξοπλισμός που δεν είναι διαθέσιμος σε όλα τα εργαστήρια (συσκευές SDE, SBSE, HS-SPME), είτε ο χρόνος ανάλυσης ήταν σχετικά μεγάλος, είτε η απαραίτητη ποσότητα του δείγματος ήταν τόσο μικρή που δεν ήταν αντιπροσωπευτική για σύνθετα υποστρώματα, είτε δεν ήταν εφικτή η εφαρμογή σε τελικά προϊόντα.

Συγκεκριμένα, (1) για τον προσδιορισμό εστραγκόλης, σαφρόλης, πουλεγόνης και μεθυλευγενόλης αναπτύχθηκε μέθοδος που περιλάμβανει την τεχνική της SDE για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιώντας τη συσκευή Likens-Nickerson, ως διαλύτη εκχύλισης το διχλωρομεθάνιο, ως εσωτερικό πρότυπο τον μέτα τολυλεστέρα του οξικού οξέος και GC-MS (Siano 2002,2005), (2) για τον προσδιορισμό α,β ασαρόνης, εστραγκόλης, ισοσαφρόλης, πουλεγόνης, σαφρόλης και α,β θουιόνης αναπτύχθηκε μέθοδος που χρησιμοποιεί την τεχνική της απόσταξης με υδρατμούς ακολουθούμενη από απλή απόσταξη για την προκατεργασία των δειγμάτων, ως διαλύτη εκχύλισης το πεντάνιο, ως εσωτερικό πρότυπο το εικοσιδυάνιο και GC-MS(Danish Veterinary and Food Administration 2008), (3) για τον προσδιορισμό κουμαρίνης, μεθυλευγενόλης, πουλεγόνης και εστραγκόλης αναπτύχθηκε μέθοδος που περιλαμβάνει προκατεργασία δείγματος με εκχύλιση με μεθανόλη των δειγμάτων και συμπύκνωση αυτών επί της τριχοειδής στήλης συστήματος LC με ανιχνευτή DAD (Avila 2009), (4) για τον προσδιοριμό εστραγκόλης, πουλεγόνης, σαφρόλης και μεθυλευγενόλης αναπτύχθηκε μέθοδος χρησιμοποιώντας την τεχνική SDE , ως διαλύτη εκχύλισης το διχλωρομεθάνιο, ως

εσωτερικό πρότυπο την 3-μέθυλοακετοφαινόνη και GC-MS (Scotter 2010), (5) για τον προσδιορισμό θουιόνης αναπτύχθηκε μέθοδος που περιλαμβάνει την Υγρό-υγρό εκχύλιση με τον διαλύτη 1,1,2-τρίχλωρο-1,2,2-τρίφθοροεθάνιο για την προκατεργασία των δειγμάτων, την κυκλοδεκανόνη ως εσωτερικό πρότυπο και GC-MS (Walch 2011), (6) για τον προσδιορισμό κουμαρίνης, β ασαρόνης, εστραγκόλης, πουλεγόνης, θουιόνης και μεθυλευγενόλης αναπτύχθηκε μέθοδος που χρησιμοποιεί την Εκχύλιση Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου για την προκατεργασία των δειγμάτων και σύστημα MS/MS (Bousova 2011), (7) για τον προσδιορισμό σαφρόλης αναπτύχθηκε μέθοδος που χρησιμοποιεί την Εκχύλιση Στερεάς Φάσης με ράβδο ανάδευσης για την προκατεργασία των δειγμάτων και GC-MS (Raffo 2013) και (8) τον προσδιορισμό εστραγκόλης, κουμαρίνης, σαφρόλης, θουιόνης, μεθυλευγενόλης και πουλεγόνης αναπτύχθηκε μέθοδος που χρησιμοποιεί τον οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη εκχύλισης, ως εσωτερικό πρότυπο την δίκυκλοέξυλομεθανόλη και GC-MS (Lopez 2014).

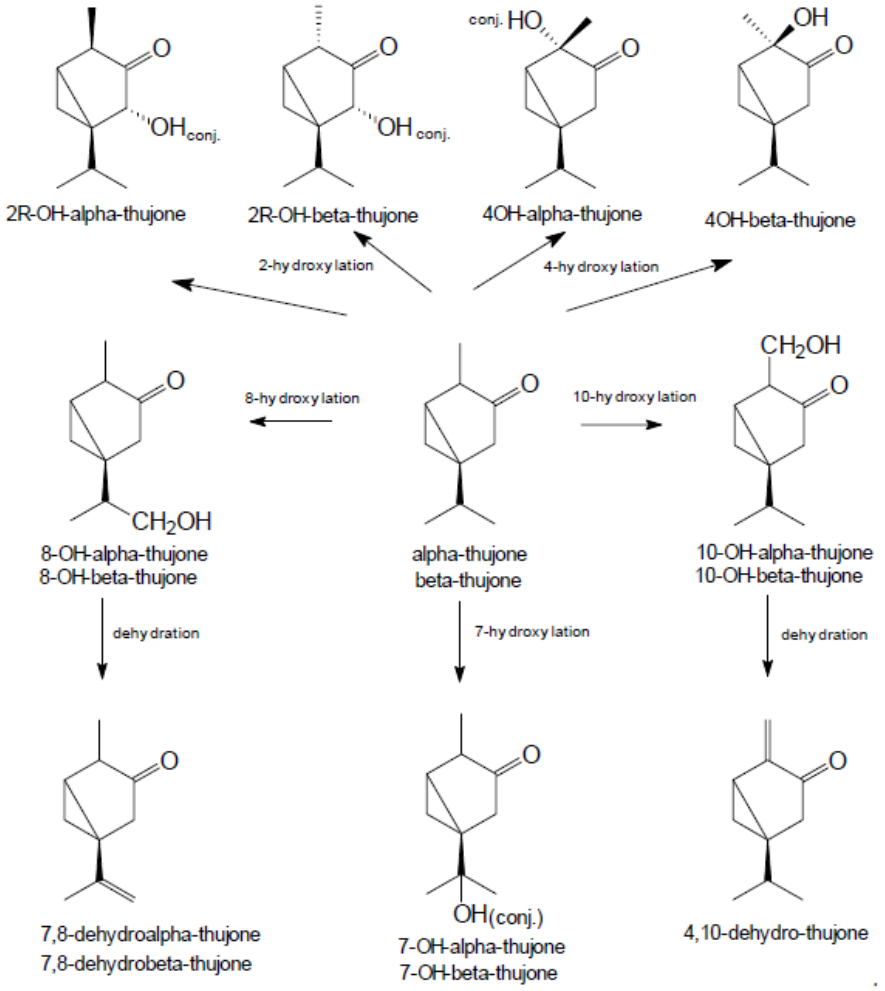
Στην παρούσα εργασία και για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες για το σύστημα GC-MS και το εσωτερικό πρότυπο όπως αυτά περιγράφονται από την επιστημονική ομάδα του Siano (2003) στον προσδιορισμό εστραγκόλης, σαφρόλης και μεθυλευγενόλης σε τρόφιμα.

Στην πραγματικότητα κάθε μέθοδος προοριζόταν για περιορισμένο αριθμό αρωματικών ουσιών, ενώ πραγματοποιείται προσπάθεια ταυτόχρονου προσδιορισμού αρκετών ουσιών από αυτές που ορίζει ο κανονισμός 1334/2008. Επιπροσθέτως μέθοδοι που προορίζονται για αναλύσεις ρουτίνας από εργαστήρια ελέγχου θα πρέπει να πληρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις δηλαδή να είναι σχετικά γρήγορες, ευέλικτες, πολυχρηστικές και οικονομικές.

1.4 Βιοχημική διάσταση

1.4.1 Μεταβολισμός α,β θουιόνης [3]

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν διερευνήσει τον μεταβολισμό των διαστερεοισομερών θουιόνης έχει ταυτοποιηθεί πως ο μεταβολισμός συνήθως περιλαμβάνει τον σχηματισμό υδροξυλιωμένων και αφυδρογονομένων θουιονών, παρά τις παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα διάφορα είδη. Σύνοψη των προτεινόμενων μεταβολιτών παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1 Οι προτεινόμενοι μεταβολίτες α και β θουιόνης [8,26]

Τοξικολογία και καρκινογένεση[35]

Το 2011 το Εθνικό Πρόγραμμα Τοξικολογίας των ΗΠΑ δημοσίευσε μελέτη κατά την οποία σε ομάδες των 50 αρσενικών και θηλυκών αρουραίων και ποντικιών χορηγήθηκαν διαλύματα α, β θουιόνης σε μέθυλο-κυτταρίνη για 5 ημέρες κάθε εβδομάδας με συνολική διάρκεια τα 2 έτη. Οι αρουραίοι έλαβαν 12.5, 25 ή 50 mg α, β θουιόνης ανά kg σωματικού βάρους και τα ποντίκια έλαβαν 3,6,12 ή 25 mg/kg. Η ομάδα ελέγχου έλαβε σκέτη μέθυλο-κυτταρίνη κατά τον ίδιο τρόπο. Με το πέρας της μελέτης εξετάστηκαν ιστοί για περισσότερα από 40 σημεία για κάθε υποκείμενο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης όλοι οι αρουραίοι που έλαβαν δόση 50 mg/kg α, β θουιόνης, κατέληξαν πριν το πέρας της μελέτης. Όλα τα υποκείμενα αυτής της δόσης καθώς και η πλειοψηφία αυτών που έλαβαν 25 mg/kg, παρουσίασαν κρίσεις. Στους αρσενικούς αρουραίους διαπιστώθηκαν αυξημένα περιστατικά καρκίνου σε αδένες των γεννητικών οργάνων και φαιοχρωμοκυττώματος στο επινεφρίδιο. Σχεδόν το σύνολο των ποντικιών που έλαβαν δόση 25 mg/kg α, β θουιόνης παρουσίασαν κρίσεις ενώ τα θηλυκά ποντίκια της ίδιας δόσης κατέληξαν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Δεν διαπιστώθηκε αύξηση στην εμφάνιση καρκίνων στους θηλυκούς αρουραίους και στα ποντίκια και των 2 φύλων.

Η μελέτη καταλήγει πως τα παραπάνω αποτελέσματα οφείλονται στην χορήγηση α, β θουιόνης.

Γνωμοδοτήσεις EFSA και EMA – Συμπεράσματα [8,9,10]

Βασιζόμενοι σε μελέτες γονιδιοτοξικότητας και καρκινογένεσης οι οργανισμοί αυτοί προχώρησαν στις γνωμοδοτήσεις (SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/23 ADD2) και (EMA/HMPC/732886/2010).

Επειδή η ημερήσια αποδεκτή πρόσληψη (acceptable daily intake, ADI) είναι ένα μέτρο της ποσότητας μιας συγκεκριμένης ουσίας που μπορεί να προσλαμβάνεται κατά τη διάρκεια όλης της ζωής χωρίς κάποιο κίνδυνο για την υγεία, για τις περιπτώσεις περιορισμένης πρόσληψης, όπως αυτές των φυτικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, το όριο τιμών για την θουιόνη μπορεί να είναι υψηλότερο από αυτό της πρόσληψης από τη διατροφή. Σε αυτή τη βάση η αρμόδια επιτροπή (Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC) συστήνει ημερήσια πρόσληψη 3.5 mg θουιόνης ανά άτομο (70 kg) και πως το ποσοστό της θουιόνης θα πρέπει να γνωστοποιείται για κάθε παρτίδα.

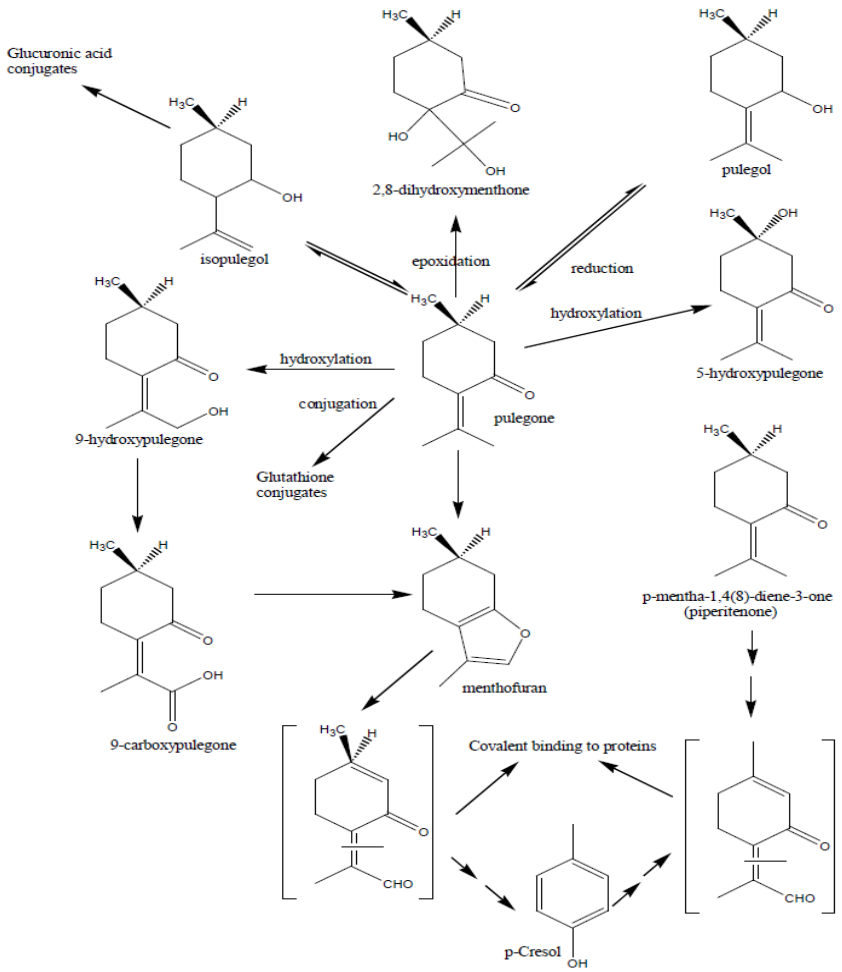
Ωστόσο θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πως η μέση ημερήσια πρόσληψη από τη διατροφή ήδη μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0.3 και 1 mg θουιόνης ανά άτομο, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει αθροιστικά με την πρόσληψη ενός φυτικού φαρμακευτικού προϊόντος σε ημερήσια πρόσληψη επιπέδου 3.8 - 4.5 mg θουιόνης

ανά άτομο. Η πρόσληψη από τα τρόφιμα δεν μπορεί να αγνοηθεί και γενικά θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από την ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (tolerable daily intake, TDI) των 0.7 mg θουιόνης ανά άτομο καθώς με την παράλληλη χρήση ενός φυτικού φαρμακευτικού προϊόντος, η ημερήσια πρόσληψη αυξάνεται κατά τρεις φορές το λιγότερο.

Συνοπτικά συστήνεται ο προσδιορισμός της περιεχόμενης θουιόνης στα προϊόντα και διαπιστώνεται πως πρόσληψη εύρους 3 με 7 mg την ημέρα δεν θέτει λόγους ανησυχίας.

1.4.2 Μεταβολισμός πουλεγόνης [3]

Ο μεταβολισμός της πουλεγόνης έχει μελετηθεί εκτεταμένα και θεωρείται πως ακολουθεί περίπλοκα μεταβολικά μονοπάτια τα οποία περιέχουν περισσότερους από 24 μεταβολίτες, που μερικώς απεικονίζονται στην Εικόνα 1.2.



Εικόνα 1.2 Ο προτεινόμενος μεταβολισμός της πουλεγόνης [7,21,22]

Τοξικολογία και καρκινογένεση[36]

Το 2011 το Εθνικό Πρόγραμμα Τοξικολογίας των ΗΠΑ δημοσίευσε μελέτη κατά την οποία σε ομάδες των 50 αρσενικών και θηλυκών αρουραίων και ποντικιών χορηγήθηκε πουλεγόνη διαλυμένη σε καλαμποκέλαιο, για 5 ημέρες κάθε εβδομάδας με συνολική διάρκεια τα 2 έτη. Οι αρσενικοί αρουραίοι έλαβαν 18.75, 37.5 ή 75 mg πουλεγόνης για κάθε kg σωματικού βάρους και οι θηλυκοί αρουραίοι και το σύνολο των ποντικιών έλαβαν 37.5, 75 ή 150 mg/kg. Η ομάδα ελέγχου έλαβε σκέτο καλαμποκέλαιο κατά τον ίδιο τρόπο. Με την ολοκλήρωση της 60ης εβδομάδας αρκετοί εκ των αρσενικών αρουραίων που λάμβαναν τη δόση των 75 mg/kg και των θηλυκών αρουραίων που λάμβαναν τη δόση των 150 mg/kg κατέληξαν, οπότε και τα υποκείμενα που επέζησαν από αυτές τις ομάδες έλαβαν σκέτο καλαμποκέλαιο για το υπόλοιπο της μελέτης. Στο πέρας αυτής εξετάστηκαν ιστοί για περισσότερα από 40 σημεία για κάθε υποκείμενο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης εμφανίστηκε φλεγμονή στους νεφρούς (σπειρωματοπάθεια) σε όλες τις ομάδες των αρσενικών και θηλυκών ποντικιών και αρουραίων που έλαβαν τις υψηλότερες δόσεις πουλεγόνης. Στους θηλυκούς αρουραίους παρατηρήθηκαν αυξημένα περιστατικά καρκίνου στην ουροδόχο κύστη. Το σύνολο των ποντικιών εμφάνισε περιπτώσεις καλοήθους και κακοήθους καρκίνου στο συκώτι ενώ τα θηλυκά ποντίκια επιπροσθέτως παρουσίασαν μικρή αύξηση σε φλεγμονές των οστών (οστεοσάρκωμα).

Η μελέτη καταλήγει πως τα παραπάνω αποτελέσματα οφείλονται στη χορήγηση πουλεγόνης.

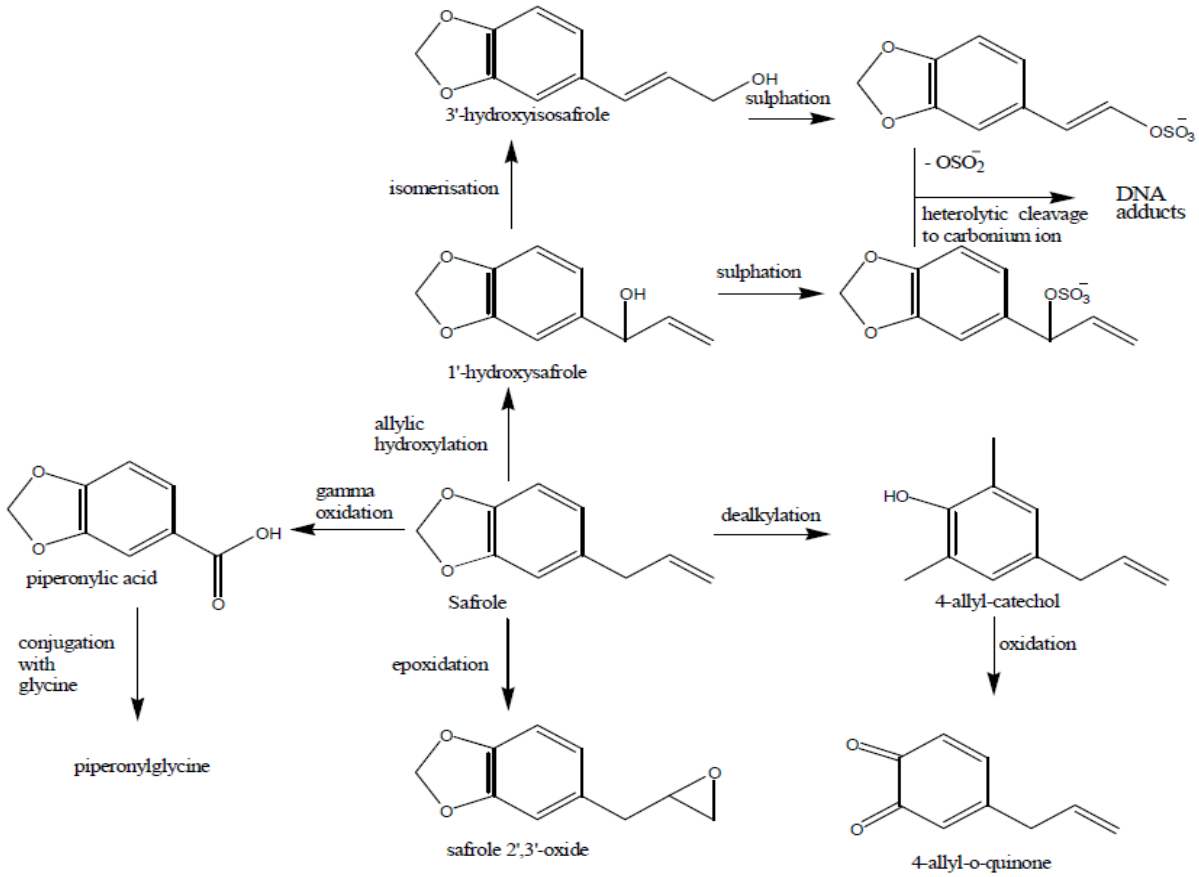
Γνωμοδοτήσεις EFSA και EMA [2,7,9,11]

Βασιζόμενοι σε μελέτες γονιδιοτοξικότητας και καρκινογένεσης οι οργανισμοί αυτοί και σε συνδυασμό με την πρόσφατη ταξινόμηση του Διεθνούς Οργανισμού Ερευνών για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) της πουλεγόνης στην κατηγορία 2Β (πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο) προχώρησαν στις γνωμοδοτήσεις (SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/3 ADD2)και (EMA/HMPC/138386/2005).

Η ημερήσια δόση για έναν ενήλικα 50 κιλών συστήνεται στα 37.5 mg πουλεγόνης ανά ημέρα. Η τιμή αυτή αποτελεί τη μέγιστη δυνατή δόση στην οποία μπορεί να εκτεθεί ένας οργανισμός χωρίς να εκδηλώσει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό το προκαθορισμένο τοξικό αποτέλεσμα (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL). Η ίδια τιμή ισχύει και για τα φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα. Σε περίπτωση θεραπειών διάρκειας μικρότερης του ενός χρόνου η πρόσληψη μπορεί να αυξηθεί στα 75.0 mg ανά ημέρα και γενικά το όριο προσαρμόζεται ανάλογα με το συνολικό αριθμό δόσεων του φαρμακευτικού προϊόντος.

1.4.3 Μεταβολισμός σαφρόλης [3]

Παθητική απορρόφηση σαφρόλης λαμβάνει χώρα άμεσα στο γαστρεντερικό σύστημα και ακολουθεί εκτεταμένος μεταβολισμός. Στην Εικόνα 1.3 παρουσιάζεται μια σύνοψη των μετατροπών που πραγματοποιούνται.



Εικόνα 1.3 Προτεινόμενα μεταβολικά μονοπάτια σαφρόλης [23-25]

Τοξικολογία και καρκινογένεση[37]

Το 1979 διεξήχθησαν μια σειρά από μελέτες οι οποίες αποτέλεσαν τη βάση για την ταξινόμηση της σαφρόλης στην κατηγορία των καρκινογόνων ή πιθανά καρκινογόνων ουσιών (2B).

Μία εξ αυτών αφορά στην καρκινογένεση από σαφρόλη μέσω του πλακούντα και του θηλασμού (Vesselinovitch, 1979). Κατά αυτή τη μελέτη ερευνήθηκε η καρκινογένεση από σαφρόλη μετά από έκθεση εμβρύου ποντικιού μέσω του πλακούντα και νεογέννητου ποντικιού μέσω του μητρικού γάλακτος. Η χορήγηση της ουσίας σε δόση των 120 mg ανά kg σωματικού βάρους πραγματοποιήθηκε σε εγκυμονούντα ποντίκια (4 φορές: την 12^{η}, την 14^{η}, την 16^{η} και την 18^{η} ημέρα κύησης), σε θηλάζουσες μητέρες (12 φορές: κάθε δεύτερη ημέρα μετά τον τοκετό) και σε 4^{ων} εβδομάδων γόνους (180 φορές: 2 φορές για κάθε εβδομάδα με συνολική διάρκεια τις 90 εβδομάδες). Ακόμα 2 ομάδες γόνων έλαβαν συνδυασμό των προαναφερθέντων δόσεων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης παρατηρήθηκε εμφάνιση καρκίνου στο επιθήλιο των νεφρών σε ποσοστό 7 % στους θηλυκούς γόνους που εκτέθηκαν στη σαφρόλη κατά την παραμονή τους στη μήτρα. Μόνο οι αρσενικοί γόνοι που θήλαζαν από μητέρες που λάμβαναν σαφρόλη ανέπτυξαν καρκίνο στο συκώτι σε ποσοστό 34 %. Σε αντίθεση, η απευθείας χορήγηση σαφρόλης από την στιγμή του απογαλακτισμού και με διάρκεια το πέρας της μελέτης οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα περιστατικά καρκίνου στο συκώτι στα θηλυκά υποκείμενα σε ποσοστό 48 % (με υψηλό ποσοστό μεταστάσεων στους πνεύμονες, 42 %), ενώ στα αρσενικά σε ποσοστό 8 %.

Γνωμοδότηση EFSA [6,9]

Βασιζόμενοι σε μελέτες γονιδιοτοξικότητας και καρκινογένεσης ο οργανισμός αυτός προχώρησε στη γνωμοδότηση (SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/6 ADD3) όπου αναδεικνύεται ο κίνδυνος από πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων. Η Επιτροπή αδυνατεί να ορίσει ένα όριο ασφαλείας και γι’ αυτό συστήνεται περιορισμός στην έκθεση και στη χρήση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο}

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Αεριοχρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών [12,13,18]

Εισαγωγή

Η ανάγκη για την ταυτοποίηση των συστατικών σύνθετων μειγμάτων αποτέλεσε το κίνητρο για την ανάπτυξη διάφορων συζευγμένων τεχνικών, συμπεριλαμβανομένης και της αεριοχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (για πτητικές ενώσεις). Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί καθώς οι ενώσεις που μπορούν να αναλυθούν από ένα αεριοχρωματογράφο (μικρό μοριακό βάρος, μέτρια ή χαμηλή πολικότητα, συγκεντρώσεις επιπέδου ppb-ppm) είναι επίσης συμβατές με τις προδιαγραφές της φασματομετρίας.

Αεριοχρωματογραφία

Σε ένα σύστημα αεριοχρωματογραφίας το δείγμα μπορεί να είναι ένα υγρό διάλυμα ή μόρια προσροφημένα σε μια επιφάνεια. Κατά τη μεταφορά στον αεριοχρωματογράφο, το δείγμα εξατμίζεται/εξαχνώνεται με ταχεία έκθεση σε μια ζώνη που επικρατεί υψηλή θερμοκρασία (200-300 °C) και αναμιγνύεται με ρεύμα φέροντος αερίου (Ar, He, N_2 ή H_2). Το αέριο μείγμα που έχει προκύψει εισέρχεται στο τμήμα διαχωρισμού, μια χρωματογραφική στήλη. Με το πέρασμά τους από τη στήλη, τα μόρια των αναλυτών κατανέμονται μεταξύ της ροής του φέροντος αερίου (κινητή φάση) και της επίστρωσης του πολυμερούς (στατική φάση) σε βαθμό που εξαρτάται κυρίως από τη χημική τους δομή και το σημείο ζέσεως. Στο τέλος του τμήματος διαχωρισμού (της στήλης) οι ουσίες φθάνουν σε διαφορετικό χρόνο η καθεμία σε ένα σύστημα ανίχνευσης στο οποίο μια καθορισμένη φυσική ιδιότητα (θερμική αγωγιμότητα) ή μια φυσικοχημική διαδικασία (σύλληψη ηλεκτρονίου, ιοντισμός φλόγας) προκαλεί μεταβολή σε ένα ηλεκτρικό σήμα σε σχέση με το σήμα που λαμβάνεται τη χρονική στιγμή που δεν διέρχονται μόρια (βασική γραμμή), μεταβολή η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας των μορίων με την ίδια ταυτότητα (ίδια ουσία). Ένα ψηφιακό σύστημα καταγραφής και διαχείρισης δεδομένων δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας ενός γραφήματος της μεταβλητότητας του σήματος του ανιχνευτή σε συνάρτηση με το χρόνο (χρωματογράφημα).

Προετοιμασία δείγματος

Η προετοιμασία δείγματος για ανάλυση σε αεριοχρωματογράφο περιλαμβάνει τεχνικές οι οποίες εκλεκτικά απομονώνουν πτητικές και ημιπτητικές ενώσεις και αποτρέπουν τις ιοντικές μορφές και τις ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους να εγχυθούν στο σύστημα. Αυτές οι τεχνικές χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: την Απόσταξη, την Εκχύλιση και τις μεθόδους Υπερκείμενου Αέριου Χώρου.

Επιπροσθέτως υπάρχουν μέθοδοι που συνδυάζουν τεχνικές από δύο κατηγορίες όπως η Ταυτόχρονη Απόσταξη-Εκχύλιση (Simultaneous Distillation Extraction,SDE).

Φασματομετρικός ανιχνευτής μαζών (Mass Spectrometric Detector, MSD)

Το σύστημα ανίχνευσης διακρίνει τα μόρια του αναλύτη από την κινητή φάση, η οποία είναι «διαφανής» για τον ανιχνευτή. Η απόκριση του ανιχνευτή (σήμα) βασίζεται στη μέτρηση μιας φυσικής ιδιότητας της ροής των μορίων του αναλύτη (ιοντικό ρεύμα, θερμική αγωγιμότητα, φθορισμός, δείκτη διάθλασης, εκπομπή φωτονίων κ.α. Το σήμα πρέπει να είναι ανάλογο της ποσότητας του αναλύτη που εξέρχεται της στήλης, καθορίζοντας έτσι μια αλληλένδετη σχέση και διενεργώντας μια ποσοτική ανάλυση, η οποία είναι βασικό κομμάτι του χρωματογραφικού προσδιορισμού και απαντά στο ερώτημα του αριθμού των περιεχόμενων συστατικών και της αναλογίας του καθενός στο μείγμα.

Το φάσμα μαζών (MS) περιέχει πληροφορίες για ένα μοναδικό συνδυασμό φορτισμένων θραυσμάτων (ιόντων) τα οποία δημιουργήθηκαν κατά την θραυσματοποίηση του ιοντισμένου μορίου. Η συμπληρωματικότητα της χρωματογραφικής ανάλυσης (screening) με τα φασματικά δεδομένα επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό GC-MSD. Το τετράπολο είναι ο πιο κοινός αναλυτής που χρησιμοποιείται στα συζευγμένα συστήματα GC-MS. Η GC-MSD ανάλυση παρέχει πληροφορίες σχετικά με: (1) χρόνους κατακράτησης, (2) χρωματογραφικές περιοχές και (3) φάσμα μαζών για κάθε συστατικό του μείγματος, που έχει αποκτηθεί από τον ιοντισμό του με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI) 70eV.

Η παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος (selected ion monitoring, SIM) είναι ένας εκλεκτικός τρόπος λειτουργίας του MSD. Αντί της σάρωσης ενός εύρους μαζών, επιλέγεται να παρακολουθείται μια διακριτή ομάδα τιμών m/z. Αυτό επιτρέπει την καταγραφή πολύ μεγαλύτερου σήματος στη μονάδα του χρόνου, πράγμα που σημαίνει πως η ευαισθησία είναι μεγαλύτερη (30-100 φορές) σε σύγκριση με την πλήρη σάρωση. Η ανάλυση με GC-MS-SIM ενός εκχυλίσματος ή ενός σύνθετου μείγματος επιτρέπει την εκλεκτική ανίχνευση ομόλογων μορίων, ισομερών ή δομικών παραγώγων. Η ανίχνευση γίνεται εξειδικευμένη, άκρως εκλεκτική, όταν τα παρατηρούμενα ιόντα συνθέτουν ένα μοναδικό συνδυασμό ο οποίος μπορεί μόνο να βρεθεί στο φάσμα μαζών του αναλύτη-στόχου.

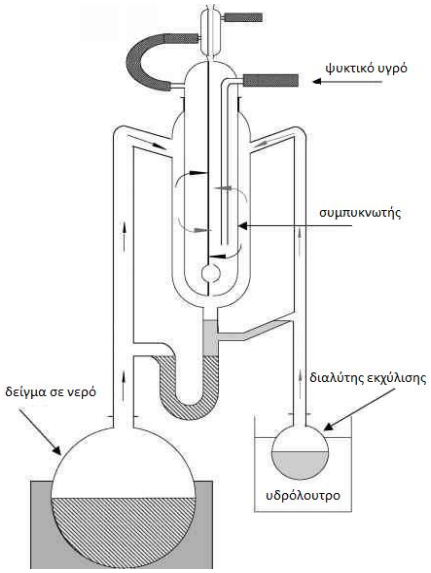
2.2 Ταυτόχρονη Απόσταξη-Εκχύλιση (Simultaneous Distillation Extraction – SDE) [1, 26]

Εισαγωγή

Για ένα δεδομένο δείγμα απαιτείται να προηγηθεί της αεριοχρωματογραφίας , η απομόνωση και συγκέντρωση των πτητικών ουσιών από το μη πτητικό υπόστρωμα. Η Ταυτόχρονη Απόσταξη Εκχύλιση αποτελεί μία από τις πιο συχνές τεχνικές κατεργασίας δείγματος από το 1964, που στηρίζεται στην πτητικότητα και τη διαλυτότητα των υπό εξέταση ενώσεων που περιλαμβάνει την άμεση επαφή του δείγματος με το διαλύτη. Έκτοτε παρατηρούνται συνεχείς βελτιώσεις , με δεδομένα πλεονεκτήματα και περιορισμούς.

SDE Ατμοσφαιρικής Πίεσης (A-SDE)

Η πρώτη συσκευή κατασκευάστηκε το 1964 από τους Likens και Nickerson (Εικόνα 2.1) για την ανάλυση του αιθέριου ελαίου του λυκίσκου. Η επιτευχθείσα απομόνωση – συγκέντρωση σε ένα βήμα των συστατικών «γευσιαρώματος» επέτρεψε δραματική εξοικονόμηση χρόνου ως προς τη διαδικασία διαχωρισμού και πολύ μεγάλη μείωση στους χρησιμοποιούμενους όγκους των διαλυτών. Το δείγμα (υδατικό διάλυμα ή κονίαμα στερεάς ύλης σε νερό) βράζεται υπό ανάδευση σε φιάλη που είναι συνδεδεμένη στον αριστερό βραχίονα. Έπειτα οι πτητικές ουσίες αποστάζονται με υδρατμούς μέσω του άνω μέρους του αριστερού βραχίονα και ταυτόχρονα οι ατμοί του διαλύτη αποστάζονται μέσω του άνω μέρους του δεξιού βραχίονα. Οι ατμοί συμπυκνώνονται στον αποστακτήρα ψυχρού δακτύλου και η διαδικασία της εκχύλισης ανάμεσα στα δύο υγρά στρώματα ξεκινά στην επιφάνεια του ψυκτήρα. Το νερό και ο διαλύτης που έχουν συλλεχθεί και μεταγγιστεί στον διαχωριστή, επιστρέφονται στις αρχικές τους φιάλες. Με αναστροφή των φιαλών επιτρέπεται η χρήση διαλυτών μικρότερης πυκνότητας του νερού.



Εικόνα 2.1 Συσκευή SDE Likens – Nickerson για διαλύτες μεγαλύτερης πυκνότητας του νερού

Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί μια σειρά βελτιώσεων στη συσκευή όπως

1. Χρήση πιο αποτελεσματικών ψυκτήρων και μόνωση του βραχίονα απόσταξης ατμών με παρατηρούμενη απόδοση άνω του 80% (MacLeod)

2. Κατασκευή μικροσυσκευής με τελική συγκέντρωση των πτητικών ουσιών σε 1 mL διαλύτη επιτυγχάνοντας έτσι παράγοντα υψηλής συγκέντρωσης της ουσίας και απευθείας ένεση του οργανικού αποστάγματος στον αεριοχρωματογράφο (Godefroot)

3. Αύξηση της επιφάνειας του συμπυκνωτή ώστε να αποτρέπονται απώλειες και τροποποίηση του βραχίονα απόσταξης σε θέση τέτοια που να επιτρέπει την εργασία με διαλύτες μικρότερης πυκνότητας του νερού στην ίδια συσκευή (Blanch et al.)

Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η παρουσία παραπροϊόντων στα αποστάγματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε:

- Επιμόλυνση

  Έχει παρατηρηθεί πως αντιαφριστικές ουσίες που προστίθενται στο δείγμα και λιπαρές ύλες που χρησιμοποιούνται στα σημεία σύνδεσης των γυάλινων σκευών απελευθερώνουν πτητικές ουσίες. Επίσης έχει διαπιστωθεί επιμόλυνση που οφείλονται στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες και στο αποσταγμένο νερό.

- Οξείδωση

  Πολλά συστατικά είναι επιρρεπή στην οξείδωση (βενζαλδεϋδες, τερπένια, ακόρεστα λιπαρά οξέα κ.α.)
- Θερμικές αντιδράσεις

  Μερικές από τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι η υδρόλυση εστέρων, η αντίδραση Maillard, η αποικοδόμηση σακχάρων κ.α.

Επίδραση των παραμέτρων εργασίας

- Διαλύτης

  Πολλοί διαλύτες μεγαλύτερης ή μικρότερης πυκνότητας του νερού έχουν δοκιμαστεί όπως το διχλωρομεθάνιο, το πεντάνιο, το εξάνιο, το χλωροφόρμιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο διαιθυλαιθέρας, ο μέθυλο τερτ-βουτυλαιθέρας, καθώς και μίγματα αυτών. Συμπερασματικά το διχλωρομεθάνιο αποτελεί την καλύτερη επιλογή για εκχύλιση καθώς μπορεί να μην παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα αλλά έχει την πιο ευρεία εφαρμογή. Η επιλογή του διαλύτη θα πρέπει να γίνεται όχι μόνο σύμφωνα με την διαλυτότητα του αναλύτη σε αυτόν αλλά και τον περιορισμό πιθανών προσμίξεων.
- Εξαλάτωση

  Με σκοπό τη μείωση της διαλυτότητας των πτητικών ουσιών στο νερό προτείνεται η προσθήκη άλατος στη φιάλη του δείγματος (ιδιαίτερα για την ανάκτηση των πολικών ενώσεων).
- Διάρκεια Απόσταξης – Εκχύλισης

  Σαν γενικός κανόνας προτείνεται οι 1-2 ώρες απόσταξη-εκχύλιση για μη λιπαρό υπόστρωμα (π.χ. φυτά).
- Επίδραση οξυγόνου

  Προσοχή πρέπει δοθεί στην απαέρωση του νερού και στην εκτέλεση της απόσταξης-εκχύλισης σε αδρανή ατμόσφαιρα ώστε να ελαχιστοποιηθεί η οξείδωση.

Σύγκριση της A-SDE με άλλα μέσα απομόνωσης αρωματικών υλών

Η A-SDE φέρεται να αποδίδει το πιο αντιπροσωπευτικό απόσταγμα, με την μεγαλύτερη ανάκτηση για την πιο ευρεία γκάμα ενώσεων, μετά από σύγκριση με τις τεχνικές Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (Supercritical Fluid Extraction-SFE) και Soxhlet.

Ποσοτικοποίηση και SDE

Εξαιτίας των υψηλών ανακτήσεων σε συνδυασμό με τη μικρή αστάθεια, η SDE συχνά χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση πτητικών ενώσεων σε διάφορα υποστρώματα. Συνήθως γίνεται προσθήκη στη φιάλη ενός εσωτερικού προτύπου, πριν την SDE, ώστε να περιοριστεί η επίδραση από τυχόν απώλεια του διαλύτη κατά τη διαδικασία του πειράματος. Στην περίπτωση μη ικανοποιητικών ανακτήσεων μπορεί να γίνει χρήση διπλού εσωτερικού προτύπου (το ένα προστίθεται στη φιάλη του δείγματος και το άλλο σε αυτή του διαλύτη).

SDE υπό κενό (V-SDE)

Η κατασκευή αυτής της συσκευής πραγματοποιήθηκε για να αντιμετωπίσει το κύριο μειονέκτημα της ήδη υπάρχουσας που είναι η δημιουργία παραπροϊόντων. Δυστυχώς οι προσπάθειες εργασίας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος απέτυχαν να παρουσιάσουν αποτελέσματα ανάλογα με αυτά της κλασικής συσκευής καθώς υπό συνθήκες υψηλού κενού οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες δεν μπορούσαν να συμπυκνωθούν.

SDE υπό στατικό κενό (SDE apparatus under Static Vacuum)

Αυτό οδήγησε στο κλείσιμο του συστήματος με μια βαλβίδα ώστε να λειτουργεί υπό στατικό κενό, αποφεύγοντας τις υπάρχουσες απώλειες από τη συνεχή «άντληση» κενού. Απαραίτητος ήταν ο συμβιβασμός μεταξύ μιας γρήγορης έκλουσης του διαλύτη και ενός σημείου βρασμού που θα επέτρεπε την συμπύκνωση υπό τέτοια πίεση. Συγκεκριμένοι διαλύτες όπως το επτάνιο, το οκτάνιο, η 2-πεντανόνη και το τολουόλιο ανταποκρίθηκαν στα στις συγκεκριμένες παραμέτρους. Κάτω από αυτές τις ήπιες συνθήκες απόσταξης-εκχύλισης, το σύστημα παρουσίασε αξιοσημείωτο περιορισμό των παραπροϊόντων και αποτέλεσε και τη λύση για θερμοευαίσθητες ουσίες.

2.3 Αρωματικές ύλες και ορισμένα συστατικά τροφίμων με αρωματικές ιδιότητες

2.3.1 Θουιόνη (α και β) [3,14,15]

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Συνώνυμες και εμπορικές ονομασίες

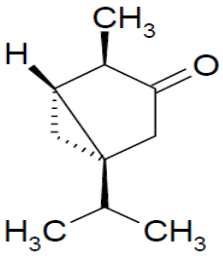
1-ισοπρόπυλο-4-μέθυλο-δίκυκλο[3.1.0]εξαν-3-όνη (IUPAC)

Γενικές πληροφορίες

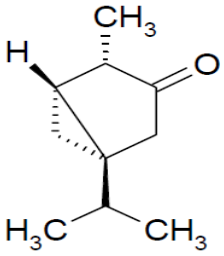
CAS No (α-θουιόνη): 546-80-5, 59573-80-7

CAS No (β-θουιόνη): 471-15-8

Μοριακές δομές



(-)-α-θουιόνη



(+)-β-θουιόνη

Πίνακας 2.1 Δομικές και μοριακές πληροφορίες

Μοριακός τύπος	$C_{10}H_{16}O$
Μοριακό βάρος	152.237 g/mol
Στοιχειακή ανάλυση	C 78 %, H 10.59 %, O 10.51 %
Τάξη	ισοκυκλικό – μονοτερπένιο, κετόνη

Πίνακας 2.2 Σύνοψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων

Χρώμα – Εμφάνιση	άχρωμο ή σχεδόν άχρωμο υγρό
Οσμή	παραπλήσια μίνθης (μέντας)
Διαλυτό σε	αλκοόλη (αιθανόλη) και άλλους οργανικούς διαλύτες (χλωροφόρμιο, διαιθυλαιθέρας, μέθυλο-τερτ-βουτυλαιθέρας)
Αδιάλυτο σε	νερό (407 mg/L στους 25°C)
Σημείο βρασμού	203 °C
Σημείο τήξης	<25 °C
Πυκνότητα	α-θουιόνη 0.9109 g/mL β-θουιόνη 0.9135 g/mL

Πηγή

Η α και β θουιόνη συνυπάρχουν στα αιθέρια έλαια και αποστάγματα φυτών όπως Artemisia absinthium (αρτεμισία το αψίνθιον) και Artemisia vulgarius (κοινή αρτεμισία), Salvia officinalis (φασκόμηλο), Salvia sclarea (φασκομηλιά), Tanacetum vuglaris (τανατσέτο), Thuja occidentalis (κίτρινος κέδρος) και είδη των Juniperus (άρκευθος) και Cedris (κέδρος). Κύρια πηγή για τον άνθρωπο αποτελεί το φασκόμηλο και κάποια αλκοολούχα ποτά.

Η α και β θουιόνη είναι διαστερεοϊσομερή. Τα ισομερή διαφέρουν σε τοξικότητα. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. η β-θουιόνη φέρεται να είναι σημαντικά πιο τοξική σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα. Όμως σε πολλές μελέτες χρησιμοποιείται μίγμα άγνωστης σύστασης όπου έχει βρεθεί πως το α ισομερές είναι αρκετά πιο δραστικό από το β. Η αναλογία α/β θουιόνης ποικίλλει και εξαρτάται από το είδος του φυτού που προέρχεται.

Χρήση

Η θουιόνη έχει χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης. Τα αιθέρια έλαια στα οποία όμως περιέχεται χρησιμοποιούνται σε φάρμακα φυτικής προέλευσης, ως αρωματικές ύλες σε τρόφιμα, αρώματα και απωθητικά ακάρεων/τρωκτικών.

Όρια

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 1334/2008 – Παράρτημα ΙΙΙ

2.3.2 Πουλεγόνη [3,5,16]

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Συνώνυμες και εμπορικές ονομασίες

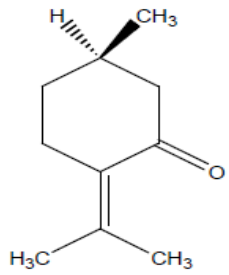
2-ισοπροπυλίδενο-5-μέθυλο-κυκλοεξ-1-όνη (IUPAC)

Γενικές πληροφορίες

CAS No 89-82-7

JECFA No 753

Μοριακή δομή



Πίνακας 2.3 Δομικές και μοριακές πληροφορίες

Μοριακός τύπος	$C_{10}H_{16}O$
Μοριακό βάρος	152.237 g/mol
Στοιχειακή ανάλυση	C 78 %, H 10.59 %, O 10.51 %
Τάξη	ισοκυκλικό – μονοτερπένιο, κετόνη

Πίνακας 2.4 Σύνοψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων

Χρώμα - Εμφάνιση	άχρωμο έλαιο
Οσμή	μεταξύ μίνθης (μέντας) και καμφοράς
Διαλυτό σε	αλκοόλη (αιθανόλη) και άλλους οργανικούς διαλύτες (χλωροφόρμιο, διαιθυλαιθέρας, μέθυλο-τερτ-βουτυλαιθέρας)
Αδιάλυτο σε	νερό (276 mg/L στους 25 °C)
Σημείο βρασμού	224 °C
Πυκνότητα	0.9346 g/mL

Πηγή

Η πουλεγόνη βρίσκεται σε φυτά της οικογένειας Lamiaceae (ή Labiatae). Είναι κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων του δυόσμου και του φλισκουνιού, επίσης περιέχεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στην ρίγανη, το τσάι και τα φασόλια.

Η πουλεγόνη θεωρείται ως ενεργό συστατικό στο φλισκούνι όπως και σε άλλα είδη μέντας. Η ποσότητα πουλεγόνης που μπορεί να βρεθεί σε ένα φυτό εξαρτάται από την προέλευση του φυτού, τις ετήσιες καιρικές συνθήκες, τον χρόνο συγκομιδής, την ηλικία του φυτού, την τοποθεσία και τον χρόνο εμφύτεψης.

Χρήση

Τα φύλλα και άνθη φυτών που περιέχουν πουλεγόνη χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως αρωματικά, μπαχαρικά και για τη δημιουργία τσαγιού. Η χρήση του δυόσμου είναι εκτεταμένη στον αρωματισμό τόσο τροφίμων (καραμέλες, είδη ζαχαροπλαστικής) όσο και ποτών. Επιπλέον το έλαιο φλισκουνιού αποτελεί συστατικό αρωμάτων, προϊόντων στοματικής υγιεινής και απορρυπαντικών. Τόσο το έλαιο δυόσμου όσο και αυτό του φλισκουνιού χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις κοινού κρυώματος, πονοκέφαλου, δυσμηνόρροιας κ.α.

Όρια

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 1334/2008 – Παράρτημα ΙΙΙ

2.3.3 Σαφρόλη [3,17]

Φυσικοχημικές ιδιότητες

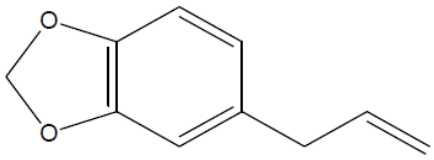
Συνώνυμες και εμπορικές ονομασίες

1-άλλυλο-3,4-μέθυλοδιόξυβενζόλιο (IUPAC)

Γενικές πληροφορίες

CAS No 94-59-7

Μοριακή δομή



Πίνακας 2.5 Δομικές και μοριακές πληροφορίες

Μοριακός τύπος	$C_{10}H_{10}O_2$
Μοριακό βάρος	162.188 g/mol
Στοιχειακή ανάλυση	C 74.05 %, H 6.21 %, O 19.7 %
Τάξη	ετεροκυκλικό, υποκατεστημένο αλλυλοβενζόλιο

Πίνακας 2.6 Σύνοψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων

Χρώμα - Εμφάνιση	άχρωμο ή υποκίτρινο υγρό
Οσμή	σασσαφρά
Διαλυτό σε	αιθέρα (διαιθυλαιθέρας, μέθυλο-τερτ-βουτυλαιθέρας), χλωροφόρμιο
Αδιάλυτο σε	νερό (121 mg/L στους 25 °C)
Σημείο βρασμού	232-234 °C
Σημείο τήξης	11.2 °C
Πυκνότητα	0.946 g/mL

Πηγή

Η σαφρόλη εντοπίζεται σε μια σειρά μπαχαρικών όπως το μοσχοκάρυδο, η κανέλα, ο γλυκάνισος, το μαύρο πιπέρι, ο βασιλικός και ο σάσσαφρος.

Το αιθέριο έλαιο από θρυμματισμένα φύλλα του Piper auritum, περιέχει 70% σαφρόλη. Έχει βρεθεί πως η συνολική ποσότητα σαφρόλης σε δείγμα μαύρου πιπεριού τελικά μειώθηκε σε ποσοστό 57-99% της αρχικής εξαιτίας των διάφορων μεθόδων κατεργασίας/μαγειρέματος.

Χρήση

Η σαφρόλη περιέχεται σε ποικίλες συγκεντρώσεις σε πολλά μπαχαρικά που χρησιμοποιούνται για τον αρωματισμό τροφίμων. Τέτοια μπαχαρικά παρουσιάζονται επίσης σε διάφορα αναψυκτικά π.χ. τύπου cola. Πρόσθετη χρήση γίνεται από τη βιομηχανία αρωμάτων και κατά τη δημιουργία σαπουνιών. Μερίδα ψαράδων εκμεταλλεύονται το αιθέριο έλαιο του Piper autitum, που περιέχει κατά 70% σαφρόλη για να προσελκύουν ψάρια.

Όρια

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 1334/2008 – Παράρτημα III

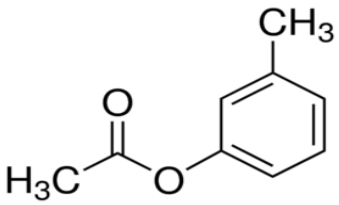
2.3.4 Μέτα τολυλεστέρας του οξικού οξέος (IS) [33]

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Γενικές πληροφορίες

CAS No 122-46-3

Μοριακή δομή



Πίνακας 2.7 Δομικές και μοριακές πληροφορίες

Μοριακός τύπος	$C_9H_{10}O_2$
Μοριακό βάρος	150.177 g/mol
Στοιχειακή ανάλυση	C 71.98 %, H 6.71 %, O 21.31 %
Τάξη	οξικός εστέρας της μετακρεζόλης

Πίνακας 2.8 Σύνοψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων

Χρώμα - Εμφάνιση	άχρωμο ή υποκίτρινο διαυγές υγρό
Διαλυτό σε	αιθέρα, αλκοόλη
Αδιάλυτο σε	νερό
Σημείο βρασμού	210-213 °C
Σημείο τήξης	12.0 °C
Πυκνότητα	1.04 g/mL
m/z (EI, 70eV, positive)	150, 108, 107

2.4 Εξοπλισμός-Οργανολογία

Η Ταυτόχρονη Απόσταξη-Εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε αυτοσχέδια διάταξη του εργαστηρίου (τύπου Clevenger), χρησιμοποιώντας σύστημα ψύξης (IDE), θερμαντικούς μανδύες (FALC και ELECTROTHERMAL), σφαιρικές φιάλες 1000 mL (ISOLAB, Germany), αποστακτήρες μήκους 100 mm και χωρητικότητα απόσταξης 12 mL, φιαλίδια 5 mL, υάλινες πιπέτες Pasteur, φιαλίδια βιδωτά ή κουμπωτά 2 mL (AGILENT TECHNOLOGIES).

Η ανάδευση των φιαλιδίων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή HEIDOLPH REAX 2000.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης, πρότυπων διαλυμάτων και διαλυμάτων εργασίας χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες 250 μL (HAMILTON), 1000 μL (SGE), σιφώνια 2 mL και 5 mL (HBG Precicolor, Germany) και ογκομετρικές φιάλες 50 mL (DURAN, Germany).

Για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (SARTORIUS, BP2215) και δύο δεκαδικών ψηφίων (HAMILTON INSTRUMENTS, PB3002), γουδιά διαφόρων μεγεθών (WETA) και ομογενοποιητής (IKA, T 25 digital ULTRA TURRAX).

Το σύστημα αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών που χρησιμοποιήθηκε είναι μάρκας Shimadzu μοντέλο GC-MS QP2010. Το όλο σύστημα αποτελείται από τα κατωτέρω:

- Αέριο χρωματογράφο Shimadzu με δύο εισόδους split/splitless
- Αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu με απλό πύργο και δίσκο φιαλιδίων (μοντέλο AOC 5000)
- Φασματογράφο μάζας με πηγές ιονισμού EI, CI και NCI.
- Ειδική είσοδο DI απ' ευθείας εισαγωγής δείγματος στην πηγή ιονισμού
- Λογισμικό με πλήρη επικοινωνία με όλα τα ανωτέρω συστήματα και με πλήρη δυνατότητα επεξεργασίας δεδομένων Shimadzu GC MS Solutions ver. 2.21
- Προσωπικό υπολογιστή PC με Windows NT στον οποίο είναι εγκατεστημένο το ανωτέρω λογισμικό.

- Εκτυπωτή Ink Jet.
- Παροχή αερίων He και CH4 από το δίκτυο των αερίων του εργαστηρίου με ανεξάρτητα μανόμετρα πριν την τελική σύνδεση στο χρωματογράφο.

2.5 Αντιδραστήρια [20, 34]

Κατά τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Θουιόνη (α και β), ($C_{10}H_{16}O$), βαθμού καθαρότητας 86.7 % (α θουιόνη 71.3 % και β θουιόνη 15.4 %), (FLUKA)
- (+)- Πουλεγόνη, ($C_{10}H_{16}O$), βαθμού καθαρότητας ≥98.5 %, (SIGMA-ALDRICH)
- Σαφρόλη, ($C_{10}H_{10}O_2$), βαθμού καθαρότητας 99.8 %, (SIGMA)
- Μέτα τολυλεστέρας του οξικού οξέος, ($C_9H_{10}O_2$), βαθμού καθαρότητας 99.7 %, (ACROS ORGANICS)
- Τερτ βούτυλομεθυλαιθέρας, MTBE, ($(CH_3)_3COCH_3$, (MERCK και CHEM-LAB)
- Ακετόνη , CH_3COCH_3, βαθμού καθαρότητας ≥99.5 % για αεριοχρωματογραφία, (SIGMA-ALDRICH)
- Θειικό νάτριο άνυδρο, Na_2SO_4, βαθμού καθαρότητας ≥99.0 %, (FLUKA ANALYTICAL)
- Νερό, (H_2O), υπερκάθαρο, συσκευή Nex Power 1000, Human Corporation

2.6 Διαλύματα παρακαταθήκης

Παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης για κάθε ουσία συγκέντρωσης περίπου 1000 mg L^{-1} ως εξής:

[A] Ζυγίζονται 0.1090 g πρότυπης ουσίας σαφρόλης απευθείας σε ογκομετρική φιάλη 100 mL και ακολουθεί αραίωση μέχρι χαραγής με MTBE. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος παρακαταθήκης της σαφρόλης είναι 1090 ppm.

[B] Ζυγίζονται 0.0566 g πρότυπης ουσίας α,β θουιόνης απευθείας σε ογκομετρική φιάλη 50 mL και ακολουθεί αραίωση μέχρι χαραγής με MTBE. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος παρακαταθήκης της α,β θουιόνης είναι 1132 ppm.

[Γ] Ζυγίζονται 0.0580 g πρότυπης ουσίας πουλεγόνης απευθείας σε ογκομετρική φιάλη 50 mL και ακολουθεί αραίωση μέχρι χαραγής με MTBE. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος παρακαταθήκης της πουλεγόνης είναι 1160 ppm.

[Δ] Ζυγίζονται 0.0502 g πρότυπης ουσίας μέτα τολυλεστέρα του οξικού οξέος απευθείας σε ογκομετρική φιάλη 50 mL και ακολουθεί αραίωση μέχρι χαραγής με MTBE. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος παρακαταθήκης του μέτα τολυλεστέρα του οξικού οξέος είναι 1004 ppm.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονται σε ψυγείο (2-8 °C) όπου παραμένουν σταθερά.

2.7 Διαλύματα εργασίας

Για την παρασκευή του κάθε διαλύματος εργασίας φέρονται σε ογκομετρική φιάλη 5 mL του αντίστοιχου διαλύματος παρακαταθήκης και συμπληρώνεται μέχρι χαραγής με τον διαλύτη MTBE, ως φαίνονται στον Πίνακα 2.9.

Πίνακας 2.9 Διαλύματα εργασίας

Αρχικό διάλυμα	Όγκος (mL)	Διαλύτης	Τελικός όγκος (mL)	Τελική συγκέντρωση (mg L^{-1})
Α	5	MTBE	50	109
Β	5	MTBE	50	113.2
Γ	5	MTBE	50	116
Δ	5	MTBE	50	100.4

Για την παρασκευή του κάθε μίγματος πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς για κάθε επίπεδο φέρεται σε σφαιρική φιάλη 1000 mL ο εκάστοτε όγκος του διαλύματος εργασίας της κάθε ουσίας και ακολούθως προστίθενται 0.50 mL του διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου, ο επιλεγμένος όγκος διαλύτη εκχύλισης, 200 mL υπερκάθαρου νερού και πέτρες βρασμού, ως φαίνεται στον Πίνακα 2.10.

Πίνακας 2.10 Μίγματα πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Επίπεδο καμπύλης αναφοράς	Όγκος δ/τος εργασίας α,β θουιόνης (mL)	Όγκος δ/τος εργασίας πουλεγόνης (mL)	Όγκος δ/τος εργασίας σαφρόλης (mL)	Όγκος δ/τος εργασίας μέτα τολυλεστέρα του οξικού οξέος (IS) (mL)	'Ογκος διαλύτη MTBE (mL)
1	0.10	0.10	0.10	0.50	4.00
2	0.25	0.25	0.25	0.50	4.00
3	0.50	0.50	0.50	0.50	4.00
4	0.75	0.75	0.75	0.50	4.00
5	1.50	1.50	1.50	0.50	2.00

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο}

Αποτελέσματα

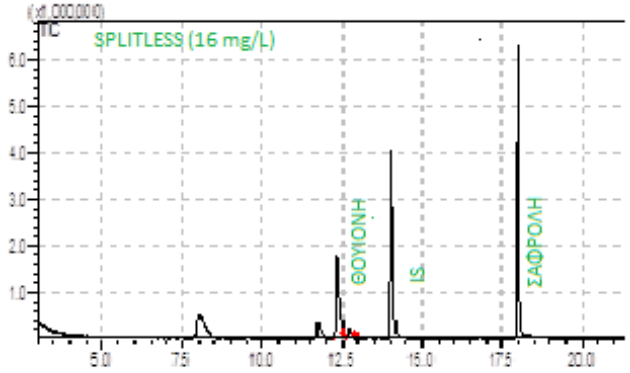
3.1 Καθορισμός των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών [20, 34]

1. Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης και του εσωτερικού προτύπου έγινε με βάση τη βιβλιογραφία και τη διαθεσιμότητα του εργαστηρίου.
2. Πειραματικά διαπιστώθηκε η ανάγκη για προκατεργασία των πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς με SDE. Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς χωρίς και με κατεργασία SDE όπου και έγιναν οι παρατηρήσεις. Πρότυπο διάλυμα σαφρόλης μετά από προκατεργασία με SDE, αναλύθηκε και επεξεργάστηκε με την καμπύλη αναφοράς άνευ SDE όπου παρατηρήθηκε απόκριση αυξημένη κατά 20 %.
3. Η διάρκεια της προκατεργασίας των δειγμάτων με SDE παρουσιάζει την ίδια αποτελεσματικότητα είτε αναφέρεται σε 60 min είτε σε 90 min εκχύλισης (επιβεβαιώνεται πειραματικά). Επιλέχθηκε χρόνος ίσος με 90 min για την προκατεργασία με την τεχνική SDE.
4. Πειραματικά διαπιστώθηκε πως ο συνολικός προστιθέμενος όγκος διαλύτη εκχύλισης κατά την προκατεργασία με SDE αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει την απόκριση των ουσιών και συγκεκριμένα αυτός δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 7 mL. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1 που ακολουθεί στα μίγματα πρότυπων διαλυμάτων που ο συνολικός όγκος του διαλύτη εκχύλισης υπερβαίνει τα 7 mL παρατηρείται σημαντική μείωση του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Τα επισημασμένα πρότυπα διαλύματα απορρίπτονται.

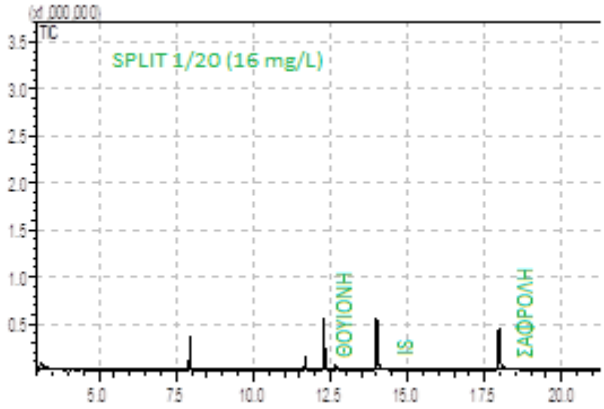
Πίνακας 3.1 Επίδραση του συνολικού όγκου διαλύτη εκχύλισης στο εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου κατά την SDE

Όγκος δ/τος εργασίας κάθε ουσίας (mL)	**Όγκος διαλύτη εκχύλισης (mL)**	**Σύνολο όγκου διαλύτη εκχύλισης (mL)**	**Ολοκλήρωμα κορυφής IS**	**Μέσος όρος ολοκληρωμάτων κορυφών IS**
0,10	4,00	4,80	922.251	845.873
			798.026	
			817.342	
0,25	4,00	5,25	494.448	528.588
			498.323	
			592.992	
0,50	4,00	6,00	399.143	480.419
			467.886	
			574.228	
0,75	4,00	6,75	649.686	610.680
			582.390	
			599.965	
1,00	4,00	7,50	221.109	248.674
			243.599	
			281.314	
1,50	4,00	**9,00**	38.506	**51.162**
			53.080	
			61.899	
1,50	2,00	7,00	523.915	560.708
			567.704	
			590.504	
2,00	4,00	**10,50**	2.251	**2.693**
			2.876	
			2.953	

5. Η επιλογή εισαγωγής του δείγματος στο σύστημα GC-MS, άνευ διαμοιρασμού έγινε με κριτήριο τη συμμετρία και τα ολοκληρώματα των χρωματογραφικών κορυφών, λαμβάνοντας υπόψη τα επιθυμητά επίπεδα της καμπύλης αναφοράς. Παρακάτω στις εικόνες 3.1 και 3.2 γίνεται αντίστοιχα η σύγκριση χρωματογραφημάτων μεταξύ άνευ διαμοιρασμού (διαλύματος συγκέντρωσης 16 mg/L) και με διαμοιρασμό 1/20 (διαλύματος συγκέντρωσης 16 mg/L). Επιπροσθέτως στον Πίνακα 3.2 παρατίθενται τα ολοκληρώματα των χρωματογραφικών κορυφών για τις ουσίες α,β θουιόνη, σαφρόλη και του εσωτερικού προτύπου για τα διαλύματα συγκέντρωσης 16 mg/L για τις δύο περιπτώσεις εισαγωγής δείγματος.



Εικόνα 3.1 Χρωματογράφημα δ/τος συγκέντρωσης 16 mg/L εισαγωγής δείγματος άνευ διαμοιρασμού



Εικόνα 3.2 Χρωματογράφημα δ/τος συγκέντρωσης 16 mg/L εισαγωγής δείγματος με διαμοιρασμό 1/20

Πίνακας 3.2 Ολοκληρώματα χρωματογραφικών κορυφών των ουσιών α,β θουιόνης, σαφρόλης και εσωτερικού προτύπου για τις λειτουργίες εισαγωγής δείγματος άνευ διαμοιρασμού και με διαμοιρασμό 1/20

Ουσία	**Θουιόνη α**	**Θουιόνη β**	**Μέτα τολυλεστέρας του οξικού οξέος (IS)**	**Σαφρόλη**
Ολοκλήρωμα κορυφής (άνευ διαμοιρασμού, 16 mg/L)	809.801	144.959	261.053	2.518.141
Ολοκλήρωμα κορυφής (με διαμοιρασμό 1/20, 16 mg/L)	84.316	16.860	18.070	110.939

3.2 Ανάπτυξη μεθόδου

Η μέθοδος εκμεταλλεύεται τους συντελεστές κατανομής των πτητικών αναλυτών μεταξύ του δείγματος τροφίμου σε νερό και του διαλύτη. Το δείγμα ομογενοποιείται και φέρεται σε σφαιρική φιάλη όπου και προστίθενται διαδοχικά υπερκάθαρο νερό, πέτρες βρασμού, διαλύτης εκχύλισης και το εσωτερικό πρότυπο. Η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη διάταξη Ταυτόχρονης Απόσταξης-Εκχύλισης και στο θερμαντικό μανδύα. Η φιάλη θερμαίνεται και οι παραγόμενοι ατμοί, ακολουθώντας τον κάθετο βραχίονα, συμπυκνώνονται στον αποστακτήρα τύπου Graham. Τόσο η υδατική όσο και η οργανική φάση που δημιουργούνται, συγκεντρώνονται σε προχοϊδα 12 mL. Το νερό όντας πυκνότερο του MTBE καταλαμβάνει την βάση της προχοϊδας και μέσω του κεκλιμένου βραχίονα οδηγείται πίσω στη φιάλη. Με την συνεχή επανάληψη αυτού του κύκλου που πραγματοποιεί το νερό επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη εκχύλιση. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται η αυτοσχέδια διάταξη Ταυτόχρονης Απόσταξης-Εκχύλισης.



Εικόνα 3.3 Αυτοσχέδια διάταξη Ταυτόχρονης Απόσταξης-Εκχύλισης

Το ομογενοποιημένο δείγμα φέρεται σε σφαιρική φιάλη 1000 mL όπου και προστίθενται διαδοχικά 200 mL υπερκάθαρου νερού (ώστε να περιοριστούν τυχόν προσμίξεις), πέτρες βρασμού (για ομαλό και ομοιόμορφο βρασμό), 4 mL διαλύτη

εκχύλισης (MTBE) και 1 mL εσωτερικού προτύπου (μέτα τολυλεστέρας του οξικού οξέος). Ανάλογα διαμορφωμένο σύστημα ψύξης διατηρεί τη θερμοκρασία στους 4 – 7 °C.

Στην περίπτωση όπου υπάρχει το ενδεχόμενο το δείγμα να παρουσιάσει έντονο αφρισμό κατά τη διάρκεια της SDE και εφόσον δεν είναι δυνατή η επέμβαση στη διάταξη αφού αρχίσει η διαδικασία, προτείνεται η προσθήκη καρναουβικού κηρού (αντιαφριστική ουσία) στη σφαιρική φιάλη.

Αρχικά ο θερμαντικός μανδύας ρυθμίζεται στο μέγιστο επίπεδο. Με την έναρξη του βρασμού η θερμοκρασία επαναρυθμίζεται στο μέσο επίπεδο. Η απόσταξη συνεχίζεται για 90 min, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διάρκεια αυτής πως η πειραματική διάταξη παραμένει καθαρή, δεν παρατηρείται διαρροή και πως η διαδικασία της SDE εξελίσσεται ομαλά. Με το πέρας του χρόνου αυτού διακόπτεται η λειτουργία του θερμαντικού μανδύα και η συσκευή αφήνεται για 15 min ώστε να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια απορρίπτεται η υδατική φάση ενώ η οργανική συλλέγεται σε γυάλινο φιαλίδιο 5 mL. Με μια σπάτουλα προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου (για να απομακρυνθεί η υγρασία) και το φιαλίδιο φέρεται σε κατάλληλο αναδευτήρα για 10 sec.Ακολούθως με μια γυάλινη πιπέτα Pasteur μεταγγίζεται μέρος του αποστάγματος σε φιαλίδιο 2 mL για ανάλυση σε GC-MS. Τέλος πραγματοποιείται επιμελής καθαρισμός της διάταξης με ακετόνη.

Παρατηρήσεις

Κατά τη διάρκεια λειτουργίας της συσκευής SDE, έγινε προφανές πως ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στη διασφάλιση της καθαριότητας και στεγανότητας του συστήματος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άγκιστρα και περιβλήματα Teflon στα σημεία σύνδεσης. Κρίνεται απαραίτητη η τακτική επίβλεψη της συσκευής ώστε να διασφαλίζεται η σωστή λειτουργία του συστήματος.

Κατά το βρασμό παρατηρείται πως κάποια δείγματα έχουν την τάση να αφρίζουν δημιουργώντας ένα δαχτυλίδι στερεού υπολείμματος σε μεγαλύτερο ύψος της στάθμης νερού, ενώ κάποιες φορές αυτό οδηγεί σε επιμόλυνση της συσκευής

απαιτώντας επιμελή καθαρισμό των μερών της. Συνιστάται η περιοδική ανακίνηση της συσκευής SDE.

Συγκεκριμένα δείγματα όπως τα βότανα (πχ φλισκούνι) πρέπει να είναι επαρκώς τεμαχισμένα ώστε να επιτυγχάνεται διάσπαση του μητρικού υλικού. Δοκιμές με ισχυρά αντιδραστήρια μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντική απώλεια αναλύτη με απρόβλεπτα αποτελέσματα.

Στους Πίνακες 3.3 έως 3.7 παρατίθενται οι συνθήκες λειτουργίας και χαρακτηριστικά του συστήματος GC-MS και στην Εικόνα 3.4 απεικονίζεται σε γράφημα το πρόγραμμα θερμοκρασίας του κλιβάνου.

Πίνακας 3.3 Συνθήκες λειτουργίας συστήματος GC-MS

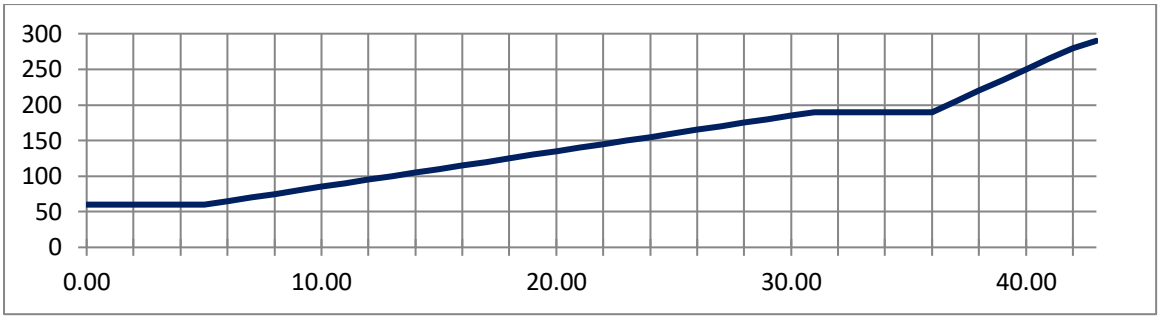
Αρχική θερμοκρασία (κλίβανος)	60 °C
Θερμοκρασία εγχυτήρα	250 °C
Λειτουργία ένεσης	άνευ διαμοιρασμού
Όγκος ενέσιμου δείγματος	1 μL
Διάρκεια δειγματοληψίας	1.00 min

Πίνακας 3.4 Συνθήκες που αφορούν στο φέρον αέριο (He)

Λειτουργία ελέγχου ροής	γραμμική ταχύτητα
Πίεση	51.0 kPa
Συνολική ροή	22.3 mL/min
Ροή στήλης	0.92 mL/min
Γραμμική ταχύτητα	35.0 cm/sec
Ροή καθαρισμού	3 mL/min
Αναλογία διαμοιρασμού	20.0

Πίνακας 3.5 Πρόγραμμα θερμοκρασίας κλιβάνου

	Ρυθμός	**Τελική θερμοκρασία**	**Χρόνος αναμονής**
0	-	60.0 °C	5.00 min
1	5.00 °C/min	190.0 °C	5.00 min
2	15.00 °C/min	290.0 °C	0.00



Εικόνα 3.4 Γράφημα του προγράμματος θερμοκρασίας του κλιβάνου

Συνολικός χρόνος προγράμματος: 42.67 min

Πίνακας 3.6 Χαρακτηριστικά της χρωματογραφικής στήλης

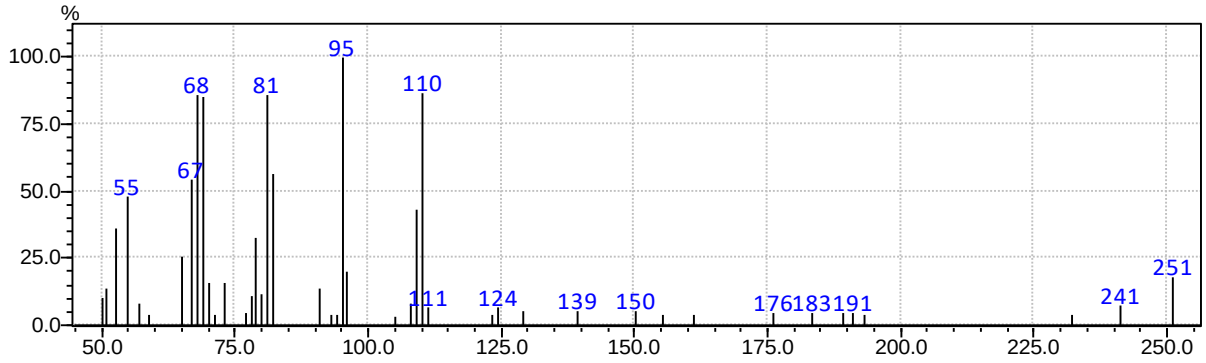
Όνομα	DB-5ms (Agilent)
Διαστάσεις	30.0 m x 0.25 mm x 0.25 μm
Σύσταση	φαίνυλο άρυλο πολυμερές
Χαρακτηριστικά	τριχοειδής στήλη, μη πολική

Πίνακας 3.7 Συνθήκες λειτουργίας ανιχνευτή MS

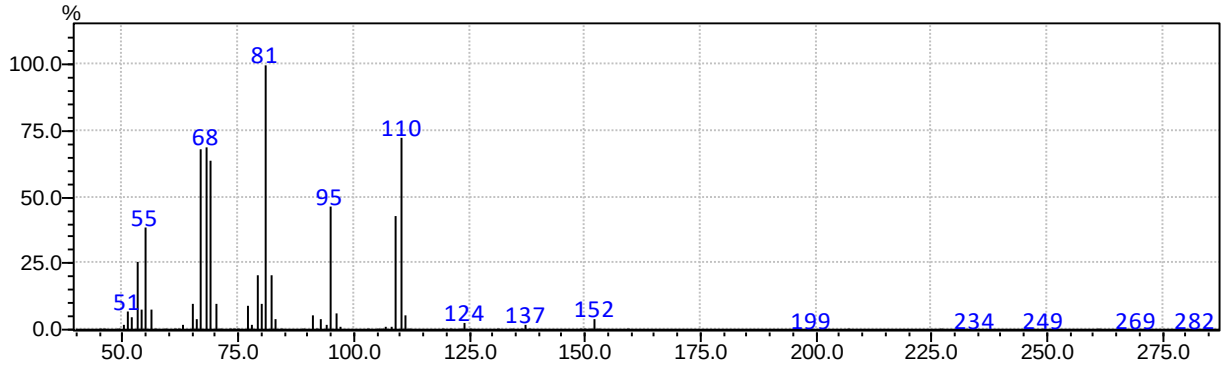
Τεχνική ιοντισμού	ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων 70 eV
Όριο τάσης ανιχνευτή	150 V
Θερμοκρασία πηγής ιόντων	200 °C
Θερμοκρασία διεπαφής	300 °C
Λειτουργία συλλογής δεδομένων	SCAN και SIM
Πλήρη σάρωση μαζών (SCAN)	45 – 300 m/z

Καθεμία από τις ουσίες (α, β θουιόνη, πουλεγόνη, σαφρόλη, μέτα τολυλεστέρας του οξικού οξέος - IS) εποπτεύεται σε λειτουργία παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων (SIM) . Η ποσοτικοποίηση αυτών γίνεται βάσει του ιόντος που βρίσκεται σε αφθονία (target ion) και η ταυτοποίηση βάσει μίας ομάδας κατάλληλων ιόντων (qualifier ions). Στις Εικόνες 3.5 έως 3.9 παρατίθενται τα διαγράμματα θραυσμάτων όλων των ουσιών από τα οποία έγινε η επιλογή των ιόντων και στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται τα επιλεγμένα ιόντα κάθε ουσίας. Τα διαγράμματα θραυσμάτων

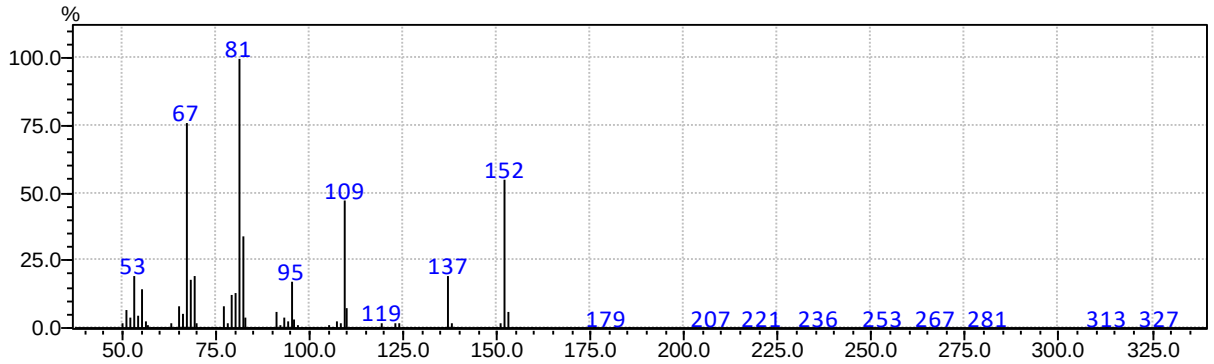
αποκτήθηκαν μετά από ανάλυση του διαλύματος εργασίας κάθε ουσίας σε λειτουργία πλήρης σάρωσης (scan).



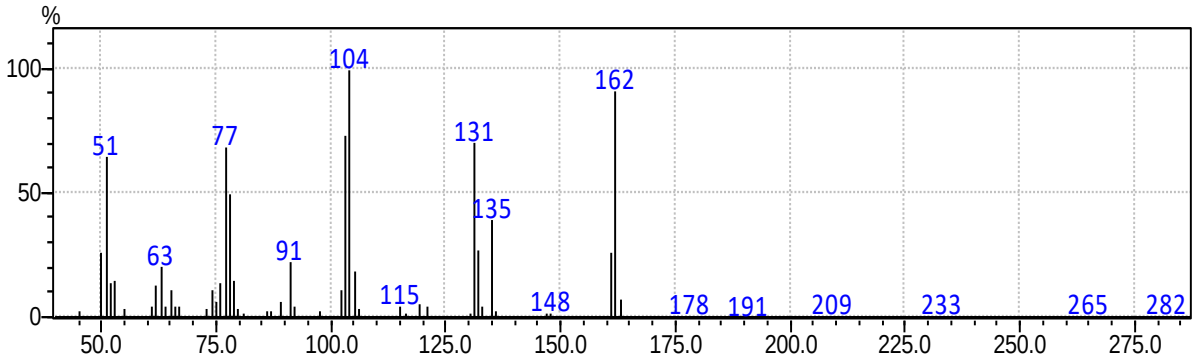
Εικόνα 3.5 Διάγραμμα θραυσμάτων του πρότυπου δ/τος α θουιόνης συγκέντρωσης 107,6 mg L^{-1} σε λειτουργία εισαγωγής δείγματος με διαμοιρασμό 1/40 και πλήρη σάρωσης



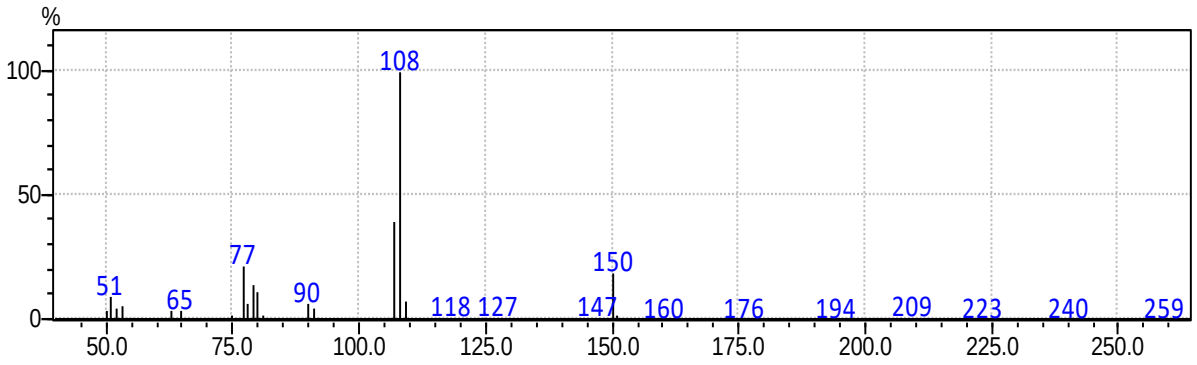
Εικόνα 3.6 Διάγραμμα θραυσμάτων του πρότυπου δ/τος β θουιόνης συγκέντρωσης 107,6 mg L^{-1} σε λειτουργία εισαγωγής δείγματος με διαμοιρασμό 1/40 και πλήρη σάρωση



Εικόνα 3.7 Διάγραμμα θραυσμάτων του πρότυπου δ/τος πουλεγόνης συγκέντρωσης 116 mg L^{-1} σε λειτουργία εισαγωγής δείγματος με διαμοιρασμό και πλήρη σάρωση



Εικόνα 3.8 Διάγραμμα θραυσμάτων του πρότυπου δ/τος σαφρόλης συγκέντρωσης 99,6 mg L^{-1} σε λειτουργία εισαγωγής δείγματος με διαμοιρασμό 1/40 και πλήρη σάρωση



Εικόνα 3.9 Διάγραμμα θραυσμάτων του πρότυπου δ/τος μέτα τολυλεστέρα του οξικού οξέος (IS) συγκέντρωσης 105 mg L^{-1} σε λειτουργία εισαγωγής δείγματος με διαμοιρασμό 1/40 και πλήρη σάρωση

Πίνακας 3.8 Επιλεγμένα ιόντα ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης για κάθε ουσία

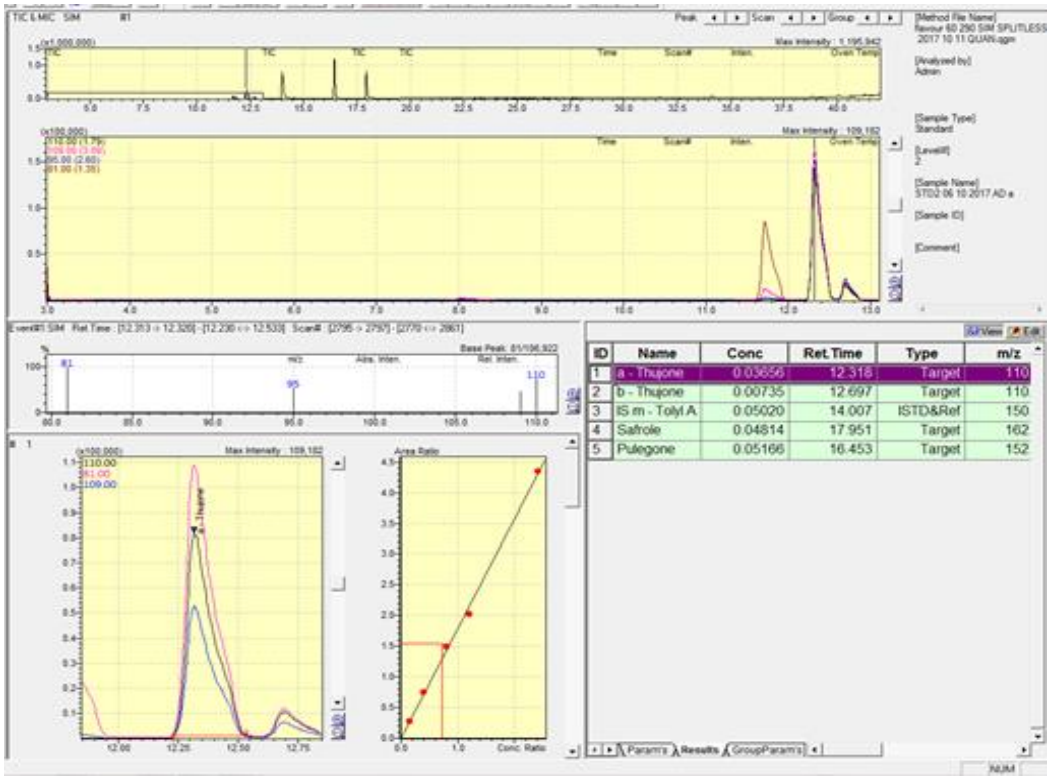
Ουσία	**Ιόν ποσοτικοποίησης (m/z)**	**Ιόντα ταυτοποίησης (m/z)**			
Θουιόνη α, β	110	109	95	81	
Πουλεγόνη	152	109	81	67	
Σαφρόλη	162	161	135	131	104
Μέτα τολυλεστέρας του οξικού οξέος (IS)	150	108	107		

Η λειτουργία πλήρης σάρωσης μαζών χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση αγνώστων συστατικών του αποστάγματος δηλαδή άλλες πτητικές αρωματικές ύλες, ειδικά αυτές που εκλούονται κοντά στις κορυφές των υπό εξέταση ουσιών.

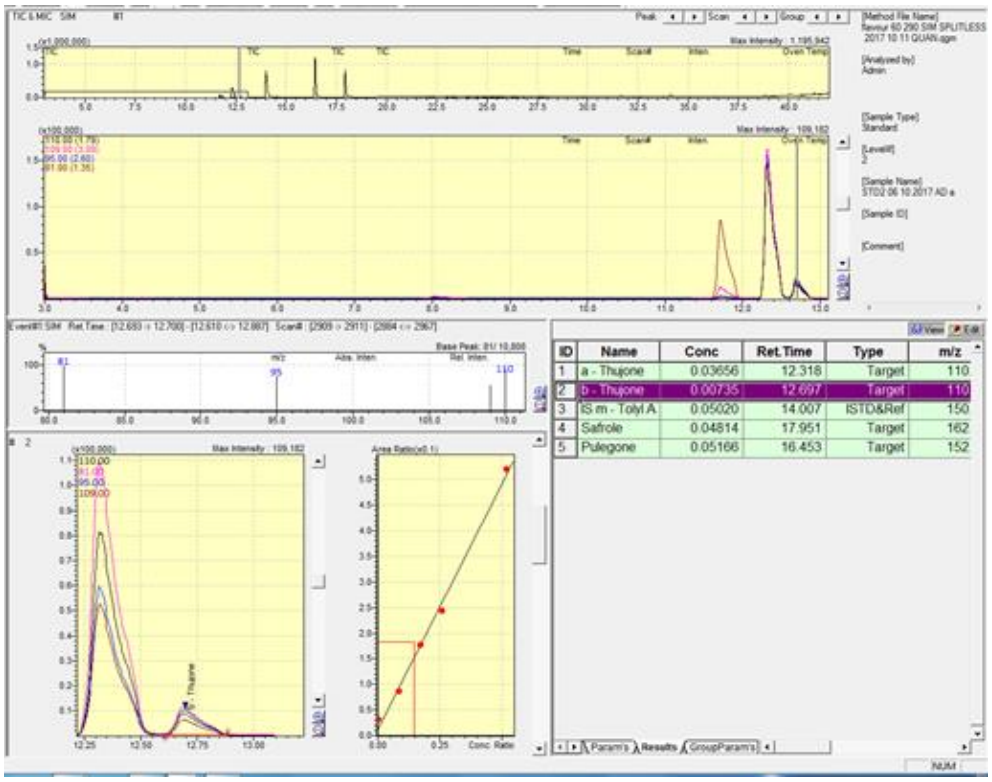
Οι χρωματογραφικές κορυφές των αναλυτών είναι καλώς διαχωρισμένες και ταυτοποιημένες σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησης και την κατάλληλη απόκριση στο συνολικό ρεύμα ιόντων (TIC) και στην παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος (SIM). Για κάθε αναλύτη τουλάχιστον τρία ιόντα ήταν διαθέσιμα προς παρακολούθηση σε λειτουργία SIM. Όπου κρίθηκε απαραίτητο έγινε σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων σε λειτουργία πλήρης σάρωσης με τα χρωματογραφήματα των προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών σχετίζοντας τα μοτίβα θραυσματοποίησης και τη σχετική αφθονία των ιόντων. Αυτό ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο για την αναγνώριση άγνωστων κορυφών στα χρωματογραφήματα που οφείλονται σε άλλες αρωματικές ύλες και άλλα πτητικά συστατικά.

Ο συνολικός χρόνος χρωματογραφήματος (42,67 min) έχει χωριστεί σε τέσσερα επιμέρους χρονικά παράθυρα όπου σε κάθε ένα εξετάζεται μία με δύο ουσίες σε λειτουργία SIM.

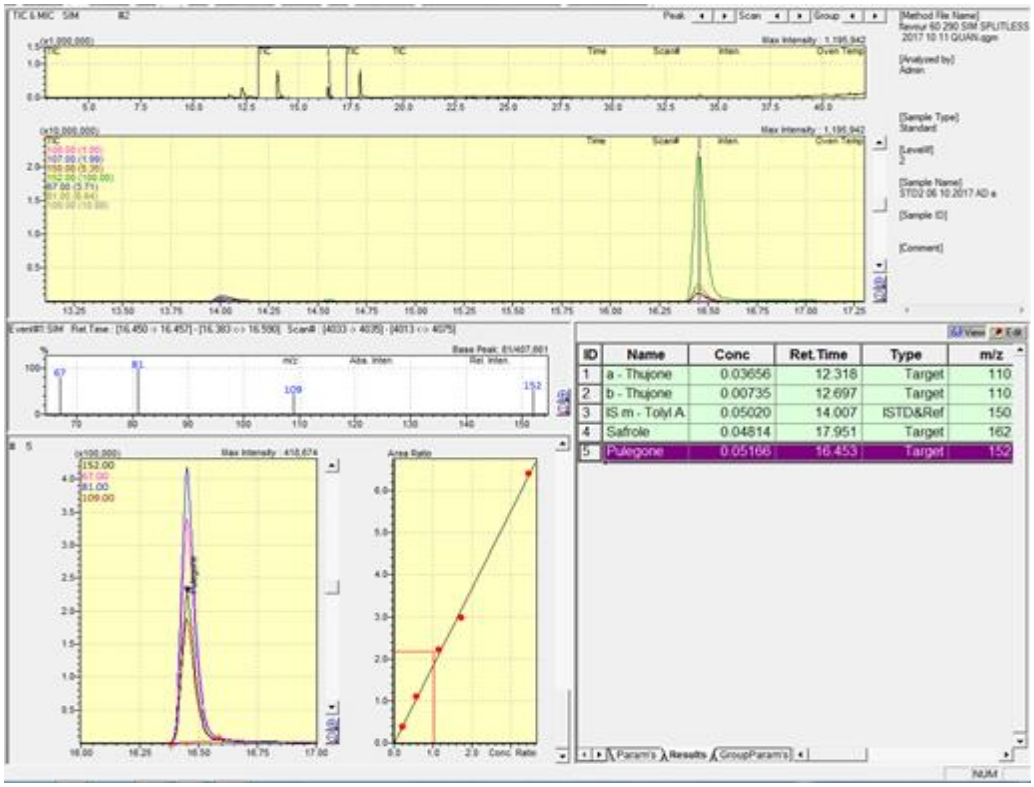
Ακολουθούν οι Εικόνες 3.10 έως 3.14 όπου απεικονίζονται τα αποτελέσματα αναλύσεων του πρότυπου μίγματος διαλυμάτων του 3^{ου} επιπέδου της καμπύλης αναφοράς για κάθε ουσία ξεχωριστά, όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό Shimadzu GC MS Solutions ver. 2.21. Ξεκινώντας την ανάγνωση παρουσιάζεται πρώτα το συνολικό χρωματογράφημα με επισήμανση του επιλεγμένου χρονικού παραθύρου και μετά εστιασμένο το χρωματογράφημα στο επιλεγμένο χρονικό παράθυρο. Παρακάτω συνεχίζοντας την ανάγνωση από τα δεξιά παρατίθεται ο πίνακας αποτελεσμάτων της επιλεγμένης ουσίας (συγκέντρωση, χρόνος κατακράτησης, εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής κ.α.), το διάγραμμα θραυσμάτων της, η καμπύλη αναφοράς της και εστιασμένη η χρωματογραφική κορυφή της. Στον Πίνακα 3.9 που έπεται παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα χρονικά παράθυρα, οι ουσίες που εξετάζονται σε κάθε ένα από αυτά και η λειτουργία του ανιχνευτή.



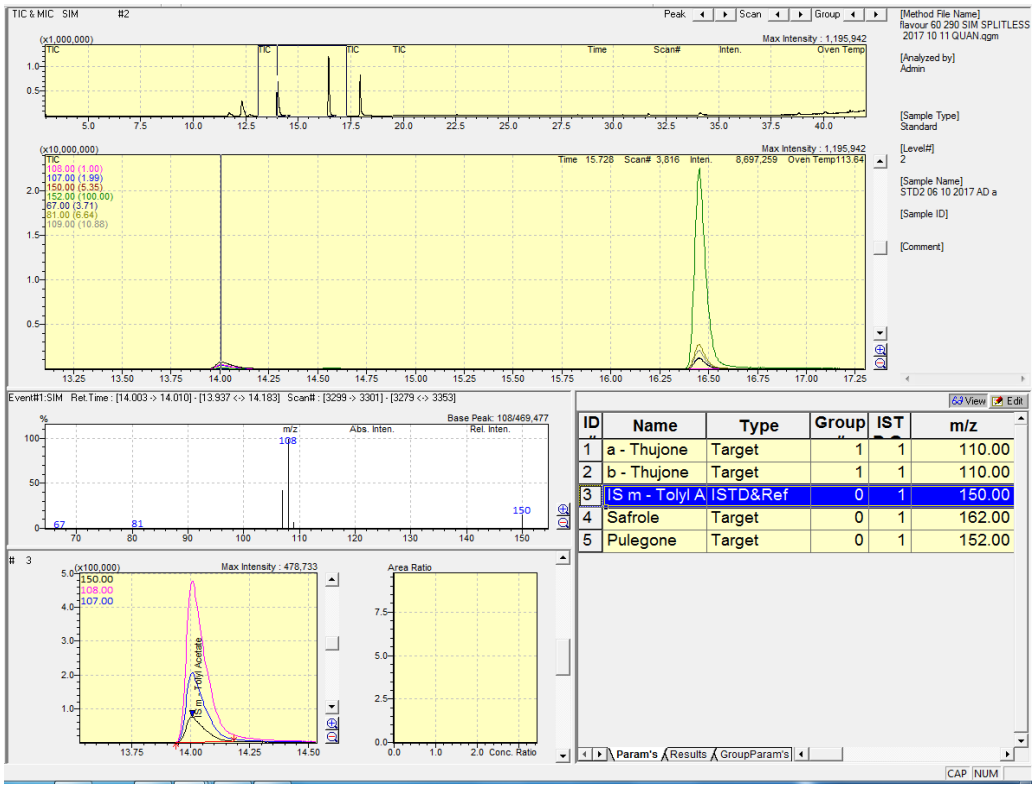
Εικόνα 3.10 Αποτελέσματα ανάλυσης του πρότυπου μίγματος διαλυμάτων του 3ου επιπέδου της καμπύλης αναφοράς για την α θουιόνη, όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό Shimadzu GC MS Solutions ver. 2.21.



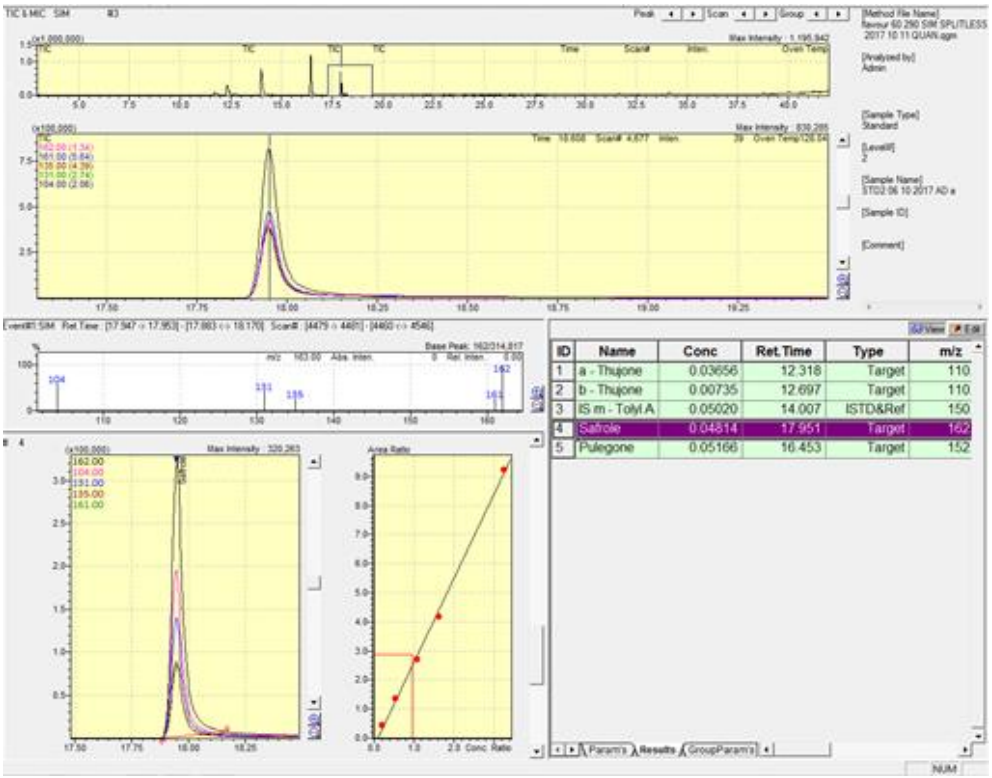
Εικόνα 3.11 Αποτελέσματα ανάλυσης του πρότυπου μίγματος διαλυμάτων του 3ου επιπέδου της καμπύλης αναφοράς για την β θουιόνη, όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό Shimadzu GC MS Solutions ver. 2.21.



Εικόνα 3.12 Αποτελέσματα ανάλυσης του πρότυπου μίγματος διαλυμάτων του 3ου επιπέδου της καμπύλης αναφοράς για την πουλεγόνη, όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό Shimadzu GC MS Solutions ver. 2.21.



Εικόνα 3.13 Αποτελέσματα ανάλυσης του πρότυπου μίγματος διαλυμάτων του 3ου επιπέδου της καμπύλης αναφοράς για το IS, όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό Shimadzu GC MS Solutions ver. 2.21.



Εικόνα 3.14 Αποτελέσματα ανάλυσης του πρότυπου μίγματος διαλυμάτων του 3ου επιπέδου της καμπύλης αναφοράς για την σαφρόλη, όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό Shimadzu GC MS Solutions ver. 2.21.

Πίνακας 3.9 Τα χρονικά παράθυρα, οι ουσίες που εξετάζονται σε κάθε ένα και η λειτουργία του ανιχνευτή

Χρονικό παράθυρο (min)	**Ουσία**	**Χρόνος Έκλουσης (min)**	**Λειτουργία**
3,00 – 13,10	Θουιόνη α	12,30	SIM
	Θουιόνη β	12,70	
13,11 – 17,30	Μέτα τολυλεστέρας του οξικού οξέος (IS)	14,00	
	Πουλεγόνη	16,50	
17,31 – 19,50	Σαφρόλη	18,00	
19,51 – 42,67	-	-	SCAN*

*Το τελευταίο χρονικό παράθυρο έχει οριστεί σε λειτουργία SCAN με σκοπό τον καθαρισμό της χρωματογραφικής στήλης.

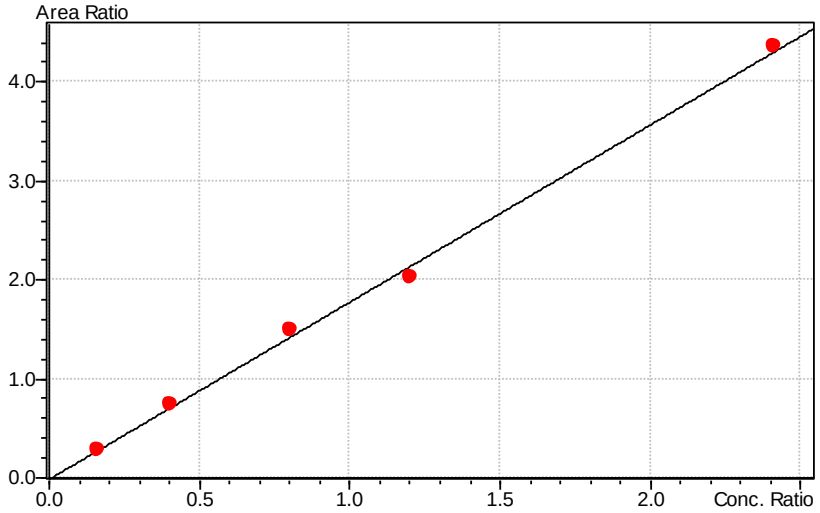
3.3 Επικύρωση μεθόδου

3.3.1 Έλεγχος γραμμικότητας-Καμπύλες αναφοράς

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν μίγματα πρότυπων διαλυμάτων σε πέντε επίπεδα ,εύρους 0.02-0.16 mg με σταθερή ποσότητα εσωτερικού προτύπου, ορισμένη στα 0.0502 mg. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.7 και αναλύονταν τρεις φορές το καθένα. Στις εικόνες 3.15 με 3.18 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς για κάθε ουσία, η εξίσωση της καμπύλης και τα χαρακτηριστικά της όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό του συστήματος GC-MS. Αντίστοιχα στους Πίνακες 3.10 με 3.13 αναφέρονται για κάθε επίπεδο της καμπύλης η περιεκτικότητα της ουσίας, το εμβαδόν της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής και οι λόγοι αυτών με τις αντίστοιχες τιμές του εσωτερικού προτύπου καθώς και η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση.

ΘΟΥΙΟΝΗ Α

$$Y = 1{,}79(\pm 0{,}064)X - 0{,}015(\pm 0{,}082)$$



R= 0,998

Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Γραμμική καμπύλη

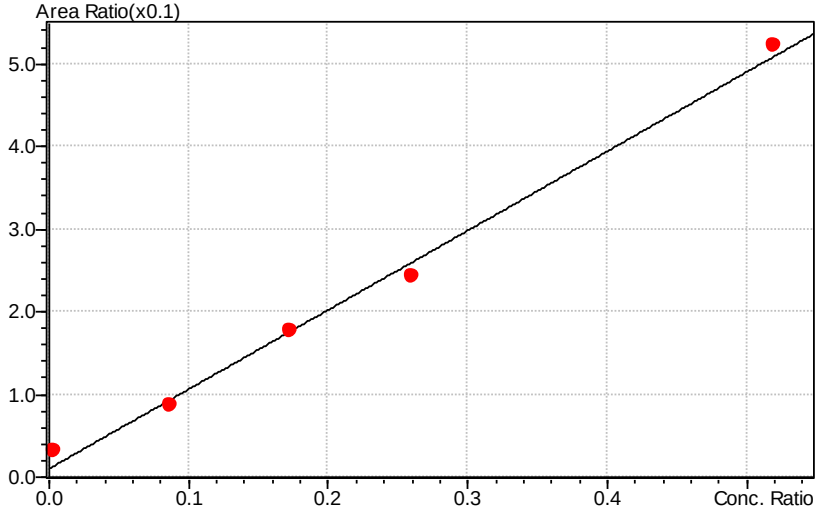
Εικόνα 3.15 Η εξίσωση, το γράφημα και τα χαρακτηριστικά της καμπύλης αναφοράς της α θουιόνης

Πίνακας 3.10 Τιμές περιεκτικότητας, εμβαδού κορυφής και οι λόγοι αυτών με τις αντίστοιχες τιμές του εσωτερικού προτύπου, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση των 5 επιπέδων της καμπύλης αναφοράς της α θουιόνης

Level	Conc Ratio	Conc (mg L^{-1})	Mean Area	SD	% RSD	Area Ratio 1	Area Ratio 2	Area Ratio 3	Area 1	Area 2	Area 3
1	0,1606	1,68	0,2706	0,0144	5,3373	0,2552	0,2729	0,2838	235.334	217.821	231.948
2	0,4027	3,85	0,7391	0,0362	4,8914	0,6981	0,7666	0,7525	345.185	382.013	446.201
3	0,9188	7,69	1,4908	0,0547	3,6705	1,5486	1,4840	1,4398	618.107	694.364	826.758
4	1,2056	8,97	2,0138	0,0692	3,4383	1,9355	2,0390	2,0669	1.257.442	1.187.490	1.240.051
5	2,4114	17,29	4,3477	0,0875	2,0136	4,4436	4,2719	4,3278	2.328.046	2.425.190	2.555.554

ΘΟΥΙΟΝΗ Β

$$Y = 0{,}96X(\pm 0{,}027) + 0{,}010(\pm 0{,}007)$$



R= 0,997

Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Γραμμική καμπύλη

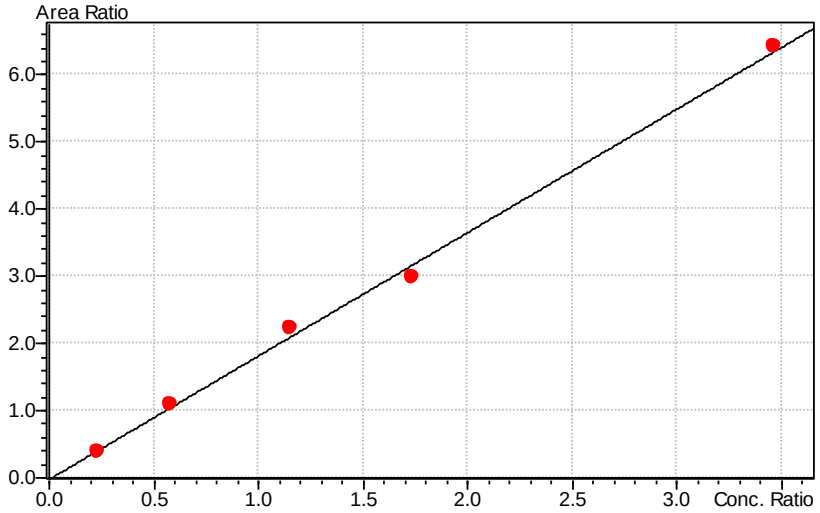
Εικόνα 3.16 Η εξίσωση, το γράφημα και τα χαρακτηριστικά της καμπύλης αναφοράς της β θουιόνης

Πίνακας 3.11 Τιμές περιεκτικότητας, εμβαδού κορυφής και οι λόγοι αυτών με τις αντίστοιχες τιμές του εσωτερικού προτύπου, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση των 5 επιπέδων της καμπύλης αναφοράς της β θουιόνης

Level	Conc Ratio	Conc (mg L^{-1})	Mean Area	SD	% RSD	Area Ratio 1	Area Ratio 2	Area Ratio 3	Area 1	Area 2	Area 3
1	0,0344	0,36	0,0313	0,0012	3,9384	0,0311	0,0302	0,0326	28.639	24.109	26.677
2	0,0879	0,84	0,0859	0,0016	1,8537	0,0845	0,0876	0,0856	41.774	43.667	50.763
3	0,1732	1,45	0,1763	0,0069	3,9166	0,1833	0,1760	0,1695	73.166	82.328	97.338
4	0,2608	1,94	0,2424	0,0063	2,6020	0,2373	0,2494	0,2403	154.197	145.267	144.161
5	0,5202	3,73	0,5203	0,0167	3,2039	0,5394	0,5088	0,5127	282.602	288.823	302.761

ΠΟΥΛΕΓΟΝΗ

$$Y = 1{,}84X(\pm 0{,}058) - 0{,}022(\pm 0{,}106)$$



R= 0,998

Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Γραμμική καμπύλη

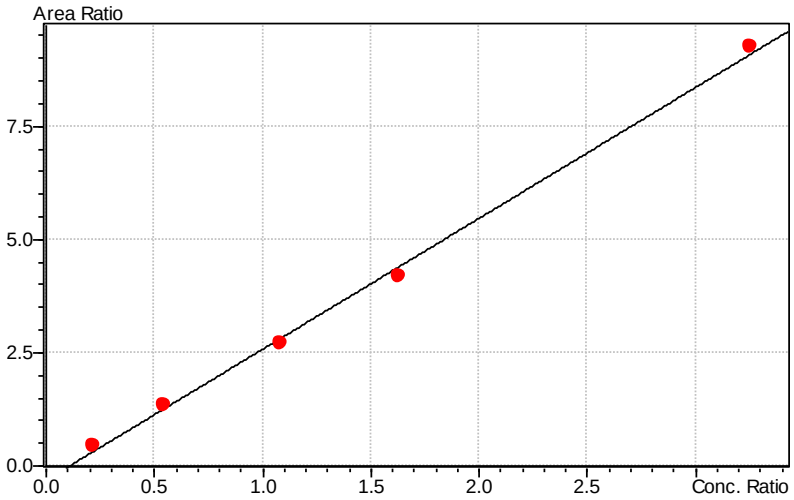
Εικόνα 3.17 Η εξίσωση, το γράφημα και τα χαρακτηριστικά της καμπύλης αναφοράς της πουλεγόνης

Πίνακας 3.12 Τιμές περιεκτικότητας, εμβαδού κορυφής και οι λόγοι αυτών με τις αντίστοιχες τιμές του εσωτερικού προτύπου, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση των 5 επιπέδων της καμπύλης αναφοράς της πουλεγόνης

Level	**Conc Ratio**	**Conc (mg L^{-1})**	**Mean Area**	**SD**	**% RSD**	**Area Ratio 1**	**Area Ratio 2**	**Area Ratio 3**	**Area 1**	**Area 2**	**Area 3**
1	0,2314	2,42	0,3841	0,0042	1,1027	0,3887	0,3803	0,3833	358.471	303.521	313.277
2	0,5774	5,52	1,0874	0,0311	2,8634	1,0724	1,1232	1,0666	530.230	559.693	632.458
3	1,1553	9,67	2,2170	0,0745	3,3604	2,1703	2,3029	2,1778	866.248	1.077.503	1.250.566
4	1,7325	12,89	2,9653	0,0828	2,7918	2,8723	2,9925	3,0311	1.866.121	1.742.779	1.818.545
5	3,4672	24,86	6,4047	0,1597	2,4929	6,5890	6,3109	6,3140	3.452.082	3.582.743	3.728.456

ΣΑΦΡΟΛΗ

$$Y = 2{,}89(\pm 0{,}082)X - 0{,}311(\pm 0{,}141)$$



R = 0,998

Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Γραμμική καμπύλη

Εικόνα 3.18 Η εξίσωση, το γράφημα και τα χαρακτηριστικά της καμπύλης αναφοράς της σαφρόλης

Πίνακας 3.13 Τιμές περιεκτικότητας, εμβαδού κορυφής και οι λόγοι αυτών με τις αντίστοιχες τιμές του εσωτερικού προτύπου, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση των 5 επιπέδων της καμπύλης αναφοράς της σαφρόλης

Level	Conc Ratio	Conc (mg L^{-1})	Mean Area	SD	% RSD	Area Ratio 1	Area Ratio 2	Area Ratio 3	Area 1	Area 2	Area 3
1	0,1988	2,08	0,4433	0,0717	16,1632	0,5255	0,3937	0,4109	484.635	314.158	335.826
2	0,5429	5,19	1,3384	0,1170	8,7404	1,4729	1,2815	1,2607	728.273	638.591	747.585
3	1,0848	9,08	2,7109	0,1446	5,3335	2,8690	2,6784	2,5854	1.145.154	1.253.172	1.484.617
4	1,6277	12,11	4,1772	0,3056	7,3164	4,5246	4,0573	3,9498	2.939.584	2.362.936	2.369.713
5	3,2580	23,36	9,2271	0,2298	2,4907	9,4913	9,1168	9,0732	4.972.613	5.175.629	5.357.763

3.3.2 Υποστρώματα που δοκιμάστηκαν με τη μέθοδο για κάθε ουσία

Κατηγορία: Βότανα, Μπαχαρικά, Τρόφιμα

Η α, β θουιόνη προσδιορίστηκε επιτυχώς σε φασκόμηλο αποξηραμένο και καραμέλα με μέλι και φασκόμηλο του εμπορίου.

Για την πουλεγόνη δοκιμάστηκαν αποξηραμένη μέντα, αποξηραμένος δυόσμος, τσίχλα με γεύση δυόσμο και παστίλια δροσερής αναπνοής με γεύση μέντα (MEZ) χωρίς να επιτευχθεί απόκριση. Αντιθέτως σε δείγμα φλισκουνιού και άλλης παστίλιας δροσερής αναπνοής (TIC TAC) η παρατηρούμενη απόκριση ήταν καλή.

Η σαφρόλη επιτυχώς προσδιορίστηκε σε αποξηραμένο μοσχοκάρυδο, σούπα βοδινού με μοσχοκάρυδο, κρεμμυδόσουπα με μοσχοκάρυδο και σάλτσα τομάτας με μοσχοκάρυδο.

Κατηγορία: Αλκοολούχα ποτά

Επιλέχθηκαν ως δείγματα το αψέντι και ένα βοτανικό λικέρ καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε αυτά χρησιμοποιούνται έλαια αψιθιάς και βοτάνων που περιέχονται η α, β θουιόνη και η πουλεγόνη.

Αρχικά δοκιμάστηκε η μέθοδος ως έχει σε δείγμα αψεντιού χωρίς να παρατηρείται κάποια απόκριση γεγονός που αποδόθηκε στην συναπόσταξη της περιεχόμενης αλκοόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές εκχύλισης σε δείγματα αψεντιού και βοτανικού λικέρ χρησιμοποιώντας ως διαλύτη MTBE και απευθείας ανάλυση του εκχυλίσματος στο σύστημα GC-MS, όπου παρατηρείται ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μόνο του εσωτερικού προτύπου.

Ακολούθως για να διαπιστωθεί εάν η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στα αλκοολούχα ποτά πραγματοποιήθηκε πείραμα με εμβολιασμό διαλύματος εργασίας α, β θουιόνης σε δείγμα αψεντιού ως εξής:

Φέρονται 10 mL δείγματος σε διαχωριστική χοάνη και εμβολιάζονται με 1 mL διαλύματος εργασίας θουιόνης α,β. Η χοάνη ανακινείται και ακολουθεί η προσθήκη 1 mL εσωτερικού προτύπου και 10 mL διαλύτη εκχύλισης (MTBE). Στη συνέχεια ανακινείται η χοάνη και μετά το σχηματισμό των φάσεων με γυάλινη πιπέτα παραλαμβάνεται μέρος της φάσης του διαλύτη εκχύλισης και μεταγγίζεται σε φιαλίδιο ώστε να ακολουθήσει η ανάλυση στο σύστημα GC-MS. Παρατηρείται ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της α, β θουιόνης που οδηγεί στο συμπέρασμα της επιτυχούς εφαρμογής της μεθόδου.

3.3.3 Επαναληψιμότητα

Δείγματα τροφίμων όπως μπαχαρικά σε σκόνη θεωρούνται ως επαρκώς ομοιογενή και δεν πραγματοποιείται επιπλέον κατεργασία, πέραν της απλής ανάμιξης. Τα βότανα και τα αποξηραμένα προϊόντα κονιοποιούνται σε γουδί πορσελάνης. Για τρόφιμα όπως σάλτσες γίνεται χρήση ψηφιακού ομογενοποιητή Ultra Turrax. Οι καραμέλες και τα μικροπροϊόντα ζαχαρωδών δροσερής αναπνοής φέρονται ως έχουν στη σφαιρική φιάλη.

Μετά την κατεργασία τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο.

Στους πίνακες 3.14 και 3.15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων επαναληψιμότητας για την α και β θουιόνη στα υποστρώματα αποξηραμένου φασκόμηλου και καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο, αντίστοιχα. Στην περίπτωση του αποξηραμένου φασκόμηλου παρατηρήθηκε αυξημένη σχετική τυπική απόκλιση για αυτό και πραγματοποιήθηκε Grubbs' test όπου και επιβεβαιώθηκε η απουσία έκτροπων τιμών. Η αυξημένη σχετική τυπική απόκλιση οφείλεται στο γεγονός ότι πρόκειται για φυσικό προϊόν. Επισημαίνεται πως όλες οι ζυγίσεις δειγμάτων προήλθαν από την ίδια παρτίδα παραγωγής του προϊόντος.

Στις Εικόνες 3.19 και 3.20 παρατίθενται αποτελέσματα αναλύσεων όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό του συστήματος GC-MS για την α και β θουιόνη σε υπόστρωμα αποξηραμένου φασκόμηλου. Πρώτα παρουσιάζεται το συνολικό χρωματογράφημα, δεύτερο το κομμάτι εκείνο του χρωματογραφήματος που αφορά στο πρώτο χρονικό παράθυρο όπου βρίσκονται η α και β θουιόνη, και μετά ακολουθεί ο πίνακας αποτελεσμάτων για την επιλεγμένη ουσία, το διάγραμμα θραυσμάτων αυτής, η καμπύλη αναφοράς της και η χρωματογραφική κορυφή της.

Πίνακας 3.14 Αποτελέσματα πειραμάτων επαναληψιμότητας για την α και θουιόνη σε υπόστρωμα αποξηραμένου φασκόμηλου

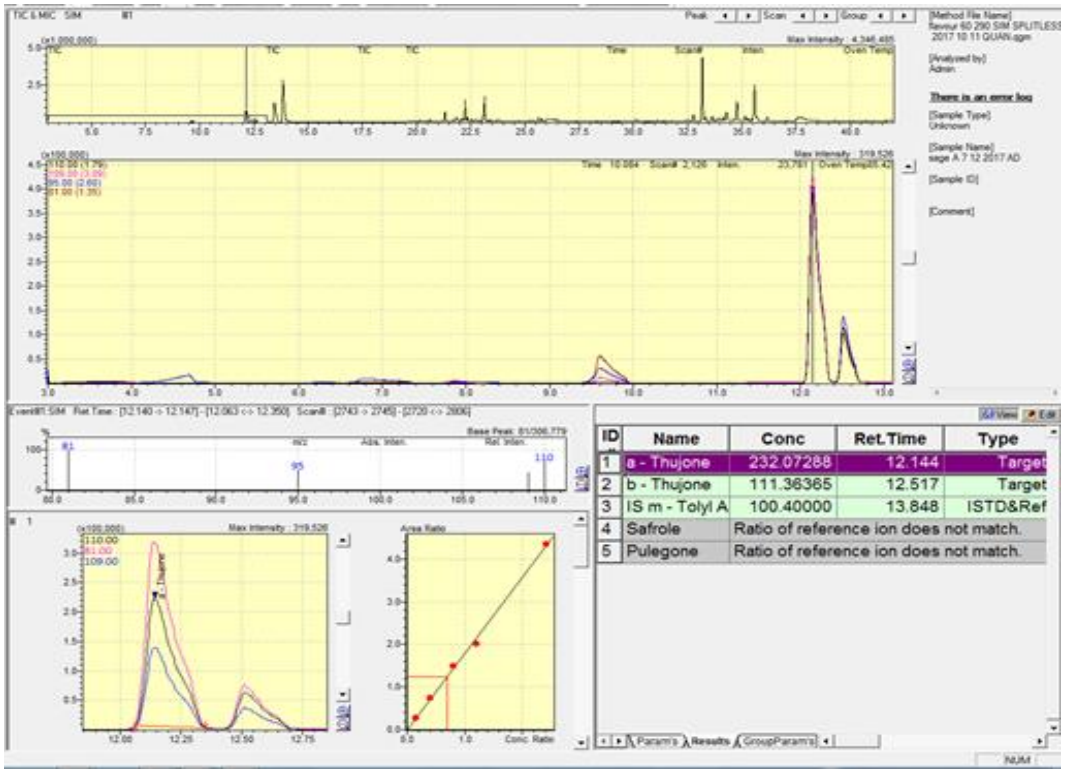
Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση α θουιόνης (mg kg^{-1})**	**Συγκέντρωση β θουιόνης (mg kg^{-1})**	**Λόγος α/β θουιόνης**
26/10/2017	26/10/2017	0,5022	296,7	163,6	1,8
		0,3422	284,5	139,9	2,0
		0,2503	295,9	154,8	1,9
6/11/2017	6/11/2017	0,5053	265,5	142,1	1,9
		0,3515	226,0	108,6	2,1
		0,2506	235,4	115,2	2,0
20/11/2017	17/11/2017	0,3507	321,7	172,1	1,9
			315,2	168,5	1,9
30/11/2017			311,5	172,3	1,8
20/11/2017		0,4630	254,3	133,3	1,9
			256,6	121,6	2,1
30/11/2017			251,4	131,4	1,9
7/12/2017	7/12/2017	0,3001	232,1	111,4	2,1
			233,3	113,0	2,1
		0,4353	222,9	115,2	1,9
			219,9	113,6	1,9
		0,3935	218,9	112,3	1,9
			217,7	113,0	1,9

Xmean α θουιόνης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD (LOT)**
258,9	36	14,1%

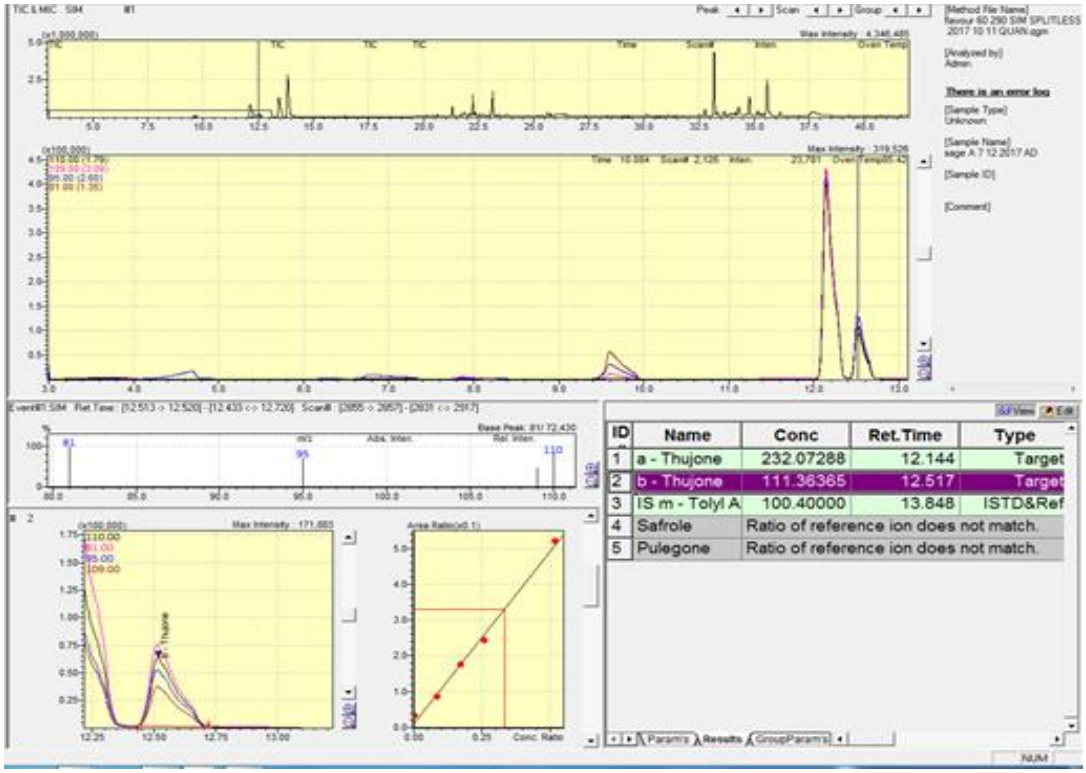
Xmean β θουιόνης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD (LOT)**
133,4	23,4	17,5%

% RSD ΜΕΘΟΔΟΥ – Α ΘΟΥΙΟΝΗ: 2,8 – 8,5

% RSD ΜΕΘΟΔΟΥ – Β ΘΟΥΙΟΝΗ: 1,1 – 6,9



Εικόνα 3.19 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα α θουιόνης σε υπόστρωμα αποξηραμένου φασκόμηλου



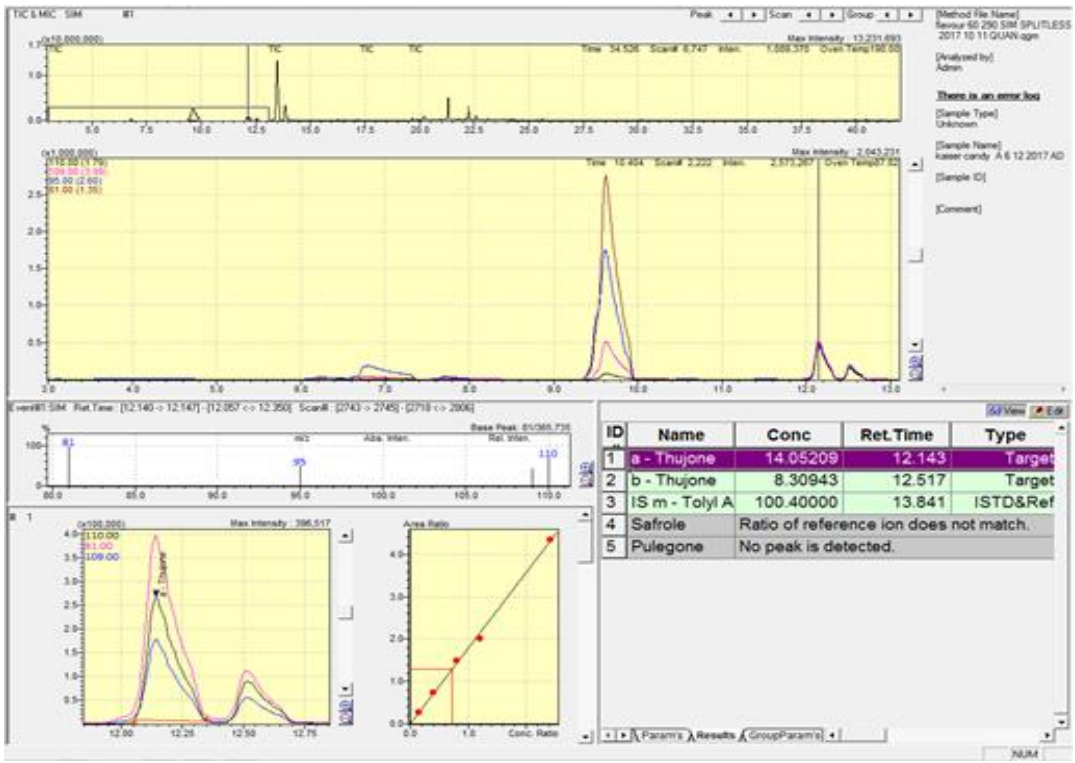
Εικόνα 3.20 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα β θουιόνης σε υπόστρωμα αποξηραμένου φασκόμηλου

Πίνακας 3.15 Αποτελέσματα πειραμάτων επαναληψιμότητας για την α και β θουιόνη σε υπόστρωμα καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο

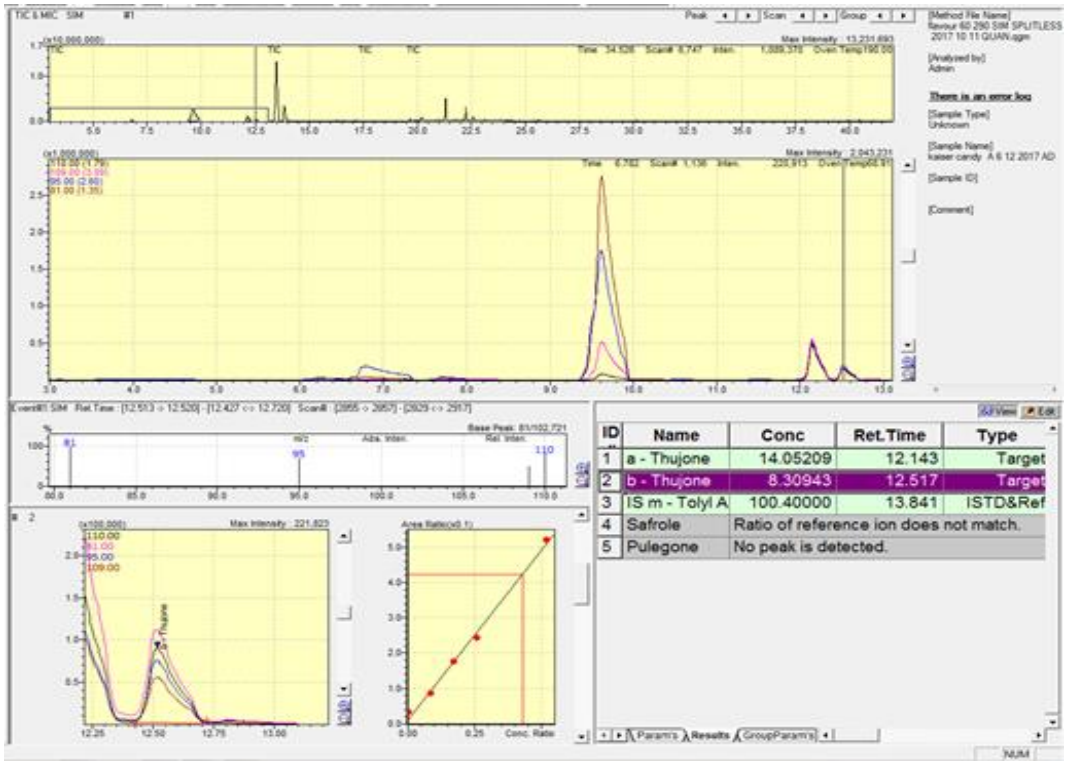
Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση α θουιόνης (mg kg^{-1})**	**Συγκέντρωση β θουιόνης (mg kg^{-1})**	**Λόγος α/β θουιόνης**
6/12/2017	6/12/2017	5,20	14,1	8,3	1,7
			13,7	8,2	1,7
		5,20	12,0	7,2	1,7
			12,7	7,5	1,7
		5,10	11,9	7,0	1,7
			11,5	6,7	1,7
		5,29	11,5	7,0	1,6
			11,8	7,1	1,7
		5,22	14,8	8,8	1,7
			15,0	8,9	1,7
		5,27	11,4	7,5	1,5
			12,8	7,6	1,7

Xmean α θουιόνης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD (LOT)**
12,8	1	10,3%

Xmean β θουιόνης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD (LOT)**
7,7	1	9,6%



Εικόνα 3.21 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα α θουιόνης σε υπόστρωμα καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο



Εικόνα 3.21 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα β θουιόνης σε υπόστρωμα καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο

Κατά ανάλογο τρόπο οι Πίνακες 3.16 και 3.17 αναφέρονται στον προσδιορισμό πουλεγόνης σε αποξηραμένο φλισκούνι και παστίλια δροσερής αναπνοής με γεύση μέντα. Για τις τιμές που αναφέρονται στο αποξηραμένο φλισκούνι πραγματοποιήθηκε Grubbs' test, το οποίο απέκλεισε την ύπαρξη έκτροπων τιμών. Οι Εικόνες 2.23 και 3.24 αποτελούν χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα ανάλυσης προσδιορισμού της πουλεγόνης σε αποξηραμένο φλισκούνι και παστίλια δροσερής αναπνοής με γεύση μέντα, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.16 Αποτελέσματα πειραμάτων επαναληψιμότητας για την πουλεγόνη σε υπόστρωμα αποξηραμένου φλισκουνιού

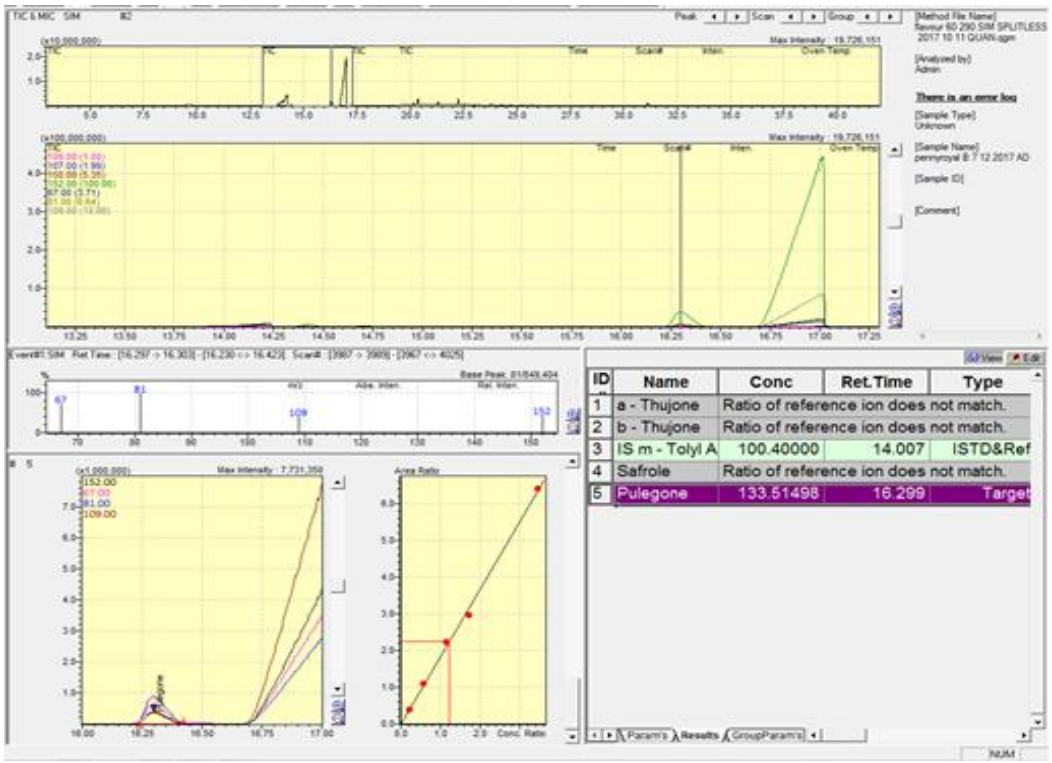
Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση πουλεγόνης (mg kg^{-1})**
6/11/2017	2/11/2017	0,7512	203,0
		1,0007	187,6
16/11/2017	16/11/2017	0,7501	172,4
20/11/2017			173,2
30/11/2017			160,4
16/11/2017		0,8325	206,1
20/11/2017			207,6
30/11/2017			197,3
16/11/2017		0,9029	177,6
20/11/2017			175,9
30/11/2017			164,7
7/12/2017	7/12/2017	0,8296	161,0
			163,4
		0,9249	133,5
			139,0
		0,8905	159,0
			157,4

Xmean πουλεγόνης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD**	**% RSD ΜΕΘΟΔΟΥ**
172,9	22	12,6%	8,3 – 9,8

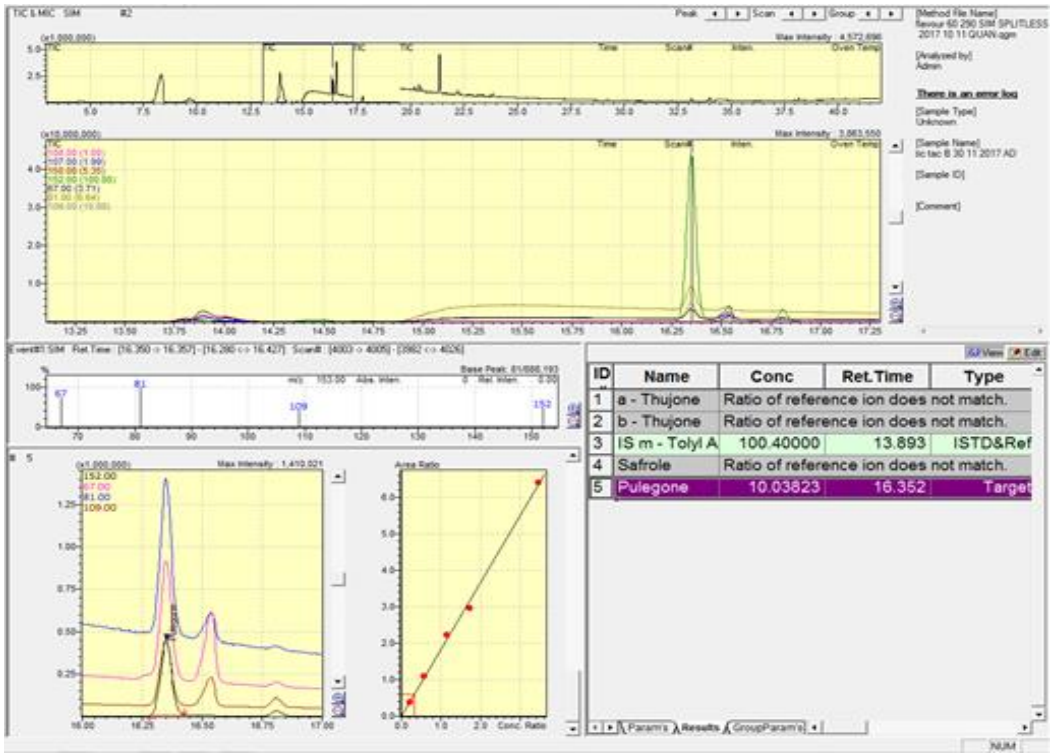
Πίνακας 3.17 Αποτελέσματα πειραμάτων επαναληψιμότητας για την πουλεγόνη σε υπόστρωμα παστίλιας δροσερής αναπνοής με γεύση μέντα

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση πουλεγόνης (mg kg^{-1})**
20/11/2017	20/11/2017	3,0725	10,7
			10,9
30/11/2017			10.8
30/11/2017	24/11/2017	3,1414	10,8
			11,1
		3,3532	10,0
			10,1
4/12/2017	4/12/2017	3,0083	9,2
			9,1
		3,1218	9,6
			9,9
		3,0178	10,1
			10,2

Xmean πουλεγόνης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD (LOT)**
10,1	1	6,4%

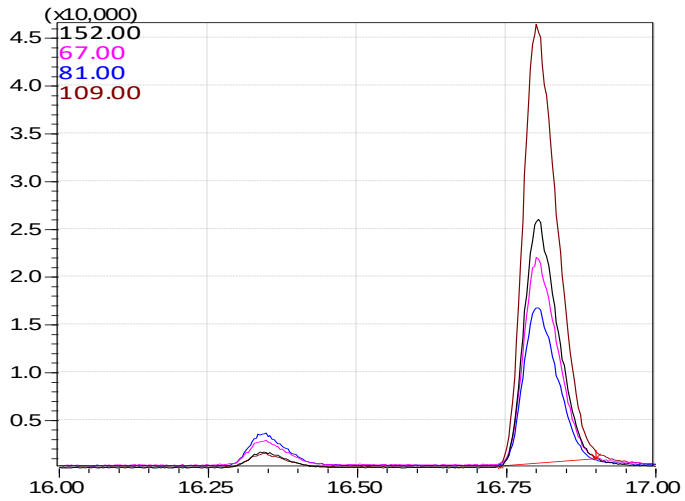


Εικόνα 3.23 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα πουλεγόνης σε υπόστρωμα αποξηραμένου φλισκουνιού



Εικόνα 3.24 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα πουλεγόνης σε υπόστρωμα παστίλιας δροσερής αναπνοής με γεύση μέντα

Αναφορικά με το φλισκούνι ως υπόστρωμα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.25 εμφανίζονται δύο κορυφές στο χρωματογράφημά του εκατέρωθεν του χρόνου έκλουσης της πουλεγόνης (16,5 min). Η πρώτη κορυφή εντοπίζεται σε χρόνο 16,3 min με συγκέντρωση 331,8 mg L^{-1} και η δεύτερη σε χρόνο 16,8 min με συγκέντρωση 5437,6 mg L^{-1}.



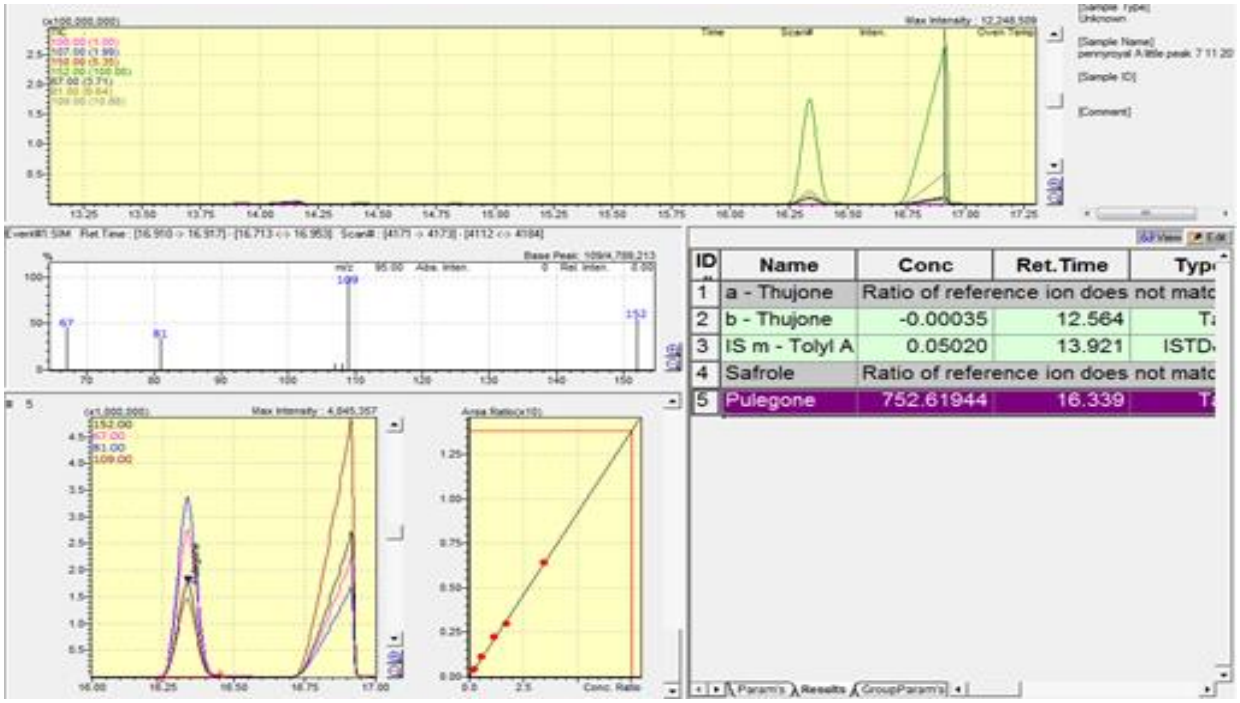
Εικόνα 3.25 Χρωματογραφικές κορυφές που εμφανίζονται εκατέρωθεν του χρόνου έκλουσης της πουλεγόνης σε ανάλυση υποστώματος αποξηραμένου φλισκουνιού

Προκειμένου να διευκρινιστεί ποια κορυφή αντιστοιχεί στην πουλεγόνη ή αν ακόμα και οι δύο αναφέρονται σε αυτή, παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα διαλύματα του δείγματος που έδωσε το παραπάνω χρωματογράφημα, με διάλυμα εργασίας πουλεγόνης 116 mg L^{-1}.

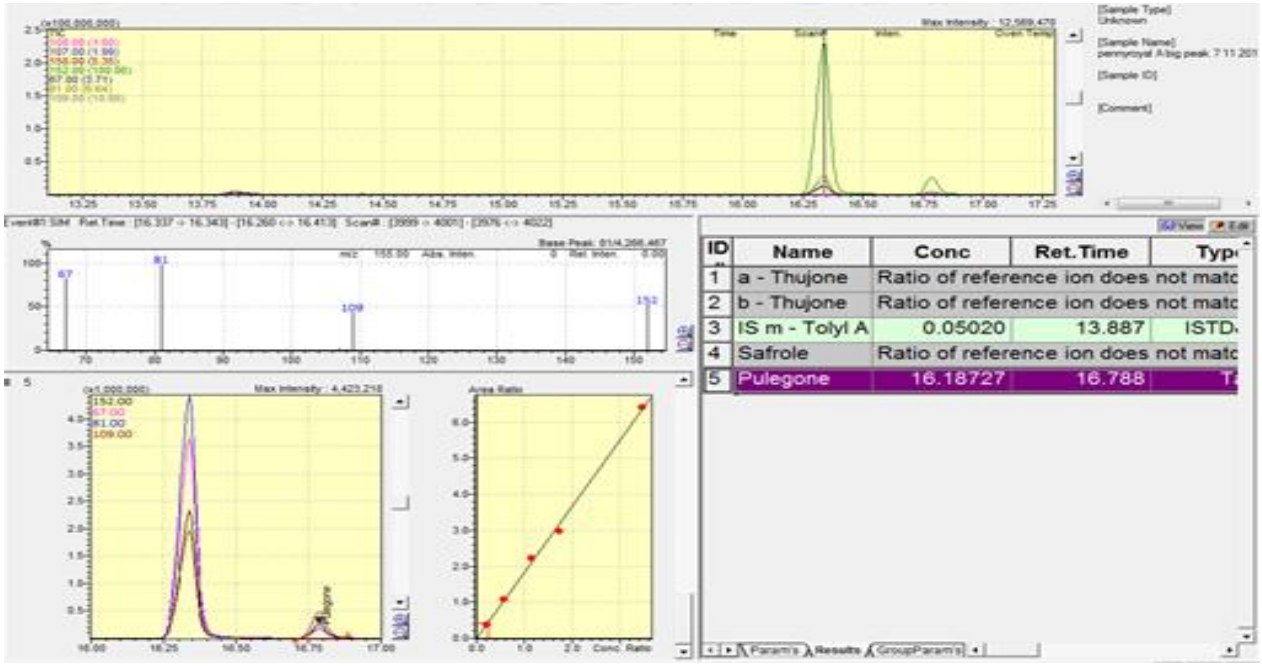
Στην περίπτωση της πρώτης κορυφής πρόκειται για μικρή συγκέντρωση (331,8 mg L^{-1}) οπότε σε φιαλίδιο προστίθενται 500 μL του εν λόγω δείγματος και 500 μL διαλύματος εργασίας πουλεγόνης 116 mg L^{-1}. Το εσωτερικό πρότυπο υπολογίζεται στα 50 μg. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.26 παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης που αναφέρεται στην πρώτη κορυφή σε 752,6 mg L^{-1}.

Στην περίπτωση της δεύτερης κορυφής πρόκειται για μεγάλη συγκέντρωση (5437,6 mg L^{-1}) οπότε αρχικά πραγματοποιείται αραίωση 1/10 (διάλυμα Α). Σε φιαλίδιο προστίθενται 100 μL του διαλύματος Α και 900 μL εσωτερικού προτύπου (διάλυμα Β). Σε νέο φιαλίδιο προστίθενται 500 μL του διαλύματος Β και 1000 μL διαλύματος εργασίας πουλεγόνης 116 mg L^{-1}. Το εσωτερικό πρότυπο υπολογίζεται στα 33 μg. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.27 παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης που αναφέρεται στην δεύτερη κορυφή σε 16,2 mg L^{-1}.

Συμπεραίνεται πως η κορυφή που εμφανίζεται σε χρόνο 16,3 min αναφέρεται στην πουλεγόνη.



Εικόνα 3.26 Πείραμα εμβολιασμού δείγματος φλισκουνιού με σκοπό την ταυτοποίηση της χρωματογραφικής κορυφής της πουλεγόνης (περίπτωση πρώτης κορυφής με χρόνο έκλουσης 16,3 min)



Εικόνα 3.27 Πείραμα εμβολιασμού δείγματος φλισκουνιού με σκοπό την ταυτοποίηση της χρωματογραφικής κορυφής της πουλεγόνης (περίπτωση δεύτερης κορυφής με χρόνο έκλουσης 16,8 min)

Οι Πίνακες 3.18 έως 3.20 παρουσιάζουν τις μετρήσεις προσδιορισμού της σαφρόλης σε μοσχοκάρυδο σε σκόνη, σάλτσα τομάτας με μοσχοκάρυδο και κρεμμυδόσουπα με μοσχοκάρυδο. Στις τιμές που αφορούν στο μοσχοκάρυδο σε σκόνη πραγματοποιήθηκε Grubbs' test που βεβαίωσε την μη ύπαρξη έκτροπων τιμών. Η κάθε ζύγιση δείγματος προέρχεται από την ίδια παρτίδα παραγωγής.

Πίνακας 3.18 Αποτελέσματα πειραμάτων επαναληψιμότητας για την σαφρόλη σε υπόστρωμα μοσχοκάρυδου σε σκόνη

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντωση σαφρόλης (mg kg^{-1})**
17/10/2017	17/10/2017	0,5002	173,9
19/10/2017	19/10/2017	0,5583	170,1
6/11/2017	3/11/2017	0,1506	202,4
		0,1168	217,0
		0,2007	191,0
7/11/2017	7/11/2017	0,1037	226,9
		0,1021	228,4
16/11/2017	16/11/2017	0,8250	223,5
			227,4
20/11/2017			228,8
30/11/2017			218,5
16/11/2017		0,8479	197,2
			200,5
20/11/2017			201,5
30/11/2017			201,9
16/11/2017		0,8022	193,9
			201,7
20/11/2017			195,1
30/11/2017			195,0

Xmean σαφρόλης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD (LOT)**	**% RSD ΜΕΘΟΔΟΥ**
205,0	18	8,6%	6,4 – 6,9

Πίνακας 3.19 Αποτελέσματα πειραμάτων επαναληψιμότητας για την σαφρόλη σε υπόστρωμα σάλτσας τομάτας με μοσχοκάρυδο

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση σαφρόλης (mg kg^{-1})**
30/11/2017	30/11/2017	10,0210	1,14
			1,14
5/12/2017	5/12/2017	10,0300	1,14
			1,13
		10,1700	1,11
			1,11
		10,1400	1,11
			1,11
		10,1900	1,11
			1,11
		10,4200	1,08
			1,09
		10,2300	1,10
			1,11

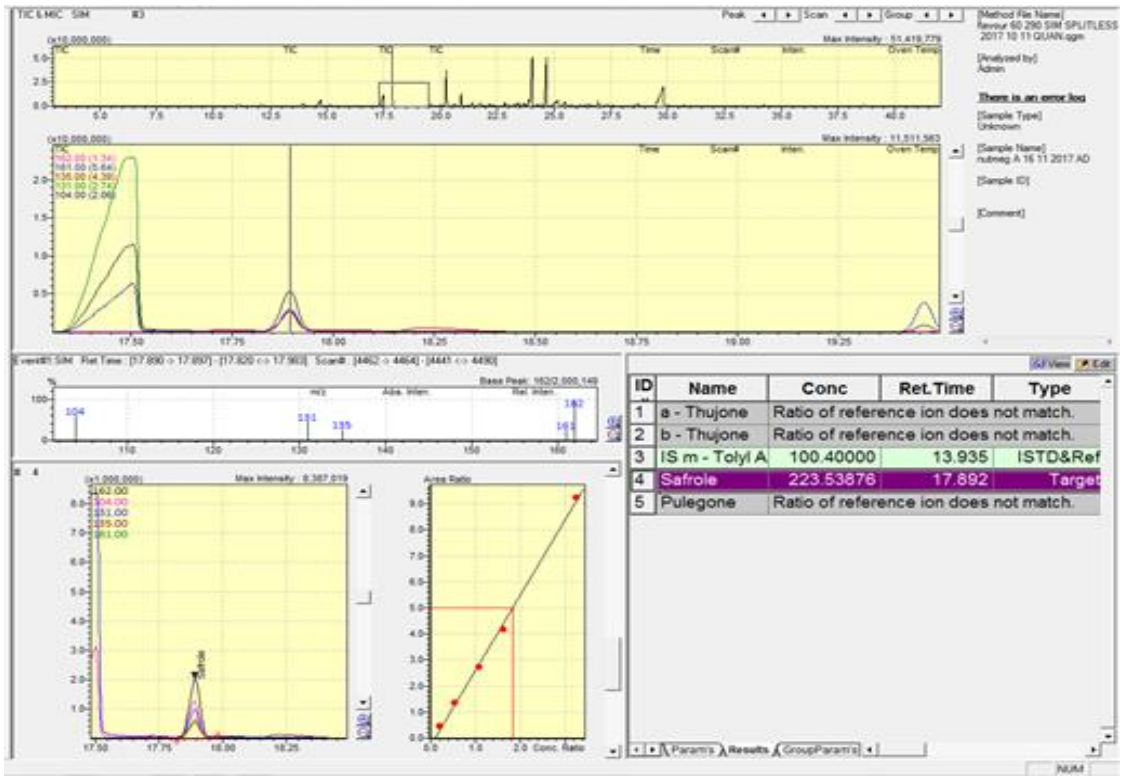
Xmean σαφρόλης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD (LOT)**
1,1	0	1,6%

Πίνακας 3.20 Αποτελέσματα πειραμάτων επαναληψιμότητας για την σαφρόλη σε υπόστρωμα κρεμμυδόσουπας με μοσχοκάρυδο

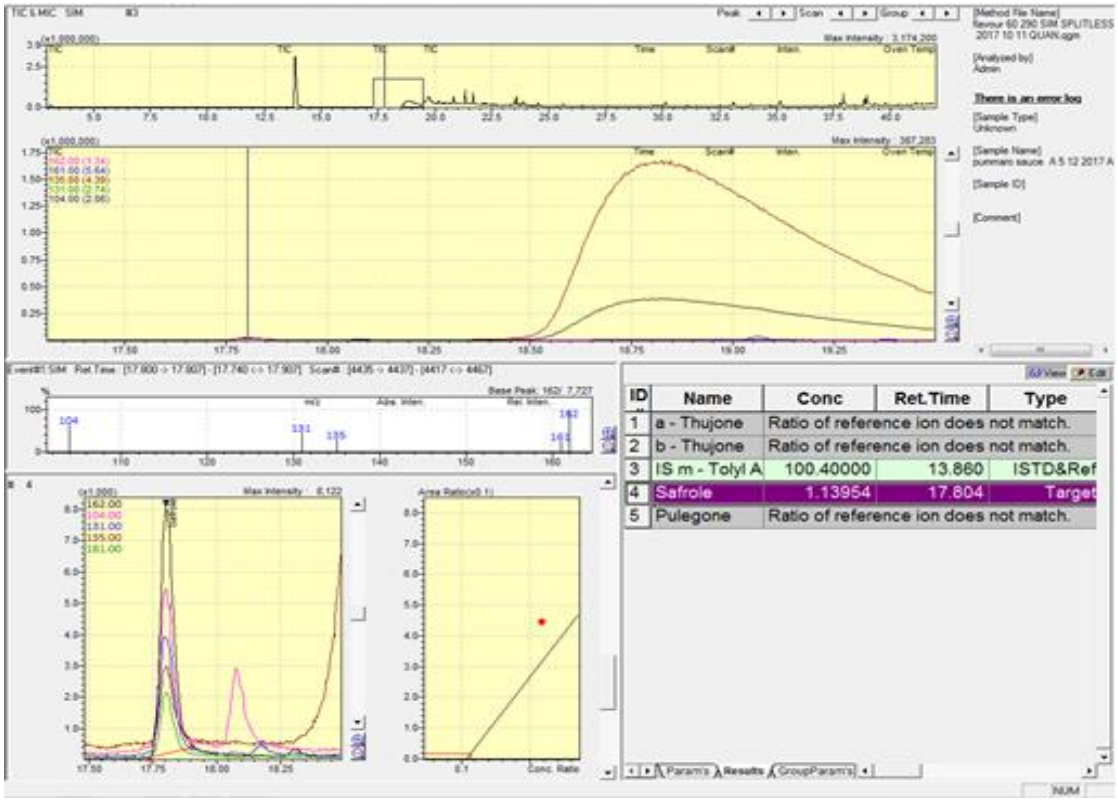
Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση σαφρόλης (mg kg^{-1})**
20/11/2017	20/11/2017	6,0059	2,37
			2,37
30/11/2017			2,36
20/11/2017		6,5293	2,09
			2,10
30/11/2017			2,07
30/11/2017	30/11/2017	6,0250	2,21
			2,18
8/12/2017	8/12/2017	5,5757	2,31
			2,33
		6,0582	2,20
			2,17
		6,0353	2,14
			2,13

Xmean σαφρόλης (mg kg^{-1})	**SD**	**RSD (LOT)**
2,2	0	5,0%

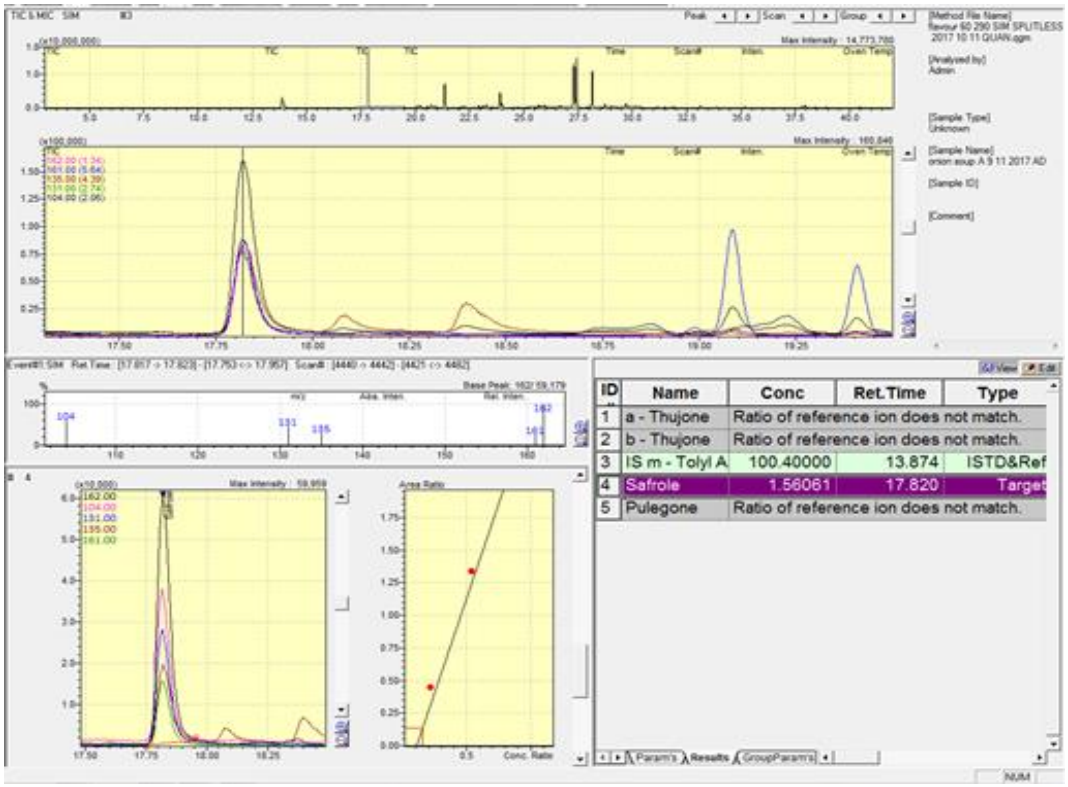
Οι Εικόνες 3.28 έως 3.30 απεικονίζουν χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα αναλύσεων προσδιορισμού της σαφρόλης σε μοσχοκάρυδο σε σκόνη, σε σάλτσα τομάτας με μοσχοκάρυδο και σε κρεμμυδόσουπα με μοσχοκάρυδο όπως αυτά λαμβάνονται από το λογισμικό του συστήματος GC-MS.



Εικόνα 3.28 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα σαφρόλης σε υπόστρωμα μοσχοκάρυδου σε σκόνη



Εικόνα 3.29 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα σαφρόλης σε σάλτσας τομάτας με μοσχοκάρυδο



Εικόνα 3.30 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα σαφρόλης σε υπόστρωμα κρεμμυδόσουπας με μοσχοκάρυδο

3.3.4 Ανάκτηση

Το πείραμα ανάκτησης της α, β θουιόνης πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο γνωστής περιεκτικότητας (0.0667 mg α θουιόνης και 0.0401 mg β θουιόνης). Το δείγμα εμβολιάστηκε με 900 μL διαλύματος εργασίας α, β θουιόνης συγκέντρωσης 113.2 mg L^{-1} που αντιστοιχεί σε 0.1019 mg. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 3.2. Στον Πίνακα 3.21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης για την α, β θουιόνη. Το ποσοστό ανάκτησης της α θουιόνης υπολογίζεται στο 105.8 % και αυτό της β θουιόνης στο 115.2 %.

Ανάλογα και το πείραμα ανάκτησης της πουλεγόνης πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα παστίλιας δροσερής αναπνοής με γεύση μέντα γνωστής περιεκτικότητας (0.03 mg πουλεγόνης). Το δείγμα εμβολιάστηκε με 250 μL διαλύματος εργασίας πουλεγόνης συγκέντρωσης 116 mg L^{-1} που αντιστοιχεί σε 0.029 mg. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 3.2. Στον Πίνακα 3.22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης για την πουλεγόνη. Το ποσοστό ανάκτησης της πουλεγόνης υπολογίζεται στο 68.5 %. Εξαιτίας του χαμηλού ποσοστού ανάκτησης το πείραμα επαναλήφθηκε κατά τον ίδιο τρόπο με νέο διάλυμα εργασίας πουλεγόνης συγκέντρωσης 107.6 mg L^{-1} που αντιστοιχεί σε 0.027 mg, με το ποσοστό να υπολογίζεται στο 65.3 % όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.23. Έτσι συστήνεται η προσθήκη συντελεστή διόρθωσης.

Ακολούθως το πείραμα ανάκτησης της σαφρόλης πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα σάλτσας τομάτας με μοσχοκάρυδο γνωστής περιεκτικότητας (0.011 mg σαφρόλης). Το δείγμα εμβολιάστηκε με 200 μL διαλύματος εργασίας σαφρόλης συγκέντρωσης 109 mg L^{-1} που αντιστοιχεί σε 0.022 mg. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 3.2. Στον Πίνακα 3.24 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης για την σαφρόλη. Το ποσοστό ανάκτησης της σαφρόλης υπολογίζεται στο 90.9 %.

Πίνακας 3.21 Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης α, β θουιόνης σε υπόστρωμα καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση α αθουιόνης (mg kg^{-1})**	**Ανακτηθέντα mg α θουιόνης**	**Συγκέντρωση β θουιόνης (mg kg^{-1})**	**Ανακτηθέντα mg β θουιόνης**	**Λόγος α/β θουιόνης**
19/12/2017	15/12/2017	5,32	29,9	0,1591	13,4	0,0713	2,2
			31,2	0,1660	14,2	0,0755	2,2
		5,19	27,4	0,1422	12,4	0,0644	2,2
			27,6	0,1432	12,3	0,0638	2,2
		5,12	26,0	0,1331	10,8	0,0553	2,4
			25,5	0,1306	10,5	0,0538	2,4
		5,16	31,5	0,1625	13,5	0,0697	2,3
			31,1	0,1605	13,3	0,0686	2,3
		5,26	27,3	0,1436	11,9	0,0626	2,3
			27,8	0,1462	12,4	0,0652	2,2
		5,34	26,4	0,1410	11,8	0,0630	2,2
			26,8	0,1431	11,3	0,0603	2,4
Xmean			28,2	0,1476	12,3	0,0645	

Αναμενόμενα mg α θουιόνης	**Ανάκτηση % α θουιόνης**	**Αναμενόμενα mg β θουιόνης**	**Ανάκτηση % β θουιόνης**
0,1394	105,80	0,0558	115,20

Πίνακας 3.22 Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης πουλεγόνης σε υπόστρωμα παστίλιας δροσερής αναπνοής με γεύση μέντα (1η σειρά πειραμάτων)

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση πουλεγόνης (mg kg^{-1})**	**Ανακτηθέντα mg**
12/12/2017	12/12/2017	2,99	13,10	0,0390
			13,00	0,0390
		3,00	14,00	0,0420
			13,50	0,0410
		2,94	13,70	0,0400
			14,50	0,0430
		3,01	13,00	0,0390
			13,20	0,0400
		2,97	13,50	0,0400
			13,00	0,0390
		2,92	14,50	0,0420
			14,10	0,0410
Xmean			13,59	0,0404

Αναμενόμενα mg πουλεγόνης	**Ανάκτηση % πουλεγόνης**
0,0590	68,50

Πίνακας 3.23 Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης πουλεγόνης σε υπόστρωμα παστίλιας δροσερής αναπνοής με γεύση μέντα (2η σειρά πειραμάτων)

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση πουλεγόνης (mg kg^{-1})**	**Ανακτηθέντα mg**
24/1/2018	25/1/2018	2,94	12,10	0,0360
			12,40	0,0370
		2,93	12,10	0,0360
			11,90	0,0350
		2,92	12,90	0,0380
			12,40	0,0360
		2,93	12,60	0,0370
			12,30	0,0360
		2,89	12,50	0,0360
			13,10	0,0380
		2,97	13,50	0,0400
			13,80	0,0410
Xmean			12,63	0,0372

Αναμενόμενα mg πουλεγόνης	**Ανάκτηση % πουλεγόνης**
0,0570	65,30

Πίνακας 3.24 Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης σαφρόλης σε υπόστρωμα σάλτσας τομάτας με μοσχοκάρυδο

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Συγκέντρωση σαφρόλης (mg kg^{-1})**	**Ανακτηθέντα mg**
14/12/2017	13/12/2017	10,0800	3,10	0,0310
			3,00	0,0300
		10,0100	3,00	0,0300
			3,00	0,0300
		10,1600	2,90	0,0290
			3,00	0,0300
	14/12/2017	10,0300	3,00	0,0300
			3,00	0,0300
		10,0500	3,00	0,0300
			2,90	0,0290
		10,1000	2,90	0,0290
			2,90	0,0290
Xmean			2,98	0,0298

Αναμενόμενα mg σαφρόλης	**Ανάκτηση % σαφρόλης**
0,0330	90,90

3.3.5 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ)

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης της α, β θουιόνης πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε δείγματα καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο με χαμηλή περιεκτικότητα σε α, β θουιόνη. Για την 1η σειρά αναλύσεων η προκατεργασία του δείγματος είχε ως εξής: Φέρεται μία καραμέλα με μέλι και φασκόμηλο σε ποτήρι 100 mL, ζυγίζεται και προστίθενται 15 mL υπερκάθαρου νερού. Ακολούθως αναδεύεται μέχρι διαλυτοποιήσεως του δείγματος. Στη συνέχεια μεταφέρεται το διάλυμα ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη 25 mL. Με χρήση σιφωνίου μεταγγίζονται 10 mL (πραγματοποιώντας 3 εκπλύσεις με υπερκάθαρο νερό) του διαλύματος σε σφαιρική φιάλη, ποσότητα που αντιστοιχεί σε περίπου 2 g δείγματος . Τα βήματα που ακολουθούν έχουν περιγραφεί στην παράγραφο 3.2, με την εξής τροποποίηση: προσθήκη 170 mL υπερκάθαρου νερού (αντί 200 mL).

Για την 2η σειρά αναλύσεων τα βήματα προκατεργασίας του δείγματος ήταν τα παρακάτω: Φέρεται μία καραμέλα με μέλι και φασκόμηλο σε ποτήρι 100 mL, ζυγίζεται και προστίθενται 15 mL υπερκάθαρου νερού. Ακολούθως αναδεύεται μέχρι διαλυτοποιήσεως του δείγματος. Στη συνέχεια μεταφέρεται το διάλυμα ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη 25 mL. Με χρήση σιφωνίου μεταγγίζονται 5 mL (πραγματοποιώντας 3 εκπλύσεις με υπερκάθαρο νερό) του διαλύματος σε σφαιρική φιάλη, ποσότητα που αντιστοιχεί σε περίπου 1 g δείγματος . Τα βήματα που ακολουθούν έχουν περιγραφεί στην παράγραφο 3.2, με την εξής τροποποίηση: προσθήκη 190 mL υπερκάθαρου νερού (αντί 200 mL).

Συμπερασματικά ορίζεται ως όριο ανίχνευσης για την α θουιόνη τα 8 μg/g και για την β θουιόνη τα 2,7 μg/g και κατά συνέπεια ως όριο ποσοτικοποίησης τα 26,4 μg/g για την α θουιόνη και τα 8,9 μg/g για την β θουιόνη.

Πίνακας 3.25 Αποτελέσματα αναλύσεων για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης της α, β θουιόνης σε υπόστρωμα καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο (1η σειρά αναλύσεων)

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Περιεκτικότητα α θουιόνης (mg)**	**Περιεκτικότητα β θουιόνης (mg)**
28/12/2017	22/12/2017	1,9480	0,0162	0,0080
			0,0160	0,0084
		1,9480	0,0146	0,0074
			0,0142	0,0068
		2,0680	0,0122	0,0062
			0,0122	0,0062
		2,0680	0,0126	0,0064
			0,0130	0,0045
		2,1160	0,0112	0,0057
			0,0112	0,0057
		2,1160	0,0106	0,0055
			0,0114	0,0057

Πίνακας 3.26 Αποτελέσματα αναλύσεων για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης της α, β θουιόνης σε υπόστρωμα καραμέλας με μέλι και φασκόμηλο (2η σειρά αναλύσεων)

Ημ/νια ανάλυσης	**Ημ/νια απόσταξης**	**Ζύγιση (g)**	**Περιεκτικότητα α θουιόνης (mg)**	**Περιεκτικότητα β θουιόνης (mg)**
26/1/2018	4/1/2018	1,0180	0,0097	0,0031
			0,0095	0,0033
		1,0180	0,0088	0,0025
			0,0083	0,0029
		1,0180	0,0091	0,0036
			0,0083	0,0025
		1,0480	0,0077	0,0031
			0,0078	0,0027
		1,0480	0,0074	0,0027
			0,0071	0,0026
		1,0480	0,0073	0,0026
			0,0070	0,0024

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης της σαφρόλης πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε δείγματα σάλτσας τομάτας με μοσχοκάρυδο με χαμηλή περιεκτικότητα σε σαφρόλη. Διαπιστώνεται πως με τη μέθοδο μπορεί να ανιχνευθεί η σαφρόλη σε επίπεδο 6 μg/g και συνεπώς το όριο ποσοτικοποιήσεως ορίζεται στα 18 μg/g (LOQ=3LOD).

3.4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό της α και β θουιόνης, της πουλεγόνης και της σαφρόλης σε τρόφιμα. Τμήμα της προκατεργασίας των υποστρωμάτων αποτέλεσε η τεχνική της Ταυτόχρονης Απόσταξης-Εκχύλισης και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με αεριοχρωματογράφο συζευγμένο με ανιχνευτή μαζών (GC-MS). Η χρωματογραφική στήλη ήταν DB-5ms με διαστάσεις 30.0 m x 0.25 mm x 0.25 μm και ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το He.

Διαπιστώνεται πως η τεχνική της SDE είναι αποτελεσματική για την απομόνωση και τον καθαρισμό/συγκέντρωση των ουσιών από ευρεία γκάμα υποστρωμάτων. Κλειδί αποτελεί η κατεργασία του δείγματος ώστε να προσφέρει ένα επαρκώς διαλυτοποιημένο ή κονιοποιημένο υπόστρωμα και να ακολουθήσει η SDE. Οι συνθήκες του GC-MS αρκετά σαφείς. Όμως προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην επιλογή της στήλης, όπου θα πρέπει να παρουσιάζει καλά χαρακτηριστικά διαχωρισμού, ώστε να διαχωρίζει τις ουσίες από άλλες που έχουν συνεκχυλιστεί.

Η πορεία βελτιστοποίησης της μεθόδου περιλάμβανε μελέτες που αφορούν την ανάγκη προκατεργασίας των πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την τεχνική της Ταυτόχρονης Απόσταξης-Εκχύλισης , τη διάρκεια της Ταυτόχρονης Απόσταξης-Εκχύλισης (90 min), τον μέγιστο όγκο του συνολικά προστιθέμενου διαλύτη εκχύλισης (7 mL) και τη λειτουργία έγχυσης του δείγματος άνευ διαμοιρασμό.

Η κατασκευή των καμπυλών αναφοράς πραγματοποιήθηκε με σειρά μετρήσεων σε πέντε επίπεδα, εύρους 0.01-0.17 mg με σταθερή ποσότητα εσωτερικού προτύπου, ορισμένη στα 0.05020 mg. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε αναλύσεις τροφίμων και ποτών της ελληνικής αγοράς. Τα παραπάνω αποτελέσματα καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη να εφαρμοστεί σε αναλύσεις ρουτίνας εργαστηρίων ελέγχου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

Παρουσία ορισμένων ουσιών

Μέρος Α: *Ουσίες που δεν πρέπει να προστίθενται ως έχουν σε τρόφιμα*

Αγαρικό οξύ
Αλοΐνη
Καψαϊκίνη
1, 2-Βενζοπυρόνη, κουμαρίνη,
Υπερικίνη
β-ασαρόνη
1-αλλυλο-4-μεθοξυβενζόλιο, εστραγκόλη
Υδροκυάνιο
Μενθοφουράνιο
4-αλλυλο-1,2-διμεθοξυβενζόλιο, μεθυλευγενόλη
Πουλεγόνη
Κασσίνη
1-αλλυλο-3,4-μεθυλοδιοξυβενζόλιο, σαφρόλη
Τευκρίνη Α
Θουιόνη (α και β)

Μέρος Β: *Ανώτατα επίπεδα ορισμένων ουσιών, που απαντώνται φυσικώς σε αρωματικές ύλες και συστατικά τροφίμων με αρωματικές ιδιότητες, σε ορισμένα σύνθετα τρόφιμα όπως καταναλώνονται και στα οποία έχουν προστεθεί αρωματικές ύλες ή/και συστατικά τροφίμων με αρωματικές ιδιότητες.*

Ονομασία της ουσίας	Σύνθετο τρόφιμο στο οποίο περιορίζεται η παρουσία της ουσίας	Ανώτατο επίπεδο mg/kg
β-ασαρόνη	Αλκοολούχα ποτά	1,0
1-αλλυλο-4-μεθοξυβενζόλιο, Εστραγκόλη (*)	Γαλακτοκομικά προϊόντα	50
	Επεξεργασμένα φρούτα, λαχανικά (συμπεριλαμβανομένων μανιταριών, ριζών, βολβών, ψυχανθών), καρποί με κέλυφος και σπόροι	50
	Προϊόντα ιχθύων	50
	Μη αλκοολούχα ποτά	10
Υδροκυάνιο	Νουγκά, αμυγδαλόπαστα ή τα υποκατάστατά της ή παρόμοια προϊόντα	50
	Εγκυτιωμένα εμπύρηνα φρούτα	5
	Αλκοολούχα ποτά	35
Μενθοφουράνιο	Ζαχαρώδη, πλην μικροπροϊόντων ζαχαρωδών δροσερής αναπνοής που περιέχουν δυόσμο/μέντα	500
	Μικροπροϊόντα ζαχαρωδών δροσερής αναπνοής	3 000
	Τσίχλα	1 000
	Αλκοολούχα ποτά που περιέχουν δυόσμο/μέντα	200
4-αλλυλο-1,2-διμεθοξυβενζόλιο Μεθυλευγενόλη (*)	Γαλακτοκομικά προϊόντα	20
	Παρασκευάσματα κρέατος και προϊόντα με βάση το κρέας, συμπεριλαμβανομένων πουλερικών και θηραμάτων	15
	Παρασκευάσματα ιχθύων και προϊόντα ιχθύων	10
	Σούπες και σάλτσες	60
	Έτοιμα ορεκτικά	20
	Μη αλκοολούχα ποτά	1

Ονομασία της ουσίας	Σύνθετο τρόφιμο στο οποίο περιορίζεται η παρουσία της ουσίας	Ανώτατο επίπεδο mg/kg
Πουλεγόνη	Ζαχαρώδη, πλην μικροπροϊόντων ζαχαρωδών δροσερής αναπνοής που περιέχουν δυόσμο/μέντα	250
	Μικροπροϊόντα ζαχαρωδών δροσερής αναπνοής	2 000
	Τσίχλα	350
	μη Αλκοολούχα ποτά που περιέχουν δυόσμο/μέντα	20
	Αλκοολούχα ποτά που περιέχουν δυόσμο/μέντα	100
Κασσίνη	Μη αλκοολούχα ποτά	0,5
	Αρτοσκευάσματα	1
	Αλκοολούχα ποτά	1,5
1-αλλυλο-3,4-μεθυλοδιοξυβενζόλιο, σαφρόλη (*)	Παρασκευάσματα κρέατος και προϊόντα με βάση το κρέας, συμπεριλαμβανομένων πουλερικών και θηραμάτων	15
	Παρασκευάσματα ιχθύων και προϊόντα ιχθύων	15
	Σούπες και σάλτσες	25
	Μη αλκοολούχα ποτά	1
Τευκρίνη Α	Πικρά αλκοολούχα ποτά ή bitter (1)	5
	Λικέρ (ηδύποτα) (2) με πικρή γεύση	5
	Άλλα αλκοολούχα ποτά	2
Θουιόνη (α και β)	Αλκοολούχα ποτά, πλην αυτών που παράγονται από είδη Artemisia	10
	Αλκοολούχα ποτά που παράγονται από είδη Artemisia	35
	Μη αλκοολούχα ποτά που παράγονται από είδη Artemisia	0,5
Κουμαρίνη	Παραδοσιακά ή/και εποχιακά αρτοσκευάσματα που αναγράφουν κανέλα στην επισήμανση	50
	«Δημητριακά προγεύματος» συμπεριλαμβανομένου του λεγόμενου muesli	20
	Εκλεκτά αρτοσκευάσματα εκτός των παραδοσιακών ή/και εποχιακών αρτοσκευασμάτων που αναγράφουν κανέλα στην επισήμανση	15
	Επιδόρπια	5

(*) Οι ανώτατες τιμές δεν ισχύουν όταν σύνθετο τρόφιμο δεν περιέχει πρόσθετες αρωματικές ύλες και τα μόνα συστατικά τροφίμων με αρωματικές ιδιότητες που έχουν προστεθεί είναι φρέσκα, αποξηραμένα ή κατεψυγμένα βότανα και μπαχαρικά. Μετά από διαβουλεύσεις με τα κράτη μέλη και την Αρχή, βάσει δεδομένων που διαθέτουν τα κράτη μέλη, σχετικά με τις πλέον πρόσφατες επιστημονικές πληροφορίες και λαμβάνοντας υπόψη τη χρήση βοτάνων και μπαχαρικών και φυσικών αρωματικών παρασκευασμάτων, η Επιτροπή, εάν το κρίνει σκόπιμο, προτείνει τροπολογίες στην παρέκκλιση αυτή.

(1) Σύμφωνα με τον ορισμό του παραρτήματος II, σημείο 30 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 110/2008.

(2) Σύμφωνα με τον ορισμό του παραρτήματος II, σημείο 32 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 110/2008.

Βιβλιογραφία

1. A. Chaintreau, Simultaneous Distillation-Extraction: from birth to maturity, Flavour and Fragrance Journal, 136-148, 1099-1026, 2001
2. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings Processing Aids and Materials in contact with Foods on a request from the Commission on Pulegone and Menthofuran in flavourings and other food ingredients with flavouring properties, The EFSA Journal, 298, 1-32, 2005
3. J. S. Turner, D. E. G. Shuker, Review of Methods of Analysis for Biologically Active Principles, 1-94, Department of Chemistry The Open University
4. M. Scotter, G. Rees, Development of methods to quantitatively extract biologically active principles from complex foods, flavourings and herbs and spices, to allow their subsequent analysis, DEFRA Food and Environment Research Agency, 1-74, 2010
5. https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono108-05.pdf
6. Opinion of the Scientific Committee on Food on the safety of the presence of safrole (1-allyl-3,4-methylene dioxy benzene) in flavourings and other food ingredients with flavouring properties, Scientific Committee on Food, 2001
7. Opinion of the Scientific Committee on Food on pulegone and menthofuran, Scientific Committee on Food, 2002
8. Opinion of the Scientific Committee on Food on thujone, Scientific Committee on Food, 2002
9. Guideline on the assessment of genotoxicity of herbal substances/preparations, Committee on Herbal Medicinal Products (CHMP),European Medicines Agency (EMA), 2008
10. Public statement on the use of herbal medicinal products containing thujone, Committee on Herbal Medicinal Products (CHMP), European Medicines Agency (EMA), 2011
11. Public statement on the use of herbal medicinal products containing pulegone and menthofuran, Committee on Herbal Medicinal Products (CHMP), European Medicines Agency (EMA), 2016
12. M. A. Grayson, A History of Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS), ELSEVIER, 152-158, 2015
13. S. Z. Hussain, K. Maqbool, GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science, 1-11, 2250-1770, 2014
14. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Thujone
15. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6553876
16. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/___-Pulegone
17. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/safrole
18. J. Sneddon , S. Masuram, J. C. Richert, Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Basic Principles, Instrumentation and Selected Applications for Detection of Organic Compounds, Analytical Letters, 1003-1012, 0003-2719, 2007
19. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1334/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 16ης Δεκεμβρίου 2008 για αρωματικές ύλες και ορισμένα συστατικά τροφίμων με αρωματικές ιδιότητες που χρησιμοποιούνται εντός και επί των τροφίμων

20. http://www.drugfuture.com/chemdata/m-cresyl-acetate.html
21. S. Zhou, H.-L. Koh, Y. Gao, Z.-y. Gong, E. J. D. Lee, Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly, Life Sciences, 74, 935-968, 2004
22. D. H. Phillips, J. A. Miller, E. C. Miller, B. Adams, Structures of the DNA Adducts Formed in Mouse Liver after Administration of the Proximate
23. M. Murray, Mechanisms of Inhibitory and Regulatory Effects of Methylenedioxyphenyl Compounds on Cytochrome P450-Dependent Drug Oxidation, Current Drug Metabolism, 1, 67-84, 2000
24. I. M. C. M. Rietjens, M. J. Martena, M. G. Boersma, W. Spiegenlenburg, G. M. Alink, Molecular Mechanism of Toxicity of Important Food-borne Phytotoxins, Molecular Nutrition
25. N. S. Sirisoma, K. M. Hold, J. E. Casida, alpha and beta thujones (herbal medicines and food additives): Synthesis and analysis of hydroxy and dehydro metabolites, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1915-1921, 2001
26. M. Scotter, Simultaneous Distillation-Extraction GC-MS Method for the Determination of Biologically Active Principles in Foods and Beverages, FERA UK, 2011
27. Determination of Flavourings in Foodstuffs using GC-MS, Danish Veterinary and Food Administration, 2008
28. P. Lopez, M. Van Sisseren, S. De Marco, A. Jekel, M. De Nijs, H. G. J. Mol, A straightforward method to determine flavouring substances in food by GC-MS, Food Chemistry, 174, 407-416, 2015
29. F. Siano , C. Ghizzoni, F. Gionfriddo , E. Colombo, L. Servillo , D. Castaldo, Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products, Food Chemistry 81, 469–475, 2003
30. S. G. Walch, T. Kuballa, W. Stühlinger, D. W Lachenmeier, Determination of the biologically active flavour substances thujone and camphor in foods and medicines containing sage (Salvia officinalis L.), Chemistry Central Journal, 5:44, 2011
31. A. Raffo, A. D'Aloise, A. L. Magrì, C. Leclercq, Quantitation of tr-cinnamaldehyde, safrole and myristicin in cola-flavoured soft drinks to improve the assessment of their dietary exposure, Food and Chemical Toxicology 59, 626–635, 2013
32. M. Ávila, M. Zougagh, A. Escarpa, Á. Ríos, Determination of alkenylbenzenes and related flavour compounds in food samples by on-column preconcentration-capillary liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1216, 7179–7185, 2009
33. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/67406
34. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tert-Butyl_methyl_ether
35. Toxicology and carcinogenesis studies of a,β thujone in F344/N rats and B6C3F1 mice, National Toxicology Program, NIH Publication, 570, 1-265, 2011
36. Toxicology and carcinogenesis studies of pulegone in F344/N rats and B6C3F1 mice, National Toxicology Program, , NIH Publication, 563, 1-201, 2011
37. S. D. Vesselinovitch, K. V. N. Rao, N. Mihailovich, Transplacental and Lactational Carcinogenesis by Safrole, CANCER RESEARCH ,39, 4378-4380, 1979